

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^۱، حسن مرعشی^{۱*}، مسعود توحیدفر^۲، سعید ملک‌زاده شفارودی^۱

۱- به‌ترتیب دانشجوی دکتری، استاد، دانشیار، گروه بهنژادی و بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

۲- دانشیار، دانشکده مهندسی فناوری‌های نوین، دانشگاه شهید بهشتی

Hamid R¹, Marashi H^{*1}, Tohidfar M², Malekzadeh-shafaroudi S¹

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: ۹۶/۷/۱۷ - تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۲/۱۳)

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 phytag) بیش‌ترین درصد باززایی (۹۸ درصد) را ایجاد می‌کند، همچنین پیش‌کشت کوتاه مدت ریزنمونه‌ها به مدت ۴-۵ ساعت در محیط حاوی سیتوکینین، تلقیح به مدت ۲۰ دقیقه در محیط MS مایع حاوی ۱۰۰ میکرومولار استوسیرینگون و استفاده OD: ۰/۳، همکشتی به مدت دو روز و همچنین افزودن ۲۰۰ 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 همچنین مطالعه عملکرد ژن‌ها تبدیل شده است (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* به علت 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 ۶۵ 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 مرستمی برای باززایی و انتقال ژن با توجه به دوره کوتاه‌تر باززایی، و باززایی مستقل از ژنوتیپ بسیار مورد توجه قرار گرفته است. Renfro and Smith (1986) اولین گزارش از باززایی از بافت‌های مرستمی را منتشر کردند بعد از آن گزارشات متعدد از باززایی مرستم منتشر شد (Morre et al. 1998; Saeed et al. 1997; Zapata et al. 1999). از آنجا که بافت‌های مرستمی دارای کارایی بالای باززایی هستند (Niu et al. 1998)، افزایش کارایی ترانسفورماسیون به این بافت‌ها ضروری به نظر می‌رسد. انتقال ژن

به واسطه 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 حالی که 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 به واسطه *A. tumefaciens* به پنبه زارعی به منظور 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 به منظور کرک‌زدایی بذور با اسید سولفوریک غلیظ (۹۶ درصد) به مدت ۳۰ ثانیه شستشو داده شدند، سپس بذور با استفاده از آب شهری به مدت ۴۰ 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 ۵-۶ بار به خوبی آبکشی و بر روی کاغذ استریل خشک شدند. پس از خشک شدن بذور، ۳-۴ بذر در هر لوله آزمایش حاوی محیط

جوانه زنی (MS 1/2) قرار داده شد و بذور کشت داده شده در شرایط تاریکی به اتاقک کشت (25 ± 2 درجه) منتقل شد. جداسازی مریستم از گیاهچه‌های ۵-۴ روزه، ۴-۳ 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 به منظور 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 ۴-۳ 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. به منظور بررسی تاثیر پیش کشتی بر روی نرخ تراریختگی ریز نمونه‌ها در چهار دوره شامل ۵-۴ 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% Glucose) منتقل شدند. در این مطالعه از دو سویه آگروباکتریوم pBi 121 و GVA 3101 که دارای پلاسمید دوگانه pBi 121 بودند استفاده شد. به منظور تلقیح ریزنمونه‌ها، ابتدا یک کلون از باکتری تازه کشت آگروباکتریوم برداشته شد و به ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت باکتری مایع دارای آنتی‌بیوتیک‌های کانامایسین ۵۰ mg/L و ریف آمپسین ۷۵ mg/L در ارلن ۱۰۰ میلی‌لیتر منتقل شد. کشت در شیکر انکوباتور با دور ۱۸۵ rpm در دمای ۲۸ درجه به مدت یک شب (۱۶ ساعت) قرار داده شد. به منظور بررسی اثر OD بر کارایی ترانسفورماسیون دو میلی‌لیتر از این کشت برداشته و در ۵۰ میلی‌لیتر LB مایع به همراه آنتی‌بیوتیک‌های کانامایسین و ریف آمپسین کشت داده شد پس از ۴ 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 کایتین و دو درصد گلوکز و غلظت‌های مختلف استوسرینگون (pH محیط بر روی ۵/۴ 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 به صورت عمودی و رو به بالا بر روی محیط هم‌کشتی که یک کاغذ صافی بر آن قرار داده شده بود منتقل شدند و در مدت زمان‌های ۱، ۲، ۳ و ۴ 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 به خوبی خشک شدند و به محیط باززایی با آنتی‌بیوتیک انتخابی و غلظت‌های ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر سفاتاکسیم و ۲۰۰ میلی‌گرم کربنی‌سیلین در شرایط ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و دمای 25 ± 2 درجه منتقل شدند. ریز نمونه‌ها هر دو هفته یکبار واکشت شدند. به منظور بررسی درج ژن با استفاده از واکنش PCR، DNA ژنومی از برگ‌های جوان گیاهان باززا شده در محیط انتخابی به وسیله روش CTAB با اندکی تغییرات استخراج شد (Soni and Murray 1994). حضور ژن *nptII* از طریق آغازگرهای اختصاصی مورد تایید قرار گرفت. آغازگرهای استفاده شده برای ژن مقاومت به کاناماسین به صورت آغازگر

5'-GGGTGGAGAGGCTATTCGGCTATGA-3' و برای آغازگر عقب‌رونده 3'-ATTCGGCAAGCAGGCATCGC-5' می‌باشند که یک قطعه 700bp را تکثیر می‌کنند. پلاسمید pBi121 به عنوان کنترل مثبت و گیاهان غیر تراریخت و مسترمیکس به عنوان کنترل منفی انتخاب شدند. هم‌چنین از آغازگر ژن *Vir* برای تایید عدم آلودگی با آگروباکتریوم استفاده شد.

به منظور تجزیه‌های آماری فراوانی تشکیل ساقه از ریزنمونه‌ها به عنوان 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 کاملاً 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 ژرم پلاسماهای موجود، هتروزیگوسیتی بالا، آلپلوئیدی 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 به عنوان دستاوردی ارزشمند و جایگزین برای بهبود و اصلاح ژنتیکی پنبه مطرح شده است (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 به ویژه برای ارقام زراعی نیازمند مطالعه دقیق عوامل مؤثر بر باززایی و عامل‌های مؤثر بر تراریزش به واسطه آگروباکتریوم اند.

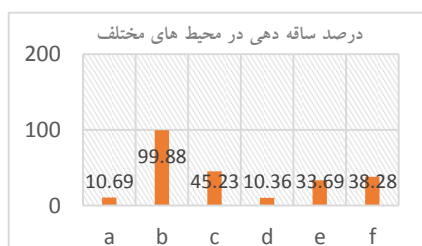
نتایج تجزیه واریانس میزان باززایی حاکی از آن است که گیاهچه‌هایی که در محیط (b) قرار داده شده‌اند بیشترین درصد ساقه‌دهی (۱۰۰ درصد) را داشتند (شکل ۱). گیاهچه‌های به دست آمده مطلوب و دارای فرم طبیعی بودند که در مقایسه با محیط‌های Zapata et al. (1999) و Gould et al. (1998) تعداد گیاهچه‌های بیشتری تولید کردند (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).

به منظور 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 کانامایسین) مشاهده شد. با افزایش غلظت کانامایسین تعداد ریزنمونه‌های از بین رفته

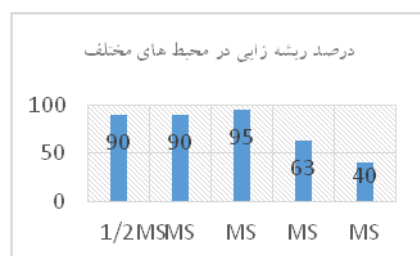
روند افزایشی داشت. در غلظت ۹۰ میلی گرم بر لیتر تمامی ریزنمونه‌های غیر تراریخته از بین رفتند. اما تفاوت معنی‌داری در سطوح بالاتر از ۹۰ میلی گرم در لیتر مشاهده نشد. به همین دلیل سطح مؤثر غلظت کانامایسین ۹۰ میلی گرم در لیتر تعیین شد و در همه محیط‌های انتخابی باززایی و نیز تشکیل ریشه از همین غلظت استفاده شد (جدول ۳).



شکل ۱- الف) مریستم‌های جداسازی شده پس از ۲ هفته بر روی محیط ساقه‌دهی (b) مریستم‌های جداسازی شده پس از ۴ هفته بر روی محیط ساقه‌دهی b



شکل ۲- درصد ساقه‌دهی در محیط‌های مختلف ساقه‌دهی



شکل ۳- 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	تعداد 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 معنی داری در سطح یک درصد در آزمون دانکن ندارد.

جدول ۲- تاثیر تیمارهای مختلف ریشه زایی بر میزان ریشه زایی

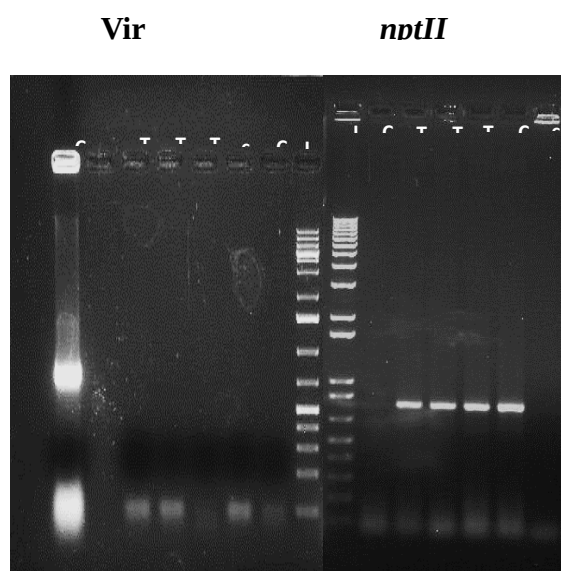
تیمار	محیط	IBA (mg/l)	درصد ریشه دهی	طول ریشه (cm)
			درصد	
A	1/2MS	0.0	90 a ^a	5.1±1.2a
B	MS	0.0	90 a	1.5b± 5.3
C	MS	1.0	95 a	7.1±0.7b
D	MS	1.5	63 b	3.5±1.3c
E	MS	2.0	40 c	1±0.5d

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

به منظور بهینه سازی عوامل موثر بر کارایی انتقال ژن عوامل مختلفی مورد بررسی قرار گرفت. در ابتدا پس از جداسازی مریستم ها در شرایط استریل، مریستم ها بر روی محیط هم کشتی به مدت ۱، ۲ و ۳ روز قرار داده شدند همچنین یک سری از مریستم ها به مدت ۴-۵ ساعت به محیط هم کشتی منتقل و در همان روز تلقیح شدند. نرخ باززایی پس از تلقیح برای یک روز هم کشتی ۳۰ درصد، برای ۲ و سه روز به ترتیب برابر ۲۴ و ۱۶ درصد بود. در حالی که نمونه هایی که بلافاصله پس از جداسازی تلقیح شده بودند، در محیط انتخابی نرخ باززایی ۳۵ درصد را نشان دادند (جدول ۳). (Gould et al. 1998) پیش کشت ریز نمونه ها را به مدت ۳-۵ روز توصیه و گزارش کرده اند که این روش علاوه بر شناسایی ریزنمونه های آلوده تقسیم سلولی را در سلول های مریستمی تحریک می کند (Gould and Magallanes-Cedeno 1998). نسبت بین سلول های آگروباکتریوم و سلول های میزبان یکی از عوامل بسیار مهم موثر در افزایش فراوانی انتقال T-DNA است، غلظت کم آگروباکتریوم فراوانی انتقال T-DNA را کاهش می دهد در حالی که غلظت بیشتر قابلیت زیست پذیری سلول های گیاهی را کاهش می دهد (Wang et al. 2009). تاثیر غلظت آگروباکتریوم بر روی فراوانی ترانسفورماسیون از طریق چهار

غلظت (۰/۳، ۰/۴، ۰/۵ و ۰/۶) بررسی شد. اثر غلظت آگروباکتریوم بر روی نرخ ترانسفورماسیون بین غلظت های ۰/۳ و ۰/۵ و ۰/۶ در سطح پنج درصد معنی دار بود در حالی که تفاوتی بین نرخ ترانسفورماسیون در غلظت های ۰/۳ و ۰/۴ مشاهده نشد. براساس نتایج مقایسه میانگین OD های ۰/۳ و ۰/۴: 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 معنی داری بین دو سویه آگروباکتریوم بر روی نرخ ترانسفورماسیون مشاهده نشد و به نظر می رسد 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 معنی دار بود. همچنین اضافه کردن استوسرینگون به محیط تلقیح اثر مثبت در افزایش نرخ ترانسفورماسیون در تمام ارقام مورد مطالعه داشت افزودن غلظت ۱۰۰ میکروگرم استوسرینگون به محیط تلقیح بیشترین کارایی را در افزایش نرخ ترانسفورماسیون نشان داد در حالی که تعداد گیاهان ترانسفورم شده در دو غلظت صفر و ۲۰۰

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 بیش‌کشت آگروباکتریوم و در نتیجه از بین رفتن ریزنمونه می‌شود (Cervera et al. 1998). تایید تراریختی بر روی گیاهانی که پس از 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 ۴). 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 به‌کار 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 ۴- نتایج حاصل از تجزیه PCR؛ C- کنترل منفی، T1، T2، T3، گیاهان ترانسژن و Ctrl گیاه شاهد غیر تراریخته

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 ۱۸-۲۰ درصد بود (جدول ۳). اثر مدت زمان هم‌کشتی بر نرخ تراریختگی برای ۱، ۲، ۳ و ۴ روز مورد آزمایش قرار گرفت. اثر مدت زمان هم‌کشتی 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 مرستمی زاینده ریشه قهوه‌ای شدند. در نمونه‌های چهار روز هم‌کشتی ناحیه مرستمی کاملاً نکروزه شد. بهترین مدت زمان هم‌کشتی برای سایر ارقام ۴۸ ساعت بود در حالی که برای رقم ورامین ۷۲ ساعت بهترین مدت زمان هم‌کشتی بود (جدول ۳). در طول مدت زمان هم‌کشتی عناصر کد شده به‌وسیله رگولون‌های *Vir* القا



شکل ۵- آزمون Kan leaf-painting بر روی گیاهان T_1 ، سمت چپ گیاه ترانسژنی که ژن کانامایسین را بیان می کند، 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 می دهد.

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

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

a اعداد به حروف یکسان تفاوت معنی داری در سطح پنج درصد در آزمون دانکن ندارد.

نتیجه گیری

اگر چه انتقال ژن به واسطه اگروباکتریوم پرکاربردترین روش انتقال ژن است، تنها تعداد کمی از ارقام به این روش پاسخگو هستند. عوامل زیادی می توانند کارایی انتقال ژن به واسطه اگروباکتریوم را تحت تاثیر قرار دهند که عمده ترین دلیل این امر پاسخ وابسته به ژنوتیپ در جنین زایی سوماتیکی است. استفاده از مریستم انتهایی برای باززایی نسبتا آسان تر است. از زمان اولین گزارش های انتقال ژن به واسطه اگروباکتریوم به ریزنمونه های مریستم انتهایی توسط Gould et al. (1998) و Zapata et al. (1999) گزارشات متعدد دیگری از انتقال ژن به این ریزنمونه منتشر شده است (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 نمونه ها بررسی شد که مشخص شد نمونه هایی که فقط چند ساعت بر روی محیط پیش کشت قرار داده شده اند بیش ترین نرخ باززایی ۲۰ درصد را نشان دادند.

هر چند که پیش کشت کردن ریزنمونه های مریستمی در بسیاری از مطالعات توصیه شده برای مثال Li et al. (2012) پیش کشت ریز نمونه ها را به مدت ۳-۴ روز توصیه کرده اند (Lei et al. 2012). Li et al. (2012) $OD_{600} = 0.5$ را برای انتقال ژن به پنبه پیشنهاد کرده اند (Lei et al. 2012). در بسیاری از گونه های گیاهان غلظت اگروباکتریوم بر روی کارایی ترانسفورماسیون بستگی به رقم و گونه گیاهی دارد (Dutt and Grosser 2009). بنابراین بهبود سازی غلظت اگروباکتریوم و رقم مناسب جهت افزایش نرخ باززایی ضروری است. سویه اگروباکتریوم نقش مهمی در فرآیند ترانسفورماسیون دارد زیرا که در آلودگی و کارایی انتقال ژن نقش دارند (Bhatnagar and Khurana 2003). توان آلودگی سویه باکتری بین گونه های مختلف گیاهان و حتی ارقام گیاهی بسیار متنوع است و این امر ناشی از نوع اثر متقابل سلول های گیاه میزبان و سلول های باکتریایی است (Davis et al. 1991). تاکنون سویه LBA4404 بیش ترین 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 سلول های میزبان به وسیله پروتئین های Vir صورت می گیرد، این گروه ژنی به وسیله ترکیبات فنولی ساخته شده توسط سلول های زخمی گیاهان القا می شوند (Georgiev et al. 2008). تاکنون ترکیبات متعددی در القای ژن های Vir شناسایی شده اند (Delmotte et al. 1991; Dye et al. 1997). از بین سایر این ترکیبات استوسرینگون پرکاربردترین و موثرترین عامل به شمار می رود (Fortin et al. 1992). در حضور غلظت کم استوسرینگون ترکیبات قندی مانند گلوکز و گالاکتوز به صورت سینرژیک در القای ژن های Vir عمل می کنند (Cangelosi et al. 1990) و سبب افزایش نرخ ترانسفورماسیون در بسیاری از گونه ها می شوند (Henzi et al. 2000). هر چند Zapata et al. (1999) روش اول را برای تلقیح ریزنمونه های مریستم پیشنهاد کرده اند با این حال، Nandeshwar et al. (2009) روش دوم را برای تلقیح ریزنمونه های مریستمی مناسب تر گزارش کرده اند. در این مطالعه بهترین مدت زمان هم کشتی برای سایر ارقام ۴۸ ساعت بود طول مدت زمان هم کشتی عناصر کد شده به وسیله رگولون های Vir القا شده و انتقال و الحاق T-DNA را منجر می شوند (Stachel et al. 1985). به طور کلی مدت زمان هم کشتی برای اکثر گونه ها ۲-۳ روز گزارش شده است و مدت زمان های بیش تر از این منجر به بیش کشت اگروباکتریوم و در نتیجه از بین رفتن ریزنمونه می شود (Cervera et al. 1998). با این حال در مطالعات تراریزش نمونه های مریستمی هم کشتی ۴ روز بهترین نرخ ترانسفورماسیون را داشته است (Dutt et al. 2007)، که این نشان می دهد بافت های مریستمی نسبت به مدت زمان هم کشتی مقاومت بیش تری نسبت به سایر ریزنمونه ها دارند. نتایج به دست آمده از پژوهش حاضر را می توان به شکل زیر خلاصه کرد: کشت اگروباکتریوم استرین LBA4404 در محیط LB و کشت ریزنمونه های مریستم در محیط پیش کشت به مدت ۵-۴ ساعت، سپس تلقیح ریزنمونه ها به وسیله باکتری در محیط تلقیح MS با غلظت ۱۰۰ میکرومولار استوسرینگون و ۱ میلی گرم بر لیتر کایتین، غوطه وری سازی نمونه ها به مدت ۲۰ دقیقه در شیک انکوباتور ۲۸ درجه، ۲ روز هم کشتی

سپاسگزاری

از پژوهشکده بیوتکنولوژی کرج به خاطر فراهم آوردن امکانات این پژوهش قدردانی می شود هم چنین نویسندگان از آقای دکتر زنگی عضو هیئت علمی مرکز تحقیقات پنبه گرگان به خاطر فراهم کردن بذور استفاده شده در این پژوهش تشکر می نمایند.

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.
- 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* 16:283-283.
- Henzi 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
- Renfro 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 *Agrobacterium tumefaciens*-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.