

جامعة الملك فيصل

المحررين
مات دكنسن
وجينيفر هودجيت

الفيتوبلازما؛ طرق وأساليب

Phytoplasma Methods and Protocols

ترجمة
أ.د/ خالد بن عبدالله الهديب

قسم زراعة الأراضي القاحلة - كلية العلوم الزراعية والأغذية
جامعة الملك فيصل

١٤٤٤هـ / ٢٠٢٣م

**الفيتوبلازما؛
طرق وأساليب
Phytoplasma
Methods and Protocols**

المحررين
مات دكنسن
وجينيفر هودجيت

ترجمة
أ.د/ خالد بن عبدالله الهديب
قسم زراعة الأراضي القاحلة - كلية العلوم الزراعية والأغذية
جامعة الملك فيصل

١٤٤٤هـ / ٢٠٢٣م

ح) جامعة الملك فيصل، ١٤٤٤هـ
فهرسة مكتبة الملك فهد أثناء النشر

دكنسن، مات

الفيتوبلازما؛ طرق وأساليب، مات دكنسن؛

خالد عبدالله الهديب - الأحساء، ١٤٤٤هـ

٤٦٩ ص ، ٢١ × ٢٨ سم

ردمك: ٩٧٨-٦٠٣-٩١٩٥٢-١-٤

١- النبات - مرض أ. الهديب، خالد عبدالله (مترجم) ب. العنوان

١٤٤٤/٩٢١٢

ديوي ٥٨٩,٢

رقم الإيداع: ١٤٤٤/٦٢١٢

ردمك: ٩٧٨-٦٠٣-٩١٩٥٢-١-٤

حقوق الترجمة والطبع والنشر محفوظة

لدى مركز الترجمة والتأليف والنشر - جامعة الملك فيصل

METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY™

Series Editor
John M. Walker
School of Life Sciences
University of Hertfordshire
Hatfield, Hertfordshire, AL10 9AB, UK

For further volumes:
<http://www.springer.com/series/7651>

Phytoplasma

Methods and Protocols

Edited by

Matt Dickinson

School of Biosciences, University of Nottingham, Sutton Bonington,
Nottingham, UK

Jennifer Hodgetts

The Food and Environment Research Agency, Sand Hutton, York, UK

Editors

Matt Dickinson
School of Biosciences
University of Nottingham
Sutton Bonington
Nottingham, UK

Jennifer Hodgetts
The Food and Environment Research Agency Sand
Hutton, York, UK

ISSN 1064-3745

ISSN 1940-6029 (electronic)

ISBN 978-1-62703-088-5

ISBN 978-1-62703-089-2 (eBook)

DOI 10.1007/978-1-62703-089-2

Springer New York Heidelberg Dordrecht London

Library of Congress Control Number: 2012945976

© Springer Science+Business Media, LLC 2013

This work is subject to copyright. All rights are reserved by the Publisher, whether the whole or part of the material is concerned, specifically the rights of translation, reprinting, reuse of illustrations, recitation, broadcasting, reproduction on microfilms or in any other physical way, and transmission or information storage and retrieval, electronic adaptation, computer software, or by similar or dissimilar methodology now known or hereafter developed. Exempted from this legal reservation are brief excerpts in connection with reviews or scholarly analysis or material supplied specifically for the purpose of being entered and executed on a computer system, for exclusive use by the purchaser of the work. Duplication of this publication or parts thereof is permitted only under the provisions of the Copyright Law of the Publisher's location, in its current version, and permission for use must always be obtained from Springer. Permissions for use may be obtained through RightsLink at the Copyright Clearance Center. Violations are liable to prosecution under the respective Copyright Law.

The use of general descriptive names, registered names, trademarks, service marks, etc. in this publication does not imply, even in the absence of a specific statement, that such names are exempt from the relevant protective laws and regulations and therefore free for general use.

While the advice and information in this book are believed to be true and accurate at the date of publication, neither the authors nor the editors nor the publisher can accept any legal responsibility for any errors or omissions that may be made. The publisher makes no warranty, express or implied, with respect to the material contained herein.

Printed on acid-free paper

Humana Press is a brand of Springer

Springer is part of Springer Science+Business Media (www.springer.com)

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

الفيتوبلازما: هي مجموعة من البكتيريا التي تفتقر إلى جدار الخلية، والتي لا يمكن -حتى الآن- أن تزرع في بيئة خاصة. وهي قادرة على أن تسبب أمراضا خطيرة في مجموعة واسعة من أنواع النباتات، وتنتقل بين النباتات عن طريق الحشرات الناقلة -بشكل رئيس، نطاطات الأوراق- التي يمكن أن تتكاثر فيها البكتيريا أيضا. والهدف من هذا الكتاب، هو تقديم مجموعة من طرق العمل المهمة التي يمكن أن تشكل الأساس لأي شخص يرغب في تطوير برنامج بحثي عن الفيتوبلازما، أو يعتزم إنشاء معملٍ لكشف هذه المسببات المرضية، وتشخيصها في النباتات أو الحشرات الناقلة لها.

وبعد فصل المقدمة الذي يتناول أهمية أمراض الفيتوبلازما، يتم تقديم عددٍ من طرق العمل للحفاظ على مجموعات النباتات والحشرات، ونقل الفيتوبلازما بين أنواع النباتات عن طريق الحشرات أو التطعيم أو بالحامول. ويتبع ذلك، طرقٌ للكشف والتشخيص؛ والتي تتراوح ما بين الأساليب القائمة على الفحص المجهرى للـ PCR وPCR الكمي اللحظي، وطرق الكشف القائمة على الحقل. ويتم -أيضا- تضمين التقنيات الخاصة بفصل الفيتوبلازما وتصنيفها إلى مجموعات التصنيفية المختلفة ومجموعاتها الفرعية، فضلاً عن الأساليب التي تم تطويرها لتحليلات البروتينات. وتغطي الفصول الأخيرة، طرق فصل جينوم الفيتوبلازما والبلازميد الحمض النووي عن الحمض النووي النباتي من تسلسل الجينوم الكامل، إلى جانب طرق رسم خرائط جينوم الفيتوبلازما. والقراء المستهدفون -في المقام الأول- الباحثون في أمراض النبات والبيولوجيا الجزيئية، بما في ذلك الباحثون في البلدان النامية؛ حيث تكون الفيتوبلازما -غالباً- مشكلةً خطيرةً ومدمرةً لنباتات المحاصيل لديهم.

مات دكنسن
وجينيفر هودجيت

الحمد لله رب العالمين، والصلاة والسلام على أشرف الأنبياء والمرسلين، سيدنا محمد، وعلى آله وصحبه أجمعين ... وبعد،

فقد تم الانتهاء من ترجمة هذا الكتاب بحمد الله وتوفيقه. وقد كانت فكرة ترجمة هذا الكتاب تراودني منذ إصداره، حيث إن هذا العلم يعتبر حديثا جدا في مجال أمراض النبات؛ مقارنة بكثير من العلوم الزراعية في مجال وقاية النبات. وهو يعتبر من أكثر الكتب شمولية وتفصيلاً في أمراض النبات الفيتوبلازمية. كما أنه يعتبر الكتاب الأول من نوعه من حيث التأليف؛ فهو ليس جهداً فردياً، وإنما هو نتاج جهد لعدد كبير من العلماء الذين عملوا في أمراض النبات، وخصوصاً أمراض الفيتوبلازما، ووضعوا جل خبراتهم بين دفتي هذا الكتاب؛ حتى يستفيد منه كل مهتم بهذا المجال.

ويحتوي الكتاب على عدة فصول؛ تتكلم عن: أهمية أمراض النباتات الفيتوبلازمية، ونبذه تاريخية عن الفيتوبلازما. ويتميز الكتاب في جميع فصوله بوجود التطبيقات العملية العلمية. كما يحتوي على طرق الحفاظ على النباتات المصابة، والحشرات الناقلة للمرض، وكيفية انتقال الفيتوبلازما فيما بين النباتات عن طريق التطعيم أو بواسطة الحشرات. ويلى ذلك، الطرق العملية في التشخيص والكشف؛ والتي تختلف أساليبها ما بين الكشف في الحقل إلى الفحص المجهرى ثم إلى PCR.

كما يتضمن الكتاب -أيضاً- عدة فصول في التقنيات العلمية المستخدمة في فصل الفيتوبلازما وتصنيفها إلى مجموعاتها المختلفة ومجموعاتها الفرعية. أما الفصول الأخيرة منه، فهي تتضمن الطرق العملية في فصل جينوم الفيتوبلازما والبلازميد الحمض النووي عن الحمض النووي النباتي، وكذلك التعرف على خارطة الجينوم الكاملة للفيتوبلازما.

وكما يعلم الكتاب القارئ أن الترجمة من لغة إلى لغة تتطلب جهداً كبيراً وحرصاً على ألا يختل المعنى والهدف من الكتاب، ولقد اجتهدت كثيراً في اختيار المصطلحات العلمية المستعملة والمفهومة في هذا المجال. فالوطن العربي بحاجة ماسة لهذا العلم خصوصاً أن الكثير من الدول يتواجد لديها هذا المرض على العديد من المحاصيل الزراعية.

ولا يسعني -في النهاية- إلا أن أتقدم بالشكر إلى منسوبي مركز الترجمة والتأليف والنشر، وأخص مديره سعادة الدكتور / منير بن حزام القحطاني، والمدقق اللغوي بالمركز الدكتور / أشرف محروس زاهر، والأخ الفاضل / أحمد حسين علي الحمود الذي بذل جهدا كبيرا في تصحيح الأشكال وإخراج الكتاب بصورته التي عليها الآن. ولا أنسى أن أشكر قسم زراعة الأراضي القاحلة (برنامج وقاية النبات)؛ على دعمهم لي في الموافقة على ترجمة هذا الكتاب. وأخيرا، جزيل الشكر لجامعة الملك فيصل - بالمملكة العربية السعودية، ممثلة في مركز الترجمة والتأليف والنشر لدعمها طباعة الكتاب ونشره.

الترجم

أ.د. خالد الهديب

الصفحة

ز	مقدمة المؤلفين
ط	مقدمة المترجم
س	المشاركون
١	الفصل الأول: الفيتوبلازما: مقدمة <i>Matt Dickinson, Melanie Tuffen, and Jennifer Hodgetts</i>
١٧	الفصل الثاني: تقنيات الحفاظ على الفيتوبلازما وتكاثرها داخل البيت المحمي على نبات <i>Catharanthus roseus</i> <i>Jennifer Hodgetts, David Crossley, and Matt Dickinson</i>
٣٧	الفصل الثالث: التكاثر والحفاظ على الفيتوبلازما عن طريق عملية زراعة الأنسجة <i>Assunta Bertaccini, Samanta Paltrinieri, Marta Martini, Mara Tedeschi, and Nicoletta Contaldo</i>
٤٥	الفصل الرابع: نقل نبات الحامول للفيتوبلازما <i>Jaroslava Přibyllová and Josef Špak</i>
٥٣	الفصل الخامس: الحفاظ على الحشرات وانتقالها <i>Heather Kingdom</i>
٦٩	الفصل السادس: صيد الحشرات الناقلة للفيتوبلازما <i>Phyllis Weintraub and Jürgen Gross</i>
٨٣	الفصل السابع: تجارب انتقال الحشرات الناقلة <i>Domenic Bosco and Rosemarie Tedeschi</i>
٩٧	الفصل الثامن: التعريف الجزيئي لأنواع الحشرات الناقلة للفيتوبلازما <i>Sabrina Bertin and Domenico Bosco</i>
١٢٣	الفصل التاسع: صبغة دينيس واستخدام الميكروسكوب الضوئي لمشاهدة الفيتوبلازما <i>Rita Musetti</i>
١٢٩	الفصل العاشر: تقنيات الميكروسكوب الفلورسنتي وصبغة DAPI للكشف عن الفيتوبلازما <i>Nancy M. Andrade and Nolberto L. Arismendi</i>

- ١٣٧..... الفصل الحادي عشر: فحص الفيتوبلازما باستخدام الميكروسكوب الإلكتروني
B. Jean Devonshire
- ١٥٥..... الفصل الثاني عشر: استخلاص الـ DNA لعدد كبير من العينات النباتية آلياً
Nataša Mehle, Petra Nikolic', Matevž Rupal, Jana Boben, Maja Ravnika, and Marina Dermastia
- الفصل الثالث عشر: استخلاص الـ DNA من الأنواع النباتية أحادية الفلقة، ومعالجة التحديات مع
العوائل النباتية الأخرى
Nigel A. Harrison, Robert E. Davis, and Ericka E. Helmick
- ١٧٧..... الفصل الرابع عشر: تفاعل الـ PCR المزدوج، وتحليل الـ RFLP وفقاً لجين الـ 16S rRNA
Bojan Duduk, Samanta Paltrinieri, Ing-Ming Lee, and Assunta Bertaccini
- ١٩٣..... الفصل الخامس عشر: تحليلات الـ PCR والـ RFLP وفقاً للبروتين الريبوسومي
Marta Martini and Ing-Ming Lee
- ٢١١..... الفصل السادس عشر: تضخيم الـ *Tuf* و *secY* بالـ PCR بتحديد النمط الجيني للفيتوبلازما
Xavier Foissac, Jean-Luc Danet, Sylvie Malembic-Maher, Pascal Salar, Dana Šafářová, Pavla Válová, and Milan Navrátil
- ٢٢٩..... الفصل السابع عشر: تحليل ناتج الـ PCR الخاص للفيتوبلازما للجين *secA*
Matt Dickinson and Jennifer Hodgetts
- الفصل الثامن عشر: تحليل التعدد الشكلي للشريط الواحد للتمييز بين سلالات
الفيتوبلازما
Martina Šeruga Music' and Dijana Škoric'
- ٢٤٩..... الفصل التاسع عشر: المصفوفة الصغرى (Microarray) لكشف الفيتوبلازما وتعريفها
Mogens Nicolaisen, Henriette Nyskjold, and Assunta Bertaccini
- ٢٦١..... الفصل العشرون: T-RFLP للكشف عن الفيتوبلازما وتعريفها في النباتات
Jennifer Hodgetts and Matt Dickinson
- الفصل الواحد والعشرون: استخدام تقنية الـ PCR الكمي اللحظي للكشف عن الفيتوبلازما
وتحديد كميتها
Nynne Meyn Christensen, Henriette Nyskjold, and Mogens Nicolaisen
- ٢٧٥..... الفصل الثاني والعشرون: نظام كشف الـ PCR الكمي اللحظي لفيتوبلازما Bois Noir و
Flavescence Doree وتحديد كمية الـ DNA المستهدف
Nataša Mehle, Nina Prezelj, Matjaž Hren, Jana Boben, Kristina Gruden, Maja Ravnika, and Marina Dermastia

٣٠٣.....	الفصل الثالث والعشرون: استخدام الـ PCR الكمي اللحظي للكشف عن ثلاث من الفيتوبلازما من مجموعة التفاح المنتشرة Apple Proliferation <i>Nataša Mehle, Petra Nikolic', Kristina Gruden, Maja Ravnikar, and Marina Dermastia</i>
٣١٧.....	الفصل الرابع والعشرون: تفاعل الـ PCR للنسخ العكسي للكشف عن الفيتوبلازما باستخدام مستخلصات العصير الخام <i>Paolo Margaria and Sabrina Palmano</i>
٣٢٥.....	الفصل الخامس والعشرون: التشخيص الحقلّي باستخدام التضخيم المتساوي الحرارة الحلقّي <i>Jenny Tomlinson</i>
٣٣٧.....	الفصل السادس والعشرون: ترميز الـ DNA لتحديد الفيتوبلازما <i>Olga Makarova, Nicoletta Contaldo, Samanta Paltrinieri, Assunta Bertaccini, Henriette Nyskjold, and Mogens Nicolaisen</i>
٣٥٥.....	الفصل السابع والعشرون: تحاليل أطوار نشوء الفيتوبلازما وفقاً لمقارنة الجينوم الكامل <i>Hiromi Nishida</i>
٣٦٥.....	الفصل الثامن والعشرون: المُصنّف الفيزيائي iPhyClassifier، أداة تفاعلية على الإنترنت لتصنيف الفيتوبلازما وتحديدّها <i>Yan Zhao, Wei Wei, Ing-Ming Lee, Jonathan Shao, Xiaobing Suo, and Robert E. Davis</i>
٣٧٧.....	الفصل التاسع والعشرون: التحليل البروتيني (Proteomic) للفيتوبلازما <i>Xianling Ji and Yingping Gai</i>
٣٩١.....	الفصل الثلاثون: تحضير البروتينات المُجمعة لغشاء الفيتوبلازما <i>Luciana Galetto, Majid Siampour, and Cristina Marzachi</i>
٤١٥.....	الفصل الواحد والثلاثون: استخلاص بلازميد الحمض النووي Plasmid DNA للفيتوبلازما <i>Mark T. Andersen and Lia W. Liefting</i>
٤٢٥.....	الفصل الثاني والثلاثون: تدرجات بسينزيميد كلوريد السيزيوم لفصل الـ DNA للنباتات والفيتوبلازما <i>Lucy T. T. Tran-Nguyen and Bernd Schneider</i>
٤٣٩.....	الفصل الثالث والثلاثون: طريقة Pulsed-Field Gel Electrophoresis لعزل كروموسومات الفيتوبلازما بأكملها من النباتات <i>Carmine Marcone</i>
٤٥١.....	الفصل الرابع والثلاثون: رسم خريطة الكروموسومات للفيتوبلازما <i>Sylvie Malembic-Maher and Patricia Carle</i>
٤٦٥.....	كشاف الموضوعات

- MARK T. ANDERSEN • *Plant & Food Research, Auckland, New Zealand*
- NANCY M. ANDRADE • *Institute of Production and Plant Protection, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile*
- NOLBERTO L. ARISMENDI • *Institute of Production and Plant Protection, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile*
- ASSUNTA BERTACCINI • *Alma Mater Studiorum—University of Bologna, DiSTA, Plant Pathology, Bologna, Italy*
- SABRINA BERTIN • *DIVAPRA—Entomologia e Zoologia applicate all’Ambiente “Carlo Vidano”, Università degli Studi di Torino, Grugliasco, Italy*
- JANA BOBEN • *National Institute of Biology, Ljubljana, Slovenia*
- DOMENICO BOSCO • *DIVAPRA—Entomologia e Zoologia applicate all’Ambiente “Carlo Vidano”, Università degli Studi di Torino, Grugliasco, Italy*
- PATRICIA CARLE • *INRA, University of Bordeaux, UMR1332 Fruit Biology and Pathology, Villenave d’Ornon, France*
- NYNNE MEYN CHRISTENSEN • *Center for Advanced Bioimaging (CAB), University of Copenhagen, Copenhagen, Denmark*
- NICOLETTA CONTALDO • *Alma Mater Studiorum—University of Bologna, DiSTA, Plant Pathology, Bologna, Italy*
- DAVID CROSSLEY • *The Food and Environment Research Agency, Sand Hutton, York, UK*
- JEAN-LUC DANET • *INRA, University of Bordeaux, UMR1332 Fruit Biology and Pathology, Villenave d’Ornon, France*
- ROBERT E. DAVIS • *USDA, Beltsville, MD, USA*
- MARINA DERMASTIA • *National Institute of Biology, Ljubljana, Slovenia*
- B. JEAN DEVONSHIRE • *Bioimaging, Plant Pathogens and Microbiology, Rothamsted Research, Harpenden Herts, UK*
- MATT DICKINSON • *School of Biosciences, University of Nottingham, Sutton Bonington, Nottingham, UK*
- BOJAN DUDUK • *Institute of Pesticides and Environmental Protection, Laboratory of Applied Phytopathology, Belgrade, Serbia*
- XAVIER FOISSAC • *INRA, University of Bordeaux, UMR1332 Fruit Biology and Pathology, Villenave d’Ornon, France*
- YINGPING GAI • *State Key Laboratory of Crop Biology, Shandong Agricultural University, Tai’an, Shandong, People’s Republic of China*
- LUCIANA GALETTO • *Istituto di Virologia Vegetale, CNR, Torino, Italy*

- JÜRGEN GROSS • *Federal Research Centre for Cultivated Plants, Institute for Plant Protection in Fruit Crops and Viticulture, Dossenheim, Germany*
- KRISTINA GRUDEN • *National Institute of Biology, Ljubljana, Slovenia*
- NIGEL A. HARRISON • *Plant Pathology Department, Research & Education Center, University of Florida, Fort Lauderdale, FL, USA*
- ERICKA E. HELMICK • *Plant Pathology Department, Research & Education Center, University of Florida, Fort Lauderdale, FL, USA*
- JENNIFER HODGETTS • *The Food and Environment Research Agency, Sand Hutton, York, UK*
 UK MATJAŽ HREN • *National Institute of Biology, Ljubljana, Slovenia*
- XIANLING JI • *College of Forestry, Shandong Agricultural University, Tai'an, Shandong, People's Republic of China*
- HEATHER KINGDOM • *John Innes Centre, Norwich Research Park, Norwich, UK*
- ING-MING LEE • *Molecular Plant Pathology Laboratory, USDA-ARS, Beltsville, MD, USA*
- LIA W. LIEFTING • *Plant Health and Environment Laboratory, Ministry for Primary Industries, Auckland, New Zealand*
- OLGA MAKAROVA • *Department of Agroecology, Aarhus University, Slagelse, Denmark*
- SYLVIE MALEMBIC-MAHER • *INRA, University of Bordeaux, UMR1332 Fruit Biology and Pathology, Villenave d'Ornon, France*
- CARMINE MARCONE • *Department of Pharmaceutical and Biomedical Sciences, University of Salerno, Salerno, Italy*
- PAOLO MARGARIA • *Istituto di Virologia Vegetale, CNR, Torino, Italy*
- MARTA MARTINI • *Department of Agriculture and Environmental Sciences, University of Udine, Udine, Italy*
- CRISTINA MARZACHÌ • *Istituto di Virologia Vegetale, CNR, Torino, Italy*
 NATAŠA MEHLE • *National Institute of Biology, Ljubljana, Slovenia*
- RITA MUSETTI • *Department of Agricultural and Environmental Sciences, University of Udine, Udine, Italy*
- MILAN NAVRÁTIL • *Department of Cell Biology and Genetics, Palacký University, Olomouc, Czech Republic*
- MOGENS NICOLAISEN • *Department of Agroecology, Aarhus University, Slagelse, Denmark*
- PETRA NIKOLIC • *National Institute of Biology, Ljubljana, Slovenia*
- HIROMI NISHIDA • *Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo, Tokyo, Japan*
- HENRIETTE NYSKJOLD • *Department of Agroecology, Aarhus University, Slagelse, Denmark*
- SABRINA PALMANO • *Istituto di Virologia Vegetale, CNR, Torino, Italy*
- SAMANTA PALTRINIERI • *Alma Mater Studiorum—University of Bologna, DiSTA, Plant Pathology, Bologna, Italy*
- NINA PREZELJ • *National Institute of Biology, Ljubljana, Slovenia*

- JAROSLAVA PŘIBYLOVÁ • *Institute of Plant Molecular Biology, Biology Centre of the Academy of Sciences of the Czech Republic, České Budějovice, Czech Republic*
- MAJA RAVNIKAR • *National Institute of Biology, Ljubljana, Slovenia*
- MATEVŽ RUPAR • *National Institute of Biology, Ljubljana, Slovenia*
- DANA ŠAFÁŘOVÁ • *Department of Cell Biology and Genetics, Palacký University, Olomouc, Czech Republic*
- PASCAL SALAR • *INRA, University of Bordeaux, UMR1332 Fruit Biology and Pathology, Villenave d'Ornon, France*
- BERND SCHNEIDER • *Julius Kühn-Institute (JKI), Federal Research Centre for Cultivated Plants, Institute for Plant Protection in Fruit Crops and Viticulture, Dossenheim, Germany*
- MARTINA ŠERUGA MUSIĆ • *Department of Microbiology, Division of Biology, University of Zagreb, Zagreb, Croatia*
- JONATHAN SHAO • *Molecular Plant Pathology Laboratory, USDA-Agricultural Research Service, Beltsville, MD, USA*
- MAJID SIAMPOUR • *Plant Virology Research Center, College of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran*
- DIJANA ŠKORIĆ • *Department of Microbiology, Division of Biology, University of Zagreb, Zagreb, Croatia*
- JOSEF ŠPAK • *Institute of Plant Molecular Biology, Biology Centre of the Academy of Sciences of the Czech Republic, České Budějovice, Czech Republic*
- XIAOBING SUO • *Molecular Plant Pathology Laboratory, USDA-Agricultural Research Service, Beltsville, MD, USA*
- MARA TEDESCHI • *Alma Mater Studiorum—University of Bologna, DiSTA, Plant Pathology, Bologna, Italy*
- ROSEMARIE TEDESCHI • *DIVAPRA—Entomologia e Zoologia applicate all'Ambiente "Carlo Vidano", Università degli Studi di Torino, Grugliasco, Italy*
- JENNY TOMLINSON • *The Food and Environment Research Agency, Sand Hutton, York, UK*
- LUCY T. T. TRAN-NGUYEN • *Department of Resources, Plant Industries, Darwin, NT, Australia*
- MELANIE TUFFEN • *School of Biosciences, University of Nottingham, Sutton Bonington, Nottingham, UK*
- PAVLA VÁLOVÁ • *Department of Cell Biology and Genetics, Palacký University, Olomouc, Czech Republic*
- WEI WEI • *Institute for Bioscience and Biotechnology Research, University of Maryland, College Park, MD, USA*
- PHYLLIS WEINTRAUB • *Gilat Research Center, D.N. Negev, Israel*
- YAN ZHAO • *Molecular Plant Pathology Laboratory, USDA-Agricultural Research Service, Beltsville, MD, USA*

الفيتوبلازما: مقدمة

Matt Dickinson, Melanie Tuffen, and Jennifer Hodgetts

الملخص:

يحتوي هذا الكتاب على "طرق في البيولوجيا الجزيئية" بعنوان: "الفيتوبلازما؛ طرق العمل والبروتوكولات"؛ والذي يهدف إلى توفير مجموعة كبيرة من البروتوكولات للعمل مع هذه المجموعة من مسببات الأمراض النباتية. وسوف نقوم في هذا الفصل، بعرض المعلومات الأساسية حول الفيتوبلازما لوضع البروتوكولات الخاصة بها.

الكلمات المفتاحية: الكشف، التشخيص، الشكل الظاهري، القدرة الإراضية، الفيتوبلازما، التصنيف، النقل.

١- المقدمة:

تعد الفيتوبلازما من مسببات الأمراض النباتية البكتيرية التي تصيب اللحاء، والتي تم تعريفها لأول مرة- في عام ١٩٦٧، وذلك عن طريق مقاطع رقيقة جدا ultrathin sections من لحاء النباتات المصابة بمرض الاصفرار، والذي كان يعتقد -سابقا- أن المسبب له مسبب فيروسي. ولأن شكلها الخارجي كان مشابها لمجموعة الميكوبلازما المسببة للأمراض الحيوانية -وهي عبارة عن بكتيريا تفتقر إلى الجدار الخلوي-، سميت بالكائنات الحية الشبيهة بالميكوبلازما أو MLOs (١). وبعد ذلك، تم اكتشاف عديد من الأمراض النباتية الأخرى المرتبطة بها. وفي أوائل التسعينيات، أظهرت التحليلات الوراثية لتسلسل الحمض النووي (DNA) لشجرة القرابة الوراثية أنها مجموعة كبيرة، وأنها أحادية الخلية من مجموعة mollicutes. وعليه، اقترح مصطلح "الفيتوبلازما" لوصف مسببات تلك الأمراض النباتية. وتشمل هذه المجموعة أحادية الخلية - أيضا - ميكوبلازما (mycoplasmas)، أكوليبلازما (acholepasma)، وسبيروبلازما (spiroplasmas). وهم الأكثر ارتباطا بالبكتيريا، مثل Bacillus، Clostridium، Streptococcus.

وتتملك الفيتوبلازما جينوماً صغيراً يتراوح ما بين ٥٣٠ إلى ١٣٥٠ كيلوبايت (يعتبر من أصغر الجينومات المعروفة لأي من الكائنات الحية التي تتكاثر ذاتياً). كذلك، الحمض النووي (DNA) لها يحتوى على الأحماض الأمينية من السيتوزين والجوانين G+C بنسبة منخفضة (٢٣,٠-٢٩,٥٪).

مول)، والآن تم تخصيص جنس جديد باسم 'Candidatus Phytoplasma' (٢، ٣). وهذه الفئة من Candidatus تستخدم من قبل خبراء التصنيف لتصنيف الكائنات الحية مثل الفيتوبلازما؛ والتي لا يمكن استزراعها مخبرياً (في المعمل). وقد حدد أكثر من ٢٠ نوعاً من Candidatus داخل الجنس، وذلك استناداً - في المقام الأول - على أنواع العزلات داخل الجنس؛ والتي تتشابه - على الأقل - بنسبة ٩٧,٥ ٪ من التسلسل الجيني للحمض النووي الريبوسومي 16S rRNA. وبالإضافة إلى أنواع الأجناس Candidatus، هناك عدد من المقترحات "للأجناس" التي لم تتم الموافقة عليها رسمياً، وتعمل بالتوازي مع نظام تصنيف أجناس Candidatus؛ حيث إن نظام تصنيف المجموعات القائم على أساس 16Sr هو الأكثر استخداماً. ويستند هذا النظام على إنزيمات الهضم المقيدة في نطاق محدد للحمض النووي الريبوسومي 16S rDNA (انظر: الفصل ١٤). والإجراء الأساسي عند استخدام ذلك النظام من أنظمة التصنيف، أن البادئات العامة universal primers تستخدم لتضخيم amplify هذه المنطقة المحددة من الحمض النووي الريبوسومي 16S rDNA من عينات الحمض النووي للحشرات أو النباتات المصابة، ثم يلي ذلك هضم ناتج سلسلة تفاعل البلمرة (PCR) مع إنزيمات القطع restriction enzymes المحددة. ويتم تحليل النتائج - عادة - باستخدام عملية الترحيل الكهربائي لمادة عديد الأكريلاميد (polyacrylamide gel electrophoresis) لإعطاء أفضل النتائج لعملية الهضم. وينتج من عملية الهضم أنماط محددة يتم مقارنتها واستخدامها في تصنيف الفيتوبلازما إلى مجموعات 16Sr ومجموعات فرعية (٤).

وعلى الرغم من أنه لا يمكن تنمية الفيتوبلازما والحفاظ عليها في بيئة خاصة، فقد أمكن الحفاظ على سلالات مرجعية لبعض الفيتوبلازما في النباتات العائلة، مثل نبات "Catharanthus roseus"؛ إما في النباتات النامية في الصوبات الزجاجية، أو في النباتات الناتجة من زراعة الأنسجة (انظر: الفصل الثاني والثالث والرابع). وتتواجد مجموعات من هذه الفيتوبلازما في عدد من المعاهد العلمية حول العالم. ومع ذلك، فهناك عديد من "عزلات" الفيتوبلازما التي لم تحفظ maintained؛ والتي لا يوجد لها سوى وصف أعراض الإصابة وتسلسلها الجيني في بنك الجينات (GenBank). وهذا يجعل من الصعب إجراء تحليل (RFLP) التقليدي، ومقارنة الأنماط المحددة عن طريق تقنية الفصل الكهربائي الهلامي gel electrophoresis لتحديد الاختلافات بين المجموعات المختلفة والمجموعات الفرعية للفيتوبلازما. ومن الصعب - أيضاً - إضافة أو دمج سلالات ومجموعات فرعية جديدة تعتمد في أنظمة تصنيفها على 16Sr أو أجناس Candidatus. ونتيجة لذلك، أشار Wei et al (٥، ٦) إلى نظام يستند إلى التسلسل الجيني المتواجد في قاعدة بيانات تسلسل النيوكليوتيدات في المركز الوطني لمعلومات التكنولوجيا الحيوية (The National Center for Biotechnology Information) (NCBI)، حيث يمكن استخدام تلك المعلومات ببرامج محاكاة بالكمبيوتر مع مجموعة كبيرة من الإنزيمات المحددة للتنبؤ بعملية التصنيف (انظر: الفصل الثامن والعشرون). بعدها، يتم حساب الأنماط المحددة المتشابهة بمعادلات (٤، ٦، ٧) لتعكس عدد الأنماط المشتركة والتميزة بين أي

عزلات. واستنادا إلى هذا النظام، هناك - الآن - أكثر من ٢٨ مجموعةً من تتابع 16Sr (انظر الجدول ١).

الجدول رقم (١) تصنيف مجموعات الفيتوبلازما:

16Sr group ^a	<i>Candidatus species</i> ^b	Type strain	GenBank accession number	Geographic distribution of the group ^c
I-A	<i>Candidatus Phytoplasma asteris</i>	Aster yellows witches' broom	NC_007716	North America, Europe
I-B	<i>Ca. Phytoplasma asteris</i>	Onion yellows	NC_005303	Worldwide
I-C	<i>Ca. Phytoplasma asteris</i>	Clover phyllody	AF222065	North America, Europe
I-D	<i>Ca. Phytoplasma asteris</i>	Paulownia witches' broom	AY265206	Asia
I-E	<i>Ca. Phytoplasma asteris</i>	Blueberry stunt	AY265213	North America
I-F	<i>Ca. Phytoplasma asteris</i>	Apricot chlorotic leaf roll	AY265211	Spain
II-A		Peanut witches' broom	L33765	Asia
II-B	<i>Ca. Phytoplasma aurantifolia</i>	Lime witches' broom	U15442	Arabian peninsula
II-C		Cactus witches' broom	AJ293216	Asia, Africa
II-D	<i>Ca. Phytoplasma australasiae*</i>	Papaya yellow crinkle	Y10097	Australia
III-A	<i>Ca. Phytoplasma pruni*</i>	Western X disease	L04682	North America
III-B		Clover yellow edge	AF189288	America, Asia, Europe
IV-A	<i>Ca. Phytoplasma palmarum*</i>	Coconut lethal yellowing	AF498307	Florida, Caribbean
IV-B	<i>Ca. Phytoplasma palmarum*</i>	Phytoplasma sp. LY5(PE65)-Oaxaca	AF500334	Mexico
IV-D	<i>Ca. Phytoplasma palmarum*</i>	<i>Carludovica palmata</i> leaf yellowing	AF237615	Mexico
V-A	<i>Ca. Phytoplasma ulmi</i>	Elm yellows	AY197655	North America, Europe
V-B	<i>Ca. Phytoplasma ziziphi</i>	Jujube witches' broom	AB052876	Asia
V-C	<i>Ca. Phytoplasma vitis*</i>	Alder yellows	AY197642	Europe
V-G		Jujube witches' broom related	AB052879	Asia
VI-A	<i>Ca. Phytoplasma trifolii</i>	Clover proliferation	AY390261	North America, Asia

(continued)

جدول رقم (١) (تكملة):

16Sr group ^a	<i>Candidatus species</i> ^b	Type strain	GenBank accession number	Geographic distribution of the group ^c
VII-A	<i>Ca. Phytoplasma fraxini</i>	Ash yellows	AF092209	North America
VIII-A	<i>Ca. Phytoplasma luffae</i> *	Loofah witches' broom	AF353090	Taiwan
IX-A		Pigeon-pea witches' broom	AF248957	America
IX-D	<i>Ca. Phytoplasma phoenicium</i>	Almond witches' broom	AF515636	Middle East
X-A	<i>Ca. Phytoplasma mali</i>	Apple proliferation	AJ542541	Europe
X-C	<i>Ca. Phytoplasma pyri</i>	Pear decline	AJ542543	Europe
X-D	<i>Ca. Phytoplasma spartii</i>	Spartium witches'-broom	X92869	Europe
X-F	<i>Ca. Phytoplasma prunorum</i>	European stone fruit yellows	AJ542544	Europe
XI-A	<i>Ca. Phytoplasma oryzae</i>	Rice yellow dwarf	AB052873	Asia, Africa, Europe
XII-A	<i>Ca. Phytoplasma solani</i> *	Stolbur	AJ964960	Europe
XII-B	<i>Ca. Phytoplasma australiense</i>	Australian grapevine yellows	L76865	Australasia
XII-C		Strawberry lethal yellows	AJ243045	Australia
XII-D	<i>Ca. Phytoplasma japonicum</i>	Japanese hydrangea phyllody	AB010425	Japan
XII-E	<i>Ca. Phytoplasma fragariae</i>	Strawberry yellows	DQ086423	Europe
XIII-A		Mexican periwinkle virescence	AF248960	Mexico, Florida
XIV-A	<i>Ca. Phytoplasma cynodontis</i>	Bermudagrass whiteleaf	AJ550984	Asia, Africa
XV-A	<i>Ca. Phytoplasma brasiliense</i>	Hibiscus witches' broom	AF147708	Brazil
XVI-A	<i>Ca. Phytoplasma graminis</i>	Sugar cane yellow leaf	AY725228	Cuba
XVII-A	<i>Ca. Phytoplasma caricae</i>	Papaya bunchy top	AY725234	Cuba
XVIII-A	<i>Ca. Phytoplasma americanum</i>	Potato purple top wilt	DQ174122	North America
XIX-A	<i>Ca. Phytoplasma castanae</i>	Chestnut witches' broom	AB054986	Japan

(continued)

جدول رقم (١) (تكملة):

16Sr group ^a	<i>Candidatus</i> species ^b	Type strain	GenBank accession number	Geographic distribution of the group ^c
XX-A	<i>Ca. Phytoplasma rhamni</i>	Buckthorn witches' broom	X76431	Germany
XXI-A	<i>Ca. Phytoplasma pini</i>	Pine shoot proliferation	AJ632155	Spain
XXII-A	<i>Ca. Phytoplasma cocosnigeriae</i> *	Coconut lethal decline	Y14175	West Africa, Mozambique
XXIII-A		Buckland valley grapevine yellows	AY083605	Australia
XXIV-A		Sorghum bunchy shoot	AF509322	Australia
XXV-A		Weeping tea witches' broom	AF521672	Australia
XXVI-A		Sugar cane phytoplasma D3T1	AJ539179	Mauritius
XXVII-A		Sugar cane phytoplasma D3T2	AJ539180	Mauritius
XXVIII-A		Derbid phytoplasma	AY744945	Cuba
XXIX-A*	<i>Ca. Phytoplasma allocasuarinae</i>	<i>Allocasuarina muelleriana</i> phytoplasma	AY135523	Australia
XXX-A*	<i>Ca. Phytoplasma cocostanzaniae</i> *	Tanzanian lethal decline	X80117	Tanzania

^a يستند نظام تصنيف 16Sr على نظام محاكاة بالكمبيوتر باستخدام الأنماط المحددة من RFLP (Wei et al (5). والمجموعات التي تحمل علامة النجمة لم تتضمن في التحليل؛ لأن التتابعات النيوكليوتيدية المتاحة لم تغط منطقة F2nR2 كاملة، وهي المطلوبة لنظام محاكاة بالكمبيوتر، باستخدام الأنماط المحددة من RFLP.

^b يعتمد تصنيف "أنواع *Candidatus*" على ما تم وصفه بواسطة Hogenhout et al (25). والأجناس التي تحمل علامة النجمة هي أسماء مؤقتة لم يتم التصديق عليها حتى الآن.

^c تم تحديث المواقع الجغرافية طبقاً لما تم وصفه من قبل Lee et al (2).

وقد تم العثور على عدد من الفيتوبلازما المرتبطة بعديدٍ من أمراض النباتات في جميع أنحاء العالم. وتعتمد الأعراض على عديدٍ من العوامل، منها: النبات العائل، وعزلة الفيتوبلازما، والعوامل البيئية، وتشمل -غالباً- تغيير اللون إلى الأصفر/الأرجواني على الأوراق والمجموع الزهري، ويحدث ما يسمى بالتورق الزهري (اخضرار بتلات الزهرة)، فيلودى (phyllody) (تحويل الزهرة إلى هياكل تشبه الأوراق)، ويكثر التبرعم، وتظهر شكل المكنسة الساحرة على النبات، التقرم، وإعاقة نمو النبات، وفي بعض الحالات يصل الأمر إلى موت النبات.

ومن بين الأمراض الأكثر أهمية من الناحية الاقتصادية: اصفرار الاستر؛ والذي يصيب مجموعة واسعة من المحاصيل، مثل: البطاطس والجزر والذرة والطماطم والبصل، والزهور في جميع أنحاء العالم، والأمراض التي تصيب الخوخ في الولايات المتحدة، والتي تحدث تشوهاً على التفاح، ومرض التدهور على الكمثرى في أوروبا، وأمراض العنب في جميع أنحاء العالم. بالإضافة إلى تلك التي تصيب قصب السكر، وأمراض الأعشاب، مثل: اصفرار نبات الأرز وتقزمه، وبيضاض أوراق قصب السكر، وتقزم أعشاب نيبير؛ والذي يحدث في شرق أفريقيا وآسيا، وظاهرة مكنسة الساحرة التي تصيب البطاطس، ومرض تقزم الذرة في أمريكا الوسطى والجنوبية، وأمراض الاصفرار المميت على جوز الهند، وشبيهه الاصفرار المميت؛ والذي يحدث في البحر الكاريبي وأمريكا الوسطى؛ والذي أدى إلى التخلي عن زراعة جوز الهند في أفريقيا. وبالنظر إلى المجالات العلمية، مثل: تقارير الأمراض الجديدة (New Disease Reports) أو أمراض النبات (Plant Disease)، تظهر لنا أمراض فيتوبلازما جديدة على عوائل نباتية جديدة في مواقع جديدة. ويوضح جدول رقم ١، تفاصيل بعض هذه الأمراض المهمة، والمجموعات التابعة لـ 16Sr، وأنواع *Candidatus* التي تنتمي إليها تلك الأمراض. وهذه القائمة ليست شاملة، ومن المهم أن نلاحظ أن "العزلات" - غالباً - تعطى أسماء على أساس الأمراض التي ترتبط بها، ولكن - كما ذكر أعلاه - في معظم الحالات المعلومات الوحيدة التي يتم توفيرها لهذه "العزلات" هي وصف للأعراض، وأجزاء من تسلسل النيوكلوتيدي 16S rDNA للحمض النووي الريبوسومي الموجود في بنك الجينات.

وسوف يكون هذا التسلسل النيوكلوتيدي كافياً لتعيين "العزلات" إلى مجموعات أو مجموعات فرعية على أساس 16Sr وربما - أيضاً - أنواع أخرى من *Candidatus*، ولكن لن تكون هذه المعلومات كافية للتأكد من ارتباط "العزلات" بالأخرى داخل المجموعة نفسها / المجموعة الفرعية 16Sr. وبالتالي، فمن المحتمل أن يكون هناك عديد من "العزلات" التي تم عزلها من أنواع نباتية مختلفة وأعطيت أسماء مختلفة، وقد تكون هذه كائنات متطابقة، ولكن هناك حاجة إلى مزيد من التسلسل النيوكلوتيدي لجينات إضافية لتأكيد ذلك. كما سيتم التطرق إلى عدد من البروتوكولات في هذا الكتاب؛ لدراسة جينات إضافية خارج نطاق التسلسل النيوكلوتيدي للحمض النووي الريبوسومي 16S rRNA، إضافة إلى عملية الترميز "barcoding" الخاصة بالفيتوبلازما (انظر: الفصول ١٤، ١٥، ١٦، ١٧، ٢٦، ٢٧). ومما يدعو إلى الحيرة، إعطاء أسماء عامة للمرض في أجزاء مختلفة من العالم بسبب الأعراض التي تسببها (مثل: أمراض جوز الهند المميت)، ولكن عندما تمت دراسة هذه "العزلات" بمزيد من التفصيل وجد أنها تنتمي إلى مجموعات مختلفة من 16Sr، وذلك اعتماداً على البلد الأصلي للمرض. على سبيل المثال: الاصفرار المميت لجوز الهند من الولايات المتحدة ومنطقة البحر الكاريبي ينتمي إلى مجموعة 16SrIV، في حين أن الأمراض التي تسبب الأعراض نفسها في غانا وموزمبيق تنتمي إلى مجموعة 16SrXXII، وتلك الموجودة في تنزانيا مختلفة ولا تنتمي إلى مجموعة 16Sr، (وتم إدراجها مؤقتاً 16SrXXX في

الجدول ١). لذلك، من المهم توخي الحذر في تسمية الأمراض الجديدة المرتبطة بالفيتوبلازما -وأيضاً- عند دراسة "العزلات" التي تم وضع التسلسل النيوكلوتيدي في بنك الجينات، حيث إنه -حتى هذه اللحظة- لم يتحقق من صحة هذه الأعداد الكبيرة من التسلسل النيوكلوتيدي. ومع ذلك، هناك -أيضاً- عديد من عينات الفيتوبلازما المتاحة، والتي تم دراستها على نطاق واسع، وقد تم القيام بالأعمال الكثيرة الرائدة التي ساعدت على فهم هذه الكائنات وفهم الجينوم التابع لها، وآليات الإصابة بالمرض، وانتقال المرض، ومحاولة مكافحة الأمراض التي تسببها وإدارتها.

٢- الشكل الظاهري "Morphology":

يمكن رؤية "الفيتوبلازما" في النباتات المصابة عن طريق الفحص المجهرى، وتوصف - غالباً - بأنها متعددة الأشكال، وتأخذ الشكل المدور أو الشكل الأسطواني، بأقطارٍ أقل من 1µm (٢). وهي تفتقر إلى جدران الخلية، وتحتوي على غشاء من ثلاث طبقات (١). وبسبب عدم المقدرة على زراعة الفيتوبلازما في بيئة خاصة، فإن تصويرها يتطلب مهارة في مجال المجاهر والتقنيات؛ والتي تتضمن عمل القطاعات العرضية وتثبيت الأنسجة. ثم يلي ذلك، صبغها بواسطة مادة DAPI (diamidino-2-phenylindole) وفحصها بالمجهر الفلورسنتى (fluorescence) أو بالمجهر الإلكتروني النافذ (TEM). وبالإضافة إلى ذلك، تم تطوير أساليب التصوير الحيوي؛ باستخدام أصباغ خاصة تتفاعل مع تقنية مجهر (confocal laser scanning microscopy) لرؤية الفيتوبلازما وهي داخل النبات الحي (٨)، وبعض هذه الطرق ستعرض في الفصول ٩، ١٠ و ١١.

٣- الكشف والتشخيص:

على الرغم من أن التصوير بواسطة المجهر مفيدٌ جداً؛ لتعريف الفيتوبلازما وتأكيد وجودها في النباتات - وأيضاً - لتحديد موقعها في العائل، إلا أنها ليست مثالية كطريقة التشخيص الروتينية السريعة. ويتضمن معظم التشخيص للفيتوبلازما -بدلاً من ذلك- الكشف عن الحمض النووي البكتيري في النباتات المصابة والحشرات. وقد بذلت بعض المحاولات -أيضاً- لتطوير نظم الكشف بالأجسام المضادة، وقد استعملت مستخلصات الفيتوبلازما من الأنسجة المصابة لحقنها في حيوانات لإنتاج أمصال مضادة متعددة، واستخدمت -مؤخراً- جينات محددة؛ حيث تم استنساخها في ناقلات بكتيرية لإنتاج بروتينات مهجنة لإنتاج أمصال مضادة متعددة أو وحيدة (انظر: الفصل ٣٠). وفي حين أن استخدام أجزاء من المستخلص تكون لها مزية نسبية بكونها سريعة وسهلة، فإنه من غير الممكن - حتى الآن - الحصول على مستخلص متكامل تماماً؛ والذي -في الأصل- لا يحتوي على أنسجة العائل. وعليه، فإن الأجسام المضادة المنتجة المتعددة تفتقر إلى التخصصية. لذلك، يجب توخي الحذر في الفحص وتحضير المستخلص. وإن استخدام البروتينات المهجنة تتميز

بإنتاج كميات أكبر من الأمصال المضادة المتخصصة، ولكن إذا كان من المقرر تطويرها إلى نظام تشخيصي، فمن المحتمل أن تحتاج البروتينات المستخدمة إلى أن تكون بروتينات معبرة؛ والتي تكون معرضة على سطح البكتيريا، بحيث يمكن الكشف عنها بسهولة. وقد تم تحديد أهم الأجسام المضادة الرئيسية والجينات التي ترمز لها، وكذلك التسلسل النيوكليوتيدي لبعض فيتوبلازما، وهناك إمكانية لتطوير بعض طرق الكشف، ولكن هذه ستكون متخصصة لفيتوبلازما محددة وليست عامة، حيث إن هناك تنوعاً كبيراً في البروتينات بين الفيتوبلازما المختلفة.

وفي بروتوكولات هذا الكتاب، ركزنا أساساً على الكشف عن الحمض النووي ونظم التشخيص، لأن هذه يمكن أن تتطور بسهولة، ولاستخدامها أداة عامة (لتحديد ما إذا كانت عينة ما تحتوي على فيتوبلازما)، أو أداة محددة (لتحديد أي مجموعة 16Sr أو Candidatus موجود في الأنسجة). ويمكن - أيضاً - أن تستخدم لتصنيف متعلق بتطور سلالات الفيتوبلازما، وتعزيز فهم التنوع الموجود في هذه المجموعة من الكائنات الحية.

وطريقة التشخيص الأبسط والأكثر شيوعاً هي تفاعل سلسلة البوليميريز PCR. وقد تم تطوير البادئات الرئيسية الخاصة للفيتوبلازما التي تزيد في تضخيم مناطق مختلفة من جينات الحمض النووي الريبوسومي (rRNA انظر الفصل ١٤). ويتم استخراج الحمض النووي الكلي من النباتات المختبرة أو الحشرات، وهناك عدد قليل من الطرق لاستخراج الحمض النووي وإثبات وجود الفيتوبلازما في الأنسجة قد تم وصفها في الفصول ١٢ و١٣، وستقوم البادئات الرئيسية الخاصة بالفيتوبلازما بتأكيد ما إذا كانت هناك فيتوبلازما في العينة المختبرة من عدمه؛ حيث يكون تواجد الفيتوبلازما -عادة- بتركيز منخفض، وغالباً ما تكون هناك حاجة إلى تفاعل البلمرة المتسلسل المتداخل (nested PCR)، وأحياناً باستخدام البادئات الخاصة بمجموعة 16Sr، وهي مجموعة محددة للمساعدة في التصنيف. وبدلاً من ذلك، وعندما لا تستخدم البادئات الخاصة بالمجموعة، يمكن استخدام تقنيات تعدد أشكال الأطوال المتقطعة RFLP في نواتج تفاعل البلمرة المتسلسل PCR لتخصيص الفيتوبلازما إلى مجموعات 16Sr. وبالإضافة إلى ذلك، تم تطوير اختبار التشكل أحادي السلسلة للكشف عن التباين الطفيف بين السلالات ذات الصلة داخل المجموعات (انظر الفصل ١٨)، ويمكن - أيضاً - استخدام تسلسل الجينات الريبوسومي rRNA للتحديد الدقيق للسلالات لأغراض التصنيف، وإذا كان من الضروري وضع تسلسل الشفرات في برنامج خاص للتصنيف (iPhy classifier) (الفصل ٢٨) لتخصيصهم إلى مجموعة 16Sr.

وفي حين أن تفاعل البلمرة المتسلسل PCR سريع وسهل الاستخدام طريقةً للتشخيص، فإنه يجب توخي الحذر في تفسير النتائج بطريقة صحيحة. وبعض الأحماض النووية المستخلصة من النباتات تحتوي على مثبطات لتاك بوليمراز Taq polymeras. لذلك، ظهور أي نتائج سلبية في تفاعل البلمرة المتسلسل لا يعني بالضرورة غياب الفيتوبلازما. وعادة، يتم اختبار العينات - أيضاً - مع

البادئات Primers لجينات النبات/الحشرات، وذلك لتأكيد نتائج الـ PCR قبل أخذ قرار نهائي بشأن نتيجة الاختبار. وهناك استراتيجية بديلة تم تطويرها، وهي: استخدام طريقة تعدد الأشكال الطولية لأجزاء المسك الطرفية (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism T-RFLP) (الفصل: ٢٠)؛ والتي تسمح بتحديد النبات والفيتوبلازما في وقت واحد في العينة للتأكد من أنها تدعم نتيجة الـ PCR. وتعتبر الإيجابيات الكاذبة False positives أيضاً مشكلة رئيسية في بروتوكولات PCR القياسية، خاصةً إذا تم استخدام تقنية الـ PCR المتداخل. ويمكن أن يؤدي استخدام نظام مفتوح - حيث يتم فتح أنابيب وتجهيز عينات باستخدام الجل - إلى إنتاج كميات كبيرة من نواتج تفاعل الـ PCR؛ والتي يتم إطلاقها في المختبرات مواداً ملوثة، مثل الإيروسولات وما إلى ذلك. وهذه يمكن أن تلوث مرة أخرى خليط التفاعلات والعينات إذا كان الحذر والدقة غير مأخوذتين بعين الاعتبار.

وبسبب هذه المشاكل، فإن معظم مختبرات التشخيص ابتعدت عن تطبيق النظم المفتوحة إلى الأنظمة المغلقة، حيث يتم الكشف عن نواتج التضخيم في الوقت الحقيقي بدلاً من الجل. وتشمل هذه الطرق الـ Real-time PCR وأيضاً - اختبار Real-time Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP) (انظر الفصول ٢١ و ٢٢ و ٢٣ و ٢٤ و ٢٥). وقد تم تطوير طرق أخرى - إما عامة أو متخصصة - يمكنها الكشف عن الفيتوبلازما، مع حساسية مماثلة لتقنيات الـ PCR المتداخلة. ومزايا هذه الطرق هي الحد من احتمال التلوث، وإعطاء نتائج إيجابية خاطئة. لذلك، ينصح باستخدامها في التشخيص الروتيني المتكرر. ومن عيوب هذه الطرق: تكلفة المعدات، وخاصة في اختبار الـ real-time PCR، وأنه من الصعب القيام بتحليل النهاية الطرفية Downstream analysis، مثل: تحليل RFLP، وتحديد مجموعة 16Sr. لذلك، يجب استخدام اختبارات خاصة للكشف على العينات، أو يمكن تحليل العينات بطريقة تفاعل البلمرة المتسلسل التقليدي PCR و RFLP/sequencing، إذا كانت هذه المعلومات الإضافية مطلوبة.

ومن المهم أن نلاحظ أن الكشف عن الفيتوبلازما في النبات المصاب ليس دليلاً مطلقاً على أنها الكائن المسؤول عن هذا المرض، حيث إن فروض كوخ (Koch's postulates) لا يمكن إثباتها للكائنات التي لا يمكن تمييزها في أوساط غذائية مختلفة. ونتيجة لذلك، هناك العديد من الأمثلة، حيث يجب تحديد أنه تم العثور على الفيتوبلازما "مرتبطة" بأعراض معينة. والمشكلة معقدة من خلال حقيقة أن الفيتوبلازما يمكن العثور عليها على النباتات التي لا تُظهر أعراضاً واضحة، والعكس صحيح، حيث تم اختبار النباتات التي تظهر عليها أعراض، ولكن نسبة قليلة فقط تظهر وجود الفيتوبلازما. ويعزى ذلك - بشكل عام - إلى التوزيع غير المتكافئ للفيتوبلازما داخل النباتات المصابة؛ حيث إن العينات المأخوذة من جزأين مختلفين من النبات نفسه قد تعطي نتائج مختلفة في تحليل تفاعل البلمرة المتسلسل. وبالإضافة إلى ذلك، هناك أدلة على أن تركيز الفيتوبلازما يتأثر بالتغيرات في مواسم السنة وبالعوامل البيئية (٢). ومع ذلك، فقد تمت تجارب على

الحشرات الناقلة المعروفة، حيث اكتسبت الفيتوبلازما إجراء تجارب التغذية المناسبة، كما أن هناك عدداً من الحالات التي تبين فيها -بشكل قاطع- أن الفيتوبلازما هي المسبب المرضي.

٤- الجينوم وآليات القدرة الإراضية:

تشير الأعراض التي تسببها الفيتوبلازما في النباتات إلى حدوث تداخل مع آليات إشارات النبات و/ أو التمثيل الغذائي لهرمونات النبات. وقد أظهرت الدراسات الفسيولوجية: أن مستويات النشا في جذور أشجار الفاكهة المصابة بالفيتوبلازما تنخفض إلى ما يقرب من النصف إلى ثلث المعدل الطبيعي، وأن النشا وغيرها من الكربوهيدرات تتراكم في الأوراق. وقد أكدت تجارب التشخيص بالتعليم الإشعاعي أن نقل نتاج التمثيل الضوئي من البراعم إلى الجذور، ومن الأوراق الناضجة إلى الأصغر يكون ضعيفا في النباتات المصابة بالفيتوبلازما. وقد أظهرت الدراسات الخاصة بعمليات الأيض في نبات الوينكا Madagascar periwinkle تراكم عديد من المواد في أوراق النبات المتعلقة بتخليق الفيناييل بروبانويد (phenylpropanoid) و terpenoid indole alkaloid؛ والتي تعد نواتج علمية الأيض الثانوية، بالإضافة إلى تراكم السكروز، والجلوكوز، والجليسين، البولي فينول، وحمض السكسينيك (٩) ومن المعروف -أيضا- أن مستويات السكر مهمة في تنظيم عملية الانتقال إلى مرحلة التزهير، ودراسات التعبير الجيني على الطماطم المصابة بالفيتوبلازما (stolbur)، والتي تتسبب في ظهور أعراض تورق الأزهار، حيث أشارت الدراسات إلى أن الجينات تتحكم في نظام التزهير في النسيج النباتي المرستيمي؛ والتي تكون منظمة في النباتات السليمة وغير منظمة في النباتات المصابة بالفيتوبلازما (١٠).

وللحصول على مزيد من المعلومات حول آليات القدرة الإراضية للفيتوبلازما، فقد تم تنفيذ مشاريع تحليل التسلسل للجينوم، وتحديد الجينات المرتبطة بالأمراض. وقد شملت هذه المشاريع: عزل الحمض النووي النقي من النباتات المصابة / الحشرات؛ باستخدام إما (CsCl gradients)، أو باستخدام تقنية الفصل الكهربائي باستخدام الرحلان الكهربائي (gel)، وطرق أخرى. كما تم عزل بلازميدات الفيتوبلازما، ورسم الخرائط الكروموسومية؛ والتي سنتناولها بشكل مفصل في الفصول ٣١، ٣٢، ٣٣ و٣٤.

تم عمل تتابع تسلسلي للشفرات الكاملة لأربعة جينومات للفيتوبلازما، اثنين منهم ينتميان إلى 16SrI، مجموعة 'Ca. Phytoplasma asteris'، سلالة اصفرار البصل (OY) (11)، وسلالة مكنسة الساحرة لاصفرار الأستر aster yellows witches' broom strain (AY-WB) (12)؛ جنبا إلى جنب مع مجموعة 16SrXII، 'Ca. Phytoplasma australiense' (13)، و 'Ca. Phytoplasma mali' (14). أما 'Ca. Phytoplasma mali'؛ والتي تختلف عن غيرها من الجزيئات التي تم دراستها حتى الآن؛ حيث إنها كروموسوم خطي linear chromosome (١٤). ولكن هناك عدداً من مجموعات 16Sr التي يتوفر لها قليل من معلومات التتابع التسلسلي. لذلك، ظهور الكروموسومات

الخطية غير واضح. ويمتلك نوعان من الفيتوبلازما المسببة لمرض اصفرار الأستر كروموسومات حلقيه (مع عدد ٢-٤ من البلازميدات)، وترميز ٧٥٤ و٦٧١ جينا، على التوالي، منها ما يقرب من ٦٠٪ معلومة الوظائف. وجينوم *Ca. Phytoplasma australiense* هو -أيضا- دائري، ولديه ٨٣٩ جينا، وبلازميد واحد، في حين أن *Ca. Phytoplasma mali* لا يحتوي على أي بلازميدات، وتم ترميز ٧٥٤ و٦٧١ جينا وترجمتهم على الترتيب، وقد تم معرفة وظائف ٦٠٪ منهم من هذه الجينات. كذلك جينوم *Ca. Phytoplasma australiense* -أيضا- من النوع الدائري، وتم ترميز ٨٣٩ جينا، ولديها بلازميد واحد، بينما *Ca. Phytoplasma mali* ليس لديه بلازميدات، وتم ترميز ٤٩٧ جينا فقط.

ويكشف تحليل التسلسل لأربعة جينومات للفيتوبلازما أنها تفتقر إلى الجينات الخاصة لعمليات الأيض الرئيسية، حتى تلك التي وجدت في جينوم الكائنات الدقيقة الأخرى. وهذا يشمل مسارات الحيوية لعدد من الأحماض الأمينية والأحماض الدهنية والنيوكليوتيدات، مما يوحي بأن الفيتوبلازما يجب أن تحصل عليها من العائل (١٣، ١٤). علاوة على ذلك، وعلى الرغم من أنها تعيش في بيئات عالية السكر (١ مولر من السكر في اللحاء، و٠,٩ مولر من trehalose في العقد للمفاوية الخاصة بالحشرات)، فإن الفيتوبلازما تفتقر إلى الجينات المنظمة للنقل، وتسمى الناقلات الفوسفاتية؛ حيث إن معظم البكتيريا الأخرى تستخدمها وسيلة فعالة؛ حيث تحصل عليها لفسفرة السكر، مثل: السكر والجلوكوز والفركتوز. علاوة على ذلك، يبدو أنها تفتقر إلى الإنزيمات الخاصة بالسكر، وبدلا من ذلك، يبدو أن الفيتوبلازما قد تقوم بالحصول على هيكسوز (hexoses) في شكلها الفسفوري للاستخدام مباشرة في مساراتها من السكر، وربما يكون ذلك السبب في الخلل الناتج في توزيع السكر في النباتات، وهذا ما يؤدي إلى ظهور الأعراض المرضية في أماكن مختلفة (١٥). بالإضافة إلى ذلك، تمتلك الفيتوبلازما مسارات غير مكتملة لتمثيل الكربوهيدرات وإنتاج أدينوسين ثلاثي الفوسفات ATP. وكان الجينوم الخاص بـ *Ca. Phytoplasma asteris* أول كائن حي تم التعرف عليه لا يحتوي على جينات لتصنيع أدينوسين ثلاثي الفوسفات ATP (١١)، أو جينات قد تكون قادرة على الحصول على أدينوسين ثلاثي الفوسفات ATP. وكان الوضع نفسه قائما - أيضا - في حالة *Ca. Phytoplasma mali*، بحيث يقترح أن تقوم الفيتوبلازما بالحصول -أو إنتاج- على أدينوسين ثلاثي الفوسفات ATP باستخدام آلية غير معروفة (١٤).

ويشير حجم الجينوم الصغير والميل الواضح نحو التطور الاختزالي للفيتوبلازما إلى أن مستوى التكرار مرتفع في جينوم الفيتوبلازما، وهذا له أهمية. وقد وجد أن عدداً من الجينات لها نسخ متعددة، مثل: *Ca. Phytoplasma australiense*، وتحتوي على نسختين كاملتين من نظام النقل النشط ABC للبيبتيد والنيكل (١٣). وقد تم عزل سلالتين من اصفرار البصل التي تظهر أعراضاً حادة ومعتدلة في النباتات (OY-W and OY-M)، على التوالي، ووجد أن OY-W يحتوي على تكرار

متزامن بطول ٣٠ كيلوبايت في الجينوم الخاص به، والتي تحتوي على الجينات الأساسية لتحلل السكر (glycolysis) (١٦).

وغالبا ما ترتبط الجينات متعددة النسخ Multicopy genes مع ظاهرة أخرى من جينومات الفيتوبلازما؛ وهي الوحدات المتنقلة المحتملة (PMUs). وهناك بعض من الوحدات المتنقلة المحتملة (PMUs) لا تحتوي على جميع العناصر اللازمة لتكون متنقلة، ولكن بعضاً منها -مثل الجينات المشتمة على DNA recombination function، إنزيم النقل (transposase)- يتم تثبيتها بواسطة تكرار مقلوب الجين (١٧). وفي داخل جينومات الفيتوبلازما تميل PMUs إلى أن تكون متجمعة، ومن المحتمل أن يكون PMU1 من AY-WB هو الأفضل تمييزاً؛ والتي وجد أنها موجودة في شكلين داخل AY-WB: دائري (يسمى C-PMU1)، وشكل خطي (L-PMU1) (١٨). ومن المثير للاهتمام، أن مستويات C-PMU1 هي أعلى في الفيتوبلازما التي تصيب خلايا الحشرات من تلك المعزولة من النباتات. وزيادة C-PMU1 في الخلايا التي تصيب الحشرات تشير إلى أن هذه العملية تساعد على تكيف الفيتوبلازما مع بيئتها (١٨). والتكيف مع بيئة جديدة يوفر تفسيراً موجزاً للسؤال: لماذا الكائن الحي الذي يحتوي على جينوم صغير يحتوي على تكرارات متعددة للجينات؟

ومن المعروف أن عدداً من البكتيريا المسببة للأمراض النباتية تستخدم أنظمة إفراز من النوعين الثالث والرابع (Type III and IV) لضخ العوامل المؤثرة والعوامل المسببة للأمراض في الخلايا النباتية. وبينما تفتقر الفيتوبلازما إلى أنظمة الإفراز هذه، إلا أنها تمتلك أنظمة إفراز تستند إلى تسلسل الجينوم وتسلسل البروتين؛ والذي يحمل الببتيدات في النهاية الطرفية -N؛ التي تستهدفها لإفرازها حيث تم التعرف عليها. ومن المفترض أن تقوم الفيتوبلازما بإفراز هذه الببتيدات الصغيرة في اللحاء، وبعد ذلك تنتقل إلى خلايا نباتية أخرى للتأثير على التعبير الجيني. وقد تم التعبير الجيني مؤخراً عند عدد من هذه الجينات في النباتات المعدلة جينياً، وتبين أنها تعمل بروتينات مؤثرة، وتتدخل في عوامل النسخ في النبات العائل؛ مما يؤدي إلى ظهور أعراض الفيتوبلازما الكلاسيكية، مثل: تلون الأخضر، وتورق الأزهار، ومكنسة الساحرة، والتقرم (١٩-٢٢). وقد افترض - أيضاً - أن (epigenetic methylation) توقف عمل بعض الجينات من الحمض النووي النباتي التي تؤثر على نمو الأزهار (١٠).

٥- النقل:

تنتقل الفيتوبلازما بين النباتات بواسطة الحشرات التي تتغذى على اللحاء؛ والذي يعد جهاز النقل في النبات، مثل: رتبة الحشرات نصفية الأجنحة، وفي المقام الأول نطاطات الأوراق (Cicadelloidea)، وحشرات نطاطات النباتات (Fulgoroidea)، وبسيليدي (Psylloidea) psyllids

(٢٣). ومع ذلك، لا يزال هناك عديد من الفيتوبلازما التي لم يتم التأكد من أن لها ناقلات، في حين أن بعضها الآخر يمكن أن ينتقل بواسطة عديد من الأنواع الحشرية. ويحدث أن تحصل الحشرة الناقلة على الفيتوبلازما أثناء التغذية، ثم تحدث فترة لا تستطيع فيها الحشرات الناقلة أن تنقل الفيتوبلازما، وهذه الفترة تعرف باسم: فترة الحضانة أو الفترة الكامنة. ولكي يصبح الناقل معديا، يجب أن تمر الفيتوبلازما عبر المعدة والغشاء القاعدي؛ والذي يدخل الحويصلة الحشرية، ويمكن أن تتحرك الفيتوبلازما من خلال الخلايا الدموية الليمفاوية وتصيب أجزاء عديدة من الحشرة. وهنا، سوف تتكاثر الفيتوبلازما وتصل إلى درجة عالية من التطور؛ والذي من شأنه أن يسمح لها بالانتقال أثناء تغذيتها على النبات (٢٣-٢٥). ومن أكثر الأجزاء في جسم الحشرة التي يمكن للفيتوبلازما أن تصيبها وتنتقل من خلالها الأعضاء التناسلية للنواقل، وقد تبين أن الفيتوبلازما يمكن أن تنتقل من الحشرة الأم إلى نسلها. وهناك بعض الحالات، حيث يؤدي وجود الفيتوبلازما في جسم الحشرة إلى ضعف الحشرة (٢٦). وهناك أمثلة أخرى، حيث ثبت أن الفيتوبلازما تزيد من الخصوبة وطول العمر للحشرات الناقلة (٢٧). والمدى العائلي للفيتوبلازما يتأثر بالناقلات الخاصة بها مثل النوع المسبب لاصفرار الأستر، والتي تنتقل عن طريق نطاطات الأوراق متعددة العوائل (*Macrosteles fascifrons*) وحشرات أخرى، ويمكن أن تصيب مدى عائليا واسعا (على الأقل ١٩١ نوعاً من النباتات في ٤٢ عائلة). في حين أن بعض الأمراض -مثل أمراض جوز الهند- تنتقل عن طريق واحدة، أو عدد قليل من الحشرات أحادية العائل. وقد تم عرض طرق مختلفة في هذا الكتاب من أجل الحفاظ على الحشرات، وصيد الحشرات الناقلة، والتعرف الجزيئي لأنواع تلك الناقلات (الفصول ٥، ٦، ٧، ٨).

ومن الناحية التجريبية، فمن الممكن -أيضا- أن تنتقل الفيتوبلازما عن طريق التطعيم (انظر الفصل ٢)، أو باستخدام النباتات المتطفلة، مثل: الحامول (*Cuscuta* sp.) (انظر الفصل ٤)، على الرغم من أن محاولات عمل عدوى بواسطة عصير النبات المحتوى على الفيتوبلازما إلى النباتات الأخرى لم تكن ناجحة. كما كانت هناك تقارير، تم فيها الكشف عن الحمض النووي للفيتوبلازما في أجنة جوز الهند (٢٨، ٢٩)؛ جنبا إلى جنب مع إمكانية النقل بالبذور في البرسيم، الطماطم، والبذور الزيتية، والليمون. ومع ذلك، فقد تم عرض هذه الدلائل على انتقال الفيتوبلازما النباتية عن طريق البذور في وقائع المؤتمر، وليس في أوراق بحثية محكمة. لذلك، فمن غير الواضح ما إذا كانت هذه هي الطريقة التي تنتقل بها الفيتوبلازما. وهناك حاجة إلى مزيد من الدراسات لإظهار: ما إذا كان هو مجرد الحمض النووي الخاص بالفيتوبلازما الموجود في البذور، أو الكائنات الحية المعدية التي يمكن أن تستمر لإنتاج أعراض في الجيل القادم للنبات.

٦- وجهات النظر المستقبلية:

تسبب الفيتوبلازما مجموعة واسعة من الأمراض الخطيرة. وفي حين كانت تقتصر الإصابة -في الماضي- على البيئات المدارية وشبه الاستوائية، فإن هناك خطراً متزايداً من انتقالها إلى محاصيل ومواقع جديدة مع زيادة النطاق الجغرافي لنواقلها. إضافة إلى ذلك، فإن مرونة الجينوم ووجود الحمض النووي و PMUs والتسلسلات المشابهة للفيروس -كل ذلك- يشير إلى أنها قد تكون قادرة على توليد سلالات جديدة بسرعة.

إن اختبارات العينات النباتية وعمل دراسات حصر للحشرات الناقلة لتلك الفيتوبلازما هي المفتاح للحفاظ على هذه النباتات من هذه الأمراض. وقد تم إحراز تقدم كبير على مدى السنوات الأخيرة؛ من خلال تحليل تسلسل جينوم للفيتوبلازما النباتية، وأصبحت الأدوات الجزيئية متاحة -الآن- لإحراز تقدم سريع في فهمنا لكيفية ممارسة آثارها الجينية، خاصة وأن الفيتوبلازما تم إدخالها الآن في النبات النموذجي (*Arabidopsis thaliana*)، وهذه الأدوات الجينية تؤدي -أيضا- إلى تحسين طرق التشخيص. بالإضافة إلى أن الدراسات الجزيئية للحصول على نباتات مقاومة، أو نباتات تتحمل الإصابة؛ تؤدي إلى تطوير استراتيجيات محسنة لإدارة أمراض الفيتوبلازما النباتية. ومن المتوقع والمأمول أن مجموعة واسعة من طرق العمل الواردة في هذا الكتاب سوف تمكن الباحثين الجدد وذوي الخبرة من مواصلة التحقيق والتقصي حول الفيتوبلازما وجمع مزيد من التفاصيل؛ حتى نتمكن من فهم - ليس فقط مدى بقاء هذه الكائنات على قيد الحياة، وانتقالها عبر الحشرات الناقلة والنباتات- تطوير وسائل مناسبة وفعالة من حيث التكلفة للسيطرة على الأمراض الرئيسية التي تسببها للنباتات.

المراجع:

1. Doi Y et al (1967) Mycoplasma—or PLT group-like microorganisms found in the phloem elements of plants infected with mulberry dwarf، potato witches' broom، aster yellows، or paulownia witches' broom. Ann Phytopathol Soc Jpn 33:259–266
2. Lee I-M، Davis RE، Gundersen-Rindal DE (2000) Phytoplasmas: phytopathogenic mollicutes. Annu Rev Microbiol 56:1593–1597
3. Firrao G، Gibb K، Streten C (2005) Short taxonomic guide to the genus 'Candidatus phytoplasma'. J Plant Pathol 87:249–263
4. Lee I-M et al (1998) Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analyses of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences. Int J Syst Bacteriol 48:1153–1169
5. Wei W et al (2007) Computer-simulated RFLP analysis of 16S rRNA genes: identification of ten new phytoplasma groups. Int J Syst Evol Microbiol 57:1855–1867

6. Wei W et al (2008) Automated RFLP pattern comparison and similarity coefficient calculation for rapid delineation of new and distinct phytoplasma 16Sr subgroup lineages. *Int J Syst Evol Microbiol* 58:2368–2377
7. Nei M, Li W-H (1979) Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *PNAS USA* 76: 5269–5273
8. Christensen NM et al (2004) Distribution of phytoplasmas in infected plants as revealed by real-time PCR and bioimaging. *Mol Plant Microbe Interact* 17:1175–1184
9. Choi YH et al (2004) Metabolic discrimination of *Catharanthus roseus* leaves infected by phytoplasma using ¹H-NMR spectroscopy and multivariate data analysis. *Plant Physiol* 135: 2398–2410
10. Pracos P et al (2006) Tomato flower abnormalities induced by stolbur phytoplasma infection are associated with changes of expression of floral development genes. *Mol Plant Microbe Interact* 19:62–68
11. Oshima K et al (2004) Reductive evolution suggested from the complete genome sequence of a plant-pathogenic phytoplasma. *Nat Genet* 36:27–29
12. Bai X et al (2006) Living with genome instability: the adaptation of phytoplasmas to diverse environments of their insect and plant hosts. *J Bacteriol* 188:3682–3696
13. Tran-Nguyen LTT et al (2008) Comparative genome analysis of ‘*Candidatus Phytoplasma australiense*’ (subgroup tuf Australia I; rp-A) and ‘*Ca. Phytoplasma asteris*’ strains OY-M and AY-WB. *J Bacteriol* 190:3979–3991
14. Kube M et al (2008) The linear chromosome of the plant-pathogenic mycoplasma ‘*Candidatus Phytoplasma mali*’. *BMC Genomics* 9:306
15. Christensen NM et al (2005) Phytoplasmas and their interactions with hosts. *Trends Plant Sci* 10:526–535
16. Oshima K, Nishida H (2007) Phylogenetic relationships among mycoplasmas based on the whole genomic information. *J Mol Evol* 65:249–258
17. Dickinson M (2010) Mobile units of DNA in phytoplasma genomes. *Mol Microbiol* 77: 1351–1353
18. Toruño TY et al (2010) Phytoplasma PMU1 exists as linear chromosomal and circular extrachromosomal elements and has enhanced expression in insect vectors compared with plant hosts. *Mol Microbiol* 77:1406–1415
19. Hoshi A et al (2008) A unique virulence factor for proliferation and dwarfism in plants identified from a phytopathogenic bacterium. *PNAS USA* 106:6416–6421
20. Bai X et al (2009) AY-WB phytoplasma secretes a protein that targets plant cell nuclei. *Mol Plant Microbe Interact* 22:18–30
21. Himeno M et al (2011) Unique morphological changes in plant pathogenic phytoplasma-infected petunia flowers are related to transcriptional regulation of floral homeotic genes in an organ-specific manner. *Plant J* 67:971–979
22. MacLean AM et al (2011) Phytoplasma effector SAP54 induces indeterminate leaf-like flower development in *Arabidopsis* plants. *Plant Physiol* 157:831–841
23. Weintraub PG, Beanland Le A (2006) Insect vectors of phytoplasmas. *Annu Rev Entomol* 51:91–111

24. Lefol C et al (1994) Propagation of fl avescence doree MLO (Mycoplasma-Like Organism) in the leafhopper vector Euscelidius variegatus . J Invertebr Pathol 63:285–293
25. Hogenhout SA et al (2008) Phytoplasmas: bacteria that manipulate plants and insects. Mol Plant Pathol 9:403–423
26. Bressan A, Girolami V, Boudon-Padieu E (2005) Reduced fitness of the leafhopper vector Scaphoideus titanus exposed to Flavescence dorée phytoplasma. Entomol Exp Appl 115: 283–290
27. Beanland L et al (2000) Influence of aster yellows phytoplasma on the fitness of aster leafhopper (Homoptera: Cicadellidae). Ann Entomol Soc Am 93:271–276
28. Cordova I et al (2003) In situ PCR detection of phytoplasma DNA in embryos from coconut palms with lethal yellowing disease. Mol Plant Pathol 4:99–108
29. Nipah JO, Jones P, Dickinson MJ (2007) The Cape St Paul Wilt disease is transmitted to the embryos of infected West African tall coconut palms. Plant Pathol 56:777–784

تقنيات الحفاظ على الفيتوبلازما، وتكاثرها داخل

البيت الحمي على نبات *Catharanthus roseus*

Jennifer Hodgetts , David Crossley , and Matt Dickinson

الملخص:

إن مجموعات الفيتوبلازما هي: مصدر حيوي وبالغ الأهمية للباحثين والخبراء بتشخيص الأمراض لدراسة أمراض الفيتوبلازما. وتعتبر تلك المجموعات نقطة مرجعية وأداة بحثية لزيادة فهمنا للفيتوبلازما والأمراض التي تسببها. ويتناول هذا الفصل الأمراض التي تسببها ويصف - كذلك - التقنيات المطلوبة للحفاظ على مجموعات الفيتوبلازما على نبات *Catharanthus roseus*، أو ما يعرف ب: نبات "الوينكا".

الكلمات المفتاحية: *Catharanthus roseus*، الشتلات، صيانة البيوت المحمية، تقنية تطعيم النبات، الفيتوبلازما.

١- المقدمة:

الـ *Catharanthus roseus* (L.) Don G. - والمعروفة سابقاً باسم: *Vinca rosea* - اسمها المتداول هو "الوينكا"، حيث وُجد أن نبتة مدغشقر عرضة للإصابة بالعدوى من خلال الفيتوبلازما، على الرغم من أن أسباب هذه الإصابة لا تزال غير معروفة. وبسبب هذا، تم استخدامها عائلاً تجريبياً، وذلك للحفاظ على مجموعات الفيتوبلازما للأغراض البحثية (١-٣). ويعد نبات "الوينكا" من النباتات الاستوائية المعمرة، وينتمي إلى الفصيلة الدفلية التي يتم توزيعها على مستوى العالم وتزرع على نطاق واسع (٤). و *C. roseus* هو نبات دائم الخضرة مع أوراق جذابة لامعة غامقة وغالباً الزهور الملونة، وتزرع بكثرة في الحدائق، ومنذ فترة طويلة تستخدم نباتاً من نباتات الزينة (٥). ومع ذلك، فإنها تستخدم - أيضاً - إحدى النباتات الطبية؛ وذلك لأنه تم اكتشاف - خلال الستينيات - أن أوراق النبات كان لها تأثير مضاد ومقاوم للجراثيم في الفئران. ويرجع ذلك إلى إنتاج عديد من المواد القلوية أحادية الإندول، ومنها (الفينبلاستين، وفينكرستين)،

واللذان يعدان عقارين مهمين لعلاج السرطان (٦، ٧). ومن المثير للاهتمام، أن الدراسات أشارت إلى زيادة كبيرة في مادة الفينبلاستين في جذور *C. roseus* النباتات المصابة بالفيتوبلازما مقارنة مع النباتات السليمة (٣).

إن الأعراض التي تسببها الفيتوبلازما في النباتات العائل -بما في ذلك *C. roseus*- يمكن أن تشمل على الاخضرار، برغم إنها لا تقتصر عليه فقط، والاخضرار هو تطور غير طبيعي لأنسجة الأزهار وتحويلها إلى اللون الأخضر، وال *phyllody* هو تطور أجزاء نباتية كالزهرة لتصبح شبيهة بالأوراق في الشكل، والفيتوبلازما تسبب -أيضا- العقم وعدم تكاثر النبات، واستطالة الفواصل العقدية في النبات وذبولها، كذلك تشوه الأزهار وظهور الخطوط عليها، واصفرار النبات، وتيبس الأوراق، والتفرع المفرط من البراعم الأفقية، والتكاثر وظهور ما يسمى بمكنسة الساحرة (انتشار البراعم من نقطة واحدة، وعادة في النباتات الخشبية)، والتقرم العام، وتجمع أو التفاف الأوراق، وظهور الأزهار الصغيرة ذات الألوان الشاحبة. وقد تختلف هذه الأعراض في النباتات المصابة تبعا للفيتوبلازما المعنية، وأنواع النباتات المضيعة، وعمر النبات عند العدوى، ومرحلة العدوى. على سبيل المثال: في مجموعات اصفرار الأستر (*Candidatus Phytoplasma asteris*)، تنتج مجموعات فرعية مختلفة مجموعة متميزة من الأعراض، وقد لا تحدث أي أعراض واضحة في السلالات الضعيفة. ومع ذلك، تكون الأعراض ضارة بالنسبة للنبات العائل (٢، ٨، ٩) (الشكل ١).



الشكل (١): عرض من الأعراض الأنموذجية الناجمة عن عدوى بالفيتوبلازما على *Catharanthus roseus* (A) نبات سليم من الوينكا: (b-f) *C. roseus* مصابة بسلالات مختلفة من الفيتوبلازما، ويظهر في الشكل (b) تشوه بتلات النبات، بينما في الشكل (c) يظهر اخضرار الأزهار، (d-f) توضح مراحل مختلفة من تورق الزهر.

وقد تنتقل أغلب الفيتوبلازما إلى نبات *C. roseus* عن طريق التطعيم (وهذا ما سنتناوله في هذا الفصل)، أو تنتقل عن طريق الحامل (الفصل الرابع)، أو الانتقال من خلال الحشرات (الفصل الخامس). ومع ذلك، هناك استثناءات ملحوظة؛ فالفيتوبلازما في المقام الأول له عائل متخصص. وفي هذه الحالات، قد يكون من المناسب -في بعض الأحيان- الحفاظ على العائل الأصلي في البيوت المحمية، مثل: بعض أنواع الفيتوبلازما التي تصيب الحشائش، مثل: الثيوم الأرجواني (Napier)، وتسبب مرض إعاقة النمو (16SrXI).

ومع ذلك في حالات أخرى، فإن قوام النبات تمنع ذلك، على سبيل المثال الأمراض الصفراء القاتلة (16SrIV، XXII، XXX and) التي تصيب *Cocos nucifera* (نخيل جوز الهند). وهذا يعني أن مصادر هذه العزلات تكون متاحة -بشكل عام فقط- عدوى طبيعية في البيئة. ومن المعروف أن تركيز الفيتوبلازما يعتمد تبعاً لنبات العائل، مع وجود العوائل النباتية الخشبية مثل الأشجار وأشجار العنب التي تميل الفيتوبلازما إلى التواجد بتركيز منخفض بشكل خاص. بينما - غالباً - ما تكون تركيزات الفيتوبلازما في *C. roseus* أعلى بكثير (١٠).

إن الأمراض الشائعة التي قد تصيب *C. roseus* المزروع في بيوت المحمية تضم من بين عدة أمراض أخرى: العنكبوت الأحمر (*Tetranychus urticae*)، ومرض البياض الدقيقي، وذبابة السكيرد (Sciarid fly). ولعل الأكثر ضرراً من هذه الأمراض هو العنكبوت الأحمر؛ بسبب بطء الكشف عن وجوده وصعوبته، والذي يساعد في الإصابة بالأمراض. وفي كثير من الأحيان، وبمجرد ظهور أعراض واضحة من الإصابة، عندها لا توجد أي علاجات فعالة، والخيار الوحيد هو التخلص من النباتات المصابة. ويمكن معالجة حالات العدوى الأكثر اعتدالاً والتي لوحظت مبكراً بالتطبيقات الكيميائية أو المكافحة البيولوجية، مع تطبيق المفترسات الطفيلية مثل *Phytoseiulus persilis* أو *Neoseiulus californicus* (متوفر تجارياً). ومع ذلك، لا يستحسن معالجة النباتات -بشكل وقائي- بالمبيدات واسعة النطاق بسبب خطر المقاومة النامية. وغالباً ما تنتج إصابات بذبابة السكيرد من السماد المفرط، ويمكن أن تكون مشكلة أكثر استمراراً إذا تم وضع النباتات على غطاء الخاص في بيت المحمي حتى تسهل عملية الري. ولا توجد تقارير عن مبيدات الآفات أو العلاجات المتاحة تجارياً بأنها تؤثر على الفيتوبلازما (انظر: الملاحظة ١). لذلك، عندما يتطلب الأمر يمكن استخدامها في علاج انتشار الأمراض. ومع ذلك، فإننا لا نؤيد التطبيق الروتيني.

ويجب حفظ جميع النباتات المصابة بالفيتوبلازما في البيوت المحمية أو غرف نمو للنباتات داخل المنشأة؛ والتي تكون حاصلة على رخصة من قبل السلطة المحلية لآفات الحجر الصحي. وقد تختلف المتطلبات المحلية عبر الدول، ولكن غالباً ما تكون محكومة بشكل صارم لمنع الإفراج عن المرض غير الطبيعي و/أو الحجر الصحي على البيئة المحلية. وبصفة عامة، ستكون هناك حاجة إلى ترخيص لنقل النبات المصاب وتسهيلات الفحص، ويمكن أن تحتاج هذه العملية إلى وقت طويل. ومع ذلك، فإن الالتزام الصارم بمتطلبات الحجر الزراعي أمر مهم.

وللبداء بمجموعة من النباتات المصابة بالفيتوبلازما، يمكن جمع النباتات من البيئة الطبيعية (إن كان أمراً ممكناً ومسموحاً به)، أو الحصول عليها من المجموعات الموجودة من جهات أخرى. كما أن عديداً من المجموعات البحثية تحتفظ بعزلات تعمل عليها، وغالبا ما تكون على استعداد لتوفير تلك النباتات أو الشتلات النباتية لباحثين آخرين.

وعليه، فإن جميع الطرق المستخدمة هنا خاضعة للإجراءات البستانية القياسية للحفاظ على النباتات ودعم تكاثرها. والنقطة البارزة فيما يتعلق بالنباتات المصابة بالفيتوبلازما هي التوزيع داخل النبات العائل. وهذا يعني أنه عند تكاثر النباتات الجديدة -بأي وسيلة كانت- فمن الضروري أن يتم اختبارها والتأكد من أن النباتات تنقل الفيتوبلازما قبل التخلص من النبات الأم الأكبر سناً. والطرق المستخدمة هنا هي: التطعيم داخل الأنواع نفسها؛ ولكن في بعض الحالات، يمكن نقل الفيتوبلازما من العائل الطبيعي إلى *C. roseus* عن طريق التطعيم بين الأنواع. ولتفويض ذلك الأمر، يجب اتباع البروتوكولات الموضحة هنا، رغم أن نسبة النجاح تكون أكبر بكثير إذا كانت أنواع النباتات أكثر تماثلاً في نوع الساق. وغالباً في عملية التطعيم عبر الأنواع، لن يستمر فرع النبات في النمو، وسيتم نقل الفيتوبلازما إلى الجذر عن طريق العصارة، وسوف يتم إزالة الفرع بعد ذلك.

٢- المواد:

يتطلب ذلك، توفر بيت محمي أو غرف بيئية مُحكمة للحفاظ على النباتات المصابة بالفيتوبلازما، ويجب أن يطابق أحدهما -على الأقل- مواصفات الحجر الصحي للكائنات. كما أن النباتات السليمة من نبات *C. roseus* ينبغي أن تكون في بيت محمي منفصل، أو يتم قصرها على النباتات المصابة بالفيتوبلازما فقط. وإذا لم يكن ذلك ممكناً، فيجب تجميعها على أن تكون مفصولة عن بعضها بعضاً قدر الإمكان. على سبيل المثال: أن تكون على طاوولات البيت المحمي، والأخرى تكون في نهاية الطاولة، كما أن حجم البيت المحمي سوف يحدد عدد النباتات التي يمكن الحفاظ عليها.

١-٢: زراعة نباتات *C. roseus* السليمة من البذور:

١. علبة بذور بلاستيكية.
٢. غطاء بلاستيكي شفاف (به منفذ لخروج الهواء) يتناسب مع علبة البذور.
٣. أوانٍ بلاستيكية للنباتات (قطرها ٩ سم) (انظر: الملاحظة ٢).
٤. صحن نباتات مناسب للأواني (انظر: الملاحظة ٢).
٥. معلمات على النباتات.
٦. أقلام.

٧. أداة زراعة البذور (انظر: الملاحظة ٣).
٨. البذور الأصلية وأسمدة.
٩. البيرلايت.
١٠. بذور نباتات *C. roseus* (انظر: الملاحظة ٤).

٢-٢: التعامل مع نباتات *C. roseus* النامية:

١. أصيص بلاستيك للنباتات (أحجام مختلفة) (انظر: الملاحظة ٢).
٢. مزيج سماد الاستخدامات لتسميد النباتات.
٣. البيرلايت.
٤. شفرات حادة، أو المشرط (مثل: Swann Morton رقم ١٠ أو ٢٢).
٥. إيثانول بتركيز ١٠٠٪ (إذا كنت تستخدم مقصات التقليم).
٦. إناء للتخلص من الأدوات الحادة (إذا كنت تستخدم شفرات مشرط).
٧. أسمدة نباتية.



الشكل (٢): المعدات اللازمة لأخذ الشتلات وإجراء عمليات التطعيم، والتي تشمل على: وعاء للبذور، وغطاء مزود بفتحة، وصحون للنباتات، وأكياس بلاستيكية شفافة، وقصبات للنباتات، وملصقات للنباتات، بارافيلم®، وشرائط بلاستيكية، وشفرات أو مشارط معقمة، بالإضافة إلى قلم تحديد دائم.

٢-٣: تكاثر النباتات بواسطة الشتلات (الشكل ٢):

١. مقصات للتقليم، وشفرات أو مشارط معقمة (مثل: Swann Morton رقم ١٠ أو ٢٢).
٢. الإيثانول بتركيز ١٠٠٪ (إذا كنت تستخدم مقصات التقليم).
٣. إناء للتخلص من الأدوات الحادة (إذا كنت تستخدم شفرات مشرط).
٤. مزيج سماد الاستخدامات لتسميد النباتات.
٥. البيرلايت.
٦. أصيص نباتي بلاستيكي (حوالي قطر ٩ سم) (انظر: الملاحظة ٢).
٧. علبة البذور البلاستيكية.
٨. غطاء بلاستيكي شفاف (مع منفذ لخروج الهواء) يتناسب مع علبة البذور.
٩. ملصقات للنباتات.
١٠. قلم تحديد دائم.
١١. مسحوق أو محلول للهرمونات تجذير (اختياري).
١٢. أداة غرز (انظر: الملاحظة ٣).

٢-٤: تكاثر النباتات بواسطة التطعيم:

١. نباتات *C. roseus* سليمة بعمر يتراوح ما بين ٦-٨ أسابيع تقريبا.
٢. النبات المصاب بالفيتوبلازما للتكاثر.
٣. صحن وعائي للنباتات.
٤. قصابات صغيرة للنباتات.
٥. أكياس بلاستيكية شفافة (حوالي ٢٠ × ٣٠ سم).
٦. أربطة مرنة.
٧. شفرات أو مشارط معقمة (على سبيل المثال: Swann Morton رقم 10A أو ٢٢).
٨. شريط من بارافيلم M® (بعرض ٣٨ مم على الأقل).
٩. إناء للتخلص من الأدوات الحادة.
١٠. قلم تحديد دائم.

٣- طرق العمل:

٣-١: زراعة نبات *C. roseus* من بذور سليمة:

١. قم بخلط ما بين ٢٥ و ٥٠٪ من البيرلايت بالبذور والتربة الزراعية (انظر: الملاحظة ٥). وضع الخليط بطبق البذور، ثم اضغط على الطبقة برفق؛ وذلك لضغط التربة الزراعية.

٢. قم بترطيب خليط التربة الزراعية في صنية البذور؛ إما بتركه في صنية ماء؛ وذلك بترك التربة الزراعية تقوم بإدمصاص الماء، أو بترطبيه بلطف من الأعلى باستخدام وعاء من أوعية الترتيب الخاصة المعدة لذلك (انظر: الملاحظة ٦).
٣. قم برفق بزراعة بذور نباتات *C. roseus* (L.) G. Don، ثم غطها بطبقة من طبقات التربة الزراعية، وضع عليها ملصقاً يوضح تاريخ الزراعة وكافة المعلومات.
٤. قم بوضع الصنية في البيت المحمي في درجة حرارة 20°C تحت ضوء النهار العادي حتى تثبت.
٥. بمجرد نمو النباتات، تكون أول مجموعة من الأوراق الحقيقية (التي تثبت بعد أوراق الفلقية) جاهزة للغرس.
٦. قم بإعداد الأضيص الفردي بخليط التربة الزراعية، كما هو الحال في الخطوة ١، ولا تملأ الأضيص - تماماً - بالخليط، اترك فراغاً مقداره ٢ سم من الحافة لتسهيل عملية ري النباتات، وقم باستخدام أداة حفر لعمل ثقب في وسط التربة، يكون قطره حوالي ٣ سم، وعمقه ٣ سم أيضاً.
٧. قم بإزالة النباتات، وضعها في أضيص فردي، حيث يتم إزالة النبات - فقط - بمسك الأوراق الفلقية وليس الساق أو الأوراق الحقيقية، ويمكن استخدام أداة الحفر في تحرير التربة الزراعية حول الجذور، ويتم استخدامها - أيضاً - في رفع الجذور إلى الأضيص الآخر.
٨. قم بنقل النباتات (النباتات الصغيرة) في الحفرة التي تم إنشاؤها في الأوعية الفردية، واستخدام أداة الحفر لوضع التربة الزراعية حول الجذور وتوزيعها بطريقة مناسبة باستخدام أصابعك، ويجب أن نحافظ على مستوى التربة وتركيزها حول الجذور، كما كان في علبة البذور.
٩. قم بري الأواني بلطف لتسوية التربة، وقم بزيادة مزيج التربة إذا لزم الأمر.
١٠. ضع النباتات في البيت المحمي، واطرها لتتمو حتى تتكون جذورها بطريقة جيدة.

٣-٢: الحفاظ على نباتات *C. roseus* النامية:

للحفاظ على كل من النباتات السليمة والنباتات المصابة بالفيتوبلازما (بمجرد نموها)، ينبغي اتباع تلك الطريقة. وهي من ضمن الممارسات السليمة للحفاظ - بشكل دائم - على مخزون من النباتات السليمة الأصلية التي يمكن بعد ذلك استخدامها لإنتاج نباتات و/أو بذور بالطريقة المطلوبة. ويتم استخدام النباتات السليمة الصغيرة التي تثبت من الشتلات مصدراً لطعوم أساسية؛ لزيادة مخزون النباتات المصابة بالفيتوبلازما والحفاظ عليها (الشكل ٣). ومن الأفضل الحفاظ على ما لا يقل عن ثلاث نباتات أساسية لكل عازلة من الفيتوبلازما؛ لأن بعض سلالات الفيتوبلازما قد

تكون سببا في موت النبات بسرعة كبيرة، وإذا كانت هناك حاجة إلى نباتات إضافية مصابة بالفيتوبلازما، فيمكن إنتاجها إما من خلال الشتل أو التطعيم، وسوف تكون أكثر نجاحا. ١. في المقام الأول، يتم تحديد ظروف البيوت المحمية لنمو النباتات السليمة من *C. roseus*. وبما أن معظم الفيتوبلازما توجد بشكل طبيعي في المناطق المعتدلة، فإن الظروف المناسبة لنباتات *C. roseus* تبدو مناسبة - أيضاً - للحفاظ عليها لفترات طويلة في معظم سلالات الفيتوبلازما. ومع ذلك وبشكل استثنائي، قد تحتاج بعض السلالات إلى ظروف مختلفة. وينبغي أن تتراوح درجة الحرارة أثناء النهار ما بين ٢٤ و ٢٨ درجة مئوية، و ليلا ١٦ درجة مئوية حداً أدنى، وهذا يتوقف على البلد ووقت السنة، وقد يتطلب هذا الأمر تبريداً صناعياً و/أو تدفئة (انظر: الملاحظة ٧). كما نعلم أن النباتات تحتاج ١٦ ساعة من ضوء النهار. ولذلك، ستكون هناك حاجة إلى إضاءة إضافية لفترات متفاوتة من الوقت حسب الوقت من السنة والبلد، ولا توجد هناك حاجة للتحكم في درجة الرطوبة.



الشكل (٣): نباتات *C. roseus* السليمة. على اليسار: النبات الأم والمصدر، وعلى اليمين: شتلة لنبات صغير مزروع بالعقل من النبات الأم.

٢. يجب ري النباتات بالماء بالقرب من درجة الحرارة المحيطة. والنباتات - على الأرجح - تحتاج إلى ري كل يومين، كما أن نباتات *C. rosrus* لا تحتاج إلى كميات كبيرة من المياه في التربة. لذلك، فهناك اختلاف إذ تحتاج النباتات الصغيرة إلى كميات أقل من المياه عن النباتات القائمة الكبيرة، وإذا تم ري النبات بكميات أكبر من الماء فيمكن أن تتعفن الجذور ويموت النبات. ولتحديد إن كان النبات يحتاج للري يمكن لمس التربة للشعور بدرجة

- رطوبتها، أو بالخبرة المكتسبة، ويمكن استخدام طريقة وزن الأصبص. ويعتمد ذلك على تجهيز البيت المحمي، كما يمكن أن يتم ري النباتات من الأعلى (مباشرة في الأصبص)، أو من الأسفل باستخدام صحن النباتات (انظر: الملاحظة ٨).
٣. يجب إضافة الأسمدة النباتية للنباتات التي تم زراعتها أسبوعياً، والتي تكون متاحة على نطاق تجاري، مع اتباع توصيات المصنع للأسمدة (انظر: الملاحظة ٩).
٤. يجب فصل النباتات في جميع أنحاء المكان - قدر الإمكان - بحيث لا تكن متلامسة، ويكون هناك حد أدنى للبعد بين كل نبات، مما يساعد على الحد من انتشار الأمراض.
٥. ينبغي تقليم النباتات الكبيرة - حسب الحاجة - للحفاظ على النبات في حجم عملي ولتقوية النبات. ويمكن تقليم نباتات *C. roseus* بطريقة جائرة، ولكنها ستتمو مرة أخرى من الجذور الخشبية البنية. وعموماً، فإنه يمكن أن يكون التقليم مرتين أو ثلاث مرات في السنة كافياً، وكذلك يمكن التقليم مرة قبل بداية فصل الشتاء. ويراعى عند التقليم إما استخدام مقص التقليم (والذي يتم تطهيره دائماً عن طريق مسحه باستخدام الإيثانول بنسبة ١٠٠٪ بين كل نبات)، أو يتم استخدام شفرات المشروط. ويمكن القيام بالتقليم بدون تمزيق ساق النبات. وعند القطع يجب الحرص على أن يكون القطع - دائماً - فوق البرعم أو الورقة. وعند تقليم النبات يفضل أن تكون بشكل "كأس مفتوح"، مع الحفاظ على شكل النبات، ويكون في المركز مفتوحاً. وهذا يساعد على تدفق الهواء خلال النباتات مما يقلل من الإصابة بالأمراض. وينبغي إزالة أي ساق مريضة أو تالفة على النحو المطلوب طوال العام دون انتظار وقت التقليم (انظر: الملاحظة ١٠).
٦. يمكن أن تبقى النباتات في الأصص الكبيرة (قطر حوالي ٢٠ سم أو أكبر) لفترات طويلة من الزمن، ولا تحتاج إلى تدويرها إلى أصص أكبر. وعموماً، يمكن أن يتم إعادة نقلها مرة واحدة في السنة في أصص أكبر ببضعة سنتيمترات. فالنباتات الأصغر سناً تحتاج إلى نقلها إلى أصص أخرى حتى تصبح ثابتة، وربما مرتين أو ثلاث مرات في السنة، ولكن - فقط - زيادة تدريجية في حجم الأصبص. ويمكن استخدام خليط من التربة الزراعية التجاري المتعدد الأغراض المتاح تجارياً مع خلط ما يقرب من ١٠٪ البيرليت (انظر: الملاحظتين ٥ و ١١).
٧. إذا أصيبت النباتات بأي من الأمراض الشائعة، فيمكن التعامل معها بمبيد للأفات/مبيد للحشرات حسب توصيات الشركة المصنعة. كما أن الفحص المنتظم للنباتات للكشف عن الآفات مبكراً يعطي أفضل النتائج.
٨. يجب مراقبة النباتات داخل المجموعة بشكل روتيني وفحصها لوجود الفيتوبلازما بأي طريقة جزيئية تختارها (انظر: الفصول ١٤ و ١٥ و ١٦ و ١٧ و ١٨ و ١٩ و ٢٠ و ٢١ و ٢٢ و ٢٣ و ٢٤ و ٢٥ و ٢٦). وهذا مهم بشكل خاص عند زراعة نباتات جديدة عن طريق التطعيم، أو من خلال نمو

الشتلات لضمان انتقال الفيتوبلازما بنجاح. وينبغي -أيضا - إجراء فحص روتيني للنباتات السليمة.

٣-٣: تكاثر النباتات من خلال الشتلات:

ويمكن استخدام المشتل لنمو نباتات جديدة غير السليمة، أو نباتات أخرى مصابة بالفيتوبلازما؛ حيث تستخدم الطريقة نفسها. ومع ذلك، إذا تم عمل تكاثر للنباتات المصابة، يجب أن يتم ذلك داخل منطقة الحجر الزراعي.

١. قم بخلط ما بين ٢٥ و ٥٠% من البيرليت وخليط السماد عند زراعة البذور، وملء الأصبص، ثم اضغط برفق على المكان لضغط مزيج التربة الزراعية، ولا تقم بملء الأصبص إلى حافته، ولكن يجب ترك فراغ مقداره حوالي ٢ سم من الحافة للسماح بتسهيل عملية ري النباتات (انظر: الملاحظة ٥).

٢. قم باختيار ساق نبات من نباتات *C. roseus* المصابة بالفيتوبلازما أو أخرى سليمة غير مصابة، والمطلوب تكاثره. حدد برعماً نباتياً صغيراً - إن أمكن - غير مزهر، يظهر عليه بعض أعراض المرض (قدر الاستطاعة)، ويكون مستقيماً، وقطره ٢-٣ ملم، وطوله حوالي ٦-٨ سم، ثم يتم قطعه باستخدام شفرة المشروط المعقمة لإزالة البراعم من النبات الأصلي (انظر: الملاحظة ١٢)، (الشكل ٤A على اليسار).

٣. تجهيز البراعم من خلال قطع كل الأوراق بعناية (الزهور، والبراعم إذا وجدت) باستثناء أعلى ثلاثة أزواج من البراعم، وذلك باستخدام شفرة حادة ومعقمة للحصول على قطع دقيق (الشكل ٤A، الشكل على اليمين).

٤. قم بوضع ٣ سم من أسفل الساق في مركب تجذير هرموني. (اختياري) (انظر: الملاحظة ١٣).

٥. استخدام أداة الحفر لعمل حفرة حوالي ٥ سم على طول جانب أصبص النبات.

٦. أدخل القطع المعدة في الحفرة حتى يكون أخرى ٣ سم أعلى التربة الزراعية، وتكون الأوراق قريبة (ولكن أعلى قليلاً) من مستوى خليط التربة.

٧. قم بتنظيم سطح التربة وتسويته بلطف، ووضعه بالقرب من البراعم باستخدام أصابعك.

٨. كرر الخطوات ٢-٧، وضع أربع أو خمس عقل حول حافة الوعاء. تأكد من أن الأوراق لا تلمس بعضها بعضاً (الشكل ٤ ب).

٩. قم بوضع ملصق على الأصبص بتاريخ الشتلات أو العقل (انظر: الملاحظة ١٤).



الشكل (٤): يحدد السيقان التي سوف تستخدم للشتل أو لعملية تطعيم النبات. (أ) برعم مناسب تم قصه من النبات الأصلي (على اليسار)، وجرده من أوراقه ليكون به أوراق أقل (على اليمين)، (ب) أصيص به شتلات جاهزة للنمو.

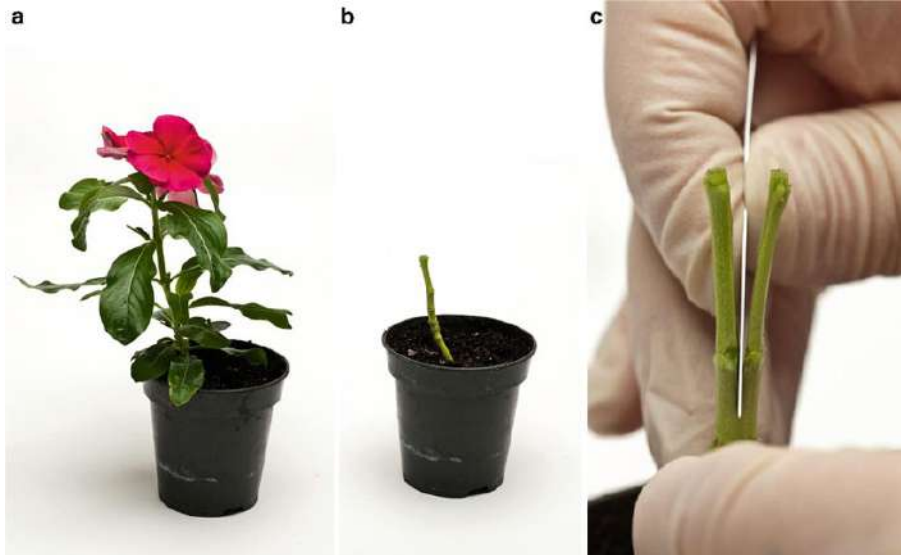
١٠. ضع الأصيص في صينية مناسبة بحيث تتناسب مع غطاء به فتحة مع إغلاق فتحة التهوية، وضعها في البيت المحمي في درجة حرارة 20°C على ضوء النهار العادي.
١١. قم بري النبات بلطف كما هو مطلوب - (مرتين تقريبا في الأسبوع) - (انظر: الملاحظة ١٥).
١٢. قم بفتح فتحة التهوية بعد أسبوع واحد، وإذا بدأت أي قطع بالتعفن أو الموت قم بإزالة هذه القطع بعناية بعيداً من الأصيص.
١٣. بمجرد تكوين الجذور (حوالي ٤ أسابيع)، انقلها إلى الأصيص الفردي (انظر: الملاحظة ١٦)، وللقيام بذلك، قم بإعداد الأصيص الفردية كما في الخطوة الأولى.
١٤. اضغط برفق على جوانب الأصيص، لتخفيف التربة الزراعية وتوزيعها على العقل، ضع أصابعك فوق الجزء العلوي من الوعاء لدعم العقل، اقلب الأصيص واضغط على الجزء السفلي من الأصيص بقوة، والضغط على الجانب لانزلاق التربة الزراعية في أماكنها في الأصيص.
١٥. قم بتقسيم التربة الزراعية بحيث يبقى كل قطع متجذر مرتبطاً بجذوره. قم برفعها بشكل فردي بعد الخطوات ٧-١٠ في العنوان الفرعي ٣.١.
١٦. بمجرد تكوين كامل الجذور في الأصيص الجديد، واكتمال النمو عندها يمكن استخدامها للتطعيم أو نباتاً سليماً (انظر: الملاحظة ١٧).

٣-٤: التكاثر عن طريق التطعيم:

الطريقة الموضحة أدناه، تعمل اتحاداً قميماً لتطعيم النبات، والذي يعد أسهل طريقة تعامل في التطعيم، ويعطي أفضل معدل انتقال، ويرجع ذلك إلى أن أسطح الطعوم النباتية متطابقة في العقل. كما يمكن استخدام التطعيم الوتدي الجانبي أو التطعيم من القمة؛ حيث يتم قطع كل طعم النبات بزاوية ٤٥ درجة، ويتم تثبيتهم جنباً إلى جنب بشريط خاص، وتعتبر هذه الطريقة البديلة الأكثر شيوعاً. ويمكن استخدام هذه الطرق لنقل الفيوتوبلازما بنجاح. ومع ذلك، فمن الصعب أحياناً - من الناحية الفنية - تحقيق نجاح التطعيم النبات بطريقة مثالية، كما يجب تحضير كل المعدات المطلوبة (الشكل ٢) قبل البدء في عملية التطعيم (انظر: الملاحظة ١٨).

٣-٤-١: إعداد الطعوم الجذرية:

١. يجب أولاً تحضير النبات السليم، والذي سيكون مصدر الطعوم (انظر: الملاحظة ١٩).
٢. يجب أخذ نبات صغير (حوالي ٦-٨ أسابيع من العمر)؛ بحيث تكون جذوره سليمة من نبات *C. roseus* (الشكل 5A) (انظر: الملاحظة ٢٠).
٣. يجب استخدام شفرة مشرط معقمة (انظر: الملاحظة ٢). قم بإزالة كل الأوراق من النبات من الساق بعناية شديدة. استخدام شفرة لضمان قطع دقيق في كل نقطة بدلا من حدوث أي قطع قد يؤدي إلى الإصابة بالمرض، كما يجب إزالة جميع السيقان بعيداً عن الجذع الرئيسي (انظر: الملاحظة ٢٢).



الشكل (٥): إعداد طعوم نباتية سليمة: (a) نبات صغير سليم، والذي سيكون النبات الأساسي. (b) ساق جُرِّدت من الأوراق. (c) قطع الساق للتحضير، ثم وضع طعم النبات.

٤. إزالة مناطق النمو من الساق الرئيسي، ومن ثم إجراء قطع أفقي للحد من نمو الساق بحوالي ١٠ سم من سطح التربة (الشكل 5b).

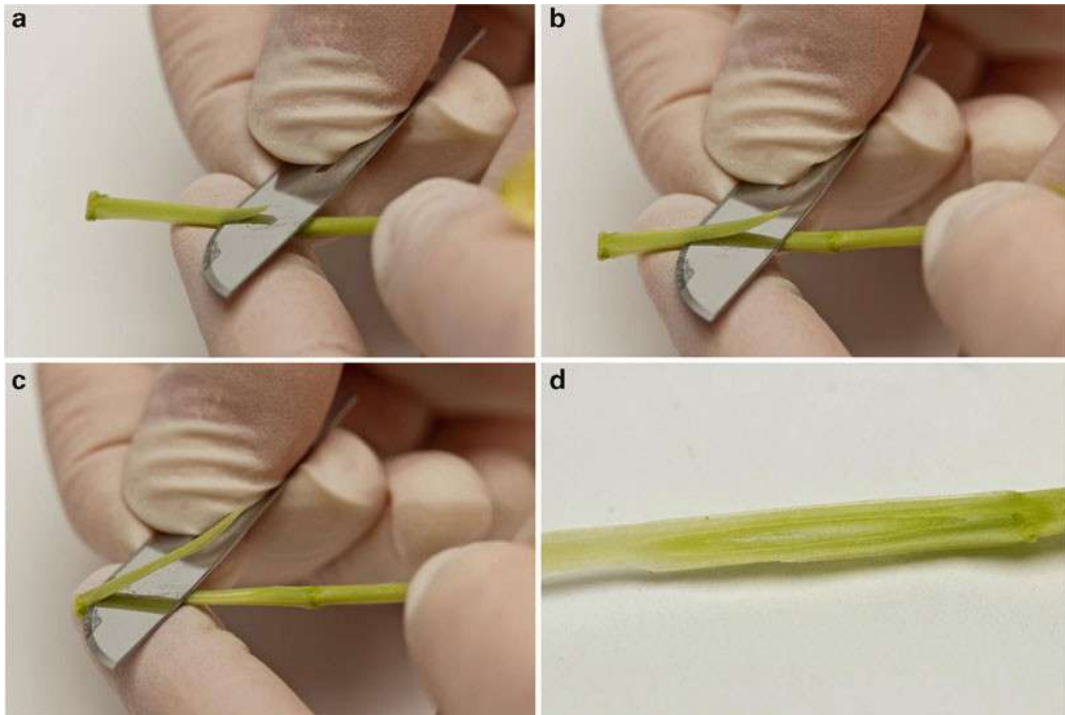
٥. قطع الساق رأسياً من الوسط بحوالي ٦ سم ليكون على الساق إلى شكل "V" (الشكل 5c) (انظر: الملاحظة ٢٣).

٣-٤-٢: إعداد البراعم التطعيم النباتية:

١. حدد الساق المناسب من النبات المصاب بالفيتوبلازما على نبات *C. roseus*؛ والذي يحتاج إلى تطعيم، وهذا سيكون أساس التطعيم النباتي.

٢. إذا كان ذلك ممكناً، حدد البراعم غير المزهرة؛ والتي تظهر بعض أعراض المرض عليها وتكون مستقيمة، وقطرها ٢-٣ ملم، وطولها حوالي ٦-٨ سم، باستخدام شفرة مشرط معقمة قم بالقطع لإزالة تلك البراعم من النبات الأم (الشكل 4a على اليسار) (انظر: الملاحظة ١٢).

٣. استخدام شفرة المشرط لإزالة الأوراق السفلية من الساق -لا تترك أي مواد خلفها- تاركاً أعلى ٢-٣ أزواج من الأوراق (شكل 4a).



الشكل (٦): مراحل إعداد الطعوم للتطعيم: (a-c) قطع العقلة لتجهيزها طعماً. (d) الجزء الداخلي مكشوف للطعم.

٤. الجزء السفلي من الساق (من ٤ - ٥ سم) يحتاج إلى قطع من "الجانبين" لكشف بنية الساق الداخلية، بلطف ممسكاً بالعقلة باستخدام يد واحدة، ثم اقطع تدريجياً الساق إلى عمق حوالي ٠,٥ - ١ ملم، ومنه تصبح العقلة بشكل مدبب في نهاية الساق. كرر الأمر على الجانب "المعكس" حتى تحصل على نهاية القطع حادة، وتنتهي في نقطة رقيقة مع اللحاء وطبقة والخشب على طول القطع. وقد يكون من الضروري عمل عديد من القطع. يجب أن تكون نهايات القطع رقيقة جداً للسماح بإدخالها طوعاً في النبات المراد تطعيمه (الشكل ٦).

٣-٤-٣: عمل التطعيم:

١. إدراج الطعوم في الساق الرئيسي للنبات السليم، ومن الممكن استخدام قمة المشروط لفتح القطع في الساق. وتأكد من أن منطقة القطع والطعم داخل الساق النباتي بالكامل. وإذا لزم الأمر، يمكن تعميق الطعم على طول الساق أو تقليص نهاية الطعم النباتي (الشكل 7a).

٢. يتم تدعيم الطعم داخل مركز الساق -عادة- بلف كامل منطقة القطع باستخدام البارافيلم (parafilm®) على الساق، وتأكد من اللف تحت منطقة القطع. وهناك حاجة إلى العناية لدعم الساق أثناء عملية لف البارافيلم وسحبه. ويتم لف البارافيلم على طول منطقة التطعيم بالكامل (الشكل 7b، c) (انظر: الملاحظة ٢٤).



الشكل (٧): عملية تطعيم الطعم في النبات السليم: (a) كيفية إدراج الطعم في الساق النباتي. (b) لف الساق والطعم بالبارافيلم. (c) جمع الطعم والساق بشكل كامل.

٣. قم بتسمية النبات المعد (اسم أصل النبات، وأصل الطعم النباتي).
٤. وضع ثلاث قصب متساوية البعد حول حافة الأصيص (انظر: الملاحظة ٢٥).
٥. ضع كيساً بلاستيكيًا شفافاً فوق الأقصاب ليحمي (الأصيص، والنبات)، مع وضع شريط مطاطي على الأصيص ليضمن الإغلاق التام (انظر: الملاحظة ٢٦) (الشكل ٨).
٦. قم بوضع الأصيص في طبق من الأطباق لتمكين عملية الري من الأسفل، ومن ثم ضعه في البيت المحمي على درجة حرارة ٢٠ مئوية حداً أقصى، وفي ضوء النهار الطبيعي (انظر: الملاحظة ٢٧).
٧. بعد ٣-٤ أيام، قم بعمل ثلاث فتحات صغيرة بالقرب من الجزء العلوي من الكيس، ويُترك النبات لينمو (انظر: الملاحظة ٢٨).
٨. بمجرد بدأ نمو التطعيمات الجديدة بشكل جيد (حوالي ٣-٤ أسابيع)، يكون النبات جاهزاً لإزالته من الكيس (انظر: الملاحظة ٢٩).
٩. قم بعمل عدة ثقوب كبيرة في الكيس البلاستيكي. واتركه لمدة ليلة واحدة حتى يتأقلم النبات مع الجو المحيط. وفي اليوم التالي، قم بإزالته من الغطاء البلاستيكي والقصبات (انظر: الملاحظة ٣٠).
١٠. اترك النبات لينمو وضعه في الأصيص، وذلك حسب الحاجة ٣,٢.



الشكل (٨): نبات مطعم بالكامل جاهز للنمو.

٤- الملاحظات:

١. يجب تحديد المبيدات العلاجية للآفات التي سيتم استخدامها حسب البلد؛ حيث إنه لم تتم كتابة أي تقارير حول المعاملات بالمبيدات (مثل: رش الأوراق، أو إضافتها بالتربة) للقضاء على الفيثوبلازما على نبات *C. roseus*. وللقيام بذلك، قم بإنتاج كميات إضافية من النباتات المصابة بالفيثوبلازما من أجل التجارب، و قم بتجميع النباتات، ومن ثم يتم معاملتها بالمبيدات وفقا لتعليمات الشركة المصنعة. وأيضا - قم باختبار النبات للتأكد من وجود الفيثوبلازما قبل معاملتها على فترات بعد معاملتها للتأكد من أن الفيثوبلازما لا تزال موجودة.
٢. قد يتم استخدام الأواني أو الأصبص المصنوعة من الطين بالرغم من أن الأواني البلاستيكية أسهل من حيث التعقيم والتطهير (من خلال تعقيمها بالأوتوكليف). لذلك، يفضل استخدام الأواني البلاستيكية. ومن أهم مزايا الأصبص الطينية قدرتها على ادمصاص نسبة من الرطوبة وحفظها، وهذا يعني أن جذور النبات لن تجف بسهولة. لهذا السبب (وخاصة في المناخ الحار)، يفضل استخدام الأصبص الطينية بالنسبة لنباتات المصدر الأصلية والأمهات.
٣. يتم استخدام حفار صغير (dibber). وهو عبارة عن عصا مدببة مصنوعة من الخشب أو البلاستيك لعمل حفرة في السماد أو التربة، وذلك لزراعة النباتات أو البذور دون إتلاف للجذور. ويتوفر -غالباً - الديبر في أحواض الحدائق؛ وإن لم يكن متوفراً يمكن استخدام عود مدبب أو قلم مكانه.
٤. هناك عديد من مصادر بذور *C. rosues* متوفرة لدى الموردين التجاريين. وبمجرد استكمال نمو النباتات السليمة إلى حد إنتاج البذور، يمكن جمع بذورها وتخزينها. ويجب إعطاء فرصة لنمو الزهور على النبات وبمجرد نضجها يتم حصاد قرون البذور ويتم إزالتها بعناية، ثم يتم فتحها للحصول على البذور. ويتم فصل أي مخلفات عن البذور، ثم توضع في مغلف ورقي صغير جاف، وفي جو بارد جاف (يفضل أن يكون في الثلاجة في أكياس من السليكا). إن البذور التي تم جمعها وتخزينها بتلك الطريقة ستظل صالحة طالما هناك بذور تجارية، ويجب أن تُستخدم خلال ستة أشهر من تخزينها. وقد تكون نسبة نجاح إنباتها ضئيلة.
٥. يتم إضافة البيرلايت إلى السماد للمساعدة في تحسين الصرف في الأصبص. ويمكن - أيضا - استخدام حبيبات الحصى أو الفيرميكوليت لهذا الغرض. ويضاف -غالباً- بنسبة ٢٥-٥٠% للنباتات الصغيرة، و ١٠% للنباتات الكبيرة.
٦. تتم إضافة الماء إلى التربة الزراعية قبل وضع البذور؛ حيث إن إضافة الماء إليه من أعلى بعد إضافة البذور يجعل من السهل غسيل البذور أو إعادة توزيعها على حواف الصينية بمجرد زراعتها، وهذا غير مقبول.
٧. يمكن خلال فترة الشتاء استخدام -إذا تطلب الأمر- أكياس عازلة من الفقاعات الهوائية، ووضعها على الجوانب الداخلية للبيت المحمي؛ لتقليل تسرب الحرارة، وللحد من تكاليف التدفئة، بحيث لا تلامس هذه الأكياس النباتات.

٨. يجب أن تكون درجة حرارة الماء قريبة من درجة حرارة البيئة المحيطة لتجنب حدوث أي صدمات للنباتات. وقد يكون من الضروري -في بعض الحالات- تخزين المياه داخل البيت المحمي (مثال: في برميل ماء، أو خزانات)، والسبب أنه إذا تم ري الماء في الشتاء عن طريق الأنابيب الخارجية تصبح باردة جدا. ويجب تجنب تناثر الماء على أوراق النبات عند الري، لأن ذلك قد يؤدي إلى تلف أوراق النباتات. ويمكن ري النباتات في الصباح حتى يتبخر الماء الزائد خلال اليوم؛ لأن الماء الزائد يعمل على رفع درجة الرطوبة؛ والتي تؤدي إلى ظهور الأمراض في البيت المحمي. وإن تم وضع النباتات على طاولات (حيث تكون أسهل في الري)، يجب تجنب نقل الأصيل كثيراً؛ لأن هذا الأمر يحد من الاتصال بين الجذر وأرضية البيت المحمي، ويحد - أيضاً - من امتصاص النبات للماء؛ مما يؤخر تثبيت النبات مرة أخرى. وفي حالة استخدام الصحنون تحت النباتات لا تدعها تمكث طويلاً بالماء.
٩. يجب عدم إضافة كمية كبيرة من الأسمدة إلى النباتات؛ لأن ذلك قد يسبب عديداً من الأضرار. وعند زرع النباتات في تربة زراعية غنية بالسماذ، يجب ألا يضاف السماذ المغذي لمدة ٦ أسابيع؛ وذلك لأن التربة يوجد بها سماذ. وبعض السلالات من الفيتوبلازما -على وجه الخصوص- يمكن أن تسبب اصفراراً أو ابيضاضاً للأوراق التي تبدو مثل: نقص العناصر. ومع ذلك، إذا كانت النباتات يُجرى لها تسميدٌ بانتظام، فلا حاجة لأي معاملة أخرى.
١٠. تقليم النباتات قبل الشتاء يقلل من تحميل الأوراق ويزيل الأنسجة الميتة أو المريضة، ويمكن أن تكون النباتات قد تعرضت لمزيد من الأمراض في فصل الشتاء، لذا فأمر التقليم يعد إجراءً وقائياً مهماً. ويجب تقليم النبات دائماً إلى البراعم أو الأوراق؛ بحيث لا يترك هذا الجزء من الساق للموت الرجعي. وفي بعض الأحيان، قد ينتج من النباتات الكبيرة بعض الأمراض التي تؤدي إلى موت السيقان، رغم أن النبات سليم. وإذا حدث ذلك، يجب إزالة الساق بأكملها حتى القاعدة. وعادة، ما يستعيد النبات وظائفه وينمو بطريقة سليمة.
١١. في حالة تدوير نبات *C. roseus* من أصيص إلى أخرى، يجب أن يكون التدوير بلطف، مع مراعاة عدم تقطيع الجذور إلى أجزاء.
١٢. إذا لم تتواجد على الساق براعم أو لم تكن غير مزهرة، فيجب اختيار ساق عليها أزهار وبراعم قليلة. ثم بعد ذلك، تتم محاولة إزالة الزهور بلطف من الساق، وقطع القمة النامية لطرف الساق. ومع ذلك، فإن الطعم لا بد أن يكون قطره مماثلاً لساق. وإذا لم يكن ذلك ممكناً، إذا كان الطعم لا بد أن يكون مماثلاً للساق، ولا يكون الطعم أكبر. إن السيقان التي تظهر بعض أعراض الفيتوبلازما تكون أفضل في نقل الفيتوبلازما، ولكن ليس كل سلالات الفيتوبلازما تسبب أعراضاً على نباتات *C. roseus*. وفي هذه الحالة، يجب تحديد براعم صغيرة سليمة. وميل البراعم القديمة إلى الانتشار بشكل أقل. كما يجب الحذر عند التعامل مع البراعم الصغيرة أثناء تطعيم النباتات.

١٣. يمكن استخدام هرمونات التجذير إذا كانت النباتات في حاجة لذلك. ونباتات *C. roseus* يمكنها تكوينها للجذور بطريقة جيدة بدون الحاجة لذلك، ولكن استخدام تلك الهرمونات قد يزيد من سرعة نمو الجذور.
١٤. يجب أن يكون لكل فيتوبلازما ونبات داخل المجموعة تسمية خاصة، ويفضل ذلك عند التكاثر؛ حيث يساعد ذلك في تسجيل النبات، ومعرفة مصدر النبات والفيتوبلازما، خصوصا عند التطعيم إلى أكثر من النبات، أو في حالة العزلات المتعددة من الفيثوبلازما.
١٥. كن حريصا جدا أثناء ري النباتات، فلا يجب زيادة كمية الماء، لأن هذا قد يسبب موت الجذور وتعفنهما. ولا تترك الأصيل فترات طويلة في المياه.
١٦. لمعرفة ما إذا كانت الشتلات متجذرة، انظر: في الجزء السفلي من الأصيل، وابحث عن أي جذور بيضاء تخرج من فتحات الأصيل. وعند رؤية ذلك، فسيكون ذلك دليلا على أن الشتلات متجذرة بشكل جيد، وعلى استعداد لتدويرها إلى أصيص أخرى.
١٧. إذا كان النبات جاهزا مصدرًا للطعوم، فمن المفضل أن يكون النبات له ساق واحدة أساسية. وفي هذه الحالة، يترك النبات ينمو بطريقة سليمة، حيث إن هذا يساعد على أن يقوى النبات وينمو. ومع ذلك، إذا كان النبات سوف تستخدم طعوماً أو أمهات، فيجب أن تتم إزالة الأجزاء المتنامية؛ بحيث يكون النبات بحجم معقول، وألا يزيد طوله (عن ١٠-١٢ سم)؛ وذلك لتعزيز نمو السيقان الجانبية، مما سيعطي للنبات شكلاً مستديراً وشكلاً أفضل.
١٨. الميزة الإيجابية لاستخدام "طريقة التطعيم الوتدي أو التطعيم الجانبي"، أنه يكون لدينا طرق سهلة ومختلفة من التطعيم النباتي. وهذا قد يؤدي إلى زيادة "تركيز" الفيثوبلازما أو القيام بعمل نبات يحتوي على خليط نوعين من الفيثوبلازما معا. وإذا كانت هذه هي النتيجة المطلوبة، فإنه يتم إزالة القمة النامية من الساق الرئيسي في حالة النبات الصغير (بطول حوالي ٥ سم)، والذي سوف يزيد من عدد الأفرع في النبات. وبمجرد أن تبدأ عملية التطعيم، يجب ألا تتوقف وتكون العمليات متواصلة في الوقت واحد من قطع النبات الأم /السيقان، وأيضا الطعوم بعد قطعها. وذلك للحد من حدوث جفاف في الأجزاء المقطوعة من النبات، والتي إذا أصبحت جافة قد تجعل عملية التطعيم غير ناجحة.
١٩. يجب توخي الحذر الشديد عند التطعيم، وخصوصا عند قطع السيقان النباتية، وقطع الطعوم النباتية لتجنب أي إصابات.
٢٠. ينبغي أن تكون السيقان المستخدمة ناتجة من النباتات الأمهات السليمة أو النباتات النامية عن طريق البذور. وينبغي أن تكون هذه النباتات خالية من الفيثوبلازما؛ وذلك باختبارها بشكل متكرر. وإذا رغبت التأكيد، فيمكن جمع عينة من أوراق النبات المعد للتطعيم واستخدامها في اختبار للتأكد على أن النباتات خالية من الفيثوبلازما قبل عملية التطعيم. ويجب أن تكون سيقان النباتات المستخدمة في عملية التطعيم بعمر ١٢-١٤ أسبوعاً تقريباً. وبمجرد تخشب

الساق الرئيسي في النبات، سيكون من الصعب أن تنمو طعوم النبات، وعندها لا يمكن أن تستخدم النبات في هذه المرحلة.

٢١. يجب استخدام مشروط واحد لكل نبات (للسيقان السليمة، وكل النباتات المصابة بالفيتوبلازما التي سوف تستخدم طعاماً)؛ وذلك لمنع انتشار أي أمراض أخرى (مثل: الفيروسات)؛ والتي قد تسبب الموت للنباتات. ويمكن استخدام المشارط وحدها أو الشفرات التي تكون على مقص عملية التطعيم، وذلك يعتمد على المستخدم. ومعظم الناس يجدون أن استخدام شفرة واحدة فقط تسمح بأقصى قدر من التحكم في إجراء عملية التطعيم.

٢٢. إن إزالة أغلب الأوراق والسيقان (بخلاف الجذع الرئيسي) من النباتات تساعد على نقل الفيتوبلازما وانتشارها من الطعم إلى النبات بأكمله. لكن إذا كان النبات كبيرة وقت عملية التطعيم فسوف يقل انتشار الفيتوبلازما، وهذا يمكن أن يؤخر من انتشارها في جميع أنحاء النبات.

٢٣. إن وضع طعم إلى أسفل ما يمكن من ساق النبات يضمن أن النبات المطعم سيكون مستقرًا وينمو بشكل كامل.

٢٤. يمنع البارافيلم تعرض عملية التطعيم إلى الجفاف؛ والذي قد يؤدي إلى فشل عملية التطعيم بأكملها. وهذا يحتاج إلى التطبيق بحذر، ويكون على امتداد النبات؛ بحيث يلتصق مع نفسه، وفي الوقت نفسه يلتف حول الساق الرئيسي.

٢٥. الغرض من القصبات هو منع كيس البلاستيك من لمس النبات؛ لأن هذا قد يسبب تلوث النبات وتلفه.

٢٦. حجم الكيس البلاستيكي يختلف تبعاً لحجم النبات، والأصيص، والقصبات المستخدمة. تأكد من أن الشريط المطاطي يغلق الكيس البلاستيكي على نحو متكامل وبإحكام. ومن الضروري الحفاظ على الرطوبة العالية في الأيام الأولى بعد التطعيم. وإذا لم يتم الحفاظ على هذا فقد تفشل العملية بأكملها.

٢٧. يجب نقل النباتات إلى البيت المحمي؛ حيث يتم الاحتفاظ -أيضاً- بالنبات الأم الأصلي.

٢٨. في بعض الأحيان، قد يهلك الشريط المرن قبل أن يكون النبات جاهزاً لإزالته من الكيس البلاستيكي. وإذا كان هذا هو الحال، فيجب استبداله سريعاً. وتسمح الثقوب للهواء النقي بالدخول للكيس، ولكن لا تزال تحافظ على بيئة عالية من الرطوبة. وإذا كان هناك ذبول مفرط في الطعم، فيتم إزالة الكيس لمدة تصل إلى أسبوع واحد. وفي بعض الأحيان، قد يفشل الطعم في النمو، وقد يصل الحال إلى الموت عادة في غضون أول أسبوعين. وفي هذه الحالة، تجاهل النبات؛ حيث إن الفيتوبلازما من غير المرجح أن يكون قد تم نقلها. وبمجرد الحصول على الخبرة الكافية في التطعيم، تكون معظم عمليات التطعيم تصل إلى تحقيق نسبة نجاح ١٠٠٪.

٢٩. للتأكد من أن الطعم النباتي بعد التطعيم ينمو وينشط، لاحظ أن الطعم ينمو في القمة ويُنتج أوراقاً جديدة، كما أن الساق قد بدأت -أيضاً- بإعادة النمو من قاعدتها الرئيسية.

٣٠. يتطلب النبات المصاب التآكل مع الظروف البيئية المحيطة قبل الإزالة الكاملة للكيس؛ وذلك تجنباً لمنع الصدمة؛ مما قد يسبب الضرر للنبات أو موته.

الشكر والتقدير:

نوجه بالغ الشكر والتقدير للبروفيسور فيل جونز، وموظفي البستنة في جامعة نوتنغهام، ووكالة أبحاث الأغذية والبيئة للتدريب والتوجيه؛ المقدمة بشأن عمل مجموعات الفيتوبلازما وصيانتها. ونود -أيضاً- أن نشكر جميع الباحثين والمنظمات؛ والذين قدموا لنا عينات النبات المصابة بالفيتوبلازما.

المراجع:

1. Seemuller E et al (1998) Current status of molecular classification of the phytoplasmas. J Plant Pathol 80:3-26
2. Choi YH et al (2004) Metabolic discrimination of *Catharanthus roseus* leaves infected by phytoplasma using ¹H-NMR spectroscopy and multivariate data analysis. Plant Physiol 135: 2398-2410
3. Favali MA et al (2004) *Catharanthus roseus* L. plants and explants infected with phytoplasmas: alkaloid production and structural observations. Protoplasma 223:45-51
4. Pati PK, Kaur J, Singh P (2011) A liquid culture system for shoot proliferation and analysis of pharmaceutically active constituents of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. Plant Cell Tissue Organ Cult 105:299-307
5. Aslam J et al (2010) *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. an important drug: its applications and production. Pharm Glob 1:1-16
6. Abdul JA et al (2007) Antioxidant potentials and ajmalicine accumulation in *Catharanthus roseus* after treatment with gibberellic acid. Colloids Surf 60:195-200
7. Gupta S et al (2007) Construction of genetic linkage map of the medicinal and ornamental plant *Catharanthus roseus*. J Genet 86: 259-268
8. Lee I-M et al (2004) 'Candidatus Phytoplasma asteris', a novel phytoplasma taxon associated with aster yellows and related diseases. Int J Syst Evol Microbiol 54:1037-1048
9. Kakizawa S (2008) Genome sequencing and analysis of cell surface membrane proteins of phytoplasmas. J Gen Plant Pathol 74:457-548
10. Berges R, Rott M, Seemüller E (2000) Range of phytoplasma concentrations in various plant hosts as determined by competitive polymerase chain reaction. Phytopathology 90:1145-1152

التكاثر والحفاظ على الفيتوبلازما عن طريق عملية زراعة الأنسجة

Assunta Bertaccini, Samanta Paltrinieri, Marta Martini, Mara Tedeschi, and Nicoletta Contaldo

الملخص:

إن المحافظة على سلالات الفيتوبلازما في زراعة الأنسجة أمر يمكن تحقيقه لكافة السلالات التي تنتقل إلى نبات الوينكا (*Catharanthus roseus*)، وأيضاً بالنسبة لغيره من أنواع العوائل النباتية المصابة طبيعياً. إن البراعم التي يبلغ طولها 1-3 سم يمكن تنميتها في وسط غذائي صلب يحتوي على عناصر صغرى وكبرى تسمى: البيئة (MS، Murashige and Skoog) مع 0.12 ملي/جرام من (benzylaminopurine). ويمكن استمرار الفيتوبلازما في البراعم المصابة لنبات الوينكا التي تم الحفاظ عليها في عملية تكاثر بزراعة الأنسجة لمدة 20 عاماً، ويمكن التحقق من ذلك من خلال طرق التشخيص، مثل اختبارات nested PCR باستخدام جين 16S rDNA (انظر: الفصول 14، 15، 16، 17، 18، 19، 20، 21، 22، 23، 24، 25، 26 لطرق تشخيص الفيتوبلازما).

الكلمات المفتاحية: 16S rDNA الحمض النووي الريبوسومي، المجموعات، التكاثر بالأنسجة، تحديد السلالة.

1- المقدمة:

الفيتوبلازما عبارة عن كائن ليس به نواة حقيقية ويفتقر للجدار الخلوي، كما أنها من أهم مسببات عديد من الأمراض النباتية التي تسبب خسائر كبيرة للمحاصيل الزراعية، وأضراراً جسيمة للنباتات بشكل عام. وفي الأساس، يستند تحديد الفيتوبلازما على الحمض النووي RNA الريبوسومي 16S، وعلى جينات أخرى مثل: عامل استطالة الترجمة (translation elongation factor) *tuf*، وإنزيم البروتين *secY* (protein translocase subunit)، والجينات المتصلة بالبروتين الريبوسومي *rp* (ribosomal protein)، والتسلسل الجيني 16S-23S، وتحت وحدة إنزيم البروتين (protein

(*secA* translocase subunit، وجينات *groEL* (1-8)). ومع ذلك، فإن الحفاظ على سلالات مختلفة عند زراعة الأنسجة لاستخدامها سلالات مرجعية للدراسات المتعلقة بالتفاعلات مع العائل للمرض قد طورت أساليب تشخيص جديدة، تساعد في البحث عن طريقة للقضاء على إصابات الفيتوبلازما على المحاصيل، وهذا يعتبر شرطاً أساسياً في البحث.

ويمكن التعامل مع البراعم المصابة بالفيتوبلازما من الأنواع المختلفة على المدى الطويل باستخدام التكاثر النسيجي. وينطبق البروتوكول الموضح هنا على نبات *Catharanthus roseus* (الوينكا)؛ فقد تكون هناك حاجة لإعداد وسط غذائي معين من أجل أنواع النباتات الأخرى (9-12). وتعد بعض أنواع الفيتوبلازما خطيرة، وتختلف بشكل كبير خاصة عندما تدخل في عملية التكاثر النسيجي وطول فترة عمر البراعم؛ إلا أن التلوث بالكائنات الحية مثل الخمائر -أو غيرها من البكتيريا في الوسط الغذائي- يتطلب استخدام المضادات الحيوية أو المواد الكيميائية الأخرى المخصصة للقضاء على هذه الكائنات. ويفترض تجنب استخدام التتراسيكلين في كل خطوة من خطوات التكاثر؛ لتفادي إخراج الفيتوبلازما من البراعم دون قصد (13). ومع ذلك، أحيانا تحدث إزالة غير مقصودة للفيتوبلازما عند استخدام بعض المضادات الحيوية التي لا تهدف للقضاء على الفيتوبلازما في الوسط الغذائي، وقد ورد ذلك فيما يخص الفيتوبلازما والفيروسات (14-17). ولقد تم العثور على توزيع غير متكافئ للفيتوبلازما في البراعم المستخدمة في التكاثر النسيجي، الأمر الذي وضحته دراسات أجريت على براعم شجر الفاكهة المصاب بالفيتوبلازما. وهكذا، يمكن الحصول على مواد للتكاثر النسيجي الخالي من الفيتوبلازما من إنسية النبات الأصلي المصاب، ولكن لا يمكن تقييم هذا الأمر إلا من خلال استخدام تحليل دقيق بأساليب كشف (جزيئية) حساسة للغاية، (انظر: الفصول 21 و 22 و 23). إن براعم الوينكا يتم زراعتها في وسط غذائي صلب باستخدام بيئة (Murashige and Skoog) (18)، مع تعديل بسيط عليها (19)، وتُحفظ في غرفة خاصة للنمو مع تحكم في الإضاءة ودرجة الحرارة، كما وصفت سابقا (20، 21). والتكاثر النسيجي لبراعم نبات الوينكا المصابة تعتبر طريقة مثلى للحفاظ على سلالات الفيتوبلازما على المدى الطويل؛ فقد تم إثبات الحفاظ على سلالات الفيتوبلازما على المدى الطويل في زراعة الأنسجة من خلال أساليب PCR/RFLP (22). ومع ذلك، يجب فحص تلك البراعم المستخدمة في عملية زراعة الأنسجة بشكل دوري لإثبات وجود الفيتوبلازما بها.

٢- المواد:

1. براعم نبات الوينكا (*C.roseus*) مصابة بالفيتوبلازما؛ والتي نقلت بواسطة الحشرات، الحامول، أو التطعيم (انظر: الملاحظة 1).
2. أنابيب زجاجية (2×20 سم مع أغشية معدنية)، أو أنابيب من نوع Magenta®.
3. ميزان (ذو أربعة أرقام عشرية).

٤. ميزان (ذو رقمين عشريين).
٥. مزيج من العناصر الكبرى: ١٧٠ مجم NaH_2PO_4 ، ١٦٥٠ مجم HH_4NO_3 ، ٤٤٠ مجم $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ، ١٩٠٠ مجم KNO_3 ، ٣٧٠ مجم $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ، ١٧٠ مجم KH_2PO_4 ، ٣٧,٣ مجم NaFeEDTA ، ٦,٢ مجم H_3BO_3 ، ٢٢,٣ مجم من $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ، ٨,٦ مجم $\text{ZnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ، ٨٠ مجم من كبريتات الأدينين، ١٠٠ مجم ميو إنوسيتول، لكل ١ لتر من الوسط الصلب.
٦. محلول العناصر الصغرى: إعداد محلول مكون من ٥ مجم / ١٠٠ مل من كل من: KI ، CoCl_2 ، CuSO_4 ، H_2O ، Na_2MO_4 ، H_2O ، والجليسين، وحمض النيكوتينيك، البيريدوكسين، وهيدروكلوريد الثيامين. ومن المحاليل المخزنة، يتم خلط ١٦,٦ ملليتر من KI "أيوديد البوتاسيوم"، و٠,٥ ملليتر من $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ، و٥ ملليتر من $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ، و٥ ملليتر من $\text{Na}_2\text{MO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ، و٦٠ ملليتر من الجلايسين، و١٠ ملليتر من حمض النيكوتينيك، و١٠ مل من البيريدوكسين، و٨ مل هيدروكلوريد الثيامين لكل ١ لتر من الوسط الصلب.
٧. أوتوكلاف للتعقيم.
٨. ماء مقطر منزوع الأيونات.
٩. ماء معقم.
١٠. غرفة نمو معقمة (أو كابائن النمو).
١١. ماصات (١ مل، و١٠ مل).
١٢. حمام مائي.
١٣. سخان أو فرن ميكروويف.
١٤. كبائن (Laminar flow hood).
١٥. شفرات تقليم معقمة.
١٦. ملقط معقم.
١٧. أطباق بيتري بلاستيكية أو زجاجية معقمة.
١٨. مواد مطهرة تجارية.
١٩. قوارير مع أغطية معقمة بحجم ١٠٠ مل و٢٠٠ مل.
٢٠. مقياس الأس الهيدروجيني "درجة الحموضة".
٢١. سكروز.
٢٢. أجار.
٢٣. بنزاييل أمينو بيورين (BAP) Benzylaminopurine: ٠,٠٥ مجم / مل.
٢٤. قارورة معقمة بحجم ١,٥ لتر.
٢٥. هيدروكسيد الصوديوم.

٣- طرق العمل:

يجب أن يتم تنفيذ جميع عمليات التكاثر النسيجي في بيئة معقمة، وعلى وجه الخصوص باستخدام كابينتة معزولة معقمة. ويجب أن تكون كافة الأدوات المستخدمة معقمة حرارياً (على سبيل المثال، باستخدام موقد بنزين) (الشكل رقم ١)، كما ينبغي استخدام المواد البلاستيكية والزجاجية المعقمة في جميع الخطوات (انظر: الملاحظة ٢).



الشكل (١): يجب أن تتم جميع عمليات التكاثر النسيجي في بيئة معقمة باستخدام كبائن معقمة. والصورة أعلاه هي للمعدات المطلوبة من أنابيب زجاجية تحتوي على وسط التكاثر النسيجي، وملاقط، وشفرات، وأطباق بلاستيكية معقمة، وكحول للحرص على تعقيم كافة الأدوات المستخدمة.

٣-١: وسط التكاثر النسيجي:

١. قم بوزن مكونات خليط العناصر الكبرى، ومحاليل العناصر الصغرى. ودمجها في قارورة معقمة حجمها ١,٥ لتر، وأضف إليها ٧٥٠ مل من الماء المعقم.
٢. قم بضبط درجة الحموضة pH إلى ٥,٧-٥,٥، وذلك بإضافة هيدروكسيد الصوديوم، واخلطها بعناية أثناء قياس الـ pH.
٣. أضف ٣٠ جراماً من السكروز و٤ جرامات من الأجار، ثم اخلطهما جيداً، واضبط الحجم على ١ لتر.
٤. إضافة ٢,٤ مل من محلول بنزاييل أمينو بيورين (BAP).
٥. تسخين المحلول في حمام مائي لإذابة جميع المكونات.
٦. قم بملء الأنابيب مع أحجام مناسبة من الوسط المستخدم (~ ٥ مليلتر في كل أنبوبة، أو ١٠ مليلتر في أنابيب® Magenta)، وأغلق الأنابيب بالأغطية (انظر: الملاحظة ٣).
٧. ضع الأنابيب في جهاز الأوتوكلاف عند درجة حرارة ١٢١ مئوية لمدة ٢٠ دقيقة.

٨. اترك الأنابيب تبرد تدريجياً، واسمح للوسط الغذائي بالتجمد والتحول للحالة الصلبة، في وضعية الوقوف (انظر: الملاحظة ٤).

٢-٣: تعقيم البراعم النباتية:

١. إعداد ٣-٥ من براعم نبات *C. roseus* بطول ٣-٥ سم لكل نبات/ سلالة فيتوبلازما، عن طريق إزالة جميع الأوراق وغمس البراعم في ٨٠ مليلتر من المواد المطهرة (الماء المقطر المعقم) بنسبة (١:٣)، في قارورة معقمة حجمها ١٠٠ مليلتر، ثم يتم تغطيتها.
٢. رج بلطف لمدة من ١-٣ دقائق.
٣. افتح القارورة في الكبينة المعقمة، وانقل البراعم إلى قارورة حجمها ١٠٠ مليلتر معقمة تحتوي على ٨٠ مليلتر من الماء المقطر المعقم فقط، وذلك باستخدام ملقط معقم.
٤. أغلق الغطاء ورج بلطف لمدة من ١-٣ دقائق.
٥. كرر الخطوات ٣ و٤.
٦. قم بتجفيف البراعم بلطف في طبق بتري معقم، وقم بإزالة أي بقع متبقية من النبات، واقطع ١-٢ مل من أعلى السيقان وأسفلها.
٧. اقطع حوالي ٢ سم من البراعم، ومن ثم ضعها في أنابيب معقمة بها وسط غذائي معقم.
٨. ضع علامة على الأنابيب بأول حرف من نوع سلالة الفيتوبلازما أو بأي طريقة أخرى يسهل بها التعرف على مصدر سلالة الفيتوبلازما ونوعها.
٩. ضع الأنابيب في غرفة نمو معقمة درجة حرارتها 24 ± 1 مئوية، وشدة ضوء 3، 000، لمدة ١٦ ساعة/ يوم.
١٠. قم بغرس البراعم كل ٨-١٢ أسبوعاً في وسط جديد (الشكل ٢) (انظر: الملاحظة ٥).



الشكل (٢): براعم نبات (الوينكا) مصابة بالفيتوبلازما المختلفة أثناء حفظها بالتكاثر الدقيق.

٣-٣: اختبار وجود الفيتوبلازما في براعم التكاثر النسيجي:

يجب اختبار إصابة البراعم بالفيتوبلازما الصحيحة كل عام (عن طريق الفحص بي PCR/RFLP)؛ حيث لكل ١ جرام (أو أقل حسب الإمكان) من الأنسجة الناتجة عن التكاثر النسيجي، بعد عملية الاستخلاص باستخدام منهجية مناسبة وإجراءات تشخيصية، كما هو موضح في الفصول: ١٤، ١٥، ١٦، ١٧، ١٨، ١٩، ٢٠، ٢١، ٢٢، ٢٣، ٢٤، ٢٥، ٢٦ من هذا الكتاب.

٤- الملاحظات:

١. يجب أن يكون تحليل الـ PCR الخاص بالنباتات إيجابياً، مشيراً إلى وجود فيتوبلازما معينة وأعراض واضحة (٢٣-٢٥).
٢. إن طريقة العمل المشروحة هنا تتعلق ببراعم نبات الوينكا المصابة بالفيتوبلازما النباتية. ويمكن أيضاً -تتمية البراعم السليمة في التكاثر النسيجي، ولكن بقاءها في الوسط الغذائي المشار إليه ليس مرغوباً فيه بالضرورة. أما بالنسبة للأنواع الأخرى المصابة بالفيتوبلازما، فقد يكون من الضروري إعداد وسط غذائي مختلف لعملية التكاثر النسيجي.
٣. استخدام أنابيب زجاجية حجمها حوالي ٢×٢٠ سم بأغطية بلاستيكية أو معدنية لبراعم الوينكا. وبالنسبة لأنواع النباتات الأخرى ذات النمو المختلف، فيفضل لها استخدام حاويات خاصة polycarbonate Magenta®، ويجب أن تكون جميع الحاويات المستخدمة معقمة. ولاستخدام الحاويات السابقة مرة أخرى، يجب غسلها بمواد مطهرة تركيزها ٣٠٪، ثم يتم غسلها بماء معقم، ثم عقمها في الأوتوكلاف.
٤. بمجرد إعداد الوسط الغذائي، قم بحفظه على درجة حرارة الغرفة بحيث لا تزيد على ٣٠ مئوية، أو في بيئة نظيفة (يفضل أن تكون معقمة، إن أمكن). وقم باستخدامها بعد ١-٢ يوم؛ وذلك للتأكد من نجاح التعقيم. ولا تستخدمها إذا لوحظ وجود أي علامات للتلوث.
٥. يجب أن تستخدم ملاقط معقمة لنقل البراعم من الوسط الغذائي إلى أنبوب بوسط غذائي جديد، ثم اغمر جزءاً صغيراً من الساق في الوسط الغذائي الجديد برفق. وإذا أظهر الوسط أو البرعم أي علامة من علامات التلوث، عندها يجب التخلص من الأنبوب فوراً. وفي حال كون البرعم هو الوحيد المتبقي من البراعم المصابة) -على سبيل المثال- فيمكن حينها أن تحاول تنظيف البرعم. ولتنظيفه، قم بإزالة حافظه، وكرر عملية التعقيم مرة أخرى (انظر: البند الفرعي رقم ٣.٢)؛ وذلك قبل وضع البرعم في أنبوب جديد. فهذه الخطوة قد تزيل التلوث.

1. Botti S, Bertaccini A (2003) Variability and functional role of chromosomal sequences in 16SrI-B subgroup phytoplasmas including aster yellows and related strains. J Appl Microbiol 94:103–110
2. Hodgetts J et al (2008) Phytoplasma phylogenetics based on analysis of *secA* and 23S rRNA gene sequences for improved resolution of candidate species of 'Candidatus Phytoplasma'. Int J Syst Evol Microbiol 58:1826–1837
3. Langer M, Maixner M (2004) Molecular characterisation of grapevine yellows associated phytoplasmas of the stolbur-group based on RFLP-analysis of non-ribosomal DNA. Vitis 43:191–199
4. Lee I-M, Zhao Y, Bottner KD (2006) *SecY* gene sequence analysis for finer differentiation of diverse strains in the aster yellows phytoplasma group. Mol Cell Probes 20:87–91
5. Lee I-M et al (2010) Phylogenetic analysis and delineation of phytoplasmas based on *secY* gene sequences. Int J Syst Evol Microbiol 60: 2887–2897
6. Martini M et al (2002) Genetic variability among flavescence dorée phytoplasmas from different origins in Italy and France. Mol Cell Probes 16:197–208
7. Martini M et al (2007) Ribosomal protein gene-based phylogeny for finer differentiation and classification of phytoplasmas. Int. J Syst Evol Microbiol 57:2037–2051
8. Mitrović J et al (2011) The *groEL* gene as an additional marker for finer differentiation of 'Candidatus Phytoplasma asteris'-related strains. Ann Appl Biol 159:41–48
9. Jarausch W, Lansac M, Dosba F (1994) Micropropagation for maintenance of mycoplasma-like organisms in infected *Prunus marianna* GF 8-1. Acta Hort 359:169–176
10. Jarausch W, Lansac M, Dosba F (1996) Long-term maintenance of nonculturable apple-propagation phytoplasmas in their micropropagated natural host plant. Plant Pathol 45:778–786
11. Laimer da Machado M et al (2001) Improved detection of viruses and phytoplasmas in fruit tree tissue cultures. Acta Hort 550:463–470
12. Laimer M et al (2002) FAIR CT 97-3889: Validierung von diagnostischen methoden an *in vitro* Pflanzern zur Zertifizierung von Obstgehölzen. Erwerbs Obstbau 44:76–81
13. Ishii T et al (1967) Suppressive effects of antibiotics of tetracycline group on development of mulberry dwarf disease. Ann Phytopathol Soc Jpn 33:267–275
14. Bertaccini, A. et al (2004) Micropropagation and establishment of mite-borne virus-free garlic (*Allium sativum*). Acta Hort 631: 201–206.
15. Bertaccini A et al (2004) Improved molecular methods for detection of *European stone fruit yellows* (ESFY) phytoplasmas from *in vitro* shoots of fruit trees. Acta Hort 657:495–500
16. Plavsic B et al (1986) Kinetin treatment of stolbur diseased tomato plants (*Lycopersicon esculentum* L.) and the possibility of its application in chemotherapy. Acta Bot Croat 45:27–32
17. Veronesi F et al (2000) PCR indexing of phytoplasma-infected micropropagated periwinkle treated with PAP-II, a ribosome inactivating protein from *Phytolacca americana* leaves. Acta Hort 530:113–120

18. Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473–497
19. Bertaccini A, Marani F (1986) BYMV-free clones of eight gladiolus cultivars obtained by meristem-tip culture. *Acta Hort* 177:299–308
20. Bertaccini A, Davis RE, Lee I-M (1992) In vitro micropropagation for maintenance of mycoplasma-like organisms in infected plant tissues. *HortSci* 27:1041–1043
21. Bertaccini A et al (2000) Micropropagation of a collection of phytoplasma strains in periwinkle and other host plants. Proceedings of the 13th International Congress of IOM. Fukuoka, Japan, July 14–19, abstract 101
22. Bertaccini A et al (1992) Sensitive detection of mycoplasma-like organisms in field-collected and *in vitro* propagated plants of *Brassica*, *Hydrangea* and *Chrysanthemum* by polymerase chain reaction. *Ann Appl Biol* 121:593–599
23. Duduk B, Bertaccini A (2011) Phytoplasma classification: taxonomy based on 16S ribosomal gene, is it enough? *Phytopathogenic Mollicutes* 1:3–13
24. The IRPCM Phytoplasma/Spiroplasma Working Team—Phytoplasma taxonomy group (2004) ‘*Candidatus* Phytoplasma’, a taxon for the wall-less, non-helical prokaryotes that colonize plant phloem and insects. *Int J Syst Evol Microbiol* 54:1243–1255
25. Lee I-M et al (1998) Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analyses of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences. *Int Syst Bacteriol* 48:1153–1169

نقل نبات الحامول للفيثوبلازما

Jaroslava Příbylová and Josef Špak

الملخص:

في هذا الفصل، نستعرض عملية انتقال الفيثوبلازما من بعض أنواع النباتات المصابة باستخدام النبات الطفيلي المسمى بالحامول (*Cuscuta* spp. (dodder)) إلى نبات *Catharanthus roseus* الوينكا؛ حيث تعتبر هذه الطريقة إحدى الطرق الفعالة للحفاظ على مجموعة واسعة من فصائل الفيثوبلازما لاستخدامها في الأبحاث. وسوف نتناول في هذا الفصل، انتقال الفيثوبلازما من خلال نبات الحامول من النبات الطبي *Rehmannia glutinosa* var. *purpurea*، ومن نبات الكشمش (*Ribes* spp.) إلى نبات *C. roseus*. ويعتبر استخدام نبات الطفيلي وسيلة نقل ثابتة للفيثوبلازما بين النباتات. وفي كلتا الحالتين، تم الحصول على أعراض مثالية لمرض الفيثوبلازما على نبات *C. roseus*؛ حيث تحولت الأزهار إلى اللون الأخضر، مع زيادة عدد البراعم الإبطية، والأوراق أصبحت أصغر بعد نقل الفيثوبلازما من نبات *R. glutinosa*. كذلك اخضرت البتلات بعد انتقال الفيثوبلازما من نبات الكشمش *Ribes* spp. ويمكن الكشف عن الفيثوبلازما في النباتات المانحة أو المتلقية بواسطة المجهر الإلكتروني، أو من خلال تفاعلات (PCR) باستخدام أزواج البادات العام للفيثوبلازما. كما يمكن استخدام تقنية (RFLP) مع نتائج الـ (PCR) للتأكد والتعرف على نوع الفيثوبلازما المتواجدة في النباتات المانحة والمتلقية.

الكلمات المفتاحية: نبات الحامول، نبات كتارانوس وردي، نبات الوينكا، Periwinkle، نبات الكشمش.

١- مقدمة:

يتبع (مدقشقر وينكا) *Catharanthus roseus* (L.) G. Don عائلة الدفلية family Apocynaceae، وهي تستخدم في علم الأمراض النباتية عائلاً نباتياً تجريبياً لمرض الفيثوبلازما (١). وهو يعمل مضيفاً لمجموعة واسعة من العازلات من الفيثوبلازما. ومن أهم الخطوات الرئيسية في استخدام *C. roseus* للحفاظ على الفيثوبلازما، هو آلية الانتقال الناجحة لمرض الفيثوبلازما من

النباتات الطبيعية المصابة إلى نبات الوينكا، والتي يمكن تحقيقها بطرق مختلفة، بما في ذلك استخدام نبات الطفيلي الحامول (*Cuscuta spp.*). إن استخدام نبات الحامول الطفيلي جسر اتصال يتيح انتقال مسببات المرض بين نباتين غير متوافقين؛ سواء كان ذلك في النباتات الخشبية أم العشبية. كما يمكن نقل الفيتوبلازما من نبات مانح ومصاب إلى نبات الوينكا، ثم العودة إلى نبات العائل السليم حتى نشاهد أعراض المرض بوضوح.

ومن مزايا نبات الوينكا عند استخدامه عائلاً تجريبياً للإصابة بالفيتوبلازما أنه يظهر أعراضاً مميزة على النباتات المصابة. كما أن نبات الوينكا يعطي فرصة للمقارنة بين الأعراض المختلفة التي يسببها أكثر من الفيتوبلازما على عوائل نباتية متطابقة وراثياً. ويجب توافر سلالات من الفيتوبلازما تكون معرفة مرجعاً وتكون إيجابية أو سلبية في حالة التجارب البحثية. ويتم الاحتفاظ بمجموعات من سلالات الفيتوبلازما في عديد من المختبرات شرطاً مسبقاً للبحوث، ويجب الحفاظ عليها تحت نظم خاصة للحجر الزراعي والحشري (وفقاً لمتطلبات الدولة). وقد تتطلب مجموعة سلالات مختلفة من الفيتوبلازما درجات حرارة مختلفة لتربية النباتات بطريقة مثالية (٢). ويسهل البحث والتعامل مع الفيتوبلازما كثيراً إذا كانت متوفرة في عائل عشبي مثل: *C. roseus*. إن توفر الفيتوبلازما في نباتات الوينكا عائلاً تجريبياً يكون له مزايا إيجابية، ولا سيما في الاختبارات على المستوى الجزيئي، ويوفر إمكانية إجراء كافة التجارب والأبحاث على مدار السنة. على سبيل المثال: نباتات الوينكا هي أفضل مصدر للحصول على الأحماض النووية للفيتوبلازما والبروتينات والمواد المناعية من نباتات أخرى، كذلك نباتات الوينكا - عادة ما - تكون الفيتوبلازما موجودة فيه بتركيز عالية، كما أن مكونات الفيتوبلازما يمكن الحصول عليها بطريقة سهلة. أما بالنسبة لعديد من الفيتوبلازما التي لا تتوفر في نباتات الوينكا أو النباتات العشبية الأخرى، فلا يمكن الحصول على أي من مواد الأجسام المضادة أو أجزاء من الحمض النووي؛ والتي تستخدم في الكشف والتعريف (١). وقد تؤثر ظروف النمو - جنباً إلى جنب - مع وقت العدوى وتكاثر الفيتوبلازما داخل النبات على زيادة الأعراض وتطورها (٣)، وعلى التوزيع غير المتكافئ للفيتوبلازما داخل العائل النباتي؛ مما يسبب صعوبات في إجراءات الفحص والكشف (٤).

ومن الطرق الفعالة لنقل الفيتوبلازما استخدام نبات الحامول الطفيلي *Cuscuta spp.* وجميع أنواع نبات الحامول من جنس *Cuscuta* (*Convolvulaceae*) أنواع كاملة التطفل. وتنتشر أنواعها المختلفة في المناطق المعتدلة إلى المناطق الاستوائية في العالم. وتتميز النباتات بسيقان خضراء أو صفراء أو بيضاء بلا جذور مع أشباه الوريقات، وأيضاً تحتوي على مستويات منخفضة من الكلوروفيل، وبعض الأنواع - مثل الحامول *Cuscuta reflexa* - يمكنه إتمام عملية البناء الضوئي (٥). ونبات الحامول لديه روابط فيزيائية وثيقة مع نبات العائل، ويعتمد اعتماداً كلياً على العائل لإمداده بالمواد الغذائية والماء (٦). ومنذ إنبات الحامول يكون مرتبطاً ومتصلاً مع العائل في غضون

عدة أيام بعد الإنبات. وعند نقاط الاتصال مع العائل، تلتف ساق الحامول وينتج ما يسمى بالممصات، وهي جهاز يقوم باختراق أنسجة العائل. وتقوم الممصات بالبحث بين خلايا العائل وغيرها لترتبط بالأنسجة الوعائية للعائل (٧). ويكون نبات الحامول متصلاً مباشرةً مع الوعاء الخشبي في النبات العائل، على الرغم من أن طبيعية اتصالها مع اللحاء غير مفهومة، ويدعم ذلك - أيضاً - الاتصال المباشر مع اللحاء مباشرة. على سبيل المثال: صبغة اللحاء الخاصة والمسماة (carboxyfluorescein) تتحرك من العائل إلى نبات الحامول المتطفل (٨). بالإضافة إلى الاتصال بالأنسجة الوعائية المباشرة، يبدو أن نباتات الحامول تلاحظ استمرارية انتقال السيتوبلازم مع العائل من خلال ما يسمى بالرابطة البلازمية (plasmodesmata). وقد ذكرت Vaughn (٧) أن خلايا هيفات الممصات نبات الحامول المتطفلة؛ والتي تحتوي على روابط بلازمية، وتكون ممتدة ومتاخمة لجدران الحامول تبحث عن سطح جدار نبات العائل.

وقد عرفت جيداً العلاقة بين نبات الحامول المتطفل وبين العائل وانتقال عديد من الفيروسات: فنبات الحامول الواحد يمكنه التطفل على اثنين من النباتات وينقل الفيروسات من نبات إلى آخر (٩-١٢). وكانت الأبحاث السابقة تقوم باستخدام نباتات الحامول لأغراض تشخيص، أو لدراسة الكائنات الحية الشبيهة بالميكوبلازما داخل الخلايا الخاصة بنبات الحامول (١٣). ويمكن إجراء نقل تجريبي للفيتوبلازما من نبات مصاب إلى نبات سليم من الأنواع نفسها أو من أنواع مختلفة، وهو ما يمكن تحقيقه في المختبر أو في البيوت المحمية. وتدخل خلايا الفيتوبلازما الموجودة في اللحاء العائل إلى نبات الحامول من خلال الممصات، وتتكاثر وتمر من خلاله قناة الحامول إلى أن تصل إلى الممصات المتواجدة في نبات سليم. وتنتقل خلايا الفيتوبلازما من نبات الحامول إلى لحاء نبات المتلقي، ومنه تكون قد استكملت عملية الانتقال (٢). ويمكن استخدام طريقتين أساسيتين للانتقال؛ عن طريق جسور قنوات الحامول، أو من خلال قطع خيوط قنوات نبات الحامول المصاب (١٤). وتختلف كفاءة الانتقال باختلاف سلالات الفيتوبلازما من خلال نبات الحامول، وخاصة عند استخدام قطع منفصلة من نبات الحامول المصابة. وينتقل الفيتوبلازما بنشاط أكبر عندما يكون الحامول متصلاً بمصدر اللقاح نحو النبات المتلقي (وليس في الاتجاه المعاكس)؛ وحركة الفيتوبلازما خلال سيقان نبات الحامول يبدو أن معظمها يكون في اتجاه منطقة النمو (١٥). ويعتمد انتقالها على كل من نوع الفيتوبلازما ونبات الحامول الناقل للعدوى. على سبيل المثال: نبات العليق الأمريكي ومرض تورق زهور نبات القطن يكون انتقال المرض فيهما بكفاءة عالية؛ بواسطة نبات الحامول الأوروبي، ونبات الحامول المرجي على التوالي (*Cuscuta europea* and *Cuscuta campestris*)، في حين لم تنتقل الفيتوبلازما الأخرى إلا بمعدل منخفض (١٦).

٢- المواد:

١-٢: نقل الحامول:

نبات الرحمانية اللزجة *Rehmannia glutinosa var. purpurea*، ونبات الكشمش الأحمر redcurrant plants استخداماً أمثلةً في هذا الفصل (انظر: الملاحظة ١). وبالتالي، تم تحديد بعض المواد المطلوبة (المواد ١-٤) للأنواع النباتية المصابة والسليمة (شاهداً). وينبغي أن تختلف هذه حسب التطبيق الخاص بك.

١. أظهر نباتان من الـ (*R. glutinosa*) أعراضاً للمرض، وتم أخذهما من الحقل، والمحافظة عليهما في ظروف البيوت المحمية.
٢. تم تنمية نبات (*R. glutinosa*) من البذور في البيت المحمي نبات شاهدي سليم (١٧).
٣. تم أخذ سيقان عليها أعراض من نبات الكشمش؛ والتي أظهرت التواء شديداً في البراعم، وتشوها في الفروع، وكان إنتاجها ضعيفاً من التوت، وقد أخذت من مزرعة خاصة في جنوب جمهورية التشيك. وظهرت الأعراض الأصلية على براعم النمو الجديدة، واستمرت طوال حياة النبات. وتم الحفاظ على سيقان النبات في البيت المحمي لحمايتها من الحشرات
٤. تمت زراعة نبات الكشمش من البذور نبات شاهدي سليم.
٥. بذور البرسيم الحجازي.
٦. تمت زراعة نبات الحامول والحفاظ عليه في البيت المحمي.
٧. تمت زراعة نبات الحامول نوع (*C. campestris*) من البذور، والمتفضل على نبات (*R. glutinosa*) ونبات الكشمش، والمزروعة في البيت المحمي تحت ظروف خاضعة للرقابة (انظر: الملاحظة ٢).
٨. سهولة الوصول إلى البيت المحمي.
٩. صواني البذور.
١٠. تربة زراعية للبذور.

٣- طرق العمل:

١-٣: الانتقال خلال نبات الحامول الطفيلي:

١. اخلط بذور نبات الحامول (*C. campestris*) وبذور نبات البرسيم الحجازي وازرعهما على سطح التربة الزراعية في صحن البذور، في ظروف البيت المحمي (درجة حرارة ٢٥ مئوية، ورطوبة بنسبة ٧٠-٩٠٪، والضوء المكثف).

٢. بعد ١٠-١٤ يوما، انقل شتلات البرسيم الحجازي والمتطفل عليها الحامول إلى أصيص فيه النباتات المصابة من *R. glutinosa* (أو نبات الكشمش)؛ مع الحفاظ عليها في ظروف البيت المحمي. اسمح لنبات الحامول بالاتصال بالنباتات المصابة.
٣. قم بتوصيل خيوط نبات الحامول الحديثة من كل نبات مصاب مع ٢-٣ من نباتات الوينكا السليمة (انظر: الملاحظة ٣). مع التأكيد على أن طريقة نقل بالحامول الثابتة ترفع من احتمالية الإصابة (الشكل ١) يوضح ذلك.
٤. الحفاظ على طريقة النقل بالحامول حتى تظهر الأعراض على نبات الوينكا، أو حتى لا تتكسر سيقان الحامول (انظر: الملاحظة ٤).
٥. استخدام نباتات: الوينكا السليمة، ونبات (*R. glutinosa*)، ونبات الكشمش المنزرعة من البذور، شاهداً للنباتات السليمة للمقارنة.
٦. بعد التأكد من عملية الانتقال (انظر: الفصول ١٤ و١٥ و١٦ و١٧ و١٨ و١٩ و٢٠ و٢١ و٢٢ و٢٣ و٢٤ و٢٥ و٢٦ لاستخدام طرق التشخيص المناسبة)؛ قم بإزالة خيوط نبات الحامول من نباتات الوينكا، ثم احتفظ بنبات الوينكا مع مراعاة مقاومة الحشرات داخل البيت المحمي (انظر: الملاحظة ٥)؛ وذلك لمزيد من الدراسة وظهور أعراض جديدة (انظر: الملاحظة ٦).



الشكل (١): نبات الحامول (*C. campestris*) ينقل الفيثوبلازما من نبات الكشمش المصاب (*Ribes spp*) إلى نبات الوينكا (*Catharanthus roseus*).

٤- ملاحظات:

١. ليست كل أعراض تشبه أمراض الفيتوبلازما تكون بسبب الفيتوبلازما؛ حيث يمكن أن تكون هذه الأعراض بسبب بعض الأمراض الفسيولوجية الأخرى.
٢. ن استخدام أنواع مناسبة من جنس نبات الحامول أمر مهم لنجاح عملية انتقال الفيتوبلازما، وقد نحتاج إلى تجربة عدة أنواع مختلفة من الحامول لتحقيق انتقال ناجح. وفي حالة فشل عملية النقل، يمكن استخدام طرق أخرى، مثل: استخدام الانتقال عن طريق الحشرات، أو التطعيم لنجاح عملية النقل.
٣. ضع طرفاً واحداً من سيقان نبات الحامول حول ساق النبات المصابة والطرف الآخر حول ساق النبات السليم. ثم يقوم نبات الحامول بالتطفل على كل من النبات المانح (المصاب) والنبات المتلقي (السليم).
٤. وقت الانتقال يمكن أن يختلف في النباتات العشبية والخشبية، ويكون توزيع الفيتوبلازما غير منتظم في النباتات الخشبية. وعليه، فإن الوقت الذي يستغرقه ظهور الأعراض على نباتات الوينكا يمكن أن يكون مختلفاً.
٥. الحفاظ على سلالات مختلفة من الفيتوبلازما في البيوت المحمية والخالية من الحشرات؛ وذلك تحت ظروف بيئية مناسبة، والأمر قد يتطلب استخدام درجات حرارة مختلفة.
٦. قد يكون من المفيد نقل الفيتوبلازما التي تم نقلها من نبات الوينكا المصابة إلى نبات سليم في المناخ الأصلي، وذلك للحفاظ على العزلة.

الشكر والتقدير:

دُعم هذا العمل من الوكالة المانحة للمنحة في الجمهورية التشيكية (رقم ٠٧٩٢/٩٨/٥٢٢)، ومن خلال المشاريع QH91224 التابعة للوكالة الوطنية للبحوث الزراعية، والمشاريع AV0Z50510513 التابعة لأكاديمية العلوم في جمهورية التشيك.

المراجع:

1. Marcone C, Ragozzino A, Seemüller E (1997) Dodder transmission of alder yellows phyto- plasma to the experimental host *Catharanthus roseus* (periwinkle). Eur J Forest Pathol 27: 347–350
2. Davis RE, Lee I-M (1991) Mycoplasma-like organisms as plant disease agents-a review. ATCC Q Newsl 11:7–11
3. Kamińska M, Korbin M (1999) Graft and dod- der transmission of phytoplasma affecting lily to experimental hosts. Acta Physiol Plant 21:21–26

4. Davies DL et al (1992) Parry's disease of pears is similar to pear decline and is associated with mycoplasma-like organisms transmitted by *Cacopsylla pyricola*. Plant Pathol 41:195–203
5. Machado MA, Zetsche K (1990) A structural, functional and molecular analysis of plastids of the holoparasites *Cuscuta reflexa* and *Cuscuta europaea*. Planta 181:91–96
6. Jeschke WD et al (1994) Modelling the flow and partitioning of carbon and nitrogen in the holoparasite *Cuscuta reflexa* Roxb. and its host *Lupinus albus* L. Methods for estimating net flows. J Exp Bot 45:791–800
7. Vaughn KC (2003) Dodder hyphae invade the host: a structural and immunocytochemical characterization. Protoplasma 220:189–200
8. Birschwilks M et al (2006) Transfer of phloem- mobile substances from the host plants to the holoparasite *Cuscuta* sp. J Exp Bot 57:911–921
9. Bennet CW (1940) Acquisition and transmission of viruses by dodder (*Cuscuta subinclusa*). Phytopathology 30:2
10. Bennet CW (1944) Studies of dodder transmission of plant viruses. Phytopathology 34:905–932
11. Johnson F (1941) Transmission of plant viruses by dodder. Phytopathology 31:649–656
12. Hosford RM (1967) Transmission of plant viruses by dodder. Bot Rev 33:387–406
13. Siller W et al (1987) Occurrence of mycoplasma-like organisms in parenchyma cells of *Cuscuta odorata* (Ruiz et Paw.). J Phytopathol 119:147–159
14. Bennett CW (1967) Plant viruses: transmission by dodder. In: Maramorosch K, Koprowski H (eds) Methods in virology, vol 1. Academic, New York, pp 393–401
15. Carraro L et al (1991) Transmission characteristics of the clover phyllody agent by dodder. J Phytopathol 133:15–22
16. Marcone C et al (1999) Dodder transmission of pear decline, European stone fruit yellows, rubus stunt, Picris echioides yellows and cotton phyllody phytoplasmas to periwinkle. J Phytopathol 147:187–192

الحفاظ على الحشرات وانتقالها

Heather Kingdom

الملخص:

الفيتوبلازما هي من مسببات الأمراض النباتية ذات الأهمية الاقتصادية الكبيرة؛ لأنها مسؤولة عن خسائر كبيرة في المحاصيل الزراعية في جميع أنحاء العالم. وتحاول المؤسسات البحثية في جميع أنحاء العالم فهم سبب هذه الخسارة في المحاصيل والتحكم بالمرض، في الوقت الذي يحتل فيه الأمن الغذائي مكانة عالية في أولويات الحكومات. ومن أجل فهم كامل لآليات الإصابة بالفيتوبلازما وانتشارها، سنحتاج إلى مزيد من الناقلات الحشرية لتلك الفيتوبلازما لاستخدامها في الأبحاث في جميع أنحاء العالم. إن دراسة مستعمرات الفيتوبلازما أمر ضروري في البحث والتطوير؛ مما يساعد على مكافحتها. ويسلط هذا الفصل الضوء على المواد والطرق التي تعمل مع الناقلات الحشرية والحفاظ على الفيتوبلازما، كما يتضمن أساليب لتربية حشرات نطاط الأوراق المتطفلة على نبات الذرة، والفيتوبلازما المسببة لمرض تقزم الذرة، وحشرات نطاط الأوراق الناقلة لمرض الأيستر، ومرض فيتوبلازما اصفرار الأيستر عزلة مكنسة الساحرة أيضا.

الكلمات المفتاحية: نطاط الأوراق *Dalbulus maidis*، أقفاص الحشرات، مستعمرات الحشرات، نطاط الأوراق المتبقع، تربية نطاط الأوراق، تربية نطاط النبات، تربية حشرة البسليدي (psyllids).

١- مقدمة:

تتمية مستعمرات الحشرات أمرٌ أساسي لدراسة انتقال الفيتوبلازما. والفيتوبلازما المسببة لمرض الأستر الاصفرار عزلت مكنسة الساحرة 'Aster yellows phytoplasma strain witches' broom (AY-WB) يصيب بسهولة نبات *Arabidopsis thaliana*، ويؤدي إلى تحول الأزهار إلى أوراق وتقزم في النمو وزيادة الأنسجة الورقية. وهذه الأعراض تعد أنموذجية لمرض مكنسة الساحرة؛ والتي تنتج الأعراض نفسها للنباتات الأخرى المصابة بمرض الأستر الاصفرار (AY-WB) (١). وآلية هذا المرض تبدو في أن لديه القدرة على استخدامه أنموذجاً لدراسة انتشار الفيتوبلازما، وتساعد تربية

مستعمرات النواقل والحفاظ عليها على سهولة فحصها. ويؤثر عمر حشرات نطاط الأوراق (*Macrosteles quadrilineatus*) ودرجة الحرارة في فعالة انتقال الفيتوبلازما المسببة للأستر المصفر (٢). علاوة على ذلك، فقد تبين أن انتقال الفيتوبلازما *chrysanthemum yellows phytoplasma* في نبات الأقحوان *Eusclidius variegatus* تعتمد على توزيع الفيتوبلازما داخل الحشرة (٣، ٤). كما تساعد تنمية مستعمرات الحشرات الناقلة - أيضا - على دراسة تفاعلات عوائلها النباتية، وتسمح بدراسة تغير التفاعلات بين الفيتوبلازما والحشرات. على سبيل المثال: السلالات الخطيرة من الفيتوبلازما مثل: عزلة اصفرار الأستر لديها تأثيرات مختلفة على فعالية نقل نطاط الأوراق من نوع *M. quadrilineatus* (٥). وفي الوقت نفسه، هناك سلالتان من الفيتوبلازما المسببة (*flavescence dorée*)؛ والتي تؤثر على بقاء ناقلات نطاط الأوراق *Eusclidius varegatus* وخصوبتها (٦).

وقد تم إجراء هذه الاكتشافات كلها بسبب تربية مستعمرات الحشرات الناقلة في المختبرات. وتعد بعض ناقلات الفيتوبلازما -مثل: حشرة البسليدي *Cacopsylla melanoneura*- أكثر صعوبة في تربيتها وإتمام دورة حياتها (٧). وعلى الرغم من ذلك، ومن خلال دراسة جزء من دورة حياتها، يمكننا إجراء كثير من البحوث المستقبلية عليها. أما حشرة البسليلا *C. melanoneura* التي تنتج مجموعة قليلة من البيض على *Phytoplasma mali* والتي تصيب سيقان التفاح في الظروف المعملية (٧)، والتي تم جمعها *Ca. Phytoplasma mali* من البستان المصاب فقد قامت بنقل الفيتوبلازما إلى أشجار التفاح السليمة بفاعلية ملحوظة (٨، ٩). ومن الصعب تربية بعض نطاطات الأوراق (مثل: النطاطات النباتات، والسليدي) وتكاثرها تحت ظروف المختبرات؛ بسبب عدم قدرتها للتكاثر تحت هذه الظروف أو عدم قابليتها لنباتات العائل. ويمكن استخدام التقنيات التكاثرية الدقيقة كي نوفر حلا مفيدا في تربية الحشرات خلال فترة من فترات دورة حياتها (١٠). ومن خلال تربية مستعمرات الناقلات بتربية جزء أو كل من دورة حياتهم، يمكن الحفاظ على الفيتوبلازما في ظروف المختبر، ويساعد ذلك في التقدم في الأبحاث المعملية.

ويمكن لمستعمرات (نطاط الأوراق، ونطاط النباتات، السليدي) تربيتها من الحشرات الكاملة التي تم جمعها من الحقل أو من النباتات التي عليها البيض المرسل من مختبرات أخرى (١١). وفي كلتا الحالتين، عادة ما يكون عدد قليل كافيا لبدء المستعمرة. والمستعمرات من هذا النوع يمكن أن تسفر عن الآلاف من الحشرات الفردية (١٢، ١٣). ويجب أن يتزامن خروج المستعمرات الحشرية وجمعها مع ظهور الحشرات في الحقل، في حين أن المواد المرسل من مختبرات أخرى يمكن تربيتها في أي وقت تحت ظروف مناسبة لإنتاج جيل من الحشرات (١٤). إن عديداً من (نطاط الأوراق، نطاط النباتات، والسليدي) هي كائنات حية لها جيل واحد أو جيلان في السنة، ولكن إذا تم الحفاظ عليها في ظروف مناسبة في فترة الصيف يمكنها إنتاج أكثر من جيل واحد خلال العام (١٥).

ويجب أن تبقى جميع الحشرات والفيتوبلازما في غرف النمو ذات التحكم داخل مبنى خاص حاصل على رخصة من قبل السلطة المحلية. وفي المملكة المتحدة -على سبيل المثال- تسمح وكالة أبحاث الأغذية والبيئة (Fera) بإبقاء الحشرات والفيتوبلازما تحت رخصة الاستيراد، ورخصة نقل اللافقاريات المحظورة والحفاظ عليها، ورخصة الصحة النباتية، على التوالي (١٦). ويجب أن يكون استيراد الحشرات والنباتات تحت رقابة صارمة في عديد من البلدان. والحصول على موافقه للقيام بذلك يمكن أن يستغرق وقتاً طويلاً، وربما تطلب تفتيشاً للمنشآت. وهذه القيود الصارمة موجودة لضمان عدم هروب الحشرات ومسببات الأمراض. وهذا أمر ذو أهمية؛ خاصة عند دراسة الحشرات غير المألوفة وأمراض الفيتوبلازما، وينبغي الالتزام بمتطلبات الرخصة المحلية في حال إنشاء نظام خاص لتربية الحشرات والفيتوبلازما ودراساتها.

٢- المواد:

١. غرفة للتربية. وتعتمد جميع المتطلبات لهذا المرفق على المتطلبات المبينة في أساس ترخيص السلطة المحلية للحفاظ على الحشرات ومسببات الأمراض الحجرية. وتشمل المتطلبات الرئيسية: المداخل المغلقة، ونظام التهوية، والتحكم في درجة الحرارة، والتحكم بتوقيت الإضاءة الفلوريسنت، وتصريف المياه، ورصد الرطوبة (الشكل ١).
٢. البيت المحمي للاستخدام العام، والمناسب لزراعة النباتات، وتربية مستعمرات الحشرات. وقد تكون هناك حاجة إلى مرفق أكثر للحفاظ على النباتات المصابة بالفيتوبلازما.
٣. غرفة مظلمة تحتوي على إضاءة يدوية (انظر: الملاحظة ١).
٤. جهاز الشفط (انظر: الملاحظة ٢).
٥. قفص لمستعمرة الحشرات (انظر: الملاحظة ٣).
٦. قفص الاكتساب / ونقل الحشرات (انظر: الملاحظة ٤).

٣- طرق العمل:

٣-١: نمو النباتات:

يجب أن يبدأ هذا قبل جمع الحشرات من الحقل أو الحصول على البيض على النباتات من مختبرات أخرى. وسوف تكون هناك حاجة لنباتات سليمة ناضجة للحفاظ على الحشرات والبيض المكتسب في بداية جيل المستعمرة. وسيعتمد وقت زراعة النبات على أنواع النباتات اللازمة للحشرات والفيتوبلازما. وفيما يلي، طرق لزراعة أربعة أنواع نباتية مختلفة.



الشكل (١): غرف التربية توفر بيئة محكمة وأمنة على الحشرات والفيتوبلازما. وتحتوي هذه الغرفة على: العناصر الأساسية محكمة الإغلاق، وأدوات التهوية مفلترة، ومنظم درجة الحرارة، ومصابيح الفلورسنت التي تعمل بالتوقيت، وإمدادات المياه والصرف الصحي، ومراقبة الرطوبة. وغرف النمو لدينا لديها كل هذه الميزات، وتقع داخل مبنى عال التحكم. وقد تم تجهيز المناطق المحيطة بغرف النمو بالأشعة فوق البنفسجية القاتلة للحشرات، وهي مضادة بالضوء الأحمر؛ حيث إن هذا الضوء غير مرئي للحشرات الموجودة بالغرفة.

٣-١-١: نبات الأرابيدوسيس *Arabidopsis*:

١. زراعة نبات الأرابيدوسيس (مثل: ecotype Columbia-0)؛ وهي بذور رقيقة تزرع على التربة الزراعية في صوان بها نسبة قليلة من الرطوبة (انظر: الملاحظة ٥).
٢. وضع الصواني على درجة حرارة ٤ درجات مئوية لمدة أربعة أيام لإزهار النبات (انظر: الملاحظة ٦).
٣. نقل الأواني إلى غرفة النمو في بيئة مناسبة لمدة ١٠ ساعات يوميا؛ تحت ضوء الفلورسنت في درجة حرارة ثابتة من ٢٠ مئوية .
٤. بعد ١٠ أيام من الزراعة، قم بنقل الشتلات (بطول حوالي ١٠ ملم) إلى الأصيص الفردية في الصواني لتنمو لمدة ٣ أسابيع أخرى (انظر: الملاحظة ٧).
٥. السماح للنباتات أن تنمو لمدة ٣-٦ أسابيع أخرى اعتمادا على عمر النباتات المطلوبة. وتتم عملية الري من ثلاث إلى أربع مرات في الأسبوع (انظر: الملاحظة ٨).

٣-١-٢: نبات النجم والخس *Aster and Lettuce*:

١. ازرع بذور نبات النجم والخس على التربة الزراعية في ٢٤ حفرة، وقم بتغطيتها بطبقة ٢ مل من التربة الزراعية الناعمة.
٢. السماح للنباتات بالنمو في البيوت المحمية لمدة ٦ أسابيع، (٤ أسابيع للخس) قبل زرعها في الأواني الكبيرة.
٣. السماح للنباتات بالنمو في الظروف نفسها لمدة ٣ أسابيع أخرى؛ وعندها تكون جاهزة للاستخدام في المستعمرات. ويجب أن تكون النباتات بطول حوالي ١٥ سم، وخالية من الآفات والأمراض مثل: مرض العفن وحشرة التريس.

٣-١-٣: الذرة *Maize*:

١. ازرع ثلاثة من بذور الذرة في كل أصيص من الأصص ذات القطر البالغ ١٤ سم، واغرسهم جميعاً باستخدام الإصبع لعمق معلوم في أصص معبأة بمزيج من سماد الكمبوست، وقم بتوزيع التربة الزراعية على الثقوب، وتركها للنمو في ظروف البيوت المحمية لمدة ٤ أسابيع.
٢. اترك النباتات لتستقر، وتتمو لمدة ١-٣ أسابيع أخرى؛ حتى تصل للارتفاع والعمر المطلوبين المناسبين لنمو المستعمرات، والطول المناسب للنباتات من ٢٠-٤٠ سم، وهو الطول المناسب لنمو المستعمرات.

٣-٢: تربية مستعمرات الحشرات من مواد أخرى:

١. قم بإزالة جميع عبوات الأصيص، ثم ضع كل نبات في الأصيص مع التربة الزراعية، وقم بريها بالماء، ثم اترك للنبات الفرصة للتأقلم في قفص المستعمرة في غرفة النمو (انظر: الملاحظة ٩).
٢. بعد ٢-٣ أيام، أضف اثنتين من النباتات الحديثة مصدراً غذائياً طازجاً للحشرات بعد فقس البيض.
٣. يتم إضافة اثنتين من النباتات الحديثة السليمة كل ثلاثة أيام، مع السماح للمجموعة الأولى من النباتات بالموت في القفص (انظر: الملاحظة ١٠).
٤. بمجرد موت أول مجموعة من النبات تماماً، يجب إزالتها من القفص.
٥. يجب إضافة مزيد من النباتات عند الحاجة، مع الحفاظ على اثنتين على الأقل من النباتات في حالة جيدة في جميع الأوقات.
٦. السماح للعداري بإكمال خمسة أطوار، وإغلاق القفص قبل انتقال أي حشرات إلى أقفاص جديدة (انظر: الملاحظة ١١).
٧. ثم يتم إحصاء عدد البالغين، وتحديد نسبة الجنس (انظر: الملاحظة ١٢).

٨. إذا كانت النسبة -تقريباً- منحازة للإناث وأكثر من ٢٠٠ حشرة موجودة، قم بوضع نصف الحشرات في قفص جديد في الغرفة المظلمة مع اثنتين من النباتات الجديدة لبدء عمل مستعمرة جديدة (انظر: الملاحظة ١٣).
٩. السماح للجيل الأول من الحشرات بإنتاج البيض على النباتات الحديثة في مستعمرتين جديدتين. كذلك، إضافة مزيد من النباتات السليمة إلى أقفاص جديدة، مع الحفاظ على اثنتين - على الأقل- من النباتات في حالة جيدة في جميع الأوقات.
١٠. السماح للبيض أن يفقس، والسماح للعذارى بالتحول خلال الأطوار الخمسة، والتحول إلى حشرة بالغة، ثم كرر الخطوات مرة أخرى ابتداءً من الخطوة رقم ٧.
١١. قم بفصل الجيل الثاني من البالغين، مع ترك الجيل الأول ليموت (انظر: الملاحظة ١٤).

٣-٣: توليد مستعمرات الحشرات المصابة بالفيتوبلازما:

- بعد أن تكون قد أعددت مستعمرات من الحشرات، فأنت على استعداد لبدء مستعمرة من الحشرات المصابة بالفيتوبلازما.
١. اجمع بعض النباتات المصابة بفيتوبلازما الحقل، أو احصل على نباتات مصابة بالفيتوبلازما من مختبرات أخرى، وتأكد من أن جميع النباتات غير جافة.
٢. ضع النباتات المصابة بالفيتوبلازما فور وصولها بمفردها في أقفاص داخل غرف النمو، مع السماح بالتأقلم لمدة يومين (انظر: الملاحظة ١٥).
٣. أضف حوالي ٣٠ حشرة بالغة لكل قفص يحتوي على النباتات المصابة، وينبغي أن تكون نسبة البالغين من الإناث إلى الذكور (٢:١، أو ١:١) (انظر: الملاحظة ١٦).
٤. اترك الحشرات على المواد المصابة حتى تكتسب المرض (انظر: الملاحظة ١٧).
٥. الحفاظ على النباتات المصابة بالفيتوبلازما مع الحشرات في القفص حتى يموت النبات تماماً. وعندما تبدو النباتات مريضة جداً، أضف نباتات أخرى مصابة بالفيتوبلازما أو نباتات جديدة غير مصابة.
٦. عندما ينقضي وقت اكتساب الحشرات للمرض، تنقل الحشرات إلى قفص جديد يحتوي على نباتات جديدة سليمة (انظر: الملاحظة ١٨).
٧. السماح للحشرات المصابة حديثاً بنقل الفيتوبلازما إلى نباتات سليمة، ومراقبة تطور الأعراض على النباتات.
٨. عندما تتكشف أعراض الإصابة، انقل الحشرات إلى قفص كبير مع النباتات السليمة.
٩. انقل النباتات المصابة حديثاً إلى قفص خاص حتى يتم طلب مزيد من الحشرات (انظر: الملاحظة ١٩).

١٠. السماح للحشرات في القفص بوضع البيض، وللعذراء بالتطور لمرحلة البلوغ. وفي هذه المرحلة، ستصاب النباتات، ويمكن تقسيم النباتات والحشرات البالغة الجديدة إلى مستعمرة إضافية، وينبغي أن تكون نسبة البالغين من الإناث إلى الذكور (٢:١، أو ١:١).
١١. يجب مواصلة فصل المستعمرات بعد تكون جيل جديد، ومنه يتم تنظيف الأقفاس القديمة. كما يجب أن تترك بعض المساحات للأعمال المستقبلية.

٣-٣-١: الحفاظ على الفيتوبلازما المسببة للأستر الاصفرار سلالة مكنسة الساحرة (AY-WB):

يمكن الحفاظ على هذا النوع من الفيتوبلازما من خلال: (الأستر الصيني، ونبات الخس، ونبات الأرابيدوبسيس) باستخدام حشرات نطاط الأوراق (*M. quadrilineatus*) (انظر: الملاحظة ٢٠).

١. اجمع النباتات المصابة بالأستر الاصفرار - المكنسة الساحرة (AY-WB) بالفيتوبلازما، أو الحصول عليها من قبل مختبرات أخرى، وضعهم في الأضيء، ووفر لهم الماء، واسمح لهم بالتأقلم لمدة يومين في أقفاص تحضيرية.
٢. أضف ٥٠ حشرة من حشرات نطاط الأوراق البالغة (*M. quadrilineatus*) لكل قفص يحتوي على نبات الخس أو النجم (الأستر) (ذات طول أكبر من ٢٠ سم). ويجب أن تكون نسبة الحشرات البالغة من الإناث إلى الذكور (٢:١، أو ١:١)، ونباتات الأرابيدوبسيس (بقطر أكبر من ٦ سم)، أضف ٢٠ حشرة من حشرات نطاط الأوراق البالغة لكل قفص.
٣. انقل الحشرات السابقة بعد ٧ أيام من اكتسابها للمرض على (نبات الخس أو نبات النجم) السليمين في أقفاص الانتقال، ثم لاحظ ظهور أعراض الاصفرار على النباتات على مدى ١٠ - ١٤ يوما (انظر: الملاحظة ٢١).
٤. أضف الحشرات الحديثة إلى أقفاص الانتقال، وكرر الخطوات ٢ و ٣ (انظر: الملاحظة ٢٢). ويجب التخلص من نباتات الأستر (AY-WB) المصابة بالفيتوبلازما بعد الدورة الثانية من إضافة الحشرات.
٥. عند تكشف أعراض المرض في النباتات المنقولة، انقل الحشرات إلى قفص كبير يحتوي على نباتات سليمة.
٦. انقل نباتات الأستر (AY-WB) المصابة حديثا بالفيتوبلازما إلى قفص الحجز؛ حتى الحاجة إلى مزيد من حشرات معدية (انظر: الملاحظة ١٩).
٧. تترك الحشرات في القفص لإنتاج البيض والعذارى لتتطور حتى وصولها إلى حشرة كاملة (انظر: الملاحظة ٢٣).
٨. يجب مواصلة فصل المستعمرات بعد تكون جيل جديد، ومنه يتم تنظيف الأقفاس القديمة. كما يجب أن تترك بعض المساحات للأعمال المستقبلية.

٣-٣-٢: الحفاظ على الفيتوبلازما المسببة لمرض تقزم الذرة في الذرة الصفراء باستخدام حشرة نطاط الأوراق *Dalbulus maidis*:

- يجب الحصول على الذرة المصابة بالفيتوبلازما المسببة لمرض تقزم الذرة (Maize bushy stunt phytoplasma (MBSP)، ويجب أن يكون النبات مع المجموع الجذري، من الحقل أو من أحد المختبرات الأخرى. ويجب أن تكون النباتات بعمر ٧-١٠ أسابيع، ويجب ألا تكون طويلة للغاية.
١. ضع النباتات في أصيص مناسب، وقم بري النباتات، والسماح للتأقلم لمدة يومين في أقفاص خاصة للنقل (انظر: الملاحظة ٢٤).
 ٢. أضف ٥٠ حشرة من حشرات نطاط الأوراق البالغة (*Dalbulus maidis*) لكل قفص يحتوي على نبات الذرة، كما يجب أن تكون نسبة الحشرات البالغة من الإناث إلى الذكور (٢:١، أو ١:١).
 ٣. انقل الحشرات بعد ١٤ يوماً من قفص الانتقال إلى الذرة السليمة في أقفاص النقل، وتابع النباتات حتى ظهور الأعراض الحمراء بعد ١٤-٢١ يوماً (انظر: الملاحظة ٢٥).
 ٤. تخلص من النباتات الأصلية المصابة بالفيتوبلازما بعد قيام الحشرات بنقل المرض إلى نبات الذرة السليم.
 ٥. عند تكشف أعراض المرض وظهورها، يتم نقل الحشرات إلى قفص كبير مع نباتات الذرة السليمة.
 ٦. انقل الذرة المصابة حديثاً بالفيتوبلازما المسببة لمرض تقزم الذرة (MBSP) إلى قفص الحجر حتى الحاجة إلى مزيد من الحشرات المعدية (انظر: الملاحظة ١٩).
 ٧. اترك الحشرات في القفص لإنتاج البيض والعداري لتمر عبر مراحل الأطوار حتى وصولها إلى حشرة كاملة (انظر: الملاحظة ٢٣).
 ٨. يجب مواصلة فصل المستعمرات بعد تكون جيل جديد، ومنه يتم تنظيف الأقفاص القديمة، كما يجب أن تترك بعض المساحات للأعمال المستقبلية.

٤- الملاحظات:

١. هذا الأمر مثالي للتعامل مع حشرات (نطاط الأوراق، ونطاط النباتات، وحشرة البسيليدي) داخل الأقفاص مع توفر الظروف البيئية المناسبة، حيث يمكن استخدام استجابتها للطيران نحو الضوء للتعامل معها وفصلها وتحديد جنس تلك الحشرات. وللتعامل مع الحشرات خارج الأقفاص، سيكون هناك حاجة للأضواء خلف الشاشات، وذلك لتوخي عدم وصول حرارة المصابيح إلى الحشرات؛ حيث إنها تتأثر بذلك، وقد تموت بسرعة كبيرة.

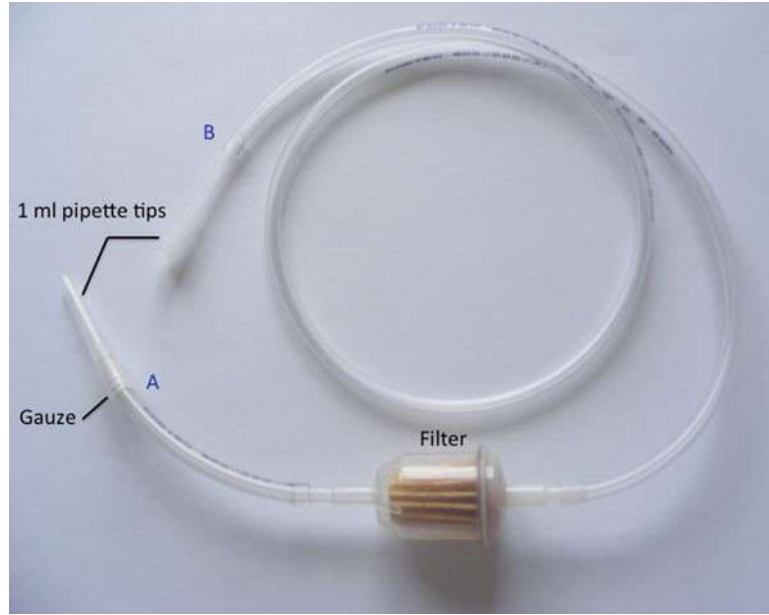
إضافات اختيارية:

• يمكن لأداة الشفط اليدوية أن تقوم بتجميع الحشرات واستبدالها بحيث يتم التعامل مع الحشرات بسهولة. ويمكن عن طريق الـ Rose Entomology (PO box 1474)، Benson، AZ، 85602، USA أن يمدنا بمجموعة جيدة من هذه الأدوات. وهذا له فائدة كبيرة عند جمع الحشرات في الحقل، ثم إضافتها إلى قفص إكثار الحشرات.

• كما يمكن استخدام مضخة هوائية صغيرة لشفط الحشرات وصيدها عن طريق إضافة أنبوب إلى صمام المضخة، أو وضع أداة الشفط في صمام دخول الهواء في المضخة. ومثال لذلك: مضخة الهواء الصغيرة B100 SE من Charles Austen Pumps Ltd Royston Rd، By، Surrey، fleet، UK، KT14 7NY،

٢. يوفر جهاز الشفط وسيلة مفيدة للتعامل مع حركة الحشرات، وخصوصا الحشرات الهشة الصغيرة. ويمكن شراء شفاطات الفم والمضخات أو صنعها محليا، وهي متشابهة جدا في التصميم. ويمكن صنع أنموذج واحد بسيط مع اثنين من الأنابيب الماصة بمقاس ١ مل، وأنبوبة ٧٠ سم مع قطر ٦ ملم، وبعض الشاش ومرشح كما هو في (الشكل ٢). إن استخدام المرشح أمر اختياري ولكنه يقلل من تواجد (brochosomes)، وهي عبارة عن حبيبات مجهرية يفرزها نطاط الأوراق، وأيضا يقلل من ذرات الغبار. ولصناعة أداة شفط، يمكن استخدام اثنين من الأنابيب الماصة، وقطعها لجزئين، بكل طرف منهما نتوء حاد ومائل، ثم قطع الأنبوب بطول ١٠، و ٦٠ سم على حدة، ثم يتم وضع ٢,٥ سم من شاش مربع على إحدى النهايتين للأنبوبة بطول ١٠ سم، وادفع من طرف الماصة إلى النهاية، ثم ادفع فوهة الفتحة الأمامية إلى الطرف الآخر من الأنبوب البالغ طوله ١٠ سم والفوهة الخلفية في إحدى نهايتي الأنبوب البالغ طوله ٦٠ سم؛ ثم ادفع الطرف المائل لطرف الماصة المتبقي في الطرف الآخر من الأنبوب.

٣. يمكن أن تكون أقفاص تربية المستعمرات من أي حجم، وذات تصميم يتناسب مع متطلبات العمل، ومصنوعة من نوعية جيدة مع إطارات الألومنيوم والشاش (١٧). وتستخدم البلاستيك الشفاف في مناطق التهوية، وتصنع إطارات القفص من البلاستيك مع الشاش، وهذه الأقفاص متواجدة في متجر Taichung، BugDorm Store (MegaView science Co. No. 656-2 Fuya Rd، Taiwan)، 40762. وقد تم تصنيع أقفاص الحشرات من قبل شركة Polaris Instruments Ltd، وتم تصميمها من قبل Dr Ian Bedford at the John Innes Centre. وتتكون الأقفاص من بلاستيك داكن، وإطار من الألومنيوم، مع جوانب وسقف شفاف من البلاستيك. وقد تم تجهيز الأقفاص بالشاش على جانبيها، ومروحة كهربائية في الخلف، واثنين من الأبواب المغناطيسية على المقدمة (الشكل رقم ١). وبعض الأقفاص البلاستيكية ذات الشبك المعدني تكون عرضة للانسحاق والصدأ إذا تركت في الماء لفترات طويلة. ولإطالة عمر كل صندوق، يجب الاهتمام بالتنظيف المنتظم.



الشكل ٢: أنموذج مبسط التركيب سهل الصنع لشفاط صيد الحشرات. ويمكن ضبط الشفاط وتركيبه بمضخة عن طريق إزالة طرف (النقطة A) ووضعها على صمام الإدخال الخاص بالمضخة. ويمكن - أيضا - أن تستخدم هذه الشافطة لجمع الحشرات في الحقل، ويمكن فصل المضخة ببساطة واستبدال أي طرف منها، كما يمكن استبدال طرف من النقطة B مع علبة جمع الحشرات. ويمكن شراء علبة خاصة لجمع الحشرات مع علب ذات أنابيب متعددة. ولتغيير الأنابيب الشفاطة، اضغط برفق على الجزء السفلي من الأنبوب على الطاولة، ومنه ستقوم الحشرات بالتساقط في الجزء السفلي من الأنبوبة، وعندها يمكن إزالة الأنبوبة وتغطية جميع الحشرات. قم باستخدام أنابيب جديدة لجمع حشرات أخرى.

٤. تستخدم هذه الأقفاص لنبات واحد على المدى القصير، وعديد من أنواع البلاستيك ليس مناسباً للاستخدام بسبب المعاملات التي تتم عليها من قبل المصنع وتكون ضارة بالحشرات. ومن الأفضل تجنب استخدام البلاستيك لعلب المشروبات (Polymer Plastics Company LC, 550 Mallroy Way, Carson City, NV 89701, USA). كما يمكن قطع الأنابيب المصنوعة من مادة البوليمرات لجعل الأقفاص قوية جدا. كذلك، يمكن صنع الأغطية من البلاستيك مع عمل فتحة دائرية للتهوية محكمة الإغلاق بالشاش، أو يمكن استخدام الشاش فوق الجزء العلوي من القفص مع ربطه بشريط مطاطي. ومن المفيد -أيضا- استخدام الأغطية البلاستيكية المجهزة (The Bag N Box Man Ltd. Unit 1, West St, Shutford, Banbury, Oxfordshire, OX15 6PH, UK). وهناك أنواع من الأنابيب تسمى (جيتران) (Jetran) أكثر مرونة بكثير من المصنوعة من البوليمرات، ويمكن قطعها إلى أي طول حسب الحاجة، كما أنها خفيفة. ويمكنك قطع ثقب صغير في الغطاء، ووضع مادة لاصقة على دائرة من الشاش، وذلك للتهوية. وبمجرد صنعها، يمكن غسل الأقفاص مرتين باستخدام الماء الدافئ مع بعض المنظفات، ثم

- تترك لتجف. وهذا يساعد على التخلص من المواد اللاصقة داخل القفص؛ والذي يؤدي إلى التصاق الحشرات في جوانب القفص، وقد يؤدي إلى موت تلك الحشرات.
٥. بذور نبات الأرابيدوسيس صغيرة جدا، وغالبا ما تبقى في أنابيب. وفي هذه الحالة، من الممكن ظهور بعض الشحنات الكهربائية في الأنبوبة؛ والذي يؤدي إلى خروج تلك البذور بكميات كبيرة. ولتجنب ذلك، اضغط على الأنبوبة بظفرك بلطف للسماح لبعض البذور بالانتشار.
٦. المعاملة الباردة تحث البذور على الإنبات والنمو.
٧. يتم إعداد الأضيء بإضافة التربة الزراعية والماء، وعمل حفرة بعمق ١ سم في التربة الرطبة باستخدام فرشاة للتأكد من وضع البذور في مكانها الصحيح. ولبدء عملية الزراعة، أفضل البادرات بلطف عن بعضها باستخدام ملقط، وضعها في الحفرة المعدة مسبقاً في التربة الزراعية، ويتم تغطية جذر البادرات بلطف باستخدام الملقط والفرشاة، مع الحرص على عدم تلف البادرات.
٨. يُظهر نبات الأرابيدوسيس أفضل النتائج في ظروف رطبة معتدلة؛ فترك النبات ١٠ ساعات يوميا عند ٢٠ درجة مئوية يسمح بنموه وإزهار النبات، وينبغي إزالة أي نباتات ظهر عليها أعراض للإصابة، مثل: الإصابة بحشرة المن، أو أمراض العفن.
٩. عندما تصل المواد من مراكز بحثية أخرى، قم بالتعامل معها على الفور، وقم بإزالتها من حافظاتها؛ وذلك لإطالة عمر النبات وبيض الحشرات.
١٠. سوف تجد أن الحوريات الحشرات أسهل في التعامل معها ونقلها إلى نباتات حديثة؛ إذا كانت على نباتات قديمة في القفص، وهذا يضمن بقاء أفضل للحوريات.
١١. مرحلة التحول إلى حشرة كاملة هي آخر مرحلة تمر بها الحشرة حتى تصبح حشرة بالغة، ويعتمد ذلك على جنس الحشرة والظروف البيئية.
١٢. حرك القفص في (غرفة مظلمة/صناديق مظلمة) من الضوء، ثم اضبط مصباح الطاولة بالقرب من جانب واحد من القفص البلاستيك. وبعد ٥-١٠ دقائق، سوف تستقر الحشرات على مكان تسليط الضوء في القفص. وهنا، يمكن عدّها وتحديد نسبة الأجناس من ذكر وأنثى. ويتم تحديد جنس (نطاطات الأوراق، ونطاطات النباتات، وحشرة السيليدي) بسرعة عن طريق وجود آلة وضع البيض الغامق اللون، وتكون على الجانب السفلي من البطن. إن التعرف على آلة وضع البيض هو أسهل طريقة للتمييز بين الإناث والذكور في حشرات النطاطات والسيليدي، بدون استخدام العدسة اليدوية. ومع ذلك، فإن آلة وضع البيض في الإناث الصغيرة غير واضحة مثل تلك التي لدى الإناث الأكبر سنا. لذا، يجب توخي الحذر في تحديد الجنس. كذلك، الذكور تحتوي -بوضوح- في أسفل البطن على شعيرات عن منطقة نهاية تحت البطن. وإذا كنت تشك في الأمر يمكن استخدام عدسة اليد. ومن الجدير بالملاحظة -أيضا- أثناء التعامل، أن سلوك

- الحشرات يتغير كثيرا مع التقدم في السن؛ إذ يمكن للبالغين أن يصبحوا أكثر قابلية للطيران، مع إمكانية انتقال الذكور إلى الضوء أكثر من الإناث.
١٣. تقسيم المستعمرات يولد مزيداً من الحشرات، مع تقليل مخاطر فقدان جميع الحشرات في فشل المستعمرة أو تلوثها. وفي بعض الأحيان، يمكن أن يحدث إنتاج عدد كبير من الذكور. وفي هذه الحالة، لن يتم تقسيم المستعمرة، وببساطة حفاظاً على المستعمرة؛ حتى يظهر جيل جديد. وينبغي أن تكون نسبة الجنس متعادلة، ثم يمكن تقسيم المستعمرة.
١٤. سوف تكون هذه الحشرات أكبر في السن، وسوف يحتاج القفص دائماً إلى التنظيف بسبب المواد الصمغية والأعفن؛ بحيث يمكن استخدامه للجيل القادم. ويضمن التخلص من المستعمرات القديمة والحفاظ على النظافة وجود حشرات خالية من الأمراض. كما يجب إجراء فحوص مستمرة للتأكد من صحة المستعمرات السليمة. وإذا أظهرت تلك الحشرات أي إصابة بالفطريات، فإنها -غالباً ما- تصاب بالكسل، ويمكن أن تغطى بمسحوق أزرق أخضر قاتل، ويجب التخلص من المستعمرات لتجنب انتشار تلك العدوى الفطرية. وإذا أصيحت النباتات مصابة بالعناكب أو الحلم أو المن أو العفن، فيجب محاولة السيطرة على الإصابة؛ عن طريق إزالة النباتات أو استبدالها أو قتل المستعمرة. وتعتمد المستعمرات المحافظ عليها جيداً على نوع القفص المتاح، والأماكن المتاحة للأقفاص، وطول عمر النبات، وطول مدة دورة حياة الحشرات.
١٥. من الناحية المثالية، يكون القفص بداخله ما لا يقل عن أربعة نباتات. وفي حالة استخدام نباتات مطعمة، حالما تكشف الإصابة بالفيتوبلازما في جميع النباتات، ضع النباتات في أقفاص فردية.
١٦. العدد الدقيق للحشرات يعتمد على نوع الحشرات، وحجم النبات وحالته. والهدف من ذلك، هو السماح للنباتات بالبقاء على قيد الحياة لفترة كافية؛ بحيث يكون للحشرات الوقت الكافي للتغذية واكتساب الفيتوبلازما من اللحاء. ويمكن للنباتات الكبيرة مقاومة عديد من الحشرات.
١٧. وقت اكتساب الحشرات للفيتوبلازما يختلف باختلاف أنواع الحشرات والفيتوبلازما. وفي كثير من الحالات، تكون مدة أسبوعين كافية. ومع ذلك، قد لا تعيش النباتات طويلاً، وسيكون هناك حاجة لمزيد من النباتات.
١٨. في هذه المرحلة، إذا كان النبات المصاب لا يزال على قيد الحياة، فيمكن إضافة مزيد من الحشرات للحصول على الفيتوبلازما. وإذا لم يحدث ذلك، يجب إغلاق القفص وتنظيفه.
١٩. إزالة الحشرات من هذه النباتات سوف تساعدهم على العيش لفترة أطول؛ لاستخدامها في وقت لاحق في (تكوين/الحفاظ) على مزيد من المستعمرات.
٢٠. يمكن لنطاطات الأوراق (*M. quadrilineatus*) -وغيرها من النطاطات- إنتاج أعداد هائلة على نبات الشوفان. لذلك، فستحتاج إلى عدد أقل من المستعمرات. وللحصول على نبات الشوفان،

يمكن زراعة ١٥-٢٠ من بذور الشوفان، ووضع البذور في أصيص بقطر ١٤ سم، وتغطي البذور بالتربة الزراعية بارتفاع ١ سم، وتترك في البيوت المحمية لمدة ٤ أسابيع. ويتم تركها لتنمو على مدى ١-٣ أسابيع لتصل إلى العمر والطول المطلوبين لنمو المستعمرات، ويعد طول ٢٠-٤٠ سم طولاً مناسباً لبدء نمو المستعمرات.

٢١. استخدام نبات الأستر الصيني الطويل يؤدي إلى الحصول على أفضل النتائج، مثل: Bridesmaid (Sutton Seeds, Woodview Road, Paignton, Devon, UK). أما في حالات الخس فيمكن استخدام Paris Island and Lobjoits (Ball Colegrave, West Adderbury, Banbury, Oxfordshire, UK). وهذه الأنواع تعطي كميات كبيرة من الفيتوبلازما (AY-WB) مع وضوح الأعراض.

٢٢. يجب أن تظل نباتات (الخس، والأستر) على قيد الحياة؛ من أجل الحصول على فترة اكتساب ثانية. أما نبات الأرابيدوسيس فهو أكثر النباتات ضعفاً، وربما لن يكون قادراً على الصمود لفترة اكتساب ثانية للمرض.

٢٣. تستغرق حشرات نطاط الأوراق *M. quadrilineatus* ٤,٥ أسابيع من وضع البيض للوصول لمرحلة الحشرة الكاملة خلال ١٦ ساعة يومياً على درجة حرارة ٢٢ مئوية، و٢٤ مئوية في الليل. وفي هذه المرحلة، سوف تصاب النباتات، ويمكن تقسيم النباتات الكبيرة وتقسيم الحشرات الجديدة لتشكيل مستعمرة إضافية. كما يجب أن تكون نسبة الحشرات البالغة من الإناث إلى الذكور (٢:١، أو ١:١).

٢٤. تحتاج أقفاص نباتات الذرة أن تكون طويلة وجيدة التهوية ومحكمة الإغلاق؛ حيث يمكن للنبات دفع الأغذية أثناء نموه.

٢٥. استخدام نباتات الذرة (Zea mays var. rugosa) cv. Early Sunglow (Park Seed Co. Greenwood, South Carolina, USA)؛ وذلك للحصول على أعراض واضحة للإصابة بالفيتوبلازما.

٢٦. تستغرق نطاطات الأوراق *D. maidis* مدة أربعة أسابيع من وضع البيض حتى تصل لمرحلة الحشرة الكاملة؛ وذلك خلال ١٦ ساعة يومياً عند درجة حرارة ٢٦ مئوية، و٢٢ مئوية في الليل. وفي هذه المرحلة، سوف تصاب النباتات، ويمكن تقسيم النباتات الكبيرة، وتقسيم الحشرات الجديدة لتشكيل مستعمرة إضافية.

الشكر والتقدير:

أود أن أتقدم بالشكر والعرفان إلى: Angela Stroock (بمركز البحوث والتنمية الزراعية، ووستر، جامعة ولاية أوهايو، ٤٤٦٩١)، وكذا: الدسوقي عمار (بوحددة بحوث الحشرات شبه الاستوائية، وزارة الزراعة الأمريكية، USDA-ARS, Fort Pierce, FL. 34945)؛ لدراسة الحفاظ

على نطاقات الأوراق، والتعامل مع تلك الحشرات. كما أوجه الشكر والتقدير -أيضا- إلى: Dr Saskia Hogenhout (بمركز جون أينييس، مجمع البحوث نورويتش، نورويتش، NR4 7UH، المملكة المتحدة)؛ وذلك لما قدمه من توجيه، ولجميع العاملين بالمركز. وقد تم تمويل المشروع من قبل (مجلس بحوث التكنولوجيا الحيوية والعلوم البيولوجية).

المراجع:

1. Sugio A et al (2011) Phytoplasma protein effector SAP11 enhances insect vector reproduction by directly manipulating plant development and defense hormone biosynthesis. PNAS USA. doi: 10.1073/pnas.1105664108
2. Murrall DJ et al (1996) Effects of temperature and vector age on transmission of two Ohio strains of aster yellows phytoplasma by the aster leafhopper (Homoptera: Cicadellidae). J Econ Entomol 89:1223-1232
3. Galetto L et al (2009) Variation in vector competency depends on chrysanthemum yellows phytoplasma distribution within Euscelidius variegatus. Entomol Exp Appl 131:200-207
4. Marzachi C, Bosco D (2005) Relative quantification of chrysanthemum yellows (16Sr I) phytoplasma in its plant and insect host using real-time polymerase chain reaction. Mol Biotechnol 30:117-127
5. Beanland L et al (2000) Influence of aster yellows phytoplasma on the fitness of aster leafhopper (Homoptera: Cicadellidae). Ann Entomol Soc Am 93:271-276
6. Bressan A et al (2005) Effects of two strains of Flavescence dorée phytoplasma on the survival and fecundity of experimental leafhopper vector Euscelidius variegatus Kirschbaum. J Invertebr Pathol 89:144-149
7. Malagnini V et al (2010) A study of the effects of 'Candidatus Phytoplasma mali' on psyllid Cacopsylla melanoneura (Hemiptera: Psyllidae). J Invertebr Pathol 103:65-67
8. Tedeschi R, Bosco D, Alma A (2002) Population dynamics of Cacopsylla melanoneura (Homoptera: Psyllidae), a vector of apple proliferation phytoplasma in northwestern Italy. J Econ Entomol 95:544-551
9. Tedeschi R, Alma A (2004) Transmission of apple proliferation phytoplasma by Cacopsylla melanoneura (Homoptera: Psyllidae). J Econ Entomol 97:8-13
10. Hughes GL et al (2008) In vitro rearing of Perkinsiella saccharicida and the use of leaf segments to assay Fiji disease virus transmission. Phytopathology 98:810-814
11. Maramorosch K (1999) Leafhopper and planthopper rearing. In: Maramorosch K, Mahmood F (eds) Maintenance of human, animal, and plant pathogen vectors. Science Publishers, Enfield, pp 199-211
12. Ammar E-D, Hall DG (2011) A new method for short-term rearing of citrus psyllids (Hemiptera: Psyllidae) and for collecting their honeydew excretions. Fla Entomol 94:340-342
13. Skelley LH, Hoy MA (2004) A synchronous rearing method for the Asian citrus psyllid and its parasitoids in quarantine. Biol Control 29:14-23

14. Zhang J et al (2004) Molecular and symptom analyses of phytoplasma strains from lettuce reveal a diverse population. *Phytopathology* 94:842–849
15. Ebbert MA, Nault LR (2001) Survival of *Dalbulus* leafhopper vectors improves after exposure to maize stunting pathogens. *Entomol Exp Appl* 100:311–324
16. UK Department of Food and Rural Affairs (2009) Explanatory leaflet on the issue of licences for the import, movement and keeping of prohibited plants, plant material, plant pests, soil and growing medium. <http://www.fera.defra.gov.uk/plants/forms/documents/plantHealth/DEF-PHI1-FERA-1.pdf>. Accessed 11 Nov 2011
17. Nault LR, Ammar ED (1989) Leafhopper and planthopper transmission of plant viruses. *Annu Rev Entomol* 34:503–529

صيد الحشرات الناقلة للفيتوبلازما

Phyllis Weintraub and Jürgen Gross

ملخص:

إن الحشرات الناقلة لمرض الفيتوبلازما هي حشرات: نطاطات الأوراق leafhoppers، نطاطات الأوراق planthoppers، والبسيليدي psyllids. وبالرغم من إمكانية رصد مجموعات الحشرات بعدد من التقنيات السهلة في الحقول، إلا أن الحصول على حشرات حية يعد أمراً مهماً للدراسة والمعالجة. وبالفعل، هناك عديد من الطرق الفيزيائية لصيد هذه الحشرات، ولكن تم تطوير مصائد أكثر ابتكاراً مزودة بـطعم إنفوكيميائي infochemical؛ لرصد فصائل معينة، وللحصول على مجموعة كبيرة منها.

الكلمات المفتاحية: نسيج الصيد، أقفاص طوارئ، المواد الكيميائية من نوع infochemical، الكيرمون، صيد المجموعات، الرصد، الفيرومونات، طريقة الجذب والدفع، مصائد لاصقة، الشفط، المركبات العضوية المتطايرة.

١- المقدمة:

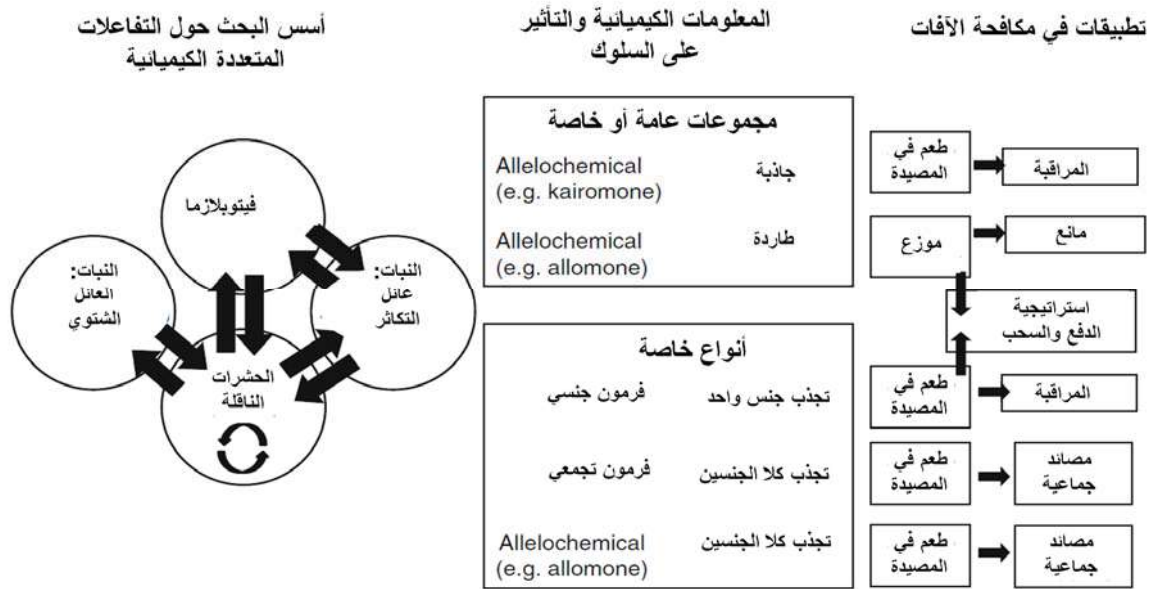
هناك ثلاث طرق لإصابة النباتات بالفيتوبلازما؛ أولها: غذاء الحشرات، وثانيها: التطعيم/التكاثر النباتي، وثالثها: الاتصال بين النباتات السليمة والمصابة من خلال النباتات الطفيلية، مثل الـ *Cuscuta* spp. ويعتبر غذاء الحشرات من أهم طرق الانتقال على المستوى الموضوعي؛ بأن كل الحشرات الناقلة للمرض المعروفة من النوع نصفي الأجنحة (Hemiptera)، والتي تعتبر عواقبها وخيمة في مسألة انتشار المرض وباء؛ حيث تتغذى الحشرات الصغيرة والكبيرة منها على النباتات نفسه، وتتغذى بشكل رئيسي على أنسجة نباتية معينة -مثل: اللحاء- والذي هو مستوطن الفيتوبلازما، ولا تؤثر التغذية على النبات، كما أنها لا تثير رد فعل دفاعي للنبات. ويعد نقل المرض محددًا بالحشرات Cicadellidae, Fulgoromorpha, and Psyllidae (١). وبالنسبة للحشرات الناقلة للمرض المتخصصة، يجب أن تكون الفيتوبلازما قادرة على اختراق خلايا المعدة، ومن ثم ترحل وتتكاثر في خلايا الغدد اللعابية حتى تقوم بنقلها. وتعرف الفترة ما بين الاكتساب والانتقال بفترة

الكمون، وقد تستمر لأيام أو أشهر. وهناك حالات تؤكد حصول الحشرات على الفيتوبلازما، ولكنها تكون غير قادرة على نقلها (٢). ولهذا السبب، ولتحديد قدرة أي جنس من الأجناس على نقل الفيتوبلازما، ينبغي إجراء تجارب نقل بحشرات حية.

إن أعراض الإصابة بمرض الفيتوبلازما تحتاج بعض الوقت لتتطور، وقد لا يكون للحشرات علاقة بالنبات عند ملاحظة ظهور أعراض الإصابة؛ وذلك لأن الحشرة الناقلة للمرض قد لا تعود مقترنة بالنبات. لذلك، يجب متابعة النبات وقتاً أطول لتحديد وقت ظهور الحشرات المحتملة الناقلة للمرض. مثال ذلك: الـ *Scaphoideus titanus* التي تتغذى على جنس واحد فقط من النباتات (٣). في حين وجدت حشرات أخرى -مثل: الـ *Cacopsylla pruni* - تتغذى على عائلين مختلفين تماماً في مواقع مختلفة (٤)، وهذا الأمر يحتاج متابعة بطريقة مختلفة. وغالباً ما يتم الحصول على الـ Psyllids حية باستخدام مصائد خاصة تعرف باسم beating/beat sheets (٥). كذلك، يمكن استخدام شبكات الكانسة أيضاً. وغالباً ما يتم صيد نطاطات الأوراق Leafhoppers وهي حية باستخدام المصائد الضوئية (٦)، أو شبكات المسح (٧)، أو الجمع بالشفط (٨). إن مصائد ماليز Malaise يتم استخدامها لتحديد حركات الحشرات الناقلة للمرض واتجاهاتها (٩). ويتم استخدام أقفاص طوارئ للنباتات التي عليها حوريات نطاطات الأوراق للـ nymphal Fulgoromorpha (١٠). ويمكن ملاحظة كافة الحشرات الناقلة للمرض بمصائد لاصقة صفراء أو شفافة.

وقد تساعد الاكتشافات الحديثة التي تم إجراؤها على البيئة الكيميائية للـ Psyllidea والـ Fulgoromorpha على تصميم طرق جديدة ومبتكرة لصيد بتلك الحشرات (الشكل ١). ومؤخراً، تم توضيح أن هذه الحشرات تستخدم إشارات كيميائية لتحديد العائل والتوجه إليه. وتسمى هذه المواد الكيميائية الناقلة للمعلومات (أو المواد الجاذبة)، وقد تؤثر على الكائنات الحية الدقيقة بشكل عام (على سبيل المثال: تطاير رائحة الأوراق الخضراء). كذلك، قد تكون متخصصة لمجموعة معينة من الحشرات (على سبيل المثال: أنواع من الـ Kairomones)، أو قد تكون حتى محددة لأجناس معينة (على سبيل المثال: Pheromones). وعلى سبيل المثال: أجناس الـ Psyllid الـ *Cacopsylla picta* والـ *C. melanoneura* لها القدرة على تمييز التكاثر والبيات الشتوي للنبات العائل من خلال إشارات كيميائية يقوم بها العائل النباتي (١١). وتحليل التفاعلات الكيميائية بين الـ *C. picta*، والناقل الحشري الرئيسي للفيتوبلازما المسببة لمرض تشوه التفاح، *Candidatus Phytoplasma mali*، والعائل النباتي (في التكاثر والبيات الشتوي)، وجدت أن هذه الفيتوبلازما تجذب الـ *C. picta* إلى أشجار التفاح المصابة؛ وذلك بتغيير رائحتها (١٢، ١٣). إن الفيتوبلازما تحفز أشجار التفاح على إنتاج كميات كبيرة من السييسكيتريين (β -caryophyllene: Fig. 2b1)، وهذا ما تفضله وتتجذب إليه الحشرات حديثة الفقس الـ *C. pruni* قبل بدء هجرتها بعد فصل الشتاء للعائل النباتي (١٢، ١٤). وتزيد التغذية المكثفة على النباتات المصابة -عادة- من احتمالية اكتساب الفيتوبلازما. وعلى النقيض من ذلك، الأجناس غير الناقلة مثل: *C. hawthorn psyllid*،

الشتاء، تقوم حشرة *C. pruni* بالهجرة مرة أخرى إلى نبات التفاح، لكنها تفضل في المقام الأول النباتات غير المصابة (١٥).

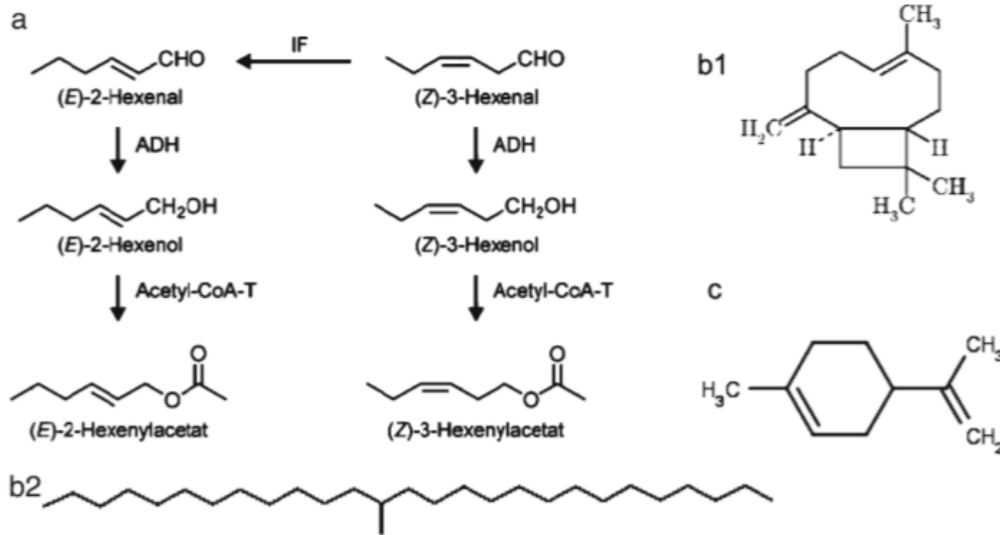


الشكل (١): الأبحاث التي تم إجراؤها على التفاعلات الغذائية عديدة بالوسط الكيميائي بين الفيتوبلازما، والنباتات المضيفة الخاصة بها، وبين الحشرات الناقلة للمرض التي تكشف عن إمكانية تحديد المواد الكيميائية الناقلة التي تؤثر على سلوك الحشرات الناقلة للمرض. وقد يتم استخدام هذه المركبات مُحسنة السلوك في التحكم بالحشرات بالتقنية الحيوية. وتكون طرق التطبيق باستخدام مركبات جاذبة لإمساكها في المصيدة ومراقبتها أو في حالات جذب كلا النوعين، للإمساك بمجموعة كبيرة. وقد يتم استخدام المركبات الطاردة رذاذاً أو في أنابيب؛ لجعل المحاصيل طاردة أو غير مناسبة للحشرات الناقلة للمرض. وقد يتم جمع المركبات الجاذبة والطاردة فيما يسمى باستراتيجيات الجذب والدفع.

إن هذا السلوك يؤدي إلى زيادة احتمال انتقال الفيتوبلازما إلى النباتات السليمة. وتظل هوية المواد الكيميائية التي تقوم بتنظيم عملية وضع البيض مجهولة. وتستخدم - أيضاً - الأجناس البسيليدي، مثل: الـ *C. pruni* (النتائج التي توصل إليها J. gross ولم تُنشر) و *Diaphorina citri* (١٦، ١٧)، أو الـ *Planthopper Hyalesthes obsoletus* (١٥)، أيضاً - وتعتبر الإشارات كيميائية العمل في تمييزها للعائل النباتي.

وبجانب المواد الكيميائية البديلة، والتي تُعد جاذبة لبعض أنواع الآفات الناقلة للمرض، فإن الفيرومون الجنسي قد يؤدي دوراً في سلوك حشرة البسيليدي. وكان يُعتقد لفترة طويلة أن الاتصال الضمني بين نطاطات الأوراق ونطاطات النبات والبسيليدي يحدث من خلال الصوت أو إشارات

اهتزازية (١٨، ٢٠). وقد تم التعرف على أول دليل سلوكي على وجود فيرمون الجنس في حشرات البسيليدي على *Cacopsylla bidens* (٢١)، *Cacopsyllid pyricola* (٢٢، ٢٣)، و *D. citri* (٢٤). وتم تحديد أول فيرمون جنسي للبسيليدي (13-methylheptacosane، الشكل 2b2) في القريب، وتم التعرف على حشرة البسيليدي للكثري الـ *C. pyricola*.



الشكل (٢): أمثلة على المركبات العضوية المتطايرة التي تعمل على تحسين سلوك الحشرات الناقلة لمرض الفيتوبلازما: (أ) مركبات جذب عامة (تساقط الأوراق الخضراء). (ب) مركبات جذب محددة لأنواع معينة، -β: 1: caryophyllene (allomone)، (12) (Cacopsylla picta) attractive for، 2: 13-methylheptacosane (فيرمون الجنس)، جاذب لذكور الـ *Cacopsylla pyricola* (٢٥). (ج) Limonene طاردة لـ *Trioxa apicalis*.

ويكون من الصعب على غير المتفرسين التعرف على حشرة الـ *Cacopsylla*؛ وذلك لصغرهما جداً، ولتشابه أشكالها. لذلك، تم استخدام مصائد مُخصصة لهذه للأجناس وتطويرها لتسهيل عملية التعرف عليها بشكل صحيح من قبل المزارعين. وبالتالي، تُساعد على تقليل كمية المبيدات الكيماوية المستخدمة بتحديد ميعاد الرش الأمثل. وبناءً على هذه الحقائق، يمكن صنع مصائد مُخصصة للأجناس أو للمجموعة، مع استخدام طعم مع مركبات جذب لصيد حشرة البسيليدي؛ وذلك بهدف المراقبة (١٤، ٢٦) (الشكل ٢). ويجب الأخذ في الاعتبار حالة تطوير أنظمة وطرق جديدة لصيد الآفات تكلفة الطعوم الكيماوية، وقوة الجاذب (الفعالية)، واستمرار المواد الكيماوية في الحقول (٢٧). وعندما تنتج النباتات المُصابة مواداً كيميائية تنجذب إليها ذكور حشرة البسيليدي وإناثها، وتسري هذه الحالة على أشجار التفاح المُصابة (١٢، ١٤)، ويكون من الممكن تطوير أنظمة الصيد؛ وللأجل تكون طريقة لمكافحة لحشرات فيما بعد (الشكل ١)

(انظر: الملاحظة ١). ويعرض هذا الفصل مجموعة من المصائد الفعالة لصيد الآفات، ومراقبة الحشرات الناقلة للفيتوبلازما؛ والتي يمكن استخدامها في عديد من الحالات.

٢- المواد:

يمكن شراء المعدات (مثل: أغطية لصيد الحشرات، أقفاص الطوارئ، المصائد الضوئية، مصائد ماليز، المصائد اللاصقة، شبكات المسح، وشفطات للعينات) من الموردين المتخصصين العلميين، أو/و من المتخصصين في علم الحشرات. إن بعض المواد الكيميائية البديلة متوفرة للشراء، في حين أن بعضها يجب تصنيعها على يد مختصين أو بالاشتراك مع باحثين آخرين.

١-٢: المصائد الميكانيكية:

١. نسيج الصيد: يتم تحضير الغطاء المربع من الورق بمقاس (1-0.5 m²) من مواد صلبة، مثل: الموسلين، ثم قم بتثبيت الجوانب لعمل جيوب مثلثة، وثبت كل جانب من كل زاوية بطول 10 cm ~، ثم قم بشراء أوتاد مختلفة الأطوال (1 cm diameter ~)؛ وذلك لصنع إطار متشابك متقاطع يناسب زوايا الغطاء. ويمكن استبدالها بأي شيء مشابه، مثل: مظلة خفيفة اللون، أو صحن خفيف الوزن واللون، أو قطعة خفيفة اللون من القماش.
٢. مصيدة الشفط: عدل المروحة اليدوية المتحركة بالغاز لدفع الهواء وذلك بتحويله إلى سحب الهواء، ثم أرفق خرطومًا صلبًا أو مرنا طوله 1-1.5 m وقطره 15-30 cm إلى المدخل لشفط الهواء، ثم قم بتوزيع ٣ إلى ٤ مسامير خاصة على مسافات متباعدة بالتساوي حول الفتحات. ويتم شراء أو صنع مجموعة من الأكياس من شبك النيون حتى تلائم قطر الخرطوم، ثم ثبت مجموعة الأكياس في الخرطوم بشرائط مطاطية حول المسامير الخاصة.
٣. أقفاص طوارئ: يمكن صنع أقفاص مستطيلة أو مربعة بأي حجم، وبإطارات خشبية أو بلاستيكية أو معدنية، ويجب أن يظل وزنها خفيفًا لنقلها بسهولة. وينبغي تغطية جوانبها الخمسة بمنخل لأبعاد (50-mesh)؛ وذلك لمنع الآفات الناقلة للأمراض من الهروب، ويجب ترك مساحة لتحرك الهواء حتى لا ترتفع الحرارة. وقد يتم وضع مصائد لاصقة للآفات الهاربة.
٤. شبكات المسح: يمكن استخدامها مع الغطاء النباتي المنخفض، ويلائمها 1 m طول العصاة المسكة بالشبكة، ويمكن استخدام طول قبضة 4 m للأشجار.

٢-٢: صيد الآفات باستخدام إشارات كيميائية ومرئية:

١. المصائد المزودة بإشارات مرئية: يمكن صنع هذه المصائد ببلاستيك شفاف أو أصفر اللون، ولكن يجب أن يكون صلباً بشكل كاف حتى لا يتلف. وقد يختلف حجم المصيدة

لتصل إلى 50 cm مربعاً، ولكن يجب أن تكون ثابتة أثناء فترة المراقبة. ومن الممكن أن تكون مقاومة للماء، أو يمكن استخدام غراء زيتي، أو استخدام زيت الطهي.

٢. المصائد المزدودة بمواد جذب كيميائية: ويمكن شراء مواد الجذب الكيميائية - إن توفرت- من الأسواق التجارية (بعض النباتات تنتج مركبات متطايرة (VOCs))، وقد تصنع بكميات مناسبة في المعامل الكيميائية (الفيرمونات). ويمكن التأكد من انطلاق مواد الجذب الكيميائية من خلال المواد التالية: (ورقة الفلتر، غشاء التوزيع، أنابيب صغيرة مطاطية، شريط لاصق، مركبات هلامية، وغيرها). ومن هذه المصائد النشطة: (المضخات الدقيقة، أو البخاخات الدقيقة الكهروضغطية) (٢٨، ٢٩). وقد يتم استخدامهم لعمل خليط أو مادة واحدة من المواد الكيميائية الجذابة أو الروائح؛ حيث تعد بمعدلات ونسب ثابتة، كما أن هناك عديداً من الأنواع متوفرة. لذلك، يجب إعدادها بما يلائم المتطلبات الضرورية لصيد الأجناس المستهدفة. وقد تضاف مادة الـ Paraffin oil إلى المركبات النشطة كي تؤخر عملية انطلاق هذه المركبات المتطايرة. وهناك عديد من المصائد المختلفة متوفرة تجارياً ويمكن شراؤها، أو يمكن تطويرها وصناعتها، ويتوقف ذلك على سلوك أجناس الآفات الناقلة للأمراض المستهدفة. ويجب تزويدها بنظام مناسب لإطلاق مواد جذب وعمل خليط معين من المركبات التي تجذب أجناساً خاصة من الحشرات المستهدفة.

٣- طرق العمل:

يجب ملاحظة تعداد الحشرات بطريقة منتظمة؛ (أسبوعياً، كل أسبوعين، شهرياً). ومن الأفضل أن تتم هذه الملاحظة قبل خروج الحشرات في الحقل حتى يقل تعددها. ويجب تعداد العينات في كل حقل عن عشر مصائد أو نباتات؛ وذلك للحصول على بيانات دقيقة (انظر: الملاحظة ٢).

٣-١: طريقة الطرق:

تُستخدم مع الشجيرات الخشبية أو الأشجار لجمع الآفات حية، خصوصاً البسيليدي (انظر: الملاحظة ٣):

١. قم بوضع الغطاء المصيد تحت الفرع حتى أخذ العينات.
٢. استخدام عصا قصيرة بلاستيكية أو مطاطية لضرب الفرع دون التسبب في قطعه.
٣. قم بجمع العينات بالشفط.

٢-٣: مصائد الشفط:

- تستخدم مع كافة أنواع النباتات والآفات الناقلة للأمراض:
١. يتم شفط جزء من النبات.
 ٢. احفظ كيس الجمع في مكان بارد حتى يتم نقلها إلى المعمل للتعرف عليها والتعامل معها.

٣-٣: أقفاص الطوارئ:

- يتم استخدامها مع نباتات العائل المناسبة، خاصة مع Fulgoromorpha:
١. ضع المصيدة تحت النبات المستهدف وثبتها حتى لا تستطيع الآفات الناقلة للأمراض الحديثة الهروب.
 ٢. يمكن تثبيت المصائد اللاصقة في القفص لجمع العينات.

٤-٣: شبكات المسح:

- تستخدم مع كافة النباتات، للعينات الحية:
١. يتم استخدام عدد ثابت من الكنسات في ما لا يقل عن أربعة مواقع في الحقل؛ وذلك في حالة المراقبة (٧).
 ٢. بعدها يتم فرز العينات المطلوبة وتعدادها.

٥-٣: المصائد الضوئية:

- تستخدم لمراقبة أنواع الآفات الناقلة للمرض أثناء الليل؛ للحصول على عينات حية أو ميتة:
١. يمكن صيد الحشرات بوضع دلو أو دورق زجاجي تحت الضوء.
 ٢. يمكن ملء الدورق بـ ٧٠٪ إيثانول أو جليكول البولي أيثيل؛ وذلك لحفظ العينات.

٦-٣: مصائد ماليز:

- تستخدم لمراقبة اتجاهات حركة الآفات الناقلة للعينات الحية أو الميتة:
١. تحتوي المصائد على دوارق صائدة لجمع (اثنين، أربع)، أو آفات عشوائية الاتجاه.
 ٢. يمكن ملء الدورق بـ ٧٠٪ إيثانول أو جليكول البولي أيثيل؛ وذلك لحفظ العينات.

٧-٣: المصائد اللاصقة:

- تستخدم للمراقبة العامة طويلة المدى للعينات الميتة فقط:

١. قم بوضع المصيدة في المكان المرغوب فيه لفترة كافية (ما تحتاجه من وقت) (انظر: الملاحظة ٤).

٢. يمكن إزالة العينات باستخدام الـ butane ، hexans ، أو أي مادة كيميائية مذيبة أخرى.

٣-٨: مصائد الآفات بمواد كيميائية جاذبة:

٣-٨-١: تحديد مواد الجذب الإنفوكيميائية المتوقعة:

١. توضع الكائنات الحية (النباتات، أو الآفات الحية) في قفص زجاجي مناسب، أو قم بوضع النباتات الكبيرة في أكياس خاصة (polyethylene terephthalate PET) مقاس (Ø 20 cm).

٢. يضح الهواء المنقى المتوفر تجارياً أو الهواء المنقى (بالفحم الحُببي، 4-8 mm) داخل الكونتینر أو الكيس لفترة كافية. ويمكن التحكم في تدفق الهواء من خلال مقياس التدفق.

٣. يتم جمع الـ VOCs من الآفات أو النباتات، ومن ثم تختار الطريقة المناسبة لإعداد تجربتك (انظر: الملاحظة ٥).

• ديناميكية أخذ عينات من الحشرات: يتم جمع الـ VOCs في فلتر للتجميع (مثل: 5 mg charcoal, Gränicher + Quartero, Daumazan, France)؛ ومن ثم تزال العينات المستخلصة التي تحتوي على الـ VOCs من خلال غسل الفلتر بمُذيب يحتوي على معيار داخلي (IS)؛ وذلك لقياسها فيما بعد، أو بتجميع الـ VOCs في أنابيب خاصة (thermodesorption) (زجاجية، أو معدنية) تحتوي على مواد ادمصاصية مناسبة (انظر: الملاحظة ٦).

• تقنية أخذ عينات من الحشرات بالطريقة الإستاتيكية: الحصول على مستخلصات صغيرة صلبة ((solid phase microextraction (SPME)) (انظر: الملاحظة ٧).

٤. لتحليل الـ VOCs المتحصل عليه من الحشرات أو النباتات، يجب أن يتم حقن العينات -مثل هذه المواد المستخلصة المتطايرة، (انظر: الفقرة الأعلى)- في جهاز كوموتوجرفي الغاز (gas chromatograph GC)، أو يتم بواسطة أنابيب خاصة بها مواد ادمصاص الخاصة (thermodesorption أو SPME fiber)؛ وذلك بتسخين الخليط عند درجة حرارة تتراوح ما بين ٢٥٠ - ٣٠٠ درجة مئوية (انظر: الملاحظة ٨).

٥. يتم اختيار عمود GC للفصل بين خصائص الهياكل الكيميائية للـ VOCs المتحصل عليها. أما بالنسبة لتحليل التطاير، فقم باستخدام عمود لخيوط السيليكا المنصهرة بشكل ثابت مناسب، nonpolar dimethyl polysiloxanes (مثل: DB-5، DB-1)، أو more polar

- polyethylene glycol polymers (e.g., DB-Wax, Carbowax ®) استخدم ٦,٠ من غاز الهيليوم كطور المحرك.
٦. يتم استخدام برنامج حراري مناسب لفصل المركبات المتحصل عليها بأفضل طريقة ممكنة.
٧. استخدام سبكتروميتر الكتلة (mass spectrometer MS) موصلاً بـ GC لتحديد تطابق المركبات المتباعدة؛ وذلك لمقارنة خصائص أنموذج التقسيم الأيوني (سبكتروم الكتلة) بالبيانات المأخوذة من مكتبات سبكترو الكتلة (انظر: الملاحظة ٩).
٨. يتم إثبات التطابق بحقن العينات المركبة في العمود نفسه، ويُفضل حقنها في عمودين بمستقطبات مختلفة، ومقارنة فترة التعلق وسبكترو الكتلة (انظر: الملاحظة ١٠).

٣-٨-٢: تقييم المركبات المحسنة سلوكياً:

١. يتم استخدام جهاز الكروماتوجراف الغازي الموصل بكاشف electro-entennographic (GC-EAD) لتحديد المركبات التي تم اكتشافها بقرون استشعار الآفات (انظر: الملاحظة ١١).
٢. يمكن إجراء التجارب السلوكية باستخدام المقياس الشمي ديناميكياً أو (static olfactometers)، والقنوات الهوائية أو (Kramer sphere)، حيث تعتمد على سلوك معين للكائنات الحية المستهدفة (انظر: الملاحظة ١٣).
٣. يضح الهواء المنقى في حاويتين تحتويان على VOC تجريبياً، ونهاية كل منهما بذراع تجريبي من المقياس الشمي (static olfactometers). ومنه يتم التحكم في تدفق الهواء بمقياس التدفق (انظر: الملاحظة ١٣).
٤. بعدها، يتم حصر كل العناصر التي تصل إلى نقطة النهاية أو من الذراعين التجريبيين خلال فترة زمنية محددة (من ٥-١٥ دقيقة) (انظر: الملاحظة ١٤).
٥. يتم تحليل البيانات إحصائياً (على سبيل المثال: اختبار t، أو اختبار G)؛ إذا تم تجربة أكثر من حشرة بسليدي في الوقت نفسه.
٦. اختبر المركب الجاذب أو الخليط المكون من المركبات لاستخدامها عنصر جذب في المصائد الكيميائية.

٣-٨-٣: تطوير المصائد الكيميائية:

١. يتم اختيار مادة خاملة أو نشطة لتوفير (المركب/ الخليط الكيميائي) في المصيدة أثناء فترة تحليق الكائنات الحية الدقيقة المستهدفة.

٢. بعد ذلك، تفحص معدل إطلاق المركبات بالموزع عن طريق قياس وزنها أثناء فترة التجربة في الحالة الطبيعية (انظر: الملاحظة ١٥).
٣. تعدل معدلات إطلاق المركبات الكيميائية حسب الاحتياجات الطبيعية للأجناس المستهدفة.

٣-٨-٤: تعديل المصائد المتخصصة:

١. قم بشراء مصيدة متوفرة تجارياً، وعدل عليها وفقاً للنظام الذي تم شرحه في الفقرات السابقة لتطوير المصائد الكيميائية.
٢. يتم إضافة (سطح لاصق، مبيد حشري، أو سائل) (٧٠٪ من Poly-ethylene glycol، و Ethanol لحفظ العينات).
٣. افحص المصائد للكشف عن العينات التي تم صيدها.
٤. يتم ملاحظة مستوى الموزع للمركبات أثناء فترة تحليق الأجناس المستهدفة، وقم بتعبئته مرة أخرى عند الحاجة.

٤- الملاحظات:

١. بجانب ملاحظة الآفات الناقلة للأمراض بعد إمساكها في المصائد التي تحتوي على عناصر كيميائية جاذبة، يمكن -أيضاً- استخدام مصائد المجموعات بهدف المكافحة؛ وذلك عندما تكون المواد الكيميائية عامل جذبٍ لذكور الأجناس المستهدفة وإناثها. وقد يكون هذا هو الحال عندما يتم استخدام (فيرمونات تجميعة، كيرومونات النبات، أو allomones) عناصر جذب كيميائية (الشكل ١). إن فاعلية مصائد المجموعة يمكن ملاحظتها من خلال التجارب الحقلية ومن خلال المحاكاة بالكمبيوتر. وعند تطوير نظام الصيد الجماعي للآفات، يجب الأخذ في الاعتبار تكلفة الطعوم الكيميائية، وقدرة الجاذب في وحدة المساحة، وطول فترة بقاء الفرمون في الحقل. ولقراءة مزيد عن هذا الأمر، يقدم الموقع الإلكتروني (Byers ٢٧) برمجيات، Java applets، ومجموعة من الأدوات الأخرى المساعدة لهذه الطريقة.
٢. المصائد المراقبة، الشبكة الكانسة للعينات، ومصائد الشفط؛ يتم استخدامها بعد تبخر قطرات الندى من الحقل؛ حيث تلتصق الحشرات التي يتم صيدها بهذه الطريقة بالأكياس ويصعب التخلص منها. والعكس، في حالة وجود رياح قوية أو متوسطة، تتوارى الحشرات داخل النباتات؛ فيصعب مشاهدتها وصيدها. ويجب عدم تطبيق (مصيدة الطرق، والشفط، وشبكات المسح) أثناء هذه الفترات.
٣. يجب أن تتم مراقبة مجموعة الآفات وفقاً لديناميكيته؛ وذلك من أجل الحصول على كمية متوافقة من النتائج (٣٠). وللحصول على عينة واحدة، يجب أخذ عشرة فروع من كل عائل

٤. نباتي، وضرب كل فرع ثلاث مرات بقوة باستخدام عمود (طوله الفرع حوالي ١ متر تقريباً). ويمكن وضع الآفات المتحصل عليها من مصيدة غطاء الطرق، في كيس الجمع بولي إثيلين. ويمكن بعد أخذ العينات، وضع أكياس الجمع في ثلاجة لنقلها إلى المعمل؛ حيث يتم عد الحشرات وتعريفها لتحديد هيا وإخضاعها للتجارب لاحقاً.
٥. يتم تحديد الفترة الزمنية في الحقول وفقاً لكمية الأتربة المتراكمة على المصائد.
٦. المرجع (٣١)، يشرح بالتفصيل معلومات إضافية عن الطرق العلمية لتحليل المواد المتطايرة من النباتات للباحثين غير المتمرسين باستخدام التقنيات التحليلية.
٧. يمكن الحصول على لمحة عامة عن المواد الامتصاصية شائعة الاستخدام من المرجع (٣١). كما يمكن استخدام تحليل استخلاص اللوب المغلق (closed loop stripping analysis CLSA) عندما تقوم الكائنات الحية بإطلاق كمية صغيرة من المواد المتطايرة.
٨. تعتبر الـ SPME طريقة بسيطة وسريعة لتجميع المواد المتطايرة في حدود الكميات المنخفضة، ولأنها تحمل خصائص مميزة تُعد ملائمة لأخذ عينات الـ VOCs للحصول على تحليل نوعي لا كمي.
٩. عند استخدام جهاز العازل الحراري ذي المرحلتين، يتم تركيز العناصر المتطايرة المنبعثة حرارياً بالتبريد قبل حقنها في جهاز الكروماتوجرافي الغازي، في حين يتم العزل بالحقن مباشرة باستخدام الـ SPME.
١٠. تحتوي المكتبات الملائمة على مكتبة طيف الكتلة NIST-EPA-NIH في المعهد الوطني للمعايير والتكنولوجيا (National Institute of Standards and Technology، Mass Spectral Library، Wiley).
١١. في حالة كون المواد المتطايرة مركبة، يجب تنفيذ التحليل المتعدد، ويطبق تحليل VOC للتعرف على المواد من النباتات أو من خليط مكون من فرمون الحشرات (٣٢).
١٢. إن هذا الأمر يقلل عدد الـ VOCs التي قد تكون مسؤولة عن جذب الآفات الناقلة للأمراض إلى العائل النباتي. وبالتالي، تقلل -أيضاً- الجهود المطلوبة لتحديد المركبات المتغيرة سلوكياً.
١٣. تم إثبات فاعلية الأولفاكتوميتر، والذي يأخذ الشكل Y الديناميكي بالنسبة لبعض أجناس البسليدي ونشاطات الأوراق (١٠، ١٢)؛ حيث إنها تتكون -بشكل عام- من أنبوب زجاجي على شكل Y مثبت على لوح بارز.
١٤. يتم اختيار إما عينة واحدة (٥، ١٠)، أو عشر عينات (١٢، ٢١) فيما يتعلق بسلوك معين من الذكور أو الإناث للأجناس المستهدفة في الأولفاكتوميتر. ولا يتم اختبار أجناس مختلفة في الوقت نفسه.

١٤. إذا كان هناك حاجة لتحديد مدى نقل الآفات للمرض إلى النباتات، تحفظ العينات بعد إجراء التجارب السلوكية على الحشرات في زجاجات منفصلة ممتلئة بـ (٧٠-٩٦٪) من الأيثانول. وبعد ذلك، يتم استخلاص الـ DNA وتحديد الفييتوبلازما المطلوبة.
١٥. يجب أن يكون معدل انطلاق مواد الجذب ثابتاً -إلى حد ما-، وينبغي أن يظل فعالاً أثناء فترة تحليق الأجناس المستهدفة. إلا أنه، أثناء فترات ارتفاع درجات الحرارة المحيطة، قد يزداد معدل الانطلاق، وذلك يعتمد على مدى تطاير المركبات. لذلك، من المهم مراقبة مستوى المركب بالوعاء أثناء فترة تحليق الحشرات المستهدفة وملئها عند الحاجة. ولتقليل انبعاث المواد المتطايرة، يتم تخفيفها في زيت البرافين. ويتم استخدام أنظمة أخرى، مثل: المضخة الصغرى، أو Piezoelectric micro-sprayer لتخفيف معدلات درجة الحرارة -بشكل عام-، مع مراعاة انطلاق المركبات بمعدلات ثابتة.
١٦. إن الاستراتيجيات التي يطلق عليها الجذب-الدفع- تتطوي على المعالجة السلوكية للآفات الناقلة للأمراض من خلال الجمع بين مُحفزين مختلفين. ويعمل عنصر الطرد على جعل العناصر غير جذابة أو غير ملائمة للآفة الناقلة للمرض (حافز الطرد)، والجاذبة نحو عنصر الجذب (حافز الجذب)، مثل: وضع المصائد اللاصقة. وبالقيام بالتجارب والتفاعلات بين (النباتات، والفييتوبلازما، والحشرات الناقلة)، يتم منها التوصل إلى عملية عزل المواد الجاذبة والطاردة وتعريفها، وهذا قد يفتح الطريق للاستراتيجية المبتكرة في مكافحة تلك الآفات.

المراجع:

1. Weintraub PG, Beanland L (2006) Insect vectors of phytoplasmas. Annu Rev Entomol 51:91-111
2. Vega FE et al (1993) Detection of a plant pathogen in a nonvector insect species by the polymerase chain reaction. Phytopathology 83:621-624
3. Maixner M (1993) Scaphoideus titanus, a possible vector of grapevine yellows in New York. Plant Dis 77:408-413
4. Jarausch B, Jarausch W (2010) Psyllid vectors and their control. In: Weintraub PG, Jones P (eds) Phytoplasmas: genomes, plant hosts and vectors. CAB International Oxfordshire, Wallingford, UK, pp 250-271
5. Carraro L et al (2004) Macropsis mendax as a vector of elm yellows phytoplasma of Ulmus species. Plant Pathol 53:90-95
6. Pilkington LJ et al (2004) Reducing the immigration of suspected leafhopper vectors and severity of Australian lucerne yellows disease. Aust J Exp Agric 44:983-992
7. Rice Mahr SE, Wyman JA, Chapman RK (1993) Variability in aster yellows infectivity of local populations of the aster leafhopper (Homoptera: Cicadellidae) in Wisconsin. J Econ Entomol 86:1522-1526
8. Weintraub PG, Horowitz AR (1996) Spatial and diel activity of the pea leaf miner (Diptera: Agromyzidae) in potatoes, Solanum tuberosum. Environ Entomol 25:722-726

9. Irwin ME et al (2000) Diversity and movement patterns of leaf beetles (Coleoptera: Chrysomelidae) and leafhoppers (Homoptera: Cicadellidae) in a heterogeneous tropical landscape: implications for redressing the integrated pest management paradigm. In: Ekbom B, Irwin ME, Robert Y (eds) Interchanges of insects between agricultural and surrounding landscapes. Kluwer, Dordrecht, The Netherlands, pp 141–168
10. Sharon R et al (2005) *Vitex agnus-castus* is a preferred host plant for *Hyalesthes obsoletus*. *J Chem Ecol* 31:1051–1063
11. Gross J, Mekonen N (2005) Plant odours influence the host finding behaviour of apple psyllids (*Cacopsylla picta*; *C. melanoneura*). *IOBC/WPRS Bull* 28(7):351–355
12. Mayer CJ, Vilcinskis A, Gross J (2008) Pathogen-induced release of plant allomone manipulates vector insect behavior. *J Chem Ecol* 34:1518–1522
13. Mayer CJ et al (2009) *Cacopsylla melanoneura* has no relevance as vector of apple proliferation in Germany. *Phytopathology* 99:729–738
14. Mayer CJ, Vilcinskis A, Gross J (2008) Phytopathogen lures its insect vector by altering host plant odor. *J Chem Ecol* 34:1045–1049
15. Mayer CJ, Vilcinskis A, Gross J (2011) Chemically mediated multitrophic interactions in a plant–insect vector–phytoplasma system compared with a partially nonvector species. *Agric For Entomol* 13:25–35
16. Patt JM, Sétamou M (2010) Responses of the Asian citrus psyllid to volatiles emitted by the flowering shoots of its rutaceous host plants. *Environ Entomol* 39:618–624
17. Wenninger EJ, Stelinski LL, Hall DG (2009) Role of olfactory cues, visual cues, and mating status in orientation of *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae) to four different host plants. *Environ Entomol* 38: 225–234
18. Percy DM, Taylor GS, Kennedy M (2006) Psyllid communication: acoustic diversity, mate recognition and phylogenetic signal. *Invertebr Syst* 20:431–445
19. Percy DM, Boyd EA, Hoddle MS (2008) Observations of acoustic signaling in three sharpshooters: *Homalodisca vitripennis*, *Homalodisca liturata*, and *Graphocephala atropunctata* (Hemiptera: Cicadellidae). *Ann Entomol Soc Am* 101:253–259
20. Tishechkin DY (2005) Vibrational communication in Psylloidea (Hemiptera). In: Drosopoulos S, Claridge MF (eds) *Insects sounds and communication: physiology, behavior, ecology, and evolution*. CRC Taylor & Francis, Boca Raton, FL, pp 358–363
21. Soroker V et al (2004) The role of chemical cues in host and mate location in the pear psylla *Cacopsylla bidens* (Homoptera: Psyllidae). *J Insect Behav* 17:613–626
22. Horton DR, Guédot C, Landolt PJ (2007) Diapause status of females affects attraction of male pear psylla, *Cacopsylla pyricola*, to volatiles from female-infested pear shoots. *Entomol Exp Appl* 123:185–192
23. Horton DR, Landolt PJ (2007) Attraction of male pear psylla, *Cacopsylla pyricola*, to female-infested pear shoots. *Entomol Exp Appl* 123:177–183
24. Wenninger EJ, Stelinski LL, Hall DG (2008) Behavioral evidence for a female-produced sex attractant in *Diaphorina citri*. *Entomol Exp Appl* 128:450–459
25. Guédot CN et al (2009) Identification of a sex attractant pheromone for male winterform pear psylla, *Cacopsylla pyricola*. *J Chem Ecol* 35: 1437–1447
26. Gross J, Mayer CJ (2010) Nuove prospettive per il monitoraggio e la difesa biomolecolare. *Frutta e vite* 34:39–41

-
27. Byers JA (2011) Mass trapping. <http://www.chemical-ecology.net/masstrap.htm>. Accessed 14 Nov 2011
 28. Zada A, Falach L, Byers JA (2009) Development of sol-gel formulations for slow release of pheromones. *Chemoecology* 19:37–45
 29. El-Sayed AM (2011) The Pherobase: database of insect pheromones and semiochemicals. <http://www.pherobase.com>. Accessed 14 Nov 2011
 30. Müther J, Vogt H (2003) Sampling methods in orchard trials: a comparison between beating and inventory sampling. *IOBC/WPRS Bull* 26(5):67–72
 31. Tholl D et al (2006) Practical approaches to plant volatile analysis. *Plant J* 45:540–560
 32. Van Dam NM, Poppy GM (2008) Why plant volatile analysis need bioinformatics—detecting signal from noise in increasingly complex profiles. *Plant Biol* 10:29–37
 33. Nehlin G, Valterova I, Borg-Karlson A-K (1994) Use of conifer volatiles to reduce injury caused by carrot psyllid, *Trioza apicalis*, Förster (Homoptera, Psylloidea). *J Chem Ecol* 20:771–783

تجارب انتقال الحشرات الناقلة

Domenico Bosco and Rosemarie Tedeschi

ملخص:

تنتقل الفيتوبلازما عن طريق الحشرات بالطريقة الباقية حيث تتكاثر بداخلها، كما أن الحشرات التي تتغذى على اللحاء تنتمي إلى رتبة الـ Hemiptera (نصفية الأجنحة) وتحت رتبة الـ Homoptera. وبعد اكتساب الفيتوبلازما من على النبات المصاب، تبدأ فترة الكمون قبل قدرة الآفة على نقل المرض. وبالتالي، تتكون مراحل النقل من ثلاث خطوات رئيسية: الاكتساب، الكمون، والعدوى. وتم اكتشاف أكثر من ٩٠ نوعاً من الآفات الناقلة للأمراض حتى الآن (plant-leafhoppers, and psyllids) (نطاطات الأوراق، نطاطات النبات، البسيليدي). ولكن لا يزال هناك عديد من الأنواع لم يتم اكتشافها، ولا يُنظر إلى دورها في نقل الأمراض للمحاصيل المهمة اقتصادياً. لذلك، يُعد فحص الآفات الناقلة للأمراض خطوة مهمة في وضع استراتيجيات مكافحة الصحة؛ والتي تستهدف الآفات الناقلة لمرض الفيتوبلازما. إن مجرد اكتشاف الفيتوبلازما في الآفة لا يدل على أنها تحمل المرض. لذلك، تعتبر تجارب النقل ضرورية لتقديم أدلة نهائية. ويمكن إجراء تجارب النقل باستخدام حشرات خالية من الفيتوبلازما من قبل مختبرات خاصة أو جمعها من الحقول. لذا، يمكن إجراء تجارب النقل بتغذية الآفات الحاملة للمرض بغذاء صناعي من خلال البرافيلم (Parafilm®). وبعد ذلك، يمكن الكشف عن الفيتوبلازما من الوسط الغذائي بالـ PCR. وهناك عدة تقنيات مختلفة يمكن استخدامها تجارب النقل، وهذا يعتمد على بيولوجية أنواع الآفات، leafhoppers، planthoppers، و psyllids.

الكلمات المفتاحية: التغذية الصناعية، التغذية، نصفية الأجنحة، PCR، النقل، أنواع الآفات الناقلة للأمراض.

١- المقدمة:

الفيتوبلازما من مسببات المرضية المتواجدة بشكل دائم في اللحاء، وتسبب كثيراً من الأمراض للنباتات الصحراوية والزراعية. وفي الطبيعية، تعمل الآفات الحاملة للمرض بنقل الفيتوبلازما بالطريقة الباقية في جسم الحشرة بالتكاثر داخل جسمها. والحشرات تكتسب

الفيتوبلازما عن طريق التغذية على النباتات المصابة، ومن ثم تنقلها إلى النباتات السليمة بعد فترة الكمون، وخلالها تقوم الفيتوبلازما بالتحرك والتكاثر داخل جسم الناقل. وتظل الحشرة معدية - غالباً - طوال عمرها. وحيث إن الفيتوبلازما تتواجد - فقط - باللحاء، تتغذي الآفات التي تنتمي إلى الرتبة نصفية الأجنحة على اللحاء. وتم حصر عدد كبير من الآفات الناقلة للفيتوبلازما، وتم تقسيمها إلى ثلاث مجموعات تصنيفية: نطااط الورق: (Auchenorrhyncha: leafhoppers)، ونطااط النباتات (psyllids)، وplantoppers (Auchenorrhyncha: Fulgoromorpha)، والبسيليدي (Sternorrhyncha: Psyllidae).

ويمكن أن تنتقل الفيتوبلازما تجريبياً من خلال التطعيم والحامول dodder (١)، أو في حالة واحدة - على الأقل - من خلال تلامس الجذر (٢). وقد تم - أيضاً - اقتراح احتمال نقل البذور للفيتوبلازما، ويمكن - أيضاً - اكتشاف DNA الفيتوبلازما في الأجنة. ولا يوجد - حتى الآن - أي دليل على أن الفيتوبلازما تنتقل عن طريق البذور، ومن ثم الشتلات، والتي تسبب المرض للنبات المنزرع (٣). وتعتبر طريقة نقل الآفات للفيتوبلازما أهم طريقة حتى الآن لانتشار المرض في الحقول والظروف الطبيعية. إن الأجناس المحددة - فقط - هي التي تتصرف كحامل للمرض. وعليه، فإن نقل الفيتوبلازما يعتمد عليها في مستويات عديدة، كما أن هناك عناصر لتحديد نبات العائل (٤). وقد تكون الآفات الناقلة للمرض oligophagous، polyphagous، أو monophagous حسب قدرتها على التكاثر والتغذي على كثير أو قليل، أو نبات واحد من النباتات العائلة، على التوالي. وبالمثل، قد تُصيب الفيتوبلازما - بشكل عام - عديداً من الأنواع النباتية المختلفة، أو أنواعاً معينة، أو نوعاً واحداً أو عدداً قليلاً من أنواع النباتات من الجنس نفسه. ونتيجة لذلك، فإن الفيتوبلازما - عامة - قد تنتقل بعدد من الأجناس من الحشرات. أما النباتات المتخصصة للفيتوبلازما فقد تنقل بمجموعة محدودة من الآفات الحاملة للمرض أو بحشرات خاصة (٤).

وعند فحص الآفات الناقلة للفيتوبلازما، قد تقدم تجارب الـ PCR مؤشرات على الدور الذي تؤديه الحشرات المتحصل عليها في نقل الفيتوبلازما. ومع ذلك، عند اكتشاف الفيتوبلازما لا يعني أنه يمكن القيام بالعدوى عن طريق التغذية (٥)، إن مجرد اكتشاف الفيتوبلازما في الآفات لا يُثبت أن هذه الآفات ناقلة لها. لذا، فإن القيام بتجارب النقل هو الدليل على إثبات ذلك. إن تجارب النقل تعتبر ضرورية (١) لتحديد الآفات الناقلة للأمراض الجديدة (٢) وخصائص النقل، مثل: فاعليه النقل، ومدة فترة الاكتساب، والحضانة، وفترة العدوى (٣)، ومعرفة مدى انتشار مرض الفيتوبلازما وباءً (هل تتغذى الحشرات وتنشر المرض على المحاصيل المصابة أم هي آفة زائرة تنقل الفيتوبلازما بشكل متقطع من العشب أو النباتات الطبيعية المصابة إلى أنواع المحاصيل؟). وبرغم إدراج Weintraub و Beanland (٦) لما يقرب من ١٠٠ جنس من الآفات الناقلة للفيتوبلازما، إلا أن هناك عديداً من الآفات الناقلة لها لم يتم اكتشافها بعد، ولا دورها في نشر الأمراض المهمة اقتصادياً.

ويهدف هذا الفصل إلى تقديم المعلومات التقنية المهمة لإجراء تجارب النقل باستخدام نطاقات الأوراق ونطاقات النبات والبسيليدي (psyllids، Planthoppers، Leafhoppers). ومعروف أنه بعد اكتساب الفيتوبلازما من النبات المصاب، تكون هناك فترة كمون قبل انتقال المرض. لذلك، تتكون تجارب النقل من ثلاث خطوات رئيسية: الاكتساب، الكمون، العدوى. وأثناء مرحلة الاكتساب، تحصل الآفات الناقلة للمرض على خلايا الفيتوبلازما من خلال تغذيتها على النبات المصاب. وقد يكون الاكتساب "طبيعياً"؛ عندما يتم الحصول على الحشرات من الحقول، وهذه الحشرات المصابة يتم استخدامها في القيام بتجارب النقل، وقد يكون الاكتساب "مُتحكماً" فيه؛ عندما تكون الحشرات سليمة في قفص على النباتات المصابة. وفي الحالة الأخيرة، تسمى الفترة المتاحة للحشرات لاكتساب الفيتوبلازما بفترة الوصول للاكتساب (Acquisition Access Period AAP). وغالباً تستمر الـ AAP من بضعة إلى عدة أيام للتأكد من أن كفاءة الاكتساب عالية. وحتى إن كانت ساعات قليلة فهي كافية لالتقاط بعض الأنواع للفيتوبلازما (٧، ٨). ومن النتائج غير المنشورة للمؤلف، أنه عندما يكون الـ AAP مجهولاً، ينبغي أن يكون وقت الاكتساب طويلاً كي تكون الكفاءة عالية. إن فترة الكمون (latency period LP) - والتي تُعرف أيضاً بـ "فترة الحضانة" - هي الفترة الزمنية بين الاكتساب وبداية العدوى. وأثناء هذه المرحلة، تُهاجم الفيتوبلازما جسم الآفة عن طريق الدم Hemolymph وتتكاثر وتصل إلى الغدد اللعابية. وتتراوح LP من ١٢ يوماً إلى أكثر، حسب أنواع الآفات، وأجناس/ سلالة الفيتوبلازما، والعوامل غير الحيوية مثل درجة الحرارة (٥). وأثناء هذه المرحلة، يجب أن تنمو الآفات على نبات مناسب لضمان أعلى معدل للبقاء على الحياة. وبمجرد انتهاء فترة الكمون، تقوم الحشرات بإدخال الفيتوبلازما مباشرة في الأنابيب الغربالية للنبات السليم. لذلك، يجب عزل الآفات الناقلة للمرض المُختبرة - لوحدتها أو في مجموعات - على النباتات السليمة لتقييم انتقال الفيتوبلازما. إن الفترة الزمنية المتاحة للحشرات المُفترضة لنقل الفيتوبلازما تُعرف باسم: فترة العدوى (Inoculation Access Period IAP). وتكفي بضع ساعات لنقل مُسبب المرضي، لكن الفترات الأطول أفضل من حيث كفاءة النقل.

وبناءً على إجراء التجارب، يمكننا التمييز بين: (١) تجارب النقل المُتحكم بها (التي يتم فيها تنفيذ جميع الخطوات تحت ظروف خاضعة للرقابة، ومتحكم بها في الغرف الخاصة أو البيوت المحمية). (٢) وتجارب الانتقال بحشرات مُجمعة من الحقول (التي يتم فيها تنفيذ خطوة العدوى فقط في ظل ظروف خاضعة للرقابة). أولاً، سوف يتم وصف الأساليب الأساسية لتربية الآفات الناقلة للمرض. وبعدها، يتم تفصيل طرق عمل تجارب النقل التي تستخدم الآفات المتحصل عليها من الحقول أو التي تم تنميتها في المعمل. وأخيراً، يتم عرض الطرق التي استخدمت لنقل الفيتوبلازما للأجيال القادمة. وتم مناقشة الأساليب المختلفة بالنسبة لحشرة نطاقات الأوراق/النبات والبسيليدي، في ضوء بيولوجيتهم المختلفة.

٢- المواد:

١. مستعمرة من الحشرات الناقلة خالية من الفيتوبلازما
٢. مصدر نباتات مصابة بالفيتوبلازما. ومصدر لنباتات مطعمة من نبات مصاب إلى نبات سليم، من خلال طريقة النقل بالحشرات السابق ذكرها، أو من خلال التطعيم بالبراعم المصابة بالفيتوبلازما (٩) (انظر: الفصل ٢، ٣، ٤).
٣. الشبكة الكانسة، أو شبكة الصيد بالطرق.
٤. شتلات من نباتات للتجارب.
٥. غرف تحكم بظروف جوية؛ بيت محمي، أو بيت زجاجي.
٦. أقفاص تربية (أقفاص زجاجية، /أو شبكية) (انظر: الشكل 1a، b).
٧. شفاط الحشرات.
٨. مييدات حشرية.
٩. وسط تغذية الآفات، مثل:
- (أ) ٥٪ سكروز في (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA) TE (١٠).
- (ب) ١٠٪ سكروز، ٠,٢٪ فركتوز، 0.028% MgCl₂, 0.375% K₂HPO₄, pH 7.5.
١٠. أنابيب صغيرة، أو أنابيب خاصة للتغذية.
١١. غشاء بارافيلم.

٣- طرق العمل:

٣-١: تجارب النقل المتحكم بها:

إن توفر مستعمرة للآفات الناقلة للأمراض في المعمل تعتمد - في الأساس - على بيولوجية الآفة. فكثير من نشاطات الأوراق (Leafhopper) الناقلة للمرض (عائلة Cicadellidae) تنمو بسهولة - إلى حد ما - تحت الظروف البيئية المحددة؛ حيث إنها تضع البيض باستمرار (multivoltine)، أو مرة في السنة (monovoltine) على نبات واحد (monophagous)، أو قليل من (oligophagous)، أو عديد من النباتات العائلة (polyphagous). أما تربية نشاطات النبات (Planthoppers) فهي أصعب بكثير؛ حيث إن حوريات الحشرة (nymphs) تتغذى على الجذور (١١). وفي هذه الحالة، يجب أن تحتوي أقفاص التربية على تربة بها جذور النباتات العائلة، ويجب الانتباه من مفصليات الأرجل الأخرى في التربة (مثل النمل)؛ حيث إنها شرسة على الحشرات الأخرى، وعند ري النباتات في الأصيل تجنب إغراق الحوريات nymphs. وقد تم وصف أساليب تربية الـ *planthopper Hyalesthes* (١٢) *obsoletus*.



الشكل (١) (b,a): أقفاص شبكية وبلاستيكية لتربية الحشرات. (c): أقفاص شبكية لعزل فرع واحد لالتقاط الحشرات الحاملة للفيتوبلازما في الحقول. (e, d): أقفاص أسطوانية زجاجية لعدوى الفيتوبلازما في المعمل. (f): قفص شبكي لعزل فرع واحد من فروع النبات الخاضع لتجربة العدوى بالفيتوبلازما في المعمل. (g): قفص مشبكي. (i, h): أنبوب صغير تستخدم للعدوى بالفيتوبلازما وللتغذية على البيئة، وذلك لحشرة واحدة. (j): قفص على شكل كوب، تستخدم للعدوى بالفيتوبلازما وللتغذية على البيئة لمجموعة من الحشرات. (k) أنبوب زجاجي، معه غصن تفاح؛ لوضع البيض كي تستخدم في التجارب.

إن بعض البسيليدي psyllids (مثل: *Cacopsylla* spp) تعتبر حشرات مهاجرة تضع البيض وتتطور في النبات العائل، ومن ثم تنتقل إلى النباتات الضليلة للمبيت الصيفي والشتوي. وفي الحالة الأخيرة، برغم أنه من الناحية النظرية، ورغم صعوبة دورة حياة الحشرة؛ فإنه يمكن إنتاجها تحت ظروف خاضعة للتحكم، لكن من الناحية العملية لا يمكن تربية هذا النوع دائماً. وفي بعض الحالات، مثل الـ leafhoppers تضع بيضها في عوائل النباتات الخشبية، ومنه يمكن جمع الفروع بالبيض من الحقل، وتركها حتى تفقس في ظل ظروف مُتحكم بها. وعليه، يتم تربيتهم خلال السنة. أما بالنسبة لـ *Scaphoideus titanus*، والحشرة الناقلة الـ (Flavescence dorée)، فيتم جمع فروع العنب بالبيض في الشتاء، وتُخزن في الثلاجة حتى يكون هناك حاجة لها (يظل البيض صالحاً حتى بعد شهور من تخزينه)، ويمكن استخدام الحوريات nymphs التي فقسست حديثاً؛ والتي تغذت على نبات العنب أو الفاصولياء في تجارب النقل. وحسب خبرتنا، تعتبر نباتات الفاصولياء مناسبة أكثر من العنب، برغم أنه يمكن استخدام كليهما (معاً أو بالتناوب). وخياراً، فمن الممكن تربية الـ *S. titans* nymphs بسهولة في مجموعات صغيرة بصناديق بلاستيكية أسطوانية (ارتفاعها 10 cm وقطرها 5 cm) وتُغطى من الأعلى بشبكة، وتحتوي على طبقة 1 cm من محلول الآجار (8٪) على قرص من أوراق العنب، وتغير مرتين في الأسبوع (١٣). وهذه الطريقة يمكن استخدامها إذا كان عدد الحشرات محدوداً، وبالتالي لا حاجة للنبات.

ويمكن تنمية مستعمرة من مستعمرات الحشرات الناقلة معملياً على عائل نباتي مناسب. ومن الممكن أن تلد الآفات الناقلة (multivoltine) عدة أجيال في السنة الواحدة. وبشكل أساسي، يمكننا شرح نوعين من أنواع التربية المستمرة: تربية آفات أعمارها مختلفة، وتربية آفات منتظمة العمر. وفي تربية الآفات مختلفة الأعمار، تتغذى وتتكاثر أعداد من الحشرات من مختلف المراحل على عديد من النباتات. ويتم توفير نباتات جديدة بمجرد أن تكبر تلك الحشرات وتموت. وعندما يزداد عدد الحشرات، يجب إزالة الزائد منها للتأكد من قدرة النباتات على تحمل تلك الحشرات. وعند الحاجة، يتم أخذ الحوريات من القفص لإجراء تجارب النقل. وتتكون تربية الآفات المنتظمة من أقفاص خاصة لوضع البيض تحتوي على عدد من الإناث (مع الذكور)؛ وذلك لوضع البيض على النباتات العائلة لفترة قصيرة (من بضعة أيام إلى أسبوع). وبعد وضع البيض، يتم وضع النباتات العائل في أقفاص جديدة؛ حتى يكتمل تكون الجنين بالبيض ويفقس لتخرج الحوريات. ويحتوي كل قفص على نباتات بجانب الإناث التي تضع بيضها في الوقت نفسه؛ حتى تكون جميع الحوريات من العمر نفسه تقريباً. وبهذه الطريقة، يمكن استخدام كثير من الحوريات بشكل مستمر في تجارب النقل. وتكون التربية المستمرة مستحيلة عند التعامل مع الأنواع التي لها جيل واحد في السنة، ويطلق عليها monovoltine (خصوصاً في مرحلة البيض). وفي النهاية، يمكن عمل دورة الحياة الطبيعية للحشرات في ظل ظروف مُتحكم بها، أو يمكن الحصول على الآفات بالطريقة التي سبق شرحها مع حشرة لـ *S. titanus*.

١. قبل بدء تجارب النقل، يجب القيام باختبار (PCR) للتأكد من وجود الفيتوبلازما في نباتات المصدر (انظر: الفصل ١٤، ١٥، ١٦، و١٧).
٢. قم بإمساك بالحوريات (يُفضل حوريات الآفة من الثالثة إلى الخامسة) من المستعمرة الخالية من الفيتوبلازما، وضعها في قفص به نباتات المصدر؛ لتتغذى عليها لـ AAP (انظر: الملاحظة ١).
٣. بعد الـ AAP المناسبة، تنقل الحشرات (الحوريات والحشرات الكاملة) التي بقيت حية بعد الـ AAP إلى نباتات العائل الملائم لاستكمال فترة الكمون (LP).
٤. في نهاية LP، توضع الحشرات على نباتات تجارب سليمة لـ IAP. ويمكن وضع الآفات ضمن مجموعات كبيرة لعدد من نباتات التجارب داخل قفص زجاجي plexiglass، وقفص نيلون، أو قفص شبكي، ويتم وضع الحشرات أحادية، أو في مجموعات صغيرة (مثال، ٣-٥ آفة) على نبات واحد داخل أقفاص صغيرة (انظر: الملاحظة ٢ و٣).
٥. ولتحديد مدة فعلية لـ LP في ظروف بيئية معينة، قم بنقل الآفات بالتسلسل بعد الـ AAP، واحدة بعد الأخرى، أو في مجموعات، لإخضاع النباتات لتجارب الـ IAPs ليوم أو لبضعة أيام. كلما قصرت فترة الـ IAPs، كان تقدير فترة الـ LP أكثر دقة.
٦. في نهاية الـ IAP، قم برش النباتات بمبيدات حشرية للتخلص من الآفات، واحفظها في البيت المحمي أو غرفة الحضانة لترتكها حتى تظهر أعراض الفيتوبلازما (انظر: الملاحظة ٤).
٧. بعد دورات زمنية متغيرة من العدوى، قم بتحليل نباتات التجارب عن طريق الـ PCR للتحقق من وجود الفيتوبلازما.

٢-٣: تجارب النقل بالآفات المتحصل عليها من الحقول:

١. يتم جمع عدد من الحشرات الكاملة من حول الحقول المصابة بالفيتوبلازما باستخدام شبكة الكنس أو أدوات شفط الـ D-Vac (نظائط الأوراق والنبات) أو مصيدة الطرق (لحشرة البسيليدي).
٢. قم بإمساك الحشرات المتحصل عليها من الحقول والموجودة على نباتات التجارب، كما شُرح سابقاً. ومن الأفضل أن تكون فترة الـ IAP طويلة (لأسابيع، أو حتى موت الحشرة)؛ لأنه سيكون من الصعب معرفة ما إن كانت الحشرات المصابة من الحقول أكملت فترة الكمون الـ LP أو لا؟
٣. الخطوات الإضافية في تجارب النقل هي الخطوات نفسها التي شُرحت سابقاً.
٤. قد تقدم تجارب النقل بالحشرات المُجمعة من الحقول دليلاً على أنها حشرات حاملة وناقلة لمرض الفيتوبلازما، ولكنها لا تقدم دليلاً على أن مصدر النبات طبيعي وفترة الكمون الـ LP.

٣-٣: النقل إلى وسط غذائي صناعي:

يتم إجراء تجارب النقل - غالباً - عن طريق الإمساك بالحشرات المعدية من على نباتات التجارب شديدة الحساسية. وحيث إن الحشرات يمكن أن تمتص الغذاء من خلال الأغشية، فيكون من المفيد - في بعض الأحيان - اختبار قدرات هذه الحشرات الناقلة للأمراض في بيئة صناعية. وهذا الأمر جيد - على وجه التحديد - عندما: (١) تكون نباتات التجارب المتوفرة غير جيدة للحشرات الناقلة للأمراض. (٢) يكون هناك عدد كبير من الحشرات، مثل الحشرات المتحصل عليها من الحقول، ويجب إجراء تجارب عليها لمعرفة معدل الإصابة في ظل الظروف الحقلية. (٣) تكون هناك عملية مسح لآفات ناقلة مجهولة. وبالتالي، تكون نباتات العائل مجهولة أيضاً. وبالنسبة لآخر حالة، فمن الممكن إخضاع كثير من الحشرات للتجارب بسهولة لتجنب ضرورة إنتاج مجموعة كبيرة من النباتات، وحفظها لفترة طويلة حتى يتطور المرض في البيت المحمي. بالإضافة إلى ذلك، بعد مد الحشرات بالبيئة الصناعية، يمكن تحليل الوسط في الحال باستخدام الـ PCR للكشف عن الفيوتوبلازما. ومنه، يمكن تجنب زيادة فترة الحضانة في النباتات. وقد تم إجراء عديد من تجارب انتقال الفيوتوبلازما في البيئة الصناعية (٤، ١٠، ١٤-١٨) باستخدام نطاطات الأوراق والنبات. وبرغم أن النقل - فقط - هو الدليل الأخير على قدرة الحشرات على نقل المرض؛ إلا أن النقل إلى الوسط الغذائي الصناعي قد يساعد على معرفة الحشرة على قدرتها للنقل. ووفقاً "للنظام الصناعي" يجب تحليل البيانات الكمية لتجارب النقل بحذر لأنه في بعض الأحيان يتم المبالغة في تقدير إمكانية/فاعلية النقل (قد تكون للنباتات قدرة طفيفة على التحمل، وفي بعض الأحيان تؤدي عمليات العدوى إلى انتقال المرض. في حين، قد يحتوي الوسط الغذائي على خلايا من الفيوتوبلازما محقونة باللعاب؛ والذي قد يؤدي إلى ظهور نتائج إيجابية في تجارب الـ PCR) أو يتم التقليل من تلك القيمة (حيث إن الوسط الغذائي لا يساعد على تكاثر الفيوتوبلازما، ويوجد عدد قليل من الفيوتوبلازما في الوسط الغذائي، وتقل بشكل سريع في الوسط الغذائي؛ مما يؤدي ذلك إلى ظهور نتائج سلبية في تجارب الـ PCR).

١. جهاز حجرة التغذية؛ إما عن طريق: (١) ملء غطاء أنبوب الطرد المركزي بـ 200 ميكروليتر من وسط التغذية (انظر: الشكل 1h)، وأغلق الغطاء بالبرافيلم. ومن ثم اقطع الأنبوب من الأسفل، وضع الحشرة داخل أنبوب الطرد المركزي، وأغلقه بقطعة صغيرة من القطن (انظر: الشكل 1i). (٢) غطي فوهة كوب من البلاستيك بغطاء البرافيلم، ثم أضف الوسط الغذائي على البرافيلم، وغطه بغطاء آخر للبرافيلم (نستخدم أكواباً قطرها 45 mm مع بـ 800-1000 ميكروليتر من الطعام). وبالتالي، يمكن عزل مجموعة من نطاطات الأوراق داخل الكوب (ما نضع خمسة منها - غالباً - في كل كوب)؛ من خلال الفتحة التي بعد ذلك يتم غلقها بكرة من القطن (انظر: الشكل 1j).

٢. يجب وضع الأنابيب والأكواب في مصدر الضوء لجذب الحشرات إلى الوسط الغذائي (انظر: الملاحظة ٦).
٣. وفي نهاية فترة العدوى، قم بجمع الوسط الغذائي بماصة. ومن ثم، يتم استخلاص الـ DNA مع تجنب وجود السكريات في الـ DNA المستخدم مع الـ PCR.
٤. يتم الحصول على خلايا الفيتوبلازما من الوسط الغذائي بالطرد المركزي على سرعة $12000 \times g$ لمدة ١٥ دقيقة.
٥. استخلص الـ DNA الجيني بإضافة 10 ميكروليترات من 0.5 M NaOH ، بعد إضافة 20 ميكروليترا من 1 M Tris-HCL (pH 8.0) تحتوي على ١٪ من سلفات دوديسيل الصوديوم sodium dodecyl sulfate و 20 mM EDTA .
٦. يوضع الخليط في حمام مائي على درجة حرارة 65°C لمدة ١٥ دقيقة، ويتم ترسيبه بمقدارين من الإيثانول. ثم بعد ذلك، يذاب في 30 ميكروليترا من الـ TE، ويحفظ على درجة حرارة 80°C (١٠) (انظر: الملاحظة ٧).
٧. استخدام 2 (ميكروليترين) من المستخلص في الـ PCR المباشر، وبعدها PCR متداخل (nested PCR) (انظر: الفصل ١٤، ١٥، ١٦، ١٧) (انظر: الملاحظة ٨ و٩).

٣-٤: تقييم نتائج تجارب النقل:

إن نتائج تجارب النقل تقوم على تقييم الأعراض التي تطورها نباتات التجارب المعدية بالحشرات الناقلة للأمراض و/أو باختبار الـ PCR على نباتات التجارب لاكتشاف الفيتوبلازما. وعند التعامل مع تجارب النقل من خلال البارافيلم في الغذاء الصناعي، يتضح أن تجارب الـ PCR (تستخدم nested PCR بشكل عام لزيادة درجة الحساسية للاختبار) ضرورية للوصول إلى نتائج النقل. وعندما يتم إجراء تجارب النقل باستخدام مجموعة من الحشرات، يمكن تقدير الكمية الفعلية للحشرات المعدية باستخدام المقيم الأعلى $(p = 1 - Q^{1/k})$ ، حيث الـ Q تمثل الجزء الملاحظ من النباتات السليمة، والـ k تشير إلى عدد الحشرات في كل نبات، باعتبار أن الحشرات الناقلة للأمراض تتصرف بشكل مستقل (١٩). ومن الواضح، أنه كلما قلت المجموعات زادت دقة التقديرات. إن تجارب النقل التي تُجرى على المجموعات تسمح باختبار عدد كبير من الحشرات الناقلة المتحصل عليها من الحقول دون فقد معلومات عن نسبة الإصابة.

٣-٥: تجارب الانتقال إلى الجيل القادم:

إن نقل الفيتوبلازما إلى الجيل القادم تم إثباتها بالنسبة لنطاطات الأوراق من نوع *Matsumuratettix hiroglyphicus*، الحشرة الناقلة للفيتوبلازما الورقة البيضاء لقصب السكر (٢٠)، وكذا بالنسبة لـ *Cacopsylla pruni* كحشرة ناقلة لفيتوبلازما " *Ca. Phytoplasma*

prunorum" (٢١). أما بالنسبة للعلاقات بين الحشرات الأخرى الناقلة للفيتوبلازما، فقد تم إثبات وجود خلايا الفيتوبلازما أو الـ DNA في الجيل الثاني من نطاطات الأوراق التي تتغذى على النباتات المصابة بالفيتوبلازما (٢٢، ٢٣). ويمكن إجراء تجارب نقل الفيتوبلازما إلى الجيل القادم؛ إما في الحشرات المُحصَل عليها من الحقول أو في الحشرات الخالية من الفيتوبلازما من المستعمرات الموجودة في المعامل.

١. بالنسبة للمستعمرات المعملية الناقلة للأمراض، يجب أولاً وضع الحوريات في نباتات المصدر للـ AAP. وبعد ذلك، يتم حفظها في النباتات نفسها أو في نباتات أخرى حتى خروجها.
٢. يتم وضع أنثى غير ملقحة مع ذكر واحد أو أكثر في أصيص به شتلات من النباتات التي تتمتع بمناعة ضد مرض الفيتوبلازما؛ وذلك للتزاوج و/أو لوضع البيض (انظر: الملاحظة ١٠).
٣. بعد أن يتم وضع عدد كافٍ من البيض، قم بإزالة الآفات الكبيرة، وافحص الإناث للتأكد من وجود الفيتوبلازما عن طريق استخدام الـ PCR. ويتم استخدام البيض الذي وضعته الإناث المصابة فقط في الخطوات الأخرى.
٤. وفي أوقات مختلفة بعد وضع البيض، قم بأخذ بعض البيض والحوريات وعدد أكبر من عينات الحشرات المولودة حديثاً، واختبارها بالـ PCR للكشف عن وجود الفيتوبلازما.
٥. يتم وضع حشرات كاملة في أصيص يحتوي على شتلات سليمة لإجراء تجارب الانتقال. وفي نهاية الـ IAP، يجب اختبار كافة الحشرات للتأكد من إصابتها بالفيتوبلازما.
٦. قم بملاحظة نباتات التجربة على فترات زمنية مختلفة من الـ IAP، حتى تظهر أعراض المرض. ويمكن الكشف عليها باستخدام الـ PCR للتحقق من وجود الفيتوبلازما (انظر: الملاحظة ١١).

٤- الملاحظات:

١. ينصح باستخدام الحوريات بدلاً من الحشرات الكبيرة؛ وذلك لأن انتقال الفيتوبلازما يحتاج إلى فترة كمون طويلة للحشرة قبل قيامها بالنقل. ويؤدي استخدام الحشرات الكاملة إلى موت كثير منها قبل اكتمال فترة الكمون. ومن ناحية أخرى، تعتبر الحورية الأولى والثانية صغيرتين جداً ورققتين. لذلك، ينصح باستخدام الحوريات الأكبر. أما بالنسبة للـ Flavescence dorée (FD) phytoplasma فقد تم إثبات أن الحوريات التي فقست حديثاً تفشل في اكتساب الفيتوبلازما من العنب؛ بسبب أن أداة التغذية (الرمح) لا تصل إلى اللحاء (٢٤). وقد تستمر فترة الاكتساب الـ AAP ليوم أو لبضعة أيام حسب مدى ملاءمة نبات المصدر للحشرات الناقلة (إن كان نبات العائل مناسباً للحشرات الناقلة، ومنه كلما زادت فترة الـ AAP زادت فاعليات الاكتساب، وإن كان نبات العائل غير مناسب للحشرات، تزيد فترة الـ AAP، ومنه ترتفع معدلات موت الحشرات. ونتيجة لذلك، فإن فترة الـ AAP الأقصر هي المطلوبة). ولا ينصح بأن تكون الـ AAPs أقل من يوم؛ لأنها قد تؤدي إلى انخفاض فاعلية الإصابة بشكل ملحوظ.

ويمكن إجراء تجارب لفترة الاكتساب الـ AAPs في البيت المحمي أو في الحاضنات الخاصة. ومن الممكن وضع الحوريات على نبات واحد، أو على كل النباتات عند استخدام شتلات في أصص صغيرة مصدراً. وبالعكس، يمكن إجراء الـ AAP في الحقول داخل أقفاص شبكية لعزل فرع واحد من فروع نباتات المصدر (الشكل 1c).

٢. يمكن أن تكون هذه الأسطوانات من الزجاج أو زجاجاً شبكياً، وتغطي بشبكات واقية للحشرات من الأعلى (انظر: شكل 1d, e)، أو شبكة عزل لعزل فرع واحد من الفروع الكبيرة لنباتات التجارب (انظر: الشكل 1f). وقد تختلف فترة العدوى الـ IAP. وكقاعدة عامة، كلما استمرت الـ IAPs لفترات طويلة كانت معدلات الانتقال أعلى. وكما هو واضح، فإن فترة الاكتساب الـ AAP - إن كان العائل النباتي التجريبي غير مناسب للحشرات - تؤدي فترة الـ IAPs الطويلة إلى موت كثير من الحشرات. وعليه، اقتضت الحاجة لقصر فترة العدوى الـ IAPs لتجنب معدل الموت المرتفع. ومع ذلك، ولرفع كفاءة الانتقال، يمكن وضع الحشرات الناقلة على النبات نفسها أو على نباتات التجارب الأخرى حتى تموت. واستمرار تنقل الحشرات المعدية بين نباتات التجارب المختلفة قد يؤدي هذا الأمر إلى زيادة عدد النباتات المصابة؛ مما يُثبت أن فترة الكمون الـ LP قد اكتملت. ويجب أن يتم تعريض عدد قليل من نباتات التجارب لحشرات سليمة (من المستعمرات التي تربي في المعامل) تكون من الجنس نفسه شاهداً سلبياً. وبهذه النباتات، -التي تمثل: شكلاً من أشكال الشاهد السليم- يمكن الوصول إلى تقييم الأعراض التي تظهر على نباتات التجارب ومقارنتها؛ والتي تم تعرضها للحشرات المعدية.

٣. لدراسة حركة الفيتوبلازما في النبات، يمكن وضع الحشرات الناقلة في قفص في موقع محدد من الأوراق (مثل: على القمة النامية، أو الأوراق السفلى). ولتحقيق هذا الأمر، يمكن تغطية نباتات التجارب بورق ألومنيوم، ما عدا بعض القمم النامية أو الأوراق السفلى (٢٥). وفي المقابل، يمكن وضع الحشرات الناقلة على ورقة واحدة باستخدام أقفاص مُشبكية (٢٦) (انظر: الشكل 1g).

٤. إذا تم استخدام نباتات التجارب نباتات مصدر في تجارب الانتقال الجديدة (مثل: الحفاظ على سلالات الفيتوبلازما بالمعامل)، فيجب استخدام مبيدات حشرية غير باقية (مثل: الـ Dichlorvos)، أو يجب تجنب استخدام المبيدات الحشرية، ويمكن إجراء تجارب على الحشرات التي تم أخذها من على نباتات التجارب باستخدام الـ PCR للكشف عن وجود الفيتوبلازما في الحال، أو بعد وضعها في إيثانول نقي، أو التي حفظت على درجة حرارة 20°C -. وبهذه الطريقة، يمكن الربط بين كفاءة الانتقال والإصابة (وتكون عدداً إيجابياً من الفيتوبلازما، وما يقابلها عدد من الحشرات المعدية).

٥. عند التعامل مع تجربة الانتقال بشكل روتيني لفيتوبلازما في نباتات التجارب؛ فإن ظهور الأعراض واضحة للإصابة يكون كافياً، وبذلك يكون الكشف عن الفيتوبلازما غير

ضروري. وقد تصاب نباتات التجارب، وتتطور أعراض المرض في أوقات مختلفة بعد العدوى. وتتطور -غالباً- أعراض الإصابة في العوائل العشبية في الفترة ما بين ١٠ أيام إلى شهرين بعد العدوى. وبالتالي، يجب إخضاعها للتجارب باستخدام الـ PCR خلال تلك الفترات. أما بالنسبة للنباتات الدائمة، فيجب حفظ النباتات لمدة لا تقل عن سنة بعد العدوى، ومن ثم يتم اختبارها باستخدام الـ PCR. إن تجارب الـ PCR حساسة للغاية، فيمكن الكشف من خلالها عن الإصابة قبل ظهور أعراضها. ففي مجال خبرتنا، يتم اكتشاف الفيوتوبلازما المسؤولة عن اصفرار الأستر بنباتات ديزي daisy في أربعة أيام بعد العدوى، والتي تظهر الأعراض -غالباً- بعد ١٢ يوماً أو أكثر (٢٥).

٦. بجانب التغذية، تضع نطاطات الأوراق البيض -أيضاً- على البرافيلم في الوسط الغذائي.
٧. إن كميات المواد المستخدمة في الغذاء الصناعي تم تحديدها بأن تكون ٢٠٠ ميكروليتر، ومنه يتم تعديل تلك الكميات وفقاً لحجم الغذاء المستخدم (على سبيل المثال: في أكواب).
٨. قد تم عرض كثير من الأطعمة السائلة المختلفة لمركبات مختلفة لنطاطات الأوراق، ولكن أكثر ما يعمل مع الحشرات الناقلة للفيوتوبلازما استخدام محلول التغذية البسيط (محلول السكروز) المستخدم (٢٧). ويمكن توفير أطعمة صلبة للحشرات الناقلة، والتي تحتوي على محلول مائي مجمد به ٥٪ سكروز و ٤٪ من الأجاروز قليل الإذابة ومغلفان البرافيلم (٢٨)، لكن بعدها يجب إثبات طريقة عمل عزل الـ DNA الفيوتوبلازما من هذا الوسط.
٩. بالنسبة لبعض الحشرات التي تتغذى على العصارة، يتم استخدام غشاء التفلون (Teflon membranes)؛ والذي يبلغ حجم مسامه 1 μm تقريباً بدلاً من البرافيلم؛ والذي أظهر نتائج جيدة (٢٩). وحتى الآن، لم يتم إثبات استخدام أغشية التفلون المحبة للماء مع الحشرات الناقلة للفيوتوبلازما، ويتضح وفقاً للنتائج الأولية التي تم التوصل إليها في معملنا أن نطاطات الأوراق لا تتغذى بواسطة تلك الأغشية. وقد يرجع هذا إلى حجم المسام التي تبلغ (1 μm)؛ فهي صغيرة جداً ولا تسمح بدخول رمح الامتصاص للحشرة. أما الأغشية ذات المسام الكبيرة فهي غير مناسبة؛ لأنها تسمح بتسرب الأغذية السائلة من خلالها.
١٠. عند التعامل مع حشرات (monophagous) أحادية المسكن التي لا يمكن تربيتها على عائل آخر بديل، ويمكن وضع الحشرات الكاملة والمعدية منها (انظر: الشكل) 1k على غصون النباتات حساسة للمرض؛ ولكن -بعد وضع البيض- تنقل الغصون العائل مع البيض إلى أقفاص بها أصيص لشتلات سليمة؛ لإعطاء فرصة للفقس وإنتاج الحوريات، وذلك لتجنب اكتساب المرض من النبات.

١١. لتقييم وجود الفيوتوبلازما في البيض، يتم اختبار الحوريات والحشرات الكاملة الحديثة على حدة أو في مجموعات. وفي البيض -عادة- ما يكون DNA ضعيفاً، لكن في المجموعات يكون أفضل. وفي المقابل، يمكن إخضاع بيضة واحدة للتجربة باستخدام الـ PCR للكشف

عن الفيتوبلازما والجين المسيطر. وذلك، لتجنب الحصول على نتائج سلبية غير صحيحة (٣٠). إن وجود الفيتوبلازما في كافة مراحل نمو الإناث يدل على أن DNA الفيتوبلازما يورث إلى كافة الأجيال. في حين أن نجاح جيل الحشرة الكاملة في نقل المرض هو الدليل الأخير على أن الحشرة هي ناقلة للعدوي.

المراجع:

1. Marcone C et al (1999) Dodder transmission of pear decline, European stone fruit yellows, Rubus stunt, *Picris echioides* yellows and cotton phyllody phytoplasmas to periwinkle. J Phytopathol 147:187–192
2. Ciccotti AM et al (2008) Natural and experimental transmission of ‘*Candidatus* Phytoplasma mali’ by root bridges. Acta Horti 781:459–464
3. Nipah JO, Jones P, Dickinson MJ (2007) Detection of lethal yellowing phytoplasma in embryos from coconut palms infected with Cape St Paul wilt disease in Ghana. Plant Pathol 56:777–784
4. Bosco D, D’Amelio R (2010) Transmission specificity and competition of multiple phytoplasmas in the insect vector. In: Weintraub PG, Jones P (eds) Phytoplasmas: genomes, plant hosts and vectors. CAB International, Wallingford, UK, pp 293–308
5. Marzachi C, Milne RG, Bosco D (2004) Phytoplasma-plant-vector relationships. In: Pandalai SG (ed) Recent research developments in plant pathology, vol 3. Research Signpost Trivandrum, Kerala, India, pp 211–241
6. Weintraub PG, Beanland LA (2006) Insect vectors of phytoplasmas. Annu Rev Entomol 51:91–111
7. Golino DA, Oldfield GN, Gumpf DJ (1987) Transmission characteristics of the beet leafhopper transmitted virescence agent. Phytopathology 77:954–957
8. Carraro L et al (1996) Studies on the transmission of a phytoplasma from *Chrysanthemum leucanthemum* L. by the leafhopper *Euscelidius variegatus* Kbm. IOM Lett 4:127–128
9. Jarausch W, Lansac M, Dosba F (1996) Longterm maintenance of nonculturable apple-proliferation phytoplasmas in their micropropagated natural host plant. Plant Pathol 45:778–786
10. Melamed S et al (2003) Identification and characterization of phytoplasmal genes, employing a novel method of isolating phytoplasmal genomic DNA. J Bacteriol 185: 6513–6521
11. Holzinger WE, Emelianov AF, Kammerlander I (2002) The family Cixiidae Spinola 1839 (Hemiptera: Fulgoromorpha)—a review. In: Holzinger WE (ed) Zikaden leafhoppers planthoppers and cicadas (Insecta: Hemiptera: Auchenorrhyncha), vol 4. Oberösterreichisches Landesmuseum, Linz, Austria, pp 113–138
12. Sforza R et al (1999) Field observations, laboratory rearing and descriptions of immatures of the planthopper *Hyalesthes obsoletus* (Hemiptera: Cixiidae). Eur J Entomol 96:409–418
13. Mazzone V et al (2009) Disruption of the reproductive behaviour of *caphoideus titanus* by playback of vibrational signals. Entomol Exp Appl 133:174–185

14. Zhang J et al (1998) A rapid method for detection and differentiation of aster-yellows phytoplasma-infected and inoculative leafhoppers. *Phytopathology* 88(suppl):S84
15. Tanne E et al (2001) Detection of phytoplasma by polymerase chain reaction of insect feeding medium and its use in determining vectoring ability. *Phytopathology* 91:741–746
16. Ge Q, Maixner M (2003) Comparative experimental transmission of grapevine yellows phytoplasmas to plants and artificial feeding medium. 14th Meeting of the International Council for the Study of Virus and Virus-Like Diseases of the Grapevine (ICVG), Locorotondo, Italy, 12–17 Sept 2003, pp 109–110
17. Bressan A et al (2006) Insect injection and artificial feeding bioassays to test the vector specificity of Flavescence dorée phytoplasma. *Phytopathology* 96:790–796
18. Pinzauti F, Trivellone V, Bagnoli B (2008) Ability of *Reptalus quinquecostatus* (Hemiptera: Cixiidae) to inoculate Stolbur phytoplasma to artificial feeding medium. *Ann Appl Biol* 153:299–305
19. Swallow WH (1985) Group testing for estimating infection rates and probabilities of disease transmission. *Phytopathology* 75:882–889
20. Hanboonsong Y et al (2002) Transovarial transmission of sugarcane white leaf phytoplasma in the insect vector *Matsumuratettix hiroglyphicus* (Matsumura). *Insect Mol Biol* 11:97–103
21. Tedeschi R et al (2006) Possible phytoplasma transovarial transmission in the psyllids *Cacopsylla melanoneura* and *Cacopsylla pruni*. *Plant Pathol* 55:18–24
22. Alma A et al (1997) Identification of phytoplasmas in eggs, nymphs and adults of *Scaphoideus titanus* Ball reared on healthy plants. *Insect Mol Biol* 6:115–121
23. Kawakita H et al (2000) Identification of mulberry dwarf phytoplasmas in the genital organs and eggs of leafhopper *Hishimonoides sellatiformis*. *Phytopathology* 90:909–914
24. Carle P, Moutous G (1965) Observation sur le mode de nutrition sur vigne de quatre espèces de cicadelles. *Ann Epiphyt* 16:333–354
25. Saracco P et al (2006) Quantification over time of chrysanthemum yellows phytoplasma (16Sr-I) in leaves and roots of the host plant *Chrysanthemum carinatum* (Schousboe) following inoculation with its insect vector. *Physiol Mol Plant Pathol* 67:212–219
26. Ammar ED (1976) A clip-on cage for holding leafhoppers and planthoppers on living plants. *Anz Schadling P flenzen Umweltsc* 49:136–137
27. Markham PG (1982) Insect vectors. In: Daniels MJ, Markham PG (eds) *Plant and insect mycoplasma techniques*. Halsted Press, Wiley, New York, pp 307–326
28. Ranger CM et al (2004) Glandular trichome extracts from *Medicago sativa* deter settling by the potato leafhopper *Empoasca fabae*. *J Chem Ecol* 30:927–943
29. Davidson EW et al (2000) Improved artificial feeding system for rearing the white fly *Bemisia argentifolii* (Homoptera: Aleyrodidae). *Fla Entomol* 83:459–468
30. Bosco D, Mason G, Accotto GP (2004) TYLCSV DNA, but not infectivity, can be transovarially inherited by the progeny of the white fly vector *Bemisia tabaci* (Gennadius). *Virology* 323:276–283

التعريف الجزيئي لأنواع الحشرات الناقلة للفيتوبلازما

Sabrina Bertin and Domenico Bosco

ملخص:

إن التعريف الصحيح لأنواع الآفات التي تُسهم في نقل الفيتوبلازما شرط أساسي لتنظيم أمراض الفيتوبلازما وتوظيفها في وضع استراتيجيات مكافحة. ويعتمد تصنيف لحشرات - عادة - إلى: Leafhoppers، و Planthoppers، و Psyllids على الخصائص المورفولوجية. وللأسف، المهارات والخبرات المطلوبة لتحديد السمات المميزة يمتلكها عدد قليل فقط من المتخصصين. ويقدم هذا الفصل بروتوكولات تعريف الجزيئات لأنواع الآفات الناقلة للفيتوبلازما، والتي تعتمد بشكل رئيس على تفاعلات بوليمر المتسلسل (PCR) للحمض النووي للميتوكوندريا والريبوسومات DNA. ويتم أيضاً - تقديم بروتوكولات استخدام التعريف الجزيئي لعينات الحشرات الجافة المخزنة في المجموعات. ويمكن - أيضاً - استخلاص الـ DNA واستخدامها بإجراءات الأنموذج نفسه؛ والذي تستخدم فيه تفاعلات بوليمر المتسلسل لتعريف عينات الحشرات والفيتوبلازما. ولا تقتصر طرق التعريف الجزيئي على الذكور فقط، لكن يمكن تطبيقها على الحوريات والإناث أيضاً؛ عندما لا يتوفر لها أداة التصنيف المورفولوجية. ونرى أنه يجب أن تشتمل بيانات التصنيف لنشاطات الأوراق، ونشاطات النباتات، وحشرة السيليدي على تحديد الجنس عن طريق عمل الشفرة الوراثية في أسرع وقت، كلما توفر ذلك.

الكلمات المفتاحية: نصفية الأجنحة، الميتوكوندريا DNA، التعريف الجزيئي، PCR، الريبوسومات الـ DNA، الآفات الناقلة للأمراض.

١- المقدمة:

إن الفيتوبلازما من الأمراض التي تعيش في اللحاء، وهذا سبب في حدوث كثير من الأمراض في النباتات الزراعية والبرية. وتعمل الحشرات في الطبيعة على نقل الفيتوبلازما بطريقة

التكاثر الباقية داخل الحشرة. وتكتسب الحشرات الفيتوبلازما من تغذيها على النباتات المصابة، ومن ثم تنقلها إلى النباتات السليمة بعد فترة الكمون. وخلال ذلك، تنتقل الفيتوبلازما وتتكاثر في جسم الحشرة الناقلة، وتظل الحشرة مُعدية - غالباً - طوال دورة حياتها (1).

إن الحشرات الناقلة للفيتوبلازما تنتمي إلى رتبة نصفية الأجنحة (Hemiptera) وتم تحديدها في ثلاث مجموعات تصنيفية رئيسية: نطاطات الأوراق تتبع (Auchenorrhyncha: Cicadellidae). أما نطاطات النباتات فتتبع (Auchenorrhyncha: Fulgoromorpha). والحشرة السيليدي تتبع (Sternorrhyncha: Psyllidae). وتمتلك تلك الحشرات سلوكاً غذائياً وتمثيلاً غذائياً يقوي كفاءتها في نقل الفيتوبلازما؛ فهي آفات ناقصة التطور، فتكون العادات الغذائية للحوريات والحشرات الكاملة متشابهة، وكلاهما يستطيع نقل الفيتوبلازما. وعلاوة على ذلك، تتغذي - في الغالب - على اللحاء، وطريقة امتصاصها للغذاء لا تسبب تالفاً للنبات، ولا تثير النظام الدفاعي للنبات (1).

وتتضمن عائلة الـ Cicadellidae كثيراً من الأنواع الناقلة المسؤولة عن انتقال مجموعة كبيرة من مجموعات الفيتوبلازما. وقد ثبت أن أكثر من 75٪ من الحشرات الناقلة للفيتوبلازما تنتمي إلى فصيلة الـ Deltocephaline. وتنتمي آفات نطاطات الأوراق الأخرى الناقلة للمرض إلى فصائل: Aphrodinae، Agallinae، Cicadellinae، Coelidiinae، Idiocerinae، Iassinae، Macropsinae، Typhlocybina، Scarinae. كما أن داخل الفصائل الخاصة لـ Fulgoromorpha ثلاث عائلات للأنواع الناقلة للمرض، وهي: Cixiidae، Delphacidae، و Derbidae. وتشتمل هذه العائلات على أنواع تنقل الفيتوبلازما من مجموعة مرض الاصفرار المميت لجوز الهند (Candidatus Phytoplasma Solani)، ومجموعة 16SrIV (المجموعة الجينية)، و 16SrXII-A (المجموعة الجينية). وقد تم إثبات أن داخل الـ Sternorrhyncha هناك جنسان فقط في عائلة الـ Psyllidae نواقل للمرض، وهما: *Cacopsylla* spp، والذي ينقل فيتوبلازما تكاثر التفاح (المجموعة الجينية 16SrX) إلى أشجار الفاكهة الحجرية والتفاحيات، والـ *Bactericera trigonica*، والذي ينقل فيتوبلازما الـ Stolbura إلى الجزر (1).

إن التعرف الصحيح للأنواع الحشرية المسؤولة عن نقل الفيتوبلازما شرط من الشروط الرئيسية لإدارة أمراض الفيتوبلازما ولاستخدامها في استراتيجيات مكافحة. ويعتمد تصنيف الحشرات الناقلة للفيتوبلازما - غالباً - على الخصائص المورفولوجية. وعادةً، يسمح الجسم الخارجي لتحديد مستوى التصنيف للعائلة والنوع؛ حيث يتم استخدام الأعضاء التناسلية في تحديد الأنواع. وللأسف، غالباً ما يكون تحديد الخصائص المميزة صعباً ويحتاج إلى خبرة. وبعض الخبراء القلائل من علماء الحشرات المتخصصين، يركزون على أنواع معينة من الحشرات لتصنيفها. وحتى المتخصصين، في بعض الأحيان حالات الاختلافات المورفولوجية، لا تسمح بالتمييز بين الأنواع المتشابهة. على سبيل المثال: لا تزال العلاقة بين بعض الفصائل الفرعية ومجموعة عائلة الـ

Cicadellidea غير واضحة. فضلاً عن هذا، يعتمد تصنيف المستوى الجنس - غالباً - على الشكل الظاهري للجهاز التناسلي للذكور، وهذا من شأنه أن يُعيق تحديد الحشرات الصغيرة والإناث. ومن هذا المنظور، تعتبر طريقة القائمة على أساس الـ DNA دعماً مهماً لأساليب التصنيف التقليدية. وحالياً، يتم استخدامها بشكل واسع في تحديد أنواع الحشرات (٢). وتقوم معظم هذه الطرق على تفاعل البوليميرز المتسلسل (PCR) وتقدم دلالات تشخيصية مهمة؛ حيث تستخدم بإيجابية في المناطق المشفرة وغير المشفرة معاً. إن مناطق الـ DNA المختلفة مفيدة للدراسات التصنيفية؛ وذلك لأنها توضح معدلات التطور وتركز على مستويات التغير المرتفعة والمنخفضة. ومن أهم الطرق المعروفة، مثل: الحمض النووي DNA متعدد الأشكال المتضخم العشوائي (RAPD random amplified polymorphic)، وتعدد الأشكال الطولية للقطاعات الضخمة (AFLP amplified fragment length polymorphism)، وطريقة الشفرات الصغرى (SSRs microsatellites) متعددة الأشكال، وتعمل على تعريف تطور الجينات. وقد تم التعرف على الـ DNA الميتوكوندريا والريبوسومات، وكذلك على بعض الجينات النووية التي توضح باستمرار الأساس الجيني لتطور الأجناس والأنواع المختلفة (٣).

لذلك، تعتبر هذه الدلالات مناسبة كأساس من أساسيات التصنيف الجزيئي للتمييز بين الأنواع. والجدير بالذكر، أنه قد تم اختيار كود تشفير جين الميتوكوندري لأوكسيداز السيتوكروم سي (cytochrome-c oxidase I COI) معياراً لتعريف فصائل الحيوانات الكاملة تصنيفها (باركود الـ DNA) (٤، ٥). ويتوقف مدى الاعتماد على أساسيات تصنيف الجزيئات على درجة حفظها داخل الأنواع. وبالرغم من ذلك، ينتج عن تطور الـ DNA الميتوكوندري والريبوسومي اختلافات تكون - غالباً - بين الأجناس، وقد تم العثور على بعض التعدادات الشكلية داخل الجنس، خاصة عند المقارنة بين المجموعات البعيدة عن بعضها. وينبغي إثبات هذه الدلالات الجزيئية في أكبر عدد من المجموعات الناقلة للأمراض ذات الخصائص المختلفة - على سبيل المثال - من حيث التوزيع الجغرافي والنباتات العائل؛ وذلك لاستبعاد أي اختلافات محتملة بين المجموعات. وقد تُشارك في هذا السياق الحشرات المجففة والمخزنة في المتاحف لزيادة عدد العينات في التصنيف.

إن هذا الفصل يهدف إلى تقديم المعلومات اللازمة لتطوير أساسيات التصنيف الجزيئي، وتطبيقه لأنواع الحشرات الناقلة للفيتوبلازما (انظر: الملاحظة ١). ويتم الشرح في فصول أخرى من فصول الكتاب - للأساليب الأساسية لجمع الحشرات (انظر: الملاحظة ٢) وحفظها (انظر: الملاحظة ٣). وقد تم شرح طرق استخلاص الـ DNA وتركز الدلالات الجزيئية على مناطق الـ DNA؛ والتي تُعرف بأنها غنية بالمعلومات التصنيفية للأجناس. ولا يتناول هذا الفصل الاختلاف النوعي ولا تعريف النوع الواحد/ النوع البيولوجي (biotype/haplotype). وقد تم مناقشة مجموعة من

البادئات التي تُناسب DNA الحشرات. وأخيراً، يقدم هذا الفصل أولى الحالات الدراسية التي تم فيها تحديد الفيتوبلازما بسهولة عن طريق الدلالات الجزيئية.

٢- المواد:

١-٢: استخلاص DNA:

١-١-٢: طريقة CTBA:

١. مُنظم الطحن: يحتوي على ٢٪ W/V من سيتيلتريميثيل بروميد الأمونيوم cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB), 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA pH 8.0, 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.2% β -mercaptoethanol.
٢. كاربوراندم، أو رمال ناعمة معقمة.
٣. أداة طحن مناسبة لأنبوب صغير ذات حجم 1.5 مل.
٤. أنابيب صغيرة (1.5 مل).
٥. جهاز هزاز.
٦. حضانة درجة حرارتها 60 مئوية.
٧. جهاز طرد مركزي.
٨. كحول الأيزواميل والكلورفورم، بنسبة: ٢٤ جزءاً من الكلورفورم، جزء واحد من الأيزواميل.
٩. أيزوبروبانول (بارد).
١٠. أيثانول (٧٠٪).
١١. مجففة التفرغ.
١٢. ماء معقم.
١٣. محلول منظم TE (معقم) يحتوي على: 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0.

٢-١-٢: طريقة العينات المجففة:

١. محلول منظم: 3 mM CaCl₂، ٢٪ من كبريتات دوديسيل الصوديوم (SDS)، ٤٠ ملي من الديثيوتريتول (DTT)، ٢٥٠ ملغ/ملي من البروتين K, 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM NaCl.
٢. أنابيب صغيرة (٢ مل).

٣. حضانة درجة حرارتها ٥٥ م° ٦٥ م°.
٤. إيثانول (١٠٠٪).
٥. إيثانول (٨٥٪، بارد).
٦. فينول/ كلورفورم؛ بنسب متساوية من الفينول والكلورفورم.
٧. كلورفورم.
٨. طرد مركزي
٩. أيزوبروبانول.
١٠. جليكوجين.
١١. محلول أسيتات الصوديوم: 3 M، pH 5.2.
١٢. جهاز هزاز.
١٣. ماء معقم.
١٤. محلول بفر TE (معقم): 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0.

٢-٢: العلامات الجزيئية:

وكثيراً ما تُستخدم الطرق التي تقوم على استخدام الـ DNA، من حيث تطبيقها على معرفة مستويات التطور المختلفة في الدراسات الخاصة بتطور الأجناس والمجموعات (الملاحظة ٤). وتستخدم الـ DNA -غالباً- الميتوكوندريا (mt DNA) (انظر: الملاحظة ٥)، والـ DNA الريباسومي (r DNA) (انظر: الملاحظة ٦)، وعددا قليلا من الجينات النووية (انظر: الملاحظة ٧) في تحديد الأجناس:

١. أزواجا من البادئات المُصممة خصيصاً لمناطق الـ mtDNA (الجدول ١).
٢. أزواجا من البادئات المُصممة خصيصاً لمناطق الـ rDNA (الجدول ٢).
٣. زوجين من البادئات؛ بديلين لـ *EF-1α*:

EF- 1α 44:5' GCTGAGCGSGAGCGTGGTATCAC 3'

EF- 1α 52: 5' CACRGGTACTGTTCCAATACC 3'
(approximate amplicon length: 600 bp).

EF- 1α 46.5: 5' GCHTTTGTGCCYATYTCTGG 3'

EF- 1α 53.5: 5' GGCTTGGAAGGAACCARRATGATRAT 3'
(approximate amplicon length: 550 bp).

الجدول (١): مجموعة من الأزواج البادئات المُصممة في مناطق الـ DNA الميتوكوندريا؛ والمُستخدمة في تعريف الأجناس:

COI	C1-J-1709 C1-N-2776	AATTGGWGGWTTYGGAAAYTG GGTAATCAGAGTATCGWCGNGG	1,070	(23)
COI	C1-J-1718 C1-J-2191	GGAGGATTTGGAAATTGATTAGTTCC CCCGGTAAAATTAATAAACTTC	470	(22)
COI	C1-J-2183 L2-N-3014	CAACATTTATTTTGGATTTTGG TCCAATGCACTAATCTGCCATATTA	830	(22)
COI	C1-J-2195 L2-N-3014	TTGATTTTTTGGTCATCCAGAAGT TCCAATGCACTAATCTGCCATATTA	820	(22)
COI	HCO LCO	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA	650 ^a	(25)
COII	TL2-J-3033 TK-N-3796	TCTAATATGGCAGATTAGTGCA ACTATTAGATGGTTTAAGAG	760	(23)
COII	TL2-J-3037 C2-N-3661	ATGGCAGATTAGTGCAATGG CCACAAATTTCTGAACATTGACCA	620	(22)
COII	C2-J-3399 TK-N-3796	ACAATTGGTCAYCAATGATAYTG ACTATTAGATGGTTTAAGAG	400	(23)
<i>cytb</i>	CB-J-10612 CB-N-10920	CCATCCAACATCTCAGCATGATGAAA CCCTCAGAATGATATTTGTCCTCA	310	(22)
<i>cytb</i>	CB-J-10933 CB-N-11367	TATGTACTACCATGAGGACAAATATC ATTACACCTCCTAATTTATTAGGAAT	430	(22)
ND5	N5-J-7077 N5-N-7793	TTAAATCCTTWGARTAAAAYCC TTAGGTTGRGATGGNYTAGG	720	(23)
CR	MEL_fw MEL_rev	TTTTATCCACTCTTAAAGCTTG TGATAGAGCTTTTTGAATTCTC	381 and 436	(11)
CR	AFF_fw AFF_rev	TTTAAACCACCTCAAACCTCAA CGTAAAATTCTTGCGCA	499	(11)

كود الجينات المستهدفة هي للوحدات I و II من أوكسيديز C السيتوكروم (COI و COII)، و لوحة السيتوكروم b (*cytb*)، والوحدة الفرعية 5 لنظام الديهيدروجينيز NADH (ND5)، ومنطقة التحكم (CR)^a جزء الـ COI؛ والذي تم مده من خلال التضخيم الجيني الـ HCO-LCO قد تم تصميمه بشكل رسمي، ويعتبر مرجعية لقاعدة بيانات لمشروع "باركود الحياة".

٣- طرق العمل:

٣-١: استخلاص الـ DNA:

تعتبر الطرق المستخدمة لاستخلاص DNA الفيوتوبلازما من الحشرات الناقلة مناسبة لتعريف الأجناس الحشرية أيضاً. لذلك، يمكن اقتراح الإجراءات نفسها لتحقيق الأهداف التصنيفية والتشخيصية، على حد سواء (انظر: الملاحظة ٨).

الجدول (٢): مجموعة من أزواج البادئات المُصممة في مناطق الـ DNA الريبوسومي؛ والمُستخدمة لتعريف الأجناس:

Amplified section	Primer pair	Sequence (5'-3')	Annealing site	References
ITS1	ITSa	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	18S	(28)
	ITSb	GCTGCGTTCCTTCATCGATGC	5.8S	
ITS2	5.8Sfw	TGTGAACTGCAGGACACATG	5.8S	(27)
	28Srv	ATGCTTAAATTTAGGGGGTA	28S	
ITS1 + 5.8S + ITS2	18Sfw	CCTTTGTACACACCGCCCGT	18S	(27)
	28Srv	ATGCTTAAATTTAGGGGGTA	28S	
28S D2-D3	28SIfw	AGTCGKGTGCTTGAKAGTGCAG	28S	(30)
	28SIrv	TTCGGGTCCCAACGTGTACG		
28S D3-D6	28SIIfw	GGGACCCGTCCTTGAAACAC	28S	(30)
	28SIIrv	ACCCTCCTACTCGTCAAGG		
28S D6-D7	28SIIIfw	CCGCTAAGGAGTGTGTAA	28S	(30)
	28SIIIrv	GAAGTTACGGATCTARITTTG		
28S D8	28SIVfw	CCTCGGACCTTGAAAATCC	28S	(30)
	28SIVrv	TGTCTCCTTACAGTGCCAGA		
28S D9-D10	28SVfw	GTAGCCAAATGCCTCGTCA	28S	(30)
	28SVrv	CACAATGATAGGAAGAGCC		

المناطق المُستهدفة هي الفواصل الداخلية المُستسخة 1 (ITS1)، والفواصل المُستسخة 2 (ITS2)، و D2-D10 هي منطقة متغيرة لجين 28S.

٣-١-١: طريقة الـ CTAB للعينات الجديدة:

تم تعديل هذه الطريقة (٦) من الطريقة (٧):

١. قم بوضع حشرة واحدة من الحشرات في 500 ميكروليتر من المحلول المنظم للطحن، مع أداة الطحن في أنبوب صغير 1,5 مل باستخدام كبرونديم معقم أو الرمال الناعمة.
٢. قم برج المعلق وتقليبه بحركات دائرية، ومن ثم ضعه في حوض على درجة حرارة 60°C لمدة ٣٠ دقيقة.
٣. قم بوضع الأنابيب في جهاز الطرد المركزي بسرعة ١٥٠٠٠ لفة لمدة ٥ دقائق على درجة حرارة الغرفة. وبعدها، انقل المادة الطافية إلى أنبوب صغير 1,5 مل.
٤. قم بإضافة مقدار حجم واحد من كحول الأيزاميل/الكلوروفورم، وقلبه أكثر من مرة، وبعدها قم بالطرد المركزي بسرعة $15,000 \times g$ لمدة خمس دقائق في درجة حرارة الغرفة.
٥. أضف مقدار حجم واحد من الأيزوبروبانول البارد.

٦. قم بالطرد المركزي لمدة ٢٠ دقيقة بسرعة $g \times 15,000$ ، ودرجة حرارة 4 مئوية، وتخلص من الأيزوبروبانول.
٧. قم بغسل الـ DNA بـ 300 ميكروليتر بـ ٧٠٪ إيثانول.
٨. ومن ثم، قم بالطرد المركزي لمدة ٥ دقائق، بسرعة $g \times 15,000$ ؛ عند درجة حرارة 4 مئوية. وتخلص من الإيثانول.
٩. قم بتجفيف حبيبات الـ DNA في وسط الجهاز المجفف، ومن ثم أعد. قم بالإذابة مرة أخرى بـ ٢٠ - ١٠٠ ميكروليتر من الماء المعقم، أو المحلول المنظم للـ TE.

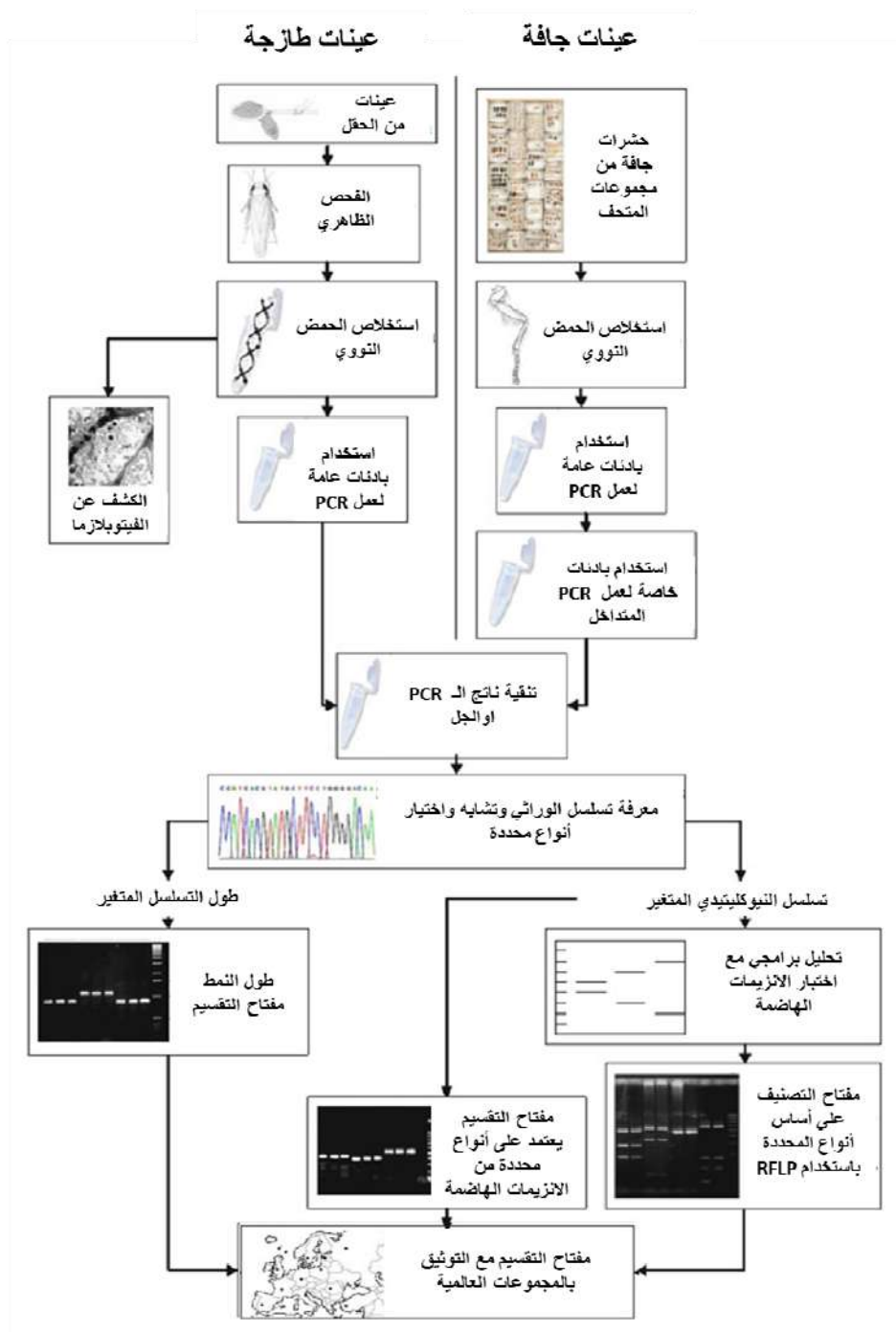
٣-١-٢: الطريقة البديلة للعينات المُجففة:

إن هذه الطريقة المقترحة هي بديلة للعينات الجافة، مثل: عينات الحشرية العملية (٨) (انظر: الملاحظة ٩):

١. قم بوضع كل العينات في أنبوب صغير ٢ مل، واغمرها كلياً في المحلول المنظم للهضم (٥٠٠-٧٠٠ ميكروليتر، حسب حجم العينة).
٢. ضعها في حضانة طوال فترة الليل (لمدة ١٦-٢٠ ساعة)، على درجة حرارة 55 مئوية، واخلطهم معاً برفق.
٣. قم بإزالة العينة من المحلول المنظم، وضعها في ١٠٠٪ إيثانول لمدة ٢-٤ ساعات لوقف أي عملية هضم أخرى، ثم اتركها لتجف في الهواء، ومن ثم ضعها مع المجموعات.
٤. قم باستخلاص الأحماض النووية من المحلول المنظم باستخدام الكمية نفسها من الفينول/الكلوروفورم. اخلط المحتويين معاً بشكل جيد، ثم اعمل طرداً مركزياً على درجة حرارة الغرفة بأقصى سرعة لفترة زمنية كافية لفصل الخليط المائي والعضوي.
٥. انقل الطبقة العلوية المائية إلى أنبوب جديد، وأضف كميات مساوية من الكلوروفورم. قم برجه جيداً، ثم اعمل طرداً مركزياً بأقصى سرعة على درجة حرارة الغرفة لفصل المحتويات عن بعضها.
٦. ثم يتم نقل الطبقة العلوية المائية إلى أنبوب جديد، ويتم ترسيب الـ DNA بإضافة ٠,٦ من الأيزوبروبانول، ٢٠ ملج من الجليكوجين، و٠,١ من إيسيتات الصوديوم 3M، ثم ضع الأنبوب على جهاز الهزاز على الفور.
٧. بعد ذلك، اطرده مركزياً على درجة حرارة الغرفة، بسرعة ١٥٠٠٠ لفة لمدة ٢٥ دقيقة.
٨. تخلص من الرواسب، واغسل الـ DNA مرتين؛ بإضافة ١,٥ مل من الإيثانول ٨٥٪ البارد جداً.
٩. تخلص من الإيثانول، واترك الـ DNA ليحجف في الهواء عند درجة حرارة 65 مئوية.
١٠. أعد تدوير الـ DNA في ١٠٠ مل من الماء المعقم، أو المحلول المنظم للـ TE.

٢-٣: تعريف الأجناس: الطرق العامة:

لقد قمنا بتقديم بروتوكولين مختلفين لتعريف العينات؛ غير العينات التي تم جمعها من الحقل والعينات المُجففة على التوالي (الشكل ١) (انظر: الملاحظة ١٠).



الشكل (١): الشكل التخطيطي، يلخص خطوات تعريف الأجناس للحشرات من خلال العينات الحقلية (المجمعة من الحقول)، وعينات المتاحف المُجففة.

١-٢-٣: العينات المُجمعة من الحقول:

١. جمع العينات (انظر: الملاحظة ١١)
٢. للتعرف على الحشرات، يتم التعرف عليها مورفولوجياً أولاً، وذلك لتمييز الحشرات على مستوى العائلة/النوع (عند استخدام الطريقة الجزيئية، إذا كانت متوفراً)، أو على مستوى الصنف (عند وجود طريقة جديدة للتعريف الجزيئي).
٣. استخلص الـ DNA من عينة واحدة (انظر: العنوان الفرعي ٣-١-١).
٤. يمكن استخدام اختبار PCR لمناطق محددة الـ DNA مع استخدام بادئات متخصصة، وقد تم عرض تلك المعلومات في الدراسات والأبحاث السابقة.
٥. تنقية الـ DNA واستخلاصه من ناتج الـ PCR (انظر: الملاحظة ١٢).
٦. الحصول على الشفرة الوراثية من الـ DNA المنقى (انظر: الملاحظة ١٣).
٧. تنسيق الشفرة الوراثية وتحليلها (انظر: الملاحظة ١٤).
٨. إن تعدد الجينات داخل الشفرة الوراثية يسمح بتسجيلها وحفظها داخل الجنس، وقد تكون مختلفة داخل الأجناس. ويتم التخلص من الأجناس ذات الأشكال المختلفة (انظر: الملاحظة ١٥). وقد يتمثل تعدد الأشكال بين الأجناس على النحو التالي:
 - اختلاف طول التسلسل الوراثي؛ وإن كان طول الشفرة ثابتاً أو متكرراً فيتم تسجيله على سبيل المثال: يتم استخدام التعدد الشكلي الوراثي لعملية التعرف على الأجناس بشكل مباشر. ويعتبر التعدد الشكلي الوراثي الممتد من طبيعة الـ ITS الريبوسومي.
 - اختلاف التسلسل النووي تيدي؛ إذا تم تسجيل عديد من التسلسلات المختلفة. (على سبيل المثال، طول التسلسل غير مشمول)؛ حيث من الممكن تصميم البادئات المحددة للأجناس وفقاً للمواقع المميزة المختلفة.
٩. يتم إجراء تجارب الـ PCR المحددة للأجناس، ثم يليها الـ RFLP التشخيصي (انظر: الملاحظة ٧).
١٠. عند تطوير بروتوكول جزيئي مميز للتصنيف، يجب اختباره؛ كي يعتمد عليه في العينات المُجمعة من المواقع المختلفة. ويجب تكرار اختبارات الـ PCR الخاصة لتعريف الجنس أو الـ PCR-RFLP على أكبر عدد من المجموعات، وذلك لإثبات أن التعدد الشكلي الجيني يكون ثابتاً داخل الأجناس. وينبغي التخلص من كافة الاختلافات الضمنية الموجودة داخل الأجناس.

٢-٢-٣: عينات المتاحف المُجففة:

١. استخلص الـ DNA من عينة واحدة (انظر: العنوان الفرعي ٣-١-٢).
٢. يتم اختبار الـ PCR للمناطق التي تحتوي على معلومات الـ DNA (انظر: الملاحظة ١٨).

٣. أكمل الباقي بالخطوات من ٥ إلى ١٠؛ الموضحة تحت العنوان الفرعي ٣-٢-١.

٣-٣: أمثلة على تعريف الأجناس:

إن التصنيف الجزيئي قد تم تطويره لعدد قليل من أجناس الحشرات التي يُعتقد -أو يُعرف عنها- أنها ناقلة لمرض الفيتوبلازما. وحتى الآن، لم يتم نشر إلا ثلاثة أعمال. اثنان منهم كانا على أجناس أوربية الأكثر شيوعاً؛ والتي تنتمي إلى فصيلة الـ *Reptalus* والـ *Hyalesthes*، وعائلة Cixiidae (٩، ١٠). إن نطاطات الأوراق تدخل في عملية نقل فيتوبلازما الـ *Stolbur*. وتقدم الدراسة الثالثة طرقاً للتمييز بين الـ *Cacopsylla melanoneura* Förster والـ *C. affinis* Löw التي تقوم بنقل فيتوبلازما تكاثر التفاح (AP) (١١). بجانب ذلك، التعريف الجزيئي للـ *Cacopsylla picta* Förster وفقاً للاختبارات الخاصة بتعريف الأجناس بالـ PCR مع جين (wingless (wg)) (١٢).

١-٣-٣: تعريف أجناس *Hyalesthes* و *Reptalus*:

إن الاختبارات الجزيئية لتعريف ثلاث أنواع من *Hyalesthes* وأربعة أنواع من *Reptalus* قد تم نشرها (٩، ١٠) (انظر: الملاحظة ١٩ و ٢٠).

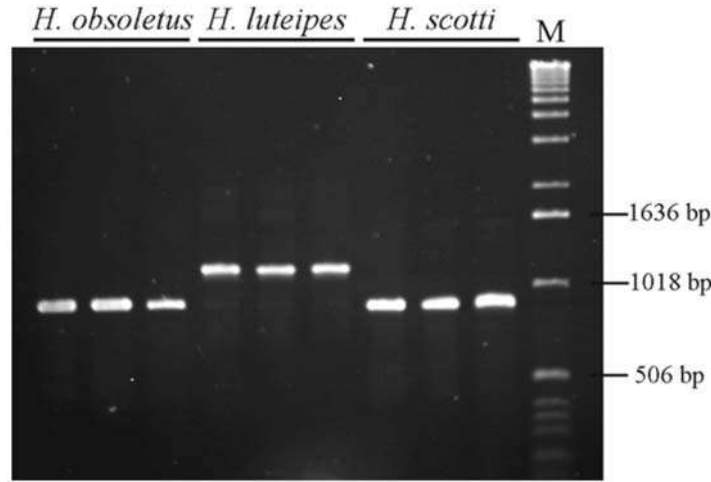
١. تعريف الأجناس يعتمد على الـ PCR لجين الـ COI باستخدام أزواج البريمر C1-J-2195/L2- N-3014 (الجدول ١) وعلى جين الـ ITS، باستخدام أزواج البريمر 5.8Sfw/28Srv (الجدول ٢).

٢. أما بالنسبة للـ *Hyalesthes*، فقم بإجراء اختبار الـ PCR-RFLP باستخدام إنزيم الهضم *TaqI*؛ حيث سيكون حجم قطعة DNA من COI حوالي 890-bp:

- حيث مع الـ *H. obsoletus* سيتكون قطعتان بحجم (210~، 680~ bp).
- ومع *luteipes* سيتكون قطعتان بحجم (390~، 500~ bp).
- ومع الـ *scotti* سيتكون قطعتان بحجم (280~، 610~ bp).

٣. و بالنسبة للـ *Hyalesthes*، ينتج عن اختبار الـ PCR للـ ITS2 (شكل ٢) أحجام مختلفة من الـ DNA:

- 130 bp for *H. luteipes*، 1
- 880 bp for *H. obsoletus*
- 830 bp for *H. scotti*.
- وباستخدام اختبار RFLP مع إنزيم الهضم *TaqI* للتمييز بين *H. obsoletus* و *H. scotti*.
- حيث مع *H. scotti* سيتكون قطعتان بحجم (130~، 700~ bp).
- ومع *H. obsoletus* تظل بدون قطع (880bp).



الشكل (٢): نتائج تفاعل البلمرة المتسلسل لجين الـ ITS2 على الأجاروز من ثلاثة أنواع لـ *Hyalesthes*: *H. scotti*، *H. obsoletus*، *H. luteipes*. وهي سلم الوزن الجزيئي (1 kb ladder). تم وضع الصور من (٩) بعد أخذ تصريح بذلك من Sons and John Wiley.

٤. بالنسبة لـ *Reptalus*، قم بإجراء اختبار الـ PCR-RFLP باستخدام إنزيم الهضم الـ *AluI*؛ حيث سيكون حجم قطعة DNA (شكل ٣):

- حيث مع *R. quinquecostatus* سيتكون ثلاث قطع بحجم (~170 ~260 ~490 bp).
- مع *R. cuspidatus* سيتكون ثلاث قطع بحجم (~80، ~330، ~510 bp).
- ومع *R. panzer* سيتكون قطعتان بحجم (~440، ~480 bp).
- ومع *R. melanochaetus* سيتكون أربع قطع بحجم (~60، ~120، ~170، ~570 bp).

٥. إما بالنسبة لـ *Reptalus*، باستخدام الـ PCR الناتج عن جين ITS2:

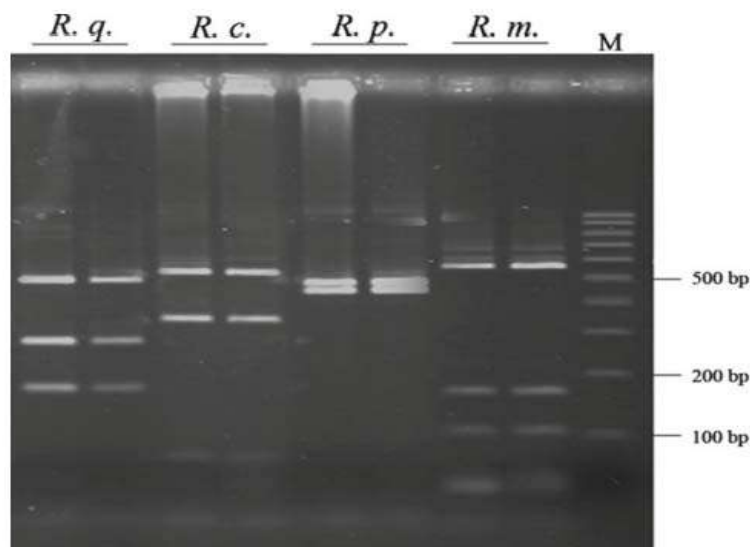
- 1، 450 bp for *R. quinquecostatus*.
- 960 bp for *R. melanochaetus*.
- 850 bp for *R. cuspidatus* and *R. panzer*.
- الاختلافات اختبار الـ RFLP مع إنزيم *TaqI* للتمييز بين *R. cuspidatus* والـ *R. panzer*.
- حيث مع الـ *R. panzer* سيتكون أربع قطع بأحجام (~20، ~230، ~260، ~340 bp).
- ومع الـ *R. cuspidatus* تظل كما هي (850bp).

٣-٢-٣: التمييز بين *C. melanoneura* والـ *C. affinis*:

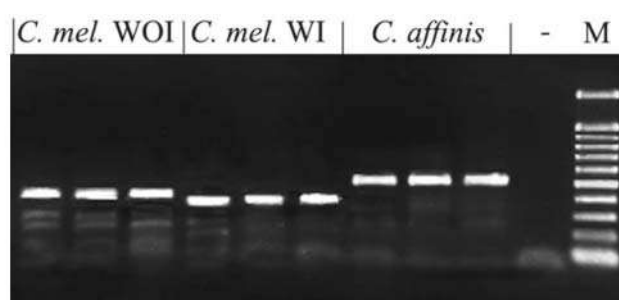
يمكن التمييز بين النوعين؛ باستخدام جين منطقة التحكم (CR) الـ DNA الميتوكوندري

(١١). وقد لوحظ أن هناك نوعين مختلفين لعدد جينين من الـ *C. melanoneura*؛ يختلفان من حيث وجود - أو عدم وجود - الـ 56 pb indel اندول (الشكل ٤).

١. بالنسبة لـ *C. affini* ، ينتج الـ PCR مع البادئات التالية: AFF_fw/AFF_rev حجماً يصل إلى 499 bp amplicon.
٢. أما بالنسبة لـ *C. melanoneura* فينتج الـ PCR مع البادئات التالية: MEL-fw/MEL-rev حجماً يصل إلى 381 و 436 bp amplicons.
٣. من الممكن إجراء تفاعل الـ PCR المتعدد ، باستخدام كل من البادئات الأربعة في الأنبوب الخاص بالتفاعل نفسه.



الشكل (٣): اختبار الـ RFLP بعد هضم نتائج الـ PCR باستخدام إنزيم *AluI* لجين الـ cytochrome- c oxidase I (COI). لأربعة أنواع من: *R. q. Reptalus*; *R. c. R. cuspidatus*; *R. p. R. quinquecostatus*; *R. m. R. panzeri*. *M* molecule *melanochaetus* وهي سلم الوزن الجزيئي (100 bp ladder). تم وضع الصور من (١٠) بعد أخذ تصريح بذلك من مطبعة جامعة كامبردج.



الشكل (٤): المواد الناتجة من تحليل الـ PCR المتعدد بأربع بادئات هي: MEL_fw/MEL_rev and AFF_fw/AFF_rev. ويوضح الشكل، أن هناك متغيرين داخل جنس الـ *C. melanoneura* يحملان جين الـ (WI) - أو لا تحمل - (WOI) 56-BP Indel. علامة - فقط - ماء (شاهد)، وعلامة الوزن الجزيئي M (100 bp ladder). وتم وضع الصور من (١١) بعد أخذ تصريح بذلك من مطبعة جامعة كامبردج.

٤- الملاحظات:

١. تستخدم تقنيات الاختبارات الجزيئية حالياً في المختبرات التي تتعامل مع الفيتوبلازما، لذلك يمكن استخدام الـ DNA نفسه؛ والذي تم استخلاصه كنموذج معياري للـ PCR؛ وذلك لتعريف الحشرات أو الفيتوبلازما. إن براعة الطرق التي تقوم بتعريف أجناس الحشرات أمر محتمل؛ حتى بالنسبة للباحثين الذين يعملون في علم أوبئة الفيتوبلازما، وينقصهم مهارات تصنيف الحشرات. وقد تم التركيز بدقة على أهمية تحليل مجموعة كبيرة من عينات كل نوع من أجناس؛ من أجل تقييم درجة الدقة على أساسيات التصنيف الجزيئي. وتوفر العينات المأخوذة من المتاحف مصدراً مهماً للمواد؛ برغم أن انخفاض جودة الـ DNA تُعيق التحليل الجزيئي. وقد تم اقتراح إجراءات مُتخصصة لاختبار عينات المتاحف. ولا يمكن استخدام طريقة الاختبارات الجزيئية بدون التصنيف التقليدي؛ فتوفر الأدوات الجزيئية يعطي مزيداً من المعلومات التي تقوي - في الغالب - عملية تعرف الأجناس المعروفة، لكن الـ DNA نفسه لا يكفي لوصف العينات غير المعروفة، مثل أجناس جديدة من الحشرات. وبالتالي، تعتبر المعلومات الجزيئية وبياناتها المختلفة - مع المعلومات المورفولوجية الأساسية - أمراً مهماً للتعريف ووصف الحشرات الجديدة. وهذا يتشابه مع قواعد البيانات لتصنيف الحشرات التالية: نطاطات الأوراق، نطاطات النباتات وحشرة السليدي (مثل: <http://www.naturalhistory.museumwales.ac.uk/vectors>, <http://ctap.inhs.uiuc.edu/dmitriev>, <http://psyllidkey.eu/index.html>). وقد تكون تلك المعلومات مفيدة في تعريف أجناس محددة عن طريق الشفرة الوراثية الـ DNA.
٢. من الممكن القيام بتعريف أجناس نواقل للأمراض، بجانب تقييم دورها في انتقال الفيتوبلازما. وفي الواقع، يمكن للحشرات المُجمعة من على النباتات أثناء فترة الملاحظة أن يظهر عليها الأعراض التي قد تُساعد في عملية التصنيف. إن من أكثر الطرق شيوعاً لفحص مجموعات الحشرات والتعرف على تعدادها وعلى محاصيل مستهدفة هي استخدام المصائد اللاصقة. وفي المقابل، يمكن تعديل مصائد الخيمية (malaise traps) للإمساك بالأنواع الأكثر صعوبة (١). ولكي تكون الاختبارات الجزيئية ناجحة، يجب إزالة الحشرات المُجمعة من المصائد بشكل دوري قبل أن يتدهور الحمض النووي الـ DNA، بالرغم من أنه في تجربتنا، يكون الـ DNA النقي المستخلص من الحشرات العالقة في المصائد والمُخزنة لأسابيع على درجة حرارة الغرفة مناسباً لاختبار الـ PCR. وتعد - أيضاً - شبكات الصيد والمصيدة الهوائية من الأساليب الفعالة، وخصوصاً في الحقول، ومن إيجابياتها توفير حشرات حية.
٣. يحدث تدهور في الـ DNA للحشرات مع الوقت، ويُفضل استخدام DNA جديد في الدراسات الخاصة بالجزيئات. وتتحسن كمية الـ DNA وجودته عندما يتم قتل الحشرات الحية بالتجميد ويتعامل معها مباشرةً. ومع ذلك، لا يتم - غالباً - نقل العينات المُجمعة من الحقول إلى المعامل على الفور. وبالتالي، تتأخر عملية استخلاص الـ DNA. وأثناء هذه الفترة، يجب تخزين العينات

بالطريقة الصحيحة لحفظ الـ DNA. ويتم استخدام الإيثانول كثيراً من خلال طريقة من ضمن طرق التخزين المختلفة. ويُفضل استخدام الإيثانول النقي؛ لأن استخدام المحاليل الكحولية المخلوطة بالماء -مثل: ٧٠٪ إيثانول- قد يؤدي إلى جودة استخلاص للـ DNA من ترك الحشرات بدون حفظ (١٣). وفي المقابل، يمكن تخزين العينات لفترة طويلة بتجميدها عند درجة حرارة ٨٠ مئوية. وقد تم وصف طريقة فعالة وسريعة لحفظ الـ Hemipterans؛ عن طريق استخدام محلول الأسيتون في درجة حرارة الغرفة، مما يجعل استخدام هذه الطريقة خياراً سهلاً وغير مُكلف في أرشفة الحشرات (١٤). علاوة على ذلك، يتضح أيضاً أن الأسيتون أفضل عامل لحفظ DNA الحشرات، ويحافظ كذلك على الفيتوبلازما؛ حيث إن نتائج اختبار الـ PCR تكون بكفاءة العينة الحديثة الجديدة (١٥).

٤. الحمض النووي الـ DNA له استخدامات كثيرة، منها أنه يتم توظيفها في معرفة المستويات الأكثر تطوراً من تحديد الأجناس، وفي الدراسات الجينية الوراثية وتطور السلالات. وقد تم تطبيق بعض هذه الطرق بنجاح على الحشرات الناقلة للفيوتوبلازما. وقد تم استخدام الـ SSRs والـ RAPD على الجينات الخاصة بمجموعة الـ *H. obsoletus* Signoret، *Scaphoideus titanus* Ball، والـ *Cacopsylla pruni* Scopoli (٢٠-١٦).

٥. تم استخدام الـ mtDNA بطريقة واسعة في التعرف على تاريخ تطور السلالات، وهذا يصب في التعرف على الأصناف. ويرجع السبب في جعل الـ mtDNA ملائماً لتحقيق الوصول إلى التصنيف إلى ارتفاع معدل التطور فيها، وفي عامل الوراثة، وانخفاض معدل الاختلاف الجيني. وكلما كان حجم الشفرة صغيراً (طولها ١٦ - ٢٠ كيلوبايت) وزاد عدده في الخلية كان من السهل الحصول على الـ mtDNA، حتى من العينات الـ DNA المتدهورة (٣).

ويحتوي الجزيء الدائري للـ mtDNA على ٢٧ جيناً، يحمل كل منهم رموز الوحدات الثانوية الصغيرة والكبيرة الخاصة بـ RNA الريبوسومي، وتتكون من ١٣ بروتيناً، و٢٢ ناقلاً للـ RNAs (tRNAs). وتكون مضغوطة الجينات منظمة على نحو خيوط من الـ DNA وجينات ممتدة، ويمكن أن تكون موجودة أو غير موجودة. وتوجد على الأقل منطقة واحدة غير معلومات الشفرة، وهي (منطقة التحكم)، وتحتوي على عناصر تنظم الاستساخ والتكاثر. مع استثناء من tRNAs، والذي يتضح أن تنظيم الجينات ثابت في الحشرات (٢١).

إن تطور جينات الميتوكوندريا بمعدلات مختلفة يجعل كل منطقة مناسبة للاختبار في تحديد مستويات التصنيف المختلفة. وأثبت أن جينات الريبوسوميات الـ 12S والـ 16S تحتوي على معلومات الشفرة سواء الصغيرة والكبيرة على التوالي، وتساعد على عملية التصنيف على مستوى الأجناس الفصائل والعائلات للحشرات. ويتم استخدام الجينات التي تحمل رمز الـ tRNA في تحاليل تطور السلالات بشكل غير متكرر، بسبب أنها صغيرة وثابتة، إلى حد كبير. وتعتبر الجينات التي تحمل رموز البروتين من أكثر أدوات التصنيف نجاحاً، وتقدم

أفضل أداء على مستوى الأنواع والتصنيف؛ ولكن عند استخدامها لوصف الارتباط في تصنيف العائلات بين الرتب، تكون بشكل متكرر، والنتيجة ضعيفة وغير مقنعة (٢٢). إن معظم الدراسات الخاصة بالأجناس تبرز المواقع متعددة الأشكال من الجينات المعروفة، مثل: الوحدات الثانوية I، و II لأكاسيد السيتوكروم سي (COI و COII)، والسيتوكروم ب (Cytb)، والوحدات الثانوية ٥ لنظام NADH dehydrogenase (ND5) (٢).

وفي الحشرات، هناك ميزة إيجابية في استخدام علامات الميتوكوندريا والمتواجدة على الكرموسومات؛ والتي يمكن تعريفها باستخدام بادئات عامة مُصممة في المناطق غير المتغيرة. وقد قام Simon وآخرون عام (1994) بإعداد أول قائمة من البادئات الخاصة لكل مناطق الميتوكوندريا في الحشرات (٢٢). ومن ثم، قام بتحديثها في Simon et al (2006) (٢٣). ويوضح الجدول (١) عينة من هذه البادئات. وقد قمنا باختيار زوج البادئات المتخصصة للمناطق التي توفر معلومات عن جينات COI، COII، Cytb، و ND5. ووجدنا أنها تعمل بشكل جيد مع رتبة ال Hemiptera.

ومن ضمن تسلسلات الميتوكوندريا، قد تم اختيار جين ال COI نقطة مرجعية لتشفير الجينوم DNA، وهو يعتبر نظاماً كاملاً لتحديد أجناس الحيوانات -مثل: الحشرات وغيرها-. ويعتمد تشفير جينوم DNA على افتراض أن تنوع تسلسل الشفرة داخل القطاع قصير، والجينوم الموحد يمكن أن يوفر (biological barcode) "التشفير البيولوجي"، ومنه يُمكن تحديد الأجناس على النوع (٤، ٥). ومنذ تقديمه في عام ٢٠٠٣، زادت عدد الدراسات المستخدمة لتشفير ال DNA بشكل سريع. وقد كان التشفير البيولوجي لـ DNA هدفاً للتعرف على كثرة تنوع الحشرات وأهميتها الاقتصادية والوبائية وأهميتها الزراعية. وقد تم اقتراح مشروع التشفير البيولوجي (Barcode) للحياة الدولي (iBOL, 2010; <http://ibol.org/>) لوضع معايير وبروتوكولات عالمية أساسية للتشفير، ولبناء مكتبة متكاملة لتشفير ال DNA. وداخل مشروع ال iBOL، يوجد أنظمة بيانات باركود الحياة (BOLD; <http://www.boldsystems.org/views/login.php>) تعتبر هي منصة المعلومات الرسمية، والتي طورها المركز الكندي لتشفير ال DNA (Canadian Center for DNA Barcoding (CCDB)؛ وهو عبارة عن نظام داعم للتعرف على أساس تلك الشفرات. كذلك، يقدم خدمات شبكية لمطوري الأنظمة الأخرى (٢٤).

وتتمثل إحدى السمات الرئيسية لمشروع التشفير في تحديد جزء واحد بطول ٦٤٨ bp عند نهايات 5' من ال COI نقطة مرجعية (٤، ٥). ويتم اختبار هذه المناطق بزواج من البادئات هي ال LCO/HCO، والذي تم تصميمها في الأساس للافقاريات البحرية، ولكن يمكن تطبيقها على كافة الفصائل الحيوانية (٢٥) (الجدول ١). ومع ذلك، تكشف الدراسات السابقة على تشفير ال DNA، أن أغلبية الأبحاث تعتمد على المشروعات المحددة أو البادئات العامة؛ حيث البادئات المتخصصة لتحديد الأجناس يكون أداؤها أفضل في ال PCR. ومن ناحية أخرى، يمكن

الحصول على ما يصل إلى 900 bp، في ظل وجود تكنولوجيا تحليل التسلسل الشفرات الحالي، بشكل روتيني ودقيق. وهذا من شأنه أن يزود فرصة تحديد الاختلاف الجيني والحصول على أكبر كمية من المعلومات حول تطور السلالات. وفي هذا الصدد، حتى جزء الـ HCO/LCO COI HG ~800-bp الموجود نهاية شفرة الـ HCO/LCO يوفر كثيرا من المعلومات حول مدي التباعد بين الأنواع المختلفة حشرية الأجنحة Lepidoptera وثنائية الأجنحة Diptera (٢٦). ومن الممكن تضخيم المنطقة الموجودة في نهاية الشفرة بسهولة عن طريق أزواج البادئات المتخصصة C1-J-2183/L2-N-3014 أو C1-J-2195/L2-N-3014 (٢٢). (الجدول ١). والآن، يتم طلب التسلسل الوراثي الـ COI لما لا يقل عن 500 bp لتسجيلها في موقع BOLD (٢٤).

٦. تم استخدام الـ rDNA على نطاق واسع ضمن علامات الجينات النووية؛ بسبب تواجد هذا الجين -بشكل عام- في كل البروتينات في الكائنات الحية الدقيقة، وتوفره بكثرة في الجينوم. كما أن مجموعة جينات الـ rDNA يتم وصفها في الكائنات الحية حقيقة النواة Eukaryota، والتي تضم عدداً من الأجناس الحشرية (٢). إن منظومة الجينات تعمل وفقاً لبنية ثابتة، والتي تقوم على أساس النسخ المتعددة والمتزنة والمتكررة، والتي يتم الفصل بينها من خلال الفواصل البينية لجينات (IGS intergenic spacers). وتشتمل وحدات الاستساخ على مناطق الجينات المشفرة؛ والتي تحمل ثلاث وحدات ريبوسومية لـ RNA، وهي (18S، 5.8S، و28S)، وهي مناطق الدعم الرئيسية، وتُعرف باسم فاصل النسخ الخارجي (ETS external transcribed spacer)، وتشتمل أيضاً على الوحدتين من الفواصل الداخلية غير المشفرة (ITS1 وITS2 internal transcribed spacers)، ولم يتم التعرف على وظائفها على الإطلاق حتى الآن. إن الـ rDNA يقوم بتكرار مكونات وحدة النسخ مع الفواصل بين الجينات القريبة من بعضها بعضاً (IGS) (٢١). وتختلف نسبة تطور المناطق لكل وحدة من وحدات الاستساخ بمعدلات مختلفة في جينوم النواة. لذلك، تقوم الدراسات الخاصة بالتطور على تحليل أجزاء مختلفة من الـ rDNA معتمدة في ذلك على مستوى التصنيف قيد الدراسة. وبصفة عامة، وجد أن هناك اختلافاً كبيراً بين القطاعات غير معروفة الوظيفة، مثل: الـ IGS، ETS، وITS. وجد بالذکر، أنه تم إثبات فائدة كل من الـ IGS والـ ITS في اكتشاف الاختلاف الجزيئي بين الأجناس؛ من حيث طول الشفرة الوراثية أو تسلسل الشفرة الوراثية. وفي المقابل، هناك تغيير في المناطق المشفرة؛ لكنه بطيء نسبياً، ويمكن استخدام هذا التغيير في الدراسات المنهجية الخاصة بالتصنيف (٢١). ويخضع الـ rDNA لعملية تطور. لذلك، يتوقع أن يكون تسلسل الشفرات متشابهاً بداخل الأجناس أكثر من بين الأجناس. ومع ذلك، يُلاحظ أن عدداً من نسخ الـ rDNA الموجودة داخل الجينوم قد تختلف في تلك المواقع القريبة من بعضها نسبياً، مثل: الـ IGS، ITS، وأجزاء من المناطق المشفرة. إن التأثير النهائي لتلك الأشكال المتعددة من الفواصل والنطاقات الفعالة هو الانتشار السريع لمتغيرات على الـ rDNA الجديد داخل الأجناس، أو حتى

داخل الجنس الواحد (٢٧). إن تلك المتغيرات -إن وجدت- قد تقلل من الاعتماد على الـ rDNA معرفاً للأجناس. لذلك، يجب إجراء فحص دقيق للاختلافات المحتملة التي تحدث داخل الأجناس أو الجنس الواحد؛ وذلك عند استخدام الريبوسومات أدواتاً للتعريف. ويتم إجراء هذا الفحص بتحليل مجموعات مختلفة من الجنس نفسه، وتحليل الجينات المستسخة (clones) المختلفة من الجنس نفسه.

ويحدث تعدد الجينات - غالباً - داخل الأجناس، أو الجنس الواحد في تسلسل الـ IGS. إن هذه المناطق -رغم معدل تطورها- يجعلها الهدف المطلوب لتحديد الأجناس، وفي بعض الأحيان تترك مهمة. علاوة على ذلك، فإن الطول الجيني للـ IGS يجعل من الصعب عمل اختبار الـ PCR له مرة واحدة. إن هذه العيوب تجعل استخدام تسلسلات الـ ITS أفضل؛ حيث إنها أقصر وأقل اختلافاً في المستوى الداخلي للأجناس (٢٧). وتوفر كل البادئات تشجيعاً على استخدام الـ ITS أداة من الأدوات التصنيفية، والتي تطابق بشكل عال المناطق الثابتة 18S، 5.8S، و28S (الجدول ٢) (٢٧، ٢٨). إن هذه البادئات تسمح -على مدى واسع- للـ ITS في تضخيم جين في الرتب الحشرية، فتُسهل عملية توفير معلومات حول التصنيفات.

وبالرغم من أن مناطق الـ rDNA المشفرة تتطور بمعدل أكثر بطئاً من المناطق الفاصلة، إلا أنه قد تم ذكر تعدد الأشكال في جين الـ 28S. وبالفعل، فإن هناك جينات من 28S متباعدة، ويبلغ عددها اثني عشر قطعاً (D12-D1)، وهي أكثر اختلافاً (٢٩). وأثبتت هذه القطاعات قدرتها على توفير معلومات لتعريف الأجناس، وقد تم توظيف مجموعة من البادئات للمنطقة الممتدة من D2 إلى D10، والتي تُناسب رتبة نصفية الأجنحة Hemiptera (الجدول ٢) (٣٠).

٧. إن عديداً من الدراسات الخاصة بتاريخ تطور السلالات والقائمة على الجينات المشفرة لبروتينات النواة هي أقل عدداً من دراسات الـ mDNA أو الـ g rDNA للنواة P؛ إلا أن عدداً قليلاً من المواقع على الكرموسوم حظي باهتمام خاص بسبب تصنيفهم، مثل: alcohol dehydrogenase (ald), decarboxylase (ddc), elongation factor-1-alpha (EF-1 α), glycerol-6- (adh), dopa phosphate dehydrogenase (g6pdh), Hunchback (hb), Period (per), phosphoenolpyruvate kinase (PEPCK), and Wingless (wg) (٢).

وقد أبدت الجينات البروتينية مجموعة كبيرة من معدلات التطور، وقد تم استخدامها لتعريف العلاقة فيما بينها (٢). ومع ذلك، فقد يؤدي العمل على جينات النواة التي تُسبب مشاكل محتملة مع الزيغوت المتغير Heterozygosity، كما أن عدد النسخ التي تُعيق عملية الاختبار الجيني قليلة. بالإضافة إلى أن تضخيم أكثر من أكسون (exon) واحد لا يتم إلا بطريقة النسخ العكسي الـ PCR (RT-PCR)؛ والذي ينفذ على الـ mRNA (٢١). ويعتبر الـ EF-1 α الأكثر شعبية بين الجينات الغنية بالمعلومات لتصنيف. وقد تم إثبات أن تسلسل الشفرات

الوراثية يفيد الدراسات التي تُجرى على الأجناس والأصناف التي تنتمي لرتب حشرية مختلفة، بما فيها نصيفية الأجنحة الـ Hemiptera (٢). كما أن هناك زوجين من البادئات التي تعمل على التفاعل، ومنطقتين مختلفتين من *EF-1a* (٣١).

٨. هناك عدد من الأدوات والمواد التجارية المُخصصة لاستخلاص DNA الحشرات والمتوفرة، مثل: (prep GEM™ Insect, ZyGEM, Solana Beach, CA, USA; E.Z.N.A.® Insect DNA Kit, Omega Bio-Tek, Norcross, GA, USA; EZgene™ Insect gDNA Kit). وهذه الخيارات مُكلفة أكثر من الطرق العادية، ولكنها تنتج كميات DNA بأقل نقاوة. ومع ذلك، يجب التركيز على أن هذه المواد الخاصة بالحشرات أيضاً تعمل مع DNA الفيثوبلازما.

٩. مع أن تعريف الأجناس يعتمد -غالباً- على العينات المُجمعة من الحقول أثناء دراسة أمراض الفيثوبلازما؛ إلا أن العينات المتحصل عليها من المتاحف قد تمثل مصدراً بديلاً للمواد. ويمكن استخدام الحشرات المُجففة والمُثبتة في استخلاص الـ DNA برغم أن نسبة العينات الناجحة بعد استخلاص الـ DNA واختبار الـ PCR تكون مختلفة تماماً. وتضمن الأدوات والمواد التجارية المُخصصة لاستخلاص الـ DNA خاصةً بالنسبة للعينات الصغيرة (مثل: QIAamp® DNA Investigator Kit، QIAGEN) أن يكون الـ DNA ذا جودة جيدة. وفي كل الحالات، فإن مدة التخزين لها تأثير قوي على طول التسلسل للشفرات في حالة عمل الـ PCR. لذا، فإن زيادة عمر العينة يتوافق مع انخفاض طول تسلسل الشفرات. وبالرغم من ذلك، وحتى بعد سنوات، فإنه يمكن اختبار العينات التي طولها (700-600 bp)~، ويمكن استخدامها لعلامات للسلم الجزيئي (٣٢). وبالنسبة لأكثر العينات صعوبة، يمكن القيام باستراتيجيات تأتي بعد الـ PCR؛ مثل: الـ PCR المتداخل (nested PCR) على تحسين نتائج الاختبار. ومن عيوب استخدام الحشرات المُجففة في الاختبار الجزيئي أنه يتم طحن كامل العينة؛ مما يؤدي إلى تلف عينات المتاحف. وللتغلب على هذا القصور، تم تطوير طريقة أقل ضرراً؛ إذ يمكن استخلاص الـ DNA بأدني ضرار، مورفولوجياً وخارجياً على العينات، عن طريق استخدام أجزاء من الحشرات، مثل: جزء من الساق أو الساقين (٣٣). وحديثاً، تم تطوير طريقة بديلة كيميائية للاستخلاص، والتي تسمح باستخلاص الـ DNA دون حدوث أي أضرار مورفولوجية خارجية، وقد تم تطبيقها على رتبة غمدية الأجنحة للـ Coleoptera (٨). إن هذه الطريقة مهمة جداً لمختلف مفصليات الأرجل (٣٤)، حتى إنه يمكننا تطبيقها على رتبة نصفية الأجنحة الـ Hemiptera.

١٠. بجانب التقنيات الحديثة، هناك بعض النقاط الأخرى التي يجب أخذها في الاعتبار عند تخطيط إجراءات الاستخلاص. أولاً: التعريف القائم على الشكل الظاهري لا يستبدل -على الإطلاق- بالتصنيف باستخدام الاختبارات الجزيئية. وبالفعل، يُعد التصنيف على أساس الشكل الخارجي ضرورياً لتعريف العينات على مستوى العائلة و/أو الجنس. وتسمح هذه المعلومات باختيار أكثر الاختبارات الجزيئية المناسبة من بين ما هو أصلاً معروفاً بالفعل للتعرف

على الأصناف. وعند تطوير الأسس التصنيفية لأول مرة، يجب تحديد علاقة واحدة بين الشكل الظاهري المحددة للجنس وبين المعلومات الجزيئية. ثانياً: يجب دائماً ضمان أن الاختبارات الجزيئية تكون على أكبر عدد من العينات المجمعّة من المواقع المختلفة، ومن عوائل نباتية مختلفة - إن أمكن ذلك-. إن هذه الخطوة أساسية في عمل دلالة واضحة للتأكد على تعريف الأجناس.

وبخصوص التقنيات الجزيئية، هناك عديد من الطرق البديلة المتوفرة. وقد أصبح تسلسل شفرات الـ DNA هي الطريقة الأساسية التي يتم اختيارها لتصنيف الجزيئات؛ وفقاً لقدرتها على تحليل كمية كبيرة من البيانات التي تستخدم في المقارنة. ومع ذلك، يظل تسلسل الـ DNA مكلفاً ويستهلك كثيراً من الوقت. وهناك طرق أخرى أكثر عملية، وخصوصاً عند تحليل كميات كبيرة من المعلومات. ومن بين تلك الطرق، تُعتبر تقنية الـ RFLP متعددة الاستخدام، وقد تم تطبيقها كثيراً في تعريف أجناس مختلفة (٢). وتستخدم طريقة الـ RFLP على الشيفرات الوراثية؛ وذلك باستخدام الإنزيمات؛ والتي يتم فيها تمييز أماكن محددة. وتركز هذه الطريقة على تضخيم النواة المختلفة أو منطقة الميتوكوندريا. وبعد ذلك، يتم هضم نتاج التضخيم بالإنزيمات القاطعة المناسبة. ويتم ترتيب الأجزاء الناتجة حسب طولها باستخدام الفصل الكهربائي بالأجاروز جل أو الأكريلاميد (agarose or acrylamide gel electrophoresis). إن صبغ الجل يساعد على تصور المحددات بوضوح. ويمكن استخدام الـ RFLP بدون تسلسل الشفرات، للتعرف على مواقع التشخيص؛ إما بالتجارب المباشرة أو بالشفرات السابقة. وفي هذه الحالة، يمكن إجراء التسلسل في البادئ على عينات ممثلة (أنموذجية). وبعدها، يتم اختيار الإنزيم عن طريق برامج المحاكاة بالكمبيوتر المساعد على الهضم. وفي النهاية، يتم تطبيق الـ RFLP على جميع العينات.

١١. لملاحظة أي اختلاف محتمل في المستوى الداخلي للأجناس واختباره، يجب توفير عينات من مواقع عديدة (مثل: مواقع جغرافية مختلفة، عوائل نباتية مختلفة، ظروف بيئية، ... وهكذا).

١٢. يمكن إجراء عملية التنقية من ناتج تفاعلات الـ PCR مباشرة باستخدام مجموعة متنوعة من الأدوات. وإن واجهت صعوبة في الحصول على ناتج PCR مُعينة، فيمكن تنقية هذه الناتج؛ أياً كان حجمه من جل الـ Agarose باستخدام الأدوات المناسبة.

١٣. بالنسبة للأجزاء الصغيرة من نتاج اختبار PCR بين (1، 300-400 pb)، تكون من اختبار واحد، ومن تفاعل شريط الـ DNA الأول أو الثاني أو في كليهما، وهي كافية للحصول على منطقة الجين بأكملها. وبهذه الطريقة، لا تكون هناك حاجة لتصميم بادئات، أو لتقليل عدد التفاعلات.

١٤. هناك عديد من برامج المحاكاة المنظمة للشفرات الوراثية، ويمكن تحميلها بالمجان، مثل: ClustalX, <http://www.clustal.org/download/current/> (35); Opal, <http://opal.cs.arizona.edu>

(37) Muscle, <http://www.drive5.com/muscle/downloads.htm>; (36). وهناك برامج أخرى يمكن تشغيلها عن طريق الموقع بالإنترنت، مثل: ClustalW, <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>; (38) T-Coffee, <http://tcoffee.crg.cat/>; (35).

١٥. عند التعامل مع الـ DNA الريبوسومي، يمكن الكشف عن مختلف الأشكال من الـ DNA المتطابقة حتى في المستوى الداخلي للنوع الواحد. ولاستبعاد مستوى الاختلاف، يجب استتساخ منطقة الريبوسوم من كل الأنواع على حدة. وبعد الاستتساخ، يتم عمل تسلسل للشفرة، ثم مقارنتها مع بعضها بعضاً، وإن تم اكتشاف الأنواع الداخلية متعددة الأشكال في الشفرات؛ فإن هذه المناطق يتم حذفها.

١٦. يعتبر برنامج الـ Primer 3 (٣٩) من البرامج متعددة الاستعمال وسهلة الاستخدام لتصميم البادئات، وهو متوفرة بالمجان في: <http://frodo.wi.mit.edu/primer3/input.htm>. وبهذه الطريقة، يمكن إجراء عديد من تجارب الـ PCR المتخصصة للأجناس. فضلاً عن هذا، من الممكن استخدام مجموعة من البادئات في اختبارات الـ PCR المتعددة. وبذلك، يمكن تفريق الأجناس عن بعضها بتفاعل واحد.

١٧. إن ميزات إنزيمات القطع يمكن العثور عليها في برنامج المحاكاة الخاصة بهضم إنزيم الشفرات المتسلسل. وهناك عديد من البرامج المجانية المتوفرة على شبكة الإنترنت، مثل: Webcutter (<http://bio.lundberg.gu.se/cutter2/>), NEBcutter (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>) (40) and pDRAW32 (<http://www.aacalone.com/>). وهذه البرامج الافتراضية تسمح بالقيام بهضم الإنزيمات وتحديدها؛ والتي تنتج أجزاءً قطع تختلف أطوالها بين الأجناس وتساعد على تعريفها. وهذا الإنزيم يقوم بالإنتاج الأكثر وضوحاً والأسهل قراءة في اختبار الـ RFLP، ومنه يمكنك الاختيار من هذه الخيارات. ولهذا الغرض، يجب تجنب الإنزيمات القاطعة؛ والتي تقطع باستمرار (تعطي عديداً من القطع الخفيفة والضعيفة)، وتلك التي تنتج قطعاً طولها واحد (لن يكون هناك إمكانية لتمييز تلك القطع في الجل). وبعد ذلك، يتم إجراء تجارب الهضم على ناتج اختبار التضخيم؛ حيث يتم عزل الأجزاء الناتجة بوضعها في جل الـ Acrylamide agarose، وذلك لينتج الـ RFLP معلومات تساعد في تعريف الأجناس.

١٨. إن DNA العينات المجففة قد تكون متدهورة، وذلك يقلل من كفاءة اختبار الـ PCR وفعاليتها، وكذا حمض الـ DNA منخفض الجودة، بجانب عدم التطابق بين البادئات العامة. وعليه، تكون النتائج المستهدفة قليلة من الـ PCR. لذلك، قد تكون كمية مواد التضخيم ليست كافية للتطبيقات والاستخدام في نهاية الجين. ويمكن التغلب على هذه المشكلة، بإجراء اختبار PCR داخلي (nested PCR)، والبادئات الجديدة والمتخصصة داخل مناطق التضخيم تعتبر أساسية. وقد يتم تصميم البادئات حسب الشفرات التي يكون قد تم الحصول عليها بالفعل من العينات الجديدة. ومن الضروري اختبار البادئات الجديدة على الشفرات الطويلة

الداخلية؛ بغرض الحد من ضياع المعلومات الجينية. ويتم إجراء اختبار الـ PCR بالبادئات الداخلية عن طريق تخفيف الـ PCR الأول (المستخدم في البادئات العامة)، ويستخدم كقالب. إن اختبار الـ PCR الداخلي هو أكثر حساسية من اختبار الـ PCR المباشر، ويجب أن يوفر هذا الاختبار كمية معقولة من ناتج التضخيم تكفي لإجراء تجارب الـ RFLP وتحليل الشفرات المتسلسل. على سبيل المثال: قد تم استخدام اختبار الـ PCR المتداخل بنجاح في تضخيم الـ DNA المُستهدف من عينات حشرة نطاطات الأوراق من نوع الـ *Empoasca spp*، وقد تم تخزينها على درجة حرارة الغرفة بين المجموعات الحشرية لمدة ٢٠ عاماً، وهي ملاحظة شخصية (Bertin, personal observations).

١٩. حتى الآن، تعتبر حشرة الـ *H. obsoletus* هي الحشرة الوحيدة التي تنقل فيتوبلازما stolbur المسؤولة عن مرض الاصفرار على العنب، وهو مرض يُعرف باسم Bois noir (BS). ومع ذلك، يُعتقد أن الحشرات من رتبة Cixiids مسؤولة عن انتقال الـ BN؛ حيث وجد بالفعل من نتائج اختبار الـ PCR أن حشرات الـ *H. luteipes* والـ *H. scotti* لها نتائج إيجابية، وأنها ناقلة للفيتوبلازما، وأن حشرة الـ *R. quinquecostatus* تستطيع نقل مرض الـ BN بواسطة التغذية الصناعية. وتقوم حشرة الـ *R. panzer* على اكتساب BN، وأيضا نقل الفيتوبلازما الـ Stolbur المسؤولة عن مرض الـ Maize redness.

٢٠. في كلتا الدراستين، تم اختبار درجة الاعتماد على جينات الـ ITS₂ والـ COI في تعريف الأجناس، في مجموعات مختلفة. وبالنسبة للأجناس، تم جمعها من نباتات مختلفة وأماكن مختلفة من إيطاليا ومن وسط أوروبا وشرقها. ولم يتم ملاحظة انتماء الفيتوبلازما إلى منطقة جغرافية محددة أو نبات محدد. وقد تم اعتماد المناطق الريبوسوم والميتوكوندريا؛ نظراً لمواصفاتها وخصوصيتها، كأساس جيد لتعريف أنواع الـ *Hyalesthes* والـ *Reptalus*.

٢١. إن الـ *C. melanoneura* والـ *C. affinis* نوعان من حشرة البسليدي يتشابهان في دورة الحياة والشكل الظاهري. إن الـ *C. melanoneura* هي الحشرة المسؤولة عن نقل فيتوبلازما الـ (*Candidatus Phytoplasma mali*) في شمال غرب إيطاليا. في حين أن الـ *C. affinis* يمكن أن تكتسب الفيتوبلازما من مجموعة الـ AP، ولكن لا يزال هناك حاجة لتقييم دورها كحشرة ناقلة للأمراض. وغالباً، يتم ملاحظة كلا النوعين كمجموعات مختلطة، ومن الصعب التفريق بينهما عن طريق الشكل الظاهري.

الشكر والتقدير:

إن البحوث التي أجراها المؤلفون لتحديد جزيئات الحشرات -بمختلف أنواعها -دعمتها وزارة البحوث الإيطالية (MIUR)، بموجب منحة الـ PRIN 2008 "لتحديد الأجناس والتغيرات التي تحدث داخل الحشرات الماصة والمتطفلة باستخدام التقنية الجزيئية".

1. Weintraub PG, Beanland LeA (2006) Insect vectors of phytoplasmas. *Annu Rev Entomol* 51:91–111
2. Caterino MS, Cho S, Sperling FAH (2000) The current state of insect molecular systematics: a thriving tower of Babel. *Annu Rev Entomol* 45:1–54
3. Behura SK (2006) Molecular marker systems in insects: current trends and future avenues. *Mol Ecol* 15:3087–3113
4. Hebert PDN et al (2003) Biological identifications through DNA barcodes. *Proc R Soc Lond B* 270:313–321
5. Hebert PDN, Ratnasingham S, deWaard JR (2003) Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proc R Soc Lond B* 270:S96–S99
6. Marzachi C, Veratti F, Bosco D (1998) Direct PCR detection of phytoplasmas in experimentally infected insects. *Ann Appl Biol* 133: 45–54
7. Doyle JJ, Doyle JL (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12:13–15
8. Gilbert MTP et al (2007) DNA extraction from dry museum beetles without conferring external morphological damage. *PLoS One* 2:e272
9. Bertin S et al (2010) Molecular identification of the *Hyalesthes* species (Hemiptera: Cixiidae) occurring in vineyard agroecosystems. *Ann Appl Biol* 157:435–445
10. Bertin S et al (2010) Molecular differentiation of four *Reptalus* species (Hemiptera: Cixiidae). *Bull Entomol Res* 100:551–558
11. Tedeschi R, Nardi F (2010) DNA-based discrimination and frequency of phytoplasma infection in the two hawthorn-feeding species, *Cacopsylla melanoneura* and *Cacopsylla affinis*, in northwestern Italy. *Bull Entomol Res* 100:741–747
12. Jarausch W et al (2010) Development of specific primers for the molecular identification of *Cacopsylla picta*, the main vector of apple proliferation disease. In: Bertaccini A, Lavina A, Torres E (eds) Current status and perspectives of phytoplasma disease research and management. COST Action FA0807. <http://costphytoplasma.eu/PDF%20files/WG%20BookwithISBN.pdf>
13. Mandrioli M (2008) Insect collections and DNA analyses: how to manage collections? *Mus Manag Curatorship* 23:193–199
14. Fukatsu T (1999) Acetone preservation: a practical technique for molecular analysis. *Mol Ecol* 8:1935–1945
15. Bosco D et al (2002) DNA-based methods for the detection and the identification of phytoplasmas in insect vector extracts. *Mol Biotechnol* 22:9–18
16. Johannesen J et al (2008) Invasion biology and host specificity of the grapevine yellows disease vector *Hyalesthes obsoletus* in Europe. *Entomol Exp Appl* 126:217–227
17. Imo M et al (2011) Highly polymorphic di- and trinucleotide microsatellite markers for the grapevine yellows disease vector *Hyalesthes obsoletus* (Auchenorrhyncha: Cixiidae). *Eur J Entomol* 108:161–163

18. Bertin S et al (2007) Diffusion of the Nearctic leafhopper *Scaphoideus titanus* Ball in Europe: a consequence of human trading activity. *Genetica* 131:275–285
19. Papura D et al (2009) Comparing the spatial genetic structures of the *Flavescence dorée* phytoplasma and its leafhopper vector *Scaphoideus titanus*. *Infect Genet Evol* 9:867–876
20. Sauvion N et al (2009) Nine polymorphic microsatellite loci from the psyllid *Cacopsylla pruni* (Scopoli), the vector of European stone fruit yellows. *Mol Ecol Resour* 9:1196–1199
21. Hoy MA (2003) *Insect molecular genetics*, 2nd edn. Academic Press/Elsevier, San Diego, CA
22. Simon C et al (1994) Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Ann Entomol Soc Am* 87:651–701
23. Simon C et al (2006) Incorporating molecular evolution into phylogenetic analysis, and a new compilation of conserved polymerase chain reaction primers for animal mitochondrial DNA. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 37:545–579
24. Ratnasingham S, Hebert PDN (2007) Bold: the Barcode of Life Data System (<http://www.barcodinglife.org>). *Mol Ecol Notes* 7:355–364
25. Folmer O et al (1994) DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol Mar Biol Biotechnol* 3:294–299
26. Roe AD, Sperling FAH (2007) Patterns of evolution of mitochondrial cytochrome c oxidase I and II and implications for DNA barcoding. *Mol Phylogenet Evol* 44:325–345
27. Collins FH, Paskewitz SM (1996) A review of the use of ribosomal DNA (rDNA) to differentiate among cryptic *Anopheles* species. *Insect Mol Biol* 5:1–9
28. White TJ et al (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Shinsky JJ, White TJ (eds) *PCR protocols: a guide to methods and applications*. Academic, San Diego, pp 315–322
29. Hancock JM, Tautz D, Dover GA (1988) Evolution of the secondary structures and compensatory mutations of the ribosomal RNAs of *Drosophila melanogaster*. *Mol Biol Evol* 5:393–414
30. Dietrich CH et al (2001) Phylogeny of the major lineages of Membracoidea (Insecta: Hemiptera: Cicadomorpha) based on 28S rDNA sequences. *Mol Phylogenet Evol* 18:293–305
31. Cryan JR et al (2000) Phylogeny of the treehoppers (Insecta: Hemiptera: Membracidae): evidence from two nuclear genes. *Mol Phylogenet Evol* 17:317–334
32. Dean MD, Ballard JWO (2001) Factors affecting mitochondrial DNA quality from museum preserved *Drosophila simulans*. *Entomol Exp Appl* 98:279–283
33. Starks PT, Peters JM (2002) Semiondestructive genetic sampling from live eusocial wasps, *Polistes dominulus* and *Polistes fuscatus*. *Insectes Soc* 49:20–22
34. Rowley DL et al (2007) Vouchering DNAbarcoded specimens: test of a nondestructive extraction protocol for terrestrial arthropods. *Mol Ecol Notes* 7:915–924

35. Larkin MA et al (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23:2947–2948
36. Wheeler TJ, Kececioglu JD (2007) Multiple alignment by aligning alignments. *Bioinformatics* 23:i559–i568
37. Edgar RC (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res* 32:1792–1797
38. Notredame C, Higgins DG, Heringa J (2000) T-Coffee: a novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *J Mol Biol* 302:205–217
39. Rozen S, Skaletsky HJ (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) *Bioinformatics methods and protocols: methods in molecular biology*. Humana Press, Totowa, NJ, pp 365–386
40. Vincze T, Posfai J, Roberts RJ (2003) NEBcutter: a program to cleave DNA with restriction enzymes. *Nucleic Acids Res* 31:3688–369

صبغة دينيس واستخدام الميكروسكوب الضوئي لمشاهدة الفيتوبلازما

Rita Musetti

ملخص:

هذا الفصل يصف تقنيات الميكروسكوب الضوئي الرئيسي المستخدمة في تشخيص الفيتوبلازما. ولأن هذه التقنيات تظهر فاعليتها -بشكل عام- في بعض الحالات التي يكون بها التركيز المُسبب للمرض بداخل أنسجة اللحاء في النبات العائل المرتفع؛ لذلك يمكن استخدام هذه التقنيات أساليب أولية لتقييم وجود الفيتوبلازما وتحليل توزيعها في النباتات التي تظهر عليها أعراض الإصابة.

الكلمات المفتاحية: الكشف، صبغة دينيس، الميكروسكوب الضوئي، الفيتوبلازما.

١- المقدمة:

الفيتوبلازما تحدث بجميع أنحاء العالم، ويرتبط وجودها بحدوث مئات الأمراض التي تؤثر على المحاصيل التي لها أهمية اقتصادية. وتعتبر الفيتوبلازما من البكتيريا بدائية النواة، وتفتقر إلى وجود جدار، كما أن لها أشكالاً متعددة ومتغيرة، وتنتمي إلى طبقة (Class Mollicutes)، وترتبط بغشاء خلوي ثلاثي الطبقات، وتحتوي على الريبوسوم و DNA، ويصل قطرها إلى $1.0 \mu\text{m}$. وقد تكون خيطية أو خرزية أو كروية الشكل. ولها القدرة على أن تعيش في شكل طفيلي، ولا يتم تمييزها في المعامل، وتتمو وتتكاثر في لحاء النباتات للعائل، وفي الحشرات الناقلة للأمراض. وقد قام Doi et al. (١) بتوضيح علاقة هذه العوامل المسببة للمرض بالنباتات التي تظهر عليها أعراض "الاصفرار"؛ وذلك باستخدام ميكروسكوب إلكتروني ناقل (TEM). ومن ذلك الحين، قام عديد من المؤلفين باستخدام الميكروسكوب الإلكتروني للكشف عن وجود الفيتوبلازما في الأنسجة اللحائية، ولدراسة التفاعلات الخلوية التي تحدث بين هذه العوامل المسببة للمرض والعائل النباتي (٢-٨). فضلاً عن هذا، حتى إن لم يتم استخدام تقنيات الميكروسكوب

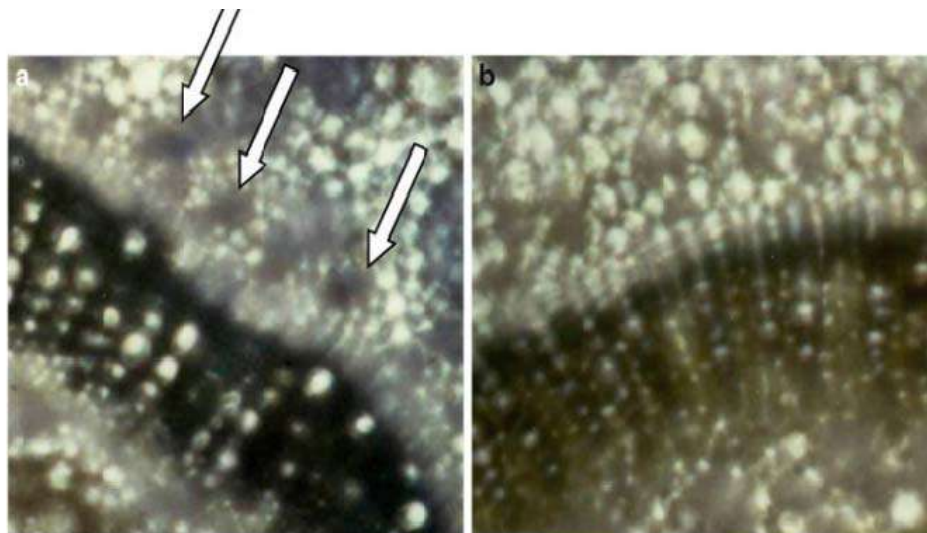
الضوئي (LM) للتصوير المرئي للفيتوبلازما بداخل الأنسجة العائل بشكل مباشر، فيمكن استخدامها بنجاح طرقاً أولية في عملية التشخيص لإثبات وجود الفيتوبلازما في النباتات التي تظهر عليها أعراض الإصابة. وبالتالي، وضعت تلك التقنيات الخطوات الأولى لفهم العلاقة المحتملة بين الفيتوبلازما وظهور أعراض المرض على النباتات. بالإضافة إلى أن طرق الـ LM تعتبر أكثر سرعة وأقل تكلفة مقارنةً بتقنيات الميكروسكوب الإلكتروني.

والهدف من هذا الفصل، توضيح بعض تقنيات الـ LM المستخدمة في تشخيص الفيتوبلازما. وقد تم استخدام عديد من أساليب الصبغة التي يتم تطبيقها على قطاعات شبه رقيقة نسبياً من المواد المصنوعة يدوياً أو المواد خاصة محددة، لمعرفة موقع الفيتوبلازما في الأنسجة المصابة عن طريق الـ LM. وتعتبر تقنية الـ LM للكشف عن الفيتوبلازما في قطاعات شبه - رقيقة نسبياً طريقة جيدة بالنسبة للخلايا التي تحتوي على تركيزات عالية من المسبب للمرض فقط. على سبيل المثال: يمكن استخدامها بنجاح مع النباتات العشبية.

وقد تم تطوير صبغة دينيس لأول مرة صبغةً متخصصةً في التصوير المرئي لمستعمرات نمو الميكوبلازما على الأجار، ولكن تم استخدام الصبغة بعد ذلك لتصوير الفيتوبلازما بشكل مباشر في الأنابيب الغربالية (sieve) للنباتات العائلة (٩). وقام Deeley et al (١٠) بتطبيق تلك الطريقة على أجزاء تم قطعها يدوياً أو بالميكروتوم المجمدة (freezing-microtome sections) للأنسجة الخلوية الخاصة بالنباتات المصابة بالفيتوبلازما والسيروبلازما (spiroplasma). وتُمثل صبغة دينيس اختباراً من الاختبارات الأولية السريعة والسهلة للتقييم السريع للعينات النباتية المتحصل عليها من الحقول. وبعد تلك الطريقة، يُمكن رؤية الأنابيب الغربالية للمستعمرات في صورة بقع غير منظمة للخلايا المصبوغة؛ وذلك عند ملاحظتها تحت الميكروسكوب الضوئي.

ويعتبر هذا الأجراء ذا قيمة تشخيصية؛ حيث تظهر على أنسجة لحاء العينات المصابة بالفيتوبلازما بقع زرقاء داكنة، في حين يظهر على الخشب بقع خضراء فاتحة باللون الفيروزي والقشرة زرقاء فاتحة. وقد تبين أن الصبغة ترتبط فقط بالأمراض التابعة للموليكوتس mollicutes، كما أنها لا تغير لون الأنسجة السليمة أو العينات المصابة عن طريق العوامل المسببة للأمراض النباتية الأخرى. ويوضح (الشكل ١) الأجزاء التي تم الحصول عليها من المواد النباتية المصابة؛ والتي تم صبغها بالمحلول المخفف لصبغة دينيس المقترح، مع مجموعة من خلايا اللحاء التي تظهر عليها بقع زرقاء (الشكل 1a، الأسهم)، وما يقبلها من لحاء غير ملون في أجزاء من نبات سليم (الشكل 1b). ويعتبر ظهور بقع معينة -والتي ترتبط بالحمض النووي للفيتوبلازم- مفيداً أيضاً لأن الأنابيب الغربالية في اللحاء ليس لها نواة. وقد تم -أيضاً- استخدام صبغة الزرقاء التولويدين (Toluidine blue stains) مع قطاعات شبه - رقيقة (١١) وثيونين/ أكردين البرتقال (thionin/acridine orange) (١٢) بنجاح. إن الصبغات المحتملة الأخرى المستخدمة للكشف عن الفيتوبلازما في أنسجة النبات

العائل (لم يتم وصفها هنا) تشتمل على الصبغ بالفيولجين والميثيل الأخضر (methyl green and Feulgen staining) (١٣، ١٤).



الشكل (١): يوضح صورة مجهرية لساق مقطوعة باليد لنبات *Catharanthus roseus* ملونة بصبغة دينيس. والمناطق التي تُمثل: مجموعة خلايا اللحاء ملونة باللون الأزرق؛ وذلك في الأجزاء التي تم الحصول عليها من المواد النباتية المُصابة (الأسهم، a)، وما يقابلها أجزاء من النباتات السليمة؛ حيث يكون لحاؤها غير ملون (b).

٢- المواد:

١-٢: صبغة دينيس:

١. مواد النباتات: تؤخذ العينات من: العروق الأساسية، والبراعم، والأوردة، والجذور الرئيسية، ومن أوراق النباتات المصابة والسليمة التي تم تنميتها في المختبر.
٢. محلول صبغة دينيس: ٢,٥ جراما من الميثيلين الأزرق، و ١,٢٥ جراما من الأزور (Azure II) II، و ١٠ جرامات من المالتوز، و ٠,٢٥ جراما من كربونات الصوديوم (Na_2CO_3)، و ١٠٠ ملي من الماء مُقطر. قم بفلترته بورقة فلتر، وخففه في 0.2% (V/V) من الماء المُقطر.

٢-٢: صبغة ثيونين وأكريدن البرتقالي:

١. المواد النباتية: تؤخذ العينات من العروق الرئيسية لنباتات مصابة وسليمة تم تنميتها في المختبر.
٢. محلول ثيونين: ٠,٣ جراما من الثيونين، و ٢٠٠ ملي من الماء المُقطر، و ٥٠ ملي من 0.1 M NaOH، و 250 ملي من ٩٠% إيثانول.
٣. محلول الأكريدن البرتقالي: ٦,٢٥ جرام من الأكريدن البرتقالي، و ٢٠٠ ملي من الماء المُقطر، و ٥٠ ملي من 1 M NAOH.

٣-٢: صبغة التولويدين الأزرق:

١. المواد النباتية: تؤخذ العينات من العروق الرئيسية للنباتات المصابة والسليمة التي تم تمييزها في المختبر.
٢. محلول التولويدين الأزرق: ١ جرام من التولويدين الأزرق، و ١٠٠ ملي من الماء المقطر.

٣-٣: طرق العمل:**١-٣: صبغة دينيسك**

١. يتم قطع النسيج يدوياً للنبات المصاب والسليم من العروق الرئيسية، والبراعم والأوراق، ووضعها في الماء المقطر.
٢. يتم وضع الأنسجة في محلول صبغة دينيسك لمدة ١٠ دقائق في درجة حرارة الغرفة.
٣. يتم غسل الأنسجة بالماء المقطر، وتحمل في الماء. ومن ثم، يتم ملاحظتها (تحت الـ LM) (انظر: الملاحظة ١).

٢-٣: صبغة الثيونين والأكريدين البرتقالي:

١. يتم تجهيز العينات ووضعها وتثبيتها في المادة الخاصة وفقاً لطريقة تجهيز عينات الميكروسكوب الإلكتروني (انظر: الفصل ١١). وبعد البلمر، يتم قطع العينات بالميكروتوم الدقيق (ultramicrotome) للحصول على أنسجة شبه رقيقة (سُمكها 0.5-1 μm) (انظر: الملاحظة ٢).
٢. يتم جمع الأنسجة الرقيقة نسبياً ثم يتم وضعها على شرائح زجاجية، وتُغطي بمحلول الثيونين thionin لمدة عشر دقائق.
٣. يتم شطف الأنسجة بماء مقطر، ثم تُوضع على سطح دافئ لتجف.
٤. يتم تغطية الأنسجة بمحلول الأكريدين البرتقالي لمدة (دقيقتين).
٥. قم بتحميل الأنسجة في المادة نفسها الخاصة بالطريقة نفسها التي استخدمت من قبل لضم العينات.
٦. تشاهد الأنسجة تحت الـ LM (انظر: الملاحظة ٣).

٣-٣: صبغة التولويدين الأزرق:

١. يتم تجهيز العينات ووضعها وتثبيتها في المادة الخاصة وفقاً لطريقة تجهيز عينات الميكروسكوب الإلكتروني (انظر: الفصل ١١). وبعد البلمر، يتم قطع العينات بالميكروتوم الدقيق (ultramicrotome) للحصول على أنسجة شبه رقيقة (سُمكها 0.5-1 μm) (انظر: الملاحظة ٢).

٢. يتم جمع الأنسجة الرقيقة نسيياً، ثم يتم وضعها على شرائح زجاجية، وتُغطى بمحلول التولويدين الأزرق لمدة ٢-٣ ثوان.
٣. يتم تجفيف الأنسجة لفترة وجيزة (لبطع ثوان) على صفائح التدفئة.
٤. يتم شطف العينات بكثير من الماء المقطر، وتترك على صفائح التدفئة حتى تجف.
٥. تشاهد الأنسجة تحت الـ (LM) (انظر: الملاحظة ٤).

٤- الملاحظات:

١. يمكن ترك الأنسجة في الماء المقطر لساعات عديدة قبل الفحص؛ وذلك الأمر لن يؤثر بالسلب عليها.
٢. تسمح عملية صبغ الأنسجة شبة الرقيقة للمواد المغمورة في المواد الخاصة باستخدام عديد من الألوان؛ والتي تساعد على الكشف على للفيتوبلازما
٣. يمكن ملاحظة وجود الفيتوبلازما في صورة بقع بنفسجية اللون منتشرة على جدار أنابيب الغربلة بأكملها، ويتم ظهور بقع صفراء اللون على الجدار الخلوي.
٤. يمكن رؤية الفيتوبلازما في صورة تراكمات زرقاء/ بنفسجية بداخل عناصر الأنابيب الغربلية، وتظهر بقع زرقاء على الجدار الخلوي.
٥. يمكن ملاحظة وجود الفيتوبلازما في صورة بقع بنفسجية اللون منتشرة على جدار أنبوب الغربلة بأكملها، ويتم ظهور بقع صفراء اللون على جدار الخلية.
٦. يمكن رؤية الفيتوبلازما في صورة تراكمات زرقاء/ بنفسجية بداخل عناصر الغربلة. وتظهر بقع زرقاء على الجدار الخلوي.

المراجع:

1. Doi Y et al (1967) Mycoplasma or PLT grouplike microorganisms found in the phloem elements of plants infected with mulberry dwarf, potato witches' broom, aster yellows or Paulownia witches' broom. Ann Phytopathol Soc Jpn 33:259-266
2. Braun EJ, Sinclair WA (1976) Histopathology of phloem necrosis in *Ulmus americana* . Phytopathology 66:598-607
3. Favali MA et al (1990) A study on peach decline. II. Ultrastructural study. Riv Pat Veg S IV 26:11-22
4. Meignoz R et al (1992) Grapevine fl avescence dorée. Presence of MLO and associated cytopathological effects in grapevine phloem. J Phytopathol 134:1-9
5. Musetti R et al (1992) An attempt to differentiate by microscopic methods two plant mycoplasma-like organisms. Cytobios 72:71-82

6. Musetti R et al (1994) Histological detection of mycoplasma-like organisms causing leptonecrosis in plum trees. *Cytobios* 78:81–90
7. Musetti R, Favali MA (1999) Histological and ultrastructural comparative study between *Prunus* varieties of different susceptibility to plum leptonecrosis. *Cytobios* 99:73–82
8. Musetti R, Favali MA, Pressacco L (2000) Histopathology and polyphenol content in plants infected by phytoplasmas. *Cytobios* 102:133–147
9. Dienes L et al (1948) The role of pleuropneumonia-like organisms in genitourinary and joint diseases. *New Engl J Med* 238:509–515
10. Deeley J, Stevens WA, Fox RTV (1979) Use of Dienes' stain to detect plant diseases induced by mycoplasma-like organisms. *Phytopathology* 69:1169–1171
11. Cousin MT, Sharma AK, Misra S (1986) Correlation between light and electron microscopic observations and identification of mycoplasma-like organisms using consecutive 350 nm thick sections. *J Phytopathol* 115:368–374
12. Hooper GR, Case JFW, Myers R (1971) Mycoplasma-like bodies associated with a flower greening disorder of a wild flower *Trillium grandiflorum*. *Plant Dis Rep* 55:1108–1110
13. Giannotti J, Morvan G, Vago C (1968) Microorganismes de type mycoplasme dans les cellules libériennes de *Malus sylvestris* L. atteinte de la maladie des proliférations. *C R Acad Sci Paris* 267:76–77
14. Kartha KK, Cousin MT, Ruegg EF (1975) A light microscopic detection of plant mycoplasma infection by Feulgen staining procedure. *Indian Phytopathol* 28:51–56

تقنيات الميكروسكوب الفلورسنتي وصبغة الـ DAPI للكشف عن الفيتوبلازما

Nancy M. Andrade and Nolberto L. Arismendi

ملخص:

التقنية التي تعتمد على صبغة 4، 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) تعتبر طريقة سهلة، وتم تطويرها لإثبات وجود الفيتوبلازما في الأنسجة المصابة المقطوعة يدوياً، أو الأنسجة المقطوعة بالميكروتوم المجمد. وترتبط صبغة الـ DAPI بالـ AT الغني في الـ DNA بشكل خاص. لذلك، يمكن تصوير الفيتوبلازما الموجودة بين الخلايا اللحائية، ومشاهدتها من خلال الميكروسكوب الفلوري. وتُعد إجراءات تلك التقنية سريعة وسهلة الاستخدام وغير مُكلفة، ويمكن استخدامها طريقة أولية أو كمية؛ للكشف أو لتحديد عدد أجسام الفيتوبلازما في النباتات المصابة.

الكلمات المفتاحية: 4، 6-diamidino-2-phenylindole، الفيتوبلازما، الميكروسكوب، الفلوري، التشخيص، التقنيات الأولية.

١- المقدمة:

الفيتوبلازما ليس لها جدار خلوي، وليست بكتيريا حلزونية، ويحيط بها طبقة واحدة غشائية، وهي مُتعددة الأشكال، ومتوسط مُحيطها 200-800 nm (١). وتعيش هذه البكتيريا أولية النواة إجبارية التطفل، ويرتبط وجودها بالأمراض التي تُصيب أكثر من ألف نوع نباتي. وهي تنقلها الحشرات، مثل: نطاطات الأوراق وحشرة البسيليدي على وجه التحديد (١-٣). وتعيش الفيتوبلازما، في النباتات المصابة في الخلايا الغريالية للنسيج اللحائي، وتُحفز ظهور أعراض المرض المرتبطة بتوزيع التأثيرات الفيسيولوجية (مثل: التوازن الهرموني، ونقل الأحماض الأمينية، وانتشار الكربوهيدرات)، والتي تؤدي إعاقة التمثيل الضوئي والتغيرات المورفولوجية داخل الأنسجة المصابة (٤-٧). وفي البداية، كان يعتقد أن هذه الاضطرابات سببها الفيروسات، لكن في عام ١٩٦٧م، قام Doi وآخرون بتحديد وجود أجسام متعددة الأشكال ليس لها جدار في النباتات المصابة، بسبب

تشابهها المورفولوجي للميكوبلازما، وأطلق عليها اسم الكائنات الشبيهة بالميكوبلازما (MLOS) (٢).

وحالياً، يتم استخدام التقنيات القائمة على الـ PCR لكشف وتحديد الفيتوبلازما، لكن من عيوبها الرئيسية تكلفتها العالية وضرورة توفر أشخاص مُدرّبين لتنفيذ إجراءاتها، ولا تتوفر تلك العوامل في كثير من معامل الدول النامية. وفي هذا السياق، تحظى تقنيات الكشف عن الفيتوبلازما السريعة، غير المُكلفة وسهلة الاستخدام في طريقة التشخيص السريع على تقييم عالٍ. ولهذا السبب، عادةً ما يتم استخدام تقنيات الـ 4',6-diamidino 2-phenylindole (DAPI) (صبغة دينيس) في التشخيص السريع وغير المُكلف للفيتوبلازما.

وقد تم تطوير (صبغة دينيس) لتكون طريقة من الطرق غير المباشرة للكشف عن الإصابة بالفيتوبلازما، ولكن تلك الطريقة تتمتع بدرجة حساسية منخفضة -إلى حد ما- وغير مُحددة؛ لأن نسيج لحاء الساق المُصابة بالفيتوبلازما يظهر عليه بقع زرقاء داكنة -بشكل عام- بينما تظهر على الخشب بقع خضراء فيروزية، والقشرة زرقاء -أرجوانية فاتحة (٨). لذلك، قد يشير الجزء النسيجي المصبوغ عن احتمال وجود الفيتوبلازما، ولكن لا توجد صبغة مُحددة للأجسام الشبيهة للفيتوبلازما. ومن ناحية أخرى، تُعتبر صبغة الـ DAPI مُحددة أكثر من صبغة دينيس. وقد تم إثبات أن شفرات الجينوم المُتسلل لعدد من الفيتوبلازما غنية بالـ AT، وما يقبله، ومحتوى الـ GC به مُنخفض؛ حيث تتراوح نسبته ما بين ٢١% (مثل: الـ *Candidatus Phytoplasma mali*) و٢٨% (مثل: *Candidatus Phytoplasma asteris*) (٩). إن هذه السمات تُسهل عملية تطويع الفيتوبلازما لتقنيات الصبغات، مثل: استخدام الـ DAPI، وصبغة فلوريسنت التي تستطيع المرور من خلال الأغشية الخلوية، وترتبط ارتباطاً وثيقاً بمناطق الـ DNA الغنية بالـ AT (١٠).

وقد أصبح تفاعل الـ DAPI مع الـ DNA الموضوع الرئيسي لعدد من الدراسات؛ وذلك منذ أن تم تصنيع هذا المركب العطري. وقد تم تصنيع عديد من مركبات الدياميدين diamidine في الأساس لتُستخدم في المجال الطبي (١١)؛ إلا أن خصائص الـ DAPI الطيفية المميزة جعلته يستخدم فاحصاً لـ DNA أكثر منه دواءً علاجياً. وحالياً، تستخدم بكثرة في الميكروسكوب الفلوريسنت. ويتم استخدامه في علم الأمراض على وجه التحديد؛ للكشف عن الفيتوبلازما والسيبروبلازما في مُختلف الأنواع النباتية وفقاً لما ورد في عديد من الدراسات (١٢-١٨). وبعد صبغة الـ DAPI، تكون الخلايا اللحاءية المُصابة أكثر وضوحاً لصبغة الفلور، وأفتح من الفلور المعتاد؛ والذي تُظهره نواة الخلايا البرنشيمة Paraenchymal. وتظهر على الأنسجة المُصابة نُقط فاتحة تشبه الفيتوبلازما في الأنابيب الغربالية للحاء، ولا تظهر تلك النقط على الأنسجة السليمة. وتُعتبر تقنية صبغة الـ DAPI طريقة سريعة ودقيقة لتحديد مكان الفيتوبلازما في أنابيب اللحاء الغربالية للأنسجة المُختلفة، مثل: الأغصان، والبراعم، والأوراق، والجذور (١٨، ١٦، ١٤، ١٣). وبعيداً عن استخدام الميكروسكوب الضوئي الفلوري للكشف عن الفيتوبلازما، يتم -غالباً- استخدام الـ DAPI -أيضاً- للكشف عن

الـ DNA للميكوبلازما التي تُصيب الخلايا الحيوانية، وتُلون خلايا الميكوبلازما بالـ DAPI في وسط النمو الفلوري، ويصبح من السهل الكشف عنها (١٩). وتم أيضاً- اكتشاف استخدامات أخرى: (PCR electrophoresis) (٢٠)، cytofluorometry (٢١)، و staining chromosomes (٢٢).

٢- المواد:

١. البراعم والسيقان (يمكن استخدام عينات جافة أو جديدة).
٢. محلول مُنظم الفوسفات KH_2PO_4 pH 6.8: 0.1 M. يتم إضافة من ٦,٨ جم من الـ KH_2PO_4 إلى 500 مل من الماء المُقطر المُعقم. ويُرج ٧ مرات في الدقيقة الواحدة لمدة عشر دقائق. ويُضاف 1.16 جم من الـ NaOH إلى ٢٠٠ ملي من الماء المُقطر المُعقم، ويُقلب ٧ مرات في الدقيقة الواحدة لمدة ١٠ دقائق. ويتم ضبط pH محلول الفوسفات على pH 6.8 من خلال إضافة محلول الـ NaOH.
٣. محلول مُنظم الفوسفات pH 6.9: 0.1 M: يُضاف ٦,٨ جرامات من KH_2PO_4 إلى ٥٠٠ مل من الماء المُقطر المُعقم، ويُرج ٧ مرات في الدقيقة الواحدة لمدة عشر دقائق. ويُضاف ١,١٦ جراماً من الـ NaOH إلى ٢٠٠ مل من الماء المُقطر المُعقم، ويُرج ٧ مرات في الدقيقة الواحدة لمدة عشر دقائق. وتُعدل pH محلول الفوسفات إلى pH 6.9 بإضافة محلول الـ NaOH.
٤. الجلوتارالديهيد (محلول ٥٪): ٥ مل من الجلوتارالديهيد، و 0.1 M 95 مل من محلول مُنظم الفوسفات بدرجة حموضة pH 6.8.
٥. صبغة DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride) (1، 000 × المحلول المُخزن): يُضاف ١ مليجرام من الـ DAPI إلى ١ مل من الماء المُقطر المُعقم. ويُخزن في درجة حرارة 4 مئوية إن لم تستخدم في الحال (انظر: الملاحظة ١).
٦. ماء مُقطر مُعقم.
٧. آلة تدوير.
٨. ميكروتوم بالتجميد (Freezing microtome) لقطع العينات.
٩. ميكروسكوب فلوريسنت.
١٠. ميزان إلكتروني.
١١. زجاجات مخروطية (١٠٠٠ ميكروليتر).
١٢. صوان وأكياس بلاستيكية.
١٣. ممصات (٥ و ١٠ مل).
١٤. ميكروبيبت (١٠٠ ميكروليتر).
١٥. شرائح الميكروسكوب غطاء.
١٦. مشرط وملقاط.

٣- طرق العمل:

- إن الطريقة الموضحة في هذا الجزء تم تعديلها بشكل بسيط من قبل Romero (٢٣)، ويمكن استخدامها لتحديد وجود -أو لتحديد كمية- الفيتوبلازما (انظر: الشكل ١).
١. يتم تخفيف المحلول المُخزن حتى يصل إلى تركيز فعال (1×): يتم أخذ ١٠٠ ميكروليتر من المحلول المُخزن (١٠٠٠×)، ويُضاف ١٠٠ ميكروليتر من الماء المُقطر المُعقم، ويُخزن المحلول الفعال على درجة حرارة 4 مئوية.
 ٢. تُؤخذ السيقان اليافعة وبزاعم النباتات المُصابة (انظر: الملاحظة ٢).
 ٣. يتم تقطيع العينات؛ بحيث تصبح أطولها ١ سم، وتوضع في ماء مُقطر ومُعقم (انظر: الملاحظة ٣).
 ٤. تُغمر العينات في جلوتارالدهيد ٥٪، وتثبت لمدة ٢٠ دقيقة.
 ٥. يتم إزالة العينات من محلول الجلوتارالدهيد، وتُغسل بـ 0.1M من محلول الفوسفات المنظم عند pH 6.9 لمدة ٥ دقائق. ومن ثم، تُنقل العينات الجديدة إلى 0.1M من محلول الفوسفات المنظم عند pH 6.9.

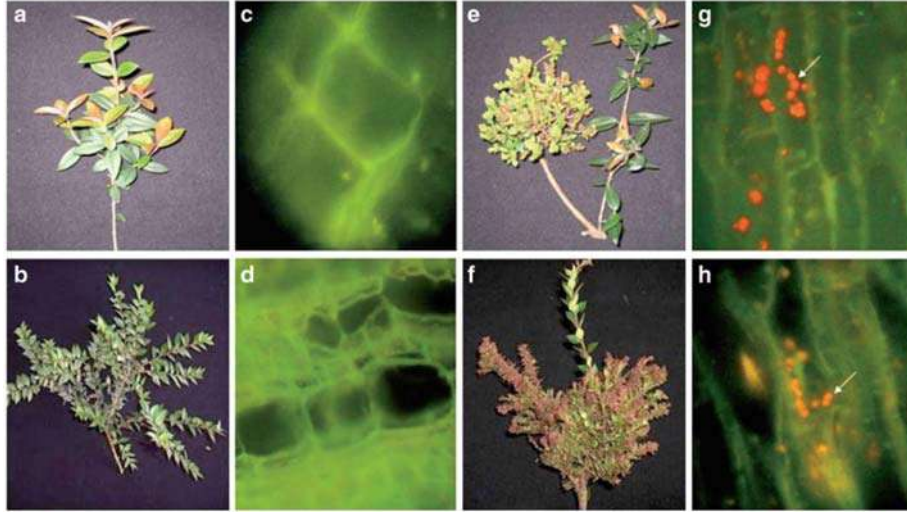


الشكل (١): توضيح للخطوات المختلفة لعملية صبغ بـ 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) لعينات مُصابة بالفيتوبلازما. قام Francisco Beluzan من جامعة Universidad Austral de Chile بإعداد هذا الرسم.

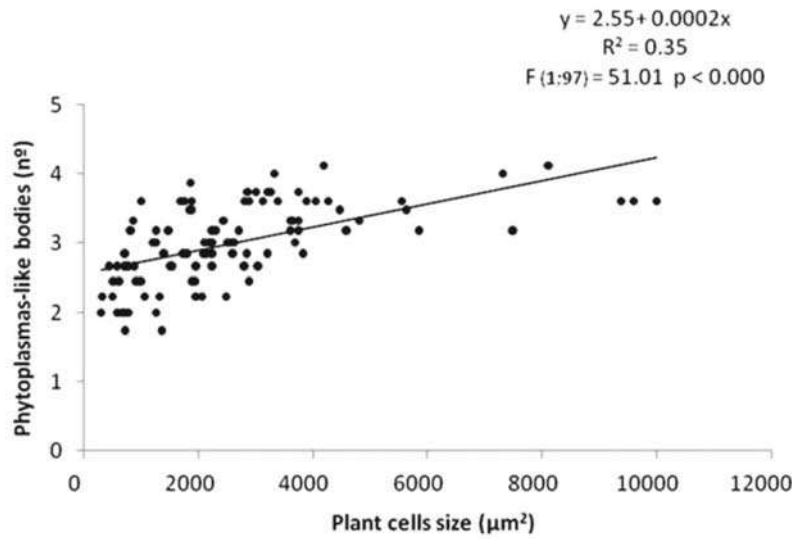
٦. وباستخدام الميكروتوم بالتجميد، يتم قطع أجزاء من العينات الثابتة أجزاء طولها 10-15 μm (انظر: الملاحظة ٤).
٧. تُوضع أنسجة العينات في صبغة الـ DAPI (١× محلول فعال) لمدة ٢٥ دقيقة.
٨. يتم إزالة العينات من الصبغة، وتوضع في ماء مقطر مُعقم لإزالة الصبغة؛ (حيث يجب أن يكون بالعينات ما لا يقل عن ٥٠٪ من لون الصبغة عند رفعها). وفي الحال، يتم رفع العينات على شريحة من الشرائح، وتُغطى بغطاء تلك الشريحة (انظر: الملاحظة ٥).
٩. يتم مشاهدة العينات باستخدام ميكروسكوب الفلوريسنت؛ والذي يحتوي على مجموعة من العدسات المُخصصة لرؤية الأشكال (10×)، (40×)، (100×) (انظر: الملاحظة ٦).

٤- الملاحظات:

١. تنبيه: تُصنف الـ DAPI على أنها مادة من المواد غير السامة، لكن لم يتم التحقق بشكل دقيق من خصائص المادة السامة لهذا المادة وفقاً لما ورد في صفحة بيانات سلامة المواد (<http://www.sigmaaldrich.com>). لذلك، نوصي باستخدام قفازات عند التعامل مع عيناتك.
٢. من الأفضل أخذ العينات التي لم تتأثر بالمرض بدرجة عالية من المناطق التي لا تظهر عليها كل أعراض المرض؛ بهدف تلافي الحصول على نتائج إيجابية خاطئة بسبب الإصابة الثانوية التي تلحق بالأنسجة من الكائنات الدقيقة الأخرى.
٣. هذه الخطوة تُقلل جفاف العينات.
٤. نوصي بأخذ طبقة -أو طبقتين- من الخلايا لتتناسب العينات الموجودة على الشريحة؛ وذلك بعد صبغة الـ DAPI.
٥. نوصي بوضع العينات في مكان مُظلم للحفاظ على الصبغة لأطول وقت ممكن في العينات المجهزة؛ لأن الضوء يقلل من جودة العينات، وغالباً يعمل على إزالة الصبغة منها. ولإجراء مزيد من المشاهدات، يُفضل إغلاق العينات بأحكام، مثل إغلاقها بطبقة من الفازلين. وإن لم يكن لديك غطاء مخصص للشريحة، فيمكنك استخدام طلاء الأظافر؛ فهو يعمل جيداً في التغطية.
٦. إن كان من الضروري الحصول على معلومات أكثر حول ميكروسكوب الفلوريسنت، فيُنصح بقراءة الدراسات السابقة المُختلفة. على سبيل المثال: (٢٤) العينات التي تحتوي على فيتوبلازما تظهر الـ DAPI عالياً في الأنابيب الغريالية بسبب خلط هذه الصبغة مع الـ DNA، في حين أنه لا تتضح أي ظاهرة على النباتات السليمة (شكل ٢). وعموماً، تم ملاحظة نقاط صغيرة وتجمعات بالقرب من جدار خلية من خلايا الأنسجة اللحائية. ويمكن استخدام هذا الإجراء نفسه لتحديد كمية الأجسام الشبيهة بالفيتوبلازما في خلايا لحاء النباتات المصابة (شكل ٣).



شكل (٢): عدم ظهور علامات المرض على الأنسجة النباتية (الشاهد) لشجيرة الـ *Ugni molinae* (a) والـ *Gaultheria phillyreifolia* (b): تلوين الأنسجة اللحائية بصبغة الـ DAPI ((c, d) بالترتيب): أعراض مرض المكنتسة الساحرة على *U. molinae* (e): *G. phillyreifolia* (f): الأجسام الشبيهة للفيتوبلازما الفلوريسنت في لحائهم (مُشار إليها بالأسهم البيضاء. (g, h) بالترتيب): تم فحص الأجزاء باستخدام ميكروسكوب الفلوريسنت (FT 510، BP 450-490 ، USA، New York، Carl Zeiss Axiolab، AND LP 520 filters) بالإشارات الضوئية للأشعة فوق البنفسجية UV 450-490 nm، و 100× بعدسة زيتية، و 10× عدسة بصرية لتكبير 1،000× (١٨).



شكل (٢): العلاقة بين عدد الأجسام الشبيهة للفيتوبلازما وحجم خلايا لحاء البراعم الـ *Hypochaeris radicata* L. وتم تلوين أنسجة اللحاء بصبغة الـ DAPI. وتم تحديد عدد خلايا اللحاء والأجسام الشبيهة للفيتوبلازما الفلورية وقياسها بعدسة عينية 10×. وتم ملاحظة التجهيزات باستخدام الميكروسكوب الفلوري (FT 510، BP 450-490 ، USA، New York، Carl Zeiss Axiolab، LP 520) وفلاتر 520 LP (USA، New York، Carl Zeiss Axiolab) بالإشارات الضوئية للأشعة فوق البنفسجية بالنسبة لـ 450-490 nm، وعدسة زيتية 100×، وتكبير يصل إلى 1000 مرة (هذه البيانات لم يتم نشرها).

1. Hogenhout SA et al (2008) Phytoplasmas: bacteria that manipulate plants and insects. *Mol Plant Pathol* 9:403–423
2. Lee I-M, Davis RE, Gundersen-Rindal DE (2000) Phytoplasma: phylogenetic mollicutes. *Annu Rev Microbiol* 54:221–255
3. Weintraub PG, Beanland L (2006) Insect vectors of phytoplasmas. *Annu Rev Entomol* 51: 91–111
4. Lepka P et al (1999) Effect of phytoplasmal infection on concentration and translocation of carbohydrates and amino acids in periwinkle and tobacco. *Physiol Mol Plant Pathol* 55: 59–68
5. Bertamini M, Grando MS, Nedunchezian N (2003) Effects of phytoplasma infection on pigments, chlorophyll-protein complex and photosynthetic activities in field grown apple leaves. *Biol Plant* 47:237–242
6. Ambrožič-Dolinšek J et al (2008) Phytoplasma infection may affect morphology, regeneration and pyrethrin content in pyrethrum shoot culture. *Sci Hortic* 116:213–218
7. Bertaccini A, Duduk B (2009) Phytoplasma and phytoplasma diseases: a review of recent research. *Phytopathol Mediterr* 48:355–378
8. Deeley J, Stevens WA, Fox RTV (1979) Use of Dienes' stain to detect plant diseases induced by mycoplasma-like organisms. *Phytopathology* 69:1169–1171
9. Hogenhout SA, Šeruga MM (2010) Phytoplasma genomics, from sequencing to comparative and functional genomics—what have we learnt? In: Weintraub PG, Jones P (eds) *Phytoplasmas: genomes, plant hosts and vectors*. CABI Publishing, Oxfordshire, pp 19–36
10. Eriksson S et al (1993) Binding of 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) to AT regions of DNA: evidence for an allosteric conformational change. *Biochemistry* 32:2987–2998
11. Jansen K, Nordén B, Kubista M (1993) Sequence dependence of 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)-DNA Interactions. *J Am Chem Soc* 115:10527–10530
12. Dale JJ (1988) Rapid compression technique for detecting mycoplasma-like organisms in leaf midrib sieve tubes by fluorescence microscopy. *Phytopathology* 78:118–120
13. Sinclair WA et al (1992) Detection of ash yellows mycoplasma-like organisms in different tree organs and in chemically preserved specimens by a DNA probe vs. DAPI. *Plant Dis* 76: 154–158
14. Thomas S, Balasundaran M (1998) In situ detection of phytoplasma in spike-disease-affected sandal using DAPI stain. *Curr Sci* 74:989–993
15. Ghosh DK et al (1999) Association of a phytoplasma with witches' broom, a new disease of acid lime (*Citrus aurantifolia*). *Curr Sci* 77: 174–177
16. Bricker JS, Stutz JC (2005) Host range and distribution of the phytoplasma causing Arizona ash decline. *J Arboric* 3:257–262
17. Fletcher S, Melcher U, Wayadande A (2006) The phytopathogenic spiroplasmas. In: Falkow S, Dworkin M, Rosenberg E et al (eds) *The prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria*, vol 4, 3rd edn. Springer, New York, pp 905–947

18. Arismendi AS et al (2010) Presence of a phytoplasma associated with witches'-broom disease in *Ugni molinae* Turcz. and *Gaultheria phillyreifolia* (Pers.) Sleumer determined by DAPI, PCR, and DNA sequencing. *Chil J Agric Res* 70:26–33
19. Jung H et al (2003) Detection and treatment of mycoplasma contamination in cultured cells. *Chang Gung Med J* 26:250–258
20. Mabuchi T, Nishikawa S (1991) Selective staining with two fluorescent dyes of DNA fragments on gels depending on their AT content. *Nucl Acids Res* 18:7461–7462
21. Hamada S, Fujita S (1983) DAPI staining improved for quantitative cytofluorometry. *Histochem Cell Biol* 79:219–226
22. Liu J-Y et al (2004) A new chromosome fluorescence banding technique combining DAPI staining with image analysis in plants. *Chromosome* 113:16–21
23. Romero J (2001) XI Curso Internacional Teórico-Práctico de Detección e Identificación de Virus, Viroides y Fitoplasmas. Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA). Madrid, p 2–9
24. Lichtman JW, Conchelo JA (2005) Fluorescence microscopy. *Nat Methods* 2:910–919

فحص الفيتوبلازما باستخدام الميكروسكوب الإلكتروني

B. Jean Devonshire

ملخص:

إن استخدام الميكروسكوب الإلكتروني -الماسح والناقل على حد سواء- يوفر طرقاً مُعتمدة ودقيقة للكشف عن الفيتوبلازما في النباتات. وقد زاد فهمنا للمُسبب المرضي، وكذلك الشكل الخارجي، والتكويني، وموقعها داخل خلايا النباتات وفي خلايا الحشرات الناقلة للمرض من خلال استخدامنا لهذه الأجهزة. إن تطوير التقنيات المناعية immunolabeling، وتقنيات تثبيت المواد البيولوجية بالتجميد cryofixation أو plunge freezing بالانتقال المباشر إلى مرحلة الميكروسكوب، بجانب استخدام الاجهزة المتقدمة يُمكننا من دراسة هذه العوامل المُسببة للمرض في ظروف شبيهة بالظروف البيئية الطبيعية التي نشأت بها. إن تقنية الميكروسكوب الإلكتروني هي الوحيدة -من ضمن التقنيات الحديثة والأساسية- التي يمكنها تصوير التفاصيل والتركيبات الدقيقة؛ من خلال ما تقدمه من دقة في تصوير الأبعاد وتجسيماها. وقد تم التوصل إلى وضع الشفرات الجينية كاملة لأربعة محتويات جينية للفيتوبلازما (حتى الآن)، وأدى الميكروسكوب الإلكتروني دوراً مهماً في عملية تحديد الوظائف الجينية وفهماها.

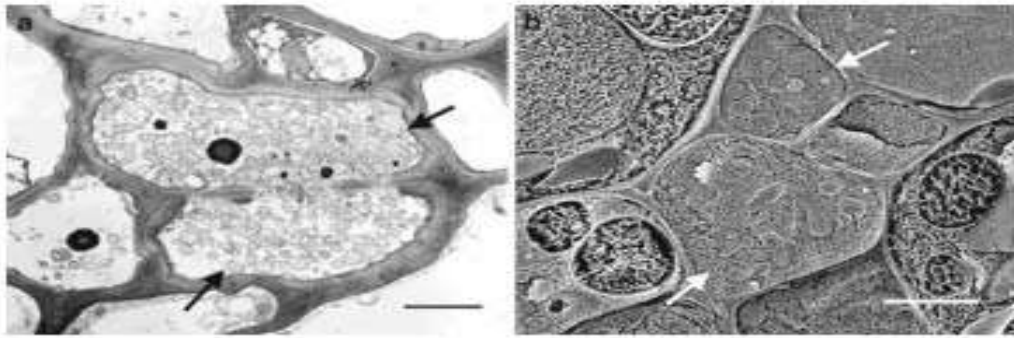
الكلمات المفتاحية: تثبت المواد البيولوجية بالتجميد، الميكروسكوب الإلكتروني، الميكروسكوب الماسح الإلكتروني، الميكروسكوب الإلكتروني الناقل، الميكروتوم الدقيق.

١- المقدمة:

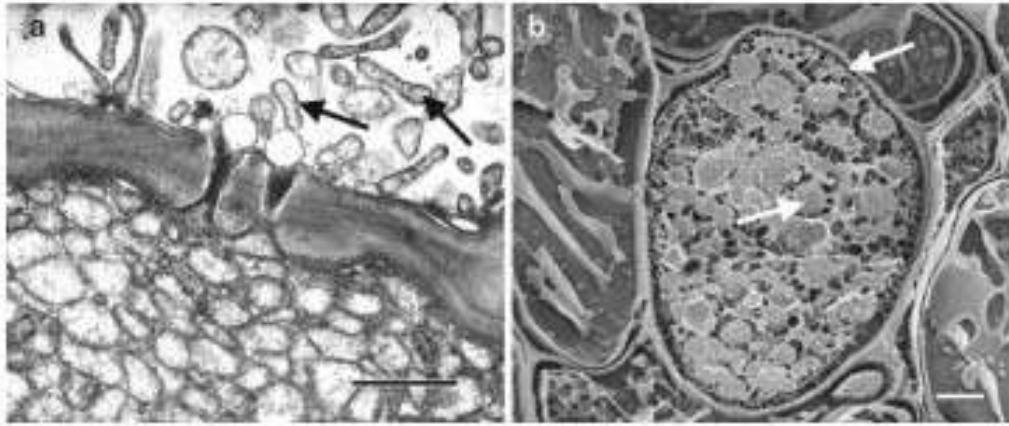
الفيتوبلازما التي عُرف عنها - حتى بداية التسعينيات - أنها كائنات حية دقيقة شبيهة- الميكوبلازما (MLOS)، تعتبر بدائية النواة، وليس لها جدار خلوي، وليس لديها نواة، أو أي أغشية مترابطة. وقد وجدت في الأنابيب الغربالية الموجودة بلحاء النبات (شكل ١)، وقد تتواجد -في بعض

الأحيان- بالخلايا البرنشيمة parenchyma cells وفي الغدد اللعابية، وفي منتصف الأمعاء والمبايض (١، ٢) من اللحاء؛ والذي تتغذى عليه الحشرات الناقلة للأمراض، مثل: حشرت نطاطات الأوراق التابعة الـ (Cicadellidae)، ونطاطات النبات التابعة لـ (fulgromorph)، والبسيليدي التابعة لـ (Psyllidae). وقد اتضح من خلال الميكروسكوب الإلكتروني أن الفيتوبلازما متعددة الأشكال pleiomorphic قد تم ملاحظتها بأشكال وأحجام مختلفة تتراوح ما بين 0.1 و 1 μm (٣-٥). وتستطيع الفيتوبلازما -من خلال قدرتها على تغيير بنيتها وشكلها- المرور من خلال الأنابيب الغربالية للحاء، ومن بين الفتحات بين جدران الخلية (plasmodesmata) في أنظمة الأوعية النباتية (شكل ٢). وبالرغم من أنه لم يتم التأكد من الآليات التي تسبب المرض للنبات، إلا أن الأعراض موثقة بشكل جيد. إن ترسب مادة الكالوز في الخلايا التي تقع بالقرب من الصفائح الغربالية قد تم مشاهدتها في الأنسجة الدقيقة الطويلة تحت الميكروسكوب الإلكتروني. (٦) ومن الواضح أن هذا الأمر علامة على ظهور أعراض المرض وموت الخلايا.

وحتى الآن، لم يتم تنمية الفيتوبلازما على بيئة خارج الخلية النباتية، بخلاف غيرها من الفطريات والكائنات بدائية النواة. وقد قام الباحثون بالحصول على إنتاج أنسجة جديدة مصابة لدراستها ولتصويرها. ويجب أخذ تلك الأنسجة من النباتات المصابة أو من أجسام الحشرات الناقلة مباشرةً. ويقدم الميكروسكوب الإلكتروني المساح (SEM) والناقل (TEM) الفرصة لرؤية التفاصيل الهيكلية الدقيقة، وتأثير محفزات البيئية، وكيف يتم تعديل الجيني من قدرة الفيتوبلازما على البقاء والنمو داخل الخلايا النباتية. وقد تم اكتشاف الفيتوبلازما في بداية عام ١٩٦٧ في الأنسجة النباتية باستخدام الـ TEM (٧)، وتم مشاهدة المسبب المرضي بالحاء النباتي؛ بظهور أعراض مرض الاصفرار ومكنسة الساحرة.



شكل (١): صور من الميكروسكوب الإلكتروني (a) الميكروسكوب الإلكتروني الناقل (TEM) قطاع رقيق جدا للحاء النباتي وللخلايا المصابة للإصابة بالفيتوبلازما sesame phyllody phytoplasma. صورة من قبل P. Jones. (b) الميكروسكوب الإلكتروني المساح (SEM) للأنسجة مقطعة بـ Cryofractured للحاء النباتي وللخلايا المصابة للإصابة بفيتوبلازما Brinjal little leaf. وتُشير الأسهم إلى الخلايا المصابة بالفيتوبلازما، إلى حد كبير. (a)، (b) .Bar = 2 micro



شكل (٢): صورة ميكروسكوب ال TEM لأجسام الفيتوبلازما التي تمر من خلية اللحاء من خلال البلازموذيمات من خلية تحتوي بشكل كثيف على الفيتوبلازما إلى خلية مصاحبة أقل كثافة. وتُشير الأسهم إلى التغير المورفولوجي. صوره من قبل P. Jones. (b) صورة CryoSEM لخلية اللحاء المليئة بأجسام مختلفة الأحجام من الفيتوبلازما. (b) bar = 2 micron, (a) Bar = 1 micron

وقد تم استخدام عديد من التقنيات للإعداد لمشاهدة الفيتوبلازما الميكروسكوب الإلكتروني، وتعتبر طريقة تثبيت الأنسجة هي الطريقة الأساسية في مجالات مختلفة. وسوف يتم وصف طريقتين واسعتي الاستخدام للأجل ال TEM وال SEM في هذا الفصل.

١-١: الأمان:

إن معظم المواد الكيميائية المستخدمة في عملية تثبيت الأنسجة تعتبر خطيرة، ومن المهم التعامل معها حسب رقم ال UN؛ والذي يعرف المواد الخطيرة (مثل: الأكريلاميد هو UN2074)، التي يتم تسليمها في حافظات خاصة. ويجب التخلص من المخلفات الكيميائية وفقاً للإجراءات الموصى بها، ويجب أن تكون كافة المعامل البحثية لديها إرشادات وإجراءات واضحة للتشغيل (standard operating procedures SOPs). ويجب ارتداء القفازات الواقية للاستخدام الواحد، ويفضل أن تكون من نوع النيتريل (nitrile)، ويجب تنفيذ جميع الأعمال في كبائن خاصة، ما لم يذكر خلاف ذلك.

وقد تختفي المشاكل المرتبطة باستخدام المواد الكيميائية الخطيرة حينما تُتاح الفرصة لاستخدام المواد الأقل خطورة، ولكن من الصعب العثور في بعض الحالات، على بدائل مشابهة. وينبغي توخي الحذر عند صنع السكاكين الزجاجية واستعمالها أثناء استخدام الميكروتوم الدقيق. وبالطبع تكون جهة التقطيع للسكين الزجاجية حادة للغاية، ويجب التخلص من السكاكين المستعملة بطريقة مناسبة.

ويجب اتباع الإرشادات والتعليمات في استخدام النيتروجين المسال. كما يجب الانتباه إلى ارتداء الملابس المناسبة بما فيها الحذاء. ودائماً يجب توفير حماية خاصة للوجه والعين. وقد تحدث حروق خطيرة إذا لامس النيتروجين المسال الجلد أو الملابس، والمنطقة الرطبة القريبة للعين هي أكثر المناطق التي يمكن أن تتعرض لحروق خطيرة أثناء الاستخدام. ويؤدي تبخر النيتروجين المسال إلى زيادة محتوى النيتروجين الغازي في الغلاف الجوي بسرعة كبيرة، وقد يؤدي إلى حدث اختناق مفاجئ. ويجب تركيب أجهزة الكشف عن انخفاض نسبة الأوكسجين، أو يجب أن يكون هناك وحدة خاصة عندما يتم استخدام النيتروجين المسال في إعدادات التجميد، وخصوصاً إن كانت في غرفة مغلقة.

٢-١: أعداد تقنيات الـ TEM:

تم الحصول على نتائج ممتازة للدراسات المورفولوجية باستخدام الـ TEM في المعامل بجميع أنحاء العالم؛ من خلال استخدام التقنيات الأساسية التي تنطوي على التثبيت الكيميائي ثم التجفيف؛ حيث يتم وضع العينة - في النهاية - في المثبت، ومن ثم يتم القطع الدقيق للأنسجة (٥، ٨)، وتستخدم طريقة التثبيت من خلال التجميد إلى ضغط عال (HPF، انظر: العنوان الفرعي ٣-٧). وقد أصبحت هذه الطريقة الأكثر اختياراً من بين الطرق الأخرى. وبرغم أن لكل تقنية عيوبها إلا أنه يجب الأخذ في الاعتبار بعض العوامل، ومن بين العوامل المهمة التكلفة الأساسية للمعدات، وإمكانية الحصول على المواد الكيميائية، بجانب حجم العينات. وذلك، للحصول على قرار صائب في حالات معينة.

ولاتزال تقنية التصوير للفيوتوبلازما في النباتات بداخل الأنسجة الحشرية باستخدام التثبيت الكيميائي واحدة من التقنيات الشائعة. وبرغم أنها تحتاج إلى خطوة تشغيلية أكثر من الـ HPF، إلا أنها تعتبر طريقة من الطرق المتوفرة في كثير من الأجهزة العملية، وتسمح بمعالجة الأجزاء النسيجية الكبيرة.

إن الخطوات تبدأ بعمل تثبيت أولي في الـ glutaraldehyde و paraformaldehyde لكل جزء من محتويات خليط الألدheid الذي له دور مختلف في عملية حفظ النسيج العائل. إن الفورمالدهيد - الخارج من بارافورمالدهيد البولي- يمر - يخترق النسيج بسرعة، ويمنع حدوث عملية التحلل الذاتي؛ عن طريق ربط البروتياز proteases والليباسيس lipases داخل الخلية، وسرعة اختراق الجزيئات الكبيرة من الجلوتارالدهيد (تكون على شكل زيتي بالمحلول). لذا، تدخل ببطء، ويكون تثبيتها أكثر فاعلية؛ لأنها ترتبط بالبروتينات بشكل متشابك من خلال مجموعة الألدheid المتعددة التابعة لها (١٠). ويتم نقل العينات، بعد غسلها عدة مرات في المحلول المنظم إلى الخطوة الثانية، وهي تثبيت الصبغ بأوكسيد الأوزميوم الثماني osmium tetroxide؛ الذي يرتبط بدوره بطريقة مميزة بالفسفوليبيد ثنائي الطبقة. وبالتالي، يزداد تباين الأغشية الخلوية، وتصبح الأغشية

سهلة في دخول محاليل الأذبان؛ التي تُستخدم في عمليات التجفيف الروتينية (١١). ويُفضل وضع العينات في درجة حرارة 4°C لمدة تتراوح ما بين ساعة إلى ساعتين، ومن المهم إغلاق العلبة مرتين بإحكام. إن تعديل طرق التثبيت وإنهاء الأوزميوم osmium من التثبيت والصبغة، يعتبر من الخيارات التي ما تؤخذ في الاعتبار. ويؤثر المحلول المنظم على معدل الربط المتقاطع للبروتين بالجلوتارالدهيد، ودوره معقد إلى حد ما. وأحياناً، يُفضل المحلول المنظم Cacodylate لأن تركيز الفوسفات العالي بمحلول (Sørensen's) يعمل على ترسيب الـ Ca^{2+} بالأنسجة النباتية (١٢). وبرغم أن المحلول المنظم للفوسفات ليس خطيراً لأنه لا يحتوي على الزرنيخ، ويمكن الحد من إعداده اختياراً الـ pH للمحلول، ومنه يمكن الحصول على نتائج جيدة.

إن المواد الصمغية المستخدمة في عملية تثبيت الأنسجة لا تذاب بالماء. لذلك، يجب اتباع طريقة ما لإزالة المياه من الأنسجة باستخدام مادة مذيبة. ويجب اتباع ورقة البيانات المرفقة بكل مجموعة من المجموعات الصمغية بدقة للتأكد من اختيار الصمغ واستخدامه بطريقة صحيحة. ووفقاً للطرق الموضحة في هذا الفصل، يتم اختيار الصمغ البديل Spurr من مجموعة الـ TAAB لاستخدامه في عملية تثبيت الأنسجة والأسيتون مادة مذيبة في التجفيف.

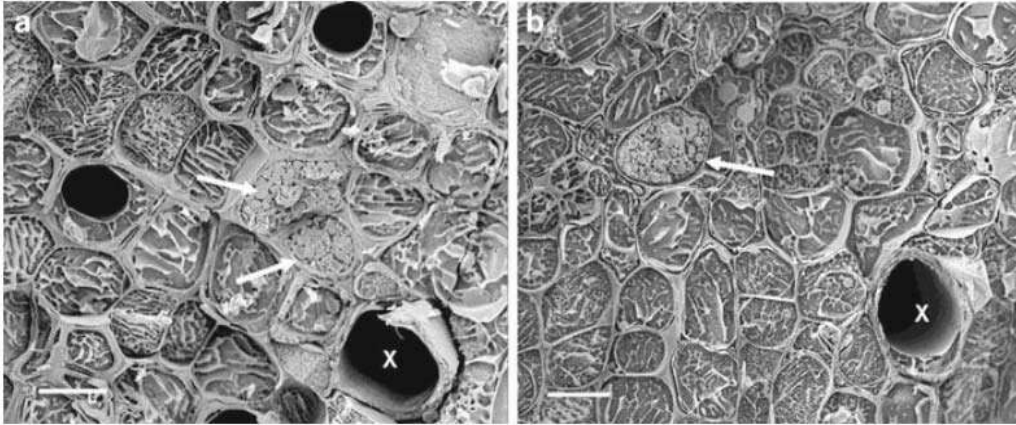
وتعتبر عملية تثبيت الأنسجة في المادة الصمغية عملية مهمة لتوفير الدعم للأنسجة؛ مما يجعلها متماسكة بإحكام وباتجاه مُحدد أثناء القطع. ويتوفر نوعان أساسيان من المادة الصمغية، وهما الـ acrylic، والـ epoxy، وكل منها يُقدم مزايا تعتمد على الهدف من استخدامه. وتعتبر المادة الصمغية الأكرليك -مثل: الـ LRW، LRG والويكريل Lowicryl- مناسبة لاستخدامها في تجارب (immunolabeling)؛ باستخدام الميكروسكوب الضوئي الإلكتروني (١٣). أما الصمغ الإيبوكسي (epoxy) -مثل: الـ Epon، والصمغ البديل Spurr من مجموعة الـ TAAB- فيستخدم بشكل عام لدراسة الشكل الظاهري تحت الـ TEM (١٤). ولم يعد الصمغ الـ Spurr الأصلي متوفراً حالياً، ولكن هناك مادة بديلة صمغية أقل لزوجة وخطورة، هي مادة الـ TAAB في الوسط S032/D. وهذه المادة تباع كـ (premix kit)، ويتم اختيارها لهذه الطريقة لأنها أعطت نتائج جيدة، وإذا تم اتباع الخطوات -كما في ورقة البيانات المرفقة- سيتم تكرار الخليط في كل مرة.

١-٣: إعداد تقنيات الـ SEM:

لقد ذكر في السابق طرق التصوير للفيتوبلازما باستخدام الـ SEMs، والصعوبات التي يمكن مواجهتها في تحديد خلايا اللحاء، والحفاظ على المحتوى الخلوي السليم (١٥، ١٦). ويتم تجهيز العينات باستخدام تقنية التجفيف للنقاط الفاصلة (CPD)، والتي تعمل على تعديل أجزاء من المحتوى الخلوي وإزالتها، وتترك أعداداً من أجسام الفيتوبلازما العالقة بلحاء جدار الخلية، وأيضاً الأجسام المحاصرة في الأنابيب الغريالية الواسعة؛ حتى يمكن مشاهدتها.

إن استخدام درجات حرارة منخفضة في تقنية التثبيت بالتجميد لا تؤدي إلى حدوث تلك المشاكل، ويزداد استخدامها في محاولة للحصول على العينات المحفوظة في حالتها الأصلية بشكل تام. والهدف هنا، هو السرعة في تثبيت الأنسجة، ومنع إعادة توزيعها. وبالمثل، يتم تقليل التغيرات التي تحدث للأغشية الخلوية -انكماش الأنسجة- والتغير يكون إلى الحد الأدنى. ويتم تحول سيتوبلازما الخلية بشكل مثالي إلى ثلج زجاجي؛ مما يقضي على حركة المكونات الخلوية وعناصرها المتغيرة (وتعتبر هذه الطريقة مهمة في الـ immunolabeling or microanalysis)؛ دون تكون البلورات الثلجية التي تعيق الأغشية الرقيقة وتُسبب ما يُعرف باسم: "التلف الكريستالي".

إن الميكروسكوب الإلكتروني المسح بالتبريد (CryoSEM Cryoscanning electron microscopy) هو ميكروسكوب إلكتروني منخفض الحرارة مُخصص للعينات الرطبة كلياً. ولا يتم تعديل العينات بتعريضها لمثبتات كيميائية أو مذيبات للحفاظ على حالتها ومميزاتها الخارجية - مثل: الطلاء الشمعي للأنسجة الخارجية للخلية- والخلايا الرطبة تماماً بمحتويات يتم تصويرها. ويمكن من خلال الـ CryoSEM ملاحظة - فهي سهلة التنفيذ- تطبيقها على عينات أكبر حجماً، وبشكل سريع. ويمكن رؤية الخلايا -بشكل عام- والهيكل الخلوي، والبنية العامة الموجودة أسفل سطح الخلية من خلال الـ CryoSEM (شكل ٣).



شكل (٣): قطاع لبرعم بواسطة Cryo SEM freeze مكون من: (a): (*Crotalaria phyllody*). (b): وورقة صغيرة من *brinjal*. والشكلان لنبات الوينكا (*Catharanthus roseus*)؛ للحزم الوعائية، والأسهم تبين اللحاء مملوءاً بالفيوتوبلازما. X= الخشب. (b/a) بار = ١٠ مايكرونات.

إن غمر العينات في النيتروجين المسال (SLN_2) طريقة من الطرق المعروفة لتثبيت العينات الكبيرة نسبياً، مثل: $2 \times 5 \times 5$ mm. وبالرغم من أن سُمك الأنسجة يؤثر على تكوين الثلج الزجاجي، لكنها تعطي أفضل مشاهدة للطبقات الخارجية، بينما تكون أقل جودة في تحديد

اتجاه العينة. وعملية التثبيت ليست بسرعة الـ HPF نفسها (١٧). وفي بعض الأحيان، التجميد يصبح ملوثاً في السطح. ويمكن التخلص منه بسهولة من خلال التسامي والتحكم الدقيقين في درجة حرارة؛ لكن بشرط أن يتم الغمر بصورة سريعة، وتجنب الضغط على الأنسجة. ويمكن أن يكشف التصوير الصحيح ما يتواجد داخل الخلية، على سبيل المثال: وجود الفيتوبلازما. إن قطع العينات عملية عشوائية، وتعتمد - إلى حد كبير- على طبيعة العينة. وغالباً ما يكشف السطح المقطوع عن المحتوى الداخلي المطلوب، ولكن يكون من الصعب - في بعض الأحيان- الحصول على سطح مقطوع المطلوب، ويمكن الحصول على أسطح موحدة ومنظمة باستخدام قطع التجميد بواسطة الميكروتوم الدقيق (cryo-ultramicrotome)، وعن طريق تقنية أخرى تُعرف بالكشط البارد (cryo-planing)، والتي تعتمد على استخدام تبريد النيتروجين المسال، إلا إن هذه التقنية تستغرق كثيراً من الوقت. وفي حين أن الفيتوبلازما يمكن تحديدها باستخدام الميكروسكوب الإلكتروني، إلا أن تصنيفها يعتمد على التقنيات البيولوجية الجزيئية.

٢- المواد:

يعتبر كلٌّ من: محلول الجلوتارالدهيد، والبارافورمالدهيد، والأوزميوم، وإسيتات اليورانيل من درجات الميكروسكوب الإلكتروني ومستوياته (EM)، والعناصر الكيميائية الأخرى مجرد مستويات تحليلية.

١-٢: المثبتات والمحاليل المنظمة:

١. المحلول المنظم للفوسفات سورنسن (PB) Sørensen عند درجة حموضة 7.2 pH؛ يتم تجهيز محلول التخزين (0.2 M). المحلول A (يذاب 2.40 g NaH₂PO₄·H₂O أو 2.76 g NaH₂PO₄·H₂O في 100 مل من الماء المقطر والمُعقم ddH₂O). المحلول B (يُذاب 5.36 g NaH₂PO₄·2H₂O في 100 مل من الماء المقطر والمُعقم ddH₂O). المحلول C (يُذاب 7.16 g Na₂HPO₄·12H₂O في 100 مل من الماء المقطر والمُعقم ddH₂O). ويتم خلط ٢٨ مل من المحلول A + ٧٢ مل من المحلول B. وتُثبت درجة الحموضة 7.2 pH (انظر: الملاحظة ١). ويُخزن الخليط في درجة حرارة 4°C. ويُخفف إلى 0.05 M لغسيل صبغة الأوزميوم osmium ولتجهيزها.

٢. المثبتات الأساسية: 2.5% (w/v) من الجلوتارالدهيد، 4% (w/v) من البارافورمالدهيد؛ يذاب ١,٦ جم من البارافورمالدهيد في ٢ مل من ddH₂O في أنبوب؛ فيكون (Falcon tube) حجمة ٤٥ مل بغطاء، وضعه في إناء ممتلئ حتى نصفه بالماء، وسخنه حتى تصل حرارته إلى 70°C، ولكن دون أن يصل إلى درجة الغليان (انظر: الملاحظة ٢). وتُضاف نقطة أو نقطتين من الـ 1

M NaOH حتى يصفى المحلول، ويُترك ليبرد. ويُضاف ٤ مل من 25% الجلوتارالدهيد و ١٠ مل من 0.2 M PB (محلول التخزين). ويصبح الشكل النهائي: ٤٠ مل من الـ ddH₂O.

٣. الصبغة/ المثبتة الثانية (W/V) 1% من أكسيد الأوزميوم (OsO₄): يتم صب ٢٥ مل من 0.05 M PB إلى أنبوب؛ فيكون (Falcon tube) حجمة ٤٥ مل بغطاء. بعدها، يتم وضع الأنبول الزجاجي؛ والذي يحتوي على 0.25 OsO₄ جم في ماء ساخن حتى تذاب الكريستلات. وفي الوقت نفسه، يتم إزالة الورقة التي تُغلف الأنبوب. وتحت كبائن خاصة وبعد ارتداء قفازات، يتم إزاحة غطاء للتأكد من أن المحتوى قد ترسب في أسفل الأنبوب. ومن ثم، يُفتح الغطاء مرة واحدة، ويُصب المحتوى إلى المحلول المنظم في الحال. ويُمكن تفريغ المحتوى المترسب بأسفل الأنبوب إلى المحلول المنظم للتأكد من إذابة كل كمية الأوزميوم. ويُغطي الأنبوب ويُقلب ببطء ليختلط محتواه. ويُغطي بإحكام، ويُغلف بالألومنيوم، ويكتب عليه، ثم يُوضع الأنبوب بكيس بلاستيكي مغلق في درجة حرارة 4°C، ويمكن استخدامه في وقت لاحق (انظر: الملاحظة ٣).

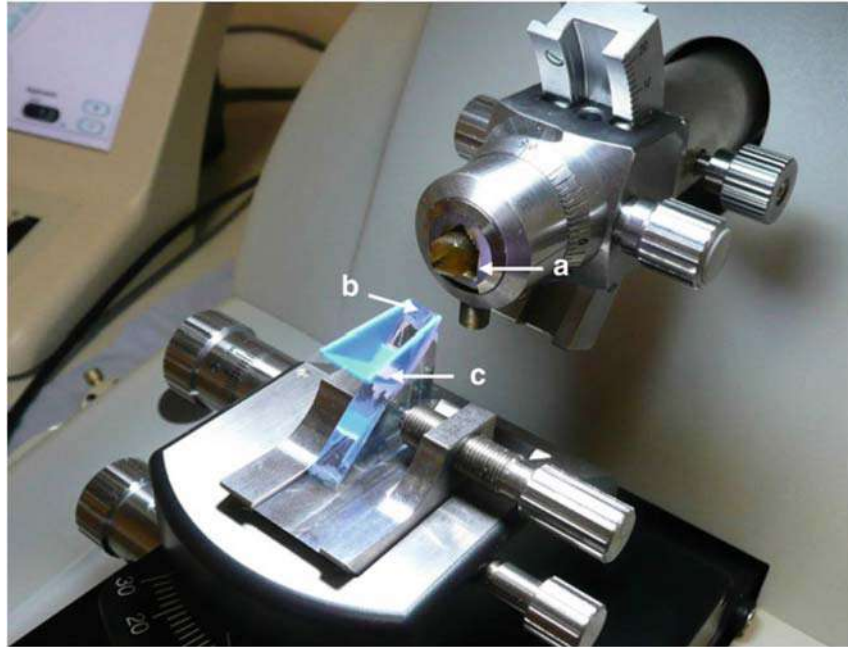
٢-٢: جفاف أنسجة الصمغ في عملية الفلترة:

١. جهاز طرد مركزي للعينات بسرعة ٢-٤ دورات في الدقيقة، أو جهاز رج العينات platform agitator.
٢. فرن درجة حرارته 70°C؛ لإجراء عملية البلمرة. ويمكن وضعه في الكبائن الخاصة.
٣. قنينات زجاجية حجمها ٧ مل بغطاء من البولييثين.
٤. أسيتون: ١٠٠٪ نقي جاف للاستخدامات الجزيئية.
٥. الأستون/الماء: بتركيز ٣٠٪، ٥٠٪، ٧٠٪، ٩٠٪ مجهز من خلال استخدام ddH₂O.
٦. صمغ مستوى متوسط SO₃₂/D للـ TAAB؛ من مجموعة المواد الصمغية قليلة اللزوجة (أو الصمغ البديل Spurr) (انظر: الملاحظة ٤).
٧. كبسولات BEEM[®]، أو قوالب مسطحة مطاطة من مادة السليكون لوضع العينات بداخلها.

٣-٢: الميكروتوم الدقيق:

١. يتم القطع من خلال استخدام مشرط دقيق للغاية، مثل: Reichert Jung Ultracut، أو Leica EMUC6 (Leica Microsystems UK) (انظر: الملاحظة ٥).
٢. EMKMR2 صانعة السكين الزجاجية، أو ما يشبهه، وزجاج (Leica Microsystems UK) (انظر: الملاحظة ٦).

٣. يتم تجهيز سكاكين زجاجية جديدة باستخدام EMKMR2، ويتم اتباع إرشادات التشغيل لكل نموذج من النماذج.
٤. حوض من البلاستيك LKB؛ تعلق وتلصق بآخر جزء من السكين الزجاجية؛ باستخدام شمع ساخن ناتج عن الموقد (شكل ٤).
٥. حامل عينة من النحاس، ذو فتحات صغيرة جداً، مغلف بفورمفار/ الكربون.
٦. ملقط حاد، وبعض التجهيزات (انظر: الملاحظة ٧).
٧. شفرات بجهتين.



شكل (٤): عينة مثبتة بالشمع ومركبة على حامل العينة Leica EMUC6، وسكينة زجاجية مرفق بها وعاء مُركب على السكين أمام العينة. A: العينة. B: حافة السكين الزجاجي. C: الوعاء البلاستيكي المليء بالماء.

٤-٢: الصبغات:

١. أسيتات اليورانيل (Uranyl acetate UA) ٢٪ (w/v) أسيتات اليورانيل؛ يُضاف ٠,٥ جم من الـ UA إلى ٢٥ مل من الـ ddH₂O في قارورة زجاجية لونها غامق. ويُستخدم جهاز تقليب مغناطيسي؛ حتى تختفي أي بقايا صلبة (انظر: الملاحظة ٨).
٢. محلول هيدروكسيد الصوديوم؛ يُضاف ١ مل إلى ٤,٠ جم إلى 100 ddH₂O NAOH؛ ويُفضل استخدام حبيبات من علبة مفتوحة حديثاً، إن أمكن، و ddH₂O (خالٍ من الـ CO₂) مغلياً ومُبرداً.

٣. صبغة سيترات الرصاص Roynold (١٨)؛ يتم إضافة ١,٣٣ جم من نترات الرصاص $Pb(NO_3)_2$ و١,٧٦ جم من سيترات الصوديوم $(Na_3C_6H_5O_2 \cdot 2H_2O)$ إلى ٣٠ مل من الـ ddH₂O في دورق حجمه ٥٠ مل، ويُقلب أو يُرج بصورة مستمرة لمدة دقيقة واحدة، وبعد ذلك، وعلى فترات متقطعة لمدة ٣٠ دقيقة. ويُضاف ٨ مل من 1 M NaOH، وبعد ذلك يستكمل الحجم إلى ٥٠ مل بالـ ddH₂O ويُخلط بالقلب. ويتم التحقق من الـ pH 12.0 ± 0.1 (انظر: الملاحظة ٩).

٥-٢: معدات الميكروسكوب الإلكتروني الماسح بالتبريد cryoSEM:

١. نظام التبريد؛ مثل: نظام (Gatan UK) Atlo2500. يتم إلحاق حجرة التجهيز بحجرة الميكروسكوب الإلكتروني مباشرةً، ويتم التفريغ الهوائي باستخدام مضخة خاصة ذات اهتزازات نفاثة (انظر: الملاحظة ١٠).
٢. ويمكن اختيار طلاء الأجزاء المُستهدفة، لكن يتم استخدام الذهب/البلاديم للتصوير الروتيني في نظام Gata system.
٣. من الضروري توفير ٢٥ لترا من النيتروجين المسال كل يوم، ويُفضل وضعة في حاويات لف swing dewar لسكبه بسهولة، وحاويات صغيرة حجمها ٢ لتر؛ لوضع النيتروجين المسال في أقماع بلاستيكية (انظر: الملاحظة ١١).
٤. Aluminum cryo-stubs (الجئاتان أو الآجار المختبري) (see Note 12.).
٥. مركب نسيجي Tek oct (الجئاتان أو الآجار المختبري).
٦. شفرات معقمة لإزالة الأنسجة من النباتات، ومشارط مسطحة أو حُطافية بحجم ١١ أو ١٢ مركبة على مقبض السكين البارد حجم ٣ (الجئاتان أو الآجار العلمي). (انظر: الملاحظة ١٣).
٧. غاز نيتروجين جاف.
٨. أسطوانة غاز الأرجون الصافي.

٣- طرق العمل:

يتم تنفيذ هذه الطرق داخل كبائن شفط خاصة، مع ارتداء قفازات (nitrile). وتُستخدم المصاصات لكافة السوائل الزائدة؛ للتأكد من أن الأنسجة ستظل مغمورة في السائل طوال الوقت، ويتم اتباع الطريقة الموصى بها للتخلص من كافة المخلفات.

١-٣: التثبيت TEM:

١. باستخدام شفرة معقمة، يتم اختيار نسيج من القمم الصغيرة، والعروق الوسطية للأوراق، والبراعم أو الساق، بعيداً عن منطقة الخلايا الميتة بحوالي 1 mm؛ والتي يمكن رؤيتها على النبات المصاب.

٢. يتم قطع النسيج إلى أجزاء صغيرة ($3 \times 1 \times 1 \text{ mm}$) (انظر: الملاحظة ١٤) في طبق تقطيع يحتوي على المحلول المثبت الأولي.
٣. تُنقل العينات إلى قارورة زجاجية بها 3~ مل من المثبت الأولي، ومعها ورقة مكتوبة بقلم الرصاص، ويتم تغطية القارورة، وتُقلب لمدة تتراوح بين ساعة إلى ساعتين (انظر: الملاحظة ١٥).
٤. وبعد ذلك، تُغسل $3 \times$ باستخدام كلور فوسفات 0.05 مولار على مدى ١٠ دقائق، وتُدور أو تُقلب برفق.
٥. بعدها، يتم تبديل آخر جزء مغسول بصبغة مثبتة ثانوية (OsO_4)، وتغلق العينات مرتين في الأنابيب المغلفة، وتوضع في كيس بلاستيكي محكم، وتوضع في الثلاجة عند درجة حرارة 4°C لمدة أربع ساعات، أو طوال الليل (انظر: الملاحظة ١٦).
٦. يتم الغسل، كما في السابق $3 \times$ باستخدام 0.05 M PB على مدى ١٠ دقائق، وتُدور أو تُقلب برفق.

٣-٢: التجفيف:

- تستخدم السن الحاد للمصاصات للتقليب برفق في كل مرحلة.
١. يتم إزالة معظم العينات المغسولة بال PB، وبالتالي تُستبدل $3 \sim$ مل من المحلول التالي.
 ٢. ٣٠٪ من الأسيتون لمدة ١٠ دقائق، ثم يُسحب.
 ٣. ٥٠٪ من الأسيتون لمدة ١٠ دقائق.
 ٤. ٧٠٪ من الأسيتون لمدة ١٠ دقائق، أو طوال الليل في درجة حرارة 4°C (انظر: الملاحظة ١٧).
 ٥. ٩٠٪ من الأسيتون لمدة ١٠ دقائق.
 ٦. ١٠٠٪ من الأسيتون النقي الجاف، لمدة 3×30 دقيقة، ويوضع في المحلول الأخير؛ حتى يصبح جاهزا للتغلغل مع الصمغ (انظر: الملاحظة ١٨).

٣-٣: التثبيت بتغلغل الصمغ:

- يتم تجهيز الصمغ حسب إرشادات المصنع، ويُخزن بالطريقة الموصى بها (انظر: الملاحظة ٤). ويتم تخزين الصمغ في الثلاجة طوال فترة الليل، كما يجب التأكد من أن درجة حرارته ارتفعت لتصل إلى درجة حرارة الغرفة قبل استخدامه. وبالتدوير أو التقليب البطيء، في كل مرحلة تتغلغل العينات بداخل سلسلة الأسيتون/الصمغ.
١. ٢:١ صمغ؛ أسيتون لمدة ساعة واحدة.
 ٢. ١:١ صمغ؛ أسيتون لمدة ساعة واحدة.

٣. ١:٢ صمغ؛ أسيتون لمدة ساعة واحدة.
٤. ١٠٠٪ صمغ؛ طوال الليل في درجة حرارة الغرفة.
٥. ويتم تغيير الصمغ بآخر جديد؛ لمدة ساعة واحدة، ويُقلب برفق.
٦. تُستخدم أعواد خشبية لوضع النسيج في القوالب أو الكبسولات المملوءة بالصمغ الجديد، وتُقلب الأنسجة في الاتجاه الصحيح، ومن ثم يتم بلمرتها في الفرن عند درجة حرارة 70°C لمدة تتراوح ما بين ١٢ إلى ١٥ ساعة (انظر: الملاحظة ١٩).
٧. وبعد التأكد من تماسك الصمغ، يتم إزالة العينات من الفرن، وتترك حتى تبرد قبل إزالتها من القالب بشفرة حادة لها جانب واحد.
٨. يتم وضع ورقة تحمل اسم كل عينة بمواصفاتها، ويتم تخزين كل منهم على حدة في مُغلف ورقي، حتى تصبح جاهزة للتقطيع إلى أجزاء صغيرة جداً.

٣-٤: الميكروتوم الدقيق:

- يتم تقطيع العينات في الميكروتوم الدقيق باستخدام سكاكين زجاجية، تُصنع حديثاً بالطلب؛ بعيداً عن طريقة السكاكين التي تفقد حداثتها في غضون أيام. لذلك، يمكن استخدام سكاكين الألماس لتقليل الحاجة إلى صناعة سكاكين زجاجية جديدة. وبرغم أن سكاكين الألماس باهظة الثمن -ويمكن إن تتلف بسهولة- إلا أنه ينبغي التعامل معها بحرص، ويجب أن يستعملها العاملون المختصون فقط.
١. يتم تركيب العينة في حامل الميكروتوم، ويُثبت الحامل بإحكام في المرحلة الأولى من الميكروتوم الحاد.
 ٢. باستخدام شفرة حادة، يتم إزالة الصمغ الزائد عن الحاجة لصنع شكل شبه منحرف صغير بقدر الإمكان، وتوضع الأنسجة في منتصف وجه العينة. ويتم التأكد من أن الحافة السفلية والحافة العلوية متوازيتان حتى يتشكل الشريط. وفي الوقت نفسه، يمكن إزالة الأجزاء الزائدة بالسكين الزجاجي للعينة المركبة على الذراع المُخصص للعينات.
 ٣. تُنقل العينة بواسطة الذراع المُخصص لها، ويتم تسوية وجه العينة بسكين زجاجي حتى يظهر النسيج على السطح.
 ٤. يُركب السكين الزجاجي الجديد بالحوض المليء بالـ ddH₂O (انظر: شكل ٤).
 ٥. يُحدد السُمك المناسب؛ حيث إن اللون الفضي يعني سمكا بمقدار ٦٠ نانومتراً، ويتم تقطيع العينات بأداة تحكم لتوجيه العينات التي تبعد عن حافة السكين.
 ٦. تُغمر ورقة فلتر واثمان Whatman رقم ١ في الكلوروفورم، ويتم مسكها فوق العينات لمدة ثوان معدودة (انظر: الملاحظة ٢١).

٧. بعدها، تكون العينات جاهزة لتفصل من الشريط، وتقسم إلى مجموعات باستخدام أداة مختلفة، مع وضعها على حامل العينات.
٨. يمكن تصفية الماء الزائد بلمس جانب من جوانب الملقاط بورقة فلتر. وبعدها، يتم قلب الحامل ليصبح الجزء السفلي السليكون المطاطي لأعلى، ووضعه في طبق Petri مغطى ليجف.

٣-٥: الصبغ:

- يتم صبغ العينات مرتين؛ باستخدام ٢٪ من يورانيل أسيتات و (Reynolds lead citrate) (w/v).
١. يتم قلب الحامل وتعويمه على 30 ميكروليترا من قطرات صبغة أسيتات اليورانيل؛ والتي تم وضعها على شمع بطبق Petri؛ لمدة تتراوح ما بين ٥ إلى ١٠ دقائق في درجة حرارة الغرفة.
٢. يُثبت الحامل في الملقط، ويغسل بتيار بسيط من الـ ddH₂O الجديد، ويتم إزالة الماء الزائد عن طريق تجفيفه برفق بورقة فلتر.
٣. يتم قلب الحامل وتعويمه في 30 ميكروليترا من قطرات صبغة سيترات الرصاص؛ والتي تم وضعها على شمع في طبق Petri؛ لمدة تتراوح ما بين ٢ إلى ١٠ دقائق في درجة حرارة الغرفة، وتوضع من ٤ إلى ٥ حبيبات من الـ NaOH بداخل الطبق لمص ثاني أكسيد الكربون (انظر: الملاحظة ٢٢).
٤. يغسل الحامل بالطريقة السابقة نفسها، ويتم إزالة الماء الزائد مرة أخرى بورقة الفلتر.
٥. يوضع الحامل على قطعة من السليكون المطاطي في طبق Petri مغطى؛ حتى تصبح جاهزة لفحص الـ TEM (انظر: الملاحظة ٢٣).

٣-٦: الـ SEM بالتبريد:

١. يتم خفض درجة حرارة وحدة التبريد والميكروسكوب الإلكتروني باستخدام النيتروجين المسال (LN₂). وتُستكمل العملية عندما تصل درجة الحرارة إلى -170°C. ودائماً، يجب أن تكون أعلى من درجة الحرارة المطلوبة بمقدار 10°C (انظر: الملاحظة ١١ و ٢٤).
٢. يتم اقتلاع العنق أو النسيج الوريدي الموجود بمنتصف الورقة؛ والذي يبلغ عرضه 1-2 × 5~ mm من النبات باستخدام شفرة مُعقمة.
٣. يتم تركيبها على حافة التبريد المُعدلة؛ باستخدام نسيج الـ Tek وحافظ للتبريد منخفض الحرارة وصبغ. ويتم استخدام حواف فتحها الضيقة لتقسيم الورقة، واستخدام الحواف المثقوبة لتقسيم العنق أو الجزوع بطريقة أفضل وأكثر نجاحاً (انظر: الملاحظة ١٢).

٤. يتم تعبئة الحاوية (Gatan Alto 2500) بـ LN₂، وتغطي الوحدة بالغطاء، ويتم تشغيل مضخة التفريغ (انظر: الملاحظة ٢٥)؛ حتى يتحول الـ LN₂ إلى نيتروجين شبه صلب.
٥. يُسمح لغاز النيتروجين بالدخول إلى الوحدة حتى يتم إزالة الغطاء، وتتغلغل العينة بسرعة في النيتروجين المسال.
٦. يتم تشغيل مضخة التفريغ مرة أخرى عند انتهاء الغليان، وتسحب العينة إلى كبسولة النقل المفرغة عندما يبدأ الـ LN₂ في التصلب. وتُغزل العينة في الكبسولة بإغلاق الصمام، وتُفتح الكبسولة بإدخال غاز الـ N₂ في الوحدة، ويسمح بانتقاله إلى غرفة العمل.
٧. بمجرد قفل الهواء، تُفتح الصمامات المزدوجة للخارج؛ مما يسمح بالدخول إلى غرفة التجهيز، وتبدأ بالإعداد لتحميل العينة (انظر: الملاحظة ٢٦).
٨. لمسة واحدة من السكين البارد المُعد في الحجرة كفيلة لقطع العينات. ويجب إعادة السكين إلى الحوض البارد، إن لم يكن هناك حاجة لاستخدامها (انظر: الملاحظة ٢٧).
٩. يتم التحكم في درجة الحرارة باستخدام سخان حراري يسمح بتسامي العينة. ويتم ضبط درجة حرارته على 95°C- لمدة تتراوح ما بين ١ إلى ٢ دقيقة؛ لإزالة الثلج تماما من على السطح. وتبرز بعض السمات، مثل بعض أجزاء من الخلية والأغشية الرقيقة على الوجه المقطوع (انظر: الملاحظة ٢٨).
١٠. يتم غلق السخان لترجع درجة الحرارة في هذه المرحلة إلى 140°C- قبل طلاء العينات بالـ Au/Pd في جو معبأ بغاز الأرجون (انظر: الملاحظة ٢٩). ويكفي ضبط وقت الطلاء لـ ٦٠ ثانية.
١١. يمكن نقل العينات عندما يتلاشى غاز الأرجون، إلى مرحلة الميكروسكوب الإلكتروني، مع حفظ درجة الحرارة عند 150°C- للفحص (انظر: الملاحظة ٣٠) والتصوير.

٣-٧: التجميد بالضغط العالي:

إن تجميد الضغط العالي (HPF) وضغط التشغيل وحجم العينة -وخصوصاً سُمكها- من العوامل الضرورية (١٧). ويتم التحكم بتلك العوامل بدقة لتجنب تلف الكريستالات، وخصوصاً بمركز العينة؛ حيث لا يُخترق الجزء الأمامي بشكل سريع. وتُستخدم الواقيات من البرودة (Cryoprotectants)، مثل: معجون الخميرة، أو ٢٠٪ من مصّل الألبومين البقري (BSA)؛ لتقليل نقطة تجميد الماء. وتُساعد بعض المواد -مثل: الهيكساديسين hexadecane- في الوصول إلى مزيد من حالات التجميد. ويتم تعريض العينات ببطء بعد الـ HPF لدرجة حرارة الغرفة، غالباً لفترة أطول من ٣-٤ أيام، باستخدام وحدة تجميد بديلة؛ حيث يذوب الماء ويحل الأستيون؛ والذي يحتوي على مواد تشبيث، مثل: أكسيد الأوزميوم. وبعد الوصول إلى درجة حرارة الغرفة، تُغسل العينات في الأستيون

الجاف، ويتم إكمال روتين التجفيف (العنوان الفرعي ٣-٢). وبعده، توضع العينة في الصمغ، وتتم عملية التقسية.

١. كما ذكرنا من قبل، ليس للـ HPF أي عيوب؛ خصوصاً فيما يتعلق بحجم العينة. ويجب إزالة الأجزاء الزائدة من الأنسجة لتتناسب وحدة المعالجة وتدخل فيها، وتكون ذات قطر 1.5 mm، وسُمك 0.2 mm. ويُمثل هذا التحديد الحجمي مشكلة عند محاولة التحديد لمسبب المرض، لكن قامت الشركات بمعالجة الأجهزة بما يتناسب مع العينات؛ بحيث تكون متطابقة في الاستخدام، وأصبحت هناك بدائل أخرى متوفرة. وتتمثل أهمية تلك التقنية وقيمتها، في إمكانياتها اللامحدودة في حفظ التفاصيل المورفولوجية، وسوف تزيد أهميتها إذا أصبحت الفيتوبلازما تنمو على بيئة خاصة.

٤- الملاحظات:

١. يتم إعداد 0.2 مولار من محلول الـ Sørensen المنظم بدرجة حموضة pH 7.2؛ كما هو موضح في الجدول *Plant Microtechnique and Microscopy*, 1999, S. Ruzin, Oxford University Press, Oxford.
٢. تعتبر الأبخرة ضارة للغاية. لذا، يجب أن يكون التعامل معها في كبائن خاصة.
٣. يجب التخلص من محلول الأزومسيوم بعد أسبوع، أو بمجرد تغير لونه إلى اللون الأسود/ البنفسجي. وتذكر ضرورة اتباع الإجراءات الموصى بها في التعامل مع هذه المواد الخطيرة. وعادةً، ما يتم معادلة مخلفات الـ OsO_4 بخلطها مع زيت الذرة بضعف كميتها في كوب زجاجي، وهي طريقة شائعة الاستخدام. ولمزيد من الوقاية، يمكن ارتداء قفازين.
٤. يجب اتباع الإرشادات الموضحة في ورقة البيانات الخاصة بالصمغ قبل خلط الـ S032D. وتضاف محتويات زجاجة واحدة حجمها 50 مل إلى محتويات زجاجة واحدة 100 مل. وبعدها، يُضاف محتوى علبة واحد من مادة تسريع التفاعل، وتخلط جيداً. ويتم تجهيز 100 مل تقريباً من الصمغ للاستخدام، ويمكن تخزينه في درجة حرارة $4^{\circ}C$ لبضعة أيام، أو في درجة حرارة $20^{\circ}C$ لبضعة أشهر، ولكن قبل استخدامه يجب رفع درجة حرارته إلى درجة حرارة الغرفة، وليس من الضروري وزن المكونات.
٥. يجب التأكد من قراءة المعلومات، والحصول على التدريب قبل تشغيل الميكروتوم الدقيق.
٦. يجب قراءة تعليمات التشغيل، والتدريب عليها أثناء التعامل مع الزجاج.
٧. الحصول على رمش عين ولصقه في عود بشريط لاصق أو شمع، وتستخدم في التعامل مع العينات.
٨. إن لم يتوفر قارورة غامقة، يمكن تغطية القارورة بورق ألومنيوم لحجب الضوء. ويسحب المحلول بمصصات من تحت الدورق، ويُفضل تمرير المحلول بفلتر طولة ٠.٢ ميكروليتر.

٩. يمكن حفظ الصبغة في زجاجة بها سداة، في درجة حرارة 4 مئوية لأكثر من ٦ أشهر، ويفضل تمريرها بفلتر ٠,٢ ميكروليتر قبل استخدامها، وإن تم ملاحظة ترسب أبيض اللون فيجب التخلص منها، وإعداد محلول جديد.
١٠. يتم إجراء جميع العمليات الخاصة بالقطع والتسامي أو الطلاء في مكان الإعداد. ومن الضروري، التحكم في درجة حرارة غرفة الإعداد وغرفة الميكروسكوب، ويتم وضع مضادات التلوث فوق مكان العينات.
١١. يتم وضع ورقة النسيج في كل قمع لامتصاص أي رطوبة في كل مرة يتم فيها الاستغناء عن الـ LN₂.
١٢. يمكن عمل ثقب أو فتحات في الألومنيوم المتبقي ليكون هناك مساحة كافية للسيقان، والأوراق، أو البراعم، أو البديل؛ والذي يعتبر من الخيارات الأخرى، ويمكن شراءه (Gatan UK).
١٣. إن استخدام الشفرات المسطحة أسهل في تقسيم الأوراق أو السيقان، ويجب تذكر قبل تبريد الغرفة الإعداد وتبريد الشفرة؛ كي تكون جاهزة للاستخدام.
١٤. يساعد تسجيل العينة وتوجيهها خلال وضع العينة في قالب. ويمكن استخدام قطعة من الشمع في طبق بتري قاعدة لتقطيع العينات.
١٥. إذا ظل النسيج طافيا بعد مرور ٥ دقائق، يجب وضع الزجاجات المفتوحة في المجفف، وإضافة نقطة واحدة من Tween 20 (محلول مخفف 0.05% في ddH₂O) في كل زجاجة. ويتم تفرغها بحرص باستخدام مضخة التفريغ حتى تنغمر الأنسجة.
١٦. الفشل في إغلاق الحاوية بإحكام يسمح لبخار الأوزميوم بالتطاير، وبتثبيت الدهون وغيرها على الثلجة، مثل: تواجد بصمات الأصابع على الأبواب والأرف باللون الأسود.
١٧. هذه المرحلة مناسبة لجعل العينات قادرة على تجنب روتين التجفيف السريع، والصعوبة أنها قد تؤدي إلى تلف الأنسجة.
١٨. إن وضع الأنسجة في ١٠٠٪ من الأسيتون يجعلها رقيقة وحساسة جداً لتحمل روتين تغلغل الصمغ. لذلك، يُفضل تقليل وقت هذا الروتين إلى أقصى حد.
١٩. يمكن وضع أي صمغ زائد عن الحاجة في كبسولة فارغة، واستخدامها في التأكد من عملية البلمرة. ويمكن أيضاً استخدام هذه الكبسولة حاملاً للعينات.
٢٠. إذا كان ملمس الصمغ لزجاً، فهذا يعني أن عملية البلمرة لم تكتمل. وفي تلك الحالة، يجب إرجاع العينات إلى الفرن حتى يتم معالجتها بشكل صحيح، وتصبح جافة الملمس.
٢١. تطاير بخار الكلوروفورم يساعد على مد الأنسجة ذات اللون الفضي؛ مما يساعد على اختفاء أي انكماش.

٢٢. عند استخدام الصبغة، يجب عدم التنفس بشكل مباشر في طبق البتري؛ لأن الـ CO_2 الموجود بالنفس قد يؤدي إلى تكون كربونات، وهذا يسبب تلوثاً للحامل. لذلك، يجب مسك طبق بتري בזاوية بعيدة عن الجسم، وهذا يساعد في تجنب حدوث تلك المشكلة.
٢٣. يجب فحص الأنسجة بمجرد صبغها؛ حتى لا تضع بعض التفاصيل الدقيقة أثناء تخزينها.
٢٤. عادةً، يتم وضع مرحلة التبريد فوق مرحلة التجفيف في عديد من الميكروسكوبات الإلكترونية، ويمكن إزالتها لعمل الميكروسكوب في درجة حرارة الغرفة. وإن كان الوضع دائماً على هذا الحال، يجب التأكد من أن مرحلة التبريد في وضع التشغيل قبل البدء في إجراء التبريد. ويجب تطهير النظام بغاز النيتروجين لمدة ١٠ دقائق قبل البدء بالتبريد، وهذا التطهير يسمح أي رطوبة موجودة في الأنبوب، كما أنه فرصة للتأكد من عدم وجود أي تسرب غازي.
٢٥. يتم تجميد الـ LN_2 في وحدة الطمي قبل غمر العينة، ويتم إزالة أي مواد رطبة تذاب بها، وهذا يقلل من احتمال تلوث الثلج الموجود على العينة.
٢٦. يتم تبريد المرحلة مباشرةً بالـ LN_2 ، وهذا يحافظ على تثبيت درجة الحرارة عند $-180^\circ C$ تقريباً، مع درجة حرارة مضادات التلوث عند $-190^\circ C$ ، ويتم تسجيل درجات الحرارة بلوحة التحكم في وحدة Alto.
٢٧. لا يتم استخدام أي حركة تعديل أو نشر؛ لأن هذا سوف يترك علامات السكين على العينة. ويكفي لمسة أو وخزة بسيطة، وتتشرط العينات المجمدة بسهولة دون مقاومة.
٢٨. يعتمد وقت هذا الإجراء على العينة، ولا توجد عينة تشبه الأخرى، ويُفضل بدء العمل على التجربة لتحقيق التوقيت الأمثل.
٢٩. تتشكل البلازما في جو مُعبأ بغاز الأرجون؛ والذي يتم إرفاقه بالغرفة من خلال المفتاح الكهربائي. ويوصل المفتاح بساعة زمنية يتم ضبطها على وقت معين (٦٠ ثانية تقريباً)، ويُغلق الغاز بمجرد مرور هذا الوقت. ويكون سُمك الطلاء $\sim 5\text{ nm}$.
٣٠. يجب نقل العينات من غرفة إعداد التبريد إلى مرحلة الميكروسكوب بمجرد وصول درجة الحرارة إلى $10^\circ C$ لكليهما. ويمكن أن تتلوث العينات إذا كان الفرق كبيراً.

الشكر والتقدير:

أوجه خالص الشكر إلى الـ Prof. Phil Jones، الرئيس السابق لقسم التصوير البيولوجي في Rothamsted لنصائحه القيمة، ووضعه نسخة من طرق العمل الـ TEM، واستخدام صور الـ TEM. كما أشكر الـ Prof. John Lucas وDr. Allison؛ لملاحظتهم المهمة حول المسودة. وقد حظيت بحوث الـ Rothamsted بدعم من مجلس بحوث التكنولوجيا الحيوية والعلوم البيولوجية (BBSRC Biotechnology and Biological Sciences Research Council) من بريطانيا.

1. Weintraub PG, Beanland LeA (2006) Insect vectors of phytoplasmas. *Annu Rev Entomol* 51:91–111
2. Kawakita H et al (2000) Identification of mulberry dwarf phytoplasmas in the genital organs and eggs of leafhopper *Hishimonoides sellatiformis*. *Am Phytopathol Soc* 90:909–914
3. Hull R, Horne RW, Nayar RM (1969) Mycoplasma-like bodies associated with Sandal Spike Disease. *Nature* 224:1121–1122
4. Horne RW (1970) The ultrastructure of mycoplasma and mycoplasma-like organisms. *Micron* 2:19–38
5. Waters H, Hunt P (1980) The in vivo three dimensional form of a plant mycoplasma-like organism by analysis of serial ultrathin sections. *J Gen Microbiol* 116:111–131
6. Musetti R (2010) Biochemical changes in plants infected by phytoplasmas. In: Weintraub PG, Jones P (eds) *Phytoplasmas: genomes, plant hosts and vectors*. CAB International, Wallingford, pp 132–146
7. Doi Y et al (1967) Mycoplasma—or PLT group-like microorganisms found in the phloem elements of plants infected with mulberry dwarf, potato witches' broom, aster yellows, or paulownias witches' broom. *Ann Phytopathol Soc Jpn* 33:259–266
8. Siddique ABM et al (2001) Electron microscopy and molecular characterization of phytoplasmas associated with little leaf disease of brinjal (*Solanum melongena* L.) and periwinkle (*Catharanthus roseus*) in Bangladesh. *J Phytopathol* 149:237–244
9. Franova J et al (2003) Electron microscopy and molecular characterization of phytoplasmas associated with strawflower yellows in the Czech Republic. *Eur J Plant Pathol* 109: 883–887
10. Kiernan JA (2000) Formaldehyde, formalin, paraformaldehyde and glutaraldehyde: what they are and what they do. *Microsc Today* 00–1:8–12
11. Sabatini DD, Bensch K, Barnett MD (1963) The preservation of cellular ultrastructure and enzymatic activity by aldehyde fixation. *J Cell Biol* 17:19–58
12. Dykstra MJ, Reuss LE (2003) *Biological electron microscopy: theory, techniques and troubleshooting*, vol 2. Springer Verlag GmbH, New York, pp 27–28
13. Musetti R et al (2002) Application of immunoelectron microscopy techniques in the diagnosis of phytoplasma diseases. *Microsc Res Tech* 56:462–464
14. Arocha Y et al (2009) Detection of phytoplasma and potyvirus pathogens in papaya (*Carica papaya* L.) affected with 'Bunchy Top Symptom' (BTS) in eastern Cuba. *Crop Prot* 28:640–646
15. Haggis GH, Sinha RC (1977) Scanning electron microscopy of mycoplasma like organisms after freeze fracture of plant tissues affected with Clover Phyllody and Aster Yellows. *J Phytopathol* 68:677–680
16. Poghosyan AV et al (2004) Possible phytoplasma disease in papaya (*Carica papaya* L.) from Baja California Sur: diagnosis by scanning electron microscopy. *J Phytopathol* 152: 376–380
17. Studer D et al (2001) A new approach for cryofixation by high-pressure freezing. *J Microsc* 203:285–294
18. Reynolds ES (1963) The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol* 17:208–212

استخلاص الـ DNA لعدد كبير من العينات النباتية آلياً

Nataša Mehle, Petra Nikolic', Matevž Rupar, Jana Boben,
Maja Ravnikar, and Marina Dermastia

ملخص:

إن الطريقة الموصوفة في هذا الفصل هي إجراء سريع؛ لاستخلاص الـ DNA الكلي، ويمكن تطبيقها على عدد كبير من العينات النباتية التي تحتاج إلى الكشف عن المسببات المرضية. إن هذا الإجراء يجمع خطوة الطحن سريعاً وببساطة بمواد الاستخلاص الخام، مع استخلاص الـ DNA على أساس ربط الـ DNA بكرات مغناطيسية. ويتم تصفية الـ DNA بعملية آلية تمر بها الكرات المغناطيسية بسلسلة من المحاليل المنظمة المنظفة، ويُناسب الـ DNA المستخلص عملية الاختبار الفعالة في تفاعلات الـ PCR.

الكلمات المفتاحية: الفيتوبلازما، الطحن، استخلاص الـ DNA، الآلي، المعالج المغناطيسي.

١- المقدمة:

تعتبر خطوة استخلاص الـ DNA في عملية تحليل العينات من الخطوات الصعبة التي تستغرق وقتاً طويلاً. ويصف هذا الفصل طريقة الاستخلاص الآلية الـ DNA، وقد تم إثبات ملاءمتها لمعالجة عديد من عينات أشجار الفاكهة والعنب.

وقد تم تحقيق عملية تقطيع الخلية باستخدام جهاز FastPrep[®]24 (MP Biomedicals)، وبها ينتج عن تصادم هيكل الخلية والعينة في وجود المحلول المنظم؛ والذي يؤدي إلى خروج الـ DNA الكلي من الخلايا. ويتم استخدام جهاز الـ SML Plant DNA (Bio-Nobile) QuickPick[™] في استخلاص الـ DNA الكلي؛ حيث يخرج الـ DNA من نسيج العينات النباتية باستخدام محلول K البروتينيز (proteinase K) ومحلول التحطيم lysis، ثم يتم عمل طرد مركزي للسائل المحلل للخلية لإزالة الأجزاء المتبقية، ويتم خلط سائل محلل الخلية المصفي مع الكرات المغناطيسية، وتحمل على

جدار جهاز الاستخلاص KingFisher® (Thermo Scientific)، ومنه يلتصق الـ DNA على سطح الكرات المغناطيسية، ويتم تنقيتها من خلال جهاز KingFisher؛ والذي يعمل على تمرير الكرات المغناطيسية بسلسلة من المحاليل المنظمة. وأخيراً، يُنقى الـ DNA في محلول الفصل المنظم. ويمكن لنظام KingFisher® مل معالجة ١٥ عينة في ساعة واحدة (لا تشمل الوقت اللازم لطحن المواد النباتية)؛ إلا أنه يمكن معالجة عدد أكبر من العينات معاً باستخدام معدات أخرى. على سبيل المثال: يعالج جهاز KingFisher® Flex ٩٦ عينة في الوقت نفسه، ولا تحتاج هذه التقنية أي مواد عضوية مذيبة، وتلغي الحاجة إلى تكرار عملية الطرد المركزي، والتنقية بالتفريغ، واستخدام عمود الفصل، وتنخفض أيضاً مخاطر تلوث العينات. ويرجع السبب في ذلك، إلى استخدام المواد البلاستيكية مرة واحدة في كل خطوة، وتطبيق الطريقة ببساطه. إن كفاءة الإجراء الآلي -بما فيها كمية وجودة الـ DNA المستخلص- لا تُقارن بطرق الاستخلاص الـ CTAB (١). لذلك، تم استخدام الإجراء الآلي لاستخلاص الـ DNA ومطابقته بنجاح بمعملنا في برنامج ملاحظة فيتوبلازما أشجار الفاكهة وعب السولفانيا (١، ٢)، وفي تشخيص أنواع من البكتيريا الأخرى (٣). ويمكن استخدام الـ DNA المستخلص في التطبيقات، مثل: الـ PCR، الـ real-time PCR، والتمدد الحراري، مثل: الـ LAMP (انظر: الملاحظة ١).

٢- المواد:

١. العينات: نسيج نباتي جديد (مثل: أوراق، جذور، لحاء).
٢. خلط أنسجة، مثل: FastPrep® -24 with TN 12 × 15-TeenPrep™ Adapter (MP Biomedicals) (انظر: الملاحظة ٢).
٣. أنابيب طرد مركزي صالحة للاستخدام مرة واحدة، مصنوعة من البوليبروبيلين، معقمة ١٥ مل، و ٢ مل و ١,٥ مل معقم؛ خاصة للطرد المركزي.
٤. نسيج، مثل: النسيج A: نسيج الجارنت، وما لا يقل عن ٥/٤ إنش من كرات السيراميك.
٥. جهاز طرد مركزي.
٦. جهاز مُقلب الأنابيب Vortexer.
٧. جهاز حراري، أو حمام ماء (٦٥ درجة مئوية).
٨. مجموعة من الممصات (مجموعة مُخصصة لاستخلاص الـ DNA).
٩. مصصات مفلترة للاستخدام مرة واحدة.
١٠. مُعدات (Bio-Nobil) QuickPick™ SML Plant DNA: حبيبات مغناطيسية (MagaZorb™)، ومحلول K البروتينيز، ومحلول مُنظم lysis، ومحلول مُنظم للربط، ومحلول مُنظم للغسل، ومحلول مخفف (انظر: الملاحظة ٤).

١١. مُعالج الحبيبات المغناطيسية (مثل: KingFisher® mL، Thermo Scientific، وعدد ٥ حاويات لشرائط الأنابيب للاستخدام لمرة واحدة، وأمشاط مديبية للاستخدام مرة واحدة؛ مُصممة للأجهزة) (انظر: الملاحظة ٥).

٣- طرق العمل:

هناك عديد من الطرق للطحن يمكن استخدامها، والطريقة المشروحة في هذا الفصل تعمل بفاعلية، والطريقتان الأخريان المستخدمتان في معملنا -فيما سبق- تستهلكان كثيراً من الوقت (انظر: الملاحظة ٦).

٣-١: مطابقة المواد النباتية:

١. يتم تجهيز حوالي ١ جم من نسيج نصل الورقة الوسطي، أو النسيج اللحاءي للجذر لكل عينة من العينات (انظر: الملاحظة ٧)، وتُقطع العينات إلى قطع صغيرة (انظر: الملاحظة ٨).
٢. تُنقل العينات إلى أنابيب الطرد المركزي ١٥ مل، عليها ورقة بمواصفاتها تحتوي على Matrix A (انظر: الملاحظة ٩).
٣. يتم إضافة ٢ مل إلى كل أنبوب من محلول تحطيم الخلايا المنظم (lysis)، ويجب توفر ما لا يقل عن عينة واحدة شاهداً في العملية (انظر: الملاحظة ١٠).
٤. توضع الأنابيب في مُحول FastPrep®، ويتم تشغيل جهاز FastPrep® الطحن على ٤٠ ثانية في 5 m/s (راجع دليل استخدام الجهاز للحصول على تعليمات مفصلة) (انظر: الملاحظة ١١).
٥. عمل الطرد المركزي للعينات لمدة ١٠ دقائق بسرعة ١٥٠٠٠ لفة.
٦. بحرص، يتم وضع 800 ميكروليتر من المادة الطافية إلى أنابيب ٢ مل جديدة، وتستكمل طريقة العمل للاستخلاص بشكل سريع.

٣-٢: استخلاص الـ DNA الكلي:

١. يضاف من محلول K البروتينيز إلى كل مادة من المواد الطافية على السطح، ثم يتم خلطهم بواسطة pulse-vortexing.
٢. تُحل العينات لمدة ٣٠ دقيقة في درجة حرارة 65°C.
٣. أثناء خطوة الحل، يتم وضع حاويات شرائط الأنابيب الخمس على حامل فولاذي مقاوم للصدأ مزود مع جهاز KingFisher® (انظر: الملاحظة ١٢)، وتُضاف قطرات من المواد الكاشفة إلى الحاويات؛ ٢٠ ميكروليترا من الحبيبات المغناطيسية، و ٥٠٠ ميكروليتر من المحلول المنظم للربط (الحاوية A)، و ٨٠٠ ميكروليتر من المحلول المنظم للغسيل (الحاوية B)

- والحاوية (C)، و ٢٠٠ ميكروليتر من المحلول المنظم الفصل (الحاوية D)، و ١٠٠ مل من الماء (الحاوية E). تُجهز بعدها شريطاً أنبوبياً جديداً لكل عينة من العينات، ويتم تحميل أمشقة جديدة في فتحات المصاصة المتعددة (انظر: الملاحظة ١٣).
٤. تُزال العينات من الحضانة 65°C ، وتدور الأنابيب بالطرد المركزي لمدة دقيقة واحدة بسرعة ٦٠٠٠ لفة.
٥. يُنقل بحرص ٢٢٠ ميكروليترا من المادة الطافية إلى الحاويات الأولى (A) للأشرطة التي تحتوي على الحبيبات المغناطيسية والمحلول المنظم للربط (انظر: الملاحظة ١٤).
٦. يتم إدخال الشرائط في جهاز KingFisher[®]، ووضعها على حامل الشريط في الوضع الصحيح (راجع دليل استخدام الجهاز للحصول على تعليمات مفصلة).
٧. يجب استخدام البرنامج الموجود في الجهاز التالي في KingFisher[®]؛ زمن الربط في الحاوية A، ويترك لمدة 1×3 دقيقة، ثم يربط لمدة ٢ دقيقة، ويتم غسل العينات في الحاوية B لمدة ١٥ ثانية، والشطف في الحاوية C لمدة ١٥ ثانية، والفصل في الحاوية D لمدة ١٠ دقائق، وتُطلق حبيبات المغناطيس في الحاوية E (انظر: الملاحظة ١٥ و ١٦). وتفصيل البرنامج هي:
- (a) تُجمع الحبيبات: من الحاوية = A، ما قبل الخلط = لا يوجد عداد التجميع = ١.
- (b) الربط: من الحاوية = A، الترك = نعم، الزمن = دقيقة واحدة و ٠ ثانية، السرعة = خلط ثنائي سريع، زمن الربط = ٢ دقيقة و ٠ ثانية، السرعة = بطيئة، الحبيبات المُجمعة = لا يوجد، الترك = نعم، الزمن = دقيقة واحدة و ٠ ثانية، السرعة = سريعة، زمن الربط = ٢ دقيقة و ٠ ثانية، السرعة = بطيئة، جمع الحبيبات = لا، الترك = نعم، الزمن = ١ دقيقة و ٠ ثانية، السرعة = خلط ثنائي سريع، زمن الربط = ٢ دقيقة و ٠ ثانية، السرعة = بطيئة، جمع الحبيبات = نعم، عددها = ٤.
- (c) الشطف: من الحاوية = B، الترك = نعم، الزمن = ٠ ثانية، السرعة = سريعة، زمن الشطف = ١٥ ثانية، السرعة = خلط مزدوج سريع، جمع الحبيبات = نعم، عددها = ٣.
- (d) الشطف: من الحاوية = C، الترك = نعم، الزمن = ٠ ثانية، السرعة = سريعة، زمن الشطف = ١٥ ثانية، السرعة = خلط مزدوج سريع، جمع الحبيبات = نعم، عددها = ٣.
- (e) الفصل: من الحاوية = D، الترك = نعم، الزمن = ١٠ ثوان، السرعة = خلط مزدوج سريع، الزمن = ١٠ دقائق و ٠ ثانية، السرعة = بطيئة من القاع، توقيف المقبض اليدوي = لا.
- (f) إزالة الحبيبات = نعم، العدد المُجمع = ٤، حاوية الصرف = E.
٨. قبل الانتهاء من البرنامج، يتم إزالة الرف، ونقل الـ DNA المفصول من الحاوية D إلى أنبوب الطرد المركزي المُصغر ١,٥ مل مُعقم. ويُخزن في درجة حرارة 5 ± 20 مئوية حتى الحاجة إليه.

٤- الملاحظات:

١. لا يعني استخدام أسماء المواد الكيميائية أو المعدات في هذا الفصل أنها هي الأفضل، أو يتم استبعاد المواد والمعدات الأخرى. ويتم توفير هذه المعلومات لتلائم أهداف المستخدمين، ولا تُشكل أي تأكيد للمنتجات أو الخدمات. ويمكن استخدام أي من المنتجات المشابهة لها، إن ثبت أنها تعطي النتائج نفسها.
٢. قد تم اختبار عدد قليل من المطاحن وتم المزج في معملنا، ولكن لم يتم العثور -حتى الآن- على أي طريقة طحن -أو مزج- للنسيج مناسبة لنصل الورقة أو نسيج اللحاء للجذر.
٣. يجب استخدام في جميع المراحل أدوات بلاستيكية؛ ولمرة واحدة، ويجب أن تكون نظيفة وخالية من الـ DNA ase.
٤. يجب تخزين جميع المحاليل في درجة حرارة الغرفة، وينبغي أن تكون صافية عند استخدامها. وفي حالة تكون الرواسب، يتم تدفئة المحلول بلطف حتى تذوب الرواسب. ويجب أن تكون الحبيبات المغناطيسية مخلوطة تماماً قبل إضافتها، ولا يُنصح بتقليب حبيبات المغناطيس.
٥. يُمكن لجهاز الـ KingFisher® mL التعامل مع ١٥ عينة في المرة الواحدة، وتستهلك كل تشغيل شريط أنابيب واحد، يحتوي على خمس حاويات. ويتم استخدام مشط مدبب واحد يحتوي على خمسة أمشاط لمعالجة خمس عينات في الوقت نفسه. لذلك، يجب توفر ١٥ شريطاً للأنابيب، و٣ أمشاط مدببة، إن كان هناك ١٥ عينة يتم معالجتها في الوقت نفسه. وإن تم معالجة عينة واحدة في المرة الواحدة، يُفضل استخدام جهاز إنتاجيته عالية، مثل: جهاز KingFisher® Flex. وبجهاز KingFisher® Flex يمكن معالجة ما يصل إلى ٩٦ عينة في التشغيل الواحدة، ويجب توفر خمسة أطباق للحوي ٩٦، ومشط واحد مدبب بشكل ٩٦ لكل تشغيل.
٦. الطحن مع النيتروجين المسال باستخدام الهاون والمدقة:
 - (a) بعد الحصاد مباشرة، تُجمد عينة النسيج النباتي في النيتروجين المسال، مع الحرص على عدم إذابة الجليد من على العينة أثناء طحن.
 - (b) يتم تبريد المعدات قبل استخدامها؛ بصب النيتروجين المسال في الهاون، ووضع طرف مدقة الطحن في النيتروجين المسال.
 - (c) توضع عينة النسيج النباتي المجمدة في المدقة، ويتم طحنها حتى تتحول إلى مسحوق أبيض ناعم.
 - (d) يتم إضافة النيتروجين المسال، إن لزم الأمر، مع الحرص على عدم تسرب العينة من على الهاون.
 - (e) استخدام ملعقة مُبردة قبل استخدامها، لنقل حوالي ٢٠٠ مليجرام من مسحوق النسيج النباتي إلى أنبوب ٢ مل سبق تبريده. ويجب أن تتبخر كمية النيتروجين المسال بأكملها قبل غلق الأنبوب.

(f) إن لم تُعالج عينة النسيج مباشرةً، يجب وضع الأنبوب في ثلج جاف أو في نيتروجين مسال، أو حفظها في درجة حرارة -80°C حتى لا تذاب العينة. ولاستخلاص الـ DNA، يتم إضافة ٦٠٠ ميكروليتر من المحلول المنظم للفصل، وعلى الفور تستكمل طريقة الاستخلاص. الطحن في أكياس الاستخلاص.

(a) يتم وزن حوالي ١ جرام من عينات النسيج النباتي، توضع في الأكياس (على سبيل المثال: Universal-U- form، BIOREBA). وإن لم يتم معالجة الأنسجة النباتية على الفور، فيجب وضع الأكياس في درجة حرارة -20°C مدة أقصاها شهر.

(b) يُضاف ١ مل من المحلول المنظم للفصل، ويتم طحنه باستخدام جهاز الطحن (BIOREBA) Homex٦، أو مطحنة أسطوانية تطحن عينات النسيج النباتي.

(c) يُضاف ٣ مل من المحلول المنظم للفصل، ويطحن برفق على سطح الأكياس (يجب ألا يتحول المحلول المنظم إلى رغوة).

(d) باستخدام المصتات، يتم نقل حوالي ٨٠٠ ميكروليتر من المادة المخلوطة إلى أنبوب ٢ مل جديد، وتستكمل طريقة عمل في الحال.

٧. كمية مواد العينات الموصى باستخدامها ١ جم، وتسمح هذه الكمية بتقسيم العينات بشكل جيد، حيث يُعتقد أن الفيتوبلازما ليست موزعة بالتساوي.

٨. يجب تنفيذ خطوة تجهيز العينة في موقع آخر بعيداً عن الموقع المستخدم للطحن ومجانسة العينات ولاستخلاص الـ DNA ومعالجة الـ DNA. ويجب تنظيف الأسطح (باستخدام مزيل الـ DNA وبمياه نظيفة) قبل البدء، وفي نهاية كل خطوة من الخطوات؛ تجهيز العينة، والطحن، واستخلاص الـ DNA.

٩. يجب وضع الأنبوب في الثلج، ويجب نقل العينة إلى الأنبوب في الحال بعد الحصاد، ولا يجب تجميد الأنابيب في النيتروجين المسال حتى لا تتكسر، وإذا لم يتم معالجة عينات النسيج النباتي في الحال فيجب حفظ الأنابيب في درجة حرارة -20°C مدة أقصاها شهر واحد.

١٠. يجب أن يكون هناك شاهد لكل مجموعة من المجموعات. ويتم استخدام شاهد الاستخلاص لإثبات عدم تلوث العينة أثناء عملية الاستخلاص، ويجب أن تكون دائماً آخر عينة في المجموعة، ويعتبر الشاهد شاهداً سلبياً للاستخلاص. وتستخدم المحلول المنظم للفصل فقط في كافة خطوات مع العينات التي تم استخلاص الـ DNA منها. إن شاهد الاستخلاص يتم اختباره مع العينات في أي إجراءات أخرى.

١١. تعتمد مدة الطحن على النسيج الذي تم معالجته، وقد تمتد المدة حتى تختفي بقايا النسيج. وقد اكتشفنا بعد سنوات من التجارب، أنه من الصعب الحصول على خلط بنسبة ١٠٠٪، وخصوصاً إن تمت على عينات الجذور، ولكن إذا اتبعت الطرق المشروحة سيتم الحصول على كميات كافية من الـ DNA المستخلص.

١٢. شريط الأنابيب له طريقة واحدة فقط؛ إن كان هناك علامة محددة على نهاية حافة الشريط الموجود لتحديد موقع في الجهاز. وتعتبر الحاوية A هي أقرب حاوية من نهاية الحافة، وبعدها الحاوية B، C، D، وأبعد حاوية هي الحاوية E.
١٣. لا يتم دفع الأمشطة المدببة للداخل حتى الشعور بصوت (click). وهذا يضمن أن المشط في الوضع الصحيح، وإن لم يتم ترتيب الأمشاط في خط مواز للقضبان المغناطيسية لن تعمل الآلة بشكل صحيح، وقد تؤدي إلى توقف الآلة نهائياً.
١٤. يجب الحرص على وضع علامة واضحة على كل شريط برقم / مُسمى للعيينة المحددة التي سيتم استخلاصها في هذا الشريط، ومن السهل وضع رقم على نهاية حافة الشريط، ويجب استخدام قلم دائم. وإذا تم استخدام جهاز KingFisher® Flex يجب وضع ملحوظة حول مخطط أماكن العينة في طبق يحتوي على ٩٦ حفرة (طبق الإليزا).
١٥. أثناء جمع الحبيبات المغناطيسية، يكون القضب المغناطيسي بأكمله داخل الحافة، وتتحرك القضبان المغناطيسية مع المشط أو الأمشطة المدببة لأعلى ولأسفل ببطء في الحاويات، ويتم تجميع الحبيبات من على جدار الحواف، ويمكن رفع القضبان المغناطيسية والمشط -أو الأمشطة المدببة- بعد تجميعها للحبيبات المغناطيسية من الحاويات، ونقلها إلى الحاوية التالية التي تحتوي على المادة الكاشفة. وتقع الحبيبات المغناطيسية عند تحريك المشط -أو الأمشطة المدببة- لأعلى ولأسفل بسرعة عدة مرات؛ حتى تختلط كل الحبيبات بالمادة في التفاعل التالي. إن عملية الغسيل عبارة عن مجموعة من عمليات التجميع في الحاويات المملوءة بمحلول الغسيل.
١٦. يمكن أيضاً -يدويًا- استخدام على سبيل المثال: PickPen® (Bio-N obile)، أو أي أنظمة أخرى متاحة.

المراجع:

1. Boben J, Mehle N, Ravnika M (2007) Optimization of extraction procedure can improve phytoplasma diagnostics. Bull Insectol 60:249–250
2. Nikolić P et al (2010) A panel of real-time PCR assays for specific detection of three phytoplasmas from the apple proliferation group. Mol Cell Probes 24:303–309
3. Pirc M et al (2009) Improved fire blight diagnostics using quantitative real-time PCR detection of *Erwinia amylovora* chromosomal DNA. Plant Pathol 58:872–881

استخلاص الـ DNA من الأنواع النباتية أحادية الفلقة، ومعالجة التحديات مع العوائل النباتية الأخرى

Nigel A. Harrison, Robert E. Davis, and Ericka E. Helmick

ملخص:

إن تجارب الكشف عن الـ DNA المسبب للأمراض بتفاعل بوليمر المتسلسل (PCR) من أكثر الطرق استخداماً لتشخيص أمراض الفيتوبلازما. وتُمثل عملية الكشف عن الفيتوبلازما الفعالة والمُثبتة - خاصة في النباتات الخشبية التي تعيش لأكثر من سنتين - تحدياً صعباً بسبب قلة الفيتوبلازما بشكل غير عادي، وتوزعها غير المنظم داخل الأنسجة العائل المصابة. وإلى حد كبير، يعتمد نجاح عملية اكتشافها على أنواع العوائل وإجراءات أخذ العينات، وبدرجة أقل على الطريقة المستخدمة للكشف عن الفيتوبلازما. ونُناقش في هذا الفصل، طرقاً بسيطة واضحة وغير مُدمرة لأخذ العينات من الساق لإثبات إصابة النباتات أحادية الفلقة والنخيل بالفيتوبلازما. وتتطلب هذه الطرق الحد الأدنى من الأنسجة من النباتات، واستخلاص DNA الفيتوبلازما بكميات معقولة لإجراء عملية الكشف بتجارب nested PCR.

الكلمات المفتاحية: استخلاص الـ DNA، النخيل، الفيتوبلازما، أنسجة الساق، النباتات الخشبية.

١- المقدمة:

إن اكتشاف أمراض الفيتوبلازما وتشخيصها يقوم - في الأساس - على اختبار الـ DNA الفيتوبلازما؛ من خلال تجارب تفاعلات البلمرة المتسلسل (PCR)؛ والتي تتطلب أحماضاً نووية، أو تجهيز الـ DNA من النباتات المصابة لإجراء هذه الاختبارات. ويُعتبر الكشف عن الفيتوبلازما التي تُصيب النباتات الخشبية المعمرة من أكثر الاختبارات صعوبة. ويرجع ذلك، إلى تركيزاتها المنخفضة، وتوزيعها غير المنظم داخل النسيج العائل (١-٤). وقد يتأثر أيضاً نجاح عملية الاكتشاف بعوامل أخرى، مثل: التقلبات الموسمية لتعداد الفيتوبلازما الموجودة داخل النباتات المصابة، ويتأثر -

أيضاً- بأنواع عوائل معينة -أعضاء النبات-، أو الأنسجة التي تم اختيارها لإجراء الاختبار (٤-٨). وتُعد القرارات التي تدور حول: (كيف، ومكان، وزمان) أخذ العينات من النباتات من الاعتبارات المهمة أثناء الدراسة في الحالات المشتبه بها لأمراض الفيتوبلازما.

ولا توجد طريقة عامة لأخذ العينات يمكن تطبيقها على كافة الأنواع النباتية بالكفاءة نفسها (٩، ١-١٣). وعادةً ما يتم العثور على الفيتوبلازما -بشكل كبير- في الأنسجة الغنية كالأوعية واللحاء. وهذا يشتمل على: قواعد الأوراق التي تنمو منها الأزهار، والجذور الصغيرة للنباتات أحادية الفلقة (٣، ١٤-١٦)، والبراعم، والقمم النامية الحديثة، وعنق الأوراق، ونصل الأوراق، وأعناق الأزهار، والنشارة الخشبية، أو جذور النباتات الخشبية ثنائية الفلقة (١، ٥، ٧، ٩، ١٧، ١٨). ومن ضمن الاستراتيجيات المقترحة هي جمع عديد من العينات لكل نوع من أنواع الأنسجة من النبات العائل نفسه المصاب على فترات زمنية مختلفة أثناء موسم النمو، ويوصى بهذه الاستراتيجية للتعويض عن عدم ثبات تركيز المسبب المرضي وتوزيعه (١، ١٠، ١٣).

قد تم إعداد مختلف الطرق للحصول على الـ DNA من الأنسجة المصابة بالفيتوبلازما المناسبة للاختبار بالـ PCR (١٧-٢٢). وغالباً ما يتم إجراء الكشف عن المسببات المرضية، بالنسبة لعديد من الأنواع النباتية، في استخلاص الـ DNA الكلي (total DNA) المُستخرجة - بشكل مباشر- من الأنسجة العائلة حديثة الإصابة، المُجمدة أو المحفوظة بعد عملية الطحن للأنسجة مع محلول مُنظم للاستخلاص؛ حيث يحتوي على مواد قوية، ومضادات للأوكسدة، ويولي فاينيل بيرليدون (polyvinylpyrrolidone PVP) لتركيب البوليفينول النباتي (٢٠، ٢١). ويسبق - غالباً- عملية استخلاص الـ DNA، بالنسبة للعوائل الصعبة التي تكون نسبة نجاح عملية الكشف بها غير مؤكدة، وخطوة التخصيب (١٧، ٢١، ٢٣) لزيادة نسبة DNA الفيتوبلازما، وفي الوقت نفسه تقليل -أو إزالة- الـ DNA للنبات العائل، والمكونات النباتية الأخرى (مثل: السكريات والأبيض الثانوية) في الخطوات النهائية. ويوصى بتجهيز خطوة التخصيب للأنسجة الحديثة فقط، وقد تحتاج إليها مع بعض أنواع النباتات بإدخال تعديلات مثل: خطوة التحضين مع بيروتينيز K (٨)، أو عمل التخصيب في درجة حرارة 25°C (٤) بدلاً من 4°C، كما هو موصى به (١٧) للحصول على الـ DNA بالتنوع والجودة المطلوبة. وتعتبر خطوة التنقية الأخيرة لتجهيز الـ DNA التي تتم باستخدام مواد تجارية مُصممة خصيصاً لهذا الغرض قبل تحديد التركيز، ولاستخدام الـ DNA في اختبار الـ PCR.

وغالباً ما يعتمد تشخيص مرض فيتوبلازما الاصفار القاتل -والأنواع الأخرى القاتلة المشابهة له التي تُصيب النخيل- على أخذ عينة للنسيج من على قمة الجذع واختبارها (٤). ولأنه نادراً ما يقاوم النخيل الصغير هذه الأمراض، فإن تأثير المرض على النخيل واضح ومرتفع جداً؛ والذي يجب إسقاطه حتى تسهل عملية الحصول على تلك الأنسجة. ونادراً ما تكون هذه الطريقة لأخذ العينات ممكنة في معظم مناطق المدن والضواحي، وغير عملية خاصة عندما يكون عدد كبير من النخيل مصاباً. والطريقة التالية لأجل الكشف عن المسببات المرضية في أنسجة الساق أو

الجدع باختبار الـ PCR المتداخلة (nested PCR) تعتبر طريقة استراتيجية بديلة وفعالة وذات كفاءة عالية، ونقوم باستخدامها (٣، ١٦، ٢٧)، وتستخدمها أيضا باحثون آخرون، وأثبتت نجاحها في الكشف على إصابة النخيل بأمراض الفيتوبلازما.

٢- المواد:

١-٢: معدات أخذ العينات:

١. وحدة نظام تحديد المواقع GPS محمولة، مثل: Garmin etrex Legend.
٢. كاميرا رقمية، مثل: كاميرا Olympus Stylus Tough، ١٠ ميجابيكسل.
٣. حفار آلي محمول ببطاريات يمكن شحنها مرة أخرى، مثل: DeWalt DC720، 18 V.
٤. حفار لأغراض متعددة الاستخدام، قطره (8 mm) 16th in.، وطوله (6.5 in 16.5 cm).
٥. موقد نار محمول.
٦. قطع خشبية بطول 2-4 in. 95-10 cm) of 3/8 in.
٧. مطرقة صغيرة.
٨. أكياس بلاستيكية محكمة الغلق نظيفة (حجم ١ لتر).
٩. قارورة بلاستيكية مملوءة بماء مقطر.
١٠. مبرد محمول داخله ثلج مسحوق.

٢-٢: مكونات المحلول المنظم لاستخلاص الـ DNA:

يتم إعداد كافة المحاليل بماء مقطر أو منزوع الأيونات، ما لم يُحدد خلاف ذلك. ويجب الحرص على اتباع كافة التعليمات الخاصة بالتخلص الآمن للمواد المتبقية أو المحاليل.

١. المحلول المنظم لاستخلاص الـ DNA: 2% CTAB، 100mM Tris-HCl، pH 8.0، 1.4 M NaCl، 20 mM EDTA، pH 8.0، 1% PVP-40، 1% 2-mercaptoethanol. في البداية، يتم تجهيز المحلول المنظم EDTA 0.5 M؛ وذلك بإضافة 186.1 جم من disodium EDTA·2H₂O إلى ٨٠٠ مل ماء مقطر، ويُقلب جيدا بجهاز التقليب المغناطيسي، ويتم ضبط الـ pH على ٨.٠ بهيدروكسيد الصوديوم NaOH (20~ جراما من حبيبات NaOH)، وتقدر الكمية بـ ٢٠ واحد من الماء، ويتم تعقيم المحلول المنظم بجهاز التعقيم عند درجة حرارة 121°C لمدة ٢٠ دقيقة. يُجهز محلول 1M من المحلول المنظم للتحضين (Tris buffer)؛ حيث يتم إذابة ١٢١.١ جم من الترس القاعدي في ٨٠٠ مل من الماء المقطر، وتضبط pH المحلول على ٨.٠ بإضافة 42~ مل من الـ HC المركز، وتضبط كمية المحلول المنظم على ١ لتر بالماء، ويُعقم بجهاز التعقيم لمدة ٢٠ دقيقة، ويتم تخزين المحاليل المنظمة في درجة حرارة الغرفة، ويتم إعداد

المحلول المنظم لاستخلاص الـ DNA بإضافة المكونات التالية إلى ٦٠٠ مل من الماء المقطر، ومع تحريكها يضاف ١٠ جم من PVP-40 (في حالة السائلة)، ١٠٠ مل من 1 M المحلول ترس درجة حموضته pH 8.0، و ٤٠ مل من 0.5 M EDTA بدرجة حموضة pH 8.0، و ٨١.٨ جم من NaCl. ويتم صب المحلول المنظم للاستخلاص في قارورة زجاجية (Pyrex) مدرجة، ويضاف ٢٠ جم من الـ CTAB (hexadecyltrimethylammonium bromide)، وتضبط كمية المحلول المنظم على ١ لتر بالماء. وتُغطى القارورة، ويُرج محتوها لفترة قصيرة، وبعدها يُعقم بجهاز التعقيم لمدة ٢٠ دقيقة. وبمجرد وصول المحلول إلى درجة حرارة الغرفة، يتم وضع القارورة في كباين خاصة، ويضاف ١٠ مل من ٢- ميركابثوثانول (2-mercaptoethanol)، ويخزن المحلول المنظم على درجة حرارة الغرفة.

٢. الكلوروفورم: الكحول الأيزواميلي (Chloroform:isoamyl alcohol) (24:1 v/v): ١٩٢ مل من الكلوروفورم، و ٨ مل من الكحول الأيزواميلي. ويحفظ الخليط في قارورة زجاجية بنية اللون نظيفة في كباين خاصة عند درجة حرارة 25°C.

٣. بروبانول (2-propanol): والمعرف - أيضاً - باسم الأيزوبروبانول.

٤. ٩٥٪ من الإيثانول.

٥. ٧٠٪ من الإيثانول.

٦. محلول منظم TE، 50 mM tris، pH 8.0، 5 mM EDTA، pH 8.0. إلى ٩٤ مل من الماء المقطر، ويضاف ٥ مل إلى 1 M من محلول ترس المنظم على درجة حموضته pH 8.0، و ١ مل من المحلول المنظم EDTA ٠.٥M درجة حموضته pH 8.0. ويعقم بجهاز التعقيم لمدة ٢٠ دقيقة، ويخزن على درجة حرارة 25°C.

٧. المحلول المنظم TE: 10 mM Tris، 1 mM EDTA، 1 M NaCl، pH 8.0. يتم إذابة ٢٩.٢٢ جم من NaCl في ٢٥ مل من الماء المقطر، ويضاف ٥ مل من 1 M محلول ترس المنظم بدرجة حموضة pH 8.0، و ١ مل من 0.5 M محلول منظم EDTA درجة حموضته pH 8.0، وتضبط الكمية على ٥٠٠ مل بالماء. وبعدها، يُعقم بجهاز التعقيم لمدة ٢٠ دقيقة، ويُخزن على درجة حرارة 25مئوية.

٨. أنابيب طرد مركزي Oak Ridge من البولي بروبلين مقاس ٥٠ مل.

٩. أنابيب من البولي بروبلين Falcon مقاس ١٥ مل معقمة.

١٠. محلول DNA-OFF (Inc، Clontech Laboratories).

١١. حمام مائي درجة حرارته ثابتة عند 65°C.

١٢. جهاز طرد مركزي عالٍ بزوايا دوران ثابتة مقاس ٦٠٠٠، مثل: Sorvall Legend Mach 1.6.

١٣. نظام غسيل الـ DNA من شركة (Promega).

٣-٢: مكونات الجل الكهربائي:

١. المحلول المنظم لإسيتات ترس $50\times$ (Tris-acetate TAE): يذاب ٢٤٢ جم من ترس القاعدي في ٥٠٠ مل بالتحريك السريع، ويتم إضافة ١٠٠ مل من 1M للمحلول المنظم EDTA ٠,٥M، pH 8.0، و١,٥٧ مل من حمض الخليك. وتُضبط الكمية على 1 M بالماء، وتُخزن على درجة حرارة 25°C .
٢. ١٪ من جل الأجاروز: يُضاف ١ جم من الأجاروز المعد للاستعمال البيولوجي (low EEO/ multipurpose) و١٠٠ مل من ١:٥٠ مادة التخفيف لـ $50\times$ TAE من المحلول المنظم، وتوضع في قارورة زجاجية ٢٥٠ مل، ويتم وزن القارورة ومحتوياتها، وتغطى القارورة بكأس زجاجي ١٥٠ مل مقلوب، وتُسخن في المايكرويف حتى يُذاب الأجاروز تماما. ويجب ارتداء قفازات واقية لحمل القارورة. ويتم وزن القارورة ومحتوياتها مرة أخرى، وإذا كان الوزن أقل يعوض فرقه بإضافة ماء مقطر.
٣. المحلول المنظم لتحميل الجل: ٠,٢٥٪ من البروموفينول الأزرق (bromophenol blue): ٠,٢٥٪ من FF زيلين السيانول (cyanol FF xylene)، و ١٥٪ من الفيكول في ماء (Ficoll in water)، ويُخزن على درجة حرارة 25°C .
٤. محلول بروميد الأيثيديوم (EtBr)، (10 /mL) : ١ جم من بروميد الأيثيديوم في ١٠٠ مل من الماء المقطر، ويُخزن المحلول في قارورة زجاجية ٢٥٠ مل غامقة اللون من البولي بروبيلين، على درجة حرارة 25°C (انظر: الملاحظة ١).
٥. خزان الهجرة الكهربائي لجل الأجاروز، مثل: Bio-Wide Mini-Sub Cell GT System (Rad).
٦. معلمات الوزن الجزيئي لحمض الـ DNA، مثل: *HindIII*-digested phage lambda DNA.
٧. نظام الفصل الكهربائي الرأسي لجل البولي أكريلاميد (Polyacrylamide gel)، مثل: للجل $16 \times 14 \times 0.08$ cm.
٨. المحلول المنظم لبورات الترست (TBE) EDTA : ٥٤ جم من ترس القاعدي، و ٢٧,٥ جم من حمض البورك، و ٢٠ مل من 0.5 M EDTA، بدرجة حموضة 8.0 pH، ثم يُضاف إلى ٧٠٠ مل من ماء المقطر. ويتم تقلبيها بسرعة حتى تذاب المكونات، ويتم ضبط الكمية الأخيرة إلى ١ لتر بماء مقطر.
٩. تحضير محلول البولي أكريلاميد: ٢٩٪ أكريلاميد، ١٪ *N,N'*، والمثيلين الشائي (*NN*-methylene bisacrylamide). ويُضاف ٢٩ جم من الأكريلاميد، و ١ جم من سكريلاميد المثيلين الشائي إلى ٥٠ مل من الماء المقطر، ويتم تسخين المحلول حتى تصل درجة الحرارة إلى 37°C ، مع التقليب المستمر حتى إذابة المواد الكيميائية، وتضبط الكمية على ١٠٠ مل

بالماء المقطر، ويُخزن المحلول في زجاجة من البولي بروبيلين غامقة اللون على درجة حرارة 4 مئوية (انظر: الملاحظة ٢).

١٠. معلمات للـ pGEM -DNA من شركة (Promega)

١١. جهاز transilluminator بالأشعة فوق البنفسجية.

١٢. نظام توثيق الجل، مثل: Kodak EDAS 290.

٢-٤: المكونات لاختبار للـ PCR:

يتم تجهيز كافة المحاليل بماء من درجة عالية من النقاوة، مفلترة ومعقمة، ما لم يُذكر خلاف ذلك.

١. إنزيم *Taq* للبلمرة DNA (Taq DNA polymerase)، U/ 5م مع محلول منظم لتفاعل البلمرة $\times 10$.

٢. محاليل 100 mM dNTP.

٣. أنابيب صغيرة معقمة، حجمها ٠,٢ مل خاصة للـ PCR.

٤. جهاز لتفاعل البلمرة المتسلسل، مع قابلية للبرمجة بغطاء تسخين، مثل: PTC-100 (MJ Research, Inc.).

٥. مقياس لقياس تركيز للـ DNA، مثل: Qubit™ (Invitrogen).

٦. نظام تنقية ناتج الـ PCR من شركة (Promega).

٣- طرق العمل:

٣-١: أخذ عينات من الجذوع (شكل ١):

١. يتم تثبيت مثقاب متعدد الأغراض على مثقاب كهربائي لاسلكي (انظر: الملاحظة ٣)، وتعقم نهايته بموقد اللهب، وبعدها تبرد بقليل من الماء المقطر.

٢. تبدأ عملية أخذ العينات؛ عن طريق حفر حفرة تجريبية صغيرة في الساق السفلي لإزالة الطبقة الخارجية من الليف الخشبية، ويتم التخلص من تلك الأنسجة (انظر: الملاحظة ٤).

٣. يُستكمل ثقب الفتحة التجريبية بشكل تدريجي حتى يصل عمقها النهائي إلى 15 cm، يتم بعدها الوصول إلى الجذع الداخلي أثناء حركة الحفر بالمثقب للإمام وللخلف حتى تخرج النشارة، ويتم تجميع النشارة دون توقف، ثم يتم وضعها في كيس ثلاجة بلاستيكي نظيف يمكن غلقه، ويكون على بعد قريب من حافة فتحة الحفرة (انظر: الملاحظة ٥).



شكل (١): أخذ عينات من جذوع النباتات أحادية الفلقة الكبيرة لتشخيص أمراض الفيتوبلازما بواسطة حمض الـ DNA. (a) الأدوات الأساسية التي تُستخدم لإزالة العينات من الأنسجة الداخلية لجذع النخيل، ومن النباتات الأخرى أحادية الفلقة. (b) نشارة الخشب من الفتحة التجريبية الخارجية التي تم حفرها تعتبر مصدراً محتملاً لعينات من الميكروبات غير المستهدفة، ويجب التخلص منها. (c) تجمع العينات الجذعية الداخلية، وتوضع في حقيبة بلاستيكية نظيفة يمكن غلقها، ويجب وضع ورقة تحمل مواصفات العينة، وتُخزن في البراد ومعها تلج حتى لا يتغير لون النسيج أثناء نقله إلى المعمل. (d) يمكن الحصول على ما لا يقل عن ٣ جم من النشارة؛ بحفر حفرة عمقها ٦ إنش؛ باستخدام مثقب طوله ٦,٥ إنش (5 / 16th dia). (e) عادة، تلتصق بقايا أنسجة الجذع بثنايا المثقب بعد إزالة عينة جذع النخيل. (f) يمكن غسل الأنسجة من على المثقب بسهولة؛ ببخ قليل من الماء الموجود بزجاجة. (g) من الضروري، تعقيم المثقب باللهب، ومن ثم تبريده بالماء قبل أخذ عينة من النخيل الثاني؛ لتنظيف المثقب من أي DNA عالق به من عينة النخيل الأول. (h) يجب إحكام غلق الفتحات التي أخذت منها العينات بقطعة من الخشب لمنع خروج العصارة من الجذع، وللإشارة بأنه تم أخذ عينة من النخيلة. (i) يُفضل استخدام مثقب حفر خشبي طوله ٩ إنش مع جذوع النخيل المحاطة بأوراق قديمة أو بطبقة سميكة من النباتات.



تابع شكل ١.

٤. بمجرد الانتهاء من أخذ العينة (انظر: الملاحظة ٦)، يمكن غلق الجذع -إن لزم الأمر- بدق قطعة الخشب في الفتحة. وبهذا، يتم منع خروج كثير من العصارة، ويكون ذلك حاجزاً لمنع دخول الآفات من خلال الفتحة.
٥. يتم استخدام الماء لغسل الأنسجة المتبقية من على مثقاب الحفر، ويُعقم المثقاب باللهب، ويُبرد مرة أخرى قبل أخذ أي عينة من نخيل آخر.
٦. يتم توثيق موقع العينات (باستخدام نظام تحديد المواقع GPS)، وأخذ صور لكل نوع من أنواع النخيل؛ والتي تم أخذ عينات منها. وتُخزن العينات في مبرد أثناء عملية الجمع من الحقل، على درجة حرارة 4°C ، لمدة أقصاها ٢٤ -٤٨ ساعة قبل التعامل معها في المعمل (انظر: الملاحظة ٧).

٢-٣: استخراج DNA العينة:

١. يتم إضافة ٣ جم من عينة الأنسجة في أنبوب معقم من نوع Oak Ridge tube (انظر: الملاحظة ٨) مع ١٥ مل من المحلول المنظم لاستخلاص الـ CTAB. وبعدها، يغلق الأنبوب ويرج، ويوضع

1. الأنبوب في حمام مائي درجة حرارته 65°C لمدة 30 دقيقة، وتُرج محتويات الأنبوب عدة مرات خلال فترة الحضانة (انظر: الملاحظة ٩).
2. يتم إزالة الأنبوب من الحمام المائي، ويترك حتى يبرد ويصل إلى درجة حرارة 25°C قبل إضافة 15 مل من كحول الأيثيل/ الكلوروفورم، ويغطي الأنبوب بإحكام، ويُرج بسرعة لمدة 5-10 ثوان حتى يستحلب المحتوى.
3. يوضع الأنبوب بالطرد المركزي بسرعة 10000 لفة لمدة 15 دقيقة عند درجة حرارة 25°C ؛ وذلك لاستخلاص بقايا الأنسجة الميتة في قاع الأنبوب، وتُنقل الطبقة العليا للسائلة إلى أنبوب أخرى معقم Oak Ridge باستخدام المصحات الخاصة للاستخدام الواحد.
4. تُكرر الخطوة 2 و3 مرة أخرى.
5. تُنقل الطبقة السائلة إلى أنبوب Oak Ridge معقم آخر، ويُضاف إليه 10 مل من 2- بروبان، ويغطي الأنبوب ويُقلب بالعكس عدة مرات لمزج محتواه، ويوضع الأنبوب في حضانة درجة حرارتها 25°C لمدة 30 دقيقة (انظر: الملاحظة 10).
6. يوضع الأنبوب بالطرد المركزي بسرعة 10000 لفة لمدة 10 دقائق لترسيب الأحماض النووية. وبالماسة ويحرص يتم إزالة 2- بروبان دون المساس بالحمض النووي الواضح، ويُضاف من 1 إلى 3 مل من المحلول المنظم TES لإعادة ترسيب الراسب.
7. يُنقل محلول الحمض النووي إلى أنبوب طرد مركزي معقم من البولي البروبيلين للاستخدام الواحد حجمة 15 مل، ويتم إضافة كمية تصل إلى 2,5 من الأثينول 95%. يُغطي الأنبوب، ويُقلب بالعكس لعدة مرات لخلط محتواه بلطف، ويتم ترسيب الحمض النووي بالطرد المركزي بسرعة 10000 لفة لمدة 10 دقائق.
8. يتم إزالة السائل بحرص لفترة يتم غسيل الرواسب الظاهرة بإضافة 0,5 مل من الأثينول 70% إلى الأنبوب، ثم الطرد المركزي بسرعة 10000 لفة لمدة 2 دقيقة، ويزال الأثينول، ويُقلب الأنبوب بالعكس حتى يجف الراسب عن طريق بالهواء لمدة 15 دقيقة، ويتم إعادة ترسيبه في 200 مل من المحلول المنظم TE درجة حموضته pH 8.0 (انظر: الملاحظة 11).
9. يتم تنقية 50 مل من عينة الحمض النووي الخام المراد اختبارها في عمود تنقية الطرد المركزي، ويتم إزالة DNA من على العمود، ويتم وضعه في 50 ميكروليترا من الماء النقي الدافئ (65 درجة مئوية) والمعقم، أو في محلول منظم TE درجة حموضته pH 8.0.
10. يجب قياس تركيز كل عينة DNA منقاة بمقارنتها بكمية محددة من الـ DNA الجيني (مثل: lambda phage DNA)؛ باستخدام معيار جل الفصل الكهربائي، أو من خلال مقياس الضوء الطيفي (A 260)، أو بالمقياس الفلوري (fluorometry).

٣-٣: تحليل الـ PCR:

- انظر الفصول: (١٤، ١٥، ١٦، ١٧): لمزيد من التفاصيل.
١. كل ٥٠ ميكروليترا من خليط الـ PCR يتم إضافة ٥٠-١٠٠ ميكروجرام له من عينة الـ DNA.
 ٢. تُخلط المحاليل المناسبة لـ PCR إلى التركيز النهائي لـ 10 mM Tris-HCl ، 50 mM KCl ، 15 mM MgCl₂ ، 200 mM لكل NTP ، ٠,١٥ ميكروليتر لكل بادي، 1.25 U Taq DNA polymerase ، وماء فائق النقاء معقم (انظر: الملاحظة ١٢).
 ٣. بعد ٣٥ دورة من الـ PCR ، يتم عمل الفصل الكهربائي لـ ١٠ ميكروليترات من كل خليط تفاعل نهائي؛ من خلال ١٪ من جل الأجاروز؛ باستخدام 1× TAE.
 ٤. يتم صبغ النتائج من الـ PCR عن طريق وضع الجل في ٥ ميكروجرام/ مل من محلول الـ EtBr لمدة ٥ دقائق، ويتم إزالة لون الجل بوضعة في ١ لتر من الماء المقطر لمدة ١٥ دقيقة.
 ٥. يتم تصوير النتائج من الـ PCR بالأشعة الضوئية فوق البنفسجية للجل، وتُسجل النتائج.
 ٦. بالنسبة لتجارب الـ PCR المتداخلة (nested PCR)، يتم تجهيز ١٠:١ لتخفيف كل مادة ناتجة من الـ PCR بماء معقم نقي جداً، ويتم استخدام ٢ ميكروليتر من كل مادة تخفيف قالباً أثناء الـ ٣٥ دورة؛ لإعادة البلمرة مع البادئات الخاصة بالاختبار.
 ٧. تكرر الخطوات من ٣ إلى ٥ بالمواد الناتجة من الـ PCR المتداخل.

٣-٤: تحديد الفيتوبلازما:

- انظر الفصول: ١٤، ٢٧، ٢٨؛ لمزيد من التفاصيل.
١. لتحديد الـ rDNA من النخيل المصاب بالفيتوبلازما، يتم خلط ٥ ميكروليترات من كل مادة من ناتج الـ PCR المتداخل ب ٨ ميكروليترات من الماء المقطر المعقم، و ٠,٥ ميكروليتر (5 U) من إنزيمات الهضم (إنزيمات القطع) (انظر: الملاحظة ١٣)، و ١,٥ ميكروليتر من 10× محلول منظم الإنزيمي. يُوضع الخليط في حضانة درجة حرارتها معتدلة ومناسبة لإنزيم الهضم (غالباً ما تكون في درجة حرارة 37°C).
 ٢. يتم إضافة مزيد من إنزيمات الهضم بمقدار ٠,٥ ميكروليتر (5 U)، ومعها محلول منظم إنزيمي 10× و ٤ ميكروليترات من الماء المعقم إلى كل إنزيم. وتستمر فترة التحضين أربع ساعات، قبل إضافة ٢ ميكروليتر من محلول منظم تحميل الجل 6×.
 ٣. يتم تحميل نصف الكمية (١١ ميكروليترا) من كل إنزيم على جدار جل البولي إكريلاميد طبيعي ٨٪، ويتم فصل كل تفاعل من خلال الفصل الكهربائي ٢٥٠ فولتا؛ باستخدام المحلول المنظم 1× TBE.

٤. تصبغ أجزاء الـ DNA؛ بوضع الجل في ٠,٥ ميكروليتر/ مل من محلول EtBr لمدة ١٥ دقيقة، ويتم إزالة الصبغة بالماء لمدة ١٥ دقيقة، وتُصور أجزاء الـ DNA بجهاز تصوير ضوئي بالأشعة فوق البنفسجية UV، ويتم حفظ الصور والمعلومات الخاصة بالتفاعل.
٥. يجب تنقية نتاج الـ PCR المتبقية باستخدام مواد تجارية مناسبة (مثل: Wizard PCR Preps) مُصممة خصيصاً لهذا الغرض. وبعدها، يتم تحديد التسلسل الجيني للتفاعل المتبقي وكميته (انظر: الملاحظة ١٤).

٤- الملاحظات:

١. تعتبر مادة الـ EtBr من المواد المتغيرة القوية السامة بدرجة معتدلة، ويجب ارتداء قفازات عند التعامل مع المحاليل التي تحتوي على هذه الصبغة.
٢. يُعد مركب الأكريلاميد ساماً من السموم العصبية القوية؛ والذي يمتصه الجلد. والأكريلاميد له تأثير متراكم، ويجب ارتداء قفازات مناسبة وقناع عند وزن مسحوق الأكريلاميد وميثيلين البيساكريلاميد، أو عند التعامل مع محاليل هذه المواد الكيميائية. والبولي أكريلاميد يعتبر من المركبات غير السامة، ولكن يجب التعامل معه بحذر؛ لأنه قد يحتوي على كميات صغيرة من الأكريلاميد غير المبلر.
٣. يمكن استخدام دعامة نجار أو مثقب الحفر اليدوي بدلاً من الحفار الكهربائي اللاسلكي.
٤. الطبقة الخارجية الميتة من القشرة يختلف سُمكها حسب عمر النخيل وحالته ونوعه، وقد تكون هذه الأنسجة الميتة في مصادر الـ DNA البكتريا الإيجابية الجرام؛ والتي قد تتداخل في نوعية اختبارات الـ PCR التي تضم أزواجاً من البادئات لجين الـ rRNA العام للفيتوبلازما.
٥. بالنسبة لجوز الهند أو النخيل العائل الذي يحتوي على الحد الأدنى من القشرة، يتم ثقب فتحة عمقها ١٥cm لتوفير ما لا يقل عن ٣ جم من نشارة الجذع. وبالنسبة للنخيل الذي ينمو ببطء مثل: *Sabal palmetto*، يحتفظ ببقايا الأوراق التي تتصل بالجذوع لعدة سنوات، ثم تسقط الأوراق المنخفضة بشكل مفاجئ. وقد يحتاج هذا النوع إلى استخدام مثقاب حفر من نوع (auger)، ويجب أن يبلغ طوله ٢٠ سم على الأقل لاستخلاص كميات كافية من عينات أنسجة الجذع الداخلية، وتنتج هذه العينات كميات من الـ DNA تكفي لتحقيق أهداف التشخيص والحفظ للمستقبل.
٦. الحزم الوعائية للفلقة الواحدة تكون حساسة لاختبارات الـ PCR المتدخلة؛ حيث إن أخذ العينات تكون من نقطة واحدة من النخيل، ولا تتأثر عملية الكشف بالعوامل المسببة للأمراض بالموقع الذي أخذ منه عينات النخيل. إن الحصول على الأنسجة من الجذع الرئيسي أمر مطلوب من الناحية التجميلية بالنسبة لنخيل الزينة المزروع في الحدائق الذي قد يكون مُصاباً.

٧. العينات التي يتم شحنها في خلال ٢٤ ساعة بعد الحصاد عن طريق الشحن السريع إلى المعامل لإجراء التجارب التشخيصية عليها لا تظهر بها أي أعراض للإصابة بسبب نمو ملوثات ميكروبية ثانوية، أما العينات التي يتم شحنها من مواقع بعيدة، وتحتاج إلى وقت سفر طويل حتى تصل إلى المعامل التشخيصية فيجب حفظها عن طريق غمرها في محلول منظم للاستخلاص CTAB.
٨. يتم إعادة استخدام أنابيب الـ Oak ridge لعمليات استخلاص الـ DNA. وبين كل استخلاص وآخر، يجب معالجة كل أنبوب بمحلول DNA-OFF؛ وذلك وفقاً لتوصيات المصنعين لإزالة أي آثار لأحماض الـ DNA الملوثة. ويجب غسل كل الأنابيب وأغطيتها بماء مقطر، وتغييره من مرتين إلى ثلاث مرات. ويجب أن تجفف، وتجمع الأنابيب، ومن ثم تُعقم بجهاز التعقيم لمدة ٢٠ دقيقة.
٩. ليس من الضروري طحن نشارة الأنسجة الجديدة بالهون والمطرقة؛ لأنها لن تؤدي إلى أي زيادة ملحوظة في ناتج الـ DNA.
١٠. قد لا تظهر خيوط الحمض النووي في المحلول عند هذه المرحلة، برغم تعكر الخليط بشكل ملحوظ.
١١. يجب تخزين الأنابيب في درجة حرارة 4°C لما لا يقل عن ساعتين أو طوال فترة الليل، وذلك لإعادة ترسيب الحمض النووي. وقد تكون هناك حاجة للسحب البطيء لمحتوى الأنبوب بممصات معقمة؛ للاستخدام الواحد من البولي بروبيلين لإعادة الترسيب الكامل للحمض النووي.
١٢. يمكن النجاح في الكشف عن الفيوتوبلازما القاتلة التي تُصيب النخيل، وتؤدي إلى اصفرار الفروع من خلال اختبار الـ PCR التي تعتمد على المجموعة المحددة للفيوتوبلازما؛ باستخدام بادئات متخصصة بدلاً من الفيوتوبلازما التي تستخدم زوجاً من البادئات العامة لجين الـ rRNA. وقد تؤدي البادئات الأخيرة إلى تفاعل الـ rDNA من البكتيريا غير المستهدفة الموجودة في أو على أنسجة جذع النخيل. ويعتبر تحديد التسلسل الجيني الناتج من الـ rDNA المشتقة من النخيل المصاب أمراً ضرورياً لتشخيص الأمراض التي لا لبس بها.
١٣. غالباً ما يكون التحليل والمقارنة نتيجة تفاعل الإنزيمات الناتجة عن هضم كل ناتج الـ PCR بأنزيمات الـ *AluI*، *DdeI*، *HhaI*، *HinfI*، *MseI* كافياً للتحديد الشامل لكل مجموعات فيوتوبلازما النخيل وسلالات الأنواع الفرعية.
١٤. يمكن النجاح في عمل تسلسل جيني مباشر من ناتج الـ PCR بعد تنقيته بالبادئات نفسها التي تم استخدامها أثناء تفاعل الـ PCR، ويمكن مقارنة التسلسل الجيني المتحصل عليه ومطابقته بسلاسل نيوكليوتيدات الفيوتوبلازما الأخرى المحفوظة في قاعدة بيانات GenBank.

1. Boudon-Padieu E et al (2003) Grapevine yellows: comparison of different procedures for DNA extraction and amplification with PCR for routine diagnosis of phytoplasmas in grapevine. *Vitis* 42:141–149
2. Christensen NM et al (2004) Distribution of phytoplasmas in infected plants as revealed by real-time PCR and bioimaging. *Mol Plant Microbe Interact* 17:1175–1184
3. Oropeza C et al (2011) Phytoplasma distribution in coconut palms affected by lethal yellowing disease. *Ann Appl Biol* 159:109–117
4. Thomas DL, Norris RC (1980) The use of the electron microscope for lethal yellowing diagnosis. *Proc Fla State Hort Soc* 93:196–199
5. Baric S et al (2011) Seasonal colonisation of apple trees by ‘ Candidatus Phytoplasma mali’ revealed by a new quantitative TaqMan realtime PCR approach. *Eur J Plant Pathol* 129:455–467
6. Berges R, Rott M, Seemüller E (2000) Range of phytoplasma concentrations in various plant hosts as determined by competitive polymerase chain reaction. *Phytopathology* 90:1145–1152
7. Jarausch W, Lansac M, Dosba F (1999) Seasonal colonization pattern of European stone fruit yellows phytoplasma in different Prunus species detected by specific PCR. *J Phytopathol* 147:47–54
8. Marzachi C (2006) Molecular diagnosis of phytoplasmas. *Arab J Plant Prot* 24:139–142
9. Gibb K, Padovan A (1994) A DNA extraction method that allows reliable PCR amplification of MLO DNA from “difficult” plant host species. *Genome Res* 4:56–58
10. Green MJ, Thompson DA, MacKenzie DJ (1999) Easy and efficient DNA extraction from woody plants for the detection of phytoplasmas by polymerase chain reaction. *Plant Dis* 83:482–485
11. Heinrich M et al (2001) Improved detection methods for fruit tree phytoplasmas. *Plant Mol Biol Rep* 19:169–179
12. Lee I-M, Davis RE (1983) Phloem-limited prokaryotes in sieve elements isolated by enzyme treatment of diseased plant tissues. *Phytopathology* 73:1540–1543
13. Palmano S (2001) A comparison of different phytoplasma DNA extraction methods using competitive PCR. *Phytopathol Mediterr* 40:99–107
14. Cordova I et al (2000) First report of a phytoplasma-associated leaf yellowing syndrome of Palma Jipi plants in southern Mexico. *Plant Dis* 84:807
15. Thomas DL, Donselman HM (1979) Mycoplasma-like bodies and phloem degeneration associated with declining Pandanus in Florida. *Plant Dis Rep* 63:911–916
16. Vázquez-Euán R et al (2011) Occurrence of a 16SrIV group phytoplasma not previously associated with palm species in Yucutan, Mexico. *Plant Dis* 95:256–262
17. Kirkpatrick BC et al (1995) Isolation of mycoplasma-like organism DNA from plant and insect hosts. In: Razin S, Tully JG (eds) *Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmaology* Vol. 1, molecular characterization. Academic, New York, pp 105–117

18. Prince JP et al (1993) Molecular detection of diverse mycoplasma-like organisms (MLOs) associated with grapevine yellows and their classification with aster yellows, X-disease, and elm yellows MLOs. *Phytopathology* 83:1130–1137
19. Ahrens U, Seemüller E (1992) Detection of DNA of plant pathogenic mycoplasma-like organisms by a polymerase chain reaction that amplifies a sequence of the 16S rRNA gene. *Phytopathology* 82:828–832
20. Doyle JJ, Doyle JL (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12:13–15
21. Kollar A et al (1990) Isolation of the DNA of various plant pathogenic mycoplasma-like organisms from infected plants. *Phytopathology* 80:233–237
22. Zhang Y-P, Uyemoto JK, Kirkpatrick BC (1998) A small-scale procedure for extracting nucleic acids from woody plants infected with various phytopathogens for PCR assay. *J Virol Methods* 71:45–50
23. Jiang YP, Chen TA (1987) Purification of mycoplasma-like organisms from lettuce with aster yellows disease. *Phytopathology* 77:949–953
24. Harrison NA et al (2001) Detection and characterization of an elm yellows (16SrV) group phytoplasma infecting Virginia creeper plants in southern Florida. *Plant Dis* 85: 1055–1062
25. Harrison NA, Helmick EE, Elliott ML (2008) Lethal yellowing-type diseases of palms associated with phytoplasmas newly identified in Florida, USA. *Ann Appl Biol* 153:85–94
26. Harrison NA, Womack M, Carpio ML (2002) Detection and characterization of a lethal yellowing (16SrIV) group phytoplasma in Canary Island date palms affected by lethal decline in Texas. *Plant Dis* 86:676–681
27. Nejat N et al (2009) Phytoplasmas associated with disease of coconut in Malaysia: phylogenetic groups and host plant species. *Plant Pathol* 58:1152–1160

تفاعل الـ PCR المزدوج، وتحليل الـ RFLP وفقاً لجين الـ 16S rRNA

Bojan Duduk, Samanta Paltrinieri, Ing-Ming Lee, and Assunta Bertaccini

ملخص:

إن الطرق الحالية لتعريف الفيتوبلازما والكشف عنها تقوم في الأساس على تفاعل البلمرة المتسلسل المتداخل (nPCR)، ويتبعه تحليل تعدد أطوال الأنماط (RFLP) والفصل الكهربائي. ويمكن من خلال هذه الطرق، تحديد الفرق والكشف عن كافة أنواع الفيتوبلازما، بما فيها الأنواع التي لم يتم وصفها بعد. ويشرح التوصيف الحالي طريقة تطبيق هذه الطرق واستخدامها لتحديد الفيتوبلازما في مجموعة الـ 16S rRNA (16Sr) ومستويات المجموعة الفرعية 16Sr.

الكلمات المفتاحية: الكشف، التعريف، المجموعة الريبوسومية، المجموعة الفرعية الريبوسومية.

١- المقدمة:

إن تعريف الفيتوبلازما على مستوى مجموعة الـ 16Sr يتم إجراؤها -حاليا- من خلال تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) / وتحليل تعدد أطوال الأنماط (RFLP) لجين الـ 16S rDNA. وقد استند أول تصنيف شامل للفيتوبلازما على تحليل الـ RFLP لتفاعل الـ PCR للـ 16S rRNA (١، ٢)، مقدماً أساليب يمكن الاعتماد عليها لتحديد الفرق بين مجموعات كبيرة من الفيتوبلازما. وقد سمح هذا النظام بتصنيف الفيتوبلازما إلى ١٩ مجموعة، وأكثر من ٤٠ مجموعة فرعية. وبذلك، أصبح من أكثر الأنظمة المقبولة المتكاملة والشاملة لتصنيف الفيتوبلازما حتى الآن (٣-٩). إن الكشف الدقيق والمعقد لهذه الكائنات الحية الدقيقة هو شرط أساسي لإدارة الأمراض المرتبطة بالفيتوبلازما. وبعد اكتشافها، يصبح من الصعب الكشف عن الفيتوبلازما بسبب تركيزاتها المنخفضة في العائل، خاصة العوائل الخشبية، وبسبب توزيعها غير المنظم في الأنابيب الغربالية للنباتات المصابة (١٠). وتمثل تقنيات الميكروسكوب الإلكتروني (EM) نهجاً بديلاً لإجراء التصنيف التقليدي للفيتوبلازما المعتمد على النقل بالتطعيم للمرض إلى النباتات الدالة السليمة. وقد

كانت المشاهدة من خلال الـ EM (١١، ١٢) والميكروسكوب الماسح للـ EM (١٣) الطرق التشخيصية الوحيدة المتوفرة حتى تم تطوير طريقة الصبغ بصبغات محددة للـ DNA مثل: DAPI (١٤). وبعد ذلك، تم تطوير طرق لإنتاج أمصال مضادة محددة للفيتوبلازما، وتقديم تقنيات كشف تقوم على الأمصال لدراسة تلك المسببات المرضية على النباتات أو الحشرات الناقلة للأمراض (١٥). وقد تم إجراء أول كشف للفيتوبلازما بالـ 16S rDNA في التسعينيات (١٦-٢٠)، ولكن يتم إجراؤها الآن بتقنيات الأحماض النووية المختلفة، خصوصاً الـ PCR (٢١-٢٤). وتكشف الإجراءات التي تم تطويرها في العشرين سنة الأخيرة عن وجود الفيتوبلازما في المواد النباتية والحشرات الناقلة للأمراض، وهذا ساعد على منع انتشار الأمراض وتقليل آثارها على الجانب الاقتصادي. وقد تم تطوير عديد من البادئات العامة التي صُممت على أساس تسلسل الـ 16S rDNA لتشمل كافة أنواع ومجموعات الفيتوبلازما (الجدول ١)، وقد يتم استخدامها في مجموعات مختلفة في الاختبارات المباشرة، المتداخلة، أو شبه المتداخلة للكشف الروتيني عن الفيتوبلازما، وكذلك لتحديد أنواع جديدة من الفيتوبلازما أو العوائل الجديدة (٢٥-٣١).

إن الجهود المبذولة لتحسين إجراءات التشخيص تهدف إلى تطوير طرق سريعة واقتصادية وأكثر قوة. إن درجة الدقة ليست قضية - في حد ذاتها - لأن طرق تفاعل الـ PCR المتداخل الراهنة تتمتع بمستويات عالية من الدقة، ولكن هناك سعياً دائماً للوصول إلى مستويات عالية من الدقة، دون التعرض لمخاطر الحصول على نتائج إيجابية غير صحيحة؛ تلك التي تُصاحب تفاعل الـ PCR المتداخل. ومع ذلك، فقد تم تطوير بعض من الاختبارات الإضافية لتحاليل تطور الأنواع، ولتمييز السلالات بشكل أفضل بسبب طبيعة ثبات جين الـ 16S rRNA دون تغيير، وبسبب الوجود غير الشائع لتسلسل الـ 16S rDNA (١، ٣٢-٣٧)، بالإضافة إلى بعض الأدوات، مثل: (برامج تحليل التقارب، وتطوير معرفة الاختلافات بين السلالات). وقد اتضح أن هناك نسخة واحدة من الجينات أكثر تغييراً، مثل: البروتينات الريبوسومية (*rp122* و *rpS3*)، *SecY*، *SecA*، *tuf*، و *GroEL* مناسبة لتمييز بعض أنواع الفيتوبلازما (٦، ٨، ٣٨-٤٦).

إن تمييز الفيتوبلازما يقوم بشكل روتيني على تسلسلات جين الـ 16S rRNA، ويتم إجراؤه من خلال تحليل RFLP لتضخيم الـ PCR لتسلسلات الـ DNA باستخدام ١٧ إنزيماً من إنزيمات الهضم (١، ٢)؛ وفقاً لما هو موضح في شكل ١. ويسمح هذا الإجراء بتمييز أغلب أنواع الفيتوبلازما على مستوى المجموعات / والمجموعات الفرعية الـ 16Sr، والتي لها صلة بأعراض الأوبئة والحجر الصحي. ويمكن تحديد الفيتوبلازما غير المعروفة عن طريق مقارنة أنماطها بأنماط الفيتوبلازما المعروفة، دون الحاجة إلى تحليل كافة مراجع الفيتوبلازما في الوقت نفسه (١، ٢، ٤٧-٥١). ويرجع ذلك إلى ثبات الخصائص النمطية للـ RFLP الشامل لكل نوع من أنواع الفيتوبلازما (لكل من R16F2/R16R2 وتفاعل P1/P7). وفي بعض الحالات، قد تحتوي العينة على الفيتوبلازما - أو أكثر - مع وجود RNA ريبوسومي متغير، أو أنواع مختلطة من الفيتوبلازما.

جدول (1): البادئات التي تستخدم في تعريف الفيتوبلازما عن طريق الـ 16Sr DNA.

Primer ^a	Specificity 16S group	Sequence 5'-3'	Position ^b	References
<i>P1</i>	Universal	AAGAAITTTGATCCTGGCTCAGGATT	16S rDNA	(13)
<i>P7</i>	Universal	CGTCCTTCATCGGCTCTT	23S rDNA	(51)
<i>R0</i>	Universal	GAATACCTTGTTACGACITTAACCCC	16S rDNA	(29)
<i>P3</i>	Universal	GGATGGATCACCTCCTT	16S rDNA	(51)
<i>P4</i>	Universal	GAAGTCTGCAACTCGACTTC	16S rDNA	(51)
<i>P5</i>	Universal	CGGCAATGGAGGAAACT	16S rDNA	(51)
<i>R16F2n</i>	Universal	GAAACGACTGCTAAGACTGG	16S rDNA	(29)
<i>R16R2</i>	Universal	TGACGGGCGGTGTGTACAAACCCCG	16S rDNA	(29)
<i>F1</i>	Universal	AAGACGAGGATAACAGTTGG	16S rDNA	(11)
<i>B6</i>	Universal	TAGTGCCAAAGGCATCCACTGTG	IS	(47)
<i>R16mF2</i>	Universal	CATGCAAGTCGAACGGA	16S rDNA	(21)
<i>R16mR2</i>	Universal	CTTAACCCCAATCATCGA	16S rDNA	(21)
<i>P1A</i>	Universal	AACGCTGGCGGCGGCCTAATAC	16S rDNA	(33)
<i>16Sr-SR</i>	Universal	GGTCTGTCAAAACTGAAGATG	IS	(34)
<i>P7A</i>	Universal	CCTTTCATCGGCTCTTAGTGC	23S rDNA	(33)
<i>Pc399</i>	Universal	AACGCCGCGTGAACGATGAA	16S rDNA	(53)
<i>Pc1694</i>	Universal	ATCAGGCGGTGTGCTCTAACC	IS	(53)
<i>fU5</i>	Universal	CGGCAATGGAGGAAACT	16S rDNA	(39)
<i>rU3</i>	Universal	TTCAGCTACTCTTTGTAAACA	16S rDNA	(39)

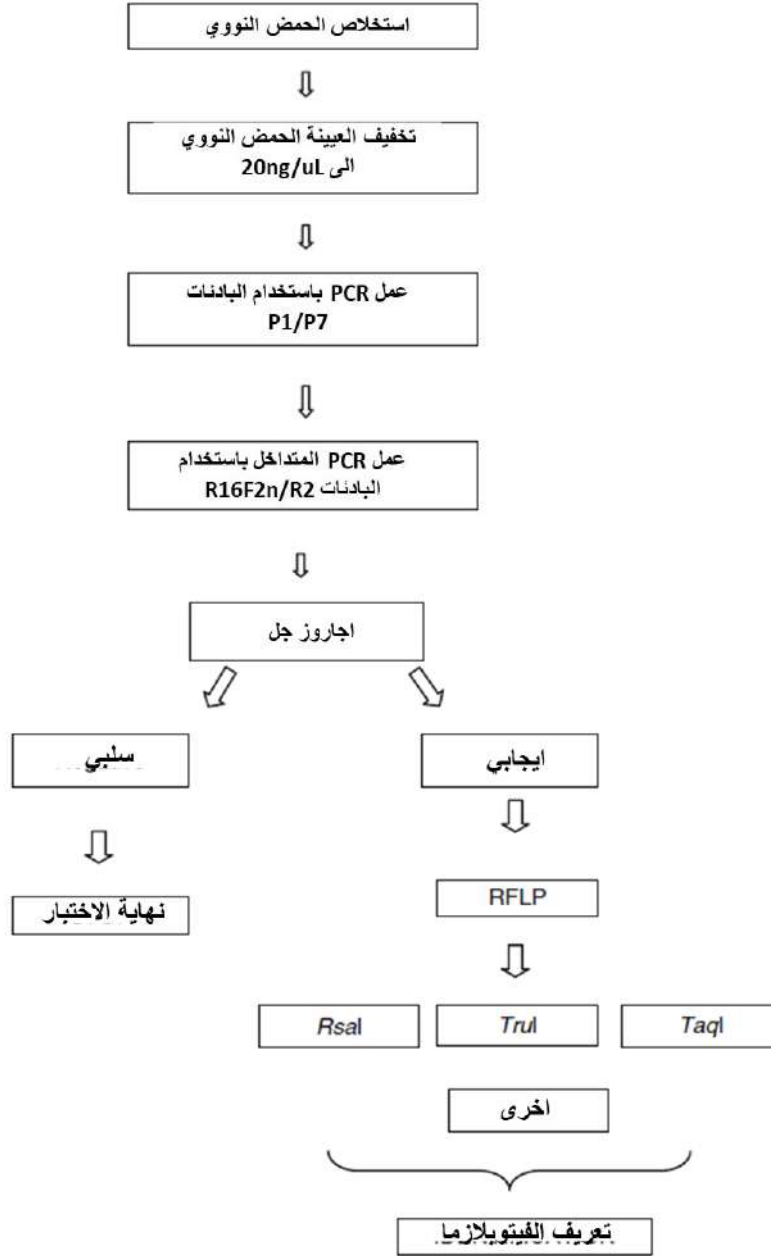
(continued)

تابع جدول (١).

Primer ^a	Specificity 16S group	Sequence 5'-3'	Position ^b	References
PA2f	Universal	GCCCCGGCTAACTATGTGC	16S rDNA	(23)
PA2r	Universal	TTGGTGGGCCTAAATGGACTC	IS	(23)
M1(758F)	Universal	GTCTTTACTGACGC	16S rDNA	(19)
M2(1232R)	Universal	CTTCAGCTACCCCTTTGTAAC	16S rDNA	(19)
SN910601	Universal	GTTTGATCCTGGCTCAGGATT	16S rDNA	(46)
SN910502	Universal	AACCCCGAGAACGTATTACCC	16S rDNA	(46)
R16(I)F1	I, II, XII, XV	TAAAAGACCTAGCAATAGG	16S rDNA	(28)
R16(I)R1	I, II, XII, XV	CAATCCGAACTAAGACTCT	16S rDNA	(28)
R16(III)F2	III	AAGAGTGGAAAAAAGTCCC	16S rDNA	(28)
R16(III)R1	III	TTCGAACTGAGATTGA	16S rDNA	(28)
R16(V)F1	V	TTAAAAGACCTTCTTCGG	16S rDNA	(28)
R16(V)R1	V	TTCAATCCGTAAGACTGAGACTACC	16S rDNA	(28)
R16(X)F1	X	GACCCGCAAGTATGCTGAGAGATG	16S rDNA	(29)
R16(X)R1	X	CAATCCGAACTGAGAGTCT	16S rDNA	(29)
fO1	X	CGGAAACTTTIAGITTTTCAGT	16S rDNA	(39)
rO1	X	AAGTGCCCAACTAAATGAT	16S rDNA	(39)

^aProtocol is provided here for primers in bold italics

^bIS, spacer region between 16S and 23S rDNA



شكل (١): طرق تعريف الفيتوبلازما.

ويتم ظهور أنماط الـ RFLP بشكل غير اعتيادي -عادةً- مع أجزاء الـ DNA، ويكون -أحياناً- مجموع أحجام الأنماط أكبر من أحجام جزء من DNA المتوقع. وفي حالة الإصابات المرضية المختلطة، يُفضل استخدام بادئات معينة (الجدول ١) -عند توفرها-. ومع ذلك، تُساعد -أيضاً- عملية استنساخ جزيء الـ DNA في حل المشكلة، لكن استعراض هذا الأمر سيعرض في فصولٍ أخرى.

٢- المواد:

١. أنابيب PCR، و٢٠٠ أو ٥٠٠ ميكروليتر.
٢. أنابيب آيندورف (1.5 ميكروليتر).
٣. بادئات 20 ميكروليتر/pmol (الجدول ١).
٤. محلول مُنظم للـ PCR.
٥. إنزيم البلمرة (*Taq*). وبالنسبة لهذه الطريقة، يتم استخدام إنزيم من Sigma-Aldrich *Taq* DNA لتفاعل الـ PCR. وبالرغم من ذلك، قد يتم استخدام إنزيمات PCR أخرى. وبالنسبة للإنزيم البلمرة *Taq*، غالباً ينبغي إضافة 25 mM MgCl₂ (3 ميكروليترات لكل خليط ٥٠ ميكروليترا).
٦. dNTPs.
٧. جهاز للـ PCR.
٨. نباتات مصابة وسليمة متحكم بها (من البيوت المحمية)، ويُفضل أن تكون من نفس النوع والعينات والنسيج.
٩. ماء مُقطر مُعقم (ddH₂O).
١٠. آجار للرحلان الكهربائي.
١١. الأكريلاميد/ الأكريلاميد - مُكرر، بنسبة ٢٩:١.
١٢. الأمونيوم بيرسولفات ٠,١ جم في ١ مل من الـ ddH₂O، وتحفظ في درجة حرارة 4°C، وتُستخدم طازجة (يجب أن يكون المحلول مدته أقل من ١٠ أيام).
١٣. TEMED.
١٤. جهاز فصل كهربائي أفقي.
١٥. مولد كهربائي.
١٦. جهاز فصل كهربائي عمودي.
١٧. ممصات (٢٠، ١٠٠، ٢٠٠، و١٠٠٠ ميكروليتر).
١٨. ماصة بفلتر (٢٠، ١٠٠، ٢٠٠ و١٠٠٠ ميكروليتر).
١٩. ماصة بدون فلتر (٢٠ ميكروليترا).
٢٠. إنزيمات قاطعة.
٢١. حمامات مائية، أو بلوكات حرارية.
٢٢. محلول مُنظم TAE (10^x): ٤٨,٤٤ جم من تريزما قاعدي (Trizma)، و٧,٤٤ جم من حمض ثنائي أمين الإيثيلين الرباعي (EDTA)، و500 ddH₂O مل، وتُضبط درجة الحموضة pH على ٨,٠

٢٣. بحمض الخليك، ويتم ضبط الكمية على ١ لتر بـ ddH₂O، ويُحفظ في درجة حرارة 4°C، ويُخفف إلى 1[×] في ddH₂O (إن دُكر في التعليمات) قبل الاستخدام.
٢٤. محلول مُنظم TBE (10[×]): ١٠٨ جم من تريزما قاعدي، و ٥٥ جم من حمض البوريك، 0.5M EDTA 40 مل، ويتم ضبط الكمية إلى ١ لتر بـ ddH₂O، ويُخزن على درجة حرارة 4 مئوية. ويُخفف إلى 1[×] في ddH₂O (إن ورد في التعليمات) قبل الاستخدام.
٢٥. حوامل تطفو في الحمام المائي.
٢٦. صبغة تحميل: في هذه الطريقة، تتمتع البولييميراز DNA Sidma Aldrich Taq المستخدمة في تكبير الـ PCR بصبغة في المحلول المنظم PCR 10[×]. وإن لم يحتوِ المحلول المنظم للـ PCR على صبغة، فيمكن إضافة 1.5 ميكروليتر من أي صبغة للـ DNA مناسبة لكل 6 ميكروليترات من ناتج الـ PCR قبل استخدام الجل.
٢٧. سلم أو معلومات بحجم الـ DNA: ويكفي ١ كيلوبايت (kb) من سلم الـ GeneRuler DNA (Fermentas)، بالرغم من أنه يمكن استخدام سلالم أو معلومات أخرى للحمض النووي DNA.
٢٨. ماركر (Fermentas) *BsuRI* (HaeIII) DNA/ Φ ×174. وقد يتم استخدام أحجام مناسبة من سلالم أخرى للحمض النووي DNA.
٢٩. بروميد الأيثيديوم: ١٠ مليجرام/ مل من محلول؛ حيث يتم حفظ محلول في مكان مُظلم. ويُحضر 0.5 µg/ mL من محلول العمل؛ بإضافة 50 ميكروليترا من المحلول إلى ١ لتر من الماء H₂O المقطر.

٣- طرق العمل:

٣-١: استخلاص الـ DNA:

تم شرح استخلاص الفيتوبلازما بالتفصيل في الفصلين ١٢ و ١٣. ودائماً، يجب شمل العينات السليمة للنبات والشاهد السلبي جميع الاختبارات.

٣-٢: تحضير خليط التفاعل وتفاعل الـ PCR (انظر: الملاحظة ١):

١. قبل تحضير خليط تفاعل الـ PCR، يجب ترقيم الأنابيب الـ PCR (حيث عدد الأنابيب هو عدد العينات +2، حيث يتم تحديد أنبوب واحد للشاهد السلبي، والأنابيب الأخرى للشاهد الإيجابي) (انظر: الملاحظة ١). ودائماً يكون آخر أنبوب للشاهد السلبي.
٢. يجب تحضير خليط تفاعل الـ PCR لكافة الأنابيب معاً، وفقاً للكميات الموضحة في الجدول (٢). ويحتوي كل ٢٥ ميكروليترا من خليط تفاعل الـ PCR على 20 ng من DNA القالب، ١٠ × ٢٥ ميكروليترا من المحلول المنظم للـ PCR، و ٠.٥ وحدة من *Taq* البولييميراز،

و dNTP 0.2 mM (200 µM لكل dNTP)، و 0.4 µM لكل بادئ. والعينات التي بدون الـ DNA عينة شاهدٍ سلبيٍّ في كل تفاعل PCR (انظر: الملاحظة ١).

الجدول (٢): كميات تفاعل الـ PCR، بدون DNA القالب، ويتم إنقاصها إلى النصف (لتقليل تكلفة التفاعل الواحد).

Loading order	Reagents	One sample (µL)	Two samples (µL)	Ten samples (µL)
1	ddH ₂ O	16.35	32.7	163.5
2	Primer # 1 (20 µM)	0.5	1.0	5.0
3	Primer # 2 (20 µM)	0.5	1.0	5.0
4	10× PCR buffer	2.5	5.0	25.0
5	MgCl ₂ (25 mM)	1.5	3.0	15.0
6	dNTPs (10 mM)	2.5	5.0	25.0
7	<i>Taq</i> DNA polymerase (5 U/µL)	0.15	0.3	1.5
	Total	24.0	48.0	240.0

٣. توضع كافة المواد -معدا الـ DNA- في أنبوب، وتُخلط جيداً. ويتم إضافة 24 ميكروليترا من خليط تفاعل الـ PCR في جميع أنابيب الـ PCR.

٤. يُضاف 1 ميكروليتر من عينات الـ DNA (تُخفف إلى 20 ng / ميكروليتر أو ١:١٠٠ بالماء المقطر). وبعدها، تضاف نقطة من الزيت المعدني، إن لم يكن للجهاز PCR غطاء حراري.

٥. تُوضع الأنابيب في جهاز الـ PCR ويُشغل البرنامج (انظر: العنوان الفرعي ٣-٢-١ و ٣-٢-٢). أما البادئات الأخرى المدرجة في الجدول ١ فيكون لها حالات أخرى حسب المراجع.

٣-٢-١: تفاعل الـ PCR الجيني المباشر:

١. يوصى باستخدام البادئات P1/P7 لتفاعل الـ PCR الجيني (١٦، ٥٢). وتقريباً تعمل هذه البادئات على بلمرة كامل للـ 16S، ما بين جينات الـ 16S-23S، وجزء صغير من جين الـ 23S rRNA.

٢. يحتوي خليط التفاعل على: ٥ ميكروليترات من المحلول المنظم PCR (10[×])، وميكروليتر ٢,٥ من الـ dNTP (10mM)، و١ ميكروليتر من البادئ P1 (٢٠ ميكرومل)، و١ ميكروليتر من البادئ P7 (٢٠ ميكروليترا)، و٢ ميكروليتر من بوليميراز الـ *Taq* (٥ وحدات / ميكروليتر)، و٢ ميكروليتر من مُستخلص الـ DNA (20 ng / ميكروليتر)، و ddH₂O إلى

- ٥٠ ميكروليترا (الجدول ٢). ومن الممكن استخدام كمية تصل إلى ٢٥ ميكروليترا، ويمكن تقليل كمية المواد إلى النصف للأغراض الاقتصادية.
٣. تكون حالات الـ PCR كما يلي: دورة واحدة على درجة حرارة 95°C لمدة ٣ دقائق، و 35°C دورة على درجة حرارة 94°C لمدة ١ دقيقة، وعلى درجة حرارة 50°C لمدة ٢ دقيقة، و 72°C لمدة ٣ دقائق. وبعدها، فترة أخيرة على 72°C لمدة ١٠ دقائق.
٤. إذا كانت العينات مأخوذة من إحدى النباتات العشبية، يمكن استخدام آجاروز جل، كما هو موضح أدناه (البند الفرعي ٣-٣). أما إذا كانت مأخوذة من العوائل الخشبية أو من حشرة فيتم استخدام PCR مباشر، ثم إلى PCR المتداخل انظر: أدناه (البند الفرعي ٣-٢-٢).

٣-٢-٢: الـ PCR الجيني المتداخل:

١. إذا تم الحصول على نتائج سالبة ببيادئات P1/P7، أو بالعينات الأصلية المأخوذة من العينات الحشرية أو الخشبية، فيجب إجراء تفاعل الـ PCR المتداخل ببيادئات R16F2n/ R16R2 (٢٨).
٢. خليطة المواد للتفاعل ودورات الـ PCR مثل: تفاعل PCR المباشر (العنوان الفرعي ٣-٢-١)، لكن يتم استخدام البيادئات R16F2n/R16R2 بدلاً من البيادئات P1/P7، باستخدام الكميات نفسها. وتستخدم ١,٠ ميكروليتر من مادة الـ PCR المباشر (P1/P7)، وتُخفف بنسبة ١:٣٠ في ddH₂O بدلاً من إضافة الـ DNA.

٣-٣: التصوير المرئي لمواد الـ PCR (آجاروز جل):

١. لتحضير ١٠٠ مل من ١٪ من آجاروز جل (انظر: الملاحظة ٢): يتم وزن ١ جم من الآجاروز، ويُضاف ١٠٠ مل من المحلول المنظم $1 \times \text{TAE}$.
٢. بحرص يذاب الآجاروز في فرن مايكرويف.
٣. يُبرد محلول الآجاروز إلى درجة حرارة 40°C ، ويُصب الآجاروز في حوض الجل، ويتم إدخال مشط، مع إزالة أي فقاعات هوائية. ويجب تركه حتى يصبح صلباً (حوالي ١٥ دقيقة).
٤. يوضع الجل في حوض الفصل الكهربائي، ويُغلى بمحلول منظم $1 \times \text{TAE}$.
٥. يوضع ٦ ميكروليترات من ناتج الـ PCR (يخلط ناتج الـ PCR وصبغة التحميل، إن لم تكن موجودة بالفعل) في الحفر. ودائماً يُضاف سلم الـ DNA (٢,٥ ميكروليترات) إلى الحفر من على حافة الجل.

٦. توصل الأقطاب بمصدر الطاقة (٥ فولت/سم)، ويُشغل الجل، ويتم توقفها قبل خروج صبغة تحميل الجل.
٧. يتم صبغ الجل؛ من خلال نغعه في محلول أيثيديوم البروميدي لمدة تتراوح ما بين ١٠ إلى ١٥ دقيقة. وبعدها، يُغسل في الماء لمدة ١٠ - ١٥ دقيقة.
٨. يُشاهد الجل في جهاز transilluminator تحت الأشعة فوق البنفسجية؛ حيث يتم أخذ صورة، وتُحفظ نسخة في ملف إلكتروني على الكمبيوتر أو في كتاب معلمي.
٩. يجب أن تخضع نتائج الـ PCR التي تظهر على الآجاروز جل فقط لتحليل الـ RFLP بأنزيمات الهضم (العنوان الفرعي ٣-٤).

٣-٤: تحليل RFLP لتعريف المجموعات وتحت المجموعات (ملاحظه ٣):

١. تستخدم ٢-١٥ ميكروليترا من ناتج الـ PCR (انظر: الملاحظة ٤) في الخليط الإنزيمي المختار وفقاً لإرشادات المصنع.
٢. يُحضن على درجة الحرارة الموصى بها في الحمام المائي، أو البلوكات الحرارية (درجات الحرارة الأكثر شيوعاً 37°C أو 65°C) لما لا يقل عن ١٦ ساعة (انظر: الملاحظة ٥).

٣-٥: مشاهدة ناتج RFLP:

إن الاختيار بين الآجاروز جل والبولي أكريلاميد لتحليلات RFLP يعتمد على طول الأجزاء والأنماط المتوقعة؛ ولفصل الأجزاء أو الأنماط القصيرة بوضوح (أقل من 300 bp)، يكون جل البولي أكريلاميد ضرورياً.

٣-٥-١: آجاروز جل:

١. لتجهيز ١٠٠ ميكروليتر من الآجاروز جل ٣٪ (انظر: الملاحظة ٢)، يتم وزن ٣ جم من الآجاروز، وإضافة ١٠٠ ميكروليتر من المحلول المنظم 1× TBE.
٢. بحرص يذاب الآجاروز في فرن مايكرويف.
٣. يُبرد محلول الآجاروز إلى درجة حرارة 40°C، ويُصب الآجاروز في حوض الجل، ويتم إدخال مشط مع إزالة أي فقاعات هوائية. ويجب تركه حتى يصبح صلباً (حوالي ١٥ دقيقة).
٤. يُوضع الجل في حوض الفصل الكهربائي، ويُغطي بمحلول مُنظم 1× TAE.
٥. يوضع كل ما هو في الأنبوب في الحفر، ويوضع ١,٥ ميكروليتر من السلم $\Phi \times 174$ DNA/ *BsuRI* (*HaeIII*) في آخر الجل.

٦. توصل الأقطاب بمصدر الطاقة (٥ فولت/سم)، ويُشغل الجل حتى قبل خروج صبغة التحميل الجل.
٧. يتم صبغ الجل من خلال نغعه في محلول أيثيديوم البروميدي لمدة تتراوح ما بين ٢٠ إلى ٢٥ دقيقة. وبعدها، يُغسل في الماء لمدة ٢٠ - ٢٥ دقيقة.
٨. يُشاهد الجل في جهاز transilluminator تحت الأشعة فوق البنفسجية؛ حيث يتم أخذ صورة، وتُحفظ نسخة في ملف إلكتروني على الكومبيوتر أو في كتاب معلمي.

٣-٥-٢: جل البولكرميدي:

١. لإعداد ٢٥ مل من ٧٠٪ من جل البولكرميدي (انظر: الملاحظة ٦)، يتم مزج كافة المواد في كأس زجاجي بيكر Beaker، بالترتيب التالي:

ddH ₂ O	17.83 mL
10× TBE	2.5 mL
Acrylamide/bis-acrylamide solution	4.37 mL
Ammonium persulphate	310 µL
TEMED	15.6 µL

٢. يتم بلطف مزج الخليط وصبه بين الألواح الزجاجية، ثم يُضاف المشط، ويُترك لمدة ٢٠ دقيقة ليتصلب.
٣. يتم إخراج المشط، وتُثبت الألواح الزجاجية التي تحتوي على الجل في جهاز الفصل الكهربائي العمودي.
٤. يُغطى بالـ 1 × TBF، وتُنظف الحفر بلطف؛ عن طريق شطفها بـ 1 × TBE بمصاصات بلاستيكية مناسبة، وإزالة الفقاعات الهوائية الموجودة في القاع بين الألواح الزجاجية.
٥. توضع كامل الكمية للتفاعل في الحفر.
٦. يتم تحميل ١,٥ ميكروليتر من سلم $\phi \times 174$ DNA/ *BsuRI HaeIII* في النطاق الخارجي للجل.
٧. توصل الأقطاب بمصدر الطاقة (٧ فولت/سم)، ويُشغل الجل حتى قبل خروج صبغة التحميل الجل.
٨. يتم صبغ الجل من خلال نغعه في محلول أيثيديوم البروميدي؛ لمدة تتراوح ما بين ١٠ إلى ١٥ دقيقة. وبعدها، يُغسل في الماء لمدة ١ - ٢ دقيقة.
٩. يُشاهد الجل في جهاز transilluminator تحت الأشعة فوق البنفسجية؛ حيث يتم أخذ صورة، وتُحفظ نسخة في ملف إلكتروني على الكومبيوتر أو في كتاب معلمي.

٤- الملاحظات:

١. يجب اتخاذ الاحتياطات التالية في جميع المراحل أثناء تحضير تفاعلات الـ PCR لتجنب تلوث العينات والمواد، وهي:
 - استخدام ممصات مخصصة فقط لإعداد تفاعلات الـ PCR، ولا تستخدم أبداً في عمل الـ DNA.
 - استخدام ممصات مع فلاتر (تكون الممصات بالفلاتر للرحلان الكهربائي الآجاروز جل غير ضرورية، ما لم تكن للاستخدام بعد ذلك بعينات تفاعل الـ PCR المتداخل)، ويجب استخدام ممصات جديدة لكل خطوة.
 - يجب غلق أنابيب العينات والمواد على الفور بعد أخذ الكمية المطلوبة.
 - يجب غسل اليدين بعناية بالصابون؛ فقد تصبح في أي وقت ملوثة (مثال: عندما تغادر الغرفة، قد تمسك شيئاً ما من على الأرض).
 - يجب استخدام الأدوات البلاستيكية النظيفة والمعقمة فقط.
 - يجب تنفيذ كل الإجراءات التالية في مواقع منفصلة، بأدوات معملية مخصصة (ممصات، ماصة، أنابيب، أرفف للأنابيب):
 - تجهيز خليط التفاعل (بدون الـ DNA).
 - إضافة الـ DNA (في غرفة قابلة للتعقيم بالأشعة فوق البنفسجية).
 - منطقة عمل البلمرة.
 - تحليل مواد الـ PCR.
٢. القياس الصحيح لكمية هلام الآجاروز اللازمة بالنسبة لسعة الطبق: بالنسبة للطبق الصغير تكون ٨٠ مل كمية كافية، لكن بالنسبة للطبق الكبير يلزمه حوالي ١٢٠ مل أو أكثر.
٣. الإنزيمات الهاضمة الـ ١٧ التي يتم استخدامها في تمييز المجموعات والمجموعات الفرعية الريبوسومية هي: HpaI، HinfI، HhaI، HaeIII، EcoRI، DraI، BfaI، BamHI، AluI، KpnI، HpaII، MseI (Tru1I)، RsaI، Sau3AI، SspI، TaqI، and ThaI. ويمكن استخدام بعض الإنزيمات الهاضمة الأكثر استخداماً (AluI، HhaI، HpaII، MseI، RsaI، TaqI) في التصنيف المبدئي؛ لأنه يمكنها تمييز أغلبية المجموعات الريبوسومية، وإذا لزم الأمر يمكن استخدام إنزيمات إضافية (الجدول والرسومات في هذا المجال تم التحدث عنها في المقدمة).
٤. لتحديد كمية مادة الـ PCR لاستخدامها للهضم، يجب الأخذ في الاعتبار كثافتها في الآجاروز جل. وهي تحتاج من ١-٢ ميكروليتر في حالة عالية الكثافة الـ RFLP، وفي الكثافة المتوسطة حوالي ٣-٦ ميكروليترات، وفي الكثافة المنخفضة تحتاج ١٠-١٥ ميكروليترا، أو أكثر. ويجب ألا يتعدى إجمالي الكمية ٢٠ ميكروليترا، أو لا يتعدى سعة الحفرة بالجل.

5. يوفر بعض المُصنَّعين إنزيمات هاضمة سريعة تعمل على تقليل وقت الهضم ليصل إلى بضع دقائق. ويجب الانتباه إلى أن الإنزيمات قد تصبح مُعطلة في حالة تكرار تذيوبها. لذلك، يكون من الأفضل تجهيز أحجام أصغر منها.
6. تعتمد كمية المواد اللازمة لتجهيز البولي أكريلاميد جل على حجم الألواح الزجاجية وسمك الجل.

المراجع:

1. Lee I-M et al (1998) Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analyses of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences. *Int J Syst Bacteriol* 48:1153–1169
2. Lee I-M, Gundersen-Rindal DE, Bertaccini A (1998) Phytoplasma: ecology and genomic diversity. *Phytopathology* 88:1359–1366
3. Al-Saady NA et al (2008) ‘Candidatus Phytoplasma omanense’, a phytoplasma associated with witches’ broom of *Cassia italica* (Mill.) Lam. in Oman. *Int J Syst Evol Microbiol* 58:461–466
4. Arocha Y et al (2005) ‘Candidatus Phytoplasma graminis’ and ‘Candidatus Phytoplasma caricae’, two novel phytoplasmas associated with diseases of sugarcane, weeds and papaya in Cuba. *Int J Syst Evol Microbiol* 55: 2451–2463
5. Bertaccini A, Duduk B (2009) Phytoplasma and phytoplasma diseases: a review of recent research. *Phytopathol Mediterr* 48:355–378
6. Lee I-M et al (2004) ‘Candidatus Phytoplasma asteris’, a novel taxon associated with aster yellows and related diseases. *Int J Syst Bacteriol* 54:1037–1048
7. Lee I-M et al (2004) Classification of phytoplasma strains in the elm yellows group (16SrV) and proposal of ‘Candidatus Phytoplasma ulmi’ for the phytoplasma associated with elm yellows. *Int J Syst Evol Microbiol* 54: 337–347
8. Lee I-M, Zhao Y, Bottner KD (2006) SecY gene sequence analysis for finer differentiation of diverse strains in the aster yellows phytoplasma group. *Mol Cell Probes* 20:87–91
9. Montano HG et al (2001) ‘Candidatus Phytoplasma brasiliense’, a new phytoplasma taxon associated with hibiscus witches’ broom disease. *Int J Syst Evol Microbiol* 51: 1109–1118
10. Berges R, Rott M, Seemüller E (2000) Range of phytoplasma concentration in various plant hosts as determined by competitive polymerase chain reaction. *Phytopathology* 90: 1145–1152
11. Bertaccini A, Marani F (1982) Electron microscopy of two viruses and mycoplasma-like organisms in lilies with deformed flowers. *Phytopathol Mediterr* 21:8–14
12. Cousin MT, Sharma AK, Isra S (1986) Correlation between light and electron microscopic observations and identification of mycoplasma-like organisms using consecutive 350 nm thick sections. *J Phytopathol* 115: 368–374

13. Haggis GH, Sinha RC (1978) Scanning electron microscopy of mycoplasma-like organisms after
 1. freeze fracture of plant tissues affected with clover phyllody and aster yellows. *Phytopathology* 68:677–680
14. Seemüller E (1976) Investigation to demonstrate mycoplasma-like organisms in diseased plants by fluorescence microscopy. *Acta Hort* 67:109–112
15. Hobbs HA, Reddy DVR, Reddy AS (1987) Detection of a mycoplasma-like organism in peanut plants with witches' broom using indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Plant Pathol* 36:164–167
16. Deng SJ, Hiruki C (1991) Amplification of 16S ribosomal-RNA genes from culturable and nonculturable mollicutes. *J Microbiol Methods* 14:53–61
17. Firrao G, Gobbi E, Locci R (1993) Use of polymerase chain reaction to produce oligonucleotide probes for mycoplasma-like organism. *Phytopathology* 83:602–607
18. Lee I-M et al (1993) Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of mycoplasma-like organisms. *Phytopathology* 83:834–842
19. Namba S et al (1993) Detection and differentiation of plant-pathogenic mycoplasma-like organisms using polymerase chain reaction. *Phytopathology* 83:786–791
20. Schneider B et al (1993) Classification of plant-pathogenic mycoplasma-like organisms using restriction site analysis of PCR-amplified 16S rDNA. *J Gen Microbiol* 139:519–527
21. Baric S, Dalla VJ (2004) A new approach to apple proliferation detection: a highly sensitive real-time PCR assay. *J Microbiol Meth* 57:135–145
22. Green MJ, Thompson DA, MacKenzie DJ (1999) Easy and efficient DNA extraction from woody plants for the detection of phytoplasmas by polymerase chain reaction. *Plant Dis* 83:482–485
23. Schaff DA, Lee I-M, Davis RE (1992) Sensitive detection and identification of mycoplasma-like organisms by polymerase chain reactions. *Biochem Biophys Res Comm* 186:1503–1509
24. Zhang Y, Uyemoto JK, Kirkpatrick BC (1998) A small-scale procedure for extracting nucleic acids from woody plants infected with various phytopathogens for PCR assay. *J Virol Meth* 71:45–50
25. Alvarez E et al (2009) Characterization of a phytoplasma associated with frogskin disease in cassava. *Plant Dis* 93:1139–1145
26. Cozza R et al (2008) Molecular identification of 'Candidatus Phytoplasma asteris' inducing histological anomalies in *Silene nicaeensis*. *Phytoparasitica* 36:290–293
27. Duduk B et al (2004) Identification of phytoplasmas associated with grapevine yellows in Serbia. *J Phytopathol* 152:575–579
28. Lee I-M et al (1995) Detection of multiple phytoplasmas in perennial fruit trees with decline symptoms in Italy. *Phytopathology* 85: 728–735
29. Lorenz KH et al (1995) Detection of the apple proliferation and pear decline phytoplasmas by PCR amplification of ribosomal and nonribosomal DNA. *Phytopathology* 85:771–776

30. Montano HG et al (2011) Hibiscus witches' broom disease associated with different phytoplasmas taxa in Brazil. *Bull Insectol* 64:S249–S250
31. Tolu G et al (2006) Identification of 16SrII-E phytoplasmas in *Calendula arvensis* L., *Solanum nigrum* L. and *Chenopodium* spp. *Plant Dis* 90:325–330
32. Davis RE et al (2003) Differential amplification of sequence heterogenous ribosomal RNA genes and classification of the ' *Fragaria multicipita* ' phytoplasma. *Microbiol Res* 158: 229–236
33. Duduk B et al (2007) Identification of phytoplasmas belonging to aster yellows ribosomal group in vegetables in Serbia. *Bull Insectol* 60:341–342
34. Duduk B et al (2009) Multigene analysis for differentiation of aster yellows phytoplasmas infecting carrots in Serbia. *Ann Appl Biol* 154:219–229
35. Jomantiene R et al (2002) New group 16SrIII phytoplasma lineages in Lithuania exhibit rRNA interoperon sequence heterogeneity. *Eur J Plant Pathol* 108:507–517
36. Liefting LW et al (1996) Sequence heterogeneity in the two 16S rRNA genes of Phormium yellow leaf phytoplasma. *Appl Environ Microbiol* 62:3133–3139
37. Schneider B, Seemüller E (1994) Presence of two sets of ribosomal genes in phytopathogenic mollicutes. *Appl Environ Microbiol* 60:3409–3412
38. Gundersen DE, Lee I-M (1996) Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal primer pairs. *Phytopathol Mediterr* 35:144–151
39. Lee I-M, Davis RE, Gundersen-Rindal DE (2000) Phytoplasmas: phytopathogenic mollicutes. *Annu Rev Microbiol* 56:1593–1597
40. Lee I-M et al (2010) Phylogenetic analysis and delineation of phytoplasmas based on SecY gene sequences. *Int J Syst Evol Microbiol* 60: 2887–2897
41. Marcone C et al (2000) Classification of aster yellows-group phytoplasmas based on combined analyses of rRNA and *tuf* gene sequences. *Int J Syst Evol Microbiol* 50:1703–1713
42. Martini M et al (2002) Genetic variability among Flavescence dorée phytoplasmas from different origins in Italy and France. *Mol Cell Probes* 16:197–208
43. Martini M et al (2007) Ribosomal protein gene-based phylogeny for finer differentiation and classification of phytoplasmas. *Int J Syst Evol Microbiol* 57:2037–2051
44. Mitrović J et al (2011) The *groEL* gene as an additional marker for finer differentiation of ' *Candidatus Phytoplasma asteris*'-related strains. *Ann Appl Biol* 159:41–48
45. Schneider B, Gibb KS, Seemüller E (1997) Sequence and RFLP analysis of the elongation factor Tu gene used in differentiation and classification of phytoplasmas. *Microbiol* 143:3381–3389
46. Wei W et al (2004) An antibody against the SecA membrane protein of one phytoplasma reacts with those of phylogenetically different phytoplasmas. *Phytopathology* 94: 683–686
47. Cai H et al (2008) Genetic diversity among phytoplasmas infecting *Opuntia* species: virtual RFLP analysis identifies new subgroups in the peanut witches'-broom phytoplasma group. *Int J Syst Evol Microbiol* 58: 1448–1457
48. Duduk B, Bertaccini A (2006) Corn with symptoms of reddening: new host of stolbur phytoplasma. *Plant Dis* 90:1313–1319

49. Khan AJ et al (2002) Molecular identification of a new phytoplasma associated with alfalfa witches'-broom in Oman. *Phytopathology* 92:1038–1047
50. Wei W et al (2007) Computer-simulated RFLP analysis of 16S rRNA genes: identification of ten new phytoplasma groups. *Int J Syst Evol Microbiol* 57:1855–1867
51. Wei W et al (2008) Automated RFLP pattern comparison and similarity coefficient calculation for rapid delineation of new and distinct phytoplasma 16Sr subgroup lineages. *Int J Syst Evol Microbiol* 58:2368–2377
52. Schneider B et al (1995) Phylogenetic classification of plant pathogenic mycoplasma-like organisms or phytoplasmas. In: Razin S, Tully JG (eds) *Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmaology*. Academic, San Diego, pp 369–380
53. Skrzeczkowski L et al (2001) Bacterial sequences interfering in detection of phytoplasma by PCR using primers derived from the ribosomal RNA operon. *Acta Hort* 550:417–424

تحليلات الـ PCR والـ RFLP وفقاً

للبروتين الريبوسومي

Marta Martini and Ing-Ming Lee

المخلص:

إن تعريف الفيتوبلازما وتصنيفها يستند في الأساس على جين 16S rRNA غير المتغير. وقد حدد تحليل الـ RFLP لتسلسل جين 16S rRNA 31 مجموعة للـ 16S rRNA (16Sr)، وقد حدد أيضاً أكثر من 100 مجموعة فرعية للـ 16Sr. وبالرغم من ذلك، يمكن أن يصبح تصنيف سلالات الفيتوبلازما أكثر دقة وتحديداً إن تم استخدام الجينات المعتدلة، مثل: جينات البروتين الريباسي (*rp*) علامات جينية؛ حيث يعمل استخدام العلامات الجينية الإضافية على تحسين قوة تصنيف الفيتوبلازما. ويشرح هذا الفصل منهجية الكشف والاختلافات وتصنيف سلالات الفيتوبلازما وفقاً لتسلسل جين الـ *rp*. ويتم استخدام تحليل الـ RFLP الناتج المتحصل عليه من المجموعة -أو المجموعة الفرعية- المحددة لجين الـ *rp* القائم على البادئات في تحديد سلالات الفيتوبلازما داخل مجموعة، أو مجموعة فرعية معينة. إن التصنيف القائم على جين الـ *rp* لا يعمل على تصنيف المجموعات الفرعية للـ 16Sr بسهولة داخل مجموعة 16Sr معينة فقط، ولكنه يُقدم -أيضاً- مدى تشابه ومقاربة سلالات الفيتوبلازما مع بعضها. وهناك عديد من المجموعات الفرعية الفردية للـ 16Sr، يمكن تصنيفها -أيضاً- إلى مجموعتين فرعيتين أو لأكثر من مجموعة فرعية مختلفة على أساس *rp*.

الكلمات المفتاحية: *rpsC (rps3)*، *rplV (rpl22)*، البادئات شبه العامة، البادئات المحددة لمجموعة الـ 16Sr، البادئات المحددة للمجموعة الفرعية للـ 16Sr، إنزيمات الهضم، تمييز سلالات الفيتوبلازما.

١- المقدمة:

كشفت الدراسات المتعلقة بالأوبئة خلال العقد الماضي أن هناك عديداً من مختلف سلالات الفيتوبلازما تتداخل فيما بينها في حدوث أمراض متشابهة لأنواع نباتية معينة مزروعة في مناطق

جغرافية مختلفة. وغالباً ما تكون السلالات متشابهة للغاية وفقاً لتحليل تسلسلات جين الـ 16S rRNA، ولكن من الغريب أن يكون لدى سلالات الفيتوبلازما المتشابهة منافذ بيئية فريدة من نوعها، تشمل اختلافاً في كل من مجموعة العوائل النباتية والحشرات الناقلة للأمراض. ولتحقيق أهداف الدراسات الوبائية والحجر الصحي، فمن الضروري تحديد هذه السلالات المرتبطة ببعضها ارتباطاً وثيقاً وتمييزها، ولكنها مختلفة في الوقت نفسه من الناحية الإحيائية.

وحالياً، تُعتبر العلامة الجينية الرئيسية لدراسات نشوء الأنواع وتطورها وتصنيف الفيتوبلازما هي جين الـ 16S rRNA للثبات العالي لذلك الجين من التغير. وحتى الآن، تم تحديد ٣١ مجموعة للـ 16Sr، وتم تحديد - أيضاً - أكثر من ١٠٠ مجموعة فرعية للـ 16S rRNA (١، ٢). ومع ذلك، وبسبب طبيعته الثابتة، غالباً لا يمكن استخدام جين الـ 16S rRNA فقط لتحديد السلالات المتشابهة والمختلفة إحيائياً (٣). ويؤكد ضرورة الحصول على علامات إضافية تسمح بتوضيح الاختلاف بين السلالات المتشابهة. وتعتبر عديد من الجينات الأقل ثباتاً - بما فيها جينات البروتين الريباسي (*rp*) - مناسبة للعمل على علامات جزيئية تكملية للتمييز بين السلالات وتحسينه.

وتُعد جينات البروتين الريبوسومي (*rp*) متغيرة أكثر من جينات الـ 16S rRNA، كما أن لديها خصائص أكثر، الأمر الذي يعمل باستمرار على تحسين قوة تصنيف سلالات الفيتوبلازما المختلفة داخل مجموعة معينة من مجموعات الـ 16Sr. إن دراستنا السابقة حول تمييز الفيتوبلازما في مجموعات الـ 16SrI و 16SrV أوضحت أن تحليل تسلسلات جين الـ *rp* لا يعمل فقط على تحديد المجموعات الفرعية التي تُطابق المجموعات الفرعية الـ 16Sr؛ ولكنه يُحدد - أيضاً - داخل بعض المجموعات الفرعية سلالات مختلفة أخرى؛ والتي لا يمكن التوصل إليها من خلال تحليل تسلسلات جين الـ 16S rRNA عالي الثبات (٤-٧). وتم تمييزها من عشرة إلى اثنتي عشرة مجموعة فرعية RFLP، على أساس تسلسلات جين البروتين الريباسي لسلالات الفيتوبلازما 16SrI و 16SrV، على التوالي. ومعظم السلالات الإضافية التي حُددت تتمتع بخصائص بيئية وإحيائية مختلفة. على سبيل المثال: فيتوبلازما (*MBS*) maize bushy stunt، وهي نوع من أنواع المجموعة الفرعية الـ 16SrI-B، التي يكون عائلها المحدد مختلفاً عن الأنواع الأخرى التي تنتمي إلى مجموعة الـ 16SrI، يتم فصلها بسهولة عن السلالات الأخرى للمجموعة الفرعية الـ 16SrI-B وفقاً لتحليل الـ RFLP لتسلسل جين الـ *rp* (٥). وعلى هذا النهج، يمكن تصنيف المجموعة الفرعية الـ 16SrV-C إلى عدة مجموعات فرعية للـ *rp* وفقاً لتحليل الـ RFLP بعدد من الإنزيمات الهاضمة الرئيسية (٦، ٧). إن كفاءة تسلسلات جين الـ *rp* للتمييز الأفضل بين سلالات الفيتوبلازما في مجموعة معينة من مجموعات الـ 16Sr قد تم تقييمها بواسطة تحاليل مواقع الهضم افتراضياً لتسلسلات جين الـ *rp* لفيتوبلازما مجموعات الـ 16SrVI و X (٨). على سبيل المثال: تم ترشيح ثلاثة أنواع من الفيتوبلازما، هي: '*Ca. Phytoplasma mali*'، و '*Ca. Phytoplasma pyri*'، و '*Ca. Phytoplasma prunorum*' من مجموعة الـ 16SrX، وحُددت بسهولة بواسطة تحليل الـ RFLP لتسلسلات جين الـ *rp* (٨).

ويصف هذا الفصل طرق الكشف عن الفيتوبلازما باستخدام البادئات القائمة على جين الـ *rpl* شبه العامة أو الانتقائية لمجموعة الـ 16Sr والمجموعة الفرعية المحددة، لتقديم تمييز أفضل لسلاسل الفيتوبلازما وتصنيفها على أساس تحليل الـ RFLP للمواد الناتجة التي تم الحصول عليها، من خلال البادئات المحددة للمجموعة أو المجموعة الفرعية.

٢- المواد:

١-٢: PCR:

١. ماء خالٍ من النوكلياز مقطر معقم.
٢. ١٠ × محلول مُنظم للبلمرة (Applied Biosystems).
٣. 25 mM من $MgCl_2$.
٤. محلول dNTPs يحتوي على كل الـ dNTPs الأربعة، و 2.5 mM (انظر: الملاحظة ١).
٥. بادئات عكسية وأمامية (٢٠ ميكرومل) (انظر: الملاحظة ٢).
٦. AmpliTaq Gold polymerase (Applied Biosystems).
٧. قالب الـ DNA: مجموع الحمض النووي الـ DNA الجيني النباتي 20ng / ميكروليترا، مأخوذ من عينات النباتات التجريبية والسلاسل المرجعية للفيتوبلازما المحفوظة في نبات الـ الوينكا.
٨. ممصات دقيقة، وماص بفلتر (انظر: الملاحظة ٣).
٩. أنابيب خاصة للطرد المركزي (٠,٢-٠,٥ مل ذات جدار خفيف لتفاعلات الـ PCR، ١,٥ مل معقمة).
١٠. جهاز لتفاعل البلمرة المتسلسل، يتم برمجته حسب التفاعل.

٢-٢: الفصل الكهربائي الأجاروز جل:

١. الأجاروز.
٢. محلول مُنظم للرحلان الكهربائي الـ ٥٠x TAE: ٢٤٢g تريس القاعدي، و ٥٧,١ مل من حمض الأسيتيك، و ١٠٠ مل من 0.5 M EDTA (pH 8.0). ويجب استخدام المُخفف الـ 1× TAE في ddH_2O .
٣. محلول منظم تحميل بالجل 6× من النوع I: ٠,٢٥% بروموفينول الأزرق، و ٠,٢٥% زيلين سيانول FF، و ٤٠% (v/w) السكروز في الماء.

٤. محلول الصبغ: محلول التخزين ٠,٥ ميكروجرام/ مل لأيثيديوم بروميد، ومحلول تخزين SYBR[®]Safe 10^x، GelRed[™] 000^x (Biotium)، أو محلول تخزين 10^x، لصبغة جل الـ SYBR[®]Safe DNA من DMSO (Ivotrogen) (انظر: الملاحظة ٤).
٥. معيار لحجم الـ DNA.
٦. إنتاج الـ PCR (انظر: الملاحظة ٥).
٧. ممصات دقيقة، وماصة.
٨. شريط لاصق للجل.
٩. جهاز رحلان كهربائي أفقي مع حوض ومشط.
١٠. جهاز توليد الطاقة لجهاز الفصل الكهربائي.
١١. فرن مايكرويف.
١٢. خلاط حراري مغناطيسي.
١٣. نظام لتوثيق الجل وتصويره، مثل: DigiDoc-It (UVP).

٢-٣: تحليل الـ RFLP ناتج الـ PCR:

١. ماء خالٍ من النيكليز.
٢. بعض الإنزيمات الهاضمة الأساسية المُخزنة في درجة حرارة 20°C-.
٣. محلول مُنظم 10^x مُزود، مع الإنزيم الهاضم المُخزن في درجة حرارة 20°C-.
٤. ناتج PCR مأخوذ من العينات التجريبية، أو من السلالات المرجعية للفيتوبلازما.
٥. زيت معدني.
٦. ممصات.
٧. أنابيب طرد مركزي (٠,٥ مل).
٨. حمام مائي.

٢-٤: الفصل الكهربائي عديد أكريلاميد:

١. ماء مُقطر ومُعقم.
٢. محلول مُنظم للفصل الكهربائي TBE 10^x: 10٨ جم من التريس القاعدي، و٥٥ جم من حمض البوريك، و٤٠ مل من EDTA 0.5 M (pH 8.0). استخدام مُخفف إلى 1^x TBE.
٣. محلول الأكريلاميد / البيساكريلاميد (١:٢٩) (30% w/v)، مُخزن في درجة حرارة 4°C (انظر: الملاحظة ٦).
٤. كبريتات الأمونيوم (APS): محلول 10% w/v في ماء (انظر: الملاحظة ٧).
٥. N^٢-tetramethyl-ethylenediamine (TEMED)، N، N، N.

٦. محلول مُنظم تحميل الجل من نوع I (6× stock): ٠,٢٥٪ بروموفينول الأزرق، و ٠,٢٥٪ زيلين سيانول FF، و ٤٠٪ (w / v) السكروز في ماء.
٧. معيار لحجم الـ DNA.
٨. الآجاروز: محلول ١٪.
٩. نظام الفصل الكهربائي رأسي، وألواح زجاجية، وفواصل ومشط، ومشابك ورق أو مقبض.
١٠. جهاز مد بالطاقة لنظام الفصل الكهربائي.
١١. ممصات دقيقة، وقطرات لتحميل الجيل.
١٢. فرن مايكرويف، أو خلاط حراري مغناطيسي.
١٣. نظام لتوثيق الهلام، مثل: DigiDoc-It (UVP).
١٤. إيثانول ١٠٠٪.

٣- طرق العمل:

٣-١: تحليل الـ PCR باستخدام البادئات المحددة لمجموعة الـ 16Sr شبه العامة، أو المحددة للمجموعات الفرعية:

١. قم باختيار زوج البادئات *rp* حسب حاجتك. وقد تم تصميم عديد من أزواج البادئات المحددة للمجموعة الفرعية والمحددة لمجموعة الـ 16Sr شبه العامة بلمرة أوبرون الـ *rp* الجزئي (الجدول ١)، ويمكن -أيضاً- استخدام أغلبيتها في الـ PCR المباشر أو المتداخل (انظر: الملاحظة ٨).
٢. قم بإذابة مواد الـ PCR على الثلج، و قم بعمل خلطة رئيسية في أنبوب واحد 1.5 مل مُعقم باستخدام المواد بالترتيب التالي: (الكميات المعطاة لتفاعل واحد، ويمكن مضاعفتها حسب الضرورة لعدد العينات):

Component	Final volume (µL)	Final concentration
Nuclease-free water	16.875	-
10× amplification buffer	2.5	1×
MgCl ₂ solution, 25 mM	1.5	1.5 mM
dNTPs, 2.5 mM	2	200 µM
Forward primer 20 µM	0.5	0.4 µM
Reverse primer 20 µM	0.5	0.4 µM
AmpliTaq Gold polymerase (5 U/µL) (see Note 9)	0.125	0.625 U
Total volume	24	

جدول (1): بادئات كل جين *rp* -شبه عام- خاص بالمجموعات 16Sr وتحت المجموعة 16Sr؛ تم تصميمها لأجل بلمرة جزء من جين الفيتوبلازما جين *rp*.

Primer pair	Sequence (5'-3')	Location	Expected size of PCR product (bp)	Specificity	Reference
<i>rp</i> F1/ <i>rp</i> R1	GGACATAAGTTAGGTGAATTT ACGATAATTTAGTTCTTTTTGG	<i>rpsS</i> <i>rpIP</i>	1,245-1,389 ^a	16SrI, III, IV, V, VII, VIII, IX, XIII	(9)
<i>rp</i> (I)F1A/ <i>rp</i> (I)R1A	TTTTCCCTACACGTACTTIA GTTCTTTTTGGCATTAAACAT	<i>rpsS</i> <i>rpsC</i> / <i>rpIP</i>	1,200	16SrI	(10)
<i>rp</i> (I-A)F1/ <i>rp</i> (I-A)R1	CAAGAGCTAAAGGTTCTGGC GAGGGCCCTGTAGGGTTA	<i>rpIV</i> <i>rpsC</i>	800	16SrI-A	(10)
<i>rp</i> (I-B)F1/ <i>rp</i> (I-B)R2	AAGAGCTAAAGGTTCTGGT GAGGGCGTCTGTAGGAGTG	<i>rpIV</i> <i>rpsC</i>	800	16SrI-B	(10)
<i>rp</i> L2F3/ <i>rp</i> (I)R1A	WCCTTGGGGYAAAAAAGCTC GTTCTTTTTGGCATTAAACAT	<i>rpIB</i> <i>rpsC</i> / <i>rpIP</i>	1,600	16SrI, III, IV, V, VI, VII, IX, X, XII, XIII, XVIII	(8)
<i>rp</i> F1C/ <i>rp</i> (I)R1A	ATGGTDDGGDCAYAAKTTAGG GTTCTTTTTGGCATTAAACAT	<i>rpsS</i> <i>rpsC</i> / <i>rpIP</i>	1,212-1,386 ^a	16SrI, II, III, IV, V, VI, VII, IX, X, XII, XIII, XVIII	(8)
<i>rp</i> (II)F1/ <i>rp</i> (II)R1	GCTCTTACTCGTAAAYATGTAGT TACTTGATTTTCTGGTTTTGA	<i>rpsS</i> <i>rpsC</i>	1,200	16SrII	(8)
<i>rp</i> (II)F/ <i>rp</i> (I)R1A	ACTTATTCTCGTGATACTAG GTTCTTTTTGGCATTAAACAT	<i>rpsS</i> <i>rpsC</i> / <i>rpIP</i>	1,390	16SrII	(11)
<i>rp</i> (II)F2/ <i>rp</i> (I)R1A	ATGGTAGGTTATAAAATTAGG GTTCTTTTTGGCATTAAACAT	<i>rpsS</i> <i>rpsC</i> / <i>rpIP</i>	1,290	16SrII	(11)
<i>rp</i> (III)F1/ <i>rp</i> (III)R1	TTAGAGAAAGGCATTAAAC CTCTTTCCCCCATCTAGGAGG	<i>rpsS</i> <i>rpsC</i>	1,200	16SrIII	(8)

(continued)

Primer pair	Sequence (5'-3')	Location	Expected size of PCR product (bp)	Specificity	Reference
rp(V)F1/rpR1	TCGCGGTCATGCAAAAAGGCG ACGATAATTTAGTCTTTTTTGG	<i>rpsS</i> <i>rplP</i>	1,200	16SrV	(4, 9)
rp(V)F2/rpR1	TTGCCCTCGTTTATTTCCGAGAGCTA ACGATAATTTAGTCTTTTTTGG	<i>rplV</i> <i>rplP</i>	950	16SrV	(4, 9)
rp(V)F1A/rp(V)R1A	AGCGGATAAAAAAGTTTCAAAA GGCATTAAACATAATATAATATG	<i>rpsS</i> <i>rplP</i>	1,200	16SrV	(6)
rp(V1)F2/rp(V1)R2	GGTTGTTGATTTAATTCGTGGTC CCAGATAATTCGTCTAGTATCAGAA	<i>rplV</i> <i>rpsC</i>	1,000	16SrVI	(8)
rp(VIII)F2/rp(VIII)R2	AGTTGTCGATTTAATTCGTGGCA CAGCAGATAATTTGTCTAGTATCTGCG	<i>rplV</i> <i>rpsC</i>	1,000	16SrVII, VIII	(8)
rp(IX)F2/rp(IX)R2	GCACAAGCTATTTAATGTTTACACCC CAAAGGGACTAAACCCTAAAG	<i>rplV</i> <i>rpsC</i>	800	16SrIX	(8)
rpAPI5f2/rp(1)R1A	CTCCTAAATCAGCTTCAAGT TTCCTTTTTGGCATTAAACAT	<i>rplV</i> <i>rpsC/rplP</i>	1,036	16SrX-A	(12)
rpAPI5f/rpAPI5r	AGTGCTGAAAGCTAATTTGG TGCTTTTTTATAGCAAAAAGGTT	<i>rplV</i> <i>rpsC</i>	920	16SrX-A	(12)
rpStolF/rpStolR	CGTACAAAATAATCGGGAGA CGAAAACAAAAGTTTACGAG	<i>rplB</i> <i>rpsC</i>	1,372	16SrXII-A	(8)
rpStolF2/rpStolR	AAACTTGGTCACGTAGTTCC CGAAAACAAAAGTTTACGAG	<i>rplP</i> <i>rpsC</i>	1,253	16SrXII-A	(8)

٣. تُخلط جيداً، وتُقلب لفترة، ثم يعمل لها طرد مركزي خفيف. وبعدها، تؤخذ كمية ٢٤ ميكروليتر من خليط التفاعل، وتوضع في كل أنبوبة من أنابيب الـ PCR.
٤. يُضاف 1uL من قالب الـ DNA ($\geq 20 \text{ ng}$)، ويتم عمل الشاهد الإيجابي والسلبي للـ PCR في كل مجموعة من المجموعات (انظر: الملاحظة ١٠).
٥. اخلط جيداً، واعمل طرداً مركزياً سريعاً، وضع الأنابيب في جهاز تفاعل البلمرة المتسلسل باستخدام عدد الدورات، والنسخ، والالتئام، ومواقيت البلمرة، ودرجات الحرارة موضحة (في الجدول ٢) لزوج البادئات.
٦. لإجراء تفاعل الـ PCR المتداخل، خفف الناتج من الـ PCR المباشرة (في ddH₂O) بنسبة ١:٣٠٠ في أنابيب ٠,٥ مل. وبعدها، استخدم ١ ميكروليتر من المادة المخففة قالباً للـ DNA في الـ PCR المتداخل.

٣-٢: الفصل الكهربائي الآجاروز جل:

١. قم بسد نهايات فتحة القلب البلاستيكي المرفق بجهاز الفصل الكهربائي بشريط لاصق لعمل قالب، وضع القالب في الجزء الأفقي من طاولة العمل، واختر مشطاً مناسباً وضعه على مسافة ٠,٥-١,٠ mm فوق الطبق. وبذلك، يكون قد تم تشكيل شكل الحفر بالكامل عند إضافة الآجاروز إلى القالب.
٢. قم بإعداد كمية كافية من محلول مُنظم الفصل الكهربائي TAE 1× ملء حوض وقالب الجِل (انظر: الملاحظة ١١)
٣. قم بتجهيز محلول الآجاروز 1% (w/v) في TAE 1× في دورق أو في قارورة زجاجية (انظر: الملاحظة ١٢).
٤. سخن القارورة في فرن المايكرويف حتى يذاب الآجاروز (انظر: الملاحظة ١٣).
٥. قم بإضافة قطب من أقطاب التحريك المغناطيسية إلى الدورق أو الزجاجية. وبعدها، انقله إلى المُحرك حتى يبرد محلول الآجاروز ويصل إلى 60°C.
٦. بشكل اختياري، يتم إضافة ١ ميكروليتر من الـ GelRed™ (محلول التخزين $\times 10000$)، أو صبغة جل الـ SYBR®Safe DNA (محلول التخزين $\times 10000$) إلى ١٠٠ مل من محلول الآجاروز، وقم بخلط محلول الجِل من خلال تدويره بلطف.
٧. قم بصب محلول الآجاروز الدافئ في القالب (انظر: الملاحظة ١٤)، واترك الجِل ليبرد تماماً لمدة ٢٠-٣٠ دقيقة على درجة حرارة الغرفة. وبعد ذلك، قم بصب كمية قليلة من المحلول المُنظم TAE 1× على الجزء العلوي من الجِل، وقم بإزالة المشط بحرص، ثم صب المحلول المُنظم للرحلان الكهربائي بكمية أقل، وأزل الشريط اللاصق بحرص، ثم ضع الجِل في الحوض الفصل الكهربائي، وأضف كمية كافية من المحلول المُنظم TAE 1× حتى يُغطي الجِل تماماً.

جدول (٢): درجات الحرارة حسب نوع البادئات المستخدمة في PCR لجين *rp*

Primer pair	Initial denaturation	Cycles	Denaturation	Anneal	Extension	Final extension
rpF1/rpR1	94°C 11 min	38	94°C 1 min	50°C 2 min	72°C 3 min	72°C 7 min
rpL2F3/rp(I)R1A						
rpF1c/rp(I)R1A						
rp(II)F1/rp(II)R1						
rp(II)F/rp(I)R1A						
rp(II)F2/rp(I)R1A						
rp(III)F1/rp(III)R1						
rp(V)F1/R1						
rp(V)F1A/rp(V)R1A						
rp(VI)F2/rp(VI)R2						
rp(VIII)F2/rp(VIII)R2						
rp(IX)F2/rp(IX)R2						
rp(I)F1A/rp(I)R1A	94°C 11 min	38	94°C 1 min	55°C 2 min	72°C 3 min	72°C 7 min
rp(I-A)F1/rp(I-A)R1	94°C 11 min	38	94°C 1 min	64°C 2 min	72°C 3 min	72°C 7 min
rp(I-B)F1/rp(I-B)R2	94°C 11 min	38	94°C 1 min	60°C 2 min	72°C 3 min	72°C 7 min
rpAP15f2/rp(I)R1A	94°C 2 min	35 40 ^a	94°C 1 min	54°C 45 s 52°C 80 s	72°C 1.5 min 72°C 2 min ^a	72°C 8 min
rpAP15f/rpAP15r	94°C 2 min	35/40 ^b 36 ^a	94°C 1 min	55°C 45 s 53°C 1 min ^a	72°C 1.5 min 72°C 2 min ^a	72°C 8 min
rpStolE/rpStolR	94°C 2 min	40	94°C 1 min	53°C 45 s	72°C 1.5 min	72°C 8 min
rpStolE2/rpStolR						

^aPCR conditions used with insect total DNA template

^bNumber of cycles used in direct PCR with primers rpAP15f/rpAP15r

٨. اسحب 5 ميكروليترات من كل عينة، وأيضا الشاهد من خليط تفاعل الـ PCR، وأضف ١ ميكروليتر من المحلول المنظم لتحميل الجـل 6× (انظر: الملاحظة ١٥)، ويوضع الخليط ببطء في الحفرة باستخدام ممصات مقاس P10 أو P20. وحمل ٥ ميكروليترات من سلم الـ DNA، مثل: GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Fermentas) في الحفر على الجانب الأيسر والأيمن من الجـل.
٩. أغلق غطاء الحوض الجـل، واستخدم من ١ إلى ٥ cm/V (انظر: الملاحظة ١٦)، وشغل الجـل حتى تبعد الصبغة (bromophenol blue and xylene cyanol FF) عن بعضها بمسافة مناسبة على جانبي الجـل.
١٠. إن وجدت صبغة الجـل الـ SYBR® Safe أو GelRed™ في الجـل (انظر: الملاحظة ١٧)، افحص الجـل بضوء الـ UV على الـ transilluminator، وصور الجـل بكاميرا رقمية بعدسة ثابتة باستخدام جهاز تصوير الجـل، أو يتم صبغ الجـل من خلال غمره في بروميد إثيديوم (٠,٥ ميكروجرام / مل في الماء) لمدة ١٠ دقائق، في درجة حرارة الغرفة. وبعدها، تزال الصبغة بوضعها في الماء لمدة ١٠ دقائق.

٣-٣: تحليل الـ RFLP لمواد الـ PCR:

١. اختر الإنزيمات الهاضمة الرئيسية التي يتناسب استخدامها حسب سلالات فيتوبلازما المجموعة 16Sr والمجموعات 16Sr التي تقوم بدراستها (الجدول ٣).
٢. اضبط الحمام المائي على درجة الحرارة المناسبة حسب ما حدده مُصنِع الإنزيمات.
٣. قم بإذابة مواد الإنزيم في أنبوب الطرد المركزي المعقم ٠,٥ مل، واخلط المواد وفقاً لترتيب الجدول التالي (الجدول يبين التفاعل لعينة واحدة):

Component	Final volume (µL)	Final concentration
Nuclease-free water	9.5-11.5	-
10× restriction buffer	2	1×
Restriction enzyme	0.5	0.5-1U
PCR product	6-8	300-500 ng/20 µL
Total volume	20	

٤. اخلط جيداً، ثم قم بعمل طرد مركزي سريع، ثم أضف قطرة واحدة من الزيت المعدني إلى أي تفاعلات للإنزيمات. وبعد ذلك، يتم التحضين في درجة حرارة 60-65°C.
٥. توضع الأنابيب في الحمامات المائية على درجة الحرارة التي ذكرها المُصنِع، وتُترك طوال فترة الليل.

الجدول (٣): مجموعة مُفيدة من الإنزيمات الهضمية الرئيسية التي تُساعد في تحديد سلالات الفيتوبلازما داخل مجموعات الـ 16Sr المختلفة أو مجموعاتها الفرعية.

16Sr group	Restriction enzymes	Reference
I	<i>AluI</i> , <i>MseI</i> , <i>Tsp509I</i>	(4, 5, 10)
II	<i>AluI</i> , <i>DraI</i> , <i>HbaI</i> , <i>MseI</i> , <i>RsaI</i> , <i>SspI</i> , <i>TaqI</i> , <i>Tsp509I</i>	(11)
III	<i>AluI</i> , <i>DraI</i> , <i>MseI</i>	(4, 13)
V	<i>AluI</i> , <i>DraI</i> , <i>HaeIII</i> , <i>HbaI</i> , <i>HpaII</i> , <i>MseI</i> , <i>SspI</i> , <i>TaqI</i> , <i>Tsp509I</i>	(6, 7)
VI	<i>AluI</i> , <i>DraI</i> , <i>TaqI</i> , <i>Tsp509I</i>	(8)
VII	<i>MseI</i>	(14)
X	<i>AluI</i> , <i>DraI</i>	(8, 12)
XII-A	<i>MseI</i>	(15)
XII-B	<i>AluI</i> , <i>DraI</i> , <i>MseI</i>	(16)

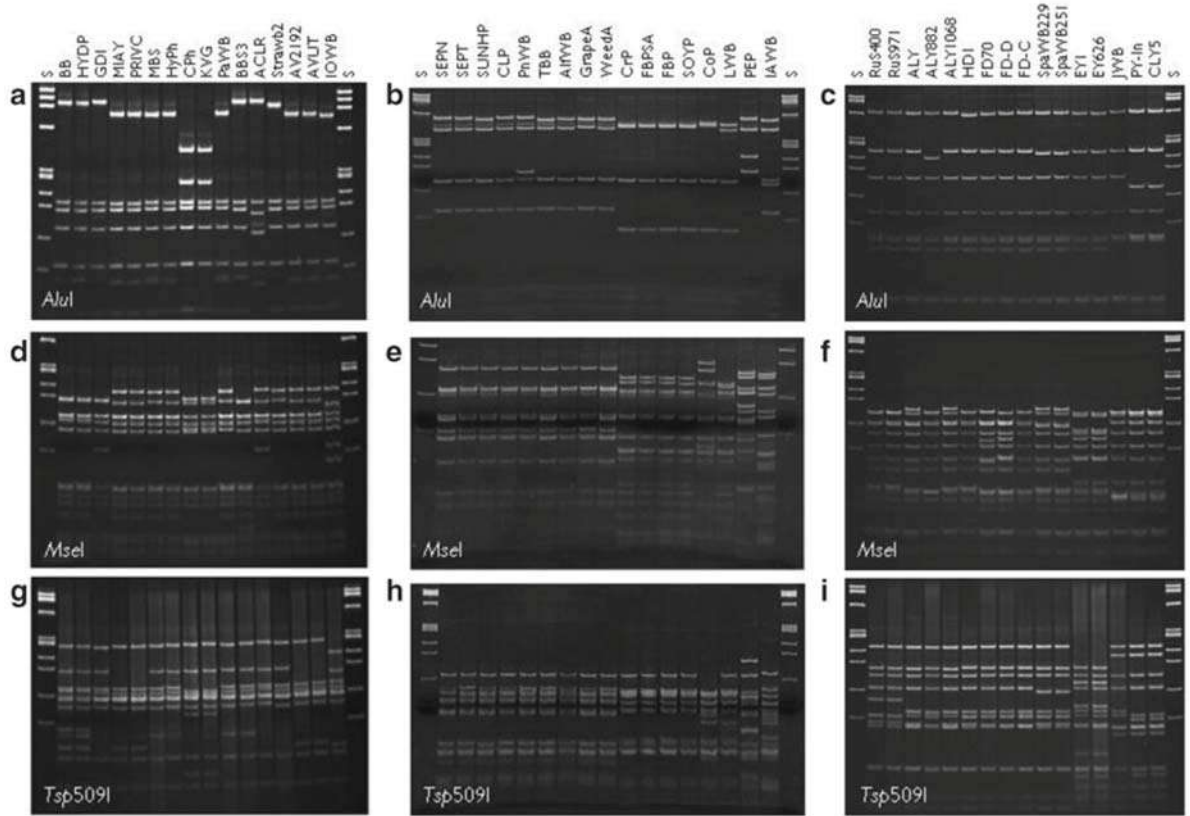
٣-٤: الفصل الكهربائي للجل عديد الأكريلاميد:

١. نظف الأطباق الزجاجية، والفواصل، والمشط بإيثانول تركيزه ١٠٠٪.
٢. يتم تجميع الصفائح الزجاجية والفواصل: ضع الصفيحة الرئيسية على طاولة العمل، ورتب الفواصل على كل جانب، أسند الصفيحة الأخرى على أشرطة الفواصل، ثم يتم ربط الصفائح معا بمشابك ورقية.
٣. أذب محلول الآجاروز ١٪ في فرن المايكرويف، واستخدمه في سد كلا الجانبين وختمهما كاملين وفي قاع الصفائح الزجاجية (انظر: الملاحظة ١٨).
٤. يجب أخذ حجم الصفائح الزجاجية وسُمك الفواصل في الاعتبار (انظر: الملاحظة ١٩)، ثم احسب كمية الجل المطلوبة. وجهاز محلول الجل بنسبة البولي أكريلاميد (جدول ٤) التي تريدها في قارورة نظيفة (انظر: الملاحظة ٢٠).
٥. على الفور بعد إضافة الـ TEMED، اخلط المحلول بتدويره بلطف.
٦. صب المحلول في الفراغ الموجود بين الصفائح الزجاجيتين، بحيث يملأ الفراغ إلى أعلى (انظر: الملاحظة ٢١).
٧. على الفور، أدخل المشط المناسب في الجل، ولا تدع فرصة لانحصار فقاعة الهواء تحت أسنان المشط، ويجب أن تكون قمة المشط أعلى بقليل من فتحته الزجاجية، وتأكد من عدم تسرب محلول الأكريلاميد من القالب الجل.
٨. اترك الأكريلاميد يتصلب لمدة ٣٠-٤٠ دقيقة على درجة حرارة الغرفة (انظر: الملاحظة ٢٢).

٩. يتم إزالة الفاصل من قاع الجل، ثم يوضع الجل بحوض جهاز الفصل الكهربائي باستخدام المشابك على الجوانب (انظر: الملاحظة ٢٣).
١٠. املاً خزانات الفصل الكهربائي بـ $1 \times$ TBE (انظر: الملاحظة ٢٤).
١١. قم بسحب المشط (comb) بعناية من الجل المبلمر، و قم بغسل الحفر بـ $1 \times$ TBE بشكل كامل بمجرد إزالة المشط (انظر: الملاحظة ٢٥).
١٢. يتم استخدام حقنة بسن مثني لإزالة الفقاعات الهوائية المحصورة تحت الجزء السفلي من الجل.
١٣. اخلط عينات الـ DNA المهضومة (٢٠ ميكروليترا) مع ٤ ميكروليترات من المحلول المنظم لتحميل الجل $6 \times$. وحمل حوالي ١٢ ميكروليترا من الخليط بماصة دقيقة P20 (انظر: الملاحظة ٢٦). حمل ١٠ ميكروليترات من سلم الـ DNA مثل: *HaeIII*-digested ϕ X174 في الحفر على الجانبين الأيمن والأيسر من الجل.
١٤. قم بتوصيل الأقطاب الكهربائية بمصدر للطاقة، واستخدام فولت ٨-١ cm/V، وشغل الجل حتى تبتعد الصيغة (bromophenol blue and xylene cyanol FF) عن بعضها بمسافة مناسبة على جانبي الجل.
١٥. افصل الصفائح الزجاجية وضعها على طاولة المعمل، وارفع زاوية من الزجاج العلوي باستخدام ملعقة، وارفع الصفيحة العلوية وأزل الفواصل.
١٦. اغمر بلطف الجل المرفق بالصفيحة السفلية في بروميد الإثديوم (٠,٥ ميكروجرام / مل في الماء) لمدة ١٠ دقائق على درجة حرارة الغرفة، ثم أزل الصبغة لمدة ١٠ دقائق في الماء (انظر: الملاحظة ٢٧).
١٧. اعكس الجل، وأزل الصفيحة الزجاجية، وضع الجل في جهاز التصوير فوق البنفسجي.
١٨. افحص الجل بواسطة جهاز الأشعة فوق البنفسجية، وصور الجل بكاميرا رقمية ثابتة بالجهاز.
١٩. قارن أنماط الـ RFLP التي تم الحصول عليها مع السلالات المرجعية للفيتوبلازما أو الأنماط التي نُشرت سابقا (الشكل ١) (٤-٦، ١٠، ١٢-١٤، ١٦).

الجدول (٤): كمية المواد المستخدمة لتحضير جل البولي أكريلاميد (٢٥ مل).

Final polyacrylamide gel (%)	30% acrylamide/bisacrylamide (mL)	H ₂ O (mL)	10× TBE (mL)	10% APS (μL)	TEMED (μL)
5	4.2	18	2.5	310	15.6
12	10	12.2	2.5	310	15.6



شكل (١): (a, d, g) أنسجة الـ RFLP لتسلسل أويرون الـ *rp* (١,٢ كيلوبايت، يحتوي على جينات الـ *rp122* و *rps3*)، تم تضخيمها بالـ PCR المتداخل مع البادئات الـ *rpF1/R1*، وبعدها زوج من البادئات الـ *(D)F1A/rp(D)R1A* من سلالات الفيتوبلازما الموضحة في مجموعة الفيتوبلازما *AY (16SrI)*. وتم هضمه بناتج الـ PCR بالـ *AluI*، *MseI*، أو الـ *Tsp509I*، بالترتيب. (b, e, h) أنسجة الـ RFLP لتسلسل أويرون الـ *rp* (١,٢ كيلوبايت، يحتوي على جينات الـ *rp122* و *rps3*) تم بلمرته بالـ PCR شبه المتداخل بزواج من البادئات الـ *(II)F1/rp(D)R1A*، وبعدها بزواج من البادئات الـ *rp(II)F2/rp(I)R1A* من سلالات الفيتوبلازما الموضحة الـ *SEPN SEPT* sesame phyllody; *SUNHP* sunn hemp witches'-broom; *CLP* Cleome phyllody; *PnWB* peanut witches'-broom; *TBB* Australian tomato big bud; *AlfWB* alfalfa witches' broom; *GrapeA* Australian grapevine yellows; *WeedA* weed virescence; *CrP* Crotalaria phyllody; *FBPSA* Crotalaria saltiana phyllody; *FBP* faba bean phyllody; *SOYP* soybean phyllody; *CoP* cotton phyllody; *LWB* lime witches'-broom; *PEP* Picris echioides phyllody; *IAWB* Italian alfalfa witches'-broom (في مجموعة فيتوبلازما الـ *peanut witches'-broom (16SrII)*). نتاج الـ PCR تم هضمه بالـ *AluI*، *MseI*، أو الـ *Tsp509I* بالترتيب. (c, f, i) أنسجة الـ RFLP لتسلسل أويرون الـ *rp* (١,٢ كيلوبايت، يحتوي على جينات الـ *rp122* و *rps3*) تمت البلمرة بالـ PCR المتداخل بزواج من البادئات الـ *rp(V)F1/R1*، وبعدها بزواج من البادئات الـ *rp (V)F2/rp(V)R1A* من سلالات الفيتوبلازما في مجموعة الفيتوبلازما *EY (16SrV)*. وتم هضم نتاج الـ PCR بالـ *AluI*، *MseI*، أو الـ *Tsp509I* بالترتيب. يتم فصل المواد المهضومة في (a) بالفصل الكهربائي بواسطة جل ٥% البولي أكريلاميد؛ ويتم فصل كافة المواد المهضومة الأخرى بواسطة جل ١٢% البولي أكريلاميد. المرات S، *HaeIII- ̢X174 DNA*; حجم السلم من أعلى إلى أسفل كتالي: ١٣٥٣، ١٠٧٨، ٨٧٢، ٦٠٣، ٣١٠، ٢٨١، ٢٧١، ٢٣٤، ١٩٤، ١١٨، ٧٢.

٤- الملاحظات:

١. اخلط كميات متساوية من المحاليل الأصلية 100 mM من الـ dATP، dCTP، dGTP، و dTTP في أنبوب ١,٥ مل، واخلطهم جيداً. وبعدها، أذب الخليط ١:١٠ بماء معقم، ويخزن في درجة حرارة 20°C-.
٢. أذب ٢٠ ميكروملا من المحاليل الأصلية من البادئات ١:١٠ بماء معقم.
٣. من الطبيعي أن يتم تخصيص مجموعة كاملة من المصحات الدقيقة لاستخدام الـ PCR فقط. ومن أكثر المصحات استخداماً من شركة Gilson الـ P10، P20، P100، P200، والـ P1000 (أو ما يُعادلها).
٤. في السنوات القليلة الماضية، زاد الاهتمام باستخدام صبغات خاصة للـ DNA البديلة، مثل: صبغة جل الـ SYBR[®] Safe DNA (Invitrogen) أو الـ GelRed[™] (Biotium) بدائل للصبغ ببروميد الإثيديوم الخطير.
٥. يتم -عادة- تحليل ناتج الـ PCR المتداخل بجل الآجروز مع جهاز الفصل الكهربائي.
٦. من الأفضل شراء محاليل الأكريلاميد الجاهزة لتقليل التعرض لأكريلاميد والبيساكريلاميد (acrylamide and bisacrylamide)؛ حيث البيساكريلاميد (٢٩: ١) متوفر لمختلف الموردين، بدلا من الأكريلاميد والبيساكريلاميد المسحوق. ويجب ارتداء قفازات دائماً للتعامل مع محلول الأكريلاميد والبيساكريلاميد لأنها سامة.
٧. يمكن تجهيز كميات صغيرة جديدة (١٠ مل) من APS 10%، وتخزينها في درجة حرارة 4 مئوية لمدة تصل إلى شهر.
٨. تعتبر البادئات شبه العامة الـ rpL2F3 و rpF1C من البادئات الجديدة، ويتم استخدامها مع البادئات العكسية rp(I)R1A. ويمكن -أيضاً- استخدام البادئات rpF1C/ rp(I)R1A في الـ PCR شبه المتداخل بعد التفاعل مع rpL2F3/rp(I)R1A لتفاعل الـ PCR شبه العام الأكثر حساسية. ويمكن أيضاً استخدام أزواج البادئات rp(I)F1A/rp(I)R1A (الخاص لمجموعة 16SrI، rp(I-A)F1/rp(I-A)R1 (الخاص بالمجموعة الفرعية 16SrI-A)، rp(I-B)F1/rp(I-B)R2 (الخاص بالمجموعة الفرعية 16SrI-B) في تفاعل الـ PCR المتداخل بعد الـ PCR المباشر بزواج من البادئات rpF1/rpR1. أو يمكن استخدام المجموعة الخاصة بزواج البادئات rp(II)F1/rp(II)R1 في تفاعل الـ PCR المتداخل بعد الـ PCR المباشر بـ rpF1C/rp(I)R1A، بينما يمكن استخدام أزواج البادئات للمجموعة المحددة، ومنها: rp(III)F1/rp(III)R1، rp(VI)F2/rp(VI)R2، rp(VIII)F2/rp(VIII)R2، rp(IX)F2/rp(IX)R2 في تفاعل الـ PCR المتداخل بعد الـ PCR المباشر بـ rpL2F3/rp(I)R1A أو rp(I)R1A. وبالنسبة للبلمرة الجزئية لوبرون الـ rp من سلالات الفيتوبلازما للمجموعة 16SrII بالـ PCR شبه المتداخل بأزواج البادئات rp(II)F/rp(I)R1A وبعده يتبع rp(II)F2/rp(I)R1A فيمكن استخدامها أيضاً.

٩. ويمكن بلمرة الأبروان *rp* الجزئي من سلالات الفيتوبلازما للمجموعة 16SrV مع الـ PCR المباشر بزواج بادئات الـ rp(V)F1/rpR1، وبعده يتبع الـ PCR شبه المتداخل مع البادئات rp(V)F2/rpR1 أو الـ PCR المتداخل بالـ rp(V)F1A/rp(V)R1A. وزوج البادئات الأخيرة يمكنها بلمرته بشكل أطول، ومنه يُصبح جزء من البرون الـ *rp* أكثر في المعلومات. وللمرة البرون الـ *rp* الجزئي من سلالات فيتوبلازما 16SrX-A apple proliferation؛ فيمكن استخدام زوج البادئات المجموعة الفرعية rpAP15f/rpAP15r في الـ PCR المباشر أو في الـ PCR المتداخل؛ والذي يتبعه الـ PCR المباشر بالـ rpAP15f2/rp(I)R1A. وأخيراً، يمكن بلمرة البرون الـ *rp* الجزئي لفيتوبلازما الـ stolbur (المجموعة الفرعية 16SrXII-A) من خلال الـ PCR شبه المتداخل بالبادئات الـ rpStolF/rpStolR التي يتبعها rpStolF2/rpStolR.
٩. يُفضل استخدام الـ Hot-start *Taq* polymerase (مثل: AmpliTaq Gold DNA polymerase) -بشكل خاص- في تفاعلات الـ PCR بالبادئات شبه العامة. ويمكن -أيضاً- استخدام الـ *Taq* polymerases العام من مختلف المصنعين في تفاعلات الـ PCR للبادئات الخاصة للمجموعة أو لمجموعة فرعية محددة.
١٠. تُعتبر الشاهدات الإيجابية (السلالات المرجعية للفيتوبلازما) مطلوبة لمراقبة كفاءة الـ PCR، في حين تتمثل أهمية الشاهدات السلبية في الكشف عن حدوث التلوث مع الـ DNAs؛ والذي يحتوي على الهدف من التفاعل.
١١. أضف ٢٠ مل من الـ TAE 50× إلى ٩٨٠ مل من الماء المقطر في أسطوانة مدرجة ١ لتر، ثم أغلق الأسطوانة بالبارافلم، واخلط المحلول بتقليب الأسطوانة.
١٢. أضف في دورق -أو قارورة زجاجية- ١ جم من الآجاروز المعياري إلى ١٠٠ مل من المحلول المنظم 1× TAE.
١٣. قم بتسخين المحتوى لأقصر فترة من الزمن للسماح بإذابة الآجاروز؛ حيث يطفو الآجاروز الصلب الذي لم يذوب في صورة رقائق شفافة في المحلول، ثم رج الزجاجية أو القارورة بحرص من وقت لآخر للتأكد من عدم التصاق أي من حبيبات الآجاروز الصلبة على الجدار، ولكن يجب أن تكون في المحلول.
١٤. يجب أن يصبح سُمك الجل ما بين ٣ و ٥ mm، ويجب ألا يكون هناك أي فقاعات هوائية أسفل أسنان المشط أو بينها.
١٥. يمكن وضع ١ ميكروليتر من محلول تنظيم التحميل 6× في قطعة من البارافلم يشكل قطارها. وبعدها، يُمكن إضافة ٥ ميكروليترات من العينة، وخلطهم على البارافلم قبل تحميل العينة.
١٦. يتم قياس المسافة بال (سم) بين الأقطاب الكهربائية الموجبة والسالبة.
١٧. وجود صبغة الجل للحمض النووي SYBR® Safe DNA أو الـ GelRed™ في الجل يساعد ذلك على فحص الجل بواسطة ضوء الأشعة فوق البنفسجية في أي مرحلة أثناء الفصل الكهربائي،

- وقد يتم إزالة حوض الجل ووضعها مباشرةً على جهاز التوثيق. ويمكنك -أيضاً- نقع الجل بعد الفصل الكهربائي في محلول صبغة الحمض النووي SYBR[®] Safe أو الـ GelRed[™]، والذي تم تخفيفه إلى 1× بمحلول الفصل الكهربائي، إن لم تقم بإضافة الصبغة في الآجروز.
١٨. الهدف من ذلك، هو منع تسريب المحلول بين الألواح والفواصل، وحتى لا يتسرب محلول الجل.
١٩. يتباين سُمك الفاصل من 0,5 mm إلى 2، وغالباً ما يُفضل استخدام الجل الرفيع، لكي يصبح أنماطاً للـ DNA أكثر وضوحاً ودقة.
٢٠. بالنسبة لتحليل الـ RFLP التي يتم إجراؤها لنتائج الـ PCR لجين الـ *rp*، عادةً ما يتم استخدام جل البولي أكريلاميد 5% بكفاءة إنزيماته الهاضمة؛ إلا أنه يُفضل استخدام جل البولي أكريلاميد، بنسبة 12% لإنزيمات القطع المتكرر مثل: *MseI* و *Tsp509I*، لتحسين وضع الأنماط.
٢١. لسحب المحلول بحقنة 50 مل، أدخل فوهة الحقنة بين طبقتين زجاجيتين أو بالكأس الزجاجي الذي استخدمته لتجهيز المحلول، ومنه يتم إدخال فوهة للصب بين الطبقتين الزجاجيتين.
٢٢. عند الانتهاء من تصلب البلمرة، يظهر التعرج واضحاً تحت أسنان المشط.
٢٣. يجب قلب اللوح؛ بحيث يوجه نحو حوض المحلول.
٢٤. من المهم استخدام مجموعة المحاليل نفسها المنظمة للرحلان الكهربائي في كل من الحوض والجل؛ لأن أي تغييرات أو اختلافات بسيطة ستدمر انتقال الحمض النووي. ولإعداد محلول 1× TBE، أضف 100 مل من 10× TBE إلى 900 مل من الماء المقطر في أسطوانة مُدرجة 1 لتر، ثم أغلق الأسطوانة بالبارافيلم، واخلط المحلول بتقليب الأسطوانة.
٢٥. استخدم حقنة أو ممصات رفيعة لشطف الجل وحفره بمحلول تنظيف الفصل الكهربائي، ومن الضروري غسل الحفر جيداً بمجرد إزالة المشط؛ وإلا سيتم تبلور كميات صغيرة من محلول الأكريلاميد المحاصر المسوك بالمشط داخل الحفر. وتنتج بذلك، أشكال غير منتظمة ومشوهة من أنماط الـ DNA.
٢٦. يُمكن استخدام الماصة نفسها لتحميل عينات عديدة، بشرط أن يتم غسلها جيداً بين كل تحميل وآخر.
٢٧. استخدم الألواح الزجاجية دعائم.

المراجع:

1. Zhao Y et al (2010) Recent advances in 16S rRNA gene-based phytoplasma differentiation, classification and taxonomy. In: Weintraub PG, Jones P (eds) Phytoplasmas: genomes, plant hosts and vectors. CAB International, Wallingford, pp 64-92

2. Lee I-M et al (2011) ‘ *Candidatus Phytoplasma costaricanum*’ a new phytoplasma associated with a newly emerging disease in soybean in Costa Rica. *Int J Syst Evol Microbiol*. doi: 10.1099/ijs.0.029041-0
3. Lee I-M, Zhao Y, Davis RE (2010) Prospects of multiple gene-based systems for differentiation and classification of phytoplasmas. In:
 1. Weintraub PG, Jones P (eds) *Phytoplasmas: genomes, plant hosts and vectors*. CAB International, Wallingford, pp 51–63
4. Lee I-M et al (1998) Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analyses of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences. *Int J Syst Bacteriol* 48:1153–1169
5. Lee I-M et al (2004) ‘ *Candidatus Phytoplasma asteris*’, a novel phytoplasma taxon associated with aster yellows and related diseases. *Int J Syst Evol Microbiol* 54:1037–1048
6. Lee I-M et al (2004) Classification of phytoplasma strains in the elm yellows group (16SrV) and proposition of ‘ *Candidatus Phytoplasma ulmi*’ for the phytoplasma associated with elm yellows. *Int J Syst Evol Microbiol* 54:337–347
7. Martini M et al (2002) Genetic variability among flavescence dorée phytoplasmas from different origins in Italy and France. *Mol Cell Probes* 16:197–208
8. Martini M et al (2007) Ribosomal protein gene-based phylogeny for finer differentiation and classification of phytoplasmas. *Int J Syst Evol Microbiol* 57:2037–2051
9. Lim P-O, Sears BB (1992) Evolutionary relationships of a plant-pathogenic mycoplasma-like organism and *Acholeplasma laidlawii* deduced from two ribosomal protein gene sequences. *J Bacteriol* 174:2606–2611
10. Lee I-M et al (2003) Ecological implications from a molecular analysis of phytoplasmas involved in an aster yellows epidemic in various crops in Texas. *Phytopathology* 93:1368–1377
10. Martini M (2004) Ribosomal protein gene-based phylogeny: a basis for phytoplasma classification. PhD dissertation, University of Udine, Udine, Italy, p 106
11. Martini M et al (2008) Molecular differentiation of ‘ *Candidatus Phytoplasma mali*’ and its spreading in Friuli Venezia Giulia region (north-east Italy). *Acta Hort* 781:395–402
12. Gundersen DE et al (1996) Genomic diversity and differentiation among phytoplasma strains in 16S rRNA group I (aster yellows and related phytoplasmas) and III (X-disease and related phytoplasmas). *Int J Syst Bacteriol* 46:64–75
13. Griffiths HM et al (1999) The phytoplasma associated with ash yellows and lilac witches’broom: ‘ *Candidatus Phytoplasma fraxini*’. *Int J Syst Bacteriol* 49:1605–1614
14. Durante G et al (2008) Bois noir in Lombardy (northern Italy): identification

تضخيم الـ *Tuf* والـ *secY* بالـ PCR بتحديد النمط الجيني للفيتوبلازما

Xavier Foissac, Jean-Luc Danet, Sylvie Malembic-Maher, Pascal Salar,
Dana Šafářová . Pavla Válová, and Milan Navrátil

ملخص:

تم تطوير تقنيات تحديد النمط الجيني *secY* و *Tuf* لتمييز سلالات الفيتوبلازما، ويتم توفير تحليلات تفاعل البلمرة المتسلسل لجين *Tuf* لمجموعات الفيتوبلازما لتصنيفه 16SrV ، 16SrI ، 16SrXII-A ، وXII-B. وبجانب استخدامها لتصنيف سلالات الفيتوبلازما، فالجين منتشر في سلالات الفيتوبلازما في النباتات العائلة وفي الحشرات الناقلة للأمراض، ومنه يمكن تتبعها. ويعتبر الـ *SecY* متغيراً أكثر من الـ *tuf*، وهو بالتالي أكثر تميزاً من الـ *tuf*، لكن الـ *tuf* والـ *secY* يظهر تاريخ التطور مدى تطابقهما.

الكلمات المفتاحية: علم الأوبئة، التنوع الجيني، تفاعل البلمرة المتسلسل، تحليل التطور، الـ *tuf*، الـ *secY*.

١- المقدمة:

إن تصنيف الفيتوبلازما يقوم على الاختلاف الوراثي لجين الـ 16S rRNA بتخطي حد المتشابه بنسبة ٩٧,٥٪، كذلك من خلال الخصائص البيولوجية والمرضية والجينية المميزة (١، ٢). وفي كثير من الحالات، لا يوفر تسلسل الـ 16S rDNA تميزاً كافياً لإجراء دراسات معينة خاصة بالأوبئة التي تقوم على تمييز السلالات. وقد انصب الاهتمام، في السنوات الأخيرة على الجينات غير الريبوسومية الثابتة والأقل ثباتاً، مثل: *secA*، *tuf*، *map*، *secY*، *pnp*، وجينات البروتين الريباسومي (٣-٥)، أو البروتينات الجينية المختلفة، مثل: *vmp1* (٦-٩)، *imp* (١٠-١٤)، *amp* (١٥)، *stamp* (١٦)، و *hflB* (١٧، ١٨). وقد أدى التحليل الجيني وتحليل التطور لهذه الجينات إلى تمييز سلالات الفيتوبلازما وتصنيفها بشكل دقيق، وذلك باكتشاف التعدد الجيني، مثل: وجود الأنواع البينية المعاد تركيبها في مجموعة 16SrX (١١).

ويعمل جين الـ *tuf* على ترميز ترجمة عامل الاستطالة EF-Tu. ويمد الـ EF-Tu -عند عمله- بالطاقة لعملية ترجمة البروتينات. وقد تم استخدام الـ *Tuf* بنجاح مؤشراً من مؤشرات الدراسات التصنيفية والوبائية والإحيائية. وترتبط الأنماط الجينية للـ *tuf* مع الفيتوبلازما -بشكل معين- بأنماط خاصة بالحشرات الناقلة ونبات العائل (٤).

ويعمل الجين غير الريبوسومي *secY* على ترميز (translocase)؛ والذي يُعد جزءاً من نظام نقل البروتينات المفردة عبر غشاء السيتوبلازمي (١٩). ويُظهر الـ *SecY* نسبة مشابهة من الاختلاف لجينات البروتين الريباسي (*rp*)، ويتم استخدامه مؤشراً جزيئياً لتمييز سلالات الفيتوبلازما في كل من المجموعات المصنفة الـ 16SrI، 16SrV، 16SrX، و16SrXII-A (٧، ١١، ٢٠-٢٩). إن أهمية سلاسل جين الـ *secY* وقدرتها على تجميع الفيتوبلازما في المجموعات الفرعية نفسها كجينات الـ 16S rRNA، *tuf*، *secA*، و*rp* الأكثر استخداماً. ومؤخراً، تم توضيحه مع مجموعة المصنفة الـ 16SrV (٣٠).

ويعتبر تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) أحد طرق تضخيم مناطق معينة للحمض النووي DNA المستهدف في المختبر باستخدام البادئات، وdNTPs، وإنزيم بلمرة الـ DNA المستقر حرارياً. ويشتمل تفاعل الـ PCR على الخطوات الرئيسية التالية: (١) فصل البروتين على درجة حرارة 95°C تقريباً، وأثناء ذلك ينقسم الحمض النووي DNA الحلزوني المزدوج إلى شرائط واحدة. (٢) الالتصاق على درجة حرارة تتراوح بين ٤٥ و ٧٢ مئوية حسب درجة حرارة صهر (T_m) البادئات، الأمر الذي يسمح للبادئات بالالتصاق في مواقع الـ DNA المحددة، ومنه يتم تضخيم المنطقة التكميلية. (٣) الاستطالة في درجة حرارة 66-72°C، وخلالها تصنع إنزيمات بلمرة الحمض النووي DNA شريطاً تكميلياً من النهايات 3' للبادئات. ويتم تكرار الخطوات (1)-(3) من ٢٥-٤٠ مرة (دورات تفاعل الـ PCR) لتكبير السلاسل التي تكون بين البادئين بشكل تصاعدي. ونتيجة لذلك، يتم الحصول على مادة تفاعل الـ PCR (الأمبليكون amplicon) ذات الحجم المحدد. ولتحسين درجة حساسية الكشف عن الفيتوبلازما (خاصة في العوائل النباتية الخشبية)، يمكن إجراء دورة ثانية من دورات تفاعل الـ PCR (الـ PCR المتداخل) بالبادئات الداخلية.

وأصبح تحليل تعدد أطوال الأنماط (RFLP) للمواد المضخمة المشتقة من الـ PCR من التحاليل المهمة لتحديد الفيتوبلازما، وكذلك في تحديد الأنواع في الدراسات الوبائية. ويمكن إجراء عملية تحديد أنواع الـ RFLP من خلال قطع الـ DNA باستخدام الإنزيمات الهاضمة (RFLP معملياً)، و/أو من خلال استخدام معلومات التسلسل الجيني مع تحليل الحاسب الآلي (برنامج محاكاة RFLP). ويمكن استخدام الجينات و/أو أجزاء الجينوم التي تم تضخيمها بتفاعل الـ PCR لتحاليل تطور الأنواع.

٢- ١: مواد تفاعل الـ PCR:

١. ماء نقي منزوع الأيونات (ddH₂O)، توصيلة كهربائية 18 MΩ في درجة حرارة 25°C.
٢. إنزيم *Taq* بوليميراز DNA لا يتأثر بالحرارة، مع محلول مُنظم الـ DNA، وMgCl₂.
٣. مقدار 5 mM من محلول dNTP.
٤. بادئات *tuf* للمجموعة 16SrI (*Candidatus Phytoplasma asteris*) والمجموعة 16rXII-A (*stolbur phytoplasma*) (الجدول ١): rTufAy، fTufAy، rTuf1، fTuf1.
٥. بادئات *tuf* للمجموعة 16SrXII-B (*Ca. Phytoplasma australiense*)، وللتفريق بين الأنواع الفرعية *tuf1* و *tuf2*: PaTC1R1، PaTC1F1، PaTC1R، PaTC1F، PaTC2R، PaTC2F.
٦. بادئات *tuf* للمجموعة 16SrV: FDTUF-F1، FDTUF-R1، FDTUF-F2، FDTUF-R2.
٧. بادئات *secY* للمجموعة 16SrI (*Ca. Phytoplasma asteris*): AYsecYF1، AYsecYR1.
٨. بادئات *secY* للمجموعة 16SrII (*Ca. Phytoplasma aurantifolia*): SecYF1(II)، SecYR1 (II)، SecYF2(II).
٩. بادئات *secY* للمجموعة 16SrIII (Western X phytoplasma group): SecYF2(III)، SecYR1 (III)، SecYF1(III).
١٠. بادئات *secY* للمجموعة 16SrVI (*Ca. Phytoplasma trifolii*): SecYR1، SecYF1(VI)، SecYF2(VI).
١١. بادئات *secY* للمجموعة 16SrV: إما FD9f و FD9r، أو FD9r و FD9f2L: FD9r2L، FD9f3L، بريمر التسلسل FD9ri.
١٢. بادئات *secY* للمجموعة 16SrX (*Ca. Phytoplasma mali*، *Ca. Phytoplasma pyri*، and *Ca. Phytoplasma prunorum*): SecYMalF1، SecYMalR1، SecYMalF2، SecYMalR2.
١٣. بادئات *secY* للمجموعة 16SrXII-A (*Stolbur 'Bois noir' phytoplasma*): PosecF1، PosecR1، PosecF3، أو PosecN2 (كبديل لـ PosecF3 في حالة عدم وضوح الـ DNA على الجل بسبب محتوى الـ GC المرتفع لنهاية الـ '3' PosecF3)، PosecR3.
١٤. قالب الـ DNA: من الـ DNA الكلي المستخلص من الجزء الغني بالفيتوبلازما (٣٣)، أو المستخلص بالـ CTAB (٣٤).

٢- ٢: الفصل الكهربائي للأجاروز جل:

١. 0.5 M EDTA من الـ pH 8.0: 186.1g من ثنائي صوديوم أمين الأيثيلين رباعي حمض الأسيتيك (disodium ethylenediaminetetraacetic acid dihydrate)، EDTA، ٨٠٠ مل من ماء المقطر. اضبط درجة الحموضة pH لتصل إلى ٨.٠ باستخدام NaOH لإذابته، ثم يكمل إلى ١ لتر بماء المقطر.

الجدول (١): تسلسل البادئات لجينات *tuf* وال *secY* المستخدمة في هذا الفصل.

Gene	Group	Primer	Sequence (5'-3')	Reference
<i>tuf</i>	16SrI and 16rXII-A	fTuf1	CACATTGACCACGGTAAAAC	(5)
		rTuf1	CCACCTTCACGAATAGAGAAC	(5)
		fTufAy	GCTAAAAGTAGAGCTTATGA	(5)
		rTufAy	CGTTGTCACCTGGCATTACC	(5)
<i>tuf</i>	16SrXII-B, distinguish tuf 1 and tuf 2 subtypes	PaTC1F	CATTCTAGTTGTTTCTGGT	(31)
		PaTC1R	GTCTTCTCGGTTAATC	(31)
		PaTC2F	TATTTTAGTTGTTTCTGGA	(31)
		PaTC2R	GTCTTCGCGGTTAATA	(31)
<i>tuf</i>	16SrV	FDTUF-F1	ATTGGTCATGTAGACCATGG	(30)
		FDTUF-R1	GTTCTTCCGCCTTCACGTAC	(30)
		FDTUF-F2	ATTGGTCATGTAGACCATGG	(30)
		FDTUF-R2	CTTGTTCTTCTTCGATCGC	(30)
<i>secY</i>	16SrI	AYsecYF1	CAGCCATTTTAGCAGTTGGTGG	(29, 32)
		AYsecYR1	CAGAAGCTTGAGTGCCTTTACC	(29, 32)
<i>secY</i>	16SrII	SecYF1(II)	CGCGTATAGGTTTTGAAGGTG	(28)
		SecYR1(II)	CCTGCCATTTTCATTATAGCG	(28)
		SecYF2(II)	TGAAGGTGGTCAAACCTCT	(28)
<i>secY</i>	16SrIII	SecYF1(III)	CTAGACCAGGTTTTGAAGG	(28)
		SecYR1(III)	GACCTGCTTTTCTCATTATAGC	(28)
		SecYF2(III)	TGAAGGYGGACAAATCCCT	(28)
<i>secY</i>	16SrVI	SecYF1(VI)	CTAGATTAGGATTYGAGGG	(28)
		SecYR1(VI)	GACCRCCAAAACCTTGATAATC	(28)
		SecYF2(VI)	ATTYGAGGGYGGYCAAACAC	(28)
<i>secY</i>	16SrV	FD9f	GAATTAGAACTGTTTGAAGAC	(27)
		FD9r	TTTGCTTTACATCTTGTATCG	(27)
		FD9r	TTTGCTTTACATCTTGTATCG	(21)
		FD9f2L	GTTTTAGCTAAAGGTGATTTAAC	(21)
		FD9r2L	TAAAAGACTAGTCCCRCCAAAAG	(21)
		FD9f3L	AATAAGGTAGTTTTATATGACAAG	(21)
		FD9r3L	AATAAGGTAGTTTTATATGACAAG	(21)
<i>secY</i>	16SrX	SecYMalF1	TTAGGACGTAGTATACAAATCCCNTT	(11)
		SecYMalR1	ACAATAATTAAAAATCCTGTNCC	(11)
		SecYMalF2	AAGAATGGCGTGAACARGGNGA	(11)
		SecYMalR2	GCATCTTGTTTAGATAAATGTTC	(11)
<i>secY</i>	16SrXII-A	PosecF1	TCTGCTTTGCCTTTGCCTTT	(7)
		PosecR1	ATTAGTAAACTAGTTCCTCC	(7)
		PosecF3	GGATTGATAGATGCTGCCCC	(7)
		PosecN2	CCATCAAACTTTTTGGTTTAGGC	(7)
		PosecR3	GCCCCTATAACGGTGATTTTGA	(7)

٢. محلول مُنظم الـ $50\times$ TAE (ترييس-إسيتات- EDTA): 242 g من ترس قاعدي، ٥٠٠ مل من ماء المقطر. أضف ٥٧,٢ مل من حمض الأسيتيك و ١٠٠ مل من 0.5 M EDTA، pH 8.0، واخلطهم بحرص. اضبط الكمية الأخيرة لتصل إلى ١ لتر. (يجب أن تكون درجة حموضة pH المحلول المنظم ٨-٨,٥، وليس من الضروري ضبطها).
٣. محلول مُنظم $1\times$ TAE : ٢٠ مل من محلول مُنظم $1\times$ TAE، ٩٨٠ مل من الماء المقطر.
٤. آجاروز جل ١٪: ١ جم من الآجاروز (في زجاجة أو دورق ٢٥٠ مل)، ١٠٠ مل من محلول مُنظم $1\times$ TAE. ويتم إذابتهم في فرن الميكرويف لمدة ٢-٣ دقائق تقريباً حتى يذاب الآجاروز تماماً، لكن دون زيادة تسخين خليط الجل (انظر: الملاحظة ١).
٥. بروميد الأيثيديوم (3, 8-diamino-5-ethyl-6-phenylphenan thridinium bromide, EtBr) ٢ : ٢ مليجرام / مل (انظر: الملاحظة ٢ و ٣).
٦. أي صبغة مناسبة لتحميل لحمض الـ DNA.
٧. معلم أو سلم DNA (Ladder) معروف الأحجام، كـمقياس لقدرة الفصل الكهربائي.

٢-٣: التجهيزات:

١. ممصات دقيقة.
٢. جهاز للتفاعل البلمرة المتسلسل.
٣. وحدة الفصل الكهربائي.
٤. مزود الطاقة.
٥. جهاز الفصل الكهربائي بالأشعة فوق بنفسجية UV transilluminator.
٦. نظام توثيق.
٧. خلاط.
٨. جهاز طرد مركزي.
٩. ميزان.
١٠. فرن مايكرويف.

٣- طرق العمل:

ضع كافة المكونات والعينات في الثلج، ثم قم بإذابتهم واخلطهم وعمل طرد مركزي قبل استخدامهم.

٣-١: مكونات تضخيم الـ PCR:

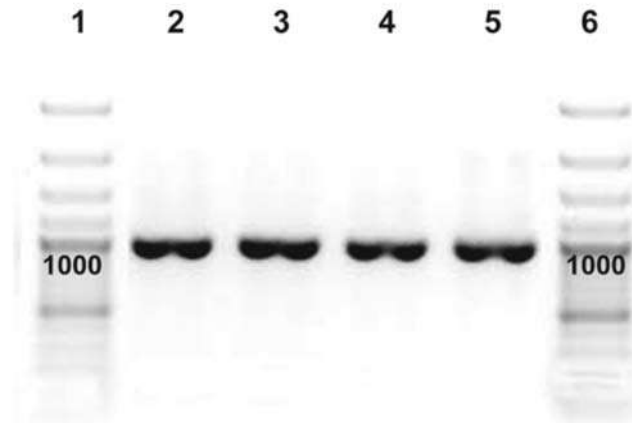
١. جهاز تفاعل الـ ٢٥ ميكروليترا PCR، بخلط (سحب) المواد التالية في أنبوب من أنابيب الـ PCR ٠,٢ مل: 2.5 ميكروليتر من محلول مُنظم الـ PCR $10\times$ بدون الـ $MgCl_2$ ، ٢ ميكروليتر من $MgCl_2$ 25 mM، ١٧,٨٥ ميكروليتر من الـ ddH₂O، ١ ميكروليتر من الـ dNTPs 5 mM، ٠,٢٥ ميكروليتر من الـ ١٠٠ ميكرومول للبادئ ٢، ٠,٢ ميكروليتر من إنزيم بلمرة الـ DNA (*Taq* U) / 5 ميكروليتر). ويمكن تجهيز الخلطة الرئيسية حسب عدد التفاعلات التي سيتم اختبارها. وتشتمل العينات التالية: شاهدا فقط للماء، وشاهدا سلبيا للنبات السليم، وشاهدا موجبا للحمض الـ DNA الخاص بالنباتات المصابة بالفيتوبلازما. اخلطهم باستخدام الهزاز، واعمل طردا مركزيا على أقل سرعة. وبعدها، قسمهم في أنابيب PCR ٠,٢ مل، حيث يحتوي كل أنبوب على ٢٤ ميكروليترا من الخليط.
٢. اسحب بالماصة ١ ميكروليتر (أي، 20-50 ng) من قالب الـ DNA، وضعهم مع خليط التفاعل.
٣. اخلط برفق لمزج العينة مع خليط تفاعل الـ PCR، واعمل طردا مركزيا لفترة قصيرة في جهاز الطرد المركزي.
٤. يتم برمجة دورة الـ PCR، ويبدأ التفاعل الـ PCR (المباشر) الأول وفقاً للتعليمات الموضحة في العنوان الفرعي ٢,٣.
٥. بالنسبة لتفاعل الـ PCR (المتداخل) الثاني، يمكن إضافة ١ ميكروليتر من مادة الـ PCR الناتجة من التفاعل الأول إلى تفاعل الـ PCR المتداخل مع المواد نفسها، والمكونات مثل الخطوة الأولى السابقة. ويُفضل -في بعض الأحيان- تخفيف الـ DNA؛ يخفف ناتج الـ PCR ٤٠ مرة في ddH₂O، واستخدمها قالباً في تفاعل الـ PCR المتداخل (انظر: الملاحظة ٤).
٦. كرر الخطوات ٣ و ٤.
٧. احفظ ناتج الـ PCR على درجة حرارة 4°C لأجل الفصل الكهربائي أو تحليل التسلسل، ويمكن تخزينها لفترة طويلة في حالة حفظ تفاعلات الـ PCR في درجة حرارة 20°C -.

٣-٢: شروط تدوير تفاعل الـ PCR:

٣-٢-١: مجموعة الـ 16SrI و 16SrII:

١. استخدام بادئات الـ fTuf1/rTuf1 لتفاعل الـ PCR المباشر وفقاً للشروط التالية:
 - عملية الفصل الرئيسية: 90°C لمدة ٩٠ ثانية.
 - التضخيم: ٣٥ دورة (94°C لمدة ٣٠ ثانية، 45°C لمدة ٣٠ ثانية، 72°C لمدة ٦٠ ثانية).

- التمديد: 72°C لمدة 10 دقائق.
- حجم الناتج: 1، 038 bp.
- ٢. استخدام بادئات الـ rTufAy/rTufAy لتفاعل الـ PCR المتداخل وفقاً للشروط التالية:
 - عملية الفصل الرئيسية: 94°C لمدة 4 ثوان.
 - التكرير: 35 دورة (94°C لمدة 30 ثانية، 53°C لمدة 30 ثانية، 72°C لمدة 60 ثانية).
 - التمديد: 72°C لمدة 5 دقائق.
 - حجم الناتج: 940 bp.



شكل (١): استخدام الناتج من PCR لتفاعل *Tuf* جين بواسطة البادئات الـ rTufAy/rTufAy. الخط من ١ و٦: عبارة عن GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas)؛ والخط ٢-٥: عينات مصابة لمرض (stolbur) على نباتات الحشائش. (٢) عشبة القريص. (٣) العنب. (٤) الطماطم. (٥).

٣-٢-٢: مجموعة *Tuf* لـ 16SrXII-B

١. استخدام بادئات الـ PaTCIF/PaTCIR (نوع ١) أو PaTC2F/PaTC2R (نوع ٢) وفقاً للشروط التالية:

- عملية تضخيم أولي: 1 دورة (92°C لمدة 2 دقيقة، 51°C لمدة 1 دقيقة، 72°C لمدة 2 دقيقة).
- التضخيم: 35 دورة (92°C لمدة 45 ثانية، 51°C لمدة 1 دقيقة، 72°C لمدة 1 دقيقة).
- حجم الناتج: 553 bp.

٣-٢-٣: مجموعة *Tuf* لـ 16SrV

١. استخدام بادئات الـ FDTUF-F1/FDTUF-R1 لتفاعل الـ PCR المباشر وفقاً للشروط التالية:

- عملية الفصل الرئيسية: 92°C لمدة 60 ثانية.

- التضخيم: ٣٥ دورة (92°C لمدة ٣٠ ثانية، 56°C لمدة ٣٠ ثانية، 77°C لمدة ٦٠ ثانية).
- التمديد: 66°C لمدة ٥ دقائق.
- حجم الناتج: 1.079 bp.
- ٢. استخدام البادئات FDTUF-F2/FDTUF-R2 لتفاعل PCR المتداخلة وفقاً للشروط المباشرة السابقة نفسها للـ PCR.
- حجم الناتج: 998 bp.

٣-٢-٤: SecY مع مجموعة 16Sr (*Ca . Phytoplasma asteris*):

١. استخدام بادئات الـ AYsecYF1/AYsecYR1 وفقاً للشروط التالية:
 - عملية الفصل الرئيسية: 94°C لمدة ١٠ دقائق.
 - التضخيم: ٣٨ دورة (94°C لمدة دقيقة واحدة، 55°C لمدة ٢ دقيقة، 72°C لمدة ٣ دقائق).
 - التمديد: 72°C لمدة ٧ دقائق.
 - حجم الناتج: ~1.4 kb.

٣-٢-٥: SecY مع مجموعة 16Sr (*Ca . Phytoplasma aurantifolia*):

١. استخدام بادئات الـ SecYF1(II)/SecYR1(II) في تفاعل PCR المباشر وفقاً للشروط التالية:
 - عملية الفصل الرئيسية: 94°C لمدة ١ دقيقة.
 - التضخيم: ٣٥ دورة (94°C لمدة ٣٠ ثانية، 50°C لمدة ١ دقيقة، 68°C لمدة ٥ دقائق).
 - التمديد: 72°C لمدة ١٠ دقائق.
 - حجم الناتج: ~1.7 kb.
٢. استخدام بادئات الـ SecYF2(II)/SecYR1(II) لتفاعل الـ PCR المتداخل وفقاً لشروط الـ PCR المباشرة نفسها.
 - حجم الناتج: ~1.7 kb.

٣-٢-٦: SecY مع مجموعة 16Sr (Western X *Phytoplasma Group*):

١. استخدام بادئات الـ SecYF1(III)/SecYR1(III) لتفاعل الـ PCR المباشر وفقاً للشروط التالية:
 - عملية الفصل الرئيسية: 94°C لمدة ١ دقيقة.
 - التضخيم: ٣٥ دورة (94°C لمدة ٣٠ ثانية، 50°C لمدة ١ دقيقة، 68°C لمدة ٥ دقائق).
 - التمديد: 72°C لمدة ١٠ دقائق.
 - حجم الناتج: ~1.7 kb.

٢. استخدام بادئات الـ SecYF2(III)/SecYR1(III) لتفاعل الـ PCR المتداخل وفقاً للشروط التالية:

- عملية الفصل الرئيسية: 94°C لمدة ١ دقيقة.
- التضخيم: ٣٥ دورة (94°C لمدة ٣٠ ثانية، 55°C لمدة ١ دقيقة، 68°C لمدة ٥ دقائق).
- التمديد: 72°C لمدة ١٠ دقائق.
- حجم الناتج: $\sim 1.7\text{ kb}$.

٧-٢-٣: SecY مع مجموعة (Ca . Phytoplasma trifolii)16Sr

١. استخدام بادئات الـ SecYF1(VI)/SecYR1(VI) لتفاعل الـ PCR المباشر وفقاً للشروط التالية:

- عملية الفصل الرئيسية: 94°C لمدة ١ دقيقة.
- التضخيم: ٣٥ دورة (94°C لمدة ٣٠ ثانية، 50°C لمدة ١ دقيقة، 68°C لمدة ٥ دقائق).
- التمديد: 72°C لمدة ١٠ دقائق.
- حجم الناتج: $\sim 1.8\text{ kb}$.

٢. استخدام بادئات الـ SecYF2(VI)/SecYR1(VI) لتفاعل الـ PCR المتداخل وفقاً للشروط التالية:

- عملية الفصل الرئيسية: 94°C لمدة ١ دقيقة.
- التضخيم: ٣٥ دورة (94°C لمدة ٣٠ ثانية، 55°C لمدة ١ دقيقة، 68°C لمدة ٥ دقائق).
- التمديد: 72°C لمدة ١٠ دقائق.
- حجم الناتج: $\sim 1.7\text{ kb}$.

٨-٢-٣: SecY مع مجموعة 16SrV

١. لتفاعل الـ PCR المباشر، استخدام إما بادئات الـ FD9f/FD9r بالشروط التالية:

- عملية الفصل الرئيسية: 92°C لمدة ٩٠ ثانية.
- التضخيم: ٤٠ دورة (92°C لمدة ٣٠ ثانية، 54°C لمدة ٣٠ ثانية، 72°C لمدة ٨٠ ثانية).
- التمديد: 72°C لمدة ١٠ دقائق.
- حجم الناتج: 1.3 kb .

أو استخدام بادئات الـ FD9r/FD9F2L بالشروط التالية:

- عملية الفصل الرئيسية: 92°C لمدة ١ دقيقة.
- التضخيم: ٤٠ دورة (92°C لمدة ١ دقيقة، 55°C لمدة ١ دقيقة، 66°C لمدة ٣٠ ثانية).

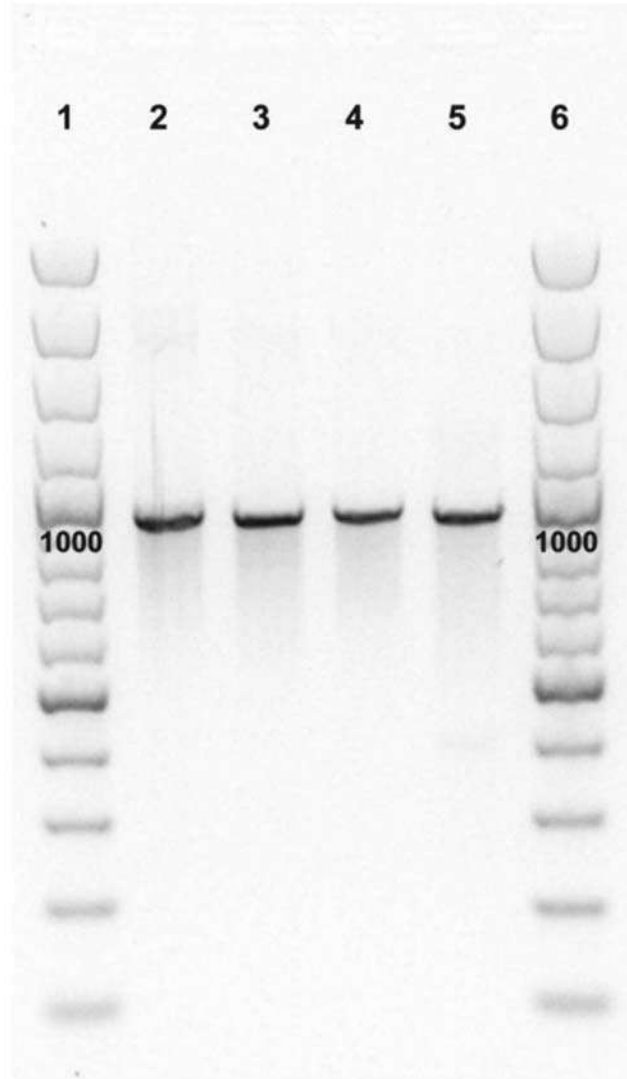
- التمديد: 66°C لمدة ٥ دقائق.
- حجم الناتج: 1، 343 bp.
- ٢. استخدام بادئات الـ FD9r2L/FD9f3L لتفاعل الـ PCR المتداخل وفقاً للشروط التالية:
 - عملية الفصل الرئيسية: 92°C لمدة ١ دقيقة.
 - التضخيم: ٣٥ دورة (92°C لمدة ١ دقيقة، 55°C لمدة ١ دقيقة، 66°C لمدة ٣٠ ثانية).
 - التمديد: 66°C لمدة ٥ دقائق.
 - حجم الناتج: 1، 174 bp.

٩-٢-٣: مجموعة SecY 16SrX (*Phytoplasma mali*, *Phytoplasma pyri*, *Ca* . , *Ca* . *Phytoplasma prunorum*):

١. استخدام بادئات الـ SecYMalF1/SecYMalR1 لتفاعل الـ PCR المباشر وفقاً للشروط التالية:
 - عملية الفصل الرئيسية: 95°C لمدة ٣ دقائق.
 - التضخيم: ٢٠ دورة (94°C لمدة ٣٠ ثانية، 50°C لمدة ٣٠ ثانية، 66°C لمدة ٤٥ ثانية).
 - التمديد: 66°C لمدة ٥ دقائق.
 - حجم الناتج: 664 bp.
٢. استخدام بادئات الـ SecYMalF2/SecYMalR2 لتفاعل الـ PCR المتداخل بالشروط نفسها المستخدمة للـ PCR المباشر، لكن استخدام ٣٥ دورة لتضخيم:
 - حجم الناتج: 691 bp.

١٠-٢-٣: مجموعة الـ 16SrXII-A (*Stolbur 'Bois noir' Phytoplasma*) (الشكل ٢):

١. استخدام بادئات الـ PosecF1/PosecR1 لتفاعل الـ PCR المباشر وفقاً للشروط التالية:
 - عملية الفصل الرئيسية: 94°C لمدة ٣ دقائق.
 - التضخيم: ٣٥ دورة (94°C لمدة ٣٠ ثانية، 62°C أو 54°C لمدة ٣٠ ثانية، 72°C لمدة ٦٠ ثانية).
 - التمديد: 72°C لمدة ١٠ دقائق.
 - حجم الناتج: 1، 052 bp.
٢. استخدام الـ PosecF3 أو الـ POSECN2 مع الـ PosecR3 لتفاعل الـ PCR المتداخل بالشروط نفسها المستخدمة للـ PCR المباشر.
 - حجم الناتج: 998 bp.



شكل (٢): استخدام الناتج من PCR لتفاعل *SecY* جين بواسطة البادئات PosecN2/PosecR3. الخط من ١ و٦: عبارة عن GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas)؛ والخط ٢-٥: عينات مصابة لمرض (stolbur) على نباتات الحشائش. (٢) عشبة القريص. (٣) العنب. (٤) والطماطم. (٥).

٣-٣: الفصل الكهربائي للجل:

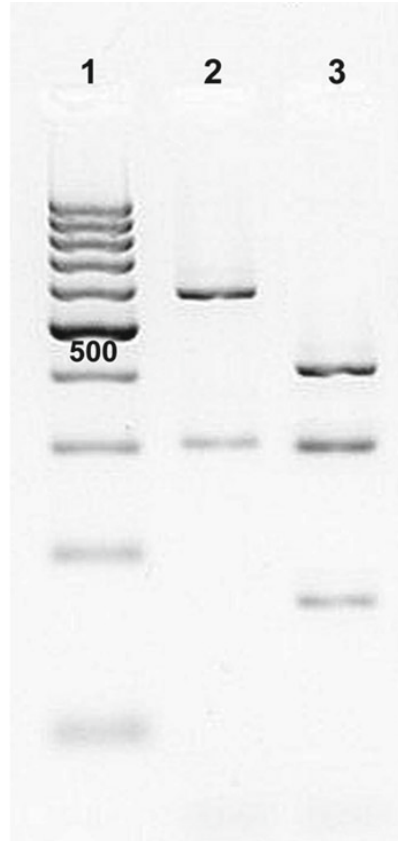
١. صب ٥٠-١٠٠ مل تقريباً من الآجاروز ١٪ الذائب (إلى المحلول المنظم TAE 1×) في حوض بلاستيكي مغلق للحصول على عمق 5 mm من الجل السائل. وسريعاً، أدخل المشط البلاستيكي لإنتاج الحفر مكان وضع عينات الـ PCR، وقم بإزالة الفقاعات باستخدام الماصة.

٢. ركب معدات جهاز الفصل الكهربائي أثناء تبريد الجل على درجة حرارة الغرفة.

٣. اترك الجل حتى يتصلب على درجة حرارة الغرفة لمدة ٣٠-٦٠ دقيقة.
٤. يتم وضع الحوض بالجل المتصلب في جهاز الفصل الكهربائي.
٥. املاً حوض المحلول المنظم بـ $1 \times TAE$ حتى يُغطي الجل؛ ويجب أن يُغطي الجل بمقدار 0.2-0.5cm.
٦. قم بإزالة المشط برفق.
٧. انقل ٥-١٠ ميكروليترات من ناتج الـ PCR إلى أنبوب جديد، وأضف ٠,٥ - ١ ميكروليتر من صبغة التحميل التي سبق تدفئتها في درجة حرارة $40^{\circ}C$ ، واخلطهم بالتقليب أو بالماصة، وإن لزم الأمر، جمع المواد السابقة بعمل طرد مركزي.
٨. حمل ٢-١٠ ميكروليترات من السلم DNA في الحفرة الأولى والأخيرة للجل. وبعدها، حمل ٥,٥-١١ ميكروليترا من العينة إلى الحفر الأخرى.
٩. ركب معدات جهاز الفصل الكهربائي، ثم وصل الأقطاب بمزود الطاقة.
١٠. شغل الجل بـ ٨٠ فولتاً (حوالي 8 V/ cm من طول الجل). ثم أوقف عمل جهاز الفصل الكهربائي عند وصول الصبغة الأمامية (bromophenol blue band) إلى ثلثي الجل.
١١. أطفئ مزود الطاقة، وافصل مقباس معدات جهاز الفصل الكهربائي، وانقل الجل لمدة ١٥ دقيقة إلى محلول صبغ يحتوي على ٢ ميكروجرام / مل من بروميد الأثيديم في ddH₂O (انظر: الملاحظة ٥).
١٢. أزل الصبغة في ٢٠٠ مل من الـ ddH₂O لمدة ١٥ دقيقة.
١٣. يتم تصوير ناتج الـ PCR من على الجل باستخدام الجهاز الضوئي بالأشعة فوق البنفسجية عند طول موجي ٣٠٢ نانومتر (انظر: الملاحظة ٦). وقم بالتقاط صور للتوثيق (مثل: باستخدام نظام من أنظمة توثيق الجل).
١٤. يمكن تجفيف الجل المصبوغ في درجة حرارة الغرفة بعد استخدامه، ويجب التخلص منه بطرق غير ملوثة للبيئة.

٣-٤: تحليل الـ RFLP:

١. يتم إجراء تحليل الـ RFLP لناتج الـ PCR من خلال التقطيع بواسطة الإنزيمات الهاضمة وفقاً لتوصيات الشركة المصنعة.
٢. يمكن مشاهدة الأنماط بواسطة الفصل الكهربائي بالجل (٤، ٢٨) (شكل ٣).

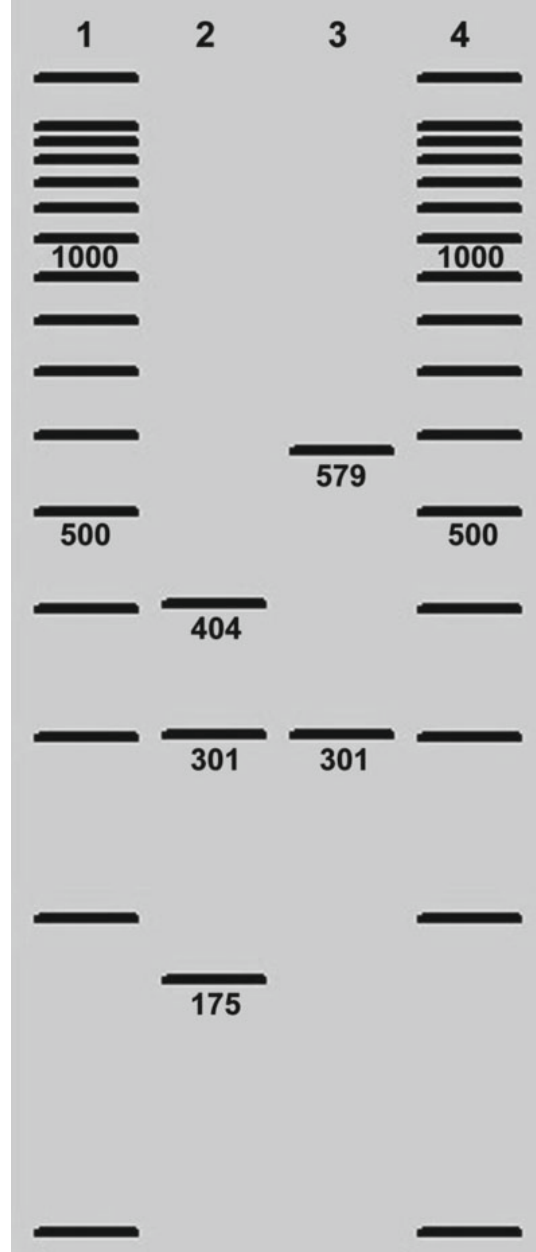


شكل (٣): أنماط الإنزيم الهاضم *HpaII* الناتج من RFLP من ناتج الـ PCR لجين *tuf* باستخدام البادئات *fTufAy/rTufAy*. خط ١: GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder (Fermentas) وخط ٢: stolbur-infected bindweed plant، وخط ٣: stolbur-infected grapevine.

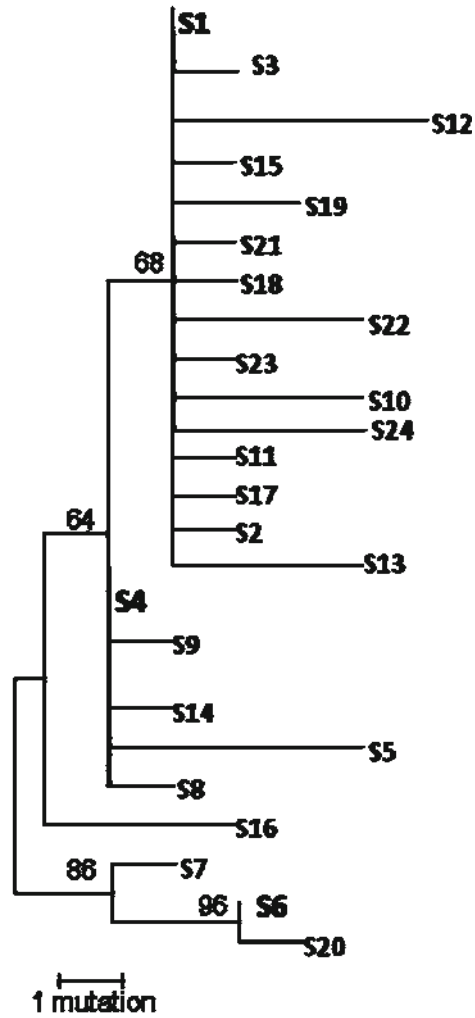
٣- ٥: تسلسل الجيني والتحليل الإضافية:

١. يمكن إجراء تفاعلات التسلسل الجيني لناتج الـ PCR بطرق مأخوذة من طريقة Sanger العادية التي يتبعها تحليل التسلسلي بالجهاز، ويتم وضع تسلسل لجميع ناتج التضخيم على كلا الجهتين للوصول إلى التغطية $\times 2$.
٢. يتم تجميع كافة الكروماتوجرامات المتسلسلة الأصلية وتحليلها باستخدام مجموعة متنوعة من البرامج، على سبيل المثال: preGAP4 و GAP4 software (Staden Package)، PHRED-PHRAP-CONSED bioinformatic package أو (<http://staden.sourceforge.net>) أو (<http://www.phrap.org>).
٣. يمكن عمل أنماط خاصة للـ RFLP بواسطة برامج محاكاة؛ باستخدام pDraw، MapDraw (Lasergene)، أو برامج أخرى (شكل ٤).

٤. يتم تنظيم التسلسل الجيني وتطابقه باستخدام برامج ClustalW software، وبالتحليل الجينية باستخدام طريقة التحليل الأقصى التي يمكن إجراؤها بـ MEGA software (<http://megasoftware.net>) (شكل ٥). ويتم تقييم صحة فروع شجرة التقارب من خلال bootstrapping.



شكل (٤): الأنماط باستخدام الكمبيوتر لـ RFLP *HpaII* مع ناتج جين *tuf*: خط ١ و٤ حجم السلام، خط ٢: Ca. P. solani' isolate R47/5، خط ٣: *Phytoplasma solani*' isolate R49/15 (GenBank no. FJ394551). (GenBank no. FJ394552).



شكل (٥): التحليل الأقصى للتسلسل الجيني لـ *secY* (S1-s24) لعزلة الفيتوبلازما stolbur باستخدام برنامج MEGA. الأرقام التي على الأفرع تشير إلى النسبة المئوية للتقارب.

٤- الملاحظات:

١. يمكن إعداد كميات أكبر، وتخزينها على درجة حرارة الغرفة، أو في درجة حرارة 4 مئوية حتى يكون هناك حاجة لها.
٢. يعتبر بروميد الأيثيديوم متغيراً قوياً. لذا، استخدم -دائماً- قفازات عند التعامل مع المحاليل التي تحتوي على بروميد الأيثيديوم. ويجب التخلص من (المحاليل، ومواد الجل، وكافة المواد المتلوثه، والقفازات، والمناشف الورقية، والأنابيب، وغيرها) بطرق آمنة، ويجب التعامل معها على أنها مواد خطيرة. وإن لزم الأمر، يتم شراء محاليل مركزة سائلة لتجنب استخدام البودر.

٣. يوصى باستخدام الصبغات الحمضية النووية التي لا تُسبب تشوهات جينية، مثل: الصبغة الحمضية النووية GelRed™ (Biotium Ltd.)، والصبغة الحمضية النووية GoodView™ (SBS)، والصبغة الحمضية النووية Ultra Power™ (مؤسسة BioTeke).
٤. يوصى باستخدامها لارتفاع كفاءة PCR فيها، وهناك بديل من البدائل الموصى بها؛ وهو تقليل عدد دورات PCR المباشر. وبالرغم من ذلك، تعتبر خطوة تخفيف التركيز بين الـ PCR والـ PCR المتداخل مصدراً من مصادر تلوث الـ DNA الريباسومي؛ والذي يعطي نتائج إيجابية بالخطأ.
٥. يمكن استخدام محلول صبغة بروميد الأيثيديوم لمدة شهرين في حالة حمايته من الضوء. ويجب التخلص منه بالطرق المتبعة لحماية البيئة.
٦. يعتبر ضوء الأشعة فوق البنفسجية مسرطناً. لذلك، دائماً استخدم واقياً للوجه، ونظارات، وقفازات؛ لتجنب تعرض العين والبشرة المباشر لضوء الأشعة فوق البنفسجية.

المراجع:

1. The IRPCM Phytoplasma/Spiroplasma Working Team—Phytoplasma taxonomy group (2004) ‘ Candidatus Phytoplasma’, a taxon for the wall-less, non-helical prokaryotes that colonize plant phloem and insects. *Int J Syst Evol Microbiol* 54:1243–1255
2. Firrao G, Gibb K, Streten C (2005) Short taxonomic guide to the genus ‘ Candidatus Phytoplasma’. *J Plant Pathol* 87:249–263
3. Hodgetts J et al (2008) Phytoplasma phylogenetics based on analysis of secA and 23S rRNA gene sequences for improved resolution of candidate species of ‘Candidatus Phytoplasma’. *Int J Syst Evol Microbiol* 58:1826–1837
4. Langer M, Maixner M (2004) Molecular characterisation of grapevine yellows associated phytoplasmas of the stolbur-group based on RFLP-analysis of non-ribosomal DNA. *Vitis* 43:191–199
5. Schneider B, Gibb KS, Seemüller E (1997) Sequence and RFLP analysis of the elongation factor Tu gene used in differentiation and classification of phytoplasmas. *Microbiology* 143:3381–3389
6. Cimerman A et al (2009) Striking diversity of vmp1, a variable gene encoding a putative membrane protein of the stolbur phytoplasma. *Appl Environ Microbiol* 75:2951–2957
7. Fialová R et al (2009) Genetic variability of stolbur phytoplasma in annual crop and wild plant species in south Moravia (Czech Republic). *J Plant Pathol* 91:411–416
8. Murolo S et al (2010) Genetic variability of the stolbur phytoplasma vmp1 gene in grapevines, bindweeds and vegetables. *J Appl Microbiol* 109:2049–2059
9. Pacifico D et al (2009) Characterization of Bois noir isolates by restriction fragment length polymorphism of a Stolbur-specific putative membrane protein gene. *Phytopathology* 99: 711–715

10. Berg M et al (1999) Isolation of the gene encoding an immunodominant membrane protein of the apple proliferation phytoplasma, and expression and characterization of the gene product. *Microbiology* 145:1937–1943
11. Danet JL et al (2011) Multilocus sequence analysis reveals the genetic diversity of European fruit tree phytoplasmas and the existence of inter-species recombination. *Microbiology* 157:438–450
12. Danet JL et al (2007) Imp and sec Y, two new markers for MLST (multilocus sequence typing) in the 16SrX phytoplasma taxonomic group. *Bull Insectol* 60:339–340
13. Kakizawa S et al (2009) Cloning of immunodominant membrane protein genes of phytoplasmas and their in planta expression. *FEMS Microbiol Lett* 293:92–101
14. Kakizawa S, Oshima K, Namba S (2006) Diversity and functional importance of phytoplasma membrane proteins. *Trends Microbiol* 14:254–256
15. Kakizawa S et al (2006) Positive selection acting on a surface membrane protein of the plant-pathogenic phytoplasmas. *J Bacteriol* 188: 3424–3428
16. Fabre A, Danet JL, Foissac X (2011) The stolbur phytoplasma antigenic membrane protein gene stamp is submitted to diversifying positive selection. *Gene* 472:37–41
17. Schneider B, Seemüller E (2009) Strain differentiation of *Candidatus Phytoplasma mali* by SSCP- and sequence analyses of the *hfl B* gene. *J Plant Pathol* 91:103–112
18. Seemüller E, Schneider B (2007) Differences in virulence and genomic features of strains of ‘*Candidatus Phytoplasma mali*’, the apple proliferation agent. *Phytopathology* 97:964–970
19. Economou A (1999) Following the leader: bacterial protein export through the Sec pathway. *Trends Microbiol* 7:315–320
20. Angelini E et al (2003) Phylogenetic relationships among Flavescence dorée strains and related phytoplasmas determined by heteroduplex mobility assay and sequence of ribosomal and nonribosomal DNA. *Plant Pathol* 52: 663–672
21. Arnaud G et al (2007) Multilocus sequence typing confirms the close genetic inter-relatedness of three distinct flavescence dorée phytoplasma strain clusters and group 16SrV phytoplasmas infecting grapevine and alder in Europe. *Appl Environ Microbiol* 73: 4001–4010
22. Clair D et al (2003) A multiplex nested-PCR assay for sensitive and simultaneous detection and direct identification of phytoplasma in the Elm yellows group and Stolbur group and its use in survey of grapevine yellows in France. *Vitis* 42:151–157
23. Daire X et al (1992) Cloned DNA probes for detection of grapevine Flavescence dorée mycoplasma-like organism (MLO). *Ann Appl Biol* 121:95–103
24. Daire X et al (1993) Diversity among mycoplasma-like organisms inducing grapevine yellows in France. *Vitis* 32:159–163
25. Daire X et al (1997) Survey for grapevine yellows phytoplasmas in diverse European countries and Israel. *Vitis* 36:53–54
26. Daire X et al (1993) Occurrence of diverse MLOs in tissues of grapevine affected by grapevine yellows in different countries. *Vitis* 32:247–248
27. Daire X et al (1997) Detection and differentiation of grapevine yellows phytoplasmas belonging to the elm yellows group and to the stolbur subgroup by PCR amplification of non-ribosomal DNA. *Eur J Plant Pathol* 103:507–514

28. Lee IM et al (2010) Phylogenetic analysis and delineation of phytoplasmas based on secY gene sequences. *Int J Syst Evol Microbiol* 60: 2887–2897
29. Lee IM, Zhao Y, Bottner KD (2006) SecY gene sequence analysis for finer differentiation of diverse strains in the aster yellows phytoplasma group. *Mol Cell Probes* 20:87–91
30. Malembic-Maher S et al (2011) Genetic diversity of European phytoplasmas of the 16SrV taxonomic group and proposal of ‘*Candidatus Phytoplasma rubi*’. *Int J Syst Evol Microbiol* 61:2129–2134
31. Andersen MT et al (2006) Phylogenetic analysis of “*Candidatus Phytoplasma australiense*” reveals distinct populations in New Zealand. *Phytopathology* 96:838–845
32. Lee IM et al (2004) ‘*Candidatus Phytoplasma asteris*’, a novel phytoplasma taxon associated with aster yellows and related diseases. *Int J Syst Evol Microbiol* 54:1037–1048
33. Ahrens U, Seemüller E (1992) Detection of DNA of plant pathogenic mycoplasma-like organisms by a polymerase chain reaction that amplifies a sequence of the 16S rRNA gene. *Phytopathology* 82:828–832
34. Maixner M, Ahrens U, Seemüller E (1995) Detection of the German grapevine yellows (Vergilbungskrankheit) MLO in grapevine, alternative hosts and a vector by a specific PCR procedure. *Eur J Plant Pathol* 101: 241–250

تحليل ناتج الـ PCR الخاص

للفيتوبلازما للجين *secA*

Matt Dickinson and Jennifer Hodgetts

ملخص:

من الناحية العملية، تم إسناد تشخيص تطور سلالات الفيتوبلازما بشكل أساسي لجين 16S rRNA، وذلك لتوفر البادئات "العامة" التي تضخم معظم مجموعات الفيتوبلازما 16Sr. ومع ذلك، في السنوات الأخيرة أجريت محاولات لتطوير البادئات "العامة" للجينات الأخرى التي يمكن استخدامها لاستكمال استخدام جين 16S rRNA. ويعمل هذا الفصل على شرح استخدام البادئات وتفصيلها وفقاً لجين الفيتوبلازما *secA*، ويصف الطريقة التي يمكن بها استخدام هذه البادئات في كل من الـ PCR المباشر والمتداخل لإجراء عملية التضخيم. ويُشير -أيضاً- إلى استخدام الضوابط المناسبة التي ينبغي اتخاذها في حالة استخدام مصادر التسلسل لجين *secA* phytoplasma المتوفرة في قاعدة البيانات، ولتحليل تطور السلالات.

الكلمات المفتاحية: التشخيصات، تفاعل البوليميراز المتسلسل، *secA* gene، *cox* gene، تحليل التطور السلالات.

١- المقدمة:

تاريخياً، تم الاعتماد على تطور سلالات الفيتوبلازما وتشخيصاتها على جين الـ 16S rRNA، ويرجع هذا الأمر إلى توفر البادئات "العامة" لهذا الجين (١) (أيضاً اطلع على Duduk وآخرين (٢)، الفصل الرابع عشر). وبالرغم من ذلك، فقد تم ملاحظة -أيضاً- أن البادئات "العامة" الأساسية لها القدرة على تضخيم المواد الناتجة من البكتريا المشابهة للغالبية -مثل: بكتريا الـ *Bacillus spp* -، الأمر الذي يؤدي إلى ظهور نتائج اختبار إيجابية، ومنه يكون التشخيص خاطئاً (٣). وبالنسبة لتحليل التطور للكائنات الحية الدقيقة، فقد تم ملاحظة -مؤخراً- أن دراسات النشوء والتطور التي تستند على جين واحد ثابت -مثل: جين 16S rRNA- لها محدودية، وخصوصاً عندما يتعلق الأمر بتحديد المجموعات الفرعية أو اختلاف السلالات داخل المجموعات الفرعية،

والطريقة المستخدمة حالياً بالنسبة لغالبية الكائنات الحية الدقيقة الأخرى هي إعادة بناء شجرة التقارب من خلال جمع بيانات التسلسل الجيني مع بعض من مجموعات جينية مختلفة. وبالرغم من أنه يصعب العثور على البادئات لعدد من جينات الفيتوبلازما التي يمكن أن تُستخدم لعمليات التضخيم من المجموعات الفرعية الموجودة بداخل المجموعة 16Sr، والتي تُستخدم في بعض الأحيان لعملية التضخيم من المجموعات المتشابهة للغالبية، وقد تم إثبات صعوبة العثور على جين يمكن استخدامه لتصميم بادئات عامة تستخدم للتضخيم مع كافة مجموعات الفيتوبلازما؛ وذلك لأن التسلسل الجيني يختلف بين السلالات. وقد قام Martini وآخرون (٤) و Lee و Martini (٥) -الفصل الخامس عشر- بتطوير بادئات على أساس جينات البروتين الريباسيومي (*rp*)، وتم التأكد من صحتها لمعظم مجموعات الـ 16Sr، بالرغم من عدم قدرتها على تضخيم مجموعات الـ 16SrII والـ 16SrXI. ونقوم في هذا الفصل بطرح تفاصيل البادئات وفقاً لجين الـ *secA* -مثل: بادئ جين الـ *rp*- والذي يمكنه أن يضخم من كل مجموعات الـ 16Sr الرئيسية، بما فيها الـ 16SrII، ولكنه مثل بادئ جين الـ *rp*، لا يعتمد - أيضاً - على فيتوبلازما الـ 16SrXI.

وفي الأساس، تم وضع تسلسل جين الـ *secA* -والذي يُرمز الـ SecA- حيث تم اكتشافه لك ATP من خلال تتابع حركة تحول البروتين في نظام البكتريا، والذي في الأصل تم معرفة تسلسله من خلال فيتوبلازما اصفرار البصل جزءاً من مشروع معرفة تسلسل الجينوم (٦). وفي العمل التالي، قمنا بتنظيم تسلسل جين الـ *secA* فيتوبلازما اصفرار البصل في صفوف مع جين فيتوبلازما aster yellows witches' broom والجين المشابه من فيتوبلازما coconut lethal yellowing الموجود في مجموعة الـ 16SrIV (٧). ووفقاً لهذه الصفوف، تم تصميم ثلاث بادئات يمكن استخدامها في تحليل الـ PCR شبه المتداخل: SecAFor1، SecAFor2، و SecARev3. وعندما تم استخدام زوج البادئات SecAFor1/SecARev3 في الـ PCR، تم إنتاج ٨٤٠ bp من العينات، حيث كان تركيز الفيتوبلازما فيها عالياً. ومنه تم إعادة تضخيم هذا المنتج من الدورة الأولى بتخفيفه واستخدام البادئات SecAFor2/SecARev3 وإنتاج 480 bp، بما في ذلك العينات التي لم يتم اكتشاف الفيتوبلازما بها في الدورة الأولى. وبالرغم من ذلك - كما ذكر في (٧) - يمكن أن تُنتج أيضاً هذه البادئات المتداخلة مع منتجات PCR أخرى أحجاماً مختلفة، الأمر الذي قد يؤدي إلى اختلال في علمية التشخيص. لذلك، قمنا لاحقاً بإعادة تصميم بادئات جديدة وتطويرها (SecARev2 و SecAFor5) لوضع طريقة للـ PCR المتداخل، والذي من خلاله ينتج 600 bp واضحة (٨). وفضلاً عن هذا، فقد لاحظنا في نتائج لم تُنشر أنه أثناء الدورة الأولى يمكن للبادئات في بعض الأحيان أن تنتج وتتفاعل مع البكتريا التي تعيش داخل كائنات حية أخرى مثل: *Wolbachia spp*، وخصوصاً من عينات الحشرات، وعندما تم تحليل هذه العينات بالـ PCR المتداخل لم يكن هناك أي تضخم آخر، وحتى اليوم لم نجد أي منتجات من أي كائنات حية دقيقة أخرى بعيداً عن الفيتوبلازما تستخدم النهج المتداخل الكامل.

ولإكمال استخدام بادئات جين *secA*، فقد قمنا - أيضاً - بالإشارة إلى تجربة تكميلية تقوم على جين نباتي السيتوكروم أوكسيداز (cytochrome oxidase *cox*) (٩)، والذي نوصي باستخدامه على كافة العينات المأخوذة من النباتات، والذي يتبين أنها سالبة بعد الـ PCR باستخدام بادئات الـ *secA*. وقد تم توضيح أن هذه البادئات تُضخم العينة بما يقرب من 200pb من أنواع النباتات التي قمنا باختبارها. ومن ثم، يمكن استخدامها لإثبات أن عينات الـ DNA تُعمل مع الـ PCR ولا تحتوي على مثبطات الـ PCR. وبالتالي، يمكن استبعاد النتائج السلبية الخاطئة. وفي النهاية، قمنا بتوضيح طريقة من الطرق ووصفها لتنظيف الـ DNA سريعاً، ويمكن استخدامها لإزالة مثبطات الـ PCR في العينات التي لا تعمل مع الـ PCR، وفقاً لطريقة Hirsch و Cullen (١٠).

٢- المواد:

يجب تجهيز كافة المحاليل بالماء المعقم المقطر في مكان بعيد عن مكان النبات و DNA الفيتوبلازما التي يتم التعامل معها. وينبغي استخدام ممصات Gilson (أو ما يُعادلها)، ويتم تخصيصها للعمل مع كافة البادئات وتجهيزات تفاعل الـ PCR بدون الـ DNA، مع مجموعة من المجموعات المنفصلة، والتي تُستخدم للتعامل مع الـ DNA والفصل الكهربائي للجل.

١-٢: PCR:

١. أنابيب PCR (٢٠٠ أو ٥٠٠ ميكروليتر).
٢. أنابيب Eppendorf (١,٥ مل).
٣. بادئات (10 ميكرومل) (الجدول ١).
٤. مواد PCR. نقوم -بشكل عام- باستخدام (إما -To-Go™ PCR IllustraPuReTaq Ready- (Amersham، GE Healthcare، UK، London) أو MangoMix™ (Bioline، UK، London) (انظر: الملاحظة ١).
٥. خلاط هزاز.
٦. جهاز للـ PCR.
٧. ممصات.
٨. ماصات مفلتر (٢٠، ٢٠٠، و ١٠٠٠ ميكروليتر).
٩. ماء مُعقم مقطر (ddH₂O).

٢-٢: الفصل الكهربائي:

١. آجاروز.
٢. جهاز فصل كهربائي أفقي.
٣. محلول مُنظم TBE (10× stock): وزن ١٠٨ جم، من تريزما (Trizma) قاعدي و٥٥ جم من حمض البوريك. أضف ٤٠ مل من 0.5 M EDTA (حمض ethylenediaminetetraacetic) (انظر: الملاحظة ٢)، ويتم استكمالهم وخلطهم إلى ١ لتر من الماء المقطر. ويتم تخزينهم على دراجة حرارة الغرفة. ولعمل 1x من المحلول، يتم تخفيف ١٠ مل تركيز 10x مع 90 مل ماء مقطر.
٤. صبغة الحمض النووي GelRed™ (UK، Cambridge، Biotium) نقوم باستخدام 10، × 000 من محلول التخزين (انظر: الملاحظة ٣).
٥. سلم الـ DNA (1 kb): نستخدم في هذا البروتوكول Promega 1 kb ladder، ولكن قد يتم استخدام مواد أخرى.
٦. يتم استخدام الأشعة فوق البنفسجية ونظام تصوير الالتقاط صورة للجل.

الجدول (١): تسلسلات البادئات لجين *secA* المستخدم في هذه الطرق:

Name	Sequence (5'-3')
SecAFor1	GARATGAAAACCTGGRGAAGG
SecARev3	GTTTTTRGCAGTTCCTGTCATNCC
^a SecAFor5-u	ASTCGTGAAGCTGAAGG
^a SecAFor5-1	AGCTAAAAGAGAATTTGAAGG
^a SecAFor5-LY	CTGATAGAGAAGCTAATGG
SecARev2	CCNTRCCTAAATTGNCGTCC
CoxF3	TATGGGAGCCGTTTTTGC
CoxB3	ACTGCTAAGRGCATTCC

^aThe SecAFor5 primer is a mixture of these 3 primers, each at 10 μM

٣-٢: تنظيف الـ DNA:

١. Micro Bio-Spin chromatography column (3 cm) (Bio-Rad, Hemel Hempstead, UK).
٢. بودر (PVPP) (vinylpolypyrrolidone) Poly.
٣. جهاز طرد مركزي.
٤. أنابيب طرد مركزية صغيرة (١,٥ مل).

٥. ماء مقطر ومُعقم (ddH₂O).

٣- طرق العمل:

قم بتنفيذ كافة الإجراءات على درجة حرارة الغرفة، ما لم يُذكر خلاف ذلك.

٣-١: تجهيز خليط تفاعل الـ PCR *secA* وتنفيذ الـ PCR:

١. أنابيب PCR.
٢. قم بعمل الخليط الأساسي للعينات $n + 1$. وتعتمد الكمية على عدد العينات التي سيتم اختبارها، بما فيها الشاهد الإيجابي وشاهد الماء (n). على سبيل المثال، لو كان هناك ٦ عينات سيتم اختبارها يصبح الـ $n = 8$ بمجرد ضم شاهد الإيجابي والماء. وبالتالي، يتم عمل الخليط الرئيسي لتفاعلات $n + 1 = 9$. ولو كان هناك ٢٠ عينة، $n = 22$ ، سيتم عمل الخليط الرئيسي لـ ٢٣ تفاعلاً، وهكذا.
٣. يعتمد استهلاك الخليط الرئيسي على استخدام whether PuReTaq Ready-To-Go™ PCR Beads أو MangoMix™. ويحتوي الـ PuReTaq Ready-To-Go™ PCR Beads (على n) $(22\mu\text{L ddH}_2\text{O} + 1 \text{ SecAFor1 primer} + 1\mu\text{L SecARev3 primer}) \times (n + 1)$ ويحتوي الخليط الرئيسي على $(9.5\mu\text{L ddH}_2\text{O} + 12.5\mu\text{L MangoMix}^{\text{TM}} + 1\mu\text{L SecAFor1 primer} + 1\mu\text{L SecARev3 primer}) \times (n + 1)$.
٤. لا بد من ارتداء القفازات في المنطقة التي يتم بها التعامل مع النبات و DNA الفيتوبلازما، واستخدام ممصات Gilson (أو ما يشبهها)، وتكون مخصصة للعمل في المنطقة الخالية من الـ DNA ومعها ماصات مفلترة، ويتم إضافة كمية من الخليط الرئيسي المطلوب إلى أنبوب بحجم ١,٥ مل. على سبيل المثال، إذا تم تجربة ٦ عينات ومعها شاهد سلبي وإيجابي ($n = 8$) ($n + 1 = 9$)، يتم إضافة ١٩٨ ميكروليترا من الـ ddH₂O، والبادئات ٩ ميكروليترات من الـ SecAFor1، و ٩ ميكروليترات من الـ 3SecARev (for PuReTaq Ready-To-Go™ PCR Beads)، أو إضافة ٨٥,٥ ميكروليترا من الـ ddH₂O، و ١١٢,٥ ميكروليترا من الـ MangoMix™، والبادئات ٩ ميكروليترات من الـ SecAFor1، و ٩ ميكروليترات من الـ SecARev3 (for MangoMix™). ويتم مزج الخليط جيداً، ثم يتم إضافة ٢٤ ميكروليترا إلى PuReTaq Ready-To-Go™ PCR Beads في لأنابيب (في حالة استخدام الحبيبات)، أو في أنابيب PCR مباشرةً (في حالة استخدام MangoMix™).
٥. من ثم تصبح الأنابيب جاهزة لإضافة عينة الـ DNA، التي قد تم تجهيزها بطريقة استراتيجية (اطلع على طريقة تجهيز الـ DNA). ويتم إغلاق أنابيب الـ PCR ونقلها من

- المنطقة الخالية من DNA الفيتوبلازما، ثم ضعهم في منطقة التعامل مع DNA الفيتوبلازما بها. استخدم ممصات Gilson غير التي تم استخدامها لعمل الخليط الرئيسي وبممصات مفلترة، ثم أضف 1 ميكروليتر من الـ DNA لكل عينة في أنبوب PCR مناسب. وبالنسبة للشاهد الموجب، أضف 1 ميكروليتر من العينة التي قد تم مسبقاً التأكد من فاعليتها مع طرقة PCR secA. وبالنسبة للشاهد السالب، أضف 1 ميكروليتر من الـ ddH₂O.
6. يتم تغطية الأنابيب ووضعها في جهاز PCR. ويتم برمجة جهاز PCR بالطريقة التالية: دورة واحدة في درجة حرارة 94°C لمدة دقيقتين، 30 دورة في درجة حرارة 94°C لمدة 30 ثانية، 53°C لمدة دقيقة واحدة، ودرجة حرارة 72°C لمدة دقيقة واحدة؛ ودورة واحدة في درجة حرارة 72°C لمدة 10 دقائق.
7. بعد دورة الـ PCR الأولى، يمكن تخزين المواد الناتجة في الفريزر لفترة طويلة، ويمكن تصوير الفصل الكهربائي للأجاروز جل (انظر: العنوان الفرعي 3-2)، أو تستخدم للـ PCR المتداخل قبل جل الفصل الكهربائي. وفي العموم، نقوم بعمل الـ PCR المتداخل قبل جل الفصل الكهربائي.
8. بالنسبة للـ PCR المتداخل، يتم عمل الخليط الرئيسي الطريقة السابقة نفسها في المنطقة الخالية من DNA الفيتوبلازما، ولكن باستخدام البادئات الـ SecAF والـ SecARev2 بدلاً من الـ SecAFor1 والـ SecARev3، ثم يتم إضافة 24 ميكروليترا في أنابيب PCR بالطريقة السابقة بنفسها، ويتم إغلاقها، ومن ثم يتم نقلها إلى منطقة يُسمح فيها بـ DNA الفيتوبلازما. أيضاً، في المنطقة الخالية من DNA الفيتوبلازما، يتم إضافة 39 ميكروليترا من الـ ddH₂O في أنابيب بحجم 0.5 ml، ثم يتم إغلاقها، وتقل هذه الأنابيب إلى منطقة يسمح بها DNA الفيتوبلازما.
9. في المنطقة التي يسمح فيها باستخدام DNA الفيتوبلازما، قم بتخفيف منتجات الدورة الأولى للـ PCR إلى 40 ضعفاً بإضافة (من 1 ميكروليتر إلى الـ 39 ميكروليترا) من الـ ddH₂O في أنابيب 0.5 مل، ويتم خلطها برفق، ثم يضاف 1 ميكروليتر من المواد المُخففة في تفاعل الـ PCR المتداخل.
10. يتم تغطيتها، ثم وضعها في جهاز PCR. ويتم تنفيذ الـ PCR باستخدام برنامج الدورة الأولى نفسها؛ دورة واحدة في درجة حرارة 94°C لمدة دقيقتين، 30 دورة في درجة حرارة 94°C لمدة 30 ثانية، 53°C لمدة دقيقة واحدة، ودرجة حرارة 72°C لمدة دقيقة واحدة؛ ودورة واحدة في درجة حرارة 72°C لمدة 10 دقائق.
11. بعد الـ PCR، قد تُخزن العينات في الفريزر، أو قد تُستخدم للرحلان الكهربائي للأجاروز جل.

٣-٢: الفصل الكهربائي للجل:

١. لإعداد ١٠٠ مل من جل الآجاروز ١٪، يتم وزن ١ جم من الآجاروز ووضعه في زجاجة Duran ٥٠٠ مل (أو ما يشابهها)، وأضف ١٠٠ مل 1× TBE، ثم أذب الآجاروز بحرص في الميكرويف، ثم برده لتصل درجة حرارته إلى 50°C، ثم أضف ١٠ ميكروليترات من محلول الـ 10.000× GelRed™، ثم اخلطهم جيدا وقم بصيهم في حوض الجل، ثم أدخل المشط، وأزل الفقاعات الهوائية، واتركه ليتصلب.
٢. بمجرد أن يبرد، أزل المشط، وضع الجل في حوض الفصل الكهربائي. واغمر الجل في محلول منظم 1× TBE.
٣. حمل ٥ ميكروليترات من منتجات الـ PCR في الحفرة. وإن تم إجراء الـ PCR باستخدام الـ MangoMix فلن يكون هناك حاجة لإضافة صبغة التحميل إلى العينات. ولكن، إذا تم تجهيز العينات باستخدام حبيبات الـ PCR، فيجب إضافة صبغة التحميل (انظر: الملاحظة ٤). ودائماً، أضف سلم الـ DNA إلى الحفرة الأولى و/ أو الأخيرة (انظر: الملاحظة ٥).
٤. وصل الأقطاب بالكهرباء (5 V/cm)، وشغل الجل حتى تصل صبغة التحميل بالقرب من نهاية الجل. يتم تصوير الجل بعد رفعه من الحوض بالأشعة فوق البنفسجية (انظر: الملاحظة ٦)، ثم صورته واطبعه/ وخرزته بالحاسب الآلي/ وفي كتاب المعمل.
٥. يجب أن تكون منتجات الـ PCR SecA لدورة الـ PCR الأولى 840 bp تقريباً، أما المواد الناتجة من الـ PCR المتداخل فينبغي أن تكون 600bp تقريباً. وإن تم مشاهدة نمط عينات الشاهد الموجب ولم تشاهد أي شيء في عينة شاهد الماء، فهذا يُشير إلى نجاح تفاعل الـ PCR. وإن لم يتم ظهور أي شيء في عينات الشاهد الموجب، فيجب إعادة الـ PCR. وإن تم رؤية أنماط في شاهد الماء، فيجب أيضاً إعادة التجربة، وتنظيف التجهيزات و/أو تغيير المحاليل أولاً.
٦. بالنسبة لعينات التجربة، إن تم رؤية منتجات الـ PCR بأحجامها الصحيحة في دورة الـ PCR الأولى والـ PCR المتداخل، فإنها تُشير إلى وجود الفيتوبلازما في التركيز العالي. وإن تم رؤية منتجات الـ PCR بأحجامها الصحيحة في الـ PCR المتداخل فقط، فإنها تُشير إلى وجود الفيتوبلازما في التركيز الأقل. وإن تم رؤية منتجات الـ PCR بأحجامها الصحيحة بعد الدورة الأولى ولكن ليس بعد الـ PCR المتداخل، فهذا يُشير إلى أن المنتج ليس من الفيتوبلازما، ولكن من البكتيريا المختلفة، مثل: *Wolbachia* spp. وإذا لم تتم رؤية أي منتجات PCR في عينة الاختبار، فهذا يشير إلى أنه (إما أنه لا يوجد فيتوبلازما في العينة/ أو أن الـ DNA لم يتفاعل مع PCR، ربما بسبب وجود مثبطات PCR). لذلك، فإننا ننصح بإعادة اختبار جميع عينات الـ DNA التي كانت سالبة بعد تفاعل الـ PCR المتداخل مع بادئات

cox، إذا تم الحصول على عينات DNA من النبات للتأكد من أنها تتفاعل مع الـ PCR (انظر: الملاحظة ٧)

٣-٣: مدى صحة بادئات Cox مع PCR:

١. قم بترقيم أنابيب PCR، وعمل خليط PCR لعينات $n + 1$ ، كما هو الحال في البند الفرعي ٣،١، لكن باستخدام البادئات *CoxF3* و *CoxB3* بدلاً من *SecAFor1* و *SecARev3*، ثم يقسم الخليط في أنابيب PCR، وتغطي، وتنقل إلى منطقة عمل DNA.
٢. أضف ١ ميكروليتر من عينة DNA لمزيج PCR كما سبق، وكذلك إعداد الشاهد الإيجابي والماء.
٣. يتم تغطية الأنابيب ووضعها في جهاز PCR، ويتم إجراء PCR على النحو التالي: دورة واحدة في درجة حرارة 94°C لمدة دقيقتين، ٣٠ دورة في درجة حرارة 94°C لمدة ٣٠ ثانية، 53°C لمدة دقيقة واحدة، ودرجة حرارة 72°C لمدة دقيقة واحدة؛ ودورة واحدة في درجة حرارة 72°C لمدة ١٠ دقائق.
٤. تصور منتجات الـ PCR بواسطة الفصل الكهربائي للأجاروز جل، كما هو موضح في البند الفرعي ٣،٢، ويجب أن تكون منتجات PCR حوالي 200 bp. وعلى افتراض أن الشاهد الإيجابي والسليبي قد نجحا في الاختبار، فهذا يشير إلى أن منتج الـ PCR في الحجم الصحيح في عينة الاختبار DNA، وقد تم تفاعل مع PCR ولا يحتوي على مثبطات. لذلك، إذا ثبت أن العينة إيجابية مع بادئات *cox* وسلبية مع بادئات *secA*، فهذه دلالة على أنه لا توجد فيوتوبلازما في الأصل، وأنه سلبى حقيقي (انظر: الملاحظة ٨). ومع ذلك، إذا كانت العينة سلبية مع كل من *cox* و *secA*، فهذا يدل على وجود مثبطات PCR في عينة DNA، وأنه يحتاج إلى مزيد من التنظيف (انظر: العنوان الفرعي ٣-٤).

٣-٤: طرق التنظيف DNA:

١. يتم وضع عمود الدوران Micro Bio-Spin Chromatography (٣ سم) ذي الطرف الرفيع في أنبوب ١,٥ مل مع إزالة الغطاء.
٢. املاً الجزء السفلي من عمود الدوران ٣/٢ بمسحوق PVPP.
٣. أضف ٤٠٠ ميكروليتر من ddH_2O ، ويتم عمل طرد مركزي بسرعة ١٠٠٠ لفة لمدة ٣ دقائق.
٤. إزالة الراسب.

٥. أضف ٢٠٠ ميكروليتر من ddH₂O إلى العمود، ثم يتم عمل طرد مركزي بسرعة ١٠٠٠ لفة لمدة ٣ دقائق.
٦. انقل العمود إلى أنبوب آخر نظيف (مع تعليمه) ١,٥ مل، مع إزالة الغطاء.
٧. أضف مستخلص DNA في حجم ٢٠٠ ميكروليتر (انظر: الملاحظة ٩) إلى العمود، ويتم عمل طرد مركزي بسرعة ١٠٠٠ لفة لمدة ٣ دقائق.
٨. يُنقل الـ DNA النظيف إلى الأنبوب الجديد (مع تعليمه)، ويمكن -الآن- استخدام هذا DNA بشكل مباشر في تفاعل PCR مع البادئات *cox* و/أو *secA*، كما هو موضح في البنود الفرعية ٣,١ و ٣,٣، أو يمكن ترسيبها مع الإيثانول لتركيز الحمض النووي. وعادة ما تكون دورة واحدة للتنظيف مناسبة لإزالة مثبطات PCR من عينة الحمض النووي. ومع ذلك، إذا كانت العينة لا تزال لا تتفاعل مع PCR بعد التنظيف، فإننا نوصي باستخلاص الـ DNA من عينات طازجة من نباتات أصلية.

٣-٥: تحليل التسلسل لتطور الجين *secA*:

١. بعد نجاح الـ PCR للعينات باستخدام البادئات *secA* لمعرفة وجود الفيتوبلازما النباتية، يمكن إجراء مزيد من التحاليل للعينة من خلال الاستساخ ومعرفة التسلسل الجيني، متبوعاً بتحليل التقارب phylogenetic، ومقارنتها مع متواليات الجينات *secA* للفيتوبلازما المعروفة.
٢. تم وصف طرق استساخ منتجات PCR وتسلسلها بالتفصيل من قبل الآخرين. لذلك، لن يتم وصفها هنا، وتتوفر المواد لهذه الاختبارات بعدد من الموردين المختلفين. ونوصي بتنظيف منتجات الـ PCR باستخدام مواد تنظيف الـ PCR، ثم يتم استساخها في ناقلات الاستساخ المناسبة (cloning vectors)، ومن ثم عمل التسلسل الجيني في كلا الاتجاهين باستخدام الاختبارات العادية.
٣. بعد التسلسل الجيني وتعديل الشفرات الوراثية بإزالة تسلسل ناقلات البلازميد، يجب تحليل تسلسل DNA من خلال برامج ترجمة للحمض النووي (انظر: الملاحظة ١٠)؛ لإثبات أن لديه إطاراً مفتوحاً يمتد عبر طول التسلسل الجيني. وهذه هي الطريقة الصحيحة للتحقق من صحة تسلسل الحمض النووي، وللتأكد من أنه ليس هناك خطأ في التسلسل الجيني.
٤. يمكن مقارنة التسلسل باستخدام برنامج BLAST لقواعد بيانات NCBI. ومع ذلك، لا يوجد سوى عدد قليل نسبياً من متواليات الجينات *secA* المتوفرة في قواعد بيانات NCBI. لذا، فمن المستحسن إجراء أفضل للمقارنة بين المتواليات في مجموعة 16Sr؛ وهو عمل ملف FASTA للتسلسل *secA* الذي تم نشره من قبل Hodgetts وآخرين (٧)، ثم استخدام برنامج

MEGA4 (11) (انظر: الملاحظة 11)؛ لمواءمة تسلسل عينة (عينات) الاختبار الخاصة بك مع متواليات الفيتوبلازما الأخرى، وبناء شجرة التقارب والتطور.

٤- الملاحظات:

١. يتم التوصية بالمواد الجاهزة لإعداد ال PCR -مثل: حبيبات ال PCR أو MangoMix-لأنه كلما قلت أعداد المحاليل وقل استخدام الممصات تقل مخاطر التلوث. ويتم التوصية بحبيبات ال PCR بشكل خاص في الحالات التي يجب فيها إرسال المواد إلى مناطق بعيدة، و/أو عند حاجتها إلى كهرباء، أو تخزينها في برادات حالتها غير معروفة، بسبب أنه يمكن تخزين الحبيبات لفترة طويلة على درجة حرارة الغرفة. ومع ذلك، يمكن استخدام مصادر أخرى من بوليمرز *Taq* و مواد ال PCR.
٢. لتجهيز 0.5 M من ال EDTA، أضف ١٨٦,١ جم من ال EDTA ($\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) إلى ٨٠٠ مل من ال ddH₂O. وباستخدام مقياس pH، أضف ما يقرب من ٢٠ جم من حبيبات NaOH، مع التقليب لضبط pH على ٨,٠، مع الحرص على إضافة قليل من الجرامات ببطء لتجنب تجاوز pH المطلوب، وتأكد من إذابة الحبيبات تماما قبل أي إضافة أخرى، ولاحظ أن ال EDTA لن يذوب تماما، حتى لو أصبحت pH ٨,٠. وبمجرد تجهيزه، يجب تعقيم محلول ال EDTA وتخزينه في درجة حرارة الغرفة.
٣. في هذا الطريقة، نوصي باستخدام ال GelRed™ بدلاً من بروميد الأيثيديوم لصنع ال DNA في الجل. ويمكن تصور GelRed باستخدام جهاز الأشعة فوق البنفسجية في طول الموجة نفسه لبروميد الأيثيديوم، ولكنه يعتبر منتجاً أكثر أماناً؛ حيث لا يتطلب وجود إجراءات أمان خاصة للتعامل مع مواد الجل والمحاليل والتخلص من الجل، وما إلى ذلك. ويمكن استخدام بروميد الأيثيديوم بدلاً من GelRed، ولكن يجب التأكد من اتباع أنظمة السلامة المناسبة لاستخدام مواد الأيثيديوم بروميد الملوثة، والتخلص منها بشكل صحيح.
٤. إن ال MangoMix و مواد ال PCR المشابهة تحتوي بالفعل على صبغات تحميل. لذلك، لا يجب إضافة أي صبغات أخرى إلى تلك المنتجات قبل عمل الفصل الكهربائي للجل؛ إلا إذا تم استخدام حبيبات ال PCR. ففي تلك الحالة، يجب استخدام خليط من خلطات صبغة التحميل، مثل bromophenol blue/ xylene cyanol أو Orange G (١٢).
٥. يجب استخدام سلالم ال DNA، مثل: سلالم 1 Kb وفقاً لإرشادات المصنع.
٦. يتم استخدام جهاز الأشعة فوق البنفسجية لتصوير ال DNA المصبوغ بـ GelRed/ethidium bromide في جل الآجاروز. والآن، تستخدم عديد من المعامل جهاز توثيق الجل، والذي يحتوي على نظام الكاميرا، بحيث يتم التقاط الصور على شاشات الكمبيوتر. وبالتالي، لا يتعرض المشغل لمصدر ضوء الأشعة فوق البنفسجية. وإذا تعرض المشغل بشكل مباشر إلى مصدر ضوء

الأشعة فوق البنفسجية، فيجب الحرص على ارتداء أقنعة مناسبة للسلامة ونظارات واقية للحماية.

٧. تم تطوير البادئات *cox* لتضخيم معظم عينات DNA النباتية، وينتج من هذه العينات نمط بمقياس 200 bp تقريباً، وهذا يجب استخدامه لإثبات أن مستخلصات الـ DNA من إنتاج النباتات. وبالنسبة لمستخلصات الـ DNA التي أنتجتها الحشرات، فيكون من الضروري استخدام بادئات أخرى تشمل DNA الحشرات، ولكننا لم نقم بتطوير طرق لتلك التجارب.
٨. أثبتت الأبحاث في جامعة نوتنجهام أن بادئات الـ *secA* تعمل بفاعلية لكافة مجموعات الفيوتوبلازما المتطورة التي تم تجربتها (16SrI، II، III، IV، V، VI، VII، IX، X، XI، XII، XIV، XXII كما حددها Wei et al. (١٣) وجزء من مجموعة 16SrXI). لذلك، فالنتيجة السلبية مع تلك البادئات لا تدل على احتمال احتواء تلك العينات على الفيوتوبلازما 16SrXI.
٩. تم تخصيص طريقة لتنظيف عينات الـ DNA التي كميتها ٢٠٠ مل وتركيزها ٠,١ - ١٠ مل / مليجرام.
١٠. يعتبر تطبيق الـ ExPASy من الأدوات التي تستخدم في تحويل الـ DNA، وهو على عنوان <http://web.expasy.org/translate/> من الطرق الجيدة لتحويل التسلسلات الجينية.
١١. يمكن تحميل برنامج MEGA4 من <http://www.megasoftware.net/> مجاناً.

الشكر والتقدير:

نتوجه بخالص الشكر إلى: Defra، BBSRC، DfiD، وLeverhulme Society على تمويل مختلف جوانب هذا العمل، وكذا الدكتور نايجل هاريسون، جامعة فلوريدا، وفورت لودرديل، بالولايات المتحدة الأمريكية، لتقديمه لنا التسلسل لـ *secA* الخاص بمرض فيتوبلازما الاصفار القاتل 16SrIV؛ والذي ساعدنا على تصميم البادئات الأساسية. ونود -أيضاً- أن نشكر جميع الأفراد والمنظمات التي قدمت لنا DNA للفيتوبلازما / وعينات النباتات المصابة؛ لتمكيننا من تحقق هذا العمل.

المراجع:

1. Smart CD et al (1996) Phytoplasma-specific PCR primers based on sequences of the 16S-23S rRNA spacer region. Appl Environ Microbiol 62:2988-2993
2. Duduk B, Paltrinieri S, Lee IM, Bertaccini A (2012) Nested PCR and RFLP analysis based on the 16S rRNA gene. In: Dickinson M, Hodgetts J (eds) Methods in molecular biology. Springer, New York

3. Harrison NA, Womack M, Carpio ML (2002) Detection and characterization of a lethal yellowing (16SrIV) group phytoplasma in Canary
1. Island date palms affected by lethal decline in Texas. *Plant Dis* 86:676–681
4. Martini M et al (2007) Ribosomal protein gene-based phylogeny for finer differentiation and classification of phytoplasmas. *Int J Syst Evol Microbiol* 57:2037–2051
5. Martini M, Lee IM (2012) PCR and RFLP analyses based on the ribosomal protein operon. In: Dickinson M, Hodgetts J (eds) *Methods in molecular biology*. Springer, New York
6. Kakizawa S et al (2001) Cloning and expression analysis of Phytoplasma protein translocation genes. *Mol Plant Microbe Interact* 14:1043–1050
7. Hodgetts J et al (2008) Phytoplasma phylogenetics based on analysis of secA and 23S rRNA gene sequences for improved resolution of candidate species of ‘ Candidatus Phytoplasma’. *Int J Syst Evol Microbiol* 58:1826–1837
8. Bekele B et al (2011) Use of a real-time LAMP isothermal assay for detecting 16SrII and XII phytoplasmas in fruit and weeds of the Ethiopian Rift Valley. *Plant Pathol* 60:345–355
9. Tomlinson JA et al (2005) On-site DNA extraction and real-time PCR for detection of *Phytophthora ramorum* in the field. *Appl Environ Microbiol* 71:6702–6710
10. Cullen DW, Hirsch PR (1998) Simple and rapid method for direct extraction of microbial DNA from soil for PCR. *Soil Biol Biochem* 30:983–993
11. Tamura K et al (2007) MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 24:1596–1599
12. Sambrook J, Russell DW (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3rd edn. Cold Spring Harbour Press, New York
13. Wei W et al (2007) Computer-simulated RFLP analysis of 16S rRNA genes: identification of ten new phytoplasma groups. *Int J Syst Evol Microbiol* 57:1855–1867

تحليل التعدد الشكلي للشريط الواحد

للتمييز بين سلالات الفيتوبلازما

Martina Šeruga Music' and Dijana Škoric'

ملخص:

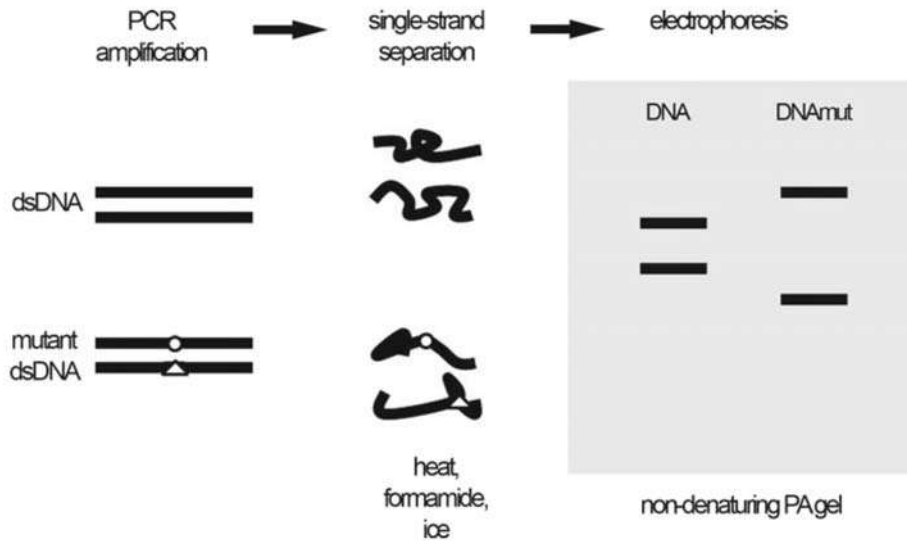
إن تحليل التعدد الشكلي للشريط الواحد (Single-strand conformation polymorphism SSCP) تقنية من التقنيات الدقيقة والسريعة للكشف عن تعدد أشكال الـ DNA والطفرات في أجزاء الـ PCR المتضخمة. وبسبب بساطة تقنيته، كثيراً ما تُستخدم أداة من الأدوات المختلفة للتشخيص، كما بدأ في التشخيص السريري للأمراض الوراثية لدى الإنسان ووصفها المجموعات الميكروبية. ويمكن - أيضاً - استخدام تلك الطريقة بنجاح مع الفيتوبلازما أداة من الأدوات للكشف عن التباين الجزيئي في الجينات المتراكمة الثابتة مثل: *tuf* و *16S rRNA*، وكذلك في الجينات الأكثر اختلافاً، والكشف عن وجود التعدد الشكلي؛ والذي لم يتم اكتشافه من خلال تحاليل الـ RFLP الروتينية. وقد تم إثبات إمكانية الاعتماد على الـ SSCP بكثرة في التسلسلات المتتالية، وفي تحاليل التطور الجيني التي تعرض مختلف ملفات الـ SSCP. وبالرغم من ذلك، لم يتم استخدامها بتوسع في أبحاث الفيتوبلازما حتى الآن. وتقدم هذه التقنية طريقة دقيقة ومناسبة وغير مكلفة لتحديد تباين التسلسل ولتمييز بين سلالات الفيتوبلازما، وتُناسب الدراسات البائية بشكل خاص، أو تكون أداة سريعة مناسبة للفحص وخصوصاً عند التعامل مع عدد كبير مع العينات الحقلية.

الكلمات المفتاحية: البصمة الوراثية، تعدد الأشكال الجينية، الطفرات، PCR، التسلسل الجيني، SSCP، التنوع، التباين.

١- المقدمة:

إن تحليل التعدد الشكلي للشريط الواحد (SSCP) من أبسط الطرق التقنية للكشف السريع عن التغيرات النوكليةوتيدية في أي تسلسل لـ DNA؛ حيث تقوم التقنية على التمييز بالانتقال

الكهربيائي لأجزاء الـ DNA الأحادي (ssDNA)؛ والتي لها هياكل أساسية مختلفة (١). إن أجزاء الـ DNA عادة تتضخم بتفاعل الـ PCR بالمواد الكيميائية و/ أو بالحرارة، ثم تتعرض للترحيل الكهربيائي بالبولي أكريلاميد جل (شكل ١). ويرتبط الشريط الواحد للأحماض النووية التي تختلف أشكالها الرئيسية بتطبيقات مختلفة بسبب التكامل الذاتي والتفاعلات التي تحدث داخل الجزيئات الـ DNA. وفي حالات لفصل الكهربيائي، تنتقل ssDNAs بسرعات مختلفة، ويتم الكشف عن وجود الطفرات كتغير الأنماط أو كتغير في عدد الأنماط. وقد يتم الكشف عن التغيرات التي تحدث للقاعدة الواحدة فيما يصل إلى ٢٠٠ من أجزاء القاعدة كتحويلات (٢)، برغم أن هناك طفرات قد تكون "غير مرئية" لتحليل الـ SSCP تظل غير مُكتشفة (٣).



شكل (١): شكل يوضح التخطيط الأساسي التحليل التعدد الشكلي للشريط الواحد SSCP.

وبعيداً عن الهيكل الرئيسي للـ ssDNA، هناك عوامل أخرى يمكن أن تؤثر على الحركة الكهربية، مثل: حجم جزء الـ DNA الذي تم تحليله، وتركيب الجل والمحلل المنظم، ودرجة الحرارة التي يتم فيها الفصل الكهربيائي، وغيرها. لذلك، من أجل الحصول على استنتاج مرضٍ لتحليل SSCP، يجب أن تكون لكل مجموعة من الأجزاء حالة خاصة (٣، ٤). ومع ذلك، فقد تم تقدير دقة هذه الطريقة ونجاحها في الكشف عن بدائل النيوكليوتيد؛ حيث تتراوح ما بين 80% و95% (٥، ٦). ومنذ نشر هذه الطريقة لأول مرة، تم إجراء تحسينات وتعديلات لزيادة دقتها وسرعتها واستنتاجها. وفي الطريقة الأصلية، تم استخدام علامات النظائر الكيميائية المشعة للـ DNA مع التصوير الذاتي الإشعاعي (١). وتم تقديم التصوير الأنماط الـ DNA بصبغة بروميد الأيثيديوم (٧، ٨)، والصبغة الفضية الأكثر دقة (٤، ٩)، والتي سوف يتم تقديمها قريباً.

وفي الآونة الأخيرة، تم استخدام أنظمة الفصل الكهربائي الأوتوماتيكي عالية الإنتاج بدلاً من الفصل الكهربائي الجل التقليدي، حيث إنها تقلل وقت التحليل، وتقلل من استهلاك المواد والعينات، وتكون أكثر دقة وحساسية وإنتاجيتها عالية (١٠). وقد تم - أيضاً - شرح تحليل تباين بين الهيترودبليكس (heteroduplex HA) وتحليل الـ SSCP باستخدام نظام الفصل الكهربائي (١١). وبالرغم من ذلك، لا يزال الـ SSCP من التقنيات المستخدمة بتوسع. وغالباً ما تكون الطريقة التي يتم اختيارها في البحوث الطبية وفي التشخيصات السريرية لأمراض الإنسان الوراثية ومرض السرطان (٥، ١٢، ١٣)، وفي الدراسات السريرية والعلاجية للفيروسات التي تُصيب الإنسان (١٤، ١٥)، وفي البحوث البيطرية والحيوانية (١٦، ١٧)، وكذلك في الكشف عن أنواع الفطريات (١٨، ١٩). وحتى بعض أنواع البكتيريا من البيئة التي لا تنمو على البيئة الصناعية يمكن النجاح في تحليلها بواسطة الـ SSCP، وغالباً يتم استخدامها في دراسات المجموعات البكتيرية (٢٠).

وفي علوم الأمراض النباتية، يتم استخدام الـ SSCP على نطاق واسع لتحديد النمط الجيني للسلالات، وكذلك في الدراسات الخاصة بالمجموعات الفيروسية (٢١، ٢٢)، ولتحديد - أيضاً - سمات الفيروسات (٩). وكان Seruga Musi et al. (٢٣) أول من قام بتقييم إمكانية استخدام هذه الطريقة أداة من أدوات البصمة الوراثية في تحليل جينات الفيتوبلازما، حيث يكشف تحليل الـ SSCP لجين 16S rRNA، tuf، وجين الـ dnaB عن وجود اختلاف جزيئي بين المواد المفصولة من المجموعة الفرعية للريوسومات نفسها التي لم يتم الكشف عنها بتحليل الـ RFLP. وقد أكد التحليل الوراثي لسلاسل الفيتوبلازما التي تشترك مع SSCP متشابهاتها في النتائج. وبعد ذلك، نجح Schneider و Seemuller (٢٤) في تطبيق طريقة للتمييز بين سلالات 'Candidatus Phytoplasma mali' بتحليل الـ SSCP لجين الـ hflB، وقاما باكتشاف أكثر من ٢٠ نسيجاً مختلفاً. ومع ذلك، لا يتم استخدام تحليل الـ SSCP على نطاق واسع في التحليل الروتيني لجينات الفيتوبلازما.

٢- المواد:

٢-١: عزل DNA والفصل الكهربائي عديد الأكريلاميد جل:

١. محلول منظم للفصل: فورمايد ٩٠%، 25 mM من الـ EDTA، بروموفينول أزرق ٠,٠٥%، ٠,٠٥% سيلينول زيلين. يتم إعدادهم بماء مقطر، ويُخزن على درجة حرارة 4°C، في أنبوب ملفوف بورق الألمنيوم (انظر: الملاحظة ١).
٢. محلول مُنظم الـ TBE (1×): 90 mM من Tris، 90 mM من حمض البورك، 1 mM من الـ EDTA، pH 8.3.
٣. ٣٠% محلول الأكريلاميد/الأكريلاميد المكرر (٤٠:١): ٣٠ جم من مونومر أكريلاميد، ٠,٧٥ جم من المُكرّر (N'-methylenebisacrylamide, N). يتم إضافتهم إلى أسطوانة مُدرجة

- بحجم ١٠٠ مل تحتوي على ٤٠ مل تقريباً من الماء، وتُخلط على محرك مغناطيسي لمدة ٣٠ دقيقة. ومن ثم تكمل إلى ١٠٠ مل من الماء، وتفلتر بمقاس مسامي ٠,٤٥ ميكرومتر، وتخزن على درجة حرارة 4°C، في زجاجة مغلقة بالألمونيوم.
٤. أمونيوم بيرسلفيت: محلول ١٠٪ في الماء، يتم إعداده حديثاً، ويُخزن في درجة حرارة 4°C لفترة زمنية قصيرة.
٥. *N,N,N,N*-tetramethyl-ethylenediamine (TEMED)، يُخزن على درجة حرارة 4°C.
٦. جلسرين.

٢-٢: مشاهدة DNA بواسطة الصبغة الفضية:

١. محلول التثبيت: ٥٠٪ من الإيثانول، ١٠٪ من حمض الإسيستيك (glacial acetic acid).
٢. محلول الصبغ: 12 mM من نترات الفضة: تُخزن في زجاجة غامقة عند درجة حرارة 4°C.
٣. محلول المشاهدة: 0.75 M من هيدروكسيد البوتاسيوم، وفورمالديهايد ٠,٢٨٪، دائماً، ويتم تجهيزه قبل الاستخدام. (انظر: ملاحظات ٢).
٤. محلول التوقف: 0.07 M من كربونات الصوديوم تُجهز بصورة جديدة.

٣- طرق العمل:

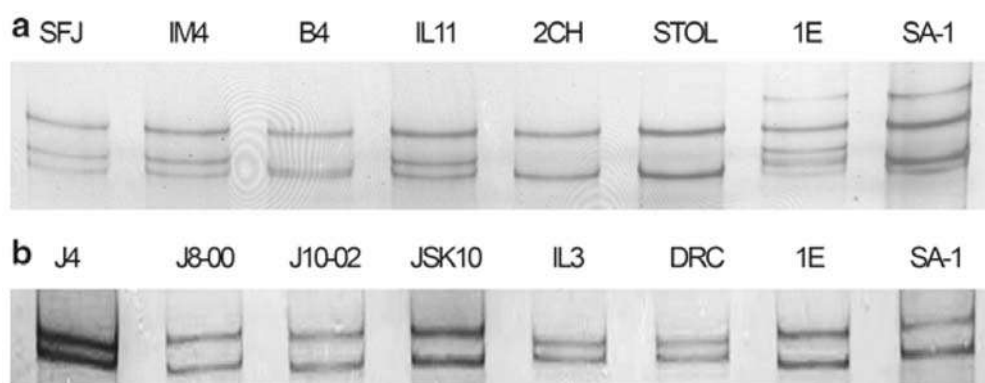
يتم تحليل أجزاء الـ PCR ذات الأطوال المختلفة التي تم تضخيمها بالبادئات المختلفة، ومنها يجب تحسين الحالات لتحليل الـ SSCP للحصول على أفضل فصل، ومنتجات معينة من الـ ssDNA. وقد تكون القياسات التالية متنوعة: تركيز الأكريلاميد، وجود الجلسرين في إحدى مواد الجل، و/أو فترة الفصل الكهربائي. وبالنسبة للأجزاء 500 bp ~، وجدنا أن جل البولي أكريلاميد (PA) ١٤٪ يعمل لمدة ٧-٨ ساعات للوصول إلى الحالات المثالية؛ وبالنسبة للأجزاء التي أطولها ما بين 1-800~ bp، 250، نقوم باستخدام جل PA ٨٪ مع جلسرين ٢,٥٪ يعمل لمدة ٣-٤ ساعات (شكل ٢: (٢٣)). ويمكن أيضاً النجاح باستخدام طرق أخرى غير صبغة الفضة التي تم وصفها لتصوير الـ DNA (٢٥).

٣-١: عزل DNA والفصل الكهربائي عديد أكريلاميد جل:

١. لتجهيز جل ١٤٪ PA يحتوي على ٥٪ جلسرين، يتم خلط ١ مل من المحلول المنظم 10× TBE، ٣,٧ مل من الماء، ٤,٦٧ مل من محلول أكريلاميد / بيساكريلاميد، ٠,٥ مل من الجلسرين، ويُقلب برفق. ويتم إضافة ١٦٠ ميكروليترا من أمونيوم بيرسلفيت و ١٦ ميكروليترا من الـ TEMED، ويُقلب بلطف، ويُصب في حوض الجل مقاس 10.5 cm × 10 cm × 1 mm.

ولتجهيز جل 8% PA يحتوي على 2,5% جلسرين، يتم خلط 10 مل من المحلول المنظم و 10× TBE 5,09 مل من الماء، 2,67 مل من محلول بيساكريلاميد/ الأكريلاميد، 0,25 مل من الجلسرين، ويُقلب برفق. ويتم إضافة 120 ميكروليترا من كبريتات الأمونيوم و 120 ميكروليترا من الـ TEMED، ويُقلب برفق، ويُصب في حوض الجل مقاس 10 cm × 10.5 cm (انظر: الملاحظة 3).

2. يتم خلط 1-4 ميكروليترات من منتج الـ PCR حسب كثافة النمط (انظر: الملاحظة 4) مع 7 أحجام من المحلول المنظم للفصل، ويوضع في الحضانة لمدة 10 دقائق على درجة حرارة 99°C. ويجب وضع العينات على الفور في ثلج، وتُحمل على بولي أكيلااميد جل. ويتم إجراء الفصل الكهربائي في محلول مُنظم 1× TBE على درجة حرارة 4°C، ويجهد ثابت مقداره 200V (انظر: الملاحظة 5).



شكل (2): أنماط الفيتوبلازما من تحليل SSCP للـ DNA للعنب. (a) 16SrRNA (510bp) و (b) جين *tuf* (850 bp) تم تضخيمه باستخدام البادئات *fTufu/rTufu* and *16R_{738f} /16R_{1232r}*، على التوالي. وتم تحليل الأنماط في جل أكريلاميد بنسبة 14% (a) أو 8% (b) مع صبغة الفضية بعد الفصل الكهربائي. خطوط تحتوي: SFJ, cv. Debet; Sveti Filip i Jakov; IM4, cv. Chardonnay, I mbriovec; B4, cv. Chardonnay, Brodski Stupnik; 2CH, cv. Chardonnay, FYR of Macedonia; DRC, cv. Chardonnay, Drniš; 1E, cv. Chardonnay, Erdut; J4, J8-00, J10-02, cv. Chardonnay, Jazbina; JSK10, cv. Chardonnay, Jaska; IL3, cv. Chardonnay, Ilok; IL11, cv. Riesling, Ilok; SA-1, STOL 16SrXII-A.

3-2: شاهدة DNA بواسطة الصبغة الفضية:

1. بعد الفصل الكهربائي، يُنقل الجل إلى محلول التثبيت، ويُحضان في جهاز هزاز لمدة لا تقل عن ساعة واحدة (انظر: الملاحظة 6).
2. يتم شطف الجل ثلاث مرات بماء مقطر.
3. يتم تحضين الجل في محلول صبغة نترات الفضة لمدة ساعة واحدة.
4. يُشطف الجل ثلاث مرات بماء مقطر مزدوج.

٥. يتم إضافة محلول المشاهدة، ويُرج برفق.
٦. عند الوصول إلى الكثافة المطلوبة للأنماط، يتم التخلص من محلول المشاهدة، ويُضاف محلول التوقف.
٧. يجب توثيق المواد الجل على الفور (انظر: الملاحظة ٧).

٤- الملاحظات:

١. ذوبان الـ EDTA يكون ضعيفا عندما تكون درجة الحموضة pH أقل من ٨,٠، ويجب ضبط pH المحلول المُخزن باستخدام NaOH.
٢. يجب إذابة حبيبات الـ KOH أولاً في كمية بسيطة من الماء.
٣. يمكن تجهيز المواد الجل قبلها بيوم واحد، وتخزينها في درجة حرارة 4°C.
٤. يتم استخدام ٤ ميكروليترات من منتج الـ PCR إن كانت الأنماط ضعيفة للغاية؛ وعادةً ما يكون ١-٢ ميكروليتر من منتج الـ PCR كافياً للوصول إلى أفضل النتائج.
٥. يجب أن يتم إنهاء الفصل الكهربائي - غالباً - بعد خروج صبغة السيانول الزيلين من الجل على الفور.
٦. يمكن مد فترة التحضين في محلول التثبيت طوال الليل، ويجب تجنب ملامسة الجل، ليس لأسباب تتعلق بالصحة والسلامة فقط، ولكن أيضاً للحصول على صورة واضحة. وقد يؤدي لمس الجل باليد إلى ترك بقع داكنة عليه. ولتجنب لمس الجل عند التخلص من المحاليل أثناء إجراء صبغ الفضة، يتم استخدام أجهزة شفط.
٧. يمكن وضع الجل بين ورقتي فيلم شفاف والاحتفاظ به لفترة قصيرة، أو يتم تجفيفه لتخزينه لفترة طويلة.

المراجع:

1. Orita M et al (1989) Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. Proc Natl Acad Sci U S A 86:2766-2770
2. Orita M et al (1989) Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. Genomics 5:874-879
3. Telenti A (1994) Detection of mutations by PCR-SSCP (single-strand conformation polymorphism). In: Dale JW, Sanders PG (eds) Methods in gene technology, vol 2. JAI Press Ltd, Middlesex, UK, pp 241-252
4. Rubio L et al (1996) Differentiation of citrus tristeza closterovirus (CTV) isolates by singlestrand conformation polymorphism analysis of the coat protein gene. Ann Appl Biol 129: 479-489

5. Ravnik-Glavač M, Glavač D, Dean M (1994) Sensitivity of single-strand conformation polymorphism and heteroduplex method for mutation detection in the cystic fibrosis gene. *Hum Mol Genet* 3:801–807
6. Hall JS et al (2001) Structure and temporal dynamics of populations within wheat streak mosaic virus isolates. *J Virol* 75:10231–10243
7. Yap EP, McGee JO (1992) Nonisotopic SSCP detection in PCR products by ethidium bromide staining. *Trends Genet* 8:49
8. Hongyo T et al (1993) 'Cold SSCP': a simple, rapid and non-radioactive method for optimized single-strand conformation polymorphism analyses. *Nucleic Acids Res* 21: 3637–3642
9. Palacio A, Duran-Vila N (1999) Single-strand conformation polymorphism (SSCP) analysis as a tool for viroid characterisation. *J Virol Methods* 77:27–36
10. Ren J-C (2000) High-throughput single-strand conformation polymorphism analysis by capillary electrophoresis. *J Chromatogr B* 741:115–128
11. Kozłowski P, Krzyżosiak WJ (2001) Combined SSCP/duplex analysis by capillary electrophoresis for more efficient mutation detection. *Nucleic Acids Res* 29:e71
12. Papp T et al (2007) Mutational analysis of Chk1, Chk2, Apaf1 and Rb1 in human malignant melanoma cell lines. *Oncol Rep* 17:135–140
13. Silveira APF et al (2011) Gene mutations and polymorphisms of TP53 and FHIT in chronic esophagitis and esophageal carcinoma. *Anticancer Res* 31:1685–1690
14. Mackiewicz V et al (2005) Rapid investigation of hepatitis A virus outbreak by single strand conformation polymorphism analysis. *J Med Virol* 76:271–278
15. Di Liberto G et al (2006) Clinical and therapeutic implications of hepatitis C virus compartmentalization. *Gastroenterology* 131:76–84
16. Simsek S et al (2011) Molecular discrimination of sheep and cattle isolates of *Echinococcus granulosus* by SSCP and conventional PCR in Turkey. *Vet Parasitol* 178:367–369
17. Schaschl H, Wegner KM (2006) Polymorphism and signature of selection in the MHC class I genes of the three-spined stickleback *Gasterosteus aculeatus*. *J Fish Biol* 69(suppl B):177–188
18. Dassanayake RS, Samaranayake LP (2003) Amplification-based nucleic acid scanning techniques to assess genetic polymorphism in *Candida*. *Crit Rev Microbiol* 29:1–24
19. Nahiyan ASM et al (2011) PCR-SSCP analysis of *Fusarium* diversity in asparagus decline in Japan. *Eur J Plant Pathol* 130:197–203
20. Oto M, Suda W, Shinoyama H (2006) 16S rRNA gene-based analysis of microbial community by whole-genome amplification and minigel-single-strand conformation polymorphism technique. *J Biosci Bioeng* 102: 482–484
21. Turturo C et al (2005) Genetic variability and population structure of Grapevine leafroll - associated virus 3 isolates. *J Gen Virol* 86: 217–224
22. Cerni S et al (2008) Stem pitting and seedling yellows symptoms of Citrus tristeza virus infection may be determined by minor sequence variants. *Virus Genes* 36:241–249
23. Šeruga Musić M, Krajačić M, Škorić D (2008) The use of SSCP analysis in the assessment of phytoplasma gene variability. *J Microbiol Methods* 73:69–72

24. Schneider B, Seemüller E (2009) Strain differentiation of Candidatus *Phytoplasma mali* by SSCP- and sequence analyses of the *hflB* gene. *J Plant Pathol* 91:103–112
25. Igloi GL (1983) A silver stain for the detection of nanogram amounts of tRNA following twodimensional electrophoresis. *Anal Biochem* 134:184–188

المصفوفة الصغرى (Microarray) لكشف الفيتوبلازما وتعريفها

Mogens Nicolaisen , Henriette Nyskjold , and Assunta Bertaccini

ملخص:

يُعد اكتشاف الفيتوبلازما وتحديدًا عملية من العمليات التي تتطوي - غالباً - على الـ PCR المتداخل؛ والذي يتبعه التحليل الخاص بإنزيمات، ومن ثم فصل كهربائي عالي الدقة. ولتحسين النتائج، يتطلب وجود طرق أخرى. وتعمل تقنية الميكروآري على تقديم اختبارات عامة يمكن من خلالها تعريف كافة أنواع الفيتوبلازما، واكتشافها في اختبار واحد. وسوف نشرح هنا الطريقة التي تقوم على الميكروآري لتحديد الفيتوبلازما على مستوى مجموعة الـ 16Sr.

الكلمات المفتاحية: الفيتوبلازما، الميكروآري، رقاقة الـ DNA، الكشف، التشخيص، 16S .rRNA

١- المقدمة:

في الوقت الحالي، يتم تعريف الفيتوبلازما على مستوى مجموعة الـ 16Sr بالـ PCR المتداخل، وغالباً ما يكون باستخدام البادئات العامة P1/P7 (١، ٣) و R16F2n/R16R2 (٣)، وذلك بعد تحليل تعدد أطوال الأنماط بالـ (RFLP)، وفصل الجل الكهربائي عالي الدقة (٤). وتُعد هذه الطرق أمراً صعباً، وتحتاج إلى وجود فنيين يتمتعون بمهارات، وعدد من سلالات الفيتوبلازما المرجعية. إن تقنية الميكروآري للـ DNA أداة من الأدوات القوية التي تحدد الكائنات الحية الدقيقة وتعرفها، بما فيها الكائنات الدقيقة المسببة لأمراض النباتات، ويمكن - أيضاً - من خلالها أداء اختبارات لعدد من الكائنات الدقيقة في الوقت نفسه. ومن الأمثلة على استخدام تقنيات الميكروآري: الكشف عن الديدان الخيطية، والنيماتودا (٥)، والفطريات (٦، ٧)، والفطريات البيضية الخيطية (٨)، والبكتيريا (٩، ١٠)، والفيتوبلازما (١١)، والفيروسات (١٢). وتقوم معظم مصفوفات الـ DNA للكشف عن الكائنات الدقيقة التي تُسبب أمراض النباتات على اختبار النيوكلييدات الموجودة على الشرائح الزجاجية، حيث تسمح بتحليل عينة واحدة على كل شريحة.

ومع ذلك، تم تطوير طرق أخرى من أجل الحصول على نتائج عالية، مثل: المصفوفات المتعددة على كل شريحة (هذا الطريقة و(11))، والمصفوفات في شريحة microtitre أو في أنابيب صغيرة، حيث يمكن تحليل ٩٦ عينة (Alere Technologies GmbH)؛ إلا أن هذه الطرق تُناسب المصفوفات منخفضة الكثافة.

إن الأساس في تطوير الميكروآراي هو في تصميم المجسات (prob)؛ حيث يبدأ تصميم المجس الميكروآراي بتحديد المنطقة المستهدفة الأكثر ملاءمة لتصميم التجربة. كما يتم استخدام الـ PCR - في كثير من الأحيان- لتضخيم الـ DNA المُستهدف، ويجب أن تكون منطقة الـ DNA المطلوبة يسهل تضخيمها من كافة السلالات المطلوبة، ويجب أن تحتوي المنطقة على اختلافات كافية للتفريق بينها في المستوى المطلوب. وبعد اختيار المنطقة التي يمكن استخدامها، يجب تنظيم التسلسلات المتشابهة في صفوف، وينبغي اختيار المنطقة التي يمكنها التفريق بين السلالات. ويُمكن استخدام العلامات مختلفة الأطول في تقنيات الميكروآراي وذلك حسب نوع التطبيق. إن المجسات القصيرة (15- 25 nt) دقتها أقل، ولكنها أفضل في التفريق بين الاختلافات المتسلسلة البسيطة، في حين أن المجسات الأطول (>50 nt) تُقدم دقة أعلى، ولكنها لا تُفرق بين التسلسلات المطلوبة التي بها اختلافات متسلسلة قليلة. ومن الناحية المثالية، يجب أن يكون لدى كافة المجسات في المصفوفة درجة حرارة الذوبان (T_m) نفسها. ويمكن تطبيق هذا الأمر من خلال السماح بوجود بعض الاختلافات (الطفيفة) في طول الجسم، وعن طريق اختيار التسلسلات داخل المنطقة المطلوبة التي تلبى معايير درجة حرارة الانصهار.

إن التقنية الرئيسية لتصنيع الميكروآراي هي التركيب الآلي لمجسات شفرات النيكلوليتيدات، على شرائح زجاجية ذات أسطح مميزة؛ لربط المجسات على السطح. وللمراجعة، الاطلاع على المرجع (١٣).

وغالباً ما تكون الخطوة التي تسبق تضخيم الميكروآراي -مثل: الـ PCR- ضرورية لتحسين الدقة، خاصةً للكائنات الدقيقة المسببة لأمراض النباتات منخفضة التركيز، مثل: الفيتوبلازما. وللكشف عن حدوث التهجين، يجب وضع علامات على منتج الـ PCR. وهناك عديد من الطرق المتوفرة لوضع علامات على منتجات الـ PCR، مثل: الـ Cy3 أو بصبغات أخرى. وقد يتم استخدام البادئات التي تحمل علامة الـ Cy3؛ إلا أن عديداً من الدراسات كشفت عن وجود "تأثير موضعي". ولا يتم تهجين المجسات إلا بالقرب من جزيء Cy3 فقط، وينتج منه قراءة جزئية، والأمر يتطلب وضع بعض القيود على تصميم المجسات (١٤). وقد يتم وضع علامات على منتجات الـ PCR أثناء تضخيمها عن طريق ضم بعض النيوكليوتيدات المُقترنة بالـ Cy3. ومع ذلك، فقد تمت ملاحظة أن هذا الأمر يقلل من كفاءة الـ PCR. وفي المقابل، ربما تم تعليم المنتجات بمعلم- بيوتن (biotin-) (labeled) أثناء الـ PCR، بعد التحضين بالـ Cy3-streptavidin بعد التهجين. وتتضمن الإجراءات التي تلي وضع علامات على الـ PCR بادئات- عشوائية معلمة لمنتج الـ PCR مع Cy3-coupled nucleotides

(١١). وقد قام Franke-Whittle et al. (١٥) بمقارنة طرق وضع العلامات المختلفة، ووجدوا أن تعليم البادئات مع الـ Cy3 يعطي أفضل النتائج، وقد تم إجراء مقارنة للخطوات المختلفة التي تلي كشف التهجين الثانوي لتضخيم العلامات (١٦).

وتستند الطرق الحالية على الطريقة التي طورها Bertaccini و Nicolaisen (١١)؛ حيث تبين أن اختبارات الـ oligonucleotide القصيرة تُحدد أغلب مجموعات الـ 16Sr للفيتوبلازما، على الرغم من أن عدداً قليلاً من تلك الاختبارات أظهرت أنه يمكن تحديد اختلاف تسلسلي بسيط في مستوى المجموعة 16Sr. وقد تم تصميم عدد محدود من تلك المجسات في هذا العمل؛ بالرغم من أنه يمكن تصميم مزيد من المجسات لكل مجموعة 16Sr لتحسين إمكانية الاعتماد عليها. وتُصمم المجسات الأخرى لأغراض مُحددة، مثل: تحديد السلالات المتشابهة في مجموعات 16Sr مُعينة أو أجناس الـ 'Candidatus Phytoplasma'، وتكون مُحددة في التصميم من مناطق جينية أخرى، وكذلك يُمكن تصميم بادئات لتضخيم الـ PCR.

٢- المواد:

١. جهاز مراقبة (مشاهدة) الميكروآراي، (مثل: Genetix QArray Mini).
٢. دبوس التقسيم (مثل: Telechem XSMP2.5) (انظر: الملاحظة ١).
٣. شرائح ميكروآراي (Nexterion Slide E, Schott UK Ltd, Stafford, UK)، (انظر: الملاحظة ٢).
٤. صفيحة بحفر ٣٨٤ (Genetix #X7020).
٥. ماسك الشرائح.
٦. طرد مركزي للتكثف SpeedVac.
٧. مُجسمات نيوكليدية مُتخصصة برابط (T)، ومجموعة NH₂ مُلحقة بنهاية 5' (الجدول ١) (انظر: الملاحظة ٣).
٨. مجسات نيوكليدية ليست مخصصة شاهداً سلبياً (انظر: الملاحظة ٤).
٩. SSC (محلول 20×): يتم إذابة ١٧٥,٣ جم من NaCl، و ٨٨,٢ جم من سيترات الصوديوم في ٨٠٠ مل ماء. تضبط درجة الحموضة pH على ٧,٠ بـ 10 M من الـ NaOH، ويتم ضبط الكمية لتصل إلى ١ لتر، وتُعقم بالأوتوكلاف.
١٠. المحلول المنظم المستخدم لوضع العلامات: 1.5 M من البيتين، 3× SSC.
١١. غسيل ١: 0.1% Triton X-100.
١٢. غسيل ٢: 1 mM من الـ HCl.
١٣. غسيل ٣: 100 mM من الـ KCl.
١٤. محلول مُنظم التوقيف: 50 mM من الإيثانولامين، و 0.1% SDS، و 0.1 M من التريس، و pH 9.

جدول (١): المجسات التي استخدمت في طريقة عمل الميكروآراي:

Probe	Target 16Sr group	Sequence 5'-3'
PpI-465	I	TATTAGGGAAGAATAAATGATGGAAAAATC
PpII-471	II	CGAACCATTTGTTTGCCGGTA
PpII-629	II	CGTTGTCCGGCTATTGAAACTGC
PpIII-478	III	GTGGAAAACTCCCTTGACGGTACTTAAT
PpIV-630	IV	CTTAACGTTGTCTCTGCTAGAGAACTGTT
PpV-221	V	AGACCTTCTTCGGAGGGTATGCTTAA
PpVI-276	VI	TTAGTTGGTAGAGTAAAAGCCTACCAAGAC
PpVII-621	VII	TATAGAACTACCTTGACTAGAGTTAGATAGAG
PpVIII-634	VIII	ACGCTTAACGTTGTTTTGTTATAGAACTG
PpIX-609	IX	AACGCTGTAsCGCTATAGAACTGTCTG
PpX-183	X	GGATAGGAAGTTTTAAGGCATCTTGAAAC
PpX-224	X	AGGGTATGCTAAGAGATGGGCTTGC
PpXII-465	XII	GGGAAGAAAAGATGGTGGAAAAACC
PpXII-480	XII	GTGGAAAAACCATTATGACGGTACCT
PpXIV-585	XIV	GAACTATCAGACTAGAGTGAGATAGAGGCAAG
Pp-148	All	TTTCGGCAATGGAGGAACTCTGAC
Pp-502	All	AGGCGGCTyrCTGGGTCTTTACT
Tub1	Neg	GGTGGCAGCTCAACAACAATGC
Tub2	Neg	GCGATAGTTTACCTTCAGACCG

In a few probes, degenerate nucleotides are used (s = G or C; y = C or T; r = A or G)

١٥. غرفة تجفيف.

١٦. فرن تهجين.

١٧. إطارات تهجين: (إطار سريع لأربع شرائح، Sigma- Aldrich #Z721212).

١٨. النباتات السليمة والمصابة: ويُفضل أن تكون من الفصيلة نفسها، وأنسجة العينات نفسها.

١٩. جهاز PCR (انظر: الملاحظة ٥).

٢٠. بادئات: ' 3-AAC AGT GTG CGG GAA GGC AGT 5'-Pp array fwd، ' 5-Pp array rev

' 3-AAC AGT GTG CGG GAA GGC AGT (لتضخيم ٥' من نهاية جين الـ 16S rRNA).

٢١. BioPrime® Array CGH Genomic Labeling Module (Invitrogen, #18095-012).

٢٢. Cy3-dCTP (Amersham Biosciences, #PA53021).

٢٣. جهاز تنظيف تفاعل الـ MinElute (QIAGEN, #28204).

٢٤. محلول مُنظم التهجين: ٢٠٪ فوراميد، و $5\times$ SSC، ٠,١ ميكروجرام/ ميكروليتر من sonicated salmon sperm DNA.
٢٥. محلول NaCl مشبع.
٢٦. غسيل ٤: $2\times$ SSC، 0.1% SDS.
٢٧. غسيل ٥: $1\times$ SSC.
٢٨. غسيل ٦: $0.1\times$ SSC.
٢٩. جهاز ضغط هواء (خالٍ من الزيت).
٣٠. Microarray scanner (مثل: GenePix 4100A Microarray Scanner from Molecular Devices).

٣- طريق العمل:

١-٣: مجسات النيوكلييدات:

تم تصميم مجسات نيوكليوتيدية في هذه الطريقة من منطقة الـ 16S rRNA (الجدول ١) (انظر: الملاحظة ٦). وبإضافة مجسات عشوائية من الـ T_m شاهداً سلبياً.

٢-٣: تحضير شريحة المصفوفات:

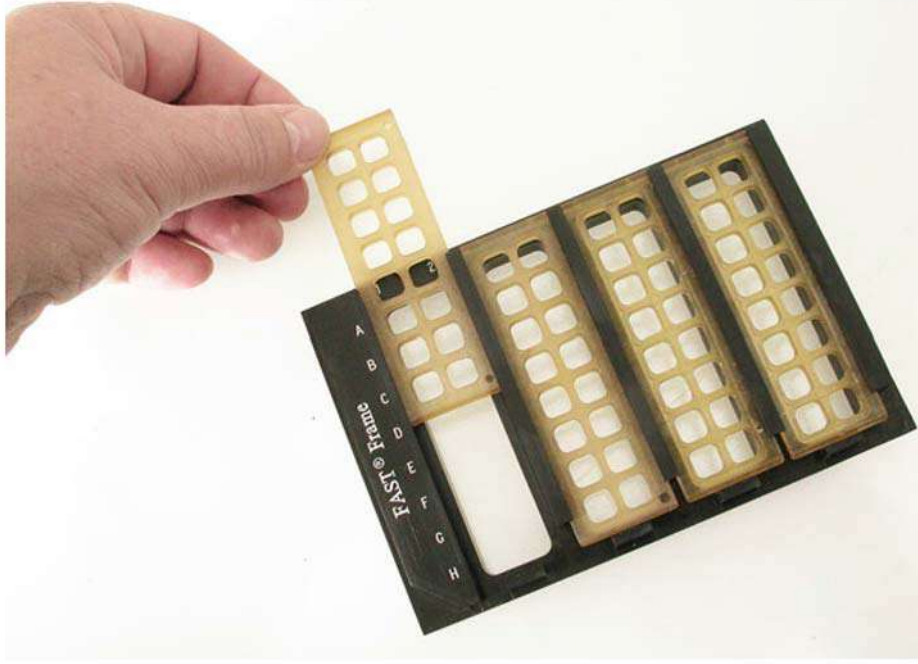
إن المصفوفة التي تشرح في هذه الطريقة تسمح بتهجين ١٦ عينة على كل شريحة من الشرائح (شكل ١). وباستخدام يد آلية Genetix لصنع المصفوفات، يكون من السهل استخدام دبوس واحد فقط عند طباعة المصفوفات المتمثلة على كل شريحة (انظر: الملاحظة ٧).

١. يتم تحميل ٢ ميكروليتر من كل مجس نيوكليوتيدي (١٠٠ ميكرومل) في صفيحة الحفر ٣٨٤.

٢. تُجفف الصفيحة تماماً في المُكثف السريع Vac، وتذاب نيوكليوتيد في ٢٠ ميكروليترا من المحلول المُنظم. وتُغطى الصفيحة بورقة لصق، وتُخزن في درجة حرارة 20- مئوية حتى تُستخدم. وقبل استخدام الصفيحة، يتم عمل طرد مركزي بسرعة (١٠٠٠ لفة) لمدة ٢ دقيقة (انظر: الملاحظة ٨).

٣. يُصمم برنامج طباعة، يقوم بطبع ١٦ مصفوفة متشابهة تُناسب الإطار السريع (FAST frame). ويجب طباعة كل مجس في المُكرر (على الأقل). ويجب غسل الدبوس جيداً بين كل تطبيق للنيوكليوتيد. على سبيل المثال: يغسل بالماء لمدة ٨ ثوان، وبعدها بالإيثانول لمدة ٢ ثانية، ويجفف لمدة ٥ ثوان. ويتم اختيار البرنامج المُصمم باستخدام صفيحة صورية وشرائح ميكروسكوب أنموذجية باستخدام المحلول المُنظم لوضع النيوكليوتيد (انظر: الملاحظة ٩).

٤. تضبط رطوبة الغرفة (أو اليد الآلية للصف) على ٥٠٪ (انظر: الملاحظة ١٠).



شكل (١): أربع من الشرائح مضافة على (FAST frame).

٥. يتم إعداد اليد الآلية للإضافة، من خلال ملء الصفيحة بمجسات النيوكليوتيد، والحصول عدد مناسب من الشرائح، بما فيها الشرائح التصويرية لتعليمها، ودبوس من دبائيس الفصل (مثل: XSMP2.5).
٦. بعدها تبدأ عملية الطباعة.
٧. يتم تفكيك الشرائح، ثم يتم التأكد من أن الطباعة جيدة باستخدام ميكروسكوب التشريح (انظر: الملاحظة ١١).
٨. تُخزن الشرائح في حاوية من حاويات التجفيف.

٣-٣: تجميد المجسات وإضافتها على الشريحة:

١. على الفور قبل التهجين، يتم تجميد المجسات من خلال تحضينها على رطوبة ٩٠٪ لمدة ٣٠ دقيقة (في صندوق رطب).
٢. يتم غسل الشريحة (الشرائح) في درجة حرارة الغرفة، ولا تُجفف الشرائح بين كل خطوة وأخرى:
 - 0.1% Triton X-100 for 1 × 5 min.
 - 1 mM HCl for 2 × 2 min.
 - 100 mM KCl for 1 × 10 min
 - dH₂O ماء مقطر for 1 × 1 min.

٣. تُحجَب الشرائح في محلول مُنظَّم للحجَب في درجة حرارة 50°C لمدة ١٥ دقيقة، وتغسل بال dH_2O في درجة حرارة الغرفة لمدة دقيقة واحدة.
٤. تُجفف الشرائح بالهواء.

٣-٤: استخراج الـ DNA:

إن نطاق هذا الفصل لا يشمل على استخراج الـ DNA الفيتوبلازما، وهناك عديد من الطرق لاستخراج الـ DNA الفيتوبلازما؛ ولكننا نستخدم هنا طريقة Prince et al. (١٧)؛ حيث يجب أن تشمل على شاهدٍ لنبات سليم وشاهدٍ سلبي.

٣-٥: تحضير معلمات لعينة الـ DNA:

٣-٥-١: التضخيم بالـ PCR:

١. يتم تضخيم عينات الـ DNA ($\sim 20\text{ ng}$) باستخدام المكونات التالية (انظر: الملاحظة ١٢):

ddH ₂ O	10.4 μL
PCR buffer (5 \times , Promega)	5.0 μL
MgCl ₂ (25 mM)	1.5 μL
dNTP (2.5 mM each)	2.0 μL
Pp array fwd (10 μM)	2.5 μL
Pp array rev (10 μM)	2.5 μL
Taq DNA polymerase (Go Taq Flexi) (5 U/ μL)	0.125 μL
Template DNA	1.0 μL

٢. يستخدم البرنامج الحراري التالي: 94°C لمدة ٣ دقائق، ويليه ٣٥ دورة في 94°C لمدة ١٥ ثانية، و 62°C لمدة ٣٠ ثانية، و 72°C لمدة دقيقة واحدة، وأخيراً 72°C لمدة ١٠ دقائق.
٣. يتم تحليل ٥ ميكروليترات من التفاعل على جل الآجاروز، ويمكن مشاهدة المنتج المُضخَّم بمقدار $\sim 0.7\text{kb}$ بعد عملية الصبغ.

٣-٥-٢: تعليم منتج الـ PCR:

١. يتم تعليم ١ ميكروليتر من منتج الـ PCR بمعلم باستخدام BioPrime[®] Array CGH Genomic Labeling Module مع Cy3-dCTP (انظر: الملاحظة ١٣). وتُخلط المكونات التالية:

2.5× random primers	5 µL
dH ₂ O	3.25 µL
PCR product	1 µL

٢. يتم تحضينها في درجة حرارة 95°C لمدة ٥ دقائق، ثم تُوضع في الثلج.
٣. يتم إضافة الخليط الرئيسي التالي:

10× dCTP nucleotide mix	1.25 µL
1 mM Cy3-dCTP	0.25 µL
1 mM dCTP	0.5 µL
Exo-Klenow fragment	0.25 µL

٤. يُخلط، ثم يُحضن في 37°C لمدة ساعتين.
٥. يتم إضافة ١,٥ ميكروليتر من المحلول المنظم للتوقف.
٦. يُضاف ٧,٢٥ ميكروليترات من الـ H₂O.
٧. يتم تنقية تفاعلات العلامات باستخدام MinElute Reaction Cleanup Kit (QIAGEN) حسب تعليمات المُصنع وإرشاداته، وتُخزن المنتجات التي تم تنقيتها في 20°C- حتى تُستخدم، وتُحفظ بعيداً عن أشعة الشمس (انظر: الملاحظة ١٤).

٦-٣: التهجين:

١. يتم تركيب الشرائح بشبكة FAST Frame (Schleicher & Schuell, Dassel, Germany) بها ١٦ حفرة، ويتم تعليم الشرائح لمعرفة الاتجاه.
٢. يتم فصل العلامات لمنتج الـ PCR على 95°C لمدة ٥ دقائق، ثم تُوضع في الثلج مباشرةً.
٣. يُضاف ٨٠ ميكروليترا من المحلول المنظم للتهجين إلى كل حفرة من حفر التهجين.
٤. يُضاف منتج الـ PCR المعلم إلى كل حفرة.
٥. يُغطي (FAST frame) الإطار بغطاء خاص للإطار microtitre أو ما يشابه.
٦. يُوضع في غرفة مظلمة رطبة بها محلول كلوريد صوديوم مشبع على 48°C طوال الليل.

٧-٣: الغسيل:

١. يتم إزالة الخليط المُهجن من كل حفرة من الحفر بماصة، دون لمس الشريحة.
٢. يُوضع الإطار (FAST frame) مع الشرائح في صندوق به ٥٠٠ مل من الـ SSC 2×، 0.1% SDS لمدة ٢ دقيقة، ويتم هز الصندوق.

٣. يتم فك الشرائح من الإطار، وتوضع في حاملة الشرائح، وتغسل في $2 \times \text{SSC}$ ، $0.1\% \text{ SDS}$ لمدة ٥ دقائق في درجة حرارة 42°C .
٤. يتم الغسيل بمحلول $2 \times \text{SSC}$ في $1 \times \text{min}$ على درجة حرارة الغرفة.
٥. يتم الغسيل بمحلول $2 \times \text{SSC}$ في $0.1 \times \text{min}$ على درجة حرارة الغرفة.
٦. يتم إزالة السائل المتبقي، ويُجفف باستخدام هواء مضغوط خالٍ من الزيت.
٧. يتم تخزين الشرائح في مكان مظلم تحت التجفيف (انظر: الملاحظة ١٥).

٣-٨: الماسح:

تعتمد القياسات على جهاز الماسح المستخدم؛ فنحن نقوم باستخدام جهاز المسح من النوع GenePix Personal 4100A. ويتم مسح الشريحة باستخدام الإعدادات الافتراضية في 532 nm ، وتُحدد منطقة البقعة والمنطقة الخلفية وفقاً لبرنامج مُخصص لهذا النوع من أجهزة المسح، ووفقاً لنمط تحديد البقعة. وبعد تنظيم البقاع والتمييز، تُحلل النتائج، ثم تُنقل إلى ملف نصي (انظر: الملاحظة ١٦).

٤- الملاحظات:

١. يُفضل استخدام دبابيس قطرها صغير حاد؛ وذلك للحصول على مصفوفات كثافتها أعلى. ويُسمح باستخدام الدبابيس المقسومة، مع الطباعة المتكررة على السائل الناتج، في حين تعمل الدبابيس الصلبة على تطويل عملية الطباعة، إلى حد كبير. ويجب تنظيف الدبابيس بانتظام. ويُمكن تنظيفها في حمام الموجات فوق الصوتية sonication bath بماء مقطر، ويجب تجنب لمس سن الدبابيس.
٢. وجدنا أن الشريحة Nexterion E التي تقوم على شريحة الإيبوكسي (epoxysilane) تعمل بشكل جيد في تجاربنا، ويمكن الحصول على مزيد من المعلومات من الموقع الإلكتروني: http://www.schott.com/nexterion/english/products/coated_slides/epoxysilane/epoxysilane.html
٣. يعمل الطرف (T) d في نهاية 5' على تحسين كفاءة التهجين، وخصوصاً للمجسات القصيرة، حيث تتمكن المجسات المتسلسلة من الوصول إلى الـ DNA المطلوب، ونستخدم في هذه الطريقة الطرف $d(T)_{10}$.
٤. يُمكن استخدام المجسات التي لا يتوقع تهجينها لعينة الـ DNA؛ (مثل: الـ DNA البكتيري أو النباتي) شاهداً سلبياً، ويجب أن يكون T_m هذه المجسات مماثلاً لـ T_m المجسات الخاصة. وقد قمنا باستخدام مجسين من الفطريات لجين $\beta\text{-tubulin}$ في هذا الميكروآراي.

5. وفقاً لهذه الطريقة، يعمل الـ Promega GoTaq على تضخيم الـ PCR بفاعلية. ومع ذلك، فقد يتم استخدام إنزيمات أخرى.
6. يتم تصميم المجسات المستخدمة في هذه الطريقة على أساس مطابقة الـ 16SrRNA للفيتوبلازما باستخدام برنامج CLC DNA Workbench. وتم تحديد مجسات لتمييز مجموعة الفيتوبلازما يدوياً؛ مع تفصيل ما لا يقل عن أربع حالات بعدم تطابقها مع المجموعات غير المستهدفة. وعلاوة على ذلك، تم تصميم مسبارين كاملين لتهجين تسلسلات جين 16S rRNA من كافة أنواع الفيتوبلازما المعروفة، وتم تعديل طول النيوكليوتيد لإعطاء T_m من 59 ± 2 درجة مئوية، وتم حسابها باستخدام طريقة الـ nearest-neighbor، وتم فحص القدرة على تشكيل هياكل hairpin و dimers باستخدام CBC DNA Workbench، وتم اختيار مجسات قليلة لتشكيل هذا النوع من الهياكل.
7. في معظم الطرق، يتم طباعة مصفوفة واحدة فقط على كل شريحة. ومع ذلك، يقلل هذا الأمر من السرعة الإنتاجية، إلى حد كبير. وبطباعة مزيد من المصفوفات على كل شريحة واستخدام الإطارات لفصل المصفوفات، يمكن أن يزيد هذا الأمر من معدل الإنتاجية، بشكل كبير. ويجب ضبط موضع كل مصفوفة فرعية بعناية؛ حتى يتم وضعها على إطار (FAST Frame). ونستخدم في Genetix spotter الإعدادات التالية لأجل مقياس موضع 16×16 Spotting pitch: 330؛ 8؛ No Fields X؛ 2؛ No Fields Y؛ 4510؛ Offset Field 1X؛ 5310؛ Offset Field 1Y؛ 3720؛ Offset Field Y؛ 75500؛ Size X؛ 24200؛ Size Y. ونقوم باختبار العلامات المحسوبة باستخدام المحلول المنظم لتحديد البقعة وشرائح المجهر القياسية في الاختبار الجاري.
8. يمكن استخدام لوحات الطباعة مع النيوكليوتيدات للطباعة لعدة مرات. ومع ذلك، تعمل كل عملية طباعة على تقليل كمية محاليل المجسات، ويرجع ذلك في الأساس إلى التبخر. ويجب التأكد من أن وحدات التخزين بالطباعة كافية قبل كل عملية طباعة.
9. نقوم باستخدام 330 ميكروملا مسافة لتحديد مكان البقعة، 0ms لوقت الإضافة، 1s لوقت الطباعة. ويتم طباعة عشرين طابعاً على شريحة من الشرائح الوهمية قبل طباعة الشرائح لتجنب ترسب السائل المتبقي. وبعد ذلك، يمكن عمل ما يصل إلى 200 طابع.
10. يجب أن تكون درجة الرطوبة ثابتة بين أوقات الطباعة، على الرغم من أن بعض الطابعات يمكنها التحكم في درجة الرطوبة، إلا أننا نفضل الغرف التي يمكن التحكم بها في درجة الرطوبة، لأن هذا يخلق بيئة أكثر تناسقاً. ويجب ضبط درجة الرطوبة جيداً قبل البدء في تحديد البقع لضمان استقرار الرطوبة، ويجب وضع الميكروواري في غرفة نظيفة. وإذا لم يكن ذلك ممكناً، فحاول وضع الطابعة في غرفة بها أعمال محدودة.
11. نظراً لوجود الأملاح في المحلول المنظم للطباعة، فيمكن رؤية البقع المميزة قبل غسيل الشرائح. ويجب أن يُثبت الفحص أن جميع المجسات مطبوعة، وأن البقع مفصولة بشكل جيد.

١٢. يجب اتخاذ الاحتياطات لتجنب تلوث العينات والكواشف في جميع المراحل أثناء إعداد ال-PCR، مع استخدام الممصات المخصصة فقط لإعداد الخلطات الرئيسية، واستخدام أخرى لإضافة ال-DNA المُستخدم، وكذا استخدام الممصات المفلترة فقط. كما يجب ارتداء قفازات وتغييرهم باستمرار، واستخدام الأدوات البلاستيكية النظيفة المعقمة فقط، ويجب تحضير الخلطة الرئيسية، وإضافة ال-DNA في أماكن مُفصّلة.
١٣. يتم تقليل كمية الاختبارات إلى الربع لتوفير المواد.
١٤. يمكن حفظ نصف الاختبارات نسخاً احتياطية.
١٥. تنخفض كثافة صبغة ال-Cy3 مع مرور الوقت. ومع ذلك، تظل الشرائح في إعطاء إشارات مقبولة بعد بضعة أسابيع، إذا تم تخزينها بشكل صحيح.
١٦. يجب توفير مجموعة من أجهزة المسح الضوئي والبرمجيات للميكرواري لتسجيل عمليات التهجين الخاصة بالميكرواري وتحليلها. وعادةً يتم تهجين عينة واحدة فقط لكل مصفوفة (فرعية). وبالتالي، يتم استخدام مسح ضوئي أحادي اللون. ولتحليل كثافة الإشارة بعد عملية المسح، عادةً يتم إضافة شبكة من الدوائر على الصورة. لذلك، تُحدد كل دائرة من الدوائر بقعة الميكرواري، وقد يتطلب هذا الأمر تعديل الدوائر الفردية. ويتم التعبير عن كثافة الإشارة بمتوسط القراءات (ويتم حساب كثافة متوسط القراءات كي تستثني القراءات غير المنطقية)، ويتم طرح القراءات الخلفية (يتم ذلك بشكل تلقائي في GenePix Pr). وبالنسبة لطرح القراءات الخلفية في ال-GenePix Pro، يتم ذلك باستخدام طريقة الطرح الافتراضية؛ حيث يتم طرح الكثافة متوسطة القراءة للمنطقة الوسطى للعنصر؛ والذي يبلغ قطره ثلاثة أضعاف قطر العنصر العادي (باستثناء العناصر القريبة) من الكثافة متوسطة القراءة للعنصر المميز. وتُعتبر المجسات موجبةً إذا كانت الإشارة الخلفية المطروحة أعلى من الدرجة التي تم تحديدها بشكل اعتباري أو تجريبي. وقد قمنا بوضع حدٍ لتحديد عتبة الإيجابيات، مثل: $3 \times$ (كثافة متوسط للبقعة + الانحراف المعياري للإشارات من مجسات الشاهد السلبي).

المراجع:

1. Deng S, Hiruki C (1991) Amplification of 16S rRNA genes from culturable and nonculturable mollicutes. J Microbiol Meth 14:53-61
2. Smart CD et al (1996) Phytoplasma-specific PCR primers based on sequences of the 16S-23S rRNA spacer region. Appl Environ Microbiol 62:2988-2993
3. Gundersen DE, Lee I-M (1996) Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal primer pairs. Phytopathol Mediterr 35:144-151
4. Lee I-M et al (1998) Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analyses of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences. Int J Syst Bacteriol 48:1153-1169

5. François C et al (2006) Towards specific diagnosis of plant-parasitic nematodes using DNA oligonucleotide microarray technology: a case study with the quarantine species *Meloidogyne chitwoodi*. *Mol Cell Probes* 20:64–69
6. Nicolaisen M et al (2005) An oligonucleotide microarray for the identification and differentiation of trichothecene producing and nonproducing *Fusarium* species occurring on cereal grain. *J Microbiol Meth* 62:57–69
7. Lievens B et al (2006) Detecting single nucleotide polymorphisms using DNA arrays for plant pathogen diagnosis. *FEMS Microbiol Lett* 255:129–139
8. Tambong JT et al (2006) Oligonucleotide array for identification and detection of *Pythium* species. *Appl Environ Microbiol* 72: 2691–2706
9. Pelludat C, Duffy B, Frey JE (2009) Design and development of a DNA microarray for 1. rapid identification of multiple European quarantine phytopathogenic bacteria. *Eur J Plant Pathol* 125:413–423
10. Fessehaie A, De Boer SH, Lévesque CA (2003) An oligonucleotide array for the identification and differentiation of bacteria pathogenic on potato. *Phytopathology* 93:262–269
11. Nicolaisen M, Bertaccini A (2007) An oligonucleotide microarray-based assay for identification of phytoplasma 16S ribosomal groups. *Plant Pathol* 56:332–336
12. Boonham N, Tomlinson J, Mumford R (2007) Microarrays for rapid identification of plant viruses. *Annu Rev Phytopathol* 45:307–328
13. Dufva M (2005) Fabrication of high quality microarrays. *Biomol Eng* 22:173–184
14. Zhang L, Hurek T, Reinhold-Hurek B (2005) Position of the fluorescent label is a crucial factor determining signal intensity in microarray hybridizations. *Nucleic Acids Res* 33:e166
15. Franke-Whittle IH et al (2006) Comparison of different labeling methods for the production of labeled target DNA for microarray hybridization. *J Microbiol Meth* 65: 117–126
16. Vora GJ et al (2008) Comparison of detection and signal amplification methods for DNA microarrays. *Mol Cell Probes* 22:294–300
17. Prince JP et al (1993) Molecular detection of diverse mycoplasma-like organisms (MLOs) associated with grapevine yellows and their classification with aster yellows, X-disease, and elm yellows MLOs. *Phytopathology* 83: 1130–1137

T-RFLP للكشف عن الفيتوبلازما وتعريفها في النباتات

Jennifer Hodgetts and Matt Dickinson

ملخص:

إن الكشف عن الفيتوبلازما يجرى بشكل تقليدي من خلال تحليل الـ PCR لجين الـ 16S rRNA، ويتبع ذلك: إما بالـ RFLP أو تسلسل الـ DNA لتحديد المجموعة الـ 16Sr للفيتوبلازما. ويوضح هذا الفصل تقنية تعدد الأشكال الطولية لأجزاء المسك الطرفية (T-RFLP)، وهي تقنية من تقنيات البصمة التي تجمع بين التحديد والكشف في طريقة واحدة، والفائدة الإضافية أيضاً تعمل على إزالة مخاطر الحصول على نتائج سلبية غير صحيحة، فضلاً عن أنها تُسلط الضوء على احتمال الحصول على نتائج موجبة غير صحيحة.

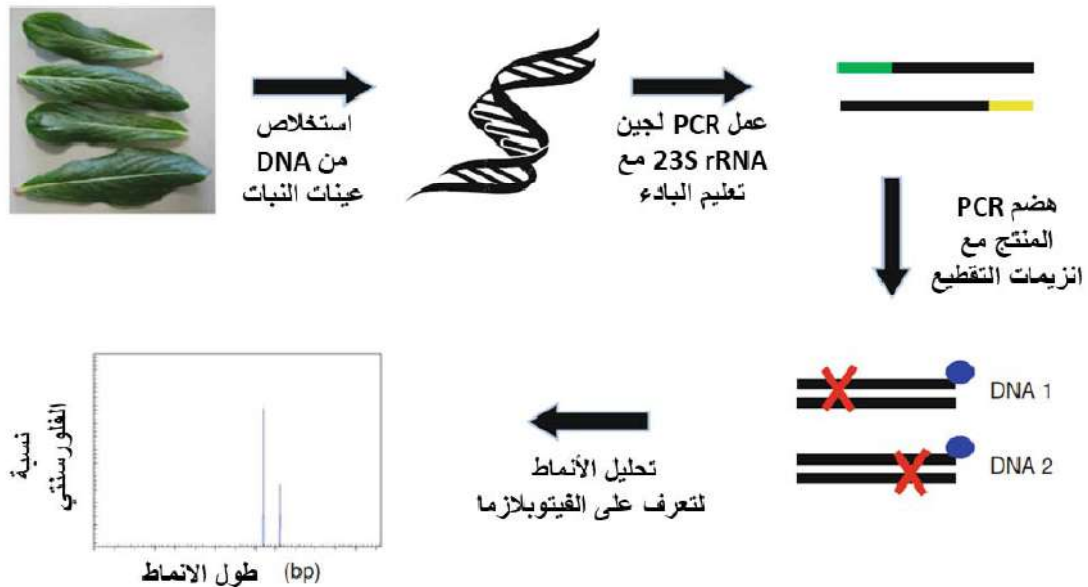
الكلمات المفتاحية: T-RFLP، التشخيص، جين الـ 23S rRNA، تحديد المجموعة الـ 16Sr.

١- المقدمة:

إن التجارب التشخيصية للفيتوبلازما تقوم -من الناحية التاريخية- على جين الـ 16S rRNA، ويرجع هذا الأمر إلى توافر البادئات "العامة" لهذه المنطقة (١) (انظر: أيضاً إلى Duduk et al. (٢)، الفصل الرابع عشر). ومع ذلك، قد تمت ملاحظة أن البادئات "العامة" القياسية يمكنها تضخيم المواد الناتجة من البكتيريا المتشابهة مثل: البكتيريا *Bacillus spp.*، الأمر الذي يؤدي إلى حدوث أخطاء في التشخيص والحصول على نتائج موجبة خاطئة (٣). وبسبب ذلك، تم دراسة جينات أخرى أهدافاً تشخيصية محتملة، ومن أمثلة تلك الجينات: *secA* و *secY*، *tuf*، *rp operon* (انظر: الفصول الخامس عشر، السادس عشر، والسابع عشر). وفي حين أنها قد تكون أقل عرضة للنتائج الإيجابية الخاطئة، فإن معظم هذه الأهداف لا تعطي كشفاً شاملاً عن كل أنواع الفيتوبلازما. وخارج نطاق علم أمراض النبات يُعتبر جين الـ 23S rRNA أحد أهم الأهداف التي يكثر استخدامها للكشف عن المجموعات الكبيرة للأنواع البكتيرية (٤)؛ إلا أنه -عادةً- لا يتم استخدامه للكشف عن

الفيتوبلازما البعيدة عن متناول بعض بادئات الـ PCR التقليدية التي تُضخم الـ 16S rRNA إلى بداية الـ 23S rRNA.

إن تحليل تعدد الأشكال الطولية لأجزاء المسك الطرفية (T-RFLP) هي إحدى التقنيات التي تم تطويرها لأول مرة في عام ١٩٩٧؛ لتحديد أنماط المجموعات الميكروبية على أساس تحديد مواقع إنزيمات الهضم المقيدة ضمن الـ DNA (٥). وهي تقنية تربط تضخيم الـ PCR ببداي واحد من ضمن البادئات الفلورية، وإنزيم الهضم بأنزيم واحد أو أكثر، وفصل الأجزاء بجهاز تسلسل للـ DNA من خلال رحلان كهربائي عالي الدقة؛ ليتم الكشف عن المنتجات التي تم تعليمها بصبغة الفلورسنت؛ التي تُعرف باسم: أجزاء الهضم الطرفية (TRFs) (شكل ١). وقد قمنا في معملنا بتعديل التقنية لجين الفيتوبلازما 23S rRNA ليسمح بالكشف المشترك للفيتوبلازما، وتحديد مجموعة 16Sr في عملية واحدة. وبينما في الـ T-RFLP، تُمثل كل TRE نوع مختلف من الأنواع البكتيرية في المجموعات الميكروبية، إلا أن كل TRF في هذه الطريقة يشير إلى مجموعة 16Sr لفيتوبلازما واحدة (٦). وبمجرد تحديد TRFs عن طريق الاختبارات التي يتم إجراؤها على مخطط الفصل الناتج (أو مُصنفات الـ T-RELP) يتم مقارنتها بأحد جداول الـ TRFs المتوقعة التي تسمح بتحديد مجموعة 16Sr. ويختلف الـ T-RFLP عن تحليل الـ RFLP (انظر: الفصلين الرابع عشر والخامس عشر)؛ من حيث أنه يكشف عن الجزء الطرفي فقط، ويرجع ذلك إلى وجود الصبغة الفلورية. ولا تحتوي الأجزاء الأخرى (اللاطرفية) على صبغة. وبالتالي، لا يتم اكتشافها مقارنةً بتحليل الـ RFLP؛ والذي من خلاله يتم تصوير أنماط الأجزاء كلها.



شكل (١): شكل توضيحي للخطوات المختلفة لاختبار تعدد الأشكال الطولية لأجزاء المسك الطرفية (T-RFLP)

وفي الآونة الأخيرة، مع زيادة استخدام الـ PCR المتزامن (real-time PCR)، أصبح من الشائع إجراء فحوصات بشكل روتيني؛ والتي تثبت أن استخلاص الـ DNA أمر ناجح، وأن أعداد الـ DNA يدعم تضخيم الـ PCR. وتُعتبر هذه خطوة أساسية، بكل من الـ PCR المتزامن والتقليدي على حد سواء، وهو ما يتطلب - غالباً - إجراء اختبارين فرديين. إن إحدى مميزات الـ T-RFLP الرئيسية أنه في التفاعل الواحد تعمل مجموعة واحدة من البادئات على تضخيم الـ DNA الفيتوبلازما والنباتات، ويتم إنتاج الـ TRFs الذي يمثل كليهما. وهذا يعني أنه من السهل إثبات عدم وجود نتائج سلبية خاطئة تؤكد جودة الـ DNA وعدم وجود مثبطات، وعدم وجود نتائج من الـ TRFs الفيتوبلازما والنبات يُشير إلى المثبطات أو الـ DNA غير القابل للتضخيم، ومنه تستبعد العينات السلبية الخاطئة. ويتم استبعاد هذا الأمر في الـ T-RFLP؛ لأن كل مجموعة من مجموعات الـ 16Sr تنتج الـ TRFs بها إنزيمان للهضم. وإن وجود أي الـ TRFs أخرى قد يُشير إلى وجود مجموعة جديدة من مجموعات الفيتوبلازما، أو إلى احتمال وجود سلالات غير مستهدفة. وبالتالي، تتضح العينات الإيجابية الخاطئة. ولتحديد الـ TRFs الصحيح لمجموعة معينة، يجب تحديد تسلسل الـ 23S rRNA. وبعد ذلك، يمكن إجراء عملية هضم بالبرامج الخاصة بأنزيمات معينة لوضع توقعات عن أحجام الـ TRF. وهذا يسمح بتطوير التقنية بشكل مستمر، ويتم اكتشاف أنواع جديدة من الفيتوبلازما.

وتستهدف التجربة المشروحة جين الـ 23S rRNA، وهو جين ذو نسخ متعددة. ويعمل هذا الهدف على توفير البادئات التي تشمل كافة أنواع الفيتوبلازما المعروفة، ويُحافظ على مستوى معقول من درجة الحساسية. إن درجة حساسية الـ T-RFLP تُعادل تحليل الـ PCR المعتاد، ويكون متوسطاً بينه وبين الـ PCR المتزامن (real-time PCR).

ومع كل هذه المعطيات المتنوعة من العوامل (الكشف العام، وتحديد السلبيات والإيجابيات الخاطئة، والحساسية) - كل ذلك - يجعل من الـ T-RFLP أداة مناسبة وعملية في بعض الحالات؛ كحالة الفحص أعلى الإنتاجية لموقع الانتشار - على سبيل المثال -؛ حيث تكون هناك حاجة لفحص عدد كبير من العينات وإثباتها لمجموعة الـ 16Sr الخاصة بالفيتوبلازما. وفي بعض الحالات، قد تكون ملائمة بشكل أكبر من تحليل الـ PCR المتزامن (التقنية القياسية للإنتاج العالي)؛ حيث إنها تُحدد نوع الفيتوبلازما في خطوة واحدة. ومقارنةً بالـ PCR المتزامن؛ والذي يتم استخدامه في التجارب العامة التي تحتاج إلى تحديد المستوى الأدنى لمجموعات، قد يتم استخدام بادئات معينة تفشل في تحديد الإصابة بأنواع أخرى من الفيتوبلازما (أو الإصابات المزدوجة). ومنه يستطيع الـ T-RFLP اكتشاف الإصابات المختلطة التي تشتمل على فيتوبلازما من مجموعات نباتية مختلفة؛ حيث يمكن اكتشافها في التجربة نفسها. وبالرغم من ذلك، يُعتبر الـ T-RFLP أقل ملاءمة لتحديد مجموعة جديدة من مجموعات الفيتوبلازما، حيث إن التقنيات الأخرى تقدم أعلى مستويات من الحساسية، وتعتبر أكثر ملاءمة.

٢- المواد:

يجب تحضير كافة المحاليل المخزنة بماء مُعقم ومُقطر في منطقة مختلفة عن المنطقة التي يتم بها التعامل مع DNA الفيتوبلازما والنباتات. ويجب استخدام ممصات Gilson (أو ما يشابهها) من النوع المُخصص للعمل في مكان يخلو من الـ DNA، وذلك لجميع البادئات أثناء تحضير اختبار الـ PCR واختبارات هضم إنزيمات، ومجموعة مختلفة تُستخدم للتعامل مع منتجات الـ PCR والـ DNA.

١-٢: PCR:

١. أنابيب PCR (٢٠٠ أو ٥٠٠ ميكروليتر).
٢. أنابيب Eppendorf (١,٥ مل).
٣. بادئات (١٠ ميكرومل) (الجدول ١). ومع البادئ العكسي (23Srev)، يجب إضافة WellRED dye-D4 (المتوفرة عند Sigma-Proligo or Integrated DNA Technologies) (انظر: الملاحظة ١).
٤. مواد الـ PCR (بدون صبغة التحميل): نستخدم Fermentas PCR Master Mix 2X (انظر: الملاحظة ٢).
٥. جهاز هزاز للخلط.
٦. جهاز للـ PCR.
٧. ممصات (٢، ٢٠، ٢٠٠، و١٠٠٠ ميكروليتر).
٨. ماصات مفلتر (١٠، ٢٠، ٢٠٠، و١٠٠٠ ميكروليتر).
٩. ماء مُعقم ومُقطر (ddH₂O).
١٠. مُستخلص للـ DNA من العينات التي سيتم اختبارها (انظر: الملاحظة ٣).

جدول (١): البادئات المستخدمة في اختبار تعدد الأشكال الطولية لأجزاء المسك الطرفية (T-RFLP) في هذه الطريقة:

Primer name	Sequence (5'-3')	Label
MJD5	GGCACTAAGAGCCGATGAAGG	None
23Srev	TTCGCCTTCCCTCACGGTACT	D4 Beckman dye (Sigma-Proligo)

٢-٢: إنزيمات الهضم:

١. أنابيب Eppendorf (١,٥ و ٠,٦ مل).
٢. إنزيم هاضم *Mse* I (T'TAA).

٣. إنزيم هاضم *Bsh12361* (CG'CG).
٤. محاليل منظمة لإنزيمات الهضم بتركيز $10 \times$ ؛ والمزودة مع الإنزيمات *Mse I* و *Bsh 12361*.
٥. جهاز هزاز للخلط.
٦. حمام مائي، أو جهاز حراري (معه مقياس الحرارة).
٧. قطارات (٢، ٢٠، و ٢٠٠ ميكروليتر).
٨. ماصات مفلترة (١٠، ٢٠، و ٢٠٠ ميكروليتر).
٩. ماء مُعقم ومُقطر (ddH_2O).
١٠. منتجات PCR من العنوان الفرعي ١،٢.

٢-٣: تحليل T-RFLP:

١. أنابيب Eppendorf (٠,٦ و ١,٥ مل).
٢. زيت معدني.
٣. ماء مُقطر ومُعقم.
٤. حامل مبرد ($4^\circ C$) لصفحة خاصة بـ DNA ذات (٩٦-حفرة).
٥. جهاز هزاز للخلط.
٦. جهاز GenomeLab DNA معياري الحجم - ٦٠٠ (Beckman Coulter).
٧. محلول تحميل العينة GenomeLab (Beckman Coulter).
٨. قطارات (٢، ٢٠، ٢٠٠، و ١٠٠٠ ميكروليتر).
٩. ماصات مفلترة (١٠، ٢٠، ٢٠٠، و ١٠٠٠ ميكروليتر).
١٠. صفحة ميكروتيتير (Microtiter plate) ٩٦ حفرة مناسبة لجهاز تسلسل الـ DNA.
١١. منتجات هضم الإنزيمات من العنوان الفرعي ٢-٢.
١٢. خدمة تحليل الأنماط على نظام تحليل DNA CEQ 8000.

٣- طريقة العمل:

يتم إجراء كافة الخطوات في درجة حرارة الغرفة، ما لم يُذكر خلاف ذلك.

٣-١: تحضير خليط تفاعل الـ PCR وتفعيل الـ PCR:

١. يُوضع ملصق على أنابيب الـ PCR.
٢. يتم عمل خليط الـ PCR الرئيسي للعينات $n+1$ ، وتعتمد الكمية على عدد العينات التي سيتم اختبارها؛ والتي تشتمل على الشاهد الإيجابي (يتم معرفة العينات الإيجابية بواسطة الـ

PCR والهضم بالإنزيم) والشاهد السلبي (الماء/عدم وجود DNA) (n). على سبيل المثال: إذا كان هناك ٦ عينات من المفترض أن يتم اختبارها، عندها تصبح $n = 8$ بمجرد إدراج عناصر الشاهد الإيجابي والسلبي. وبالتالي، يتم عمل الخليط الرئيسي على أساس $n+1=9$. وإذا كان هناك ٢٠ عينة سيتم اختبارها، $n = 22$ ، ويتم عمل الخليط الرئيسي لـ ٢٣ تفاعلا، وهكذا.

٣. يعتمد تركيب الخليط الرئيسي على اختبار الـ PCR المستخدم؛ ويتكون كل تفاعل بالنسبة Fermentas PCR Master Mix 2X من: ١٢,٥ ميكروليترا من الخليط الرئيسي 2X للـ PCR + ٩,٥ ميكروليترات من ddH₂O + ١ ميكروليتر من البادئ MJD5 + ١ ميكروليتر من البادئ 23Srev.

٤. يجب ارتداء القفازات، في منطقة بعيدة عن المكان؛ والذي يتم التعامل مع DNA الفيتوبلازما والنباتات، ويجب استخدام قطارات Gilson (أو ما يعادلها) من النوع المخصص للعمل في منطقة خالية من الـ DNA ومعها ماصات مفلترة، ويتم إضافة الخليط الرئيسي حسب الكمية المطلوبة في أنبوب Eppendorf ١,٥ مل (انظر: الملاحظة ٤). على سبيل المثال: إذا كان عدد العينات التي سيتم إخضاعها للاختبار ١٩، وكذلك شاهد الموجبة والسالبة ($n = 21$ و $n + 1 = 22$)، ومنه يتم إضافة ٢٠٩ ميكروليترات من ddH₂O، و ٢٧٥ ميكروليترا PCR Master Mix 2X، و ٢٢ ميكروليترا من البادئ MJD5، و ٢٢ ميكروليترا من البادئ 23Srev. نقوم بخلطهم جميعا، وبعدها نقوم بتقسيم ٢٤ ميكروليترا في أنابيب PCR تحمل ملصقات.

٥. بعد ذلك، تصبح الأنابيب جاهزة لإضافة عينة الـ DNA، ويتم إغلاق أنابيب الـ PCR. وبعدها، تنقل من المنطقة الخالية من DNA الفيتوبلازما إلى مكان آخر يمكن معالجة DNA الفيتوبلازما به. وباستخدام ممصات Gilson غير التي تم استخدامها لعمل الخليط الرئيسي، ومعها ماصات مفلترة، يتم إضافة ١ ميكروليتر من DNA لكل عينة إلى أنبوب PCR مناسب. وبالنسبة للشاهد الإيجابي، يتم إضافة ١ ميكروليتر من DNA العينة التي سبق إثبات أنها تعمل بفاعلية بالنسبة لطريقة الـ T-RFLP. وبالنسبة للشاهد السالبي، نضيف ١ ميكروليتر من ddH₂O.

٦. يتم إغلاق الأنابيب، ويتم وضعها في جهاز الـ PCR (إن لم يكن الغطاء العلوي لجهاز PCR لا يعطي الحرارة المطلوبة، يتم إضافة طبقة من الزيت المعدني على الخليط الرئيسي في كل أنبوبة). ويتم تنفيذ الـ PCR كما يلي: دورة واحدة في درجة حرارة 94°C لمدة ٢ دقيقة، ٣٥ دورة في درجة حرارة 94°C لمدة ٣٠ ثانية، 56°C لمدة 60 ثانية و 72°C لمدة 90 ثانية.

٧. بمجرد انتهاء الـ PCR، يمكن تخزين العينات في درجة حرارة -20°C قبل عمل عملية الهضم بالإنزيمات (انظر: الملاحظة ٥).

٢-٣: الهضم بالإنزيمات:

١. ضع ملصقاً على أنابيب Eppendorf ٠,٦ مل.
٢. قم بتحضير الخليط الرئيسي للهضم بالإنزيمات للعينات $n+2$ (انظر: الملاحظة ٦). على سبيل المثال: إذا كان مجموع العينات التي تم اختبارها بال-PCR ٨ عينات تصبح (من ضمنها الشاهدين) الاختبارات $n+2=10$. ويتم ضم الشاهد الإيجابي الـ PCR في تفاعل الهضم على أنه شاهد إيجابي أيضاً. ويسمى "2+" بتحضير الشاهد السالب؛ حيث يتم حذف إنزيم الهضم من الخليط الرئيسي لعامل الـ PCR الإيجابي، وكذلك تحسباً لأي أخطاء في المصنات.
٣. يتم اتباع طرق الشركة المصنعة؛ حيث يخلط كمية مناسبة من المحلول المنظم مع الماء، واستخدام 1 U من الإنزيم الهاضم (انظر: الملاحظة ٧) في أنبوب Eppendorf سعته ١,٥ مل. اخلطهم جيداً، وقسم كمية مناسبة في أنابيب Eppendorf ٠,٦ مل.
٤. أضف ١٠ ميكروليترات من منتج PCR إلى الخليط الرئيسي (انظر: الملاحظة ٨).
٥. يتم تحضين العينات على درجة حرارة 37°C لمدة ساعتين؛ باستخدام حمام مائي، أو جهاز حراري (انظر: الملاحظة ٩).
٦. بمجرد الانتهاء من اختبار الهضم، يمكن تخزين العينات على درجة حرارة -20°C قبل تحليل الـ T-RFLP (انظر: الملاحظة ١٠).

٣-٣: خطوات اختبار T-RFLP:

١. قم بوضع ملصق على أنابيب Eppendorf ٠,٦ مل.
٢. يتم إذابة ١ ميكروليتر من كل منتج من منتجات الهضم في ٥ ميكروليترات من الـ ddH₂O في أنابيب Eppendorf 0.6 مل، ويتم خلطهم جيداً.
٣. يتم وضع المخلوط في صفيحة الميكروتيتير التي تتكون من ٩٦ حفرة في كتلة باردة.
٤. أضف ٣٨,٥ ميكروليتر من محلول تحميل العينة Genomelab، و ٠,٥ ميكروليتر من Genomelab DNA Size Standard Kit-600 إلى كل حفرة من الحفر صفيحة الميكروتيتير الـ ٩٦ التي سيتم استخدامها.
٥. أضف ١ ميكروليتر من كل منتج من منتجات الهضم المخففة (من خطوة ٢) في كل حفرة.
٦. ضع في كل حفرة قطرة واحدة من الزيت المعدني.

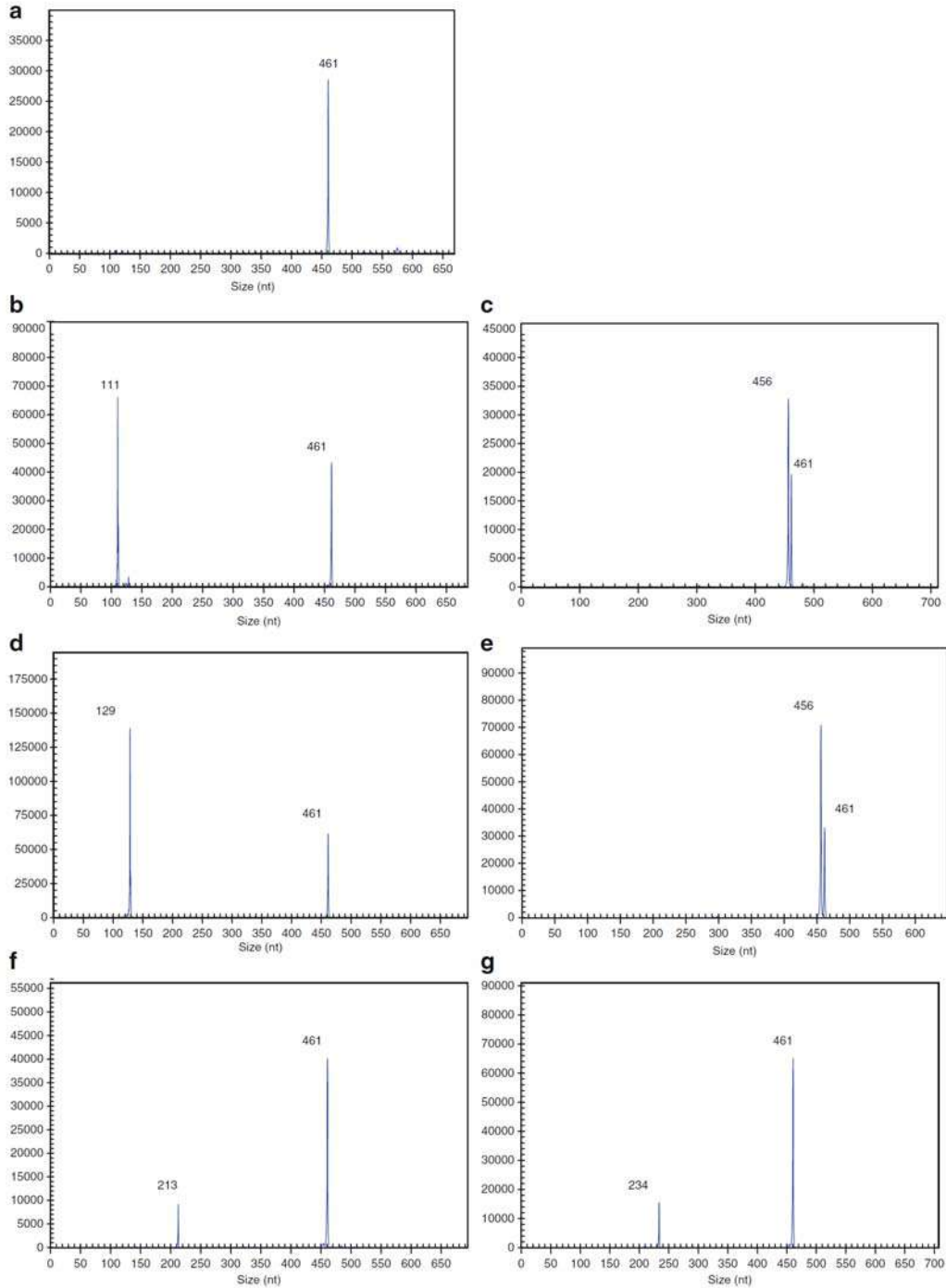
٤-٣: تشغيل T-RFLP وتحليلها:

١. يتم وضع العينات على نظام التحليل DNA CEQ 8000 وتشغيلها، وتحليل الأنماط وفقاً لطريقة الشركة المصنعة.

٢. نقوم بتحليل التخطيط الكهربائي باستخدام أنظمة وبرنامج الـ CEQ، مع مراعاة أن تكون الـ TRFs بين ٦٠ و 640 bp، ويجب اعتبار الـ TRFs الأكثر من 1.25 bp مختلفة.
٣. تُشير الـ TRF التي تحتوي على ٤٦١ زوجاً قاعدياً أن DNA النبات موجود، وأن الاختبار الذي تم تنفيذه ناجح (الرسم 2a). وقد يُشير عدم وجودها إلى فشل استخلاص الـ DNA، والـ DNA يحتوي على مُثبطات أو فشل الـ PCR في تلك الحالة. ويعزى ذلك، للعينة، أو لإعادة استخلاص الـ DNA، أو عمل تنظيف الحمض النووي.
٤. يتضح أن TRFs إضافية إلى وجود الفيتوبلازما (الشكل 2b-g). ومن ثم، يتم مقارنة حجم الـ TRF الناتج من خلال الـ *MseI* والـ *Bsh12361* (بالجدول ٢) لتحديد مجموعة الفيتوبلازما 16Sr (انظر: الملاحظة ١١).

٤- الملاحظات:

١. يمكن شراء البادئات؛ إما في حالة مُجففة بالتجميد، أو في مجموعة من تركيزات (غالباً ما تكون ٥٠-٢٠٠ ميكرومل) من مُصنعين كثيرين. وإن لزم الأمر، يتم إعادة تحضير البادئات المُجففة بالتبريد بناءً على توصيات الشركة المصنعة؛ فيكون إما في ماء خاص للأعمال الجزيئية، أو في محلول مُنظم TE. وعادة ما يتم حفظ ١٠٠ ميكرومل من المحلول المُخزن بتقسيمها إلى الكميات صغيرة (أي ١٠٠ ميكروليتر) من محلول المستخدم ١٠ ميكرومل (بتخفيف ١٠٠ ميكرومل من المحلول المُخزن 1:10 في ddH₂O) على درجة حرارة 20°C - في الظلام. ومن الأفضل، استخدام كميات المخففة من المحلول المستخدم (بدلاً من تخفيف كل المحاليل المُخزنة)؛ وذلك لتجنب تعدد دورات تذيب الثلج التي قد تُضر البادئات، وأيضاً للمساعدة في منع تلوث المحلول الأساسي، ويجب دائماً الحفاظ على البادئات المعلمة بالفلور في الظلام لمنع تدهور الفلور.
٢. يُنصح باستخدام خلطات الـ PCR الجاهزة للعمل، وتقليل خطوات التعامل مع الممصات، وهذا يساعد على تقليل مخاطر حدوث التلوث، إلا أنه يمكن استخدام مصادر أخرى لخلطات الـ PCR و *Taq polymerase*. ومن المهم ألا تحتوي أي مواد خاصة للـ PCR؛ والتي تُستخدم للـ T-RFLP على أي صبغة تحميل؛ لأنها قد تتداخل في فصل أجزاء التسلسل الـ DNA (sequencer).
٣. يمكن تحضير الـ DNA بأي طريقة ملائمة بالنسبة للنسيج الذي يُجري اختباره.
٤. تأكد من أن جميع المواد تم إزالة الثلج من عليها تماماً قبل استخدامها، واخلطها جيداً. وبمجرد إزالة الثلج، يُفضل التعامل معها في الثلج.



شكل (٢): اختبار T-RFLP مع نبات *Catharanthus roseus* شاهداً (سليماً) ونبات مصاب مع عديد من مختلف الفيتوبلازما؛ باستخدام البادئات MJD5، 23Srev مصبوغ، ويتبعه إما *MesI* أو *Bsh12361*. (a) *C. roseus* تم هضمها مع *Bsh12361*. (b) *Bsh12361* هضم مع *MesI*. (c) *FBP* هضم مع *Bsh12361*. (d) *TBB* هضم مع *MesI*. (e) *FBP* هضم مع *MesI*. (f) *FD-C* هضم مع *Bsh12361*. (g) *FD-C* هضم مع *MesI*. (جدول ٢ لمعرفة اختصارات أسماء الفيتوبلازما). وقيمة المحور س هو حجم زوج القواعد (هو رقم على العمود)، أما المحور ص فهو قوة الإشارة. وقد تم الحصول على الصور (٦) عن طريق الأذن من Wiley-Blackwell

جدول (٢): حجم TRF من الفيتوبلازما بعد استخدام MJD5 و 23Srev وهضم باستخدام إنزيمات إما *MesI* أو *Bsh12361*.

Sample	Description	16Sr group	<i>Candidatus</i> species	TRF (bp)	
				<i>MseI</i>	<i>Bsh12361</i>
CHRYM	Chrysanthemum yellows	IA	<i>P. asteris</i>	129	305
DIV	<i>Diplotaxis virescence</i>	IB	<i>P. asteris</i>	129	305
DAY	Dwarf aster yellows	IB	<i>P. asteris</i>	129	305
CACT	Aster yellows cactus	IB	<i>P. asteris</i>	129	305
EAY	European aster yellows	IB	<i>P. asteris</i>	129	305
KVE	Clover phyllody	IC	<i>P. asteris</i>	114	305
AYA	Apricot chlorotic leaf roll	IF	<i>P. asteris</i>	129	305
AY2192	Aster yellows	IL	<i>P. asteris</i>	129	305
AVUT	Atypical aster yellows	IM	<i>P. asteris</i>	129	305
CLP	Cleome phyllody	IIA	<i>P. aurantifolia</i>	129	456
FBP	Faba bean phyllody	IIC	<i>P. aurantifolia</i>	111	456
FBPSA	<i>Crotalaria saltiana</i> phyllody	IIC	<i>P. aurantifolia</i>	111	456
SOYP	Soyabean phyllody	IIC	<i>P. aurantifolia</i>	111	456
TBB	Australian tomato big bud	IID	<i>P. australasiae</i>	129	456
SPLL	Sweet potato little leaf	IID	<i>P. australasiae</i>	129	456
PEP	<i>Picris echioides</i> phyllody	IIE	<i>P. aurantifolia</i>	129	456
CoP	Cotton phyllody	IIF	<i>P. aurantifolia</i>	111	456
CX	Peach X disease	IIIA	<i>P. pruni</i>	129	450
GVX	Green valley X	IIIA	<i>P. pruni</i>	129	450
PYLV	Peach western X	IIIA	<i>P. pruni</i>	129	450
API	<i>Euscelidius variegatus</i>	IIIB	<i>P. pruni</i>	129	450
JRI	Poinsettia branching factor	IIIH	<i>P. pruni</i>	129	450
ULW	Elm witches broom	VA	<i>P. ulmi</i>	213	234
FD-C	Flavescence doree	VC	<i>P. vitis</i>	213	234
FD-D	Flavescence doree	VC	<i>P. vitis</i>	213	234
RuS	Rubus stunt	VE	<i>P. ulmi</i>	213	455
PWB	Potato witches broom	VIA	<i>P. trifolii</i>	425	237
BLL	Brinjal little leaf	VIA	<i>P. trifolii</i>	425	237

(continued)

تابع جدول (٢).

Sample	Description	16Sr group	Candidatus species	TRF (bp)	
				MseI	Bsh12361
CPS	Catharanthus phyllody	VIC	P. trifolii	425	237
ASHY-1	Ash yellows	VIIA	P. fraxini	328	234
LWB	Loofah witches broom	VIIIA	P. luffae	207 ^a	227 ^a
AP-15	Apple proliferation	XA	P. mali	129	230
GSFY-1	German stone fruit yellows	XB	P. prunorum	129	230
PD	Pear decline	XC	P. pyri	129	230
BVK	Flower stunting	XIC	P. oryzae	129	456
NGS	Napier grass stunt	XI	P. oryzae	129	456
STOL	Stolbur of pepper	XIIA	P. solani	412	441
LDG	Ghanaian Cape St Paul wilt	XXII	P. cocosnigeriae	420	450

Table reproduced from (6) with permission from Wiley-Blackwell

^aIndicates where the sizes have been estimated from the 23S accession

٥. لكي يكون المستخدم واثقاً من استخدام اختبار الـ PCR، من الأفضل تصوير منتجات الـ PCR (٥ ميكروليتر) من خلال الفصل الكهربائي الآجروز جل (كما هو متبع)؛ وذلك للتأكد من نجاح PCR قبل تحليل الـ T-RFLP، ويجب أن يكون حجم مواد تضخيم الـ PCR ٤٧٠ bp تقريباً.
٦. يجب استخدام كافة منتجات الـ PCR؛ بما فيها الشواهد الموجبة والسالبة بالنسبة للـ T-RFLP؛ للتأكد من أن عملية الاختبار ناجحة، ولمعرفة السبب في إحالة الفضل (إذا لزم الأمر).
٧. يتم توفير الإنزيمات الهاضمة والمحاليل المنظمة الخاصة بالشركة المصنعة بتركيزات مختلفة. لذلك، تكون مواد الخليط الرئيسي مختلفة، ونتأكد من اتباع طريقة الشركة المصنعة. إن إنزيمات الهضم حساسة للغاية تجاه تكرار إذابة الثلج، ويجب تخزينها دائماً في الثلج عندما لا تكون في الفريزر، ومن الأفضل تقسيم الإنزيم والمحلول المنظم إلى كميات صغيرة عند استلامهم من الشركة المصنعة.
٨. يجب أن يتم هضم كل جزء منفصل من منتجات الـ PCR بشكل مستقل بواسطة الـ MseI و Bsh12361 وليس في صورة هضم مزدوج. وغالباً - يُفضل - تحليل العينات أولاً بواسطة الـ MseI، وبعدها الـ Bsh12361؛ لأن الإنزيم الأول يكون أكثر وضوحاً مع بعض مجموعات الـ 16Sr، ولكن بالنسبة للمجموعات الأخرى كلا الإنزيمان مهم.

٩. تأكد من دقة درجة حرارة الحمام المائي/ والجهاز الحراري باستخدام ترموميتر؛ بحيث تكون أكثر من $2 \pm$ درجة مئوية.
١٠. حتى يتأكد المستخدم من استخدام طريقة الهضم الصحيحة، من الأفضل أن يتم تصوير المنتجات (٥ ميكروليترات) عن طريق الفصل الكهربائي للأجاروز جل؛ للتأكد من نجاح الهضم قبل تحليل الـ T-RFLP. ويجب التأكد من عدم تفاعل الشاهد السلبي للهضم مقارنةً بمنتج الـ PCR غير المهضوم.
١١. قد يرجع سبب عدم عرض أي من أحجام الـ TRF في الجدول ٢ إلى وجود مجموعة فيتوبلازما جديدة تحتاج إلى تأسيس حجم TRF الخاص بها، أو وجود عينة إيجابية خاطئة قد تم تضخيمها كالبكتيريا. ويتم تحديد المنتج غير المهضوم -الذي يجب دراسته- من خلال إجراء تسلسل الـ DNA. وإن اكتمل هذا الأمر، يجب تذكر أن البادئات تشترك في تضخيم الـ DNA النباتي، وتنتج PCR مختلطاً للحمض النووي للفيتوبلازما والنباتات. ولإنتاج عينة تناسب عمل تسلسل الـ DNA، يجب استنساخ منتج الـ PCR (يمكن إجراء هذا الأمر بعدد من النواقل لاستنساخ المنتجات المتوفرة، مثل: Promega pGEM®-T easy vector system). وبعد ذلك، يجب فحص الاستنساخ عن طريق تنقيذ عملية الهضم، كما هو مفصل في الجزء السابق. ويتم تحليل منتجات الهضم بالفصل الكهربائي للجل للسماح بمعرفة منتجات الـ PCR المختلطة. وبالتالي، عديد من المستنسخات -مع اختلاف الأنماط RFLP- يجب أن يتم معرفة تسلسلها، ويجب أن يمثل هذا الأمر الحمض النووي DNA الخاص بالبكتيريا والنباتات. ويعمل تحليل تسلسل الـ DNA على تحديد ما إذا كانت العينة تحتوي على أنواع جديدة من الفيوتوبلازما أو البكتيريا التي تتفاعل مع البادئات الـ PCR.

شكر وتقدير:

تم إكمال هذا العمل جزءاً من Defra Plant Health Fellowship for JH. ونود أن نشكر - هنا- جميع الأفراد والمنظمات التي قدمت لنا الدعم عن طريق إمدادنا بعينات من حمض الفيوتوبلازما النووي/ وعينات من النباتات المصابة؛ لتمكنا من التحقق من صحة الاختبارات.

المراجع:

1. Smart CD et al (1996) Phytoplasma-specific PCR primers based on sequences of the 16S-23S rRNA spacer region. Appl Environ Microbiol 62:2988-2993
2. Duduk B, Paltrinieri S, Lee IM, Bertaccini A (2012) Nested PCR and RFLP analysis based on the 16S rRNA gene. In: Dickinson M, Hodgetts J (eds) Methods in molecular biology. Springer, New York

3. Harrison NA, Womack M, Carpio ML (2002) Detection and characterization of a lethal yellowing (16SrIV) group phytoplasma in Canary Island date palms affected by lethal decline in Texas. *Plant Dis* 86:676–681
4. Anthony RM, Brown TJ, French GL (2000) Rapid diagnosis of bacteremia by universal amplification of 23S ribosomal DNA followed by hybridisation to an oligonucleotide array. *J Clin Microbiol* 38:781–788
5. Liu W-T et al (1997) Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* 63:4516–4522
6. Hodgetts J et al (2007) Use of terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) for identification of phytoplasmas in plants. *Plant Pathol* 56:357–365

استخدام تقنية الـ PCR الكمي اللحظي للكشف عن الفيتوبلازما وتحديد كميتها

Nynne Meyn Christensen , Henriette Nyskjold , and Mogens Nicolaisen

ملخص:

في الوقت الحالي، يُعد التحليل اللحظي للـ PCR من أكثر الطرق فعالية للكشف عن الفيتوبلازما وتحديد كميتها بدقة. وبالمقارنة مع PCR المتداخل، يعتبر هذا الاختبار أقل درجة حساسية بالتلوث، كما أن كمية العمل أقل. لذلك، تُعتبر طريقة تحليل الـ PCR اللحظي مهمة في برامج المسح، وفي الإعدادات الأخرى التي يتم فيها اختبار عدد كبير من العينات.

الكلمات المفتاحية: الفيتوبلازما، تحديد الكمية، الزمن الحقيقي الـ PCR، الكشف العام.

١- المقدمة:

إن تحليل الـ PCR أصبح الطريقة المفضلة في عمليات الكشف والتشخيص، وذلك لأن زراعة الفيتوبلازما في المختبر أمر غير محتمل في الوقت الحالي. وقد تم استخدام عديد من مجموعات بادئات الـ PCR لتضخيم DNA الفيتوبلازما، وفي الغالب جين الـ 16S rRNA. وتعمل هذه البادئات على تضخيم الـ DNA من كافة مجموعات الفيتوبلازما؛ حيث إن بعضها يعتبر عاما (١، ٢). وتشتمل أكثر تجارب الـ PCR المعروفة على خطوات الـ PCR المتداخل لتعزيز درجة الحساسية؛ إلا أنها تحتوي على زيادة مخاطر حدوث التلوث. وبالتالي، الحصول على نتائج إيجابية خاطئة. ومن جهة أخرى، تم إثبات أن الـ PCR اللحظي مساوٍ أو أكثر دقة من الـ PCR المتداخل (٣). وفي الوقت نفسه، يعتبر الـ PCR اللحظي أقل حساسية لحدوث التلوث؛ لأنه ليس من الضروري القيام بعديد من المعاملات قبل اختبار الـ PCR. ولم يتم نشر سوى عدد قليل من التجارب الخاصة عن الـ PCR اللحظي في الكشف وتشخيص الفيتوبلازما (٣، ٤)، ولكن تم توفير عديد من التجارب الخاصة؛ بتشخيص مجموعات معينة من الفيتوبلازما (انظر: الفصلين الثاني والعشرون والثالث والعشرون في هذا الكتاب).

ويقوم كشف الـ PCR اللحظي على قياس الضوء الفلورينسي المنبعث (emitted fluorescence) أثناء عملية تضخيم الـ PCR. ويتم استخدام نوعين من الجزيئات، وهما: عامل الإدخال، أو المجس الفلوري. وكثيراً ما تستخدم الـ SYBR Green[®] عامل إدخال، والذي لا يرتبط بشكل مُحدد بكافة مواد التضخيم. وبالتالي، قد يُقلل من دقة تحديد الكمية، وحتى قد يؤدي إلى الحصول على نتائج إيجابية خاطئة. ويوفر المجس الفلوري، مثل: مجس الـ TaqMan[®]، درجة عالية من التخصص؛ ذلك لأنه لا تحتاج إلى تُهجن البادئات فقط بل إن الـ TaqMan[®] يذهب إلى القالب. ولمزيد من المعلومات والتوضيح حول الاختبار الـ PCR اللحظي، تمت الإشارة إلى بعض الكتب المميزة التي تُناقش هذا الموضوع، والتي يمكن للقارئ الاطلاع عليها.

وقد يكون تحديد تركيز الفيتوبلازما أمراً مهماً للغاية؛ لأن معايرة الفيتوبلازما تختلف بشكل كبير خلال الموسم وفي الأنسجة النباتية المختلفة، ويُعد تحديد الكميات أمراً مهماً أيضاً في فحص النباتات التي تم تحليلها للكشف عن مقاومتها للفيتوبلازما. ومن جهة أخرى، لا يعتبر تحديد الكمية عملية مهمة دائماً في برامج فهرست الفيتوبلازما أو في التجارب التشخيصية. وعندما تكون هناك حاجة إلى عملية تحديد الكمية، يجب عمل معايير التخفيف لتركيزات المعلومة المتوازية مع الاختبار.

وهذه الاختبارات التي تقوم على تجربة الـ TaqMan[®] لتحليل الـ PCR اللحظي قد قام بتطويرها Christensen et al. (٣). وتم استخدام هذا الاختبار لتحديد كمية الفيتوبلازما في أنواع نباتية مختلفة في *Euphorbia pulcherrima*، ولكن تم إثبات إمكانية استخدامه في عديد من الأنواع النباتية الأخرى (انظر: المرجع (٣)). ويمكن تعديل هذا الاختبار بسهولة للبادئات التي تم استخدامها في Hodgetts et al. (٤)، إلا أنه يجب ملاحظة أن هذه البادئات لا تعمل على تضخيم منطقة الـ 16. وبالتالي، لا يمكن استخدام نواتج هذا الاختبار الـ PCR في المنحني القياسي. لذا، هناك حاجة لتطوير هذا الاختبار.

٢- المواد:

١. جهاز طحن الأنسجة: نوع (Geno/Grinder 2000, OPS Diagnostics, Bridgewater, NJ, USA).
٢. أنابيب طحن.
٣. حبيبات صلبة للطحن (قطرها ٥ ملم).
٤. نيتروجين مسال (LN₂).
٥. مواد لاستخلاص الـ DNA (DNeasy Plant Mini Kit, QIAGEN).
٦. NanoDrop 2000 (Thermo Scientific).
٧. خلطة رئيسية للـ PCR mastermix الشاملة TaqMan[®] (Applied Biosystems).
٨. بادئات (الجدول ١).

٩. بادئات معلمة بـ FAMTM-TAMRATM (الجدول ١). (انظر: الملاحظة ١).
١٠. منتج PCR من فيتوبلازما الـ 16S rDNA معلوم التسلسل المستهدف، وتستخدم معياراً (مقياساً).
١١. مواد لتتقية الـ PCR من النوع (QIAGEN) MinElute®.
١٢. نبات سليم شاهداً من النوع نفسه، ونسيج للعينات.
١٣. صفيحة تفاعل مكونة من ٣٨٤ وعاءً من نوع (MicroAmp® Optical 384-Well) (Applied Biosystems) Reaction Plate.
١٤. MicroAmp® 96- & 384-Well Optical Adhesive (Applied Biosystems).
١٥. جهاز طرد مركزي لصفائح الـ PCR.
١٦. جهاز الـ PCR اللحظي (Applied Biosystems) (7900HT).

جدول (١): تسلسل البادئات والمجسات المصممة للكشف عن الفيتوبلازما والحمض النووي النباتي.

	Phytoplasma 16S rDNA (5'-3')	Plant 18S rDNA (5'-3')
Forward primer	CGTACGCAAGTATGAAACTTAAAGGA	GACTACGTCCCTGCCCTTTG
Probe	TGACGGGACTCCGCACAAGCG	ACACACCGCCCGTCGCTCC
Reverse primer	TCTTCGAATTAACAACATGATCCA	AACACTTCACCGGACCATTCA

Probes are labeled with FAMTM (5') and TAMRATM (3')

٣- طرق العمل:

٣-١: استخلاص الـ DNA:

١. يتم تحميل العينات الخاصة بالنباتات (g 0.5-1) في أنابيب الطحن، ومعها ٨ حبيبات صلبة للطحن (انظر: الملاحظة ٢).
٢. يتم تجميد الأنابيب المغلقة في النيتروجين المسال.
٣. بعد ذلك، يتم تحميل أنابيب الطحن المجمدة على جهاز الطحن Geno/Grinder، ورجها بسرعة ١,٥٠٠ / دقيقة واحدة.
٤. يتم تكرار الخطوة ٢ و٣ حتى تصبح المواد النباتية مسحوقاً ناعماً. وتتطلب هذه العملية، ما لا يقل عن ثلاث دورات من الطحن والتجميد، ويجب الحرص ألا تذاب العينات.
٥. يتم وضع ١٠٠ gm من العينة النباتية المطحونة المجمدة في أنابيب Eppendorf شبه مجمدة باستخدام ملعقة خاصة شبه مجمدة (انظر: الملاحظة ٣).
٦. يتم إضافة ٤٠٠ ميكروليتر من المحلول المنظم API، و٤ ميكروليترات من الـ RNase A من مواد DNeasy إلى عينة النبات التي تم طحنها، ويتم استكمال العملية وفقاً لتعليمات المصنع.

٧. يخفف الـ DNA في ١٠٠ ميكروليتر من المحلول المنظم. ومن ثم، يتم تخزين الـ DNA على درجة حرارة 20°C حتى يتم استخدامه.
٨. قبل استخدامه، يجب تخفيف الـ DNA بتركيز $10\times$ (في الماء)؛ وذلك لعمل التحليل الـ PCR اللحظي (انظر: الملاحظة ٤).

٢-٣: تحضير المعايير للقياسات الكمية:

يعتبر تكرار دورات إذابة المواد المجمدة من أحد الأسباب الرئيسية لتحلل قوالب الـ DNA بالتدرج. ولضمان استمرارية جودة المعايير القياسية، يجب إعداد كميات مُقسمة بالتساوي لكل معيار من سلاسل التخفيف القياسية، ويجب تخزين الكميات المُقسمة في شرائط أنابيب الـ PCR القياسية، ويجب استخدامها مرات قليلة (انظر: الملاحظة ٥).

١-٢-٣: فحص الفيتوبلازما:

١. قم بإجراء تحليل الـ PCR المتداخل باستخدام البادئات P1/P7 وبعدها بادئات الـ 16SF2n/16SR2 على الـ DNA المأخوذ من إحدى العينات المصابة بالفيتوبلازما. (انظر: ملاحظة ٦).
٢. بعدها، يتم فصل أجزاء الـ PCR على ١٪ من الآجاروز جيل، ويجب أن تظهر أنماط مفردة بحجم 1، 246 bp. بعد ذلك، يتم تنقية منتج الـ PCR باستخدام PCR MinElute[®] (Purification Kit (QIAGEN) حسب بروتوكول المُصنع.
٣. يتم تحديد كمية ما تم استخلاصه من منتجات الـ PCR بالطرق العادية، مثل: الفصل الكهربائي، أو التحليل بواسطة جهاز الـ NanoDrop حسب تعليمات المُصنع.
٤. احسب عدد الجزيئات (الوزن الجزيئي للجزء؛ والذي تم تضخيمه تقريباً 387 KDa)، ثم اضبط تركيز الناتج من الـ PCR المنقى حتى يصل إلى 10^9 من الجزيئات لكل ميكروليتر.
٥. يعمل سلسلة من التخفيفات $10\times$ للحصول على ١٠٠ ميكروليتر من كل 10^8 - 10^2 جزيئات لكل ٢ ميكروليتر من المحلول.
٦. يتم تجهيز كميات متساوية مُقسمة من كل مُخفف (على سبيل المثال: ٢٠ ميكروليترا).

٢-٢-٣: فحص النبات:

١. يتم استخلاص DNA من النباتات السليمة (انظر: الملاحظة ٧).
٢. بعدها، يحدد التركيز والجودة بالفصل الكهربائي، أو تُحلل بجهاز قياس تركيز الحمض النووي (NanoDrop). بعد ذلك، يتم ضبط التركيزات، وتكون أول نقطة في تسلسلات

التخفيفات غير مُخففة أو ما يشابه ذلك، على سبيل المثال ١٠ ng ميكروليتر. وبعد ذلك، يتم تجهيز سلسلة التخفيف للحصول على ١٠٠ ميكروليتر من كل تركيز يحتوي على: ٠,٠١، ٠,١، ١، ١٠، ١٠٠، ١,٠٠٠، ١٠,٠٠٠ pg DNA.

٣. جهز كميات متساوية لكل مُخفف. (على سبيل المثال: ٢٠ ميكروليترا).

٣-٣: PCRs اللحظي:

في جميع المراحل التي يتم فيها إعداد تفاعلات الـ PCR، يجب اتخاذ الاحتياطات لتجنب تلوث العينات والكواشف (انظر: الملاحظة ٨).

١. بمجرد حدوث الذوبان، يتم خلط كافة المواد جيداً (بقلب الأنابيب عدة مرات، أما الأحجام الصغيرة فقم بهز الأنبوب وتحريكه)، ثم عمل طرد مركزي لفترة وجيزة (٥~ ثانية). ويتم حفظ كافة مواد التفاعل الذائبة وعينات الحمض النووي النباتي DNA في ثلج قبل استخدامها. ويجب حماية مجس الـ TaqMan[®] من الضوء، ولا يجب إذابتها إلا قبل استخدامها.

٢. جهز أنبوبين من خليط الـ PCR الرئيسي: واحد منهم لتجربة الفيتوبلازما، والآخر لفحص النباتات الطبيعية. وتعتمد الكميات لكل خليط رئيسي على عدد التفاعلات المطلوبة لكل PCR اللحظي. ويتم تجهيز كميات إضافية من الخليط الرئيسي بمقدار ١٠٪ زيادة لمنع أخطاء استخدام الممصات (انظر: الجدول ٢ لتجهيز الخلطات الرئيسية).

جدول (٢): المزيج الرئيسي لتجارب الـ PCR اللحظي real-time PCR.

Reaction component	Stock concentration	Volume (µL) in each well (final total volume 10 µL)	Final concentration
Master mix	2×	5	1×
Forward primer	10 µM	0.3	300 nM
Reverse primer	10 µM	0.3	300 nM
TaqMan [®] Probe	2.5 µM	0.4	100 nM
ddH ₂ O		2	

Volumes are listed for one well. Volumes should be multiplied according to the number of required wells. Add 10% extra wells to allow for some error in pipetting

الأحجام الموجودة في الجدول لوعاء واحد، ويجب ضرب الأحجام في عدد الأوعية المطلوبة، ويتم إضافة ١٠٪ زيادة في الأوعية تحسباً للأخطاء التي يمكن أن تحدث في النقل بالمصمات.

٣. جهز الـ PCR اللحظي في صفيحة تتكون من ٣٨٤ وعاءً بكمية ٨ ميكروليترات من الخليط الرئيسي لكل وعاء من أوعية الصفيحة (انظر: الملاحظة ٩). ويتم استخدام العمود

الأولى من الصفيحة لتجربة الفيتوبلازما، وقد تُستخدم الأعمدة الأخرى للتجارب التي يتم إجراؤها على النباتات. ويجب أن تحتوي كل صفيحة على سلسلة تخفيفات ومعايير قياسية من النبات والفيتوبلازما، وشواهد سالبة وموجبة (NTC)، والعينات المراد اختبارها، وتتم هذه العملية في ثلاثة مكررات.

٤. أضف ٢ ميكروليتر من عينة الـ DNA المُخففة $10 \times$ إلى كل وعاء من الأوعية (انظر: الملاحظة ١٠). وعند الانتهاء من عمليات الإضافة، يتم تغطية الأوعية بفيلم لاصق.
٥. بعدها، يتم عمل طرد مركزي لصفحة التفاعل reaction plate عند سرعة بطيئة لمدة ٢min. وبعدها، يتم حمل الصفيحة على جهاز الـ PCR اللحظي (Applied Biosystems 7900HT).

٣-٤: برمجة جهاز 7900HT Applied Biosystems وتشغيله:

يتم -بإيجاز- تشغيل برنامج SDS، وفتح نافذة الصفحة الخاصة باسم قالب صفيحة جديدة؛ وذلك لتوضيح أماكن الأوعية على الصفيحة التي تحتوي على ٣٨٤ وعاءاً للتخفيفات القياسية والشواهد والعينات المخبرية، ثم يتم اختيار الكاشف (FAM/ TAMRA). وبعد ذلك، يحفظ القالب بالبيانات المسجلة ملفاً تشغيل SDS، ثم الضغط على إبداء التشغيل (انظر: الملاحظة ١١ و١٢).

٣-٥: تجميع البيانات وتحليلها:

١. بعد انتهاء التشغيل، قم بإزالة الصفيحة من الجهاز، واختر الخط الأساسي، وضع خط البداية في مرحلة التضخيم الأساسية (انظر: الملاحظة ١٣)، ثم قم بتحليل نتائج التشغيل وحفظها.
٢. اختبر نتائج المنحنى المعياري في مخطط التضخيم وطريقة عرض المنحنى القياسي في برنامج SDS، ثم حلل التجارب التي تُجري على النباتات والفيتوبلازما كلاً على حده؛ لأن البرنامج يستوعب منحنى قياسي واحداً فقط لكل مرة. ويتم تسجيل تركيزات المنحنيات المعيارية للأوعية التي تحتوي على مواد تخفيف العينة لتجربة الفيتوبلازما. ويجب أن يكون ميل المنحنى القياسي 3.3- وقيمة الـ R^2 قريبين من 1.00. وأخيراً، تأكد من أن قيم العينة ضمن نطاق قيم المنحنى المعياري.
٣. بعدها، يتم تحويل النتائج من برنامج SDS ملفاً نصياً.
٤. كرر الخطوتين ٢ و ٣ باستخدام مُخفف الحمض النووي النباتي DNA معياراً قياسياً.
٥. يتم تحويل الملفات النصية إلى برنامج Microsoft Excel لعمل الحسابات لاحقاً.

٦. يتم دمج نتائج الفيتوبلازما والنباتات لكل عينة في ملف Excel تم إنشاؤه لإجراء العمليات الحسابية.

يقوم برنامج SDS تلقائياً بحساب الكميات من قيم Ct لكل عينة وفقاً للمنحنيات القياسية. وتشمل الحسابات المطلوبة على: (١) يتم حساب متوسط القيم المكررات ومكررات العينات التي تم اختبارها. (٢) تسوية كميات الفيتوبلازما في كل عينة باستخدام كمية DNA للنبات. وينتج عن هذه العمليات الحسابية عدد خلايا الفيتوبلازما/كمية DNA النباتي. ومع ذلك، يجب قسمة النتائج على اثنين (انظر: الملاحظة ١٤)؛ لأن الفيتوبلازما تحمل نسختين من الـ 16S.

٤- الملاحظات:

١. يمكن استخدام أنظمة أخرى لطحن العينات. وإن لم يتوفر وجود أي مطاحن للأنسجة، يمكن استخدام الهون والمدقة. وبالرغم من ذلك، يجب توخي الحذر حتى لا يكون هناك تلوث بين العينات.
٢. يجب حماية مجسات الـ TaqMan® من الضوء.
٣. يجب أن تكون أدوات العمل باردة جداً، حتى لا تلتصق العينات النباتية بالأدوات.
٤. يُفضل تخفيف DNA العينة ١:١٠ لتقليل آثار المثبطات.
٥. قياس الكميات ليس دائماً أمر ضرورياً؛ ففي بعض الحالات يتم حذف سلسلة تخفيف معايير النباتات والفيتوبلازما.
٦. كثيراً ما يتم تطبيق التضخيم المتداخل باستخدام P1/P7 (٢، ٥)، يتبعه R16F2n/ R16F2 (١) لتضخيم أغلب جين 16S rDNA للفيتوبلازما (1، ~246 bp). وبرنامج الـ PCR بالنسبة لـ P1/P7 هي: 94°C لمدة ٥ دقائق، وبعدها ٣٥ دورة في درجة حرارة 94°C لمدة ٩٠ ثانية، و55°C لمدة ٢ دقيقة، و72°C لمدة ٣ دقائق، وبعدها دورة واحدة في درجة حرارة 72°C لمدة ١٠ دقائق. وأخيراً، ثبت درجة الحرارة على 4°C. وحالات التفاعل بالنسبة للـ R16F2n/R16F2 هي: 94°C لمدة ٢ دقيقة، وبعدها ٣٥ دورة في درجة حرارة 94°C لمدة دقيقة واحدة، و50°C لمدة ٢ دقيقة، و72°C لمدة ٣ دقائق، وبعدها دورة واحدة في درجة حرارة 72°C لمدة ١٠ دقائق. وأخيراً: ثبت الاختبار على درجة حرارة 4°C. وتسلسلات البادئات هي:
P1: 5' -AAGAGTTTGATCCTGGCTCAGG ATT-3'
P7: 5' -CGTCCTTCATCGGCTCTT-3'

، R16F2n: 5' -GAAACGACTGCTAAGACTGG-3'

.R16F2: 5' -TGACGG GCGGTGTGTACAAACCCCG-3'

انظر الفصل: ١٤ للحصول على تفاصيل أكثر حول هذه الكمية.

٧. يتأثر استخلاص الـ DNA بالطريقة المستخدمة، وبنوع المواد التي يتم البدء بها؛ لأن الـ DNA من نباتات أو سلالات نباتية مختلفة يمكن أن يستخلص بكفاءة أعلى أو أقل حتى عندما يتم استخدام الطريقة نفسها، وذلك لأن الأنسجة نفسها قد تحتوي على مستويات مختلفة من مثبطات الـ PCR (للحصول على مزيد من التفاصيل، انظر: المرجع (٦)). لذلك، من المهم جداً استخدام الطريقة نفسها والأنسجة نفسها لإنتاج مواد من العينات قياسية.
٨. في جميع المراحل أثناء إعداد تفاعلات الـ PCR، يجب توخي الحذر لتجنب تلوث العينات والمواد. لذا، يتم استخدام المصحات المخصصة لتحضير الخلطات الرئيسية، ومجموعة أخرى من المصحات لإضافة قالب الـ DNA، واستخدام ماصات ذات فلتر فقط. كما يجب ارتداء قفازات واقية وتغييرها باستمرار. كذلك، يجب استخدام أدوات بلاستيكية فقط معقمة ونظيفة، وينبغي تجهيز الخليط الرئيسي، وإضافة قالب الـ DNA في أماكن منفصلة بأدوات معملية خاصة.
٩. يُنصح باستخدام المعدات المصممة خصيصاً للتعامل مع عدد كبير من العينات (مثل: الروبوتات، المصحات ذات أكثر من قناة؛ التي يمكن استخدامها في عديد من الخطوات)؛ وذلك بسبب تعدد خطوات الاستخدام.
١٠. يجب إجراء عملية التخفيف للكميات المقسمة بالتساوي من عينة الـ DNA، ويتم الحفاظ على DNA المركز لفترة طويلة.
١١. إعداد برنامج في الـ SDS:
يتم تشغيله في وضع مشابه ٩٦٠٠،
وتحدد الكمية لتصل إلى ١٠ ميكروليترات،
وتستخدم الـ FAM/TAMRA مادة كاشفة/الطيف (detector/quencher).
١٢. دورات القياسات في الـ SDS:
دقيقتين عند درجة حرارة 50°C (خطوة تفعيل الـ UNG)،
و ١٠ دقائق في درجة حرارة 90°C (تنشيط البلمرة)،
٤٠ دورة لمدة ١٥ ثانية في درجة حرارة 95°C (فصل الـ DNA). وبعد ذلك، لمدة دقيقة واحدة في درجة حرارة 60°C (تهجين، ومد).

١٣. في بعض الحالات، وخصوصاً عند تحليل مواد تضخيم النباتات 18S، يتم ملاحظة الإشارات في دورات التشغيل الأولى. وفي هذه الحالات، يجب تحديد الخط الأساسي من الدورة ١. ١٤. مثال على الإجراء الحسابي الذي يتم لعينة واحدة:

Ct (triplicates) phytoplasma	Copies (calculated by SDS software)	Average number of copies	Cells	Ct (triplicates) plant	Amount (ng plant DNA)	Average (ng plant DNA)	Normalized amount (phytoplasma cells/ng plant DNA)
25.43	8.5×10^3	8.9×10^3	4.5×10^3	15.17	11.3	12.0	375
25.52	8.0×10^3			14.78	14.3		
25.17	10.2×10^3			15.28	10.5		

المراجع:

1. Gundersen DE, Lee I-M (1996) Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal primer pairs. *Phytopathol Mediterr* 35:144–151
2. Smart CD et al (1996) Phytoplasma-specific PCR primers based on sequence of the 16S-23S rRNA spacer region. *Appl Environ Microbiol* 62:2988–2993
3. Christensen NM et al (2004) Distribution of phytoplasmas in infected plants as revealed by real-time PCR and bioimaging. *Mol Plant Microbe Interact* 17:1175–1184
4. Hodgetts J et al (2009) Panel of 23S rRNA genebased real-time PCR assays for improved universal and group-specific detection of phytoplasmas *Appl Environ Microbiol* 75:2945–2950
5. Deng SJ, Hiruki C (1991) Amplification of 16S ribosomal-RNA genes from culturable and nonculturable mollicutes. *J Microbiol Meth* 14:53–61
6. Demeke T, Jenkins GR (2010) Influence of DNA extraction methods, PCR inhibitors and quantification method on real-time PCR assay of biotechnology-derived traits. *Anal Bioanal Chem* 396:1977-1990.

نظام كشف الـ PCR الكمي اللحظي لفيتوبلازما Bois Noir، و Flavescence Doree، وتحديد كمية الـ DNA المستهدف

Nataša Mehle, Nina Prezelj, Matjaž Hren, Jana Boben,
Kristina Gruden, Maja Ravnkar, and Marina Dermastia

ملخص:

إن نظام الكشف الخاص بالـ PCR اللحظي لفيتوبلازما اصفرار العنب؛ والذي يتم شرحه في هذا الفصل يتكون من تجربتين مخصصتين للكشف عن الفيتوبلازما في مجموعة الـ Flavescence doree (FD) و Bois noir (BN)، وتجربة أخرى من تجارب الفيتوبلازما الشاملة؛ حيث إنها تستخدم مجساً خاصاً (TaqMan-MGB). وتعمل التجربة الأخرى الخاصة بتضخيم حمض النبات النووي DNA المستخلص مع حمض الفيتوبلازما النووي DNA على توفير عامل تحكم إضافي؛ بجودة استخلاص الـ DNA وتضخيم الـ PCR لكل عينة من العينات. إن نظام الكشف الموصوف في هذا الفصل: معتمد، ومُحدد، وحساس، وسريع، ويسهل استخدامه في عملية تشخيص فيتوبلازما اصفرار العنب. وبجانب نظام الكشف، يتم شرح طريقة محددة لتحديد كمية الفيتوبلازما في العينات.

الكلمات المفتاحية: Bois noir، Flavescence doree، اصفرار العنب، مجس الـ MGB، التحديد الكمي، الـ PCR اللحظي، TaqMan.

١- المقدمة:

إن أمراض اصفرار العنب مرتبطة بأنواع مختلفة من الفيتوبلازما التي تحدث في مناطق زراعة العنب على مستوى العالم. ومن ضمن المسببات الرئيسية لمرض اصفرار العنب في أوروبا هي Flavescence dorée (FD) و Bois noir (BN) (١). ويعتبر مرض الـ FD من أكثر الأمراض التي تؤثر

على الاقتصاد، وتُعترف به منظمة حماية النباتات في أوروبا والبحر المتوسط (the European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO)) آفةً حجريةً (٢). ومن ناحية أخرى، يظهر مرض BN في أغلب مناطق إنتاج النبيذ بأوروبا، ويتم نقل مرض الـ FD والـ BN عن طريق الحشرات الناقلة التي تنتمي إلى رتبة نصفية الأجنحة Hemiptera، وتُعد حشرة نطااط الأورق Scaphoideus titanus Ball (٣) الحشرة الوحيدة المعروفة الناقلة لمرض الـ FD، في حين أن الحشرة الأساسية الناقلة لمرض الـ BN هي حشرة نطااطات النباتات Hyalesthes obsoletus Signoret (٤).

وحيث إن تشخيص الفيوتوبلازما أمر ممكن وغير مستحيل بواسطة استخدام الطرق الميكروبيولوجية التقليدية، لكن طرق التشخيص الجزيئي مطلوبة ومعتمدة في التشخيص. وفي السنوات القليلة الماضية، تم شرح ووصف عدد من طرق العمل وفقاً للـ PCR اللحظي (qPCR) للكشف عن الفيوتوبلازما. وقد تم تطوير أنظمة عامة وشاملة للكشف عن الفيوتوبلازما وفقاً لـ qPCR (٥، ٦). وقام Bianco et al. (٧) بتطوير تجربة الـ qPCR المُحددة للـ FD. وطور Galetto et al. (٨) تجارب خاصة للكشف عن أمراض الـ BN، و فيوتوبلازما تضاعف التفاح apple proliferation (AP) (SYBR® Green)، وتجربة أخرى للكشف عن مجموعات الفيوتوبلازما 16SrX، 16SrV و 16SrXII (TaqMan®). وقام Angelini et al. (٩) بنشر تجارب الـ qPCR لتحديد الفيوتوبلازما التي ترتبط بأمراض الـ BN، و اصفرار الأستر aster yellows (AY). وقد تم تصميم qPCR للكشف عن أمراض الـ FD والـ BN في آنٍ واحدٍ (١٠). وفضلاً عن ذلك، فقد تم تطوير تجارب كشف الـ qPCR للنسخ العكسي لأمراض الـ FD والـ BN، باستخدام مواد الاستخلاص الخام نفسها التي تم استخدامها للكشف عن فيروس العنب (١١).

ونشرح في هذا الفصل، نظام الكشف عن فيوتوبلازما الـ FD والـ BN القائم على الـ qPCR؛ حيث يمكن استخدامه في الأغراض التشخيصية (١٢). ويضم هذا النظام مادتي تضخيم للكشف عن مجموعة مُحددة لأمراض الـ FD والـ BN وجزءاً من الفيوتوبلازما بشكل عام. ويعمل -أيضاً- على تضخيم الفيوتوبلازما التي تنتمي إلى مجموعات أخرى، مثل: 16SrI، 16SrIII، 16SrX، و 16SrIII (١٢)، وشاهداً إيجابياً للتحقق من جودة الـ DNA المستخلص من كل عينة، ويُعتبر تضخيم DNA النبات المستخلص مع DNA الفيوتوبلازما جزءاً من الأجراء. ويتم -أيضاً- التحقق من مثبطات الـ PCR بإخضاع مادتي تخفيف مختلفتين من الـ DNA المستخلص للتجربة. إن استخدام مجسات MGB (hydrolysis) TaqMan® (Minor Groove Binder Probes) (١٣) في التجربة يقلل -بشكل كبير- من إمكانية الكشف عن الحمض النووي DNA غير المستهدف. ومقارنةً بتجارب تفاعل الـ PCR/RFLP المتداخل، تُعتبر تجربة الـ qPCR من الطرق الأسرع، والأقل صعوبة، والأكثر دقة للكشف عن الفيوتوبلازما. وتُقلل من مخاطر انتشار التلوث بين العينات؛ ذلك؛ لأن الخطوات التي يتم إجرائها في المعمل أبسط وأقصر.

ويمكن استخدام النظام في التحليل الكمي وذلك ببعض الخطوات الإضافية، مثل: استخدام مواد الـ DNA المرجعية (وهي عينة تحتوي على تسلسل الـ DNA المُستهدف، أو عينة من البلازميد معروفة الكمية التي تحتوي على تسلسل الـ DNA المُستهدف)، وأيضا استخدام منحني المعايرة القياسي. وفي هذا الفصل، يتم تقديم شرح مُفصل لتحليل النظام خطوة بخطوة، بجانب الاحتياطات التي يجب أخذها بالاعتبار لتجنب تلوث العينات والمواد. ولضمان الإنتاجية العالية للطريقة وللنظام فقد تم النجاح في القيام بالدراسات الاستقصائية لمرض اصفرار العنب التي تم إجراؤها في Slovenia منذ عام ٢٠٠٧.

٢- المواد:

١-٢: العينات والشاهد:

١. استخلاص DNAs من العينات (انظر: الملاحظة ١).
٢. تخفيف الأحماض النووية DNAs المستخلصة عشرة أضعاف: ٥ ميكروليترات من الـ DNA، ٤٥ ميكروليترا مع الماء المعقم (انظر: الملاحظة ١ و ٢).
٣. عامل الشاهد السلبي (NCI): طريقة استخلاص الشاهد تتم من مواد سليمة خالية من الإصابة (انظر: الملاحظة ٣).
٤. شاهد بدون حمض نووي (NTC): ماء مُقطر ومُعقم (مُطابق للماء الذي تم استخدامه في تحضير خليط الـ qPCR الرئيسي) (انظر: الملاحظة ٤).
٥. الشاهد الإيجابي (PC) (عينة تحتوي على التسلسل المُستهدف): الحمض النووي DNA للنباتات المصابة بمرض الـ BN والـ FD (انظر: الملاحظات ٣-٥).
٦. سلسلة من مواد الـ DNA المرجعية التي تم تخفيفها عشرة أضعاف (في حالة الحاجة للتحليل الكمي فقط) (انظر: الملاحظة ٦).

٢-٢: المواد الخاصة بالـ qPCR:

١. خليط الـ PCR الرئيسي الشامل 2×TaqMan (Applied Biosystems) (انظر: الملاحظة ٧ و ٨).
٢. جين الـ 18S rRNA البشري (20×) (Applied Biosystems Human 18S rRNA): خليط مجس - ببادئ لجين الـ 18S rRNA، مجس 18S rRNA يحتوي على لاصقة الـ VIC الفلوري (VIC fluorescent label) (انظر: الملاحظة ٩).
٣. ماء معقم خاص حيوي جزئي (خالٍ من الأحماض نووية)، أو ماء منزوع الأيونات معقم (انظر: الملاحظة ٩).

٤. مجس، وبادئات (الجدول ١) (انظر: الملاحظة ١١ و١٢).

جدول (١): بادئات ومجسات لـ MGB خاصة لـ (FDgen) (FD) (flavescence dorée) و خاص لـ (BNgen) bois noir (BN)، وبادئات عامة للفيتوبلازما (UniRNA).

Name	Orientation	Sequence (5'-3')	Working concentration (μM)
UniRNA	Forward	AAA TAT AGT GGA GGT TAT CAG GGA TAC AG	10
	Reverse	AAC CTA ACA TCT CAC GAC ACG AAC T	10
	Probe	<i>FAM-ACG ACA ACC ATG CAC CA-NFQ</i>	2.5
FDgen	Forward	TTA TGC CTT ATG TTA CTG CTT CTA TTG TTA	10
	Reverse	TCT CCT TGT TCT TGC CAT TCT TT	10
	Probe	<i>FAM-ACC TTT TGA CTC AAT TGA-NFQ</i>	2.5
BNgen	Forward	AAG CAG GTT TAG CGA TGG TTG T	10
	Reverse	TGG TAC CGT TGC TTC ATC ATT T	10
	Probe	<i>FAM-TTA ATA CCA CCT TCA GGA AA-NFQ</i>	2.5

^aNFQ nonfluorescent MGB quencher

٢-٣: الأجهزة:

١. صفائح تفاعل شفافة الـ qPCR: مثل: صفائح للتفاعل تحتوي على ٣٨٤ وعاء (Applied Biosystems) (انظر: الملاحظة ٧ و١٣).
٢. أغطية لاصقة شفافة (مثل: Applied Biosystems).
٣. جهاز الطرد المركزي Centrifuge، مع rotor لتدوير الصفائح.
٤. جهاز طرد مركزي للأنابيب.
٥. هزاز.
٦. جهاز PCR لحظي: مثل: Applied ABI PRISM® 7900 HT Sequence Detection System (Biosystems) (انظر: الملاحظة ٧).
٧. برامج (مثل: SDS 2.3، Applied Biosystems) لحساب الامتصاص الفلوري، وحساب عدد الدورات، والخط القياسي (دورات قياس الكمية؛ Cq) (انظر: الملاحظة ٧).
٨. غرفتا UV (انظر: الملاحظة ١٤ و١٥).
٩. مجموعتان من الماصات.
١٠. أنابيب خالية من الـ DNase، وحامل الأنابيب.
١١. فتاحة لأنبوبة جهاز الطرد المركزي.
١٢. ممصات (Aerosol-barrier).

١-٣: تحضير الصفائح:

١. قم بترتيب العينات في صفيحة الاختبار حسب رقم العينة. وبالنسبة لكل مجموعة من البادئات، يضم الـ NTC، NCI، والـ PC جزءاً من مجموعة العينات. (انظر شكل ١) مثلاً على توزيع صفيحة الاختبار. وإذا كان هناك حاجة لإجراء التحليل الكمي، يتم استبدال الـ PC بسلسلة من سلاسل عينات الـ DNA المرجعي المخفض عشرة أضعاف لكل مجموعة بادئات لإنتاج منحنيات معايرة قياسية. ويجب أن تحتوي عينة الـ DNA المرجعية على نفس الـ DNA المُستهدف كالعينات (على سبيل المثال، الـ FD)، ولتضخيم الـ DNA الشاهد (على سبيل المثال، الـ 18S rRNA). (انظر شكل ٢) مثلاً.
٢. يتم حساب كمية المواد المكونة المطلوبة للاختبار وفقاً للجدول ٢ و٣. وإضافة كمية كافية من المواد لعدد العينات (غير مُخففة، ومُخففة عشرة أضعاف)، ومواد تخفيف عينة الـ DNA المرجعية (في حالة الحاجة لإجراء تحليل كمي)، والشاهد حتى يتم اختبارها مرتين، ويتم إضافة ١٠٪ من الكميات تحسباً لأي هدر قد يحدث خلال عملية المصنات، وفي حالة حدوث الأخطاء.
٣. إزالة كافة مواد الاختبار من الفريزر، وتركها حتى تذاب، ثم اخلط كافة المواد الذاتية جيداً بالهزاز، وقلبهم لفترة وجيزة (~5s) في جهاز الطرد المركزي.
٤. يتم بتجهيز أربع خلطات رئيسية للاختبار (18S rRNA، UniRNA، FDgen، وBNgen)؛ كل منهم في أنبوب منفصل. ولكل خليط، يتم إضافة المواد حسب الترتيب والكمية التي تم حسابها في الخطوة رقم ٢. وبعد إكمال تلك الخطوة، تُخلط كافة المواد جيداً بالهزاز، وتُقلب لفترة وجيزة (~5s) في جهاز الطرد المركزي (انظر: الملاحظة ١٦).
٥. يتم أخذ صفيحة qPCR التي تتكون من ٣٨٤ وعاءاً، ثم يتم ملء الأوعية المناسبة بكمية قدرها ٨ ميكروليترات من الخليط الرئيسي، حسب مخطط الصفيحة (انظر: الملاحظة ١٧).
٦. إضافة ٢ ميكروليتر من العينة غير المُخففة، والعينة المُخففة عشرة أضعاف، مواد تخفيف عينة الـ DNA المرجعية (للتحليل الكمي)، أو الـ DNA الشاهد إلى كل وعاء تجريبي. ودائماً، ابدأ بإضافة الماء الأول للـ NTC (NTCI)، ويتبع ذلك عينات الـ DNA، وعينات الـ DNA المرجعية المُخففة ثم الشواهد. والخطوة الأخيرة بالماء للـ NTC (NTC2). إن استخدام هذا الترتيب لإضافة الـ DNA يُسهل عملية تحديد أي مصدر من مصادر التلوث المُحتملة (انظر: الملاحظة ١٧).

٧. بعد إضافة الـ DNA، يجب تغطية صفيحة الـ qPCR بغطاء لاصق شفاف، وختمها بماسك بلاستيكي (انظر: الملاحظة ١٨).
٨. يتم عمل طرد مركزي للصفحة بسرعة $1 \times 1000 \text{ g}$ في الدقيقة؛ للتأكد من الخليط والـ DNA والتفاعل في قاع الأوعية (انظر: الملاحظة ١٩).

	18S rRNA				UniRNA				FDgen				BNgen				17	18	19	20	21	22	23	24			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16											
A	S1		S1 d		S1		S1 d		S1		S1 d		S1		S1 d												
B	S2		S2 d		S2		S2 d		S2		S2 d		S2		S2 d												
C	S3		S3 d		S3		S3 d		S3		S3 d		S3		S3 d												
D	S4		S4 d		S4		S4 d		S4		S4 d		S4		S4 d												
E	S5		S5 d		S5		S5 d		S5		S5 d		S5		S5 d												
F	S6		S6 d		S6		S6 d		S6		S6 d		S6		S6 d												
G	S7		S7 d		S7		S7 d		S7		S7 d		S7		S7 d												
H	S8		S8 d		S8		S8 d		S8		S8 d		S8		S8 d												
I	S9		S9 d		S9		S9 d		S9		S9 d		S9		S9 d												
J	S10		S10 d		S10		S10 d		S10		S10 d		S10		S10 d												
K	S11		S11 d		S11		S11 d		S11		S11 d		S11		S11 d												
L	S12		S12 d		S12		S12 d		S12		S12 d		S12		S12 d												
M	S13		S13 d		S13		S13 d		S13		S13 d		S13		S13 d												
N	S14		S14 d		S14		S14 d		S14		S14 d		S14		S14 d												
O	NCI		NCI d		NCI		NCI d		NCI		NCI d		NCI		NCI d												
P	N ₁	N ₂	P	P	N ₁	N ₂	P	P	N ₁	N ₂	P	P	N ₁	N ₂	P	P											

شكل (١): مخطط الصفيحة لاختبار الـ qPCR لضيتوبلازما العنب. ويمثل: ترتيب الصفيحة اختبار ١٤ عينة من العنب لوجود FD وBN. ويتم اختبار كل العينات مع جميع البادئات الثلاثة الخاصة بالفيتوبلازما (UniRNA، BNgen، FDgen) واختبار الشاهد (18S rRNA) بتفاعل qPCR منفصلة. جميع الاختبارات يتم تكرارها مرتين في الحفرة بتخفيفين (غير مخفف وعشرة أضعاف) على الصفيحة نفسها ٣٨٤. SX (X = 1-14) مستخلص DNA للعينات؛ SXd تخفيفات من الحمض النووي المستخلص، NCI عزلة الشاهد السلبى، $NCId$ لتخفيفات عزلة الشاهد السلبى، NI شاهدا بدون حمض نووي-يتم إضافة ماء معقم منزوع الأيونات في الصفيحة في بداية العمل (NTC1)؛ $N2$ شاهدا بدون حمض نووي-يتم إضافة ماء معقم منزوع الأيونات في الصفيحة في نهاية العمل (NTC2)؛ P شاهدا إيجابياً للحمض النووي المستهدف (PC).

	18S rRNA						FDgen																	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
A	S1		S1 d		R 10d					S1	S1 d	R 10d												
B	S2		S2 d		R 10 ² d					S2	S2 d	R 10 ² d												
C	S3		S3 d		R 10 ³ d					S3	S3 d	R 10 ³ d												
D	S4		S4 d		R 10 ⁴ d					S4	S4 d	R 10 ⁴ d												
E	S5		S5 d		R 10 ⁵ d					S5	S5 d	R 10 ⁵ d												
F	S6		S6 d							S6	S6 d													
G	S7		S7 d							S7	S7 d													
H	S8		S8 d							S8	S8 d													
I	S9		S9 d							S9	S9 d													
J	S10		S10 d							S10	S10 d													
K	S11		S11 d							S11	S11 d													
L	S12		S12 d							S12	S12 d													
M	S13		S13 d							S13	S13 d													
N	S14		S14 d							S14	S14 d													
O	NCI		NCI d							NCI	NCI d													
P	N 1	N 2								N 1	N 2													

شكل (٢): مثالاً على مخطط الصفيحة للاختبار الكمي qPCR لفيتوبلازما. ويمثل: ترتيب الصفيحة اختبار ١٤ عينة من العنب، والتحليل الكمي، ومقارنته بوجود FD. ويتم اختبار كل العينات مع جميع البادئات الخاصة بالفيتوبلازما (في الحال FDgen) واختبار الشاهد (18S rRNA) بتفاعل qPCR منفصلة. وجميع الاختبارات يتم تكرارها مرتين في الحفرة بتخفيفين (غير مخفف، وعشرة أضعاف) على الصفيحة نفسها ٣٨٤. SX ($X = 1-14$) مستخلص DNA للعينات؛ SXd تخفيفات من الحمض النووي المستخلص، NCI عزلة الشاهد السلبية، $NCId$ لتخفيفات عزلة الشاهد السلبية. $N 1$ شاهدا بدون حمض نووي-يتم إضافة ماء معقم منزوع الأيونات في الصفيحة في بداية العمل (NTC1)؛ $N 2$ شاهدا بدون حمض نووي-يتم إضافة ماء معقم منزوع الأيونات في الصفيحة في نهاية العمل (NTC2)؛ Yd ($Y=10-10^5$) مزرعية في التخفيفات المرجعية للعينة لـ DNA. وإذا تم تحليل عينات أكثر، وتحتاج إلى أكثر من صفيحة واحدة، عندها ضع سلسلة من التخفيفات المرجعية لعينة الحمض النووي لجميع الصفائح المراد تحليلها. ويجب أن تكون نتائج عينة الحمض النووي المرجعية على جميع الصفائح متماثلة (لا تختلف عن ٠.٥-١ Cq) من أجل أن تكون قادرة على مقارنة العينات على الصفائح المختلفة.

٣-٢: تشغيل الـ qPCR:

١. قم بتشغيل جهاز qPCR أولاً، حسب تعليمات الشركة المصنعة لتجهيزه، مع تثبيت درجة الحرارة ومصادر الضوء.

جدول (٢): خليط المواد الخاصة (FD) مع flavescence dorée (FDgen)، (BN) مع bois noir (BNgen)، باستخدام البادئ العام للفيتوبلازما (UniRNA).

Components	Final concentration	Volume per well (µL)
Sterile nuclease-free water		0.2
2× TaqMan Universal PCR Master Mix	1×	5.0
Forward primer (10 µM)	900 nM	0.9
Reverse primer (10 µM)	900 nM	0.9
Probe (2.5 µM)	250 nM	1.0
Total volume		8.0

جدول (٣): خليط مواد الـ 18S rRNA.

Components	Final concentration	Volume per well (µL)
Sterile nuclease-free water		2.5
2× TaqMan Universal PCR Master Mix	1×	5.0
Human 18S rRNA (20×)	1×	0.5
Total volume		8.0

٢. يتم نقل صفيحة الـ qPCR إلى جهاز PCR اللحظي، مع تشغيل الـ qPCR باستخدام البرنامج الشامل التالي (راجع الدليل الخاص بالجهاز للحصول على تعليمات معينة). انظر في ذلك: الملاحظة (٢٠):

1 cycle	2 min at 50°C (UNG activation step) 10 min at 95°C (polymerase activation)
45 cycles	15 s at 95°C (DNA denaturation) 1 min at 60°C (annealing and extension)

٣-٣: تحليل البيانات:

١. قم بطلب البيانات الأصلية وتحليلها (انظر: الدليل الخاص بالجهاز للحصول على تعليمات مفصلة حول إعداد المستند، والخط الأساسي، وإعدادات الخط الفاصل) (انظر: الملاحظة (٢١)).

٢. يتم تصدير البيانات إلى Microsoft Excel، أو برامج جدولة Spreadsheet مشابهة، ومعه الخواص الإحصائية، ثم يتم حساب متوسط القيمة Cq لكل مكررات من العينة. ويجب إعادة التحليل، إن تم ملاحظة وجود فرق شاسع بين المكررات (انظر: الملاحظة ٢٢). ويتم اعتبار أن متوسط قيمة Cq لكافة العينات الأقل من القيمة الحدية أنها عينة موجبة في ذلك الاختبار (انظر: الملاحظة ٢٣). وإن تم إجراء التحليل الكمي باستخدام منحني المعايرة القياسي، فيجب استكمال التحليل بحساب منحنيات المعايرة القياسية لكافة مواد التضخيم (الـ DNA المُستهدف، والـ DNA الشاهد). (انظر: الملاحظة ٦ و ٢٢). بعد ذلك، قم بحساب كفاءة منحنيات المعايرة القياسية في عملية التضخيم، ثم اختبار العينات المدروسة في التجارب، وتخلص من كافة العينات التجريبية التي تُعتبر كفاءتها في التضخيم غير كافية (انظر: الملاحظة ٢٤). ويتم تحديد كمية الـ DNA المستهدف والـ DNA الشاهد في العينات من منحنيات المعايرة القياسية. وبالنسبة لكل عينة من العينات، يتم تسوية كمية الـ DNA المستهدف بكمية الـ DNA الشاهد في تلك العينة، ثم قارن كمية الـ DNA المستهدف بين العينات بعضها بعضا (انظر: الملاحظة ٢٥).
٣. إذا تم اكتشاف أن نتيجة الشاهد لعينة النبات السليم موجبة (NCI)، هنا يكون الاشتباه في حدوث تلوث للمواد أو العينات أثناء استخلاص الـ DNA. وبالتالي، لا يمكن الاعتماد على نتائج تحليل العينات، ويكون التحليل غير صحيح ويجب إعادته، بما فيه استخلاص الـ DNA.
٤. لا يجب أن ينتج عن تحليل الـ NTC لأي تجربة من التجارب إشارة qPCR إيجابية. وإن حدث خلاف ذلك، يكون هناك اشتباه في حدوث تلوث أثناء تحضير الـ qPCR، ولا يمكن الاعتماد على نتائج تحليل العينة. وبالتالي، ينبغي إعادة تحليل الـ qPCR (انظر: الملاحظة ٢٦).
٥. يجب التأكيد من النتيجة الإيجابية لكافة التسلسلات المستهدفة في الشاهد الإيجابي. وإن لم يحدث ذلك في الشاهد الإيجابي، يصبح التحليل غير صحيح، ويجب النظر إلى الأخطاء التي حدثت في اختبار الـ PCR.
٦. يجب أن يكون Cq الحمض النووي DNA المعزول، والذي تم قياسه على أساس شاهد (مثل: الـ 18S rRNA، cox) داخل النطاق المتوقع (انظر: الملاحظة ٢٧). وإن حدث خلاف ذلك، يكون التحليل غير صحيح، ويجب الأخذ في الاعتبار الأخطاء التي حدثت أثناء عملية، أو وجود مثبطات.
٧. يجب التحقق من قيم الـ Cq بالنسبة للـ UniRNA؛ للتأكد من وجود فيتوبلازما الـ FD والـ BN، أو للكشف عن أنواع الفيتوبلازما الأخرى غير المعروفة (الجدول ٤) (انظر: الملاحظة ٢٨).

جدول (٤): تفسير نتائج ال PCR اللحظي.

Primers used for amplification ^a			Phytoplasma present ^b		
BNgen	FDgen	UniRNA	Bois noir	Flavescence dorée	Unidentified
+	-	±	✓	□	
-	+	+	□	✓	
+	+	+	✓	✓	
-	-	+	□	□	✓
-	-	-	□	□	□

^a+Cq value lower than cut-off value; -Cq value higher than cut-off value

^b✓ presence shown; □ presence not shown

٤- الملاحظات:

١. يجب أن تكون كمية ال DNA الكلية المضافة إلى اختبار ال PCR -بصفة عامة- أقل من 100 ng. ويجب أن تقوم بخلط كافة عينات ال DNA والمواد الخاصة مع تخفيفها جيداً، ثم عمل طرد مركزي لمدة (٥ ثوان تقريباً) قبل استخدامها. وإن تم تخزين العينات وهي مجمدة، فيجب تركها حتى تذاب قبل خلطها.
٢. كل العينات يجب أن تُختبر على تخفيفين: ففي الحالة الخاصة، عندما تم شرح خطوات KingFisher لاستخلاص ال DNA آلياً في الفصل الثاني عشر، تم استخدام كمية DNA مُخفف عشرة أضعاف و DNA غير مُخفف، وفي بعض الحالات يكون ال DNA المُخفف مئات المرات مناسباً لإجراء الاختبار. إن اختبار سلاسل التخفيف للتحكم في مثبطات ال PCR، إن التحقق من وجود المثبطات في العينة التي قد تؤثر على كفاءة تضخيم ال qPCR. وفي حالة عدم وجود أي مثبطات، يكون شكل منحنيات التضخيم متشابهاً للحمض النووي DNA المُخفف عشرات أضعاف وغير المُخفف، ويكون الفرق بين قيم ال Cq للحمض النووي DNA المُخفف عشرة أضعاف أكبر بقيمة ٣,٣ إضافية من ال DNA غير المُخفف بكفاءة ١٠٠٪ في عملية التضخيم. وفي حالة التثبيط القوي (على سبيل المثال، قيمة ال Cq لتخفيف ال 18S rRNA عشرة أضعاف أقل من القيمة ال Cq الخاصة بتحكم ال 18S rRNA غير المُخفف)، قد ينتج عن تفاعل ال qPCR نتائج سلبية خاطئة، ويجب تكرار التحاليل بتخفيف الحمض النووي DNA أكثر. وإن استمر ظهور المثبط القوي، فيجب استخلاص ال DNA باستخدام طريقة أخرى، ويتم ظهور تلك الحالة في عملنا اليومي عند استخدام عينات الياسمين البري (clematis). وعندما يُختبر ال DNA المُخفف عشرة أضعاف وغير المُخفف، والذي يتم استخلاصه بالخطوات المشروحة في الفصل الثاني عشر، لا يتم الحصول على أي قيم Cq لمواد تضخيم ال FD وال 18S rRNA. وعند

استخدام الـ DNA المُخفف مئات المرات فقط (حتى لبعض عينات الـياسمين البري، يجب تجربة سلاسل تخفيف الأعلى لك الـ DNA) يتم الحصول على قيم *Cq*. وإن لم يتم اكتشاف أي مثبط أثناء استخدام الطريقة لعدد من العينات التي تنتمي إلى النوع نفسه المأخوذ منه العينة، يمكن استخدام سلسلة تخفيف واحدة لك الـ DNA، ولكننا في تلك الحالة نقترح اختبار كل عينة بالـ qPCR في ثلاثة مكررات بدلاً من مكررين. وبالنسبة للتحليل الكمي، قم دائماً باستخدام مكررين من العينة، وتأكد من عدم وجود أي تثبيط، وأن الفرق في الـ *Cq* بين سلاسل التخفيف المضاعفة تتراوح ما بين ٢,٩ و ٤,٠.

٣. إن هذه التجربة تصلح -فقط- للعنب، والحشرات (*S. titanus, H. obsoletus, Orientus ishidae*)، وعينات الـياسمين البري. وعندما يُستخدم هذا الاختبار مع عينة أخرى، فيجب ضم العينة السليمة والعينة السليمة الأخرى، ويجب استخدام المواد نفسها في التحليل للتحقق من التقاطعات المحتملة للبادئات والمجسات مع عينات جديدة، ولإثبات أن الكشف عن الهدف من مواد العينة الجديدة أمر محتمل، على التوالي.

٤. يجب أن يحتوي أي اختبار على الشاهد المعياري (NTC) والشاهد الإيجابي (PC) في كل تشغيله qPCR. وإن كان هناك حاجة لإجراء التحليل الكمي، فيتم استبدال الـ PC بعينات الـ DNA المرجعية المُخففة عشرة أضعاف. إن الـ NTC يحتوي على كافة المواد المستخدمة لك الـ qPCR، ولكن يتم إضافة الماء المُقطر والمُعقم إلى التفاعل بدلاً من الـ DNA العينة، ويجب استخدام الـ NTC لمادة التضخيم لنفسها، كما هو حال العينة في المكررات، واحدة في بداية العمل بالمصات (NTC1)، وواحدة في النهاية (NTC2) لكل مادة من مواد التضخيم.

٥. إن الشاهد الإيجابي (PC) يعتبر عينة من العينات التي تحتوي على الـ DNA المُتسلسل المُستهدف. ولجعل التجارب أكثر تشابهاً، نقترح تحضير عدة كميات مقسمة بالتساوي من الشاهد الإيجابي ووضعها في الفريزر؛ بحيث يمكن استخدامها مع كل تحليل، ولمنع تكسير الـ DNA بسبب تكرار عملية التجمد والإذابة.

٦. بالنسبة للتحليل الكمي، الـ DNA المرجعي مطلوب لهذا الاختبار. وقد تكون أي عينة تحتوي على الـ DNA المُستهدف، أو عينة البلازميد معروف التركيز (أو رقم نسخة البلازميد التي تحتوي على الـ DNA المُستهدف). وتستطيع تحضير عينة الـ DNA المرجعية بعمل تجميع الـ DNA لكافة العينات التي سيتم تحليلها. ويجب استخدام ما لا يقل عن أربع سلاسل تخفيف (خمس بشكل مثالي) للعينة مرجعية الإنتاج، ومنحنى معايرة قياسي (انظر: أيضاً الملاحظة ٢٤).

٧. إن استخدام أسماء المواد الكيميائية والأجهزة لا يعني استبعاد غيرها، وقد تم تقديم هذه المعلومات لتوائم المستخدم، ولا تُشكل أي جانب تسويقي للخدمات أو المنتجات، ويمكن استخدام المنتجات المُماثلة إن تم إثبات أنها تؤدي إلى النتائج نفسها.

٨. تمت المقارنة بين مواد الخليط الرئيسي من Applied Biosystems و Fermentas؛ حيث كانت النتائج التي تم الحصول عليها متشابهة لحد كبير.
٩. للتحكم بخطوة استخلاص الـ DNA، يجب أن تشتمل التجارب على الشاهد. ويُفضل أن يكون جيناً معروفاً، لكي يؤكد نجاح عملية استخلاص الحمض النووي من نباتات مختلفة، ويجب أن يتواجد الجين بأعداد كبيرة في الجينوم لزيادة دقة التجربة، وفي الحالتين هنا، يتم استخدام جين 18S rRNA للكشف عن DNA العنب، ويمكن استخدام عينة الشاهد الآخر بدلاً من 18S rRNA، مثل: نبات (cytochrome oxidase) (*cox*) (١٤). ويمكن استخدام الـ 18S rRNA للتسوية في التحليل الكمي للمقارنة؛ للتأكد من أن الاختلافات التي تم قياسها بين العينات لا ترتبط بكمية المادة الأولية؛ ولأن الـ *cox* جين ميتوكوندريا، لا يصلح استخدامه في تلك الأغراض الكمية.
١٠. من الضروري استخدام المستوى البيولوجي الجزيئي (الخالي من الحمض النووي) أو الماء المعقم مزدوج الفلتر منزوع الأيونات في كافة الوصفات وخطوات العمل. ويُنصح بعدم استخدام المياه المعالجة بالـ DEPC لأن الـ pH قليل الحموضة قد يُساعد على تحلل البادئات، وقد تتلوث تجربة الـ PCR بسهولة إن تم تكرار استخدام زجاجة الماء القديمة. لذلك، قم بتقسيم كمية المياه بالتساوي بين الأنابيب، وبعدها استخدام أنبوباً واحداً لكل تجربة.
١١. تُصمم مادة البادئات لـ FDgen مع جين الـ *secY*، حيث إن وظيفته نقل البروتين. وتقع هذه المادة بين بادئ الـ FD9f/r (١٥) و بادئ الـ FD9f3b/r2 (١٦) المستخدممين للكشف عن الـ FD من خلال الـ PCR المتداخل. وتم تصميم البادئات BNgen داخل الجزء الجينومي *Stoll*، ويقع بين بادئ الـ STOL11f2/r1 (١٥) و بادئ الـ STOL11f3/r2 (١٦)، المستخدممين للكشف عن الـ BN بواسطة الـ PCR المتداخل التقليدي. ويعمل بادئ الشامل UniRNA على تضخيم فيتوبلازما الـ BN والـ FD (بجانب أنواع أخرى من الفيتوبلازما، مثل: مجموعات الفيتوبلازما 16SrI، 16SrIII و 16SrX)، ولكن الأفضل مع الـ FD. ويتم إدراج هذه البادئات في الاختبار وسيلةً من الوسائل لزيادة دقة الكشف عن الـ FD، ولاكتشاف أنواع أخرى من الفيتوبلازما (١٢).
١٢. قم بشراء المواد النيوكليوتيدية oligonucleotides من الشركات المصنعة، وتكون على تركيز 25 nmol. وبالنسبة لها، تكون كفاية؛ حيث لا يتم إزالة أملاحها، ولا تحتاج إلى أي تنقية أخرى. ولا بد من عمل طرد مركزي للمواد النيوكليوتيدية oligonucleotide لفترة وجيزة حتى تكون المكونات في قاع الأنبوب، و قم بإعادة تعليق المواد النيوكليوتيد في ١٠٠ ميكرومل من المياه عالية الجودة، ثم يتم تخفيف كل مجموعة من البادئات إلى ١٠ ميكرومل. وبعد ذلك، يتم تحضير كميات مُقسمة بالتساوي من هذه المحاليل الخاصة بأعمال المختبر وتخزينها على درجة حرارة 20- مئوية. وقد تستمر فاعلية مخزون البادئات لما لا يقل عن عامين، إن تم تخزينه بطريقة صحيحة، وإخضاعه لعدد قليل من دورات التجميد - الإذابة. ويجب تجنب تكرار دورات

- التجميد-الإذابة، ويجب أن تقوم بتذويب الثلج قبل الاستخدام للحفاظ على حالة المجس، واحفظ المسبار بعيداً عن الضوء (على سبيل المثال: ضع الأنابيب التي تحتوي على المجس في حاويات داكنة) لمنع التغيير الكيميائي الضوئي للصبغات الفلورية والتبخر.
١٣. يمكنك استخدام - في المقابل - صفائح تفاعل شفافة مكونة من ٩٦ وعاء. وفي حالة استخدام تلك الصفائح ذات الـ ٩٦ وعاء، فيجب أن يكون حجم التفاعل الكلي ٢٥ ميكروليترا (٢٠ ميكروليترا من الخليط الرئيسي، و ٥ ميكروليترات من DNA العينة).
١٤. يجب تحضير خلطات التفاعل وإضافة عينات الـ DNA في غرف UV منفصلة باستخدام أجهزة معملية مخصصة لهذه العملية (ممصات، ومصات، وأنابيب، وفتاحة أنبوب، وحوامل للأنابيب، ومعطف معمل، وقفازات): أولاً، قم بتحضير خلطات التفاعل وحملها على صفيحة qPCR (لا يجب إحضار أي DNA سوى المجسات والبادئات). ثانياً، أضف عينات الـ DNA في غرفة UV أخرى. ويجب هنا أن تتخذ الخطوات السابقتين في مكان منفصل عن الأماكن المستخدمة لطحن العينات واستخلاص الـ DNA.
١٥. يجب اتخاذ الاحتياطات التالية في جميع مراحل إعداد اختبار الـ PCR حتى لا تتلوث العينات والمواد: (١) استخدام مصات مفلترة فقط (aerosol barrier tips)، واستخدام ممصات جديدة لكل خطوة تقطير. (٢) قم بإغلاق أنابيب العينة/المواد بعد سحب الكمية المطلوبة. (٣) ارتد دائماً القفازات وغيرها من وسائل الحماية، إن توقع حدوث تلوث. (٤) استخدام الأدوات البلاستيكية النظيفة والمعقمة فقط. (٥) يجب فتح كافة الأنابيب بفتاحة أنبوب.
١٦. يمكن تحضير تلك الخطوة من البداية، ويمكن وضع الأنابيب في الثلج، أو تخزينها في درجة حرارة 4°C لمدة يوم واحد قبل تحضير صفيحة التفاعل.
١٧. يمكن استخدام نظام مناولة السائل إلى (على سبيل المثال: Multiprobe® II PLUS EX، PerkinElmer)؛ وذلك لإرسال عدد كبير من عينات الحمض النووي والمزج الرئيسي إلى صفيحة ٣٨٤ وعاء. وإذا كان العمل يدوياً مع الصفيحة، فابدأ بالمزج الرئيسي، وضع المزيج في قاع الوعاء، وتستمر بإضافة عينات من الحمض النووي والشاهد إلى الجدران الجانبية للوعاء، وهذا يسهل المشاهدة أثناء إضافة العينات، وتجنب لمس المزيج الرئيسي داخل الأنابيب مع طرف ماصة. ومن المستحسن استخدام (multistep pipettors)، وفي هذه الحالة استخدام ماصة واحدة لجميع الأوعية لوضع المزيج الرئيسي، ومامسة واحدة للمكررات عند إضافة الحمض النووي للعينة. وفي حالة استخدام آلات معالجة السوائل، يمكن عكس ترتيب pipetting للخليط الرئيسي وللحمض النووي؛ ويتم وضع الـ DNA لأول مرة (في قاع الوعاء)، ثم يتم عمل طرد مركزي لضمان جمع الحمض النووي في القاع، ثم يضاف المزيج الرئيسي دون لمس قاع الأنبوب، يليها ختم الصفيحة، وعمل طرد مركزي.
١٨. لا تلمس الغطاء اللاصق الشفاف بأصابعك.

١٩. بمجرد التجهيز، يجب بدء الاختبار في الحال. وإن كان هذا مستحيلاً، فيجب تخزينها بعيداً عن الضوء على درجة حرارة $2-8^{\circ}\text{C}$ لبضع ساعات حداً أقصى.

٢٠. قبل بدء التشغيل، اتبع التالي: (١) قم بضبط حجم التفاعل، إن كان هناك حاجة لذلك. (٢) قم بتعين أماكن العينات على الصفيحة. (٣) قم بتعيين مواد الكشف للعينات الخاصة بك، (اختر الفلاتر المناسبة حسب المجسات المستخدمة في البادئات: الـ FAM لمواد تضخيم الفيتوبلازما، والـ VIC لمادة تضخيم الـ 18S rRNA)، ويجب أن يكون معدل انحدار درجة الحرارة مطابقاً للدوائر الحرارية لجهاز Applied Biosystems 7900 thermal cyclers، مع العلم بأن النمط القياسي لمعدلات درجة الحرارة على الـ 7900HT هو: لأعلى من 1.6°C/s ، ولأقل من 1.6°C/s ، ولا تستخدم معدلات انحدار لدرجة الحرارة أسرع من ذلك.

٢١. إن تحويل الإشارة الفلورية إلى بيانات Cq - على سبيل المثال: دورة مستوى الـ Ct، ونقطة اجتياز الـ Cp - وكذلك الأنظمة المستخدمة لإعداد الخط الأساسي والحدية، تختلف بين نماذج الأجهزة، ويجب الرجوع إلى الدليل المخصص لكل جهاز. وعند تحليل البيانات الأساسية، يجب ضبط مستوى دورة Cq مخطط التضخيم ضمن المرحلة الهندسية (الأسية) للتضخيم، ويُفضل أن يكون في بداية المرحلة الهندسية، ويُمثل في السجل العرض الجزء الخطي من مخطط التضخيم، ويُعتبر مهماً لإجراء تحليل كمي؛ لأن المرحلة الهندسية تُمثل نقطة التفاعل التي عندها يكون الـ Cq مرتبطاً كميًا بكمية قالب الـ PCR الرئيسي. وقد لاحظنا -من خلال التجربة- أنه غالباً عندما يكون الخط الرئيسي الآلي على مستوى $٠,٠٦٥$ يكون ذلك مناسباً عند استخدام الدوائر الحرارية لجهاز Applied Biosystems 7900، وذلك للتحقق من المخططات التي تحتوي على عديد من المكونات لكافة العينات (الأوعية). وفي الأوعية التي تحتوي على عينات إيجابية، يجب أن يزداد الشعاع الفلوري (صبغة الـ FAM في تلك الحالة) مع دورات التفاعل، ولا تعتبر قيمة الـ Cq إيجابية عندما لا يتم ملاحظة أي زيادة في الشعاع الفلوري للـ FAM.

٢٢. من الضروري - دائماً - إجراء مكررين أو من الأفضل ثلاثة مكررات من التفاعلات المواد التخفيف بنفسها عند تنفيذ تجربة من تجارب الـ qPCR. وإذا كانت قيم الـ Cq مرتفعة جداً، فمن الضروري استخدام المكررات للتأكد من أن التفاعل يعمل بشكل جيد. وإذا كانت البيانات المأخوذة من التفاعلات المكررة عالية المعنوية، فيجب إعادة التفاعلات، ما لم يكن التغير الكبير في قيم الـ Cq مرتبطاً بالتأثير العشوائي لتوزيع النسخة المُستهدفة في التفاعلات المكررة. ويحدث هذا الأمر عندما يتواجد عدد أقل من عشر نسخ من النسخ المُستهدفة في التفاعل (١٨، ١٩).

٢٣. يتم تحديد القيمة الحدية لكل تجربة في عملية التحقق من صلاحية التجربة قبل استخدام التجربة بشكل روتيني، ولا يزال ينظر إلى قيمة الـ Cq الأعلى على أنها النتيجة الإيجابية، ويجب

اتباع الإرشادات التالية لتحديد القيمة الحدية أثناء التحقق من صلاحية التجربة. بعد ذلك، قم بتحليل مواد التخفيف المتسلسلة للعينات الإيجابية والسلبية في العينات مختلفة الأنواع، ويجب تحليل ما لا يقل عن خمسة تخفيفات (غالباً التخفيفات مضاعفات العشرات)، وكل منها يحتوي على عينة من العينات في خمس أوعية مُكررة. وبعدها، ابحث عن المجموعة الأخيرة للعينات التي لم يتم بها أي تضخيم لعدد من النسخ المُكررة، وخذ نطاق قيم الـ Cq الأعلى التي تم ملاحظتها، ثم قم بحساب قيمة الـ Cq إلى نصف القيمة. وبعدها، أضف ٠,٥ إلى تلك القيمة للأخذ في الاعتبار الفرق في المستوى؛ والذي تم اختياره بين كل عملية تشغيل وأخرى. إن تلك القيمة الخاصة بالـ Cq هي القيمة الحدية، ويجب تحديدها لكل تجربة من التجارب أثناء التحقق من فاعلية الطريقة. وقد تختلف القيمة الحدية للتجربة نفسها من معمل لآخر. ويرجع ذلك، إلى أسباب عديدة (على سبيل المثال: آلة الـ qPCR، وبرنامج المُستخدم). لذلك، يجب أن يُعيد كل معمل التحقق من فاعلية القيم الحدية لأي تجربة جديدة قبل تنفيذها.

٢٤. يتم حساب منحنيات المعايرة القياسية بالنسبة لكل جزء من الحمض النووي المأخوذ من قيم الـ Cq لمواد تخفيف العينة المرجعية. وفي حالة استخدام الـ DNA البلازميدي (بجانب رقم نسخة الـ DNA الشاهد / الـ DNA المُستهدف) عينةً مرجعيةً، قم برسم قيم الـ Cq على المحور x ، وسجل رقم نسخة الـ DNA على المحور y . وعند استخدام عينة من العينات لا يُعرف رقم نسخة الـ DNA الشاهد / الـ DNA المُستهدف الخاص بها بشكل مُحدد، قم بتعيين رقم النسخة لـ ١٠ مواد من مواد التخفيف الأكثر تركيزاً ($\log_{10}=1$). وبعدها، عيّن أرقام العينات لمواد التخفيف الأخرى حسب عامل التخفيف، ثم قم بحساب ميل (K) جزء اللوغاريتم الخطي (\log -linear) لمنحنى المعايرة وحدد كفاءة التضخيم. ويجب أن تكون قيمة R^2 الانحدار الخطي أكبر من ٠,٩٩، ومنه تتراوح الكفاءة التي تم حسابها في صورة $10^{-1/\text{slope}}$ ما بين ١,٨٥-٢,١٥.

٢٥. من منحنيات المعايرة وقيم الـ Cq الخاصة بالعينة، قم بتحديد كمية الـ DNA المُستهدف والـ DNA الشاهد في العينة. ويمكن استخدام المعادلة اللوغاريتم لرقم النسخة $= -\text{slope}(k) * Cq + y$. إن الناتج لرقم النسخة ليس القيمة المطلقة عند استخدام عينة مرجعية برقم نسخة DNA غير معروف؛ ففي تلك الحالة، احصل على قيمة نسبية للعينة المرجعية. ويمكن إجراء القياس الكمي النسبي؛ من خلال مقارنة تلك القيم بين العينات الخاصة بك للحصول على النسبة المئوية للـ DNA المُستهدف في العينة ١ مقارنةً بالعينة ٢.

٢٦. إن حدثت عملية تضخيم للـ NTC، فقد تكون نتيجة لتلوث المواد، أو لتدهور الخليط الرئيسي الأولي، أو يكون ناتج PCR غير محدد. وإن اشتبهت في تلوث المواد، فاستخدم كميات جديدة من كافة مواد التفاعل. وفي الحالة الـ 18S rRNA، تكون القيم الـ Cq العالية (>36) بالنسبة للـ NTC حالة غير عادية، وأنها ناتجة عن آثار تضخيم الـ DNA البكتيري. حتى في الحالات التي تتضخم فيها جميع منتجات التفاعل -بما فيها المنتجات غير المُحددة- في الإشارة الفلورية، فقد

يتم النظر إليها على أنها منتجات غير مهمة، إن كانت قيم الـ *Cq* بالنسبة لـ NTC أو الـ NCI أعلى من القيمة الحدية.

٢٧. إن كمية الـ DNA الموجودة التي تم عزلها تؤثر -إلى حد كبير- على اكتشاف مرض اصفرار العنب، ومراقبة قيم الـ *Cq* لمواد الشاهد (مثل: الـ *cox*، الـ 18S rRNA) تسمح بتقدير كلا المتغيرين. وبالتالي، تُزيد من الثقة بالنتائج. إن قيم الـ *Cq* للـ 18S rRNA في عملية استخلاص الـ DNA المستخدمة في معملنا بطريقة الـ KingFisher (انظر: الفصل الثاني عشر. Mehle et al. (20)) تختلف عن ١٧ إلى ٢٥ (في حين استخدام الـ *cox*، قيم الـ *Cq* تصل إلى ٢٩). وتُشير قيم الـ *Cq* الأعلى إلى كميات أقل من DNA النبات، ومن المفترض كميات أقل من DNA الفيتوبلازما في العينة. وبالتالي، تعمل على تقليل درجة الثقة بالنتائج، وهذه إشارة إلى أن هذا النوع من العينات يجب إعادة استخلاصه واختباره مرة أخرى. وأحياناً، تُشير القيم الأعلى للـ *Cq* إلى وجود المثبطات في العينة. لذلك، يجب إعادة اختبار العينات ذات التخفيف العالي لـ DNA.

٢٨. إن مادة البادئ العام UniRNA التي تعمل على تضخيم فيتوبلازما الـ FD والـ BN مع سلالات أخرى للفيتوبلازما تنتمي إلى مجموعات مختلفة، مثل: 16SrI، 16SrII، و16SrX. ومع ذلك، غالباً ما ينتج عن الـ FD -والذي يتم تفضيله بشكل واضح- قيم أقل للـ *Cq* بالنسبة للـ FD. وفي الحالة التي يكون عندها الـ FD فقط موجوداً في العينة، تكون قيم الـ *Cq* بالنسبة للـ UniRNA أقل من أربع دورات أدنى قيم الـ *Cq* للـ FDgen. إن تواجد الـ BN فقط في العينة -مع ذلك- تكون معه قيم الـ *Cq* بالنسبة لمادة تضخيم الـ UniRNA أكثر من أربع دورات أكثر منها بالنسبة للـ BNgen. وغالباً ما ينتج عن مثبطات الـ PCR في الـ DNA المستخلص، المصحوبة بالـ FD والـ BN، أو وجود أنواع أخرى من الفيتوبلازما بالعينة تكون قيم الـ *Cq* مختلفة. وإن نتج عن مادة تضخيم الـ UniRNA إشارة واحدة، فقد يتم اعتبار العينة مصابة بفيتوبلازما غير معروفة. وإن كانت قيم الـ *Cq* بالنسبة للـ UniRNA أعلى من ٣٠ -حتى في الـ DNA غير المُخفف- فيجب اعتبار تواجد الـ FD بتركيز منخفض جداً؛ وذلك لأن مادة التضخيم الخاصة بالـ FD أقل دقة عشر مرات تقريباً من مادة التضخيم العامة (انظر: الجدول ٤).

المراجع:

1. Angelini E et al (2001) Flavescence dorée in France and Italy—occurrence of closely related phytoplasma isolates and their near relationships to Palatinate grapevine yellows and an alder yellows phytoplasma. *Vitis* 40:79–86
2. EPPO/CABI (2003) Data sheets on quarantine pests—grapevine flavescence dorée phytoplasma. In: Smith IM, McNamara DG, Scott PR, Holderness M (eds) Quarantine pests for Europe. CABI International, Wallingford, UK, pp 1013–1021

3. Schwester D, Carle P, Moutous G (1963) Transmission de la fl avescence dorée de la vigne par *Scaphoideus littoralis* Ball. *Ann Epiphyt* 14:175–198
4. Maixner M, Ahrens U, Seemüller E (1995) Detection of the German grapevine yellows (Vergilbungskrankheit) MLO in grapevine, alternative hosts and a vector by specific PCR procedure. *Eur J Plant Pathol* 101:241–250
5. Christensen NM et al (2004) Distribution of phytoplasmas in infected plants as revealed by real-time PCR and bioimaging. *Mol Plant Microbe Interact* 17:1175–1184
6. Hodgetts J et al (2009) Panel of 23S rRNA gene-based real-time PCR assays for improved universal and group-specific detection of phytoplasmas. *Appl Environ Microbiol* 75:2945–2950
7. Bianco PA, Casati P, Marziliano N (2004) Detection of phytoplasmas associated with grapevine fl avescence dorée disease using realtime PCR. *J Plant Pathol* 86:257–261
8. Galetto L, Bosco D, Marzachi C (2005) Universal and group-specific real-time PCR diagnosis of fl avescence dorée (16Sr-V), bois noir (16Sr-XII) and apple proliferation (16Sr-X) phytoplasmas from field-collected plant hosts and insect vectors. *Ann Appl Biol* 147:191–201
9. Angelini E et al (2007) A new TaqMan method for identification of phytoplasmas associated with grapevine yellows by real-time PCR assay. *J Microbiol Methods* 68:613–622
10. Pelletier C et al (2009) Triplex real-time PCR assay for sensitive and simultaneous detection of grapevine phytoplasmas of the 16SrV and 16SrXII-A groups with an endogenous analytical control. *Vitis* 48:87–95
11. Margaria P, Turina M, Palmano S (2009) Detection of Flavescence dorée and Bois noir phytoplasmas, Grapevine leafroll associated virus-1 and – 3 and Grapevine virus A from the same crude extract by reverse transcriptionRealTime Taqman assays. *Plant Pathol* 58: 838–845
12. Hren M et al (2007) Real-time PCR detection systems for Flavescence dorée and Bois noir phytoplasmas in grapevine: comparison with conventional PCR detection and application in diagnostics. *Plant Pathol* 56:785–796
13. Afonina I et al (1997) Efficient priming of PCR with short oligonucleotides conjugated to a minor groove binder. *Nucleic Acids Res* 25:2657–2660
14. Weller SA et al (2000) Detection of *Ralstonia solanacearum* strains with a quantitative, multiplex, real-time, fluorogenic PCR (TaqMan) assay. *Appl Environ Microbiol* 66:2853–2858
15. Daire X et al (1997) Detection and differentiation of grapevine yellows phytoplasmas belonging to the elm yellows group and to the stolbur subgroup by PCR amplification of non-ribosomal DNA. *Eur J Plant Pathol* 103: 507–514
16. Clair D et al (2003) A multiplex nested-PCR assay for sensitive and simultaneous detection and direct identification of phytoplasma in the Elm yellows group and Stolbur group and its use in survey of grapevine yellows in France. *Vitis* 42:151–157
17. Bustin SA et al (2009) The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 55:611–622
18. Morrison TB, Weis JJ, Wittwer CT (1998) Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotech* 24:954–962

19. Ellison SLR et al (2006) Routes to improving the reliability of low level DNA analysis using real-time PCR. *BMC Biotechnol* 6:33
20. Mehle N, Nikolić P, Rugar M, Boben J, Ravnikar M, Dermastia M (2012) Automated DNA extraction for large numbers of plant samples. In: Dickinson M, Hodgetts J (eds) *Methods in molecular biology*. Springer, New York

استخدام الـ PCR الكمي اللحظي للكشف

عن ثلاث من الفيتوبلازما من مجموعة

التفاح المنتشرة Apple Proliferation

Nataša Mehle, Petra Nikolic', Kristina Gruden,
Maja Ravnikar, and Marina Dermastia

ملخص:

نقوم خلال هذا الفصل، بشرح نظام الكشف اللحظي للـ PCR للتمييز والكشف السريع، والخاص، والحساس؛ والذي يميز الأمراض عن بعضها، وهي: 'Candidatus Phytoplasma mali'، 'Ca. P. pyri' and 'Ca. P. prunorum' من مجموعة الـ 16SrX (أمراض التفاح apple proliferation). إن هذه الأنواع من الفيتوبلازما هي الأنواع المسببة لأمراض أشجار الفاكهة داخل الفصيلة الوردية *Rosaceae*، وهي: آفة التفاح المنتشرة AP، واصفرار الفواكه الحجرية الأوروبي European stone fruit yellow، وتدهور الكمثرى. ويستخدم في هذه التجارب (التحلل المائي) مجس من نوع TaqMan[®] minor groove binder. وتشتمل قائمة التجارب مقارنة على مجموعة البادئات نفسها والمجسات الخاصة لتضخيم أنواع محددة، بالإضافة إلى مجموعة من البادئات والمجسات للـ 18S rRNA شاهداً لجودة استخلاص DNA. ويُمكن استخدام التجارب التي تم شرحها في الدراسات لحصر الأمراض للفيتوبلازما، وفي برامج الحجر الزراعي.

الكلمات المفتاحية: أمراض التفاح Apple proliferation، اصفرار الفاكهة الحجرية الأوروبي، مجسات الربط الداخلي، تدهور الكمثرى، الـ PCR اللحظي، TaqMan.

١- المقدمة:

تتأثر أشجار الفاكهة التي تنتمي إلى الفصيلة الوردية (*Rosaceae*) في أوروبا - إلى حد كبير- بفيتوبلازما مجموعة آفات التفاح Apple proliferation (مجموعة 16SrX)، التي تضم 'Candidatus Phytoplasma mali'، 'Ca. Phytoplasma pyri'، و'Ca. Phytoplasma prunorum'.

وهذه المجموعة هي المسببة لأمراض التفاح (AP)، وتدهور الكمشري (PD)، واصفرار الفاكهة الحجرى الأوروبى (ESFY)، بالترتيب (١). وتعتبر الـ '*Ca. Phytoplasma mali*' و '*Ca. Phytoplasma pyri*' من آفات الحجر الصحى بأوروبا، وهي مصنفة في قائمة EPPO A2 (٢).

وقد تم تطوير عدد من الأساليب والاختبارات الجزيئية التي تقوم على أساس PCR/nested و PCR/RFLP للكشف الخاص عن الثلاث سلالات. وفي الآونة الأخيرة، تم تطوير طريقة عمل جديدة تقوم على أساس تقدير الـ PCR اللحظي (qPCR) للكشف عن مسببات مرض الـ AP، و الـ ESFY، حيث تقوم بعض التجارب على استخدام chemistry SYBR[®] Green، وتسمح إما بالكشف عن الفيوتوبلازما في مجموعة 16SrX (٣)، أو عن الـ '*Ca. Phytoplasma mali*' (٤، ٥)، أو الـ '*Ca. Phytoplasma prunorum*' بشكل خاص (٦). وقد تم استخدام الـ TaqMan[®] للكشف عن الـ '*Ca. Phytoplasma prunorum*' (٧). وقد قام Babini et al. (٨) بعمل تشخيص خاص على الـ '*Ca. Phytoplasma pyri*' بواسطة الاختبار المتعدد. وقد تم تطوير الاختبار المتعدد أيضاً لتعريف الـ '*Ca. Phytoplasma mali*' (٩)، وقد استخدم فيه مجس TaqMan[®] minor groove binding (MGB) probe، ومن خلاله تم السماح باستخدام نيوكليوتيدات أقصر (١٠). وتعتبر هذه الطريقة أكثر تخصصاً مقارنةً بمجسات الـ TaqMan[®] التقليدية (١١). ويُعتبر عدم تطابق مجس الـ MGB من الأمور الحساسة بالنسبة للكشف عن الـ '*Ca. Phytoplasma mali*'، وبالنسبة للتمييز بين الـ '*Ca. Phytoplasma mali*' و الـ '*Ca. Phytoplasma prunorum*' (١٢).

ومن خلال هذا الفصل، نعمل على شرح طرق استخدام الـ qPCR للكشف عن الـ '*Ca. Phytoplasma mali*'، '*Ca. Phytoplasma prunorum*'، و الـ '*Ca. Phytoplasma pyri*' لأشجار الفاكهة. وقد قام Nikolić et al. (١٣) بتطوير طرق لأهداف تشخيصية، ويقوم على الـ PCR اللحظي باستخدام MGB TaqMan[®]، والذي تستخدم أزواجاً من البادئات المتطابقة والمجسات المختلفة. وتحتفي المجسات والبادئات داخل المنطقة المتغيرة لمنطقة الفصل بين الجينات (intergenic spacer region IGS) بين الـ 16S rRNA و rRNA S23. إن إجراء اختبار الـ qPCR باستخدام مجس TaqMan[®] (التحلل المائي) MGB، والتي تسمح باستخدام قليل من النيوكليوتيدات والأقصر، أكثر تخصصاً مقارنةً بمجس الـ TaqMan[®] التقليدي. وفضلاً عن ذلك، يتم ضم تضخيم DNA النباتات المستخلص مع DNA الفيوتوبلازما للتحقق من جودة الـ DNA المستخلص لكل عينة من العينات. ويتم التحقق - أيضاً - من التثبيط المحتمل للـ PCR بواسطة تخفيفين مختلفين من الـ DNA المستخلص. إن هذه التجربة تُقدم تشخيصاً سريعاً ومُعتمداً ودقيقاً ومُحدد للفيوتوبلازم داخل مجموعة الـ 16SrX لأشجار الفاكهة التي تنتمي إلى الفصيلة الوردية. إن استخدام الصفيحة المكونة من ٣٨٤ وعاءاً تُسهل تحليل عديد من العينات في الوقت نفسه، وعندما يكون عدد خطوات المعاملة أقل يُمكن تطبيق التجربة على تشخيصات الفيوتوبلازما لأعداد كبيرة؛ والتي يمكن استخدامها في

برامج الاعتماد أو حصر للفيتوبلازما. ويتم في هذا الفصل توضيح وشرح مفصل لتحليل النظام خطوة بخطوة، والاحتياطات التي يجب اتخاذها لتجنب تلوث العينات والمواد المستخدمة.

٢- المواد:

١-٢: العينات والشاهد:

١. استخلاص DNAs من العينات (انظر: الملاحظة ١).
٢. تخفيف الأحماض النووية DNAs عشرات الأضعاف: ٥ ميكروليترات من الـ DNA، ٤٥ ميكروليترا من الماء المقطر المعقم (انظر: الملاحظة ١ و ٢).
٣. عزل الشاهد السلبي (NCD): يتم استخلاص الشاهد السلبي من مواد معروف أنها غير مصابة (انظر: الملاحظة ٣).
٤. شاهد بدون حمض نووي (NTC): وهو عبارة عن ماء مُعقم منزوع الأيونات (مثل: الماء المُستخدم في تحضير الخليط الرئيسي للـ qPCR) (انظر: الملاحظة ٤).
٥. شاهد إيجابي (PC) (عينات تحتوي على التسلسل المُستهدف): DNA من AP، PD- معروف، ونبات مصاب ESFY (انظر: الملاحظة ٣-٥)

٢-٢: مواد الـ qPCR:

١. الخليط الرئيسي qPCR 2× Maxima™ (Fermentas) (انظر: الملاحظة ٦).
٢. الخليط الرئيسي للـ PCR العام 2× TaqMan (Applied Biosystems) (انظر: الملاحظة ٦ و ٧).
٣. ويتم شراؤه بتركيز (20×) 18S rRNA خليط المجس من (Applied Biosystems) - للبادئ الـ 18S rRNA. ويحمل المجس الـ 18S rRNA على الـ VIC فلوري، (انظر: الملاحظة ٦ و ٨).
٤. مياه معقمة عالية الجودة خاصة للأعمال الجزيئية (خالية من الحمض النووي)، أو ماء منزوع الأيونات مزدوج الفلترة- معقم (انظر: الملاحظة ٩).
٥. مجسات وبادئات (الجدول ١) (انظر: الملاحظة ١٠).

٢-٣: الأدوات:

١. صفائح تفاعل الـ qPCR: صفائح تفاعل شفافة مكونة من ٣٨٤ وعاءً (Applied Biosystems) (انظر: الملاحظة ٦ و ١١).
٢. أغشية لاصقة شفافة (مثل: Applied Biosystems).
٣. جهاز طرد مركزي لتدوير الصفائح.

جدول (١): مجسات MGB لأعراض التفاح (AP)-specific، pear decline (PD)، and ، apple proliferation (AP)-specific . European stone fruit yellows (ESFY) -specific amplicons

Name	Orientation	Sequence (5'-3')	Working concentration (μM)
SAD	Forward	TGG TTA GAG CAC ACG CCT GAT	10
SAD	Reverse	TCC ACT GTG CGC CCT TAA TT	10
AP	Probe	FAM-CAA AGT ATT TAT CTT AAG AAA ACA AGC T-NFQ ^a	2.5
ESFY	Probe	FAM-CAA AAT ATT TAT TTT AAA AAA ACA AGC TC-NFQ	2.5
PD	Probe	FAM-AAT ATT TAT TTT AAA AAA AAG CTC TTT G-NFQ	2.5

Primer pairs are identical for all three species-specific assays (SAD) (13)

^aNFQ nonfluorescent MGB quencher

٤. جهاز طرد مركزي دقيق لتدوير الأنابيب.
٥. هزاز.
٦. جهاز PCR لحظي: مثل: ABI PRISM® 7900 HT Sequence Detection System (Applied Biosystems) (انظر: الملاحظة ٦).
٧. برامج (مثل: SDS 2.3، Applied Biosystems) لحساب الامتصاص الفلوري، وحساب عدد الدورات والخط القياسي (دورات قياس الكمية؛ *Cq*) (انظر: الملاحظة ٦).
٨. غرفتا UV (انظر: الملاحظة ١٢ و١٣).
٩. مجموعتان من المصحات.
١٠. أنابيب خالية من الـ DNase، حامل الأنابيب.
١١. فتاحة لأنبوب جهاز الطرد المركزي.
١٢. مصحات (Aerosol-barrier).

٣- طرق العمل:

١-٣: تجهيز الصفيحة:

١. قم بترتيب العينات في صفيحة الاختبار حسب رقم العينة. وبالنسبة لكل مجموعة من البادئات، يضم الـ NTC، NCI والـ PC جزءاً من مجموعة العينات. (انظر: شكل ١) مثالا على توزيع صفيحة الاختبار.

	18S rRNA				AP				9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
	1	2	3	4	5	6	7	8																
A	S1	S1 d	S1	S1 d																				
B	S2	S2 d	S2	S2 d																				
C	S3	S3 d	S3	S3 d																				
D	S4	S4 d	S4	S4 d																				
E	S5	S5 d	S5	S5 d																				
F	S6	S6 d	S6	S6 d																				
G	S7	S7 d	S7	S7 d																				
H	S8	S8 d	S8	S8 d																				
I	S9	S9 d	S9	S9 d																				
J	S10	S10 d	S10	S10 d																				
K	S11	S11 d	S11	S11 d																				
L	S12	S12 d	S12	S12 d																				
M	S13	S13 d	S13	S13 d																				
N	S14	S14 d	S14	S14 d																				
O	NCI	NCI d	NCI	NCI d																				
P	N ₁	N ₂	P	P	N ₁	N ₂	P	P																

شكل (1): مخطط صفيحة الاختبار qPCR لفيتوبلازما AP. ويمثل ترتيب الصفيحة اختبار 14 عينة من أشجار الفاكهة لوجود AP. ومع صفيحة أخرى مشابهة يمكن استخدامها لأجل فيتوبلازما PD وESFY. ويتم اختبار كل العينات مع البادئات المتخصصة، واختبار الشاهد (18S rRNA) بتفاعل qPCR منفصلة. وجميع الاختبارات يتم تكرارها مرتين في الحفرة بتخفيفين (غير مخفف، وعشرة أضعاف) على الصفيحة نفسها 384. SX (X = 1-14) مستخلص DNA للعينات؛ SXd تخفيفات من الحمض النووي المستخلص، NCI عزلة الشاهد السلبي. NCId لتخفيفات عزلة الشاهد السلبية، N 1 شاهدا بدون حمض نووي-يتم إضافة ماء معقم منزوع الأيونات في الصفيحة في بداية العمل (NTC1)؛ N 2 شاهدا بدون حمض نووي-يتم إضافة ماء معقم منزوع الأيونات في صفيحة في نهاية العمل (NTC2)؛ P شاهدا إيجابياً للحمض النووي المستهدف (PC).

2. يتم حساب كمية المواد المكونة المطلوبة للاختبار وفقاً للجدول 2 و 3، وإضافة كمية كافية من المواد لعدد العينات (غير مخففة، ومُخففة عشرة أضعاف)، والشاهد حتى يتم اختبارها في مرتين. ويتم إضافة 10٪ من الكميات تحسباً لأي هدر قد يحدث خلال عملية الممصات، وفي حالة حدوث الأخطاء.

3. أزل كافة مواد الاختبار من الفريزر واطرها حتى تذوب، ثم اخلط كافة المواد الذائبة جيداً بالهزاز، وقلبهم لفترة وجيزة (~5s) في جهاز الطرد المركزي.

جدول (٢): الخليط الرئيسي لـ apple proliferation (AP)-، pear decline (PD)-، and European stone ، fruit yellows (ESFY) -specific amplicons.

Components	Final concentration	Volume per well (μ L)
Sterile nuclease-free water		0.84
2 \times Maxima TM qPCR master mix	1 \times	5.0
Forward primer SAD (10 μ M)	900 nM	0.9
Reverse primer SAD (10 μ M)	900 nM	0.9
Probe (2.5 μ M)	90 nM	0.36
Total volume		8.0

جدول (٣): خليط مواد لـ 18S rRNA.

Components	Final concentration	Volume per well (μ L)
Sterile nuclease-free water		2.5
2 \times TaqMan Universal PCR master mix	1 \times	5.0
Human 18S rRNA (20 \times)	1 \times	0.5
Total volume		8.0

٤. يتم تجهيز خلطتين رئيسيتين للاختبار (18S rRNA، و AP، PD، أو ESFY)، كل منهم في أنبوب منفصل. ولكل خليط، يتم إضافة المواد حسب الترتيب والكمية التي تم حسابها في الخطوة رقم ٢. وبعد إكمال تلك الخطوة، اخلط كافة المواد جيداً بالهزاز، وقلبهم لفترة وجيزة (~5s) في جهاز الطرد المركزي (انظر: الملاحظة ١٤).
٥. يتم أخذ صفيحة qPCR التي تتكون من ٢٨٤ وعاء، ثم يتم ملء الأوعية المناسبة بكمية قدرها ٨ ميكروليترات من الخليط الرئيسي حسب المخطط للصفحة (انظر: الملاحظة ١٥).
٦. يتم إضافة ٢ ميكروليتر من العينة غير المخففة، والعينة المخففة عشرة أضعاف، والـ DNA الشاهد إلى كل وعاء تجريبي. وداًئماً، ابدأ بإضافة الماء الأول للـ NTC (NTCI)، ويتبعه عينات الـ DNA، ثم الشواهد. وانه الخطوة الأخيرة بالماء للـ NTC (NTC2). إن استخدام هذا الترتيب لإضافة الـ DNA يُسهل عملية تحديد أي مصدر من مصادر التلوث المحتملة (انظر: الملاحظة ١٥).
٧. بعد إضافة الـ DNA، يجب تغطية صفيحة الـ qPCR بغطاء لاصق شفاف، وختمها بماسك بلاستيكي (انظر: الملاحظة ١٦).
٨. يتم عمل طرد مركزي للصفحة بسرعة 1، $g \times 000$ في الدقيقة؛ للتأكد من خليط والـ DNA والتفاعل في قاع الأوعية (انظر: الملاحظة ١٧).

٢-٣: تنفيذ تشغيل الـ qPCR:

١. قم بتشغيل جهاز qPCR أولاً، حسب تعليمات الشركة المصنعة لتجهيزه، وتثبيت درجة الحرارة ومصادر الضوء.
٢. يتم نقل صفيحة الـ qPCR إلى جهاز PCR اللحظي، وتشغل الـ qPCR باستخدام برنامج الشامل التالي (راجع الدليل الخاص بالجهاز للحصول على تعليمات معينة، انظر: الملاحظة (١٨):

1 cycle	2 min at 50°C (UNG activation step)
	10 min at 95°C (polymerase activation)
45 cycles	15 s at 95°C (DNA denaturation)
	1 min at 60°C (annealing and extension)

٣-٣: تحليل البيانات:

١. قم بطلب البيانات الأصلية وتحليلها (انظر: الدليل الخاص بالجهاز للحصول على تعليمات مفصلة حول إعداد المستند، والخط الأساسي، وإعدادات الخط الفاصل) (انظر: الملاحظة (١٩)).
٢. يتم تصدير البيانات إلى Microsoft Excel أو برنامج جدولة Spreadsheet مشابه، ومعه الخواص الإحصائية، ثم يتم حساب متوسط القيمة Cq لكل مكرر من العينة. ويجب إعادة التحليل إن تمت ملاحظة وجود فرق شاسع بين المكررات (انظر: الملاحظة (٢٠))، ويتم اعتبار أن متوسط قيمة Cq لكافة العينات الأقل من القيمة الحدية عينة موجبة في ذلك الاختبار (انظر: الملاحظة (٢١)).
٣. إن تم اكتشاف نتيجة الشاهد لعينة نبات سليم موجبة (NCI)، هنا يكون الاشتباه في حدوث تلوث للمواد أو العينات أثناء استخلاص الـ DNA. وبالتالي، لا يمكن الاعتماد على نتائج تحليل العينات، ويكون التحليل غير صحيح ويجب إعادته، بما فيه استخلاص الـ DNA.
٤. لا يجب أن ينتج عن تحليل الـ NTC لأي تجربة من التجارب إشارة qPCR إيجابية. وإن حدث خلاف ذلك، يكون اشتباهاً في حدوث تلوث أثناء تحضير الـ qPCR، ولا يمكن الاعتماد على نتائج تحليل العينة. وبالتالي، ينبغي إعادة تحليل الـ qPCR (انظر: الملاحظة (٢٢)).
٥. يجب تأكيد نتيجة إيجابية لكافة التسلسلات المستهدفة في الشاهد الإيجابي. وإن لم يتم حدوث ذلك في الشاهد الإيجابي، يصبح التحليل غير صحيح، ويجب النظر إلى الأخطاء التي حدثت في اختبار الـ PCR.

٦. يجب أن يكون Cq الحمض النووي DNA المعزول والذي تم قياسه على أساس الشاهد (مثل: الـ 18S rRNA، cox) داخل النطاق المتوقع (انظر: الملاحظة ٢٣). وإن حدث خلاف ذلك، يكون التحليل غير صحيح، ويجب الأخذ في الاعتبار الأخطاء التي حدثت أثناء العملية، أو افتراض وجود مثبطات.
٧. إذا تم الحصول على نتيجة سلبية للعينة التي تظهر عليها الأعراض الاعتيادية للإصابة بالفيتوبلازما، فيجب إعادة اختبار العينة للتحقق من وجود أنواع أخرى من الفيتوبلازما (انظر: الملاحظة ٢٤).

٤- الملاحظات:

١. يجب أن تكون كمية الـ DNA الكلية المضافة إلى الاختبار الـ PCR -بصفة عامة- أقل من 100 ng، ويجب أن تقوم بخلط كافة عينات الـ DNA والمواد الخاصة بتخفيفها جيداً، ومن ثم عمل طرد مركزي لمدة (٥ ثوان تقريباً) قبل استخدامها. وإن تم تخزين العينات وهي مجمدة، فيجب تركها حتى تذاب قبل خلطها.
٢. كل العينات يجب أن تختبر على تخفيفين: إن اختبار سلاسل التخفيف للتحكم في مثبطات الـ PCR يجب التحقق فيه من وجود المثبطات في العينة التي قد تؤثر على كفاءة تضخيم الـ qPCR. وفي حالة عدم وجود أي مثبطات، يكون شكل منحنيات التضخيم مشابهاً للحمض النووي DNA المُخفف عشرة أضعاف وكذا غير المُخفف، ويكون الفرق بين قيم الـ Cq للحمض النووي DNA المُخفف عشرة أضعاف أكبر بقيمة ٣,٣ إضافية من الـ DNA غير المُخفف بكفاءة ١٠٠٪ في عملية التضخيم. وفي حالة التثبيط القوي (على سبيل المثال: قيمة الـ Cq لتخفيف الـ 18S rRNA عشرة أضعاف أقل من القيمة الـ Cq الخاصة بالتحكم الـ 18S rRNA غير المُخفف)، وقد ينتج عن تفاعل الـ qPCR نتائج سلبية خاطئة، ويجب تكرار التحاليل بتخفيف الحمض النووي DNA أكثر، ومع استمرار ظهور المثبط القوي، يجب استخلاص الـ DNA باستخدام طريقة أخرى. وإن لم يتم اكتشاف أي مثبط أثناء استخدام الطريقة لعدد من العينات التي تنتمي إلى النوع نفسه المأخوذ منه العينة، فيمكن استخدام سلسلة تخفيف واحدة للـ DNA، ولكننا في تلك الحالة نقترح اختبار كل عينة بالـ qPCR في ثلاثة مكررات بدلاً من مكررين. وفي كلتا الحالتين، عندما تم شرح خطوات KingFisher لاستخلاص الـ DNA آلياً في الفصل الثاني عشر تم استخدام هذه الكمية، و DNA مُخفف عشرة أضعاف، و DNA غير مُخفف مناسب لإجراء الاختبار.
٣. إن التجربة تصلح - فقط - لأشجار الفاكهة (التفاح، الكمثرى، والفاكهة ذات النواة الحجرية). وعندما تستخدم هذا الاختبار مع عينة أخرى، يجب ضم العينة السليمة والعينة السليمة الأخرى، ويجب استخدام المواد نفسها في التحليل للتحقق من التقاطعات المحتملة

- للبادئ والمجسات مع عينات جديدة، ولإثبات أن الكشف عن الهدف من مواد العينة الجديدة أمر محتمل، على التوالي.
٤. يجب أن يحتوي أي اختبار على الشاهد المعياري (NTC) والشاهد الإيجابي (PC) في كل تشغيلة qPCR. إن الـ NTC يحتوي على كافة المواد المستخدمة لـ qPCR، ولكن يتم إضافة الماء المقطر والمُعقم إلى التفاعل بدلاً من DNA العينة. ويجب استخدام الـ NTC لمادة التضخيم نفسها، كما هو حال العينة في المكررات، واحدة في بداية عمل الممصات (NTC1)، وواحدة في النهاية (NTC2) لكل مادة من مواد التضخيم.
٥. إن الشاهد الإيجابي (PC) يعتبر عينة من العينات التي تحتوي على الـ DNA المُتسلسل المُستهدف. ولجعل التجارب أكثر تشابهاً، نقترح تحضير عدة كميات مقسمة بالتساوي من الشاهد الإيجابي ووضعها في الفريزر؛ بحيث يمكن استخدامها مع كل تحليل، ولمنع تكسير الـ DNA بسبب تكرار عملية التجمد والإذابة.
٦. إن استخدام أسماء المواد الكيميائية والأجهزة لا يعني استبعاد غيرها، وقد تم تقديم هذه المعلومات لتوائم المستخدم، ولا تُشكل أي جانب تسويقي للخدمات أو المنتجات، ويمكن استخدام المنتجات المماثلة إن تم إثبات أنها تؤدي إلى النتائج نفسها.
٧. تمت المقارنة بين مواد الخليط الرئيسي من Applied Biosystems و Fermentas؛ حيث كانت النتائج التي تم الحصول عليها متشابهة، إلى حد كبير.
٨. للتحكم بخطوة استخلاص الـ DNA، يجب أن تشمل التجارب على الشاهد. ويُفضل أن يكون جيناً معروفاً؛ لكي يؤكد نجاح عملية الحمض النووي من نباتات مختلفة، ويجب أن يتواجد الجين بأعداد كبيرة في الجينوم لزيادة دقة التجربة. وفي كلتا الحالتين هنا، يتم استخدام جين 18S rRNA للكشف عن DNA العنب، ويمكن استخدام عينة شاهد أخرى بدلاً من 18S rRNA، مثل: نبات (cytochrome oxidase) (cox) (١٤).
٩. من الضروري استخدام المستوى البيولوجي الجزيئي (الخالي من الحمض النووي) أو الماء المُعقم مزدوج الفلتر ومنزوع الأيونات في كافة الوصفات وخطوات العمل. ويُنصح بعدم استخدام المياه المُعالجة بالـ DEPC؛ لأن الـ pH قليل الحموضة قد يُساعد على تحلل البادئات. وقد تتلوث تجربة الـ PCR بسهولة إذا تم تكرار استخدام زجاجة الماء القديمة. لذلك، قم بتقسيم كمية المياه بالتساوي بين الأنابيب، وبعدها استخدم أنبوباً واحداً لكل تجربة.
١٠. قم بشراء المواد نيوكليوتيدية oligonucleotide من الشركات المصنعة، وتكون على تركيز 25 nmol. وبالنسبة لها تكون كافية؛ حيث لا يتم إزالة أملاحها، ولا تحتاج إلى أي تنقية أخرى. ولا بد من عمل طرد مركزي للمواد النيوكليوتيدية oligonucleotide لفترة وجيزة حتى تكون المكونات في قاع الأنبوب، بعدها، قم بإعادة تعليق المواد النيوكليوتيدية في ١٠٠ ميكرومل من المياه عالية الجودة، ثم يتم تخفيف كل مجموعة من البادئات إلى ١٠ ميكرومل. بعد ذلك، يتم

تحضير كميات مُقسمة بالتساوي من هذه المحاليل الخاصة بأعمال المختبر وتخزينها على درجة حرارة 20°C . وقد تستمر فاعلية مخزون البادئات لما لا يقل عن عامين، إن تم تخزينه بطريقة صحيحة وإخضاعه لعدد قليل من دورات التجميد - والإذابة، وتجنب تكرار دورات التجميد - والإذابة، وقم بتذويب الثلج قبل الاستخدام للحفاظ على حالة المجس، واحفظ المسبار بعيداً عن الضوء (على سبيل المثال: ضع الأنابيب التي تحتوي على المجس في حاويات/ داكنة) لمنع التغير الكيميائي الضوئي للصبغات الفلورية ولمنع عملية التبخر.

١١. يمكنك - في المقابل - استخدام صفائح تفاعل شفاقة مكونة من ٩٦ وعاءً. وفي حالة استخدام تلك الصفائح ٩٦ وعاءً، يجب أن يكون حجم التفاعل الكلي ٢٥ ميكروليترا (٢٠ ميكروليترا من الخليط الرئيسي، و ٥ ميكروليترات من DNA العينة).

١٢. يجب تحضير خلطات التفاعل، وإضافة عينات الـ DNA في غرف UV منفصلة باستخدام أجهزة معملية مُخصصة لهذه العملية (ممصات، ومصات، وأنابيب، وفتاحة أنبوب، وحوامل للأنابيب، ومعطف معمل، وقفازات): أولاً، قم بتحضير خلطات التفاعل، وحملها على صفيحة qPCR (لا يجب إحضار أي DNA سوى المجسات والبادئات). ثانياً، أضف عينات الـ DNA في غرفة UV أخرى، ويجب تنفيذ الخطوتين في مكان منفصل عن الأماكن المستخدمة لطحن العينات واستخلاص الـ DNA.

١٣. يجب اتخاذ الاحتياطات التالية في جميع مراحل إعداد اختبار الـ PCR حتى لا تتلوث العينات والمواد: (١) استخدم مصات مفلترة فقط (aerosol barrier tips)، واستخدام ممصات جديدة لكل خطوة تقطير. (٢) قم بإغلاق أنابيب العينة/ المواد بعد سحب الكمية المطلوبة. (٣) ارتد دائماً القفازات وغيرها من وسائل الحماية، إن توقعت حدوث التلوث. (٤) استخدم الأدوات البلاستيكية النظيفة والمُعقمة فقط. (٥) يجب فتح كافة الأنابيب بفتاحة أنبوب.

١٤. يمكن تحضير تلك الخطوة من البداية، ويمكن وضع الأنابيب في الثلج، أو تخزينها في درجة حرارة 4°C لمدة يوم واحد قبل تحضير صفيحة التفاعل.

١٥. يمكن استخدام نظام مناولة السائل إلى (على سبيل المثال، Multiprobe® II PLUS PerkinElmer، EX)؛ وذلك لإرسال عدد كبير من عينات الحمض النووي والمزج الرئيسي إلى الصفيحة ٣٨٤ وعاءً. وإذا كان العمل يدوياً مع الصفيحة، فابدأ بالمزج الرئيسي وضع المزيج في قاع الوعاء، وتستمر بإضافة عينات من الحمض النووي والشاهد إلى الجدران الجانبية للوعاء. وهذا الأمر يسهل المشاهدة أثناء إضافة العينات. وتجنب لمس المزيج الرئيسي داخل الأنابيب مع طرف الماصة. ومن المستحسن استخدام (multistep pipettors) في هذه الحالة، واستخدام ماصة واحدة لجميع الأوعية لوضع المزيج الرئيسي، و ماصة واحدة للمكررات عند إضافة الحمض النووي للعينة. وفي حالة استخدام آلات معالجة السوائل، يمكن عكس ترتيب pipetting للخليط الرئيسي والحمض النووي؛ حيث يتم وضع الـ DNA لأول مرة (في قاع الوعاء)، ثم يتم

- عمل طرد مركزي لضمان جمع الحمض النووي في القاع، ثم يضاف المزيج الرئيسي دون لمس قاع الأنبوب، ثم يليها ختم الصفيحة، وعمل طرد مركزي.
١٦. لا تلمس الغطاء اللاصق الشفاف بأصابعك.
١٧. بمجرد التجهيز، يجب بدء الاختبار في الحال. وإن كان هذا مستحيلاً، فيجب تخزينها بعيداً عن الضوء على درجة حرارة $2-8^{\circ}\text{C}$ لبضع ساعات حداً أقصى.
١٨. قبل بدء التشغيل: (١) قم بضبط حجم التفاعل، إن كان هناك حاجة لذلك. (٢) قم بتعيين أماكن العينات على الصفيحة. (٣) قم بتعيين مواد الكشف للعينات الخاصة بك (اختر الفلاتر المناسبة حسب المجس المستخدمة في البادئات: الـ FAM لمواد تضخيم الفيتوبلازما، والـ VIC لمادة تضخيم الـ 18S rRNA). ويجب أن يكون معدل انحدار درجة الحرارة مطابقاً للدوائر الحرارية لجهاز Applied Biosystems 7900 thermal cyclers. إن النمط القياسي لمعدلات درجة الحرارة على الـ 7900HT هو: لأعلى من 1.6°C/s ، ولأقل من 1.6°C/s ، ولا تستخدم معدلات انحدار لدرجة الحرارة أسرع من ذلك.
١٩. إن تحويل الإشارة الفلورية إلى بيانات Cq (على سبيل المثال: دورة مستوى الـ Ct، ونقطة اجتياز الـ Cp)، وكذلك الأنظمة المستخدمة لإعداد الخط الأساسي والحدية، تختلف بين نماذج الأجهزة. ويجب الرجوع إلى الدليل المخصص لكل جهاز. وعند تحليل البيانات الأساسية، يجب ضبط مستوى دورة Cq مخطط التضخيم ضمن المرحلة الهندسية (الأسية) للتضخيم، ويُفضل أن يكون في بداية المرحلة الهندسية. ويُمثل في السجل العرض الجزء الخطي من مخطط التضخيم، وهذا الأمر يُعتبر مهماً لإجراء تحليل كمي لأن المرحلة الهندسية تُمثل: نقطة التفاعل التي عندها يكون الـ Cq مرتبطاً كميّاً بكمية قالب الـ PCR الرئيسي. وقد قمنا بتحديد - من خلال التجربة - أنه غالباً ما يكون الخط الرئيسي الآلي ومستوى 0.065 مناسبين عند استخدام الدوائر الحرارية لجهاز Applied Biosystems 7900. وللتحقق من المخططات التي تحتوي على عديد من المكونات لكافة العينات (الأوعية). وفي الأوعية التي تحتوي على عينات إيجابية، يجب أن يزداد الشعاع الفلوري (صبغة الـ FAM في تلك الحالة) مع دورات التفاعل، ولا تعتبر قيمة الـ Cq إيجابية عندما لا يتم ملاحظة زيادة في شعاع فلوري الـ FAM.
٢٠. دائماً من الضروري إجراء مكررتين، أو من الأفضل ثلاثة مكررات من التفاعلات لمواد التخفيف نفسها عند تنفيذ تجربة من تجارب الـ qPCR. وإذا كانت قيم الـ Cq مرتفعة جداً، فمن الضروري استخدام المكررات للتأكد من أن التفاعل يعمل بشكل جيد. وإذا كانت البيانات المأخوذة من التفاعلات المكررة عالية المعنوية، فيجب إعادة التفاعلات، ما لم يكن التغير الكبير في قيم الـ Cq مرتبطاً بالتأثير العشوائي لتوزيع النسخة المُستهدفة في التفاعلات المكررة. ويحدث هذا الأمر عندما يتواجد عدد أقل من عشر نسخ من النسخ المُستهدفة في التفاعل (١٦، ١٧).

٢١. يتم تحديد القيمة الحدية لكل تجربة في عملية التحقق من صلاحية التجربة قبل استخدام التجربة بشكل روتيني. ولا يزال يُنظر إلى قيمة الـ *Cq* الأعلى على أنها النتيجة الإيجابية. ويجب اتباع الإرشادات التالية لتحديد القيمة الحدية أثناء التحقق من صلاحية التجربة، ويجب أن تقوم بتحليل مواد التخفيف المتسلسلة للعينات الإيجابية والسلبية في العينات مختلفة الأنواع. ويجب تحليل ما لا يقل عن خمسة تخفيفات (غالباً التخفيفات مضاعفات العشرات)، وكل منها يحتوي على عينة من العينات في خمس أوعية مُكررة. وبعدها، ابحث عن المجموعة الأخيرة للعينات التي لم يتم بها أي تضخيم لعدد من النسخ المُكررة، وخذ نطاقاً قيم للـ *Cq* الأعلى التي تم ملاحظتها. بعدها، قم بحساب قيمة الـ *Cq* إلى نصف القيمة، وبعدها أضف ٠,٥ إلى تلك القيمة، مع الأخذ بالاعتبار الفرق في المستوى؛ والذي تم اختياره بين كل عملية تشغيل وأخرى. إن تلك القيمة الخاصة بالـ *Cq* هي القيمة الحدية، ويجب تحديدها لكل تجربة من التجارب أثناء التحقق من فاعلية الطريقة. وقد تختلف القيمة الحدية التجربة نفسها من معمل لآخر. ويرجع ذلك، إلى أسباب عديدة (على سبيل المثال: آلة الـ qPCR، وبرنامج المستخدم). لذلك، يجب أن يُعيد كل معمل التحقق من فاعلية القيم الحدية لأي تجربة جديدة قبل تنفيذها.

٢٢. إن حدثت عملية تضخيم للـ NTC، فقد تكون نتيجة لتلوث المواد، أو لتدهور الخليط الرئيسي الأولي، أو يكون ناتج PCR غير محدد. وإن اشتبه في تلوث المواد، فاستخدم كميات جديدة من كافة مواد التفاعل. وفي الحالة الـ 18S rRNA، تكون القيم الـ *Cq* العالية (>36) بالنسبة الـ NTC حالة غير عادية؛ وهي ناتجة عن آثار تضخيم الـ DNA البكتيري. وحتى في الحالات التي تتضخم فيها جميع منتجات التفاعل -بما فيها المنتجات غير المُحددة- في الإشارة الفلورية، وقد يتم النظر إليها على أنها منتجات غير مهمة إن كانت قيم الـ *Cq* بالنسبة للـ NTC، أو الـ NCI أعلى من القيمة الحدية.

٢٣. إن كمية الـ DNA الموجودة التي تم عزلها تؤثر -إلى حد كبير- على اكتشاف مرض اصفرار العنب. ومراقبة قيم الـ *Cq* لمواد الشاهد (مثل: الـ 18S rRNA، *cox*) تسمح بتقدير كلا المتغيرين، وبالتالي تُزيد من الثقة بالنتائج. إن قيم الـ *Cq* للـ 18S rRNA في عملية استخلاص الـ DNA المستخدمة في معملنا بطريقة الـ KingFisher (انظر: الفصل الثاني عشر، Mehle et al. (20)) تختلف عن ١٧ إلى ٢٥ (في حين استخدام الـ *cox*، قيم الـ *Cq* تصل إلى ٢٩). وتُشير قيم الـ *Cq* الأعلى إلى كميات أقل من DNA النبات، ومن المفترض كميات أقل من DNA الفيتوبلازما في العينة. وبالتالي، تعمل على تقليل درجة الثقة بالنتائج. وهذه إشارة إلى أن هذا النوع من العينات يجب إعادة استخلاصه واختباره مرة أخرى. وأحياناً، تُشير القيم الأعلى للـ *Cq* إلى وجود المشطبات في العينة. لذلك، يجب إعادة اختبار العينات ذات التخفيف العالي لـ DNA.

٢٤. إن الـ 'Ca. Phytoplasma mali' مسبب للأمراض على جنس: الـ *Malus* (التفاح)، 'Ca. Phytoplasma pyri' وعلى جنس *Pyrus* (الكمثرى)، و'Ca. Phytoplasma prunorum'، وعلى

جنس *Prunus* (الفاكهة الصلبة) (١). وغالباً، يمكن أن تُصيب النباتات الأخرى غير العائلة، مثل: الـ '*Ca. Phytoplasma mali*' الموجودة في الفاكهة الصلبة، وفي الكمثرى الأوروبية والآسيوية (*Py. Pyrifolia Py. Communis*) (١، ١٩-٢١). لذلك، من الجدير عمل اختبار إضافي، لتجربة الفيتوبلازما بصفة عامة (مثل: التجارب التي تم وصفها في الفصل الواحد والعشرون، Christensen et al. (٢٢)، للقيام بعملية التشخيص، ولإثبات وجود الفيتوبلازما و/أو لاكتشاف أنواع أخرى غير مُحددة للفيتوبلازما. وفي معملنا، نقوم بإجراء ثلاث تجارب في الوقت نفسه. ويتم اختبار كل عينة بالتجارب التالية: مجموعة مُعينة من مجس/بادئات الـ AP، ESFY، أو PD، والبادئ العام UniRNA لتضخيم الفيتوبلازما (٢٣)، وبادئ 18S rRNA شاهداً على جودة استخلاص الـ DNA. وفي الحالات التي يعطي بها البادئ العام نتيجة إيجابية ويعطي البادئ المُخصص نتيجة سلبية، نقوم بإعادة اختبار تلك العينات باستخدام مجموعة أخرى من المجسات/البادئات المُخصصة لأنواع أخرى من الفيتوبلازما.

المراجع:

1. Seemüller E, Schneider B (2004) '*Candidatus Phytoplasma mali*', '*Candidatus Phytoplasma pyri*' and '*Candidatus Phytoplasma prunorum*', the causal agents of apple proliferation, pear decline and European stone fruit yellows, respectively. *Int J Syst Evol Microbiol* 54:1217-1226
2. EPPO (2011) EPPO A2 List of pests recommended for regulation as quarantine pests. <http://www.eppo.org/QUARANTINE/listA2.html>. Last Accessed 10 June 2011
3. Torres E et al (2005) Real-time PCR for simultaneous and quantitative detection of quarantine phytoplasmas from apple proliferation (16SrX) group. *Mol Cell Probes* 19:334-340
4. Jarausch W et al (2004) Establishment of a quantitative real-time PCR assay for the quantification of apple proliferation phytoplasmas in plants and insects. *Acta Hort* 657:415-420
5. Galetto L, Bosco D, Marzachi C (2005) Universal and group-specific real-time PCR diagnosis of flavescence dorée (16Sr-V), bois noir (16Sr-XII) and apple proliferation (16Sr-X) phytoplasmas from field-collected plant hosts and insect vectors. *Ann Appl Biol* 147:191-201
6. Yvon M et al (2009) Specific detection and quantification of the phytopathogenic agent '*Candidatus Phytoplasma prunorum*'. *Mol Cell Probes* 23:227-234
7. Pignatta D et al (2008) A real-time PCR assay for the detection of European stone fruit yellows phytoplasma (ESFY) in plant propagation material. *Acta Hort* 781:499-504
8. Babini AR et al (2008) Investigations with realtime PCR assay on the transmissibility of pear decline phytoplasma (PDP) with dormant buds. *Acta Hort* 781:495-498
9. Baric S, Dalla VJ (2004) A new approach to apple proliferation detection: a highly sensitive real-time PCR assay. *J Microbiol Meth* 57:135-145

10. Kutuyavin IV et al (2000) 3 ϕ -Minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures. Nucl Acids Res 28:655–661
11. Yao Y, Nellåker C, Karlsson H (2006) Evaluation of minor groove binding probe and Taqman probe PCR assays: Influence of mismatches and template complexity on quantification. Mol Cell Probes 20:311–316
12. Aldaghi M et al (2007) Development of a new probe for specific and sensitive detection of ‘*Candidatus Phytoplasma mali*’ in inoculated apple trees. Ann Appl Biol 151:251–258
12. Nikolić P et al (2010) A panel of real-time PCR assays for specific detection of three phytoplasmas from the apple proliferation group. Mol Cell Probes 24:303–309
13. Weller SA et al (2000) Detection of *Ralstonia solanacearum* strains with a quantitative, multiplex, real-time, fluorogenic PCR (TaqMan) assay. Appl Environ Microbiol 66:2853–2858
14. Bustin SA et al (2009) The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. Clin Chem 55:611–622
15. Morrison TB, Weis JJ, Wittwer CT (1998) Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. Biotechniques 24:954–962
16. Ellison SLR et al (2006) Routes to improving the reliability of low level DNA analysis using real-time PCR. BMC Biotechnol 6:33
17. Mehle N, Nikolić P, Rupar M, Boben J, Ravnikar M, Dermastia M (2012) Automated DNA extraction for large numbers of plant samples. In: Dickinson M, Hodgetts J (eds) Methods in molecular biology. Springer, New York
18. Lee I-M et al (1995) Detection of multiple phytoplasmas in perennial fruit trees with decline symptoms in Italy. Phytopathology 85:728–735
19. Del Serrone P et al (1998) Occurrence of apple proliferation and pear decline phytoplasmas in diseased pear trees in Hungary. J Plant Pathol 80:53–58
20. Mehle N et al (2007) First report of ‘*Candidatus Phytoplasma mali*’ in *Prunus avium*, *P. armeniaca* and *P. domestica*. Plant Pathol 56:721
21. Christensen NM, Nyskjold H, Nicolaisen M (2012) Real-time PCR for universal phytoplasma detection and quantification. In: Dickinson M, Hodgetts J (eds) Methods in molecular biology. Springer, New York
22. Hren M et al (2007) Real-time PCR detection systems for Flavescence dorée and Bois noir phytoplasmas in grapevine: comparison with conventional PCR detection and application in diagnostics. Plant Pathol 56:785–796

تفاعل الـ PCR للنسخ العكسي للكشف عن الفيتوبلازما باستخدام مستخلصات العصير الخام

Paolo Margaria and Sabrina Palmano

الملخص:

إن الفيتوبلازما يتم الكشف عنها بشكل روتيني بالتقنيات التي تقوم على الحمض النووي. وتعتمد هذه الطرق على استخلاص الحمض النووي DNA للفيتوبلازما بجودة عالية، ويتبعها عديد من طرق التنقية التي تأخذ وقتاً طويلاً وكثيراً من العمل. وفي هذا الفصل، نقوم بوصف طريقة سريعة جداً، ومحددة، ودقيقة، ومعتمدة للكشف عن فيتوبلازما *flavescence dorée*، وفقاً لتفاعل الـ PCR للنسخ العكسي Taqman® اللحظي للـ 16S rRNA. وتعتبر هذه الطريقة مفيدة -بشكل خاص- لفحص المزارع الكبيرة، مثل: مزارع العنب vineyards، والمشاتل، وحصر مسببات الأمراض، والدراسات الميدانية الوبائية.

الكلمات المفتاحية: العصارة الخام، العنب، تفاعل الـ PCR للنسخ العكسي TaqMan® اللحظي، الريبوسوم RNA.

١- المقدمة:

إن استخدام تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) لتضخيم DNA الفيتوبلازما أداة أساسية في وصف وتصنيف، والكشف عن مسببات الأمراض التي لا يمكن زراعتها. ويُعتبر جين الـ 16S rRNA هو الهدف الرئيسي لتصميم مجموعة محددة أو عامة من البادئات، بالرغم من استخدام جينات أخرى بنجاح للفرض نفسه (١). وبسبب تركيز الفيتوبلازما المنخفض وتوزيعها غير المتساوي في العائل النباتي (٢)، غالباً ما يكون تفاعل الـ PCR المتداخل (٢-٥) ضرورياً لزيادة الدقة. وقد أصبحت الاختبارات التشخيصية التي تقوم على تفاعل الـ PCR اللحظي رائجة (٦)، حيث أنها تصل إلى مستويات عالية من الدقة، وتقلل من مخاطر التلوث التي تُميز تجارب الـ PCR المتداخل ولا تحتاج

إلى تحليل بواسطة الجل. إن محدودية طرق الكشف عن الفيوتوبلازما لا تقتصر بالضرورة على درجة الدقة ولكنها تعتمد نقاوة استخلاص DNA وهذا يتطلب إلى وقت طويل ومكلف في الوقت نفسه، مما يجعل الطرق السابقة غير مناسبة للكشف عن الفيوتوبلازما في الإعداد الكبيرة. ونقوم في هذا الفصل بوصف تجربة سريعة، مُعتمدة، ودقيقة تقوم على عملية بسيطة لطحن جميع الأنسجة تتجنب استخدام المواد الخطيرة التي تُستخدم - عادة - في عمليات استخلاص الـ DNA، ويليها تفاعل الـ PCR للنسخ العكسي (reverse transcription RT). إن التجارب القائمة على تفاعل الـ PCR يمكن أن تستهدف إما الـ DNA أو الـ RNA. ولأن الترنسكربت يتوهم يعتمد على الحالة -على سبيل المثال-، التي يتغير معها محتوى الـ mRNA مع الفسيولوجي أو التطور، فيجب أن يتم التركيز في اختيار هدف الـ RT-PCR على الجين الظاهر بشكل أساسي أو، كما في طريقة العمل المُصوف، على الجين الريبوسومي. تتمتع عملية استهداف الـ 16S rRNA بميزة إضافية وهي أن أعداد الـ rRNA عالية وموجود في الخلية الحية، وفي المقابل فإن نسختي جين الـ 16S rRNA الموجودتين في جينوم الفيوتوبلازما (V) أدتا إلى زيادة كمية القالب الرئيسي للتضخيم. وقد تم إجراء مقارنة بين الطريقة التشخيصية التي تستخدم تفاعل الـ PCR المتداخل (مع تحضير الفيوتوبلازما الغنية بالـ DNA) وبين الـ RT-PCR (باستخدام العصارة الخام) وقد أظهرت التحاليل الإحصائية توافقاً بين نتائج المجموعتين (8). وفضلاً عن هذا، إن الـ RT-PCR مع نظام TaqMan[®] اللحظي يعمل على زيادة دقة التجربة بشكل ملحوظ (9). وقد تم تطبيق Real-time TaqMan[®] RT-PCR للحظي للكشف عن الـ (FD) *flavescence doree*، وهو مرض من الأمراض الخطيرة التي قد تُصيب مزارع العنب، ومرتبطة بفيوتوبلازما مجموعة 16SrV، وقد تم تقديمه في الآونة الأخيرة بـ '*Candidatus Phytoplasma vitis*' (10). وهو خاضع لقيود الحجر الزراعي الأوروبي. وتُعد هذه طريقة الكشف المتخصصة، وكذلك واسعة النطاق مهمة بشكل خاص لإجراء حصر ميداني، ولوقاية النباتات في المشاتل وهي مهمة في وضع الخطط الاستراتيجية في الحد من انتشار المرض ورصده. وأيضاً، يمكن استخدام الطريقة الموصوفة في هذا الفصل مع الطرق الخاصة بالكشف عن مسببات مرض مزارع العنب، مثل: الكشف عن فيروسات الـ RNA، باستخدام المادة الخام نفسها مثل: القالب في تفاعل التضخيم (9، 11-13). وتم تلخيص المزايا الكلية للـ RT-PCR اللحظي مقارنةً بتفاعل الـ PCR الداخل في الجدول (1).

٢- المواد:

قم بتحضير كافة المحاليل باستخدام ماء نقي عالي الجودة (مُعد من خلال تنقية المياه منزوعة الأيونات للوصول إلى دقة 18 MΩ cm عند درجة حرارة 25°C).

جدول (١): مقارنة بين طريقتي PCR المتداخل و RT-PCR اللحظي في الكشف عن فيتوبلازما *flavescence doree* على عينات عنب.

Execution time	2 days	3-4 h
No. of samples processed/day	<i>n</i>	4 <i>n</i>
Technical difficulty	Medium	Easy
Hazardous chemicals	Chloroform, phenol, β -mercaptoethanol, ethidium bromide, or other DNA stain for electrophoresis	None
Cost	Medium	Medium
Sensitivity	Very high	Very high
Multiple pathogen detection	Phytoplasmas	Viruses, phytoplasmas

١-٢: تحضير العينة:

١. محلول منظم كربونات الصوديوم: 15 mM من كربونات الصوديوم (Na_2CO_3)، 34.9 mM من كربونات هيدروجين الصوديوم (NaHCO_3)، درجة حموضة 9.6 pH، قم بوزن 1.09 جم من الـ Na_2CO_3 ، 2.93 جم من الـ NaHCO_3 وانقلهما إلى كأس زجاجي 1 لتر. وأضف 800 مل من الماء، واخلطهم، واضبط درجة الحموضة pH مع الـ HCl (انظر: الملاحظة ١). وانقل المحلول إلى زجاجة مقاس 1 لتر، وأضف الماء إلى حتى تصبح الكمية النهائية 1 لتر، ثم يتم تعقيمها، وتخزينها على درجة حرارة الغرفة.
٢. محلول منظم للطحن: ٢٪ بولي فينيل بيروليدون (polyvinylpyrrolidone) مول ووزنة 40,000 (PVP40)، ٢٪ البيومين مصل بقرى (bovine serum albumin BSA)، بيروكبريتيت الصوديوم (sodium metabisulphite) ١٪ ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$)، ٢٠ توين (Tween 20) ٠.٠٥٪ في محلول منظم كربونات الصوديوم (انظر: الملاحظة ٢).
٣. محلول منظم GES: 100mM جلسرين، 50 mM من الـ NaCl، 1 mM من الـ EDTA، 0.5% Triton X-100، درجة حموضة 9.0 pH. قم بوزن 1.50 جم من الجلسرين، انقله إلى كوب زجاجي حجم 500 مل، وأضف حوالي 100 مل من الماء. اضبط درجة الحموضة pH لتصل إلى 9.0 بواسطة الـ NaOH. أضف 0.58 جم من الـ NaCl و 0.07 جم من الـ EDTA. وانقلهم إلى دورق زجاجي وأضف الماء إلى الكمية النهائية 200 مل. عقمها بجهاز التعقيم (انظر: الملاحظة ٣) وبعدها يتم رجها وأضف 1 مل من الـ Triton X-100. وخذنها على درجة حرارة الغرفة.
٤. أكياس بلاستيك خاصة للاستخلاص من BIOROEBA، 12x14 cm (BIOREBA)، الكتالوج رقم (٤٣٠١٠٠).
٥. وعاء ثلج.

٢-٢: الـ RT-PCR اللحظي:

- خزن كافة المواد على درجة حرارة -20°C ، إن لم يُذكر خلاف ذلك.
١. محلول مُنظم A (Applied Biosystems) (انظر: الملاحظة ٤).
 ٢. dNTPs: حضر خلطة تحتوي على 2 mM من كل نوكليوتيديا.
 ٣. MgCl_2 : محلول 25 mM.
 ٤. مجس $\text{TaqMan}^{\text{®}}$: 3'-TTTCGGTATGTAAAGTTCT-5' مُعلم بال FAM-6 (فلوريسين الكريوكسيل-6 fluorescein 6-carboxy) في نهاية 5'، ومع الـ TAMRA (tetramethylrhodamin) في نهاية 3'. قم بتحضير ١٠ ميكرومل من الكمية لمحلول في مياه مُقطرة ومُعقمة.
 ٥. البادئ الأمامي FD-395F: 3'-GCCGCGTGAACGATGAA-5'، في محلول ١٠ ميكرومل في ماء مُقطر ومُعقم.
 ٦. البادئ العكسي FD-480R: 3'-GAATAACGTCAAGATAGTTTTTCCACT-5'، في محلول ١٠ ميكرومل في ماء مُقطر ومُعقم.
 ٧. النسخ العكسي لفيروس (Murine leukemia virus (MuLV)، 50 U / ميكروليتر.
 ٨. مثبط RNase، 20 U / ميكروليتر.
 ٩. إنزيمات 5 U AmpliTaq Gold / ميكروليتر (Applied Biosystems).
 ١٠. ماء نقي عال الجودة مُعقم، مخزن على درجة حرارة الغرفة.
 ١١. صفائح تفاعل من نوع MicroAmp Fast مكونة من ٩٦ وعاء شفافة سريعة (Applied Biosystems، كتالوج رقم ٤٣٤٦٩٠٦).
 ١٢. فيلم لاصق شفاف MicroAmp (Applied Biosystems، كتالوج رقم ٤٣١١٩٧١).
 ١٣. نظام PCR لحظي من نوع (Applied Biosystems) StepOnePlus أو جهاز أخرى لتفاعل PCR اللحظي.

٣- طرق العمل:

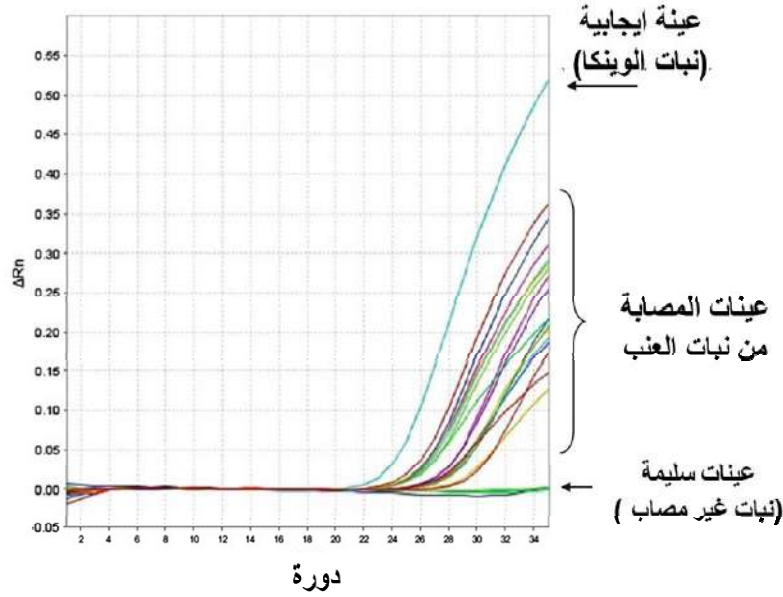
١-٣: تحضير العينة:

- يتم تنفيذ الخطوات التالية على درجة حرارة الغرفة.
١. قم بتحضير محلول مُنظم الحديث لكل خطوة (انظر: الملاحظة ٥).
 ٢. اغسل عينات أوراق العنب بماء ونشفاها بمناديل ورقية (انظر: الملاحظة ٦).

٣. قم بتعين جزء من الورقة من المناطق التي تظهر بها الأعراض ومن المنطقة القاعدية بجانب العنق الورقة. وفي حالة النباتات التكاثر يوجد بها عدد قليل من الأوراق، يتم أخذ عينات من الأنسجة تحت الغلاف (انظر: الملاحظة ٧). حجم العينة التي تحتوي على إجمالي 1-0.3 g كاف ولكن تعتمد على حالة وجودة النسيج المتوفر. يتم وضع كل عينة في كيس من أكياس (انظر: الملاحظة ٨).
٤. يضاف محلول منظم الطحن إلى كل كيس، باستخدام ١٠ مل لكل 0.5 g جرام من العينة.
٥. قم بطحن العينات النباتية بجهاز ضغط أو rolling ball (انظر: الملاحظة ٩).
٦. أضف باستخدام ممصات ١٠٠ ميكروليتر من المحلول المنظم GES إلى أنابيب PCR ٠,٢ مل. اخلط العصير داخل كيس الاستخلاص ثم اسحب ٨ ميكروليتر من العصير الخام بالتساوي في المحلول المنظم GES (انظر: الملاحظة ١٠ و ١١). واخلطهم مع تحريكهم باليد. وسخنهم عند درجة حرارة 95°C لمدة 10 min في الجهاز الحراري (انظر: الملاحظة ١٢). على الفور برد الأنابيب في الحال في خلطة ثلج وماء (انظر: الملاحظة ١٣).

٣-٢: تفاعل TaqMan RT-PCR اللحظي:

١. يتم تحضير خلطة الـ PCR بإضافة ١٠,١٧ ميكروليتر ماء، ٢,٥ ميكروليتر من المحلول المنظم A، ٢,٥ ميكروليتر من الـ dNTPs، ٥,٥ ميكروليتر من الـ MgCl₂، ٠,٥ ميكروليتر من مجس TaqMan[®]، ٠,٧٥ ميكروليتر من البادئ الأمامي، ٠,٧٥ ميكروليتر من البادئ العكسي، ٠,١ ميكروليتر من الـ MuLV، ٠,١ ميكروليتر من مثبط الـ RNase، ٠,١٢٥ ميكروليتر من AmpliTaq Gold لكل عينة (انظر: الملاحظة ١٤). اخلط وقسم كمية ٢٣ ميكروليتر إلى كل وعاء في صفيحة الـ PCR.
٢. ثم أضف ٢ ميكروليتر من العصير الخام إلى كل وعاء (انظر: الملاحظة ١٥). غط الصفيحة بالفيلم اللاصق.
٣. يتم ضبط البرنامج المستخدم بالجهاز على الإرسال والمبرد (reporter and quencher) في البرنامج إلى لحظي بحيث يكون FAM وTAMRA، على التوالي.
٤. قم بضبط دورات التضخيم كما يلي: 25°C لمدة 30 min (النسخ العكسي)، 95°C لمدة 10 min (AmpliTaq) و 35 دورة تضخيم، مكونة من 15 s عند درجة حرارة 95°C ودقيقة واحدة عند درجة حرارة 58°C. ويوضح شكل ١ مخططاً تمثيلاً للتضخيم.



شكل (١): تضخيم عينات العنب، ١٥ منها كانت مصابة بفيتوبلازما *flavescence dorée* (FD). تكون دورة العتبة الشاهد الإيجابي من نبات الوينكا المصاب أقل عموماً من تلك الموجودة في عينات العنب المصابة، حيث يكون تركيز الفيتوبلازما منخفضاً في الغالب. تُظهر ΔRn دالة لرقم الدورة، حيث ΔRn هي حجم الإشارة الفلورية الطبيعية الناتجة عن المراسل في كل دورة أثناء تضخيم PCR.

٤- الملاحظات:

١. يجب أن تكون درجة حموضة pH المحلول قريبة جداً من ٩,٦. وإن لزم الأمر قم بضبط درجة الحموضة pH إلى ٩,٦ بإضافة قطرات قليلة من 10% HCl.
٢. تأكد من إذابة الـ PVP40 والـ BSA تماماً، وبعدها أضف Tween 20 فقط بعد إذابة المكونات الأخرى تماماً، وتأكد من عدم وجود رواسب أو كتل.
٣. تجنب إضافة الـ Triton X-100 قبل التعقيم الحراري، لأن المواد في توين تُؤدي إلى غليان المحلول.
٤. لا تستخدم المحلول المنظم Gold، المزود مع إنزيم الـ AmpliTaq من شركة Applied Biosystems. يتوفر المحلول المنظم A فقط مع مجموعة المحلول المنظم A لتفاعل Taqman 1000 (Taqman 1000 Reaction Buffer A Pack) (الكتالوج رقم ٤٣٠٤٤٤١).
٥. يجب تحضير المحلول المنظم للطحن جيداً كل مرة، لأن المكونات تترسب عند تخزينه لأكثر من بضع ساعات.
٦. تُساعد خطوة الغسيل -دائماً- على تقليل مخلفات المعاملات التي يمكن إن تتداخل مع تضخيم الـ PCR.

٧. يُعتبر أخذ عينات من الورقة أمراً بالغاً في الأهمية لأن الفيتوبلازما غير موزعة بالتساوي في العائل. أخطر عينات من أوراق عديدة مختلفة لضمان أخذ عينات تمثيلية لتحديد الحالة الصحية للنبات. تجنب أخذ العينات من الأنسجة المتعفنة أو الميتة.
٨. يعتبر إدراج عينة جديدة من نبات الـ وينكا سليماً ومصاباً في كل اختبار من الاختبارات بفيتوبلازما FD التي يتم حفظها بطريقة سليمة أمراً مهماً، وتستخدم الشاهد السلبي والإيجابي، على التوالي.
٩. يجب توخي الحذر وتجنب قطع الأكياس أثناء طحن العينة.
١٠. خذ ٨ ميكروليتر من الجانب الصافي للكيس، في الجهة المقابلة من المكان والذي يتم وضع عينة الورقة به. وبتلك الطريقة يكون امتصاص أو سحب بقايا الأوراق في المحلول المنظم GES ضئيلة.
١١. تضم عينة تحتوي على محلول منظم GES فقط كخطوة للشاهد السلبي في المحلول المنظم.
١٢. تعتبر خطوة الغليان في المحلول المنظم GES ضرورية حتى ينبعث الـ rRNA وتصبح جاهزة لتفاعل الـ RT.
١٣. إن التبريد السريع بالماء والتلج مهم للحفاظ على الـ rRNA في حالة خطية، ويكون متاحاً لخطوة الـ RT.
١٤. يتم خلط مواد الـ PCR في الهزاز لمدة ٣s قبل استخدامها للتأكد من تجانسها ولتجنب الرواسب. ثم قم بعمل طرد مركزي للإنزيمات لمدة 3 min بأقصى سرعة في جهاز الطرد المركزي. ويمكن تحضير خلطة الـ PCR أثناء خطوة الغليان لتوفير الوقت.
١٥. يجب توخي الحذر عند فتح الأنابيب لتجنب حدوث التلوث.

الشكر والتقدير:

“Studi sui fattori che favoriscono le epidemie di flavescenza dorata in Piemonte e loro superamento”
Paolo Margaria حصلت عليه منه من قبل
مشروع الفرعي C، من منطقة بيمونتي،
إيطاليا (التقرير رقم ١٢٨٥١).

المراجع:

1. Bertaccini A (2007) Phytoplasmas: diversity, taxonomy, and epidemiology. Front Biosci 12: 673–689
2. Firrao G, Garcia-Chapa M, Marzachi C (2007) Phytoplasmas: genetics, diagnosis and relationships with the plant and insect host. Front Biosci 12:1353–1375

3. Lee I-M et al (1994) Use of mycoplasma-like organism (MLO) group-specific oligonucleotide primers for nested-PCR assays to detect mixed-MLO infections in a single host plant. *Phytopathol* 84:559–566
4. Gundersen DE, Lee I-M (1996) Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal primer pairs. *Phytopathol Mediterr* 35:144–151
5. Clair D et al (2003) A multiplex nested-PCR assay for sensitive and simultaneous detection and direct identification of phytoplasma in the Elm yellows group and Stolbur group and its use in survey of grapevine yellows in France. *Vitis* 42:151–157
6. Galetto L, Marzachi C (2010) Real-time PCR diagnosis and quantification of phytoplasmas. In: Weintraub PG, Jones P (eds) *Phytoplasmas: genomes, plant hosts and vectors*. CAB International, Cambridge, pp 1–18
7. Schneider B, Seemüller E (1994) Presence of two sets of ribosomal genes in phytopathogenic mollicutes. *Appl Environ Microbiol* 60:3409–3412
8. Margaria P et al (2007) Detection of Flavescence dorée phytoplasma in grapevine by reverse transcription PCR. *Plant Dis* 91: 1495–1501
9. Margaria P, Turina M, Palmano S (2009) Detection of Flavescence dorée and Bois noir phytoplasmas, Grapevine leafroll associated virus - 1 and - 3 and Grapevine virus A from the same crude extract by reverse transcription RealTime Taqman assays. *Plant Pathol* 58: 838–845
10. The IRPCM Phytoplasma/Spiroplasma Working Team—Phytoplasma taxonomy group (2004) ‘ Candidatus Phytoplasma’, a taxon for the wall-less, non-helical prokaryotes that colonize plant phloem and insects. *Int J Syst Evol Microbiol* 54:1243–1255
11. Osman F, Rowhani A (2006) Application of a spotting sample preparation technique for the detection of pathogens in woody plants by RT-PCR and real-time PCR (TaqMan). *J Virol Methods* 133:130–136
12. Osman F et al (2007) Real-time RT-PCR (TaqMan®) assays for the detection of Grapevine Leafroll associated viruses 1–5 and 9. *J Virol Methods* 141:22–29
13. Osman F, Rowhani A (2008) Real-time RT-PCR (TaqMan®) assays for the detection of viruses associated with Rugose wood complex of grapevine. *J Virol Methods* 154: 69–75

التشخيص الحلقي باستخدام التضخيم المتساوي الحرارة الحلقي

Jenny Tomlinson

الملخص:

إن التضخيم الحلقي متساوي الحرارة (Loop-mediated isothermal amplification LAMP) هو أحد طرق التضخيم والكشف عن الكائنات الحية المُستهدفة، ولا يحتاج إلى الدورات الحرارية، بخلاف تفاعل البلمرة المتسلسل. ويمكن تطوير اختبارات الـ LAMP في المختبر ليتم استخدامه لاحقاً في الحقول، حيث إن بساطة التضخيم -والذي يتم تنفيذه بالحرارة الثابتة- يجعل من الـ LAMP طريقة جيدة للكشف السريع عن الفيتوبلازما بمستويات من الدقة والتخصصية عن الطرق الأخرى المعقدة والطويلة التي يتم إجراؤها في المعمل.

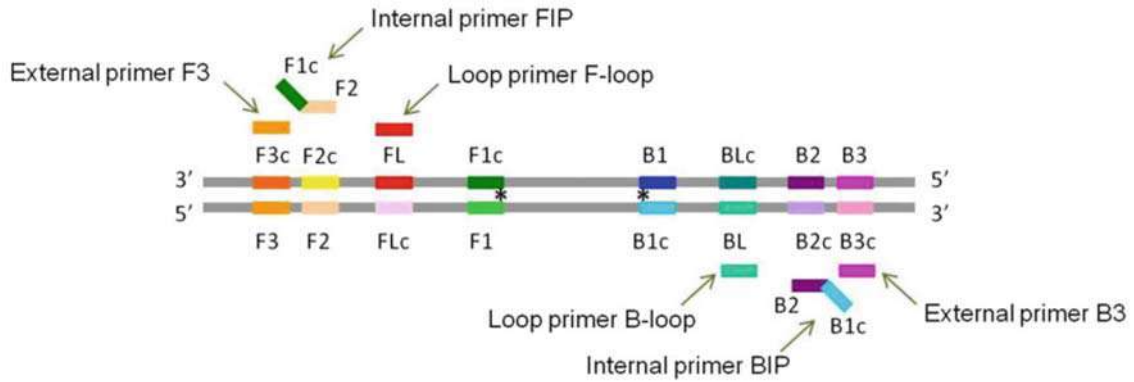
الكلمات المفتاحية: الكشف، الاختبار الحلقي، التكبير الحلقي بالحرارة الثابتة، تفاعل البلمرة المتسلسل، تصميم البادئات.

١- المقدمة:

إن طرق الكشف عن الفيتوبلازما (والأمراض الأخرى) التي تقوم على تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) تكون لها مميزات، مثل: الدقة، والتخصصية، مقارنةً بطرق الكشف التقليدية. وبرغم أن الأدوات المطلوبة والتجهيزات مكلفة ومعقدة، فإنه يمكن تهيئة تفاعل الـ PCR اللحظي لإجراء التجارب الآلية أو شبه الآلية عالية الإنتاج، وهذا يعمل باستخدام أجهزة مُعقدة لتفاعل الـ PCR اللحظي على زيادة الحاجة لمراقبة الإشارات الفلورية مع دورات حرارية. وبالتالي، يقتصر الاستخدام الروتيني للـ PCR والـ PCR اللحظي على المعامل المُجهزة تجهيزاً جيداً بسبب تلك العوامل. وقد تم تطوير طرق التضخيم متساوية الحرارة بديلاً للـ PCR؛ حيث يمكن إجراؤها بدون أجهزة التدوير الحراري. ويُعد التضخيم الحلقي المتساوي الحرارة (LAMP) إحدى الطرق التي من خلالها يمكن تضخيم منطقة معينة من الـ DNA أثناء التحضين بدرجة حرارة واحدة (١، ٢). وتستخدم الـ LAMP إنزيم DNA متنقل ومجموعة من البادئات الداخلية والخارجية، بالإضافة إلى البادئات

"الحلقية"، (٣) (شكل ١) تنتج مواد تضخيم تحتوي على المناطق الحلقية. ويتم استخدام المناطق الحلقية وحيدة الخيط مواقع ربط بادئ؛ مما يسمح باستمرار التضخيم بدون فصل الحرارية للقالب. وبخلاف بعض طرق التضخيم متساوية الحرارة التي يمكنها دعم التضخيم للمناطق القصيرة فقط للحمض النووي المستهدف، يُعتبر الـ LAMP طريقة فعالة لتضخيم الـ DNA، بمواد تضخيم طولها 200-300 bp. ويعمل الـ LAMP على إنتاج مواد تحتوي على تكرار متتالٍ موجه للتسلسل المستهدف؛ والذي يشبه السلم عند تصويره مرئياً بالفصل الكهربائي للجل. وقد تم تطوير تجارب الـ LAMP لمجموعة من مسببات المرضية النباتية (٤) تحتوي على أنواع عديدة من الفيتوبلازما (٥-٩) (انظر: الملاحظة ١).

ويوضح هذا الفصل طريقة اختبار الـ LAMP للكشف عن الفيتوبلازما، وطريقة تهيئة تجارب الـ LAMP التي تم تطويرها للمعامل للاستخدام الميداني.



شكل (١): تنظيم البادئات المستخدمة في التضخيم المتساوي الحلقي (LAMP) والبادئات الداخلية FIP و BIP؛ كل هدف محدد يرتبط به بادئان (F1 و F2 و B1 و B2، على التوالي). ♦ تشير إلى المواضع التي لا يتم فيها تلاقي المنطقة المستهدفة/ وغير المستهدفة.

٢- المواد:

١. بادئات LAMP (انظر: الملاحظة ٢-٥، وشكل ١)، ويجب أن تُنقى البادئات الداخلية FIP والـ BIP بالـ HPLC.
٢. إنزيم *Bst* DNA (New England Biolabs).
٣. 50 mM : MgSO₄.
٤. بيتان (Betaine) : 5 M.
٥. خلطة dNTP: كل منها 10mM.
٦. ماء نقي عالي الجودة صالح للاستعمال مع مواد بيولوجية الجزيئية.
٧. أنابيب Eppendorf 1,5 مل (أو ما يشابهها).

٨. هزاز للخلط.
٩. أنابيب تفاعل ٠,٢ مل (أو ما يشابهها).
١٠. Heated block أو حمام مائي.
١١. DNA مُستخلص من العينة (انظر: الملاحظة ٦).
١٢. ممصات، وممصات مفلترة (انظر: الملاحظة ٧).
١٣. آجاروز.
١٤. 1× TBE : 89 mM Tris base ، وحمض البوريك 89 mM ، 2 mM EDTA.
١٥. بروميد الأيثيديوم (١٠ ميكروجرام / ميكروليتر). وهي مادة معروفة بخطورتها؛ لذا يجب ارتداء قفازات عند التعامل معها، والتخلص منها بحرص.
١٦. وعاء صب جل ومشط.
١٧. خزان الجل، وجهاز شحن power pack.
١٨. محلول منظم تحميل الجل 6× وسلم DNA (أي شركة مُصنعة). إن الحجم الصحيح للأشرطة في السلم ليس بالأمر المهم؛ لأن منتجات الـ LAMP تحتوي على جزيئات أحجمها مختلفة.
١٩. جهاز تصوير للأشعة فوق البنفسجية UV transilluminator.

٣- طرق العمل:

٣-١: تفاعلات الـ LAMP:

- قم بتحضير التفاعلات باستخدام ممصات خاصة، ويفضل أن تكون في منطقة مخصصة لتحضير التفاعلات، لتجنب تلوث المواد (انظر: الملاحظة ٧).
١. أعد الخلطة الرئيسية لكافة التفاعلات التي سيتم إجراؤها؛ بالإضافة إلى تفاعلين إضافيين على الأقل. أضف المكونات الموضحة في الجدول (١) إلى أنبوب ١,٥ مل، ويجب تعديل تركيز البيتين والـ $MgSO_4$ حسب الاختبارات المعدة لها (انظر: الملاحظة ٨).
 ٢. استخدم جهاز الهزاز لمزجهم، ومن ثم وزع كميات مُقسمة بالتساوي ٢٤ ميكروليتر في أنابيب التفاعل 0.2 مل، وأضف ١ ميكروليتر من الـ DNA لكل تفاعل.
 ٣. يجب تكرار التفاعلات، وضم التفاعلات التي تحتوي على الماء بدلاً من الـ DNA شاهداً سلبياً في كل دورة.
 ٤. ضع أنابيب التفاعل في جهاز التسخين heated block، أو في حمام مائي عند درجة حرارة 65°C لمدة 60 min (انظر: الملاحظة ٩).
 ٥. يمكن إنهاء التفاعل بتسخينه إلى درجة حرارة 80°C لمدة 5-10 min لفصل البوليميريز. (انظر: الملاحظة ١٠، للاطلاع على مناقشة المواد البديلة).

جدول (١): المواد المستخدمة في تفاعل التضخيم الحلقي متساوي الحرارة (LAMP)

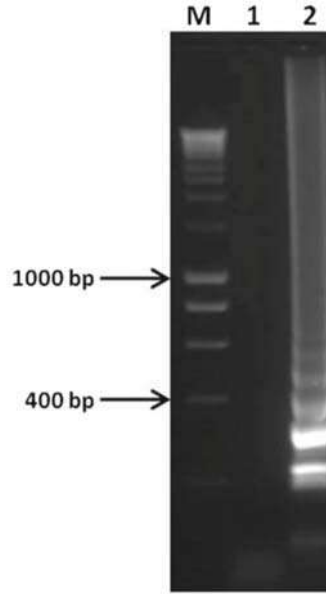
Reagent	Starting concentration	Volume per reaction (μL)	Final concentration
Thermopol buffer ^a	10×	2.5	1×
MgSO ₄ ^a	50 mM	0-4	2-10 mM
dNTP mix	10 mM each	3.5	1.4 mM
Primer F3	10 μM	0.5	200 nM
Primer B3	10 μM	0.5	200 nM
Primer FIP	100 μM	0.5	2 μM
Primer BIP	100 μM	0.5	2 μM
Primer F-loop	100 μM	0.25	1 μM
Primer B-loop	100 μM	0.25	1 μM
Betaine	5 M	3-7	0.6-1.4 M
<i>Bst</i> polymerase	8 units/ μL	1	0.32 units/ μL
Molecular biology grade water		To give a final reaction volume of 24 μL	

^a10× thermopol buffer contains 20 mM MgSO₄

٢-٣: تحليل منتجات تفاعل الـ LAMP:

١. يمكن تصوير منتجات الـ LAMP بالفصل الكهربائي للأجاروز جل طريقة كشف بديلة لاستخدامها خارج المعمل. (انظر: الملاحظة ١٠ - ١٢).
٢. لتحضير جل ١٠٠ مل، اخلط ١,٢ جم من الأجاروز مع TBE 1× ١٠٠ مل، ثم ضعهم في المايكرويف لمدة ٦٠s-٩٠s لإذابة الأجاروز.
٣. عندما يبرد وتصل درجة حرارته إلى 60°C <، أضف ٥ ميكروليترات تقريباً من بروميد الأيثيديوم؛ لإعطاء تركيز نهائي نسبته ٠,٥ ميكروجرام/ مل.
٤. يتم تهيئة خزان الأجاروز، ثم يُوضع المشط المناسب، ثم يُصب الجل ببطء في الوعاء الخاص. ويترك لمدة ٣٠ min، ثم قم بإزالة المشط، وانقل الجل (وهو في وعاء الصب) إلى خزان الجل.
٥. حمل ٥-١٠ ميكروليترات من كل منتج من منتجات الـ LAMP إلى الجل المخلوط بالمحلول المنظم للتحميل بنسبة ١:٥. وبالإضافة إلى منتجات الـ LAMP، حمل سلم الـ DNA في إحدى الحفر.
٦. وصل خزان الجل بجهاز الشحن power pack، وشغل الجهاز بسرعة ١١٠V تقريباً لمدة 40-60 min.

٧. يتم فحص الجل تحت إضاءة الأشعة فوق البنفسجية UV illumination، مع العلم بأن منتجات الـ LAMP تظهر على شكل يشبه السلم (شكل ٢).



شكل (٢): ظهور واضح لنتائج LAMP على الأجاروز جل، يشبه الأنماط التي بالسلم. *M* حجم السلم. خط رقم ١ تفاعل الشاهد السلبي. خط ٢ التفاعل الإيجابي.

٤- الملاحظات:

١. يمكن استخدام الـ LAMP - أيضاً - للكشف عن الـ RNA، واستخدام إنزيم من إنزيمات النسخ العكسي ثابتة الحرارة، مثل: (Life Technologies) Thermoscript؛ والذي يُمكن من إجراء كل من النسخ العكسي والـ LAMP في الوقت نفسه عند درجة حرارة 65°C تقريباً. وإن للبوليميراز في الخلطة الرئيسية ثابتة الحرارة (Isothermal Master Mix) (انظر: الملاحظة ٩) نشاطاً في النسخ العكسي؛ مما يسمح بتضخيم الـ RNA بدون نسخ عكسي إضافي. وبالنسبة لبعض التجارب، يتم تحسين زمن التفاعل و/أو دقة التجربة من خلال التحضين لفترة قصيرة عند درجة حرارة منخفضة ($50-55^{\circ}\text{C}$ تقريباً) للسماح بنسخ عكسي؛ ليكون أكثر فاعلية قبل رفع درجة الحرارة إلى 65°C لإتمام باقي التفاعل.

٢. تم توضيح إعداد البادئات لتجربة الـ LAMP في الشكل (١). ولاحظ أن البادئات الداخلية FIB وBIP؛ كلٌّ منها يستهدف موقعي ربط بالبادئات (F1c وF2، وB1 وB1c، بالترتيب). إن تصميم البادئات يشبه معايير تصميم الـ PCR؛ وعند تصميم البادئات، يجب الرجوع إلى توافق تسلسلات الأنواع المستهدفة وغير المستهدفة، وإلى الخصائص الفيزيائية للبادئات - ودرجة حرارة الانصهار الخاصة (يتم تحديدها من خلال طول التركيب الأساسي)، والبنية الثانوية يجب

أخذها في الاعتبار. ويجب أن تكون درجة حرارة الصهر (T_m) 60°C تقريباً بالنسبة لـ F3/B3، F2/B2، و F-loop/B-loop و 65°C تقريباً بالنسبة لـ F1/B1، ويجب تجنب مناطق التسلسل التي تحتوي على بنية ثانوية، ويجب اختيار البادئات التي لا تُشكل قطعاً صغيرة أو أنماطاً غير مستهدفة (hairpins or primer dimers) (عمل أنماط أو عمل عديد من الأنماط غير المستهدفة)، وخصوصاً التي تحتوي على النهايات $3'$ البادئات، والتي قد تُشكل آثاراً للتضخيم. ويجب تصميم البادئات لتستهدف التباين الموجود بين الأنواع المُستهدفة وغير المُستهدفة، وحصراً الاختلافات الداخلية المُحددة. وفي الحالات التي لا يمكن بها تجنب التباين الموجود بين التسلسلات المُستهدفة، يمكن إدخال القواعد الصناعية، مثل الأينوسين في البادئات. وبالنسبة للتشخيص العام، يكون مختلف الهدف، فيجب تصميم البادئات لوضع المواد غير المتطابقة المُتحللة بعيداً عن النهايات $3'$ لمواقع ربط البادئات. وبخلاف بادئات الـ PCR، يتم توزيع بادئات الـ LAMP بين كل مواد لتضخيم (200-300 bp)، وهي ميزة يمكنها أن تمنح تجارب الـ LAMP درجة عالية من الدقة. ويجب تصميم البادئات لتبرز حالات عدم التطابق في النهايات $5'$ للبادئات الداخلية FIB والـ BIP. وللحصول على أعلى درجة من الدقة، يجب استخدام النهايات $3'$ لكافة البادئات (F3/B3، FIP/BIP، و F-loop/B-loop) لتستهدف حالات عدم التطابق المميزة إن أمكن. ويمكن إجراء الـ LAMP بدون البادئات الحلقية- أو ببادئ حلقي واحد- إن لم يكن من الممكن تصميم مناطق حلقية كبيرة بما يكفي؛ لاستيعاب البادئات الحلقية (انظر: الملاحظة ٤).

٣. يتم حساب البادئات والتعرف على خصائصها وقيم درجة الحرارة لنوكليوتيد T_m ، وعندما تكون في حالة بنية ثانوية (على سبيل المثال (١٠)). ويمكن الحصول على نتائج يمكن الاعتماد عليها باستخدام قيم T_m التي تم ضبطها بالملح ($(\text{Na}^+) = 50 \text{ mM}$).

٤. يمكن إجراء الـ LAMP ببادئات داخلية وخارجية فقط (١)، ولكن -غالباً- ما يتم تسريع التضخيم بضم البادئات الحلقية (٣)؛ لأن هذا يسمح لكافة الحلقات في منتج التضخيم للعمل بادئ رابط للموقع (يحتوي منتج التضخيم على تكرار التسلسل المُستهدف بطريقة مُتتابة. لذلك، فإن البادئات الداخلية يمكنها ربط نصف الحلقات المتوفرة فقط). وإن حدث قيود على تصميم وخيارات البادئات الحلقية، فيمكن تصميم البادئات بدون الحلقية، أو ببادئ حلقي واحد فقط.

٥. يتم توفير البرامج التالية لتصميم بادئات الـ LAMP: PrimerExplorer (Eiken, Japan) (<http://primerexplorer.jp/e/>)؛ ومصمم الـ LAMP (USA, PREMIER Biosoft).

٦. تعتبر طريقة العمل المذكورة في الجزء السابق مناسبة للاستخدام في تطوير تجارب الـ LAMP في المعمل؛ حيث يمكن اختبار الـ DNA المستخلص بالطريقة التقليدية لتأسيس درجة دقة ونوعية التجربة. إن تجارب الـ LAMP مناسبة أكثر للاستخدام خارج المختبر مقارنةً بالطرق

القائمة على تفاعل PCR ، وتحتاج إلى تعديل بسيط نشرها في هذا المجال. وعادةً تُظهر اختبارات الـ LAMP على درجة من الدقة أعلى من دقة اختبارات الـ PCR التي يمكن مقارنتها بالأهداف نفسها؛ وتتمتع أيضاً الـ LAMP بميزة تتمثل: في تحملها للمواد المثبطة للـ PCR. وبجانب هذا، تسمح هذه المميزات باستخدام طرق استخلاص الـ DNA الخام أكثر من الطرق المعتادة المستخدمة لاختبار الـ PCR. وهناك إحدى طرق إعداد العينات بطريقة الرج في محلول من المحاليل المنظمة؛ كي تمزق العينة بجهاز تدفق جانبي (LFD). وبعدها، يتم فصل جزء من غشاء الـ LFD من على الجهاز، ويُضاف مباشرةً إلى تفاعل الـ (LAMP) (١١). وتشتمل طريقة أخرى بديلة على تحضير عصير الخام في محلول منظم البولي أيثيلين جلايكول (alkaline PEG polyethylene glycol)، وإضافة عينة من العصير مباشرةً إلى أنبوب التفاعل (٦، ١٢). إن هذه الطرق سريعة ولا تحتاج إلى أجهزة معملية؛ مما يجعلها من الطرق المناسبة جداً للاستخدام في الحقول. وتُعتبر من طرق الكشف المناسبة للحالات التي يتم تنفيذها خارج المعمل (انظر: الملاحظة ١١ و١٢)، ويمكن استخدام مواد الـ LAMP السريعة، مع طريقة من طرق استخلاص الـ DNA البسيطة لإيجاد مسارات بسيطة للعمل يمكن لعاملين غير متخصصين في المجال إجراؤها في الحقول.

٧. إن تفاعلات الـ LAMP بسيطة جداً، وتنتج -بشكل أساسي- كميات كبيرة من منتجات التضخيم. ونتيجة لذلك، يجب اتخاذ كل الاحتياطات لتجنب تلوث في العمل والأجهزة العامل؛ لأنه قد ينتج عن التلوث بكميات صغيرة جداً إعطاء نتائج مفاجئة وغير صحيحة. ويجب الفصل بين عملية التضخيم قبل -وبعد- العملية تماماً؛ ويجب تخزين المواد وخلطها في مكان مُخصص، ويجب -أيضاً- استخدام ممصات وخزانات مُخصصة للمياه الحيوية الجزيئية النقية عالية الجودة؛ ويجب وضع كل الممصات والأدوات الأخرى التي تم استخدامها لإجراء معالجة ما بعد التضخيم (مثل: الفصل الكهربائي) بعيداً عن الأدوات النظيفة، وينبغي تقليل عملية فتح أنابيب التفاعل على قدر الإمكان بعد التضخيم. وهناك بعض الطرق الخاصة بالاكشاف والتصوير المرئي لمنتجات الـ LAMP تتطلب فتح أنابيب التفاعل بعد التضخيم، ويجب توخي الحذر الشديد عند استخدام هذه الطرق. وإذا كان إجراء الفصل بين الأدوات المستخدمة في الخطوات التي تسبق وتلي عملية التضخيم أمراً ممكناً، فيمكنك استخدام طريقة مماثلة (باستخدام الأنابيب المغلقة)؛ وذلك للكشف عن التضخيم، وتشتمل على الكشف اللحظي الفلوري وعن العكارة، ويمكن ملاحظتها مباشرة (وهي عبارة عن بيروفوسفات المغنيسيوم مترسب)، والكشف اللوني باستخدام هيدروكسي نفثول أزرق hydroxy naphthol blue (HNB) (انظر: الملاحظة ١٢). وبالنسبة للاختبارات التي يتم إجراؤها في الحقول، فتكون طريقة العمل التي تحتوي على أقل عدد ممكن من الخطوات. لذا، تكون أقل عرضة للتلوث

من الطرق المُعالجة المكونة من عدد أكبر من الخطوات، ويجب تقسيم خلطة التفاعل مُسبقاً بكميات مُساوية في أنابيب تفاعل مُفصلة قبل استخدامها في الحقل.

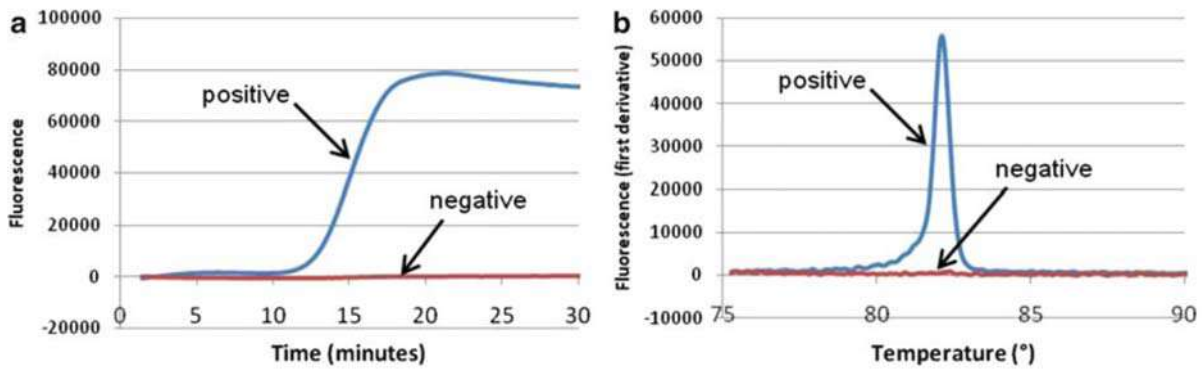
٨. يجب تحسين الاختبارات الجديدة؛ من حيث التركيزات الخاصة بالبيتين والـ $MgSO_4$. ويمكن إجراء اختبار مبدئي للبادئات الجديدة باستخدام الـ $MgSO_4$ في 6mM والبيتين في 1.2 M. قم باختبار سلسلة تخفيف الـ DNA المُستهدف لتأسيس حد للكشف باستخدام تركيبات التفاعل المبدئية. وبعدها، اختبر تركيبات البيتين والـ $MgSO_4$ المختلفة باستخدام أي جانب لتركيزات الـ DNA من حدود الكشف؛ لتحديد التركيبات التي تؤدي إلى زيادة -أو نقص- دقة التجربة، ثم قم باختبار تركيبات الـ $MgSO_4$ بين 4 و 10 mM وتركيزات البيتين بين 0.6 و 1.6 mM. ويمكن -أيضاً- تحسين تركيز المكونات الأخرى (*Bst* بوليميراز، dNTPs، البادئات)، ونسبة تركيز البادئ الحلقي الداخلي والخارجي، ولكن غالباً ما يكون تأثيرهم أقل على تنفيذ التجربة.

٩. باستخدام *Bst* بوليميراز والحالات التي تم شرحها في الجزء السابق، على الأرجح وقت التفاعل -والذي يصل إلى 60 min- كافٍ لمعظم التجارب، بالرغم من أن زيادة الوقت إلى 90 min قد يُحسن قليلاً من الدرجة الدقيقة بالنسبة لبعض الاختبارات. وغالباً، لا تعمل زيادة فترة التحضين لأكثر من 90 min على زيادة درجة الدقة. وفي نهاية الأمر، قد تؤدي إلى إنتاج تضخيم غير مُحددة. ويمكن استخدام درجة حرارة تفاعل $65^{\circ}C$ لمعظم الاختبارات؛ إلا أنه قد يتم تحسين درجة حرارة التفاعل بين 60 و $66^{\circ}C$. وبالنسبة لبعض الاختبارات، قد يزيد ذلك من سرعة التفاعل، أو يؤدي إلى زيادة طفيفة في درجة الدقة.

١٠. اتضح أن معظم طرق الـ LAMP التي تم نشرها -حتى الآن- تستخدم *Bst* بوليميراز. وهناك بديل آخر للـ *Bst* بوليميراز؛ وهي الخلطة الرئيسية مُتساوية الحرارة (UK، Horsham، OptiGene)، والتي تحتوي على بوليميراز ناقل خيطي مُتدرج، وصبغات EvaGreen التي تتغلغل في الاختبار اللحظي وتتراكم بالمنتج التضخيم. وغالباً، تُقدم الخلطة الرئيسية تضخيماً أكثر سرعة (10-30 min تقريباً) من عملية التضخيم التي تم تنفيذها باستخدام الـ *Bst* بوليميراز.

١١. يمكن تنفيذ الـ LAMP اللحظي؛ والذي تستخدم به الصبغات المتغلغلة في المسام بنظام أساسي للـ PCR اللحظي، وغالباً ما تكون تلك التجهيزات متشابهة في التكلفة نسبياً بسبب سرعة سعة دوائرها الحرارية، ويُنسب قليل منها للاستخدام في المواقع خارج المعمل. إن جهاز الـ Genie II (UK، Horsham، OptiGene) نظام أساسي تم تطويره خصيصاً للـ LAMP اللحظي، وحجمه الصغير وسهولة حمله ونقله يجعله مناسباً جداً للاستخدام الميداني. ولأن الكشف اللحظي لا يحتاج إلى إجراء خطوات ما بعد التضخيم، تقل مخاطر انتشار التلوث، إلى حد كبير. وعندما يتم متابعة الكشف اللحظي، يُلاحظ أن الـ LAMP تنتج بيانات التضخيم مشابهة للبيانات التي ينتجها الـ PCR اللحظي (شكل 3a). وبعد التضخيم وباستخدام جهاز الـ Genie II، عادةً يتم

تحليل المنتجات بالرصد الفلوري المتزامن لخطوة الفصل؛ لأن درجة حرارة الفصل/ الصهر لمنتج التضخيم متطابقة ومُميزة لكل اختبار (الرسم 3b). وباستخدام هذا التحليل، يمكن تمييز منتجات تضخيم معينة عن آثار التضخيم غير المحددة. وبالإضافة لذلك، تسمح هذه الطريقة بعمل واختبار وتضخيم منتجين أو ثلاثة من منتجات التضخيم في التفاعل نفسه، إن كان للمنتجات درجة حرارة صهر/فصل مختلفة بما فيه الكفاية. إن القدرة على إذابة عديد من المنتجات قد تسمح باكتشاف كثير من المسببات المرضية في تفاعل واحد من التفاعلات. وفي المقابل، يمكن الجمع بين تجربة خاصة بالمسببات المرضية وبين تجربة الكشف عن الشاهد لدعم تفسير النتائج السلبية.



شكل (٣): شكل يمثل: النتائج النموذجية لاختبار LAMP اللحظي باستخدام رصد الفلورسنت. (a) يظهر التضخيم الذي تم مع الفلورسنت خلال التحضين على درجة الحرارة 65 مئوية. (b) يوضح درجة الحرارة الفصل/الصهر التي يتم فيها تضخيم المنتج ودرجة الحرارة الفصل/الصهر بعد التضخيم.

١٢. يمكن تحليل منتجات الـ LAMP بطريقة تحليل منتجات الـ PCR نفسها بالفصل الكهربائي للجل، أو بعملية رصد الفلوري اللحظي بالصبغة التي تتغلغل في المسام مثل: SYBR Green. وهناك طريقة أخرى بديلة؛ وهي الكشف عن العناصر أثناء التضخيم باستخدام الـ LFDs (١١، ١٣). ويمكن أن تتحد العناصر المعلمة باستخدام النوكليوتيدات معلمة، والبادئات، و/أو المجسات؛ وإن تم دمج عنصرين مختلفين من العناصر المعلمة، فإنه يمكننا الكشف عن منتج التضخيم المزدوج في شكل الـ LFD. ويمكن تطبيق استخدام هذه الطريقة أيضاً في طرق التضخيم الأخرى التي تشتمل على طرق الـ PCR والحرارة الثابتة، مثل: تضخيم البوليميريز المُحفز (RPA)، ولكنها مُفيدة خصوصاً بالنسبة لإذابة منتجات الـ LAMP المخلوطة. وبخلاف الـ PCR، والذي به يمكن فصل المنتجات بالفصل الكهربائي بالجل حسب الحجم، فإن كل منتج من منتجات الـ LAMP يحتوي على جزيئات مختلفة الأحجام (شكل ٢)، وفي الجل

سيكون شكلها يشبه السلم؛ مما يجعل إذابة المنتجات المختلطة أمراً صعباً، ويسمح دمج العناصر المعلمة المختلفة في كل تجربة بإذابة المنتجات المختلطة بعد التضخيم. وغالباً، فإن الكميات الكبيرة من منتجات التضخيم التي تُنتج في تفاعل الـ LAMP تُسهل استخدام الـ LAMP في كثير من طرق الكشف الإضافية التي تُعد غير دقيقة بشكل كافٍ لاستخدامها مع تفاعل الـ PCR، وطرق التضخيم الأخرى التي تنتج كميات أقل من المنتجات. إن بيروفوسفات المغنيسيوم؛ والذي يُنتج منتجاً ثانوياً لنشاط البوليميراز يصل إلى مستويات عالية كافية في تفاعلات الـ LAMP؛ ليسمح بمشاهدته مباشرة راسباً أبيض في التفاعلات الإيجابية، أو يتم قياس تعكسه في نقطة النهاية أو اللحظي باستخدام أي جهاز (١٤)، وبالمثل، يمكن استخدام طرق تغير اللون للتفريق بين التفاعلات الإيجابية والسلبية - على سبيل المثال SYBR Green، أو صبغات مُتغلغلة أخرى مثل: الـ PicoGreen - ويمكن إضافتها في نهاية التفاعل، ويتم ملاحظة تغير اللون من البرتقالي إلى الاصفرار مباشرة (١٦). ويمكن استخدام الـ HNB مؤشراً لتغير اللون (١٧)؛ بخلاف الـ SYBR Green (وهو مثبط لتفاعل الـ LAMP في المستويات اللازمة لتغيير اللون مرئياً)، ويمكن ضم الـ HNB لخلطة التفاعل؛ مما يجعلها طريقة يتم إجراؤها في أنبوب مُغلق؛ إلا أن التغير اللوني الذي يتم تحقيقه باستخدام الـ HNB يكون - عادة - أقل وضوحاً، على خلاف التغير اللوني الذي يتم تحقيقه باستخدام الصبغات المتداخلة.

المراجع:

1. Notomi T et al (2000) Loop-mediated isothermal amplification of DNA. Nucl Acids Res 28:e63
2. Nagamine K et al (2001) Loop-mediated isothermal amplification reaction using a non-denatured template. Clin Chem 47:1742-1743
3. Nagamine K, Hase T, Notomi T (2002) Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. Mol Cell Probes 16:223-229
4. Tomlinson J, Boonham N (2008) Potential of LAMP for detection of plant pathogens. CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources 3, 066, p 1-7
5. Tomlinson JA, Boonham N, Dickinson M (2010) Development and evaluation of a one-hour DNA extraction and loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of phytoplasmas. Plant Pathol 59:465-471
6. Hodgetts J et al (2011) Development of rapid in-field loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assays for phytoplasmas. Bull Insectol 64:S41-S42
7. Bekele B et al (2011) Use of a real-time LAMP isothermal assay for detecting 16SrII and XII phytoplasmas in fruit and weeds of the Ethiopian Rift Valley. Plant Pathol 60:345-355

8. Obura E et al (2011) Detection of hytoplasma by loop-mediated isothermal amplification of DNA (LAMP). J Microbiol Methods 84:312–316
9. Yankey EN et al (2011) Improving molecular diagnostics for the detection of lethal disease phytoplasma of coconut in Ghana. Bull Insectol 64:S47–S48
10. Kibbe WA (2007) OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator. Nucl Acids Res 35:W43–W46
11. Tomlinson JA, Dickinson MJ, Boonham N (2010) Rapid detection of *Phytophthora ramorum* and *P. kernoviae* by two-minute DNA extraction followed by isothermal amplification and amplicon detection by generic lateral flow device. Phytopathology 100:143–149
12. Chomczynski P, Rymaszewski M (2006) Alkaline polyethylene glycol-based method for direct PCR from bacteria, eukaryotic tissue samples, and whole blood. Biotechniques 40:454–458
13. Kiatpathomchai W et al (2008) Shrimp Taura syndrome virus detection by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification combined with a lateral flow dipstick. J Virol Methods 153:214–217
14. Mori Y et al (2004) Real-time turbidimetry of LAMP reaction for quantifying template DNA. J Biochem Biophys Methods 59:145–157
15. Mori Y et al (2001) Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. Biochem Biophys Res Commun 289:150–154
16. Iwamoto T, Sonobe T, Hayashi K (2003) Loop-mediated isothermal amplification for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex, *M. avium*, and *M. intracellulare* in sputum samples. J Clin Microbiol 41:2616–2622
17. Goto M et al (2009) Colorimetric detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by using hydroxy naphthol blue. Biotechniques 46:167–172

ترميز الـ DNA لتحديد الفيتوبلازما

Olga Makarova, Nicoletta Contaldo, Samanta Paltrinieri,
Assunta Bertaccini, Henriette Nyskjold, and Mogens Nicolaisen

ملخص:

قد تم إثبات صعوبة تمييز الفيتوبلازما بسبب عدم القدرة على حفظها في المختبر. إن ترميز الـ DNA هي طريقة تحديد تقوم على مقارنة تسلسل الـ DNA بتسلسلات معروفة من قاعدة البيانات. وقد تم تطوير أداة ترميز الـ DNA لتحديد الفيتوبلازما. وفي حين أنه قد يتم تهيئة طرق أخرى تقوم على التسلسل لتحديد سلالات معينة من الفيتوبلازما، إلا أنه لا يمكن استخدامها لتحديد الفيتوبلازما من مجموعات مختلفة في الوقت نفسه. إن طريقة عمل ترميز الـ DNA الفيتوبلازما -في هذا الفصل- تقوم على جين الـ 16SrRNA والـ tuf، ويمكن استخدامها لتحديد مجموعات الفيتوبلازما التالية: 16SrI، 16SrII، 16SrIII، 16SrIV، 16SrV، 16SrVI، 16SrVII، 16SrIX، 16SrX، 16SrXI، 16SrXII، 16SrXV، 16SrXX، 16SrXXI.

الكلمات المفتاحية: 16S rRNA، ترميز الـ DNA، التعريف، ترميز الحياة للحجر الزراعي، tuf.

١- المقدمة:

إن الفيتوبلازما تُصيب أكثر من ٢٠٠ نوع من النباتات (١). ووفقاً لتسلسل الجين ريبوسومي 16S (16S rRNA)، فقد تم تأسيس أكثر من ٢٠ مجموعة داخل أنواع الفيتوبلازما المرشحة 'Candidatus Phytoplasma' (٢، ٣). وتقوم سلطات حماية النباتات بضبط بعض أنواع الفيتوبلازما بأحكام كحجر الكائنات الحية الدقيقة (grapevine "flavescence dorée"، grapevine "bois noir"، potato stolbur، apple proliferation، palm lethal yellowing). وحتى الآن، لم يتم تطوير أي طريقة عمل لزراعة الفيتوبلازما في المعامل، مما يجعل إجراءات التحديد الميكروبيولوجي الكلاسيكية مستحيلة. وفضلاً عن ذلك، فإن انتشار الأمراض المرتبطة بالفيتوبلازما، والتي يُسهلها تنقل الحشرات المُسببة للأمراض بسبب تغيير المناخ العالمي وزيادة الحركة العالمية للأشخاص والبضائع، قد تؤدي إلى ظهور أمراض الفيتوبلازما في مناطق أخرى؛ والتي كانت في السابق غير موجودة فيها، وتصبح بيئة مثالية للحشرات والكائنات الدقيقة المُسببة للأمراض،

تاركة مُفتشي حماية النبات غير مستعدين لتحديدها معتمدين على الأعراض فقط. لذلك، فإن طريقة العمل الجيدة المستخدمة لتحديد الفيتوبلازما مطلوبة الآن بدرجة عالية. وتقوم واحدة من أكثر طرق تحديد الفيتوبلازما استخداماً على التضخيم المتداخل لمنطقة الـ 1.8 kbp في جين الـ 16S rRNA، بما في ذلك المناطق المحيطة، باستخدام بادئات الـ P1 (٤) والـ P7 (٥)، وبعدها تضخيم الجزء الـ 1.2 kbp بالبادئات R16R2 و R16F2n (٦). وتم إخضاع هذا التضخيم -فيما بعد- لتحليل الـ RFLP (restriction fragment length polymorphism). وللحصول على تمييز أفضل، يتم استخدام جينات أخرى، مثل: عامل استطالة النقل *tuf*، والبروتين المُحرك الفرعي *secY*، وبروتين أوبرون الريبوسوم *rp*، والتسلسل البيئي للجينات الـ 16S-23S rRNA، والبروتين المُحرك الفرعي *secA* (٧-١٠)، ولكن غالباً تُضخم البادئات بمجموعات مُعينة من الـ 16Sr فقط. لذلك، يمكن استخدامها للتفريق -فقط- بين الفيتوبلازما داخل مجموعة مُعينة من الـ 16Sr. وبالرغم من ذلك، تُعد طريقتنا من أكثر الطرق المعروفة -حتى الآن- لتمييز الفيتوبلازما، ويتضمن استخدام الطرق التي تقوم على الـ RFLP عديداً من المشاكل، منها: أنه ليس من السهل تجهيزها، وأنها تحتاج إلى استخدام إنزيمات باهظة ومواد بولي أكريلاميد هلامية سامة، ولكن من الضروري استخدام أنواع مرجعية للمقارنة بين الأنماط. وأخيراً، هي جزء بسيط فقط من معلومات التسلسل المتاحة.

إن تشفير الـ DNA تقنية يتم بها استخدام تسلسلات DNA القصيرة (تميز الـ DNA) DNA barcodes) لتمييز الأنواع (١١، ١٢). باختصار، يتم استخلاص الـ DNA من أنواع غير معروفة، وتضخم بمجموعة من البادئات الجينية المتسلسلة. وأخيراً، يتم مقارنة التسلسل بتسلسلات من قاعدة بيانات المعايير لتخصيص العينة للأنواع. إن هذه الطريقة تقوم على عديد من الافتراضات: (١) يوجد ترميز للـ DNA في كافة الأنواع. (٢) يُمكن تضخيم المنطقة في كافة الأنواع بمجموعة واحدة فقط من البادئات الجينية. (٣) اختلافات التسلسل بين الأنواع فيها أكبر بكثير من الاختلافات بين النوع الواحد الموجود في السلالات نفسها. (٤) الترميز قصير نسبياً فيها؛ لذلك يمكن وضع تسلسل له بسرعة. (٥) التصنيف الذي ترتبط به شفرات ترميز الـ DNA تم تأسيسه فيها بالفعل. والمزايا الرئيسية لهذه الطريقة تتمثل فيما يلي: عدم الحاجة لأي سمات ظاهرية لعملية التحديد، ويمكن الحصول على الـ DNA من مصادر عديدة من بينها العينات البيئية والعينات المأخوذة من المتاحف، ويتم استخدام تجربة جينية واحدة فقط. ومن ضمن عيوبها: خطورة حدوث تلوث قد ينتج عن التحديد الخاطئ وتباين حدود التعريف، الذي يعتمد على تركيز الـ DNA في التحضيرات، وقد يُمثل قلة تمثيل التسلسلات لأنواع معينة في قاعدة البيانات مشكلة من المشاكل الأخرى.

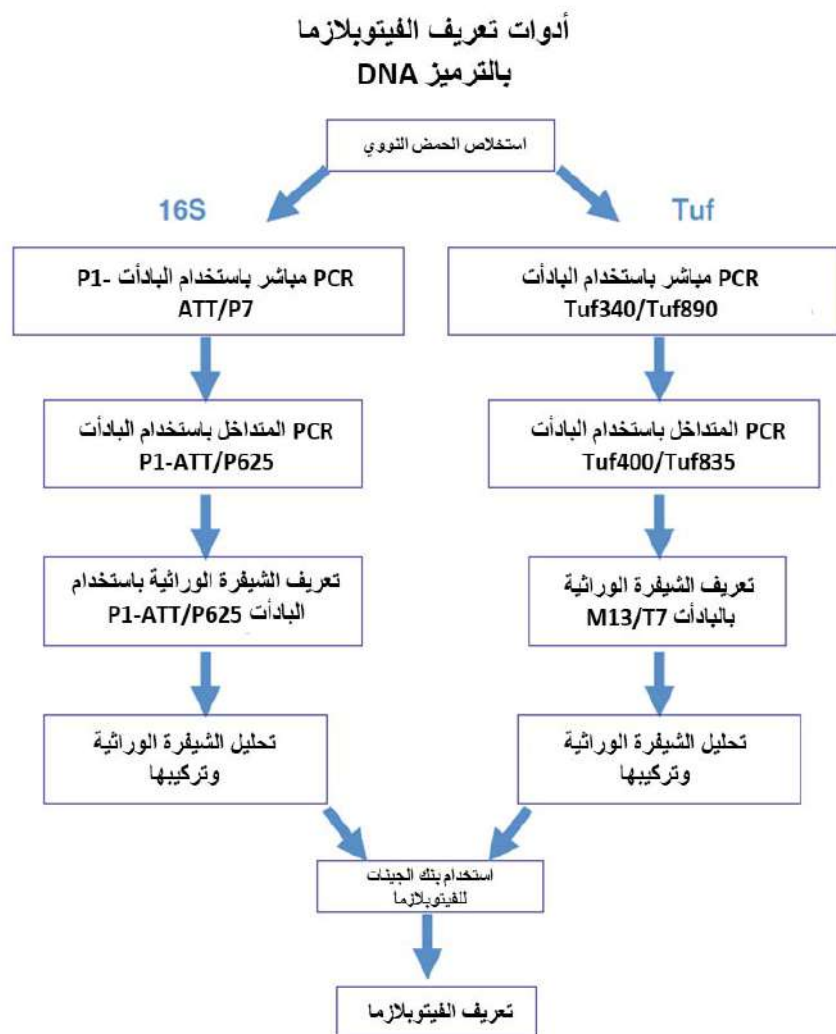
وقد تم اقتراح تبني مبادئ ترميز الـ DNA لتحديد الآفات النباتية ومُسببات الأمراض من خلال مشروع الـ QBOL (quarantine barcode of life)، والذي تموله لجنة الاتحاد الأوروبي، والذي يهدف إلى تطوير نظام عالمي لتحديد أثر المجموعات الرئيسية من مسببات الأمراض النباتية -بما

فيها الفيتوبلازما- على كائنات الحجر الصحي (١٣). ويشمل العمل في إطار هذا المشروع: الحصول على سلاسل ترميزية مرجعية عالية الجودة لممرضات الحجر الصحي وتنظيمها، وتطوير طرق عمل للتحقق منها، وإنشاء قاعدة بيانات متسلسلة عبر الإنترنت، ومجموعة مرجعية من سلالات مسببات الأمراض. وهناك عديد من الاعتبارات التي يجب إجراؤها عند تطوير نظام ترميز الـ DNA الخاص بالفيتوبلازما. أولها: لطالما كان الـ DNA الفيتوبلازما موجودا مكونا ثانويا في خلفية الـ DNA. وثانيها: بما أن الفيتوبلازما تعيش -في الغالب- مع بكتيريا أخرى، فيجب ألا تعمل البادئات على تضخيم الـ DNA النباتات أو الـ DNA البكتيري غير المتشابه. ومن ضمن المناطق العديدة التي تم اختبارها، ثبت أن هناك ترميزين -وفقاً لجينات الـ 16S rRNA والـ *tuf*- محصنين ضد هذه المشاكل، وبالتالي تم اختبارهما ترميزين نهائين للـ DNA لتحديد الفيتوبلازما. ولتطوير ترميز *tuf*، تم مقارنة جميع الجينات *phytoplasma tuf* المتاحة في بنك الجينات (NCBI)، وكل منطقة محفوظة داخل جين *tuf* موجودة في جميع الفيتوبلازما. وتم تصميم مجموعات من البادئات (الجدول ١) التي تسمح بتغيرات متسلسلة بسيطة بين المجموعات الفردية من الفيتوبلازما للمنطقة، وكان ترميز 444-420 مضخماً من جميع سلالات الفيتوبلازما التي تم اختبارها (16SrX، 16SrIX، 16SrVII، 16SrVI، 16SrV، 16SrIV، 16SrIII، 16SrII، SrI، 16SrXXI، 16SrXX، 16SrXV، 16SrXII، 16SrXI and). كما أنه تم إنشاء شجرة التقارب التي تم عملها من هذه التتابعات بعد أنماط متفرعة من الأشجار التي تم إنشاؤها باستخدام تسلسلات كاملة الـ 16S rRNA؛ مما يشير إلى أن الترميز *tuf* يمكن من التمييز بين الفيتوبلازما على مستوى المجموعة والفئة الفرعية (معلومات غير المنشورة). وفي حين أن الجين الكامل الـ 16S rRNA يشيع استخدامه لتصنيف الفيتوبلازما، إلا أن استخدامه رمزا شريطياً أمرٌ محدود؛ بسبب طوله الطويل نسبياً، وما يرتبط به من طوائف مختلفة مع التسلسلات. ومع ذلك، كان من الممكن تحديد منطقة متغيرة منه -حوالي 600 bp في 5' من الجين الـ 16S rRNA-، وتم استكشاف إمكاناتها للحصول على ترميز الحمض النووي. وتمت دراسة التسلسل لـ 600 bp في جميع سلالات الفيتوبلازما التي تم اختبارها وبناء شجرة التقارب؛ حيث أثبتت قدرتها على التمييز بين معظم الفيتوبلازما عند مستوى مجموعة الـ 16Sr؛ مما يشير إلى أنه يمكن استخدامها في ترميز الـ DNA الخاص بالفيتوبلازما. وتشتمل أداة الترميز الحالية للحمض النووي (DNA) الخاصة بمواصفات الفيتوبلازما -والتي تم تطويرها في مشروع QBOL- على مجموعتين تمهيديتين؛ لتضمين منطقتي الترميز الـ DNA جزيئات (*tuf* and 16S rRNA genes)، وهي قاعدة بيانات متسلسلة عبر الإنترنت، مع تسلسلات مرجعية لكل الـ DNA الترميزات التي تغطي أهم المجموعات التي تم وصفها حتى الآن، بما في ذلك فيتوبلازما الحجر الصحي، وبنك جين الـ DNA السلالة المرجعية. ويشمل خط عمل تحديد الهوية (الشكل ١): استخراج الحمض النووي من النباتات المشتبه في إصابتها بالفيتوبلازما؛ ثم عمل PCR متداخل مع ترميز الـ DNA؛ وعمل تسلسل للجين، وتحليل التسلسل؛ ومن ثم تحديد الهوية عبر الإنترنت.

جدول (١): تسلسل البادئات.

Barcode	Direct/nested PCR	Primer	Forward/reverse	Primer mix components	Sequence (5'-3')	Proportions in mixture
<i>tuf</i>	D	Tuf340	For	Tuf340a	GCTCCTGAAGAAARAGAACGTGG	Mix 1:1 to 10 µM
				Tuf340b	ACTAAAGAAAGAAAAAGAACGTGG	
<i>tuf</i>	D	Tuf890	Rev	Tuf890a	ACTTGDCCTCTTTTCKACTCTACCAGT	Mix 1:1:1 to 10 µM
				Tuf890b	ATTGTCCCTCTTTTCWACACGTCCTGT	
				Tuf890c	ACCATTCCCTCTTTCAACACGTCACAGT	
<i>tuf</i>	N	Tuf400	For	Tuf400a	GTA AAACG GACGGCCAGT GAAACAGAA AAAACGTCAYTATGCTCA	Mix 1:1:1:1 to 10 µM
				Tuf400b	GTA AAACG GACGGCCAGT GAAACTTC TAAAAGACATTACGCTCA	
				Tuf400c	GTA AAACG GACGGCCAGT GAAACA TCAAAAAGACAYTATGCTCA	
				Tuf400d	GTA AAACG GACGGCCAGT GAAA CAGAAAAAAGACAYTATGCTCA	
				Tuf400e	GTA AAACG GACGGCCAGT CAAAAC AGCTAAAAGACATTATYCTCA	
				Tuf835a	<i>TAA</i> TACGACTCACTATAGGGAACA TCTTCWACHGGCATTAAAGAAAAGG	
Tuf835b	<i>TAA</i> TACGACTCACTATAGGGAACAC CTTCAATAGGCATTAAAAAAWGG					
Tuf835c	<i>TAA</i> TACGACTCACTATAGGGAAC ATCTTCTATAGGTAATAAAAAAAGG					
16S rRNA	DN	P1-ATT	For	P1-ATT	AAGAGTTTGATCCTGGCTCAGG	
16S rRNA	D	P7	Rev	P7	CGTCCCTTCATCGGCTCTT	
16S rRNA	N	P625	Rev	P625	ACTTAYTAAACCGCCTACRCACC	

Bold indicates M13F tag, italic indicates T7R tag



شكل (١): شكل تخطيطي يوضح تحديد الفيتوبلازما عن طريق ترميز الـ DNA.

ويجب التأكيد على أنه على الرغم من أن هذه الطريقة فعالة لتحديد سلالات الفيتوبلازما، سواء من المجموعات المحفوظة في المختبرات أو من عينات الحقول، إلا أنها لا تزال لديها بعض الحدود. وعند حدوث إصابة مختلطة، يلزم الاستنساخ لفصل تسلسل جميع الفيتوبلازما النباتية الموجودة في العينة قبل عمل التسلسل والتحليل.

وأخيراً، تجدر الإشارة إلى أنه على الرغم من أن مشروع QBOL يوفر المنصة الأولية لتطوير نظام لتحديد الفيتوبلازما بالترميز DNA، إلا أن هناك إمكانية لتوسيع قاعدة بيانات تسلسل الحمض النووي. وبالتالي، يتم تشجيع المهتمين بالفيتوبلازما النباتية على المساهمة من خلال تقديم تسلسلات جديدة للبنك.

٢- المواد:

١-٢: استخلاص الـ DNA:

١. المواد النباتية المصابة بالفيتوبلازما (انظر: الملاحظة ١).
٢. مادة نباتية سليمة شاهدا سلبيا.
٣. النيتروجين السائل.
٤. خلاط للأنسجة (على سبيل المثال: Geno/Grinder 2000، SPEX CertiPrep)، أو الهاون، ومدق لطحن أنسجة النبات.
٥. كريات ستيل للطحن، وأنايب طحن (Geno/Grinder).
٦. أنايب طرد مركزي.
٧. ملاعق خاصة.
٨. مواد خاصة لاستخلاص DNA (QIAGEN، DNeasy) (انظر: ملاحظة ٢).
٩. جهاز طرد مركزي مع التبريد.
١٠. جهاز حراري.
١١. جهاز قياس الطيف.

٢-٢: PCR:

١. ثلج.
٢. جهاز هزاز.
٣. جهاز طرد مركزي للأنابيب PCR وأنايب ١,٥ مل.
٤. أنابيب للـ PCR وأنايب للطرد المركزي.
٥. جهاز PCR.
٦. ١٠ ميكرومل بادئ أمامي (جدول ١).
٧. ١٠ ميكرومل بادئ عكسي (جدول ١).
٨. ٢٥ mM مغنسيوم كلورايد.
٩. ١٠ mM من خليط dNTPs (٢,٥ mM كل واحد منها).
١٠. ماء مقطر معقم.
١١. شاهد إيجابي DNA (20 ng) (انظر: ملاحظة ٣).
١٢. عينات DNA من نبات مصاب ونبات سليم (20 ng) (انظر: ملاحظة ٣).
١٣. DNA البلموميز (Promega GoTaq)، 5 U ميكروليترات.
١٤. محلول منظم للتفاعل من نوع (Promega 5× colorless GoTaq Flexi).

١٥. DNA البلميري (Fermentas *Taq*)، 5 U ميكروليترات، (انظر: ملاحظة ٤)، لأجل تفاعل PCR مع P1-ATT/P7 (انظر: ملاحظة ٥).
١٦. محلول تفاعل مع KCI من (Fermentas 10×*Taq*).

٣-٢: الفصل الكهربائي بالجل الآجروز:

١. آجروز.
٢. محلول منظم للرحلان الكهربائي (Tris/acetate/EDTA) بتركيز (stock × 50): ٢٤٢ جم Tris قاعدي، و 57.1 مل حمض الخليك، و ١٠٠ مل 0.5 M EDTA، وماء مقطر مزدوج يكمل حتى ١ لتر، وضبط درجة الحموضة pH إلى ٨.٥؛ للحصول على تركيز ١ × للعمل، وقم بتخفيف المخزون بمقدار ٥٠ × بالماء المقطر المزدوج.
٣. بروميد أيثيديوم.
٤. تحميل صبغ (انظر: الملاحظة ٦).
٥. سلم الوزن الجزيئي (١٠٠-1500 bp).
٦. تجهيزات الفصل الكهربائي.
٧. فرن الميكروويف.
٨. جهاز الأشعة فوق البنفسجية.

٤-٢: عمل التسلسل:

١. بادئات M13F و T7R من أجل ترميز *Tuf*، و P1-ATT و P625 لأجل ترميز 16S.

٥-٢: برامج خاصة لتسلسل ومقارنة الـ DNA:

١. CLC DNA Workbench 6 (CLCbio) أو أي برامج تقوم بمقارنة التسلسلات.

٦-٢: موقع قاعدة البيانات QBOL لترميز DNA:

١. <http://www.q-bank.eu/>.

٣- طريقة العمل:

- ٣-١: استخلاص DNA: انظر: ملاحظة ٧ و ٨.
٢. ضع عينات النبات في أنابيب الطحن مع ثمان كرات من الحديد المعقم (انظر: الملاحظة ٩).
٣. اغمر الأنابيب في النيتروجين السائل.

٤. رج العينات عن طريق الهز (Geno/Grinder) بمعدل ١٢٠٠ هزة في الدقيقة لمدة ١ دقيقة، ثم كرر العملية مرتين (انظر: الملاحظة ١٠).
٥. استخدم ١٠٠ مليجرام من النباتات التي تم طحنها لاستخلاص DNA؛ لجعل نقل المواد النباتية أسهل، وقم بتجميد الأنابيب والملعقة في النيتروجين السائل، واستخدم ملعقة جديدة لكل عينة لتجنب التلوث.
٦. استكمل استخلاص الـ DNA من خلال اتباع التعليمات الواردة في الدليل.
٧. أزل الـ DNA بواسطة عمود بإضافة ٥٠ ميكروليتر من محلول المنظم.
٨. يتم تحديد تركيز الـ DNA عن طريق جهاز القياس الطيفي (spectrophotometer).
٩. تقسم الـ DNA، وتخزن في -20°C (انظر: الملاحظة ١١).

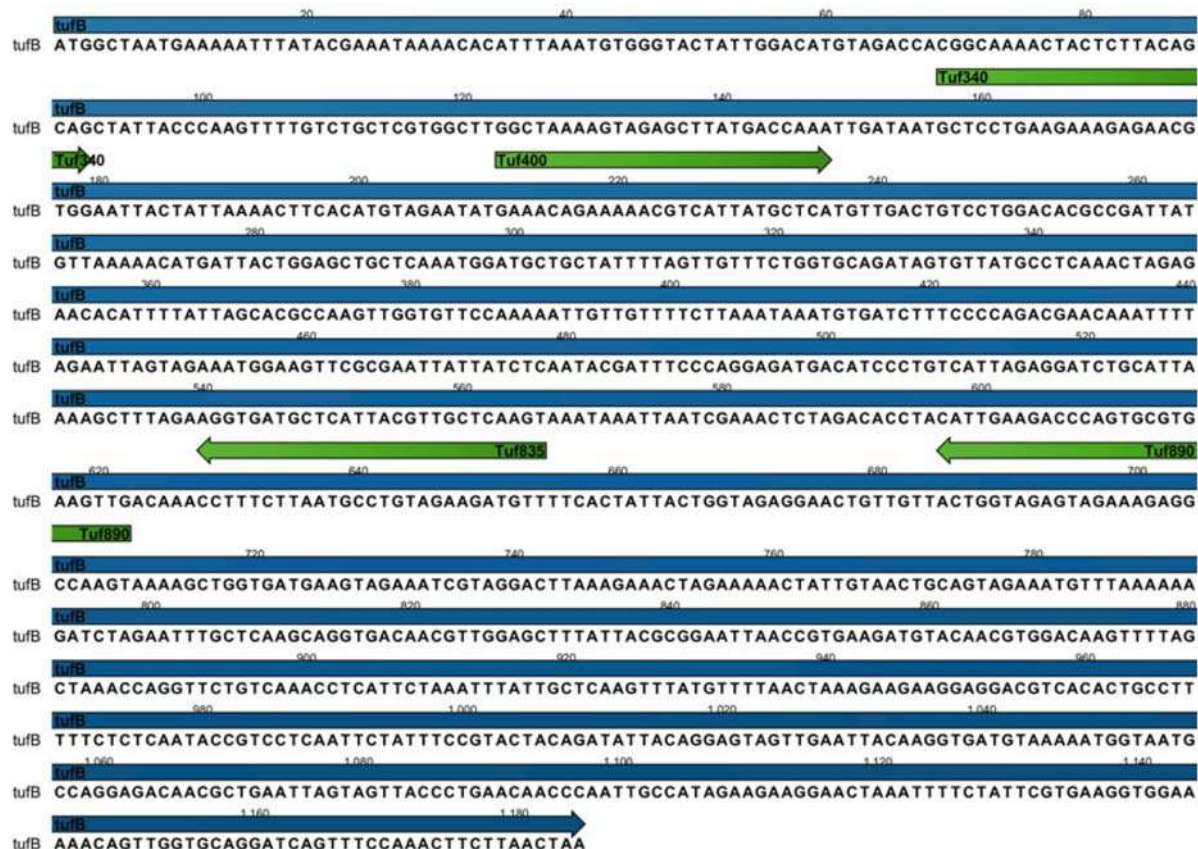
٣-٢ PCR: انظر: ملاحظة ١٢ و ١٣.

٣-٢-١: PCR مباشر:

١. أذب المواد التالية على درجة حرارة الغرفة، مع رجها بالهزاز، ثم اعمل طردا مركزيا ببطء: المحلول المنظم للتفاعل، MgCl_2 ، والبادئات P1-ATT/P7 (تنتج 1.8 kbp rRNA 16S)، أو Tuf340 / Tuf890 (تنتج 0.55 kbp مع *tuf*) (الشكل ٢ و ٣)، ويتم وضع المواد على الثلج.
٢. يتم إجراء الحسابات للخلطة الرئيسية حسب (الجدول ٢)، وتذكر أن تضمن تفاعلا بدون حمض نووي عنصرا شاهدا (NTC)، وشاهدا إيجابيا وسلبيا (غير مستهدفة).
٣. اخلط الماء مع الـ MgCl_2 ، ومحلول منظم التفاعلي، و dNTPs، والبادئات، و polymerase DNA *Taq* (انظر: الملاحظة ١٤). وبلطف يتم رج المحتوى، وعمل طرد مركزي، وقسم لكل أنبوب ٢٤ ميكروليتر من مزيج في أنابيب PCR، وضعهم في الثلج (انظر: الملاحظة ١٥).
٤. أضف ١ ميكروليتر من الـ DNA (٢٠ نانوجرام / ميكروليتر) وتخلط. تذكر أن تشمل التفاعلات الشاهد الإيجابي والسليبي والشاهد بدون الحمض النووي، ثم قم بعمل طرد مركزي بلطف، ثم يوضع على الثلج.
٥. ضع أنابيب الـ PCR في thermocycler، وشغل برنامج PCR (الظروف في الجدول ٣).
٦. إعداد ١:٣٠ من التخفيفات (في الماء) من منتج الـ PCR الذي تم الحصول عليه لأجل PCR المتداخل.
٧. يخزن الـ DNA على درجة حرارة -20°C .



شكل (٢): جين 16S rRNA للفيتوبلازما والبادئات المستخدمة لأجل ترميز 16S rRNA وتضخيمه.



شكل (٣): جين *tufB* للفيتوبلازما والبادئات المستخدمة للأجل ترميز وتضخيم *tufB*.

جدول (٢): مخلوط عمل تفاعل لا اختبار PCR.

Components	Primer pair	
	P1-ATT/P7	P1-ATT/P625 Tuf340/Tuf890 Tuf400/Tuf835
Milli-Q water	12.6 μ L	11.3 μ L
PCR reaction buffer	2.5 μ L Fermentas 10 \times PCR buffer with KCl	5 μ L Promega 5 \times PCR buffer
25 mM MgCl ₂	1.5 μ L	1.5 μ L
10 mM dNTPs mix	2 μ L	1 μ L
10 μ M forward primer	2.5 μ L	2.5 μ L
10 μ M reverse primer	2.5 μ L	2.5 μ L
<i>Taq</i> DNA polymerase (5 U/ μ L)	0.4 μ L Fermentas <i>Taq</i> DNA polymerase	0.2 μ L Promega GoTaq polymerase

Volumes indicated below are for one reaction. The total volume of a single reaction is 25 μ L. To prepare master mix, multiply the amounts indicated below by the number of reactions you are going to run plus a couple of extras to allow for pipetting errors

٣-٢-٢: PCR المتداخل:

١. باستخدام بادئات P1-ATT / P625 (0.6kbp منتج لـ RNA 16S) أو Tuf400 / Tuf835 (0.4kbp منتج لـ *tuf*). وبعد ذلك، تكرر الخطوات ١-٣ من العنوان الفرعي ١-٢-٣.
٢. أضف ١ ميكروليتر من منتج الـ PCR المخفف المباشر (العنوان الفرعي ١-٢-٣)، والخطوة (٦)، واخلطهم، وبلطف اعمل طرداً مركزياً، ثم أعد المخلوط إلى الثلج.
٣. ضع أنابيب الـ PCR في thermocycler، ثم شغل برنامج PCR (الجدول ٣).
٤. استخدم ٢,٥ ميكروليتر من المنتج PCR لأجل الفصل الكهربائي.
٥. قم بتخزين المنتج المتبقي من الـ PCR عند درجة حرارة 20°C لعمل التسلسل.

٣-٣: الفصل الكهربائي بالأجاروز:

١. إعداد آجاروز جل تركيز ١٪. ٢٠٠ مل من ١٪، وأذب 2 g من الآجاروز في ٢٠٠ مل في محلول ١ \times TAE، ويتم تسخينه عن طريق تسخين فرن الميكروويف، ثم يترك ليبرد.
٢. صب الآجاروز في حوض الخاص، وضع المشاط، وأزال أي فقاعات للهواء، واتركه ليتصلب (حوالي ٢٠ min).
٣. ضع الجل في الحوض الفصل الكهربائي، وأضف محلول تركيز 1 \times TAE، بحيث تغطي الجل تماماً.

جدول (٣): برنامج جهاز PCRs وعدد دوراته.

Step	Temperature (°C)	Time	Number of cycles
P1-ATT/P7			
Initial denaturation	94	5 min	1
Denaturation	94	1 min 30 s	35
Annealing	55	2 min	
Extension	72	3 min	
Final extension	72	7 min	1
Hold	4	As long as required	1
Tuf340/Tuf890; Tuf400/Tuf835; P1-ATT/P625			
Initial denaturation	94	3 min	1
Denaturation	94	15 s	35
Annealing	54/64 ^a	30 s	
Extension	72	1 min	
Final extension	72	7 min	1
Hold	4	As long as required	1

^a64°C for P1-ATT/P625; 54°C for others

٤. يمزج ٢,٥ ميكروليتر من منتج الـ PCR، و ٢,٥ ميكروليتر من الماء، و ١ ميكروليتر من $6 \times$ صبغة التحميل.
٥. تحمل العينات، و NTC، والشاهد الإيجابي والسلبي، و ٥ ميكروليترات من سلم الحمض النووي (ng ميكروليتر ٥٠).
٦. قم بتوصيل الأقطاب الكهربائية بمصدر الطاقة، بعدها يشغل الجبل (انظر: الملاحظة ١٦).
٧. يتم صيغ الجبل مع بروميد أيثيديوم لمدة 10 min، ويغسل في الماء لمدة 10 min.
٨. يتم مشاهدة الجبل والـ DNA وتحليله بواسطة جهاز الأشعة فوق البنفسجية.
٩. استناداً إلى الشاهد الإيجابي والسلبي، اختر عينات ذات حجم صحيح لعمل تسلسل لها.

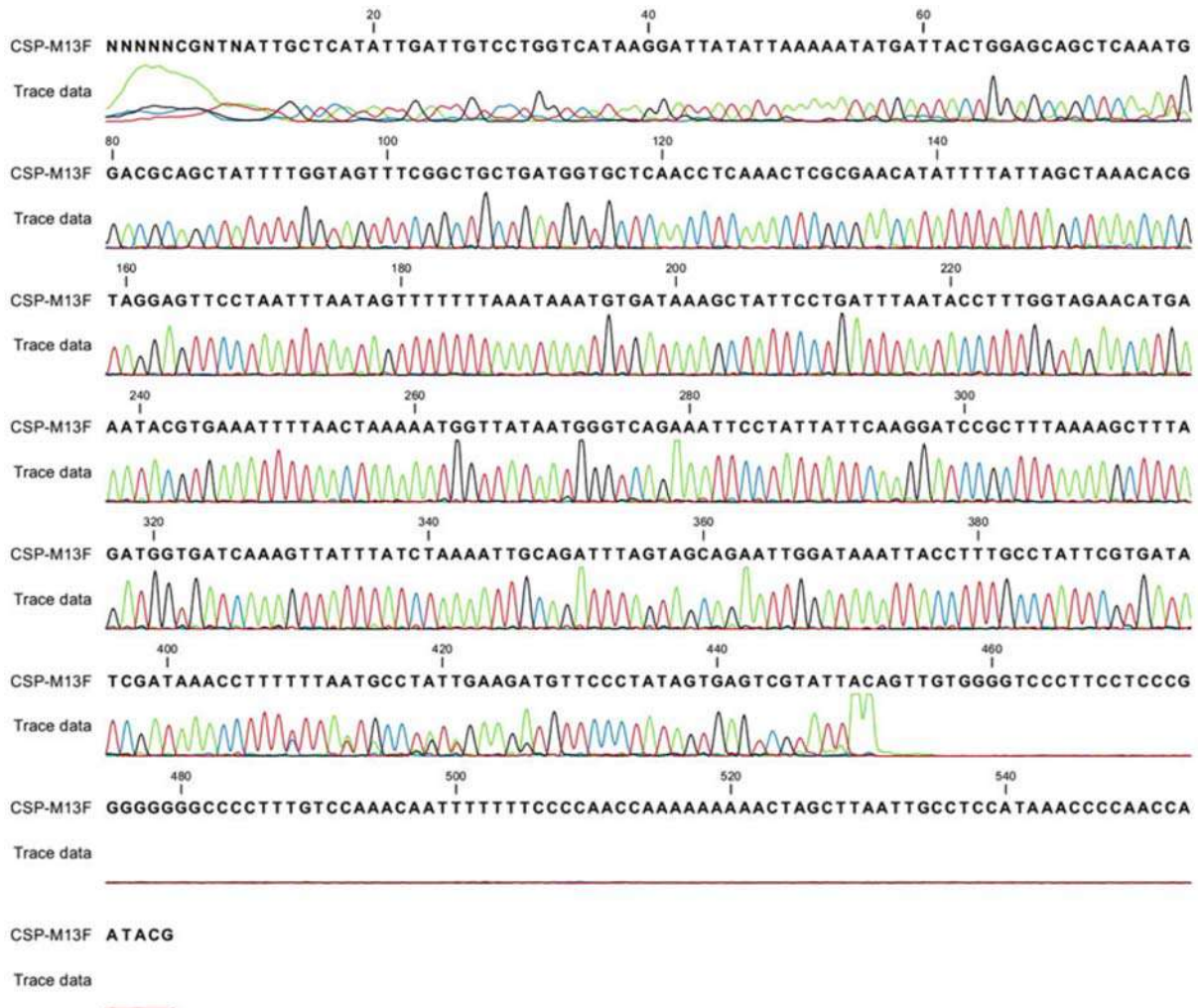
٣-٤: عمل التسلسل:

١. يتم تحضير العينات حسب طلب الشركة القائمة بعمل التسلسل (انظر: ملاحظة ١٧).
٢. استخدم بادئات M13F و T7R؛ وذلك لعمل التسلسل لترميز *Tuf* (انظر: ملاحظة ١٨)، وبادئات P1-ATT و P625 لترميز جين 16S rRNA (جدول ١)، ودائماً يعمل تسلسل للجهة الأمامية والعكسية.

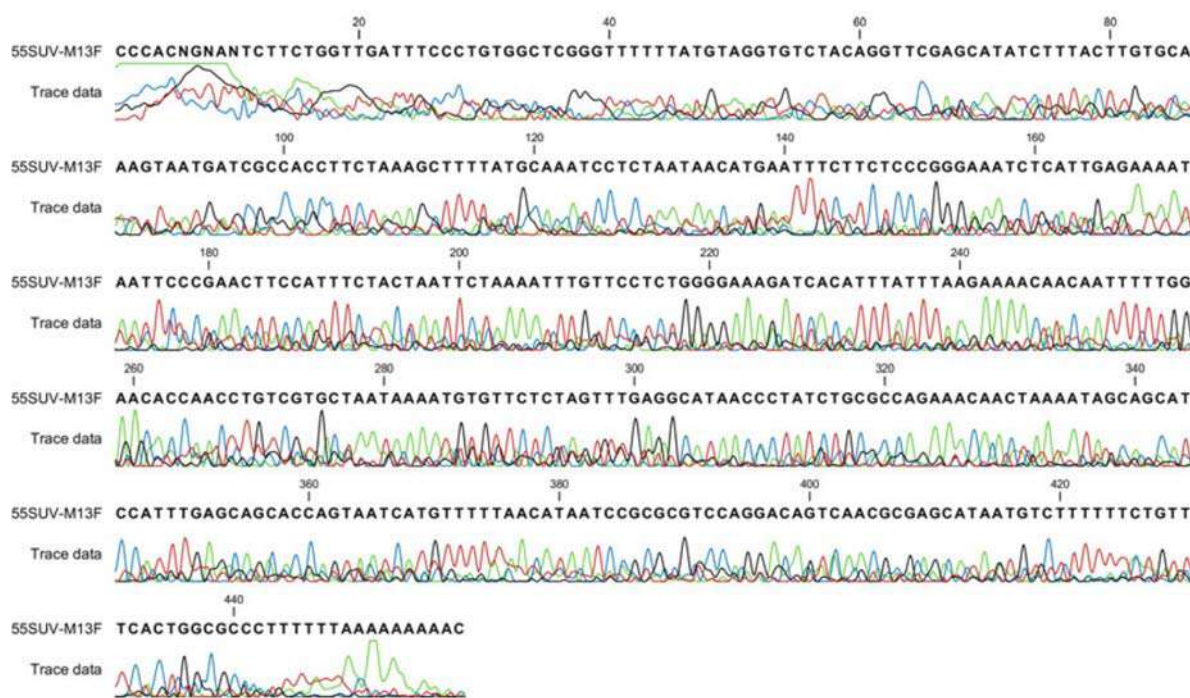
٣-٥: تحليل تسلسل DNA:

١. تقوم شركات التسلسل -عادةً- بإرجاع نتائج التسلسل بالطريقة النصية والكروماتوجرافية (الشكل ٤ و ٥)، وتحقق بعناية من الرسومات الكروماتوجرافية، إن كانت بعض القمم متداخلة (انظر: الملاحظة ١٩).

٢. قم بتجميع كلا القراءات (للأمام والخلف) في تسلسل توافقي واحد، مع استخدام برنامج CLC لعمل تجميع الحمض النووي. ومع ذلك، يمكن استخدام حزم برامج لتجميع التسلسل الأخرى.
٣. تعرف على مكان منطقة البادئات، ثم أزلها والتسلسلات المتكررة.
٤. بعد ذلك، عالج المناطق التي فيها النيوكليوتيدات المتداخلة - إن وجدت - عن طريق فحص المقترح للرسومات الكروماتوجرافية والتسلسل النصي.
٥. احفظ التسلسل النهائي.



شكل (٤): رسم يوضح مدى جودة التسلسل، وقمة الانحناء تدل على عدم وجود تلوث في العينة وعلى جودة التسلسل.



شكل (٥): رسم يوضح مدى رداءة الجودة للتسلسل. وتداخل القمم تدل على وجود تلوث وأو خليط من الإصابة في العينة، وعلى سوء جودة التسلسل.

٣-٦: التعريف بواسطة الإنترنت باستخدام قاعدة البيانات QBOL للترميز DNA:

١. اذهب إلى موقع: <http://www.q-bank.eu/BioloMICSSequences.aspx?expandparm=f> (شكل ٦).

٢. أدخل التسلسل في نافذة الاستعلام (شكل ٧) مع إبداء المقارنة، وسيتم إجراء بحث لجميع التسلسلات المودعة في قاعدة بيانات QBOL (انظر: الملاحظة ٢٠).

٣. اعرض النتائج (شكل ٨).

٤- الملاحظات:

١. استخدم أنسجة اللحاء أو العروق من الأوراق بالكامل لاستخلاص DNA. وإذا كان ذلك ممكناً، استخدم المواد النباتية التي تظهر عليها الأعراض. وقد يكون تحسين طريقة العمل لاستخلاص DNA ضرورياً لأنواع النباتات "الصعبة"؛ لأن استخلاص DNA دون المستوى الأمثل: سيؤدي إلى انخفاض التعريف.

٢. نستخدم مجموعة (QIAGEN) DNeasy Extraction، لكن يمكن استخدام طرق بديلة لاستخلاص DNA للفيتوبلازما، وهي مفصلة في الفصلين الثاني عشر والثالث عشر من هذا الكتاب.

Q-bank Phytoplasmas database

The Q-bank Phytoplasma database contains DNA sequence (Barcodes), morphological, phenotypical and ecological data of more than 96 strains that are of relevance to phytoplasma associated diseases.

Contact:

Dr. Mogens Nicolaisen
Mogens.Nicolaisen@agrsci.dk
Curator Phytoplasmas database
Phytosanitary and taxonomic expertise
University of Aarhus (UA)
Denmark

Prof. Dr. Assunta Bertaccini
bertaccini_a@cib.unibo.it
Curator Phytoplasmas database
Taxonomic expertise and collections
University of Bologna (UB)
Italy

Disclaimer:
Q-bank has carefully compiled the information on this website. Q-bank however is not responsible for the correctness and completeness of the information supplied. Q-bank cannot be held liable for any damages that occur as a result of the use of this information. In addition, you cannot claim any rights in relation to this information. Q-bank is not responsible for the content of externally-linked web pages.

Database Copyright © 2011 Phytoplasma
Software Copyright © 1999-2011 BioAware SA/NV. - Release: 2011/05/30
Powered by BioMICS Net
Page: Home - Last Changed: 16/06/2011 21:56:42 - By: vrobot@bio-aware.com

شكل (٦): موقع الإنترنت للبنك التعريفي للفيتوبلازما (Q-bank).

٣. يمكن أن تكون أي عينة من الحمض النووي للفيتوبلازما سبق وأن ثبت أنها مصابة. وبدلاً من ذلك، يمكن الحصول على سلالة مرجعية من قواعد البيانات GenBank QBOL (<http://www.q-bank.eu/>).
٤. من تجربتنا، يعمل بوليميريز الـ Fermentas Taq DNA بشكل أفضل لتضخيم منتجات الـ PCR الأطول، مثل: التضخيم الكامل لمنطقة 16S rRNA.

Q-bank COMPREHENSIVE DATABASES ON REGULATED PLANT PESTS

Home Bacteria Fungi Insects Invasive Plants Nematodes Phytoplasmas Viruses & viroids Identification

Pairwise sequence alignment

I have read the disclaimer and I agree with the conditions and limitations associated with the usage of the software

Pairwise sequence alignment parameters

Minimum similarity to keep alignment results (0-100):

Gap creation penalty (1-100):

Gap extension penalty (1-10):

Maximum alignments to display (1-1000):

Penalty for a nucleotide mismatch (default is -1):

Reward for a nucleotide match (default is 1):

Word size:

Select sorting mode:

Select the reference(s) file(s) to be used for the alignment:

<input type="checkbox"/>	Name	Location	Status
<input type="checkbox"/>	COLLETO	http://www.q-bank.eu/Fungi/	Reachable
<input type="checkbox"/>	PHOMA	http://www.q-bank.eu/Fungi/	Reachable
<input type="checkbox"/>	PHYTOPH	http://www.q-bank.eu/Fungi/	Reachable
<input checked="" type="checkbox"/>	NSEQ	http://www.q-bank.eu/Phytoplasmas/	Reachable
<input type="checkbox"/>	VIRUS	http://www.q-bank.eu/Virus/	Reachable


Paste sequence to align:

CGTTGACTGCCCTGGGCACGCTGACTATGTTAAAAACATGATTACTGGAGCCGCTCAAATGGACGCTGCCATTCTAGTTGTTTCTGGTGACAGATAGTGAATGC

شكل (٧): إدخال لترميز الـ DNA وتطبيق بالموقع بقواعد البيانات. ومن خلال الإنترنت وأدوات الموقع للبحث في قواعد البيانات لترميز الـ DNA. ويمكن تعديل المقاييس المختلفة حسب طريقة المقارنة.

٥. هذه نسخة معدلة من بادئ P1 المنشور سابقاً (٢). وتختلف النيوكليوتيدات المقابلة لنهاية 3' من هذه السلالات لاستيعاب الاختلافات بين السلالات؛ حيث تمت إزالة النيوكليوتيدات الثلاثة الأخيرة (ATT).

٦. يمكن شراء أصباغ التحميل المتاحة تجارياً من عدد من الشركات المصنعة. ومع ذلك، تأكد من استخدام صبغة تحميل سلالم الـ DNA نفسها لتحميل العينات. لذا، سوف تتحرك العينات والسلم أثناء التشغيل بالسرعة نفسها، مع تكون أحجام العينات صحيحة.

Pairwise sequence alignment 
 I have read the disclaimer and I agree with the conditions and limitations associated with the usage of the software
Pairwise sequence alignment parameters 

Paste sequence to align:

TGTAGATTGTCCTGGACACTATGAATTTATTAATAATATGATTACAGGTACAGCTCAAATGGATGCTAGTATTTGGTTGTATCAGCCACTGATGGTGTATGCCG

Start alignment

Collapse Alignments

Export data 

#	Reference description	Score	Probability	Similarity%	Fragments	Coverage%	Direction
1	ToMarV_2006_001 ToMarV_2006_001, RNA 1: EF681764 RNA 2: EF681765 N1: Genome sequence ToMarV_RNA1_full length From VIRUS	33.2842	0.010041	88.462	1	100	+/+
Alignments							
Reference sequence: More info here ToMarV_2006_001 ToMarV_2006_001, RNA 1: EF681764 RNA 2: EF681765 N1: Genome sequence ToMarV_RNA1_full length Sequence length: 7229							
Similarity: 23/26 [88.462%], Gaps: 0 [0.000%], Coverage: 26/26 [100.000%] Score: 33.2842, E value: 0.010041, Direction: +/+							
Query	220	AGATATTAAGATCTTTAAACATATA	245				
Sbjct	6193	AGATATTAAGAACTTTGAAGATATA	6218				
2	ToMarV_2006_001 ToMarV_2006_001, RNA 1: EF681764 RNA 2: EF681765 N1: Genome sequence ToMarV_RNA1_full length From VIRUS	33.2842	0.010041	88.462	1	100	+/+
Alignments							

شكل (٨): مثال على نتيجة التعريف.

٧. يعد اتباع الممارسة المختبرية الجيدة أمراً ضرورياً لتحديد هوية الفيتوبلازما بنجاح باستخدام هذه الطريقة، مع الحرص الشديد على عدم تلوث عيناتك، وخاصة عند إجراء فحوصات الـ PCR المتداخلة. واستخدم دائماً بعض النصائح، وقم بتغيير القفازات عند الاشتباه في حدوث تلوث. ويُنصح - أيضاً - بالفصل المكاني الذي يتم فيه معالجة عينات DNA، ومكان إعداد تفاعلات PCR؛ لأن الفشل في القيام بذلك قد يساهم في زيادة خطر التلوث المتبادل.
٨. بعض التقنيات والمواد المستخدمة في هذه الطريقة قد تسبب مخاطر صحية. ودائماً يُنصح بارتداء الملابس الواقية المناسبة التي تتوافق مع لوائح السلامة، وتعرف على الـ MSDS لجميع المواد قبل الاستخدام.

٩. يمكنك استخدام الهاون والمدق للتجانس بديلاً، لكن تأكد من تعقيمها تماماً أثناء استخدامها.
١٠. تذكر أن تقوم بإعادة تجميد العينات/ والأنابيب بين خطوات الطحن؛ حيث من المهم ألا تذاب العينات.
١١. تخزين الـ DNA وتقسيمه في كميات صغيرة سيساعد على تجنب تكرار دورات ذوبانهم، والتي لها تأثير سلبي على الحفاظ على الـ DNA.
١٢. لضمان جودة الطرق المستخدمة، فإننا ننصح بشدة الاستخدام المتزامن لاثنتين من معدلات الترميز (كل من *tuf* و 16S rRNA) باستخدام اختبار PCR المتداخل. ومع ذلك، فإن استخدام الترميز Tuf835 / Tuf400 في اختبار PCR مباشرة وحده غالباً ما يكون مناسباً لتحديد نوع الفيتوبلازما وتعريفها.
١٣. في الاختبارات اللحظية TaqMan PCR (١٤)، يمكن استخدامها مسبقاً. ويمكن استخدامها بسهولة، وإعدادها لفحص كثير من العينات، كما أن حساسيتها عالية مقارنةً باختبارات الـ PCR التقليدية.
١٤. يلاحظ أن كمية dNTPs المطلوبة لتضخيم منطقة 16S rRNA باستخدام الـ P1-ATT / P7 البالغ حجمها 1800 bp تحتاج إلى ضعف الكمية مقارنة بتفاعلات أخرى.
١٥. تجنب تسخين بوليميريز الـ DNA، لأنه قد يقلل من نشاطه، وحافظ على بوليميريز الـ Taq DNA في الثلجة، وأضفه إلى المزيج الرئيسي قبل الاستخدام مباشرة.
١٦. الوقت والجهد الكهربائي يعتمدان على المسافة بين الأقطاب الكهربائية. وعادة الـ 5V/cm كافية لفصل جيد في معظم أنواع الجل.
١٧. قد يكون التنظيف بعد PCR ضرورياً لبعض الشركات، بينما تقوم شركات أخرى بإضافته في خدماتها، كما أن مجموعات مواد تنظيف ما بعد PCR متواجدة على نطاق واسع.
١٨. إن علامات M13F و T7 تكوت متصلة مع Tuf400 و Tuf835 على التوالي لتسهيل عملية التسلسل.
١٩. قد تشير القمم المتداخلة إلى وجود عديد من مصادر الـ DNA في عملية التحضير (بسبب العدوى المختلطة أو التلوث) أو غيرها من المشكلات التي حدثت أثناء التسلسل. ولا ينصح باستخدام مثل: هذه التسلسلات لتحديد والتعريف. وفي هذه الحالة، نوصي بتكرار التضخيم، والتأكد من التخلص من جميع مصادر التلوث. وإذا استمرت المشكلة، يكون استساخ منتجات الـ PCR قبل إجراء التسلسل هو الحل.
٢٠. يمكنك تغيير المعايير والمقاييس لمقارنة التسلسلات، أو استخدام الإعدادات الافتراضية في البرنامج.

1. Lee I-M, Davis RE, Gundersen-Rindal DE (2000) Phytoplasma: phytopathogenic mollicutes. *Annu Rev Microbiol* 54:221–255
2. The IRPCM Phytoplasma/Spiroplasma Working Team—Phytoplasma taxonomy group (2004) ‘ Candidatus Phytoplasma’, a taxon for the wall-less, non-helical prokaryotes that colonize plant phloem and insects. *Int J Syst Evol Microbiol* 54:1243–1255
3. Wei W et al (2007) Computer-simulated RFLP analysis of 16S rRNA genes: identification of ten new phytoplasma groups. *Int J Syst Evol Microbiol* 57:1855–1867
4. Deng S, Hiruki C (1991) Amplification of 16S rRNA genes from culturable and nonculturable mollicutes. *J Microbiol Methods* 14:53–61
5. Smart CD et al (1996) Phytoplasma-specific PCR primers based on sequences of the 16S–23S rRNA spacer region. *Appl Environ Microbiol* 62:2988–2993
6. Gundersen DE et al (1996) Genomic diversity and differentiation among phytoplasma strains in 16S rRNA groups I (aster yellows and related phytoplasmas) and III (X-disease and related phytoplasmas). *Int J Syst Bacteriol* 46:64–75
7. Hodgetts J et al (2008) Phytoplasma phylogenetics based on analysis of secA and 23S rRNA gene sequences for improved resolution of candidate species of ‘ Candidatus Phytoplasma’. *Int J Syst Evol Microbiol* 58:1826–1837
8. Lee I-M, Zhao Y, Bottner KD (2006) SecY gene sequence analysis for finer differentiation of diverse strains in the aster yellows phytoplasma group. *Mol Cell Probes* 20: 87–91
9. Botti S, Bertaccini A (2003) Variability and functional role of chromosomal sequences in 16SrI-B subgroup phytoplasmas including aster yellows and related strains. *J Appl Microbiol* 94:103–110
10. Marcone C et al (2000) Classification of aster yellows-group phytoplasmas based on combined analyses of rRNA and tuf gene sequences. *Int J Syst Evol Microbiol* 50:1703–1713
11. Hebert PDN et al (2004) Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *PNAS USA* 101:14812–14817
12. Hebert PDN, Ratnasingham S, deWaard JR (2003) Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proc R Soc Lond B (Suppl)* 270:S96–S99
13. Bonants P et al (2010) QBOL: a new EU project focusing on DNA barcoding of Quarantine organisms. *EPPO Bull* 40:30–33
14. Christensen NM et al (2004) Distribution of phytoplasmas in infected plants as revealed by real-time PCR and bioimaging. *Mol Plant Microbe Interact* 17:1175–1184

تحليل أطوار نشوء الفيتوبلازما وفقاً لمقارنة الجينوم الكامل

Hiroshi Nishida

ملخص:

إن تحديد تسلسلات جينوم الـ DNA الخاصة بالبكتيريا غير القابلة للاستنبات لم يعد بالأمر الصعب كما كان في الماضي، ويرجع الفضل إلى تطور تقنيات تسلسل الـ DNA. ومن المرجح تزايد أعداد تسلسل الجينوم الكامل للفيتوبلازما. وفي هذا الفصل، يتم شرح استراتيجيتين رئيسيتين لدراسات مقارنة الجينوم الكامل، وشرح المقارنات المتعلقة بسلسلة البروتين الجينية واحتوائها على الجينات. وبشكل عام، تحول الجين الأفقي تأثيره أكبر على محتوى الجين القائم على تحليل أطوار النشوء والارتقاء مقارنةً بسلسلة البروتين الجينية القائمة؛ إلا أنه نادراً ما يحدث تحول الجين الأفقي أثناء تطور الـ *Mollicutes*. ولذلك، تتشابه طوبولوجية التطور الخاصة بالـ *Mollicutes* القائمتان على استراتيجيتين مختلفتين.

الكلمات المفتاحية: مقارنة المحتوى الجيني، *Mollicutes*، مايكوبلازما، مقارنة تسلسل البروتين.

١- المقدمة:

عندما يكون عدد البدائل ليس كافياً لتوضيح العلاقات بين الكائنات الحية الدقيقة باستخدام التحليل القائم على مقارنة الجين الواحد، فلا تنطوي مقارنة تسلسلات الجين الواحد على تسوية كافية لتوضيح علاقات التطور الفعلية. وفي المقابل، تصبح مقارنة الجين الكامل أداة قوية تمكن من الحصول على تقييم دقيق للتطور أكثر من تلك التي تقوم على مقارنة تسلسل الجين الواحد (١، ٢). وهناك استراتيجيتان أساسيتان لدراسة مقارنة الجين الكامل، بواسطة محتوى الجين، وبمقارنات تسلسل البروتين للجينات (٣). وعندما تمت دراسة العلاقة التطورية بين الأيكوبلازما *mycoplasmas* على أساس مقارنة سلسلة البروتين لجينات ١٤٣، اتضح أن التسوية

التطورية أكبر بكثير مما حُصل بمقارنة سلسلة الـ 16S rRNA (٤). إضافة لذلك، تم الكشف عن الجينات التي تتطور في إطار اختيار يورابلزما *Ureaplasma* محددة من الأورثولوجي ١٤٣ (٥).

٢- المواد:

١-٢: التسلسل من قواعد البيانات:

إن الجينوم يحتوي على كثير من الجينات الوظيفية المجهولة. وتعمل بعض من هذه الجينات الوظيفية المجهولة على تشفير البروتينات المحفوظة بين عديد من الكائنات الحية الدقيقة المختلفة. لذلك، يجب ألا نختار الجينات البروتينية وفقاً للوظيفة المشروحة، ولكن حسب سلسلة الأحماض الأمينية المشفرة. ويعتمد اختيار مجموعة الجينات البروتينية على علاقات الكائنات الحية الدقيقة التجريبية بالكائنات الحية الدقيقة الأخرى مع بيانات الجينوم المتوفرة بالفعل لسد أغراض المقارنة. على سبيل المثال: عدد الجينات البروتينية بين الفيتوبلازما أكثر من تلك الموجودة بين الـ *Mollicutes*. وتُعد بيانات الجينوم الميكروبي الخاصة بالتحليل المقارن (MBGD، <http://mbgd.nibb.ac.jp/>) (٦) مهمة لاختيار الجينات البروتينية من بين الجينوم البكتيري المختلف. ويُمكننا من خلال هذا الموقع الإلكتروني، اختيار الكائنات الحية الدقيقة من بين أكثر من ١٠٠٠ نوع بكتيري، ووضع جدول أورثولوجي من الأنواع المنتقاة.

٢-٢: البرمجيات:

إن برنامج تحليل الوراثة الجزيئي التطوري (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) (MEGA) الإصدار ٥ (<http://www.megasoftware.net/>) (٧) هو من البرامج المفيدة للغاية لبناء محاذاة تسلسلية متعددة، وأشجار من التطور النوعي تستند على مصفوفة المسافة، وإعطاء حدٍ من أشجار السلالات المتسلسلة، وغيرها. الحساب الإحصائي لـ R (<http://www.r-project.org/>) و Microsoft Excel يمثل أهمية أساسية في العملية الإحصائية. (على سبيل المثال: بناء بيانات المصفوفة، وإعادة ترتيبها).

٣- طرق العمل:

١-٣: تحضير جدول Othologues من التسلسل البكتيري:

١. اختر الكائنات الحية الدقيقة من "اختيار الكائنات الحية الدقيقة" من الموقع الإلكتروني MBGD. على سبيل المثال: بغرض إنشاء جدول أورثولوجي بالنسبة لـ *Mollicutes*، اختر الـ *Mollicutes* 27 (*Acholeplasma laidlawii*)، *Candidatus Phytoplasma asteris* AYWB،

'Candidatus' ، 'Candidatus Phytoplasma australiense' ، 'Ca. Phytoplasma asteris' OY
M. ، M. agalactiae PG2 ، Mycoplasma agalactiae 5632 ، Phytoplasma mali'
M. ، M. gallisepticum ، M. crocodyli ، M. conjunctivae ، M. capricolum ، arthritidis
M. ، M. hyopneumoniae 7448 ، M. hyopneumoniae 232 ، M. hominis ، genitalium
M. ، M. pneumoniae ، M. penetrans ، M. mycoides ، M. mobile ، hyopneumoniae J
U. ، Ureaplasma parvum ATCC 27815 ، Mesoplasma florum ، M. synoviae ، pulmonis
U. urealyticum و parvum ATCC 700970 من قائمة أجناس البكتيريا.

٢. بعد الاختيار، انقر على "التجميع التنفيذي Execute Clustering" على الموقع الإلكتروني.
٣. قم بالتغيير من ٣ (الافتراضي) إلى ٢ "الحجم التجمع الأصغر Minimum cluster size"، في شروط البحث "Search conditions".
٤. بعدها، انقر على "إظهار الجدول التجميعي Show cluster table". وبعدها، انقر على "حفظ الجدول الذي تم اختياره Save selected table".
٥. أخيراً، قم بتحميل الجدول الأرتولوجي على حاسب من الحاسبات الخاصة (انظر: الملاحظة ١). بعدها، افتح الجدول ملف ميكروسوفت أكسل. وفي حالة الـ *Mollicutes* 27، يتم الحصول على ١٧٧٦ تجميعاً جينياً. ويمكننا اختيار جينات متطورة من سلالة معينة على أساس الجدول الأرتولوجي. على سبيل المثال: في حالة *Mollicutes* 27، ٢٧ جيناً من ١٧٧٦ تجميعاً جينياً محدداً بالفيتوبلازما (الجدول ١).

٣-٢: مقارنة الجينات بواسطة شجرة التقارب:

١. يتم إنشاء مصفوفة معلومات عن (وجود/غياب) الجين (على سبيل المثال: في حالة 27 *Mollicutes*، تجمع جين ١٧٧٦ × ٢٧ كائناً حياً دقيقاً)، وفقاً للجدول الأرتولوجي الذي تم الحصول عليه من العنوان الفرعي ٣،١ في مصفوفة معلومات (وجود/غياب) الجين، حيث إن الحضور عبارة عن "A"، والغياب "T" (انظر: الملاحظة ٢). ووفقاً لمصفوفة معلومات A/T، قم بإنشاء ملف مدخلات للمواءمة المتعددة في الـ MEGA، ويتم تعريف ملف المدخلات هذا بملف معلومات مواءمة النوكليوتيد في الـ MEGA.
٢. اختر "إنشاء/شجرة التطور المجاورة للتجربة" "Construct/Test Neighbor-joining tree" في تطور السلالة "Phylogeny". بعدها اختر "إنشاء/ شجرة الضم المجاورة للتجربة" "Construct/Test Neighbor-joining tree"، ثم اختر عدد النسخ "bootstrap" (على سبيل المثال 1000)، بعدها اختر رقم الاختلافات في "الأنموذج \ الطريقة" "Model/Method".
٣. بعدها، انقر على الحاسوب على "شجرة الضم المجاورة للـ *Mollicutes* 27" الموضحة في الشكل (انظر: الملاحظة ٣).

جدول (١): الجينات الخاصة للفيتوبلازما.

Ca. Phytoplasma mali	Ca. Phytoplasma australiense	Ca. Phytoplasma asteris AYWB	Ca. Phytoplasma asteris OY	Function	Gene name
ATP_00104	PAA_0768	AYWB_052	PAM_720	Malate/citrate symporter	<i>citS</i>
ATP_00420	PAA_0361	AYWB_617 AYWB_220 AYWB_179 AYWB_284 AYWB_077	PAM_571 PAM_074 PAM_388 PAM_645 PAM_523 PAM_550 PAM_570 PAM_686 PAM_341 PAM_334 PAM_375 PAM_545	Replicative DNA helicase	<i>dnaB</i>
ATP_00420	PAA_0361	AYWB_220 AYWB_179 AYWB_284 AYWB_046 AYWB_338 AYWB_389 AYWB_078 AYWB_617	PAM_335 PAM_571 PAM_074 PAM_388 PAM_645 PAM_523 PAM_550 PAM_570 PAM_686	Replicative DNA helicase	<i>dnaB</i>
ATP_00415	PAA_0360	AYWB_172 AYWB_086 AYWB_616 AYWB_219 AYWB_178 AYWB_285 AYWB_048	PAM_075 PAM_387 PAM_644 PAM_524 PAM_572 PAM_685 PAM_549 PAM_569	DNA primase	<i>dnaG</i>
ATP_00068	PAA_0755 PAA_0756	AYWB_529	PAM_191	ABC-type peptide/nickel transport system substrate-binding protein	<i>dppA</i>
ATP_00397	PAA_0127 PAA_0258 PAA_0723 PAA_0815 PAA_0316 PAA_0409 PAA_0790	AYWB_618 AYWB_045 AYWB_354 AYWB_206 AYWB_380 AYWB_359 AYWB_194 AYWB_233	PAM_503 PAM_566 PAM_397 PAM_536 PAM_700 PAM_760 PAM_702 PAM_323 PAM_363 PAM_511 PAM_320 PAM_360 PAM_040 PAM_656 PAM_408	DNA-directed RNA polymerase specialized sigma subunit	<i>fliA</i>

ATP_00382	PAA_0136	AYWB_096	PAM_658	Probable ATP-dependent Zn protease	<i>hflB</i>
ATP_00412	PAA_0385 PAA_0395 PAA_0600 PAA_0314 PAA_0648	AYWB_214 AYWB_373 AYWB_204 AYWB_371	PAM_326 PAM_366	ATP-dependent Zn protease	<i>hflB</i>
ATP_00222	PAA_0779	AYWB_018	PAM_030	Cation transport ATPase	<i>mgtA</i>
ATP_00048	PAA_0627	AYWB_121	PAM_612	Phosphatidylserine decarboxylase	<i>psd</i>
ATP_00047	PAA_0626	AYWB_120	PAM_613	CDP-diaclyglycerol-serine O-phosphatidyltransferase	<i>psxA</i>
ATP_00450	PAA_0769	AYWB_051	PAM_721	NAD-dependent malic enzyme	<i>sfcA</i>
ATP_00398	PAA_0724 PAA_0791 PAA_0814 PAA_0317 PAA_0408	AYWB_209 AYWB_150 AYWB_PIII07 AYWB_PII05 AYWB_PII04 AYWB_PIV05 AYWB_232 AYWB_378 AYWB_193 AYWB_271 AYWB_004	PAM_062 PAM_701 PAM_410 PAM_564 PAM_324 PAM_364 PAM_655 PAM_041 PAM_512 PAM_396 PAM_726 PAM_319 PAM_359 PAM_535 PAM_699 PAM_759	Single-stranded DNA binding protein	<i>ssb</i>
ATP_00403	PAA_0304 PAA_0365	AYWB_222 AYWB_282 AYWB_074 AYWB_181	PAM_552 PAM_344 PAM_688	Thymidylate kinase	<i>tnk</i>
ATP_00006 ATP_00492	PAA_0481	AYWB_624	PAM_092	ABC-type Mn/Zn transport system, periplasmicMn/Zn-binding protein	<i>znuA</i>
ATP_00402	PAA_0328 PAA_0399	AYWB_182 AYWB_223	PAM_071 PAM_391 PAM_648 PAM_520 PAM_543 PAM_345	Purative phage-related protein (endonuclease)	(continued)

تابع جدول (١).

<i>Ca. Phytoplasma mali</i>	<i>Ca. Phytoplasma australiense</i>	<i>Ca. Phytoplasma asteris</i> AYWB	<i>Ca. Phytoplasma asteris</i> OY	Function	Gene name
ATP_00093	PAA_0619	AYWB_113	PAM_622	Similar to phage-related protein predicted endonuclease	
ATP_00421	PAA_0354 PAA_0292 PAA_0721	AYWB_384 AYWB_614 AYWB_286 AYWB_176 AYWB_363 AYWB_216	PAM_407 PAM_525 PAM_386 PAM_573 PAM_682 PAM_684 PAM_643 PAM_338	Hypothetical protein	
ATP_00263	PAA_0283 PAA_0461 PAA_0305 PAA_0366 PAA_0442 PAA_0728	AYWB_239	PAM_554	Hypothetical protein	
ATP_00404	PAA_0410 PAA_0338 PAA_0388	AYWB_212 AYWB_376	PAM_562	Hypothetical protein	
ATP_00037	PAA_0298 PAA_0357	AYWB_019	PAM_477 PAM_031	Hypothetical protein	
ATP_00265	PAA_0138	AYWB_016	PAM_027	Hypothetical protein	
ATP_00129	PAA_0817	AYWB_559	PAM_160	Hypothetical protein	
ATP_00098	PAA_0533	AYWB_132	PAM_595	Hypothetical protein	
ATP_00144	PAA_0475	AYWB_141	PAM_606	Hypothetical protein	
ATP_00229	PAA_0522	AYWB_557	PAM_162	Hypothetical protein	
ATP_00280	PAA_0177	AYWB_543	PAM_177	Hypothetical protein	

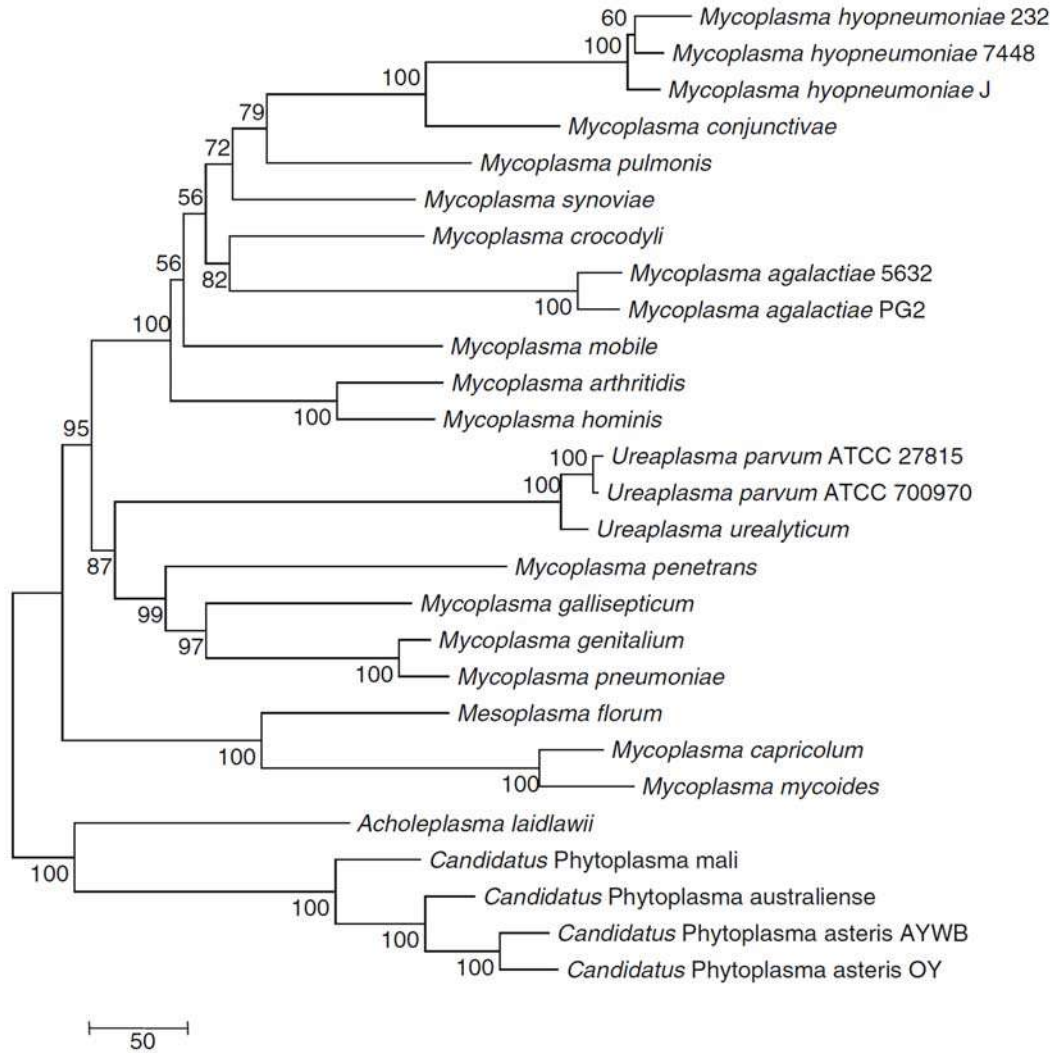
٣-٣: مقارنة التسلسل البروتيني في Othologous بواسطة شجرة التقارب:

١. تستخلص البروتينات المشتركة بين كافة الكائنات الحية الدقيقة التي وقع الاختيار عليها بروتينات للأرثولوجي وفقاً لجدول الأرثولوجي؛ والذي تم الحصول عليه في العنوان الفرعي ٣.١.
٢. افتح برنامج ال MEGA، ثم انقر على "صف التحرير\ البناء Edit/Build Alignment" على "الصف Align".
٣. اختر "إنشاء صف جديد Create a new alignment"، ثم انقر على "نعم".
٤. انسخ ملف ال FASTA لسلاسل حمض الأمينو المتعددة، ثم قم بلصقه على "Alignment Explorer" في ال MEGA.
٥. قم بإنشاء كل تنسيق متعدد لسلاسل الحمض الأميني للبروتينات المشتركة بين كافة الكائنات الحية المنتقاة باستخدام CLUSTAL W (٨) أو ال MUSCLE (٩) بالنسبة لـ MEGA.
٦. يتم وضع تسلسل كافة التسيقات المتعددة لبروتينات الأورثولوجي ملف إدخال في ال MEGA، ويتم تعريف ملف الإدخال هذا ملف معلوماتٍ تنسيقي للبروتين (alignment data file) في ال MEGA.
٧. اختر "شجرة الاحتمال القصوى للإنشاء\ الاختبار Construct/Test Maximum likelihood tree"، "شجرة الضم المجاورة للإنشاء\ الاختبار Construct/Test Neighbor-joining tree"، أو "شجرة الإمساك للإنشاء\ الاختبار Construct/Test Parsimony tree" في "الأرثولوجي Phylogeny".

٤- الملاحظات:

١. في جدول الأورثولوجي، الفراغ يعني عدم وجود جين، وتعني الجينات المتعددة في الخلية أن الجينات المتعددة في تسلسل متشابه. إن تكون منتج من منتجات الجينات في مناطق متشابهة متعددة الجينات المختلفة، يتم تصنيف الجين إلى تجمعات جينية مختلفة. ولاختيار الأورثولوجي من جينات متعددة، يجب أن ننشئ ونقيم الشجرة التطورية للجينات المتعددة.
٢. في ملف الإدخال الذي يتكون من حروف A\T، قد تتوفر أي مركبات (على سبيل المثال، G\C، G\A، وغيرها).
٣. في التحليل التطوري لـ *Mollicutes*، تشبه علاقات التطور القائمة على مقارنة محتوى الجين (شكل ١) علاقات التطور القائمة على مقارنة سلسلة البروتين الأورثولوجي (٤). وهذا اقتراح قوي بأن تحول الجين العمودي نادراً أثناء تطور ال *Mollicutes*. وبشكل مثير للاهتمام، فإن

جينوم الفييتوبلازما يحتوي على وحدات نقل محتملة وتسلسلات أولية prophage (١٠-١٢). وقد تم افتراض أن آلية إعادة تركيب الفييتوبلازما مميزة باستخدام وحدات نقل محتملة (١٠-١٢)، وهي تختلف بيئتها في النباتات والحشرات (١١). وبافتراض أن الـ *Acholeplasma* لا يوجد بها تسلسلات الـ prophage، فقد تم اقتراح أن هجوم الـ bacteriophage الأصلية تستهدف تطور الفييتوبلازما (١٢).



شكل (١): العلاقات التطورية على أساس مقارنات محتوى الجينات بين ٢٧ نوعاً من *Mollicutes*. وقد تم إجراء تحليل كتلة الـ orthologue بين ٢٧ نوعاً من البكتيريا باستخدام قاعدة بيانات الجينوم الميكروبي (MBGD) (٦). أنتج التحليل مصفوفة بيانات وجود/غياب الجينات (١٧٧٦ مجموعة جينية 27×27 كائناً حياً)، والتي استخدمت لعمل مصفوفة المسافة بين جميع أزواج الأنواع الـ ٢٧ البكتيرية على أساس مصفوفة المسافة، كما أعيد بناء شجرة المقارنة المجاورة باستخدام برنامج MEGA (٧). وتم إجراء bootstrap بـ ١٠٠٠ تكرار، وشريط يشير إلى اختلاف الجينات ٥٠.

1. Alam MT et al (2010) Genome-based phylogenetic analysis of *Streptomyces* and its relatives. *Mol Phylogenet Evol* 54:763–772
2. Oshima K et al (2011) Unique evolution of *Symbiobacterium thermophilum* suggested from gene content and orthologous protein sequence comparisons. *Int J Evol Biol* 2011:376831
3. Wolf YI et al (2002) Genome trees and the tree of life. *Trends Genet* 18:472–479
4. Oshima K, Nishida H (2007) Phylogenetic relationships among mycoplasmas based on the whole genomic information. *J Mol Evol* 65:249–258
5. Oshima K, Nishida H (2008) Detection of the genes evolving under *Ureaplasma* -specific selection. *J Mol Evol* 66:529–532
6. Uchiyama I, Higuchi T, Kawai M (2010) MBGD update 2010: toward a comprehensive resource for exploring microbial genome diversity. *Nucl Acids Res* 38:D361–D365
7. Tamura K et al (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 28: 2731–2739
8. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl Acids Res* 22:4673–4680
9. Edgar RC (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucl Acids Res* 32:1792–1797
10. Dickinson M (2010) Mobile units of DNA in phytoplasma genomes. *Mol Microbiol* 77: 1351–1353
11. Bai X et al (2006) Living with genome instability: the adaptation of phytoplasmas to diverse environments of their insect and plant hosts. *J Bacteriol* 188:3682–3696
12. Wei W et al (2008) Ancient, recurrent phage attacks and recombination shaped dynamic sequence-variable mosaics at the root of phytoplasma genome evolution. *PNAS USA* 105: 11827–11832

المُصنّف الفيزيائي *iPhyClassifier* أداة تفاعلية على الإنترنت لتصنيف الفيتوبلازما وتحديدّها

Yan Zhao, Wei Wei, Ing-Ming Lee, Jonathan Shao,
Xiaobing Suo, and Robert E. Davis

ملخص:

إن الـ *iPhyClassifier* هو أداة بحث تعتمد على الشبكة العنكبوتية لتصنيف مختلف أنواع الفيتوبلازما وتحديدّها بصورة سريعة؛ حيث يُحاكي الـ *iPhyClassifier* عملية هضم الإنزيمات بالمعامل، وما يليها من الفصل الكهربائي للجل، ويولد أنماطاً (RFLP fragment length polymorphism). وفقاً لتشابه درجات مُعامل أنماط الـ RFLP، يعطي الـ *iPhyClassifier* مقترحات لحظية لحالة تصنيف المجموعات والمجموعات الفرعية لسلاسل الفيتوبلازما قيد الدراسة. ويُسق الـ *iPhyClassifier* أيضاً السلاسل المشكوك فيها مع جميع سلاسل السلالات المرجعية للأنواع التي تم وصفها سابقاً من الـ 'Candidatus Phytoplasma'، ويحسب درجة تشابه السلاسل، ويُصنّف الفيتوبلازما قيد الدراسة إلى أنواع 'Ca. Phytoplasma' خاصة كالسلالات المترابطة؛ وذلك حسب إرشادات الإصدار الرابع التي فرضتها مجموعات تصنيف الفيتوبلازما (the Phytoplasma Taxonomy Group) لبرامج البحوث العالمية لميكوبلازما المقارن (the International Research Program on Comparative Mycoplasma Taxonomy Group). وهذا الفصل يصف عناصر البرنامج، والإجراءات التشغيلية، والمبادئ الأساسية لعملية الـ *iPhyClassifier*، ويقدم - أيضاً - النصائح حول طريقة استنباط النتائج.

الكلمات المفتاحية: وظيفة سلالات الـ 'Candidatus Phytoplasma'، *iPhyClassifier*، تصنيف الفيتوبلازما، RFLP، معامل التشابه.

١- المقدمة:

على الرغم من الجهود العديدة، فلم تكن محاولات زراعة الفيتوبلازما في أوساط البيئات الصناعية عملية ناجحة. لذلك، بالنسبة للفيتوبلازما، لا يزال من الصعب الوصول إلى الخصائص

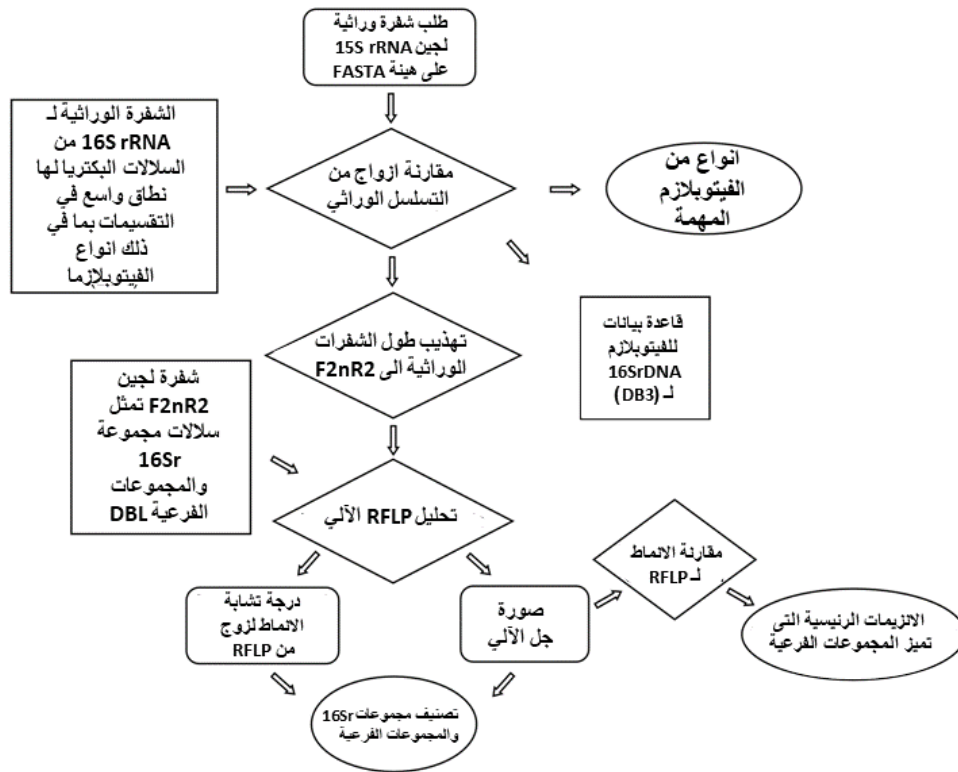
الظاهرة التي يمكن قياسها ، وتكون مناسبة لوصف العزلات والتصنيف بشكل أساسي. وبسبب التقدم في البيولوجيا الجزيئية وتكنولوجيا تضخيم الحمض النووي DNA ، أصبح من السهل تضخيم جينات الفيتوبلازما بدرجات مختلفة من سلسلة النوكليوتيدات بكميات صغيرة لك DNA المستخلص من عينات المواد المصابة (الفصل الرابع عشر والخامس عشر والسادس عشر والسابع عشر من هذا الكتاب). ونتيجة لذلك ، يمكن تحديد الجينات غير المرتبطة والعلاقات التطورية بين مختلف أنواع الفيتوبلازما؛ من خلال إخضاع الجينات المحفوظة للتحليل الجزيئي ، وتشكيل أساس تصنيف جزيئات الفيتوبلازما وتسميتها.

إن جينات تشفير الـ 16S ribosomal RNAs (rRNAs) التي تعتبر ثابتة في تسلسل النوكليوتيدات عبر الـ phytoplasma clade تحتوي على معلومات كافية لتمييز مجموعة كبيرة من سلالات الفيتوبلازما. ولذلك ، تعمل جينات الـ 16S rRNA كطابع رئيسي لتصنيف جزيئات الفيتوبلازما وتسميتها. وقد تم وضع تصنيف للمستوى الجيني *Phytoplasma 'Candidatus'* ، ونماذج تصنيف للفيتوبلازما الموجودة وفقاً لسلاسل جين الـ 16S rRNA (1-5) ، وتم بناء الأخرى على أساس تحليل أنماط تعدد أطوال جزء الحصر (RFLP) للأنماط الجينية لك الـ 16S rRNA المكبر بالنسبة لك 1.2 Kb لتفاعل تسلسل البلمرة (PCR) (6-9) ، بينما يمكن اعتماد كل أشكال التصنيف لمختلف أنواع الفيتوبلازما إلى مجموعات ، وتوفر الأخيرة آلية مهمة من الآليات؛ بتمييز الاختلافات غير الملحوظة لنمط الـ RFLP ، لتعريف مجموعة سلالات فرعية مميزة بين أنواع الفيتوبلازما الموجودة داخل المجموعات الفردية وتمييزها. وبالتحديد الدوري والتطور الحديث لتحليل الـ RFLP المشابه للتحليل الحاسوبية ، تم تحديد نمط التصنيف القائم على PCR-RFLP إلى 31 مجموعة من مجموعات الفيتوبلازما ، وأكثر من 100 مجموعة فرعية (10-17).

وقد تم -بشكل مثالي- إجراء تحليل الـ PCR-RFLP لقطاعات الفيتوبلازما الـ 16S rRNA في غياب المعلومات الكاملة لتسلسل النوكليوتيد. وفي الوقت الحالي ، أصبحت معلومات التسلسل متاحة بسهولة ، فهل لا يزال تحليل الـ RFLP أداة مفيدة لتحديد الفيتوبلازما وتصنيفها؟ نعتقد أن الإجابة إيجابية. أولاً: قدمت أنماط الفيتوبلازما الـ RFLP الـ 16S rRNA مفاتيح معيارية لتوصيف سلالات الفيتوبلازما وتصنيفها ، وقد أصبحت الأساس الفعال في مجال التصنيف والتعريف. ثانياً: على الرغم من أن المقارنة التسلسلية المتبادلة وتحليل السلالات يمكن استخدامها لتقييم العلاقات بين سلالات الفيتوبلازما ، فإن النتائج (نسبة تشابه التسلسل أو طوبولوجية الشجرة) لا تكشف عن العلامات "المرئية" التي يقدمها تحليل الـ RFLP بشكل مباشر.

وفي حين أن تحليل الـ RFLP أداة قيّمة لدراسة تنوع الفيتوبلازما وتصنيفها ، فقد تطورت الطريقة التي يتم بها تحليل الـ RFLP. ويمثل إدخال تحليل الـ RFLP الظاهري تقدماً تقنياً في تحديد الفيتوبلازما وتصنيفها. يُصدر الـ iPhyClassifier تسلسل جين الـ 16S rRNA وفقاً لأدوات البحث الخاصة بالفيتوبلازما على الشبكة العنكبوتية. وقد تم استنباط وظيفة الـ iPhyClassifier في

تصنيف المجموعة المجموعة الفرعية وفقاً لتحليل الـ PCR-RFLP القائم على نمط تصنيف الفيتوبلازما (٨، ١٤)، وتم تصميم وظيفة تعريف التصنيف بعد أن قامت اللجنة الدولية المنهجية للتصنيف البكتريولوجي (the International Committee of Systematic Bacteriology Subcommittee) بوضع مجموعة من المبادئ التوجيهية للرخويات *Mollicutes*، وبرنامج البحوث الدولي لمقارنة الميكوبلازما (the International Research Program for Comparative Mycoplasma Mycoplasma)، وفريق عمل الفيتوبلازما / الاسبيروبلازما - لمجموعة تصنيف الفيتوبلازما (Phytoplasma/Spiroplasma Working Team Phytoplasma Taxonomy Group) (١٨) (انظر: الملاحظة ١). والعملية التشغيلية لـ iPhyClassifier موضحة في شكل (١).



شكل (١): شكل تخطيطي للعملية التشغيلية لـ iPhyClassifier. وتمثل المستطيلات المدخلات والمخرجات، والمربعات تمثل قواعد البيانات، ويمثل الشكل المعين العمليات الحسابية، وتمثل الأشكال البيضاوية نتيجة التوصيات بشأن تعيين أنواع "Candidatus Phytoplasma"، وحالة تكوين مجموعة 16Sr والمجموعة الفرعية، ونوع الإنزيمات الرئيسية التي تميز سلالات المجموعات الفرعية من الفيتوبلازما متميزة. DB1، مجموعة من تسلسل 16S rRNA كامل - أو شبه كامل - الطول من السلالات المرجعية لجميع الفيتوبلازما المعروفة، وأنواع الفيتوبلازما، والسلالات المرجعية المقترحة (١١، ١٨)، ولكن لم يتم بعد وصفها رسمياً نوعاً من أنواع فيتوبلازما، وسلالات من أنواع بكتيرية أخرى تغطي مجموعة واسعة من التصنيفات؛ DB2، ومجموعة من المتواليات F2nR2 من السلالات تمثل: جميع المجموعات Sr16 والفيتوبلازما Sr16، والمجموعات الفرعية؛ DB3، ومجموعة من متواليات F2nR2 تم تجميعها من جميع المتواليات 16S rRNA المدونة حالياً في بنك الجينات.

٢- المواد:

١-٢: متطلبات النظام ونقطة الدخول:

يمكن تشغيل الـ *iPhyClassifier* من أي حاسب آلي موصل بالشبكة العنكبوتية، بغض النظر عن منصته (PC، Mac، Unix، أو Linux) ونظام التشغيل الأساسي. ولا يتطلب توفر نظام مُحدد من hardware أو software، بخلاف (مستعرض الويب web browser) الذي يعتبر وجوده أساسياً. وبالرغم من أن كافة متصفحات الويب تشتمل على Mozilla Firefox، Internet Explorer، و Google Chrome، وتعمل بفاعلية مع *iPhyClassifier*، إلا أن أفضل طريقة لمشاهدة صورة الجمل العلمية تكون باستخدام Mozilla Firefox. ويمكن -أيضاً- تشغيل الـ *iPhyClassifier* من أجهزة الهاتف المحمول، مثل: الـ iPad، iPhone والـ Google phone. وعنوان الموقع الـ *iPhyClassifier* هو: <http://plantpathology.ba.ars.usda.gov/cgi-bin/resource/iphyclassifier.cgi>

٢-٢: مكونات البرنامج:

- إن النسخة الجديدة من الـ *iPhyClassifier* تتكون من ثلاثة برامج منفصلة، وهي:
١. PM1: الذي يبحث في تسلسلات المتشابه، وحساب نقاط التشابه (انظر: الملاحظة ٢).
 ٢. PM2: الذي يقوم بتهيئة التسلسلات، ويحاكي تحليل الـ RFLP (انظر: الملاحظة ٣).
 ٣. PM3: برنامج رسم افتراضي للرحلان الكهربائي للجل (PM3) (انظر: الملاحظة ٤).

٣- طرق العمل:

١-٣: إدخال التسلسل الخاص بصيغة الاستعلام:

١. إن أفضل طلب تسلسل لشفيرات الأمثال هو أن يكون كاملاً أو شبه كامل لجين الـ 16S rRNA. وعلى الأقل، يجب أن يحتوي على المنطقة الكاملة للـ F2Nr2 الخاصة بجين الـ 16S rRNA (انظر: الملاحظة ٥). ويجب ألا تحمل رموزاً غير معروفة، ويجب -أيضاً- أن يتم تجميعها على صيغة فاستا (FASTA) (١٩) (انظر: الملاحظة ٦).
٢. تتواجد لوحة الإدخال للسلاسل المطلوبة من الجانب الأيسر لصفحة *iPhyClassifier*.
٣. كما يمكن -أيضاً- إرسال التسلسل المستعلم على هيئة ملف مجمع من قبل من حاسوب المستخدم إلى خادم شبكة الـ *iPhyClassifier*، أو من خلال كتابته أو لصقه إلى نافذة إدخال تسلسل الصيغة مباشرة. ويمكن إدخال عديد من تسلسلات صيغ الاستعلام معاً إلى عديد من صيغ فاستا (FASTA) (لائحة من تسلسلات متصلة في صيغة فاستا).

٣-٢: اختيار الوظائف وتقديم الاستعلام:

١. تتواجد لوحة اختيار الوظيفة والعرض والاستعلام على الناحية اليمنى لصفحة ويب الـ iPhyClassifier.
٢. يتم اختيار وظيفة -أو أكثر- في عملية واحدة؛ من خلال وضع علامة على المربع (المربعات) الموجود على جهة الوظيفة (الوظائف) على اليسار. ويمكن أن يؤدي إصدار الـ iPhyClassifier الحالي مجموعة الوظائف التالية:
 - يقترح نوع الفيتوبلازما 'Candidatus Phytoplasma'.
 - تصنيف المجموعة 16Sr والمجموعة الفرعية.
 - حساب معامل التشابه RFLP.
 - إنتاج صورة مرئية للجل.
 - مقارنة أنماط الـ RFLP.
٣. بالنسبة لحساب معامل تشابه الـ RFLP، يمكن أن يقوم المستخدم بتحديد الحد الأقصى للطول (٠، ١، ٢، ٣، ٤، ٥، أو ٦ نيوكليوتيدات)؛ والذي يمكنه أن يختلف في قسمين من أقسام الـ DNA. ومع ذلك، يُعتبر طولاً يُمثل الحجم نفسه أثناء مقارنة الأنماط، وقيمة الانحراف الافتراضي خمس نيوكليوتيدات.
٤. يمكن للمستخدم تحديد نمط الإنزيمات ومجموعة الفيتوبلازما التي سيتم مقارنتها بسلالة (سلالات)؛ وذلك باستخدام القائمة الموجودة بجانب وظيفة مقارنة نمط الـ RFLP على صفحة الموقع (انظر: الملاحظة ٧).
٥. بعد اختيار الوظائف المطلوبة والمعلومات المناسبة، انقر على زر: "تأكيد التحقق (submit query)" للشروع في عملية الـ iPhyClassifier.

٣-٣: مخرجات البرنامج ومناقشة النتائج:

٣-٣-١: تحديد نوع Candidatus phytoplasma:

١. إن الخطوة الأولى في عملية تحديد أنواع الـ 'Ca . Phytoplasma' هي المقارنة بين السلالات المراد التحقق منها وسلاسل قاعدة بيانات الـ DB1 (انظر: الملاحظة ٨)؛ لتحديد الأنواع ومدى مقاربتها لبعضها بعضاً بشكل سريع، وذلك باستخدام الـ BLAST algorithm (٢٠).
٢. إن لم يظهر أي نوع من أنواع الـ 'Ca . phytoplasma' في الـ DB1 من بين أعلى ٥٠ نتيجة مُكررة من بحث الـ BLAST، أو في حالة ظهور نوع واحد -أو أكثر- من أنواع الـ 'Ca . phytoplasma' بين أعلى النتائج، ولكن تسلسله يشبه تسلسل البحث بنسبة أقل من أو

- تساوي ٩٠٪، سيتم إلغاء العملية، وتظهر رسالة تحذيرية بأن التسلسل المُحقق ليس من سلالات الفيتوبلازما نفسها.
٣. إن ظهر نوع واحد -على الأقل- من أنواع الـ 'Ca . phytoplasma' من بين أعلى ٥٠ نتيجة مُكررة لبحث الـ BLAST، وتسلسله تشابه بتسلسل البحث عن المُحقق بنسبة أكبر من -أو تساوي- ٩٠٪ تستمر العملية، ويحول تسلسل المُحقق إلى برنامج الـ cLUSTALw (٢١)؛ حتى يتم تنسيقه كلياً مع كافة سلاسل الفيتوبلازما في قاعدة بيانات الـ DBIphy (وهي مجموعة فرعية من الـ DBI)، ولحساب مجموع السلاسل المتشابهة (انظر: الملاحظة ٩).
٤. وفقاً لنتيجة أكثر التسلسلات تشابهاً، توضح الأمثلة التالية أنواع البيانات المخرجة:
- الحالة ١: حاصل التشابه بين شفرات التسلسل المراد التحقق منها والتسلسل الأكثر بحثاً ١٠٠٪. يكون تسلسل جين التحقق 16S rRNA مطابقاً لتسلسل السلالة المرجعية 'Ca' 'Phytoplasma name' (GenBank accession number). إن الفيتوبلازما قيد الدراسة إما سلالة مرجعية 'Ca . Phytoplasma name' أو سلالة من السلالات المشابهة لها؛ والتي لا يمكن تمييزها بتسلسل الـ 16S rRNA وحده.
- الحالة ٢: حاصل التشابه بين شفرات التسلسل المراد التحقق منها والتسلسل الأكثر بحثاً أكثر من ٩٧,٥٪ وأقل من ١٠٠٪. ويُشارك تسلسل جين الـ 16S rRNA أوجه شبه تسلسل السلسلة المرجعية 'Ca . Phytoplasma name' (GenBank accession number) والسلالة قيد الدراسة سلالة مشابهة للـ "Ca. phytoplasma name".
- الحالة ٣: حاصل التشابه بين شفرات التسلسل المراد التحقق منها والتسلسل الأعلى بحثاً أكثر من ٩١٪ وأقل من -أو يساوي- ٩٧,٥٪، ويشابه تسلسل جين التحقق 16S rRNA تسلسل أي سلالة من السلالات المرجعية التي تم الإشارة إليها -فيما سبق- بنسبة ٩٧,٥٪. إن أقرب نوع من أنواع الفيتوبلازما هو 'Ca . Phytoplasma name'، والتي تُشارك تسلسل جين الـ 16S rRNA الخاص بها في جوانب تشابه بنسبة n% من تسلسل التحقق. وبالتالي، تُعتبر الفيتوبلازما قيد الدراسة هي Ca Phytoplasma نوعاً جديداً. (١٨).

٣-٣-٢: مجموعة 16Sr / تصنيف المجموعة الفرعية:

- وفقاً للأساس المتفق عليه (انظر: الملاحظة ١٠)، واعتماداً على حاصل مُعامل التشابه، توضح الأمثلة التالية أنواع حالة البيانات المخرجة:
- الحالة ١: عندما يكون حاصل التشابه بين شفرات التسلسل المراد التحقق منها يساوي ١,٠٠؛ فإن هذا يعني أن الـ RFLP الافتراضي الفعلي المشتق من الجزء F2nR2 لجين التحقق 16S rRNA متطابق مع النمط المرجعي الخاص بمجموعة الـ 16Sr (حروف

المجموعة -على سبيل المثال- 16SrI)، والمجموعة الفرعية (حروف المجموعة الفرعية -على سبيل المثال- A) (GenBank accession number). وتكون الفيتوبلازما - قيد الدراسة- عضواً من الأعضاء (على سبيل المثال، 16SrI-A).

الحالة ٢: عندما يكون حاصل التشابه بين شفرات التسلسل المراد التحقق منه أكبر من ٠,٩٧ -أو أقل من- ٠,١٠. ويُشابه النمط الفعلي لل RFLP الافتراضي المشتق من الجزء F2nR2 لجين التحقق 16S rRNA والنمط المرجعي الخاص بمجموعة الـ 16Sr إلى حد كبير (حروف المجموعة -على سبيل المثال- 16SrII)، والمجموعة الفرعية (حروف المجموعة الفرعية -على سبيل المثال- B) (GenBank accession number)، بقيمه معامل تشابه لنمط من الأنماط (٩٨٪، على سبيل المثال). والفيتوبلازما قيد الدراسة مختلفة للـ (16SrII-B، على سبيل المثال).

الحالة ٣: عندما يكون حاصل التشابه بين شفرات التسلسل المراد التحقق منه أكبر من ٠,٨٥ -أو يساوي- ٠,٩٧؛ ويختلف النمط الفعلي لل RFLP الافتراضي المشتق من الجزء F2nR2 لجين التحقق 16S rRNA عن النمط المرجعي الخاص بكافة مجموعات المجموعات الفرعية للـ 16Sr السابقة. والنمط الفعلي للمجموعة الـ 16Sr هو النمط الأكثر تشابهاً له (حروف المجموعة 16SrIII، على سبيل المثال)، والمجموعة الفرعية (حروف المجموعة الفرعية C، على سبيل المثال) (GenBank accession number)، بقيمه التشابه ٩٥٪ (على سبيل المثال). وقد تعبر هذه السلالة عن وجود مجموعة جديدة من المجموعات الفرعية بداخل المجموعة الـ 16Sr (16SrIII) في هذا المثال). ومن الأفضل أن يقوم المستخدم بمقارنة الأنماط الافتراضية لل RFLP بعضها بعضاً، وتحديد الإنزيمات الأساسية التي تُميز النمط الجديد للمجموعة الفرعية عن أنماط المجموعات الفرعية المعروفة. وقد يعمل الإنزيم الهاضم (الإنزيمات) الأساسي في المختبر على دعم نمط المجموعة الفرعية الجديد.

الحالة ٤: عندما يكون حاصل التشابه بين شفرات التسلسل المراد التحقق منه يساوي -أو أقل من- ٠,٨٥؛ يختلف النمط الافتراضي لل RFLP المشتق من الجزء F2nR2 لجين التحقق 16S rRNA عن النمط المرجعي التابع لكافة المجموعات الفرعية الـ 16Sr. والنمط المرجعي لمجموعة الـ 16Sr (حروف المجموعة) هو الأقرب من حيث التشابه، والمجموعة الفرعية (حروف المجموعة الفرعية) (GenBank accession number)، بقيمة معامل التشابه ٠,٧٤ (على سبيل المثال). وقد تعبر هذه السلالة عن مجموعة من المجموعات الجديدة. ومن الأفضل أن يقوم المستخدم بمقارنة الأنماط الافتراضية لل RFLP بعضها بعضاً، وأن يُحدد الإنزيمات الأساسية التي تُميز النمط الجديد للمجموعة الفرعية عن أنماط المجموعة الفرعية

التي تم تعريفها فيما سبق. وقد يعمل إنزيم الهضم (الإنزيمات) الأساسي في المختبر على دعم نمط المجموعة الفرعية الجديد.

٤- الملاحظات:

١. من المعروف أن أنواعاً عديدة من الفيتوبلازما لها مشغلان *rrnA* ، ribosomal RNA operons ، *rrnB* و *rrnB*. في حين أن مشغلي الـ *rrn* قد يكونان متطابقين في بعض سلالات الفيتوبلازما ، وفي سلالات أخرى يوجد بعض الاختلافات (٢٢-٢٧). وقد يؤثر تباين تسلسل الـ *rrn* operons المختلف على مواقع عمل الإنزيم الموجودة في منطقة الـ F2Nr2 من جين الـ 16SrRNA. ونتيجة لذلك ، قد يعبرنوع من أنواع الفيتوبلازما عن نوعين مختلفين من أنماط الـ 16Sr RFLP الافتراضية. لذلك ، من المهم التفريق بين نوع (أنواع) نمط المجموعة الفرعية وتعريف المجموعة الفرعية الأخيرة ، ويجب تجنب تعيين السلالة نفسها في مجموعتين فرعيتين مختلفتين للـ 16Sr عن طريق الخطأ. وفي هذا الصدد ، تستخدم الـ *iPhyClassifier* ثلاثة حروف للمجموعة الفرعية (١٢)؛ حيث يعبر الحرف الأول والثاني عن نوع الـ *rrnA* والـ *rrnB* على التوالي لنمط الـ RFLP ، ويُعرف الحرف الثالث المجموعة الفرعية 16Sr. على سبيل المثال: تنتمي الفيتوبلازما من نوع *Paulownia witches'-broom* (PaWB) إلى المجموعة الفرعية 16SrI-D (٧)، التي تم تحديدها فيما سبق؛ حيث لديها تسلسلان operon مختلفان في الـ rRNA يعملان بنوعين مختلفين من نمط الـ 16Sr RFLP ، وهما المجموعة الفرعية 16SrI-B و 16SrI-D ، بالترتيب. لذلك ، تم إعادة تعريف حالة المجموعة الفرعية PaWB لتصبح 16SrI-(B/D) (١٢). وبالمثل ، تم إعادة تعريف الفيتوبلازما التي تقع تحت تصنيف الـ clover phyllody (CPh) ، وهي عضو من أعضاء المجموعة الفرعية 16SrI-C ، لتصبح 16SI-(R/S)C (١٦). ومؤخراً ، تم تعديل الـ *iPhyClassifier* ليشتمل على مجموعات فرعية متداخلة بالنسبة لأنواع الفيتوبلازما التي تعمل بها الـ *rrnA* والـ *rrnB* بنوعين مختلفين من نمط الـ F2nR2 RFLP.
٢. يُقارن الـ PM1 تسلسلات جين الـ 16S rRNA ، والذي تم أخذه من سلالة بكتيرية حيث أقسامها المصنفة متشعبة ، بتسلسل من تسلسلات التحقق ، ويُحدد ما إن كان أصل تسلسل التحقق من الفيتوبلازما أم لا؟ وإن اتضح أن تسلسل التحقق من الفيتوبلازما ، عندها يقوم البرنامج بصف تسلسل التحقق مع تسلسلات الـ 16S rRNA من السلالات المرجعية لكافة أنواع الفيتوبلازما 'Phytoplasma' . Ca التي سبق شرحها ، ويقوم بحساب حاصل التسلسلات المتشابهة ويُحدد السلسلة المتطورة الأقرب للفيتوبلازما قيد الدراسة.
٣. يعمل الـ PM2 بتسويق تسلسل جين التحقق الـ 16S rRNA من فيتوبلازما في منطقة الـ F2nR2 بأكملها ، وبالحاسوب يُجري تحليل RFLP حسب التسلسل المعروف لـ ١٧ مجموعة من مجموعات إنزيمات (*Hin* ، *Hha* I ، *Hae* III ، *Eco* RI ، *Dra* I ، *Bst* UI ، *Bfa* I ، *Bam* HI ، *Alu* I)

fl، Hpa I، Hpa II، Kpn I، Sau 3AI، Mse I، Rsa I، Ssp I، و Taq I)، ويُقارن خصائص الـ RFLP الناتجة بخصائص السلالة المرجعية لكل مجموعة\مجموعة فرعية من مجموعات الفيتوبلازما التي تم شرحها سابقاً، ويقوم بحساب كل معاملين من معاملات تشابه نمط الـ RFLP وفقاً للمعادلة التالية (٧، ٢٨):

$$F = 2N_{xy}/(N_x + N_y),$$

حيث إن الـ x والـ y تُشيران إلى سلالتين تحت قيد البحث من المعطيات، والـ N_x والـ N_y حاصل مجموع أجزاء الـ DNA (الروابط) الناتجة عن هضم ١٧ إنزيمياً بداخل السلالة x و y على التوالي، والـ N_{xy} هو عدد الأجزاء المشتركة بين السلالتين. ويتم استخدام قيم معاملات التشابه لتحديد درجة ترابط المجموعة\والمجموعة الفرعية الفيتوبلازما التي يتم دراستها، ولعرض المجموعة\والمجموعة الفرعية الفيتوبلازما الجديدة.

٤. يعمل الـ PM3 على اعتماد الطريقة المستخدمة في المختبر لفصل أجزاء الـ DNA من خلال الفصل الكهربائي بجل الآجاروز، ويُخرج صورة مرئية لهضم افتراضي بالحاسب الـ *Silico* لجين التحقق الـ 16S rRNA التسلسلي، وسلاسل جين الـ 16S rRNA الخاصة بالسلالات المرجعية المتفرعة من المجموعات التي سبق تحديدها.

٥. غالباً ما يكون طول منطقة الـ F2nR2 حوالي 1.25 kb، ويتم تحديدها بكتلتين متسلسلتين محفوظتين ومطابقتين للصلق الشريط الـ R16F2n (5'-GAAACGACTGCTAAGACTGG-3') بشريط الـ R16R2 (3'-TGACGGGCGGTGTGTACAAACCCG-5') في جين الـ 16S rRNA بالفيتوبلازما (٢٩).

٦. لأن العملية التشغيلية للـ iPhyClassifier تعتمد على المعلومات المتسلسلة فقط، فإن أي خطأ بسلسلة من سلاسل التحقق يتعلق بعرض الفيتوبلازما قيد الدراسة بطريقة خاطئة يؤدي إلى تصنيف المجموعة\المجموعة الفرعية وأنواع الـ *Candidatus* الخطأ وتحديدها. وفي حين أن الأخطاء التي تتعلق بالتسلسل قد تظهر في مختلف المراحل بدءاً من تضخيم الـ PCR وسلسلة الـ DNA، وغالباً تحدث بطريقة عشوائية، ويمكن الحد منها عن طريق استخدام عدد من العينات. وللتأكد من تلك النتائج الصحيحة، ننصح بشدة أن تحتوي البيانات المتسلسلة -على الأقل- نوعين مختلفين؛ أحدهما من نبات مصاب بالفيتوبلازما، والآخر من حشرات ناقلة للمرض. وإن تم توفير عينة لحشرة أو نبات مصاب واحد بغرض الدراسة، فيجب الحصول على بيانات تسلسل مرتبطة بتفاعلي PCR منفصلين.

٧. كلا الوظيفتين منوط بتوليد صور افتراضية للجل، والوظيفة الأخرى هي مقارنة أنماط الـ RFLP التي ينتج عنهما صور مشابهة للصور الناتجة من تحليل الـ PCR-RFLP بالفصل الكهربائي بجل الآجاروز. وينتج عن الوظيفة الأولى صور افتراضية بالجل الناتج من الحاسب

silico؛ والتي تهضم سلسلة (سلاسل) 17 إنزيماً كلا على حده. بينما تُقارن الوظيفة الأخرى الصور الجل الناتجة عن هضم *silico* لسلسلة (سلاسل) المُحَقَّق وسلاسل المرجع للمجموعة المجموعة الفرعية التي سبق تحديدها. وتُساعد الوظيفة الثانية في تحديد الإنزيمات الرئيسية التي يتم استخدامها في تفريق أنماط مختلفة المجموعات / والمجموعات الفرعية.

8. DB1 هي قاعدة بيانات مكونة من جين الـ 16S rRNA كاملاً -أو شبه كامل- من ناحية الطول؛ والذي تم أخذه من السلالات المرجعية، مثل: الفيتوبلازما من النوع . Ca التي تم تحديدها فيما سبق، والسلالات المرجعية الأخرى للفيتوبلازما من النوع 'Ca . Phytoplasma' التي تم عرضها دون شرح مفصل، وكافة السلالات بدائية النواة.

9. حسب الأساس المتفق عليه حول تسلسل جين الـ 16S rRNA في الأنواع بدائية النواة (30، 31)، يقوم *iPhyClassifier* بتنفيذ الخطوات الخاصة ببناءً على مجموعة تصنيف *Phytoplasma* IRPCM (Phytoplasma Taxonomy Group) (18)، ويقوم بتجهيز 97,5% من السلاسل المتشابهة داخل جين الـ 16S rRNA؛ كالقيمة المنفصلة للأنواع الـ 'Candidatus Phytoplasma' الجديدة.

10. إن مُخطَط تصنيف المجموعة المجموعة الفرعية للفيتوبلازما؛ والذي يتم تطبيقه في *iPhyClassifier* يقوم -وفقاً لتحليل مجموعة مُعينة من الإنزيمات الهاضمة المكونة من 17 إنزيماً في جزء الـ F2NR2- بجين الـ 16S rRNA الخاص بالفيتوبلازما (7، 12). وإن لم يحتو تسلسل من تسلسلات التحقق على منطقة الـ F2nR2 بأكملها، يُعطى الـ *iPhyClassifier* أنماطاً غير دقيقة من الـ RFLP وتصنيفاً خاطئاً. وتم تحديد قيمة من قيم مُعامل التشابه -والتي تبلغ 0,97- بأنها القيمة المسموح بها لتمثيل نوع نمط الـ RFLP في مجموعة مُعينة. ولذلك، فإن بلغ مُعامل تشابه النمط الافتراضي الخاص الـ RFLP المشتق من جزء الـ F2nR2 بجين الـ 16S rRNA الخاص بسلالة الفيتوبلازما قيد الدراسة 0,97- أو أقل من ذلك- مقارنةً بسلالات المجموعة الفرعية المرجعية، فيتم حينها اعتماد نوع جديد من نمط مجموعة من المجموعات الفرعية. ومن ناحية أخرى، ووفقاً للمجموعات التي تم تحديدها سابقاً، تُشير قيمة مُعامل التشابه التي تبلغ 0,85- أو أقل من ذلك- إلى كافة المجموعات الفرعية التي تم تحديدها سابقاً إلى مجموعة الـ 16Sr الجديدة. وأنماط الـ RFLP التي يبلغ مُعامل تشابهها 0,99 أو 0,98، بالنسبة لنوع النمط المرجعي للعضو؛ والذي تم اختياره لتمثيل مجموعة فرعية مُعينة يتم اعتبارها أنماطاً مُتغيرة لنوع معين من النمط المعياري.

المراجع:

1. Kuske CR, Kirkpatrick BC (1992) Phylogenetic relationships between the western aster yellows mycoplasma-like organism and other prokaryotes established by 16S rRNA gene sequence. *Int J Syst Bacteriol* 42:226-233

2. Namba S et al (1993) Phylogenetic diversity of phytopathogenic mycoplasma-like organisms. *Int J Syst Bacteriol* 43:461–467
3. Gundersen DE et al (1994) Phylogeny of mycoplasma-like organisms (phytoplasmas): a basis for their classification. *J Bacteriol* 176:5244–5254
4. Schneider B et al (1995) Phylogenetic classification of plant pathogenic mycoplasma-like organisms or phytoplasmas. In: Razin R, Tully JG (eds) *Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmaology*. Academic, San Diego, pp 369–380
5. Seemüller E et al (1998) Current status of molecular classification of the phytoplasmas. *J Plant Pathol* 80:3–26
6. Lee I-M et al (1993) Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of mycoplasma-like organisms. *Phytopathology* 83:834–842
7. Lee I-M et al (1998) Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analyses of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences. *Int J Syst Bacteriol* 48:1153–1169
8. Lee I-M, Davis RE, Gundersen-Rindal DE (2000) Phytoplasma: phytopathogenic mollicutes. *Annu Rev Microbiol* 54:221–255
9. Schneider B et al (1993) Classification of plant pathogenic mycoplasma-like organisms using restriction-site analysis of PCR-amplified 16S rDNA. *Microbiology* 139:519–527
10. Lee I-M et al (2006) ‘*Candidatus Phytoplasma americanum*’, a phytoplasma associated with a potato purple top wilt disease complex. *Int J Syst Evol Microbiol* 56:1593–1597
11. Wei W et al (2007) Computer-simulated RFLP analysis of 16S rRNA genes: identification of ten new phytoplasma groups. *Int J Syst Evol Microbiol* 57:1855–1867
12. Wei W et al (2008) Automated RFLP pattern comparison and similarity coefficient calculation for rapid delineation of new and distinct phytoplasma 16Sr subgroup lineages. *Int J Syst Evol Microbiol* 58:2368–2377
13. Zhao Y et al (2009) ‘*Candidatus Phytoplasma tamaricis*’, a novel taxon discovered in witches’ broom-diseased salt cedar (*Tamarix chinensis* Lour.). *Int J Syst Evol Microbiol* 59:2496–2504
14. Zhao Y et al (2009) Construction of an interactive online phytoplasma classification tool, iPhyClassifier, and its application in analysis of the peach X-disease phytoplasma group (16SrIII). *Int J Syst Evol Microbiol* 59: 2582–2593
15. Jomantiene R et al (2010) Onion is host for two phytoplasma lineages, subgroups 16SrI-A and 16SrI-(B/L)L, in Lithuania: a Hinf I site revealed a SNP marking divergent branches of evolution. *J Plant Pathol* 92:461–470
16. Jomantiene R et al (2011) Phytoplasmas infecting sour cherry and lilac represent two distinct lineages having close evolutionary affinities with clover phyllody phytoplasma. *Eur J Plant Pathol* 130:97–107
17. Lee I-M et al (2011) ‘*Candidatus Phytoplasma costaricanum*’, a new phytoplasma associated with a newly emerging disease in soybean in Costa Rica. *Int J Syst Evol Microbiol*. doi: 10.1099/ijs.0.029041-0

18. The IRPCM Phytoplasma/Spiroplasma Working Team—Phytoplasma taxonomy group (2004) ‘ Candidatus Phytoplasma ’, a taxon for the wall-less, non-helical prokaryotes that colonize plant phloem and insects. *Int J Syst Evol Microbiol* 54:1243–1255
19. Pearson WR, Lipman DJ (1988) Improved tools for biological sequence comparison. *PNAS USA* 85:2444–2448
20. Altschul SF et al (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215:403–410
21. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl Acids Res* 22:4673–4680
22. Schneider B, Seemüller E (1994) Presence of two sets of ribosomal genes in phytopathogenic mollicutes. *Appl Environ Microbiol* 60:3409–3412
23. Liefing LW et al (1996) Sequence heterogeneity in the two 16S rRNA genes of Phormium yellow leaf phytoplasma. *Appl Environ Microbiol* 62:3133–3139
24. Davis RE, Sinclair WA (1998) Phytoplasma identity and disease etiology. *Phytopathology* 88:1372–1376
25. Davis RE, Dally EL (2001) Nonfunctional tRNA gene in an unusual example of rRNA interoperon sequence heterogeneity in phytoplasma. *Phytopathology* 91:S21
26. Davis RE et al (2003) Differential amplification of sequence heterogeneous ribosomal RNA genes and classification of the ‘ *Fragaria multicipita* ’ phytoplasma. *Microbiol Res* 158:229–236
27. Jomantiene R et al (2002) New group 16SrIII phytoplasma lineages in Lithuania exhibit interoperon sequence heterogeneity. *Eur J Plant Pathol* 108:507–517
28. Nei M, Li W-H (1979) Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *PNAS USA* 76:5269–5273
29. Gundersen DE, Lee I-M (1996) Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal primer pairs. *Phytopathol Mediterr* 35:144–151
30. Murray RGE, Schleifer KH (1994) Taxonomic notes: a proposal for recording the properties of putative taxa of prokaryotes. *Int J Syst Bacteriol* 44:174–176
31. Stackebrandt E, Goebel BM (1994) Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int J Syst Bacteriol* 44:846–849

التحليل البروتيني

(Proteomic) للفيتوبلازما

Xianling Ji and Yingping Gai

ملخص:

أصبح البروتين أداة من الأدوات القوية التي تُستخدم في وصف الخصائص الوظيفية للكائنات الحية الدقيقة، ويعتمد على طريقة منظمة وكاملة وشاملة للفهم البيولوجي. والخطوة التي تلي ترتيب المحتوى الوراثي بالفيتوبلازما في السلاسل - هي القيام بتحديد خصائص بروتين الفيتوبلازما؛ من أجل الحصول على شرح دقيق لكافة الجينات وموادها البروتينية. وفي هذا الفصل، نقوم بشرح طرق عمل تنقية فيتوبلازما الـ mulberry dwarf، واستخلاص بروتين الفيتوبلازما، وفصلها عن طريق الـ SDS-PAGE، والجل الهضم الثلاثي للبروتينات (in-gel tryptic digestion of the proteins)، وفصل سلاسل الببتيد السائل (liquid chromatography)، وتحديد سلاسل الببتيد بمطياف الكتلة (mass spectrometry). ويمكن تطبيق طريقة العمل - التي تم شرحها في هذا الفصل - على تحليل بروتينومات الفيتوبلازما.

الكلمات المفتاحية: هضم سلاسل الببتيد، LC-MS/MS، SDS-PAGE، القصف البروتيني shotgun proteomics.

١- المقدمة:

إن الفيتوبلازما تُصيب أنواعاً عديدة من النباتات، تصل إلى ١٠٠ نوع (١). ومعروف أن صعوبة تربية الفيتوبلازما في المختبر تُعيق القدرة على تحديد خصائصها في المستوى الجزيئي (٢). والخطوة التي تلي ترتيب المحتوى الوراثي بالفيتوبلازما في سلاسل الببتيد هي القيام بتحديد خصائص بروتينوم الفيتوبلازما؛ من أجل الحصول على شرح دقيق لكافة الجينات وموادها البروتينية. لذلك، فمن الضروري تحديد خصائص بروتينوم الفيتوبلازما. وفي نطاق البروتينوم، يمكن تحليل البروتين بتقنيات بروتينومات عالية الإنتاج. ويتطور البروتينوم، يمكن استخدام عدد أكبر من التقنيات لتحديد البروتينات، مثل: الفصل الكهربائي للبولي أكريلاميد ثنائي البعد بالجل (2-DE)،

والمصفوفة المساعدة لزمان تأين الليزر لطيف الكتلة المرتفع (matrix-assisted MALDI-TOF-MS) LC- وطيف الكتلة السائل (laser desorption ionization time of flight-mass spectrometry)، و زمن التأين بالسطح لأطياف الكتلة المرتفعة (liquid chromatography-tandem mass spectrometry MS/MS)، و زمن التأين بالسطح لأطياف الكتلة المرتفعة (surface-enhanced laser desorption/ionization-time of flight- SELDI-TOF-MS) (mass spectra) (٣).

وبمقارنة طريقة البروتيوم التقليدية طريقة 2-DE، يقوم القصف البروتيني بتحليل أنسجة مركب البروتين تحليلاً مباشراً لإنتاج معلومات عامة عن المادة المكملة للبروتين داخل النسيج. ويعد القصف البروتيني أداة من الأدوات القوية لتحديد البروتينات وفصلها عن أنسجة مركب البروتين، وخصائصها توفر كثيراً من الوقت والعمالة، وتُعتبر من الأدوات التي تتمتع بكفاءة عالية (٤). وفي هذا الفصل، قمنا بإجراء LC-MS/MS لتحديد خصائص بروتيوم فيتوبلازما mulberry dwarf (MD)، وذلك باستخدام القصف البروتيني. وتتكون طريقة تحليل بروتيوم فيتوبلازما الـ MD باستخدام القصف البروتيني من خمس خطوات: (١) تنقية الفيتوبلازما. (٢) استخدام الفصل الكهربائي SDS لجل البولي أكريلاميد (SDSPAGE). (٣) الهضم الثلاثي للبروتينات. (٤) استخدام السائل لفصل الـ peptides المهضومة. (٥) استخدام طيف الكتلة لتحديد الـ peptides.

٢- المواد:

جهز كافة المحاليل باستخدام ماء نقي (مُعد من خلال تنقية مياه منزوعة الأيونات للحصول على توصيل يبلغ 18 MΩ cm في درجة حرارة 25°C)، واستخدم مواد الإذابة المصنفة لـ HPLC والمواد عالية النقاوة. قم بإعداد كافة المواد وتخزينها في درجة حرارة الغرفة (ما لم يُذكر خلاف ذلك).

١-٢: تنقية فيتوبلازما Mulberry Dwarf:

١. المحلول المنظم للملح الفوسفات (PBS): 137 mM NaCl، 2.7 mM KCl، 4.3 mM Na_2HPO_4 ، 1.4 mM KH_2PO_4 ، pH 7.0. ثم يضاف ٨٠٠ مل إلى كأس زجاجي ١ لتر، وقم بوزن ٨ جم من الـ NaCl، ٠.٢ جم من الـ KCl، ١.٥٤ جم من الـ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ، و٠.١٩ جم من الـ KH_2PO_4 . بعد ذلك، يتم ضبط درجة الحموضة إلى أن تصبح ٧.٠، واخلطها مع HCl، وأضفها حتى يكتمل الخليط إلى ١ لتر ماء، وتُعقم وتخزن على درجة حرارة 4°C.
٢. المحلول المنظم للعزل: 0.3 M glycine، 10 mM MgCl_2 ، 80 U gentamicin، pH 7.4 (انظر: الملاحظة (١)).

٣. المحلول الإنزيمي: قم بإذابة ٢,٠ جم من السلولاز، و ٠,٨ جم من الهميسيولولاز، و ٠,٣ جم من إنزيم حمض tartaric، في ١ لتر من المحلول المنظم للفصل (انظر: الملاحظة ٢). وعقمهم بالفلتر؛ وذلك باستخدام فلتر حجم فتحاته 0.20 um، ويخزن على درجة حرارة 4°C.
٤. وسط التعليق: 0.3 M glycine، 10 mM MgCl₂، 0.3 M mannitol، 20 mM Na₂SO₄، 80 U gentamicin، pH 7.4، ويخزن على درجة حرارة 4°C.
٥. محلول بيركول أيزوتونيك (SIP): أضف ٩ أجزاء من البيركول إلى جزء واحد من السكروز (2.5 M) في ماء (انظر: الملاحظة ٣).
٦. محلول التخفيف: سكروز 0.25 M، 10 mM MOPS، pH 7.0.
٧. وسط التعليق: 0.3 M mannitol، 20 mM MOPS، pH 7.0، ويخزن في درجة حرارة 4°C.
٨. محلول منظم الـ lysis: 30 mM Tris، 2 M thiourea، 7 M urea، و 4% (w/v) CHAPS، 5% βmercaptoethanol (v/v) (انظر: الملاحظة ٤).
٩. 2-D Quant kit من شركة (GE Healthcare Life Sciences).
١٠. شبكة فتحها 100-mesh (100 mesh لكل إنش).
١١. شاش معقم.

٢-٢: الفصل الكهربائي SDS للبولي أكريلاميد جل:

١. محلول الأكريلاميد: أكريلاميد ٣٠% (w/v)، وسكريلاميد ثنائي ٠,٨% (w/v). يتم وزن ٣٠ جم من أكريلاميد مونومر و ٠,٨ جم من السكريلاميد الثنائي، ثم ضعهما في كأس زجاجي ١٠٠ مل مُدرج به ٤٠ مل ماء، وضع الكأس الزجاجي على جهاز التحريك المغناطيسي لمدة 30 min لخلطهما، ويتم ترشيح الخليط بتمريره على ورقة ترشيح بعد إتمامه إلى ١٠٠ مل بالماء، وخزن الخليط على درجة حرارة 4°C بزجاجة مغلقة بورق ألومنيوم.
٢. المحلول المنظم لتذويب الجل: 1.5 M Tris-HCl، pH 8.8. أضف إلى كأس زجاجي ١ لتر ٨٠٠ مل مليتر من الماء، ثم زن ١٨١,٧ جم من الـ Tris وتضاف في الكأس، اخلطهما معاً، واضبط درجة الحموضة بالـ HCl لتصل إلى ٨,٨، ثم أكمل إلى ١ لتر بالماء، وتخزن على درجة حرارة 4°C.
٣. محلول منظم الجل: 1.0 M Tris-HCl، pH 6.8. زن ١٢١,١ جم من الـ Tris، وحضر المحلول بطريقة الخطوة الثانية نفسها، وخزنه على درجة حرارة 4°C مئوية.
٤. دوديسيل سلفات الصوديوم (SDS) ١٠% (W\V): أضف ٨٠ مل ماء إلى كأس زجاجي ٢٠٠ لتر، وزن ١٠ جم من الـ SDS، وامزجها معاً، واضبط درجة الحموضة على ٧,٢ وذلك باستخدام الـ HCl، وأضف ماء إلى الكمية حتى تصل إلى ١٠٠ لتر.
٥. كبريتات الأمونيوم: محلول ١٠% (W\V) في ماء (انظر: الملاحظة ٥).

٦. N,N,N',N' -tetramethyl-ethylenediamine (TEMED)، يُخزن على درجة حرارة 4°C .
٧. Isobutanol.
٨. محلول مُنظم SDS-PAGE: 25 mM Tris، 0.192 M glycine، و 0.1% SDS. زن ٣.٠٣ جم من الـ Tris، و 14.4 جم من الـ glycine، و امزجها معاً، ثم أضف ١٠ مل من محلول الـ ١٠% SDS، وأضف ماء إلى أن يصل الخليط إلى ١ لتر.
٩. محلول مُنظم الفصل الكهربائي للجلل SDS تركيز $5\times$ SDS: 10% (w/v) و 250 mM Tris-HCl (pH 6.8)، و 5% (w/v) bromophenol blue، و 50% (v/v) glycerol، و 5% (v/v) β -mercaptoethanol.
١٠. محلول مُنظم للصبغة الزرقاء كوماسي: Coomassie blue R-250 (w/v) 0.1%، وميثانول ٤٠% (V\V)، وحمض أستيك ١٠% (V\V).
١١. محلول إزالة الصبغة: إيثانول ٥% (V\V)، وحمض أستيك ١٠% (V\V).

٢-٣: هضم جل التريسين Trypsin:

- يتم تحضير المحاليل طازجة قبل عملية الهضم مباشرةً:
١. NH_4HCO_3 25 mM في أسيتونيتريل ٥٠%: زن ٩٨,٧٥ مليجراماً من الـ NH_4HCO_3 ، وأضف إليه ٢٥ مل من الأسيتونيتريل، وأضف ماء إلى أن يصل المزيج إلى ٥٠ مل.
٢. 25 Mm من الـ NH_4HCO_3 في ماء: زن ٩٨,٧٥ مليجراماً من الـ NH_4HCO_3 ، وأضف إليه ماء إلى أن يصل المزيج إلى ٥٠ مل.
٣. 10 mM من (dithiothreitol (DTT) ثنائي كلورو ثنائي فينيل ثلاثي كلورو الأيثان في NH_4HCO_3 25 mM زن ٧,٧١ مليجرامات من DDT، وأضف إليها NH_4HCO_3 25 mM حتى يصل إلى ٥ مل.
٤. 55 mM أيودو أسيتاميد (iodoacetamide) في NH_4HCO_3 25 mM: زن ٥٠,٨٦ مليجراماً من الأيودو أسيتاميد، وأضف إليه NH_4HCO_3 25 mM حتى يصل إلى ٥ مل.
٥. محلول التريسين: 12.5ug/mL من التريسين في NH_4HCO_3 25 mM.
٦. حمض Trifluoroacetic ٥% (V\V) في أسيتونيتريل ٥٠% (V\V).

٢-٤: LC-MS/MS:

- يجب إفراغ كافة المحاليل المنظمة من الغازات قبل استخدامها:
١. محاليل المعايرة: تحتوي الخلطة الخاصة بالمعايرة على كافيين، methionine-) MRFA (arginine-phenylalanine-alanine)، مضافاً إليه محلول 1621 Ultramark (Thermo

1. Finnigan) حمض ميثانول/أسيتونتريل الأستيك مُذابا في ماء، ويجب اتباع إرشادات المُصنع لتحضير محلول المعايرة (انظر: الملاحظة ٦).
2. محلول الهضم الثلاثي لمصل ألبومين (BSA): يتم تخفيف محاليل BSA (Protea Biosciences, Inc, USA) إلى 10 fmol في حمض الفورميك ٠,١٪ (V\V) في الماء قبل استخدامها؛ وذلك حسب إرشادات المُصنع.
3. محلول مذيب البيبتيد: أسيتونتريل/ ماء (v/v, 95:5) يحتوي على حمض فورميك ٠,٢٪ (V\V)، و ٥ مل من الأسيتونتريل، و ٢٠٠ ميكروليتر من حمض الفورميك في ٩٥ مل ماء (ماء عالي النقاوة LC-MS).
4. محلول مُتحرك A: حمض فورميك ٠,١٪ (V\V)، وأضف ١٠٠ ميكروليتر من حمض الفورميك إلى ١٠٠ مل مليلتر الماء (ماء عالي النقاوة LC-MS).
5. محلول مُتحرك B: حمض فورميك ٠,١٪ (V\V) في أسيتونتريل تركيزه ٨٤٪ (V\V)، ثم أضف ١٠٠ ميكروليتر من حمض الفورميك إلى ٨٤ مل من الأسيتونتريل، وأضف إليه ماء إلى أن يصل إلى ١٠٠ مل (ماء عالي النقاوة LC-MS).

٥-٢: تحليل ومُعالجة البيانات:

1. برنامج BioWorks إصدار رقم ٣,٢.
2. قاعدة بيانات UniProtKB، و <http://www.uniprot.org/>.
3. برنامج Build summary، إصدار رقم ٢,٦,٥، <http://www.proteomics.ac.cn/software/proteomicstools/index.htm>

٣- طرق العمل:

١-٣: تنقية فيتوبلازما الـ Mulberry Dwarf:

1. قم بتنفيذ كافة الخطوات على درجة حرارة الغرفة، ما لم يُذكر خلاف ذلك:
 1. قم بتجهيز نسيج من غُصن نبات الـ mulberry المُصاب (انظر: الملاحظة ٧)، وقطع ٢٠٠ جم من النسيج المُصاب إلى أجزاء صغيرة، وانقعهم في ٥٠٠ مل PBS باردا، وضعهم في Food processor لمدة دقيقة واحدة على سرعة بطيئة.
 2. اسحب النسيج المنقوع في منخل حجم 100-mesh (100 mesh\in)، واعصرهم بشاش مُكون من ثلاث طبقات جيدا، واحتفظ بأنسجة الأوعية المتبقية (انظر: الملاحظة ٨).
 3. يتم طحن الأنسجة المتبقية في محلول مُنظم للعزل ٢٠٠ مل بالهاون؛ إلى أن تختفي ألياف الأوعية.

٤. يُمزج السائل الناتج مع ٢٠٠ مل من المحلول الإنزيمي، ويُحتفظ بهذا المزيج في درجة حرارة 35°C لمدة ساعتين.
٥. قم بعصر السائل الناتج باستخدام ثلاث طبقات من الشاش المُعقم، وجمع الراشح.
٦. يتم فصل السائل باستخدام جهاز centrifuge بسرعة 12000 لفة لمدة ساعة واحدة في درجة حرارة 4°C . وبعد ذلك، تجمع المواد المترسبة، ويتم تعليقها باستخدام ٥٠ مل من محلول التعليق.
٧. مرة أخرى، افصل السائل باستخدام جهاز centrifuge بسرعة 12000 لفة لمدة ١٥ دقيقة في درجة حرارة 4°C ، ومنه تسحب المادة الطافية، ثم تُوضع في أنبوب آخر.
٨. يُكرر مرة أخرى الطرد المركزي بسرعة 12000 لفة لمدة ساعة واحدة على درجة حرارة 4°C ، ومن ثم سيتراكم المعلق في قاع الأنبوب، ويحل بواسطة ٥ مل بمحلول المعلق، ويتم خلطهم باستخدام ممصات المختبر، أو وضعهم في جهاز الهزاز.
٩. يتم فصل السائل؛ باستخدام جهاز الطرد المركزي (centrifuge) بسرعة 12000 لفة لمدة ٥min على درجة حرارة 4°C ، وتُسحب المادة الطافية، ثم توضع في أنبوب جديد آخر.
١٠. خفف محلول الـ SIP بمحلول مُنظم للتخفيف؛ للحصول على محاليل Percoll بتركيزات ١٥، ٣٠، و٥٠٪.
١١. حضر تدرجات تركيزات محلول الـ SIP بالطريقة التالية: (١١ م) من التركيز ١٥٪، و(١١) مل) من التركيز ٣٠٪، و(٦ مل) من التركيز ٥٠٪، وقسم كميات المحاليل واحدة تلو الأخرى كل منهما في أنبوب جديد من أنابيب جهاز الطرد المركزي؛ بحيث تكون الكمية الأكثر كثافة في القاع، والأقل في الأعلى (انظر: الملاحظة ١٠).
١٢. قم بتحميل ٠,٨ مل من المزيج الذي تم تحضيره على الجزء العلوي من التدرج المتقطع.
١٣. يتم فصل الخليط السابق باستخدام جهاز الطرد المركزي بسرعة ٢٠٠٠٠ لفة لمدة ٢٠min على درجة حرارة 4 مئوية (انظر: الملاحظة ١٢).
١٤. يجمع الجزء الموجود بالقرب من الطبقات والذي تركيزه ٣٠-٥٠٪.
١٥. خفف الجزء الذي تم تجميعه على الفور باستخدام وسط مُعلق، ثم اعمل طردا مركزيا بسرعة ٢٠٠٠٠ لفة لمدة 20 min على درجة حرارة 4°C .
١٦. جمع المادة المتراكمة على السطح الصلب من الـ Percoll، ويتم إعادة تعليقها في ٠,٥ مل بمحلول المُنظم للـ lysis، وتحفظ في الثلج لمدة ١٠min (انظر: الملاحظة ١٣).
١٧. عن طريق جهاز الموجات الصوتية، يتم تكسير المادة المتراكمة في المحلول المُنظم للـ lysis على تردد لها ٢٠ كيلوهرتز (Bibra Cell™ Sonics and Materials Inc.، Model VC750)؛ حيث مدى ذبذبتها ٣٠٪، وبتشغيل الدورات لمدة ٢s ووقفها لمدة 2.5 s ولمدة 5 min في حمام ثلجي (انظر: الملاحظة ١٤).

١٨. بعد ذلك، يتم فصل المزيغ السابق lysates بسرعة ١٦٠٠٠ لفة لمدة 30 min على درجة حرارة 20°C، ثم تسحب المادة الطافية، وتوضع في أنبوب آخر.
١٩. يتم حساب كمية البروتين المستخلصة باستخدام جهاز الـ 2-D Quant حسب إرشادات الشركة المُصنعة. وعلى الفور، جمد عينات البروتين في نيتروجين سائل، وخذنها في درجة حرارة -80°C.

٣-٢: الفصل الكهربائي لجل SDS البولي أكريلاميد:

١. قم بتحضير ١٢٪ من الجل من الأكريلاميد؛ بحيث يبلغ مقاسه 1.5mm × 10cm × 10cm؛ وذلك باتباع هذه الطريقة: امزج الكميات التالية معاً، وهي: ٨ مل من محلول الأكريلاميد، و٠.٢ مل من SDS تركيزه ١٠٪، و٥ مل من Tris-Cl 1.5M (درجة حموضته 8.8 pH)، و٦.٦ مل من الماء المقطر؛ وذلك في كأس زجاجي، وأضف إليهم ٢٠٠ ميكروليتر من بيركبريتات الأمونيوم تركيزها ١٠٪ و١٠ ميكروليتر من TEMED، وقم بتقليبهم برفق.
٢. صب محلول الأكريلاميد بين الشرائح الزجاجية على الفور، ثم تغطي بالأيزوبوتانول، ويُترك الجل لمدة لا تقل عن ساعة حتى يتصلب (انظر: الملاحظة ١٥).
٣. يغسل سطح مركب الأيزوبوتانول بكمية وفيرة من الماء، ثم يتم التخلص من المياه الزائدة عن الحاجة.
٤. يُحضّر الجل الآخر وفقاً للطريقة التالية: يُمزج ٠.٨٣ مل من محلول الأكريلاميد مع ٥٠ ميكروليتر من SDS تركيزه ١٠٪، و٠.٦٣ مل من Tris-Cl 1.0M (درجة حموضته 8.8 pH)، و٣.٤ مل من الماء المقطر في كأس زجاجي، ويُضاف ويُمزج معهم ٥٠ ميكروليتر من بيركبريتات الأمونيوم تركيزها ١٠٪، و٥ ميكروليتر من الـ TEMED.
٥. يُصب الجل السابق بين الشرائح الزجاجية، ويُثبت عليه بحرص مشط نظيف.
٦. يُترك الجل لمدة تتراوح ما بين 30-60 min حتى يتصلب. وبعدها، يتم إزالة المشط بحرص (انظر: الملاحظة ١٦).
٧. يُضاف محلول مُنظّم تحميل الـ SDS-PAGE 5 × إلى عينات البروتين التي تم تحضيرها بنسبة ١-٥ ميكروليترات للعينة، وتُسخن على درجة حرارة 95°C لمدة لا تقل عن 5 min، وتُفصل العينات التي تم تسخينها باستخدام بسرعة ١٠٠٠٠ لفة لمدة 30 s لترسيب المواد المتكثفة عن عملية التسخين (انظر: الملاحظة ١٧).
٨. تُحمل العينات من البروتين بكمية تتراوح ما بين (50-60 ug protein/lane)، والعينة القياسية بكمية (2ug of markers/lane).

٩. تُفصل العينات عن طريق الفصل الكهربائي بقوة 12 mA/gel ؛ إلى أن يتم دخول العينات بالجل. وبعد ذلك، تُتم عملية الفصل بقوة 18 mA/gel حتى تصل الصبغة إلى نهاية الجل.
١٠. بعد عملية الفصل الكهربائي، يرفع زجاج الجل بملعقة من على الشرائح، ويغسل بالماء المقطر، ثم يتم غمره في محلول مُنظم الصبغة الزرقاء Coomassie؛ لمدة تتراوح ما بين 40-60 min.
١١. يتم إزالة الصبغة من على الجل؛ بوضعها في محلول مُنظم لإزالة الصبغة، مع رجها معاً برفق إلى أن يصبح لون الجل شفافاً، وتظل لون أنماط البروتين زرقاء، ويُغير محلول إزالة الصبغة كل 10 min.
١٢. يتم فحص الجل وتصويره (انظر: الملاحظة ١٨).

٣-٣: هضم Trypsin في الجل:

١. يتم قطع أنماط البروتينات الملونة من جل البولي الأكريلاميد، وتُقطع كل أجزاء الشرائح إلى قطع صغيرة حسب كثافة كل نمط، بغض النظر عن الصبغة. ويتم تقطيع كل شريحة من الشرائح الصغيرة إلى قطع حجمها $1 \times 1 \text{ mm}$ توضع في أنبوب حجمه ١,٥ مل (انظر: الملاحظة ١٩).
٢. يتم غسل قطع الجل مع 400 ميكروليتر مع الماء النقي من نوع HPLC لمدة 15 min على درجة حرارة الغرفة.
٣. يُضاف 400 ميكروليتر من $25 \text{ mM NH}_4\text{HCO}_3$ إلى أسيتونيتريل تركيزه ٥٠٪، ويتم تحضينهم لمدة 15 min على درجة حرارة الغرفة في جهاز هزاز، ويتم التخلص من المواد الطافية، وتُكرر هذه العملية مرة أو مرتين (انظر: الملاحظة ٢٠).
٤. يُضاف إليهم 200 ميكروليتر من الأسيتونيتريل، وتترك لمدة ٥ min على جهاز رج في درجة حرارة الغرفة، ويتم التخلص من المواد الطافية، وتُجفف القطع لمدة ٥ min بجهاز Speedvac.
٥. بعد ذلك، يُضاف إليهم 100 ميكروليتر -أو كمية كافية حتى يتم تغطيتهم- من 10 mM DTT في $25 \text{ mM NH}_4\text{HCO}_3$ ، ويُحفظ الخليط على درجة حرارة 60°C لمدة ساعة واحدة، ويتم التخلص من المواد الطافية، وتترك الأنابيب لتبرد على درجة حرارة الغرفة.
٦. يتم إضافة الكمية نفسها من يودويستاميد طازج 55 mM إلى $25 \text{ mM NH}_4\text{HCO}_3$ ، ويُحفظ المزيج بالظلام لمدة 45 min على درجة حرارة الغرفة، ويُقلب من حين إلى آخر، بجانب إزالة الطايف.
٧. تُغسل قطع الجل بكمية 400 ميكروليتر من $25 \text{ mM NH}_4\text{HCO}_3$ لمدة 15 min على درجة حرارة الغرفة، وتتم تلك العملية على جهاز الرج، ويتم إزالة المواد الطافية.

٨. تُفسل قطع الجل بكمية ٤٠٠ ميكروليتر من 25mM NH₄HCO₃ بمحلول أسيتونيتريل تركيزه ٥٠٪ لمدة 15 min على درجة حرارة الغرفة، وتتم تلك العملية على جهاز الرج، بجانب إزالة المواد الطافية.
٩. يُضاف ٣٠٠ ميكروليتر من الأسيتونيتريل لمدة 5 min على درجة حرارة الغرفة على جهاز الرج، مع إزالة المواد الطافية.
١٠. يجفف الجل في جهاز Speedvac لمدة ٥min.
١١. تُضاف كمية تتراوح ما بين ٢٠-٥٠ ميكروليترا -أو كمية تكفي لامتصاص الجل لها- من محلول التريسين المُحسن 12.5 ug/mL إلى 25 mM من NH₄HCO₃، ويُحفظ هذا الخليط لمدة 15 min على درجة حرارة الغرفة؛ إلى أن تمتص القطع الجل محلول التريسين، ويتم إزالة كمية المحلول الزائدة، والتخلص منها (انظر: الملاحظة ٢١).
١٢. تُضاف كمية قليلة من الـ 25 mM NH₄HCO₃ بدون التريسين، وذلك لاستخدام أقل كمية يمكن استخدامها خلال القطع الجل لا تزال مغمورة كلياً أثناء فترة الهضم، وتُحفظ الكمية على درجة حرارة 37°C لمدة تتراوح ما بين 12-16 h.
١٣. يتم استخلاص القطع الجل مرتين بواسطة ٥٠ ميكروليترا -أو كمية كافية لتغطيته- من الأسيتونيتريل تركيزه ٥٠٪، ومرة أخرى بحمض ثلاثي الفلوراسيتيك تركيزه ٥٪ في كل مرة لمدة 60 min على درجة حرارة الغرفة، وتُكرر هذه الخطوة مرة واحدة، ويتم التخلص من المستخلص، ويُجفف في جهاز Speedvac.

٣-٤: LC-MS/MS

يتم إجراء عملية نزع الأملاح من البيبتيد، وفصل حالة البيبتيد العكسية باستخدام نظام Ultimate 3000 Nano/Capillary LC أو نظام شبيه له، ويتم ربط نظام الـ LC بطيف الكتلة من نوع linear trap quadrupole (LTQ) أو نظام مشابه له. ونحن استخدمنا الطريقة التالية، كما هو موصوف مع بعض التعديلات (٥-٧):

١. شغل الـ LTQ FT الطيف الكتلي للبيانات القياسية المستقلة المتحكم فيه؛ عن طريق برنامج Xcalibur 1.4 software.
٢. احصل على مسح استقصائي بالمدى التالي: (400-2.000 m/z range) على جهاز FT-ICR بدقة 100.000 على 400 m/z at ، ويستخدم واحد ميكرو للمسح لكل طيف.
٣. يعتمد أكثر ٢ إلى ٥ أيونات مشحونة بأقل كثافة بالعدة رقم ١,٠٠٠ على الـ MS\MS؛ وذلك في الجذب الأيوني الخطي بعازلة عرضها ٢ طومسون (Thomson).
٤. يتم إجراء تنشيط للمادة المتراكمة؛ والتي بدورها تُنشط الإنزيم (precursor activation) في وقت 30 ms، وتُضبط طاقة هذا التنشيط على Q عند ٠,٢٥، وطاقة التصادم على ٣٥٪،

- ويُضبط عرض نظام الاستبعاد الديناميكي على $\pm 5\text{ppm}$ بالنسبة لنتيجتين مكررتين من نتائج اختيار الأيونات المتطابقة، ولفترة 30 s.
٥. تضبط قيمة التحكم الأتوماتيكية المُستهدفة على $5e^5$ بالنسبة للـ FT، و $1e^4$ بالنسبة لجهاز الجذب الأيوني للحبيبات المشحونة؛ بحيث يكون أقصى وقت للحقن 1.000 ms بالنسبة للـ FT، و 200 ms بالنسبة لجهاز الجذب الأيوني للحبيبات المشحونة.
٦. تُحدد الأداة التي سيتم تعيينها وحدة قياس؛ وذلك باستخدام محاليل المعايرة حسب إرشادات الشركة المُصنعة.
٧. يتم التحقق من أداء الأجهزة؛ بإجراء تحاليل LC-MS/MS متعددة للهضم الثلاثي المعياري BSA.
٨. يتم إذابة خلطات الـ peptide مرة أخرى في ٣٠ ميكروليترا من محلول مُذيب الـ peptide، ويتم وضعها في جهاز الطرد المركزي بسرعة ١٠٠٠٠ لفة لمدة 5 min.
٩. يتم موازنة عمود الـ RP لمدة 10 min باستخدام ٢٠٠/min ميكروليتر من المحلول A وذلك قبل تحميل العينة.
١٠. يُحمل ٣٠ ميكروليترا من كل عينة peptide؛ وذلك باستخدام جهاز الـ autosampler لكل عينة، ويتم إزالة الملح في عمود من أعمدة جهاز الجذب المغناطيسي، بتدفق مقداره ٢٥/min ميكروليترا من المحلول A، ولمدة 5 min.
١١. يُغير الصمام ليُصبح عمود جهاز الجذب المغناطيسي متصلاً بالعمود التحليلي.
١٢. يتم البدء في طلب تشغيل جهاز الـ MS.
١٣. يتم البدء في شطف الببتيدات بصورة متدرجة على العمود التحليلي؛ بمعدل تداخل يبلغ 300 nL/min، وفصلها باستخدام التدرج التالي: (١) المحلول B بتركيز يبدأ من ١٠ إلى ٤٠٪ لمدة ٤٠ min. (٢) المحلول B بتركيز يبدأ من ٤٠ إلى ٩٠٪ لمدة 10 min. (٣) يتم إعداد النسبة المتبقية من محلول A (انظر: الملاحظة ٢٢).

٣- ٥: معالجة وتحليلها البيانات:

١. تُعالج بيانات الـ MS باستخدام الإصدار رقم ٣,٢ من برنامج BioWorks (Thermo Electron)؛ للحصول على قائمة الملفات وإرسالها إلى برنامج الـ Mascot رقم ٢,٠ (Matrix Science)؛ للبحث عن قاعدة بيانات البروتين على UniProtKB (<http://www.uniprot.org/>)، ويتم استخدام حروف البحث "Phytoplasma" لتحديد البروتين والبيبتيد.
٢. تُجري عمليات البحث في البرنامج باستخدام المعلمة "trypsin enzyme"، ويتم تحديد أكسدة الميثيونين تعديلاً متغيراً، ويتم تحديد ميثيون كربوكاميدو السيستين تعديلاً ثابتاً.

٣. يتم إجراء البحث الخاص بقاعدة بيانات الببتيد بالمعلومات التالية: مقدار اختلاف شحنة كتلة أيون الببتيد 10 ppm ، ومقدار اختلاف كتلة أيون جزء الببتيد 0.7 Da ، وأقصى موقع مفقود من مواقع إنزيم التربيسين هو موقع واحد.
٤. تُصفي نتائج بحث الـ SEQUEST باستخدام المقاييس التالية:
 ١. $X_{corr} > 1.55$ and $\Delta Cn > 0.15$ بالنسبة للببتيدات في حالة الشحنة +١.
 ٢. $X_{corr} > 1.85$ and $\Delta Cn > 0.16$ بالنسبة للببتيدات في حالة الشحنة +٢.
 ٣. $X_{corr} > 2.6$ and $\Delta Cn > 0.22$ بالنسبة للببتيدات في حالة الشحنة +٣.
٥. تُجمع كافة النتائج التي تم الحصول عليها باستخدام برنامج in-house Buildsummary (الإصدار: 2.6.5 ، <http://www.proteomics.ac.cn/software/proteomicstools/index.htm>)

٤- الملاحظات:

١. إن الجنتاميسين (Gentamicin) يتم استخدامه لمنع التلوث بالبكتيريا ، ويمكن -أيضاً- استخدام المضادات الحيوية الأخرى.
٢. يمكن استبدال هذه الإنزيمات بالإنسيليز (snailase) ، والمعروفة -أيضاً- باسم إنزيم الـ helicase ، وهي خليط يجمع أكثر من ٣٠ إنزيماً ، من بينهم السليلوز والهيميسيللاز وسينماسي (seminase ، hemicellulase ، cellulose) وغيرها ، والتي تم استخراجها من المحاصيل والجهاز الهضمي للقواقع.
٣. الـ Percoll في الأصل مُعقم ، ويمكن إعادة تعقيمه بالـ Autoclave على درجة حرارة 120°C لمدة 30 min دون حدوث أي تغيير في خصائصه ، ويجب أن تكون محاليل الـ Percoll خالية من الملح والعصارة عند تعقيمها. ويُفضل عند تعقيم المحاليل غير المُخففة من الـ Percoll ، أن يقل اتصالها بالهواء بأكبر قدر ممكن؛ حتى لا تتراكم الحبيبات على سطح الـ Percoll. ويمكن تحقيق هذا الأمر باستخدام زجاجة ضيقة العنق عند التعقيم. وفي حالة تراكم الحبيبات وتجمعها ، فمن الممكن إزالتها بجهاز الطرد المركزي وضبطه على سرعة منخفضة. وإن حدث أي تبخر أثناء عملية التعقيم ، يتم تجديد الكمية بماء معقم حتى لا تتأثر كثافة المحاليل.
٤. يمكن استخدام مواد أخرى ، مثل: Triton X-100 ، و NP-40 ، ومواد غير أيونية أو مزدوجة الأيونات بدلاً من CHAPS.
٥. يُفضل تحضيرها طازجة كل مرة.
٦. عند قياس حمض الأسيتيك (glacial acetic acid) ، يتم استخدام ممصات زجاجية ، أو إبر مصنوعة من الاستانلس ستيل فقط؛ لأن استخدام الممصات البلاستيكية يؤدي إلى تلوث المحلول الحمضي؛ والذي بدوره ينقل الملوثات إلى محلول المعايرة.

٧. يجب أن تظهر أعراض مُعينة على النباتات المصابة، مثل: صغر الأوراق، وتقلص فواصلها العقدية، وتقرنها، وانتشار البقع على براعمها. كما تظهر المكنسة الساحرة الـ 'witches' broom، وغيرها من الأعراض المرضية.
٨. تظل الفيتوبلازما في النباتات مُحترجة في نسيج اللحاء. لذلك، يجب أن تكون المواد المستخدمة هي أنسجة الأغصان الوعائية.
٩. يجب أن تتم عملية الطحن برفق وببطء؛ حتى لا تتدمر الفيتوبلازما.
١٠. يُرتب التدرج بوضع محاليل الـ Percoll الأقل كثافة تدريجياً فوق بعضها؛ بحيث يكون المحلول الأول الذي يتم استخدامه محلول Percoll وتركيزه ٥٠٪، وينتج عن استخدام المحاليل بصورة ثابتة تدرجات يمكن عمل نسخ عديدة منها. لذلك، يُفضل اتباع الطريقة التالية: أولاً، تُوضع أنابيب الطرد المركزي الشفافة الخاصة في حامل الأنابيب. وبعدها، يتم تثبيت طرف قطارة حجمها ٢٠٠ ميكروليتر على طرف قطارة أخرى حجمها ١٠٠٠ ميكروليتر، وتُثبت القطارتان بشكل جيد على حامل مشابك، ويمكن لمس الجدار الداخلي للأنبوب بحافة القطارة الأولى التي يبلغ حجمها ٢٠٠ ميكروليتر. وبذلك، يمكن وضع محلول الـ Percoll في القطارة الثانية التي يبلغ حجمها ١٠٠٠ ميكروليتر، وستتحرك المحاليل في الأنبوب بثبات وببطء بواسطة الجاذبية. وفي حالة فشل استخدام طرف ممصات لتوصيل المحاليل إلى قاع الأنبوب، يمكن استخدام ضغط هوائي لإنزالها في القطارة ١٠٠٠ ميكروليتر. وتتم هذه العملية بالنقر على نهاية القطارة بلطف، ويمكن تخزين المحاليل المُتدرجة التي تم تحضيرها لعدة أسابيع دون تغيير شكلها؛ بشرط أن تُعقم، ولا تتغير خصائصها الفيزيائية.
١١. يجب التعامل مع الأنابيب بعناية فائقة، وتحميلها على جهاز الطرد المركزي؛ وذلك بعد أن يتم استخدام العينة مع محلول أول طبقة من الطبقات التي تم تدرجها وفقاً للأقل كثافة، ويجب وضع الأنبوب بجهاز الطرد المركزي، والبدء في تشغيله بعد عملية تحميله مباشرة.
١٢. تحتاج كافة خطوات عملية الطرد المركزي إلى جهاز دوران متوازن. لذلك، يجب توفير أنبوب آخر يحتوي على ذات الكمية نفسها. ويعني هذا الأمر من الناحية العملية، أنه يجب تحضير محلولين مُتدرجين؛ بحيث لا يحتوي المحلول الثاني على عينة تجريبية، وفي المقابل يحتوي على كمية ماء مُساوية لكمية العينة.
١٣. يجب إجراء هذه العملية في درجة حرارة منخفضة جداً.
١٤. للحصول على تغطية كافية من الـ proteome، يجب التأكد من وجود البروتينات في الأغشية الخلوية، وأن النواة قد أذيت وخرج منها، ويمكن حل هذا الأمر بسهولة من خلال تحريك المواد الناتجة عن انحلال الغشاء الخلوي بالموجات فوق الصوتية، كما هو مشروح سابقاً.
١٥. إن هذه التغطية تمنع وصول الأكسجين الجوي -والذي يُعيق عملية التصلب الأكريلاميد-، بالإضافة إلى مُساعدتها على تسوية محلول جل البروتين الذي تم فصله.

١٦. حاول تحضيرها قبل استخدامها بحوالي ١٨-٢٤ ساعة؛ للحصول على أعلى تصلب.
١٧. يُساعد الطرد المركزي للعينات -قبل استخدامها- على التخلص من المركبات التي لا يمكن إذابتها، وقد تؤدي إلى ظهور خطوط في الممرات البروتينية عند تلويثها.
١٨. يتم وضع طبقة من الجل بين الطبقتين على هيئة فيلم من الأسيتات المغسولة بماء منزوع الأيونات dH₂O، ويجب وضع الطبقتين على الماسح scanner، ثم اطبع صورة الماسح ضوئياً، وضع علامة على مكان الأنماط التي سوف تقطع، ثم أعد الجل إلى الطبق المملوء بالماء حتى يصبح جاهزاً للحصول على الأنماط.
١٩. استخدام مشروطاً جديداً لقطع كل شريحة، ثم انقل قطع الجل إلى أنبوب باستخدام المشروط نفسه، وحاول أن يتم العمل بأسرع ما يمكن؛ لأن الجل عندما يجف يكون أكثر لزوجة.
٢٠. يجب أن تتكمش أجزاء الجل، ويكون غير شفاف في هذه الخطوة. وإذا كانت قطع الشرائط مازالت زرقاء، كرر هذه الخطوة مرة أخرى.
٢١. يكون التربيسين Trypsin غير مستقر، خصوصاً عندما يكون نقياً، وفي ظروف غير حامضية. لذا، يجب تخفيفه بالمحلول قبل الاستخدام مباشرة.
٢٢. بسبب أن تركيب العينة معقد، يفضل أن يتم التدرج لفترة 50 min، أو أكثر؛ حتى تُفصل الببتيدات بشكل جيد، ولتقليل مشكلة اختزال ال-MS. يجب تحليل نسخ مكررة من العينات، واستخدام عينة فارغة لتقليل الترحيل بين حقن وآخر.

شكر وتقدير:

تم تمويل هذا العمل من قبل المؤسسة الوطنية للعلوم الطبيعية في الصين (the National Natural Science Foundation of China)، ومؤسسة العلوم لعلماء الشباب الممتازة في مقاطعة شاندونغ (Science Foundation for the Excellent Youth Scholars of Shandong province of China) في الصين؛ (رقم التمويل: ٣٠٩٧٢٣٦٦ و ٣١٠٧٠٥٧٣ و ٣١١٠٠٤٧٨ و BS2009NY024 و BS2010NY015).

المراجع:

1. Garnier M et al (2001) Mycoplasmas, plants, insect vectors: a matrimonial triangle. C R AcadSci III 324:923-928
2. Christensen NM et al (2005) Phytoplasmas and their interactions with hosts. Trends Plant Sci 10:526-535
3. Wu K, Zhang Y (2007) Clinical application of tear proteomics: present and future prospects. Proteomics Clin Appl 1:972-982

4. Wu SL et al (2003) Evaluation of shotgun sequencing for proteomic analysis of human plasma using HPLC coupled with either ion trap or fourier transform mass spectrometry. *J Proteome Res* 2:383–393
5. Brosch M et al (2008) Comparison of Mascot and X!Tandem performance for low and high accuracy mass spectrometry and the development of an adjusted Mascot threshold. *Mol Cell Proteomics* 7:962–970
6. Collins MO et al (2008) Phosphoproteomic analysis of the mouse brain cytosol reveals a predominance of protein phosphorylation in regions of intrinsic sequence disorder. *Mol Cell Proteomics* 7:1331–1348
7. Collins MO, Yu L, Choudhary JS (2008) Analysis protein complexes by 1D-SDS-PAGE and tandem mass spectrometry. *Protoc Exch.* doi: 10.1038/nprot.2008.123

تحضير البروتينات المجمعة لغشاء الفيتوبلازما

Luciana Galetto, Majid Siampour, and Cristina Marzachi

ملخص:

دراسة تفاعل بروتين غشاء الفيتوبلازما مع بروتينات الخلية العائلة يُمثل: أهمية في فهم دورة حياة تلك الكائنات الحية الدقيقة داخل العوائل. ويتم تقديم شرح مُفصل حول طريقة عمل من الأعمال التي تُعبر عن اختلاف البروتينات الخاصة بغشاء الفيتوبلازما في بكتريا الـ *Escherichia coli*، وبجانبه شرح لخطوات عملية لتتقية كمية من مسببات المرضي التي تُهاجم جهاز المناعة؛ وذلك لاستخدامها في دراسة التفاعلات التي تحدث بين العائل والفيتوبلازما.

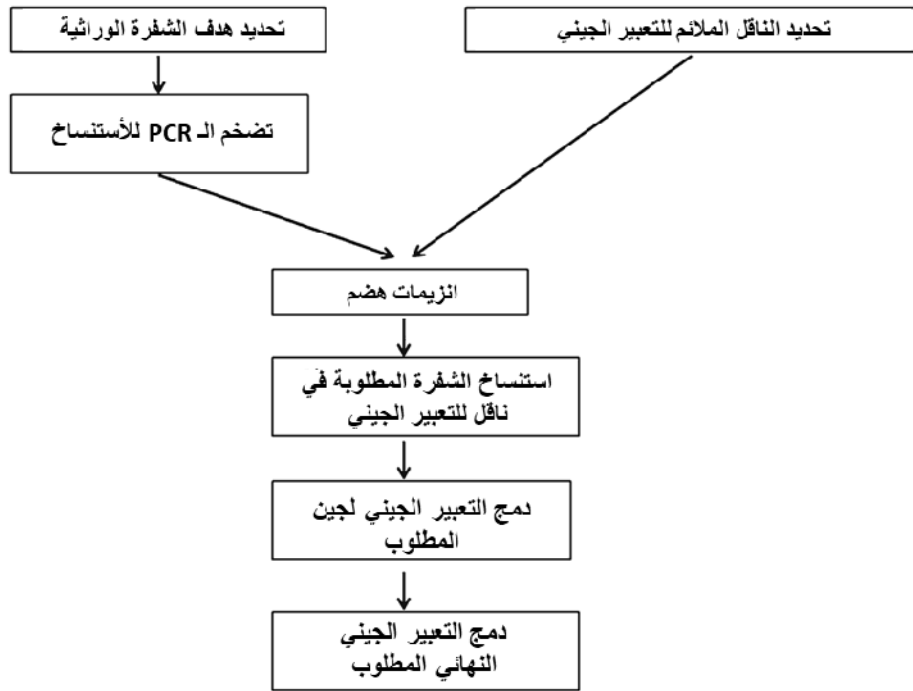
الكلمات المفتاحية: البروتين الغشائي المولد للمضاد *Escherichia* , Antigenic membrane protein , *coli* ، بروتين الاتحاد المرتبط بالهستيدين، البروتين الغشائي المناعي، بدائية النواة الناقلة للمرض.

١- المقدمة:

غشاء الخلية هو الحد الذي يرسم خلية الفيتوبلازما، وهو المكان الذي تحدث فيه أول تفاعلات مباشرة مع البيئة المضيفة. وقد أظهرت عمليات فحص الجينومات المتوفرة في الفيتوبلازما (١) أن عديداً من البروتينات تمتلك نطاقات غشائية. ونتيجة لذلك، موقعها معروف في الغشاء الخلوي. وبما أن بروتينات غشاء الفيتوبلازما على اتصال مباشر بالخلايا المضيفة، فمن المرجح أنها تدخل في تفاعلات مُعينة مع تلك الخلايا.

ويتم تصنيف بروتينات غشاء الفيتوبلازما الأكثر وفرة إلى ثلاثة أنواع؛ وذلك حسب موقعها داخل الكروموسوم - وأيضاً - حسب هيكلها الخلوي، والذي يتم توقعه (٢). وقد تم اقتراح دور من أدوار تحديد نوعية الحشرة المسببة للمرض بالنسبة للبروتين الغشائي المولد للمضاد (Amp Antigenic membrane protein) في فيتوبلازما 'Candidatus Phytoplasma asteris' التي تؤدي إلى اصفرار البصل (٣)، وكذلك في سلالات الـ chrysanthemum yellows (٤). إن البروتينات الأخرى

التي يفترض ارتباطها بالغشاء والنطاقات المتوقعة الموجودة خارج الخلية في جينوم الفيتوبلازما قد يحدث -أيضا- تفاعلا بينها وبين المضيف. ويتم تصنيف سلاسل بعض هذه الجينات (مثل: *amp* و *imp*) تحت الاختيار الإيجابي (٥-٧)، ويُشار إلى دور من الأدوار المحتملة للبروتينات في عملية تقييم الفيتوبلازما. وتوجد أنظمة نقل عديدة في جينوم الفيتوبلازما من ضمن البيانات المتسلسلة (٨- ١١). وتتوجد تلك الأنظمة أيضاً داخل الغشاء الخلوي، وتعمل على تحريك نطاق ربط مواد الإذابة الجزيئية في اتجاه سيتوبلازما الفيتوبلازما أو مُحيط الخلية العائلة. وتُعد هذه البروتينات الغشائية هي البروتينات الرائدة في التفاعل، الأمر الذي يحدث مع البروتينات العائل.



شكل (١): رسم تخطيطي لخطوات التجارب المطلوبة للتعبير الجيني للغشاء البروتيني للفيتوبلازما في بكتيريا *Escherichia coli*.

وبسبب صعوبة تربية الفيتوبلازما في المختبر، ولعدم توفر طريقة تحويل لهذه البكتيريا، يُعد التعبير عن جينات غشاء الفيتوبلازما في الأنظمة المختلفة عن بعضها أمراً ضرورياً لإجراء مزيدٍ من الدراسات حول التفاعل؛ والذي يتم بين الفيتوبلازما والنبات والعائل المُسبب للمرض. وقد تم التعبير عن عدد من بروتينات غشاء الفيتوبلازما مُضاداتٍ مُتحدةً في الأنظمة المختلفة. وفي هذا الفصل، نعمل على تقديم تقرير حول الخطوات الرئيسية المطلوبة لإنتاج البروتينات المُتحدة لغشاء الفيتوبلازما؛ بدءاً من تحديد مجال الغشاء الرئيسي البيني للجين المُستهدف، وتصميم البادئات الخاصة بعملية الاستنساخ لمنتج PCR في الحشرة المناسبة الناقلة للمرض، واختيار المستعمرات التي

تُمثل: البروتين المسؤول عن إعادة الاتحاد، والتجارب المستمرة الخاصة بدراسة قابلية إذابة البروتين المهجن وتوجيهه، والبولي هيسستدين الكلي المربوط بالتعبير عن البروتين المهجن والتنقية في الحالة غير الطبيعية والحالات الطبيعية (شكل ١).

وقد تم توضيح أن التعبير عن الطول الكامل لبروتينات غشاء الفيتوبلازما -مثل: Imp و Amp- يؤدي إلى تأخر نمو الـ *Escherichia coli* المتحولة، بينما عملية إلغاء نطاق الغشاء البيني ليس لها تأثير (٦، ١٢). ولهذا السبب، نقترح أن تكون الخطوة الأولى خاصة بتحديد نطاق الغشاء البيني للبروتين المُستهدف؛ وذلك حسب استخدام مضاد الاتحاد في المستقبل؛ لإزالته من البنية الموجهة، ويتم توفير عديد من الحشرات الناقلة للمرض.

وفي هذا الفصل، نقوم بشرح نظام الـ pRSET (Invitrogen)، حسب الناقل للأمراض الموجهة للـ pUCderived؛ والتي تم تصميمها للتعبير عن البروتين الموجود في المستوى العالي والتنقية الجينات في الـ *E. coli*. ويجب أن يتم تثبيت الـ DNA المُستهدف في منطقة النهاية، وفي نطاق السلسلة التي تُرمز N-terminal polyhistidine fusion peptide؛ حيث يعمل على ربطه مع البروتين المهجن، ويعمل - أيضاً - رابطاً للكشف عن المضاد الجيني المهجن. ويتم التحكم في التعبير عن الجين المُستهدف من خلال phage T7 promoter؛ والذي يقود عملية تمثيل الجين العاشر، وذلك بعد تعريفه بالتفاعل الجزيئي isopropyl β - d -thiogalactoside (IPTG)، ويتعرف بُوليميراز الـ T7 RNA على هذه المادة المُحفزة تحديداً. ويتم استخدام سلالة الـ BL21 (DE3) pLysS من بكتيريا *E. coli*؛ وذلك لتقليل المستوى القاعدي لبُوليميراز T7 RNA. وبالتالي، التحكم في عملية تمثيل المضادات الجينية المُدمجة؛ والتي قد تؤثر على *E. coli* بالسلب. وتحمل هذه السلالة الـ DE3 bacteriophage lambda lysogen مع جين الـ *lacI*، وجين البُوليميراز T7 RNA، وجزء بسيط من جين الـ *lacZ*.

ويعمل بروتين اللاكتوز lac repressor على قمع بُوليميراز T7 RNA على وجه التحديد، وتعمل إضافة الـ IPTG على إعادة تمثيل البُوليميراز الـ T7 RNA. وعندما يصل بُوليميراز الـ T7 RNA إلى تركيز كافٍ في الخلية، يرتبط بمُحفز الـ T7؛ ومن ثم تبدأ عملية تمثيل جين الفيتوبلازما. وتختلف شروط عملية التمثيل وفقاً لطبيعة البروتين، وبالتالي على الدراسة التجريبية التي تعمل على تحسين التعبير عن بروتين الاتحاد، وتوضيح ما إذا كان موجوداً في الجزء القابل للإذابة من البروتين أو في الأجسام المُدمجة. وتصف الخطوة الأخيرة من طريقة العمل عملية واسعة النطاق لتنقية البروتين المدمج المُستهدف.

٢- المواد:

يتم تحضير المحاليل المنظمة الروتينية والوسائط والمحاليل حسب (١٢) استخدام الـ H₂O المقطر والمعقم على مرحلتين (ddH₂O)، ويجب ارتداء قفازات عند استخدام الأكريلاميد والمواد الخطيرة الأخرى، ويجب -أيضاً- التخلص من كافة المخلفات وفقاً للقواعد الخاصة.

١-٢: الأجهزة العامة:

١. جهاز طرد مركزي ميكرو microcentrifuge مُبرّد.
٢. جهاز طرد مركزي، ومُحرك تدوير للعينات ذات الحجم الكبير.
٣. هزاز.
٤. جهاز رج، وجهاز رج حراري.
٥. خزان جهاز شفط الأبخرة.
٦. غرفة خاصة.
٧. جهاز تشتت بالموجات فوق الصوتية Sonicator.
٨. أعمدة كروماتوغرافيا.
٩. جهاز الفصل الكهربائي بجل الآجروز.
١٠. جهاز تحليل كهربائي لفصل جل بولي أكريلاميد SDS (SDS-PAGE)، مثل: Miniprotein 3 Cell (Bio-Rad).
١١. حضانة للأنايب من حجم ١,٥ - ٢,٢ ملي.
١٢. جهاز دائرة حرارية.

٢-٢: تضخيم الـ PCR للجين المُستهدف والقطع بالهضم:

١. محلول مُنظم 10× و Taq DNA polymerase.
٢. محلول 2 mM dNTP.
٣. 25 mM MgCl₂.
٤. بادئات مُحددة للهدف بمواقع تحديد الإنزيم على نهايتها 5'.
٥. آجروز.
٦. محلول مُنظم Tris-borate-EDTA (TBE).
٧. أيثيديوم بروميد لصبغ الجل.
٨. مواد لتتقية منتج الـ PCR، مثل: GeneClean Turbo (MP Biomedicals).
٩. إنزيمات قطع هضم مناسبة، ومحاليلها المنظمة للتفاعل المُركز.

٣-٢: استنساخ منتج الـ PCR داخل الناقل التعبيري:

١. محلول مُنظم للتفاعل و T4 DNA ligase.
٢. خلايا متخصصة *E. coli* strain DH5α.
٣. بيئة (S.O.C. broth (Invitrogen).
٤. *E. coli* strain BL21 (DE3) pLysS خلايا متخصصة من (Invitrogen).

٥. بادئات تعتمد على تسلسلات الناقل. وبالنسبة لتطبيق استخدام طريقة العمل المشروح في هذا الفصل، يتم استخدام البادئ الخاص لـ T7 والبادئ المعاكس (Invitrogen) T7.
٦. بوليميراز الحمض النووي Taq، ومحلول مُنظم التفاعل $10\times$.
٧. 2 mM dNTPs.
٨. 25 mM MgCl₂.
٩. محلول جلسرين تركيزه ٥٠٪ (لتخزين الخلايا المزروعة لمدة أطول في درجة حرارة -80°C).
١٠. مواد تنقية البلازميد، مثل: (Eppendorf S.R.L, 5 Prime) FastPlasmid Mini Kit، ولكن يمكن استخدام المواد أو الخطوات التي تم شرحها في (١٣).

٢-٤: المضادات الحيوية، والإنزيمات، والوسائط:

١. الأمبيسيلين (Ampicillin): 100 mg/mL في ماء ddH₂O نقي ومُعقم، مع فلتر ٠,٢٢ ميكرومل، ويُخزن المحلول القياسي على درجة حرارة -20°C .
٢. الكلورامفينيكول (Chloramphenicol): 25 mg/mL في إيثانول (١٠٠٪)، ويُخزن المحلول القياسي في درجة حرارة -20°C .
٣. بيئة LB: ١٠ جم من Bacto tryptone، و٥ جم من المادة المستخلصة من الخميرة، و٥ جم من الـ NaCl على ٩٥٠ مل من الـ ddH₂O؛ ويتم ضبط درجة الحموضة pH على ٧,٠ مع 1 M من الـ NaOH، ويُضاف ماء ddH₂O إلى ١ لتر، ويُعقم بجهاز التعقيم على درجة حرارة 120 مئوية لمدة ٢٠ min.
٤. بيئة LB اجار: يتم جمع ١٠ جم من Bacto tryptone، و٥ جم من مستخلص الخميرة، و٥ جم من NaCl مع ٩٥٠ مل من ddH₂O، ويمزجون معاً حتى يكون الخليط شفافاً، وتُضبط درجة الحموضة pH على ٧,٠ مع 1 M من NaOH. وبعدها، يُضاف ١٥ جم من الآجاروز، ويتم إضافة ddH₂O حتى تصل كمية الخليط إلى ١ لتر، ويُعقم بجهاز التعقيم على درجة حرارة 120 مئوية لمدة 20 min.
٥. Isopropyl- β - D -thiogalactopyranoside (IPTG) 1 M، ٢٣٨ مليجرام من IPTG على ١ مل ddH₂O، ينقى ويُعقم بفلتر ٠,٢٢ ميكروليتر، ويُقسم إلى كميات متساوية، وتُخزن على درجة حرارة -20°C مئوية. (وبالنسبة لـ 100 mM من الـ IPTG، تذوب ٢٣٨ مليجرام من الـ IPTG في ١٠ مل من ddH₂O، وتنقى وتُعقم بفلتر ٠,٢٢ ميكروليتر، ويُخزن بكميات مُقسمة بالتساوي في درجة حرارة -20°C).
٦. LB مُعدل بالأمبيسيلين (100 ug/mL) وكلورامفينيكول (25 ug/mL): لتحضير ٥ أطباق، يُضاف ١٠٠ ميكروليتر من محلول الأمبيسيلين المُخزن، و١٠٠ ميكروليتر من محلول

الكلورامفينيكول المُخزن، إلى ١٠٠ مل من LB agar المُذاب (في درجة حرارة 50°C)، ويتم خلطهم، ثم صب البيئة في الأطباق، ويُتركون حتى تبرد الأطباق وتصل درجة حرارتها إلى درجة حرارة الغرفة، وتُغطى الأطباق بالبارافيلم، وتُخزن على درجة حرارة 4°C لأكثر من شهر. ولتحضير ١ لتر من وسط الـ LB، يُضاف ١ مل من محلول الأمبيسيلين المُخزن، و ١ مل من محلول الكلورامفينيكول المُخزن، إلى ١ لتر من وسط الـ LB، ويتم خلطهم واستخدامهم على الفور.

٧. مسحوق الليزوزيم (Lysozyme powder). يُخزن في درجة حرارة 20°C -.

٢-٥: استخلاص البروتين في الحالات غير الطبيعية:

١. محلول مُنظم الانحلال الأساسي (Lysis buffer): 100 mM من NaH_2PO_4 ، 10 mM من Tris-HCl، ودرجة الحموضة 8.0 pH .
٢. محلول مُنظم إعادة التعليق (R): 8 M من اليوريا في محلول مُنظم الانحلال الأساسي، ودرجة الحموضة 8.0 pH .
٣. محلول مُنظم الغسيل ١ (W1): 8 M من اليوريا في محلول مُنظم الانحلال الأساسي، ويتم ضبط درجة الحموضة pH على 6.3 باستخدام 1 M من الـ HCl.
٤. محلول مُنظم الغسل ٢ (W2): 8 M من اليوريا في محلول مُنظم الانحلال الأساسي، ويتم ضبط درجة الحموضة pH على 5.9 باستخدام 1 M من الـ HCl.
٥. محلول مُنظم الشطف (E): 8 M من اليوريا في محلول مُنظم الانحلال الأساسي، ويتم ضبط درجة الحموضة pH على 4.5 باستخدام 1 M من الـ HCl.
٦. الآجاروز Ni-NTA: يُزود طينا سائلا بنسبة 50% إلى الإيثانول.

٢-٦: استخلاص البروتين في الحالات الطبيعية:

١. المحلول المُنظم القاعدي: 50 mM من NaH_2PO_4 ، 300 mM من NaCl، 8.0 pH . يذاب 6.9 جم من الـ $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ، و 17.53 جم من الـ NaCl في ddH_2O ، ويتم ضبط درجة الحموضة pH على 8.0 باستخدام NaOH، وتُزود بماء ddH_2O حتى تصل الكمية بأكملها إلى ١ لتر.
٢. محلول مُنظم الانحلال (المحلول المُنظم A): 10 mM من الأيميدازول، و 20 Tween بتركيز 0.2% في محلول مُنظم قاعدي، و 8.0 pH ، ويذاب 0.7 جم من الأيميدازول، و 2 مل من Tween 20 في الكمية الأخيرة المكونة من المحلول المُنظم القاعدي ١ لتر.
٣. محلول مُنظم الغسل (المحلول المُنظم B): 20 mM من الأيميدازول في المحلول المُنظم القاعدي، 8.0 pH .

٤. محلول مُنظم الشطف (المحلول المُنظم C): 250 mM من الأيميدازول في المحلول المُنظم القاعدي، pH 8.0.
٥. الآجاروز Ni-NTA: يُزود طينا سائلا بنسبة ٥٠٪ إلى الإيثانول (QIAGEN)؛ ويُغسل مرتين بماء ddH₂O لإزالة الإيثانولو؛ لموازنته ثلاث مرات بالمحلول المُنظم A قبل استخدامه.

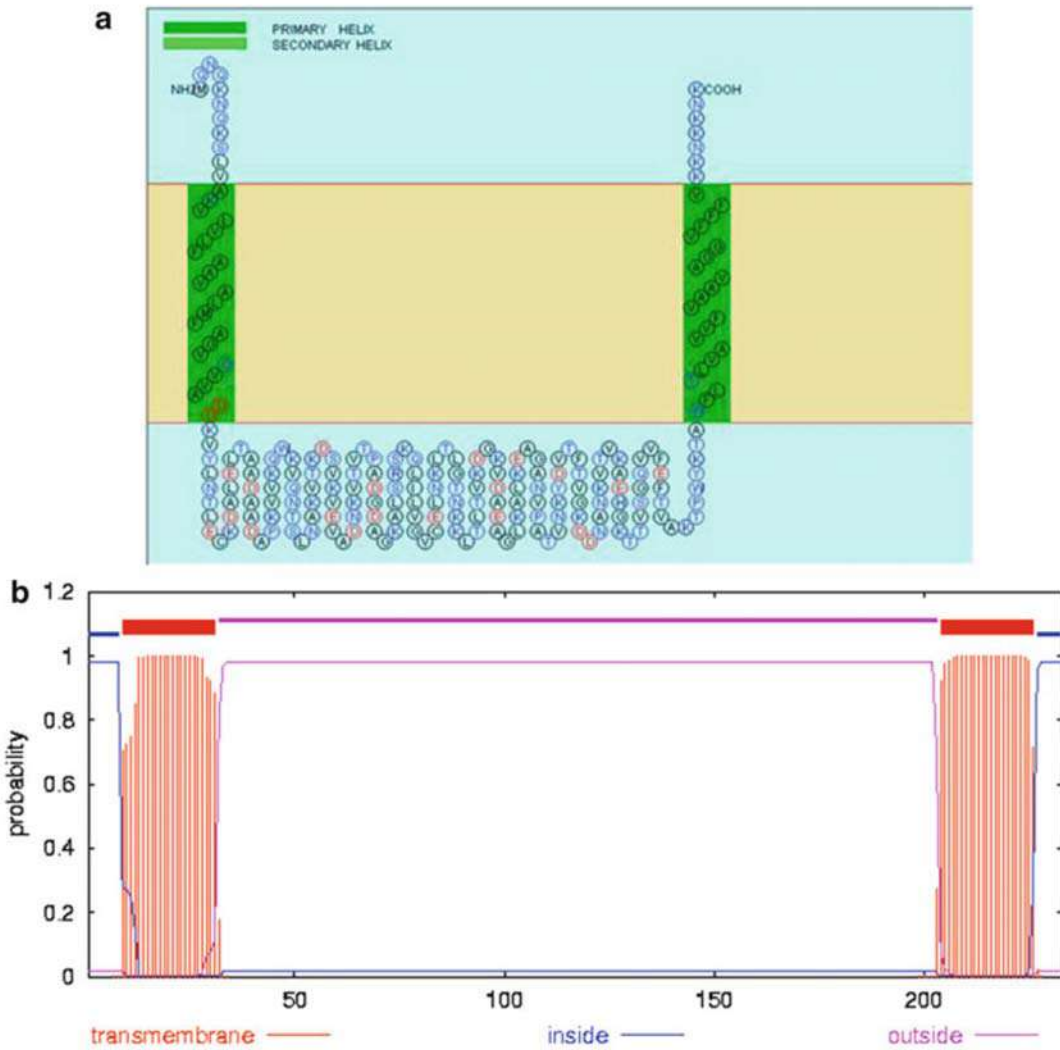
٧-٢: الفصل الكهربائي لجل البولي أكريلاميد – SDS:

١. محلول أكريلاميد تركيزه ٤٠٪ (١:٢٩ أكريلاميد: بيس – أكريلاميد).
٢. 1.5 M من الـ Tris-HCl، pH 8.8.
٣. دوديسيل كبريتات صوديوم بتركيز ١٠٪ (SDS) في ddH₂O.
٤. فوق كبريتات الأمونيوم بتركيز ١٠٪ في ddH₂O.
٥. N⁺، N، N، N⁻ tetramethylethylenediamine (TEMED)، يُخزن في درجة حرارة 4°C.
٦. ثالثي البوتانول (tert-Butanol).
٧. 1.5 M من الـ Tris-HCl، pH 6.8.
٨. محلول مُنظم الـ Laemmli (تركيز 5×): 25 mM من الـ Tris، 250 mM من الجلوسرين، 0.1% SDS. يُحضر ٢ لتر من المحلول تركيز 5× بإذابة ٣٠ جم من Tris، و١٨٨ جم من الجلوسرين، و١٠ جم من SDS، في ٢ لتر من ماء ddH₂O، ويتم تعقيم هذا المزيج بوضعه في جهاز التعقيم في درجة حرارة 120°C لمدة 20 min. ولتحضير ١ لتر من محلول مُنظم الـ 1× Laemmli، يتم خلط ٢٠٠ مل من المحلول المُخزن 5× بماء ddH₂O كميته ٨٠٠ مل.
٩. محلول مُثبت لصبغة Coomassie: إيثانول تركيزه ٤٠٪، وحمض أسيتيك تركيزه ١٠٪.
١٠. محلول صبغة كوماسي المُخزن: 10% H₃PO₄، 10% (NH₄)₂SO₄، وصبغة كوماسي الزرقاء G-250 بتركيز ٠,١٢٪.
١١. محلول صبغة كوماسي، والذي يتم استخدامه في المعمل: ميثانول ٢٠٪، ومحلول كوماسي مُخزن ومجهز للاستخدام.
١٢. محلول مُنظم عينة الـ SDS (محلول مُخزن 3×): ١٥٪ β-mercaptoethanol، وجلوسرين ٢٩٪، و138 mM من الـ Tris-HCl بدرجة حموضة pH 6.8، بروموفينول أزرق ٠,٠١٪. ولتحضير ٢٥ مل، يتم خلط ٧,٢٥ مل من الجلوسرين، و٣,٤٥ مل من الـ Tris-HCl بدرجة حموضة pH 6.8، وملعقة واحدة من بروموفينول الأزرق، و٩ مل من ddH₂O، ويُخزن في درجة حرارة -20°C على كميات مُقسمة كل كمية ٨٥٠ ميكروليترا. وعند الحاجة، يُترك في درجة حرارة الغرفة حتى يذوب، ويتم إضافة ١٥٠ ميكروليترا β-mercaptoethanol، ويُخزن على درجة حرارة 4°C.
١٣. مُحدد الوزن الجزيئي للبروتين: المعايير القياسية الخاصة بـ SDS-PAGE.

٣- طرق العمل:

١-٣: تحديد النطاقات الغشائية المفترضة في تسلسل البروتين المستهدف:

١. يتم نسخ شفرة سلسلة البروتين المُستهدف ولصقها على برنامج لتوقع الغشاء البيني الافتراضي (انظر: الملاحظة ١).
٢. تُحدد الأحماض الأمينية الموجودة في نطاق الأغشية البينية الافتراضية الخاصة بالبروتين المُستهدف (شكل ٢).
٣. بعدها، يتم الرجوع إلى سلسلة DNA البروتين، مع استبعاد جزء من السلسلة التي ترمز إلى نطاق الأغشية البينية الافتراضية من السلسلة التي يُستهدف نسخها في الناقل التعبيري.



شكل (٢): (a) TMHMM و (b) SOSUI موقع الغشاء المفترض للفيتوبلازما *'Ca. Phytoplasma asteris'* chrysanthemum yellows strain phytoplasma Amp protein

٣-٢: تصميم البادئات واستنساخ منتج PCR في الناقل التعبيري:

١. يتم وضع السلاسل الخاصة بالإنزيم وتثبيتها على نهايات 5' البادئات العكسية والأمامية، حسب خريطة الربط المتعدد للناقل التعبيري (expression vector). ويجب التحقق من أن إضافة موقع الإنزيم على النهاية 5' تُحافظ على ترميز سلسلة الجين المُستهدف في قالب المفتوح (open reading frame ORF) للنقل التعبيري الذي تم اختيارها (انظر: الملاحظة ٢).
٢. يُجرى تحليل الـ PCR باستخدام تلك البادئات، والتحقق من حجم الأَمبِيسيلين المُحتَمَل بواسطة الفصل الكهربائي لجل الآجاروز.
٣. يُستخلص الأَمبِيسيلين من جل الآجاروز، ويُنظف بمواد التنقية الخاصة التي سيتم اختيارها، وتُحدد كميته.
٤. يتم هضم الناتج المنقى (حوالي ١ ميكروجرام)، والناقل التعبيري (حوالي 200 ng) مع إنزيمين من الإنزيمات يتم اختيارهما (انظر: الملاحظة ٣).
٥. يُنقى ناتج المهضوم من الناقل التعبيري، ويتم تنقيتهم بواسطة مواد التنقية الخاصة من اختيارك، مع تحديد كمية الـ DNA.
٦. يتم ربط ناتج المهضوم والناقل التعبيري معاً (انظر: الملاحظة ٤).
٧. يُحول ١٠٠ ميكروليتر من خلايا *E. coli* DH5 α المكونة من خلال إضافة ١٠ ميكروليترات من خلطة المواد الرابطة، مع رج الخليط معاً برفق، ويتم وضعهم في الثلج لمدة 30 min، ويتم وضعهم في الحضانة في درجة حرارة 42°C لمدة 45 s، ثم يتم وضع الخليط مرة أخرى في الثلج لمدة 2 min، ويتم إضافة ٤٠٠ ميكروليتر من بيئة الـ S.O.C، وتترك على درجة حرارة 37°C، ويُرج لمدة ساعة واحدة، ثم يتم وضع ٢٠٠ ميكروليتر من الأَمبِيسيلين في طبق بيئة الـ LB، ويتم وضع الطبق في الحضانة على درجة حرارة 37°C طوال فترة الليل.
٨. تُفحص المستعمرات بتحليل الـ PCR، وباستخدام البادئات الخاصة للتسلسل الناقل؛ للتأكد من وجود الجين المضاف (انظر: الملاحظة ٥).
٩. تُنقى بلازميدات الـ DNA ثلاث مستعمرات على الأقل، ويتم العمل والتعرف على تسلسلهم للتأكد من أن الأَمبليكون قد أدخل في الإطار، وللتأكد -أيضاً- من عدم وجود الـ spurious termination codons في قالب مفتوح (ORF) مُستهدف.
١٠. تُحول الخلايا المكونة للـ pLysS (*E. coli* BL21 (DE3)) مع الناقل التعبيري التي تم تنقيتها (50 ng)؛ والتي تحتوي على التسلسلات المُدرجة في الإطار (انظر: الملاحظة ٦). وتوضع الخلايا في طبق يحتوي على بيئة آجار الـ LB مع الأَمبِيسيلين والكلورامفينيكول، ويتم اختيار ما لا يقل عن ثلاث مستعمرات لإعادة دمج البروتين المُستهدف (recombinant target protein expression).

٣-٣: اختيار المستعمرات التي تُعبر عن البروتين المُؤْتَلَف:

١. تتم عدوى ٢ مل من بيئة الـ LB التي تحتوي على الأمبيسلين والكلورامفينيكول (في أنابيب ١٥ مل) بمستعمرات بكتيرية مُتَحَوِّلة، وتُوضَع في الحضانة درجة حرارتها 37°C طوال فترة الليل مع الرُج.
٢. في صباح اليوم التالي، يتم تلقيح ٥ مل من بيئة LB الطازج (في أنابيب ٥٠ مل) بـ ٥٠٠ ميكروليتر من البكتيريا التي زُرعت أثناء فترة الليل، وتُحضن الأنابيب في درجة حرارة 37°C ، ورجها بقوة (فوق 200 rpm) حتى تصل الكثافة البصرية عند 600 nm (OD_{600}) إلى 0.4-0.7.
٣. يتم إضافة IPTG إلى كل أنبوب ليصل التركيز النهائي إلى 1 mM (مثل: ٥ ميكروليترات من المحلول المُخزن 1M IPTG في ٥ مل في بيئة الـ LB).
٤. تُترك المجموعات المزروعة لتنمو لمدة تتراوح ما بين ٣ إلى ٥ ساعات.
٥. يتم نقل ٤ مل من كل مجموعة نمو -على خطوتين متتاليتين- إلى أنبوب من أنابيب الطرد المركزي ٢,٢ مل، مع عمل طرد مركزي لحصاد خلايا البكتيريا (15000 لفة لمدة دقيقة واحدة على درجة حرارة الغرفة).
٦. يتم التخلص من المادة الطافية، ويُضاف ٣٠٠ ميكروليتر من المحلول المُنظَّم R (المحلول المُنظَّم لإعادة التعليق)، وبعدها تُحلل الخلايا البكتيرية بالماصة أو من خلال قلبها برفق، وتنتهي عملية الانحلال عندما يصبح المحلول شفافاً.
٧. يوضع السائل الناتج عن انحلال الخلايا البكتيريا في جهاز الطرد المركزي لمدة 10 min بسرعة ١٥٠٠٠ لفة، وتُثقل المادة الطافية المُضافة والتي تحتوي على بروتينات البكتيريا المُذابة (السائل الناتج عن عملية انحلال الخلايا المُصْفَى) إلى أنبوب طرد مركزي ١,٥ مل جديد.
٨. يُضاف ٥٠ ميكروليترا من الآجاروز Ni-NTA 50% (انظر: الملاحظة ٨) إلى كل أنبوب يحتوي على المادة الطافية المُصْفَاة، ويخلطون معاً لمدة 20 min على درجة حرارة الغرفة.
٩. يتم جمع الآجاروز Ni-NTA بالطرد المركزي (بسرعة ٦٠٠٠ لفة، لمدة دقيقة واحدة)، ويتم التخلص من المادة الطافية، ويُحفظ ١٠ ميكروليترات من المادة الطافية لفحصها باستخدام الـ SDS-PAGE.
١٠. تُغسل حبيبات الآجاروز Ni-NTA مرتين بـ ٣٠٠ ميكروليتر مع المحلول المُنظَّم للغسيل (المحلول المُنظَّم W1)؛ وذلك بعد وضعها في جهاز الطرد المركزي على سرعة ٦٠٠٠ لفة لمدة دقيقة واحدة، ويتم التخلص من المادة الطافية، (مع الاحتفاظ بـ ١٠ ميكروليترات من المادة الطافية لفحصها بواسطة الـ SDS-PAGE).

١١. لاستخلاص البروتين المُهجن المُحدد للبولي الهيستدين (polyhistidine-tagged fusion protein) من الآجاروز Ni-NTA، يتم إضافة ٣٠ ميكروليترا من المحلول المنظم للاستخلاص (المحلول المنظم E)، ويُخلط برفق باستخدام الماصة، ويُوضع على جهاز الطرد المركزي على سرعة ٦٠٠٠ لفة لدقيقة واحدة، وبحرص يتم نقل المادة الطافية التي تحتوي على البروتين المُهجن إلى أنبوب جديد، وتُكرر الخطوة مرة أخرى.

١٢. يتم اختبار البروتين المستخلص (١٠ ميكروليترات) على الـ SDS-PAGE، وعلى سلم الوزن الجزيئي للبروتين المناسب.

١٣. يتم تحضين جل البولي أكريلاميد في ٥٠ مل من محلول التثبيت، مع رجها معاً برفق لمدة ٥min، ويُغسل الجل مرتين بماء ddH₂O لمدة خمس دقائق، وطوال فترة الليل يتم وضع الجل في محلول صبغة كوماتسي المُحضر في المعمل لتلوينه (انظر: الملاحظة ٩)، ويجب إزالة الصبغة من على الجل بماء ddH₂O؛ وذلك قبل فحص الأنسجة البروتينية للتأكد من تمثيل البروتين المُهجن المُستهدف، وللتحقق من وزنه الجزيئي (انظر: الملاحظة ١٠). ويجب تحديد المستعمرات التي تعبر عن البروتين المُهجن بدقة عالية لاستخدامها في الخطوات التالية، ويجب -أيضاً- تخزين المستعمرات البكتيرية في درجة حرارة 80°C- (انظر: الملاحظة ٥).

٣-٤: تجربة أنموذجية لدراسة الزمن التعبيري وإذابة البروتين:

١. يُحضن ١٠ مل من بيئة الـ LB؛ والذي يحتوي على الأمبيليسين (١٠ مل/ميكروجرام) والكلورامفينيكول (25/مل ميكروجرام) مع المستعمرة البكتيرية التي تُعبر عن أغلب البروتينات المُهجنة المُستهدفة (الموضحة في العنوان الفرعي ٣,٣ الخطوة ١٠)، ويتم حفظها في حضانة عند درجة حرارة 37°C طوال فترة الليل، مع رجها.

٢. في اليوم التالي، يُحضن ٩٠ مل من بيئة الـ LB بعد تدفئته بدرجة حرارة 37°C مئوية مع ١٠ مل من المستعمرة التي تم زرعها خلال فترة الليل (انظر: الملاحظة ١١)؛ والتي تنمو بالرج الشديد (أعلى من 200 rpm)؛ للوصول إلى OD₆₀₀ من ٠,٤-٠,٧ (عادة حوالي 2 h).

٣. تُؤخذ عينتان من العينات المزروعة (٥ مل من كل عينة)، ويتم تعريف العينة الأولى بـ A₀، والعينة الثانية بـ B₀ (كعينات شاهد، انظر: الملاحظة ١٢)، ثم يتم عمل طرد مركزي بسرعة ٤٠٠٠ لفة لمدة 15min (4 مئوية)، وتوضع في أطباق، وتُخزن في درجة حرارة 20°C- إلى أن يتم استخدامها.

٤. يُضاف IPTG إلى تركيز الـ 1 mM لحث عملية تمثيل البروتين المُهجن، وتوضع العينات المزروعة في حضانة عند درجة حرارة 37°C، مع رجها بشدة (أكثر من 200 rpm).

٥. يتم تحضير جل الـ SDS-PAGE ١٥% (انظر: الملاحظة ١٣)، ويُخزن في درجة حرارة الغرفة في محلول مُنظم الـ Laemmli.

٦. تؤخذ عينتان (٥ مل من كل عينة) بعد ساعة واحدة من وضعها في الحضانة مع الـ IPTG، ويتم تعريف العينة الأولى A1، والأخرى B1. وبعد ذلك، يتم عمل طرد مركزي لتجميع الخلايا البكتيرية (بسرعة ٤٠٠٠ لفة لمدة ١٥min على درجة حرارة 4°C)، وتُخزن الحبيبات في درجة حرارة -20°C، وتترك العينات المزروعة لتُكمل نموها، وتُجمع العينات (٥ مل من كل عينة) على فترات متقطعة لمدة ساعة، ويتم تعريفهما بـ A₂... A_n و B₂... B_n (انظر: الملاحظة ١٤)، وتُفكك الخلايا (٤٠٠٠ لفة لمدة 15 min على درجة حرارة 4°C)، وتُخزن الحبيبات في درجة -20°C.

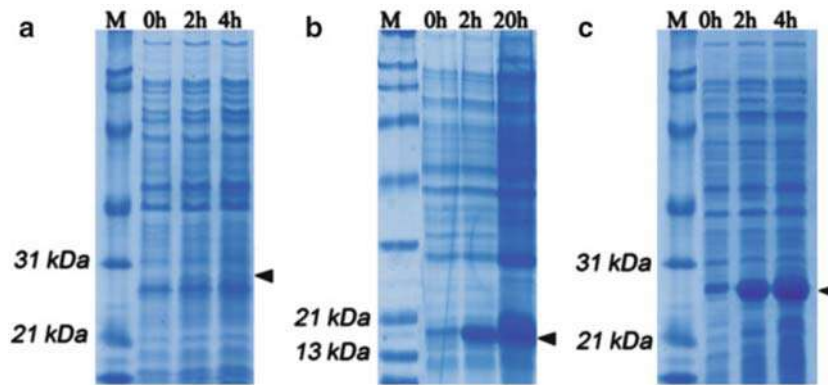
٨. بالنسبة لتحليل العينات على فترات زمنية، تترك حبيبات الخلية المجمدة على الثلج من العينات A₀ إلى A_n لتذاب لمدة 20 min، ويتم استخلاص البروتينات بأكملها في هذه الحالة الطبيعية؛ بإضافة ٢,٥ مل من المحلول المنظم R إلى الحبيبات الذائبة، وتُخلط الخلايا المُفككة بلطف حتى يصبح المحلول شفافاً، وتوضع في جهاز الطرد المركزي على سرعة 15000 لفة لمدة 10 min (على درجة حرارة الغرفة)، وتُنقل المادة الطافية (المادة المُفككة المنقاة) إلى أنبوب جديد (انظر: الملاحظة ١٥)، ويتم تعيين ٥ ميكروليترات من المادة المُفككة التي تم تقويتها على مدد زمنية مختلفة؛ وذلك بعد إضافة الـ IPTG (A₀ - A_n)، ويُضاف ٢ ميكروليتر من المحلول المنظم للعينة SDS 3×، ويتم غليهم لمدة 5 min، وتُحفظ للخطوة ٩.

٩. لاختبار درجة إذابة المضاد الجيني المُهجن المُستهدف، تُذاب الحبيبات البكتيرية (B₀ to B_n) التي تم وضعها على الثلج (لمدة 20 min تقريباً)، ويُضاف ٥ مل من المحلول المنظم A إلى كل أنبوب، ويُضاف الـ lysozyme إلى أن يصبح التركيز النهائي بنسبة 1mg/mL. وبعدها، يتم وضعه للتحضين على الثلج لمدة 30 min، ويتم تُفكك الخلايا البكتيرية بالرنين المغناطيسي (لمدة 10 s، بضبط طاقة الرنين على 200 W، وتُكرر ٦ مرات)، وتوضع العينة على الثلج لتخزينها بين كل استخلاص وآخر بالموجات الصوتية (يجب أن يتم تجنب فوران العينات ورغوتها)، وتوضع العينات في جهاز طرد مركزي على سرعة 15000 لفة على درجة حرارة 4°C لمدة 10 min، وتُجمع المواد الذائبة (المواد الطافية) وغير الذائبة (الحبيبات) الناتجة من المادة المُفككة lysate، ويُعاد تعليق الحبيبات في المحلول المنظم للعينة SDS 3×، وتُغلى لمدة 5 min، وتُحفظ ١٠ ميكروليترات من العينة للخطوة ٩، وتُنقل ١٠ ميكروليترات من البروتينات الذائبة إلى أنبوب طرد مركزي جديد، وتُضاف ٣ ميكروليترات من المحلول المنظم للعينة SDS 3×، ويُغلى الأنبوب بمحتوياته لمدة 5 min، ويُحفظ للخطوة ٩.

١٠. يتم تحضير مواد الأكريلاميد بنسبة ١٥٪ للـ SDS-PAGE، وتُحمل العينات المغلية A₀- A_n و B₀ إلى مواد B_n الذائبة وغير الذائبة، مع ضرورة وجود مؤشر وزن جزيئي للبروتين مناسب (انظر: الملاحظة ١٦).

١١. يُشغل جهاز الأكريلاميد جل SDS-PAGE، ويتم التلوين بصبغة كوماسي الزرقاء (شكل ٣).

١٢. يتم تقييم مستوى تمثيل البروتين وإذابته، ويتم - أيضاً - تحديد الحالات المثالية للوصول إلى أفضل تعبير لتركيبه وفقاً للشروط المحددة لاستخدامها في المستقبل (انظر: الملاحظة ١٦).



شكل (٣): SDS - بولي أكريلاميد الجل الكهربائي (SDS-PAGE)؛ من البروتينات الكلي من التعبير بالأوقات المختلفة من ثلاث فيتوبلازما مختلفة للغشاء البييني (a و b؛ على التوالي)، والسهام السوداء تشير إلى المكان المتوقع من البروتين. M المعيار SDS-PAGE سلم واسعة النطاق، و 0h عينة تم جمعها قبل تفاعل - D - isopropyl β من البروتين. 20h، ٢، ٤، thiolactoside (IPTG)، عينات تم جمعها في ٢٠، ٤٠، ٢٠٠ بعد تفاعل IPTG.

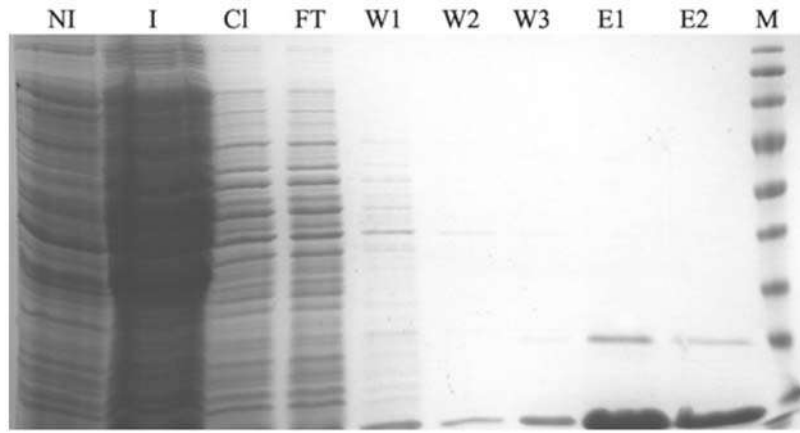
٣-٥: التعبير البروتيني على نطاق واسع للبوليهيستيدين (Polyhistidine) المُستهدف:

١. يتم عدوى ٥٠ مل من بيئة الـ LB؛ والذي يحتوي على امبسلين (100ug/mL) والكلورامفينيكول (25 ug/mL) بالمستعمرة البكتيرية التي تم اختيارها؛ والتي تُمثل البروتين المُستهدف المُهجن بكفاءة عالية، وتُحضن العينة على درجة حرارة 37°C، وتُترك لتتمو طوال فترة الليل، مع الرُج.
٢. يتم عدوى 1 لتر من بيئة الـ LB الطازج بالعينة التي نبتت خلال فترة الليل، ويُوضع في الحضانة عند درجة حرارة 37°C، مع الرُج (أكثر من 200 rpm) (انظر: الملاحظة ١١).
٣. عند وصول الـ OD 600 إلى 0.4-0.7، يتم إضافة العينة المزروعة وتحريكها بالكاشف الحيوي الجزيئي IPTG المُحفز؛ إلى أن تصل 1 mM من التركيز النهائي. وتُترك العينة لمدة أربع ساعات أخرى لتتمو (للتقنية في ظل الحالة الطبيعية)، أو لمدة ٦ ساعات (للتقنية في ظل حالته غير الطبيعية).
٤. توضع العينة المزروعة والمُستتبته على جهاز الطرد المركزي (بسرعة ٤٠٠٠ لفة لمدة 30 min على درجة حرارة 4°C)؛ وذلك لتجميع الخلايا البكتيرية.

٥. تُوزن الحبيبات التي تم تجمعها، وتُخزن الحبيبات البكتيرية في درجة حرارة 20°C - طوال فترة الليل؛ وذلك قبل البدء في التنقية التحضيرية للبروتين المُستهدف من مادة البولي الهيستدين.

٣-٦: تنقية بوليهاستدين البروتين المُستهدف على نطاق واسع: ٣-٦-١: الحالة غير الطبيعية:

١. تذاب حبيبات الخلايا البكتيرية على الثلج لمدة 30 min، ويتم حكها بجدار الأنبوب بعود زجاجي لتجنب تكتلها أثناء عملية إعادة التعليق.
٢. يتم إضافة من ١ مل إلى ٥ مل من المحلول المنظم للتفكك R إلى كل جرام من الخلايا (انظر: الملاحظة ١٧)، ويُخلطون معاً برفق، ويتركون لمدة 30 min على درجة حرارة الغرفة لمواصلة تفكك الخلايا.
٣. تُوضع المادة الناتجة عن الخلايا المُفككة بجهاز الطرد المركزي الرئيسي (بسرعة 15000 لفة لمدة 30 min)، وتُنقل المادة الطافية إلى أنبوب ٥٠ مل جديد.
٤. يُضاف ٢ مل من الآجاروز Ni-NTA 50% إلى المادة المنقاة الناتجة عن تفكك الخلايا المُفككة (انظر: الملاحظة ١٨)، ويُرج الخليط برفق لمدة ساعة واحدة على درجة حرارة 4°C .
٥. يُنقل الخليط إلى العمود الكروماتوغرافي (على خطوة واحدة أو على خطوات متتالية) مع غلق غطاء القاع. وعند تحميل الخليط، يتم فتح غطاء القاع، ويُجمع التدفق، والذي يحتوي على البروتينات التي لا تدخل في ربط الجزيئات معاً (انظر: الملاحظة ١٩)، ويُخزن جزء من التدفق في درجة حرارة 20°C - لتحليله فيما بعد بواسطة الـ SDS-PAGE.
٦. يُغسل عمود الآجاروز Ni-NTA ثلاث مرات بـ ٢ مل ملم من محلول مُنظم الغسل ١ (المحلول المنظم W1)؛ وكل مرة يتم أخذ عينة واحدة لتحليلها فيما بعد بواسطة الـ SDS-PAGE.
٧. يُغسل عمود الآجاروز Ni-NTA مرتين بـ ١ مل من محلول مُنظم الغسل ٢ (المحلول المنظم W2)؛ وفي كل مرة يتم أخذ عينة واحدة لتحليلها فيما بعد بواسطة الـ SDS-PAGE.
٨. يُستخلص البروتين المُهجن المُستهدف من الآجاروز Ni-NTA بإضافة ٠,٥ مل المحلول المنظم للغسل (المحلول المنظم E) خمس مرات، ويُضاف ٣ ميكروليترات من المحلول المنظم للعينة $3 \times \text{SDS}$ إلى ١٠ ميكروليترات من العينة المُستخلصة، ثم تغلى لمدة 5 min، وتُحمل على جل الإكريلاميد لتحليلها بالـ SDS-PAGE؛ وذلك لقياس جودة التنقية وكمية البروتينات المُهجنة المُستهدفة (شكل ٤)، ويُضم إليها عينات الجل الناتجة عن التدفق والغسل؛ والذي تم إجراؤه أثناء خطوات الاستخلاص (من الخطوة ٥ إلى ٧)، وذلك لتتبع الإطلاق المحتمل للبروتين المُستهدف في كل خطوة.



شكل (٤): SDS-PAGE جل من عينات من خطوات مختلفة من التعبير والتنقية تحت الظروف غير الطبيعية للغشاء البروتيني لفيتوبلازما. *NI* البروتين الكلي من النموات البكتيرية غير المستحثة، *I* البروتين الكلي من النموات البكتيرية المستحثة، *CI* البروتين الكلي المحلل النقي من النموات البكتيرية المستحثة، *FT* بروتينات المحملة من خلال Ni-NTA جل؛ والمحضنة في النموات البكتيرية المعلقة، بروتينات *W1*، *W2*، *W3* ثلاث خطوات متتالية من الغسيل من Ni-NTA جل، *E1*، *E2*، البروتينات المنقاة بالعمود في خطوتين متتاليتين من Ni-NTA جل، *M* علامات السلم القياسي للوزن الجزيئي.

٣-٦-٢: الحالة الطبيعية:

١. تُذاب حبيبات الخلايا البكتيرية على الثلج لمدة 30 min، ويتم حكها بجدار الأنبوب بعود زجاجي لتجنب تكتلها أثناء عملية إعادة التعليق.
٢. تُعلق الخلايا مرة أخرى في ٢٠ مل من المحلول المنظم للاستخلاص A (انظر: الملاحظة ٢٠)، ثم توضع على الثلج.
٣. يتم إضافة الليزوزيم (lysozyme) إلى أن يصل التركيز النهائي إلى 1 mM، ويُقلب الأنبوب لخلط المحاليل ببطء، ويوضع على الثلج لمدة 30 min.
٤. تُعرض المادة الناتجة عن الخلايا المُفككة بالموجات الصوتية؛ إلى أن يتم اكتمال تفكك غشاء الخلية وانحلالها (انظر: الملاحظة ٢١).
٥. توضع المادة الناتجة عن التفكك في جهاز الطرد المركزي الرئيسي بسرعة 15000 لفة لمدة ٢٠ min على درجة حرارة 4°C؛ لتحويل البقايا الناتجة عن الخلية المُفككة والبروتين الذي لم يذب إلى حبيبات في الأجسام التي حولها.
٦. تُنقل المادة الناتجة عن التفكك إلى أنبوب ٥٠ مل، ويُضاف ١ مل الآجاروز Ni-NTA 50%؛ والذي تمت موازنته في المحلول المنظم A، ويُخلطون معاً برفق على جهاز من أجهزة الرج لمدة ٣٠ min على درجة حرارة 4°C.
٧. يُحمل الخليط على العمود الكروماتوغرافي مُغلقة من الأسفل.

٨. يُزال غطاء الفوهة لإزالة البروتينات التي لا تدخل في ربط الجزيئات معاً، وتؤخذ عينة من عينات التدفق (١٠ ميكروليترات) لتحليلها بال SDS-PAGE.
٩. يُغسل العمود ثلاث مرات بـ ٢ مل من محلول مُنظّم الغسل (محلول مُنظّم B)، وتؤخذ عينات من كل غسلة (١٠ ميكروليترات) لتحليلها بال SDS-PAGE.
١٠. تُستخلص البروتين المستهدف من الآجاروز Ni-NTA بمحلول مُنظّم الغسل (المحلول المُنظّم C)، وتُكرر عملية الغسل أربع مرات، وتؤخذ عينات (١٠ ميكروليترات) من كل غسلة؛ وذلك للتحقق من جودة البروتين المُحدد وكميته للبولي هيسستيدين المُستهدف في تحليل ال SDS-PAGE.

٤- الملاحظات:

١. البرامج المقترحة هي: (TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) ؛ SOSUI (http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui/sosui_submit.html) (١٤).
٢. لدعم نطاق الإطار، يمكنك إضافة نكليوتيدة واحدة أو نكليوتيدين، والتحقق من أنه لم يتم إدخال جين التوقف. ويمكنك -أيضاً- إضافة عدد قليل من النكليوتيدات على النهايات '5' البادئة لتعزيز تسلسل إنزيم الهضم.
٣. للتحقق من اكتمال هضم ال DNA، يتم عمل شاهد واحد للتحكم في عملية الهضم لأي بلازميد مُغلق مساهم لكل إنزيم من خلال الهضم بنفس نسبة وكمية وحدة نموذج الإنزيم، كما في عمليات هضم الناقل/جين قيد الدراسة. ويُحضن الهضم في درجة حرارة مناسبة لمدة ساعة واحدة. وبعدها، يتم التحقق من أن البلازميد تم هضمها من خلال الفصل الكهربائي لجل الآجاروز. وفي حالة اكتمال عملية الهضم، يتم انتقال العمل إلى الخطوات المُتتابة للجين والناقل التعبيري.
٤. بالنسبة لتفاعل الربط، نستخدم من ٣:١ لنسبة الكمية للناقل، بناءً على ما يلي: $ng_i = 3ng_p \times (bp_i/bp_p)$ ؛ حيث إن $ng_i = ng_p$ تُشير إلى هضم-مرتين والجزء من حمض النووي قيد الدراسة المنقى (المُدْرَج)، و $ng_p = ng_i$ هي هضم-مرتين والناقل التعبيري المنقى (البلازميد)، و $bp_i =$ الحجم المُدرَج من الأزواج القاعدية، و $bp_p =$ حجم الناقل من الأزواج القاعدية. ويوضع تفاعل الربط في الثلج بواسطة إضافة ٣ وحدات من إنزيم ربط ال DNA T4 في محلول منظم مناسب إلى الكمية الصحيحة لهضم-مرتين وناقل التعبيري المنقى في الكمية النهائية التي تبلغ ١٠ ميكروليترات. ويتم -أيضاً- إعداد ربط الشاهد الذي به يتم استبدال جزء من ال DNA المهضوم بماء ddH₂O المُعقم، ويُحضن التفاعل في درجة حرارة 4°C خلال الليل.
٥. عند فحص المستعمرات بعد التحول، تأكد من أن فترة خطوة التضخيم في تفاعل ال PCR طويلة بما فيه الكفاية لضمان قدرة الجزء المستهدف، مع تثبيت المستعمرات التي تم اختيارها

على طبقة رئيسية من الأجار L/ أمبيسيلين. وعند توفر تسلسل الإدراج المُستهدف وتأكيد صحته، يتم تخزين المستعمرة المطابقة في الجلسرين عند درجة حرارة 80°C وللقيام بذلك، تُزرع المستعمرة المحولة في 2 مل في بيئة LB مع الأمبيسيلين طوال فترة الليل، ثم يُمزج 700 ميكروليتر من المستعمرة التي تم زراعتها وتُركها لتنمو أثناء فترة الليل مع 300 ميكروليتر من جلسرين تركيزه 50٪، ويُخلطان معاً جيداً، ويُوضعان في نيتروجين سائل إلى أن يتجمدا، ويُخزنا في درجة حرارة 80°C .

6. تُحول خلايا الـ *E. coli* BL21 (DE3) pLysS التي تمت معالجتها بعناية من خلال إضافة 1 ميكروليتر/50 ng من الناقل التعبيري المنقى، ويُخلطون معاً بقلبهم بعناية، ويُخزن المزيج في الثلج لمدة 30 min، ويُحضان في درجة حرارة 42°C لمدة 45 s، ويوضع مرة أخرى على الثلج لمدة 2 min، ويتم إضافة 400 ميكروليتر من بيئة الـ SOC، ويُحضان في درجة حرارة 37°C مع الرج لمدة ساعة واحدة.

7. يتم اختيار مستعمرات أخرى مترابطة، ويُتم تنميتها على بيئة آجار رئيسية LB تحتوي على الأمبيسيلين والكلورامفينيكول؛ إلى أن تُبين نتائج اختبار المستعمرات الأخرى لتوفر البروتينات المرتبطة.

8. لموازنة مادة الـ Ni-NTA، يتم وضع 50٪ من المادة في جهاز الطرد المركزي على سرعة 6000 لفة لمدة دقيقة واحدة، ويتم إزالة المادة الطافية، وتُضاف كتلة واحدة من المحلول المنظم للتفاعل (المحلول المنظم R أو A للحالة الطبيعية للبروتينات أو في الحالة غير الطبيعية، على التوالي). ويُمزجان معاً برفق، ويعمل لهم طرد مركزي مرة أخرى، ويتم التخلص من المادة الطافية، ويُغسل الخليط مرة أخرى. وأخيراً، تتواجد مادة الطمي 50٪ في محلول منظم للتفاعل مناسب (المحلول المنظم A أو R).

9. بالنسبة لمواد الجل الصغيرة، غالباً ما يكون 20 مل من محلول كوماسي-المعد حديثاً والمُستخدم في المعامل - كمية كافية، ويجب التخلص من هذا المحلول لأنه نفايات سامة. وبعد إزالة صبغة كوماسي، يمكن تخزين المواد الجل على درجة حرارة 4°C ، وتوضع في كيس من البلاستيك، في وجود نسبة 1٪ من حمض الخليك.

10. يجب أن يكون الوزن الجزيئي المتوقع للبروتين المستهدف قد زاد؛ وذلك لتمثيل الـ polyhistidine

tail؛ فضلاً عن أن استمرار وجود الأحماض الأمينية للناقل لا تزال موجودة في بناء الانشطار.

11. ينبغي أن تحتوي القارورة على مساحة خالية كافية للتهوية للبكتريا المزروعة بشكل جيد.

وعموماً، فإن الحد الأقصى للنسبة المطلوبة لكمية السائل/ بالقارورة للتهوية الجيدة هي 3، 0.

إن الخطوات الأساسية في التعبير البروتيني الناجح (غشاء أو بروتينات غير غشائية) في *E. coli*

هي: أن يتم اختيار نظام التعبير الصحيح، مع التحقق من التكامل الصحيح وهيكل الإدماج

المدخل، والوصول إلى حصيلة جيدة من الخلايا التي تُعبر عن البروتين المُستهدف بمستوى تعبير

فعال في الخلايا البكتيرية، وربما في شكلها الأصلي. وتعتبر الطريقة السابقة طريقة مهمة - أيضا- لضمان التحلل الكامل للخلايا، ولتتقية البروتين المستهدف من البروتينات المضيفة الخلفية. وقد يؤدي عدم الالتزام بأية خطوة من هذه الخطوات إلى فشل التجربة التعبيرية. لذلك، يُنصح بأن يتم ضم الشاهد السلبي (زراعة بكتيريا غير محفزة) والشاهد الإيجابي (للتعبير عن البروتين المتحد عند تحفيزه): بالتوازي مع النظام التعبيري قيد الدراسة، ولمراقبة مستوى التعبير عن البروتين المستهدف وجودته عند كل خطوة، ولتحديد مكان وقوع مشاكل معينة.

١٢. يتم تكريس العينات المعروفة باسم A للتعبير المستمر عن البروتين المستهدف، ويتم تكريس تلك العينات المعروفة باسم B لتحديد ذوبان البروتين الاندماجي. ويُعتقد أن البروتينات الغشائية المصنوع منها نسخ عديدة (over-expressed) ترتبط بالنطاقات الطاردة للماء الخاصة بالبروتينات المضيفة، مكونة أجسام دمج غير قابلة للإذابة، ولا يمكن تتقيتها في ظل الظروف الطبيعية. وقد يتسبب المعدل السريع لتجميع البروتينات (protein expression) وتعديلها وتنظيمها في الطي غير المناسب، خصوصاً عندما تحتوي البروتينات الموجهة على رواسب مركب السيستين (cysteine) القادر على تكوين كبريتيد (١٥)، والتي قد يتبعها تكون أجسام دمج غير قابلة للإذابة. ومع ذلك، يمكن إذابة معظم الأجسام المشتمة بمحاليل منظمة قوية للفصل وتتقية البروتينات في شكل أجسام. وقد تعمل عملية التحضين في درجة حرارة مُخفضة تتراوح ما بين (18-30°C) على خفض مستوى التعبير وتُساعد على تصحيح للبروتين المتحد، وذلك يُحافظ على ترسبه في الأجسام المشتمة. إن تواجد المواد التي لم يتم تغيير تركيبها الطبيعي (مثل: 0.1% Triton X-100) في المحلول المنظم للاستخلاص قد تكون مفيدة -أيضا- في استعادة بعض البروتينات الغشائية المرتبطة في شكلها الأصلي؛ وذلك بتقليل روابطها الطاردة للماء. ومع أنه يُفضل تتقية التعبير عن البروتينات في شكلها الأصلي؛ إلا أن هناك بعض التقنيات المتاحة التي تعمل على إعادة تشكيل البروتينات المنقاة في ظل ظروف الفصل لتصل إلى هيكلها الأصلي renaturation (١٦).

١٣. لتحضير جيل أكريلاميد مصغر ١٥٪، تُخلط المكونات التالية معاً: ١,٩ مل من خليط الأكريلاميد ٤٠٪ (٢٩:١)، و ١,٧ مل من ماء ddH₂O، و ١,٣ مل من Tris-HCl 1.5 M (pH 8.8)، و ٥٠ ميكروليترا من ١٠٪ SDS، و ٥٠ ميكروليترا من كبريتات الأمونيوم تركيزها ١٠٪، و ٥ ميكروليترات من TEMED. ويُصب المزيج السابق بين اللوحين الزجاجيين الخاصين بجهاز الفصل الكهربائي، ويُغطى السطح بـ ١٠٠ ميكروليتر من tert-butanol، ويتم الانتظار حتى يحدث التصلب، ثم يتم غسل الـ tert-butanol من على السطح بماء ddH₂O، ويُصب على قمة الجل المتبقي ١٥٪ حوالي ٢,٥ مل من جل ٥٪ الأكريلاميد؛ والذي يُحضر من خلال مزج ٣١٣ ميكروليترا من خليط أكريلاميد ٤٠٪ (٢٩:١)، و ١,٦ مل من ماء ddH₂O، و ٣١٥ ميكروليترا من Tris-HCl 1.5 M (pH 6.8)، و ٢٥ ميكروليترا من ١٠٪ SDS، و ٢٥ ميكروليترا من

كبريتات أمونيوم التي يصل تركيزها ١٠٪، و٢٥ ميكروليترا من TEMED، ثم يُدخل المشط البلاستيكي حتى انتظار التصلب، ثم يُزال المشط، وتُغسل الأوعية بماء الـ ddH₂O. ١٤. غالباً ما تكون ٥ ساعات فترة كافية للتفعيل والحث، ولكن ربما تحتاج بعض بروتينات غشاء الفيتوبلازما إلى حثٍ دائمٍ لمدة ٨ ساعات. ويجب ملاحظة أنه في أنظمة التعبير الناجحة، قد يكون عمل نسخ عديدة من البروتينات الخارجية ساما بالنسبة لـ *E. coli*. وقد يؤدي هذا الأمر إلى تباطؤ معدل نمو الخلايا المضيفة المستحثة مقارنةً بالتحكم غير المُستحث، ويمكن اعتبار أن التأخر البسيط في النمو الخلوي لخلايا الـ *E. coli* مقارنةً بالخلايا المستحثة مؤشراً لنجاح تجميع البروتين protein expression وتعديله وتنظيمه. وإن تم تأخر النمو الخلوي بدرجة ملحوظة - كما هو سائد عند تجميع بروتينات غشاء الفيتوبلازما وتعديلها وتنظيمها - تكون حصيلة الخلايا البكتيرية ضئيلة، مُسببة انخفاضاً في مستويات تجميع البروتينات المُتحدة وتنظيمها. وإذا كانت هذه هي الحالة، فهناك بعض التقنيات مُخصصة لتحسين نمو الخلايا، بالإضافة إلى تحسينها لكفاءة تجميع الخلايا المتحدة وتنظيمها وتعديلها، مثل: حث الخلايا ذات التركيزات المنخفضة من IPTG في تجميع (0.1 mM)، وتربية البكتيريا في درجات حرارة منخفضة (20-30°C). وقد يكون من المفيد - أيضاً - زراعة الخلايا البكتيرية بكثافة عالية قبل إضافة الـ IPTG، لتعويض الآثار السلبية الناجمة عن تجميع البروتين المُتحد على نمو الخلايا البكتيرية وانتشارها، ويمكن الجمع بين هذه التقنيات وتحسينها للحصول على أفضل النتائج في التجربة الرائدة. وفي بعض الحالات، تنمو المجموعة البكتيرية المزروعة المستحثة بمعدل مماثل للتحكم غير المُستحث، ولكن يكون مستوى التجميع منخفضاً جداً (على سبيل المثال: ٠,١ مليجرام / لتر لبروتين غشاء الفيتوبلازما؛ والذي تم استنساخه في الناقل pQE). وفي مثل هذه الحالات، يجب مراقبة الخلايا البكتيرية؛ لملاحظة عملية تفكك البروتين السريعة التي يحتمل حدوثها وتقلب البلازميد، وقد يتفكك البروتين سريعاً عندما يكون حجم البروتين المُتحد أقل من 10kDa. وقد يتم تحسين عملية تجميع البروتينات الصغيرة من خلال الاتحاد مع البروتينات التي تنقل المواد من أحد جوانب الغشاء إلى جانب آخر، مثل: GST أو DHFR. إن حدوث تفكك البروتينات المتحدة بعد تحلل الخلايا يوصي بضم مثبطات البروتياز (protease inhibitors) في المحاليل المنظمة ومباشرة العمل على الثلج، كما أنه يجب التحقق من تسلسل البروتين المستهدف لاستبعاد وجود تسلسلات الإشارة التي تتسبب في نسخ البروتين المُتحد وترجمته بشكل غير صحيح؛ مما يؤدي إلى التفكك. وإذا استمرت المشاكل، يُقترح تغيير نظام تجميع البروتينات، واختيار سلالات *E. coli* مع إضافة قليل من البروتياز. ويُعد عدم استقرار البلازميد - حيث من خلاله تفقد الخلايا البكتيرية البلازميد؛ والذي تم تجميعه ودمجه من كائنات حية مختلفة plasmid recombinant؛ وبالتالي تكون مقاومة المضادات الحيوية) - مشكلةً في بعض أنظمة التجميع. وبما أن الأمبيسلين ليس مضاداً حيويّاً مستقراً

ويتم استنفاذه بسرعة، فإن الخلايا البكتيرية التي تفتقر إلى بنية التعبير- لديها فرصة أفضل للتكاثر في الوسط الذي تم زراعته عن تلك التي يأويها البلازميد المُجمع من كائنات حية مختلفة. ولاختبار عدم استقرار البلازميد، يجب أن يتم وضع خلايا الـ *E. coli* BL21 (DE3) pLysS المستحثة والمحولة ببناء التجميع على أطباق جل الـ LB مع وبدون الأمبليسلسن، وتعمل النسبة بين عدد المستعمرات التي تنمو في وجود - وفي غياب- المضاد الحيوي على تحديد استقرار البلازميد (من صفر = غير مستقر إلى 1 = مستقر) (17). إن عدم استقرار البلازميد يمثل مشكلة، ومن الأفضل استخدام تركيز أمبليسلسن أعلى (مل/٢٠٠ ميكروجرام)، أو استخدام مضادات حيوية بديلة أكثر استقراراً في وسط النمو.

١٥. تحتوي المادة الطافية (المادة المنقاة الناتجة عن التفكك lysate) على البروتينات البكتيرية الكلية، بما فيها البروتين المتحد المستهدف.

١٦. تجرى المادة المنقاة الناتجة عن التفكك (A₀-A_n) cleared lysate على أكريلاميد جل ١٥٪ SDS-PAGE. وبعد التلوين بصبغة كوماسي، تُقارن كمية البروتين المتحد المُجمع في أوقات مختلفة بعد حثها. وينبغي هنا التأكيد على الفصل الكهربائي للمادة الناتجة عن التفكك والمنقاة من العينات B₀-B_n على الجل المتوازي- يسمح بتحديد وقت الحث الأمثل؛ لتحصيل أكبر كمية من البروتينات المتحدة المستهدفة في شكلها الأصلي القابل للذوبان. وتُعد هذه النتائج بالغة الأهمية لمعرفة أفضل الظروف لإعداد بروتين الفيوتوبلازما المتحد والمستهدف على نطاق واسع. وتُمثل تلك النتائج أهمية واضحة في معرفة الظروف المثالية لتحضير بروتين الفيوتوبلازما المتحد والمستهدف. وعادةً ما يتم الاعتقاد بأن التجميع الأمثل يتوصل إليه عند تجميع كمية كافية من البروتينات، وأنه يتم تنقيتها في شكلها الأصلي. ومن المهم ملاحظة، أن التجميع الذي ينتجه النظام كان منخفضاً (على سبيل المثال، > ١ مليجرام / لتر من البروتين المستهدف المتحد من البكتيريا المزروعة)، خاصة عند استخلاص البروتين المتحد في ظل الظروف الطبيعية. وفي تلك الحالة، لا تمثل المقارنة بين مستويات تجميع البروتينات - في ظل مختلف الظروف، وباستخدام التحليل المحدود لمستخلص البروتين الخام- أي جدوى. وفي الواقع، البروتينات التي يتم تجميعها بطريقة سيئة بواسطة بروتينات الخلية المضيفة - إذا كانت في مثل هذه الحالة- فيفضل الانتقال مباشرة إلى تجميع البروتينات المتحدة على نطاق واسع، ثم تليها تنقية البروتين؛ والذي يُعلمه حامض الهيستدين باستخدام نسيج الآجاروز Ni-NTA. وفي تجربة من التجارب محدودة النطاق (في ظل ظروف الفصل)، ومقارنةً بالمعايير القياسية للبروتين، حصلنا على مستوى تجميع لبروتينات غشاء الفيوتوبلازما وصل إلى ٥ مليجرامات / لتر من المجموعة المزروعة. وفي ظل الظروف الطبيعية، يمكن تنقية كميات أقل من البروتينات التي تم تجميعها ودمجها (recombinant protein)؛ لأن معظمها قامت بتكوين أجسام محصورة غير قابلة للإذابة. إن مقدار المستنبتات اللازمة لإجراء تجارب واسعة النطاق تعتمد على مستوى تجميع البروتينات

المستهدفة، وتعتمد -كذلك- على كمية البروتينات المُتحدة المنقاة اللازمة لإجراء التطبيقات المتتالية.

١٧. إن المقدار اللازم من المحلول المُنظم يعتمد على مستوى تجميع البروتين المُتحد المُستهدف وتعديله وتنظيمه، وعلى كمية الخلايا التي تم جمعها، وتحتاج مستويات التجميع الأعلى إلى كمية أكبر من المحلول المُنظم للتحلل. لذلك (على سبيل المثال)، إن كان مستوى التجميع أكبر من 10 مليجرامات من البروتين المُستهدف المُتحد لكل لتر من البكتريا المزروعة مقارنةً بالحبيبات (كرات صغيرة) البكتيرية التي تم الحصول عليها من ١ لتر من المُستبتات - ربما يُعاد ترسيبها في ١٠٠ مل من المحلول المنظم للتحلل (تركيزه $10\times$). وتحتاج مستويات التجميع الأدنى إلى عامل تركيز أعلى ومُستبتات حجمها أكبر. وفي ظل ظروفنا التجريبية، عندما كان مستوى تجميع البروتينات المُستهدفة ٥ مليجرامات \ لتر (و12~ جم من الخلايا السائلة)، تم استخدام عامل تركيز $40\times$ ، وتم إعادة ترسيب ١ لتر من حبيبات البكتيرية المزروعة في ٢٥ مل من المحلول المُنظم للتحلل. وبالنسبة لمستويات التجميع الأقل، يُفضل إذابة الحبيبة البكتيرية في تركيز $50\times$ (٢٠ مل من المحلول مُنظم للتحلل لـ ١ لتر من المُستبتات).

١٨. تعتمد الكمية اللازمة من آجاروز Ni-NTA على مستوى تجميع البروتينات، وعادةً ما تتراوح قدرة ربط آجاروز Ni-NTA ٥٠% بالبروتين المُعلم بالبولي هيسستين ما بين ٢ إلى ٥ مليجرامات \ مل، وذلك يعتمد على طبيعة البروتين. وفي ظل حالته التجريبية، كانت مستويات تجميع ٥ جم (في حالة بروتينات غشاء الفيتوبلازما المُعلمة بالبولي هيسستين) و ٢ مل من آجاروز Ni-50% NTA كافية لربط ٦ مليجرامات من البروتين المُعلم بالبولي هيسستين.

١٩. لا تسمح لآجاروز Ni-NTA بأن يجف في أي مرحلة من المراحل السابقة السابق ذكرها.

٢٠. يُقترح استخدام عامل تخفيف مقداره ٥٠ نقطة لترسيب الحبيبات البكتيرية مرة أخرى في محلول مُنظم للتحلل؛ لأن الحبيبات البكتيرية تم الحصول عليها من ١ لتر من المُستبتات. وتعتمد كمية المحلول المُنظم للتحلل على عدد البروتينات المُجمعة في تكوينها الأصلي الذي يمكن إذابته، وتعتمد -أيضاً- على الوزن السائل للخلايا البكتيرية المُجمعة. وعادةً ما يُستلزم كمية تتراوح ما بين ١ مل و ٥ جم من المحلول المنظم للتحلل لكل جرام من الخلايا البكتيرية. إن كمية البروتين المُستهدف في طور الذوبان أقل من كمية البروتينات المُتحدة المُجمعة إجمالاً، وخصوصاً عندما يتم تجميع البروتينات. وبالتالي، يُوصى بحفظ المادة الناتجة عن تفكك الخلايا بصورة مركزة أكثر (عامل التركيز ما بين ٥٠ إلى ١٠٠ نقطة). وفي ظروفنا التجريبية، كانت كمية بروتين غشاء الفيتوبلازما المُجمع في الطور الذائب حوالي ١ مليجرام \ مل بالنسبة لـ ١٢ جم من الخلايا، من ١ لتر مُستبت.

٢١. يكفي معالجة العينات بالموجات الصوتية في ست دورات؛ بحيث تكون مدة كل دورة 15 s، بقوة 200 W، باستخدام جهازٍ من أجهزة الموجات الصوتية مُزودٍ بمسبار. ويُثبت المسبارُ بداخل

مادة تحلل الخلايا لتجنب تكون الرغاوى. وإن كانت هذه المادة تحلل الخلايا اللزجة للغاية، فإن طريقة العمل المعالجة بالموجات الصوتية ليست كافية لقطع المادة الجينومية. ولإزالة تلك المادة الجينومية، تستخدم الـ RNaseA والـ DNase I في التركيزات الأخيرة للمادة الناتجة عن تحلل الخلايا بمقدار ٥ و ١٠ ميكروجرامات/ مل بالترتيب، في حين يوصى بتحضيرها على الثلج لمدة ٥ دقائق، وتعمل المادة اللزجة الناتجة عن تحلل الخلايا على عرقلة أو تباطؤ تشغيل التدفق الكروماتوجرافي.

شكر وتقدير:

تم دعم هذا المشروع (L.G) من قبل: the Italian Regional Grant (Regione Piemonte) “Studi sui fattori che favoriscono le epidemie di fla vescenza dorata in Piemonte e loro superamento”، كما حصل -أيضا- على دعم من قبل مشروع: B.M.S. Iranian Ministry of Research and Technology، Science .

المراجع:

1. Hogenhout SA et al (2008) Phytoplasmas: bacteria that manipulate plants and insects. Mol Plant Pathol 9:403–423
2. Kakizawa S, Oshima K, Namba S (2006) Diversity and functional importance of phytoplasma membrane proteins. Trends Microbiol 14:254–256
3. Suzuki S et al (2006) Interaction between the membrane protein of a pathogen and insect micro filament complex determines insect-vector specificity. Proc Natl Acad Sci U S A 103:4252–4257
4. Galetto L et al (2011) The major antigenic membrane protein of ‘ *Candidatus Phytoplasma asteris*’ selectively interacts with ATP synthase and actin of leafhopper vectors. PLoS One 6:e22571
5. Fabre A, Danet JL, Foissac X (2011) The stolbur phytoplasma antigenic membrane protein gene *stamp* is submitted to diversifying positive selection. Gene 472:37–41
6. Kakizawa S et al (2009) Cloning of immunodominant membrane protein genes of phytoplasmas and their *in planta* expression. FEMS Microbiol Lett 293:92–101
7. Kakizawa S et al (2006) Positive selection acting on a surface membrane protein of the plantpathogenic phytoplasmas. J Bacteriol 188:3424–3428
8. Bai X et al (2006) Living with genome instability: the adaptation of phytoplasmas to diverse environments of their insect and plant hosts. J Bacteriol 188:3682–3696
9. Kube M et al (2008) The linear chromosome of the plant-pathogenic mycoplasma ‘ *Candidatus Phytoplasma mali*’. BMC Genomics 9:306
10. Oshima K et al (2004) Reductive evolution suggested from the complete genome sequence of a plant-pathogenic phytoplasma. Nat Genet 36:27–29

11. Tran-Nguyen LTT et al (2008) Comparative genome analysis of ‘ Candidatus Phytoplasma australiense’ (subgroup tuf -Australia I; rp -A) and ‘ Ca. Phytoplasma asteris’ strains OY-M and AY-WB. J Bacteriol 190: 3979–3991
12. Galetto L et al (2008) Characterization of putative membrane protein genes of the ‘ Candidatus Phytoplasma asteris’, chrysanthemum yellows isolate. Can J Microbiol 54:341–351
13. Sambrook J, Russell DW (2001) Molecular cloning: a laboratory manual, 3rd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
14. Hirokawa T, Boon-Chieng S, Mitaku S (1998) SOSUI: classification and secondary structure prediction system for membrane proteins. Bioinformatics 14:378–379
15. Singh SM, Panda AK (2005) Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. J Biosci Bioeng 99:303–310
16. de Marco A (2011) Molecular and chemical chaperones for improving the yields of soluble recombinant proteins. Methods Mol Biol 705:31–51
17. Bernard A, Payton M (2001) Selection of Escherichia coli expression systems. In: Coligan JE, Dunn BM, Ploegh HL, Speicher DW, Wingfield PT (eds). Curr Protoc Protein Sci vol.1. Wiley and Sons Inc, New York, Unit 5.2

استخلاص بلازميد الحمض النووي

Plasmid DNA للفيتوبلازما

Mark T. Andersen and Lia W. Liefing

ملخص:

إن بلازميد الفيتوبلازما قد تم اكتشافه -بشكل عام- من DNA النباتي والحشري؛ والذي تم استخلاصه باستخدام طرقٍ صُممت لتنقية DNA الفيتوبلازما بأكمله. وتتضمن تلك الطرق استخلاصه من الأنسجة العالية في نسبة تركيز الفيتوبلازما فيها -مثل: لحاء النباتات- باستخدام معاملات تدرج CsCl-bisbenzimidazole؛ والتي تستخدم محتوى G+C المنخفض من DNA الفيتوبلازما. وعديد من الطرق المستعملة لتنقية الفيتوبلازما قد تم وصفها في جزء آخر من هذا الكتاب. وفي هذا الفصل، سوف نصف بالتفصيل طريقتين تسيان إلى عزل DNA البلازميد.

الكلمات المفتاحية: التحلل القلوي، معاملات تدرج الـ CsCl، البلازميد.

١- المقدمة:

١-١: البلازميدات:

إن البلازميدات عبارة عن جزيئات من الحمض النووي DNA تتواجد خارج نواة الخلية ذاتية التضاعف، وقد تم العثور عليها في كلٍّ من بدائية الأنوية وحقيقية الأنوية (prokaryotes and eukaryotes). وبالرغم من ذلك، تم ذكر الجزيئات الدائرية المغلقة، والبلازميدات الخيطية بشكل عام (١). وفي عام ١٩٨٨م، تم ذكر البلازميد لأول مرة في الفيتوبلازما في مرض تقزم القمة النامية في الذرة (٢) maize bushy stunt phytoplasma.

ومنذ ذلك الحين، تم العثور على الـ DNA الموجود خارج نواة الخلية في أكثر من ٢٠ نوعاً من أنواع الفيتوبلازما المختلفة (٣، ٤). وتُعد البلازميدات مشيرة للاهتمام، ويرجع السبب في ذلك إلى مساهمتها المحتملة مع الجراثيم المسببة للأمراض شديدة العدوى (٥، ٦)، بجانب دورها المحتمل في

استبدال المادة الوراثية بـكروموسوم الفيتوبلازما (٧)، وزيادة التنوع الجيني للفيتوبلازما. ومن المحتمل أن الرابط التطوري بين بلازميدات الفيتوبلازما وفيروسات الجيمياني يمثل -أيضاً- مصدراً للاستمرار في البحث (٨).

٢-١: نظرة عامة على تلك الطرق:

تم فصل بلازميدات الفيتوبلازما في الـ DNA المستخلص واكتشافها بطرق عديدة؛ حيث اشتملت بعض الطرق على فصل خلايا الفيتوبلازما السليمة باستخدام جهاز طرد مركزي مُميز (٩)، أو بفصل العنصر الغريالي (sieve element isolation) (١٠). وقد قام آخرون بتعديل طرق "hot" Doyle and Doyle CTAB" (١١) وDellaporta وآخرون (١٢)؛ والتي عادةً ما تستخدم لاستخلاص الـ DNA النباتي على نطاق واسع أو محدود (٣، ١٣). وقد تم -أيضاً- استخدام مُعدات تجارية لاستخلاص الـ DNA النباتي بنجاح (٣، ٧). وقد تم فصل الـ DNA البلازميدي للفيتوبلازما بنجاح مع الـ DNA الكروموسومي للفيتوبلازما- من الـ DNA النباتي بواسطة استخدام تدرجات الـ CsCl bisbenzimidate التي تستخدم طرق فصل المعدلة من Kollar وآخرون (١٣-١٥). وقد تم فصل بلازميدات الفيتوبلازما باستخدام طرق كان من المفترض استبعادها، وتم الكشف عن أربع بلازميدات في DNA فيتوبلازما 'aster yellows witches' broom؛ عُزلت باستخدام الفصل الكهربائي بجل الآجاروز في حقل متغير (pulsed- field gel electrophoresis)، ومن حيث المبدأ يُفترض فصل البلازميدات الأصغر بعيداً عن الحمض النووي الـ DNA الكروموسومي للفيتوبلازما (١٦).

إن طريقة Denes and Sinha (١٧) وطريقة Kirkpatrick Kuske (١٨) هما طريقتان تستهدفان فصل بلازميدات الفيتوبلازما، على وجه التحديد. وتستخدم الطريقة الأخيرة تعديلاً من تعديلات طريقة التحلل القلوي الخاصة بـ Birnboim and Doly (١٩)؛ والتي يكون بها الـ DNA الدائري المغلق مقاوماً للفصل في الحالات القلوية. وقام Kirkpatrick وKuske (١٨) باستخدام طريقة تدرج bromide CsCl-ethidium لفصل الحمض النووي البلازميدي الدائري المغلق عن الحمض النووي الكروموسومي الخيطي- وهو إجراء موحد في البيولوجيا الجزيئية (٢٠، ٢١) (انظر: الملاحظة ١).

٢- المواد:

يجب تحضير كافة المحاليل في ماء معقم، أو ماء منزوع الأيونات، مع توصيل كهربائي 18 MΩ أو أقل في درجة حرارة 25°C.

١-٢: طريقة التحلل القلوي:

١. هون ومدق.
٢. جهاز طرد مركزي ذو سرعة منخفضة، مع أنابيب ملائمة.
٣. نيتروجين سائل.
٤. محلول منظم التحلل: 100 mM من Tris-HCl (pH 8.0)، و 50 mM من EDTA (pH 8.0)، ودودسيل كبريتات الصوديوم ١٪ (SDS) (انظر: الملاحظة ٢).
٥. كلوريود الصوديوم: 5 M.
٦. هيدروكسيد الصوديوم: 3 M (انظر: الملاحظة ٣).
٧. Phenol/CHCl₃ (انظر: الملاحظة ٤).
٨. CHCl₃ (انظر: الملاحظة ٤).
٩. PEG 8000 : ٥٠٪ v/w.
١٠. 1 M : Tris-HCl، ودرجة حموضة pH 8.0 (انظر: الملاحظة ٥).
١١. 2 M : Tris-HCl، ودرجة حموضة pH 7.0 (انظر: الملاحظة ٥).
١٢. 0.5 M : EDTA، ودرجة حموضة pH 8.0 (انظر: الملاحظة ٦).
١٣. SDS : ١٠٪ v/w (انظر: الملاحظة ٧).

٢-٢: تدرج CsCl - بروميد الأيثيديوم:

١. جهاز طرد مركزي رئيسي فائق السرعة (Ultracentrifuge)، وحامل، وأنابيب.
٢. جهاز طرد مركزي، سرعته منخفضة.
٣. إبرة حقن ٣ مل، ومعها غطاء غلق.
٤. إبر، سُمكها ١٨ ؛ لتناسب إبرة الحق.
٥. إبر، سُمكها ٢٣ ، أو ما يشبه ذلك.
٦. مصدر ضوئي للأشعة فوق البنفسجية (UV).
٧. معدات الوقاية الشخصية (PPE): قفازات، واقية وجه مقاومة للأشعة فوق البنفسجية، ونظارات مقاومة للأشعة فوق البنفسجية.
٨. محلول منظم الـ TE (pH 8.0) : 10 mM من Tris (pH 8.0)، 1 mM من EDTA (pH 8.0).
٩. CsCl (انظر: الملاحظة ٨).
١٠. محلول CsCl : ١,٥٥ جم / مل يذوب في TE (pH 8.0).
١١. بروميد الأيثيديوم (EtBr) : ١٠ جم / مل (انظر: الملاحظة ٩).
١٢. 1-Butanol المشبع بالماء (انظر: الملاحظة ١٠).

٣- طرق العمل:

٣-١: طريقة التحلل القلوي:

تُعد تلك الطريقة نسخة مُعدلة لطريقة تنقية البلازميد؛ والذي تم فصله بالتحلل القلوي؛ وهي تعمل على استخدام سمات جزيئات الحمض النووي الدائري المغلق، وذلك لمقاومة الفصل القلوي (١٧):

١. يُستخدم هون ومدق لطحن المواد النباتية بنيتروجين سائل إلى أن تصبح مسحوقاً.
 ٢. يُضاف ١٠ مل من محلول مُنظم التحلل لكل جرام من الأنسجة، ويُترك للتحلل الخلايا لمدة ساعة واحدة، وعلى درجة حرارة الغرفة (RT).
 ٣. تُضبط درجة حموضة pH المُحللات اللزجة على 12.4؛ وذلك بإضافة 3 M من NaOH، ويخلطون معاً برفق وبواسطة الماصة.
 ٤. يُحضن الخليط على درجة حرارة الغرفة لمدة 30 min، وبعدها تُضبط درجة حموضة المُحللات على ٨,٤ بواسطة 2 M Tris-HCl (pH 7.0).
 ٥. يُضبط المحلول حتى يصل إلى 1 M بإضافة NaCl، ويُقلب برفق ليختلطوا معاً.
 ٦. يُحضن الخليط في ثلج لمدة 6 h.
 ٧. يُرسب مركب الـ SDS/NaCl بالطرد المركزي بسرعة ١٧٠٠٠ لفة، لمدة 30 min على درجة حرارة 4°C.
 ٨. تُستخلص المادة الطافية من فوق الراسب بكمية phenol/CHCl₃ متساوية.
 ٩. تُستخلص الطبقة المائية المكونة على السطح بكمية CHCl₃ متساوية.
 ١٠. تُنقل الطبقة المائية المكونة على السطح إلى أنبوب جديد، ويُضاف ٥٠% (w/v) PEG 8000 إلى التركيز اللانهائي المحدد بـ ١٠٪.
 ١١. يُخلط برفق، ويُترك على ثلج طوال فترة الليل (انظر: الملاحظة ١١).
 ١٢. تُضع العينات بجهاز طرد مركزي، وتُضبط سرعته على ١٢٠٠٠ لفة، لمدة 30 min على درجة حرارة 4°C؛ للحصول على الـ DNA.
 ١٣. تُعلق كرة الحمض النووي مرة أخرى في 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) و 20 mM EDTA (pH 8.0).
- يمكن استخدام الـ DNA الناتج في خطوات التنقية اللاحقة، مثل: فصل تدرج CsCl-bisbenzimidazole؛ والذي سيعمل على فصل الفيوتوبلازما و DNA العائل.

٢-٣: تدرج CsCl - بروميد الأيثيديوم:

وتُعد تدرجات CsCl-ethidium bromide طريقة من الطرق التي يمكن الاعتماد عليها لتتقية البلازميد برغم خطواتها الطويلة والمكلفة والمعقدة؛ والتي تشتمل على استخدام بروميد الأيثيديوم؛ حيث إنها صبغة من الصبغات السامة، ومن المحتمل تغيرها للمادة الجينية. ولهذه الأسباب، يميل الباحثون لاستخدام طرق أسرع وأقل تكلفة وتعقيداً؛ إلا أنها تُناسب الحالات التي تتطلب كمية أقل، ولا يشكل تواجد الحمض النووي لكروموسوم الفيتوبلازما أي مشكلة.

ملاحظة تحذيرية: يجب التعامل مع المركبات التي تحتوي على بروميد الأيثيديوم بعناية قصوى، ويجب -أيضاً- ارتداء قفازات ذات الاستعمال الواحد عند التعامل مع هذه المادة الكيميائية، ويجب التخلص من النفايات التي تحتوي على هذا المركب، بما يتوافق مع الممارسات المختبرية الآمنة المقبولة:

١. يُضاف ١,٠١ جم من CsCl الصلب لكل جرام من محلول الـ DNA، ويُخلطوا معاً برفق (إن لزم الأمر يُدفاً الخليط حتى تصل درجة حرارته إلى 30°C) (انظر: الملاحظة ١٢).
٢. يُضاف ١٠٠ ميكروليتر من ١٠ مل/مليجرام EtBr لكل ٥ جم من محلول الـ DNA الأصلي.
٣. يتم التحقق من الكثافة باستخدام مقياس الانكسار (refractometer)، أو يتم وزن ١ مل من المحلول، وتُضبط الكثافة إلى أن يُعابير مقياس الانكسار ١,٣٨٦٠، أو كثافة ١,٥٥ مل/جم.
٤. قد يظهر راسب بلون أحمر غامق، ويمكن إزالته بجهاز الطرد المركزي؛ بضبطه على سرعة بطيئة مقدارها ٢٠٠٠ لفة، لمدة 5 min على درجة حرارة الغرفة.
٥. يُنقل المحلول إلى أنبوب طرد مركزي فائق السرعة باستخدام قطارة باستير (Pasteur)، ويُختار الأنبوب حسب الحامل؛ والذي تم اختياره لجهاز الطرد المركزي الفائق السرعة (انظر: الملاحظة ١٤).
٦. يجب التأكد من أن أنابيب الطرد المركزي متوازنة، ويُغلق الأنبوب وفقاً لتعليمات الشركة المُصنعة.
٧. يتم عمل التدرجات على درجة حرارة تتراوح ما بين 15-20°C؛ لمدة وسرعة مناسبتين. (وهذا الأمر يعتمد على الحامل الذي تم اختياره).
٨. بعد تشغيل جهاز الطرد المركزي، يجب التحقق من وجود أنماط (bands) في الأنابيب.
٩. بعد الطرد المركزي الناجح، يجب أن يكون هناك نمطان؛ نمط علوي عبارة عن DNA خيطي أو حلقي، ونمط سفلي عبارة عن DNA بلازميدي حلقي مُغلق (انظر: الملاحظة ١٦).
١٠. يزال النمط السفلي (نمط البلازميدي) (انظر: الملاحظة ١٧)؛ باستخدام إبرة سُمكها ضئيل لثقب الجزء العلوي من الأنبوب ويُترك في مكانه، وذلك للسماح للهواء بالدخول إلى الأنبوب، ومنه يتم خروج النمط السفلي.

١١. يتم تثبيت إبرة سُمْكها ١٨ بإبرة الحقن ٣ مل، ويرفق يتم إدخالها في أنبوب الطرد المركزي، مع إمالة الجانب الأعلى (انظر: الملاحظة ١٨).
١٢. يسحب النمط السفلي بإبرة الحقن، وتُحرك الإبرة لالتقاط أكبر كمية ممكنة من الـ DNA، ويتم سحب الإبرة، ويُترك باقي التدرج يخرج في حاوية المخلفات، أو تُغلق فتحة الإبرة بلاصق.
١٣. يتم إزالة الإبرة، ويُنقل الـ DNA إلى كأس مُعقم أو أنبوب اختبار من البولي بروبيلين.
١٤. يُزال الـ EtBr من الـ DNA من خلال استخلاصه بكمية مساوية؛ من 1-butanol المشبع بالماء (انظر: الملاحظة ١٩).
١٥. يتم التخلص من الطبقة المائية السطحية (في حاوية مُخلفات مناسبة)، ويستمر حتى تظلم الطبقة المائية السطحية صافية.
١٦. تُضاف ٣ كميات من الماء المقطر والمُعقم.
١٧. تُضاف كميتان من الـ EtOH، ويُترك في درجة حرارة 4°C طوال فترة الليل، أو لحين الحاجة إليه (انظر: الملاحظة ٢١).
١٨. نحصل على الـ DNA المترسب من خلال الطرد المركزي بسرعة ٢٠٠٠٠ لفة، لمدة 15 min على درجة حرارة 4°C .

٣-٣: الإنزيم الهاضم:

يمكن جعل بلازميدات الفيوتوبلازما خطية أو مقطعة (لتحليل آخر مثل الاستساخت والتسلسل)؛ وذلك باستخدام إنزيمات الهضم. وإنزيمات الهضم عبارة عن قواعد داخلية تعمل على تمييز سلاسل الخيط المزدوج للحمض النووي DNA وقطعها بشكل مُحدد. وتتواجد مجموعة كبيرة من إنزيمات الهضم التي تتعرف على التسلسلات المختلفة من الحمض النووي، ويمكن تصنيفها حسب الطول إلى أزواج قاعدية (bp) لسلاسل التعرف؛ كأربع ٤ أو ٦ أو ٨ قواطع، واحتمال عدد سلاسل التعرف في أي امتداد خاص بالحمض النووي يتناسب عكسياً مع طول سلسلة التعرف. ومن المتوقع أن تظهر ٤ سلاسل قاعدية مُعينة في كل ٢٥٦ (٤٤) زوجاً قاعدياً ولمرة واحدة، و ٦ سلاسل قاعدية مرة واحدة في كل ٤، 096 (٤٦) زوجاً قاعدياً، ٨ سلاسل قاعدية مرة واحدة في كل 65، 536 (٤٨) زوجاً قاعدياً. ويمكن أن تكون سلاسل التعرف على إنزيمات الهضم أيضاً من AT أو GC الرئيسية، والتي قد تؤثر على احتمال وجود موقع هضم مُعين؛ وذلك إن كان الـ DNA - كالفيتوبلازما - غنياً بالـ A+T. وبالنسبة لعمليات هضم الإنزيم، يتم قطع من ١ إلى ٥ ميكروجرامات من الحمض النووي حسب إرشادات الشركة المصنعة.

٤- الملاحظات:

١. إن أغلب طرق عمل تنقية البلازميد تقوم على الجزيئات الدائرية، لكن ليس كل البلازميدات دائرية، ومن المحتمل استبعاد البلازميدات الخيطية بواسطة استخدام هذه الطرق. وعلى غرار ذلك، تستخدم تنقية CsCl-ethidium bromide محتوى G+C المنخفض الخاص بـ DNA الفيتوبلازما، والاختلاف الموجود بينه وبين DNA النباتات أو الحشرات العائل. وغالباً ما يعتبر محتوى البلازميدات من الـ G+C منخفضاً. ولذلك، ينبغي أن تكون تلك الطرق الخاصة بالاستخلاص كافية، وفي حالة انخفاض محتوى الـ G+C بالبلازميد فقد لا يتم تنقيته بهذه الطرق.
٢. من الممكن تحضير محلول تنظييم التحلل من المحاليل المخزنة.
٣. هيدروكسيد الصوديوم ضار جداً، ويُسبب تآكلاً، ويجب التعامل معه بحذر.
٤. الفينول والكلوروفورم (CHCl_3) مواد كيميائية ضارة، يجب عدم استخدامها دون معدات الوقاية الشخصية PPE المناسبة، ويجب ارتداء قفازات اللاتكس أو ما يعادلها عند التعامل مع هذه المواد الكيميائية، ويجب القيام بالعمل في خزانة من الخزانات الطاردة للغازات. وينبغي أن يكون الفينول مُشبعاً بالماء أو بالمحلول المنظم. ولا يتعين استخدام الفينول إن كان وردياً أو أصفر اللون إلا إن تم إضافة ٨-hydroxyquinoline إلى تركيز نهائي قدره ٠.١٪. ويمكن إضافة كحول الإيزوامي عاملاً مضاداً (IAA) إلى الكلوروفورم، ونسبة الفينول إلى CHCl_3 هي ١:١. وإن تم إضافة IAA إلى CHCl_3 ، فإن نسبة الفينول: IAA: CHCl_3 ستكون ٢٤:٢٥:١.
٥. يمكن عمل الـ Tris-HCl محلول تخزين 1 M أو 2، وتُضبط درجة الحموضة الصحيحة بإضافة HCl، وينبغي تعقيم محلول التخزين بجهاز التعقيم.
٦. لن يسري ملح الصوديوم ثنائي أمين الأيثيلين رباعي حمض الأسيتيك EDTA إلى المحلول إلا أن تقترب درجة حموضته من 8.0، ويتم تحصيل تلك القيمة بواسطة إضافة حبيبات NaOH، ويحتاج ١ لتر من المحلول حوالي ٢٠ جم من حبيبات NaOH، وينبغي تعقيم محلول التخزين.
٧. يُعرف الـ SDS -أيضاً- باسم (sodium lauryl sulfate)، ويمكن تحضير محلول المخزون بتركيز ١٠ أو ٢٠٪، ويجب توخي الحذر عند التعامل مع تلك المواد الكيميائية، ويجب وزن المسحوق في خزانة طرد الغازات أو المواد السامة. ويُمثل التسخين ضرورة لتحويل المسحوق إلى محلول. ومن الممكن تشكيل الراسب في درجات الحرارة المنخفضة، ويمكن إذابته ببساطة مرة أخرى بإعادة تسخين المحلول، ولا ينبغي تعقيم الـ SDS.
٨. ينبغي استخدام تدرج CsCl عالي الجودة (التدرج البيولوجي الجزيئي أو AnalaR).
٩. يجب توخي الحذر الشديد عند التعامل مع بروميد الأيثيديوم؛ فيجب ارتداء القفازات ذات الاستخدام الواحد، ويجب وزن مسحوق البروميد الأيثيديوم في خزانة طرد الغازات أو المواد

السامة؛ وذلك لمنع التعرض لغباره. وبدلاً من ذلك، يمكن شراء بروميد الأيثيديوم إما أقراصاً موزونة أو محلولاً جاهزاً.

١٠. يجب منع تدفق الماء من جزء الـ DNA إلى جزء الـ 1-butanol؛ والذي يؤدي إلى نقص حجم الجزء، وإمكانية ترسب الـ CsCl عند الوصول إلى حد التشبع.

١١. يُحفظ الثلج في غرفة باردة حتى لا يذوب.

١٢. لمنع ترسب الـ CsCl، يجب تجنب درجات الحرارة الأقل من 15 مئوية.

١٣. بعد استخدام جهاز الطرد المركزي بسرعة بطيئة تضاف مادة زغبة حمراء على السطح (مركب protein-EtBr)، أو تتشكل كرات صغيرة (بقايا الخلية الميتة، وتُستخدم قطارة (باستري) من نوع الاستعمال الواحد؛ لنقل المحلول الأحمر الصافي إلى أنبوب الطرد المركزي فائق السرعة.

١٤. يعتمد اختيار المحرك الحامل على الكمية التي سيتم وضعها بجهاز الطرد المركزي، وعلى ما هو متاح. ومحركات الدوران العمودي وشبه العمودي تُتيح مدد تشغيل أقصر. وفي ما يلي بعض الامثلة (٢٠):

Beckman NVT 65 rotor	Spun at 366,000 × g (62,000 rpm)	For 6 h
Beckman VTi65 rotor	Spun at 194,000 × g (45,000 rpm)	For 16 h
Beckman Type 65Ti rotor	Spun at 314,000 × g (60,000 rpm)	For 24 h

١٥. يجب التعامل مع التدرجات بحذر شديد، ويجب وضعهم في وضع مستقيم، وتحريكهم بأقل قدر ممكن، وقد تكون هناك حاجة لضوء الأشعة فوق البنفسجية (بكثافة منخفضة، وموجة قصيرة). وإن كان تركيز الـ DNA منخفضاً، فيجب التأكد من استخدام الحماية المناسبة لتجنب تضرر العينين والجلد إثر التعرض للأشعة فوق البنفسجية. لذلك، يجب ارتداء نظارات سلامة مقاومة للأشعة فوق البنفسجية، ودرع كامل للوجه أثناء استخدام ضوء الأشعة فوق البنفسجية.

١٦. قد تكون هناك طبقة من البروتين موجودة بالقرب من السطح وحببيبات RNA في القاع. وبمحركات الدوران الرأسية، يعني انتقال التدرج من الوضع العمودي إلى الرأسي، مع ظهور طبقة من البروتين على جانب الأنبوب، ويجب تجنب هذا الأمر عند استخلاص النمط السفلي.

١٧. تُعتبر الطريقة الأكثر فاعلية لإزالة النمط (Band) هي ثقب أنبوب جهاز الطرد المركزي بإبرة حقن (سُمكها ١٨) ذات ثقب عريض. وتُعد هذه الطريقة عملية دقيقة، ويجب توخي الحذر عند

احتوائها محلول بروميد الأيثيديوم؛ لأنه سيتدفق من الأنبوب. لذلك، يجب التأكد من تجميع كل شيء وتجهيزه قبل ثقب الأنبوب.

١٨. يمكن التحكم في العملية بشكل أكبر، إن تم تركيب الإبرة في إبرة الحقن. وقبل تركيبها، تأكد من سهولة تحريك مقبس إبرة الحقن، واسحب المقبس قليلاً إلى الخارج)، وقد يكون من الصعب إدخال إبرة الحقن بالأنبوب، وقد يتطلب الأمر قليلاً من القوة، وتأكد من أن الأصابع التي تحمل الأنبوب بعيدة عن الفتحة التي سيتم إدخال الإبرة بها؛ لأن الضغط على الإبرة قد يؤدي إلى اختراقها للجانب الآخر من الأنبوب، وقد يُساعد لف أو تدوير الإبرة قليلاً إلى مرورها عبر جدار الأنبوب، ولكن بمجرد كسر طرف الإبرة لسطح الأنبوب يجب إدخالها بالكامل إلى الأنبوب لمنع التسرب. لذا، قبل إدخال الإبرة يجب وضع قطعة لصق صغيرة شفافة على فتحته الأنبوب لمنع التسرب، وفي حال انحصار الإبرة في الأنبوب نتيجة لعملية الإدخال، تُترك في مكانها، ويتم إدخال إبرة أخرى.

١٩. يتم استخراج الـ EtBr على سطح الطبقة السائلة جاعلاً لونها وردياً، ويتم استخراجها بخلط العينات معاً في أنبوب مناسب - كأنبوب Corex الزجاجي -. ويجب تغطية فتحة الأنبوب بقطعة فيلم بلاستيك شفاف. وبعدها، بفيلم بارافين ورقي، ويُثبت جيداً أثناء قلب الأنبوب مرتين أو ثلاث مرات، وستستقر العينات في مرحلتين، ولكن من المفترض أن تُسهل سرعة بطيئة وقصيرة من الطرد المركزي لعملية الفصل.

٢٠. الغرض هنا هو تخفيف CsCl إلى تركيز يمكنه من البقاء في المحلول بعد ترسيب الإيثانول. وهناك طريقة بديلة، وهي إزالة الـ CsCl من خلال الديليزة (dialysis).

٢١. يمكن ترسيب الـ CsCl على درجات حرارة أقل من 4 مئوية.

المراجع:

1. Hinnebusch J, Tilly K (1993) Linear plasmids and chromosomes in bacteria. Mol Microbiol 10:917-922
2. Davis MJ et al (1988) Cloning of chromosomal and extrachromosomal DNA of the mycoplasma-like organism that causes maize bushy stunt disease. Mol Plant Microbe Interact 1:295-302
3. Tran-Nguyen LTT, Gibb KS (2006) Extrachromosomal DNA isolated from tomato big bud and *Candidatus* Phytoplasma australiense phytoplasma strains. Plasmid 56:153-166
4. Namba S, Oshima K, Gibb K (2005) Phytoplasma genomics. In: Blanchard A, Browning GS (eds) Mycoplasmas: molecular biology, pathogenicity and strategies for control. Horizon Bioscience, Norfolk, pp 97-133
5. Panopoulos NJ, Peet RC (1985) The molecular genetics of plant pathogenic bacteria and their plasmids. Annu Rev Phytopathol 23: 381-419

6. Vivian A, Murillo J, Jackson RW (2001) The roles of plasmids in phytopathogenic bacteria: mobile arsenals? *Microbiology* 147:763–780
7. Toruño TY et al (2010) Phytoplasma PMU1 exists as linear chromosomal and circular extrachromosomal elements and has enhanced expression in insect vectors compared with plant hosts. *Mol Microbiol* 77:1406–1415
8. Nishigawa H et al (2002) Evidence of intermolecular recombination between extrachromosomal DNAs in phytoplasma: a trigger for the biological diversity of phytoplasma? *Microbiology* 148:1389–1396
9. Niemark H, Kirkpatrick BC (1993) Isolation and characterization of full-length chromosomes from non-culturable plant-pathogenic *Mycoplasma-like* organisms. *Mol Microbiol* 7:21–28
10. Lee I-M, Davis RE (1983) Phloem-limited prokaryotes in sieve elements isolated by enzyme treatment of diseased plant tissues. *Phytopathology* 73:1540–1543
11. Doyle JJ, Doyle JL (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12:13–15
12. Dellaporta SL, Wood J, Hicks JB (1983) A plant DNA miniprep: version II. *Plant Mol Biol Rep* 1:19–21
13. Liefing LW et al (2006) Comparative analysis of the plasmids from two isolates of “*Candidatus Phytoplasma australiense*”. *Plasmid* 56:138–144
14. Harrison NA et al (1991) Molecular cloning and detection of chromosomal and extrachromosomal DNA of mycoplasma-like organisms associated with witches’-broom disease of pigeon pea in Florida. *Mol Plant Microbe Interact* 4:300–307
15. Kollar A et al (1990) Isolation of the DNA of various plant pathogenic mycoplasma-like organisms from infected plants. *Phytopathology* 80:233–237
16. Bai X et al (2006) Living with genome instability: the adaptation of phytoplasmas to diverse environments of their insect and plant hosts. *J Bacteriol* 188:3682–3696
17. Denes AS, Sinha RC (1991) Extrachromosomal DNA elements of plant pathogenic mycoplasma-like organisms. *Can J Plant Pathol* 13:26–32
18. Kuske CR, Kirkpatrick BC (1990) Identification and characterization of plasmids from the western aster yellows mycoplasma-like organism. *J Bacteriol* 172:1628–1633
19. Birnboim HC, Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7:1513–1523
20. Sambrook J, Russell DW (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3rd edn. Cold Spring Harbour Press, New York
21. Ausubel FM et al (eds) (1992) *Current protocols in molecular biology*. Wiley, New York

تدرجات بسبينزيميد كلوريد السيزيوم لفصل الـ DNA للنباتات والفيوتوبلازما

Lucy T. T. Tran-Nguyen and Bernd Schneider

الملخص:

يُعد الطرد المركزي لتدرج بسبينزيميد - CsCl (CsCl-bisbezimide) طريقة من الطرق الفاعلة لإزالة الفيوتوبلازما من DNA للنبات العائل. ويُشكل البسبينزيميد تركيباً معقداً مع الـ DNA الغني بالـ A + T، وبالتالي يعمل على خفض كثافته النسبية. وأثناء الطرد المركزي، يتم فصل مكان DNA الفيوتوبلازما الغني بالـ A + T عن DNA النبات العائل الغني بالـ A + T. إن اختلاف الكثافة بين DNA الفيوتوبلازما و DNA النبات يتباين حسب تركيب الميكروب، أو الكائن الحي الدقيق المُعدي للعائل، ويُكون DNA الفيوتوبلازما نمطاً مُميزاً واضحاً فوق DNA النبات العائل، من المُمكن الحصول عليه. وحسب تركيز الفيوتوبلازما ومقياسها، يتم الحصول على كميات كافية من الـ DNA المنقى بدرجة عالية لبناء مكتبة جينية، أو للتعرف على المُتسلسل، أو الدراسات الخاصة بالتهجين.

الكلمات المفتاحية: بسبينزيميد، طرد مركزي لمعامل تدرج كثافة، كلوريد السيزيوم، استخلاص الـ DNA، Hoechst 33258.

١- المقدمة:

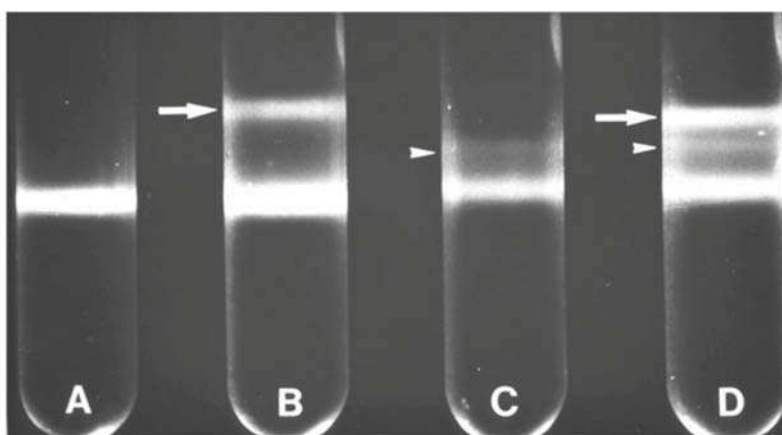
إن الطرد المركزي لتدرج كثافة كلوريد السيزيوم (CsCl) يتم استخدامه لتتقية الـ DNA وفصله للأجل التحضيري والتحليلي، ويمكن استخدام الـ DNA المنقى في التطبيقات النهائية، مثل: تأسيس مكتبة جينية، وتسلسل الجينوم، أو دراسات التهجين. وبعد عمل طرد مركزي لـ CsCl بسرعة، ولمدة مناسبة يُشكل تدرج من تدرجات الكثافة الخطية، ويتراكم الـ DNA في عامل تدرج CsCl في موضع مقابل لكثافته النسبية ($\sim 1.7 \text{ g/cm}^3$)، وهي قريبة من محتواه (G + C) (1). وبناء على ذلك، يمكن فصل المسافة بين الأحماض النووية مختلفة التراكيب القاعدية عن

مكانها؛ إلا أن المسافة الفاصلة بينهم قصيرة، ومن الصعب تجميع الأجزاء المقسمة بمفردها. ويتم تحسين هذا الأمر بتركيب الـ DNA مع البسبينزيميد (Hoechst 33258) (٢، ٣)، وتتفاعل الصبغة الفلورية مع السلاسل الغنية بالـ A + T في الفتحات الثانوية في الشريط الـ DNA (٤، ٥) تناسباً مع محتوى A + T من المواد القاعدية. وبالتالي، تُقلل من كثافتها النسبية مقارنةً بالـ DNA الغني بالـ G + C. ومنه يكون DNA واضحاً بتواجد مُعقد البسبينزيميد مع صبغة الزرقا. وعليه، تتبع وتتاثر بأطوال موجية ٣٦٥nm و ٤٦٥ على التوالي، والذي يمكن مشاهدة الـ DNA تحت ضوء الأشعة فوق البنفسجية UV light.

إن محتوى DNA الفيتوبلازما من الـ A + T يتراوح ما بين ٧٨,٦ و ٧٢,٦ mol% بالنسبة للـ *Candidatus Phytoplasma mali* and *Candidatus Phytoplasma australiense* (٦-٨). وبشكل عام، يُعد DNA الفيتوبلازما غنياً بالـ A + T مقارنةً بـ DNA النباتات، ومن الممكن فصله وفقاً للمبادئ التي تم ذكرها سابقاً. وتعتمد المسافة الفاصلة بين DNA الفيتوبلازما و DNA النبات العائل على تركيب الميكروب، أو الكائن الحي الدقيق المُعدي والعائل. وحيث إن DNA فيتوبلازما الـ aster yellows (٢٧-٢٩ مول% G + C) و DNA الـ نبات الـ وينكا (٣٢,٩ مول% G + C) مسافة متقاربة، و DNA فيتوبلازما الـ apple proliferation (٢١,٤ مول% G + C)، ويمكن فصلهم عن نبات الـ وينكا والدخان (٣٥ مول% G + C)، أو التفاح (٣٥,١ مول% G + C) بشكل جيد (٦، ٩). ويُستحسن فحص DNA النبات السليم في تدرجات بسبينزيميد CsCl قبل الشروع في تنقية DNA الفيتوبلازما لأول مرة من نبات من النباتات العائلة. وغالباً ما تحتوي النباتات على أحماض نووية DNAs على توابع (satellite)؛ والتي تكون إما غنية بالـ A + T أو G + C وتنتج عنه أنماط من DNA (DNA bands) مختلفة بعيداً عن الـ DNA الكروموسومي الرئيسي (١٠، ١١). وقد تتراكم التوابع الغنية بالـ A + T فوق DNA الفيتوبلازما، ومنه تُفسر عن طريق الخطأ كالحمض النووي الخاص بالفيتوبلازما. وبعد الطرد المركزي للبسبينزيميد CsCl الـ الـ وينكا (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don.)؛ والتي تُعد أفضل نبات تجريبي عائل بالنسبة لعدد من أنواع الفيتوبلازما تعرض أنماطاً مختلفة (26.5 mol% G + C) فوق الـ DNA الكروموسومي الرئيسي (شكل ١) (٦). إن التوابع الغنية بالـ G + C موجودة أسفل شريط الـ DNA الكروموسومي، ولم يتم تحديد محتوى الحمض النووي G + C في أغلب النباتات العائلة للفيتوبلازما، ويُفضل عمل DNA مرجعي، مثل: (*Spiroplasma citri*) مع محتوى المعروف للـ G + C معاً. ومن السهل تنمية الـ *S. citri* ومحتواها من الـ G + C (٢٦ مول%) مشابه لمحتوى DNA الفيتوبلازما.

إن الإعدادات الخاصة بالطرد المركزي لبسبينزيميد CsCl تعتمد على نطاق تنقية DNA الفيتوبلازما، وتمثل خطوة الصبغ أهمية بشكل خاص، ويمكن صبغ كميات الـ DNA التحليلية (٥٠ مل \ ميكروجرام)، بالإضافة لمحاليل الصبغة المُخففة مباشرةً (< 0.5 مل \ ميكروجرام) إلى الـ DNA وخلطهم برفق. ومن المفترض صبغ محاليل الـ DNA المركزة (> ٥٠ مل \ ميكروجرام)

من خلال الإحلال؛ وذلك لتجنب ترسب الـ DNA التي تُسببها عملية الصبغ. ويتم تعديل مُعامل انكسار (n) محلول CsCl-DNA ليتناسب مع القيمة المحسوبة من التجربة القريبة من كثافة طيف DNA الفيوتوبلازما المصبوغ (٦). وبعد عملية الطرد المركزي المتوازنة، يتم تصوير أنماط DNA تحت ضوء الأشعة فوق البنفسجية، ويتم جمع النمط العلوي؛ والذي يمثل: DNA فيوتوبلازما. وبشكل عام، يخضع DNA فيوتوبلازما لجولات إضافية من الطرد المركزي حتى لا تتم رؤية أي بقايا من DNA للنبات. وبعد الطرد المركزي النهائي، يتم تكسير DNA الفيوتوبلازما وتحلله قبل عمل أي تطبيقات عليه.



شكل (١): تنقية DNA لفيوتوبلازما 'Candidatus Phytoplasma mali' بواسطة الطرد المركزي مع CsCl- bisbenzimidide من نبات طبيعي *Malus domestica* (b) وعائل آخر تجريبي *Catharanthus roseus* (d). (c) نبات سليم: التفاح، والوينكا، على التوالي، والأسهم تشير إلى DNA الفيوتوبلازما. وتشير رؤوس الاسم إلى DNA التابع لنبات الوينكا الغني بالـ A + T. والصورة مأخوذة من A + T Kollar A، Seemüller E، Bonnet F، Saillard C، Bove JM (1990) Isolation of the DNA of various plant pathogenic mycoplasma-like organisms from infected plants. *Phytopathology* 80:234.

٢- المواد:

١-٢: المواد الكيميائية:

١. DNA مُستخلص باستخدام طريقة عمل خاصة لفيوتوبلازما (انظر: الملاحظة ١ و٢)، أو استخلاصه باستخدام طريقة (CTAB) cetyltrimethylammonium bromide.
٢. كلوريد السيزيوم، المستوى التحليلي: ١,٤ مل \ جم في 10mM Tris-HCl، ودرجة حموضته pH 8.0.
٣. بسبينزيميد (Hoechst 33528): ٠,٥ مل \ مليجرام في ماء ddH₂O.
٤. Tris(hydroxymethyl)-aminomethane: 10 mM في ddH₂O، pH 8.0.

٥. محلول منظم TE: 10 mM Tris-HCl ، pH 8.0 ، 1 mM EDTA ، pH 8.0.
٦. أيزوبروبانول.
٧. إيثانول: ٧٠ و ٨٠٪.
٨. محلول منظم لـ TAE (50× stock): Tris base ٢٤٢ جم، وحمض أسيتيك مثل: ج ١، ٥٧، ١ مل، و ١٠٠ مل من 0.5 EDTA (درجة حموضته pH 8.0) في ١ لتر.
٩. Bacteriophage lambda DNA.
١٠. آجاروز، مستوى بيولوجي جزيئي، و ١٪ في محلول منظم لـ TAE 1×.
١١. بروميد الأيثيديوم: ١٠ مل \ مليجرام في ddH₂O.
١٢. صبغة تحميل الـ DNA (6× stock): بروموفينول أزرق ٢٥ مليجراما، و FF سيانول زايلين ٢٥ مليجراما، وجليسرول ٣،٣ مل، و ddH₂O ٦،٧١ مل لتحضير ١٠ مل.

٢-٢: التجهيزات:

١. أنابيب إحلال من نوع MWCO 12.000-14.000: قطرها يتوقف على كمية محلول الصبغة. وقبل بدء الخطوة، يتم تبليل الأنابيب بماء ddH₂O في دورق لمدة 15 min على الأقل.
٢. كلبسات للأنابيب السابقة؛ (اختيارية، أو ببساطة عقد الأنبوب فقط).
٣. أجهزة تقليب مغناطيسية، وبار للتقليب.
٤. حامل، أو جهاز لحمل الأنابيب؛ (مناسب لرؤية التدرج بجهاز نقل الأشعة فوق البنفسجية UV transilluminator).
٥. جهاز تقطيع لفتح الأنابيب (يفضل المقصات، أو مقصات التقليم).
٦. أنبوب Teflon: طوله من 5-8 cm، وقطره الداخلي 1 mm.
٧. ممصات؛ (من نوع Gilson P1000، أو P5000، أو ما يشبهها)، أو سرنجة ذات الاستعمال الواحد.
٨. مقاييس الانكسار: مقياس الانكسار Kruss، أو جهاز مماثل.
٩. أنابيب جهاز الطرد المركزي فائقة السرعة؛ مصنوعة من البولي كربونات، أو أنابيب مصنوعة من polyallomer: ١٣،٥ مل أو أكبر (Beckman and Coulter).
١٠. Quick-seal device (Beckman and Coulter).
١١. حوامل خاصة لجهاز الطرد المركزي فائق السرعة: تسلسلها Beckmann Ti أو NVT أو VT.
١٢. Ultracentrifuge: Beckmann, L8-70 M or comparable device.
١٣. جهاز نقل الأشعة فوق البنفسجية UV transilluminator.
١٤. مصدر للإمداد بالطاقة.

١٥. وحدة الفصل الكهربائي.

١٦. ملابس واقية من الأشعة فوق البنفسجية (قفازات واقية للوجه).

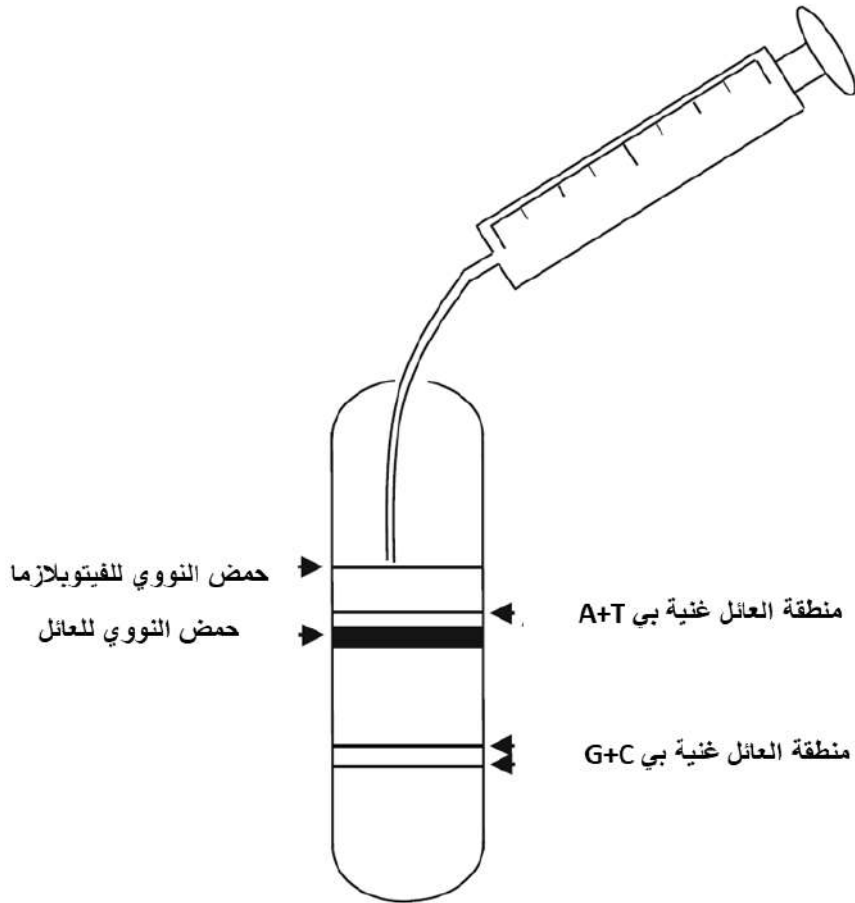
١٧. مقياس الطيف الضوئي Spectrophotometer.

٣- طرق العمل:

١. يُذاب CsCl الصلب في 10 mM من Tris-HCl، درجة حموضته 8.0 pH، في تركيز ١,٤ مل/جم (انظر: الملاحظة ٣)، ويجب تصفية المحلول، إن وجدت مواد غير مُذابة، ويُحضر محلول البسبينزيميد (Hoechst 33528) (انظر: الملاحظة ٤).
٢. يتم إذابة كرات الحمض النووي الصغيرة بحرص في كمية تتراوح ما بين ٥ مل إلى ١٠ مل من محلول CaCl، ويتم تحديد كمية المحلول اللازمة لإذابة الكرات تماما، حسب كمية ودرجة نقاء الـ DNA (انظر: الملاحظة ٥).
٣. يتم تقدير كمية الـ DNA بواسطة الفصل الكهربائي بجل الآجاروز، أو بمقياس الطيف الضوئي (انظر: الملاحظة ٦).
٤. تُحسب الكمية الكلية للصبغة اللازمة، وينبغي أن تكون نسبة الـ DNA الصبغة ١:٢ (على سبيل المثال ٥٠ ميكروجرام من الحمض النووي: ٢٥ ميكروجرام من البسبينزيميد): والصبغة تُضاف إما مباشرة بكميات صغيرة، وتُخلط برفق، أو تعبأ في أنبوب الإحلال المبلى مسبقاً (انظر: الملاحظة ٧ و٨). ويتم وضع قطعة ممغنطة داخل أنبوب الإحلال، ويُغلق إما بكبس أو بعقدة، ويُوضع أنبوب الإحلال إلى محلول DNA-CsCl، ويجب وضع محلول DNA-CsCl في كأس صغير، ويجب أن يكون عمق محلول DNA-CsCl في الكأس أو القارورة بنفس مستوى أنبوب الإحلال. ويتم تثبيت القارورة على جهاز التقليب المغناطيسي، وتُضبط بسرعة بطيئة لتحريك أنبوب الإحلال، مع ملاحظة أن السرعة العالية سوف تؤدي إلى قطع تمزق أشرطة الـ DNA. ويتم الإحلال على درجة حرارة الغرفة أثناء فترة الليل، في مكان مظلم كالخزانة، وبتغطية القارورة بالأمونيوم، ويُزال أنبوب الإحلال في اليوم التالي.
٥. يُعدل معامل انكسار المحلول بمقياس انكسار دقيق إلى قيمة ما بين ١,٣٩٤٢ و١,٣٩٤٥ (انظر: الملاحظة ٩). ويستخدم محلول DNA-CsCl بكميات ضئيلة؛ لأنه قد يكون من الضروري إجراء قراءات عديدة للحصول على تعديل دقيق.
٦. تُقاس كمية محلول DNA-CsCl، ويتم تعبئة عدد مناسب من الأنابيب polyallomer بكميات متطابقة. وإن لم يتم ملء الأنابيب إلى آخرها تُكمل بـ CsCl في محلول 10 mM Tris-HCl من معامل الانكسار المتطابق، ولكن يجب ترك مسافة صغيرة بين سطح المحلول وعنق الأنبوب (انظر: الملاحظة ١٠).
٧. تُوزن الأنابيب قبل غلقها بجهاز quick-seal.

٨. يتم اختيار حامل مناسب لجهاز الطرد المركزي الفائق السرعة (انظر: الملاحظة ١١)، ويتم وضع الأنابيب متوازنة عكس بعضها، وتُغطى بـ spacer، ويُغلق الغطاء بأحكام، ويُشغل الجهاز بسرعة ٧١٨٣٠ لفة [r max] لمدة 72 h (على سبيل المثال، ٩٩٧٤٦ لفة Ti70.1)، على درجة حرارة 20°C، دون تباطؤ.

٩. تُزال الأنابيب من على حامل الدوار بحرص، وتُوضع في جهاز نقل الأشعة فوق البنفسجية. ١٠. يتم فتح كل أنبوب من أنابيب جهاز الطرد المركزي بحرص (انظر: الملاحظة ١٢ و ١٣)، ويُشغل ضوء الأشعة فوق البنفسجية، وتوضع الـ أنبوب الـ Teflon؛ بحيث يكون في مواجهة شريط DNA الفيتوبلازما (شكل ٢)، وتُجمع أجزاء DNA الفيتوبلازما مع حفظ الكمية القليلة بقدر المستطاع، ويوضع DNA الفيتوبلازما المُجمع، إن تم استخدام أنابيب عديدة بجهاز الطرد المركزي.



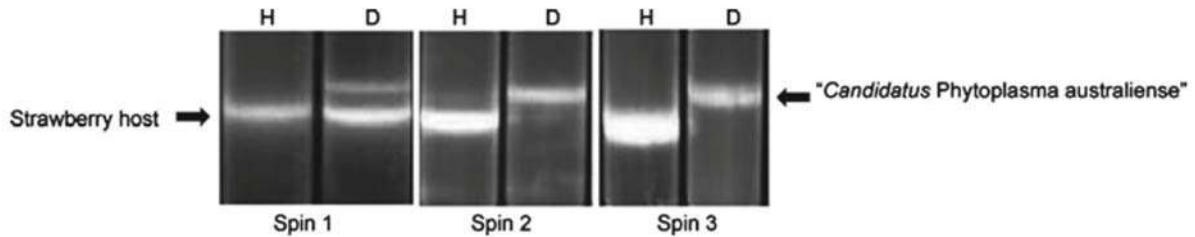
شكل (٢): شكل يوضح أنماط الـ DNA بعد أول طرد مركزي مع CsCl- bisbenzimidate لنبات *C. roseus* مصاب بفيتوبلازما '*Ca. Phytoplasma mali*' وطريقة الحصول على DNA للفيتوبلازما.

١١. تُقاس كمية الـ DNA المُستخلص بأي طريقة من الطرق التي تم ذكرها في الخطوة ٣، وتُحسب كمية الصبغة، كما هو موضح في الخطوة ٤. وتتم عملية الصبغ من خلال إضافة البسبينزيميد مباشرة، مع رجه بشكل طفيف، ويتم ضبط معامل الانكسار، كما هو موضح فيما سبق، ويعمل مُعامل التدرج بالمُعلمات نفسها. وفي الحالات التي يتم فيها استخدام حامل دوار رأسي، يمكن تقليل مدة التشغيل.
١٢. تُكرر الخطوات من ٩ إلى ١١ (انظر: الملاحظة ١٤ و ١٥).
١٣. تُزال الصبغة من على DNA الفيوتوبلازما النقي من خلال إضافة كمية متساوية من الأيزوبروبانول، مع تقليب الأنبوب عدة مرات (انظر: الملاحظة ١٦). ويتم إزالة طبقة الأيزوبروبانول العليا، وبعدها تُضاف كمية من الأيزوبروبانول المتساوية مرة أخرى، وتُكرر تلك العملية مرتين. ويمكن التحكم في عملية إزالة الصبغة من خلال تعريض محلول CsCl لضوء الأشعة فوق البنفسجية لفترة قصيرة. وإن لم يتم ملاحظة أي شعاع فلوري، فإن عملية إزالة الصبغة تكون قد اكتملت.
١٤. يتم ترسيب DNA الفيوتوبلازما من خلال إضافة كمية ٢,٥ من إيثانول 80% على درجة حرارة الغرفة. ويتم استخلاص الـ DNA بالطرد المركزي بسرعة ١٦٠٠٠ لفة لمدة 20 min على درجة حرارة الغرفة، ويتم غسل الكرات الصغيرة مرتين بالإيثانول ٧٠٪ (انظر: الملاحظة ١٧).
١٥. يُذاب الـ DNA في كمية صغيرة من المحلول المنظم للـ TE، ويُقاس كمية الـ DNA. وبذلك، يصبح الـ DNA جاهزاً للاستخدام.

٤- الملاحظات:

١. بسبب المسافة الضيقة، أو تداخل أنماط الـ DNA الكروموسومي، أو التابع الغني بالـ A + T من نبات *C. roseus* -على التوالي- مع DNA بعض أنواع الفيوتوبلازما (مثل: *Ca. Phytoplasma asteris*)، فإن انتقال الفيوتوبلازما بواسطة الحامل إلى عائل آخر -كنبات الدخان-، أو استخدام الفصل الكهربائي لجل (PFGE)؛ يجب أخذ تلك المتغيرات في الحسبان. ولكن غالباً ما يكون تابع الـ *C. roseus* الغني بالـ A + T كميته صغيرة مقارنةً بـ DNA الفيوتوبلازما. وحسب غرض التجربة، قد يكون تلوث DNA النباتات الصغيرة أمراً يمكن تحمله.
٢. إن الـ DNA يمكن استخلاصه بأي طريقة عمل تنتج كمياً كبيراً من الـ DNA. وتُعد طرق العمل التي تقوم على الـ CTAB من الطرق التي - كثيراً - ما تُستخدم لاستخلاص الـ DNA النباتي بكمية كبيرة (١٢، ١٣). وبغض النظر عن العملية، تتجاوز كمية الـ DNA النباتي كمية الـ DNA الفيوتوبلازما، ولكن يمكن نقل التوازن قليلاً بالقرب من DNA الفيوتوبلازما؛ وذلك عند استخدام المواد النباتية التي يكون تركيز الفيوتوبلازما بها عالياً.

ويُعد النسيج اللحاءي من أكثر المصادر الغنية بـ DNA الفيتوبلازما. وفي بعض الحالات، يمكن تحضير نسيج لحاء من النباتات الخشبية، أو من أجزاء لجين النباتات العشبية؛ من خلال تقشير اللحاء من على قشرة العينة بشكل دائري. ولكن تعتبر هذه العملية باهظة، أو يصعب تنفيذها مع معظم النباتات. وفي هذه الحالات، يجب أن يتم استخدام أجزاء النبات التي تكون الفيتوبلازما بها عالية، ولكن محتوى DNA النبات بها منخفض، مثل: الجذور، أو الجزوع، أو العروق الوسطي، أو السويقات، أو الزهور. وتؤدي الزيادة المفرطة للحمض النووي DNA الخاص بالنبات إلى اتساع نمط DNA العائل؛ وذلك في تدرجات بسبينزيميد كلوريد السيزيوم، أو تتداخل أو تُغطي DNA الفيتوبلازما. وإن لم يتوفر سوي المواد الغنية بالـ DNA -مثل: الأوراق- فيجب تنفيذ عملية تعزيز الفيتوبلازما وفقاً لـ Ahrens و Seemüller (١٣). وبالنسبة لنباتات العائل التي تحتوي على تركيزات بولي سكاريد وبولي فينول عالية -مثل: الفراولة (*Fragaria spp*)-؛ يُفضل تعديل طريقة استخلاص الـ DNA بالطريقة بنفسها التي قام بشرحها Porebski وآخرون (١٤). ويتم وضع نمط الـ DNA الـ '*Ca. Phytoplasma australiense*' في مكان قريب جداً من نمط العائل الخاص بالفراولة (شكل ٣)، وقد يؤدي هذا إلى نقل كمية صغيرة من DNA النبات؛ والذي يمكن تحمله حسب التطبيقات التي تسبق عملية التنقية.



شكل (٣): تدرج CsCl-bisbenzimidate DNA لفيتوبلازما '*Ca. Phytoplasma australiense*' لنبات *Fragaria spp* بين موقع النمط العائل والفيتوبلازما. بعد كل خطوة من الطرد المركزي.

وتُستخدم مواد بلاستيكية مُعقمة مخصصة للاستعمال الواحد عند التعامل مع DNA الفيتوبلازما المنقى، ويمكن إذابة كرات الـ DNA الصغيرة بطرق عديدة، ولكن ينبغي التقليل من فصلها أو قطعها إلى أقل حد ممكن، وعادةً ما يُستعصى إذابة كرات الـ DNA الكبيرة. ويتم إعادة ترسيب الـ DNA من خلال نشر الكرات الصغيرة الرطبة المغسولة بالكحول على طبقة من الطبقات الرقيقة، وتُجفف الحبيبات بالهواء، وتُضاف مليترات قليلة من محلول CsCl. وكلما كان السطح كبيراً ذاب الـ DNA سريعاً، ويمكن دعم العملية بتدفئة بسيطة للـ DNA المنقوعة، ويُمثل الزمن عاملاً مهماً؛ حيث ينتج -غالباً- عن ترك محلول DNA-CsCl طوال الليل نتائج جيدة. ولا يُعد محلول CsCl من أفضل محاليل الإذابة؛ ولكنه

- يحمي الـ DNA من عمل إنزيمات الفصل (degrading enzymes). ويمكن تطبيق طرق أخرى لإذابة الـ DNA؛ بشرط ضمان سلامة الـ DNA. وسيتم إذابة القطع الصغيرة المتبقية في المحلول أثناء عملية الاحلال، ويجب الحفاظ على كمية المذيب قليلة بالقدر المستطاع في البداية؛ وإلا ستكون هناك حاجة لإضافة كميات كبيرة من CsCl الصلب لضبط معامل الانكسار.
٣. إن النوع الجيد من CsCl باهظ الثمن، وتعتمد الكميات اللازمة منه على حد استخلاص الـ DNA. وكقاعدة من القواعد الأساسية، يحتاج أول طرد مركزي إلى ١ مل لكل ١٥٠ ميكروجرام من الـ DNA. وإن تم تحضير كم كبير من محلول CsCl فيجب إضافة كريستالات ببطء؛ لأن المحلول يبرد أثناء إذابة CsCl. ولتسريع العملية، يمكن تدفئة المحلول حتى تصل درجة حرارته إلى 60°C في فرن الميكروويف، أو في حمام مائي.
٤. على الرغم من أن علم السموم البيسببنيزيميد لم يتم التحقيق فيه بشكل كامل، فيفضل أن يرتدي القائم بالعمل معطف المختبر وقفازات الحماية ونظارات الأمان؛ في أي وقت عند التعامل مع محلول المخزون أو المحاليل التي تحتوي على الصبغة.
٥. إن الـ DNA يستقر في محاليل CsCl المُعالجة بالمحلول المنظم في درجة حرارة الغرفة، ولا يحتاج للتبريد بين كل خطوة، خصوصاً إن تم تنفيذ العملية بكاملها بسرعة معقولة. ومع ذلك، يجب أن تبقى المحاليل التي تحتوي على البيسببنيزيميد في مكان مظلم.
٦. يمكن تقدير كم الـ DNA بواسطة 260 nm من مقياس الضوء الطيفي، وإن الوحدة الواحدة من الكثافة البصرية (OD) تُعادل ٥٠ ميكروجرام من الـ DNA. وعادة ما تحتوي كرات الحمض النووي الصغيرة على كميات كبيرة من RNA بعد استخلاصها بواسطة CTAB؛ الأمر الذي ينتج عنه حسابات غير دقيقة (عادة، عالية جداً). ومن ضمن الطرق البسيطة لتقدير الكم والجودة بدقة، إجراء الفصل الكهربائي بالجل، ويتم إجراء الرحلان الكهربائي لنسبة بسيطة من الـ DNA المُذاب ومقارنتها مع الـ DNA القياسي لمعروفة التركيز، مثل: (λ DNA). وبسبب تركيز CsCl العالي، لا بد من تخفيف المحلول إلى خمسة أضعاف بمحلول مُنظم الـ TE قبل الفصل الكهربائي، ويجب تجهيز مواد التخفيف المتسلسلة الخاصة بالـ DNA المستخلص وفحصها، وكذا λ في جل آجاروز ١٪؛ والذي تم صبغه ببروميديد الإثيديوم. وهناك عديد من الطرق البديلة لتقدير تركيز الـ DNA؛ ولكن أغلبها لا يعمل على تحديد الجودة. لذلك، لا يُصح باستخدامها.
- ويتم التعامل بحذر من أول خلط لمواد النبات إلى إعادة ترسيب الـ DNA، ويمكن الحصول على جزء من الـ DNA يتراوح متوسط حجمه ما بين 20-35 kb (مقاسة بواسطة PFGE، Schneider unpublished). وتؤدي الكميات الكبيرة من الـ DNA الذي تم فصله إلى أنماط مشتتة وغير واضحة، وتعمل سلاسل الـ DNA النباتي الغني بالـ A + T على تلوين DNA

الفيتوبلازما، ولا تؤثر كمية الـ RNA على جودة التدرج، بسبب أن RNA ($p= 1.85 \text{ g/cm}^3$)؛ وذلك لأن بروتينات ورواسب الـ RNA ($p= 1.3 \text{ g/cm}^3$)؛ وذلك حسب الشروط المطبقة.

7. Bisbenzimidazole هو مسحوق أصفر إلى أصفر أخضر، مع قابلية الذوبان في الماء بنسبة 10 مل \ 1 ملجرام، ويتم تحضيره محلولاً - عادة - بنسبة 0.5 مل \ 1 ملجرام أو أقل. ويمكن تخزين الصبغة المذابة في مكان مظلم عند درجة حرارة 4 مئوية. وتعتمد عملية الصبغ على تركيز الـ DNA في المحلول؛ بحيث إن كان تركيز الـ DNA مرتفعاً (> 0.1 مل \ 1 ملجرام)، فتؤدي إضافة محلول الصبغة مباشرة إلى حدوث ترسب (على شكل خيوط صفراء)، ويمكن تجنب هذا الأمر - إلى حد معين - باستخدام تركيز أقل من تركيزات البسيبيزيمييد المخزنة، أو بتقليب محلول الـ DNA أثناء إضافة الصبغة بكميات صغيرة (قطرة تلو الأخرى)، ويجب وقف الصبغة بمجرد ظهور الترسب. ولا بد من صبغ محاليل الـ DNA المركزة بواسطة الاحلال، وينبغي أن تكون القطعة الممغنطة الخاصة بالتقليب أكبر من قطر الأنبوب؛ حتى لا يدور بداخل الأنبوب. وأثناء عملية الصبغ تمر كمية كبيرة من الماء بأنبوب الاحلال، وتعمل على تخفيف محلول CsCl، وينجم عن التقليب البطيء خلال فترة الليل بجهاز التقليب المغناطيسي نتائج صبغ ممتازة، دون ترسب الـ DNA. وقد تم تجريب طرق تقليب أخرى بدون استخدام القطعة الممغنطة التقليب؛ لكنها لم تُسفر عن نتائج مرضية (Schneider unpublished). ويمكن التأكد من درجة كفاءة الصبغ، من خلال تعريض الـ DNA لضوء الأشعة فوق البنفسجية بعد إزالة كيس الإحلال، ويجب أن يكون المحلول متفلوراً بلون أزرق فاتح، ويُشير لون الاصفرار إلى ضعف عملية الصبغ، أو إلى أن كمية الـ DNA في المحلول صغيرة، ويمكن استعادة القطعة الممغنطة وتنظيفها بالتقليب بالأيزوبروبانول.

8. يجب ألا تتعدي كمية الـ DNA 100-150 ميكروجرام لكل مل، مع التأكيد على أن أغلب الـ DNA من DNA النبات العائل، وتؤدي التركيزات العالية إلى الحصول على نمط DNA العائل العريض. وقد يُمثل هذا الأمر مشكلة عندما تكون المسافة الفاصلة بين الفيتوبلازما وDNA العائل قليلة. ونتيجة لذلك، لن يتم التمكن من إزالة DNA الفيتوبلازما إلا ملوثة بدرجة عالية بحمض DNA العائل. وفي أسوأ الحالات، يُغطي نمط العائل على نمط DNA الفيتوبلازما. 9. يمكن الاستعانة بإرشادات الشركة المُصنعة للحصول على تفاصيل أكثر حول طريقة تشغيل جهاز قياس الإنكسار، ويتم ضبط قيمة مؤشر الإنكسار على 1.3942 - 1.3945؛ بإضافة CsCl صلب. وإن كان مؤشر الانكسار عالياً، فيمكن إضافة 10 mM من Tris-HCl. ويجب إضافة CsCl الصلب أو Tris-HCl بعناية وبكميات صغيرة؛ لتقييم درجة التغيير. ويجب خلط محلول DNA-CsCl برفق قبل بدء القياس التالي. ويجب تجنب إضافة كثير من CsCl الصلب لأنه يخفض درجة حرارة المحلول، ويمنع الإذابة. وبالتجربة، تم تقدير مؤشر الانكسار (6)،

ووجد أنه أعلى بقليل من مؤشر انكسار محلول CsCl؛ والذي به ينتقل الـ DNA المستخلص من *Ca. Phytoplasma mali* ($n=1.3940$ [$p=1.630 \text{ g/cm}^3$]).

١٠. يجب أن يكون عنق الأنبوب خالياً من قطرات CsCl أو من أي مواد مُغلّفة، ويجب ألا يتعدى فرق الوزن بين الأنابيب (في الأوضاع العكسية على حامل الدوار) ١٠ مليجرام، ومن الأفضل موازنة الأنابيب بميزان رقمي. وإن لزم الأمر، يمكن ضبطها من خلال إضافة - أو إزالة - محلول CsCl بإبرة مرفقة بسرّنجة؛ حيث إنها تُعد أفضل طريقة لإجراء هذا الأمر. وبعد غلق الأنابيب، يجب التحقق من عدم وجود أي تسريبات؛ وذلك من خلال ضغطها برفق بأصبع السبابة والأصابع الأمامية. ولتجنب مخاطر التلوث التي قد تطولك في حالة غلق الأنبوب بشكل خاطئ، ضعه في كيس بلاستيكي قبل تطبيق الضغط.

١١. تتوفر مجموعة من الحوامل الدوارة؛ يمكنها حمل أنابيب مختلفة الأحجام تُناسب الطرد المركزي المُدرج على الصعيد التحليلي أو التحضيري، (مثل: Beckman Ti70.1، VTi50، و NVTi70). ويتم بدء التجربة التحضيرية بحامل دوار من نوع VTi50؛ والذي يمكنه حمل ٨ أنابيب محتوى كل منها ٤٢ مل، وتعمل الحوامل الدوارة العمودية على تقليل فترات الطرد المركزي بشكل ملحوظ. وبالنسبة للتجربة التحليلية أو تكرار الطرد المركزي، يتم استخدام حامل دوار من نوع Ti70.1 أو NVTi70؛ والذي يمكن تشغيله لمدة 72 h أو 42 على التوالي.

١٢. يُثبت التدرج لفترة قصيرة؛ ولكن يُفضل تكملته بعد توقف الطرد المركزي على الفور، ويوضع الأنبوب على رف من الأرفف، أو على حامل أنابيب يسمح بالتحقق من الأنبوب بأكمله من أعلى إلى أسفل، ويمكن تعديل الأرفف البلاستيكية للسماح للأشعة فوق البنفسجية باختراق الأنبوب بسهولة. ويعتمد نمط ربط الحامض النووي على تركيبة النبات المصاب بالفيتوبلازما، وتشتمل الأمثلة المقدمة على: *Malus domestica* و *C. roseus* المصابة بفيتوبلازما *Ca. Phytoplasma mali* (شكل ١)، والفراولة المصابة بفيتوبلازما *Ca. Phytoplasma austreliense* (شكل ٣). ويكون نمط الـ DNA الأكثر بروزاً من العائل، ويقع في النصف السفلي من أنبوب الطرد المركزي، ويعتمد سطوع هذا النمط واتساعه على كمية الـ DNA وجودته ومدى فاعلية عملية الصبغ. وفي الحالة التي تتعلق بـ *Ca. Phytoplasma mali* تكون المسافة إلى النبات العائل للحمض النووي DNA حوالي 1 cm (شكل ١). ويختلف سطوع هذا النمط ويعتمد على تركيز الفيتوبلازما في النبات وعمليته. وغالباً ما يكون النمط خفيفاً جداً (شكل ٣)، وفي بعض الأحيان يكاد يكون مرئياً؛ وذلك بالمقارنة بالوضع المبين في شكل ١. وتابع النبات الغني بالـ A + T يمكن رؤيته بوضوح - أيضاً - بين الفيتوبلازما ونمط DNA العائل (شكل 1d). ويشبه تفلور هذا النمط سطوع DNA الفيتوبلازما، ولكن المسافة الفاصلة من النمط الأساسي أصغر. وكما ذكر سابقاً، تعتمد المسافة من نمط DNA الفيتوبلازما إلى نمط الـ DNA الكروموسومي الخاص بالـ *C. roseus* على محتوى الـ A + T. وعادةً ما يكون أقل من محتوى

Ca. Phytoplasma mali DNA، ويتم توثيق التدرج بالصور، ويُعلم الإطار الداخلي والخارجي لكافة أنماط الـ DNA بمركز ثابت. ويجب تقنين المدة المُستغرقة تحت ضوء الأشعة فوق البنفسجية لأقل حد ممكن؛ حتى لا تؤثر على الـ DNA. إن الكميات التي تصل إلى ٥ ميكروجرامات - وأقل - يمكن رؤيتها؛ مثل النمط تحت ضوء الأشعة فوق البنفسجية في أنابيب بلمرة ١٢,٥ مل.

١٣. تُعتبر القاطعات أو المقصات الحادة جداً أسهل وسيلة لفتح الأنابيب (quick-seal tubes). وإن تم استخدام الممصات العادية، فيجب التأكد من ضغط المكبس لأسفل، وأنه لا يوجد هواء قبل إدخال أنبوب الـ Teflon؛ حيث إن الفقاعات الهوائية تُعرقل التدرج، وتضع حافة أنبوب الـ Teflon بجانب نمط الـ DNA المعني (شكل ٢)، ويتم سحب محلول CsCl بعناية وببطء بالماصة أو القطارة، مع تحريك حافة أنبوب الـ Teflon بحركات دائرية. وأثناء ذلك، تُحرك حافة أنبوب الـ Teflon ببطء من الجزء العلوي للنمط المُعلم إلى أسفله. ويؤدي فشل القيام بتلك الخطوة، إلى تجميع الـ CsCl في السطح؛ حيث كثافة المحلول أقل من كثافة المحلول الموجود بأسفل الأنبوب. وإن كانت الفيتوبلازما ونمط العائل قريبين من بعض، فيمكن استخدام قلم لعمل علامة، ويجب تجنب لمس أو تحريك طبقة الـ DNA الكروموسومي، وتحتاج هذه الخطوة إلى تمرس وخبرة. إن الـ DNA لازق للغاية، وفي حال لمس طبقة الـ DNA الكروموسومي يصبح من الصعب منعه من الدخول إلى الأنبوب. وفي تلك الحالة، تُزال القطارة، وتبدأ العملية من جديد. إن ثقب أنبوب الطرد المركزي بإبرة من الداخل لجمع DNA الفيتوبلازما تم تجربته، ولكن بسبب الصعوبات التي يتم مواجهتها بالنسبة للتحكم في تدفق الـ DNA الطبيعية، لا يُفضل استخدام هذه الطريقة.

وفي الحالات التي يكون بها تركيز الفيتوبلازما منخفضاً في النبات العائل أو الـ DNA الخفيف جداً، يصبح من الصعب رؤية نمط DNA الفيتوبلازما الواضح بعد أول طرد مركزي. وهذا لا يعني أنه لا يوجد هناك DNA للفيتوبلازما؛ فربما يكون النمط باهتاً جداً؛ بحيث لا يمكن رؤيته، أو أن تفلور DNA العائل قوي للغاية. وفي تلك الحالة، يمكن أخذ جزء CsCl من على نمط DNA العائل. إن التنقيط بالقلم الدائم طريقة جيدة لتحديد ما يجب أخذه من الجزء، وفي معظم الحالات يظهر نمط DNA الفيتوبلازما بعد إعادة الطرد المركزي. ودائماً ما ينصح بمعالجة كمية صغيرة من DNA النبات، ويمكن أخذ كمية من النبات السليم حمضاً نووياً DNA مرجعياً بالكميات نفسها بالتساوي.

١٤. إن الـ DNA الآن في حالة نقية، والقراءات التي يظهرها جهاز قياس الطيف الضوئي صحيحة. لذا، يفضل استخدام وعاء صغير للحفاظ على DNA الفيتوبلازما. وفي حالة الحصول على قراءات عالية كثيرة جداً، فهذا - على الأرجح - يعني تلوثاً لـ DNA النبات، ويجب الحرص عند تطبيق الصبغة لتجنب حدوث الترسيب. وإن كانت كمية الفيتوبلازما قليلة جداً (١ مل - ٤)،

15. فيجب إضافة كمية من محلول CsCl بمؤشر انكسار 1.3942 - 1.3945، ويصل إلى 12 مل، وذلك قبل إضافة الصبغة. وهذا يُقلل من خطورة ترسب الـ DNA.
16. إن الجزء المستخلص من DNA النبات يجب معاملته مثل DNA الفيوتوبلازما واستخدامه مقياساً للمقارنة. ووفقاً للمسافة الفاصلة بين DNA العائل والفيوتوبلازما ومهارة التقني، يجب الاستمرار في تكرار الطرد المركزي إلى أن يختفي شريط DNA العائل.
17. يتم إزالة الصبغة من خلال إضافة كمية الأيزوبروبانول نفسها إلى محلول CsCl-DNA على درجة حرارة الغرفة، ويُخلط المحلول برفق مرتين أو ثلاثة، ويُترك إلى أن يكون الفصل واضحاً، مع دورة سريعة على جهاز الطرد المركزي ليتم تسريع العملية. ويتم التخلص من طور الأيزوبروبانول الأعلى. ويعمل الأيزوبروبانول على سحب الماء من محلول CsCl. وبالتالي، يزداد تركيز CsCl، ويتسبب في ترسيب الملح. وإن تعكر المحلول، فإن إضافة قليل من 10 mM من Tris-HCl تعكس العملية. وإن تم إضافة كمية كبيرة من Tris-HCl، فربما يختفي طور الفصل، ويمكن إعادة فصل الأطوار من خلال إضافة كميات صغيرة من CsCl الصلب إلى إن يُعاود الطور في الظهور. وبعد خطوة الإزالة الأخيرة، يتم إزالة الأيزوبروبانول المتبقي، ويمكن تصوير نجاح العملية مرئياً على جهاز الأشعة فوق البنفسجية، ويجب أن يكون محلول DNA-CsCl غير متفلور.
18. إن الطريقة البديلة لإزالة CsCl تتم بواسطة تقنية كروماتوغرافيا العمود؛ باستخدام Sepharose 4B يحضر مع TE، ويتم تحميل محلول CsCl-DNA من أعلى العمود. ويرجع هذا إلى خصائص الخليط الفيزيائية، ويتم تأخير نقل CsCl؛ وذلك حسب DNA الفيوتوبلازما. ويمكن تحديد جزء الـ DNA المستخلص من خلال ملاحظة الامتصاص، ويُعد حجم السعة وشكلها مؤشراً للجودة والكم. وبعد انتهاء كروماتوغرافيا العمود تزداد الكمية، ويمكن فصل الـ DNA من خلال الترسيب في جهاز طرد مركزي فائق السرعة (277072 لفة لمدة 24 ساعة على درجة حرارة 4°C)؛ باستخدام أنابيب بولي كربونات. ويتم التخلص من الراسب على الفور بعد توقفه، وتُوضع الأنابيب المعكوسة على ورقة امتصاص للتخلص من المحلول المنظم المتبقي، ويمكن تذويب حبيبات الـ DNA بكمية صغيرة من محلول TE. وبعد الانتهاء من عمود كروماتوغرافيا، يمكن تركيز الـ DNA بأجهزة عديدة، منها -على سبيل المثال- (Millipore Centricon Ultracell YM100).

شكر وتقدير:

يود المؤلفون أن يشكروا Erich Seemüller (من Julius KühnInstitute)، Federal Research ؛ Institute for Plant Protection in Fruit Crops and Viticulture)، Centre for Cultivated Plants وذلك لقراءته المتأنية الفاحصة لهذا الفصل.

1. Schildkraut CL, Marmur J, Doty P (1962) Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its buoyant density in CsCl. *J Mol Biol* 4:430–443
2. Bontemps H, Houssier C, Fredericq E (1975) Physio-chemical study of the complexes of “33258 Hoechst” with DNA and nucleohistone. *Nucleic Acids Res* 2:971–984
3. Manuelidis L (1977) A simplified method for preparation of mouse satellite DNA. *Anal Biochem* 78:561–568
4. Burckhardt G et al (1985) Two binding modes of netropsin are involved in the complex formation with poly(dA-dT).poly(dA-dT) and other alternating DNA duplex polymers. *J Biomol Struct Dyn* 2:721–736
5. Kopka ML et al (1985) Binding of an antitumor drug to DNA, Netropsin and C-G-C-G-A-A-TT-BrC-G-C-G. *J Mol Biol* 183:553–563
6. Kollar A, Seemüller E (1989) Base composition of the DNA of mycoplasma-like organisms associated with various plant diseases. *J Phytopathol* 127:177–186
7. Kube M et al (2008) The linear chromosome of the plant-pathogenic mycoplasma ‘Candidatus *Phytoplasma mali*’. *BMC Genomics* 9:306
8. Tran-Nguyen LTT et al (2008) Comparative genome analysis of ‘Candidatus *Phytoplasma australiense*’ (subgroup tuf Australia I; rp-A) and ‘Ca. *Phytoplasma asteris*’ strains OY-M and AY-WB. *J Bacteriol* 190:3979–3991
9. Berg M, Seemüller E (1999) Chromosomal organization and nucleotide sequence of the genes coding for the elongation factors G and Tu of the apple proliferation phytoplasma. *Gene* 226:103–109
10. Capesius I et al (1975) An A + T-rich satellite DNA in a monocotyledonous plant, *Cymbidium*. *Biochim Biophys Acta* 395: 67–73
11. Sacristán MD, Dobrigkeit I (1973) Variable content of a (GC) rich satellite DNA in tumorous and normal cultures of *Crepis capillaris*. *Z Naturforschung C* 28:564–567
12. Doyle JJ, Doyle JL (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12:13–15
13. Ahrens U, Seemüller E (1992) Detection of DNA of plant pathogenic mycoplasma-like organisms by a polymerase chain reaction that amplifies a sequence of the 16S rRNA gene. *Phytopathology* 82:828–832
14. Porebski S, Bailey LG, Baum BR (1997) Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. *Plant Mol Biol Rep* 15:8–15

طريقة Pulsed-Field Gel Electrophoresis

لعزل كروموسومات الفيتوبلازما

بأكملها من النباتات

Carmine Marcone

المُلخَص:

إن الفصل الكهربائي بالجل في حقل مُتغير (PFGE) من التقنيات الفاعلة للدراسات الجينومية لأنواع الفيتوبلازما التي تُسبب أمراضاً للنباتات؛ والتي لا يمكن استنباتها مما يُمكن من فصل كروموسومات الفيتوبلازما بأكملها بسبب تلوثها بالأحماض النووية الخاصة بالنبات العائل. إن طريقة الـ PFGE المشروحة في هذا الفصل تتضمن عزل DNA الفيتوبلازما عن النباتات العشبية المصابة بنسبة عالية من الفيتوبلازما؛ وذلك باستخدام عملية من عمليات تثبيط الفيتوبلازما، وهي إدراج كروموسومات الفيتوبلازما في كتل آجاروز، وفصل كروموسومات الفيتوبلازما بأكملها من حمض النبات النووي العائل مصدر التلوث من خلال الفصل الكهربائي. وتتفكك كروموسومات الفيتوبلازما بطولها على هيئة أنماط متفرقة بذاتها في الجل، ويمكن التحقق من هوية تلك الأنماط بطريقة اختبار طبع سوثرن المهجن (Southern blot hybridization)؛ باستخدام جزء من أجزاء الـ DNA الريبوزوم مجسماً. وفي هذه الطريقة، لا يتم استخدام أشعة جاما أو كروموسومات الفيتوبلازما المقطعة قبل الفصل الكهربائي.

الكلمات المفتاحية: كتل الآجاروز، *Catharanthus roseus*، نظام CHEF، كروموسوم الفيتوبلازما، تحضير اللحاء، الفصل الكهربائي بالجل في حقل متغير.

١- المقدمة:

إن الفصل الكهربائي بالجل في حقل مُتغير (PFGE) تقنية من التقنيات الفاعلة في الجينوم البكتيرية؛ حيث إنه يُمكن من فصل حمض نووي وزنه الجزيئي ثقيل، يتراوح ما بين 10 kb إلى أكثر من 10 Mb، وهو بعيد عن الحد الفصل الأعلى للرحلان الكهربائي بجل الآجاروز القياسي

(انظر: المرجع ١ للاطلاع). وبخلاف الفصل الكهربائي بجل الأجاروز القياسي، يعمل الـ PFGE على فصل جزيئات الـ DNA من خلال حقل كهربائي يتغير اتجاهه بشكل دوري في نسيج الجل أثناء التشغيل. ويتحقق الفصل لأنه تختلف قدرة جزيئات الـ DNA مختلفة الأحجام على إعادة توجيه وتنظيم نفسها في اتجاه حقل جديد، والجزيئات الأكبر هي التي تتحمل الانتقال إلى الاتجاه الجديد لفترة أطول، ويمكن استخدام الفارق الزمني لفصل الجزيئات.

وقد كان لتقنية الـ PFGE أثر كبير على الدراسات الجينومية لأنواع الفيتوبلازما التي تسبب أمراضاً للنباتات غير المستتبتة، ويرجع ذلك إلى قدرتها على فصل كروموسومات الفيتوبلازما بطولها الكامل عن حمض النبات النووي العائل مصدر التلوث. وفي دراسات عديدة مختلفة، تم تقدير أحجام الكروموسومات لأكثر من ١٠٠ نوع، من أنواع الفيتوبلازما تنتمي إلى مجموعات فرعية تطورية رئيسية وفرعية، من خلال مقارنة حركة الكروموسوم بطوله الكامل بالنسبة لحركة الـ DNA المُعلم على حجمة في جل الـ PFGE (٢-٦). وقد تم وضع خرائط فعلية لتحديد مواقع أنواع الفيتوبلازما باستخدام إنزيمات الهضم التي تقطع قطعاً نادرة في كروموسومات المنتقاة بالـ PFGE، وتُفكك الأجزاء بالـ PFGE (٧-١١). وقد تم أيضاً إنشاء مكتبات جينومية للفيتوبلازما من حمض نووي عالي الجودة مفصول بتقنية الـ PFGE ومُنقى، وأصبح من السهولة مع توفر هذا النوع من المكتبة على القائم بعمل المشاريع البحثية للتسلسلات التي تستهدف؛ إما أجزاء كروموسومية مختارة أو كروموسومات كاملة (١٢-١٦).

إن العمل السابق قد أوضح أن حصيعة الـ DNA الكروموسومي كامل الطول للفيتوبلازما يعتمد فصله بواسطة تقنية الـ PFGE على النبات العائل، ويمكن الحصول على كمية معقولة من الـ DNA الكروموسومي، تكفي لتحديد موقع إنزيم الهاضم؛ من النباتات التي تحدث بها الفيتوبلازما بتركيز عالٍ جداً، أو بتركيز عالٍ، إلى حد ما؛ والتي تكون -أيضاً- مناسبة لتحضير اللحاء. وتتواجد الفيتوبلازما بعدد في النباتات باللحاء فقط، وهذا يؤدي عند تحضير اللحاء إلى تثبيط الفيتوبلازما، إلى حد كبير. وبالنسبة لبعض أنواع الفيتوبلازما، يمكن الحصول على كميات كافية من الـ DNA المنقى، وبالفصل الكهربائي بالـ PFGE من *Catharanthus roseus* (Madagascar periwinkle)، وهي من أكثر العوائل للفيتوبلازما التجريبية، ولها أهمية حيث يتم تطعيمها بشكل دوري بأنواع الفيتوبلازما لحفظها. وفي الحالات التي أثبتت بها الـ periwinkle أنها عائل غير مناسب، فقد كانت النباتات الأخرى -مثل: الكرفس، *Nicotiana tabacum* (التبغ) cv. Samsun، *Nicotiana glutinosa*، والطماطم، أو faba bean -أفضل بكثير مصدراً من مصادر الـ DNA (٧، ٨، ١٠، ١١). إن الـ *N. tabacum* cv. Samsun والـ *N. glutinosa* لا يدعمان تركيز الفيتوبلازما العالي فقط، بل قد أثبتا -أيضاً- ملاءمتها لتحضير اللحاء (٨، ١٠). ولا يوجد هناك أي تقارير تُفيد نجاح فصل كروموسومات الفيتوبلازما بأطوالها الكاملة بواسطة تقنية الـ PFGE

من لحاء النباتات الخشبية، مثل: استخلاص كروموسومات *Candidatus Phytoplasma mali* من جذور لحاء أشجار التفاح؛ فقد أثبت أنها ليست مرضية (١٧).

إن طريقة الـ PFGE المشروحة في هذا الفصل تقوم على أساس ثلاث خطوات رئيسية:

عنوان فرعي ٣,١: فصل DNA الفيتوبلازما من النباتات العشبية المصابة بالفيتوبلازما بتركيز عالٍ باستخدام عملية تخصيب الفيتوبلازما.

عنوان فرعي ٣,٢: وضع كروموسومات الفيتوبلازما في كتل الآجروز.

عنوان فرعي ٣,٣: فصل كروموسومات الفيتوبلازما بأكملها من حمض النبات النووي العائل الملوث بالفصل الكهربائي.

وللتأكد من هوية الأنماط المفككة، قد يتم إجراء خطوة إضافية (العنوان الفرعي ٣-٤)؛ تتضمن طريقة تهجين (Southern blot hybridization) بجزء DNA ريبوزوم مجسماً. وإن الطريقة المشروحة لا تعتمد استخدام أشعة (γ-irradiation) لجعل كروموسومات الفيتوبلازما خطية قبل الفصل الكهربائي.

٢- المواد:

نستخدم ماءً مُعقماً منزوع الأيونات لتحضير كافة التفاعلات.

١-٢: فصل الـ DNA الكروموسومي:

١. نباتات عشبية مصابة بالفيتوبلازما بتركيز عالٍ.
٢. محلول مُنظم لطحن الفيتوبلازما: 125 mM من فوسفات البوتاسيوم، وسكاروز ١٠٪، وألبومين (bovine serum albumin) ٠,١٥٪، وبولي فاينيل بيرليدون (polyvinylpyrrolidone) ٢٪، 30 mM من حمض الاسكوربيك، ودرجة حموضة 7.6 pH. ولتحضير ١ لتر من هذا المحلول المُنظم، يتم إذابة ٢١,٧ جم من K_2HPO_4 ، و $3H_2O$ (أو ١٦,٧ جم من K_2HPO_4)، و ٤,١ جم من KH_2PO_4 ، و ١٠٠ جم من السكاروز، و ١,٥ جم من جزيء ألبومين، و ٢٠ جم من بولي فاينيل بيرليدون (PVP-40)، و ٥,٣ جم من حمض الأسكوربيك في ١ لتر ماء، ويُضاف حمض الأسكوربيك قبل الاستخدام. وبعد إضافة حمض الأسكوربيك تُضبط pH على ٧,٦ بواحد 1 M من NaOH، ويمكن تخزين المحلول المُنظم المخزن بدون حمض الأسكوربيك في درجة حرارة 4°C مئوية، أو 20°C-.
٣. محلول منظم سكاروز- Tris (TS): 20 mM من Tris-HCl، وسكاروز ١٠٪، 50 mM من EDTA، و 8 pH.
٤. طرد مركزي بارد.

٥. أنابيب جهاز طرد مركزي ٥٠ مل.
٦. قماش قطني.
٧. هاون، ومدق.
٨. وعاء ثلج.

٢-٢: تحضير كتل الـ PFGE:

١. محلول منظم $2 \times$ TES: 0.2M من Tris-HCl، و 0.2 M من NaCl، و 20mM من EDTA، و pH 8.
٢. محلول منظم التحلل: 0.5 M من EDTA، ودودييسيل كبريتات صوديوم (SDS) ١٪، و pH 8.
٣. محلول بروتيناز K: ٢٠ مليجرام / مل في ماء.
٤. محلول منظم التخزين: 0.5 M من EDTA، و 1% N-lauroylsarcosine، و pH 8.
٥. آجاروز مُعتمد لتحضير كتل الـ DNA قبل الـ PFGE (مثل: InCert agarose، FMC Bioproducts): ١٪ في المحلول المنظم $2 \times$ TES.
٦. قوالب بلاستيكية لصب الجل الـ PFGE بلاصقة بلاستيكية لنزع الكتل من القوالب: ويمكن شراؤها من شركات تصنيع أجهزة الـ PFGE (انظر: الملاحظة ١).
٧. قنينات زجاجية بغطاء.
٨. حمامات مائية.

٣-٢: الفصل الكهربائي بالجل في حقل متغير:

١. محلول منظم TE: 10 mM من Tris-HCl، و 1mM من EDTA، و pH 8.
٢. آجاروز لتحضير جل الـ PFGE (مثل: SeaPlaque GTG agarose، FMC Bioproducts): ١٪ في محلول منظم $0.5 \times$ TBE.
٣. محلول منظم الفصل الكهربائي EDTA Tris-borate $5 \times$ (TBE): 450mM من Tris base، و 450mM من حمض البوريك، و 10 mM من EDTA، و pH 8.
٤. جهاز PFEG، مثل: نظام CHEF-DR III Variable Angle، أو نظام CHEF Mapper (Bio-Rad Laboratories) XA. إن هذه الأنظمة مُجهزة بحجارات فصل كهربائي متشابهة -بشكل أساسي-، وأنظمة تبريد ومضخات بسرعات متباينة، وأمشطة، وحوامل صب، وغيرها.
٥. علامات (markers) حجم الـ DNA: كروموسومات *Hansenula wingei* (Bio-Rad Laboratories)، وكروموسومات *Saccharomyces cerevisiae* (Bio-Rad Laboratories or Pharmacia Biotech)، وسلم DNA متسلسل لبكتريا Lambda (Bio-Rad Laboratories).
٦. محلول بروميد أيثيديوم (EtBr) مخزن: ١٠ مليجرام / مل في ماء.
٧. صندوق ضوء الأشعة فوق البنفسجية: مُجهز بكاميرا، أو بنظام التقاط الصور.

٣-١: فصل الـ DNA الكروموسومي:

١. يتم اختيار ٥,٠g تقريباً من: عروق وسط الورقة، وبراعم سليمة بأوراقها، وأطراف براعم، ونسيج جذعي قشري يحتوي على اللحاء، أو تحضير لحاء جذعي من النباتات العشبية المصابة؛ والتي تظهر عليها أعراض الفيتوبلازما بتركيز عال (انظر: الملاحظة ٢). وبالنسبة للنباتات التي تُناسب تحضيرات اللحاء، فيتم تحضير اللحاء بتقشير شريحة عرضها يتراوح من 2-3 mm من نسيج الجذع القشري، وتُزال الطبقة الناعمة من اللحاء الوعائي بمشرط.
٢. تُقطع العينات إلى قطع صغيرة بمقص، وتُحضر لمدة 10 min في محلول منظم طحن الفيتوبلازما البارد، وتُوضع بمدق الهاون في الثلج.
٣. تُطحن جيداً بمدق بارد (انظر: الملاحظة ٣) ويُضاف ٦٠ مل من محلول منظم جديد آخر، وتُكرر عملية الطحن إلى إن يتفتت النسيج تماماً.
٤. يُنقل النسيج المتجانس إلى أنبوتين باردتين ٥٠ مل طرداً مركزياً، وتظل الأنابيب بالثلج إلى أن يتم طحن العينات تماماً.
٥. توضع الأنابيب في حامل دوار بارد، وتُطرد مركزياً بسرعة ١٥٠٠ لفة لمدة 5 min على درجة حرارة 4°C، ويُنقل الطايف بحرص إلى أنابيب نظيفة وباردة ٥٠ مل طرداً مركزياً، مع تصفيته بطبقات عديدة من قماش.
٦. يطرد الطايف مركزياً بسرعة ١٨٠٠٠ لفة، على درجة حرارة 4°C لمدة 25 min، ويتم صرف الطايف بحرص، وتُجفف الأنابيب جيداً.
٧. يُعاد ترسيب الكرات الصغيرة برفق في ١٠ مل من محلول منظم TS بارد (انظر: الملاحظة ٤)، وتُجمع المعلقات معا في أنبوب طرد مركزي واحد سعته ٥٠ مل، ويُضاف محلول منظم TS إضافي إلى أن تصل الكمية كلها بالقرب من سطح أنبوب الطرد المركزي.
٨. يُكرر الطرد المركزي بسرعة ١٥٠٠ لفة لمدة 5 min على درجة حرارة 4°C، ويُنقل الطايف إلى أنبوب طرد مركزي ٥٠ مل نظيف، ويُطرد مركزياً بسرعة ١٨٠٠ لفة لمدة 25 min، على درجة حرارة 4°C، ويُصرف الطايف ويُجفف الأنبوب سريعاً، ثم يُوضع في الثلج. ويجب ملاحظة أن حبيبات الفيتوبلازما المخضبة يُغطيها فيلم من محلول منظم TS.
٩. يُضاف ٥٠ ميكروليترا من المحلول المنظم TS، ويُعاد ترسيب حبيبات الفيتوبلازما المخضبة برفق لكن بشكل كامل (انظر: الملاحظة ٥). وتُنقل المحتويات إلى أنبوب طرد مركزي بارد حجمه ١,٥ مل، ويُترك الأنبوب على الثلج إلى أن يتم تحضير كتل الـ PFGE.

٣-٢: تحضير كتل الـ PFGE:

١. يُحضّر محلول يحتوي على آجاروز InCert 1% في محلول منظم TES $2\times$ ، ويُسخن إلى درجة حرارة 90°C تقريباً لإذابة الآجاروز، ثم يُنقل إلى حمام مائي، ويُحفظ في درجة حرارة 40°C .
٢. يتم تدفئة معلق الفيوتوبلازما المخصب إلى درجة حرارة 37°C لمدة دقيقة أو دقيقتين، وسريعاً تُضاف كمية مساوية من الآجاروز المذاب المحفوظ مسبقاً في درجة حرارة 40°C ، ويُخلطان جيداً باستخدام ملقط قطارة.
٣. توزع كميات الخلطة السابقة المقسمة بالتساوي سريعاً بين أوعية 50 ميكروليترا قالب بلوك بلاستيكي بارد، ويُترك القالب في الثلج لمدة 30 min؛ ليتسنى لها أن يجمد الآجاروز كلياً، ويكون حجم الكتل المستطيلة الناتجة $2 \times 4 \times 6 \text{ mm}$.
٤. تُنقل البلوكات التي تجمدت بحرص من القوالب (انظر: الملاحظة ٦) إلى ورق زجاجي يحتوي على محلول منظم التفكك مدفئ مسبقاً، ويتم استخدام كمية ٥٠٠ ميكروليتر من محلول منظم التفكك لكل ٥٠ ميكروليترا من البلوك.
٥. يُضاف محلول K بروتيناز (proteinase K) معد مؤخراً إلى محلول منظم التفكك إلى مل/2 مليجرام من التركيز النهائي ويُخلطان جيداً، ويُحضان على درجة حرارة 52°C لمدة ٣ أيام. ويُزال محلول منظم التفكك الذي يحتوي على K بروتيناز، ويُبدل بمحلول منظم تفكك طازج، ومحلول K بروتيناز مرتين في اليوم على الأقل، ويتم لف القنينة وتحريكها برفق من وقت لآخر حتى لا تلتصق البلوكات ببعضها. وإن ظلت البلوكات غير ظاهرة في المركز بعد مرور ثلاثة أيام من التحضين، تُحضان لمدة ٢٤ ساعة إضافية؛ بتغيير محلول منظم التفكك، ومحلول K بروتيناز (انظر: الملاحظة ٧)، وينبغي أن تظهر البلوكات المهضومة بوضوح.
٦. بمجرد وضوح البلوكات يُفرغ محلول منظم التفكك؛ والذي يحتوي على محلول K بروتيناز، ويُستبدل بمحلول التخزين. ويُحضان في درجة حرارة 52°C لمدة ساعة تقريباً لموازنة البلوكات بالمحلول المنظم. ويمكن الآن تخزين القارورة التي تحتوي على البلوكات في درجة حرارة 4°C ؛ حتى يكون هناك حاجة لها (انظر: الملاحظة ٨).

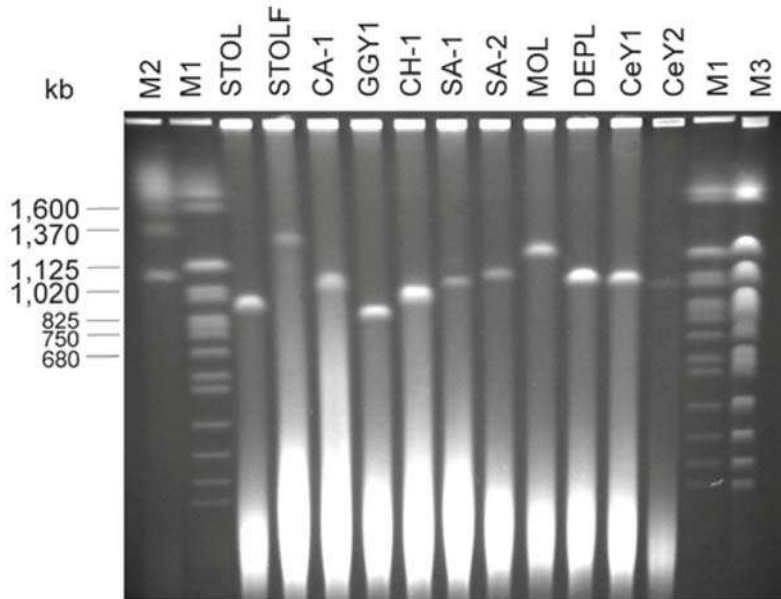
٣-٣: الفصل الكهربائي بالجل في حقل متغير:

١. قبل الفصل الكهربائي، تُغسل بلوكات الآجاروز ثلاث مرات بمحلول منظم TE، لمدة لا تقل عن 30 min لكل غسلة.
٢. يُحضّر محلول يحتوي على آجاروز SeaPlaque GTG 1% في محلول منظم TBE $0.5\times$ ، ويُسخن إلى درجة حرارة 90°C تقريباً لإذابة الآجاروز، ثم يُنقل إلى حمام مائي، ويُحفظ في درجة حرارة 40°C .

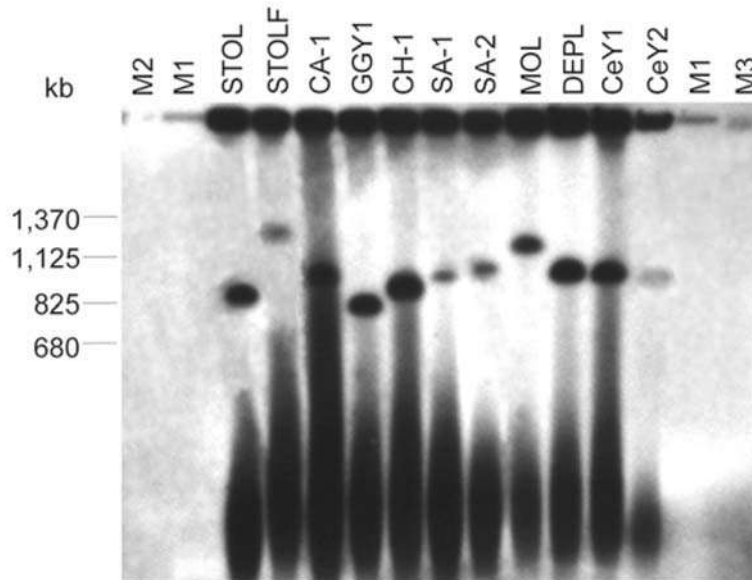
٣. تُثبت منصة صب جل الـ PFGE على سطح مستوٍ باتباع تعليمات الشركة المصنعة، وتُوضع بلوكات الآجاروز التي تحتوي على مُعلّقات حجم الـ DNA على المنصة التي يتم عليها صب الجل باستخدام معلقة بسط نظيفة، وتُضغط البلوكات برفق باتجاه كل سن من أسنان المشط، ويُصب محلول الآجاروز GTG SeaPlaque بسُمك 6-7 mm تقريباً، ويُسمح للجل بالتصلب في درجة حرارة الغرفة لمدة لا تقل عن 30 min، ويُزال المشط بحرص من الجل، وتظل البلوكات في مكانها عندما يتم إزالة المشط، وتُغلق الأوعية بإضافة الآجاروز المُذاب، ويُترك ليتصلب (انظر: الملاحظة ٩).
٤. يُزال الجل بالمنصة من على حامل الصب، ويتم وضعهم في حجرة الفصل الكهربائي الخاصة بجهاز PFGE، ويجب غمر الجل بأكمله في المحلول المنظم.
٥. يُشغل الجل وفقاً للطريقة التالي: درجة حرارة 14°C ، وجهد $6\text{V}/\text{cm}$ ، وبذبذبة 20-120 s، وزمن التشغيل ٢١ ساعة بزاوية 120° ، ومحلول منظم $0.5 \times \text{TBE}$.
٦. يُزال الجل بالمنصة من حجرة الفصل الكهربائي، ويُنقل الجل بحرص إلى طبق إعداد يحتوي على كمية كافية من ماء مقطر تسمح للجل بالتحرك دون قيد، ويُضاف محلول بروميد الأيثيديوم إلى ١ مليجرام / مل من التركيز النهائي، ويرج برفق لمدة ساعة واحدة.
٧. يتم إزالة الصبغة من الجل من خلال رجّه برفق في ماء مُقطر لمدة تتراوح ما بين 1-2 h مع تغيير الماء عدة مرات، ويُصور الجل تحت ضوء الأشعة فوق البنفسجية، ويتفكك كروموسوم الفيتوبلازما بطوله الكامل إلى خيوط متناثرة، كل خيط بذاته في الجل (شكل ١) (انظر: الملاحظة ١٠).

٣- ٤: طريقة Southern المهجنة:

١. إن كروموسومات الفيتوبلازما بكافة أطوالها التي تتفكك بطريقة الـ PFGE يتم نقلها من جل الآجاروز إلى غشاء نيلون بعد الطرق المعتادة (١٨). ولتسهيل النقل، يتم نزع البيورين من الـ DNA من خلال معالجة الجل مرتين في 0.2 M من HCl لمدة 10 min مع رجّه برفق. وبعدها، يُغسل سريعاً في ماء مقطر قبل تكملة خطوة الفصل والمعادلة (neutralization).
٢. يجري النقل في محلول منظم $10 \times \text{SSC}$ (١٨): بتقيطه لمدة لا تقل عن ١٢ ساعة، ويمكن ربط الـ DNA المنقول بالغشاء بواسطة اتصال الأشعة فوق البنفسجية المتقاطعة.
٣. يتم إجراء التهجين وفقاً لطريقة Hoheisel et al. (١٩): باستخدام مجس DNA ريبوزومي إشعاعي يضم منطقة جين 16S rRNA بأكملها، ومنطقة فراغ 16S/23S rDNA، ومنطقة 5' للجين الخاص بجين الفيتوبلازما 23S rRNA (٣، ١٠). ويتم توضيح مثال على طريقة Southern لتقيط جل الـ PFGE في شكل ٢ (انظر: الملاحظة ١١).



شكل (١): كروموسومات كاملة الطول للفيتوبلازما المنتمية إلى مجموعة stolbur or 16SrXII المعزولة بواسطة الفصل الكهربائي للجل المتغير من اختبار نبات العائل (STOL *Catharanthus roseus* (periwinkle) (through DEPL)، والنباتات التي تم جمعها بشكل طبيعي من الكرفس (CeY2 و CeY1). وكان سلم الأحجام لـ DNA: M2 كروموسوم *Hansenula wingei* من شركة (Bio-Rad Laboratories)، وM1 كروموسوم *Saccharomyces cerevisiae* من شركة (Bio-Rad Laboratories)، وM3 كروموسوم *S. cerevisiae* من شركة (Pharmacia Biotech)، وDNA مهضوم غير واضح في الجزء السفلي من الخط المرئي.



شكل (٢): Southern blot hybridization لكروموسوم الفيتوبلازما من (شكل ١)، باستخدام مجس DNA ريبوزومي إشعاعي يضم منطقة جين 16S rRNA بأكملها، ومنطقة فراغ 16S/23S rDNA، ومنطقة 5' للجين الخاص بجين الفيتوبلازما 23S rRNA.

٤- الملاحظات:

١. إن قوالب البلوك يمكن صناعتها -أيضاً- في المعمل؛ فأى حاوية بلاستيكية - أو زجاجية- يمكن صب الآجاروز المذاب بها يمكن استخدامها قالب بلوك.
٢. يتم الحصول على أفضل النتائج؛ عندما تظهر أعراض المرض بأكملها على النباتات؛ ولكن دون ظهور علامات تدهور. وقد اتضح أن زهور الـ Periwinkle -بدلاً العروق التي تتوسط الورقة- أفضل مصدر للفيتوبلازما لفصل كروموسومات *Candidatus Phytoplasma australiense* (١٥).
٣. إن إضافة كمية صغيرة من حبات الزجاج أو الرمل تسهل عملية الطحن.
٤. يمكن تحقيق ذلك الأمر، باستخدام جهاز منسق للتجانس قطارة نقل بلاستيكية.
٥. لتقليل الأضرار التي قد تلحق بكروموسومات الفيتوبلازما من القص الآلي، يمكن استخدام ملاقيط مرفقة بقطارة ثقبها واسع، أو ملاقيط حادة. ويجب أيضاً تجنب التقطير لأعلى ولأسفل عند إذابة الحبيبة، ولا تخلط بقوة. ويمكن فتح الكتل باستخدام قطارة نقل بلاستيكية جهازاً خالطاً.
٦. يأتي مع قوالب البلوك البلاستيكية التي تم شراؤها من الأسواق التجارية شريط لاصق صغير من البلاستيك؛ مُصمم لدفع البلوكات إلى الخارج القوالب، مع أن معلقة صغيرة تفي بالغرض.
٧. يُقترح غلق القوارير الزجاجية ببارافيلم لمنع التبخر.
٨. يمكن تخزين البلوكات لأشهر عديدة -وحتى لسنوات- في محلول منظم عند درجة حرارة 4°C ، في قارورة زجاجية مغلقة ببارافيلم.
٩. بدلا من ذلك، يمكن تحميل العينات عن طريق إدخال بلوكات في الأوعية بعد إزالة المشط، ثم تغلق الأوعية التي تحتوي على بلوكات مع آجاروز مذاب. ولتسهيل عملية التحميل، يجب أن يكون حجم الأوعية أكبر بقليل من البلوكات.
١٠. يتم الحصول على أنماط كروموسوم الفيتوبلازما بأطوالها الكاملة دون استخدام إشعاع (γ -irradiation) الافتراضي؛ من خلال استخدام الجزيء الفيزيائي أو نشاط الإنزيمات الداخلي أو كليهما؛ أثناء تحضير العينة للحصول على كروموسومات خطية. وعلى عكس استنتاج Kirkpatrick و Neimark (٢)، أظهرت الدراسات الحديثة أن تعريض بلوكات الآجاروز لإشعاع (γ -irradiation) لم يُحسن من حصيلة الكروموسومات الخطية، ولكنه زاد من خلفية الـ DNA غير الواضحة في الجِل (٣، ٨، ٩). أيضاً، تم الإبلاغ مؤخراً عن حدوث كروموسومات فيتوبلازما خطية (١٦).
١١. أظهرت الدراسات السابقة: أنه بالنسبة لبعض عازلات الفيتوبلازما، لوحظ وجود أكثر من نمط واحد في جِل الـ PFGE. وأبسط تفسير لحدوث أنماط ربط متعددة، هو أن النباتات التي تم تحضير العينات منها مصابة بفيتوبلازما مميزة تحتوي على كروموسومات مختلفة الحجم (٢،

(Southern blot وفي هذه الحالة، قد تساعد طريقة Southern على التتقيط التهجينى (Southern blot hybridization)؛ باستخدام مجس فيتوبلازما ملائمة على توضيح طبيعة الأنماط الإضافية.

المراجع:

1. Nassonova ES (2008) Pulsed field gel electrophoresis: theory, instruments and application. *Cell Tissue Biol* 2:557–565
2. Neimark H, Kirkpatrick BC (1993) Isolation and characterization of full-length chromosomes from non-culturable plant-pathogenic Mycoplasma - like organisms. *Mol Microbiol* 7:21–28
3. Marcone C et al (1999) Chromosome sizes of phytoplasmas composing major phylogenetic groups and subgroups. *Phytopathology* 89: 805–810
4. Marcone C et al (2001) Updating and extending genetic characterization and classification of phytoplasmas from wild and cultivated plants in southern Italy. *J Plant Pathol* 83: 133–138
5. Griffiths HM et al (1999) The phytoplasma associated with ash yellows and lilac witches' broom: 'Candidatus Phytoplasma fraxini'. *Int J Syst Bacteriol* 49:1605–1614
6. Seemüller E, Schneider B (2007) Differences in virulence and genomic features of strains of 'Candidatus Phytoplasma mali', the apple proliferation agent. *Phytopathology* 97: 964–970
7. Firrao G, Smart CD, Kirkpatrick BC (1996) Physical map of the Western X-disease phytoplasma chromosome. *J Bacteriol* 178: 3985–3988
8. Lauer U, Seemüller E (2000) Physical map of the chromosome of the apple proliferation phytoplasma. *J Bacteriol* 182:1415–1418
9. Padovan AC et al (2000) Chromosome mapping of the sweet potato little leaf phytoplasma reveals genome heterogeneity within the phytoplasmas. *Microbiology* 146:893–902
10. Marcone C, Seemüller E (2001) A chromosome map of the European stone fruit yellows phytoplasma. *Microbiology* 147:1213–1221
11. Malembic-Maher S et al (2008) A chromosome map of the Flavescence dorée phytoplasma. *Microbiology* 154:1454–1463
12. Liefting LW, Kirkpatrick BC (2003) Cosmid cloning and sample sequencing of the genome of the uncultivable mollicute, Western X-disease phytoplasma, using DNA purified by pulsed field gel electrophoresis. *FEMS Microbiol Lett* 221:203–211
13. Oshima K et al (2004) Reductive evolution suggested from the complete genome sequence of a plant-pathogenic phytoplasma. *Nat Genet* 36:27–29
14. Bai X et al (2006) Living with genome instability: the adaptation of phytoplasmas to diverse environments of their insect and plant hosts. *J Bacteriol* 188:3682–3696
15. Tran-Nguyen LTT et al (2008) Comparative genome analysis of "Candidatus Phytoplasma australiense" (subgroup tuf -Australia I; rp -A) and "Ca . Phytoplasma asteris" strains OY-M and AY-WB. *J Bacteriol* 190:3979–3991

16. Kube M et al (2008) The linear chromosome of the plant-pathogenic mycoplasma ‘*Candidatus Phytoplasma mali*’. *BMC Genomics* 9:306
17. Lauer U, Seemüller E (1998) Physical map of the apple proliferation phytoplasma genome. 12th International Organisation of Mycoplasma Conference, 22–28 July, 1998, Sydney, Australia, p 155–156
18. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
19. Hoheisel JD et al (1991) Use of high coverage reference libraries of *Drosophila melanogaster* for relational data analysis. A step towards mapping and sequencing of the genome. *J Mol Biol* 220:903–914

رسم خريطة الكروموسومات للفيتوبلازما

Sylvie Malembic-Maher and Patricia Carle

الملخص:

يمكن أن تكون الخارطة الفيزيائية والوراثية لكروموسوم الفيتوبلازما أداة مفيدة في مشروع تسلسل الجينوم، وربما هي في هذا الجانب أفضل من عمل تنبؤ باستخدام الأدوات كالحواسيب لرسم الخارطة. ويتكون رسم الخرائط من أربع خطوات مختلفة، أولها: تحضير كروموسومات الفيتوبلازما من النباتات المصابة. وثانيها: هضم الكروموسومات المفردة والمزدوجة مع الإنزيمات، خاصة ذات قطع نادرة. وثالثها: فصل أنماط الـ DNA الكبيرة بواسطة الفصل الكهربائي بالجل الحقلي. والأخيرة: عملية التهجين باستخدام معلمات وراثية متنوعة، وسوف يتم وصف المواد والطرق اللازمة لكل خطوة. كذلك، يتم توضيح هذه التقنية باستخدام خريطة الجينوم لفيتوبلازما *Flavescence dorée* على سبيل المثال.

الكلمات المفتاحية: فيتوبلازما *Flavescence dorée*، الخريطة الوراثية، الرخويات، الخريطة الفيزيائية، رحلان الجل الكهربائي النبضي، الإنزيمات الهاضمة، اختبار Southern.

١- المقدمة:

ساهم تحليل جينومات الفيتوبلازما ومقارنته في إحراز تقدم مهم في معرفة بيولوجيا الفيتوبلازما النباتية؛ فعلى سبيل المثال: تحديد المحددات الجزيئية للأمراض النباتية (انظر: المرجع (١، ٢) للمراجعات). وأثناء مشروع تسلسل الجينوم، يمكن أن يكون رسم الخرائط الفيزيائية والجينية لكروموسوم الفيتوبلازما مفيداً من أجل مقارنة أقسام الجينوم المتوقعة وتوجيهها في الحواسيب. وقد تم تحديد الخرائط الفيزيائية والجينية لكروموسومات فيتوبلازما *Ca. Phytoplasma pruni* (٣)، وفيتوبلازما البطاطا الحلوة ذات الأوراق النباتية الصغيرة (4) *Ca. flavescence dorée* (5) *Ca. Phytoplasma prunorum* (6)، وفيتوبلازما (FD) (٧). وتتقاسم الطرق المستخدمة في هذه الدراسات في أوجه التشابه التي يمكن تقسيمها إلى أربع مراحل مختلفة: (١) إثراء كروموسومات الفيتوبلازما من المواد النباتية المصابة وإدراجها في

الآجاروز (٤). (٢) هضم الحمض النووي الفردي والمزدوج في الكتل بواسطة الإنزيمات نادرة القطع (٨). (٣) الفصل الكبير لجزيئات الحمض النووي بواسطة الكهربيائي الحقلي الهوائي (PFGE) (٩)، (١٠). (٤) اختبار (Southern blotting) يليه التهجين باستخدام الملعلمات الوراثة المختارة (١١). وقد تم تطوير تقنيات أخرى -تسمى الخرائط البصرية (١٢)- لرسم خرائط الكروموسومات البكتيرية (١٣). وهذا الاختبار يتجنب خطوة PFGE، وتحتاج فقط إلى كميات قليلة من DNA، وتحافظ على ترتيب أنماط الحمض النووي. ومع ذلك، فإن التخطيط البصري غير مناسب للاستخدام على الفيتوبلازما غير المنزرعة في البيئة بسبب الحاجة إلى كروموسومات عالية النقاء. وفي هذا الفصل، سوف نتحدث عن المواد والأساليب التفصيلية للخطوات الأربعة التي أجريناها؛ من أجل الحصول على خريطة فيزيائية وراثية لجينوم الكروموسومات فيتوبلازما *flavescence dorée* (٧).

٢- المواد:

١-٢: تحضير الكروموسومات:

- يجب تحضير كافة المحاليل في ماء عالي النقاوة، ومفلتر بفلتر 0.45 um، ويحفظ معقماً على درجة حرارة مئوية 4°C:
١. 0.5M Na₂HPO₄.
 ٢. 0.3M Na₂HPO₄.
 ٣. 1M من Tris-HCl، ودرجة حموضة 8.0 pH.
 ٤. 1M من NaCl.
 ٥. ٢٠٪ (w/v) polyvinylpyrrolidone (PVP) (MW 40)، مذابة على درجة 55°C.
 ٦. 0.5M EDTA، ودرجة حموضة 8.0 pH.
 ٧. ٥٪ w/v Bovine serum albumin (BSA).
 ٨. ١٠٪ (w/v) N-lauroylsarcosine.
 ٩. محلول منظم للعزل: 0.03 M NaH₂PO₄، 0.1M Na₂HPO₄، 10% (w/v) sucrose، 2% (w/v) . with 0.15% (w/v) BSA and 1mM iso -ascorbic acid، pH 7.6، 10mM EDTA، PVP.
 ١٠. محلول معلق أو TSE: 20 mM Tris-HCl، 10 % (w/v) sucrose، 50 mM EDTA، pH 8.0.
 ١١. محلول 2 × TES: 0.2 M Tris-HCl، 0.2 M NaCl، 20 mM EDTA، pH 8.0.
 ١٢. محلول محلل (Lysis): 0.5 M EDTA، (w/v) N -lauroylsarcosine، pH 8.0، 1 mg/mL، ١٪ proteinase K.
 ١٣. آجاروز نصف ذائب (مثل: ١ من Bio-Rad).

١٤. جهاز طحن من شركة (BIOREBA AG)، مع أكياس (polyethylene) مقاس 12×12 cm، مع بلاستيك داخل الكيس نوع C010.
١٥. أنابيب 30 مل نوع Cored® II.
١٦. جهاز طرد مركزي عالي السرعة (Avanti® J-E with JA20 rotor).
١٧. شاش معقم.
١٨. زجاج دقيق معقم.
١٩. آجاروز خاص 100 ميكروليتر من شركة (Bio-Rad).

٢-٢: إنزيمات الهضم:

- يجب تحضير كافة المحاليل في ماء عالي النقاوة، ومفلتر بفلتر 0.45 ميكرومل، ويحفظ معقماً على درجة حرارة مئوية ٤،
١. 0.1M phenylmethanesulphonyl fluoride (PMSF) في أيزوبروبانول، يخزن على درجة حرارة -20°C .
 ٢. 10 M dithiothreitol (DTT)، ويخزن على درجة حرارة -20°C .
 ٣. 1 M spermidine، ويخزن على درجة حرارة -20°C .
 ٤. ١٠ مل \ مليجرام BSA، ويخزن على درجة حرارة -20°C .
 ٥. محلول x١ TE : 10 mM Tris-HCl (pH 8.0) : 1 mM EDTA (pH 8.0).
 ٦. محلول الهضم: 4 mM DTT، 0.1 مل \ مليجرام BSA، 4 mM spermidine، و١٠ مل محلول خاص إنزيمات الهضم يتوفر من قبل الشركة، ويخزن على درجة حرارة -20°C .
 ٧. 0.5 mM EDTA، pH 8.0.
 ٨. إنزيمات القطع النادرة مثل: *I-Ceu I*، *Eag I*، *Bss HII*، *Apa I*، *Pvu II*، *Mlu I*، *Kpn I*، *Xho I*، *Sma I*، *Sal I* . مع المحاليل الخاصة بها بتركيز $10\times$.
 ٩. ملاعق صغيرة.
 ١٠. أمواس للقطع معقمة.

٣-٢: الفصل الكهربائي الحقلي:

١. محلول x١٠ TBE (Bio-Rad).
٢. آجاروز خاص للجل الحقلي (Bio-Rad).
٣. كروموسومات الخمائر PFG (*Saccharomyces cerevisiae* YPH80)، وسلم ذو حجم منخفض للـ PFG (New ، mixture of lambda DNA- Hin dIII fragments and concatemers) (England Biolabs).

٤. CHEF-DR[®] III خاص للرحلان الكهربائي الحقلي؛ من نظام تبريد ومضخة يمكن التحكم بها (Bio-Rad).
٥. حوض خاص للجل بمقاسات (14 × 13 cm من شركة Bio-Rad).
٦. ١٥ حفرة بالمشط المستخدم بمقاس 14 cm عرض، وسماكة 1.5 mm، ويمكن التحكم بالارتفاع (Bio-Rad).
٧. برنامج باسم Quantity One[®] (Bio-Rad).
٨. أمواس للقطع معقمة.
٩. ملاعق صغيرة.
١٠. محلول إيثيم بروميد، مل / ٢ ميكروجرام.
١١. جهاز الأشعة فوق البنفسجية مع كاميرا تصوير.

٢-٤: التهجين و Southern Blot:

يتم تحضير جميع المحاليل مع ماء مقطر، ويعقم بالأوتوكلاف، ويخزن على حرارة الغرفة.

٢-٤-١: نقل DNA إلى الحامل:

١. محلول العزل: 0.25 M HCl.
٢. محلول منظم فصل: 0.5 M NaOH ، 1.5 M NaCl.
٣. محلول منظم محايد: 1 M Tris-HCl ، 1.5 M NaCl ، pH 7.6.
٤. محلول النقل 10 × SSC : 1.5 M NaCl ، 0.15 M ثلاثي صوديوم الستريت.
٥. غشاء نيلون N⁺ (Schleicher and Schuell ، Nytran[®] Super Charge)
٦. حامل بلاستيك أو زجاجي.
٧. طبقان زجاجيان.
٨. هزاز مسطح.
٩. لفه بلاستيكية.
١٠. أوراق ترشيح من نوع 3MM.
١١. ورق جاف للمسح.
١٢. مسافة.
١٣. فرن درجة حرارته 80°C.

٢-٤-٢: تحميل المجس:

١. DNA 100 ng\ul من فيتوبلازما نبات مصاب، ومخزنة على حرارة 20°C-.

٢. ١٠٠ ميكرومل بادئات للـ PCR، ومخزنة على حرارة 20°C .
٣. 25 mM MgCl_2 ، ومخزنة على حرارة 20°C .
٤. 5 mM dNTPs ، ومخزنة على حرارة 20°C .
٥. $5\text{ Taq DNA polymerase units}\mu\text{L}$ ، ومخزنة على حرارة 20°C .
٦. $1\text{ mM Digoxigenin-dUTP}$ (Roche، DIG-11-dUTP alkali-labile)، ومخزنة على حرارة 20°C .
٧. ماء معقم مقطر.
٨. أنابيب للطرد المركزي (بحجم ٥ مل).
٩. جهاز PCR الحراري (Thermal cycler).

٢-٤-٣: التهجين:

١. تتم تنقية مجس المعلم لـ DNA مع DIG-11-dUTP، alkali-labile، بواسطة التضخيم بالـ PCR، ويخزن على حرارة 20°C .
٢. DNA للحيوانات المنوية لسماك السلمون (Salmon sperm)، و 10 مل مليجرام، ومخزنة على حرارة 20°C .
٣. محلول $20 \times \text{SSC}$: 3 M NaCl ، 0.3 M ثلاثي صوديوم الستريت.
٤. محلول Sodium dodecyl sulphate (SDS)، 10% (w/v) في ماء مقطر، ويخزن على درجة حرارة الغرفة؛ لأن SDS يترسب على درجة الحرارة 4°C .
٥. محلول المنظم للتهجين: $5 \times \text{SSC}$ ، 0.1% (w/v) *N-lauroylsarcosine*، 0.2% (v/v) SDS، و 50% formamide، و 2% (w/v) من المادة الماسكة (Roche)، ويخزن على درجة حرارة الغرفة.
٦. أكياس بلاستيكية قابلة للغلق.
٧. سداة أكياس.
٨. حمام مائي يصل عند درجة حرارة 100°C كذلك 50°C .
٩. حضان على درجة الحرارة 37°C .

٢-٤-٤: تكشف التوهج الكيميائي:

١. محلول حامض المالك (Maleic acid): 0.1 M حمض ماليك، و 0.15 M NaCl ، و $\text{pH } 7.5$.
٢. محلول غسيل: 0.1 M حمض المالك، و 0.15 M NaCl ، و $\text{pH } 7.5$ ، و 0.3% (v/v) Tween 20.
٣. محلول الكشف: 0.1 M Tris-HCl ، و 0.1 M NaCl ، و $\text{pH } 9.5$.

٤. محلول الماسك × 10 : مادة الماسك ١٠% (w/v) في محلول حمض الماليك، ويتم تقليبه باستمرار على درجة الحرارة 65 مئوية، ويخزن على حرارة 20°C ، ويتم تخفيف محلول الماسك بمحلول حامض الماليك.
٥. قطع معلمات من Antidigoxigenin-AP Fab، مع alkaline phosphatase من (Roche)، مخففة في محلول الماسك بنسبة 1:10 antidigoxigenin-AP، 000.
٦. CDP-Star[®] substrate من (Roche): يتم تحضير المحلول CDP-Star[®] بتخفيفه بتركيز 1:100 مع محلول الكشف.
٧. حامل بلاستيكي أو زجاجي.
٨. زجاج مسطح.
٩. حضان على حرارة 37°C .
١٠. فيلم للتصوير الإشعاعي (X-ray): من نوع (GE Healthcare، Amersham Hyperfi Im ECL).
١١. إطار للفيلم (Kodak) X-ray.
١٢. تحميض للفيلم (Sigma-Aldrich، Kodak GBX).
١٣. مثبت للفيلم (Sigma-Aldrich، Kodak GBX).

٣- طرق العمل:

٣-١: تحضير الكرموسومات:

١. جميع الخطوات يجب أن تتم على درجة حرارة 4 مئوية.
٢. يتم جمع المنطقة العليا من 15-20 cm من النباتات المصابة في العرق الوسطي، والسيقان، وأعناق الورقة.
٣. طحن ٢ جم من المواد الطازجة في محلول العازل ١٠ مل (انظر: الملاحظة ١).
٤. قم بعملية تجانس للمستخلص، مع طرد مركزي على سرعة ١٥٠٠ لفة لمدة ٥ دقائق، ثم يتم ترشيح الطاي في من خلال طبقات متعددة من القماش القطني لإزالة القطع الكبيرة من الورقة.
٥. يتم عمل طرد مركزي بسرعة ١٨٠٠ لفة لمدة 30 دقيقة. وبعد ذلك، يعاد تعليق المحتوى في ١٠ مل من TSE (انظر: الملاحظة ٢).
٦. كرر خطوات الطرد المركزي المنخفض والسريع، وخطوات الترشيح، وأعد تعليق الراسب ب TSE؛ من أجل الحصول على ٥٠ ميكروليترا من الفيتوبلازما (انظر الملاحظة ٣).
٧. قم بتسخين المعلق عند درجة حرارة 55°C ، مع مزجه برفق بأحجام متساوية شبه ذاتية من ٢% (w/v) من الأجاروز الحقلي المذاب في TES × 2 (حافظ عليه عند درجة حرارة 55°C).

٧. صب ١٠٠ ميكروليتر في قوالب بلاستيكية، وتجنب فقاعات الهواء، مع السماح للأجاروز بأن يتصلب لمدة 15 min في درجة حرارة 4°C.
٨. انقل كتل الجل في محلول التحلل (١ مل لكل كتلة)، ثم يحضن لمدة 60 h على درجة حرارة 50°C ٤ مرات يتم فيها تغيير المحلول، ثم لمدة 12 h في محلول التحلل بدون بروتيناز K، ويخزن في درجة حرارة 4°C في 0.5 M EDTA درجة الحموضة 8 pH، ويتم عمل جميع الإجراءات السابقة مع نباتات الشاهد السليمة.

٣-٢: إنزيمات الهضم:

يتم هضم المنتج، ويكون في الأجاروز الماسك المعد من النباتات المصابة مع النباتات سليمة شاهدا سلبيا، ونصف كتلة الأجاروز يوفر ما يكفي للرحلان الكهربائي.

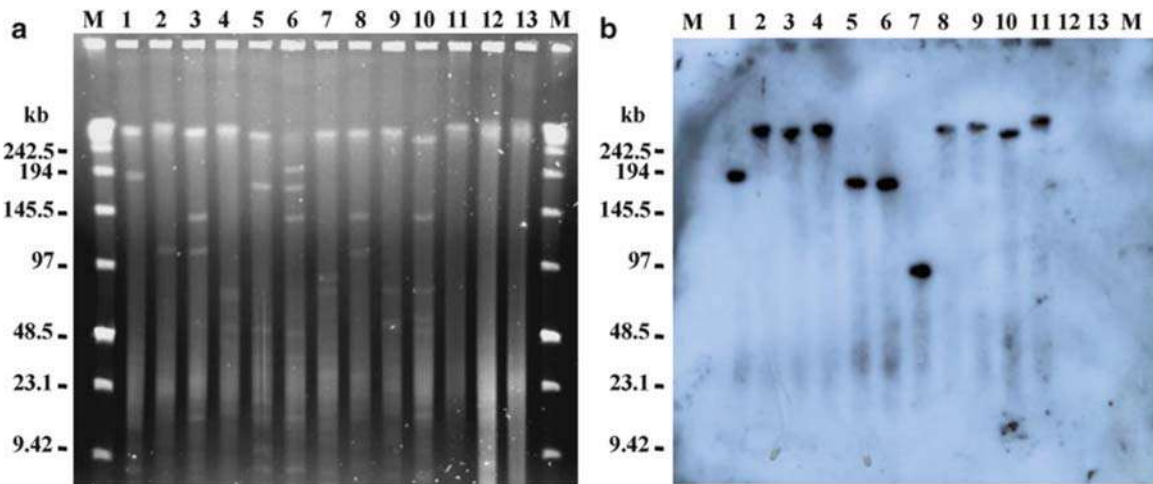
١. بعد الغسيل مرتين لمدة ساعتين بحجم ١٠ مرات من 1 × TE، تحضن الكتل ليلا على درجة حرارة 4°C بحجم ١٠ مرات من 1 × TE مع ١ مل من PMSF؛ من أجل تعطيل البروتيناز K، ثم يتم الغسيل مرة أخرى بحجم ١٠ من 1 × TE، وأربع مرات لمدة ساعتين عند درجة حرارة 4°C.
٢. يتم تحضين كل كتلة بشكل منفصل لمدة ١ ساعة عند 4°C بحجم ٥ مرات بمحلول الهضم، ثم نقلها إلى الحجم مرتين بمحلول الهضم بالإضافة إلى ٣٠ وحدة من الإنزيم، ويترك طوال الليل حسب درجة الحرارة الموصى بها من قبل الشركة المصنعة.
٣. بالنسبة للهضم المزدوج، قم بإلغاء نشاط الإنزيم الأول عن طريق تحضين الكتل لمدة ساعتين عند 4°C بحجم ١٠ مرات من 0.5 M EDTA pH 8.0، ثم الغسيل ثلاث مرات، وكرر عملية الهضم مع الإنزيم الثاني، وقم بإجراء الهضم الفردي والمزدوج بشكل منفصل.

٣-٣: الفصل الكهربائي الحقلي:

ويتم تنفيذ الـ PFGE باستخدام تقنية المجال الكهربائي المتجانس الثابت (CHEF) مع نظام CHEF-DR®-III (Bio-Rad).

١. يتم وضع 0.5 × TBE في غرفة باردة؛ من أجل تبريد المحلول بين درجة حرارة 10 و 15°C.
٢. إذابة ١٥٠ مل من ٠.٨% (w/v) من الأجاروز الخاص المعتمد في 0.5 × TBE في الميكروويف.
٣. صب حوالي ١٠٠ مل من محلول الأجاروز في الحوض الخاص مع المشط (انظر: الملاحظة ٤).
٤. دعه يتصلب لمدة 1 h، واطرك الأجاروز المتبقي على درجة حرارة 65°C.
٥. قم بإزالة المشط برفق، وأضف الأجاروز داخل الحفر باستخدام ملعقة صغيرة.
٦. ضع في الحفرة الأولى والأخيرة سلم معلم الأحجام، وتجنب تكون الفقاعات بين الجل والكتل.

٧. يتم ملء الحفر بالأجاروز الذائب.
٨. حرر الجل من القالب؛ عن طريق إزالة الإطار، واتركه على سطح اللوح الأسود السفلي، ثم يتم إزالة أي فائض من الأجاروز قد تكون تحت لوحة، وضعه في وسط إطار الحوض الكهربائي (انظر: الملاحظة ٥).
٩. املاً ببطء الحوض بـ 2.2 L من محلول الباردة $0.5 \times TBE$.
١٠. قم بتشغيل الطاقة، واضبط نظام التبريد على $14^{\circ}C$ ، وقم بتنشيط المضخة لتحرك المحلول. ويتم عمل الفصل الكهربائي على $6 V/cm$ ، بزاوية 120° لمدة 18 h، وتكون أوقات النبضية منحدرية: من ٧s إلى ١٣؛ وذلك للمدى المنخفض الحجم، من 2-40 s، و 2-60 s من أجل المتوسطة الحجم، ومن 5-90 s من أجل العالي الحجم (انظر: الملاحظة ٦).
١١. بعد الفصل الكهربائي، قم بتنظيف حوض الفصل الكهربائي بالماء منزوع الأيونات ثلاث مرات.
١٢. حضن الجل لمدة ١٥ دقيقة في محلول بروميد الأيثيديوم، ثم اغسله لمدة ساعة في الماء المقطر قبل التصوير تحت ضوء الأشعة فوق البنفسجية، ثم التقط صورة لكل جل مع وضع مسطرة بالاتجاه نفسه. ويوضح الشكل a 1 مثلاً على PFGE؛ والذي تم إجراؤه على الكروموسومات في فيتوبلازما *flavescence dorée*.



شكل (١): (a) PFGE من DNA المحضر من فيتوبلازما *flavescence dorée* المصابة (خط من ١ إلى ١١) والنبات السليم الفاصوليا (خط ١٢، ١٣)، مفردة أو مزدوجة الهضم؛ بمختلف إنزيمات نادرة القطع. خط ١، *SalI*، 2؛ *MluI* + *EagI*، 3؛ *BssHII*، 4؛ *MluI*، 5؛ *BssHII* + *SalI*، 6؛ *EagI* + *SalI*، 7؛ *MluI* + *SalI*، 8؛ *EagI* + *BssHII*، 9؛ *MluI* + *BssHII*، 10؛ *MluI* + *EagI*، 11؛ غير المهضوم؛ *SalI*، 12؛ *BssHII*، 13؛ M، سلم PFG منخفضة المدى (kb). (b) تهجين بالبقع (Southern blot hybridization) من الجل نفسه؛ والذي تم اختياره باستخدام المجسات مع *uvrB-degV*.

٣-٤: التهجين و Southern Blot:

جميع الخطوات تمت على درجة حرارة الغرفة، وذلك على النحو التالي:

٣-٤-١: نقل DNA إلى الحامل:

١. ضع الجل في صينية على سطح الهزاز، ويجب تغطية الجل بالكامل بـ ١٠٠ مل تقريباً من المحاليل المتتالية؛ مع هزٍ لطيفٍ طوال الإجراءات المختلفة، وغسيل الجل في الماء منزوع الأيونات المعقم بين كل خطوة وأخرى.
٢. تتم الإزالة؛ عن طريق وضع الجل في الحضانة مرتين لمدة ١٠ دقيقة مع محلول الإزالة.
٣. عملية العزل تتم بواسطة محلول العزل مرتين لمدة ٢٠ دقيقة.
٤. يتم تنفيذ عملية المعادلة -لأول مرة- لمدة ٣٠ دقيقة، ثم لمدة ١٥ دقيقة.
٥. بعد المعادلة، يتم التخلص من المحلول السابق، ويغسل مع الجل في $10 \times SSC$.
٦. ضع الجل على قطعة من البلاستيك، وقم بقياس طول الجل وعرضه بدقة، ثم ارجع الجل مرة أخرى في $10 \times SSC$.
٧. اقطع قطعة واحدة من غشاء النايلون المفلتر N^+ حسب أبعاد الجل، وضع الغشاء في صينية ورطبه مع $10 \times SSC$ لمدة ١٠ دقيقة.
٨. قص ثلاث أوراق من ورق Whatman 3MM إلى قطع حسب أبعاد الجل.
٩. قم بتجهيز قطعة واحدة من ورقة Whatman 3 MM، بعرض حوالي 2 cm من الجل، وطول 30-40 cm.
١٠. ضع ٥٠٠ مل من $10 \times SSC$ في صينية كبيرة.
١١. ضع الطبق الزجاجي فوق الصينية، ثم ضع القطعة السابقة على الصفيحة؛ بحيث يكون كلا الطرفين معلقين في $10 \times SSC$ ، ثم بلل القطعة جيداً باستخدام $10 \times SSC$ ، وأزل فقاعات الهواء بين الفتيل واللوح الزجاجية.
١٢. ضع الجل فوق الفتيل، وقم بإزالة فقاعات الهواء بين الجل والورقة.
١٣. ضع الغشاء فوق الجل، مع إزالة جميع فقاعات الهواء، ثم لا تقم بتحريك نظام النقل (انظر: الملاحظة ٧).
١٤. تجنب فقاعات الهواء، ثم غط الغشاء بثلاث قطع من ورقة Whatman 3 mm (انظر: الملاحظة ٨).
١٥. ضع من 5-6 cm سماكة من المناشف الورقية الجافة أعلى ورقة Whatman 3 mm؛ من أجل الحفاظ على ضغط الهرم بالكامل وتسريع حركة المحلول، وضع صفيحة زجاجية في الأعلى، مع زيادة الوزن (~300g) في الأعلى.
١٦. اترك التجهيزات طوال الليل إلى اليوم التالي.

١٧. بعد اكتمال عملية النقل، يتم إزالة الهرم حتى بدون إزالة غشاء النايلون فوق الجل (انظر: الملاحظة ٩)، ثم أخرج الغشاء من الجل وجففه على قطعة جديدة من ورقة Whatman 3 mm، ثم ضعه بين قطعتين جافتين من ورقة Whatman 3 mm، وسخنه لمدة ساعتين عند درجة حرارة 80°C .

١٨. قم بتخزين الأغشية الملفوفة بالبلاستيك على درجة حرارة 4°C إلى أن تتم الحاجة له.

٣-٤-٢: تحميل المجس:

تتم إجراء عملية وضع العلامات على المجس باستخدام DIG DNA Labeling و Detection Kit (Roche)؛ حيث المجس معلم مع DIG-11-dUTP، alkali-labile بواسطة PCR التضخيم. ويتم إجراء ال PCR المتداخل من أجل الحصول على معلم فعال، مع إضافة (digoxigenin solely) فقط في ال PCR الثاني. وهنا سوف نصف فقط ال PCR الثاني:

١. قم بإعداد خليط تفاعل ٥٠ ميكروليترا في أنبوب بحجم ٠.٥ مل. يتكون المزيج من ١ ميكروليتر من 100 ng / ميكروليتر من DNA نبات مصاب بـ u؛ الفيتوبلازما مع ١ ميكرومل من كل بادئ PCR، و 2 mM من MgCl_2 ، و ٢٠٠ ميكرومل من dNTP، و ٢٠ ميكروملا من DIG-11-dUTP، و 0.04 unit / ميكروليتر من بوليميريز Taq وذلك الحجم النهائي ٥٠ ميكروليترا. يجب إجراء تفاعل دون DIG-11-dUTP عنصرَ شاهدٍ سلبيّ.
٢. تعتمد المجسات المستخدمة على PCR، وعلى حجم ومحتوى ال G + C في الجزء المتضخم. وفي حالته تلك، بعد ٥ دقائق من التسخين عند درجة حرارة 95°C ، نفذ على ٣٥ دورة باستخدام درجة الحرارة التالية: للفصل 94°C لمدة 30 s؛ وحرارة البادئات 52°C لمدة 30 s؛ ولتمديد البادئ 66°C لمدة 60 s. وفي النهاية، توقف الدورة، وتختتم 66°C لمدة ٥ دقائق.
٣. يتم تأكيد نجاح تضخيم الحمض النووي وإدراجه لـ DIG-11-dUTP عن طريق الفصل الكهربائي على الآجاروز، ويجب أن يكون حجم الجزء DIG-11-dUTP - متضخما بصورة أكبر من ذلك بدون DIG-11-dUTP.

٣-٤-٣: التهجين:

١. ضع الغشاء المسخن في كيس قابل للغلق، ثم يُقاس سطح الغشاء، ويُضاف ٦-١٠ مل من محلول التهجين (يعتمد على حجم الفلتر، ١ مل لكل 10 cm^2)، و ٢٠٠ مل \ ميكروجرام من الحيوانات المنوية للسلمون المغلي لمدة ٥ دقائق في الماء (انظر: الملاحظة ١٠).
٢. أغلق الكيس، وتجنب الفقاعات، ثم قم بإعداده للتهجين لمدة ساعة و ٣٠ دقيقة عند 37°C . وخلال ذلك، ضع محلول التهجين عند 37°C .
٣. في نهاية التهجين، قم بقطع زاويا الكيس من التخلص من المحلول.

٤. أضف مرة أخرى محلول التهجين (١ مل لكل 15 cm²).
٥. قم بالتخلص بمقدار مل/ ميكروجرام ٢٠٠ من DNA الحيوان المنوي للسلمون (في أنبوب واحد). وبعد ذلك، أضف حوالي 20 ng / ميكروليتر من المجس المنقي (ميكروليتر/ مل ١ من المحلول التهجين المستخدم في الخطوة ٢، في أنبوب ثاني)؛ بواسطة الغليان لمدة ٥ دقائق في الماء، ثم ضع الأنبوبين مباشرة في الثلج.
٦. يتم إضافة الحيوانات المنوية للسلمون، ومحلول المجسات المعلمة في كيس قابل للغلق، ثم انشر المحلول فوق الفلتر، وأغلق الكيس بدون فقاعات.
٧. يحضن المحلول على 37°C إلى اليوم التالي.
٨. في اليوم التالي، اغسل الفلتر في كيس من البلاستيك أربع مرات لمدة ١٥ دقيقة بـ ٢٠٠ مل من 2 × SSC + 0.5% SDS؛ على درجة حرارة الغرفة مع الاهتزاز.
٩. اغسل الفلتر في كيس من البلاستيك مرتين لمدة ٣٠ دقيقة بـ ٢٠٠ مل من 0.1 × SSC + 0.1% SDS؛ على 50°C مع الاهتزاز.

٣-٤-٤: تكشف التوهج الكيميائي:

- يتم تنفيذ جميع الإجراءات في درجة حرارة الغرفة مع اهتزاز لطيف:
١. في نهاية الغسيل، يوضع الفلتر في علبة، ويشطف لمدة ٢ دقيقتين، في ١٠٠ مل مع محلول الغسيل.
 ٢. يحتض الغشاء لمدة ٣٠ دقيقة، في ١٠٠ مل من محلول الماسك تركيز ١*.
 ٣. يحضن الغشاء لمدة ٣٠ دقيقة، في ٢٠ مل من antidigoxigenin AP (المخفف ١: ١٠٠٠٠٠).
 ٤. يغسل الغشاء مرتين لمدة ١٥ دقيقة في ١٠٠ مل من محلول الغسيل.
 ٥. يعادل الغشاء لمدة ٥ دقائق في ٢٠ مل من المحلول الكاشف.
 ٦. يوضع غشاء الفلتر مع جهة DNA للجهة العليا، في ملف التحميص أو حقيبة التهجين، ثم يضاف محلول من ١ مل - ٢ CDP-Stard[®] (راجع الملاحظة ١١)، وتتم تغطية الغشاء فوراً بالورقة الثانية من ملف توزيع المحلول بالتساوي، وبدون فقاعات هواء فوق الغشاء.
 ٧. يحضن الغشاء لمدة ٥ دقائق على 37°C.
 ٨. قم بالضغط على السائل الزائد باستخدام الورق الجاف، وقم بإغلاق حواف الملف التحميصي (انظر الملاحظة ١٢).
 ٩. بالنسبة للتصوير الإشعاعي، يعرض الغشاء للأشعة (X-ray) فيلم في الكاسيت في غرفة مظلمة، ضع الفيلم على الغشاء، ويمكن إجراء تعريض في أوقات متعددة (من بضع ثوان إلى ساعة واحدة)؛ لتحقيق قوة الإشعاع العالية والمطلوبة.

١٠. يتم تحميض الفيلم وإظهاره لمدة 30 s في المحلول التحميضي، ويغسل الفيلم لمدة ٢ دقيقتين بالماء، ثم يوضع لمدة 30 s ثانية في محلول مثبت. وفي النهاية، يتم شطف الفيلم بالماء لمدة 30 s، ثم يجفف بالهواء. ويوضح الشكل 1b مثالاً على تهجين (Southern blot)؛ حيث يتم إجراؤها باستخدام مسبار *degV* - *uvVB*، بعد PFGE من هضم الكروموسوم لفيتوبلازما *flavescence dorée*.

٣-٥: تحليل البيانات:

ويتم تقدير الوزن الجزيئي للأنماط المقطعة مقارنةً بالعلامات وسلم المناسبة باستخدام برنامج® Quantity One، ويتم حساب متوسط حجم كل جزء من ثلاثة PFGEs مختلفة على الأقل، ويجب أن يكون كل نمط عبارة عن DNA الفيتوبلازما؛ من خلال مقارنتها مع الحمض النووي لنباتات سليمة أعدت تحت الظروف نفسها، وبتهجين العلامات نفسها. كما يتم التعرف على الـ DNA غير المهضوم عن طريق الجل؛ من أجل تقدير حجم الكروموسوم، ويتم حساب مجموع أحجام الأنماط لكل عملية هضم ومقارنتها بحجم الكروموسوم. ويجب هنا الإشارة إلى أن بناء الخريطة الفيزيائية والجينية لكروموسوم الفيتوبلازما الممكنة، يتم عن طريق الجمع بين نتائج الهضم الفردي والمزدوج مع الإنزيمات المختلفة مع تهجين البقع الجنوبية (Southern blot hybridizations).

٤- الملاحظات:

١. واحدة نبات فاصولياء مصابة بـ *flavescence dorée*، تعطي حوالي 2 g من المواد، وهو ما يكفي لصنع كتلة من الآجاروز.
٢. يجب إجراء إعادة تعليق الكريات بعناية فائقة، مع خلطها بالماصات، أو يمكن استخدام ملعقة متناهية الصغر لسحق الخليط بلطف.
٣. ضع في الاعتبار، حجم الحبيبة بالنسبة للحجم النهائي قبل إعادة التعليق.
٤. تأكد من أن حامل الصب على سطح مستوٍ، وتخلص من الفقاعات التي يمكن حصرها تحت الصفيحة؛ بالضغط عليها بلطف ورفق.
٥. قم بعمل ربط بواسطة الآجاروز المنصهر بين الإطار والجل؛ من أجل تجنب أن يطفو الجل.
٦. فقط ابدأ بتشغيل الجهاز الكهربائي عندما تكون درجة الحرارة 14°C ، والتيار بين 110 و 150 mA، وعادةً تبعد الفقاعات في الأنابيب أثناء الفصل الكهربائي لضمان دوران جيد للمحلول.

٧. باستخدام قلم رصاص، تتبع الخط على الغشاء لتحديد الموضع السفلي لحضر الجل؛ لمعرفة الموضع الدقيق لها بعد التهجين.
٨. تأكد من أن أجزاء ورقة Whatman 3 mm لها أبعاد الغشاء نفسها.
٩. باستخدام المقص، قم بعمل قصة صغيرة على الفلتر الموجودة في الجزء العلوي الأيمن؛ لمعرفة التوجه الصحيح للجل والإشارة إليه.
١٠. يجب إضافة محلول التهجين إلى أسفل الكيس، ويتم ترطيب الفلتر عن طريق تحريك الكيس للخلف وللإمام؛ عبر حافة الكيس.
١١. كن حذراً؛ CDP-Star[®] وحساساً جداً للضوء.
١٢. كن حذراً؛ فلا تلمس الغشاء مطلقاً بأصابع اليد؛ لأنها سوف تضع علامات على الغشاء.

شكر وتقدير:

تم تمويل هذا البحث من قبل المعهد الوطني الفرنسي للبحوث الزراعية (French INRA National Institute of Agronomical Research)، ومجلس (Interprofessional Council of CIVB)، كما نشكر زملائنا في Pascal Salar وGéraldine Gourgues على إعداد طرق العمل لعزل كروموسوم الفييتوبلازما على PFGE.

المراجع:

1. Hogenhout SA, Šeruga MM (2010) Phytoplasma genomics, from sequencing to comparative and functional genomics—what have we learnt? In: Weintraub PG, Jones P (eds) Phytoplasmas: genomes, plant hosts and vectors. CABI Publishing, Oxfordshire, pp 19–36
2. Sugio A et al (2011) Diverse targets of phytoplasma effectors: from plant development to defense against insects. Annu Rev Phytopathol 49:175–195
3. Firrao G, Smart CD, Kirkpatrick BC (1996) Physical map of the Western X-disease phytoplasma chromosome. J Bacteriol 178:3985–3988
4. Padovan AC et al (2000) Chromosome mapping of the sweet potato little leaf phytoplasma reveals genome heterogeneity within the phytoplasmas. Microbiology 146:893–902
5. Lauer U, Seemüller E (2000) Physical map of the chromosome of the apple proliferation phytoplasma. J Bacteriol 182:1415–1418
6. Marcone C, Seemüller E (2001) A chromosome map of the European stone fruit yellows phytoplasma. Microbiology 147:1213–1221
1. Malembic-Maher S et al (2008) A chromosome map of the Flavescence dorée phytoplasma. Microbiology 154:1454–1463

7. Bautsch W (1988) Rapid physical mapping of the *Mycoplasma mobile* genome by two-dimensional field inversion gel electrophoresis techniques. *Nucl Acids Res* 16:11461–11467
8. Herschleb J, Ananiev G, Schwartz DC (2007) Pulsed-field gel electrophoresis. *Nat Protoc* 2:677–684
10. Schwartz DC, Cantor CR (1984) Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell* 37:67–75
1. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
2. Schwartz DC et al (1993) Ordered restriction maps of *Saccharomyces cerevisiae* chromosomes constructed by optical mapping. *Science* 262:110–114
3. Latreille P et al (2007) Optical mapping as a routine tool for bacterial genome sequence finishing. *BMC Genomics* 8:321

كشاف الموضوعات

برنامج المحاكاة	أ	DNA البلازمي
البروتين الغشائي المولد للمضاد		PCR المتداخل
البروتينات المُجمعة		الاختبار الحقلي
البسيليدي		استخلاص DNA البلازميد
البطاطا الحلوة ذات الأوراق النباتية الصغيرة		استخلاص DNA ألياً
بطريقة النسخ العكسي الـ PCR		استخلاص DNA البلازميد
البلازميد		الأستر الصيني
البنك Q		اصفرار الأستر
البييض		اصفرار الأستر عزلة مكنسة الساحرة
البيئة الخاصة		اصفرار البصل
البيئة الصناعية		اصفرار الفاكهة الحجرية الأوروبي
		الأعراض
		أقفاص طوارئ
		الاكتساب
		أكوليلازما
		آليات الإصابة بالمرض
		أمراض التفاح
		إنشاء مستعمرة
		أنواع الحشرات
		أنواع النبات
		أوكسيديز السيتوكروم سي
		ب
		البادئ
		بدائية النواة الناقلة للمرض
ت		
التأثير الاقتصادي		
التتابع التسلسلي		
تثبيت المواد البيولوجية بالتجميد		
التحديد		
تحديد الكمية		
تحضير اللحاء		
التحلل القلوي		
التحليل البروتيني		
تحليل التطور		
تحليل تعدد أطوال الأنماط		
تدرج بروميد الأيثيديوم		
تدرجات بسينزيميد كلوريد السيزيوم		
التدهور الكمثري		

<p>ذ</p> <p>الذرة</p>	<p>التربية التركيز ترميز الـDNA التشخيص</p>
<p>ر</p> <p>الفصل الكهربائي عديد إكربلاميد جل الفصل كهربائي لجل الآجاروز</p>	<p>تشخيص بالميكروسكوب تشخيص بالطريقة الجزيئية تصميم البادئ التصنيف</p>
<p>ز</p> <p>زراعة الأنسجة</p>	<p>تصنيف الفيتوبلازما التطعيم</p>
<p>س</p> <p>السبيروبلازما</p>	<p>تعدد الأشكال الطولية لأجزاء المسك الطرفية تفاعل البلمرة المتسلسل تقارير الأمراض الجديدة التكاثر</p>
<p>ش</p> <p>شبكة المسح شبه العامة الشتلات الشفط</p>	<p>ج</p> <p>جمعها من الحقل الجينوم الكامل</p>
<p>ص</p> <p>صبغة DAPI صبغة دنيس</p>	<p>ح</p> <p>الحجر الزراعي الحشرات التي تتغذى على اللحاء الحصر الحفاظ</p>
<p>ط</p> <p>الطحن الطرد المركزي لمعامل تدرج الكثافة طريقة CTAB طريقة الجذب والدفع طريقة النقل بالحامل الثابتة الطماطم</p>	<p>الحفاظ بالبيت المحمي الحوريات</p>
<p>ظ</p> <p>الظاهري</p>	<p>خ</p> <p>الخارطة الفيزيائية الخرائط الكروموسومية الخريطة الوراثية الخنس</p>

المجموعة الفرعية الريبوسومية	ع	العام
مجهر إلكتروني		العائل
مجهر المساح الإلكتروني		العائل التجريبي
محافظة		العصارة الخام
مراقبة		عوائل صعبة
مرض تقزم الذرة		عينات المتاحف المُجففة
مرض الاصفرار المميت لجوز الهند		عينات المجموعة من حقل
مركبات متطايرة		
مصيدة الطرق	ف	فترة الاكتساب
مصيدة شفط		فترة العدوى
مصيدة ضوئية		فترة الكمون
مصيدة غذائية		فترة الوصول للاكتساب
مصيدة كائنة		فروض كوخ
مصيدة مليز		القول
مصيده ضوئية		الفيتوبلازما
مصيده لاصقة		الفيرومونات
معاملة		
مقارنة الجينوم الكامل		
المواد الكيميائية الناقلة للمعلومات	ق	القصف البروتيني
مواد نباتية		
ميكروسكوب ضوئي		
ميكروآرأي		
الميكروتوم الدقيق	ك	
الميكروسكوب الفلوري		كائنات حية شبيهة بالميكوبلازما
		الكرفس
		الكرمون
		الكشف
		الكشف العام
ن	م	
نبات الوينكا		مايكوبلازما
نسيج الصيد		المثبطات
نسيج نباتي		المجال الكهربائي المتجانس الثابت
نصفية الأجنحة		المجس
نشاطات الأوراق		مجموعات بالبيت المحمي
النقل		
نقل الفيتوبلازما إلى الجيل القادم		
النقل بالحامل		

و

وحدات نقل محتملة
وسط غذائي صناعي



الأستاذ الدكتور/ خالد بن عبدالله الهديب
kalhudaib@kfu.edu.sa

- رئيس قسم زراعة الأراضي القاحلة- جامعة الملك فيصل، والمشرف على وحدة الآفات وأمراض النبات، بكلية العلوم الزراعية والأغذية.
- عمل عميداً سابقاً لمعهد البحوث والاستشارات، ووكيلاً لعمادة البحث العلمي بالجامعة.
- يعتبر الأستاذ الدكتور/ خالد الهديب المؤسس لوحدة الآفات وأمراض النبات، بكلية الزراعة بجامعة الملك فيصل.
- كما أنه يهتم بالأبحاث في مجال وقاية النبات، وخصوصاً المتعلقة بتعريف أمراض النبات والآفات وتوصيفها؛ باستخدام التقنيات الحديثة الجزيئية.
- أشرف على عديدٍ من طلاب الماجستير، وكذلك له أكثر من ٧٠ بحثاً منشوراً.
- شارك في عديدٍ من المؤتمرات العالمية، وهو عضوٌ في عديد من الجمعيات العلمية العالمية، ومحرراً في عديد من المجلات العلمية.
- حصل على عديد من الجوائز العلمية.

الفيتوبلازما؛

طرق وأساليب

Phytoplasma

Methods and Protocols

هذا الكتاب

الفيتوبلازما هي مجموعة من البكتيريا التي تغتقر إلى جدار الخلية؛ والتي لا يمكن لها أن تتكاثر بدونها؛ وهي قادرة على أن تسبب أمراضاً خطيرة في مجموعة واسعة من أنواع النباتات، وهي تنتقل بين النباتات عن طريق ناقلات الحشرات التي يمكن إن تتكاثر فيها البكتيريا. وتسبب الفيتوبلازما النباتية مشكلة خطيرة ومدمرة لنباتات المحاصيل، خصوصا في الدول النامية.

وكتاب: (الفيتوبلازما؛ طرق وأساليب) يعتبر من الكتب العلمية المتخصصة التي تغطي مواضيع علمية مختلفة لتطوير البرامج البحثية في مجال الفيتوبلازما. وتبدأ فصول الكتاب بالمقدمة؛ التي تتناول أهمية أمراض الفيتوبلازما النباتية. ويتبع ذلك في فصوله؛ طرق الكشف والتشخيص، والتقنيات المستخدمة لفصل الفيتوبلازما النباتية، وتصنيفها إلى مجموعاتها الرئيسة المختلفة ومجموعاتها الفرعية. وتغطي الفصول الأخيرة؛ طرق فصل جينوم الفيتوبلازما والبلازميد الحمض النووي عن الحمض النووي النباتي من تسلسل الجينوم الكامل.

إن نجاح أسلوب سلسلة كتب -طرق البيولوجية الجزيئية- قد ساعد في تحديد طريقة كتابة هذا الكتاب؛ حيث تتضمن المقدمة جميع المواضيع المتعلقة بذلك، وكذا قائمة بالمواد والتجهيزات المستخدمة، والعمل خطوة بخطوة، مما ساعد على أن تكون طريقة العمل متكاملة، وكذلك كتابة ملاحظات، وعمل كشاف للأخطاء؛ للتأكد من عدم حدوث أخطاء في طريقة العمل.

والكتاب موثوق ومن السهل قراءته، ويعتبر كتاب: (الفيتوبلازما طرق وأساليب) مرشداً ودليلاً للمتخصصين في مجال أمراض النبات والبيولوجية الجزيئية؛ بهدف عمل مختبرات للفحص والكشف عن تواجد الأمراض النباتية أو الحشرات الناقلة لها.



KFU
جامعة الملك فيصل
KING FAHD UNIVERSITY OF
PETROLEUM & MINERALS

مركز الترجمة
والتأليف والنشر

KFU
إدارة الطباعة
PRESS ADMIN

ردمك ٩٧٨-٦٠٢-٩١٥٢-١-٤