ژنتیک نوین
دوره دوازدهم، شماره ٤، زمستان ١٣٩٦
صفحه ٦٠٦ - ٥٩٧

بهینه سازی باززایی و عوامل موثر بر انتقال ژن با واسطه اگروباکتریوم در ارقام تجاری پنبه ایرانی (*Gossypium hirsutum* L.)

Optimization of regeneration and parameters affecting Agrobacterium-mediated transformation of commercial cultivar of cotton (*Gossypium hirsutum* L.)

رسمیه حمید[١]، حسن مرعشی*[١]، مسعود توحیدفر[٢]، سعید ملک‌زاده شفارودی[١]

١- دانشجوی دکتری، استاد، دانشیار، گروه بهنژادی و بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
٢- دانشیار، دانشکده مهندسی فناوری‌های نوین، دانشگاه شهید بهشتی

Hamid R[1], Marashi H[*1], Tohidfar M[2], Malekzadeh-shafaroudi S[1]

1- PhD Student, Professor, Associate Professor, Department of Biotechnology and Plant Breeding, Ferdowsi University of Mashhad
2- Associate Professor, Science and Biotechnology Faculty, Shaid Beheshti

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: marashi@um.ac.ir

(تاریخ دریافت: ٩٦/٧/١٧ - تاریخ پذیرش: ٩٦/١٢/١٣)

چکیده

مهندسی ژنتیک نقش مهمی در اصلاح مدرن پنبه دارد. با وجودی که موفقیت‌های بسیاری در مطالعات انتقال ژن به پنبه حاصل شده‌است، اما هنوز محدودیت‌های زیادی در ایجاد پنبه تراریخت وجود دارد. باززایی وابسته به ژنوتیپ و ریزنمونه کاربرد ارقام مختلف را در مطالعات انتقال ژن این گیاه محدود می‌کند. در این مطالعه یک پروتکل بهبود یافته برای باززایی و مهندسی ژنتیک پنج رقم تجاری با استفاده از حامل حاوی ژن *nptII* توصیف شده‌است. چندین پارامتر برای بهینه‌سازی انتقال ژن به این ارقام مورد بررسی قرار گرفت. مشخص شد که محیط (MS+ B5, 0.1 mg/L NAA, 0.1 mg/L 6-BA, + 2.5 g/l phytage) بیش‌ترین درصد باززایی (٩٨ درصد) را ایجاد می‌کند، هم‌چنین پیش‌کشت کوتاه مدت ریزنمونه‌ها به مدت ٥-٤ ساعت در محیط حاوی سیتوکنین، تلقیح به مدت ٢٠ دقیقه در محیط MS مایع حاوی ١٠٠ میکرومولار استوسیرینگون و استفاده ٠/٣: OD، همکشتی به مدت دو روز و همچنین افزودن ٢٠٠ میکرومولار استوسیرینگون به محیط هم کشتی برای تلقیح بیشترین کارایی ترانسفورماسیون را دارد. نتایج PCR و *Kan*-painting در گیاهان T1 نشان داد که ژن *nptII* در ژنوم پنبه درج و به خوبی بیان می‌شود.

واژه‌های کلیدی

پنبه
ژن *nptII*
باززایی
مریستم انتهایی
Agrobacterium tumefaciens

مقدمه

از زمان ظهور اولین مورد از محصولات تراریخته، تکنولوژی مهندسی ژنتیک پیشرفت‌های قابل توجهی داشته است. امروزه مهندسی ژنتیک به یک راهبرد اصلی برای بهبود ارقام زراعی و همپنین مطالعه عملکرد ژن‌ها تبدیل شده‌است (Nyaboga et al. 2015). روش انتقال ژن به واسطه Agrobacterium در مقایسه با سایر رویکردها بیش‌ترین کاربرد را دارد. این روش ساده، ارزان و کارایی بسیار بالایی دارد (Lei et al. 2012). *Agrobacterium tumefaciens* به‌علت دامنه وسیع میزبانی یک روش موثر برای دستکاری ژنتیکی گونه‌های متنوع گیاهی است (Niu et al. 2000). از اوایل دهه ۱۹۹۰ دامنه میزبانی این باکتری در آزمایشگاه‌های مهندسی ژنتیک به روش‌های گوناگون مانند استفاده از ترکیبات فنولی مصنوعی مانند استوسرینگون افزایش یافته است (Bourras et al. 2015)، با این حال استفاده از *A. tumefaciens* در بسیاری از گیاهان زراعی هنوز کارایی پایینی دارد (Juturu et al. 2015). پنبه (*Gossypium hirsutum* L.) بهترین منبع طبیعی فیبر و منبع اصلی صنعت نساجی است که در بیش از ٦٥ کشور کشت می‌شود. مهندسی ژنتیک نقش مهمی در اصلاح مدرن پنبه دارد، ۸۱ درصد از سطح زیر کشت پنبه در جهان به پنبه تراریخت اختصاص دارد با وجود این دستاوردها، هنوز محدودیت‌های زیادی در دستیابی به پنبه تراریخت وجود دارد و کارایی انتقال ژن به این گیاه بسیار پایین است (Juturu et al. 2015). باززایی وابسته به ژنوتیپ و ریزنمونه، طولانی بودن دوره باززایی، مطالعات انتقال ژن در این گیاه را محدود می‌کند (Cousins et al. 1991; Feng et al. 1996; Trolinder and Goodin 1987). امروزه استفاده از بافت‌های مریستمی برای باززایی و انتقال ژن با توجه به دوره کوتاهتر باززایی، و باززایی مستقل از ژنوتیپ بسیار مورد توجه قرار گرفته است. Renfroe and Smith (1986) اولین گزارش از باززایی از بافت‌های مریستمی را منتشر کردند بعد از آن گزارشات متعدد از باززایی مریستم منتشر شد (Morre et al. 1998; Saeed et al. 1997; Zapata et al. 1999). از آنجا که بافت‌های مریستمی دارای کارایی بالای باززایی هستند (Niu et al. 1998)، افزایش کارایی ترانسفورماسیون به این بافت‌ها ضروری به‌نظر می‌رسد. انتقال ژن به‌واسطه اگروباکتریوم فرایند پیچیده‌ای شامل اثر متقابل سلول‌های میزبان و باکتری و درج T-DNA در ژنوم سلول‌های میزبان است. شناخته‌شده‌ترین و موثرترین عامل در افزایش آلودگی و درج T-DNA در ژنوم میزبان ژن‌های *Vir* پلاسمید Ti هستند (Zupan et al. 1997). ژن‌های *Vir* از طریق محصولات شناخته‌شده‌ای که توسط سلول‌های میزبان تولید می‌شوند و از طریق گیرنده‌های دیواره باکتریایی و آبشار پیام‌رسانی فعال می‌شوند (Sheng and Citovsky 1996). ترکیباتی مانند انواع شکرها، هورمون‌ها و بعضی آمینواسیدها می‌توانند در بهبود القای ژن‌های *Vir* موثر واقع شوند (Niu et al. 2000). در حالی‌که سیستم‌های باززایی و تراریختی برای پنبه توسعه یافته است، در عین حال این روش‌ها کارایی و راندمان پایین و تغییر پذیری ژنتیکی بالا دارند (Bakhsh et al. 2015). برای استفاده از پتانسیل مهندسی ژنتیک در اصلاح پنبه، این روش‌ها بایستی تا رسیدن به سطح اقتصادی مطلوب بهبود یابند. این پژوهش یک پروتکل کارا برای باززایی و انتقال ژن به‌واسطه *A. tumefaciens* به پنبه زارعی به‌منظور انتقال ژن‌های مفید را معرفی می‌کند، نیاز و عدم نیاز به پیش کشت ریزنمونه و مدت زمان آن، OD باکتری برای تلقیح، روش تلقیح، شرایط هم کشتی و ترکیبات محیط تلقیح از عوامل بررسی شده در این پژوهش می‌باشند. در نهایت یک روش بهینه برای بهبود ترانسفورماسیون و افزایش توانایی باززایی پس از تلقیح ارقام تجاری پنبه توسعه داده شد.

مواد و روش‌ها

ارقام تجاری پنبه شامل خورشید، ساحل، ورامین، لطیف و کاشمر از موسسه پژوهش پژوهشات پنبه گرگان تهیه شدند. ابتدا به‌منظور کرک‌زدایی بذور با اسید سولفوریک غلیظ (۹٦ درصد) به مدت ۳۰ ثانیه شستشو داده شدند، سپس بذور با استفاده از آب شهری به مدت ٤٠ دقیقه آب‌شویی شدند. پس از آن با استفاده از الکل ۷۰ درصد بذور به مدت یک دقیقه شستشو داده شده و سپس در هیپو کلرید سدیم ۲۰ درصد به مدت ۲۰ دقیقه شستشو شدند. پس از آن بذور با استفاده از آب دوبار تقطیر استریل ٦-٥ بار به‌خوبی آبکشی و بر روی کاغذ استریل خشک شدند. پس از خشک شدن بذور، ٤-۳ بذر در هر لوله آزمایش حاوی محیط

جوانه‌زنی (1/2 MS) قرار داده شد و بذور کشت داده شده در شرایط تاریکی به اتاقک کشت (۲±۲۵ درجه) منتقل شد. جداسازی مریستم از گیاهچه‌های ۵-٤ روزه، ٤-۳ روزه و ۳-۲ روزه مطابق روش Zapata et al. (1999) صورت گرفت. در این روش پس از جداسازی برگ‌های کوتیلدنی به کمک سوزن‌های باریک دو برگ اولیه جداسازی شده و مریستم که بین این دو برگ است جداسازی شد. مریستم‌های جداسازی شده به‌منظور بهینه‌سازی باززایی به شش نوع محیط باززایی (جدول ۱) انتقال یافتند. پایه اصلی تمامی این محیط‌ها محیط پایه MS به اضافه ویتامین B5 بود. مریستم‌هایی که بعد از ٤-۳ هفته تولید ساقه کرده بودند برای ریشه‌زایی به ۵ نوع محیط ریشه‌زایی (جدول ۲) به مدت ۳-۲ هفته در قالب طرح تصادفی منتقل شدند. چندین پارامتر برای بهینه سازی انتقال ژن به این ارقام مورد بررسی قرار گرفت. به‌منظور بررسی تاثیر پیش کشتی بر روی نرخ تراریختگی ریز نمونه‌ها در چهار دوره شامل ۵-٤ ساعت، یک روز، دو روز و سه روز پیش کشتی مورد مطالعه قرار گرفتند. تمامی ریز نمونه‌ها به محیط پیش کشتی (MS+ B5 Vit+ 1 mg/l BAP+ 3% Glocose) منتقل شدند. در این مطالعه از دو سویه اگروباکتریوم LBA4404 و GVA 3101 که دارای پلاسمید دوگانه pBi 121 بودند استفاده شد. به‌منظور تلقیح ریزنمونه‌ها، ابتدا یک کلون از باکتری تازه کشت آگروباکتریوم برداشته شد و به ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت باکتری مایع دارای آنتی‌بیوتیک‌های کانامایسین mg/l ۵۰ و ریف آمپسین mg/L ۷۵ در ارلن ۱۰۰ میلی‌لیتر منتقل شد. کشت در شیکر انکوباتور با دور rpm ۱۸۵ در دمای ۲۸ درجه به مدت یک شب (۱٦ ساعت) قرار داده شد. به‌منظور بررسی اثر OD بر کارایی ترانسفورماسیون دو میلی‌لیتر از این کشت برداشته و در ۵۰ میلی‌لیتر LB مایع به‌همراه آنتی‌بیوتیک‌های کانامایسین و ریف آمپسین کشت داده شد پس از ٤ ساعت این باکتری رسوب داده شد و رسوب در دو نوع مایع تلقیح حل شد. محیط اول شامل MS مایع به اضافه ۷۵ میلی‌مولار MES به اضافه ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر کاینتین و دو درصد گلوکز و غلظت‌های مختلف استوسرینگون (pH محیط بر روی ۵/٤ تنظیم شد.) و محیط دوم نیز شامل LB و غلظت‌های مختلف استوسرینگون بودند. تلقیح به دو روش چکاندن مایع تلقیح بر روی ریزنمونه‌ها و غوطه‌ورسازی ریزنمونه‌ها در مایع تلقیح و شیک در انکوباتور در مدت زمان‌های مختلف صورت گرفت. در روش غوطه‌ورسازی پس از تلقیح ریز نمونه‌ها بر روی کاغذ صافی خشک شدند و پس از خشک شدن به‌صورت عمودی و رو به بالابر روی محیط هم‌کشتی که یک کاغذ صافی بر آن قرار داده شده بود منتقل شدند و در مدت زمان‌های ۱، ۲، ۳ و ٤ روز در شرایط تاریکی در دمای ۲۸ درجه انکوبه شدند. ریزنمونه‌هایی که به روش چکاندن تلقیح شدند نیز در همین شرایط قرار داده شدند. پس از مدت زمان هم‌کشتی ریز نمونه‌ها با استفاده از کاغذ صافی به‌خوبی خشک شدند و به محیط باززایی با آنتی‌بیوتیک انتخابی و غلظت‌های ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر سفاتاکسیم و ۲۰۰ میلی‌گرم کربنی‌سیلین در شرایط ۱٦ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و دمای ۲±۲۵ درجه منتقل شدند. ریز نمونه‌ها هر دو هفته یکبار واکشت شدند. به‌منظور بررسی درج ژن با استفاده از واکنش PCR، DNA ژنومی از برگ‌های جوان گیاهان باززا شده در محیط انتخابی به‌وسیله روش CTAB با اندکی تغییرات استخراج شد (Soni and Murray 1994). حضور ژن *npt*II از طریق آغازگرهای اختصاصی مورد تایید قرار گرفت. آغازگرهای استفاده شده برای ژن مقاومت به کاناماسین به‌صورت آغازگر جلورونده: 5′-GGGTGGAGAGGCTATTCGGCTATGA-3′ و برای آغازگر عقب‌رونده 5′-ATTCGGCAAGCAGGCATCGC-3′ می‌باشند که یک قطعه 700bp را تکثیر می‌کنند. پلاسمید pBi121 به‌عنوان کنترل مثبت و گیاهان غیر تراریخت و مسترمیکس به‌عنوان کنترل منفی انتخاب شدند. هم‌چنین از آغازگر ژن *Vir* برای تایید عدم آلودگی با اگروباکتریوم استفاده شد.

به‌منظور تجزیه‌های آماری فراوانی تشکیل ساقه از ریزنمونه‌ها به‌عنوان درصد باززایی در نظر گرفته شد. هم‌چنین درصد ترانسفورماسیون از روی تعداد گیاهان PCR مثبت به تعداد کل ریزنمونه‌های تلقیح شده محاسبه شد. برای هر آزمایش ۵۰۰ ریزنمونه در نظر گرفته شد و هر آزمایش نیز در چهار تکرار کاملا تصادفی انجام شد. تجزیه و تحلیل داده‌های آزمایش با استفاده از نرم‌افزار SPSS ver.16 انجام شد. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن صورت گرفت.

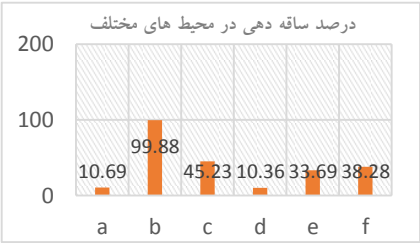
نتایج

کمبود ژن‌های مقاومت در خزانه ژنی ژرم‌پلاسم‌های موجود، هتروزیگوسیتی بالا، آلوپلوئیدی و عدم همزمانی گلدهی اصلاح سنتی را در گیاه پنبه تبدیل به فرایندی طولانی و طاقت فرسا کرده است (Noman et al. 2016). بنابراین مهندسی ژنتیک به‌عنوان دستاوردی ارزشمند و جایگزین برای بهبود و اصلاح ژنتیکی پنبه مطرح شده‌است (Kumar et al. 2013). هر چند برای کاربرد مهندسی ژنتیک نیاز به سیستم باززایی با کارایی بالا و مستقل از ژنوتیپ و پروتکل مناسب با کارایی بالا برای ترانسفورماسیون است. توسعه چنین پروتکلی به‌ویژه برای ارقام زراعی نیازمند مطالعه دقیق عوامل موثر بر باززایی و عامل‌های موثر بر تراریزش به واسطه اگروباکتریوم‌اند.

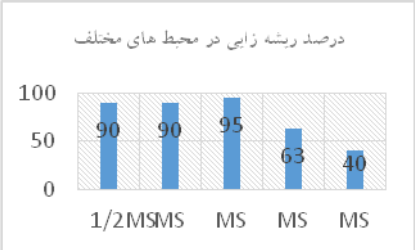
نتایج تجزیه واریانس میزان باززایی حاکی از آن است که گیاهچه‌هایی که در محیط (b) قرار داده شده‌اند بیشترین درصد ساقه‌دهی (۱۰۰ درصد) را داشتند (شکل ۱). گیاهچه‌های به‌دست آمده مطلوب و دارای فرم طبیعی بودند که در مقایسه با محیط‌های Zapata et al. (1999) و Gould et al. (1998) تعداد گیاهچه‌های بیش‌تری تولید کردند (شکل ۲). هم‌چنین این محیط نسبت به محیط کشت‌های Zapata et al. (1999) و Gould et al. (1998) تعداد گیاهچه شیشه‌ای کمتری تولید کرد (جدول ۱). درصد ساقه‌دهی بین ارقام مورد مطالعه اختلاف معنی‌داری ($p\leq 0.01$) نشان نداد. از بین مریستم‌های باززا شده در محیط ساقه‌دهی تعداد ۱۲۰ گیاهچه به پنج نوع محیط ریشه‌دهی منتقل شدند. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که تفاوت بسیار معنی‌داری ($p\leq 0.01$) بین محیط‌های مختلف ریشه‌زایی وجود دارد (جدول ۲). هم‌چنین محیط ریشه‌زایی C نسبت به دیگر محیط‌ها گیاهچه‌های ریشه‌دار بیش‌تری تولید کرد (شکل ۳).

به‌منظور تعیین دز کشنده آنتی بیوتیک ریزنمونه‌ها در غلظت‌های مختلف آنتی بیوتیک قرار گرفتند، نتایج کشت ریزنمونه‌ها در غلظت‌های مختلف کانامایسین بعد از حدود چهار هفته نشان داد که کانامایسین بر باززایی ریزنمونه‌ها اثر منفی دارد. بیش‌ترین تعداد باززایی در نمونه‌های تیمار شاهد (بدون کاناماسین) مشاهده شد. با افزایش غلظت کانامایسین تعداد ریزنمونه‌های از بین رفته روند افزایشی داشت. در غلظت ۹۰ میلی‌گرم بر لیتر تمامی ریزنمونه‌های غیر تراریخته از بین رفتند. اما تفاوت معنی‌داری در سطوح بالاتر از ۹۰ میلی‌گرم در لیتر مشاهده نشد. به‌همین دلیل سطح مؤثر غلظت کانامایسین ۹۰ میلی‌گرم در لیتر تعیین شد و در همه محیط‌های انتخابی باززایی و نیز تشکیل ریشه از همین غلظت استفاده شد (جدول ۳).

شکل ۱- الف) مریستم‌های جداسازی شده پس از ۲ هفته بر روی محیط ساقه‌دهی b، ب) مریستم‌های جداسازی شده پس از ٤ هفته بر روی محیط ساقه‌دهی b



شکل ۲- درصد ساقه‌دهی در محیط‌های مختلف ساقه‌دهی



شکل۳- درصد ریشه‌زایی در محیط‌های مختلف ریشه‌زایی

جدول ۱- مقایسه میانگین ترکیبات هورمونی مختلف بر روی میزان باززایی

Treatment	BAP (mg/l)	NAA (mg/l)	روز تا باززایی	درصد باززایی	طول شاخساره	تعدا شاخساره های با رشد طبیعی
a	0.1	0	10 cd[a]	10.69e	1.83 ± 0.68b	40± 0.8c
b	0.1	0.1	8 cd	99.88a	2.84 ± 1.29a	100± 0.7a
c	0.1	0.2	12 bc	45.23b	0.84 ± 0.13c	75± 0.9b
d	0.0	0	11 cd	10.36d	0.76 ± 2.42c	11± 1.3d
e	0.0	0.1	13 b	33.69bc	0.87 ± 0.42c	12± 1.0d
f	0.0	0.2	11 a	38.28b	0.82 ± 1.06c	9±0.7d

a اعداد با حروف یکسان تفاوت معنی‌داری در سطح یک درصد در آزمون دانکن ندارد.

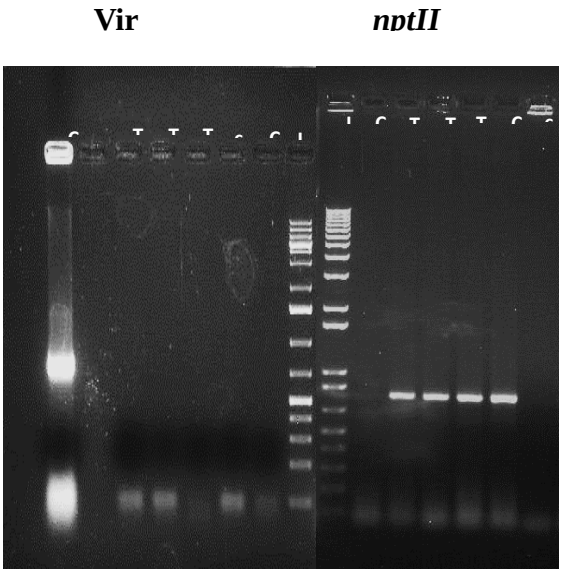
جدول ۲- تاثیر تیمارهای مختلف ریشه‌زایی بر میران ریشه‌زایی

تیمار	محیط	IBA (mg/l)	درصد ریشه دهی درصد	طول ریشه (cm)
A	1/2MS	0.0	90 a[a]	5.1±1.2a
B	MS	0.0	90 a	1.5b± 5.3
C	MS	1.0	95 a	7.1±0.7b
D	MS	1.5	63 b	3.5±1.3c
E	MS	2.0	40 c	1±0.5d

a اعداد با حروف یکسان تفاوت معنی‌داری در سطح یک درصد در آزمون دانکن ندارد.

به‌منظور بهینه‌سازی عوامل موثر برکارایی انتقال ژن عوامل مختلفی مورد بررسی قرار گرفت. در ابتدا پس از جداسازی مریستم‌ها در شرایط استریل، مریستم‌ها بر روی محیط هم‌کشتی به مدت ۱، ۲ و ۳ روز قرار داده شدند همچنین یک سری از مریستم‌ها به مدت ٤-٥ ساعت به محیط هم‌کشتی منتقل و در همان روز تلقیح شدند. نرخ باززایی پس از تلقیح برای یک روز هم‌کشتی ۳۰ درصد، برای ۲ و سه روز به‌ترتیب برابر ٢٤ و ١٦ درصد بود. در حالی که نمونه‌هایی که بلافاصله پس از جداسازی تلقیح شده بودند، در محیط انتخابی نرخ باززایی ۳۵ درصد را نشان دادند (جدول ۳). Gould et al. (1998) پیش‌کشت ریز نمونه‌ها را به مدت ۳-۵ روز توصیه و گزارش کرده‌اند که این روش علاوه بر شناسایی ریزنمونه‌های آلوده تقسیم سلولی را در سلول‌های مریستمی تحریک می‌کند (Gould and Magallanes-Cedeno 1998). نسبت بین سلول‌های اگروباکتریوم و سلول‌های میزبان یکی از عوامل بسیار مهم موثر در افزایش فراوانی انتقال T-DNA است، غلظت کم اگروباکتریوم فراوانی انتقال T-DNA را کاهش می‌دهد در حالی‌که غلظت بیشتر قابلیت زیست‌پذیری سلول‌های گیاهی را کاهش می‌دهد (Wang et al. 2009). تاثیر غلظت اگروباکتریوم بر روی فراوانی ترانسفورماسیون از طریق چهار غلظت (۰/۳، ۰/٤، ۰/٥، و ۰/٦) بررسی شد. اثر غلظت اگروباکتریوم بر روی نرخ ترانسفورماسیون بین غلظت های ۰/۳ و ۰/٥ و ۰/٦ در سطح پنج درصد معنی‌دار بود در حالی‌که تفاوتی بین نرخ تراسفورماسیون در غلظت‌های ۰/۳ و ۰/٤ مشاهده نشد. براساس نتایج مقایسه میانگین ODهای ۰/۳ و ۰/٤: بیش‌ترین کارایی انتقال ژن را دارد (جدول ۳). در این پژوهش اثر دو سویه LBA4404 و GVA3103 بر روی نرخ ترانسفورماسیون ارقام تجاری پنبه مطالعه شد. تفاوت معنی‌داری بین دو سویه اگروباکتریوم بر روی نرخ ترانسفورماسیون مشاهد نشد و به‌نظر می‌رسد هر دو سویه برای انتقال ژن مناسب باشند. اما کنترل آلودگی پس از تلقیح برای سویه GVA3103 بسیار دشوارتر بود بنابراین سویه LBA4404 برای ادامه کار انتخاب شد (جدول ۳). محیط تلقیح MS مایع نسبت به محیط LB تعداد گیاهان ترانسفرم بیشتری تولید کرد و این تفاوت در سطح پنج درصد معنی‌دار بود. هم‌چنین اضافه کردن استوسرینگون به محیط تلقیح اثر مثبت در افزایش نرخ ترانسفورماسیون در تمام ارقام مورد مطالعه داشت افزودن غلظت ۱۰۰ میکرولار استوسرینگون به محیط تلقیح بیش‌ترین کارایی را در افزایش نرخ ترانسفورماسیون نشان داد در حالی‌که تعداد گیاهان ترانسفورم شده در دو غلظت صفر و ۲۰۰

میکرومولار با هم تفاوت معنی‌داری نشان نداد. تعداد گیاهان ترانسفورم ایجاد شده در غلظت ۱۵۰ میکرومولار برلیتر کمتر از غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار بود. با توجه به نتایج به‌دست آمده به نظر می‌رسد سلول‌های زخمی به اندازه‌ای ترکیبات فنولی تولید می‌کنند که با غلظت ۱۰۰ میکرومولار بهترین کارایی را نشان می‌دهند و غلظت‌های بالاتر از ۲۰۰ میکرومولار در محیط تلقیح کشنده است (جدول ۳). علاوه بر این، اضافه کردن ۲۰۰ میکرومولار استوسرینگون به محیط هم‌کشتی برای افزایش کارایی ترانسفورماسیون در سایر ارقام بهترین غلظت بود (جدول ۳). در این مطالعه از دو روش برای تلقیح ریزنمونه‌ها استفاده شد. در روش اول مایع تلقیح بر روی ریزنمونه چکانده شد (۵ ماکرولیتر بر روی هر ریز نمونه) و در روش دوم ریزنمونه در مایع تلقیح شناور شده و در شیکر انکوباتور به مدت ۲۰ دقیقه شیک شدند. روش دوم برای سایر ارقام کارایی بیشتری نشان داد (جدول ۳). با توجه به این نتیجه مدت زمان تلقیح به روش شیک (زمان‌های ۱۰، ۲۰ و ۳۰ دقیقه بر روی سایر ارقام) مورد بررسی قرار گرفت. لازم به ذکر است که دمای تلقیح و تعداد دور بر دقیقه شیکر برای تمام زمان‌ها ۲۸ درجه با دور کم (۱۵۰–۱۶۰ rpm) یکسان بود. مشخص شد که نرخ باززایی در مدت زمان ۱۰ دقیقه برای سایر ارقام بین ۸ تا ۵ درصد بود در حالی که نمونه‌هایی که به مدت ۳۰ دقیقه تلقیح شده بودند نرخ باززایی بسیار کمی داشتند و اغلب ریزنمونه‌ها در سایر ارقام از بین رفتند. نرخ باززایی برای سایر ارقام در مدت زمان ۲۰ دقیقه ۲۰–۱۸ درصد بود (جدول ۳). اثر مدت زمان هم‌کشتی بر نرخ تراریختگی برای ۱، ۲، ۳ و ٤ روز مورد آزمایش قرار گرفت. اثر مدت زمان هم کشتی بر روی رقم معنی‌دار بود. نتایج این مطالعه نشان داد که مرفولوژی ریزنمونه‌ها پس از یک روز در تمام ریزنمونه‌ها مشابه بود پس از دو روز ریزنمونه‌ها ۵ تا ۸ میلی متر رشد کردند اما در ریزنمونه‌هایی که برای سه روز هم‌کشتی شده بودند سلول‌های مریستمی زاینده ریشه قهوه‌ای شدند. در نمونه‌های چهار روز هم کشتی ناحیه مریستمی کاملا نکروزه شد. بهترین مدت زمان هم کشتی برای سایر ارقام ٤۸ ساعت بود در حالی که برای رقم ورامین ۷۲ ساعت بهترین مدت زمان هم کشتی بود (جدول ۳). در طول مدت زمان هم‌کشتی عناصر کد شده به‌وسیله رگلون‌های *Vir* القا شده و انتقال و الحاق T-DNA را منجر می‌شوند (Stachel et al. 1985). به‌طور کلی مدت زمان هم کشتی برای اکثر گونه‌ها ۳–۲ روز گزارش شده‌است و مدت زمان‌های بیش‌تر از این منجر به بیش کشت اگروباکتریوم و در نتیجه از بین رفتن ریزنمونه می‌شود (Cervera et al. 1998). تایید تراریختی بر روی گیاهانی که پس ۸ هفته در محیط انتخابی زنده مانده بودند با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *nptII* صورت گرفت. هم‌چنین جهت بررسی عدم آلودگی نمونه‌ها از آغازگرهای *Vir* نیز استفاده شد. گیاهانی که برای PCR ژن *nptII* مثبت و برای PCR ژن *Vir* منفی بودند به‌عنوان گیاهان تراریخت در نظر گرفته و به گلدان منتقل شدند (شکل ٤). در ادامه گیاهان T1 تراریخت از طریق بررسی بیان کانامایسین با استفاده از روش *kan*-painting شناسایی شدند. غلظت استفاده شده برای تایید تراریختگی مشابه غلظت استفاده شده در محیط انتخابی و برابر ۹۰ mg/l بود. پس از به کار بردن کانامایسین بر روی برگ گیاهان، برگ گیاه غیر تراریخت نکروزه شده اما برگ گیاهان تراریخت شاداب و سبز ماند (شکل ۵). هم‌چنین برای تایید بیشتر گیاهان مقاوم به کانامایسین PCR انجام شد.



شکل ٤- نتایج حاصل از تجزیه PCR؛ C- کنترل منفی، T1، T2، T3، گیاهان ترانسژن و Ctrl گیاه شاهد غیر تراریخته

شکل ۵- آزمون Kan leaf-painting بر روی گیاهان T_1، سمت چپ گیاه ترانسژنی که ژن کانامایسین را بیان می‌کند، سمت راست گیاه شاهد غیر تراریخت پس از هفت روز به کار بردن کانامایسین بر روی برگ مورد مطالعه. فلش نقاط نکروزه شده بر اثر به کار بردن کانامایسین را نشان می‌دهد.

جدول ۳. کارایی ترانسفورماسیون بر روی پنج رقم پنبه با استفاده از تیمارهای انتخاب شده

تیمار	رقم cultivar				
مدت زمان پیش کشت	خورشید	کاشمر	ساحل	ورامین	لطیف
0	25 a [a]	23 a	24 a	23 a	24 a
1	20 b	15 b	16 b	18 b	16 b
2	11 c	12 c	9 c	12 c	12 c
3	5 d	3 d	4 d	8 c	5 d
OD باکتری					
0.3	25 a	24 a	22 a	25 a	26 a
0.4	20 a	22 a	23 a	22 a	25 a
0.5	12 c	13 c	11 c	11 c	12 c
0.6	8 d	2 d	9 c	8 d	8 d
غلظت استوسرینگون (میکرو مولار)					
0	d 2	1 d	1 d	2 d	1 d
50	12 b	11 b	14 b	13 b	14 b
100	24 a	21 a	23 a	24 a	24 a
150	7 c	6 c	5 c	6 c	c 6
200	2 d	1 d	2 d	1 d	1 d
نحوه تلقیح					
چکاندن	6 b	5 b	7 b	2 b	4 b
غوطه ور سازی	20 a	18 a	21 a	18 a	19 a
مدت زمان تلقیح					
10	b 8	8 b	7 b	5 b	5 b
20	19 a	20 a	18 a	19 a	18 a
30	2 c	1 c	2 c	1 c	1 c
مدت زمان هم کشتی					
1	8 b	8 b	b 7	6 b	b 6
2	23 a	21 a	20 a	21 a	23 a
3	6 c	4 c	4 c	19 a	3 c
4	2 d	3 c	2 c	1 d	0 d
سویه اگروباکتریوم					
GN 3103	20	16 b	20 a	18 a	19 a
LBA 4404	18 a	20 a	19 a	20 a	20 a
محیط تلقیح					
MS مایع	19 a	20 a	19 a	20 a	18 a
LB	5 b	6 b	5 b	4 b	5 b
محیط هم‌کشتی					
Co-culture+200 aceto	20	16 a	20 a	18 a	19 a
Co-culture+ 0 aceto	5 b	6 b	5 b	4 b	5 b

a اعداد به حروف یکسان تفاوت معنی‌داری در سطح پنج درصد در ازمون دانکن ندارد.

نتیجه‌گیری

اگر چه انتقال ژن به واسطه اگروباکتریوم پرکاربردترین روش انتقال ژن است، تنها تعداد کمی از ارقام به این روش پاسخگو هستند. عوامل زیادی می‌توانند کارایی انتقال ژن به‌واسطه اگروباکتریوم را تحت تاثیر قرار دهند که عمده‌ترین دلیل این امر پاسخ وابسته به ژنوتیپ در جنین‌زایی سوماتیکی است. استفاده از مریستم انتهایی برای باززایی نسبتا آسان‌تر است. از زمان اولین گزارش‌های انتقال ژن به واسطه اگروباکتریوم به ریزنمونه‌های مریستم انتهایی توسط Gould et al. (1998) و Zapata et al. (1999) گزارشات متعدد دیگری از انتقال ژن به این ریزنمونه منتشر شده‌است (Juturu et al. 2015; Sunilkumar and Rathore 2001; Zhang 2013). اما کارایی انتقال ژن در تمام این گزارشات بسیار پایین است. در این مطالعه تعدادی از عوامل اثرگذار بر کارایی انتقال ژن به واسطه اگروباکتریوم را بررسی شد.

در این مطالعه اثر پیش کشت برای نمونه‌ها بررسی شد که مشخص شد نمونه‌هایی که فقط چند ساعت بر بروی محیط پیش‌کشت قرار داده شده‌اند بیش‌ترین نرخ باززایی ۲۰ درصد را نشان دادند.

هر چند که پیش‌کشت کردن ریزنمونه‌های مریستمی در بسیاری از مطالعات توصیه شده برای مثال Li et al. (2012) پیش‌کشت ریز نمونه‌ها را به مدت ۳-٤ روز توصیه کرده‌اند (Lei et al. 2012). OD_{600}= 0.5 Li et al.(2012) را برای انتقال ژن به پنبه پیشنهاد کرده‌اند (Lei et al. 2012). در بسیاری از گونه‌های گیاهان غلظت اگروباکتریوم بر روی کارایی ترانسفورماسیون بستگی به رقم و گونه گیاهی دارد (Dutt and Grosser 2009). بنابراین بهینه‌سازی غلظت اگروباکتریوم و رقم مناسب جهت افزایش نرخ باززایی ضروری است. سویه اگروباکتریوم نقش مهمی در فرآیند ترانسفوماسیون دارد زیرا که در آلودگی و کارایی انتقال ژن نقش دارند (Bhatnagar and Khurana 2003). توان آلودگی سویه باکتری بین گونه‌های مختلف گیاهان و حتی ارقام گیاهی بسیار متنوع است و این امر ناشی از نوع اثر متقابل سلول‌های گیاه میزبان و سلول‌های باکتریایی است (Davis et al. 1991). تاکنون سویه LBA4404 بیش‌ترین کاربرد را در مطالعات انتقال ژن به پنبه داشته است (Bakhsh et al. 2015). و تاثیر سویه اگروباکتریوم بر روی نرخ باززایی تاکنون بررسی نشده است. نتایج مقایسه میانگین نشان داد که دو سویه برای سایر ارقام به جز رقم کاشمر کارایی یکسانی در انتقال ژن دارند. فرایند انتقال و درج T-DNA به سلول‌های میزبان به وسیله پروتئین‌های *Vir* صورت می‌گیرد، این گروه ژنی به‌وسیله ترکیبات فنولی ساخته شده توسط سلول‌های زخمی گیاهان القا می شوند (Georgiev et al. 2008). تاکنون ترکیبات متعددی در القای ژن‌های *Vir* شناسایی شده‌اند (Delmotte et al. 1991; Dye et al. 1997). از بین سایر این ترکیبات استوسرینگون پرکاربردترین و موثرترین عامل به شمار می‌رود (Fortin et al. 1992). در حضور غلظت کم استوسرینگون ترکیبات قندی مانند گلوکز و گالاکتوز به‌صوررت سینرژیک در القای ژن‌های *Vir* عمل می‌کنند (Cangelosi et al. 1990) و سبب افزایش نرخ ترانسفورماسیون در بسیاری از گونه‌ها می‌شوند (Henzi et al. 2000). هرچند Zapata et al. (1999) روش اول را برای تلقیح ریزنمونه‌های مریستم پیشنهاد کرده‌اند با این حال، Nandeshwar et al. (2009) روش دوم را برای تلقیح ریزنمونه‌های مریستمی مناسب‌تر گزارش کرده‌اند. در این مطالعه بهترین مدت زمان هم‌کشتی برای سایر ارقام ٤٨ ساعت بود طول مدت زمان هم‌کشتی عناصر کد شده به‌وسیله رگلون‌های *Vir* القا شده و انتقال و الحاق T-DNA را منجر می‌شوند (Stachel et al. 1985). به‌طور کلی مدت زمان هم‌کشتی برای اکثر گونه‌ها ۲-۳ روز گزارش شده‌است و مدت زمان‌های بیش‌تر از این منجر به بیش کشت اگروباکتریوم و در نتیجه از بین رفتن ریزنمونه می‌شود (Cervera et al. 1998). با این حال در مطالعات تراریزش نمونه‌های مریستمی هم‌کشتی ٤ روز بهترین نرخ ترانسفورماسیون را داشته است (Dutt et al. 2007)، که این نشان می‌دهد بافت‌های مریستمی نسبت به مدت زمان هم‌کشتی مقاومت بیش‌تری نسبت به سایر ریزنمونه‌ها دارند. نتایج به‌دست آمده از پژوهش حاضر را می‌توان به شکل زیر خلاصه کرد: کشت آگروباکتریوم استرین LBA4404 در محیط LB و کشت ریزنمونه‌های مریستم در محیط پیش‌کشت به مدت ٥-٤ ساعت، سپس تلقیح ریزنمونه‌ها به وسیله باکتری در محیط تلقیح MS با غلظت ۱۰۰ میکرومولار استوسرینگون و ۱ میلی‌گرم بر لیتر کاینتین، غوطه‌ورسازی نمونه‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در شیک انکوباتور ۲۸ درجه، ۲ روز هم‌کشتی

در شرایط تاریکی و دمای ۲۸ درجه و استفاده از غلظت ۹۰ میلی‌گرم بر لیتر کانامایسین برای انتخاب ریزنمونه‌های ترانسفورم کارایی ترانسفورماسیون را تا ۲۰ درصد افزایش می‌دهد. در این مطالعه روش انتقال ژن به‌واسطه اگروباکتریوم برای پنج رقم تجاری پنبه که گیاهی بسیار سرسخت است بهینه‌سازی شد.

سپاسگزاری

از پژوهشکده بیوتکنولوژی کرج به‌خاطر فراهم آوردن امکانات این پژوهش قدردانی می‌شود هم‌چنین نویسندگان از آقای دکتر زنگی عضو هیئت علمی مرکز تحقیقات پنبه گرگان به‌خاطر فراهم کردن بذور استفاده شده در این پژوهش تشکر می‌نمایند.

منابع

Bakhsh A, Anayol E, Özcan SF, Hussain T, Aasim M, Khawar KM, Özcan S (2015) An insight into cotton genetic engineering (*Gossypium hirsutum* L.): current endeavors and prospects. Acta Physiologiae Plantarum 37:171.

Bhatnagar S, Khurana P (2003) Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of Indian mulberry, Morus indica cv. K2: a time-phased screening strategy. Plant Cell Reports 21:669-675.

Bourras S, Rouxel T, Meyer M (2015) Agrobacterium tumefaciens gene transfer: how a plant pathogen hacks the nuclei of plant and nonplant organisms. Phytopathology 105:1288-1301.

Cangelosi GA, Ankenbauer RG, Nester EW (1990) Sugars induce the Agrobacterium virulence genes through a periplasmic binding protein and a transmembrane signal protein. Proceedings of the National Academy of Sciences 87:6708-6712.

Cervera M, Pina J, Juarez J, Navarro L, Pena L (1998) Agrobacterium-mediated transformation of citrange: factors affecting transformation and regeneration. Plant Cell Reports 18:271-278.

Cousins Y, Lyon B, Llewellyn D (1991)Transformation of an Australian cotton cultivar: prospects for cotton improvement through genetic engineering. Functional Plant Biology 18:481-494 18:481-494.

Davis ME, Lineberger RD, Miller AR (1991) Effects of tomato cultivar, leaf age, and bacterial strain on transformation by Agrobacterium tumefaciens. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 24:115-121.

Delmotte FM, Delay D, Cizeau J, Guerin B, Leple J-C (1991) Agrobacterium vir-inducing activities of glycosylated acetosyringone, acetovanillone, syringaldehyde and syringic acid derivatives. Phytochemistry 30:3549-3552.

Dutt M, Grosser J (2009) Evaluation of parameters affecting Agrobacterium-mediated transformation of citrus. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC) 98:331-340.

Dye F, Berthelot K, Griffon B, Delay D, Delmotte F (1997) Alkylsyringamides, new inducers of Agrobacterium tumefaciens virulence genes. Biochimie 79:3-6.

Feng R, Wang Q, Zhang B, Yu X (1996) Genotype analysis in cotton tissue culture and plant regeneration. Acta Agriculturae Boreali Sinica 6:27-30.

Fortin C, Nester E, Dion P (1992) Growth inhibition and loss of virulence in cultures of Agrobacterium tumefaciens treated with acetosyringone. African Journal of Bacteriology Research 174:5676-5685.

Georgiev M, Georgiev V, Weber J, Bley T, Ilieva M, Pavlov A (2008) Agrobacterium rhizogenes-mediated genetic transformations: A powerful tool for the production of metabolites Genetically modified plants. Nova Science Publishers, New York, USA:99-126.

Gould JH, Magallanes-Cedeno M (1998) Adaptation of cotton shoot apex culture to Agrobacterium-mediated transformation. Plant Molecular Biology Reporter 16:283-283Henzi M, Christey M, McNeil D (2000) Factors that influence Agrobacterium rhizogenes-mediated transformation of broccoli (*Brassica oleracea* L. var. italica). Plant Cell Reports 19:994-999.

Juturu VN, Mekala GK, Kirti P (2015) Current status of tissue culture and genetic transformation research in cotton (*Gossypium* spp.). Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC) 120:813-839.

Kumar M, Shukla A, Singh H, Verma P, Singh P (2013) A genotype-independent agrobacterium mediated transformation of germinated embryo of cotton (*gossypium hirsutum* l.). International Journal of Bio-Technology and Research 3:91-90.

Lei J, Li X, Wang D, Shao L, Wei X, Huang L (2012) Agrobacterium-mediated Transformation of Cotton Shoot Apex with SNC1 Gene and Resistance to Cotton Fusarium Wilt in T 1 Generation. Cotton Genomics and Genetics 3

Morre JL, Permingeat HR, Romagnoli MV, Heisterborg CM, Vallejos RH (1998) Multiple shoot induction and plant regeneration from embryonic axes of cotton. Plant Cell Tissue Organ Cult 54:131-136.

Nandeshwar SB, Sandhya Moghem, Chakrabarty PK, Deshattiwar MK, Keshav Kranthi, Anandkumar P, Mayee CD, Khadi BM (2009) Agrobacterium-Mediated Transformation of cry1Ac Gene into Shoot-Tip Meristem of Diploid Cotton Gossypium arboreum cv. RG8 and Regeneration of Transgenic Plants. Plant Molecular Biology Reporter 27: p.549

Niu X, Li X, Veronese P, Bressan R, Weller S, Hasegawa P (2000) Factors affecting Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of peppermint. Plant Cell Reports 19:304-310.

Niu X, Lin K, Hasegawa P, Bressan R, Weller S (1998) Transgenic peppermint (*Mentha× piperita* L.) plants obtained by cocultivation with Agrobacterium tumefaciens. Plant Cell Reports 17:165-171.

Noman A, Bashir R, Aqeel M, Anwer S, Iftikhar W, Zainab M, Zafar S, Khan Sh, Islam W, Adnan M (2016) Success of transgenic cotton (*Gossypium hirsutum* L.): Fiction or reality?. Cogent Food and Agriculture 2:1207844.

Nyaboga EN, Njiru JM, Tripathi L (2015) Factors influencing somatic embryogenesis, regeneration, and Agrobacterium-mediated transformation of cassava (*Manihot esculenta Crantz*) cultivar TME14. Frontiers in Plant Science 6: p.411

Renfroe M, Smith R Cotton shoot tip culture. In: Proceedings-Beltwide. Cotton Production Research Conferences (USA), 1986.

Saeed NA, Zafar Y, Malik KA (1997) A simple procedure of Gossypium meristem shoot tip culture. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 51:201-207

Sheng J, Citovsky V (1996) Agrobacterium-plant cell DNA transport: have virulence proteins, will travel. The Plant Cell 8:1699.

Soni R, Murray JA (1994) Isolation of intact DNA and RNA from plant tissues. Analytical Biochemistry 218:474-476.

Stachel SE, Messens E, Van Montagu M, Zambryski P (1985) Identification of the signal molecules produced by wounded plant cells that activate T-DNA transfer in Agrobacterium tumefaciens. Nature 318:624-629.

Sunilkumar G, Rathore KS (2001) Transgenic cotton: factors influencing Agrobacterium-mediated transformation and regeneration. Molecular Breeding 8:37-52.

Trolinder NL, Goodin J (1987) Somatic embryogenesis and plant regeneration in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). Plant Cell Reports 6:231-234.

Wang B, Liu L, Wang X, Yang J, Sun Z, Zhang N, Gao S (2009) Transgenic ramie [*Boehmeria nivea* (L.) Gaud.]: factors affecting the efficiency of Agrobacteriumtumefaciens-mediated transformation and regeneration. Plant Cell Reports 28:1319-1327.

Zapata C, Park S, El-Zik K, Smith R (1999) Transformation of a Texas cotton cultivar by using Agrobacterium and the shoot apex. TAG Theoretical and Applied Genetics 98:252-256.

Zhang B (2013) Transgenic cotton: from biotransformation methods to agricultural applicatio. Transgenic Cotton: Methods and Protocols 958:3-15

Zupan J, Zambryski P, Citovsky V (1997) The Agrobacterium DNA transfer complex. Critical Reviews in Plant Sciences 16:279-295.