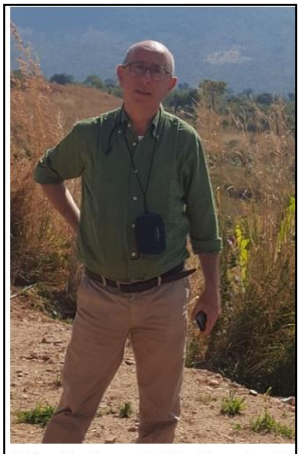
تقنية تسلسل النانو للأحماض النووية: أداة موسعة لتشخيص الفيروسات النباتية

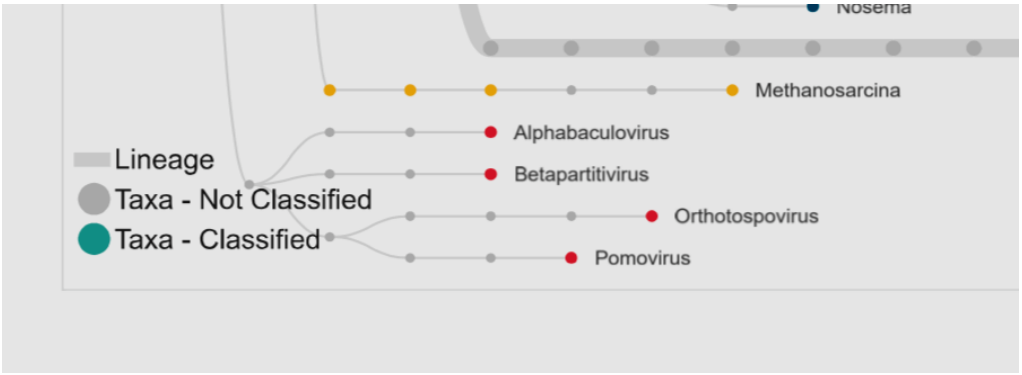
أنجيلانطونيو مينافرا، باحث أول في المجلس الوطني للبحوث الايطالي (CNR)، معهد وقاية النباتات المستدامة (IPSP)، مدينة باري، إيطاليا. البريد الالكتروني: angelantonio.minafra@cnr.it

لمواجهة التجارة العالمية المتزايدة للمواد النباتية – و مخاطر انتشار مسببات الأمراض النباتية - هناك حاجة إلى طرق تشخيص سريعة وحساسة وفعالة من حيث التكلفة وعامة لتحديد و التحكم بـ العوامل المسببة للأمراض الضارة. لتقييم وجود جينومات الفيروسات النباتية، التي تكون في بعض الأحيان غير منتظمة ومنخفضة التركيز وحتى كامنة في الأنسجة النباتية التي لا تظهر عليها أعراض، يعد التشفير الوراثي الضخم لإجمالي الأحماض النووية، حتى الآن، طريقة مثيرة للاهتمام. منذ عام 2014، أصبحت تقنية النانو مطروحة في السوق كأداة اختيارية من المحتمل أن تستجيب للاحتياجات المذكورة أعلاه. يتم تقديم الحمض النووي المفرد (إما DNA أو RNA) من مكتبة تم إعدادها بسهولة من مستخلصات منقاة، داخل مجموعة من المسام النانوية المضمنة في الغشاء من خلال عمل البروتينات الحركية (والتي يمكنها تفكيك dsDNA أو RNA-cDNA الهجين). يتم تسجيل مرور كل نيوكليوتيد منفرد على طول سلسلة متعدد النيوكليوتيدات عبر المسام بواسطة أقطاب كهربائية دقيقة كتغير محدد في التيار الكهربائي، الذي يمر عبر الغشاء. يشرف برنامج مخصص (MinKNOW) على البيانات، بدءًا من الاتصال الأساسي الأولي. ومن اللافت للنظر أن برنامج WIMP قادر على الوصف في الوقت الفعلي للإسناد التصنيفي للتسلسلات المنتجة على مستوى العائلة والجنس، والذي يحدث في أول ساعتين من المدى القصير (الشكل 1).هناك مسألتان ذات صلة بتسلسل ثقب النانو هما إمكانية تشغيل الحمض النووي الريبي (RNA) الأصلي وإمكانية تسلسل الجزيئات الطويلة جدًا (التي تزيد عن عدة كيلو بايت). سيتم التغلب على العيب السابق المتمثل في معدل الخطأ المرتفع نسبيًا (مقارنة بطرق التسلسل بالتوليف) من خلال تطوير كيمياء جديدة وقراءة تدفق الخلايا. تمثل تكلفة إعداد المكتبة وتشغيلها وحتى الحجم المحمول (قارئ الخلية الصغيرة المتدفقة المرتبط بجهاز كمبيوتر شخصي) ابتكارًا رائدًا يجعل هذا النظام شائعًا في المختبرات منخفضة الموارد والأقل تنظيماً. في حين أن الخبرة المعلوماتية الحيوية ليست في الواقع عائقًا، وذلك بسبب انتشار المعرفة واستخدام خطوط التحليل الآلية، و إن مرونة التطبيقات توفر إطارًا واسعًا تصبح فيه التقنية مفيدة للاستجابة في مراقبة واكتشاف الامرا ض الجديدة او الخطيرة. لغرض المراقبة (كما في حالة الفحص ند نقاط دخول الاستيراد والتصدير) أو لاكتشاف العوامل المسببة في الأمراض الشبيهة بالفيروسات غير معروفة، يتم أيضًا استخدام دنا تكميلي (cDNA) مجهز عشوائيًا من الحمض النووي الريبي (RNA) أو مستخلصات الرنا المزدوج السلسلة (dsRNA) المخصب، مع مضاعفة الإرسال عن طريق التشفير الشريطي ودعمه بتصحيح معدل الخطأ مع رسم الخرائط المرجعية، يعتبر ايضاً ميزة لتوفير الوقت والمال.

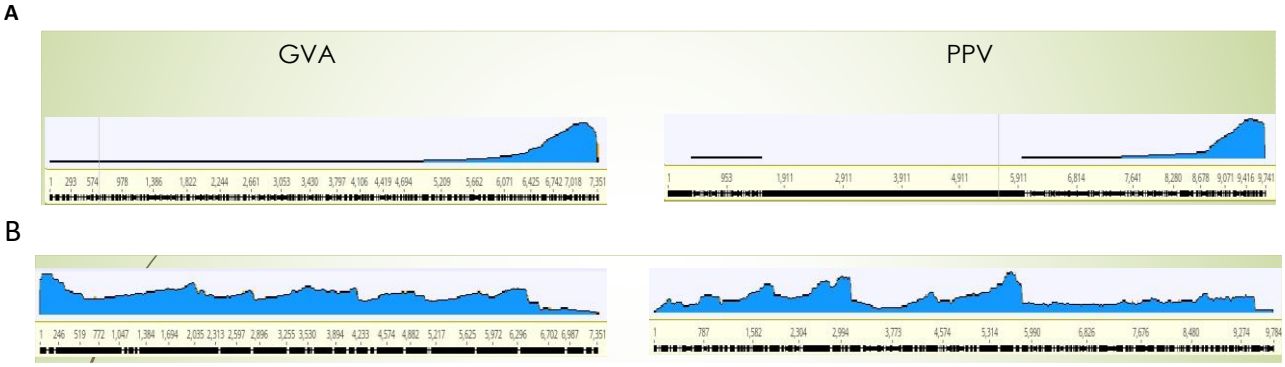

Minafra in a visit to Angola, 20

من هذه المقدمة، يمكن تصور التطبيق الكبير لتسلسل ثقب النانو على عدد من الدراسات في علم الفيروسات النباتية. اكتشف Bronzato Badial (2018) فيروس PPV في حشرة *M. persicae* و اكتشف ايضا *Ca. Liberibacter asiaticus* في ناقل البسيليد *D. citri* والأنسجة النباتية من خلال تضخيم النسخة الكاملة، في حين قام Chalupowicz (2018) ب قراءة تسلسل الحمض النووي أو الحمض النووي الريبي (RNA) المعزول من نباتات من عدة عائلات، وتم تلقيحها صناعيًا بمسببات الأمراض المعروفة (مثل البكتيريا والفيروسات والفطريات والفيتوبلازما). قام المؤلفون الأخيرون أيضًا باختبار بذور الطماطم بحثًا عن *C. michiganensis* و*P. Corrugate* و*F. oxysporum*. كما تم إجراء مقارنات محددة لمعرفة مدى ملاءمتها بين قوالب الحمض النووي ومستحضرات المكتبة. قارن Pannareth (2021) بروتوكولات إعداد المكتبة المختلفة وأطوال وقت التشغيل التسلسلي لتشخيص *R. solanacearum* وPPV، كمستخلصات DNA وRNA على التوالي. قارن Lieftig (2021) تعدد الأدينين الاصطناعي للحمض النووي الريبي (RNA) بطول 3 بوصات مع إثراء الرنا المزدوج الجديلة في مستخلصات التريستيزا CTV من الحمضيات، ووجد تحيزًا واضحًا لتسلسلات 3 بوصات في تخليق oligo-dT مقابل تغطية جينوم أكثر تجانسًا لـ دنا المكملة المجهزة عشوائيًا. وقد واجه هؤلاء المؤلفون أيضًا العديد من دراسات الحالة من خلال تسلسل ثقب النانو، مثل الكيوي المصاب بـ TSWV، والبازلاء الحلوة المصابة بعدوى فيروسية مختلطة، والكشف الأول عن بكتيريا Liberibacter التي تؤثر على الفراولة.

وبالمثل، استعرض سن (2022) قائمة التطبيقات في الكشف عن الفيروسات النباتية التي تمتد من الخوخ واليام والكسافا والطماطم. أظهرت مقارنة أخرى، أجراها جافاران (2023)، حول استخدام تسلسل دنا المباشر من الرنا المزدوج السلسلة مقابل تلك الموجودة في الحمض النووي الريبي الكلي المستنفد، أن إزالة تعدد الإرسال تكون أسرع بكثير من مادة بدء الرنا المزدوج الجديلة وتنتج المزيد من القراءات الخاصة بالفيروسات. في مختبر علم الفيروسات النباتية في CNR IPSP (باري)، قمنا بتطوير تقنية النانو من خلال العديد من البروتوكولات والجمع بين مضيف الفيروس. في اختبار أولي، تم تسلسل إجمالي مستخلصات الأحماض النووية من العدوى الاصطناعية لـ PPV وGVA على *N. benthamiana* إما على شكل RNA مباشر من نهاية 3' أو كـ cDNA إجمالي معبأ بشكل عشوائي (الشكل 2). في حين أنه، في الحالة الأولى، كان متوسط طول القراءة حوالي 800 nt ولكن تراكم القراءات يمثل بشكل زائد الجزء 3 من الجينوم النهائي، في الحالة الثانية تم الحصول على تغطية كاملة من خلال التوزيع المتجانس للقراءات البالغة 300 nt في المتوسط. باستخدام عدد قليل من البادئات العكسية المحددة على طول الجينوم، تم الحصول على تسلسل عزلة محلية من ToBRFV (أبو قبع 2023)، في حين تم أيضًا تسلسل الجينوم الكامل لفيروس فسيفساء البيبينو (PepMV) بشكل غير متوقع من نفس مكتبة ToBRFV، مما يشير إلى أن يمكن أن يوفر المعدل المنخفض للتسلسل غير المستهدف معلومات مفيدة عن الفيروسات المختلفة التي تصيب نفس العينة. تم أيضًا تقييم تطبيق تسلسل المسام النانوية السريع لاكتشاف الفيروسات من خلال قوالب الحمض النووي المختلفة في حالة نبات الياسمين الذي يظهر بقعًا صفراء وتغير لون الأوراق (أمويا2022). تحديد فيروس الياسمين C (Carlavirus) في نبات زينة مستخدم إلى حد كبير في البستنة يعتبر تنبيه هام لانتشار الفيروس المحتمل والحاجة إلى اختبار مواد الانتشار النظيفة. إن إمكانات هذه التقنية التشخيصية العامة الجديدة، المبينة في الأمثلة القليلة المقدمة هنا من الأدبيات الحديثة الواسعة، تهدف إلى تغيير الرؤية في التشخيص الجزيئي. يمكن أن يلعب التسلسل الضخم في السنوات القادمة دورًا أساسيًا في اكتشاف الفيروسات النباتية من جديد من خلال الميتاجينوم، بغض النظر عن تأثيرها المرضي الفعال، والذي يجب إثباته من خلال التفاعل البيولوجي. على أية حال، لا تزال هناك حاجة إلى القليل من المعرفة "القديمة" في مجال أمراض النبات لإعطاء تقييم شامل لوفرة البيانات الجديدة عن الفيروس.



الشكل 1 - مثال على مخرجات قسم فيروس من برنامجWIMP من تحليل تسلسل النانو للنسخة الكاملة لنبات الياسمين



الشكل 2 -تسلسل الإخراج من نبات نيكوتيانا بنثاميانا المصابة بفيروس العنب A وفيروس جدري البرقوق.