ABRII
پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی

دستورالعمل فنی

تولید سیب‌زمینی تراریخته مقاوم به بید سیب‌زمینی

نویسنده:
حسن رهنما

بید سیب‌زمینی (*Phtorimaea operculella Zeller*) از آفات زیان‌بار سیب‌زمینی (*Solanum tuberosum*) در مناطق گرمسیری و نیمه‌گرمسیری دنیا و از جمله ایران است. تلاش برای اصلاح ارقام سیب‌زمینی مقاوم به این آفت با روش‌های سنتی چندان موفقیتی نداشته است. مهندسی ژنتیک یکی از روش‌های اصلاحی جدید برای تولید گیاهان مقاوم به آفات محسوب می‌شود. امروزه سطح وسیعی از مزارع کشاورزی دنیا زیر کشت محصولات حاصل از مهندسی ژنتیک قرار دارند. فناوری تراریخته با هدف تولید گیاهان مقاوم به آفات و بیماری‌ها و افزایش کیفی و کمی محصولات زراعی موفقیت زیادی در عرصه تولید محصولات کشاورزی داشته است. گیاهان Bt از جمله محصولات تراریخته‌ای هستند که با هدف تولید گیاهان مقاوم به آفات در محصولاتی مانند پنبه، ذرت، سیب‌زمینی و ... به‌کار گرفته شده‌اند. در ایران هم تحقیقات زیادی در زمینه تولید محصولات تراریخته انجام شده است. از جمله این محصولات، تولید سیب‌زمینی تراریخته مقاوم به آفت بید سیب‌زمینی است. در این نوشتار تلاش می‌شود فرایند تولید این محصول به‌صورت مرحله‌به‌مرحله شرح داده شود. بدیهی است با اندکی بازنگری و اصلاح می‌توان دستورالعمل پیوست را برای انتقال سایر صفات به گیاه سیب‌زمینی با روش مهندسی ژنتیک استفاده نمود.

کرج، بلوار شهید فهمیده، مجموعه موسسات تحقیقاتی کشاورزی، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی
تلفن: ۳۲۷۰۱۰۳۵ - ۰۲۶ فکس: ۳۲۷۰۱۰۶۷ - ۰۲۶
۳۲۷۰۳۵۳۶ - ۰۲۶ کد پستی: ۳۱۳۵۹۳۳۱۵۲

Shahid Fahmideh Blvd, Karaj, Iran.
Tel: +9826-3270 1035 Fax: +9826-3270 1067
+9826-3270 3536 Postcode: 3135933152

web: www.abrii.ac.ir e-mail: info@abrii.ac.ir

بسم الله الرحمن الرحيم

تولید سیب‌زمینی تراریخته مقاوم به بید سیب‌زمینی

حسن رهنما

نوع نشریه: دستورالعمل فنی
نام نشریه: دستورالعمل فنی تولید سیب‌زمینی تراریخته مقاوم به بید سیب‌زمینی
نویسنده: حسن رهنما
ویراستار علمی: رضا ضرغامی
ویراستاران ادبی: آمنه ناصری، منظر حیدری
طراحی: محمد قفلگری جداری، منظر حیدری
تهیه شده در: پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی
شمارگان: ۳۰
نوبت انتشار: ۱
سال انتشار: ۱۴۰۲
مسئولیت صحت مطالب با نویسندگان است.

شماره ثبت در مرکز اطلاعات و مدرک علمی کشاورزی ۶۴۱۴۴ به تاریخ ۱۴۰۲/۰۶/۱۳ است.

فهرست مطالب

عنوان — صفحه

۱- مقدمه ۱
۱-۱- بید سیب‌زمینی ۱
۱-۲- روش‌های مرسوم کنترل و مبارزه با آفت بید سیب‌زمینی ۳
۱-۳- سموم زیستی و مهندسی ژنتیک ۴
۱-۴- مهندسی ژنتیک در سیب‌زمینی ۵
۱-۵- مزایا و مخاطرات احتمالی ۸
۲- مراحل انجام کار ۹
۲-۱- مواد و وسایل مورد نیاز ۹
۲--۲ انتخاب ژن و تهیه سازه ژنتیکی ۱۰
۲-۳- انتقال سازه‌های ژنتیکی به سویه اگروباکتریوم ۱۲
۲-۴ تکثیر درون شیشه‌ای گیاهان سیب‌زمینی ۱۳
۲-۵- تهیه ریزنمونه جهت تراریختی و کشت آن‌ها ۱۴
۲-۶- تهیه سوسپانسیون آگروباکتریوم ۱۵
۲-۷- تلقیح ریزنمونه‌ها ۱۶
۲-۸- انتقال و واکشت ریزنمونه‌ها در محیط باززایی تا دست‌یابی به گیاهان تراریخته احتمالی ۱۶
۲-۹- ریشه‌زایی و انتقال به گلدان ۱۸
۲-۱۰- آزمون‌های مولکولی گیاهان تراریخته احتمالی ۲۰
۲-۱۰-۱- استخراج DNA از برگ‌های گیاه ۲۰
۲-۱۰-۲- بررسی وجود ژن‌های *cry۱Ab* و *nptII* با روش PCR ۲۰
۲-۱۰-۳- آزمون سادرن بلاتینگ ۲۱
۲-۱۱- بررسی بیان پروتئین‌های CRY۱AB ۲۲
۲-۱۲- زیست‌سنجی گیاهان تراریخته با لاروهای بید سیب‌زمینی ۲۴
۲-۱۲-۱- تکثیر و پرورش لارو بید سیبزمینی ۲۴
۲-۱۲-۲- روش زیست‌سنجی ۲۵
۳- جمع‌بندی ۲۸
منابع ۲۹

چکیده

بید سیب‌زمینی (*Phtorimaea operculella Zeller*) از آفات زیان‌بار سیب‌زمینی (*Solanum tuberosum*) در مناطق گرمسیری و نیمه‌گرمسیری دنیا و از جمله ایران است. تلاش برای اصلاح ارقام سیب‌زمینی مقاوم به این آفت با روش‌های سنتی چندان موفقیتی نداشته است. مهندسی ژنتیک یکی از روش‌های اصلاحی جدید برای تولید گیاهان مقاوم به آفات محسوب می‌شود. امروزه سطح وسیعی از مزارع کشاورزی دنیا زیر کشت محصولات حاصل از مهندسی ژنتیک قرار دارند. فناوری تراریخته با هدف تولید گیاهان مقاوم به آفات و بیماری‌ها و افزایش کیفی و کمی محصولات زراعی موفقیت زیادی در عرصه تولید محصولات کشاورزی داشته است. گیاهان Bt از جمله محصولات تراریخته‌ای هستند که با هدف تولید گیاهان مقاوم به آفات در محصولاتی مانند پنبه، ذرت، سیب‌زمینی و ... به‌کار گرفته شده‌اند. در ایران هم تحقیقات زیادی در زمینه تولید محصولات تراریخته انجام شده است. از جمله این محصولات، تولید سیب‌زمینی تراریخته مقاوم به آفت بید سیب‌زمینی است. در این نوشتار تلاش می‌شود فرایند تولید این محصول به‌صورت مرحله‌به‌مرحله شرح داده شود. بدیهی است با اندکی بازنگری و اصلاح می‌توان دستورالعمل پیوست را برای انتقال سایر صفات به گیاه سیب‌زمینی با روش مهندسی ژنتیک استفاده نمود.

۱- مقدمه

۱-۱- بید سیب‌زمینی

بید سیب‌زمینی (*Phthorimaea operculella*) از خانواده Gelecidea است که یکی از مهم‌ترین و زیان‌بارترین آفات سیب‌زمینی به‌ویژه در مناطق گرمسیر و نیمه گرمسیر دنیا است. این آفت با آلودگی و تغذیه از بوته‌ها و غده‌های سیب‌زمینی در مزارع و انبارها، کمیت و کیفیت محصول را به شدت کاهش می‌دهد. سرزمین اولیه این آفت امریکای جنوبی است که با توسعه کشت سیب‌زمینی، جمعیت آن افزایش یافته و با انتقال و جابجایی غده‌های سیب‌زمینی به دیگر کشورها و قاره‌ها انتقال یافته است و درحال حاضر در اکثر کشورهای جهان دیده می‌شود. بید سیب‌زمینی در گذشته برای ایران یک آفت قرنطینه‌ای به‌شمار می‌رفت ولی در مهر ماه سال ۱۳٦٤ برای اولین بار در کرج مشاهده و معرفی گردید و به این ترتیب فصل جدیدی در مسائل مرتبط با آفات سیب‌زمینی در ایران گشوده شد. وجود این آفت به‌طور هم‌زمان در کرج و استان‌های جنوبی کشور مانند فارس، بوشهر، هرمزگان و خوزستان گزارش شده است. درحال حاضر در اکثر مناطق تولید سیب‌زمینی در ایران وجود دارد و باعث خسارات فراوانی می‌شود (حبیبی و همکاران، ۱۳۸۳؛ سیدان و همکاران، ۱٤۰۱).

این آفت، پروانه کوچکی است که طول آن ۱۰ میلی‌متر و عرض آن با بال‌های باز به ۱۵ میلی‌متر می‌رسد. این حشره تخم‌های خود را به‌صورت انفرادی یا دسته‌جمعی در زیر و گاهی روی برگ‌ها و در غده‌های سیب‌زمینی در محل گودی‌های روی غده می‌گذارد (کریمی، ۱۳۹۸).

عامل اصلی خسارت این آفت، لاروهای آن است که در سن کامل به ۱۰ تا ۱۲ میلی‌متر می‌رسد. رنگ این لاروها در صورتی‌که از برگ و یا دیگر اندام‌های هوایی بوته سیب‌زمینی تغذیه کرده باشند سبز و در صورتی‌که از غده تغذیه کرده باشند کرم رنگ با هاله‌ای صورتی است. شفیره‌های این آفت به‌طور معمول در مزرعه روی غده، در سطح خاک و حتی در داخل و روی ساقه و در انبارها بیشتر روی گونی‌های سیب‌زمینی تشکیل می‌شوند.

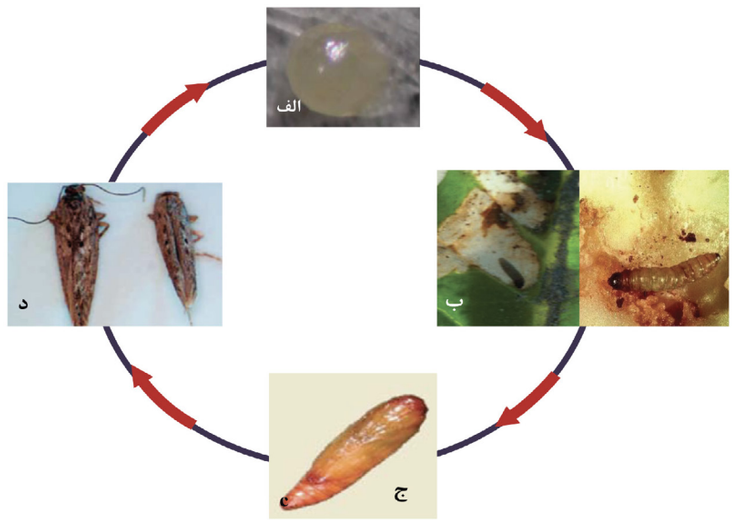
آلودگی مزارع با حمله و تخم‌ریزی حشرات بالغ این آفت آغاز می‌شود. با تفریخ تخم‌ها لاروها فعالیت خود را با نفوذ به داخل برگ، تغذیه از پارانشیم برگ، رگبرگ‌ها، دمبرگ و ساقه و باقی‌گذاشتن علائم

مینوز، سوختگی، به‌هم چسبیدگی و لوله‌ای‌شدن برگ‌ها، ضعف و خشکی بوته‌های سیب‌زمینی را موجب می‌شوند. آلودگی با نفوذ از طریق شکاف‌ها و ترک‌ها به غده‌ها نیز سرایت می‌کند. میکروارگانیسم‌ها نیز از محل ورود لارو به داخل غده‌ها نفوذ یافته و پوسیدگی غده را موجب می‌شوند. به همین دلیل، آلودگی به بید همراه با پوسیدگی و بوی نامطبوع است. بید سیب‌زمینی یک حشره شب‌پرواز است، در طول روز غیرفعال و در لابه‌لای بوته‌ها به‌سر می‌برد و تخم‌ریزی در شب هنگام و به‌طور معمول ٤۸ ساعت پس از جفت‌گیری انجام می‌شود.

شکل ۱ چرخه زندگی چهار مرحله‌ای این آفت را در مزرعه و انبار نشان می‌دهد. دوره زندگی این آفت به‌شدت تحت تأثیر دما و میزان رطوبت قرار دارد و به‌همین‌دلیل تعداد نسل‌های این آفت در دوره رشد سیب‌زمینی بسته به شرایط آب و هوایی منطقه بین٤ تا ۷ نسل است. تعداد نسل این آفت در صورت مساعد بودن شرایط انباری به ۱۰ تا ۱۲ نسل در سال نیز می‌رسد (حبیبی و همکاران، ۱۳۸۳؛ نوری قنبلانی و همکاران، ۱۳۹۷؛ Rondon et al., 2007). خسارت‌زاترین مرحله رشد آفت، طولانی‌ترین مرحله زندگی حشره یعنی مرحله لاروی آن است که از برگ‌ها و غده‌ها تغذیه می‌کند (شکل ۱)؛ به‌طوری‌که هر لارو در شرایط مزرعه‌ای قادر به تغذیه ٦/۲۸ سانتی‌مترمربع برگ سیب‌زمینی است. بیدها در مزرعه در نسل‌های اول قبل از تشکیل غده‌ها، تخم‌های خود را در سطوح زیرین برگ‌ها قرار می‌دهند (کریمی، ۱۳۹۸). لاروها با تفریخ تخم‌ها فعالیت خود را با نفوذ به داخل برگ و تغذیه از پارانشیم برگ، رگبرگ‌ها و ساقه شروع می‌کنند. نقاط تغذیه لاروها علائم مینوزی به صورت لکه‌های شفاف در برگ‌ها ایجاد می‌کند و با تغذیه بیشتر به‌طور غالب برگ‌ها به هم چسبیده و لوله‌ای می‌شود که در نهایت موجب ضعف و خشکی بوته‌ها می‌گردد. بیدها تخم‌های خود را با طی فصل و نزدیک‌شدن به زمان برداشت علاوه بر برگ‌ها روی غده‌های خارج از خاک به‌ویژه غده‌های سبز رنگ نیز قرار می‌دهند و از این طریق سبب انتقال آلودگی از مزرعه به انبار می‌شوند (کریمی، ۱۳۹۸). بنابراین، از نظر اقتصادی این آفت کمیت و کیفیت سیب‌زمینی را در مرحله قبل و پس از برداشت کاهش می‌دهد. علاوه‌بر خسارت مذکور، حمله این آفت سبب شیوع بیماری‌هایی از قبیل بیماری قارچی(*Fusarium spp*) و باکتریایی (*Erwinia spp*) به علت ایجاد دالان‌هایی در غده‌ها می‌شوند (کریمی، ۱۳۹۸). حدود ۲۰ تا ۳۰ درصد کل غده‌ها به‌طور متوسط در مزرعه آلوده

می‌شوند که منبع اولیه آلودگی در انبار و در سال آینده در مزرعه خواهد بود (Adhikari et al., 2022). مرکز بین‌المللی سیب‌زمینی تخمین زده است، سالانه در دنیا در حدود ۳/۳۲٤/۰۰۰ هکتار از اراضی سیب‌زمینی‌کاری در اثر خسارت این آفت از بین می‌روند، در حالی‌که پتانسیل برداشت سالانه از این اراضی در حدود ۵۰/۸۳۳/۲۰۰ تن سیب‌زمینی است (www.cipotato.org). از طرفی، با انتقال آلودگی از طریق غده‌های آلوده از مزرعه به انبار، سطح خسارت این آفت در انبار به ۲۵ تا ۱۰۰ درصد نیز می‌رسد (Adhikari et al., 2022).

در ایران اولین بار در سال ۱۳٦٤ این آفت در مزارع سیب‌زمینی در کرج گزارش شد و امروزه اکثر مناطق مرکزی تحت کشت سیب‌زمینی را فراگرفته و خسارت سنگینی، بیش از ۱٦ درصد را در مزرعه و انبار به محصول سیب‌زمینی کشور وارد می‌کند (حبیبی و همکاران، ۱۳۸۳؛ سیدان و همکاران، ۱٤۰۱).



شکل ۱- الف: مرحله تخم که بین ۲ تا ٦ روز؛ ب: مرحله لاروی که بین ۱٦ تا ۲٤ روز؛ ج: مرحله شفیرگی که بین ٦ تا ۹ روز؛ د: مرحله پروانه‌ای یا حشره بالغ که بین ۲ تا ٤ روز طول می‌کشد.

۱-۲- روش‌های مرسوم کنترل و مبارزه با آفت بید سیب‌زمینی

درحال حاضر برای جلوگیری از خسارت آفت بید سیب‌زمینی، مزارع و انبارهای سیب‌زمینی به دفعات مورد سمپاشی قرار می‌گیرند؛ به‌طوری‌که پس از پنبه، سیب‌زمینی بیشترین میزان مصرف سم را دارد. به تجربه ثابت شده است که مبارزه شیمیایی با این آفت به‌دلیل مخفی‌بودن آن در درون برگ‌ها، ساقه‌ها و غده‌ها و بروز مقاومت سریع به حشره‌کش‌ها به تنهایی کافی نیست و باید با استفاده از روش‌های مختلف زراعی، مکانیکی و زیستی با این آفت مقابله کرد. از طرف دیگر، آثار سوء زیست‌محیطی استفاده از سموم شیمیایی و تأثیر آن بر سلامتی انسان و سایر موجودات غیرهدف، استفاده از روش‌های جایگزین برای مقابله با آفات را ضروری ساخته است. برای دست‌یابی به چنین هدفی، ایجاد گیاهان مقاوم به آفات از طریق برنامه‌های مدیریت تلفیقی آفات[1] (IPM) ضرورت دارد که عمده این برنامه‌ها، ترکیبی از روش‌های کنترلی شامل به‌کارگیری آگاهانه آفت‌کش‌ها، تناوب کشت گیاهی، سالم‌سازی مزرعه و مهم‌تر از همه بهره‌برداری از ارقام گیاهی مقاوم است. این راهکارهای کشاورزی شامل کنترل شیمیایی، کنترل زیستی، کنترل مزرعه‌ای، کنترل مکانیکی و کنترل ژنتیکی می‌باشند (سلطانی، ۱۳۹۵). کنترل ژنتیکی آفات یا استفاده از گیاهان تراریخته بیان‌کننده ژن‌های هدف و حشره‌کش بخش مهمی از برنامه IPM است. از آنجاکه منابع ژنتیکی مقاومت به آفات در گیاهان سیب زمینی وجود ندارد، مهندسی ژنتیک می‌تواند به‌عنوان یک گزینه مناسب برای ایجاد مقاومت به آفات عمل نماید. در این راستا، پروتئین‌های مختلفی که دارای فعالیت حشره‌کشی هستند، شناسایی و ژن‌های رمزکننده آن‌ها همسانه‌سازی شده‌اند. از جمله این پروتئین‌ها می‌توان به پروتئین‌های حشره‌کش باکتری‌های جنس *Bacillus* (شامل پروتئین‌های کریستالی حشره‌کش[2] از گونه *B. thuringiensis* و پروتئین‌های رویشی حشره‌کش[3] از گونه‌های *B. cereus* و *B. thuringiensis*)، پروتئین‌هایی با منشأ گیاهی مانند بازدارنده‌های پروتئینازی[4]، بازدارنده‌های آلفا آمیلاز[5]، لکتین‌ها[6]، آنزیم‌هایی مانند کیتیناز و پروتئین‌های غیرفعال‌کننده ریبوزوم اشاره کرد. تاکنون این ژن‌ها برای ایجاد

1 Integrated pest management(IPM)
2 Insecticidal Crystal Proteins (ICP)
3 Vegetative Insecticidal Proteins (VIP)
4 Proteinase Inhibitors (PIs)
5 α-amylase inhibitors
6 Lectins

مقاومت به آفات مختلف به گونه‌های مختلف گیاهی منتقل شده‌اند که پروتئین‌های کریستالی یا همان α-endotoxinهای تولیدشده توسط باکتری *B. thuringiensis*، مؤثرترین فعالیت حشره‌کشی را دارد و نسبت به موارد دیگر بیشتر مورد استفاده قرار گرفته است.

۱-۳- سموم زیستی و مهندسی ژنتیک

مصرف حشره‌کش‌های شیمیایی اثرات زیانباری بر موجودات زنده مفید داشته و سبب باقی گذاشتن پسماندهای شیمیایی روی محصولات و آلودگی زیست‌محیطی می‌شوند؛ ازاین‌رو، محققان به‌دنبال راهکارهای جایگزین برای مصرف این حشره‌کش‌ها هستند. از طرف دیگر، با توجه به این‌که عوامل میکروبی روی حشرات به‌صورت کاملاً تخصصی عمل می‌کنند با کشف خاصیت حشره‌کشی باکتری Bt در قرن بیستم، اهمیت قابل ملاحظه آن برای حفاظت گیاهان در مقابل آفات حشره‌ای روشن شد. مصرف حشره‌کش‌های زیستی Bt نسبت به حشره‌کش‌های شیمیایی دارای مزایای مهمی از قبیل فعالیت اختصاصی بالا نسبت به میزبان‌های معین، غیر سمی‌بودن آن‌ها نسبت به حشرات مفید، گیاهان، حیوانات و انسان (Schnepf et al., 1998) و نیز زیست تجزیه‌پذیر بودن سموم Bt و عدم پایداری آن‌ها در محیط زیست (Van Frankenhuyzen, 1993) است. با وجود چنین مزایایی، مصرف این حشره‌کش‌ها معایبی نیز دارد، شامل ۱- لزوم مکانیزه بودن کشاورزی، ۲- غیرفعال شدن در مقابل اشعه خورشید (۳۰۰ تا ۳۸۰ نانومتر)، ۳- شسته‌شدن در اثر باران و رقیق‌شدن در اثر شبنم روی برگ‌ها، ٤- نیاز به استفاده چند نوبتی در هر فصل زراعی، ٥- اثرات کمتر در گیاهان ردیفی (نظیر سیب‌زمینی) و ٦- بالا بودن هزینه تولید حشره‌کش‌های Bt.

تجاری سازی حشره‌کش‌های Bt اولین بار در سال ۱۹۳۸ در فرانسه آغاز و در دهه ۱۹۵۰ در آمریکا مصرف شد (Van Frankenhuyzen, 1993). فروش آفت‌کش‌های Bt در سال ۱۹۹۰ با فرمولاسیون و نژادهای جدید Bt و توسعه محصولات نوترکیب Bt افزایش یافت (Damalas and Koutroubas, 2018). با این وجود، در حال حاضر تنها ٥ درصد از فروش جهانی حشره‌کش‌ها به حشره‌کش‌های Bt اختصاص دارد که ارزش تجاری آن معادل ۳ میلیارد دلار در سال است (Marone, 2014: Olson, 2015).

با وجود چنین محدودیت‌هایی و به‌دلیل مزایای محصولات Bt از نظر ایمنی زیستی از باکتری‌های

آن به‌عنوان سم بیولوژیک استفاده می‌شود و به‌عنوان یک ابزار مؤثر، سالم و اختصاصی برای کنترل دامنه گسترده‌ای از آفات حشره‌ای استفاده شده است (Salehi Jouzani et al.,2005). Btها دارای خانواده بزرگی از پروتئین‌های Cry می‌باشند که علیه حشرات خانواده‌های پروانگان، دوبالان، سخت بالپوشان، هم بالان[7]، پرده بالان[8]، شپش‌ها[9] و بعضی از بی‌مهرگان[10] فعالیت سمی دارد (Abbas, 2018).

۱-٤- مهندسی ژنتیک در سیب‌زمینی

اصلاح سیب‌زمینی به‌دلیل اینکه ارقام زراعی آن تتراپلوئید هستند، انتقال صفات مطلوب بین ارقام و بروز آن‌ها در نتاج مشکل و زمان‌بر است (Grafius and Douches, 2008). به‌همین‌دلیل، مهندسی ژنتیک یکی از راهکارهای اساسی برای اصلاح ارقام سیب‌زمینی به حساب می‌آید. به‌طورکلی، تراریختی ژنتیکی یک ابزار مهم در افزایش نیازهای جهانی به تولید بالای محصولات کشاورزی و ارزش غذایی آن‌ها است. از آنجایی‌که سیب‌زمینی رتبه چهارم محصولات مهم دنیا را از نظر تولید و تقاضا دارد، روش‌هایی برای بهبود تولید این محصول در کشورهای توسعه یافته و در حال توسعه به‌کار گرفته شده است. سیب‌زمینی تراریخته از اولین محصولات حاصل از مهندسی ژنتیک بود. در دهه ۱۹۸۰ دوره تراریختی گیاهان آغاز شد و سیب‌زمینی از اولین گونه‌های گیاهی بود که تراریختی آن با استفاده از *Agrobacterium rhizogenes* گزارش شده است (Ooms., 1983). همان‌گونه که قبلاً اشاره شد، یکی از روش‌های رایج برای کنترل آفات، استفاده از آفت‌کش زیستی (Bt) *B. thuringeiensis* است. این باکتری در طی فاز سکون رشدی خود پروتئین‌هایی به‌نام پروتئین‌های کریستالی Cry تولید می‌کند (Bravo et al., 2007). این پروتئین‌ها بر روی طیف محدودی از حشرات آفت مانند پروانه‌ای‌ها[11] (مانند بید سیب‌زمینی)، دوبالان[12]، سخت‌بالپوشان[13] (مانند سوسک کلرادو) و پرده‌بالان[14] عمل می‌کنند (Van Frankenhuyzen, 2009).

اولین نتایج مربوط به انتقال ژن‌های Bt به توتون و گوجه‌فرنگی در سال ۱۹۸۷ منتشر شده است

7 Homoptera
8 Hymenoptera
9 Mallophaga
10 Invertebrates
11 Lepidoptera
12 Diptera
13 Coleoptra
14 Hymenoptra

(Fischhoff et al., 1987). ژن‌های Bt بعد از آن به تعداد دیگری از گونه‌های زراعی مانند پنبه، برنج و ذرت انتقال یافته است که در آن‌ها حشرات راسته بال‌پولکداران مهم‌ترین هدف بوده‌اند. در گزارش‌های اولیه، مقدار بیان ژن‌های Bt در مقایسه با سایر ژن‌های انتقال‌یافته به گیاهان پایین بود (کمتر از ۰/۰۰۰۱ پروتئین محلول برگ). ژن‌های طبیعی *cry* در توالی DNA خود غنی از بازهای AT هستند که این ویژگی در نواحی اگزون DNA گیاهان نادر است. ثابت شده است که تغییر کدون (بهینه‌سازی کدونی) و افزایش پایداری mRNA و یا کارایی ترجمه (بدون تغییر آمینواسیدها) باعث افزایش بیان ژن‌های *cry* در گیاهان تراریخته می‌شود (Perlak et al., 1991). با بهینه‌سازی کدون ژن‌های *cry*، گیاهان تراریخته‌ای به‌دست آمد که نسبت به آفات در حد مطلوبی مقاوم بودند. به‌عنوان مثال، سیب‌زمینی‌های تراریخت‌شده با ژن‌های تغییر یافته *cry3A* نسبت به سوسک کلرادو مقاومت بالایی از خود نشان دادند (Perlak et al., 1993). بنابراین، امروزه اغلب ژن‌های مصنوعی Bt برای انتقال به گیاهان استفاده می‌شوند.

با توجه به‌اینکه بید سیب‌زمینی در حد بالایی نسبت به پروتئین‌های کریستالی سویه‌هایی از باکتری *B. thuringiensis* حساس است، دانشمندان درصدد انتقال ژن‌های کدکننده این پروتئین‌ها به سیب‌زمینی برای دست‌یافتن به گیاهان تراریخته مقاوم برآمدند .بیان بسیاری از این ژن‌ها در گیاه سیب‌زمینی باعث کنترل مؤثر بید سیب‌زمینی می‌شود. محققان برای اولین‌بار با انتقال ژن *cryIA(c)* به سیب‌زمینی گیاهان تراریخته‌ای به‌دست آوردند که مقاومت خوبی به این آفت از خود نشان ندادند (Ebora et al., 1994)، بعد از آن ژن *cry IA(b)* را به سه رقم سیب‌زمینی منتقل کردند (Jansens et al., 1995). نتایج زیست‌سنجی لاروهای بید بر روی گیاهان تراریخته حاصل نشان داد که ۱۰۰ درصد لاروهای بید به دنبال تغذیه از این گیاهان از بین رفتند و از ٤٠ لاین به‌دست آمده در این بررسی، ۳۲ لاین با میزان کشندگی ۱۰۰ درصد و ۵ لاین با میزان کشندگی ۹۵ درصد مقاومت کامل در برابر این آفت از خود به نمایش گذاشتند. زیست‌سنجی غده‌های گیاهان تراریخته نشان داد که بعد از ٤ تا ۷ ماه ذخیره در انبار، غده‌ها هیچ‌گونه خسارتی از این آفت ندیدند و همه لاروهای گذاشته شده روی این غده‌ها در اوایل دوره لاروی از بین رفتند. ژن *cryV* طبیعی (Westedt et al., 1998, Douches et al., 1998) و

ژن تغییر یافته *cryIA(b)* را (Gleave et al., 1998) برای دست‌یابی به گیاهان تراریخته مقاوم به بید سیب‌زمینی به این گیاه منتقل شد. نتایج هر سه بررسی، بیانگر کنترل کامل این آفت توسط گیاهان تراریخته بود. علاوه‌بر موارد فوق از ژن‌های زیر هم در تراریختی سیب‌زمینی به‌منظور ایجاد مقاومت به بید سیب‌زمینی استفاده شده است.

cry1Ab2 (Chakrabarti et al.,2000), *cry1Ab5* (Canedo et al., 1999; Rico et al., 1998), *cry1Ac9* (Davidson et al., 2002, 2004, Meiyalaghan et al., 2006b), *cry1Ia1* (Douches et al., 2011; Li et al., 1999), *cry1Ba1* & *cry1Ca5* (Meiyalaghan et al., 2006a)

در ایران نیز با انتقال ژن *cry1A(b)* تحت کنترل پیش‌برهای PEPC و CamV35S، مقاومت ۱۰۰ درصدی این گیاه به بید سیب‌زمینی در شرایط آزمایشگاهی ایجاد شده است (Ghasimi Hagh et al., 2009; Salehian et al., 2021). علاوه‌بر ژن‌های گروه *cry1* از ژن *cry9Aa2* هم برای ایجاد مقاومت به بید سیب‌زمینی استفاده شده است (Jacobs et al., 2009; Meiyalaghan et al., 2005, 2006b). بنابراین، استفاده از ژن *cryIAb* می‌تواند در کنترل آفت بید سیب‌زمینی مؤثر باشد (Raspor and Cingel., 2021).

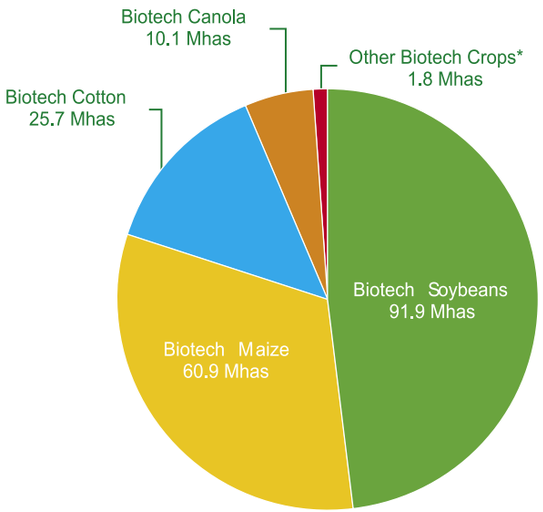
در گزارشی که توسط مرکز بین‌المللی سیب‌زمینی منتشر شده است با انتقال ژن *cryIA (b)* به یک رقم سیب‌زمینی، گیاهان تراریخته‌ای به‌دست آورده‌اند که با قدرت کشندگی ۱۰۰ درصد در برابر لارو بید سیب‌زمینی به‌طور کامل مقاومت نشان دادند (Canedo et al., 1999, Kumar et al., 1995). این مرکز در صدد معرفی این رقم به کشورهای در حال توسعه است که بید سیب‌زمینی در آن‌ها مشکل‌ساز می‌باشد. در جدول ۱ برخی از ژن‌های انتقال‌یافته به سیب‌زمینی همراه با درصد کنترل‌کنندگی‌شان بر بید سیب‌زمینی خلاصه شده‌اند.

ژن‌های کیمری[15] Bt *cry* هم با هدف کنترل طیف وسیعی از آفات مورد استفاده قرار گرفته‌اند. یک ژن Bt حاوی نواحی I و II ژن *cry1Ba* و ناحیه II ژن *cry1Ia* به سیب‌زمینی منتقل شد و باعث ایجاد مقاومت هم‌زمان به سوسک کلرادو، بید سیب‌زمینی و کرم ساقه‌خوار اروپایی شده است (Naimov et al., 2003, Martinez Prada et al., 2021).

15 Chimeric genes

با تغییر کدون ژن‌های Bt بسیاری از گیاهان مانند ذرت، پنبه، سیب‌زمینی، گوجه‌فرنگی، توتون، برنج، سویا، گردو، کاج، صنوبر و غیره گیاهان تراریخته‌ای به‌دست آورده‌اند که ژن Bt را در حد بالایی بیان می‌کنند (Wang et al., 2014). گیاهان Bt یکی از مهم‌ترین گیاهان تراریخته تجاری در سطح دنیا هستند که می‌توان به ذرت و پنبه تراریخته مقاوم به آفات اشاره کرد که سطح وسیعی از مزارع دنیا را به‌خود اختصاص داده‌اند. علاوه‌بر آن‌ها، سیب‌زمینی تراریخته به‌همراه بادمجان، خربزه درختی، سیب، کدو و چغندر قند نیز حدود ۱/۸ میلیون هکتار از ۱۸۰ میلیون هکتار سطح زیر کشت محصولات تراریخته دنیا را به‌خود اختصاص داده‌اند (شکل ۲).

در حدود ۵۰ رخداد سیب‌زمینی تراریخته برای کشت (در آمریکا و کانادا) و مصرف و فراوری (آمریکا، کانادا، نیوزیلند، ژاپن، اتحادیه اروپا و ...) مورد پذیرش قرار گرفته‌اند (http://isaaa.org) که اغلب این رخدادها با هدف مقاومت به آفات و بیماری‌های ویروسی و بهبود کیفیت نشاسته مهندسی شده‌اند.



شکل ۲- سطح زیر کشت محصولات تراریخته در دنیا

جدول ۱- ژن‌های Bt انتقال یافته به سیب‌زمینی برای ایجاد گیاهان مقاوم به بید

منبع	درصد پادزیستی	ژن انتقالی
ابورا و همکاران ۱۹۹٤	۱۲	*cry I A (c)*
جانسون و همکاران ۱۹۹۵	۱۰۰	*cry I A (b)*
وستید و همکاران ۱۹۹۸	۹٦	*cry V*
کنیدو و همکاران ۱۹۹۹	۱۰۰	*cry I A (b)*
گلیو و همکاران ۱۹۹۸	۱۰۰	*cry 9 A 2*
قسیمی و همکاران ۲۰۰۹	۱۰۰	*cry1Ab*
صالحیان و همکاران، ۲۰۲۱	۱۰۰	*cry1Ab*

جدول ۲- مزایا و مخاطرات احتمالی محصولات تراریخته

مزایا	مخاطرات احتمالی
افزایش تولید و عملکرد محصول	اثرات احتمالی بر سلامت انسان
رفع محدودیت در انتقال صفات و شکست سد بین گونه‌ای	تأثیر بر موجودات غیرهدف
ایجاد محصولات مقاوم به آفات، بیماری‌ها، خشکی، شوری، سرما و ...	فرار ژن و گسترش علف‌های هرز
ایجاد محصولات متحمل به علف‌کش	تأثیر بر موجودات خاکزی
بهبود کیفیت محصولات با تولید مواد مغذی و حذف مواد مضر	تأثیر بر تنوع زیستی
کاهش مصرف سموم شیمیایی و کاهش اثرات زیست‌محیطی ناشی از آن‌ها	اثرات اقتصادی و اجتماعی
کاهش هزینه تولید	

۱-۵- مزایا و مخاطرات احتمالی

مهندسی ژنتیک نیز همانند هر فناوری جدید دارای مزایا و مخاطراتی است که باید در زمان تولید محصولات تراریخته مورد توجه قرار گیرند. بدیهی است اگر مزایای فناوری جدید نسبت به فناوری‌های موجود بیشتر باشد استفاده از آن منطقی خواهد بود. ارزیابی مخاطرات احتمالی محصولات تراریخته فرایندی است که با انجام آن مشخص خواهد شد که آیا محصول مورد مورد نظر می‌تواند مجوز کشت و مصرف پیدا کند یا خیر؟ این ارزیابی فرایندی پیچیده و زمان‌بر است که در جدول ۲ به مباحث مهم آن اشاره شده است.

۲- مراحل انجام کار

در این دستورالعمل، تولید گیاهان سیب‌زمینی تراریخته مقاوم به آفت بید سیب‌زمینی ارائه شده است.

۲-۱- مواد و وسایل مورد نیاز

- کاغذ صافی استریل
- تیپ، تیوپ و فالکون
- پتری‌دیش و ظروف کشت شیشه‌ای
- انواع پنس و تیغ استریل
- خاک (مخلوط برابر رس، پیت و پرلیت)
- گیاهچه‌های استریل سیب‌زمینی رقم مارفونا یا اگریا
- سویه AGLO۱ *Agrobacterim tumefaciens*
- لارو بید سیب‌زمینی

شیکر انکوباتور

- اتاق کشت و رشد استریل
- اتوکلاو
- دستگاه ژل داک (برای تهیه عکس ژل)
- هورمون‌های GA۳، NAA، TDZ
- CTAB
- مواد لازم برای PCR شامل آنزیم‌ها، پرایمرها و ...
- آگارز
- کیت PCR DIG Probe Synthesis Kit
- بافرهای لازم برای سادرن بلاتینگ
- Bt-Cry1Ab/Ac ImmunoStrip Test
- سازه ژنی حاوی ژن *cry* (*cry1Ab*)
- آنزیم‌های برشی *HindIII* و *EcoR1*
- آنزیم T4-DNA Ligase

- pH متر
- سمپلر
- اسپکتروفتومتر یا نانودراپ
- دستگاه ترموسایکلر (PCR)

دستگاه الکتروفورز

- محیط کشت جامد LB
- محیط کشت مایع LB
- محیط کشت موراشیگ و اسکوگ (MS)
- آنتی‌بیوتیک‌های ریفامپسین، کانامایسین، مروپنم

۲-۲- انتخاب ژن و تهیه سازه ژنتیکی

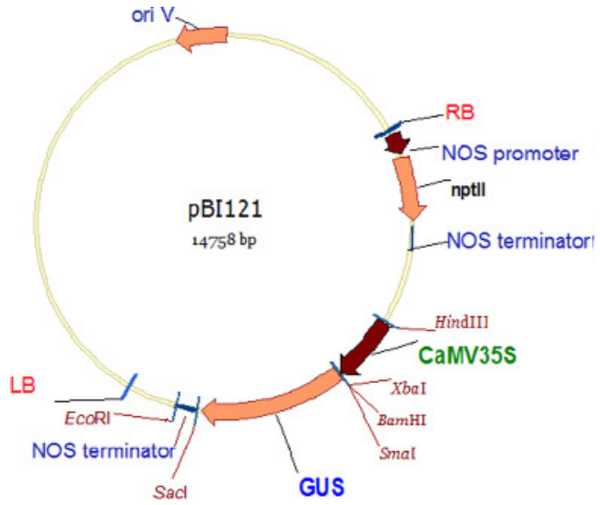
ژن‌های *cry* متعلق به باکتری *B. thuringiensis* بسیار اختصاصی عمل می‌کنند. به‌منظور انتخاب ژن مناسب برای کنترل آفات پروانه‌ای مانند بید سیب‌زمینی می‌توان از ژن‌های *cry* دسته I، II و گاهی V استفاده کرد. برخی از مهم‌ترین این ژن‌ها عبارتند از:

cryIA(a), cryIA(b), cryIA(c), cryIA(e), cryIB, cryIC, cryIC(b), cryID, cryIE, cryIF, cryIG, cryIIA, cryIIB, cryIIC, cryV

به‌طورکلی، پس از انتخاب ژن مورد نظر، توالی مربوطه شناسایی و همسانه‌سازی می‌شود. توالی ژن هدف تحت کنترل پیشبر (پروموتور) مناسب قرار گرفته و در نهایت در یک ناقل پلاسمیدی دوگانه گنجانده می‌شود.

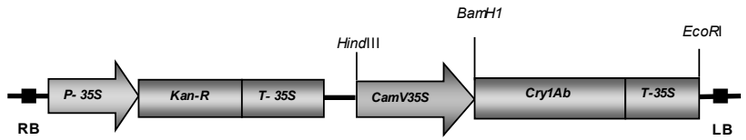
برای تولید سیب‌زمینی تراریخته مقاوم به بید سیب‌زمینی از ژن *cryIA(b)* استفاده شده است. ژن هدف تحت کنترل یک پیشبر اختصاصی حساس به نور، فسفوانول پیروات کربوکسیلاز (PEPC) یا یک پیشبر دایمی (CaMV35s) قرار می‌گیرد. تفاوت این دو پیشبر این است، هر ژنی که تحت کنترل پیشبر PEPC باشد تنها در حضور نور و در اندام‌های سبز گیاه بیان می‌شود. در حالی‌که پیشبر CamV35s سبب می‌شود تا ژن تحت کنترل آن در همه بافت‌های گیاه و در هر شرایطی بیان شود.

برای همسانه‌سازی ژن مورد نظر در یک ناقل پلاسمیدی مناسب می‌توان از پلاسمید دوگانه pBI121 استفاده کرد (شکل ۳).



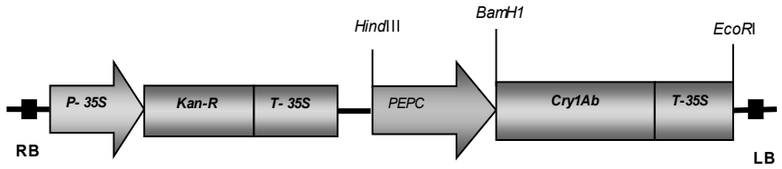
شکل ۳- نقشه ناقل دوگانه pBI121

برای کنترل ژن *cry1Ab* تحت پیشبر CamV35s، کافی است قطعه مربوط به ژن GUS را با استفاده از دو آنزیم برشی مناسب مانند *BamHI* و *SacI* خارج و ژن *cry1Ab* را جایگزین نمود. بدین ترتیب سازه نهایی ساخته خواهد شد (شکل ٤).



شکل ٤- نقشه ناحیه T-DNA مربوط به سازه نهایی حاوی ژن *cry1Ab* تحت کنترل پیشبر CaMV35s

برای کنترل ژن *cry1Ab* تحت پیشبر القای نوری PEPC باید با استفاده از دو آنزیم *HindIII* و *EcoRI* (یا هر آنزیم مناسب دیگر) کاست کامل ژن GUS را از پلاسمید pBI121 خارج و کاست هدف را جایگزین آن نمود (شکل ٥).



شکل ٥- نقشه T-DNA مربوط به سازه نهایی حاوی ژن *cry1Ab* تحت کنترل پیشبر PEPC

۲-۳- انتقال سازه‌های ژنتیکی به سویه اگروباکتریوم

سازه ژنتیکی با استفاده از روش انجماد-ذوب به سویه AGLO1 اگروباکتریوم تومی فاسینس منتقل شود. مراحل انتقال پلاسمید به اگروباکتریوم به شرح زیر است:

- یک کلونی از باکتری اگروباکتریوم سویه AGLO1 در پنج میلی‌لیتر محیط کشت LB مایع حاوی ۷۵ میلی‌گرم بر لیتر ریفامپسین در فالکون ۵۰ میلی‌لیتر کشت و به‌مدت یک روز در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور شیکردار با سرعت ۱۸۰ دور در دقیقه قرار گیرد.
- وقتی OD600nm کشت به ۰/٦ رسید، کشت باکتری به‌مدت ۵ دقیقه با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شود.
- فاز رویی را زیر هود لامینار خالی کرده و یک میلی‌لیتر از محلول $CaCl_2$ ۲۰ میلی‌مولار به رسوب اضافه شود. محلول حاصل با حجم ۱۰۰ میکرولیتر در ویال‌های استریل تقسیم شود.
- یک میکروگرم از پلاسمید مورد نظر به یک ویال باکتری اضافه و چند بار به‌آرامی پایپت شده و سپس در ازت مایع قرار گیرد.
- نمونه‌ها از ازت مایع خارج شده و ۵ دقیقه در حمام آب گرم ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شود.
- یک میلی‌لیتر محیط کشت مایع LB به ویال اضافه و به‌مدت ۲ تا ٤ ساعت در انکوباتور شیکردار و در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد قرار گیرد. سپس به‌مدت یک دقیقه با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شود.

- مایع رویی را در زیر هود لامینار دور ریخته و به رسوب حاصل ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت مایع (LB Broth) اضافه و به‌آرامی پایپت شود.
- در محیط LB جامد حاوی ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر آنتی‌بیوتیک کانامایسین و ۷۵ میلی‌گرم ریفامپیسین، کشت شده و در انکوباتور ۲۸ درجه سانتی‌گراد قرار گیرد تا کلنی‌های باکتری ظاهر شود.
- کلنی‌های حاصل باید با آزمون PCR تأیید شوند. کلنی‌های اگروباکتریومی تأیید شده آماده انتقال به گیاه سیب‌زمینی هستند.

۲-٤- تکثیر درون شیشه‌ای گیاهان سیب‌زمینی

برای سهولت انتقال ژن، بهتر است از گیاهچه‌های درون‌شیشه‌ای سیب‌زمینی استفاده شود. به‌منظور تکثیر گیاهچه‌های درون‌شیشه‌ای (شکل ٦)، ریزنمونه‌های تک یا دو گرهی در محیط تکثیر شامل محیط کشت پایه MS (Murashige and Skoog, 1962) حاوی ۳ درصد ساکارز، pH 5.7، در شرایط دمایی ۲۲ درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ١٦ ساعت روشنایی (با شدت ٤٠٠٠ لوکس) و ۸ ساعت تاریکی تکثیر شوند (شکل ۷).

شکل ٦- روش جداکردن قطعات گره (فلش سفید) جهت تکثیر و میانگره (فلش قرمز) جهت تراریختی از گیاهچه‌های استریل سیب‌زمینی

شکل ۷- گیاهچه‌های استریل تکثیرشده جهت ریزنمونه‌گیری برای تراریختی

۲-۵- تهیه ریزنمونه جهت تراریختی و کشت آن‌ها

گیاهچه‌های ۳ تا ٤ هفته‌ای برای تهیه ریزنمونه جهت تراریختی و باززایی مناسب هستند. ریزنمونه میانگره به طول ٤ تا ٦ میلی‌متر (شکل ٦ و ۸) پس از جداسازی در محیط القای کالوس (پیش‌کشت) (جدول ۳) کشت شده و به مدت دو روز در اتاقک رشد با دمای ۲۲ تا ٢٤ درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ١٦ ساعت تحت نور لامپ‌های فلورسنت سفید (با شدت ٤٠٠٠ لوکس) نگهداری شوند (شکل ۸).

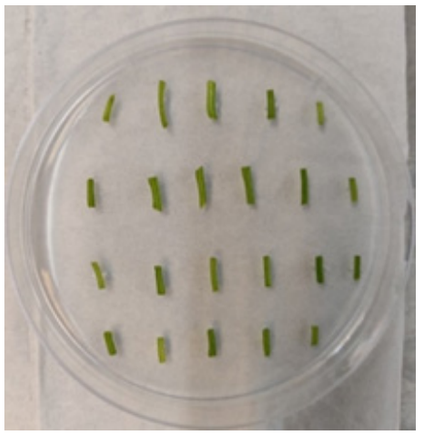
۲-٦- تهیه سوسپانسیون آگروباکتریوم

یک روز قبل از زمان تلقیح ریزنمونه‌ها، یک کلنی از کشت جامد اگروباکتریوم حاوی پلاسمید مورد نظر در ۲۰ میلی‌لیتر محیط LB مایع حاوی آنتی‌بیوتیک‌های کانامایسین و ریفامپسین (از هر کدام ۵۰ میلی‌گرم در لیتر) در یک فالکون ۵۰ میلی‌لیتری به‌صورت شبانه کشت شود (شکل ۹). کشت‌ها در دمای ۲۸ درجه‌سانتی‌گراد در شیکر با ۲۰۰ دور در دقیقه قرار گیرند تا OD600 باکتری به ۰/٦ تا ۰/۸ برسد. این سوسپانسیون باکتری، آماده استفاده برای تراریختی سیب‌زمینی است.

جدول ۳- ترکیبات محیط کشت برای تکثیر و باززایی گیاه سیب‌زمینی

محیط کشت	هورمون‌ها و آنتی‌بیوتیک (میلی‌گرم در لیتر)				
	NAA	ZR	GA3	کانامایسین	مروپنم
محیط پیش‌کشت و هم‌کشتی	۰/۰۲	۲/۵	۰/۰۵	–	–
محیط گزینش و باززایی	۰/۰۲	۲/۵	۰/۰۵	۱۰۰	۵۰
محیط رشد و ریشه‌زایی	–	–	–	–	۵۰
محیط تکثیر	–	–	–	–	۵۰

نکته: در تمام محیط‌ها از نمک‌ها و ویتامین‌های MS به همراه ۳۰ گرم در لیتر ساکارز، ۷ گرم در لیتر آگار گیاهی و pH 5.7 به‌عنوان محیط پایه استفاده شود.



شکل ۸- ریزنمونه‌های میان‌گره سیب‌زمینی و کشت آن‌ها در محیط پیش‌کشت

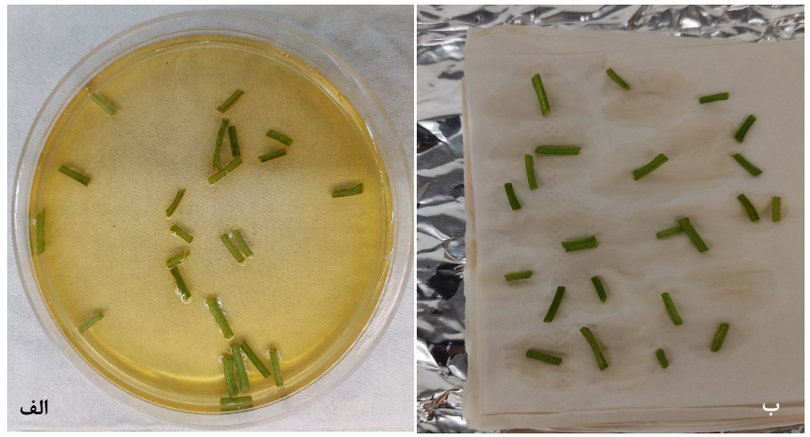
شکل ۹- کشت اگروباکتریوم در محیط مایع LB و رشد شبانه آن

۲-۷- تلقیح ریزنمونه‌ها

ریزنمونه‌ها از محیط پیش‌کشت به فالکون حاوی سوسپانسیون اگروباکتریومی منتقل و به‌مدت ۱۰ دقیقه تلقیح شوند (شکل ۱۰). بعد از انجام تلقیح بر روی کاغذ صافی استریل، خشک و دوباره به‌مدت دو روز (جهت هم-کشتی) به محیط القای کالوس منتقل شده و در نهایت به محیط انتخاب و باززایی انتقال یابند.

۲-۸- انتقال و واکشت ریزنمونه‌ها در محیط باززایی تا دست‌یابی به گیاهان تراریخته احتمالی

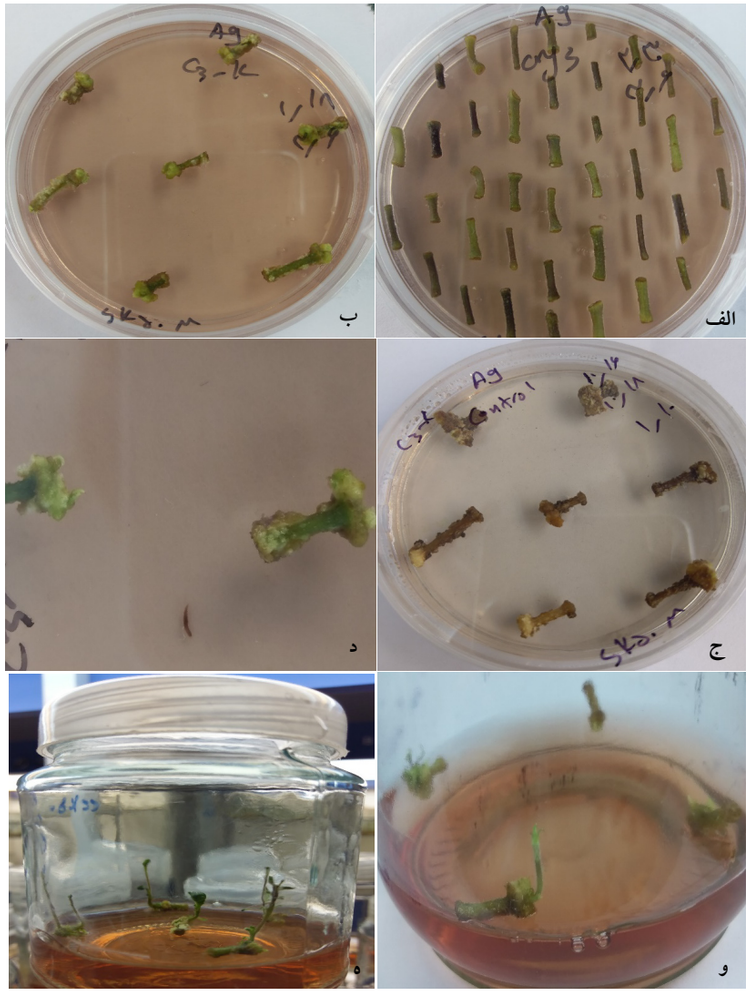
ریزنمونه‌ها پس از دو روز کشت در محیط هم‌کشتی به محیط انتخابی (جدول ۲) حاوی آنتی‌بیوتیک‌های مروپنم (جهت حذف اگروباکتریوم) و کانامایسین (عامل انتخاب سلول‌های تراریخته) منتقل شوند. به‌منظور کنترل مناسب اگروباکتریوم و جلوگیری از آلودگی پیشنهاد می‌شود حداقل هر هفت روز یک‌بار ریزنمونه‌ها به محیط تازه منتقل شوند. کالوس‌ها پس از حدود دو هفته در انتهای ریزنمونه‌ها ظاهر شده و به‌دنبال آن (در طی حدود دو ماه) باززایی و تولید گیاهچه‌های باززا شده به‌تدریج مشاهده خواهد شد (شکل ۱۱).



شکل ۱۰- مراحل تلقیح ریز نمونه‌های میانگره با اگروباکتریوم. (الف) تلقیح ریزنمونه‌ها با سوسپانسیون باکتری و (ب) خشک کردن سطحی آن‌ها بر روی کاغذ صافی استریل

۲-۹- ریشه‌زایی و انتقال به گلدان

گیاهچه‌های باززا شده پس از اینکه حدود دو سانتی‌متر رشد کردند از قاعده قطع و به ظروف شیشه مربایی (یا ارلن) حاوی محیط کشت ریشه‌زایی (جدول ۲) منتقل شوند. به‌تدریج ریشه‌ها در قاعده گیاهچه‌ها ظاهر خواهد شد (شکل ۱۱). گیاهچه‌های ریشه‌دار را می‌توان به خاک (ترکیبی با نسبت برابر از پیت و پرلیت) منتقل کرد. سپس، برای سازگاری با شرایط گلخانه، روی گیاهچه‌ها را با کیسه‌های پلاستیکی شفاف و یا لیوان‌های پلاستیکی پوشانده (شکل ۱۲) و پس از ۵ روز به‌تدریج با ایجاد سوراخ در پوشش‌ها، گیاهچه‌ها را با شرایط محیطی سازگار کرده و بعد از ۱۰ روز پوشش‌ها به‌طور کامل برداشته شوند. رشد گیاهان با آبیاری مناسب و حداقل یک‌بار کودهی با محلول N:P:K به‌تدریج به حد مناسبی خواهد رسید.



شکل ۱۱- مراحل تراریختی گیاه سیب‌زمینی از تلقیح تا باززایی. الف- ریزنمونه‌های تلقیح شده در محیط هم‌کشتی، ب- ریزنمونه‌های تلقیح‌شده در محیط انتخابی حاوی کانامایسین، ج- ریزنمونه‌های تلقیح نشده در محیط انتخابی (کنترل)، د- شروع باززایی، ه- ادامه باززایی و رشد گیاهچه‌های تراریخته احتمالی در محیط انتخابی

شکل ۱۲- مراحل انتقال گیاهچه‌های تراریخته احتمالی به گلدان و گلخانه. الف- گیاهچه‌های درون‌شیشه‌ای ریشه‌دار، ب- انتقال گیاهچه‌های ریشه‌دار به خاک و پوشش آن با لیوان شفاف به منظور سازگاری، ج- د-ه-و- مراحل مختلف رشد گیاهچه‌های سازگار شده در شرایط گلخانه

۲-۱۰- آزمون‌های مولکولی گیاهان تراریخته احتمالی

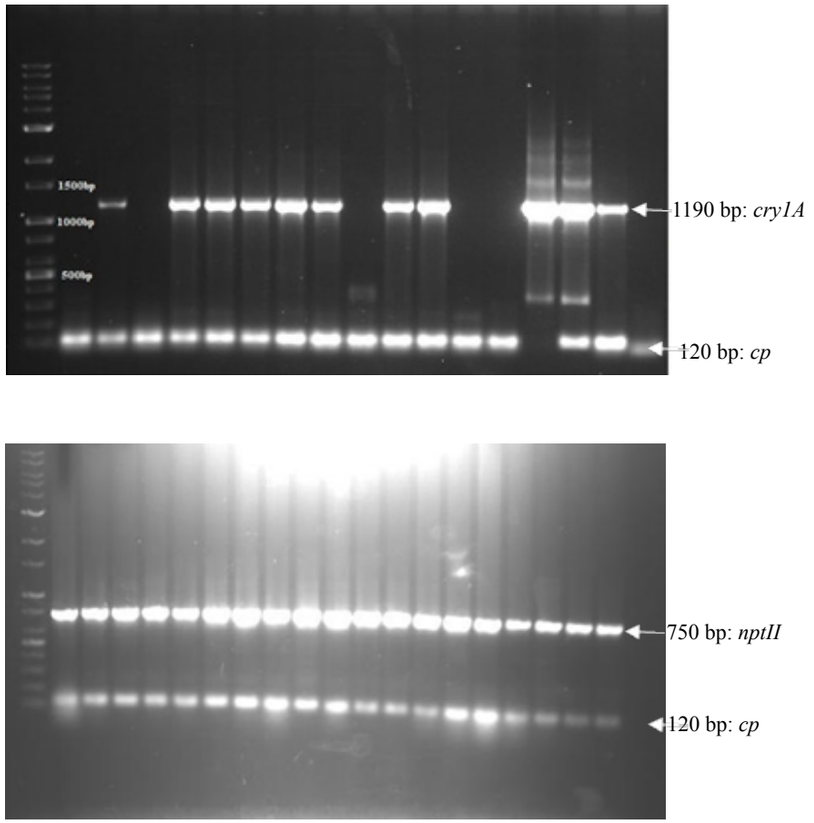
به‌منظور غربال گیاهان تراریخته احتمالی، شناسایی و تأیید آن‌ها انجام آزمون‌های مولکولی الزامی است.

۲-۱۰-۱- استخراج DNA از برگ‌های گیاهی

استخراج DNA با استفاده از روش CTAB (Doly, 1991) انجام شود. کیفیت و کمیت نمونه‌های DNA استخراج شده با الکتروفورز در ژل آگارز ۰/۸ درصد و مقایسه باندها با نوارهای DNAλ و همچنین استفاده از نانودراپ (خوانش در طول موج ۲۸۰/۲۶۰) ارزیابی شود و نمونه‌های DNA مناسب در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان استفاده نگهداری شوند.

۲-۱۰-۲- بررسی وجود ژن‌های *cry1Ab* و *nptII* با روش PCR

آزمون PCR به‌منظور بررسی اولیه و انتخاب لاین‌های تراریخته بر روی DNA استخراج شده با استفاده از آغازگر اختصاصی ژن *cry1Ab* (آغازگر مستقیم: 5´-GGC-GGC-GAG-AGG-ATC-GAG-AC-3´، منطبق بر نوکلئوتیدهای ۷۳- ناحیه رمزکننده و آغازگر معکوس: 5´-TCG-GCG-GGA-CGT-TGT-TGT-TC-3´، منطبق بر نوکلئوتیدهای ۱۲۷۶- ناحیه رمزکننده) انجام شود. از طرف دیگر به‌منظور بررسی لاین‌های به‌دست‌آمده از نظر وجود ژن *nptII*، واکنش PCR با حدود ۲۵ نانوگرم از DNA الگو با آغازگرهای اختصاصی ژن *nptII* (آغازگر مستقیم: 5´-GAA-CAA-GAT-GGA-TTG-CAC-GC-3´ و آغازگر معکوس: 5´-GAA-GAA-CTC-GTC-AAG-AAG-GC-3´) بر روی تمامی لاین‌هایی که وجود ژن‌های *cry1Ab* به‌وسیله PCR محرز شده، انجام شود. شرایط PCR در همه نمونه‌ها شامل یک چرخه با دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت پنج دقیقه و ۳۵ چرخه با دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت یک دقیقه، دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت یک دقیقه و دمای ۷۲ درجه‌سانتی‌گراد به‌مدت یک دقیقه و در نهایت یک چرخه اضافی با دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت پنج دقیقه (طویل شدن نهایی) است که در دستگاه ترموسایکلر انجام شود. محصول PCR برای ژن‌های *cry1Ab* و ژن *nptII* با استفاده از دستگاه الکتروفورز بر روی ژل آگارز یک درصد حاوی ۰/۱ میکروگرم در لیتر اتیدیوم بروماید تفکیک شود و در دستگاه Gel Doc عکسبرداری و از نظر تکثیر یا عدم تکثیر و همچنین اندازه قطعات تکثیری مورد ارزیابی قرار گیرد (شکل ۱۳).

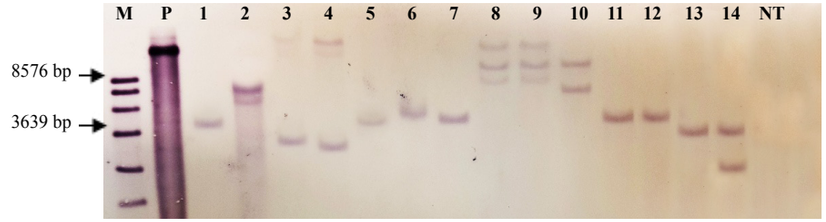


شکل ۱۳- آزمون PCR گیاهان تراریخته احتمالی با ژن‌های *cry1Ab* (الف) و *nptII* (ب). قطعه تکثیر شده ۱۱۹۰ جفت باز مورد انتظار مربوط به ژن *cry1Ab*، ۷۵۰ جفت باز مربوط به *nptII* و ۱۱۰ جفت باز مربوط به ژن داخلی *pot-cp* را نشان می‌دهد. L: نشانگر DNA 1Kb plus ladder ؛ P-: گیاه غیرتراریخته (کنترل منفی)؛ P: پلاسمید (کنترل مثبت)؛ W: آب (کنترل منفی)؛ Rec: ریکانستراکت (حاوی DNA گیاه کنترل و پلاسمید). سایر اعداد نشان‌دهنده شماره لاین‌های تراریخته احتمالی به‌دست آمده در محیط انتخابی هستند.

۲-۱۰-۳- آزمون سادرن بلاتینگ

به‌طور مختصر، با استفاده از سیستم نشان‌گذاری DIG کاوشگر اختصاصی ژن *cry1Ab* با کیت PCR DIG probe synthesis kit (Roche, Mannheim, Germany) تهیه شود. نشان‌دار کردن کاوشگر با DIG، طبق دستورالعمل کیت و با روش PCR و استفاده از پرایمر اختصاصی این ژن انجام شود. برای تعیین کیفیت و کمیت کاوشگر نشان‌دار شده، سه میکرولیتر از محصول PCR با الکتروفورز ژل آگارز یک درصد بررسی شود.

حدود ۳۰ میکروگرم DNA ژنومی از برگ گیاهانی که در آزمون PCR حضور تراژن در آن‌ها تأیید شده، گیاه غیرتراریخت به‌عنوان شاهد منفی و پلاسمید نوترکیب حاوی ژن مورد نظر (*cry1Ab*) به‌عنوان شاهد مثبت به‌وسیله آنزیم *HindIII* هضم شوند. حدود ۲/۵ واحد آنزیم به ازای هر میکروگرم DNA استفاده شده و واکنش‌های هضمی (با حجم نهایی ۲۰۰ میکرولیتر) در بن‌ماری با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌طور شبانه نگهداری شود. در مرحله بعد ابتدا کیفیت DNA هضم‌شده با الکتروفورز ژل آگارز ۰/۸ درصد ارزیابی شود. پس از تأیید هضم کامل DNA، DNA ژنومی هضم‌شده و هضم‌نشده روی ژل آگارز ۰/۸ درصد بارگذاری شده و در الکتروفورز با جریان ۵۰ میلی‌آمپر به‌مدت ۵ ساعت تفکیک شوند. ژل آماده شده با محلول HCl ۲۵۰ میلی‌مولار به‌مدت ۱۵ دقیقه تیمار شود. پس از شستشوی ژل با آب مقطر استریل، ژل در محلول NaOH ۰/٤ نرمال دو مرتبه و هر مرتبه به‌مدت ۱۵ دقیقه تیمار شده و دوباره با آب مقطر استریل شسته شود. با روش انتقال موئین در هرم سادرن، DNA از ژل به غشای نایلونی دارای بار مثبت انتقال داده شود. پس از گذشت ۸ تا ۱۰ ساعت، غشای نایلونی حاوی DNA برداشته شد و با محلول 2X SSC شستشوی سطحی شده و در آون ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ دقیقه نگهداری شود. پیش دورگ‌سازی، دورگ‌سازی غشا و مراحل بعدی تا عکسبرداری، همانند روش ذکر شده در دستورالعمل آزمون سادرن بلاتینگ انجام شود (Sambrook and Russell, 2001). آزمون سادرن تعداد نسخه‌های تراژن در هر لاین تراریخته را مشخص خواهد کرد و بدین ترتیب رخداد تراریخته تأیید خواهد شد (شکل ١٤).



شکل ١٤- آزمون سادرن بلاتینگ برخی از لاین‌های تراریخته سیب‌زمینی حاوی ژن *cry1Ab*. از کاوشگرهای اختصاصی ژن *cry1Ab* برای شناسایی تعداد نسخه‌های ژنی استفاده شده است. M: خط‌کش ملکولی VII نشاندار شده با DIG (شرکت Roche)؛ P، پلاسمید؛ NT، گیاه غیرتراریخته (کنترل)؛ مابقی اعداد مربوط به شماره لاین‌های تراریخته سیب‌زمینی است. تمامی نمونه‌های DNA با آنزیم *HindIII* هضم شدند. تعداد باندهای مربوط به هر لاین نشان دهنده تعداد نسخه تراژن در آن لاین تراریخته است.

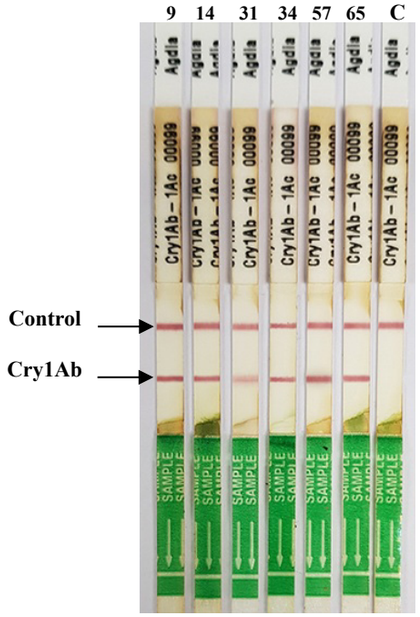
۲-۱۱- بررسی بیان پروتئین‌های Cry1Ab

پس از تأیید تعداد نسخه‌های تراژن موجود در لاین‌های تراریخته با استفاده از آزمون سادرن بلاتینگ، برای بررسی بیان پروتئین Cry1Ab در لاین‌های سیب‌زمینی تراریخته می‌توان از کیت Bt-Cry1Ab/ Ac ImmunoStripTest (شماره کاتالوگ STX 06200 شرکت Agdia آمریکا) براساس دستورالعمل شرکت سازنده و به شرح زیراستفاده کرد.

۱. حدود ۱۰۰ میلی‌گرم از بافت برگی درهاون چینی و با کمک ازت مایع ساییده شده و نمونه‌های پودر شده به ظرف‌های دو میلی‌لیتری منتقل شوند.

۲. دو میلی‌لیتر از بافر استخراج SEB4 کیت (با نسبت بافر SEB4: نمونه،۱:۲۰) به تیوب‌ها اضافه شده و سپس محتوای لوله‌ها با دستگاه ورتکس مخلوط شوند.

۳. در داخل محلول هر کدام از لوله‌ها یک عدد نوار ایمونواستریپ از قسمت پایین تا ارتفاع ۰/۵ سانتی‌متری قرار داده شود. پس از گذشت ۱ تا ۵ دقیقه باندهای پروتئین شاهد و Cry1Ab ظاهر خواهند شد. پس از ۱۰ دقیقه باندهای مربوطه به‌خوبی آشکار خواهند شد که نشان‌دهنده بیان موفقیت‌آمیز پروتئین‌های مربوطه در گیاهان تراریخته است (شکل ۱۵).



الف

شکل ۱۵- بررسی بیان پروتئین نوترکیب با روش ایمونواستریپ در گیاهان تراریخته حاوی ژن *cry-1Ab*. c: گیاه غیرتراریخته کنترل. شماره‌ها بیانگر لاین‌های تراریخته است. باند Cry1Ab نشان‌دهنده بیان پروتئین Cry1Ab در لاین تراریخته است. باند کنترل، نشان‌دهنده درستی آنالیز است.

۲-۱۲- زیست سنجی گیاهان تراریخته با لاروهای بید سیب‌زمینی

پس از تکمیل آنالیزهای ملکولی گیاهان سیب‌زمینی تراریخته برای سنجش کارایی ژن *cry1Ab* و میزان مقاومت آن‌ها در مقابل آفت هدف (بید سیب‌زمینی)انجام آزمون‌های زیست‌سنجی بر روی گیاهان تراریخته ضروری است (Mohammed et al., 2000).

۲-۱۲-۱- تکثیر و پرورش لارو بید سیب‌زمینی

برای تکثیر و پرورش لاروهای بید سیب‌زمینی، ابتدا لاروهای تهیه شده بر روی غده‌های سیب‌زمینی قرار گیرند (لاروها را می‌توان از مراکز تحقیقاتی گیاه‌پزشکی، حشره‌شناسی و در صورتی‌که فصل مناسب باشد می‌توان از غده‌های آلوده موجود در انبارها و حتی مزارع آلوده تهیه کرد). غده‌ها در ظروف تهویه‌دار و بر روی ماسه بادی موجود در کف آن قرار گیرد (شکل ۱۶). ظروف حاوی لاروها در دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد و دوره روشنایی/تاریکی ۸/۱۶ ساعت قرار داده شوند (شکل ۱۶). لاروها پس از تغذیه از غده‌ها و سپری نمودن دوره لاروی، شفیره‌های خود را در ماسه تشکیل می‌دهند (شکل ۱۶).

شکل ۱۶- مراحل مختلف پرورش بید سیب‌زمینی در شرایط آزمایشگاهی. الف: مرحله لاروی؛ ب: مرحله شفیرگی؛ ج: مرحله ظهور حشرات بالغ و تخم‌ریزی

شفیره‌ها با استفاده از الک مناسب جدا شده ودر ظرف مناسب برای جمع‌آوری تخم قرار داده شوند. پس از ظهور حشرات بالغ، تغذیه آن‌ها با عسلی که در لبه تور بالای ظرف قرار می‌گیرد، انجام شود. پس از جفت‌گیری حشرات، صفحات تخم‌ریزی هر ۲۴ ساعت برداشته شوند. صفحات تخم‌ریزی در درون پتری‌دیش قرار گرفته و با پارافیلم درزگیری شوند و تا زمان تفریخ تخم‌ها در همان شرایط پرورش حشره نگهداری شوند (برای نگهداری طولانی‌تر می‌توان ظرف حاوی تخم‌ها را در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری کرد). پس از گذشت ۳ روز، هم‌زمان با تفریخ تخم‌ها، نمونه‌ها برای زیست‌سنجی آماده خواهند بود.

در صورتی‌که پروانه بید سیب‌زمینی در دسترس باشد، می‌توان پس از جفت‌گیری، به‌منظور تهیه تخم آن‌ها را بر روی صفحات تخم‌ریزی نگه‌داری و تخم‌های حاصل را جمع‌آوری نمود و پس از تبدیل به لارو برای زیست‌سنجی استفاده کرد.

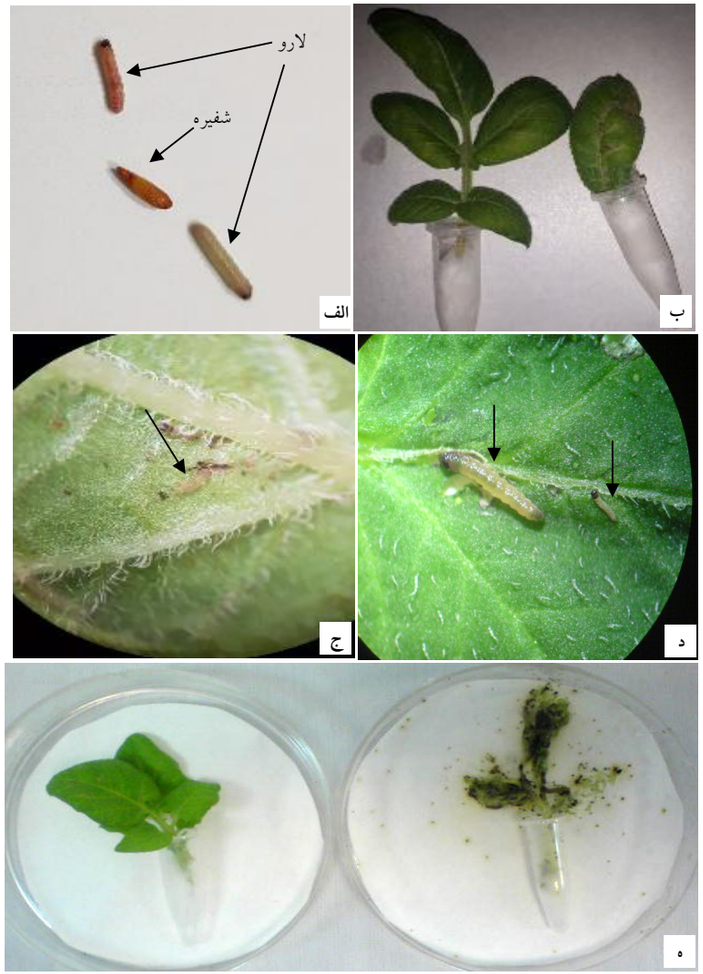
۲-۱۲-۲- روش زیست‌سنجی

زیست‌سنجی را می‌توان هم بر روی گیاهان درون شیشه‌ای و هم بر روی گیاهان گلخانه‌ای انجام داد. نمونه‌های برگی از دومین یا سومین برگ انتهایی دارای رشد کامل، از گیاهان جوان شش تا هشت هفته‌ای برای زیست‌سنجی تهیه شوند. دمبرگ برگ‌ها در داخل تیوپ‌های (۰/۵ میل‌لیتری) حاوی پنبه خیسانده شده با آب قرار داده شود و مجموعه فوق در داخل ظروف پتری‌دیش قرار گیرد (شکل ۱۷). سپس، تعداد مشخصی لارو (۸ تا ۱۰ عدد) سن اول بید سیب‌زمینی (حداکثر ۱۲ ساعته) روی برگ‌ها قرار گرفته و ظروف پتری‌دیش با پارافیلم درزگیری شوند. نمونه‌ها در اتاقک رشد با شرایط دمایی ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد، رطوبت نسبی ۷۰ درصد و ۱۶ ساعت نور قرار گیرند. بعد از سه روز، لاروها در زیر بینوکولر از برگ‌ها خارج شده و لاروهای زنده به روی برگی تازه از همان لاین و ازهمان موقعیت برای ادامه زیست‌سنجی منتقل شوند (شکل ۱۷). مرگ‌ومیر لاروها و درصد خسارت برگی در روزهای سوم و هشتم بعد از آلودگی ثبت شود و تمام لاروهای زنده در هر تکرار در روز ششم توزین شوند.

علاوه‌بر آن می‌توان از گیاهان گلخانه‌ای هم برای زیست‌سنجی استفاده کرد. برای این کار گیاهانی که در شرایط گلخانه رشد کافی دارند در زیر توری‌های مناسب قرار گرفته و تعداد مشخصی لارو بر روی آن‌ها قرار داده می‌شود (شکل ۱۸). پس از مدت مشخصی می‌توان میزان خسارت لاروها را بررسی کرد.

از آنجاکه بید سیب‌زمینی آفتی است که به غده‌ها هم خسارت وارد می‌کند، می‌توان به‌منظور زیست‌سنجی از غده‌های درون شیشه‌ای یا گلخانه‌ای نیز برای زیست‌سنجی استفاده کرد. بدین‌منظور تعداد مشخصی لارو بر روی غده‌ها قرار گرفته و پس از چند روز میزان خسارت و مرگ‌ومیر لاروها بررسی می‌شود (شکل ۱۹).

شکل ۱۹- زیست‌سنجی غده‌های سیب‌زمینی تراریخته نسبت به بید سیب‌زمینی بعد از چهار هفته.
الف: غده کامل ب: غده برش خورده . غده غیرتراریخته (راست) غده تراریخته (چپ)



شکل ۱۷- زیست‌سنجی لاین‌های تراریخته سیب‌زمینی در مقابل بید سیب‌زمینی. الف: تصویری از لارو و شفیره سن اول بید سیب‌زمینی. ب: برگ گیاهان شاهد (راست) و تراریخته (چپ) گیاه سیب‌زمینی در ابتدای زیست‌سنجی ج: نمایی از لاروهای بید سیب‌زمینی بر روی برگ در ابتدای آزمایش د: نمایی از لاروها سه روز پس از تغذیه بر روی لاین تراریخته (راست) و غیرتراریخته (چپ). ه: برگ گیاه غیرتراریخته (راست) و تراریخته (چپ) در روز هشتم زیست‌سنجی.

شکل ۱۸- زیست‌سنجی لاین‌های تراریخته مقاوم به بید سیب‌زمینی در شرایط گلخانه. سمت راست: لاین تراریخته مقاوم به بید سیب‌زمینی؛ سمت چپ: لاین غیرتراریخته (۱۵ روز پس از شروع تغذیه با لاروها).

۳- جمع‌بندی

تلاش برای اصلاح ارقام سیب‌زمینی مقاوم به بید سیب‌زمینی با روش‌های سنتی موفقیت‌های کمی داشته است (Naeem et al., 2021). پروتئین‌های کریستالی Cry (پروتئین Bt) که توسط باکتری *B.thuringiensis subsp. kustaki* رمز می‌شوند، در حد بسیار بالایی اثر کشندگی بر روی لاروهای بید سیب‌زمینی دارند. تراریختی سیب‌زمینی با ژن‌های *cry1Ab* یکی از روش‌های مهم در مدیریت تلفیقی آفات برای کنترل آفت بید سیب‌زمینی محسوب می‌شود. بدیهی است برای اطمینان از تأثیر گیاهان تراریخته سیب‌زمینی در مقاومت به آفات، به‌کارگیری راهکارهای مدیریت مقاومت بلافاصله پس از رهاسازی رقم تراریخته بسیار حائز اهمیت است. راهکارهای مختلفی برای مدیریت مقاومت پیشنهاد شده است که می‌توان به استفاده هم‌زمان و ترکیبی از ژن‌های مقاومت به آفت که با روش‌های مختلفی عمل می‌کنند؛ بیان ژن‌های مقاومت در زمان یا در بافت خاص؛ بیان ژن در حد پایین همراه با کنترل بیولوژیکی؛ ترکیب، چرخش یا کپه‌کاری گیاهان تراریخته با بیان ژنی بالا با استفاده از پناهگاه و ... اشاره کرد. علاوه‌بر آن استفاده از راهکارهای تلفیقی مدیریت آفات هم بسیار کارآمد خواهد بود.

بدیهی است بعد از تولید گیاهان تراریخته، ارزیابی‌های ایمنی زیستی آن در قالب ارزیابی مخاطرات احتمالی گیاهان تراریخته الزامی است. این ارزیابی‌ها هم در سطح ایمنی غذایی و هم در سطح ایمنی زیست‌محیطی و در قالب دستورالعمل‌های اختصاصی انجام می‌شود (رهنما، ۱۳۹۹؛ رهنما، ۱۴۰۰-الف و ب). امکان رهاسازی و کشت آن‌ها تنها در صورت تأیید این گیاهان با این آزمون‌های اختصاصی وجود خواهد داشت. فرایند رهاسازی و کشت محصولات تراریخته در تمامی کشورها و از جمله ایران تابع مقرراتی است که مصرف این دسته از محصولات را برای مصرف‌کنندگان نهایی ایمن خواهد کرد.

٤- منابع

حبیبی ج، حاجیان‌فر ر، میرکمالی س ح (۱۳۸۳) آفات و بیماری‌ها و علف‌های هرز مهم سیب زمینی در ایران و مدیریت تلفیقی آن‌ها، انتشارات نشر آموزش کشاورزی.

رهنما ح (۱۳۹۹) راهنمای ارزیابی مخاطرات احتمالی غذاهای حاصل از گیاهان تراریخته. نشر آموزش کشاورزی، ۱۲۰ صفحه.

رهنما ح (۱٤۰۰–الف) راهنمای ارزیابی مخاطرات احتمالی زیست‌محیطی محصولات تراریخته. انتشارات روناس. ۱۷۳ صفحه.

رهنما ح (۱٤۰۰–ب) بررسی جنبه‌های محیط‌زیستی سیب‌زمینی تراریخته. سازمان حفاظت محیط زیست. ۸٤ صفحه.

سلطانی ه (۱۳۹۵) دستورالعمل: مدیریت بید سیب‌زمینی در مزرعه و انبار. مؤسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور، شماره ۵۰٤۸٦.

سیدان س م، احمدی ر، سلگی م (۱٤۰۱) تعیین خسارت آفت بید سیب‌زمینی و ارائه راهکار کاهش آن در استان همدان. علوم کاربردی سیب‌زمینی، ۲: ۷–۱۲.

کریمی ک (۱۳۹۸) دستورالعمل اجرایی: مدیریت تلفیقی بید سیب‌زمینی (Potato tuber moth (*Phtrorima operculella*). سازمان حفظ نباتات. شماره دستورالعمل ۹۸۰٦۷۸.

نوری قنبلانی ق، زمانی ر، عبداللهی ع، حسن‌پناه د (۱۳۹۷) مقایسه خسارت بید سیب‌زمینی، *Phthorimaea operculella* (Zeller)، در نه ژرم پلاسم سیب‌زمینی و تأثیر خاک‌دهی مجدد پای بوته و تغییر تاریخ برداشت در کنترل آفت. پژوهش‌های کاربردی در گیاه‌پزشکی، ۷: ۱۲۱–۱۳۱.

Adhikari A, Shrestha AK, Timsina S and Adhikari A (2022) Efficacy of biopesticides in management of potato tuber moth, Phthorimaea operculella (Zeller), in potato under storage. Journal of Agriculture and Food Research, 10: 100411

Abbas MST (2018) Genetically engineered (modified) crops (Bacillus thuringiensis crops) and the world controversy on their safety. Egyptian Journal of Biological Pest Control, 28:52https://doi.org/10.1186/s41938-018-0051-2.

Bravo A, Gill SS and Soberon M (2007) Mode of action of Bacillus thuringiensis Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. Toxicon, 49, 423–435.

Canedo V, Benavides J, Golmirzaie A, Cisneros F, Ghislain M and Lagnaoui A (1999) Assessing Bt-transformed potatoes for potato tuber moth, Phthorimaea operculella (Zeller), management. In: Program Report 1997–98 Impact on a Changing World, pp. 161–170. Lima, Peru: International Potato Centre (CIP).

Chakrabarti, SK, Mandaokar AD, Shukla A, Pattanayak D, Naik PS, Sharma RP and Kumar P.A. (2000) Bacillus thuringiensis *cry1Ab* gene confers resistance to potato against Helicoverpa armigera (Hubner). Potato Res. 43, 143–152.

Damalas CA and Koutroubas SD (2018) Current Status and Recent Developments in Biopesticide Use. Agriculture 2018, 8, 13; doi:10.3390/agriculture8010013

Davidson MM, Jacobs JME, Reader JK, Butler RC, Frater CM, Markwick NP, Wratten SD and Conner AJ (2002) Development and evaluation of potatoes transgenic for a *cry1Ac9* gene conferring resistance to potato tuber moth. J. Am. Soc. Hortic. Sci. 127, 590–596.

Davidson MM, Takla MFG, Jacobs JME, Butler RC, Wratten SD and Conner AJ (2004) Transformation of potato (Solanum tuberosum) cultivars with a *cry1Ac9* gene confers resistance to potato tuber moth (Phthorimaea operculella). N Z J. Crop. Hort. 32, 39–50.

Douches DS, Coombs J, Lacey L, Felcher KJ and Pett W (2011) Evaluations of transgenic potatoes for resistance to potato tuberworm in the laboratory and field. Am. J. Potato Res. 88, 91–95.

Douches DS, Westedt AL, Zarka K and Schroetre B (1998) Potato transformation to combine natural and engineered resistance for controlling tuber moth. HortScience, 33:1053-1056.

Ebora RV, Ebora MM and Sticklen MB (1994) Transgenic potato expression the Bacillus thuringiensis *cryIA(c)* gene effects on survival and food consumption of Phthorimea operculella (Lepidoptera: Gelechiide) and Ostrinia nubilalis (Lepidoptera:Nactuidae). J. Econ. Entomol., 87:1122-1127.

Fischhoff DA, Bowdish KS, Perlak FJ, Marrone PG, MvCormick SM, Niedermeyer JG, Dean DA, Kusano-Kretzmer K, Mayer EJ, Rochester DE, Rogers SG and Fraley RT (1987) Insect tolerant tomato plants. Biotechnology, 5: 807-812.

Ghasimi Hagh Z, Rahnama H, Mahna N, Panahandeh J, Baghban Kohneh Rouz B, and Arab Jafari KM (2009) Green-tissue-specific, C4-PEPC- promoter-driven expression of *Cry1Ab* makes transgenic potato plants resistant to tuber moth (Phthorimeae operculella, Zeller). Plant Cell Reports. 28:1869–1879.

Gleave AP, Mitra DS, Markwick NP, Morris BAM and Beuning LL (1998) Enhanced expression of the Bacillus thuringiensis *cry9Aa2* gene in transgenic plants by nucleotide sequence modification confers resistance to potato tuber moth. Mol. Breed., 4: 459-472.

Grafius E and Douches D (2008) The present and future role of insect-resistant genetically modified potato cultivars in IPM. In: Romeis J, Shelton A, Kennedy G (eds) Integration of insect-resistant genetically modified crops within IPM programs, vol 5. Springer, Dordrecht, pp 195–221.

Jacobs JME, Takla MFG, Docherty LC, Frater CM, Markwick NP, Meiyalaghan S and Conner AJ (2009) Potato transformation with modified nucleotide sequences of the *cry9Aa2* gene improves resistance to potato tuber moth. Potato Res. 52, 367–378.

Jansens S, Cornelissen M, Clerco RD, Reynaerts A and Peferoen M (1995) Phthorimaea operculella (Lepidoptera: Gelechiidae) resistance in potato by expression of the Bacillus thuringiensis *CryIA(b)* insecticidal crystal protein. J. Econ. entomol., 88:1469–1476.

Kumar A (1995) Agrobacterium mediated transformation of potato genotypes. pp. 121- 128. In: Gartland K.M.A and M.R. Davey (eds.). Methods in molecular biology. Agrobacterium protocols. Vol. 44. Humana Press, Totowa, NJ.

Lagnaoui A, Ben Salah H and El-Bedewy R (1996) Integrated management to control potato moth in North Africa and the Middle East. CIP Circular, 96:10-15.

Li W, Zarka KA, Douches DS, Coombs JJ, Pett WL and Grafius EJ (1999) Coexpression of potato PVYo coat protein and *cryV-Bt* genes in potato. J. Am. Soc. Hortic. Sci. 124, 218–223.

Marrone PG (2014) The market and potential for biopesticides. In Biopesticides: State of the Art and Future Opportunities; Gross, A.D., Coats, J.R., Duke, S.O., Seiber, J.N., Eds.; American Chemical Society: Washington, DC, USA; pp. 245–258.

Martinez-Prada MM, Curtin SJ and Gutierrez-Gonzales J (2021) Potato improvement through genetic engineering. GM CROPS & FOOD, 12: 479–496. https://doi.org/10.1080/21645698.2021.199368.

Meiyalaghan S, Jacobs JME, Butler RC, Wratten SD and Conner AJ (2006a) Transgenic potato lines expressing *cry1Ba1* or *cry1Ca5* genes are resistant to potato tuber moth. Potato Res. 49, 203–216.

Meiyalaghan S, Jacobs JME, Butler RC, Wratten SD and Conner AJ (2006b) Expression of *cry1Ac9* and *cry9Aa2* genes under a potato light-inducible Lhca3 promoter in transgenic potatoes for tuber moth resistance. Euphytica, 147, 297–309.

Meiyalaghan S, Takla MFG, Barrell PJ, Keijzer RM, Jacobs JME and Conner AJ (2005) Resistance to tuber moth following the transfer to potato of a *cry9Aa2* gene under the control of constitutive and light-inducible promoters. Acta Hortic. 45, 71–77.

Mohammed A, Douches DS, Peet W, Grafius E, Coombs J, Liswidowati LW and Madkour MA (2000) Evalution of potato tuber moth (Lepidoptera: Glechiidae) resistance in tubers of *Bt-cry5* transgenic potato lines. J. Econ. Entomol., 93: 472-476.

Murashige T and Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. Physiol Plant 15:473–497.

Naeem M, Demirel U, Farhan Yousaf M, Caliskan S and Caliskan ME (2021) Overview on domestication, breeding, genetic gain and improvement of tuber quality traits of potato using fast forwarding technique (GWAS): A review. Planr Breeding, 140: 519-542.

Naimov S, Dukiandjiev S and de Maagd RA (2003) A hybrid Bacillus thuringiensis delta-endotoxin gives resistance against a coleopteran and a lepidopteran pest in transgenic potato. Plant Biotechnol. J. 1, 51–57.

Olson S (2015) An analysis of the biopesticide market now and where is going. Outlooks Pest Manag. 26: 203–206.

Ooms G, Burrell M, Karp A, Bevan M and Hille J (1987) Genetic transformation in two potato cultivars with T-DNA from disarmed Agrobacterium. Theoretical and Applied Genetics; 73:744-50.

Perlak FJ, Fuchs RL, Dean DA, McPherson SL and Fischhoff DA (1991) Modification of the coding sequence enhances plant expression of insect control protein genes. Proc. Natl Acad. Sci. USA, 88, 3324–3328.

Perlak FJ, Stone TB, Muskopf YM, Petersen LJ, Parker GB, McPherson SA, Wyman J, Love S, Reed G, Biever D and Fischhoff DA (1993) Genetically improved potatoes-protection from damage by Colorado potato beetles. Plant Mol. Biol. 22, 313–321.

Raspor M and Cingel A (2021) Genetically Modified Potato for Pest Resistance: Thrift or Threat? DOI: 10.5772/intechopen.98748.

Rico E, Ballester V and M_ensua JL (1998) Survival of two strains of Phthorimaea operculella (Lepidoptera: Gelechiidae) reared on transgenic potatoes expressing a Bacillus thuringiensis crystal protein. Agronomie, 18, 151–155.

Rondon SI, DeBano SJ, Clough GH, Hamm PB, Jensen A, Schreiber A, Alvarez JM, Thornton M, Barbour J and Dogramaci M (2007) Biology and Management of the Potato Tuberworm in the Pacific Northwest. PNW.594

Salehi Jouzani, GR, Komakhin RA, and Piruzian ES (2005) Comparative study of the expression of the native, modified, and hybrid *cry3a* genes of Bacillus thuringiensis in prokaryotic and eukaryotic cells. Russ J Genet, 41:116-121.

Salehian H, Rahnama H, Dezhsetan S and Babaei S (2021) Constitutive expression of a synthetic *cry1Ab* gene confers resistance to potato tuber moth (Phthorimaea operculella Zeller) larva. Crop Breeding and Applied Biotechnology, 21(1): e31292119.

Sambrook and Russell (2001) Molecular cloning. Cold Harbor Laboratory Press. Sci 127: 590–596.

Schnepf HE, Crickmore N, Van Rie J, Lereclus D, Baum J, Feitelson J, Zeigler DR and Dean DH (1998) Bacillus thuringiensis and its pesticidal crystal proteins. Microbiol Mol. Biol. R., 775–806.

Van Frankenhuyzen K (1993) The challenge of Bacillus thuringiensis. In: Entwistle, P. E., Cory, J. S., Bailey, M. J., and Higgs, S. (eds) Bacillus thuringiensis, An Environmental Biopesticide: Theory and Practice, John Wiley and Sons, Chichester, UK, 1-35.

Van Frankenhuyzen K (2009) Insecticidal activity of Bacillus thuringiensis crystal proteins. J. Invertebr. Pathol. 101, 1–16.

Wang F, Peng S, Cui K, Nie L and Huang J (2014) Field performance of Bt transgenic crops: A review. Australian Journal of Crop Science, 8:18-26.

Westedt AL, Douches DS, Pett W and Grafius EJ (1998) Evaluation of natural and engineered resistance mechanisms in Solanum tuberosum L. for resistance to Phthorimaea operculella Zeller. J. Econ. Entomol., 91:552-556.