تحقیقات آفات گیاهی
۲۳-۱۳: (۴) ۴- ۱۳۹۳

ارزیابی مقاومت سه رقم برنج تراریخته حاوی ژن *cry*1Ab به کرم سبز برگ‌خوار برنج *Naranga aenescens* Moore (Lep.: Noctuidae)

عبدالله یحیی‌پور[۱]، عباس خانی*[۲]، مجید ستاری[۳]، مهرداد عمواقلی طبری[۴] و محمد سالاری[۵]
۱، ۲ و ۵- دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، ۳ و ۴- موسسه تحقیقات برنج آمل، مازندران، آمل

(تاریخ دریافت: ۹۲/۹/۱۳ تاریخ پذیرش: ۹۳/۱/۱۷)

چکیده

کرم سبز برگ‌خوار برنج *Naranga aenescens* Moore یکی از آفات برنج محسوب می‌شود و تغذیه لارو از برگ منجر به کاهش سطح فتوسنتز کننده و در نتیجه کاهش بازده گیاه می‌شود. تقریبا نیمی از سموم مصرفی در مزارع برنج علیه بال‌پولک‌داران استفاده می‌شود. امروزه ایجاد ارقام تراریخت برنج با ژن باکتری Bt یک روش معمول برای ایجاد مقاومت گیاهان در برابر هجوم حشرات آفت می‌باشد. در این تحقیق، برنج‌های تراریخته خزر، ندا و نعمت از نظر میزان مقاومت به کرم سبز برگ‌خوار برنج در شرایط گلخانه بررسی شد. برای لاروهای سنین اول ۱۰ عدد لارو و برای لاروهای سنین سوم ۵ عدد لارو در هر برگ (۴ برگ در هر بوته، ۳ بوته از هر رقم) رهاسازی شدند و تلفات تا چهار روز بعد از آلوده‌سازی، بررسی شد. نتایج بین ارقام تراریخته و شاهد از نظر میزان تلفات لاروهای سن اول و سوم و تغذیه لاروهای سن سوم آفت اختلاف معنی‌داری نشان داد. میزان تلفات لارو سن اول و سوم در ارقام تراریخته خزر، ندا و نعمت تا چهار روز پس از آلوده‌سازی افزایش معنی‌داری یافت و به حدود ۱۰۰ درصد رسید. در صورتی‌که میزان تلفات برای هر دو سن لاروی در همین زمان در ارقام شاهد کمتر از ۱۰ درصد بود. رقم‌های خزر، نعمت و ندا تراریخته به‌طور میانگین با ۶، ۹ و ۱۱/۸ درصد تغذیه از سطح برگ و رقم‌های خزر، نعمت و ندا شاهد به‌ترتیب با میانگین ۴۲/۶، ۴۶/۶، ۵۱/۱ درصد صدمه به‌وسیله لارو سن سوم در دو گروه مجزای آماری قرار گرفتند. نتایج این آزمایش نشان‌دهنده سطوح بالایی از مقاومت برنج‌های تراریخته در برابر کرم سبز برگ‌خوار برنج بود.

واژه‌های کلیدی: اندوتوکسین، برنج تراریخته، کرم سبز برگ‌خوار برنج، تلفات، ژن *cry*1Ab

*نویسنده مسئول: abbkhani@uoz.ac.ir & abbkhani@yahoo.com

مقدمه

برنج (*Oryza sativa*) بعد از گندم مهم‌ترین محصول غذایی جهان می‌باشد. برنج یکی از محصولات قدیمی و مهم کشور است که با سطح کشت حدود ۶۰۰ هزار هکتار در استان‌های مازنداران، گیلان و گلستان کشت می‌شود. در میان غلات، برنج پس از گندم بیشترین سطح کشت را داشته ولی از نظر تولید انرژی در واحد سطح، مقاوم اول را دارا می‌باشد (Soleimani and Amiri Larijani, 2004)

برنج، میزبان صد گونه آفت است که یکی از این آفات کرم سبز برگ‌خوار برنج می‌باشد. کرم سبز برگ‌خوار برنج در صورت مساعد بودن شرایط جوی به مدت طولانی از برگ گیاه برنج تغذیه کرده و منجر به کاهش شدید فتوسنتز شده و راندمان محصول را به صورت قابل توجهی کاهش می‌دهد (Ye *et al*., 2001).

امروزه با استفاده بی‌رویه سموم، معضلات متعددی در زمینه بقایای غیر قابل تجزیه مواد شیمیایی در محیط، به هم خوردن تعادل جمیعت حشرات، نابودی عوامل کنترل‌کننده طبیعی، بروز آفات ثانوی و مقاومت حشرات در برابر حشره‌کش‌های شیمیایی به وجود آمده است (Alam *et al*., 1998). استفاده از مواد شیمیایی، نه تنها هزینه تولید برنج را افزایش می‌دهد بلکه باعث آسیب‌های بهداشتی به برنج‌کاران و محیط زیست نیز می‌شود (Pingali and Rogers, 1995). با توجه به چنین مشکلاتی، همواره راهکارهای گوناگونی مورد بررسی قرار گرفته و در نهایت روش کنترل تلفیقی برای محافظت محصول، با در نظر گرفتن حداقل اثرات زیان‌بخش و کنترل پایدار آفات، برگزیده شده است. یکی از این روش‌ها استفاده از آفت‌کش‌های بیولوژیکی به عنوان عوامل کنترلی موثر در مدیریت تلفیقی آفات بوده است که در این میان ویروس‌ها، باکتری‌ها و قارچ‌های بیماریزای حشرات شناخته شده‌اند (Gill *et al*., 1992).

در برنامه مدیریت تلفیقی آفات، باکتری‌ها از جایگاه خاصی برخوردار هستند. یکی از این باکتری‌ها به نام *Bacillus thuringiensis* (Bt) به عنوان حشره‌کش اختصاصی عمل می‌کند و به ویژه روی لاروهای بال‌پولک‌داران موثر می‌باشد. امروزه این باکتری به دلیل تخصص میزبانی و سمیت کم برای موجودات زنده غیر هدف به ویژه دشمنان طبیعی (شکارگرها و پارازیتوئیدها) یکی از موفق‌ترین حشره‌کش‌های میکروبی می‌باشد (Frankenhuyzen, 1993). باکتری Bt یک باکتری خاکزی است که بیش از ۵۰ سال به عنوان حشره‌کش بیولوژیکی مورد استفاده قرار می‌گیرد. فعالیت حشره‌کشی این باکتری به خاطر سم دلتا اندوتوکسین می‌باشد (Macintosh *et al*., 1990). حل شدن کریستال پروتئینی ناشی از اسپوردهی باکتری در روده میانی و فعال شدن اندوتوکسین لاندا و در نتیجه سوراخ شدن غشاء سلول و ایجاد عدم تعادل یونی در روده باعث غیر فعال شدن و فلج سریع لارو می‌شود (Schnepf *et al*., 1998).

امروزه ژن *cry*1Ab (ژن کنترل کننده بیوسنتز کریستال پروتئینی) از باکتری *B. thuringiensis* جدا شده و به گیاهان زراعی متعددی از جمله ذرت، سویا، پنبه، سیب‌زمینی و برنج منتقل شده است. ژن یاد شده تنها یکی از ژن‌های موجود در این باکتری است که پروتئینی هم نام خودش یعنی پروتئین cry1Ab را رمز می‌کند. بر اساس گزارش آژانس حفاظت محیط زیست آمریکا، این پروتئین دارای هیچ گونه اثر سمی و یا آلرژی زایی روی پستانداران نیست (Mendelsohn *et al*., 2003). در حال حاضر حدود ۲۴۰ ژن تولید کننده کریستال در این باکتری وجود دارد که به طور اختصار *cry* نامیده می‌شود. در سال‌های اخیر متخصصین علاقه زیادی به انتقال این ژن‌های مولد توکسین از باکتری به گیاهان زراعی داشته اند. این ژن‌ها را از باکتری جدا کرده و به داخل ژنوم‌های گیاهان زراعی منتقل می‌کنند به طوری که سیستم سلولی گیاه تولید سم می‌نماید. استفاده از این روش مزایای فراوانی از جمله کاهش استفاده از آفت‌کش، کاهش هزینه تولید برای کشاورز، کاهش آلودگی زیست‌محیطی و عدم تاثیر روی پارازیتوئید و شکارگرها را به دنبال خواهند داشت (Ghareyazie, 1997). تاکنون مهندسی ژنتیک توانسته است با تولید گیاهان تراریخته مقاوم به آفات بال‌پولک‌دار برنج از طریق انتقال ژن باکتری Bt به برنج، قدم مثبتی در جهت کنترل بیولوژیک با این آفات برداشته و در نتیجه

کاهش مصرف سموم آفت‌کش را به دنبال داشته باشد (Tabashninik and Gaughey, 1994).

تولید برنج تراریخته برای اولین‌بار در مزرعه‌ای به وسعت ۱۲ هکتار از سال ۱۳۸۳ در استان گیلان آغاز شد و یک رقم کیفی به نام طارم مولایی حاوی ژن کریستال *Cry*1Ab از باکتری *B. thuringiensis* و مقاوم به کرم ساقه‌خوار *Chilo suppressalis* Walk و کرم سبز برگ‌خوار برنج *Naranga aenescens* Moore تولید شد (Alinia *et al*., 2000). همچنین بررسی نشان داد انتقال ژن تاثیر سوء روی رشد و نمو گیاه برنج نگذاشته و تفاوتی در این رقم با رقم غیرتراریخته از نظر ویژگی‌های مرفولوژیک، فیزیولوژیک و بیوشیمیایی مشاهده نشده است. از طرفی با توجه به این که رقم طارم مولایی یک رقم کیفی بوده و با توجه به اهمیت ارقام کمی برنج و نقش آن در رساندن کشور به خودکفایی پس از تراریخته نمودن رقم طارم مولایی سه رقم کمی به نام‌های ندا، نعمت و خزر در معاونت موسسه تحقیقات برنج کشور در آمل به همان روش تراریخته شده و مقاومت آ نها به کرم ساقه‌خوار برنج اثبات شد (Kiani *et al*., 2008; Kiani *et al*., 2009). در همین راستا این پژوهش جهت بررسی مقاومت سه رقم ذکر شده نسبت به کرم سبز برگ‌خوار برنج در شرایط گلخانه انجام شد.

مواد و روش‌ها

ارقام مورد بررسی

بذرهای سه رقم تراریخته خزر، نعمت و ندا حاوی ژن *cry*1Ab از باکتری *B. thuringiensis* با روش تلاقی برگشتی[1] با رقم تراریخته طارم مولایی به عنوان والد غیر برگرداننده[2] ایجاد شد (Kiani *et al*., 2012). در تیمار شاهد از ارقام غیر تراریخته استفاده شد.

حشرات

برای تهیه لارو سن یک، شب‌پره‌های نر و ماده به وسیله تله نوری جمع‌آوری و تعداد ۵ جفت شب‌پره نر و ماده داخل ظروف استوانه‌ای شکل به ارتفاع ۲۴ و قطر ۱۴ سانتی‌متر که حاوی ۲۰ برگ همراه با غلاف بود، قرار داده شد. برای جلوگیری از خشک شدن برگ‌ها انتهای غلاف برگ‌ها از منفذی که روی در این ظروف تعبیه شده بود، خارج و با پنبه مرطوب پوشیده شد. سپس تعداد ۱۰ جفت شب‌پره نر و ماده در داخل این ظروف رهاسازی شد. پس از ۱۲ساعت برگ‌های حاوی تخم را برش زده و داخل ظرف پتری (۲×۱۰ سانتی‌متری) که ته آن با کاغذ صافی مرطوب پوشیده شده بود، قرار داده شدند. برای جلوگیری از لوله شدن برگ‌ها، دو طرف برگ‌ها با پنبه مرطوب پوشانده شد. تخم‌ها بعد از سه الی چهار روز از رنگ روشن به تیره تغییر رنگ داده و در روز چهارم تفریخ شدند. از لاروهای نوزاد برای آلودگی (آزمایش زیست‌سنجی) استفاده شد.

برای تهیه لارو سن سوم، در قسمتی از مزرعه یک قفس فلزی به شکل مکعب مربع به ابعاد دو متر نصب و روی این قفس با توری حریر پوشانده شد. در طول شب، شب‌پره‌های نر و ماده (به تعداد ۵۰ جفت) داخل این قفس رهاسازی و در هر روز به طور مرتب بازدید انجام گرفت. دسته تخم‌های گذاشته شده پس از چهار روز در شرایط طبیعی تفریخ شدند و پس از حدود هشت روز تغذیه، با اندازه‌گیری عرض کپسول سر که برای لارو سن سوم ۰/۹۲ میلی‌متر بود، لاروهای سن سوم برای آلوده‌سازی استفاده شدند.

آزمایش زیست‌سنجی

برای انجام آزمایش، دو قطعه به طول ۱۰/۳۰ متر و عرض ۲/۴۰ متر در محیط گلخانه (حداقل دمای گلخانه ۲±۲۸ و حداکثر آن ۲±۳۲ درجه سانتی‌گراد و رطوبت‌نسبی آن حداقل ۶۵ و حداکثر بالای ۸۵ درصد) با پارچه توری محصور شد. در هر کدام از این دو قطعه ۱۸ کرت یک مترمربعی وجود داشت که با علامت زدن زمین این کرت‌ها مشخص شدند. داخل این کرت‌ها برنج‌های شاهد و تراریخته در قالب طرح کاملا تصادفی با سه تکرار به صورت تک بوته نشا شدند. فاصله تیمارها از یکدیگر ۱/۶۰ متر و فاصله تکرارها ازهم ۸۰ سانتی‌متر بود. پس از نشاکاری، مراقبت‌های زراعی از جمله آبیاری، وجین و کوددهی در این مدت انجام گرفت و هیچ‌گونه سمپاشی در طول دوره رشد برنج صورت نگرفت تا امکان ارزیابی

1.Backcross
2.Non-recurrent

مقاومت این لاین‌ها به طور دقیق فراهم شود. برای آلوده-سازی از لاروهای سن اول و سوم استفاده شد. آلوده‌سازی لارو سن اول و سوم به این صورت بود که ابتدا در هر رقم سه پنجه انتخاب و از هر پنجه چهار برگ انتخاب و روی هر برگ ۱۰ لارو سن اول و ۵ لارو سن سوم با استفاده از قلم-موی نرم در محلی روی پهنک برگ قرار داده شد و به منظور جلوگیری از حرکت لاروها از بوته‌ای به بوته دیگر، روی بوته‌ها با پوشش توری به ابعاد ۱×۱×۲ متر پوشانده شد. میزان تلفات لارو تا چهار روز بعد از آلوده‌سازی و زمانی ثبت شد که حداکثر تلفات در ارقام تراریخته مشاهده شد.

همچنین در همین زمان، تعداد برگ صدمه دیده (تغذیه به صورت کنگره‌ای) در هر بوته و سطح برگ خورده شده با دستگاه اندازه‌گیری سطح برگ مورد بررسی قرار گرفت. برای تعیین میزان تغذیه‌ی برگ، سه برگ سالم از هر رقم و سه برگ خورده شده تقریبا هم اندازه در هر بوته (ارقام شاهد و تراریخته) در سه تکرار به صورت تصادفی انتخاب و سطح برگ اندازه‌گیری شد. میزان نسبی سطح تغذیه شده (درصد) از طریق تقسیم سطح برگ در ارقام شاهد ویا تراریخته به میانگین سطح سه برگ سالم از هر رقم، و تفریق این نسبت از صد اندازه‌گیری شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

پس از حصول اطمینان از نرمال بودن با آزمون غیرپارامتریک کولموگروف- اسمیرنوف[3]، داده‌ها با استفاده از نرم افزار اس پی اس اس[4] نسخه ۱۶ تجزیه شدند. برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون توکی در سطح خطای آماری ۵ درصد استفاده و شکل‌ها با برنامه Excel رسم شد.

نتایج

ارزیابی مقاومت برنج رقم خزر، نعمت و ندای تراریخته به لارو کرم سبز برگ‌خوار برنج

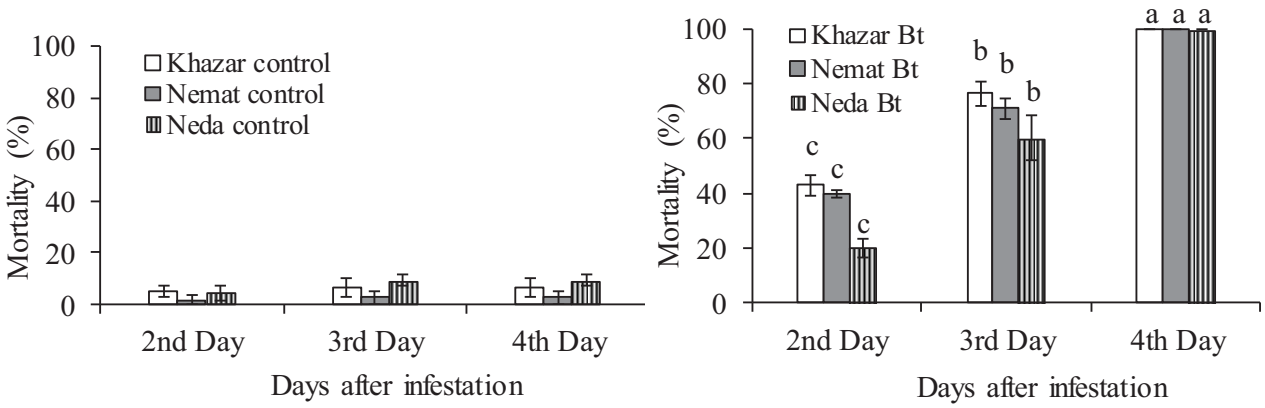
میزان تلفات لاروهای سن یک و سن سه بعد از چهار روز از رهاسازی لاروها روی ارقام تراریخته به ۱۰۰ درصد رسید. در صورتی که این مقدار در ارقام شاهد بعد از همین زمان کمتر از ۱۰ درصد بود. با گذشت زمان، تلفات لاروها در ارقام تراریخته مورد بررسی افزایش معنی‌دار در سطح خطای یک درصد داشت. این حالت افزایش معنی‌دار تلفات با روند مشابهی برای لارو سن یک روی هر سه رقم خزر تراریخته ($F_{2,8}=69.35$; $P=0$)، ندا تراریخته ($F_{2,8}=59.55$; $P=0$) و نعمت تراریخته ($F_{2,8}=156.83$; $P=0$) مشاهده شد (شکل ۱). در مورد لارو سن سه نیز تلفات لاروها به‌تدریج و به صورت معنی‌دار در سطح خطای یک درصد روی ارقام خزر تراریخته ($F_{3,11}=43.20$; $P=0$)، ندا تراریخته ($F_{3,11}=66.53$; $P=0$) و نعمت تراریخته ($F_{3,11}=219.22$; $P=0$) افزایش یافت و بعد از چهار روز از شروع رهاسازی لارو تلفات به ۱۰۰ درصد رسید (شکل ۲). نتایج به دست آمده نشان‌دهنده یکپارچه-سازی ژن *cry*1Ab در ژنوم برنج می‌باشد. در صورتی‌که در همین زمان میزان تلفات لارو سن یک و سن سه در ارقام شاهد به صورت غیرمعنی‌دار و تنها به کمتر از ۱۰ درصد افزایش یافت.

با توجه به نتایج حاصل از تجزیه واریانس (جدول ۱) بین میزان تلفات لارو سن سوم کرم سبز برگ‌خوار برنج در سه رقم برنج تراریخته در زمان‌های مختلف در گلخانه تفاوت معنی‌داری در سطح خطای یک درصد وجود داشت ($F=28.76$; $P=0$).

مقایسه بین ارقام تراریخته و شاهد از نظر میزان تغذیه برگ

نتایج حاصل از تجزیه آماری داده‌ها نشان می‌دهد که در هر سه رقم بین ارقام تراریخته و شاهد از نظر درصد برگ-های آسیب دیده در هر بوته ($F_{5,17}=24.29$; $P=0$) و درصد کاهش سطح برگ ($F_{5,17}=99.48$; $P=0$) به وسیله لارو سن سوم کرم سبز برگ‌خوار برنج، تفاوت معنی‌داری در سطح خطای یک درصد وجود دارد (شکل ۳). در تجزیه آماری داده‌های مربوط به میزان تغذیه از برگ ارقام شاهد در یک گروه آماری و ارقام تراریخته در گروه آماری مجزا قرار گرفتند. رقم‌های خزر، نعمت و ندا تراریخته به طور میانگین با ۶، ۹ و ۱۱/۸ درصد تغذیه از سطح برگ از نظر آماری در جدول گروه‌بندی توکی در گروه b و رقم‌های خزر، نعمت و ندا شاهد به ترتیب با میانگین ۴۲/۶، ۴۶/۶،

3.Kolmogorov-Smirnov
4.SPSS



شکل ۱- درصد مرگ و میر لاروهای سن یک کرم سبز برگ‌خوار برنج در ارقام تراریخته و شاهد برنج در زمان‌های مختلف بعد از آلوده‌سازی در گلخانه

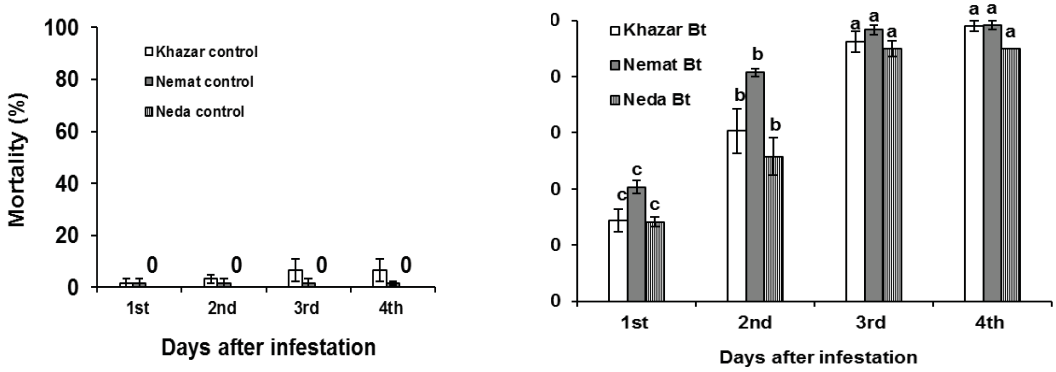
Figure 1. Mortality percent of the first larval instar of *Naranga aenescens* in transgenic and non-transgenic rice varieties (control) at various times after infestation in greenhouse conditions

جدول ۱- تجزیه واریانس داده‌های مربوط به درصد تلفات لاروهای سن سوم کرم سبز برگ‌خوار برنج در زمان‌های مختلف و درصد سطح برگ خورده شده چهار روز پس از آلوده‌سازی در سه رقم برنج تراریخته در گلخانه

Table 1. Variance analysis of mean percentage of mortality at various times and leaf area consumption four days after infestation for the third larval instar of *Naranga aenescens* in three transgenic rice varieties in greenhouse

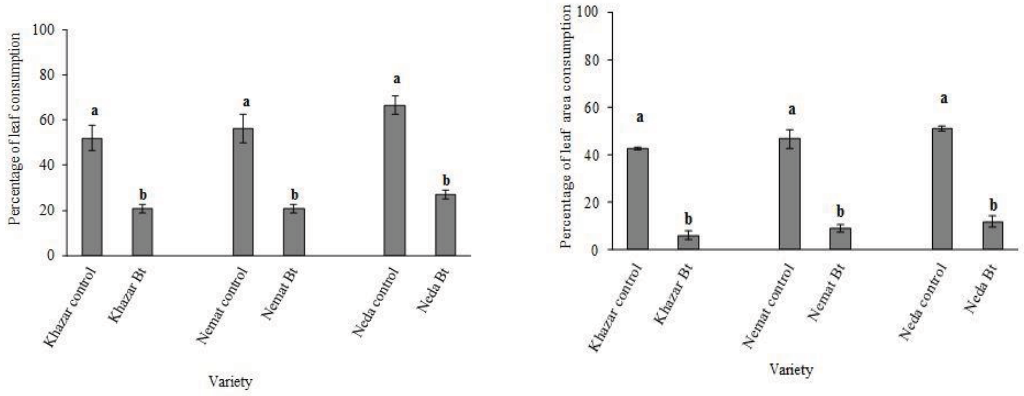
Experiment	Variable	df	Sum of Squares	Mean Square	F
Larval mortality evaluation	Variety	2	1318.05	659.03	28.76**
	Times after infestation	3	23129.86	7709.95	336.43**
	Variety × Times	6	693.05	115.51	5.04**
	Error	24	550	22.92	
	Total	35	25691.97		CV = 6.69
Leaf area consumption	Variety (Between Groups)	2	50.48	25.24	2.43 ns
	Within Groups	6	62.20	10.38	
	Total	8	112.68		

** Significant differences at 1% level. (Using Tukey test)
ns: No significant differences at 5% level. (Using Tukey test)



شکل ۲- درصد مرگ و میر لاروهای سن سوم کرم سبز برگ‌خوار برنج در ارقام تراریخته و شاهد برنج در زمان‌های مختلف بعد از آلوده‌سازی در گلخانه

Figure 2. Mortality percent of the third larval instar of *Naranga aenescens* in transgenic and non-transgenic rice varieties (control) at various times after infestation in greenhouse conditions



شکل ۳- میانگین درصد و سطح برگ تغذیه شده در ارقام شاهد و تراریخته برنج به وسیله لاروهای سن سوم کرم سبز برگ‌خوار برنج چهار روز بعد از آلوده‌سازی در شرایط گلخانه

Figure 3. Mean percentage and leaf area consumption by third larval instars of *Naranga aenescens* in transgenic and non-transgenic rice varieties 4 days after infestation in greenhouse conditions

۵۱/۱ درصد صدمه به برگ در گروه a جدول توکی قرار گرفتند (شکل۳).

نتایج حاصل از تجزیه آماری داده‌ها نشان داد (جدول ۱) بین میزان تغذیه سطح برگ سه رقم برنج تراریخته به وسیله لارو سن سوم کرم سبز برگ‌خوار برنج، چهار روز پس از آلوده سازی در گلخانه تفاوت معنی‌داری وجود ندارد (F=2.435; P=0.168).

بحث

باکتری *B. thuringiensis* یکی از باکتری‌های گرم مثبت موجود در خاک، هوازی و اسپورزا می‌باشد که بیشتر علیه لارو آفات مهم گیاهی از راسته بال‌پولک‌داران به کار

می‌رود. باکتری Bt اولین‌بار بعد از جنگ جهانی اول علیه کرم ساقه‌خوار اروپایی ذرت در جنوب شرقی اروپا استفاده شد و بعد از جنگ جهانی دوم علیه چندین آفت در آمریکای شمالی بکار برده شد (Pree and Daly, 1992). در گذشته این باکتری‌ها به صورت پودرهای حاوی ترکیبی از اسپورهای خشک شده و کریستال‌های سمی به فروش می‌رسیدند. این پودرها را در سطح برگ‌ها و دیگر محیط‌هایی که لارو حشره از آنجا تغذیه می‌کرد، به کار می‌بردند اما دلایلی نظیر ناپایداری باکتری و تجزیه شدن سموم Bt در برابر نور خورشید باعث شد تا گیاهان تراریخته تولید شوند (Percy and Fast, 1983). برای اولین‌بار در سال ۱۹۸۳ گیاهان تراریخته مطرح شدند. واژه گیاه تراریخته به گیاهی اطلاق می‌شود که در آن قطعه DNA خارجی پس از انتقال ژن، وارد ژنوم گیاه شوند.

بذرهای مورد استفاده در این مطالعه، بذرهای سه رقم تراریخته خزر، نعمت و ندا حاوی ژن *cry*1Ab از باکتری *B. thuringiensis* می‌باشد که با روش تلاقی برگشتی با رقم تراریخته طارم مولایی به عنوان والد غیر برگداننده ایجاد و حضور ژن و بیان آن در جمعیت‌های اصلاحی با کمک نشانگر مولکولی (MAS)[5] اثبات شده بود (Kiani *et al*., 2012). بررسی قبلی نشان دهنده وجود سطح بالایی از مقاومت در برابر کرم ساقه‌خوار برنج *C. suppressalis* Walker در این سه رقم تراریخت بوده است (Kiani *et al*., 2008).

نتایج به دست آمده در مطالعه حاضر بیانگر این است که سه رقم برنج تراریخته خزر، ندا و نعمت در مرحله رویشی مقاومت بالایی را در برابر آلودگی کرم سبز برگ‌خوار در شرایط کنترل شده در گلخانه دارند در حالی که رقم‌های غیر تراریخته خزر، ندا و نعمت چنین نبودند و آفت باعث آسیب گسترده‌ای به این ارقام شد. این مقاومت بالا، نشان دهنده بیان ژن *cry*1Ab در ژنوم این ارقام برنج می‌باشد (Kiani *et al*., 2012; Kiani *et al*., 2008). میزان تلفات لاروهای سن اول و سوم روی برنج تراریخته در کل زمان ارزیابی به طور معنی‌داری بیش از ارقام شاهد بود.

در بررسی انجام شده روی برنج تراریخته به روش انتقال به وسیله آگروباکتریوم، دو لاین *Bt* هموزیگوس به نام‌های KMD1 و KMD2 با زمینه ژنتیکی رقم ژاپونیکا تجارتی به نام Xiushui11 تولید شد که این لاین‌ها حاوی ژن *cry*1Ab بود. در ارزیابی بیولوژیکی آزمایشگاهی لاین‌های KMD_1 و KMD_2 سمیت بالایی نسبت به هشت گونه از آفات راسته بال‌پولک‌داران از جمله کرم ساقه‌خوار نواری *C. suppressalis* و کرم سبز برگ‌خوار برنج *N. aenescens* نشان دادند (Shu *et al*., 2000). در بررسی انجام شده نیز ۱۰۰٪ لاروهای نوزاد و لاروهای سن سوم کرم سبز برگ‌خوار برنج در اثر تغذیه از بافت برگ برنج تراریخته، از بین رفتند. در حالی که فقط ۹/۶۵٪ از لاروهای نوزاد و کمتر از ۶ درصد لاروهای سن سوم در ارقام شاهد تلف شدند. نتایج این مطالعه با نتایج این محققین مطابقت داشت .

بررسی یک رقم برنج تراریخته هندی حاوی ژن *cry*1Ab، مقاومت بالایی در برابر لاروهای نسل اول و دوم کرم ساقه‌خوار نواری نشان داد و اثر بازدارندگی تغذیه روی دو گونه از برگ‌خوارها با نام علمی *Cnaphalocrocis medinalis* Guenée و *Marasmia patnalis* Bradley داشت. به هر حال در این آزمایش از پروموتر *CaM35s* در همه بافت‌ها استفاده شد (Wunn *et al*., 1996). ولی واریته‌های تراریخته خزر، ندا و نعمت که در این بررسی استفاده شد با پروموتر PEP کربوکسیلاز تراریخته شده بودند، یعنی بیان ژن توکسین فقط در بافت‌های سبز وجود داشت و در بذر که مورد تغذیه انسان قرار می‌گیرد، بیان ژن وجود ندارد و این حالت یک برتری نسبت به برنج‌های تراریخته دیگر به حساب می‌آید.

مطالعه کرم قوزه پنبه *Helicoverpa zea* Boddie، کرم شاخدار توتون *Heliothis virescens* Fabricius و سوسک کلرادوی سیب‌زمینی *Leptinotarsa decemlineata* Say نشان داد که لاروهای سنین بالاتر حساسیت کمتری نسبت به لاروهای سنین پایین‌تر روی

5. Marker assisted selection

گیاهان تراریخته دارند (Wierenga *et al*., 1996). ولی نتایج این آزمایش نشان داد ارقام تراریخته اثر بالایی بر لاروهای سن سوم شبیه به لاروهای سن یک داشتند.

در آزمایش زیست‌سنجی انجام شده به روش برش برگ[6] تلفات بالایی در لاروهای کرم سبز برگ‌خوار *N. aenescens* مشاهده شد (Ye *et al*., 2001). مرگ و میر لاروی و میزان تغذیه از بافت برگی بین گیاهان تراریخته و شاهد تفاوت معنی‌داری داشت و باعث تلفات شدید برگ-خوارها شد. این موضوع می‌تواند معیار مفیدی برای ارزیابی سمیت برنج تراریخته علیه برگ‌خوارها باشد. نتایج این آزمایش با نتایج محققین فوق مطابقت داشته است.

بر اساس بررسی علی‌نیا و همکاران (Alinia *et al*., 2000) مقاومت برنج رقم طارم مولایی که حامل ژن *cry*1Ab از باکتری *B. thuringiensis* بودند، بر چهار گونه از بال‌پولک‌داران، دو گونه ساقه‌خوار *C. suppressalis* و *Scirpophaga incertulas* Walker و دو گونه برگ‌خوار *C. medinalis* و *N. aenescens*، ارزیابی شد. نتایج نشان داد که این رقم برنج مقاومت زیادی در برابر آلودگی طبیعی و مصنوعی نسبت به این چهار گونه از بال‌پولک‌داران دارد ولی در برنج شاهد، علائمی چون سفید شدن خوشه[7]، مرگ جوانه مرکزی[8] و همچنین پیچیدگی و خوردگی برگ مشاهده شد. همچنین بررسی کیانی و همکاران (Kiani *et al*., 2008) روی ارقام تراریخته ندا، نعمت و خزر نشان دهنده مقاومت بالای این ارقام به کرم ساقه‌خوار برنج می‌باشد. نتایج این آزمایش مشابه نتایج فوق بود و همان گونه که بیان شد رقم‌های تراریخته خزر، ندا و نعمت مقاومت بسیار بالایی را در برابر کرم سبز برگ‌خوار برنج از خود نشان دادند.

با انجام این آزمایش مشاهده شد که ارقام تراریخته در مقایسه با ارقام شاهد باعث مرگ و میر بالایی روی کرم سبز برگ‌خوار برنج می‌شود و این مرگ و میر بالا به خاطر حضور و بیان ژن *cry*1Ab در ارقام تراریخت مورد بررسی بود. با توجه به نتایج به دست آمده در این بررسی، می‌توان این گونه بیان کرد که برنج‌های تراریخته مورد آزمایش دارای توانایی بالایی در کنترل آفت بررسی شده، می‌باشد. امید می‌رود با پیشرفت روش‌های بیوکنترل و اصلاحی و نیز با بررسی‌های دقیق و علمی‌تر در آینده گیاهان تراریخته نقش مهمی در کنترل آفات مهم راسته بال‌پولک‌داران ایفا کنند.

سپاسگزاری

این تحقیق به وسیله دانشگاه زابل و موسسه تحقیقات برنج آمل حمایت مالی و معنوی شده است که تقدیر و تشکر می‌شود. از آقایان مهندس مرتضی نصیری، مهندس وحید خسروی و مهندس غلامعلی عبداللهی به خاطر همکاری بی‌دریغشان تشکر و قدردانی می‌شود.

6.Cut-leaf
7.White head
8.Dead heart

References

Alam, M. F., Datta, K., Abrigo, E., Vasquez, A., Senadhira, D. and Datta, S. K. 1998. Production of transgenic deep-water indica rice plants expressing a synthetic *Bacillus thuringiensis cry1Ab* gene with enhanced resistance to yellow stem borer. **Plant Science** 135: 25-30.

Alinia, F., Ghareyazie, B., Rubia, L. G., Bennett, J. and Cohen, M. B. 2000. Effect of plant age, larval age, and fertilizer treatment on resistance of a *cry1Ab* transformed aromatic rice to *Lepidopterous* stem borers and foliage feeders. **Journal of Economic Entomology** 93 (2): 484-493.

Frankenhuyzen, K. V. 1993. The challenge of *Bacillus thuringiensis*. John Wiley Publication, New York, pp. 1-35.

Ghareyazie, B., Alinia, F., Mengaito, C. A., Rubia, L. G., Palma, J. M., Liwang, E. A., Cohen, M., Bkhush, G. S. and Bennett, J. 1997. Enhanced resistance to two stem borers in an aromatic rice containing synthetic *cry1Ab* gene. **Molecular Breeding** 3: 401-414.

Gill, S. S., Cowles, E. A. and Pietrantonio, P. V. 1992. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. **Annual Review of Entomology** 37: 615-636.

Kiani, Gh., Nematzadeh, Gh. A., Ghareyazie, B. and Sattari, M. 2008. Evaluation of Bt (*Bacillus thuringiensis*) rice varieties against stem borer (*Chilo suppressalis*). **Pakistan Journal of Biological Sciences** 11(4): 648-51.

Kiani, Gh., Nematzadeh, Gh. A., Ghareyazie, B. and Sattari, M. 2009. Comparing the agronomic and grain quality characteristics of transgenic rice lines expressing *cry1Ab* vs. non-Transgenic controls. **Asian Journal of Plant Sciences** 8(1): 64-68.

Kiani, Gh., Nematzadeh, Gh. A., Ghareyazie, B. and Sattari, M. 2012. Pyramiding of *cry1Ab* and *fgr* genes in two Iranian rice cultivars Neda and Nemat. **Journal of Agricultural Science and Technology** 14: 1087-1092.

Macintosh, S. C., Stone, T. B., Sims, S. R., Hunst, P. L., Greenplate, J. T., Marrone, P. G., Perlak, F. J., Fichhoff, D. A. and Fuchs, L. 1990. Specificity and efficacy of purified *Bacillus thuringiensis* proteins against agronomically important insects. **Journal of Invertebrate Pathology** 56: 258-266.

Mendelsohn, M., Kough, J., Vaituzis, Z. and Matthews, K. 2003. Are *Bacillus thuringiensis* crops safe? **Nature Biotechnology** 21: 1003-1009.

Percy, J. and Fast, P. G. 1983. *Bacillus thuringiensis* crystal toxin: ultrastructural studies of its effect on silkworm midgut cells. **Journal Invertebrate Pathology** 41: 86-98.

Pingali, P. L. and Rogers, P. A. 1995. Impact of pesticides on farmer health and the rice environment. IRRI, Manila, Philippines. International Rice Research Institute. 664 pp.

Pree, J. D. and Daly, J. C. 1992. Toxicity of mixtures of *Bacillus thuringiensis* with endosulfan and other insecticides to the cotton bollworm *Heliothis armigera.* **Pesticide Science** 48: 199-204.

Schnepf, E., Crickmore, N., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, D. R. and Dean, D. H. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews** 62: 775-806.

Shu, Q., Ye., G., Cui, H., cheng, X., Xiamq, Y., Wu, D., Gao, M., Xia, Y., Hu, C., Sardana, R. and Altossaar, I. 2000. Transgenic rice plants with synthetic *cry*1Ab gene from *Bacillus thuringiensis* were highly resistant to eight lepidopteran rice pest species. **Molecular Breeding** 6: 433-439.

Soleimani, A. and Amiri Larijani, B. 2004. Basics of rice good cultivation. Tehran, Iran: Avij Publication. 303pp. (In Farsi).

Tabashninik, B. E. and Gaughey, W. H. 1994. Resistant risk assessment for single and multiple insecticides: responses of Indian meal moth (Lep., Pyralidae) to *Bacillus thuringiensis.* **Journal of Economic Entomology** 87(4): 834-841.

Wierenga, J. M., Norris, D. L. and Whalon, M. E. 1996. Stage specific mortality of Colorado potato beetle (Coleopteran: Chrysomelidae) on transgenic potato. **Journal of Economic Entomology** 895: 1042-1052.

Wunn, J. A., Kloti, A., Burkhardt, P. K., Ghosh, G. C., Launis, K., Iglesias V. A. and Potrykus, I. 1996. Transgenic indica rice breeding line IR58 expressing a synthetic *cry*1Ab gene from *Bacillus thuringiensis* provides effective insect pest control. **Bio Technology** 14: 171-176.

Ye, G. Y., Shu, Q. Y., Cui, H. R., Cui, H., Gao, M. W., Xia, Y. W., Cheng X. Y. and Altosaar, I. 2001. A leaf-section bioassay for evaluating rice stem borer resistance in transgenic rice containing a synthetic *cry*1Ab gene from *Bacillus thuringiensis* Berliner. **Bulletin of Entomological Research** 90: 179-182.

Plant Pests Research
2015 - 4(4): 13-23

Resistance assessment of three *cry*1Ab Transgenic Rice varieties against *Naranga aenescens* Moore (Lep.: Noctuidae)

A. Yahyapur[1], A. Khani*[2], M. Sattari[3], M. Amoo-Oughlou Tabari[4] and M. Salari[5]
1, 2 & 5. Department of plant protection, College of Agriculture, University of Zabol, 3 & 4. Rice Research Institute of Iran, Amol, Mazandaran

(Received: December 4, 2013- Accepted: April 6, 2014)

Abstract

Phyllophagous larvae of *Naranga aenescens*, a one of the most important pest of rice, causing a severe reduction in photosynthetic area and plant yield. Fifty percent of insecticides employed in rice fields are targeted at lepidopteran insects. Transformation of rice with Bt genes is a common approach to confer resistance to insect infestations. In this study, three transgenic varieties, Khazar, Neda and Nemat, were studied for the resistance to *N. aenescens* larvae in greenhouse condition. Larval mortality and feeding, were significantly different between transgenic and non-transgenic varieties. Mortality rate of first and third larval instars was about 100% in the transgenic varieties four days after infestation. However, the rate of larval mortality was less than 10% in the non-transgenic varieties at the same time. The leaf area consumption by third larval instars of *Naranga aenescens* in transgenic varieties, Khazar, Nemat and Neda were 6, 9 and 11.8% witch were significantly less than the non-transgenic varieties with 42.6, 46.6 and 51.1% damage respectively. The transgenic varieties showed high levels of resistance to *N. aenescens* larvae.

Keywords: Endotoxin, Transgenic rice, Rice green semilooper, Mortality, *cry*1Ab gene

*Corresponding author: abbkhani@uoz.ac.ir & abbkhani@yahoo.com