

تراریزش گیاه پنبه (*Gossypium hirsutum* L.) به کمک اگروباکتریوم با استفاده از ژن کیتیناز لوبیا

مسعود نو حید فر^۱، بهزاد قره یاضی^۱ و مجتبی محمدی^۲

^۱ کرج- پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی صندوق پستی ۳۱۵۳۵-۱۸۹۷

gtohidfar@yahoo.com

^۲ دانشکده کشاورزی کرج- گروه گیاهپزشکی ۳۱۵۸۷-۱۱۶۷

(دریافت: ۸۱/۲/۳۰؛ پذیرش: ۸۲/۴/۴)

چکیده

بهینه سازی انتقال ژن کیتیناز (از لوبیا) به پنبه (*Gossypium hirsutum* L.) که باعث مقاومت به بیماری‌های قارچی ورتیسیلیوز و فوزاریوز می‌شود با کمک اگروباکتریوم و پلاسمید pBI121 بررسی شد. به منظور تهیه پلاسمید حاوی ژن کیتیناز (pBI121-BCH)، ابتدا قطعه یک کیلو بازی کیتیناز لوبیا (CHI) درمکان *EcoRI* اپران *lacZ* در ناقل همسانه ساز pGEM-7Zf(+) همسانه مجدد شد. ژن کیتیناز (*chti*) الحاق شده متعاقباً با دو آنزیم برشی *SacI/XbaI* هضم و درمکان همولوگ به وکتور بانبری pBI121 متصل شد. در این حالت، تظاهر ژن (*chti*) تحت کنترل مستقیم پیشبرذاتی 35S ویروس موزاییک گل کلم قرار گرفت. جهت ژن *chti* بر اساس الگوی بدست آمده در اثر هضم دوگانه مورد تأیید واقع شد. قطعات بافت هیپوکوتیل واریته‌های ساحل و کوکر پنبه با سه سویه C58، LBA4404 و EHA101 از *Agrobacterium tumefaciens* تیمار شدند. تمام سویه‌های باکتری دارای پلاسمید Ti و ناقل دوتایی pBI121 حاوی پروموتور CaMV35S و ژن کیتیناز لوبیا بودند. ریزنمونه‌های (محور زیر لپه) تیمار شده با باکتری به مدت ۴۸ ساعت در محیط کشت کالوس‌زایی هم‌کشت شدند. بیشترین درصد کالوس‌ها (۸۷ درصد) و گیاهان مقاوم به کانامایسین (۶۸ درصد) مربوط به سویه LBA4404 بود. تجلی ژن *gus* در برگ رقم کوکر مؤید انتقال ژن بود. واکنش رنجیره‌ای پلیمرز نشان داد که گیاهان فرضی تراریخته در مقایسه با شاهد حداقل یک نسخه از ژن کیتیناز و *nptII* را در ژنوم دارا هستند.

واژه‌های کلیدی: اگروباکتریوم، پنبه (*Gossypium hirsutum* L.)، باززایی، کیتیناز و تراریزش.

مقدمه

بیماری پژمردگی پنبه یا ورتیسیلیوز (*Verticillium dahliae*) یکی از بیماری‌های مهم در مناطق پنبه خیز کشور از قبیل استان‌های گلستان، فارس، خراسان، لرستان، آذربایجان، اصفهان و مرکزی می‌باشد. خسارت زیاد بیماری در مزارع پنبه شهرستان استهبان از استان فارس و مناطق کردکوی و بندرگز از استان گلستان عامل محدود کننده کشت ارقام پرمحصول و حساس به بیماری پژمردگی ورتیسیلیوز می‌باشد. کاهش محصول ناشی از تیپ برگ ریز این بیماری ۲۰-۳۰ درصد و در تیپ غیر برگ ریز، ۵۰-۱۰ درصد برآورد شده است (حمدا...زاده، ۱۳۷۲). در ایران میزان خسارت تیپ SS4، ۲۰-۱۵ درصد برآورد شده است (حمدا...زاده، ۱۳۷۲). ضد عفونی خاک با گاز متیل بروماید یا مخلوط متیل بروماید و کلرو پیکرین به میزان زیاد و عمق زیاد و کشیدن ورقه پلاستیکی پلی اتیلن روی خاک می‌تواند موجب از بین رفتن عامل بیماری شود ولی هزینه این روش بسیار زیاد بوده و اثرات زیانباری نیز روی ارگانسیم‌های خاک در ناحیه ریزوسفر داشته و آلودگی محیط را نیز به همراه دارد. بنا براین، بهترین روش در کنترل پژمردگی ورتیسیلیوزی پنبه، (همانند آفات و بیماری‌های دیگر) استفاده از رقم متحمل یا مقاوم است. استفاده از روش‌های اصلاح نباتات سنتی تنها در سطح تلاقی‌های درون گونه‌ای کارآمد بوده و در استفاده از سایر منابع ژنتیک ناتوان می‌باشد. دستکاری‌های ژنتیک بوسیله انتقال ژن در پنبه به منظور ایجاد مقاومت در مقایسه با اغلب گیاهان پیشرفت نسبتاً زیادی داشته و این به خاطر مستعد بودن این گیاه برای دستکاری‌های ژنتیک می‌باشد. در میان روش‌های انتقال ژن، استفاده از آگروباکتريوم در گیاهان دولپه‌ای مناسب ترین روش است. تاکنون از ریزنمونه محور زیرلپه و مریستم برای تهیه گیاهان تراریخته پنبه از طریق آلودگی با آگروباکتريوم استفاده شده است (Zapata et al., 1998; Umbeck et al., 1987). با توجه به اهمیت اقتصادی پنبه، ایجاد ارقام مقاوم به بیماری‌ها از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است.

آنزیم کیتیناز، از پروتئین‌های مربوط به بیماری‌زایی می‌باشد که پلیمر کیتین را با شکستن پیوندهای بتا-۱و۴ که می‌تواند بصورت داخلی یا خارجی باشد به اولیگومرهای ان - استیل گلوکوز آمین، هیدرولیز می‌کند. کیتین عبارت از یک هموپلیمر خطی از ان استیل - دی گلوکز آمین است که با پیوندهای بتا-۱ و ۴ به هم متصل شده‌اند. کیتین، یکی از اجزای مهم تشکیل دهنده دیواره سلولی قارچ‌هایی از قبیل آسکومیست‌ها، بازیدیومیست‌ها و دئوترومیست‌ها می‌باشد (Coling et al., 1993). یاماماتو و همکاران (Yamamoto et al., 2000) گزارش کردند انگورهای تراریخته حاوی ژن کیتیناز کلاس یک،

مقاومت بالایی به سفیدک سطحی دارند. بروگلی و همکاران (Broglie *et al.*, 1991) توانستند یک ژن اگروکیتینازی حاصل از باکتری *Serratia marcescens* را وارد ژنوم توتون کنند و بعدها مشاهده نمودند که ژن کیتیناز A ناشی از باکتری فوق توانایی ممانعت از رشد چندین قارچ زراعی از جمله *Rizoctonia solani* را دارد. در همین تحقیق گیاهچه‌های توتون تراریخته در خاک آلوده به *R. solani* کاشته شدند. پس از ۱۵ روز ۸۰ درصد گیاهان حامل ژن کیتیناز باقی مانده ولی از گیاهان شاهد ۳۰-۲۰ درصد زنده ماندند.

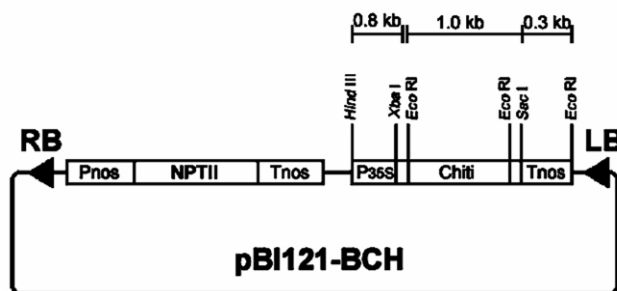
طی آزمایش‌هایی که بر روی بادام زمینی تراریخته حاوی ژن کیتیناز تحت کنترل پیشبر CaMV35S انجام شد مشخص گردیده است که رشد قارچ لکه برگ‌گی (*Cercospora arachidicola*) درمقایسه با شاهد بطور معنی داری کاهش یافته است (Rohin and Shankara, 2001).

این پژوهش به منظور بهینه سازی انتقال ژن‌های گزارشگر *gus* و کیتیناز (مقاومت به ورتیسیلیوز) به پنبه با استفاده از اگروباکتریوم انجام شد.

مواد و روش‌ها:

۱- ساخت پلاسمید pBI121-BCH

به منظور ساخت پلاسمید حاوی ژن کیتیناز (pBI121-BCH) ابتدا پلاسمید حاوی ژن کیتیناز لوبیا (ZENECA MOGEN Lab) با نشانگر انتخابی مقاومت به آمپی‌سیلین و پلاسمید pGEM (-7z) (Cinna Gen p76-07C) حاوی نشانگر انتخابی مقاومت به آمپی‌سیلین و ژن *lacZ'* با *EcoRI* برش داده شدند. به منظور جلوگیری از عمل خود اتصالی، پلاسمید pGEM(-7z) پس از برش دفسفره شد (Sambrook, 1987). قطعه مربوط به ژن کیتیناز و پلاسمید pGEM(-7z) از روی ژل آگارز جدا شد. سپس قطعه جدا شده به پلاسمید pGEM(-7z) متصل شد. پلاسمیدهای نو ترکیب که دارای نشانگر مقاومت به آمپی‌سیلین بودند به باکتری *E. Coli* سویه XLI-Blue (Cinna Gen B76-05C) منتقل شدند. ارزیابی باکتری‌های نو ترکیب از طریق غیرفعال شدن ژن *lacZ'* بود. نو ترکیب‌ها از طریق عدم توانایی سنتز بتاگالاکتوزیداز شناسایی شدند. جهت ژن در نو ترکیب‌ها با استفاده از آنزیم *Sma1* (در ابتدای ژن و محدوده‌ای در پلاسمید) بررسی شد. با استفاده از آنزیم‌های *Sac1/Xba1* ژن کیتیناز از وکتور pGEM (-7z) جدا و در وکتور pBI121 (شکل ۱) قرار گرفت. پلاسمید pBI121 حاوی ژن *gus* با پیشبر ویروس موزائیک گل کلم (CaMV35S) و ژن *nptII* با پیشبر Nos به عنوان ژن‌های نشانگر می‌باشد.



شکل ۱ - نقشه فیزیکی پلاسمید نو ترکیب pBI121-BCH حاوی ژن کیتیناز

۲- مرحله انتقال ژن

برای انتقال ژن، از اگروباکتریوم سویه‌های غیربیماریزای LBA4404، EHA101 و C58 استفاده شد. در ابتدا ریز نمونه‌های محور زیرپله گیاهچه‌های ۷ روزه رقم ساحل و کوکر ۳۱۲ در محلول باکتری با $OD_{600} = 0.7-0.8$ به مدت ۵ ثانیه غوطه‌ور گردید (Firoozabadi *et al.*, 1987). پس از خشک کردن با استفاده از کاغذ صافی، هم کشتی نمونه‌ها به مدت ۲ روز انجام گرفت سپس ریز نمونه‌ها به محیط کالوس‌زایی همراه با کانامایسین (۵۰ mg/L) با دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و دمای ۲۸ درجه سانتی گراد انتقال داده شدند. برای حذف باکتری‌ها از سه نوع آنتی‌بیوتیک [سفوتاکسیم (Cefotaxime) ۲۰۰ میلی گرم در لیتر، کربنسیلین (Carbenicillin) ۴۰۰ میلی گرم در لیتر و وانکومایسین (Vancomycin) ۵۰ میلی گرم در لیتر] با سفوتاکسیم ۲۰۰ میلی گرم در لیتر استفاده شد. بعد از ۸-۱۰ هفته کالوس‌ها جهت تحریک و تشکیل جنین‌های سوماتیکی 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 کاناماسین به مدت ۴-۶ هفته منتقل شدند (توحید فرو عبدمیثانی، ۱۳۷۸). برای جوانه دار کردن جنین‌های سوماتیکی از محیط کشت حاوی نمک‌های MS همراه با ویتامین B5، ذغال فعال ۲ گرم در لیتر و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر زآتین همراه با کانامایسین استفاده شد. در نهایت از محیط MS بدون هورمون به منظور باززایی گیاهچه استفاده شد (Zapata *et al.*, 1998).

۳- آنالیز تظاهر ژن *gus* و واکنش زنجیره‌ای پلیمرز

آزمایش هیستوشیمیایی *Gus* (Jefferson, 1987) برای برگ گیاه باززا شده در محیط انتخابی انجام گرفت. به منظور اثبات واکنش زنجیره‌ای پلی مرز در حجم ۲۵ میکرولیتری حاوی یک

واحد آنزیم DNA پلیمرز، ۲۵ نانوگرم DNA، ۶۰ نانوگرم پرایمر، ۲/۵ میکرولیتر dNTP (یک میلی مولار)، ۳/۳ میکرولیتر $MgCl_2$ (۱۵ میلی مولار)، ۲/۵ میکرولیتر بافر ۱۰X انجام گرفت. واکنش در ۹۳ درجه سانتیگراد ۲ دقیقه و ۴۰ چرخه (هر چرخه شامل یک دقیقه در ۹۴ درجه، یک دقیقه در ۶۲ درجه برای ژن کیتیناز و ۵۵ درجه برای ژن *nptII* و سه دقیقه در ۷۲ درجه سانتیگراد انجام گرفت) و تکمیل بسط در ۷۲ درجه ۵ دقیقه انجام گرفت. محصول PCR روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز و پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بوسیله دوربین پولاوید عکس برداری گردید.

وجود ژن از روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز (PCR) استفاده گردید. ابتدا با توجه به توالی نوکلئوتیدی ژن کیتیناز و *nptII* با استفاده از برنامه نرم‌افزاری Oligo(USA) چهار آغازگر اختصاصی برای دو انتهای 5' و 3' طراحی گردید.

5' -GAGTGGTGTGGATGCTGTTG- 3' کیتیناز رو به جلو

3' -ACGAACCTCAGCCAATACCG- 5' معکوس

5' -GAACAAGATGGATTGCACGC - 3' NPTII رو به جلو

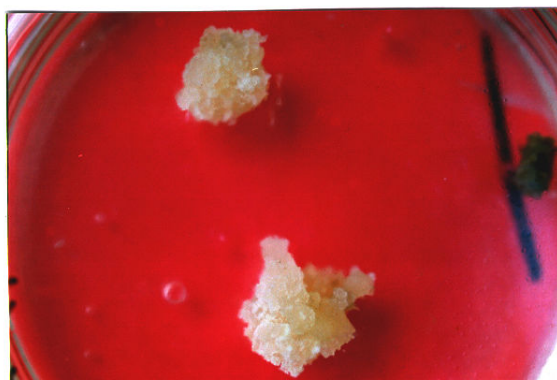
3' -GAAGAACTCGTCAAGAAGGC - 5' معکوس

نتایج

۱- انتخاب کالوس‌های تراریزش شده

برای حذف باکتری‌ها از سه نوع آنتی‌بیوتیک استفاده شد. مشاهدات حاصل نشان داد که آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم نسبت به بقیه آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده بهتر می‌تواند رشد باکتری‌ها را کنترل کند. در همین تحقیق مشخص شد که کاربرد سویه EHA ۱۰۱ آلودگی شدید نمونه‌ها را به همراه داشت. بطوریکه سبب از بین رفتن ریزنمونه‌ها گردید. شستشوی نمونه‌ها در محلول آب مقطر استریل حاوی غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم یا ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم به مدت یک ساعت یا از ترکیب سفوتاکسیم به میزان ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر و آنکومایسین به میزان ۵۰ میلی‌گرم در لیتر توانست فعالیت باکتری را کنترل نماید، و باعث حذف واکشت گردید. سویه‌های LBA4404 و C58 آلودگی کمتری در محیط کشت ایجاد نمودند. دلیل وجود کانامایسین پس از ۸ هفته ریز نمونه‌هایی که غیرتراریخته بودند قهوه‌ای گشته و از بین رفتند و تنها کالوس‌های تراریخته قادر به ادامه حیات بودند (شکل ۲). هشت

هفته بعد از آلودگی، کالوس‌های رشد کرده شمارش شدند. بطور متوسط ۲ تا ۴ کالوس مقاوم به کانامایسین از هر ریزنمونه بدست آمد (جدول ۱). با توجه به جدول ۱ ملاحظه می‌گردد که بیشترین کالوس مقاوم به کانامایسین مربوط به سویه LBA4404 می‌باشد.



شکل ۲- ریز نمونه شاهد که در محیط انتخابی کانامایسین دار قهوه ای و نکروز شده است (سمت راست). رشد کالوس رویان زای پنبه در محیط کانامایسین دار (سمت چپ).

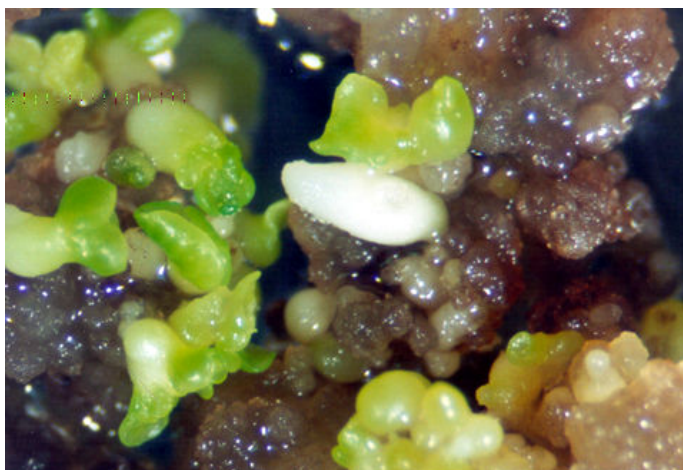
جدول ۱- فراوانی تراریزش ریز نمونه‌های محور زیر لپه (هیپوکوتیل) پنبه به کمک آگروباکتریوم. چهار هفته بعد از آلودگی، کالوس‌ها جدا و به محیط تازه حاوی کانامایسین منتقل شدند. ۸ هفته بعد از آلودگی، کالوس‌ها برای مقاومت به کانامایسین ارزیابی شدند.

فراوانی تراریزش (%)	متوسط تعداد کالوس‌های رشد کرده از هر ریز نمونه در محیط انتخابی	تعداد ریزنمونه آلوده شده	آگروباکتریوم
۸۷ (۴۶)	۴/۱	۵۴	LBA4404
۷۹ (۴۷)	۲/۹	۳۹	C58
۵۳ (۹)	۰/۵	۱۸	EHA101

۲- باززایی کالوس‌های انتخاب شده

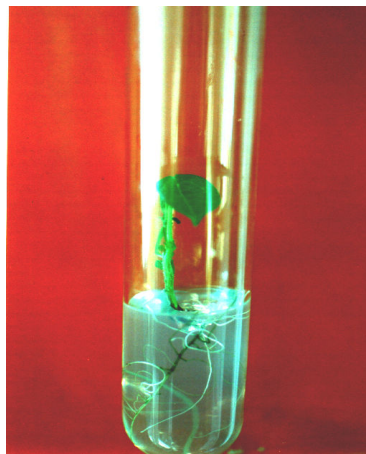
در این مرحله کالوس‌های تراریخته احتمالی به محیط کشت انتخابی جنین‌زایی و جوانه‌زنی سوماتیکی انتقال یافتند. کالوس‌های گرانوله، کرم رنگ و شکننده جنین‌های سوماتیکی تولید کردند این جنین‌ها از نظر شکل و اندازه با هم فرق داشتند با وجود اینکه اندازه کالوس‌های منتقل شده به محیط باززایی کوچک بود، اما از یک قطعه کالوس رقم کوکر چندین جنین سوماتیکی که حاوی دو برگ بودند حاصل می‌شد (شکل ۳) که این امر به دلیل قدرت خوب باززایی رقم کوکر ۳۱۲ و کیفیت خوب کالوس‌های انتخاب شده بود. در رقم ساحل جنین‌زایی سوماتیکی مشاهده نشد، لذا باززایی هم در آن صورت نگرفت.

جوانه‌زنی جنین‌های سوماتیکی در رقم کوکر با تشکیل ریشه‌های به طول دو میلی‌متر یا شاخه‌های بیش از سه میلی‌متر آغاز شد. طویل شدن برگچه‌ها یا قبل از آغاز ریشه‌دهی یا همراه با ریشه‌دهی بود.



شکل ۳- جنین‌های سوماتیکی حاصل از رویش کالوس‌های جنین‌زا در محیط انتخابی

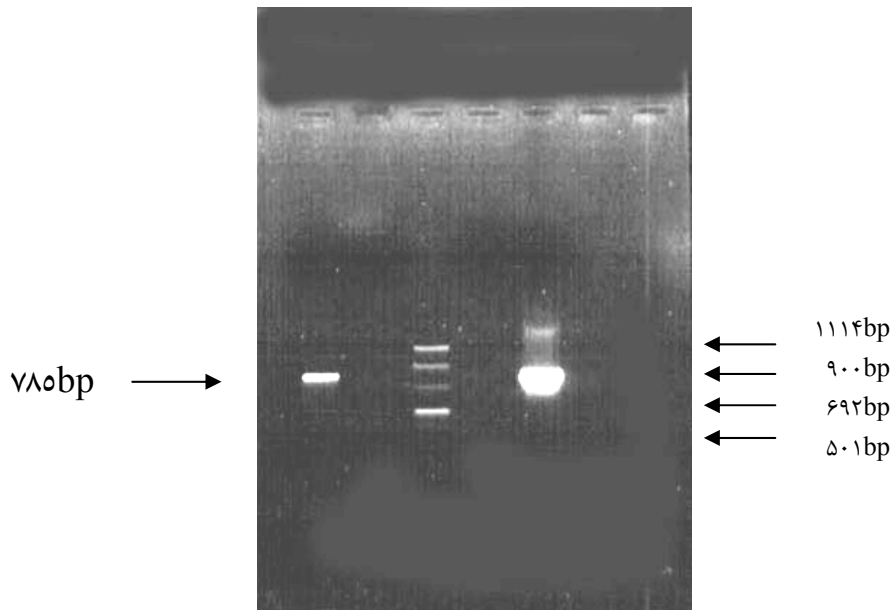
جنین‌های سوماتیکی پس از جوانه زنی به محیط باززایی منتقل شدند. به دلیل وجود کانامایسین در محیط باززایی رشد گیاهچه‌ها به کندی صورت می‌گرفت. پس از اینکه گیاهچه‌ها به خوبی رشد کردند به محیط ریشه‌زایی منتقل شدند در این محیط رشد ریشه‌ها به کندی صورت می‌گرفت و به مرور قهوه‌ای می‌شدند که با کشت مجدد به حالت طبیعی برمی‌گشتند (شکل ۴).



شکل ۴-- پنبه تراریزش شده با ژن کیتیناز

تعدادی از گیاهچه‌های مقاوم به کانامایسین با استفاده از پرایمر اختصاصی ژن *nptII* بررسی شدند. این ژن سبب مقاومت گیاه در برابر کانامایسین می‌شود. وجود این ماده در محیط کشت سبب می‌شود که بتوان در مراحل اولیه رشد گیاهانی را انتخاب نمود که نسبت به کانامایسین از خود مقاومت نشان می‌دهند و قادر به رشد هستند. علاوه بر این وجود این ماده یک محیط انتخابی جهت رشد گیاهان تراریخته احتمالی ایجاد می‌نماید. شکل ۵ آنالیز پی‌سی‌آر گیاه رشد کرده روی محیط حاوی کانامایسین را از نظر وجود ژن *nptII* همراه با شاهد مربوطه را نشان می‌دهد. عدم وجود بند در شاهد بدون دی. ان. آ نشان از این دارد که هیچ آلودگی در کار نبوده است. وجود بند 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 هستند.

۱ ۲ ۳ ۴ ۵



شکل ۵-- آنالیز PCR برای پنبه‌های تراریخته به منظور تشخیص ژن *nptII* با آغازگرهای اختصاصی
 ۱- محصول PCR برای DNA ژنومی پنبه‌های تراریخته
 ۲- محصول PCR برای مخلوط مادری بدون الگو DNA (کنترل منفی)
 ۳- نشانگر مولکولی تعیین اندازه DNA (نشانگر 1114bp, 900bp, 692bp, 501bp.....VIII)
 ۴- محصول PCR برای DNA ژنومی پنبه فاقد ژن *nptII*
 ۵- محصول PCR برای DNA پلاسمید pBI121 حاوی ژن *nptII* (کنترل مثبت).

در این پژوهش کارایی سویه‌های EHA105, LBA4404 و C58 حاوی وکتور دوگانه‌ی pBI121 بمنظور استفاده در تراریزش پنبه مورد مقایسه قرار گرفتند. میزان تراریزش از طریق درصد جنین‌ها یا گیاهچه‌های مقاوم به کانامایسین و بر اساس رشد کالوس برگ‌ها در محیط انتخابی حاوی کانامایسین محاسبه شدند. جدول ۲ نتایج حاصل از این مطالعه را نشان می‌دهد. همانگونه که در جدول ۲ ملاحظه می‌گردد. با توجه به تعداد محدود نمونه استفاده شده در این آزمایش درصد گیاهان مقاوم به کانامایسین در سویه LBA4404 نسبت به بقیه سویه‌ها بیشتر بود.

جدول ۲- فراوانی تراریزش جنین‌ها یا گیاهچه‌های باززایی شده از کالوس‌های مقاوم به کانامیسین

فراوانی تراریزش (%) ^a مقاوم به کانامیسین	تعداد جنین‌ها (گیاهچه‌ها) آزمایش شدند	آگروباکتریوم
۶۸	۱۱	LBA4404
۲۱/۲	۹	C58
۲۰	۵	EHA101

a - فراوانی تراریزش از طریق درصد جنین‌ها یا گیاهچه‌های مقاوم به کانامیسین که بر اساس رشد کالوس برگ در محیط انتخابی کانامیسین دار محاسبه شدند.

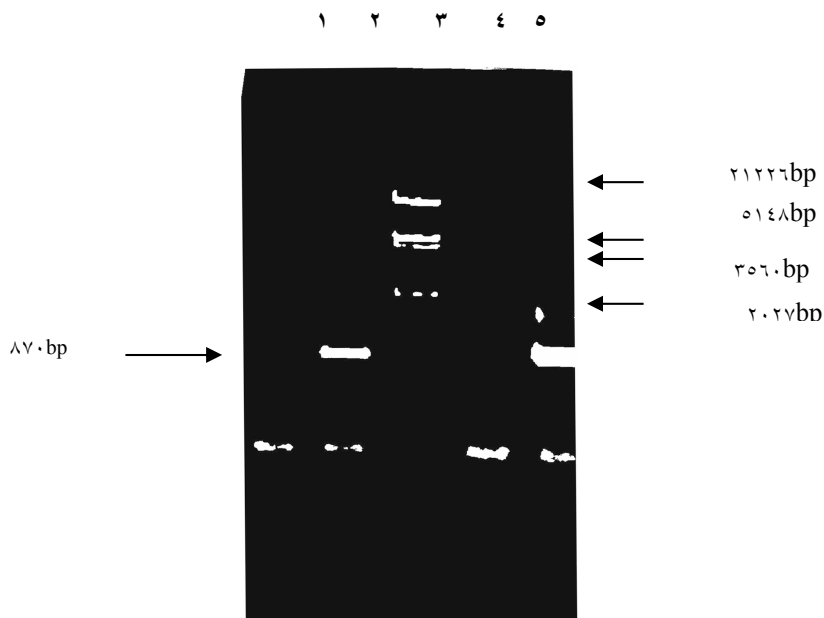
۳- رنگ آمیزی بافت برای ارزیابی ژن بتاگلوکورونیداز و واکنش زنجیره‌ای پلیمرز گیاهان تراریخته احتمالی

پس از بهینه‌سازی سیستم کشت بافت ارقام ذکر شده و انتخاب بهترین رقم جهت تراریزش و قبل از اینکه تراریزش انجام شود لازم بود که با استفاده از یک ژن گزارش‌گر مانند بتاگلوکورونیداز، روش انتقال ژن برای رقم انتخاب شده، بهینه شود. به همین دلیل تعدادی از گیاهچه‌ها که باززایی شدند و حاوی برگ بودند با تست هیستوشیمیایی GUS آزمایش شدند (شکل ۶). نتیجه نشان داد که جنین‌های هم‌کشتی شده با سویه LBA4404 تراریخته است و بقیه تراریخته نشده‌اند. مقاومت اینگونه جنین‌ها شاید بخاطر سم زدایی کانامیسین توسط جنین‌های تراریخته محیط بوده که اجازه داده تا جنین‌های غیرتراریخته رشد نمایند.



شکل ۶- رنگ آمیزی برگ پنبه رقم کوکر برای ارزیابی تظاهر ژن بتا گلوکیورونیداز، برگ تراریخته با ژن *gus* (سمت راست)، گیاه شاهد (سمت چپ)

تعدادی از جنین‌های جوانه زده در محیط انتخابی شاخه تولید کردند. ولی بقیه بتدریج از بین رفتند. شکل ۷ واکنش زنجیره‌ای پلیمرز گیاهان تراریخته احتمالی رشد کرده روی محیط حاوی کانامایسین را از نظر وجود ژن کیتیناز همراه با شاهد مربوطه را نشان می‌دهد. عدم وجود بند در شاهد بدون دی. ان. آ حاکی از این است که هیچ آلودگی در کار نبوده است. وجود بند ۸۷۰ جفت بازی مربوط به ژن کیتیناز نشان دهنده این مطلب است که گیاهان تراریخته احتمالی در مقایسه با شاهد حداقل یک نسخه از ژن کیتیناز را دارا می‌باشند.



شکل ۷ - نتایج PCR برای پنبه‌های تراریخته به منظور تشخیص ژن کیتیناز با آغاز گرهای اختصاصی

- ۱- محصول PCR برای DNA ژنومی پنبه تراریخته شماره ۱۵
- ۲- محصول PCR برای DNA ژنومی پنبه تراریخته شماره ۲۶
- ۳- محصول PCR برای DNA ژنومی پنبه فاقد ژن کیتیناز
- ۴- نشانگر مولکولی تعیین اندازه DNA (Marker III)
- ۵- محصول PCR برای مخلوط مادری بدون الگو DNA (کنترل منفی)
- ۶- محصول PCR برای DNA پلاسمید pCH18 حاوی ژن کیتیناز (کنترل مثبت)

بحث

انتقال ژن به پنبه از طریق *A. tumefaciens* به نوع ژنوتیپ گیاه پنبه بستگی دارد. لذا روش‌های انتقال ژن تنها برای برخی از ژنو تیپ‌ها (کوکر) موفقیت‌آمیز بوده است (Firoozabadi *et al.*, 1987; Perlak *et al.*, 1991; Rajasekaran *et al.*, 1996). به عنوان مثال در مطالعه‌ای که بر روی ارقام پنبه در ایلات متحده صورت گرفت تولید جنین‌های سوماتیکی و باززایی در رقم کوکر سریعتر و با فراوانی بالایی گزارش گردید (Firoozabadi *et al.*, 1987). گزارش‌های مشابهی در مورد اثر ژنوتیپ در تولید کالوس‌های جنین‌زا و باززایی توسط محققین گزارش گردید (Norma *et al.*, 1987; Nick *et al.*, 1990) در مطالعه‌ای بر روی پنبه‌های هندی و نتایج آنها مشخص شد که ارقام کوکر بالاترین درصد باز زایی را دارند (Khmar *et al.*, 1998) ایجاد سیستم انتقال ژن مریستم بواسطه آگروباکتریوم در سال‌های اخیر امکان هر نوع تغییر در ژنوتیپ را بدون وابستگی به نوع ژنوتیپ فراهم کرده است (Zapata *et al.*, 1998). در این آزمایش مشخص شد که نوع آنتی‌بیوتیک جهت حذف باکتری مهم می‌باشد. استفاده از کربنسیلین به میزان ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر قادر به حذف باکتری‌ها نبود، بطوریکه باکتری‌ها به مرور باعث از بین رفتن ریزنمونه‌ها و کالوس‌های تراریخته احتمالی می‌شدند. در صورتی که سفوتاکسیم به میزان ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر یا مخلوط سفوتاکسیم ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر با وانکومایسین ۵۰ میلی‌گرم در لیتر استفاده گردد باکتری‌ها بتدریج از بین می‌روند.

انتخاب مناسب سویه‌ی آگروباکتریوم در تراریزش گیاه، نقش مهمی ایفا می‌کند، بطوریکه وکتور دوگانه‌ی pBI121 با سویه‌ی LBA4404 در مقایسه با سویه‌ی EHA105 در تراریزش گیاهان دولپه، مناسب‌تر گزارش شده است (Donaldson and Simmonds, 2000). مقایسه‌ی سویه‌های EHA105 و LBA4404 در تراریزش چهار ژنوتیپ پنبه نشان داد که بیشترین تراریزش مربوط به سویه‌ی LBA4404 بوده است (Sunilkuman & Rathore, 2001). در مطالعه‌ی دیگر توسط فیروز آبادی و همکاران (Firoozabadi *et al.*, 1987) و اومبک و همکاران (Umbeck *et al.*, 1987) در تراریزش پنبه از سویه LBA4404 استفاده شده است.

تعدادی از جنین‌های سوماتیکی در محیط دارای کانامایسین سبز باقی ماندند ولی تعداد کمی از آنها تراریخته بودند. این امر نشان می‌دهد که تراریزش پایدار تنها در تعداد کمی از گیاهچه‌ها 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 نشد، که نشان می‌دهد باززایی در پنبه وابستگی شدیدی به ژنوتیپ دارد.

از آنجا که تراریزش در برخی از جنین‌های جوانه زده صورت گرفت می‌توان امیدوار بود که با همین روش و یا روش‌های دیگر جنین‌های سوماتیکی و نیز استفاده از سویه‌های دیگر اگروباکتریوم که بافت پنبه نسبت به آنها مستعدتر باشد بتوان رویان‌های تراریخته و در نهایت 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، و اغلب ژنوتیپ‌های مهم ایران دارای پتانسیل باززایی پائینی هستند، لذا استراتژی بلند مدت باید در جهت انتقال صفت جنین‌زایی سوماتیکی به ارقام زراعی باشد. 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 ژنوتیپ‌های زراعی پنبه پتانسیل باززایی پائینی دارند و دستکاری‌های ژنتیکی در آنها مشکل می‌باشد، بهینه سازی باززایی از طریق کشت مریستم که وابسته به ژنوتیپ نمی‌باشد و مدت زمان باززایی را کاهش می‌دهد مناسب به نظر می‌رسد.

سپاسگزاری

بدینوسیله از موسسه تحقیقات پنبه کشور بخاطر در اختیار گذاردن بذور مورد نیاز و جناب آقای دکتر ملبویی از مرکز ملی مهندسی ژنتیک بخاطر در اختیار گذاردن پلاسמיד سپاسگزاری می‌گردد.

References

- Broglie, K., Chet, I., Holliday, M., Robert, C., Biddle, P., Knolton, S., Mauvais, C.J., and Broglie, R. (1991) *Transgenic plants with enhanced resistance to the fungal pathogen Rhizoctonia Solani*. Science. **254**, 1194-1197.
- Colling, D.B., Kra, K.M., Kragh., K.M., Mikkelsen, J.D., Nilson, K.K., Rasmussen, UR., and Vad, K. (1993) *Plant chitinase*. The Plant Journal, **3**, 31-40.
- Donaldson, P.A., and Simmonds, D.H. (2000) *Susceptibility to Agrobacterium tumefaciens and cotyledonary node transformation in short-season soybean*. Plant Cell Rep, **19**, 478-484.
- Firoozabadi, E., Debeer, D., Melo, D., Halk, E., and Murray, E. (1987) *Transformation of cotton (Gossypium hirsutum) by Agrobacterium tumefaciens and regeneration of transgenic plant*. Molecular Biology, **10**, 105-116.
- Jefferson, RA. (1987) *Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system*. Plant Mol Biol Rep, **5**, 387-405.

- Khumar, S., Sharma, P., and Penter, D. (1998) *A genetic approach to in vitro regeneration of non-regeneration cotton (Gossypium hirsutum L.) cultivars*. Plant Cell Rep, **18**, 59-63.
- Nick . J., Gawel, L., and Carol, O., Robacker, J. (1990) *Somatic embryogenesis in two Gossypium hirsutum genotypes on semi-solid versus liquid proliferation media*. Plant Cell Tissue and Organ Culture, **23**, 201-204.
- Norma. L., Trolinder, H., and Xhixian, U. (1987) *Genotype specificity of somatic embryogenesis response in cotton*. Plant Cell Rep, **8**, 133-136.
- Perlak, F.j., Deaton, R.W., and Fischhoff, D.A. (1990) *Insect-resistant cotton plants*. Bio/ Tecnology, **8**, 939-943.
- Rajasekaran, K., Grula, J. W., Hundspeth, R. L., Pofelis, S. and 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.
- Rohini, V.K., and Sankara, K. (2001) *Transformation of peanut (Arachis hypogaea L.) with tobacco chitinase gene: variable response of transformants to leaf spot disease*. Plant Science, **160**, 889-898.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: a Laboratory manual*, 2nd end. Cold spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Sunilkumar, G., and Rathore, K. (2001) *Transgenic cotton: factors influencing Agrobacterium-mediated transformation and regeneration*. Molecular Breeding, **8**, 37-52.
- Umbeck, P., Johnson, G., Barton, K., and Swain, K. (1987) *Genetically transformed cotton (Gossypium hirsutum)*. Plant Bio/Tecnology, **5**, 263-265.
- Zapata, C., Park., S.H., El-Zik, K. M., and Smith, R. H. (1998) *Transformation of a Texas cotton cultivar by using Agrobacterium and the shoot apex*. Theor Appl.Genet, **98**, 252-256.
- Yammamoto, T., Iketani, H., and Leki, H. (2000) *Transgenic grapevine plants expressing a rice chitinase with enhanced resistance to fungal patogens*. Plant Cell Rep, **19**, 629-644.

توحید فر، م. و عبد میثانی. س. (۱۳۷۸) بررسی اثرات ژنوتیپ و محیط کشت بر کال‌زایی و باززایی پنبه‌های زراعی. نخستین همایش بیوتکنولوژی جمهوری اسلامی ایران. دانشگاه تربیت مدرس ۳-۵ اسفند، ۱۱۳۰-۱۱۳۴.

حمدا... زاده، ا. (۱۳۷۲) ویژه گیهای نژاد برگ ریز و غیر برگ ریز عا مل بیماری پژمردگی پنبه شمال . بیماری گیاهی ایران. ۲، ۱۳۱-۱۲۵.