

## الفصل العاشر

### تطبيقات الهندسة الوراثية فى مجال التربية لمقاومة الفيروسات

#### مقدمة

تُحتمل عاى الجينات التى تستعمل فى تحويل النباتات وراثياً لجعلها مقاومة للفيروسات، من مصادر متنوعة، فهى قد تكون من الفيروس ذاته، أو من العائل النباتى الذى يرغب فى حمايته أو الأنواع القريبة منه، أو من مصادر نباتية راقية أخرى، أو من الكائنات الدقيقة، أو حتى من الثدييات بما فى ذلك الإنسان.

وتجرى غالبية عمليات التحول الوراثى لأجل إنتاج نباتات مقاومة للفيروسات بأى من الاستراتيجيات التالية:

- ١ - التعبير عن الجينوم الكامل للفيروس.
- ٢ - التعبير عن جين الغلاف البروتينى.
- ٣ - التعبير عن الشفرة المضادة لجين الغلاف البروتينى.
- ٤ - التعبير عن تتابعات التوابع الفيروسية.
- ٥ - التعبير عن الريبوزيمات ribozymes.
- ٦ - التعبير عن جين انقسام الفيروس.
- ٧ - التعبير عن رنا معيب ومعيق defective interfering RNA.
- ٨ - التعبير عن الأجسام المضادة للفيروسات.

#### التحول الوراثى بجينات فيروسية

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

إن الفكرة من وراء ما يعرف بالمقاومة المستمدة من المسبب المرضى كما فى بعض حالات الهندسة الوراثية لمقاومة الفيروسات - هى أن التعبير عن بعض جينات المسبب

المرضى (الفيروس في حالتنا تلك) في العائل سوف يخل بالتوازن الطبيعي لمكونات الفيروس؛ وبالتالي يتعارض مع دورة حياة الفيروس. وفي أكثر الحالات نجاحاً 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 المرضى 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 الفيروس للوسط الخلوي المحيط به. وإذا ما كان الفيروس يحمل رنا كمادة وراثية فإنه يبدأ على الفور في إنتاج البروتينات الخاصة بالفيروس (بروتينات الغلاف البروتيني) لأجل تكاثره. أما إذا كان الفيروس حاملاً لدنا كمادة وراثية فإنه يدخل نواة العائل أولاً ويوجه إنزيمات العائل لإنتاج الرنا الرسول المناسب لأجل نقل الشفرة الوراثية.

ومن أهم الخطوات في تكاثر فيروسات الرنا إنتاج بروتين أو بروتينات إنزيم الـ replicase بالاعتماد على خلايا العائل ذاتها؛ الأمر الذي يؤدي إلى تكاثر الفيروس.

ويعتقد بأن معظم فيروسات الرنا تنتشر من خلية إلى أخرى عبر الروابط البروتوبلازمية plasmodesmata كحامض نووي (رنا) بحماية ومساعدة بروتين خاص بذلك، أو في حالات الحركة لمسافة طويلة من خلال الاقتران بغلاف بروتيني نشط. وبدا... فإن كل مرحلة من دورة الإصابة الفيروسية يمكن التأثير سلبياً عليها، وتلك المراحل هي: مرحلة التخلص من الغلاف البروتيني uncoating، وترجمة الشفرة الوراثية translation، والانقسام replication، والحركة. ويكون الهدف من هندسة نباتات مقاومة للفيروسات هو التعبير فيها عن جزء من الجينوم الفيروسي سواء أ تضمن هذا التعبير الغلاف البروتيني، أم لم يتضمن؛ بما يتعارض مع أحد جوانب دورة

التكاثر. وتتضمن استراتيجيات الهندسة الوراثية لمقاومة الفيروسات النباتية عدة اتجاهات كما سيأتي بيانه (عن Scholthof 1993).

### الشفرة الوراثية الكاملة لسلالة ضعيفة من الفيرس

في بداية محاولات إنتاج نباتات محولة وراثياً مقاومة للفيروسات اتجه الباحثون نحو نقل الحامض النووي 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 في التبغ، ونمت النباتات التي نقل إليها الحامض النووي 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 ميوبه هذا التطبيق للمنحة الوراثية ما يلي:

- ١ - ضرورة العثور على سلالة ضعيفة من الفيرس.
- 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 الذي يحدث بين فيرس موزايك التبغ وفيرس x البطاطس في الطماطم الذي يؤدي إلى ظهور أعراض التخطيط المزدوج (عن Grumet 1990).

### جين الغلاف البروتيني للفيرس

يطلق على المقاومة التي تتحقق عن طريق الغلاف البروتيني الفيروسي اسم viral coat protein mediated resistance (اختصاراً: CP-MR). ولقد عرف منذ عام 1986 أن نقل الجين المسئول عن تمثيل الغلاف البروتيني لفيرس موزايك التبغ إلى نبات التبغ قلل جوهرياً تكاثر الفيرس بالنبات. وقد أعقب ذلك تطبيق هذه الطريقة بنجاح كبير في

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 1999).

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 البروتينى للسلالة الأولى قبل وصول السلالة الثانية. والفرق بين الوقاية المكتسبة فى الحالتين أن الغلاف البروتينى الفيروسي الذى يُصنعه النبات - فى الحالة الأولى - يكون خالياً من الحامض النووى الفيروسي، بينما يتواجد الفيروس كاملاً فى 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 البروتينى الذى يُصنعه 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 السيولوجية (عن Grumet 1990).

**وتتميز جميع حالات التحول الوراثى لمقاومة الفيروسات - باستعمال جين الغلاف البروتينى للفيروسات - بما يلى،**

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 التحويل الوراثى بالجين المسئول عن تكوين الغلاف البروتينى للفيروس تقتصر فقط على الفيروس المعنى والسلالات القريبة الشبه منه، إلا إنه تعرف بعض الحالات التى تمتد فيها الحماية إلى عدد من الفيروسات الأخرى المتباينة.

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

ولأسباب ليست معروفة بعد .. نجد أن الحماية التى يوفرها التحويل الوراثى بجين الغلاف البروتينى لا ترتبط بالضرورة بأى تعبير عن الغلاف البروتينى؛ ففى بعض الحالات كانت الحماية أعلى عند مستويات منخفضة من تراكم الغلاف البروتينى فى النبات.

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

هذا .. وعند تلقيح (حقن) أوراق النباتات المحولة وراثياً بجين الغلاف البروتينى لفيروس ما .. عند حقنها بجزيئات الفيروس ذاته، فإنها تظهر 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 المظهرى للنبات، كما كانت المقاومة فيها ثابتة وراثياً وانتقلت للنسل لأجيال عديدة.

يتراوح تركيز الغلاف البروتينى للفيروس - عادة - بين ٠,٠١٪، و ٠,٢٪ من المحتوى البروتينى الذائب الكلى بالنباتات المحولة وراثياً، ويتوقف التركيز الفعلى على الفيروس. وال promoter المستعمل، وعدد نسخ جين الغلاف البروتينى التى نقلت فعلاً 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 ١٩٩٠).

وفى بعض الحالات نجد أن مستوى الحماية يتناسب طردياً مع مستوى التعبير عن الغلاف البروتينى فى النباتات، ذلك كما فى حالات: فيروس موزايك البرسيم الحجازي 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 الفيروس.

وبينما يصل تركيز فيروس التفاف أوراق البطاطس فى أوراق صنف البطاطس القابل للإصابة Maris Piper إلى ٢٩٠٠ نانوجرام لكل جرام، فإن ذلك التركيز ينخفض إلى ١٨٠ : و ١٢٠ نانوجرام لكل جرام فى السلالتين المقاومتين G7032. و G7445 على التوالى (Barker وآخرون ١٩٩٤ ب). وبتحويل هاتين السلالتين المقاومتين للفيروس وراثياً

## تطبيقات الهندسة الوراثية في مجال التربية لمقاومة الفيروسات

بجين الغلاف البروتيني للفيروس انخفض تركيز الفيروس في الأوراق بدرجة أكبر ليصل إلى ٢٠-٤٠ نانوجرام لكل جرام، وكان ذلك التركيز حوالى ١٪ مما وصل إليه تركيز الفيروس في الأصناف القابلة للإصابة Désirée، و Maris Piper، و Pentland Square، و Barker وآخرون (١٩٩٤ أ).

هذا .. إلا أنه في حالات أخرى لا يوجد بالضرورة ارتباط بين مستوى الغلاف البروتيني ومستوى المقاومة، وذلك كما في بعض الـ potyviruses، و luteoviruses، و tospoviruses. كما وجد أن الحماية ضد فيروس موزايك الزوكيني الأصفر ZYMV في القاوون (والتي لا تظهر فيها على النباتات أية أعراض مرضية لمدة ٩٠ يوماً بعد حقنها بالفيروس) لا ترتبط بمستوى التعبير عن الغلاف البروتيني في النباتات المحولة وراثياً.

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

وتجدر الإشارة إلى أنه في حالات الفيروسات التي يمكن أن تنتقل إلى النباتات بأكثر من طريقة (مثل النقل بالمنّ والنقل الميكانيكى)، 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 واى البطاطس PVY، لكن ذلك لم يتحقق في حالة فيروس خشخشة التبغ TRV - الذى

ينتقل ميكانيكاً وبالنيما تودا - حيث أظهرت النباتات المحولة وراثياً مقاومة ضد الحقن الميكانيكى فقط (عن Grumet ١٩٩٥).

ولقد أظهرت الدراسات بعض المفارقات فيما يتعلق بمدى المقاومة التى يوفرها جين الغلاف البروتينى لفيروس ما ضد الفيروسات الأخرى. وعلى سبيل المثال .. وجد أن جين الغلاف البروتينى لفيروس موزايك الخس LMV - وهو من الـ potyviruses - يعطى - كذلك - مقاومة تامة ضد فيروس وى البطاطس PVY، وهو فيروس لا يتشابه مع فيروس LMV سوى فى ٦٦٪ من الأحماض الأمينية، بينما لم يُكسب هذا الجين النباتات أية حماية ضد فيروس إتش التبغ TEV الذى يتساوى - كذلك - مع فيروس PVY فى نسبة الأحماض الأمينية التى تتشابه مع تلك التى يحملها فيروس LMV.

ومن ناحية أخرى .. وجد أن جين الغلاف البروتينى لفيروس موزايك وتقزم 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 البروتينى للـ MDMV - بكلا الفيروسين وفرت حماية أكبر ضد الـ MCMV عما إذا ما حقنت النباتات المحولة وراثياً بالفيروس الأخير منفرداً (عن Grumet ١٩٩٥).

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

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

## تطبيقات الهندسة الوراثية في مجال التربية لمقاومة الفيروسات

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

هذا .. وإلى جنب ما سبقت الإشارة إليه من حالات فيروسات الرنا التى استخدمت فيها جينات الغلاف البروتيني في هندسة نباتات وراثياً لتكون مقاومة لتلك الفيروسات .. فقد طبقت التقنية ذاتها على فيرس تجعد واصفرار أوراق الطماطم tomato yellow leaf curl virus - وهو فيرس ذات خيط مفرد من الدنا وينتقل عن طريق الذبابة البيضاء - وأمكن الحصول على نباتات طماطم تحتوى على جين الغلاف البروتيني للفيرس ومقاومة له (عن Kavanagh & Spillane ١٩٩٥).

ويبين من جدول (١٠-١) أن الحماية التى يوفرها جين الغلاف البروتيني للفيرس تكون فعّالة - غالباً سواء أتم انتقال الفيرس للنباتات ميكانيكياً، أم بواسطة النواقل vectors.

هذا ويبين جدول (١٠-٢) أمثلة لحالات من التحول الوراثي كان الاعتماد فيها على جين الغلاف البروتيني لفيرس ما، والفيروسات التى أصبحت النباتات التى حُوّلت وراثياً مقاومة لها من جراء هذا التحول. كما يبين جدول (١٠-٣) فاعلية الهندسة الوراثية لمقاومة الفيروسات بالاعتماد على جين الغلاف البروتيني أياً كانت المجموعات التى تنتمى إليها تلك الفيروسات.

### جين تكاثر الفيرس

بينما توفر عملية التحول الوراثي للنباتات باستخدام جين الغلاف البروتيني للفيروسات مقاومة ضد مدى واسع نسبياً من الفيروسات القريبة 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 في النباتات غير المحولة.

كما يمكن كسر المقاومة بإجراء الحقن بتركيزات عالية جداً من الفيروس، أو بالرنا الفيروسي المجرد من الغلاف البروتيني.

جدول (١٠-١): الحماية التي يوفرها التحول الوراثي بين 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 (١٠-٢): 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 (١٠-٢).

الفيرس مصدر جين	النبات المحول وراثياً	الفيرس التي أصبحت النباتات مقاومة لها
CMV	التبغ	CMV
SMV	التبغ	PVY, TEV
BNYVV	بنجر السكر	BNYVV
PVX	التبغ	PVX
PVX	البطاطس	PVX
PVX + PVY	البطاطس	PVX, PVY
PVS	البطاطس	PVS
PLRV	البطاطس	PLRV
GCMV	التبغ	TBRV
PaRSV	التبغ	TEV
TVMV	التبغ	TVMV, TEV

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

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 بفيروس موزايك التبغ تلعب دوراً فى انقسام الفيروس 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 لفيروس موزايك التبغ حتى عندما وصل تركيز اللقاح إلى ١٠٠٠ ضعف التركيز الذى يقاومه جين الغلاف البروتيني، وحتى مع عدم القدرة على اكتشاف وجود هذا البروتين - 54kD - فى تلك النباتات.

## تطبيقات تربية النبات في مكافحة الأمراض والآفات

جدول (١٠-٣): 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	Iarvirus
البطاطس	PLRV	Potato leaf roll virus	Luteovirus
التبغ	ArMV	Arabis 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. benthamian</i>	BYMV	Bean yellow mosaic virus	Potyvirus
التبغ	LMV	Lettuce mosaic virus	
الذرة	MDMV	Maize dwarf mosaic virus	
التبغ - البباز	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			
الأرز	RSV	Rice stripe virus	Tenuivirus
التبغ - الطماطم	TMV	Tobacco mosaic virus	Tabamovirus
التبغ	TRV	Tabacco rattle virus	Tobravirus
التبغ	TSWV	Tomato spotted wilt virus	Tospovirus

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

وكما في حالة التحول الوراثي باستعمال جين الغلاف البروتيني، فإن المقاومة التي يوفرها جين الـ replicase تختلف من سلالة محولة وراثياً لأخرى، إلا أن المستوى العام للمقاومة التي يوفرها جين الـ replicase أعلى من تلك التي يوفرها جين الغلاف البروتيني (عن Grumet ١٩٩٥).

هذا .. وتعرف - حالياً - عدة حالات تحققت فيها المقاومة عن طريق جين الـ replicase (جدول ١٠-٤)، منها تلك الخاصة بفيروسات: إكس البطاطس PVX، وواي البطاطس PVY، و التلون البني المبكر للبسلة pea early browning، وموزايك الخيار CMV. ومن بين تلك الحالات ما حدث فيها التحول الوراثي بجين الـ replicase الفيروسي الكامل، منها ما استخدم فيها صوراً مقتضبة truncated أو مطفرة mutated من ذلك الجين، وذلك بتعديل أو فصل أجزاء خاصة منه (عن Kavanagh & Spillane ١٩٩٥، و Grumet ١٩٩٥).

ومن الأصناف التجارية التي حدث فيها التحول الوراثي بتلك التقنية صنف البطاطس Newleaf Plus الذي يحتوى على كل من: جين بروتين الانقسام replicase protein gene لفيروس التفاف أوراق البطاطس، وجين الـ Bt من البكتيريا *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis* (عن Duncan وآخرين ٢٠٠٢).

### 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 عدلت 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.

جدول (١٠-٤): المهندسة الوراثية لمقاومة الفيروسات بالاعتماد على جينات فيروسية أخرى غير جين الغلاف البروتينى (عن Grumet ١٩٩٥).

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

أ- *cymbidium ringspot virus* = CyRSV و *pea early browning virus* = PEBV .  
 للتعرف على الأسماء الكاملة لباقي الفيروسات التى وردت رموزها فى الجدول .. يراجع جدول (١٠-٣).

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

لقد أظهرت نباتات التبغ التى حولت وراثياً بجين الحركة لفيروس brome mosaic virus .. أظهرت مقاومة ضد فيروس موزايك التبغ الذى لا يمت للفيروس الأول بصلة قرابة. كذلك أظهرت نباتات التبغ التى عدلت وراثياً بطفرة لجين الحركة الخاص بفيروس موزايك التبغ مقاومة ضد عدد من الفيروسات غير القريبة منه (عن Dickinson ٢٠٠٣).

كما أنتجت نباتات بطاطس محولة وراثياً تحتوى على صور طفرية من جين فيروس التغاف أوراق البطاطس ORF4، وهو الجين الذى يتحكم فى إنتاج البروتين pr17 الخاص بحركة هذا الفيروس فى النبات، وأظهرت النباتات التى حولت وراثياً نقصاً

جوهرياً في أعداد هذا الفيروس في النبات، كما كانت مقاومة - كذلك - لكل من فيروس وای البطاطس، وفيروس إكس البطاطس (Tacke وآخرون ١٩٩٦).

### شفرة الرنا الفيروسي العكسية

اتبعت استراتيجية شفرة الرنا العكسية antisense RNA strategy في عمليات الهندسة الوراثية لمقاومة الفيروسات بنقل تتابعات رنا إلى النبات تعبر عن شفرة الرنا الفيروسي العكسية. أي بنقل خيط رنا ذات تتابعات متممة للرنا الفيروسي؛ حيث يلتحم الرنا ذو الشفرة المضادة مع الرنا الرسول المقابل؛ مما يؤدي إلى منع استنساخه، وتعرف الحماية التي توفرها تلك التقنية باسم antisense mediated protection.

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

وقد كانت تلك الطريقة فعالة سواء استخدمت الشفرة المضادة لجين الغلاف البروتيني. أم لجين الـ replicase الفيروسي. ونظراً لأن نظام الحماية يختلف في الحالتين، فقد يكون من الممكن رفع مستوى المقاومة بنقل الشفرة المضادة لكلا الجينين.

هذا .. إلا أنه في كل من حالات فيروس موزايك الخيار، وفيروس إكس البطاطس، وفيروس موزايك التبغ لم تحدث شفرة الرنا العكسية حماية من الإصابة إلا في التركيزات المنخفضة فقط من اللقاح الفيروسي، وكانت أقل كفاءة من عملية التحول الوراثي باستعمال جين الغلاف البروتيني.

وبالمقارنة .. فإن الحماية من الإصابة بفيرس التفاف أوراق البطاطس تساوت في كل من النباتات المحولة وراثياً بجين الغلاف البروتيني للفيرس أو بشفرته العكسية.

ومن مميزات التحول الوراثي بالشفرة العكسية بدلاً من شفرة الغلاف البروتيني، أن النبات لا ينتج الغلاف البروتيني للفيرس؛ وبذا .. تتوفر طاقته للنمو الطبيعي (عن Nascari & Montanelli 1997).

ويبين جدول (١٠-٥) 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، أي مُشَفَّرَة)، ولكنها معيبة defective، وذلك من خلال تحويلها بطريقة تجعلها غير قادرة على نقل الشفرة. ويبين جدول (١٠-٥) أمثلة لحالات اعتمد فيها التحول الوراثي على تلك التقنية.

### الRNA الفيروسي التابع وجزيئات الRNA المشوهة المعيقة لفعل الفيرس

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

وقد حظيت تلك المتطفلات الجزيئية باهتمام الباحثين الساعين إلى هندسة نباتات مقاومة للفيروسات. ويبين جدول (١٠-٦) أمثلة للفيروسات التي استعملت معها تلك التقنية.

## تطبيقات الهندسة الوراثية في مجال التربية لمقاومة الفيروسات

جدول (١٠-٥): هندسة النباتات لمقاومة الفيروسات بالاعتماد على تنابتات رنا فيروسى -viral derived RNA sequences (عن Grumet ١٩٩٥).

النوع النباتى المحول وراثياً	الفيروس	المجموعة الفيروسية	الرنا
التبغ	CMV	Cucumovirus	شفرة فيروسية عكسية
التبغ	<sup>١</sup> TGMV	Geminivirus	
البطاطس	PLRV	Luteovirus	
التبغ	PVX	Potexvirus	
<i>Nicotiana benthamiana</i>	BYMV	Potyvirus	
التبغ	PVY		
التبغ	<sup>١</sup> TEV		
القاوون - التبغ	ZYMV		
التبغ	TMV	Tobamovirus	
	<sup>١</sup> TSWV	Tospovirus	
التبغ	TEV	Potyvirus	شفرة غير عكسية ولكن معيبة
التبغ	TMV	Tobamovirus	
التبغ	TSWV	Tospovirus	
	<sup>١</sup> TYMV	Tymovirus	

أ - *tomato golden mosaic virus* = TGMV، و *tobacco etch virus* = TEV، و *TSWV* = *tomato spotted wilt virus*، و *turnip yellow mosaic virus* = TYMV؛ ولأسماء الكاملة للفيروسات الأخرى التى وردت رموزها فى الجدول .. يراجع جدول (١٠-٣).

يوجد التابع الفيروسي فى عدة مجاميع من الفيروسات التى يوجد بها الحامض النووى على صورة رنا. وهو - أى التابع - جزئى مفرد من الرنا يحتوى على نحو ٣٠٠-٤٠٠ نيوكليوتيدة. وقد اعتبر البعض هذه التتابع كطفيليات للفيروسات، لأنها تستفيد من آلية تكاثر الفيروس، وتغلف نفسها بالغلاف البروتينى للفيروس، ولكنها ليست ضرورية لتكاثر الفيروس ذاته. وقد جرب هذا التطبيق للهندسة الوراثية مع كل من فيروسى موزايك الخيار، وتبقع التبغ الحلقى 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.

## تطبيقات تربية النبات في مكافحة الأمراض والآفات

جدول (١٠-٦): الهندسة الوراثية لمقاومة الفيروسات باستعمال المتطولات الفيروسية (عن Grumet ١٩٩٥).

المائل المحول وراثياً	الفيروس	المجموعة الفيروسية	المُتَطَلِّف الفيروسي
	التبغ - الطماطم	CMV	Cucumovirus
	التبغ <sup>(ب)</sup>	TobRV	Nepovirus
<i>Nicotiana benthamiana</i>	التبغ <sup>(ب)</sup>	ACMV	Geminivirus
<i>N. benthamiana</i>		BCTV	
<i>N. benthamiana</i>		CyRSV	Tombusvirus

أ - Defective interfering particles .. وهي جزيئات 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 في الجدول .. يراجع جدول (١٠-٤).

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

ومن أهم محووب هذا التطبيع للمنحمة الوراثية ما يلي:

- ١ - لا تتوفر التوابع في جميع الفيروسات.
- ٢ - لا يمكن التنبؤ دائماً بتأثير التوابع في النباتات المحولة وراثياً، فبينما هي تقلل كثيراً من شدة الأعراض المرضية في معظم الحالات، فإنها تزيدها في حالات أخرى قليلة (عن Grumet ١٩٩٠).

وقد وجد أن الحماية التي يوفرها الرنا التابع لفيروس موزايك الخيار كانت فعالة في مكافحة الفيروس في كل من حالتى الحقن بالمن وميكانيكياً.

أما بالنسبة للتحويل الوراثى الذى يجرى باستعمال جينوم الـ helper virus . فقد أظهرت الدراسات أن المقاومة لا تظهر فى الأوراق التى تحقن بالفيروس . وإنما فى

## تطبيقات الهندسة الوراثية في مجال التربية لمقاومة الفيروسات

الأوراق التالية لها في الظهور، وأن درجة الحماية لا تتوقف على تركيز الفيروس المستخدم في الحقن، ولا ترتبط بدرجة التعبير عن تتابعات الحامض النووي (ال helper virus) المستخدم في التحويل الوراثي (عن Grumet ١٩٩٥).

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

هذا .. ويبين جدول (١٠-٧) مقارنة بين الطرق المختلفة للتحويل الوراثي باستعمال جينات مختلفة ذات أصل فيروسي.

جدول (١٠-٧): مقارنة بين الطرق الرئيسية لهندسة النباتات لمقاومة الفيروسات (عن Grumet ١٩٩٠).

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