

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

محمودجوکار<sup>۱\*</sup>، قربانعلی روشنی<sup>۱</sup>، سیدجلال میرقاسمی<sup>۱</sup> و بهزاد قره یاضی<sup>۲</sup>  
<sup>۱</sup>موسسه تحقیقات پنبه کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، گرگان، ایران  
<sup>۲</sup>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 هر ساله 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 روش‌ها:** به منظور 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 استفاده 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.

**یافته‌ها:** 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،  $۰/۰۱ \pm ۷۱$  درصد در لاین ۳۷۰۱ و  $۰/۰۲ \pm ۶۷$  درصد در لاین ۱۵۲۴،

مرگ و میر نشان دادند که این مقدار در رقم شاهد  $0.2 \pm 0.59$  درصد محاسبه شد. تفاوت معنی‌داری در سطح  $0.05$  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 ( $R^2=88/1$ ). 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) در کنترل آفت کرم غوزه برتری داشتند. از طرفی بررسی میزان کارایی لاین‌های تراریخته در مبارزه با آفت کرم غوزه پنبه کنترل‌کنندگی 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 داده‌اند. 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 بقولات، سورگوم، ذرت و گوجه فرنگی تغذیه می‌کنند (سالم و شکوری، ۲۰۱۷). کشاورزان نه تنها در ایران بلکه در سراسر دنیا برای کنترل این آفت، به آفت‌کش‌های شیمیایی وابسته می‌باشند (ژایی و همکاران، ۲۰۱۶).

استفاده مکرر از آفت‌کش‌ها نه تنها سبب افزایش مخاطرات زیست محیطی بوده بلکه سبب ایجاد درجاتی از مقاومت در آفت هدف نیز شده است که این خود به معضلی جدید برای کشاورزان تبدیل گشته است (اشتیاق و سالم، ۲۰۱۱). دانشمندان با مهندسی ژنتیک، پروتئین‌های مختلفی و ژن‌های رمزکننده آنها که دارای فعالیت حشره‌کشی هستند را شناسایی و با روش‌های انتقال ژن را به گیاهان هدف نظیر پنبه و سایر گیاهان منتقل می‌کنند. باکتری *Bacillus thuringiensis* یکی از معروف‌ترین 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 می‌نمایند (وی و همکاران، ۲۰۱۷).

پروتئین‌های کریستالی Bt باعث بروز فلج در معده میانی، تغییر نفوذپذیری و از هم گسیختگی اپیتلیوم گوارشی در لاروها شده، لاروها بی‌تحرک و بدون تغذیه مانده و سه یا چهار روز بعد از بین می‌روند (گیل و همکاران، ۱۹۹۲). محصولات دستکاری شده ژنتیکی براساس Bt در کل بیش از ۹۶۱ میلیون هکتار را در سراسر جهان در بر می‌گیرند. اولین گیاهان Bt علیه آفات از خانواده بالپولکداران مهندسی شده بودند و امروز سایر محصولات Bt علیه سایر آفات نیز طراحی شده است (کاربیر و همکاران، ۲۰۰۳). در دنیا همواره به محصولات دستکاری شده ژنتیکی مقاوم به حشرات (GMO)، به‌عنوان جایگزین ارقام تجاری که مقاوم به کرم غوزه می‌باشند توجه شده است (عظیمی و همکاران ۱۳۹۷). پنبه تراریخته و یا Bt در کشورهای آمریکا و چین نتایج بسیار مثبتی در کنترل دو آفت کرم غوزه پنبه و کرم سرخ پنبه داشته و سهم مصرف سم را بسیار کاهش داده است (عظیمی و همکاران ۱۳۹۷). پنبه تراریخته پتانسیل مناسبی برای کنترل کرم غوزه پنبه که به بسیاری از گروه‌های حشره‌کش‌های متداول از جمله فسفره‌های آلی، کاربامات‌ها، پاپروتروئیدها و سیکلودین‌ها مقاوم شده است، دارد (گاسمان و هوتیچیسون، ۲۰۱۲).

تحقیقات بسیاری در کارایی استفاده از پنبه‌های تراریخته در مقابله با آفت کرم غوزه پنبه سطح دنیا انجام شده و در حال اجرا است. احمد و همکاران (۲۰۱۹) وضعیت مقاومت و کارایی ژن Cry1Ac در ارقام تراریخته به آفت کرم غوزه پنبه را با جمع‌آوری 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 مناطق مختلف و قسمت‌های مختلف گیاه مشاهده نمودند. در آزمایش‌های

زیست‌سنجی LD<sub>50</sub> و LD<sub>95</sub> به ترتیب 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 ( $r=0/84$ ) سبب ایجاد مرگ و میر گردد اما اگر فقط ژن دلتا توکسین محدود به Cry1Ac گردد کارایی ارقام مقاوم بشدت کاهش خواهد یافت. در پژوهشی دیگر در کشور چین کارایی ارقام تراریخته در کنترل کرم غوزه پنبه با پیشی 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 و Cry2Ab در رقم تجاری پنبه تراریخته Bollgard II® بررسی گردید (بهار و همکاران، ۲۰۱۹). در بررسی‌های مزرعه‌ای پراکنش و زنده‌مانی نسل اول کرم غوزه پنبه بر روی رقم Bollgard II® و غیرتراریخته صورت گرفت. در براساس نتایج گزارش شده زنده‌مانی لاروها روی رقم تراریخته بلگراد ۲ و رقم غیر تراریخته با گذشت ۶ روز، به ترتیب 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 کوکر ۳۱۰ همراه با ژن Cry2AX1 توانست در آزمایشات مزرعه ای ۵۶/۶۶ درصد مرگ و میر لاروها را نسبت به رقم غیرتراریخته افزایش داد (داهویا 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 کاملاً 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 سبکل 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 نانواپی، ۱۳ گرم آگار، ۳/۵ گرم ویتامین C، ۲/۵ گرم نیپازین، ۱/۱ اسید سوربیک، ۲/۵ میلی‌لیتر فرمالدئید، ۵ میلی‌لیتر روغن کلزا

بدون آنتی‌اکسیدان و ۶۵۰ میلی لیتر آب مقطر) تغذیه و در دمای  $25 \pm 1$  درجه سانتی‌گراد، رطوبت اتافک رشد  $55 \pm 5$  درصد و دوره روشنایی و تاریکی ۸:۱۶ ساعت نگهداری شدند. لاروهای سنبلین 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 کاملاً 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 تار عنکبوتی، 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 در برابر 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 شاخه‌ی 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 نرمالیت 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.

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

**زیست‌سنجی 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 استفاده 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 به کار 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

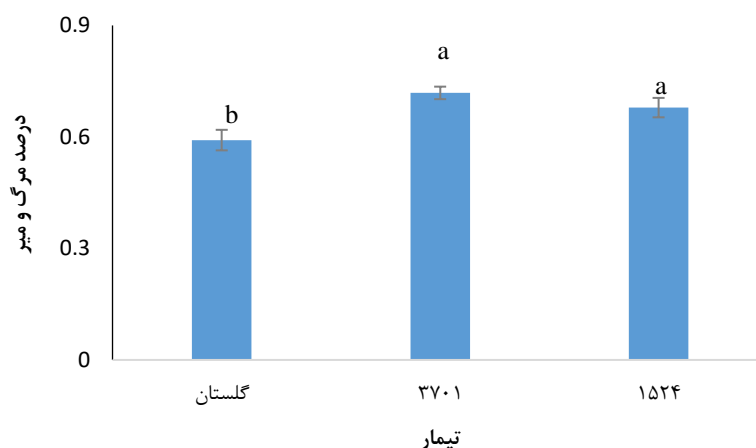
**بررسی اثر پنبه تراریخته بر درصد مرگ و میر لارو کرم غوزه پنبه در شرایط مزرعه‌ای:** بررسی حاضر نشان داد که لاروهای سن سه (همسن شده) در شرایط مزرعه‌ای با تغذیه از دو رقم تراریخته بعد از هفت روز،  $71 \pm 0.1$  درصد در لاین ۳۷۰۱ و  $67 \pm 0.2$  درصد در لاین ۱۵۲۴، مرگ و میر نشان دادند که این مقدار در رقم شاهد  $59 \pm 0.2$  درصد محاسبه شد. نتایج گروه بندی در آزمون توکی در سطح  $0.05$  کاملاً معنی‌دار بود ( $F=22.02$ ,  $P=0.002$ ,  $df=8$ ) (جدول ۱) و شکل ۱). 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 درمحل ایجاد شده وجود داشت ( $R^2=88/1\%$ ). 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 نهایتاً 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 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 بر روی پنبه همسویی داشت. محقق مذکور مرگ و میر  $68 \pm 0.02$  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 از جمله 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 در سنین 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 و میر تمامی لاروها، می‌تواند به دلیل بیان کم پروتئین باکتری در گیاهان تراریخته، و یا 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 و میر لاروهای کرم غوزه پنبه

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

\*\* تفاوت بسیار معنی‌دار در سطح ۱ درصد



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

آزمایشات زیست‌سنجی 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 آنالیز واریانس اندازه‌گیری‌های مکرر، این است که واریانس اختلاف مشاهدات در هر دو مرحله از مراحل مطالعه یکسان باشد. به عبارت 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 و میر 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	۲۲/۴۲۱**	۹۳/۰۴۳	۰/۰۰
خطا (زمان)	۱۳/۳۵۶	۰/۳۴۸		

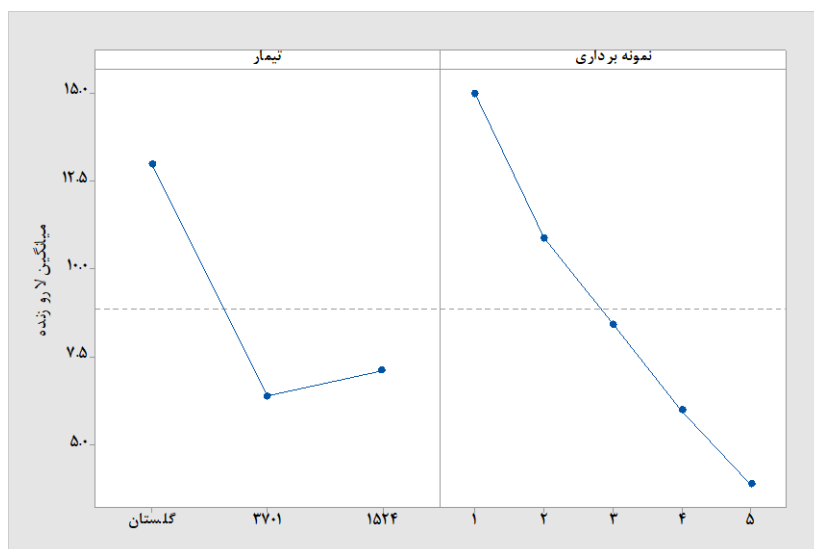
\*\* تفاوت بسیار معنی دار در سطح ۱ درصد

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 معنی داری 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 این حال دو لاین تراریخته در ایجاد مرگ و میر با یکدیگر تفاوت معنی داری نداشتند (شکل ۲).

جدول ۴- 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 و میر لاروها در روز دوم اما تاثیر سم دلتا اندوتوکسین و شروع روند مسمومیت از روز دوم می‌باشد. پژوهش حاضر با نتایج داهویو 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 برگ

### 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) در کنترل 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 مزرعه‌ای 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., Rezapannah, 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., Eilers-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., Gómez, 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 Mite. *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. *Oncotargets 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.

