Shahid Bahonar University of Kerman
Agricultural Biotechnology Journal
Iranian Biotechnology Society
Print ISSN: 2228-6705 Online ISSN: 2228-6500

SCMV-based overexpression of insecticidal proteins in maize and evaluation of their effects against fall armyworm

Mahdieh Sadeghian

PhD Candidate, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Zabol, Zabol, Iran. Email: Mahdie.Sadeghi@gmail.com

Mahmood Solouki

*Corresponding author. Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Zabol, Zabol, Iran. Email: Mahmood.Solouki@gmail.com

Jafar Zolala

Associate professor, Department of Biotechnology, Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran. Email: j.zolala@uk.ac.ir

Abbasali Emamjomeh

Associate professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Zabol, Zabol, Iran. Email: Aliimamjomeh@uoz.ac.ir

Georg Jander

Professor, Boyce Thompson Institute for Plant Research, Ithaca, New York 14853, USA. Email: gj32@cornell.edu

Abstract

Objective

Zea maiys L. is a key cereal worldwide which its yield is threatened severely by numerous herbivorous insects such as notorious fall armyworm (*Spodoptera frugiperda* Smith.). Current management strategies are basically depended upon costly and time-consuming methods such as chemicals and transgenic maize plants resulted in resistant pest populations in addition to health and environmental concerns. Transient In-planta expression of novel insecticidal proteins using viral vectors can explore the most efficient candidates against fall armyworm under time-saving, cost-effective and more real conditions. Present study aimed to investigate the effects of three insecticidal proteins including PTA (*Pinellia ternata* agglutinin), OAIP-1 and Nc1a (toxins derived from two spiders' venom) against fall armyworm using Sugarcane Mosaic Virus vector.

Materials and methods

Coding sequences of considered insecticidal proteins were inserted into pSCMV vector between P1 and HC-Pro and recombinant constructs agro-injeced into maize seedlings. Successful overexpression of the proteins was confirmed by RT-PCR and qRT-PCR. In-planta insect bioassays were performed and weight gain of fall armyworm larvae was compared between infected and control plants after seven and 14 days of feeding.

Results

Overexpression of foreign genes was confirmed by RT-PCR and qRT-PCR results. Results of in planta insect bioassays showed that SCMV-based expression of insecticidal proteins in maize plants caused a statically significant reduction in weight gain of fall armyworm larvae in comparison with controls. After seven of feeding on plants expressing Nc1a and PTA and OAIP-1 larval weight showed a reduction by 52, 54 and 31%, respectively, in comparison with GFP expressing plants. These results were stable after two weeks of larval feeding for two spider toxins but declined to 31% for PTA.

Conclusions

In conclusion, under in planta condition, PTA, Nc1a and OAIP-1 were efficiently affected fall armyworm growth. They could be considered individually or in fusions (lectin- spider toxin) for further investigations to engineer maize resistance to fall armyworm.

Keywords: *Spodoptera frugiperda*, Overexpression, Sugacane Mosaic virus, Lectin, Spider venom toxins.

Paper Type: Research Paper.

Citation: Sadeghian M, Solouki M, Zolala J, Emamjomeh A (2024) SCMV-based overexpression of insecticidal proteins in maize and evaluation of their effects against fall armyworm. *Agricultural Biotechnology Journal* 16(4), 49-76.

Agricultural Biotechnology Journal 16 (4), 49-76. DOI: 10.22103/jab.2024.22853.1547

Received: August 22, 2024. Received in revised form: October 02, 2024.

Accepted: October 03, 2024. Published online: December 30, 2024.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.

© the authors

مجله بیوتکنولوژی کشاورزی
شاپا چاپی: ۶۷۰۵-۲۲۲۸ شاپا الکترونیکی: ۶۵۰۰-۲۲۲۸

بیان بیش از حد پروتئین‌های حشره‌کش با استفاده از ناقل مبتنی بر ویروس موزائیک نیشکر در گیاه ذرت و ارزیابی اثرات آن‌ها بر کرم برگخوار پائیزه

مهدیه صادقیان بهنوئی

دانشجوی دکترای بیوتکنولوژی کشاورزی، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، کد پستی: ۳۵۸۵۶۹۸۶۱۳، زابل، ایران. رایانامه: Mahdie.Sadeghi@gmail.com

محمود سلوکی

*نویسنده مسئول: دانشیار، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، کد پستی: ۳۵۸۵۶۹۸۶۱۳، زابل، ایران. رایانامه: Mahmood.Solouki@gmail.com

جعفر ذوالعلی

دانشیار، گروه مهندسی بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کد پستی: ۷۶۱۶۹۱۳۴۳۹، کرمان، ایران. رایانامه: j.zolala@uk.ac.ir

عباسعلی امام‌جمعه

دانشیار، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، کد پستی: ۳۵۸۵۶۹۸۶۱۳، زابل، ایران. رایانامه: Aliimamjomeh@uoz.ac.ir

جورج جندر

استاد، موسسه تحقیقات گیاهی بویس- تامپسون، کد پستی: ۱۴۸۵۳، ایتاکا، نیویورک، ایالات متحده آمریکا. رایانامه: gj32@cornell.edu

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۶/۰۱ تاریخ دریافت فایل اصلاح شده نهایی: ۱۴۰۳/۰۷/۱۱ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۷/۱۲

چکیده

هدف: ذرت (*Zea mays* L.) یکی از مهم‌ترین گیاهان زراعی در سراسر دنیا است که توسط آفات گیاه‌خوار متعددی از جمله کرم برگخوار پائیزه (*Spodoptera frugiperda* Smith.) تهدید می‌شود. روش‌های کنترل این آفات عمدتاً مبتنی بر آفت‌کش‌های شیمیایی، اصلاح انتخابی و تولید گیاهان تراریخته است که علاوه بر هزینه و زمان‌بر بودن، در برخی موارد، عواقب زیست‌محیطی و بهداشتی جبران‌ناپذیری ایجاد می‌نمایند. بیان موقت پروتئین‌های آفت‌کش با استفاده از ویروس‌های گیاهی می‌تواند تحمل گیاه را

در زمان لازم، به صورت هدفمند نسبت به آفات بهبود دهد. پژوهش حاضر با هدف افزایش مقاومت گیاه ذرت به آفت کرم برگخوار پائیزه از طریق بیان موقت سه پروتئین حشره‌کش شامل PTA (*Pinellia ternata* agglutinin)، OAIP-1 (توکسین به دست آمده از زهرابه عنکبوت *Nephila clavata*) و Nc1a (توکسین به دست آمده از زهرابه عنکبوت *Selenotypus plumipes*) به واسطه ناقل مهندسی‌شده ویروس موزائیک نیشکر در گیاه ذرت تشریح می‌نماید.

مواد و روش‌ها: توالی رمزکننده این پروتئین‌ها، در ناحیه بین توالی P1 و HC-Pro در ناقل pSCMV درج و با استفاده از اگروباکتریوم به گیاهان ذرت منتقل شد. گیاهان ذرتی که به صورت موفقیت‌آمیز پروتئین‌های مذکور را بیان نمودند، پس از تائید با استفاده از RT-PCR و qRT-PCR، در آزمون‌های زیست‌سنجی مورد تغذیه لاروهای آفت کرم برگخوار پائیزه قرار گرفت.

نتایج: نتایج حاصل از آزمون‌های زیست‌سنجی نشان داد که لاروهای گیاهان ذرتی که این ژن‌های خارجی را بیان می‌نمودند در مقایسه با لاروهای تغذیه شده از گیاهان شاهد، به طور معناداری کاهش وزن نشان دادند. به طوری که پس از ۷ و ۱۴ روز تغذیه روی گیاهان حاوی پروتئین‌های نوترکیب، بیشترین کاهش وزن مربوط به لاروهای تغذیه شده روی گیاهان حاوی توکسین عنکبوتی Nc1a بود.

نتیجه‌گیری: استفاده از این پروتئین‌های حشره‌کش به ویژه Nc1a می‌تواند برای بیان پایدار در ذرت علیه آفات گیاهخوار مدنظر قرار گرفته و استفاده از این سیستم برای غربالگری عملکرد پروتئین‌های حشره‌کش در گیاه ذرت می‌تواند باعث صرفه‌جویی قابل توجه در زمان و هزینه شود.

کلیدواژه‌ها: *Spodoptera frugiperda*، بیان بیش از حد، ویروس موزائیک نیشکر، لکتین، توکسین‌های عنکبوتی.

نوع مقاله: پژوهشی.

استناد: صادقیان مهدیه، سلوکی محمود، ذوالعلی جعفر، امام‌جمعه عباسعلی، جندر جورج (۱۴۰۳) بیان بیش از حد پروتئین‌های حشره‌کش با استفاده از ناقل مبتنی بر ویروس موزائیک نیشکر در گیاه ذرت و ارزیابی اثرات آن‌ها بر کرم برگخوار پائیزه. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی، ۱۶(۴)، ۷۶-۴۹.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.

© the authors

مقدمه

ذرت (*Zea mays* L.) یکی از غلات کلیدی و دومین محصول زراعی از نقطه نظر سطح زیر کشت در سراسر جهان است (FAOSTAT 2022). این محصول برای تغذیه دام استفاده و به محصولات غذایی و صنعتی فراوانی از جمله نشاسته، شیرین-

کننده‌ها، روغن ذرت، الکل، و اتانول سوختی فرآوری می‌شود (Shiferaw et al. 2011; Kanyamasoro et al. 2012). عملکرد و کیفیت محصول ذرت توسط بیش از ۱۰۰ گونه مختلف از حشرات آفت جونده و مکنده متعلق به راسته‌های بالپولک‌داران، سخت‌بالپوشان، جوربالان و ناجوربالان مورد تهدید است (Meissle et al. 2010; Betsiashvili et al. 2015; McMullen et al. 2009). یکی از آفات کلیدی این محصول کرم برگخوار پائیزه (*Spodoptera frugiperda*) است که بومی آمریکا بوده اما دامنه میزبانی گسترده، قدرت پرواز بالا، توانایی مهاجرت در فواصل طولانی و همچنین تولید تخم بالا در حشرات ماده، طی سال‌های اخیر آن را به آفتی مهاجم و خسارتزا در بسیاری از مناطق کاشت ذرت از آمریکا تا آسیا مبدل ساخته است. به طوری که از سال ۲۰۱۶ تاکنون این آفت از آمریکا به بیش از ۸۰ کشور گسترش پیدا کرده است (Midega et al. 2023; Goergen et al. 2016). در سال ۲۰۲۳ (مردادماه ۱۴۰۲) این آفت اولین بار در مزارع ذرت شهرستان ارزوئیه استان کرمان گزارش گردید. استقرار سریع جمعیت آفت در این منطقه منجر به بروز خسارت قابل توجهی به محصول ذرت این استان گردید (Naseri et al. 2024). پس از آن، حضور آفت در استان‌های فارس، هرمزگان، سیستان و بلوچستان، بوشهر و کهگیلویه و بویراحمد نیز گزارش شد و بیم آن می‌رود به زودی در سراسر کشور همه‌گیر شده، خسارت وسیعی به بسیاری از محصولات گیاهی کشور وارد نماید.

لاروهای مهاجم این آفت با تغذیه از کلیه اندام‌های هوایی ذرت شامل برگ، خوشه‌های انتهائی و میوه قادرند خسارت اقتصادی قابل ملاحظه‌ای را به عملکرد ذرت وارد نمایند (Tsai et al. 2020). روش‌هایی که هم اکنون برای کنترل این آفت در دسترس است شامل کاربرد حشره‌کش‌های شیمیایی و ذرت تراریخته حاوی توکسین‌های باکتری *Bacillus thuringiensis* (Bt) است، اما تاثیر این روش‌ها به دلیل بروز مقاومت در جمعیت آفت رو به کاهش است (Zhang et al. 2020; Huang et al. 2014; Abbas 2018; Yainna et al. 2022). لذا توجه محققین به شناسایی و جداسازی پروتئین‌های حشره‌کش جدید با مکانیسم اثر منحصر بفرد و دامنه اثر گسترده‌تر معطوف شده است. یکی از اصلی‌ترین منابع پروتئین‌های ضدحشره، گیاهان و یک دسته خاص از پروتئین‌های دفاعی گیاهان به نام لکتین‌ها هستند که می‌توانند به طور اختصاصی با کربوهیدرات‌های خاص برهمکنش دهند (Hivrale and Ingale 2013). لکتین‌ها به پروتئین‌های گیرنده غشایی اپی‌تلیوم روده حشره متصل شده و منجر به کاهش جذب مواد مغذی و نفوذپذیری غشا می‌شوند (Bandyopadhyay et al. 2001). طی دو دهه گذشته، گزارشات متعددی پیرامون فعالیت ضدحشره‌ای این پروتئین‌ها علیه آفات جونده و مکنده متعددی از راسته‌های بالپولک‌داران، سخت‌بالپوشان، دوبالان و جوربالان به چاپ رسیده است (Singh et al. 2023; Khandagale et al. 2022, Vandenborre et al. 2011; Macedo et al. 2015). یکی از لکتین‌های گیاهی که علاوه بر اثرات ضدحشره‌ای آن علیه برخی آفات جونده و مکنده، اثرات ضدقارچی، ضدباکتریایی، ضدنماتدی و حتی ضدویروسی آن ثابت شده است لکتین یا آگلوتینین گیاه (PTA) *Pinellia ternata* است. ژن *pta* با استفاده از RACE-PCR همسانه‌سازی و با هدف بهبود مقاومت نسبت به آفات مکنده در چندین گیاه از جمله برنج، توتون و گندم بیان شده است (Jin et al. 2012; Ling et al. 2010; Hongyu et al. 2003; Yao et al 2003; Yu and Wei 2008; Gaofu et al. 2008; Umer et al. 2020; Zhang et al. 2021).

یکی دیگر از منابع غنی توکسین‌های حشره‌کش، زهرهای عنکبوتی هستند. عنکبوت‌ها متنوع‌ترین جانوران سمی و از فراوان‌ترین شکارگرهای خشکی هستند (Windley et al. 2012). هر زهر عنکبوتی می‌تواند محتوی بیش از هزار توکسین پپتیدی باشد که اکثرشان دارای فعالیت حشره‌کشی هستند. در واقع توکسین‌های پپتیدی متعددی از زهرهای عنکبوتی جداسازی شده‌اند که علیه راسته‌های مختلفی از حشرات فعال هستند (Tedford et al. 2004; Khan et al. 2006; Cao et al. 2010; Wang et al. 2019; Vásquez-Escobar et al. 2023). μ-NPTX-Nc1a و OAIP-1 دو توکسین هستند که در سال‌های اخیر به ترتیب از زهرابه عنکبوت‌های *Nephila clavata* و *Selenotypus plumipes* جداسازی و تاثیر حشره‌کشی آن‌ها به اثبات رسیده است (Jin et al. 2017; Hardy et al. 2013).

پیشرفت در تکنولوژی‌های توالی‌یابی ژنوم و ترنسکریپتوم منجر به فهرست طویلی از ژن‌های حشره‌کش کاندید شده است که ارزیابی عملکرد و غربالگری اولیه تاثیر این ژن‌ها بر آفات هدف یک چالش اساسی پیش روی محققین است (Wang et al. 2011 Yang et al. 2020, Edwards and Batley 2010; Marudamuthu et al. 2023). تراریختگی پایدار گیاهان یک روش متداول برای بیان ژن دلخواه و شناسایی عملکرد آن به ویژه در گیاهانی مانند ذرت است اما آزمودن تاثیر ژن‌های خارجی برای کنترل حشرات آفات در گیاهان تراریخته معمولاً وقت‌گیر، هزینه‌بر و پرزحمت است (Kawazu, 2012; Lee et al. 2015). به علاوه، رخدادهای تراریخته معمولاً به دلیل تاثیر محل درج ژن و تعداد کپی ژن درج شده می‌توانند از نظر بیان ژن متغیر باشند (Wroblewski et al. 2005). به دنبال چنین اشکالاتی، علاقه روزافزونی به سیستم‌های بیان موقت درون‌گیاهی از جمله استفاده از ناقل‌های ویروسی به وجود آمده است که امکان غربالگری اولیه سریع ژن‌های کاندید برای صفات یا پاسخ‌های سلولی ویژه را فراهم می‌آورند (Lawrence and Novak 2001; Lee et al. 2015; Chung et al. 2021; Tyurin et al. 2020).

در حال حاضر، حداقل یازده ویروس مختلف برای کاربرد به عنوان ناقل‌های خاموشی، بیان و ویرایش ژن در غلات از جمله ذرت بررسی و معرفی شده‌اند که هر یک حائز مزایا و معایبی هستند. به طور مثال برخی از آن‌ها تنها توانایی درج و نگه‌داری توالی‌های کوتاه خارجی را در خود دارند (Beernink and whitham, 2023). ویروس موزائیک ارزنی دم روباهی (Foxtail Mosaic Virus, FoMV)، ویروس موزائیک نواری جو (Barley Stripe Mosaic Virus, BSMV)، ویروس موزائیک کوتولگی ذرت (Maize Dwarf Mosaic Virus, MDMV)، ویروس موزائیک ذرت (Maize Mosaic Virus, MMV)، ویروس موزائیک خطی گندم (Wheat Streak Mosaic Virus, WSMV)، ویروس موزائیک زرد نواری جو (Barley Yellow Striate Mosaic Virus, BYSMV) و ویروس موزائیک نیشکر (Sugarcane Mosaic Virus, SCMV) به عنوان ناقلین ویروسی جهت بیان پروتئین‌های خارجی در گیاه ذرت مورد استفاده و بررسی قرار گرفته‌اند (Mei et al. 2016; Mei et al. 2019a,b; Bouton et al. 2018; Haupt et al. 2001; Xie et al. 2021; Kanakala et al. 2022; Gao et al. 2019; Tatineni et al. 2010). در این میان ویروس موزائیک ارزنی دم روباهی موفق‌ترین ناقل برای بیان ژن‌های

خارجی در گیاه ذرت بوده است که برای بررسی عملکرد ژن‌های مقاومت، ژن‌های دخیل در ایمنی گیاه و برهمکنش‌های ذرت- قارچ و ذرت- باکتری نیز به طور موفقیت‌آمیز استفاده شده است (Bredow et al. 2022). آخرین گزارش مربوط به یک ناقل مبتنی بر ویروس موزائیک نیشکر (SCMV) است که برای بیان چندین ژن گزارشگر و نشانگر انتخابی و همچنین برخی پروتئین‌های ضدحشره در ذرت استفاده شده است (Beernink et al. 2021; Mei et al. 2019a, b; Chung et al. 2021; Sadeghian et al. 2021) این ناقل به طور موفقیت‌آمیز برای خاموشی ژن از طریق تکنولوژی RNA مداخله‌گر نیز مورد استفاده قرار گرفته است (Chung et al. 2021). SCMV متعلق به جنس پوتی‌ویروس است. ویریون رشته‌ای و انعطاف‌پذیر آن محتوی یک ژنوم RNA تک رشته‌ای سنس مثبت (+ssRNA) با انتهای '۳ پلی آدنیله شده است. این ویروس قادر به آلوده‌سازی لاین‌های خالص مختلفی از ذرت شیرین و دندان اسبی است و دامنه میزبانی بالقوه آن شامل سایر گیاهان تک لپه حائز اهمیت زراعی از جمله سورگوم، برنج، جو، چچم و غیره نیز می‌شود (Pirone 1972). لذا می‌تواند به عنوان یک ناقل بالقوه در سیستم کارآمد بیان درون‌گیاهی و آنالیز عملکرد ژن مورد استفاده قرار گیرد (Rosenkranz 1983; Gao et al. 2019). پژوهش حاضر با هدف بررسی عملکرد سه پروتئین ضدحشره شامل لکتین PTA و توکسین‌های Nc1a و OAIP-1 با استفاده از ناقل بیانی مبتنی بر ویروس موزائیک نیشکر علیه آفت کرم برگخوار پائیزه انجام گرفته است. توالی‌های رمزکننده پروتئین‌های مذکور بین سیسترون‌های P1 و HC-Pro ویروسی در ناقل پلاسمیدی SCMV-CS3 درج و از طریق تزریق اگروباکتریومی به گیاهچه‌های هفت روزه ذرت منتقل شدند. پس از تائید فنوتیپی علائم موزائیک ویروسی و نیز بررسی ملکولی بیان پروتئین‌ها در گیاهان هدف، عملکرد گیاهان از نظر مقاومت به لاروهای برگخوار پائیزه مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

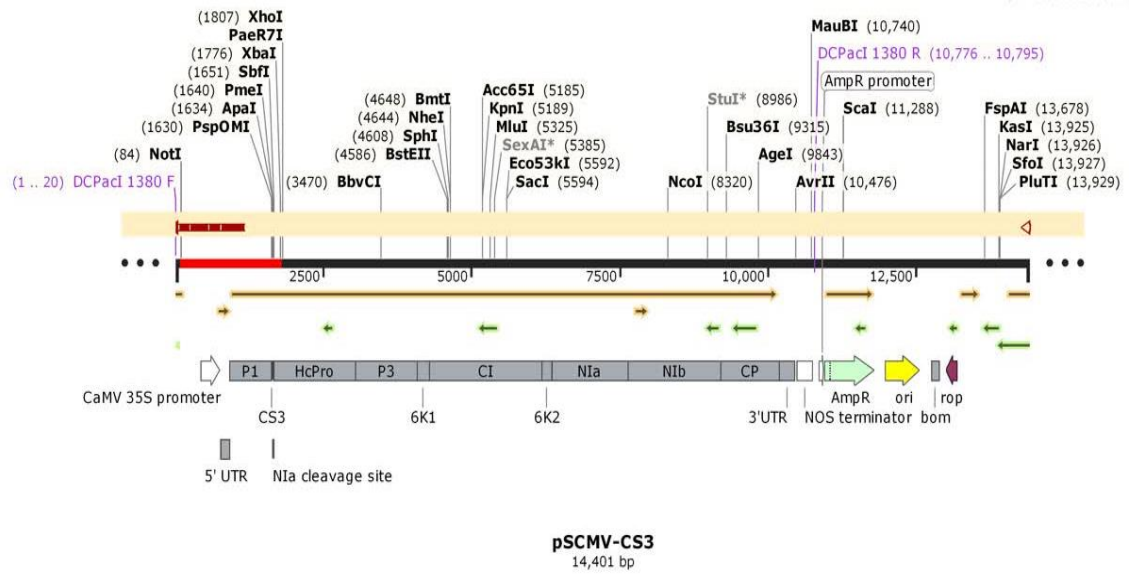
گیاهان و حشرات، سویه‌های باکتریایی و ناقل‌های ویروسی: بذور ذرت شیرین ارقام گلدن‌بانتام (Golden Bantham) از کمپانی برپی (Burpee, Pennsylvania, USA) تهیه شد. سویه باکتریایی *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 از کلکسیون موسسه تحقیقات گیاهی بویس‌تامپسون واقع در دانشگاه کرنل (Boyce-Thompson Institute, BTI, Cornell University, Ithaca, USA) تهیه شد. ناقل بیانی SCMV-CS3 به صورت ناقل‌های خام SCMV-CS3-EV و SCMV-CS2-GFP از آزمایشگاه پروفسور جندر (واقع در موسسه BTI، دانشگاه کرنل) تهیه شد. تخم‌های کرم برگخوار پائیزه از شرکت بنزون ریسرچ (Benzon Resarch, Carlisle, PA, USA) خریداری و روی یک جیره مصنوعی مخصوص (Fall Armyworm Diet, Southland Products Inc, Lake Village, AR, USA) در انکوباتور در دمای ۲۸°C پرورش داده شد (Chung et al. 2021; Gull and Jander 2023).

Agricultural Biotechnology Journal; Print ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500

کاشت بذور و تهیه گیاهچه‌های ذرت: کاشت بذور ذرت، پرورش گیاهچه‌ها و همچنین انتقال سازه‌های ویروسی نوترکیب به روش تزریق اگرروباکتریومی به گیاهان هفت روزه ذرت به صورتی که در پژوهش پیشین بیان شده است انجام پذیرفت (Sadeghian et al. 2021).

ساخت سازه‌های SCMV دربردارنده توالی‌های رمز کننده پروتئین‌های ضدحشره: توالی رمزکننده ۷۱۷ جفت بازی mEGFP (Zacharias et al. 2002) مشابه آنچه در مطالعه قبلی تشریح شده است در بین نواحی رمزکننده پروتئین P1 و توالی HCPro و در امتداد چهارچوب قرائت آزاد ویروسی ناقل درج شد (Sadeghian et al. 2021). توالی ۸۱۰bp لکتین PTA با استفاده از جفت آغازگر PTAF و PTAR با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز از DNA ژنومی استخراج شده از برگ گیاه *P. ternata* تکثیر و مطابق با آنچه برای ژن گزارشگر GFP بیان شد در ناقل درج گردید. توالی‌های رمزکننده توکسین‌های عنکبوتی Nc1a و OAIP-1 نیز توسط شرکت ژن‌ویز (GENEWIZ, Plainfield, NJ, US) سنتز شد و پس از تکثیر طی واکنش PCR و با استفاده از جفت آغازگرهای Nc1aF، Nc1aR و OAIPF و OAIPR مطابق با روال فوق‌الذکر در ناقل درج گردید. ناقل SCMV-CS3 فاقد توالی درجی به عنوان شاهد در آزمایشات مورد استفاده قرار گرفت (شکل ۱). کلیه آغازگرهای مورد استفاده توسط نرم‌افزار برخط Primer-Blast (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast) طراحی و با استفاده از نرم افزار OligoAnalyzer (Integrated DNA Technologies Inc., Iowa, USA) ارزیابی و توسط شرکت IDT (Iowa, USA) ساخته شد (جدول ۱).

همسانه‌سازی و انتقال سازه‌های SCMV به باکتری *Agrobacterium*: پس از همسانه‌سازی سازه‌های ژنی تهیه شده در باکتری *Escherichia coli* DH5α با استفاده از روش شوک حرارتی (Chang et al. 2017)، استخراج پلاسمید با استفاده از کیت PureYield™ Plasmid Miniprep System (Promega, Madison, USA) انجام گرفت. سپس، سویه GV3101 باکتری *A. tumefaciens* به طور جداگانه با پلاسمیدهای دربردارنده سازه‌های SCMV-CS3-GFP، SCMV-CS3-Nc1a، SCMV-CS3-OAIP1، SCMV-CS3-PTA و SCMV-CS3 فاقد توالی درجی (به عنوان کنترل) طبق پروتکل ارائه شده توسط Beernink et al. (2021) با استفاده از روش انجماد–ذوب ترانسفورم گردید. پس از کشت روی محیط انتخابی لوریا–برتانی (LB) حاوی آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین (۳۰µg/mL، آنتی‌بیوتیک انتخابی سویه GV3101)، ریفامپیسین (۵۰µg/mL) و کانامایسین (۵۰µg/mL) کلنی‌های ترانسفورم شده با استفاده از کلنی‌پی‌سی‌آر با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن‌های خارجی و نیز آغازگرهای اختصاصی نواحی احاطه‌کننده (Flanking region) محل درج آن در ناقل (جدول ۱) تکثیر و از طریق توالی‌یابی به روش سانگر شناسایی شد (Cornell Institute of Biotechnology, Ithaca, USA). این کلنی‌ها جهت نگه‌داری طولانی مدت در محیط کشت LB حاوی ۲۰٪ گلیسرول در فریزر ۸۰˚C– سوسپانسیون شدند.



شکل ۱. شمای کلی ناقل SCMV-CS3. یک جایگاه چندگانه همسانه‌سازی (CS3) بین ژن‌های P1 و HC-Pro ویروس موزائیک نیشکر درج شده است. 35S: پیشبر ویروس موزائیک گل کلم؛ T: خاتمه‌دهنده نوپالین‌سینتاز

Figure 1. Schematic diagram of the SCMV-CS3 cloning vector; A multiple cloning site (MCS) was introduced between P1 and HC-Pro genes of SCMV. 35S: cauliflower mosaic virus 35S promoter; T: NOS terminator

انتقال سازه‌های SCMV به گیاهان ذرت به واسطه اگروباکتریوم: باکتری‌های ترانسفورم شده در محیط کشت LB انتخابی حاوی آنتی‌بیوتیک‌های مربوطه کشت داده شدند. پس از گذشت ۴۸-۲۴ ساعت زمانی که چگالی نوری کشت مایع در طول موج ۶۰۰nm برابر با یک بود، سوسپانسیون سلولی به روشی که در ادامه می‌آید تهیه شد. سلول‌های باکتری با استفاده از سانتریفیوژ به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه (rpm) رسوب‌گذاری و با آب دیونیزه استریل شستشو داده شد. پس از تکرار این مرحله، رسوب باکتری در بافر (10mM MES, 10mM MgSO4, 200µM Acetosyringone, 0.02% Silwet L-77) سوسپانسیون شد به طوری که چگالی نوری آن در طول موج ۶۰۰nm برابر با یک شد. سوسپانسیون حاصل به مدت سه ساعت در دمای اتاق با استفاده از شیکر رفت و برگشتی به آرامی هم زده شد. سپس سوسپانسیون حاصل با استفاده از سرنگ‌های انسولین ۰/۲mL در فاصله دو میلی‌متر بالاتر از گره کلئوپتیلی به گیاهچه‌های ذرت هفت روزه تزریق شد. سپس گیاهان به اتاقک رشد با دمای ۲۳°C، تحت ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی منتقل و نگه‌داری شدند. بروز علائم موزائیک ویروسی طی ۴-۲ هفته پس از تزریق ردیابی شد (Beernink et al. 2021; Wang et al. 2017; Cao et al. 2014).

جدول ۱. مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در تکثیر، همسانه‌سازی و درج ژن‌های خارجی در ناقل SCMV-CS3

Table 1. Oligonucleotide primers used for gene amplification and cloning and insertion into SCMV-CS3 vector.

کد دسترسی در بانک ژن Accession number	طول قطعه تکثیر شده Amplicon size (bp)	توالی آغازگر Primer sequence	نام آغازگر Primer Name	ژن هدف Target sequence
D00949.1	987	5'-TCGGGAACTGTTGATGCGGG-3'	CPF	CP
		5'-CTAGTGGTGCTGCTGCACTC-3'	CPR	
KF154979.1	810	5'-AGAGGGCCCATGGCCTCCAAG-3'	PTAF	PTA
		5'-GGGTTTAAACCCTTAATTCACCTTCTCCGTCACC-3'	PTAR	
K7N5K9.2	120	5'-GGGCCCATGGATTGCGGCCATCTTC-3'	OAIPF	OAIP-1
		5'-GTTTAAACAAACCCTAACAAGGCAC-3'	OAIPR	
E17099.1	717	5'-ATTAGGGCCCATGGTGAGCAAGGG-3'	GFP-F	GFP
		5'-ATTAGTTTAAACCCTTGTACAGCTCGT-3'	GFP-R	
C0HL38.1	140	5'-GGGCCCATGGGCTGCAACCCGGACTG-3'	NC1AF	Nc1a
		5'-GTTTAAACAGCCCTGGGCGCTCTTCG-3'	NC1AR	
-	650-1460	5'-GAGGAAAGACATAGCCATTGGGC-3'	VecF	Flanking region
		5'-GCCCTATTGTTTCCGCAACTTGCC-3'	VecR	

بررسی‌های میکروسکوپی بیان پروتئین فلورسنت سبز: در صورت مشاهده علائم موزائیک در فاصله ۳-۲ هفته پس تزریق روی گیاهان، بیان پروتئین فلورسنت سبز در برگ‌های گیاهان محتوی سازه SCMV-CS3-GFP در مقایسه با گیاهان محتوی سازه SCMV-CS3-EV با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت کانفوکال (Leica confocal laser-scanning microscope, SP5 TCS, Leica, Germany) موجود در مرکز تصویربرداری سلولی گیاهی (PCIC) موسسه تحقیقاتی BTI (Ithaca, Cornell University, BTI, Plant Cell Imaging Center) بررسی شد. نمونه‌های برگ جمع‌آوری شده از گیاهان دارا و فاقد علائم ویروسی در طول موج ۴۸۸nm مشاهده و سیگنال فلورسنس در دامنه ۵۰۵-۵۴۵nm ردیابی شد. اسکن

لامبدا (در بازه طول موج‌های ۴۸۰-۵۸۰nm؛ ۲۰ مرحله) برای تولید نمودار و پروفایل‌های طیف نشر استفاده شد. تصاویر و نتایج اسکن لامبدا با استفاده از نرم‌افزار LAS-AF (V 2.6.0) آنالیز شد (Sadeghian et al. 2021).

بررسی بیان ژن‌های خارجی با استفاده از RT-PCR و qRT-PCR: سه هفته پس از تزریق و قبل از آزمون‌های زیست‌سنجی ضدحشره‌ای، به طور جداگانه برای هر سازه ژنی، از برگ هفتم یا هشتم گیاهان دارای علائم نمونه‌برداری انجام گرفت، نمونه‌ها در ازت مایع منجمد و سپس در دمای ۸۰˚C- نگه‌داری شد. RNA کل با استفاده از کیت SV Total RNA Isolation System (Promega, Madison, WI, USA) استخراج و سپس جهت حذف هرگونه آلودگی به DNA ژنومی، با آنزیم RQ1 RNase-free DNaseI (Promega, Madison, WI, USA) طبق دستورالعمل شرکت سازنده تیمار شد. DNA مکمل با استفاده کیت RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, Germany) و آغازگرهای OligodT طبق دستورالعمل شرکت سازنده ساخته شد. برای هر نمونه، واکنش کنترل منفی فاقد آنزیم رونوشت‌بردار معکوس در نظر گرفته شد. سپس آغازگرهای اختصاصی هر ژن خارجی (جدول ۱) و جفت آغازگر CPF و CPR برای ردیابی پروتئین پوششی ویروس (CP) در گیاهان هدف استفاده شد.

تائید بیان ژن‌ها با استفاده از qRTPCR: به منظور تائید بیان ژن‌های مقاومت به حشرات که در ناقل SCMV همسانه‌سازی شده بود، qRT-PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی هر ژن (جدول ۲) اجرا شد. واکنش‌ها شامل ۵µl از مخلوط آماده واکنش (PowerUp SYBR Green PCR master mix, Applied Biosystems)، ۵/۰µl از هر آغازگر (با غلظت نهائی ۳۰۰nM برای هر آغازگر)، ۱µl از cDNA نمونه (رقیق شده به نسبت ۱:۱۰ با آب عاری از نوکلئاز) در حجم نهایی ۱۰µl بود. واکنش‌های بدون الگو نیز به عنوان کنترل منفی لحاظ شد. واکنش PCR با استفاده از دستگاه QuantStudio 6 Flex Real-Time PCR (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) با برنامه: دو دقیقه در دمای ۵۰˚C، دو دقیقه در دمای ۹۵˚C و ۴۰ سیکل شامل دمای ۹۵˚C به مدت ۱۵ثانیه و ۶۰˚C به مدت یک دقیقه اجرا شد. عملکرد اختصاصی آغازگرها با استفاده از آنالیز منحنی ذوب تائید شد. میانگین سیکل آستانه سه تکرار هر نمونه با استفاده از ژن مرجع بتا-توبولین (β-Tubulin) ذرت نرمال شد. میزان بیان نسبی ژن‌ها با استفاده از روش $^{-\Delta\Delta CT}$۲ محاسبه گردید (Livak and Schmittgen 2001).

آزمون‌های زیستی علیه کرم برگخوار پائیزه: به منظور تعیین اثر پروتئین‌های حشره‌کش PTA، Nc1a و OAIP-1 بر رشد آفت کرم برگخوار پائیزه، روی هر کدام از گیاهانی که سه هفته از زمان تزریق اگروباکتریومی به آن‌ها سپری شده و بیان این پروتئین‌ها در آن‌ها با استفاده از RT-PCR و qRTPCR مورد تائید قرار گرفته بود، پنج لارو دو روزه کرم برگخوار پائیزه قرار داده شد و گیاهان با استفاده از کیسه‌های پلاستیکی منفذدار به طور جداگانه و کامل پوشانده شد. لاروهای زنده‌مانده پس از گذشت هفت و چهارده روز از شروع رهاسازی توزین و میانگین وزن لاروهای روی هر گیاه به عنوان تکرار بیولوژیک جهت مقایسه گیاهان

ذرت آلوده به سازه‌های SCMV مختلف محاسبه شد (Chung et al. 2021). گیاهان محتوی سازه SCMV-CS3-GFP به عنوان شاهد در نظر گرفته شد.

جدول ۲. مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در بررسی بیان ژن‌های خارجی در گیاهان ذرت تلقیح شده با ناقل SCMV-CS3 با استفاده از واکنش qRTPCR

Table 2. Oligonucleotide primers used for qRTPCR-based confirmation of transgenes expression SCMV-CS3 vector

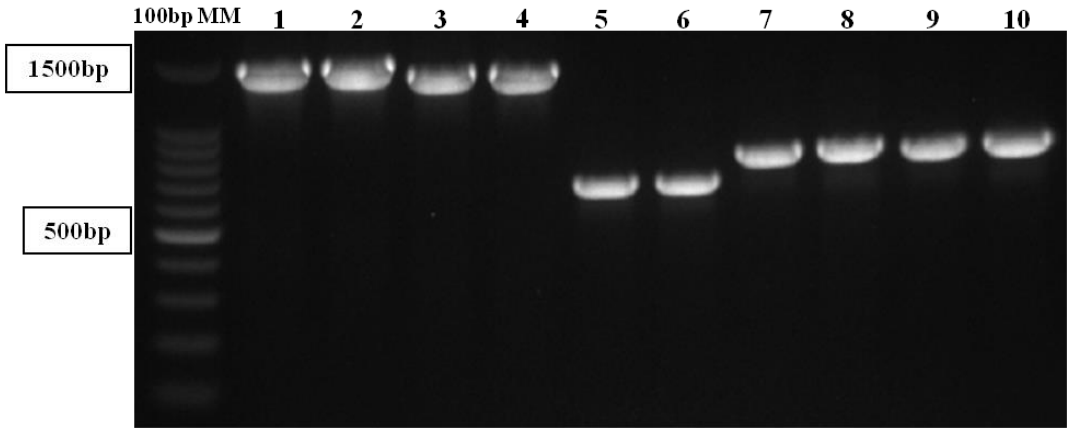
ژن هدف Target sequence	نام آغازگر Primer Name	توالی Primer sequence	طول قطعه تکثیر شده Amplicon size (bp)
پروتئین CP) پوششی (	qCPF	5'-ACTTCAGCGCAATCTCACCG-3'	119
	qCPR	5'-ACTGCTGCGGCTTTCATCTG-3'	
PTA	qPTAF	5'-AAACCCTAAACACGGACGGC-3'	132
	qPTAR	5'-GTGAGCTTGCAGTCTCGTCC-3'	
OAIP-1	qOAIPF	5'-ATGGATTGCGGCCATCTTCAT-3'	120
	qOAIPR	5'-TAACAAGGCACTTGCCATACCTG-3'	
GFP	qGFP-F	5'-GACCTACGGCGTGCAGTG-3'	148
	qGFP-R	5'-CACTACTTTCTCTTATGG-3'	
Nc1a	qNC1AF	5'-TCCAGATTGCACAGGCATTCA-3'	140
	qNC1AR	5'-ACTTTGGTGGGCAGAATGGG-3'	
B-tubulin	qBTF	5'-CTACCTCACGGCATCTGCTATGT-3'	139
	qBTR	5'-GTCACACACACTCGACTTCACG-3'	

آنالیز آماری: آماده‌سازی و تنظیم داده‌های در نرم افزار Microsoft Office Excel 2010 (Microsoft Company, Redmond, Washington, United States) و کلیه آنالیزهای آماری با استفاده از نرم افزار SAS 9.2 (SAS Institute Inc.Cary, NC, USA.) انجام پذیرفت. در مورد آزمایشات بررسی بیان ژن، داده‌های حاصل قبل از آنالیز آماری جهت تامین فرضیات ANOVA به صورت Log2 تبدیل و با استفاده از آزمون t مورد مقایسه قرار گرفت اما در ترسیم نمودارها از داده‌های تبدیل نشده استفاده شد. داده‌های حاصل از آزمون‌های زیستی ضدحشره‌ای که شامل میانگین وزن لاروها بود،

با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه با استفاده از نرم افزار .SAS 9 مورد بررسی قرار گرفته و در ادامه، جهت تعیین سطوح معنی‌داری، میانگین‌ها با استفاده از آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD) مورد مقایسه قرار گرفت.

نتایج و بحث

نتایج حاصل از کلنی پی‌سی‌آر و نیز توالی‌یابی با استفاده از آغازگرهای اختصاصی توالی ژن‌های خارجی GFP، PTA، Nc1a و OAIP1 و نیز آغازگرهای نواحی احاطه کننده محل درج آن‌ها در ناقل نشان دهنده درج صحیح توالی‌های رمزکننده مذکور و حضور پلاسمید دربردارنده ناقل ویروسی در کلنی‌های ترانسفورم شده *Agrobacterium* بود (شکل ۲).



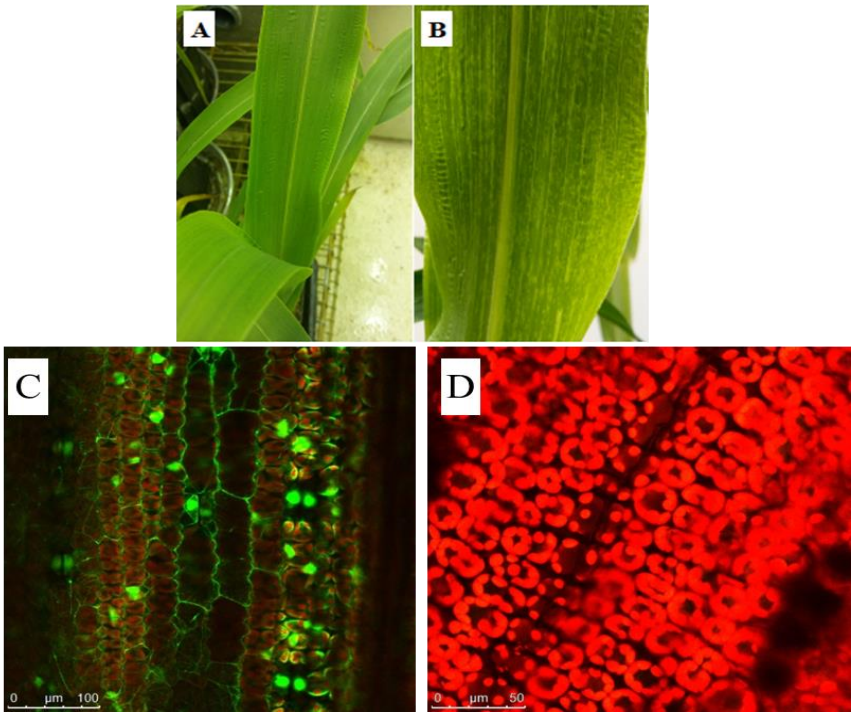
شکل ۲. نتایج حاصل از کلنی‌پی‌سی‌آر کلنی‌های آگروباکتریوم ترانسفورم شده با ناقل ویروسی pSCMV-CS3 نوترکیب با استفاده از آغازگرهای طراحی شده از نواحی احاطه‌کننده محل درج ژن خارجی، تکثیر قطعه ۶۵۰bp در کلنی‌های ترانسفورم شده با ناقل فاقد توالی درجی pSCMV-CS3-EV (چاهک‌های ۵ و ۶) در مقایسه با تکثیر قطعات ۱۴۶۰bp در ناقل محتوی PTA (چاهک‌های ۱ و ۲)، ۱۳۶۷bp در ناقل محتوی GFP (چاهک‌های ۳ و ۴)، ۷۵۵bp در ناقل محتوی OAIP-1 (چاهک‌های۷ و ۸)، و ۷۷۶bp در ناقل محتوی Nc1a (چاهک‌های ۹ و ۱۰)

Figure 2. Polymerase chain reaction of transformed *Agrobacterium* colonies (Colony-PCR) containing pSCMV-CS3 vectors using primers flanking the transgene insertion site; Amplification of 650bp sequence in transformed colonies harboring empty pSCMV-CS3 (lanes 5 and 6) in comparison with 1460bp (1-2), 1367bp (3-4), 755bp (7-8) and 776bp (9-10) amplicons in colonies transformed with recombinant pSCMV vectors containing PTA, GFP, OAIP-1 and Nc1a coding sequences, respectively

بروز علائم موزائیک و بررسی میکروسکوپی بیان پروتئین فلورسنت سبز: دو هفته پس از تزریق سازه‌های ویروسی نوترکیب به واسطه آگروباکتریوم به گیاهچه‌های ذرت گلدن بانتام، علائم و الگوهای موزائیکی بر روی برگ‌های برخی گیاهان ذرت تلقیح شده با ناقل بدون ژن خارجی و نیز ناقل دربردارنده توالی‌های رمز کننده پروتئین فلورسنت سبز، لکتین PTA و توکسین‌های OAIP-1 و Nc1a ظاهر شد. این الگوهای موزائیکی تیره و روشن همراه با روند رشد گیاه در برگ‌های تازه ظهور یافته گیاه نیز به طور سیستمیک گسترش یافت. گیاهان شاهد در تمامی مراحل رشدی خود فاقد چنین علائمی بودند (شکل ۳). مشاهدات میکروسکوپی گیاهان تلقیح شده با ناقل‌های نوترکیب محتوی ژن خارجی GFP تحت طول موج‌های موردبررسی و اسکن لامبدا در دامنه‌ای از طول موج‌ها نشان دهنده بیان پایا و قوی پروتئین فلورسنت سبز در سلول‌های مزوفیل کلیه برگ‌های گیاهان دارای علائم ویروسی، حتی برگ‌های نوظهور بود. در گیاهان فاقد علائم و گیاهان تلقیح شده با ناقل‌های محتوی سایر سازه‌های ژنی، هیچگونه سیگنال فلورنس مرتبط با GFP ردیابی نشد (شکل ۴).

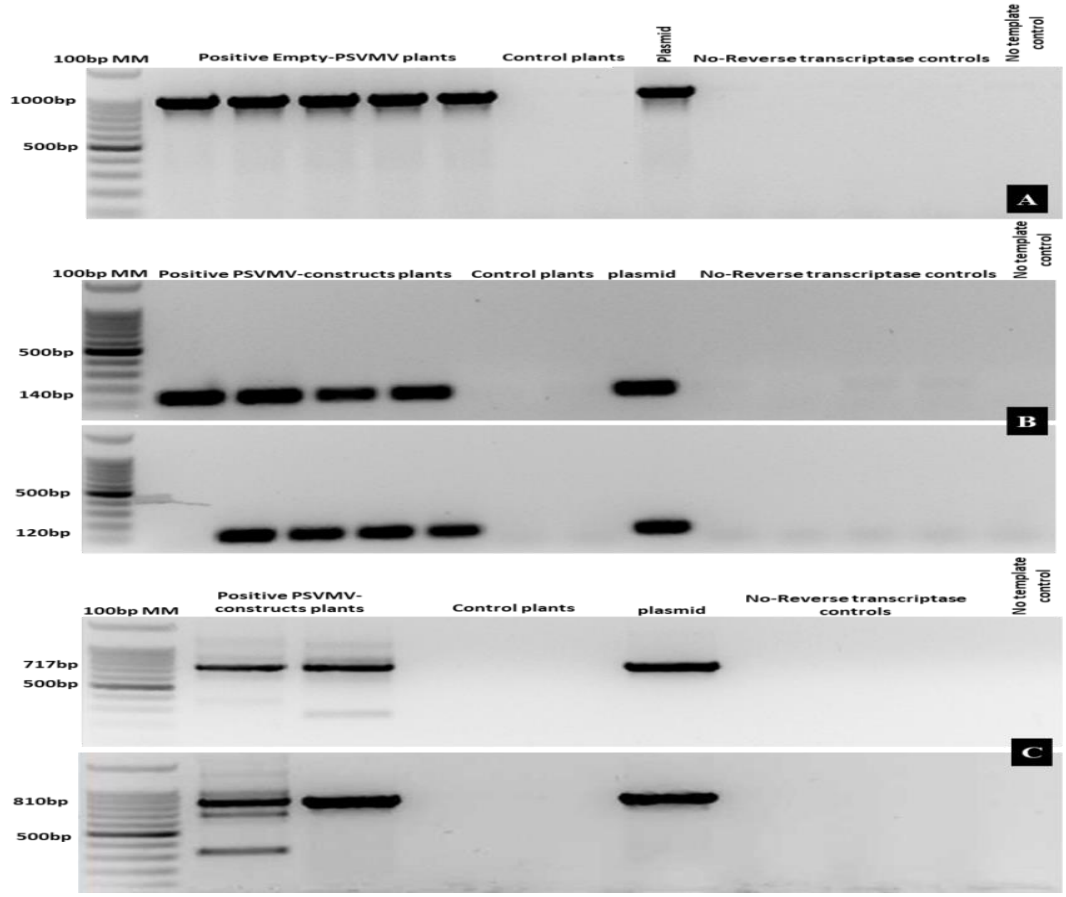
بررسی بیان سازه‌های نوترکیب در گیاهان تلقیح شده با استفاده از RT-PCR و qRT-PCR: داده‌های حاصل از RT-PCR گیاهان دارای علائم موزائیک، وجود رونوشت‌های ناقل ویروسی و ژن‌های رمزکننده GFP، PTA، OAIP-1 و Nc1a را در گیاهان محتوی سازه‌های نوترکیب pSCMV-CS3 و ژن رمزکننده پروتئین پوششی ویروس SCMV را در گیاهان تلقیح شده با ناقل pSCMV-CS3 تهی تائید نمود (شکل ۵). در گیاهان شاهد فاقد علائم و همچنین کنترل منفی واکنش سنتز cDNA که فاقد آنزیم رونوشت‌بردار معکوس بود، هیچ‌گونه نسخه‌ای از این رونوشت‌ها ردیابی نشد. نتایج حاصل از qRTPCR نیز نشان‌دهنده موفقیت ناقل SCMV در بیان بیش از حد ژن‌های خارجی PTA، Nc1a و OAIP-1 و همچنین GFP در مقایسه با ژن مرجع بتاتوبولین در گیاهان ذرت تلقیح شده با ناقل‌های دربردارنده توالی این ژن‌ها در مقایسه با گیاهان شاهد بود (شکل ۶).

آزمون‌های زیستی علیه کرم برگخوار پائیزه: نتایج حاصل از آزمون‌های زیست‌سنجی نشان داد که تغذیه لاروهای کرم برگخوار پائیزه روی گیاهان ذرت محتوی پروتئین‌های ضدحشره موردبررسی در مقایسه با گیاهان شاهد محتوی ژن GFP منجر به کاهش وزن معنی‌داری پس از گذشت ۷ و ۱۴ روز می‌شود (شکل ۶). به گونه‌ای که پس از گذشت هفت روز از آغاز تغذیه، بیان ژن توکسین عنکبوتی Nc1a و لکتین PTA منجر به کاهش بیش از ۵۰ درصدی و توکسین OAIP-1 منجر به کاهش ۳۳ درصدی وزن لاروها در مقایسه با شاهد شد. همین نتایج پس از گذشت چهارده روز برای توکسین‌های عنکبوتی مجدداً تکرار شد اما در مورد لکتین PTA میزان کاهش وزن‌گیری لاروها پایدار نبود و پس از گذشت ۱۴ روز به میزان ۳۲ درصد وزن لاروهای شاهد رسید (شکل ۷).



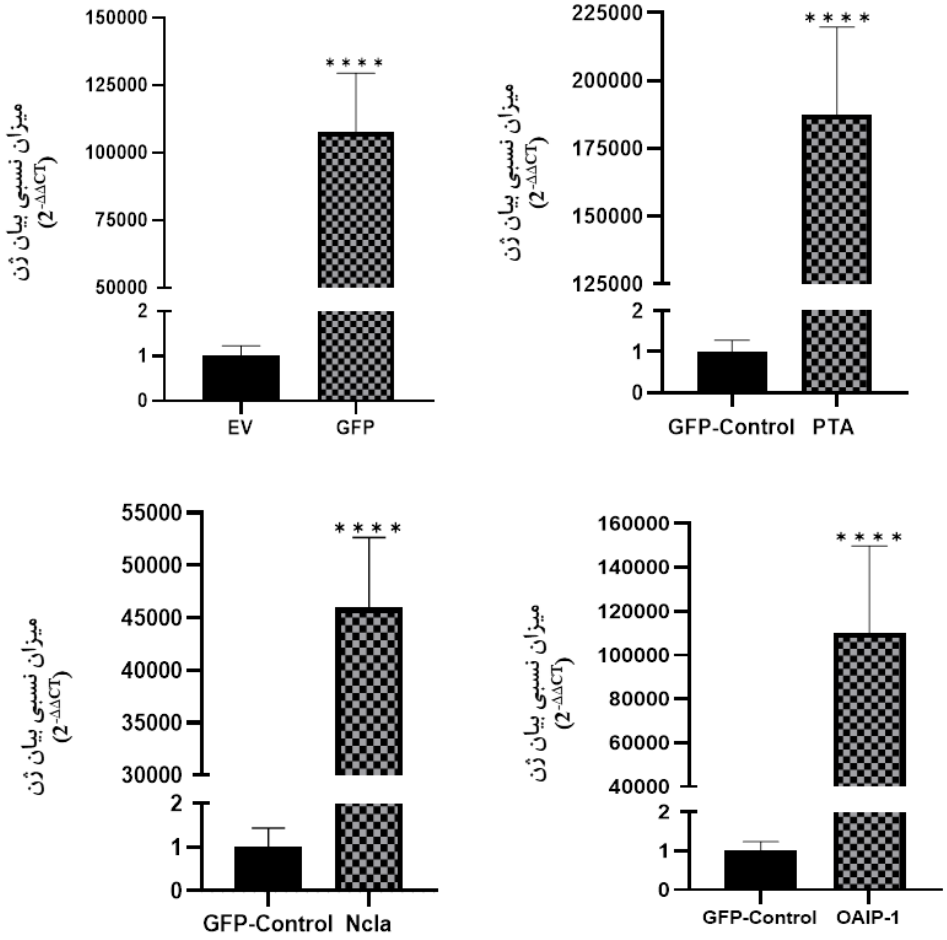
شکل ۳. بروز علائم موزائیک سیستمیک در گیاهان ذرت تلقیح شده با ناقل ویروسی نوترکیب pSCMV محتوی ژن‌های خارجی (B) در مقایسه با گیاهان شاهد فاقد علائم (A) دو هفته پس از تزریق آگروباکتریومی؛ و ارزیابی میکروسکوپی برگ گیاهان ذرت تلقیح شده با ناقل ویروسی pSCMV-CS3، ۲۰ روز پس از تزریق آگروباکتریومی با میکروسکوپ کانفوکال با بزرگنمایی ۴۰X؛ C) فلورسنس ناشی از بیان پروتئین GFP توسط ناقل ویروسی pSCMV-CS3-GFP در مقایسه با D) فلورسنس ناشی از کلروفیل در گیاهان ذرت شاهد تلقیح شده با ناقل pSCMV-EV فاقد ژن خارجی؛ رنگ قرمز نشان دهنده فلورسنس ناشی از کلروفیل گیاه و رنگ سبز نشان دهنده فلورسنس ناشی از بیان GFP است

Figure 3. Appearance of systemic viral mosaic patterns in maize plants 2-4 weeks after direct Agroinjection of recombinant pSCMV vector constructs containing transgenes (B) in comparison with asymptomatic control ones (A). Microscopic examination of maize plants, 20 days after direct Agoinjection of pSCMV-CS3 vectors into stems, under confocal Leica TCS-SP5 microscope (40X); C) fluorescence emission in plants expressing pSCMV-CS3-GFP in comparison with B) Chlorophyll fluorescence emission in control plants inoculated with empty pSCMV vector; Red is indicative of plant chlorophyll autofluorescence and green is related to GFP expression in plant mesophyll cells



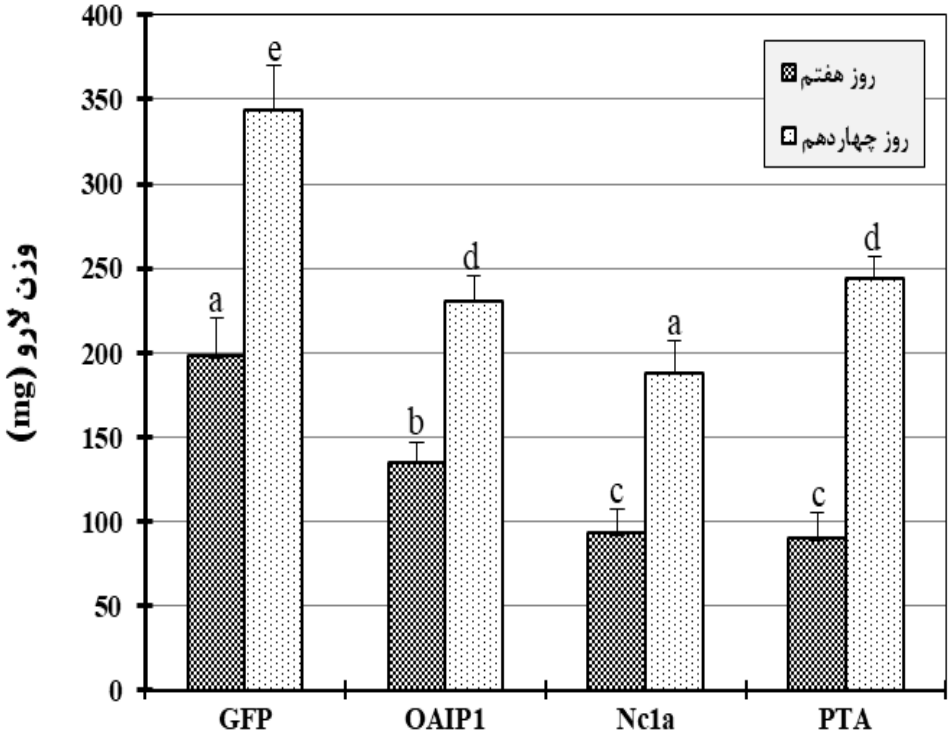
شکل ٤. تائید حضور رونوشت‌های ژن‌های خارجی در گیاهان ذرت تلقیح شده با ناقل‌های pSCMV-CS3 نوترکیب؛ A) تکثیر قطعه ۹۸۷bp رونوشت‌های ژن پروتئین پوششی ویروس (CP) در گیاهان ذرت تلقیح شده با ناقل فاقد توالی خارجی pSCMV-CS3-EV؛ B) بالا: تکثیر قطعه ۱٤۰bp رونوشت‌های ژن ضدحشره Nc1a در گیاهان ذرت تلقیح شده با ناقل pSCMV-CS3-Nc1a، پائین: تکثیر قطعه ۱۲۰bp رونوشت‌های ژن ضدحشره OAIP-1 در گیاهان ذرت تلقیح شده با ناقل pSCMV-CS3-OAIP؛ C) بالا: تکثیر قطعه ۷۱۷bp رونوشت‌های ژن GFP در گیاهان ذرت تلقیح شده با ناقل pSCMV-CS3-GFP و پائین: تکثیر قطعه ۸۱۰bp رونوشت‌های ژن ضدحشره PTA در گیاهان ذرت تلقیح شده با ناقل pSCMV-CS3-PTA؛ در کلیه آزمایشات گیاهان شاهد فاقد علائم تلقیح نشده یا تلقیح شده با بافر، پلاسمید pSCMV-CS3 نوترکیب حاوی ژن خارجی مربوطه به عنوان شاهد مثبت واکنش PCR، شاهد منفی فاقد آنزیم رونوشت‌بردار معکوس و همچنین شاهد فاقد DNA الگو در نظر گرفته شده است

Figure 4. RT-PCR analysis of plants inoculated with recombinant pSCMV-CS3 containing transgenes; A) Amplification of 987bp viral CP coding sequence in pSCMV-CS3-EV inoculated plants; B) Top: Amplification of 140bp insecticidal Nc1a gene in pSCMV-CS3-Nc1a inoculated plants, Bottom: Amplification of 120bp insecticidal OAIP-1 gene in pSCMV-CS3-OAIP inoculated plants; C) Top: Amplification of 717bp GFP transgene in pSCMV-CS3-GFP and Bottom: Amplification of 810bp insecticidal PTA transgene in pSCMV-CS3-PTA inoculated. All experiments contained control asymptomatic uninoculated or buffer-inoculated plants, recombinant transgene-containing pSCMV-CS3 as positive PCR control, no reverse transcriptase control (NRT) and no template control (NTC)



شکل ۵. بیان موقت ژن‌های خارجی هترولوگ در گیاهان ذرت گلدن‌بانتام تلقیح شده با ناقل ویروسی SCMV-CS3 دربردارنده ژن‌ها؛ بیان بیش از حد ژن خارجی GFP در مقایسه با گیاه شاهد دربردارنده ناقل تهی SCMV-CS3 و ژن‌های ضدحشره (لکتین PTA و زهرابه‌های عنکبوتی OAIP-1 و Nc1a) در مقایسه با گیاهان شاهد محتوی ناقل دربردارنده ژن خارجی GFP. میانگین± خطای استاندارد (N=٦) نشان داده شده‌اند

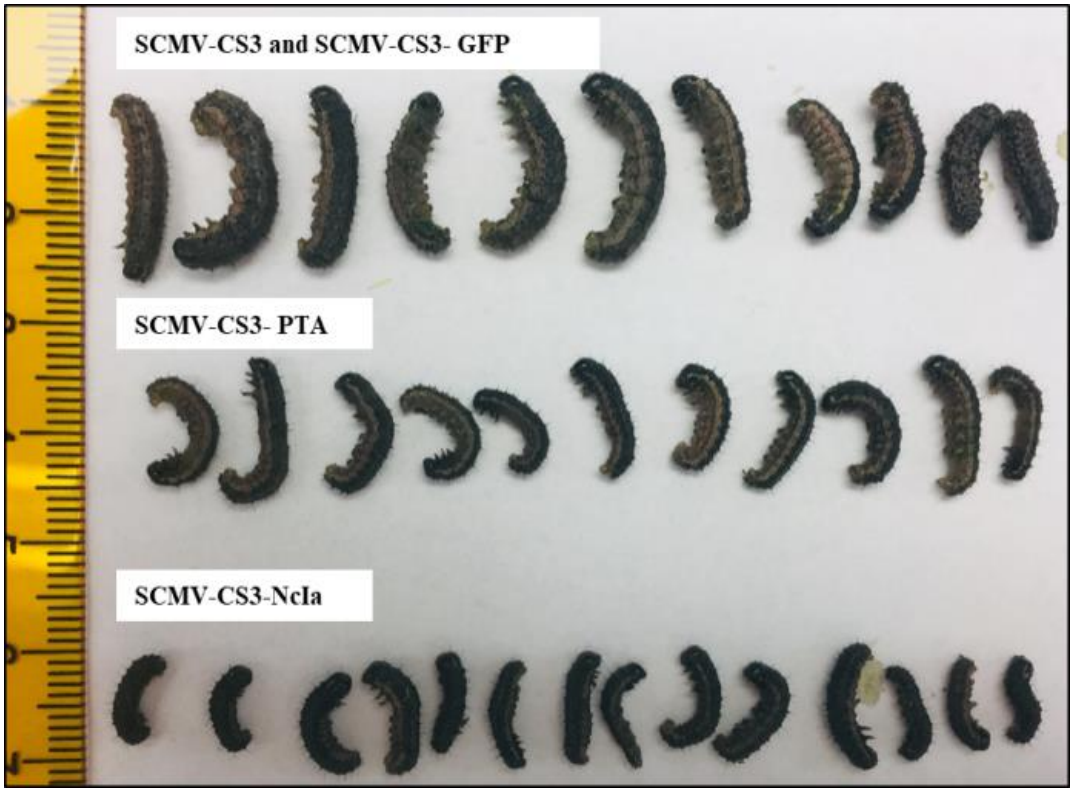
Fig 5. Heterologous overexpression of GFP and insecticidal genes PTA, OAIP-1 and Nc1a genes in Golden Bantham maize plants infected with SCMV-CS3 vector. Means ± SE of N=6, *******P*<0.0001



شکل ٦. تاثیر بیان ژن‌های ضدحشره PTA، Nc1a و OAIP در گیاهان ذرت رقم گلدن بانتام به واسطه ناقل مبتنی بر SCMV بر رشد لاروهای دوروزه کرم برگخوار پائیزه پس از گذشت ۷ و ١٤ روز از آغاز تغذیه. میانگین‌ها با آزمون LSD مقایسه شده‌اند ($p<0.05$) و تفاوت میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک معنی‌دار نیست

Figure 6. Effects of SCMV-based overexpression of insecticidal protein PTA, Nc1a and OAIP-1 in Golden Bantham maize plants on weight gain of 2-days old fall army worms after 7 and 14 days of feeding. Different letters indicate significant differences (LSD test), $p<0.05$

به طور معمول، برای بررسی تاثیر پروتئین‌های حشره‌کش جدید علیه آفات مختلف از جمله کرم برگخوار پائیزه از جیره‌های مصنوعی و یا تزریق به حشره هدف استفاده می‌شود (Fitches et al. 2012; Panwar et al. 2018; Chung et al. 2021; Dowd et al. 2012; de Oliviera et al. 2016; Merlin et al. 2021; He et al. 2022; Huang et al. 2023). مهار رشد مشاهده شده ناشی از تغذیه مصنوعی همواره با تاثیراتی که همان پروتئین پس از بیان در گیاهان تراریخته روی آفت نشان می‌دهد مطابقت چندانی ندارد، زیرا هم بافت گیاهی پیرامونی و هم مکان‌یابی پروتئین‌های حشره‌کش در گیاهان می‌تواند سمیت آن‌ها علیه آفت هدف را تحت تاثیر قرار دهد (Khan et al. 2020).



شکل ۷. تاثیر ژن‌های ضدحشره بیان‌شده به واسطه ناقل SCMV در گیاهان ذرت بر وزن‌گیری لاروهای دوروزه کرم برگخوار پائیزه پس از گذشت ۱۴ روز از آغاز تغذیه در مقایسه با گیاهان شاهد

Figure 7. The effects of insecticidal genes transiently expressed in maize plants by SCMV-based vector on weight gaining of fall armyworm larvae after 14-days of feeding

ناقل‌های مبتنی بر ویروس موزائیک نیشکر به عنوان یک سیستم بیان موقت کارآمد و قدرتمند می‌تواند زمان لازم برای ارزیابی عملکرد ژن‌های مقاومت به آفات را کاهش داده و یک غربال اولیه درون‌گیاهی سیستمیک را برای بررسی اثرات ژن‌های حشره‌کش کاندید بر رشد و نمو آفت هدف و نحوه اثر آن‌ها فراهم آورد (Sadeghian et al. 2021: Mei et al. 2019b; Leckie and Neal Stewart, 2011; Chung et al. 2021). در پژوهش حاضر، بیان سریع، موفق و درون‌گیاهی دو توکسین عنکبوتی OAIP-1 و Nc1a و لکتین PTA با استفاده از ناقل SCMV منجر به کاهش قابل توجه و معنی‌دار وزن‌گیری لاروهای کرم برگخوار پائیزه در دوره‌های زمانی ۷ و ۱۴ روز پس از آغاز تغذیه روی گیاهان ذرت آلوده شد. در آزمون‌های زیستی درون‌گیاهی علیه کرم برگخوار پائیزه، توکسین Nc1a که اولین بار علیه سوسری آمریکایی استفاده شده بود، تاثیرات بسیار چشمگیری در کاهش رشد لارو کرم برگخوار پائیزه داشت به نحوی که لاروهای تغذیه شده روی گیاهان بیان‌کننده این توکسین در مقایسه با لاروهای شاهد که روی گیاهان بیان‌کننده پروتئین فلورسنت سبز تغذیه کرده بودند به میزان بیش از ۵۰ درصد کاهش وزن نشان دادند. OAIP-1، که به عنوان یک توکسین عنکبوتی موثر علیه آفت کرم غوزه پنبه معرفی و سمیت خوراکی آن در جیره مصنوعی

از برخی سموم پایروتروئیدی از جمله فن‌والریت نیز بیشتر گزارش شده بود، در این پژوهش نسبت به توکسین Nc1a عملکرد ضعیف‌تری را در کاهش رشد لاروهای کرم برگخوار پائیزه داشت به نحوی که پس از گذشت یک و دو هفته از شروع تغذیه لاروها روی گیاهان ذرت بیان‌کننده این توکسین، میزان کاهش وزن‌گیری لاروها در مقایسه با لاروهای شاهد اندکی بیشتر از ۳۰٪ بود. این در حالی است که بررسی منابع نشان می‌دهد از میان توکسین‌های عنکبوتی معرفی شده در زمینه مبارزه با حشرات آفت، توکسین عنکبوتی بسیار شناخته شده Hvt (*Hadronyche versuta* Toxin) پس از بیان موقت در گیاهان ذرت به صورت جداگانه باعث کاهش حدود ۲۰ درصد و در قالب سازه‌های تلفیقی همراه با لکتین ACA منجر به کاهش ۴۱ درصدی رشد و وزن‌گیری لاروهای کرم برگخوار پائیزه شده است (Chung et al, 2021). بررسی مکانیسم و محل اثر برخی از توکسین‌های عنکبوتی که بر کانال‌های یونی سدیمی و پتاسیمی اثرگذارند نشان داده است که آنچه باعث مرگ آفت می‌شود نه لزوماً بروز علائم حاد مسمومیت بلکه اثرات ثانویه آن یعنی توقف تغذیه و کم‌آبی بدن است. به نحوی که به محض بروز علائم مسمومیت تغذیه متوقف می‌شود و حتی در صورت بهبود علائم مسمومیت در لاروها، جلوگیری از تغذیه همچنان ادامه می‌یابد. چنانکه در مورد Hvt نیز نشان داده شده است که بیان این توکسین در گیاهان توتون تراریخته میزان تغذیه لاروهای کرم برگخوار پنبه (*Spodoptera littorallis*) و کرم غوزه پنبه (*Helicoverpa armigera*) از برگ گیاهان تراریخته و همچنین از برگ‌های جداشده از آن‌ها را نسبت به گیاهان شاهد به طور معناداری کاهش می‌دهد (Khan et al. 2006). لذا با توجه به اینکه محل اثر توکسین‌های Nc1a و OAIP-1 نیز کانال‌های سدیمی حشرات هدف هستند، کاهش رشد و وزن‌گیری لاروها می‌تواند ناشی از کاهش و توقف تغذیه باشد.

لکتین‌های گیاهی به گلیکوپروتئین‌های موجود در اپی‌تلیوم حشرات متصل می‌شوند و از جذب مواد مغذی جلوگیری می‌کنند که باعث مرگ حشره می‌شود (Reyes-Montano and Vega-Castro, 2018). همچنین لکتین‌ها روده میانی حشرات را از طریق از کار انداختن سلول‌های دستگاه گوارش تحت تاثیر قرار داده و از طریق آسیب به پرده دور غذا، لایه سلولی ترشحی و غشای پرزدار در هضم و جذب مواد غذایی ایجاد اختلال نموده و منجر به کاهش دسترسی به آمینواسیدها می‌شود (Napoleao, 2019). از میان لکتین‌های گیاهی شناخته شده، لکتین GNA از گیاه زنگوله زمستانی که مطالعات متعددی پیرامون اثرات ضدآفت آن منتشر شده است علیه لاروهای کرم برگخوار پائیزه تاثیر معناداری نشان نداده است و بیان سایر لکتین‌های گیاهی شامل لکتین برگرفته از جوانه گندم (WGA)، لکتین پیاز (ACA) و تارین منجر به کاهش ۲۰ تا ۴۵ درصدی وزن‌گیری لاروهای کرم برگخوار پائیزه شده است (Chung et al. 2021; Leal-Bertioli et al. 2003; Dowd et al. 2012). در حالی که در پژوهش حاضر پس از گذشت یک هفته، لاروهای تغذیه کننده از گیاهان محتوی سازه‌های SCMV-CS3-PTA از نظر وزنی تنها ۵۴٪ وزن لاروهای تغذیه نموده روی گیاهان شاهد را داشتند. اگرچه این شرایط در پایان هفته دوم پایدار نبود و این عملکرد به حدود ۳۱٪ رسید اما به نظر می‌رسد یکی از دلایل احتمالی این موضوع بزرگ بودن توالی ژن و تاثیر منفی افزایش مقدار محتوای ژنتیکی بیگانه در ژنوم ویروس بر پایداری آن است. همانگونه که برخی مطالعات نشان داده‌اند که پایداری و حفظ تمامیت توالی درج شده در ناقل‌های

ویروسی گیاهی به میزان بالایی به اندازه و توالی ژن درج شده وابسته است به گونه‌ای که با بالا رفتن اندازه توالی درجی خارجی، احتمال رهاسازی آن توسط ژنوم ویروس، ایجاد جهش و حذف در توالی آن و یا بروز نوترکیبی در توالی آن افزایش می‌یابد (Avesani et al. 2007; Mei et al. 2016; Mei et al. 2019; Beernink et al. 2021).

هرچند، اثرات نامطلوب آلودگی درازمدت به SCMV بر رشد گیاهان ذرت به طور کامل مورد بررسی قرار نگرفته است و مطالعات بیشتری بایستی بر دستکاری و اصلاح SCMV متمرکز گردد تا ضمن کاهش اثرات بیماری‌زایی آن، توانایی آن برای حمل و نگه‌داری قطعات ژنی طویل‌تر برای بازه‌های زمانی طولانی‌تر مورد توجه قرار گیرد و همچنین پژوهش‌های گسترده‌تری برای بررسی اثرات منفی احتمالی پروتئین‌های حشره‌کش مورد استفاده بر مهره‌داران موردنیاز است. مزیت اصلی سیستم بیان مبتنی بر SCMV بهره‌مندی از زمان‌بندی مناسبی است که امکان بررسی موقت و مقایسه تاثیر پروتئین‌های حشره‌کش مختلف را در گیاهان ذرت به صورت واقعی و در زمانی کمتر از یک ماه میسر می‌سازد و متعاقباً می‌توان از ناقل‌های ایمن‌تر موجود جهت انتقال دائم پروتئین‌های کاندید موفق به گیاه ذرت استفاده نمود.

نتیجه‌گیری: نتایج به دست آمده از این پژوهش نشان می‌دهد که توکسین‌های Nc1a و لکتین PTA می‌توانند به عنوان پروتئین‌های کاندید و کارآمد برای مطالعات بعدی علیه سایر آفات ذرت و در نهایت انتقال پایدار به گیاه ذرت به منظور ایجاد گیاهان تراریخته مقاوم به آفات به ویژه کرم برگخوار پائیزه معرفی شوند. بررسی مکانیسم اثر و همچنین عملکرد سازه‌های تلفیقی از این دو ژن چنانکه در برخی مطالعات پیشین مشاهده شده است و بررسی اثرات هم‌افزایی آن‌ها در مهار رشد آفت برگخوار پائیزه می‌تواند مدنظر قرار داده شود.

سپاسگزاری: نویسندگان این مقاله بر خود فرض می‌دانند که از پروفسور استیون ویتام (دپارتمان بیماری‌شناسی گیاهی و میکروبیولوژی، دانشگاه آیوا) و سایر همکاران تیم تحقیقاتی در موسسه تحقیقات گیاهی بویس–تامپسون به سبب همکاری‌های ارزشمند ایشان از جمله تامین ناقل مبتنی بر ویروس موزائیک نیشکر (pSCMV-CS3) تقدیر به عمل آورند.

منابع

ناصری مهدی، بمانی مرجان، عالی‌پناه هلن و همکاران (۱۴۰۲). گزارش کرم برگ‌خوار پاییزه *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera, Noctuidae: Noctuinae) برای اولین بار از ایران. نامه انجمن حشره شناسی ایران، ۴۴(۱)، ۱۱۶–۱۱۱.

صادقیان مهدیه، سلوکی محمود، ذوالعلی جعفر و همکاران (۱۴۰۰). فاکتورهای تاثیرگذار بر کارایی روش آگروواینجکشن برای بیان سیستمیک ژن خارجی در گیاه ذرت به‌واسطه ویروس موزائیک نیشکر. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی، ۱۳(۴)، ۱۸۲–۱۵۹.

References

Abbas MST (2018) Genetically engineered (modified) crops (*Bacillus thuringiensis* crops) and the world controversy on their safety. Egypt J Biol Pest Control 28(1), 1-2.

Avesani L, Marconi G, Morandini F, et al. (2007) Stability of Potato virus X expression vectors is related to insert size: implications for replication models and risk assessment. Transgen Res 16(5), 587-597.

Bandyopadhyay S, Roy A, Das S (2001) Binding of garlic (*Allium sativum*) leaf lectin to the gut receptors of homopteran pests is correlated to its insecticidal activity. Plant Sci 161(5), 1025-1033.

Beernink BM, Holan KL, Lappe RR, Whitham SA (2021) Direct agroinoculation of maize seedlings by injection with recombinant foxtail mosaic virus and sugarcane mosaic virus infectious clones. J Vis Exp 168, e62277.

Betsiashvili M, Ahern KR, Jander G (2015) Additive effects of two quantitative trait loci that confer *Rhopalosiphum maidis* (corn leaf aphid) resistance in maize inbred line Mo17. J Exp Bot 66(2), 571-578.

Bouton C, King RC, Chen H, Azhakanandam K, et al. (2018) Foxtail mosaic virus: A viral vector for protein expression in cereals. Plant Physiol 177(4), 1352-1367.

Bredow M, Natukunda M I, Beernink BM, et al. (2023) Characterization of a foxtail mosaic virus vector for gene silencing and analysis of innate immune responses in *Sorghum bicolor*. Mol Plant Pathol 24(1), 71-79.

Cao CW, Liu GF, Wang ZY, et al. (2010) Response of the gypsy moth, *Lymantria dispar* to transgenic poplar, *Populus simonii*× *P. nigra*, expressing fusion protein gene of the spider insecticidal peptide and Bt-toxin C-peptide. J Insect Sci 10(1), 200.

Cao SL, Masilamany P, Li WB, Pauls KP (2014) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of corn (*Zea mays* L.) multiple shoots. Biotechnol Biotechnol Equip 28(2), 208-216.

Chang AY, Chau VW, Landas JA, Pang Y (2017) Preparation of calcium competent *Escherichia coli* and heat-shock transformation. JEMI Methods 1, 22-25.

Chung SH, Bigham M, Lappe RR, et al. (2021) A sugarcane mosaic virus vector for rapid in planta screening of proteins that inhibit the growth of insect herbivores. Plant Biotechnol J 10, e33763921.

Chung SH, Zhang S, Song H, et al. (2022) Use of sugarcane mosaic virus for virus-induced gene silencing in maize. BioRxiv 20, 02. https://doi.org/10.1101/2022.02.20.481188.

de Oliveira RS, Oliveira-Neto OB, Moura HF, et al. (2016) Transgenic cotton plants expressing Cry1Ia12 toxin confer resistance to fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*) and cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*). Front Plant Sci 19(7), e165.

Dowd PF, Johnson ET, Price NP (2012) Enhanced pest resistance of maize leaves expressing monocot crop plant-derived ribosome-inactivating protein and agglutinin. J Agric Food Chem 60(43), 10768-10775.

Edwards D, Batley J (2010) Plant genome sequencing: applications for crop improvement. Plant Biotechnol J 8(1), 2-9.

FAO (2022) World Food and Agriculture – Statistical pocketbook 2019. Rome.

Fitches E, Audsley N, Gatehouse JA, Edwards JP (2002) Fusion proteins containing neuropeptides as novel insect contol agents: snowdrop lectin delivers fused allatostatin to insect haemolymph following oral ingestion. Insect Biochem Mol Biol 32, 1653–1661.

Foissac X, Loc NT, Christou P, Gatehouse AM, Gatehouse JA (2000) Resistance to green leafhopper (*Nephotettix virescens*) and brown planthopper (*Nilaparvata lugens*) in transgenic rice expressing snowdrop lectin (*Galanthus nivalis* agglutinin; GNA). J Insect Physiol 46(4), 573-583.

Gao Q, Xu WY, Yan T, et al. (2019) Rescue of a plant cytorhabdovirus as versatile expression platforms for planthopper and cereal genomic studies. New Phytologist 223(4), 2120-2133.

Gaofu Q, Shiqing M, Fayin Z, et al. (2008) In vitro assessment of plant lectins with anti-pinwood nematode activity. J Invertebr Pathol 98(1), 40-45.

Goergen G, Kumar PL, Sankung SB, et al. (2016) First report of outbreaks of the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (JE Smith)(Lepidoptera, Noctuidae), a new alien invasive pest in West and Central Africa. PloS One 11(10), e0165632.

Gull I, Jander G (2023) Inoculation of Maize with Sugarcane Mosaic Virus Constructs and Application for RNA Interference in Fall Armyworms. Bio-Protoc 13, e14.

Hardy MC, Daly NL, Mobli M, et al. (2013) Isolation of an orally active insecticidal toxin from the venom of an Australian tarantula. PLoS One 8(9), e73136.

Haupt S, Duncan GH, Holzberg S, et al. (2001) Evidence for symplastic phloem unloading in sink leaves of barley. Plant Physiol 125, 209–218.

He P, Jia H, Xue H, et al. (2022) Expression of modified snowdrop lectin (*Galanthus nivalis* Agglutinin) protein confers aphids and *Plutella xylostella* resistance in *Arabidopsis* and cotton. Genes 13(7), e1169.

Hivrale AU, Ingale AG (2013) Plant as a plenteous reserve of lectin. Plant Signal Behav 8(12), e26595.

Hongyu Z, Xianjun W, Kexuan T, et al. (2003) A primary study of transferring the *Pinellia tenata* agglutinin (pta) gene into rice and expression. Acta Genet Sinica 30(11), 1013-1019.

Hossain MA, Maiti MK, Basu A, et al. (2006) Transgenic expression of onion leaf lectin gene in Indian mustard offers protection against aphid colonization. Crop Sci 46, 2022-2032.

Huang F, Qureshi JA, Meagher JR RL, et al. (2014) Cry1F resistance in fall armyworm *Spodoptera frugiperda*: single gene versus pyramided Bt maize. PloS one 9(11), e112958.

Huang K, He H, Wang S (2023) Sequential and Simultaneous Interactions of Plant Allelochemical Flavone, Bt Toxin Vip3A, and Insecticide Emamectin Benzoate in *Spodoptera frugiperda*. Insects 14(9), e736.

Jin L, Fang M, Chen M, et al. (2017) An insecticidal toxin from *Nephila clavata* spider venom. Amino Acids 49, 1237-1245.

Jin S, Zhang X and Daniell H (2012) Pinellia ternata agglutinin expression in chloroplasts confers broad spectrum resistance against aphid, whitefly, lepidopteran insects, bacterial and viral pathogens. Plant Biotechnol J 10(3), 313-327.

Kanakala S, Diniz Xavier CA, Martin KM, et al. (2022) Rescue of the first alphanucleorhabdovirus entirely from cloned complementary DNA: an efficient vector for systemic expression of foreign genes in maize and insect vectors. Mol Plant Pathol 24, 788–800.

Kanyamasoro MG, Karungi J, Asea G, Gibson P (2012) Determination of the heterotic groups of maize inbred lines and the inheritance of their resistance to the maize weevil. Afr Crop Sci J 20(1), e12017.

Kawazu K, Wasano N, Konno K, et al. (2012) Evaluation of anti-herbivory genes using an Agrobacterium-mediated transient expression system. Plant Biotechnol 29(5), 495-499.

Khan MH, Jander G, Mukhtar Z, et al. (2020) Comparison of in vitro and in planta toxicity of vip3a for Lepidopteran herbivores. J Econ Entomol 113, 2959–2971.

Khan SA, Zafar Y, Briddon RW, et al. (2006) Spider venom toxin protects plants from insect attack. Transgen Res 15, 349-457.

Khandagale K, Roylawar P, Randive P, et al. (2022) Isolation and Expression Profiling of Insecticidal Lectins from Wild Alliums Against Onion Thrips (*Thrips tabaci* Lindeman). Proc of the Natl Acad of Sc, Ind Sec B: Biol Sci 92(2), 451-459.

Lawrence SD, Novak NG (2001) A rapid method for the production and characterization of recombinant insecticidal proteins in plants. Mol Breed 8(2), 139-146.

Leal-Bertioli SC, Pascoal AV, Guimarães PM, et al (2003) Transgenic tobacco plants expressing Tarin 1 inhibit the growth of *Pseudomonas syringae* pv. tomato and the development of *Spodoptera frugiperda*. Annals of Appl Biol 143(3), 349-357.

Leckie BM, Neal Stewart C (2011) Agroinfiltration as a technique for rapid assays for evaluating candidate insect resistance transgenes in plants. Plant Cell Rep 30, 325-334.

Lee WS, Hammond-Kosack KE, Kanyuka K (2012) Barley stripe mosaic virus-mediated tools for investigating gene function in cereal plants and their pathogens: virus-induced gene silencing, host-mediated gene silencing, and virus-mediated overexpression of heterologous protein. Plant Physiol 160(2), 582-590.

Lee, WS., Hammond-Kosack, K., Kanyuka, K (2015) In Planta Transient Expression Systems for Monocots. In: Recent Advancements in Gene Expression and Enabling Technologies in Crop Plants. Azhakanandam K, Silverston A, Daniell H, Davey M (eds). Springer, New York, NY. pp 391–422. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2202-4_14.

Ling LJ, Yang YZ and Bi YR (2010) Expression and characterization of two domains of *Pinellia ternata* agglutinin (PTA), a plant agglutinin from *Pinellia ternata* with antifungal activity. World j Microbiol Biotechnol 26(3), 545-554.

Livak KJ and Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. Methods 25, 402–408.

Macedo ML, Oliveira CF, Oliveira CT (2015) Insecticidal activity of plant lectins and potential application in crop protection. Molecule 20(2), 2014-2033.

Marudamuthu B, Sharma T, Purru S, et al. (2023) Next-generation sequencing technology: a boon to agriculture. Gent Resour Crop Evol 70(2), 353-72.

McMullen MD, Frey M, Degenhardt J (2009) Genetics and Biochemistry of Insect Resistance in Maize. In: Handbook of Maize: Its Biology. Bennetzen JL, Hake SC (eds). Springer, New York, NY. pp. 271-289. https://doi.org/10.1007/978-0-387-79418-1_14

Mei Y, Beernink BM, Ellison EE, et al. (2019a) Protein expression and gene editing in monocots using foxtail mosaic virus vectors. Plant Direct 3(11), e00181.

Mei Y, Liu G, Zhang C, et al. (2019b) A sugarcane mosaic virus vector for gene expression in maize. Plant Direct 3(8), e00158.

Mei Y, Zhang C, Kernodle BM, et al. (2016) A Foxtail mosaic virus vector for virus-induced gene silencing in maize. Plant Physiol 171(2), 760-772.

Meissle M, Mouron P, Musa T, et al. (2010) Pests, pesticide use and alternative options in European maize production: current status and future prospects. J Appl Entomol 134(5), 357-75.

Merlin BL, Pino LE, Peres LE, et al (2021) Beyond host specificity: the biotechnological exploitation of chitolectin from teratocytes of *Toxoneuron nigriceps* to control non-permissive hosts. J Pest Sci 94, 713-227.

Midega C, Hadi B, McGuire S, et al. (2023) Fall armyworm: measuring damage and loss caused by a novel invasive pest as a guide to sustainable management. Statistics Working Paper Series, No. 23-38. Rome, FAO. https://doi.org/10.4060/cc8140en.

Napoleao TH, Albuquerque LP, Santos ND, et al. (2019) Insect midgut structures and molecules as targets of plant-derived protease inhibitors and lectins. Pest Manag Sci 75(5), 1212-22.

Naseri M, Bemani M, Alipanah H, et al. (2024). First report of the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera, Noctuidae: Noctuinae) from Iran. Entomol Soc Iran 44(1), 111-116 (In Persian).

Oliveira CT, Machado SW, Bezerra CD (2020) Effects of a reserve protein on *Spodoptera frugiperda* development: A biochemical and molecular approach to the entomotoxic mechanism. Molecule 25(9), e2195.

Panwar BS, Kaur J, Kumar P, Kaur S (2018) A novel cry52Ca1 gene from an Indian *Bacillus thuringiensis* isolate is toxic to *Helicoverpa armigera* (cotton boll worm). J Invertebr Pathol 159, 137–140.

Pirone T P (1972) Sugarcane mosaic virus. In: CMI/AAB descriptions of plant viruses. Gibbs AJ, Harrison BD, Murant AF (Eds), No. 88, Commonwealth Mycological Institute/Association of Applied Biologists, Kew, Surrey, England.

Reyes-Montaño EA, Vega-Castro NA (2018) Plant lectins with insecticidal and insectistatic activities. Insectic Agric Toxicol 23(10), 17-40

Rosenkranz E (1983) Susceptibility of representative native Mississippi grasses in six subfamilies to maize dwarf mosaic virus strains A and B and sugarcane mosaic virus strain B. Phytopathology 73(9), 1314-1321.

Sadeghian M, Solouki M, Zolala J, Emamjomeh A, Jander G (2021) Factors influencing the efficiency of an agroinjection-mediated SCMV-based systemic heterologous gene expression system in maize. Agric Biotechnol J 13(4), 159-82 (In Persian).

Shiferaw B, Prasanna BM, Hellin J, Bänziger M (2011) Crops that feed the world 6. Past successes and future challenges to the role played by maize in global food security. Food Secur 3, 307-27.

Singh J, Singh A, Singh S (2023) Entomotoxic Potential of Plant Lectins as an Environment Friendly Tool to Control Insect Pests. Environ Sci 2(2), e205.

Tamilselvan-Nattar-Amutha S, Hiekel S, Hartmann F, et al. (2023) Barley stripe mosaic virus-mediated somatic and heritable gene editing in barley (*Hordeum vulgare* L.). Front Plant Sci 14, e1201446.

Tatineni S, McMechan AJ, Hein GL, et al. (2010) Efficient and stable expression of GFP through wheat streak mosaic virus-based vectors in cereal hosts using a range of cleavage sites: formation of dense fluorescent aggregates for sensitive virus tracking. Virology 410, 268–281

Tedford HW, Sollod BL, Maggio F, King GF (2004) Australian funnel-web spiders: master insecticide chemists. Toxicon 43(5), 601-618.

Tsai CL, Chu IH, Chou MH, et al. (2020) Rapid identification of the invasive fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera, Noctuidae) using species-specific primers in multiplex PCR. Sci Rep 10(1), e16508.

Tyurin AA, Suhorukova AV, Kabardaeva KV, Goldenkova-Pavlova IV (2020) Transient gene expression is an effective experimental tool for the research into the fine mechanisms of plant gene function: advantages, limitations, and solutions. Plants 9(9), e1187.

Umer N, Naqvi RZ, Rauf I, et al. (2020) Expression of Pinellia ternata leaf agglutinin under rolC promoter confers resistance against a phytophagous sap sucking aphid, *Myzus persicae*. Electron J Biotechnol 47, 72-82.

Vandenborre G, Smagghe G, Van Damme EJ (2011) Plant lectins as defense proteins against phytophagous insects. Phytochem 72(13), 1538-1550.

Vásquez-Escobar J, Benjumea-Gutiérrez DM, Lopera C, et al. (2023) Heterologous Expression of an Insecticidal Peptide Obtained from the Transcriptome of the Colombian Spider *Phoneutria depilate*. Toxins 15(7), e436.

Wang X, Tang X, Xu D, Yu D (2019) Molecular basis and mechanism underlying the insecticidal activity of venoms and toxins from Latrodectus spiders. Pest Manag Sci 75(2), 318-323.

Wang Y, Zhang H, Li H, Miao X (2011) Second-generation sequencing supply an effective way to screen RNAi targets in large scale for potential application in pest insect control. PloS One 6(4), e18644.

Windley MJ, Herzig V, Dziemborowicz SA, et al. (2012) Spider-venom peptides as bioinsecticides. Toxins 4(3), 191-227.

Wroblewski T, Tomczak A, Michelmore R (2005) Optimization of *Agrobacterium*-mediated transient assays of gene expression in lettuce, tomato and *Arabidopsis*. Plant Biotechnol J 3(2), 259-273.

Xie W, Marty DM, Xu J, et al. (2021) Simultaneous gene expression and multi-gene silencing in *Zea mays* using maize dwarf mosaic virus. BMC Plant Biol 21, e208.

Yainna S, Tay WT, Durand K, et al. (2022) The evolutionary process of invasion in the fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*). Sci Rep 12(1), e21063.

Yang M, Lin J, Cheng L, et al. (2020) Identification of a novel planthopper resistance gene from wild rice (*Oryza rufipogon* Griff.). Crop J 8(6), 1057-1070.

Yao JH, Zhao XY, Liao ZH, et al. (2003) Cloning and molecular characterization of a novel lectin gene from *Pinellia ternata*. Cell Res 13(4), 301-308.

Yu Y, Wei Z (2008) Increased oriental armyworm and aphid resistance in transgenic wheat stably expressing *Bacillus thuringiensis* (Bt) endotoxin and *Pinellia ternata* agglutinin (PTA). Plant Cell Tissue Organ Cul 94(1), e33.

Zacharias DA, Violin JD, Newton AC, Tsien RY (2002) Partitioning of lipid-modified monomeric GFPs into membrane microdomains of live cells. Science 296(5569), 913-916.

Zhang L, Liu B, Zheng W, et al. (2020) Genetic structure and insecticide resistance characteristics of fall armyworm populations invading China. Mol Ecol Resour 20(6), 1682-1696.

Zhang Y, Deng Q, Chen J (2021) Transgenic expression of *Pinellia ternata* agglutinin (PTA) and *Arisaema heterophyllum* agglutinin (AHA) in wheat confers resistance against the grain aphid, *Sitobion miscanthi*. J Pest Sci 94, 1439-48.