

## فاکتورهای مؤثر در تراریزش پنبه با استفاده از آگروباکتریوم

مسعود توحیدفر<sup>1\*</sup>، مطهره محسن پور<sup>2</sup>

<sup>1</sup> پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی کرج

<sup>2</sup> دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

### چکیده

پنبه (*Gossypium spp.*) در رتبه اول گیاهان تولید کننده الیاف در دنیا قرار دارد و به عنوان یک منبع مهم روغن نیز محسوب می شود. اگر چه در برنامه های اصلاحی پنبه پیشرفت های قابل ملاحظه ای به وجود آمده است، ولی روش های سنتی دارای محدودیت هایی از جمله منبع ژنی محدود، عدم تلاقی، انتخاب ناکارا و وقت گیر بودن هستند. پیشرفت های اخیر در انتقال ژن به پنبه، نه تنها راه را برای انتقال ژن های مفید هموار می کند بلکه امکان شناسایی و مطالعه عملکرد و تنظیم ژن را نیز فراهم می آورد. روش آگروباکتریوم یکی از روش هایی است که بیشترین استفاده را در انتقال ژن به گیاهان از جمله پنبه دارد. کارایی انتقال ژن بستگی به چندین فاکتور دارد. از جمله، می توان به نژاد و غلظت باکتری، اضافه کردن مواد فنولی در محیط کشت، گونه گیاهی و ژنوتیپ، تنظیم کننده های رشدی، ریز نمونه، نور و دما، دمای هم کشتی، آنتی بیوتیک، تیمار ایجاد زخم در بافت هدف و روش مناسب انتخاب سلول های تراریخت شده از بافت غیرتراریخته اشاره نمود. در انتقال ژن توسط آگروباکتریوم به پنبه از هیپوکوتیل، لپه ها و سوسپانسیون سلولی به عنوان ریزنمونه استفاده شده است. محدودیت این ریزنمونه ها میزان باززایی کم و وابسته بودن آنها به ژنوتیپ است به طوری که تنها تعداد محدودی از ارقام از این ریزنمونه ها باززا می شوند. با به وجود آمدن سیستم باززایی از مریستم نوک ساقه پنبه، این امکان به وجود آمد تا میزان انتقال ژن تا حدی افزایش یابد. در این مقاله تلاش شده است تا با مروری بر پژوهش های انجام شده در انتقال ژن به پنبه، فاکتورهایی که در تراریزش پنبه با آگروباکتریوم مؤثر بوده اند معرفی شوند.

**کلمات کلیدی:** آگروباکتریوم، انتقال ژن، پنبه.

## مقدمه

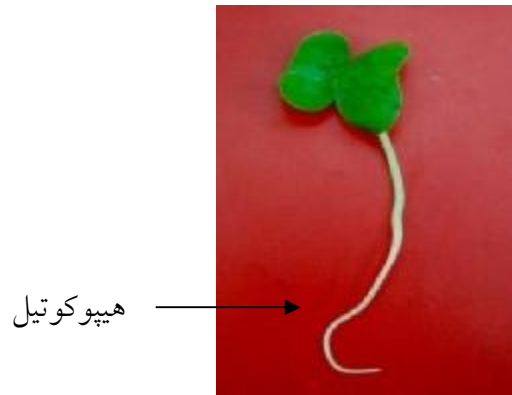
و *Umbeck et al.* (1987) گزارش شد که مسیر آزادسازی تجاری نخستین پنبه بازاری شده و تراریخته و ورود آن به عرصه تولید را هموار نمود (Perlak et al., 1990). در تراریزش پنبه به کمک آگروباکتریوم از جنین‌زایی سوماتیکی تاکنون بیش از سایر روش‌ها استفاده شده است. قسمت اعظم این موضوع به تکرارپذیری این روش و کارایی آن در بازاری گیاه تراریخته مربوط می‌شود و نخستین روشی است که هم در بخش خصوصی و هم در بخش دولتی برای پنبه به طور گسترده‌ای مورد استفاده قرار می‌گیرد (Rajasekaran et al., 2005; Tohidfar et al., 2009). بازاری گیاه تراریخته به یک دوره 8 تا 10 ماهه نیاز دارد. با اینکه از ریزنمونه‌های حاصل از بافت‌های مختلفی مثل برگ‌ها و لپه‌ها در تراریزش استفاده می‌شود ولی هیپوکوتیل‌های گیاهچه‌ای بیشترین آمادگی را برای جنین‌زایی دارند (Trolinder and Goodin, 1988a). هیپوکوتیل گیاهچه‌های جوان 7 تا 10 روزه (شکل 1) به عنوان ریزنمونه بریده می‌شوند (تا 5 میلی‌متر) و سپس با آگروباکتریوم آغشته شده و به محیط کشت القاءکننده کالوس منتقل می‌شوند. این محیط حاوی ترکیبی از هورمون‌های گیاهی و ماده‌ای برای تحریک القای کالوس تراریخته است. ابتدا کالوس کامل تشکیل می‌گردد (4 تا 6 هفته)، اما در ادامه واکشت‌گزینشی، کالوس‌های نوع

گیاه پنبه به عنوان مهم‌ترین و قدیمی‌ترین گیاه لیفی مصارف گوناگونی دارد و از نظر اقتصادی و تجارت دارای اهمیت فوق‌العاده‌ای می‌باشد. هر چند رقابت الیاف مصنوعی با پنبه موجب شده است که این گیاه اهمیت نسبی خود را از دست بدهد، ولی با این وجود، مصرف جهانی و سطح زیر کشت آن افزایش یافته، مهم‌ترین و پرمصرف‌ترین الیاف صنعتی بوده و از نظر غذایی نیز به عنوان یک دانه روغنی، مقام دوم را در جهان دارا می‌باشد. با وجود تولید ارقام مطلوب پنبه توسط اصلاح نباتات کلاسیک، اصلاح ژنتیکی آن به دلیل فقدان تنوع در ژرم‌پلاسم از نظر وجود ژن‌های مقاومت به آفات و بیماری‌ها، طولانی بودن زمان اصلاح و نیز کمی بودن صفات مقاومت به آفات و بیماری‌ها محدود شده است. مهندسی ژنتیک قادر به افزایش تولید، حفظ تنوع ژنتیکی، استفاده بهینه از نهاده‌های کشاورزی، افزایش پایداری تولید با کاهش صدمات سال‌های خشکسالی به علت تنش‌های زنده و غیرزنده و پیشرفت‌های اقتصادی و اجتماعی و کاهش فقر مفرط در کشورهای در حال توسعه می‌باشد (Satyavathi et al., 2002).

اولین انتقال ژن موفقیت‌آمیز به پنبه از طریق آگروباکتریوم توسط *Firoozabady et al.* (1987)

فرایند تراریزش آخرین مانع، توانایی بازیابی موفقیت آمیز گیاهچه از جنین های سوماتیکی است (شکل 2) (Tohidfar *et al.*, 2008).

مطلوب منجر به تشکیل کالوس جنین زا می گردد. جنین های سوماتیکی گرد و یا قلبی شکل انتخاب شده و به محیط کشت باززایی منتقل می شوند. در

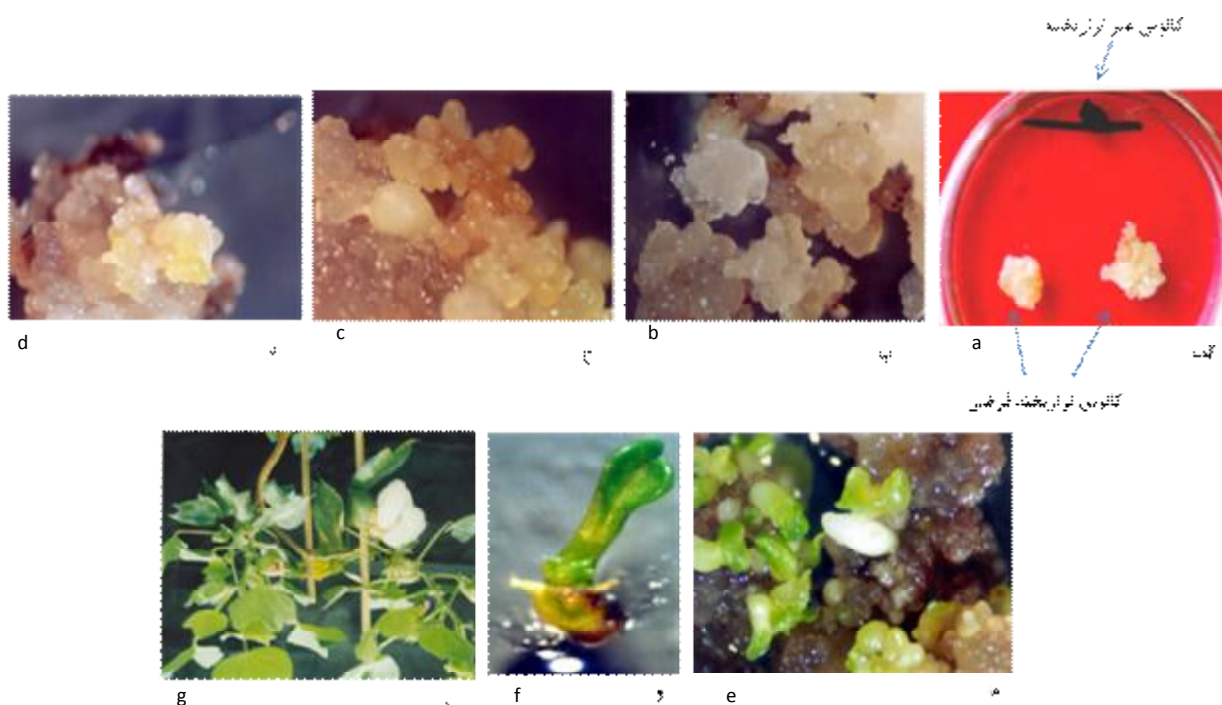


شکل 1- گیاهچه 10 روزه استریل.

Figure 1- Ten days old sterile explant.

10 ماه در محیط کشت باقی می ماند و در همین مرحله و پس از آن خطر تنوع زیانبار سوماکلونال به طور معنی داری افزایش پیدا می کند. بنابراین، کمینه سازی زمان صرف شده در هر مرحله، نکته ای کلیدی برای کم کردن مشکلات مربوط به تنوع سوماکلونال است. اگر چه میزان انتقال ژن به پنبه به طور معنی داری نسبت به گزارش های اولیه افزایش یافته است ولی باز هم درصد انتقال ژن بیشتری مورد نیاز است. عوامل متعددی بر کارایی انتقال ژن اثر می گذارند که در ادامه به آنها اشاره خواهد شد.

چندین ایراد به جنین زایی سوماتیکی به عنوان راهکاری برای ایجاد گیاهان تراریخته پنبه وارد است که بیشتر آنها با تغییراتی برطرف می شوند. یکی از معایب برجسته این روش در بدو امر در قابلیت تنوع سوماکلونال پدیدار شد (Firoozabady and DeBoer 1993; ) (Rajasekaran *et al.*, 1996). در نسل اول بسیاری از گیاهان تراریخته پنبه که با استفاده از جنین زایی باززا شدند تنوع سوماکلونال به صورت تغییر در مورفولوژی و کاهش باروری نشان می دهند. واقع امر آن است که این لاین ها بیش از



شکل 2- تولید کالوس تراریخته و باززایی پنبه در محیط انتخاب حاوی کانامایسین (به میزان 50 میلی گرم در لیتر). الف) کالوس های نکروزه غیر تراریخته و کالوس های تراریخته فرضی مقاوم به کانامایسین، ب، ج، د) کالوس های جنین زای شکنده و قلبی شکل، ه) جنین های سوماتیکی با مورفولوژی مختلف، و) جوانه زنی جنین های سوماتیکی، ز) گیاه کامل بازاشده.

**Figure 2-** Transgenic callus production and cotton regeneration stages in the kanamycin selective medium (50 mg/lit). a: non-transgenic necrotic callus and putative transgenic callus resistant to kanamycin; b, c, d: Heart-shaped embryogenic callus; e: somatic embryos with different morphology; f: germination of somatic embryos; g: regenerated plant.

2009). در بعضی موارد نیز برای تراریزش از هیپوکوتیل یا لپه ای که از کشت سوسپانسیون یا کشت کالوس مشتق شده استفاده شده است که باززایی تراریخت ها از طریق جنین زایی سوماتیکی صورت می گرفت (Finer and McMullen 1990; Rajasekaran *et al.*, 1996; Leelavathi *et al.*, 2004). امکان کوتاه کردن دوره بین مرحله

#### نوع ریزنمونه

در بیشتر گزارش ها برای ایجاد پنبه تراریخته از کشت سلول های لپه یا هیپوکوتیل برای تراریزش استفاده شده است (Umbeck *et al.*, 1987; Townsend and Llewellyn 2002; Tohidfar *et al.*, 2005; Rathore *et al.*, 2006; Tohidfar *et al.*, 2008; Yazdanpanah *et al.*,

تراریزش و بازیابی گیاهان پنبه تراریخته با استفاده از کالوس‌های جنین‌زا یا سوسپانسیون از قبل تهیه شده به عنوان بافت هدف در روش آگروباکتريوم وجود دارد ( Rajasekaran *et al.*, 2000; Leelavathi *et al.*, 2004)، ولی انجام این مرحله نیز نیازمند دوره‌های تولید اولیه کالوس و حفاظت مرتب از کالوس‌های جنین‌زا و کشت‌های سوسپانسیون است. به منظور رفع مشکلات ناشی از مراحل جنین‌زایی سوماتیکی، تلاش‌هایی برای تراریزش مستقیم سلول‌ها با مریستم انتهایی ساقه انجام گرفته است. از سویی دیگر، استفاده از ریزنمونه‌هایی نظیر هیپوکوتیل، لپه و سوسپانسیون سلولی، دارای محدودیت‌هایی نظیر باززایی کم و وابسته بودن آنها به ژنوتیپ است به طوری که باززایی فقط در تعداد محدودی از ارقام ممکن بوده است. با به وجود آمدن سیستم باززایی از مریستم نوک ساقه پنبه این امکان به وجود آمده تا انتقال ژن به هر ژنوتیپ در زمان کوتاهی انجام پذیر شود (Zapata *et al.*, 1999).

#### اندازه کالوس

اندازه کالوس اثری قوی در زنده ماندن آن دارد. کالوس‌های با اندازه کوچکتر میزان زنده ماندن آنها پایین می باشد. با این وجود، در آزمایش‌ها انتقال ژن، این که منتظر بمانیم تا تمامی کالوس‌ها، قبل از جداسازی به اندازه کافی رشد

کنند تا شانس زنده ماندن آنها افزایش یابد، غیر عملی خواهد بود، زیرا این امر ممکن است منجر به یکی شدن دو کالوس در حال رشد شود. یکی شدن باعث مخلوط شدن وقایع تراریزش مستقل خواهد شد. میزان پایین زنده ماندن کالوس‌های کوچک ممکن است به علت نیاز به تراکم خاص سلول باشد تا به طور مستقل بتوانند بعد از جداسازی از ریز نمونه به رشد خود ادامه دهند. اعتقاد بر این است که این وضعیت مشابه با نیاز به حداقل تراکم خاص سلول است که برای رشد پروتوپلاست یا سلول گزارش شده است (Shneyour *et al.*, 1984). این نیاز از طریق سلول‌های تغذیه‌کننده یا پرستار که رشد توده‌های سلول کوچک یا پروتوپلاست را حمایت می‌کنند جبران می‌شود (Imbrie-Milligan 1986). درحقیقت استفاده از سلول‌های پرستار یا تغذیه‌کننده در پژوهش‌ها معمول است خصوصاً در مواقعی که تراکم پروتوپلاست کم است، اما نیاز دارند تا تقسیم شوند و توده‌های سلولی تشکیل دهند تا باززا شوند. آزمایش‌ها نشان داده‌اند که پس از برش ریزنمونه از بافت اولیه (هیپوکوتیل یا لپه)، تعداد قابل توجهی از لاین‌های کالوس مجزا در طول مراحل انتخاب در محیط حاوی کانامایسین پس از حدود دو دوره واكشتی از بین می‌روند. علت این امر ممکن است کافی نبودن توده سلولی برای زنده ماندن در شرایط انتخابی و یا به علت

هنوز به درستی شناخته نشده است. آغاز تقسیم سلولی فعال در محل زخم، در افزایش اتصال آگروباکتریوم به سلول‌هایی که به تازگی دیواره سلولی خود را ساخته اند موثر بوده و تولید ترکیبات القاء‌کننده ژن‌های *vir* توسط سلول‌هایی که از لحاظ متابولیکی فعال هستند به عنوان فاکتورهای مهمی که در این افزایش کارایی مشارکت دارند، مطرح می‌باشند (Karami 2008).

#### زخم‌زنی ریزنمونه

از دیگر عوامل موثر در کارایی انتقال ژن پیش تیمار زخم‌زنی مریستم‌ها عنوان شده است (Rajasekaran *et al.*, 1996; Norelli *et al.*, 1996). مریستم‌ها قبل از مرحله آلوده‌سازی با باکتری ابتدا توسط سوزن استریل و تیز، زخم‌زنی شده و روی محیط همکشتی حاوی استوسرینگون قرار داده می‌شدند. زخم‌زنی دسترسی باکتری را به لایه‌های پایین تر مریستم (رگه زایشی) که قسمت اعظم بافت جدید را تشکیل می‌دهد، افزایش خواهد داد.

اثرات استفاده از استوسرینگون<sup>2</sup> در طول همکشتی

استوسرینگون یکی از ترکیبات فنلی است که توسط بافت گیاهی زخمی شده، ترشح می‌شود و

فرار باشد. در مطالعه‌ای برای درک علت از بین رفتن لاین‌های کالوس، ارتباط بین اندازه کالوس، بیان GFP و قدرت زنده ماندن در طول دوره دو ماهه روی محیط حاوی کانامایسین مورد بررسی قرار گرفت و نتایج آزمایش‌ها به طور واضحی نشان داد که کالوس‌های بزرگ‌تری که GFP را نیز بیان می‌کردند قدرت زنده ماندن بیشتری داشتند، به طوری که میزان زنده ماندن آنها 68/2% بود. این در حالی است که درصد زنده ماندن کالوس‌های دارای اندازه متوسط 50/2 و کالوس‌های کوچک 25/6 مشاهده شد (اندازه کالوس‌های کوچک 1 میلی‌متر و کمتر از آن، کالوس‌های متوسط بین 1 تا 2 میلی‌متر و کالوس‌های بزرگ 2 تا 3 میلی‌متر بود) (Sunilkumar and Rathore 2001).

در مواردی که از مریستم به عنوان ریزنمونه استفاده شده بود نیز مریستم‌های جدا شده از گیاهانی که 9 تا 11 روز در محیط جوانه‌زنی بذر قرار داشتند، دارای باززایی بهتری نسبت به مریستم‌هایی بودند که زودتر جدا می‌شدند (Jiang 2004).

#### پیش‌کشت<sup>1</sup> ریزنمونه‌ها

پژوهش‌ها نشان داده است که پیش‌کشت ریزنمونه‌ها در کارایی تراریزش در پنبه موثر بوده است (Wu *et al.*, 2005a). اساس افزایش کارایی انتقال ژن به کمک آگروباکتریوم در اثر پیش‌کشت،

<sup>2</sup> Acetosyringone

<sup>1</sup> Preculture

پنبه، استفاده از استوسرینگون را گزارش نکردند. در گزارش Sunilkumar و Rathore (2001)، استوسرینگون با غلظت 100 میکرومولار در مرحله نهایی رشد باکتری و در طول همکشتی مورد استفاده قرار گرفت و نشان داده شد که استوسرینگون به طور معنی داری کارایی تراریزش را بهبود می بخشد. در آن تحقیق وقتی که استوسرینگون برای تیمار رقم کوکر 312 به محیط کشت اضافه شد، میانگین تعداد کالوس های مقاوم به کانامایسین 2 تا 3 برابر بیشتر شد. در سه رقم دیگر پنبه ( TAM-94L25, TAM-89E51, and TAM-94WE37S) نیز وقتی که تراریزش در حضور استوسرینگون انجام شد، افزایش معنی داری در تعداد کالوس های مقاوم به کانامایسین مشاهده گردید. این نتایج پیشنهاد می کند که استوسرینگون می تواند به عنوان ماده ای که دارای تاثیر قابل توجهی در تراریزش پنبه است، مورد استفاده قرار گیرد (Sunilkumar and Rathore 2001).

#### اثر دما در همکشتی

نشان داده شده است که همکشتی در دمای پایین کارایی تراریزش با آگروباکتریوم را در *Nicotiana tabacum* و *Phaseolus acutifolius* افزایش می دهد، به طوری که، Dillen et al. (1997) گزارش کردند که کارایی انتقال ژن *gus* در لوبیا (*Phaseolus acutifolius*) و توتون در

به عنوان القاکننده بالقوه ژن های آگروباکتریوم شناخته شده است. چندین گزارش در مورد تک لپه ای ها و برخی گزارشات نیز روی دولپه ای های مهم، نشان داده اند که پیش القای<sup>1</sup> آگروباکتریوم با استوسرینگون و یا استفاده از استوسرینگون در محیط همکشتی به میزان قابل توجهی انتقال ژن به کمک آگروباکتریوم را افزایش خواهد داد ( Rashid et al., 1996; Leelavathi et al., 1999; Sunilkumar et al., 1999). در حقیقت استوسرینگون به طور معمول برای انتقال ژن به تک لپه ای ها مورد استفاده قرار می گیرد. نتایج آزمایش ها (Sunilkumar and Rathore 2001) نشان داد که استوسرینگون کارایی انتقال ژن را 2-4 برابر افزایش می دهد. استوسرینگون نه تنها تعداد متوسط وقایع انتقال ژن ثابت در هر ریزنمونه را افزایش می دهد بلکه درصد ریزنمونه هایی که انتقال ژن پایدار نشان می دهند را نیز افزایش می دهد. این نتایج با نتایج سایر محققین در گونه های مختلف از جمله ذرت ( Shen et al. 1993) سویا (Godwin et al. 1991) و صنوبر (Levee et al., 1999) مطابقت دارد. در توتون مشخص شده هنگامی که استوسرینگون به محیط کشت اضافه می شود کارایی انتقال ژن 3 برابر افزایش می یابد (Sunilkumar et al., 1999). هیچکدام از پژوهش ها اولیه در ارتباط با تراریختی

<sup>1</sup> Pre-induction

این وجود، از مشکلات فراوانی پائین درصد تراریزش نیز نباید غافل ماند (Mahammadi *et al.*, 2009; Zapata 1999; Rajasekaran *et al.*, 2000). ارقامی از پنبه که تاکنون با استفاده از آگروباکتریوم تحت تراریزش قرار گرفته‌اند، در جدول 1 نشان داده شده است. **نشانگرهای انتخابی**

لیست مقالات چاپ شده در خصوص پنبه‌های تراریخته نشان می‌دهد که اولین نشاگر انتخابی استفاده شده در پنبه ژن *nptII* بود که باعث مقاومت به آنتی‌بیوتیک کانامایسین می‌شود. ارزان بودن آن و نداشتن اثرات سوء روی باززایی گیاه باعث شده تا بیشترین کاربرد را داشته باشد. دومین نشانگر انتخابی استفاده شده ژن هیگرومایسین فسفوترانسفراز بوده که باعث مقاومت به آنتی‌بیوتیک هیگرومایسین می‌شود (Li *et al.*, 2004). دو گزارش هم در خصوص استفاده از ژن *bar* (مقاومت به علفکش بیالافوس) وجود دارد. با این وجود در انتخاب های اولیه سلول‌های تراریخته از آن استفاده نشده است (Wang *et al.*, 2004b). ژن *nptII* موجود در محصولات پنبه برای محیط و انسان سالم تشخیص داده شده است. بنابراین به صورت معمول در تراریزش پنبه استفاده می‌شود. با این وجود چنانچه نیاز باشد می‌توان با انواع روش‌های موجود نشانگرهای انتخابی را از گیاهان تراریخته حذف نمود (Breitler *et al.*, 2004).

حرارت 22 درجه نسبت به دمای 25 و 27 درجه بالا بود. در پژوهش‌ها اولیه روی تراریزش پنبه، همکشتی در دمای بین 25 تا 28 درجه سانتیگراد انجام می‌گرفت. آزمایش‌ها بعدی نشان دادند که وقتی همکشتی در دمای 21 درجه انجام می‌شود، کارایی تراریزش پنبه بیشتر است (Sunilkumar and Rathore 2001). Jin *et al.* (2005) هم نشان دادند که همکشتی با آگروباکتریوم در دمای پایین کارایی انتقال ژن را افزایش می‌دهد. Fullner *et al.* (1996) نشان دادند که حرارت پایین منجر به افزایش پیلای در سطح سلول آگروباکتریوم می‌شود. پیشنهاد شده است که حرارت پایین که کارایی انتقال ژن را بالا می‌برد ممکن است به علت بهتر عمل کردن ژن‌های *virB-virD4* باشد.

#### رقم و ژنوتیپ

مطالعات نشان می‌دهد که باززایی پنبه از طریق جنین‌زایی سوماتیکی تا حد زیادی وابسته به ژنوتیپ است (Firoozabady and DeBoer 1993; Koonce *et al.*, 1996). تعداد کمی از ارقام قادرند از طریق جنین‌زایی سوماتیکی باززا شوند که اکثراً واریته‌های گروه کوکر هستند که امروزه به صورت تجاری کاشته نمی‌شوند. به منظور حذف وابستگی به ژنوتیپ از تراریزش مریستم ساقه و یا تراریزش به کمک تفنگ ژنی استفاده می‌شود و تراریزش مریستم ساقه این قابلیت را دارد که باززایی سریع لاین‌های تراریخته را ممکن سازد. با



جدول 1- خلاصه‌ای از پژوهش‌ها انجام شده برای تراریزش پنبه با استفاده از آگروباکتریوم

| منبع<br>reference  | ژن منتقل شده<br>Transgene                                   | روش بازیابی<br>تراریخت‌ها<br>Transgenic plant<br>regeneration<br>method | ریزنمونه هدف برای<br>انتقال ژن<br>Target explant<br>for<br>transformation | رقم<br>Cultivar                |
|--|---|---|---|--------------------------------|
| Umbeck <i>et al.</i><br>(1987)                             | <i>cat</i> و <i>nptII</i>                                   | جنین‌زایی سوماتیکی  | هیپوکوتیل   | Coker 310, 312 و<br>5110       |
| Firoozabady <i>et al.</i> (1987)                           | <i>nptII</i> و OCS  | جنین‌زایی سوماتیکی  | لپه   | Coker 201                      |
| Perlak <i>et al.</i><br>(1990)                             | <i>CryIAC</i> , <i>CryIAb</i><br>و <i>nptII</i>             | جنین‌زایی سوماتیکی  | هیپوکوتیل   | Coker 312                      |
| Cousins <i>et al.</i><br>(1991)                            | <i>nptII</i> و <i>gusA</i>                                  | جنین‌زایی سوماتیکی  | هیپوکوتیل   | Siokra 1-3                     |
| Bayley <i>et al.</i><br>(1992)                             | <i>nptII</i> و <i>tfDA</i>                                  | جنین‌زایی سوماتیکی  | هیپوکوتیل   | Coker 312                      |
| Lyon <i>et al.</i><br>(1993)                               | <i>gusA</i> و <i>tfDA</i>                                   | جنین‌زایی سوماتیکی  | لپه   | Coker 315                      |
| Thomas <i>et al.</i><br>(1995)                             | <i>nptII</i> , protease<br>inhibitors                       | جنین‌زایی سوماتیکی  | لپه   | Coker 312                      |
| Rajasekaran <i>et al.</i><br>(1996)                        | <i>nptII</i> mutant<br>native AHAS<br>genes                 | جنین‌زایی سوماتیکی  | هیپوکوتیل، لپه،<br>سوسپانسیون سلولی<br>جنین‌زا                            | Coker 315 و<br>Acala varieties |
| Nida <i>et al.</i><br>(1996); Chen <i>et al.</i><br>(2006) | <i>nptII</i>  | جنین‌زایی سوماتیکی  | هیپوکوتیل   | Coker 312                      |
| Payton <i>et al.</i><br>(1997)                             | <i>nptII</i>  | جنین‌زایی سوماتیکی  | هیپوکوتیل   | Coker 312                      |
| Murray <i>et al.</i><br>(1999)                             | <i>nptII</i>  | جنین‌زایی سوماتیکی  | لپه   | Coker 315                      |
| Zapata <i>et al.</i><br>(1999)                             | <i>nptII</i> , <i>gusA</i>                                  | باززایی شاخه در کشت   | مریستم نوک ساقه   | CUBQHRPIS                      |
| McFadden <i>et al.</i><br>(2000)                           | Tobacco basic<br>chitinase glucose<br>oxidase, <i>nptII</i> | جنین‌زایی سوماتیکی  | هیپوکوتیل   | Coker 315                      |
| Ellis <i>et al.</i> (2000)                                 | Cotton <i>Adh2</i> , rice<br><i>Pdc1</i> , <i>nptII</i>     | جنین‌زایی سوماتیکی  | لپه   | Coker 315                      |
| Song <i>et al.</i>   | Cotton seed-  | جنین‌زایی سوماتیکی  | هیپوکوتیل   | Coker 312                      |

|   |   |                     |                   |                                 |
|---|---|---------------------|-------------------|---------------------------------|
| (2000)  | protein promoter or rbcS promoter driving <i>gusA</i>               |                     |                   |                                 |
| Sunilkumar and Rathore (2001); Rathore <i>et al.</i> (2006) | <i>nptII</i> , <i>gusA</i>  | جنین‌زایی سوماتیکی  | هیپوکوتیل         | <b>Coker 312</b>                |
| Kornyeyev <i>et al.</i> (2001), (2003a, b)                  | Mn-SOD, APX, GR, <i>nptII</i>                                       | جنین‌زایی سوماتیکی  | هیپوکوتیل         | <b>Coker 312</b>                |
| Payton <i>et al.</i> (2001); Logan <i>et al.</i> (2003)     | Mn-SOD, APX, GR, <i>nptII</i>                                       | جنین‌زایی سوماتیکی  | هیپوکوتیل         | <b>Coker 312</b>                |
| Chapman <i>et al.</i> (2001)                                | Phaseolin promoter driving rapeseed mutant <i>fad2</i>              | جنین‌زایی سوماتیکی  | لپه               | <b>Coker 312</b>                |
| Sunilkumar <i>et al.</i> (2002a)                            | Cotton $\alpha$ -globulin promoter driving <i>gusA nptII</i>        | جنین‌زایی سوماتیکی  | هیپوکوتیل         | <b>Coker 312</b>                |
| Sunilkumar <i>et al.</i> (2002b)                            | CaMV 35S promoter driving GFP gene, <i>nptII</i>                    | جنین‌زایی سوماتیکی  | هیپوکوتیل         | <b>Coker 312</b>                |
| Liu <i>et al.</i> (2002b)                                   | Seed-specific RNAi of Cotton SAD-1 and Cotton FAD2-1 <i>nptII</i>   | جنین‌زایی سوماتیکی  | لپه               | <b>Coker 315</b>                |
| Llewellyn (2002)  | Soybean lectin promoter driving <i>gusA</i>                         | جنین‌زایی سوماتیکی  | لپه               | <b>Coker 315</b>                |
| Satyavathi <i>et al.</i> (2002)                             | <i>gusA</i> , <i>nptII</i>  | باززایی شاخه در کشت | نوک ساقه جوانه‌ها | <b>MCU5, DCH32 و Coker310FR</b> |
| Li <i>et al.</i> (2002b)                                    | Cotton $\beta$ -tubulin promoter driving <i>gusA</i> , <i>nptII</i> | جنین‌زایی سوماتیکی  | هیپوکوتیل         | <b>Coker 312 C</b>              |
| Emani <i>et al.</i> (2003)                                  | Endochitinase gene from <i>Trichoderma virens</i> , <i>nptII</i>    | جنین‌زایی سوماتیکی  | هیپوکوتیل         | <b>Coker 312</b>                |
| Ruan <i>et al.</i> (2003)                                   | Sense and antisense suppression of sucrose synthase, <i>nptII</i>   | جنین‌زایی سوماتیکی  | لپه               | <b>Coker 315</b>                |
| Martin <i>et al.</i> (2003); Benedict                       | CaMV 35S promoter driving   | جنین‌زایی سوماتیکی  | هیپوکوتیل         | <b>Coker 312</b>                |

|                                  |   |                     |                                       |   |
|----------------------------------|---|---------------------|---------------------------------------|---|
| <i>et al.</i> (2004)             | antisense <i>cdn1-C1</i>  |                     |                                       |   |
| Chaudhary <i>et al.</i> (2003)   | <i>nptII gusA</i>   | جنین‌زایی سوماتیکی  | هیپوکوتیل و لپه                       | <b>Coker 310FR</b>                        |
| Leelavathi <i>et al.</i> (2004)  | <i>CryIIa5nptII</i>   | جنین‌زایی سوماتیکی  | لپه یا هیپوکوتیل<br>مشتق‌شده از کالوس | <b>Coker 310</b>                          |
| Yan <i>et al.</i> (2004)         | <i>GF14λ, nptII</i>   | جنین‌زایی سوماتیکی  | هیپوکوتیل                             | <b>Coker 312</b>                          |
| Haq (2004)                       | <i>gusA nptII</i>   | جنین‌زایی سوماتیکی  | هیپوکوتیل مشتق‌شده<br>از کالوس        | <b>Coker 312</b>                          |
| Li <i>et al.</i> (2004)          | <i>acsA, acsB, hpt, gusA</i>  | جنین تخم بارور شده  | دانه‌گرده                             | <b>G007</b>                               |
| Zhang <i>et al.</i> (2004)       | Cotton <i>ghCTL2</i> promoter driving <i>gusA, nptII</i>                  | جنین‌زایی سوماتیکی  | هیپوکوتیل                             | <b>Coker 312</b>                          |
| Sunilkumar <i>et al.</i> (2005)  | Seed-specific antisense of cotton FAD-2, <i>nptII</i>                     | جنین‌زایی سوماتیکی  | هیپوکوتیل                             | <b>Coker 312</b>                          |
| Townsend <i>et al.</i> (2005)    | Soybean lectin promoter or CaMV 35S promoter driving <i>nptII</i>         | جنین‌زایی سوماتیکی  | لپه                                   | <b>Coker 315 antisense <i>cdn1-C4</i></b> |
| Rajasekaran <i>et al.</i> (2005) | Synthetic antimicrobial peptide <i>D4E1, nptII</i>                        | جنین‌زایی سوماتیکی  | هیپوکوتیل                             | <b>Coker 312 C</b>                        |
| Sanjaya <i>et al.</i> (2005)     | Antisense of AV2, <i>nptII</i>  | باززایی شاخه در کشت | مریستم نوک ساقه                       | <b>F846</b>                               |
| Jin <i>et al.</i> (2005)         | <i>gusA, nptII</i>  | جنین‌زایی سوماتیکی  | هیپوکوتیل مشتق‌شده<br>از کالوس        | <b>YZ-1</b>                               |
| He <i>et al.</i> (2005)          | Arabidopsis <i>NHX1, nptII</i>  | جنین‌زایی سوماتیکی  | هیپوکوتیل                             | <b>Coker 312</b>                          |
| Wu <i>et al.</i> (2005a)         | <i>CryIAC API-B, nptII</i>  | جنین‌زایی سوماتیکی  | هیپوکوتیل مشتق‌شده<br>از کالوس        | <b>Ekang 9 and Jihe 321</b>               |
| Li <i>et al.</i> (2005)          | Cotton ACTIN1 promoter driving <i>gusA</i> , RNAi of <i>ghACT1, nptII</i> | جنین‌زایی سوماتیکی  | هیپوکوتیل                             | <b>Coker 312 C</b>                        |
| Tohidfar <i>et al.</i> (2005)    | Bean chitinase and <i>nptII</i>   | جنین‌زایی سوماتیکی  | هیپوکوتیل                             | <b>Coker 312</b>                          |

|                                 |  |                     |                                     |                               |
|---------------------------------|--|---------------------|-------------------------------------|-------------------------------|
| Light <i>et al.</i> (2005)      | Tobacco glutathione S-transferase and <i>nptII</i>                     | جنین‌زایی سوماتیکی  | هیپوکوتیل                           | Coker 312                     |
| Jin <i>et al.</i> (2006)        | <i>nptII</i>   | جنین‌زایی سوماتیکی  | هیپوکوتیل مشتق شده کالوس‌های ترد از | YZ-1, Coker 312 and Coker 201 |
| Wu <i>et al.</i> (2006a)        | Phloem-specific promoter driving ACA gene <i>nptII</i>                 | جنین‌زایی سوماتیکی  | هیپوکوتیل                           | Zhongmiansuo 35               |
| Yuceer and Koc (2006)           | <i>gusA nptII</i>  | باززایی شاخه در کشت | مریستم نوک ساقه                     | Cukurova 1518                 |
| Zhao <i>et al.</i> (2006)       | <i>aroA-M1</i>   | جنین‌زایی سوماتیکی  | هیپوکوتیل                           | Zhongmian 35                  |
| Zhu <i>et al.</i> (2006)        | <i>GhExp1 nptII</i>  | جنین‌زایی سوماتیکی  | هیپوکوتیل                           | G9803                         |
| Sunilkumar <i>et al.</i> (2006) | Seed-specific RNAi of cotton $\delta$ -cadinene synthase, <i>nptII</i> | جنین‌زایی سوماتیکی  | پتیول لپه                           | Coker 312 H                   |

**Table 1- Summary of performed research for *Agrobacterium* mediated transformation of cotton.**

بود و می‌تواند وقت و دقت و کار بیشتری را صرف رسیدگی و پرورش این گیاهان ارزشمند نموده تا به رشد کافی دست یابد و دارای سیستم ریشه‌ای مناسبی برای انتقال به گلدان شده و به مراحل بلوغ و بذردهی برسند. طراحی و استفاده از سازه مناسبی که امکان ردیابی آسان گیاهان تراریخته را در مراحل اولیه رشد فراهم نماید، برای رسیدن به این هدف بسیار مفید خواهد بود. طراحی و ساخت پلاسمید حامل ژن موردنظر بین یک ژن گزارشگر و یک ژن انتخابی، امکان ردیابی آسان و سریع گیاهان تراریخته احتمالی را در مراحل اولیه باززایی فراهم خواهد نمود. به عنوان مثال اگر ژن مورد نظر به همراه نواحی تنظیمی

#### سازه انتقال ژن

ناقل‌های مورد نیاز برای انتقال ژن با جایگزینی بخش T-DNA با قطعاتی از DNA که باید به گیاه وارد شود به دست می‌آیند. بیان موفقیت‌آمیز ژن‌های خارجی پس از انتقال به گیاه نیازمند آماده‌کردن ساختار مناسب ژن قبل از انتقال به گیاه است. علاوه بر توجه به توالی ژن بایستی پیشبر<sup>1</sup> و پایانبر<sup>2</sup> مناسبی به پایانه‌های 5' و 3' اضافه گردد تا بیان موثر و دلخواه ژن را تضمین نماید. تشخیص گیاهان تراریخته احتمالی در ماه‌های اولیه رشد برای محقق بسیار مهم خواهد

<sup>1</sup> - Promoter  
<sup>2</sup> - Terminator

می‌آورند که در هضم DNA و مراحل PCR تداخل ایجاد می‌کند. ولی برای انجام آزمون هیستوشیمیایی GUS حتی قطعه کوچکی از یک برگ نیز بدون نیاز به انجام مراحل استخراج DNA، کفایت می‌کند. بنابراین نیاز به نمونه گیاهی کمتر در ردیابی ژن‌های گزارش‌گر، نسبت به آنالیزهای ملکولی، یکی از مزایای این سیستم ردیابی می‌باشد. از سویی دیگر از بین رفتن تعداد زیادی از گیاهان غیرتراریخته نیز در محیط حاوی کانامایسین تا چندین ماه به طول می‌انجامد. این گیاهان به تدریج ضعیف می‌شوند. ضعف حاصل از مقاوم نبودن با ضعف باززایی روی محیط حاوی کانامایسین که گیاهان تراریخته را نیز شامل می‌شود، قابل تشخیص نبوده و از آنجایی که حضور کانامایسین در محیط کشت به طور معنی‌داری طولیل شدن ساقه و رشد گیاه را با کندی مواجه کرده (Jiang 2004) و برای القای ریشه نیز باید کانامایسین از محیط کشت گیاه حذف گردد، با تشخیص گیاهان تراریخته احتمالی توسط آزمون GUS سنجی در مراحل اولیه باززایی می‌توان آنها را روی محیط کشت بدون کانامایسین قرار داده تا دچار کندی و متوقف شدن رشد نگردند. این روش غربالگری، امکان تشخیص و حذف گیاهان تراریخته‌ای را که در اثر عدم الحاق کامل ناحیه T-DNA ممکن است تنها ژن *nptII* را دریافت کرده و بنابراین روی محیط

بین ژن‌گرینشگر *nptIII* در مرز راست و ژن گزارش‌گر *gus* در مرز چپ ناحیه T-DNA کلون‌سازی گردد، گیاهان باززا شده‌ای که در محیط حاوی کانامایسین رشد کرده و به آزمون هیستوشیمیایی GUS پاسخ مثبت می‌دهند، به احتمال زیاد ژن مورد نظر که در فاصله ژن‌های *gus* و *nptIII* کلون‌سازی شده را نیز دریافت خواهند نمود. با توجه به اینکه گیاهان باززا شده از مریستم نوک ساقه پنبه بسیار کند رشد بوده و به سختی ریشه‌دار می‌شوند، تشخیص گیاهان تراریخته احتمالی در ماه‌های اولیه رشد برای محقق بسیار مهم خواهد بود. به علت اینکه گیاهان حاصل از مریستم نوک ساقه پنبه حتی تا چندین ماه پس از باززایی بسیار ظریف و کوچک باقی می‌مانند، جداسازی این برگ‌های کوچک جهت آنالیزهای ملکولی موجب ضعیف و ناتوان شدن بیشتر گیاه شده و ممکن است گیاهان تراریخته از دست بروند. جداسازی برگ‌ها برای بررسی رویداد انتقال ژن تا زمان رسیدن گیاه به رشد کافی توصیه نمی‌گردد (Mohsenpou et al., 2007). از طرفی PCR مستقیم روی قطعه کوچکی از برگ پنبه و بدون انجام مراحل استخراج DNA به دلیل وجود سطوح بالای از پلی‌ساکاریدها و پلی‌فنل‌ها در گونه‌هایی نظیر پنبه مناسب نمی‌باشد. این ترکیبات یک مجموعه ژلاتینی قهوه‌ای رنگ در طی آماده‌سازی به وجود

حاوی کانامایسین به رشد خود ادامه داده ولی فاقد ژن مورد نظر می‌باشند را نیز با منفی بودن آزمون هیستوشیمیایی GUS، فراهم می‌کند. با تشخیص زودهنگام گیاهان تراریخته احتمالی دارای ژن مورد نظر، می‌توان دیگر گیاهان غیرتراریخته را در مراحل اولیه باززایی حذف نمود و حجم کار، وقت و هزینه‌ای که صرف نگهداری آنها شده تا به میزان رشد کافی جهت بررسی‌های ملکولی برسند و هزینه‌ی اضافه آنالیزهای ملکولی روی گیاهان غیرتراریخته را کاهش داد (Mohsenpour et al., 2007). طراحی و استفاده از پلاسمیدهای نو ترکیبی که دو یا چند ژن را تحت پیشبرهای جداگانه در ناحیه T-DNA دارا هستند، منجر به کاهش هزینه‌های انتقال جداگانه ژن‌ها شده و با وارد کردن همزمان آنها، به انجام مراحل وقت‌گیر و پرهزینه ایجاد گیاهانی که به طور جداگانه این ژن‌ها را دریافت نموده و سپس تلاقی آنها و انجام مراحل هرمبندی ژنی به منظور دستیابی و شناسایی گیاهان تراریخته‌ای که دارای هر دو ژن باشند، نیازی نخواهد بود (Mohsenpour et al., 2008).

#### محیط کشت و تنظیم‌کنندگان رشد گیاهی

یکی از محدودیت‌های بزرگ تولید پنبه تراریخته باززایی از کالوس است. این محدودیت به زنده ماندن لاین‌های کشت و طولانی بودن

مدت زمان تولید کالوس‌های جنین‌زا مربوط می‌شود. غلظت بالای سیتوکینین برای زنده ماندن و تکثیر کالوس بعد از جداسازی ضروری است. انتقال بلافاصله کالوس به محیط سیتوکینین پایین و اکسین بالا بعد از جدا سازی، زنده ماندن کالوس را کاهش و زمان و مقدار واکنش جنین‌زایی را افزایش می‌دهد. نسبت بالای اکسین به سیتوکینین باعث شکننده بودن کالوس در مراحل اولیه و در نهایت باعث تبدیل آنها به جنین می‌شود. در اکثر این مطالعات محیط کشت موراشی و اسکوگ (MS) با بعضی تغییرات به عنوان محیط اولیه در کشت‌ها مورد استفاده قرار گرفته است. ترکیبی از یک اکسین (2و4-دی‌کلروفنوکسی استیک اسید (2,4-D)، آلفا-نفتالن استیک اسید یا ایندول 3-بوتیریک اسید) و یک سیتوکینین (کنتینین یا N6-2-ایزوپنتیل) آدنین) به همراه MgCl<sub>2</sub> برای القای کالوس، تکثیر و به دست آوردن کالوس‌های جنین‌زا به کار رفته است. معمولاً یک محیط بدون هورمون در ترکیب با KNO<sub>3</sub> برای نمو جنین‌های سوماتیکی مورد استفاده قرار می‌گیرد. بعضی از آزمایش‌ها نیز از یک کشت سوسپانسیون حدواسط (Cousins et al., 1991; Bayley et al., 1992; Payton et al., 1997; Wilkins et al., 2004)، برای تسریع جنین‌زایی و افزایش تعداد جنین‌های سوماتیکی استفاده کرده‌اند.

### سویه آگروباکتریوم

عامل دیگری که می‌تواند نقش مهمی در تراریزش پنبه داشته باشد سویه آگروباکتریوم است. انتخاب سویه می‌تواند در کارایی انتقال ژن مهم باشد. برای مثال سویه‌های EHA101، A281 و EHA105 مشخص شد برای غلات (Raineri *et al.*, 1990) و دو لپه‌ای های مناسب‌ترند. آزمایش‌ها نشان دادند که کارایی انتقال ژن با سویه LBA4404 به طور قابل توجهی (بیش از 2 برابر) بیشتر از سویه EHA105 در پنبه بود. انجام این مقایسه سویه‌های آگروباکتریوم برای سه ژنوتیپ دیگر پنبه (TAM-94L25, TAM-94WE37S, and TAM-89E51) نیز برتری معنی‌دار LBA4404 را به EHA105، در تمام ارقام نشان داد. یکی از مشکلات سویه EHA105، رشد بیش از حد آن در طول مرحله انتخاب است که روی ریزنمونه‌ها دیده می‌شود. رشد بیش از حد باکتری با رشد کالوس در محیط انتخابی تداخل ایجاد خواهد کرد که این مشکل با افزودن سفاتاکسیم و کربنی‌سیلین به محیط کشت حل خواهد شد.

### غلظت آگروباکتریوم

در پنبه، رشد زیاد باکتری باعث افزایش آلودگی شده و در نتیجه باززایی گیاه را کاهش می‌دهد (جین و همکاران، 2005). پژوهش‌ها

نشان داده‌اند که استفاده از باکتری با  $OD_{600nm}=0/6$  در افزایش کارایی انتقال ژن به پنبه موثر می‌باشد (Jiang 2004).

### نتیجه‌گیری و بحث

به طور کلی چندین فاکتور می‌توانند اثر مهمی بر تراریزش با استفاده از آگروباکتریوم در گونه‌های گیاهی مختلف داشته باشند. انتخاب سویه آگروباکتریوم در کارایی انتقال ژن بسیار تأثیرگذار است. در حالی است که EHA101 و EHA105 که از مشتقات سویه بسیار بیماری‌زای A281 هستند برای تراریزش غلات بسیار مناسب گزارش شده‌اند (Raineri *et al.*, 1990; Rashid *et al.*, 1996)، ولی در مورد پنبه، مقایسه کارایی تراریزش با LBA4404 در تمامی ژنوتیپ‌های مورد آزمایش پنبه بیشتر بوده است (Sunilkumar and Rathore 2001). علاوه بر این، وقتی از سویه LBA4404 در انتقال ژن به پنبه استفاده شد، میزان پایداری تراریزش افزایش یافت. از آنجایی که تراریزش بدون استفاده از استوسرینگون در پنبه امکان‌پذیر بوده است، نشان می‌دهد که زخم‌زنی بافت پنبه فاکتورهای القاءکننده ژن‌های *vir* که برای تراریزش به واسطه آگروباکتریوم ضروری هستند را تولید می‌نماید. اما نتایج آزمایش‌ها مختلف نشان داده است که

کشت لاین‌های کالوس در محیط دارای سیتوکنین کم/اکسین زیاد، بلافاصله پس از جداسازی، درصد زنده ماندن را کاهش می‌دهد ولی زمان و مقدار پاسخ جنین‌زایی را در کالوس‌های زنده اساساً بهبود می‌بخشد. نسبت بالاتری از اکسین به سیتوکنین باعث زودتر ایجاد شدن کالوس‌های تُرد و شکننده شده و این کالوس‌های تُرد هستند که سرانجام به کالوس‌های جنین‌زا تبدیل می‌شوند.

به منظور تراریزش پنبه، یک سیستم باززایی مطمئن و مستقل از ژنوتیپ مورد نیاز است. باززایی از طریق جنین‌زایی سوماتیکی دارای مشکلاتی است. از جمله اینکه تنها تعداد کمی از ارقام قادرند از این طریق باززا شوند که اکثراً واریته‌های گروه کوکر هستند که امروزه به صورت تجاری کشت نمی‌شوند. علاوه بر محدودیت ژنوتیپی، بسیاری از گیاهانی که از کالوس‌های جنین‌زای سوماتیکی باززا می‌شوند نرمال نیستند. این مشکلات و وقت‌گیر بودن این روش کاربرد این روش را در بیوتکنولوژی پنبه و اصلاح آن محدود می‌کند. ایجاد سیستم انتقال ژن به مریستم به واسطه آگروباکتریوم، امکان هر نوع تغییر در ژنوتیپ را بدون وابستگی به نوع ژنوتیپ فراهم کرده است. از آنجایی که اغلب ژنوتیپ‌های زراعی پنبه، پتانسیل باززایی پایینی دارند و دستکاری ژنتیکی در آنها مشکل می‌باشد، بهینه‌سازی باززایی از طریق کشت مریستم که

استفاده از استوسرینگون کارایی تراریزش پایدار را به میزان 2 تا 4 برابر در ژنوتیپ‌های مختلف پنبه افزایش داده است و این نتایج با نتایج حاصل از استفاده استوسرینگون در تراریزش گیاهان دیگری مثل ذرت، سویا و توتون مطابقت داشته است (Shen et al., 1993; Godwin et al., 1991; Sunilkumar et al., 1999). هم‌کشتی با آگروباکتریوم در دمای پایین نیز در بهبود کارایی تراریزش به سلول‌های گیاهی موثر می‌باشد. در مورد پنبه با هم‌کشتی در دمای 21 درجه کارایی تراریزش بیشتر شده است (Sunilkumar and Rathore 2001). همانطور که قبلاً اشاره شد، یکی از بزرگترین مراحل محدودکننده برای دستیابی به پنبه تراریخته، باززایی می‌باشد. محدودیت باززایی به زنده ماندن لاین کشت شده و مدت زمانی که طول می‌کشد تا به کالوس جنین‌زا تبدیل شود، مرتبط است. Sunilkumar و Rathore (2001) نشان دادند که فقط یک دوره کشت اضافی پس از جداسازی به مدت دو هفته روی محیط کشت حاوی سیتوکنین زیاد / اکسین کم، به طور قابل توجهی زنده ماندن کالوس را بهبود بخشیده ولی این تیمار وقوع جنین‌زایی را به تأخیر می‌اندازد. احتمالاً استفاده از غلظت‌های بالاتری از سیتوکنین در محیط کشت برای زنده ماندن و تکثیر سلول‌ها در کالوس‌های مجزا بلافاصله پس از جداسازی، نیاز است. انتقال و



چندان به ژنوتیپ وابسته نمی‌باشد و مدت زمان باززایی را کاهش می‌دهد مناسب به نظر می‌رسد. با بهینه سازی فاکتور های موثر می توان کارایی انتقال ژن به پنبه را بالا برد. علیرغم داستان‌هایی که از موفقیت تراریختی به کمک آگروباکتریوم حکایت دارد، این روش با چند مشکل بالقوه روبروست که برای آن‌ها راه‌حلی نیز به دست آمده است. یکی از این مشکلات آن است که آگروباکتریوم به دنبال تراریختی به حضور خود در بافت ادامه می‌دهد که این امر منجر به آلودگی سیستمیک می‌شود. با این وجود، از آنجا که این مشکل در گونه‌هایی که به صورت کلونی تکثیر می‌گردند جدی‌تر است، مشکلی در گونه‌های بذرزادی مثل پنبه ایجاد نمی‌کند. در هر دو حالت، روش استاندارد برای ارزیابی نواحی کناری احاطه‌کننده محل ادغام برای حصول اطمینان از اینکه ژن در ژنوم میزبان ادغام شده است و در پلاسمید موجود نیست، وجود دارد. موضوع دوم، کشف اخیر در این مورد است که گاهی قسمت‌هایی از DNA بیرون توالی‌های حاشیه‌ای T-DNA همراه با ژن انتقالی در داخل ژنوم میزبان ادغام می‌گردد (Fullner et al., 1996).

ادغام چندین نسخه ( $\geq 6$ ) از ژن مورد نظر در تراریختی به کمک آگروباکتریوم نسبتاً معمول است، هر چند که این روش، کاراترین روش برای ایجاد ادغام تک‌نسخه‌ای است. نسخه‌های چندگانه

ژن که یا به صورت ادغام‌شدن پی‌درپی و یا به صورت نسخه‌های پراکنده در محل‌های تصادفی از ژنوم میزبان ادغام می‌گردد، احتمال ایجاد اثرات ثانویه غیرمطلوب و الگوهای توارثی پیچیده (انتقال ژن مورد نظر به داخل ارقام برتر را پیچیده‌تر می‌سازند) را به ویژه در شرایطی افزایش می‌دهند که ژن‌های انتقالی به طور متفاوتی بروز یابند یا خاموش گردند. از این رو، حداقل 30 لاین سلولی تراریخته مستقل مورد تجزیه و تحلیل مولکولی قرار می‌گیرند تا لاین تراریخته‌ای برای آزادسازی تجاری انتخاب شود که شرایط ذیل را داشته باشد: (1) یک تک نسخه از ژن مورد نظر به طور پایدار در ژنوم ادغام شده باشد و با نسبت‌های شبه مندلی به نتاج انتقال یابد (2) ژن مورد انتقال کامل و دست‌نخورده بوده و بنابراین فاقد هرگونه نوتریبی<sup>1</sup> باشد که با بروز آن تداخل نداشته باشد (3) هیچ گونه DNA کناری خارج از ناحیه T-DNA به آن منتقل نشده باشد (4) برای برطرف نمودن اثر مکانی، تعداد کافی از گیاهان غربال می‌شوند و (5) ژن مورد نظر به حد کافی بروز یابد تا فنوتیپ مورد نظر را ایجاد نماید (Fullner et al., 1996). تراریختی به کمک آگروباکتریوم علیرغم محدودیت‌هایی که دارد، در حال حاضر هنوز هم کاراترین روش برای تولید پنبه تراریخته است. کوشش‌هایی در جریان است

<sup>1</sup> Rearrangement

تا این روش را ساده‌تر و مؤثرتر نمایند. تا تعداد ژنوتیپ‌های بیشتر، به خصوص واریته‌های برتر را تراریخته نمایند. در بهترین موارد، بهره‌وری صنعتی برای غربال‌سازی لاین‌های پیشرفته‌ترم پلاسم سازگار با محل، جداسازی لاین‌های بازآشونده است، هر چند که امروزه فرصت‌های سرمایه‌گذاری برای اینگونه فعالیت‌های کاربردی تقریباً موجود نیست. برای ایجاد یک روش تراریختی مستقل از ژنوتیپ در پنبه پژوهش‌ها بیشتری لازم است تا به افزایش تقاضا برای دستیابی سریع به ارقامی بهبودیافته برای تولید تجاری پاسخ داده شود.

### منابع

- Bayley C, Trolinder N, Ray C, Morgan M, Quisenberry JE, Ow DW (1992). Engineering 2,4-D resistance into cotton. *Theoretical and Applied Genetics* 83: 645–649.
- Benedict CR, Martin GS, Liu J, Puckhaber L, Magill CW (2004). Terpenoid aldehyde formation and lysigenous gland storage sites in cotton: variant with mature glands but suppressed levels of terpenoids aldehydes. *Phytochemistry* 65: 1351–1359.
- Breitler J. C, Meynard D, Van Boxtel J, Royer M, Bonnot F, Cambillau L, Guiderdoni E (2004). A novel two T-DNA binary vector allows efficient generation of markerfree transgenic plants in three elite cultivars of rice (*Oryza sativa* L.). *Transgenic Research* 13: 271–287.
- Chapman KD, Austin-Brown S, Sparace SA, Kinney AJ, Ripp, KG, Pirtle, IL, Pirtle RM (2001). Transgenic cotton plants with increased seed oleic acid content. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 78: 941–947.
- Chaudhary B, Kumar S, Prasad KVSK, Oinam GS, Burma PK, Pental D (2003). Slow desiccation leads to high-frequency shoot recovery from transformed somatic embryos of cotton (*Gossypium hirsutum* L. cv. Coker 310 FR). *Plant Cell Reports* 21: 955–960.
- Cousins YL, Lyon BR, Llewellyn, DJ (1991). Transformation of an Australian cotton cultivar: Prospects for cotton improvement through genetic engineering. *Australian Journal of Plant Physiology* 18: 481–494.
- Dillen W, De Clercq J, Goossens A, Van Montagu M, Angenon G (1997) *Agrobacterium*-mediated transformation of *Phaseolus acutifolius* A. Gray. *Theor Appl Genet* 94: 151–158.
- Ellis MH, Millar AA, Llewellyn D, Peacock WJ, Dennis ES (2000). Transgenic cotton (*Gossypium hirsutum*) over-expressing alcohol dehydrogenase shows increased ethanol fermentation but no increase in tolerance to oxygen deficiency. *Australian Journal of Plant Physiology* 27: 1041–1050.
- Emani C, Garcia JM, Lopata-Finch E, Pozo MJ, Uribe P, Kim DJ, Sunilkumar G, Cook DR, Kenerley CM, Rathore KS (2003). Enhanced fungal resistance in transgenic cotton expressing an endochitinase gene from *Trichoderma virens*. *Plant Biotechnology Journal* 1: 321–336.

- Finer JJ, McMullen MD (1990) Transformation of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) via particle bombardment. *Plant Cell Reports* 8: 586–589.
- Firoozabady E, DeBoer DL (1993). Plant regeneration via somatic embryogenesis in many cultivars of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *In Vitro Cellular and Developmental Biology*. 29: 166–173.
- Firoozabady E, DeBoer DL, Merlo DJ, Halk EL, Amerson, LN, Rashka KE, Murray EE. (1987). Transformation of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) by *Agrobacterium tumefaciens* and regeneration of transgenic plants. *Plant Molecular Biology* 10: 105–116.
- Fullner KJ and Nester EW (1996). Temperature affects the T- DNA transfer machinery of *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bact* 178: 1798-1504.
- Godwin I, Todd G, Ford-Lloyd B, Newbury HJ (1991). The effects of acetosyringone and pH on *Agrobacterium* mediated transformation vary according to plant species. *Plant Cell Rep* 9: 671–675.
- Haq IU (2004). *Agrobacterium*-mediated transformation of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) via vacuum infiltration. *Plant Molecular Biology Reporter* 22: 279–288.
- He C, Yan J, Shen G, Fu L, Holaday AS, Auld D, Blumwald E, Zhang H. (2005). Expression of an Arabidopsis vacuolar sodium/proton antiporter gene in cotton improves photosynthetic performance under salt conditions and increases fiber yield in the field. *Plant and Cell Physiology* 46: 1848–1854.
- Imbrie-Milligan CW, Hodges TK (1986). Microcallus formation from maize protoplasts prepared from embryogenic callus. *Planta* 168: 395-401.
- Jiang B 2004. Optimization of *Agrobacterium* mediated cotton transformation using shoot apices and explants quantitative trait loci analysis of yield and yield component traits in upland cotton. Ph.D. thesis, Louisiana State University 106p.
- Jin S, Zhang X, Liang S, Nie Y, Guo X, Huang C (2005). Factors affecting transformation efficiency of embryogenic callus of Upland cotton (*Gossypium hirsutum*) with *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 81: 229–237.
- Jin S, Zhang X, Nie Y, Guo X, Liang S, Zhu H (2006). Identification of a novel elite genotype for *in vitro* culture and genetic transformation of cotton. *Biologia Plantarum* 50: 519–524.
- Karami O (2008). Factors Affecting *Agrobacterium*-mediated Transformation of Plants. *Transgenic Plant Journal*. 127-137.
- Koonce L, Dever J, Burns T, Trolinder NL (1996) Progress towards genotype- independent transformation. *Proc. Beltwide Cotton Prod. Res. Conf.* p. 1173.
- Kornyejev D, Logan BA, Allen R, Holaday AS (2003a) Effect of chloroplastic overproduction of ascorbate peroxidase on photosynthesis and photoprotection in cotton leaves subjected to low temperature photoinhibition *Plant Science* 165: 1033–1041.
- Kornyejev D, Logan BA, Payton P, Allen RD, Holaday AS (2001) Enhanced photochemical light utilization and decreased chilling-induced photoinhibition of photosystem II in cotton overexpressing genes encoding chloroplast-targeted antioxidant enzymes. *Physiologia Plantarum* 113: 323–331.
- Kornyejev D, Logan BA, Payton P, Allen RD, Holaday AS (2003b). Elevated chloroplastic glutathione reductase activities decrease chilling-induced photoinhibition by increasing rates of photochemistry, but not thermal energy dissipation, in transgenic cotton. *Functional Plant Biology* 30: 101–110.

- Leelavathi S, Sunnichan VG, Kumria R, Vijaykanth GP, Bhatnagar RK, Reddy V (2004). A simple and rapid *Agrobacterium*-mediated transformation protocol for cotton (*Gossypium hirsutum* L.): embryogenic calli as a source to generate large numbers of transgenic plants. *Plant Cell Reports* 22: 465–470.
- Levee V, Garin E, Klimaszewska K, Seguin A (1999). Stable genetic transformation of white pine (*Pinus strobes* L.) after cocultivation of embryogenic tissues with *Agrobacterium nanefaciens*. *Mol. Breed* 5: 429-440.
- Li X, Wang XD, Zhao X, Dutt Y (2004). Improvement of cotton fiber quality by transforming the *acsA* and *acsB* genes into *Gossypium hirsutum* L. by means of vacuum infiltration. *Plant Cell Reports* 22: 691–697.
- Li XB, Cai L, Cheng NH, Liu JW (2002b). Molecular characterization of the cotton *ghTUB1* gene that is preferentially expressed in fiber. *Plant Physiology* 130: 666–674.
- Li XB, Fan XP, Wang XL, Cai L, Yang WC (2005). The cotton *ACTIN1* gene is functionally expressed in fibers and participates in fiber elongation. *Plant Cell* 17: 859–875.
- Light GG, Mahan JR, Roxas VP, Allen RD (2005). Transgenic cotton (*Gossypium hirsutum* L.) seedlings expressing a tobacco glutathione S-transferase fail to provide improved stress tolerance. *Planta* 222: 346–354.
- Liu Q, Singh SP, Green AG (2002b). High-stearic and high-oleic cottonseed oils produced by hairpin RNA-mediated post-transcriptional gene silencing. *Plant Physiology* 129: 1732–1743.
- Logan BA, Monteiro G, Kornyejev D, Payton P, Allen RD, Holaday AS (2003). Transgenic overproduction of glutathione reductase does not protect cotton, *Gossypium hirsutum* (Malvaceae), from photoinhibition chloroplastic glutathione reductase activities decrease chilling-induced photoinhibition during growth under chilling conditions. *American Journal of Botany* 90: 1400–1403.
- Lyon BR, Cousins YL, Llewellyn DJ, Dennis ES 1993. Cotton plants transformed with a bacterial degradation gene are protected from accidental spray drift damage by the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Transgenic Research* 2: 162–169.
- Mahammadi M, Tohidfar M, Ghareyazie B, Salehi Jouzani G (2009) Transformation of Iranian Cotton Varieties Using Shoot Apex. *Transgenic Plant Research* (Accepted)
- Martin GS, Liu J, Benedict CR, Stipanovic RD, Magill, CW (2003). Reduced levels of cadinane sesquiterpenoids in cotton plants expressing antisense (+)-  $\delta$ -cadinene synthase. *Phytochemistry* 62: 31–38.
- McFadden H, de Feyter R, Murray F, Grover A, Llewellyn D, Dennis E, Peacock WJ (2000). Genetic engineering approaches to the improvement of cotton's tolerance to *Verticillium* wilt. In: Tjamos, E.C., Rowe, R.C., Heale, J.B. and Fravel, D.R. (eds.) *Advances in Verticillium Research and Disease Management*, APS, St. Paul, pp: 187–191.
- Mohsenpour M, Babaeian jelodar NA, Tohidfar M, and Habashi AA. (2008). Design and construction of four recombinant plasmid vectors containing chitinase, glucanase and Bt genes, suitable for plant transformation. *Journal of Agricultural Sciences and Natural Resources*, University of Gorgan 15 (4): 69-80.
- Mohsenpour M, Tohidfar M, Babaeian jelodar NA, Habashi AA (2007). Design and construction of a recombinant plasmid pBI121-*Glu* in order to *Agrobacterium* mediated transformation of cotton. *Journal of Agricultural Sciences and Natural Resources* University of Gorgan 14(4): 112-124.

- Murray F, Llewellyn D, McFadden H, Last D, Dennis ES, Peacock WJ (1999). Expression of the *Talaromyces flavus* glucose oxidase gene in cotton and tobacco reduces fungal infection, but is also phytotoxic. *Molecular Breeding* 5: 219–232.
- Nida DL, Kolacz KH, Buehler RE, Deaton WR, Schuler WR, Armstrong TA, Taylor ML, Ebert CC, Rogan GJ, Padgett SR, Fuchs RL (1996). Glyphosate-tolerant cotton: genetic characterization and protein expression. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44: 1960–1966.
- Norelli, J, Mills J, Aldwinckle H (1996). Leaf wounding increases efficiency of *agrobacterium*-mediated transformation of apple. *Hort Science*. 36:1026-1027.
- Payton P, Allen RD, Trolinder N, Holaday AS (1997). Over-expression of chloroplast-targeted Mn superoxide dismutase in cotton (*Gossypium hirsutum* L., cv. Coker 312) does not alter the reduction of photosynthesis after short exposures to low temperature and high light intensity. *Photosynthesis Research* 52: 233–244.
- Payton P, Webb R, Korniyev D, Allen R, Holaday AS (2001). Protecting cotton photosynthesis during moderate chilling at high light intensity by increasing chloroplastic antioxidant enzyme activity. *Journal of Experimental Botany* 52: 2345–2354.
- Perlak FJ, Deaton RW, Armstrong TA, Fuchs RL, Sims SR, Greenplate JT, Fischhoff, DA (1990). Insect resistant cotton plants. *Bio/Technology* 8: 939– 943.
- Raineri DM, Bottino P, Gordon MP, Nester EW 1990. *Agrobacterium*-mediated transformation of rice (*Oryza sativa* L.). *Bio/technology* 8: 33–38.
- Rajasekaran K, Cary JW, Jaynes JM, Cleveland TE (2005). Disease resistance conferred by the expression of a gene encoding a synthetic peptide in transgenic cotton (*Gossypium hirsutum* L.) plants. *Plant Biotechnology Journal* 3: 545–554.
- Rajasekaran K, Grula JW, Hudspeth RL, Pofelis S, Anderson DM (1996). Herbicide-resistant Acala and Coker cottons transformed with a native gene encoding mutant forms of acetohydroxyacid synthase. *Molecular Breeding* 2: 307–319.
- Rajasekaran K, Hudspeth RL, Cary JW, Anderson DM, Cleveland TE (2000). High-frequency stable transformation of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) by particle bombardment of embryogenic cell suspension cultures. *Plant Cell Reports* 19: 539–545.
- Rashid H, Yokoi S, Toriyama K, Hinata K (1996). Transgenic plant production mediated by *Agrobacterium* in *Indica* rice. *Plant Cell Rep* 15: 727–730.
- Rathore KS, Sunilkumar G, Campbell LM (2006). Cotton (*Gossypium hirsutum* L.). In: Wang, K. (ed.) *Methods in Molecular Biology. Volume 343: Agrobacterium Protocols*, 2nd edn. Humana, Totowa, Vol. 1. pp: 267–279.
- Ruan YL, Llewellyn DJ, Furbank, RT (2003). Suppression of sucrose synthase gene expression represses cotton fiber cell initiation, elongation, and seed development. *Plant Cell* 15: 952–964.
- Sanjaya, V, Satyavathi VV, Prasad V, Kirthi N, Maiya SP, Savithri HS, Sita LG (2005). Development of cotton transgenics with antisense AV2 gene for resistance against cotton leaf curl virus (CLCuD) via *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 81: 55–63.
- Satyavathi, VV, Prasad V, Gita Lakshmi B. Lakshmi Sita, G (2002). High efficiency transformation protocol for three Indian cotton varieties via *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Science* 162: 215–223.

- Shen WH, Escudero J, Schlappi M, Ramos C, Hoha B, Koukolikova-Nicola Z (1993). T-DNA transfer to maize cells: histochemical investigation of  $\beta$ -glucuronidase activity in maize tissues. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 90: 1488-1492.
- Shneyour Y, Zelcer A, Izhar S, Beckmann JS (1984). A simple feeder layer technique for the plating of cells and protoplasts at low density. Plant Sci. Lett. 33: 293-302.
- Song P, Heinen JL, Burns TH, Allen RD (2000). Expression of two tissue-specific promoters in Trolinder, NL, Goodin JR (1987). Somatic embryogenesis and plant regeneration in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). Plant Cell Reports 6: 231-234.
- Sunilkumar G, Vijayachandra K, Veluthambi K (1999). Preincubation of cut tobacco leaf explants promotes *Agrobacterium*-mediated transformation by increasing *vir* gene induction. Plant Sci 141: 51-58.
- Sunilkumar G, Rathore KS (2001). Transgenic cotton: factors influencing *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration. Molecular Breeding 8: 37-52.
- Sunilkumar G, Campbell LM, Hossen M, Connell JP, Hernandez E, Reddy AS, Smith CW, Rathore KS (2005). A comprehensive study of the use of a homologous promoter in antisense cotton lines exhibiting a high seed oleic acid phenotype. Plant Biotechnology Journal 3: 319-330.
- Sunilkumar G, Connell JP, Smith CW, Reddy AS, Rathore KS (2002a). Cotton  $\alpha$ -globulin promoter: isolation and functional characterization in transgenic cotton, *Arabidopsis*, and tobacco. Transgenic Research 11: 347-359.
- Sunilkumar G, Campbell LM, Puckhaber LS, Stipanovic RD, Rathore K (2006). Engineering cottonseed for use in human nutrition by tissue-specific reduction of toxic gossypol. Proceedings of the National Academy of Sciences 103: 18054-18059.
- Sunilkumar G, Mohr L, Lopata-Finch E, Emani C, Rathore KS (2002b). Developmental and tissue-specific expression of CaMV 35S promoter in cotton as revealed by GFP. Plant Molecular Biology 50: 463-474.
- Sunilkumar G, Rathore KS (2001). Transgenic cotton: factors influencing *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration. Molecular Breeding. 8: 37-52.
- Thomas JC, Adams DG, Keppenne VD, Wasmann CC, Brown JK, Kanost MR, Bohnert HJ (1995). Protease inhibitors of *Manduca sexta* expressed in transgenic cotton. Plant Cell Reports 14: 758-762.
- Tohidfar M., Mohammadi M, Ghareyazie B (2005). *Agrobacterium*-mediated transformation of cotton (*Gossypium hirsutum*) using a heterologous bean chitinase gene. Plant Cell Tissue and Organ Culture 83: 83-96.
- Tohidfar M, Rasoly H, Hagnazary A, Ghareyazie B (2009). Evaluation of stability of chitinase gene in Transgenic offspring of cotton (*Gossypium hirsutum*). Iranian Journal of Biotechnology 7(1): 45-50.
- Tohidfar M, Ghareyazie B, Mousavi M, Yazdani S (2008). *Agrobacterium*-mediated transformation of cotton (*Gossypium hirsutum*) using a synthetic *cryIAb* gene for enhanced resistance against *Heliothis armigera*. Iranian Journal of Biotechnology. 6 : 164-173.
- Townsend BJ, Llewellyn DJ (2002). Spatial and temporal regulation of a soybean (*Glycine max*) lectin promoter in transgenic cotton (*Gossypium hirsutum*). Functional Plant Biology 29: 835-843.

- Townsend BJ, Poole A, Blake CJ, Llewellyn DJ (2005). Antisense suppression of a (+)- $\delta$ -cadinene synthase gene in cotton prevents the induction of this defense response gene during bacterial blight infection but not its constitutive expression. *Plant Physiology* 138: 516–528.
- Trolinder NL, Goodin JR (1988a). Somatic embryogenesis in cotton (*Gossypium*). I. Effects of source of explant and hormone regime. *Plant Cell Tiss. Organ Cult* 12: 31–42.
- Umbeck P, Johnson G, Barton K, Swain W. (1987). Genetically transformed cotton (*Gossypium hirsutum* L.) plants. *Bio/Technology* 5: 263–266.
- Wang YQ, Chen DJ, Wang DM, Huang QS, Yao ZP, Liu, FJ, Wei XW, Li RJ, Zhang ZN, and Sun YR (2004b) Over-expression of *Gastrodia* anti-fungal protein enhances *Verticillium* wilt resistance in coloured cotton. *Plant Breeding* 123: 454–459.
- Wilkins, TA. Mishra R, Trolinder NL (2004). *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration of cotton. *Journal of Food Agriculture and Environment* 2: 179–187.
- Wu J, Luo X, Guo H, Xiao J, Tian Y (2006a). Transgenic cotton expressing *Amaranthus caudatus* agglutinin, confers enhanced resistance to aphids. *Plant Breeding* 125: 390–394.
- Wu J, Zhang X, Nie Y, Luo X (2005a). High-efficiency transformation of *Gossypium hirsutum* embryogenic calli mediated by *Agrobacterium tumefaciens* and regeneration of insect-resistant plants. *Plant Breeding* 124: 142–146.
- Yan J, He C, Wang J, Mao Z, Holaday SA, Allen RD, Zhang H (2004). Overexpression of the *Arabidopsis* 14-3-3 protein GF14 $\lambda$  in cotton leads to a “Stay- Green” phenotype and improves stress tolerance under moderate drought conditions. *Plant and Cell Physiology* 45: 1007–1014.
- Yazdanpanah F, Tohidfar M, Ashari M, Ghareyazi B, Mosavi M (2009). Enhanced insect resistance to bollworm (*Helicoverpa armigera*) in cotton containing a synthetic *cryIAb* gene. *Indian Journal of Biotechnology* 8: 72-77.
- Yuceer SU, Koc NK (2006). *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration of cotton plants. *Russian Journal of Plant Physiology* 53: 413–417.
- Zapata C, Park SH, El-Zik KM, Smith RH (1999). Transformation of a Texas cotton cultivar by using *Agrobacterium* and the shoot apex. *Theoretical and Applied Genetics* 98: 252–256.
- Zhang D, Hrmova M, Wan CH, Wu C, Balzen J, Cai W, Wang J, Densmore LD, Fincher GB, Zhang H, Haigler CH (2004) Members of a new group of chitinase-like genes are expressed preferentially in cotton cells with secondary walls. *Plant Molecular Biology* 54: 353–372.
- Zhao FY, Li YF, Xu P (2006). *Agrobacterium* mediated transformation of cotton (*Gossypium hirsutum* L. cv. *Zhongmian 35*) using glyphosate as a selectable marker. *Biotechnology Letters* 28: 1199–1207.
- Zhu SW, Gao P, Sun JS, Wang HH, Luo XM, Jiao MY, Wang ZY, Xia GX (2006). Genetic transformation of green-colored cotton. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 42: 439–444.

## Effective factors in Cotton (*Gossipium spp* ) Transformation Using *Agrobacterium*

Tohidfar M.<sup>\*1</sup>, Mohsenpour M.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII)

<sup>2</sup> University of Agricultural and Natural Resources, Sari- Iran

### Abstract

Cotton (*Gossipium spp* ) is ranked first among the fibers producing plants in the world and is also considered as an important source of oil. Although significant progress has been made in traditional cotton breeding programs, but there are still limitations including limited gene resources, lack of crosses, lack of efficient selection and high timeconsumption. Through recent advances in gene transformation to cotton, not only facilitated transformation of useful genes has become possible, but also promising results have been obtained in gene identification as well asfunction and regulation studies. *Agrobacterium* mediated transformation is one of the most used transformation methods in plants, including cotton. Several factors could affect transformation efficiency such as bacterial strains and concentrations, added phenolic regent in plant culture medium, plant species and genotypes, use of plant growth regulators, explants type, light and temperature during co-cultivation, antibiotics, wounding the target tissue and suitable method for selection of transgenic cells. Hypocotyls, cotyledons and cell suspensions are used as explants in cotton transformation using *Agrobacterium*. These explants have some limitations such as low regeneration rate and genotype dependence. Therefore, regeneration could be obtained in only a limited number of species using these explants. On the other hand, establishment of a regeneration system using shoot apex meristem in cotton has increased its transformation efficiency. This article is trying to review the factors shown to be effective in gene transformation into cotton.

**Key Word:** *Agrobacterium, Cotton, Transformation.*

---

\* Corresponding Author: M. Tohidfar

Tel: 09124627014

Email: gtohidfar@abrii.ac.ir