نشریهٔ پژوهش‌های حبوبات ایران
جلد۵ شمارهٔ۱، صفحهٔ۱۳۸-۱۲۹، نیمهٔ اول ۱۳۹۳

Iranian Journal of Pulses Research
Vol. 5, No. 1, 2014, p. 129-138

آزمون‌های زیستی و مولکولی گیاه نخود تراریخته (*Cicer arietinum* L.) مقاوم به آفت پیله‌خوار (*Helicoverpa armigera* Hub.)

پرویز عبادی باباجان[1]، نسرین مشتاقی[2*]، عبدالرضا باقری[2]، حسن مرعشی[3] و سعید ملک‌زاده شفارودی[2]

۱- کارشناسی‌ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

۲- اعضای هیئت علمی گروه بیوتکنولوژی و بِه‌نژادی گیاهی دانشکده کشاورزی، پژوهشکده فناوری زیستی و پژوهشکدهٔ علوم گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد

۳- عضو هیئت علمی گروه بیوتکنولوژی و بِه‌نژادی گیاهی دانشکده کشاورزی و پژوهشکده فناوری زیستی دانشگاه فردوسی مشهد

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۰۲/۱۲
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۲/۲۱

چکیده

آفت پیله‌خوار یکی از عوامل اصلی کاهش عملکرد نخود محسوب می‌شود و انتقال ژن با هدف افزایش مقاومت به این آفت، از اهداف اصلاحی در این گیاه زراعی می‌باشد. یکی از راهبردهای مؤثر برای تولید نخود تراریخته مقاوم به آفت پیله‌خوار، استفاده از سموم طبیعی Cry از باکتری باسیلوس تورینجینسیس است. این سموم قادرند در معده حشرات فعال شده و سیستم گوارشی حشره را مختل نمایند. در مطالعه حاضر بررسی ثبات حضور ژن *cry1Ac* و بیان آن در نسل‌های سوم (T3) و چهارم (T4) حاصل از نسل دوم نخود تراریخته با ژن *cry1Ac* و ژن گزینشگر *nptII* انجام شد تا بتوان به لاینی دست یافت که تنها حاوی ژن *cry1Ac* بوده و ژن *nptII* بر اثر نوترکیبی بین دو T-DNA از آن تفکیک شود. آزمون PCR از بین ۲۵نمونه مشکوک در نسل سوم به وجود ژن *cry1Ac*، در ۶مورد باند مربوط به ژن *cry1Ac* و باند مربوط به ژن *nptII* را در تمامی نمونه‌ها نشان داد، ولی از بین این ۶نمونه، در آزمون RT-PCR تنها در ۵مورد ژن *cry1Ac* در سطح RNA بیان شد. نتایج PCR در طی نسل چهارم حاکی از وجود باند مربوط به ژن *cry1Ac* در ۷۳مورد و باند مربوط به ژن *nptII* در ۸۱نمونه از ۹۴مورد بود. در ۱۰نمونه از گیاهان تراریخته که حاوی ژن *cry1Ac* بودند، باند مربوط به ژن *nptII* مشاهده نگردید که این نشان‌دهنده آن بود که ژن *cry1Ac* از ژن *nptII* تفکیک شده است. نتایج آزمون RT-PCR نیز نشان داد که ژن موردنظر در همه گیاهان تراریخته، در سطح RNA بیان شده است. همچنین نتایج آزمون الایزا نشان داد که در تمام نمونه‌های مورد آزمون، پروتئین Cry1Ac در لاین‌های مختلف در غلظت‌های متفاوتی بیان شده است. در آزمون زیست‌سنجی، لاروهایی که با برگ گیاهان غیرتراریخته تغذیه شدند، همگی زنده ماندند، اما در مقابل لاروهایی که با برگ گیاهان تراریخته نسل T4 تغذیه شدند، همگی به‌طور کامل از بین رفتند که این امر نشان‌دهندهٔ بروز موفقیت‌آمیز فنوتیپ مورد انتظار می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: آفت پیله‌خوار، نخود تراریخته، Bt، *cry1Ac*

مقدمه

تنش‌های زیستی نظیر آفت پیله‌خوار، از عوامل اصلی کاهش عملکرد نخود محسوب می‌شوند. اصلاح نخود از طریق روش‌های مرسوم مشابه با سایر گیاهان با صرف هزینه و زمان زیادی انجام می‌شود و در برخی مواقع به‌دلیل فقدان ژن‌های مطلوب در خزانه ژرم‌پلاسم و عدم تلاقی بین‌گونه‌ای، با محدودیت‌هایی مواجه است. لذا به‌نظر می‌رسد بتوان با استفاده از تلفیق روش‌های نوین کشت این‌ویترو و مهندسی ژنتیک، موانع موجود در روش‌های اصلاحی کلاسیک را از میان برداشته و فرایندهای اصلاحی را سرعت بخشید (Bajaj, 1990).

میزان خسارت آفت پیله‌خوار نخود در سطح جهانی سالانه بالغ بر ۳۲۵میلیون‌دلار تخمین زده شده است (Popelka & Higgins, 2007)، لذا افزایش مقاومت در برابر این آفت می‌تواند سبب بهبود عملکرد این گیاه در نواحی کاشت آن شود. یکی از راهبردهای مؤثر برای تولید نخود تراریخته مقاوم به آفت پیله‌خوار، استفاده از سموم طبیعی Cry از باکتری *Bacillus thurigiensis* است. این سموم قادرند در معده حشرات، فعال شده و سیستم گوارشی حشره را مختل نمایند. تلاش‌های متعددی برای انتقال انواع ژن‌های *cry* به گیاهان زراعی جهت ایجاد مقاومت به انواع آفات حشره‌ای انجام شده است و تعدادی از گیاهان Bt هم‌اکنون در سطح وسیعی در کشورهای مختلف نظیر هند، چین، ایالات‌متحده، اسپانیا، کانادا، استرالیا، پرتغال، چک، لهستان، اسلواکی، رومانی و برزیل

* **نویسنده مسئول:** مشهد، میدان آزادی، دانشگاه فردوسی، دانشکدهٔ کشاورزی، گروه بیوتکنولوژی و بِه‌نژادی گیاهی، moshtaghi@um.ac.ir

کشت می‌شوند (James, 2011). این گیاهان میزان مصرف آفت‌کش‌ها را کاهش داده و مزایای فراوانی را برای تولیدکننده و مصرف‌کننده به‌همراه دارند، ضمن این‌که باعث صرفه‌جویی اقتصادی نیز خواهند شد.

محققان با استفاده از آگروباکتریوم تومی‌فاشینس توانسته‌اند انتقال چندین ژن نشانگر و گزارشگر از جمله *bar*، *nptII*، *gus* و *gfp* را در نخود ردیابی کنند (Fontana *et al*, 1993; Krishnamurthy *et al.*, 2000; Chandra & Pental, 2003; Somers *et al.*, 2003; Polowick *et al.*, 2004). Fontana *et al*, (1993) اولین کسانی بودند که توانستند گیاه نخود تراریخته با ژن *gus* را تولید نمایند. آن‌ها در تحقیق خود از محورهای جنینی به‌عنوان ریزنمونه و از آگروباکتریوم تومی‌فاشینس جهت تراریزش استفاده کردند. علاوه بر این، تلاش‌هایی نیز در جهت تولید نخود مقاوم به آفت کرم پیله‌خوار انجام گرفته و با موفقیت همراه بوده است (Moshtaghi, 2008; Moshtaghi *et al*., 2010; Sanyal *et al.*, 2005; Indurker *et al.*, 2007; Acharjee *et al.*, 2010; Mehrotra *et al*, 2011).

در مطالعه Moshtaghi *et al*, (2010) سعی شد تا با انتقال ژن *cry1Ac* به لاینی از نخود Bt دست یابند که بتواند به‌طور مؤثری باعث کنترل آفت پیله‌خوار در نخود شود و این مطالعات تا نسل دوم گیاهان تراریخته پیش رفته است. نکته متمایز در بررسی آن‌ها، استفاده از دو ژن گزینشگر *nptII* و ژن عامل تولید پروتئین کریستالی در دو T-DNAی جدای از هم روی پلاسمید آگروباکتریوم می‌باشد. به‌این‌ترتیب، علاوه بر انتقال ژن *cry1Ac* می‌توان انتظار داشت که در نسل‌های بعد به لاینی دست یافت که تنها حاوی ژن *cry1Ac* بوده و ژن گزینشگر مقاوم به آنتی‌بیوتیک (*nptII*) بر اثر نوترکیبی بین این دو T-DNA حذف شود.

بنابراین می‌توان در نسل‌های بعد که هدف این بررسی نیز می‌باشد به یک لاین مطلوب هموزیگوس از ژن *cry1Ac* دست یافت که مشکل ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک را دارا نیست و نیز باعث کنترل مؤثر آفت پیله‌خوار خواهد شد. لذا در مطالعه حاضر سعی شد ضمن بررسی ثبات حضور ژن *cry1Ac* و بیان آن در نسل‌های T3 و T4 بتوان به لاینی دست یافت که تنها حاوی ژن *cry1Ac* بوده و ژن *nptII* بر اثر نوترکیبی بین دو T-DNA از آن تفکیک شود.

مواد و روش‌ها

کشت گیاهان و تهیه نمونه

ضدعفونی بذور نخود تراریخته مقاوم به آفت پیله‌خوار در طی نسل سوم و چهارم، در وایتکس ۰/۵درصد به‌مدت ۴دقیقه انجام شد. جوانه‌زنی بذور در داخل پتری‌دیش در شرایط آزمایشگاهی انجام گرفت. بعد از جوانه‌زنی، بذور به گلدان‌های کوچک انتقال داده شدند. بعد از ۲۰روز، نمونه برگی از هر کدام از بوته‌ها برای استخراج DNA و RNA و پروتئین تهیه شدند و درون میکروتیوب‌های ۱/۵میلی‌لیتری قرار داده شده و در فریزر با دمای ۸۰-نگهداری شدند.

استخراج DNA و انجام PCR

استخراج DNA با استفاده از کیت استخراج DNA (Fermentas #K0512) طبق دستورالعمل شرکت سازنده از بافت برگی فریزشده صورت گرفت. پس از هر استخراج، کمیت و کیفیت DNAی ژنومی با نانودراپ و الکتروفورز بر روی ژل آگارز تعیین شد. جهت تأیید وجود ژن *cyr1Ac* و *nptII* در گیاه، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با استفاده از آغازگرهای ژن *cry1Ac* و *nptII* انجام شد (جدول ۱). تعداد چرخه‌های انجام‌گرفته برای ژن *cry1Ac*، ۳۵چرخه و حجم نهایی واکنش ۲۵میکرولیتر درنظر گرفته شد. واسرشت‌سازی اولیه برای هر دو ژن، در دمای ۹۵درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۵دقیقه و در ۳۵چرخه بعدی به‌مدت یک‌دقیقه انجام شد. دمای اتصال برای آغازگر *cry1Ac*، ۵۴درجه سانتی‌گراد و به‌مدت ۹۰ثانیه و برای ژن *nptII*، ۵۱درجه سانتی‌گراد و به‌مدت ۶۰ثانیه درنظر گرفته شد. مرحله پلیمریزاسیون در دمای ۷۲درجه سانتی‌گراد و به‌مدت ۱۲۰ثانیه برای ژن *cry1Ac* و ۹۰ثانیه برای ژن *nptII* برای تمام چرخه‌ها و ۱۰دقیقه برای چرخه نهایی انتخاب شد. در ضمن برای تأیید نسبت تفکیک ژن *cry1Ac* از آزمون کای‌مربع در نسل چهارم استفاده گردید.

استخراج RNA و انجام RT-PCR

برای استخراج RNA از کیت Fast Pure™ RNA (TaKaRa) در نسل سوم و کیت استخراج RNAدنازیست (#S1020) در نسل چهارم استفاده شد. مقدار ۵۰میلی‌گرم از بافت برگ فریزشده توسط هاون عاری از RNase (اتوکلاو شده و شستشو با آب depsi) به‌خوبی ساییده شد و بقیه مراحل طبق دستورالعمل کیت شرکت سازنده انجام گرفت. پس از هر استخراج، کمیت و کیفیت RNAی استخراج‌شده با نانودراپ و الکتروفورز بر روی ژل آگارز تعیین شد. نمونه‌های RNA برای اطمینان از عدم آلودگی، DNAزدایی شدند و PCR نمونه‌های RNA هیچ باندی را تکثیر ننمود. سپس نسخه‌برداری معکوس با استفاده از کیت Quantitect Reverse Transcription (Takara) طی نسل سوم و کیت Revert Aid First Strand Kit (Fermentas, K1621) طی نسل چهارم در حجم نهایی ۲۰میکرولیتر انجام پذیرفت. حجم مذکور حاوی یک

میکروگرم RNAی الگو است. به‌منظور بررسی بیان ژن در سطح RNA، آزمون RT-PCR با استفاده از cDNAهای سنتزشده صورت گرفت. بدین‌منظور cDNAهای سنتزشده به‌عنوان الگو در واکنش PCR مشابه با قسمت قبل استفاده شد.

جدول ۱- توالی آغازگر ژن‌های *cry1Ac* و *nptII*

Table 1. Primer sequences of *cry1Ac* and *nptII* genes

آغازگر Primer	رفت Forward	برگشت Reverse	اندازه محصولات Product size
cry1Ac	5´-GACACAATGGACAACAACCCAAA-3´	5´-TCACTGCAGGGATTTGAGTAATA-3´	1473 bp
nptII	5´-ATCGGGAGCGGCGATACCGTA-3´	5´-GGCTATTCGGCTATGACTG-3´	887 bp

آزمون ELISA

آزمایش الایزا با استفاده از کیت Krishgene Biosystem (# KBA005D) صورت گرفت. بدین‌منظور، از محلول استخراج پروتئین کیت برای استخراج پروتئین از بافت برگی استفاده شد. بافر استخراج پروتئین به‌مقدار ۵۰۰میکرولیتر به‌همراه بافت برگی در درون میکروتیوب قرار گرفت. سپس با استفاده از یک پستل، بافت برگی به‌صورت دستی کاملاً له شد. سپس محلول حاصل در دستگاه سانتریفیوژ در ۱۲۰۰۰دور و به‌مدت ۲دقیقه قرار گرفت. بعد از آن، محلول رویی که حاوی پروتئین کل بود برداشته شد. بعد از استخراج پروتئین، انجام آزمون الایزا با استفاده از آنتی‌بادی‌های اختصاصی Cry1Ac طبق دستورالعمل کیت شرکت سازنده انجام گرفت. در نهایت چگالی نوری (جذب نوری) چاهک‌ها در ۴۵۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. ارزیابی نتایج با مشاهده تغییر رنگ چاهک از بی‌رنگ به رنگ زرد و یا اندازه‌گیری میزان جذب در محدوده طول موج ۴۵۰نانومتر با استفاده از دستگاه الایزاخوان (Stat Fax 2100, Awarness Tech. Inc, USA) صورت گرفت.

ارزیابی زیستی

برای تأیید تأثیر بیان پروتئین Bt بر رشد لارو آفت پیله‌خوار در گیاهان تراریخته نسل چهارم و بروز فنوتیپ مورد نظر، از آزمون زیست‌سنجی استفاده شد. بدین منظور از برگ گیاهان شاهد (غیرتراریخته‌های نسل چهارم که حاصل از تفرق‌یافتن لاین‌های تراریخته نسل سوم بودند) و تراریخته‌های نسل چهارم استفاده گردید. لاین‌های تراریخته‌ای که مورد این آزمون قرار گرفتند شامل 4D7، 4E11، 4E15 و 4E30 بودند. برای این آزمون، از لاروهای یک تا دوروزه که از مزرعه دانشگاه فردوسی مشهد جمع‌آوری شده بودند، استفاده شد. لاروها، بعد از جمع‌آوری به آزمایشگاه انتقال داده شدند. لاروها توسط برگ‌های تازه نخود غیرتراریخته به‌عنوان شاهد و برگ‌های تازه نخود تراریخته در داخل پتری‌دیش در دمای ۲۵درجه سانتی‌گراد در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار به‌مدت یک‌هفته تغذیه شدند. در این آزمون، یک برگ به‌همراه یک لارو در هر پتری‌دیش قرار داده شدند. بعد از این مدت میزان مرگ‌ومیر لاروها ثبت گردید.

نتایج و بحث

نتایج کشت گیاهان

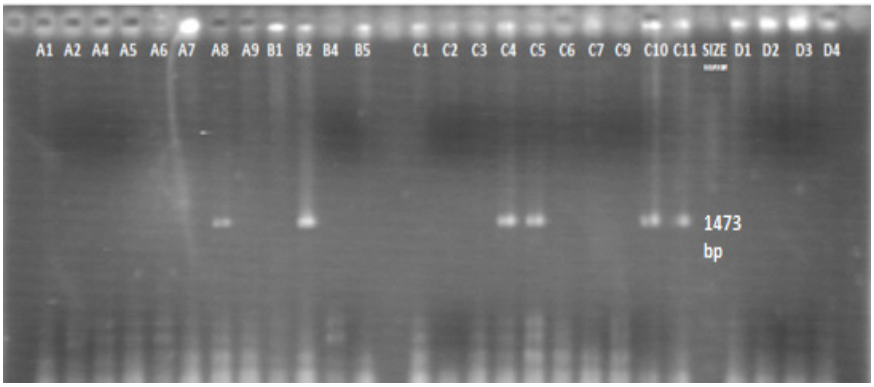
در نسل سوم گیاهان تراریخته، تعداد کل بذور جوانه‌زده ۲۵عدد بود که ارزیابی PCR و RT-PCR در نسل سوم بر روی آن‌ها صورت گرفت. نمونه‌های شاهد نیز برای تکثیر و به‌دست‌آوردن بذور کشت شدند. در نسل چهارم، ۱۰۸عدد بذر حاصل از لاین‌های تراریخته حاوی ژن *cry1Ac* و چند گیاه شاهد غیر تراریخته نیز کشت شدند. از این تعداد بذور تراریخته ۹۴گیاه به مرحله گلدهی رسیدند، ولی ۶۸گیاه قادر به تولید بذر برای نسل بعدی شدند.

نتایج آزمون PCR

از گیاهان حاصل از کشت بذور در نسل سوم، در آزمون PCR، در۶مورد باند مربوط به ژن *cry1Ac* مشاهده گردید و باند مربوط به ژن *nptII* در تمامی نمونه‌ها مشاهده شد.

PCR با آغازگرهای *cry1Ac* منجر به تکثیر یک قطعه ۱۴۷۳جفت بازی (شکل ۱) و با آغازگرهای *nptII* منجر به تکثیر قطعه ۸۸۷جفت بازی (شکل ۲) شد.

نتایج PCR در طی نسل چهارم حاکی از وجود باند مربوط به ژن *cry1Ac* در ۷۳مورد از ۹۴مورد (شکل ۳)، و باند مربوط به ژن *nptII* در ۸۱نمونه از ۹۴مورد (شکل ۴) بود. در ۱۰نمونه از گیاهان تراریخته که حاوی ژن *cry1Ac* بودند، باند مربوط به ژن *nptII* مشاهده نگردید که این، نشان‌دهندهٔ این مطلب بود که ژن *cry1Ac* از ژن *nptII* تفکیک شده است.

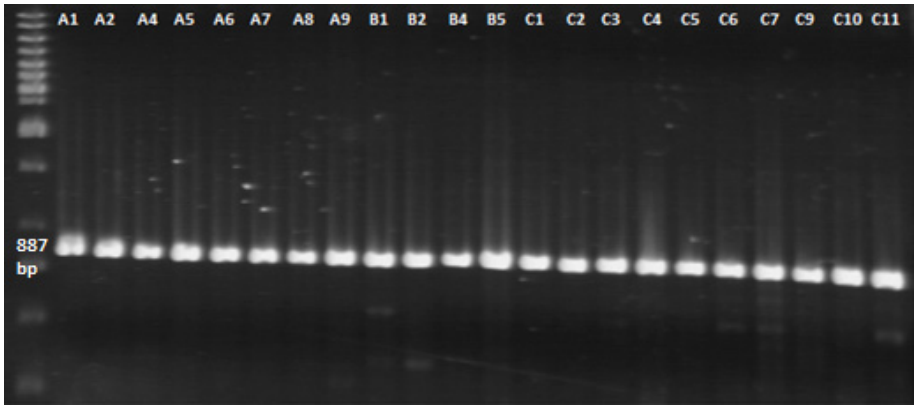


شکل ۱- تکثیر قطعه ۱۴۷۳جفت بازی مربوط به ژن *cry1Ac* در نسل سوم گیاهان تراریخته

(چاهک‌های مختلف، لاین‌های تراریخته هستند که بذور به‌دست‌آمده از یک گیاه با حرف لاتین مشترک نشان داده شده‌اند).

Fig. 1. Amplified 1473 bp *cry1Ac* gene by PCR in T3 generation of transgenic plants

(Different wells show the transgenic lines which the common alphabet indicated the all seeds from one plant)



شکل ۲- تکثیر قطعه ۸۸۷جفت بازی مربوط به ژن *nptII* در نسل سوم گیاهان تراریخته

(چاهک‌های مختلف، لاین‌های تراریخته هستند که بذور به‌دست‌آمده از یک گیاه با حرف لاتین مشترک نشان داده شده‌اند).

Fig. 2. Amplified 887 bp *cry1Ac nptII* by PCR in T3 generation of transgenic plants

(Different wells show the transgenic lines which the common alphabet indicated the all seeds from one plant)

نتایج حاصل از PCR نشان داد که تفکیک ژن *cry1Ac* با نسبت ۳:۱ در نسل چهارم صورت گرفته است. آزمون کای‌مربع این نسبت را تأیید نمود (جدول۲).

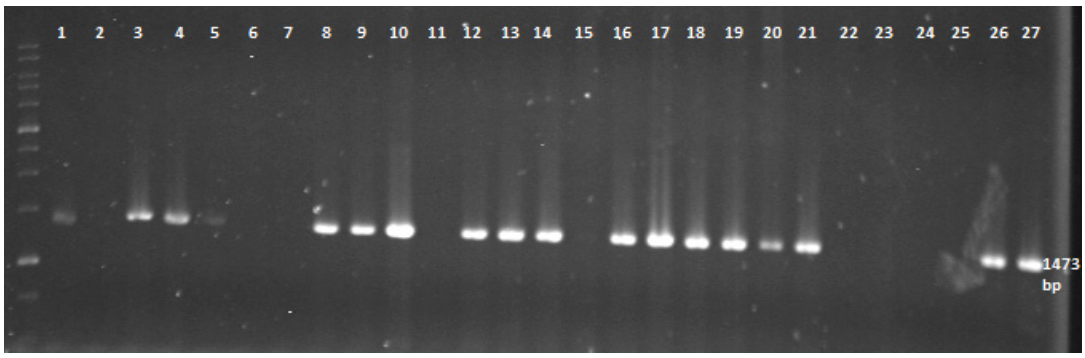
نتایج RT-PCR

از بین ۶نمونه موجود در نسل سوم که دارای ژن *cry1Ac* بودند، در آزمون RT-PCR معمولی، در ۵مورد قطعه ۱۴۷۳جفت بازی مربوط به ژن *cry1Ac* تکثیر شد و بر روی ژل آگارز ۱درصد باند مربوطه مشاهده گردید (شکل ۵-a).

در طی نسل چهارم از ۷۳نمونه‌ای که در آزمون PCR دارای ژن *cry1Ac* بودند، استخراج RNA صورت گرفت. پس از ساخت cDNA، آزمون RT-PCR با استفاده از آغازگر ژن *cry1Ac* به‌عمل آمد. نتایج آزمون RT-PCR نشان داد که در همهٔ نمونه‌ها باند مربوطه مشاهده شد و قطعه ۱۴۷۳جفت بازی مشاهده گردید؛ و به بیان دیگر در همه گیاهان تراریخته، ژن موردنظر در سطح RNA بیان شده است (شکل ۵-b).

نتایج آزمون *ELISA*

آزمون ELISA به‌منظور تأیید بیان پروتئین Cry1Ac در گیاهانی که دارای ژن این پروتئین بودند، صورت گرفت. پس از انتقال میزان برابر از پروتئین کل به درون چاهک‌ها، انتظار می‌رفت که تغییر رنگ ناشی از وجود پروتئین مربوطه، و با اندازه‌گیری میزان جذب نوری در طول موج ۴۵۰نانومتر با استفاده از دستگاه الایزاخوان میزان بیان پروتئین Cry1Ac در گیاهان تراریخته را مشخص کند. همان‌طوری‌که انتظار می‌رفت، تغییر رنگ متمایل به زرد در چاهک‌ها مشاهده شد (شکل ۶).

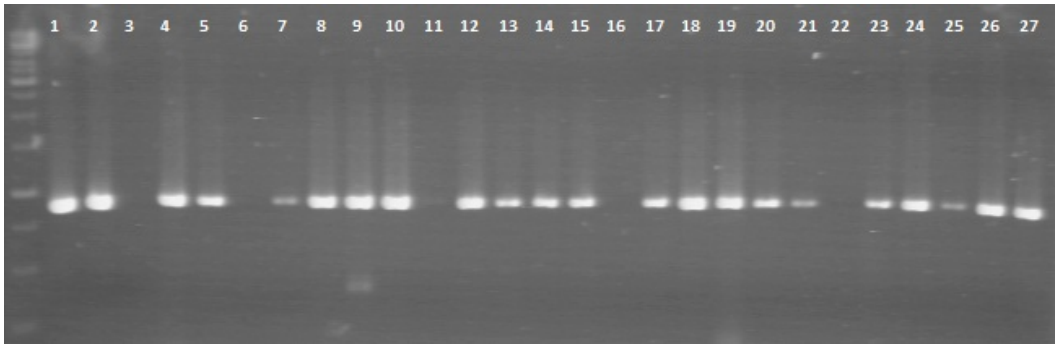


شکل ۳- تکثیر قطعه ۱۴۷۳جفت بازی مربوط به ژن *cry1Ac* در نسل چهارم گیاهان تراریخته

Fig. 3. Amplified 1473 bp *cry1Ac* gene by PCR in T4 generation of transgenic plants

The number well from left to right are, respectively:

4A1-4A2-4A3-4A4-4A5-4A6-4A7-4A8-4A9-4A10-4A11-4A12-4A13-4A14-4A15-4A16-4A17-4A18-4A19-4B1-4B2-4B3-4B4-4C1-4C2-4C3-4C4



شکل ۴- تکثیر قطعه ۸۸۷جفت بازی مربوط به ژن *nptII* در نسل چهارم گیاهان تراریخته

Fig. 4. Amplified 1473 bp *nptII* gene in PCR in T4 generation of transgenic plants

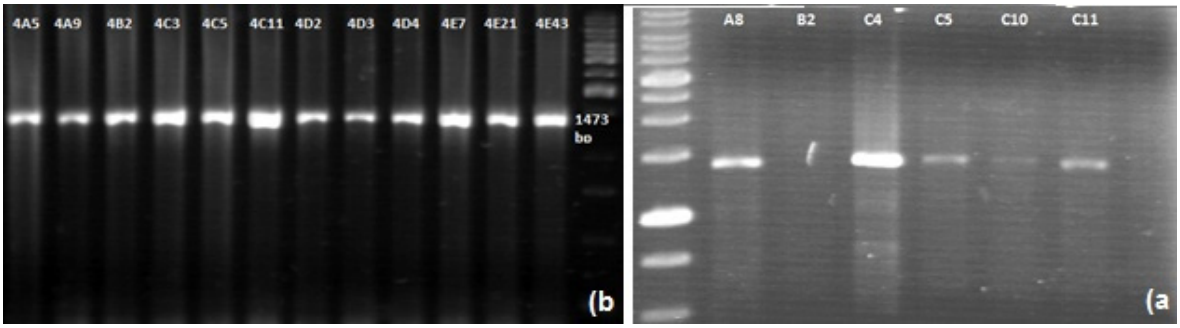
The number well from left to right are, respectively:

4A1-4A2-4A3-4A4-4A5-4A6-4A7-4A8-4A9-4A10-4A11-4A12-4A13-4A14-4A15-4A16-4A17-4A18-4A19-4C1-4C2-4C3-4C4-4C5-4C6-4C7-4C8

جدول ۲- برآورد نسبت حضور ژن *cry1Ac* در نسل چهارم

Table 2. The estimation of the presence ratio of *cry1Ac* gene in the T4 transgenic plants

نسل Generation	تعداد کل گیاهان Total plants	مدل Model		فراوانی مشاهدات و مورد انتظار Frequency of observed and expected		χ^2
				حضور ژن *cry1Ac* Presence *of cry1Ac*	عدم حضور ژن *cry1Ac* Absence *of cry1Ac*	
T4	94		مشاهدات Obs.	73	21	
		3:1	مورد انتظار Exp.	70.5	23.5	0.184^{ns}



شکل ۵- a: تکثیر قطعه ۱۴۷۳جفت بازی ژن *cry1Ac* در آزمون RT-PCR در نسل سوم گیاهان تراریخته؛ b: تکثیر قطعه ۱۴۷۳جفت بازی ژن *cry1Ac* در آزمون RT-PCR در نسل چهارم گیاهان تراریخته

Fig. 5. a: Amplified 1473 bp *cry1Ac* gene by RT-PCR in T3 generation of transgenic plants; b: T4 generation of transgenic plants

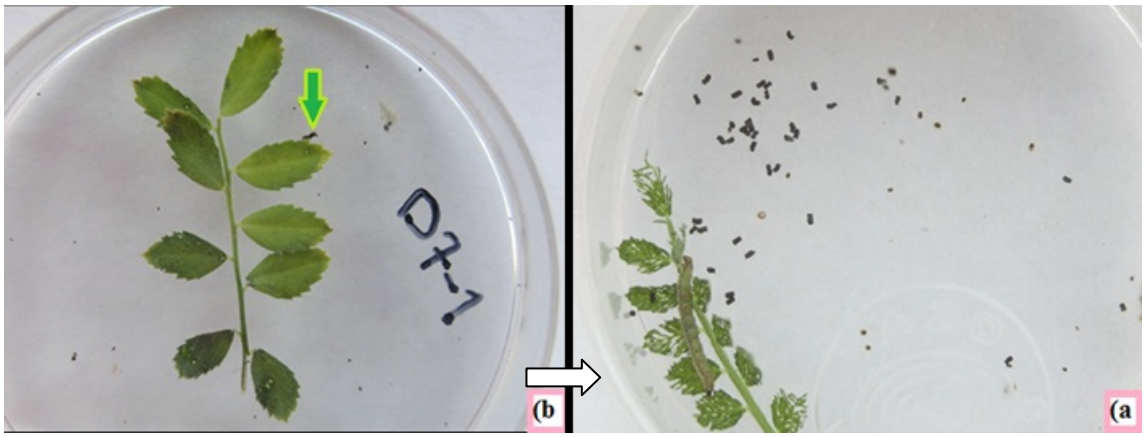
شکل ۶- رنگ متمایل به زرد در چاهک‌های مربوط به آزمون الایزا

Fig. 6. Yellow color of the well associated with the ELISA test

بر اساس نتایج الایزا، در تمام نمونه‌های مورد آزمون، پروتئین Cry1Ac بیان شده است. مقدار بیان این پروتئین در لاین‌های مختلف گیاهان تراریخته از ۲۴نانوگرم بر گرم بافت تا تقریباً ۱۰۰نانوگرم بر گرم بافت متفاوت بوده است.

نتایج ارزیابی زیستی

طی نسل چهارم گیاهان تراریخته، ارزیابی زیستی با لارو یک تا دوروزه از آفت پیله‌خوار در سه تکرار در مقایسه با گیاهان غیرتراریخته حاصل از تفرق گیاهان تراریخته نسل سوم انجام گرفت. نتایج آزمون زیست‌سنجی حاکی از آن بود که تمام لاروهایی که با برگ گیاهان غیرتراریخته به‌عنوان نمونه شاهد تغذیه شدند، زنده ماندند (شکل ۷-a) اما در مقابل ۱۰۰درصد لاروهایی که با برگ گیاهان تراریخته تغذیه شدند، از بین رفتند (شکل ۷-b) که این امر، نشان‌دهندهٔ بروز موفقیت‌آمیز فنوتیپ مورد انتظار بوده است.



شکل ۷- تغذیه لارو آفت پیله‌خوار از a: برگ گیاهان غیرتراریخته و زنده‌ماندن لارو (فلش، محل لارو رشدیافته را بر روی برگ نشان می‌دهد)؛ b: برگ گیاهان تراریخته و مرگ لارو (فلش، محل لارو مرده را نشان می‌دهد)

Fig. 7. Feeding pod borer larvae of: a) leave of non-transgenic plant and survived larvae (Arrow shows the survived larvae); b) leave of transgenic plant and dead larvae (Arrow shows the dead larvae)

در این بررسی، نتایج حاصل از PCR نشان داد که ژن *cry1Ac* در گیاه نخود تراریخته به ثبات و پایداری رسیده است. همچنین تفکیک ژن *cry1Ac* در نسل چهارم نسبت۳:۱ را نشان داد. میزان انتقال ژن *cry1Ac* در حدود ۷۷/۶۶درصد بود. در بررسی‌های انجام‌شده در نخود، تفکیک ۳:۱ در نسل دوم گیاه تراریخته با ژن *cry1Ac* مقاوم به آفت پیله‌خوار نیز گزارش شده است (Acharjee *et al*., 2010). نتایج به‌دست‌آمده نشان دادند که دو ژن *cry1Ac* و *nptII* در چندین نمونه از هم تفکیک شده‌اند، به‌طوری‌که در۱۰نمونه که دارای ژن *cry1Ac* بودند، ژن *nptII* منتقل نشده است. اما از این تعداد، تنها سه گیاه تولید بذر (متوسط ۵عدد) نمودند و بذر T5 آن‌ها در اختیار است.

در این تحقیق مشخص شد که گیاه نخود تراریخته، فنوتیپ مورد نظر را آشکار کرد و نشان داد که ژن *cry1Ac* اثر کشندگی بالایی بر روی لاروهای آفت پیله‌خوار دارد و باعث مرگ‌ومیر ۱۰۰درصدی لاروهای این آفت شد. مطالعه بر روی تأثیر سموم Bt و گیاهان تراریخته Bt نشان می‌دهد که هر کدام از سموم خانواده Bt تأثیرات متفاوتی بر روی لاروهای مختلف آفات دارند. از میان توکسین‌های Bt، سم Cry1Ac در برابر پیله‌خوار بسیار مؤثر شناخته شده است. پس از آن سموم Cry2Ab، Cry2Aa و Cry1Aa تأثیر بیشتری بر روی این آفت دارند (Perlak *et al*., 1990). ارزیابی زیستی نخود تراریخته با ژن *cry2Aa* برای مقاومت به آفت پیله‌خوار نخود، داده‌های متفاوتی را نشان داده است، اما در همه لاین‌هایی که بیان پروتئین بالایی داشتند، همه لاروها از بین رفتند (Acharjee *et al*., 2010). ارزیابی زیستی نخود تراریخته با ژن *cry1Ac* علیه آفت پیله‌خوار، نشان‌دهندهٔ مرگ‌ومیر ۷۶درصدی لارو این آفت بود (Indurker *et al*., 2010).

در مطالعه حاضر نیز گیاهان نسل سوم، از رشد بسیارخوبی برخوردار بودند، اما میزان بذور تولیدی این گیاهان در مقایسه با گیاهان غیرتراریخته پایین بود. بااین‌حال، اندازه ظاهری بذور تولیدی گیاهان تراریخته با بذور تولیدی گیاهان غیرتراریخته تفاوتی را نشان نمی‌داد. تفاوت فاحشی بین ارتفاع بوته، تعداد غوزه، تعداد روز تا بلوغ، میزان خسارت غوزه و عملکرد متوسط بین خطوط تراریخته و کنترل در گیاه پنبه تراریخته نیز به دو ژن *cry1Ac* و *cry2A* مشاهده شد. همچنین رسیدگی سریع‌تر لاین‌های تراریخته نسبت به لاین‌های غیرتراریخته مشاهده شد و همه ویژگی‌ها در نسل‌های پیشرفته به توارث پایدار رسیده بودند (Bakhsh *et al*., 2009). رشد گیاهان نخود تراریخته دارای ژن *cry2Aa* طی دو هفته اول، تفاوتی با لاین‌های مادری نشان نمی‌داد که این امر نشان می‌دهد که بیان بالای پروتئین بر سبزشدن و استقرار گیاهان تأثیر ندارد، درحالی‌که از هفته سوم به بعد کاهش رشد گیاهان تراریخته در مقایسه با گیاهان غیرتراریخته مشاهده شد. همگام با کاهش رشد، تولید دانه نیز کاهش یافت. اما در لاین‌های با بیان پروتئینی کم، کاهش رشد دانه در مقایسه با لاین‌های مادری، تفاوت زیاد قابل‌توجهی نداشت. اندازه دانه‌ها در بین لاین‌ها تفاوت زیاد معنی‌داری را نشان نمی‌داد (Acharjee *et al*., 2010). البته مطالعات دیگر نشان داده است که لاین‌های تراریخته می‌توانند افزایش تولید داشته باشند. در مطالعه مربوط به لاین‌های تراریخته برنج با ژن‌های *cry1Ac* و *cry2A* نشان داده شده است که این گیاهان در نسل‌های پیشرفته در مقایسه با گیاهان غیرتراریخته بیش از ۴۰درصد بذر تولید کردند و همه این ویژگی‌ها در نسل‌های پیشرفته به ارث رسیده بودند (Rahman *et al*., 2007).

علت تفاوت در میزان خسارت در آزمایشات مربوط به آزمایشگاه و مزرعه شاید به‌دلیل سن گیاه و همچنین قسمت‌های مختلف گیاه باشد (Kranthi *et al*., 2005). گزارش‌ها نشان می‌دهد تراریختگی موجب رسیدگی زودتر و یا دیرتر می‌شود (Jiang *et al*., 2000). علت این تنوع مورفولوژیکی احتمالاً به دلایلی از قبیل بروز تنوع سوماکلونی (Larkin & Scowcroft, 1981)، تفکیک ژن‌های گیاهی به‌دلیل واردشدن ژن جدید یا جهش (Lijsebettens *et al*., 1991)، پلیوتروپی و یا خاموشی ژن القایی (Metzke *et al*., 2000) و یا بیان بالای پروتئین Cry (Gahakwa *et al*., 2000) نسبت داد که از بین این‌ها تنوع سوماکلونی محتمل‌تر به‌نظر می‌رسد، چون زمان بیشتری برای تولید گیاهان تراریخته در روش کشت بافت صرف می‌شود و طولانی‌شدن زمان کشت بافت فراوانی تنوع سوماکلونی را در پی دارد (Kaeppler *et al*., 2000).

افزایش تعداد کپی‌های ترانسژن ممکن است باعث ناپایداری یا بی‌ثباتی شده و خاموش‌کردن ژن وابسته به همسانی را ایجاد کند. اما با طراحی دقیق، ممکن است به سطوح بالایی از بیان پروتئین از طریق رونویسی دست یافت (Butaye *et al*., 2005). برنج تراریخته بیان‌کننده سطح بالای (بیش از ۱درصد پروتئین محلول) پروتئین Cry1Ac و Cry2A، نواقص رشدی و مورفولوژیکی از جمله توقف رشد و عقیمی را نشان داد (Gahakwa *et al*., 2000). بیان سطوح بالای پروتئین Bt در گیاهان، برای محافظت کامل، همیشه مورد نیاز نیست، مقدار کم (کمتر از ۰/۱درصد کل پروتئین محلول) پروتئین Cry1Ab مرگ ۱۰۰درصدی لارو ساقه‌خوار برنج را باعث می‌شود (Wunn *et al*., 1996). در مطالعه حاضر نیز، با توجه به این‌که بیان پروتئین Cry1Ac به میزان حدود ۳۲نانوگرم بر گرم بافت (۹/۲۸نانوگرم بر میلی‌لیتر پروتئین محلول) باعث کنترل۱۰۰درصدی آفت پیله‌خوار شد، به‌نظر می‌رسد بتوان با بیان پایین این پروتئین نیز آفت را کنترل کرد.

منابع

1. Acharjee, S., Sarmah, B.K., Kumar, P.A., Olsen, K., Mahon, R., Moar, W.J., Moore, A., and Higgins, T. J.V. 2010. Transgenic chickpeas (*Cicer arietinum* L.) expressing a sequence-modified *cry2Aa* gene. Plant Science 178: 333-339.
2. Bajaj, Y.P.S. 1990. Biotechnology in Agriculture and Forestry 10: Legumes and Oilseed Crops. New Delhi. India. p. 100-113.
3. Bakhsh, A., Rao, A.Q., Shahid, A.A., Husnain, T., and Riazuddin, S. 2009. Insect resistance and risk assessment studies in advance lines of Bt cotton harboring cry1Ac and cry2A genes. American Eurasian Jornal of Agricultural and Environmental Science 6: 1-11.
4. Butaye, K.M.J., Cammue, B.P.A., Delaure, S.L., and De Bolle, M.F.C. 2005. Approaches to minimize variation of transgene expression in plants. Molecular Breeding 16: 79-91.
5. Chandra, A., and Pental, D. 2003. Regeneration and genetic transformation of grain legumes: An overview. Current Science 84: 381-387.
6. Fontana, G.S., Santini, L., Caretto, S., Frugis, G., and Mariotti, D. 1993. Genetic transformation in the grain legume *Cicer arietinum* L.(chickpea.). Plant Cell Reports, 12: 194-198.
7. Gahakwa, D., Maqbool, S.B., Fu, X., Sudhakar, D., Christou, P., and Kohli, A. 2000. Transgenic rice as a system to study the stability of transgene expression: multiple heterologous transgenes show similar behaviour in diverse genetic backgrounds. TAG Theoretical and Applied Genetics 101: 388-399.
8. Indurker, S., Misra, H.S., and Eapen, S. 2007. Genetic transformation of chickpea (*Cicer arietinum* L.) with insecticidal crystal protein gene using particle gun bombardment. Plant Cell Reports 26: 755-763.
9. Indurker, S., Misra, H., and Eapen, S. 2010. *Agrobacterium*-mediated transformation in chickpea (*Cicer arietinum* L.) with an insecticidal protein gene: optimisation of different factors. Physiology and Molecular Biology of Plants 16: 273-284.
10. James, C. 2011. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2011. ISAAA Brief No. 43. ISAAA: Ithaca, NY.
11. Jiang, J., Linscombe, S.D., Wang, J., and Oard, J.H. 2000. Field evaluation of transgenic rice (*Oryza sativa* L.) produced by *Agrobacterium* and particle bombardment methods. In: Plant and Animal Genome VIII Conference (9-12 January, 2000, San Diego, CA, USA). Available from Internet: http://www.intl-pag.org/8/abstracts/pag8695.html.
12. Kaeppler, S.M., Kaeppler, H.F., and Rhee, Y. 2000. Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. Plant Molecular Biology 43: 179-188.
13. Kranthi, K.R., Naidu, S., Dhawad, C., Tatwawadi, A., Mate, K., Patil, E., Bharose, A., Behere, G., Wadaskar, R., and Kranthi, S. 2005. Temporal and intra-plant variability of Cry1Ac expression in Bt-cotton and its influence on the survival of the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hubner) (Noctuidae: Lepidoptera). Current Cience-Bangalore 89: 291.
14. Krishnamurthy, K., Suhasini, K., Sagare, A., Meixner, M., De Kathen, A., Pickardt, T., and Schieder, O. 2000. *Agrobacterium* mediated transformation of chickpea (*Cicer arietinum* L.) embryo axes. Plant Cell Reports 19: 235-240.
15. Larkin, P.J., and Scowcroft, W. 1981. Somaclonal variation-a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. TAG Theoretical and Applied Genetics 60: 197-214.
16. Lijsebettens, M., Vanderhaeghen, R., and Montagu, M. 1991. Insertional mutagenesis in Arabidopsis thaliana: isolation of a T-DNA-linked mutation that alters leaf morphology. TAG Theoretical and Applied Genetics 81: 277-284.
17. Matzke, M.A., Mette, M., and Matzke, A. 2000. Transgene silencing by the host genome defense: implications for the evolution of epigenetic control mechanisms in plants and vertebrates. Plant Molecular Biology 43: 401-415.
18. Mehrotra, M., Singh, A.K., Sanyal, I., Altosaar, I., and Amla, D. 2011. Pyramiding of modified *cry1Ab* and *cry1A*c genes of *Bacillus thuringiensis* in transgenic chickpea (*Cicer arietinum* L.) for improved resistance to pod borer insect *Helicoverpa armigera*. Euphytica 182: 87-102.
19. Moshtaghi, N. 2008. Genetic engineering for increasing resistance of chickpea (*Cicer arietinum* L.) to pod borer and freezing stress. Ph.D Dissertation, College of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad. (In Persian with English Summary).
20. Moshtaghi, N., Bagheri, A., Higgins, T.J., Jalali Javaran, M., and Ghareyazie, B. 2010. Genetic engineering for increasing resistance of chickpea (*Cicer arietinum* L.) to pod borer (*Helicoverpa armigera*). Iranian Journal of Pulses Research 1: 65-75. (In Persian with English Summary).
21. Perlak, F.J., Deaton, R.W., Armstrong, T.A., Fuchs, R.L., Sims, S.R., Greenplate, J.T., and Fischhoff, D.A. 1990. Insect resistant cotton plants. Nature Biotechnology 8: 939-943.

22. Polowick, P., Baliski, D., and Mahon, J. 2004. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of chickpea (*Cicer arietinum* L.): gene integration, expression and inheritance. Plant Cell Reports 23: 485-491.
23. Popelka, J.C., and Higgins, T.J.V. 2007. Chickpea. In: E.C. Pua and M.R. Davey (Eds.). Biotechnology in Agriculture and Forestry Vol. 59: Transgenic Crops IV. Springer- Verlag berlin Heridelberg.
24. Rahman, M., Rashid, H., Shahid, A.A., Bashir, K., Husnain, T., and Riazuddin, S. 2007. Insect resistance and risk assessment studies of advanced generations of basmati rice expressing two genes of *Bacillus thuringiensis*. Electronic Journal of Biotechnology 10: 241-251.
25. Sanyal, I., Singh, A.K., Kaushik, M., and Amla, D.V. 2005. *Agrobacterium*-mediated transformation of chickpea (*Cicer arietinum* L.) with *Bacillus thuringiensis cry1Ac* gene for resistance against pod borer insect *Helicoverpa armigera.* Plant Science 168: 1135-1146.
26. Schuh, W., Nelson, M.R., Bigelow, D.M., Orum, T.V., Orth, C.E., Lynch, P.T., Eyles, P.S., Blackhall, N.W., Jones, J., Cocking, E.C., and Davey, M.R. 1993. The phenotypic characterisation of R2 generation transgenic rice plants under field conditions. Plant Science 89: 69-79.
27. Somers, D.A., Samac, D.A., and Olhoft, P.M. 2003. Recent advances in legume transformation. Plant Physiology 131: 892-899.
28. Wunn, J., Kloti, A., Burkhardt, P.K., Biswas, G.C.G., Launis, K., Iglesias, V.A., and Potrykus, I. 1996. Transgenic indica rice breeding line IR58 expressing a synthetic *crylA (b)* gene from *Bacillus thuringiensis* provides effective insect pest control. Nature Biotechnology 14: 171-176.

Iranian Journal of Pulses Research
Vol. 5, No. 1, 2014, p. 129-138

Bioassay and molecular tests of transgenic chickpea (*Cicer arietinum* L.) resistant to *Helicoverpa armigera* Hub.

Ebadi Babajan[1], P., Moshtaghi[2*], N., Bagheri[2], A., Marashi[2], H. & Malekzadeh-Shafaroudi[2], S.

1. MSc. of Agricultural Biotechnology, College of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad
2. Contributions from Biotechnology and Plant Breeding Department, College of Agriculture and Biotechnology Research Center, Ferdowsi University of Mashhad

Received: 1 May 2012
Accepted: 11 May 2014

Abstract

Pod borer is one of the main causes for yield loss of chickpea. Therefore, breeding of chickpea for resistance to this pest is important. The use of Cry toxin from *Bacillus thuringiensis* is an effective strategy for producing of transgenic resistant chickpea to this pest. These toxins are able to become active in the midgut of larvae and disrupt the insect's digestive system. We studied the stability and expression of cry1Ac gene obtained as T2 transgenic chickpea with cry1Ac gene and nptII gene with binary T-DNA in T3 and T4 generations of transgenic plants and observed the transgenic lines with cry1Ac gene and no nptII gene suggesting that separation between cry1Ac and nptII genes was occurred by recombination between two T-DNAs. In T3, PCR results showed that 6 of 25 putative transgenic plants had cry1Ac gene but all of them showed the nptII gene. From six samples with positive PCR in cry1Ac gene, five of them had positive results in RT-PCR reaction, confirming the expression of cry1Ac gene in transgenic lines. PCR results in T4 plants showed that 73 of 94 plants had cry1Ac gene and 81 of 94 samples included the nptII gene. In 10 samples cry1Ac gene separated from nptII gene. According ELISA results, in all samples tested, Cry1Ac protein was expressed in different concentrations. Bioassay tests showed that all pod borer larvae fed by leaves of transgenic plants, were dead, but all survived when the larvae were fed with leaves of non-transgenic plants. So, expected phenotype was observed successfully.

Key words: Bt, Chickpea, cry1Ac, Pod borer, Transgenic

* **Corresponding Author:** moshtaghi@um.ac.ir