مجله بیوتکنولوژی کشاورزی

علمی-پژوهشی و ISC

مهندسی ژنتیک پنبه: از گذشته تا امروز

مسعود توحیدفر*[1]، سولماز خسروی [2]

[1]دانشیار، دانشکده علوم و زیست فنآوری، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران.

[2]مربی پژوهشی، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۲/۱٤، تاریخ پذیرش: ۱۳۹٦/۰٤/۲۲

خلاصه

پنبه یکی از گیاهان زراعی مهم و اقتصادی در دنیا و به عنوان چهارمین محصول مهم صنعتی در ایران به شمار می‌رود. در گذشته، تلاش‌های زیادی جهت اصلاح کیفیت پنبه توسط اصلاحگران سنتی صورت گرفته است که به علت محدودیت‌های موجود در روش‌های سنتی، استفاده از روش‌های مهندسی ژنتیک رواج یافت. به دنبال رواج روش‌های نوین، گیاهان تراریخته پنبه مقاوم به حشرات، بیماری‌ها، علفکش، تنش‌های غیر زیستی و همچنین الیاف با کیفیت بالاتر تولید شدند. امروزه، تعدادی از این ارقام تجاری‌سازی شده و از پذیرش عمومی بالایی در سراسر جهان برخوردار هستند. اکنون نیز با ظهور روش‌های توالی‌یابی نسل جدید و تسهیل شناسایی ژن‌های کاندید و مناسب جهت دست‌ورزی و وجود روش‌های ویرایش ژنوم (CRISPR/Cas9) با قابلیت ایجاد تغییرات هدفمند در ژن‌ها، افق تازه‌ای در حوزه اصلاح ژنتیکی پنبه ایجاد شده است. این مقاله ضمن مروری بر تاریخچه اصلاح پنبه و بررسی موانع موجود، به تحقیقات صورت گرفته در زمینه تولید ارقام مقاوم به تنش‌های زیستی و غیر زیستی و افزایش کیفیت پنبه با روش‌های مهندسی ژنتیک و ویرایش ژنومی می‌پردازد.

کلمات کلیدی: *پنبه تراریخته، مقاومت به بیماری، مقاومت به حشرات، ویرایش ژنوم، CRISPR/Cas9.*

*نویسنده مسئول: مسعود توحیدفر تلفن: ۰۲۱۲۹۹۰۳۲٤٤ Email: gtohidfar@yahoo.com

مقدمه

زراعت پنبه نیز مانند سایر گیاهان تحت تاثیر تنش‌های زیستی و غیرزیستی قرار می‌گیرد. البته خسارت‌های ناشی از تنش‌های زیستی در این گیاه (۷٦ تا ۸۵ درصد) در مقایسه با سایر گیاهان بسیار بیشتر است. خسارت‌های حاصل از حمله آفات و علف‌های هرز به تنهایی شامل ۳٦/۸ و ۳۵/۹ درصد می‌شود (Oerkem, 2006). بیش از ۱۵ گونه مختلف از حشرات به پنبه خسارت می‌زنند که از بین آنها کرم غوزه پنبه (*Heliothis armigera*) بیشترین خسارت را وارد می‌کند. بیماری‌های قارچی نیز باعث خسارت ۸ تا ۱۲ درصدی به زارعت پنبه می‌شوند که مهمترین آنها قارچ‌های ورتیسیلیوم و آلترناریا هستند (Tohidfar *et al*., 2005). پنبه همچنین به آلودگی‌های ویروسی مانند جیمنی‌ویروس‌ها حساس است. این ویروس‌ها باعث کاهش تعداد و اندازه غوزه و عملکرد دانه می‌شوند (Mahmood-ur-Rahman *et al*., 2012). تنش-های غیرزیستی نیز مانند خشکی یا شوری به روش‌های مختلف کشت و کار پنبه را تحت تاثیر قرار می‌دهند. به عنوان مثال تنش خشکی در دوران زایشی گیاه پنبه اثرات بسیار نامطلوبی را بر عملکرد و کیفیت الیاف دارد (Maqbool, 2009). شوری نیز با توقف رشد رویشی گیاه، باعث کاهش عملکرد آن می‌شود (Pic *et al*., 2002). با وجودی‌که اصلاحگران سنتی پنبه تلاش‌های زیادی را جهت بهبود افزایش تحمل به تنش‌های زیستی و غیرزیستی انجام داده‌اند (Dutt *et al*., 2004; Lu & Zeiger, 1994)، اما به علت فقدان ژن‌ها یا ژرم‌پلاسم‌های مطلوب و زمانبر بودن موفقیت‌های چندانی حاصل نشده است (Juturu *et al*., 2015). بنابراین، استفاده از روش‌های نوین مهندسی ژنتیک به عنوان ابزاری ارزشمند در جهت اصلاح پنبه و ایجاد مقاومت در مقابل تنش‌های زیستی و غیرزیستی توسعه یافته اند، بطوریکه میزان پذیرش جهانی پنبه تراریخته نسبت به نوع سنتی آن ۷۰ درصد گزارش شده است (James, 2014). پنبه تراریخته بعد از ذرت و سویای تراریخته به میزان گسترده‌ای کشت، خرید و فروش و پذیرفته شده است و بیش از ۲٤ میلیون هکتار در سراسر دنیا سطح زیر کشت دارد. پنبه تراریخته سهم قابل توجهی را در افزایش میزان درآمد ۱٦/۵ میلیون کشاورز خرده پا در کشورهای در حال توسعه داشته است (James, 2014).

روش‌های مهندسی ژنتیک امکان انتقال یک تا چند ژن را به گیاه فراهم کرده‌اند. روش انتقال ژن به کمک آگروباکتریوم از بین روش‌های موجود، بیشترین کاربرد را در تراریختی پنبه دارد. تولید اولین پنبه تراریخته در سال ۱۹۸۷ گزارش شد (Firozabady *et al*., 1987). این محققین ژن انتخابگر نئومایسین فسفوترانسفراز (*npt II*) را به ریزنمونه‌های برگرفته از هیپوکوتیل منتقل کرده و به کمک آنالیزهای مولکولی تلفیق آن در داخل ژنوم را تایید کردند. این مطالعات باعث آغاز

تحقیقات گسترده در زمینه مهندسی ژنتیک پنبه شد. کارایی انتقال ژن توسط آگروباکتریوم به پنبه تحت تاثیر عوامل مختلفی قرار دارد به عنوان مثال نژاد و غلظت باکتری، اضافه کردن مواد فنولی در محیط کشت، گونه گیاهی و ژنوتیپ، تنظیم‌کننده های رشدی، ریز نمونه، نور و دما، دمای همکشتی، آنتی‌بیوتیک و تیمار ایجاد زخم در بافت هدف (Tohidfar *et al*., 2010). از دیگر روش‌های انتقال ژن به پنبه، استفاده از تفنگ ژنی است که اولین بار توسط Finer and McMullen (۱۹۹۰) با ۰/۷ درصد کارایی گزارش شد. در این گزارش از کالوس‌های جنین‌زا برای انتقال ژن استفاده شد. در مقابل این تحقیق، گزارش دیگری با کارایی انتقال ٤ درصد نیز وجود دارد (Rajasekaran *et al*., 2000). به همین دلیل پلاستید، مریستم شاخه و محور جنینی نیز مورد استفاده قرار گرفته‌اند (Rech *et al*., 2008; Liu *et al*., 2011; Kumar *et al*., 2004). از آنجا که روش‌های یاد شده مستلزم بهینه‌سازی رشد و باززایی گیاه در شرایط درون شیشه هستند، روش انتقال *In planta* نیز مورد استفاده قرار گرفت. این روش شامل معرفی ژن خارجی/هترولوگ به بذر/گیاه به کمک روش‌های فیزیکی یا زیستی و به دنبال آن بازیابی گیاه بدون استفاده از روش های کشت بافت است که مشتمل بر سه روش انتقال ۱) بواسطه لوله گرده، ۲) بواسطه گرده و ۳) مریستم است (Juturu *et al*., 2015). میزان کارایی انتقال با روش *In planta* تحت تاثیر عوامل مختلفی قرار می‌گیرد که از ۰/۰۵ درصد تا ۵ درصد گزارش شده است (Chen *et al*., 2010).

با وجودی‌که پیشرفت‌های زیادی در زمینه انتقال ژن پنبه صورت گرفته است اما برخی از موانع هنوز بر سر راه انتقال ژن به پنبه وجود دارند که از مهمترین آنها می‌توان به وابسته بودن کشت بافت گیاه پنبه به ژنوتیب اشاره کرد. کشت بافت پنبه از دو طریق جنین‌زایی رویشی و اندام زایی انجام می‌شود که البته روش اول بیشتر استفاده می‌شود (Tohidfar *et al*., 2010). در جنین‌زایی رویشی از بافت‌هایی مانند ساقه، برگ، ریشه و گلبرگ‌ها به عنوان اندام‌های بالغ و کوتیلدون، هیپوکوتیل و مریستم ساقه به عنوان اندام‌های نابالغ استفاده شده است. بطور کلی ریزنمونه‌هایی که دارای محتوای اکسینی بیشتری هستند برای جنین‌زایی رویشی مناسب‌تر هستند (Jime´nez & Thomas, 2006). مهمترین عاملی که جنین‌زایی رویشی در پنبه را تحت تاثیر قرار می‌دهد، ژنوتیپ است. مطالعات انجام شده روی محتوای فنولیک کشت‌های سوسپانسونی به منظور ایجاد جنین‌های رویشی در دو کولتیوار کوکر ۳۱۲ و R405-2000 نشان داد که کولتیوار R405-2000 در مقابل کوکر یک کولتیوار غیرجنین‌زا است و القای جنین‌زایی در کوکر به شدت به داشتن محتوای بیشتر از کافئیک، فرولیک اسید و اسید سالسیلیک وابسته است، ضمن اینکه ژن‌هایی هم وجود دارند که در جنین‌زایی نقش دارند (Kouakou *et al*., 2007). وابستگی به ژنوتیپ، داشتن تنوع سوماکلونال

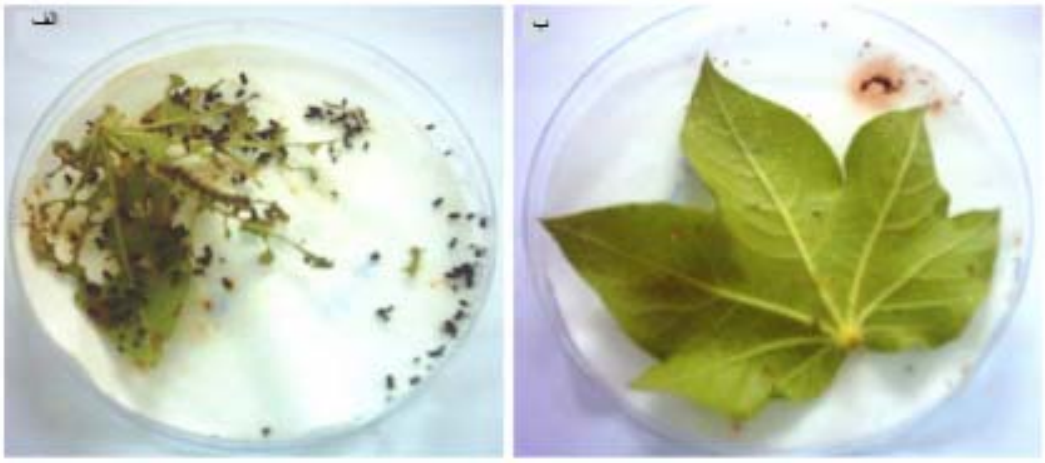
(Jin *et al*., 2008) و طولانی بودن زمان جنین زایی رویشی، موانع موجود در کاربرد این روش در برنامه‌های مهندسی ژنتیک پنبه هستند (Juturu *et al*., 2015). به همین دلیل تلاش‌هایی به منظور ایجاد یک روش باززایی مستقیم صورت گرفت که در آن از ریزنمونه‌هایی مانند نوک مریستم، گره کوتیلدون، هیپوکوتیل، محورهای جنینی، قطعاتی از اپیکوتیل و کوتیلدون استفاده می‌شود. این مقاله ضمن مرور پیشرفت‌ها و تلاش‌های صورت گرفته در زمینه اصلاح پنبه با کمک روش‌های مهندسی ژنتیک، به بحث در خصوص چشم انداز مورد انتظار در این حوزه می‌پردازد.

پنبه مقاوم به حشرات

تلاش‌های بسیاری جهت انتقال ژن مقاومت به حشرات از منابع مختلف به پنبه صورت گرفته است (Lycett & Grierson, 1990). انواع پروتئین‌های *Bt* برگرفته از باکتری *Bacillus thuringiensis* که برای راسته‌های لپیدوپترا (Cohen *et al*., 2000)، دیپترا (Andrews *et al*., 1987) و کلوئپترا (Krieg *et al*., 1983) کار گرفته می‌شود، به پنبه منتقل شده‌اند. در حال حاضر، ۲٤ میلیون هکتار سطح زیر کشت پنبه در سراسر دنیا به پنبه تراریخته اختصاص دارد که معادل ۷۸ درصد سطح کل زیر کشت پنبه است و انتظار می‌رود در سال‌های آینده میزان آن افزایش یابد (James, 2015).

موفقیت‌های چشمگیر زمانی ایجاد شد که تغییراتی در ژن‌های *Bt* جهت بیان بهتر در گیاه ایجاد شد (Perlak *et al*., 1991). انتقال ژن *cry1Ac* به پنبه باعث مقاومت بیشتر به حشرات راسته لپیدوپترا مثل کرم غوزه شد. آزمایشات مزرعه‌ای این گیاهان نشان داد که آنها به کرم صورتی غوزه (*Pectinophora zea*) نیز مقاومت بسیار خوبی دارند (Perlak *et al*., 1990). گزارش‌های متعددی نیز از انتقال ژن *cry1Ab* به پنبه با روش آگروباکتریوم وجود دارد (Tohidfar *et al*., 2008; Khan *et al*., 2013). همکشتی کالوس جنین‌زا با سویه آگروباکتریوم حاوی ژن *cry1Ia5* نیز گزارش شده است (Leelavathi *et al*., 2004). گیاهان پنبه مقاوم به *H. armigera* نیز با انتقال ژن‌های *cry1Ac* و *API-B* ایجاد شده‌اند که در واکنش‌های زیست‌سنجی مقاومت بالایی به کرم غوزه نشان داده‌اند (Wu *et al*., 2005). یک کولتیوار پاکستانی نیز با انتقال ژن های *GNA* و *cry1Ac* به آفات جونده و مکنده مقاوم شده است (Hussain *et al*., 2007). کارایی حشره‌کشی پروتئین *cry1F* بوسیله آزمایش‌های مزرعه‌ای پنبه‌های تراریخته حاوی ژن در کنترل آفت *Spodoptera frugiperda* نشان داده شده است (Siebert *et al*., 2008). به منظور ایجاد مقاومت طولانی مدت به آفات مورد هدف، ژن‌های *cry1C* و*cry2A* بطور همزمان به پنبه (رقم CIM-482) توسط روش آگروباکتریوم منتقل شدند (Rashid *et al*., 2008). لاین‌های تراریخته باعث مرگ و میر آفت (شکل ۱) از ۷۵ تا ۱۰۰ درصد در مقایسه با شاهد شدند. زمانیکه این گیاهان تحت آزمایش‌های مزرعه‌ای بیشتر قرار گرفتند، نتایج نشان داد که عملکرد بالایی در

نقاط مختلف دارند (Bakhsh *et al*., 2009). مقایسه پنبه‌های تراریخته دارای ژن مقاومت به حشره تحت کنترل پیشبرهای 35S CaMV و RbcS نشان داد که پنبه‌های دارای پیشبر بافت اختصاصی، ژن مقاومت را به طور دایم در برگها بیان می‌کنند (Bakhsh*et al*., 2010). با وجودی-که پیشبر دایمی 35S یک پیشبر قوی برای بیان ژنهای مورد نظر در گیاه تراریخته محسوب می-شود، اما بیان همیشگی ژن مورد نظر در گیاه می-تواند باعث ایجاد اختلالاتی در رشد و نمو و یا توان متابولیکی گیاه شود (Hood *et al*., 2003). به همین منظور، کاربرد عوامل تنظیمی که بیان ژن را به طور اختصاصی در بافت‌های مورد هدف یا مراحل رشدی خاص تضمین کنند، همواره مطلوب بوده است (Song *et al*., 2000). شناسایی پیشبر ژن *Gh-1* (۹٦۵ جفت باز بالادست محل شروع رونویسی) (John & Crow, 1992)، *E6* (Dang *et al*., 1995)، *FbL2A* (۲/۳ کیلوباز) (Rinehart *et al*., 1996) و شش ژن مخصوص مراحل مختلف رشدی الیاف (Chen & Brucke, 2015) از جمله تلاش‌هایی هستند که برای معرفی پیشبرهای مختص الیاف پنبه صورت گرفته است. جداسازی پیشبر مختص بذر FAD2-1 نشان داد که در این گونه پیشبرهای اختصاصی، حضور عناصر تنظیمی Cis مختص اندوسپرم یا بذر و یا نواحی 5′UTR بر کارایی پیشبر تاثیر دارند (Liu *et al*., 2015).



شکل ۱- کارایی ژنهای مقاومت به حشره در پنبه تراریخته. الف) لارو زنده *Helicoverpa* حال تغذیه از برگ پنبه غیر تراریخته. ب) مرگ لارو پس از تغذیه از پنبه تراریخته(Bakhsh *et al*., 2009).

Figure 1- The efficiency of insect resistance genes in transgenic cotton. A) Alive *Helicoverpa* feeding from non-transgenic cotton, B) Dead *Helicoverpa* after feeding from transgenic cotton.

راهکارهای مختلفی جهت مقابله با توسعه مقاومت در حشرات پیشنهاد شده است از جمله بیان غلظت‌های بالا از پروتئین‌های مختلف Bt (Tohidfar & Gryspeirt & Gre´goire, 2012; Jafari, 2007) و استفاده از پروتئین Bt متصل شده به لکتین جهت افزایش قابلیت اتصال پروتئین در قسمت میانی مجرای هاضمه حشره (Mehlo *et al*., 2005). محققان پیشنهاد می‌دهند که استفاده از تک پروتئین Bt می‌تواند باعث ایجاد مقاومت نسبی در حشرات مورد هدف شود. علاوه بر روش هرم‌بندی ژن‌ها و راهکار پناهگاه، انتقال ژن *Cry1Ac-RB* به کلروپلاست که برای بیان موضعی ژن‌ها بکار می‌رود، توانست مانع ایجاد مقاومت در حشرات شود (Kiani *et al*., 2013).

علاوه بر کرم غوزه پنبه، حشرات مکنده از خانواده همیپترا مانند زنجره ، مگس سفید و شته-ها نیز جزو آفات ثانویه پنبه محسوب شده و باعث ایجاد خسارت به آن می‌شوند (Amudha *et al*., 2011). این حشرات در مقایسه با خانواده لپیدوپترا سریع تکثیر شده و عادات غذایی متفاوتی دارند، بنابراین سخت‌تر بوسیله حشره-کش‌های سنتی کنترل می‌شوند. ژن‌های *Bt* علیه این دسته از حشرات موثر نیستند. گیاهان بطور طبیعی با سنتز پروتئین‌هایی مانند لکتین یا ممانعت‌کننده‌های پروتئازی با این آفات مقابله می‌کنند (Yarasi *et al*., 2008). مکانسیم عملکرد لکتین و ممانعت کننده‌های پروتئازی بخوبی مطالعه شده است (Vasconcelos & Oliveira, 2004). ژن‌های لکتین گیاهی با موفقیت به پنبه منتقل شده (Yarasi *et al*., 2008) و کارایی آنها به خوبی به اثبات رسیده است (Vajhalal *et al*., 2013).

علاوه بر روش‌های رایج ایجاد مقاومت در گیاهان ، فناوری RNAi نیز در پنبه به خدمت گرفته شده است تا خصوصا در برابر آفات حشره‌ای مقاومت ایجاد کند (Price and Gatehouse 2008). این تکنیک که اولین بار در *Caenorhabditis elegans* شناسایی شد، به خوبی برای خاموش سازی ژن‌ها استفاده شده است (Fire *et al*., 1998). ژن‌های حشرات مختلف بوسیله تغذیه از گیاهان حاوی dsRNA از حشرات همینوپترا (Lynch & Desplan, 2006)، کلوئپترا (Tomoyasu *et al*., 2008)، دیپترا (Dzitoyeva *et al*., 2001)) و لپیدوپترا (Terenius *et al*., 2011) خاموش شدند. تعداد زیادی از کولتیوارهای پنبه در اندامهای هوایی و ریشه گاسیپول تولید می‌کنند که در نهایت تبدیل به ماده سمی آرسنال می‌شود. بسیاری از حشرات قادر به هضم اینگونه متابولیت‌های سمی که گیاه برای دفع آفات در خود تولید می‌کند، هستند. ژن *P450* (*CYP6AE14*) نیز در *Helicoverpa armigera* بواسطه تولید گاسیپول در بدن حشره القا می‌شود و با رشد حشره رابطه مستقیم دارد که در زمان تغذیه حشره به آن کمک می‌کند تا سمیت گاسیپول را خنثی کند. فناوری siRNA

جهت خاموش‌سازی این ژن به منظور ایجاد مقاومت به *Helicoverpa armigera* در پنبه استفاده شده است (Mao *et al*., 2011). زمانیکه لاروهای این حشره از گیاهان تراریخته که *dsRNA* را علیه *CYP6AE14* تولید می‌کردند، تغذیه کردند؛ بیان ژن *CYP6AE14* در حشرات کاهش یافت. این روش در مراحل ابتدایی خود بوده و در نقاط مختلف دنیا تحقیقات در این زمینه با هدف استفاده تجاری از آن در حال انجام است.

پنبه مقاوم به علفکش

خسارت ناشی از حمله علف‌های هرز به مزارع پنبه می‌تواند از ٤٥ تا ٨٥ درصد کاهش عملکرد را موجب شود (Nalini *et al*., 2015). مدیریت علف‌های هرز با شروع تجاری‌سازی محصولات تراریخته مقاوم به علفکش مانند پنبه، ذرت، سویا و کلزا بسیار آسان شده است. بهبود مدیریت علف‌های هرز باعث افزایش عملکرد می‌شود (Green 2012). ژن *EPSPS* جداشده از سویه CP4 آگروباکتریوم که مسئول مقاومت در برابر علفکش است با موفقیت به پنبه و چند گیاه دیگر منتقل شده است. گلایفوسیت ماده موثره رانداپ است که از فعالیت EPSP سنتتاز جلوگیری می‌کند. این آنزیم در مسیر شیکیمات و ساخت اسیدآمینه‌های آروماتیک نقش دارد. سویه CP4 آگروباکتریوم آنزیم مقاومت به گلایفوسیت را کد می‌کند (Pollegioni *et al*., 2011). اولین پنبه مقاوم به علفکش با انتقال این ژن با نام MON 1445/1698 توسط شرکت مونسانتو در سال ۱۹۹۷ ایجاد شد که به گلایفوسیت مقاومت دارد. بعد از آن، انتقال ژن به پنبه با سرعت بیشتری انجام شد (جدول ۱).

یک رقم چینی پنبه (Zhongmian 35) با انتقال ژن کدکننده مقاومت به گلایفوسیت (aroA-M1) که به آن پپتید نشانه کلروپلاستی متصل شده بود، تحت پیشبر CamV 35S تراریخته شد و کارآیی آن در نسل های T0 و T1 بررسی شد که نسبت به علفکش مقاومت بهتری از خود نشان دادند (Zhao *et al*., 2006). پنبه تراریخته تجاری با نام Roundup Ready Flex دارای ژن *epsps* پس از ۸ سال تحقیقات مزرعه-ای با انتخاب رخداد MON 88913 توسط مونسانتو روانه بازار شد. اخیرا یک رقم محلی پنبه که دارای ژنهای *cry1AC* و *cry2A* بود با ژن *epsps* که ترجیح کدونی آن بهینه شده، تراریخته شد (Latif *et al*., 2015).

کارایی این ژن پس از اسپری گلایفوسیت بر لاین‌های تراریخته ٤١ درصد و کارایی ژنهای مقاومت به حشره ۱۰۰ درصد گزارش شد. میزان پذیرش گیاهان مقاوم به علفکش تا کنون رشد مثبتی داشته است (۱۰ درصد).

جدول ۱- کولتیوارهای پنبه تراریخته مقاوم به علفکش که تجاری‌سازی شده‌اند و در حال کشت هستند.

Table 1- Commercialized herbicide resistant cotton cultivars which are under cultivation.

پنبه مقاوم به علفکش Herbicide resistant cotton	ژن منتقل شده Introduced gene	نام رخداد Event	سال تجاری سازی Commercialization year
گلایفوسیت Glyphosate	*CP4 EPSPS*	MON1445/1698	۱۹۹۷ 1997
	دو ژن *CP4 EPSPS*	MON88913	۲۰۰۶ 2006
	ZM-2MEPSPS	GHB614	۲۰۰۹ 2009
گلیفوزینات Glyphosinate	*PAT*	A2704-12	۲۰۰۹ 2009

منتقدین این فناوری اظهار می‌دارند که استفاده از گیاهان مقاوم به علفکش تنها برای زراعت‌های در مقیاس انبوه مناسب است، درحالی‌که استفاده این گیاهان توسط کشاورزان خرده پا نیز به علت افزایش عملکرد محصول و تسهیل عملیات مدیریت علف‌های هرز باعث سودآوری بالایی شده است (Green, 2012). علاوه براین، بسیاری از تحقیقات نشان داده است که محصولات تراریخته مقاوم به علفکش در کنترل علف‌های هرز بسیار کارآمد بوده و ضمن ایمن بودن، برای محیط زیست تهدیدی به حساب نمی‌آیند (Entine, 2006; Duke 2011).

پنبه مقاوم به پژمردگی

پنبه به تعداد کمی از بیماری‌های قارچی حساس است که در بین آنها پژمردگی فوزاریومی و ورتیسیلیومی از همه مهمتر هستند. عامل بیماری پژمردگی فوزاریومی قارچ *Fusarium oxysporum* است درحالی‌که پژمردگی ورتیسیلیومی توسط قارچ *Verticillium dahlia* ایجاد می‌شود. بیشتر کولتیوارهای پنبه (آپلند) به *V. dahlia* حساس هستند و تلاش‌های انجام شده برای اصلاح ارقام موجود موفق نبوده است. قارچ ورتیسیلیوم برای مدت طولانی در خاک به صورت میکرواسکلروتیا باقی می‌ماند. علایم اندام هوایی به صورت کلروز یا نکروز سیستم آوندی است و زمانیکه بیماری پیشرفت می‌کند گیاه

دچار خزان می‌شود و غوزه‌های جوان نیز ممکن است ریزش پیدا کنند (Miao *et al*., 2010). این بیماری گاهی می‌تواند باعث از بین رفتن ۸۰ درصد از عملکرد الیاف پنبه شود (Wei *et al*., 2015). انتقال ژنهای مقاومت به ارقام پنبه از طریق روش‌های سنتی بسیار زمانبر بوده و امکان تولید ارقام مقاوم به ورتیسیلیوم حاصل از تلاقی-های درون گونه‌ای که قابلیت تجاری‌سازی داشته باشند، مشکل است (Borole, 2000). علاوه بر این، از نشانگر های مولکولی هم در راستای شناسایی ژن های مقاومت به بیماری قارچی استفاده شده است (Najafzadeh *et al*., 2016). محققین تلاش‌های زیادی را جهت انتقال ژن‌های مقاومت به ورتیسیلیوم به پنبه انجام داده‌اند (جدول ۲). گیاهان تراریخته سطوح متغیری از مقاومت کم تا مقاومت کامل را در برابر رشد ورتیسیلیوم نشان داده‌اند (شکل ۲) (Tohidfar *et al*., 2005; Tohidfar *et al*., 2008; Tohidfar *et al*., 2009; Rajasekaran *et al*., 2005). برخی نیز در شرایط مزرعه‌ای نسبت به این بیماری افزایش مقاومت داشتند (Miao *et al*., 2010). گزارشاتی نیز در مورد پنبه مقاوم به فوزاریوم و آلترناریا وجود دارد (Ganesan *et al*., 2009). انتقال ژن *NaD1* از تنباکو به پنبه، به عنوان ژنی که پتانسیل ضد قارچی علیه *Fusarium oxysporum* f. sp. vasinfectum (Fov) و *V. dahlia* دارد؛ باعث شد پنبه‌های تراریخته در مزرعه آلوده به این دو قارچ ۲ تا ۳ برابر درصد زنده‌مانی بالاتر و ۲ تا ٤ برابر عملکرد الیاف بیشتر نسبت به کنترل داشته باشند (Gaspar *et al*., 2014).

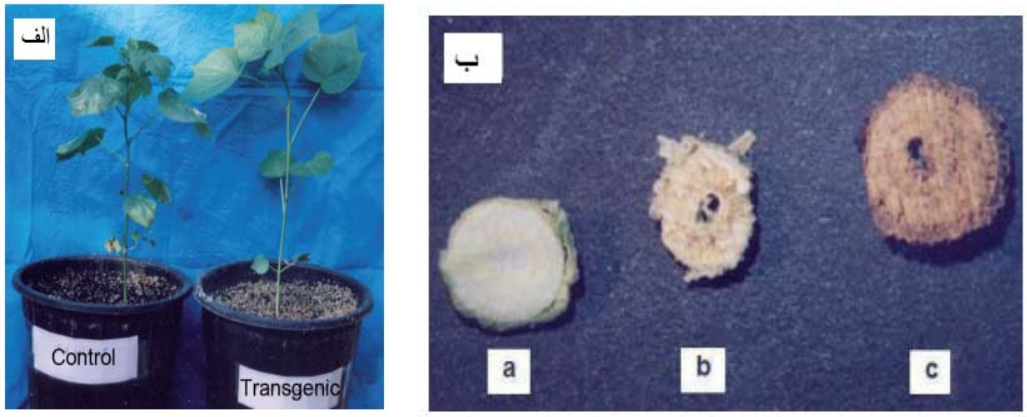
از آنجا که مبارزه با *V. dahlia* سخت است، جهت کنترل این بیماری به ارقامی از پنبه نیاز است که مقاومت گسترده‌ای نسبت به این بیماری نشان دهند. پروتئین‌های GAFPs[1] که از گیاه دارویی *Gastrodia elata* جدا شده‌اند مقاومت بالایی را به انواع *V. dahlia* نشان داده‌اند (Wang *et al*., 2016). انتقال دو ژن متفاوت از این خانواده ژنی به ارقام پنبه منجر به تولید گیاهان تراریخته‌ای شد که عملکرد تولید الیاف پنبه در آنها به ٤۰ تا ۵۰ درصد افزایش یافت (Wang *et al*., 2016).

پنبه مقاوم به ویروس

ویروس پیچیدگی برگ پنبه (CLCuD[2]) یکی از مهمترین مشکلات تولید پنبه محسوب می‌شود. زمانیکه بیماری اوایل فصل رشد شایع شود و یا ارقام حساس را آلوده کند، می‌تواند تا ۲۰ درصد تولید را کاهش دهد. این ویروس بوسیله مگس سفید منتقل می‌شود و از اعضای خانواده *Geminiviridae* است. جیمنی‌ویروس‌ها بیشتر در مناطق گرمسیر باعث خسارت می‌شوند. ژنوم جیمنی‌ویروس‌ها ممکن است یک یا دو قسمتی باشد که وجود DNA b از ژنوم تک قسمتی برای آلودگی ویروسی ضروری است (Mahmood-ur-Rahman *et al*., 2012). پنبه-

[1] *Gastrodia elata* antifungal proteins
[2] Cotton leaf curl disease

هایی که با این ویروس آلوده شده‌اند دارای DNA A و یک ماهواره تک‌رشته‌ای از مولکول DNA با نام DNA b (۱۳۵۰ نوکلئوتید) هستند که با هم علایم تیپیک بیماری CLCuD را سبب می‌شوند (Briddon & Markham, 2000).



شکل ۲- مقایسه مقاومت پنبه تراریخته دارای ژن کیتیناز لوبیا با شاهد نسبت به بیماری قارچی ورتیسیلیوم. الف) علایم بیماری در گیاه شاهد ایجاد شد، ب) برش افقی از ساقه گیاهان تراریخته و شاهد پنبه پس از تیمار با عامل بیماری a- ساقه پنبه غیرتراریخته تزریق شده با آب، b- ساقه پنبه تراریخته تزریق شده با کنیدی‌های *V. dahlia* که سالم مانده، ساقه پنبه غیرتراریخته تزریق شده با کنیدی‌های *V. dahlia* که علایم بیماری به شکل قهوه‌ای شدن آوندها در آن ظاهر شده است (Tohidfar *et al.*, 2012)

Figure 2- Transgenic cotton harboring endochitinase Gene from *Phaseolus vulgaris* resistant to *V. dahlia.* A) Symptoms of disease are observed in non-transgenic cotton. B) Horizontal cut from transgenic and control cotton stem: a- non-transgenic cotton stem injected with water, b- transgenic cotton stem injected with *V. dahlia* conidia which remained natural, c- non-transgenic cotton stem injected with *V. dahlia* conidia which showed symptom of brown vascular discoloration.

تولید پنبه تراریخته مقاوم به CLCuD می‌تواند راهکار مناسبی برای مدیریت این بیماری محسوب شود. پنبه تراریخته مقاوم به CLCuD از دو روش انجام شده است: انتقال ژن مقاومت به ویروس که از خود ویروس برگرفته باشد یا از منبع دیگر. در روش ایجاد مقاومت به بیمارگر، تمام یا قسمتی از ژن بیماریزا به گیاه منتقل می‌شود. بنابراین، چون این RNAها مکمل ژنوم ویروس هستند باعث اختلال در فعالیت آن و در نهایت خاموشی آن می‌شوند. در مورد بگوموویروس‌ها بیان ژن پروتئین پوششی (Neves-Borges *et al.*, 2001)، رپلیکاز (Yang *et al.*, 2004) و یا پروتئین حرکتی موفقیت‌آمیز بوده است.

جدول ۲- انتقال ژنهای مختلف به پنبه جهت تولید کولتیوارهای مقاوم به بیماری ورتیسیلیوم.

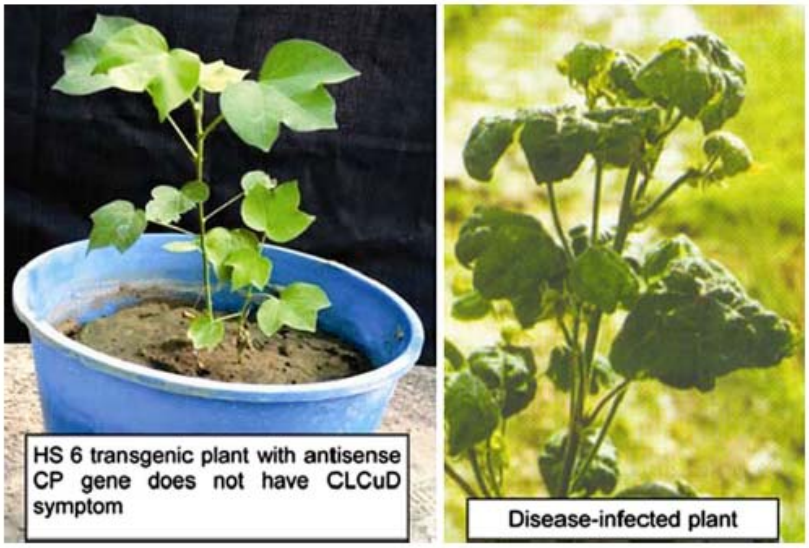
Table 2- Introduction of different genes to cotton against *Verticillium*.

منبع Reference	ریزنمونه مورد استفاده Explant	ژن منتقل شده Introduced gene	کولتیوار Cultivar
Parkhi *et al*.2010	هیپوکوتیل و کوتیلدون Hypocotyl and cotyledon	*NPR1*	Coker 312
Tian *et al*. 2010	هیپوکوتیل Hypocotyl	*Anti-apoptotic gene p35*	Z99668
Miao *et al*. 2010	هیپوکوتیل Hypocotyl	*HRinducedHpa1Xoo*	ZhongMian 35
Tohidfar *et al*. 2005	هیپوکوتیل Hypocotyl	*کیتیناز*	Coker 312
Rajasekaran *et al*. 2005	هیپوکوتیل Hypocotyl	*chitinase D4E1*	Coker 312
Wang *et al*. 2004	لوله گرده Pollen tube	*Gastrodia*	Xin-Cai, Lv-9902, Lv-9903
Gaspar *et al*. 2014	هیپوکوتیل Hypocotyl	*NaD1*	Coker 315
Wang *et al*. 2016	---	*GAFPs*	---

استفاده از ژن پروتئین پوششی، اولین و گسترده‌ترین ژنی است که در ایجاد مقاومت به ویروس استفاده می‌شود (Prins, 2003).

پنبه مقاوم به CLCuD با استفاده از پروتئین آنتی‌سنس پوششی (ACP[1]) ایجاد شده است (Amudha *et al*., 2011). در این روش یک ناقل دوگانه حامل ژن *ACP* و *npt II* برای تراریختی استفاده شد. گیاهان تراریخته به صورت مجزا در گلخانه کشت شدند و به کمک مگس سفید به ویروس CLCuD آلوده شدند و مقاومت آنها نسبت به این بیماری بررسی شد (شکل ۳). نتایج نشان داد این گیاهان با وجودیکه آلوده شده بودند، علایمی از بیماری را نشان ندادند.

[1] Antisense coat protein



الف A ب B

شکل ۳- مقایسه مقاومت الف) گیاهان مقاوم به ClCuD و ب) شاهد پس از آلوده‌سازی گیاهان با این ویروس توسط مگس سفید (Amudha *et al.*, 2011).

Figure 3- Comparison of ClCuD transgenic and control plants' resistance after being infected through white fly.

پنبه مقاوم به تنش‌های غیرزیستی

تنش‌های غیرزیستی مانند درجه حرارت-های بالا، کم آبی و شوری رشد و عملکرد گیاهان را تحت تاثیر قرار می‌دهند. افزایش بیان ژن‌های تکی مانند ژن‌های کدکننده آنتی‌اکسیدانت‌ها، نگهدارنده فشار اسمزی، LEAs، HSPs و ناقلین غشایی و همچنین ژن‌های چند عملکردی مانند عوامل رونویسی و پروتئین‌کینازها باعث ایجاد گیاهان مقاوم به تنش‌های غیرزیستی می‌شوند (Allen, 2010). بیان ژن *AtNHX1* کدکننده یک آنتی‌پورتر آوندی Na^+/H^+ در پنبه باعث شد تحمل گیاهان در شرایط گلخانه و مزرعه به شوری افزایش یابد همچنین باعث افزایش در میزان زیست‌توده و الیاف در آنها شد (He *et al.*, 2005). بیش‌بیان ژن *SNAC1* از برنج در کولتیوار YZ-1 پنبه باعث افزایش توسعه ریشه و کاهش میزان رونویسی شد که نتیجه آن تولید گیاهان مقاوم به خشکی و شوری، افزایش زیست‌توده و تعداد غوزه در شرایط شوری بود (Lie *et al.*, 2014). بیش‌بیان ژن *AVP1* از آرابیدوپسیس در پنبه نیز ضمن افزایش مقاومت به خشکی و شوری باعث افزایش عملکرد الیاف تحت شرایط خشکی شد (Zhang *et al.*, 2011). افزایش رشد ریشه و زیست‌توده برگ‌ها در پنبه به ترتیب به کمک بیش بیان ژن‌های *At RAV1/2* یا *At AB15* از آرابیدوپسیس و *Ta MnSOD* از گیاه

Tamarix albiflonum باعث شد گیاهان تراریخته حاصل به شرایط خشکی مقاومت بیشتری داشته باشند (Mittal *et al*., 2014; Zhang *et al*., 2014). گیاهان تراریخته دارای بیش‌بیان ژن *AtLOS5* از آرابیدوپسیس، ۱۳ درصد وزن خشک بیشتری نسبت به گیاهان کنترل در شرایط خشکی داشتند (Yue *et al*., 2012). بیان ژن *IPT* از آگروباکتریوم تحت کنترل پیشبر *PSARK* نیز باعث افزایش مقاومت به خشکی شد (Kuppu *et al*., 2013). بیان ژن AnnBj1 از گیاه خردل نیز باعث افزایش مقاومت به پراکسید هیدروژن، سدیم کلراید شده و همچنین تعداد غوزه و محتوای سلولزی الیاف پنبه تحت تنش شوری زیاد شد (Divya *et al*., 2010). باوجود رهاسازی ذرت متحمل به خشکی هنوز هیچ رخدادی از پنبه که مقاوم به تنش غیرزیستی باشد، تجاری‌سازی نشده است. انتظار می‌رود تحقیقات در زمینه مهندسی ژنتیک پنبه نیز بر تولید رخدادهای مقاوم به تنش‌های غیرزیستی متمرکز شود.

افزایش محتوای الیاف پنبه

ویژگی‌ها و کیفیت الیاف پنبه که شامل طول، استقامت و رسیدگی الیاف هستند در صنعت نساجی بسیار مهم هستند (Chee & Campbell, 2009). مهندسی ژنتیک ژن‌های مرتبط با الیاف در پنبه گزارش شده است که در آن طول، استحکام، کیفیت، رنگ و ویژگی‌های مرتبط با الیاف بهبود یافته‌اند (Richter, 1998; May & Wofford, 2000; Zhang *et al*., 2004; Li *et al*., 2004; Shangguan *et al*., 2007; Qin *et al*., 2007).

انتقال ژن‌های مسئول سنتز سلولز (*acsA* و *acsB*) از باکتری گرم منفی *Acetobacter xylinum* به پنبه باعث بهبود کیفیت الیاف شد (Li *et al*., 2004). پروتئین فیبریون از کرم ابریشم نیز برای بهبود کیفیت الیاف استفاده شده است. ساختار کریستالین ویژه‌ای که این پروتئین دارد باعث اعطای خاصیت کشسانی و نرمی به بافت پنبه می‌شود (Chen *et al*., 2003). ژن این پروتئین به پنبه منتقل شد که باعث بهبود کیفیت خصوصیات الیاف شد (Li *et al*., 2009). انتقال یک ژن مرتبط با سنتز الیاف از منبع *Calotropis procera* به یک کولتیوار محلی از پنبه، باعث افزایش ظرافت و استحکام الیاف در مقایسه با رقم کنترل شد (Bajwa *et al*., 2013).

بهبود کیفیت روغن پنبه

پنبه به طور طبیعی دارای تعدادی از سزکویی‌ترپن‌ها شامل گاسیپول در قسمت‌های اندام هوایی و سلول‌های اپیدرمی ریشه است (Bell, 1986). وجود این ماده در اندام‌های هوایی به عنوان یک سد دفاعی در برابر حشرات است. اما حضور گاسیپول در بذور پنبه باعث می‌شود تا از ارزش این بذر به عنوان یک محصول جانبی برای تغذیه دام کاسته شود. تلاش‌های زیادی صورت گرفته است تا مسیرهای سنتز گاسیپول و سایر ترپن‌ها شناخته شوند. اولین مرحله در سنتز سزکویی‌ترپنها ساخت گاما-کادینین (δ-

cadinene) است که حاصل فعالیت کاتالیکی بتاکادینین سیکلاز بر فارنسیل دی سولفید است. از آنجا که (+)-گاما-کادینین مهمترین ماده حدواسط در سنتز گاسیپول است، محققین تلاش کردند با کمک روش RNAi میزان این ماده را در بذر پنبه کاهش دهند، بدون اینکه میزان آن در سایر اندام‌ها کاهش یابد. در ابتدا کاهش سنتز گاسیپول با کمک روش RNAi زیاد موفق نبود (Townsend *et al*., 2005)، اما بعدها با شناسایی یک پیشبر اختصاصی دانه (آلفا-گلوبولین) تعدادی لاین‌های تراریخته پنبه ایجاد شدند که سطح گاسیپول به طور معنی‌داری در آنها کاهش یافت (Sunilkumar *et al*., 2006). از آنجا که پیشبر اختصاصی دانه در این تحقیق استفاده شده بود، سطح گاسیپول در سایر اندام‌های هوایی یا ریشه که در دفاع علیه بیماری‌ها و حشرات نقش دارد، کاهش نیافت. بر اساس این نتایج، بعدها پنبه تراریخته‌ای ایجاد شد که سطح گاسیپول بذور نه تنها نسبت به کنترل بسیار کاهش یافته بود بلکه سایر محتویات بذری هیچ تغییری نداشتند (Palle *et al*., 2013) که این نتایج توانایی روش RNAi را برای تولیدات تجاری نشان می‌دهد.

استفاده از روش‌های نوین اصلاح ژنوم

ویرایش ژنوم[1] با اندونوکلئازهای اختصاصی، امکان انجام ژنتیک معکوس، مهندسی ژنوم و انتقال ژن به صورت هدفمند را با کارایی بالا فراهم ساخته است. ویرایش ژنوم شامل ایجاد یک شکست در DNA دورشته‌ای بواسطه یک نوکلئاز مهندسی شده است که در نتیجه آن واکنش‌های سلولی ترمیم DNA فعال می‌شوند.تغییراتی که در ژنوم ایجاد می‌شوند بسته به مسیر ترمیمی که در سلول فعال شده است و حضور یا عدم حضور یک الگو برای ترمیم DNA متفاوت خواهند بود (Bortesi & Fischer, 2015). سه نوع آنزیمی که برای ایجاد شکست در DNA دورشته‌ای بکار می‌روند عبارتند از: انگشت روی (ZFNs[2])، TALENs[3] و مگانوکلئازها (Epinat *et al*., 2003). انگشت روی شامل یک ناحیه متصل‌شونده به DNA و ناحیه کاتالیتیکی FokI است. ناحیه متصل‌شونده به DNA دارای سه تا پنج انگشت روی است که هریک سه نوکلئوتید را شناسایی می‌کنند.

شامل یک ناحیه متصل‌شونده به DNA است که از دست‌ورزی TALE بدست آمده و نیز دارای ناحیه کاتالیتیکی FokI است (Cermak *et al*., 2011). پروتئین‌های TAL[4] در واقع فاکتورهای بیماریزا در باکتری زانتاموناس هستند که طی سیستم ترشحی نوع III وارد گیاه میزبان شده و رونویسی از ژنهای گیاهی را به نفع باکتری تغییر می‌دهند. هر TAL دارای یک ناحیه فعال و در پایانه C دارای سیگنال مکان‌یابی هسته (NLS[5]) است. ناحیه فعال در قسمت میانی خود دارای تکرارهایی حفاظت شده از ۳۴ اسیدآمینه است که البته اسیدآمینه‌های ۱۲ و ۱۳ در آن متغیر

[1] Genome editing

[2] Zinc finger proteins
[3] Transcription activator-like effector nuclease
[4] Transcription activation like
[5] nuclear localization signal

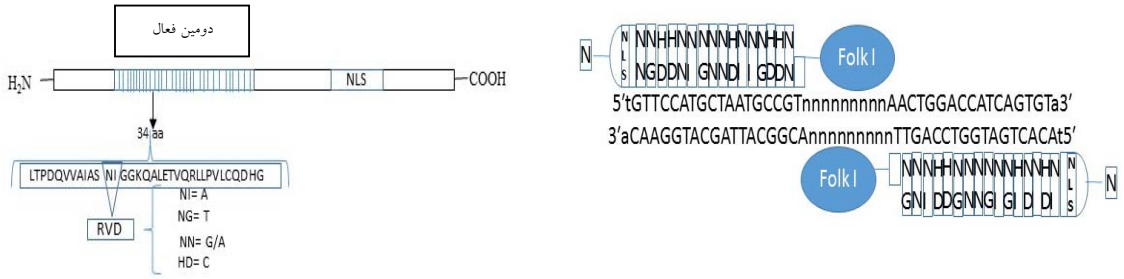
بوده و به ناحیه RVD[1] معروف است. ناحیه RVD مسوول تشخیص و اتصال به DNA هستند. هر تکرار TALE به یک نوکلئوتید متصل می‌شود و هر واحد حدود ۱۷ بار تکرار می‌شود. از آنجا که آنزیم FokI تنها زمانیکه به صورت دایمر باشد DNA را برش می‌دهد این نکته در کاربرد TALENs و ZFNs لحاظ می‌شود (شکل ٤). سومین دسته از آنزیم‌ها که در ایجاد شکست در DNA دورشته‌ای به کار می‌روند، مگاآنزیم‌ها هستند. از آنجا که ناحیه متصل‌شونده به DNA متصل به ناحیه کاتالیتیکی بوده و از آن جدا نمی-شود، مهندسی این دسته از آنزیم‌ها در مقایسه با TALENs و ZFNs مشکل‌تر است (Taylor *et al*., 2012). مگانوکلئازها تکرارهای بلند ۲۰ تا ۳۰ نوکلئوتیدی را شناسایی می‌کنند. اخیرا از نوکلئازهای مهندسی‌شده که بوسیله RNA هدایت می‌شوند، استفاده می‌شود که رایجترین آنها سیستم CRISPR/Cas9 برگرفته از *Streptococcus pyogenes* است. این سیستم بخشی از سیستم ایمنی باکتری و آرکی‌هاست که آنها را با برشی که در قطعات نوکلئیک اسید ایجاد می‌کند، در برابر ویروس‌ها حفاظت می‌کند. این سیستم با تلفیق قطعاتی از DNA مهاجم (ویروس) به درون ژنوم میزبان (باکتری/ آرکی) در مکان ژنی CRISPR ایجاد می‌شود. زمانیکه باکتری با ویروس مهاجم روبرو می‌شود؛ قطعات CRISPR رونویسی و پس از ویرایش به قطعات کوچکتری که CRISPR RNA (crRNAs) نامیده می‌شوند، تبدیل می‌شوند که طول آنها حدودا ٤٠ نوکلئوتید است. این قطعات در نتیجه انجام نسخه‌برداری از مکان ژنی CRISPR و ایجاد یک توالی RNA تک رشته‌ای به هم پیوسته از توالی‌های تکراری (حاوی نواحی پالیندرومیک) و توالی‌های spacer غیرتکراری ایجاد می‌شود. به طوری که نواحی پالیندرومیک ساختار ساقه-حلقه یا pre-crRNA یا CRISPR RNA اولیه را تشکیل می‌دهند. در نهایت پردازش crRNA اولیه (CRISPR RNA processing) توسط نوکلئازی پروتئین‌های Cas انجام گرفته و crRNAهای بالغ را ایجاد میکند. این قطعات در ترکیب با transactivating CRISPR RNA (tracrRNA) باعث فعالسازی و هدایت نوکلئاز Cas9 می‌شوند. در نهایت، این مجموعه باعث شکست DNA می‌شود. لازمه شکسته شدن DNA توسط CRISPR حضور موتیف PAM[2] در پایین دست DNA هدف[3] در ژنوم میزبان است که معمولا یک توالی 5'-NGG-3' یا NAG است (Gasiunas *et al*., 2012). وجود یک هسته نوکلئوتیدی ۱۲ جفت بازی در بالادست PAM باعث اتصال اختصاصی DNA هدف و RNA راهبر[4] می‌شود (شکل ٥). می‌توان Cas9 را طوری طراحی کرد که DNA را تنها به کمک یک RNA راهبر بشکند. RNA راهبر از ترکیب انتهای ′3 crRNA و انتهای ′5 tracrRNA بدست می‌آید. پس از ایجاد شکست، مکانیسم‌های ترمیم سلولی

1 repeat variable diresidue

2 protospacer-adjacent motif
3 targeted DNA
4 guide RNA (gRNA)

فعال می‌شوند که معمولا از نوع نوترکیبی غیرهمولوگ (NHR[1]) هستند. NHR معمولا دقیق نبوده و با حذف و اضافه کردن تصادفی نوکلئوتیدها همراه است و در نتیجه باعث غیرفعال شدن ژن شکسته‌شده می‌شود. چنانچه هنگام تعمیر؛ الگوی همولوگ با DNA شکسته شده وجود داشته باشد، مکانیسم تعمیر بر اساس نوترکیبی همولوگ (HR) خواهد بود که بسیار دقیق است. تلفیق دو ژن مقاومت به علفکش (*epsps*،[2] *hppd*) کنار مکان ژنی مقاومت به حشره (*cry2Ae*) در پنبه به کمک روش CRISPR انجام شده است (D'Halluin *et al*., 2013). به این منظور، ژنوم پنبه به طول ۵/۲ کیلوباز بالادست این مکان ژنی مورد بررسی قرار گرفت که بر اساس آن چهار سایت هدف احتمالی برای تولید آنزیم‌های مگانوکلئاز انتخاب شدند. با وجودیکه هر چهار آنزیم در شرایط *in vitro* ژنوم را در جایگاه‌های مورد نظر برش دادند، اما تنها یکی از آنها توانست عمل برش را در شرایط *in planta* انجام دهد. تلفیق این دو ژن بطور هدفمند به جایگاه مورد نظر به کمک مکانیسم HR انجام شد و وراثت‌پذیری آنها به تایید رسید. تلفیق ژنهای مختلف در یک جایگاه کروموزومی داخل ژنوم پنبه که از جمله گیاهانی است که به سختی تراریخته می شود، کاری سخت و زمانبر است. با این وجود، استفاده از روش‌هایی مانند ناقل‌های چند ژنی یا انتقال چند ناقل به طور همزمان که هر یک دارای یک ژن هدف هستند، به منظور تولید پنبه تراریخته چند صفتی[3] رواج یافته است. در روش استفاده از ناقل‌های حاوی دو ژن، آنالیز نتاج به منظور یافتن گیاهانی که دارای یک کپی از ژنهای انتقال یافته بوده و به خوبی هم بیان شوند، کاری بسیار زمانبر است. زمانیکه ژنها پشت سر هم منتقل می‌شوند به علت تداخل‌هایی که حین رونویسی با یکدیگر ممکن است پیدا کنند؛ بیان آنها تحت تاثیر یکدیگر قرار می‌گیرد (Eszterhas *et al*., 2002). با کاربرد ناقل‌هایی که دارای چند کاست ژنی هستند نیز احتمال انتخاب یک رخداد که دارای تمامی ژنها باشد، کاهش پیدا می‌کند، چرا که با افزایش تعداد ترانسژن‌ها، بیان هر ژن و کارایی هر صفت کمتر قابل پیش‌بینی می‌شود (Dietz-Pfeilstetter, 2010). درصورتیکه مزیت استفاده از روش CRISPR نسبت به روش‌های رایج این است که امکان معرفی همزمان ژنهای مختلف را به جایگاه‌های کروموزومی مشخص دارد به گونه‌ای که هر یک از این ژنها بر روی بیان یکدیگر تاثیری نداشته باشند (D'Halluin *et al*., 2013).

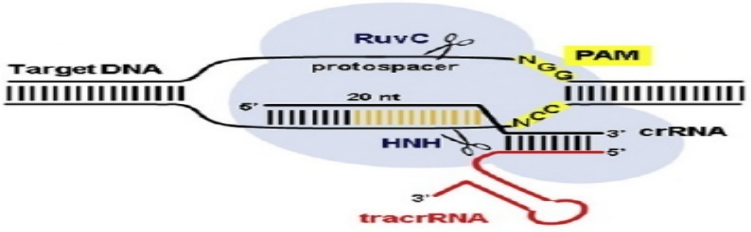
[1] Non homologous recombination
[2] 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase
[3] stacked traits



الف A ب B

شکل ٤- ساختار TALEN. الف) ساختار TALE. هر TAL دارای یک دومین فعال و در پایانه C دارای سیگنال مکان یابی هسته است. دومین فعال در قسمت میانی خود دارای تکرارهایی حفاظت شده از ۳٤ اسیدآمینه است که البته اسیدآمینه‌های ۱۲ و ۱۳ در آن متغیر بوده و به ناحیه RVD معروف است. ناحیه RVD مسوول تشخیص و اتصال به اسیدهای نوکلئیک در DNA هستند. هر تکرار TALE به یک نوکلئوتید متصل می‌شود و هر واحد ۱۷ بار تکرار می‌شود. ب) نحوه اتصال TALEN به توالی DNA. آنزیم FolkI تنها زمانیکه به صورت دایمر باشد DNA را برش می‌دهد. درنتیجه هنگام کاربرد TALENs از دو واحد TALEN استفاده می‌شود که هریک به یکی از رشته‌های DNA متصل می-شوند.

Figure 4- TALEN structure. A) Each TALE have an active domain and NLS in its C-terminal. The active domain contains tandem repeats of 34 conserved amino acids in its center. However, amino acids of 12 and 13 are variant and called RVD. The RVD is responsible for detecting and attaching to nucleic acids in DNA. Each TALE recognizes one nucleotide. B) TALEN binds to DNA. FolkI enzyme can cleave DNA just in dimer form. Subsequently, two TALENS are used that each of them binds to one DNA strand.



شکل ٥- ساختار CRISPR. پروتئین Cas9 (دایره آبی) به همراه crRNA که دارای یک توالی ۲۰ نوکلئوتیدی است که ویژگی آن را تعیین می‌کند و tracrRNA که باعث پایداری کل این ساختار و فعالسازی Cas9 برای ایجاد برش می‌شود؛ با شناسایی موتیف PAM (NGG یا NAC)، توالی ژنوم بالادست آنرا برش می‌دهد.

Figure 5- CRISPR structure. Cas9 protein (blue circle) is guided by crRNA which is a 20bp-long sequence determining target specificity, and tracrRNA which stabilizes the structure and activates Cas9 to cleave the target DNA upstream of PAM motif (NAC or NGG).

تاکنون تلاش‌های زیادی در قالب روش‌های اصلاح سنتی تا مولکولی صورت گرفته است تا با بیماری ویروسی پنبه CLCuD مبارزه شود، با این وجود مقاومت یا تحمل به این بیماری در طول زمان بوسیله ویروس شکسته شده است. از طرفی، تمام روش‌های بکار رفته جهت مبارزه با بگوموویروسها وابسته به خود ژنوم CLCuD بوده است که در آنها DNA های ماهواره‌ای مورد هدف قرار نمی‌گیرند. در واقع بیماری CLCuD بوسیله مجموعه‌ای از بگوموویروس‌ها و مولکول های ماهواره‌ای خاصی (آلفا و بتاماهواره‌ها) ایجاد می‌شود (Sattar *et al*., 2013). از بین این دو ماهواره، بتاماهواره تک پروتئین βC1 را کد می-کند که دارای نقش بازدارنگی بر سیستم دفاعی میزبان است (Saeed *et al*., 2005). به تازگی سیستم CRISPR/Cas9 برای کنترل تعدادی از بیماری‌های ویروسی مانند BeYDV (Baltes *et al*., 2015)، BSCTV (Ji *et al*., 2015) و TYLCV (Ali *et al*., 2015) بکار رفته است. به همین جهت، از روش CRISPR به منظور افزایش کارآیی مقابله با بیماری CLCuD استفاده شد که در آن چندین gRNA طراحی شدند تا بطور همزمان امکان هدفگیری نه تنها تمام بگوموویروس‌ها بلکه DNAهای ماهواره‌ای مرتبط به هم نیز میسر شود (Iqbal *et al*., 2016). تا کنون سیستم CRISPR برای کنترل این بیماری بکار رفته است اما روش معرفی شده با طراحی چندین gRNA و معرفی آنها به گیاه امکان ایجاد مقاومت به بگوموویروس‌های مختلف را بطور همزمان فراهم می‌کند.

علاوه بر موارد اشاره شد، مهندسی کلروپلاست یا انتقال ژن به کلروپلاست هم در پنبه در راستای مقاومت به آفت مورد بهره برداری قرار گرفته است. بطورکلی برای تولید پروتئین‌های نوترکیب در گیاه از روش هسته‌ای و ناقلین ویروسی استفاده می‌شود. استفاده از ناقلین ویروسی بیشتر به‌منظور بیان موقت پروتئین‌های نوترکیب استفاده می‌شود. از طرفی بیان ژن‌های بیگانه در هسته نیز پایین است. اخیراً روش کلروپلاست به‌منظور بیان بیشتر و بالاتر، توسعه یافته است. کلروپلاست نسبت به هسته چندین مزیت منحصر به فرد دارد که شامل: بیان بالای ژن خارجی؛ بیان پلی‌سیسترونی، جلوگیری از فرار ژن به دلیل وجود وراثت مادری (دانه گرده فاقد سیتوپلاسم است)، فقدان خاموشی ژن و اثرات مکانی است. بیان بالای سیستم کلروپلاست را می‌توان به تعداد ژنوم‌های کلروپلاست نسبت داد. به‌طوری که کلروپلاست بالغ دارای تعداد نسخه‌های زیادی (بیشتر از ۱۰۰ عدد) از ژنوم است. در یک سلول مزوفیل که دارای تقریبا ۱۰۰ کلروپلاست است، حدود ۱۰ هزار کپی کروموزوم پلاستیدی وجود دارد. در نتیجه مقدار پروتئین بیان شده در اثر وارد کردن یک ژن خارجی در ژنوم کلروپلاستی می‌تواند بسیار بالا باشد. اخیرا دانشمندان با استفاده از مهندسی کلروپلاست توانستند پنبه‌های تولید کنند که مقاومت بالایی به کرم غوزه داشته

باشند (Amarjeet K S *et al* 2016). این فناوری در حال حاضر در اول راه است و تاکنون در پنبه تجاری نشده است.

بحث و نتیجه‌گیری

محصولات تراریخته ظرفیت قابل توجهی در برطرف‌سازی فقر و تامین غذا در دنیا دارند. بررسی اثرات استفاده از پنبه مقاوم به آفت نشان داده است که فواید اقتصادی زیادی را برای کشاورزان و مصرف‌کنندگان به همراه داشته است. همچنین اثرات سودمندی را بر سلامت انسان و محیط زیست دارد (Qaim, 2009). پنبه تراریخته در چین فواید اقتصادی به ارزش بیش از ۱۵ میلیون دلار را بین سال‌های ۱۹۹۶ و ۲۰۱۲ ایجاد کرده است. درآمد کشاورزان در هند نیز بین سال‌های ۲۰۰۲ تا ۲۰۱۰ با کشت پنبه تراریخته ۷/۱ میلیون دلار افزایش داشته است (Kouser and Qaim 2012).

با توجه به نقش اقتصادی پنبه در جهان و همچنین دارا بودن رتبه سوم بین گیاهان صنعتی کشور (۱۶/۶ درصد از کل سطح زیر کشت گیاهان زراعی)، توسعه برنامه‌های اصلاحی برای بهره‌برداری بهینه و اقتصادی این محصول از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. فرآیند تولید محصول در این گیاه با چالش‌های متفاوتی مانند حمله آفات، بیماری‌ها، علف‌های هرز و تنش‌های زیست‌محیطی روبرو است. البته، با تلاش‌های بیشمار اصلاح‌گران سنتی پشرفت‌های زیادی در زمینه بهبود عملکرد پنبه ایجاد شده است. با این وجود، تحقیقات در رابطه با اصلاح پنبه به علت عدم وجود منابع ژنتیکی کافی به سمت استفاده از روش‌های جدید مهندسی ژنتیک سوق داده شده است. اگرچه، تولید پنبه تراریخته از طریق مهندسی ژنتیک مانند استفاده از آگروباکتریوم یا روش‌های انتقال ژن مستقیم نیز دارای مشکلاتی مانند تاثیر ژنوتیپ و فرآیند طولانی مدت باززایی است؛ با این وجود، تولید رخدادهای مقاوم به علفکش و آفت در پنبه به خوبی تاثیر مثبت خود در افزایش تولید را نشان داده‌اند. با این حال، استفاده از ژنهای جدید برای تولید پنبه مقاوم به آفت، ایجاد پنبه تراریخته با بیان ژن مختص یک بافت و انتقال ژن به ژنوم پلاستید در این حوزه ضروری به نظر می‌رسد. علاوه بر این، تولید پنبه تراریخته مقاوم به تنش‌های غیرزیستی و الیاف با کیفیت از پیشرفت‌های بزرگ در این زمینه به شمار می‌روند. در این رابطه، افزایش سطح زیر کشت پنبه‌های تراریخته مقاوم به تنش زیستی از مقیاس آزمایشگاهی به طرح پایلوت به منظور ارزیابی ظرفیت آنها در مقابله با تنش‌های زیستی بسیار مهم است. این محصولات می‌توانند تاثیر بسزایی بر کشاورزی پایدار داشته باشند چراکه خسارت هدر رفت محصول ناشی از تنش‌های زیستی بسیار شایع است.

اگر چه از زمان ظهور این تکنولوژی تا به حال چالش ها و بحث های جنجال برانگیزی در خصوص جنبه‌های اخلاقی و ایمنی بر علیه آن مطرح شده است ولی هر روز سطح زیر کشت محصولات ناشی این فنآوری در حال افزایش

است. بطوریکه سطح زیر کشت محصولات تراریخته از جمله پنبه Bt نسبت به سال ۱۹۹۶میلادی بی سابقه بوده و موجب شد تا کشت پنبه تراریخته به عنوان سریع ترین فناوری مورد پذیرش در تاریخ اخیر کشاورزی باشد. این امر نشان دهنده اعتماد و اطمینان میلیون‌ها کشاورز در سراسر جهان به این فناوری است که به دلیل فواید چندگانه محصولات تراریخته به طور مستمر و در هر سال کشت بیشتر این محصولات را ادامه می‌دهند. برای اولین مرتبه، سطح زیر کشت پنبه تراریخته تقریبا به ۷٤ درصد از مساحت ۳۳ میلیون هکتاری این محصول در جهان رسید. در هندوستان در سال ۲۰۱۲ بیش از هشتاد و هفت درصد کل محصول پنبه این کشور به پنبه Bt اختصاص یافته است. جالب توجه این که ۱۳ میلیون نفر از ۱٤ میلیون کشاورزی که از این فناوری بهره‌مند می‌شوند، از کشاورزان خرده پا و فقیر هستند. این کشاورزان در حال حاضر از کشت محصولات تراریخته‌ای مانند پنبه Bt منتفع می-شوند.

زمانی استفاده از یک تکنولوژی اخلاقی خواهد بود که بتواند مشکلی را حل نموده و از نظر ایمنی و سلامتی هم مشکلی را ایجاد ننماید. به نظر می رسد جامعه بایستی با نگرش منطقی و علمی نسبت به این فنآوری قضاوت کند. اگر چه هیچ مدرکی دال بر مضر بودن پنبه تراریخته Bt برای انسان، موجودات دیگر و محیط زیست تا به حال گزارش نشده است ولی همیشه آزمایشات اکولوژیکی _ زراعی اساسی ودر سطح وسیع برای ارزیابی اثرات آنها صورت میگیرد تا ایمنی آنها تایید شود.

تاکنون فواید حاصل از تجاری‌سازی پنبه-های تراریخته مقاوم به آفت و علفکش به خوبی به اثبات رسیده‌اند؛ اکنون نیز انتظار می رود که تولید پنبه‌هایی که از روش‌های ویرایش ژنوم بدست آمده‌اند بتوانند جهش فوق‌العاده‌ای را در تولید پنبه ایجاد کنند. اخیرا، استفاده از داده‌های توالی‌یابی نسل سوم به منظور کاندید ژنهای مناسب برای اصلاح صفات زراعی مهم و روشهای ویرایش ژنوم به منظور دست‌ورزی اختصاصی ژنها امکانات گسترده‌ای را برای اصلاح مولکولی گیاهان فراهم کرده است.

منابع

Ali Z, Abulfaraj A, Idris A, Ali S, Tashkandi M, Mahfouz M (2015). CRISPR/Cas9-mediatedviralinterferenceinplants. Genome Biology 16: 238.doi: 10.1186/s13059-015-0799-6.

Allen RD (2010). Opportunities for engineering abiotic stresses. In: Zher UB (ed) Biotechnology advances in agriculture and forestry, 65th edn. Springer, Berlin, pp 127–148.

Amarjeet KS, Kumar P, Uma K, Pradeep K B, Deepak P (2016). High Expression of Cry1Ac Protein in Cotton (Gossypium hirsutum) by Combining Independent Transgenic Events

that Target the Protein to Cytoplasm and Plastids. PLoS ONE 11: e0158603. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158603

Amudha J, Balasubramani G, Malathi VG, Monga D, Kranthi KR (2011). Cotton leaf curl virus resistance transgenics with antisense coat protein gene (AV1). Current Science 101: 300–307.

Andrews RW, Fausr R, Wabiko MH, Roymond KC, Bulla LA (1987). Biotechnology of Bt: a critical review. Biotechnology 6: 163–232.

Bajwa KS, Shahid AA, Rao AQ, Kiani MS, Ashraf MA, Dahab AA, Bakhsh A, Latif A, Khan MAU, Puspito AN, Aftab A, Bashir A, Husnain T (2013). Expression of Calotropis procera expansin gene CpEXPA3 enhances cotton fibre strength. Australian Journal of Crop Science 7: 206–212.

Bakhsh A, Rao AQ, Shahid AA, Husnain T, Riazuddin S (2009). Insect resistance and risk assessment studies in advance lines of Bt cotton harboring Cry1Ac and Cry2A genes. American Eurosian Journal of Agriculture & Enviromental Sciences 6: 1–1.

Bakhsh A, Siddiq S, Husnain T (2012). A molecular approach to combat spatio-temporal variation in insecticidal gene (*Cry1Ac*) expression in cotton. Euphytica 183: 65–74.

Baltes NJ, Hummel AW, Konecna E, Cegan R, Bruns AN, Bisaro DM, (2015). Conferring resistance to geminiviruses with the CRISPR–Cas prokaryotic immune system. Nature Plants 1: 15145.doi: 10.1038/nplants.2015.145.

Bell AA (1986). Physiology of secondary products. In: Mauney JR, Stewart JM (eds) Cott Townsend BJ, Poole A, Blake CJ, Llewellyn DJ (2005). Antisense suppression of a (+)-d-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.

Briddon RW, Markham PG (2000). Cotton leaf curl disease. Virus Research 71: 151–159.

Borole VK, Dhumale DB & Rajput JP (2000). Embryo culture studies in interspecific crosses between arboretum and hirsutum cotton. Indian Journal of Genetics 60: 105–214.

Cermak T, Doyle E, Christian M, Wang L, Zhang Y, Schmidt C, Baller J, Somia N, Bogdanove A, Voytas D (2011). Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting. Nucleic Acids Research 39: e82.

Chee PW, Campbell BT (2009). Bridging classical and molecular genetics of cotton fiber quality and development. Genom Cotton.Springer Inc, New York, pp 283–31.

Chen H, Zhu LJ, Min SJ (2003). Progress of studies on fibroin genes of Bombyx mori (in Chinese). Bulletin of Science and Technology 19: 260–263.

Chen TZ, Wu S, Zhao J, Guo WZ, Zhang TZ (2010). Pistil drip following pollination: a simple in planta Agrobacterium-mediated transformation in cotton. Biotechnolgy Letters 32: 547–555.

Chen J, Brucke JJ (2015). Developing Fiber Specific Promoter-Reporter Transgenic Lines to Study the Effect of Abiotic Stresses on Fiber Development in Cotton. PLoS One 10: e0129870.

Cohen BM, Gould F, Bentur JC (2000). Bt rice: practical steps to sustainable use. International Rice Research Notes 2: 4–10.

D'Halluin K, Vanderstraeten C, Van Hulle J, Rosolowska J, Van Den Brande I, Pennewaert A, D'Hont K, Bossut M, Jantz D, Ruiter R, Broadhvest J (2013). Targeted molecular trait stacking in cotton through targeted double-strand break induction. Plant Biotechnology Journal 11: 933–941.

Dang PM, Heinen JL, Allen RD (1995). Expression of a cotton fiber gene promoter in tobacco. Proc. Beltwide Cotton. Conf., San Antonio, TX. 4-7 Jan. 1995. Natl. Cotton Counc. Am., Memphis, TN.

Dhaliwal HS, Kawai M, Uchimiya H (1998). Genetic engineering for abiotic stress tolerance in plants. Plant Biotechnology 15: 1–10.

Dietz-Pfeilstetter A (2010). Stability of transgene expression as a challenge for genetic engineering. Plant Science. 179: 164‑167.

Divya K, Jami SK, Kirti PB (2010). Constitutive expression of mustard annexin, AnnBj1 enhances abiotic stress tolerance and fiber quality in cotton under stress. Plant Molecular Biology 73:293–308.

Dutt Y, Wang XD, Zhu YZ, Li YY (2004). Breeding for high yield and fibre quality in colored cotton. Plant Breeding 123: 145–151.

Dzitoyeva S, Dimitrijevic N, Manev H (2001). Intra-abdominal injection of double-stranded RNA into anesthetized adult Drosophila triggers RNA interference in the central nervous system. Molecular Psychiatry 6: 665–670.

Entine J (2006). Beyond precaution. In: Entine J (ed) Let them eat precaution: how politics is undermining the genetic revolution in agriculture. AEI Press, Washington, DC, pp 1–14.

Epinat JC, Arnould S, Chames P, Rochaix P, Desfontaines D, Puzin C, Patin A, Zanghellini A, Paques F, Lacroix E (2003). A novel engineered meganuclease induces homologous recombination in yeast and mammalian cells. Nucleic Acids Research 31: 2952‑2962.

Eszterhas S, Bouhassira E, Martin D, Fiering S (2002). Transcriptional interference by independently regulated genes occurs in any relative arrangement of the genes and is influenced by chromosomal integration position. Molecular and Cellular Biology 22: 469‑470.

Finer JJ, McMullen MD (1990). Transformation of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) via particle bombardment. Plant Cell Report 8: 586–589.

Firozabady E, Deboer DL, Merlo DJ (1987). Transformation of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) by Agrobacterium tumefaciens and regeneration of transgenic plants. Plant and Molecular Biology 10: 105–116.

Ganesan M, Bhanumathi P, Ganesh Kumari K, Lakshmi Prabha A, Song P-S, Jayabalan N (2009). Transgenic Indian cotton (*Gossypium hirsutum*) harboring rice chitinase gene (Chi II) confers resistance to two fungal pathogens. American Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology 5: 63–74.

Gasiunas G, Barrangou R, Horvath P, Siksnys V (2012). Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. Proceeding of National Academi of Science USA 109: E2579–86.

Gaspar YM, McKenna JA, McGinness BS, Hinch J, Poon S, Connelly AA, Anderson MA, Heath RL (2014). Field resistance to *Fusarium oxysporum* and *Verticillium dahliae* in transgenic cotton expressing the plant defensin *NaD1* . Journal of Experimental Botany 65: 1541-1550.

Green JM (2012). The benefits of herbicide-resistant crops. Pest Management Science 68: 1323–1331.

Gryspeirt A, Gre´goire JC (2012). Effectiveness of the high dose/refuge strategy for managing pest resistance to Bacillus thuringiensis (Bt) plants expressing one or two toxins. Toxins 4: 810–835.

He C, Yan J, Shen G, Fu L, Holaday AS, Auld D, Blumwald D, 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 Cell Physiology 46: 1848–1854.

Hood EE, Bailey MR, Beifuss K, Magallanes-Lundback M, Horn ME, Callaway E, Drees C, Delaney DE, Clough R, Howard JA (2003). Criteria for high-level expression of a fungal laccase gene in transgenic maize. Plant Biotechnology Journal 1: 129–140.

Duke S (2011). Comparing Conventional and Biotechnology-Based Pest Management. Journal of Agricultural Food and Chemistry 59: 5793–5798

Hussain SS, Husnain T, Riazuddin S (2007). Sonication assisted Agrobacterium mediated transformation (SAAT): an alternative method for cotton transformation. Pakistan Journal of Botany 39: 223–230

Iqbal1 Z, Sattar MN, Shafiq M (2016). CRISPR/Cas9: A Tool to Circumscribe Cotton Leaf Curl Disease. Frontiers in Plant Science 7, doi: 10.3389/fpls.2016.00475.

Jafari M, Tohidfar M (2007). Bt transgenic plants: biosafety and advantages. Genetic Novin 2: 5-17

James C (2014) Global status of commercialized biotech/GM crops: ISAAA Brief No. 49, ISAAA, Ithaca, NY.

James C (2015). 20th Anniversary (1996 to 2015) of the Global Commercialization of Biotech Crops and Biotech Crop Highlights in 2015. ISAAA Brief No. 51. ISAAA: Ithaca, NY.

Ji X, Zhang H, Zhang Y, Wang Y, Gao C (2015). Establishing a CRISPR– Cas-like immune system conferring DNA virus resistance in plants. Nature Plants 1: 15144.doi:10.1038/nplants.2015.144

Jime´nez V, Thomas C (2006). Participation of plant hormones in determination and progression of somatic embryogenesis. In: Mujib A, S ˇ amaj J (eds) somatic embryogenesis. Springer, Berlin, pp 103-118.

Jin S, Mushke R, Zhu H, Tu L, Lin Z, Zhang Y, Zhang X (2008). Detection of somaclonal variation of cotton (Gossypium hirsutum) using cytogenetics, flow cytometry and molecular markers. Plant Cell Rep 27: 1303-16.

John ME, Crow LJ (1992). Gene expression in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) fiber: cloning of the mRNAs. Proc. Proceeding of National Academi of Science USA 89:5769-5773.

Juturu VN, Mekala GK, Kirt BP (2015). Current status of tissue culture and genetic transformation research in cotton (*Gossypium* spp.). Plant Cell Tissue & Organ Culture 20: 813-839.

Kantartzi SK, Ulloa M, Sacks E, Stewart JM (2009). Assessing genetic diversity in Gossypium arboreum L. cultivars using genomic and EST-derived microsatellites. Genetica 36: 141–147.

Keshamma E, Rohini S, Rao KS, Madhusudhan B, Kumar MU (2008). Tissue culture-independent in planta transformation strategy: anAgrobacterium tumefaciens-mediated gene transfer method to overcome recalcitrance in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). Journal of Cotton Science 12: 264–272

Khadi BM, Santhy V, Yadav MS (2010). Cotton: an introduction. In: Zher UB (ed) Biotechnology advances in agriculture and forestry, 65th edn. Springer, Berlin, pp 1–14.

Khan GA, Bakhsh A, Ghazanffar M, Riazuddin S, Husnain T (2013). Development of transgenic cotton pure lines harboring a pesticidal gene (cry1Ab). Emirates Journal of Food and Agriculture 25: 434–442.

Kiani S, Mohamed BB, Shehzad K, Jamal A, Shahid MN, Shahid AA, Husnain T (2013). Chloroplast targeted expression of recombinant crystal-protein gene in cotton: an unconventional combat with resistant pests. Journal of Biotechnology 166: 88–96

Kouakou TH, Waffo-Te´guo P, Kouadio YJ, Valls J, Richard T, Decendit A, Me´rillon J (2007). Phenolic compounds and somatic embryogenesis in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). Plant Cell Tissue & Organ Culture 90: 25–29.

Kouser S, Qaim M (2012). Valuing financial, health and environmental benefits of Bt cotton in Pakistan. In: The International Association of Agricultural Economists (IAAE) Triennial Conference, Foz do Iguac¸u, Brazil.

Krieg A, Huger AM, Langenbruch GA, Schnetter W (1983). *Bacillus thuringiensis* var tenebrionis: a new pathotype effective against larvae of coleopteran. Journal of Applied Entomology 96: 500–50.

Kuppu S, Mishra N, Hu R, Sun L, Zhu X, Shen G, Blumwald E, Payton P, Zhang H (2013). Water-deficit inducible expression of a cytokinin biosynthetic gene IPT improves drought tolerance in cotton. PLoS ONE 8:e64190.

Kumar S, Dhingra A, Daniell H (2004). Stable transformation of the cotton plastid genome and maternal inheritance of transgenes. Plant Mol Biol 56: 203–216

Latif A, Rao AQ, Khan MAU , Shahid N, Bajwa KSh, Ashraf MA, Abbas MA, Azam M, Shahid AA, Nasir IA, Husnain T (2015). Herbicide-resistant cotton (*Gossypium hirsutum*) plants: an alternative way of manual weed removal. BMC Research Notes 8: 453.

Leelavathi S, Sunnichan SG, Kumria R, Vijaykanth GP, Bhatnagar RK, Reddy VS (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.

Li F, Wu S, Chen T, Zhang J, Wang H, Guo W, Zhang T (2009). Agrobacterium-mediated co-transformation of multiple genes in upland cotton. Plant Cell Tissue and Organ Culture 97: 225–235.

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 Report 22: 691–697.

Liu F, Zhao YP, Wang X, Li Y, Sun J (2015). Isolation and functional characterization of seed-specific FAD2-1 promoter from cotton (*Gossypium hirsutum* L). Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology 24: 369-375.

Liu GZ, Li XL, Jin SX, Liu XY, Zhu LF, Nie YC, Zhang XL (2014). Overexpression of rice NAC gene SNAC1 improves drought and salt tolerance by enhancing root development and reducing transpiration rate in transgenic cotton. PLoS ONE 9: e86895.

Liu JF *et al* (2011). Biolistic transformation of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) with the phyA gene from *Aspergillus ficuum*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 106: 207–214.

Lu Z, Zeiger E (1994). Selection of higher yield and heat resistance in pima cotton has caused genetically determined changes in stomatal conductance. Physiologia Plantarum 92:273–278.Lycett GW, Grierson D (1990). Genetic engineering of crop plants. Butterworth Heinemann, London.

Lynch JA, Desplan C (2006). A method for parental RNA interference in the wasp Nasonia vitripennis. Nature Protocols 1: 486–494

Mahmood-ur-Rahman Hussain K, Khan MA, Bakhsh A, Rao AQ (2012). An insight of cotton leaf curl virus: a devastating plant pathogenic begomovirus. Pure and Applied Biology 1: 52–58

Mao YB, Tao XY, Xue XY, Wang LJ, Chen XY (2011). Cotton plants expressing CYP6AE14 double-stranded RNA show enhanced resistance to bollworms. Transgenic Research 20: 665–673.

Maqbool A (2009). Search for drought tolerant genes through differential display. Ph.D. thesis, The University of Punjab, Lahore, Pakistan.

May OL, Wofford TJ (2000). Breeding transformed cotton expressing enhanced fiber strength. J New Seed 2: 1–13.

Mehlo L, Gahakwa D, Nghia PT, Loc NT, Capell T *et al*. (2005). An alternative strategy for sustainable pest resistance in genetically enhanced crops. Proceeding of National Academi of Science USA 10222:7812–7816

Miao W, Wang X, Li M, Song C, Wang Y, Hu D, Wang J (2010). Genetic transformation of cotton with a harpin-encoding gene hpaXoo confers an enhanced defense response against different pathogens through a priming mechanism. BMC Plant Biology 10: 67.

Mittal A, Gampala SSL, Ritchie GL, Payton P, Burke JJ, Rock CD (2014). Related to ABA-Insensitive3 (ABI3)/Viviparous1 and AtABI5 transcription factor coexpression in cotton enhances drought stress adaptation. Plant Biotechnology Journal 12: 578–589.

Najafzadeh R, Darvishzadeh R, Mossa Gh, Abreenbena M (2016). Identification of retrotransposonious sites (IPAR) associated with resistance to stem sclerotinia disease in sunflower. Journal of Agricultural Biotechnology 3: 97-111.

Nalini K, Murhukrishnan P, Chinnusamy C, Vennila C (2015). Weeds of cotton – A Review. Agri. Review, 36: 140-146.

Neves-Borges AC, Collares WM, Pontes JA, Breyne P, Farinelli L, de Oliveira DE (2001). Coat protein RNA-mediated protection against Andean potato mottle virus in transgenic tobacco. Plant Science 160: 699–712.

Oerke EC (2006). Centenary review: Crop losses due to pests. The Journal of Agricultural Science 144: 31–43.

Palle SR, Campbell LM, Pandeya D, Puckhaber L, Tollack LK, Marcel S, Sundaram S, Stipanovic RD, Wedegaertner TC, Hinze L, Rathore KS (2013). RNAi-Mediated ultra-low gossypol cottonseed trait: performance of transgenic lines under field conditions. Plant Biotechnology Journal 11: 296–304.

Parkhi V, Kumar V, Campbell LAM, Bell AA, Rathore KS (2010). Expression of Arabidopsis NPR1 in transgenic cotton confers resistance to non-efoliating isolates of Verticillium dahliae but not the defoliating isolates. Journal of Phytopathology 158: 822–825.

Perlak FJ, Deaton RW, Armstrong TA, Fuchs RL, Sims SR, Greenplate JT, Fischhoff DA (1990). Insect resistant cotton plants. Biotechnology 8: 939–943.

Perlak FJ, Fuchs RL, Dean DA, McPherson SL, Fischhoff DA (1991). Modification of the coding sequence enhances plant expression of insect control protein genes. Proceeding of National Academi of Science USA 88: 3324–3328.

Pic E, De la Serve BT, Tardieu F, Turc O (2002). Leaf senescence induced by mild water deficit follows the same sequence of macroscopic, biochemical, and molecular events as monocarpic senescence in pea. Plant Physiology 128: 236–246.

Pollegioni L, Schonbrunn E, Siel D (2011). Molecular basis of glyphosate resistance: Different approaches through protein engineering. FEBS Journal 278: 2753–2766.

Price RGD, Gatehouse JA (2008). RNAi-mediated crop protection against insects. Trends in Biotechnology 26: 393–400.

Prins M (2003). Broad virus resistance in transgenic plants. Trends Biotechnol 21: 373–375

Qaim M (2009). The economics of genetically modified crops. Annual Review of Research Economics. 1: 665–693.

Qin YH, Qiao ZX, Liu JY (2007). Application of genetic transformation in cotton breeding (in Chinese). Acta Gossypii Sin 19: 482–48.

Rajasekaran K, Cary J, Jaynes J, Cleveland T (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, Hudspeth RL, Cray JW, Anderson DM, Cleveland TE (2000). High-freequency stable transformation of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) by particle bombardment of embryogenic calli suspension cultures. Plant Cell Report 19: 539–545.

Rech EL, Vianna GR, Aragaˇo FJL (2008). High-efficiency transformation by biolistics of soybean, common bean and cotton transgenic plants. Nature Protocols 3: 410–418.

Richter D (1998). Genetic engineering of cotton to increase fiber strength, water absorption and dye binding. In: Proceedings Beltwide Cotton Conferences. San Diego, pp 595–598.

Rinehart JA, Peterson MW, John ME (1996). Tissuespecific and developmental regulation of cotton gene FbL2A. Plant Physiology 112: 1331-1341.

Saeed M, Behjatnia SAA, Mansoor S, Zafa Y, Hasnain S, Rezaian MA (2005). A single complementary-sense transcript of a gemini viral DNA b satellite is determinant of pathogenicity. Molecular Plant Microbe Interaction 18: 7–14.

Sattar MN, Kvarnheden A, Saeed M, Briddon RW (2013). Cotton leaf curl disease–an emerging threat to cotton production worldwide. Journal of General Virology 94: 695–710.

Shang-guan XX, Wang LJ, Li YE, Yun-Sheng L, Xia WU (2007). Analysis of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) plants transformed with a silkworm fibroin light chain gene (in Chinese). Acta Agronomia Sinica 33: 697–702.

Sunilkumar G, Campbell LM, Puckhaber L, Stipanovic RD, Rathore KS (2006). Engineering cottonseed for use in human nutrition by tissue-specific reduction of toxic gossypol. Proceeding of National Academy of Science USA 103: 18054–18059.

Taylor G, Petrucci L, Lambert A, Baxter S, Jarjour J, Stoddard B (2012). LAHEDES: the LAGLIDADG homing endonuclease database and engineering server. Nucleic Acids Research 40: 110‑116.

Terenius O *et al* (2011). RNA interference in Lepidoptera: an overview of successful and unsuccessful studies and implications for experimental design. Journal of Insect Physiology 57: 231–245.

Tian J, Zhang X, Liang B, Li S, Wu Z, Wang Q, Leng C, Dong J, Wang T (2010). Expression of baculovirus anti-apoptotic genes p35 and op-iap in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) enhances tolerance to Verticillium Wilt. PLoS ONE 5:e14218.

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: 45-50.

Tohidfar M, Ghareyazie B, Mohammadi M, Abdmishani C (2005). Agrobacterium-mediated transformation of cotton using a chitinase gene. Plant Cell Tissue and Organ Culture. 83: 83-96.

Tohidfar M, Ghareyazie B, Mosavi M, Yazdani S, Golabchian R (2008). Agrobacterium-mediated transformation of cotton (*Gossypium hirsutum*) using a synthetic cry1Ab gene for enhanced resistance against Heliothis armigera. Iranian Journal of Biotechnology 6: 164–173.

Tohidfar M, Hossaini R, Shokhandan Bashir N, Tabatabaei M (2012). Enhanced Resistance to Verticillium dahliae in Transgenic Cotton Expressing an Endochitinase Gene from Phaseolus vulgaris. Czech Journal of Genetic Plant Breeding 48: 33–41.

Tohidfar M, Mohsenpour M (2010). Effective factors on Agrobacterium- mediated transformation of cotton. Journal of Agricultural Biotechnology 2: 1-24.

Tomoyasu Y, Miller SC, Tomita S, Schoppmeier M, Grossmann D, Bucher G (2008) Exploring systemic RNA interference in insects: a genome-wide survey for RNAi genes in Tribolium. Genome Biology 9: R10.

Vajhala SKC, Sadumpati VK, Nunna HR, Sateesh Puligundla SK, Vudem DR, Khareedu VR (2013). Development of transgenic cotton lines expressing allium sativum agglutinin (ASAL) for enhanced resistance against major sap-sucking pests. PLoS One 8: 1–9.

Vasconcelos IM, Oliveira JTA (2004). Antinutritional properties of plant lectins. Toxicon 44: 385–403.

Wang Y, Liang Ch, Wu Sh, Zhang X, Tang J, Jian G, Jiao G, Chu Ch (2016). Significant Improvement of Cotton *Verticillium* Wilt Resistance by Manipulating the Expression of Gastrodia Antifungal Proteins. Molecular Plant 9: 1436–1439.

Wang YQ, Chen DJ, Wang DM, Huang QS, Yao ZP, Liu FJ, Wei XW, Li RJ, Zhang ZN, Sun YR (2004). Over-expression of gastrodia anti-fungal protein enhances *verticillium* wilt resistance in coloured cotton. Plant Breeding 23: 454–459.

Wei F, Fan R, Dong H, Shang W, Xu X, Zhu H, Yang J, Hu X (2015). Threshold microsclerotial inoculum for cotton *Verticillium* wilt determined through wet-sieving and real-time quantitative PCR. Phytopathology 105: 220–229.

Wu J, Zhang X, Nie Y, Luo X (2005). Agrobacterium tumefaciens and regeneration of insect-resistant plants. Plant Breeding 124: 142–146.

Yang Y, Sherwood TA, Patte CP, Hiebert E, Poiston J (2004). Use of tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) Rep gene sequence to engineer TYLCV resistence in tomato. Phytopathology 94: 490–496.

Yarasi B, Sadumpati V, Immanni CP, Reddy VD, Rao KV (2008). Transgenic rice expressing Allium sativum leaf agglutinin (ASAL) exhibits high-level resistance against major sap-sucking pests. BMC Plant Biology 8: 102.

Yue Y, Zhang M, Zhang J, Tian X, Duan L, Li Z (2012). Over expression of the AtLOS5 gene increased abscisic acid level and drought tolerance in transgenic cotton. Journal of Experimental Botany 63(10): 3741–3748.

Zhang H, Zhao F, Zhao Y, Guo C, Li C, Xiao K (2009). Establishment of transgenic cotton lines with high efficiency via pollen-tube pathway. Frontiers of Agriculture in China 3: 359–365.

Zhang DY, Yang HL, Li XS, Li HY, Wang YC (2014). Overexpression of Tamarix albiflonum TaMnSOD increases drought tolerance in transgenic cotton. Molecular Breeding 34: 1–11.

Zhang H, Shen G, Kuppu S, Gaxiola R, Payton P (2011). Creating drought-and salt tolerant cotton by overexpressing a vacuolar pyrophosphatase gene. Plant Signal Behavior 6: 861–863.

Zhang ZL, Chen S, Liu ZL (2004) Transformation of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) with a silkworm fibroin gene to achieve strength-enhanced fiber (in Chinese). Acta Agriculturea Jiangxi 6:15–19.

Zhao FY, Li YF, Xu P (2006). Agrobacterium mediated transformation of cotton (*G. hirsutum* L. cv. Zhongmian 35) using glyphosate as selectable marker. Biotechnology Letters 28: 1199–1207.

Cotton genetic engineering: from past till now

Tohidfar M.*[1], Khosravi S.[2]

[1]Science and biotechnology faculty, Shaid beheshti. Tel.: 02129903244. Fax: 021 29903244.
[2]Agricultural biotechnology Institute of Iran, AREO. Tel.: 02632703536. Fax: 02632701068

Abstract

Cotton is considered as one of the most important crops in the world and ranks the fourth economic crop in Iran. In past years, conventional plant breeders endeavored to increase cotton quality. To overcome the constraints that conventional breeding programs comprised, new genetic engineering technologies were introduced. Since then, many cotton events resistant to pests, disease, pesticides, abiotic stresses and also high quality of lint have been produced and commercialized around the world which has confronted a noticeable public acceptance. Today and with the advent of next generation sequencing methods in favor of easier identification of suitable candidate genes for their manipulation and novel targeted genome editing technology (CRISPR/Cas9), outstanding prospects regarding cotton breeding have been developed. In present article, history of cotton breeding including genetic engineering and genome editing researches which led to production of resistant cultivars to biotic and abiotic stresses and high quality fiber are reviewed.

Keywords: *Transgenic cotton, resistance to disease, resistance to pests, genome editing, CRISPR/Cas9.*

* Corresponding Author: Tohidfar M. Tel: 02129903244 Email: gtohidfar@yahoo.com