اثر پنبه تراریخته بر برخی از پارامترهای زیستی و فیزیولوژیکی *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae)

سولماز عظیمی[۱]، شیما رحمانی[۲]*،احمد عاشوری[۳] و علیرضا بندانی[۴]

۱ -دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، دانشکده کشاورزی، گروه گیاهپزشکی، تبریز، ایران

۲ -***نویسنده مسوول**: گروه حشره شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران (shrahmani@srbiau.ac.ir)

۳ -گروه گیاهپزشکی، دانشکده علوم مهندسی کشاورزی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

۴ -گروه گیاهپزشکی، دانشکده علوم مهندسی کشاورزی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

تاریخ دریافت: ۹۶/۰۸/۰۱ تاریخ پذیرش: ۹۷/۰۶/۲۸

چکیده

کرم غوزه *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) آفتی همه جایی و پلی‌فاژ است که به بسیاری ازگونه‌های گیاهی از جمله پنبه خسارت می‌زند. کاربرد پنبه تراریخته، از جمله راه‌های جایگزین کنترل این آفت به جای استفاده از آفت‌کش‌های شیمیایی است. در بررسی حاضر، اثر پنبه تراریخته کوکر، حاوی ژن *cry1Ab* بر زیست شناسی و فعالیت آنزیم پروتئاز گوارشی کرم غوزه در آزمایشگاه مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد مرگ و میر لارو سن دو در تیمار پنبه تراریخته ۶۸ درصد و در تیمار شاهد ۶ درصد است. همچنین وزن لاروهای سنین مختلف در تیمار پنبه تراریخته، به طور معنی‌داری کمتر و طول دوره زندگی آنها نسبت به شاهد بیشتر بود. بعلاوه، فعالیت پروتئاز کل گوارشی و آنزیم‌های تریپسین و کیموتریپسین، به ترتیب از سن دو به بعد و سنین پنج و شش لاروی پس از تغذیه از پنبه تراریخته نسبت به شاهد کاهش معنی‌داری را نشان داد. بنابراین، گیاه پنبه تراریخته کوکر، با به جای گذاشتن تأثیرات منفی معنی‌داری بر طول زندگی آفت، می‌تواند در مطالعات آتی برای استفاده در مدیریت کرم غوزه پنبه مورد توجه واقع شود.

***کلید واژه‌ها: کرم غوزه، پنبه تراریخته*، Bacillus thuringiensi، سنجش آنزیمی**

مقدمه

پنبه (*Gossypium hirsutum*) یک گیاه مهم الیافی است که در ایران در سطحی معادل ۱۵۰ الی ۲۰۰ هزار هکتار کشت می‌شود. خسارت ناشی از آفات این محصول در ایران بیش از ۳۰ درصد برآورد شده است و از همین رو، در طول فصل رشد و به منظور کنترل آفات، به طور معمول با استفاده از حشره‌کش‌های شیمیایی که اثرات ناگواری بر محیط زیست دارند مبارزه انجام می‌شود (Tohidfar et al., 2008).

کرم غوزه پنبه، *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae)، از جمله مهم‌ترین آفات کشاورزی است که پراکنش جهانی دارد و در آفریقا، خاورمیانه، جنوب اروپا، هند، آسیای مرکزی و جنوب شرقی آسیا، شرق و شمال استرالیا، نیوزیلند و بسیاری از جزایر اقیانوس آرام شرقی یافت می‌شود (Tay et al., 2013; Fitt, 1989). لاروهای این آفت پلی‌فاژ هستند و علاوه بر پنبه، به بسیاری از محصولات غذایی مهم تجاری، از جمله بقولات، سورگوم، ذرت و گوجه فرنگی خسارت می‌زند (Chelliah et al., 2011; Liu et al., 2010; Wu and Guo, 2005). لاروهای *H. armigera* به دلیل طغیان یکباره جمعیت و تخریب گسترده محصولات، کاملا شناخته شده‌اند (Degrande and Omoto, 2013;

(Alvi et al., 2012; Feng et al., 2010). با توجه به میزان تولید مثل بالا، توزیع گسترده و توانایی تغذیه و رشد و نمو روی گونه‌های مختلف گیاهان میزبان، این آفت باعث زیان چشمگیری می‌شود و کنترل آن مشکل است (Czepak et al., 2013; Kotkar et al., 2009). کشاورزان تقریبا به طور کامل برای کنترل این آفت، وابسته به آفت‌کش‌های شیمیایی هستند (Xie et al., 2016). بسیاری از این مواد شیمیایی در محیط پایدارند و باعث آلودگی‌های زیست محیطی می‌شوند (Damalas and Eleftherohoinos, 2011). از طرف دیگر استفاده مکرر از این ترکیبات شیمیایی طی سال‌های متمادی باعث بروز مقاومت در این حشره نسبت به بیشتر حشره‌کش‌ها شده است (Ishtiaq and Saleem, 2011; McCaffery, 1998).

اثرات منفی آفت‌کش‌های شیمیایی موجب شده است که راه‌های جایگزین جهت کنترل آفات در نظر گرفته شود (Isman, 2006). در سال‌های اخیر تحقیقات گسترده‌ای در مورد ترکیبات یا ژن‌های بدست آمده از میکروب‌ها و گیاهان انجام شده است تا شاید بتوان جایگزین مناسبی برای کنترل آفات پیدا کرد. بنابراین ترکیباتی مانند مهارکننده‌های آنزیم‌های گوارشی شامل آنزیم‌های آمیلاز و پروتئاز، لکتین‌های بدست آمده از گیاهان و قارچ ها، دلتا اندوتوکسین باکتری‌ها دارای پتانسیل خوبی برای کنترل آفات هستند (Franco et al, 2002). تعداد زیادی ژن از گیاهان و میکروب‌ها شناسایی شده‌اند که این قابلیت را دارند تا به گیاهان منتقل شوند. محصول این ژن‌ها برای حشرات گیاه‌خوار سمی خواهد بود و باعث مقاومت یا حفاظت گیاهان در برابر حشرات گیاه‌خوار می‌شود (Cascone et al, 2015; Gatehouse and Gatehouse, 1998).

محصولات دستکاری شده ژنتیکی دارای ژن‌های مولد حشره‌کش ابزاری مهم برای مدیریت حشرات آفت در جهان به شمار می‌روند و در سال ۲۰۰۷، درحدود ۳۷ درصد کل محصولات تراریخته را شامل می‌شدند (James, 2011). از سال ۱۹۹۶ محصولات دستکاری شده به صورت ژنتیکی که برای کنترل آفات، تولید پروتئین‌های حشره‌کش از باکتری *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* می‌کنند در کل بیش از ۵۶۰ میلیون هکتار را در سرتاسر جهان در بر می‌گیرند. اولین گیاهان Bt، تولید تنها یک توکسین Bt می‌کردند و علیه بالپولکداران آفت به کار می‌رفتند و امروزه نیز در برخی از کشورها کاربرد دارند. در کنار این محصولات تراریخته، محصولاتی با چندین توکسین (تا پنج توکسین در محصولات تراریخته Bt) هم امروزه تولید می‌شوند که می‌توان آن‌ها را علیه طیف گسترده‌تری از آفات به کار برد (Carriere et al, 2015). محصولات دستکاری شده ژنتیکی مقاوم به حشرات (GM) در بسیاری از نقاط جهان، به عنوان جایگزین مناسب آفت‌کش‌های شیمیایی در کنترل آفات دانسته شده‌اند. ارزیابی‌ها نشان دادند که محصولات GM تا سال ۲۰۱۲، ۱۷۰ میلیون هکتار از اراضی ۳۰ کشور را به خود اختصاص داده بودند (James, 2007). رهاسازی تجاری محصولات تراریخته مقاوم به حشره، تغییر یافته با ژن‌های باکتری خاکزی *B. thuringiensis* یکی از موفق‌ترین ابزار توسعه در مورد ایجاد تغییرات ژنتیکی طی دهه ۱۹۹۰ میلادی بوده است (Patankar et al., 2001). ژن‌های *cry* که پروتئین‌های کریستالی را بیان می‌کنند به دلیل فعالیت حشره کشی که علیه لاروهای بالپولکداران آفت دارند، شناخته شده‌اند. آن‌ها به طور مستقیم به صورت آفت‌کش زیستی یا به طور غیر مستقیم از طریق بیان ژن در گیاهان به کار گرفته می‌شوند. مرگ و میر لاروی وابسته به گونه حشره، سن لاروی، زمان در معرض قرارگیری و مقدار توکسین Cry بلع شده بستگی دارد (Halcomb et al., 1996; Ashfaq et al., 2001).

از جمله محصولات تغییریافته ژنتیکی، پنبه Bt است که توکسین‌های حشره‌کش *B. thuringiensis* را تولید می‌کند. استفاده از چنین پنبه تغییر ژنتیکی داده شده، انقلابی در کشاورزی جهان پدید آورد (Head et al., 2005). پنبه تراریخته بیان کننده ژن‌های دلتا اندوتوکسین باکتری *B. thuringiensis* مانند *cry1Ab* و *cry1Ac* (Patankar et al., 2001) پتانسیل مناسبی برای کنترل کرم غوزه پنبه در مواردی است که به بسیاری از گروه‌های حشره‌کش از جمله فسفره‌های آلی، کاربامات‌ها، پایروتروئیدها و سیکلودین‌ها که به طور معمول در محصولات پنبه استفاده می‌شوند مقاومت نشان داده است (Huang et al., 1999). پنبه تراریخته این قابلیت را دارد که استفاده از حشره کش‌های شیمیایی با طیف وسیع برای کنترل بال‌پولکداران آفت را کاهش دهد (Joanne, 1994; Fitt, 1998) و افزایش ایمنی نسبی برای موجودات زنده غیرهدف را به همراه داشته باشد (Huang et al., 1999; Meeusen and Warren, 1989). تغذیه از پروتئین‌های کریستالی Bt باعث بروز فلج در معده میانی، تغییر نفوذپذیری و از هم گسیختگی اپیتلیوم ناحیه گوارشی لاروها شده، باعث می‌شود لاروها قدرت تغذیه را از دست بدهند و سه یا چهار روز بعد، از بین بروند (Gill et al., 1992). مرگ لارو بسته به گونه حشره، سن لاروی و مقدار توکسین بلع شده می‌تواند بسیار متنوع باشد (Halcomb et al., 1996). توکسین Bt در پنبه تراریخته اثرات نامطلوبی روی زنده مانی و رشد و نمو لارو *H. armigera* دارد (Bambawale et al., 2004). در ارتباط با اثر محصولات تراریخته Bt بر کرم غوزه پنبه مطالعات متعددی انجام گرفته است (Azambuja et al., 2015; Ullah et al., 2014; Arshad et al., 2009; Anlikumar et al., 2008; Gujar et al., 2007; Men et al., 2005).

تمامی گیاهان سطوحی از مقاومت درون زاد در مقابل حمله ناشی از حشرات آفت دارند. با این حال، در نتیجه تکامل پایاپای، حشرات گیاه‌خوار به سدهای دفاعی گیاهان از طریق اجتناب و یا سم زدایی سازگار شده‌اند (Gatehouse and Gatehouse, 1998). معرفی ژن Bt به گیاه پنبه می‌تواند متابولیسم پنبه را تغییر دهد و باعث حضور محتوای بیشتری از اسید آمینه‌های آزاد و پروتئین محلول Bt در برگ‌های پنبه شود (Chen et al, 2005). بنابراین، اثرات پنبه Bt بر حشرات گیاه‌خوار ممکن است تنها مربوط به پروتئین Bt نباشد و سایر ترکیبات متابولیک ثانویه نیز دخیل باشند (Olsen and daly, 2000). در این موارد، متابولیت‌های گیاه می‌توانند فعالیت‌های آنزیم‌های سم زدا و سایر آنزیم‌های هدف را در گیاه خواران تغییر دهند (Vanhaelen et al., 2001).

بررسی‌ها در زمینه برهم کنش آنزیم‌های متابولیکی حشرات با گیاهان GM ناچیز است. از این میان می‌توان به آزمایشی اشاره کرد که فعالیت آنزیم‌های سم‌زدا و آنزیم‌های گوارشی را در نسل‌های مختلف *Spodoptera exigua* (Hubner) در پاسخ به پنبه Bt تراریخته مورد بررسی قرار دادند (Guo and Wan, 2010). در بررسی حاضر اثرات گیاه پنبه بیان کننده پروتئین Cry1Ab توکسین Bt بر زنده‌مانی، رشد و نمو و وزن لاروهای *H. armigera* مورد ارزیابی واقع شده و اثرات تغذیه‌ای این گیاه بر پروفیل آنزیم پروتئاز گوارشی در این حشره مورد بحث قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

پرورش حشره

به منظور پرورش کرم غوزه پنبه، *Helicoverpa armigera* (Hübner)، تخم‌های حشره در ابتدا از کلنی پرورشی گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه تبریز تهیه شد. در کلنی، لاروها با غذای مصنوعی بر پایه لوبیا

(۲۰۵ گرم پودر لوبیا چشم بلبلی، ۳۰ گرم پودر جوانه گندم، ۳۵ گرم مخمر، ۱۲ گرم آگار، ۳/۵ گرم اسید آسکوربیک، ۲/۲ گرم نیپاژین، ۱/۱ گرم اسید سوربیک، ۲/۵ میلی لیتر فرمالدهید، ۵ میلی لیتر روغن آفتاب گردان و ۸۵۰ میلی لیتر آب مقطر) تغذیه و در دمای ۱±۲۶ درجه سلسیوس، رطوبت نسبی ۵±۵۰ درصد و دوره نوری ۱۶:۸ (روشنایی: تاریکی) نگهداری می‌شدند (Shorey and Hale, 1965).

کاشت بذر پنبه تراریخته

گیاه پنبه استفاده شده در این پژوهش نسل چهارم پنبه رقم کوکر معمولی و تراریخته حاوی *ژن cryAb1* توکسین باکتری *B. thuringiensis* بود (Azimi et al., 2016). گیاهان، در گلدان‌های به قطر ۱۵ و ارتفاع ۲۵ سانتیمتر در شرایط دمایی ۴±۲۶ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۱۰±۶۵ درصد در شرایط گلخانه کشت داده شدند.

تأثیر پنبه تراریخت بر بیولوژی کرم غوزه پنبه

به منظور بررسی اثر گیاه تراریخته بر کرم غوزه پنبه و مقایسه آن با پنبه غیر تراریخت کوکر (شاهد)، تخم‌های هم سن از ماده های تخم‌گذار جمع‌آوری شد و زمانی که تخم‌ها تفریخ شده و به سن دو رسیدند به روی هریک از ۱۰ دیسک برگی در هر تیمار (دو تیمار گیاه تراریخته و غیر تراریخته) یک لارو قرار داده شدند. دیسک‌های برگی در داخل پتری‌هایی که در کف آن کاغذ صافی گذاشته شده بود قرار داده شده و کاغذها هر روز مرطوب و برگ‌های تازه جایگزین می‌شدند. در آزمون‌ها سعی شد از برگ‌های جوان گیاه چهار تا شش برگی با وزن تقریبا یکسان استفاده شود. بازدیدها ۳ روز بعد از شروع آزمایش انجام و مشاهدات ثبت می‌شد. برای بررسی تاثیر پنبه تراریخته بر وزن لاروهای تغذیه کرده، لاروهای سنین مختلف که زنده مانده بودند ۴۸ ساعت قبل از پوست اندازی انتخاب و با ترازوی با دقت میکروگرم وزن شدند. آزمایش در ۴ تکرار انجام گرفت و در هر تکرار ۱۰ لارو قرار داده شد.

تاثیر گیاه پنبه بر آنزیم پروتئاز گوارشی کرم غوزه پنبه

استخراج عصاره آنزیمی اندام گوارشی

لاروهای سنین مختلف *H. armigera* (سن یک تا سن شش) پرورش یافته بر هر دو گیاه پنبه شاهد و تراریخته برای تشریح مورد استفاده قرار گرفتند. تعداد ۱۰ لارو از هر سن لاروی از هر یک از دو تیمار جمع آوری و روی یخ بی حس شدند. سپس سطح شکمی بدن لارو با قیچی بریده شده و لوله گوارش با استفاده از پنس جدا شد. تعداد ۱۰ عدد لوله گوارش در داخل میکروتیوب‌های حاوی پانصد میکرولیتر آب دوبار تقطیر سرد قرار داده شده و جهت استخراج عصاره آنزیمی، هموژنایز شدند. سپس نمونه‌ها در دمای چهار درجه‌ی سلسیوس با سرعت ۱۵۰۰۰ ×g به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. بعد از این مرحله، بخش رونشین جدا شده و به عنوان منبع آنزیمی تا شروع آزمایش‌ها و به مدت محدود، در دمای ۲۰- درجه‌ی سلسیوس نگه‌داری شد.

تعیین فعالیت پروتئازی

فعالیت پروتئازی گوارشی کل لاروهای سنین یک تا شش، در اسیدیته ۱۰ تعیین شد. بدین منظور از سوبسترای آزوکازئین نیم درصد استفاده شد. برای تعیین فعالیت، ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره آنزیمی در ۲۰۰ میکرولیتر از محلول آزوکازئین به مدت یک ساعت در ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شد. واکنش با افزودن ۳۰۰ میکرولیتر از تری کلرواستیک اسید ۱۰ درصد (TCA) متوقف شد. بعد از ۳۰ دقیقه در چهار درجه سلسیوس، سوسپانسیون سانتریفوژ شد، حجم برابر ۵۰ mM میکرولیتراز NaOH به رونشین اضافه گردید و جذب نوری در ۴۴۰ نانومترخوانده شد (Saadati and Bandani, 2011).

بررسی فعالیت سرین پروتئازهای گوارشی با استفاده از سوبستراهای اختصاصی SAAPFpNA و BApNA

تشخیص فعالیت کیموتریپسین و تریپسین پروتئازها بر اساس روش سعادتی و بندانی (Saadati and Bandani, 2011) صورت گرفت. به این منظور به پنج میکرولیتر عصاره آنزیمی پنج میکرولیتر محلول سوبسترا و ۴۰ میکرولیتر بافر با pH برابر ۱۰ (pH اپتیمم معده) اضافه کرده و به مدت ۳۰ دقیقه در ۳۰ درجه انکوبه شد. سپس واکنش با افزودن ۱۵۰ میکرولیتر اسید استیک ۳۰ درصد متوقف گردید و پارانیتروانیلین آزاد شده در طول موج ۴۰۵ نانومتر اندازه‌گیری شد.

منحنی استاندارد پروتیین

سنجش فعالیت پروتئین بر اساس روش بردفورد (Bradford, 1976) با استفاده از سرم آلبومین گاوی به عنوان استاندارد انجام گرفت و جذب نوری در طول موج ۶۳۰ نانومتر اندازه‌گیری گردید.

تجزیه و تحلیل آماری

تمامی آزمایش‌ها در سه تکرار و مقایسه میانگین‌ها با آزمون t انجام گرفت. تجزیه و تحلیل داده ها با استفاده از نرم افزار SAS 9.0 (SAS Institute 2003) انجام شد. برای رسم نمودارها از نرم افزار سیگماپلات 11.0 استفاده شد. گروه‌بندی داده‌های آنزیمی با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن و در سطح معنی‌داری ۱ درصد بررسی شد.

نتایج و بحث

بررسی اثر پنبه تراریخته بر درصد مرگ و میر و کاهش وزن لاروهای غوزه پنبه *H. armigera*

بررسی حاضر نشان داد که لاروهای سن دو با تغذیه از پنبه تراریخته بعد از هفت روز، ۶۸ درصد مرگ و میر داشتند. هم‌چنین پنبه تراریخته در مقایسه با پنبه شاهد باعث کاهش وزن لاروها شد (جدول ۱). در ضمن میانگین وزن شفیره در تیمار پنبه تراریخته ۰/۳ گرم بود که در مقایسه با تیمار شاهد با وزن ۰/۴۵ گرم، ۰/۱۵ گرم کاهش وزن نشان داد. مقایسه دو به دوی وزن سنین مختلف لاروی، معنی‌دار بودن اختلاف تیمارها را نشان داد (جدول ۱).

طول دوره رشدی لاروهای غوزه پنبه به تفکیک هر سن ثبت شد. همان‌طور که در جدول ۲ مشاهده می‌شود تغذیه از پنبه تراریخته به طور معنی‌داری باعث افزایش طول دوره لاروی شد (t = ۳۶/۱۴ ، P < ۰/۰۰۱). طول دوره شفیرگی در تیمار با پنبه تراریخته به طور میانگین ۰/۰۱۲±۲۳ روز بود که در مقایسه با شاهد (۰/۵±۱۶ روز) به طور معنی‌داری (t=۲۶ /۵۶ ، P < ۰/۰۰۱) طولانی‌تر بود. در این آزمایش از ۳۲ عدد لارو سن شش، تنها ۱۶ شفیره سالم ایجاد شد.

تعیین فعالیت پروتئازی کل در معده میانی *H. armigera*

نتایج آنزیمی با استفاده از سوبسترای آزوکازئین نشان داد که میزان فعالیت کل پروتئازی از سن دوم تا سن ششم لاروی *H. armigera* در هر دو تیمار پنبه شاهد و تراریخته با افزایش سن لارو روند افزایشی داشت. با این وجود در لاروهای سن دوم به بعد در مقایسه با شاهد کاهش معنی‌داری ($F_{24, 2}$= 91.11; P< 0.01) در فعالیت پروتئازهای گوارشی دیده شد (شکل ۱).

اثر تغذیه از پنبه تراریخته بر سرین پروتئازها با استفاده از سوبسترای اختصاصی BapNA و SAAPFpNA

نتایج مربوط به اثر تغذیه لاروهای سن پنجم و ششم کرم غوزه پنبه از پنبه تراریخته بر فعالیت آنزیم‌های اختصاصی تریپسین و کیموتریپسین به ترتیب با سوبستراهای اختصاصی BapNA و SAAPFpNA در شکل ۲ و ۳ نشان داده شده است. تغذیه از پنبه تراریخته بوسیله لاروهای سن پنجم و ششم کرم غوزه پنبه باعث کاهش فعالیت هر دو آنزیم تریپسین ($F_{28, 2}$= 22.82; P< 0.01) و کیموتریپسین ($F_{28, 2}$= 48.12; P< 0.01) شد. کم‌ترین میزان فعالیت آنزیم در لارو سن شش مشاهده شد (شکل۲ و ۳).

جدول ۱- درصد مرگ و میر لارو سن دوم و وزن (SE±میانگین) سنین مختلف لاروهای *H. armigera* پرورش یافته روی گیاه پنبه تراریخته و شاهد.

*** درصد مرگ و میر برای لارو سن دو محاسبه شده است.**

Table 1. Mortality percentage of second instar larvae and body weight of different instars larvae (Mean ± SE) of *H. armigera* on Bt cotton and control cotton

Treatment	Mortality* %	Second instar (gr)	Third instar (gr)	Fourth instar (gr)	Fifth instar (gr)	Fifth instar (gr)
Bt cotton	68 ±2.23[a]	0.025 ±0.00[b]	0.074 ±0.00[b]	0.12 ±0.004[b]	0.25 ±0.004[b]	0.36 ±0.005[b]
Control cotton	6 ±0.00[b]	0.029 ±0.00[a]	0.087 ±0.00[a]	0.91 ±0.004[a]	0.31 ±0.006[a]	0.42 ±0.008[a]
t	7.05	34.2	22.09	17.6	43.7	28.9
P	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001

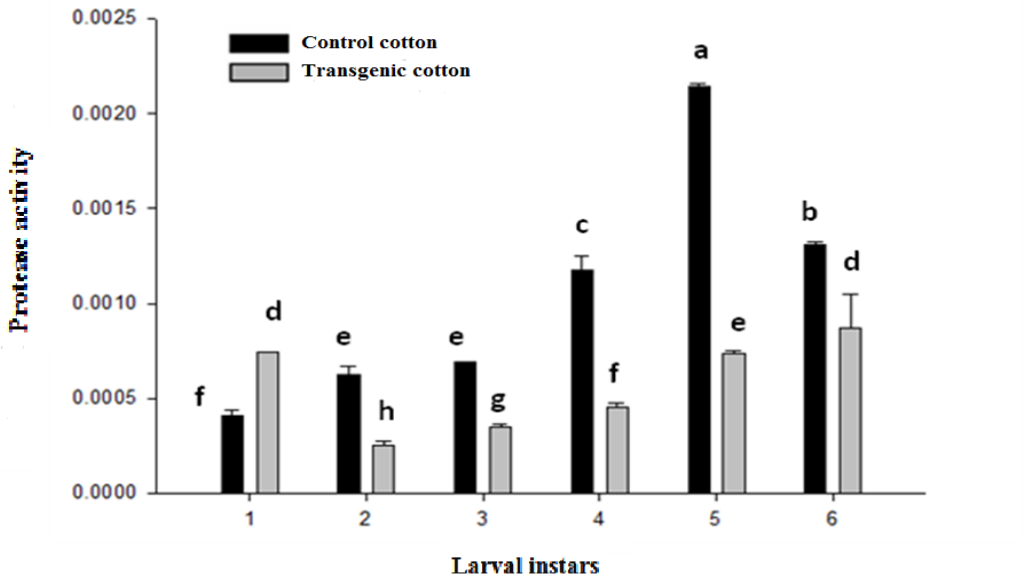
In each column means followed by a different latter are significantly different.
*Mortality% is calculated for second instar larvae.

جدول ۲- طول دوره (SE±میانگین) (روز) لاروی سنین مختلف *H. armigera* پرورش یافته روی گیاه پنبه تراریخته و شاهد.

2. Developmental period (day) (Mean ±SE) of different larval stages *H. armigera* reared on Bt cotton and control cotton.

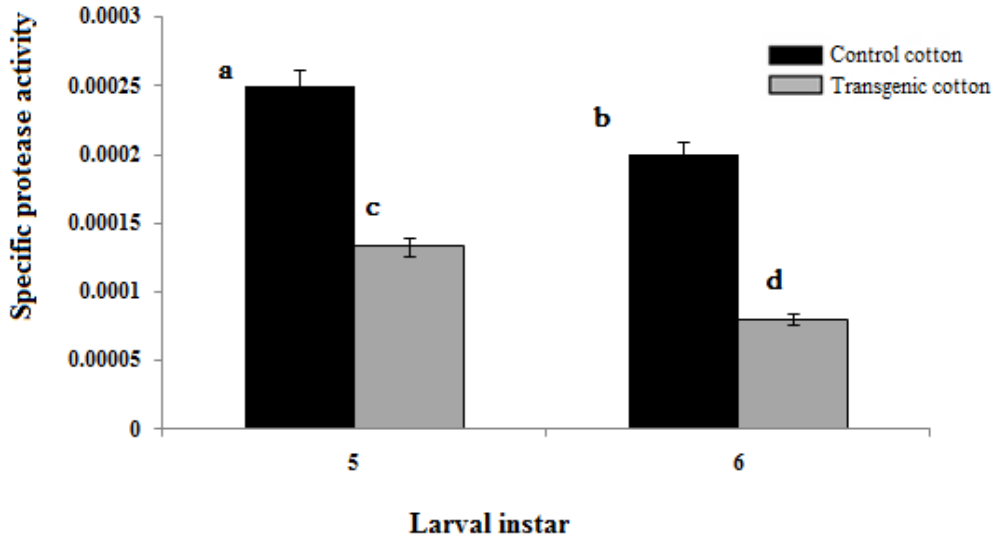
treatment	First instar	Second instar	Third instar	Fourth instar	Fifth instar	sixth instar	Total period
Bt cotton	6.1 ±0.3[a]	7.1 ±0.41[a]	7.5 ±0.5[a]	5.1 ±0.63[a]	5.0 ±0.63[a]	6.0 ±0.7[a]	37.4 ±1.2[a]
Control	3.2 ±0.21[b]	3.1 ±0.32[b]	4.1 ±0.31[b]	3.5 ±0.43[b]	4.2 ±0.32[b]	4.1 ±0.43[b]	21.6 ±0.62[b]
t	23.2	8.04	4.86	46.67	9.97	2.02	36.14
P	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001

In each column means followed by a different latter are significantly different.



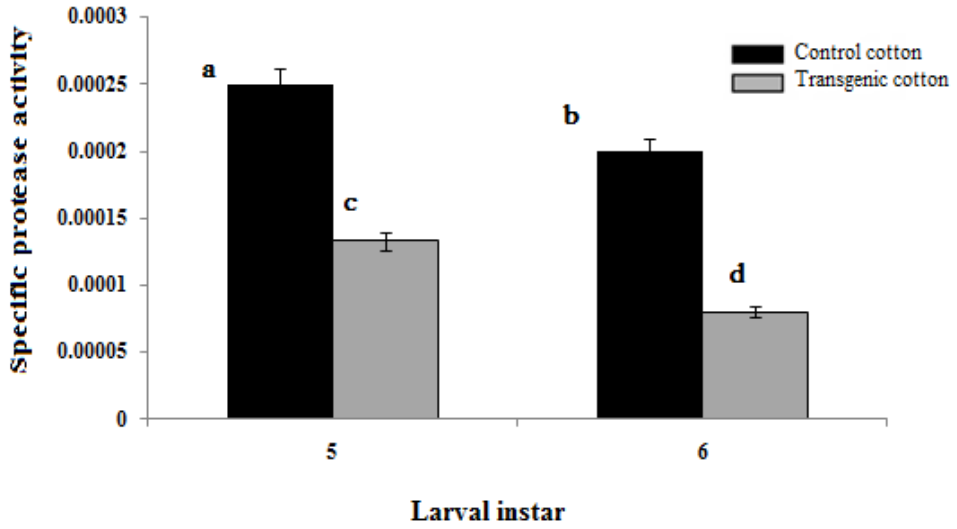
شکل ۱- فعالیت آنزیم پروتئاز کل (بر حسب میکرو مول بر دقیقه بر میلی گرم پروتئین) سنین مختلف لاروهای *H. armigera* که از هر دو برگ پنبه تراریخته و شاهد تغذیه کرده‌اند، با استفاده از سوبسترای آزوکازئین.

Figure 1. Total protease activity (µmol min-1 mgr-1 protein) of different larval instar of *H. armigera* feed on transgenic (Bt) cotton and control cotton, using Azocasein as substrate.



شکل ۲- فعالیت آنزیم تریپسین، سن پنج و شش لاروهای *H. armigera* که از هر دو برگ پنبه تراریخته و شاهد تغذیه کرده‌اند، با استفاده از سوبسترای BapNA.

Figure 2. Specific protease activity (µmol min^{-1} mgr^{-1} protein) of fifth and sixth larval instar of *H. armigera* feed on transgenic (Bt) cotton and control cotton, using BapNA as substrate.



شکل ۳- فعالیت آنزیم کیموتریپسین، سن پنج و شش لاروهای *H. armigera* که از هر دو برگ پنبه تراریخته و شاهد تغذیه کرده‌اند، با استفاده از سوبسترای SAAPFpNA.

Figure 3. Specific protease activity (µmol min^{-1} mgr^{-1} protein) of fifth and sixth larval instar of *H. armigera* feed on transgenic (Bt) cotton and control cotton, using SAAPFpNA as substrate.

بحث

در بررسی حاضر، از نظر درصد تلفات لاروی در سن دوم، کاهش وزن لارو و افزایش طول دوره لاروی تفاوت معنی‌داری بین تیمار شاهد و پنبه تراریخته مشاهده شد. با توجه به این که توکسین Cry 1Ab در گونه‌های مختلف آفات بالپولکدار از جمله کرم غوزه پنبه و کرم ساقه‌خوار ذرت، اثر بازدارندگی تغذیه‌ای دارد (Yoshinori and Harryk, 1993) در نتیجه کاهش وزن لاروی و افزایش طول دوره لاروی دور از انتظار نیست. طول دوره لاروی افزایش و وزن لاروهای تغذیه کرده از گیاه تراریخته در مقایسه با شاهد کاهش یافت. این موضوع با بررسی‌های پیشین در این زمینه جمله (Bajwa and Kogan, 2001) مطابقت کامل دارد. کاهش وزن لاروهایی که از پنبه تراریخته تغذیه کرده‌اند، شاید به دلیل عدم تغذیه لاروها از برگ یا تغذیه اندک آن‌ها بوده باشد به طوری که تعدادی از لاروها یک هفته بعد از تغذیه از گیاه تراریخته زنده ماندند. این امر موجب کاهش خسارت در برگ می‌شود که از نظر مدیریت کنترل آفات می‌تواند حائز اهمیت باشد. از آن جایی که کاهش تغذیه باعث افزایش طول دوره لاروی می‌شود، لاروها مدت زمان بیشتری در دسترس دشمنان طبیعی قرار می گیرند (Arshad et al., 2009). یکی از تأثیرات باکتری *B. thuringiensis* خاصیت ضد تغذیه‌ای آن است که به عنوان یکی از جنبه‌های مثبت در کنترل بیولوژیک نیز بررسی می‌شود. بر این اساس محققین مشاهده کردند که ذخایر انرژی (پروتئین کل، گلیکوژن و لیپید) در لاروهای *Plodia interpunctella* تغذیه شده با Bt کاهش می یابد. آنها این فرض را داشتند که Bt به عنوان یک عامل ضد تغذیه عمل می‌کند. همچنین در آزمایش ایشان وزن لاروها به عنوان شاخص اولیه فیتنس کاهش نشان میداد که نمایانگر این موضوع بود که لاروها به درستی تغذیه نشده‌اند (Nouri-Ganbalani et al, 2016). در واقع می‌توان این موضوع را یک مقاومت آنتی بیوزی به شمار

آورد که در فیزیولوژی آفت اختلال ایجاد می‌کند. به طور کلی پنبه تراریخته با اثرات نامطلوب در روند رشد و نمو و بازدارندگی از تغذیه، بیشترین تاثیر خود را در سنین اول لاروی گذاشت. عدم مشاهده میزان مرگ و میر کامل، می‌تواند به دلیل بیان کم پروتئین باکتری در گیاهان تراریخته، حساسیت پایین برخی از لاروهای کرم غوزه پنبه به علت تفاوت‌های فیزیولوژیک بین لاروها باشد (Yoshinori and Harryk, 1993) ولی با این حال به طور قطع نمی‌توان در این رابطه اظهار نظر کرد و نیازمند بررسی‌های بیشتری است. بررسی‌هایی که تا به حال انجام شده است حاکی از آن است که کرم غوزه پنبه *H. armigera* یک حشره پلی فاژ است که قادر است بر مهارکننده‌های مختلف گیاهان که پروتئازهای آن را تحت تاثیر قرار می‌دهند، فایق آید (Alvi et al., 2012). کرم غوزه پنبه این عمل را با تغییر در ترکیبات معده (آنزیم‌ها) انجام می‌دهد (Bajwa and Kogrn, 2001). لذا این ویژگی‌ها باعث ایجاد رفتار همه‌چیزخواری در این آفت شده است و در نتیجه این آفت قادر است که به محصولات مختلفی خسارت وارد می‌کند. گیاهان تراریخته حاوی توکسین باکتری *B. thuringiensis* شاید به عنوان بهترین راه‌کار برای مقابله با این آفت در سال‌های اخیر معرفی شدند. اما این گیاهان نیز تا حدودی ناموفق بودند و علی رغم سمیت بالای باکتری، گیاهان تراریخته مقاومت خوبی از خود نشان ندادند و بیم این می‌رود که این آفت در مقابل گیاهان تراریخته مقاوم شوند (Anilkumar et al., 2008). با وجود بررسی‌هایی که در مورد فیزیولوژی این آفت صورت گرفته است باز هم ابهاماتی در مورد واکنش فعالیت آنزیمی این آفت در مقابل گیاهان تراریخته وجود دارد. در این بررسی نشان داده شد که باکتری *B. thuringiensis* باعث کاهش فعالیت آنزیم پروتئاز در مقایسه با شاهد شد، که فرض می‌شود، این به معنای کاهش ایزوفرم‌های فعال آنزیم پروتئاز و کاهش توانایی لارو در هضم مواد پروتئینی مورد نیاز استررسی تاثیر گیاه تراریخته بر طول دوره رشدی آفت نشان داد که تغذیه لاروها از گیاه تراریخته باعث افزایش طول دوره لاروی کاهش وزن لاروها شد. در این تحقیق فعالیت آنزیمی از سن دوم تا سن پنجم لاروی در دو تیمار افزایش می‌یابد و با مقایسه فعالیت آنزیم پروتئاز در دو تیمار مشاهده شد که فعالیت آنزیم پروتئاز در گیاه تراریخته به طور قابل توجهی کمتر از گیاه شاهد بود. احتمال دارد پایین بودن فعالیت پروتئاز در معده میانی به منزله از بین رفتن تدریجی سلول‌های معده و در نتیجه کاهش فعالیت آنزیم پروتئاز باشد (Bajwa and Kogrn, 2001). در سن اول لاروی فعالیت آنزیم پروتئاز در تیمار پنبه تراریخته به طور معنی‌داری از شاهد بیشتر است، احتمالا به این دلیل است که که لارو سن اول در پاسخ به حضور باکتری آنزیم بیشتری ترشح می‌کند و در سنین بعدی با ادامه تغذیه از گیاه تراریخته تعدادی از سلول‌های دیواره روده میانی تخریب می‌شوند که باعث کاهش آنزیم پروتئاز در مقایسه با تیمار شاهد شد.

حضور توکسین در معده میانی باعث اتصال آن به گیرنده‌های پروتئینی شده و در نتیجه باعث از بین رفتن بیشتر دیواره سلولی می‌گردد که این امر منجر به کاهش تولید آنزیم پروتئاز و کاهش فعالیت این آنزیم می‌شود. در نتیجه کاهش تولید آنزیم پروتئاز، لارو توکسین کمتری را دریافت می‌کند پس زنده خواهد ماند و معدودی از لاروها به سنین بالاتر لاروی می‌رسند ولی در اثر کاهش فعالیت آنزیم پروتئاز، لاروها مواد غذایی کمتری را دریافت می‌کنند که این امر باعث کندی رشد و نمو و کاهش وزن لاروها خواهد شد. با افزایش سن لاروی فعالیت پروتئازی حشره افزایش می‌یابد. دلیل افزایش فعالیت پروتئازی را می‌توان به علت نیاز حشره به پروتئین غذایی در سنین بالاتر دانست (Simpson et al., 1998). در سن شش مشاهده شد که فعالیت آنزیم پروتئاز در تیمار شاهد در مقایسه با سن پنجم کاهش یافت که شاید

به دلیل عدم تغذیه حشره و عدم نیاز به ترشح اضافی آنزیم باشد. پاتانکار و همکاران (Patankar et al., 2001) نشان دادند با افزایش سن لاروی، فعالیت آنزیم پروتئاز کل در کرم غوزه پنبه افزایش یافت و در سن چهار و پنج بالاترین فعالیت آنزیم مشاهده شد و در سن شش فعالیت این آنزیم کاهش یافت. آن‌ها گزارش کردند که این کاهش فعالیت زمانی اتفاق می‌افتد که مصرف مواد غذایی نیز کاهش یافته یا متوقف شد چون لارو در سن آخر برای تبدیل شدن به شفیره تغذیه را کم کم متوقف می‌کند.

سرین پروتئازها (تریپسین و کیموتریپسین) نقش اصلی را در تجزیه مواد پروتئینی و حتی فعال شدن پروتوکسین باکتری دارند. نتایج داده است که در اثر از بین رفتن دیواره روده میانی، در سلول‌های این بخش مخصوصا در لاروهای سنین اول تا چهارم، هیچ گونه فعالیت سرین پروتئازی ثبت نشده است. ولی در سن پنج تا شش این آنزیم‌ها فعال می شوند که احتمالا به این معنی است که لاروهای سنین بالاتر در اثر تغذیه کم از پنبه تراریخته و ذخیره برخی از مواد غذایی اکتسابی از سنین اول لاروی قادر به ترمیم دیواره معده میانی، حفظ فعالیت آنزیمی و رشد و نمو به مرحله بالاتر هستند.

چنان‌چه در سال‌های اخیر محققین در صدد بودند با کاربرد توام مهارکننده‌های آنزیمی با گیاهان تراریخته مقاومت کامل را در گیاهان تراریخته ایجاد کنند (Bajwa and Kogrn, 2001).

به طور کلی، استفاده از گیاهان تراریخته به دلیل آن که توانایی بیان پروتئین‌های سمی علیه آفت هدف را دارند، می‌تواند جایگزین مناسبی برای کاربرد آفت‌کش‌های پایدار شیمیایی باشد. در بررسی حاضر، استفاده از پنبه حاوی ژن *cry* علیه کرم غوزه پنبه، اثرات معنی‌داری بر پارامترهای مختلف زیستی و فیزیولوژیکی آن به جای گذاشت و نشان داد که پنبه Bt حتی اگر مرگ و میر صد در صد در حشره آفت ایجاد نکند، اما از طریق تأثیر منفی که در طول زندگی آفت به جای می‌گذارد می‌تواند در مدیریت آفت مهمی مانند کرم غوزه پنبه مفید و مورد توجه باشد.

سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله از معاون پژوهشی دانشگاه تهران و پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران به ویژه جناب آقای دکتر مسعود توحیدفر جهت فراهم نمودن هزینه‌های این طرح قدردانی می‌کنند.

REFERENCES

Alvi, A. H. K., Sayyed, A. H., Naee, M., and Ali, M. 2012. Field Evolved Resistance in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) to *Bacillus thuringiensis* Toxin Cry1Ac in Pakistan. PLoS ONE, 7: 1-9.

Anilkumar, K. J., Rodrigo-Simon, A., Ferre, J., Pusztai Carey, M., Sivasupramaniam, S., and Moar, W. J. 2008. Production and characterization of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac-resistant cotton bollworm *Helicoverpa zea* (Boddie). Applied and Environmental Microbiology, 74: 462-469.

Arshad, M., Suhail, A., Arif, M. J., and Khan, M. A. 2009. Transgenic-Bt and non-transgenic cotton effects on survival and growth of *Helicoverpa armigera*. International Journal of Agricultural and Biological Engineering, 11: 473–476.

Ashfaq, M., Young, S., and McNew, R. 2001. Larval mortality and development of *Pseudoplusia includens* (Lepidoptera: Noctuidae) reared on a transgenic *Bacillus thuringiensis*_cotton cultivar expressing CryIAc insecticidal protein. *Journal of* Economic Entomology, 94: 1053-1058.

Azambuja R., Degrande, P. E., dos Santos, R. O., de Souza, E. P., and Gomes, C. E. C. 2015. Effect of Bt Soybean on Larvae of *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). Journal of Agricultural Science, 7(8): 90-94.

Azimi S., Rahmani S., Tohidfar, M., and Ashouri, A. 2016. Effect of Iranian Bt cotton on life table of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Alyrodidae) and Cry 1Ab detection in the whitefly honeydew. Arthropods, 5(3): 87-96.

Bambawale, O. M., Singh, A., Sharma, O. P., Bhosle, B. B., Lavekar, R. C., Dhandapani, A., Kanwar, V., Tanwar, R. K., Rathod, K. S., Patange, N. R., and Pawar, V. M. 2004. Performance of Bt cotton (MECH-162) under Integrated Pest Management in farmers' participatory field trial in Nanded district, Central India. Current Science, 86: 1628-1633.

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.

Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical* Biochemistry, 72: 248-254.

Carrière, Y., Crickmore, N., and Tabashnik, B. E. 2015. Optimizing pyramided transgenic Bt crops for sustainable pest management. Nature Biology, 33: 161-168.

Cascone, P., Iodice, L., Maffei, M. E., Bossi, S., Arimura, G., and Guerrieri, E. 2015. Tobacco overexpressing β-ocimene induces direct and indirect responses against aphids in receiver tomato plants. Journal of Plant Physiology, 173: 28-32.

Chelliah, A., Gupta, G. P., Karuppiah, S., and Kumar, P. A. 2011. Chimeric *d*-endotoxins of *Bacillus thuringiensis* with increased activity against *Helicoverpa armigera*. International Journal of Tropical Insect Science, 31: 59-68.

Czepak, C., Vivan, L. M., and Albernaz, K. C. 2013. Pragas da vez. Cultivar Grandes Culturas, 167: 20-27.

Damalas, C. A., and Eleftherohorinos, I. G. 2011. Pesticide exposure, safety issues, and risk assessment indicators. International Journal of Environmental Research and Public Health, 8: 1402-1419.

Degrande, P. E., and Omoto, C. 2013. Pragas: Estancar prejuízos. Cultivar Grandes Culturas, 167: 30-34.

Feng, H., Gouldb, F., Huangb, Y., Jiangd, Y., and Wua, K. 2010. Modeling the population dynamics of cotton bollworm *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) over a wide are in northern China. Ecological Modelling, 221: 1819-1830.

Fitt, G. P. 1994. Cotton pest management: Part 3. An Australian perspective. Annual Review of Entomology, 39: 543-562.

Fitt, G. P. 1989. the ecology of *Heliothis* species in relation to agroecosystems. Annual Review of Entomology, 34(1): 17-52.

Franco, O. L., Rigden, D. J., Melo, F. R., and Grossi de Sa, M. F. 2002. Plant alphaamylase inhibitors and their interaction with insect alpha-amylases -structure, function and potential for crop protection. European Journal of Biochemistry, 269: 397-412.

Gatehouse, A. M. R., and Gatehouse, J. A. 1998. Identifying Proteins with Insecticidal Activity: use of encoding genes to produce insect-resistant transgenic crops. Pesticide Science, 52: 165-175.

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.

Gujar, G. T., Kalia, V., Kumari, A., Singh, B. P., Mittal, A., Nair, R., and Mohan, M. 2007. *Helicoverpa armigera* baseline susceptibility to *Bacillus thuringiensis* Cry toxins and resistance management for Bt cotton in India. Journal of Invertebrate Pathology, 95: 214–219.

Guo, J. Y., Wu, G., and Wan, F. H. 2010. Activities of digestive and detoxification enzymes in multiple generations of beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Hübner), in response to transgenic Bt cotton. Journal of Pest Science, 83(4): 53–460.

Halcomb, J., Benedict, J., Cook, B., Ring, and D. 1996. Survival and growth of bollworm and tobacco budworm on nontransgenic and transgenic cotton expressing a CrylA insecticidal protein (Lepidoptera: Noctuidae). Environmental Entomology, 25: 250-255.

Head, G., Moar, M., Eubanks, M., Freeman, B., Ruberson, J., Hagerty, A., and Turnipseed, S. 2005. A multiyear, large-scale comparison of arthropod populations on commercially managed Bt and non-Bt cotton fields. Environmental Entomology, 34: 1257-1266.

Huang, F., Higgins, R. A., and Buschman, L. L. 1999. Transgenic Bt plants: successes, challenges and strategies. ACPC conference. Pestology Special Issue, 2-29.

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. Journal of Economic Entomology, 104: 1343-1348.

Isman, M. B. 2006. Botanical Insecticides, Deterrents, and Repellents In Modern Agriculture and an Increasingly Regulated World. Annual Review of Entomology, 51: 45-66.

James, C. 2007. Global status of commercialized biotech/GM Crops: 2007. ISAAA Briefs No. 37, International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications, Ithaca, NY.

James, C. 2011. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2011. ISAAA BriefNo. 44. ISAAA: Ithaca, New York, USA.

Joanne, C. D. 1994. Ecology and Resistance Management for *Bacillus thuringiensis* transgenic plants. Biocontrol Science and Technology, 4: 563-571.

Kotkar, H. M., Sarate, P. J., Tamhane, V. A., Gupta, V. S., and Giri, A. P. 2009. Responses of midgut amylases of *Helicoverpa armigerato* feeding on various host plants. Journal of Insect Physiology, 55: 663-670.

Liu, Z., Gong, P., Li, D., and Wei, W. 2010. Pupal diapause of *Helicoverpa armigera* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae) mediated by larval host plants: Pupal weight is important. Journal of Insect Physiology, 56: 1663-1670.

McCaffery, A.R. 1998. Resistance to insecticides in heliothine Lepidoptera: a global view. Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences, 353: 1735-1750.

Meeusen, R. L., Warren, and G. 1989. Insect control with genetically engineered crops. Annual Review of Entomology, 34: 373-382.

Men, X., Ge, F., Edwards, C. A., and Yardim, E. N. 2005. The influence of pesticide applications on *Helicoverpa armigera* Hubner and sucking pests in transgenic Bt cotton and non-transgenic cotton in Chin. Crop Protection, 24: 319-324.

Nouri-Ganbalani, G., Borzoui, E., Abdolmaleki, A., Abedi, Z., and Kamita, S. G. 2016. Individual and Combined Effects of Bacillus Thuringiensis and Azadirachtin on Plodia Interpunctella Hübner (Lepidoptera: Pyralidae). Journal of Insect Science, 16(1): 1-8.

Olsen, K. M., and Daly, J. C. 2000. Plant-Toxin Interactions in Transgenic Bt Cotton and their Effect on Mortality of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). Journal of Economic Entomology, 93: 1293-1299.

Patankar, A. G., Giri, A. P., Harsulkar, A. M., Sainani, M. N., Deshpande, V.V., Ranjekar, P. K., and Gupta, V. S. 2001. Complexity in specificities and expression of *Helicoverpa armigera* gut proteinases explains polyphaguos nature of the insect pest. Insect Biochemistry and molecular Biology, 31: 453-464.

Saadati, F., and Bandani, A. R. 2011. Effects of serine protease inhibitors on growth and development and digestive serine proteinases of sunn pest, *Eurygaster inegriceps*. Journal of Insect Science, 11, 1-12.

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

Shorey, H. H., and Hale, R. L. 1965. Mass–rearing of the larvae of nine noctuid species on a simple artificial medium. Journal of Economic Entomology, 58: 522-524.

Simpson, L. L., Zepeda, and H., Ohishi, L. 1988. Partial characterization of the enzymatic activity associated with the binary toxin (type C2) produced by *Clostridium botulinum*. Infection and Immunity, 56: 24-27.

Tay, W. T., Soria, M. F., Walsh T., Thomazoni, D., Silvie, P., Gajanan, T. B., and Sharon, D. 2013. A brave new world for an old world pest: *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. PLoS ONE, 8: 1-7.

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*. Iranian Journal of Biotechnology, 6(3): 164-173.

Ullah, I., Asif, M., Arslan, M., and Ashfaq, M. 2014. Temporal expression of Cry1Ab/c protein in Bt-cotton varieties, their efficacy against *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) and population dynamics of sucking arthropods on them. International Journal of Agriculture and Biology, 16: 879-885.

Vanhaelen, N., Haubruge, E., and Francis, F. 2001. Effects of Brassicaceae secondary metabolites on the Glutathione S-transferase activity from *Episyrphus balteatus* De Geer (Diptera: Syrphidae). Pesticide Biochemistry and Physiology, 71: 170–177.

Wu, K. M., and Guo, Y. Y. 2005. The evolution of cotton pest management practices in China. Annual Review of Entomology, 50: 31-52.

Xie, B., Hu, Y., Liang, Z., Liu, B., Zheng, X., and Xie, L. 2016. Association between pesticide exposure and risk of kidney cancer: a meta-analysis. Onco Targets Therapy, 93893–3900.

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

Effect of transgenic Bt on some biological and physiological parameters of *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae)

S. Azimi[1], Sh. Rahmani[2*], A. Ashouri[3] and A. Bandani[4]

1. Assistant Professor, Department of Plant Protection, College of Agriculture, University of Azarbaijan Shahid madani, Tabriz, Iran
2. [*]**Corresponding author:** Assistant Professor, Department of Entomology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran (shrahmani@srbiau.ac.ir)
3. Professor, Department of Plant Protection, College of Agriculture, Tehran University, Karaj, Iran
4. Professor, Department of Plant Protection, College of Agriculture, Tehran University, Karaj, Iran

Received: 23 October 2017 Accepted: 19 September 2018

Abstract

Background and objective

Cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) is a cosmopolitan and polyphagous pest that attacks many plant species including cotton. One of the most important principles of the Integrated Pest Management programs (IPM) is use of non-chemical agents such as natural enemies (parasitoids and predators), and resistant host plant to control pests. Transgenic Bt cotton is one of the substitution ways of chemical pesticide used for control of this insect pest. Production of transgenic crops was a novelty in the method of applying host-plant resistance. Crops that are genetically engineered to express *Bacillus thuringiensis* toxin are planted in many areas.

Material and Methods

In the present study, effect of transgenic Bt cotton, Coker cultivar, including cry1Ab was studied on biology and digestive protease activity of the bollworm. For bioassays, gut dissection and demographic studies, *H. armigera* were obtained from the Division of Entomology, Department of Plant Protection, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Alborz, Iran. The insects were held in the growth room on the condition of 25 ± 1ºC, 60–70 % relative humidity with a 16-h day length. Proteolysis using general substrate (Azocasein 2%) was assayed after some modification. In this manner, 10 µl enzyme extract and 50 µl Azocasein 2% (substrate solution) were mixed into 40 µl of the 20 mM Tris-HCl buffer pH 8.0 and incubated during 60 min. Protease activity was measured using specific substrate with some modifications. Trypsin- and chymotrypsin-like activities were assayed using 1mM BApNA (Benzoyl-l-arginine-p-nitroanilide) and 1 mM SAAPFpNA (Succinyl-l-Ala-l-Ala-l-Pro-Phe-p-nitroanilide), respectively.

Result

The results illustrated that the second larval instar mortality in the transgenic cotton was 68 percent and in control cotton was 6 percent. Furthermore, larvae in different instars, in transgenic Bt, had significantly lower weight and longer life time in comparison with control. Several biological characters of both treatments including survivorship, development and weight were significantly changed. On the other hand, total protease, trypsin and chymotrypsin activity in digestive lumen, after the second, fifth and sixth larval instar in transgenic cotton showed significant reduction, respectively.

Discussion

Coker cotton crop with cry1Ab, will have significantly negative effects in insect biology and digestive physiology during the pest life time and can be noticeable in management of important pests such as boll worm. Bt cotton can therefore be useful in an integrated

pest management program, because it resulted in a reduction in the number of insecticide applications per season.

Keywords**: **Cotton bollworm, transgenic cotton, **Bacillus thuringiensis, Enzyme assay.**