مجله پژوهش‌های پنبه ایران
جلد نهم، شماره اول، ۱۴۰۰
۱۰۹-۱۲۴
www.jcri.ir

ارزیابی آزمایشگاهی و میدانی مقاومت دو لاین وارداتی پنبه تراریخته مقاوم به آفت کرم غوزه پنبه

محمودجوکار[1*]، قربانعلی روشنی[1]، سیدجلال میرقاسمی[1] و بهزاد قره یاضی[2]
[1]موسسه تحقیقات پنبه کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، گرگان، ایران
[2] پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۰/۱۸ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱/۳۰

چکیده

سابقه و هدف: پنبه یک گیاه مهم صنعتی است که هرساله مورد حمله آفات متعدد به ویژه کرم غوزه پنبه Helicoverpa armigera (Lep.Noctuidae) قرار می‌گیرد. در این تحقیق، آزمایش‌های میدانی و زیست‌سنجی آزمایشگاهی (دیسک برگ) برای ارزیابی مقاومت دو لاین با شماره ۳۷۰۱ و ۱۵۲۴ در مقایسه با رقم شاهد (گلستان) با حفظ شرایط قرنطینه‌ای اینچه‌برون در قالب طرح کاملاً تصادفی در ۳ تکرار اجرا شد.

مواد و روش ها: به‌منظور بررسی میزان سمیت گوارشی توکسین در ارقام تراریخته پنبه نسبت به شاهد، آزمایش‌های زیست‌سنجی توسط روش دیسک برگ انجام گرفت. هر تیمار ۱۵ عدد لارو سن سوم در داخل لیوان‌های یکبار مصرف مفروش شده با کاغذ صافی و از غوزه تازه به عنوان غذا استفاد شده و نمونه‌برداری و آماربرداری روزانه به مدت پنج روز متوالی انجام شد. اثر تیمارهای مختلف بر درصد مرگ و میر اصلاح شده لاروها، از آنالیز واریانس داده‌های تکرار شونده The Repeated Measurements ANOVA توسط نرم افزار SPSS23 استفاده شد.

یافته ها: در بررسی‌های مزرعه، ۱۵ عدد لارو همسن شده (سن سوم) بصورت جداگانه با سه تکرار بر روی شاخه زایای جانبی (دارای غوزه‌های ابتدای فصل) در داخل قفس پلاستیکی با تهویه مناسب رها شدند (۴۵ قفس برای هر لاین در هر تکرار). درصدهای مرگ و میر با فرمول هندرسون و تیلتون اصلاح و مقایسه میانگین‌ها توسط آنالیز واریانس یک طرفه با آزمون Tukey HSD در سطح ۵ درصد توسط نرم افزار SPSS 23 انجام پذیرفت.

نتیجه گیری کلی: بررسی حاضر نشان داد که لاروهای سن سه (همسن شده) در شرایط مزرعه‌ای با تغذیه از دو رقم تراریخته بعد از هفت روز، ۰/۰۱ ± ۷۱ درصد در لاین ۳۷۰۱ و ۰/۰۲± ۶۷ درصد در لاین ۱۵۲۴،

*نویسنده مسئول: m.jokar@areeo.ac.ir

مرگ و میر نشان دادند که این مقدار در رقم شاهد ۰/۰۲± ۵۹ درصد محاسبه شد. تفاوت معنی‌داری در سطح ۰/۰۵ بین دو لاین تراریخته (در یک گروه) و رقم شاهد مشاهده شد. نتایج حاکی از رابطه‌ای مثبت و معنی‌دار بین درصد مرگ و میر نرمال شده لاروها و ارقام تراریخته است (R2=۸۸/۱). نتایج زیست‌سنجی در آزمایشگاه با روش دیسک برگی توسط روش نمونه‌برداری‌های مکرر به‌طور روزانه انجام شد. نتایج تجزیه واریانس نمونه برداری مکرر در مورد تاثیر سری زمانی بر روی مرگ و میر لاروهای همسن کرم غوزه پنبه در روش دیسک برگی و همچنین اثر برهمکنش زمان در رقم تفاوت معنی‌داری را نشان داد. ارقام تراریخته نسبت به شاهد بالاترین نرخ مرگ و میر آماری را ایجاد نمودند با این حال دو لاین تراریخته در ایجاد مرگ و میر با یکدیگر تفاوت معنی‌داری نداشتند. طبق نتایج آزمایشگاهی علیرغم عدم مشاهده تفاوت معنی‌دار در میزان مرگ و میر لاروها در روز دوم اما تاثیر سم دلتا اندوتوکسین و شروع روند مسمومیت از روز دوم بود. نتایج حاصله از تجزیه و تحلیل داده‌ها طی سال زراعی ۱۳۹۸ نشان داد که لاین‌های تراریخته نسبت به رقم شاهد منطقه (گلستان) درکنترل آفت کرم غوزه برتری داشتند. از طرفی بررسی میزان کارایی لاین‌های تراریخته در مبارزه با آفت کرم غوزه پنبه کنترل کنندگی بسیار بالایی را چه در سطح مزرعه و چه در زیست‌سنجی آزمایشگاهی نشان داد. زمان اثر سم کریستاله در طی پنج روز حداکثر تاثیر را نشان داد اما مسمومیت از روز سوم شروع به تظاهر کرد.

واژه‌های کلیدی: ارقام تراریخته پنبه ، توکسین کریستالی، کرم غوزه پنبه

مقدمه و بررسی منابع

پنبه یک گیاه مهم لیفی و روغنی در ایران و جهان است که سالانه میلیون‌ها هکتار از آن در سراسر دنیا کشت می‌شود. کشورهایی چون هند، چین و ایالات متحده آمریکا بیشترین مزارع کشت این گیاه صنعتی را به خود اختصاص داده اند. حدود ۳۱ درصد از خسارت وارده به این محصول، ناشی از آفات برآورد شده است (اگبوتا و همکاران، ۲۰۱۷). از همین‌رو، استفاده از حشره‌کش‌های شیمیایی به منظور کنترل آفات در جهت کاهش خسارت آفات مهم پنبه در طول فصل رشد امری متداول و پرتکرار است که این نیز خود علاوه بر هزینه‌های گزاف، اثرات بسیار نامطلوبی بر سلامت عمومی دارد (توحیدی‌فر و همکاران، ۲۰۰۸؛ نارنجو، ۲۰۰۵).

در ایران نیز کشت پنبه در استان‌های گلستان، مازندران، منطقه‌ی مغان استان اردبیل، استان فارس، استان خراسان و خوزستان انجام می‌گیرد (عالیشاه و سیدمعصومی، ۱۳۹۵). از مهمترین آفات این محصول، کرم غوزه پنبه *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) (Hübner) می‌باشد که خسارت قابل توجهی به این محصول راهبردی وارد می‌سازد. این آفت کلیدی با پراکنش وسیع جهانی که دارد (تایی و همکاران، ۲۰۱۳) و لاروهای پلی‌فاژ آفت علاوه بر پنبه، از بسیاری محصولات

دیگر از جمله بقـولات، سـورگوم، ذرت و گوجـه فرنگـی تغذیـه مـی‌کننـد (سـالم و شـکوری، ۲۰۱۷). کشاورزان نه تنها در ایران بلکه در سراسر دنیا برای کنترل این آفت، به آفت‌کش‌های شیمیایی وابسـته می‌باشند (ژایی و همکاران، ۲۰۱۶).

استفاده مکرر از آفت‌کش‌ها نه تنها سبب افزایش مخاطرات زیست محیطی بوده بلکـه سـبب ایجـاد درجاتی از مقاومت در آفت هدف نیز شده است که این خود به معضلی جدید بـرای کشـاورزان تبـدیل گشته است (اشتیاق و سالم،۲۰۱۱). دانشمندان با مهندسی ژنتیک، پـروتئین‌هـای مختلفـی و ژن‌هـای رمزکننده آنها که دارای فعالیت حشره‌کشی هستند را شناسایی و با روش‌های انتقال ژن را به گیاهـان هدف نظیر پنبه و سایر گیاهان منتقل می‌کنند. باکتری *Bacillus thuringiensis* یکی از معـروف‌تـرین نمونه‌های مهندسی ژنتیک است که می‌تواند برای توسعه مقاومت به حشرات استفاده شود. ژن‌های دلتا اندوتوکسین باکتری Bt را به ژنوم گیاهان زراعی انتقال داده و این گیاهان علاوه بر ساخت پروتئین‌های کد شده ژنوم خود، پروتئین‌های کریستالی Cry با خاصیت حشره‌کشی در نسوج خود تولید مـی‌نماینـد (وی و همکاران، ۲۰۱۷).

پروتئین‌های کریستالی Bt باعث بروز فلج در معده میـانی، تغییـر نفوذپـذیری و از هـم گسـیختگی اپیتلیوم گوارشی در لاروها شده، لاروها بی‌تحرک و بدون تغذیه مانده و سـه یـا چهـار روز بعـد از بـین می‌روند (گیل و همکاران، ۱۹۹۲). محصولات دستکاری شده ژنتیکی براساس Bt در کـل بـیش از ۹۶۱ میلیون هکتار را در سراسر جهان در بر می‌گیرند. اولین گیاهان Bt علیه آفـاتی از خـانواده بالپولکـداران مهندسی شده بودند و امروز سایر محصولات Bt علیه سـایر آفـات نیـز طراحـی شـده اسـت (کـاریبر و همکاران،۲۰۰۳). در دنیا همواره به محصولات دسـتکاری شـده ژنتیکـی مقـاوم بـه حشـرات (GMO)، به‌عنوان جایگزین ارقام تجاری که مقاوم به کرم غوزه می‌باشند توجه شـده اسـت (عظیمـی و همکـاران ۱۳۹۷). پنبه تراریخته و یا Bt در کشورهای آمریکا و چین نتایج بسیار مثبتی در کنترل دو آفـت کـرم غوزه پنبه و کرم سرخ پنبه داشته و سهم مصرف سم را بسیار کاهش داده اسـت (عظیمـی و همکـاران ۱۳۹۷). پنبه تراریخته پتانسیل مناسبی برای کنتـرل کـرم غـوزه پنبـه کـه بـه بسـیاری از گـروه‌هـای حشره‌کش‌های متداول از جمله فسفره‌های آلی، کاربامات‌ها، پایروتروئیدها و سیکلودین‌هـا مقـاوم شـده است، دارد (گاسمان و هوتیچیسون، ۲۰۱۲).

تحقیقات بسیاری در کارایی استفاده از پنبه‌های تراریخته در مقابله با آفت کـرم غـوزه پنبـه سـطح دنیا انجام شده و درحال اجرا است. احمد و همکاران (۲۰۱۹) وضعیت مقاومت و کـارایی ژن Cry1Ac در ارقام تراریخته به آفت کرم غوزه پنبه را با جمع آوری لاروها از ۲۶ نقطه (۲۵ نقطه ارقام تراریخته و یک نقطه غیر تراریخته) از سراسر پاکستان با تکنیک دیسک برگ در آزمایشگاه بررسی کردند و تفاوت معنی‌داری را در منـاطق مختلـف و قسـمت‌هـای مختلـف گیـاه مشـاهده نمودنـد. در آزمـایش‌هـای

زیست‌سنجی LD_{50} و LD_{95} به‌ترتیب ۰/۶۲ و ۱/۵۹ میلیگرم بر گرم وزن برگ تازه بود. براساس نتایج احمد و همکاران در سال ۲۰۱۹ اگرچه پنبه‌های تراریخته توانسته با همبستگی بالا (r=۰/۸۴) سبب ایجاد مرگ و میر گردد اما اگر فقط ژن دلتاتوکسین محدود به Cry1Ac گردد کارآیی ارقام مقاوم بشدت کاهش خواهد یافت. در پژوهشی دیگر در کشور چین کارایی ارقام تراریخته در کنترل کرم غوزه پنبه با پایشی در بین سال‌های ۲۰۰۸ تا ۲۰۱۵ در ۱۹۷ مزرعه کشت شده با ارقام تراریخته در ۴۲ نقطه از سه استان هبی،شاندونگ و هنان در شمال چین بررسی شد. نتایج زیست‌سنجی بالاترین میزان مرگ و میر در لاروهای نسل دوم نسبت به نسل سوم و چهارم کرم غوزه پنبه را نشان داد (لو و همکاران، ۲۰۱۸). در پژوهش دیگر در کشور استرالیا سطح بیان ژن‌های Cry1Ac وCry2Ab در رقم تجاری پنبه تراریخته Bollgard II® بررسی گردید (بهار و همکاران، ۲۰۱۹). در بررسی‌های مزرعه‌ای پراکنش و زندمانی نسل اول کرم غوزه پنبه بر روی رقم Bollgard II® و غیرتراریخته صورت گرفت. در براساس نتایج گزارش شده زنده‌مانی لاروها روی رقم تراریخته بلگراد۲ و رقم غیر تراریخته با گذشت ۶ روز، به‌ترتیب ۱ و ۳۱ درصد بود (بهار و همکاران، ۲۰۱۹). در مورد بروز مقاومت در ارقام تراریخته گزارش‌های متعددی شده است، بیشترین مقاومت در مورد ژن Cry1A است (تابانیشیک و همکاران، ۲۰۰۳) که با استفاده از چندین ژن و استفاده از پروتین‌های مختلف مقاومت را به تاخیر انداخت. در یک پژوهش استفاده از رقم تراریخته شده کوکر۳۱۰ همراه با ژن Cry2AX1 توانست در آزمایشات مزرعه ای ۵۶/۶۶ درصد مرگ و میر لاروها را نسبت به رقم غیرتراریخته افزایش داد (داهیویا و همکاران، ۲۰۱۶).

هدف از این پژوهش ارزیابی دو لاین پنبه تراریخته به شماره‌های ۳۷۰۱ و ۱۵۲۴ در مقایسه با رقم شاهد غیرتراریخته تجاری گلستان بود. نظر به رعایت اصول حفاظتی و قرنطینه‌ای این طرح به صورت مزرعه‌ای در منطقه‌ای کاملا محصور شده انجام گرفت. سپس میزان مرگ‌ومیر لاروهای همسن در طول فصل زراعی محاسبه و با نمونه‌برداری‌های مکرر در کرت‌های آزمایشی، فرض اصلی این تحقیق، که آیا لاروهای رها شده بر روی دو لاین Bt، با گذشت زمان دچار اختلال در تغذیه و به دنبال آن عدم تکمیل سیکل زندگی خود و مرگ خواهند شد، بررسی گردید.

مواد و روش‌ها

پرورش کرم غوزه: به منظور انجام روش دیسک‌برگ و تشکیل جمعیت کرم غوزه پنبه در انسکتاریوم موسسه تحقیقات پنبه کشور، لاروهای سنین مختلف و شب‌پره‌ها از غوزه‌های پنبه و تله‌های فرمونی در طول فصل زراعی جمع‌آوری شد. در کلنی، لاروها با غذای مصنوعی (آسمی و همکاران، ۲۰۱۲) (۲۵۰ گرم پودر لوبیا چشم بلبلی، ۳۰ گرم پودر جوانه گندم، ۳۵ گرم مخمر نانوایی، ۱۳ گرم آگار، ۳/۵ گرم ویتامین C، ۲/۵ گرم نیپاژین، ۱/۱ اسید سوربیک، ۲/۵ میلی‌لیتر فرمالدئید، ۵ میلی‌لیتر روغن کلزا

بدون آنتی‌اکسیدان و ۶۵۰ میلی لیتر آب مقطر) تغذیه و در دمای ۱±۲۵ درجه سانتی‌گراد، رطوبت اتاقک رشد ۵±۵۵ درصد و دوره روشنایی و تاریکی ۱۶:۸ ساعت نگهداری شدند. لاروهای سنین یک تا سه به صورت دسته جمعی روی غذای مصنوعی پرورش داده شدند. از سن سه، به دلیل هم‌خواری لاروها در ظروف انفرادی پرورش داده شدند. پس از ظهور حشرات کامل به ظروف تخم‌گیری منتقل شده و دهانه ظروف با توری پوشانده شد. به منظور تغذیه حشرات کامل از آب عسل ۲۰ درصد استفاده شد. توری‌های ظروف تخم‌گیری به صورت روزانه تعویض شده و تا تفریخ تخم‌ها نگهداری شدند.

کشت ارقام پنبه: ۳۰۰ مترمربع از حدود چهار هکتار از مزرعه محصور شده کشتارگاه اینچه‌برون جهت حفظ شرایط قرنطینه‌ای و ایمنی‌زیستی انتخاب شد. تسطیح خاک و دفع مکانیکی علف‌های هرز قبل از کاشت صورت گرفت. پس از تهیه بستر مناسب بذر دو لاین تراریخته B.t و رقم تجاری گلستان متعلق به گونه‌ی *Gossypium hirsutum* L. در نیمه دوم اردیبهشت به صورت سه قطعه نواری (۸×۱۰ متر با فاصله ۱/۵ متر) کشت شدند.. با توجه به آزمون خاک و عدم شیب در کرت انتخابی، آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی در سال ۱۳۹۸ انجام گرفت. نصب تله‌ها بر روی بوته‌های پنبه بطور تصادفی صورت پذیرفت. کاشت بذرها توسط ردیف‌کار در الگوی (۲۰ در ۸۰ سانتی‌متر) و آبیاری طبق اصول متداول در منطقه انجام پذیرفت. عملیات داشت شامل وجین، تنک و آبیاری در طول فصل طبق دستورالعمل فنی زراعت پنبه انجام و در مراحل بعد در کرت‌های آزمایشی آلوده به شته و کنه تارعنکبوتی، تنها یکبار از سموم مکنده‌کش و کنه‌کش استفاده گردید.

تاثیر پنبه تراریخته بر بیولوژی کرم غوزه پنبه

آزمایش‌های مزرعه‌ای: به منظور بررسی میزان مقاومت دو لاین پنبه تراریخته دربرابر کرم غوزه پنبه و مقایسه آن با پنبه غیرتراریخته شاهد منطقه رقم گلستان، ۱۵ عدد لارو همسن شده (سن سوم) بصورت جداگانه با سه تکرار بر روی شاخه زایای جانبی (دارای غوزه‌های ابتدای فصل) در داخل قفس پلاستیکی رها شد (۴۵ قفس برای هر لاین در هر تکرار). جنس قفس‌ها استوانه‌ای از ورقه‌های شفاف پلکس‌گلس به طول ۲۱ سانتی‌متر با دهانه ۱۲ سانتی‌متر همراه با دریچه‌های جانبی و دو انتها پوشیده شده با تور بود. تعداد لاروهای رهاسازی شده مرده در هر تیمار و تکرار با بازدیدهای هفتگی (به‌مدت سه هفته) ثبت شد. داده‌های مربوط به درصد مرگ و میر از دامنه صفر تا ۱۰۰ درصد در صورت عدم نرمالیته با فرمول شماره (۱) نرمال شد. نظر به، در صورت مشاهده مرگ و میر در شاهد، درصدهای مرگ و میر با فرمول هندرسون و تیلتون اصلاح شد (هندرسون و تیلتون، ۱۹۵۵) مقایسه میانگین‌ها توسط آنالیز واریانس یک طرفه با آزمون Tukey HSD در سطح ۵ درصد توسط نرم‌افزار SPSS 23 انجام پذیرفت.

فرمول(۱) $$\text{Arcsin}\sqrt{\frac{x+1}{2}}$$

زیست سنجی آزمایشگاهی: بمنظور بررسی میزان سمیت گوارشی توکسین در ارقام تراریخته پنبه نسبت به شاهد، آزمایش‌های زیست‌سنجی توسط روش دیسک‌برگ انجام گرفت (وانگ و همکاران، ۲۰۱۷). برای هر تیمار ۱۵ عدد لارو همسن سوم را در داخل لیوان‌های یکبار مصرف مفروش شده با کاغذ صافی قرار داده شد. از غوزه تازه به عنوان غذا استفاد شده و نمونه‌برداری و آماربرداری روزانه به مدت پنج روز انجام شد. تمایز زنده و مرده بودن لاروها توسط تماس خودکار و مشاهده پاسخ دهی آنها بود. لاروهای آماس‌کرده و بی‌تحرک جز نمونه‌های مرده طبقه‌بندی شده و لاروها در صورت داشتن تحرک یا فرار در اثر تماس، زنده فرض شدند. بررسی نرمال بودن داده‌ها بر اساس آزمون شاپیرو-ویلک یا آزمون کولموگروف-اسمیرنوف انجام گرفت و در صورت عدم نرمال بودن از روش تغییر داده کاکس-باکس استفاده شد. داده‌های تبدیل شده برای بررسی اثر تغذیه لاروها از گیاهان تراریخته و شاهد برای تحلیل به‌کار گرفته شد. برای بررسی اثر تیمارهای مختلف بر درصد مرگ و میر اصلاح شده، لاروهای همسن کرم غوزه پنبه، از آنالیز واریانس داده‌های تکرار شونده The Repeated Measurements ANOVA توسط نرم افزار ®spss استفاده شد (اسلام و چودرو، ۲۰۱۷)

نتایج و بحث

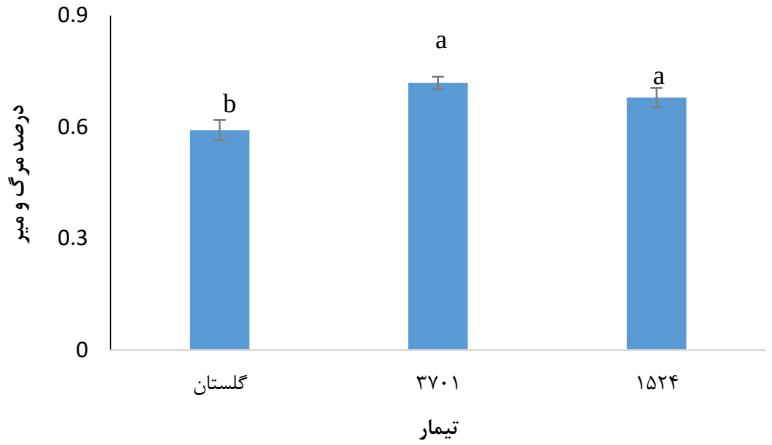
بررسی اثر پنبه تراریخته بر درصد مرگ و میر لارو کرم غوزه پنبه در شرایط مزرعه ای: بررسی حاضر نشان داد که لاروهای سن سه (همسن شده) در شرایط مزرعه‌ای با تغذیه از دو رقم تراریخته بعد از هفت روز، ۰/۰۱±۷۱ درصد در لاین ۳۷۰۱ و ۰/۰۲ ± ۶۷ درصد در لاین ۱۵۲۴، مرگ و میر نشان دادند که این مقدار در رقم شاهد ۰/۰۲± ۵۹ درصد محاسبه شد. نتایج گروه بندی در آزمون توکی در سطح ۰/۰۵ کاملاً معنی‌دار بود (df=8 F-value=22.02 , P-value=0.002) (جدول ۱و شکل۱). با گذشت هفت روز، تفاوت معنی‌دار مرگ و میر در درون قفس‌های نصب شده در مزرعه بین دو لاین تراریخته (در یک گروه معناداری) و رقم شاهد مشاهده شد که رابطه‌ای تنگاتنگی بین درصد مرگ و میر نرمال شده و ارقام تراریخته درمدل ایجاد شده وجود داشت (R^2=۸۸/۱٪). با توجه نتایج حاضر کاملاً میزان مرگ و میر لاروها با ارقام تراریخته رابطه تنگاتنگ داشت که با نتایج با احمد و همکاران (۲۰۱۹) همسویی دارد. علایم مرگ‌ومیر به صورت لاروهای متورم شده بی‌حرکت و یا ترکیده و یا خشک شده بود. در رقم غیر تراریخته (گلستان) لاروها دوره نشو نمای طبیعی خود را طی نموده و

به سنین بالاتر لاروی رسیده و نهایتا درون قفس به شفیره تبدیل شدند. بخشی از مرگ و میر مشاهده شده در رقم شاهد ناشی از سایر عوامل نظیر: تغییرات دما، رطوبت و سایر عوامل غیر زیستی بوده که در هنگام انتقال لارو به بوته در درون قفس صورت گرفته است. برای اصلاح در صد مرگ و میر در تیمار با توجه به اینکه نصب قفس‌ها در مزرعه از پراکنش یکنواخت تبعیت نموده بود (به صورت خانه‌های شطرنجی در کرت‌های تصادفی نصب شده بود) از رابطه هندرسون-تیلتون برای اصلاح درصد مرگ و میر استفاده شد. گذشت هفت روز، یک زمان بسیار مناسب براساس فیزیولوژی حشره است که تاثیر کریستاله پروتئین‌ها را به وضوح نشان می‌دهد. براساس مطالعات پایه‌ای که توسط گیل و همکاران در سال در سال ۱۹۹۲ انجام پذیرفت، مورد استناد همه محققین است (سوبرون و همکاران، ۲۰۱۶). این زمان بسیار مطلوب برای سنجش میزان مرگ‌ومیر خواهد بود. به سبب داشتن توری‌ها با مش ریز و دوجداره، هجوم زنبورهای پارازیتوئید غیر ممکن است. ارزیابی‌های اخیر با نتایج تحقیقاتی عظیمی و همکاران در سال ۱۳۹۵ برروی پنبه همسویی داشت. محقق مذکور مرگ و میر ۰/۰۲±۶۸ درصد را بر روی لاین تراریخته ثبت نموده و که در رقم شاهد درصد مرگ و میر حدود ۶ درصد بود. میزان بالاتر مرگ‌ومیر در تیمار شاهد در پژوهش حاضر، ممکن است به سبب درجه حرارت بالا در فصل زراعی سال ۹۷ بوده که سبب شوک دمایی به آفات در هنگام انتقال شده باشد. دما همواره ازجمله شاخص غیر زیستی بوده که تاثیر زیادی هم در نرخ بقا و هم نرخ زادآوری داشته است (میروندیس و سولوتانی، ۲۰۱۰). نظر به تحقیقات انجام شده در سراسر دنیا حول محور تاثیرات ارقام تراریخته بر فرآیندهای تغذیه در لارو شب‌پره‌ها، به‌طور کلی پنبه تراریخته با اثرات نامطلوب در روند رشد و نمو و بازدارندگی از تغذیه، بیشترین تاثیر خود را درسنین اول لاروی می‌گذارد (داسیلوا و همکاران، ۲۰۱۸). انتخاب لارو سن سوم نیز بر این اساس بوده که حساسیت سنین ابتدایی حذف گردد تا مرگ و میر در لاروها با اعتبارسنجی بالا مرتبط با اثر تغذیه باشد. لارو سن سوم، با بالاترین میزان مقاومت به محصولات تراریخته Bt در انجام مطالعات زیست‌سنجی همواره مورد توجه است (دورادو و همکاران، ۲۰۱۶). عدم مشاهده میزان مرگ ومیر تمامی لاروها، می‌تواند به دلیل بیان کم پروتئین باکتری در گیاهان تراریخته، ویا حساسیت پایین لاروهای کرم غوزه پنبه به علت تفاوت‌های فیزیولوژیک بین لاروها باشد (عبدا... و همکاران، ۲۰۱۵).

جدول ۱- بررسی تفاوت ارقام مختلف در ایجاد مرگ ومیر لاروهای کرم غوزه پنبه

منابع	درجه آزادی	میانگین مربعات	F
تیمارها (ارقام)	۲	۱۲۶/۴۹**	۲۲/۳۶
خطا	۶	۵/۶۷۵	
کل	۸		

**: تفاوت بسیار معنی‌دار در سطح ۱ درصد



شکل ۱- میزان مرگ و میر لاروهای سن سه بر روی ارقام مختلف پنبه (ازمون توکی در سطح ۹۵درصد)

آزمایشات زیست سنجی دیسک برگ در شرایط آزمایشگاهی: در این روش برای اثبات نتایج مزرعه‌ای، زیست‌سنجی در آزمایشگاه با روش دیسک‌برگی انجام شد. با توجه به اجرای نمونه‌برداری‌های مکرر به‌طور روزانه ، آنالیز واریانس داده‌های تکرار شونده در این آزمایش قدرت تفکیک زمانی را در کنار مقایسه ارقام مختلف را به صورت همزمان در اختیار قرار داد.

به‌منظور مقایسه تفاوت ارقام مختلف در میزان مرگ‌ومیر لاروهای سن سوم کرم غوزه در پنج روز متوالی، در ابتدا فرض نرمال بودن داده‌ها توسط آزمون کولموگروف-اسمیرنوف بررسی شد و از روش کاکس-باکس برای تبدیل داده‌ها استفاده شد. همچنین واگرایی واریانس‌ها توسط آزمون کرویت موچلی بررسی شد. نتایج این آزمون نشان داد که در متغیر رقم، فرض کرویت رد نشده و نیاز به تعدیل در درجات آزادی آزمون Repeated measures ANOVA نیست (جدول ۲). با توجه به مقدار اپسیلون که کمتر از ۰/۷۵ شده است بایستی از آزمون Greenhouse-Geisser استفاده شود.

منظور از فرض کرویت در انالیز واریانس اندازه گیری‌های مکرر، این است که واریانس اختلاف مشاهدات در هر دو مرحله از مراحل مطالعه یکسان باشد. به‌عبارت دیگر همبستگی مشاهدات هر زوج حالت دلخواه با یکدیگر برابر باشد. چنانچه آزمون ماچولی (Mauchly) معنی‌دار باشد به معنی آن است که فرض کرویت مارتیس واریانس کواریانس مشاهدات برقرار نیست. به عبارت دیگر واریانس اختلافات مراحل مختلف با یکدیگر برابر نیستند. در صورتی که فرض کرویت برقرار نباشد لازم است از آزمون‌های

Greenhouse-Geisser و Huynh- Feldt و استفاده نمود. در این آزمون درجات آزادی آماره F در ضریب اپسیلون ضرب و تعدیل می گردد. در آزمون حاضر چون دو رقم تراریخته دارای رفتار مساوی در روند مسمویت بودند در آزمون کرویت روند مشابه نشان داده و فرض کرویت رد برقرار است. به عبارت دیگر فرض برابری بین میانگین درصد و مرگ و میر در طول زمان برای دو لاین تراریخته رد نشده است که نشان از همسوی دو لاین تراریخته در ایجاد مرگ ومیر نسبت به شاهد غیر تراریخته است.

جدول ۲- نتایج آزمون موچلی برای بررسی فرض کرویت

عامل	آماره ماچولی Mauchly W	مجذور کای تقریبی	df	p-value	Epsilon
زمان	۰/۰۹۸	۱۰/۲۷۳	۹	۰/۳۶۹	۰/۵۵۳

جدول ۳- نتایج آزمون Repeated measures ANOVA برای مقایسه تاثیر سری زمانی در پنج نوبت نمونه برداری مکرر روزانه

منابع	df	میانگین مجذور	F	p-value
زمان	۲/۲۲۶	۳۱۳/۳۲۰**	۸۹۹/۱۸۵	۰/۰۰
زمان*رقم	۴/۴۵۲	۳۲/۴۲۱**	۹۳/۰۴۳	۰/۰۰
خطا (زمان)	۱۳/۳۵۶	۰/۳۴۸		

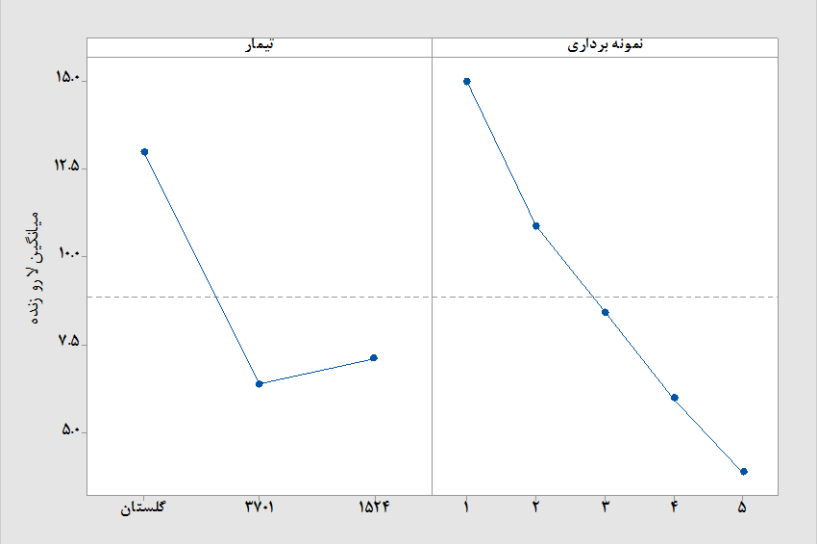
**: تفاوت بسیار معنی دار در سطح ۱ درصد

نتایج تجزیه واریانس نمونه برداری مکرر در مورد تاثیر سری زمانی بر روی مرگ و میر لاروهای همسن کرم غوزه پنبه در روش دیسک برگی و همچنین اثر برهمکنش زمان در رقم تفاوت معنی‌داری را نشان داد (جدول ۳). اثرات تیمارهای تراریخته بر نرخ مرگ و میر لاروهای همسن شده (سن سه) در ارقام مختلف و سری زمانی نشان داد که ارقام تراریخته نسبت به شاهد بالاترین نرخ مرگ و میر آماری را ایجاد نمودند (جدول ۴). با این‌حال دو لاین تراریخته در ایجاد مرگ‌ومیر با یکدیگر تفاوت معنی‌داری نداشتند (شکل۲).

جدول۴- نتایج آزمون Repeated measures ANOVA برای مقایسه تاثیر ارقام مختلف با گذشت زمان بر روی مرگ و میر لارو سن سوم کرم غوزه پنبه.

منابع	df	میانگین مجذور	F	p-value
همبستگی	۱	۳۳۹۸/۸۷۷**	۵۲۹۹/۷۷۹	۰/۰۰
ارقام	۲	۲۱۳/۶۷۸**	۳۳۳/۱۲۴	۰/۰۰
خطا(رقم)	۶	۰/۶۴۱		

با توجه به ثابت بودن تمامی مولفه‌های آزمایشگاهی بالا بودن میزان مرگ و میر را تنها می‌توان به تولید پروتئین‌های کریستاله نسبت داد. مرگ و میر لاروها از روز سوم به صورت معنی‌داری آغاز شد (شکل ۲). طبق نتایج آزمایشگاهی علیرغم عدم مشاهده تفاوت معناداری در میزان مرگ ومیر لاروها در روز دوم اما تاثیر سم دلتا اندوتوکسین و شروع روند مسمومیت از روز دوم می‌باشد. پژوهش حاضر با نتایج داهیویا و همکاران (۲۰۱۶) که ۵۶/۶۶ درصد مرگ و میر را در رقم تراریخته شده کوکر ۳۱۰ همراه با ژن Cry2AX1 نشان داد، همسو است. براساس نتایج دیسک برگ شروع اثر توکسین‌های کریستالی از روز سوم آغاز می‌گردد که نتایج کاملاً با تحقیقات یونس و همکاران (۲۰۱۹) همسو است.



شکل ۲- میانگین لاروهای زنده کرم غوزه در پنج بار نمونه برداری مکرر در ارقام مختلف پنبه به روش دیسک برگی

نتیجه گیری نهایی و پیشنهادات

بررسی نتایج حاصله از تجزیه و تحلیل داده‌ها طی سال زراعی ۹۸ آنها نشان داد که لاین‌های تراریخته نسبت به رقم شاهد منطقه (گلستان) درکنترل آفت کرم غوزه برتری داشتند. از طرفی بررسی میزان کارایی لاینهای تراریخته در مبارزه با آفت کرم غوزه پنبه کنترل کنندگی بسیار بالایی را چه در سطح مزرعه و چه در زیست‌سنجی آزمایشگاهی نشان داد. زمان اثر سم کریستاله در طول پنج روز حداکثر تاثیر را نشان داد اما مسمومیت از روز سوم شروع به تظاهر کرد . ضمن آنکه تصمیم‌گیری

قطعی در این خصوص نیاز به ادامه ارزیابی‌ها در آزمایشگاه و مزرعه دارد. از طرفی بایستی بیان ژن‌ها در کارهای مزرعه ای بررسی‌های بیشتری انجام گیرد (شکل ۳).

شکل ۳- الف) نمونه قفس‌های رهاسازی، ب) لارو لهیده شده در اثر تغذیه بر روی لاین تراریخته، ج) تکمیل مراحل رشد لارو بر روی رقم غیر تراریخته گلستان (شاهد)

منابع

1. Abedullah, Kouser, S., Qaim, M., 2015. Bt Cotton, Pesticide Use and Environmental Efficiency in Pakistan. J. Agric. Econ. 66: 66–86. https://doi.org/10.1111/1477-9552.12072.
2. Ahmad, S., Cheema, H.M.N., Khan, A.A., Khan, R.S.A., and Ahmad, J.N. 2019. Resistance status of Helicoverpa armigera against Bt cotton in Pakistan. Transgenic Research, 28(2), 199–212. https://doi.org/10.1007/s11248-019-00114-9.
3. Assemi, H., Rezapanah, M., Vafaei-Shoushtari, R. and Mehrvar, A. 2012. Modified Artificial Diet for Rearing of Tobacco Budworm, Helicoverpa armigera , using the Taguchi Method and Derringer's Desirability Function. J. Insect Sci. 12: 1–18.
4. Azimi, S., Rahmani, S., Ashouri, A., Bandani, A., Effect of transgenic Bt on some of biological and physiological parameters of Helicoverpa armigera (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). Plantprotection. 41(7), 59-72.(In Persian)
5. Bahar, M. H., Stanley, J., Backhouse, D., Mensah, R., Del Socorro, A., and Gregg, P. 2019. Survival of Helicoverpa armigera larvae on and Bt toxin expression in various parts of transgenic Bt cotton (Bollgard II) plants. Entomologia Experimentalis et Applicata, eea.12792. https://doi.org/10.1111/eea.12792
6. Carriere, Y., Ellers-Kirk, C., Sisterson, M., Antilla, L., Whitlow, M., Dennehy, T.J., and Tabashnik, B.E. 2003. Long-term regional suppression of pink bollworm by Bacillus thuringiensis cotton. Proc. Natl. Acad. Sci. 100, 1519–1523.
7. Da Silva, I.H.S., Goméz, I., Sánchez, J., Martínez de Castro, D.L., Valicente, F.H., Soberón, M., Polanczyk, R.A., and Bravo, A. 2018. Identification of midgut membrane proteins from different instars of Helicoverpa armigera

(Lepidoptera: Noctuidae) that bind to Cry1Ac toxin. PLoS One 13, e0207789.
8. Dhivya, K., Sathish, S., Balakrishnan, N., Udayasuriyan, V., and Sudhakar, D. 2016. Genetic engineering of cotton with a novel cry2AX1 gene to impart insect resistance against Helicoverpa armigera. Crop Breeding and Applied Biotechnology, 16(3): 205–212. https://doi.org/10.1590/1984-70332016v16n3a31
9. Dourado, P.M., Bacalhau, F.B., Amado, D., Carvalho, R.A., Martinelli, S., Head, G.P., and Omoto, C. 2016. High Susceptibility to Cry1Ac and Low Resistance Allele Frequency Reduce the Risk of Resistance of Helicoverpa armigera to Bt Soybean in Brazil. PLoS One 11, e0161388.
10. Egbuta, M.A., McIntosh, S., Waters, D.L.E., Vancov, T., and Liu, L. 2017. Biological Importance of Cotton By-Products Relative to Chemical Constituents of the Cotton Plant. Molecules 22. https://doi.org/10.3390 /molecules22010093
11. Gassmann, A.J., and Hutchison, W.D. 2012. Bt crops and insect pests. GM Crops Food 3, 139–139. Gill, S.S., Cowles, E.A., Pietrantonio, P.V. 1992. The Mode of Action of Bacillus Thuringiensis Endotoxins. Annu. Rev. Entomol. 37, 615–634.
12. Henderson, C.F., and Tilton, E.W. 1955. Tests with Acaricides against the Brown Wheat Mite12. J. Econ. Entomol. 48: 157–161.
13. Ishtiaq, M., and Saleem, M.A. 2011. Generating susceptible strain and resistance status of field populations of Spodoptera exigua (Lepidoptera: Noctuidae) against some conventional and new chemistry insecticides in Pakistan. J. Econ. Entomol. 104: 1343–8.
14. Islam, M.A., and Chowdhury, R.I. 2017. Analysis of Repeated Measures Data, 1st ed. Springer Singapore, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-10-3794-8.
15. LÜ, L., LUO, J., ZHANG, S., YU, Q., MA, L., LIU, X., … CUI, J. 2018. Efficiency of cotton bollworm (Helicoverpa armigera Hübner) control of different Bt cotton varieties in North China. Journal of Cotton Research, 1(1), 4. https://doi.org/10.1186/s42397-018-0003-0
16. Mironidis, G.K., and Savopoulou-Soultani, M. 2010. Effects of heat shock on survival and reproduction of Helicoverpa armigera (Lepidoptera: Noctuidae) adults. J. Therm. Biol. 35, 59–69. https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2009.11.001
17. Naranjo, S.E. 2005. Long-Term Assessment of the Effects of Transgenic Bt Cotton on the Function of the Natural Enemy Community. Environ. Entomol. 34: 1211–1223.
18. Saleem, F., and Shakoori, A.R. 2017. The First Cry2Ac-Type Protein Toxic to Helicoverpa armigera: Cloning and Overexpression of Cry2ac7 Gene from SBS-BT1 Strain of Bacillus thuringiensis. Toxins (Basel). 9.
19. Seyed Masoumi, Y., and Alishah, O. 2017. Introduction of cotton hybrids and promising cultivars in Moghan region, Iran. Agroecology Journal. 12(4), 9-15. (In Persian)

20. Soberón, M., Monnerat, R., and Bravo, A. 2016. Mode of Action of Cry Toxins from Bacillus thuringiensis and Resistance Mechanisms, in: Microbial Toxins. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 1–13.
21. Tay, W.T., Soria, M.F., Walsh, T., Thomazoni, D., Silvie, P., Behere, G.T., Anderson, C., and Downes, S. 2013. A Brave New World for an Old World Pest: Helicoverpa armigera (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. PLoS One 8, e80134.
22. Tabashnik, B.E., Carrière, Y., Dennehy, T. J., Morin, S., Sisterson, M. S., Roush, R. T., …and Zhao, J.-Z. 2003. Insect Resistance to Transgenic Bt Crops: Lessons from the Laboratory and Field. Journal of Economic Entomology, 96(4): 1031–1038. https://doi.org/10.1603/0022-0493-96.4.1031
23. Tohidfar, M., Ghareyazie, B., Mosavi, M., Yazdani, S., and Golabchian, R. 2008. Agrobacterium-mediated Transformation of Cotton (Gossypium hirsutum) Using a Synthetic cry1Ab Gene for Enhanced Resistance Against Heliothis armigera. Iran. J. Biotechnol. 6, 164–173.
24. Wang, Y., Ma, Y., Zhou, D.-S., Gao, S.-X., Zhao, X.-C., Tang, Q.-B., Wang, C.-Z., and Van Loon, J.J.A. 2017. Higher plasticity in feeding preference of a generalist than a specialist: experiments with two closely related Helicoverpa species. Sci. Rep. 7, 17876.
25. Wei, Y., Wu, S., Yang, Y., and Wu, Y. 2017. Baseline Susceptibility of Field Populations of Helicoverpa armigera to Bacillus thuringiensis Vip3Aa Toxin and Lack of Cross-Resistance between Vip3Aa and Cry Toxins. Toxins (Basel). 9, 127.
26. Xie, B., Hu, Y., Liang, Z., Liu, B., Zheng, X., and Xie, L. 2016. Association between pesticide exposure and risk of kidney cancer: a meta-analysis. Onco. Targets. Ther. 9, 3893–900.
27. Yunus, F., Raza, G., and Makhdoom, R. et al. 2019. Genetic improvement of Bacillus thuringiensis against the cotton bollworm, Earias vitella (Fab.) (Lepidoptera: Noctuidae), to improve the cotton yield in Pakistan. Egypt Journal Biology Pest Control 29, 72.

Experimental and field evaluation of resistance of two promising transgenic cotton lines to bollworm

Mahmoud Jokar* [1], GhorbanAli Roshani [2], Seyyd Jalal Mirghasemi [3], Behzad Ghareyazie[4]

1- Assistant Prof Cotton Research Institute of Iran, Agricultural Research, Education and Extension Organization(AREEO), Gorgan, Iran, 2- Cotton Research Institute of Iran, Agricultural Research, Education and Extension Organization(AREEO), Gorgan, Iran, 3- Associate Prof of Cotton Research Institute of Iran, Agricultural Research, Education and Extension Organization(AREEO), Gorgan, Iran

4- Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran.

Received: 2020.08.01----------Accepted: 2021.04.19

Abstract

Background and Objectives: Cotton is an important industrial crop that is attacked by various pests every year, especially the cotton bollworm Helicoverpa armigera (Lep.Noctuidae). In this study, field experiments and laboratory bioassessment (leaf disc) were conducted to evaluate the resistance of two lines numbered 3701 and 1524 in comparison with the control variety (Golestan) under quarantine conditions of Incheh-Burun in a completely randomized design experiments with 3 repetitions.

Materials and Methods: To evaluate the gastrointestinal toxicity of the transgenic cotton cultivars in comparison with the control, bioassay experiments were carried out using leaf disc method. Each treatment consisted of 15 third instar larvae in disposable cups lined with filter paper and fresh bolls as food, and samples were taken daily for five consecutive days. The Effect of the different treatments on the percentage of modified larval mortality percentage was analyzed using Repeated Measurements ANOVA and SPSS 23 software. In the field studies, 15 third instar larvae (24 hours old) were separately released in well ventilated plastic cages on lateral branches (Containing bolls) with three replicates (45 cages per line in each replicate). Percent mortality was corrected using Henderson and Tilton's formula and means were compared using Tukey HSD test at 5% level using SPSS 23 software.

Results: The present study showed that third instar larvae under field condition fed with two transgenic varieties had 71±0.01 and 67±0.02% in lines 3701 and 1524, respectively after seven days as compared to 59±0.02% in control variety. There

was a significant difference at 0.05 level between the two transgenic lines (in one group) and the control cultivar. The results showed a positive and significant relationship between the normalized larval mortality rate and the transgenic cultivars (R2 = 88.1%). The results of the leafdisk bioassay in the laboratory were carried out using repeated sampling method. The results showed a significant difference in the effect of time series on bollworm larval mortality and also the effect of time*cultivar. The Transgenic cultivars had the highest statistical mortality rate compared to the control. However, the two transgenic lines did not differ significantly in mortality. According to the laboratory results, although there was no significant difference in larval mortality, the second day was the onset of intoxication. The results of data analysis in 2019 showed that the transgenic lines were superior to the control cultivar of the study region (Golestan) in controlling bollworm.

Conclusion: the study of the efficacy of the transgenic lines on Cotton bollworm showed high repressive effect in the field and laboratory bioassay. The duration of action of the crystalline toxin at which it showed maximum effect was five days, but the poisoning started from the third day.

Keywords: Transgenic lines, toxin crystals, bollworm