دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اراک
شاپا ۴۶۶۸-۲۰۰۸
http://jer.iau-arak.ac.ir

فصلنامه تخصصی تحقیقات حشره‌شناسی
جلد ۲، شماره ۱، سال ۱۳۸۹، (۲۱- ۲۹)

ارزیابی کارایی لاین‌های چغندرقند تراریخته حاوی ژن *cry1Ab* در کنترل *Agrotis segetum* Schiff. (Lep., Noctuidae)

لادن صدیقی[۱*]، محمدرضا رضاپناه[۲]، پیمان نوروزی[۳]، رضا وفائی‌شوشتری[۴]

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد حشره‌شناسی کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اراک
۲- استادیار، بخش تحقیقات کنترل بیولوژیک، موسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور، تهران
۳- استادیار، موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه بذر چغندرقند، کرج
۴- استادیار، گروه حشره‌شناسی دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اراک

چکیده

در کشور ما چغندرقند، *Beta vulgaris* L. ، مورد حمله چندین آفت کلیدی قرار می‌گیرد که یکی از این آفات شب‌پره زمستانی، *Agrotis segetum* Schiff.، می‌باشد. یکی از روش‌های موثر در کنترل آفات چغندرقند استفاده از گیاهان تراریخته دارای ژن *cry1Ab* باکتری *Bacillus thuringiensis* Berliner می‌باشد. در این پژوهش تاثیر ۱۶ لاین چغندرقند تراریخته نسل T1 به همراه دو لاین چغندرقند به‌عنوان شاهد روی میزان مرگ و میر، کاهش وزن لاروی و کاهش خسارت ایجاد شده توسط آفت مذکور روی برگ میزبان بررسی شد. بدین منظور قطعات هم وزنی از برگ‌های هر یک از لاین‌های تراریخته در داخل ظروف پتری در چهار تکرار و در هر تکرار در معرض ۱۰ عدد لارو نئونات شب‌پره زمستانی در شرایط مشابه قرار داده شد. سپس در دو فاصله زمانی سه و شش روز پس از آغاز بررسی تعداد لاروهای مرده، وزن لاروهای زنده و میزان کاهش وزن برگ تعیین شد. تجزیه واریانس داده‌ها در قالب طرح پایه کاملا تصادفی، وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای مورد بررسی را در مورد تمام فاکتورهای مورد ارزیابی (به‌جز مرگ و میر لاروی در روز سوم)، در سطح احتمال یک درصد تایید کرد. در نهایت میانگین‌های حاصل در مورد هر یک از فاکتورهای ارزیابی شده توسط آزمون دانکن مورد مقایسه قرار گرفت. گروه‌بندی تیمارها به‌منظور معرفی موثرترین لاین یا لاین‌های چغندر تراریخته در کنترل آفت هدف نشان داد که تمام لاین‌های مورد بررسی نسبت به تیمار شاهد در کنترل آفت شب‌پره زمستانی موثر بوده‌اند. در بین لاین‌های مختلف چغندر تراریخته، لاین $S_{36\text{-}13}$ با ۷/۵ تا ۲۰ درصد مرگ و میر لاروی، ۱/۵۷تا ۱۰/۷۶ میلی‌گرم کاهش وزن لاروی و ۳۹/۳ تا ۵۳/۶ درصد کاهش خسارت برگ، ۳ تا ۶ روز پس از تغذیه لاروها، با در نظر گرفتن هر سه پارامتر مورد بررسی بیشترین کارایی را در کنترل آفت اگروتیس داشت.

واژه‌های کلیدی: شب‌پره زمستانی، لاین‌های تراریخته چغندر قند

* نویسنده رابط، پست الکترونیکی: *ladan_sedighi@yahoo.com*

تاریخ دریافت مقاله (۸۸/۶/۲۶) - تاریخ پذیرش مقاله (۸۸/۱۲/۱۷)

مقدمه

چغندرقند یکی از مهمترین گیاهان صنعتی در دنیا و ایران است. حدود یک چهارم شکر جهان در مناطق معتدل، یعنی مناطقی که نیشکر در آن‌ها کشت نمی‌شود، به‌وسیله این محصول تولید می‌شود (Draycott, 2006). آفات پروانه‌ای از جمله آفات مهم هستند که در اغلب مزارع چغندرقند وجود داشته و خسارات زیادی وارد می‌کنند. یکی از مهمترین آفات چغندرقند کرم طوقه‌بر، *Agrotis segetum* می‌باشد که هر ساله خسارت قابل توجهی به مزارع چغندرقند وارد می‌کند. لاروهای جوان اگروتیس از برگ تغذیه کرده و پس از تغییر جلد سوم به قسمت پایین گیاه می‌آیند و در زیر خاک و کنار طوقه زندگی می‌کنند که در نتیجه تغذیه از طوقه باعث قطع بوته میزبان از سطح خاک می‌شوند (Asadi, 2004).

تاکنون برای کنترل این آفت از روش‌های شیمیایی و زراعی استفاده شده است و در مزارع چغندرقند به‌طور معمول از ترکیبات شیمیایی استفاده می‌شود. ولی به‌دلیل استحصال قند از این محصول ابداع روش‌های جایگزین مطئمن در کنترل این آفت به‌منظور تامین امنیت و سلامت غذایی جامعه ضروری می‌باشد. گیاهان مقاوم در مقابل ایجاد خسارت به آفات با مکانیسم‌های مختلفی مقاومت می‌کنند. گیاهان تراریخته دارای ژن *B.t.* موجب از بین رفتن آفت و یا کاهش میزان رشد آن می‌شوند (Behdad, 2002).

تعدادی از باکتری‌ها، قارچ‌ها و ویروس‌های بیمارگر حشرات به‌عنوان میکروارگانیسم‌های مطمئن و بی‌خطر در کنترل میکروبی کاربرد دارند. در میان عوامل بیماریزای حشرات، باکتری‌ها به لحاظ قدرت تکثیر سریع و راحتی تولید آن‌ها، توجه زیادی را به خود جلب کرده‌اند. جدایه‌های مختلف باکتری *Bacillus thuringiensis* Berliner روی راسته‌های دوبالان، بالپولکداران، سخت‌بالپوشان، موریانه‌ها، راست‌بالان، خرطوم‌مفصلی‌ها و بال‌غشاییان موثر است (Sharma *et al*., 2000).

ویژگی‌های بیولوژیکی خاص چغندرقند از جمله دو ساله بودن، دگرگشنی، خودناسازگاری، محدود بودن منابع مقاومت و تنوع ژنتیکی و سیستم چندژنی مقاومت به این آفت، بهبود آن از طریق اصلاح کلاسیک را بسیار مشکل کرده است. به‌همین دلیل استفاده از روش‌های نوین مهندسی ژنتیک و انتقال ژن‌های مسئول ایجاد مقاومت به حشرات زیان‌آور در چغندرقند می‌تواند به‌عنوان راهکاری برای حل این مشکل مورد بررسی قرار گیرد (Sharma, 2000; Ivic-Haymes & Smigocki, 2005). بهبود ژنتیکی چغندرقند از طریق بیوتکنولوژی به‌دلیل سرسخت بودن آن هم از لحاظ باززایی در محیط کشت مصنوعی و هم از لحاظ دستکاری ژنتیکی با مشکل رو به رو است و به‌شدت وابسته به ژنوتیپ می‌باشد. تا به‌حال تعداد کمی از ژنوتیپ‌ها با موفقیت تراریخته شده‌اند و اکثر ژنوتیپ‌ها نسبت به تراریخت شدن مقاوم هستند. تحقیقات دهه اخیر تا حدودی سیستم انتقال ژن در چغندرقند را بهبود داده است. در سال‌های اخیرا چندین لاین تراریخته با *B.t.* در موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه بذر چغندرقند کرج تولید شده است (Hisano *et al*., 2004; Norouzi *et al*., 2005).

در این پژوهش سعی شد تا ضمن تعیین درصد مرگ ومیر لاروهای اگروتیس روی لاین‌های مختلف چغندرهای تراریخته به‌عنوان مهمترین شاخص در ارزیابی این لاین‌ها، در مراحل بعدی اثرات این گیاهان روی وزن لاروهای اگروتیس و کاهش وزن برگ‌های چغندر در فواصل زمانی مشخص پس از آغاز تغذیه روی لاین‌های تراریخته در مقایسه با چغندرهای معمولی تعیین و در تحلیل کارایی گیاهان تراریخته مورد بررسی قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

برای ایجاد کلنی آزمایشگاهی، از شب‌پره زمستانی *A. segetum*، از نمونه‌هایی که در سال ۱۳۸۷ از مزارع چغندرقند استان آذربایجان غربی استفاده شد. این نمونه‌ها پس از انتقال به آزمایشگاه بیولوژی مولکولی و ویروس شناسی حشرات بخش تحقیقات مبارزه بیولوژیک تا مرحله بلوغ پرورش داده شدند. نتاج نسل دوم آزمایشگاهی برای انجام بررسی‌ها مورد استفاده قرار گرفت.

در این تحقیق از ۱۶ لاین تراریخته نسل T1 حاصل از دو ژنوتیپ مولتی ژرم و دیپلوئید چغندرقند (رقم تجاری 7233(S) و گیاه والد گرده افشان HM1990(H)) به‌منظور ارزیابی مقاومت چغندرقند تراریخته نسبت به این آفت مهم پروانه‌ای چغندرقند استفاده شد (جدول۱). گیاهان تراریخته مذکور در موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه بذر چغندرقند کرج تولید شده بودند (Jafari *et al*., 2009; Malboobi & Norouzi, 2009). در این آزمون‌ها والدهای غیرتراریخته این دو ژنوتیپ نیز به‌عنوان تیمار شاهد مورد استفاده قرار گرفت. در آزمون‌ها از برگ‌های تازه و از نظر ضخامت و وزن یکسان برای تغذیه لاروها استفاده شد.

جدول۱- لاین‌های نسل تراریخته مورد بررسی در مورد آفت شب پره زمستانی *Agrotis segetum*

Table1- Transgenic lines studied against *Agrotis segetum*

Genotype	Transgenic lines					
7233 (S)	S18-1 S37-2	S18-8	S18-15	S32-2	S35-3	S36-13
HM1990 (H)	H2-2 H6-3	H2-5 H6-4	H2-6 H6-10	H2-7	H3-2	H3-4

این آزمایش در سه مرحله و در شرایط محیطی دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی، دمای ۱±۲۵ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۱۰±۶۵ درصد انجام شد.

در آزمون اول به منظور برآورد میزان واقعی مرگ و میر لاروها از فرمول Abbot (1925)، طبق رابطه زیر استفاده شد:

$$\%\text{Effect} = \left(1 - \frac{N_t}{N_C}\right) \times 100$$

که در این رابطه N_t تعداد افراد مرده در تیمارهای مورد ارزیابی و N_c تعداد افراد مرده در تیمار شاهد است. تاثیر لاین‌های تراریخته روی میزان مرگ و میر لاروهای اگروتیس در قالب طرح پایه کاملا تصادفی در چهار تکرار و در هر تکرار روی ۱۰ عدد لارو نئونات اگروتیس در داخل ظروف پتری شیشه‌ای با قطر ۱۰ سانتی‌متر بررسی شد. در هر ظرف در فواصل زمانی سه و شش روزه پس از آغاز تغذیه روی چغندرهای تراریخته تعداد لاروهای زنده در هر ظرف شمارش شد.

در آزمون دوم تاثیر لاین‌های چغندرقند تراریخته روی کاهش وزن لاروهای زنده مانده در مقایسه با تیمار شاهد در تکرارهای مختلف (در هر تکرار ۱۰ عدد لارو) هر لاین گیاه تراریخته در فواصل زمانی مشابه با آزمایش اول پس از تغذیه روی گیاهان ثبت شد. سپس به‌منظور به‌دست آوردن اثر واقعی تیمار بر اساس رابطه زیر از اختلاف این دو کاهش وزن لاروی ناشی از گیاه تراریخته استفاده شد:

$$LaWL = CLaW - TLaW$$

LaWL : Larval Weight Loss : میزان کاهش وزن لاروی در لاین‌های تراریخته

CLaW : Check Larval Weight : میانگین وزن لاروی در تیمار شاهد

TLaW : Treatment Larval Weight : میانگین وزن لاروهای تغذیه کننده از گیاه تراریخته

در آزمایش سوم میزان کاهش وزن برگ در هر یک از لاین‌های مورد بررسی به‌عنوان معیاری از میزان خسارت حاصل از تغذیه اگروتیس روی گیاهان مورد بررسی در مقایسه با تیمار شاهد در چهار تکرار تعیین شد. در واقع میزان کاهش وزن برگ به‌عنوان معیاری از خسارت که در اثر عدم استفاده از لاین‌های تراریخته می‌تواند حادث شود، مدنظر بود. مقدار این پارامتر با استفاده از رابطه زیر محاسبه شد:

$$LWL = CLW - TLW$$

LWL : Leaf Weight Loss : میزان کاهش خسارت وارده به برگ در اثر تراریختگی

CLW : Check Leaf Weight : میزان کاهش وزن برگ در تیمار شاهد

TLW : Treatment Leaf Weight : میزان کاهش وزن برگ در تیمار تراریخته

داده‌های حاصل از آزمایش‌های مذکور در قالب طرح کاملا تصادفی با استفاده از نرم‌افزار SPSS ver.13 تجزیه واریانس شدند. بر اساس نتایج حاصل از تجزیه واریانس گروه‌بندی بین لاین‌های مختلف تراریخته چغندر قند با استفاده از آزمون مقایسه چند دامنه میانگین دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد.

نتایج

نتایج حاصل از آزمایش اول (جدول ۲) نشان داد که بین ۱۶ لاین نسل T1 چغندرقند تراریخته از نظر درصد مرگ و میر ایجاد شده روی لاروهای اگروتیس در روز سوم ($F=0.498$, $df=15$, $P>0.05$) در سطح احتمال ۱ درصد اختلاف معنی‌دار وجود ندارد، اما در روز ششم ($F=1.677$, $df=15$, $P<0.05$) در همان سطح احتمال بین لاین‌ها مختلف اختلاف معنی‌دار مشاهده گردید. بر این اساس گروه‌بندی تیمارها با آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد.

بر اساس نتایج حاصل از ارزیابی درصد مرگ و میر لاروها (جدول ۳) در ششمین روز تغذیه از گیاهان تراریخته بین ۵ تا ۲۰ درصد متغیر بود و در گیاهان غیرتراریخته صفر بود که حاکی از وجود تفاوت معنی‌دار بین گیاهان تراریخته و غیرتراریخته است. در روز سوم میزان مرگ و میر لاروی در آزمون مقایسه میانگین و در سطح احتمال ۵ درصد بین لاین‌های تراریخته از نظر آماری اختلاف معنی‌دار وجود نداشت. در این میان، بیشینه تلفات در لاروها ۷/۵ درصد (مربوط به لاین‌های $S_{36\text{-}13}$ و $H_{2\text{-}6}$) و کمینه آن ۵ درصد بود. در روز ششم میزان مرگ و میر در لاین‌های مورد ارزیابی از ۵ درصد در لاین‌های $S_{18\text{-}8}$ و $H_{2\text{-}7}$ تا ۲۰ درصد در لاین $S_{36\text{-}13}$ مشاهده شد.

نتایج حاصل از بررسی‌ها در آزمایش دوم روی میزان کاهش وزن لاروها نشان داد که بین کارایی ۱۶ لاین چغندرقند تراریخته نسل T1 در سطح احتمال ۱ درصد در روزهای سوم ($F=34.112$, $df=15$, $P<0.001$) و ششم ($F=22.236$, $df=15$, $P<0.001$) اختلاف معنی‌داری وجود دارد. بر این اساس گروه‌بندی تیمارها با آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد. بر اساس نتایج ثبت شده در جدول (۲) متوسط وزن لاروهای زنده برداشته شده از روی برگ گیاهان تراریخته در سومین روز آلودگی۰/۸۵ تا ۱/۴۸ میلی‌گرم متغیر است و در ششمین روز آلودگی این میزان به۱/۰۵ تا ۲/۰۷ میلی‌گرم رسیده است، در حالی که وزن لاروهای زنده روی برگ گیاهان شاهد پس از شش روز آلودگی۱۱/۳۰ تا ۱۲/۰۹ میلی‌گرم است که تفاوت بسیار معنی‌دار با وزن لاروهای مربوط به گیاهان تراریخته دارد.

جدول ۲- ارزیابی گیاهان چغندرقند تراریخته T_1 حاوی ژن *cry1Ab* در برابر *Agrotis segetum*

Table 2- Evaluation of T_1 sugar beet plants with *cry1Ab* gene against *Agrotis segetum*

Line	Number of dead larvae		Larval weight (mg)		Leaf damage (%)	
	3 DAI	6 DAI	3 DAI	6 DAI	3 DAI	6 DAI
Control-S	0.00±0.00*	0.00±0.00	2.36±0.14	12.09±0.11	57.91±1.69	81.03±1.39
S18-1	0.25±0.25	1.25±0.25	1.48±0.08	2.07±0.03	26.11±1.96	33.46±1.40
S18-8	0.25±0.25	0.50±0.28	1.21±0.02	1.20±0.08	24.38±1.42	29.51±1.55
S18-15	0.25±0.25	1.00±0.00	1.01±0.06	1.30±0.05	18.96±1.13	27.36±1.38
S32-2	0.50±0.28	0.75±0.25	1.42±0.03	1.60±0.03	20.91±1.57	29.09±2.25
S35-3	1.25±0.47	1.25±0.47	0.92±0.07	1.48±0.07	20.61±1.45	28.25±1.18
S36-13	0.25±0.25	2.00±0.40	0.85±0.08	1.32±0.03	18.59±2.18	27.36±2.10
S37-2	0.50±0.28	1.00±0.40	1.22±0.03	1.72±0.05	23.49±1.56	29.97±1.57
Control-H	0.00±0.00	0.00±0.00	2.42±0.03	11.30±0.12	61.68±1.53	82.43±1.58
H2-2	0.25±0.25	0.25±0.25	1.08±0.01	1.34±0.05	28.38±1.64	36.67±1.47
H2-5	0.25±0.25	1.50±0.28	0.97±0.06	1.42±0.03	24.57±1.21	30.43±2.10
H2-6	0.75±0.25	1.00±0.40	1.14±0.07	1.31±0.07	25.48±1.21	35.97±1.38
H2-7	0.25±0.25	0.50±0.28	1.15±0.03	1.21±0.04	28.85±2.31	32.66±1.16
H3-2	0.25±0.25	0.75±0.25	0.98±0.06	1.19±0.04	29.08±1.83	37.12±2.21
H3-4	0.25±0.25	1.00±0.40	1.04±0.03	1.29±0.09	26.41±1.42	32.24±2.32
H6-3	0.25±0.25	0.75±0.25	1.12±0.02	1.05±0.05	25.43±1.40	31.14±1.72
H6-4	0.28±0.25	0.75±0.25	1.20±0.03	1.09±0.05	29.91±1.51	36.15±1.64
H6-10	0.25±0.25	1.00±0.40	0.98±0.03	1.17±0.05	25.04±1.87	33.16±1.20

* میانگین ± خطای استاندارد، گیاهان والد غیرتراریخته S و H به‌عنوان شاهد و کدهای تراریخته ژنوتیپ HM1990 به اختصار به‌صورت H و ژنوتیپ 7233 به اختصار به‌صورت S نشان داده شده است

* Means ± SE, of 10 larvae/leaf, the assays were done in 4 replications for each line. (DAI, Days After Infestation), Non-transgenic plants S and as control. Transgenic lines genotype HM1990 and 7233 are shown as H and S in brief

جدول ۳- ارزیابی گیاهان چغندرقند تراریخته T_1 حاوی ژن *cry1Ab* در برابر *Agrotis segetum* پس از تصحیح با فرمول ابوت

Table 3- Evaluation of T_1 sugar beet plants with *cry1Ab* gene against *Agrotis segetum* after correction according to Abbott´s formula

Line	Larval mortality (%)		Larval weight (mg)		Leaf damage (%)	
	3 DAI	6 DAI	3 DAI	6 DAI	3 DAI	6 DAI
S18-1	2.50 ± 2.50^{ns}*	12.50 ± 2.50^{abc}	0.21 ± 0.06^{g}	10.01 ± 0.03^{f}	31.79 ± 1.96^{i}	47.56 ± 1.40^{f}
S18-8	2.50 ± 2.50^{ns}	5.00 ± 2.88^{bc}	0.88 ± 0.08^{f}	10.10 ± 0.08^{ef}	33.53 ± 1.42^{g}	51.51 ± 1.55^{c}
S18-15	2.50 ± 2.50^{ns}	10.00 ± 0.00^{abc}	1.41 ± 0.06^{abc}	10.78 ± 0.05^{a}	38.95 ± 1.13^{a}	53.65 ± 1.38^{a}
S32-2	5.00 ± 2.88^{ns}	7.50 ± 2.50^{bc}	1.20 ± 0.03^{de}	10.48 ± 0.04^{bc}	37.00 ± 1.57^{bc}	51.92 ± 2.25^{bc}
S35-3	2.50 ± 2.50^{ns}	12.50 ± 4.78^{abc}	1.50 ± 0.07^{ab}	10.60 ± 0.07^{ab}	37.29 ± 1.45^{b}	52.78 ± 1.18^{ab}
S36-13	7.50 ± 2.50^{ns}	20.00 ± 4.08^{a}	1.57 ± 0.08^{a}	10.76 ± 0.03^{a}	39.30 ± 2.18^{a}	53.64 ± 2.10^{a}
S37-2	5.00 ± 2.88^{ns}	10.00 ± 4.08^{abc}	1.24 ± 0.02^{cde}	10.36 ± 0.05^{cd}	34.42 ± 1.56^{f}	51.06 ± 1.57^{cd}
H2-2	2.50 ± 2.50^{ns}	2.50 ± 2.50^{c}	1.34 ± 0.01^{bcde}	9.96 ± 0.05^{f}	33.29 ± 1.53^{gh}	45.75 ± 1.47^{g}
H2-5	2.50 ± 2.50^{ns}	15.00 ± 2.88^{ab}	1.45 ± 0.06^{abc}	10.67 ± 0.03^{ab}	37.11 ± 1.64^{bc}	51.98 ± 2.10^{bc}
H2-6	7.50 ± 2.50^{ns}	10.00 ± 4.08^{abc}	1.28 ± 0.07^{cde}	9.99 ± 0.07^{f}	36.20 ± 1.21^{d}	46.45 ± 1.38^{fg}
H2-7	2.50 ± 2.50^{ns}	5.00 ± 2.88^{bc}	1.15 ± 0.02^{e}	10.14 ± 0.06^{ef}	32.83 ± 2.31^{h}	49.76 ± 1.16^{e}
H3-2	2.50 ± 2.50^{ns}	7.50 ± 2.50^{bc}	1.44 ± 0.06^{abc}	10.11 ± 0.04^{ef}	31.60 ± 1.83^{i}	45.29 ± 2.21^{g}
H3-4	2.50 ± 2.50^{ns}	10.00 ± 4.08^{abc}	1.38 ± 0.03^{abcd}	10.01 ± 0.09^{f}	35.27 ± 1.42^{e}	50.17 ± 2.32^{de}
H6-3	2.50 ± 2.50^{ns}	7.50 ± 2.50^{bc}	1.15 ± 0.03^{e}	10.25 ± 0.05^{de}	36.25 ± 1.40^{d}	51.29 ± 1.72^{cd}
H6-4	5.00 ± 2.88^{ns}	7.50 ± 2.50^{bc}	$0,93\pm0.03^{f}$	10.21 ± 0.05^{de}	31.76 ± 1.51^{i}	46.29 ± 1.64^{g}
H6-10	2.50 ± 2.50^{ns}	10.00 ± 4.08^{abc}	1.44 ± 0.03^{abc}	10.13 ± 0.05^{ef}	36.64 ± 1.87^{cd}	49.27 ± 1.20^{e}

*میانگین ± خطای استاندارد، کدهای تراریخته ژنوتیپ HM1990 به‌عنوان گیاهان والد غیرتراریخته به اختصار به‌صورت H و ژنوتیپ 7233 به اختصار به‌صورت S نشان داده شده است.

*Means±SE, of 10 larvae/leaf, the assays were done in 4 replications for each line. (DAI, Days After Infestation and ns, non-significant), Non-transgenic plants S and H as control and transgenic lines genotype HM1990 and 7233 are shown H and S in brief.

در روز سوم پس از آغاز تغذیه لاروی از برگ لاین‌های تراریخته، بیشترین مقدار کاهش وزن لاروی در لاین S_{36-13} با ۱/۵۷ میلی‌گرم در اثر ۱۰ لارو مشاهده شد. این در حالی بود که از نظر آماری بین کاهش وزن لاروها در لاین‌های H_{6-10}، H_{3-4}، H_{3-2}، H_{2-5}، S_{18-15}، S_{35-3} و S_{36-13} اختلاف معنی‌داری وجود نداشت و همگی از نظر آماری در گروه *a* قرار گرفتند. در روز ششم بیشترین کاهش وزن لارو در لاروهایی مشاهده شد که روی لاین S_{18-15} و S_{36-13} تغذیه کرده بودند که با نتایج روز سوم هم‌خوانی داشت .

نتایج حاصل از بررسی‌ها در آزمایش سوم روی کاهش میزان خسارت ناشی از تغذیه لاروها نشان داد که بین کارایی ۱۶ لاین چغندرقند تراریخته در سطح احتمال ۱ درصد اختلاف معنی‌داری در روزهای سوم (F=160.178, df=15, P<0.001) و ششم (F=52.589, df=15, P<0.001) وجود دارد. بر این اساس گروه‌بندی تیمارها با آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد.

میزان خسارت برگی گیاهان شاهد سه روز پس از آلودگی ۵۷ تا ۶۱ درصد بوده که روز ششم به ۸۲ درصد رسید. در حالی که این شاخص در گیاهان تراریخته روند کندی داشت. به‌طوری‌که به ترتیب سه و شش روز پس از آلودگی میزان خسارت ۲۰–۲۸ درصد و حداکثر ۳۵ درصد برآورد شد که از لحاظ آماری با گیاهان غیرتراریخته تفاوت کاملا معنی‌دار داشت. در روز سوم پس از آغاز تغذیه روی لاین‌های تراریخته، کمترین میزان خسارت در برگ‌های مورد بررسی به‌ترتیب در لاین‌های S_{18-15}، S_{36-13} دیده شد. به عبارت بهتر در روی این لاین‌ها میزان تغذیه لاروها کمتر از سایر لاین‌ها بود. در روز ششم نیز نتایج مشابه نتایج روز سوم بود.

بحث

درصد تلفات لاروی، درصد کاهش وزن لارو و میزان کاهش خسارت برگ در لاین‌های تراریخته چغندرقند در مقایسه با شاهد شش روز پس از آغاز تغذیه لاروهای شب‌پره زمستانی، مرگ و میر لاروی به‌ترتیب ۲/۵ تا ۱۵ درصد، ۹/۹۶ تا ۱۰/۷۸ میلی‌گرم و ۴۵/۲۹ تا ۵۳/۶۵ درصد متغیر بود و در واقع نتایج بین لاین‌های تراریخته و غیرتراریخته (شاهد) از نظر فاکتورهای مورد ارزیابی تفاوت معنی‌داری مشاهده گردید. در بررسی فاکتور مرگ و میر لاروی، با توجه به این که به لاین‌های تراریخته مورد بررسی ژن *cry1Ab* باکتری *B. thuringiensis* منتقل شده بود، مرگ و میر لاروی در آفت مورد بررسی قابل انتظار بود. از طرف دیگر اثبات شده است که توکسین *cry1Ab* در گونه‌های *Agrotis* spp. و کرم ساقه‌خوار اروپایی ذرت، *Ostrinia nubilalis* Hb.، اثر بازدارندگی از تغذیه دارد (Yoshinori & Harryk, 1993). خاصیت ضدتغذیه‌ای[1] یکی از تاثیرات مثبت باکتری *B. thuringiensis* است که به‌عنوان یکی از جنبه‌های مفید در کنترل بیولوژیک نیز بررسی می‌شود. با توجه به این که چغندرقند تراریخته مورد آزمایش دارای ژن *cry1Ab* از باکتری *B. thuringiensis* است، این عکس‌العمل در بین لاروهای تغذیه شده از برگ تراریخته نیز مشهود بود. در واقع می‌توان این موضوع را یک نوع مقاومت آنتی‌بیوزی[2] به‌شمار آورد که در فیزیولوژی آفت اختلال ایجاد می‌کند. به‌طور کلی لاین‌های تراریخته حاصل در مقایسه با گیاهان شاهد در برابر آفت مذکور با ایجاد اثرات نامطلوب در روند رشد و نمو و بازدارندگی از تغذیه مقاومت مناسبی نشان دادند. اگر چه مقاومت کامل در لاین‌های تراریخته مشاهده نشد که ممکن است به‌دلیل سطح ناکافی بیان ژن مولد پروتئین *cry1Ab* و همچنین حساسیت پایین آفت مذکور نسبت به این توکسین باشد. همچنین بین لاین‌های

1- Antifeedant
2- Antibiosis

تراریخته تنوع و تفاوت در درصد مرگ و میر آفت و خسارت برگ مشاهده شد که این موضوع نیز ممکن است ناشی از تفاوت در سطح بیان ژن مولد توکسین *B.t.* در نتیجه اثرات اپی‌ژنتیک مانند تعداد نسخه، اثرات موضعی در محل تلفیق و یا متیله شدن تراژن، شرایط آزمایش‌های انجام شده و تا حدودی به‌دلیل تفاوت فیزیولوژیک بین لاروهای مورد بررسی باشد (Fujimoto, 1993).

در حین انجام آزمایش‌ها، کاهش تغذیه در لاروهایی که از گیاهان تراریخته تغذیه کرده بودند به وضوح مشاهده شد. به‌طوری‌که با وجود آن‌که لاروها تا یک هفته بعد از تغذیه از گیاه تراریخته حاوی ژن *B.t.* زنده می‌ماندند، ولی میزان تغذیه آن‌ها بسیار اندک بود. این موضوع از نظر علم مدیریت آفات حائز اهمیت می‌باشد. زیرا نه تنها تغذیه شدیدی انجام نمی شد بلکه در چنین شرایطی، لاروهای آفت به‌دلیل افزایش طول دوره زیستی، مدت زمان بیشتری در معرض پرداتورها و پارازیتوییدها قرار می‌گیرند که جای مطالعه بیشتر دارد.

طول دوره لاروهایی که در اثر تغذیه از گیاه تراریخته در آزمایش‌های انجام شده زنده ماندند، افزایش یافته و وزن لاروهای باقیمانده نسبت به شاهد به‌شدت کاهش نشان داد. این موضوع توسط Bajwa & Kogan(2001)، در قالب اثرات دزهای زیرکشنده *B.t.* شامل کاهش تغذیه، کاهش طول عمر لاروی و بالغین، کاهش باروری و کاهش وزن لارو و حشرات بالغ ذکر شده است. نتایج تحقیق حاضر که در قالب بررسی کاهش وزن لاروهای تغذیه کننده از لاین‌های تراریخته، کاهش تغذیه و در نتیجه کاهش خسارت ایجاد شده بود.

نتایج به‌دست آمده از تحقیق حاضر با نتایج بررسی‌های متعدد در این زمینه منطبق است. کنترل کامل آفت کرم ساقه‌خوار ذرت توسط تعدادی از گیاهان تراریخته حاوی ژن *cry1Ab* Koziel *et al.*(1993) گزارش شده است. مقاومت ۱۰۰ درصد در برابر کرم ساقه‌خوار زرد Ghareyazie *et al.*(1997) و Datta *et al.*(1998) و مقاومت ۱۷ درصد نسبت به کرم ساقه‌خوار زرد و مقاومت ۵۳ درصد نسبت به کرم برگ‌خوار برنج در گیاهان برنج تراریخته حاوی ژن *cry1Ab* Husnain *et al.*(2002) گزارش شده است. تاثیر کشنده برنج تراریخته طارم مولایی در بردارنده ژن *cry1Ab* روی چهار نوع آفت پروانه‌ای برنج به اثبات رسیده است (Alinia *et al.*, 2001).

با توجه به تحقیقات محدود انجام یافته در مورد مقاومت به حشرات آفت در چغندرقند، لازم است تحقیقات بیشتری در مورد ایجاد چغندرقند مقاوم به آفات با استفاده از ژن‌های مختلف *B.t.* و یا در ترکیب با دیگر ژن‌های رمز کننده مقاومت انجام گیرد. توصیه می‌شود آزمایش‌های ارزیابی کارآیی لاین‌های تراریخته چغندرقند روی سایر آفات پروانه‌ای چغندرقند (در مراحل مختلف و نسل‌های بعد) و در صورت امکان تحت شرایط گلخانه ای مزرعه‌ای نیز انجام گیرد. بر اساس یافته های این پژوهش می توان لاین های تراریخته مورد بررسی چغندر قند را به عنوان یکی از ابزارهای قابل استفاده در برنامه مدیریت تلفیقی آفات چغندر قند، معرفی کرد که در کنار سایر روش های غیر شیمیایی می تواند در تولید محصولات عاری از سموم شیمیایی مؤثر باشد.

سپاسگزاری

نویسندگان لازم می‌دانند از همکاری و مساعدت مسئولین محترم موسسه تحقیقات چغندرقند و موسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور در تامین امکانات لازم برای اجرای این پژوهش سپاسگزاری کنند.

References

Abbot, W. S. A. 1925. method of computing the effectiveness of insecticide. Journal of Economic Entomology, 18: 265-276.

Alinia, F., Ghareyazie, B., Rubia, L., Bennett, J., and Cohen, M. B. 2001. Expression of effect of plant age, larval age, and fertilizer treatment on resistancet of a *cryIAb*–transformed aromatic rice to lepidopterans stem borers and foliage feeders. Journal of Economic Entomology, 93:484–493.

Asadi, Gh. A. 2004. Study of biology of *Agrotis segetum* Schiff (Lep., Noctuidae) and control in Shirvan sugar beet fields. M.Sc. Thesis in agricultural Entomology. Tarbiat Modares University. 155pp. [In Persian with English summary]

Bajwa, W. I. and Kogan, M. 2001. Bacillus thuringiensis- based biological control of insect pests Integrated Plant Protection Center (IPPC). Oregon State University, Corvallis.National IPM Network..

Behdad, E. 2002. Introductory entomology and important plant pests in Iran. Yadboud publisher, 241-285. [In Persian with English summary]

Datta, K., Vasquez, A., Tu, J., Torrizo, L., Alam, M. F., Oliva, N., Abrigo, E., Khush, G. S. and Datta, S. K. 1998. Constitutive and tissue specific differential expression of the *cry1Ab* gene in transgenic rice plants conferring resistance to rice insect pest. Theoretical and Applied Genetics, 97(1-2): 20–30.

Draycott, A. P. 2006. Sugar Beet. Blackwell Publishing. Suffolk, United Kingdon, 475 pp.

Fujimoto, H., Itoh, K., Yamamoto M., Kyozuka, J., and Shimamoto, K. 1993. Insect resistant rice generated by introduction of a modified endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis*. Bio/technology, 11: 1151-1155.. Insect

Ghareyazie, B., Alinia, F., Menguito, C. A., Rubia, L. G., Palma, J. M., Liwanag, E. A., Cohen, M. B., Khush, G. S. and Bennerr, J. 1997. Enhanced resistance to two stem borers in an aromatic rice containing a synthetic cry IA(b) gene. Molecular Breeding. 3:401-414.

Hisano, H., Kimoto, Y., Hayakawa, H., Takeichi, J., Domae, T., Hashimoto, R., Abe, J., Asano, S., Kananzawa, A., and Shimamato, Y. 2004. High frequency *Agrobacterium*-mediated transformation and plant regeneration via direct shoot formation from leaf explants in *Beta vulgaris* and *Beta maritime*. Plant Cell Reports, 22: 910-918.

Husnain, T., Asad, J., Maqbool, S.B., Datta, S.K. and Riazuddin, S. 2002. Variabilty in expression of insecticidal *cry1Ab* gene in Indica Basmati rice. Euphytica, 128: 121-128.

Ivic-Haymes, S.D. and Smigocki, A.C. 2005. Biolistic transformation of highly regenerative sugar beet (*Beta vulgaris* L.) leaves. Plant Cell Rep., 23: 699-704.

Jafari, M., Norouzi, P., Malboobi, M. A., Ghareyazie, B., Valizadeh, M., Mohammadi, A. and Mousavi, M. 2009. Enhanced resistance to a lepidopteran pest in transgenic sugar beet plants expressing synthetic *cry1Ab* gene. Euphytica 165: 333-344.

Koziel, M. G., Beland, G. L., Bowman, C., Carozzi, N., Crensham, R., Crossland, L., Dawson, J., Desai, N., Hill, M., Kadwell, S., Launis, K., Lewis, K., Maddox, D., McPherson, K., Meghji, M., Merlin, E., Rhodes, R., Warren, G. W., Wright, M., and Evola, S. 1993. Field performance of elite transgenic maize plants expressing an insecticidal protein derived from *Bacillus thuringiensis*. Nature biotechnology, 11:194-200.

Malboobi, M. A. and Norouzi, P. 2009. Production of transgenic sugar beet expressing resistant gene against Lepidopteran pests. Sugar Beet Seed Institute (SBSI), Karaj. Final report. 88 pp.

Norouzi, P., Zamani, K., Malboobi, M. A., Yazdi-Samadi, B. 2005. Using a competent tissue for efficient transformation of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). In Vitro Cell Dev Biol Plant. 41:11-16.

Sharma, H. C., Sharma, K. K., Seetharama, N. and Otriz, R. 2000. Prospects for using transgenic resistance to insect in crop improvement. Electronical Journal of Biotechnol. 3:1-20.

SPSS, 1999. SPSS 9 for Windows User's Guide. Copyright 1999 by SPSS Inc., SPSS, Chicago, IL.

Yoshinori, T. and Harryk, K., 1993. Insect Pathology. Harcourt Broce Jovanvich publishers, New Yourk. Boston. Londan. Sydney, Tokyo, Toronto, 666 pp.

Journal of Entomological Research
Volume 2, Issue 1, pages: 21-29

Islamic Azad University, Arak Branch
ISSN 2008-4668
http://jer.iau-arak.ac.ir

Efficiency evaluation of *Bt*-transgenic lines of sugar beet against *Agrotis segetum* Schiff. (Lep., Noctuidae)

L. Sedighi[1*], M. Rezapanah[2], P. Norouzi[3], R. Vafaei-Shoushtari[4]

1- Graduated student, Entomology Department, Islamic Azad University, Arak, Iran
2- Assisstant Professor, Biological Control Research Department, Iranian Research Institute of Plant Protection, Tehran, Iran
3- Assisstant Professor, Sugar Beet Seed Institute (SBSI), Karaj, Iran
4- Assisstant Professor, Entomology Department, Agricultural faculty, Islamic Azad University, Arak branch, Arak, Iran

Abstract

The common cutworm (*Agrotis segetum* Schiff.), is one of the most important pests of sugar beet (*Beta vulgaris* L.), in Iran. Among the alternatives to control this pest, use of *B.T.*-transgenic sugar beet expressing *cry1Ab* gene has gained attention due to its efficiency. In the present study, larval mortality, larval weight loss and damage level of this pest on 18 treatments (16 T1 transgenic and 2 non-transgenic sugar beet lines) were evaluated in 3 CRD experiments with 4 replications. Therefore, 40 larvae of the common cutworm in 4 replications (10 larvae/replication) were fed on leaves of the treatment lines in glass Petri dishes. The mortality, weight of larvae and weight loss of leaves were recorded at the third and the sixth days after infestation (DAI). ANOVA results confirmed the significantly differences at %1 probability level among treatments in all of the evaluated factors (except larval mortality at 3 DAI). Finally, mean comparisons were carried out using Duncan's multiple range tests at %5 probability levels. Based on the results, all of the examined transgenic lines were more effective than non-transgenic lines against *A. segetum.* The results confirmed that the transgenic line $S_{36\text{-}13}$ (7.5-20% larval mortality, 1.57-10.76 mg LaWL and 39.3-53.64% Leaf Weight Loss at 3 and 6 DAI) was the most effective among evaluated transgenic and non-transgenic lines.

Key words: *Agrotis segetum*, Sugar beet, Transgenic lines

* Corresponding Author, E-mail: *ladan_sedighi@yahoo.com*
Received: 17 Sep. 2009 - Accepted: 8 Mar. 2010