

حث الاستجابات الدفاعية النشطة

إن المقاومات النشطة هي في واقع الأمر استجابات مستحثة، وتعنى أن النباتات تكون قادرة على التعرف على محفز ما أو أكثر من محفز يفرزهم المسبب المرضي - خلال المراحل المبكرة من الإصابة - والاستجابة لها. ويستدل من ذلك على أن الخلايا النباتية تمتلك أنظمة للمراقبة تمكنها من التعرف على تلك المحفزات التي تنتجها الكائنات الممرضة وتستجيب لها. ويُشفر لأنظمة المراقبة تلك بواسطة جينات المقاومة التي تُنتج بروتينات مُستقبلة receptor proteins، تتواجد في مواقع استراتيجية في حجيرات خلوية. ويعنى ذلك أن التحكم في قدرة النبات على شن استجابة دفاعية نشطة تعتمد على امتلاكه لمجموعة من جينات المقاومة وعلى توقيت التعبير عنها.

إن جينات المقاومة تتواجد - عادة - في مناقيد تكون على درجة عالية من التقارب الوراثي، ومن أمثلة ذلك ما يلي:

١ - أمكن التعرف على خمسة مواقع كروموسومية تتحكم في مقاومة الكتان للصدأ، وأظهر تحليل الموقعين L₁ و M احتواء الأول على ١٣ جينًا والثاني على سبعة جينات شديدة التماثل.

٢ - تعد جينات الـ Cf، و Pto، و Fen، و Prf، و I2C-1 في الطماطم جزءًا من عنقود أكبر من الجينات المتقاربة.

٣ - يعتبر جين Xa21 في الأرز جزءًا من عناقيد أكبر من الجينات المتقاربة. ويسمح تواجد جينات المقاومة المتقاربة في عناقيد بحدوث انعزالات أثناء الانقسام الاختزالي: مما يؤدي إلى ظهور خصائص جديدة لجينات المقاومة في الأجيال المتتالية (عن Hutcherson ١٩٩٨).

المقاومة النشطة: فرط الحساسية

وصفت ظاهرة فرط الحساسية لأول مرة بواسطة Stakman في أصداء الحبوب، وذلك في عام ١٩١٥، ولذا .. كان الاعتقاد حتى بدايات القرن الماضي - أن الظاهرة لا

نحدث إلا مع الطفليات الإجبارية، ولكن ظهر خطأ هذا الاعتقاد فيما بعد، حيث لوحظت الظاهرة في عديد من التفاعلات المرضية.

ويعنى باصطلاح فرط الحساسية كل التغيرات المورفولوجية، والهستولوجية. والفسيزولوجية. والكيميائية التي تحدث نتيجة الإصابة بمسبب مرضي مُعدٍ infectious Agent. وتؤدي إلى تحلل سريع وموضعي في خلايا النسيج المصاب. ووقف نشاط المسبب المرضي عند موقع الإصابة. وتحديد موقع الإصابة، بما يمنع تقدم المسبب المرضي. تحدث التفاعلات التي تقود إلى حالة فرط الحساسية بمجرد حدوث تعارف خاص جداً بين ناتج جين عدم الضراوة في المسبب المرضي وناتج جين المقاومة في العائل.

أما النباتات التي لا تستجيب للمسبب المرضي بالطريقة السابقة.. فإنها توصف بأنها Normsensitive.

خصائص ظاهرة فرط الحساسية

من أهم خصائص تفاعل فرط الحساسية ما يلي:

- ١ - لا يمكن لغير المسببات المرضية الحية بمختلف أنواعها، والفيروسات. وبعض الحشرات الثاقبة الماصة إحداث هذا التفاعل.
- ٢ - لا يحدث التفاعل إلا في الحالات التي لا يوجد فيها توافق بين العائل والطفيل، والتي توصف بأنها Incompatible.
- ٣ - لا يوجد في بداية الإصابة فرق جوهري - في سرعة تكاثر المسبب المرضي - بين كل من العوائل المقاومة والعوائل القابلة للإصابة.
- ٤ - يحدث تفاعل فرط الحساسية، ويظهر التحلل necrosis الماحب لها. في الأصناف المقاومة. قبل ظهور أعراض المرض في الأصناف القابلة للإصابة.

تفسير ظاهرة فرط الحساسية

تُصاحَب استجابة فرط الحساسية بواحد أو أكثر من التفاعلات الدفاعية، والتي تتضمن ما يلي:

- ١ - تمثيل الفيتوأكسينات phytoalexin production.
- ٢ - اللجننة lignification.
- ٣ - إنتاج الإنزيمات المحللة، مثل الـ chitinases، والـ glucanases.
- ٤ - تمثيل الجليكوبروتينات الغنية بالهيدروكسي بربولين hydroxyproline rich glycoproteins.

ومن أهم مظاهر قرب موت الخلية، ما يلي:

- ١ - فقد الأغشية الخلوية لقطبيتها membrane depolarization.
- ٢ - التسرب الأيوني electrolyte leakage.
- ٣ - فشل الخلية في أن تتبلزم بصورة طبيعية في محلول ذات ضغط أسموزي أعلى من ضغطها الأسموزي.

وكل هذه المظاهر تعنى حدوث تدهور في الأغشية تفقد معه الخلية خصائصها المميزة.

وقد يحدث هذا التدهور من خلال:

- ١ - وسائل غير إنزيمية من خلال نشاط المركبات النشطة في الأكسدة، مثل:
 - ذرات الأكسجين المفردة (singlet oxygen) (O_2^1).
 - أنيون الـ superoxide (O_2^-).
 - شق الهيدروكسيل hydroxyl radical (OH).
 - شق البيروكسيد perhydroxyl radical (HO_2).

٢ - عن طريق الإنزيمات .. فمثلاً يزداد نشاط كلا من: lipolytic acid hydrolase و lipoxigenase في أوراق الفاصوليا العادية التي تتعرض للإصابة بسلالة غير متوافقة من *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (عن Strange ١٩٩٣).

ولكن .. هل يعد موت الخلايا بفرط الحساسية ضرورياً لكي يكون النبات مقاوماً لسببات الأمراض؟ إن الإجابة على هذا السؤال هي بالنفي؛ ذلك أن موت الخلايا قد

لا يحدث. وقد يحدث كنتيجة لأحداث أخرى قادت إلى المقاومة، ولم يحدث كسبب مباشر لها. ونحن نعرف عديد من حالات المقاومة النباتية للفيروسات، والبكتيريا، والفطريات لا يظهر فيها تفاعل فرط الحساسية.

ومن أمثلة حالات المقاومة التي لا تظهر فيها فرط الحساسية، ما يلي:

١ - مقاومة جين Rx فى البطاطس لفيروس إكس البطاطس.

٢ - مقاومة الفاصوليا ضد طفرات Hrp من *Pseudomonas syringae*.

٣ - المقاومة المتخصصة ضد سلالات معينة من الفطر المسبب للبياض الدقيقي فى الشعير والتي يتحكم فيها الجين mlg.

٤ - مقاومة الطماطم للفطر *Cladosporium fulvum* (عن Kombrink & Schmelzer

(٢٠٠١).

إن التفاعلات التي تؤدي إلى ظهور حالة فرط الحساسية (وهي نوع من الموت المبرمج لخلايا النبات) تُستحث على الحدوث عندما يتعرف البروتين (الذى يُشفر الجين R - المسئول عن المقاومة - لتكوينه) على بروتين آخر يُنتجه المسبب المرضى (يُشفر لتكوينه الجين Avr - المسئول عن عدم الضراوة - فى الطفيل). يعرف بروتين الطفيل باسم "الحاث" أو "المثير" elicitor، ومن أمثلته: AvrBs3 الذى تنتجه البكتيريا *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*، و AvrPto الذى تنتجه البكتيريا *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*، وهى بروتينات يتعرف ناتج الجين R داخل الخلايا النباتية عليها.

وإلى جانب جينات عدم الضراوة فإن البكتيريا تتطلب جينات hrp (وهى الخاصة باستجابة فرط الحساسية والتطفل المرضى hypersensitive response and pathogenicity) لأجل حث تفاعل فرط الحساسية فى غير العوائل والأصناف المقاومة، وأيضاً لأجل إحداث المرض فى العوائل المتوافقة.

هذا ويُشفر أحد جينات الـ hrp لتكوين بروتين حاث لتفاعل فرط الحساسية يعرف باسم harpin. وجد فى كل من *P. syringae* و *Erwinia amylovora*. و E.

chrysanthemi، و *E. carotovora*، وتكون بروتينات الـ *harpins* النقية نشطة بيولوجياً ويمكنها حث تفاعل فرط الحساسية في عديد من العوائل. وتلك الاستجابة لا تعد من التفاعلات التي تنطبق عليها نظرية الجين للجين. ومن أمثلة البروتينات الأخرى الشبيهة بالـ *harpins* التي أمكن عزلها البروتين *PopA* الذي عزل من البكتيريا *Ralstonia solanacearum* (عن Alarcon وآخرين ١٩٩٨).

إن جميع الأنواع البكتيرية المنتجة للـ *harpins* أو للبروتينات الشبيهة بالـ *harpins* – التي أسلفنا بيانها – هي سالبة لصبغة جرام. وباكتشاف أن البكتيريا الموجبة لصبغة جرام *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* تستحث استجابة تحلل موضعي (فرط حساسية) في كل من نبات شب الليل *Mirabilis jalapa* والتبغ .. تمكن Alarcon وآخرون (١٩٩٨) من عزل رائق مزارع الخلايا البكتيرية الخالي من البكتيريا (والذي كان قادراً – مثل البكتيريا الحية – على إحداث تفاعل فرط الحساسية) .. تمكنوا من عزل مركب بروتيني له خصائص بروتينات الـ *harpin*. كان قادراً على حث تفاعل فرط الحساسية في كل من نباتي شب الليل والتبغ.

المسببات المرضية المحدثة لظاهرة فرط الحساسية

لا تقتصر حالة فرط الحساسية على فئة معينة من المسببات المرضية. وإنما تحدثها عديد من المسببات المرضية بمختلف فئاتها. كما يلي:

- ١ – الطفيليات الإجبارية Obligate Parasites، كما في فطريات الأصداء والبياض الدقيقي.

- ٢ – الطفيليات الاختيارية Facultative Parasites. كما في الفطر *P. infestans* المسبب لمرض الندوة المتأخرة في البطاطس.

- ٣ – الرميات الاختيارية Facultative Saprophytes. كما في فطريات *Colletotrichum lindemuthianum* في الفاصوليا، و *Corynespora cucumerinum* في الخيار.

- ٤ – البكتيريا، حيث تظهر فرط الحساسية في عديد من الحالات غير المتوافقة التي تتكون فيها بقع محلية.

٥ - الفيروسات، حيث توجد فيها كذلك عديد من الحالات غير المتوافقة (عن Muller ١٩٥٩).

٦ - النيما تودا .. فمثلاً .. وجد أن مقاومة الفاصوليا لنيما تودا تعقد الجذور ترجع إلى حدوث تحلل Necrosis في القمة النامية للجذر بعد أربعة أيام من اختراق اليرقة له، وهو تفاعل فرط حساسية يحدث في الجزء المصاب فقط من الجذر، بينما تتكون الخلايا العملاقة - في موضع الإصابة - في الأصناف القابلة للإصابة (Fassulitotis وآخرون ١٩٧٠).

أمثلة لحالات فرط الحساسية ضد مختلف مجاميع المسببات المرضية فرط الحساسية في (الأمراض الفطرية)

١ - المقاومة للندوة المتأخرة في البطاطس:

إن مقاومة الـ R genes في البطاطس للفطر *Phytophthora infestans* هي من نوع فرط الحساسية الذي يحدث - في التفاعلات غير المتوافقة - في خلال ٢٤ ساعة من التعرض للفطر؛ حيث تموت خلية واحدة إلى ثلاث من خلايا البشرة عند موقع الإصابة مباشرة. هذا إلا أنه يحدث أحياناً أن يفلت الفطر من تفاعل فرط الحساسية البشري ويغزو الخلايا المجاورة للبشرة؛ مما يترتب عليه حدوث نوع من الانتشار لحالة فرط الحساسية.

أما في أصناف البطاطس القابلة للإصابة (في التفاعلات المتوافقة) فإن خلايا البشرة المصابة - رغم أنها لا تموت - فإنها كثيراً ما تُظهر بعض المظاهر التي تُصاحب فرط الحساسية، مثل: ظهور السيتوبلازم المحبب الضارب إلى البنى. وحدثت زيادة في سماكة الجدر الخلوية، والفلورة الذاتية لدى التعرض للأشعة فوق البنفسجية، وزيادة كثافة الأنوية.

ويستدل مما تقدم بيانه أن الاختلاف بين المقاومة والقابلية للإصابة بالفطر المسبب للندوة المتأخرة في البطاطس هو اختلاف كمي، على الرغم من تواجد جينات R في حالة المقاومة.

لقد تم تصوير التغيرات الهستولوجية السريعة التي تحدث في أولى خلايا البطاطس التي يخترقها الفطر *P. infestans* .. تم تصويرها مجهرياً بالفيديو من لحظة بداية الإصابة إلى حين موتها. أوضحت الدراسة أنه بعد محاولة الفطر اختراق الخلية مباشرة كونت الخلية - عند موقع الاختراق مباشرة - حاجزاً موضعياً (هو الـ papilla) بإضافة مواد إلى الجدار الخلوي، وكانت تلك العملية مصاحبة بزيادة في الحركة الدورانية للسيتوبلازم وانتقال النواه إلى ذلك الموقع. ولقد اكتملت هجرة النواة وتراكم السييتوبلازم تحت الـ appressorium الفطري في خلال ١.٥-٢ ساعة من ظهور الفطر داخل الخلية النباتية، وأعقب ذلك ازدياد في تراكم المركبات المعيقة لتقدم الفطر بتربسيبها حوله. ولقد استدل من اللون البنى القاتم لتلك المركبات وقدرتها على الفلورة الذاتية تحت الأشعة تحت الحمراء على وجود مركبات فينولية بها. وأعقب ذلك حدوث ترسيب للكالوز في الطوق المغلف للـ papillae الفطرية. وبمجرد توقف تقدم النمو الفطري اختفى التحبيب السييتوبلازمي وتركت النواة مكانها عند موقع الاختراق؛ أي إن التغيرات التي حدثت لم تكن نهائية (كانت reversible). حدث ذلك كله في التفاعلات غير المتوافقة تماماً.

أما عندما كانت التفاعلات أكثر توافقاً، فإن الاستجابة الدفاعية الموضعية الأولى فشلت في الحدوث. ونجح الفطر في غزو الخلايا مكوناً حويصلات ماصة داخلية intracellular vesicles. ولقد سهرت أولى الأعراض الدالة على التغيرات النهائية (أي الـ irreversible) التي قادت إلى موت الخلايا بحدوث تجيب للسيتوبلازم وهجرته حول الفطر. مع توقف الحركة الدورانية للسيتوبلازم. ثم حدوث انهيار مفاجئ للسيتوبلازم والنواة في خلال ٢٠ ثانية، تبعه انهيار في حوصلات الفطر الماصة. وتبع ذلك اكتساب الجدر الخلوية ومحتويات الخلية الداخلية لونها قاتماً وأصبحت ذات قدرة على الفلورة الذاتية في خلال ساعات قليلة.

وتجدر الإشارة إلى أن الاستجابات الدفاعية في التفاعلات بين البطاطس والفطر *P. infestans* كثيرة ومتنوعة وتحدث - بدرجة متساوية - في كل من النباتات المقاومة

والقابلة للإصابة على حد سواء. ويتضمن ذلك موت للخلايا من جراء فرط الحساسية، على الرغم من أن المظهر النهائي يكون مختلفاً، حيث لا تتكون سوى بقع صغيرة متحللة في النباتات المقاومة. مقابل تكوين بقع كبيرة متحللة في النباتات القابلة للإصابة. ولذا... فإنه على الرغم من وجود أو غياب R gene رئيسي. فإن تفاعلات المقاومة الرئيسية تحدث في كلتا الحالتين. ويكون مظهر المقاومة نتيجة لاختلافات كمية صغيرة في الاستجابات الخلوية والكيميائية الحيوية. ويستدل مما تقدم بيانه أنه على الرغم من وجود علاقة واضحة بين استجابة فرط الحساسية المؤدية إلى موت الخلايا وتثبيط نمو الفطر، فإنه لا يوجد دليل يُظهر الحاجة لحدوث استجابة فرط الحساسية لكي يتم الحد من انتشار الفطر (عن Kombrink & Schmelzer ٢٠٠١).

فرط الحساسية في الأمراض البكتيرية

يحدث تفاعل فرط الحساسية في الإصابات البكتيرية - كما في الإصابات المرضية الأخرى - بين أي عائل وأي طفيل غير متوافقين. ويعتقد أن البكتيريا تعد أكثر المسببات المرضية صلاحية لدراسات فرط الحساسية. نظراً لأنه يمكن وقف نموها ونشاطها في أي وقت عن طريق معاملة الأنسجة المحتوية على البكتيريا بالاستربتومييسين. ولا تحدث تفاعلات فرط الحساسية إذا أجريت هذه المعاملة خلال العشرين دقيقة الأولى من العدوى بالبكتيريا. أما المعاملة بالاستربتومييسين بعد ٢٥ دقيقة من العدوى فإنه لا يفيد في وقف تفاعل فرط الحساسية. لأن هذه التفاعلات يمكن أن تستمر بعد ذلك في الخلايا - أي بعد أن تبدأ - دونما حاجة إلى وجود خلايا بكتيرية حية. وتستمر هذه التفاعلات لمدة ٥-٧ ساعات، ويعقب ذلك موت الخلايا النباتية ذاتها في خلال ساعة أو ساعتين، ويحدث هذا الموت السريع في الخلايا النباتية نتيجة حدوث تغيير مفاجئ في نفاذية الأغشية الخلوية (Klement & Goodman ١٩٦٧).

يحدث تفاعل فرط الحساسية في الظروف الطبيعية عند وصول أي نوع من البكتيريا إلى أنسجة نباتية غير قابلة للإصابة، ولكن المناطق المتحللة تكون صغيرة جداً

ولا يمكن رؤيتها بالعين المجردة. أما عند دفع أعداد كبيرة من البكتيريا عنوة إلى داخل النبات - مثلما يحدث عند إجراء العدوى برشاشة تحت ضغط مرتفع، بتركيز لا يقل عن 5×10^6 خلية بكتيرية/مل من المعلق البكتيري .. فإن المناطق التي تتحلل - بفعل تفاعل فرط الحساسية - تلتحم معاً. وتبدو واضحة للعين المجردة.

فرط الحساسية في (الأمراض الفيروسية)

يأخذ تفاعل فرط الحساسية في الإصابات الفيروسية أحد مظهرين، كما يلي:

١ - البتر أو الاستئصال Amputative Hypersensitivity:

في هذا النوع من التفاعل يزيل العائل الفيروس بإسقاط الأوراق المصابة قبل وصول الفيروس إلى اللحاء. كما يحدث في بعض أصناف الفلفل لدى إصابتها بفيروس موزايك التبغ.

يلاحظ أن هذا التفاعل يكون مصاحباً بنقص فجائي في مستوى الأوكسين في النبات. يحدث هذا النقص عقب الإصابة بالفيروس، ويؤدي إلى سقوط الأوراق. وقد أدى رش النباتات التي يحدث فيها هذا التفاعل بالأوكسين نقتالين حامض الخليك Naphthalene Acetic Acid بتركيز ١٠٠ جزء في المليون إلى منع سقوط الأوراق. بينما لم تستجب النباتات للمعاملة بالأوكسين الطبيعي إندول حامض الخليك.

٢ - موت جميع الخلايا النباتية المصابة بالفيروس Necrogenic Hypersensitivity:
يؤدي هذا النوع من التفاعل إلى وقف انتشار الفيروس في النبات، كما يحدث عند عدوى النوع *Nicotiana glutinosa* بفيروس موزايك التبغ (عن Kiraly وآخرين ١٩٧٤).

وكثيراً ما تُعرف حالات فرط حساسية يتحكم فيها جينات رئيسية سائدة. ويترتب عليها منع انتشار الفيروس تحت ظروف الحقل، وهي التي تعرف باسم المناعة الحقلية field immunity. علماً بأنه قد يمكن حقن تلك النباتات بالفيروس صناعياً، وغالباً ما تظهر تحللاً قميماً بعد عداها بطريقة التطعيم.

وتجدر الإشارة إلى أن حالة فرط الحساسية تكون في بعض الحالات قليلة التأثير

جداً إلى درجة أن النباتات لا تكون مقاومة. فمثلاً تكون مقاومة البطاطس بفرط الحساسية لفيرس M البطاطس مصاحبة بانتشار شديد للفيرس تحت ظروف الحقل (عن Swiezynski 1994).

المقاومة النشطة : تكوين الفيتوالاكسينات

تعريف الفيتوالاكسينات

يقوم النبات بتمثيل مركبات معينة استجابة لأي محفز خارجي (سواء أكان كيميائياً، أم طبيعياً، أم بيولوجياً) بما في ذلك مسببات الأمراض، ويطلق على تلك المركبات اسم فيتوالاكسينات Phytoalexins، وهي التي تعد الأساس في حالات المقاومة الرأسية التي يتحكم فيها جين واحد.

وكان Muller (1956) قد أعطى الفيتوالاكسينات التعريف الأصلي على أنها "مضادات حيوية antibiotics تنتج من تفاعل نظامين حيويين - هما العائل والطفيل - وتؤدي إلى وقف نمو الكائنات الدقيقة الممرضة للنباتات": أما التعريف الحديث للفيتوالاكسينات فيقرر أنها مركبات مضادة للكائنات الدقيقة، ذات وزن جزيئي منخفض. تمثل وتتراكم في النباتات كنواتج أيضية ثانوية بعد تعرضها للكائنات الدقيقة، أو لمعاملات أو لظروف بيئية قاسية (Cruickshank 1980).

وتشتق كلمة Phytoalexin من الأصلين اليونانيين Phytos بمعنى نبات، و alexin بمعنى مركب عازل Wording off Compound.

كانت بداية اكتشاف الفيتوالاكسينات في عام 1940 بواسطة Müller & Börger اللذان قاما بعدوى سطح مقطوع لدرنات بطاطس بسلالة عديمة الضراوة avirulent من الفطر *Phytophthora infestans*. وأعقب ذلك - بعد فترة - بعدوى السطح المقطوع ذاته بسلالة ممرضة virulent من نفس الفطر. ولقد أدى ذلك إلى فشل السلالة الممرضة في إحداث الإصابة. ولقد كانت هذه المقاومة فعالة - كذلك - ضد فطريات أخرى. مثل *Fusarium caeruleum*. مما حدا بالباحثين إلى اقتراح أن مادة دفاعية (هي الفيتوالاكسين) كان لها دوراً في هذا الأمر.