الثورة الأخيرة في تكنولوجيا تشخيص النباتات: إستخدام تقنية التسلسل عالي الإنتاجية HTS للكشف عن أمراض النبات

من المعروف منذ فترة طويلة أن الأمراض تسبب خسائر في الإنتاج في المحاصيل المعمرة مثل أشجار الفاكهة والكروم. وللكشف عن الأمراض الضارة في هذه المحاصيل، استخدمت في البدايات برامج الحجر الصحي والحماية النباتية النباتات الدالة البيولوجية. هذه النباتات الدالة عبارة عن أنواع أو أصناف نباتية محددة من المعروف أنها تظهر الأعراض عند تعرضها لعوامل مرضية معينة. يتم استخدام النباتات الدالة العشبية عن طريق نشر عصارة النبات الذي يتم اختباره عبر أوراق النبات الدال. قد تكتمل هذه العملية في أيام أو أسابيع. تُستخدم ايضاً النباتات الدالة الخشبية عن طريق تطعيم مادة النبات المعني بمجموعة متنوعة من النباتات معروفة بأنها تظهر الأعراض في حالة الإصابة. بعد اكتمال التطعيم، من المتوقع أن تصيب عوامل المرض الموجودة في النبات المعني المصاب، النبات الدال، مما قد يؤدي إلى ظهور الأعراض. من المعروف أن النباتات الدالة تظهر أعراضًا لأمراض معينة فقط؛ ومن الممكن ألا يظهر هذا النبات أي أعراض، لكن العامل الممرض لا يزال موجودًا. قد يستغرق الأمر عدة سنوات حتى تظهر الاعراض على النباتات الخشبية. تطورت تكنولوجيا التشخيص إلى الطرق الجزيئية ELISA وPCR، غالبًا بالتزامن مع تطور فحص النباتات الدالة. يعد اختبار ELISAو PCR بمثابة تقدم في الفهرسة البيولوجية لأنهما يسمحان بتحديد عوامل مرضية معينة، وعادةً ما يتطلبان وقتًا أقل لإكمال الاختبار.

هناك أيضًا عيوب لهذه الطرق التقليدية للكشف عن الأمراض. تستغرق تجربة النباتات الدالة وقتًا طويلاً، ولا تكتشف جميع الفيروسات المسببة للأمراض، وتعاني من أداء غير موثوق للنباتات، ولا يمكنها تحديد الفيروسات المسببة للأمراض على وجه التحديد، وتتطلب كميات كبيرة من المساحة والعمالة. تعتبر الاختبارات الجزيئية التقليدية مثل ELISA و RT-PCRمحدودة لأنها تتطلب معرفة مسبقة بالعامل الممرض وغير قادرة على اكتشاف المتغيرات. بالمقارنة مع هذه الطرق التقليدية، فإن أحدث أداة تشخيصية يمكننا استخدامها هي التسلسل عالي الإنتاجية (HTS). يوفر HTS ميزة لأنه يعطي صورة شاملة عن جميع اشكال الاصابات (ان وجدت) في العينة دون معرفة مسبقة بالعامل الممرض. لقد أدرك العديد من الباحثين قيمة HTS ، وهناك قائمة متزايدة من الأبحاث المنشورة التي توضح

مزاياه مقارنة بالنباتات الدالة. تطلّبَ استبدال النباتات الدالة بـ HTS للاختبار التنظيمي التحقق الشامل من بروتوكولات التشخيص بعد إثبات مزاياها.

مؤسسة خدمات النبات(FPS) ، التي أنشئت في جامعة كاليفورنيا، ديفيس، الولايات المتحدة الأمريكية، في عام 1958 هي مصدر لنخبة مواد إكثار العنب وأشجار الفاكهة والزيتون واللوزيات والفراولة والورود والبطاطا الحلوة. تعمل FPS على تسهيل إدخال العنب وأشجار الفاكهة المستوردة وحجرها والافراج عنها في الولايات المتحدة بموجب تصريح استيراد خاضع للرقابة (P588) صادر من قسم الحجر في ادارة الشؤون النباتية والحيوانية، وزارة الزراعة الأمريكية، وحماية النبات والحجر الصحيUSDA) (APHIS PPQ. تتطلب اللوائح والقوانين الحجرية المعتمدة استخدام الطرق التقليدية للكشف عن الأمراض، بما في ذلك الكشف باستخدام النباتات الدالة، ELISA وRT-PCR.

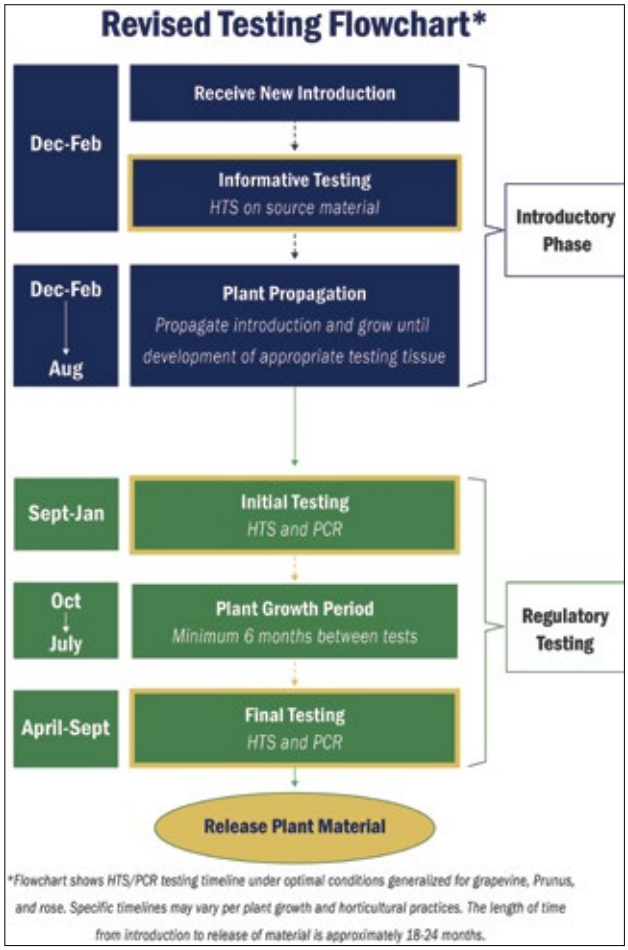
عادةً ما يتم زراعة مواد الإكثار التي توفرها FPS لإنشاء حقول الاكثار في المشاتل، والتي توزع المشاتل منها على المزارعين. من المهم أن يتم فحص المواد النباتية التي توزعها FPS بدقة بحثًا عن الفيروسات باستخدام طريقة ذات أقل نسبة سلبية كاذبة ممكنة.

بدأت FPS لأول مرة في تقييم HTS للكشف عن أمراض النبات في عام 2007. ومن خلال مقارنة الدراسات والنتائج جنبًا إلى جنب بين النباتات الدالة وHTS، ارتأت FPS أن HTS كانت

الطريقة المتفوقة والافضل للكشف عن الأمراض. ومن أجل الحصول على موافقة الجهات المعتمدة في وزارة الزراعة في ولاية كاليفورنيا ووزارة الزراعة الامريكية لاستخدامHTS في الاختبارات التشخيصية، كان هناك حاجة إلى مزيد من التحقق من صحة النتائج. فيFPS ، اتبع التحقق عملية مؤلفة من مرحلتين: (1) التحقق من صحة الطرق المستخدمة والمعتمدة ضمن مختبر FPS (2) التحقق من صحة تلك الطرق من خلال اعادة تطبيقها في عدة مختبرات للتأكيد من نجاحها.

بناء على نتائج الدراسات السابقة، تم في FPS اقتراح و اعتماد بروتوكول يدمج بين عدة طرق كشفية (HTS وRT-qPCR) (الشكل 2). يتطلب البروتوكول اختبارًا اولي معلوماتي على المواد المصدر، يليه اختبار أولي ونهائي لنوعين مختلفين من المادة النباتية، يفصل بينهما ستة أشهر على الأقل وفترة سكون شتوية. و في النهاية، وافقت وزارة الزراعة في ولاية كاليفورنيا و وزارة الزراعة الأمريكية على استخدام بروتوكول الاختبار التشخيصي المطورهذا و ذلك باستبدال الطرق التقليدية باختباري HTSوPCR للافراج عن المواد النباتية و الغاء اختبار النباتات الدالة .على حد علمي، فإن الولايات المتحدة هي أول دولة تتبنى تقنية التسلسل العالي الانتاجية للإفراج عن المواد النباتية من الحجر الصحي؛ وآمل أن لا يبقى على هذا النحو لفترة طويلة. هناك العديد من العوامل المذكورة ادناه و التي تؤدي إلى عدم التوسع في اعتماد تقنية HTS، ولكن بشكل عام يمكن التغلب على كل منها، بالتعاون بين عدة جهات بحثية و خدمية.

- ارتفاع تكلفة التجهيزات، مما قد يؤدي إلى ارتفاع سعر العينة إذا كان حجم الاختبار صغير. ويمكن التغلب على ذلك من خلال التعاون مع برامج أخرى، أو إنشاء مختبرات مركزية مشتركة، أو إرسال عينات إلى شركات خاصة او طرف ثالث لتحليل الدفع مقابل الخدمة.
- متطلبات البنية التحتية للمعلوماتية الحيوية من برامج الحاسوب وقوة المعالجة والذاكرة. ويمكن أيضًا تقليل هذه التكاليف من خلال مشاركة موارد الحوسبة مع الآخرين، أو الاستعانة بطرف ثالث للخدمات. مع تقدم تقنية HTS، توجد الآن خيارات برامج تخصصية متاحة يمكن الوصول إليها بسهولة وبأسعار معقولة.
- إعداد العينة حيث يتطلب الاختبار وجود حمض نووي عالي الجودة، والذي قد يكون من الصعب الحصول عليه من بعض النباتات المضيفة.
- تحليل نتائج البيانات – أولاً، يجب فصل الشيفرة الوراثية للفيروس الحقيقي عن بقية الشيفرات الوراثية بما فيها تسلسل جينوم المضيف. ثانيًا، يجب الاستعانة بأخصائي فيروسات مدرب لتقييم النتائج وتحديد ما إذا كانت العدوى موجودة بالفعل وتشكل خطرًا.
- تقنية HTS جديدة جدًا، ومعظم البروتوكولات والقوانين الحجرية لم تتبناها بعد. والعمل جاري على تغيير هذا، من خلال قيام المزيد من الدول بالتحقق من صحة البروتوكولات المعتمدة.
- وأنا على ثقة من أنه استمرار عمل الباحثين واخصائيي القوانين الحجرية في مختلف أنحاء العالم للتحقق من صحة بروتوكولات HTS، سيعمل على توظيفه قريبًا في تطوير متطلبات القوانين الحجرية في جميع أنحاء العالم.



الشكل 1: مخطط يوضح الجدول الزمني لاختبارHTS / PCR للنباتات فيFPS\ في ظل الظروف المثالية. قد تختلف الجداول الزمنية المحددة حسب نمو النبات و الاعمال في البيوت الزجاجية. تبلغ المدة الزمنية من تقديم المادة إلى إصدارها ما يقرب من 18 إلى 24 شهرًا.

الدكتور ماهر الرواحنة
مدير مؤسسة خدمات النبات/
جامعة كاليفورنيا ديفيس، الولايات المتحدة الامريكية
malrwahnih@ucdavis.edu