تحقیقات آفات گیاهی
۱۳۹۵-۶ (۲): ۷۵ -۸۶

تاثیر پنبه تراریخته Bt بر ویژگی‌های زیستی سن شکارگر *Macrolophus pygmaeus* Rambur (Hem.: Miridae)

سولماز عظیمی[1*]، شیما رحمانی[2] و احمد عاشوری[3]

۱- دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، ۲- دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، ۳- پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران.

(تاریخ دریافت: ۹۴/۱۰/۲۰ تاریخ پذیرش: ۹۵/۴/۲۷)

چکیده

یکی از مهم‌ترین پژوهش‌ها پیرامون گیاهان تراریخته مطالعه تاثیر این گیاهان روی بندپایان غیر هدف است. این گیاهان می‌توانند اثرات مستقیم (کشندگی) و غیر مستقیم (از طریق گیاه‌خوار) روی دشمنان طبیعی بگذارند. بنابراین در این پژوهش اثر تغذیه از گیاه پنبه Bt و طعمه (عسلک پنبه *Bemisia tabaci* Gennadius) پرورش یافته روی پنبه Bt، روی سن شکارگر *Macrolophus pygmaeus* Rambur مورد بررسی قرار گرفت. چهار رژیم غذایی شامل پنبه Bt+ پوره سن سوم عسلک پنبه (گروه یک)، پنبه شاهد+ پوره سن سوم عسلک پنبه (گروه دو)، پنبه Bt (گروه سه) و پنبه شاهد (گروه چهار) برای آزمایش‌ها استفاده شد. بر اساس نتایج به دست آمده، پنبه Bt هم به صورت مستقیم و هم از طریق طعمه، اثر معنی‌داری بر طول دوره نشو و نمای پورگی و میزان تخم‌ریزی داشت. طول دوره پورگی روی رژیم غذایی گروه اول، دوم، سوم و چهارم به‌ترتیب ۱۹/۸۵±۰/۳۲، ۱۶/۰۸±۰/۲۴ ، ۲۹/۴۲±۰/۴۵ و ۲۳/۱۱±۰/۲۳ روز به دست آمد. هم‌چنین، میزان کل تخم‌های گذاشته شده در تیمار پنبه شاهد+ پوره عسلک پنبه به طور معنی‌داری بیشتر از سایر گروه‌ها بود، گرچه بین تیمار پنبه Bt و پنبه شاهد در تعداد تخم گذاشته شده تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. نتایج نشان داد که پنبه تراریخته این قابلیت را دارد که به طور مستقیم یا از طریق تاثیر بر شکار، باعث کاهش شایستگی سن شکارگر شود و در نتیجه در استفاده از گیاهان تراریخته به عنوان یکی از عوامل مدیریت تلفیقی آفات نیاز به دقت بیشتر و ارزیابی‌های دقیق‌تر خواهد بود.

واژه‌های کلیدی: گیاه تراریخته، Cry، *Macrolophus pygmaeus*، عسلک پنبه

*نویسنده مسئول: s_azimi2007@yahoo.com

مقدمه

Archive of SID

www.SID.ir

امروزه با پیشرفت مهندسی ژنتیک، محققین پروتئین‌های مختلفی که دارای فعالیت حشره‌کشی هستند را شناسایی و ژن-های رمزکننده آن‌ها را به گیاهان منتقل می‌کنند. فناوری انتقال ژن‌های باکتری *Bacillus thuringiensis* Berlinger به گیاهان، تنها یک مثال از راه‌کارهای مهندسی ژنتیک است که می‌تواند برای توسعه مقاومت به حشرات استفاده شود. به این صورت که ژن‌های دلتا اندوتوکسین باکتری Bt را به گیاهان زراعی انتقال داده و گیاهان تراریخته ایجاد کرده‌اند. در نهایت این گیاهان پروتئین‌های کریستالی Cry با خاصیت حشره‌کشی را تولید کرده و نسبت به حشرات مقاوم می‌شوند (Sharma *et al*., 2000).

گیاه پنبه یکی از مهم‌ترین گیاهان لیفی در سطح جهان است و کشورهایی چون هند، چین و ایالات متحده آمریکا بیشترین مزارع کشت این گیاه را به خود اختصاص داده‌اند (Naranjo, 2005). در ایران نیز کشت پنبه در استان‌های مازنداران، منطقه‌ی مغان استان اردبیل و شمال استان خراسان انجام می‌گیرد. از مهم‌ترین آفات این محصول، کرم غوزه پنبه، برگ‌خوار پنبه و عسلک پنبه می‌باشند که خسارت قابل توجهی را وارد می‌کنند (KhajehPour, 2004). کشت پنبه تراریخته Bt در آمریکا و چین اثر کنترل کننده خوبی در برابر کرم غوزه پنبه و کرم قرمز پنبه داشته و باعث کاهش مصرف سم شده است (Naranjo, 2005). در ایران نیز پنبه تراریخته Bt تولید شده است که احتمالا بتواند در برنامه‌های مدیریت تلفیقی آفات به‌کار گرفته شود (Tohidfar and Kaviani, 2010).

موجودات غیر هدف ممکن است در معرض پنبه تراریخته و پروتئین‌های آن، چه به صورت مستقیم با تغذیه از گیاهان تراریخته و چه به صورت غیر مستقیم با تغذیه از حشرات فعال روی این گیاهان قرار گیرند. حشراتی که از دانه گرده تغذیه می‌کنند و نیز تغذیه‌کنندگان از شیره گیاهی مثل شته‌ها نیز در معرض این پروتئین‌ها قرار می‌گیرند (Tohidfar and Kaviani, 2010).

گزارش‌های متعددی وجود دارد که حاکی از تاثیر گیاهان تراریخته بر دشمنان طبیعی است (Ashouri *et al*., 2001; Guo *et al*., 2001; Hilbeck and Schmidt, 2006; Torres *et al*., 2008). این بررسی‌ها اثرات منفی پنبه Bt را بر حشرات مفید در آزمایشگاه (Hillbeck *et al*., 1999; Ponsard *et al*., 2002) و شرایط مزرعه (Men *et al*. 2003; Pilcher *et al*., 2005) نشان داده است. مرگ و میر لاروهای *Chrysoperla carnea* Stephens که از *Ostrinia nubilalis* (Hübner)) و *Spodoptera littoralis* (Boisduval) پرورش یافته روی ذرت Bt تغذیه کرده بود در مقایسه با ذرت شاهد معنی‌دار گزارش شد. هم‌چنین طول دوره لاروی *C. carnea* که با طعمه‌ی پرورش یافته روی ذرت Bt تغذیه شده بود، نسبت به تیمار شاهد بیشتر بود (Hilbeck *et al*., 1999). ضمن ارزیابی اثر مستقیم Bt مشخص شد که ماده‌های *Orius insidiosus* (Say) با تغذیه از تخم‌های *Plutella xylostella* (Linnaeus) آلوده به سوسپانسیون Bt نتاج کمتری داشتند که در نتیجه منتهی به نرخ رشد پایین جمعیت می‌شد (Goulart *et al*., 2015). در بررسی سو و همکاران (Su *et al*., 2015) نشان داده شد که تغذیه سن شکارگر *Zelus renardii* Kolenati از شکار *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) و *Trichoplusia ni* (Hübner) پرورش یافته روی پنبه تراریخته Cry1Ac/Cry2Ab و ذرت تراریخته Cry1F باعث افزایش طول دوره پوره سن چهار شکارگر می‌شود.

اگرچه به نظر می‌رسد که نحوه عمل باکتری برای محققین روشن شده است ولی اثر احتمالی این باکتری بر موجودات غیرهدف به طور کامل شناخته نشده است. حضور ژن این باکتری در گیاهان تراریخته بیشتر از فرمولاسیون‌های مختلف این باکتری موجودات مختلف را تحت تاثیر قرار می-دهد (Hilbeck and Schmidt, 2006)، چرا که بر خلاف مواد شیمیایی که برای احراز نتیجه، به دفعات باید از آن‌ها در محیط استفاده شود، گیاهان تراریخته به طور طبیعی و ضمن

Archive of SID

www.SID.ir

گرده افشانی قابلیت پخش در محیط‌های جدید را دارند. وقتی گیاهان تراریخته دارای ژن مولد سموم مختلف حشره‌کش، در طبیعت تثبیت می‌شوند انتقال پروتئین‌ها در سطح زنجیره غذایی صورت می‌گیرد و دیگر قابل برگشت نمی‌باشند (Torres *et al*., 2006).

موجودات غیرهدف از جمله دشمنان طبیعی فقط در صورتی پروتئین حشره‌کش کمتری دریافت می‌کنند که عادات غذایی خود را ترک کنند. این موضوع در رابطه با ترجیح میزبانی شکارگرها ممکن است اتفاق بیافتد و در این صورت میزان دریافت پروتئین توسط شکارگر کاهش می‌یابد. عدم تمایل شکارگر به طعمه پرورش یافته روی گیاه تراریخته باعث کاهش ارزش استفاده‌ی توأم از دشمنان طبیعی در کنار گیاهان تراریخته در قالب برنامه‌های مدیریت تلفیقی آفات خواهد شد. به طور کلی، بررسی تاثیر گیاهان تراریخته بر دشمنان طبیعی می‌تواند در تصمیم‌گیری محققان در به‌کارگیری این عوامل در کنار این گیاهان موثر واقع شود. بهترین روش جهت بررسی اثرات مستقیم (کشندگی) و غیرمستقیم گیاهان تراریخته بر موجودات غیر هدف به کارگیری حشراتی است که رژیم غذایی توام گیاه‌خواری و گوشت‌خواری داشته باشد. از این نوع حشرات می‌توان به سن چندین‌خوار *Macrolophus pigmaeus* Rambur اشاره کرد. سن‌های جنس *Macrolophus* متعلق به خانواده Miridae می‌باشند. این سن‌ها به طور عمده روی گیاهان تیره Solanaceae به‌ویژه گوجه‌فرنگی و توتون یافت می‌شوند، اما روی سایر محصولات نیز دیده می‌شوند. سن *M. pygmaeus* چندین‌خوار است اما سفید بالک‌ها طعمه ترجیحی این شکارگر هستند. این گونه از سال ۱۹۹۴ برای کنترل سفید بالک گلخانه در اروپا و سفیدبالک توتون استفاده شده است. پوره‌ها و حشرات کامل از تمام مراحل سفیدبالک‌ها با ترجیح تخم‌ها و لاروها تغذیه می‌کنند. اگرچه *M. pygmaeus* تغذیه از سفیدبالک ها را ترجیح می دهد ولی به علت رفتار چندین خواری، وقتی سن به تعداد زیاد روی یک محصول وجود داشته باشد، در کنترل سایر آفات مانند شته‌ها، کنه‌های تارتن، تخم و لارو بالپولکداران، لارو مینوزها و تریپس‌ها نیز موثر است. این سن همچنین به عنوان عامل کنترل بیولوژیک کمکی کنه‌های تارتن روی گیاهان گوجه فرنگی استفاده شده است (Talaei *et al*., 2012).

با فرض این‌که گیاه تراریخته مقاوم به کرم غوزه پنبه می‌تواند جنبه‌های زیستی شکارگر عسلک پنبه را به‌طور غیرقابل پیش‌بینی تحت تاثیر قرار دهد، آزمون‌هایی برای تعیین اثر پنبه تراریخته روی شاخص‌های زیستی *M. pygmaeus* (مرگ و میر، طول دوره لاروی و میزان زادآوری) طراحی شد. هدف از این پژوهش، بررسی تاثیر گیاه پنبه تراریخته روی دشمن طبیعی گوشتخوار-گیاهخوار در مقایسه با گیاه پنبه غیر تراریخته است تا با بررسی آن مشخص شود که آیا ژن باکتری که برای لارو بال‌پولکداران اختصاصی است پس از انتقال به گیاه پنبه روی دشمنان طبیعی هم اثر می‌گذارد یا خیر.

مواد و روش‌ها

گیاه پنبه استفاده شده در این پژوهش، پنبه رقم Cuker معمولی و تراریخته حاوی ژن باکتری *B. thuringiensis subsp. kurstaki* بود که برای اولین بار در ایران در پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران تولید شده است (Tohidfar *et al*., 2008). دو گیاه پنبه تراریخته و گیاه پنبه شاهد در گلدان‌های به قطر ۱۵ و ارتفاع ۲۵ سانتی متر در شرایط دمایی ۴±۲۶ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۱۰±۶۵ درصد کشت شدند. سن شکارگر *M. pygmaeus* از شرکت کوپرت* خریداری شد. جمعیت سفیدبالک *Bemisia tabaci* Gennadius از مزارع پنبه گرگان جمع آوری و در شرایط ثابت آزمایشگاهی (۱±۲۵ درجه سلسیوس، رطوبت نسبی ۵±۶۵٪ و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی) پرورش داده شد. گلدان‌های حاوی گیاهان ۴ تا ۶ برگی به قفس‌های چوبی به ابعاد ۷۵×۷۵×۷۵ سانتی متر منتقل

* Koppert

Archive of SID

www.SID.ir

شدند. آبیاری گلدان‌ها هر ۴ روز یک بار انجام می‌شد. از حشرات نسل چهارم سن شکارگر برای انجام آزمایش روی گیاهان تراریخته و شاهد استفاده شد.

بررسی شکارگری پوره‌ها و افراد بالغ سن *M. pygmeus*

در این آزمایش ۳۰ سفیدبالک هم سن (پوره سن سوم) روی برگ پنبه شاهد و تراریخته به طور جداگانه درون ظروف پرورش پلاستیکی (قطر ۸ سانتی‌متر) در اختیار سن شکارگر (سن اول تا افراد بالغ) قرار داده شد. سفیدبالک‌های خورده شده هر سه ساعت یک‌بار جایگزین و در نهایت تعداد سفیدبالک‌های خورده شده طی یک شبانه‌روز با انجام هشت بازدید مشخص شد.

بررسی تاثیر رژیم‌های غذایی بر میزان مرگ ومیر وطول دوره رشدی پوره‌های سنین مختلف *M. pygmeus*

در این آزمایش چهار تیمار شامل برگ پنبه تراریخته، برگ پنبه شاهد، طعمه (*B. tabaci*) روی پنبه تراریخته، طعمه (*B. tabaci*) روی پنبه شاهد در شرایط آزمایشی ذکر شده در نظر گرفته شد. در هر تیمار ۵۰ پوره سن اول یک روزه شکارگر *M. pygmaeus* به صورت انفرادی داخل ظروف پتری مورد بررسی قرار گرفت. بازدید ظروف پتری هر ۲۴ ساعت یکبار انجام می‌شد. در تمامی تیمارها دیسک‌های برگ پنبه به عنوان بستر استقرار طعمه‌ها استفاده شد. ظروف پتری به منظور ثبت بقا و طول دوره‌ی رشدی پوره‌ها هر ۲۴ ساعت یکبار بازدید و تعویض غذا نیز انجام می‌شد. هم‌چنین، نسبت جنسی نسل بعد شکارگر در هر یک از تیمارها تعیین شد.

بررسی تاثیر رژیم‌های غذایی بر طول دوره پیش از تخم‌گذاری و میزان زادآوری *M. pygmaeus*

ظروف پلاستیکی استوانه‌ای شفاف با قطر دهانه ۷/۵ و طول ۱۸ سانتی‌متر برای آزمایش تعیین میزان زادآوری مورد استفاده قرار گرفت. این استوانه‌ها شامل دو قطعه به ارتفاع ۱۳/۵ و ۵/۵ سانتی‌متر بودند. جهت تامین تهویه ظروف، در انتهای فوقانی و دو طرف بدنه استوانه‌ها سوراخ‌هایی به قطر ۵ میلی‌متر ایجاد شد. سوراخ‌های بدنه در ارتفاع شش سانتی‌متر از قاعده قرار داشتند. روی سوراخ‌ها با توری پارچه‌ای پوشانده شد. در قاعده هر استوانه از دیسک برگی گیاه پنبه به قطر تقریبی یک سانتی‌متر به عنوان بستر استفاده شد. در این آزمایش هم از چهار تیمار مشابه آزمایش قبل استفاده شد. در هر کدام از استوانه‌ها یک سن نر و یک سن ماده یک روزه قرار داده شد. علاوه بر رژیم غذایی مربوط به هر تیمار، تکه‌ای از ساقه پنبه به طول شش و قطر پنج میلی‌متر به عنوان بستر تخم‌ریزی در استوانه مورد استفاده قرار گرفت. برای تامین رطوبت ساقه‌ها یک سر هر قطعه ساقه تخم‌ریزی در پنبه مرطوب قرار می‌گرفت. استوانه‌ها در انکوباتور با شرایط دمایی ۱±۲۵ درجه سلسیوس، رطوبت نسبی ۵±۶۵٪ و دوره نوری، ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند. بازدید استوانه‌ها به منظور شمارش تخم‌های گذاشته شده داخل بافت ساقه به صورت روزانه انجام شد. زمان مشاهده اولین تخم در ساقه برای هر سن ماده به منزله پایان دوره پیش از تخم‌گذاری در نظر گرفته شد. این آزمایش تا ۳۲ روز پس از بلوغ ادامه یافت. تعویض غذا هر دو روز یک بار انجام می‌شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

داده‌های مربوط به درصد مرگ و میر از دامنه صفر تا صد درصد با فرمول $\mathrm{Arcsin}\sqrt{\frac{x+1}{2}}$ نرمال شدند. تجزیه واریانس و مقایسه میانگین‌ها با روش توکی (Tukey) و آزمون کای دو (Chi Square Test) برای نسبت جنسی با استفاده از نرم‌افزار SAS 0.9 (SAS Institute 2003) انجام شد.

نتایج و بحث

نتایج حاصل از تاثیر رژیم‌های غذایی مختلف بر طول دوره پورگی به طور خلاصه در جدول ۱ ارائه شده است. تجزیه واریانس طول دوره رشدی مرحله‌ی نابالغ (از تفریخ تا ظهور حشرات کامل) روی جیره‌های غذایی متفاوت نشان-دهنده وجود اختلاف معنی‌دار (df= 196,3 F=29.87,

Archive of SID

www.SID.ir

($P<0.001$) بین تیمارها است. به این صورت که رژیم غذایی پنبه شاهد و پنبه تراریخته در یک گروه و رژیم غذایی گیاه پنبه شاهد+پوره عسلک پنبه و پنبه تراریخته+ عسلک پنبه در گروه دیگر دسته‌بندی شدند. کوتاه‌ترین دوره پورگی شکارگر مربوط به گیاه پنبه شاهد+پوره عسلک پنبه و طولانی‌ترین آن در تیمار برگ پنبه تراریخته به‌ترتیب ۱۶/۰۸ و ۲۹/۴۲ روز به دست آمد. اختلاف معنی‌داری بین چهار تیمار مذکور مشاهده شد، به این صورت که اثر رژیم‌های غذایی در دو گروه (گروه یک: طعمه+پنبه شاهد و طعمه +پنبه تراریخته و گروه دوم: شامل پنبه تراریخته و پنبه شاهد) طبقه‌بندی شدند ($P=0.02$,$F=2.87$,$df=196,3$) (جدول ۱).

رژیم غذایی تاثیر معنی‌داری ($df=89,3$ $\chi^2=2.56$, $P=0.52$) روی درصد ماده‌های به وجود آمده از پوره‌های سن شکارگر نداشت (جدول ۲). درصد تبدیل پوره‌ها به حشرات ماده در چهار رژیم غذایی، پنبه Bt+ پوره سن سوم عسلک پنبه، پنبه شاهد+ پوره سن سوم عسلک پنبه، پنبه Bt و پنبه شاهد به‌ترتیب ۴۹/۹ درصد، ۵۶ درصد، ۴۸/۴۲ درصد و ۵۳/۲ درصد مشاهده شد. در شاخص طول دوره پیش از تخم-گذاری بین تیمارهای مختلف مورد آزمایش تفاوت معنی‌داری ($df=90,3$ $F=1.98$, $P=0.24$) وجود نداشت (جدول۲).

میزان تخم‌گذاری افراد ماده در یک دوره زمانی ۴۰ روزه تا مرگ ماده، اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای مختلف نشان داد ($df= 58,3$ $F=13.22$ $P<0/001$) به این صورت که رژیم‌های غذایی در سه گروه (گروه یک: طعمه+پنبه شاهد، گروه دوم: طعمه +پنبه تراریخته و گروه سوم: شامل پنبه تراریخته و پنبه شاهد) طبقه‌بندی شد. بیشترین میزان تخم-گذاری در تیمار عسلک پنبه+ برگ پنبه شاهد و کم‌ترین میزان در تیمار برگ پنبه تراریخته دیده شد (جدول ۳).

ویژگی گیاه‌خواری و تغذیه از طعمه جانوری در سن شکارگر *M. pymaeus* امکان بررسی اثر مستقیم و غیرمستقیم گیاهان تراریخته روی این شکارگر را فراهم آورد و انتخاب تیمارهای مختلف غذایی بر این اساس بود. برای بررسی تاثیر مستقیم گیاه تراریخته از تیمار برگ پنبه و برای بررسی اثرات غیرمستقیم از تیمار برگ پنبه+طعمه (عسلک پنبه) استفاده شد. نتایج این پژوهش نشان‌دهنده اثرات معنی‌دار رژیم‌های غذایی مختلف بر طول دوره پورگی، زنده‌مانی پوره‌ها و زادآوری سن شکارگر *M. pymaeus* است، در حالی که نسبت جنسی حشرات بالغ و طول دوره پیش از تخم‌گذاری در بین تیمارهای مختلف تفاوت معنی‌داری نداشت. عسلک پنبه پرورش یافته روی بوته‌های پنبه شاهد در مقایسه با افراد پرورش یافته روی پنبه تراریخته از کیفیت غذایی بهتری برای شکارگر برخوردار بود. هم‌چنین برگ‌های پنبه تراریخته در مقایسه با برگ پنبه شاهد نیز تاثیرات معنی‌داری بر شاخص‌های زیستی شکارگر داشت (جدول ۱).

نسبت جنسی حشرات بالغ سن شکارگر پرورش یافته روی تیمارهای غذایی مختلف اختلاف معنی‌داری با هم نداشتند. ماده‌های سن شکارگر به علت تغذیه از طعمه‌های با کیفیت پایین قادر به تولید تخم‌های ماده زیادی نبودند. حشرات ماده که از تیمار عسلک پنبه+ پنبه شاهد تغذیه کرده بودند، زادآوری بیشتری را در دوره ۴۰ روزه نشان دادند. همانگونه که نتایج نشان می‌دهند، تیمار پنبه تراریخته تاثیر معنی‌داری بر ویژگی‌های زیستی سن شکارگر داشته است. وقتی که یک طعمه یا حشره‌ی آفت حساس به پروتئین Cry روی گیاه Bt تغذیه می‌کند، به طور مشخص تحت تاثیر اثرات منفی گیاه تراریخته قرار می‌گیرد. افزون بر این، زمانی که شکارگر از این طعمه‌ی آلوده تغذیه می‌کند امکان دارد دچار اثرات منفی ناشی از تغذیه شکار شده و برخی از شاخص‌های زیستی آن تحت تاثیر قرار گیرد (Su *et al.*, 2015).

Archive of SID

www.SID.ir

جدول۱- طول (SE±میانگین) دوره پورگی و زنده‌مانی سن (نابالغ) شکارگر *Macrolophus pygmaeus* در چهار تیمار متفاوت غذایی

Table 1. Nymphal period (mean±SE) and survival of *Macrolophus pygmaeus* on four different diets

Treatment	Initiation of experiment (Number of individuals)	End of experiment (Number of individuals)	Length of nymphal period (day)	Survival (%)
Prey+Control Cotton	50	42	16.08±0.24d	88 a
Prey+Transgenic cotton	50	41	19.85±0.32c	84 a
Control cotton	50	27	23.11±0.23b	64 b
Transgenic cotton	50	24	29.42±0.45a	58 b

جدول ۲ – طول (SE ± میانگین) دوره پیش از تخمریزی و نسبت جنسی سن شکارگر در چهار تیمار متفاوت غذایی *Macrolophus pymaeus*

Table 2. (mean±SE) Pre-oviposition period (mean±SE) and sex ratio of *Macrolophus pygmaeus* on four different diets

Treatment	Sex ratio	Pre-oviposition period (day)
Prey+Control Cotton	56a	9.00±1.14a
Prey+Transgenic cotton	49.9a	8.85±1.12a
Control cotton	53.2a	10.11±1.16a
Transgenic cotton	48.42a	10.67±1.28a

Mean with different letter in each column are significantly different at 1% level.

در این پژوهش مشخص شد که پنبه تراریخته باعث طولانی شدن دوره‌های پیش از بلوغ و کاهش تخم‌ریزی در ماده‌های سن شکارگر می‌شود و اثر کمتری روی مرگ و میر دارد. دلیل تفاوت در طول دوره زندگی در رژیم غذایی حاوی پنبه Bt و شاهد به درستی مشخص نشده است اما چنین اثراتی را در بررسی‌های آزمایشگاهی سایر محققان نیز می‌توان مشاهده کرد (Li and Romeis, 2010). چنانچه گیو و همکاران (Guo *et al*., 2004) دریافتند که لاروهای بالتوری *Chrysoperla sinica* (Tjeder) و کفشدوزک *Propylaea japonica* (Thunberg) که از پوره‌های عسلک پنبه پرورش یافته روی گیاه تراریخته تغذیه کرده بودند، در مقایسه با شاهد، طول دوره رشدی طولانی‌تری داشتند.

Archive of SID

www.SID.ir

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۳- تعداد تخم روزانه و تعداد کل تخم (میانگین±SE) در سن شکارگر *Macrolophus pygmaeus* در چهار تیمار متفاوت

Table 3. Daily and total oviposition (mean±SE) of *Macrolophus pygmaeus* on four different diets

Treatment	Initiation of experiment (No. of individual)	Total number of eggs	Number of eggs per day
Prey+Control Cotton	19	32.778±0.97a	1.5±0.21a
Prey+Transgenic cotton	17	27.526±0.90b	1.25±0.19a
Control cotton	14	21.571±0.77c	1.09±0.23a
Transgenic cotton	12	21.75±0.79c	1.1±0.21a

Mean with different letter in each column are significantly different at 1% level.

این امکان وجود دارد که شکارگر تحت تاثیر اثرات غیرمستقیم ناشی از تغذیه طعمه‌ی پرورش یافته روی گیاه Bt که ارزش غذایی پایین‌تری نسبت به گیاه شاهد داشته است دوره رشدی خود را کندتر طی کرده باشد (Hilbeck *et al*., 1999). در واقع تاثیر منفی این گیاهان بر دشمنان طبیعی مثل افزایش طول دوره لاروی و کاهش میزان تخمریزی ممکن است به دلیل عدم سازگاری این گیاهان با دشمنان طبیعی باشد (Torres *et al*., 2008). با وجود این ، هنوز ابهامات زیادی در مورد عملکرد باکتری و تاثیر گیاهان تراریخته بر موجودات غیر هدف وجود دارد. باکتری *B. thuringiensis* می‌تواند هم آفت و هم دشمنان طبیعی را تحت تاثیر قرار دهد. با این همه، شدت تاثیر به میزان چسبندگی بین توکسین با غشای سلول‌های ستونی روده میانی حشره بستگی دارد. اثر کشنده *B. thuringiensis* بر بندپایان پیچیده است و بستگی به چندین مرحله پیاپی دارد که شروع آن با انحلال کریستال متعاقب هضم در pH مناسب، فعال سازی پروتوکسین‌ها، اتصال به گیرنده‌های ویژه‌ی سطح روده میانی، ایجاد منفذ در این سلول-ها و بهم ریختن ساختار روده میانی است، در نهایت جوانه‌زنی اسپورها به همراه کریستال‌ها فرایندی را آغاز می‌کند که منتهی به مرگ موجود زنده هدف می‌شود (Mohan and Gujar, 2003; Benfarhat-Touzri *et al*., 2013; Valaitis and Podgwaite, 2013).

قدرت تحمل به *B. thuringiensis* مرتبط با تغییراتی در فرایند پروتئولیزی توکسین‌ها (Oppert *et al*., 1997)، کاهش یا تغییر درگیرنده‌ها، اتصال برگشت‌پذیر به گیرنده‌ها (Aranda *et al*., 1996; Gahan *et al*., 2001; Darboux *et al*., 2002)، بهبود سلول‌های تخریب شده اپیتلیال روده‌ای (Forcada *et al*., 1999) و هم‌چنین ملانیزاسیون هملمف به عنوان یک سازوکار پاسخ ایمنی مرتبط با تحمل به *B. thuringiensis* است (Rahman *et al*., 2004). در نتیجه دلیل تاثیر محصولات Bt بر دشمنان طبیعی می‌تواند هم به دلیل اثرات ناشی از کاهش ارزش غذایی شکار در معرض Bt باشد که به دلیل اثرگذاری این محصولات بر فیزیولوژی جانور ایجاد می‌شود و هم به طور مستقیم از اثرات ناشی از پروتئین‌های Bt حادث شود (Hilbeck *et al*., 1999).

با وجود اعتقاد عموم محققین بر این اصل که لازمه اثر باکتری بر موجودات غیر هدف، وجود گیرنده‌های اختصاصی و قلیایی بودن معده میانی است (Hua *et al*., 2001; Zhang *et al*., 2006; Sivakumar *et al*., 2007; Kaur *et al*., 2014)، ولی هنوز بررسی‌ها برای درک بیشتر نحوه عمل این

Archive of SID

www.SID.ir

باکتری ادامه دارد. در این راستا بررسی اثر این باکتری بر موجودات غیر هدف، باعث روشن شدن برخی از ابهامات خواهد شد. چنانچه بررسی‌های بیشتر ثابت کرد که باکتری Bt می‌تواند دامنه هدف وسیعی داشته باشد (Hilbeck and Schmidt, 2006). هشدارهای محققین تنها به اثرات کشندگی این باکتری محدود نیست، چنانچه ردیابی پروتئین توکسین در عسلک *B. tabaci* نشان داد که گیاه تراریخته قابلیت تولید پروتئین باکتری را در شیره آوندهای آبکش دارد و محققین برای انتقال این ژن از پیشبری (پروموتور) استفاده رده‌اند که باعث بیان ژن مورد نظر در همه اندام‌های گیاهی می‌شود (Zhang *et al*., 2008). شناسایی این پروتئین در عسلک پنبه نشان داد که مقدار بیشتر این پروتئین از روده حشره دفع شده و جذب همولنف نشده است، پس از این نظر طبیعی به نظر می‌رسد که پروتئین مذکور اثر کشندگی بر این حشره نداشته باشد. اما مقدار اندک پروتئین در بدن حشره و نیز مقادیر باقیمانده آن در عسلک می‌تواند بر حشرات شکارگر و غیرهدف اثرگذار باشد. آزمون‌های ELISA[1] نشان داده‌اند که پروتئین‌های Cry در گیاه در بالاترین سطح وجود دارند، اما میزان آن‌ها در طعمه کمتر و در شکارگر در پایین ترین سطح است (Su *et al*., 2015). پژوهش‌های پیشین متذکر می‌شوند که بقایای پروتئین Bt در حشراتی که از گیاهان دارای این ژن تغذیه کرده‌اند به صورت فعال از نظر بیولوژیکی وجود دارد. البته سطوح پروتئین‌های Cry در آزمون های تغذیه‌ای سه سطحی در شکارگرها تنها جزئی کوچک از میزان پروتئینی است که در گیاهان بیان شده است (Su *et al*., 2015; Tian *et al*., 2013). البته باید توجه داشت که تعمیم دادن مطالعات آزمایشگاهی به مزرعه‌ای مشکل است زیرا توکسین Bt در شرایط کنترل شده نسبت به شرایط مزرعه‌ای بهتر جواب می‌دهد (Sears *et al*., 2001). نتایج آزمایش-های مزرعه ای حاکی از آن است که حتی در صورتی که گیاهان تراریخته اثری مستقیم بر شکارگرها و پارازیتوئیدها نداشته باشند به دلیل از بین بردن یا کاهش جمعیت طعمه، می-توانند بر دشمنان طبیعی اثرگذار باشند (Schoenly *et al*., 2003). کاهش فراوانی جمعیت طعمه در اثر تغذیه از گیاهان تراریخته می‌تواند کاهش جمعیت دشمنان طبیعی از جمله شکارگرها را در پی داشته باشد که این مساله کنترل تلفیقی آفات را در اجرا با مشکل مواجه خواهد کرد (Strickl and Annells, 2005; Torres and Ruberson, 2005).

با توجه به نتایج به دست آمده مشخص می‌شود که گیاه پنبه تراریخته- Bt نه تنها بر آفات هدف تاثیر گذار است و می‌تواند موجب مدیریت این حشرات شود و در نتیجه به عنوان یک عامل کنترل بیولوژیک مورد توجه و استفاده قرار گیرد، بلکه هم‌چنین این قابلیت را دارد که بر موجودات غیر هدف که به طور مستقیم یا غیرمستقیم با این محصول یا سایر گیاهان تراریخته در ارتباط هستند اثرگذار باشد. همان‌طور که در بررسی حاضر نشان داده شد پنبه Bt هم به صورت مستقیم و هم از طریق تغذیه از شکار، اثر معنی‌داری بر طول دوره زندگی پوره ها و میزان تخمریزی سن شکارگر *M. pygmaeus* داشت. در واقع، نتایج حاکی از آن بود که پنبه تراریخته می‌تواند شایستگی سن شکارگر را تحت تاثیر قرار دهد. بنابراین، شناسایی زوایای ناشناخته احتمالی این گیاه که یکی از گیاهان تراریخته تولید شده در داخل کشور نیز هست، خواهد توانست به کاربرد صحیح‌تر و کم خطرتر این نوع از گیاهان دستکاری شده ژنتیکی در کشور کمک کند.

[1]. Enzyme linked immunosorbent assay

Archive of SID

www.SID.ir

References

Aranda, E., Sanchez, J., Peferoen, M., Guereca, L. and Bravo, A. 1996. Interactions of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins with the midgut epithelial cells of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Invertebrate Pathology** 68: 203–212.

Ashouri, A., Michaud, D. and Cloutier, C. 2001. Unexpected effects of different potato resistance factors to the Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) on the Potato Aphid (Homoptera: Aphididae). **Environmental Entomology** 30: 524-532.

Benfarhat-Touzri, D., Saadaoui, M., Abdelkefi-Mesrati, L., Saadaoui, I., Azzouz, H. and Tounsi, S. 2013. Histopathological effects and determination of the putative receptor of *Bacillus thuringiensis* Cry1Da toxin in *Spodoptera littoralis* midgut. **Journal of Invertebrate Pathology** 112: 142–145.

Darboux, I., Pauchet, Y., Castella, C., Silva-Filha, M. H., Nielsen-Leroux, C., Charles, J. F. and Pauron, D. 2002. Loss of the membrane anchor of the target receptor is a mechanism of bioinsecticide resistance. P**roceeding of the National Academy of Sciences** 99: 5830–5835.

Forcada, C., Alcacer, E., Garcera, M. D., Tato, A. and Martinez, R. 1999. Resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin in three strains of *Heliothis virescens*: proteolytic and SEM study of the larval midgut. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology** 42: 51-63.

Gahan, L. J., Gould, F. and Heckel, D. G. 2001. Identification of a gene associated with Bt resistance in *Heliothis virescens*. **Science** 293: 857-860.

Goulart, R. M., De Bortoli, S. A., Vacari, A. M., Laurentis, V. L., Veiga, A. C. P., De Bortoli, C. P. and Polanczyk, R. A. 2015. Effect of *Bacillus thuringiensis* on the biological characteristics of the predator *Orius insidiosus* Say (Hemiptera: Anthocoridae) feeding on eggs of *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Plutellidae). **BioAssay** 10(2): 1-7.

Guo, J. Y., Wan, F. H. and Dong, L. 2004. Survival and development of immature *Chrysopa sinica* and *Propylaea japonica* feeding on *Bemisia tabaci* propagated on transgenic Bt cotton. **Chinese Journal of Biological Control** 20: 164-169.

Han, Y., Wang, H., Chen, J., Cai, W. and Hua, H. 2015. No impact of transgenic cry2Aa rice on *Anagrus nilaparvatae*, an egg parasitoid of *Nilaparvata lugens*, in laboratory tests. **Biological Control** 82: 46–51.

Hillbeck, A., Moar, W. J., Pusztai-Carey, M., Filippini, A. and Bigler, F. 1999. Prey mediated effects of Cry1Ac toxin and Cry2Ac protoxin on the predator *Chrysoperla carnea*. **Entomologia Experimentalis et Applicata** 91(2): 305-316.

Hilbeck, A. and Schmidt, J. E. U. 2006. Another view on Bt proteins-How specific are they and what else might they do**. Biopesticides International** 2(1): 1–5.

Hua, G., Masson, L., Jurat-Fuentes, J. L., Schwab, G. and Adang, M. J. 2001. Binding analyses of *Bacillus thuringiensis* cry d-endotoxins using brush border membrane vesicles of *Ostrinia nubilalis.* **Applied and Environmental Microbiology** 67(2): 872-879.

Kaur, R., Sharma, A., Gupta, D., Kalita, M. and Bhatnagar, R. K. 2014. *Bacillus thuringiensis* toxin, Cry1C interacts with 128HLHFHLP134 region of aminopeptidase N of agricultural pest, *Spodoptera litura*. **Process Biochemistry** 49(4): 688–696.

Khajehpour, M. 2004. Production of Industrial Plants. 1st Ed., Jehad-e-Daneshgahi Isfahan Press, Isfahan, Iran, ISBN: 961-6122-63-9, p. 335.

Kumar, R., Tian, J. C., Naranjo, S. E. and Shelton, A. M. 2014. Effects of Bt cotton on *Thrips tabaci* (Thysanoptera: Thripidae) and its predator, *Orius insidiosus* (Hemiptera: Anthocoridae), **Journal of Economic Entomology** 107(3): 927-932.

Li, Y. H. and Romeis, J. 2010. Bt maize expressing Cry3Bb1 does not harm the spider mite, *Tetranychus urticae*, or its ladybird beetle predator, *Stethorus punctillum*. **Biological control** 53: 337-344.

Men, X. Y., Ge, F., Liu, X. H. and Yardim, E. N. 2003. Diversity of arthropod communities in transgenic Bt cotton and nontransgenic cotton agro ecosystems. **Environmental Entomology** 32(2): 270-275.

Archive of SID

www.SID.ir

Mohan, M. and Gujar, G. T. 2003. Local variation in susceptibility of the diamondback moth, *Plutella xylostella* (Linnaeus) to insecticides and role of detoxification enzymes. **Crop Protection** 22: 3495-504.

Naranjo, S. 2005. Long–term assessment of the effects of transgenic Bt cotton on the function of the natural enemy community. **Environmental Entomology** 34(5):1211–1223.

Oppert, B., Kramer, K. J., Beeman, R. W., Johnson, D. and Mcgaughey, W. H. 1997. Proteinase-mediated insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Biological Chemistry** 272: 23473-23476.

Perdikis, D. Ch. and Lykouressis, D. P. 2001. Description of the egg and nymphal instars of *Macrolophus pygmaeus* Rambur (Hem: Miridae). **Entomologia Hellenica** 14: 32–40.

Pilcher, C. D., Rice, M. E. and Obrycki, J. J. 2005. Impact of transgenic *Bacillus thuringiensis* corn and crop technology on five non-target arthropods. **Environmental Entomology** 34(5): 1302-1316.

Ponsard, S., Gutierrez, A. P. and Mills, N. J. 2002. Effects of Bt toxin (Cry1Ac) in transgenic cotton on the adult longevity of four heteropteran predators. **Environmental Entomology** 31(6): 1197-1205.

Rahman, M. M., Roberts, H. L. S., Sarjan, M., Asgari, S. and Schmidt, O. 2004. Induction and transmission of *Bacillus thuringiensis* tolerance in the flour moth *Ephestia kuehniella*. **PNAS** 101: 2696–2699.

SAS Institute. 2003. SAS/STAT. Guide for Personal Computers. Ver. 6.12. Cary (NC): SAS Institute.

Schoenly, K. G., Cohen, M. B., Barrion, A. T., Gaolach, W. Z. B. and Viajante, V. D. 2003. Effects of *Bacillus thuringiensis* on non-target herbivore and natural enemy assemblages in tropical irrigated rice. **Environmental Biosafety Research** 3: 181–206.

Sears, M. K., Hellmich, R. L., Stanley-Horn, D. E., Oberhauser, K. S., Pleasants, J. M., Mattila, H. R., Siegfried, B. D. and Dively, G. P. 2001. Impact of Bt corn pollen on monarch butterfly populations: a risk assessment. **Proceeding of the National Academy of Science of the USA** 98: 11937-11942.

Sharma, H., Sharma, K., Seetharama, N. and Ortiz, R. 2000. Prospects for transgenic resistance to insects. **Electronic Journal of Biotechnology** 3:76–95.

Sivakumar S., Rajagopal R., Venkatesh G. R., Srivastava A. and Bhatnagar R. K. 2007. Knockdown of aminopeptidase-N from *Helicoverpa armigera* larvae and in transfected Sf21 Cells by RNA interference reveals its functional interaction with *Bacillus thuringiensis* insecticidal protein Cry1Ac. **Journal of Biological Chemistry** 282(10): 7312–7319.

Strickl, G. R. and Annells, A. J. 2005. The seasonal dynamics of arthropods in conventional, Ingard and Bollgard II cotton genotypes in a winter production system at Kununurra, Bentley Delivery Centre WA 6983 © State of Western Australia, pp. 1-13.

Su, H. H., Tian, J. C., Naranjo, S. E., Romeis, J., Hellmich R. L. and Shelto, A. M. 2015. *Bacillus thuringiensis* plants expressing Cry1Ac, Cry2Ab and Cry1F are not toxic to the assassin bug, *Zelus renardii*. **Journal of Applied Entomology** 139: 23–30.

Talaei-Hassanlouei R., Zeinalian Mehrabani, N. and Ezzati Tabrizi, R. 2012. Natural enemies biology of greenhouse pests. University of Tehran Press, p. 265.

Tian, J. C., Wang, X. P., Long, L. P., Romeis, J., Naranjo, S. E., Hellmich, R. L., Wang, P., Earle E.D. and Shelton A. M. 2013. Bt crops producing Cry1Ac, Cry2Ab and Cry1F do not harm the green lacewing, *Chrysoperla rufilabris*. **PLoS One** 8(3): e60125.

Tohidfar, M. and Kaviani, M. 2010. Biotechnology of cotton and its biosafety aspects. Published by: **Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran**, Karaj, Iran. P. 232.

Tohidfar, M., Ghareyazie, B., Nosavi, M., Yazdani, Sh. and Golabchian, R. 2008. Agrobacterium-e mediated transformated of cotton (*Gossypium hirsutum*) using a synthetic Cry 1Ab gene for enhanced resistance against *Heliothis armigera*. 2008. **Iranian Journal of Biotechnology** 6(3): 164-173.

Archive of SID

www.SID.ir

Torres, J. B., Ruberson, J. R. and Adnag, M. J. 2006. Expression of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab protein in cotton plants, acquisition by pests and predators: a tritrophic analysis. **Agricultural and Forest Entomology** 8: 191-202.

Torres, J. B. and Ruberson, J. R. 2005. Canopy and grounddwelling Predatory arthropods in commercial Bt And nonBt cotton fields: Patterns and mechanism. **Environmental Entomology** 34(5):1242-1256.

Torres, J. B. and Ruberson, J. R. 2008. Interaction of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin in genetically engineered cotton with predatory heteropterans. **Transgenic Research** 17: 345–354.

Valaitis, A. P. and Podgwaite, J. D. 2013. *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxin-building glicoconjugates present on the brush border membrane and in the peritrophic membrane of the Douglas-fir tussock moth are peritrophins. **Journal of Invertebrate Pathology** 112: 1–8.

Zhang, X., Candas, M., Griko, N. B., Taussig, R. and Bulla, L. A. 2006. A mechanism of cell death involving an adenylyl cyclase/PKA signaling pathway is induced by the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis*. **Proceeding of the National Academy of Science of the USA** 103: 9897–9902.

Zhang, X., Griko, N. B., Corona, S. K. and Bulla, L. A. 2008. Enhanced exocytosis of the receptor BT-R1 induced by Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis* directly correlates to the execution of cell death. B. **Comparative Biochemistry** 149: 581–588.

Archive of SID

www.SID.ir

Plant Pest Research
2016- 6(2): 75-86

Effects of Bt cotton on biological characteristics of *Macrolophus pygmeus* Rambur (Hem.: Miridae)

S. Azimi[1]*, S. Rahmani[2] and A. Ashouri[3]

1- Department of Plant Protection, College of Agriculture, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran, 2- Department of Entomology, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, Iran, 3- Department of Plant Protection, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj

(Received: January 10, 2016- Accepted: June 16, 2016)

Abstract

Study of the effects of genetically modified plants on non-target arthropods, is one of the most important research on transgenic plants safety. These plants are able to affect on natural enemies, directly and/or indirectly. So, in this study, the effect of feeding on Bt cotton and prey (*Bemisia tabaci* Gennadius) reared on Bt cotton was determined on predatory bug, *Macrolophus pygmeus* Rambur. Four diets including Bt-cotton + *Bemisia tabaci* (first group), non Bt-cotton + *Bemisia tabaci* (second group), Bt-cotton (third group), non Bt-cotton (forth group) were used in this experiment. The results showed that Bt-cotton significantly affected development time and fecundity of the predator. Developmental times of nymphs in the first, second, third and fourth groups were estimated to be 19.85±0.32, 16.08±0.24, 29.42±0.45 and 23.11±0.23 days, respectively. In addition, mean number of eggs laid in the non Bt-cotton + *Bemisia tabaci* treatment were significantly more than other groups (32.778±0.97), although no significant differences were found on fecundity between Bt-cotton and non Bt-cotton treatments. According to the obtained results, the Bt-cotton potentially could have negative effect on the biological parameters of *M. pygmeaus* severely and applying transgenic plants as one of integrated pest management agent, needs still more experiments and attentions.

Keywords: Transgenic plant, Cry, *Macrolophus pygmeaus*, *Bemisia tabaci*

*Corresponding author: s_azimi2007@yahoo.com

Archive of SID

www.SID.ir