

ومع التقدم فى عزل الجينات وفى تقنيات الدنا تبين لنا تدريجياً أن كثيراً من حالات المقاومة فى أجناس نباتية مختلفة تُستثار بنفس جين عدم الضراوة avirulence البكتيرى. ولقد أصبح السؤال المثار حالياً هو: هل توجد أسس فعلية وواقعية للتمييز بين مقاومة الأنواع التى تعتبر من عوائل مسبب مرضى معين ومقاومة الأنواع التى لا تعد من عوائله؟ (عن Day ١٩٩٢).

الاعتماد على الجينات التى تتحكم فى إنتاج البروتينات المضادة للفطريات

تعتمد خاصية المقاومة فى حالة هندسة نباتات تحمل جينات تتحكم فى إنتاج بروتينات مضادة للفطريات على قدرة النباتات التى حولت وراثياً على إنتاج إنزيمات معينة تكون مدمرة للفطريات التى يمكن أن تهاجم تلك النباتات.

ومن بين البروتينات ذات العلاقة بالحماية من الإصابات المرضية فى النباتات تلك التى تلعب دوراً فى عملية اللجننة lignification، وفى تمثيل الفيتو ألكسينات phytoalexins. وكذلك إنزيمات الشيتينيز chitinases، والـ β -1,3-glucanases، ومثبطات البروتينيز proteinase inhibitors، والبروتينات المثبطة لعمل الريبوسومات ribosome inactivating proteins (عن Nascari & Montanelli ١٩٩٧).

كذلك يفيد استخدام الجينات التى تشفر لتكوين البولى بيبتيديات الصغيرة الغنية فى السيستين، مثل: الثيونينات thionins، والهيفينات heveins، وهى المركبات التى تؤدى إلى تدهور الأغشية الخلوية للفطريات، كما تقوم الأخيرة بربط الشيتين فى الجدر الخلوية للفطريات (عن Williamson ٢٠٠٢).

ومن أكثر الجينات أهمية فى عمليات هندسة النباتات لمقاومة الفطريات عن طريق البروتينات المضادة لها antifungal protein-mediated resistance الجينين المتحكمين فى إنتاج كل من الشيتينيز chitinase، والجلوكانيز glucanase، حيث يعمل هذان الإنزيمان على الجدر الخلوية للفطريات المهاجمة للنباتات؛ مما يجعلها أكثر حساسية لقوى الدفاع الطبيعية العادية للنباتات (عن Chahal & Gosal ٢٠٠٢).

وتجدر الإشارة إلى أن الاستعانة بالجينات التي تحلل الجدر الخلوية للبكتيريا والفطريات - بهدف مقاومة النباتات لها - ليس لها أى تأثير على الجدر الخلوية للنباتات التي تختلف - تماماً - فى تركيبها - عن الجدر الخلوية للبكتيريا والفطريات.

إنزيمات الشيتينيز والجلوكونيز

تتكون الجدر الخلوية للفطريات من مكونين، هما: الجلوكان glucan، والشيتين chitin. وهما اللذان يمكن تحليلهما بواسطة كل من الـ glucanases (مثل: β -1,3-glucanase) والـ chitinases - على التوالى. هذا .. إلا أن تركيب الشيتين يتباين كثيراً بين الأنواع الفطرية المختلفة. ولذا .. فإن إنزيم الشيتينيز chitinase الذى يكون فعالاً ضد أحد الفطريات لا يلزم - بالضرورة - أن يكون فعالاً ضد الفطريات الأخرى، بما يعنى أن نجاح إكساب النباتات صفة المقاومة لفطر ما بطرق الهندسة الوراثية التى تعتمد على تحويلها وراثياً باستعمال إنزيم الشيتينيز يعتمد على الاختيار المناسب للإنزيم الذى يكون فعالاً ضد الفطر المعنى (عن Broglie & Broglie، ١٩٩٤، و Chrispeels & Sadava ٢٠٠٣).

وكان Brooglie وآخرون (١٩٩٣) قد قدما شرحاً لعملية التحول الوراثى للتبغ بجين الفاصوليا endochitinase، والذى أدى التعبير عنه فى التبغ إلى جعله مقاوماً للفطر *Rhizoctonia solani*. ومن المعتقد أن مرد ذلك كان إلى تحليل الإنزيم لشيتين الجدر الخلوية للفطر.

ومن المعروف أن البكتيريا *Serratia marcescens* وكائنات دقيقة أخرى كثيرة تفرز طرزا مختلفة من الإنزيمات التى تعمل على تحليل الشيتين chitinases، وهى التى ثبتت فاعليتها ضد الفطريات، التى تحتوى جدرها الخلوية على الشيتين chitin كمكون أساسى. كذلك ربما يكون لتلك الإنزيمات تأثيرات ضارة على الحشرات والنيماتودا. ولكن يتعين تحديد إنزيم الشيتينيز chitinase المناسب للعمل ضد المسببات المرضية المعنية. وقد يبدو من المفيد نقل جينات تتحكم فى إنتاج عدة إنزيمات شيتينيز مرة واحدة لأجل الحصول على مدى واسع من المقاومة.

وتجدر الإشارة إلى أن النباتات ذاتها يمكن أن تنتج إنزيمات الشيتينيز - ضمن مركبات أخرى - استجابة للإصابة بالمسببات المرضية (Mount & Berman 1994).

وبينما يكون نشاط الشيتينيز في النباتات السليمة غير المصابة منخفضاً، أو غير ملحوظ، فإن ذلك النشاط يزداد بوضوح بعد الإصابة بأحد الفطريات الممرضة، أو بعد المعاملة بأحد المثريات elicitors. وبينما يحمي الشيتينيز النباتات من الإصابة بالفطريات التي تحتوى على شيتين chitin في جدرها الخلوية، فإنه لا يكون مؤثراً على الفطريات التي يعوزها الشيتين (عن Nascari & Montanelli 1997).

وقد ازدادت مقاومة الطماطم للإصابة بالفطريات عندما حولت وراثياً بكل من طراز I من إنزيم الشيتينيز class I chitinase، وطراز I من إنزيم بيتا 1، 3 جلوكانيز class I β -1,3-glucanase من التبغ، بينما لم يؤد التحول الوراثي للطماطم بأى من الجينين على انفراد إلى حمايتها من الإصابة الفطرية. ولقد بلغ مقدار النقص في شدة الإصابة بالفطر *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici* في نباتات الطماطم المحولة وراثياً المقاومة، مقارنة بالوضع في النباتات غير المحولة وراثياً: 36% و 58%. وذلك في سلالتين محولتين وراثياً من الطماطم. وقد حدث تخلص كامل من الإصابة الأولية بالفطر في سلالتين محولتين وراثياً، في الوقت الذى كانت فيه نباتات المقارنة قد قتلها الفطر. وتتفق تلك النتائج مع ما هو معروف من أن كلا الإنزيمين class I و class I β -1,3-glucanase يعملان - تداوياً synergistically - على تثبيط نمو الفطريات في البيئات الصناعية (Jongedijk وآخرون 1995).

وقد أمكن تحويل عدداً من أصناف الخيار والجزر وراثياً بجينات مختلفة للشيتينيز chitinase حُصل عليها من كل من البيتونيا، والتبغ، والفاصوليا. وبينما لم تُظهر نباتات الخيار المحولة وراثياً بأى واحد من الجينات الثلاثة أى فروق معنوية عن النباتات غير المحولة لدى عدواها بأى من الفطريات الممرضة: *Alternaria cucumerina*، و *Botrytis cinerea*، و *Colletotrichum orbiculare*، و *Rhizoctonia solani*.. فإن نباتات الجزر المحولة بجين شيتينيز التبغ أظهرت مقاومة أعلى بصورة

تطبيقات الهندسة الوراثية لمقاومة الفطريات والبكتيريا والنباتات

معنوية ضد الإصابة بأى من الفطرين *R. solani*، أو *Corticium rolfisii* مقارنة بالنباتات غير المحولة وراثياً، هذا بينما لم تظهر تلك المقاومة فى نباتات الجزر المحولة وراثياً بجين شيتينيز البيتونيا، وفى كليهما .. لم تظهر أى مقاومة فى نباتات الجزر المحولة وراثياً ضد أى من الفطرين *Alternaria radicina*، أو *Thielaviopsis basicola*. ويستدل من تلك النتائج على أن كفاءة التحول الوراثى بجينات الشيتينيز فى مقاومة النباتات للفطريات تتأثر بكل من النوع النباتى المحول وراثياً، وجين الشيتينيز المستخدم، والفطر المستهدف مقاومته (Punja & Rharjo ١٩٩٦).

كذلك أمكن تحويل الخيار وراثياً بجين شيتينيز من الأرز، وأظهرت النباتات المحولة وراثياً مستوى من المقاومة للفطر *Botrytis cinerea* أعلى من نباتات المقارنة، وتوقف فيها انتشار المرض كلية (Tabei وآخرون ١٩٩٧).

كذلك أمكن تحسين المقاومة للأمراض فى النباتات بتحويلها وراثياً بجينات من فطريات تستخدم فى المقاومة الحيوية. فعلى سبيل المثال .. أمكن نقل الجين المسئول عن إنتاج شيتينيز قوى التأثير على الفطريات من *Trichoderma harzianum* إلى كل من التبغ والبطاطس، وظهرت مستويات عالية من الإنزيم المضاد للفطريات فى الأنسجة النباتية المختلفة. دون أن يكون لذلك أى تأثيرات منظرية على نمو النباتات أو تطورها. ولقد أظهرت النباتات المحولة وراثياً تحملاً أو مقاومة تامة للفطريات: *Alternaria alternata*، و *A. solani*، و *Botrytis cinerea*، و *Rhizoctonia solani*، الأمر الذى يجعلها أفضل حالاً بكثير من تلك التى تحول بجينات الشيتينيز المتحصل عليها من النباتات أو البكتيريا (Lorito وآخرون ١٩٩٨).

وأمكن تحويل البروكولى وراثياً بجين endochitinase حُصل عليه من *Trichoderma harzianum*، وذلك لإكسابه صفة المقاومة للفطر *Alternaria brassicicola* (Mora & Earle ٢٠٠١).

بروتينات الديفنسين

يُستفاد - كذلك من بروتينات الديفنسين definsins فى عمليات التحول الوراثى .

وهى بروتينات تتواجد فى كل الخلايا الحية. ولها خصائص متنوعة، ولكنها تشترك جميعها فى كونها بيبتيديات صغيرة (٢٦-٥٠ حمض أمينى) مضادة للميكروبات. تُظهر الديفينسينات نشاط انحلالى lytic بالارتباط داخل الغشاء البلازمى الميكروبي؛ علمًا بأنه يكون من الصعب جدًا على أى مسبب مرضى أن يطور مقاومة لهذا التأثير نظرًا لأهمية المحافظة على كمال الغشاء البلازمى لاستمرار بقاء الكائن؛ ومن ثم لا يمكن أن تحدث به تغيرات تمنع هذا الارتباط بين الديفينسينات وبينه.

ولقد أمكن تحويل البطاطس وراثيًا بجين الديفينسين alfAFP من البرسيم الجازى، حيث تبين تمثيل الديفينسين فى النباتات التى حولت وراثيًا وتم إفرازه فى المسافات بين الخلايا فى كل من الأوراق والجذور، وأظهرت النباتات مقاومة معنوية ضد الفطر *Verticillium dahlia*، بدرجة كانت مماثلة للمقاومة الطبيعية فى أصناف البطاطس المقاومة لهذا الفطر. إلا أن النباتات المحولة وراثيًا لم تكن مقاومة للفطر *Alternaria solani* (عن Slater وآخرين ٢٠٠٣).

الإنزيمات المثبطة لنشاط الريبوسومات

تفيد البروتينات المثبطة للريبوسومات ribosome-inactivating proteins (اختصارًا: RIP) فى عمليات التحول الوراثى إذ إنها تمنع الريبوسومات من القيام بعملها؛ ومن ثم يتوقف تمثيل البروتين. ولهذه البروتينات درجات مختلفة من التخصص، وبعضها يؤثر على الثدييات (عن Williamson ٢٠٠٢).

وقد أحدث إدخال جينات تتحكم فى إنتاج البروتينات المثبطة للريبوسومات مع جين الشيتينيز .. أحدث ذلك تأثيرًا متدانيًا synergistic. ولقد نقل بالفعل جين الفجل Rs-AFP2 الذى يشفر لإنتاج مضاد الفطريات 2 antifungal 2 .. نقل إلى التبغ الذى أظهر مقاومة للفطر *Alternaria longipes* (عن Chahal & Gosal ٢٠٠٢).

بروتينات أخرى تفيد فى عمليات التحول الوراثى لمقاومة الأمراض

من بين البروتينات الأخرى التى حازت باهتمام الباحثين فى عمليات التحول

الوراثي لمقاومة الفطريات المسببة للأمراض، ما يلي:

● يحتوى عنب السذاب (أو عنب الثعلب) pokeweed على بروتين مضاد للفيروسات، وقد أظهرت نباتات التبغ التي حولت وراثياً بالجين المسئول عن إنتاج هذا البروتين تدهوراً شديداً في نموها، إلا أن إطفار هذا الجين واستخدام الجين المطفر في عملية التحول الوراثي أدى إلى إنتاج نباتات تبغ طبيعية النمو ومقاومة للفيروس، كما كانت كذلك - وعلى غير المتوقع - مقاومة للفطر *Rhizoctonia solani*، وارتبط ذلك بإنتاج النباتات المحولة وراثياً لعدد من البروتينات ذات العلاقة بالدفاع ضد الإصابات الفطرية (عن Williamson 2002).

● أمكن تحويل الطماطم وراثياً بالجين المسئول عن تكوين البروتين هاربين harpin والمتحصل عليه من البكتيريا *Erwinia amylovora* المسببة لمرض اللفحة النارية في التفاح والكمثرى. وبعدها النباتات بسلالة مركبة من الفطر *Phytophthora infestans* وجد أن زيادة تعبير النباتات عن الهاربين - سواء أكان ذلك ذاتياً أم بسبب حث المسبب المرضي على ذلك - أدى إلى انخفاض معدل نمو البقع المرضية (Li & Fan 1999).

الاعتماد على الجينات التي تتحكم في إنتاج مركبات مضادة للفطريات

قد يُحصل على الجينات التي تتحكم في إنتاج المركبات المضادة للفطريات من حالات المقاومة الطبيعية كتلك التي أسلفنا بيانها (مثل الجينات التي تتحكم في إنتاج الفيتوألوكسينات). وقد تكون من مصادر أخرى نباتية أو غير نباتية.

الجينات التي تتحكم في إنتاج الفيتوألوكسينات

تعد الفيتوألوكسينات phytoalexins من المركبات المضادة للكائنات الدقيقة، وتلعب - بطبيعتها - دوراً في مقاومة النباتات للمسببات المرضية الفطرية والبكتيرية. وتعرف المقاومة التي تعتمد عليها بأنها antifungal-compound mediated resistance.

وقد أمكن تحويل الطماطم وراثياً وجعلها قادرة على إنتاج فيتوألوكسين نبات العنب؛ بهدف حمايتها من الإصابة ببعض الفطريات المرضية؛ فقد نقل إلى الطماطم جينين من