

التقويم الحيوي للمورثة *Cry* المقاومة ليرقات حرشفية الأجنحة في الذرة الصفراء المحورة وراثياً

إسماعيل الدهام⁽¹⁾ * وفاتح خطيب⁽¹⁾

(1). قسم وقاية النبات، كلية الزراعة، جامعة حلب، حلب، سورية.

(*المراسلة: م. إسماعيل الدهام. البريد الإلكتروني: dhamasmay12@gmail.com)

تاريخ القبول: 2022/03/ 23

تاريخ الاستلام: 2022/02/ 11

الملخص

استخدمت الهندسة الوراثية في نقل مورثات من كائنات أخرى، بطريقة لا يمكن تحقيقها بالتربية التقليدية، وقد أدى ذلك إلى تحسين أداء النباتات في الحقل، وزيادة تحملها لبعض الإجهادات الأحيائية والأحيائية. تم عزل المورثة *Cry* من البكتريا *Bacillus thuringiensis* subsp. *Kurstaki* HD1. وهي سامة للنيماطودا، والآفات الحشرية وخاصة الأنواع التابعة لرتبة حرشفية الأجنحة، وغمدية الأجنحة، وثنائية الأجنحة والتي تسبب خسائر اقتصادية كبيرة للمحاصيل الرئيسية المزروعة حول العالم. هدفت هذه الدراسة إلى تقويم الأثر السمي للمورثة *Cry* في بعض منتجات الذرة الصفراء المنتشرة في السوق المحلية لمدينة حلب والتي تم التأكد من أنها محورة وراثياً من خلال الاختبارات الجزيئية وذلك باستخدام فراشة طحين البحر المتوسط *Ephestia kuehniella* كعائل بديل. استخدم في عملية التقويم الحيوي علب بلاستيكية مقسمة بحواجز بلاستيكية، تحوي 100 غ طحين ذرة لكل مكرر من العينات المختبرة. نقلت 20 يرقة من يرقات العمر الثاني لفراشة الطحين إلى كل علبه (مكرر)، وبمعدل ثلاثة مكررات لكل عينة، وغطيت بقطعة من الموسلين مثبتة بواسطة شريط مطاطي. حضنت العلب عند درجة حرارة 23 ± 2 °س ورطوبة نسبية 50 ± 5 %، وإضاءة (16 ساعة ضوء: 8 ساعة ظلام)، وأخذت القراءات التالية: طول العمر اليرقي، وزن اليرقات، النسبة المئوية المصححة للقتل، طول فترة التعذر، الخصوبة الجنسية للبالغات. أظهرت نتائج التحليل الإحصائي أطول فترة زمنية للعمر اليرقي الثاني وموت جميع اليرقات 100% عند تغذيتها على رقائق الذرة، وحبوب الذرة الأرجنتينية، كما سجلت انخفاضاً في وزن اليرقات وعدد البيوض التي وضعتها الحشرات التي تغذت اليرقات فيها على حبوب الذرة ومنتجاتها الغذائية المحورة وراثياً بالمقارنة مع الشاهد غير المحور وراثياً، كما لوحظ حدوث تشوهات عند الحشرة الكاملة خاصة في الأجنحة الخلفية.

الكلمات المفتاحية: تقويم حيوي، المورثة *Cry*، ذرة صفراء محورة وراثياً، فراشة طحين البحر المتوسط.

المقدمة

تشهد الثورة العلمية في عصرنا الحاضر وتيرةً متسارعةً لم يُعرف لها نظيرٌ في تاريخ البشرية، إذ فتحت أبواباً عديدة لحل الكثير من المشاكل المختلفة وأولها تلك المتعلقة بالغذاء والدواء، ففي الوقت الذي تتزايد فيه أعداد سكان الكرة الأرضية وتزداد حاجتهم للغذاء والدواء والكساء وغيرها، تنقلص مقابها الموارد الطبيعية الأرضية والمائية والنباتية والحيوانية يوماً بعد يوم نتيجةً للتدهور والتلوث الناجم عن الاستغلال المفرط، ورغم التكثيف الزراعي المتراكم من الاستخدام المتزايد لوسائل الإنتاج من الطرز الوراثية المحسنة

والإضافات السمادية وغيرها، إلا أن العجز الغذائي لا يزال قائماً، بل إن الفجوة الغذائية قد تتزايد (Ashraf et al., 2002). وقد برزت الهندسة الوراثية في أوائل سبعينيات القرن الماضي كحل للعديد من المشاكل المتعلقة بمستويات الإنتاج والجودة، إذ تهدف إلى إنتاج وتطوير أنواع نباتية مقاومة للآفات الحشرية، ومبيدات الأعشاب، والممرضات الفطرية والبكتيرية والفيروسية، ومتحملة للعديد من الإجهادات اللاحيائية كالحرارة والبرودة والملوحة والمعادن الثقيلة وغيرها (Glass and Jessica, 2017). تعتمد هذه التقنية على نقل مورثة أو أكثر من كائنات قد لا توجد بينها أي قرابة وراثية إلى الكائن المراد تحسينه وراثياً وقد أُطلق على الكائنات التي تم تعديل مجينها بهذه الطريقة اسم الكائنات المحورة وراثياً (Genetically Modified Organisms (GMO) Atherton,) (2002; Kamthan et al., 2016; Griffiths et al., 2005).

تم اعتماد زراعة المحاصيل المحورة وراثياً بشكل متسارع بين الدول المتقدمة والنامية على حد سواء. فقد زادت المساحة العالمية المزروعة بالمحاصيل المحورة وراثياً من 1.7 مليون هكتار عام 1996 إلى 190.4 مليون هكتار عام 2019. وُزعت هذه المساحة في 29 دولة (24 دولة نامية +5 دول صناعية)، يأتي في مقدمتها الولايات المتحدة الأمريكية (71.5 مليون هكتار)، تليها البرازيل (52.8 مليون هكتار) والأرجنتين (24 مليون هكتار) وكندا (12.5 مليون هكتار) والهند (11.9 مليون هكتار)، وتشكل هذه الدول مساحة قدرها 172.7 مليون هكتار، ونسبة 91 % من إجمالي المساحة المزروعة بالمحاصيل المحورة وراثياً حول العالم، بالإضافة إلى 44 دولة لا تزرع محاصيل محورة وراثياً ولكنها تسمح باستهلاك منتجاتها، (ISAAA, 2019).

تتصدر الذرة الصفراء وفول الصويا والقطن والخردل الزيتي (الكانولا) قائمة المحاصيل المحورة وراثياً وتشكل نسبة 99% من إجمالي المحاصيل المحورة وراثياً حول العالم، وتعد صفة المقاومة لمبيدات الأعشاب herbicide resistance من أهم الصفات التي تم نقلها للمحاصيل المحورة وراثياً، وتشكل مساحة 88.7 مليون هكتار بنسبة 47% من المساحة المزروعة، تليها الصفات المكدسة stacked traits التي تحمل فيها النباتات صفة المقاومة للحشرات ولمبيدات الأعشاب؛ حيث تشكل مساحة 77.7 مليون هكتار بنسبة 41% من المساحة المزروعة، وأخيراً صفة المقاومة للحشرات insect resistance حيث تشكل مساحة 23.3 مليون هكتار بنسبة 12% من المساحة المزروعة بالمحاصيل المحورة وراثياً (James, 2017).

يعد محصول الذرة الصفراء (*Zea mays* L.) واحداً من أهم المحاصيل الغذائية والعلفية، ومحاصيل إنتاج الطاقة والبروتين في جميع أنحاء العالم (Reeves et al., 2016)، كما يعد غذاءً رئيسياً للعديد من سكان العالم (Camacho and Caraballo,) (1994)، وهو من المحاصيل غير المكلفة اقتصادياً (Fapri, 2003) والتي تساهم في الحد من الجوع (Babaleye and Menkir,) (2006). يتبع نبات الذرة الصفراء للعائلة النجيلية *Poaceae* والقبيلة *Maydeae* والجنس *Zea* والنوع *mayz*. وهو نبات عشبي حولي منفصل الجنس، أحادي المسكن (Akbar et al., 2008)، ونظراً لانتشاره الواسع أُطلق عليه اسم ملك النجيليات (Massey) (2009 and Warsi). وهو محصول خطي التلقيح نتيجة انفصال أعضائه المذكرة عن المؤنثة. تزرع الذرة الصفراء في عروتين ربيعية وتكثيفية (Abendroth and Elmore, 2007c)، وتمتد الزراعة من 6-8 أسابيع (Abendroth and Elmore, 2007a). يتعرض محصول الذرة الصفراء للإصابة بالعديد من الآفات الحشرية محدثةً له خسائر كبيرة في الغلة (كماً ونوعاً)، وتكون هذه الخسائر على مستوى الحقل، والمخزن (Ristanovic, 2001). ومن أهم الآفات الحشرية التي تصيب محصول الذرة الصفراء هي الآفات التابعة لرتبة حرشفية وغمدية وثنائية الأجنحة ومن أهمها حفار ساق الذرة الأوربي والمتوسطي، ديدان اللوز، الديدان السلوكية، حشرات المن، خنافس الحبوب، وحشرات السوس، وفراشة الطحين (Meissle et al., 2010). تعتمد استراتيجيات مكافحة المتبعة في السيطرة على هذه الآفات على استخدام المبيدات الحشرية الكيميائية، وقد أدى الاستخدام العشوائي والمتكرر لتلك المبيدات إلى

تطور صفة المقاومة في العديد من الآفات الحشرية (Sayed and Wright, 2006)، وظهور آفات ثانوية جديدة وانتشارها بشكل وبائي، بالإضافة إلى مشاكل التلوث البيئي، وتراكم المواد السامة في النظام البيئي الطبيعي. زادت المساحة العالمية المزروعة بالذرة الصفراء المحورة وراثياً حيث بلغت 60.9 مليون هكتار وتشكل نسبة 32% من إجمالي المساحة المزروعة بالذرة الصفراء في جميع انحاء العالم (ISAAA, 2019).

توجد عدة سلالات من الذرة الصفراء المحورة وراثياً عرف منها ما يقارب الـ 18 سلالة؛ غالبية هذه السلالات تحمل صفة المقاومة للحشرات عن طريق إدخال المورثة *cry* إلى جينوم النبات. تعد السلالتان Mon810, Bt176 من أهم الأصناف التي تم تطويرها بغرض مقاومة حشرة حفار ساق الذرة الأوربي وانتشرت زراعتها في أوروبا، وقد اكتسبت صفة المقاومة من خلال نقل المورثة *CryIA(b)*. يستخدم مع الصنف Mon810 حاث من النوع P35S والذي يضمن تعبيراً مستمراً للمورثة خلال فترة طويلة من موسم النمو وفي جميع الأنسجة النباتية (Archer et al., 2000). في حين يستخدم مع الصنف Bt176 نوعان من الحاثات الأولى يضمن تعبير المورثة فقط في الأنسجة الخضراء، والآخر في حبوب الطلع (Estruch et al., 1997).

تم عزل المورثة *Cry* من البكتريا *Bacillus thuringiensis* subsp. *Kurstaki* HD1 (Jain et al., 2017)، تشفر هذه المورثة لسموم داخلية δ -endotoxins في النبات المحور وراثياً، وهي سامة للنيماتودا (*Cry3A, Cry6A, Cry12A, Cry13A*)، والآفات الحشرية وخاصة الأنواع التابعة لرتبة حرشفية الأجنحة (*Cry1A, Cry1B, Cry1C, Cry1H, Cry2A*)، وغمدية الأجنحة (*Cry3A, Cry6A*)، وثنائية الأجنحة (*Cry10A, Cry11A*)، والتي تسبب خسائر اقتصادية كبيرة للمحاصيل الرئيسية المزروعة حول العالم ومن أهمها نذكر: دودة الحشد (*Spodoptera frugiperda*)، حفار ساق الذرة الأوربي (*Ostrinia nubilalis*)، ديدان الذرة (*Helicoverpa zea*)، دودة لوز القطن الأمريكية (*Helicoverpa armigera*)، دودة براعم التبغ (*Heliothis virescens*)، خنفساء الكولورادو على البطاطا (*Leptinotarsa decemlineata*) (Roh et al., 2007)، في حين أنها غير سامة للآفات غير المستهدفة والأعداء الحيوية الطبيعية (Romeis et al., 2019). يظهر أثر المورثة *Cry* في الآفات المستهدفة من خلال تغذيتها على ساق وأوراق النباتات المحورة والحاوية على السموم البلورية التي تنتجها البكتريا *B. thuringiensis* وكذلك في حبوب وكيهان الذرة والتي يتم استهلاكها من قبل الإنسان والحيوان (Koch et al., 2015). عرف إلى الآن حوالي 321 نوعاً من أنواع المورثة *Cry* (*Cry1- Cry51*)، وذلك تبعاً لدرجة التشابه في التتالي النكليوتيدي (Kati et al., 2007). قسمت المورثات *Cry* المسؤولة عن تشكيل السموم البلورية في البكتريا *B. thuringiensis* إلى أربع مجموعات وذلك حسب وزنها الجزيئي، والرتبة الحشرية التي تتأثر بها، *A, B, C, ...* وهي: *Cry I*، وزنها الجزيئي 130-140 كيلو دالتون وهي متخصصة على يرقات رتبة حرشفية الأجنحة، *Cry II*، وزنها الجزيئي 65 كيلو دالتون وهي متخصصة على يرقات رتبة ثنائية الأجنحة، *Cry III*، وزنها الجزيئي 72 كيلو دالتون وهي متخصصة على يرقات رتبة غمدية الأجنحة، *Cry IV*، وزنها الجزيئي 27 كيلو دالتون وهي متخصصة على يرقات رتبة ثنائية الأجنحة.

كما قسمت كل مجموعة منها إلى صفوف ثانوية فرعية بلغ عددها حوالي 70 مجموعة فرعية (Adang et al., 2014)، ومع ذلك فإن مجموعة فرعية صغيرة واحدة فقط قد تم عزلها من البكتريا *B. thuringiensis* عام 2017، حيث تشير التقارير إلى أن أكثر من 100 مليون هكتار من المحاصيل المحورة وراثياً تحوي على مورثات البكتريا *B. thuringiensis* (ISAAA, 2017). تتوضع تلك المورثات على بلازميدات نقالة، حيث يمكنها أن تنتقل أثناء الاقتران البكتيري بين سلالات البكتريا Bt أو بينها وبين الأنواع القريبة منها (Höfte and Whiteley, 1989).

أظهر (Maeda et al., 2000) وجود علاقة بين الفعالية وشكل البلورات السامة فالبروتينات السامة لرتبة حرشفية الأجنحة تشكل بلورات هرمية الشكل أما البروتينات السامة لرتبة ثنائية الأجنحة فهي تشكل بلورات كروية الشكل، أما البروتينات السامة لرتبة غمدية الأجنحة فهي تشكل بلورات بيضاوية الشكل، فبعد تناول البروتين البلوري الذي تنتجه البكتريا *B. thuringiensis* من قبل الحشرة ينحل هذا البروتين ليهاجم بطانة القناة الهضمية (Meeusen and Warren, 1989). حيث تتوقف الحشرة عن التغذية خلال عدة ساعات، ويتحطم جدار القناة الهضمية، وتتحلل خلايا الجسم خلال 24 ساعة (Soberon et al., 2009). تعد المورثة *Cry1A(b)* واحدة من أوائل المورثات التي جذبت الاهتمام لاستخدامها في التحوير الوراثي من خلال تأثيرها في يرقات حرشفية الأجنحة (Meeusen and Warren, 1989)، وخاصة حفار ساق الذرة الأوروبي، حيث تم إدخالها في مجين عدة سلالات من الذرة الصفراء المحورة وراثياً ومن أهمها *Mon810, Bt-176* (Bruderer and Leitner, 2003).

هدف البحث

إجراء تقويم حيوي لعدد من منتجات الذرة الصفراء في السوق المحلية باستخدام فراشة طحين البحر المتوسط *Ephestia kuehniella* كعائل بديل.

مواد البحث وطرائقه

مكان تنفيذ البحث: تم إجراء اختبارات هذا البحث في مختبر أبحاث وقاية النبات في كلية الهندسة الزراعة بجامعة حلب في عام 2021.

1. جمع العينات وتحضيرها

استخدمت 8 عينات من منتجات الذرة المحلية في عملية التقويم الحيوي للمورثة *cry* تم التأكد من أنها محورة وراثياً من خلال الاختبارات الجزيئية، وذلك بالمقارنة مع عينة ذرة محلية (سلمية -1) كشاهد (الجدول 1).

الجدول (1): عينات حبوب الذرة ومنتجاتها التي جمعت من السوق المحلية في مدينة حلب

رقم العينة	نوع العينة
1	منتجات ذرة (رقائق)
2	منتجات ذرة (رقائق)
3	منتجات ذرة (رقائق الذرة)
4	طحين ذرة
5	طحين ذرة
6	طحين ذرة
7	حبوب ذرة أوربية
8	حبوب ذرة أرجنتينية
9	حبوب ذرة محلية (سلمية-1)

2. التربية المخبرية لفراشة طحين البحر المتوسط (*Ephestia kuehniella* (Zeller)

تم الحصول على بيوض حديثة الفقس لفراشة طحين البحر المتوسط (*Ephestia kuehniella* (Zeller) (Pyralidae: Lepidoptera)، من مركز الأعداء الحيوية، مديرية زراعة حماه. وضعت البيوض في أطباق بتري تحوي طحين حبوب ذرة غير محورة وراثياً. حضنت الأطباق عند درجة حرارة 23 ± 2 °س ورطوبة نسبية 50 ± 5 %، وإضاءة (16 ساعة ضوء: 8 ساعة ظلام).

تمت عملية المراقبة الدورية للأطباق حتى بدء فقس البيض وظهور اليرقات، حيث يستدل على بدء ظهور يرقات العمر الأول من خلال الخيوط الحريرية التي تنسجها تلك اليرقات حول نفسها حتى قبل البدء بعملية التغذية، (Hansen and Jensen, 2002).

3. التقويم الحيوي

حضرت العينات بطحنها بواسطة خلاط كهربائي، ومن ثم نخلت على منخل ناعم للحصول على الطحين من العينات المدروسة. استخدم في عملية التقويم الحيوي علب بلاستيكية أبعادها (10 × 10 × 5 سم)، مقسمة بحواجز بلاستيكية، تحوي 100 غ طحين ذرة لكل مكرر من العينات المختبرة. نقلت 20 يرقة من يرقات العمر الثاني إلى كل علبة (مكرر)، وبمعدل ثلاثة مكررات لكل عينة، وغطيت بقطعة من الموسلين مثبتة بواسطة شريط مطاطي بحيث تسمح بالتهوية وتمنع خروج اليرقات.

حضنت العلب عند درجة حرارة 23 ± 2 °س ورطوبة نسبية 50 ± 5 %، وإضاءة (16 ساعة ضوء: 8 ساعة ظلام)، نقلت يرقتان (ذكر وأنثى)، إلى علب جديدة وضعت فيها قطعة كرتونية بشكل زكزاك لكي تتعذر عليها، واستمرت عملية المراقبة الدورية حتى التزاوج ووضع البيض (Moghaddassi et al., 2019).

صممت التجربة وفق التصميم كامل العشوائية، وحللت النتائج إحصائياً باستخدام برنامج الـ (R) لتحليل التباين عند مستوى معنوية 1%، وحساب معامل الاختلاف وأقل فرق معنوي عند مستوى معنوية 5%.

تم خلال التجربة أخذ القراءات التالية:

- طول العمر اليرقي
- وزن اليرقات
- عدد اليرقات الميئة في الأعمار اليرقية الخمسة
- النسبة المئوية المصححة للقتل والتي تم حسابها وفق معادلة (Abbot, 1925):

$$\% \text{ للنسبة المئوية المصححة للقتل} = \frac{\% \text{ للقتل في المعاملة} - \% \text{ للقتل في الشاهد}}{100 - \% \text{ للقتل في الشاهد}}$$

- طول فترة التعذر
 - الخصوبة الجنسية للبالغات
- النتائج والمناقشة**

1. النسبة المئوية المصححة للقتل:

أظهرت نتائج التحليل الإحصائي وجود فروق معنوية عالية ($P < 0.01$) في النسبة المئوية المصححة للموت عند اليرقات. بلغت نسبة القتل المصححة عند يرقات العمر اليرقي الثاني 100% في عينة رقائق الذرة (العينة 2)، وعينة حبوب الذرة (العينة 8)، وكان هناك فروق معنوية بينها وبين باقي العينات من منتجات الذرة (العينة 1 و 3)، وطحين الذرة (العينات 4، 5، 6)، وحبوب الذرة (العينة 7). كما ماتت جميع يرقات العمر اليرقي الثالث المتبقية من العينة (1)، والتي تغذت على منتجات الذرة، وكان هناك فروقاً معنوية في نسبة القتل بينها وبين عينة منتجات الذرة الأخرى (العينة 3). استمرت اليرقات التي غذيت على العينات (3، 4، 5، 6، 7) حتى العمر اليرقي الخامس، وكان هناك فروقاً معنوية في النسبة المئوية المصححة للقتل بين عينة منتجات الذرة (العينة 3) وعينات الطحين (العينات 4، 5، 6)، وعينة حبوب الذرة (العينة 7) في العمر اليرقي الثاني والثالث والرابع حيث بلغت نسبة القتل 67.61، 63.62، 63.62%، على التوالي. كما سجلت نسبة قتل بين يرقات العمر اليرقي الثاني والثالث والرابع والخامس التي تغذت على طحين الذرة (العينات 4، 5، 6)، وعلى حبوب الذرة بعد طحنها (العينة 7) والتي سجل عليها أعلى نسبة قتل على يرقات العمر اليرقي الثاني حيث بلغت 35.08%، ولكن دون أن يكون هناك أي فروق معنوية في نسبة القتل المصححة بين هذه العينات وعند جميع الأعمار المدروسة (الجدول 2).

الجدول (2): النسبة المئوية المصححة لموت يرقات فراشة طحين البحر المتوسط. *Ephestia kuehniella* (Zeller).

النسبة المئوية المصححة للموت %					رقم العينة
جميع الأعمار اليرقية	العمر اليرقي الخامس	العمر اليرقي الرابع	العمر اليرقي الثالث	العمر اليرقي الثاني	
100 ^a ± 0.00	nd	nd	100 ^a ± 0.00	70.17 ^b ± 9.9	1
100 ^a ± 0.00	nd	nd	Nd	100 ^a ± 0.00	2
81.99 ^a ± 18.5	16.48 ^a ± 0.00	63.62 ^a ± 38.5	67.61 ^b ± 24.1	59.64 ^b ± 15.1	3
46.42 ^b ± 21.0	21.27 ^a ± 6.0	13.88 ^b ± 9.7	29.18 ^c ± 19.0	24.56 ^c ± 10.8	4
51.18 ^b ± 13.5	24.57 ^a ± 11.7	17.85 ^b ± 9.0	31.36 ^c ± 13.6	33.33 ^c ± 6.8	5
47.75 ^b ± 14.3	17.15 ^a ± 4.1	20.20 ^b ± 11.8	19.74 ^c ± 7.4	29.82 ^c ± 6.8	6
54.68 ^b ± 13.8	17.15 ^a ± 8.4	24.92 ^b ± 3.7	23.85 ^c ± 6.5	35.08 ^c ± 6.8	7
100 ^a ± 0.00	nd	nd	Nd	100 ^a ± 0.00	8
L.S.D = 24.99	L.S.D = 23.02	L.S.D = 44.43	L.S.D = 43.27	L.S.D = 23.99	

2. طول العمر اليرقي

تباين طول العمر اليرقي عند تغذية اليرقات على منتجات وحبوب الذرة المطحونة بشكل معنوي ($P < 0.01$) بالمقارنة مع الشاهد غير المعدل وراثياً. سجلت أطول فترة زمنية للعمر اليرقي الثاني عند اليرقات التي تغذت وماتت في هذا الطور (العينتين 3 و 2)، أو استمرت حتى العمر اليرقي الثالث (العينة 1)، وبفروق معنوية فيما بينها من جهة، وبينها وبين باقي العينات من جهة أخرى حيث بلغ متوسط طول العمر اليرقي الثاني فيها 19 و 14 و 11.67 يوماً، على التوالي. بشكل عام ازداد طول العمر اليرقي الثالث والرابع والخامس وبفروق معنوية بين اليرقات التي تغذت على طحين ذرة معدلة وراثياً بالمقارنة مع الشاهد، ويستثنى منها العمر اليرقي الثاني (للعينات 6 و 7)، والعمر اليرقي الرابع (للعينة 4)، والعمر اليرقي الخامس (للعينة 7). استمر عدد من اليرقات في التغذية على العينات (3، 4، 5، 6، 7) المعدلة وراثياً، وعينة صنف الذرة غير المعدل وراثياً (العينة 9) حتى العمر اليرقي الخامس. تباين متوسط مجموع أطوال الأعمار اليرقية المدروسة بين العمر اليرقي الثاني والخامس، إذ تراوح بين 32 - 46.06 يوماً على العينات المعدلة وراثياً، بالمقارنة مع الشاهد غير المعدل حيث بلغ 25 يوماً فقط (الجدول 3).

الجدول (3): متوسط طول العمر اليرقي عند يرقات فراشة طحين البحر المتوسط عند تغذيتها على منتجات ذرة معدلة وراثياً

متوسط طول العمر اليرقي (يوم)					رقم العينة
جميع الأعمار اليرقية	العمر الخامس	العمر الرابع	العمر الثالث	العمر الثاني	
46.06	11.198 ^a ± 0.00	12.633 ^a ± 1.50	12.56 ^b ± 0.50	9.67 ^d ± 0.94	3
32 ^a ± 0.816	8.33 ^b ± 1.25	8.33 ^{ce} ± 0.47	8.33 ^c ± 0.47	7 ^e ± 0.82	4
35 ^a ± 2.45	9.33 ^b ± 0.47	10 ^{bc} ± 0.82	8.33 ^c ± 1.25	7.33 ^e ± 0.48	5
33 ^a ± 0.816	8.33 ^b ± 0.47	10.33 ^b ± 0.47	8.33 ^c ± 0.50	6 ^{ef} ± 0.00	6
33.67 ^a ± 0.417	8 ^{bc} ± 0.00	10 ^{bcd} ± 0.00	9.33 ^c ± 0.48	6.33 ^{ef} ± 0.50	7
25 ^b ± 0.00	6 ^c ± 0.00	7 ^e ± 0.00	5 ^d ± 0.00	5 ^f ± 0.00	9
LSD = 4.35	LSD = 2.29	LSD = 2.38	LSD = 2.06	LSD = 1.8	

3. طول فترة التعذر والخصوبة

أظهرت النتائج وجود فروق معنوية ($pr < 0.01$)، بين طول فترة التعذر لليرقات التي تغذت على العينات المعدلة وراثياً من حبوب ومنتجات الذرة (العينات 3، 4، 5، 6، 7)؛ إذ تراوحت بين 8 - 9.67 يوماً، بالمقارنة مع الشاهد (العينة 9)، حيث بلغت 6 أيام فقط. كما أظهرت النتائج انخفاضاً معنوياً ($pr < 0.01$) في عدد البيوض التي وضعتها الحشرات التي تغذت اليرقات فيها على حبوب ومنتجات الذرة المعدلة وراثياً (العينات 3، 4، 5، 6، 7)، إذ تراوح متوسط عدد البيوض التي وضعتها بين 104.7 - 143.3 بيضة، بالمقارنة مع الشاهد غير المعدل وراثياً حيث وضعت الفراشات 203 بيضة (الجدول 4).

الجدول (4): متوسط طول فترة التعذر وخصوبة الإناث عند تغذيتها على منتجات ذرة معدلة وراثياً

رقم العينة	طول فترة التعذر (يوم)	الخصوبة (بيضة)
3	8.93 ^{ab} ± 0.00	119.3 ^{bc} ± 0.00
4	8 ^b ± 0.50	143.3 ^b ± 19.00
5	8 ^b ± 0.50	119 ^{bc} ± 8.53
6	9.67 ^a ± 0.85	104.7 ^c ± 6.55
7	9 ^{ab} ± 0.50	101.3 ^c ± 15.20
9	6 ^c ± 1.50	203 ^a ± 44.58
	LSD = 1.54	LSD = 50.58

كما أظهرت النتائج حدوث تشوهات عند الحشرة الكاملة خاصة في الأجنحة الخلفية.

وزن اليرقة

أدت تغذية يرقات فراشة طحين البحر المتوسط على منتجات الذرة المعدلة وراثياً إلى خفض أوزان اليرقات في جميع الأعمار اليرقية المدروسة وبفروق معنوية ($P < 0.01$) بالمقارنة مع الشاهد غير المعدل وراثياً. حيث تراوح وزن اليرقة في العمر اليرقي الثاني بين 0.43 - 0.77 مغ، وفي العمر اليرقي الثالث بين 1.47 - 2.27 مغ، وفي العمر اليرقي الرابع بين 2.8 - 3.8 مغ، وفي العمر اليرقي الخامس بين 12.67 - 14.47 مغ، في حين بلغ متوسط أوزان اليرقات عند الشاهد غير المعدل وراثياً 1.07 و 2.8 و 4.67 و 18 مغ، على التوالي (الجدول 5).

الجدول (5): متوسط وزن يرقة فراشة طحين البحر المتوسط عند تغذيتها على منتجات ذرة معدلة وراثياً

رقم العينة	متوسط وزن اليرقة / مغ			
	العمر الثاني	العمر الثالث	العمر الرابع	العمر الخامس
1	0.43 ^e ± 0.00	1.47 ^d ± 0.00	nd	nd
2	0.53 ^{de} ± 0.00	Nd	nd	nd
3	0.53 ^{bde} ± 0.00	1.73 ^{cd} ± 0.00	2.80 ^c ± 0.00	12.67 ^c ± 0.00
4	0.77 ^b ± 0.00	2.20 ^{bc} ± 0.00	3.8 ^b ± 1.0	14.47 ^b ± 1.0
5	0.67 ^{bcd} ± 0.00	2.13 ^{bc} ± 0.00	3.23 ^{bc} ± 0.00	13.57 ^{bc} ± 0.00
6	0.77 ^{bc} ± 0.00	2.27 ^b ± 0.00	3.77 ^b ± 0.00	14.2 ^b ± 0.00
7	0.7 ^{bcd} ± 0.00	2.13 ^{bc} ± 0.00	3.57 ^{bc} ± 0.00	14.4 ^b ± 0.00
8	0.67 ^{bcd} ± 0.00	Nd	nd	nd
9	1.07 ^a ± 0.00	2.8 ^a ± 0.00	4.67 ^a ± 0.00	18 ^a ± 0.00
	LSD = 0.29	LSD = 0.67	LSD = 1.07	LSD = 1.44

المناقشة

أظهرت نتائج التقويم الحيوي لحبوب ومنتجات الذرة المختبرة، وقد يعزى تباين نسبة القتل بين اليرقات في العينات المختلفة إلى تباين نسبة البروتين السام في العينات المختبرة، حيث تموت خلال فترة قصيرة عند توفر تراكيز مرتفعة من هذا البروتين. تبقى تراكيز بروتين المورثة *cry* أعلى في الأنسجة الخضراء (9.35 مغ من البروتين لكل غرام من الأوراق الطازجة)، منها في الحبوب الجافة والتي تقدر في هذه الأخيرة بالميكروغرامات (0.31 مغ من البروتين لكل غرام من الحبوب) (Horner et al., 2003)، أضف إلى ذلك أن حبوب الذرة المستخدمة عادة في تصنيع المنتجات غالباً ما تكون حبوب خليطة، ومن مصادر مختلفة، أي بمعنى آخر قد تكون خليط من بذور معدلة وغير معدلة وراثياً مما يتيح الفرصة لمتابعة بعض اليرقات تغذيتها حتى اكتمال نموها، وقد ينعكس ذلك على مؤشرات حيوية أخرى كوزن اليرقة وطول العمر اليرقي وخصوبة الحشرات الكاملة أو شكلها الظاهري، وهذا لا يتعارض مع كون الحبوب أو المنتجات التي اختبرت تم تأكيدها على أنها معدلة وراثياً بواسطة الـ PCR حيث أن هذا الاختبار نوعي وليس كمي

حیث یمكن من خلاله تعریف العینة بأنها معدلة وراثياً ولو بنسبة ضئيلة أو كانت معدلة بنسبة 100%، الأمر الذی یتطلب إجراء تقدیر كمي لنسبة التعديل الوراثی بواسطة التفاعل التسلسلی للبولیمیراز بالزمن الحقیقی Real time PCR، أو تقدیر لكمیة البروتین السام فی وزن محدد من طحین العینات المدروسة. كما أثرت التراكیز غیر القاتلة من المورثة *Cry* فی عدد المؤشرات المدروسة حیث ازداد طول العمر الیرقی، وطول فترة التعذر وانخفض وزن الیرقات، والخصوبة عند الإناث، وتطورت بعض الحشرات بشكل مشوه وهذا یتوافق مع ما ذكره (Mulla and Singh, 1991) حول التشوهات الخلقیة التي تحدث فی الیرقات الحیة والعداری وحتى الحشرات الكاملة عند معاملتها بتراكیز غیر قاتلة من المورثة *Cry*.

أظهرت النتائج التي توصل إليها (Eizaguirre et al; 2005) أن تعریض یرقات *Sesamia nonagrioides* لجرعات غیر قاتلة (0.35, 0.035) مع/كغ من المورثة (*cry1Ac, cry1Aa, cry1Ab, cry2*) أدت إلى ارتفاع النسبة المئوية المصححة للقتل وبطء فی نمو الیرقات وتطورها.

كما أظهرت النتائج التي توصل إليها (Kannan and Uthamasamy, 2006) أن تعریض یرقات *Helicoverpa armigera* لجرعات غیر قاتلة (0.071, 0.119) مع/مل من المورثة *cry1Ac* أدت إلى انخفاض الخصوبة الجنسیة لدى البالغات وزيادة فی عدد الحشرات المشوهة.

أشارت النتائج التي توصل إليها (Perez-Hedo et al, 2011) أن تعریض یرقات *Sesamia nonagrioides* لجرعات غیر قاتلة (0.35, 0.9, 2) مع/كغ من المورثة *cry1Ab* أدت إلى زيادة نسبة هرمون الشباب والذی أدى إلى زيادة فی طول العمر الیرقی.

كما أشارت النتائج التي توصل إليها (Paola et al; 2014) أن تعریض یرقات *Chlosyne lacinia* لجرعات غیر قاتلة 100, (2.0) نانوغرام/مل من المورثة *cry1Ac* أدت إلى ارتفاع النسبة المئوية المصححة للقتل وبطء فی نمو الیرقات وتطورها. أوضحت النتائج التي توصل إليها (Rabelo et al; 2020) أن تعریض یرقات *Spodoptera cosmioides* لجرعات غیر قاتلة (10000, 853.4, 1132.1) > نانوغرام/سم² من المورثة (*cry1Ac, cry1Fa, cry2Aa*) أدت إلى تثبیط النمو وإطالة فترة العمر الیرقی.

كما أوضحت النتائج التي توصل إليها (Motta et al:2021) انخفاض وزن یرقات *Spodoptera frugiperda* المعاملة بجرعات غیر قاتلة (2000, 3200, 5120) ng cm⁻² مع/سم من المورثة (*cry1Ac, cry1Aa, cry1Ab*) بالمقارنة مع الیرقات غیر المعاملة.

الإستنتاجات

- إمكانية استخدام الحبوب والمنتجات الغذائیة للذرة الصفراء فی عملية التقویم الحیوی للمورثات المنقولة عن طریق التحویر الوراثی.
- أثرت المورثة *cry* على حیاتیة فراشة طحین البحر المتوسط وتجلی ذلك من خلال ارتفاع النسبة المئوية للموت
- ازدياد طول دورة الحیاة وفترة التعذر، وانخفاض وزن الیرقات والخصوبة الجنسیة عند تغذی الیرقات على تراكیز غیر قاتلة.

المقترحات والتوصیات

- التقدير الكمي لنسبة التعديل الوراثي بواسطة التفاعل التسلسلي للبوليميراز بالزمن الحقيقي Real time PCR، أو تقدير لكمية البروتين السام.
- تقويم دور المورثة Cry1A(b) المنقولة إلى الذرة الصفراء في مكافحة حشرات المواد المخزونة من رتب حشرية أخرى مث غمدية الأجنحة.

المراجع:

- Abendroth, L., Elmore, R. 2007a. Corn seeding rates and variable rate seeding. Department of agronomy, Iowa State University. 9 April 2007, U.S.A, ICM-498 (5) p: 110-111.
- Abendroth, L., Elmore, R. 2007c. Tri-model planting date for corn. Department of agronomy, Iowa State University. 18 Jun 2007, U.S.A. ICM-498 (15) p:182-184.
- Adang, M.J., Crickmore, N. and Jurat-Fuentes, J.L. 2014. Diversity of *Bacillus thuringiensis* crystal toxins and mechanism of action. In: Dhadialla, T.S., Gill, S.S. (Eds.), *Adv. Insect Physiol.* 47. Elsevier Academic Press, Waltham, MA, pp. 39–87.
- Akbar, M., Saleem, M., Azhar, M. F., Ashraf, Y. M. and Ahmad, R. 2008. Combining ability analysis in maize under normal and high temperature conditions. *Journal of Agricultural Research* 46 (1): 27-38.
- Archer, T. L., Schuster, G., Patrick, C., Cronholm, G., Bynum, E. D. and Morrison, W. P. 2000. Whorl and stalk damage by European and Southwestern corn borers to four events of *Bacillus thuringiensis* transgenic maize. *Crop Prot.* 19, 181-190.
- Ashraf, H., EL-Shafey, Y.H., EL-Siphy, O.M. AND Madkour, M.A. 2002. Highly efficient régénération via somatic embryogenesis from immature embryos of two Egyptian wheat cultivars (*Triticum durum*). Conférence internationale sur les biotechnologies et le développement durable (voix du Sud et du Nord) Alexandrie, Egypt du 16 au 20 mars 2002.
- Atherton, K.T. 2002. Safety assessment of genetically modified crops. *Toxicology.* 181 : 421-426. DOI : 10.1016/ S0300-483X (02)00485-7.
- Babaleye, T. and Menkir, A. 2006. A global platform for agrobiodiversity research, Genflow, A publication about Agricultural Biodiversity, *Biodiversity International.* Rome, Italy. p: 54.
- Bruderer, S. and Leitner, K. 2003. Genetically Modified Crops: molecular and regulatory details. Agency BATS, Switzerland. July 2003. Portable Document Format. Available from Internet: <http://www.bats.ch/gmo-watch/GVO-report140703.pdf>.
- Camacho, R. G. and Caraballo, D. F. 1994. Evaluation of morphological characteristics in Venezuelan maize (*Zea mays* L.) genotypes under drought stress. *Scientia Agricola Piracicaba.* Brazil, v.51, no.3.
- Eizaguirre, M., Tort, S., Lopez, C. and Albajes, R. 2005. Effects of sublethal concentrations of *Bacillus thuringiensis* on larval development of *Sesamia nonagrioides*. *Journal of Economic Entomology* 98:464-470.
- Ephestia kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae). *J. Econ. Entomol.* 95 (1), 50e56.
- Estruch, J. J., Carozzi, N. B., Desai, N., Warren, G. W., Duck, N. B. and Koziel, M. G. 1997. The expression of a synthetic CryIA(b) gene in transgenic maize confers resistance to European corn borer. In CIMMYT, 1997: Insect resistant maize, recent advances and utilization. In: J. Mihm. (ed.), *Insect resistant maize, recent advances and utilization.* Proc. Int. Symp. on Methodologies for Developing Host Plant Resistance to Maize Insects, CIMMYT, Mexico, 27 Nov.-3 Dec. 1994, 172-174. CIMMYT, Mexico DF.

- FAPRI. 2003. US and World Agricultural Outlook. Food and Agricultural Policy Research Institute. U.S.A. Ames. *Iowa State University*.
- Glass, S., Jessica, F. 2017. Genetic modification Technology for nutrition and improving diets : An ethical perspective. *Current Opinions in Biotechnology*. 44: 46-51.
- Hansen, L.S. and Jensen, K.M. 2002. Effect of temperature on parasitism and host feeding of *Trichogramma turkestanica* (Hymenoptera: trichogrammatidae) on
- Höfte, H. and Whiteley, H. R. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Rev.*, 53, 242-255.
- ISAAA. 2017. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops in 2017: Biotech Crop Adoption Surges as Economic Benefits Accumulate in 22 Years
- ISAAA. 2019. Global Status of Commercialized/Biotech GM Crops in 2019: Biotech Crops Drive Socio-Economic Development and Sustainable Environment in the New Frontier.
- Jain D., Sunda, S. D., Sanadhya, S., Nath, D. J., and Khandelwal, S. K. 2017. Molecular characterization and PCR-based screening of cry genes from *Bacillus thuringiensis* strains. 3 *Biotech*, 7 (1), 1–8. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0583-7>.
- James, C. 2017. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops. ISAAA Brief No. 53. ISAAA: Ithaca, NY.
- Kannan, M., Uthamasamiy, S. 2006. Effects of Sublethal Doses of *Bacillus thuringiensis* δ -Endoprotein Cry1Ac on the Developmental Performance of the Cotton Bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hübner). *Biopesticides International* 2:51-59.
- Kati, V., Foufopoulos, J., Ioannidis, Y., *et al.* 2007. Diversity, ecological structure and conservation of herpetofauna in a Mediterranean area (Dadia National Park, Greece). *Amphib-Reptil*, 28: 517-529.
- Koch, M.S., Ward, J.M., Levine, S.L., Baum, J.A., Vicini, J.L. and Hammond, B.G. 2015. The food and environmental safety of Bt crops. *Front. Plant Sci.* 6, 283.
- Massey, P., and Warsi, M.Z.K. 2009. Influence of nitrogen and excess soil moisture stress on yield of maize inbreds and their hybrids. *Journal Maize Genetics Cooperation* 83.
- Meeusen, R. L. and Warren, G. 1989. Insect control with genetically engineered crops. *Ann. Rev. Entomol.* 34, 373-381.
- Meissle, M., Mouron, P., Musa, T., Bigler, F., Pons, X. and Vasileiadis, V.P. 2010. Pests, pesticide use and alternative options in European maize production: current status and future prospects. *J Appl Entomol* 134: 357–375.
- Moghaddassi, Y., Ashouri, A., Bandani, A.R., Leppla, N.C. and Shirk, P.D. 2019. Effect of *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae) Larval Diet on Egg Quality and Parasitism by *Trichogramma brassicae* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Journal of Insect Science*, 19(4): 10; 1–7
- Motta, A.C.Q., Polanczyk, R.A. and Dias, N. P. 2021. Sublethal effects of *Bacillus thuringiensis* Berliner in *spodoptera frugiperda* (J.E.smith) (Lepidoptera: Noctuidae). UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA- UNESP CAMPUS JABOTIC ABAL. 2021. 116P.
- Paula, D.P., Andow, D.A., Timbó, R.V., Sujii, E.R., Pires, C.S. and Fontes, E.M. 2014 Uptake and transfer of a Bt protein by a Lepidoptera to its eggs and effects on its offspring. *PloS One* 9:1-7.

- Pérez-Hedo, M., Albajes, R. and Eizaguirre, M. 2011. Modification of hormonal balance in larvae of the corn borer *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera: Noctuidae) due to sublethal *Bacillus thuringiensis* protein ingestion. *Journal of Economic Entomology* 104:853-861.
- Rabelo, M.M., Matos, J.M.L., Orozco-Restrepo, S.M., Paula-Moraes, S.V. and Pereira, E. J. G. 2020b. Like Parents, Like Offspring? Susceptibility to Bt Proteins, Development on Dual-Gene Bt Cotton, and Parental Effect of Cry1Ac on a Nontarget Lepidopteran Pest. *Journal of Economic Entomology* 113:1234-1242.
- Reeves, T.G., Thomas, G., and Ramsa, Y.G. 2016. Save and grow in practice: maize, rice and wheat. *A guide to sustainable cereal production*, 1stedn. FAO, Rome
- Ristanovic, D. 2001. Maize *Zea Mays* L. In: R. Raemaekers, ed. (2001). *Crop Production in Tropical Africa*. Directorate General for International Co-operation, Ministry of Foreign Affairs, External Trade and International Co-operation, Brussels, Belgium, pp: 23-45. [Excellent overview of growth and production conditions of tropical crops in Africa, including maize; this paper includes photos 1, 3 and 4 taken over in this paper].
- Roh, J.Y., Choi, J.Y., Li, M.S., Jin, B.R. and Je, Y.H. 2007. *Bacillus thuringiensis* as a specific, safe, and effective tool for insect pest control. *J. Microbiol. Biotechnol.* 17, 547–559.
- Romeis, J., Naranjo, S. E., Meissle, M. and Shelton, A. M. 2019. Genetically engineered crops help support conservation biological control. *Biol. Control* 130: 136–154.
- Sahin, B., Gomis-Cebolla, J., Günes, H. and Ferré, J. 2018. Characterization of *Bacillus thuringiensis* isolates by their insecticidal activity and their production of Cry and Vip3 proteins. *PLoS ONE*, 13(11), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206813>.
- Sayyed, A.H. and Wright, D.J. 2006. Genetics and evidence for an esterase-associated mechanism of resistance to indoxacarb in a field population of diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). *Pest Manage. Sci.* 62:10451051.
- Soberón, M., Gill, S.S. and Bravo, A. 2009. Signaling versus punching hole: how do *Bacillus thuringiensis* toxins kill insect midgut cells? *Cell. Mol. Life Sci.* 66, 1337–1349.
- Horner, T.A., Dively, G.P. and Herbert, D.A. 2003. Effects of MON810 Bt field corn on adult emergence of *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Econ. Entomol.* 96, 925–930.

Bioassay of Lepidopteran larvae resistance *Cry* gene in transgenic zea mays

Esmail Al Daham^{*(1)} and Fateh Khatib⁽¹⁾

(1). Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Aleppo University
(*corresponding author: Esmail Al Daham E-Mail: dhamasmayl2@gmail.com).

Received: 11/02/2022

Accepted: 23/03/2022

Abstract

Genetic engineering has been used to transfer genes from other organisms, in a way that cannot be achieved by conventional breeding, and has improved the performance of plants in the field, increasing their tolerance to certain biological and abiotic stresses. The *Cry* gene has been isolated from *Bacillus thuringiensis* subsp. Kurstaki HD1. It is toxic to nematode, insect pests, especially species of the order Lepidoptera, Coleoptera, and Diptera, which cause significant economic losses to major crops grown around the world. This study aimed to evaluate the toxic effect of *Cry* gene in some maize products spread in the local market of Aleppo city that have been shown to be transgenic through molecular tests using a Mediterranean flour butterfly as an alternative host. Plastic cans divided with plastic barriers, containing 100 g of corn flour per replicate, were used in the bioassay. The second instars were transferred to the boxes (replicates), twenty larva each and the sample was repeated for three times. The boxes were covered with a piece of muslin and fixed with a rubber band. The boxes were incubated at a temperature of 23 ± 2 °C, relative humidity $50 \pm 5\%$, illumination (16 h light: 8 h dark), and the following readings were taken: larval longevity, larval weight, corrected kill percentage, length of pupal period, and the sexual fecundity for adults. The results of the statistical analysis showed that the longest period of time for the second larval life and the death of all larva 100% when fed on corn flakes and Argentine corn kernels. It also recorded a decrease in larvae weight and the number of eggs laid by insects whose larvae fed on corn grain and its genetically modified food products comparing to the control (non-transgenic flour). Deformations were observed on the whole insect, especially on the hind wings.

Key words: Bioassay, *Cry* gene, transgenic maize, Mediterranean flour butterfly