

واستمرت حالة المقاومة في كل من الظروف الهوائية واللاهوائية. ويبدو أن تلك المقاومة كان مردها إلى المستويات العالية التي تكونت من فوق أكسيد الأيدروجين، نظراً لأنها - أى المقاومة - اختفت لدى معاملة الأنسجة المحولة وراثياً والمحقونة بالبكتيريا بإنزيم محلل لفوق أكسيد الأيدروجين H_2O_2 degrading catalase كذلك أظهرت النباتات المحولة وراثياً مقاومة جيدة ضد الفطر *Phytophthora infestans* المسبب للندوة المتأخرة، حيث تأخر ظهور البقع المميزة للإصابة بهذا الفطر (Wu وآخرون ١٩٩٥)

كذلك أظهرت نباتات البطاطس التي حولت وراثياً بهذا الجين مقاومة عالية لعدد آخر من الأمراض الفطرية والبكتيرية، وخاصة لمرض ذبول فيرتسيليم. كما أظهرت نباتات الأرز التي حولت وراثياً بجين فوق أكسيد الأيدروجين مقاومة للفطريات (عن Chahal & Gosal ٢٠٠٢).

الجينات المستعملة في عمليات التحول الوراثي لمقاومة البكتيريا

لم تلق جهود الهندسة الوراثية لأجل مقاومة الأمراض البكتيرية نجاحاً كبيراً، ومن الأمثلة القليلة الواعدة في هذا الشأن، ما يلي:

جينات المقاومة الطبيعية

قد تكون الجينات المتحصل عليها من النباتات الراقية - لأجل عمليات التحول الوراثي لمقاومة الأمراض البكتيرية - من جينات المقاومة الطبيعية للمرض ذاته أو لأمراض أخرى في النباتات التي حُصل منها على تلك الجينات، ومن الأمثلة على ذلك، ما يلي

• من بين جينات المقاومة الطبيعية التي تكثر الدراسات عليها حالياً في مجال هندسة المقاومة للأمراض البكتيرية الجين Rps2 من *Arabidopsis*، وجينا الطماطم Cf9، و Pto (عن Chahal & Gosal ٢٠٠٢).

• أمكن عزل طفرة من النبات النموذجي *Arabidopsis thaliana* تؤدي إلى وقف ظهور أعراض الإصابة بالذبول بعد حقن النبات بسلاطة عالية الضراوة من البكتيريا

الصناعة الوراثية لمقاومة الفطريات والبكتيريا

Ralstonia solanacearum. أعطى هذا الجين الرمز nws1 (حيث لا توجد أعراض ذبول (no wilt symptoms). ولم يكن لغياب أعراض الذبول ارتباطاً مع أى موت لخلايا العائل، أو لأى تعبير معين لجينات حامض السلسليك salicylic acid أو حامض الجاسمونيك jasmonic acid، أو تلك المتعلقة بالإثيلين، كما كانت هذه الطفرة خاصة - فقط - بتلك البكتيريا (Feng وآخرون ٢٠٠٤).

● وتتطلب مقاومة الطماطم للبكتيريا *Pseudomonas syringae* pv *tomato* الجينين Pto، و Prf. وفى الطفرات التى يختفى فيها الجين Prf تُفقد المقاومة للـ Pto. والحساسية للمبيد الحشرى العضوى الفوسفورى فنثيون fenthion، بما يفيد تحكم الجين Prf فى كلا الشكلين المظهرين. ولقد وجد أن زيادة التعبير عن الجين Prf تؤدي إلى زيادة المقاومة لعدد من مسببات المرضية البكتيرية والفيروسية وزيادة الحساسية للفنثيون، كما تُظهر تلك النباتات مستويات من حامض السلسليك تقارن بما تظهره النباتات التى تحدث بها حالات المقاومة الجهازية المكتسبة ويستفاد من تلك الدراسة أن زيادة التعبير عن Prf يُنشئ المسارات الأيضية لكل من الـ Pto والـ Fen بطريقة مستقلة عن المسبب المرضى، وتؤدي إلى تنشيط المقاومة الجهازية المكتسبة (Oldroyd & Staskawicz ١٩٩٨).

● أُنكن تحويل الأرز وراثياً بالجين Xa21 - الذى يكسبه مقاومة ضد البكتيريا *Xanthomonas oryzae* - بنقله إليه من النوع *Oryza longista-minata*، الأمر الذى لم يمكن تحقيقه بطرق التربية التقليدية.

هذا . إلا أنه عندما نقل جين الفلفل Bs2 - المسئول عن مقاومته للبكتيريا *Xanthomonas* - إلى أنواع من غير الباذنجانيات فإنه لم يكن فعالاً، بما يعنى أن جينات المقاومة R genes قد تقتصر فاعليتها على الأنواع المتقاربة تقسيمياً فقط (عن Dickinson ٢٠٠٣).

التعبير عن جينات البكتيروفاجات

أدى التعبير عن الـ bacteriophage T4 lysozyme في البطاطس المحولة وراثياً إلى زيادة مقاومتها للبكتيريا *Erwinia carotovora*

وتجدر الإشارة إلى أن الليزوزيمات تعد من البروتينات ذات النشاط المضاد للبكتيريا

الجينات التي تشفر لبروتينات مضادة للبكتيريا

يمكن الاستفادة من الجينات التي تشفر لبروتينات ذات نشاط مضاد للبكتيريا، وهي التي تعرف باسم lytic proteins، مثل: السركوبيينات cercopins، والأتاسينات attacins، والليزوزيمات lysozymes (التي أسلفنا الإشارة إليها).

وعنى سبيل المثال أمكن تحويل البطاطس وراثياً بالجين cercopin B، وكانت النباتات الناتجة أكثر تحملاً للسالة ٣ من البكتيريا *Ralstonia solanacearum* عن النباتات غير المحولة وراثياً

كذلك فإن الجينات التي تشفر لتكوين البولي بيبتيديات الصغيرة مثل الثيونينات thionins - وهي التي تؤدي إلى تدهور الأغشية الخلوية في الكائنات الدقيقة - تفيد في عمليّات التحول الوراثي وقد وجد أن التعبير عن جين الشعير α -thionin في التبغ المحول وراثياً يزيد بشدة من مقاومته للبكتيريا *Pseudomonas syringae*، إلا أن محاولات أخرى مع هذا البروتين لم تحسن من صفة المقاومة (عن Slater وآخرين ٢٠٠٣).

هذا وتتركب الجدر الخلوية للبكتيريا مما يعرف باسم peptidoglycans. وهي تتكون من بروتين ومكونات كربوهيدراتية يمكن هضمها بالإنزيم ليزوزيم lysozyme، الذي يوجد بوفرة في بيض الدجاج بتواجد هذا الإنزيم - كذلك - في معدة الماشية حيث يلعب دوراً في تحليل البكتيريا التي تتكاثر هناك لأنها تساعد في تحليل السليليوز والمكونات الأخرى للجدر الخلوية النباتية ومن الممكن استعمال إنزيم الماشية هذا المُحلّل للجدر الخلوية للبكتيريا في عمليّات التحول الوراثي للنباتات. ولقد أمكن -

بالفعل - نقل هذا الجين إلى الخميرة *Pichia pastoris* التي أصبحت قادرة على إنتاج كميات ضخمة من إنزيم الليزوزيم ولدى استعمال هذا الإنزيم في معاملة بذور النباتات بتركيز ٢٥-١٠٠ جزء في المليون فإنه أدى إلى قتل ما على تلك البذور من بكتيريا.

هذا . إلا أنه من مخاطر استعمال إنزيم الليزوزيم في عمليات التحول الوراثي ثباته الشديد، الأمر الذي قد يؤدي إلى قتله للبكتيريا النافعة في التربة، ولذا .. يتعين التأكد من مدة بقاء الإنزيم في التربة بعد زراعة نباتات محولة وراثياً به، وما هي تأثيراته على بكتيريا التربة (عن Chrispeels & Sadava ٢٠٠٣)

ولقد أمكن تحويل البطاطس وراثياً بجين الدجاج chly المسئول عن تكوين الإنزيم lysozyme (وهو إنزيم يحلل الشيتين والبيتي دوجليكان petidoglycan)، وقد أظهرت النباتات المحولة وراثياً مقاومة للإصابة بالبكتيريا *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* المسببة لمرض العفن الأسود لقاعدة الساق والعفن الطرى. وقد ارتبط مستوى المقاومة بمستوى التعبير عن الجين chly في النباتات المحولة وراثياً (Serrano وآخرون ٢٠٠٠).

الجينات التي تشفر لتكوين مركبات مضادة للبكتيريا

من بين محاولات التحول الوراثي التي أجريت بهدف التشفير لتكوين مركبات مضادة للبكتيريا، ما يلي:

• تم تحويل البطاطس وراثياً بالجين المنتج للبروتين IA sarcotoxin (وهو سُم بكتيري) المتحصل عليه من *Sarcophaga peregrina*. وذلك لجعلها أكثر تحملاً للإصابة للأعفان التي تسببها كلا من *Erwinia* spp. و *Ralstonia solanacearum* (Galun وآخرون ١٩٩٧)

• أمكن تخليق جين في المختبر - يتميز بنشاطه الواسع المدى المضاد للكائنات الدقيقة - أعطى الرمز MsrA1، وهو يشفر لتكوين المركب: N terminus-modified, cecropin-melittin cationic peptide chimera ذات الفاعلية الواسعة المدى ضد

الكائنات الدقيقة وقد تم نقل هذا الجين المخلوق إلى البطاطس، التي لم يتأثر مظهرها أو محصولها من الدرنات، بينما كانت شديدة المقاومة للمسببات المرضية التي حقنت بها البطاطس، وهي: *Phytophthora cactorum*، و *Fusarium solani*، و *Erwinia carotovora* ولقد احتفظت الدرنات المحولة وراثياً بقدرتها على المقاومة لأكثر من عام، ولم تظهر أى أضرار على الفئران التي غذيت عليها (Osusky وآخرون ٢٠٠٠)

• أمكن تحويل البطاطس وراثياً بجين تم تحضيره من جيني الديفينسين *cecropin* من الفراشة *giant silkmoth*، والـ *melittin* من نحل العسل، وباختبارها تبين مقاومتها للبكتيريا *Erwinia carotovora* المسببة للعفن الطرى البكتيري

• تُجرى محاولات تأخذ اتجاهات شتى في محاولة لتحويل التفاح والكمثرى وراثياً بأنواع مختلفة من البروتينات المضادة للميكروبات لأجل مقاومتها للبكتيريا *Erwinia amylovora* المسببة للفحة ولقد نجح تحويل التفاح وراثياً بجين الـ *attacin E* فى جعله أكثر مقاومة للبكتيريا تحت ظروف الحقل (عن Slater وآخرون ٢٠٠٣).

• أمكن زيادة المقاومة فى كل من التبغ والكرنب بتحويلهما وراثياً بجين *glucose oxidase* الذى حُصل عليه من *Aspergillus niger*، وكانت حالات المقاومة التي اختبرت هى ضد كل من *Phytophthora nicotianae* فى التبغ، و *Xanthomonas campestris pv campestris* فى الكرنب (Lee وآخرون ٢٠٠٢)

• يؤدى المركب المعروف باسم *tachyplexin I* [وهو ببتيد مضاد للميكروبات يُنتجه سلطعون حدوة الحصان الآسيوى *Tachypleus tridentatus* (أحد أنواع سرطان البحر)] .. يؤدى بتركيز ٤-١١.١ ميكروجرام/مل فى البيئات الصناعية إلى قتل البكتيريا *Erwinia spp.* المسؤولة عن إصابة البطاطس بكل من العفن الطرى وعفن قاعدة الساق الأسود وعندما حولت البطاطس وراثياً بالجين الذى يشفر لهذا المركب كانت الدرنات أقل إصابة قليلاً ببكتيريا العفن الطرى *Erwinia carotovora subsp. atroseptica* (Allefs وآخرون ١٩٩٦)

• يتميز جليكوبروتين الـ *lactoferrin* (الذى يأخذ الرمز *Lf*) بخاصيتى قتل

البكتيريا bactericidal ووقف نشاطها bacteristatic، وذلك بالنسبة لمدى واسع منها، وكذلك تأثيره على الفطريات والفيروسات، حيث يتراوح التركيز القاتل منه بين ٣، و ١٥٠ ميكروجرام/مل بالنسبة للبكتيريا، و ١٨-١٥٠ ميكروجرام/مل بالنسبة للخميرة، و ٣-٦٠ ميكروجرام/مل بالنسبة للفطريات الخيطية (عن Zhang ١٩٩٨).

وقد أمكن تحويل التبغ وراثياً بالجين المسئول عن تكوين الـ lactoferrin الإنساني، حيث أظهرت النباتات التي عُبرَ فيها عن هذا الجين تأخيراً جوهرياً في ظهور أعراض الإصابة بالذبول عندما تم عداها بالبكتيريا *Ralstonia solanacearum*، وكانت العلاقة طردية بين شدة التعبير عن الجين وشدة المقاومة للبكتيريا (Zhang وآخرون ١٩٩٨).

الجينات التي تشفر لتكوين إنزيمات تُلغى التأثير السام للسموم

البكتيرية

إن عديداً من الأنواع البكتيرية والفطرية الممرضة للنباتات تقوم بزيادة قدرتها على الإصابة (زيادة درجة ضراوتها virulence) بإنتاجها لسموم متخصصة على عوائل معينة أو غير متخصصة ونظراً لأن المسببات المرضية تكون مقاومة للسموم التي تنتجها، فإن الأعراض المرضية التي تُحدثها بعض تلك المسببات يمكن الحد منها بنقل جينات المسببات المرضية - التي تتحكم في إنتاج تلك السموم - إلى النباتات. ومن الأمثلة الهامة على المقاومة - المتحصل عليها من المسبب المرضي - للأمراض التي تظهر أعراضها من خلال السموم التي تفرزها المسببات المرضية - حالة اللفحة الهالية في الفاصوليا التي

تسببها البكتيريا *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*

إن الاصفرار الشديد الذي يظهر على النباتات التي تُصاب بهذه البكتيريا يحدث بفعل السم phaseolotoxin (وهو ثلاثي الببتيد tripeptide) الذي تفرزه البكتيريا. يثبط هذا الإنزيم ornithine carbamoyltransferase (اختصاراً OCTase) الذي يقوم بتحويل كل من الـ ornithine والـ carbomyl phosphate إلى citrulline، وهو تفاعل يدخل في تفعيل الـ arginine وفي التحولات بين الأحماض الأمينية من عائلة الـ

glutamate يثبط الـ phaseolotoxin - كذلك - نمو عديد من الأنواع البكتيرية نظراً لاحتوائها - أيضاً - على OCTase.

تنتج البكتيريا *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* طرازين من الـ OCTase، أحدهما حساس للـ phaseolotoxin، والآخر مقاوم له. وأثناء النمو في الجو البارد نسبياً - عندما يكون إنتاج الـ phaseolotoxin مثاليًا - تنتج هذه البكتيريا الـ OCTase المقاوم فقط، ومن ثم تكون البكتيريا مقاومة للسم الذي تفرزه ولقد عزل الجين المسئول عن إنتاج الـ OCTase البكتيري غير الحساس ونقله إلى النباتات، التي أصبحت قادرة على إنتاج هذا الـ OCTase غير الحساس للـ phaseolotoxin، بالإضافة إلى الـ OCTase الأصلي الذي يعد حساساً لهذا السم. هذا إلا أن وجود الـ OCTase غير الحساس في النباتات يجعلها قادرة على التغلب على التثبيطات الإنزيمية التي يمكن أن تحدث عندما تنتج البكتيريا السم داخل النبات، ومن ثم تكون هذه النباتات أقل حساسية للسم وأقل إظهاراً لأعراض المرض (عن Lindow 1996).

ويشفر جين الطماطم Pto لإنزيم من الـ serine-threonine kinase، الذي يكسب النباتات مقاومة لسلاسل البكتيريا *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* التي يُعَبَّرُ فيها عن جين عدم الضراوة gene avirulence الذي يأخذ الرمز avrPto ولقد تبين أن سلالة التبغ Wisconsin-38 يظهر عليها حالة فرط حساسية hypersensitivity لدى حقنها (عدواها) بالبكتيريا *P. syringae* pv. *tabaci* التي يُعَبَّرُ فيها عن الجين avrPto وعندما حولت سلالة التبغ Wisconsin-38 وراثياً بالجين Pto أظهرت النباتات زيادة معنوية في المقاومة للبكتيريا، مقارنة بمقاومة السلالة الأصلية غير المحولة وراثياً (Thilmony وآخرون 1995) ولقد حدث الأمر ذاته عندما حولت نباتات *Nicotiana benthamiana* بنفس الجين Pto (Rommens وآخرون 1995). مما يعنى أن جينات المقاومة تحافظ على خصائصها وتأثيراتها المسئولة عن صفة المقاومة المتخصصة حتى عند نقلها من جنس الآخر

كذلك أمكن تحويل التبغ وراثياً بالجين ttr الخاص بتنظيم المقاومة للـ tabtoxin في

Pseudomonas syringae pv. *tabaci*، حيث أظهرت النباتات المحولة وراثياً مقاومة لكل من المعاملة بالسم البكتيري وللإصابة بالبكتيريا ومن الطبيعي أن هذه الاستراتيجيات في الهندسة الوراثية لا تفيد إلا مع الأمراض التي تلعب فيها السموم دوراً مباشراً وأساسياً في ظهور المرض (عن Nascari & Montanelli 1997).

الاستراتيجيات الأخرى لهندسة نباتات مقاومة للأمراض

من بين الاستراتيجيات التي يفكر فيها علماء الهندسة الوراثية لإنتاج نباتات مقاومة لسببات الأمراض، ما يلي

١ - تجريد السببات المرضية - التي تحدث أضرارها من خلال إفرازها لإنزيمات تقوم بتحليل الجدر الخلوية - تجريدها من أسلحتها، نيس بوقف إنتاج تلك الإنزيمات - فهي كثيرة - وإنما بالحد من مفعولها بتعديل النباتات بجينات تؤثر في انتقال تلك الإنزيمات في النباتات، وهي التي ينظم انتقالها جينات مثل Aep (وهو رمز لوظيفة الجين activation of extracellular enzyme production)؛ فإذا أمكن تحديد ونقل جين يحد من نشاط الجين Aep activator لأمكن الحد من انتقال إنزيمات بعينها، كذلك التي تعص على تحلل الجدر الخلوية

٢ - نزع الجينات التي تجعل النباتات أقل عرضة للتجريح، أو تزيد من سرعة الاستجابة للتجريح، أو تزيد من سرعه تكوين بيريدم الجروح

٣ - إبطاء النضج بحيث لا تفقد التعار صلابتها سريعاً بعد الحصاد، ومن ثم تستمر أقل عرضة للإصابة بالأعقان لأطول فترة ممكنة بعد الحصاد، وقد تناولنا هذا الموضوع بالشرح في موضع آخر من هذا الكتاب (Mount & Berman 1994)

الإنجازات في مجال التحول الوراثي لمقاومة الأمراض الفطرية والبكتيرية

على الرغم من حداثة العهد نسبياً في مجال دراسات التحول الوراثي لإنتاج نباتات مقاومة للفطريات والبكتيريا الممرضة للنباتات، فقد تم إنتاج واختبار عديد من حالات التحول الوراثي في عدد من أهم المحاصيل الزراعية؛ بهدف جعلها مقاومة لعدد من أهم المسببات المرضية (جدولاً ١٦-٢، و ١٦-٣)