استراتيجيات التحول الوراثى لمقاومة الحشرات

إن من أهم الاستراتيجيات التى قامت عليها الهندسة الوراثية للنبات لمقاومة الحشرات، ما يلى.

١ – التعبير عن السم الحشرى δ-endotoxin الخاص بالبكتيريا *Bacillus thuringiensis* فى النباتات (من ذوات الفلقتين وحديثًا ذوات الفلقة الواحدة كذلك) لمقاومة يرقات حرشفية الأجنحة، والتى من أمثلتها دودة ورق القطن، والدودة الخضراء، وديدان اللوز، ودودة ثمار الطماطم، والديدان القياسيه، والدودة الدبوسية، وفراشة درنات البطاطس، وثاقبات الذرة . إلخ

٢ – التعبير عن مثبطات إنزيم البروتييز protease، مثل الـ trypsin inhibitor، وهى التى تفيد فى مكافحة عديد من اليرقات الحشرية

٣ – التعبير عن بروتينات أخرى، مثل:

أ – اللكتينات lectins وهى التى تتواجد بكثرة فى بذور عديد من النباتات، وتلعب دورًا فى دفاع النباتات ضد الإصابات المرضية والحشرية.

ب – مثبط الألفا أميليز α-amylase inhibitor، وهو الذى يتواجد طبيعيًا فى بذور الفاصوليا، ويلعب دورا فى حمايتها من الإصابة بخنفساء اللوبيا

جـ – إنزيم cholestrol oxidase الذى عزل من الـ *Streptomyces* ووجد له نشاط فعال فى مكافحة ديدان اللوز.

د – بروتينات أخرى عديدة فعالة ضد بعض الحشرات التى تقاوم الـ δ-endotoxin – مثل دودة جذور الذرة والدودة القارضة – وتفرز طبيعيًا بواسطة بعض أنواع البكتيريا، مثل *Bacillus cereus*، و *B. thuringiensis* (عن Koziel وآخرين ١٩٩٨)

لقد أمكن التعرف على عديد من تلك البروتينات ذات الأصل النباتى القاتلة للحشرات (مثل اللكتينات lectins، ومثبطات البروتييز protease inhibitors) التى يمكنها تثبيط نمو وتطور الحشرات عندما تتغذى عليها بكميات كبيرة. كذلك أمكن عزل بعض الجينات التى تشفر لإنتاج عدد من تلك البروتينات، مثل: CpTi، و PIN-I، و PIN-II، و αAI، و GNA، وهى تستعمل فى برامج الهندسة الوراثية، بهدف التربية لمقاومة الحشرات

وقد وجد أن الجينات التى تكسب النباتات مقاومة ضد آفات أخرى غير حشرية تجعلها - كذلك - مقاومة لبعض الحشرات، ومن أمثلة ذلك جين الطماطم Mi-1 الذى يكسبها مقاومة لنيماتودا تعقد الجذور، والذى وجد أنه يكسب النباتات - كذلك - مقاومة لمن البطاطس (عن Chahal & Gosal ٢٠٠٢).

غربلة مصادر المقاومة

ربما كانت أسرع وسيلة للتوصل إلى نوعيات جديدة من البروتينات ذات التأثير السام على الحشرات - لأجل استخدامها فى عمليات التحول الوراثى للنباتات بهدف مقاومة الحشرات - هى بغربلة أكبر عدد ممكن من البروتينات من أى مصدر كان، كالأنسجة النباتية وإفرازات الكائنات الدقيقة، حيث تضاف العينات البروتينية إما مفردة، وإما فى مجموعات إلى الغذاء الذى تُربى عليه الحشرات الهامة المعنية بالمقاومة. وعندما تُظهر إحدى العينات تأثيرًا سامًا على الحشرة فإنه يتم - بوسائل الفصل المختلفة وإعادة الاختبار - تحديد البروتين المسئول عن هذا التأثير والتأكد من كونه بروتين فى طبيعته، ويلى ذلك عزل الجين المسئول عن إنتاج هذا البروتين واستخدامه فى عمليات التحول الوراثى.

وباتباع هذه الطريقة .. تمكن Corbin وآخرون (١٩٩٨) من التوصل إلى أن البروتين cholesterol oxidase ذات الأصل الميكروبى كان له تأثيرًا سامًا على سوسة اللوز بالقطن cotton boll weevil (*Anthonomus grandis grandis*). ويعتقد الباحثون أن تحويل القطن وراثيًا بالجين المسئول عن إنتاج هذا الإنزيم ربما يلعب دورًا كبيرًا فى مقاومة تلك الآفة.

جينات المقاومة ومصادرها

يعرف حاليًا أكثر من ٤٠ جينًا لمقاومة الحشرات تم نقلها - من مصادر مختلفة - إلى النباتات لأجل إنتاج أصناف مقاومة، ومن بين أهم الجينات التى استخدمت فى هذا المجال، ما يلى

الجين	المصدر الأصلى للجين
Bt	*Bacillus thuringiensis*
isopentyl transferase (ipt)	*Agrobacterium tumefaciens*
cholesterol oxidase	*Streptomyces* spp.
Pht	*Photorhabdus luminescens*

هذا . بالإضافة إلى جينات المقاومة للحشرات التى حُصل عليها من النباتات الراقية، والتى تتحكم فى إنتاج البروتينات التالية

١ – مثبطات البروتينيز proteinase inhibitors.

٢ – مثبطات الأميليز amylase inhibitors.

٣ – اللكتينات lectins، مثل لِكتين زهرة اللبن الثلجية snowdrop lectin، ولكتين البسلة، ولكتين الأرز ... إلخ

كذلك حُصل على جينات المقاومة من أصول حيوانية، مثل مثبطات البروتينيز من السيرين serine proteinase inhibitors، التى حصل عليها من كل الثدييات وحرشفية الأجنحة *Manduca sexta* (وهى الـ tobacco hornworm) (عن Chawla ٢٠٠٠)

وقد اتجه الباحثون – لأجل مكافحة الحشرات بطرق الهندسة الوراثية – إلى محاولة هندسة التعبير عن البروتينات ذات التأثير القاتل للحشرات (insecticidal proteins)، ونشط الباحثون فى البحث عنها فى كل من النباتات وغيرها من الكائنات الحية ومن بين البروتينات ذات التأثير القاتل للحشرات ذات الأصل النباتى التى أمكن رصدها، ما يلى:

chitinases	polyphenol oxidases
anionic peroxidases	trypsin inhibitors
α-amylase inhibitors	proteinase inhibitors
lectins	

ولقد وجد أن الـ chitinases تحلل المكونات الشيتينية بالقناة الهضمية للحشرات وتولد الـ polyphenol oxidases مركبات كيميائية ذات تأثير معتدل السمية على الحشرات من مكونات غذاء الحشرة أما الـ trypsin، والـ α-amylase، والـ

proteinase inhibitors فإنها تتعارض مع الإنزيمات الهاضمة بالحشرة، بينما ترتبط الـ lectins بكل من عديدات التسكر oligosaccharides و الـ glycosylated proteins، بما يتعارض مع عملية الهضم. ولقد أنتجت نباتات محولة وراثيًا تنتج تلك المركبات وتم اختبارها، إلاّ أن مستوى مقاومة الحشرة – فى كل حالة – لم يبرر إنتاجها تجاريًا؛ ففى معظم الحالات تتأقلم الحشرة – تدريجيًا – على الوضع غير المناسب لها فى النبات المحول وراثيًا (Bent & Yu ١٩٩٩).

ومن بين مركبات الأيض الثانوية التى وجد أنها تلعب دورًا فى مقاومة الحشرات، ما يلى:

١ – الجلوكوسيدات السيانوجينية cyanogenic glucosides، والجلوكوسينولات glucosinolates.

٢ – أحماض الأيدروكسامك الحلقية cyclic hydroxamic acids: تلعب هذه الأحماض دورًا فى دفاع بادرات الذرة والقمح والراى الصغيرة ضد الإصابات البكتيرية والفطرية والحشرية.

٣ – البيرثرين pyrethrin.

٤ – الروتينون rotenone.

٥ – الأميدات غير المشبعة unsaturated amides (عن Chilton ١٩٩٧).

هذا .. ومن المعروف أن إنزيمات البيروكسيديز peroxidases، والليبوكسى جينيز lipoxygenases، والبولى فينول أوكسيديز polyphenol oxidases تلعب دورًا فى مقاومة الحشرات (عن Gatehouse ١٩٩٩).

مثبطات البروتينيز

من المعلوم أن إنزيم البروتينيز proteinase يتواجد فى الجهاز الهضمى للحشرات، وعلى ذلك فإن تواجد مثبطات البروتينيز proteinase inhibitors فى غذاء الحشرة يؤثر فيها سلبيًا، ويعتقد على نطاق واسع أن وجود تلك المثبطات فى النباتات يوفر لها حماية ضد الحشرات.

تنتشر مثبطات إنزيمات البروتينيز فى المملكة النباتية انتشارًا واسعًا، وتتوفر بكثرة بصفة خاصة – فى البذور وأعضاء التخزين، حيث تتراكم – أحيانًا – إلى ما يقرب من ١٪ إلى ١٠٪ من البروتين الكلى بها تتباين تلك البروتينات فى الوزن الجزيئى ما بين ٤٠٠٠ إلى ٨٠٠٠٠، ولكن معظمها يتراوح بين ٨٠٠٠، و ٢٠٠٠٠. ومن أكثر هذه المثبطات انتشارًا تلك التى تعرف باسم السيرين بروتييز serine protease، وهى التى يقع الوزن الجزيئى لمعظمها فى حدود هذا المدى الأخير، حيث يبلغ فى غالبيتها ١٠٠٠٠ (عن Gatchouse ٢٠٠٠)

من أمثلة إنزيمات البروتينيز المعروفة تلك التى تعرف باسم الـ metallo proteinases لكل من السيرين serine، والسيستين cysteine، والأسبارتك aspartic تعمل تلك الإنزيمات على إطلاق الأحماض الأمينية من البروتين الموجود بالغذاء؛ وهى التى تكون حاسمة بالنسبة للنمو والتطور الطبيعيين للحشرة، بينما تعمل مثبطات البروتينيز على حرمان الحشرات من تلك الأحماض الأمينية من خلال تعارضها مع الإنزيمات الهاضمة للحشرة (عن Chawla ٢٠٠٠).

إن مثبطات إنزيمات البروتينيز ذات الأصل النباتى يمكنها تثبيط تلك الإنزيمات فى كل من الحيوانات، والبكتيريا، والفطريات، ولكنها نادرًا ما تؤثر على الإنزيمات المماثلة فى النبات

وتقسم مثبطات البروتييز – عادة – إلى أربع فئات: تلك التى تثبط بصورة خاصة الـ serine proteases، والـ sulphydryl proteases، والـ metallo carboxypeptidases، والـ acid proteases. تقع معظم مثبطات البروتييز النباتية ضمن الفئة الأولى، وهى التى نالت القدر الأكبر من اهتمام الباحثين كذلك نالت الـ sulphydral proteases قدرًا من الاهتمام. وخاصة فيما يتعلق باستخدامها فى مكافحة غمديات الأجنحة.

تثبط الـ serine proteinase inhibitors إنزيمات الـ endopeptidases، مثل التربسن trypsin والكيموتربسن chemotrypsin التى توجد فى كل من النباتات والحيوانات. ولقد أمكن التعرف على ثلاثة طرز تحفز الجروح إنتاجها فى النباتات كوسيلة للدفاع. حيث تؤثر سلبًا – بندة – على نمو وبقاء الحشرات، وخاصة من حرشفية الأجنحة

تتميز تلك المثبطات بقدرة كل جزئ منها على تثبيط جزيئين من الإنزيمات. فمثلاً .. يثبط الـ Bowman-Birk inhibitor – المتحصل عليه من فول الصويا – جزئ من التربسن trypsin، وآخر من الكيموتربسن chymotrypsin، ويثبط الـ ragi inhibitor – المتحصل عليه من نبات *Eleusine coracana* – كلا من التربسن، والألفا أميليز α-amylase، وتعرف عدة مثبطات مناظرة للـ Bowman-Birk توجد فى اللوبيا وتثبط إما التربسن فقط، وإما كلا من التربسن والكيموتربسن.

كذلك تعرف عدة مثبطات مستقلة للبروتينيز، منها: الـ cysteine، والـ aspartyl، والـ metallo protease inhibitors. وجميع هذه المثبطات صغيرة فى وزنها الجزيئى، حيث يتراوح بين ٥، و ٢٥ kDa، ويؤدى تواجدها فى غذاء الحشرة إلى زيادة إنتاجها لإنزيم البروتينيز؛ الأمر الذى يؤدى إلى تضخم البنكرياس، ونقص فى وزن جسم الحشرة، ثم موتها (عن Gatehouse ١٩٩٩، و Watt وآخرين ١٩٩٩).

مثبطات البروتينيز التى تستحث الجروح تكوينها

كان أول ما عُزِلَ من مثبطات البروتينيز التى تستحث الجروح تكوينها wound-induced proteinase inhibitors مثبطان أعطيا الرمزان I، و II، عزلا من درنات البطاطس، وذلك فى ستينيات القرن العشرين، وتبين إنتاجهما فى أوراق كل من البطاطس والطماطم استجابة لكل من الإصابات الحشرية والأضرار الميكانيكية. وأظهرت الدراسات إنتاج النباتات جهازيًّا لمركب (هو: PIIF) استجابة لإشارة تحدث لدى تعرضها للتجريح؛ هذا المركب تبدأ منه عملية تمثيل وتراكم مثبطات البروتينيز، وتتباين الأنواع النباتية فى مستوى استجابتها لإنتاج تلك المثبطات من انعدام الاستجابة إلى الاستجابة الشديدة. ولقد تبين أن النباتات التى تتراكم فيها تلك المثبطات استجابة للتجريح لا تكون عائلاً مناسبًا لتكاثر الحشرات، كما فى حالة تغذية يرقات كل من *Heliothis zea*، و *Spodoptera exigua* على البطاطس (عن Watt وآخرين ١٩٩٩).

مثبطات السيستين

أمكن عزل مثبطات الـ cysteine protease من عدة مصادر نباتية، لكن لم تثبت

أهميتها فى مقاومة الحشرات إلاّ بالنسبة لغمديات الأجنحة التى تعتمد على cysteine proteases بصورة أساسية فى هضمها للبروتين. ولقد وجد أن المثبط oryzacystatin المتحصل عليه من الأرز يثبط الـ proteases الهاضمة لعدة أنواع حشرية من غمديات الأجنحة.

وتوجد حالات قليلة من النباتات المحولة وراثيًا التى يعبر فيها عن مثبطات الـ cysteine protease، ومنها: الحور، والتبغ، والأرز. وفى الأرز اختبر تأثير المثبط على المقاومة للنيماتودا، حيث لوحظ إحداثه لنقص قدره ٥٥٪ فى إنتاج البيض (عن Gatehouse ١٩٩٩، و Watt ١٩٩٩).

مثبطات السبرين

تحتوى كل من البطاطس والطماطم على مثبطين قويين للـ serine proteases يأخذان الاسمين Inhibitor I، و Inhibitor II يحتوى Inhibitor I على موقع تفاعلى واحد، وهو يثبط الكيموتربسن، ولا يثبط التربسن إلا قليلاً. بينما يحتوى الـ Inhibitor II على موقعين تفاعليين، يُثبِّط التربسن بواسطة أحدهما، والكيموتربسن بواسطة الآخر يتم تمثيل المثبطين كبادئين لمركبات أخرى تخزن فى الفجوات العصارية. وتجدر الإشارة إلى أن هذين المثبطين يُستحث إنتاجهما فى أوراق البطاطس والطماطم استجابة للتجريح، على الرغم من أنهما يتراكمان فى درنات البطاطس.

ونظرًا لأن الـ serine proteases (التربسن والكيموتربسن) هما أهم الـ endoproteases الهاضمة فى معى الحشرات، فإن تلك المثبطات يمكن أن يكون لها أهمية كبيرة فى الحماية من الحشرات، وخاصة حرشفيات الأجنحة (عن Gatehouse ١٩٩٩)

مثبطات بروَمان/بِرك (مثبطات التربسن والكيموتربسن)

تم عزل أول مثبطات البروتينيز من الطراز المعروف باسم بروَمان/برك Browman-Bırk proteinase inhibitor من فول الصويا، وتلاه عزل عديد من المثبطات الأخرى من الطراز ذاته من بعض أنواع العائلة البقولية كاللوبيا، وجميعها ذات وزن جزيئى صغير

(حوالى ٨ kDa)، وغنية فى السيستين cysteine، وتتكون أساسًا فى البذور أثناء تكوينها. ولهذه المثبطات موقعين نشطين لنوعين من إنزيمات البروتينيز، هما: التربسن trypsin، والكيموتربسن chemotrypsin.

ولقد كان أحد تلك المثبطات، وهو الـ cowpea trypsin inhibitor (اختصارًا: CpTI) أول ما استخدم – من بين مختلف مثبطات البروتينيز – فى دراسات الهندسة الوراثية، وذلك فى محاولة لمكافحة سوسة بذور اللوبيا *Callosobruchus maculatus* (عن Watt وآخرين ١٩٩٩).

يُعطى هذا الجين الرمز CpTI، وهو أكثر المثبطات المعروفة تأثيرًا. ينتج هذا الجين مركبات مضادة للأيض antimetabolite substances توفر حماية للوبيا ضد أهم خنافس البذور، وهى الـ Bruchid beetle (*Callosobruchus maculatus*). كذلك يعتبر هذا الجين ضارًا بحشرات متباينة كثيرًا (جدول ١٥–١) مثل: *Heliothis virescens*، و *Manduca sexta* (وهما من حرشفيات الأجنحة Lepidopteran)، وكلا من *Callosobruchus*، و *Anathomus grandis* (وهما من غمديات الأجنحة Coleopteran)، و *Locusta migratoria* (وهو مستقيم الأجنحة Orthopteran)، ولكنه ليس ضارًا بالثدييات (عن King ١٩٩٠، و Chawla ٢٠٠٠).

ولقد أمكن عزل الجين CpTI واستعمل عن طريق فيرس موزايك القنبيط فى تحويل التبغ وراثيًا، مما أدى إلى اكتسابه مقاومة واضحة لدودة لوز القطن *Helicoverpa zea*، مقارنة بنباتات الكنترول غير المحولة وراثيًا (عن Chawla ٢٠٠٠).

هذا .. إلاّ أنه على الرغم من أن النباتات التى عُدِّلت وراثيًا بجين اللوبيا CpTI احتوت على البروتين المثبط للتربسن بكميات وصلت إلى نحو ١٪ من البروتين الكلى الذائب، وعلى الرغم من أن الحماية التى وفرها هذا البروتين ضد حشرات مثل *Heliothis zea*، و *Spodoptera littoralis* كانت معنوية، إلاّ أنها لم تصل إلى المستوى المناسب للمكافحة الجيدة التى يرضى عنها المزارعون (عن Gatehouse ١٩٩١).

جدول (١٥-١): الحشرات التى تؤثر فيها مثبطات التربسن المتحصل عليها من اللوبيا والتى يشفر لإنتاجها الجين CpTI (عن Gatehouse وآخرين ١٩٩٢).

الرتبة	الحشرة	المحاصيل الرئيسية التى تصاب بالحشرة
حشرات حقلية		
Lepidoptera	*Heliothis virescens*	التبغ والقطن
	Heliothis zea	الذرة والقطن والفاصوليا والتبغ
	Helicoverpa armigera	القطن والفاصوليا والذرة والمورجم
	Spodoptera littoralis	الذرة والأرز والقطن والتبغ
	Chilo partellus	الذرة والمورجم وبنجر السكر والأرز
	Autographa gamma	بنجر السكر والخس والكرنب والفاصوليا والبطاطس
	Manduca sexta	الطماطم والتبغ والبطاطس
Orthoptera	*Locusta migratoria*	النجيليات
Coleoptera	*Diabrotica undecimpunctata*	الذرة
	Costelytra zealaadica	النجيليات والبرسيم
	Anthonomus grandis	القطن
حشرات المخازن		
Coleoptera	*Callosobruchus maculatus*	اللوبيا وفول الصويا
	Tribolium confusum	معظم الزحور

وقد أمكن تحويل القنبيط وراثيًا بجين مثبط للتربسن حُصِلَ عليه من إحدى سلالات البطاطا المقاومة لعدد من الحشرات المحلية الانتشار فى تايوان، الأمر الذى ظهر كذلك فى نباتات القنبيط التى حولت وراثيًا (Ding وآخرون ١٩٩٨).

كذلك وجد أن كلا من الـ anti-trypsin، والـ anti-chemotrypsin، والـ anti-elastrase الحشرية أدت - عند التعبير عنها فى التبغ - إلى نقص تكاثر الحشرات التى تغذت عليها بنسبة ٩٨٪، مقارنة بالكنترول (عن Watt ١٩٩٩).

هذا ويعطى جدول (١٥-٢) قائمة بعدد من الأنواع المحصولية التى حولت وراثيًا بجينات مختلفة من مثبطات البروتينيز، والأنواع الحشرية التى قاومتها تلك الأنواع المحصولية

جدول (١٥-٢): جينات مضادات البروتينيز التى استخدمت فى هندسة بعض الأنواع المحصولية وراثيًا لمقاومة بعض الأنواع الحشرية (عن Gatehouse ١٩٩٩).

النوع المحصولى المحول وراثيًا	الجينات	الحشرات التى تمت مقاومتها
التبغ	CpTI	*Heliothis* virescens
	Pot PI II	Lepidoptera
	CpTI + p-lec	*Heliothis* virescens
	Na PI	*Helicoverpa* punctigera
البطاطس	CpTI	*Lacanobia* oleracea
الطماطم	Pot PI I	*Helicoverpa* armigera
		Teleogryllus commodus
	Pot PI II	*Helicoverpa* armigera
		Teleogryllus commodus
	CpTI	
الأرز	Pot PI II	*Sesamia* inferens
		Chilo suppressalis
	CpTI	*Sesamia* inferens
		Chilo suppressalis
الفراولة	CpTI	*Otiorhynchus* sulcatus
الخس	CpTI	
	Pot PI II	*Teleogryllus* commodus
البطاطا	CpTI	
لفت الزيت	CpTI	
	OC-I	Coleoptera
	CII	Lepidoptera
		Diptera
القطن	M. S PI	*Bemisia* tabaci
البرسيم الحجازى	M. S PI	Thrips
التفاح	CpTI	*Cydia* pomenella
الحور	OC-1	*Chrysomela* tremulae
	CII	Lepidoptera
البتولا Birch	Pot PI II	

CpTI = cowpea trypsin inhibitor; CII = double headed serine protease inhibitor from soybean; Na PI = *Nicotiana alata* protease inhibitor; OC-1 = oryzacystatin; Pot PI II = Potato proteinase inhibitor II; Pot PI I = Potato proteinase inhibitor I; p-lec = pea lectin.

مثبطات الأميليز

اكتشفت مثبطات الألفا الأميليز α-amylase inhibitors فى عدد من الحبوب النجيلية، ووجد أن لبعضها وظيفة مزدوجة، حيث أظهرت - كذلك - نشاطًا مضادًا للتربسن هذا وبحصول الحشرات على مثبطات الألفا أميليز ضمن غذائها، فإن ذلك يتعارض مع نشاط إنزيمات الألفا أميليز بها؛ بما يخل بعملية تحلل النشا (عن Watt ١٩٩٩)

ومن المعلوم أن بذور الفاصوليا تتميز بمقاومتها للسوس، مثل سوسة اللوبيا *Callosobruchus maculatus*، وسوسة فاصوليا أدزوكى *C. chinensis*، الأمر الذى يرجع إلى احتواء البذور على ذلك البروتين α-AI-Pv، المثبط لإنزيم الألفا أميليز، والذى يعد سامًا ليرقات تلك الحشرات

ولقد أمكن تحويل البسلة وراثيًا بالجين المسئول عن إنتاج هذا البروتين باستخدام promoter خاص بالبذور، حيث كان التعبير عنه فى بذور البسلة بالدرجة ذاتها التى يُعبِّرُ بها عنه فى بذور الفاصوليا، كما كانت بذور البسلة المحولة وراثيًا مقاومة - مثل الفاصوليا - لكلا النوعين من الحشرات (Shade وآخرون ١٩٩٤)

وقد أدى تحويل فاصوليا أدزوكى adzuki bean (وهى *Vigna angularis*) وراثيًا بجين الفاصوليا - الذى يشفر لتمثيل مثبط إنزيم الألفا أميليز α-amylase inhibitor - إلى جعلها مقاومة كليًا - مثل الفاصوليا - لكل من سوستى البذور *Callosobruchus chinensis*، و *C. analis*، ولكنها - ومثل الفاصوليا كذلك - لم تكن مقاومة للسوسة *Zabrotes subfactatus*، هذا مع العلم بأن إنزيم الألفا أميليز يوقَف نشاطه فى معى السوستين *C. chinensis*، و *C. analis* بفعل مثبط الإنزيم (Ishimoto وآخرون ١٩٩٦)

كذلك أمكن التعبير عن ثلاثة جينات لمثبطات الألفا أميليز فى التبغ، حيث أظهرت نشاطًا مضادًا لحشرات غمدية الأجنحة كما أظهرت البسلة المحولة وراثيًا بجين مثبط الألفا أميليز من الفاصوليا . أظهرت مقاومة لسوسة البسلة (عن Watt وآخرين ١٩٩٩)

اللكتينات النباتية

إن اللكتينات lectins عبارة عن بروتينات ذات تركيب خاص، تتواجد فى الطبيعة فى كل من النباتات، والحيوانات، والحشرات، والكائنات الدقيقة، ويعتقد بأن من وظائفها فى النباتات حمايتها من الإصابات الحشرية، حيث ترتبط بالسكريات وتؤثر على أيض المواد الكربوهيدراتية فى عديد من الأنواع الحشرية. وتعرف أنواع عديدة من اللكتينات (جدول ١٥-٣)، ومن أكثرها انتشارًا تلك التى تتراكم فى بذور البقوليات، والتى قد يصل تركيزها إلى حوالى ٣٪، كما فى بذور الفاصوليا

ولقد عرفت سمية تلك المركبات للثدييات والطيور منذ فترة طويلة. كذلك وجد أن تلك اللكتينات ترتبط بالخلايا المبطنة لمعى الديدان الحشرية، مما يؤثر فيها، ويعطل عملها، ويزيد من فرصة مرور المركبات الضارة للحشرة من خلالها (عن Gatehouse وآخرين ١٩٩٢).

ولقد أظهرت اللكتينات المتخصصة على المانوز mannose-specific lectins خصائص مثبطة قوية ضد الحشرات الثاقبة الماصة، مثل المن، والذبابة البيضاء، ونطاطات النباتات، ونطاطات الأوراق، وأمكن عزل تلك المثبطات من نباتات مختلفة، مثل نبات زهرة اللبن الثلجية snowdrop، والنرجس البرى daffodil (وهو *Narcissus pseudonarcissus*)، والثوم (عن Watt وآخرين ١٩٩٩)

ولعل أهم اللكتينات المعروفة تلك التى عزلت من نبات زهرة اللبن الثلجية snowdrop (الذى يعرف بالاسم العلمى: *Galanthus nivalis*)، وهى التى نالت حظًا وافرًا من اهتمام الباحثين بسبب نشاطها المضاد للمن ولقد أمكن نقل هذا الجين بطرق الهندسة الوراثية لكل من البطاطس، ولفت الزيت، والطماطم وأظهرت الدراسات على البطاطس المحولة وراثيًا والتى عُبِّر فيها عن هذا الجين أنه لا يزيد من معدل موت الحشرات، ولكنه يقلل كثيرًا من خصوبتها وتكاثرها ومن أهم خصائص هذا الجين أنه يؤثر - كذلك - على مختلف الحشرات الثاقبة الماصة الأخرى، ولكن من أهم عيوبه أن لا يكون فعّالاً إلا عندما تتناول الحشرة البروتين الخاص بهذا الجين بكميات كبيرة (عن Chawla ٢٠٠٠)

جدول (١٥-٣): أهم اللكتينات النباتية ذات التأثير القاتل على الحشرات **inceticidal plant lectins** (عن Gatehouse ١٩٩٩).

الرتبة الحشرية	الحشرة	اللكتين	السكر الذى يتخصص عليه اللكتين
		Castor bean	GalNAc
		Camel's foot tree	GalNAc
		Wheatgerm (WGA)	GalNAc
	Lacanobia oleracea	Snowdrop (GNA)	Mannose
Coleoptera	*Callosobruchus*	Bean (PHA)	Complex carbohydrates
	maculatus	Winged bean	GlcNAc
		Griffonia	GlcNAc
		Various sources	GalNAc & GlcNAc
		Rice	GlcNAc
		Stinging nettle (UDA)	GlcNAc
		Snowdrop (GNA)	Mannose
		Elderberry (SNA-I)	2,6-neuraminyl-gal/GalNAc
	Zabrotes subfaciatus	Bean (Arcelin)	--
	Diabrotica	Various sources	GalNAc & GlcNAc
	undecimpunctata	Snowdrop (GNA)	Mannose
Homoptera	*Nilaparvata lugens*	Snowdrop (GNA)	Mannose
		Wheatgerm (WGA)	GlcNAc
	Acyrthosiphon pisum	Jackbean (Con A)	Glucose/Mannose
	Myzus persica	Snowdeop (GNA)	Mannose
	Aulacorthum solani	Snowdeop (GNA)	Mannose
	Empoasca fabae	Various sources	GalNAc & GlcNAc
Diptera	*Lucilia cuprina*	Wheatgerm (WGA)	GlcNAc
		Jackbean (Con A)	Glucose/Mannose

ويبين جدول (١٥-٤). الأنواع المحصولية التى تم تحويلها وراثيًا لمقاومة الحشرات بواسطة جينات اللكتينات أو جينات المركبات الشبيهة باللكتينات.

جدول (١٥-٤): الأنواع المحصولية التى حولت وراثيًا بجينات اللكتينات أو بجينات المركبات الشبيهة باللكتينات lectin-like genes.

النوع المحصولى	الجينات	الحشرات التى تمت مقاومتها
التبغ	GNA	*Heliothis virescens*
		Myzus persicae
	p-lec	*Heliothis virescens*
	CpTI + p-lec	
البطاطس	GNA	*Lacanobia oleracea*
		Myzus persicae
		Aulacorthum solani
	GNA + BCH	*Myzus persicae*
		Aulacorthum solani
الطماطم	GNA	*Lacanobia oleracea*
الأرز	GNA	*Nilaparvata lugens*
البطاطا	GNA	
لفت الزيت	GNA	
البسلة	a-AI	*Zabrotes subfaciatus*
		Bruchus pisorum
فاصوليا أدزوكى	a-AI	*Callosobruchus chinensis*

GNA = snowdrop lectin; p-lec = pea lectin; CpTI + p-lec = cowpea trypsin inhibitor + pea lectin; GNA + BCH = snowdrop lectin + bean chitinase; a-AI = bean α-amylase inhibitor.

وربما أمكن كذلك الاستفادة من الجين المسئول عن تمثيل البروتين أجلوتينين agglutinin، الذى يصنع فى جنين حبة القمح، والذى يعد من اللكتينات lectins المقيدة والرابطة للشيتين chitin-binding، ويعرف بتثبيطه لنمو يرقات الحشرات التى تتغذى على الأغذية المجهزة المزودة بهذا البروتين. فإذا أمكن نقل هذا الجين إلى الذرة - مثلاً - وعُبِّرَ عنه بقدر كافٍ فإنه قد يجعل النبات مقاومًا لعديد من الحشرات. لكن بالنظر إلى أن هذا البروتين يمنع بعض العمليات الحيوية فى خلايا الإنسان - كذلك - فإنه يتعين ألا يزيد حد التعبير عنه فى النباتات المحولة وراثيًا عن ذلك الذى يتحمله الإنسان (كالمستوى الموجود فى القمح)، أو أن يرافق الجين بآخر ينظم التعبير عنه فى

الأجزاء النباتية التى لا يستعملها الإنسان فى غذائه (عن Chrispeels & Sadava ٢٠٠٣)

إن من أهم العوامل المسببة للقلق بشأن استخدام اللكتينات فى عمليات التحول الوراثى هى خصائصها المضارة للتغذية فى أغذية الإنسان والحيوان، وتأثيراتها على الحشرات النافعة غير المستهدفة بها. فعلى سبيل المثال . أظهرت لكتينات الفاصوليا وفول الصويا تأثيرات سامة مضادة للتغذية على معظم الحيوانات. كذلك من مشاكل الاعتماد على اللكتينات الحاجة إلى تركيزات عالية منها لكى تُحدث تأثيرها السام على الحشرات (عن Czapla ١٩٩٧)

إنزيمات الشيتينيز

يدخل الشيتين chitin [وهو البوليمر غير المتفرع للـ 2-acetamide-2-deoxy-D-glucopyranoside (أو N-acetylglucosamine، واختصارًا GlcNAc)] برابطة β-1,4 يدخل هذا الشيتين كمكون أساسى فى تركيب الأديم cuticle والغلاف القشرى shells للحشرات، وفى تركيب الجدر الخلوية للفطريات وبعض الطحالب، كما يتواجد فى كل من النيماتودا والرخويات mollusks. وأنواع عديدة من الكائنات

ونظرًا للأهمية الكبرى للسيتين والإنزيمات الشيتونيلية chitinolytic enzymes فى نمو الحشرات وتطورها، فإن تلك الإنزيمات تحظى بقدر كبير من اهتمام الباحثين فيما يتعلق باستعمالها ذاتها كمبيدات حشرية حيوية، أو بروتينات دفاعية فى النباتات، التى تحول وراثيًا لهذا الغرض، أو الاعتماد عليها فى كائنات حية دقيقة محولة وراثيًا بها، لستخدم فى المكافحة الحيوية للحشرات

وتُعرّف إنزيمات الشيتينيز chitinases بأنها إنزيمات ذات نشاط موجه لتحلل بوليمر السيتين، هذا إلاّ أن بعض إنزيمات الشيتنيز تحلل بوليمرات أخرى قريبة، مثل متعددة السكريات التى توجد فى الجدر الخلوية والتى تحتوى على N-acetylglucosamines، و N-acetylmuramates التى يكون فيها الارتباط برابطة β,1-4 يحدث التحلل الإنزيمى عشوائيًا فى مواقع داخلية على امتداد طول جزئ