نامه انجمن حشره‌شناسی ایران
۱۳۹٤ - ۳۵(۳): ۵۱-٦۱

تأثیر گیاه توتون تراریخته، *Nicotiana tabacum* حاوی ژن بازدارنده فعالیت ریبوزوم جدا شده از پیاز گیاه زنبق هلندی، *Iris hollandica* روی پارامترهای بیولوژیکی *Spodoptera exigua* (Lep.: Noctuidae) و *Myzus nicotianae* (Hem.: Aphididea)

شهناز شهیدی نوقابی

گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولی‌عصر(عج) رفسنجان، ایران.

*مسئول مکاتبات، پست الکترونیک: shahidi@vru.ac.ir

Effect of transgenic tobacco plant, Nicotiana tabacum expressing ribosome inactivating gene isolated from the bulbs of Dutch iris, Iris hollandica on biological parameters of *Myzus nicotianae* (Hem.: Aphididea) and *Spodoptera exigua* (Lep.: Noctuidae)

Sh. Shahidi-Noghabi

Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Vali-e-Asr University of Rafsanjan, Rafsanjan, Iran.

*corresponding author, E-mail: shahidi@vru.ac.ir

چکیده

استفاده از گیاهان زراعی اصلاح شده با استفاده از انتقال ژن بین گونه‌های مختلف گیاهی نقش مهمی در کنترل آفات گیاهی داشته است. در این پژوهش، خواص حشره‌کشی دو لاین از گیاهان تراریخته شامل IRIP (حاوی ژن بازدارنده ریبوزوم نوع ۱) و IRA (حاوی ژن بازدارنده ریبوزوم نوع ۲) علیه کرم برگخوار چغندرقند *Spodoptera exigua* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) و شته توتون، *Myzus nicotianae* Blackman (Hemiptera: Aphididae) بررسی شده است. تغذیه از گیاه توتون تراریخته IRA، باعث افزایش مرگ‌ومیر و کاهش تولید مثل در شته توتون شد. هم‌چنین طول دوره تولیدمثلی شته‌های پرورش یافته روی گیاه IRA در مقایسه با تیمار شاهد و IRIP کاهش یافت. اما پارامترهای تولیدمثلی شته‌های تیمار شده با IRIP تفاوت معنی‌داری با شاهد نداشتند. تغذیه لاروهای سن دو *S. exigua* از گیاه تراریخته IRA، باعث مرگ‌ومیر حدود ۳۳/۳ درصد شد. به‌علاوه وزن لاروها و شفیره‌ها و درصد خروج حشرات کامل *S. exigua* نیز در تیمار IRA نسبت به شاهد و تیمار گیاهان تراریخته IRIP کاهش معنی‌داری نشان دادند. نتایج حاکی از این است که پروتئین‌های بازدارنده فعالیت ریبوزوم نوع دوم دارای فعالیت حشره‌کشی قابل‌توجهی روی هر دو گونه حشره آفت می‌باشند که می‌توانند در برنامه‌های کنترل تلفیقی آفات به‌کار گرفته شوند.

واژگان کلیدی: بال‌پولک‌داران، پروتئین غیرفعال کننده ریبوزوم، جوربالان، لکتین

Abstract

The use of modified crop plants through gene transfer between different plant species plays an important role in pest control programs. We have investigated the insecticidal properties of two lines of tobacco transgenic plant consisting of IRIP (expressed with type 1 ribosome inactivating gene) and IRA (expressed with type 2 ribosome inactivating gene) against beet armyworm, *Spodoptera exigua* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) and tobacco aphid, *Myzus nicotianane* Blackman (Hemiptera: Aphididae). The transgenic tobacco plants expressing IRA increased mortality and decreased reproduction rate of tobacco aphid. The reproductive period of tobacco aphid fed on transgenic tobacco plant expressing IRA reduced in comparison with the control and IRIP. We did not observed any impact on reproduction parameters of the aphids treated with IRIP plant in comparison with control. Feeding second instar larvae of *S. exigua* on transgenic tobacco plant expressing IRA led to about 33.3% mortality. Weight of larvae and pupae as well as the rate of the emergence of adult *S. exigua* were significantly decreased in larvae fed on IRA in comparison with control. These results suggest that type-2 ribosome inactivating proteins serve as significant insecticidal factors on both insect pest and can be used in integrated pest control programs.

Key words: Lepidoptera, Ribosome inactivating proteins, Hemiptera, Lectins

مقدمه

در حال حاضر، انتقال ژنتیکی امکان تغییر در گیاهان برای بهبود مقاومت آن‌ها به حشرات و عوامل بیماریزا را میسر ساخته است. پیشرفت‌های حاصل در این زمینه گامی مهم در جهت رسیدن به اهداف اقتصاد پایدار و کاهش استفاده از ترکیبات شیمیایی برای کنترل

دریافت: ۱/٤/۱۳۹٤، پذیرش: ۱۳۹٤/۹/۵.

آفات و بیماری‌ها می‌باشد. بسیاری از گیاهان شامل گیاهانی که منبع مهم غذایی هستند مانند گندم، سیب زمینی، گوجه‌فرنگی، سویا و لوبیا حاوی پروتئین‌های پیوند شده با کربوهیدرات‌ها هستند که اصطلاحاً لکتین‌ها (lectins)، منعقد کننده‌ها (agglutinin) و یا منعقدکننده‌های خون (hemagglutinins) نامیده می‌شوند. تعداد زیادی از پروتئین‌های متعلق به خانواده لکتین‌ها قادر به منعقد کردن یا چسباندن (clump together) سلول‌های قرمز خونی هستند. مهندسی ژنتیک گیاهان فرصت مناسبی برای ایجاد گیاهان مقاوم به حشرات از طریق وارد کردن و بیان پروتئین‌های بیمارگر حشرات به گیاهان ازجمله لکتین‌های گیاهی را ایجاد کرده است (Jouanin *et al*., 1998). استفاده از محصولات گیاهی تهیه شده با روش های مهندسی ژنتیک، به‌عنوان روش جایگزین استفاده از حشره‌کش‌های شیمیایی برای حفاظت گیاهان در برابر آفات روند رو به رشدی را در سال‌های اخیر پیموده است (Ranjekar *et al*., 2003). گیاهان تراریخته‌ای (transgenic plants) که اخیرا به صورت تجاری درآمده‌اند، توسط یک ژن کدکننده سم از باکتری *Bacillus thuringiensis* (Bt) تهیه شده‌اند که راسته‌های Coleoptera, Lepidoptera و Diptera را مورد هدف قرار می‌دهند.

ریسین (ricin) لکتینی است که در گیاه کرچک، *Ricinus communis* L. وجود دارد و به نام لکتین خانوادهricin-B نامیده می‌شود. یکی از لکتین‌های معروف در خانواده ricin-B، پروتئین‌های بازدارنده ریبوزومی نوع دوم،-type-2 ribosome inactivating proteins می‌باشند (Stirpe, 2004; Stirpe & Battelli, 2006; Van Damme *et al*., 200) پروتئین‌های بازدارنده ریبوزوم گیاهان، آنزیم‌ها یا پروتئین‌هایی هستند که با برداشتن یک یا چند آدنین از rRNA به ریبوزوم‌ها صدمه وارد می‌کنند. به‌دلیل حذف یک آدنین توسط RNA-N-glycosylase، ریبوزوم ها دیگر قادر به ایجاد پیوند با elongation factors, EF-1 و EF-2 نبوده و فعالیت ازدیاد طول خود را از دست می‌دهند (Peumans *et al*. 2001). براساس ساختمان ژن ها و پروتئین‌های مربوط به آن‌ها، پروتئین‌های بازدارنده ریبوزوم به‌طور کلی به دو دسته تقسیم می شوند که تحت عنوان پروتئین‌های مهارکننده ریبوزوم نوع اول و نوع دوم نامیده می‌شوند. نوع اول پروتئین های تک‌زنجیره‌ای هستند که فعالیت آنزیمی دارند و نوع دوم آن‌ها شامل یک زنجیره‌ای A هستند که دارای فعالیت آنزیمی است و یک زنجیره B دارند که به زنجیره A توسط یک پل دی سولفید متصل شده و دارای فعالیت لکتینی یا قابلیت ایجاد پیوند با کربوهیدرات ها می‌باشند. اگرچه زنجیره‌های B در پروتئین‌های غیرفعال‌کننده ریبوزوم نوع دوم دارای تشابه زیادی از لحاظ توالی ژنی می‌باشند و ازنظر ساختمان سه‌بُعدی بسیار مشابهند، اما از لحاظ قابلیت ایجاد پیوند با کربوهیدرات‌ها تفاوت‌های عمده‌ای با هم دارند. امروزه، به‌دلیل سرعت زیاد ایجاد مقاومت در حشرات در مقابل آفت‌کش‌ها و نیز نگرانی جدی از اثرات آفت‌کش‌ها بر سلامتی انسان و محیط‌زیست، استفاده از گیاهان تراریخته که حاوی ژن‌ها و پروتئین های بیان شده با خاصیت حشره‌کشی باشند، برای حفاظت از گیاهان در برابر آفات مورد توجه بسیاری از محققان قرار گرفته است.

شته توتون، *Myzus nicotianae* Blackman (Hemiptera: Aphididae) یکی از آفات بسیار مهم می باشد که به‌صورت گسترده‌ای در سراسر دنیا پراکنده شده است. حضور تعداد زیاد پوره‌ها و حشرات بالغ این آفت مکنده باعث کاهش شدید شیره گیاهی در برگ‌ها و جوانه‌های گیاه شده و خسارت جدی به آن وارد می‌کند. با این که چندین گونه از شته‌ها و آفات

دیگر روی گیاه توتون تغذیه می‌کنند، اما به‌طور معمول تنها شته توتون قادر به تأسیس کلونی‌های بزرگ مشابه با شته سبز هلو می‌باشد. شته توتون روی چندین گونه از گیاهان خسارت می‌زند اما گیاه توتون میزبان ترجیحی این آفت می‌باشد (Blackman & Eastop, 2000). علاوه بر این، شته‌ها با تغذیه از گیاه باعث انتقال ویروس‌های گیاهی به میزبان‌های خود شده و به‌طور غیرمستقیم باعث از بین رفتن گیاهان می شوند.

کرم برگخوار چغندرقند، *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) یکی از آفات پلی فاژ است که به بسیاری از محصولات زراعی، سبزیجات و نیز گیاهان زینتی خسارت وارد می‌کند. منشاء گسترش این آفت جنوب شرق آسیا می‌باشد (Metcalf *et al*., 1962; Smagghe *et al*., 2003; Senthil-Nathan *et al*., 2008).

در این تحقیق، فعالیت حشره‌کشی دو نوع از پروتئین‌های بازدارنده فعالیت ریبوزومی علیه دو گونه مختلف از حشرات آفت شامل یک حشره نماینده از نوع حشرات مکنده، *Myzus nicotianae* و یک حشره نماینده از نوع حشرات جونده، *Spodoptera exigua* مطالعه شده است. گیاهان مورد استفاده در این آزمایشات شامل یک لاین گیاه توتون تراریخته حاوی ژن *Iris* ribosome inactivating protein با نام اختصاری IRIP (پروتئین‌های بازدارنده ریبوزوم نوع اول) و یک لاین گیاه توتون تراریخته حاوی ژن *Iris* hybrid با نام IRA (پروتئین‌های بازدارنده ریبوزوم نوع دوم) بودند که از پیاز گیاه زنبق، *Iris hollandica* منشاء گرفته بودند و در گیاه توتون، *Nicotiana tabacum* cv Samsun NN بیان شدند.

مواد و روش‌ها

گیاه توتون، *Nicotiana tabacum*

در این تحقیق، گیاهان توتون، *N. tabacum* شاهد که دارای یک ناقل خالی (empty vector) (بدون ژن موردنظر و تنها با وکتور همراه با یک نشانگر یا مارکرمعین) می‌باشد و دو لاین از گیاهان تراریخته توتون شامل IRIP (line 5, Desmyter *et al*., 2003) و IRA (line 2, Vandenbussche *et al*., 2004) که ژن مورد نظر تحت کنترل پروموتور 35S ویروس موزاییک گل کلم (Cauliflower mosaic virus 35S promoter) انتقال یافته بود، مورد استفاده قرار گرفتند. بیان و میزان انتقال ژن موردنظر قبلا به اثبات رسیده است (Desmyter *et al*., 2003; Vandenbussche *et al*., 2004). بذر این دو لاین به همراه گیاه شاهد (empty vector control) از آزمایشگاه بیوتکنولوژی Ghent University از کشور بلژیک تهیه شدند. این گیاهان در اتاق رشد در شرایط دمایی ۲ ± ۲۵ °C و ۵۰٪ رطوبت نسبی و دوره روشنایی به تاریکی ۱۶ به ۸ ساعت پرورش داده شدند.

حشرات آفت

شته توتون، *Myzus nicotianae* مورد آزمایش از یک کلونی آزمایشگاهی که روی گیاهان توتون *N. tabacum* cv Samsun NN (آزمایشگاه جانورشناسی کشاورزی، دانشگاه گنت، بلژیک) که تحت شرایط استاندارد پرورش داده شده بودند، مورد استفاده قرار گرفت. کرم برگخوار چغندرقند در اتاق رشد در شرایط دمایی ۳ ± ۲۳ °C و رطوبت نسبی ۵ ± ٦۵ درصد و دوره نوری ۱٦ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگه‌داری شدند. مراحل لاروی با استفاده از غذای مصنوعی تهیه شده براساس روش Hakim *et al*. (2006) پرورش داده شدند.

زیست‌سنجی شته توتون

تأثیر تغذیه شته توتون از گیاهان تراریخته توتون که ژن‌های IRIP و IRA در آن‌ها بیان شده بود، روی رشدو نمو و تولید مثل *M. nicotianae* در شرایط اتاق رشد (ذکر شده در بالا) انجام گرفت. شته‌ها روی برگ های گیاه توتون در ظروف پتری با قطر ۹ میلی‌متر مستقر شدند و برای تطبیق با شرایط آزمایش و تغذیه از توتون برای چند نسل پرورش داده شدند. یک حشره ماده بدون بال به‌صورت تصادفی از محل پرورش اولیه انتخاب و روی یک برگ توتون که به‌صورت وارونه درون ظروف پتری قرار داده شده بود منتقل شد. هر برگ در هر پتری روی قطعه‌ای از دستمال کاغذی خیس شده با آب مقطر استریل قرار داده شد تا از خشک شدن برگ جلوگیری شود. سپس، شته‌های سن اول نئونات (سن کم‌تر از ٢٤ ساعت) برای آزمایش انتخاب شدند و برای هر تیمار تعداد ۱۵ تکرار در هر بار آزمایش درنظر گرفته شد و آزمایشات سه بار تکرار گردید. تکرارهایی که ظرف کم‌تر از ٢٤ ساعت مرگ ومیر نشان دادند حذف و تکرار جدید جایگزین آن شد. پنبه‌ها هر روز مرطوب و هر ۲-۳ روز یک‌بار تعویض شدند تا از آلودگی جلوگیری به‌عمل آید. بقا و رشدونمو شته‌ها روزانه مورد بررسی قرار گرفت. آزمایشات تا زمان مرگ شته‌ها ادامه یافت و تأثیر تغذیه از گیاهان تراریخته و شاهد روی تولید مثل شته‌ها ارزیابی شد.

زیست‌سنجی کرم برگخوار چغندرقند

در این آزمایش از قفس‌هایی از جنس پلی‌اتیلن (با قطر ۹۰ میلی‌متر و ارتفاع ۳۰ میلی‌متر) استفاده شد. در دیواره این قفس برای انجام تبادلات گازی به‌منظور تهویه، شش سوراخ هم‌اندازه و به فاصله‌های مساوی تعبیه شد که با پارچه توری پوشانده شده بودند (Van de Veire *et al*., 1997). به‌علاوه، به‌منظور قرار دادن ساقه برگ از این محل به درون آب برای جلوگیری از پژمردگی آن در یک گوشه از قفس، یک کانال کوچک به قطر ۵ میلی‌متر تهیه شده بود. بالای قفس یک قطعه از جنس خود قفس به‌عنوان درپوش قرارداده شد. برگ های جدا شده از گیاهان مورد آزمایش به‌طور جداگانه در هر قفس قرار داده شد. آزمایش با لارو سن ۲ *S. exigua* (۰ تا ٦ ساعت) آغاز شد. به این ترتیب که در هر قفس یک لارو روی برگ قرار داده شد. این آزمایشات دو بار تکرارشد و در هر بار آزمایش تعداد ۱۸ تکرار برای هر تیمار درنظر گرفته شد. لاروها روزانه با برگ‌های تازه تغذیه شدند و قفس‌ها هر روز تمیز و خشک شدند. وزن هر لارو هر روز و به‌صورت انفرادی تا زمان تبدیل به شفیره اندازه‌گیری شد. به علاوه، رشدونمو لاروهای تیمار شده نیز تا زمان شفیرگی و پس از آن تا زمان تبدیل آن‌ها به حشره کامل بررسی شد.

تجزیه آماری داده‌ها

داده‌های به‌دست آمده از مرگ‌ومیر حشرات با استفاده از فرمول ابوت تصحیح شد. ابتدا برای بررسی توزیع نرمال داده‌ها از روش Kolmogorov-Smirnov استفاده شد و همگنی واریانس بین تیمارهای مختلف به‌کمک leven´s test انجام گرفت و سپس تفاوت‌های آماری میانگین داده‌های به‌دست آمده به‌وسیله آنالیز واریانس (ANOVA) مشخص شدند. تفاوت میانگین‌ها به‌وسیله نرم‌افزار SPSS v15 (SPSS, Chicago, IL, US) از هم تفکیک شدند. تفاوت‌های معنی‌دار بین تیمارها در سطح P = ۰/۰۵ و با کمک آزمون Tukey HSD و یا آزمون غیرپارامتری یومان ویتنی (Mann-Whitney *U* test) محاسبه شدند.

نتایج

تأثیر گیاهان تراریخته IRIP و IRA روی شته توتون *M. nicotianae*

نتایج این پژوهش نشان داد شته‌های توتون که روی گیاه تراریخته IRIP و IRA تغذیه شدند، در مقایسه با شاهد دارای جمعیت کم‌تری بودند. به این ترتیب که پس از گذشت دو هفته، درصد مرگ‌ومیر پوره‌ها در شته‌های تغذیه شده با گیاه IRA و IRIP به ترتیب حدود ٦٨٪ و ٥٢٪ بود درحالی‌که در تیمار شاهد تنها ۳۰٪ مرگ‌ومیر مشاهده گردید (شکل ۱). پس از آن، در روز بیست و سوم، تمام شته‌های تغذیه شده با گیاهان IRA از بین رفتند درحالی‌که در شته‌های تغذیه شده با گیاه IRIP و شاهد به‌ترتیب هنوز ۲۳٪ و ٤٥٪ از شته ها باقی مانده بودند (شکل ۱). جمعیت شته‌های تیمار شده با IRIP و شاهد به‌ترتیب در روزهای سی‌ودوم و سی‌وپنجم به صفر رسید. به‌علاوه میانگین تولیدمثل کل شته‌های توتون تغذیه شده با گیاهان تراریخته که ژن IRA در آن‌ها بیان شده بود به طور معنی‌داری ($p < 0.05$) نسبت به شاهد کاهش یافت (جدول ۱). هم‌چنین در تیمار IRA میانگین تعداد پوره‌های تولید شده در هر روز و میانگین طول دوره پوره‌زایی نیز به‌طور معنی‌داری کم‌تر از شاهد بود. اما تفاوت معنی‌داری در میانگین تعداد پوره‌های تولید شده در هر روز و میانگین طول دوره پوره‌زایی شته‌های تغذیه شده روی گیاهان شاهد و گیاهان تراریخته IRIP مشاهده نشد (جدول ۱).

تأثیر گیاهان تراریخته IRIP و IRA روی لاروهای سن دوم برگخوار چغندرقند *S. exigua*

لاروهای سن دوم *S. exigua* پرورش داده شده روی گیاه تراریخته IRA، پس از دو هفته، حدود ۳۳/۳٪ درصد مرگ‌ومیر نشان دادند درحالی‌که لاروهای پرورش داده شده روی گیاه تراریخته IRIP و شاهد به‌ترتیب حدود ٦/٧٪ و ۳/۸٪ مرگ‌ومیر داشتند (جدول ۲). به‌علاوه، تغذیه لاروهای سن دوم کرم برگخوار چغندرقند روی برگ‌های گیاه توتون تراریخته IRA تأثیر منفی روی رشد لاروها نشان داد به‌صورتی‌که وزن لاروها پس از هفت روز تغذیه به طور معنی‌داری نسبت به شاهد کاهش یافت ($p < 0.05$). اما تغذیه لاروهای سن دو از گیاه توتون تراریخته IRIP کاهش معنی‌داری در وزن لاروها نسبت به شاهد ایجاد نکرد (شکل ۲). کاهش وزن لاروها هفت روز پس از تغذیه از برگ‌های گیاهان تراریخته IRA ظاهر شد. به همین ترتیب در ادامه آزمایش وزن شفیره‌ها اندازه‌گیری شد و نتایج به دست آمده نشان داد که وزن شفیره‌هایی که در مرحله لاروی از گیاه توتون تراریخته IRA تغذیه کرده بودند (۰/۰۵۰ گرم)، به‌طور معنی‌داری ($P < 0.05$) نسبت به شاهد (۰/۰٦٥ گرم) و تیمار IRIP (۰/۰٦۱ گرم) کاهش داشت (جدول ۲). اما، تفاوت معنی‌داری در وزن شفیره‌هایی که با گیاه تراریخته IRIP تغذیه شده بودند، در مقایسه با تیمار شاهد دیده نشد. با محاسبه زمان رشدونمو لاروها، تأخیری در رشدونمو هیچ‌کدام از لاروهای تغذیه شده با گیاهان تراریخته IRIP و IRA در مقایسه با شاهد مشاهده نشد، اما درصد خروج حشرات بالغ در تیمار لاروهای تغذیه شده با گیاه تراریخته IRA تحت تأثیر قرار گرفت. به‌طوری‌که، درصد خروج حشرات بالغ در تیمارIRA (٤٥ درصد) در مقایسه با میزان خروج حشرات کامل در تیمار شاهد (۸۸ درصد) حدود ٤٥٪ کاهش داشت. درصد خروج حشرات کامل در تیمارهای IRIP حدود ۸۲ در صد بود که با شاهد تفاوت معنی‌داری نداشت (جدول ۲).

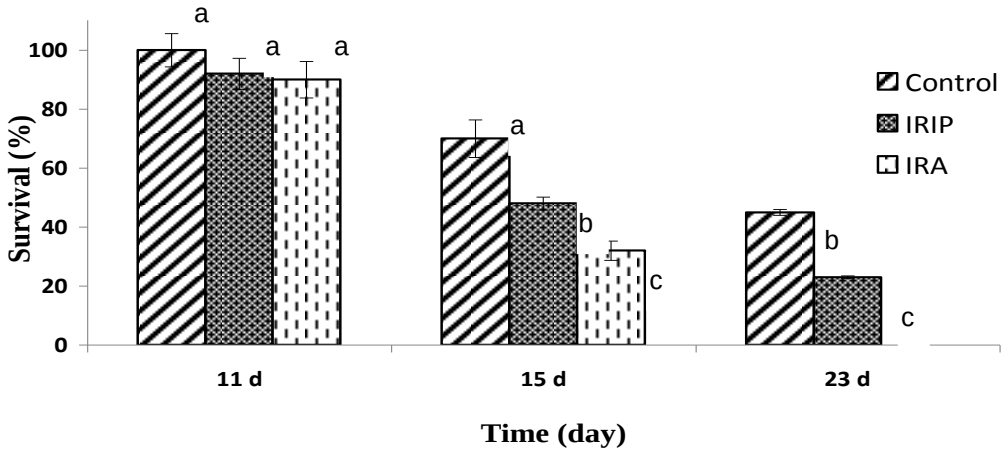
جدول ۱- پارامترهای تولیدمثلی (میانگین ± انحراف معیار) *Myzus nicotianae* روی لاین‌های مختلف گیاه توتون

Table 1. Reproductive parameters (Mean ± SE) of *Myzus nicotianae* fed on different transgenic lines of tobacco.

Treatment	Mean daily offspring (nymphs/adult)	Mean duration of reproductive period (days)	Mean total progeny (nymphs/adults)
IRIP	2.3 ± 0.11^{a}	11.4 ± 0.20^{a}	26.6 ± 1.6^{a}
IRA	1.6 ± 0.03^{b}	10.0 ± 0.29^{b}	15.9 ± 1.4^{b}
Control	2.2 ± 0.20^{a}	12.0 ± 0.54^{a}	26.5 ± 2.8^{a}

میانگین‌های مشخص شده با حروف متفاوت در هر ستون با هم تفاوت معنی‌دار دارند.

Means given with a different letter in columns are significantly different.



شکل ۱- زنده‌مانی شته توتون، *Myzus nicotianae* روی لاین‌های مختلف توتون.

Fig. 1. Survival of *Myzus nicotianae* fed on different transgenic lines of tobacco.

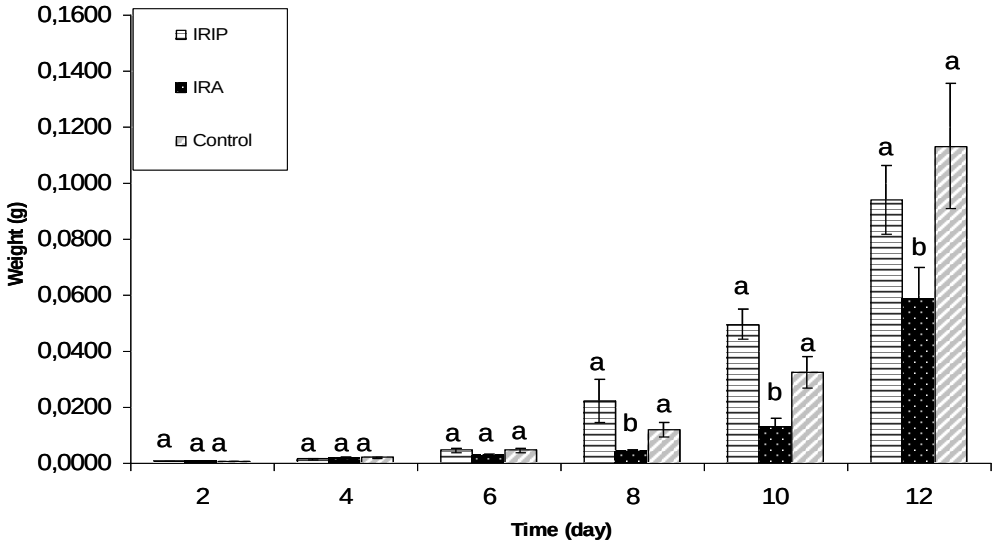
جدول ۲- مرگ‌ومیر و شاخص‌های زیستی (میانگین ± انحراف معیار) *Spodoptera exigua* پس از تغذیه از لاین‌های مختلف گیاه توتون.

Table 2. Mortality and biological parameters (Means ± SE) of *Spodoptera exigua* after feeding on different transgenic lines of tobacco.

Treatments	Adult emergence (%)	Pupal Weight (g)	Mortality after 2 weeks (%)
IRA	45 ± 5.65^{a}	0.050 ± 0.002^{a}	33.3 ± 6.25^{a}
IRIP	82 ± 7.63^{b}	0.061 ± 0.005^{b}	6.7 ± 3.60^{b}
Control	88 ± 3.63^{b}	0.065 ± 0.003^{b}	3.8 ± 1.20^{b}

میانگین‌های مشخص شده با حروف متفاوت در هر ستون با هم تفاوت معنی‌دار دارند.

Means given with a different letter in columns are significantly different.



شکل ۲- وزن تر (میانگین ± انحراف معیار) لارو *Spodoptera exigua* روی لاین‌های مختلف گیاه توتون.

Fig. 2. Fresh weight (Mean ± SE) of *Spodoptera exigua* larvae fed on different transgenic lines of tobacco.

بحث

استفاده از لکتین‌ها برای محافظت گیاهان به‌کمک دست‌کاری‌های ژنتیکی علاقمندان بسیاری را در سال های اخیر به خود جلب کرده است. مطالعات زیادی در زمینه بررسی پتانسیل و اثرات حشره‌کشی لکتین‌ها علیه حشرات آفت انجام گرفته است. اما تحقیقات بسیار محدودی در رابطه با اثرات حشره‌کشی لکتین‌های خانواده پروتئین‌های مهارکننده ریبوزوم نوع دوم تاکنون انجام گرفته است. اخیراً اثرات حشره‌کشی و نحوه اثر این گروه از لکتین‌ها در گیاهان تراریخته SNAI (I agglutinin (*Sambucus nigra*) و SNAI` (I` agglutinin *S. nigra*) روی گونه‌های مختلف حشرات مانند شته نخودفرنگی (Harris) *Acyrthosiphon pisum* و *S. exigua* گزارش شده است (Shahidi *et al*., 2009, 2010 a, b, 2011). در بررسی‌های Chen *et al*. (2002) نشان داده شده است که پروتئین‌های مهارکننده ریبوزوم نوع دوم می‌تواند به‌طور موفقیت آمیزی در گیاه توتون بیان شوند که در عین حال تأثیری روی رشد و باروری گیاهان تراریخته نداشته باشند. در طی دو دهه اخیر، خواص حشره‌کشی تعداد معدودی از پروتئین‌های بازدارنده ریبوزوم گزارش شده است. Gatehouse *et al*. (1990) نشان دادند که پروتئین‌های بازدارنده ریبوزوم بذر گیاهان دولپه‌ای مانند ricin که یک پروتئین بازدارنده ریبوزوم نوع دوم (type 2 RIP) از گیاه کرچک *Ricinus communis* و saporin (type 1 RIP) که از گیاه *Saponaria officinalis* L. می‌باشد علیه سخت بال‌پوش‌ها سمیت داشتند، اما روی لارو بال‌پولک‌داران مؤثر نبودند. هم‌چنین، یک نوع پروتئین بازدارنده ریبوزوم نوع دوم به نام cinnamomin از گیاه *Cinnamomum camphora* L. علیه پشه‌ها و کرم قوزه پنبه سمیت نشان داد (Zhou *et al*., 2000; Wei *et al*., 2004). در یک پژوهش دیگر پروتئین‌های بازدارنده ریبوزوم نوع سوم از گیاه ذرت به نام maize RIP علیه سخت‌بال‌پوشان و لارو بال‌پولکداران فعالیت حشره‌کشی نشان دادند (Dowd *et al*., 2006). به علاوه گیاهان تراریخته توتون که در آن‌ها ژن

maize RIP بیان شده بود علیه *Helicoverpa zea* Boddie مقاومت نشان دادند و تغذیه از این گیاهان به‌طور معنی داری کاهش یافت (Dowd *et al*., 2006). هم‌چنین مرگ-ومیر در لاروهای *H. zea* از راسته بال‌پولکداران و *Lasioderma serricorne* از راسته سخت بال‌پوش‌ها پس از تغذیه از گیاهان تراریخته maize RIP افزایش یافت (Dowd *et al*., 2003, 2006). تمام نتایج ذکر شده در بالا که یا با تغذیه از گیاهان تراریخته و یا با پروتئین‌های بازدارنده ریبوزوم خالص شده که به رژیم غذایی اضافه شده به‌دست آمده است، خواص حشره‌کشی پروتئین های بازدارنده ریبوزوم را روی راسته بال‌پولک‌داران و سخت بال‌پوش‌ها تأیید می‌کند، اما تاکنون گزارشات زیادی از فعالیت حشره‌کشی این خانواده از لکتین‌ها روی حشرات راسته جوربالان به ثبت نرسیده است.

در تحقیق حاضر، روش‌های کاربردی مفیدی برای بررسی پتانسیل حشره‌کشی گیاهان تراریخته که ژن‌های بازدارنده فعالیت ریبوزومی در آن‌ها بیان شده بود علیه حشرات مکنده و برگخوارها به‌کار گرفته شد. اولین هدف از این پژوهش تعیین فعالیت حشره‌کشی پروتئین های بازدارنده فعالیت ریبوزومی‌بیان شده در گیاهان تراریخته توتون، روی گونه‌های مختلف حشرات آفت بود. نتایج این پژوهش آزمایشگاهی نشان داد که میزان مرگ‌ومیر شته‌ها روی گیاهان تراریخته IRA بالاتر از گیاهان تراریخته IRIP و شاهد بود. به‌علاوه، طول عمر شته‌های باقی مانده در تیمار IRA کم‌تر از شته‌های تیمار شده با گیاهان تراریخته IRIP و شاهد بود، به‌طوری‌که حدود بیست روز پس از شروع آزمایش تمام شته‌های تغذیه شده با گیاهان تراریخته IRA از بین رفتند درحالی‌که بیش از ٤٠٪ درصد از شته‌های تیمار شده با گیاهان شاهد هنوز زنده بودند. نتایج این بخش از آزمایشات به روشنی نشان داد که گیاه تراریخته IRA نسبت به شاهد و تیمار IRIP دارای اثر حشره‌کشی بالاتری روی شته توتون بود. بنابراین می‌توان گفت که پروتئین‌های بازدارنده ریبوزوم نوع دوم نسبت به پروتئین‌های بازدارنده ریبوزوم نوع اول دارای اثر حشره کشی بالاتری روی شته توتون بوده است. در طی سالیان گذشته پژوهشگران مختلفی گزارش‌هایی مبنی بر اثرات سمی پروتئین‌های بازدارنده فعالیت ریبوزوم روی لاین‌های مختلف سلولی و نیز مدل‌های حیوانی به ثبت رسانده‌اند (Tamura *et al*., 2002; Shahidi-Noghabi *et al*., 2010). اما در هر حال توجه به این نکته که سمیت پروتئین‌های بازدارنده فعالیت ریبوزوم نوع دوم به‌طور قابل ملاحظه ای با هم متفاوت می‌باشد، حائز اهمیت است (Peumans *et al*., 2000; Barbieri *et al*., 2004). اگرچه اطلاعات زیادی در مورد خواص بیوشیمیایی پروتئین‌های بازدارنده ریبوزوم در دسترس می‌باشد اما هنوز مکانیسم اثر آن‌ها به‌طور کامل مشخص نشده است. فعالیت لکتینی پروتئین‌های بازدارنده ریبوزوم نوع دوم نقش مهمی در سمیت و یاخته‌آزاری این پروتئین‌ها دارند، زیرا پیوند زنجیره B با گیرنده‌های دارای کربوهیدرات در سطح سلول نیاز اولیه و اساسی برای ورود آن‌ها به داخل سلول می‌باشد (Van Damme *et al*., 2001). چنان‌که Stirpe & Battelli (2006) گزارش کردند که دامنه زنجیره B در مولکول پروتئین‌های بازدارنده ریبوزوم نوع دوم با گیرنده‌های دارای پایانه‌های گالاکتوز در سطح سلول ها پیوند می‌شوند و در نتیجه به زنجیره A اجازه ورود به داخل سلول را می‌دهند در نتیجه ریبوزوم‌ها را غیر فعال می‌کنند و نهایتاً باعث مهار سنتز پروتئین و منجر به مرگ سلولی می‌شوند (Steeves *et al*., 1999; Baykal & Tumer, 2007). تحقیقات قبلی به‌طور واضحی نشان داده‌اند که توانایی پروتئین‌های بازدارنده ریبوزوم نوع دوم در ایجاد پیوند

با هیدروکربن‌ها که دلیلی برای قرار دادن آن‌ها در لیست لکتین‌های گیاهی است، یک فاکتور مهم و اصلی برای شناسایی سلول‌های هدف می‌باشد. از آن‌جاکه زنجیره B موجود در IRA دارای فعالیت آنزیمی نمی باشد، لذا به احتمال بسیار زیاد فعالیت ایجاد پیوند با هیدروکربن‌ها در گیاهان تراریخته IRA باعث ایجاد خاصیت حشره‌کشی در آن‌ها شده است. نتایج بررسی‌ها روی شته توتون نشان داد که تیمارهای IRIP و IRA هر دو به‌طور معنی‌داری باعث کاهش جمعیت شته توتون شدند، اما شته‌های باقی‌مانده در تیمار IRIP در مراحل تولیدمثلی تفاوت معنی‌داری با شاهد نداشتند. برعکس، شته‌های تغذیه شده با گیاهان تراریخته IRA علاوه بر مرگ‌ومیر بالاتر نسبت به تیمار شاهد و IRIP، فاکتورهای مربوط به تولیدمثل آن‌ها مانند تعداد پوره‌های تولید شده در هر روز، میانگین طول دوره تولیدمثل، میانگین تولیدمثل کل کاهش معنی‌داری نسبت به دو تیمار شاهد و IRIP نشان داد. این درحالی است که لاروهای*S. exigua* تنها با تغذیه از گیاهان تراریخته IRA تحت تأثیر قرار گرفتند و تغذیه با گیاه تراریخته IRIP تغییری در میزان مرگ‌ومیر، رشدونمو لاروها، وزن لاروها و شفیره‌ها و درصد خروج حشرات کامل ایجاد نکرد. شایان ذکر است که برگخوار چغندرقند تمام قسمت‌های برگ را مورد تغذیه قرار می‌دهد، بنابراین ژن انتقال یافته به گیاه به‌طور حتم وارد دستگاه گوارش این حشره شده است. طبق گزارش Dowd *et al.* (2006) میزان تغذیه لاروهای *H. zea* و *L. serricorne* با تغذیه روی گیاهان تراریخته که ژن Maize RIP در آن‌ها بیان شده بود بسیار کاهش و مرگ‌ومیر افزایش یافت.

در مقایسه واکنش دو گونه مورد مطالعه، پس از دو هفته مرگ‌ومیر در شته‌های تغذیه شده با IRA ٦٨ درصد بود که در مقایسه با برگخوار چغندرقند حدود ۳۵ درصد بالاتر بود. هم‌چنین، در مورد تیمار IRIP نیز نتایج مشابهی دیده شد. تفاوت در واکنش دو گونه حشره مورد استفاده در پژوهش حاضر، می‌تواند به دلیل تفاوت در عکس‌العمل گونه‌های متفاوت نسبت به ترکیبات خارجی باشد که تفاوت در pH معده از عمده‌ترین عوامل دخیل در میزان تأثیر آن‌ها در بدن گونه‌های مختلف می‌باشد. درحالی‌که pH معده شته‌ها حدود ۵ تا ٦ تخمین زده شده است (Deraison *et al*., 2004) pH معده میانی *S. exigua* چنان که در این پژوهش اندازه‌گیری شد، بیش‌تر از ۸ می باشد. نتایج این پژوهش نشان داد که احتمالاً این لکتین‌ها در محیط قلیایی پایداری کم‌تری دارند. به علاوه، تفاوت در ساختار معده حشرات می‌تواند دلیلی دیگر برای وجود این تفاوت‌ها باشد. به‌علاوه، پرده دور غذا (Peritrophic membrane) یک ساختار آناتومی است که در بیش‌تر حشرات ازجمله در بال‌پولک‌داران تشکیل می‌شود اما در شته‌ها وجود ندارد (Silva *et al*., 2004). در عین حال، برای بیان دلیل قطعی و دقیق تفاوت در سمیت گیاه تراریخت روی شته و کرم برگخوار چغندرقند باید آزمایشات بیش‌تری انجام گیرد.

نتایج به‌طور کلی قابلیت پروتئین‌های بازدارنده فعالیت ریبوزوم نوع دوم را برای کنترل هر دو آفت *M. nicotianae* و *S. exigua* تأیید کرد. اما، قبل از اظهارنظر قطعی، انجام تحقیقات بیش‌تر و کامل‌تر برای بررسی مکانیسم و نحوه اثر فعالیت پروتئین‌های بازدارنده ریبوزوم نوع اول و نوع دوم و نیز شناسایی محل اثر آن‌ها در بدن دو گونه آفت مورد آزمایش ضروری به‌نظر می‌رسد. هم‌چنین می‌توان با اندازه‌گیری میزان عسلک تولید شده از شته توتون در تیمارهای مختلف نیز میزان تغذیه را ارزیابی کرد. درمجموع برای رسیدن به نتیجه قطعی و دانستن دقیق دلیل تأثیر ضد حشره‌ای گیاه تراریخته IRA نسبت به تیمارهای دیگر باید آزمایشات

تکمیلی در مورد بررسی میزان تغذیه دو گونه حشره مورد آزمایش مورد بررسی قرار گیرد. نتایج این پژوهش می‌تواند گامی مثبت در استفاده از گیاهان مقاوم به حشرات به‌عنوان جایگزینی مناسب برای استفاده از آفت‌کش‌های شیمیایی باشد.

سپاسگزاری

نویسنده مقاله از شورای پژوهشی ویژه دانشگاه گنت به‌دلیل دریافت کمک هزینه دکترا (Special Research Council of Ghent University) و هم چنین از شورای پژوهشی دانشگاه گنت BOF-Ugent و صندوق پژوهش‌های علمی–فلاندر (FWO-Vlaanderen, Brussels, Belgium) تشکر می‌کند.

منابع

Barbieri, L., Ciani, M., Girbes, T., Liu, W. Y., Van Damme, E. J. M., Peumans, W. & Stripe, F. (2004) Enzymatic activity of toxic and non-toxic type 2 ribosome-inactivating proteins. *FEBS Letters* 563, 219-222.

Baykal, U. & **Tumer, N. E.** (2007) The C-terminus of pokeweed antiviral protein has distinct roles in transport to the cytosol, ribosome depurination and cytotoxicity. *The Plant Journal* 49, 995-1007.

Blackman, R. L. & Eastop, V. F. (2000) *Aphids on the World's Crops: An Identification and Information Guide*: Wiley, John & Sons, Incorporated. 2 nd ed. 476 pp. The University of Michigan

Chen, Y., Peumans, W. J. & Van Damme, E. J. M. (2002) The *Sambucus nigra* type-2 ribosome-inactivating protein SNA-I' exhibits in planta antiviral activity in transgenic tobacco. *FEBS Letters* 516, 27-30.

Desmyter, S., Vandenbussche, F., Hao, Q., Proost, P., Peumans, W. J. & Van Damme, E. J. M. (2003) Type-1 ribosome-inactivating protein from iris bulbs: a useful agronomic tool to engineer virus resistance? *Plant Molecular Biology* 51, 567-576.

Dowd, P. F., Rober, A. H., Pinkerton, T. S., Johnson, E. T., Lagrimini, L. M. & Boston, R. S. (2006) Relative activity of a tobacco hybrid expressing high levels of a tobacco anionic peroxidase and maize ribosome-inactivating protein against *Helicoverpa zea* and *Lasioderma serricorne*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 2629-2634.

Dowd, P. F., Zou, W. N., Gillikin, J. W., Johnson, E. T. & Boston, R. S. (2003) Enhanced resistance to *Helicoverpa zea* in tobacco expressing an activated form of maize ribosome-inactivating protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 3568-3574.

Gatehouse, A. M. R., Barbieri, L., Stirpe, F. & Croy, R. R. D. (1990) Effects of ribosome-inactivating proteins on insect development differences between Lepidoptera and Coleoptera. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 54, 43-51.

Hakim, R. S., Blackburn, M., Corti, P., Gelman, D., Goodman, C., Elsen, K., Loeb, M., Lynn, D. & Smagghe, G. (2006) Growth and mitogenic effects of arylphorin *in vivo* and *in vitro*. *Archives of insect Biochemistry and Physiology* 64, 63-73.

Jouanin, L., Bottino, M., Girard, C., Morrot, G. & Giband, M. (1998). Transgenic plants for insect resistance. *Plant Science* 131, 1-11.

Metcalf, C. L., Flint, W. P. & Metcalf, R. L. (1962) *Destructive and useful insects their habits and control*. 4th ed. 1087pp. McGraw-Hill Book Co., New York.

Peumans, W. J., Barre, A., Hao, Q., Rougé, P. & Van Damme, E. J. M. (2000) Higher plants developed structurally different motifs to recognize foreign glycans. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology* 12, 83-101.

Peumans, W. J., Hao, Q. & Van Damme, E. J. M. (2001) Ribosome-inactivating proteins from plants: more than RNA N-glycosidases? *FASEB Journal* 15, 1493-1506.

Ranjekar, P. K., Patankar, A., gupta, V., Bhatnagar, R., Bentur, J. & Kumar, P. A. (2003). Genetic engineering of crop plants for insect resistance. *Current Science* 84, 321-29.

Stirpe, F. & Battelli, M. G. (2006) Ribosome-inactivating proteins: progress and problems. *Cellular and Molecular Life Sciences* 63, 1850-66.

Senthil-Nathan, S., Choi, M. Y., Paik, C. H. & Kalaivani, K. (2008) The toxicity and physiological effect of goniothalamin, a styryl-pyrone, on the generalist herbivore, *Spodoptera exigua* Hubner. *Chemosphere* 72, 1393-1400.

Shahidi-Noghabi, S., Van Damme, E. J. M., Iga, M. & Smagghe, G. (2010a) Exposure of insect midgut cells to *Sambucus nigra* L. agglutinins I and II causes cell death via caspase-dependent apoptosis. *Journal of Insect Physiology* 56, 1101-1107.

Shahidi-Noghabi, S., Van Damme, E. J. M., De Vos, W. H., Smagghe, G. (2011) Internalization of *Sambucus nigra* agglutinins I and II in insect midgut cells. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 76, 211-222.

Shahidi-Noghabi, S., Van Damme, E. J. M., Mahdian, K. & Smagghe, G. (2010b) Entomotoxic action of *Sambucus nigra* agglutinin I in *Acyrthosiphon pisum* aphids and *Spodoptera exigua* caterpillars through caspase-3 like dependent apoptosis. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 75, 207-220.

Shahidi-Noghabi, S., Van Damme, E. J. M. & Smagghe, G. (2009) Expression of *Sambucus nigra* agglutinin (SNA-I′) from elderberry bark in transgenic tobacco plants results in enhanced resistance to different insect species. *Transgenic Research* 18, 249-259

Smagghe, G., Pineda, S., Carton, B., Del Estal, P., Budia, F. & Viñuela, E. (2003) Toxicity and kinetics for methoxyfenozide in greenhouse-selected *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). *Pest Management Science* 59, 1203-1209.

Steeves, R. M., Denton, M. E., Barnard, F. C., Henry, A. & Lambert, J. M. (1999) Identification of three oligosaccharide binding sites in ricin. Biochemistry 38, 11677-11685.**].**

Stirpe, F. (2004) Ribosome-inactivating proteins. *Toxicon* 44, 371-383.

Tamura, T., Sadakat, N., Oda, T. & Muramatsu, T. (2002) Role of zinc ions in ricin-induced apoptosis in U937 cells. *Toxicology Letters* 132, 141-151.

Van Damme. E. J. M., Hao, Q., Chen, Y., Barre, A., Vandenbussche, F., Desmyter, S., Rougé, P. & Peumans, W. J. (2001) Ribosome-inactivating proteins: a family of plant proteins that do more than inactivate ribosomes. Crit Rev. *Plant Science*. 20, 395-465.

Van Damme, E. J. M. (2008) Plant lectins as part of the plant defense system against insects. pp. 285-307 In: Schaller, A. (Ed.) *Induced plant resistance to herbivory*, Springer Science, Dordrecht, The Netherlands,

Van De Veire, M., Smagghe, G. & Degheele, D. (1997) Laboratory test method to evaluate the effect of 31 pesticides on the predatory bug, *Orius laevigatus* (Het.: Anthocoridae). *Entomophaga* 41, 235-244.

Vandenbussche, F., Peumans, W. J., Desmyter, S., Proost, P., Ciani, M. & Van Damme, E. J. M. (2004) The type-1 and type-2 ribosome-inactivating proteins from Iris confer transgenic tobacco plants local but not systemic protection against viruses. *Planta* 220, 211-221.

Wei, G. Q., Liu, R. S., Wang, Q. & Liu, W. Y. (2004) Toxicity of two type II ribosome-inactivating proteins (cinnamomin and ricin) to domestic silkworm larvae. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 57, 160-165**.**

Zhou, X., Li, X. D., Yuan, J. Z., Tang, Z. H. & Liu, W. Y. (2000) Toxicity of cinnamomin-a new type II ribosome-inactivating protein to bollworm and mosquito. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 30, 259-264.