تطبيقات التقنيات الإحيائية في هندسة النباتات المقاومة للحشرات

د. حسين فاضل الربيعي

دائرة البحوث الزراعية ، وزارة العلوم والتكنلوجيا

ص.ب 765 بغداد . halrubeai @ yahoo. com

المقدمة

اصبح من المعروف ان المحاصيل المقاومة للحشرات تعد احدى اهم النجاحات التطبيقية لتقنية الهندسة الوراثية في الزراعة ،فقد ادى التوسع في زراعة القطن *Gossypium hirsutum* المقاوم ليرقات حرشفية الاجنحة والذرة *Zea mays* المقاومة ليرقات كلاُ من حرشفية وغمدية الاجنحة ،على مستوى العالم الى تقليص استعمال مبيدات الحشرات وخفض تكاليف الانتاج (Toenniessen واخرون ، 2003 و Brooks و Barfoot ، 2005).ان مصدر السموم القاتله للحشرات والمنتجة من قبل النباتات المحورة وراثياً هو احد انواع بكتريا التربة *Bacillus thuringiensis* (Bt) . وقد اظهرت ضروب هذه البكتريا فاعلية قاتلة وتخصصا مختلفا اتجاه انواع الافات الحشرية كما ثبت كونها مصدراً كبيراً للجينات المشفرة لبروتينات قاتلة للحشرات والتي تتركز في الاجسام الضمينة البلورية Crystalline inclusion bodies المنتجة من قبل البكتريا في مرحلة تكون الابواغ (بروتينات Cry و Cyt) او تنتج خلال النمو البكتيري (بروتينات Vip) ومن خلال الدراسات المستفيضة للسموم البلورية يتضح ان أليه فعلها تتضمن قابلية تحليل البروتينات البلورية في امعاء الحشرة بعد ابتلاعها بواسطة انزيم البروتيز والتي تؤدي الى تكوين السم الفعال ثم يعقبها تفاعل احد اوكلا المكونيين I domain و Π مع "مستقبلات" موجودة على اسطح الخلايا الطلائية في معي الحشرة . ان هذا التفاعل يقود الى بلمرة البروتينات مما يؤدي الى تكوين قناة مفتوحة خلال جدار الخلايا (Bravo واخرون ، 2007) تستمر بتسرب الايونات والماء الى داخل الخلية وتحطم الخلية وتفتت المعي وانتشار البكتريا وموت الحشرة .

مع ذلك فليس كل الافات الحشرية يمكن استهدافها بمثل هذه السموم في الوقت الحاضر ولازال هناك حاجة لتطوير حلول لمشاكل محددة مثل استحداث المقاومة للافات الحشرية الماصة للعصارة النباتية كذلك لافات المنتجات المخزونة.

تهدف هذه الدراسة استعراض التطويرات العلمية التي ادخلت على الاستراتيجية الرئيسية لسموم بكتريا *B.thuringiensis* ،كذلك بعضاً من الطرائق البديله في هندسة النباتات المقاومة للافات الحشرية .

تحسين مستوى توضح السموم البكتيرية وانواعها الجديدة

تحوير الجينات البلاستيدية Plastid Genome Transformation .

ان عملية التعبير عن مورثات expression السموم البكتيرية ضمن النباتات المحورة تحتاج لان تكون بمستوى كافي لاجل اعطاء النبات الحماية المناسبة ضد الافة المستهدفة (وقد حددت من قبل وكالة حماية البيئة الامريكية EPA بالتسبب في قتل اكثر من 95% الحشرات المهاجمه ، وهذا معناه لابد وان تحتوي النباتات المحورة على اكثر من 0.2% بروتينات السم البلوري من مجموع البروتينات الذائبة في الانسجة النباتية المناسبة). ان عمليات التحوير الوراثي للجينات النووية لادخال جينات تشفر للسموم البكتيرية تؤدي الى مستويات منخفضة جداً من التعبير مالم تجرى عليها عمليات تحويرية مكثفة بضمنها ازالة المناطق الغنية بالقواعد النووية AT في سلسلة الشفرة واستخدام تغايرات تكوينية او معززات نسيجية متخصصة tissue - specific promoters .ان مثل هذه الطرائق كانت قد استخدمت ومنذ المراحل الاولى لتطوير هذه التقنية وتعد الان من العمليات الروتينية مع ذلك فانها تتضمن مشاكل تقنية كثيرة .

بالمقابل وجد ان ادخال جين السم البلوري غير المعدلة ضمن جينات البلاستيدات الخضراء ينتج عنه تجمع مستويات عالية من هذه السموم (3–5 % من بروتين الاوراق الكلي ، Mc Bride واخرون،1996) . فبالرغم من مشاكل التوصل الى تحوير وراثي ثابت في الجينات البلاستيدية للتعبير عن البروتينات Cry المختلفة في بلاستيدات نبات التبغ *Nicotiana tabacum* (Kota واخرون ، 1999 De Cosa واخرن ، 2001) كذلك بروتينات Cry1Ab في بلاستيدات نبات فول الصويا *Glycine max* (Dufourmantel واخرون ، 2005). من جهة اخرى وجد ان التعبير المفرط للمشغل Cry2Aa2 operon في البلاستيدات يكون مهماً في اعطاء مدى واسع من الحماية ضد العديد من انواع الافات الحشرية . تمتلك هذه التقنية فائدة محتملة في كون ان البلاستيدات الحائزة على المواصفات المشفرة تتوارث من الام بصورة سائدة في معظم النباتات وبهذا فان حبوب اللقاح الناتجة عن المحاصيل المحورة وراثياً تكون اقل احتمالاً نشر الجين المحور الى النباتات غير المحورة وراثياً.

سموم بكتريا Bt الجديدة

لقد تم غير العديد من السموم البكتيرية الجديدة والتي تختلف في تسلسلاتها ولاتمت بصلة لمكونات البروتينات من نوع Cry ثلاثية الاجزاء . فقد وجد ان بأستطاعة سموم ثنائية مثل Cry 34/35 و Vip 1/2 من ان تكون فعالة ضد دودة جذور الذرة *Diabrotica virgifera* (Moellenbeck واخرون ، 2001) حيث لاتوجد حاجة الى اعادة هندسة سلاسل التشفير مقارنة بالاجراء البديل في استخدام النوع Cry3Bb1 المحور (كما سيذكر بحقاً) . من جهة اخرى فقد وجد ان سلسلة مفردة للبروتين Vip مثل Vip 3 تكون فعالة ضد مدى اوسع من يرقات حرشفية الاجنحة مقارنة ببروتينات Cry . وبالامكان توسيع هذا المدى عن طريق هندسة البروتين (Fang واخرون ، 2007). ان الانتاج التجاري لمثل هذه النبات المحورة وراثياً والحاوية على هذه البروتينات هو حالياً تحت التطوير.

توضح السموم المتعددة في النباتات

تعد تخصصية سموم Cry لبكتريا Bt للافات المستهدفة احدى اهم المميزات كون ان تأثيرها في الحشرات غير المستهدفة وغيرها من الكائنات يكون بحدودهة الدنيا. مع ذلك فان توسع زراعة النباتات المحورة وراثياً والحاوية على جين متخصص لنوع محدد من السموم يمكن ان يقود الى مشاكل منها بروز مشكلة الافات الثانوية وبالتالي فان احتواء هذه النباتات على جينات Cry اخرى يمكن ان يوفر حماية ضد مدى اوسع من الافات . وفي هذا الصدد فان الاستعمال التجاري للقطن المحور وراثياً والحادي على جينين لسموم بكتريا Bt كان قد ابتدأ في عام 1999 ، أي بعد ثلاث سنوات من اطلاق ضروب القطن الحاوية جين Cry واحد. ان نباتات القطن الحاوية على كل من Cry1Ac و Cry2Ab تكون سامة لدود الجوز *Helicoverpa zea* (الافة المستهدفة) ونوعين من الديدان هما *Spodoptera frugiloarda* و *S. exigua* (الافات الثانوية) مقارنة بالنباتات الحاوية على الجين Cry1Ac لوحدة في تجارب مختبرية (Stewart واخرون ، 2001) والبيوت الزجاجية والحقل (Chitkowski واخرون 2003).

ان توضح بروتينات Cry المتعددة يمكن ايضاً ان يكون نافعاً في منع تطور المقاومة للسموم في الحشرات المستهدفة . فبالرغم من نجاح استراتيجية اماكن اللجوء (زراعة مناطق بنباتات غير محورة وراثيا ضمن النباتات المحورة) في احتواء امكانية تطور المقاومة (Tabashnik واخرون ،2005) فان استهداف مستقبلات مختلفة في معي الحشرات (من الناحية النظرية) يكون اكثر فاعلية وذلك لان فقد الحساسية للسموم يتطلب في هذه الحالة حدوث طفرات متعددة، وفي هذا الاطار تم تعريض نباتات البروكولي المحورة وراثياً والحاوي على البروتينات Cry1Ac و Cry 1C او كلاهما الى تغذية يرقات العث ذات الظهر الماسي *Plutella xylostella* التي تحوي على جينات مقاومة لبكتريا Bt وبتردد منخفض نسبياً (Zhao واخرون ، 2003) . وبعد 24 جيل من اجيال الافة ، اظهرت النباتات الحاوية على جينين من السموم البكتيرية تأخراً معنوياً في عملية الانتخاب لحشرات مقاومة لفعل السموم البكتيرية . مع ذلك فان تعريض الحشرات الى النباتات الحاوية على جين او جينين من جينات سموم Bt في نفس الوقت فانه يؤدي الى زيادة ملحوظة في التغلب على المقاومة لكلا نوعي النباتات (Zhao واخرون ، 2005) مما تعود الى الاستنتاج بان النباتات الحاوية على اكثر من نوع من السموم البكتيرية ليست هي الحل الناجح. وهناك نتائج اخرى تشير الى ان بامكان الافات من تطوير المقاومة ضد السموم المتعددة، فعلى سبيل المثال فأن احدى سلالات النوع *Heliothis virescens* الذي يصيب القطن يمتلك مقاومة البروتينات Cry 1Ac و Cry 2Aa وبأسس وراثية مختلفة (Gahan واخرون، 2005) .

ان التحسينات والتطوير الذي يجرى على طرائق التحوير الوراثي للنباتات مثل امكانية الناقل الجيني *Agrobacterium* للتعامل مع النباتات من ذات الفلقة الواحدة واستعمال ناقلات بلازميدية تحتوي على جينات متعددة يمكن ادخالها الى موضع وراثي واحد ، قد مكنت من توضيح سموم متعددة في ضروب النباتات المحورة وراثياً . ويقع في هذا الاطار الاعلان في عام 2007 عن انتاج ضرب من الذرة المحورة وراثياً والحاوية على ست جينات مقاومة للحشرات فعالة ضد دورة جذور الذرة وغيرها من افات حرشفية الاجنحة (Cry35Ab1 + Cry34Ab1 و Cry3Bb1 و Cry1F و Cry1A.105 و Cry2Ab2) فضلاً عن جينين تعطي النباتات تحملاً لنوعية من الادغال كاحد الحلول لمشاكل الحشرات والادغال (Crainnet ،2007) وتعطي مثلاً عن امكانية تقنية التراكم الجيني

. gene stacking tech.

تحسين الاصل: الهندسة الوراثية لبروتينات سموم بكتريا Bt.

ان استخدام الطفرات الوراثية في سموم Cry بهدف دراسة اليه تأثير هذه البروتينات (Bravo واخرون ،2007) قد ساعدت في التوسع لانتاج سموم محورة وراثياً جديدة .

تبادل الاجزاء في السموم الثلاثية .

ان التماثل التركيبي لكل اعضاء عائلة سموم بكتريا Bt الثلاثية الاجزاء domain والادوار المفضلة للاجزاء في عمليات الارتباط بالمتقبلات وتكوين الاقنية تشير الى ان تجميع الاجزاء من بروتينات سامة مختلفة يمكن ان يؤدي الى تكوين سموم فعالة وذات تخصصات جديدة . فعلى سبيل المثال فان نقل الجزء الثالث domain III المرتبط بالكربوهيدرات يؤدي الى تكوين السم الهجين Cry1Ab –Cry1C المتصف بكونه عالي السمية للافة *S. exigua* المقاومة بدورها للسم Cry1A ، من جهة اخرى فان وجود Cry1Ca في الجزء الثالث كان كافياً للتاكد من سميتة ضد هذا النوع من الافات (de Maaged واخرون، 2000)اكثر من ذلك فقد وجد ان بروتين Cry الهجين يحتوي على الجزئين I و III من البروتين Cry1Ba والجزء Π للبروتين Cry1Ia مما اكسب نباتات البطاطا المحورة وراثياً مقاومة ضد عثة درنات البطاطا *Phthorimaea operculella* وخنفساء كولوراد و *leptinotarsa decemlineata* (Naimov واخرون ، 2003) ان "اباء" بروتينات Cry في هذا الهجين متخصصة بحشرات حرشفية الاجنحة وليس لها فاعلية ضد حشرات غمدية الاجنحة مثل خنفساء البطاطا مما يشير الى امكانية تطوير تخصص جديد.

استحداث الطفرات الوراثية في سموم Cry ثلاثية الأجزاء.

ان التحوير الوراثي لسموم بكتريا Btمن خلال احداث طفرات موقعية محددة بهدف زيادة سميتها للحشرات المستهدفة يعد احدى التقنيات المناسبة لرفع فاعليه هذه السموم وتوسيع مدى تخصصها . من المعلوم ان الدور الرئيسي للجزء Π من بروتينات Cry ثلاثية الاجزاء في احداث التفاعلات مع المستقبلات في معي الحشرات كان قد اكتشف من خلال تطفير جزئيات الحامض الاميني الموجود في المناطق الحلقية لهذا الجزء. حيث اظهرت نتائج تطفير البروتين Cry 1Ab زيادة في سميته ليرقات العثة الفجرية *Lymantria dispar* بحدود 40 ضعفاً (Rajamohan واخرون ،1996) واتبعت هذه الاستراتيجية في زيادة فاعلية (سمية) بروتينات Cry3A ضد الحشرات المستهدفة من أنواع غمديه الأجنحة (Wu وآخرون ، 2000 ، لاحظ الشكل 1). ومن الأمثلة الأخرى هندسة السمية باتجاه يرقات البعوض في البروتين Cry1Aa المتخصص بيرقات حرشفية الأجنحة (Liu و Dean ،2006). من جهة أخرى تم تطوير نظام

جديد لإنتاج سموم ذات مواصفات محسنة وخصوصاً ارتباطها بالمستقبلات في معي الحشرات وبالتالي زيادة سميتها (Ishikawa وآخرون ، 2007).

ففي هذا المجال هناك ضروب الذرة التجاري MON 863 المقاوم لدودة جذور الذرة الذي يحتوي على نوع محور من السم البكتيري Cry3Bb1 (Vaughn وآخرون ،2005) ، علماً ان البروتين Cry3Bb1 غير المحور فعال ضد عدد من أنواع غمديه الأجنحة وسميته اتجاه افات الجذور غير كافية . كما تم اختبار فاعلية العديد من ضروب البروتين Cry3Bb1 المحدث فيها طفرات محددة في احداث الاقنية في خلايا معي الحشرات من قبل هذه السموم (English واخرون ،2003). وقد تم احداث العديد من انواع الطفرات (شكل 2) بهدف : 1) زيادة في نفور جزيئات البروتين من الماء في مناطق الجزء I الحاوية على اشرطة من جزيئات الماء المرتبطة وفي المناطق الحلقية .2) زيادة في قابلية التحرك للمناطق اللوبية المكونة للاقنية في الجزء I من خلال تثبيط تكون الاواصر الهيدروجينية . 3) زيادة قابلية التحرك والمرونه في المناطق الحلقية في الجزء I .4) تغيير قابلية ion- pair interactions وموقع ارتباط المعادن. واخيراً 5) خفض او ازالة الارتباط بالكربوهيدرات في معي الحشرات عن طريق احداث الطفرات في المنطقة الحلقية ما بين الجزئين I و II . وعبر هذه الانواع من الطفرات وجد ان سمية البروتين لديدان جذور الذرة قد ازدادت ثمانية اضعاف تقريباً نتيجة وجود بروتينات محورة وراثياً بإمكانها التوضح وبمستويات كافية لاعطاء حماية مناسبة ضد هذه الافات .

وتشير النتائج الحالية الى ان oligomerization سموم Cry ما بعد الارتباط بالمستقبلات في معي الحشرات تعد خطوة مهمة ضمن اليه التسمم وقد قادت الى هندسة بروتينات Cry لكي تصبح فعالة ضد تلك الحشرات التي اكتسبت مقاومة للسموم الاعتيادية وعن طريق احداث طفرات في المواقع المستقبلة (Soberon واخرون، 2007)، فقد وجد ان ازالة المنطقة اللولبية (1-) في الجزء I ينتج عنها سم بروتيني لا يحتاج الى الارتباط بمستقبل لتحدث عملية Oligomerization وكان ساماً للحشرات المقاومة ، مع ذلك فأن مدى توضح هذه السموم المحورة داخل النباتات لازال تحت التجربة.

اندماج البروتينات Fusion Proteins

لقد تم استخدام تقنية ادخال سمين من سموم Cry محورة بحيث تحتوي على سلسلة تشفير واحدة مندمجة (Bohorova واخرون ، 2001) بهدف اضفاء فاعلية اضافية لسموم Cry .وعلى سبيل المثال تم دمج الجزء Gal- binding lectin (B-chain) من بروتين تثبيط الريبوزوم في سم الرايسين ricin، مع الجزء III للسم Cry1Ac (Mehlo واخرون 2005) مما اعطى بروتيناً مدمجاً بامكانه الارتباط بجزيئية Gal في مستقبلات معي الحشرات فضلاً عن ارتباطة بجزيئة N-acetyl galactosamine عن طريق الجزء III لهذا السم. ان ادخال هذه

البروتينات المدمجة في نباتات الذرة والرز *Oryza sativa* وتوضحها ادى الى اضفاء صفة المقاومة ضد حفارات السيقان *Chilo suppressalis* ويرقات اكلة الاوراق *Spodoptera littoralis* في حين كانت النباتات الحاوية على السم غير المحور Cry 1Ac معرضة للاصابة بهاتين الافتين . كما لوحظ ان النباتات الحاوية على البروتينات المدمجة كانت مقاومة لافات نصفية الاجنحة مثل قفاز الاوراق *Cicadulina mbila* ومن المعتقد ان سبب هذه المقاومة هو جزء اللكتين، لان سموم بكتريا Bt عادة غير فعالة ضد هذه الافات .

الدفاع الذاتي : استثمار البروتينات الدفاعية للنبات.

بالرغم من ان هندسة النبات بادخال البروتينات التي تفرز كاستجابة للجروح مثل مثبطات محلالات البروتينات proteinase inhibitor و polyphenol oxidase قد فشلت في اضفاء حماية كاملة للنباتات ضد الحشرات بسبب التكيف المسبق للافات . مع ذلك هناك مثالين واعدين عن استثمار البروتينات الدفاعية للنبات في معالجة بعض المشاكل المتخصصة لمقاومةالحشرات.

مثبط انزيم الفا– اميليز وافات المنتجات المخزونة.

ان من المعروف كون مثبط انزيم الفا– اميليز الموجود في بذور بعض انواع البقوليات يضفي مقاومة لبعض ضروب البقوليات ضد سوسة بذور البقوليات . تبعاً لذلك تم ادخال وتوضح هذا الجين في بذور البازلاء *Pisum sativum* وغيرها من البقوليات باستخدام محفز قوي خاص بالبذور (Shade وآخرون ، 1994) وكانت النتيجة بذوراً تحوي على حوالي 3% من هذا البروتين الخارجي وذات مقاومة للآفات المخزنية مثل يرقات سوسة البازلاء *Bruchus pisorum* (Morton واخرون، 2000). أن هذه الاستراتيجية تستهدف بالتحديد الافات الحشرية من رتبة غمدية الاجنحة التي يكون مستوى pH معيها معتدل او حامضي، لذلك فأن المثبط يستمر في عمله فضلاً عن ان العامل المحدد للتغذية هو هضم النشا وليس البروتين. وبالرغم من هذه الحقائق فأن نشر زراعة هكذا نباتات لم يأخذ مداه وذلك من منطلق بعض التخوفات الناتجة عن أن مثل هذه البذور قد ادت الى استجابات مناعية في الفئران التي تغذت عليها(Prescott واخرون، 2005).

اللكتين والحشرات الماصة

منطلقاً من عدم تأثر الحشرات من رتبة نصفية الاجنحة بسموم Cry فقد تم التوجه نحو ادخال جينات اللكتين الى النباتات لأكسابها صفة المقاومة فعبر استخدام محفزات لحائية phloem متخصصة تم انتاج نباتات رز محورة وراثياً (تحتوي على جين الكلتين GNA) وذات مقاومة نسبية لقفازات النبات البنية *Nilaparvata lugens* وغيرها من نصفية الاجنحة. حيث انخفضت نسبة الافراد الحية الى 50% تقريباً بعد تغذيتها على مثل هذه النباتات، فضلاً عن معاناة الافراد الناجية من انخفاض التغذية والتطور والقابلية على التكاثر Roa واخرون، 1998 و Foissac واخرون، 2000). وقد منعت التخوفات من تبعات المحتملة لمثل هذه النباتات على الحيوانات الراقية من تطور هذا الجانب، مع ذلك فأن الدراسات الحديثة قد أشارت الى عدم وجود تأثيرات حادة نتيجة اكل الجرذان لنباتات رز محور وراثياً تحتوي على جين اللكتين (Poulsen واخرون، 2007). كما تم الحصول على نباتات رز محورة وراثياً ومقاومة نسبياً لقفازات النبات عن طريق ادخال جين الكلتين (ASA-L-) المأخوذ من اوراق نبات الثوم *Alliam sativum* (Saha واخرون، a 2006). كما تم ملاحظة كون ان هذه النباتات المحورة وراثياً قد ساعدت في انخفاض نسبة انتقال احد انواع الفيروسات النباتية بوساطة ناقلاتها الحشرية، وربما كنتيجة لانخفاض تغذيتها (Saha واخرون، b 2006) .

الطرائق الجديدة

بروتينات النيماتودا

تستخدم وعلى نطاق ضيق بعض انواع النيماتودا *Heterorhabditis* التي تحتوي على بكتريا تعايشيه داخلها، في المكافحة الاحيائية للافات الحشرية. فعند دخول النيماتودا داخل جسم الحشرة العائل تنتشر البكتريا التعايشية في جهاز الدوران للحشرة وبفضل السموم البكترية تموت الحشرات المصابة في النهاية. ويعد النوع البكتيري *Photorhabdus luminescens* اكثر الانواع اخضع للبحث والتجربة كونه يحتوي العديد من المكونات السامة للحشرات ffrench-Constant) واخرون، 2007) واحد المركبات السامة عن طريق الفم هو السم A الذي يشفر له الجين tcdA. أن توضح هذه الجين وبمستوى أكثر من 0.07% من البروتين الكلي في اوراق نباتات *Arabidopsis thaliana* اكسبها حماية كاملة تقريباً ضد يرقات *Manduca sexta*. وقد أثبت كون ان الخلاصة الورقية لمثل هذه النباتات كانت سامة ليرقات دودة جذور الذرة مما شجع على الارتقاء بهذه التقنية الى المستوى التجاري.

مؤكسدات الكولسترول

لقد وجد أن لمؤكسدات الكولسترول البكتيرية فاعلية قاتلة للحشرات مشابهة لسموم بكتريا Bt وتبعاً للنشاط الانزيمي الذي يضن انه يحفز عدم توازن اغشية الخلايا. وقد تم ادخال الجين المشفر لمثل هذه البروتينات او الببتيدات داخل نباتات التبغ (Corbin واخرون، 2001)، الا انه لوحظ وجود بعض التشوهات المظهرية في النباتات المحورة ما لم يتمركز الانزيم في البلاستيدات. وقد وجد ان اوراق هذه النباتات المحورة كانت سامة ليرقات جوز القطن وفي هذا المجال فأن جين الانزيم المؤكد للكولسترول هو الاكثر ترشحاً للإدخال في البلاستيدات مما في النواة وذلك لتجنب المشاكل المحتملة والمتسببة عن النشاط الأنزيمي في السايتوبلازم.

الافيدين كقاتل للحشرات

للافيدين avidin تأثيرات قاتلة ضد العديد من انواع الحشرات مع ذلك هناك مدى واسع لهذه السمية يختلف بأختلاف الأنواع الحشرية (ربما تعتمد على متطلبات البايوتين biotin) . وقد تم ادخال وتوضح جين الافدين في نباتات الذرة بحيث ان احتواء بذورها على اكثر من 0.1% افدين من مجموع البروتين ادى الى مقاومتها ليرقات ثلاثة انواع من غمدية الاجنحة(Kramer واخرون، 2000). كما تم ادخال جين البروتين في نباتات اخرى وبحيث يكون بعيداً عن سايتوبلازم الخلايا (بأستخدام سلسلة استهداف targeting seqences من مثبطات أنزيمات التحلل البروتيني للبطاطا(Murray واخرون، 2002)، وذلك لتجنب حدوث التشوهات في النباتات الناتجة.

طرائق جديدة: استثمار مواد الايض الثانوية

هندسة مواد الأبيض الثانوية للمركبات الدفاعية النباتية

ان توفر الجينات التي تشفر انزيمات الايض الثانوية قد جعل من عملية نقل المسار التخليقي ما بين النباتات مجدياً. فالجينات التي تشفر نوعية من مؤكسدات Cyt P450 و UDP-glucosyltransferase من نبات الشيلم *Sorghum bicolor* قد امكن نقلها (ادخالها) في نباتات Arabidopsis (Tattersall واخرون،2001) مما نتج عنها انتاج cyanogenic glycoside من التايروسين (Kristensen واخرون، 2005) وبذلك فأن النباتات الناتجة بأمكانها انتاج سيانيد الهيدروجين في الاسنجة المتضررة وبالتالي تحفز مقاومة هجوم الخنفساء البرغوثية *Phyltotreta nemorum* المتخصصة بالتغذية على نباتات العائلة الصليبية كما وجد ان النباتات المحورة تقوم بأنتاج مركب ايض ثانوي اخر هو قلويد الكافائين (في التبغ من

خلال ادخال ثلاث جينات تشفر للانزيم (N- methyl transferase) (Kim واخرون، 2006).

هندسة المركبات النباتية المتطايرة

ان هندسة المركبات النباتية المتطايرة توفر فرصاً لطرائق جديدة في مجال وقاية النباتات. أن تركيبة هذه المواد المتطايرة امكن تحويرها في نباتات التبغ بوساطة تداخل RNA interferance (RNAi) الوسيط لخفض توضح جين اكسدة cyt P450 في الشعيرات النباتية (trichomes) وفي نباتات Arabidopsis بوساطة توضح تكويني مفرط للإنزيمين Lnerolidol synthase /linalool في البلاستيدات (hlang واخرون ،2001 و Aharoni واخرون ، 2003). ان النباتات الناتجة كانت طاردة لحشرات المن وتمنع تمركزها الا انها لم تكن كاملة المقاومة . كما يمكن استخدام المواد المتطايرة كجاذبات للاعداء الطبيعية للافات ، فعلى سبيل المثال ان نباتات النوع Arabidopsis المحورة بادخال جين terpene synthese من الذرة (TPS 10) تقوم باطلاق مواد متطايرة كالتي في نباتات الذرة وبالتالي تجذب الزنابير التي تهاجم افات الذرة (Schnee واخرون ،2006). كما يمكن الاستفادة من المركبات الكيميائية التي تطلقها الحشرات ذاتها من اجل التواصل مع بعضها فعلى سبيل المثال فان sesqiterpene (E)- ß- farensene هو فيرمون تحذيري في المن ويمكن ان يجذب مفترساته ومتطفلاته (Beale واخرون ، 2006) فعند ادخال هذا الجين من نبات النعناع (*Mentha x piperita*) فان النباتات الناتجة اظهرت مستوى جيد من طرد المن وجذبها احد متطفلاته *Diaeretiella rapae* .

تقنية تداخل RNA

تعد عملية تعطيل عمل الجين عبر استخدام تقنية تداخل RNA (RNAi) احدى التقنيات المعروفة في الدراسات الوراثية للحشرات التي تعتمد على الحقن داخل الخلايا او الانسجة الحشرية . كما لوحظ ايضاً اهمية تقنية RNAi في خفض التوضح الجيني المقاس بوساطه مستوى mRNA (Tumer واخرون ، 2006) قد قادت الى الحصول على نباتات محورة تنتج RNA ثنائي الاذرع (ds RNAs) ذات مقاومة نسبية للافات الحشرية . حيث وجد ان الذرة المحورة وراثيا والمنتجة ds RNA تؤثر على النوع V من الانزيم ATPase في دورة جذور الذرة كما نجد فيها انخفاضاً لمستوى mRNA فضلاً عن انخفاض اضرار تغذية الحشرات مقارنة بالنباتات غير المحورة (Baum واخرون ،2007). من جهة أخرى وجد ان نباتات التبغ و Arabidopsis الحاوية على RNA ds الموجة ضد أنزيم إزالة التسمم

(Cyt P450 gene CYP6 A E14) بمادة الكوسيبول gossypol في دودة جوز القطن تتسبب في جعل الحشرة أكثر حساسية لهذه المادة في غذائها (Mao واخرون ،2007) . ان هذه التقنية تتضمن الكثير من الفوائد المتحملة والقابلة للتطوير في المستقبل .

المصادر

Aharoni A, Giri AP, Deuerlein S, Griepink F, de Kogel WJ,Verstappen FWA, Verhoeven HA, Jongsma MA, Schwab W, Bouwmeester HJ, (2003) Terpenoid metabolism in wild – type and transgenic *Arabidopsis* plants. Plant Cell 15: 2866-2884.

Baum JA, Jonasma T, Clinton W, Heck GR, Feldmann P, Ilagan O, Johnsn, S Plaetinck G, Munyikwa T, Pleau M, et al (2007) Control of cole- opteran insect pests through RNA interference. Nat Biotechnol 25: 1322-1326.

Beale MH, Birkeff MA, Bruce TJA, Chamberlain K, Field lM, Huttly AK, Martin JL, parker R, Phillips AL, Pickett JA, et al (2006) Aphid alarm pheromone produced by transgenic plants affects aphid and parasitoid behavior, proc Natl Acad Sci USA 103:10509-10513886.

Bohorova N, Frutos R, Royer M, Estanol P, Pacheco M, Rascon Q, Mclean S,Hoisington D (2001) Novel *synthetic Bacillus thuringiensis cry* 1 B gene and the *cry 1 B- cry 1 Ab* translational fusion confer resistance to south- western corn orer, sugarcane borer and fall armyworm in transgenic tropical maize. Theor Appl Genet 103: 817-826.

Bravo A, Gill SS, Soberon M (2007) Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control Toxicon 49: 423-435.

Brookes G, Barfoot P (2005) GM crops: the global economic and environ- mental impact; the first nine years 1996- 2004, AgBioForum 8:5.

Chitkowski RL, Turnipseed SG, Sullivan MJ, ridges WC (2003) Field and laboratory evaluations of transgenic cottons expressing one or two *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* Berliner proteins for management of noctuid (Lepidoptera) pests. J Econ Entomol 96: 755-762

Christou P, Capell T, Kohli A, Gatehouse JA, Gatehouse AMR (2006) Recent developments and future prospects in insect pest control in transgenic crops. Trends Plant Sci 11: 302-308.

Corbin DR, Grebenok RJ, Ohnmeiss TE, Greenplate JT, Purcell JP(2001) Expression and chloroplast targeting of cholesterol oxidase in trans- genic tobacco plants. Plant Physiol 126:1116-1128

De Cosa B, Moar W, Lee SB, Miller M, Daniell H (2001) Overexpression of the *Bt cry2Aa2* operon in chloroplasts leads to formation of insecticidal crystals . Nat Biotechnol 19:71-74.

De Maagd RA, Weemen-Hendriks M, Stiekema W, Bosch D (2000) *Bacillus thuringiensis* delta-end toxin Cry1C domain III Cari function as a spec-ificity determinant for *Spodoptera exigua* in different, but not all, Cry1-Cry1C hybrids. App1 Environ Microbiol 66:1559-1563.

Dufourmantel N, Tissot G, Goutorbe F, Garcon F, Muhr C, Jansens S, Pelissier B, Peltier G, Dubald M (2005) Generation and analsis of soybean plastid transformants expressing Bacillus thuringiensis Cry 1 Ab protoxin. Plant Mol Biol 58: 659-668.

English LH, Brussock SM, Malvar TM, Bryson JW, Kulesza CA, Walters FS, Slatin SL, Von Tersch MA, Romano C, inventors. July 3, 2003. Coleopteran – resistant transgenic plants and methods of their produc- tion. US Patent No. 7,227,056.

Fang J,Xu X, Wang P, Zhoa JZ, Shelton AM, Cheng J, Feng MG, Shen Z (2007) Characterization of chimeric *Bacillus thurigiensis* Vip3 toxins. Appl Eviron Microbiol 73: 956-961.

ffrech- Constant RH, Dowling A, Waterfield NR (2007) Insecticidal toxins from *Photorhabdus* bacteria and their potential use in agriculture. Toxicon 49:436-451.

Foissac X, Loc NT,Christou P, Gatehouse AMR, Gatehouse JA (2000) Resistance to green leafhopper (Nephotettix oirescens) and brown plant-hopper (Nilaparoata lugens) in transgenic rice expressing snowdrop lectin (Galanthus nioalis agglutinin; GNA) J. Econ Entomol 98;1357-1368.

Grainnet (2007) Monsanto and Dow Agrsciences launch "SmartStax" industry s first- ever eight- gene stacked combination in corn. Grainnet. http: // www. Grainnet. Com / (September 14, 2007)

Huang J, Hu R, Rozelle S, pray C (2005) Insect- resistant GM rice in farmerщs fields: assessing productivity and health effects in China Science 308:688-690.

Ishikawa H, Hoshino Y,Motoki Y, Kawahara T, Kitajima M, Kitami M, Watanabe A, Bravo A, Soberon M, Honda A, et al (2007) A system for the directed evolution of the insecticidal protein from *Bacillus thuringiensis* Mol Biotechnol 36: 90-101.

Kim Ys, Uefuji H, Ogita S, Sano H(2006) Transgenic toacco plants producing caffeine: a potential neww strategy for insect pest control Transgenic Res 15: 667-672.

Kota M. Daniell H, Varma S, Garczynski SF, Gould F, Moar WJ (1999) Overexpression of the *Bacillus thuringiensis (Bt)* Cry 2Aa2 protein in chloro- plasts confers resistance to plants against susceptible and *Bt*-resistant insects proc Natl Acad Sci USA 96:1840-5.

Kramer KJ, Morgan TD, Throne JE, Dowell FE, Bailey M,Howard JA(2000) Transgenic avidin maize is resistant to storage insect pests Nat Biotechnol 18: 670- 674.

Kristensen C, Morant M. Olsen CE, Ekstrom CT, Galbraith DW, Moller BL, Bak S (2005) Metabolic engineering of dhurring in transgenic *Arabidopsis* plants with marginal inadvertent effects on the metabolome and transcriptome Proc Natl Acad Sci USA 102: 1779- 1784.

Liu D, Burton S, Glancy T, Lizs, Hampton R, Meade T, Merlo DJ (2003) Plant Physiol. Vol. 146,2008 Insect resistance conferred y 283- kDa *photorhabdus luminescens* protein Tcd A in *Arabidopsis thaliana.* Nat Biotechnol 21:1222- 1228.

Liu XS, Dean DH (2006) Redesigning *Bacliius thuringiensis* Cry1Aa toxin a mosquito toxin. Protein Eng Des Sel 19:107-111.

Mao YB, Cai WJ, Wang JW, Hong GJ, Tao XY, Wang LJ, Huang YP, Chen XY (2007) Silencing a cotton bollworm P450 monoxygenase gene y plant- mediated RNAi impairs Iarval tolerance of gossypol. Nat Biotechnol 25: 1307-1313.

McBride KE, Svab, Z, Schael DJ, Hogan PS, Stalker KM, Maliga P (1995) Amplification of an insecticidal protein in tobacco. Bio/Technology 13:362-365

Mehlo L, Gahakwa D, Nghia PT, Loc NT, Capll T, Gatehouse JA, Gatehouse AMR, Christu P (2005) An alternative strategy for sustainable pest resistance in genetically enhanced crops. Proc Natl Acad Sci USA 102:7812-7816.

Moellenbeck DJ, Peters MJ, Bing JW, Rouse JR, Higgins LS, Sims L, Nevshemal T, Marshall l, Ellis RT, Bystrak PG, et al (2001)Insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis* protect corn from corn rootworms. Nat Biotechnol 19:668-672.

Morton RT, Schroeder HE, Bateman KS, Chrispeels MJ, Armstrong E, Higgins TJV (2000) Bean alpha- amylase inhibitor I, in transgenic oeas (*Pisum sativum)* provides complete protection from pea weevil (*Bruchus pisrum*) under field conditions. Proc Natl Acad Sci USA 97:3820-3825.

Murray C, Sutherland PW, Phung MM, Lester MT, Marshall RK, Christeller JT, (2002)Expression of biotin-binding proteins, avjdin and streptavidin in plant tissues using plant vacuolar targrting sequences. Transgenic Res 11:199-214.

Naimov S, Dukiandjiev S, de Maagd RA (2003) A hybrid *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin gives resistance against a coleopteran and a lepidopteran pest in transgenic potato. Plant Biotechnol J 1: 51-57.

Nature Biotechnology Editorial (2007) Another inconvenient truth . Nat Biotechnol 25:1330.

Poulsen M, Kroghssbo S, Schroder M, Wilcks A, Jacobsen H, Miller A, Frenzel T, Danier J, Rychlik M, Shu QY, et al (2007) A 90-day safety study in Wistar rats fed genetically modified rice expressing snowdrop lectin *Galanthus nioalis* (GNA). Food Chem Toxicol 45:350-363

Prescott VE, Campbell PM, Moore A, Mattes J, Rothenberg ME, Fster PS, Higgins TJV, Hogan SP, (2005) Transgenic expressuin of bean alpha-amylase inhibitor in peas results in altered structure and immunogenicety Agric Food Chem 53:9023-9030

Rajamohan F, Alzate O, Cotrill JA, Curtiss A, Dean DH, (1996) Protein engineering of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin: mutations at domain II of CrylAb enhance receptor affinity and toxicity toward gypsy moth larvae. Proc Natl Acad Sci USA 93:14338-14343.

Rao KV, Rathore kS, Hodges Tk, Fu X, Stoger E, sudhaker D, Williams S, Christou P, Bharathi M, Bowm DP, et al (1998) Expression of snowdrop lectin (GNA) in transgenic rice plants confers resistance to rice brown planthopper. Plant J 15:469-477.

Saha p, Dasgupta I, Das S (2006 b) A novel approach for developing resistance in rice against phloem limited viruses by antagonizing the phloem feeding hemipteran vectors. Plant mol Biol 62;735-752.

Saha P, Majumder P, Dutta I, Ray T, Roy SC, Das S (2006 a) Transgenic rice expressing *Allium sativum* leaf lectin with enhanced resistance against sap- sucking insect pests. Planta 223:1329-1343.

Schnee C, Kollner TG, Held M, Turlings TCJ, Gerehenzon J, Degenhardt J (2006) The products of a single maize sesquiterpene synthase form a volatile defense signal thet attracts natural enemies of maize herbivores. Proc Natl Acad Sci USA 103:1129-1134.

Shade RE, Schroeder HE , Pueyo JJ, Tabe LM, Murdock LL, Higgins TJV, Chrispeels MJ, (1994) Transgenic pea seeds expressing the alpha-amylase inhibitor of the common bean are resistant to bruchid beetles. Bio/ Technology 12:793-796.

Soberon M, Pardo-Lopez L, Lopez I, Gomez I, Tabashnik BE, Bravo A (2007) Engineering modified *Bt* toxins to counter insect resistance . Science 318:1640-1642.

Stewart SD, Adamczyk JJ, knighten KS, Davis FM (2001) Impact of *BTgiensis* Berliner on growth and survival of noctuid (Lepidoptera) larvae. J Ecom Entomol 94:752-760.

Tabashnik BE, Dennehy TJ, Carriere Y (2005) Delayed resistance to transgenic cotton in pink bollworm Proc Natl Acad Sci USA 102: 15389-15393.

Tattersall DB, Bak S,Jones PR, Olsen CE, Nielsen JK, Hansen ML, Hoj PB, Moller BL (2001) Resistance to an herbivore through engineered cyanogenic glucoside synthesis. Science 293: 1826-1828.

Toenniessen GH, O Toole JC, Devries J (2003) Advances in plant biotech-nology and its adoption in developing countries. Curr Opin Plant Biol 6: 191-198.

Vaughn T, Cavato T, Brar G, Coomber T, DeGooyer T, Ford S, Groth M, Howe A,J ohnson S, Kolacz K, et al (2005) A method of controlling corn rootworm feeding using a *Bacillus thuringiensis* protein expressed in transgenic maize. Crop Sci 45: 931-938.

Wang E, Wang R, Deparasis J, Loughrin JH, Gan S, Wagner GJ (2001) Suppression of a p 450 hydroxylase gene in plant trichome glands enhances natural-product-based aphid resistance. Nat Biotechnol 19; 371-374.

Wu SJ, Koller CN, Miller DL, Bauer LS, Dean DH (2000) Enhanced toxicity of *Bacillus thuringiensis* Cry3A delta- endotoxin in coleopterans by mutagenesis in a receptor binding loop. FEBSL Lett 473: 227-232.

Zhao JZ, Cao J, Collins HL, Bates SL, Roush RT, Earle ED, Shelton AM (2005) Concurrent use of transgenic plants expressing a single and two *Bacillus thuringiensis* genes speeds insect adaptation to pyramided plants. Proc Natl Acad Sci USA 102:8426-8430.

Zhao JZ, Cao J, Liyx, Collins HL, Roush RT, Earle ED, Shelton AM (2003) Transgenic plants expressing two *Bacillus thuringiensis* toxins delay insect resistance evolution. Nat. Biotechnol. 21:1493-1497.