بیان ژن *cryIAb* توسط پیشبر القا شونده با زخم (*MPI*) به منظور افزایش مقاومت به آفت شب‌پره (*Tuta absoluta*) در گوجه فرنگی

زهرا حاجی احمدی[١]، رضا شیرزادیان خرم آباد[٢،*]، محمود کاظم زاد[٣] و محمد مهدی سوهانی[٤]

١- دانش‌آموخته دکتری، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت

٢- استادیار، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت

٣- استادیار، گروه مواد، پژوهشگاه مواد و انرژی، کرج

٤- دانشیار، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت

(تاریخ دریافت: ١٣٩٦/٠٦/٠٢ – تاریخ پذیرش: ١٣٩٦/٠٨/٢٣)

چکیده

آفت شب‌پره گوجه‌فرنگی (*Tuta absoluta*) از جمله آفات مهم گوجه‌فرنگی در کشور ایران به شمار می‌رود. تغذیه این آفت موجب خسارت ٪١٠٠-٥٠ به میوه گوجه‌فرنگی در جهان شده است. ژن *cryIAb* به بسیاری از گیاهان از جمله ذرت منتقل و موجب حفاظت آن‌ها در مقابل حمله کرم ساقه‌خوار ذرت شده است. در اکثر مطالعات از پیشبرهای دائمی مانند CaMV35S در فرآیند انتقال ژن به گیاهان استفاده می‌شود که این امر به دلیل مصرف دائمی انرژی گیاه موجب تغییر در مسیرهای متابولیسمی آن می‌گردد. پیشبر القا شونده با زخم *MPI* (Maize Protease Inhibitor) دارای قدرت و کارایی بالاتری از پیشبر CaMV35S است. بنابراین در پژوهش حاضر، برای اولین بار گیاهان گوجه‌فرنگی تراریخت (رقم فلات) حاوی ژن *cryIAb* تحت پیشبر *MPI* تولید شد. پیشبر*MPI* از گیاه ذرت جدا و در ناقل بیانی pPZP122 جایگزین پیشبر CaMV35s گردید. پس از جداسازی ژن *cryIAb* از ناقل pCIB4421، سازه pPZP122:*MPI*:*CryIAb* ساخته شد و به سویه AGL1 آگروباکتریوم منتقل شد. تراریخته نمودن گوجه‌فرنگی بصورت *In planta* انجام و گزینش اولیه گیاهان ترایخت در محیط کشت‌های حاوی جنتامایسین انجام شد. حضور ژن *cryIAb* در گیاهچه‌های مقاوم نسل اول و دوم به ترتیب ٪٦٢/٥ و ٪ ٧٥/٥٨ با PCR مورد تایید قرار گرفت. حضور پروتئین در لاین‌های تراریخت نسل دوم با استفاده از روش لکه‌گذاری نقطه‌ای پروتئین و به کمک پادتن اختصاصی چند دودمانی پروتئین CryIAb، مورد تایید قرار گرفت. نتایج زیست سنجی گیاهان تراریخته نسل دوم با استفاده از آفت توتا، مقاومت بهبود یافته گیاهان تراریخته علیه آفت را نشان دادند. بنابراین پیشبر القا شونده با زخم *MPI* می‌تواند برای ساخت سازه‌های حاوی ژن‌های کد کننده پروتئین حشره‌کش (مانند انواع مختلف *cry*) و تراریختی سایر گیاهان مفید باشد تا ژن مورد نظر صرفا در زمان حمله آفت بیان شود.

واژگان کلیدی: پیشبر القا شونده توسط زخم، توتا، ژن *cryIAb*، *In planta*

* نویسنده مسئول، آدرس پست الکترونیکی: **r.shirzadian@guilan.ac.it**

مقدمه

گوجه‌فرنگی(*Lycopersicum esculentum*) به دلیل دارا بودن ویتامین‌ها، مواد معدنی و آنتی اکسیدان‌های مختلف بسیار مورد توجه محققین قرار گرفته است (Martínez-Valverde *et al.*, 2002). محصول گوجه فرنگی همواره در معرض حمله آفات، بیماری‌های قارچی، باکتریایی و ویروسی قرار دارد. متاسفانه در سال-های اخیر، آفت شب‌پره گوجه‌فرنگی (*Tuta absoluta*) از حالت قرنطینه خارج و موجب خسارت شدید به محصولاتی چون گوجه فرنگی، فلفل دلمه، بادمجان و سیب‌زمینی شده است (Lietti *et al.*, 2005). وزارت جهاد کشاورزی آذربایجان غربی در مرداد ماه سال ۱۳۸۸ طی بخشنامه‌ای برای ورود آفت قرنطینه‌ای شب‌پره گوجه فرنگی هشدار داد. اولین آثار خسارت وحشتناک این آفت تیرماه سال ۱۳۸۹ در اطراف ارومیه گزارش و در کمتر از یکسال به تمام نقاط ایران پراکنده شد (Baniameri and Cheraghian, 2011). آفت مذکور در تمام مراحل رشد بین ۵۰ تا ۱۰۰ درصد به میزبان خسارت می‌زند. خسارت آن در تمام سنین لاروی به دلیل تغذیه حشره از بافت مزوفیل برگ باعث کاهش شدید ظرفیت فتوسنتز، تولید میوه و بازارپسندی آن می‌شود. لاروهای این آفت پس از تفریخ شدن وارد بافت گیاهی شده و از دسترس سم خارج می‌شوند (Campos *et al.*, 2014). در اکثر تحقیقات به منظور کنترل آفت توتا از سموم مختلف به روش‌های رایج استفاده شده است که از آن‌ها می‌توان به مطالعات کامپوز و همکاران (Campos *et al.*, 2014)، گالدینو و همکاران (Galdino *et al.*, 2011) و پریرا و همکاران (Pereira *et al.*, 2014) اشاره نمود. یکی از سموم پر کاربرد اسپینوساد است که یک سم تماسی- گوارشی تولید شده توسط تخمیر اکتینومایست می‌باشد (Campos *et al.*, 2014). سم مذکور دارای سمیت فوق-العاده برای تمام مراحل رشد بالپولکداران (تخم، لارو و حشره کامل) است و با تاثیر بر گیرنده استیل کولین باعث فلج شدن و مرگ آفت می‌شود. این سم به طور گسترده علیه این آفت استفاده می‌گردد، ولی به دلیل اینکه قادر به نفوذ به بافت گیاهی نیست، توانایی کنترل لارو و جلوگیری از خسارت را ندارد. کنترل توتا به دلیل قدرت زاد و ولد زیاد و عدم دسترسی سم به لارو، بسیار مشکل است (Pereira *et al.*, 2014). با آن‌که استفاده از حشره کش‌ها برای حل فوری مشکل حمله آفات مؤثر است، ولی زیان‌های درازمدت استفاده از آن‌ها اثبات شده و اثر بقایای آن‌ها تا بالاترین زنجیره‌های غذایی قابل مشاهده است (Adeli and Ghareyazie 2013).

با توجه به مطالب ذکر شده، استفاده از فناوری‌هایی که اجازه انتقال ژن‌هایی با منشا خارجی به گیاهان را می‌دهند بسیار مفید است و به این ترتیب استفاده از حشره‌کش‌ها می‌تواند حذف یا کاهش یابد. از طرفی، از حدود دو دهه پیش انتقال ژن از باکتری *Bacillus thuringiensis* به گیاهان زراعی انجام شده است. بیش از صد نوع مختلف از پروتئین حشره‌کش از گونه‌های متفاوت این باکتری کشف شده است که علیه گونه‌های مختلف حشرات از آن‌ها استفاده می‌شود. در میان ژن‌های کد کننده پروتئین مذکور، ژن *cryIAb* به منظور از بین بردن لارو پروانه‌ها استفاده می‌گردد (Behzadirad *et al.*, 2009). جعفری و همکاران (Jafari *et al.*, 2009) موفق به انتقال ژن *cryIAb* به چغندرقند و ایجاد گیاهان تراریخته مقاوم به آفت برگخوار *Spodoptera littoralis* شدند. بر اساس نتایج تحقیقات ذکر شده، ژن *cryIAb* قادر به کنترل آفات راسته Lepidoptera است و به همین دلیل در تحقیق حاضر از ژن مذکور به منظور کنترل آفت شب‌پره گوجه-فرنگی استفاده شد.

نوع پیشبر مورد استفاده در ایجاد گیاهان تراریخته، یکی از مهمترین عوامل در بیان ژن انتقال یافته به گیاه است. در اکثر تحقیقات از پیشبرهای دائمی مانند CaMV35S به منظور ایجاد گیاهان تراریخته استفاده می‌شود. استفاده از این پیشبرها موجب تغییر مسیرهای متابولیسمی گیاه در غیاب تنش زیستی می‌گردد. همچنین استفاده از برخی پیشبرهای دائمی می‌تواند منجر به آسیب به رشد و توسعه

گیاه میزبان شوند. بنابراین بهتر است از پیشبرهای القا شونده یا ویژه بافت خاص (بسته به هدف تحقیق) استفاده گردد (Zhang *et al.*, 2013). استفاده از پیشبرهای القا شونده با زخم دارای مزایایی چون جلوگیری از مصرف انرژی گیاه، ذخیره کردن انرژی در غیاب تنش زیستی، به حداقل رساندن اثرات خطرناک گیاهان تراریخته بر موجودات غیر هدف، بیان ژن‌ها به صورت هدفمند و بعد از حمله آفت است. گیاهان از مکانیسم‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی مختلفی برای واکنش به زخم ایجاد شده در اثر حمله آفات و عوامل بیماری‌زا استفاده می‌کنند. این مکانیسم‌ها شامل تقویت موانع ساختاری و فعال‌سازی ترکیبات دفاعی (ساخت کیتیناز، گلوکاناز، فیتوآلکسین، مهار کننده آمیلاز و بازدارنده سرین پروتئاز) است. در بین تعداد بسیاری از پروتئین‌های القا شونده توسط زخم، بازدارنده‌های سرین پروتئازی گیاه به طور خاص علیه حشرات و علف‌خواران فعال می‌شوند و اثر بازدارندگی بر پروتئازهای میکروبی و حیوانی (به ندرت گیاهی) دارند (Ryan, 1990; Koiwa *et al.*, 1997; Heitz *et al.*, 1999; Stotz *et al.*, 1999). در سال ۱۹۹٤، cDNA کد کننده بازدارنده سرین پروتئاز ذرت (*mpi*[1]) جدا شده است (Cordero *et al.*, 1994). ژن *mpi* در گیاه ذرت توسط زخم مکانیکی، حمله قارچ و همچنین توسط هورمون-هایی چون متیل جاسمونات و آبسیزیک اسید فعال می-گردد. در تحقیقی که بریتلر و همکاران (Breitler *et al.*, 2001) انجام داده‌اند مشخص شد که قطعه ۱۹۷+/٦۸۹- از ژن *mpi* قادر به القا شدن توسط زخم می‌باشد. در تحقیق پیشین، پیشبر القا شونده با زخم *MPI* از گیاه ذرت جدا و به گوجه‌فرنگی توسط تکنیک آگروایفیلتریشن[2] منتقل گردید (Hajiahmadi *et al.*, 2017). بر اساس نتایج این تحقیق، پیشبر مذکور دارای قدرت و کارایی بالاتری از پیشبر CaMV35S بود. همچنین نتایج حاکی از آن بود که پیشبر *MPI* علاوه بر گیاهان تک لپه در گیاهان دو لپه نیز توانایی ایفای نقش دارد و ژن تحت این پیشبر تنها در سلول‌های اطراف محل زخم (نه تمام برگ) بیان می‌شود؛ بنابراین صرفا در زمان و محل حمله آفت بیان شده و بدین ترتیب باعث صرفه جویی در مصرف انرژی گیاه خواهد شد (Hajiahmadi *et al.*, 2017). با توجه به نتایج ذکر شده، در تحقیق حاضر از پیشبر القا شونده با زخم *MPI* استفاده گردید. در این تحقیق، ژن *cryIAb* تحت پیشبر *MPI* به کمک آگروباکتریوم به گوجه‌فرنگی منتقل و مقاومت گیاهان تراریخته حاصل در برابر آفت مهم شب‌پره گوجه‌فرنگی بررسی گردید.

1- Maize Protease Inhibitor
2- Agroinfiltration

مواد و روش

جداسازی پیشبر *MPI*: بذور ذرت ژنوتیپ ۷۰٤ از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه و پس از ضدعفونی سطحی بذور و جوانه‌زنی آن‌ها، تولید برگ‌های اولیه در اتاق رشد دانشکده کشاورزی دانشگاه گیلان انجام شد. به منظور استخراج DNA ژنومی از برگ‌های ذرت از روش موری و تامپسون (Murray and Thompson 1980) استفاده گردید. آغازگرهای اختصاصی پیشبر *MPI* به کمک نرم افزار Oligo ver 5.0. (Molecular Biology insights, Inc., cascade, CO, USA) و بر اساس توالی ژن *mpi* موجود در پایگاه داده NCBI (گیاه ذرت رقم B73، شماره دسترسی X78988.2) طراحی (جدول ۱) و توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) قطعه‌ای به طول ۸۷۱bp تکثیر شد. برنامه PCR عبارت بود از:

۱ x ۹۵˚C/۱۰' +

۳۰ x [۹۵˚C/ ۳۰"+٦۵˚C/۱'+ ۷۲˚C /۱'] +۱x۷۲˚C/۱۰'

مواد مورد استفاده در واکنش PCR شامل مخلوط نوکلئوتیدی dNTPs، $MgCl_2$، بافر PCR و LONG PCR Enzyme بود. آنزیم LONG PCR (Thermo Fisher Scientific Co.)، دارای قدرت تصحیح[3] می‌باشد. به منظورالحاق قطعات DNA مورد نظر به پلاسمید pTZ57R/T از کیت InsTAcloneTMPCR Cloning (Thermo Fisher Scientific Co.) استفاده و بر اساس راهنمایی‌های مندرج در کیت، الحاق انجام شد. استخراج

3- Proofreading

پلاسمید pTZ57R/T از همسانه‌هایی که وجود قطعه موردنظر با استفاده از Colony PCR در آن‌ها تأیید شده بود، به کمک کیت استخراج پلاسمید ساخت شرکت Thermo Fisher Scientific انجام و جهت توالی‌یابی در دو جهت رفت و برگشت به شرکت Bioneer کره جنوبی ارسال شد. صحت توالی به کمک توالی‌یابی تایید و در پایگاه اطلاعاتی NCBI با شماره دسترسی KP793074 ثبت گردید.

ساخت سازه pPZP122:*MPI*:*cryIAb* و انتقال به آگروباکتریوم: به منظور ساخت سازه حاوی ژن *cryIAb* تحت پیشبر *MPI*، از پلاسمیدهای استخراج شده pPZP122 (Hajdukiewicz *et al.*, 1994)، pTZ57R/T (حاوی قطعه *MPI*) و pCIB4421 (Koziel *et al.*, 1993) استفاده شد. ابتدا پلاسمیدهای pTZ/57R/T و pPZP122 توسط آنزیم‌های *Hin*dIII و *Xba*I برش داده شدند. قطعه *MPI* به کمک کیت استخراج DNA از ژل متعلق به شرکت Thermo Fisher Scientific خالص و در ناقل pPZP122 کلون شد. سپس پلاسمید pCIB4421 (حاوی ژن *cryIAb*) توسط آنزیم‌های *Eco*RI و *Bam*HI برش و قطعه حاصل پس از خالص‌سازی، در پلاسمید pPZP122:*MPI* برش یافته با آنزیم‌های مذکور، کلون گردید. بدین ترتیب سازه جدید حاوی ژن *cryIAb* تحت پیشبر القا شونده با زخم *MPI* ساخته (شکل ۱-B) و پلاسمید pPZP122:*MPI*: *cryIAb* به کمک الکتروپوریشن به آگروباکتریوم سویه AGL1 منتقل شد. به منظور تایید ورود پلاسمید مورد نظر به داخل سویه AGL1 آگروباکتریوم از روش Colony PCR استفاده گردید (داده‌ها نشان داده نشده است).

تلقیح گل و میوه گوجه‌فرنگی توسط آگروباکتریوم: در این مرحله، سازه pPZP122:*MPI*:*cryIAb* با روش *In planta* (Yasmeen *et al.*, 2009) و به کمک آگروباکتریوم به گیاهان گوجه‌فرنگی (رقم فلات) منتقل شد. به طور خلاصه، تک کلون حاوی پلاسمید pPZP122:*MPI*: *cryIAb* به مدت ٤٨ ساعت در محیط LB حاوی کلرامفنیکل (۲۵µg/ml)، آمپی‌سیلین (۱۰۰µg/ml) و ریفامپسین (۵۰µg/ml)، در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و ۲۵۰ دور در دقیقه تکثیر شد. پس از آنکه OD باکتری به ۰/۵ رسید، باکتری به مدت ده دقیقه در ۵۰۰۰ دور در دقیقه رسوب داده و در بافر NaCl ۰/۹٪ (به منظور تزریق به میوه نارنجی رنگ) یا سوکروز ۳۰٪ (به منظور تزریق به گل باز) و حاوی استوسیرینگون ۲۰۰µM رقیق شدند. سپس سوسپانسون‌های حاصل با استفاده از سرنگ انسولین به گل باز و میوه نارنجی رنگ تزریق گردیدند. نمونه‌ها پس از تزریق تا رسیدگی کامل در دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد، ١٦ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار گرفتند. گیاهان تراریخته حاصل از هر دو روش، تا نسل دوم (T2) مورد بررسی قرار داده شدند. شناسایی گیاهان تراریخت در محیط کشت MS[1] حاوی آنتی‌بیوتیک جنتامایسین: بذور جمع‌آوری شده از گیاهان تراریخته هر دو نسل (T1 و T2)، به مدت ٢٤ ساعت در دمای محیط، خشک و سپس به مدت ۱۲ ساعت در آب مقطر استریل قرار داده شدند. بذوری که آب جذب کرده بودند به مدت ۲۰ دقیقه در محلول ضدعفونی حاوی هیپوکلریت سدیم ۳٪ و تریتون[2] ۱٪ قرار گرفتند. سپس بذور سه بار به کمک آب مقطر استریل شستشو داده شدند و پس از خشک شدن به محیط 1/2MS حاوی جنتامایسین (µ۱۰۰g/ml) به مدت ۵ روز در دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد و تاریکی منتقل شدند. پس از جوانه‌زنی بذور، شیشه‌های حاوی محیط کشت به دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد، ١٦ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی به مدت ٤٠ روز انتقال یافتند. پس از ٤٠ روز، درصد گیاهان زنده مانده در محیط حاوی آنتی‌بیوتیک یادداشت برداری و به منظور مقاوم سازی پیش از انتقال به خاک، به مدت ۳۰ روز در محیط 1/2MS فاقد آنتی‌بیوتیک منتقل شدند. پس از گذشت ۳۰ روز، گیاهان به گلدان در اتاقک پرورش با دمای۲۳ درجه سانتی‌گراد، ١٦ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی به منظور انجام آنالیزهای بعدی انتقال داده شدند.

1- Murashige and Skoog
2- Triton

جدول ١- توالی آغازگر رفت و برگشت به منظور تکثیر پیشبر *MPI*، ژن‌های *cryIAb* و *actin*

Table 1. The primer sequences for amplification of the *MPI* promoter, *cryIAb* and *actin* genes

نام آغازگر Primer name	توالی آغازگر Primer sequence	میزان ΔG	طول آغازگر bp	دمای اتصال (˚C) Annealing temperature (˚C)
F-MPI	*Hin*dIII ↓ 5' –AAGCTTTTTAGGTTCTACACAAAACCCTC–3'	-9.4	29	65
R-MPI	5'-TCTAGACCGGACCAGTTGACGA-3' ↑ *Xba*I	-8.1	22	
F-cryIAb	5'–GGCGGCGAGAGGATCGAGAC–3'	-6.1	20	60
R-cryIAb	5'-TCGGCGGGACGTTGTTGTTC-3'	-6.7	20	
F-actin	5'-GCTCCTCAGTTGAGAAGAGC-3'	-7.9	20	60
R-actin	5'-CCTTCCTGATATCCACGTCAC-3'	-6.1	21	
F.RT-cryIAb	5'-CCGTGACCGACTACCACAT-3'	-6.6	19	58
R.RT-cryIAb	5'-AGCGTACAAAAACCAGCAACT-3'	-6.7	21	

آنالیزهای مولکولی گیاهان مقاوم در محیط کشت حاوی آنتی‌بیوتیک جنتامایسین: ابتدا DNA گیاهان تراریخته حاصل از هر دو نسل(T1 و T2)، به کمک روش موری تامپسون (Murray and Thompson 1980) استخراج و به منظور بررسی وجود ژن *cryIAb* و پیشبر *MPI* در گیاهچه‌های تراریخته احتمالی، آزمون PCR به کمک آغازگرهای اختصاصی ذکر شده در جدول ١ توسط دستگاه ترموسایکلر Eppendorf انجام گرفت. به منظور انجام آزمون RT-PCR، RNA کل گیاهان تراریخته نسل های اول و دوم (T1 و T2) با استفاده از کیت RNX-PLUS (سیناکلون) استخراج و به کمک کیت پیشگام (ایران) ساخت cDNA انجام گردید. از ژن *actin* (جدول ١) بعنوان ژن رفرنس استفاده شد. بیان ژن *cryIAb* در گیاهان تراریخته فوق، با استفاده از آغازگرهای اختصاصی رفت و برگشت این ژن (جدول ١) بر مبنای برنامه PCR

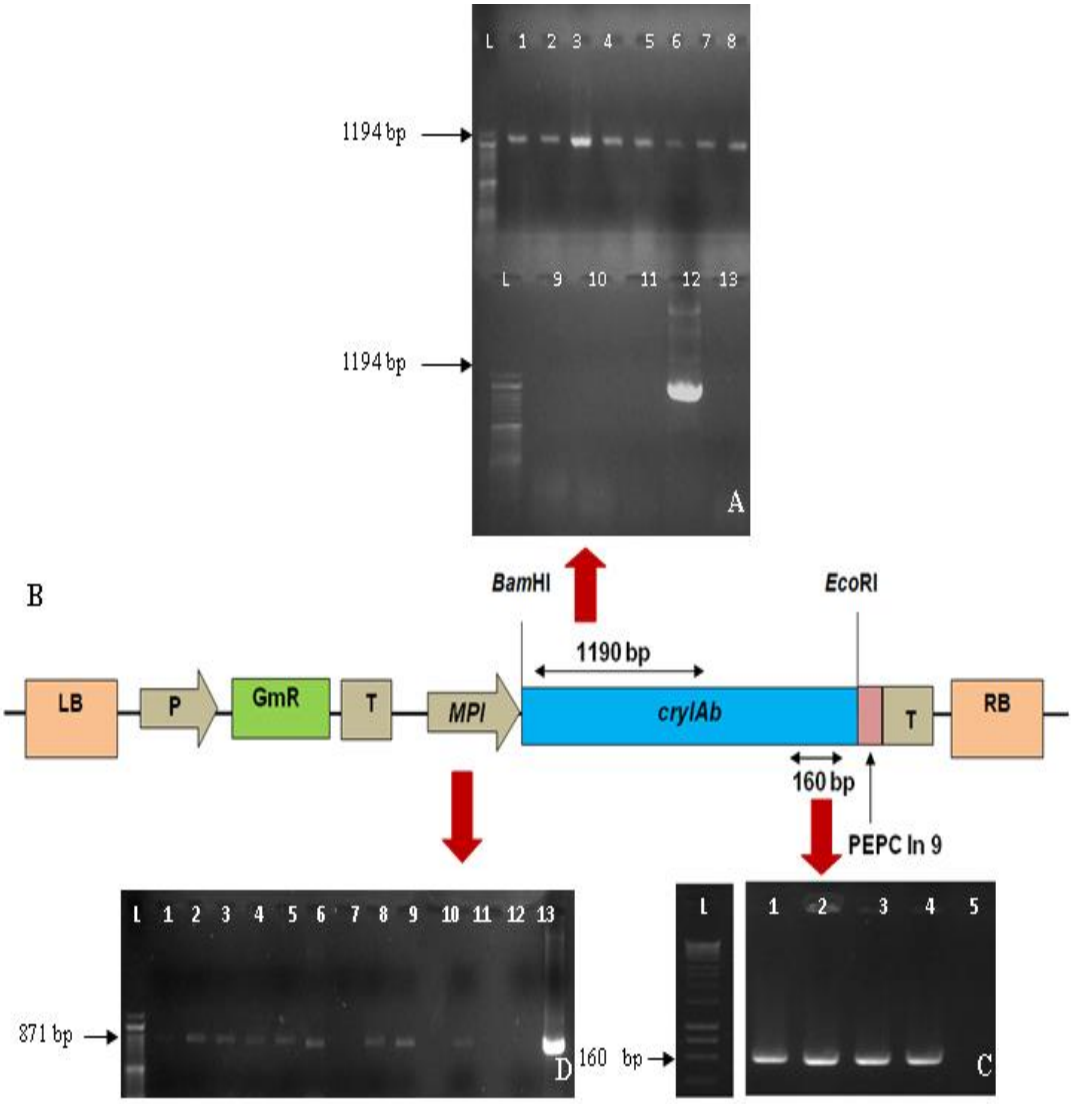
[١ x ٩٥˚C/٥'+

٣٠x[٩٥˚C/٣٠"+٥٨˚C/٢٥"+٧٢˚C/٢٥"] + ١ x٧٢˚C/٥']

با استفاده از دستگاه ترموسایکلر BioRad بررسی گردید.

آزمون لکه‌گذاری نقطه‌ای پروتئین[1]: به منظور استخراج پروتئین کل برگ، حدود یک گرم از برگ گیاهان تراریخته، غیر تراریخته (شاهد منفی) و برنج تراریخته Bt (شاهد مثبت) توسط ازت مایع پودر شد. پودر حاصل در دو میلی‌لیتر از بافر QB (KPO_4 به غلظت ١٠٠mMو دارای pH ٧/٨، EDTA به غلظت ١ mM، Triton به غلظت ١٪ و گلیسرول به غلظت ١٠٪) مخلوط و نمونه‌ها به مدت ١٥ دقیقه در ٤ درجه سانتی‌گراد و ١٢٠٠٠ rpm سانتریفیوژ شدند. فاز رویی تا استفاده بعدی در دمای ٨٠- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. به منظور تأیید وجود پروتئین نوترکیب در گیاهان تراریخته، از روش ذاکر قرآن و همکاران (Zakerghoran *et al.*, 2014) استفاده شد. به طور خلاصه، نمونه‌های پروتئینی مستقیما روی غشا PVDF فعال شده لکه‌گذاری شدند. غشا حاوی نمونه‌ها در بافر بلوکه کننده (٤٪ شیر خشک بدون چربی در بافر TBS) قرار گرفت. پس از شست و شو غشا با بافر TBS (NaCl به غلظت ١٥٠mM و Tris-HCl به غلظت ١٠mM

2- Protein dot blotting



شکل ۱– A) تایید حضور ژن *cryIAb* در گیاهان تراریخته. L: نشانگر وزن مولکولی bp ۱۰۰، ۱ تا ۱۱ نمونه‌های تراریخته، ۱۲: شاهد مثبت (سازه pPZP122:*MPI*:*cryIAb*) و ۱۳: شاهد منفی (گوجه فرنگی غیر تراریخته). B) نقشه فیزیکی سازه pPZP122:*MPI*:*cryIAb*. LB: مرز چپ، RB: مرز راست، P: پیشبر CaMV35S، T: ترمیناتور 35S، GmR: ژن مقاومت به جنتامایسین، *MPI*: پیشبر القا شونده با زخم، PEPC In 9: اینترون شماره ۹ فسفوانول پیروات کربوکسیلاز. C) تایید بیان ژن *cryIAb* با استفاده از RT-PCR. چاهک ۱ تا ٤: باند ۱۶۰ نوکلئوتیدی تکثیر شده به کمک آغازگر طراحی شده برای ژن *cryIAb* و ۵: شاهد منفی. L : نشانگر وزن مولکولی bp ۱۰۰. D) تایید حضور پیشبر *MPI* در گیاهان تراریخته. L : نشانگر وزن مولکولی bp ۱۰۰، ۱ تا ۱۱ نمونه های تراریخته، ۱۲: شاهد منفی و ۱۳: شاهد مثبت.

Figure 1. A) Confirming the *cryIAb* gene presence in transformed tomatoes. L: 100 bp ladder, lane 1-11: transgenic samples, 12: positive control (pPZP122:*MPI*:*cryIAb* plasmid) and 13: negative control (non-gentamicin ,transgenic tomato). B) pPZP122:*MPI*:*cryIAb* construct map. RB, right border; LB, left border; GmR resistance gene; P, nopaline synthase promoter; T, nopaline terminator; *MPI*, Maize Proteinase Inhibitor promoter; PEPC In 9, intron 9 of maize-phosphoenolpyruvate carboxylase gene. C) Confirming the *cryIAb* gene expression using RT-PCR. lane 1-4: a 160 bp fragment was amplified using designed primers, 5: negative control and L: 100 bp ladder. D) Confirming the *MPI* promoter presence in transformed plants. L: 100 bp ladder. lane 1-11: transformed samples, 12: negative control and 13: positive control.

و pH، ٨)، غشا با پادتن اختصاصی چند دودمانی پروتئین CryIAb[1] (Ghareyazie *et al.*, 1997) به رقت ١ به ٢٠٠٠ به مدت ٦ ساعت در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. پس از شستشو غشا، پادتن ثانویه متصل به HRP[2] به رقت ١ به ٥٠٠٠ تهیه و به غشاء به مدت ٢ ساعت در دمای اتاق اضافه گشت. پس از شستشو غشا، ده میلی‌لیتر محلول DAB[3] روی غشا ریخته شد. لکه‌ها پس از زمان کوتاهی رؤیت و واکنش رنگی با شستشو غشا در آب متوقف و عکس‌برداری گردید (Ghareyazie *et al.*, 1997).

زیست سنجی: به منظور تهیه جمعیت آفت شب‌پره گوجه‌فرنگی، برگ‌های آلوده از گلخانه‌های آلوده گوجه فرنگی در سطح استان‌های اصفهان و قزوین (تقریبا ٣٠٠ تا ٤٠٠ لارو) جمع‌آوری شد. برگ‌های آلوده در جعبه‌های پرورش حشره (حاوی دو الی سه گلدان گوجه فرنگی) قرار داده شدند. قفس‌های ذکر شده در دمای ١±٢٦، رطوبت نسبی ٦٥٪ و ١٦ ساعت نور و ٨ ساعت تاریکی نگهداری گردیدند. پس از هم‌سن سازی آفت (Galdino *et al.*, 2011)، زیست سنجی گیاهان تراریخته شده با سه سن لاروی آفت در دو لاین جداگانه از هر گیاه (هر کدام سه تکرار) انجام گرفت. پنج لارو در هر تکرار روی برگ‌های متصل به گیاه که در پتری دیش محصور شده بودند قرار داده شد. در طول مدت زیست سنجی گیاهان در شرایط ذکر شده برای پرورش آفت نگهداری شدند. میزان خسارت به سطح برگ و مرگ و میر لاروها پس از ٤، ٧ و ١٠ روز (بسته به سن لارو) بررسی گردیدند. میانگین داده‌ها و آنالیز مربوط به مقایسه میانگین‌ها توسط نرم افزار SPSS ver. 17 انجام گردید.

بررسی فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز در لاروهای مورد آزمایش: به منظور استخراج عصاره آنزیمی، لاروهایی که از گیاهان تراریخته و شاهد تغذیه نموده اند، فریز شدند. لاروهای فریز شده به میکروتیوپ‌های ٢ میلی‌لیتری منتقل و پس از اضافه نمودن ١٠٠ میکرولیتر بافر فسفات ٥٠ میلی‌مولار (بافر استخراج)، با هموژنایزر تخریب شدند. سپس نمونه‌ها به مدت ١٥ دقیقه با سرعت ١٤٠٠٠ دور در دقیقه و دمای ٤ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ و فاز رویی به میکروتیوپ جدید به منظور انجام آزمایشات بعدی منتقل گردید. آنالیز آنزیم‌های پراکسیداز (POD) و کاتالاز (CAT) بر لاروهای تغذیه کننده از گیاهان تراریخته و غیر تراریخته در سه تکرار جداگانه انجام شد. میزان فعالیت آنزیم‌ها توسط دستگاه اسپکتروفتومتر Biochorm مدل Libra S22 اندازه‌گیری گردید. جهت سنجش فعالیت سینتیکی آنزیم‌های پراکسیداز و کاتالاز با اندکی تغییرات به ترتیب از روش آماکو و همکاران (Amako *et al.*, 1994) و دیندسا و همکاران (Dhindsa and Matowe 1981) استفاده شد. به منظور مقایسه میزان فعالیت آنزیم‌های فوق در لاروهای تغذیه کننده بر گیاهان تراریخته و شاهد، آزمون t-student توسط نرم افزار SPSS ver. 17 انجام شد.

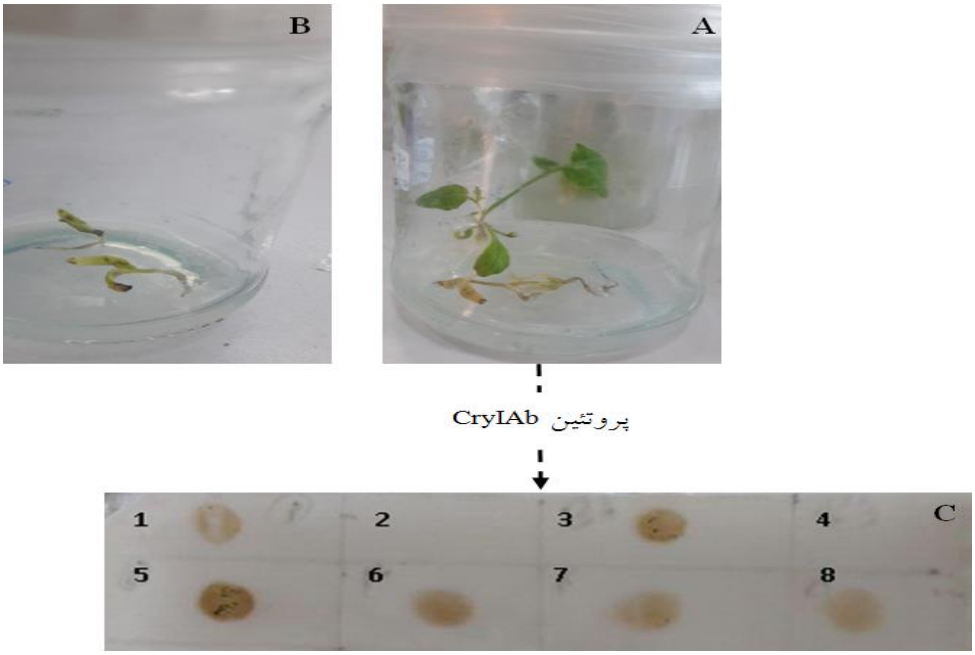
نتایج و بحث

به منظور ایجاد گیاهان تراریخته، استفاده از پیشبرهای مختلف (باتوجه به هدف مطالعه) ضروری است. در اغلب موارد از پیشبرهای دائمی استفاده می‌شود که موجب مصرف دائمی انرژی گیاه و تغییر مسیرهای متابولیسمی آن می‌شود. بنابراین استفاده از پیشبرهای القا شونده یا ویژه بافت خاص در بحث انتقال ژن مورد توجه محققین قرار گرفته است. آفت توتا یکی از آفات مهم گوجه‌فرنگی در کشورهای مدیترانه و آمریکای جنوبی است که باعث خسارت شدید به گلخانه‌ها و مزارع گوجه‌فرنگی شده است. در مطالعه حاضر ژن *cryIAb* تحت پیشبر القا شونده با زخم (*MPI*) به گیاه گوجه‌فرنگی (رقم فلات) منتقل شد. گیاهان تراریخت حاصل مقاومت بهبود یافته‌ای در برابر آفت توتا نشان دادند. استفاده از پیشبرهای القا شونده با زخم در مقایسه با پیشبرهای دائمی دارای مزایایی چون بیان ژن و تولید سم پس از حمله آفت، عدم تولید سم در مراحل مختلف رشد

1- Anti-Cry1Ab polyclonal antibody
2- Hydrogen peroxidase
3- 3,3'-Diaminobenzidine

و توسعه گیاه، ذخیره انرژی و به حداقل رساندن امکان پیدایش مقاومت در جمعیت حشره است (Breitler *et al.*, 2004).

گزینش گیاهچه‌های مقاوم به جنتامایسین: پس از رسیدگی کامل میوه‌های گوجه‌فرنگی(T0)، بذور تراریخته بدست آمده در نسل اول و دوم (T1 و T2) جمع‌آوری و بر روی محیط کشت 1/2MS حاوی جنتامایسین (µ۱۰۰g/ml) غربال‌گری شدند (جدول ۲). غلظت بالای جنتامایسین باعث استیله شدن گروه آمین در موقعیت ۳ از 2-deoxystreptamine می‌شود که بدین ترتیب برخی از ترکیبات آمینوگلیکوزیدی را غیر فعال نموده و باعث کاهش رشد در حتی گیاهان تراریخته خواهد شد (Hayford *et al.*, 1988). در این روش بذور جوانه زده مقاوم به جنتامایسین به خوبی توانستند در مقایسه با گیاهان شاهد غیرتراریخته متمایز شوند و سبز بمانند (شکل ۲-A). نشانگر جنتامایسین دارای کارایی بالا در گیاهان دولپه است. مطالعات انجام گرفته روی بیش از ۵۰۰ گیاه تراریخته حاوی سیستم انتخاب به کمک جنتامایسین دلالت بر کارایی به مراتب بیشتر این نشانگر نسبت به دو آنتی‌بیوتیک کانامایسین و هیگرومایسین دارد (Angenon *et al.*, 1994). در نسل اول (T1)، جوانه‌زنی به طور متوسط ۸۳/۵ درصد بود که از این تعداد ٪ ۲٤/۲٤ در محیط حاوی جنتامایسین زنده ماندند. باتوجه به جدول ۲، در نسل دوم (T2) درصد جوانه‌زنی به طور متوسط ۸۵/۱۰ بود که ۷۷/۲۷ درصد از آن‌ها در محیط حاوی جنتامایسین زنده ماندند. بررسی وراثت مندلی بر اساس گیاهان مقاوم به جنتامایسین در نسل دوم باتوجه به فرمول X^2 انجام شد. با توجه به جدول ۲، تفرق بر اساس نسبت مندلی ۳:۱ (X^2= ۰/۲٤ و $p<$۰/۰۵) بود که دلالت بر تک نسخه‌ای درج شدن ژن مورد نظر در ژنوم گیاهان مورد آزمایش دارد.



شکل ۲– A و B) به ترتیب انتخاب گیاهان تراریخته و غیرتراریخته بر اساس مقاومت به آنتی‌بیوتیک جنتامایسین. C) بررسی بیان ژن *cryIAb* در گیاهان تراریخته به کمک آزمون لکه‌گذاری پروتئین. ۱: شاهد مثبت (گیاه برنج Bt) و ٤: شاهد منفی (گیاه غیرتراریخته). ۲ تا ۳ و ۵ تا ۸: لاین‌های مختلف تراریخته نسل دوم.

Figure 2. A and B) Selection of gentamycin-resistance of transformed and non-transformed plants, respectively. C) Analysis of *cryIAb* gene in transformed plants using protein dot blot. 1: positive control (Bt-rice plant) and 4: negative control (non -transgenic plant). 2-3 and 5-8: various T2 transgenic lines.

جدول ٢- کارایی تراریختی گیاهان گوجه‌فرنگی

Table 2. Transformation efficiency of tomato plants

نسل Generation	تعداد لاین تراریخته Number of transgenic line	بذر Seed: تعداد بذر Number of seed	بذر Seed: متوسط بذر در هر لاین Average number of seed per line	متوسط تعداد بذر جوانه زده(٪) Average number of germinated seeds (%)	متوسط تعداد گیاهچه مقاوم (٪) Average number of resistance plants (%)	متوسط تعداد PCR^+ (٪) Average number of PCR^+ plants (%)
نسل اول First generation	-	40	-	33(82.5%)	8(24.24%)	5 (62.5%)
نسل دوم Second generation	5	-	103.4±33.74	88±28.86 (85.10%)	68±24.42 (77.27%)	51.4±16.87 (75.58%)

میانگین‌ها ± انحراف معیار

Means ± SD

بررسی گیاهان تراریخته توسط PCR و RT-PCR: حضور ژن *cryIAb* و پیشبر *MPI* در گیاهچه‌های مقاوم به جنتامایسین (نسل اول و دوم) با استفاده از آنالیز PCR مورد تایید قرار گرفت. گیاهچه‌های تراریخته باندهایی به اندازه ١١٩٤ bp و ٨٠٠ bp هم اندازه با باند تکثیر شده در سازه pPZP122:*MPI*:*cryIAb* (به عنوان شاهد مثبت) نشان داد، در حالیکه هیچ باندی در گیاه غیرتراریخته مشاهده نشد (شکل١-A و D). به ترتیب در نسل اول و دوم ٦٢/٥ و ٧٥/٥٨ درصد از گیاهچه‌های مقاوم به جنتامایسین حاوی ژن مورد نظر بودند. یاسمین و همکاران (Yasmeen *et al.*, 2009) با تراریخته نمودن گوجه‌فرنگی (ژن *gus*، تحت پیشبر CaMV35S) با تزریق به میوه و تحت عامل گزینشی کانامایسین، به طور متوسط تنها ٣٩٪ حضور ژن انتقالی را بدست آوردند. بنابراین، استراتژی گزینشی مورد استفاده در این تحقیق (غربال‌گری به کمک آنتی‌بیوتیک جنتامایسین) دارای کارایی بالایی است. از گیاهانی که نتایج PCR آن‌ها مثبت بود (PCR^+)، استخراج RNA انجام شد. پس از ساخت cDNA، آزمون RT-PCR به کمک آغازگرهای اختصاصی طراحی شده برای ژن *cryIAb* انجام و نتایج بیان این ژن در گیاهچه‌های PCR^+ در هر دو نسل مورد تأیید قرار گرفت. باندی به اندازه ١٦٠ جفت باز در گیاهچه‌های تراریخته مشاهده شد، در حالیکه در گیاهان غیرتراریخته (شاهد منفی) هیچ باندی وجود نداشت که دلیل بر نداشتن ژن *cryIAb* در ژنوم آن است (شکل ١-C). باتوجه به مشاهده باند مورد نظر، تلفیق کامل سازه ژنی (شامل پیشبر، ناحیه رمز کننده ژن و توالی پایان دهنده) در لاین‌های تراریخته تأیید شد. باتوجه به درصد فراوانی بالای گیاهان تراریخته حاوی ژن *cryIAb* در نسل دوم (٧٥/٥٨٪)، روش انتقال ژن بصورت *In planta* در این تحقیق کارایی بالایی در گوجه‌فرنگی داشته و می‌تواند جایگزین مناسبی برای روش رایج انتقال ژن به ریزنمونه‌های برگی در این گیاه باشد.

بررسی بیان پروتئین CryIAb در گیاهان تراریخته: لکه‌گذاری به عنوان روشی سریع و نسبتا آسان به منظور غربال گیاهان تراریخته محسوب می‌شود. با توجه به نتایج لکه‌گذاری پروتئین حاصل از گیاهان نسل T2 (شکل C٢)، در نمونه‌های مربوط به گیاه غیر تراریخته لکه رنگی مشاهده نشد که دلیلی بر آلوده نبودن سیستم و صحت آزمون انجام شده است. باتوجه به نتایج لکه‌گذاری و ایجاد واکنش رنگی در نمونه‌های تراریخته در مقایسه با نمونه شاهد منفی (گیاه غیرتراریخته)، پروتئین CryIAb در گیاهان مورد آزمایش سنتز و تولید شده است. تولید پروتئین نوترکیب دلالت بر تلفیق ژن هدف در ژنوم گوجه‌فرنگی و انتقال آن به نسل دوم دارد. باتوجه به نتایج این آنالیز و حضور پروتئین CryIAb، تلفیق کامل سازه

ژنی (شامل پیشبر، ناحیه رمز کننده ژن و توالی پایان دهنده) را بار دیگر در لاین‌ها تأیید نمود.

بررسی عملکرد گیاهان تراریخته نسل دوم علیه آفت توتا: تعدادی از گیاهان تراریخته نسل T2 حاوی ژن *cryIAb* تحت پیشبر *MPI* به همراه دو گیاه غیرتراریخته برای بررسی مقاومت آن‌ها علیه آفت شب‌پره گوجه‌فرنگی انتخاب شدند. باتوجه به اینکه ارزیابی زیست سنجی روی گیاه کامل انجام می‌شود، درصد افزایش سطح برگ در محاسبات لحاظ گردید. میانگین درصد افزایش سطح برگ گیاهان تراریخته مورد آزمایش بعد از چهار، هفت و ده روز به ترتیب ۵/۷۷، ۱۱/۷۵و ۳۰/٤٥ بود. نتایج حاصل از زیست سنجی در جدول ۳ ارائه شده است. خسارت وارده توسط این آفت در گیاهان غیرتراریخته در قیاس با گیاهان تراریخته به طور محسوسی بیشتر است و لذا لاین‌های تراریخت در مقایسه با گیاهان شاهد دارای مقاومت نسبی هستند (شکل ۳). با وجود اینکه اکثر لاروهای مورد مطالعه در گیاهان غیرتراریخته به سن ٤ رسیده بودند، ولی در گیاهان تراریخته رشد کلیه لاروها در مرحله سن ۲ یا ۳ متوقف شد (شکل ٤). تنوع در میزان مرگ و میر و خسارت به سطح برگ بین گیاهان تراریخته مختلف می‌تواند ناشی از تفاوت در سطح بیان توکسین در نتیجه تغییرات اپی‌ژنتیک (مانند تعداد نسخه، اثر درج در محل نامناسب و غیره) باشد (Ghareyazie *et al.*, 1997). باتوجه به نتایج بدست آمده، توانایی پروتئین CryIAb در کنترل لاروهای سنین اول بیشتر از لاروهای سن آخر است. لذا پیشبر *MPI* برای بیان پروتئین CryIAb در گوجه‌فرنگی مناسب است و می‌تواند خسارت ناشی از تغذیه لاروهای توتا را در مراحل آغاز حمله کنترل نماید و مانع از افزایش سن این لارو و خسارت بیشتر آن به مزارع گوجه‌فرنگی شود. القا پیشبر *MPI* در واکنش به زخم، به دلیل وجود موتیف‌های القایی مانند موتیف MeJA و ABA است (Hajiahmadi *et al.*, 2017). پیشبرهای القا شونده در مواقع دفاعی کاربردهای بسیاری در زیست‌فناری به منظور توسعه محصولات تراریخته مقاوم به آفات دارند. همچنین، به منظور به حداقل رساندن اثرات خطرناک گیاهان تراریخته بر موجودات غیر هدف، ضروری است که ژن‌ها به صورت هدفمند و بعد از حمله آفت بیان شوند.

بررسی فعالیت آنزیمی لاروهای تغذیه کننده از گیاهان تراریخته و شاهد: تنش اکسیداتیو در اثر طیف وسیعی از عوامل محیطی مانند حمله آفات، اثر آفت‌کش‌ها و غیره القا می‌شود. گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) تحت تنش اکسیداتیو تولید و باعث آسیب به DNA، غشا و پروتئین می‌گردند (Yuan *et al.*, 2011). همچنین ROSها می‌توانند عملکرد سلول را از طریق کنترل تولید و فعال‌سازی مواد فعال زیستی تنظیم نمایند. آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند POD و CAT با شکستن ROSها، موجود زنده را از آسیب‌های ناشی از تنش اکسیداتیو حفاظت می‌نمایند (Yuan *et al.*, 2011). باتوجه به اینکه میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی دلالت بر قرارگیری موجود زنده تحت عوامل محیطی مضر دارد، فعالیت این آنزیم‌ها در لاروهای تغذیه کننده از گیاهان تراریخته و غیر تراریخته بررسی و تعیین شد (شکل ٤). باتوجه به نتایج، میزان فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و کاتالاز به ترتیب ۱/۷۰±۰/۲۱ و ۲/٦۳±۰/٦۱ در لاروهایی که از برگ گیاهان تراریخته تغذیه کرده بودند و ۰/۵۸±۰/۰۱۷ و ۰/۷۱±۰/۱٤ در لاروهای تغذیه کننده از برگ شاهد بود. باتوجه به معنی‌دار شدن نتایج آزمون t-student، میزان فعالیت این آنزیم‌ها در لاروهای تغذیه کننده از برگ‌های تراریخته به مراتب بیشتر از لاروهای تغذیه کننده از برگ‌های غیرتراریخته بوده است. نتایج این تحقیق با نتایج اینگوآ و همکاران (Yinghua *et al.*, 2017) تطابق دارد. آن‌ها فعالیت آنزیمی آنتی‌اکسیدانی در لاروهای تغذیه کننده بر ذرت تراریخته حاوی ژن *cryIAb* را بررسی کردند. نتایج آن‌ها نشان داد که فعالیت این آنزیم‌ها در لاروهای قرار گرفته در معرض گیاهان تراریخته افزایش پیدا می‌کند.

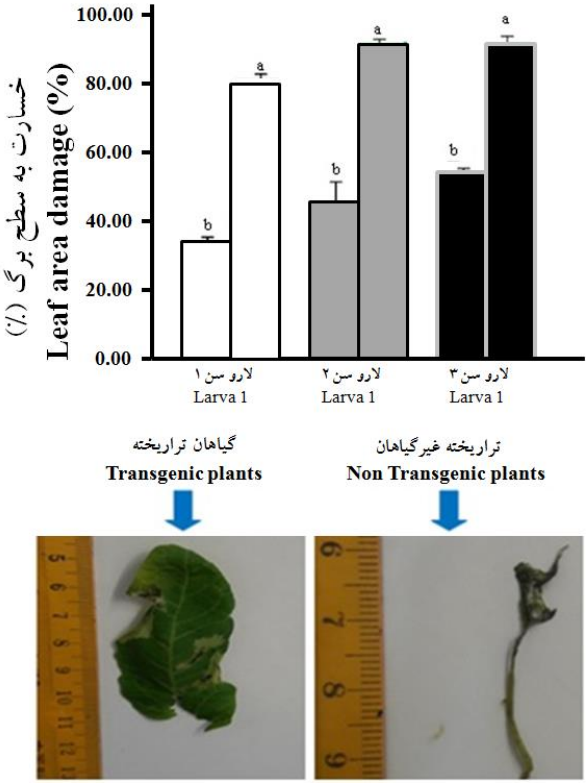
جدول ۳- زیست سنجی گیاهان تراریخته گوجه‌فرنگی دارای ژن *cryIAb* تحت کنترل پیشبر *MPI* علیه آفت شب‌پره گوجه-فرنگی (*Tuta absoluta*).

Table 3. Bioassay of transgenic tomato plants harboring the *cryIAb* gene under control of the *MPI* promoter against tomato leafminer (*Tuta absoluta*)

نام نمونه sample	لاین تراریخت Transgenic line	تعداد لارو Number of larva	درصد خسارت به سطح برگ Leaf area damage (%)			درصد مرگ و میر Mortality (%)		
			لارو ۱ Larva 1	لارو ۲ Larva 2	لارو ۳ Larva 3	لارو ۱ Larva 1	لارو ۲ Larva 2	لارو ۳ Larva 3
گیاهان تراریخته Transgenic plants	1	15	23.32±0.51^{b}	33.15±2.62^{b}	37.75±0.94^{cd}	90.00±4.47^{a}	93.33±4.21^{a}	80.00±7.30^{a}
	2	15	23.67±0.92^{b}	28.67±2.11^{b}	38.13±1.97^{c}	96.66±3.33^{a}	96.66±3.33^{a}	84.00±4.00^{a}
شاهد Control	1	15	83.42±0.71^{a}	95.50±0.79^{a}	92.72±0.91^{b}	3.33±3.33^{b}	0.00±0.00^{b}	0.00±0.00^{b}
	2	15	84.90±1.41^{a}	94.73±0.97^{a}	98.25±0.49^{a}	0.00±0.00^{b}	3.33±3.33^{b}	0.00±0.00^{b}

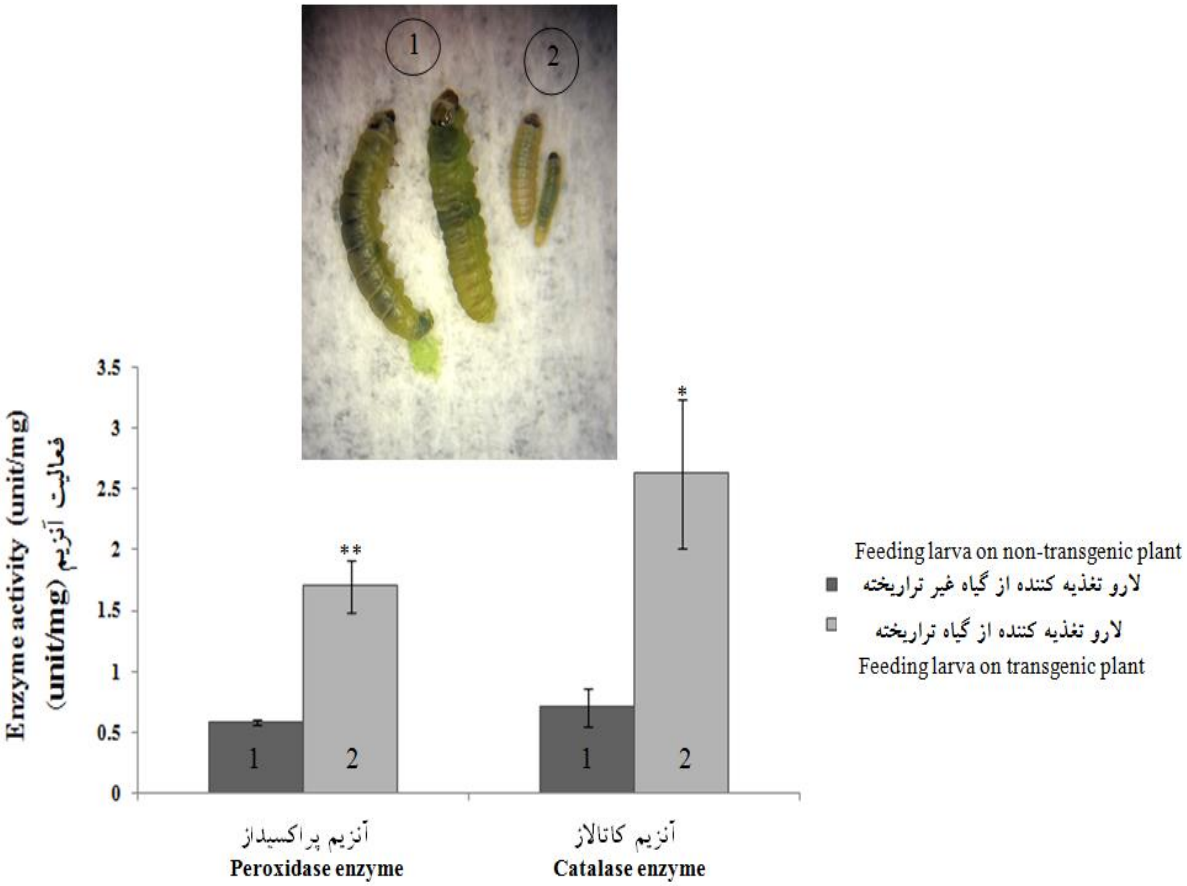
میانگین‌ها± انحراف معیار، در هر ستون میانگین‌های دارای حروف مشترک اختلاف معنی داری در سطح ۰/۰۵ با یکدیگر توسط آزمون دانکن ندارند

Means± SD, Difference between means in each columns followed by different letters are significantly different (P<0.05) in Duncan multiple range test



شکل ۳- میزان خسارت به سطح برگ پس از آلودگی توسط لارو شب پره گوجه‌فرنگی. در هر سن لاوری میانگین، حروف غیر مشترک دارای اختلاف معنی‌داری در سطح ۰/۰۵ با یکدیگر بر اساس آزمون دانکن دارند (P<0.05).

Figure 3. Leaf area damage after tomato leafminer larva infestation. Values not labeled with the same letter are significantly difference (P<0.05) in Duncan multiple range test



شکل ٤- مقایسه فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز در لاروهای مورد آزمایش با استفاده از آزمون t-student. ۱ و ۲: به ترتیب لاروهای تغذیه شده روی برگ غیرتراریخته و تراریخته. خطوط روی ستون‌ها میانگین ± انحراف معیار را نشان می‌دهند. ** و * به ترتیب معنی‌داری در سطح ۱٪ و ۵٪.

Figure 4. Comparison of the catalase and peroxidase activities in the tested larva with a student's T-test. 1 and 2: alive larvae collected from non-transgenic and transgenic leaves. Error bars that represent based on Mean±SD. ** and *significant at 1% and 5% probability levels, respectively.

نتیجه‌گیری کلی

توسعه گیاهان حاوی سم Bt و مقاوم به آفت از جمله راهکارهای کاهش مصرف حشره‌کش‌ها و صدمات جانی و محیطی استفاده از آن‌ها است. آفت توتا، یکی از آفات مهم و کلیدی گوجه فرنگی در ایران بشمار می‌رود که کنترل آن بسیار مشکل است. از طرفی پیامدهای ناگوار استفاده از حشره‌کش‌های شیمیایی بر روی محیط زیست و سلامت انسان مستند به شواهد علمی معتبر است. بنابراین انتقال ژن به گیاهان می‌تواند استفاده از حشره‌کش‌ها را کاهش دهد. در مطالعه حاضر، گیاهان تراریخته حاوی ژن *cryIAb* تحت پیشبر القا شونده با زخم *MPI* تولید شد. در رابطه با ایمنی زیستی و ارزیابی مخاطرات احتمالی پروتئین‌های Cry در گیاهان تراریخته، محققان بسیاری در جهان و به خصوص ایران به بررسی این آسیب‌ها پرداخته‌اند. نتایج آزمایشات هیچ‌گونه آلرژی‌زایی از این گیاهان را نشان نداده است (Behzadirad *et al.*, 2009). نتایج تحقیق حاضر، مقاومت بهبود یافته‌ای را در گیاهان گوجه‌فرنگی تراریخته به آفت توتا نشان داد. باتوجه به اهمیت این آفت در کاهش معنی‌دار عملکرد محصول، کاشت گیاهان تراریخته که دارای مقاومت نسبی به آن هستند می‌تواند کمک شایانی به حفظ گلخانه‌های گوجه‌فرنگی کرده و مانع از نابودی آن‌ها شود.

References

Adeli, N. and Ghareyazie, B. (2013). Comparison between the impact of transgenic insect resistant Crop plants and their traditional counterparts on human health and the environment. *Genetic Engineering and Biosafety Journal*, **1**: 1-28 (In Persian).

Amako, Y,. **Yamamoto, T. and Nagai, H.** (1994). The119Sn Mössbauer effect in RMn6Sn6 compounds (R= Gd, Y). *Hyperfine Interactions*, **94**: 1897-1901.

Angenon, G., Dillen, W. and Van Montagu, M. (1994). Antibiotic resistance markers for plant transformation In: *Plant Molecular Biology Manua* (Geert Angenon, G., Dillen, W. and Montagu, M.V., Eds), pp. 125-137, Springer, Chapman and Hall, London, UK.

Baniameri, V. and Cheraghian, A. (2011). The current status of *Tuta absoluta* in Iran In: *International Symposium on Management of Tuta absoluta*, pp. 16-18, Agadir, MOR.

Behzadirad, M., Naghavi, M.R., Abbasi, A. and Dastmalchi, T. (2009). Phytoremediation, especial solution of biotechnology in environmental protection. *Journal of Biosafety*, **2**: 43-50.

Breitler, J.C., Cordero, M.J., Royer, M., Meynard, D., San Segundo, B. and Guiderdoni, E. (2001). The− 689/+ 197 region of the maize protease inhibitor gene directs high level, wound-inducible expression of the *cry1B* gene which protects transgenic rice plants from stemborer attack. *Molecular Breeding*, **7**: 259-274.

Breitler, J.C., Vassal, J.M., Del-Mar-Catala, M., Meynard, D., Marfà, V., Melé, E., Royer, M., Murillo, I., San Segundo, B. and Guiderdoni, E. (2004). Bt rice harbouring cry genes controlled by a constitutive or wound-inducible promoter: protection and transgene expression under Mediterranean field conditions. *Plant Biotechnology Journal*, **2**: 417-430.

Campos, M.R., Rodrigues, A.R.S., Silva, W.M., Silva, T.B.M., Silva, V.R.F., Guedes, R.N.C. and Siqueira, H.A.A. (2014). Spinosad and the tomato borer *Tuta absoluta*: a bioinsecticide, an invasive pest threat, and high insecticide resistance. *PloS One*, **9(8)**, (doi.org/10.1371/journal.pone .0103235).

Cordero, M.J., Raventós, D. and Segundo, B. (1994). Expression of a maize proteinase inhibitor gene is induced in response to wounding and fungal infection: systemic wound-response of a monocot gene. *The Plant Journal*, **6**: 141-150.

Dhindsa, R.S. and Matowe, W. (1981). Drought tolerance in two mosses: correlated with enzymatic defence against lipid peroxidation. *Journal of Experimental Botany*, **32**: 79-91.

Galdino, T.V.d.S., Picanço, M.C., Morais, E.G.F.d., Silva, N.R ,.**Silva, G.A.R.d. and Lopes, M.C.** (2011). Bioassay method for toxicity studies of insecticide formulations to *Tuta absoluta* (Meyrick, 1917). *Ciência e Agrotecnologia*, **35**: 869-877.

Ghareyazie, B., Alinia, F., Menguito, C.A., Rubia, L.G., de Palma, J.M., Liwanag, E.A., Cohen, M.B., Khush, G.S. and Bennett, J. (1997). Enhanced resistance to two stem borers in an aromatic rice containing a synthetic *cryIA(*b) gene. *Molecular Breeding*, **3**: 401-414.

Hajdukiewicz, P., Svab, Z. and Maliga, P. (1994). The small, versatilePZP family ofAgrobacterium binary vectors for plant transformation. *Plant Molecular Biology*, **25**: 989-994.

Hajiahmadi, Z., Shirzadian-Khorramabad, R., Kazemzad, M. and Sohani, M.M. (2017). *In silico* analysis and transient expression of wound-inducible promoter *MPI* in tomato (*Lycopersicon esculentum*Mill. cv. CH). *Plant Omics*, **10**: 118.

Hayford, M.B., Medford, J.I., Hoffman, N.L., Rogers, S.G. and Klee, H.J. (1988). Development of a plant transformation selection system based on expression of genes encoding gentamicin acetyltransferases. *Plant Physiology*, **86**: 1216-1222.

Heitz, T., Geoffroy, P., Fritig, B. and Legrand, M. (1999). The PR-6 family: proteinase inhibitors in plant-microbe and plant-insect interactions In: *Pathogenesis Related Proteins in Plants* (Datta, SK. and Muthukrishnan, S., Eds), 131-155, Chapman & Hall, Productivity Press, Auerbach Publications, Florida, USA.

Jafari, M., Norouzi, P., Malboobi, M.A., Ghareyazie, B., Valizadeh, M., Mohammadi, S.A. and Mousavi, M. (2009). Enhanced resistance to a lepidopteran pest in transgenic sugar beet plants expressing synthetic cry1Ab gene. *Euphytica*, **165**: 333-344.

Koiwa, H., Bressan, R.A. and Hasegawa, P.M. (1997) .Regulation of protease inhibitors and plant defense. *Trends in Plant Science*, **2**: 379-384.

Koziel, M.G., Beland, G.L., Bowman, C., Carozzi, N.B., Crenshaw, R., Crossland, L., Dawson, J., Desai, N., Hill, M. and Kadwell, S. (1993). Field performance of elite transgenic maize plants expressing an insecticidal protein derived from *Bacillus thuringiensis*. *Nature Biotechnology*, **11**: 194-200.

Lietti, M.M., Botto, E. and Alzogaray, R.A. (2005). Insecticide resistance in argentine populations of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). *Neotropical Entomology*, **34**: 113-119.

Martínez-Valverde, I., Periago, M.J., Provan, G. and Chesson, A. (2002). Phenolic compounds, lycopene and antioxidant activity in commercial varieties of tomato (*Lycopersicum esculentum*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **82**: 323-330.

Murray, M. and Thompson, W.F. (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*, **8**: 4321-4326.

Pereira, R.R., Picanço, M.C., Santana, P.A., Moreira, S.S., Guedes, R.N. and Corrêa, A.S. (2014). Insecticide toxicity and walking response of three pirate bug predators of the tomato leaf miner *Tuta absoluta*. *Agricultural and Forest Entomology*, **16**: 293-301.

Ryan, C.A. (1990). Protease inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, **28**: 425-449.

Stotz, H.U., Kroymann, J. and Mitchell-Olds, T. (1999). Plant-insect interactions. *Current Opinion in Plant Biology*, **2**: 268-272.

Yasmeen, A., Mirza, B,. **Inayatullah, S., Safdar, N., Jamil, M., Ali, S. and Choudhry, M.F.** (2009). In planta transformation of tomato. *Plant Molecular Biology Reporter*, **27**: 20-28.

Yinghua, S., Yan, D., Jin, C., Jiaxi, W. and Jianwu, W. (2017). Responses of the cutworm *Spodoptera litura* (*Lepidoptera: noctuidae*) to two Bt corn hybrids expressing *Cry1Ab*. *Scientific Reports*, **7**: 1-13.

Yuan, Y., Ke, X., Chen, F., Krogh, P.H. and Ge, F. (2011). Decrease in catalase activity of Folsomia candida fed a Bt rice diet. *Environmental Pollution*, **159**:3714-3720.

Zakerghoran, B., Memari, H.R., Ahmadi, D.N. and Siahmard, M. (2014). Cloning, Transformation and Stable Expression of a Fusion of Human Interferon Gamma and bar Genes in Tobacco Plant *(Nicotiana tobaccum* cv. xanthi). *Plant Genetic Researches*, **1**: 27-36 (In Persian).

Zhang, S., Lian, Y., Liu, Y., Wang, X., Liu, Y. and Wang, G. (2013). Characterization of a maize Wip1 promoter in transgenic plants. *International Journal of Molecular Sciences*, **14**: 23872-23892.

Expression of *cryIAb* Driven by a Wound Inducible Promoter (*MPI*) in Tomato to Enhance Resistance *to Tuta absoluta*

Zahra Hajiahmadi[1], Reza Shirzadian-Khorramabad[2,*], Mahmood Kazemzad[3] and Mohammad Mahdi Sohani[4]

1- Former Ph.D. Student, Department of Plant Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran
2- Assistant Professor, Department of Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran
3- Assistant Professor, Department of Energy, Materials and Energy Research Center, Karaj, Iran
4- Associate Professor, Department of Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran

(Received: August 24, 2017 – Accepted: November 14, 2017)

Abstract

Tomato leafminer (*Tuta absoluta*) is one of the important pests of tomato in Iran. It causes serve losses to tomato yield between 50 to 100% in the world. The *cryIAb* gene has been introduced into many plant species, including maize resulting in protection of the maize plants against corn borer larvae. In most studies, constitutive promoters such as CaMV35S were employed for genetic transformation; however the constitutive expression of genes led to changes in plant metabolic pathways due to permanent energy consumption in plants. Since, wound inducible promoter *MPI* (Maize Protease Inhibitor) posses more efficiency and strength than CaMV35S promoter. Therefore, in the current study, transgenic tomato (cv. Falat) plants harboring *cryIAb* gene under control of the *MPI* promoter were developed for the first time. The *MPI* promoter was isolated from maize and cloned into pPZP122 expression vector replacing the CaMV35S promoter. The *cryIAb* gene was isolated from pCIB4427 and cloned in pPZP122:*MPI*:*cryIAb* and the resulting construct was transformed into *Agrobacterium* AGL1 strain using *In planta* approach. Initial selection of the transgenic plants was carried out in media culture containing gentamicin. PCR analysis confirmed the presence of transgene in gentamycin-resistance plants in the first and second generations by rate of 62.5% and 75.58%, respectively. Protein dot blotting using anti-CryIAb polyclonal antibody confirmed the presence of protein in the second generation of transgenic lines. Based on the result of *Tuta* bioassay, transgenic plants demonstrated an enhanced resistance against *Tuta*. Thus, the wound inducible promoter *MPI* can be used in genetic transformation of crop plants if insecticidal protein-encoding genes (such as different types of *cry*) are used and therefore, it is important to be used when plants asked to express only when are being attacked by insect pests.

Keywords: Wound inducible promoter, *Tuta*, *cryIAb* gene, *In planta*

* **Corresponding Author, E-mail: r.shirzadian@guilan.ac.it**