۴۶۳۶۷

دانشگاه رازی

دانشکده کشاورزی

گروه زراعت و اصلاح نباتات

پایان نامه جهت دریافت درجه کارشناسی ارشد در رشته اصلاح نباتات (مهندسی کشاورزی)

ردیابی و زیست سنجی ژن *Bt* درنسل سوم (T_2) پنبه تراریخت

اساتید راهنما:

دکترعزت اله فرشاد فر

دکتر مسعود توحید فر

نگارش:

شهره یزدانی

۱۳۸۷ /۷/ ۱۱

اسفند ۱۳۸۶

٤٦٣٦٧

دانشگاه رازی

دانشکده کشاورزی
گروه زراعت واصلاح نباتات

پایان نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد رشته ی مهندسی کشاورزی گرایش اصلاح نباتات

تحقیق و نگارش:
شهره یزدانی

تحت عنوان

ردیابی و زیست سنجی ژن *Bt* در نسل سوم (T_2) پنبه تراریخت

در تاریخ ۱۳۸۶/۱۲/۲۱ توسط هیأت داوران زیر بررسی و با درجه **عالی** به تصویب نهایی رسید.

۱- استاد راهنما	دکتر عزت اله فرشادفر	با مرتبه علمی استاد	امضاء
۲- استاد راهنما	دکتر مسعود توحیدفر	با مرتبه علمی استادیار	امضاء
۲- استاد داور داخل گروه	دکتر علیرضا زبرجدی	با مرتبه علمی استادیار	امضاء
۳- استاد داور خارج از گروه	دکتر ناصر معینی نقده	با مرتبه علمی استادیار	امضاء

کلیه حقوق مادی مترتب بر نتایج مطالعات، ابتکارات و
نوآوری های ناشی از تحقیق موضوع این پایان نامه
متعلق به دانشگاه رازی است.

تقدیر و تشکر

سپاس پروردگار بی همتا را که همواره از لطف و رحمت بیکرانش بهره مند بوده ام. این پروژه بدون همکاری بسیاری به شیوه های مختلف امکان پذیر نبود. من صمیمانه ترین تشکرم را به آنها تقدیم می کنم.

از استاد ارجمند جناب آقای دکتر عزت اله فرشادفر سپاسگزارم. از جناب آقای دکتر چقامیرزا و جناب آقای دکتر معینی نقده به خاطر مطالعه و تصحیح پایان نامه تشکر می کنم. از پیشنهادات و نقدهای سازنده استاد ارجمند جناب آقای دکتر علیرضا زبرجدی در تصحیح پایان نامه کمال تشکر را دارم. از جناب آقای دکتر ترکی نماینده ی محترم تحصیلات تکمیلی سپاسگزارم. از یکایک اساتید بزرگواری که از محضرشان بهره مند شدم؛ دکتر مصطفی آقایی سربرزه، دکتر عزت اله فرشادفر، دکتر کیانوش چقا میرزا، دکتر صحبت بهرامی نژاد، دکتر محسن فرشادفر، دکتر دانیال کهریزی، دکتر علیرضا زبرجدی و دکتر عبداله نجفی سپاسگزاری می کنم. از آنجا که تمام این پروژه در موسسه بیوتکنولوژی کشاورزی کرج انجام شده است از پرسنل محترم این موسسه به خصوص بخش کشت بافت و انتقال ژن تشکر می کنم.

یاد و خاطره ی دوستان عزیز؛ خانم ها آسیه مرادی، لیلا زارعی، مهستی عباسی تکیه، لیلا اکبری، زینب چقا کبودی، مینا کاویانی، پگاه خسروی، سولماز خسروی، زیبا قسیمی حق، شکیبا رجب پور، زهرا کمالی، ندا سبحانیان، مریم شیبانی، زهرا حسینی و مهناز عروجلو که در طی تحصیل و اجرای پایان نامه با آنها بودم تکرار ناپذیر و جبران خوبی هایشان غیر ممکن است. از همه آنها تشکر می کنم.

در نهایت من برای همیشه از خانواده عزیزم سپاسگزارم. آنها که در برخورد با موانع و چالش ها صبورانه کنارم ایستادند. به پاس محبت ها و حمایت های بی دریغشان.

چکیده

در یک پروژه انتقال ژن، آنالیزهای مولکولی پس از تراریختی به همراه آزمون زیست سنجی جهت بررسی پایداری ژن انتقال یافته و گزینش لاین های هموزایگوس در نسل های پیشرفته، حائز اهمیت است. در این تحقیق نسل سوم (T_2) پنبه تراریخت Bt که به روش آگروباکتریوم با پلاسمید نوترکیب pBI121-*cry1Ab* تراریخت شده بود، از نظر پایداری ژن مذکور، بررسی و با کرم غوزه پنبه زیست سنجی شد. واکنش زنجیره ای پلی مراز (PCR) و آنالیز سادرن بلات برای تایید الحاق ژن *cry1Ab* در ژنوم استفاده شد. از ۶ لاین مستقل تحت بررسی، لاین ۶۱/۲۹ هموزایگوس بود. آنالیز RT-PCR بیان ژن در سطح mRNA را نشان داد. زیست سنجی نشان دهنده مقاومت پنبه های تراریخت در مقایسه با گیاهان شاهد در برابر کرم غوزه بود که از جمله آفات مهم پنبه در ایران به شمار می رود. لاین هموزایگوس ۶۱/۲۹ پس از تثبیت صفات زراعی مطلوب در صورت موفقیت در آزمایشات مزرعه ای می تواند به عنوان منبع دهنده ژن استفاده شود.

کلمات کلیدی: آنالیز گیاهان تراریخت، زیست سنجی، پنبه Bt.

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول: مقدمه

مقدمه ۲

فصل دوم: بررسی منابع

۲-۱- گیاه شناسی پنبه ۵

۲-۲- گونه های پنبه ۵

۲-۳- ارقام موفق پنبه در ایران ۶

۲-۴- اهمیت اقتصادی پنبه ۷

۲-۵- اصلاح پنبه ۷

۲-۶- گیاهان تراریخت ۸

۲-۶-۱- روش های انتقال ژن در پنبه ۸

۲-۶-۱-۱- از طریق آگروباکتریوم ۸

۲-۶-۱-۲- از طریق زیست پرتابی ۹

۲-۷- نقش گیاهان تراریخت در کنترل آفات و بیماری ها ۹

۲-۸- ژن های *Bt* ۱۱

۲-۸-۱- مقدار پروتئین لازم برای دفع لارو حشرات ۱۱

۲-۹- ژن های انتقال یافته از گیاهان ۱۲

۲-۹-۱- ژن های مهار کننده پروتئاز ۱۲

۲-۹-۲- ژن های مهار کننده آلفا آمیلاز ۱۳

۲-۹-۳- ژن های لکتین ۱۳

۲-۱۰- هرم بندی ژن ۱۳

۲-۱۱- کرم غوزه پنبه ۱۴

۲-۱۲- خصوصیات دستگاه گوارش پروانه ها ۱۵

۲-۱۳- مکانیسم اثر دلتا- اندوتوکسین ۱۵

۲-۱۴- پنبه Bt ۱۶

۲-۱۵- استفاده از پنبه Bt با وجود در دسترس بودن حشره کش های Bt ۱۶

۲-۱۶- ایمنی پنبه های تراریخت ۱۷

۲-۱۷- پیشرفت های حاصله در افزایش مقاومت گیاهان زراعی تراریخت ۱۸

۲-۱۸- آینده کشت گیاهان تراریخت ۱۹

۲-۱۹- رشد مقاومت آفت در برابر پنبه Bt ۱۹

۲-۲۰- مدیریت مقاومت آفت به پنبه Bt ۲۰

۲-۲۱- مزایا و معایب گیاهان زراعی تراریخت در کنترل آفات..... ۲۱
۲-۲۲- آنالیز مولکولی گیاهان تراریخت..... ۲۱
۲-۲۲-۱- استفاده از ژن های گزینش گر ۲۱
۲-۲۲-۲- واکنش زنجیره ای پلیمراز ۲۲
۲-۲۲-۳- دورگ سازی سادرن ۲۴
۲-۲۲-۳-۱- نشان دار کردن DNA و تهیه کاوشگر ۲۵
۲-۲۲-۴- آنالیز Dot blot ۲۷
۲-۲۲-۵- وسترن بلاتینگ ۲۷
۲-۲۲-۵-۱- سنجش غلظت پروتئین..... ۲۷
۲-۲۲-۶- نورترن بلاتینگ..... ۲۸
۲-۲۲-۷- هیبریداسیون فلورسانت در محل ۲۸
۲-۲۲-۸- PCR به همراه نسخه برداری معکوس (RT-PCR) ۲۹
۲-۲۳- ارزیابی گلخانه ای و مزرعه ای محصولات تراریخت مقاوم به آفت..... ۳۰
۲-۲۴- توجیه اقتصادی کشت پنبه تراریخت بی تی در ایران ۳۰

فصل سوم: مواد و روش ها

۳-۱- مواد گیاهی ۳۳
۳-۲- ضد عفونی و کاشت بذرها..... ۳۴
۳-۳- استخراج DNA ۳۴
۳-۳-۱- بافرهای استخراج DNA..... ۳۴
۳-۳-۲- مراحل استخراج DNA ۳۵
۳-۴- تعیین کمیت و کیفیت DNA استخراج شده..... ۳۶
۳-۴-۱- روش های اسپکترو فتومتری..... ۳۶
۳-۴-۲- روش الکتروفورز بر روی ژل آگارز..... ۳۷
۳-۴-۲-۱- روش تهیه ژل آگارز۱٪..... ۳۷
۳-۵- واکنش زنجیره ای پلی مراز..... ۳۸
۳-۶- استخراج پلاسمید..... ۴۰
۳-۶-۱- محلول های مورد نیاز برای استخراج پلاسمید..... ۴۰
۳-۶-۲- روش استخراج پلاسمید..... ۴۱
۳-۷- آنالیز دورگ سازی سادرن..... ۴۲
۳-۷-۱- تهیه کاوشگر..... ۴۲
۳-۷-۲- مراحل سادرن..... ۴۳
۳-۸- استخراج RNA و انجام RT-PCR..... ۴۶
۳-۸-۱- روش استخراج RNA با استفاده از ترایزول..... ۴۶
۳-۸-۲- مواد و محلول های لازم برای تعیین کمیت و کیفیت RNA..... ۴۷
۳-۸-۲-۱- تعین کیفیت RNA..... ۴۸

۳-۸-۲-۲- تعیین کمیت RNA ۴۹
۳-۸-۳- RT-PCR ۴۹
۳-۹- زیست سنجی ۴۹

فصل چهارم: نتیجه گیری و بحث

۴-۱- استخراج DNA ۵۲
۴-۲- واکنش زنجیره ای پلی مراز ۵۲
۴-۳- نتایج دو رگ سازی سادرن ۵۴
۴-۴- آنالیز RT-PCR گیاهان تراریخت ۵۶
۴-۵- روند رشد گیاهان تراریخت در نسل سوم ۵۷
۴-۶- زیست سنجی ۵۹
۴-۷- نتایج کلی ۶۲
۴-۸- پیشنهادات ۶۲

منابع ۶۴

فهرست جدول ها

جدول ۳-۱- تعداد لاین ها و بذرهای کشت شده ۳۳
جدول ۳-۲- بافر استخراج ۳۴
جدول ۳-۳- بافر هضم کننده ۳۵
جدول ۳-۴- برنامه PCR برای تکثیر ژن *cry1Ab* ۳۹
جدول ۳-۵- توالی آغازگرهای ژن *cry1Ab* ۳۹
جدول ۳-۶- مقدار مواد استفاده شده در یک واکنش ۲۵ میکرولیتری PCR ۳۹
جدول ۳-۷- روش تهیه I مورد استفاده در استخراج پلاسمید ۴۰
جدول ۳-۸- روش تهیه محلول III مورد استفاده در استخراج پلاسمید ۴۱
جدول ۳-۹- مقدار مواد استفاده شده برای واکنش RT-PCR ۴۹
جدول ۴-۱- نتایج PCR گیاهان تراریخته نسل سوم ۵۲
جدول ۴-۲- تست χ^2 برای تبعیت تفرق ژن*cry1Ab* از نسبت مندلی ۳:۱ ..... ۵۴
جدول ۴-۳- بخشی از نتایج زیست سنجی ۲ ماه پس از رشد گیاه ۵۹
جدول ۴-۴- بخشی از نتایج زیست سنجی ۴ ماه پس از رشد گیاه ۶۰

فهرست شکل ها

شکل ۳-۱- نقشه فیزیکی پلاسمید نوترکیب pBI121-Bt ۳۳
شکل ۴-۱- DNA ژنومی پنبه ۵۲
شکل ۴-۲- محصول PCR ژن *cry1Ab* ۵۳
شکل ۴-۳- تست نشان دار کردن DNA ۵۴
شکل ۴-۴- نمونه های هضم شده و هضم نشده DNA ژنومی ۵۵
شکل ۴-۵- آنالیز سادرن بلات پنبه های تراریخت ۵۶
شکل ۴-۶- نمونه RNA استخراج شده ۵۷
شکل ۴-۷- RT-PCR یک نمونه تراریخت ۵۷
شکل ۴-۸- روند رشد گیاهان تراریخت ۵۸
شکل ۴-۹- مقایسه ظاهری گیاهچه شاهد و تراریخت ۵۸
شکل ۴-۱۰- مقایسه ظاهری گیاه شاهد و تراریخت در مرحله بلوغ ۵۹
شکل ۴-۱۱- آزمون زیست سنجی نسل سوم پنبه تراریخت ۶۰
شکل ۴-۱۲- لاروهای تغذیه شده از برگ پنبه تراریخت و غیر تراریخت ۶۱

فصل اول

مقدمه

مقدمه :

افزایش کمیت و کیفیت محصولات کشاورزی از مهم ترین حوزه های بیوتکنولوژی نوین به خصوص برای کشور های در حال توسعه و پرجمعیت می باشد.

منابع غذایی انسان به صورت مستقیم و یا غیر مستقیم به گیاهان وابسته است و در این میان گیاهان زراعی نقش عمده ای در تامین نیازهای بشر ایفا می کنند. تکنیک های مرسوم اصلاح گیاهان که براساس فرایند هایی نظیر تلاقی، تلاقی برگشتی و گزینش می باشد، وقت گیر است، ضمن آن که بشر با استفاده از امکانات موجود، امروزه برای تولیدات کشاورزی با محدودیت منابع روبرو می باشد. پیشرفتی که در سال های اخیر در علم زیست شناسی مولکولی و فن آوری انتقال ژن حاصل شد، نوید بخش توانمندی های جدید در عرصه بیوتکنولوژی بود.

فنون دست ورزی ژنتیکی گیاهان از شاخه های بیوتکنولوژی است که در اوایل دهه ۸۰ میلادی ابداع شد و نتایج کاربردی آن از اوایل دهه ۹۰ میلادی با ایجاد گیاهان تراریخت مقاوم به آفات، بیماری ها و علف کش ها به ثمر نشست. فرآیند تولید گیاهان حاصل از دست ورزی ژنتیکی شامل انتقال، ادغام و بیان ژن های معین بدون انتقال ژن های ناخواسته به سلول های گیاه می باشد (اسکریت[۱] ، ۲۰۰۰).

کاهش مصرف سموم، کاهش هزینه های تولید، افزایش عملکرد، محیط زیست سالم تر برای انسان، دام، آبزیان و به ویژه انطباق با روش های مبارزه تلفیقی از مزایای کاربرد گیاهان تراریخت مقاوم به آفات و بیماری ها است (کاستیلو[۲] و همکاران، ۲۰۰۱).

پنبه یکی از تولیدات مهم و استراتژیک کشاورزی جهان و ایران است ودر دنیای امروز در تأمین نیازهای ضروری انسان مانند پوشاک، تأمین بهداشت، تهیه روغن های خوراکی، صنعتی و طبی نقش اساسی دارد. همچنین از کنجاله این گیاه برای تهیه خوراک دام و تولید کود استفاده می شود. از نظر الیاف نیز پنبه به علت دارا بودن خصوصیات ویژه همچنان جایگاه خود را در مقایسه با الیاف مصنوعی حفظ کرده است. از این رو این محصول در پروژه های دست ورزی ژنتیکی با هدف تولید صفات زراعی جدید از جمله صفت مقاومت به آفت مورد توجه قرار گرفته است. کاهش عملکرد پنبه به علت وجود آفات متعدد آن به حدی است که ۲۴ درصد از بازار آفت کش ها در دنیا تنها به حفاظت این محصول اختصاص دارد (چن[۳] و همکاران، ۲۰۰۲).

انتقال ژن های مربوط به سنتز انواع پروتئین های کریستالی آفت کش Cry از باکتری *Bacillus thuringiensis* به پنبه موجب تولید پنبه تراریخت مقاوم به آفت شده است که نتایج قابل توجهی در برخی کشورها از جمله سه کشور مطرح تولید کننده پنبه یعنی چین، آمریکا و هند داشته است (جیمز[۴]، ۲۰۰۷).

---

[۱] Skerritt
[۲] Castillo
[۳] Chen
[۴] James

پنبه جزء گیاهان مهم زراعی ایران به شمار می آید و کشت آن در گرگان، مازندران، خراسان، فارس، استان مرکزی و به طور پراکنده در سایر نقاط کشور انجام می شود. سطح زیر کشت پنبه تا سال ۱۳۵۷ حدود ۴۰۰ هزار هکتار بود در حالی که سطح زیر کشت آن در سال ۱۳۸۶ حدود ۱۲۰ هزار هکتار گزارش شد. از بین ۵۴ کشور پنبه خیز در دنیا طی سال ۲۰۰۷- ۲۰۰۶ ایران رتبه دوازدهم تولید را به دست آورده است. این در حالی است که ایران به لحاظ سوابق و تجارب موفق کشت پنبه، وجود اراضی مرغوب و نیروی کار، شایسته است که رتبه بهتری در این زمینه داشته باشد. اگر علل سیر نزولی این محصول در کشور مورد توجه قرار نگیرد، به یکی از واردکنندگان این محصول تبدیل شده و صنایع نساجی کشور دچار وابستگی شدید خواهد شد.

یکی از آفات مهم پنبه در ایران، کرم غوزه پنبه *(Helicoverpa armigera)* است که گونه ای پلی فاژ و همه جایی از راسته لپیدوپترا است. صفت مقاومت به کرم غوزه در هیچ یک از نمونه های پنبه نگهداری شده در بانک ژن مشاهده نشده است. با توجه به عدم دسترسی به ارقام مقاوم نمی توان از روش های مرسوم اصلاح نباتات برای ایجاد چنین صفت مهمی استفاده کرد. نظر به اهمیت پنبه به عنوان یک محصول راهبردی و نقش آن در زنجیره اقتصاد کشور،کشت پنبه تراریخت مقاوم به آفت با هدف کنترل میزان خسارت در حد مطلوب و قابل قبول و حفظ محیط زیست از طریق کاهش مصرف سموم شیمیایی مورد توجه قرار گرفته است (توحید فر، ۱۳۸۱).

فصل دوم

بررسی منابع

۲-۱- گیاه شناسی پنبه

پنبه گیاهی است گلدار (دولپه) از تیره پنیرک[۱] و از جنس گوسیپیوم[۲] که ذاتاً چند ساله و گرمسیری بوده ولی امروزه به صورت یکساله با طول دوره رشد حدود ۲۰۰ روز، به صورت درختچه ای کوچک با ارتفاع ۶۰ الی ۱۲۰ سانتی متر رشد می کند. بر روی هر شاخه معمولاً تعداد ۸ برگ پنجه ای به طور متناوب قرار می گیرند. در انتهای دمبرگ ها، دو جوانه یکی رویشی و دیگری زایشی دیده می شود. جوانه رویشی به شاخه برگدار و جوانه زایشی به ساقه گل دهنده تبدیل می گردد. گل های پنبه کامل بوده و از ۵ کاسبرگ به هم چسبیده، ۵ گلبرگ و توسط ۳ اندام برگ مانند به نام برگچه احاطه شده است. یک روز قبل از گرده افشانی، جام گل از داخل برگچه ها خارج می شود. رنگ گلبرگ ها در موقع باز شدن، کرم و یا زرد است ولی روز دوم تغییر کرده و به رنگ قرمز درمی آید که این مشخصه پایان گرده افشانی در آن گل است . دانه های گرده پنبه سنگین بوده، مستقیماً روی کلاله خودی ریخته شده و موجب خودباروری می گردد و یا ممکن است به وسیله حشرات به سایر گل ها منتقل شده و باعث دگرباروری گردد. دانه های گرده چسبناک است و به مقدار بسیار کمی توسط باد منتقل می شود (یزدی صمدی و عبد میشانی، ۱۳۸۰).

۲-۲- گونه های پنبه

جنس گوسیپیوم جنس بسیار بزرگی است و در حال حاضر دارای ۵۰ گونه با تعداد کروموزوم پایه ۱۳ می باشد. گونه های جدید به طور مستمر درحال کشف می باشند. در میان گونه های شناخته شده ۴۵ گونه دیپلوییدی (۲n =۲x=۲۶) است که در هفت گروه ژنومی A، B، C، D، E، F و G قرار می گیرند.

گونه های دیپلوییدی با ژنوم A، B، E یا F دارای منشاء آفریقایی هستند و به عنوان گونه های دنیای قدیم معروفند. این گونه ها به خوبی با یکدیگر تلاقی یافته و قرابت نزدیکی با همدیگر دارند. گونه های دارای ژنوم D از نیمکره غربی منشا یافته و به گونه های دنیای جدید معروفند. کروموزوم های ژنوم D کوچکتر از کروموزوم سایر ژنوم ها می باشند به علاوه در این گونه ۴۵ گونه دیپلوییدی و ۵ گونه تتراپلوییدی (۲n =۴x =۵۲) وجود دارد. هر ۵ گونه مربوط به دنیای جدید می باشد که ۴ گونه منشاء آمریکایی دارند و یک گونه با منشاء هاوایی می باشد. آلوتتراپلوییدهای دنیای جدید دارای AADD ترکیبی از ۲۶ کروموزوم بزرگ و ۲۶ کروموزوم کوچک می باشند. تعدادی از کروموزوم های ژنوم A و D یکسان است.

۲ گونه دیپلوییدی و ۲ گونه تتراپلوییدی گوسیپیوم دارای الیاف بذری قابل بافت می باشند که لینت نامیده می شود. پنبه های زراعی دنیا شامل چهار گونه است:

۱- *G. herbaceum* (۲n =۲x =۲۶) ژنوم A با کروموزوم های بزرگ

۲- *G. arboreum* (۲n =۲x =۲۶) ژنوم A با کروموزوم های بزرگ

---

[۱] Malvaceae

[۲] Gossypium spp.

۳- *G. hirsutum* (۲n =۴x = ۵۲) ژنو م های AD با ۲۶ کروموزوم بزرگ و ۲۶ کروموزوم کوچک

۴- *G. barbadense* (۲n = ۴x = ۵۲) ژنوم های AD با ۲۶ کروموزوم بزرگ و ۲۶ کروموزوم کوچک

دو گونه اخیر، پنبه زراعی اصلی دنیا بوده و ۹۰ درصد تولید پنبه به آنها اختصاص دارد (ارزانی، ۱۳۸۰).

بیشتر ارقامی که امروزه در جهان کاشته می شود به گونه *G. hisutum* تعلق دارند . ارقام این گونه دارای غوزه های بزرگ، عملکرد بالا و الیافی با طول متوسط می باشند. ارقام گونه *G.barbadense* غوزه های کوچکتر و عملکرد کمتری دارند، اما الیاف بلندتری داشته و کیفیت آنها بسیار بالاتر است (خواجه پور، ۱۳۷۷).

۲-۳- ارقام موفق پنبه در ایران

ساحل رقمی است که از آمیزش کوکرهندردویلت[۱] و نژاد ۳۴۹ در مرکز اصلاح، تهیه نهال و بذر ورامین به دست آمده است و در نواحی ساحلی کشور مانند گرگان و گنبد کشت می شود. این رقم به بیماری ورتیسیلیوز[۲] متحمل است. رقم ورامین از آمیزش کوکرهندردویلت و نژاد ۵۳۹ در مرکز اصلاح، تهیه نهال و بذر ورامین به دست آمده و در نواحی مرکزی کشور، خراسان و دشت مغان کشت می شود. رقم بختگان حاصل گزینش پنبه آمریکایی آکالا اس جی ۲[۳] در مرکز، ورامین و مناسب برای بعضی نواحی فارس می باشد. رقم زودرس موتاژنز دارای حدود ۹ درصد افزایش عملکرد نسبت به رقم ورامین بوده، از نظر درصد و یکنواختی الیاف برتر از رقم تجاری ساحل و ورامین و از نظر میزان تحمل به بیماری، در حد رقم ساحل می باشد. رقم دلتاپاین ۱۵[۴] از ازبکستان وارد ایران شد و طی مراحل گزینش در چند نسل، وارد آزمایش های مقایسه عملکرد شد. از نظر سازگاری و عملکرد، همپای ارقام ساحل و ورامین می باشد. رقم سیندوس که منشاء آن یونانی است و در سال ۱۳۶۴ وارد ایران شد، عملکرد آن حدوداً ۳۰ درصد بیشتر از ارقام ورامین و ساحل بوده و همچنین زودرس تر از ارقام تجاری مذکور می باشد. الیاف آن نیز کیفیت خوبی دارد (توحیدفر، ۱۳۸۱).

---

[۱] Coker – 100 wilt
[۲] Verticellium dahilae
[۳] Acala SJ2
[۴] Deltapine 15

۲-۴- اهمیت اقتصادی پنبه

گیاه زراعی پنبه *(Gossypium hirsutum)* از مهم ترین گیاهان صنعتی بوده و از لحاظ تولید روغن، دومین رتبه را در بین دانه های روغنی داراست (می شرا[۱] و همکاران، ۲۰۰۳).

سات یاواثی[۲] و همکاران در سال ۲۰۰۳ گزارش کردند که پنبه دارای ماده خامی با ارزش ۵/۵ میلیارد دلار می باشد. سطح زیر کشت و تولید آن در جهان به ترتیب ۳۲/۴ میلیون هکتار و ۸۷/۴ میلیون عدل می باشد. در میان کشورهای تولید کننده، هندوستان با سطح زیر کشت معادل ۹/۷ میلیون هکتار رتبه اول را به خود اختصاص داده است. بعد از هندوستان آمریکا با ۲۴ درصد و چین با ۲۰ درصد در رده های دوم وسوم قرار دارند (جیمز، ۲۰۰۷).

علاوه بر نیاز صنعت نساجی به پنبه، محصولات فرآوری شده آن برای تغذیه انسان، دام و نیز در تهیه کود و کاغذ مصرف می شود.

درآمد حاصل از پنبه در آمریکا، بیشتر از صد میلیارد دلار در سال می باشد (می شرا و همکاران، ۲۰۰۳).

در سال ۱۳۸۶ سطح زیر کشت پنبه در ایران ۱۲۰۳۷۹ هکتار گزارش شد. در این سال عملکرد پنبه معادل ۲۳۰۰ کیلوگرم در هکتار بوده و قیمت هر کیلوگرم از آن معادل ۵ هزارریال گزارش شده است.

۲-۵- اصلاح پنبه

پنبه گیاهی است که درصد آلوگامی در آن ۵ تا ۲۰ درصد می باشد ولی گاهی تا ۵۰ درصد نیز دیده شده است. میزان آلوگامی بستگی به وفور حشراتی دارد که گرده را حمل می کنند. پنبه گیاه خود دگر گرده افشان می باشد و روش های اصلاح آن نیز چندان مشخص و روشن نیست. روش های اصلاح این گیاه، وارد کردن واریته های جدید، سلکسیون و دورگ گیری می باشد ولی اصلاح کنندگان هر کدام به سلیقه خود در این روش ها تغییر و تبدیل هایی داده اند (یزدی صمدی و عبد میشانی، ۱۳۸۰).

روش های که برای اصلاح پنبه استفاده می شود با روش های که در گیاهان زراعی خود گشن مثل گندم یا سویا به کار می رود، به لحاظ دگرگشنی جزئی و آثار آن بر روی ساختار ژنتیکی یک جامعه پنبه، متفاوت است (ارزانی، ۱۳۸۰).

ایجاد مقاومت به آفات قبلاً به صورت اصلاح کلاسیک صورت می گرفت ولی به دلیل این که صفت،کمی بوده و مربوط به مکان های ژنی متعدد بود پیشرفت در اصلاح مقاومت به آفات به کندی

---

[۱] Mishra
[۲] Satyavathi

صورت گرفته و احتمال موفقیت درآن کم بود. با دسترسی به روش های همسانه سازی ژن ها[1] و انتقال ژن[2] ، ایجاد مقاومت به آفات امکان پذیر شده است (شارما[3] و همکاران ، ۲۰۰۰).

۲- ۶- گیاهان تراریخت[4]

بیولوژی مولکولی و مهندسی ژنتیک، ابزارهای بسیار توانمندی را برای بشر جهت دست ورزی ژنتیکی و اصلاح ژنوتیپ های زراعی به منظور ایمنی و کشاورزی پایدار در قرن بیست و یکم فراهم کرده است (رانجه کار[5]، ۲۰۰۳) در کشاورزی روش هایی که به بیوتکنولوژی میکروبی وابسته است گوناگونی ژن هایی را که می توان در گیاهان زراعی وارد ساخت فوق العاده افزایش می دهد و زمان لازم برای تولید واریته های جدید را بسیار کوتاه می سازد (ملک زاده و همکاران ، ۱۳۸۰).

مهندسی ژنتیک در گیاهان، یک فرصت بی نظیر جهت جایگزینی صفات یا خصوصیاتی از گیاهان به منظور افزایش سودمندی آنها فراهم می کند. مهندسی ژنتیک ممکن است به منظور تغییر در بیان ژن های موجود در گیاه نیز استفاده شود. هم چنین از آن برای انتقال ژن های جدید بین گونه هایی استفاده می شود که در آنها امکان اصلاح با استفاده از روش های متداول امکان پذیر نیست. انتقال ژن های ساختگی یا جدید را نیز باید به آن افزود. این فناوری شامل امکان پذیر نمودن اصلاح گیاهانی با صفات کاملاً جدید است. با استفاده از این روش می توان ژن های منفرد را بدون هیچ تغییر به گیاه مورد نظر منتقل کرد، کاری که قبلاً با استفاده از روش تلاقی برگشتی حتی با بهره گیری از نشانگر های مولکولی انجام می شد (باقری و همکاران ، ۱۳۸۱).

این روش اجازه می دهد تا ژن مطلوب را از موجودات مختلف شناسایی کرده و آنها را به موجود مورد نظر انتقال داد. این روش همچنین بسیار سریعتر و دقیق تر از روش های به نژادی سنتی بوده و مکمل خوبی برای روش های مذکور است (نلسون[6] ، ۲۰۰۱).

۲- ۶- ۱- روش های انتقال ژن در پنبه

۲- ۶- ۱- ۱- از طریق آگروباکتریوم

انتقال ژن به پنبه از طریق *A. tumefaciens* به نوع ژنوتیپ بستگی دارد. لذا روش های تراریزش در پنبه فقط به لاین کوکر[7] محدود شده است. ایجاد صفات جدید در سایر ژنوتیپ ها می تواند از طریق

---

[1] Gene cloning
[2] Transformation
[3] Sharma
[4] Transgenic plants
[5] Ranjekar
[6] Nelson
[7] Coker

تراریزش و متعاقباً تلاقی برگشتی با لاین کوکر انجام شود. تا کنون از ریز نمونه محور زیر لپه برای تهیه گیاهان تراریخت به واسطه اگروباکتریوم استفاده شده است. ایجاد سیستم تراریزش مریستم به واسطه اگروباکتریوم در سال های اخیر امکان هر نوع تغییر در ژنوتیپ را بدون وابستگی به نوع ژنوتیپ، فراهم کرده است. از نظر تئوریک، مزیت کشت مریستم بر کشت سلولی در این است که امکان بازیابی گیاهان از هر نوع ژنوتیپ وجود دارد. اما تراریزش پنبه از این روش متمرد است و مشکلاتی هم در بازیابی گیاهان از مریستم آلوده به اگروباکتریوم به شیوه ای تکرار شونده وجود داشته است (توحید فر، ۱۳۸۱).

۲- ۶- ۱- ۲ - از طریق زیست پرتابی

فناوری انتقال ژن با شلیک ریز پرتابه ها[۱] در سرعت بالا با استفاده از تفنگ ژنی توسعه یافته است. این روش در سال ۱۹۸۸ اصلاح شد تا ژن را وارد گیاهان متمرد کند. اصول این روش بدین ترتیب است که ابتدا DNA بر روی ذرات ریز طلا رسوب داده شده و سپس به سلول های هدف پرتاب می شود. از هزاران کپی ژن که روی ذرات طلا کوب رسوب داده شده نهایتاً تعدادی از آنها به داخل ژنوم گیاه منتقل می شوند. مزایای این روش شامل بازیابی سریع تر گیاه و فرصت انتقال هم زمان چندین ژن و عدم وابستگی به نوع ژنوتیپ است.

کشت مریستم در پنبه بیشتر به منظور انتقال ژن از طریق بمباران ذره ای به کار می رود ولی فراوانی تراریزش این روش نسبت به سایر روش ها پایین تر است (توحید فر، ۱۳۸۱).

۲-۷- نقش گیاهان تراریخت در کنترل آفات و بیماری ها

با وجود تلاش در اصلاح گیاهان زراعی، هر ساله بیشتر از ده میلیارد دلار برای مدیریت و کنترل شیمیایی آفات هزینه می شود (بابو[۲] و همکاران، ۲۰۰۳).

با این که حشره کش های شیمیایی مزایای موقتی و آنی دارند، ولی این مزیت ها پایدار و دائمی نیست و نمی توان در دراز مدت به آنها امیدوار بود چرا که دارای اثرات جانبی نا مطلوب بوده و در برخی موارد مشکلات آفات را بیشتر می کنند (شارما واورتیز[۳]، ۲۰۰۲) از طرف دیگر مصرف مواد شیمیایی موجب پیدایش برتری گزینشی نتاجی از حشرات می گردد که نسبت به چنین موادی مقاومت پیدا کرده اند و نیز برخی از حشره کش ها به حشرات مفید آسیب زده و فاجعه به بار می آورند (ملک زاده و همکاران، ۱۳۸۰).

---

[۱] Particle acceleration
[۲] Babu
[۳] Ortiz