الفصل الخامس عشر

الهندسة الوراثية لمقاومة الحشرات والنيماتودا

لم تحظ جهود الهندسة الوراثية لمقاومة النيماتودا باهتمام الباحثين بالقدر الذى حظيت به جهود إنتاج الأصناف المحولة وراثيًا لمقاومة الحشرات، الأمر الذى ينعكس - بالتالى - على شرحنا لموضوع هذا الفصل، والذى يميل بشدة نحو جهود التحول الوراثى لمقاومة الحشرات.

الاعتماد على جينات المقاومة الطبيعية فى عمليات التحول الوراثى

إن نقل جينات المقاومة للأمراض والآفات من أحد الأنواع النباتية إلى نوع نباتى آخر بطرق الهندسة الوراثية يعد أحد الإنجازات الهامة التى أمكن تحقيقها عن طريق تقنيات الهندسة الوراثية. تتواجد هذه الجينات فى النباتات - عادة فى عناقيد clusters - يطلق عليها اسم R-genes تتضمن عديدًا من الجينات المتماثلة homologus genes، ويدخل ضمنها نسخًا غير نشطة من الجين، وهى التى ربما تمثل مساحات من التباين الوراثى الكامن الذى قد يتحور ليعطى جينات R جديدة تحت ظروف الشد الانتخابى لجينات ضراوة جديدة (avr genes) من قبل المسبب المرضى.

طُرُز المقاومة للحشرات

يعرف طرازان رئيسيان لمقاومة الحشرات فى النباتات يختلفان فى طبيعة المقاومة، كما يلى:

١ - أنتى زينوسس antixenosis .. يُعاق فى تلك الحالة تغذية الحشرات للنبات أو يقل، وذلك - أساسًا - من خلال إحداث تغيرات فى سلوك الحشرة، تعتمد على وسائل فيزيائية أو كيميائية.

تعرف الأنتى زينوسس كذلك باسم عدم التفضيل non-preference، وهى قد تعتمد على صفات فيزيائية فى النبات، مثل سمك الجدر الخلوية، وحدوث تضخمات فى الأنسجة المجروحة، وصلادة السيقان، وتواجد الشعيرات الغدية وكثافتها وأنواعها، والشموع السطحية، وتواجد السليكا بالأنسجة النباتية، وحدوث تحورات تشريحية فى الأعضاء المتخصصة إلخ

وقد تلعب المركبات التى تفرزها النباتات دورًا فى طرد الحشرات أو إحداث تغيرات فى سلوكياتها، مما يؤثر فى تكاثرها وفى مدى الأضرار التى يمكن أن تحدثها كذلك فإن عدم إفراز النباتات لمركبات معينة جاذبة للحشرات قد يفيد فى حمايتها من الإصابة هذا إلاّ أن بعض المركبات التى تنتجها النباتات قد تلعب دورًا مزدوجًا، كما فى حالة الكيوكربتينات التى تنتجها القرعيات، والتى تعد بمثابة جاذبات تغذية لخنفساء الخيار المنقطة، ولكنها طاردة للعنكبوت الأحمر (وهو ليس من الحشرات)

٢ التضادية الحيوية antibiosis تحدث فى تلك الحالة تغيرات فى تطور الحسرة بعد استعمارها للنبات وبداية تغذيتها عليه.

وغالبًا ما تتضمن التضادية الحيوية تأثيرات كيميائية سامة للحشرات، أو نقص فى تغذيتها ومن أكثر مجموعات المركبات تأثيرًا كمضادات تغذية، والتى تحدث نقصًا فى النمو الحشرى التربينويدات terpenoids، والألكالويدات alkaloids، والفلافونات flavonoids، والسيانوجينات الجلوكوسيدية cyanogenic glucosides، والأحماض الأيدروكسامية hydroxamic acids (عن Duck & Evola ١٩٩٧).

أما خاصية التحمل tolerance فهى ليست بمقاومة، إذ إن النباتات المتحملة تتعرض للإصابة الحشرية بالقدر ذاته التى تتعرض له النباتات القابلة للإصابة، ولكن دون أن تتأثر فيها كمية المحصول أو جودته.

استراتيجية التحول الوراثى لمقاومة الحشرات بالاعتماد على 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).

جينات المقاومة الطبيعية للنيماتودا

إن من أهم جينات المقاومة الطبيعية للنيماتودا التى استعملت أو يمكن استعمالها فى عمليات التحول الوراثى لمقاومة النيماتودا، ما يلى:

١ الجين $Hs1^{pro-1}$:

كان من أوائل الـ R-genes الفعالة ضد النيماتودا - والتى أمكن عزلها والاستفادة منها عن طريق تقنيات الهندسة الوراثية - الجين $Hs1^{pro-1}$ الذى عُزِلَ من النوع *Beta procumbens*، وهو نوع برى من البنجر يكسبه هذا الجين مقاومة للنيماتودا المتحوصلة *Heterodera schachtii*. وقد أدى نقل هذا الجين إلى سلالات بنجر قابلة للإصابة بتلك النيماتودا إلى جعلها مقاومة لها.

٢ - الجين Mi.

كان جين المقاومة الثانى فى الدراسة الـ Mi gene المسئول عن مقاومة الطماطم لكل من *Meloidogyne incognita*، و *M. arenaria*، و *M. javanica*. وقد أوضحت الدراسات تواجد ثلاثة مواقع على دنا الطماطم بها تماثل فى هذا الـ R-gene، تبين أن إحداها كان جينًا كاذبًا pseudogene، بينما كان الآخران جينين محتملين نشطين أعطيا الرمزين Mi 1.1، و Mi 1.2، وتبين أن الثانى (Mi 1.2) هو الذى يكسب النباتات المحولة وراثيًا به المقاومة للنيماتودا. وتبين أيضًا أن هذا الجين يكسب النباتات - كذلك - مقاومة ضد من البطاطس *Macrosiphum euphorbiae*

٣ - الجين Hero

تم عزل الجين Hero من الطماطم، وهو جين يكسب النباتات مستوى واسعًا من المقاومة لنيماتودا البطاطس المتحوصلة، حيث يعطى ٩٥٪ مقاومة ضد *Globodera rostochiensis*، وأكثر من ٨٠٪ ضد *G. pallida*. يقع الجين على الكروموسوم الرابع فى منطقة تحتوى على ١٤ جينًا متماثلاً homologous genes، منها ٨ تبدو كجينات فعالة ونشطة. يتماثل الجين Hero فى نحو ٣٢٪ من الأحماض الأمينية التى يشفر لها مع الجين Mi 1.2، ولكن بنسبة تماثل قدرها ٢١٪ فقط مع الجين Gpa2 (عن Atkinson وآخرين ٢٠٠٣).

٤ – الجين Cre3 لمقاومة النيماتودا *Heterodera avenae* فى القمح

٥ – الجين Gro1 لمقاومة نيماتودا الحوصلات بالبطاطس

٦ – من بين استراتيجيات مقاومة النيماتودا – كذلك – هندسة التعبير الجينى لمركبات سامة للنيماتودا، مثل المركب cystatin – وهو proteinase inhibitor من الأرز – الذى أدى نقل الجين المسئول عن إنتاجه إلى نبات *A. thaliana* إلى إكسابه مقاومة لكل من نيماتودا الحوصلات ونيماتودا تعقد الجذور (عن Bent & Yu ١٩٩٩)

٧ – مثبطات إنزيم البروتييز كمضات للنيماتودا:

تتواجد الأنواع الأربع المعروفة لمثبطات إنزيم البروتييز protease (وهى: الـ cysteine، والـ serine، والـ aspartyl، والـ metallo) فى النباتات، وغالبا ما تتراكم فى أنسجة نباتية معينة استجابة للجروح التى تحدثها آكلات الأعشاب. كذلك تتراكم مثبطات البروتييز فى عديد من البذور، مثل الأرز، والذرة، ودوار الشمس، واللوبيا، ويلعب بعضها دورًا فى التحكم فى الإنبات وتشكل تلك المثبطات مكونًا طبيعيًا يدخل ضمن غذاء الإنسان، والحيوانات الزراعية، والثدييات الأخرى، والطيور وتتغلب بعض الثدييات على التأثير الذى تحدثه تلك المثبطات بزيادة إفرازاتها الطبيعية من الإنزيم عند غذائها على علائق غنية بها.

ومن أبرز الأمثلة على مثبطات البروتييز السيرين serine المثبط لإنزيم التربسن trypsin، والذى يتواجد فى بذور اللوبيا (يعطى الرمز CpTI). وجد أن التعبير عن هذا المركب CpTI فى البطاطس المحولة وراثيًا يؤثر فى عملية التكاثر الجنسى للنيماتودا المتطفلة *Globodera pallida* فى بداية الإصابة؛ مما يؤدى إلى سيادة أعداد الذكور الأصغر حجمًا والأقل ضررًا (Atkinson وآخرون ٢٠٠٣)

٨ – يجرى الباحثون محاولات لتحويل النباتات وراثيًا لأجل جعلها أقل صلاحية لتغذية النيماتودا وتطورها داخل جذور النباتات بعد اختراقها لها، كما هو الحال بالنسبة لاستخدام جين التبغ TobRB7 الذى يؤثر – خاصة – على الخلايا العلاقة التى يتحتم تكوينها لاستمرار النمو الطبيعى للنيماتودا (عن Bent & Yu ١٩٩٩).

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

الشيتين، ويكون المنتج النهائى لعملية التحلل كتل جزيئية قابلة للذوبان فى الماء من الـ GlcNAc، مثل chitotetraose، والـ chitotriose، والـ chitobiose، وجميعها مركبات عديدة التسكر تعد بمثابة مواد يعمل عليها إنزيم شيتونيلى آخر، هو β-N-acetylglucosaminidase الذى يقوم بفصل وحدات الـ GlcNAc عن النهاية غير المختزلة. ولقد وجد كلا النوعين من الإنزيمات فى عدد من الكائنات متضمنة كائنات تحتوى على الشيتين، مثل الحشرات، والقشريات crustaceans، والخمائر، والفطريات، وكذلك فى كائنات لا تحتوى على شيتين، مثل البكتيريا والنباتات الراقية والفقاريات.

تلعب إنزيمات الشيتينيز - فى الحشرات - دورًا فى كل من الانسلاخ والهضم، فالحشرات تقوم دوريًا بطرح أديمها القديم وتمثيل آخر جديد، وتتم تلك العملية بمساعدة إنزيمات الشيتنيز التى تتواجد فى سائل الانسلاخ الذى يتراكم فى المسافة التى تفصل بين الأديم القديم وطبقة البشرة هذا .. ويعاد استخدام نواتج تحلل الأديم القديم فى تمثيل الجديد، حيث غالبًا ما تقوم الحشرة بتناول تلك النواتج ضمن غذائها، ويبدو أن إنزيمات الشيتينيز التى توجد فى معى اليرقة تلعب دورًا هاضمًا، بالإضافة إلى دورها فى تحليل الشيتين الذى يتواجد فى بطانة المعى.

أما فى الفطريات .. فإن إنزيمات الشيتينيز تساعد فى تحليل المادة العضوية، وربما تفيد فى الحد من نمو الفطريات الأخرى. وفى الخمائر تفيد إنزيمات الشيتينيز فى فصل الخلايا عن بعضها البعض.

إن الدور الذى تلعبه إنزيمات الشيتينيز النباتية معروف جيدًا، ولقد أمكن عزل عديد من إنزيمات الشيتينيز النباتية والميكروبية، ونقل بعضها إلى النباتات، حيث أدت إلى زيادة مقاومتها للأمراض الفطرية. هذا .. إلاّ أن الدور الذى تلعبه مختلف الإنزيمات الشيتينية فى مقاومة الحشرات لم يمكن فهمه جيدًا بعد

ولقد استعملت الإنزيمات الشيتينية البكتيرية فى تحفيز نشاط المبيدات الحشرية الميكروبية، بما فى ذلك *Bacillus thuringiensis*.

ويبدو أن إنزيمات الشيتينيز تلعب دورا فى اختراق الفطريات الممرضة لأديم العائل.

وتُفْرز إنزيمات الشيتينيز، والـ β-N-acetylglucosaminidases عندما تنمو الفطريات الممرضة للحشرات: *M. anisopliae*، و *B. bassiana*، و *Verticilium lecanii* على أديم الحشرات

ولا نعرف أى استعمال للإنزيمات الشيتينية النباتية فى مكافحة الحشرات، علما بأن نباتات الحبوب النجيلية تحتوى على مستويات عالية من الإنزيمات الشيتينية (١٥-١٠٠ ميكروجرام/جم)، ومع ذلك فإن الحبوب المخزنة تكون قابلة للإصابة بالحشرات

ولقد أمكن عزل الجين المسئول عن تكوين جين الشيتينيز من الحشرة *M. sexta*، ونقل بطرق الهندسة الوراثية إلى كل من التبغ والطماطم، وعندما ربيت يرقات *Heliothus virescens* على أوراقها لمدة ثلاثة أسابيع كان نموها يقل بمقدار ٨٠٪ عن نمو اليرقات التى ربيت على أوراق نباتات عادية غير معدلة وراثيًّا (عن Kramer وآخرين ١٩٩٧).

الجمع بين الجينات ذات المصادر النباتية والمقارنة بينها

أدى تحويل البطاطس وراثيًا بالجينين المسئولين عن إنتاج مثبط ألفا أميليز القمح wheat α-amylase inhibitor، ولكتين زهرة اللبن الثلجية snowdrop lectin معًا، أو بالجينين المسئولين عن إنتاج شيتينيز الفاصوليا bean chitinase ولكتين زهرة اللبن الثلجية معًا أدى ذلك إلى جعل نباتات البطاطس مقاومة للمن بصورة جوهرية (Gatehouse وآخرون ١٩٩٦)

كما قارن Gatehouse وآخرون (١٩٩٧) تأثير ثلاثة جينات ذات أصول نباتية - هى التى تشفر لكل من: لكتين lectin زهرة اللبن الثلجية snowdrop (وهى *Galanthus nivalis*) أو GNA، وإنزيم شيتينيز chitinase الفاصوليا أو BCH، وإنزيم ألفا أميليز α-amylase القمح أو WAI - قارنها مع تأثير جين اللوبيا المثبط لفعل التربسين trypsin inhibitor (CpTI) على حشرة فراشة الطماطم *Lacanobia oleracea*، حيث قاموا بإنتاج نباتات بطاطس محولة وراثيًا بأى من تلك الجينات منفردة أو فى أزواج.

وجد الباحثون أن جميع النباتات المحولة وراثيًا عبرت عن بروتينات الجينات التى نقلت إليها باستثناء تلك التى حولت وراثيًا بالـ WAI، وكان تركيز البروتينات الخاصة بمختلف الجينات أعلى فى النباتات التى حولت وراثيًا بالجينات المفردة عما فى تلك التى حولت وراثيًا بأزواج من الجينات. وقد أظهرت جميع النباتات التى عُبِّر فيها عن الـ GNA مستوى عاليًا من المقاومة لحشرة فراشة الطماطم، حيث انخفض الضرر بالأوراق عن ٥٠٪، مقارنة بالضرر الذى حدث بنباتات المقارنة. وبالمقارنة .. لم يكن للتعبير عن BCH أى تأثير على تلك الحشرة أما تأثير CpTI فكان مماثلاً لتأثير GNA على بقاء الحشرة وتكاثرها، ولكنه لم يوفر حماية من الضرر الحشرى على النبات.

هذا .. ويعطى جدول (١٥-٥) قائمة بعديد من الجينات ذات الأصل النباتى التى استعملت فى عمليات التحول الوراثى لمقاومة الحشرات.

مصادر أخرى لجينات التحول الوراثى لمقاومة الحشرات

من بين المصادر الأخرى لجينات التحول الوراثى التى استخدمت فى عمليات التحول الوراثى لمقاومة الحشرات بخلاف تلك التى أسلفنا بيانها (النباتات الراقية)، وتلك التى نختم بها هذا الفصل (البكتيريا *Bacillus thuringiensis*)، ما يلى:

١ - البروتين (الإنزيم) cholestrol oxidase:

أظهر البروتين cholestrol oxidase المتحصل عليه من راشح مزارع الـ *Streptomyces* سمية عالية ليرقات الـ boll weevil، ولقد أمكن نقل الجين المسئول عن إنتاج هذا الإنزيم إلى التبغ.

٢ - الجين ipt:

إن الجين ipt هو المسئول عن إنتاج الإنزيم isopentenyl transferase - الذى يوجد فى البكتيريا *Agrobacterium tumefacines*، والذى يعد إنزيمًا رئيسيًّا فى مسار تمثيل السيتوكينين. ولقد أدى تحويل التبغ والطماطم وراثيًّا بهذا الجين إلى ضعف تغذية يرقات الـ tobacco hornworm على أوراقهما، وكذلك ضعف معيشة وبقاء من الخوخ الأخضر *Myzus persicae* عليهما.

جدول (١٥-٥): الجينات ذات الأصل النباتى التى استخدمت فى مقاومة الحشرات (عن Slater وآخرين ٢٠٠٣)

الجين النباتى	البروتين الذى يثبط له الجين	مصدر الجين	الحشرات التى يؤثر فيها	النباتات التى حولت وراثيًا
Protease inhibitors	*Inhibited protease*			
C-II	Serine protease	فول الصويا	Coleoptera, Lepidoptera	لفت الزيت والحور والبطاطس والتبغ
CMe	Trypsin	الشعير	Lepidoptera	التبغ
CMTI	Trypsin	الكوسة	Lepidoptera	التبغ
CpTI	Trypsin	اللوبيا	Coleoptera, Lepidoptera	التفاح والخس ولفت الزيت، والبطاطس والأرز والفراولة ودوار الشمس والبطاطا والتبغ والطماطم والقمح
14K-CI	Bifunctional serine Protease and α-amylase	الحبوب		التبغ
MTI-2	Serine protease	السترد	Lepidoptera	الـ Arabidopsis والتبغ
OC-1	Cysteine protease	الأرز	Coleoptera, Homoptera	لفت الزيت والحور والتبغ
PI-IV	Serine protease	فول الصويا	Lepidoptera	البطاطس والتبغ
Pot PI-I	Proteinase	البطاطس	Lepidoptera, Orthoptera	البيتونيا والتبغ
Pot PI-II	Proteinase	البطاطس	Lepidoptera, Orthoptera	البتولا والخس والأرز والتبغ
KTi3, SKTI	Kunitz trypsin	فول الصويا	Lepidoptera	البطاطس والتبغ والأرز
PI-I	Proteinase	الطماطم	Lepidoptera	البرسيم الحجازى والتبغ والطماطم
PI-II	Proteinase	الطماطم	Lepidoptera	التبغ والطماطم

تابع جدول (١٥-٥):

الجين النباتى	البروتين الذى يشفر له الجين	مصدر الجين	الحشرات التى يؤثر فيها	النباتات التى حولت وراثيًا
α-Amylase inhibitors				
a-AI-Pv	α-amylase	الفاصوليا	Coleoptera	فاصوليا أدزوكى والبسلة والتبغ
WMAI-I	α-amylase	الحبوب	Lepidoptera	التبغ
14-K-CI	Bifunctional Serine protease and α-amylase	الحبوب	التبغ	
Lectins				
GNA	Lectin	زهرة اللبن الثلجية	Homoptera, Lepidoptera	العنب ولفت الزيت والبطاطس و الأرز والبطاطا وقصب السكر ودوار الشمس والتبغ
p-lec	Lectin	البسلة	Homoptera, Lepidoptera	البطاطس والتبغ
WGA	Agglutinin	جنين القمح	Lepidoptera, Coleoptera	الذرة
Jacalin	Lectin	Jack fruit	Lepidoptera, Coleoptera	الذرة
Rice lectin	Lectin	الأرز	Lepidoptera, Coleoptera	الذرة
Others				
BCH	Chitinase	الفاصوليا	Homoptera, Lepidoptera	البطاطس
Peroxidase	Anionic peroxidase	التبغ	Lepidoptera, Coleoptera, Homoptera	الصمغ والتبغ والطماطم
Chitinase	Chitinase			لفت الزيت
TDC	Tryptophan decarboxylase	*Catharanthus roseus*	Homoptera	التبغ

٣ – جينات من الثدييات

من بين بروتينات الثدييات التى أظهرت نشاطًا كبيرًا فى مقاومة الحشرات كلاً من: الـ bovine pancreatic trypsin inhibitor، و α-antitripsin، و spleen inhibitor، ولقد أمكن نقل الجينات التى تتحكم فى إنتاج تلك البروتينات إلى عدد من النباتات، إلاّ أن النتائج الأولية (مع فراشة درنات البطاطس على البطاطس) لم تكن مشجعة.

٤ – جينات من الحشرات

أدت جينات مثبطات البروتينيز المتحصل عليها من *Manduca sexta* مثل الـ anti-chemotrypsin، والـ anti-elastrase، التى عبر عنها فى القطن، وكذلك أدى إنزيم الـ chitinase الذى عبر عنه فى التبغ إلى خفض تكاثر كلا من الذبابة البيضاء *Bemisia tabaci*، و *Heliothis virescens*، على التوالى (عن Chawla ٢٠٠٠).

البروتينات البلورية للبكتيريا باسيلس ثورنجينسس

لقد عرف منذ نحو ٦٠ عامًا أن البروتينات البلّورية crystal proteins التى تنتجها البكتيريا *Bacillus thuringiensis* لها تأثيرات سامة على الحشرات، واستخدمت التحضيرات التجارية لتلك البكتيريا – بالفعل - فى مكافحة أكثر من ٥٠ نوعًا من حرشفيات الأجنحة هذا . إلاّ أن الاهتمام الحقيقى بها لم يبدأ إلاّ فى عام ١٩٨٥ بعد عزل الجين الخاص بأحد تلك البروتينات، ثم نقله إلى الطماطم بواسطة Fischhoff وآخرون فى عام ١٩٨٧؛ بهدف مقاومة يرقات حرشفيات الأجنحة فى ذلك المحصول (عن King ١٩٩٠)

وقد أعقب ذلك اكتشاف هذا البروتين ذاته فى عديد من سلالات هذه البكتيريا وتدريجيًا بدا واضحًا أن السلالة البكتيرية الواحدة يمكنها إنتاج عددا من تلك البروتينات كذلك أمكن التوصل إلى عدد من سلالات البكتيريا *B. thuringiensis* التى تفيد – مجتمعة – فى مكافحة مدى واسعًا من حرشفيات الأجنحة. كما أمكن التوصل إلى عدد قليل من السلالات ذات النشاط المضاد لغمديات الأجنحة (عن Hilder ١٩٩٠)

وباختصار .. فإن البكتيريا *B. thuringiensis* تقوم بتمثيل بروتين متبلور قاتل للحشرات. يذوب هذا البروتين فى الظروف القلوية للمعى الوسطى midgut ليرقات حرشفية الأجنحة بعد حصولها عليه ضمن غذائها، ثم يهضم هذا البروتين بواسطة إنزيمات الـ proteases بالمعى الأوسط؛ لينتج منه بولى بيبتيد polypeptide تكون مقاومة لمزيد من الهضم بفعل الـ peptidase، وتكون فى الوقت ذاته سامة للحشرة (عن Chahal & Gosal ٢٠٠٢).

أنواع السموم وطبيعة سميتها للحشرات

تعد *Bacillus thuringiensis* من بكتيريا التربة القادرة على تكوين الجراثيم، وهى تنتج نوعين – على الأقل – من البروتينات السامة للحشرات والنيماتودا، كما يلى:

١ – سموم خارجية exotoxins:

تنتج هذه السموم بواسطة الجين vip3a فى مراحل النمو غير الجنسى، وهى تنطلق للتربة. وتعد الـ β-exotoxins سامة للنيماتودا.

٢ – سموم داخلية δ-endotoxins:

تنتج هذه السموم بواسطة مجموعة جينات الـ cry، خلال مرحلة التجرثم البكتيرى، حيث تكوِّن البكتيريا بلّورات بروتينية تبقى داخل الجرثومة. وعندما تحصل الحشرة على هذا السم ضمن غذائها فإنه يرتبط بمواقع خاصة فى الخلايا المبطنة للمعى. وقد أمكن التعرف على جينين من الـ cry2 يتخصص السم الذى يفرزه أحدهما على حرشفية الأجنحة Lepidoptera والآخر على ثنائية الأجنحة (الذباب) Diptera. ونتيجة لعملية ارتباط السم تحدث تغيرات تركيبية فى السم، يتبعه تكون ثقب فى الخلية المبطنة التى حدث معها الارتباط، تؤدى إلى حدوث تحلل أسموزى قاتل.

ولقد وجد أن السموم الداخلية كانت سامة – كذلك – لبعض الأنواع النيماتودية؛ فوجد – مثلاً – أن السم CryB كان سامًّا للنيماتودا *Caenorhabditis elegans* (عن Atkinson وآخرين ٢٠٠٣).

وكما أسلفنا .. فإن سُم الـ Bt لا يكون فعّالاً إلاّ إذا التصق مع الجدر المعوية للحشرة، فإن لم يحدث هذا الالتصاق فإن السم لا يكون مؤثرًا. وليست لجميع سلالات *B. thuringiensis* تلك العلاقة مع جميع الأنواع الحشرية، فبعضها يتخصص - فقط - على حشرات رتبة حرشفية الأجنحة lepidoptera، بينما توجد سلالات متخصصة على حشرات غمدية الأجنحة coleoptera، أو ثنائية الأجنحة diptera، أو حتى على النيماتودا.

على الرغم من أن قتل وتجفيف البكتيريا *B. thuringiensis* ذاتها، ورش المسحوق الناتج عن ذلك على النباتات يؤدى إلى قتل الحشرات الحساسة للسلالة المستعملة من البكتيريا، إلا أن سُم الـ Bt الذى ينطلق من البكتيريا سريعًا ما يتحلل ويختفى من النباتات ويصبح عديم المفعول فى المكافحة.

ولكن وجد عند نقل الجين المسئول عن إنتاج سُم الـ Bt من *B. thuringiensis* إلى البكتيريا *Pseudomonas fluorescens* أن السم يبقى داخل البكتيريا بعد قتلها وتجفيفها، وبذلك يبقى ثابتًا بعد رش البكتيريا على النباتات

ونظرًا لأن البكتيريا تُستعمل فى المكافحة بعد قتلها، لذا . فإنه لا يوجد أى ضرر من استعمالها، ولكن الضرر يمكن أن يحدث إذا ما رشت البكتيريا الحية لأن تلك البكتيريا تتواجد بصورة طبيعية على الأسطح الورقية، فإذا ما انتقل الجين الـ Bt من السلالة المرشوشة المحولة وراثيًا إلى السلالات الطبيعية لكان هناك احتمال الخطر من استمرار تناول الإنسان لها على الدوام فى طعامه.

وتجدر الإشارة إلى أن تلك الطريقة فى المقاومة لا تكون فعالة ضد الحشرات التى تعيش على الأجزاء تحت الأرضية من النبات كالجذور والدرنات، والتى لا يصلها محلول الرش (عن Chrispeels & Sadava ٢٠٠٣).

وحاليًا يعد السُم الحشرى الـ βt δ-endotoxin - من البكتيريا *B. thuringiensis* - أهم وسائل الهندسة الوراثية لمكافحة الحشرات، وقد وصلت مبيعات بذور الذرة

والقطن وتقاوى البطاطس المهندسة وراثيًا بجين الـ Bt أرقامًا قياسية، كما حولت وراثيًا بالجين ذاته محاصيل: البرسيم الحجازى، والتفاح، والباذنجان، والحور، والأرز، والتبغ، والطماطم، والجوز.

ومن أهم مميزات الـ βt δ-endotoxin عدم استمرار تواجده فى البيئة لفترة طويلة، وفاعليته ضد مجموعة محددة من الآفات الحشرية، وعدم سميته لمعظم النباتات والحيوانات، وكذلك عدم سميته للإنسان. تُحدث هذه السموم ثقوبًا وتحللاً بالخلايا فى الأمعاء الوسطى لليرقات، عند تركيزات تقدر بالجزء فى البليون.

وحديثًا .. أصبحت المقاومة للحشرات بهذه الطريقة محل تساؤلات بعد أن اكتشفت حالات المقاومة للـ βt δ-endotoxin فى بعض الحشرات (عن Bent & Yu ١٩٩٩).

تقسيم السلالات البكتيرية والسموم التى تنتجها

يعتمد تقسيم سلالات *Bacillus thuringiensis* العديدة التى تم اكتشافها على أساس سيرولوجى يقوم على تفاعلات الترسيب بين الخلايا البكتيرية الهدبية مع antisera تم إنتاجها ضد الأهداب أو الخلايا البكتيرية الخضرية. ويعرف حاليًا أكثر من ثلاثين طرازًا سيرولوجيًا، والعدد فى ازدياد. وعلى الرغم من عدم وضوح الأهمية البيولوجية للتفاعل السيرولوجى فإنه مازال هو الأساس الذى يبنى عليه تقسيم هذه البكتيريا، علمًا بأنه لا علاقة له بنشاط البكتيريا كمنتج للسم الحشرى.

وجد الباحثون سلالات جديدة من *B. thuringiensis* أقوى تأثيرًا فى سميتها، وأخرى مؤثرة على يرقات حشرات أخرى غير حرشفيات الأجنحة. كذلك يحاول الباحثون هندسة جينات منتجة للبروتين البلّورى تكون أقوى سمية أو أوسع تأثيرًا.

وكما أسلفنا .. فإم السلالة البكتيرية الواحدة يمكنها إنتاج عددًا من البروتينات البلّورية، علمًا بأن تلك البروتينات تتباين كثيرًا فى خصائصها وفى تأثيراتها (جدولا ١٥-٦، و ١٥-٧) (عن Peferon ١٩٩٧).

وقد أمكن تعريف ما لا يقل عن ٦٠ جين من تلك الخاصة بالبروتينات البلّورية Bt crystal protein genes، وذلك على مستوى النيكليوتيدات.

وتقسم هذه الجينات إلى خمس مجموعات رئيسية حسب تأثيراتها العامة التى تتخصص فيها، كما يلى:

١ – مجموعة CryI . وهى سامة لحرشيفات الأجنحة.

٢ – مجموعة CryII وهى سامة لكل من حرشيفات الأجنحة، وثنائية الأجنحة (الذباب)

٣ – مجموعة CryIII .. وهى سامة لغمدية الأجنحة

٤ – مجموعة Cry IV .. وهى سامة لثنائية الأجنحة.

٥ – مجموعة خاصة تأخذ الاسم cry VI .. وهى نشطة ضد النيماتودا (عن Chen وآخرين ١٩٩٥).

وحاليًا . تقسم تلك البروتينات على أساس تتابعاتها من الأحماض الأمينية فقط، وليس على أساس المجموعات الحشرية التى تتأثر بها، كما كان الحال فى بداية العهد بتقسيمها (عن Peferoen ١٩٩٧).

التقدمات فى عمليات التحول الوراثى وجينات الـ Cry الأكثر شيوعاً

الجينات والبروتينات والسلالات البكتيرية الشائعة الاستعمال

إن بروتينات الـ Bt التى يُعَبَّر عنها حاليًا فى المحاصيل الزراعية المحولة وراثيًا هى من الطرازين CryI، و CryIII من الـ d-endotoxins، وهى التى تعرف بفاعليتها فى مقاومة عديد من الآفات الحشرية من كل من رتبتى حرشفية الأجنحة وغمدية الأجنحة. وقد أفاد استمرار غربلة وتقييم سلالات الـ BT فى اكتشاف d-endotoxins ذات صفات مفيدة ونشطة ضد حشرات أخرى إضافية. وعلى سبيل المثال .. وجدت d-endotoxins تنتمى إلى طراز Cry II ذات نشاط ضد بعض الآفات الرئيسية من حرشفية الأجنحة.

جدول (١٥-٦): تقسيم جينات البروتينات البلّورية للبكتريا *Bacillus thuringiensis* (عن Slater وآخرين ٢٠٠٣)

عائلة الـ	سلالة *B. thuringiensis*		
cry gene	حجم البروتين	أو تحت النوع	الآفات الحساسة لها
cry1 Aa(1-14)	133	kurstaki	حرشفية الأجنحة
cry1 Ab(1-16)	130	berliner	حرشفية الأجنحة
cry1 Ac(1-15)	133	kurstaki	حرشفية الأجنحة
cry1 Ad-g	133	aizawai	حرشفية الأجنحة
cry1 Ba(1-4)	140	kurstaki	حرشفية الأجنحة
cry1 Bb-g	1340	EG5847	حرشفية الأجنحة
cry1 Ca(1-8)	134	entomocidus	حرشفية الأجنحة
cry1 Cb(1-2)	133	galleriae	حرشفية الأجنحة
cry1 Da(1-2)	132	aizawai	حرشفية الأجنحة
cry1 Db(1-2)	131	BTS00349A	حرشفية الأجنحة
cry1 Ea(1-6)	133	kenyae	حرشفية الأجنحة
cry1 Eb1	134	aizawai	حرشفية الأجنحة
cry1 Fa(1-2)	134	aizawai	حرشفية الأجنحة
cry1 Fb(1-5)	132	Morrisoni	
cry1 Ga(1-2)	132	BTS00349A	
cry1 Gb(1-2)	133	wuhanensis	حرشفية الأجنحة
cry1 Ha-b	133	BTS02069AA	
cry1Ia(1-9)	81	kurstaki	حرشفية الأجنحة
cry1Ib-e	81	entomocidus	حرشفية الأجنحة وغمدية الأجنحة
cry1Ja-d	133	EG5847	حرشفية الأجنحة
cry1Ka1	137	morrisoni	حرشفية الأجنحة
cry2Aa(1-10)	71	kurstaki	حرشفية الأجنحة وثنائية الأجنحة
Cry2Ab(1-5)	71	kurstaki	حرشفية الأجنحة
cry2Ac(1-2)	70	shanghai	حرشفية الأجنحة
cry3Aa(1-7)	73	tenebrionis	غمدية الأجنحة
cry3Ba(1-2)	75	tolworthi	غمدية الأجنحة
Cry3Bb(1-3)	74	EG4961	غمدية الأجنحة
cry3Ca1	73	kurstaki	غمدية الأجنحة

تابع جدول (١٥-٦).

عائلة الـ	سلالة *B. thuringiensis*		
cry gene	حجم البروتين	أو تحت النوع	الآفات الحساسة لها
cry4Aa(1-3)	135	israelensis	ثنائية الأجنحة
cry4Ba(1-5)	128	ismelensis	ثنائية الأجنحة
cry5Aa1	152	darmstadiensis	النيماتودا
cry5Ab1	142	darmstadiensis	النيماتودا
Cry5Ac1	135	PS86Q3	غشائية الأجنحة
cry5Ba1	140	PS86Q3	غشائية الأجنحة
cry6Aa(1-2)		PS52A1	النيماتودا
cry6Ba1		PS69D1	النيماتودا
cry7Aa1	129	galleriae	غمدية الأجنحة
cry7Ab(1-2)	130	dakota	غمدية الأجنحة
cry8A-D	131	kumamoroensis	غمدية الأجنحة
cry9Aa(1-2)	130	galleriae	حرشفية الأجنحة
cry9Ba1		galleriae	حرشفية الأجنحة
cry9Ca1	130	tolworthi	حرشفية الأجنحة
cry9Da(1-2)	132	japonensis	
cry10Aa1	78	israelensis	ثنائية الأجنحة
cry11Aa(1-2)	72	israelensis	ثنائية الأجنحة
cry11Ba-b	81	jegathesan	ثنائية الأجنحة
cry12-40	--	--	متنوعة

وقد نشأت تلك البروتينات الـ CryII من سلالة معروفة جيدًا من Bt هى السلالة HD-1 التى تنتج - كذلك - الطراز CryI الذى سبق التعرف عليه، علمًا بأن كلا الطرازين البروتينين - CryI، و CryII - يختلفان تركيبيًا بوضوح، ويختلفان فى طريقة ارتباطهما بالأغشية المبطنة للغشاء المعدى لليرقة. ويعتقد بأن تلك الاختلافات قد تفيد فى المساعدة على مقاومة الحشرات التى طورت مقاومة للطراز البروتينى CryI (عن Corbin وآخرين ١٩٩٨).

جدول (١٥-٧): مدى البروتينات البلّورية السامة للحشرات فى مختلف سلالات البكتيريا *Bacillus thuringiensis* (عن Slater وآخرين ٢٠٠٣)

البروتينات البلورية التى تنتجها	سلالات وتحت أنواع *B. thuringiensis*
Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ad, Cry1Ca, Cry1Da, Cry1Eb, Cry1Fa, Cry9Ea, Cry39Aa, Cry40Aa	*aizawai*
Cry1Aa, Cry1Ba, Cry1Ca, Cry1Ib	*entomocidus*
Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Da, Cry1Cb, Cry7Aa, Cry8Da, Cry9Aa, Cry9Ba	*galleriae*
Cry10Aa, Cry11Aa	*israelensis*
Cry8Ca, Cry9Da	*japonensis*
Cry11Ba, Cry19Aa, Cry24An, Cry25Aa	*Jegathesan*
Cry2Aa, Cry1Ea, Cry1Ac	*kenyae*
Cry7Ab, Cry8Aa, Cry8Ba	*kumamotoensis*
Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ia, Cry2Aa, Cry2Ab	*kurstaki* HD-1
Cry1Ac	*kurstaki* HD-73
Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac	*kurstaki* NRD-12
Cry1Bc, Cry1Fb, Cry1Hb, Cry1Ka, Cry3An	*morrisoni*
Cry3Aa	*tenebrionis*
Cry3Ba, Cry9Ca	*tolworthi*
Cry1Bd, Cry1Ga, Cry1Gb	*wuhanensis*

وسائل تحسين التعبير الجينى

لقد لوحظ انخفاض مستوى تعبير الجين Bt فى بعض النباتات المحولة وراثيًا. ولكن أمكن زيادة هذا التعبير من خلال اختيار الـ promoters المناسبة (جدول ١٥-٨)، أو بتحوير منطقة التشفير coding region بالجين Bt. ولقد تحقق تنشيط فعل الجين باستعمال نسختين من الـ constitutive 35S promoter من فيرس موزايك القنبيط.

كذلك استعملت جينات Bt مخلقة أعيد تشكيلها بزيادة محتواها من الـ GC .. استعملت فى بعض من تلك المحاصيل (جدول ١٥-٩)، وأظهرت تلك الطرز المخلقة - فى كثير من الأحيان - زيادة مقدارها ٥٠٠ ضعف فى التعبير الجينى.

ومن الوسائل الأخرى التى اتبعت لزيادة التعبير الجينى إجراء تحويرات فى الجين والحصول على انعزالات من الطرز المحورة، بهدف قصر التعبير الجينى على الأنسجة التى تضار من النشاط الحشرى فقط (عن Chahal & Gosal ٢٠٠٢).

الإنجازات على المستوى التجارى

من بين الشركات الأمريكية التى أجرت اختبارات حقلية لنباتات محولة وراثيًا بالجين Bt، أو اعتُمدت اختباراتها الحقلية بواسطة وزارة الزراعة الأمريكية، ما يلى (Chrispeels & Sodava ٢٠٠٣)

الشركة	المحصول
Monsanto	البطاطس – القطن – الطماطم – الذرة
Calgene	القطن – التبغ – البطاطس
CIBA-GEIGY	التبغ – الذرة
Agrigentics	لفت الزيت (الكانولا)
Campbell Institute R & T	الطماطم
Rohm & Haas	التبغ
Roger NK Seed	الطماطم
Frito-Lay	البطاطس
Delkab	الذرة
Northrup King	الذرة
Dow Gardens	العُبيراء Serviceberry

ومن بين الأصناف الجديدة التجارية التى أدخلت فى الزراعة وتحمل الجين Bt الأصناف: Bollgard، و Maximizer، و Yield Gard من القطن، و New Leaf من البطاطس (عن Chahal & Gosal ٢٠٠٢).

ويعطى جدول (١٥–١٠) قائمة بأصناف بعض المحاصيل الزراعية الهامة التى أنتجتها بعض شركات التكنولوجيا الحيوية لمقاومة أنواع حشرية متنوعة.

جدول (١٥-٨): الـ promoters التى استخدمت مع جينات الـ Cry فى عمليات التحول الوراثى لمقاومة الحشرات (عن Chahal & Gosal ٢٠٠٢).

الـ Promoter	المصدر	موقع التعبير	البروتين البلورى	النباتات التى حولت وراثيًا
Mannopine synthase TR	*Agrobacterium* Ti plasmid	معظم الأنسجة النباتية	Cry1Ab	التبغ والبطاطس
Phytohaemagglutinin (PHA-L)	الفاصوليا	البذور	a-AI-Pv	البسلة وفاصوليا أدزوكى والتبغ
CaMV 35S	Cauliflower mosaic virus	معظم الأنسجة النباتية	Most proteins	معظم النباتات
Sucrose synthase (RSs1)	الأرز	اللحاء	GNA	التبغ
Metallothionein-like (MT-L)	الذرة	الجذور	Cry1Ab	الذرة
Phosphoenolpyruvate Carboxylase (PEPC)	الذرة	الأنسجة الخضراء	Cry1Ab	الذرة والأرز
Pollen-specific	الذرة	حبوب اللقاح	Cry1Ab	الذرة
Tryptophan synthase α-subunit (trpA)	الذرة	النخاع	Cry1Ab	الذرة
Ubiquitin-1 (Ubi-1)	الذرة	كل الأعضاء النباتية	Cry1Ac	الأرز
Proteinase inhibitor II (Pot PI-II)	البطاطس	يستحث بفعل الجروح	Pot PI-II, ipt	الأرز والتبغ والطماطم
rRNA operon (Prrn)		البلاستيدات الخضراء	Cry1Ac	التبغ
Actin-1 (Act-1)	الأرز	كل الأعضاء النباتية	CpTI	الأرز
Pathogenesis-related protein-1a (PR-1a)	التبغ	يستحث كيميائيًا	Cry1Ab	التبغ

جدول (١٥-٩): تحولات وراثية لمقاومة الحشرات اعتمدت على جينات Bt مخلقة (عن Mandaokar وآخرين ١٩٩٩).

النبات	الجين	بروتين الـ Bt (كنسبة مئوية من البروتين الذائب)	الحشرة المستهدفة
القطن	cry1Ab/ cry1Ac	٠,١	*Heliothis zea*
			Pectinophora gossypiella
البطاطس	cry3A	٠,٣	*Leptinotarsa decemlineata*
الدرة	cry1Ab	٠,١٧	*Ostrinia nubilalis*
الأرز (*japonica*)	cry1Ab	٠,١٥	*Chilo suppressalis*
الأرز (*indica*)	cry1Ac	٠,٠٢٥	*Scirpophaga incertulas*
الطماطم	cry1Ab	٠,٣	*Heliothis zea*
التبغ	cry1Ab	٠,٠٣	*Heliothis virescens*
الباذنجان	cry1Ab	٠,٠٣	*Leucinodes orbonalis*
لفت الزيت	cry1Ac	٠,٤	*Plutella xylostella*
البرسيم الحجازى	cry1C	٠,٢	*Spodoptera litoralis*

كسر مقاومة الجين Cry

عند زراعة الأصناف المعدلة وراثيًا المحتوية على الجين Cry على نطاق واسع، فإن الضغط الانتخابى على الحشرات لتطوير سلالات جديدة مقاومة للسم الذى ينتجه هذا الجين يكون قويًا؛ الأمر الذى يؤدى إلى ظهور السلالات المقاومة، ثم انتشارها مع استمرار زراعة الأصناف المعدلة وراثيًا (عن Bergelson وآخرين ١٩٩٩)

وتعرف عدة حالات كسرت فيها الحشرات المقاومة الحشرية فى النباتات المحولة وراثيًا، وخاصة فى تلك التى حصلت على جين المقاومة الحشرية من *Bacillus thuringiensis*، ولعل أبرز مثال على ذلك المقاومة التى تطورت فى الفراشة ذات الظهر الماسى *Plutella xylostella* ضد سموم الـ Cry1A فى كل من الفيلبين، وهاواى، وفلوريدا، وكذلك ضد Cry1F فى هاواى. ولقد بدا واضحًا أن مقاومة تلك الحشرة لهذه السموم يتحكم فيها جين واحد أو عدد قليل من الجينات. وجدير بالذكر أن هذه

الحشرة – على وجه الخصوص – قد طورت مقاومة ضد معظم المبيدات الحشرية فى عديد من دول العالم (عن Roush ١٩٩٧).

جدول (١٥-١٠): الأصناف التجارية التى أنتجتها شركات التكنولوجيا الحيوية من بعض المحاصيل الاقتصادية الهامة (عن Slater وآخرين ٢٠٠٣)

الحشرات المستهدفة	المحصول	بروتين الـ Bt	الصنف	الشركة
Colorado beetle	البطاطس	Cry3A	New-Leaf	Monsanto
Tobacco budworm, cotton bollworm, pink bollworm	القطن	Cry1Ac	Bollgard	Monsanto
European corn borer	الذرة	Cry1Ab	YieldGard	Monsanto
			YieldGard	Novartis
			Knockout	
			NaturGard	Mycogen
European corn borer	الذرة	Cry1Ac	Br-Xtra	DeKalb
European corn borer	الذرة	Cry9C	StarLink	Aventis
European corn borer	الذرة	Cry1F	Herculex I	Mycogen
				Pioneer
Corn rootworm larvae	الذرة	Cry3Bb		Monsanto

كذلك أمكن تطوير سلالات حشرية مقاومة للبروتين البلّورى معمليًّا، وذلك من كل من الأنواع الحشرية: *Plodia interpunctella*، و *Cadra cautella*، و *Heliothis virescens*. وقد تراوح مقدار الزيادة فى مقاومة التأثير السام للبروتين البلّورى بين ٢٤٪، وأكثر من ٢٥٠٪. وفى هاواى وجدت فى الحقول التى استعملت فيها *B. thuringiensis* فى المقاومة الحشرية – رشًّا – بكثافة عالية ولفترة طويلة .. وجدت عشائر من الحشرة ذات الظهر الماسى *Plutella xylostella* كانت أكثر مقاومة للبكتيريا بمقدار ٤١ ضعف.

وعلى الرغم من أن *Plodia interpunctella* قد طورت مقاومة لبعض سلالات البكتيريا، فإن هذه السلالة الحشرية المقاومة كانت حساسة لسلالات بكتيرية أخرى. ليس هذا فقط، بل إن السلالة الحشرية التى طورت مقاومة ضد السم المنقى ((CryIA(b)

أصبحت أكثر حساسية للسم البلّورى CryIC. وقد تبين أن المقاومة للبروتين البلّورى CryIA(b) ترتبط بانخفاض قدره ٥٠٪ فى ألفة الغشاء الخلوى على استقبال البروتين، بينما ارتبطت زيادة حساسيتها للبروتين CryIc بزيادة فى مواقع الالتحام بينه وبين الخلايا المبطنة للمعى الحشرية (عن Peferoen ١٩٩٢).

ولقد طورت استراتيجيات للتعامل مع مشكلة مقاومة الحشرات للسُم البكتيرى، وجميعها تعتمد على بقاء الآليل الحشرى الخاص بمقاومة السُم البكتيرى منخفضا، حيث يتسنى للأفراد الحساسة - التى تحتوى على الآليل الحشرى الخاص بالحساسية للسُم البكتيرى - أن تكتسح الأفراد المقاومة.

ومن بين هذه الاستراتيجيات، ما يلى:

١ - اتباع دورة زراعية تتبادل فيها المحاصيل المعدلة وراثيًّا بالجين Bt مع المحاصيل غير المعدلة وراثيًّا، أو أن تتنوع فى الأصناف المزروعة فيها سموم الـ Bt.

٢ - استعمال أصناف محولة وراثيًّا بأكثر من واحد من سموم الـ Bt، مع اختلافها فى طبيعة فعلها.

٣ - توفير ملجأ لتكاثر الحشرة العادية غير المقاومة لسموم الـ Bt، إما بالتعبير عن جينات الـ Bt فى أنسجة معينة من النباتات المحولة وراثيًّا ذاتها، أو بزراعة أصناف محولة وراثيًّا وأخرى غير محولة فى الحقل ذاته، أو فى حقول متجاورة. يؤدى ذلك إلى إبطاء عملية تطور وظهور سلالات حشرية جديدة مقاومة.

٤ - التعبير القوى جدًّا لجينات الـ Bt فى النباتات المعدلة وراثيًّا، مما يزيد من صعوبة ظهور السلالات المقاومة.

٥ - الحد من حجم عشيرة الحشرة - بهدف الحد من التباينات الوراثية التى قد تظهر فيها والتى قد تتضمن المقاومة - وذلك بالجمع بين زراعة الأصناف المقاومة ووسائل المكافحة الأخرى، مثل استعمال الأعداء الطبيعية (عن Mandaokar وآخرين ١٩٩٩، و Bent & Yu ١٩٩٩)

وقد قارن Roush (١٩٩٤) تأثير مقاومة الحشرات بتحويلها وراثيًّا بالجين Bt مع

المقاومة بالرش بالتحضيرات التجارية من البكتيريا *Bacillus thuringiensis*، وذلك على ضوء ما ابداه بعض الحشريين من أن فرصة ظهور سلالات حشرية مقاومة تكون أقل عند الرش بالبكتيريا عما يكون عليه الحال عند زراعة النباتات المحولة وراثيًّا. يذكر الباحث - بداية - أن التحضيرات التجارية من البكتيريا لا تخلط - غالبًا - بالمبيدات الحشرية الكيميائية، وليس من المحتمل أن تكون بديلاً عنها. وبالمقارنة .. فإن استعمال النباتات المحولة وراثيًّا في الزراعة يمكن أن يحل كلية محل الرش بالمبيدات الكيميائية؛ مما يجعل لاستعمالها قيمة كبيرة في حماية البيئة. كذلك أظهرت الدراسات المختبرية على كل من الفراشة ذات الظهر الماسي *Plutella xylostella* وفراشة الدقيق الهندية *Plodia interpunctella* أن النباتات التي تحمل جين Bt واحد تكون أكثر كفاءة في تأخير ظهور المقاومة الحشرية عن الرش بالبكتيريا. كما وجد أيضًا أن سلالات خنفساء كلورادو *Leptinotarsa decemlineata* التي طورت معمليًّا لمقاومة الرش بالبكتيريا لم تكن قادرة على إصابة النباتات المحولة وراثيًّا؛ مما يعني أن طبيعة المقاومة الحشرية تختلف بين حالتي الرش بالبكتيريا واستعمال النباتات المحولة وراثيًّا. وأخيرًا .. فإن استعمال نباتات محولة وراثيًّا بجينين من جينات الـ Bt تزيد - كثيرًا - من احتمالات تطوير حالات المقاومة الحشرية.