مجله علوم گیاهان زراعی ایران
دوره ۳۹، شماره ۱، ۱۳۸۷ (۷۵-۶۷)

تراریزش ژن گزارشگر gus به پنبه و مطالعه وراثت و بیان آن در نسل دوم پنبه تراریخته

مسعود توحیدفر*[1]، لیلا رمضان‌پور[2] و ریحانه گلابچیان[3]
۱، ۲، ۳، عضو هیات علمی و کارشناسان، پژوهشکده بیوتکنولوژی کرج
(تاریخ دریافت: ۸۴/۷/۲۳ - تاریخ تصویب: ۸۶/۷/۱۸)

چکیده

تولید گیاهچه تراریخته پنبه (*Gossypium hirsutum* L.) با واسطه اگروباکتریوم سویه LBA4404 و پلاسمید pBI121 حاوی ژن گزارشگر *gus* و ژن نشانگر انتخابی *nptII* به ترتیب با پیشبرهای CaMV35S و NOS بررسی شد. پنبه‌هایی که بوسیله ژن *gus* تراریخته شده بودند و بیان ژن مذکور در بافت‌های مختلف (الیاف و دانه گرده) به اثبات رسیده بود از نظر وراثت ژن مذکور در نسل دوم (T1) با استفاده از روش‌های محیط کشت انتخاب، PCR و رنگ‌آمیزی GUS مورد بررسی قرار گرفتند. نمونه های بذری لاین های تراریخته (T1) به همراه بذر های غیر تراریخته به عنوان شاهد، استفاده شدند. آزمون مجذور کای نشان داد که تفرق ژن *gus* در لاین‌های A3، A4 و A7 در نسل دوم (T1) با نسبت مندلی ۳:۱ مطابقت دارد. به منظور بررسی حضور ژن *nptII* در نسل دوم (T1) تکثیر PCR انجام شد که حضور ژن در تمامی لاین‌های تراریخته (+gus) مورد بررسی به استثنای یک لاین مورد تایید قرار گرفت. نتایج حاصله حاکی از پایداری ژن در نسل دوم پنبه تراریخته بود.

واژه‌های کلیدی: اگروباکتریوم، پنبه، وراثت، ژن *gus*، تراریزش

مقدمه

پنبه به دلیل ارزش اقتصادی و از لحاظ کمیت و کیفیت به عنوان یکی از مهمترین گیاهان لیفی و روغنی در سطح جهان مطرح می‌باشد. پنبه از گیاهان صنعتی و الیافی بسیار مهم بوده و از نظر تولید روغن دومین رتبه را در بین دانه های روغنی به خود اختصاص داده است (۱۵). محصول پنبه صنعت چند صد میلیارد دلاری محسوب شده و امرار معاش بیشتر از صدو هشتاد میلیون نفر در دنیا وابسته به آن می باشد(۱۵).

با وجود تولید ارقام مطلوب پنبه توسط اصلاح نباتات کلاسیک، اصلاح ژنتیکی آن به دلیل فقدان تنوع در ژرم پلاسم، طولانی بودن زمان اصلاح و کمی بودن صفات مقاومت به بیماریها محدود شده است. بیوتکنولوژی پنبه به ویژه پنبه تراریخته قادر به افزایش تولید، حفظ تنوع زیست ژنتیکی، استفاده بهینه از نهاده های کشاورزی، افزایش پایداری تولید با کاهش صدمات سالهای خشکسالی به علت تنشهای زنده و غیر زنده و پیشرفت های اقتصادی واجتماعی و کاهش فقر مفرط در کشورهای در حال توسعه می باشد(۱۰، ۲۰).

پیشرفت در زمینه بیوتکنولوژی پنبه وابستگی شدیدی به نوآوری و ایجاد روش های موثر انتقال ژن و باززایی دارد. استفاده از مهندسی ژنتیک در کنار روش‌های کلاسیک امری ضروری و غیر قابل اجتناب است. قبل از انتقال ژن یا

* نویسنده مسئول:مسعود توحیدفر تلفن: ۰۲۶۱-۲۷۰۴۵۳۹ E-mail:gtohidfar@yahoo.com

ژن‌های مطلوب به گیاهان مورد نظر ابتدا باید روش انتقال ژن را بهینه نمود. به همین منظور معمولاً از ژن‌هایی تحت عنوان نشانگر قابل انتخاب و ژن‌های گزارشگر استفاده می‌شود. در هنگام انتقال ژن، تعدادی از سلولها دی.ان.آی خارجی را دریافت می‌کنند و بقیه غیر تراریخته باقی می‌مانند. بنابراین وجود یک نشانگر قابل انتخاب همراه با ژن مورد نظر جهت شناسایی و انتخاب سلول‌های تراریخته، ضروری و اجتناب‌ناپذیر می‌باشد. نشانگرهای قابل انتخاب در حقیقت ژنهایی هستند که با رمز نمودن یک پروتئین خاص سبب مقاومت سلول دریافت کننده آنها نسبت به یک ماده خاص می‌شوند. بیشترین نشانگرهایی که در تراریزش گیاهان از آنها استفاده شده است، نشانگرهایی بوده‌اند که سبب مقاومت به یک آنتی‌بیوتیک خاص می‌شوند (۵) و پس از تراریزش، سلولهای دریافت کننده ژن مقاومت قادر به رشد روی محیط آنتی‌بیوتیک خواهند بود، در صورتی که سلولهای غیرتراریخته از بین می روند. ژن‌های نشانگر قابل انتخاب معمولاً با یک ژن دیگر جهت مشخص نمودن سلولهای تراریخته حاوی ژن اصلی از سلولهای غیرتراریخته مورد استفاده قرار می‌گیرد. ژن اصلی ممکن است یک ژن مقاومت به بیماری یا ژن مقاومت به حشرات و یا ژن‌های رمز کننده سایر صفات زراعی مطلوب باشد(۲).

علاوه بر نشانگرهای قابل انتخاب، دسته‌ای دیگر از ژن‌ها تحت عنوان ژن‌های گزارشگر نیز وجود دارند که بدلیل بیان سریع آنها جهت بهینه‌سازی پروتکل‌های تراریزش و برخی کاربردهای دیگر مورد استفاده قرار می‌گیرند. این ژن‌ها در حقیقت رمز کننده آنزیم‌هایی هستند که در اثر فعالیت این آنزیم‌ها در سلولهای تراریخته یک اثر قابل رویت تظاهر می‌کنند. یکی از این ژنهای گزارشگر، ژن باکتریایی*uid* می‌باشد که آنزیم بتاگلوکورونیداز را رمز می‌کند و تاکنون بطور گسترده‌ای به عنوان یک ژن گزارشگر مورد استفاده قرار گرفته است (۱۸،۱۱، ۲۵).

سونگ و همکاران (۲۱) به منظور بررسی آنالیز دونوع پیشبر (Gh-rbcs و Gh-sp) در پنبه از ژن گزارشگر *gus* استفاده کردند، آنها ثابت نمودند محل تظاهر پیشبر های Gh-sp و Gh-rbcs به ترتیب در بذر و قسمت های سبز گیاه می باشد. زاپاتا و همکاران (۲۵) با استفاده از وکتور pBI121 حاوی ژن گزارشگر *gus* و نشانگر انتخابی *nptII* توانستند سیستم انتقال ژن را در پنبه با استفاده از مریستم بهینه کنند.

به منظور بهینه کردن انتقال ژن از طریق جنین تخم در پنبه محققین از ژن گزارشگر *gus* استفاده کردند(۳).

محققین از طریق ترکیب ژن گزارشگر *gus* با پیشبر GhTUB1 در پنبه مشخص نمودند که میزان تظاهر ژن GhTUB1 در الیاف پنبه زیاد و در تخمک کم می باشد(۱۴).

دست‌ورزی‌های ژنتیک در پنبه با اهداف مقاومت به حشرات، بیماری‌های قارچی، مقاومت به علف‌کش و تغییر کیفیت الیاف از طریق به کارگیری تفنگ ژنی یا با استفاده از اگروباکتریوم صورت گرفت است (۸، ۱۷ ، ۲۳، ۲۴). در میان روش‌های انتقال ژن استفاده از اگروباکتریوم در گیاهان دو لپه‌ای معمول‌تر است. تاکنون از ریزنمونه محور زیر لپه و مریستم برای تهیه گیاهان تراریخته پنبه از طریق آلودگی با اگروباکتریوم استفاده شده است (۷،۲۳، ۲۴، ۲۵).

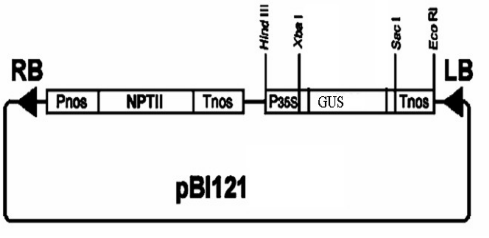
این پژوهش به منظور بهینه سازی سیستم انتقال ژن در پنبه با استفاده از آگروباکتریوم و ژن *gus* و بررسی وراثت آن در نسل دوم انجام شد. تا پس از تهیه پروتکل بتوان برای ژنوتیپ های ایرانی استفاده کرد.

مواد و روش‌ها

برای انتقال ژن، از اگروباکتریوم سویه‌ی غیر بیماریزای LBA4404 و پلاسمید pBI121 حاوی ژن *gus* به عنوان ژن گزارشگر با پیشبرCaMV35S و ژن *nptII* با پیشبر Nos به عنوان گزینشگر (شکل ۱) استفاده شد. ابتدا ریز نمونه‌های محور زیر لپه گیاهچه‌های ۷ روزه رقم ساحل و کوکر ۳۱۲ در محلول باکتری با OD_{600}=۰/۷-۰/۸ به مدت ۵ ثانیه غوطه‌ور گردید (۲۴). پس از خشک کردن با استفاده از کاغذ صافی، هم کشتی نمونه‌ها به مدت ۲ روز انجام گرفت سپس ریزنمونه‌ها به محیط کالوس‌زایی همراه با کانامایسین (۵۰mg/1) انتقال داده شدند و تحت شرایط ۱۶ ساعت روشنایی (۲۰۰۰ لوکس) و دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. برای حذف باکتری‌ها از

آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم[1] به میزان ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر استفاده شد. واکشت نمونه ها هر ۱۵ روز یکبار انجام شد. بعداز ۱۰-۸ هفته کالوس‌ها جهت تحریک و تشکیل جنین‌های رویشی به محیط بدون هورمون همراه با نمک‌های MS، ۱/۹ گرم در لیتر KNO_3 و ۰/۷۵ گرم در لیتر $MgCl_2$ همراه با کانامایسین(۵۰ میلی گرم در لیتر) و ویتامین B5 به مدت ۶-۴ هفته منتقل شدند. برای جوانه زدن جنین‌های رویشی از محیط کشت حاوی نمک‌های MS همراه با ویتامین B5، ذغال فعال به میزان ۲ گرم در لیتر و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر زآتین همراه با کانامایسین(۵۰ میلی گرم در لیتر) استفاده شد. در نهایت از محیط MS بدون هورمون به منظور باززایی گیاهچه استفاده شد (۲۵). در تمام محیط ها از فیتاژل به میزان ۲/۵ گرم در لیتر و گلوگز به میزان ۳۰ گرم در لیتر استفاده شد.

آزمایش هیستوشیمیایی GUS (۱۱) برای دانه گرده و الیاف گیاهان تراریخته انجام گرفت. به منظور اثبات وجود ژن از تکثیر واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR)



شکل ۱- نقشه فیزیکی T- DNA پلاسمید pBI121

استفاده گردید. ابتدا با توجه به توالی نوکلئوتیدی ژن *gus* و *nptII* با استفاده از برنامه‌های نرم‌افزاری Oligo چهار آغازگر اختصاصی برای دو انتهای' ۵ و '۳ طراحی گردید. توالی آغازگر های طراحی شده به قرار زیر می باشد.

GUS 3'-ACGTCCTGTAGAGAAACCCCAA-5' رو به جلو

GUS 5'-CCCGCTTCGAAACCAATGCC-3' رو به عقب

NPTII 3'-GAACAAGATGGATTGCACGC-5' رو به جلو

NPTII 5'-GAAGAACTCGTCAAGAAGGC-3' رو به عقب

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در حجم ۲۵ میکرولیتری حاوی یک واحد آنزیم Taq پلیمراز، ۲۵ نانوگرم DNA، ۶۰ نانوگرم از هریک آغازگر، ۲/۵ میکرولیتر dNTP (یک میلی مولار)، ۳/۳ میکرولیتر $MgCl_2$ (۱۵میلی مولار)، ۲/۵ میکرولیتر بافرX ۱۰انجام گرفت. واکنش در ۹۳ درجه سانتی‌گراد ۲ دقیقه و ۴۰ چرخه (هر چرخه شامل یک دقیقه در ۹۴ درجه، یک دقیقه در ۵۵ درجه و سه دقیقه در ۷۲ درجه سانتیگراد) و تکمیل بسط در ۷۲ درجه ۵ دقیقه انجام گرفت. محصول PCR روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز و پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بوسیله دوربین پولاروید عکس‌برداری گردید.

به منظور بررسی وراثت ژن منتقل شده *gus* در نسل دوم، بذور جمع‌آوری شده از نسل T_0که کار انتقال ژن به آنها با روش اگروباکتریوم صورت گرفته بود مورد استفاده قرار گرفت. هشت لاین بذری جمع‌آوری شده از گیاهان تراریخته نسل اول (T_1)که هر کدام شامل ۸ عدد بذر بودند به همراه یک توده بذری شاهد لاین‌های آزمایشی را تشکیل دادند. در این طرح به همراه ژن اصلی یک ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک کانامایسین نیز به عنوان نشانگر به گیاهان تراریخته منتقل شد. برای این منظور ابتدا بذور تراریخته همراه با گیاه شاهد به مدت ۳ دقیقه در محلول ۰/۱ درصد (حجم به حجم) کلرید جیوه ضد عفونی شدند. سپس بذور سه مرتبه با آب مقطر استریل شستشو و به مدت ۱۰ ثانیه در الکل ۹۰ درصد (حجم به حجم) ضدعفونی شدند. پس از شستشو با آب مقطر استریل، بوسیله کاغذ صافی استریل، خشک ودر محیط کشت جوانه‌زنی قرار گرفتند. محیط کشت جوانه‌زنی شامل محیط ساده MS (نمک‌های ماکرو، میکرو و آهن) ساکارز۳۰ گرم در لیتر همراه با ۸ درصد (وزن به حجم) آگار (شرکت سیگما) با pH=8 بود. یک عدد بذر در هر لوله آزمایش کشت شد، سپس لوله‌های آزمایش به اطاقک رشد با دمای ۲۸ درجه سانتیگراد و دوره نوری ۱۶ ساعت با شدت نوری ۷۵۰ لوکس و ۸ ساعت تاریکی منتقل شدند.

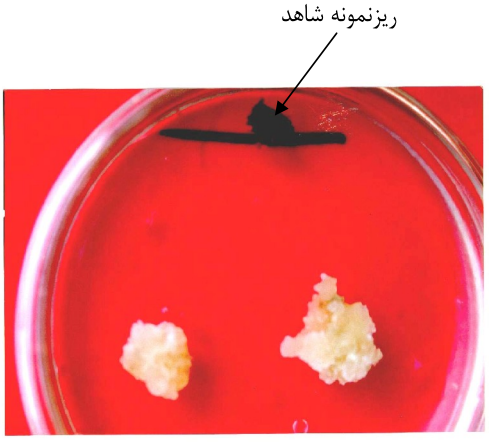
آزمایش هیستو شیمیایی GUS برای پنبه تراریخته نسل دوم که در محیط کشت انتخابی سبز مانده بودند انجام گرفت. در نهایت داده‌های حاصله جمع‌آوری شده با استفاده از آزمون χ^2مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

1. Cefotaxime

نتایج

انتخاب کالوس‌های تراریخته و باززایی آنها

بدلیل وجود کانامایسین پس از ۸ هفته ریز نمونه‌های غیر تراریخته قهوه‌ای شده و از بین رفتند، تنها کالوس‌های تراریخته قادر به ادامه حیات شدند (شکل ۲).



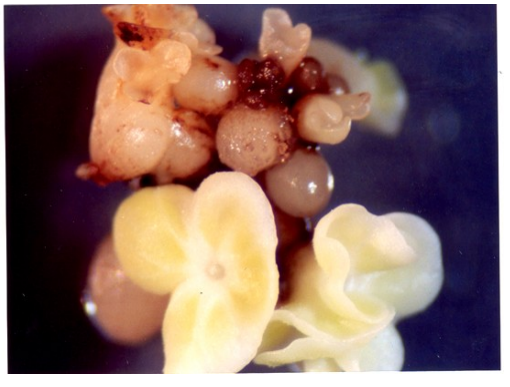
شکل ۲- رشد ریز نمونه‌های شاهد پنبه و کالوس‌های تراریخته فرضی در محیط انتخابی

کالوس‌های تراریخته فرضی به محیط کشت انتخابی جهت جنین‌زایی و جوانه‌زنی رویشی انتقال یافتند. کالوس‌های گرانوله، کرم رنگ و شکننده جنین‌های سوماتیکی تولید کردند. این جنین‌ها از نظر شکل و اندازه با هم فرق داشتند. از هر قطعه کالوس رقم کوکر چندین جنین سوماتیکی که حاوی دو کوتیلدون بودند حاصل شد. این امر را می‌توان به قدرت خوب باززایی رقم کوکر ۳۱۲ و کیفیت کالوس‌های انتخاب شده نسبت داد (۲). در رقم ساحل جنین‌زایی سوماتیکی مشاهده نشد، لذا باززایی هم در آن صورت نگرفت.

جوانه‌زنی جنین‌های رویشی در رقم کوکر با تشکیل ریشه‌هایی به طول دو میلی‌متر یا ساقه‌های بیش از سه میلی‌متر آغاز شد. طویل شدن برگچه‌ها یا قبل از آغاز ریشه‌دهی یا همراه با ریشه‌دهی بود. جنین‌های رویشی پس از جوانه‌زنی به محیط باززایی منتقل شدند (شکل ۳و ۴). تعدادی از گیاهچه‌های مقاوم به کانامایسین با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *nptII* برای تایید وجود ژن منتقل شده بررسی شدند. شکل ۵ الگوی باندی گیاه رشد کرده روی محیط حاوی کانامایسین و شاهد را براساس آغازگرهای ژن *nptII* نشان می‌دهد. عدم وجود باند در شاهد نشان دهنده عدم وجود آلودگی در واکنش PCR می‌باشد. وجود باند ۷۸۵ جفت بازی مربوط به ژن *nptII* نشان دهنده این مطلب است که گیاهان تراریخته احتمالی در مقایسه با شاهد حداقل یک نسخه از ژن *nptII* را دارا می‌باشند.

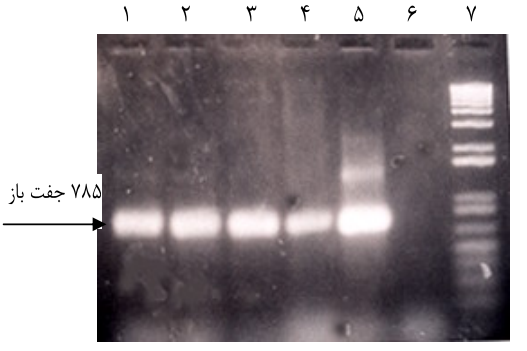
رنگ‌آمیزی بافت برای ارزیابی بیان ژن بتاگلوکورونیداز و واکنش زنجیره‌ای پلمیراز گیاهان تراریخته احتمالی

علاوه بر ارزیابی مقاومت به کانامایسین، آزمون هیستوشیمیایی برای بیان ژن *gus* نیز روی دانه گرده و الیاف گیاهان تراریخته فرضی انجام شد (شکل ۶). تظاهر ژن *gus* در بافت‌های مختلف پنبه تراریخته بیانگر انتقال موفقیت‌آمیز ژن *gus* بود.



شکل ۳- رشد جنین‌های سوماتیکی رقم کوکر در محیط انتخابی

شکل ۴- پنبه‌های باززایی شده تراریخته رقم کوکر



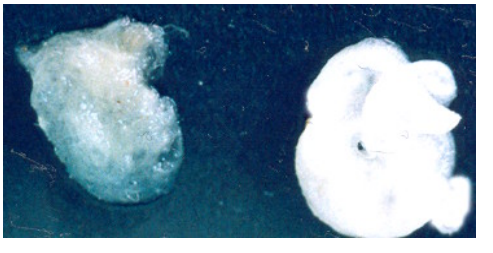
شکل ۵- آنالیز PCR برگ‌های پنبه تراریخته نسل اول رقم کوکر با استفاده از آغازگرهای اختصاصی برای تکثیر قطعه ۷۸۵ جفت بازی ژن *nptII* در ژل آگاروز

۴-۱- DNA لاین‌های تراریخته پنبه

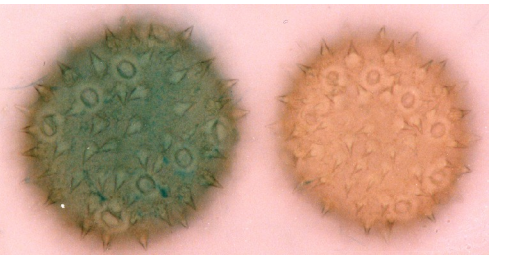
۵- DNA پلاسمید pBI121

۶- DNA پنبه غیر تراریخته

۷- نشانگر مولکولی تعیین اندازه DNA



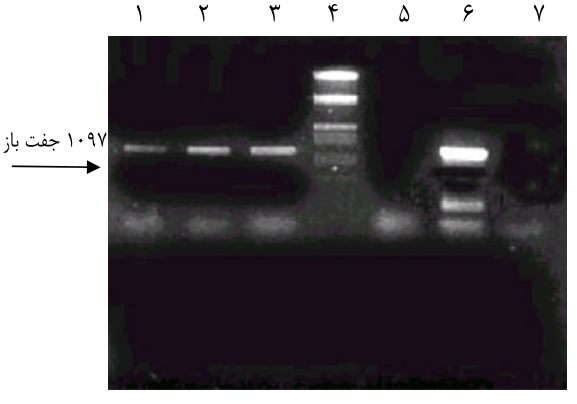
الف- تظاهر ژن *gus* در الیاف پنبه تراریخته (سمت چپ) شاهد (سمت راست)



ب- تظاهر ژن *gus* در دانه گرده پنبه تراریخته (سمت چپ) شاهد (سمت راست)

شکل ۶- آزمون هیستوشیمیایی GUS برروی بافت های مختلف پنبه تراریخته

شکل ۷ واکنش زنجیره‌ای پلیمراز گیاهان تراریخته احتمالی رشد کرده روی محیط حاوی کانامایسین را از نظر وجود ژن *gus* همراه با شاهد مربوطه را نشان می‌دهد. در این بررسی نیز عدم وجود باند در شاهد بدون دی.ان.آ دلیل عدم آلودگی در واکنش PCR می‌باشد. وجود باند ۱۰۹۷ جفت بازی مربوط به ژن *gus*نشان دهنده این مطلب است که گیاهان تراریخته احتمالی در مقایسه با شاهد حداقل یک نسخه از ژن *gus* را دارا هستند.



شکل ۷- آنالیز PCR برگ‌های پنبه تراریخته نسل اول با استفاده از آغازگرهای اختصاصی برای تکثیر ۱۰۹۷ جفت بازی ژن *gus*در ژل آگاروز

۳-۱- DNA لاین‌های تراریخته

۴- نشانگر مولکولی تعیین اندازه DNA

۵- DNA پنبه غیر تراریخته

۶- DNA پلاسمید pBI121

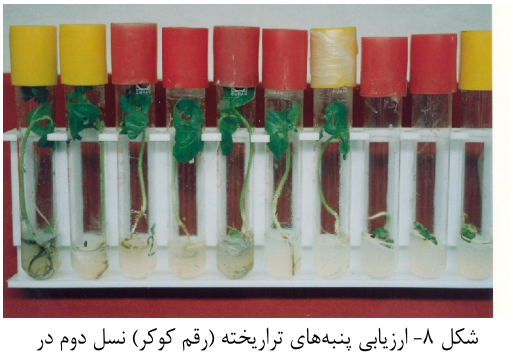
۷- مخلوط مادری بدون الگو DNA

بررسی پایداری ژن منتقل شده *gus* در نسل دوم (T_1)

بذور جمع‌آوری شده از نسل T_0 که بیان ژن *gus* در بافت‌های مختلف آن به اثبات رسیده جهت کشت به محیط انتخابی حاوی کانامایسین (۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر) منتقل شدند. بدلیل وجود کانامایسین پس از ۱۰ روز گیاهان شاهد در مقایسه با گیاهان تراریخته از رشد ضعیفی برخوردار بودند (شکل ۸). آزمون هیستوشیمیایی برای ژن *gus* نیز روی گیاهان نسل دوم انجام شد تفکیک ژن *gus* نیز در افراد نسل دوم مشاهده شد (شکل ۹). نتایج حاصل از تفکیک ژن *gus* در افراد نسل دوم در جدول ۱ نشان داده شده است.

جدول ۱- بررسی تفکیک ژن *gus* در نسل دوم پنبه تراریخته

لاین	GUS^+	GUS^-
A1	4	4
A2	4	3
A3	5	2
A4	6	2
A5	8	0
A6	4	4
A7	5	2
A8	5	3



شکل ۸- ارزیابی پنبه‌های تراریخته (رقم کوکر) نسل دوم در محیط انتخابی کانامایسین‌دار

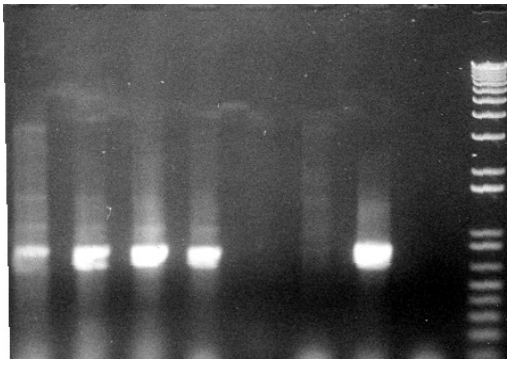
۷-۱- پنبه‌های تراریخته ۱۰-۸- پنبه‌های شاهد

شکل ۹- ارزیابی پنبه‌های تراریخته (رقم کوکر) نسل دوم از نظر تفکیک بیان ژن *gus*

با در نظر گرفتن نسبت‌های مندلی و با توجه به نتایج حاصل از جدول ۱ می‌توان چنین استنباط کرد که احتمالاً لاین‌های A4،A3 و A7 داری دو کپی از ژن *gus* بوده‌اند و لاین‌های A1 و A6 اگرچه از نسبت‌های مندلی پیروی نکرده‌اند لیکن دارای ژن مذکور بوده‌اند.

از طرفی با توجه به نتایج آزمایش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (شکل ۱۰) حضور ژن *nptII* در تمامی لاین‌های تراریخته (gus^+) به استثناء تیمار تراریخته شماره ۸ به اثبات رسیده است. بنابراین درمورد لاین ۸ که از نظر رنگ‌آمیزی GUS مثبت بوده است این احتمال وجود دارد، که در خلال انتقال ژن، ژن مقاومت به کانامایسین به دلایلی منتقل نشده است (در این صورت اگر گیاه فوق بیشتر از ۳۰ روز در محیط انتخابی می‌ماند شاید قادر به ادامه حیات نبود). عدم وجود نوار (۷۸۵ جفت بازی) در شاهد بدون دی.ان.آی نشان می‌دهد هیچ گونه آلودگی در کار نبوده است. این نتایج، بررسی پایداری ژن‌های *gus* و *nptII* را تسهیل می‌کند. از طرفی حضور و ثبات ژن‌های *gus* و *nptII* در نسل دوم گیاه تراریخته را به اثبات می‌رساند.

۱ ۲ ۳ ۴ ۵ ۶ ۷ ۸ ۹



شکل ۱۰- آنالیز PCR برگ‌های پنبه تراریخته نسل دوم با استفاده از آغازگرهای اختصاصی برای تکثیر قطعه ۷۸۵ جفت بازی ژن *nptII* در ژل آگاروز

۴-۱- DNA لاین‌های تراریخته

۵- DNA لاین ۸ تراریخته

۶- DNA پنبه غیر تراریخته

۷- DNA پلاسمید pBI121

۸- DNA مخلوط مادری بدون الگو DNA

۹- نشانگر مولکولی تعیین اندازه DNA

بحث

در پنبه، ژنوتیپ نقش بسیار مهمی در جنین‌زایی و باززایی دارد (۱۶). به عنوان مثال در مطالعه‌ای که بر روی ژنوتیپ های پنبه در ایران صورت گرفت تولید جنین‌های سوماتیک و باززایی در رقم کوکر سریعتر و با فراوانی بالایی

گزارش گردیده است (۲). گزارش‌های مشابهی در مورد اثر ژنوتیپ در تولید کالوس‌های جنین‌زا و باززایی توسط محققین گزارش گردیده است (۱۶،۹). در مطالعه‌ای بر روی پنبه‌های هندی و نتایج آنها مشخص شد که ارقام کوکر بالاترین درصد باززایی را دارند (۱۳). کیفیت کالوس مانند رنگ بافت و تردی نقش عمده ای در باززایی پنبه توسط جنین زایی سوماتیکی دارند (۱۵). به نظر می رسد انتقال کالوس ها از محیط دارای 2,4-D به محیط کشت فاقد آن باعث تحریک جنین زایی شود و استفاده از نیترات پتاسیم درصد جنین زایی را افزایش می دهد. در این مطالعه زآتین جهت تحریک جوانه زنی سوماتیکی موثر واقع شد ژانگ و همکاران (۲۶) نیز به نتیجه مشابهی دست یافته اند. مواد فنولی که در محیط کشت جنین زایی تولید شد می توانست مانع جدی در باززایی باشد. مشکل مزبور با واکشتهای زیاد با فاصله زمانی کم به ویژه با افزودن زغال فعال حل شد. از فیتاژل و گلوکز نیز برای رفع این مشکل استفاده گردید.

لذا روش‌های انتقال ژن در گذشته تنها برای برخی از ژنوتیپ‌ها (کوکر) موفقیت‌آمیز بوده است (۵، ۱۸، ۲۳) ایجاد سیستم انتقال ژن مریستم بواسطه اگروباکتریوم در سال‌های اخیر امکان هر نوع تغییر در ژنوتیپ را بدون وابستگی به نوع ژنوتیپ را فراهم کرده است (۲۵).

انتخاب سویه‌ی مناسب اگروباکتریوم در تراریزش گیاه، نقش مهمی ایفا می‌کند، بطوریکه ناقل دوگانه‌ی pBI121 با سویه‌ی LBA4404 در مقایسه با سویه‌ی EHA105 در تراریزش گیاهان دو لپه، مناسب‌تر گزارش شده است (۱۲،۶).

مقایسه‌ی سویه‌های EHA105 و LBA4404 در تراریزش چهار ژنوتیپ پنبه نشان داد که بیشترین تراریزش مربوط به سویه‌ی LBA4404 بوده است (۲۲) آزمایش‌های رشید و همکاران (۱۹) و دیگر محققین (۱۲) نشان داد که سویه‌های EHA101 و EHA105 در تراریزش گیاهان تک لپه کارایی بیشتری داشتند.

تعدادی از جنین‌های سوماتیکی در محیط دارای کانامایسین سبز باقی ماندند ولی تعداد کمی از آنها تراریخته بودند. مقاومت این گونه رویانها ممکن است بخاطرتطابق یافتن آنها با محیط و یا سم زدایی کانامایسین توسط رویانهای تراریخته محیط بوده که اجازه داده تا رویانهای غیرتراریخته رشد نمایند(۱۲). این امر نشان می‌دهد که تراریزش پایدار در تعداد کمی صورت گرفته است. تبدیل جنین‌های سوماتیکی به گیاهچه مرحله نهایی این آزمایش بود. مشاهدات نشان داد که جنین‌های تولید شده پس از قرار گرفتن در محیط بدون هورمون تولید ساقه و ریشه کردند. در رقم ساحل هیچ گونه باززایی مشاهده نشده که نشان می‌دهد باززایی در پنبه وابسته به ژنوتیپ است. از آنجا که تراریزش در برخی از جنین‌های جوانه‌زده مشاهده گردیده می‌توان امیدوار بود که با همین روش (اگروباکتریوم) و نیز استفاده از سویه‌های دیگر اگروباکتریوم که بافت پنبه نسبت به آنها مستعدتر باشد بتوان گیاه پنبه تراریخته بدست آورد.

بطور کلی، اصلاح پنبه با استفاده از کشت بافت جهت دستکاری ژنتیکی، به سهولت باززایی بستگی دارد و سهولت باززایی تحت تاثیر ژنوتیپ می‌باشد، واغلب ژنوتیپ‌ها ی مهم ایران دارای پتانسیل باززایی پائینی هستند(۲)، جهت برطرف کردن این ضعف می توان از انتقال صفت جنین‌زایی سوماتیکی به ارقام زراعی ایرانی استفاده کرد. بنابراین افزایش ژنتیکی پتانسیل باززایی ارقام پنبه ایرانی همراه با بهینه کردن روش‌های انتقال ژن جهت استفاده معمول این روش در اصلاح پنبه ضروری بوده و پیشنهاد می‌گردد که در اولویت‌های تحقیقاتی آینده این گیاه قرار بگیرد. از آنجائیکه اغلب ژنو تیپ‌های زراعی پنبه پتانسیل باززایی پائینی دارند و دستکاری‌های ژنتیکی درآنها مشکل می باشد، بهینه سازی باززایی از طریق کشت مریستم که وابسته به ژنوتیپ نمی باشد و مدت زمان باززایی را کاهش می دهد مناسب به نظر می‌رسد

سپاسگزاری

از موسسه تحقیقات پنبه کشور بخاطر در اختیار گذاردن بذور مورد نیاز، جناب آقای دکتر محمدی از دانشکده کشاورزی کرج و جناب آقای دکتر ملبوبی از مرکز ملی مهندسی ژنتیک بخاطر در اختیار گذاردن پلاسمید سپاسگزاری می‌شود.

REFERENCES

1. Banerjee, A. K., D.C. Agrawal, S.M. Nalawade & K.V.Krishnamurthy.2002. Transient expression of Glucuronidase in embryo axes of cotton by *Agrobacterium* and particle bombardment. Biologia Plantarum 45(3): 359-365
2. Banerjee, A.K., D.C. Agrawal, S.M. Nalawade, S. Hazra, & K.V. Krishnamurthy. 2003. Multiple shoot induction and plant regeneration from embryo axes of six cultivars of *Gossypium hirsitum*. Biologia Plantarum 47(3):433-436
3. Brasileiro, A.C.M., & Aragao, F. J. L. Aragao. 2001. Marker genes for in vitro selection of transgenic plants. Plant Biotechnology 3(3): 113-121
4. Donaldson, P. A & D. H. Simmonds. 2000. Susceptibility to Agrobacterium tumefaciens and cotyledonary node transformation in short-season soybean. Plant Cell Rep 19: 478-484
5. Ellis, M. H., A. A Millar, D. J. Llewelly, W. Jammes Peacock, & E. S. Dennis. 2000. Transgenic cotton (*Gossypium hirsutum*) over-expressing alcohol dehydrogenase shows increased ethanol fermentation but no increase in tolerance to oxygen deficiency, Aust. J. Plant Physiol 27(2). 1041-1050
6. Guo .X., C. Huang, S. Jin, S.Liang, Y. Nie & X. Zhang, 2007. *Agrobacterium-mediated* transformation of Cry1C, Cry2A and Cry9C genes into *Gossypium hirsitum* and plant regeneration. Biologica Planetarium 51(2): 242-248
7. Haq, I., & Y. Zafar. 2004. High frequency of callus induction. Its proliferation and somatic embryogenesis in cotton (*Gossypium hirsutum*). J. Plant Biotechnology 6(1):55-61
8. James, C.2006. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops. International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications, Ithaca, New York, USA. briefs 35.
9. Jefferson, R. A. 1987. Assaying chimeric genes in plants: the *gus* gene fusion system. Plant Mol Biol Rep 5: 387-405
10. Jin, S., X. Zhang, S. Liang & Y. Nie. 2005. Factors affecting transformation efficiency of embryogenic callus of upland cotton (*Gossypium hirsutum*) with *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 81(2):229-237
11. Khumar, S. P., Sharma, & D. Penter. 1998. A genetic approach to in vitro regeneration of non-regeneration cotton (*Gossypium hirsutum* L) cultivars. Plant Cell Reports 18: 59-63
12. Li, X. B., L. Cai, N. H Cheng & J.W. Liu. 2002**.** Molecular characterization of the cotton GhTUB1 gene that is preferentially expressed in fiber. Plant Physiol 130(2): 666-674
13. Mishra, R., H. U. Wang, N. R. Yadav & T. A. Wu. 2003. Development of a highly regeneration elite Acala cotton (*Gossypium hirsutum* cv. Maxa)–a step towards genotype-independent regeneration. Plant Cell Tiss. Org.Cult 73(1): 21-35
14. Norma, L. N. L. Trolinder & C. Xhlxlan. 1989. Genotype specify of the somatic embryogenesis respone in cotton. Plant Cell Reports 8 : 133-136
15. Rajasekaran, K. J., W. Grula, R. L. Hudspeth, S. Pofelis & D. M. Anderson.1996. Herbicide-resistant Acala and Coker cotton transformed with a native gene encoding mutant forms of acetohydroxyacis synthase. Molecular Breeding 2: 307-319
16. Rajasekaran, K. R., L. Hudspeth, J. W. Cary, D. M. Anderson & T. E. Cleveland, 2000. High frequency stable transformation of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) by particle bombardment of embryogenic cell suspension cultures, Plant Cell Reports, 19(4): 534-545.
17. Rashid, H., S. Yokoi, K. Toriyama & K. Hinata. 1996. Transgenic plant production mediated by *Agrobacterium* indica rice. Plant Cell Reporter 15: 727-730.
18. Tohidfar. M. & M. Kaviyani. 2005. Marker genes for invitro selection of transgenic plants. Modern Genetic. 5: 23-28.
19. Tohidfar, M., C. Abdimishani, M. Mohammadi, & B. Ghariyazie. 2000. Effects of genotype and growth medium on callus formation and regeneration of cotton seed and plant. 17: 376-385.
20. Satyavathi, V. V., V. Prasad, B. G. Lakshmi & G. S. Lakshmi. 2002. High effeciency transformation protocol for three Indian cotton varieties via *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Sci 162(2): 215-223.

21. Song, P.H., J. L. Heinen, T.H. Burns & R. D. Allen. 2000. Expression of two tissue-specific promoters in transgenic cotton plants. The Journal of Cotton Science 4(2): 217-223.
22. Sunikumar, G. & K. Ratore. 2001. Transgenic cotton: factors influencing *Agrobacterium-mediated* transformation and regeneration. Molecular Breeding 8(1): 7-52.
23. Tohidfar, M., M. Mohammadi, & B. Ghareyazie. 2005. *Agrobacterium-mediated* transformation of cotton (*Gossypium hirsitum*) using a heterologous bean chitinase gene. Plant Cell Tissue and Organ Culture (1)83: 83-96.
24. Wu, J., X. Luo, H. Guo, J. Xiao & Y.Tian. 2006. Transgenic cotton, expressing amaranthus caudatus agglutinin, confers enhanced resistance to aphids. Plant Breeding. 125(4): 390-394.
25. Zapata, C. S., H. Park, K. El-Zik, & R. H. Smith. 1998. Transformation of a Texas cotton cultivar by using *Agrobacterium* and the shoot apex. Theor Appl. Genet 98(2): (2)252-256.
26. Zhang, B. H., R. Feng, F. Liu, & Q. Wang. 2001. High frerequency somatic embryogenesis and plant regeneration of an elite Chinese cotton variety. Bot. Bull. Acad. Sin 42(3): 9-16.
27. Zhang, B.H., F.Liu, Z. H. Liu, H.M. Wang & C.B. Yao. 2001. Effects of kanamycin on tissue culture and somatic embryogenesis in cotton. Plant Growth Regu 33(2):137-149.