

بكتيريا العفن البكتيري الطرى الذى تسببه البكتيريا *Erwinia carotovora* subsp. واستمرت حالة المقاومة فى كل من الظروف الهوائية واللاهوائية. ويبدو أن تلك المقاومة كان مردها إلى المستويات العالية التى 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 وcatalase. 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 التى حولت وراثياً بهذا الجين مقاومة عالية لعدد آخر من الأمراض الفطرية والبكتيرية. وخاصة لمرض ذبول فيرتسيليم. كما أظهرت نباتات الأرز التى حولت وراثياً بجين فوق أكسيد الأيدروجين مقاومة للفطريات (عن Chahal & Gosal ٢٠٠٢).

الجينات المستعملة فى عمليات التحول الوراثى لمقاومة البكتيريا

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

جينات المقاومة الطبيعية

قد تكون الجينات المتحصل عليها من النباتات الراقية - لأجل عمليات التحول الوراثى لمقاومة الأمراض البكتيرية - من جينات المقاومة الطبيعية للمرض ذاته أو لأمراض أخرى فى النباتات التى حُصل منها على تلك الجينات، ومن الأمثلة على ذلك، ما يلى:

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

تطبيقات الهندسة الوراثية لمقاومة الفطريات والبكتيريا والنيماطودا

● أمكن عزل طفرة من النبات الموديل *Arabidopsis thaliana* تؤدي إلى وقف ظهور أعراض الإصابة بالذبول بعد حقن النبات بسلالة عالية الضراوة من البكتيريا *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 يخفى 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 المرضي. وتؤدي إلى تنشيط المقاومة الجهازية المكتسبة (Oldroyd & Staskawicz ١٩٩٨).

● أمكن 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).

جينات مستمدة من البكتيريا

تستخدم فى عمليات التحول الوراثى لمقاومة البكتيريا جينات بكتيرية تلعب دوراً فى حث استجابة فرط الحساسية فى النباتات (يراجع لذلك Gobalan & He 1996).

التعبير عن جينات البكتيوفاجات

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

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

الجينات التى تشفر لتكوين بروتينات مضادة للبكتيريا

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

وعلى سبيل المثال .. أمكن تحويل البطاطس وراثياً بالجين cercopin B، وكانت النباتات الناتجة أكثر تحملاً للسالة 3 من البكتيريا *Ralstonia solanacearum* عن النباتات غير المحولة وراثياً.

كذلك فإن الجينات التى تشفر لتكوين البولى بيبتيديات الصغيرة مثل الثيونينات thionins - وهى التى تؤدى إلى تدهور الأغشية الخلوية فى الكائنات الدقيقة - تفيد فى عمليات التحول الوراثى. وقد وجد أن التعبير عن جين الشعير α -thionin فى التبغ المحول وراثياً يزيد بشدة من مقاومته للبكتيريا *Pseudomonas syringae*، إلا أن محاولات أخرى مع هذا البروتين لم تُحسن من صفة المقاومة (عن Slater وآخرين 2003).

هذا .. وتتركب الجدر الخلوية للبكتيريا مما يعرف باسم peptidoglycans، وهى تتكون من بروتين ومكونات كربوهيدراتية يمكن هضمها بالإنزيم ليروزيم lysozyme،

تطبيقات الهندسة الوراثية لمقاومة الفطريات والبكتيريا والنيماطودا

الذى يوجد بوفرة فى بيض الدجاج. يتواجد هذا الإنزيم - كذلك - فى معدة الماشية حيث يلعب دوراً فى تحليل البكتيريا التى تتكاثر هناك لأنها تساعد فى تحليل السليليوز والمكونات الأخرى للجدر الخلوية النباتية. ومن الممكن استعمال إنزيم الماشية هذا المحلّل للجدر الخلوية للبكتيريا فى عمليات التحول الوراثى للنباتات. ولقد أمكن - بالفعل - نقل هذا الجين إلى الخميرة *Pichia pastoris* التى أصبحت قادرة على إنتاج كميات ضخمة من إنزيم الليوزيم. ولدى استعمال هذا الإنزيم فى معاملة بذور النباتات بتركيز ٢٥-١٠٠ جزء فى المليون فإنه أدى إلى قتل ما على تلك البذور من بكتيريا.

هذا .. إلا أنه من مخاطر استعمال إنزيم الليوزيم فى عمليات التحول الوراثى ثباته الشديد. الأمر الذى قد يؤدى إلى قتله للبكتيريا النافعة فى التربة؛ ولذا .. يتعين التأكد من مدة بقاء الإنزيم فى التربة بعد زراعة نباتات محولة وراثياً به، وما هى 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 والبيتى 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 فى النباتات المحولة وراثياً (Serrano وآخرون ٢٠٠٠).

الجينات التى تشفر لتكوين مركبات مضادة للبكتيريا

من بين محاولات التحول الوراثى التى أجريت بهدف التشفير لتكوين مركبات مضادة للبكتيريا، ما يلى:

● تم تحويل البطاطس وراثياً بالجين المنتج للبروتين IA sarcotoxin (وهو سُم بكتيرى) 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 المخلق 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 الديدافينسين: cecropin من الفراشة giant silkmoth، وال melittin من نحل العسل، وباختبارها تبين مقاومتها للبكتيريا *Erwinia carotovora* المسببة للعفن الطرى البكتيري.

● تجرى 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 E attacin فى جعله أكثر مقاومة للبكتيريا تحت ظروف الحقل (عن Slater وآخرين ٢٠٠٣).

● يؤدي المركب المعروف باسم tachyplexin I [وهو ببتيد مضاد للميكروبات يُنتجه سلطعون حدوة الحصان الآسيوى *Tachypleus tridentatus* (أحد أنواع سرطان البحر)] .. يؤدي بتركيز ١٠٤-١١٠ 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 الثدييات: 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 ٠.٣ و ١٥٠ ميكروجرام/مل بالنسبة للبكتيريا. و ١٨-١٥٠ ميكروجرام/مل بالنسبة للخميرة. و ٣-٦٠ ميكروجرام/مل بالنسبة للفطريات الخيطية.

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

الجينات التى 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 مسببات المرضية تكون مقاومة للسموم التى تنتجها، فإن الأعراض المرضية التى تُحدثها بعض تلك المسببات يمكن الحد منها بنقل جينات المسببات المرضية - التى تتحكم فى إنتاج تلك السموم - إلى النباتات. ومن الأمثلة الهامة على المقاومة - المتحصل عليها من المسبب المرضى - للأمراض التى تظهر أعراضها من خلال السموم التى تفرزها المسببات المرضية - حالة اللفحة الهالية فى الفاصوليا التى تسببها البكتيريا *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*.

إن الاصفرار الشديد الذى يظهر على النباتات التى تُصاب بهذه البكتيريا يحدث بفعل السم phaseolotoxin (وهو ثلاثى الببتيد tripeptide) الذى تفرزه البكتيريا. يثبط هذا السم الإنزيم ornithine carbamoyltransferase (اختصاراً: OCTase) الذى يقوم

بتحويل كل من الـ ornithine والـ carbomyl phosphate إلى citrulline، وهو تفاعل يدخل في تمثيل 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 مثالياً - 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 لسلالات البكتيريا *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* التي يُعبّرُ 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 يُعبّرُ 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 لك tabtoxin فى *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*، حيث أظهرت النباتات المحولة وراثياً مقاومة لكل من المعاملة بالسّم البكتيرى وللإصابة بالبكتيريا. ومن الطبيعى أن هذه الاستراتيجية فى الهندسة الوراثية لا تفيد إلاّ مع الأمراض التى تلعب فيها السّموم دوراً مباشراً وأساسياً فى ظهور المرض (عن Nascari & Montanelli 1997).

الاستراتيجيات الأخرى لهندسة نباتات مقاومة للفطريات والبكتيريا

من بين الاستراتيجيات التى يفكر فيها علماء الهندسة الوراثية لإنتاج نباتات مقاومة لمسببات الأمراض، ما يلى :

١ - تجريد المسببات المرضية - التى تحدث أضرارها من خلال إفرازها لإنزيمات تقوم بتحليل الجدر الخلوية - تجريدها من أسلحتها، ليس بوقف إنتاج تلك الإنزيمات - فهى كثيرة - وإنما بالحد من مفعولها بتعديل النباتات بجينات تؤثر فى انتقال تلك الإنزيمات فى النباتات. وهى التى 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، كتلك التى تعمل على تحلل الجدر الخلوية.

٢ - نقل الجينات التى تجعل النباتات أقل عرضة للتجريح، أو تزيد من سرعة الاستجابة للتجريح، أو تزيد من سرعة تكوين بيريديرم الجروح.

٣ - إبطاء النضج بحيث لا تفقد الثمار صلابتها سريعاً بعد الحصاد. ومن ثم تستمر أقل عرضة للإصابة بالأعفان لأطول فترة ممكنة بعد الحصاد (Mount & Berman 1994).

الإنجازات فى مجال التحول الوراثى لمقاومة الأمراض الفطرية والبكتيرية

على الرغم من حداثة العهد نسبياً فى مجال دراسات التحول الوراثى لإنتاج نباتات مقاومة للفطريات والبكتيريا الممرضة للنباتات، فقد تم إنتاج واختبار عديد من حالات