مجله بیوتکنولوژی کشاورزی (دوره 2، شماره 1، بهار 1389)

فاکتورهای مؤثر در تراریزش پنبه با استفاده از آگروباکتریوم

مسعود توحیدفر[*1]، مطهره محسن‌پور[2]

[1] پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی کرج
[2] دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

چکیده

پنبه (*Gossipinm spp.*) در رتبه اول گیاهان تولید کننده الیاف در دنیا قرار دارد و به عنوان یک منبع مهم روغن نیز محسوب می‌شود. اگر چه در برنامه‌های اصلاحی پنبه پیشرفت های قابل ملاحظه‌ای به وجود آمده است، ولی روش‌های سنتی دارای محدودیت‌هایی از جمله منبع ژنی محدود، عدم تلاقی، انتخاب ناکارا و وقت‌گیر بودن هستند. پیشرفت‌های اخیر در انتقال ژن به پنبه، نه تنها راه را برای انتقال ژن‌های مفید هموار می‌کند بلکه امکان شناسایی و مطالعه عملکرد و تنظیم ژن را نیز فراهم می‌آورد. روش آگروباکتریوم یکی از روش‌هایی 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، اضافه‌کردن مواد فنولی در محیط کشت، گونه گیاهی و ژنوتیپ، تنظیم‌کننده‌های رشدی، ریز نمونه، نور و دما، دمای هم‌کشتی، آنتی‌بیوتیک، تیمار ایجاد زخم در بافت هدف و روش مناسب انتخاب سلول‌های تراریخت‌شده از بافت غیرتراریخته اشاره نمود. در انتقال ژن توسط آگروباکتریوم به پنبه از هیپوکوتیل، لپه‌ها و سوسپانسیون سلولی به عنوان ریزنمونه استفاده شده است. محدودیت این ریزنمونه‌ها میزان باززایی کم و وابسته بودن آنها به ژنوتیپ است به طوری که تنها تعداد محدودی از ارقام از این ریزنمونه‌ها باززا می‌شوند. 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 موثر بوده‌اند معرفی شوند.

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

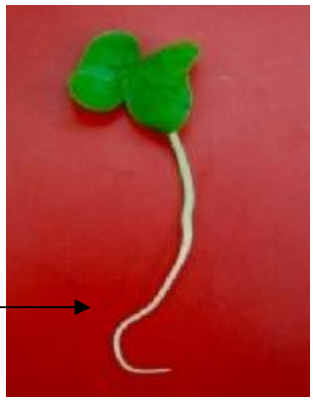
[*] نویسنده مسئول: مسعود توحید فر تلفن: 09124627014 E. Mail: gtohidfar@abrii.ac.ir

مقدمه

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 دانهٔ روغنی، مقام دوم را در جهان دارا می باشد. با وجود تولید ارقام مطلوب پنبه توسط اصلاح نباتات کلاسیک، اصلاحِ ژنتیکی آن به دلیل فقدان تنوع در ژرم‌پلاسم از نظر وجود ژن‌های مقاومت به آفات و بیماری‌ها، طولانی بودن زمان اصلاح و نیز کمّی‌بودن صفات مقاومت به آفات و بیماری‌ها محدود شده است. مهندسی ژنتیک قادر به افزایش تولید، حفظ تنوع ژنتیکی، استفادهٔ 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) و Umbeck *et al*. (1987) گزارش شد که مسیر آزادسازی تجاری نخستین پنبهٔ باززایی‌شده و تراریخته و ورود آن به عرصهٔ 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 باززایی گیاه تراریخته مربوط می شود 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). باززایی گیاه تراریخته به یک دورهٔ 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 القاءکنندهٔ 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 واکشت گزینشی، کالوس‌های نوع

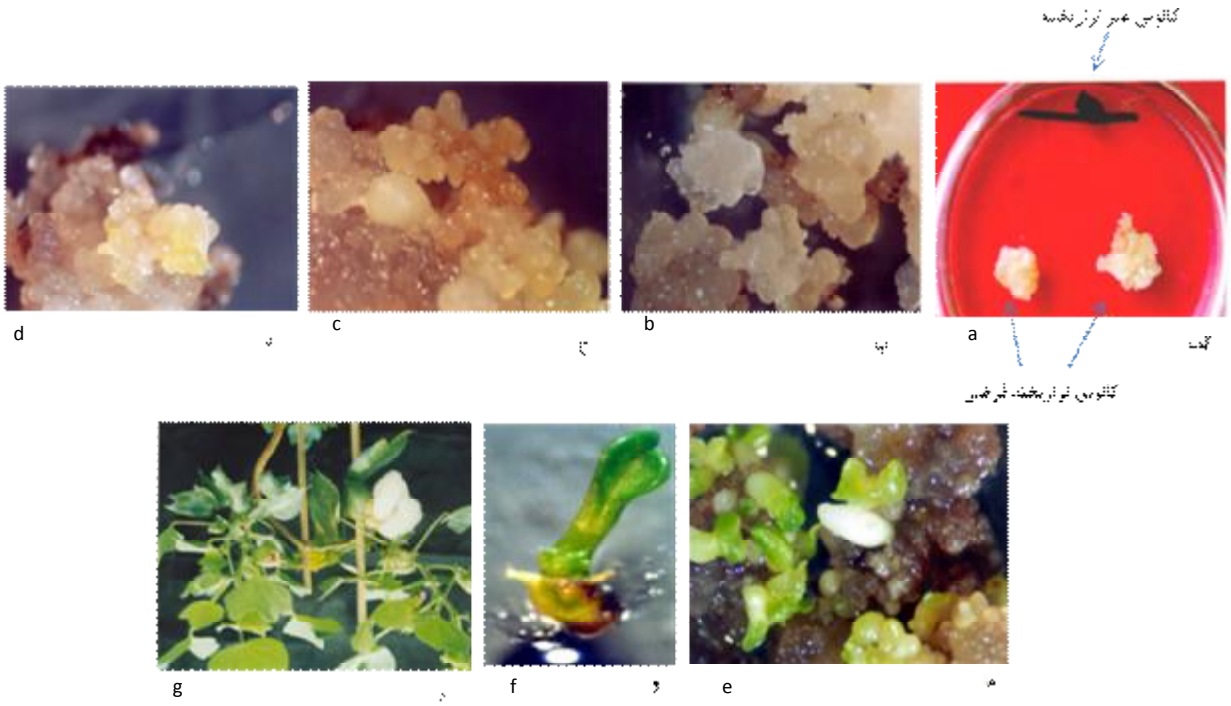
مطلوب منجر به تشکیل کالوس جنین‌زا می‌گردد. جنین‌های سوماتیکی گرد و یا قلبی‌شکل انتخاب شده و به محیط کشت باززایی منتقل می‌شوند. در فرایند تراریزش آخرین مانع، توانایی بازیابی موفقیت‌آمیز گیاهچه از جنین‌های سوماتیکی است (شکل2) (Tohidfar *et al*., 2008).



شکل 1- گیاهچه 10 روزه استریل.

Figure 1- Ten days old sterile explant.

چندین ایراد به جنین‌زایی سوماتیکی به عنوان راهکاری برای ایجاد گیاهان تراریختهٔ پنبه وارد است که بیشتر آنها با تغییراتی برطرف می‌شوند. یکی از معایب برجستهٔ 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 تراریختهٔ پنبه که با استفاده از جنین‌زایی باززا شدند تنوع سوماکلونال به صورت تغییر در مورفولوژی و کاهش باروری نشان می‌دهند. واقع امر آن است که این لاین‌ها بیش از 10 ماه در محیط کشت باقی می‌مانند و در همین مرحله و پس از آن خطر تنوع زیانبار سوماکلونال به طور معنی‌داری افزایش پیدا می‌کند. بنابراین، کمینه‌سازی زمان صرف‌شده در هر مرحله، نکته ای کلیدی برای کم‌کردن 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 متعدی بر کارآیی انتقال ژن اثر می‌گذارند که در ادامه به آنها اشاره خواهد شد.



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 ها ی تراریخته فرضی مقاوم به کانامایسین، ب، ج، د) کالوس های جنین زای شکننده و قلبی شکل، ه) جنین‌های سوماتیکی با مورفولوژی مختلف، و) جوانه‌زنی جنین‌های 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 emberiogenic callus; e: somatic embryos with different morphology; f: germination of somatic embryos; g: regenerated plant.

نوع ریزنمونه

در بیشتر گزارش ها برای ایجاد پنبهٔ تراریخته از کشت سلول‌های 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.*, 2009). در بعضی موارد نیز برای تراریزش از هیپوکوتیل یا لپه‌ای که از کشت سوسپانسیون یا کشت کالوس مشتق شده استفاده شده است که بازیابی تراریخت‌ها از طریق جنین‌زایی سوماتیکی صورت می‌گرفت (Finer and McMullen 1990; Rajasekaran *et al.*, 1996; Leelavathi *et al.*, 2004). امکان کوتاه کردن دورهٔ بین مرحلهٔ

تراریزش و بازیابی گیاهان پنبه تراریخته با استفاده از کالوس‌های جنین‌زا یا سوسپانسیون از قبل تهیه شده به عنوان بافت هدف در روش اگروباکتریوم وجود دارد (Rajasekaran *et al.*, 2000; Leelavathi *et al.*, 2004)، ولی انجام این مرحله نیز نیازمند دوره‌های تولید اولیهٔ 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 انتهای 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 ساقهٔ پنبه این امکان به وجود آمده تا انتقال ژن به هر ژنوتیپ در زمان کوتاهی انجام پذیر شود (Zapata *et al.*, 1999).

اندازهٔ 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 آزمایش ها 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. میزانِ 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 پژوهش ها معمول است خصوصاً در مواقعی که تراکم پروتوپلاست کم است، اما نیاز دارند تا تقسیم شوند و توده‌های سلولی تشکیل دهند تا باززا شوند. آزمایش ها 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 واکشتی از بین می‌روند. علت این امر ممکن است کافی نبودن تودهٔ سلولی برای زنده ماندن در شرایط انتخابی و یا به علت

فرار باشد. در مطالعه‌ای برای درک علت از بین رفتنِ لاین‌های کالوس، ارتباط بین اندازهٔ کالوس، بیان GFP و قدرتِ زنده ماندن در طول دورهٔ دو ماهه روی محیط حاوی کانامایسین مورد بررسی قرار گرفت و نتایج آزمایش ها به طور واضحی نشان داد که کالوس‌های بزرگ‌تری که GFP را نیز بیان می‌کردند قدرتِ زنده‌ماندن بیشتری داشتند، به طوری که میزان زنده ماندن آنها 68/2% بود. این در حالی است که درصد زنده ماندن کالوس‌های دارای اندازهٔ متوسط 50/2 و کالوس‌های کوچک 25/6 مشاهده شد (اندازهٔ 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 جداشده 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[1] ریزنمونه‌ها

پژوهش ها 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، هنوز به درستی شناخته نشده است. آغاز تقسیم سلولی فعال در محل زخم، در افزایش اتصال اگروباکتریوم به سلول‌هایی که به تازگی دیوارهٔ سلولی خود را ساخته اند موثر بوده و تولید ترکیبات القاءکنندهٔ 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 پایین‌تر مریستم (رگه زایشی) که قسمت اعظم بافت جدید را تشکیل می‌دهد، افزایش خواهد داد.

اثرات استفاده از استوسرینگون[2] در طول همکشتی

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

[1] Preculture

[2] Acetosyringone

به عنوان القاکنندهٔ بالقوه ژن‌های آگروباکتریوم شناخته شده است. چندین گزارش در مورد تک لپه‌ای‌ها و برخی گزارشات نیز روی دولپه‌ای‌های مهم، نشان داده‌اند که پیش القای[1] 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 لپه‌ای‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد. نتایج آزمایش ها (Sunilkumar and Rathore 2001) نشان داد که استوسرینگون کارآیی انتقال ژن را 4-2 برابر افزایش می دهد. استوسرینگون نه تنها تعداد متوسط وقایع انتقال ژن ثابت در هر ریزنمونه را افزایش می دهد بلکه درصد ریزنمونه‌هایی که انتقال ژن پایدار نشان می‌دهند را نیز افزایش می‌دهد. این نتایج با نتایج سایرمحققین در گونه‌های 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 می‌شود کارآیی انتقال ژن 3 برابر افزایش می‌یابد (Sunilkumar *et al.*, 1999). هیچکدام از پژوهش ها اولیه در ارتباط با تراریختی پنبه، استفاده از استوسرینگون را گزارش نکردند. در گزارش Sunilkumar و Rathore (2001)، استوسرینگون با غلظت 100 میکرومولار در مرحلهٔ نهایی رشد باکتری و در طول همکشتی مورد استفاده قرار گرفت و نشان داده شد که استوسرینگون به طور معنی‌داری کارایی تراریزش را بهبود می‌بخشد. در آن تحقیق وقتی که استوسرینگون برای تیمار رقم کوکر 312 به محیط کشت اضافه شد، میانگین تعداد کالوس‌های 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 معنی‌داری در تعداد کالوس‌های مقاوم به کانامایسین مشاهده گردید. این نتایج پیشنهاد می‌کند که استوسرینگون می‌تواند به عنوان ماده‌ای 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 *Phaseolus acutifolius* و *Nicotiana tabacum* افزایش می‌دهد، به طوری که، Dillen *et al.* (1997) گزارش کردند که کارایی انتقال ژن *gus* در لوبیا (*Phaseolus acutifolius*) و توتون در

[1] Pre-induction

حرارت 22 درجه نسبت به دمای 25 و 27 درجه بالا بود. در پژوهش ها اولیه روی تراریزش پنبه، همکشتی در دمای بین 25 تا 28 درجه سانتیگراد انجام می‌گرفت. آزمایش ها 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 پیلی در سطح سلول آگروباکتریوم می‌شود. پیشنهاد شده است که حرارت پایین که کارآیی انتقال ژن را بالا می برد ممکن است به علت بهتر عمل کردن ژن های *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 می شود و تراریزش مریستم ساقه این قابلیت را دارد که بازیابی سریع لاین‌های تراریخته را ممکن سازد. با 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 می شود (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).

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

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

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

et al. (2004)	antisense *cdn*1-C1			
Chaudhary *et al*. (2003)	*nptII gusA*	جنین‌زایی سوماتیکی	هیپوکوتیل و لپه	**Coker 310FR**
Leelavathi *et al*. (2004)	*Cry1Ia5nptII*	جنین‌زایی سوماتیکی	لپه یا هیپوکوتیل مشتق‌شده از کالوس	**Coker 310**
Yan *et al*. (2004)	*GF14λ, nptII*	جنین‌زایی سوماتیکی	هیپوکوتیل	**Coker 312**
Haq (2004)	*gusA nptII*	جنین‌زایی سوماتیکی	هیپوکوتیل مشتق‌شده از کالوس	**Coker 312**
Li *et al*. (2004)	*acsA, acsB, hpt, gusA*	جنین تخم بارورشده	دانهٔ گرده	**G007**
Zhang *et al*. (2004)	Cotton *ghCTL2* promoter driving *gusA, nptII*	جنین‌زایی سوماتیکی	هیپوکوتیل	**Coker 312**
Sunilkumar *et al*. (2005)	Seed-specific antisense ofcotton FAD-2, *nptII*	جنین‌زایی سوماتیکی	هیپوکوتیل	**Coker 312**
Townsend *et al*. (2005)	Soybean lectin promoter or CaMV 35S promoter driving *nptII*	جنین‌زایی سوماتیکی	لپه	**Coker 315 antisense *cdn*1-C4**
Rajasekaran *et al*. (2005)	Synthetic antimicrobial peptide *D4E1, nptII*	جنین‌زایی سوماتیکی	هیپوکوتیل	**Coker 312 C**
Sanjaya *et al*. (2005)	Antisense of *AV2, nptII*	باززایی شاخه در کشت	مریستم نوک ساقه	**F846**
Jin *et al*. (2005)	*gusA, nptII*	جنین‌زایی سوماتیکی	هیپوکوتیل مشتق‌شده از کالوس	**YZ-1**
He *et al*. (2005)	Arabidopsis *NHX1, nptII*	جنین‌زایی سوماتیکی	هیپوکوتیل	**Coker 312**
Wu *et al*. (2005a)	*CryIAc API-B, nptII*	جنین‌زایی سوماتیکی	هیپوکوتیل مشتق‌شده از کالوس	**Ekang 9 and Jihe 321**
Li *et al*. (2005)	Cotton ACTIN1 promoter driving *gusA* , RNAi of *ghACT1, nptII*	جنین‌زایی سوماتیکی	هیپوکوتیل	**Coker 312 C**
Tohidfar *et al*. (2005)	Bean chitinase and *nptII*	جنین‌زایی سوماتیکی	هیپوکوتیل	**Coker 312**

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

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

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[1] و پایانبر[2] مناسبی به پایانه های 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 بود و می‌تواند وقت و دقت و کار بیشتری را صرف رسیدگی و پرورش این گیاهان ارزشمند نموده تا به رشد کافی دست یابند و دارای سیستم ریشه‌ای مناسبی برای انتقال به گلدان شده و به مراحل بلوغ و بذردهی برسند. طراحی و استفاده از سازهٔ مناسبی که امکان ردیابی آسان گیاهان تراریخته را در مراحل اولیهٔ 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

[1] - Promoter
[2] - Terminator

بین ژن گزینشگر *nptII* 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 زیادژن مورد نظر که در فاصله ژن‌های *gus* و *nptII* 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 آنالیرهای ملکولی موجب ضغیف 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 (Mohsenpoue *et al.*, 2007). از طرفی PCR مستقیم روی قطعه کوچکی از برگ پنبه و بدون انجام مراحل استخراج DNA به دلیل وجود سطوح بالایی از پلی‌ساکاریدها و پلی‌فنل‌ها در گونه‌هایی نظیر پنبه مناسب نمی‌باشد. این ترکیبات یک مجموعه ژلاتینی قهوه‌ای رنگ در طی آماده‌سازی به وجود 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 آنجایی‌که حضور کانامایسین در محیط کشت به طور معنی‌داری طویل 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 متوقف‌شدن 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

حاوی کانامایسین به رشد خود ادامه داده ولی فاقد ژن موردنظر 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 هزینهٔ اضافه آنالیزهای ملکولی روی گیاهان غیرتراریخته را کاهش داد (Mohsenpour *et al*., 2007). طراحی و استفاده از پلاسمیدهای نوترکیبی که دو یا چند ژن را تحت پیشبرهای جداگانه در ناحیهٔ 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 لاین های کشت وطولانی بودن مدت زمان تولید کالوس های جنین زا مربوط می شود. غلظت بالای سیتوکنین برای زنده ماندن و تکثیر کالوس بعد از جداسازی ضروری است. انتقال بلافاصله کالوس به محیط سیتوکنین پایین و اکسین بالا بعد از جدا سازی، زنده ماندن کالوس را کاهش و زمان و مقدار واکنش جنین زایی را افزایش می دهد. نسبت بالای اکسین به سیتوکنین باعث شکننده بودن کالوس در مراحل اولیه و در نهایت باعث تبدیل آنها به جنین می شود. 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 (کنیتین یا N6-(2- ایزوپنتنیل) آدنین) به همراه MgCl2 برای القای کالوس، تکثیر و به دست آوردن کالوس‌های جنین‌زا به کار رفته است. معمولاً یک محیط بدون هورمون در ترکیب با KNO3 برای نمو جنین‌های سوماتیکی مورد استفاده قرار می‌گیرد. بعضی از آزمایش ها 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.

سویهٔ اگروباکتریوم

عامل دیگری که می‌تواند نقش مهمی در تراریزش پنبه داشته باشد سویه اگروباکتریوم است. انتخاب سویه می‌تواند در کارآیی انتقال ژن مهم باشد. برای مثال سویه‌های A281، EHA101 و EHA105 مشخص شد برای غلات (Raineri *et al.*, 1990) و دو لپه‌ای های مناسب‌ترند. آزمایش ها نشان دادند که که کارایی انتقال ژن با سویهٔ LBA4404 به طور قابل توجهی (بیش از 2 برابر) بیشتر از سویهٔ EHA105 در پنبهٔ بود. انجام این مقایسهٔ سویه‌های آگروباکتریوم برای سه ژنوتیپ دیگر پنبه (TAM-94L25, TAM-89E51, and TAM-94WE37S) نیز برتری معنی‌دار LBA4404 را به EHA105، در تمام ارقام نشان داد. یکی از مشکلات سویهٔ EHA105، رشد بیش از حد آن در طول مرحلهٔ 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). پژوهش ها 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 سویهٔ بسیار بیماری‌زای A281 هستند برای تراریزش غلات بسیار مناسب گزارش شده‌اند (Raineri *et al.*, 1990; Rashid *et al.*, 1996)، ولی در مورد پنبه، مقایسهٔ سویه‌های LBA4404 و EHA105 نشان داد که کارایی تراریزش با LBA4404 در تمامی ژنوتیپ‌های مورد آزمایش پنبه بیشتر بوده است (Sunilkumar and Rathore 2001). علاوه بر این، وقتی از سویهٔ 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 القاءکنندهٔ ژن‌های *vir* که برای تراریزش به واسطهٔ اگروباکتریوم ضروری هستند را تولید می‌نماید. اما نتایج آزمایش ها مختلف نشان داده است 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 استفادهٔ 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 پنبهٔ تراریخته، باززایی می‌باشد. محدودیت باززایی به زنده ماندن لاین کشت شده و مدت زمانی که طول می‌کشد تا به کالوسِ جنین‌زا تبدیل شود، مرتبط است. Sunilkumar و Rathore (2001) نشان دادند که فقط یک دورهٔ 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 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 ازکالوس‌های 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

چندان به ژنوتیپ وابسته نمی‌باشد و مدت زمان باززایی را کاهش می‌دهد مناسب به نظر می رسد. 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 راه‌حل‌هایی نیز به‌دست 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 استانداردی برای ارزیابی نواحی کناری احاطه‌کنندهٔ 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 (≥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 چندگانهٔ ژن که یا به صورت ادغام‌شدن پی‌درپی و یا به صورت نسخه‌های پراکنده در محل‌های تصادفی از ژنوم میزبان ادغام می‌گردد، احتمال ایجاد اثرات ثانویهٔ 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 تراریختهٔ 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 نوترتیبی[1] باشد که با بروز آن تداخل نداشته باشد (3) هیچ گونه DNA کناری خارج از ناحیهٔ T-DNA به آن منتقل نشده باشد (4) برای برطرف نمودن اثر مکانی، تعداد کافی از گیاهان غربال می شوند 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

[1] Rearrengment

تا این روش را ساده‌تر و مؤثرتر نمایند. تـا تعـداد ژنوتیپ‌های بیشتر، به خصوص واریته‌های برتر را تراریختـه نماینـد. در بهتـرین مـوارد، بهـره‌وری صـنعتی بـرای غربـال‌سـازی لایـن‌هـای پیـشرفتهٔ ژرم‌پلاسم سازگار با محل، جداسـازی لایـن‌هـای باززاشونده است، هر چند که امروزه فرصت‌هـای سرمایه گذاری برای اینگونه فعالیت‌های کـاربردی تقریبـاً موجـود نیـست. بـرای ایجـاد یـک روش تراریختی مستقل از ژنوتیپ در پنبـه پـژوهش هـا بیـشتری لازم اسـت تـا بـه افـزایش تقاضـا بـرای دستیابی سریع به ارقـامی بهبودیافتـه بـرای تولیـد 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 *Agrobacterrium 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 for- mation 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 quantitive 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.

Kornyeyev 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.

Kornyeyev 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.

Kornyeyev 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, Kornyeyev 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 (+)- δ-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, Padgette 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, Kornyeyev 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 *Agrobactrium 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 invbestigation of β-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*– mudiated transformation by increasing *vir* gene induc- tion .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 *α*-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: factores influencing *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration. Moleular 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*mediatedtransformation of cotton (*Gossypium hirsutum*) using a synthetic*cry1Ab* gene for enhanced resistance against Heliothis armigera. IranianJournal 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 (+)-δ-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 GF14λ 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 *cry1Ab* 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.[*1], Mohsenpour M.[2]

[1] Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII)
[2] 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