

Primary field evaluation of transgene in some cotton (*Gossypium hirsutum*) transgenic lines against Lepidoptera pests

Sayyed-Elyass Mortazavi¹, Morteza ArabSalmani²

1. Assistant Professor, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Agricultural Research, Extension and Education (AREEO), Karaj, PO Box: 31535-1897, Iran.

2. Assistant Professor, Tehran Agricultural and Natural Resources Research Center, Agricultural Research, Extension and Education (AREEO), Qoddousi Boulevard, Varamin, Tehran, Iran.

Correspondence:

Sayyed-Elyass Mortazavi

Email: mortazavi@abrii.ac.ir

Received: 22, Oct. 2024

Accepted: 21, Jan. 2025

How to cite:

Mortazavi, S.E., & ArabSalmani, M. (2025). Primary field evaluation of transgene in some cotton (*Gossypium hirsutum*) transgenic lines against Lepidoptera pests. *Crop Biotechnology*, 14 (4), 29-41. (DOI: [10.30473/cb.2025.72568.1986](https://doi.org/10.30473/cb.2025.72568.1986))

ABSTRACT

In order to evaluate characteristics related to Lepidoptera pest resistance in some transgenic cotton lines, different transgenic events from Cocker100 variety harbouring *cryIAb* gene were tested in a field experiment. The other plant materials were consisted from two backcrossed lines resulted from MON531 event and CIM-448 line, and a Chinese commercial transgenic cotton cultivar harbouring *cryIIAc* gene named 11F1 as positive control, and Khordad and Varamin cultivars as the non-transgenic negative control were used in the experiment. A randomized complete block design with three replications was adopted as the statistical model. Infestation of the field during growing season was taken place in six stages to ensure that the field was infected uniformly by the pest. The characters related to the pest resistance trait were recorded during growing season. The results showed that non-transgenic cultivars comprising Varamin and Khordad experienced 24.7 and 23 percent respectively, the maximum boll contamination, while transgenic lines showed a contamination range from relatively susceptible (%19) to relative resistance (%2.5). Also, Maximum damage index of the pest were exhibited in the Varamin and Khordad cultivars with %6.4 and %5.9 respectively, while the index for transgenic lines varied from %5 to %0.6. In general, the transgenic A and B lines showed acceptable bollworm resistance characters. More investigations are needed to confirm other agronomic and fiber quality to be considered in commercialization of the lines.

KEYWORDS

Field Evaluation, Transgenic Cotton, Resistance, Bollworm, Contamination, Damage Index.



«مقاله پژوهشی»

بررسی مقدماتی عملکرد تراژن در ایجاد مقاومت مزرعای نسبت به آفات بالپولکدار در لاین‌های تراریخته پنبه (*Gossypium hirsutum*)

سیدالیاس مرتضوی^۱، مرتضی عرب‌سلمانی^۲

چکیده

نظر به اینکه پس از تولید محصول تراریخته در آزمایشگاه، انجام آزمایش‌های میدانی به منظور اطمینان از بروز ژن در شرایط واقعی مزرعای ضروری است، پنج لاین پنبه تراریخته حاوی ژن *cryIAb*، به همراه سه لاین تراریخته حاوی ژن *cryIAC* و دو رقم تجاری و غیرتراریخته خرداد و ورامین به عنوان شاهد در یک آزمایش مزرعای محصور در یک فصل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار کاشته شده و مورد ارزیابی قرار گرفتند. در این آزمایش، پس از آلوده‌سازی مزرعه با لارو کرم غوزه، میزان آلودگی لاین‌های مورد بررسی در برابر آفت کرم غوزه در قالب تعداد غوزه در بوته، تعداد آلودگی غوزه در بوته، تعداد آلودگی برچه در بوته، و خسارت به غوزه در بوته مورد شمارش قرار گرفت و داده‌ها به صورت درصد بیان شدند. همچنین شاخص خسارت آفت نیز مورد محاسبه قرار گرفت. نتایج آنالیز داده‌ها با نرم‌افزار SAS نشان داد که لاین‌های غیرتراریخته ورامین و خرداد به ترتیب با ۲۴/۷ و ۲۳ درصد بیشترین آلودگی غوزه را داشته‌اند ولی میزان آلودگی در لاین‌های تراریخته متفاوت بود و از نسبتاً حساس (۱۹ درصد) تا نسبتاً مقاوم (۲/۵ درصد) تغییر می‌کرد. همچنین بیشترین شاخص خسارت آفت با ۶/۴ و ۵/۹ درصد به ترتیب برای لاین‌های غیرتراریخته ورامین و خرداد بود ولی این شاخص در لاین‌های تراریخته مورد مطالعه از ۵ درصد تا ۰/۶ درصد تغییر می‌کرد. در مجموع نتایج این بررسی مقدماتی نشان داد که دو لاین تراریخته A و B حاوی تراژن *cryIAC* دارای کمترین میزان آلودگی و خسارت هستند. در ادامه بررسی‌های بیشتر و دقیق‌تری بر روی این لاین‌ها لازم است تا مقاومت به آفات بالپولکدار و سایر خصوصیات کمی و کیفی آنها مورد شناسایی و تأیید قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی

آلودگی، ارزیابی مزرعای، پنبه تراریخته، شاخص خسارت، کرم غوزه، مقاومت.

۱. استادیار، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران، صندوق پستی ۳۱۵۳۵-۱۸۹۷.
۲. استادیار، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان تهران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، ورامین، تهران، ایران.

نویسنده مسئول:

سید الیاس مرتضوی

رایانامه: mortazavi@abrii.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۸/۰۱

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۱/۰۲

استناد به این مقاله:

مرتضوی، سید الیاس و عرب‌سلمانی، مرتضی (۱۴۰۴). بررسی مقدماتی عملکرد تراژن در ایجاد مقاومت مزرعای نسبت به آفات بالپولکدار در لاین‌های تراریخته پنبه (*Gossypium hirsutum*)، فصلنامه علمی زیست فناوری گیاهان زراعی، ۱۴ (۴)، ۲۹-۴۱. (DOI: [10.30473/cb.2025.72568.1986](https://doi.org/10.30473/cb.2025.72568.1986))

مقدمه

پس از تولید یک لاین ژن انتقال یافته در آزمایشگاه و اثبات بروز ژن در مراحل آزمایشگاهی و گلخانه‌ای، لازم است تا بروز آن تراژن در محیط واقعی مزرعه‌ای نیز مورد آزمایش قرار داده شود. هدف از چنین آزمایشی آن است که از بین لاین‌های آزمایشگاهی، رویداد^۱ یا لاینی انتخاب شود تا میزان بروز کافی برای ایجاد صفت مورد نظر در مزرعه را داشته باشد. به طور کلی پس از انتقال هر تراژن و از جمله ژن‌های پروتئین کریستالی به یک میزبان جدید نظیر یک محصول زراعی، به دلایل مختلفی از جمله متغیر بودن میزان بروز ژن در رویدادهای تراریزشی مختلف، و نیز تغییراتی که ممکن است پس از ترجمه در هر پروتئینی رخ دهد، یا رشد گیاه در شرایط طبیعی خارج از آزمایشگاه که به ویژه باعث اثرپذیری بروز ژن از تغییرات دما و تنش‌های مختلف محیطی می‌شود، و در نهایت، احتمال خاموشی ژن، این ضرورت را به وجود می‌آورد که اثر مورد انتظار از آن تراژن در شرایط واقعی مزرعه‌ای نیز مورد ارزیابی قرار گیرد. این آزمایش‌ها در سطح و اندازه‌های مختلف و با اهداف مختلفی انجام می‌شوند (Slot *et al.*, 2018; Ribichich *et al.* 2020).

آزمایش‌های مزرعه‌ای لاین‌های تراریخته را از دیدگاه‌های مختلفی می‌توان مورد بررسی قرار داد. به عنوان مثال، از نظر مساحت مورد استفاده برای انجام آزمایش، انواع آزمایش‌های در سطح محدود (کوچک مقیاس)، در سطح متوسط و همچنین بزرگ-مقیاس را می‌توان مورد اشاره قرار داد.

در آزمایش‌های سطح کوچک که معمولاً برای غربالگری اولیه‌ی تعداد قابل توجهی از لاین‌ها یا رویدادهای تراریزشی مورد استفاده قرار می‌گیرد، با استفاده از یک مدل آماری ساده به ارزیابی لاین‌های تراریخته پرداخته می‌شود. از آنجا که در این نوع آزمایش‌ها که معمولاً بلافاصله پس از آزمایش‌های گلخانه‌ای و با مواد آزمایشی حاصل از همان آزمایش‌ها اجرا می‌شوند، مقدار بذر اندکی وجود دارد، امکان اجرای آزمایش‌های بزرگ مقیاس و یا آزمایشی با تکرار زیاد وجود

ندارد. از این رو، این مقدار اندک بذر حاصل از آزمایش‌های گلخانه‌ای (یا دیگر مواد ژنتیکی رویشی که به عنوان بذر مورد استفاده قرار دارند) فقط کفاف یک آزمایش در مقیاس کوچک را می‌دهد. لازم به توضیح است که در این مرحله، نیازی هم به اجرای یک آزمایش متوسط یا بزرگ نیست؛ زیرا هدف از انجام آزمایش میدانی در این مرحله، ارزیابی و غربال اولیه لاین‌های تراریخته است (Walker *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2022).

آزمایش‌های سطح محدود بسته به صفت تراریخته و نوع گیاه تفاوت دارند. به هر حال این آزمایش‌ها در خصوص لاین‌های تراریخته‌ی مقاوم به آفات می‌توانند به اشکال مختلفی به اجرا در آیند. یکی از رایج‌ترین انواع این آزمایش‌های میدانی کوچک-مقیاس، استفاده از قفس یا توری است (Nickell *et al.*, 1990; Connolly *et al.*, 2024). در این روش، یک کرت کوچک در هر تکرار کشت می‌شود و یا اینکه قسمتی از یک کرت بزرگتر با توری کاملاً محصور می‌گردد. در این شرایط، حشرات آفت مورد نظر در زیر توری یا درون قفس قرار داده می‌شود و در نهایت، صفات متناسب با اثر آن آفت بر روی لاین تراریخته مورد ارزیابی قرار می‌گیرد. رهاسازی آفت در درون قفس یا زیر توری‌ها به منظور اطمینان از اثر آفت بر روی گیاه، رهاسازی یکنواخت آفت برای هر کرت، جلوگیری از اثر سایر آفات بر روی مواد آزمایشی و اندازه‌گیری دقیق صفات مرتبط با رشد و توسعه آفت در هر کرت انجام می‌شود. علاوه بر این، در صورتی که زمینه ژنتیکی لاین‌های مورد آزمایش متفاوت باشد، این احتمال وجود دارد که آفت مورد نظر، لاین یا لاین‌های خاصی را برای تغذیه ترجیح داده و در نتیجه‌ی تغذیه بیشتر آفات از آن لاین، ارزیابی میزان مقاومت نسبت به آن آفت تحت تأثیر قرار گیرد (Walker *et al.*, 2000; Connolly *et al.*, 2024).

با این وجود، ارزیابی اثر آفات بر روی لاین‌های تراریخته در قفس یا توری، اثرات نامطلوبی نیز دارد. به عنوان مثال، سایه‌اندازی توری بر روی گیاهان به طور مستقیم رشد گیاه و فیزیولوژی آن را تحت تأثیر قرار می‌دهد. در این شرایط، گاهی فقط قسمتی از یک کرت محصور شده و برای ارزیابی صفات مرتبط با رشد و

۱. رویداد یا رخداد، خطوط سلولی حاصل از تراریزش است که طبق

تعریف دارای محل ادخال منحصر به فرد در ژنوم است.

Yazdanpanah *et al.*, 2009; Rostamkhani *et al.*, 2011; Azimi *et al.*, 2012; Modirroosta *et al.*, 2013). از آنجا که آنالیزهای مولکولی و زیست‌سنجی‌های انجام‌شده بر روی این لاین‌ها در آزمایشگاه و گلخانه نشان‌دهنده وجود مقاومت در این لاین‌ها بوده است، ارزیابی دقیق این لاین‌ها و انتخاب مقاوم‌ترین لاین برای آزادسازی اجتناب‌ناپذیر خواهد بود. از این رو، هدف این آزمایش، ارزیابی اثر تراژن در ایجاد صفت مورد نظر در شرایط واقعی مزرعه‌ای تعیین شده است.

روش‌شناسی پژوهش

آزمایش بررسی مقدماتی عملکرد تراژن به منظور ارزیابی وضعیت مقاومت ارقام مورد مطالعه نسبت به شاهد در برابر آفات بالپولکدار پنبه به ویژه کرم غوزه و برای نخستین بار در ایران انجام شد. مکان انجام این آزمایش، یک قطعه زمین کشاورزی واقع در روستای سلمان‌آباد ورامین و فاصله‌ی اندک از مزارع کشاورزان بود. در انتخاب این منطقه رعایت موارد ایمنی زیستی شامل محصورسازی گیاهان تراریخته رعایت شده است؛ زیرا مزارع پنبه کشاورزان و نیز مزارع تکثیر بذر موسسه تحقیقات پنبه کشور در منطقه ورامین، ده‌ها کیلومتر با این مزرعه فاصله داشت و از این رو، به واسطه محصورسازی بیولوژیک، انتقال دانه‌گرده و گرده‌افشانی ناخواسته (انتقال افقی ژن) عملاً امکان‌پذیر نبود (Siddiqui *et al.*, 2022).

مواد گیاهی مورد استفاده در این پروژه شامل هشت لاین تراریخته پنبه به همراه دو رقم غیرتراریخته بود. از بین این لاین‌های تراریخته، یک رقم هیبرید تجاری تراریخته خارجی با منشاء کشور چین به نام رقم 11F1 محصول شرکت بایوسنتری ترانسژن (BioCentury Transgene Co., Ltd.) با کد لاین C و به عنوان رقم شاهد مثبت مورد استفاده قرار گرفت. این رقم تراریخته نیز دارای ژن *cryIAC* برای ایجاد مقاومت نسبت به آفات بالپولکدار به ویژه، کرم غوزه پنبه بود.

از بین سایر لاین‌های مورد استفاده، دو لاین تراریخته دارای ژن *cryIAC* (موسوم به لاین A و لاین B) بودند که از طریق تلاقی لاین کوکر ۳۱۲ تراریخته حاوی رویداد

فیزیولوژی از گیاهان کشت‌شده در قسمت غیرمحصور کرت استفاده می‌شود؛ هرچند که این امر از دقت ارزیابی‌ها می‌کاهد (Connolly *et al.*, 2024).

در روش دیگری از آزمایش‌های سطح محدود، برای اطمینان از آلوده‌شدن کافی لاین‌های مورد مطالعه، در مناطق آلوده به آن آفات اقدام به اجرای آزمایش می‌کنند. این روش به ویژه در مورد آفاتی مثل کرم غوزه پنبه کاربرد دارد که پلی‌فاژ بوده و از گیاهان مختلفی تغذیه می‌کنند. از آنجا که استانداردهای محصورسازی گیاهان تراریخته محدودیت‌هایی برای انتخاب محل آزمایش به وجود می‌آورد، پلی‌فاژ بودن آفت این امکان را به وجود می‌آورد که لاین‌های تراریخته یک محصول را در کنار مزارعی ایجاد کرد که امکان گرده‌افشانی را از بین ببرد، ضمن اینکه آفت کافی برای ارزیابی لاین تراریخته در اختیار قرار می‌دهد. به عنوان مثال ارزیابی لاین‌های تراریخته پنبه در کنار مزارع ذرت یا گوجه‌فرنگی انجام می‌شود که میزبان‌های دیگری برای کرم غوزه به شمار می‌روند (Govindan *et al.*, 2012; Siddiqui *et al.*, 2022).

پیشینه پژوهش

پژوهش‌های تولید پنبه تراریخته مقاوم به آفات بالپولکدار در کشور از سال ۱۳۷۹ آغاز شده است و تاکنون ادامه یافته است. در این پژوهش‌ها با استفاده از ژن پروتئین کریستالی گرفته‌شده از یک باکتری خاکزی (*cryIAb* و *cryIAC*) اقدام به انتقال ژن به یک رقم پنبه دارای قابلیت تراریزش موسوم به رقم کوکر شده است. این ژن‌ها تحت کنترل یک پیش‌بر دائمی بسیار معروف به نام پیش‌بر CaMV35S و با روش انتقال ژن به کمک *آگروباکتریوم* به ریزنمونه‌های پنبه رقم کوکر منتقل شدند و رویدادهای تراریزشی که از این روش به دست آمدند، با استفاده از انواع آنالیزهای مولکولی که اثبات‌کننده وجود، بیان ژن و ایجاد مقاومت نسبت به آفات بالپولکدار بودند، مورد بررسی‌های دقیق قرار گرفتند. همچنین تجزیه و تحلیل‌ها و بررسی‌های زیادی در خصوص عدم وجود هر گونه آثار زیانبار (احتمالی) برای سلامت انسان، دام و محیط زیست بر روی این گیاهان تراریخته در نسل‌های مختلف انجام شده است (Tohidfar *et al.*, 2008;).

cryIAb/Ac به صورت آغازگر فـوروارـد 5'CGGTGTAGTTTCCAATCAGCCTAG3' و آغازگر برگشتی 5'ACACTCCCATCGACATCTCCTTGT3' در این واکنش‌ها مورد استفاده قرار گرفت. چرخه‌های دمایی مورد استفاده در این واکنش شامل ۳۰۰ ثانیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به عنوان ذوب شدن اولیه DNA الگو، ۴۰ چرخه دمایی با ۴۵ ثانیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه در ۶۰ درجه سانتی‌گراد به عنوان دمای اتصال آغازگر و ۶۰ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد بود که در نهایت ۴۲۰ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد نیز برای تکثیر نهایی به آن افزوده شد. حجم واکنش‌ها، ۲۰ میکرولیتر در نظر گرفته شده بود و در آن از ۲ میکرولیتر بافر PCR (سیناکلون، شماره کاتالوگ MM2101)، ۰/۲ میکرولیتر آنزیم Taq (سیناکلون، شماره کاتالوگ 1601)، ۱ میکرولیتر MgCl₂ (۵۰ میلی‌مولار سیناکلون، شماره کاتالوگ MM2091)، ۴ میکرولیتر از دو آغازگر یادشده (۱۰ پیکومولار)، ۱ میکرولیتر از مجموعه نوکلئوتیدهای مورد نیاز (۱۰ میلی‌مولار، سیناکلون، شماره کاتالوگ 7604C) و ۱ میکرولیتر DNA الگو (۳۰ میلی‌مولار) و در نهایت ۱۰/۳ میکرولیتر آب مقطر استفاده شد.

پس از رشد گیاهان و به گل رفتن آنها، به منظور اطمینان از آلوده شدن کافی مزرعه با آفات بالپولکدار رایج در منطقه شامل کرم غوزه (*Helicoverpa armigera* Hübner) و کرم خاردار (*Earias insulana* Boisduval)، نسبت به جمع‌آوری تخم و لارو (غوزه آلوده) از مزارع آلوده در منطقه ورامین و گرمسار اقدام شد. بدین منظور با حضور در مزارع کشاورزان در مناطق یادشده، سرشاخه‌های آلوده حاوی تخم و لارو آفات بالپولکدار در سنین مختلف جمع‌آوری شده و ۷ بار در طول ۴۲ روز در مزرعه آزمایشی توزیع گردید. این میزان آلودگی که به منظور اطمینان از حضور آفات یادشده بر روی تمامی بوته‌های موجود در هر کرت انجام شد، به صورت فوق‌العاده یعنی بسیار بیشتر از آلودگی طبیعی که در منطقه روی می‌دهد، در نظر گرفته شد. علاوه بر این، به منظور جلوگیری از شکار شدن پروانه‌های مادر توسط پرندگان، اقدامات لازم برای دور کردن پرندگان از منطقه

MON531 و یک لاین پنبه غیرتراریخته به نام CIM-448 به همراه ۴ تلاقی برگشتی با همان لاین CIM-448 و در نهایت، خودگشتی و انتخاب تعدادی لاین‌های هموزیگوت بر مبنای آزمون نتاج به دست آمده بودند. این دو لاین تقریباً ایزوژن بودند هر چند که در بعضی از صفات با یکدیگر فرق داشتند. پنج لاین تراریخته دیگر به نام لاین‌های I, G, E, D و J لاین‌های تراریخته دارای ژن cryIAb از رقم کوکر ۱۰۰ بودند (Tohidfar et al., 2008; Yazdanpanah et al., 2009; Rostamchani et al., 2011; Azimi et al., 2012; Modirroosta et al., 2013). این لاین‌های تراریخته، رخدادهای مستقلی بودند که آنالیزهای مولکولی انجام‌شده، نشان‌دهنده وجود تراژن در آنها و بروز تراژن در شرایط گلخانه‌ای بود. دو رقم غیرتراریخته خرداد و ورامین نیز به عنوان شاهد منفی مورد استفاده قرار گرفتند. این دو رقم در منطقه مورد آزمایش، بیشترین محبوبیت و سطح زیرکشت را در بین کشاورزان دارا هستند.

آزمایش بررسی مقدماتی مقاومت به آفات بالپولکدار در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار انجام شد. هر لاین پنبه تراریخته در این آزمایش در کرتی به طول سه متر و در دو خط به صورت جوی و پشته و به فواصل ۲۰ سانتی‌متری بر روی پشته کاشته شد. فواصل بین ردیف‌های کاشت نیز به مقدار ۱۲۰ سانتی‌متر و فاصله بین کرت‌ها، ۲ متر در نظر گرفته شد.

مراقبت‌های زراعی شامل آبیاری، کوددهی و وجین علف‌های هرز مطابق معمول منطقه و طبق نیاز انجام شد به طوری که فواصل آبیاری در ابتدای فصل به صورت هر هفته و در بقیه فصل رشد هر دو هفته یکبار انجام می‌شد. کوددهی با استفاده از کودهای شیمیایی نیتروژنه و فسفره هر کدام به میزان ۱۰۰ کیلوگرم در هکتار صورت گرفت. در تمام طول فصل، عملیات وجین و مبارزه با علف‌های هرز به صورت دستی انجام می‌شد.

از آنالیز واکنش زنجیره‌ای پلیمرز برای نشان دادن حضور تراژن در لاین‌های مورد بررسی استفاده شد. برای این منظور، ابتدا استخراج DNA از نمونه برگ گیاهان هر لاین با استفاده از روش C-Tab (Paterson et al., 1993) انجام شد. آغازگرهای اختصاصی ژن‌های

جمع‌آوری شده از این آزمایش به صورت شمارشی بوده و به صورت درصد بیان می‌شدند، برای تحقق مفروضات تجزیه واریانس از تبدیل داده‌های جذری برای آن داده‌ها استفاده شد. مقایسه‌های میانگین با استفاده از روش LSD (Yazdi Samadi et al., 1998) و در سطح احتمالی انجام شد که در تجزیه واریانس معنی‌دار اعلام شد.

یافته‌های پژوهش

شکل ۲ نمونه‌ای از نتایج آنالیز واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز برای لاین‌های مورد استفاده در این آزمایش را خلاصه کرده است. این شکل نشان می‌دهد که هشت لاین از مواد گیاهی مورد استفاده در این آزمایش، حاوی تراژن بوده و دو رقم خرداد و ورامین که به عنوان شاهد در این آزمایش به کار گرفته شده‌اند، فاقد تراژن می‌باشند. این نتایج اطمینان به وجود می‌آورد که این مواد ژنتیکی دارای خصوصیات مورد ادعا هستند.

جدول ۱ نتایج تجزیه واریانس برای داده‌های تبدیل شده صفات تعداد غوزه، درصد غوزه‌های آلوده، درصد برچه‌های آلوده و درصد خسارت به غوزه در لاین‌های مورد آزمایش را خلاصه‌سازی کرده است. ابتدا اینکه به خاطر معنی‌دار نبودن اثر تکرار (بلوک) در نتایج اولیه تجزیه واریانس، اثر آن با اثر خطای آزمایشی اختلاط داده شد (Yazdi Samadi et al., 1998) تا دقت مقایسه‌ها افزایش یابد. سپس همانگونه که از جدول ۱ مشاهده می‌شود، تمامی صفات مورد مطالعه در این آزمایش، بسیار معنی‌دار (در سطح $\alpha=0/01$) اعلام شده‌اند.

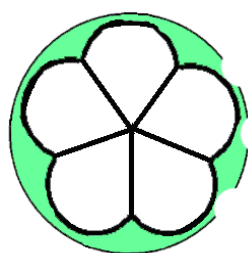
آزمایش نظیر نصب مترسک و نخ‌کشی در مزرعه صورت گرفت. همچنین به منظور جذب پروانه مادر در بین کرت‌های آزمایشی نسبت به کاشت گیاه ذرت اقدام شد (Fang et al., 2021; Siddiqui et al., 2022).

در پایان فصل و پس از رسیدگی پنبه، ۵ بوته از هر کرت قطع شد. سپس، صفات مرتبط با مقاومت به کرم غوزه شامل تعداد غوزه، تعداد غوزه آلوده (یعنی غوزه‌هایی که به صورت کامل یا تقریباً کامل توسط آفات خورده شده بود)، تعداد برچه آلوده (یعنی غوزه‌هایی که به صورت کامل خورده نشده بلکه یک یا دو برچه آن مورد حمله آفت قرار گرفته است)، تعداد غوزه آسیب‌دیده (یعنی غوزه‌هایی که تنها خسارت جزئی دیده و لارو آفت موفق به نفوذ به داخل آن نشده و تنها ظاهر آن خسارت دیده است) به روش Cooke و همکاران (۲۰۰۶) مورد شمارش قرار گرفت (شکل ۱).

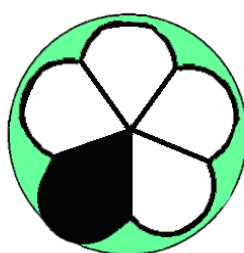
همچنین شاخص آلودگی به وسیله رابطه (۱) با استفاده از داده‌های بدست‌آمده مورد محاسبه قرار گرفت (Cooke et al., 2006).

$$D_i = \frac{\sum [(x_i \cdot f_i) / \sum f_i] \cdot (100/n)}{[(x_1 \cdot 0) + (x_2 \cdot 1) + \dots + (x_6 \cdot 5)] / \sum f_i} \quad \text{رابطه (۱)}$$

در این فرمول، D_i شاخص آلودگی، x_i تعداد برچه آلوده در یک غوزه که می‌تواند از صفر تا ۵ برچه را به خود بگیرد، f_i تعداد غوزه‌های دارای x_i برچه آلوده و n تعداد برچه در هر غوزه هستند که معمولاً ۵ برچه در یک غوزه وجود دارد. داده‌های به دست‌آمده به صورت فوق با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS (SAS Institute, 1993) و مدل آماری مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. از آنجا که داده‌های



Damaged Boll



Conaminated Locule



Contaminated Boll

شکل ۱. دسته‌بندی انواع خسارت کرم غوزه (*Helicoverpa armigera*).

Figure 1. Types of damages caused by Lepidoptera pests on the cotton boll.

جدول ۱. جدول تجزیه واریانس برای داده‌های تبدیل شده تعداد غوزه، درصد آلودگی غوزه‌ها، برچه‌ها و آسیب وارد به غوزه‌های آزمایش مقدماتی بررسی مقاومت لاین‌های پنبه نسبت به آفات بالپولکدار.

Table 1. Analysis of Variance for transformed data resulted from preliminary experiment on resistance ability of some transgenic cotton lines.

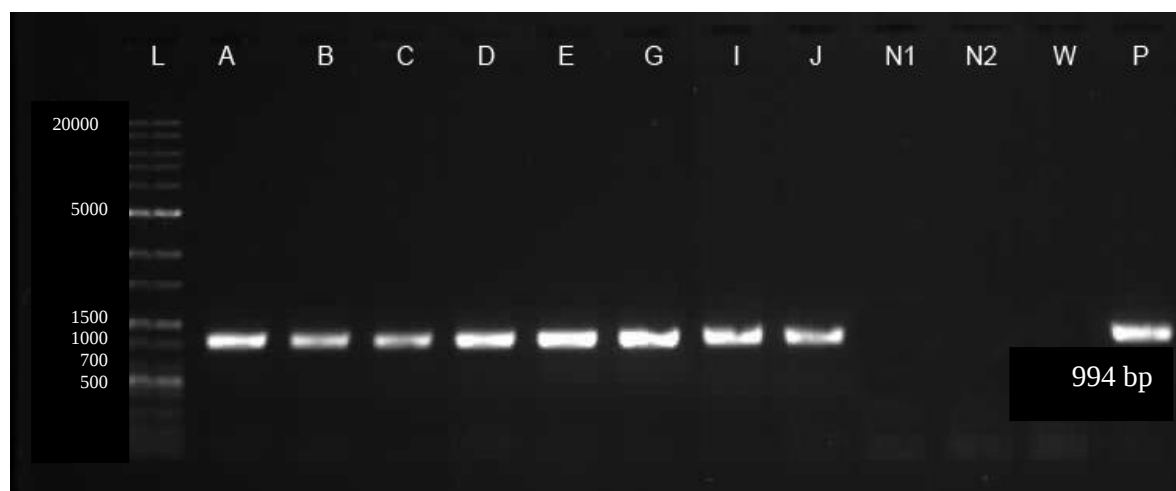
R ² (%)	ضریب تغییرات Coefficient of Variation (%)	میانگین مربعات خطا Error Mean Squares	میانگین مربعات Mean Squares	صفت Traits
36	19	1.53	14.44**	تعداد غوزه (Boll per Plant)
57	24	0.0073	0.1623**	درصد آلودگی غوزه ((Boll Contamination (%))
62	26	0.0020	0.0586**	درصد آلودگی برچه ((Locule Contamination (%))
34	31	0.0028	0.0247**	درصد غوزه آسیب‌دیده ((Boll Damage (%))
56	25	0.1924	4.0640**	شاخص خسارت ((Damage Index (%))

* Degree of freedom of the traits and the experimental errors are 9 and 150, respectively.

** means very significant ($\alpha=0.01$).

*, درجه آزادی صفات و خطای آزمایشی به ترتیب ۹ و ۱۵۰ است.

**, به معنی بسیار معنی‌دار است ($\alpha=0.01$).



شکل ۲. نتایج آنالیز واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز برای لاین‌های مورد استفاده در مطالعه از آغازگرهای اختصاصی ژن‌های *cryIAb* و *cryIAC*. در این شکل، L، نشانگر وزنی 1Kb⁺، A-J، لاین‌های تراریخته مورد مطالعه، N1 و N2، لاین‌های غیرتراریخته به ترتیب خرداد و ورامین، W، آب (شاهد منفی) و P، پلاسمید (شاهد مثبت) هستند. این شکل تأیید می‌کند که لاین‌های تراریخته مورد استفاده در این مطالعه، همگی مطابق انتظار باند مورد نظر را نشان می‌دهند.

Figure 2. The results of PCR analysis for the lines using *cryIAb/cryIAC* specific primers. The figure confirms that all transgenic lines showed specific band of the transgenes.

بیشتر تحت کنترل ژنتیکی است (Ashokkumar & Ravikesavan, 2011; Fang et al., 2021). علاوه بر قابلیت ژنتیکی، عوامل مهمی چون مراقبت‌های زراعی در کنار تیپ رشد گیاه و تراکم مورد استفاده در آزمایش نیز بر میزان رشد گیاه و در نتیجه بر تعداد غوزه تولیدی موثر است (Bednarz et al., 2005). به عبارت دیگر، در تراکم پایین کشت، یک بوته فضای بیشتری برای توسعه داشته و در نتیجه با تولید شاخه‌های زیادی بیشتر، غوزه بیشتری نیز تولید خواهد کرد.

با همه این احوال در این مطالعه، قابلیت تولید غوزه به عنوان یک صفت اصلاحی مد نظر نبوده است، و تنها

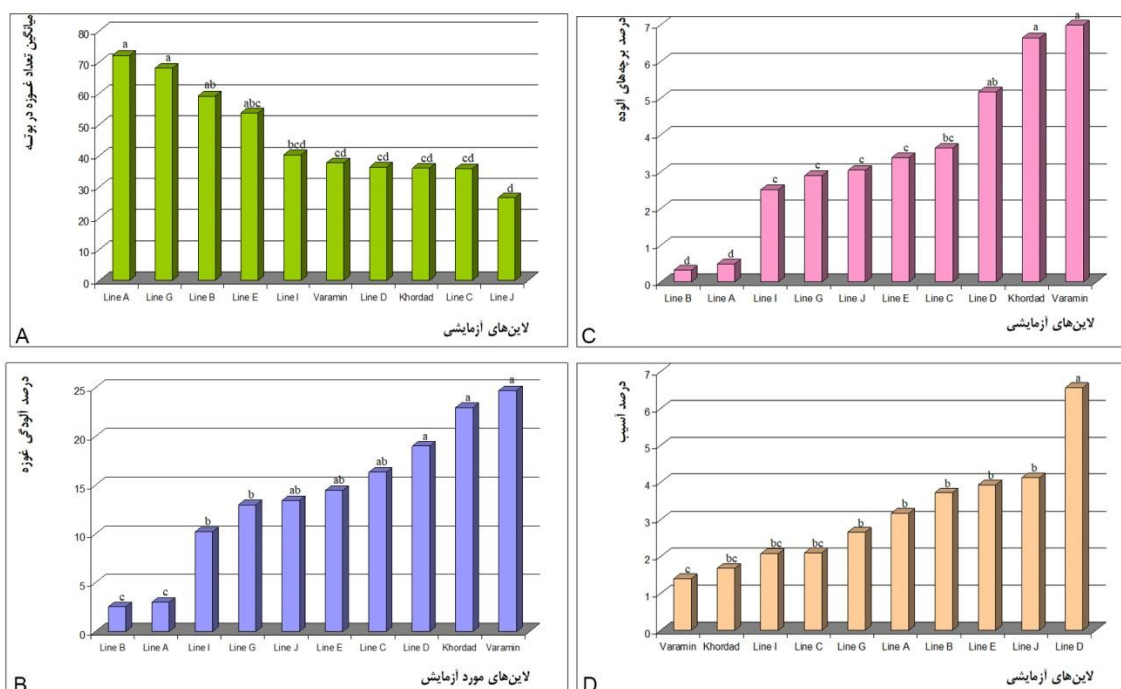
شکل ۳. مقایسه میانگین برای صفت تعداد غوزه در لاین‌های مورد مطالعه را نشان می‌دهد. این شکل نشان می‌دهد که تفاوت در تعداد غوزه در بین ارقام مورد مطالعه بسیار زیاد بوده است؛ به طوری که لاین‌های تراریخته A و G با ۷۲ و ۶۸ غوزه در بوته، بیشترین تعداد، و لاین تراریخته J با ۲۶/۴۵ غوزه در بوته، کمترین تعداد غوزه در بوته را داشته‌اند. لاین‌های غیرتراریخته ورامین و خرداد به ترتیب با ۳۷/۶۷ و ۳۶ غوزه، دارای غوزه‌های نسبتاً کمتری بودند.

صفت تعداد غوزه در بوته یک صفت بسیار مهم اصلاحی در پنبه است به طوری که قابلیت تولید غوزه

بوته‌ها نمود می‌یابد.

با این توضیح و به دلیل تفاوت موجود در تعداد غوزه در بوته در بین لاین‌های مورد مطالعه، سایر صفات مرتبط با رشد و گسترش آفت بر روی ارقام بر اساس تعداد غوزه موجود بر روی هر بوته مورد تصحیح قرار گرفته و به صورت درصد بیان شدند و در ادامه، مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

به عنوان یک صفت زمینه‌ای برای توسعه آفات بالپولکدار در نظر گرفته شده است. آفات بالپولکدار پنبه در مراحل لاروی خود ابتدا برگ و سپس گل تا غوزه را مورد حمله قرار می‌دهند (Darvish Modjeni, 2012). اگر آفات مورد اشاره در مراحل تشکیل گل و ابتدای مراحل تشکیل غوزه به گیاه حمله کنند، این امر به ریزش گل‌ها و نیز غوزه‌های بسیار جوان منتهی می‌شود که این وضعیت در کاهش تعداد غوزه بر روی



شکل ۳. A. مقایسه میانگین صفت تعداد غوزه در لاین‌های مورد مطالعه با آزمون LSD و سطح خطای $\alpha=0.01$. این شکل نشان می‌دهد که صفت تعداد غوزه در لاین‌های مورد مطالعه تفاوت بسیار زیادی دارند. **B.** مقایسه میانگین درصد آلودگی غوزه در لاین‌های مورد مطالعه با آزمون LSD و سطح خطای $\alpha=0.01$ که نشان‌دهنده آن است که ارقام غیرتراریخته ورامین و خرداد به همراه لاین تراریخته D بیشترین درصد آلودگی و لاین‌های تراریخته A و B کمترین درصد آلودگی را داشته‌اند. **C.** مقایسه میانگین درصد برچه‌های آلوده در لاین‌های مورد مطالعه با آزمون LSD و سطح خطای $\alpha=0.01$ که نشان می‌دهد که ارقام غیرتراریخته خرداد و ورامین بیشترین درصد آلودگی و لاین‌های تراریخته A و B کمترین درصد آلودگی را داشته‌اند. **D.** مقایسه میانگین درصد آسیب در لاین‌های مورد مطالعه با آزمون LSD و سطح خطای $\alpha=0.01$ که این شکل نیز نشان می‌دهد که ارقام غیرتراریخته خرداد و ورامین کمترین درصد آسیب و لاین تراریخته D بیشترین درصد آسیب را داشته‌اند.

Figure 3. A. Means comparison for boll per plant trait in the genotypes with LSD test and $\alpha=0.01$. The figure shows that boll per plant varied between genotypes which may be reflected from resistance or susceptibility of genotypes to Lepidoptera pests. B. Means comparison for boll contamination in the genotypes with LSD test and $\alpha=0.01$. The figure illustrates that non-transgenic lines along with transgenic line D experienced maximum contamination while two transgenic lines A and B had the least boll contamination. C. Means comparison for locule damage in the genotypes with LSD test and $\alpha=0.01$. The figure illustrates that non-transgenic lines along with transgenic line D experienced maximum damages while two transgenic lines A and B had the least locule damage. D. Means comparison for boll injuries in the genotypes with LSD test and $\alpha=0.01$. The figure illustrates that non-transgenic lines experienced minimum injuries while transgenic line D had the maximum boll injuries.

تفکیک این دو وضعیت و کمی سازی صفت ریزش گل بر اثر هجوم آفت در شرایط مزرعه ای بسیار مشکل است. در نتیجه با اینکه صفت درصد غوزه آلوده یا تعداد غوزه آلوده که به دنبال تغذیه لاروها از غوزه های بزرگ تر و کمی سازی آن به وجود می آید، به تنهایی معیار بسیار خوبی از مقاومت یا حساسیت یک رقم نسبت به آن آفات نیست، ولی با این حال، با مقاومت لاین ها نسبت به این آفات ارتباط داشته و در کنار صفات دیگر، تصویر مناسبی از مقاومت لاین ها را به دست می دهد (Siddiqui et al., 2022).

مقایسه میانگین درصد برچه های آلوده شده در لاین های مورد مطالعه در شکل C.۳ خلاصه شده است. این شکل نشان می دهد که الگوی مرتب شدن لاین ها بر اساس صفت درصد برچه های آلوده به الگوی مرتب شدن آنها با صفت درصد غوزه های آلوده شباهت تام دارد. بر این اساس، ارقام غیرتراریخته ورامین و خرداد به ترتیب با ۷ و ۶/۷ درصد برچه آلوده دارای بیشترین نرخ آلودگی بوده و لاین های تراریخته B و A به ترتیب با ۰/۳۲ و ۰/۴۹ درصد، دارای کمترین نرخ آلودگی بودند. سایر لاین ها شامل I, G, J, E, C و D به ترتیب با ۲/۸، ۳/۴، ۳/۶ و ۵/۲ درصد در بین این دو مقدار کرانه ای قرار گرفتند.

هر غوزه پنبه به صورت معمول دارای ۴ یا ۵ برچه است. محتوای این برچه ها یعنی بذره های نارس و نرم و نیز الیاف نارس مورد تغذیه لارو آفات بالپولکدار قرار می گیرد. این برچه ها به وسیله دیواره ای از یکدیگر جدا می شوند (شکل ۱). در صورتی که لارو بتواند به داخل غوزه نفوذ کند، در شرایط معمول از طریق سوراخ کردن دیواره برچه ها و ورود به آنها، کل غوزه را آلوده می کند. با این وجود، در برخی شرایط لارو نمی تواند کل یک غوزه را مورد تغذیه قرار دهد و تنها موفق به آلوده سازی تعداد کمی از برچه های غوزه خواهد شد. یکی از دلایل چنین امری، وجود مقاومت در غوزه ها در برابر آفت است. اگر لاروی که به غوزه حمله می کند در سنین بالاتری از مراحل نمو خود قرار داشته باشد، نسبت به اثرات سمی پروتئین کریستالی مقاومت بیشتری از خود نشان می دهد. معنای این امر آن است که لاروهای مذکور مدت بیشتری

مقایسه میانگین درصد آلودگی غوزه در لاین های مورد مطالعه در شکل B.۳ خلاصه شده است. این شکل نشان می دهد که ارقام غیرتراریخته ورامین و خرداد به ترتیب با ۲۴/۷ و ۲۳ درصد و لاین تراریخته D با ۱۹ درصد بیشترین درصد آلودگی، و لاین های تراریخته B و A به ترتیب با ۲/۵ و ۳ درصد کمترین آلودگی را در شرایط آزمایش نشان داده اند. سایر لاین های مورد مطالعه در این آزمایش در بین این مقادیر کرانه ای قرار داشتند به طوری که درصد آلودگی لاین های تراریخته I, G, J, E, C و D به ترتیب برابر ۱۰/۲، ۱۳، ۱۳/۴، ۱۴/۵ و ۱۶/۳ بود. نکته مهم در این میان، وضعیت رقم تراریخته موسوم به لاین C بود که آلودگی غوزه آن برابر ۱۴/۵ درصد گزارش شد. این مقدار آلودگی اگرچه در این آزمایش یک اختلاف ده درصدی با ارقام غیرتراریخته و اختلاف ۱۲ درصدی با بهترین لاین تراریخته این آزمایش نشان داد ولی به عنوان یک لاین تراریخته در کشور چین مورد رهاسازی قرار گرفته است.

صفت درصد و یا تعداد غوزه آلوده معیار اصلی اندازه گیری مقاومت ارقام در برابر آفات بالپولکدار و سایر آفات غوزه پنبه است (Fang et al., 2021; Siddiqui et al., 2022). با این وجود، توجه به الگوی رشد و تولید مثل آفت از اهمیت به سزایی در این میان برخوردار است. پروانه مادر آفات بالپولکدار، محل اتصال رگبرگ اصلی به برگ در برگ های جوان و بسیار جوان را به عنوان محل تخم گذاری انتخاب می کند. پس از تفریخ، لارو سن ۱ ضمن تغذیه از این برگ های جوان، راه غوزه های تازه تشکیل شده و حتی گل های گیاه را در پیش می گیرد و پس رسیدن به مقصد، وارد غوزه ها شده و به تغذیه از محتوای غوزه ها می پردازد. در صورتی که غوزه، بسیار جوان باشد، این غوزه به سرعت از گیاه جدا می شود. نتیجه این وضعیت، انباشته شدن تعداد زیادی گل و غوزه جوان در زیر بوته های گیاه پنبه خواهد بود. با اینکه این وضعیت در نگاه اول می تواند به عنوان معیاری از مقاومت یا حساسیت به آفت تلقی شود، ولی با توجه به اینکه عوامل دیگری مثل مراقبت های زراعی و کمبود رطوبت نیز به ریزش گل ها و غوزه های جوان منتهی می شوند، امکان

دوام آورده و به تغذیه خود ادامه می‌دهند. هرچه مقدار مقاومت لاین پنبه در برابر آفت بیشتر باشد، لاروها با سرعت بیشتری از بین می‌روند و در نتیجه، برچه‌های کمتری خسارت می‌بینند (Fang et al., 2021; Siddiqui et al., 2022). از این رو، جنبه دیگر مقاومت در برابر آفت با صفت تعداد یا درصد برچه‌های آلوده سنجیده می‌شود.

مقایسه میانگین درصد آسیب به غوزه در لاین‌های مورد مطالعه در شکل ۳.D. خلاصه شده است. این شکل نشان می‌دهد که الگوی آسیب در این لاین‌ها کاملاً متفاوت با الگوی آلودگی غوزه است؛ لاین‌های غیرتراریخته در این شکل کمترین آسیب را نشان می‌دهند، در حالی درصد آسیب به لاین‌های تراریخته بیشتر است. ابتدا باید توضیح داد که آسیب وارده به غوزه‌ها به صورت وجود نقاطی تعریف می‌شود که در اثر تغذیه آفت از پوست غوزه‌ها به وجود آمده است. در واقع در این شرایط، آن آفت موفق به نفوذ به داخل برچه‌ها و آلودگی آن نمی‌شود. مهم‌ترین عامل این وضعیت، مرگ و میر لاروها در اثر وجود پروتئین کریستالی در بافت‌های مورد تغذیه در لاین‌های تراریخته است. به عبارت دیگر در لاین‌های تراریخته، لارو آفت در همان مراحل ابتدایی تغذیه از پوست غوزه در اثر وجود پروتئین کریستالی در آن از بین می‌رود و فرصت نفوذ به داخل غوزه و آلوده کردن برچه و غوزه را پیدا نمی‌کند. در عوض در لاین‌های غیرتراریخته به خاطر عدم وجود پروتئین کریستالی، مانعی برای ادامه تغذیه آفت و نفوذ به داخل غوزه برای آلوده کردن برچه‌ها و کل غوزه و گذار از مرحله آسیب به خسارت وجود ندارد. از این رو انتظار می‌رود که در ارقام غیرتراریخته شاهد کمترین میزان آسیب و بیشترین میزان خسارت به برچه و غوزه باشیم.

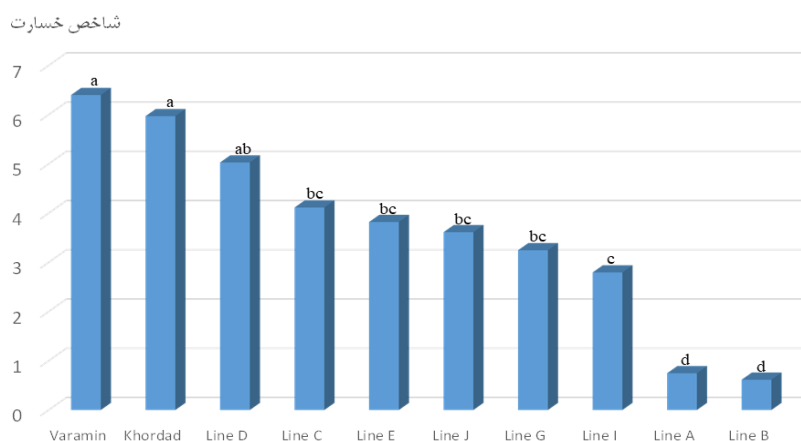
نتایج به دست آمده از این مطالعه تأییدکننده همین وضعیت است. شکل ۳.D. نشان می‌دهد که ارقام غیرتراریخته ورامین و خرداد به ترتیب با ۱/۴ و ۱/۸ درصد آسیب به غوزه دارای کمترین میزان آسیب بودند. این در حالی است که لاین تراریخته D با ۶/۶ درصد بیشترین میزان آسیب را تجربه کرد. سایر لاین‌های تراریخته در این آزمایش

اختلاف اندکی از نظر این صفت از خود نشان دادند و میزان آسیب آنها بین این دو مقدار کرانه‌ای قرار داشت.

نتایج مقایسه میانگین برای صفت شاخص خسارت به عنوان معیاری مناسب و بسیار خوب برای مقایسه میزان مقاومت ژنوتیپ‌های مورد مطالعه در برابر خسارت آفات بالپولکدار در شکل ۴ خلاصه شده است. همانگونه که شکل ۴ نشان می‌دهد، لاین‌های غیرتراریخته ورامین و خرداد با ۶/۴ و ۵/۹ درصد، بیشترین خسارت را از آفات بالپولکدار به خود دیده‌اند. لاین تراریخته D با ۵ درصد اختلاف معنی‌داری با لاین‌های غیرتراریخته نداشت ولی با لاین تراریخته C نیز اختلاف معنی‌داری نشان نداد. این لاین تجاری تراریخته با ۴/۱ درصد خسارت با لاین‌های تراریخته E، J و G به ترتیب با ۳/۸، ۳/۶ و ۳/۲ درصد در یک گروه قرار گرفت. لاین I با ۲/۸ درصد در یک گروه مجزا قرار گرفت ولی اختلاف معنی‌داری با گروه قبل نشان نداد.

نتایج بررسی‌ها نشان داد که دو لاین تراریخته A و B به ترتیب با ۰/۷ و ۰/۶ درصد خسارت، کمترین خسارت را به خود دیده و به اتفاق در یک گروه قرار گرفتند که اختلاف معنی‌دار قابل توجهی با سایر لاین‌ها از خود نشان دادند.

نتایج این مطالعه که برای نخستین بار در ایران انجام می‌شود، نشان داد که لاین‌های تراریخته مختلف مورد آزمایش در این پروژه سطوح متفاوتی از مقاومت در برابر آفات بالپولکدار را از خود نشان می‌دهند. این نتیجه با سایر نتایجی که مطالعات مختلف گرفته شده است، کاملاً مطابقت دارد. از آنجا که تراژن مورد نظر در لاین‌های تراریخته مستقلاً که از فرایند مهندسی ژنتیک به دست می‌آیند، در نقاط متفاوتی از ژنوم (کروموزوم‌ها) وارد می‌شود، و از آنجا که ساختار کروموزوم‌ها به گونه‌ای است که هم دارای نواحی یوکروماتینی و فعال از نظر بروز ژنی و هم دارای نواحی غیرفعال هتروکروماتینی هستند، ورود تراژن به هر یک از این قسمت‌ها می‌تواند بروز آن ژن را تحت تأثیر قرار دهد که این وضعیت به اثر مکانی معروف است. اختلاف در میزان و نحوه بروز ژن به اختلاف در تولید پروتئین محافظت‌کننده مورد نظر و در نهایت به اختلاف در سطح مقاومت می‌انجامد (Kohli et al., 2010; Siddiqui et al., 2022).



شکل ۴. مقایسه میانگین شاخص خسارت لاین‌های مورد مطالعه با آزمون LSD و سطح خطای $\alpha=0.01$. این شکل نشان می‌دهد که دو لاین تراریخته A و B کمترین خسارت را از اثر آفات بالپولکدار به خود دیده‌اند.

Figure 4. Means comparison for damage index in the genotypes with LSD test and $\alpha=0.01$. The figure illustrates that non-transgenic lines along with transgenic line D experienced maximum damage index while two transgenic lines A and B had the least index.

وجود دارد که میزان کل پروتئین کریستالی موجود در آنها افزایش یافته و خسارت آفت در لاین تولیدشده به زیر آستانه اقتصادی برسد. بدین ترتیب امکان ایجاد نسلی از آفت که نسبت به این پروتئین کریستالی مقاومت کسب کند نیز به شدت کاهش می‌یابد.

نتیجه‌گیری و پیشنهادها

در مجموع، نتایج این مطالعه نشان داد که لاین‌های تراریخته A و B پتانسیل عملکرد خوب و مقاومت مناسب در برابر آفات بالپولکدار دارند. همچنین این دو لاین با توجه به برخی از خصوصیات مرتبط با تیپ و ریخت‌شناسی گیاه (که در این مقاله مورد بحث قرار نگرفت) این توانایی را دارند که وارد آزمون‌های گسترده‌تر بررسی مقاومت و خصوصیات زراعی شوند. لذا در نهایت پیشنهاد می‌شود که مطالعات بیشتری بر روی توانایی‌های تبدیل این دو لاین به ارقام جدید پنبه انجام شود و در صورت اثبات قابلیت‌ها، وارد آزمایش‌های مربوط به ثبت رقم شده و پس از اخذ مجوز آزادسازی از مرجع ذی‌صلاح قانونی در مسیر معرفی به عنوان ارقام جدید پنبه قرار داده شوند.

تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان وجود ندارد.

علاوه بر این، نتایج مطالعه حاضر نشان داد که دو لاین تراریخته A و B دارای مقاومت بسیار خوبی نسبت به آفات بالپولکدار هستند. همچنین با وجود اینکه لاین‌های تراریخته I, G, J و E بین ۱۰ تا ۱۵ درصد خسارت در برابر آفات بالپولکدار به خود دیدند، باز هم میزان خسارت آنها از یک لاین تراریخته تجاری از کشور چین کمتر بود. این نتیجه در نگاه اول بدین معناست که در صورت مناسب بودن سایر صفات زراعی و کیفی در این لاین‌ها می‌توان آنها را به سمت انجام مطالعات بعدی به منظور تولید و آزادسازی رقم سوق داد. با این وجود، این واقعیت که برخی از آفات بالپولکدار می‌توانند از این لاین‌های تراریخته تغذیه کنند و خسارت به بار آورند، این خطر را به وجود می‌آورد که با گزینش آفات نسبتاً مقاوم و تلاقی آنها با یکدیگر، در نسل بعد و نسل‌های بعد از آن نتایج از آفات به وجود آید که نسبت به پروتئین کریستالی مقاومت به دست آورده و لاین‌های تراریخته مذکور به مرور مقاومت خود را در برابر آفات بالپولکدار از دست بدهند. با این حال، از آنجا که این لاین‌ها هر یک حاوی رویداد تراریزشی متفاوتی بوده و تراژن مذکور در محل متفاوتی از ژنوم قرار دارد (Tohidfar et al., 2008)، یک راه دیگر برای بهره‌گیری از توانایی موجود در این لاین‌های تراریخته، دورگ‌گیری آنها و تجمع تراژن در یک لاین است. بدین ترتیب، این امکان

References

- Ashokkumar, K., & Ravikesavan, R. (2011). Morphological diversity and *per se* performance in upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Journal of Agricultural Science*, 3(2), 107-113.
- Azimi, S., Ashouri, A., Tohidfar, M., & Talaei Hasanlouei, R. (2012). Effect of Iranian Bt cotton on *Encarsia formosa*, parasitoid of *Bemisia tabaci*. *International Research Journal of Applied and Basic Sciences*. Available online at www.irjabs.com ISSN 2251-838X/ Vol, 3 (11), 2248-2251 Science Explorer Publications.
- Bednarz, C.W., Don Shurley, W., Anthony, W.S., & Nichols, R.L. (2005). Yield, quality, and profitability of cotton produced at varying plant densities. *Agron. J.*, 97, 235-240.
- Connolly, J.B., Burt A., Christophides, G., Diabate, A., Habtewold, T., Hancock, P.A., James, A.A., Kayondo, J.K., Lwetoijer, D.W., Manjurano, A., McKemey, A.R., Santos, M.R., Windbichler, N., & Randazzo, F. (2024) Considerations for first field trials of low-threshold gene drive for malaria vector control. *Malar. J.* 23, 156. <https://doi.org/10.1186/s12936-024-04952-9>.
- Cooke, B.M., Gareth Jones, D., & Kaye, B. (2006). *The Epidemiology of Plant Diseases*. Springer, pp. 61.
- Darvish Modjeni, T. (2012). *Cotton Pests and their Managements*, Nowrouzi Press, 74 p.
- Fang, Z.X., Zhang, L., Shen, W.J., Liu, L.P., & Liu, B. (2021) Evaluation of the effect of transgenic Bt cotton on snails *Bradybaena* (*Acusta*) *ravida* and *Bradybaena similaris* (*Ferussac*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 223, 112557, <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112557>.
- Govindan, K., Gunasekaran, K., & Kuttalam, S. (2012). Evaluation of Indian transgenic Bt cotton and non Bt cotton against *Spodoptera Litera* Fab. (Nuctuidae, Lepidoptera) fourth and fifth instar larvae. *Jbiopest*, 5(2), 171-177.
- Kohli, A., Miro, B., & Twyman, R.M. (2010). Transgene Integration, Expression and Stability in Plants, Strategies for Improvements. In, *Transgenic Crop Plants*, Vol 1, Principles and Development, Edited by, Cole C., Michler CH, Abbott AG, Hall TC. Springer, pp 201-238.
- Modirroosta, B., Tohidfar, M., Saba, J., & Moradi, F. (2013). The substantive equivalence of transgenic (Bt and Chi) and non-transgenic cotton based on metabolite profiles. *Funct Integr Genomics*, 14(1), 237-44. <https://doi.org/10.1007/s10142-013-0355-y>.
- Nickell, C.D., Noel, G.R., Thomas, D.J., & Waller, R. (1990). Registration of Jack soybean. *Crop Sci.*, No. 30, 1365.
- Paterson, A.H., Brubaker, C.L., & Wendel, J.F. (1993). A rapid method for extraction of cotton (*Gossypium* spp.) genomic DNA suitable for RFLP or PCR analysis. *Plant Molecular Biology Reporter*. 11(2), 122-127.
- Ribichich, K.F., Chiozza, M., Ávalos-Britez, S., Cabello, J.V., Arce, A.L., Watson, G., Arias, C., Portapila, M., Trucco, F., Otegui, M.E., & Chan, R.L. (2020) Successful field performance in warm and dry environments of soybean expressing the sunflower transcription factor HB4, *Journal of Experimental Botany*, 71(10), 3142–3156. <https://doi.org/10.1093/jxb/eraa064>.
- Rostamchani, M., Haghazary, A., & Tohidfar M. (2011). Rapid and identification of transgenic cotton (*Gossypium hirsutum* L.) plants by loop-mediated isothermal amplification. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*, 47(4), 140–148 <https://doi.org/10.17221/7/2011-CJGPB>.
- SAS Institute. (1993). *SAS/STAT User's Guide*, Version 6. Fourth Edition. SAS Institute Inc. Cary, North Carolina, USA.
- Siddiqui, H.A., Asad, S., Naqvi, R.Z., Asif, M., Liu, C., Liu, X., Farooq, M., Abro, S., Rizwan, M., Arshad, M., Sarwar, M., Amin, I., Mukhtar, Z., & Mansoor, S. (2022) Development and evaluation of triple gene transgenic cotton lines expressing three genes (Cry1Ac-Cry2Ab-EPSPS) for lepidopteran insect pests and herbicide tolerance. *Sci Rep.* 12(1), 18422. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-22209-w>.
- Slot, M.M., van de Wiel, C.C.M., Kleter, G.A., Visser R. G. F., & Kok E. J. (2018) The assessment of field trials in GMO research around the world and their possible integration in field trials for variety registration. *Transgenic Res.* 27, 321–329. <https://doi.org/10.1007/s11248-018-0076-z>.
- Tohidfar, M., Ghareyazie, B., Mousavi, M., & Yazdani, S. (2008). *Agrobacterium* mediated transformation of cotton (*Gossypium hirsutum*) using a synthetic cry1Ab gene for enhanced resistance against *Heliothis armigera*. *Iranian Journal of Biotechnology*, 6, 164-173.
- Walker, D.R., All, J.N., McPherson, R.M., Boerma, H.R., & Parrott, W.A. (2000). Field evaluation of soybean engineered with a synthetic cry1Ac transgene for resistance to corn earworm, Soybean Looper, Velvetbean Caterpillar (Lepidoptera, Noctuidae), and Lesser Cornstalk Borer (Lepidoptera, Pyralidae). *BIOLOGICAL AND MICROBIAL CONTROL*, No. 93(3), 613-622.

- Wang, S., Liu, J., Dong, Y., Li, Y., Huang, Y., Ren, M., Yang, M., & Wang, J. (2022) Dynamic monitoring of the impact of insect-resistant transgenic poplar field stands on arthropod communities, *Forest Ecology and Management*, 505, 119921, <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2021.119921>
- Yazdanpanah, F., Tohidfar, M., Ashari, M., Ghareyazi, B., & Mosavi, M. (2009). Enhanced insect resistance to bollworm (*Helicoverpa armigera*) in cotton containing a synthetic cry1Ab gene. *Indian Journal of Biotechnology*, 8, 72-77.
- Yazdi Samadi, B., Rezaei, A., & Valyzadeh, M. (1998). Statistical Design in Agricultural Research. Tehran University Publications. No. 2346. ISBN 964-03-3882-6.