الفصل الثالث عشر

الهندسة الوراثية لتحمل مبيدات الحشائش

تمهيد

إن صفة القدرة على تحمل مبيدات الحشائش يمكن نقلها إلى النباتات بطرق التربية التقليدية، ومن أمثلة ذلك حالة لفت الزيت الذى ربى لتحمل الأترازين. يتعارض هذا المبيد مع عملية انتقال الإليكترونات فى البلاستيدات الخضراء بارتباطه بـ بولى ببيتيدة فى الغشاء البلاستيدتى - هى psbA - وهى التى يُشْفَرُ لها بواسطة جينوم البلاستيدة الخضراء. ولقد ظهرت طفرات طبيعية مقاومة للأترازين فى عديد من الأنواع النباتية يوجد بها تغيرات ضئيلة جدًّا فى تتابعات الـ psbA. ولقد ربى لفت الزيت المقاوم للأترازين بتهجين لفت الزيت *Brassica napus* مع نوع قريب منه هو الـ birds rape (أو *B. campestris*). وغنى عن البيان أن تلك الطريقة لا تناسب غالبية الأنواع النباتية إما لعدم توفر السلالات المقاومة منها، وإما لعدم توفر المقاومة فى الأنواع القريبة منها التى يمكن أن تلقح معها؛ ولذا كان الاتجاه نحو الهندسة الوراثية كأداة لتطوير الأصناف المقاومة لمبيدات الحشائش (عن Walden ١٩٨٨)

العوامل التى ساعدت التقدم فى مجال الهندسة الوراثية لتحمل مبيدات الحشائش

لقد توفرت أسباب علمية وأخرى تجارية أسهمت فى سرعة تطوير المحاصيل المعدلة وراثيًا التى تتحمل مبيدات الحشائش، كان من أهمها ما يلى:

١ - توفر الكثير من المعلومات التفصيلية عن نظام فعل مبيدات الحشائش، والمسارات الأيضية التى تؤثر فيها

٢ - توفر المصادر البيولوجية التى ساعدت على فهم نظم المقاومة للمبيدات، وكذلك جينات المقاومة، والتى من أمثلتها

أ – البكتيريا المقاومة، سواء أكانت طبيعية، أم حُصل عليها بالانتخاب المختبرى

ب – النباتات المتحملة التى حُصل عليها من مزارع الأنسجة.

جـ – النباتات المتحملة التى انتخبت تحت ظروف الحقل.

٣ – بساطة وراثة مختلف حالات التحمل، حيث تبين أن جينًا واحدًا يتحكم فى كل حالة منها

٤ – توفر لدى شركات إنتاج مبيدات الحشائش الحافز المادى القوى لإنتاج الأصناف المقاومة لتلك المبيدات.

ويتركز الاهتمام بهندسة النباتات وراثيًا لتحمل مبيدات الحشائش على المبيدات التى تستخدم بمعدلات منخفضة، والتى تتحلل بيولوجيًا بصورة سريعة، والتى لا تصل إلى المياه الجوفية، وبذا يقل تلوث البيئة بالمبيدات التى لا توجد بها تلك الصفات ومن بين أهم المبيدات التى تنطبق عليها هذه الصفات الجلايفوسيت glyphosate (مثل الروند أب)، والسلفونيل يوريا sulfonylurea، والجلوفوسينيت glufosinate وقد تنطبق تلك المواصفات – كذلك – على البروموكسينيل bromoxynil، فهو يتحلل بيولوجيًا بسرعة، ولكننا لا نعرف ماذا يحدث لنواتج التحلل، وما هى تأثيراتها على النباتات وعلى الكائنات الدقيقة فى التربة (عن Chrispeels & Sadava ٢٠٠٣).

طرق واستراتيجيات الهندسة الوراثية لتحمل مبيدات الحشائش

يتعين بداية تحديد الأساس الجزيئى لعمل مبيدات الحشائش لأجل إنتاج نباتات مهندسة وراثيًا لتحمل تلك المبيدات، الأمر الذى دُرسَ جيدا من قِبل شركات إنتاج المبيدات هذا وترجع فاعلية معظم المبيدات الناجحة إلى تأثيرها على خطوة واحدة فى المسار الكيميائى الحيوى، حيث تؤثر على تفاعل إنزيمى يلعب دورًا حيويًا فى أيض الخلية. وعلى سبيل المثال . فإن موقع فعل المبيدين chlorsulfuron (كما فى المبيد التجارى Glean)، و sulfometuron methyl (كما فى المبيد التجارى Oust) هو الإنزيم acetolactate synthase، وهو أول إنزيم متخصص فى مسار تمثيل الأحماض الأمينية المتفرعة الأيزوليوسين isoleucine، والليوسين leucine. والفالين valine (عن Walden ١٩٨٨).

ويتبع فى برامج هندسة النباتات لمقاومة مبيدات الحشائش إحدى استراتيجيتين، كما يلى:

أولا: إفقاد مبيد الحشائش لسميته Detoxification

يمكن إفقاد مبيدات الحشائش لفاعليتها - وبالتالى إفقادها لسميتها - بنقل جينات للنباتات تتحكم فى إنتاج إنزيمات تعمل على مبيد الحشائش وتغير من خصائصه، حيث يقوم الإنزيم الذى ينتجه الجين المنقول بتحليل مبيد الحشائش الذى يصل إلى النبات ومن أمثلة ذلك الجين bar المتحصل عليه من البكتيريا *Streptomyces hygroscopicus* والذى يكسب النباتات التى ينقل إليها مقاومة ضد مبيدات الحشائش التى يدخل فى تركيبها الـ phosphinothricin (اختصارا ppt) ينتج هذا الجين الإنزيم phosphinothricin acetyl transferase (اختصارا PAT) الذى يحلل الـ ppt إلى طراز يحتوى على الـ acetyl (طراز acetylate) يكون غير سام وقد تبين أن النباتات التى نقل إليها هذا الجين أمكنها النمو فى تركيزات من الـ ppt بلغت ٤ ١٠ أضعاف التركيزات المستعملة منه - عادة - فى مكافحة الحشائش

كذلك فإن الجين bxn من البكتيريا *Klebsiella ozaenae* - والذى يتحكم فى إنتاج إنزيم الـ nitrilase - يكسب النباتات مقاومة ضد مبيدات الحشائش التى تحتوى على المادة الفعالة bromoxynil ولقد أنتج بالفعل فى الولايات المتحدة صنفا من القطن (الصنف BXN) مقاوم للـ bromoxynil

ومن بين الجينات الأخرى التى استعملت فى مقاومة مبيدات الحشائش الجين tfdA لتحمل الـ 2,4-D، والجين GST لتحمل الأترازين Atrazine (عن Chahal & Gosal ٢٠٠٢)

ثانيًا: إدخال جينات لا تعمل عليها مبيدات الحشائش

يمكن جعل النباتات مقاومة لمبيدات الحشائش بإكسابها جينات تتحكم فى إنتاج إنزيمات لا تكون حساسة للمبيدات تعمل هذه الجينات الطفرية على إنتاج إنزيمات لا يمكن لمبيدات الحشائش التعرف عليها، ومن ثم فإن النباتات لا تُقتل بفعل المبيد ومن أمثلة ذلك الجين الطفرى aroA من البكتيريا *Salmonella typhimurium* الذى استعمل

فى إنتاج نباتات متحملة للمبيد جلايفوسيت glyphosate يعمل مبيد الجلايفوسيت على إنزيم البلاستيدات الخضراء 5-enol pyruvylshkikimic acid 3-phosphate synthase (اختصارا EPSPS) ويؤدى نقل الجين الطفرى aroA إلى إنتاج إنزيم EPSPS محور لا يميزه الجلايفوسيت، ومن ثم لا يؤثر فيه ولقد أنتجت بالفعل أصنافا مقاومة للجلايفوسيت، مثل صنف فول الصويا Roundup Ready، وكذلك صنف القطن Roundup Ready

كذلك فإن مبيدى الحشائش sulphonylurea، و imidazolinone يبطان إنزيم acetolactate synthase (اختصارا ALS) الخاص بالبلاستيدات الخضراء وقد أمكن هندسة نباتات مقاومة لهذين المبيدين بنقل الجين ذات الأصل النباتى ALS (عن Chahal & Gosal ٢٠٠٢)

وتتحقق عمليات التحول الوراثى لتحمل مبيدات الحشائش فى النباتات بعدة طرق، نوجزها فيما يلى:

١ - التعبير الكثيف للبروتين الذى يعمل عليه المبيد، كما هو الحال بالنسبة للإنزيمات التى تتأثر بالجلايفوسيت glyphosate

٢ – إحداث طفرة بالبروتين الذى يعمل عليه المبيد لكى لا يتعرف عليه المبيد، ومن أمثلة ذلك طفره التبغ التى تحتوى على جين acetoacetate synthase، والتى استعملت فى عمليات التحول الوراثى لمقاومة الـ sulfonylurea

ومنها كذلك حالات التحول الوراثى لتحمل كلا من المبيدات التالية

glyphosate	asulam
atrazine	chlorosulfuron

٣ – تحويل النباتات وراثيًا بجين يُلغى الأثر السام للمبيد، وتحويله إلى صورة غير سامة، وهو الذى يُتحصل عليه من البكتيريا، مثل حالات المقاومة لكل من

bilanafos	bromoxynil
phenoxyacetic acid	

ويمكن التوصل إلى تلك الإنزيمات - بسهولة - بتقييم الأنواع والسلالات النباتية المقاومة للمبيد، وكذلك غربلة الكائنات الدقيقة التى تعيش فى التربة المحتوية على المبيد والتى يمكنها تحليل مادته الفعالة ومن المهم طبعًا ألا تكون نواتج عمل الإنزيم على المبيد سامة للإنسان أو الحيوانات.

٤ - إنتاج جينات معمليًا يمكن أن تشفر لتكوين بولبيبتيدات مقاومة، الأمر الذى يمكن تحقيقه إذا ما عرف تركيب البوليبتيدات المستهدفة وكيفية فعل المبيد (عن Walden ١٩٨٨، و Mullineaux ١٩٩٢).

التحول الوراثى لتحمل أنواع مختلفة من مبيدات الحشائش

الجلايفوسيت

إن الجلايفوسيت glyphosate - وهو المادة الفعالة لمبيدات مثل الروند أب Roundup، وتمبل ويد Tumbleweed يعد من المبيدات الواسعة المفعول غير المتخصصة والفعالة ضد عديد من النباتات. يُمتص المبيد سريعًا بواسطة النبات، وينتقل سريعًا - كذلك - عن طريق اللحاء، ولذا .. تزداد فاعليته ضد الحشائش المعمرة. وهو يُعد مقبولاً بيئيًا، نظرًا لعدم سميته للحيوانات وسرعة تحلله بواسطة كائنات التربة.

يستهدف المبيد الإنزيم 5-enol-pyruvylshikimate-3-phosphate synthase (اختصارًا: EPSP synthase)، الذى يعمل فى البلاستيدات الخضراء، ويُشفَّر له بواسطة جين يقع فى النواة، والذى يعد من الإنزيمات الرئيسية للـ shikimate pathway الذى يتضمن تمثيل الأحماض الأمينية الأروماتية: التربتوفان، والفينيل آلانين، والتيروزين، علمًا بأن هذا المسار البيولوجى لا يوجد سوى فى النباتات والكائنات الدقيقة، بما يعنى عدم سمية المبيد للإنسان، الأمر الذى يجعل من تطوير محاصيل زراعية مقاومة له أمرًا هامًا (عن Walden ١٩٨٨).

ولقد اتبعت استراتيجيتان لتطوير نباتات محولة وراثيًا مقاومة للجلايفوسيت، كما يلى:

١- فى بداية الأمر تضمنت عملية هندسة نباتات مقاومة للمبيد استخدم جين - وجد فى سلالة من *Petunia hybrida* - كان قادرا على إحداث زيادة فى إنتاج الإنزيم

المستهدف EPSP synthase وبالإضافة إلى الفائدة المباشرة لاستعمال هذا الجين، فإنه سهل عملية تمثيل وعزل دنا ممثل للـ EPSP synthase مكّن الباحثين من زيادة قدرة البيتونيا كثيرًا على تحمل الجلايفوسيت (حتى ٩ ٠ جم/هكتار)

٢ – نظرًا لأن الجلايفوسيت لا يثبط الـ EPSP synthases بالكائنات الدقيقة، فقد أمكن بالانتخاب للنمو البكتيرى – فى وجود تركيزات عالية من الجلايفوسيت تكفى لوقف نمو البكتيريا العادية – أمكن عزل طفرات بكتيرية متحملة للجلايفوسيت من كل من *Salmonella typhimurium*، و *Aerobacter aerogenes*، و *Escherichia coli*. ولقد أمكن بهذه الاستراتيجية تعديل التبغ، والطماطم، والبيتونيا وراثيًا بجين من البكتيريا *Salmonella typhimurium* (الجين aroA)، وهو جين يشفر لطراز من الإنزيم EPSPs لا يأتلف (ينجذب) كثيرًا للجلايفوسيت؛ مما جعل النباتات أكثر تحملا للمبيد، ولكن دون القدرة على مقاومته (عن Walden ١٩٨٨، و Gardner وآخرين ١٩٩١، و Hopkins ١٩٩٥).

النترايازين

إن مبيدات الحشائش المحتوية على الترايازين triazine (مثل الأترازين atrazine، والسيمازين simazine) توقف انتقال الإليكترونات بارتباطها بالبروتين 32-kDa D1 فى الـ photosystem II (اختصارًا PSII).

ويعرف نظامان لمقاومة مبيدات الترايازين، هما:

١ – يدخل الترايازين النباتات – غالبًا – عن طريق الجذور، وهى التى تحتوى فى بعض الأنواع المحصولية – مثل الذرة والسورجم – على الإنزيم glutathione-S-transferase، الذى يوقف سمية المبيد سريعًا بربطه بالجلوتاثيون glutathione ولهذا السبب فإن مبيدات الترايازين تعد مبيدات اختيارية هامة لهذين المحصولين ولقد عزل هذا الجين من الذرة. وأصبح متاحًا لعمليات التحول الوراثى فى الأنواع النباتية الحساسة للأترازين

٢ – طورت عديد من الحشائش مثل الـ *Amaranthus*، و *Chenopodium* سلالات

مقاومة للترايازين. ويمكن فى كل حالات المقاومة تتبع جذورها إلى حدوث طفرة فى الجين psbA الذى يشفر للبروتين D1 فى الـ PSII. ومرد هذه الطفرة إلى تغير فى حامض أمينى واحد فى البروتين D1 من السيرين serine إلى جليسين glycine؛ الأمر الذى يخفض الألفة (الانجذاب) بين البروتين والترايازينات ألف مرة.

وعلى الرغم من أن الحشائش المقاومة للترايازين سوف تبقى مشكلة يتعين التعامل معها، فإن نقل جين المقاومة هذا من الحشائش إلى المحاصيل الزراعية يمكن أن يكون ذا فائدة كبيرة. ولسوء الحظ .. فإن التشفير للبروتين D1 يحث من خلال جينوم البلاستيدات الخضراء، حيث أحبطت محاولات الهندسة الوراثية لإنتاج نباتات مقاومة للترايازين بالصعوبات التى تواجه تحويل دنا الكلوروبلاستيدات. وفى إحدى الحالات .. استخدمت الطرق الكلاسيكية لتربية النبات فى نقل هذا الجين، وذلك بالتلقيح بين النوع المقاوم *Brassica campestris* ولفت الزيت *B. napus*. وعلى الرغم من أن نباتات لفت الزيت التى حُصِلَ عليها من برنامج التربية كانت مقاومة للترايازين، إلاّ أن محصولها كان يقل بمقدار ٢٠٪ عن محصول النباتات غير المقاومة (عن Hopkins ١٩٩٥).

المبيدات المؤثرة فى الإنزيم أسيتوهيدروكسى آسد سنثيز

توجد مجموعة غير متجانسة من مبيدات الحشائش (هى: الـ sulfonylureas، و imidazoline، والـ triazolopyrimidine) لا يجمعها سوى اشتراكها فى التأثير على الإنزيم acetohydroxyacid synthase (اختصارًا: ALS). يتواجد هذا الإنزيم فى كل من النباتات والكائنات الدقيقة، وهو يؤثر فى مرحلة مبكرة من تمثيل الأحماض الأمينية ذوات السلسلة المتفرعة: الإيزوليوسين isoleucine، والليوسين leucine، والفالين valine.

وقد وجد أن سلالة التبغ Hra تحتوى على طفرة فى الجين المسئول عن تمثيل الإنزيم ALS تجعل النباتات مقاومة للـ sulfonylureas بأكثر من ١٠٠٠ ضعف مقاومة النباتات العادية. ولقد استخدم هذا الجين فى تطوير نباتات مقاومة لهذا المبيد من كل من الطماطم، وبنجر السكر، والقطن، والبرسيم الحجازى، والتبغ (عن Hopkins ١٩٩٥).

التطبيقات العملية لعمليات التحول الوراثى لتحمل مبيدات الحشائش

يعطى جدول (١٣-١) قائمة بالجينات المسئولة عن المقاومة لمبيدات الحشائش، ومصادرها، وطبيعة المقاومة، والمحاصيل التى نقلت إليها تلك الجينات بطرق الهندسة الوراثية

جدول (١٣-١): الجينات المسئولة عن المقاومة لمبيدات الحشائش واستعمالاتها (عن Gressel ١٩٩٨)

الجين	المبيد المقاوَم	مصدر الجين	طبيعة المقاومة	المحاصيل المقاومة
AroA	Glyphosate	طفرة نباتية	موقع محدد للتأثير	فول الصويا – الذرة – القطن – لفت الزيت
bar, pat	Glufosinate	بكتيريا	أيضى	الطماطم – بنجر السكر – القمح – لفت الريت – الأرز – البطاطس – الفول السودانى – البرسيم الحجازى – الدرة
csr1, ahas3r	Imidazolinone, Sulfonylurea, Triazopyrimidine	طفرة نباتية	موقع محدد للتأثير	الذرة – التبغ – الكتان – لفت الزيت
sulI	Asulam	بكتيريا	موقع محدد للتأثير	التبغ
	مثبطات الـ ACCase	طفرة مراوغ أنسجة	موقع محدد للتأثير	الذرة
tfdA	2,4-D	بكتيريا	أيضى	القطن – التبغ
bxn	Bromoxynil	بكتيريا	أيضى	القطن
deh1	Dalapon	بكتيريا	أيضى	التبغ
	Isoxaben	نبات	غير معلوم	لا يوجد بعد
	Dichlobenil	نبات	غير معلوم	لا يوجد بعد
crt1	Pyridazinones	بكتيريا	موقع محدد للتأثير	التبغ
ped	Phenmedipham	بكتيريا	أيضى	التبغ
psbA	Atrazine	نباتات	موقع محدد للتأثير	البطاطس – لفت الريت – التبغ

كما يبين جدول (١٣-٢) مزيدًا من التفاصيل عن عمليات التحول الوراثى التى أجريت بمعرفة مختلف شركات التكنولوجيا الحيوية فى مختلف المحاصيل الزراعية لأجل إنتاج أصناف جديدة قادرة على تحمل نوعيات مختلفة من مبيدات الحشائش.

هذا .. ومن أوائل الأصناف التجارية التى أنتجت بهدف تحمل مبيدات الحشائش أصنافًا من المحاصيل الحقلية التالية:

المحصول	مصدر جين التحمل	المبيد الذى يتحمله الصنف المنتج	الشركة المنتجة للصنف
القطن	بكتيريا	Bromoxynil	Calgene
	بكتيريا/ *Arabidopsis*	Glyphosate	Monsanto
فول الصويا	بكتيريا/البيتونيا/فول الصويا	Glyphosate	Monsanto
	بكتيريا	Glufosinate	Hoecht/Agr Evo
لفت الزيت	بكتيريا	Glufosinate	Hoecht/Agr Evo
الذرة	بكتيريا	Glufosinate	Dekalb
	بكتيريا	Glufosinate	Hoecht/Agr Evo
	التبغ/بكتيريا	Sulfonyl urea	Dupont
		Glyphosate	Monsanto

الهندسة الوراثية لتحمل مبيدات الحشائش فى الطحالب المثبتة لأزوت الهواء الجوى

يحتاج النمو الجيد للأرز إلى الـ cyanobacteria (وهى من الطحالب الخضراء المزرقة) التى تقوم بتثبيت الهواء الجوى، وتعيش إما حرة، وإما بالتعاون مع السرخس: *Azolla*، ذلك لأن الأرز يُنتج فى عديد من دول العالم النامى إما بدون تسميد آزوتى، وإما بالقليل جدًا منه. ولقد أدى استعمال مبيدات الحشائش - وخاصة تلك التى توقف عملية البناء الضوئى - إلى التأثير على الطحلب كذلك، الذى يتأثر أيضًا ببعض مبيدات الحشائش الأخرى التى لا تؤثر فى عملية البناء الضوئى، مثل ألاكلور alachlor، ولذا .. فقد تولدت الحاجة إلى إنتاج سلالات من تلك الطحالب مقاومة لمبيدات الحشائش التى يمكن أن تستخدم فى حقول الأرز.

جدول (١٣-٢) أمثلة لحالات التحول الوراثي التي أجريت بمعرفة مختلف شركات التكنولوجيا الحيوية في مختلف المحاصيل الزراعية لأجل إنتاج أصناف جديدة قادرة على تحمل نوعيات مختلفة من مبيدات الحشائش (عن Slater وآخرين ٢٠٠٣)

المحاصيل	الشركة	الجين المنقول والآلية	المبيد أو المركب التجاري	فئة المبيد
فول الصويا، ولفت الزيت والطماطم	Monsanto	*Agrobacterium* CP4- resistant gene	Glyphosate (Roundup)	Glycine
الذرة	Monsanto	Maize resistant gene	Glyphosate (Roundup)	
الذرة، ولفت الزيت، وفول الصويا	Monsanto	Oxidoreductase detoxification	Glyphosate (Roundup)	
الذرة، والأرز، والقمح، والقطن، ولفت الزيت، والبطاطس، والطماطم، وبنجر السكر	Hoechst/AgrEvo/Aventis Novartis/Syngenta	*bar* gene- phosphinothricin acetyltransferase detoxification	Phosphinothricin (Basta), (Liberty)	Phosphinic acid
لفت الزيت، والكتان، والأرز، والطماطم وبنجر السكر، والذرة	DuPont- Pioneer Hi-Bred	Mutant plant acetolactate synthase	Chlorsulphuron (Glean)	Sulphonylurea
	American Cyanamid	Mutant plant acetolactate synthase	(Arsenal)	Imidazolinone
فول الصويا	DuPont, Ciba-Geigy/Novartis	Mutant plant chloroplast *psbA* gene	Atrazine (Lasso)	S-triazines
القطن، ولفت الزيت، والبطاطس، والطماطم	Calgene	Nitrilase detoxification	Bromoxynil (Buctril)	Nitriles
الذرة والقطن	Schering/AgrEvo	Monooxygenase detoxification	2,4-D	Phenoxy-carboxylic acids

ولقد وجدت بالفعل طفرات من الطحالب الخضراء المزرقة مقاومة لمبيدات الحشائش: butachlor، و fluchloralin، و alachlor، و atrazine، و propanil. وجـــدت تلـــك الطفرات فى *Gleocapsa* sp.، ونقلت بطرق الهندسـة الوراثيـة إلى النـوع المثبت لآزوت الهواء الجوى *Nostac muscorum* (عن Gressel ١٩٩٣).