ژنتیک نوین
دوره نهم، شماره ۱، بهار ۱۳۹۳
صفحه ۳۸- ۳۱

تجزیه مولکولی و زیست‌سنجی یونجه‌های تراریخته (*Medicago sativa* L.) حاوی ژن *cry3A* مقاوم به آفت سرخرطومی یونجه

Molecular analysis and bioassay in transgenic alfalfa hay containing pest resistance gene (*cry3A)*

مسعود توحیدفر*[۱]، سیده مریم افتخاری[۲]، امیرمحمد ناجی[۲]

۱- دانشیار، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران
۲- به ترتیب دانشجوی کارشناسی‌ارشد و استادیار، دانشگاه شاهد

Tohidfar M*[1], Eftekhari M[2], Naji AM[2]

1. Associate Professor, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Karaj
2. MSc Student and Assistant Professor, University of Shahed, Tehran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: gtohidfar@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ۹۱/۴/۶- تاریخ پذیرش: ۹۲/۷/۳۰)

چکیده

از جنبه‌های بسیار مهم در بررسی و تجزیه گیاهان تراریخته، پایداری و بیان ژن‌های منتقل شده می‌باشد. تحقیق حاضر به منظور بررسی یونجه تراریخته حاوی ژن *cry3A* (مقاوم به آفت سر خرطومی یونجه) که از باکتری خاکزی (*Bacillus turengensis* var. *tenebrionis*) جداسازی و بهینه کدونی شده بود انجام گرفت. در مرحله اول گیاهان تراریخته چین دوم نسل اول که در محیط باززایی MS بدون هورمون، رشد کرده و ریشه دادند به گلدان منتقل شدند. تجزیه‌های مولکولی، حضور *cry3A* را از طریق آزمایشات PCR و سادرن بلات تایید کرد. همچنین بیان ژن با استفاده از تجزیه الیزا تایید شد. آزمایش زیست سنجی با استفاده از لاروهای سرخرطومی بر روی گیاهان تراریخته یونجه نشان داد که درصد مرگ و میر لاروها در شاهد و تراریخته به‌ترتیب با ۳۰-۱۳ درصد و ۹۰-۳۳ درصد در سطح یک درصد معنی‌دار بود. مقایسه میانگین‌ها نشان داد که درصد خسارت برگی در سطح یک درصد در شاهد و تراریخته به‌ترتیب ۶۷ تا ۸۵ درصد و ۱۸ تا ۲۱ درصد معنی‌دار بود. میانگین وزن لاروهای زنده در گیاه شاهد ۰/۰۲ میلی‌گرم بوده که این میزان در گیاه تراریخته به ۰/۰۰۱ میلی‌گرم کاهش یافته است که در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود.

واژه‌های کلیدی

آفت سرخرطومی
تجزیه مولکولی
زیست سنجی
یونجه تراریخته
ژن *Cry3A*

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-01]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1393.9.1.5.4]

مقدمه

تا پایان سال ۲۰۱۱ سطح زیر کشت محصولات تراریخته به بیش از ۱۵۵ میلیون هکتار رسید که از این میان بیش از ۹۰ میلیون هکتار به پنبه، ذرت، سویا و یونجه تراریخته اختصاص دارد. آمریکا با تولید یونجه‌های تراریخته مقاوم به علفکش گلیفوسات[1] (RR)، که تنها یونجه دستورزی شده تجاری در دنیا می‌باشد بیشترین سطح زیر کشت را بخود اختصاص داده است (James 2011). سرخرطومی یونجه یکی از مهمترین آفات یونجه در ایران و جهان است که خسارت ناشی از آن در ایران ۳۳ درصد گزارش شده است (Ghanjani 2005) و هر سال برای مبارزه با آن حدود ۷۰۰ تا ۹۰۰ هزار لیتر سم مصرف می‌شود (Mierdrykvand and Ghariyazei 1999). استفاده از سموم شیمیایی برای کنترل آفات و بیماری‌های گیاهی اثرات سوء و جبران ناپذیری را به سلامت انسان و محیط زیست وارد می‌کند. تاکنون منبع مقاومتی برای آفت سرخرطومی در ژرم‌پلاسم‌های گیاهی پیدا نشده است (Mozaffari and Abbasi 2005). مهندسی ژنتیک می‌تواند به عنوان راهکاری برای کاهش مصرف سموم و مبارزه با سرخرطومی یونجه باشد. بدین منظور ژن *cry3A* پس از جدا سازی از باکتری *Bacillus turingiensis* و ترجیح کدونی تحت پروموتر CaMV35s و ترمیناتور NOS توسط آگروباکتریوم به گیاه یونجه منتقل شده است (Zare et al. 2009). این ژن پروتئین کریستالی تولید می‌کند که درمحیط قلیایی روده میانی حل شده پس از هضم توسط پروتئازهای موجود در قسمت میانی مجرای هاضمه حشره، به دو قطعه بریده می‌شود که یکی از آنها به گیرنده‌های گلیکوپروتئینی در راس ریزپرزهای سلول‌های مخاطی مجرای هاضمه لاروها می‌چسبد و از طریق سوراخ کردن غشا وارد فضای پلاسمایی سلول می‌شود و ایجاد جراحت و زخم کرده که این زخم موجب ورود یون‌ها و آب و نهایتا منجر به آماس و تخریب سلول می‌شود (Takkashi and Powell. 1993; Schnepf et al. 1998; Ranjekar et al. 2003). اولین مورد موفق انتقال ژن به یونجه، به سال ۱۹۸۶ باز می‌شود که به کمک آگروباکتریوم توانستند ژن *npt*II از طریق هیپوکوتیل وارد یونجه کنند (Shahin et al. 1986). در سال ۲۰۰۳ با استفاده از اگروباکتریوم، بیان ژن *gfp* در یونجه بررسی شد و مشخص شد که باززایی و تراریختی در یونجه وابسته به ژنوتیپ است (Bellucci et al. 2003). در سال ۲۰۰۵ شرکت مونسانتو اولین یونجه تراریخته مقاوم به علفکش گلیفوسات را تجاری سازی کرد (James 2010). در ایران تاکنون ژن‌های Bt زیادی به گیاهان منتقل شده‌اند که پنبه Bt یکی از آن‌هاست که تجزیه نسل‌های بعدی نیز پایدار بودن و بیان ژن را در این گیاه تایید می‌کند (Tohidfar et al. 2008). هدف از این تحقیق تجزیه مولکولی، بررسی بیان و آزمایش‌های زیست‌سنجی یونجه‌های تراریخته تولید شده در پژوهشکده بیوتکنولوزی کشاورزی ایران می‌باشد.

مواد و روش‌ها

محیط MS به منظور واکشت و نگهداری گیاهان تراریخته (قره یونجه – مراغه ۲۷ نسل اول چین دوم) در فیتوترون تهیه و گیاهان تراریخته ۲۰ تا ۳۰ روز یکبار واکشت شده و پس از انتقال به گلدان در شرایط ایزوله در گلخانه نگهداری شدند (شکل۱-الف). برگ‌های تازه و جوان لاین های تراریخته و شاهد منتقل شده به گلدان به منظور استخراج DNA ژنومی و زیست سنجی مورد استفاده قرار گرفت. شرایط دمایی گلخانه ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی بود و هرچند وقت یکبار با کود مایع Bio 20 (شرکت دارویی کشاورز- تهران) کوددهی شدند. همچنین علاوه بر سمپاشی چسب‌های زرد رنگ برای به دام انداختن حشرات و آفات موجود در گلخانه استفاده شد. استخراج DNA ژنومی از گیاهان تراریخته به روش CTAB (Doyle and Doyle 1990) انجام شد، کیفیت و کمیت DNA حاصل از طریق الکتروفورز ژل آگارز و همچنین بررسی میزان جذب در طول موج ۲۶۰ نانومتر توسط دستگاه نانودراپ انجام شد.

برای اثبات حضور ژن *cry3A*، از یک جفت آغازگر مستقیم (CRY3 F) 5′-TAGGATCCATGGCTGCCGACAAC-3′ و آغازگر معکوس با توالی (CRY3 R) 5′- ATGTCGACTTATGGAGGGTTCACTG -3′ برای تکثیر ژن انتقال‌یافته به گیاه استفاده شد.

[1] Roundup Ready

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-01]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1393.9.1.5.4]

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر (شامل PCR Buffer 1X، $MgCl_2$ 2.5 mM، dNTP 0.2 mM، Primer 10 pM، DNA الگو۳۰ نانوگرم، آنزیم یک واحد) طبق برنامه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه واسرشت شد و در ۳۵ چرخه با دماهای (۹۴ درجه سانتی‌گراد یک دقیقه، ۶۲ درجه سانتی‌گراد یک دقیقه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد یک دقیقه) تکثیر شد و در ۷۲ درجه سانتی‌گراد ۷ دقیقه بسط نهایی در دستگاه ترموسایکلر Bio-Rad مدل ALS 1296 انجام شد. سپس محصول PCR از طریق الکتروفورز ژل آگارز یک درصد تفکیک شد و در دستگاه gel doc (syngene) عکس برداری شد و حضور یک باند ۱۸۱۸ جفت بازی مورد بررسی قرار گرفت.

به منظور انجام سادرن بلات DNA ژنومی استخراج شده با آنزیم *Hind*III در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در تمام طول شب مورد هضم آنزیمی قرار گرفته سپس روی ژل آگارز ۰/۸ درصد الکتروفورز شد و بر اساس روش Sambrook and Russell (2001) با استفاده از کیت Dig DNA labeling and detection (شرکت Roche) طبق دستورالعمل شرکت عمل هیبریداسیون انجام شد. تهیه کاوشگر بروش آغازگرهای تصادفی از روی قطعه ژن *cry3A* طبق پروتکل Dig DNA labeling and detection (شرکت Roche) انجام شد. دمای هیبریداسیون پروپ ۴۳ درجه سانتی‌گراد و دمای شستشو ۶۰ درجه سانتی‌گراد در نظر گرفته شد. برای بررسی کیفی بیان ژن و تشخیص تولید اندوتوکسین Cry3A در گیاهان تراریخته از کیت الیزا patho screen kit for Bt-Cry3A endotoxin in plant طبق دستورالعمل شرکت Agdia (آمریکا) به (شماره کاتالوگ: PAS05900) استفاده شد. ابتدا صد میلی‌گرم از برگ‌های تازه گیاه با بافر استخراج در بوته چینی با هاون سابیده شد و سپس درون ویال‌های ۱/۵ میلی‌لیتر ریخته شد و به مدت دو دقیقه در دور g ×۱۰۰۰۰ سانتریفوژ شد سپس بقیه مراحل طبق پروتکل کیت الیزا انجام شد.

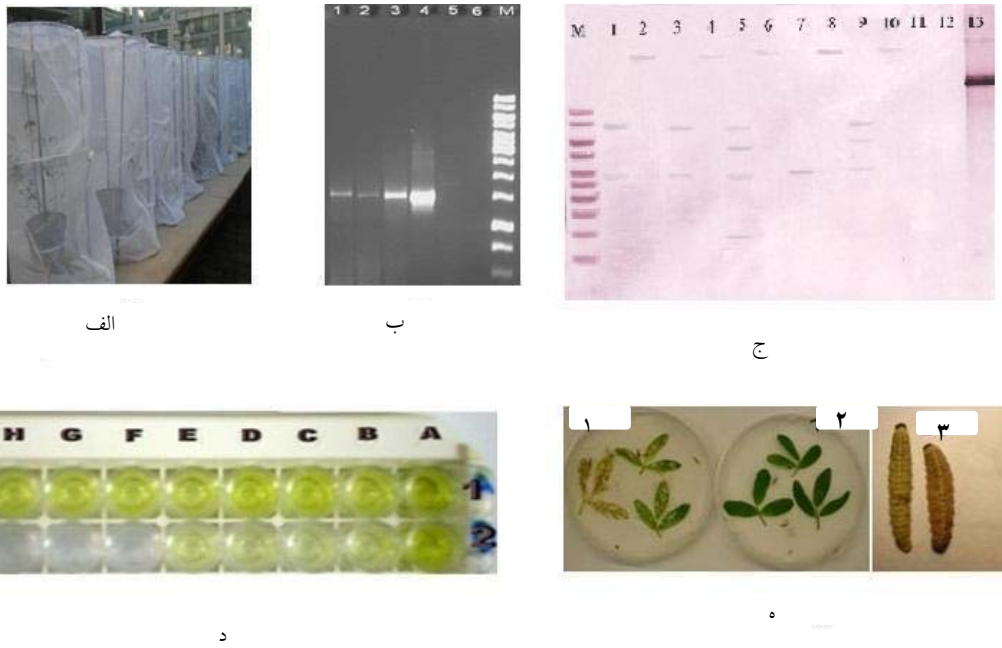
برای بررسی مقاومت، لاروهای سرخرطومی از مزارع تحقیقاتی موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر به کمک تور حشره‌گیری جمع‌آوری شدند. سپس لاروهای سن اول و دوم (با رنگ متمایل به زرد) جدا شده و به مدت ۲۴ ساعت در تاریکی در اتاقک رشد نگهداری شدند تا گرسنه شوند (Chandra and Pandy 2008). آزمایش زیست‌سنجی در قالب طرح کاملا تصادفی با شش تکرار برای هر لاین انجام گرفت و آزمایش دو بار تکرار شد. سه عدد برگ سه برگچه‌ایی در ظرف پتری با قطر ۶ سانتی‌متر بر روی کاغذ صافی استریل مرطوب قرار داده شد و پنج لارو سن اول و دوم روی برگ‌های درون هر پتری گذاشته شد و با پارافیلم بسته شدند. پتری‌ها در اتاقک رشد با شرایط دمایی ۲۲ ±۲ ºC و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند. تعداد لاروهای مرده، وزن لاروهای زنده و درصد خسارت (درصد برگ خورده شده) ۳ و ۵ روز پس از آلودگی (Day After Infection =DAI) ثبت شد.

نتایج و بحث

با انجام تجزیه PCR، همه گیاهان تراریخته نسل اول چین دوم مورد آزمون باندی همانند سازه نوترکیب pBI-CRY3A (به عنوان شاهد مثبت) یک قطعه ۱۸۱۸ جفت بازی اختصاصی ژن *cry3A* را نشان دادند ولی در گیاه غیر تراریخته که به عنوان شاهد منفی استفاده شد هیچ قطعه‌ای در PCR تکثیر نشد، همچنین آب نیز (شاهد منفی) هیچ باندی را نشان نداد که نشان‌دهنده صحت آزمون PCR می‌باشد (شکل۱- الف و ب). نتایج PCR تلفیق حداقل یک نسخه از ژن *cry3A* در گیاهان تراریخته را نشان داد. هر ۱۰ لاین تراریخته موجود در گلخانه مورد آزمون PCR قرار گرفتند و هر۱۰ لاین یک باند اختصاصی ۱۸۱۸ جفت بازی همانند باند پلاسمید به عنوان شاهد مثبت را نشان دادند.

شکل۱- ج آزمون دورگه‌سازی DNA را نشان می‌دهد. مطابق انتظار کاوشگر اختصاصی ژن *cry3A* با DNA گیاه غیرتراریخته (شاهد منفی) دورگ نشده است (ستون ۱۱ و۱۲ شکل۱). ستون ۱ تا ۱۰ گیاهان تراریخته می‌باشند، همانطور که در شکل۱-ج مشاهده می‌شود هر لاین تراریخته نوارهایی با طول متفاوت برای DNA برش داده شده با آنزیم برشی *Hind*III نشان داده که مشخص می‌شود ژن *cry3A* در جایگاه‌های مختلفی از ژنوم تلفیق شده است به‌طوری‌که در DNA برشی لاین تراریخته ستون ۴و۵ نوار با طول متفاوت مشاهده می‌شود که نشان می‌دهد ژن موردنظر در جایگاه مختلف ژنوم تلفیق شده است. DNA هضم

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-01]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1393.9.1.5.4]



الف ب ج د ه

شکل ۱- مراحل تجزیه مولکولی و زیست‌سنجی یونجه‌های تراریخته مقاوم به سرخرطومی. الف) گیاهان یونجه تراریخته احتمالی منتقل شده به گلدان به صورت ایزوله؛ ب) آزمون PCR) شماره ۱ تا ۳ گیاهان تراریخته؛ شماره ۴ شاهد مثبت (پلاسمید)؛ شماره ۵ گیاه شاهد (کنترل منفی)؛ شماره ۶ آب. M) 1 Kb ladder؛ ج) آزمون سادرن بلات) شماره ۱،۳،۵،۷،۹ DNA یونجه‌های تراریخته برش با آنزیم *Hind*III ؛ شماره‌های ۲،۴،۶،۸،۱۰ یونجه های تراریخته هضم نشده؛ شماره ۱۱ یونجه غیرتراریخته هضم شده به عنوان کنترل منفی و شماره ۱۲ یونجه غیرتراریخته هضم نشده و شماره ۱۳ پلاسمید به عنوان شاهد مثبت و M مارکر 1Kb. د) آزمون الیزایونجه‌های تراریخته با ژن *cry3A*. A_1 و A_2 به ترتیب کنترل مثبت با غلظت ۲۰ و ۱۰ نانو گرم پروتئین Cry3A در میلی‌لیتر، B_1 تا H_1 گیاهان تراریخته؛ B_2 تا E_2گیاهان تراریخته، F_2 تا H_2 به ترتیب آب، گیاه شاهد غیر تراریخته، بافر استخراج؛ ه) تجزیه زیست سنجی با استفاده از لارو سرخرطومی. ۱) گیاه تراریخته؛ ۲) گیاه شاهد؛ ۳) لارو تغذیه کرده از گیاه تراریخته؛ ۴) لارو تغذیه کرده ازگیاه شاهد.

شده لاین تراریخته ستون ۱ و ۳ هر کدام دو باند با طول متفاوت نشان می‌دهد که نشان‌دهنده تلفیق ژن در دو جایگاه مختلف از ژنوم گیاه است. در لاین تراریخته ستون ۷ یک باند مشاهده می‌شود که نشان‌دهنده وجود یک جایگاه تلفیق ژنوم در این لاین می‌باشد و در لاین تراریخته ستون ۹ (شکل۱- ج) سه باند با طول متفاوت دیده می‌شود که مشخص می‌شود ژن در سه جایگاه مختلف در ژنوم تلفیق شده است.

به منظور ارزیابی کیفی بیان ژن *cry3A* در گیاهان تراریخته، آزمون الیزا با استفاده از عصاره برگ این گیاهان انجام گرفت (شکل ۱- د). پروتئین Cry3A ارائه شده همراه کیت در دو غلظت ۱۰ و ۲۰ نانوگرم در میلی لیتر به عنوان کنترل مثبت و گیاه غیر تراریخته و بافر استخراج MEB و آب به عنوان کنترل منفی در کنار گیاهان تراریخته مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج آزمون الیزا نشان می‌دهد هر دو کنترل مثبت مورد استفاده (۱۰ و ۲۰ نانوگرم پروتئین Cry3A در میلی‌لیتر) با استفاده از کیت تشخیص داده شدند. سیگنال‌های مثبت برای هر ۱۱ لاین تراریخته مشاهده شد ولی شدت این سیگنال‌ها در آنها متفاوت بود. هیچ یک از چاهک‌های مربوط به کنترل منفی (بافر، آب و گیاه شاهد) سیگنال مثبتی ایجاد نکردند. تغییر رنگ (ظهور سیگنال) در چاهک‌های کنترل مثبت و گیاهان تراریخته ۵۰ دقیقه بعد از شروع واکنش اتفاق افتاد. برای اندازه‌گیری پروتئین بیان شده از دستگاه الیزا ریدر در جذب نوری ۴۰۵ نانومتر استفاده شد. همانطور که در (شکل۱- د) مشاهده می‌شود همه لاین های تراریخته باعث تغییر رنگ در چاهک‌ها شده‌اند ولی به دلیل غلظت متفاوت پروتئین در هر گیاه تراریخته برخی از چاهک‌ها تغییر رنگ بیشتری یافته و برخی تغییر رنگ کمتری پیدا کرده‌اند. بر اساس جدول ۱ جذب نوری و غلظت

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-01]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1393.9.1.5.4]

جدول۱- نتایج آزمون الیزا با دستگاه الیزا ریدر در نمونه‌های یونجه‌های تراریخته و غیر تراریخته

نمونه	سیگنال	جذب نوری(OD 405 nm)	غلظت پروتئین
C^{+}_{1}	+	۳/۶۳۸	ng۲۰
C^{+}_{2}	+	۱/۰۸۳	ng ۱۰
شاهد	-	۰/۴۴۹	ng>۱۰
بافر استخراج	-	۰/۲۴۴	ng>۱۰
آب	-	۰/۳۰۹	ng>۱۰
تراریخته ۱	+	۳/۵۲۸	ng<۲۰
تراریخته ۲	+	۲/۴۹۴	ng<۱۰
تراریخته ۳	+	۲/۶۶۶	ng<۱۰
تراریخته ۴	+	۳/۹۶۹	ng<۲۰
تراریخته ۵	+	۱/۸۶۷	ng<۱۰
تراریخته ۶	+	۲/۶۶	ng<۱۰
تراریخته ۷	+	۲/۸۹	ng<۱۰
تراریخته ۸	+	۳/۲۳۲	ng<۲۰
تراریخته ۹	+	۲/۰۱	ng<۱۰
تراریخته ۱۰	+	۲/۷۸	ng<۱۰
تراریخته ۱۱	+	۲/۰۵۱	ng<۱۰

(-) عدم تغییر رنگ چاهک (عدم ظهور سیگنال)؛ (+) تغییر رنگ چاهک (ظهور سیگنال)

تقریبی پروتئین‌های هر گیاه قابل مشاهده است. بر اساس این جدول در ۹ لاین تراریخته غلظت پروتئین بین ۱۰ تا ۲۰ نانوگرم در میلی‌لیتر عصاره برگ و دو لاین بیشتر از ۲۰ نانوگرم بوده است. آزمون زیست سنجی یونجه‌های تراریخته با استفاده از لاروهای سرخرطومی سن ۱و ۲ انجام شد. جدول شماره ۲ درصد مرگ و میر لاروها و میزان خسارت به گیاه را نشان می‌دهد. با توجه به درصد مرگ و میر لاروها مشاهده می‌شود میانگین درصد مرگ لاروهایی که از گیاه یونجه شاهد تغذیه کردند نسبت به میانگین درصد مرگ لاروهایی که از گیاه تراریخته تغذیه کردند در سطح احتمال یک درصد معنی دار بوده و این میزان کمتر از گیاهان تراریخته است. لاین تراریخته ۴ در روز سوم با ۵۳ درصد و تراریخته ۸ با ۹۰ درصد در روز پنجم بالاترین میزان مرگ و میر لاروها رادارا می‌باشند. در بین لاین‌های تراریخته در روز سوم لاین‌های ۹ و ۵ با هم و لاین‌های ۶ و ۳ با هم از نظر میزان مرگ ومیر لارو کاملا مشابه بوده و با لاین‌های شاهد اختلاف کمتری دارند. یعنی درصد مرگ لاروها در لاین‌های ۹ و ۵ و۳ و۶ در روز سوم کمتر از سایر گیاهان بوده و خسارت بیشتری به برگ وارد شده که این امر می‌تواند به دلیل کم بودن میزان فعالیت و تولید اندوتوکسین در این لاین‌ها باشد (Girijashankar et al. 2005) ولی در روز پنجم مانند سایر گیاهان تراریخته اختلاف معنی‌داری با گیاهان شاهد در سطح احتمال یک درصد داشته و بالاترین میزان مرگ و میر را نشان داده‌اند. میزان خسارت وارده به برگ گیاهان تراریخته به طوری که در جدول۱ مشاهده می‌شود در گیاه شاهد ۸۰ تا ۸۵ درصد بوده است که بیشترین خسارت در گیاهان شاهد دیده می‌شود در حالی که میزان خسارت در گیاهان تراریخته به ۴ تا ۶ درصد کاهش یافت. با توجه به شکل ۱- ه میزان خسارت در گیاه تراریخته بسیار کمتر از میزان خسارت در گیاه شاهد می‌باشد. در بین لاین‌های تراریخته نیز از نظر میزان خسارت به برگ تفاوت وجود دارد، برخی لاین‌ها مانند ۵ و ۹ و ۶ نسبت به سایر لاین‌های تراریخته خسارت بیشتری دیده‌اند

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-01]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1393.9.1.5.4]

جدول۲- مقایسه میانگین صفات اندازه‌گیری شده در زیست سنجی لاین‌های تراریخت و شاهد یونجه با لارو آفت سرخرطومی یونجه

لاین	درصد مرگ و میر		درصد خسارت برگی		وزن لاروهای زنده	
	۳DAI*	۵DAI**	۳DAI	۵DAI	۳DAI	۵DAI
شاهد ۱	۲۰/۰۰ bc	۲۶/۶۶ b	۶۹/۱۷ a	۸۴/۱۷ a	۰/۰۲۱۳ f	۰/۰۲۱۸ c
شاهد ۲	۱۳/۰۰ c	۲۳/۳۳ b	۷۱/۶۷ a	۸۵/۰۰ a	۰/۰۲۲۵ f	۰/۰۲۲۶ c
شاهد ۳	۲۰/۰۰ bc	۳۰/۰۰ b	۵۹/۱۷ ab	۷۷/۷۵ a	۰/۰۱۵۰ e	۰/۰۱۶۱ b
تراریخته ۱	۵۰/۰۰ a	۸۳/۰۰ a	۱۳/۳۳ cd	۱۵/۴۲ cd	۰/۰۰۴۱ bcd	۰/۰۰۱۰ a
تراریخته ۲	۴۶/۶۶ a	۸۰/۰۰ a	۱۶/۶۷ cd	۱۸/۵۸ cd	۰/۰۰۳۵ abcd	۰/۰۰۱۰ a
تراریخته ۳	۴۳/۳۳ ab	۸۰/۰۰ a	۱۱/۶۷ cd	۱۳/۷۵ cd	۰/۰۰۴۵ cd	۰/۰۰۱۱ a
تراریخته ۴	۵۳/۳۳ a	۸۶/۶۶ a	۰۵/۳۳ d	۰۶/۴۱ d	۰/۰۰۱۵ a	۰/۰۰۰۵۶ a
تراریخته ۵	۳۳/۳۳ abc	۷۰/۰۰ a	۴۵/۰۰ b	۵۰/۲۵ b	۰/۰۰۵۶ d	۰/۰۰۱۹ a
تراریخته ۶	۴۳/۳۳ ab	۸۰/۰۰ a	۲۵/۸۳ c	۲۹/۵۰ c	۰/۰۰۴۶ cd	۰/۰۰۱۹ a
تراریخته ۷	۴۸/۰۰ a	۸۶/۶۶ a	۱۴/۳۳ cd	۱۷/۵۸ cd	۰/۰۰۲۱ ab	۰/۰۰۰۸۸ a
تراریخته ۸	۵۰/۰۰ a	۹۰/۰۰ a	۱۴/۰۰ cd	۱۶/۳۳ cd	۰/۰۰۲۰ ab	۰/۰۰۰۶۸ a
تراریخته ۹	۳۳/۳۳ abc	۷۶/۶۶ a	۲۲/۵۰ cd	۲۶/۲۵ c	۰/۰۰۴۱ bcd	۰/۰۰۱۸ a
تراریخته ۱۰	۴۸/۶۶ a	۸۶/۶۶ a	۱۵/۰۰ cd	۱۷/۴۲ cd	۰/۰۰۲۷ abc	۰/۰۰۱۳ a

در هر ستون میانگین‌های با حروف غیر مشترک دارای اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد آزمون چند دامنه‌ای دانکن هستند. * و ** به ترتیب ۳ روز و ۵ روز پس از آلودگی.

که می‌تواند ناشی از تولید کم اندوتوکسین یا شرایط سنی گیاه و آفت باشد (Girijashankar et al. 2005) ولی تمام گیاهان تراریخته اختلاف کاملا معنی‌داری با گیاه شاهد در سطح احتمال یک درصد نشان می‌دهند. میانگین وزن لاروهای زنده که از گیاه شاهد تغذیه کرده بودند به طور معنی‌داری با وزن لاروهایی که از گیاهان تراریخته تغذیه کرده بودند تفاوت دارد. به‌طوری که میانگین وزن لاروهایی که از گیاه شاهد تغذیه کردند در روز سوم ۰/۰۱۹۶ میلی‌گرم و در روز پنجم ۰/۰۲ میلی‌گرم بوده‌است در حالی که وزن لاروهایی که از گیاهان تراریخته تغذیه کردند در روز سوم ۰/۰۰۳ و در روز پنجم ۰/۰۰۱ میلی‌گرم بوده که نشان‌دهنده کاهش وزن از روز سوم تا پنجم می‌باشد که به دلیل مرگ لاروها و عدم توانایی تغذیه از گیاه تراریخته می‌باشد، در حالی که در گیاه شاهد وزن لارو از روز سوم تا پنجم افزایش یافته که نشان‌دهنده تغذیه لارو از گیاه و عدم مرگ و میر لاروها و نداشتن مقاومت نسبت به آفت می‌باشد. همانطور که در (شکل۱- ه) مشاهده می‌شود اندازه لاروهایی که از گیاهان تراریخته تغذیه کردند بسیار کوچکتر از لاروهایی هستند که از گیاه شاهد تغذیه کردند. این نتایج بدست آمده نشان می‌دهد که انتقال ژن به خوبی صورت گرفته و در مکان مناسبی قرار گرفته و عمل رونویسی و ترجمه و در نهایت تولید پروتئین در گیاه انجام می‌شود و صفت مقاومت ایجاد شده در نسل اول پایدار بوده و ژن دچار خاموشی و عدم فعالیت نگشته است و مقدار پروتئین تولید شده در گیاه به میزان کافی بوده و روی آفت موثر است.

در این آزمایش مشخص شد که یونجه تراریخته تولید شده نسبت به آفت مقاوم است. نتایج به‌دست آمده درهر یک از آزمون‌های مولکولی انجام شده روی گیاهان تراریخته نشان می‌دهد که ژن *cry3A* منتقل شده به گیاه بیان می‌شود و تولید پروتین می‌کند. تایید اولیه با استفاده از آزمون PCR و آغازگرهای اختصاصی ژن *cry3A* انجام شد. همانطور که در شکل۱- الف مشاهده می‌شود گیاهان تراریخته حاوی ژن *cry3A* می‌باشند که نشان‌دهنده تلفیق ژن در ژنوم گیاه است.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-01]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1393.9.1.5.4]

آزمون سادرن بلات بر روی گیاهان تراریخته نشان داد که ژن *cry3A* در جایگاه‌های مختلف ژنوم تلفیق شده است و تعداد جایگاه‌ها در لاین های مختلف باهم فرق دارد.

آزمون الیزا انجام شده و نتایج حاصل از آن نشان می‌دهد که ژن *cry3A* تلفیق شده در ژنوم لاین‌های تراریخته قابلیت فعالیت رونویسی داشته و mRNA حاصل ترجمه شده و پروتئین Cry3A تولید می‌شود. برای اندازه‌گیری میزان پروتئین Cry3A بیان شده در گیاهان تراریخته جذب نوری چاهک‌ها در ۴۰۵ نانومتر توسط دستگاه الیزا ریدر اندازه‌گیری شد، وغلظت پروتئین بیان شده در لاین‌های مختلف متفاوت بوده است. الیزا یک آزمون مناسب برای شناسایی پروتئین‌های خاص در موجودات زنده است و پرمصرف ترین روش سرولوژیکی برای تشخیص و شناسایی پاتوژن‌های گیاهی مانند باکتری و ویروس بوده و برای تشخیص و اندازه‌گیری مقدار پروتئین‌های بیان شده در گیاهان تراریخته استفاده شده است. در ارزیابی‌های اولیه با سادرن بلات مشخص شد که تعداد ۲ تا ۴ کپی از ژن هدف در ژنوم تلفیق شده است. تراریخته‌های با دوکپی و یک کپی (طبق شکل۱-ج چاهک‌های شماره ۱ و ۳ و۷) مقاومت بیشتری نسبت به به بقیه (۳ و ۴ کپی) از خود نشان دادند که یافته‌های قبلی را تایید می‌کند (Srivastava and Ow 2001; Bhat and Srinivasan 2002). سطح بیان ژن نیز در گیاهان متغیر بود بطوری که گیاهان تراریخته با دوکپی (چاهک ۳ و۴) و یک کپی (چاهک ۷) بیان بیشتری از خود در مقایسه با کپی‌های بیشتر نشان دادند. این ممکن است بخاطر پدیده اثر موقعیتی است که نقش مهمی در بیان ژن دارد (Meyer 1985). الیزا علاوه بر داده کیفی (تغییر رنگ)، داده‌های کمی هم برای بیان ژن در اختیار محقق می‌گذارد (Li et al. 2001; Dutton et al. 2005).

در انتقال ژن تحت کنترل راه‌انداز CaMV-35s و زیر واحد کوچک روبیسکو نخودفرنگی به گیاه یونجه گزارش شده است که همه گیاهان تراریخته‌ای که از طریق لکه‌گذاری وسترن بررسی شده‌اند میزان قابل تشخیصی از بیان پروتئین مورد نظر را داشتند (Ziauddin et al. 2004). از آزمون الیزا برای تشخیص پپتیدهای لیتیک کوچک در انگور تراریخته استفاده شده و نشان داده که این روش امکان تشخیص پروتئین مورد نظر در غلظت‌های پایینی مانند ۰/۱ میکرومولار را فراهم می‌کند (Li et al. 2001) . تاکنون گزارشی در خصوص یونجه های Bt ارائه نشده است، اما یونجه-های تراریخته مقاوم به آفات از طریق پروتئین‌های بازدارنده تولید شده است (Chandra and Pandey 2008) که سوالات زیادی را در خصوص اختصاصی بودن اینگونه پروتئین‌ها و اثرات آنها بر موجودات غیر هدف ایجاد کرده است (Schluter et al. 2010). تجزیه واریانس و مقایسه میانگین براساس آزمون دانکن برای صفات اندازه‌گیری شده در آزمون زیست‌سنجی گیاهان یونجه تراریخته نشان می‌دهد که اختلاف معنی‌داری بین لاین‌های آزمایش شده از نظر درصد خسارت آفت به برگ و درصد مرگ میر لاروها وجود دارد، که ممکن است به علت تفاوت در مقدار بیان پروتئین Cry3A باشد که این تفاوت بیان می‌تواند ناشی از تفاوت در تعداد نسخه‌های ژنی، اپیستازی، متیله شدن، شرایط فیزیولوژیکی لاروها و گیاهان و تفاوت سن لاروها باشد (Girijashankar et al. 2005). این تجزیه‌های مولکولی حضور ژن و بیان آن و تولید پروتئین Cry3A، و افزایش مقاومت گیاهان تراریخته در برابر آفت را تایید کرد.

منابع

Bellucciet M, De Marchis F, Mannucci R, Arcioni M (2003) Jellyfish green fluorescent protein as a useful reporterfor transient expression and stable transformation in *Medicago sativa* L. Plant Cell Reports 22: 328-337

Bhat SR, Srinivasan S (2002) Molecular and genetic analyses of transgenic plants considerations and approach. Plant Science 163: 673-681

Chandra A, Pandy K (2008) Effect of proteinase inhibitors on Ikdian alfalfa weevil (*HyperaposticaGyll*) growth and development. Acta Physiologiae Planetarium 30: 501-505

Doyle J, Doyle L (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12:13-15.

Dutton A, Romeis J, Bigler F (2005) Effect of Bt maize expressing *cry1Ab* and Bt spray on *spoodoptera littoralis*. Enology Experimental Applied 114:161-169.

Gahanjani M (2005) Crop pests. Ali Sina University Press, Hamedan, Iran. (In Farsi).

Girijashankar V, Sharma HC, Sharma KK, Swathisree V, Prasad LS, Bhat BV, Royer M, Narasu ML, Altosaar I, Seetharma N (2005) Development of transgenic sorghum for insect resistance agains the spotted stem borer *(chilopartellus)*. Plant Cell Reports 24:513-522.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-01]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1393.9.1.5.4]

James C (2010) Global status of commercialized biotech/ GM crops. International service for the acquisition of agri-biotech Applications Press, USA No: 42.
James C (2011) Global status of commercialized biotech/ GM crops. ISAAA Press, USA No: 43.
Li Z, Jayasankar S, Gray DJ (2001) An improved enzyme-linked immunoabsorbent assay protocol for the detection of small lytic peptides in transgenic grapevines *(Vitis vinifera)*. Plant Molecular Biology Reporter 19:341-351.
Meyer P (1985) Understanding and controlling transgene expression.Trends in Biotechnology 13: 123-134
Mierdrykvand M, Ghariyazei B (1999) Study of agricultural biotechnology potential in Iran. Research Final Report. ABRII, Iran. (In Farsi). 332-337
Mozaffari G, Abbasi M (2005). Germplasme of forage plant in Iran gene bank. In: Proceeding of 1th forage plant Congress. Iran. Agricultural College of Karaj. (In Farsi).
Ranjekar P K, Patankar V, Gupta R, Bhatnagar J, Benture H, Kumar PA (2003) Genetic engineering of crop plants for insect resistance. Current Science 84: 321-329.
Sambrook J, Russell DW (2001). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, USA. 1349 pp.
Schluter U, Benchabane M, Lie AM, Kiggundu A, Vorster J, Goulet MC, Cloutier C, Michaud D (2010) Recombinant protease inhibitors for herbivore pest control: a multitrophic perspective. Journal of Experimental Botany 61:4163-4186
Schnepf E, Crickmore N, Van Rie J, Lereclus D, Baum J, Ffitelson J, Zeigler DR, Dean DH (1998). *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. Microbiology Molecular Biology Review 62:775-806.
Shahin EA, Spielman A. Sukhapinda K. Simpson RB Yashar M (1986). Transformation of cultivated alfalfa using disarmed *Agrobacterium tumefaciens*. Crop Science 26: 1235-1239.
Srivastava V, Ow DW (2001) Single-copy primary transformants of maize obtained through the co-introduction of a recombinase expressing construct. Plant Molecular Biology 46:561-566
Takkashi Y, Powell GK (1993) *Bacillus thuringiensis* crystal proteins:recent advance in understanding its insecticidal activity. Marcel Dekker, Inc USA 124-145.
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.
Zare N, Tohidfar M, Vlizadhe M, Habashi A (2009) *Agrobacterium* -Mediated transformation of alfalfa for resistant *to Hepera postic*a. In: Proceeding of 6th biotechnology congress. Iran,Tehran, (In Farsi).
Ziauddin, AR, Lee H, Lo R, Shewen P (2004) Transformation of alfalfa with a bacterial fusion gene, *Mannheimia ahaemolytica* A1 leukotoxin50-gfp: Response with *Agrobacterium tumefaciens strains* LBA4404 and C58. Plant Cell Tissue and Organ Culture 79: 271-278

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-01]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1393.9.1.5.4]