مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
ISSN 2588-5073 چاپی
ISSN 2588-5081 الکترونیکی
دوره ۸، شماره ۱، بهار و تابستان ۹۸
صفحه ۹-۱

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 8, Number 1

# انتقال ژن *cry1a105* به گوجه‌فرنگی به‌منظور افزایش مقاومت به آفت *Heliothis sp*

# Transformation of *cry1a105* gene to tomato in order to increase resistance to *Heliothis sp.*

رسول گلزاری[۱]، بهرام ملکی زنجانی[۲]، مسعود توحید فر[۳*]
Rasoul Golzari [1], Bahram Maleki Zanjani [2], Masoud Tohidfar [3*]

۱- دانشجوی دکترای ژنتیک مولکولی دانشگاه زنجان ۲- گروه زراعت و اصلاح، دانشگاه زنجان
۳- گروه بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده علوم و فنآوری زیستی دانشگاه شهید بهشتی تهران، ایران

1-Ph.D. student Molecular genetics, University of Zanjan, Iran
2- Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, University of Zanjan
3- Department of Plant Biotechnology, Faculty of Science and Biotechnology, Shahid Beheshti University, G.C., Tehran, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: m_tohidfar@sbu.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۷/۱۲/۱۳ - تاریخ پذیرش: ۹۸/۴/۴)

## چکیده

**گوجه‌فرنگی (*Solanum lycopersicum*) یکی از مهم‌ترین سبزی‌ها در جهان است که طیف وسیعی از پاتوژن ها و آفات گیاهی به این گیاه حمله می‌کنند. یکی از مهم‌ترین این آفات، لارو هلیوتیس است که عمدتاً به میوه و برگ خسارت زده و باعث کاهش محصول می‌شود. در این پژوهش ترکیب سازه ژنی *cry1a105* تحت راه‌انداز دائمی CaMV 35S و خاتمه‌دهنده NOS در ناقل pBI121 همسانه‌سازی شده و به اگروباکتریوم تومفاسینس سویه LBA4404 منتقل و سپس به گیاه گوجه‌فرنگی انتقال داده شد. ریز نمونه‌های برگ لپه‌ای از گیاه گوجه‌فرنگی برای تراریزش مورد استفاده قرار گرفتند. گیاهان تراریخته احتمالی بر روی محیط MS همراه با ویتامین B5 حاوی ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و نیز ۵۰ میلی‌گرم در لیتر آنتی‌بیوتیک کانامایسین انتخاب شدند. تجزیه مولکولی گیاهان تراریخته ($T_0$) با استفاده از PCR وجود ژن *cry1a105* را در گیاهان تراریخته تائید کرد. از گیاهانی که PCR مثبت نشان دادند بذرگیری به عمل آمد، گیاهان مورد نظر تا نسل $T_2$ کشت شدند و در این نسل وجود ژن انتقال‌یافته در آن‌ها با آنالیز مولکولی (RT-PCR) مورد بررسی قرار گرفت. گیاهانی که وجود ژن موردنظر در آن‌ها تائید شده بود با آزمون زیستی مورد بررسی قرار گرفتند. آزمون زیست‌سنجی مقاومت رقم گوجه‌فرنگی کارون را (۷۰٪) به آفت لارو هلیوتیس در مقایسه با شاهد نشان داد.**

**واژه‌های کلیدی**

گوجه‌فرنگی،
*cry1a105*،
اگروباکتریوم تومفاسینس،
سویه LBA4404،
ناقل pBI121

[ Downloaded from gebsj.ir on 2026-01-02 ]
[ DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.1.4.0 ]

## مقدمه

گوجه‌فرنگی (*Solanum lycopersicum* L) یکی از مهم‌ترین سبزی‌ها بعد از سیب‌زمینی در جهان است که میزان تولید آن در سال ۲۰۱۱ حدود ۱۵۹/۳۴۷ میلیون تن توسط فائو تخمین زده شده است (Lugasi et al. 2003). سطح زیر کشت گوجه‌فرنگی کشور در سال ۲۰۰۸، ۱۴۰ هزار هکتار بوده که از این سطح حدود ۵ میلیون تن محصول برداشت شده است. گوجه‌فرنگی به خاطر رنگ و مزه‌اش در رژیم غذایی اهمیت ویژه‌ای دارد. این گیاه یکی از مهم‌ترین منابع ویتامین، مواد معدنی مثل پتاسیم و کربوکسیلیک اسیدها شامل اسکوربیک، مالیک، سیتریک، فورمیک و اکسالیک است (Hernandez et al. 2007). گوجه‌فرنگی غنی از ترکیبات آنتی‌اکسیدانی و ترکیبات کارتنوئیدی به‌ویژه لیکوپن و ترکیبات فنولیک است (Pinela et al. 2012). گوجه‌فرنگی به‌عنوان یک گیاه مدل در مطالعات ژنومیک استفاده می‌شود (Khaliluev et al. 2011). نتایج مطالعات گوناگون لیکوپن موجود در گوجه‌فرنگی را برای جلوگیری از حملات قلبی و از بین بردن تومورها پیشنهاد می‌کنند (Levy et al. 2007). طیف وسیعی از پاتوژن ها و آفات گیاهی به گوجه‌فرنگی حمله می‌کنند به‌ویژه آفات *Heliothis armigera* که عمدتاً به میوه خسارت می‌زند درحالی‌که آفات *Spodoptera litura* به برگ‌ها خسارت می‌زنند و باعث کاهش محصول می‌شوند. میزان خسارت لارو هلیوتیس در نیوزیلند در سال ۲۰۰۱، ۳۰ درصد، در جنوب هندوستان در سال ۱۹۷۵، ۴۰ تا ۵۰ درصد و در شمال هندوستان ۳۰ درصد و در اسپانیا در سال ۲۰۰۰، ۲۰ درصد گزارش‌شده است. (Shabani et al. 2011). برای مبارزه شیمیایی علیه لارو هلیوتیس از آفت‌کش‌های کلرپیریفوس و فن پروپاترین به مقدار ۲ تا ۲/۵ لیتر در هکتار استفاده می‌شود (Faal. 2011)؛ اما آفت‌کش‌ها باعث ایجاد بیماری‌های مختلف و در مواردی موجب مرگ انسان می‌شوند که این بیماری‌ها از طریق تماس مستقیم و غیرمستقیم انسان با آفت‌کش‌ها ایجاد می‌شوند (Tarannum et al. 2019). ممکن است توسعه مقاومت پایدار در لاین های گوجه‌فرنگی از طریق بیان ژن‌های ضد حشره Bt موفقیت‌آمیز باشد. به‌عنوان‌مثال در برخی گیاهان مانند پنبه، ذرت، سویا، برنج و سیب‌زمینی موفقیت‌آمیز بوده است (Tabashnik et al. 2011). پروتئین Bt یکی از ابزارهای قدرتمند برای مقاومت به آفات گیاهی است که روی دستگاه گوارش حشره اثر می‌گذارد ولی در بدن انسان تأثیر منفی ندارد (Bravo. 2011). در این پژوهش از ژن *cry1a105* به‌منظور افزایش مقاومت به آفت لارو هلیوتیس استفاده‌شده است.

## مواد و روش‌ها

پنج رقم گوجه‌فرنگی (TIV-VC-99C، TN-VC-1088، TIV-VC-993، TN-V2-1109، Karun) از بخش موسسه تحقیقات و اصلاح نهال و بذر کرج تهیه و به‌عنوان مواد گیاهی استفاده شد. به‌منظور بهینه‌سازی سیستم باززایی از ریزنمونه برگ لپه‌ای، آزمایش به‌صورت فاکتوریل با طرح کاملاً تصادفی با ۵ رقم در محیط کشت پایه MS با ترکیب‌های مختلف از هورمون‌های NAA (۰/۰۷، ۰/۱۵، ۳ میلی‌گرم در لیتر) و BAP (۱/۵، ۳ میلی‌گرم در لیتر) در ٤ تکرار انجام شد و نتایج حاصله با استفاده از نرم‌افزار SAS (Version ۹.۱) مورد تجزیه‌وتحلیل قرار گرفتند.

### ساخت سازه ژنی

در دو طرف ژن *cry1a105* سایت‌های برشی *Xba*I/*Sac*I و آغازگرهای (F-5' CTCTAGGTTGGAAGGATTG 3' و R-5' GAGCATCGGTATAGATAG 3') طراحی شد سپس پس از هضم توسط دو آنزیم، در وکتور pBI121 که با همین دو آنزیم هضم شده است کلون شد. در این حالت ژن تحت پروموتور دائمی CaMV 35S و خاتمه دهنده NOS قرار گرفت.

### تائید گیاهان تراریخته

برای تائید تراریختی از واکنش زنجیره‌ای پلی مراز استفاده شد. استخراج DNA از نمونه‌های گیاهی گوجه‌فرنگی با استفاده از روش CTAB (Murray et al. 1980) انجام شد. برای ژن *cry1a105* آغازگرهای (F-5' CTCTAGGTTGGAAGGATTG



[ Downloaded from gebsj.ir on 2026-01-02 ]
[ DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.1.4.0 ]

3' و R-5' GAGCATCGGTATAGATAG 3')؛ و مراحل PCR ژن *cry1a105* شامل واسرشته‌سازی اولیه به مدت ۵ دقیقه در ۹٤ درجه سانتی‌گراد، ۳۵ چرخه شامل واسرشته‌سازی در دمای ۹٤ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه، اتصال آغازگر در دمای ٦۰ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه، تکثیر در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه و به دنبال آن تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انجام گردید.

## مراحل RT-PCR

استخراج RNA: از برگ تازه گیاهان جهت استخراج استفاده شد. برگ‌های تازه گیاهان به‌طور جداگانه در داخل بوته چینی با کمک ازت مایع پودر گردید. به‌منظور استخراج RNA از کیت Trizol (شرکت Invitrogen) استفاده گردید و مراحل استخراج بر اساس دستورالعمل کیت انجام شد.

سنجش کمیت و کیفیت RNA های استخراج‌شده با استفاده از دستگاه بیوفتومتر ساخت کمپانی Eppendorf (آلمان) انجام شد. در این دستگاه میزان RNA برحسب نانوگرم بر میکرو لیتر محلول نشان داده می‌شود. همچنین از طریق نسبت طول‌موج ۲٦۰ به ۲۸۰ که توسط دستگاه دریافت می‌شود می‌توان به کیفیت RNA پی برد.

سنتز cDNA با استفاده از یک میکروگرم RNA و کیت سنتز cDNA شرکت پیشگام ( M-MLV Reverse Transcriptase RNase H) با پرایمرهای Oligo-dT انجام شد.

## آزمون زیست‌سنجی ارزیابی مقاومت

در ابتدا، توده های تخم هلیوتیس، از پروانه های بالغ موجود در مزارع جنوب ایران جمع آوری شده سپس تخم ها در دمای اتاق نگهداری، و ساعاتی قبل از تفریخ به دمای ٤ درجه سانتی گراد منتقل شدند. دوازده ساعت قبل از آلودگی تخم ها خارج و به دمای اتاق منتقل شدند، تا مورد استفاده قرار گیرند . اکثر آزمایشات زیست سنجی با لاروهای نسل اول انجام شده است. به منظور آزمایش زیست سنجی ابتدا برگ‌های انتخابی از هر یک از گیاهان تراریخته احتمالی (که حضور ژن Bt با PCR تأیید گردید) جدا و مورد استفاده قرار گرفتند. برگ‌های مورد نظر در یک پتری دیش حاوی کاغذ صافی مرطوب قرار داده شدند. در هر پتری که به نحو فوق آماده شد ٤ لارو تازه تفریخ شده قرار گرفت. درب پتری ها با استفاده از پارا فیلم مسدود شد. (سه تکرار برای هر گیاه در نظر گرفته می شود) . در انتها تعداد حشرات زنده و مرده ۳ تا ۷ روز پس از آلودگی مورد بررسی قرار گرفت (Tohidfar et al. 2008).

۱۰۰ × تعداد کل لاروهای قرار داده‌شده در پتری دیش/تعداد لاروهای مرده = نرخ مرگ‌ومیر

## نتایج و بحث

آنالیزهای مقایسه میانگین مربوط به باززایی نشان داد که در بین ارقام مورداستفاده، دو رقم TIV-VC-99C و Karun بیشترین میانگین باززایی را داشته و تفاوت معنی‌داری بین آن‌ها وجود نداشت (جدول ۱). رقم TIV-VC-993 که ازنظر میانگین باززایی در مقایسه با ارقام TIV-VC-99C و Karun در رتبه سوم قرار گرفت، با سایر ارقام تفاوت معنی‌داری داشت. دو رقم TN-VC-1088 و TN-V2-1109 کمترین میانگین باززایی را دارا بودند و از این نظر با یکدیگر تفاوت معنی‌داری نشان ندادند. بالاترین میزان باززایی مربوط به سطوح هورمونی ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر NAA در ارقام کارون، TN-V2-1109 و TN-VC-1088 بود. رقم TIV-VC-993 در سطوح ۳ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۷ میلی‌گرم در لیتر NAA و رقم TIV-VC-99C در سطوح ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۷ میلی‌گرم در لیتر NAA بالاترین میزان باززایی را نشان دادند. مراحل باززایی گیاه گوجه‌فرنگی و سازگاری به محیط بیرون در شکل ۱ نشان داده‌شده است.

### تعیین غلظت آستانه تأثیر کانامایسین

ازآنجایی که کارایی تولید گیاهان تراریخته وابسته به انتخاب دقیق سلول‌ها و بافت‌های تراریخته است، لازم است که آستانه تأثیر ژن انتخاب‌گر گیاهی مشخص شود. برای این منظور غلظت‌های



[ Downloaded from gebsj.ir on 2026-01-02 ]
[ DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.1.4.0 ]

مختلف کانامایسین بررسی شد. ریز نمونه‌های برگ لپه‌ای غیرترایخته در هیچ‌کدام از محیط کشت‌های باززایی حاوی دو غلظت، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر آنتی‌بیوتیک کانامایسین، باززایی نشدند و با از دست دادن کلروفیل خود در مدت ٤ هفته از بین رفتند. غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر کانامایسین حداقل غلظت کانامایسین لازم برای مرگ کامل بافت ریز نمونه‌ها در طول مدت‌زمان فوق بود.

برای انجام صحیح واکنش زنجیره‌ای پلی مراز، لازم است DNA مورداستفاده کیفیت مطلوبی داشته باشد، به همین منظور DNA استخراجی از برگ‌های جوان روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز شدند و نتایج مورد بررسی قرار گرفت، باندهای حاصل در الکتروفورز نشان داد DNA استخراجی فاقد شکستگی و آلودگی پروتئینی بودند و کیفیت مطلوبی داشتند.

سپس واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *cry1a105* انجام شد، حضور باند مورد نظر (bp ۹۲۰) در گیاهان تراریخت چاهک‌های ۸، ۱۰، ۱۱ و ۱۲ نشان‌دهنده حضور حداقل یک نسخه از ژن در گیاهان تراریخت می باشد (شکل ۲a). همچنین این باند در گیاه شاهد (چاهک‌های ۵، ٦ و۷) مشاهده نشد (شکل ۲a). نتایج به‌دست‌آمده ۵۷ درصد تراریختگی در گیاهان را نشان داد.

جهت تائید تراریختی گیاه با ژن موردنظر و عدم آلودگی با اگروباکتری (*virG*) واکنش زنجیره‌ای پلی مراز با آغازگرهای ژن‌های بیماری‌زای مخصوص اگروباکتری (*virG*) انجام شد. عدم حضور این باند در گیاه تراریخت نشان‌دهنده انتقال موفقیت‌آمیز ژن به ژنوم گیاه و عدم آلودگی به باکتری است (شکل ۲b).

**جدول ۱**- نتایج حاصل از باززایی پنج رقم گوجه‌فرنگی

**Table 1.** The result of regeneration of five tomato cultivars

| BAP mg/l | NAA mg/l | ارقام Karun | TN-V2-1109 | TIV-VC-993 | TN-VC-1088 | TIV-VC-99C | میانگین باززایی |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ۳ | ۰/۳ | ۱/۵۳٤$^{f}$ | ۰/۹۳۹$^{f}$ | ۲/۳$^{c}$ | ۱/۰۵۳$^{d}$ | ۰/۲۸۹$^{f}$ | ۱/۸۲۲$^{c}$ |
| ۳ | ۰/۱۵ | ۳/۳۸۹$^{c}$ | ۱/۱۱۱$^{d}$ | ۱/۹۱۸$^{e}$ | ۱/۰۸۸$^{c}$ | ۲/۷۵$^{d}$ | ۲/۱۷۵$^{bc}$ |
| ۳ | ۰/۰۷ | ۲/۱۳٤$^{e}$ | ۱/٦۳۳$^{b}$ | ۳/٦۱٤$^{a}$ | ۰/۷۱۷$^{f}$ | ۲/۷۷۸$^{c}$ | ۲/۱۷٤$^{bc}$ |
| ۱/۵ | ۰/۳ | ٦/٦۹٤$^{a}$ | ۲/۸٦۱$^{a}$ | ۳/۳۰۹$^{b}$ | ۱/۵۵٦$^{a}$ | ۲/۱۳۷$^{e}$ | ۳/۸۸٤$^{a}$ |
| ۱/۵ | ۰/۱۵ | ۲/٦۷۹$^{d}$ | ۱/٦۱۱$^{c}$ | ۰/۸۳٤$^{f}$ | ۰/۸۳٤$^{e}$ | ۳/۱۹٤$^{b}$ | ۲/۰٦۲$^{bc}$ |
| ۱/۵ | ۰/۰۷ | ٤/٦۹۵$^{b}$ | ۱/۰۸٤$^{e}$ | ۲/۰۹$^{d}$ | ۱/۵۰۲$^{b}$ | ۳/٦۱۳$^{a}$ | ۲/۵۹٦$^{b}$ |
| | | ۳/۵۲$^{a}$ | ۱/۵٤۰$^{c}$ | ۲/۵۳۳$^{b}$ | ۱/۱۲۵$^{c}$ | ۳/٤۳۷$^{a}$ | در هر رقم |

حرف مشترک نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنادار در سطح احتمال ۵٪ بر اساس آزمون دانکن می‌باشد.

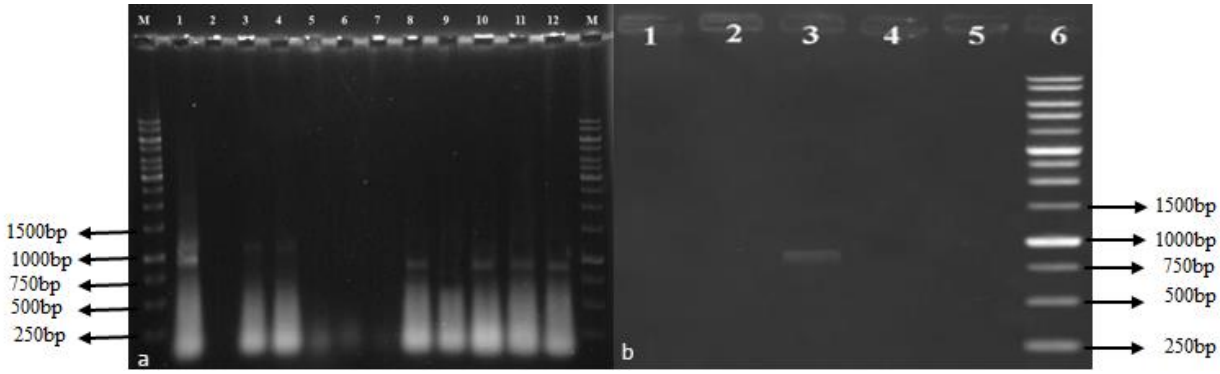
**شکل ۱**- مراحل باززایی گیاه گوجه‌فرنگی: الف: ریز نمونه‌ها ب: گیاهان باززا شده ج: سازگاری گیاه باززا شده به محیط بیرون د: گیاه باززا شده

**Figure 1**. Regeneration of tomato, a: Explants, b: Regenerated plants, c: Adapt the plant, d: Regenerated plant



[ Downloaded from gebsj.ir on 2026-01-02 ]

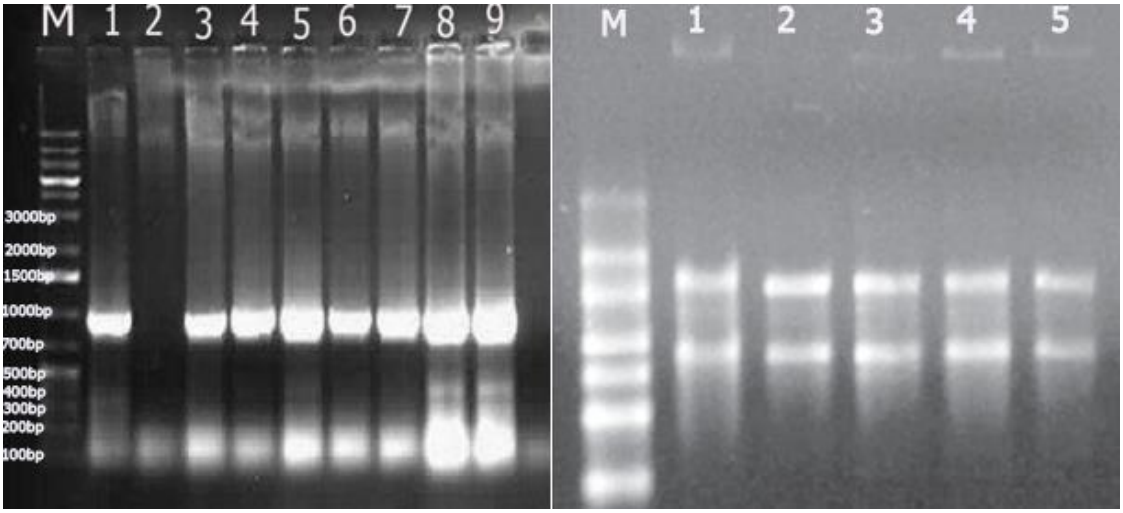
[ DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.1.4.0 ]




**شکل ۲**- a: واکنش زنجیره‌ای پلی مراز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *Cry1a105*.M: 1Kb DNA ladder- Thermo fisher scientific ، چاهک ۱: پلاسمید (کنترل مثبت)، چاهک ۲: کنترل منفی (واکنش PCR بدون الگوی DNA)، چاهک ۳ و ٤: رقم TIV-VC-993 گوجه‌فرنگی تراریخت احتمالی ، چاهک ۸، ۹ و ۱۰: رقم TIV-VC-99C گوجه‌فرنگی تراریخت احتمالی، چاهک ۱۱ و ۱۲: رقم کارون گوجه‌فرنگی تراریخت احتمالی، چاهک ۵ و ٦ و ۷: گیاهان گوجه‌فرنگی شاهد. b: واکنش زنجیره‌ای پلی مراز با استفاده از آغازگرهای ژن‌های *virG* طول باند مورد نظر 850 bp، ٦: نشانگر (1Kb DNA ladder- Thermo fisher scientific). چاهک ۳: پلاسمید (کنترل مثبت)، چاهک ۲: کنترل منفی (واکنش PCR بدون الگوی DNA)، چاهک ۱: رقم TIV-VC-993 گوجه‌فرنگی تراریخت احتمالی چاهک ٤: رقم TIV-VC-99C گوجه‌فرنگی تراریخت احتمالی چاهک ۵: رقم کارون گوجه‌فرنگی تراریخت احتمالی تراریخت.

**Figure 2.** a. PCR analysis of transgenic plants with *Cry1a105* specific primers, 1: Positive control, 2: Negative control without DNA, 3,4: Transgenic tomato plant candidates from TIV-VC-993 cultivar, 8,9,10: Transgenic plant candidates from TIV-VC-99C cultivar, 5,6,7: Untransformed plant, 11, 12: Transgenic candidates from Karun cultivar. M: DNA marker (1Kb DNA ladder- Thermo fisher scientific). b. PCR analysis of transgenic plants with *virG* specific primers, 6: 1Kb DNA ladder- Thermo fisher scientific, 3: Positive control, 2: Negative control without DNA, 1,4,5: Transgenic plant.

**آزمون RT-PCR:** تجزیه مولکولی گیاهان تراریخته ($T_0$) با استفاده از PCR وجود ژن *cry1a105* را در گیاهان تراریخته تائید کرد. از گیاهانی که وجود ژن مورد نظر در آن‌ها با آزمون PCR تائید شده بود، بذرگیری به عمل آمد و گیاهان مورد نظر تا نسل $T_2$ کاشت شدند و در این نسل وجود ژن موردنظر در آن‌ها با آنالیز مولکولی (RT-PCR) مورد بررسی قرار گرفتند و آزمون RT-PCR حضور ژن *cry1a105* را در این گیاهان تائید کرد (شکل ۳a).

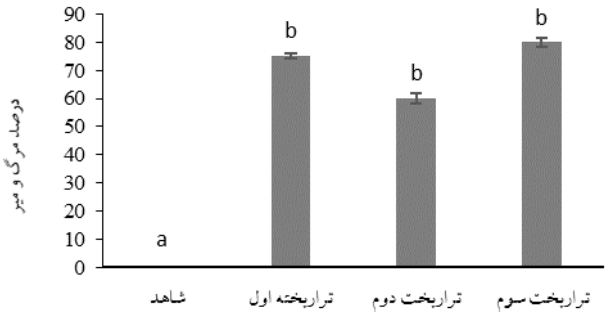



**شکل ۳**- a. ژل ۱٪ مربوط به RT-PCR: M: نشانگر (1Kb plus DNA ladder- Thermo fisher scientific)، ۱: کنترل مثبت، ۲: کنترل منفی و چاهک‌ها ۳ و ٤: رقم TIV-VC-993 چاهک‌های ۵ و ٦ رقم TIV-VC-99C چاهک‌های ۷، ۸و ۹ رقم کارون b. ژل ۱٪ مربوط به الکتروفورز RNAهای استخراجی M: نشانگر (1Kb plus DNA ladder- Thermo fisher scientific) چاهک‌های ۱ تا ۵ RNAهای استخراجی از گیاهان تراریخته احتمالی

**Figure 3a**. RT-PCR gel 1%: M: Leader marker (1Kb plus DNA ladder- Thermo fisher scientific), 1: Positive control, 2: Negative control, 3,4: TIV-VC-993 cultivar, 5,6: TIV-VC-99C cultivar, 7, 8, 9: Karun cultivar, b. Gel 1% electrophoresis RNA, M: 1Kb DNA ladder- Thermo fisher scientific, 1,2,3,4, 5: Extracted RNA of transgenic plants



[ Downloaded from gebsj.ir on 2026-01-02 ]
[ DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.1.4.0 ]




**شکل ٤**- درصد مرگ‌ومیر لاروهای هلیوتیس در لاین های گوجه‌فرنگی تراریخت شده با ژن *crya105* .

**Figure 4**. Morality percentage of *Heliothis* larvae on tomato transgenic lines transformed by *crya105*.

**شکل ٥**- a: برگ گیاه تراریخته گوجه‌فرنگی b: برگ آسیب‌دیده گیاه گوجه‌فرنگی تراریخته توسط لارو هلیوتیس c: لارو هلیوتیس قبل از تغذیه از برگ گیاهان تراریخته d: لارو هلیوتیس بعد از مصرف برگ گیاه تراریخته

**Figure 5**. Bioassay using *Heliothis armigera*, a: Transgenic plant leaf, b: The damaged leaf of the *Heliothis* larvae, c: *Heliothis* larvae before feeding from leaf, d: *Heliothis* larvae after feeding from leaf

**آزمون زیستی**

گیاهانی که وجود ژن مورد نظر در آن‌ها تائید شد برای آزمون زیستی مورد بررسی قرار گرفتند. لاروهای هلیوتیس که ازنظر وزن و سن در شرایط یکسانی بودند از برگ تازه ارقام TIV-VC-993، TIV-VC-99C و کارون شروع به تغذیه کردند و بعد از هفت روز تعداد لاروها زنده و مرده مورد شمارش قرار گرفت. نتایج نشان داد که بیشترین مقاومت مربوط به رقم کارون با ۷۰ درصد بود (شکل ٤،٥).

افزایش مقاومت به آفات از طریق انتقال ژن *cry* به گیاهان در سال‌های اخیر گزارش شده است (Chitkowski et al. 2003; Bashir et al. 2005). تولید گیاهان تراریخته به کمک اگروباکتریوم باوجود محدودیت‌هایی که دارد، در حال حاضر هنوز هم کاراترین روش برای تولید این گیاهان است. کوشش‌هایی در جریان است تا این روش را ساده‌تر و مؤثرتر کند تا تعداد ژنوتیپ‌های بیشتر، به‌خصوص واریته‌های برتر تراریخته شوند. برای ایجاد یک روش تراریختی مستقل از ژنوتیپ در گیاه پژوهش‌های بیشتری لازم است تا به افزایش تقاضا برای دستیابی سریع به ارقامی بهبودیافته برای تولید تجاری پاسخ داده شود (Tohidfar et al. 2010). در این پژوهش رقم کارون باززایی بیشتری نسبت به چهار رقم دیگر داشت. بین محیط کشت‌های باززایی، محیط کشت حاوی ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آمینو پورین به همراه ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر نفتالن‌استیک اسید بهترین محیط برای باززایی در ارقام کارون، TN-V2-1109 و TN-VC-1088 تشخیص داده شد. رقم TIV-VC-993 در سطوح ۳ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آمینو پورین و ۰/۷ میلی‌گرم در لیتر نفتالن‌استیک اسید و همچنین رقم TIV-VC-99C در سطوح ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آمینو پورین و ۰/۷ میلی‌گرم در لیتر نفتالن‌استیک اسید بالاترین میزان باززایی را نشان دادند. تنظیم‌کننده‌های رشد اکسینی نقش مؤثری در تقسیم سلولی دارند. همچنین سایتوکینین‌ها نیز در تحریک رشد و نمو و تقسیم سلولی نقش دارند (Pirik. 2007). در پژوهش حاضر ژن *cry1a105*



[ Downloaded from gebsj.ir on 2026-01-02 ]
[ DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.1.4.0 ]

برای اولین بار به ارقام گوجه‌فرنگی TIV-VC-993، TIV-VC-99C و کارون انتقال داده شد. انتقال ژن مؤثر به عواملی مثل سویه باکتری، مدت‌زمان تلقیح ریز نمونه با باکتری، نوع آنتی‌بیوتیک، ریز نمونه مورداستفاده شده بستگی دارد (Ahsan et al. 2007) در این تحقیق از سویه اگروباکتریوم LBA 4404 استفاده شد و مدت هم کشتی ریز نمونه با اگروباکتریوم حامل ناقل ژن موردنظر مدت نیم ساعت بود که این زمان خیلی کمتر از زمان تلقیح به‌وسیله ژن *cry2A* است (Qiuet et al. 2007; Jabeen et al. 2009) و از آنتی‌بیوتیک‌های کانامایسین به مقدار ۵۰ میلی‌گرم در لیتر و ۰/۰۱ میلی مولار سفوتاکسیم استفاده شد و همچنین از ریز نمونه برگ لپه‌ای که در سال‌های ۲۰۱٤ برای انتقال ژن *cry1AB* بهترین نتیجه را داده بود استفاده شد (Harish et al. 2010). تجزیه مولکولی گیاهان تراریخته ($T_0$) با استفاده از PCR وجود ژن *cry1a105* را در گیاهان تراریخته تائید کرد. از گیاهانی که وجود ژن موردنظر در آن‌ها با آزمون PCR تائید شده بود بذر گیری به عمل آمد و گیاهان موردنظر تا نسل $T_2$ کاشت شدند و در این نسل وجود ژن موردنظر در آن‌ها با آنالیز مولکولی (RT-PCR) موردبررسی قرار گرفت و گیاهانی که وجود ژن موردنظر در آن‌ها تائید شده بود با آزمون زیستی موردبررسی قرار گرفتند. آزمون زیستی بیشترین مقاومت به آفت لارو هلیوتیس را در رقم کارون (بالای ۷۰٪) و کمترین مقاومت را در رقم TIV-VC-99C نشان داد.

## منابع

**Ahsan SH, Lee DG, Lee M, Anisuzzaman MF, Alam HS, Yoon MS, Choi JK, Yang BH. (2007).** The effects of wounding type, preculture, infection method and cocultivation temperature on the Agrobacterium mediated gene transfer in tomatoes. Annals of Applied Biology 151(3):363-372.

**Bashir T, Husnain T, Fatima N, Riaz R, Makhdoom S, Riazuddin M. (2005).** Novel indica basmati line (B-370) expressing two unrelated genes of *Bacillus thuringiensis* is highly resistant to two *lepidopteran* insects in the field. Crop Protection 24:870-879

**Bravo A, Likitvivatanavong S, Soberon M. (2011).** *Bacillus thuringiensis*: Astory of a successful bioinsecticide. Insect biochemistry and molecular biology4:423-431.

**Chitkowski LSG, Turnipseed MJ, Sullivan WG. (2003).** Field and laboratory evaluations of transgenic cottons expressing one or two *Bacillus thuringiensis* var. kurstaki Berliner proteins for management of Noctuidae (*Lepidoptera*) pests. Journal of Economic Entomology 96:755-762.

**Faal MAH. (2011).** investigating the effect of chlorpyrifos and phenopenthrin pesticides on biological parameters and functional response of parasitoid bee under laboratory conditions. Master thesis of Shahid Chamran University of Ahvaz, pp4.

**Haris S, Rajeevkumar R, Sathishkumar M. (2010).** Efficient *in vitro* callus induction and regeneration of different tomato cultivars of India. Asian Journal of Biotechnology 3:178-184.

**HernandezSuarez M, RodryguezRodryguez EM, Dyazromero C. (2007).** Mineral and trace element concentrations in cultivars of tomatoes. Food Chemistry 104:489-499.

**Jabeen B, Mirza Z, Chaudhary H, Rashid M, Gulfraz S. (2009).** Study of the factors affecting Agrobacterium mediated gene transformation in tomato (*Lycopersicon esculentum Mill*.) cv. Riogrande using rice chitinase (cht-3) gene. Pakistan Journal of Botany 41:2605-2614.

**Khaliluev MR, Mamonov AG, Smirnov AN, Kharchenko PN, Dolgov SV. (2011).** Expression of genes encoding chitin_binding proteins (PR_4) and hevein_like antimicrobial peptides in transgenic tomato plants enhanced resistanse to Phytophthora infestance.Russ Agriculter Scince 4:297–302.

**Levy J, Sharoni, Y. (2007).** The functions of tomato lycopene and its role in humanhealth. The Journal of the American Botanical Council 62:49-56.

**Lugasi A, Biro L, Hovarie J, Sagi KV, Brandt S, Barna E. (2003).** Lycopene content of foods and lycopene intake in two groups of the Hungarian population. Nutrition Research 23(8):1035-1044.

**Murray MG, William F. (1980).** Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic acids research 9:4321-4326.

**Pinela J, Barros L, Carvalho AM, Ferreira IF. (2012).** Nutritional composition and antioxidant activity of four tomato (*Lycopersicon esculentum* L) farmer' varieties in Northeastern Portugal homegardens. Food Chemistry and Toxicology 50:829-834.



[ Downloaded from gebsj.ir on 2026-01-02 ]
[ DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.1.4.0 ]

**Pirik RLM. (2007).** In vitro culture of Higher plants. Translate Bagheri, A. Saffari, M. Publishing Ferdowsi University of Mashhad. (In Farsi with English abstract).

**Qiu G, Diretto R, Tavarza G, Giuliano G. (2007).** Improved protocol for Agrobacterium mediated transformation of tomato and production of transgenic plants containing carotenoid biosynthetic gene CsZCD. Scientia Horticulturae 112:172-175.

**Shabanpour M. (2011).** Density and Spatial Dispersion of Tomato Unfinished Tomato Cream and its Relationship with Parasitoid Bees in Gorgan Region. Gorgan Natural Resources University of Agricultural Sciences, pp 11-12.

**Tabashnik B, Huang F, Ghimire M, Leonard B, Siegfried B, Rangasamy M, Yang Y, Gahan L, Heckel D, Bravo A, Soberon M. (2011).** Efficacy of genetically modified Bt toxins against insects with different genetic mechanisms of resistanceNature Biotechnol 29:1128–1131.

**Tarannum N, Singh M, Hawaldar R. (2019).** Pesticides as an Occupational Hazard Facts and Figures. In Handbook of Research on the Adverse Effects of Pesticide Pollution in Aquatic Ecosystems. IGI Global 5:201-214.

**Tohidfar M, Ghareyazie B, Mousavi M, Yazdani S, Golabchian R. (2008).** Agrobacterium mediated transformation of cotton (*Gos-sypium hirsutum*) using a synthetic *Cry1Ab* gene for enhancedresistance against Heliothis armigera. Iran J Biotechnoln 6:164–173.

**Tohidfar M, Mohsenpour M. (2011).** Effective factors in Cotton (*Gossipium spp*) Transformation UsingAgrobacterium. Journal of Agricultural Biotechnology 2(1): 1-24.

[ Downloaded from gebsj.ir on 2026-01-02 ]
[ DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.1.4.0 ]

**Genetic Engineering and Biosafety Journal**
**Volume 8, Number 1**

# Transformation of *cry1a105* gene to tomato in order to increase resistance to *Heliothis sp.*

Rasoul Golzari [1], Bahram Maleki Zanjani [2], Masoud Tohidfar [3*]

1-Ph.D. student Molecular genetics, University of Zanjan, Iran
2- Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, University of Zanjan
3- Department of Plant Biotechnology, Faculty of Science and Biotechnology, Shahid Beheshti University, G.C., Tehran, Iran *Corresponding Author, Email: m_tohidfar@sbu.ac.ir

## ABSTRACT

Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) is an important vegetable in the world, it exposes to a wide range of pathogens and plant pests attack. Fruit worm is one of the most important pest of tomato that mainly damage the fruit and causes the yield reduction. In this study, *cry1a105* gene was cloned to pBI121 plasmid (under 35S promoter and Nos terminator), and was transferred to tomato by *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 strain. The cotyledons of different tomato cultivars were used for gene transformation. The candidate transgenic plants have been selected on MS medium complemented with vitamins of B5 and 0.3 mg/L NAA, 1.5 mg/L BAP, and 50 mg/L of kanamycin antibiotic. Molecular analysis using polymerase chain reaction (PCR) confirmed the presence of *cry1a105* gene in transgenic plants ($T_0$). The candidate plants were cultivated until $T_2$ generation and then the expression of gene were studied by molecular analysis (RT-PCR). The gene expression in the plants were confirmed, then they were examined by bioassay analysis. Bioassay analysis showed that the transformed Karun cultivar had a high resistance (70%) to tomato fruit worm than the control treatment.

**Key words:** Tomatoes, *cry1a105*, *Agrobacterium tumefaciens*, LBA4404 Strain, pBI121

[ Downloaded from gebsj.ir on 2026-01-02 ]

[ DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.1.4.0 ]