الفصل الحادى عشر

تطبيقات الهندسة الوراثية فى مجال التربية لمقاومة الفطريـــات والبكتيريا والنيماتودا

تتنوع كثيرًا مصادر الجينات التى تستعمل فى عمليات التحول الوراثى لمقاومة الأمراض الفطرية والبكتيرية فى النباتات، كما تتنوع - بالتالى - الآلية التى تعمل بها تلك الجينات.

استراتيجيات الهندسة الوراثية لمقاومة الفطريات والبكتيريا

أخذت جهود الهندسة الوراثية لأجل إنتاج نباتات مقاومة للأمراض خمسة مسارات، كما يلى:

١ - التعبير عن جينات تعد منتجاتها سامة بصورة مباشرة للمسبب المرضى، أو أنها تقلل من نموه، وهى التى تتضمن البروتينات ذات العلاقة بالتطفل المرضى pathogensis-related proteins (اختصارًا: PR proteins)، مثل: الإنزيمات المحللة hydrolytic enzymes (إنزيمات الشيتنيز chitinases، والجلوكانيز glucanases)، والبروتينات المضادة للفطريات antifungal proteins (الـ osmotin وشبيهات الـ thaumatin)، والبيبتيدات المضادة للميكروبات antimicrobial peptides (الـ thionins، والـ defensins، والـ lectins)، والبروتينات المثبطة لنشاط الريبوسومات ribosme-inactivating proteins، والفيتوألاكسينات phytoalexins.

لقد وصفت البروتينات ذات العلاقة بالتطفل المرض فى عام ١٩٧٠ على أنها مكونات لتفاعل فرط الحساسية فى أوراق التبغ التى تتعرض لفيرس موزايك التبغ؛ هذا إلاّ أن تلك البروتينات تتضمن حاليًا كل البروتينات النباتية التى يُستحَث إنتاجها فى أى حالة مرضية أو ظروف شدّ أخرى.

وتقسم البروتينات ذات العلاقة بالتطفل المرض إلى عائلات حسب تركيبها الأولى وعلاقاتها السيرولوجية ونشاطها الإنزيمى والبيولوجى. وفى بداية محاولات التقسيم تضمن التقسيم خمس عائلات على أساس نوعيات البروتينات التى أمكن تحديدها فى التبغ. ولكن ظهرت بعد ذلك بروتينات لم يمكن ضمها إلى أى من تلك العائلات الخمس (جداول ١١-١ إلى ١١-٥).

ولقد أظهرت البروتينات التى تنتمى إلى العائلات الخمس (PR-1 إلى PR-5) أنشطة مضادة للفطريات، وتميزت بروتينات كل عائلة منها بما يلى:

أ - جميع بروتينات العائلة PR-1 ذات وزن جزيئى منخفض (١٥-١٧ كيلودالتون)، وليس لها آلية معروفة لطريقة عملها.

ب - تتضمن عائلة بروتينات PR-2 ثلاثة أقسام مميزة من الـ β-1, 3-glucanases تختلف كثيرًا فى مدى ألفتها مع مركبات الـ β-1, 3-glucans والمركبات الأخرى.

جـ - تعد بروتينات الـ PR-3 - أساسًا - من الـ chitinases، مع إظهار بعضها لـ lyzozyme activities.

د - تعتبر بروتينات العائلة PR-4 ذات وزن جزيئى منخفض هى الأخرى، وتتشابه مع بروتين البطاطس win.

هـ - ليس لبروتينات العائلة PR-5 آلية محددة لوظيفتها البيولوجية، ولكنها تقترب فى تركيبها من البروتين الحلو: ثوماتين thaumatin (عن Yun وآخرين ١٩٩٧).

جدول (١١-١): التراكيب البنائية الغالبة لبروتينات بعض جينات المقاومة للأمراض التى أمكن عزلها (عن Wenzel ١٩٩٨).

المجموعة	البروتين	العائل/المسبب المرضى	التركيب
I	PTO	الطماطم / *Pseudomonas*	Intracellular serine/threonine kinase membrane bound
	PTI1	الطماطم / *Pseudomonas*	Serine/threonine kinase phosphorylated by PTO, interacting with PTO
Ia	RPS2	*Pseudomonas syringa/Arabidopsis*	Intracellular protein with leucine zipper, nucleotide binding site, leucine-rich-repeats
	RPM1	*Pseudomonas syringae/Arabidopsis*	
	PRF		
IIb	N	التبغ / TMV	Intracellular protein 1L-1R homology, nucleotide binding site leucine-rich repeats
	L2, L6, L10	الكتان/ *Cochliobolus carbonum*	
	RPP5	*Peronospora parasitica/Arabidopsis*	
	RPP14		
III	Cf-2	الطماطم / *Cladosporium fulvum*	Transmembrane proteins with extracellular leucine rich repeats
	Cf-4		
	Cf-5		
	Cf-9	الطماطم / *Fusarium oxysporum*	
	12		
IV	Xa21	الأرز / *Xanthomonas oryzae*	Transmembrane protein with intracellular kinase and extracellular leucine-rich repeat
V	Mlo	الشعير/ *Erysiphe graminis*	Transmembrane proteins nuclear localized

جدول (١١-٢): أمثلة لحالات تحول وراثى نباتى لمقاومة الفطريات استخدم فيها جينات نباتية تشفر للبروتينات المضادة للفطريات (عن Yun وآخرين ١٩٩٧).

البروتين المُعبَّر عنه (مصدر الجين)	النبات المحول وراثيًا	الفطر	التأثير
PR-1a (التبغ)	التبغ	*Peronospora tabacina*	زيادة القدرة على تحمل الإصابة
Glucanase (فول الصويا)	التبغ	*Phytophthora parasitico*	تأخير تطور أعراض الاصابة
Chitinase (الفاصوليا)	التبغ ولفت الزيت	*Rhizoctonia solani*	تأخير تطور أعراض الإصابة

تابع جدول (١١-٢):

البروتين المُعبَّر عنه (مصدر الجين)	النبات المحول وراثيًا	الفطر	التأثير
Chitinase	(الأرز) الأرز	*Rhizoctonia solani*	زيادة القدرة على تحمل الإصابة
Chitinase	الأرز التبغ	*Cercospora nicotianae*	زيادة القدرة على تحمل الإصابة
Glucanase	(البرسيم الحجازى) التبغ	*Rhizoctonia solani*	زيادة القدرة على تحمل الإصابة
Chitinase	(التبغ) الطماطم	*Fusarium oxysporum*	زيادة القدرة على تحمل الإصابة
		Rhizoctonia solani	خفض إصابة الثمار بعد الحصاد
		Fusarium oxysporum	زيادة القدرة على تحمل الإصابة
Glucanase	(التبغ) البطاطس	*Phytophthora infestans*	تأخير تطور أعراض الإصابة
Osmotin	(التبغ) الطماطم	*Botrytis cinerea*	خفض إصابة الثمار بعد الحصاد
PGIP	(الكمثرى) التبغ		
RIP	(الشعير) التبغ	*Rhizoctonia solani*	زيادة القدرة على تحمل الإصابة
RIP/chinase	(الشعير) التبغ	*Rhizoctonia solani*	زيادة القدرة على تحمل الإصابة
Glucanase/chitinase	(الشعير)		
Rs-AFP2	(الفجل) التبغ	*Alternaria longipes*	زيادة القدرة على تحمل الإصابة

جدول (١١-٣): نشاط الـ **PR proteins** المضاد للفطريات خارج العائل (فى البيئات الصناعية **in vitro**) (عن **Yun** وآخرين ١٩٩٧).

البروتين (النبات مصدر البروتين)	الفطر	التأثير
PR-1a (التبغ)	*Phytophthora infestans*	تثبيط إنبات الجراثيم
PR-1b (التبغ)	*Phytophthora infestans*	تثبيط إنبات الجراثيم
PR-1c (التبغ)	*Phytophthora infestans*	تثبيط إنبات الجراثيم
PR-1 basic (التبغ)	*Phytophthora infestans*	تثبيط إنبات الجراثيم
P14a (الطماطم)	*Phytophthora infestans*	تثبيط إنبات الجراثيم
P14b (الطماطم)	*Phytophthora infestans*	تثبيط إنبات الجراثيم
P14c (الطماطم)	*Phytophthora infestans*	تثبيط إنبات الجراثيم
Glucanase (البسلة)	*Fasarium solani*	تثبيط نمو الميسليوم
Chitinase (التفاح)	*Trichoderma hamatum*	تثبيط إنبات الجراثيم ونمو الميسليوم
Tobacco (القمح)	*Phycomyces blakesleeanus*	تثبيط إنبات الجراثيم ونمو الميسليوم

تابع جدول (١١-٣):

البروتين (النبات مصدر البروتين)	الفطر	التأثير
Chitinase (*Arabidopsis*)	*Trichoderma reesei*	تثبيط نمو الميسليوم
Chitinase (الشعير)	*Phycomyces blakesleeanus*	تثبيط نمو الميسليوم
	Trichoderma reesei	تثبيط نمو الميسليوم
	Trichoderma harzianum	تثبيط نمو الميسليوم
	Trichoderma viride	تثبيط نمو الميسليوم
	Rhizoctonia solani	تثبيط نمو الميسليوم
	Fusariuni culmorum	تثبيط نمو الميسليوم
	Fusarium graminearum	تثبيط نمو الميسليوم
Chitinase (*Castanea sativia*)	*Trichoderma viride*	تثبيط نمو الميسليوم
Chitinase (الذرة)	*Phycomyces blakesleeanus*	تثبيط نمو الميسليوم
	Trichoderma reesei	تثبيط نمو الميسليوم
	Fusarium oxysporum	تثبيط نمو الميسليوم
	Alternaria sloani	تثبيط نمو الميسليوم
	Trichoderma reesei	تثبيط نمو الميسليوم
Chitinase (البسلة)	*Trichaderma viride*	تثبيط نمو الميسليوم
Chitinase (التبغ)	*Trichaderma viride*	تثبيط نمو الميسليوم
	Alternaria radicina	تثبيط نمو الميسليوم
	Trichoderma viride	تثبيط نمو الميسليوم
Chitinase (القمح)	*Phycomyces blakesleeanus*	تثبيط نمو الميسليوم
	Trichoderma reesei	تثبيط نمو الميسليوم
Chitinase (البسلة)	*Fusarium solani*	تثبيط نمو الميسليوم
glncanase + (البسلة)	*Ascochyta pisi*	تثبيط نمو الميسليوم
	Penicillium digitatum	تثبيط نمو الميسليوم
	Aspergillus niger	تثبيط نمو الميسليوم
	Tielaviopsis basicola	تثبيط نمو الميسليوم
	Athelia bombacina	تثبيط نمو الميسليوم
	Trichoderma viride	تثبيط نمو الميسليوم
Chitinase + Glucanase (التبغ)	*Fusarium solani*	تثبيط نمو الميسليوم
PR-4 (التبغ)	*Trichoderma viride*	تثبيط إنبات الجراثيم ونمو الميسليوم
	Fusarium solani	تثبيط نمو الميسليوم

تابع جدول (١١-٣):

البروتين (النبات مصدر البروتين	الفطر	التأثير
PR-4 + chitinase (التبغ)	*Fusarium solani*	تثبيط نمو الميسليوم
PR-4 (التبغ)	*Fusarium solani*	تثبيط إنبات الجراثيم
+ glucanase (التبغ)	*Alternaria radicina*	تثبيط نمو الميسليوم
AP 24 (الطماطم)	*Phytophthora infestans*	تثبيط إنبات الجراثيم
BP-R (الشعير)	*Candida albicans*	تثبيط إنبات الجراثيم
	Trichoderma viride	تثبيط إنبات الجراثيم
	Fusarium oxysporum	تثبيط إنبات الجراثيم
BP-S (الشعير)	*Candida albicans*	تثبيط إنبات الجراثيم
	Trichoderma viride	تثبيط إنبات الجراثيم
	Fusarium oxysporum	تثبيط إنبات الجراثيم
PP-S (التبغ)	*Cercorpora beticola*	تثبيط نمو الميسليوم
Osmotin (التبغ)	*Alternaria solani*	تثبيط نمو الميسليوم
	Bipolaris maydis	تثبيط نمو الميسليوم
	Bipolaris zeicola	تثبيط نمو الميسليوم
	Botrytis cinerea	تثبيط إنبات الجراثيم ونمو الميسليوم
	Cladosporium cucumerinum	تثبيط نمو الميسليوم
	Colletotrichum laginarium	تثبيط نمو الميسليوم
	Dipoldia maydis	تثبيط نمو الميسليوم
	Fusarium graminearum	تثبيط نمو الميسليوم
	Fusarium roseum "Sambuciuum"	تثبيط نمو الميسليوم
	Phytophthora infestans	تثبيط نمو الميسليوم
	Phytophthora parasitica var. *nicotiana*	تثبيط إنبات الجراثيم ونمو الميسليوم
	Sclerotinia sclerotiorum	تثبيط نمو الميسليوم
	Trichoderma longibrachiatum	تثبيط نمو الميسليوم
	Fusarium oxysporum f. sp. *dianthi*	تثبيط إنبات الجراثيم ونمو الميسليوم
	Fusarium oxysporum f. sp. *lycopersici*	تثبيط إنبات الجراثيم ونمو الميسليوم

تابع جدول (١١-٣):

البروتين (النبات مصدر البروتين		الفطر	التأثير
		Verticillium dahiae	تثبيط إنبات الجراثيم ونمو الميسليوم
		Phytophthora infestans	تثبيط إنبات الجراثيم
		Candida albicans	تثبيط إنبات الجراثيم
		Neurospora crassa	تثبيط إنبات الجراثيم
		Trichoderma reesei	تثبيط إنبات الجراثيم
P 23 (الطماطم)		*Trichothecium roseum*	تثبيط نمو الميسليوم
		Colletorichum coccodes	تثبيط نمو الميسليوم
		Phytophthora citrophthora	تثبيط نمو الميسليوم
		Fusarium oxysporum f. sp. *lycopersici*	تثبيط نمو الميسليوم
Trimatin	(القمح)	*Candida albicans*	تثبيط إنبات الجراثيم
		Trichoderma reesei	تثبيط إنبات الجراثيم ونمو الميسليوم
		Nuerospora crassa	تثبيط إنبات الجراثيم ونمو الميسليوم
Zeamatin	(الذرة)	*Candida albicans*	تثبيط إنبات الجراثيم
		Trichoderma reesei	تثبيط إنبات الجراثيم
		Nuerospora crassa	تثبيط إنبات الجراثيم

جدول (١١-٤): جينات المقاومة التى تم عزلها مقسمة حسب نوع البروتين الذى تُشفر له (عن Jones ٢٠٠٠).

البروتين	العائل	المسبب المرضى	جين المقاومة
TIR-NBS-LRR	Tobacco	Tobacco mosaic virus	*N*
	Flax	*Melampsora lini*	*L6, M*
	Arabidopsis	*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*	*RPS4*
		Peronospora parasitica	*RPP1, RPP5, RPP10, RPP14*
LZ-NBS-LRR	Tomato	*P. s.* pv. *tomato*	*Prf*
		Melodogyne incognita	*Mi*
		Macrosiphon euphorbiae	*Mea1*
	Potato	Potato virus X	*Rx*

تابع جدول (١١-٤):

جين المقاومة	المسبب المرضى	العائل	البروتين
RPS2, RPS5	*P. s.* pv. *tomato*	*Arabidopsis*	
RPM1	*P. s.* pv. *maculicola*		
RPP8	*Peronospora parasitica*		
I2	*Fusarium oxysporum* pv. *lycopersici*	Tomato	NBS-LRR
Dm3	*Bremia lactuca*	Lettuce	
Cre3	*Heterodera avenae*	Wheat	
Xa1	*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*	Rice	
Pi-b, Pi^{ta}	*Magnaporthe grisea*		
Rp1-D	*Puccinia sorghi*	Maize	
Cf-2, Cf-4 *Cf-5, Cf-9*	*Cladosporium fulvum*	Tomato	LRR-TM
Xa21	*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*	Rice	LRR-TM-PK
Pto	*P. s.* pv. *tomato*	Tomato	PK
Hs1^{pro-1}	*Heterodera schachtii*	Sugar beet	Novel

TIR: Tool and interleukin-1 receptor homology. **TM: transmembrane domain.**
NBS: nucleotide hinding site. **PK: serine/threonine protein kinase.**
LRR: leucine-rich repeat. **LZ: leucine zipper.**

٢ – التعبير عن جينات تؤدى منتجاتها إلى تحطيم أو تحييد أحد مكونات المسبب المرضى التى تمكنه من إصابة النبات، مثل تثبيط إنزيمات: الـ polygalacturonase، والـ lipase.

٣ – التعبير عن جينات يمكن لمنتجاتها تحفيز الدفاعات التركيبية فى النبات، مثل زيادة مستويات الـ peroxidase، واللجنين lignin.

٤ – التعبير عن جينات تعد منتاجتها بمثابة إشارات لتنظيم الدفاع النباتى، مثل المستحثات elicitors، وفوق أكسيد الأيدروجين hydrogen peroxide، وحامض السلسيلك salicylic acid، والإثيلين ethylene.

٥ – التعبير من جينات مقاومة R genes يكون لمنتجاتها دورًا فى تفاعلات الـ R/Avr وفرط الحساسية hypersensitivity (عن Punja ٢٠٠٤).

جدول (١١-٥): طرز جينات المقاومة التى أمكن عزلها (عن Takken & Joosten ٢٠٠٠).

الجين المقابل (فى المسبب المرضى) لجين المقاومة (فى العائل)	المسبب المرضى	الفئة[ب]	الموقع[أ]	جين المقاومة	النوع النباتى
AvrPto	*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*	LZ-NBS-LRR	I	*Prf*	الطماطم
AvrRpt2	*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*	LZ-NBS-LRR	I	*RPS2*	*Arabidopsis*
AvrRpm1, avrB	*Pseudomonas syringae* pv. *maculicola*	LZ-NBS-LRR	I	*RPM1*	*Arabidopsis*
AvrPphB	*Pseudomonas syringae* DC3000	LZ-NBS-LRR	I	*RPS5*	*Arabidopsis*
AvrRpp8	*Peronospora parasitica*	LZ-NBS-LRR	I	*RPP8*	*Arabidopsis*
	Meloidogyne incognita and Macrosiphum euphorbia	LZ-NBS-LRR	I	*Mi*	الطماطم
	Fusarium oxysporum	NBS-LRR	I	I2c	الطماطم
	Fusarium oxysporum	NBS-LRR	I	I2	الطماطم
	Xanthomonas oryzae pv. *oryzae*	NBS-LRR	I	Xa1	الأرز
	Magnaporthe grisea	NBS-LRR	I	Pib	الأرز
Coat protein	Potato virus X	NBS-LRR	I	Rx	البطاطس
	Globodera rostochiensis	NBS-LRR	I	Gpa2	البطاطس
	Heterodera avenae	NBS-LRR	I	Cre3	القمح
AvrBs2	*Xanthomonas campestris*	NBS-LRR	I	Bs2	الفلفل
	Puccinia sorghi	NBS-LRR	I	Rp1-D	الذرة
AvrPITA	*Magnaporthe grisea*	NBS-LRR	I	Pi-ta	الأرز
	Erysiphe graminis	NBS-LRR	I	Mla	الشعير
Replicase	Tobacco mosaic virus	TIR-NBS-LRR	I	N	التبغ
	Peronospora parasitica	TIR-NBS-LRR	I	RPP1, 10, 14	*Arabidopsis*
	Melampsora lini	TIR-NBS-LRR	I	L^6L^{1-12}	الكتان

تابع جدول (١١-٥):

النوع النباتى	جين المقاومة	الموقع[أ]	الفئة[ب]	المسبب المرضى	الجين المقابل (فى المسبب المرضى) لجين المقاومة (فى العائل)
الكتان	M	I	TIR-NBS-LRR	*Melampsora lini*	
Arabidopsis	RPP5	I	TIR-NBS-LRR	*Peronospora parasitica*	
Arabidopsis	RPS4	I	TIR-NBS-LRR	*Pseudomonas syringae* pv. *pisi*	*AvrRps4*
الأرز	Xa21	E	LRR-TM-PK	*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*	
الطماطم	Cf-2	E	LRR-TM	*Cladosporium fulvum*	*Avr2*
الطماطم	Cf-4	E	LRR-TM	*Cladosporium fulvum*	*Avr4*
الطماطم	Hcr9-4E	E	LRR-TM	*Cladosporium fulvum*	*Avr4E*
الطماطم	Cf-5	E	LRR-TM	*Cladosporium fulvum*	*Avr5*
الطماطم	Cf-9	E	LRR-TM	*Cladosporium fulvum*	*Avr9*
بنجر السكر	$HS1^{pro-1}$	E	LRR-TM	*Heterodera schachtii*	

أ – الموقع المتوقع للبروتين: I = داخل الخلية intracellular، و E = خارج الخلية extracellular.

ب – فئة البروتين مقسمًا حسب تركيبه المميز structural domain.

TM: transmembrane region

NBS: nucleotide binding site

TIR: Tool and interleukin-1 receptor domain

LRR: leucine-rich repeat

PK: protein kinase domain