

الهندسة الوراثية لمقاومة الفيروسات

يُتحصل على الجينات التي تستعمل في تحويل النباتات وراثيًا لجعلها مقاومة للفيروسات من مصادر متنوعة، فهي قد تكون من الفيروس ذاته، أو من العائل النباتي الذي يرغب في حمايته أو الأنواع القريبة منه، أو من مصادر نباتية راقية أخرى، أو من الكائنات الدقيقة، أو حتى من الثدييات بما في ذلك الإنسان.

التحول الوراثي بجينات فيروسية

أمكن هندسة نباتات مقاومة للفيروسات بالاستفادة من جينات متحصل عليها من الفيروسات ذاتها، فيما يعرف باسم pathogen-derived resistance.

إن الفكرة من وراء ما يعرف بالمقاومة المستمدة من المسبب المرضي كما في بعض حالات الهندسة الوراثية لمقاومة الفيروسات - هي أن التعبير عن بعض جينات المسبب المرضي (الفيروس في حالتنا تلك) في العائل سوف يخل بالتوازن الطبيعي لمكونات الفيروس، وبالتالي يتعارض مع دورة حياة الفيروس. وفي أكثر الحالات نجاحًا يؤدي ذلك الخلل إلى منع تكاثر الفيروس أو تحركه إلى أبعد من الخلية التي حدثت فيها الإصابة. وحتى في الحالات التي يقل فيها التعارض مع دورة الحياة، فإن المقاومة المستمدة من المسبب المرضي ربما تحد من الأعراض المرضية، وتتسبب في حدوث إصابات موضعية فقط.

وعلى الرغم من اختلاف الفيروسات في طرق انقسامها، إلا أن جميع الفيروسات النباتية تشترك في خطوات عامة في دورات حياتها، فهي يجب أن تدخل خلايا العائل النباتي بإحدى طرق الانتقال الفيروسية المعروفة والتي تختلف من فيروس لآخر، يلي ذلك حدوث انفتاح في جزئ الفيروس أو تفكك جزئي لمحتوياته، مما يعرض دنا

أو رنا الفيرس للوسط الخلوى المحيط به. وإذا ما كان الفيرس يحمل رنا كمادة وراثية فإنه يبدأ على الفور فى إنتاج البروتينات الخاصة بالفيرس (بروتينات الغلاف البروتينى) لأجل تكاثره. أما إذا كان الفيرس حاملاً لنا كمادة وراثية فإنه يدخل نواة العائل أولاً ويوجه إنزيمات العائل لإنتاج الرنا الرسول المناسب لأجل نقل الشفرة الوراثية

ومن أهم الخطوات فى تكاثر فيروسات الرنا إنتاج بروتين أو بروتينات إنزيم ال replicase بالاعتماد على خلايا العائل ذاتها؛ الأمر الذى يؤدى إلى تكاثر الفيرس.

ويعتقد بأن معظم فيروسات الرنا تنتشر من خلية إلى أخرى عبر الروابط البروتوبلازمية plasmodesmata كحامض نووى (رنا) بحماية ومساعدة بروتين خاص بذلك، أو فى حالات الحركة لمسافة طويلة من خلال الاقتران بغلاف بروتينى نشط. وبذا .. فإن كل مرحلة من دورة الإصابة الفيروسية يمكن التأثير سلبياً عليها، وتلك الراحل هى مرحلة التخلص من الغلاف البروتينى uncoating، وترجمة الشفرة الوراثية translation، والانقسام replication، والحركة ويكون الهدف من هندسة نباتات مقاومة للفيروسات هو التعبير فيها عن جزء من الجينوم الفيروسى سواء أ تضمن هذا التعبير الغلاف البروتينى، أم لم يتضمن؛ بما يتعارض مع أحد جوانب دورة التكاثر. وتتضمن استراتيجيات الهندسة الوراثية لمقاومة الفيروسات النباتية عدة اتجاهات كما سيأتى بيانه (عن Scholthof ١٩٩٣)

الشفرة الوراثية الكاملة لسلالة ضعيفة من الفيرس

فى بداية محاولات إنتاج نباتات محولة وراثياً مقاومة للفيروسات اتجه الباحثون نحو نقل الحامض النووى الكامل complete genome الخاص بسلالة ضعيفة من الفيرس إلى النبات، حيث يمكن أن يكسب ذلك النبات وقاية ضد السلالات الأخرى الأكثر ضراوة من نفس الفيرس وقد طبقت هذه الطريقة بالنسبة لفيرس موزايك التبغ فى التبغ، ونمت النباتات التى نقل إليها الحامض النووى للفيرس بصورة طبيعية، وكانت خالية من أعراض الفيرس، أو أظهرت موزايكا خفيفاً بالأوراق. ولم تتأثر هذه النباتات عندما تعرضت للعدوى بسلالة عالية الضراوة من نفس الفيرس

ومن محبوب هذا التطبيق للهندسة الوراثية ما يلي:

- ١ - ضرورة العثور على سلالة ضعيفة من الفيروس.
- ٢ - أن السلالة الضعيفة قد تؤثر على كمية، أو نوعية المحصول.
- ٣ - قد تحدث طفرة بالسلالة الضعيفة تجعلها أكثر ضراوة.
- ٤ - قد يحدث تفاعل بين هذه السلالة الضعيفة وفيروسات أخرى يترتب عليها حدوث أعراض مرضية شديدة، مثل التفاعل الذى يحدث بين فيروس موزايك التبغ وفيروس x البطاطس فى الطماطم الذى يؤدي إلى ظهور أعراض التخطيط المزدوج (عن Grumet ١٩٩٠).

جين الغلاف البروتينى للفيروس

يطلق على المقاومة التى تتحقق عن طريق الغلاف البروتينى الفيروسي اسم viral coat protein mediated resistance (اختصاراً: CP-MR). ولقد عرف منذ عام ١٩٨٦ أن نقل الجين المسئول عن تمثيل الغلاف البروتينى لفيروس موزايك التبغ إلى نبات التبغ قلل جوهرياً تكاثر الفيروس بالنبات. وقد أعقب ذلك تطبيق هذه الطريقة بنجاح كبير فى عدد كبير جداً من الفيروسات والعوائل، وهى تعد أكثر الطرق شيوعاً فى مقاومة الأمراض الفيروسية، على الرغم من بعض الأمور التى تؤخذ عليها؛ فالحماية ضد الفيروس نادراً ما تكون كاملة، كما توجد أمثلة لحالات كثيرة لم تُجد فيها تلك الطريقة فى الحماية من الفيروس.

هذا .. ويبدو أن التعبير الزائد للغلاف البروتينى للفيروس فى النبات العائل يتعارض مع خاصية تخلص الفيروس من غلافه، وكذلك يتعارض مع تكاثره وحركته. وربما مع مراحل أخرى من دورة حياته (عن Bent & Yu ١٩٩٩).

وتعتمد هذه الطريقة فى مكافحة الفيروسات على مبدأ الوقاية المكتسبة بطريق الهندسة الوراثية، ولذا .. فإنه يطلق عليها - عادة - اسم genetically engineered cross protection، وهى تتشابه - من حيث المبدأ - مع الوقاية التى توفرها الإصابة بسلالة ضعيفة من الفيروس ضد الإصابة بسلالة أخرى منه عالية الضراوة، بسبب تواجد

الغلاف البروتيني للسلالة الأولى قبل وصول السلالة الثانية والفرق بين الوقاية المكتسبة في الحالتين أن الغلاف البروتيني الفيروسي الذي يُصنَّعه النبات - في الحالة الأولى - يكون خالياً من الحامض النووي الفيروسي، بينما يتواجد الفيروس كاملاً في حالة العدوى بسلالة ضعيفة للوقاية من سلالة أكثر ضراوة. وغنى عن البيان أن الوقاية المكتسبة بطريق الهندسة الوراثية تحقق جميع مزايا الوقاية المكتسبة الكلاسيكية دون أى من عيوبها

هذا ولا يوفر الغلاف البروتيني الذى يُصنَّعه النبات وقاية ضد سلالة الفيروس التى أخذ منها الجين فقط، وإنما ضد جميع السلالات الأخرى لنفس الفيروس. وضد الفيروسات الأخرى التى تشترك مع الفيروس المعنى فى خصائصها السيرولوجية (عن Grumet ١٩٩٠).

وتتميز جميع حالات التحول الوراثي لمقاومة الفيروسات - باستعمال جين الغلاف البروتيني للفيروسات - بما يلي،

- ١ - تكون المواقع التى تحدث عندها الإصابة فى الأوراق المحقونة بالفيروس أقل عدداً من نظيراتها فى النباتات غير المحولة وراثياً
- ٢ - يكون معدل انتشار الإصابة الجهازية أقل سرعة مما فى النباتات العادية
- ٣ - يقل تراكم الفيروس فى النباتات المحولة وراثياً عما يحدث فى النباتات غير المحولة

ويمكن - عادة - التغلب على مظاهر المقاومة تلك بزيادة التركيز المستخدم فى حقن الفيروس (عن Beachy وآخرين ١٩٩٠)

ولقد نجحت هذه التقنية فى كل من النباتات ثنائية الفلقة وأحادية الفلقة على حد سواء

وعلى الرغم من أن الحماية التى توفرها تقنية الدحول الوراثي بالجين المسئول عن تكوين الغلاف البروتيني للفيروس تقتصر فقط على الفيروس المعنى والسلالات القريبة الشبه

منه، إلا إنه تعرف بعض الحالات التي تمتد فيها الحماية إلى عدد من الفيروسات الأخرى المتباينة.

نجد في معظم الحالات أن الغلاف البروتيني يعمل فقط ضد الفيروس الكامل، بينما لا يتأثر اللقاح الذي يتكون من الرنا الفيروسي المجرد من الغلاف البروتيني (عندما يجرى التلقيح تجريبياً) .. لا يتأثر بجين الغلاف البروتيني في النبات؛ حيث يمكن للرنا الفيروسي إحداث الإصابة. هذا .. إلا أنه توجد حالات شاذة لتلك القاعدة.

ولأسباب ليست معروفة بعد .. نجد أن الحماية التي يوفرها التحول الوراثي بجين الغلاف البروتيني لا ترتبط بالضرورة بأى تعبير عن الغلاف البروتيني؛ ففي بعض الحالات كانت الحماية أعلى عند مستويات منخفضة من تراكم الغلاف البروتيني في النبات.

وأحياناً .. تتوفر الحماية نتيجة لتراكم الرنا الرسول mRNA الخاص بالغلاف البروتيني، دونما ارتباط بتراكم الغلاف البروتيني ذاته (عن Scholthof وآخرين ١٩٩٣).

هذا .. وعند تلقيح (حقن) أوراق النباتات المحولة وراثياً بجين الغلاف البروتيني لفيروس ما .. عند حقنها بجزيئات الفيروس ذاته، فإنها تُظهر عدداً قليلاً من البقع الصفراء المخضرة أو المتحللة مقارنة بما يحدث في النباتات العادية، كما تقل فيها الإصابة الجهازية، أو تتأخر، أو تنعدم. وفي جميع الحالات التي أجرى فيها التحول الوراثي بتلك الكيفية (كما في كل من الفيروسات. موزايك التبغ، وموزايك البرسيم الحجازي، وإكس البطاطس، وموزايك الخيار، وتخطيط التبغ .. وهي ذات أشكال مختلفة، وتنتمي إلى مجموعات فيروسية مختلفة، وتنتقل - طبيعياً - بوسائل مختلفة) . في جميع هذه الحالات لم تظهر على النباتات المحولة وراثياً أية تأثيرات سلبية على النمو، أو الخصوبة، أو الشكل المظهري للنبات، كما كانت المقاومة فيها ثابتة وراثياً وانتقلت للنسل لأجيال عديدة.

يتراوح تركيز الغلاف البروتيني للفيروس - عادة - بين ٠.٠١٪، و ٠.٢٪ من المحتوى البروتيني الذائب الكلي بالنباتات المحولة وراثياً، ويتوقف التركيز الفعلي

على الفيرس، وال promoter المستعمل، وعدد نسخ جين الغلاف البروتينى التى نقلت فعلا إلى النبات المحول وراثياً، وموضع إيلاج جين الغلاف البروتينى فى الهيئة الكروموسومية للنبات العائل.

ويتوقف مستوى المقاومة فى النباتات المحولة وراثياً على تركيز الغلاف البروتينى فى النبات، وليس على الرنا الرسول للغلاف البروتينى (عن Grumet 1990).

وفى بعض الحالات نجد أن مستوى الحماية يتناسب طردياً مع مستوى التعبير عن الغلاف البروتينى فى النباتات، وذلك كما فى حالات فيروس موزايك البرسيم الحجازى AIMV، وفيروس إكس البطاطس PVX، وفيروس تخطيط الأرز RSV، وفيروس اصفرار وتجعد أوراق الطماطم TYLCV. كذلك فإن خفض مستوى الغلاف البروتينى لفيروس موزايك التبغ TMV بالمعاملة الحرارية قلل من مستوى الحماية ضد الفيرس

هذا إلا أنه فى حالات أخرى لا يوجد بالضرورة ارتباط بين مستوى الغلاف البروتينى ومستوى المقاومة، وذلك كما فى بعض الـ potyviruses و luteoviruses، والـ tospoviruses كما وجد أن الحماية ضد فيروس موزايك الزوكينى الأصفر ZYMV فى القاوون (والتي لا تظهر فيها على النباتات أية أعراض مرضية لمدة 90 يوماً بعد حقنها بالفيرس) لا ترتبط بمستوى التعبير عن الغلاف البروتينى فى النباتات المحولة وراثياً

وفى حالات كثيرة .. أمكن كسر المقاومة التى يوفرها جين الغلاف البروتينى بزيادة تركيز اللقاح المستعمل فى حقن الفيرس، وذلك كما فى حالات فيروس موزايك التبغ .. وفيروس موزايك البرسيم الحجازى، وفيروس ذبول الطماطم المتبقع TSWV، وفيروس موزايك فول الصويا SMV، وفيروس موزايك البطيخ WMV، وفيروس موزايك الزوكينى الأصفر، هذا إلا أنه ظهرت مستويات مختلفة من المقاومة عند التلقيح بتركيز واحد من فيروسات مختلفة لنباتات محولة وراثياً بجين الغلاف البروتينى لتلك الفيروسات ومن الطبيعى أن المستويات العالية من المقاومة التى يمكن أن يوفرها جين الغلاف البروتينى تكون مطلوبة، ولكن الأهم هو أن تكون تلك المستويات مناسبة لمستويات اللقاح الفيروسي التى تحدث طبيعياً فى الظروف الحقلية

الصدسة الوراثية لمقاومة الفيروسات

وتجدر الإشارة إلى أنه في حالات الفيروسات التي يمكن أن تنتقل إلى النباتات بأكثر من طريقة (مثل النقل بالإنزيم والنقل الميكانيكي)، فإن المقاومة التي يوفرها جين الغلاف البروتيني تظهر عندما ينتقل الفيروس إلى النباتات بأى من الطريقتين، وذلك كما في حالة فيروس موزايك الخيار CMV، وفيروس إكس البطاطس PVX، وفيروس واي البطاطس PVY، لكن ذلك لم يتحقق في حالة فيروس خشخشة التبغ TRV - الذى ينتقل ميكانيكياً وبالنيما تودا - حيث أظهرت النباتات المحولة وراثياً مقاومة ضد الحقن الميكانيكي فقط (عن Grumet 1995).

تتوفر عدة أدلة تفيد بأن آلية المقاومة التي تتحقق بفعل جين الغلاف البروتيني تعتمد على المجموعة الفيروسيّة التي ينتمى إليها الفيروس ففي حالة فيروسات موزايك التبغ TMV، وموزايك البرسيم الحجازي AIMV، وإكس البطاطس PVX ترتبط قوة المقاومة إيجابياً بمستوى التعبير عن الغلاف البروتيني في النباتات المحولة وراثياً، وعلى الجين نفسه، وفي حالتى الـ TMV والـ AIMV - على سبيل المثال - لم تكن النباتات التي يتراكم فيها شريط الدنا (الـ transcript) الخاص بجين الغلاف البروتيني (coat protein transcript) - فقط - دون أى تراكم للغلاف البروتيني ذاته - لم تكن مقاومة. هذا إلا أنه في حالات أخرى (فيروس واي البطاطس PVY، وفيروس التفاف أوراق البطاطس PLRV على سبيل المثال) ارتبطت المقاومة بمستوى تراكم شريط الدنا (الـ transcript) الخاص بجين الغلاف البروتيني، وليس بمستوى تراكم الغلاف البروتيني ذاته. ومما يزيد الصورة تعقيداً أنه في حالة ذبول الطماطم المتبقع (TSWV) حصل على المقاومة في حالتى التحويل الوراثى بأى من جين الغلاف البروتيني كاملاً، أو بعد جعله غير صالح للاستنساخ، من خلال إزالة الـ ATG codon اليبادئ لعملية الاستنساخ (عن Kavanagh & Spillane 1995).

ولقد أظهرت الدراسات بعض المفارقات فيما يتعلق بمدى المقاومة التي يوفرها جين الغلاف البروتيني لفيروس ما ضد الفيروسات الأخرى. وعلى سبيل المثال .. وجد أن جين الغلاف البروتيني لفيروس موزايك الخس LMV - وهو من الـ potyviruses - يعطى - كذلك - مقاومة تامة ضد فيروس واي البطاطس PVY، وهو فيروس لا يتشابه

مع فيروس LMV سوى في ٦٦٪ من الأحماض الأمينية، بينما لم يُكسب هذا الجين النباتات أية حماية ضد فيروس إتش التبغ TEV الذي يتساوى - كذلك - مع فيروس PVY في نسبة الأحماض الأمينية التي تتشابه مع تلك التي يحملها فيروس LMV

ومن ناحية أخرى وجد أن جين الغلاف البروتيني لفيروس موزايك وتقرزم الذرة MDMV، وهو من الـ potyviruses، يكسب - كذلك - نباتات الذرة مقاومة ضد فيروس تبرقش واصفرار الذرة MCMV، وهو من مجموعة الـ carmoviruses ليس هذا فقط بل إن حقن النباتات المحولة وراثياً - بجين الغلاف البروتيني للـ MDMV - بكلا الفيروسين وفرت حماية أكبر ضد الـ MCMV عما إذا ما حقنت النباتات المحولة وراثياً بالفيروس الأخير منفرداً (عن Grumet ١٩٩٥).

ووجد Namba وآخرون (١٩٩٢) أن تحويل النبات *Nicotiana benthamiana* بجين الغلاف البروتيني لأي من فيروسى موزايك البطيخ ٢ (WMVII)، وموزايك الزوكيني الأصفر (ZYMV) يكسب النباتات المحولة وراثياً مقاومة ضد كلا الفيروسين بالإضافة إلى ستة فيروسات أخرى من مجموعة الـ potyviruses، وهى فيروس موزايك الفاصوليا الأصفر (BYMV)، وفيروس واى البطاطس (PVY)، وفيروس موزايك البسلة (PeaMV)، وفيروس تبرقش الغنفل (PeMV)، وفيروس إتش التبغ (TEV). وقد توقف مستوى الحماية التي وفرتها عملية التحول الوراثي على الفيروس المحقون به، وجرعة الحقن، حيث انخفض مستوى الحماية بزيادة جرعة الحقن.

كذلك أظهرت نباتات التبغ المحولة وراثياً بجين الغلاف البروتيني لفيروس موزايك التبغ درجة منخفضة - ولكن معنوية - من الحماية ضد فيروسات أخرى غير قريبة من هذا الفيروس، مثل فيروس إكس البطاطس، وفيروس واى البطاطس، وفيروس موزايك الخيار، وفيروس موزايك البرسيم الحجازي (عن Anderson وآخرين ١٩٨٩).

إن نباتات التبغ المحولة وراثياً بجين الغلاف البروتيني لفيروس موزايك فول الصويا (SMV) - الذى لا يعد التبغ من عوائله - تكتسب صفة المقاومة لفيروسين غير قريبين سيروlogياً من فيروس موزايك فول الصويا، وهما: فيروس واى البطاطس، وفيروس إتش

التبغ TEV، وكلاهما من الـ potyviruses. هذا .. علمًا بأن الأغلفة البروتينية لكل من SMV، و PVY، و TEV تشترك معًا في حوالي ٦٠٪ من التماثل في تتابعات الأحماض الأمينية. كذلك فإن النباتات المحولة وراثيًا التي تحمل جين الغلاف البروتينى لفيروس موزايك التبغ تُظهر قدرًا معنويًا من المقاومة للإصابة بالفيروسات التي تشارك فيرس موزايك التبغ في ٦٠٪ أو أكثر من درجة التماثل في تتابعات الأحماض الأمينية.

وامتدادًا للاتجاه ذاته كانت نباتات التبغ المحولة وراثيًا بجين موزايك الخيار CMV مقاومة لفيروس التبقرش المعتدل للأقحوان chrysanthemum mild mottle virus، بينما أظهرت نباتات التبغ المحولة وراثيًا بجين موزايك الخس LMV مقاومة لفيروس وى البطاطس (عن Kavanagh & Spillane ١٩٩٥).

هذا .. إلا أن المقاومة التي يوفرها جين الغلاف البروتينى لفيروس ما لا تكون دائمًا أكيدة ضد الفيروسات القريبة منه، ومن أبرز الأمثلة على ذلك فيروس موزايك التبغ وموزايك الطماطم.

يتشابه فيروس موزايك الطماطم مع فيروس موزايك التبغ فى أن كليهما من مجموعة الـ tobamovirus، إلا أنهما فيروسان مختلفان تمامًا ويمكن التمييز بينهما على أساس خصائصهما السيولوجية وتركيب البروتين فيهما. وعلى الرغم من أن فيروس موزايك التبغ يمكن أن يصيب الطماطم، إلا أن فيروس موزايك الطماطم هو الأكثر شيوعًا فى هذا المحصول فى جميع أنحاء العالم. هذا .. ويمكن أن يتواجد الفيروسان معًا فى نبات الطماطم الواحد، إذ إن الإصابة بأحدهما لا يوفر حماية من الإصابة بالآخر.

وعلى الرغم من أن الفيروسين على درجة عالية من التماثل - قدرت بنحو ٨٨٪ - فى تتابعات النيكلوتيدات، فإن تحويل نبات الطماطم وراثيًا بجين الغلاف البروتينى لأحدهما لا يعطى سوى قدر ضئيل من الحماية - أو لا يوفر أى حماية - ضد الفيروس الآخر، بينما يكسب هذا التحويل قدرًا كبيرًا من الحماية ضد الفيروس الذى استخدم جين غلافة البروتين فى عملية التحويل الوراثى (Sanders وآخرون ١٩٩٢).

هذا وإلى جنب ما سبقت الإشارة إليه من حالات فيروسات الرنا التي استخدمت فيها جينات الغلاف البروتيني في هندسة نباتات وراثياً لتكون مقاومة لتلك الفيروسات . فقد طبقت التقنية ذاتها على فيروس تجعد واصفرار أوراق الطماطم tomato yellow leaf curl virus - وهو فيروس ذات خيط مفرد من الدنا وينتقل عن طريق الذبابة البيضاء - وأمكن الحصول على نباتات طماطم تحتوي على جين الغلاف البروتيني للفيروس ومقاومة له

تتمثل المقاومة التي تتحقق عن طريق جين الغلاف البروتيني coat protein-mediated resistance في حدوث نقص في عدد البقع التي تتكون بالأوراق التي تحقن بالفيروس، وانخفاض في معدل تطور المرض جهازياً، ونقص كبير جداً في معدل تراكم الفيروس ذاته في النباتات المحولة وراثياً، مقارنة بنباتات الكنترول بعد العدوى بالفيروس المعنى. وفي أحيان كثيرة يمكن أن تصل قوة المقاومة إلى شبه المناعة (عدم حدوث أى إصابة) حتى مع استعمال تركيز عالٍ من الفيروس في عملية الحقن به (عن Kavanagh & Spillane 1995).

ويتبين من جدول (١٤-١) أن الحماية التي يوفرها جين الغلاف البروتيني للفيروس تكون فعّالة - غالباً - سواء أتم انتقال الفيروس للنباتات ميكانيكياً، أم بواسطة النواقل vectors.

هذا ويبين جدول (١٤-٢) أمثلة لحالات من التحول الوراثي كان الاعتماد فيها على جين الغلاف البروتيني للفيروس ما، والفيروسات التي أصبحت النباتات التي حوّلت وراثياً مقاومة لها من جراء هذا التحول. كما يبين جدول (١٤-٣) فاعلية الهندسة الوراثية لمقاومة الفيروسات بالاعتماد على جين الغلاف البروتيني أياً كانت المجموعات التي تنتمي إليها تلك الفيروسات.

الصدسة الوراثية لمقاومة الفيروسات

جدول (١٤-١): الحماية التي يوفرها التحول الوراثي بجين الغلاف البروتيني ضد الحقن الطبيعي بالناقلات الفيروسية، مقارنة بالوضع في حالة الحقن الميكانيكي (عن Grumet ١٩٩٥).

الحماية ضد النقل			
الناقل Vector	الميكانيكي	الناقل	الفيروس
متوفرة	لم تختبر (أ)	نشاطات النباتات	PSR
متوفرة	لم تختبر (أ)	المن	PLRV
متوفرة	لم تختبر (أ)	الذبابة البيضاء	TYLCV
متوفرة	متوفرة	المن	CMV
متوفرة	متوفرة	المن	PVX
متوفرة	متوفرة	المن	PVY
غير متوفرة	متوفرة	النيماتودا	TRV

أ- لا ينتقل الفيروس ميكانيكياً.

جدول (١٤-٢): أمثلة لحالات من التحول الوراثي كان الاعتماد فيها على جين الغلاف البروتيني لفيروس ما، وكيف أن هذا الجين أكسب النباتات مقاومة لفيروسات أخرى إلى جانب الفيروس صاحب الجين المستعمل في عملية التحول الوراثي.

الفيروسات التي أصبحت النباتات مقاومة لها	النبات المحول وراثياً	الفيروس مصدر جين الغلاف البروتيني
TMV	التبغ	TMV
ToMV, TMGMV	التبغ	TMV
PVX, CMV, AIMV, SHMV	التبغ	TMV
TMV, ToMV	الطماطم	TMV
AIMV	التبغ	AIMV
PVX, CMV	التبغ	AIMV
AIMV	الطماطم	AIMV
AIMV	البرسيم الحجازي	AIMV
TRV	التبغ	TRV
PEBV	التبغ	TRV
TSV	التبغ	TSV

تابع جدول (١٤-٢)

الفيروسات التى أصبحت النباتات مقاومة لها	النبات المحول وراثياً	الفيروس مصدر جين الغلاف البروتينى
CMV	التبغ	CMV
PVY, TEV	التبغ	SMV
BNYVV	بنجر السكر	BNYVV
PVX	التبغ	PVX
PVX	البطاطس	PVX
PVX, PVY	البطاطس	PVX + PVY
PVS	البطاطس	PVS
PLRV	البطاطس	PLRV
TBRV	التبغ	GCMV
TEV	التبغ	PaRSV
TVMV, TEV	التبغ	TVMV

جين تكاثر الفيروس

بينما توفر عملية التحول الوراثى للنباتات باستخدام جين الغلاف البروتينى للفيروسات مقاومة ضد مدى واسع نسبياً من الفيروسات الغريبة من بعضها، فإن المقاومة ذاتها لا تكون تامة، حيث تُظهر النباتات المحولة وراثياً أعراض الإصابة الفيروسية، إلا أن تلك الأعراض تكون متأخرة وأقل شدة عما تكون عليه فى النباتات غير المحولة، كما يمكن كسر المقاومة بإجراء الحقن بتركيزات عالية جداً من الفيروس، أو بالرناء الفيروسى المجرد من الغلاف البروتينى

وفى المقابل . فإن مقاومة النباتات المحولة بواسطة RNA-dependent RNA polymerase (وهو المعروف باسم replicase لأنه الإنزيم الذى ينسخ الجينوم الفيروسى) تكون تامة وشبيهة بالمناعة، إلا أنها تكون - فقط - ضد السلالات المماثلة تماماً - فى تتابعات الحامض النووى - لتلك التى حُصِل منها على الجين المستخدم فى التحول الوراثى (عن Miller وآخربن ١٩٩٧)

الهندسة الوراثية لمقاومة الفيروسات

جدول (١٤-٣) حالات الهندسة الوراثية لمقاومة الفيروسات التي استخدمت فيها جينات الغلاف البروتيني الفيروسي حتى بدايات عام ١٩٩٤ (عن Grumet ١٩٩٥).

النوع المحول وراثياً	اسمه المختصر	الفيروس	المجموعة الفيروسية
- التبغ - الطماطم - البرسيم الحجازي	AIMV	Alfalfa mosaic virus	Alfalfa mosaic virus group
البطاطس	PVS	Potato virus S	Carlavirus
التبغ - الخيار - القاوون	CMV	Cucumber mosaic virus	Cucumovirus
الطماطم	TYLCV	Tomato yellow leaf curl virus	Geminivirus
التبغ	TSV	Tobacco streak virus	Ilarvirus
البطاطس	PLRV	Potato leaf roll virus	Luteovirus
التبغ	ArMV	Arabidopsis mosaic virus	Nepovirus
التبغ	GCMV	Grapevine chrome mosaic virus	
<i>N. benthamiana</i>	CyMV	Cymbidium mosaic virus	Potexvirus
التبغ - البطاطس	PVX	Potato virus X	
<i>N. benthamiana</i>	BYMV	Bean yellow mosaic virus	Potyvirus
التبغ	LMV	Lettuce mosaic virus	
الذرة	MDMV	Maize dwarf mosaic virus	
التبغ - البهاظ	PRSV	Papaya ringspot virus	
<i>N. clevelandii</i>	PPV	Plum pox virus	
البطاطس	PVY	Potato virus Y	
التبغ	SMV	Soybean mosaic virus	
<i>N. benthamiana</i>	WMV	Watermelon mosaic virus	
- <i>N. benthamiana</i>	ZYMV	Zucchini yellow mosaic virus	
القاوون - التبغ	RSV	Rice stripe virus	Tenuivirus
الأرز	TMV	Tobacco mosaic virus	Tabamovirus
التبغ - الطماطم	TRV	Tabacco rattle virus	Tobravirus
التبغ	TSWV	Tomato spotted wilt virus	Tospovirus

جاء اكتشاف خاصية قدرة جين الـ replicase الفيروسي على إكساب النباتات المحولة وراثياً به مقاومة له . جاء من تجارب صممت لاختبار ما إذا كانت الوحدة 54 kD من إنزيم الـ replicase الخاص بفيرس موزايك التبغ تلعب دوراً في انقسام الفيرس أم لا ، حيث كانت المفاجأة أن نباتات التبغ المحولة وراثياً بنسخه من الـ cDNA لهذا الجزء من جين الـ replicase كانت على درجة عالية من المقاومة لفيرس موزايك التبغ حتى عندما وصل تركيز اللقاح إلى ١٠٠٠ ضعف التركيز الذى يقاومه جين الغلاف البروتينى، وحتى مع عدم القدرة على اكتشاف وجود هذا البروتين - 54kD - فى تلك النباتات

وقد تبين أن البروتين ٥٤ كيلو دالتون 54-kD protein - وليس الرنا الخاص به - هو المسئول عن تلك الحماية التى تقترب من مستوى المناعة. ويعتقد بأن تراكم هذا البروتين فى النباتات المحولة وراثياً قد يعطل دورة تكاثر الفيرس

وكما فى حالة التحول الوراثى باستعمال جين الغلاف البروتينى، فإن المقاومة التى يوفرها جين الـ replicase تختلف من سلالة محولة وراثياً لأخرى، إلا أن المستوى العام للمقاومة التى يوفرها جين الـ replicase أعلى من تلك التى يوفرها جين الغلاف البروتينى (عن Grumet ١٩٩٥).

هذا وتعرف - حالياً - عدة حالات تحققت فيها المقاومة عن طريق جين الـ replicase (جدول ١٤-٤)، منها تلك الخاصة بفيروسات. إكس البطاطس PVX، وواى البطاطس PVY، و التلون البنى المبكر للبسلة pea early browning، وموزايك الخيار CMV ومن بين تلك الحالات ما حدث فيها التحول الوراثى بجين الـ replicase الفيروسي الكامل، ومنها ما استخدم فيها صوراً مقتضبة truncated أو مطفرة mutated من ذلك الجين، وذلك بعدد أو فصل أجزاء خاصة منه (عن Kavanagh & Spillane ١٩٩٥، و Grumet ١٩٩٥).

ومن الأصناف التجارية التى حدث فيها التحول الوراثى بتلك التقنية صنف البطاطس Newleaf Plus الذى يحتوى على كل من. جين بروتين الانقسام replicase

الهندسة الوراثية لمقاومة الفيروسات

protein gene لفيروس التفاف أوراق البطاطس، وجين الـ Bt من البكتيريا *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis* (عن Duncan وآخرين ٢٠٠٢).

جدول (٤-٤): الهندسة الوراثية لمقاومة الفيروسات بالاعتماد على جينات فيروسية أخرى غير جين الغلاف البروتيني (عن Grumet ١٩٩٥).

النوع النباتي المحول وراثياً	الفيروس	المجموعة الفيروسية	الجين (البروتين)
التبغ	CMV	Cucumovirus	Replicase
التبغ	PVX	Potexvirus	
التبغ	PVY	Potyvirus	
التبغ	TMV	Tobamovirus	
<i>Nicotiana benthamiana</i>	^(١) PEPV	Tobravirus	
<i>N. benthamiana</i>	^(٢) CyRSV	Tombusvirus	
التبغ	TMV	Tobamovirus	بروتين الحركة
التبغ	PVY	Potyvirus	Protease

١- *pea early browning virus* = PEBV و *cymbidium ringspot virus* = CyRSV. للتعرف على الأسماء الكاملة لباقي الفيروسات التي وردت رموزها في الجدول .. يراجع جدول (٤-١) - (٣).

جين حركة الفيروس

أوضحت الدراسات التي أجريت على فيروس موزايك التبغ أن حركة الفيروس تعتمد على بروتين فيروسي خاص (هو الـ 30 kD movement protein) يقوم بتعديل قطر الثقوب التي تمر منها الروابط البروتوبلازمية التي تربط الخلايا المتجاورة بعضها ببعض؛ الأمر الذي يسهل عملية انتقال الفيروس. وعندما عُدلت نباتات التبغ وراثياً بالجين الكامل لحركة فيروس موزايك التبغ فإنها لم تكن مقاومة للفيروس، إلا أن تعديل النباتات باستعمال طراز طفرى من هذا الجين جعلها مقاومة.

وعلى خلاف المقاومة التي تنتج من استعمال جين الـ replicase، فإن المقاومة التي يحدثها جين الحركة ليست على درجة عالية من التخصص، بما يعنى إمكان استخدام جين الحركة في الحصول على نباتات مقاومة لعدة فيروسات (عن Kavanagh & Spillane ١٩٩٥).

لقد أظهرت نباتات التبغ التي حولت وراثياً بجين الحركة لفيرس brome mosaic virus أظهرت مقاومة ضد فيروس موزايك التبغ الذى لا يمت للفيروس الأول بصلة قرابة كذلك أظهرت نباتات التبغ التي عدلت وراثياً بطفرة لجين الحركة الخاص بفيروس موزايك التبغ مقاومة ضد عدد من الفيروسات غير القريبة منه (عن Dickinson 2003)

كما أنتجت نباتات بطاطس محولة وراثياً تحتوى على صور طفرية من جين فيروس التفاف أوراق البطاطس ORF4، وهو الجين الذى يتحكم فى إنتاج البروتينين pr17 الخاص بحركة هذا الفيروس فى النبات. وأظهرت النباتات التى حولت وراثياً نقصاً جوهرياً فى أعداد هذا الفيروس فى النبات، كما كانت مقاومة - كذلك - لكل من فيروس وای البطاطس، وفيروس إكس البطاطس (Tacke وآخرون 1996)

جين البروتين المتعدد الفيروسي

يشفر جينوم بعض الفيروسات - مثل فيروس وای البطاطس PVY - لتكوين جزئ بروتيني واحد كبير - يطلق عليه اسم البروتين المتعدد بروتينيز polyprotein protease - بدلاً من تكوين عدة منتجات بروتينية منفصلة، وبعد أن يتكون فإنه يخضع لـ proteolytic process ينتج عنها المنتجات البروتينية التى يحتاجها الفيروس ولقد أدت الدراسات التى أجريت على النباتات المحولة وراثياً (فيما يتعلق بالعوامل المتحكمة فى الـ proteolytic process للـ polyprotein). إلى اكتشاف أن النباتات امهندسة وراثياً لتعبر عن الـ protease الفيروسي لأى من فيروس وای البطاطس أو فيروس تبرقش عروق التبغ tobacco vein mottling virus أظهرت درجة عالية للمقاومة لتلك الفيروسات وقد كانت تلك المقاومة على درجة عالية من التخصص على مستوى السلالة المستعملة، ويبدو أنها تعارضت مع عملية proteolysis للـ polyprotein، مما أدى إلى إحداث اضطراب فى دورة حياة الفيروس (عن Kavanagh & Spillane 1995).

شفرة الرنا الفيروسي العكسية

اتبعت استراتيجية شفرة الرنا العكسية antisense RNA strategy فى عمليات الهندسة الوراثية لمقاومة الفيروسات بنقل تتابعات رنا إلى النبات تعبر عن شفرة الرنا

الفيروسى العكسية، أى بنقل خيط رنا ذات تتابعات متممة للرنا الفيروسى؛ حيث يلتحم الرنا ذو الشفرة المضادة مع الرنا الرسول المقابل؛ مما يؤدي إلى منع استنساخه، وتعرف الحماية التى توفرها تلك التقنية باسم antisense mediated protection

نجد فى النباتات العادية أن خيطاً واحداً من الدنا - يطلق عليه اسم antisense strand - تكون تتابعاته النيكلويدية متممة complementary للتتابعات فى الخيط الآخر الذى يعرف باسم sense strand أما فى تكنولوجيا ال antisense RNA فإن جين ال antisense يُنتج بإعكاس توجه منطقة النسخ بالنسبة لك promotor. وبذا . يصبح الخيط المسئول عن الشفرة الوراثية sense strand بمثابة antisense، وهو الذى يتم نسخه ويؤدي تواجد الجين الأصلي وجين ال antisense معا إلى إنتاج antisense RNA. و sense RNA، وكلاهما مكمل لبعضهما البعض حيث يقترنان ك رنا ذات خيط مزدوج، ومن ثم لا يتوفر رنا رسول mRNA لعملية النسخ؛ مما يؤدي إلى وقف نشاط (إسكت silencing) الجين الطبيعي (عن Chahal & Gosal ٢٠٠٢).

وقد كانت تلك الطريقة فعالة سواء استخدمت الشفرة المضادة لجين الغلاف البروتينى. أم لجين ال replicase الفيروسى ونظراً لأن نظام الحماية يختلف فى الحالتين. فقد يكون من الممكن رفع مستوى المقاومة بنقل الشفرة المضادة لكلا الجينين هذا إلا أنه فى كل من حالات فيروس موزايك الخيار. وفيروس إكس البطاطس، وفيروس موزايك التبغ لم تحدث شفرة الرنا العكسية حماية من الإصابة إلا فى التركيزات المنخفضة فقط من اللقاح الفيروسى، وكانت أقل كفاءة من عملية التحول الوراثى باستعمال جين الغلاف البروتينى

وبالمقارنة . فإن الحماية من الإصابة بفيرس التفاف أوراق البطاطس تناوت فى كل من النباتات المحولة وراثياً بجين الغلاف البروتينى للفيروس أو بشفرته العكسية

ومن مميزات التحول الوراثى بالشفرة العكسية بدلا من شفرة الغلاف البروتينى، أن النبات لا ينتج الغلاف البروتينى للفيروس، وبذا تتوفر طاقته للنمو الطبيعى (عن

Nascari & Montanelli ١٩٩٧)

ويبين جدول (١٤-٥) أمثلة لفيروسات أمكن مقاومتها بإجراء عملية التحول الوراثي بالاعتماد على الشفرة العكسية للRNA الفيروسي.

شفرة عادية - ولكن معيبة - من الRNA الفيروسي

أمكن هندسة نباتات مقاومة للفيروسات باستعمال خيوط RNA عادية (غير معكوسة، أى مُشَفَّرَة). ولكنها معيبة defective، وذلك من خلال تحويلها بطريقة تجعلها غير قادرة على نقل الشفرة. ويبين جدول (١٤-٥) أمثلة لحالات اعتمد فيها التحول الوراثي على تلك التقنية.

جدول (١٤-٥). هندسة النباتات لمقاومة الفيروسات بالاعتماد على تنابعات RNA فيروسي-viral derived RNA sequences (عن Grumet ١٩٩٥).

النوع النباتي المحول وراثياً	الفيروس	المجموعة الفيروسية	الRNA
	التبغ CMV	Cucumovirus	شفرة فيروسية عكسية
	التبغ ^١ TGMV	Geminivirus	
	النبطاس PLRV	Luteovirus	
	التبغ PVX	Potexvirus	
<i>Nicotiana benthamiana</i>	BYMV	Potyvirus	
	التبغ PVY		
	التبغ ^١ TEV		
	انقاوون - التبغ ZYMV		
	التبغ TMV	Tobamovirus	
	^١ TSWV	Tospovirus	
	التبغ TEV	Potyvirus	شفرة غير عكسية ولكن معيبة
	التبغ TMV	Tobamovirus	
	التبغ TSWV	Tospovirus	
	نفت اليريت ^١ TYMV	Tymovirus	

١ - TGMV = tomato golden mosaic virus - TGMV، و TEV = tobacco etch virus، و TSWV = tomato spotted wilt virus، و TYMV = turnip yellow mosaic virus؛ ولأسماء الكاملة للفيروسات الأخرى التي وردت رموزها في الجدول يراجع جدول (١٤-٣)

الرنا الفيروسي التابع وجزئيات الرنا المشوهة المعيقة لفعل الفيروس

على الرغم من بساطة تركيب الفيروسات واعتمادها الكامل على خلايا العائل في كافة نشاطها الأيضى .. فإن مجموعات عديدة من الفيروسات يمكنها أن تكتسب تتابعات لحمض نووي يكون تابعاً لها، ويمكن اعتبارها - مجازاً - متطفلات جزئية molecular parasites. هذه التتابعات - والتي تتضمن التتابع الفيروسي satellites viruses، والجزئيات المشوهة المعيقة لفعل الفيروس defective interfering particles (والتي تعرف باسم helper viruses) - ليست ضرورية لعمل الفيروس، ويمكنها تثبيط ظهور أعراض الإصابة، وتكاثر الفيروس ذاته.

وقد حظيت تلك المتطفلات الجزئية باهتمام الباحثين الساعين إلى هندسة نباتات مقاومة للفيروسات. ويبين جدول (١٤-٦) أمثلة للفيروسات التي استعملت معها تلك التقنية.

جدول (١٤-٦): المهندسة الوراثية لمقاومة الفيروسات باستعمال المتطفلات الفيروسية (عن Grumet ١٩٩٥).

المائل المحول وراثياً	الفيروس	المجموعة الفيروسية	المتطفل الفيروسي
	التبغ - الطماطم	CMV	Cucumovirus
	التبغ	TobRV ^(١)	Nepovirus
<i>Nicotiana benthamiana</i>		ACMV ^(٢)	Geminivirus
<i>N. benthamiana</i>		BCTV ^(٣)	
<i>N. benthamiana</i>		CyRSV	Tombusvirus

أ - Defective interfering particles .. وهى جزئيات رنا مشوه تعيق عمل الفيروس الأصلي (helper virus).

ب - tobacco ringspot virus = TobRV، و African cassava mosaic virus = ACMV، و beet curly top virus = BCTV، للأسماء الكاملة لباقي الفيروسات التي وردت رموزها فى الجدول .. يراجع جدول (١٤-٤).

يوجد التابع الفيروسي في عدة مجاميع من الفيروسات التي يوجد بها الحامض النووي على صورة رنا. وهو - أى التابع - جزئياً مفرد من الرنا يحتوى على نحو 300-400 نيوكليوتيدة. وقد اعتبر البعض هذه التوابع كطفيليات للفيروسات، لأنها تستفيد من آلية تكاثر الفيروس، وتغلف نفسها بالغللاف البروتينى للفيروس، ولكنها ليست ضرورية لتكاثر الفيروس ذاته. وقد جرب هذا التطبيق للهندسة الوراثية مع كل من فيروس موزايك الخيار، وبقع التبغ الحلقي فى التبغ، حيث أظهرت النباتات المحولة وراثياً أعراضاً مرضية أقل شدة - مما فى غير المحولة - عندما تعرضت للإصابة بالفيروس الأسمى، بينما لم يتأثر نموها بعملية التحول الوراثى

وتتميز هذه الطريقة بأن تعرض النباتات المحولة وراثياً للإصابة بالفيروس الذى ينتمى إليه التابع يودى - تلقائياً - إلى زيادة أعداد التابع فى النباتات، وزيادة الوقاية التى يوفرها ضد الفيروس وبالمقارنة . فإن فاعلية نقل الجين المسئول عن تمثيل الغلاف البروتينى للفيروس إلى النبات تتناسب طردياً مع الكمية المثلثة من هذا الغلاف فى النبات، وهو ما يتطلب وجود جرعة كبيرة من هذا الجين فى النبات المحول وراثياً

ومن أهم محبوس صفا التطبيقي للصناعة الوراثية ما يلى:

- ١ - لا تتوفر التوابع فى جميع الفيروسات.
- ٢ - لا يمكن التنبؤ دائماً بتأثير التوابع فى النباتات المحولة وراثياً، فبينما حى تقلل كثيراً من شدة الأعراض المرضية فى معظم الحالات، فإنها تزيد فى حالات أخرى قليلة (عن Grumet 1990)

وقد وجد أن الحماية التى يوفرها الرنا التابع لفيروس موزايك الخيار كانت فعالة فى مكافحة الفيروس فى كل من حالتى الحقن بالبن وميكانيكياً

أما بالنسبة للتحول الوراثى الذى يجرى باستعمال جينوم الـ helper virus، فقد أظهرت الدراسات أن المقاومة لا تظهر فى الأوراق التى تحقن بالفيروس، وإنما فى الأوراق التالية لها فى الظهور، وأن درجة الحماية لا تتوقف على تركيز الفيروس

المستخدم فى الحقن، ولا ترتبط بدرجة التعبير عن تقابعات الحامض النووى (ak helper virus) المستخدم فى التحويل الوراثى (عن Grumet ١٩٩٥).

إن من أكبر مخاطر تقنية التحويل الوراثى باستعمال الجينات الخاصة بالتتابع الفيروسيّة satellite viruses وال helper viruses أنها لا تكون دائماً مخفضة لأعراض الإصابات التى تحدثها الفيروسات الأصلية، فقد تحدث بها طفرات تجعل تأثيرها منشطاً للفيروس الأسمى ليصبح أشدّ ضراوة كذلك فإن الفيروس التابع لا يكون تأثيره بالضرورة واحداً فى كل عوائله، فهو قد يكون مثبطاً لفعل الفيروس الأسمى فى أحد الأنواع النباتية، ومنشطاً له فى نوع آخر (عن Scholthof وآخرين ١٩٩٣).

هذا .. ويبين جدول (١٤-٧) مقارنة بين الطرق المختلفة للتحويل الوراثى باستعمال جينات مختلفة ذات أصل فيروسى.

جدول (١٤-٧): مقارنة بين الطرق الرئيسية لهندسة النباتات لمقاومة الفيروسات (عن Grumet ١٩٩٠).

الطريقة	المزايا	العيوب
الغلاف البروتينى	- قابلة للتطبيق بصورة عامة - فعالة بصورة مقبولة	- تعتمد المقاومة - غالباً - على مستوى التعبير عن الغلاف البروتينى فى النبات وشدة الإصابة
جينات السلالات الفيروسيّة الضعيفة	- توفر مستوى عالٍ من المقاومة	- قد تتسبب فى نقص المحصول أو جودته
الكود المعكوس antisense	- تستمر المقاومة وتزداد ذاتياً	- قد تطفّر إلى سلالة أشدّ ضراوة - قد تتفاعل مع فيروسات أخرى؛ لتسبب أعراضاً شديدة
الرنا التابع	- قابلة للتطبيق بصورة عامة - تستمر المقاومة وتزداد ذاتياً بعد حدوث الإصابة الفيروسيّة	- ليست شديدة الفاعلية - لا يمكن - دائماً - التنبؤ بتأثير التابع
	- توفر مستوى عالٍ من المقاومة	- قد تطفّر التوابع؛ لتسبب أعراضاً أشدّ