

الهندسة الوراثية لمقاومة الفيروسات

يُتحصل على الجينات التي تستعمل في تحويل النباتات وراثيًا لجعلها مقاومة للفيروسات من مصادر متنوعة، فهي قد تكون من الفيروس ذاته، أو من العائل النباتي الذي يرغب في حمايته أو الأنواع القريبة منه، أو من مصادر نباتية راقية أخرى، أو من الكائنات الدقيقة، أو حتى من الثدييات بما في ذلك الإنسان.

التحول الوراثي بجينات فيروسية

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

إن الفكرة من وراء ما يعرف بالمقاومة المستمدة من المسبب المرضي كما في بعض حالات الهندسة الوراثية لمقاومة الفيروسات - هي أن التعبير عن بعض جينات المسبب المرضي (الفيروس في حالتنا تلك) في العائل سوف يخل بالتوازن الطبيعي لمكونات الفيروس، وبالتالي يتعارض مع دورة حياة الفيروس. وفي أكثر الحالات نجاحًا 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 المرضي 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 الفيرس للوسط الخلوى المحيط به. وإذا ما كان الفيرس يحمل رنا كمادة وراثية فإنه يبدأ على الفور فى إنتاج البروتينات الخاصة بالفيرس (بروتينات الغلاف البروتينى) لأجل تكاثره. أما إذا كان الفيرس حاملاً لنا كمادة وراثية فإنه يدخل نواة العائل أولاً ويوجه إنزيمات العائل لإنتاج الرنا الرسول المناسب لأجل نقل الشفرة الوراثية

ومن أهم الخطوات فى تكاثر فيروسات الرنا إنتاج بروتين أو بروتينات إنزيم ال replicase بالاعتماد على خلايا العائل ذاتها؛ الأمر الذى يؤدي إلى تكاثر الفيرس.

ويعتقد بأن معظم فيروسات الرنا تنتشر من خلية إلى أخرى عبر الروابط البروتوبلازمية plasmodesmata كحامض نووى (رنا) بحماية ومساعدة بروتين خاص بذلك، أو فى حالات الحركة لمسافة طويلة من خلال الاقتران بغلاف بروتينى نشط. وبذا .. فإن كل مرحلة من دورة الإصابة الفيروسية يمكن التأثير سلبياً عليها، وتلك الراحل هى مرحلة التخلص من الغلاف البروتينى uncoating، وترجمة الشفرة الوراثية translation، والانقسام replication، والحركة ويكون الهدف من هندسة نباتات مقاومة للفيروسات هو التعبير فيها عن جزء من الجينوم الفيروسى سواء أ تضمن هذا التعبير الغلاف البروتينى، أم لم يتضمن؛ بما يتعارض مع أحد جوانب دورة التكاثر. وتتضمن استراتيجيات الهندسة الوراثية لمقاومة الفيروسات النباتية عدة اتجاهات كما سيأتى بيانه (عن Scholthof ١٩٩٣)

الشفرة الوراثية الكاملة لسلالة ضعيفة من الفيرس

فى بداية محاولات إنتاج نباتات محولة وراثياً مقاومة للفيروسات اتجه الباحثون نحو نقل الحامض النووى 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 فى التبغ، ونمت النباتات التى نقل إليها الحامض النووى 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 محبوب هذا التطبيق للهندسة الوراثية ما يلي:

- ١ - ضرورة العثور على سلالة ضعيفة من الفيروس.
- 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 الذى يحدث بين فيروس موزايك التبغ وفيروس x البطاطس فى الطماطم الذى يؤدي إلى ظهور أعراض التخطيط المزدوج (عن Grumet ١٩٩٠).

جين الغلاف البروتينى للفيروس

يطلق على المقاومة التى تتحقق عن طريق الغلاف البروتينى الفيروسي اسم viral coat protein mediated resistance (اختصاراً: CP-MR). ولقد عرف منذ عام ١٩٨٦ أن نقل الجين المسئول عن تمثيل الغلاف البروتينى لفيروس موزايك التبغ إلى نبات التبغ قلل جوهرياً تكاثر الفيروس بالنبات. وقد أعقب ذلك تطبيق هذه الطريقة بنجاح كبير فى 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 ١٩٩٩).

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 البروتيني للسلاطة الأولى قبل وصول السلاطة الثانية والفرق بين الوقاية المكتسبة فى الحالتين أن الغلاف البروتينى الفيروسى الذى يُصنَّعه النبات - فى الحالة الأولى - يكون خالياً من الحامض النووى الفيروسى، بينما يتواجد الفيروس كاملاً فى حالة العدوى بسلاطة ضعيفة للوقاية من سلاطة 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 يُصنَّعه النبات وقاية ضد سلاطة الفيروس التى أخذ منها الجين فقط، وإنما ضد جميع السلالات الأخرى لنفس الفيروس. وضد الفيروسات الأخرى التى تشترك مع الفيروس المعنى فى خصائصها السيرولوجية (عن Grumet ١٩٩٠).

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 الدحول الوراثى بالجين المسئول عن تكوين الغلاف البروتينى للفيروس تقتصر فقط على الفيروس المعنى والسلالات القريبة الشبه

منه، إلا إنه تعرف بعض الحالات التي تمتد فيها الحماية إلى عدد من الفيروسات الأخرى المتباينة.

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

ولأسباب ليست معروفة بعد .. نجد أن الحماية التي يوفرها التحول الوراثي بجين الغلاف البروتيني لا ترتبط بالضرورة بأى تعبير عن الغلاف البروتيني؛ ففي بعض الحالات كانت الحماية أعلى عند مستويات منخفضة من تراكم الغلاف البروتيني في النبات.

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

هذا .. وعند تلقيح (حقن) أوراق النباتات المحولة وراثياً بجين الغلاف البروتيني لفيروس ما .. عند حقنها بجزيئات الفيروس ذاته، فإنها تُظهر 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، وتنقل - طبيعياً - بوسائل مختلفة) . في جميع هذه الحالات لم تظهر على النباتات المحولة وراثياً أية تأثيرات سلبية على النمو، أو الخصوبة، أو الشكل المظهري للنبات، كما كانت المقاومة فيها ثابتة وراثياً وانتقلت للنسل لأجيال عديدة.

يتراوح تركيز الغلاف البروتيني للفيروس - عادة - بين ٠.٠١٪، و ٠.٢٪ من المحتوى البروتيني الذائب الكلي بالنباتات المحولة وراثياً، ويتوقف التركيز الفعلي

على الفيرس، وال promoter المستعمل، وعدد نسخ جين الغلاف البروتينى التى نقلت فعلا 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 1990).

وفى بعض الحالات نجد أن مستوى الحماية يتناسب طردياً مع مستوى التعبير عن الغلاف البروتينى فى النباتات، وذلك كما فى حالات فيروس موزايك البرسيم الحجازى 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 الفيرس

هذا إلا أنه فى حالات أخرى لا يوجد بالضرورة ارتباط بين مستوى الغلاف البروتينى ومستوى المقاومة، وذلك كما فى بعض الـ potyviruses و luteoviruses، والـ tospoviruses كما وجد أن الحماية ضد فيروس موزايك الزوكينى الأصفر ZYMV فى القاوون (والتي لا تظهر فيها على النباتات أية أعراض مرضية لمدة 90 يوماً بعد حقنها بالفيرس) لا ترتبط بمستوى التعبير عن الغلاف البروتينى فى النباتات المحولة وراثياً

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

الصدسة الوراثية لمقاومة الفيروسات

وتجدر الإشارة إلى أنه في حالات الفيروسات التي يمكن أن تنتقل إلى النباتات بأكثر من طريقة (مثل النقل بالإنزيم والنقل الميكانيكي)، 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 وى البطاطس PVY، لكن ذلك لم يتحقق في حالة فيروس خشخشة التبغ TRV - الذى ينتقل ميكانيكياً وبالنيما تودا - حيث أظهرت النباتات المحولة وراثياً مقاومة ضد الحقن الميكانيكي فقط (عن Grumet 1995).

تتوفر عدة أدلة تفيد بأن آلية المقاومة التي تتحقق بفعل جين الغلاف البروتيني تعتمد على المجموعة الفيروسيّة التي ينتمى إليها الفيروس ففي حالة فيروسات موزايك التبغ TMV، وموزايك البرسيم الحجازي AIMV، وإكس البطاطس PVX ترتبط قوة المقاومة إيجابياً بمستوى التعبير عن الغلاف البروتيني في النباتات المحولة وراثياً، وعلى الجين نفسه، وفي حالتى الـ TMV والـ AIMV - على سبيل المثال - لم تكن النباتات التي يتراكم فيها شريط الدنا (الـ transcript) الخاص بجين الغلاف البروتيني (coat protein transcript) - فقط - دون أى تراكم للغلاف البروتيني ذاته - لم تكن مقاومة. هذا إلا أنه في حالات أخرى (فيروس وى البطاطس PVY، وفيروس التفاف أوراق البطاطس PLRV على سبيل المثال) ارتبطت المقاومة بمستوى تراكم شريط الدنا (الـ transcript) الخاص بجين الغلاف البروتيني، وليس بمستوى تراكم الغلاف البروتيني ذاته. ومما يزيد الصورة تعقيداً أنه في حالة ذبول الطماطم المتبقع (TSWV) حصل على المقاومة في حالتى التحويل الوراثي بأى من جين الغلاف البروتيني كاملاً، أو بعد جعله غير صالح للاستنساخ، من خلال إزالة الـ ATG codon اليبادئ لعملية الاستنساخ (عن Kavanagh & Spillane 1995).

ولقد أظهرت الدراسات بعض المفارقات فيما يتعلق بمدى المقاومة التي يوفرها جين الغلاف البروتيني لفيروس ما ضد الفيروسات الأخرى. وعلى سبيل المثال .. وجد أن جين الغلاف البروتيني 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 في ٦٦٪ من الأحماض الأمينية، بينما لم يُكسب هذا الجين النباتات أية حماية ضد فيروس إتش التبغ TEV الذي يتساوى - كذلك - مع فيروس PVY في نسبة الأحماض الأمينية التي تتشابه مع تلك التي يحملها فيروس LMV

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

ووجد Namba وآخرون (١٩٩٢) أن تحويل النبات *Nicotiana benthamiana* بجين الغلاف البروتيني لأي من فيروسى موزايك البطيخ ٢ (WMVII)، وموزايك الزوكيني الأصفر (ZYMV) يكسب النباتات المحولة وراثياً مقاومة ضد كلا الفيروسين بالإضافة إلى ستة فيروسات أخرى من مجموعة الـ potyviruses، وهى فيروس موزايك الفاصوليا الأصفر (BYMV)، وفيروس واى البطاطس (PVY)، وفيروس موزايك البسلة (PeaMV)، وفيروس تبرقش الغنفل (PeMV)، وفيروس إتش التبغ (TEV). وقد توقف مستوى الحماية التي وفرتها عملية التحول الوراثي على الفيروس المحقون به، وجرعة الحقن، حيث انخفض مستوى الحماية بزيادة جرعة الحقن.

كذلك أظهرت نباتات التبغ المحولة وراثياً بجين الغلاف البروتيني لفيروس موزايك التبغ درجة منخفضة - ولكن معنوية - من الحماية ضد فيروسات أخرى غير قريبة من هذا الفيروس، مثل فيروس إكس البطاطس، وفيروس واى البطاطس، وفيروس موزايك الخيار، وفيروس موزايك البرسيم الحجازي (عن Anderson وآخرين ١٩٨٩).

إن نباتات التبغ المحولة وراثياً بجين الغلاف البروتيني لفيروس موزايك فول الصويا (SMV) - الذى لا يعد التبغ من عوائله - تكتسب صفة المقاومة لفيروسين غير قريبين سيولوجياً من فيروس موزايك فول الصويا، وهما: فيروس واى البطاطس، وفيروس إتش

التبغ TEV، وكلاهما من الـ potyviruses. هذا .. علمًا بأن الأغلفة البروتينية لكل من SMV، و PVY، و TEV تشترك معًا في حوالي ٦٠٪ من التماثل في تتابعات الأحماض الأمينية. كذلك فإن النباتات المحولة وراثيًا التي تحمل جين الغلاف البروتينى لفيروس موزايك التبغ تُظهر قدرًا معنويًا من المقاومة للإصابة بالفيروسات التي تشارك فيرس موزايك التبغ في ٦٠٪ أو أكثر من درجة التماثل في تتابعات الأحماض الأمينية.

وامتدادًا للاتجاه ذاته كانت نباتات التبغ المحولة وراثيًا بجين موزايك الخيار CMV مقاومة لفيروس التبقرش المعتدل للأقحوان chrysanthemum mild mottle virus، بينما أظهرت نباتات التبغ المحولة وراثيًا بجين موزايك الخس LMV مقاومة لفيروس وى البطاطس (عن Kavanagh & Spillane ١٩٩٥).

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

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

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

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

تتمثل المقاومة التي تتحقق عن طريق جين الغلاف البروتيني -coat protein mediated resistance في حدوث نقص في عدد البقع التي تتكون بالأوراق التي تحقن بالفيروس، وانخفاض في معدل تطور المرض جهازياً، ونقص كبير جداً في معدل تراكم الفيروس ذاته في النباتات المحولة وراثياً، مقارنة بنباتات الكنترول بعد العدوى بالفيروس المعنى. وفي أحيان كثيرة يمكن أن تصل قوة المقاومة إلى شبه المناعة (عدم حدوث أى إصابة) حتى مع استعمال تركيز عالٍ من الفيروس في عملية الحقن به (عن Kavanagh & Spillane 1995).

ويتبين من جدول (١٤-١) أن الحماية التي يوفرها جين الغلاف البروتيني للفيروس تكون فعّالة - غالباً - سواء أتم انتقال الفيروس للنباتات ميكانيكياً، أم بواسطة النواقل vectors.

هذا ويبين جدول (١٤-٢) أمثلة لحالات من التحول الوراثي كان الاعتماد فيها على جين الغلاف البروتيني للفيروس ما، والفيروسات التي أصبحت النباتات التي حوّلت وراثياً مقاومة لها من جراء هذا التحول. كما يبين جدول (١٤-٣) فاعلية الهندسة الوراثية لمقاومة الفيروسات بالاعتماد على جين الغلاف البروتيني أياً كانت المجموعات التي تنتمي إليها تلك الفيروسات.

الصدسة الوراثية لمقاومة الفيروسات

جدول (١٤-١): الحماية التي يوفرها التحول الوراثي بجين 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 (١٤-٢): 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 (١٤-٢)

الفيرس مصدر جين الغلاف البروتيني	النبات المحول وراثياً	الفيروسات 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

جين تكاثر الفيروس

بينما توفر عملية التحول الوراثي للنباتات باستخدام جين الغلاف البروتيني للفيروسات مقاومة ضد مدى واسع نسبياً من الفيروسات الغريبة 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 بالربو الفيروسي المجرد من الغلاف البروتيني

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 حُصِل منها على الجين المستخدم فى التحول الوراثي (عن Miller وآخريين ١٩٩٧)

جدول (١٤-٣) 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	Ilarvirus
البطاطس	PLRV	Potato leaf roll virus	Luteovirus
التبغ	ArMV	Arabidopsis 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. benthamiana</i>	BYMV	Bean yellow mosaic virus	Potyvirus
التبغ	LMV	Lettuce mosaic virus	
الذرة	MDMV	Maize dwarf mosaic virus	
التبغ - البهاظ	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

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 بفيرس موزايك التبغ تلعب دوراً في انقسام الفيرس 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 لفيرس موزايك التبغ حتى عندما وصل تركيز اللقاح إلى ١٠٠٠ ضعف التركيز الذى يقاومه جين الغلاف البروتينى، وحتى مع عدم القدرة على اكتشاف وجود هذا البروتين - 54kD - فى تلك النباتات

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

وكما فى حالة التحول الوراثى باستعمال جين الغلاف البروتينى، فإن المقاومة التى يوفرها جين الـ replicase تختلف من سلالة محولة وراثياً لأخرى، إلا أن المستوى العام للمقاومة التى يوفرها جين الـ replicase أعلى من تلك التى يوفرها جين الغلاف البروتينى (عن Grumet ١٩٩٥).

هذا وتعرف - حالياً - عدة حالات تحققت فيها المقاومة عن طريق جين الـ replicase (جدول ١٤-٤)، منها تلك الخاصة بفيروسات . إكس البطاطس PVX، وواى البطاطس PVY، و التلون البنى المبكر للبسلة pea early browning، وموزايك الخيار CMV ومن بين تلك الحالات ما حدث فيها التحول الوراثى بجين الـ replicase الفيروسي الكامل، ومنها ما استخدم فيها صوراً مقتضبة truncated أو مطفرة mutated من ذلك الجين، وذلك بعد تعديل أو فصل أجزاء خاصة منه (عن Kavanagh & Spillane ١٩٩٥، و Grumet ١٩٩٥).

ومن الأصناف التجارية التى حدث فيها التحول الوراثى بتلك التقنية صنف البطاطس Newleaf Plus الذى يحتوى على كل من . جين بروتين الانقسام replicase

الهندسة الوراثية لمقاومة الفيروسات

protein gene لفيروس التفاف أوراق البطاطس، وجين الـ Bt من البكتيريا *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis* (عن Duncan وآخرين ٢٠٠٢).

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

النوع النباتي المحول وراثياً	الفيروس	المجموعة الفيروسية	الجين (البروتين)
التبغ	CMV	Cucumovirus	Replicase
التبغ	PVX	Potexvirus	
التبغ	PVY	Potyvirus	
التبغ	TMV	Tobamovirus	
<i>Nicotiana benthamiana</i>	^(١) PEPV	Tobravirus	
<i>N. benthamiana</i>	^(٢) CyRSV	Tombusvirus	
التبغ	TMV	Tobamovirus	بروتين الحركة
التبغ	PVY	Potyvirus	Protease

١- *pea early browning virus* = PEBV و *cymbidium ringspot virus* = CyRSV. للتعرف على الأسماء الكاملة لباقي الفيروسات التي وردت رموزها في الجدول .. يراجع جدول (٤-١) - (٣).

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 عُدلت 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.

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

لقد أظهرت نباتات التبغ التي حولت وراثياً بجين الحركة لفيرس brome mosaic virus أظهرت مقاومة ضد فيروس موزايك التبغ الذى لا يمت للفيروس الأول بصلة قرابة كذلك أظهرت نباتات التبغ التي 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 التفاف أوراق البطاطس ORF4، وهو الجين الذى يتحكم فى إنتاج البروتين pr17 الخاص بحركة هذا الفيروس فى النبات. وأظهرت النباتات التى حولت وراثياً نقصاً جوهرياً فى أعداد هذا الفيروس فى النبات، كما كانت مقاومة - كذلك - لكل من فيروس وای البطاطس، وفيروس إكس البطاطس (Tacke وآخرون ١٩٩٦)

جين البروتين المتعدد الفيروسي

يشفر جينوم بعض الفيروسات - مثل فيروس وای البطاطس PVY - لتكوين جزئى بروتينى واحد كبير - يطلق عليه اسم البروتين المتعدد بروتينيز polyprotein protease - بدلاً من تكوين عدة منتجات بروتينية منفصلة، وبعد أن يتكون فإنه يخضع لـ proteolytic process ينتج عنها المنتجات البروتينية التى يحتاجها الفيروس ولقد أدت الدراسات التى أجريت على النباتات المحولة وراثياً (فيما يتعلق بالعوامل المتحكمة فى الـ proteolytic process للـ polyprotein). إلى اكتشاف أن النباتات امهندسة وراثياً لتعبر عن الـ protease الفيروسي لأى من فيروس وای البطاطس أو فيروس تبرقش عروق التبغ tobacco vein mottling virus أظهرت درجة عالية للمقاومة لتلك الفيروسات وقد كانت تلك المقاومة على درجة عالية من التخصص على مستوى السلالة المستعملة، ويبدو أنها تعارضت مع عملية proteolysis للـ polyprotein، مما أدى إلى إحداث اضطراب فى دورة حياة الفيروس (عن Kavanagh & Spillane ١٩٩٥).

شفرة الرنا الفيروسي العكسية

اتبعت استراتيجية شفرة الرنا العكسية antisense RNA strategy فى عمليات الهندسة الوراثية لمقاومة الفيروسات بنقل تتابعات رنا إلى النبات تعبر عن شفرة الرنا

الفيروسى العكسية، أى بنقل خيط رنا ذات تتابعات متممة للرنا الفيروسى؛ حيث يلتحم الرنا ذو الشفرة المضادة مع الرنا الرسول المقابل؛ مما يؤدي إلى منع استنساخه، وتعرف الحماية التى توفرها تلك التقنية باسم antisense mediated protection

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

وقد كانت تلك الطريقة فعالة سواء استخدمت الشفرة المضادة لجين الغلاف البروتينى. أم لجين ال replicase الفيروسى ونظراً لأن نظام الحماية يختلف فى الحالتين. فقد يكون من الممكن رفع مستوى المقاومة بنقل الشفرة المضادة لكلا الجينين هذا إلا أنه فى كل من حالات فيروس موزايك الخيار. وفيروس إكس البطاطس، وفيروس موزايك التبغ لم تحدث شفرة الرنا العكسية حماية من الإصابة إلا فى التركيزات المنخفضة فقط من اللقاح الفيروسى، وكانت أقل كفاءة من عملية التحول الوراثى باستعمال جين الغلاف البروتينى

وبالمقارنة . فإن الحماية من الإصابة بفيرس التفاف أوراق البطاطس تناوت فى كل من النباتات المحولة وراثياً بجين الغلاف البروتينى للفيروس أو بشفرته العكسية

ومن مميزات التحول الوراثى بالشفرة العكسية بدلا من شفرة الغلاف البروتينى، أن النبات لا ينتج الغلاف البروتينى للفيروس، وبذا تتوفر طاقته للنمو الطبيعى (عن

Nascari & Montanelli ١٩٩٧)

ويبين جدول (١٤-٥) 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 (١٤-٥) أمثلة لحالات اعتمد فيها التحول الوراثي على تلك التقنية.

جدول (١٤-٥). هندسة النباتات لمقاومة الفيروسات بالاعتماد على تنابعات RNA فيروسي-viral derived RNA sequences (عن Grumet ١٩٩٥).

النوع النباتي المحول وراثياً	الفيروس	المجموعة الفيروسية	الRNA
	التبغ CMV	Cucumovirus	شفرة فيروسية عكسية
	التبغ ^١ TGMV	Geminivirus	
	النبطاس PLRV	Luteovirus	
	التبغ PVX	Potexvirus	
<i>Nicotiana benthamiana</i>	BYMV	Potyvirus	
	التبغ PVY		
	التبغ ^١ TEV		
	الثقاون - التبغ ZYMV		
	التبغ TMV	Tobamovirus	
	^١ TSWV	Tospovirus	
	التبغ TEV	Potyvirus	شفرة غير عكسية ولكن معيبة
	التبغ TMV	Tobamovirus	
	التبغ TSWV	Tospovirus	
	نفت اليريت ^١ TYMV	Tymovirus	

١ - TGMV = tomato golden mosaic virus - TGMV، و TEV = tobacco etch virus، و TSWV = tomato spotted wilt virus، و TYMV = turnip yellow mosaic virus؛ ولأسماء الكاملة للفيروسات الأخرى التي وردت رموزها في الجدول يراجع جدول (١٤-٣)

الرنا الفيروسي التابع وجزئيات الرنا المشوهة المعيقة لفعل الفيروس

على الرغم من بساطة تركيب الفيروسات واعتمادها الكامل على خلايا العائل في كافة نشاطها الأيضى .. فإن مجموعات عديدة من الفيروسات يمكنها أن تكتسب تتابعات لحمض نووى يكون تابعاً لها، ويمكن اعتبارها - مجازاً - متطفلات جزئية molecular parasites. هذه التتابعات - والتي تتضمن التتابع الفيروسي satellites viruses، والجزئيات المشوهة المعيقة لفعل الفيروس defective interfering particles (والتي تعرف باسم helper viruses) - ليست ضرورية لعمل الفيروس، ويمكنها تثبيط ظهور أعراض الإصابة، وتكاثر الفيروس ذاته.

وقد حظيت تلك المتطفلات الجزئية باهتمام الباحثين الساعين إلى هندسة نباتات مقاومة للفيروسات. ويبين جدول (١٤-٦) أمثلة للفيروسات التي استعملت معها تلك التقنية.

جدول (١٤-٦): المهندسة الوراثية لمقاومة الفيروسات باستعمال المتطفلات الفيروسية (عن Grumet ١٩٩٥).

المائل المحول وراثياً	الفيروس	المجموعة الفيروسية	المتطفل الفيروسي
	التبغ - الطماطم	CMV	Cucumovirus
	التبغ	TobRV ^(١)	Nepovirus
<i>Nicotiana benthamiana</i>		ACMV ^(٢)	Geminivirus
<i>N. benthamiana</i>		BCTV ^(٣)	
<i>N. benthamiana</i>		CyRSV	Tombusvirus

أ - Defective interfering particles .. وهى جزئيات 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 فى الجدول .. يراجع جدول (١٤-٤).

يوجد التابع الفيروسي في عدة مجاميع من الفيروسات التي يوجد بها الحامض النووي على صورة رنا. وهو - أى التابع - جزئياً مفرد من الرنا يحتوى على نحو 300-400 نيوكليوتيدة. وقد اعتبر البعض هذه التوابع كطفيليات للفيروسات، لأنها تستفيد من آلية تكاثر الفيروس، وتغلف نفسها بالغللاف البروتيني للفيروس، ولكنها ليست ضرورية لتكاثر الفيروس ذاته. وقد جرب هذا التطبيق للهندسة الوراثية مع كل من فيروس موزايك الخيار، وبقع التبغ الحلقي فى التبغ، حيث أظهرت النباتات المحولة وراثياً أعراضاً مرضية أقل شدة - مما فى غير المحولة - عندما تعرضت للإصابة بالفيروس الأصلي، بينما لم يتأثر نموها بعملية التحول الوراثي

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

ومن أهم محووب صطا التطبيق للصناعة الوراثية ما يلى:

- ١ - لا تتوفر التوابع فى جميع الفيروسات.
- ٢ - لا يمكن التنبؤ دائماً بتأثير التوابع فى النباتات المحولة وراثياً، فبينما حى تقلل كثيراً من شدة الأعراض المرضية فى معظم الحالات، فإنها تزيدها فى حالات أخرى قليلة (عن Grumet 1990)

وقد وجد أن الحماية التى يوفرها الرنا التابع لفيروس موزايك الخيار كانت فعالة فى مكافحة الفيروس فى كل من حالتى الحقن بالبن وميكانيكياً

أما بالنسبة للتحول الوراثي الذى يجرى باستعمال جينوم الـ helper virus، فقد أظهرت الدراسات أن المقاومة لا تظهر فى الأوراق التى تحقن بالفيروس، وإنما فى الأوراق التالية لها فى الظهور، وأن درجة الحماية لا تتوقف على تركيز الفيروس

المستخدم فى الحقن، ولا ترتبط بدرجة التعبير عن تقابعات الحامض النووى (ak helper virus) المستخدم فى التحويل الوراثى (عن Grumet ١٩٩٥).

إن من أكبر مخاطر تقنية التحويل الوراثى باستعمال الجينات الخاصة بالتتابع الفيروسية satellite viruses وال helper viruses أنها لا تكون دائماً مخفضة لأعراض الإصابات التى تحدثها الفيروسات الأصلية، فقد تحدث بها طفرات تجعل تأثيرها منشطاً للفيروس الأسمى ليصبح أشد ضراوة كذلك فإن الفيروس التابع لا يكون تأثيره بالضرورة واحداً فى كل عوائله، فهو قد يكون مثبطاً لفعل الفيروس الأسمى فى أحد الأنواع النباتية، ومنشطاً له فى نوع آخر (عن Scholthof وآخرين ١٩٩٣).

هذا .. ويبين جدول (١٤-٧) مقارنة بين الطرق المختلفة للتحويل الوراثى باستعمال جينات مختلفة ذات أصل فيروسى.

جدول (١٤-٧): مقارنة بين الطرق الرئيسية لهندسة النباتات لمقاومة الفيروسات (عن Grumet ١٩٩٠).

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

التحول الوراثى بجينات من العائل تختص بمقاومة الفيروسات

الجينات التى تشفر للإنزيمات ذات العلاقة بعملية ظهور المرض

إن أكثر مظاهر المقاومة للفيروسات فى النباتات هى الاستجابة التى تعرف باسم فرط الحساسية hypersensitivity، وهى التى يُستثار حدوثها عندما يتعرف النبات العائل على الكائن الممرض - وهو الفيروس فى حالتنا تلك - مما يؤدي إلى موت ميرمج لخلايا العائل حول الموضع الأول للإصابة ولقد وجد أن حادثة التعرف تلك تعتمد - فى بعض الأحيان - على جينات مفردة فى العائل ويؤدى تعرف النبات على الكائن الممرض - بالتالى - إلى حث عدد كبير من الجينات الأخرى المرتبطة بالدفاع ضد مسببات المرضية حثها إلى النشاط وبينما تعمل بعض تلك الجينات موضعياً فى مكان الإصابة لتتسبب فى موت الخلايا المرافق لاستجابة فرط الحساسية، فإن جينات أخرى كثيرة يظهر تأثيرها جهازياً، وتشارك فى تطور حالة من المقاومة - أعلى من الحالة العادية - فى أجزاء النبات، وهى التى تعرف باسم المقاومة الجهازية المكتسبة systemic acquired resistance، ومن بين أهم هذه الجينات التى تشارك فى إحداث حالة المقاومة الجهازية المكتسبة تلك التى تكون مسئولة عن إنتاج ما تعرف بالبروتينات المرتبطة بتولد أو نشوء المرض pathogenesis-related proteins. ولقد أمكن التعرف على عديد من تلك البروتينات، وهى تضم ما لا يقل عن عشرة بروتينات رئيسية حامضية acidic تتواجد أساساً فى البروتوبلاست، بالإضافة إلى مجموعة من البروتينات الأساسية التى تتواجد فى الفجوات العصارية وقد تبين أن عدداً كبيراً من هذه البروتينات يظهر بها نشاط لكل من الـ glucanase، و الـ chitinase

وفى التبغ وجد أن المقاومة الجهازية المكتسبة التى تُحدثها العدوى بفيروس موزايك التبغ لا تكسب النباتات حماية ضد مزيد من لقاحات الفيروس ذاته - فقط - ولكن - كذلك - ضد فيروسات أخرى، ومسببات مرضية أخرى فطرية وبكتيرية. ونظراً لأن المقاومة الجهازية المكتسبة، وتعتيل البروتينات المرتبطة بتولد المرض يحدثان فى آن واحد، فقد اقترح أن تلك البروتينات تلعب دوراً نشطاً فى عملية الدفاع. ولقد جاء أول تأكيد لذلك الاستنتاج عندما لوحظ أن رش أوراق التبغ بحامض السلييك يحث تمثيل

مجموعة من البروتينات المرتبطة بتولد المرض، وأن ظهورها يواكب تطور حدوث المقاومة الجهازية المكتسبة، هذا مع العلم بأن حامض السلسيلك يعد من النواتج الأيضية النباتية الطبيعية، ووجد أنه يلعب دوراً جوهرياً في تطور المقاومة الجهازية المكتسبة. ولقد تبين أن النباتات المهندسة وراثياً لجعلها قادرة على تحليل حامض السلسيلك الطبيعي لا تكون قادرة على تطوير مقاومة جهازية مكتسبة.

ومن المعتقد أن التعبير عن الجينات التي تشفر للبروتينات المرتبطة بتولد المرض في النباتات هو أقصر الطرق لتقييم ما إذا كان ظهورها مجرد ارتباط بتطور المقاومة الجهازية المكتسبة، أم أنها تلعب دوراً نشطاً في المقاومة (عن Kavanagh & Spillane 1995).

جينات المقاومة الطبيعية فى العائل

نعنى بجينات المقاومة الطبيعية فى العائل تلك التى تكون خاصة بأصناف معينة ضد فيروسات معينة، حيث يكون النوع النباتى الذى تنتمى إليه تلك الأصناف قابل للإصابة - بصورة عامة - بالفيروسات التى تقاومها تلك الأصناف، وتلك حالة تختلف عن كل من حالة فرط الحساسية التى أسلفنا بيانها، وحالة مقاومة نوع نباتى ما لجميع سلالات فيروس ما. وجدير بالذكر أن حالة المقاومة التى نعنيها هنا هى التى اعتمد عليها مربو النباتات لسنوات عديدة فى تربية أصناف مقاومة للفيروسات، وفى معظم الأحيان كانت تلك المقاومة بسيطة، بينما كانت حالات المقاومة الكمية أو التى يتحكم فيها عدد محدود من الجينات oligogenic resistance هى الاستثناء للقاعدة

وعلى الرغم من التعرف على عديد من تلك الجينات فإنه لا يعرف عن غالبيتها شيئاً، باستثناء تحديد الموقع الكروموسومى التقريبى لبعضها؛ الأمر الذى أعاق الاستفادة منها فى عمليات التحول الوراثى.

ولقد كان الجين التبغ N أول جينات المقاومة للفيروسات التى تم عزلها لأجل الاستخدام فى عمليات التحول الوراثى. يوفر هذا الجين مقاومة لفيروس موزايك التبغ ومعظم الفيروسات الأخرى من عائلة الـ tobamovirus ونظراً لأن سلالات فيروس

موزايك التبغ يمكنها إصابة أكثر من ٢٠٠ نوع نباتي، بما في ذلك معظم الباذنجانيات، فإنه يتبين مدى أهمية تحويل النباتات وراثياً بهذا الجين. كانت البداية بتحويل طماطم قابلة للإصابة بفيرس موزايك التبغ بالجين N، مما أدى إلى إكسابها صفة المقاومة

ومن بين الحالات القليلة التي دُرست فيها تلك الجينات على المستوى الجزيئي وجرت محاولات للاستفادة منها جين المقاومة Rx في البطاطس، الذي يضيف حالة المقاومة القصوى extreme resistance - وهي حالة تعترّب من المناعة immunity - ضد فيروس إكس البطاطس، حيث يُوقف الجين - تماما - تكاثر الفيروس

تبدأ تفاعلات حالة المقاومة القصوى عندما يبدأ البروتين المسئول عن إنتاجه الجين Rx التعرف على موقع معين من الغلاف البروتيني للفيروس، حيث يتوقف تكاثر الفيروس وما أن يُستحث الجين على إظهار نشاطه في المقاومة فإن تلك المقاومة تكون فعالة - بذات الدرجة - في تثبيط تكاثر فيروسات أخرى لا علاقة تربطها بفيرس إكس البطاطس ولقد كللت بنجاح محاولات التحويل الوراثي لكل من البطاطس، و *N benthamiana*، و *N. tabacum*، وكانت النباتات التي حولت وراثياً تامة المقاومة (عن Kavanagh & Spillance ١٩٩٥، و Walsh ٢٠٠٠)

التحول الوراثي بجينات نباتية المصدر تشفر لبروتينات مضادة للفيروسات

توجد فئة من البولي ببتيدات تعرف باسم مضادات الفيروسات، أو البروتينات المثبطة للريبوسومات ribosome-inactivating proteins، وأمكن التعرف عليها في عدد من الأنواع النباتية، منها حنيشة عنب الذئب أو عنب الثعلب pockweed (وهي *Phytolacca americana*)، التي أمكن التعرف فيها على ثلاثة أنواع من البروتينات المضادة للفيروسات pockweed antiviral proteins (اختصارا PAPS)، هي PAP و يوجد في الأوراق الربيعية، و PAPII و يوجد في الأوراق الصيفية، و PAPS و يوجد في البذور، ويرجع دورهم في تثبيط الريبوسومات إلى قدرتهم على تحويل الرنا الريبوسومي، ومن ثم إحداث تعرض مع ترجمة شفرة البولي ببتيدة وقد أوضحت الدراسات أن النشاط المضاد للفيروسات لتلك البروتينات يحدث نتيجة لدخولها في الـ cytosol (من

الحجيرات التي تكون محجوزة فيها؛ فيما يعرف باسم compartmentalization) حيث تعمل على تثبيط ريبوسومات العائل.

وقد أوضحت الدراسات - كذلك - أن عدوى النباتات بثلاثة فيروسات مختلفة - فى آن واحد - هى فيروس إكس البطاطس، وفيروس واى البطاطس، وفيروس موزايك الخيار - أن الـ PAP تسبب فى مقاومة النباتات للعدوى الميكانيكية بكل من فيروس إكس البطاطس وفيروس واى البطاطس، وأن مستوى المقاومة ارتبط إيجابياً بمستوى الـ PAP فى السلالات المحولة وراثياً، وأن السلالات التى احتوت على مستوى عالٍ من الـ PAP كانت مقاومة - كذلك - لفيروس موزايك الخيار (عن Kavanagh & Spillane 1995).

ومن الأمثلة الأخرى لحالات التحول الوراثى لمقاومة الفيروسات، والتى استخدمت فيها جينات نباتية مضادة للفيروسات، ما يلى:

- 1 - الجين ribonuclease الذى حُصل عليه من الخميرة واستعمل فى تحويل البطاطس وراثياً، حيث جعلها مقاومة لفيروس الدرنة المغزلية spindle tuber viroid.
- 2 - الجين β -1,3-glucanase الذى استعمل فى التحويل الوراثى لعدد من النباتات، حيث جعلها مقاومة لعدد من الفيروسات (عن Bent & Yu 1999).

التحول الوراثى بجينات من الثدييات

جينات تكوين الأجسام المضادة

إن جهاز المناعة الذى تتميز به الثدييات يوفر لها مراقبة فعالة ضد مسببات المرضية التى قد تهاجمها، بإكسابها القدرة على إنتاج أعداد كبيرة من الأجسام المضادة antibodies الخاصة بأنتيجينات معينة. ولقد توجه تفكير الباحثين إلى أن تحويل النباتات وراثياً بالجينات المسئولة عن تكوين تلك الأجسام المضادة ربما يفيد فى حمايتها من مختلف الإصابات المرضية.

ولقد كانت المحاولات الأولى للتعبير عن الـ monoclonal antibodies (اختصاراً: mAbs) فى النباتات واستمرار بقاء مستوى عالٍ من النشاط الرابط binding activity

[للأنتيجينات] فى النباتات المحولة وراثياً .. كانت مخيبة للآمال، وكان مرد ذلك إلى استعمال cDNAs - لك mAbs - التى أشفرت لكل جزئ الجسم المضاد الطبيعى، وهو الذى تبين عدم ثباته فى الخلايا النباتية. ولقد حُلَّت تلك المشكلة بدرجة كبيرة بتطوير أجسام مضادة صغيرة mini antibodies تحتوى - فقط - على الأجزاء الفعالة الرئيسية الضرورية للتعرف على الأنتيجين والارتباط معه، والتى أظهرت قدرًا أكبر من التبات فى الخلايا النباتية

ولقد اتبعت تلك الطريقة فى تطوير نباتات تبغ محولة وراثياً على درجة عالية من المقاومة للعدوى لفيرس تبرقش وتغضن الخرشوف artichoke crinkle mottle virus، حيث احتوت على mAb ذات سلسلة واحدة single chain mAb موجبة نحو الغلاف البروتينى للفيرس، كانت هى السبب فى المقاومة التى ظهرت على صورة تأخر فى ظهور أعراض الإصابة بعقدار ٥-١٤ يوماً بعد عدوى النباتات بتركيز من الفيرس وصل إلى ١٠٠٠ ضعف الحد الأدنى للتركيز الذى يلزم لإحداث الإصابة فى النباتات العادية. وتبين أن تلك المقاومة كانت بسبب حدوث ربط binding للفيرس مع الـ mAbs (عن Kavanagh & Spillane ١٩٩٥)

إنزيم الشدييات oligoadenylate synthase

تفرز الخلايا الحيوانية مركبات تعرف باسم إنترفيرونات interferons أثناء تكاثرها وازديادها عددياً، وذلك استجابة لمؤثرات خارجية، وخاصة الإصابات الفيروسية ليس لهذه الأنترفيرونات - بذاتها - أى نشاط مضاد للفيروسات، ولكنها تستحث تمثيل بروتينات إضافية هى التى تقوم - مباشرة - بتثبيط تكاثر الفيرس، ومنها 2'-5' oligoadenylate synthetase ينشط هذا الإنزيم فى وجود رنا مزدوج يتكون أثناء تكاثر فيروسات الرنا وما أن ينشط الإنزيم حتى يقوم بعمل بلمرة للـ ATP إلى صورة oligomeric تقوم - بدورها - بتنشيط ribonuclease معين، ليقوم بتحليل الرنا الفيروسي والخلوى

وتوجد أدلة على أن بعض مكونات ذلك المسار المضاد للفيروسات توجد فى

النباتات؛ مما يفيد بأن التعبير عن الـ cDNA الخاص بالـ oligoadenylate synthetase الذى يوجد بالتدييات ربما يكسب النباتات التى تحول وراثياً به مقاومة غير متخصصة ضد الفيروسات (عن Kavanagh & Spillance ١٩٩٥).

ولقد أمكن تحويل البطاطس وراثياً بجين التدييات الخاص بإنتاج الإنزيم 5'-2' oligoadenylate synthetase، الذى يعد أحد مكونات نظام الإنترفيرون الذى يعمل فى التدييات كمضاد للفيروسات. عُزل هذا الجين من الفئران، ونقل إلى البطاطس بالاستعانة ببكتيريا الأجروباكتيريم. وقد كانت نباتات البطاطس التى عُبرَ فيها عن الجين - والتى حقنت بغيرس إكس البطاطس - أقل احتواءً على هذا الفيروس فى كل من الأوراق والدرنات عما كان عليه الحال فى النباتات غير المحولة وراثياً (Truve وآخرون ١٩٩٣).

كما أوضحت الدراسات أن الإنترفيرون interferon الآدمى ينشط - كذلك - ضد الفيروسات النباتية؛ فقد وفر - فى إحدى الدراسات - حماية للنباتات من الإصابة بغيرس موزايك التبغ، إلا أن دراسات أخرى كثيرة أوضحت عدم جدواه فى توفير تلك الحماية. وقد ترجع تلك الاختلافات إلى التركيز العالى نسبياً للإنترفيرون الذى استخدم فى المعاملة؛ إذ إن التركيزات المنخفضة فقط هى التى تكون نشطة فى النباتات (عن Walsh ٢٠٠٠).

استعراض للإنجازات فى مجال التحول الوراثى لمقاومة الفيروسات

نقدم فى الجداول الأربعة التالية استعراضاً لما تم إنجازه فى مجال التحول الوراثى لمقاومة الفيروسات. يظهر فى جدول (١٤-٨) عرضاً لعدد الحالات التى استخدمت فيها مختلف جينات المقاومة للفيروسات، وبداية تطبيق كل حالة منها، وذلك حتى عام ١٩٩٥. وفى جدول (١٤-٩) نقدم قائمة بمختلف الجينات التى حُصل عليها من فيروسات معينة، والتى استعملت فى عمليات التحول الوراثى لمقاومة تلك الفيروسات فى عدد من الأنواع النباتية. ويقدم جدول (١٤-١٠) قائمة بعدد الأنواع المحصولية التى أنتجت فيها نباتات مقاومة للفيروسات حتى بداية عام ١٩٩٥. أما جدول (١٤-١١)

فتظهر به حالات التحول الوراثي لمقاومة الفيروسات التي أجريت عليها اختبارات حقلية في الولايات المتحدة حتى عام ١٩٩٩.

جدول (١٤-٨): أنواع الحيات التي استعملت في هندسة نباتات وراثياً لمقاومة الفيروسات، ومصادرها حتى بداية عام ١٩٩٤ (عن Grunet ١٩٩٥).

نوع الجين	مصدر الجين	عام نشر أول حالة	عدد الحالات
Coat protein	فيروسى	١٩٨٦	٤٤
Satellite	فيروس تابع	١٩٨٧	٦
Antisense, sense defective RNAs	فيروسى	١٩٨٨	١٥
Replicase	فيروسى	١٩٩٠	٨
Defective-interfering sequences	فيروسى	١٩٩٠	٣
Movement protein	فيروسى	١٩٩٣	١
Protease	فيروسى	١٩٩٣	١
Antibody	حيوانى	١٩٩٣	١
Interferon-related protein	حيوانى	١٩٩٣	١

جدول (١٤-٩) جينات المقاومة للفيروسات التي استعملت في عمليات التحول الوراثي حتى عام ١٩٩٧ (عن Nascari & Montanelli ١٩٩٧).

النبات	الفيروس	الجين
التبغ	Tobacco mosaic virus	Coat protein
التبغ	Tobacco ringspot virus	Satellite RNA
التبغ	Cucumber mosaic virus	Satellite RNA
التبغ	Alfalfa mosaic virus	RNA 4
التبغ - الطماطم	Alfalfa mosaic virus	Coat protein
التبغ	Cucumber mosaic virus	CP/antisense RNA
التبغ	Potato Virus X	CP/antisense RNA
الطماطم	Tobacco mosaic virus	Coat protein
الطماطم	Tomato mosaic virus	Coat protein
التبغ	Tobacco rattle virus	Coat protein

تابع جدول (١٤-٩).

الجين	الفيروس	النبات
Coat protein	Tobacco streak virus	التبغ
Coat protein	Potato virus X	البطاطس
Antisense RNA	Tobacco mosaic virus	التبغ
Coat protein	Soybean mosaic virus	التبغ
Nonstructural	Tobacco mosaic virus	التبغ
Coat protein	Potato leaf roll virus	البطاطس
Coat protein	Potato virus Y	البطاطس
Coat protein	Potato virus S	<i>Nicotiana debneyii</i>
Defective DNA	African cassava mosaic virus	<i>N. benthamiana</i>
Coat protein	Tomato spotted wilt virus	التبغ
Coat protein	Alfalfa mosaic virus	البرسيم الحجازي
CP/antisense RNA	Potato leaf roll virus	البطاطس
Coat protein	Papaya ringspot virus	التبغ
Coat protein	Potato virus S	البطاطس
Coat protein	Arabis mosaic virus	التبغ
Coat protein	Cymbidium mosaic virus	التبغ
Coat protein	Plum pox virus	الشمش
Coat protein	Papaya ringspot virus	<i>Dendrobium</i>
Coat protein	Watermelon mosaic virus II	<i>N. benthamiana</i>
Coat protein	Zucchini yellow mosaic virus II	<i>N. benthamiana</i>
Coat protein	Plum pox virus	<i>Nicotiana spp.</i>
Satellite RNA	Cucumber mosaic virus	الطماطم

جدول (١٤-١٠): الأنواع النباتية التي أنتجت فيها نباتات مقاومة للفيروسات حتى بداية عام

١٩٩٤ (عن Grumet ١٩٩٥).

الفيروسات	عدد الحالات المنشورة	الحصول
AIMV, ArMV, CMV, PVX, PVY, TEV, TGMV, TMV, TRV, TSV, TSWV	٣٧	التبغ
PLRV, PVY	١٠	البطاطس

تابع جدول (١٤-١٠).

الفيروسات	عدد الحالات المنشورة	المحصول
AIMV, CMV, TMV, TYLCV	٥	الطناطم
CMV	١	الخيار
CMV, ZYMV	٢	الكتنالوب
AIMV	١	البرسيم الحجازى
PRSV	١	البايلاظ
MDMV	١	الذرة
RSV	١	الأرر
TYMV	١	لفت الزريت

جدول (١٤-١١): حالات التحول الوراثى لمقاومة الفيروسات التى أجريت عليها اختبارات
حقلية فى الولايات المتحدة، حتى عام ١٩٩٩ (عن Malik ١٩٩٩)

الفيرس	الجين	المحصول
Alfalfa mosaic	Coat protein	البرسيم الحجازى
Barley yellow dwarf	Coat protein	الشعير
Beet necrotic yellow vein	Coat protein	البنجر
Maize chlorotic mottle	Coat protein	الذرة
Maize chlorotic dwarf	Coat protein	الذرة
Maize dwarf mosaic	Coat protein	الذرة
Cucumber mosaic	Coat protein	الخيار
Cucumber mosaic, waltermelon mosaic 2, zucchini yellow mosaic	Coat protein	الخيار
Bean yellow mosaic	Coat protein	الجلادبولس
Tomato spotted wilt	Nucleocapsid	الخبس
Zucchini yellow mosaic	Antisense coat protein	القاوون
Cucumber mosaic, papaya ringspot, watermelon mosaic2, zucchini yellow	Coat protein	القاوون
Waltermelon mosaic 2, zucchini yellow mosaic	Coat protein	انقاوون
Papaya ringspot	Coat protein	البايلاظ

الفيروس	الجين	المحصول
Tomato spotted wilt	Coat protein	الفول السوداني
Tomato spotted wilt	Nucleocapsid	الفول السوداني
Bean yellow mosaic	Coat protein	البطاطس
Potato leaf roll	Antisense coat protein	البطاطس
Potato leaf roll	Coat protein	البطاطس
Potato virus X	Coat protein	البطاطس
Potato virus Y	Coat protein	البطاطس
Potato virus Y	Antisense coat protein	البطاطس
Tobacco vein mottling	Coat protein	البطاطس
Barley yellow dwarf	Coat protein	البطاطس
Tobacco rattle	Coat protein	البطاطس
Tobacco rattle	Antisense coat protein	البطاطس
Barley yellow dwarf	17 Kda	البطاطس
Potato leaf roll	17 Kda	البطاطس
Potato leaf roll	VPg	البطاطس
Potato leaf roll	Replicase	البطاطس
Potato leaf roll	Protease	البطاطس
Tobacco vein mottling	Coat protein	البطاطس
Potato virus X, potato virus Y	Coat protein	البطاطس
Potato Virus X, potato virus Y, potato leaf roll	Coat protein	البطاطس
Potato virus Y, potato leaf roll	Coat protein	البطاطس
Papaya ringspot	Coat protein	البرقوق
Soybean mosaic	Coat protein	فول الصويا
Papaya ringspot	Coat protein	الكوثة
Cucumber mosaic	Coat protein	الكوثة
Cucumber mosaic, papaya ringspot	Coat protein	الكوثة
Watermelon mosaic 2, zucchini yellow mosaic	Coat protein	الكوثة
Cucumber mosaic papaya ringspot watermelon mosaic2, zucchini yellow mosaic viruses	Coat protein	الكوثة

تابع جدول (١٤-١١).

المحصول	الجين	الفيروس
التبغ	Antisense coat protein	Tobacco etch
التبغ	Coat protein	Tobacco etch
التبغ	Coat protein	Potato virus Y
التبغ	Coat protein	Alfalfa mosaic
التبغ	Coat protein	Beet curly top
التبغ	Coat protein	Tobacco vein mottling
التبغ	Cylindrical inclusion	Tobacco vein mottling
التبغ	Helper component	Tobacco vein mottling
الطماطم	Nucleocapsid	Tomato spotted wilt
الطماطم	CBI	Beet curly top
الطماطم	Coat protein	Tomato yellow leaf curl
الطماطم	Coat protein	Tomato mosaic
الطماطم	Coat protein	Cucumber mosaic
الطماطم	Replicase	Tobacco mosaic
البطيخ	Coat protein	Watermelon mosaic 2, zucchini yellow mosaic