جينات المقاومة الطبيعية

تعرف استراتيجية التحول الوراثى لمقاومة الحشرات بواسطة جينات المقاومة التى توجد بصورة طبيعية فى أنواع نباتية أخرى باسم نَسْخ الطبيعة copy nature. وهى تتضمن الخطوات التالية:

١ - البحث عن مصادر المقاومة الحشرية فى الطبيعة.

٢ - تنقية البروتين المسئول عن المقاومة فى كل حالة منها، ودراسة ما إن كان له نظير فى النبات الموديل *Arabidopsis* أم لا.

٣ - إجراء اختبارات السمية على الحشرة باستعمال البروتين النقى.

٤ - إجراء اختبارات السمية على الحيوانات - ومن ثم على الإنسان - باستعمال البروتين النقى.

٥ - التعرف على الجين المسئول عن إنتاج هذا البروتين ونقله بطرق الهندسة الوراثية إلى النوع النباتى المطلوب.

٦ - بعد التأكد من ثبات الصفة المنقولة فى الـ T_1، والـ T_2 (الجيلان الـ transformed الأول والثانى) تجرى الاختبارات البيولوجية على كل من السمية على الحشرة المعنية والحيوانات - ومن ثم على الإنسان - مرة أخرى (عن Slater وآخرين ٢٠٠٣).

ويفيد تهريم pyramiding الجينات فى النباتات فى زيادة مقاومتها للأمراض والحشرات، وفى الحد من حالات كسر المقاومة. حيث يؤدى التهريم - بعدة جينات للمقاومة متنوعة التأثير - إلى الحد كثيرًا جدًّا - إلى درجة الانعدام - من فرصة ظهور عدة طفرات مناظرة - فى آن واحد - يمكنها كسر كل عوامل المقاومة التى توفرها تلك الجينات، علمًا بأن الطفرة التى تؤدى إلى كسر أحد عوامل المقاومة لا يمكنها البقاء لوجود عوامل المقاومة الأخرى فى النبات.

هذا .. وقد يزيد تهريم جينات المقاومة من شدة المقاومة إما بطريقة تراكمية. وإما بطريقة تداؤبية synergistic (عن Gatehouse ١٩٩٩).

ويعرف 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، ولِكتين 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 ١٩٩٩).

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.

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 (عن Chawla ٢٠٠٠).

لقد 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، وهي الـ Bruchid beetle (*Callosobruchus maculatus*). كذلك يعتبر هذا الجين ضارًا بحشرات متباينة كثيرًا (جدول ١٣-١) 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).

جدول (١٣-١): الحشرات التي تؤثر فيها مثبطات التربسن المتحصل عليها من اللوبيا والتي يشفر لإنتاجها الجين **CpTI** (عن **Gatehouse** وآخرين ١٩٩٢).

الرتبة	الحشرة	المحاصيل الرئيسية التي تصاب بالحشرة
حشرات حقلية		
Lepidoptera	***Heliothis virescens***	التبغ والقطن
	Heliothis zea	الذرة والقطن والفاصوليا والتبغ
	Helicoverpa armigera	القطن والفاصوليا والذرة والسورجم
	Spodoptera littoralis	الذرة والأرز والقطن والتبغ
	Chilo partellus	الذرة والسورجم 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 zealandica	النجيليات والبرسيم
	Anthonomus grandis	القطن
حشرات المخازن		
Coleoptera	***Callosobruchus maculatus***	اللوبيا وفول الصويا
	Tribolium confusum	معظم الزهور

ولقد أمكن عزل الجين CpTI واستعمل عن طريق فيرس موزايك القنبيط في 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).

هذا .. ويعطى جدول (١٣-٢) قائمة بعدد من الأنواع المحصولية التى حولت وراثيًا بجينات مختلفة من مثبطات البروتينيز، والأنواع الحشرية التى قاومتها تلك الأنواع المحصولية.

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 وآخرين 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 يُعَبَّر بها عنه فى بذور الفاصوليا. كما كانت بذور البسلة المحولة وراثيًا مقاومة - مثل الفاصوليا - لكلا النوعين من الحشرات (Shade وآخرون ١٩٩٤).

جدول (١٣-٢): جينات مضادات البروتينيز التى استخدمت فى هندسة بعض الأنواع المحصولية وراثيًا لمقاومة بعض الأنواع الحشرية (عن Gatehouse ١٩٩٩).

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

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 lectiu.

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 subfaciatus*، هذا .. مع العلم بأن إنزيم الألفا أميليز يوقف 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 (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 ١٣-٣)، 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).

جدول (١٣-٣): أهم اللكتينات النباتية ذات التأثير القاتل على الحشرات **inceticidal plant lectins** (عن Gatehouse ١٩٩٩).

الرتبة الحشرية	الحشرة	اللكتين	السكر الذى يتخصص عليه اللكتين
Lepidoptera	*Ostrinia nubilalis*	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-1)	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

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).

ويبين جدول (١٣-٤): الأنواع المحصولية التى تم تحويلها وراثيًا لمقاومة الحشرات بواسطة جينات اللكتينات أو جينات المركبات الشبيهة باللكتينات.

جدول (١٣-٤): 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 للشيتين والإنزيمات الشيتونيلية chitinolytic enzymes فى نمو الحشرات وتطورها، فإن تلك الإنزيمات تحظى بقدر كبير من اهتمام الباحثين فيما