



سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
معاونت آموزش و ترویج

گیاهان تراریخته و تولید آنها



سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
معاونت آموزش و ترویج



گیاهان تراریخته و تولید آن‌ها

کد دوره: ۰۱/۱۲۷۷۲/۰۲/۶۰

نویسنده: ناصر بیگ زاده

۱۴۰۱



نشر آموزش کشاورزی

عنوان: گیاهان تراریخته و تولید آن‌ها

نویسنده: ناصر بیگزاده

مدیر داخلی: ویدا همتی

سروراستار ترویجی: نصیبه پورفاتیح

صفحه آرایشی: نرگس بهادر

ناشر: نشر آموزش کشاورزی

شمارگان: محدود

نوبت چاپ: اول، ۱۴۰۱

تهیه شده در: معاونت آموزش و ترویج کشاورزی، دفتر شبکه دانش و رسانه های ترویجی
مسئولیت درستی مطالب با نویسنده است.

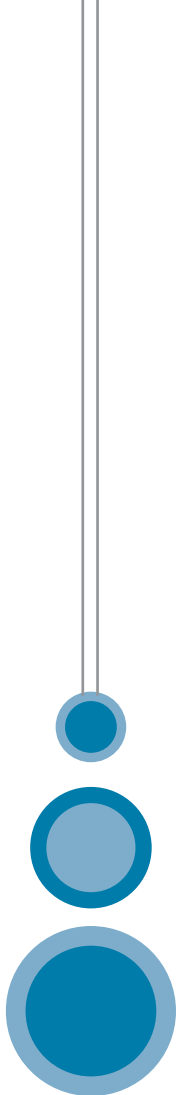
شماره ثبت در مرکز فن آوری اطلاعات و اطلاع رسانی کشاورزی به ۶۳۱۹۳ تاریخ ۱۴۰۱/۱۲/۱۸ است.

نشانی: تهران، خیابان آزادی، بین نواب و رودکی، پلاک ۲۰۵، معاونت آموزش و ترویج کشاورزی

تلفن: ۶۶۴۳۰۴۶۵ | تلفکس: ۶۶۴۳۰۴۶۴ | کد پستی: ۱۴۵۷۸۹۶۶۸۱

فهرست

صفحه	عنوان
۵	فصل اول: مقدمه.....
۱۱	فصل دوم: فواید و مضرات تولید و استفاده از محصولات تراریخته.....
۱۷	فصل سوم: روش‌های انتقال ژن و تغییر ژنتیکی گیاه.....
۴۱	فصل چهارم: کاربرد گیاهان تراریخت.....
۶۳	فصل پنجم: وضعیت جهانی محصولات اصلاح شده (تغییر یافته) ژنتیکی (گیاهان تراریخته).....
۸۱	فصل ششم: منابع.....



فصل اول:

مقدمه

اهداف رفتاری:

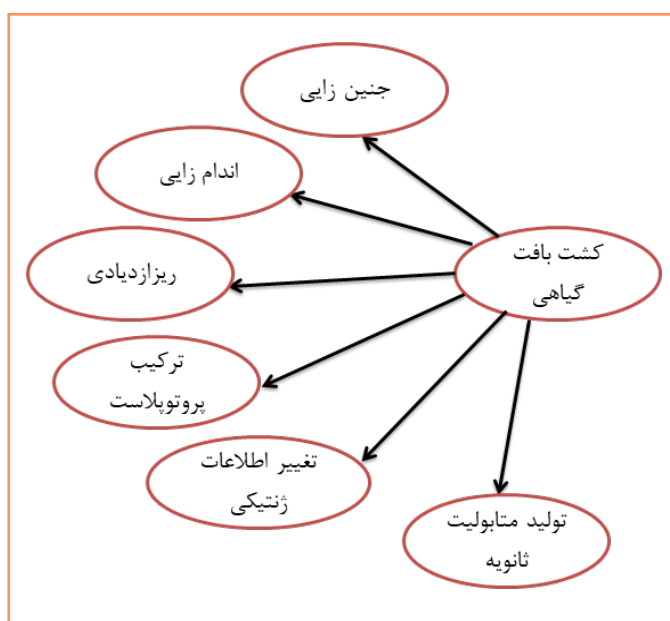
- فراگیران پس از مطالعه این فصل قادر خواهند بود:
- ۱- گیاهان تراریخته را تعریف کنند.
- ۲- هدف از به کارگیری فناوری زیستی را بیان کنند.
- ۳- برخی کاربردهای کشت بافت را بیان نمایند.
- ۴- ژن و ترانسژن را تعریف کنند.
- ۵- اهداف اصلی برای دست‌ورزی ژنتیکی و تولید گیاهان تراریخته را بیان کنند.
- ۶- اساس باززایی در کشت بافت را بیان نمایند.

مقدمه

فناوری زیستی یا بیوتکنولوژی (Biotechnology) یکی از پدیده‌های نوظهور علمی است که در سرتاسر دنیا گسترش و پیشرفت قابل توجهی داشته است. این فناوری در اغلب رشته‌های علمی دیگر مانند پزشکی، کشاورزی و صنعت مورد استفاده قرار گرفته و دستاوردهای مهمی به همراه داشته است. امروزه دانشمندان با استفاده از روش‌ها و تکنیک‌های پیشرفته و نوین در فناوری زیستی در تلاش هستند تا به یک سیستم تولید پایدار در کشاورزی دست یابند (حیدری و پاکدامن، ۱۳۸۳). فناوری زیستی طیف وسیعی از فناوری‌ها را در برمی‌گیرد و می‌توان آن‌ها را برای اهداف مختلفی از جمله بهبود ژنتیک ارقام گیاهی و جمعیت‌های حیوانی برای افزایش عملکرد یا کارایی آن‌ها، تعیین خصوصیات ژنتیکی و حفظ ذخایر ژنتیکی، تشخیص بیماری‌های حیوانی یا گیاهی، تولید واکسن و بهبود مواد غذایی به کار برد. برخی از این فناوری‌ها برای تمام بخش‌های غذایی و کشاورزی به کار گرفته می‌شود، با این حال تعدادی دیگر از آن‌ها مانند کشت بافت (در گیاهان زراعی و درختان جنگلی)، انتقال جنین (در دام) یا تریپلوئیدسازی و تغییر جنسیت (در ماهی) اختصاصی هستند. کلید مبارزه با فقر روستایی، بهره‌وری است و به همان شیوه‌ای که انقلاب سبز در طول دهه‌های ۱۹۶۰ تا ۱۹۸۰ انجام داد، فناوری زیستی متعهد به افزایش این بهره‌وری است تا درآمدهای روستایی افزایش یابد. دستاوردهای بهره‌وری اساساً تمام عوامل تولید در کشاورزی را در برمی‌گیرد. این دستاوردها ممکن است عملکرد بالاتر گیاهان زراعی و دام، کاربرد کم‌تر کود و سم، کیفیت بالاتر محصول، ذخیره‌سازی بهتر و فرایندسازی آسان‌تر، یا روش‌های پیشرفته برای نظارت و بررسی سلامت حیوانات و گیاهان باشد (FAO, 2020). فناوری زیستی به طور فزاینده‌ای تقریباً بر تمام جنبه‌های زندگی بشر تاثیر می‌گذارد، بنابراین به منظور از بین بردن باورهای غلطی که ممکن است مانع از مقبولیت آن شود، می‌بایست دانش پشت این فناوری به زبان ساده برای عموم توضیح داده شود. سوال اساسی که اغلب پرسیده می‌شود این

است که یک ژن، یک پیش‌بر (promoter) و یک خاتمه‌دهنده (terminator) چیست؟ ژن‌ها واحدهای اساسی وراثت هستند، از توالی‌های دئوکسی‌ریبونوکلئیک اسید (DNA) تشکیل شده‌اند، از والدین به فرزندان منتقل می‌شوند و به طور مستقل و یا در ترکیب با دیگر ژن‌ها صفات خاصی مانند ارتفاع بوته، رنگ گل و مقاومت به تنش‌ها را در موجودات زنده کنترل می‌کنند. ژن‌ها اساس تفاوت‌ها و شباهت‌ها در بین موجودات زنده بوده و از نسلی به نسلی دیگر منتقل می‌شوند. پیش‌برها توالی‌های دئوکسی‌ریبونوکلئیک اسید هستند که توسط آنزیم ریبونوکلئیک اسید پلیمراز (RNA polymerase) شناسایی شده و در شروع و تنظیم نسخه‌برداری نقش دارند. به توالی‌هایی که دستور یا سیگنال پایان نسخه‌برداری را صادر می‌کنند، خاتمه‌دهنده گفته می‌شود (Davey *et al.*, 2010). انفجار جمعیت در سراسر جهان منجر به فقر و گرسنگی به ویژه در کشورهای در حال توسعه می‌شود (Sathishkumar *et al.*, 2019). پیش‌بینی می‌شود جمعیت جهان در سال ۲۰۵۰ به ۸/۹ میلیارد نفر برسد (Yan and Ping, 2013). علاوه بر این، کاهش اراضی کشاورزی به دلیل شهرنشینی و تخریب اراضی منجر به گرسنگی به ویژه در کشورهایی که به لحاظ اقتصادی عقب‌مانده هستند، می‌شود. در منطقه‌ای که منابع آن محدود است، سوء تغذیه (کمبود مواد مغذی مانند آهن، روی و ویتامین A) و ناامنی غذایی از عوامل عمده خطر هستند که باید به آن‌ها پرداخته شود. بنابراین مهم است که برای حل گرسنگی و سوء تغذیه، تولید مواد غذایی با ارزش غذایی بالا افزایش یابد. علاوه بر این، عوامل آب و هوایی و زیستی متعددی، یعنی باکتری‌ها، قارچ‌ها، ویروس‌ها، حشرات، و گیاه‌خواران، کیفیت و کمیت محصول را در سراسر جهان به شدت تحت تأثیر قرار داده‌اند. این مسائل و مشکلات می‌بایست در مهندسی ژنتیک گیاهی مورد رسیدگی قرار گیرد. به گیاهی که با وارد کردن قطعات خاصی از توالی ژنوم یا نوکلئیک اسید خارجی به ژنوم آن با استفاده از روش‌های انتقال (transformation) و یا با حذف ژن‌های نامطلوب آن با کمک مهندسی ژنتیک تولید می‌شود، گیاه تراریخته یا ترانسژنیک (transgenic) یا اصلاح شده ژنتیکی (genetically modified plant; GMP) گفته می‌شود (Sathishkumar *et al.*, 2019; Kumar *et al.* 2020). ژن‌های وارد شده که ترانس‌ژن (transgene) نامیده می‌شوند، ممکن است از یک گیاه غیرخویشاوند، باکتری، قارچ، ویروس یا یک گونه حیوانی باشند. بنابراین انتقال و تغییر ژنتیکی بر محدودیت اصلی در اصلاح نباتات سنتی که در آن سازگاری جنسی بین گونه‌ها برای کراس آن‌ها پیش‌نیاز است، غلبه می‌کند (Kumar *et al.* 2020). پیشرفت در مهندسی ژنتیک و زیست‌شناسی مولکولی گیاهی منجر به تولید و توسعه طیف وسیعی از گیاهان تراریخته با صفات زراعی مهم، یعنی تحمل به تنش‌های زیستی و غیرزیستی هم در دلقه‌ای‌ها و هم در تک‌لقه‌ای‌ها می‌شود. با وجود استفاده از گیاهان تراریخته در بخش کشاورزی، این گیاهان می‌توانند به عنوان یک راکتور زیستی (bioreactor) برای تولید پروتئین‌های مهم دارویی مورد استفاده قرار گیرند (Sathishkumar *et al.*, 2019).

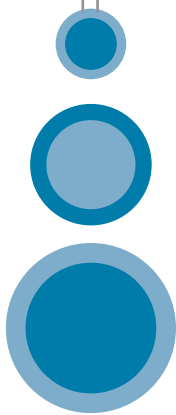
پس از اختراع دو فناوری بزرگ یعنی کشت بافت گیاهی (پرورش گیاهان و قطعات یک گیاه در شرایط آزمایشگاهی) و دئوکسی ریبونوکلیک اسید نو ترکیب، اصلاح و بهینه سازی گیاهان زراعی جهش بزرگی داشته است. کشت بافت کاربردهای متنوعی دارد از جمله جنین زایی، اندام زایی، ریزازدیادی و تغییر اطلاعات ژنتیکی گیاه (یا تولید گیاهان تراریخته) (Sathishkumar *et al.*, 2019) (شکل ۱). توسعه موفقیت آمیز گیاهان تراریخته مستلزم این است که باززایی قابل اعتماد کشت بافت، ساختار (های) ژن، ناقل یا ناقلین مناسب برای انتقال ژن و دستورالعمل های مؤثر برای وارد کردن ژن های مطلوب به گیاهان هدف، وجود داشته باشد (Davey *et al.*, 2010).



شکل ۱- برخی کاربردهای کشت بافت گیاهی

در فناوری زیستی مدرن، مهندسی ژنتیک یک ابزار قدرتمند برای تغییر ژن های یک فرد می باشد. با تغییر ژن ها در یک موجود زنده یا در بین موجودات از طریق حذف یک ویژگی یا صفت نامطلوب یا وارد کردن یک صفت یا ویژگی مطلوب، این امر امکان پذیر است. هدف اصلی در وارد کردن ترکیبی از ژن ها به یک گیاه، تولید بیش تر، مقاومت به بیماری ها و غیره است (Ubalua, 2009; Zhengquan, 2008). تغییر ژنتیکی گیاه که برای اولین بار در دهه ۸۰ میلادی گزارش شد، منتج به تولید گیاهان اصلاح شده ژنتیکی (genetically modified; GM) شد (Gauba, 2012). اهداف اصلی برای دستورزی یا دست کاری (manipulation) ژنتیکی و تولید گیاهان تراریخته شامل اصلاح گیاهان برای افزایش تحمل آن ها به علف کش ها و ایجاد مقاومت در برابر حشرات، قارچ ها، باکتری ها و ویروس ها است چون خسارت عمده به محصولات کشاورزی توسط این عوامل صورت می گیرد. اهداف دیگر شامل مهندسی ژنتیک گیاهان برای بیوسنتز محصولات بهداشتی، افزایش ارزش غذایی، افزایش ماندگاری محصولاتی که خیلی سریع پس از برداشت از بین می روند و تحمل به تنش های غیرزنده است. به همین ترتیب،

اصلاح جذابیت زیبایی گیاهان، دارای پتانسیل تجاری قابل توجهی است هرچند که برای وجود انسان ضروری نیست (Davey *et al.*, 2010). پس از انتقال و تغییر ژنتیکی، لازم است تا گیاه تراریخته باززایی (regeneration) و تکثیر شود. در ارتباط با تکثیر، باید بیان کافی و پایدار ژن در سطح مولکولی و ژنی مشخص شود (Sharma *et al.*, 2005). همچنین ممکن است لازم باشد تا از طریق روش‌های اصلاحی سنتی، ژن‌های منتقل شده را به ارقام الیت منتقل کرد. به منظور انتقال ژن و تغییر ژنتیکی گیاه وجود یک سیستم باززایی ساقه مبتنی بر کشت بافت که قابل اعتماد باشد، پیش‌نیاز است. تشخیص این که در شرایط اپتیمم غذایی و هورمونی، سلول‌های سوماتیک همه‌توان (totipotent) هستند و می‌توانند در شرایط آزمایشگاهی تحریک شده و از طریق اندام‌زایی (تشکیل شاخه) یا جنین‌زایی سوماتیکی گیاه کامل تولید کنند، اساس باززایی در کشت بافت را تشکیل می‌دهد. انتقال ژن و تغییر ژنتیکی گیاه بدون باززایی گیاه، از ارزش محدودی برخوردار بوده یا فاقد ارزش است. بنابراین برای هرگونه دستورالعمل انتقال ژن و تغییر ژنتیکی، تشخیص بافت‌های قابل کشت یا ریزنمونه (explants) (سلول‌ها / بافت‌ها / اندام‌ها) که قادر به باززایی به گیاهان شوند ضروری و بنیادی است (Davey *et al.*, 2010). پروتوپلاست‌های جدا شده (Davey *et al.*, 2005)، کالوس (Rachmawati and Anzai, 2006)، لایه‌های نازک سلول (Soneji *et al.*, 2007)، قطعات برگ (Li *et al.*, 2007)، قطعات ریشه (Huang and Ma, 1992)، بندهای ساقه (Song *et al.*, 2006)، بافت‌های گل (Agarwal *et al.*, 2008) و جوانه‌های جانبی (Manickavasagam *et al.* 2004) برای انتقال ژن و تغییر ژنتیکی مورد استفاده قرار گرفته‌اند.



فصل دوم:

فواید و مضرات تولید و استفاده از محصولات تراریخته

اهداف رفتاری:

فراگیران پس از مطالعه این فصل قادر خواهند بود:

- ۱- فواید محصولات تراریخته را بیان کنند.
- ۲- مضرات محصولات تراریخته را بیان کنند.
- ۳- اثرات گیاهان تراریخته بر تنوع زیستی و اکوسیستم را ذکر کنند.

فواید و مضرات تولید و استفاده از محصولات تراریخته

۱- فواید تولید و استفاده از محصولات تراریخته:

استفاده از مهندسی ژنتیک و محصولات تراریخته برای تولید محصولات کشاورزی، منافع زیادی به دنبال دارد که به برخی از آن‌ها اشاره می‌شود:

- **تولید محصول با عملکرد بالا:** محصولات تراریخته می‌توانند امنیت غذایی، کیفیت تغذیه‌ای و طول عمر مواد غذایی را افزایش دهند. گیاهان زراعی را می‌توان به گونه‌ای تغییر ژنتیکی داد که زیست‌توده (biomass) از قسمت‌های رویشی به قسمت‌های زایشی منتقل شده و در نتیجه بهره‌وری افزایش یابد (Mathur *et al.*, 2017).

- **افزایش مقاومت به تنش‌های غیرزنده:** با انتقال ژن‌های تحریک‌کننده مقاومت در برابر تنش‌های محیطی از گیاه به گیاهی دیگر، می‌توان مقاومت در برابر این تنش‌ها را ایجاد کرد. اثر گرم شدن جهانی می‌تواند اوضاع شرایط محیطی را بدتر کند. بنابراین، ثابت شده که محصولات تراریخته توانایی مقابله در برابر این تنش‌ها را دارند (Mathur *et al.*, 2017).

- **اثر ضد گیاه‌خواری:** بسیاری از گیاهان با استفاده از دو سیستم دفاعی پایه، با گیاه‌خواران سازگار یافته‌اند. اولین خط دفاعی، تشکیل موم، کرک و خار بر روی سطوح خارجی اندام‌هاست. سیستم دفاعی دوم شامل انتقال متابولیت‌های ثانویه و دیگر ترکیبات سمی برای حشرات، آفات یا حیوانات و تولید ترکیبات فرار و ترشح شهد در خارج از گل جهت جذب شکارگرها است. به منظور دفاع گیاهان در برابر گیاه‌خواری، می‌توان از ترکیبات ضد گیاه‌خواری استفاده کرد (Pichersky and Gershenzon, 2002; Mathur *et al.*, 2017).

- **جایگزینی آفت‌کش‌ها و کودهای شیمیایی:** استفاده مداوم از مواد شیمیایی در کشاورزی مدرن، به محیط زیست لطمه می‌زند. با وجود افزایش استفاده از آفت‌کش‌ها در سال‌های اخیر، خسارت وارده به محصولات کشاورزی توسط آفات، تغییری نکره است (Hallberg, 1986; Oerke, 2006). آفت‌کش‌ها می‌توانند آفت را در کوتاه مدت کنترل کنند اما با گذشت زمان، ممکن است مشکلات آفات افزایش یابد. علاوه بر این، کودها با افزودن مواد خطرناک به خاک، کیفیت خاک را از بین می‌برند. اگرچه کودها در مقایسه با آفت‌کش‌ها سمیت کمی دارند، اما به دلیل نشت مواد شیمیایی به داخل منابع آب، یکی از منابع اصلی آلودگی مواد غذایی و خطرات بهداشتی هستند. مطالعات نشان داده است که بین نیترات موجود در آب آشامیدنی و مشکلات مربوط به سلامت انسان، ارتباط وجود دارد (Hallberg, 1986; Ward, 2009). محصولات تراریخته ممکن است با کاهش استفاده از آفت‌کش‌ها، کودها و علف‌کش‌ها، آزاد شدن مواد شیمیایی خسارت‌زا که برای محیط زیست خطرناک هستند را محدود کند. کاهش آفت‌کش‌ها، مستقیماً تأثیر مثبتی بر تنوع زیستی خواهد داشت (Sisterson *et al.*, 2007).

- کاهش هزینه‌های کشاورزان: با استفاده از گیاهان تراریخته، استفاده از سموم و کودهای شیمیایی کاهش می‌یابد. بنابراین علاوه بر کاهش هزینه‌های کشت، خسارت وارده به محصولات کشاورزی نیز کاهش می‌یابد (Sanglestawai *et al.*, 2014).

- تثبیت صفات: با توجه این که برای تولید گیاه تراریخته، ژنوم گیاه اصلاح شده و تغییر می‌کند، بنابراین این تغییرات ثابت مانده و به نسل‌های بعدی منتقل می‌شوند. یک وارپته تراریخته از یک گیاه زراعی زمانی تجاری می‌شود که صفت مورد نظر در بین جمعیت گیاه تراریخته، ثابت باقی بماند (Mathur *et al.*, 2017).

- عدم وابستگی به شرایط محیطی: یک وارپته مقاوم، در برابر شرایط مختلف محیطی فعال باقی می‌ماند. این ویژگی مقاومت برای تحریک، به فصول وابسته نیست. از آن جا که تغییرات در سطح مولکولی است، اثرات محیطی بر فعال‌سازی مقاومت صفر است (Mathur *et al.*, 2017).

۲- مضرات تولید و استفاده از محصولات تراریخته:

با وجود پتانسیل کاربرد و توسعه بسیار بالای محصولات تراریخته، با گذشت حدود ۲۳ سال از زمان تجاری‌سازی این محصولات در دنیا، تنها چهار گیاه زراعی شامل پنبه، کلزا، سویا و ذرت که مصرف غذایی مستقیم برای انسان ندارند، به طور گسترده در دنیا کشت می‌شوند که یکی از دلایل آن، وجود نگرانی‌هایی در ارتباط با سلامت انسان است. در زیر به برخی نگرانی‌های مرتبط با محصولات تراریخته اشاره می‌شود:

- ایجاد و افزایش مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها در بیمارگر: به دلیل سرعت بالای جهش در میکروارگانیسم‌ها، بیمارگرها به سرعت تکامل می‌یابند. ژن مقاوم ممکن به طور افقی به بیمارگر منتقل شود و در نتیجه ممکن است بیمارگرهایی با توانایی مقاومت در برابر چند دارو (یا سم) ظاهر شوند (Mathur *et al.*, 2017).

- اثر بر تنوع زیستی و اکوسیستم: در گیاهانی که با پروتئین‌های باکتری (*Bacillus thuringiensis* (Bt) تراریخته شده‌اند، این پروتئین‌ها با غلظت‌های مختلف در تمام قسمت‌های گیاه (مانند ریشه، خوشه و دانه گرده) و در هر سنی به طور فعال بیان می‌شوند. بنابراین با توجه به رژیم غذایی حشرات و قدرت گیاه، حشرات در معرض مقادیر مختلف این پروتئین‌ها که خاصیت سمی دارند قرار می‌گیرند. در نتیجه، حشرات غیرهدف مانند زنبور عسل ممکن به شدت تحت تاثیر قرار گیرند (Kozziel *et al.*, 1993; Andow and Hutchison, 1998). نحوه عمل علف‌کش گلایفوسیت، جلوگیری از آنزیم 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthetase (EPSPS) که تشکیل آمینواسیدهای آروماتیک را کاتالیز می‌کند، است (Steinrucken and Amrhein, 1980; Schönbrunn *et al.*, 2001). گیاهان تراریخته متحمل به گلایفوسیت، یا با تغییر ساختار مولکولی این آنزیم باعث کاهش

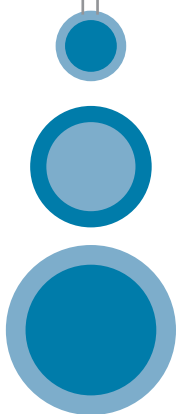
تمایل به این علف‌کش می‌شوند و یا با تولید یک آنزیم، مولکول گلايفوسیت را تخریب می‌کنند (Cerdeira and Duke, 2006). بنابراین لازم است کشاورزان از گلايفوسیت بیش‌تری در مزارع استفاده کنند. استفاده بیش‌تر از گلايفوسیت منجر به بروز مقاومت در بین علف‌های هرز می‌شود (Cerdeira and Duke, 2006; Mathur *et al.*, 2017). علاوه بر این، فراوانی نسبی شکارگرها و پارازیتوئیدها ارتباط نزدیکی با جمعیت علف‌های هرز دارد، بنابراین حذف علف‌های هرز بر دشمنان طبیعی آفات اثر سوء دارد (Hawes *et al.*, 2003; Lundgren, 2009) افزایش تنوع زیستی گیاهان نه تنها به کنترل آفات کمک می‌کند، بلکه در دسترس بودن منابع برای دشمنان طبیعی را نیز افزایش می‌دهد (Dewar *et al.*, 2000; Haughton *et al.*, 2001; Jackson and Pitre, 2004)

- **تبدیل گیاهان تراریخته به علف هرز:** با توجه به بقای طولانی گیاهان تراریخته در شرایط محیطی، این گیاهان می‌توانند به صورت علف هرز ظاهر شوند. این گیاهان می‌توانند با گونه‌های گیاهی مجاور رقابت نموده و رشد آن‌ها را محدود کنند، بنابراین تعادل اکوسیستم را برهم می‌زنند (Fontes *et al.*, 2002)

- **نگرانی‌های مربوط به سلامت انسان:** به دلیل تغییرات ژنتیکی، برخی گیاهان تراریخته ممکن است ترکیبات سمی مضر برای انسان تولید کنند. وارد کردن یک ژن خارجی به یک گیاه ممکن است باعث عدم تاخوردگی صحیح پروتئین‌ها شده و در نتیجه منجر به بروز بیماری‌هایی مانند پریون و سرطان شود. این ترکیبات ممکن است برای انسان، حساسیت ایجاد کنند. علاوه بر این، استفاده بیش‌تر از گیاهان تراریخته متحمل به علف‌کش ممکن است برای سلامت انسان و محیط زیست، خطرناک باشد (Graf *et al.*, 2014; Mathur *et al.*, 2017). نگرانی دیگر، احتمال افزایش مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها در سیستم گوارش انسان و دام به دلیل وجود ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک در گیاهان تراریخته و احتمال فرار این ژن‌ها به ژنوم میکروارگانیسم‌های موجود در سیستم گوارش انسان و دام است (صالحی جوزانی و سلیمانی، ۱۳۹۷).

- **احتمال صدمه به کشاورزی سنتی و ارگانیک:** گیاهان تراریخته ممکن است با گیاهانی که در مزارع سنتی یا ارگانیک در نزدیکی آن‌ها کشت شده‌اند، آمیزش کنند. توانایی حرکت گرده از مزرعه گیاهان تراریخته به مزارع گیاهان غیرتراریخته، به این بحث منجر شده است که در کاشت گیاهان تراریخته، فاصله با مزارعی که در آن‌ها کشت ارگانیک یا متداول صورت می‌گیرد، می‌بایست مدنظر قرار گیرد (صالحی جوزانی و همکاران، ۱۳۹۸).





فصل سوم:

روش‌های انتقال ژن و تغییر ژنتیکی گیاه

اهداف رفتاری:

فراگیران پس از مطالعه این فصل قادر خواهند بود:

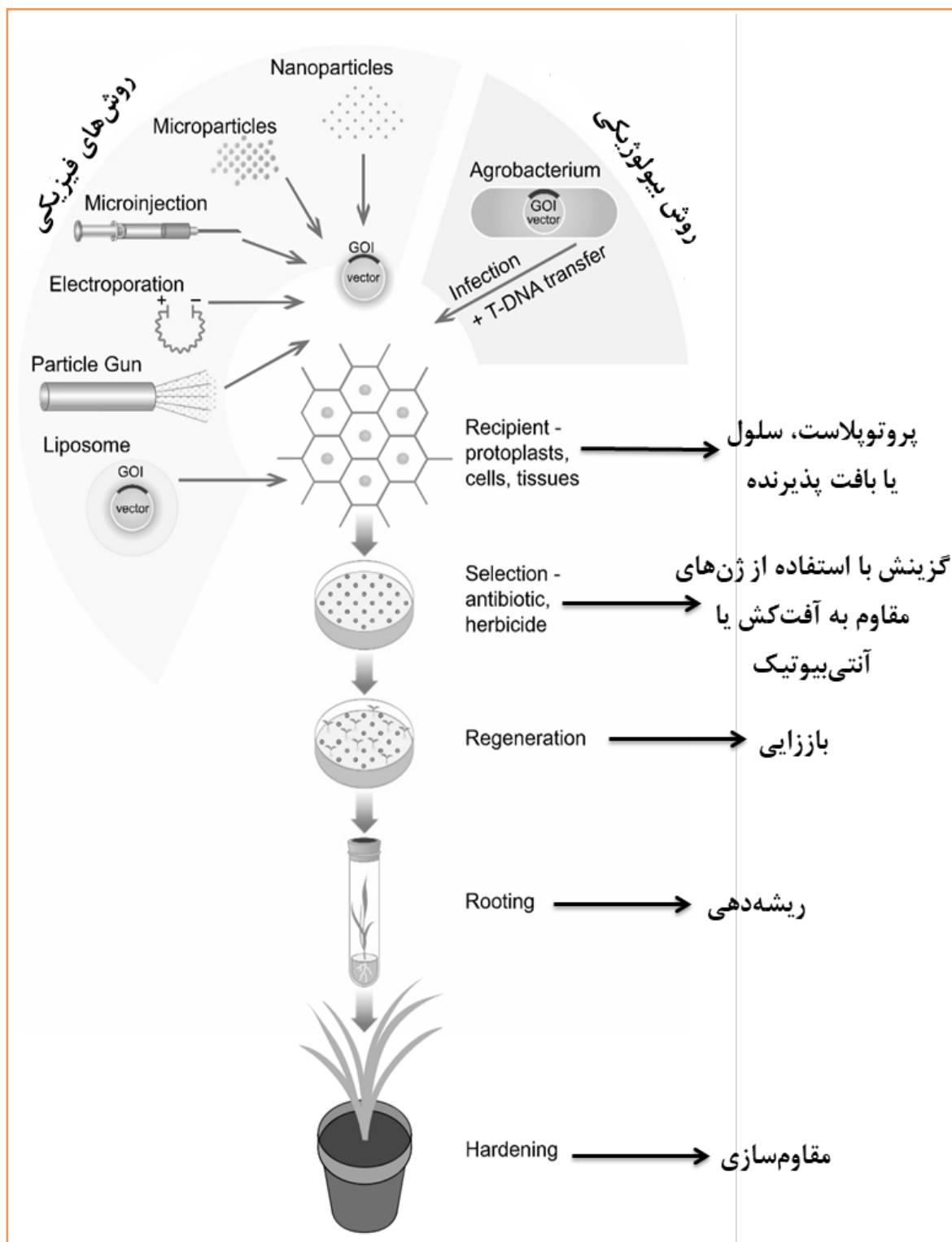
- ۱- روش‌های مختلف انتقال ژن را ذکر کنند.
- ۲- فواید و مضرات روش‌های مختلف انتقال ژن را بیان کنند.
- ۳- ژن‌های مختلف بر روی پلاسمید Ti را ذکر نموده و وظایف آن‌ها را بیان نمایند.
- ۴- انواع ناقلین برای انتقال ژن را نام برده و تفاوت آن‌ها را بیان کنند.
- ۵- انواع ژن‌های مارکر را نام برده و نقش آن‌ها در انتقال ژن را ذکر کنند.
- ۶- روش‌های تلقیح آگروباکتریوم حامل ژن به گیاه را بیان نمایند.

روش‌های انتقال ژن و تغییر ژنتیکی گیاه

انتقال ژن و تغییر ژنتیکی گیاه شامل وارد کردن پایدار توالی‌های دئوکسی ریبونوکلئیک اسید به داخل ژنوم هسته‌ای سلول‌هایی که توانایی رشد و تولید یک گیاه کامل تراریخته را دارند، می‌باشد (Sharma *et al.*, 2005). وارد کردن دئوکسی ریبونوکلئیک اسید به گیاه و بیان موقت و گذرای ژن‌ها در گیاه، مرحله مهمی در ایجاد گیاهان تراریخته است. طیف وسیعی از روش‌های شیمیایی، فیزیکی و بیولوژیکی وجود دارد که برای تعداد زیادی از گیاهان مهم اقتصادی، استاندارد شده‌اند (Birch, 1997). با توجه به نوع گیاه و همچنین در سطح گونه و رقم، کارایی انتقال و تغییر ژنتیکی متغیر است. در دنیا هیچ تکنیک کارآمدی وجود ندارد. این روش‌ها بر اساس این که آیا توالی‌های نوکلئیک اسید به طور مستقیم یا از طریق موجود زنده دیگری مانند باکتری آگروباکتریوم (*Agrobacterium*) وارد شده‌اند، به دو گروه مستقیم و غیرمستقیم تقسیم می‌شوند. انتخاب نوع روش به کارایی روش در رساندن مواد ژنتیکی به سلول گیاه مربوطه، توانایی بافت‌های قابل کشت برای باززایی و این که آیا تغییر ژنتیکی در هسته است یا پلاسمید (یک دئوکسی ریبونوکلئیک اسید خارج کروموزومی کوچک در داخل سلول است که به لحاظ فیزیکی از دئوکسی ریبونوکلئیک اسید کروموزومی جدا بوده و قادر است به طور مستقل همانندسازی کند. پلاسمید به صورت مولکول‌های دورشته‌ای کوچک کروی شکل در داخل سلول باکتری‌ها یافت می‌شود، با این حال گاهی در موجودات یوکاریوتیک نیز وجود دارد)، بستگی دارد. این که آیا می‌توان از عنصر ژنتیکی وارد شده به یک سلول برای تولید یک گیاه کامل دارای ترانس ژن استفاده کرد، به قدرت (totipotency) سلول گیاه بستگی دارد. تعداد زیادی از روش‌های انتقال ژن و تغییر ژنتیکی که تولید گیاهان تراریخته توسط آن‌ها تایید شده است، توصیف شده‌اند (جدول ۱ و شکل ۲) (Ganeshan and Chibbar, 2010; Yan and Ping, 2013). در بین این روش‌ها، انتقال با وساطت (توسط) آگروباکتریوم (*Agrobacterium-mediated gene transfer*) و انتقال مستقیم دئوکسی ریبونوکلئیک اسید به داخل سلول توسط بمباران ریزپرتابه‌ای یا ذره (particle or microprojectile bombardment)، پرکاربردترین روش‌ها برای انتقال ژن به گیاهان هستند (Davey *et al.*, 2010). تغییر ژنتیکی پلاسمید دارای مزایایی است از جمله تغییرات ژنتیکی موروثی بدون داشتن اثرات خاموشی که در تغییر ژنتیکی هسته دیده می‌شود، مهار ژن، سطح بیان بالاتر و غیره (Dufourmantel *et al.*, 2006; Soman *et al.*, 2019).

جدول ۱ - روش‌های انتقال ژن و تغییر ژنتیکی در گیاهان

مضرات	فواید	روش‌های انتقال	
تعداد زیادی از گونه‌های گیاهی در برابر این انتقال، مقاومت نشان می‌دند.	- احتمال وارد کردن یک کپی یا نسخه، بسیار بالاست. - داشتن کارایی بالای انتقال ژن و تغییر ژنتیکی در دولپه‌ای‌ها	انتقال با وساطت آگروباکتریوم	انتقال مستقیم دئوکسی‌ریبونوکلئیک اسید
- الگوی تلفیق ژن با ژنوم گیاه، غیر قابل پیش‌بینی است. - اغلب با چندین کپی همراه است که ممکن است منجر به ناپایداری ترانس‌ژن و خاموشی ژن شود.	- انجام آن، آسان‌تر است. - هم برای دولپه‌ای‌ها و هم تک‌لپه‌ای‌ها، قابل انجام است. - برای تغییر ژنتیکی میتوکندری و کلروپلاست، قابل استفاده است.	بمباران ذره یا ریزپرتابه‌ای	انتقال غیرمستقیم دئوکسی‌ریبونوکلئیک اسید
پرزحمت بوده و به نیروی کار زیادی نیاز است. برای بسیاری از گیاهان، قابل استفاده نیست.	کنترل شکل دئوکسی‌ریبونوکلئیک اسید مورد استفاده برای کلروپلاست، توسط محقق انجام می‌شود نه توسط یک ناقل بیولوژیکی	سیستم‌های پروتوپلاست از جمله ترکیب با پلی اتیلن گلیکول ((PEG fusion	
- نبودن مکانیسم کنترل اختصاصی بافت - موفقیت‌آمیز بودن فقط برای تعدادی از گونه‌های گیاهی	- وارد کردن تعداد زیادی کپی - پایداری ترانس‌ژن و بیان در سطح بالا - وراثت مادری - پیشگیری از گسترش ژن از طریق گرده‌افشانی - انتقال ژن‌های خارجی به داخل ژنوم پلاسמיד از طریق نوترکیبی همولوگ	تغییر ژنتیکی کلروپلاست	
- وارد کردن متعدد ژن - گزینش سخت و نداشتن کارایی	عدم نیاز به کشت بافت و عدم وابستگی به ژرم‌پلاسسم	انتقال با وساطت لوله گرده (pollen tube-mediated approach)	
سخت بودن باززایی کلروپلاست	کارایی بالای انتقال ژن و تغییر ژنتیکی	جریان الکتریکی (electroporation)	ریزتزریقی (microinjection)
فقط بخشی از گیاه، تراریخت می‌شود. کند و هزینه‌بر بوده و به افراد ماهر نیاز دارد	هدف قرار دادن سلول با دقت بیش‌تر و به افراد ماهر نیاز دارد		



شکل ۲- تصویری شماتیک از روش‌های مستقیم و غیرمستقیم که به طور متداول برای انتقال ژن به گیاهان مورد استفاده قرار می‌گیرند و مراحل کلی که منجر به رشد یک گیاه تراریخته می‌شود.

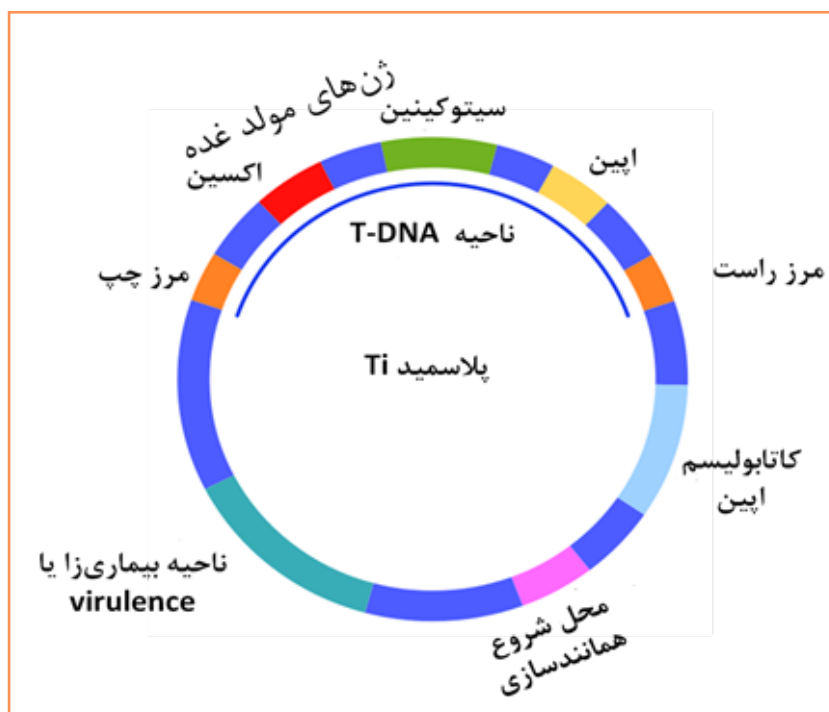
۱- انتقال ژن با واسطه (توسط) باکتری آگروباکتریوم

در سال ۱۹۰۷ دو محقق به نام Smith و Townsend نشان دادند که به علت آلودگی تعداد زیادی از گیاهان دولپه و تعداد تک‌لپه به یک باکتری خاک‌زاد و گرم منفی به نام *Agrobacterium tumefaciens*، بیماری گل طوقه ایجاد شده و این باکتری القاء‌کننده غده‌ها در این بیماری است (Binns and Campbell, 2001). این کشف، بازتاب عمده‌ای نداشت تا زمانی که محققى به نام Armin Braun نشان داد که سلول‌های غده دچار تغییر ژنتیکی شده‌اند و تکثیر غیرقابل کنترل سلول‌های غده به حضور مداوم آگروباکتریوم بستگی ندارد و این دلالت دارد بر این که تحریک و تکثیر سلول‌ها به علت تغییر ژنتیکی در آن‌ها است (Chilton, 2001). در سال ۱۹۷۴ یک پلاسمید بزرگ شناسایی شد که فقط در استرین‌های بیماری‌زای آگروباکتریوم وجود داشت و با توجه به تحریک تشکیل غده توسط این استرین‌ها، این پلاسمید به نام پلاسمید القاء یا تحریک‌کننده غده (tumor-inducing plasmid; Ti) نام‌گذاری شد (Zaenen et al., 1974). سه سال بعد، محققین نشان دادند که فقط بعضی از ژن‌های پلاسمید Ti به کروموزوم‌های سلول گیاه منتقل می‌شوند و مسئول تحریک غده هستند. این قطعه از دئوکسی‌ریبونوکلئیک اسید که به داخل سلول گیاه منتقل می‌شود را دئوکسی‌ریبونوکلئیک اسید منتقل شده (transferred DNA; T-DNA) نامیدند. در واقع، T-DNA پس از انتقال به هسته گیاه، در آن‌جا به صورت پایدار حفظ شده و در غیاب باکتری بیان می‌شود (Chilton et al., 1997). در جدول ۲، ژن‌های مختلف در پلاسمید Ti، ذکر شده است (Ozyigit, 2012).

گونه‌های *Agrobacterium rhizo-* و *Agrobacterium tumefaciens* (*Rhizobium radiobacter*) *genes* (*Rhizobium rhizogenes*) باکتری‌هایی هستند گرم منفی و ساکن خاک و به طور طبیعی این توانایی را دارند که بخشی از مواد ژنتیکی‌شان را به گیاه منتقل کنند (Gelvin, 2003; Hwang et al., 2017). این باکتری‌ها دارای دو نوع پلاسمید به نام Ti (تحریک‌کننده غده یا tumour-inducing) و Ri (تحریک‌کننده ریشه یا root-inducing) بوده که اساساً در دولپه‌ای‌ها، عامل بیماری‌های گال طوقه و ریشه مویی هستند (Otten et al., 2007). دو جزء اصلی این پلاسمیدها که در انتقال دئوکسی‌ریبونوکلئیک اسید به سلول گیاهان نقش اصلی دارند عبارتند از: T-DNA و ژن‌های بیماری‌زا (virulence genes; vir) (Soman et al., 2019). در T-DNA ژن‌های مولد یا القاکننده غده (oncogene) هستند که با تولید هورمون‌های گیاهی، باعث رشد غیرقابل کنترل سلول‌ها شده و به سلول میزبان منتقل می‌شوند (Zupan and Zambryski, 1995; Kiyokawa et al., 2009). حدود یا مرز T-DNA توسط ۲۵ جفت باز تکرارشونده و بسیار حفاظت شده در دو طرف چپ و راست (یا مرز چپ و راست) مشخص شده است. این نواحی توسط محصولات ژن‌های vir شناسایی شده، می‌شکنند و ناحیه T-DNA به داخل سلول منتقل می‌شود. انتقال از مرز راست شروع و به مرز چپ، ختم می‌شود (شکل ۳). هیچ‌کدام از ژن‌های موجود در بین این دو مرز، نقشی در انتقال T-DNA ندارند (Rogers et al., 1988).

جدول ۲- ژن‌های مختلف بر روی پلاسمید Ti و وظایف آن‌ها

ناحیه	ژن / قطعه	وظیفه (عملکرد)
T-DNA	<i>auxA/tms1/iaaM</i>	تولید آنزیم تریپتوفان - ۲- مونواکسیژناز (Tryptophan-2 monoox- ygenase) و تبدیل تریپتوفان به ایندول - ۳- استامید (Indole-3-ac- etamide; IAM)
	<i>auxB/tms2/iaaH</i>	تولید آنزیم ایندول - ۳- استامید هیدرولاز و تبدیل IAM به ایندول - ۳- استیک اسید
	<i>cyt/tmr/ipt</i>	تولید آنزیم ایزوپنتنیل ترانسفراز (<i>Isopentenyl transferase</i>) و کاتالیز کردن تشکیل ایزوپنتنیل آدنین
	<i>tml</i>	تنظیم اندازه غده یا گال
	<i>ocs</i>	تولید آنزیم اوکتوپین سینتاز (<i>Octopine synthase</i>) و تشکیل اوکتوپین، اسید پیروویک و آرژنین
	<i>agropine</i>	تولید آنزیم آگروپین سینتاز (<i>Agropine synthase</i>)
	<i>nos</i>	تولید آنزیم نوپالین سینتاز (<i>Nopaline synthase</i>) و تشکیل نوپالین از کتوگلوئاریک اسید و آرژنین
	<i>agrocinopine</i>	تولید آنزیم آگرو سینوپین (<i>Agrocinopaine synthase</i>)
	RB	مرز راست حاوی ۲۵ جفت باز که بسیار محافظت شده هستند.
	LB	مرز چپ حاوی ۲۵ جفت باز که بسیار محافظت شده هستند.
ناحیه بیماری‌زا یا vir	<i>vir A</i>	برهمکنش با محرک‌های فنلی و فسفوریلات کردن پروتئین Vir A و Vir G
	<i>vir B</i>	تشکیل منفذ در غشاء باکتری برای انتقال پروتئین‌های Vir؛ پروتئین‌های Vir B4 و B11 دارای فعالیت آدنوزین تری فسفاتاز هستند.
	<i>vir C</i>	دارای فعالیت هلیکاز بوده اختصاصیت میزبان را تعیین می‌کند.
	<i>vir D</i>	Vir D1 دارای فعالیت توپوایزومراز است. Vir D2 یک اندونوکلاز است و Vir D4 نیز در اتصال کمپلکس رشته T-DNA/Vir D2 به سیستم ترشحی تیپ IV نقش دارد.
	<i>vir E</i>	پروتئین Vir E2 از T-DNA تک رشته‌ای در برابر آنزیم‌های نوکلئاز در داخل سلول گیاه محافظت می‌کند.
	<i>vir F</i>	در جدا کردن پروتئین‌ها از T-DNA تک رشته‌ای قبل از تلفیق آن با ژنوم سلول، نقش دارد.
	<i>vir G</i>	بیان سایر ژن‌های بیماری‌زا یا vir را تحریک می‌کند.
	<i>vir H</i>	غیرسمی کردن ترکیبات خاص گیاهی که برای آگروباکتریوم مضر هستند.
سایر نواحی	Ori	محل شروع همانندسازی آگروباکتریوم
	Overdrive sequence	محل اتصال پروتئین Vir C
	<i>tra</i>	انتقال پلاسمید Ti به استرین‌های غیربیماری‌زای آگروباکتریوم از طریق هم‌یوگی یا conjugate
	NC	کاتابولیسم نوپالین
	OC	کاتابولیسم اوکتوپین
	AC	کاتابولیسم آگروپین

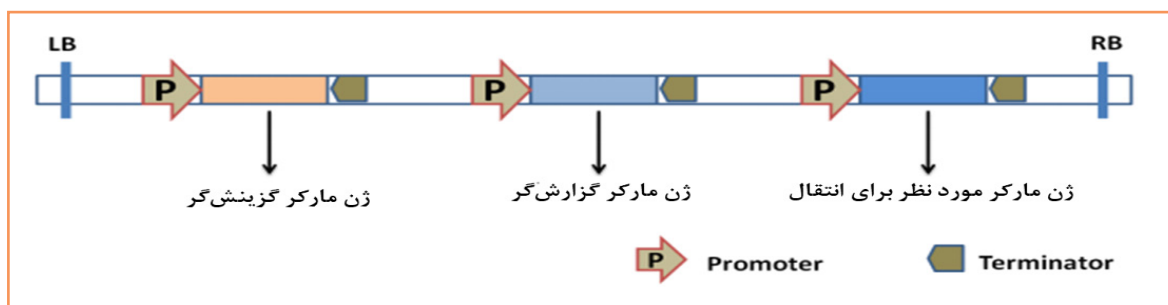


شکل ۳- پلاسمید Ti و ناحیه T-DNA

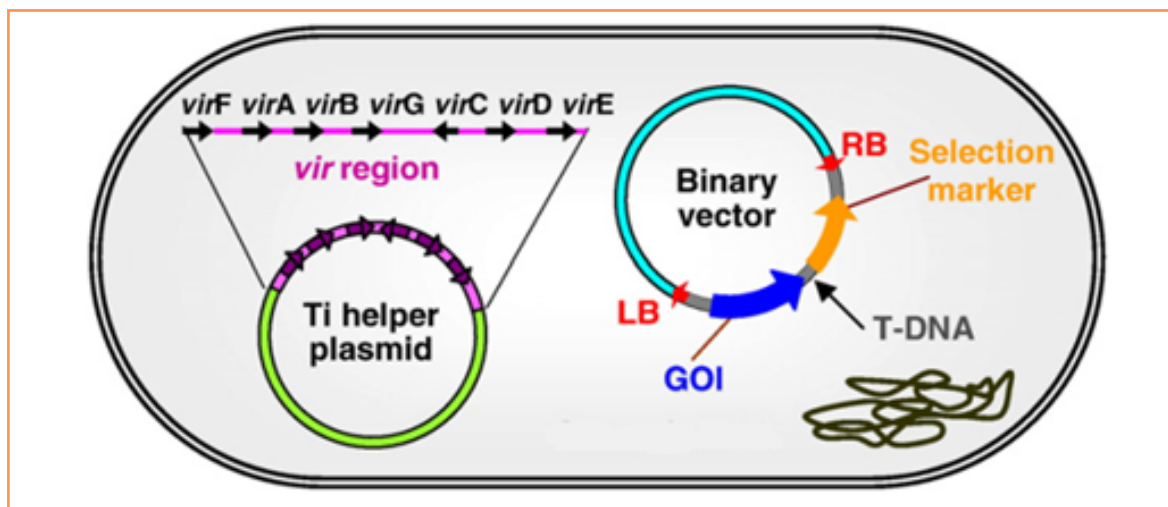
ژن‌های بیماری‌زا یا vir (VirA، VirB، VirC، VirD، VirE و VirG) در این فرایند و انتقال T-DNA به داخل سلول میزبان نقش دارند (Tzfira and Citovsky, 2000; Zupan *et al.*, 2000; Hwang *et al.*, 2017). محققین استدلال کردند که هر قطعه از دئوکسی‌ریبونوکلئیک اسید در بین این دو مرز می‌تواند به داخل سلول گیاه منتقل شده و به طور تصادفی با ژنوم گیاه تلفیق شود. محصولات ژن بیماری‌زا یا vir، هرگونه مواد ژنتیکی در بین دو مرز چپ و راست را منتقل می‌کنند. باکتری آگروباکتریوم قادر است دئوکسی‌ریبونوکلئیک اسید را به طیف وسیعی از میزبان‌ها از جمله گیاهان تک‌لپه و دولپه، قارچ‌ها و حتی سلول‌های انسانی منتقل کند (Gelvin, 2003). این توانایی باکتری آگروباکتریوم، دست‌کاری (دست‌ورزی) می‌شود و یکی از روش‌های پرکاربرد برای ایجاد گیاهان تراریخته است. اپین‌ها ترکیباتی هستند با وزن مولکولی پایین که در غده‌های تولید شده توسط آگروباکتریوم و رایزوبیوم دیده می‌شوند. آنزیم‌های خاصی که توسط ژن‌های ناحیه اپین بر روی T-DNA کد می‌شوند، در بیوسنتز اپین‌ها نقش دارند. این ژن‌ها در زمان آلودگی، وارد ژنوم گیاه می‌شوند. اپین‌ها توسط باکتری به عنوان منبع انرژی، کربن و ازت استفاده می‌شوند. ژن‌های کاتابولیسم اپین نیز انتقال اپین‌ها در داخل سلول باکتری و استفاده از آن‌ها توسط باکتری را کنترل می‌کنند (Vladimirov *et al.*, 2015). با استفاده از استراتژی‌های ناقلین تلفیقی مشترک (co-integrative) و یا ناقل دوتایی (binary vector) می‌توان انتقال ژن توسط آگروباکتریوم را انجام داد. پلاسمید Ti به علت داشتن اندازه بزرگ، نداشتن محل اختصاصی تاثیر آنزیم‌های برشی و تولید غده در گیاه نمی‌تواند به طور مستقیم به عنوان ناقل استفاده شود.

۱-۱- ناقلین دوتایی

ناقلین دوتایی به طور گسترده‌ای در انتقال ژن به گیاه توسط آگروباکتریوم به کار می‌روند (Gelvin, 2003). در استراتژی ناقل دوتایی، ترانس ژن در داخل یک ناقل مجزا در بین توالی‌های دو مرز چپ و راست همراه با مارکرهای (نشان‌گر) مناسب حمل شده (de Framond *et al.*, 1983) و به داخل یک استرین از آگروباکتریوم که حاوی پلاسمید Ti غیرمسلح است، منتقل می‌شود. پلاسمید غیرمسلح فاقد ژن‌های مولد یا القاکننده غده (ژن‌های بیوسنتز هورمون‌های گیاهی) هستند اما ژن‌های بیماری‌زا (vir) را داشته و دارای قابلیت انتقال هستند. به این استرین‌ها، استرین‌های vir helper گفته می‌شود. بنابراین با توجه به این که بعضی از توالی‌ها در ناحیه T-DNA ضروری نیستند، این توالی‌ها حذف شده و سپس ژن مورد نظر (ترانس ژن) و مارکر گزینش‌گر جایگزین خواهد شد. با توجه به آن چه گفته شد، نواحی T-DNA و vir را می‌توان به صورت دو پلاسمید مجزا با قابلیت همانندسازی در داخل یک آگروباکتریوم قرار داد. به این سیستم که در آن ژن‌های بیماری‌زا یا vir و T-DNA در داخل دو پلاسمید مجزا قرار داده می‌شوند، سیستم ناقل دوتایی نامیده می‌شود. به ناقلی که دارای ناحیه T-DNA بوده، فاقد ژن‌های مولد غده است و ژن مورد نظر در بین دو مرز چپ و راست وارد می‌شود، ناقل دوتایی (یا ناقل دوتایی T-DNA) و به ناقل دیگر که فاقد ناحیه T-DNA بوده ولی دارای ژن‌های بیماری‌زا یا vir است، vir helper یا helper plasmid گفته می‌شود. این دو پلاسمید، با هم برای تولید گیاهان تراریخته استفاده می‌شوند. این دو پلاسمید، مصنوعی بوده و بر اساس آن چه که به طور طبیعی در پلاسمید Ti در آگروباکتریوم وجود دارد، ساخته می‌شوند. چندین ناقل دوتایی هستند که در داخل آگروباکتریوم همانندسازی می‌کنند و می‌توانند برای حمل T-DNA از آگروباکتریوم به داخل گیاه مورد استفاده قرار گیرند. بخش T-DNA در این ناقل دوتایی دارای توالی‌های مرزهای چپ و راست بوده (۲۵ جفت باز) و ممکن است دارای یک ترانس ژن و یک مارکر گزینش‌گر گیاهی باشد. در شکل ۴، عناصر مورد نیاز در ناحیه T-DNA برای انتقال ژن نشان داده شده است. ناحیه بیرون از T-DNA نیز حاوی یک مارکر گزینش‌گر باکتریایی و یک ناحیه شروع همانندسازی باکتری‌ها است. پلاسمید helper یا vir plasmid که به صورت پایدار به داخل گیاه منتقل نمی‌شود، حاوی ژن‌های بیماری‌زا یا vir بوده که منشاء آن‌ها پلاسمید Ti در آگروباکتریوم است. این ژن‌ها یک رشته پروتئین‌هایی می‌سازند که ناقل دوتایی را در توالی‌های دو مرز چپ و راست قطع می‌کنند و باعث تسهیل انتقال T-DNA به داخل گیاه و تلفیق آن با ژنوم گیاه می‌شود. ابتدا ژن مورد نظر در داخل باکتری *Escherichia coli* به ناحیه T-DNA وارد شده و سپس به داخل استرینی از آگروباکتریوم که دارای vir helper مناسب است، منتقل می‌شود. اکنون این باکتری، آماده تلقیح به گیاه است (شکل ۵) (Meyers *et al.*, 2010).



شکل ۴ - تصویر عمومی از ناحیه T-DNA در یک ناقل دوتایی. P: پروموتور؛ LB و RB به ترتیب مرز راست و چپ



شکل ۵ - سیستم ناقل دوتایی در آگروباکتریوم. GOI: ژن مورد نظر برای انتقال؛ RB: مرز راست؛ LB: مرز چپ

انتقال T-DNA به داخل سلول گیاه و تلفیق آن با ژنوم، شامل مراحل زیر است (Ozyigit, ۲۰۱۲):

- آگروباکتریوم مولکول‌های سیگنال (ترکیبات فنلی و قندها) که توسط سلول‌های زخمی گیاه آزاد می‌شوند را دریافت می‌کند. این مولکول‌های سیگنال، به صورت یک جذب‌کننده شیمیایی عمل می‌کنند.
- پروتئین Vir A که یک آنزیم کیناز در غشاء داخلی باکتری است، با دریافت ترکیبات فنلی (مانند استوسیرینگون؛ acetosyringom)، پروتئین Vir G را فعال می‌کند. این پروتئین، نسخه‌برداری سایر ژن‌های بیماری‌زا یا vir را فعال می‌کند. بنابراین فعال شدن پروتئین Vir G، بیان سایر ژن‌های بیماری‌زا یا vir را تحریک یا القاء می‌کند.

- پروتئین‌های Vir D1 و Vir D2، آنزیم‌های اندونوکلاز اختصاصی دو مرز چپ و راست بوده و این دو مرز را بر روی T-DNA، تشخیص می‌دهند. پروتئین Vir D2 در مرز راست، شکستگی ایجاد نموده و در نهایت T-DNA به صورت تکرشته‌ای تولید می‌شود. سپس Vir D2 با اتصال به انتهای T-DNA تکرشته‌ای در سمت ۵'، یک کمپلکس نابالغ (T-complex) تشکیل می‌دهد.

- انتقال T-DNA از طریق سیستم ترش‌شی تیپ IV بوده که متشکل از پروتئین‌های کد شده توسط ژن‌های Vir B و Vir D4 و یک رشته مویی شکل به نام پیلویس (T-pilus) جهت اتصال باکتری به سطح

سلول می‌باشد. پروتئین Vir D4 به برهمکنش بین کمپلکس T-DNA تک‌رشته‌ای/Vir D2 با پیلوس کد شده توسط Vir B، کمک می‌کند. اعتقاد بر این است که پیلوس حاوی پروتئین‌های Vir B و Vir D4، این کمپلکس و پروتئین Vir E2 را به داخل سلول گیاه منتقل می‌کند. سایر ژن‌های بیماری‌زا یا vir (شامل Vir F، Vir E3، E2، Vir D5) نیز از طریق پیلوس عبور کرده و به مونتاژ کمپلکس T-DNA تک‌رشته‌ای/پروتئین vir در داخل سیتوپلاسم گیاه کمک می‌کنند تا یک کمپلکس بالغ (T-complex) تشکیل شود.

❖ اکثر پروتئین‌های Vir B به تشکیل کانال غشاء کمک می‌کنند یا به صورت یک آنزیم آدنوزین تری فسفاتاز عمل نموده و انرژی لازم برای فرایند مونتاژ و خروج T-DNA از کانال را فراهم می‌کنند. پروتئین‌های Vir B از جمله Vir B5، Vir B2 و Vir B7 به تشکیل پیلوس کمک می‌کنند. پروتئین تشکیل‌دهنده ساختار پیلوس، پیلین نام دارد که پروتئین Vir B2، پروتئین عمده پیلین است.

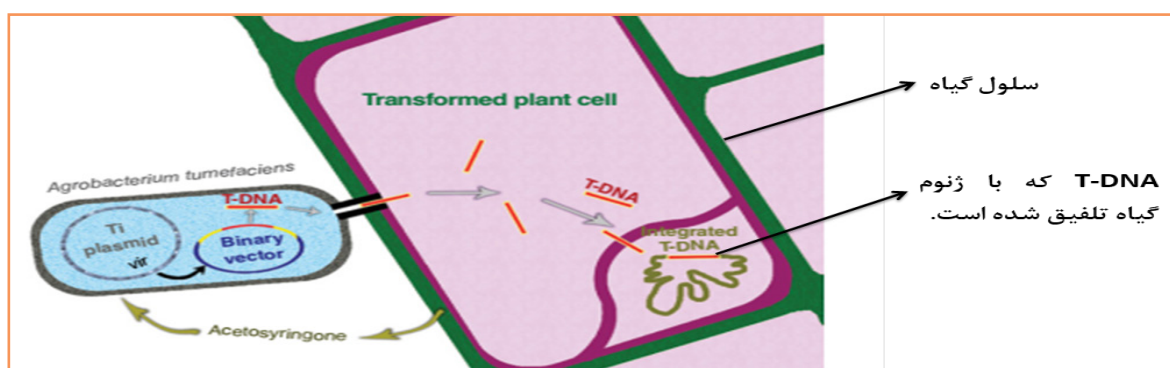
❖ پروتئین Vir E2، رشته T-DNA تک‌رشته‌ای را می‌پوشاند.

❖ پروتئین‌های Vir E2 و Vir D2، رشته T-DNA تک‌رشته‌ای را از آنزیم اندونوکلاز موجود در داخل سیتوپلاسم سلول گیاه محافظت می‌کنند. این دو پروتئین در هدایت کمپلکس بالغ به سمت هسته گیاه نقش دارند.

❖ پروتئین Vir C2 به عنصر تقویت‌کننده یا overdrive enhancer element متصل شده و کارایی انتقال را افزایش می‌دهد. این عنصر در مجاورت مرز راست قرار دارد.

❖ در داخل هسته، رشته T-DNA تک‌رشته‌ای به دورشته‌ای تبدیل شده و در طی فرایندی به نام نوترکیبی غیرمعمول یا ناروا (illegitimate recombination) با ژنوم گیاه تلفیق می‌شود و ژن‌هایی که در T-DNA هستند بیان شده و پروتئین‌ها سنتز می‌شوند.

در شکل ۶، تصویری ساده از انتقال ژن و تغییر ژنتیکی یک سلول گیاه با واسطه آگروباکتریوم نشان داده شده است. این شکل نشان می‌دهد که تولید استوسیرینگون توسط سلول گیاه، باعث تحریک ژن‌های بیماری‌زا یا vir بر روی پلاسمید Ti خواهد شد و در نتیجه T-DNA تک‌رشته‌ای از ناقل دوتایی تولید می‌شود. این T-DNA تک‌رشته‌ای از طریق پیلوس باکتری وارد سلول گیاه شده و با ژنوم هسته‌ای گیاه تلفیق می‌شود (Finer, 2016).



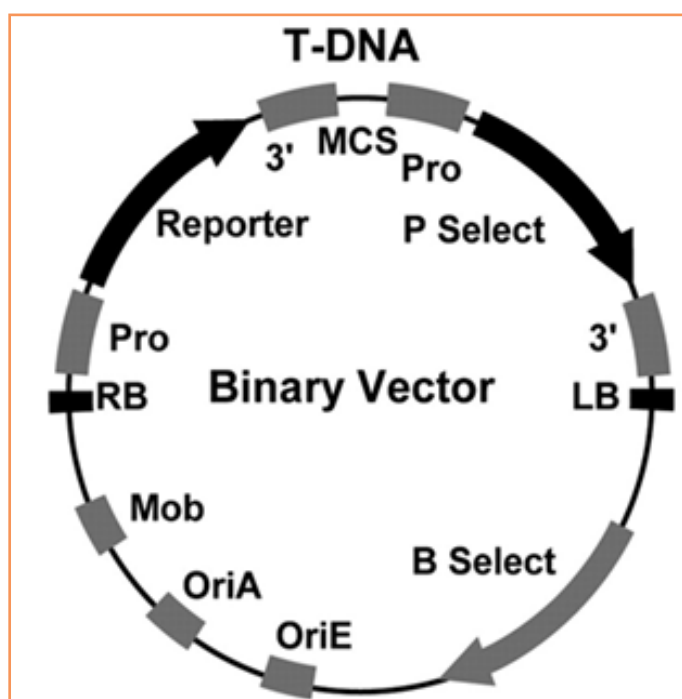
شکل ۶ - تصویری ساده از انتقال ژن به داخل سلول گیاه با واسطه آگروباکتریوم

ژن‌های مارکر در آزمایشات مربوط به انتقال ژن و تغییر ژنتیکی گیاه مورد استفاده قرار می‌گیرند تا مشخص کنند که آیا یک ترانس‌ژن به طور موفق به داخل ژنوم گیاه منتقل شده است یا خیر. همچنین این مارکرها برای انتخاب بوته‌ها و بافت‌های تراریخته در بین غیرتراریخته‌ها نیز مورد استفاده قرار می‌گیرند. ژن‌های مارکر متعددی، نقش مهمی در تسهیل تولید گیاهان تراریخته، شناسایی بعدی گیاهان تراریخته و تنظیم دقیق دستورالعمل‌هایی که برای افزایش تکرار تغییر ژنتیکی مورد نیاز هستند، ایفا کرده‌اند. ژن‌های مارکر دو دسته هستند: ژن‌های مارکر گزینش‌گر و ژن‌های گزارش‌گر (به این ژن‌ها، ژن‌های مارکر قابل مشاهده نیز گفته می‌شود) (Liu et al., 2016). به طور کلی به نظر می‌رسد که میزان موفقیت تلفیق ژن‌های خارجی وارد شده به سلول در طی تغییر ژنتیکی گیاه، خیلی پایین است. بنابراین در مطالعات انتقال ژن، لازم است تا با استفاده از روش‌های دیده‌بانی یا مونیتورینگ، بیان ژن‌های خارجی وارد شده به داخل سلول آنالیز شوند. این می‌تواند با استفاده از یک ژن مارکر برای انتخاب و بازایی گیاهان در شرایط کشت مناسب، محقق شود. به منظور دسترسی به این هدف، ناقلینی که برای انتقال ژن ساخته می‌شوند، دارای هم ژن‌های مارکر و هم ژن مورد نظر هستند. ژن‌های مارکر گزینش‌گر، به راحتی صفات قابل ردیابی کد می‌کنند که تشخیص سلول‌های نشان‌دار از غیرنشان‌دار را قادر می‌سازد. ژن‌های کدکننده پروتئین‌های متحمل به علف‌کش‌ها و آنتی‌بیوتیک‌ها، پرکاربردترین ژن‌های مارکر گزینش‌گر هستند. با استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها و یا علف‌کش‌های مختلف، می‌توان بوته‌هایی که در آن‌ها انتقال ژن صورت گرفته است را انتخاب کرد. به منظور کاهش نگرانی‌های سلامتی در استفاده از ژن‌های مارکر مقاوم به علف‌کش و آنتی‌بیوتیک، ژن‌هایی ساخته شده و مورد استفاده قرار می‌گیرند که به گیاه تراریخته اجازه انتخاب متابولیک را می‌دهند. به عنوان مثال ژن PMI، آنزیم فسفومانوز ایزومراز (phosphomannose isomerase) کد می‌کند و این آنزیم به گیاه تراریخته اجازه می‌دهد تا از مانوز به عنوان منبع کربن استفاده کند. ژن گزارش‌گر محصولی کد می‌کند که به راحتی سنجش می‌شود. ژن‌های مارکر گزینش‌گر به محقق کمک می‌کنند تا بافت تراریخته را انتخاب کنند، در حالی که ژن‌های گزارش‌گر، گزارش می‌دهند که کدام سلول‌ها تراریخته شده‌اند. ژن‌های گزارش‌گر محصولاتی کد می‌کنند که یا به طور مستقیم ردیابی می‌شوند و یا واکنش‌هایی را کاتالیز می‌کنند که محصولات حاصل از این کاتالیز، قابل ردیابی بوده و در نتیجه یک محقق می‌تواند ردیابی کند که ژن در چه زمانی و در کجا در ژنوم فعال است (Ozyigit, 2012; Yan and Ping, 2013). ژن‌های بیوسنتز پروتئین فلورسنت سبز (green fluorescent protein; GFP)، آنزیم لوسیفراز و بتا گلوکورونیداز (β -glucuronidase) نمونه‌های معروفی از ژن‌های مارکر گزارش‌گر هستند. بیان ژن‌های گزارش‌گر بلافاصله پس از تلقیح سلول گیاه با آگروباکتریوم، نشانه خوبی برای انتقال T-DNA از باکتری به هسته سلول گیاه است. بعداً، بیان این ژن‌ها در سلول‌هایی که بر روی محیط کشت‌های انتخابی رشد می‌کنند، مدرکی برای ادغام T-DNA در کروموزوم‌های گیاه است.

(Komori *et al.*, 2007) در جدول ۳، نمونه‌هایی از ژن‌های مارکر گزینش‌گر، ژن‌های مارکر گزارش‌گر و مشخصات آن‌ها ذکر شده است (Ozyigit, 2012; Yan and Ping, 2013). در شکل ۷، یک ناقل دوتایی همراه با محل ژن‌های مارکر گزینش‌گر و گزارش‌گر نشان داده شده است.

جدول ۳ - تعدادی از ژن‌های مارکر

ژن‌های مارکر	مقاومتی که ایجاد می‌کند / نحوه عمل در گیاه	محل انجام گزینش
مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها	<i>npt II</i>	در گیاه و باکتری
	<i>hpt</i> یا <i>alpha IV</i>	در گیاه و باکتری
	<i>bla</i>	در گیاه و باکتری
	<i>aadA</i>	در گیاه و باکتری
	<i>tet</i>	در گیاه و باکتری
	<i>cat</i>	در گیاه و باکتری
مقاومت به علف‌کش‌ها	<i>bar</i>	در گیاه
	<i>aro A</i>	در گیاه
	ژن‌های اصلاح شده <i>als</i>	در گیاه
ژن‌های مارکر گزارش‌گر	<i>gfp</i>	در گیاه
	<i>uid A/gus</i>	در گیاه
	<i>MYB12</i>	در گیاه
	<i>LUC</i>	در گیاه
ژن‌های متابولیک	<i>PMI</i>	در گیاه



شکل ۷ - ساختار کلی یک ناقل دوتایی. P Select: مارکر گزینش گر گیاه (مانند ژن مقاوم به علف کش) جهت گزینش بوته‌هایی که انتقال ژن در آن‌ها صورت گرفته است. B Select: مارکر گزینش گر باکتری (مانند ژن مقاوم به آنتی‌بیوتیک) جهت گزینش باکتری‌هایی که ژن مورد نظر در آن‌ها وارد شده است. LB و RB: به ترتیب مرز راست و چپ. OriE: محل شروع همانندسازی پلاسمید در *E. coli*. OriA: محل شروع همانندسازی پلاسمید در آگروباکتریوم.

گیاهانی که در برابر انتقال و تغییر ژنتیکی با وساطت آگروباکتریوم مقاومت نشان می‌دهند را می‌توان در معرض تیمارهای فیزیکی و شیمیایی متعددی مانند pH، دما، شرایط نور، پیش‌کشت و هورمون‌درمانی، و ایجاد زخم جهت تحریک آن‌ها به کسب دئوکسی‌ریبونوکلئیک اسید، قرار دارد (van Wordragen and Dons, 1992; Gafni *et al.*, 1995). انتقال ژن با وساطت آگروباکتریوم در مقایسه با سایر روش‌ها، فوایدی دارد که باعث شده تا این روش به عنوان اولین انتخاب برای انتقال ژن در نظر گرفته شود (Herrera-Estrella *et al.*, 2005). از جمله این فواید عبارتند از:

- در درصد قابل توجهی از انتقال ژن و تغییرات ژنتیکی انجام گرفته، تنها یک نسخه از T-DNA به کروموزوم‌های سلول گیاه تلفیق شده است.

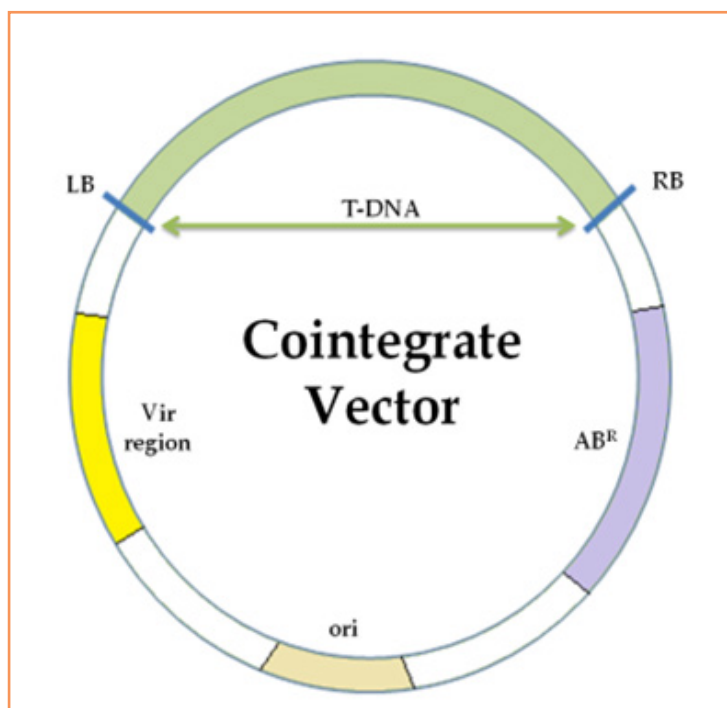
- امروزه سیستم‌های ناقل متعددی در دسترس بوده که دارای مرزهای T-DNA و ژن‌های مختلف گزارش‌گر و مارکر گزینش‌گر هستند و محققین می‌توانند مناسب‌ترین ترکیب برای وارد کردن ژن‌های هترولوگ را انتخاب کنند.

- انتقال قطعات بزرگی از دئوکسی‌ریبونوکلئیک اسید از جمله کروموزوم‌های مصنوعی باکتریایی، امکان‌پذیر است.

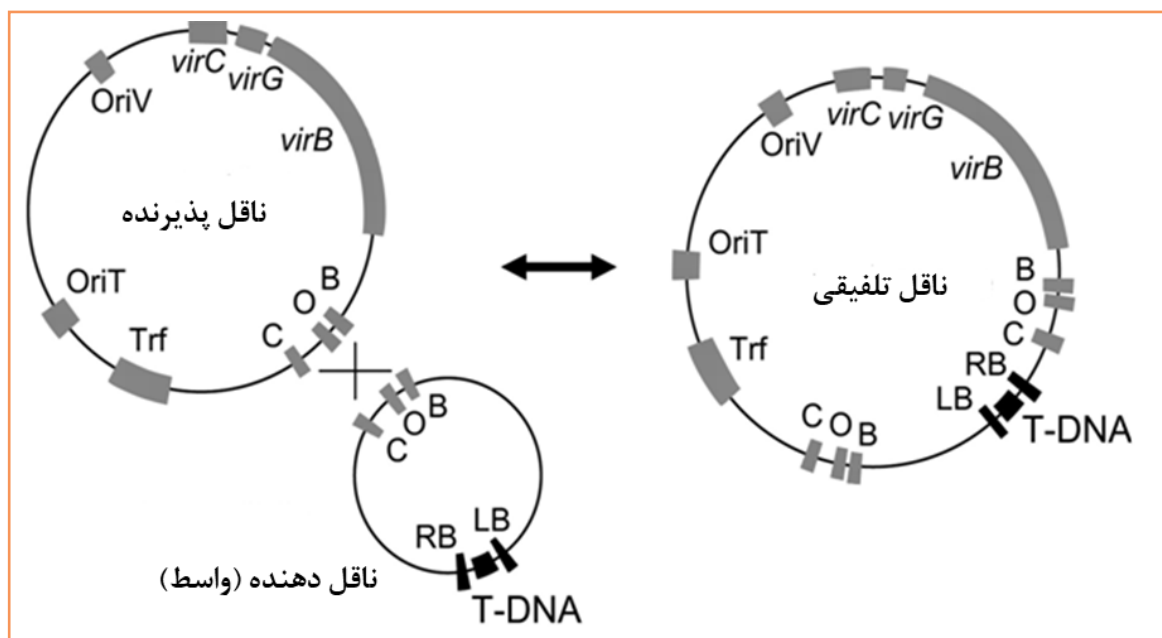
- در برخی گونه‌های گیاهی مانند آرابیدوپسیس، انتقال ژن و تغییر ژنتیکی بدون نیاز به کشت بافت امکان‌پذیر است.

۱-۲- استراتژی ناقلین تلفیقی مشترک (co-integrate vector)

در استراتژی ناقلین تلفیقی مشترک، ترانس ژن با پلاسمید Ti در باکتری آگروباکتریوم که به عنوان میزبان است، تلفیق می‌شود (Van Haute *et al.*, 1983; Zahm *et al.*, 1984). استراتژی ناقلین تلفیقی مشترک سخت بوده و دست و پاگیر است در حالی که ناقل دوتایی کوچک بوده و به راحتی قابل دست‌کاری است (Gelvin, 2003; Slater *et al.*, 2008). به ناقلینی که از طریق همولوژی دئوکسی‌ریبونوکلئیک اسید به درون یک پلاسمید Ti، وارد می‌شوند، ناقلین تلفیقی یا تلفیقی مشترک گفته می‌شود. در این ناقل، در داخل سلول آگروباکتریوم پلاسمید Ti که غیرمسلح است (پلاسمید پذیرنده) با پیوندهای همتراز به ناقل دهنده ژن مورد نظر (ناقل واسط) متصل می‌شود تا به عنوان یک ناقل منفرد عمل کند. در یک ناقل تلفیقی مشترک، بخش زیادی از T-DNA (به خصوص ژن‌های مولد غده) با قطعه‌ای از دئوکسی‌ریبونوکلئیک اسید باکتری *E. coli* جایگزین می‌گردد. مشابهت بین قطعه‌ای از T-DNA تغییر یافته که از پلاسمید *E. coli* منشأ گرفته است با توالی‌های مشابه موجود در پلاسمید پذیرنده ژن مورد نظر، مکانی مناسب برای وقوع نوترکیبی فراهم می‌کند و منجر به تشکیل یک پلاسمید Ti هیبرید یا تلفیقی می‌شود. در ناقل واسط یا دهنده ژن، ژن مورد نظر همراه با تمامی ژن‌های پلاسمید دهنده و ژن‌های مارکر آن در حفاصل دو مرز چپ و راست T-DNA جای می‌گیرد. در ناقل تلفیقی مشترک، T-DNA که حامل ژن مورد نظر است و ناحیه Vir که دارای ژن‌های بیماری‌زا یا vir است، بر روی یک پلاسمید قرار دارند (شکل ۸). بنابراین در ناقلین تلفیقی مشترک، باید بین پلاسمید دهنده ژن و پلاسمید Ti (پذیرنده ژن)، یک ناحیه همولوژی (تشابه) وجود داشته باشد. این همولوژی باعث می‌شود تا این دو پلاسمید بتوانند با هم تلفیق شوند. یک ناقل واسط که دارای T-DNA بوده و در *E. coli* ساخته شده است، به داخل استرینی از آگروباکتریوم که حامل یک ناقل پذیرنده است (پلاسمید Ti) منتقل می‌شود. سپس بین توالی‌های مشابه در این دو ناقل، نوترکیبی رخ داده و این دو ناقل با هم ترکیب می‌شوند (شکل ۹). ناقل واسط یک پلاسمید کوچک است که فقط در *E. coli* همانندسازی می‌کند در حالی که همانندسازی پلاسمید پذیرنده هم در *E. coli* و هم در آگروباکتریوم اتفاق می‌افتد. در ابتدا ژن مارکر و ژن مورد نظر وارد ناقل واسط شده و سپس این ناقل وارد استرینی از آگروباکتریوم که دارای یک پلاسمید پذیرنده است، می‌شود (Komori *et al.*, 2007).



شکل ۸- ناقل تلفیقی مشترک که دارای ناحیه vir و T-DNA است. AB^R ، یک ژن مارکر گزینش گر که باعث مقاومت باکتری به آنتی بیوتیک می‌شود.



شکل ۹- نوترکیبی بین ناقل واسط (دهنده ژن) و ناقل پذیرنده (پلاسمید Ti) در محل توالی‌های مشابه که منجر به تلفیق ناقل واسط در ناقل پذیرنده شده و یک ناقل تلفیقی مشترک تشکیل می‌شود.

۱-۳- تلقیح آگروباکتریوم حامل ژن مورد نظر به گیاه

الف- کشت توام: کشت توام بافت‌های قابل کشت یا ریزنمونه (explant) با آگروباکتریوم حامل ناقل دوتایی که دارای ژن مورد نظر است، در اکثر دستورالعمل‌های انتقال ژن با واسطه آگروباکتریوم استفاده می‌شود. بافت‌های مختلف گیاه همچون کالوس، بافت برگ، جنین بالغ، جنین نابالغ، گره‌ها، فواصل بین‌گره‌ها و غیره به عنوان بافت هدف برای آلودگی به آگروباکتریوم مورد استفاده قرار می‌گیرند. این تکنیک به توانایی باززایی بافت آلوده شده بستگی دارد که با توجه به نوع بافت و گونه گیاهی، متغیر است. در آزمایشگاه‌های مختلف دنیا، دستورالعمل‌های مختلفی برای گونه‌های مختلف گیاهی تایید شده و مورد استفاده قرار می‌گیرند. این دستورالعمل‌ها مراحل مختلفی دارد مانند استریل کردن، پیش کشت، تلقیح، تحریک تشکیل کالوس، گزینش، باززایی، مقاوم‌سازی (hardening) و سازگاری.

❖ استریل‌سازی بافت‌های قابل کشت و پیش‌تیمار: مهم‌ترین پیش‌نیاز در کشت بافت، حفظ شرایط غیرآلودگی است. مواد ضدعفونی کننده تجاری مختلفی برای استریل کردن بذر در دسترس هستند از جمله مایع سفیدکننده و مواد ضدعفونی کننده سطحی (مانند اتانل ۷۰ درصد، کلرید جیوه ۰/۱ درصد و هیپوکلریت سدیم) همراه با فعال کننده‌های سطحی (surfactant) مانند تویین ۲۰ و تویین ۸۰ که به صورت عوامل مرطوب کننده عمل می‌کنند. دوره ضدعفونی کردن بذر با این مواد از یک تا ۳۰ دقیقه متغیر است (Souza and Beck, 2013).

❖ پیش کشت: با افزودن غلظت‌های مختلفی از آکسین‌های غیرطبیعی مانند 4-D، picloram و dicamba به محیط کشت MS، منجر به افزایش کارایی تحریک کالوس در ارقام مختلف گندم شده است. مدت زمان پیش کشت، بین چهار تا پنج روز متغیر است (Mamrutha et al., 2014).

❖ تلقیح: فاکتورهای مختلفی مانند زمان، دما، مواد تشکیل دهنده محیط کشت، تراکم سلول آگروباکتریوم و محرک‌های انتقال ژن و تغییر ژنتیکی پایدار نظیر استوسیرینگون، قندها، اکسین‌ها یا فعال کننده‌های سطحی بر کارایی انتقال ژن و تغییر ژنتیکی اثر می‌گذارند. مدت زمان تلقیح بافت گیاه با سوسپانسیون آگروباکتریوم می‌تواند از یک دقیقه تا ۱۲ ساعت متغیر باشد، با این حال یک اجماع کلی وجود دارد و آن این است که مدت زمان مناسب تلقیح جهت انتقال و حمل T-DNA، حدوداً سه ساعت در دمای مناسب ۲۵ درجه سانتی‌گراد است. فعال کننده‌های سطحی مانند pluronic acid F68 (0.02%) و silwet L-77 (0.01%) با اتصال خوب آگروباکتریوم در طی تلقیح، کارایی انتقال ژن و تغییر ژنتیکی را افزایش می‌دهند. با این حال گزارشات متناقضی هم وجود دارد که نشان می‌دهد فعال کننده‌های سطحی هیچ‌گونه تاثیری بر کارایی انتقال ندارند. تحقیقات نشان داده که استوسیرینگون، قدرت بیماری‌زایی موجود در پلاسמיד Ti در *A. tumefaciens* را افزایش داده و به انتقال T-DNA کمک می‌کند. استوسیرینگون توسط سلول‌های غده در دولپه‌ای‌های میزبان تولید می‌شود ولی تولید آن در تک‌لپه‌ای‌ها گزارش نشده است. بنابراین لازم است تا غلظت مناسبی از استوسیرینگون به محیط‌های

تلقیح و کشت توام اضافه شود که در اکثر مطالعات، این غلظت ۲۰۰ میکرومول گزارش شده است. وجود استوسیرینگون در محیط تلقیح بسیار ضروری است و به طور واضح، کارایی انتقال را افزایش می‌دهد. افزودن قندهایی مانند مالتوز و گلوکز به محیط تلقیح برای افزایش کارایی انتقال و حمل T-DNA، ضروری است. گزارشات نشان می‌دهد که تراکم سلول آگروباکتریوم در افزایش کارایی انتقال مهم است که باید در ۶۰۰ نانومتر، مساوی یا بیش‌تر از یک باشد (Ding et al., 2009; Chugh et al., 2012).

◀ مدت زمان کشت توام و شرایط آن: به منظور دستیابی به کارایی بالای انتقال، مدت زمان کشت توام ۲ الی ۳ روز گزارش شده است. برای کشت توام، وجود استوسیرینگون و دمای ۲۱ درجه سانتی‌گراد ضروری است (Raja et al., 2010).

◀ کنترل آگروباکتریوم و گزینش: کارایی انتقال ژن و تغییر ژنتیکی گیاه به باززایی بافت‌های قابل کشت پس از کشت توام با آگروباکتریوم و تحریک کالوس، بسیار متکی است. رشد زیاد آگروباکتریوم بر روی بافت‌های گیاه پس از کشت توام، منجر به بافت‌مردگی خواهد شد و در نتیجه بقاء بافت‌ها کاهش می‌یابد. با استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها می‌توان این مشکل را برطرف کرد. متداول‌ترین آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده در انتقال با واسطه آگروباکتریوم، شامل cefotaxime، carbenicillin و timentin هستند. دو آنتی‌بیوتیک اولی به ترتیب پنی‌سیلین و سفالوسپورین بوده که به دلیل دلشتن گروه β -lactam، دارای حداقل تاثیر منفی بر اکثر بافت‌های گیاه هستند. این آنتی‌بیوتیک‌ها با ایجاد اختلال در بیوسنتز پپتیدوگلیکان در دیواره سلول باکتری، باعث مرگ باکتری می‌شوند. آنتی‌بیوتیک ایده‌آل باید مؤثر باشد، ارزان باشد، قابل حل باشد، در اسیدیته ۵-۶ پایدار باشد و برای بافت گیاه سمی نباشد. انتخاب آنتی‌بیوتیک و غلظت مناسب آن، به استرین آگروباکتریوم مورد استفاده بستگی دارد (Mathias and Boyd, 1986; Lee and Gelvin, 2008).

ب- روش غوطه‌وری گل: این روش، دومین روش متداول برای حمل و انتقال T-DNA به داخل ژنوم گیاه از طریق آگروباکتریوم است. در این روش لازم است تا گیاه به مرحله گل‌دهی برسد. گل‌آذین گیاه با دقت و به مدت یک الی سه روز در داخل محیط کشت حاوی آگروباکتریوم به صورت توام با آگروباکتریوم، غوطه‌ور می‌شود (کشت توام). افرادی (یا بذور) که پس از آلودگی به وجود می‌آیند، برداشت شده و از نظر انتقال ژن و تغییر ژنتیکی غربال می‌شوند. در روش غوطه‌وری گل، کشت بافت نیاز نیست، بنابراین کار و زحمت کم‌تری دارد. انتقال ژن در گیاهانی مانند گندم، برنج و ذرت با این روش صورت گرفته است (Rod-in et al., 2014).

ج- روش In-planta (در سطح گیاه): در این روش، بذرها پس از جوانه‌زنی با استفاده از یک سوزن استریل به عمق یک تا دو میلی‌متر سوراخ شده و سپس به مدت ۱۵ دقیقه تا یک ساعت در تاریکی در محیط کشت حاوی آگروباکتریوم نگهداری (انکوبه) می‌شوند. این بذرها پس از آلودگی، از محیط کشت خارج شده و سپس دوباره به مدت یک الی سه روز نگهداری (انکوبه) خواهند شد. سپس

بذرهای با آب مقطر شسته شده و با یک محلول آنتی‌بیوتیک جهت کشتن آگروباکتریوم تیمار می‌شوند. بذرهای تیمار شده جهت رشد در خاک کشت خواهند شد. بذرهای نسل اول (T1) از نظر انتقال ژن مورد نظر و تغییر ژنتیکی، غربال می‌شوند. مزیت این روش در مقایسه با کشت توام، عدم نیاز به کشت بافت است، بنابراین در زمان و هزینه صرفه‌جویی خواهد شد. در گیاهانی مانند کلزا، برنج، نیشکر، ذرت، پیاز و گوجه‌فرنگی از این روش استفاده شده است (Mayavan *et al.*, 2013; Moiseeva *et al.*, 2014).

د- روش Agrobacterium infiltration (نفوذ یا نشت آگروباکتریوم): آگروباکتریوم گیاهان را در طبیعت از طریق زخم‌ها آلوده نموده و T-DNA را با فعال کردن ژن‌های بیماری‌زا یا *vir*، به داخل سلول منتقل می‌کند. در این روش، محیط کشت حاوی آگروباکتریوم با ترکیب فنلی استوسیرینگون جهت تحریک ژن‌های بیماری‌زا یا *vir*، تیمار شده و سپس با استفاده از یک سرنگ، آگروباکتریوم به داخل بافت برگ نفوذ داده شده و منتشر می‌شود. در این روش، برهمکنش بین سلول گیاه و باکتری بیش‌تر بوده و در نتیجه ژن موجود در T-DNA نیز بیش‌تر بیان خواهد شد. محدودیت این روش این است که آلودگی باکتری به ناحیه‌ای از بافت که مورد استفاده قرار گرفته است، محدود می‌شود.

ه- روش Agrobacterium infection: به وارد کردن ژنوم ویروس به داخل سلول‌های گیاه از طریق قرار دادن آن در داخل T-DNA در یک پلاسمید *Ti* و استفاده از آگروباکتریوم حامل این پلاسمید نو ترکیب برای کشت توام با سلول‌های گیاه را *agroinfection* گفته می‌شود. در واقع، اساس استفاده از مواد ژنتیکی ویروس جهت انتقال به گیاه این است که با استفاده از پروتئین‌های کد شده توسط ژن‌های ویروسی مانند پروتئین پوششی، پروتئین حرکتی، پروتئین انتقال، ریبونوکلیک اسیدهای ماهواره‌ای و ریبوزوم‌ها مقاومت در برابر ویروس در گیاه القاء (تحریک) شود. ژنوم ویروس قادر است به سرعت در گیاه آلوده تکثیر کند و این ویژگی ایده‌آل می‌تواند در ساخت یک وسیله مناسب برای بیان موقت ژن در گیاهان مورد استفاده قرار گیرد. این استراتژی در ویروس‌هایی بیش‌تر موفق است که با حشرات منتقل می‌شوند مانند جیمینی‌ویروس‌ها، توباموویروس‌ها، پوتکس‌ویروس‌ها، توبراویروس‌ها و کوموویروس‌ها (Peyret and Lomonossoff, 2015).

۲- بمباران ذره یا ریزپرتابه‌ای (microprojectile bombardment): تکنیک بمباران ذره‌ای که به آن بیولیستیک (biolistic)، بمباران ریزپرتابه‌ای (microprojectile) و شتاب ذره‌ای (particle acceleration) نیز گفته می‌شود، به عنوان انعطاف‌پذیرترین و مؤثرترین روش برای ایجاد انواع مختلفی از موجودات تراریخت شامل میکروارگانیسم‌ها، سلول‌های حیوانی و گونه‌های گیاهی مطرح شده است. در این روش که توسط Klein و همکاران و Sanford و همکاران توصیف گردید، از ریزپرتابه‌های پرشتاب برای فرستادن دئوکسی‌ریبونوکلیک اسید به درون سلول‌های زنده استفاده می‌شود (Klein *et al.*, 1987; Sanford *et al.*, 1991). در این روش از ذرات ریز ساخته شده از تنگستن، طلا یا هرگونه فلز با دانسیته بالا که با دئوکسی‌ریبونوکلیک اسید پوشش داده شده‌اند، استفاده می‌شود. ذرات طلا به دلیل داشتن دانسیته بالا،

سمیت پایین، عدم واکنش شیمیایی، داشتن اندازه یکنواخت یا همگن، بی‌اثر بودن از نظر بیولوژیکی و عدم تخریب باندهای دئوکسی‌ریبونوکلئیک اسید برای بمباران ذره‌ای ترجیح داده می‌شوند. این ذرات با سرعت بسیار بالا به سمت بافت‌های زنده پرتاب شده و با بمباران این بافت‌ها، دئوکسی‌ریبونوکلئیک اسید توسط سلول کسب شده و با ژنوم گیاه تلفیق می‌شود. برای انجام این روش، از یک تفنگ ژن یا یک سیستم حمل بیولیستیک (بیولوژیکی) استفاده می‌شود (Klein *et al.*, 1988; Sanford, 1990; Repalli *et al.*, 2019). در سیستمی که بیش‌تر مورد استفاده قرار می‌گیرد، یک تفنگ هدایت‌کننده ذرات (به نام PDS-1000) یا تفنگ هلیومی هدایت‌کننده ذرات (PDS-1000He) استفاده می‌شود. ذرات طلا یا تنگستن (به قطر یک تا سه میلی‌متر) که ناقل دئوکسی‌ریبونوکلئیک اسید بوده و به ریزپرتابه‌ها معروف هستند، توسط یک درشت‌پرتابه (macroprojectile) یا درشت‌ناقل (macrocarrier) حمل شده و به سمت سلول‌های گیاهی زنده پرتاب می‌شوند. این ذرات حامل دئوکسی‌ریبونوکلئیک اسید بر سطح جلویی درشت‌ناقل قرار داده می‌شوند و پس از برخورد درشت‌ناقل به یک صفحه یا غربال متوقف‌کننده، از آن رها می‌شوند. این صفحه مانع طوری طراحی شده است که حرکت درشت‌پرتابه را متوقف می‌کنند ولی به ریزپرتابه‌ها اجازه عبور می‌دهند. گاز هلیوم پس از خروج از تانک، به یک صفحه مانع برخورد کرده و نمی‌تواند وارد اتاقک شود. پس از آن که این صفحه بازدارنده، گاز هلیوم را متراکم کرد، این گاز به طور ناگهانی آزاد شده و یک ورقه پلاستیکی نازک را که حامل ریزپرتابه‌ها است به سمت یک غربال فلزی شتاب می‌دهد. پس از برخورد با صفحه یا غربال متوقف‌کننده، ریزپرتابه‌ها از منافذ غربال عبور می‌کنند و پس از طی یک مسیر با خلأ ناقص، به بافت می‌رسند. امروزه در اکثر آزمایشگاه‌ها از هلیوم با فشار بالا استفاده می‌شود تا نیروی مورد برای سرعت دادن به ذرات کوچک طلا به سمت بافت هدف تولید شود. گاز هلیوم به این دلیل ترجیح داده می‌شود که بی‌اثر است و ضریب انبساط بالایی دارد، یعنی می‌تواند فشرده شود و وقتی در هوا یا خلأ آزاد شود، به سرعت منبسط می‌شود. از مزیت‌های این روش این است که در تعداد زیادی از گیاهانی که در برابر انتقال ژن با آگروباکتریوم مقاومت نشان می‌دهند (به خصوص تک‌لپه‌ای‌ها) و همچنین درطیف وسیعی از بافت‌های گیاهی می‌توان با این روش انتقال ژن و تغییر ژنتیکی انجام داد. از دیگر مزیت‌های این روش این است که سالم و پاک است و علاوه بر ژنوم هسته‌ای، ژنوم میتوکندری و کلروپلاست را نیز می‌توان با این روش، تغییر ژنتیکی داد. انتقال قطعات بزرگ دئوکسی‌ریبونوکلئیک اسید و عدم نیاز به ناقل، از دیگر مزایای این روش است. دئوکسی‌ریبونوکلئیک اسید برای حمل و انتقال، در حضور کلرید کلسیم یا اسپرمیدین (یک ترکیب پلی‌آمینی) بر روی ریزپرتابه پوشش داده می‌شود. اسپرمیدین از ساختار دئوکسی‌ریبونوکلئیک اسید حفاظت نموده و عمل اتصال را بهتر می‌کند. استفاده از پروتامین‌ها (پروتئین‌های هسته‌ای کوچک و غنی از آرژنین) به جای اسپرمیدین این برتری را دارد که دئوکسی‌ریبونوکلئیک اسید را در برابر آنزیم دئوکسی‌ریبونوکلئاز (DNase)

محافظ می‌کند. در گندم از منیزیم و پلی‌اتیلن گلیکول جهت افزایش کارایی انتقال استفاده شده است. کاهش میزان دئوکسی‌ریبونوکلئیک اسید پوشش داده شده بر روی ریزپرتابه، تلفیق یک نسخه با ژنوم را افزایش می‌دهد. با استفاده از تکنیک بمباران ذره‌ای، می‌توان از نانوذرات هم برای حمل دئوکسی‌ریبونوکلئیک اسید استفاده کرد. عدم کنترل بر شتاب بمباران که اغلب خسارت قابل ملاحظه‌ای بر سلول‌های هدف وارد می‌کند، از معایب روش بمباران ذره‌ای است. یکی دیگر از معایب این روش این است که انتقال ژن در گیاهان منجر به تلفیق ناهمسان در کروموزوم شده و چند نسخه از ژن وارد کروموزوم می‌شود. ذرات فلزی مورد استفاده در بمباران ذره‌ای باید جرم اتمی بالایی داشته باشند تا از جنبش لحظه‌ای لازم برای نفوذ به درون بافت مناسب برخوردار باشند. متداول‌ترین ذرات مورد استفاده، ذرات تنگستن و طلا به ترتیب به قطر ۱/۲ میلی‌متر و ۱/۶-۱ میلی‌متر هستند. این ذرات باید از نظر شیمیایی خنثی باشند تا از وقوع واکنش‌های ناخواسته با دئوکسی‌ریبونوکلئیک اسید و سایر اجزاء سلول جلوگیری شود. فاکتورهای محیطی مانند دما، فتوپریود و رطوبت در گیاهان بخشنده، ریزنمونه‌ها و بافت‌های بمباران شده می‌توانند بر فیزیولوژی بافت‌ها اثر گذاشته و توانایی بافت هدف جهت دریافت دئوکسی‌ریبونوکلئیک اسید خارجی را تحت تاثیر قرار دهند. همچنین بر میزان حساسیت بافت در برابر خسارت و صدمه مؤثر است. ریزنمونه‌هایی که تحت تاثیر تنش هستند، برای بمباران مناسب نیستند. دو نوع از بافت‌های گیاهی که برای بمباران ذره‌ای بیش‌تر استفاده می‌شوند شامل ریزنمونه‌های اولیه (primary explants) و بافت‌های جنینی در حال تکثیر هستند (Chawla, 2002; Kikkert et al., 2004; Torney et al., 2007; Finer, 2016).

۳- جریان الکتریکی (electroporation): در این روش از پالس‌های کوتاه فشار قوی (ولتاژ بالا) به سوسپانسیون پروتوپلاست و دئوکسی‌ریبونوکلئیک اسید استفاده می‌کنند تا غشاء سلول را به کسب دئوکسی‌ریبونوکلئیک اسید نفوذپذیر کنند (Bates, 1999). جریان الکتریکی باعث فشردگی و نازک شدن غشاء پلاسمایی شده و در نتیجه در غشاء پلاسمایی، منافذی به طور موقت تشکیل می‌شوند. انتشار طیف وسیعی از مارکرومولکول‌ها مانند پروتئین‌ها و نوکلئیک اسیدها از طریق این منافذ امکان‌پذیر خواهد شد. برای حمل و انتقال دئوکسی‌ریبونوکلئیک اسید به طیفی از سلول‌ها و بافت‌های گیاهی از روش جریان الکتریکی استفاده می‌شود. با این حال انتقال دئوکسی‌ریبونوکلئیک اسید با جریان الکتریکی به داخل پروتوپلاست، راحت‌تر است چون فاقد دیواره سلولی است. به عبارتی، چون دیواره سلول گیاه بر حرکت دئوکسی‌ریبونوکلئیک اسید به داخل سلول اثر می‌گذارد، از پروتوپلاست استفاده می‌شود. در حال حاضر فقط در آن دسته از گونه‌های گیاهی که پروتوپلاست آن‌ها می‌تواند دیواره سلولی خود را باززایی کند، انتقال ژن و تغییر ژنتیکی با استفاده از روش جریان الکتریکی انجام می‌شود. کارایی این روش به طول، نوع و دوره پالس بستگی دارد. زمان و ولتاژ مورد استفاده به نوع بافت و سلول مورد استفاده بستگی دارد. گزارش شده است که استفاده

از پلی اتیلن گلیکول همراه با کلرید منیزیم کارایی انتقال ژن را افزایش می‌دهد. گفته می‌شود که پلی اتیلن گلیکول در پیوستن دئوکسی ریبونوکلیک اسید به غشاء، کمک می‌کند. در شرایط استاندارد می‌توان دئوکسی ریبونوکلیک اسید را به درون سلول‌های برنج و چغندر که هنوز فاقد دیواره سلولی هستند، منتقل کرد. به نظر می‌رسد که طیف کم‌تری از بافت‌های گیاهی با روش جریان الکتریکی تراریخت می‌شوند. این روش برای بافت‌هایی که مستعد دریافت دئوکسی ریبونوکلیک اسید با استفاده از جریان الکتریکی هستند، یک روش ساده، سریع، متداول، با سمیت اندک برای سلول و ارزان برای تراریختی موقت و پایدار در بافت‌های تمایز یافته است. مشکل بودن باززایی گیاه از پروتوپلاست، عیب این روش است. در واقع، محدودیت اصلی روش انتقال با جریان الکتریکی، باززایی گیاهان تراریخت بارور در تعدادی از گونه‌های گیاهی از پروتوپلاست‌هایی است که با این روش در آن‌ها انتقال ژن صورت گرفته است. این حتی برای تک‌لپه‌ای‌ها مشکل‌سازتر است (Neumann and Rosenhec, 1972; Chawla, 2002; Ganesan, and Chibbar, 2010).

۴- انتقال با وساطت (واسطه) پلی اتیلن گلیکول (PEG-mediated transformation):

انتقال دئوکسی ریبونوکلیک اسید به درون پروتوپلاست‌های گیاهی با استفاده از پلی اتیلن گلیکول، ابتدا در بنفشه آفریقایی و توتون گزارش شد. حمل و انتقال دئوکسی ریبونوکلیک اسید به داخل سلول‌های گیاه به برهمکنش بین دئوکسی ریبونوکلیک اسید و غشاء سلول متکی است چون در این روش به جای سلول از پروتوپلاست استفاده می‌شود. پروتوپلاست‌ها در حضور پلی اتیلن گلیکول با دئوکسی ریبونوکلیک اسید مخلوط شده و به مدت چند دقیقه (حدود پنج دقیقه) انکوبه می‌شوند. غلظت‌های یون کلسیم و منیزیم در مخلوط انکوباسیون و وجود دئوکسی ریبونوکلیک اسید، از مهم‌ترین عوامل مؤثر بر این نوع انتقال هستند. اگرچه این روش پرزحمت بوده و به نیروی کار زیادی نیاز دارد، اما در انتقال ژن و تغییر ژنتیکی تعداد زیادی از گیاهان مؤثر است (Chawla, 2002; Neugent et al., 2006).

۵- انتقال با وساطت لوله گرده (pollen tube-mediated transformation): انتقال ژن

از طریق لوله گرده توسط تعدادی از محققین گزارش شده است. این روش که در آن دئوکسی ریبونوکلیک اسید خارجی به درون جنین گیاه منتقل می‌شود، برای اولین بار در توتون گزارش شد. انتقال از طریق لوله گرده شامل حذف کلالة با فاصله کوتاهی پس از گرده‌افشانی و بارورسازی و به دنبال آن استفاده از یک محلول دئوکسی ریبونوکلیک اسید خارجی بر روی خامه گل گیاه پذیرنده است. از طریق رشد لوله گرده، دئوکسی ریبونوکلیک اسید به تخمدان گیاه پذیرنده منتقل شده و در آن جا با سلول تخم (زیگوت) گیاه پذیرنده که هنوز تقسیم نشده است، تلفیق می‌شود. در واقع، فرستادن دئوکسی ریبونوکلیک اسید به درون گامت‌ها و پس از آن لقاح و جنین‌زایی زیگوتی، منجر به انتقال ژن خواهد شد. بنابراین به منظور موفقیت این روش، ژن‌های خارجی باید در مرحله تشکیل جنین با ژنوم گیاه پذیرنده تلفیق شده تا وارد دانه شوند. بنابراین این روش شامل دستورالعمل‌های دست‌ورزی

پروتوپلاست، کشت سلول یا باززایی گیاه نمی‌شود. این روش در مقایسه با روش‌های آزمایشگاهی، ساده‌تر، سریع‌تر و ارزان‌تر می‌باشد. با توجه به این که جدا کردن تخمک‌ها مشکل بوده و تزریق دئوکسی‌ریبونوکلئیک اسید به درون کیسه جنینی در محل طبیعی خود کار بسیار پرحمت و غیرقابل پیش‌بینی به نظر می‌رسد، استفاده از دانه گرده به عنوان یک حامل دئوکسی‌ریبونوکلئیک اسید، منطقی است. استفاده از دانه گرده تیمار شده با دئوکسی‌ریبونوکلئیک اسید به عنوان حامل برای گرده‌افشانی گیاهان بارور ذرت، مطالعه شده است. گزارشات نشان می‌دهد که دئوکسی‌ریبونوکلئیک اسید یا توسط دانه گرده در حال جوانه‌زنی جذب می‌شود و درون هسته‌های اسپرم تلفیق می‌گردد و یا از طریق مسیر عبور لوله گرده، به تخم می‌رسد (Zhou *et al.*, 1983; Luo and Wu, 1988, Chawla, 2002; Ali *et al.*, 2015).

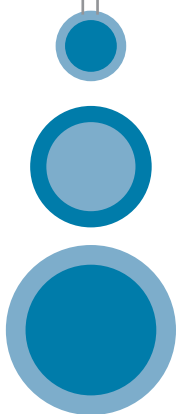
۶- انتقال با واسطه لیپوزوم (liposome-mediated transformation): لیپوزوم‌ها وزیکل‌های (حباب) فسفولیپیدی میکروسکوپی با ساختار غشاء دولایه‌ای بوده و قطر آن‌ها بین ۰/۲ تا ۱/۶ میکرومتر متغیر است. با استفاده از یک عامل ترکیب‌کننده (fusiogenic) مانند پلی‌اتیلن گلیکول یا پلی‌وینیل الکل می‌توان لیپوزوم‌ها را همراه با یک حامل با پروتوپلاست ترکیب کرد و سپس با استفاده از تیمار یون کلسیم با غلظت بالا، ترکیب با پروتوپلاست را تسریع نمود. انتقال ژن و تغییر ژنتیکی با استفاده از لیپوزوم در حضور پلی‌اتیلن گلیکول از راندمان بیش‌تری برخوردار است. مراحل انتقال ژن با واسطه لیپوزوم شامل چسبیدن لیپوزوم به سطح پروتوپلاست، تلفیق لیپوزوم‌ها در محل اتصال و رهاسازی پلاسمید در درون سلول می‌باشد. یافته‌های تحقیقاتی نشان می‌دهد که لیپوزوم‌ها با بار منفی در مقایسه با سایر لیپوزوم‌ها، نوکلئیک اسید را بهتر به داخل پروتوپلاست منتقل می‌کند. مطالعات نشان داد که انتقال دئوکسی‌ریبونوکلئیک اسید قابل مقایسه با انتقال با واسطه پلی‌اتیلن گلیکول است اما در مقایسه با روش جریان الکتریکی، کارایی کم‌تری دارد. روش انتقال دئوکسی‌ریبونوکلئیک اسید با واسطه لیپوزوم، فقط در تعداد محدودی گونه گیاهی آزمایش شده است. به منظور غلبه بر برخی مشکلات اولیه در ارتباط با انتقال دئوکسی‌ریبونوکلئیک اسید به داخل سلول‌های یوکاریوت، از لیپوزوم‌های کاتیونی استفاده شد. لیپوزوم‌های کاتیونی مشابهی نیز در توتون برای انتقال ژن و تغییر ژنتیکی پروتوپلاست مورد استفاده قرار گرفته است. اخیراً دئوکسی‌ریبونوکلئیک اسید که در داخل یک وزیکل کاتیونی مشتق شده از روغن علف آهن (ironweed; vernonia) کپسوله شده است، مورد استفاده قرار گرفته است و نتایج نشان داد که بدون ایجاد صدمه، از غشاء کوتیکولی جدا شده گیاه عبور می‌کند. به طور کلی، تکرارپذیری این روش در مقایسه با دیگر روش‌های انتقال دئوکسی‌ریبونوکلئیک اسید پایین است. بنابراین، حمل و انتقال دئوکسی‌ریبونوکلئیک اسید با واسطه لیپوزوم، برای مطالعات گسترده یا تولید گیاهان تراریخته مورد توجه گسترده قرار نگرفته است. حفاظت از نوکلئیک اسیدها در برابر هضم نوکلئازی، کاهش سمیت برای سلول، قابلیت کاربرد در گستره وسیعی از انواع سلول‌ها و پایداری و ذخیره‌سازی نوکلئیک اسیدها پس از کپسوله شدن

از مزیت‌های این روش است (Keller and Melchers, 1973; Jousma *et al.*, 1987; Chawla, 2002; Wiesman *et al.*, 2007; Ganeshan, and Chibbar, 2010).

۷- ریز تزریقی (microinjection): تزریق دئوکسی‌ریبونوکلئیک اسید به طور مستقیم به داخل هسته، یکی از مستقیم‌ترین روش‌ها برای انتقال ژن است. به منظور کنترل وارد کردن سوزن شیشه‌ای نازک به داخل هسته سلول جهت حمل و انتقال دئوکسی‌ریبونوکلئیک اسید، از دستگاه‌های الکترومکانیکی استفاده می‌شود. در زمان انتقال، سلول‌ها یا پروتوپلاست‌های پذیرنده در داخل ژل یا بر روی سطوح پوشش داده شده با پلی‌لیزین، ثابت و بی‌حرکت می‌شوند. پس از مشاهده هسته، دئوکسی‌ریبونوکلئیک اسید به داخل آن تزریق می‌شود. سلول‌های پذیرنده کشت شده و سپس با توجه به رشد بر روی محیط کشت حاوی یک عامل گزینش‌گر، سلول‌هایی که تلفیق ژن وارد شده به آن‌ها صورت گرفته است، انتخاب می‌شوند. از روش ریز تزریقی برای وارد کردن ژن به یک سلول در درون یک ساختار چند سلولی مانند جنین، تخمک، مریستم و یا وارد کردن ژن به درون توده‌ای از پروتوپلاست‌ها و یا سلول‌ها استفاده می‌شود. از این روش برای تولید یونجه تراریخته از طریق تزریق پلاسمید Ti به داخل پروتوپلاست یونجه، استفاده شده است. این تکنیک هزینه بر بوده، کند است و به افراد ماهر و باتجربه نیاز دارد (Reich *et al.*, 1986; Spangenberg *et al.*, 1986; Chawla, 2002; Ganeshan and Chibbar, 2010).

۸- انتقال با واسطه سیلیکون کربید (Silicon carbide whisker-mediated transformation):

سیلیکون کربید خیلی سخت بوده، به راحتی شکسته شده و لبه‌های تیزی که تشکیل می‌شود برای نفوذ به دیواره سلولی مناسب هستند. دئوکسی‌ریبونوکلئیک اسید از طریق منافذی که توسط رشته‌های (whisker) سیلیکون کربید ایجاد می‌شود، می‌تواند به داخل سلول حمل و منتقل شود. این رشته‌ها با سلول‌های پذیرنده و دئوکسی‌ریبونوکلئیک اسید به شدت مخلوط شده و سپس بر روی محیط کشت، کشت داده می‌شوند. سپس سلول‌های کشت شده از لحاظ انتقال دئوکسی‌ریبونوکلئیک اسید به داخل سلول و تلفیق آن با دئوکسی‌ریبونوکلئیک اسید هسته، ارزیابی می‌شوند. در مقایسه با کربوراندوم و سیلیکون نیتريد، حمل و انتقال دئوکسی‌ریبونوکلئیک اسید با سیلیکون کربید مؤثرتر بوده است (Kaeppeler and Somers, 1994; Ganeshan and Chibbar, 2010). با قرار دادن سلول‌ها در سوربیتول یا مانیتول با مولاریته بالا، کارایی انتقال با سیلیکون کربید را می‌توان افزایش داد (Wang *et al.*, 1995). مطالعات اخیر نشان داد که استفاده از مافوق صوت همراه با سیلیکون کربید در کشت‌های سوسپانسیون سلول‌های برنج، کارایی انتقال را افزایش داده است (Terakawa *et al.*, 2005). ساده بودن، مقرون به صرفه بودن و نیاز به مهارت کمتر از مزیت‌های این روش است، با این حال این روش دارای خواص سمی و سرطان‌زایی بوده و ممکن است در صورت عدم توجه و دقت، برای انسان مضر باشد. بنابراین از آلومینیوم بورات به عنوان یک ماده جایگزین استفاده می‌شود (Takahashi *et al.*, 2000; Chawla, 2002).



فصل چهارم:

کاربرد گیاهان تراریخت

اهداف رفتاری:

فراگیران پس از مطالعه این فصل قادر خواهند بود:

- ۱- کاربرد گیاهان تراریخت را ذکر کنند.
- ۲- مکانیسم‌های مورد استفاده برای تولید گیاهان تراریخته مقاوم به بیمارگرها را بیان کنند.
- ۳- نقش پروتئین Bt در تولید گیاهان تراریخته را بیان نمایند.
- ۴- استراتژی‌های کلی برای ایجاد تحمل در برابر تنش‌های غیرزنده از طریق تغییر ژنتیکی، را ذکر کنند.
- ۵- فرایندهای گیاه‌پالایی را نام ببرند.

کاربرد گیاهان تراریخت

۱- مواد غذایی با خاصیت تغذیه‌ای بهتر

۱-۱- ویتامین‌ها و مواد معدنی

۱-۱-۱- برنج طلایی: غلات به طور کلی انرژی و عملکرد غذایی بالایی دارند اما سایر عناصر غذایی مهم مانند آمینواسیدها و ویتامین‌های ضروری برای بدن در غلات پایین است. رژیم غذایی با محوریت برنج باعث بروز مشکلات جدی در سلامت بهداشت عمومی در بین مردم در تعداد زیادی از کشورهای آفریقایی، آسیایی و آمریکای لاتین شده است چون مردم در این کشورها منحصراً به برنج به عنوان غذای اصلی خود متکی هستند. حدود ۲۷ میلیون نفر و ۲۵ درصد بچه‌های پیش‌دبستانی در کشورهای در حال توسعه از کمبود ویتامین A رنج برده و حدود ۲۵۰۰۰ تا ۵۰۰۰۰ نفر از آن‌ها در سال، نابینا می‌شوند (James, 2011). این به این دلیل است که انسان و حیوانات مهره‌دار کاروتنوئیدها را سنتز نمی‌کنند و برای ساخت رتینوئیدهای (مشتقات ویتامین A) مورد نیازشان به کاروتنوئیدهای (اساساً بتا کاروتن) موجود در رژیم غذایی نیاز دارند. آندوسپرم برنج به طور معمول فاقد کاروتنوئید است. در کشورهای در حال توسعه، توسط سازمان خواربار و کشاورزی (FAO) مکمل‌سازی با ویتامین A انجام می‌شود اما گران است، پایدار نیست و نواحی دور به آن دسترسی ندارند (Yan and Ping, 2013). برنج تراریخته که دارای بتا کاروتن است (به دلیل داشتن رنگ زرد، برنج طلایی نامیده می‌شود) یک روش درمانی عملی فناوری زیستی است که محافظت مقرون به صرفه و مؤثر در برابر کمبود ویتامین A را میسر می‌کند. در سال ۲۰۰۰، با وارد کردن سه ژن از باکتری‌ها به داخل آندوسپرم برنج، تولید برنج طلایی برای اولین بار با موفقیت انجام شد (Ye et al., 2000). میزان بتا کاروتن در برنج‌هایی که ابتدا تولید شده بودند، پایین بود تا این که در سال ۲۰۰۵ شرکت سینجنتا (syngenta) با انتقال ژن phytoene synthase از ذرت به برنج رقم Japonica، نوعی برنج طلایی تولید کرد که میزان بتا کاروتن آن چهار برابر میزان بتا کاروتن در برنج‌های طلایی اولیه بود (Paine et al., 2005). این آنزیم در بیوسنتز کاروتنوئیدها نقش دارد. این برنج در کشورهایی مانند هند، اندونزی و ویتنام آزاد شده است. این برنج تراریخته در رژیم غذایی مردمان آسیا، به حد کافی ویتامین A را تامین می‌کند. با استفاده از تکنیک‌های مهندسی ژنتیک، بتا کاروتن به بذرهای ذرت و کلزا و میوه گوجه‌فرنگی وارد شده است (Zhu et al., 2008; Yan and Ping, 2013).

۱-۱-۲- مواد غذایی با مواد معدنی بیش‌تر: مواد معدنی، در زمینه رژیم غذایی انسان، عناصر شیمیایی معدنی بوده که برای فرایندهای بیوشیمیایی و بیولوژیکی مورد نیاز هستند. کربن، هیدروژن، ازت و اکسیژن در این لیست قرار ندارند چون در مولکول‌های آلی یافت می‌شوند. شانزده عنصر غذایی ضروری وجود دارند که یازده تا از این عناصر در مقادیر کم مورد نیاز است و یا آن قدر در مواد غذایی و آب آشامیدنی به اندازه کافی وجود دارند که فقط در شرایط بسیار غیرمعمول، کمبود آن‌ها

ظاهر می‌شود. پنج عنصر غذایی باقیمانده (شامل ید، آهن، روی، کلسیم و سلنیوم) در بسیاری از مواد غذایی به مقدار محدود وجود دارد و یک رژیم یکنواخت به راحتی منجر به کمبود آن‌ها می‌شود. محصولات غذایی اصلی، به ویژه دانه‌های غلات، منبع فقیری از این پنج عنصر غذایی کلیدی هستند. در نتیجه، فقیرترین مردم دنیا، به طور کلی کسانی که یک رژیم غذایی غلات یکنواخت دارند، در برابر بیماری‌های کمبود مواد معدنی بیش‌تر آسیب‌پذیر هستند، هرچند که کمبود کلسیم در جهان صنعتی بسیار گسترده است. برای مقابله با بیماری‌های ناشی از کمبود عناصر غذایی میکرو، استراتژی‌های مختلفی پیشنهاد شده است از جمله: تهیه مکمل‌های مواد معدنی، تقویت خاصیت تغذیه‌ای مواد غذایی فراوری شده، استفاده از کودهای غنی از مواد معدنی، اجرای برنامه‌های اصلاح نباتات و مهندسی ژنتیک به منظور تولید ارقام غنی از مواد معدنی (Yan and Ping, 2013). آخرین سلاح برای مقابله با بیماری‌های ناشی از کمبود مواد معدنی، مهندسی ژنتیک است که از تکنیک‌های پیشرفته بیونکنولوژی برای وارد کردن مستقیم ژن‌ها به ارقام در حال اصلاح استفاده می‌کند. این ژن‌ها می‌توانند از هر منبعی، از جمله حیوانات و میکروب‌ها، باشند و برای رسیدن به یک یا تعدادی از اهداف زیر طراحی می‌شوند (Bauer and Berezky, 2003; Ghandilyan *et al.*, 2006; Zhu *et al.*, 2007):

- ◀ اصلاح و بهبود کمبود با متحرک کردن مواد معدنی در داخل خاک
- ◀ اصلاح و بهبود کمبود با جذب مواد معدنی از خاک به سمت ریشه‌های گیاه
- ◀ بهبود انتقال مواد معدنی از ریشه به سمت بافت‌های ذخیره‌ای مانند دانه
- ◀ افزایش ظرفیت بافت‌های ذخیره‌ای جهت انباشته شدن مواد معدنی به فرمی که رشد و نمو گیاه را مختل نکند اما برای انسان، قابل دسترس باشد.
- ◀ کاهش میزان ترکیبات ضد مواد غذایی مانند اسید فیتیک (phytic acid) که از جذب مواد معدنی در لوله گوارش جلوگیری می‌کند. این اسید در جذب آهن، روی و کلسیم اختلال ایجاد می‌کند و ممکن است باعث کمبود شود.
- ◀ افزایش میزان مواد تقویت‌کننده تغذیه مانند اینولین (inulin) که می‌توانند باعث تقویت جذب مواد معدنی در لوله گوارش شوند.
- ◀ مزیت‌های اصلی مهندسی ژنتیک نسبت به اصلاح سنتی عبارتند از (Yan and Ping, 2013):
- ◀ تنوع منابع اطلاعات ژنتیکی
- ◀ سرعت تولید ارقام اصلاح شده
- ◀ تجمع صفات تغذیه‌ای برای مواد معدنی و ویتامین‌های مختلف در یک گیاه بدون نیاز به برنامه‌های اصلاحی بسیار پیچیده: این مزیت برای آینده، بسیار حائز اهمیت است.
- در تحقیقات انجام گرفته، بیش‌تر از ژن‌هایی استفاده شده است تا تجمع آهن و در دسترس بودن آن را اصلاح کنند. از آن جا که آهن در داخل خاک عمدتاً به صورت آهن معدنی (Fe) وجود دارد

که قابل جذب برای گیاهان نیست، دو استراتژی اصلی برای تقویت جذب آهن از رایزوسفر ارائه شده است. استراتژی اول شامل بیان آنزیم رداکتاز آهن (Fe reductase) که باعث جذب آهن می‌شود و در استراتژی دوم کمپلکسی متشکل از ساییدروفورهای ترشح شده گیاهی و آهن تولید می‌شود. بنابراین ژن‌های کدکننده رداکتاز و آنزیم‌هایی که در بیوسنتز ساییدروفورهای گیاهی نقش دارند، به گیاهان منتقل می‌شوند. بیش‌ترین موفقیت با بیان بالای پروتئین ذخیره آهن (ferritin؛ فریتین) در دانه‌های برنج تراریخته به دست آمد. به منظور افزایش میزان آهن و جذب آن، فریتین و آنزیم فیتاز (phytase) (برای افزایش جذب آهن) به صورت توام در ذرت و برنج بیان شدند. از آن جا که آهن و روی دارای کانال‌ها و پروتئین‌های حمل و نقل (transporter) خاصی هستند، بهبود میزان آهن در گیاه اثرات مثبتی بر میزان روی دارد. در دانه‌های غلاتی که فریتین در آن‌ها زیاد بیان شده است، تجمع روی نیز بهبود یافته است (Goto *et al.*, 1999; Bauer and Berczky, 2003; Vasconcelos *et al.*, 2003; Drakakaki *et al.*, 2005; Ishimaru *et al.*, 2006; Ghandilyan *et al.*, 2006).

۲-۱- پروتئین‌ها و آمینواسیدها: پروتئین‌های ذخیره‌ای گیاه، یک منبع غذایی اصلی برای ریشه‌ها، بذرها و غده‌ها هستند و زمانی که برای تغذیه انسان و حیوانات استفاده می‌شوند، ارزش غذایی گیاهان و دانه‌ها مشخص می‌شود. انسان و تعداد زیادی از حیوانات اهلی قادر به سنتز آمینواسیدهای خاصی نیستند و مدت‌هاست که علاقه فوق‌العاده‌ای به افزایش میزان آمینواسیدهای ضروری گیاهان زراعی ایجاد شده است. بیش‌تر دانه‌ها به دلیل کمبود یک یا چند آمینواسید ضروری در پروتئین‌های ذخیره‌ای، منبع متعادلی از پروتئین‌ها را فراهم نمی‌کنند. افزایش قابل‌ملاحظه سطح پروتئین و آمینواسیدهای ضروری با استفاده از برنامه‌های اصلاحی کلاسیک، چالش برانگیز است. بنابراین فناوری زیستی گیاهی می‌تواند نقش مهمی در بهبود خواص تغذیه‌ای غذا بازی کند. در بین ۲۰ آمینواسید ضروری، بیش‌ترین توجه به تریپتوفان، لیسین و متیونین شده است چون در منابع غذایی اصلی مانند غلات (لیسین، تریپتوفان و ترئونین) و بقولات (متیونین و سیستئین) محدود هستند (Yan and Ping, 2013). از روش‌های مولکولی برای بهبود غلظت آمینواسیدهای گوگرددار (متیونین و سیستئین) در پروتئین‌های دانه بقولات و غیربقولات استفاده شده است. یکی از روش‌های پرکاربرد، بیان ژن آلومین 2S از آفتابگردان یا آجیل برزیلی (Brazil nut; *Bertholletia excels*) در گیاه هدف است که غنی از گوگرد می‌باشد. با بیان این ژن از آجیل برزیلی در گیاهان تراریخته و تولید پروتئین 2S، به طور همزمان میزان متیونین و سیستئین افزایش یافت. با این حال، این پروتئین خاصیت آلرژی داشته و در نتیجه از تجاری شدن محصولات تراریخته جلوگیری شد (Townsend and Thomas, 1996; Streit *et al.*, 2001). در مقابل، پروتئین AmA1 که آلومین ذخیره‌ای بذر در تاج خروس طلایی (*Amaranthus hypochondriacu*) است، در طبیعت فاقد خاصیت آلرژی است، غنی از تمام آمینواسیدهای ضروری بوده و با استانداردهای سازمان جهانی بهداشت در ارتباط با تغذیه مطلوب برای انسان مطابقت دارد. به منظور افزایش ارزش

غذایی سیب‌زمینی، ژن کدکننده این پروتئین به سیب‌زمینی وارد شد و در بوته‌های تراریخته، رشد و تولید غده افزایش یافت و همچنین میزان پروتئین کل و اکثر آمینواسیدهای ضروری نیز افزایش یافتند (Chakraborty *et al.*, 2010). کمبود اصلی در دانه‌های غلات، آمینواسید لیزین است که باعث کاهش ارزش غذایی در مواد غذایی مورد استفاده انسان و حیوانات اهلی می‌شود. بوته‌های تراریخته که ژن آنزیم مورد نیاز برای سنتز لیزین در آن‌ها بیان می‌شود، قادر هستند لیزین بیش‌تری را در دانه‌ها انباشته کنند. بیان ژن کدکننده یک پروتئین با ۳۱ درصد لیزین در کلزا، سویا، ذرت و توتون، برخلاف جو و برنج، منجر به افزایش شدید لیزین آزاد در دانه شد (Shaul and Galili, 1993; Falco *et al.*, 1995; Brinch-Pedersen *et al.*, 1996; Falco, 2001; Lee *et al.*, 2001). بیوسنتز تریپتوفان به شدت خودتنظیمی (feedback regulation) است که با جلوگیری از آنزیم بیوسنتز تریپتوفان (anthranilate synthase)، بیوسنتز این آمینواسید تنظیم می‌شود. خودتنظیمی فرایندی است که در طی آن محصول یک مسیر متابولیک از طریق کنترل میزان و یا فعالیت یک یا چند آنزیمی که بر این مسیر نقش دارند، بر تولید خود اثر می‌گذارد. یک بوته جهش یافته از آراییدوپسیس که در زیر واحد آلفای آنزیم anthranilate synthase دارای یک جهش نقطه‌ای است، برای مطالعات مربوط به بهبود میزان تریپتوفان در گیاهان زراعی، بسیار مورد استفاده قرار می‌گیرد. این بوته جهش یافته به ممانعت بازخوردی توسط تریپتوفان حساس نیست، بنابراین این آمینواسید در دانه‌ها انباشته می‌شود. به عبارتی در این بوته‌ها، تریپتوفان به صورت خودتنظیمی، عمل نمی‌کند. به طور مشابه، انتقال و بیان ژن OASAIID در برنج و سیب‌زمینی منجر به افزایش میزان تریپتوفان آزاد بدون هیچ‌گونه اثر جانبی بر جوانه‌زنی و عملکرد شد. این بیان‌گر این واقعیت است که در گیاهان یک مکانیسم تکاملی حفاظت شده برای تنظیم سنتز تریپتوفان وجود دارد (Wakasa *et al.*, 2006; Yan and Ping, 2013). پروتئین‌های ذخیره‌ای در ذرت، گروهی از پلی‌پپتیدهای محلول در الکل هستند که زئین (zean) نامیده می‌شوند. این پروتئین‌ها بیش از نیمی از پروتئین کل دانه را تشکیل می‌دهند، بنابراین زئین‌ها تعیین‌کننده اصلی ترکیب آمینواسیدهای دانه هستند. تمام زئین‌ها فاقد لیزین که یک آمینواسید ضروری برای حیوانات تک‌معدده‌ای است، می‌باشند. یکی از اقدامات انجام گرفته، اصلاح ژن‌های زئین است به طوری که پروتئین‌هایی کد کنند که دارای لیزین و تریپتوفان باشند. آنالیز سنتز و فرایند این زئین‌های اصلاح شده در ذرت‌های تراریخته نشان داد که میزان تریپتوفان و لیزین بدون هیچ‌گونه اختلالی در دیگر اجسام پروتئینی مربوطه، افزایش یافته است (Davies, 2010; Frizzi *et al.*, 2010; Yan and Ping, 2013). بیان پروتئین شیر انسان (بتا کازئین) در سیب‌زمینی‌های تراریخته، راه را برای بازسازی این پروتئین در گیاهان خوراکی جهت جایگزینی با شیر گاو در غذای کودک برای بهبود کلی تغذیه نوزادان و جلوگیری از بیماری‌های معده و روده در بچه‌ها، باز کرد. محققین بوته‌های تراریخته ذرت تولید کردند که در آندوسپرم آن‌ها، پروتئین آلفا لاکتالبومین (α -lactalbumin) تولید شد (Chong *et al.*, 1997; Bicar *et al.*, 2008). گیاهان تراریخته

علاوه بر بهبود غذای انسان، می‌توانند کیفیت و کمیت غذای حیوانات را نیز افزایش دهند و در نتیجه باعث بهتر شدن محصولات حیوانات مانند پشم گوسفند شوند. گزارش شده است که آمینواسیدهای میتیونین و سیستئین عامل اصلی محدودیت در رشد پشم گوسفند هستند. افزودن یک تا دو گرم آمینواسیدهای گوگرددار در روز به غذای گوسفند، باعث افزایش قابل ملاحظه رشد پشم شده است. بدین منظور، یونجه‌های تراریخته‌ای تولید کردند که یک آلبومین غنی از آمینواسیدهای گوگرددار در آن‌ها سنتز می‌شود (Yan and Ping, 2013).

۱-۳- چربی‌ها و روغن‌ها: اکنون این امکان وجود دارد که دانه‌های روغنی متناسب با استفاده‌های خاص را طراحی کرد. گیاهان تنوع گسترده‌ای از اسیدها چرب تولید می‌کنند که اکثر آن‌ها در داخل بذر به صورت تری‌اسیل‌گلیسرول‌ها (triacylglycerol) انباشته می‌شوند. لیپیدهای گیاهی استفاده‌های مختلفی دارند از کاربردهای صنعتی به عنوان روان‌کننده‌ها و شوینده‌ها گرفته تا مواد غذایی و تغذیه‌ای. لیپیدهای گیاهی همچنین از لحاظ دارویی و مواد مغذی نقش مهمی دارند. لورات (laurate) (نمک یا استر اسید لوریک) که در شیرینی‌پزی از آن استفاده می‌شود، به طور معمول از نارگیل یا نخل تهیه می‌شود. اگرچه این دو گیاه میزان نسبتاً بالایی اسید چرب دارند، اما کاربرد آن‌ها کشاورزی محدودیت دارد. در کلزاهای تراریخته، اسید لوریک (lauric acid) (یک اسید چرب اشباع با ۱۲ کربن) می‌تواند تا ۶۰ درصد در تری‌گلیسرول‌ها افزایش یابد. ژن کدکننده آنزیم acyl-ACP thioesterase از گیاه California bay (نوعی برگ بو) در کلزا بیان شد و این آنزیم از تولید اسیدهای چرب زنجیر بلند جلوگیری کرد و در نتیجه باعث تجمع اسید لوریک شد. کمپانی کال ژن (Calgene) کلزاهایی تولید کرده است که در آن‌ها بیش از ۴۰ درصد لورات انباشته می‌شود. امروزه این روغن‌ها در آمریکای شمالی با نام تجاری Laurica برای استفاده در شیرینی‌پزی‌ها به فروش می‌رسند (Eccleston and Ohlrogge, 1998; Yan and Ping, 2013).

۱-۴- بهبود نشاسته: نشاسته‌های غلات نه تنها به طور گسترده‌ای در صنایع غذایی جهت تولید شربت‌های گلوکز و فروکتوز برای نوشیدنی‌ها استفاده می‌شوند، بلکه به عنوان ماده خام برای تولید محصولات غیرغذایی در صنایع کاغذ، پلاستیک، چسب، منسوجات، پزشکی و دارویی نیز مورد استفاده قرار می‌گیرند. در حال حاضر با استفاده از نشاسته از منابع مختلف گیاهی، تقاضا برای تغییر در خصوصیات عملکردی برآورده می‌شود و در مورد ذرت نیز با بهره‌برداری از واریانت‌های مختلفی که به طور طبیعی رخ می‌دهند، به تقاضاها پاسخ داده می‌شود. اگرچه اطلاعات و دانش در ارتباط با اساس مولکولی و بیوفیزیکی برای تغییر در خصوصیات عملکردی نشاسته هنوز ناقص است، اما به طور کلی چندین فاکتور حائز اهمیت هستند. اولین فاکتور، نسبت آمیلوز و آمیلوپکتین است (این دو ترکیب پلی‌ساکاریدی، دو ترکیب در نشاسته هستند). این دو پلیمر از نظر درجه پلیمریزاسیون و تعداد شاخه‌های جانبی تفاوت دارند. آمیلوز یک زنجیر خطی از مولکول‌های گلوکز (D-glucose) بوده

و دارای درجه پلیمریزاسیون پایین است، در حالی که آمیلوپکتین درجه پلیمریزاسیون بالاتری داشته و عملکرد مهمی دارد (Sestili *et al.*, 2010; Yan and Ping, 2013). آمیلوز و آمیلوپکتین با استفاده از یک سوستره مشترک به نام ADP-glucose ولی در دو مسیر متفاوت، سنتز می‌شوند. نشاسته با آمیلوز بالا، به طور خاص مورد توجه قرار گرفته است چون با مقدار نشاسته مقاوم در غذا ارتباط دارد. نشاسته مقاوم نقشی مشابه فیبر بازی می‌کند و اثرات مفیدی بر سلامت انسان داشته و بدن را در برابر امراضی مانند سرطان روده بزرگ، دیابت، چاقی و قلبی عروقی محافظت می‌کند (Sestili *et al.*, 2010). با دست‌کاری هدفمند در مسیر بیوسنتز آمیلوز، می‌توان مقدار آن را تغییر داده و اصلاح کرد. به طور خاص، غیرفعال کردن آنزیم‌هایی که در بیوسنتز آمیلوپکتین نقش دارند، می‌تواند منجر به افزایش آمیلوز شود. در برنج با حذف بیان ژن کدکننده آنزیم انشعاب‌دهنده نشاسته (starch branch enzyme IIb; SBEIIa)، میزان آمیلوز افزایش یافت. در گندم، جلوگیری از بیان هر دو ژن کدکننده آنزیم انشعاب‌دهنده نشاسته (SBEIIa و SBEIIb) منتج به افزایش بسیار زیاد آمیلوز و در نتیجه بهبود سلامتی روده بزرگ در موش شد. مطالعات در جو نشان داد که با کاهش بیان هر دو ژن مذکور، میزان آمیلوپکتین به شدت کاهش یافت و این نتایج نشان می‌دهد که برای افزایش میزان آمیلوز در جو، لازم است تا این دو ژن، هر دو، کاهش یابد (Mizuno *et al.*, 1993; Regina *et al.*, 2006, 2010).

۲- مقاومت به علف‌کش‌ها:

علف‌های هرز با گیاهان زراعی و درختان جنگل، به خصوص در اوایل کشت، برای غذا، آب و نور خورشید رقابت می‌کنند. بنابراین کنترل گسترده علف‌های هرز در تمام فصل رشد، برای موفقیت در تولید محصولات زراعی و جنگل‌کاری مجدد حیاتی است. دو رویکرد عمده برای ایجاد مقاومت به علف‌کش در درختان و گیاهان زراعی تراریخته، غیرسمی کردن مستقیم علف‌کش و کاهش حساسیت آنزیم هدف به علف‌کش مورد استفاده هستند. سه استراتژی مختلف برای حفاظت گیاهان از عمل علف‌کش‌های اختصاصی از طریق تغییر و اصلاح ژنتیکی عبارتند از (Yan and Ping, 2013):

- ◀ وارد کردن یک ژن غیرحساس فرعی به محل هدف علف‌کش
 - ◀ تولید بیش از حد آنزیم حساس در محل هدف به منظور درهم‌شکستن یا کاهش اثرات علف‌کش
 - ◀ وارد کردن یک سیستم غیرسمی‌کننده جدید به گیاه جهت شکستن یا متابولیزه کردن علف‌کش
- گلایفوسیت از بیوسنتز آمینواسید آروماتیک جلوگیری نموده و ماده فعال تعدادی از علف‌کش‌های تجاری است که برای کنترل علف‌هرز به صورت پیش‌رویشی استفاده می‌شود. با وارد کردن ژن کدکننده آنزیم 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS) از *Agrobacterium tumefaciens* CP4 که یک آنزیم غیرحساس به گلایفوسیت است، تحمل به این علف‌کش حاصل شده است. ژن سنتز کننده آنزیم گلایفوسیت اکسیداز از باکتری *Ochrobactrum anthropi* که گلایفوسیت را غیرسمی

می‌کند، به چندین گیاه زراعی وارد شده است. تحمل به گلایفوسیت در گیاهان تراریخته به یک موفقیت تجاری بزرگ تبدیل شده است. گروه دیگری از علف‌کش‌های بسیار قوی و با طیف وسیع، سولفونیل اوره هستند که از آنزیم استولاکتاز سینتاز (acetolactase synthase) جلوگیری می‌کنند. این آنزیم، اولین آنزیم در مسیر بیوسنتز آمینواسیدهای ضروری شامل ایزولوسین، لوسین و والین در گیاهان است. با تغییر دو آمینواسید در آنزیم استولاکتاز سینتاز از توتون، تحمل به علف‌کش سولفونیل اوره در گوجه‌فرنگی، سیب‌زمینی و پنبه تولید شد. از سویی دیگر، ژن مقاوم به علف‌کش bialaphos (شامل bar و pat) از گونه‌های باکتری Streptomyce می‌تواند هرگونه علف‌کش گلوفسینات (glufosinate) را غیرسمی کند. با بیان دو ژن bar و pat در سیب‌زمینی، کلزا و توتون، مقاومت قوی در برابر آمونیوم گلوفسینات ظاهر شد. یک ژن کدکننده آنزیم نیتریلاز (nitrilase) که از یک باکتری خاک‌زاد به نام *Klebsiella ozaenae* جدا شده است، برای ایجاد مقاومت در پنبه در برابر علف‌کش پهن‌برگ بروموکسینیل مورد استفاده قرار گرفته است (Yan and Ping, 2013).

۳- مقاومت به بیماری‌های گیاهی:

میکروب‌ها باعث بروز بیماری‌های مختلفی در گیاهان می‌شوند. میکروب‌های بیماری‌زا از استراتژی‌های مختلفی استفاده می‌کنند تا گیاهان را آلوده نموده و با مصرف مواد غذایی از گیاهان، تکثیر می‌یابند. به منظور حفاظت گیاهان زراعی از عوامل بیماری‌زا در مزرعه، از مواد شیمیایی کشاورزی به شدت استفاده می‌شود. گیاهان دارای مکانیسم دفاعی وسیع و قوی بوده که به سرعت پس از آلودگی توسط بیمارگرها فعال شده و اغلب به طور مستقیم یا غیرمستقیم توسط یک برهمکنش ژن برای ژن بین محصولات یک ژن مقاوم در گیاه (R) و یک ژن غیربیماری‌زا در بیمارگر (Avr) کنترل می‌شود. اگر یا ژن مقاوم در گیاه یا ژن غیربیماری‌زا در بیمارگر وجود نداشته باشد، این مکانیسم دفاعی به موقع و به طور مؤثری القا (تحریک) نمی‌شود و بیمارگر گیاه را آلوده نموده و مستقر می‌شود. بیش از ۲۰ ژن مقاوم با اختصاصیت مشخص برای ژن‌های شناخته شده غیربیماری‌زا از چندین گونه گیاهی در بین دولپه و تک‌لپه‌ای‌ها جدا شده‌اند. این ژن‌ها در برابر بیمارگرهای قارچی، ویروسی و باکتریایی مؤثر بوده و در یک مورد جالب توجه، ژن Mi در گوجه‌فرنگی در برابر هم نماتد و هم شته مؤثر است. در نحوه زندگی و مکانیسم‌های بیماری‌زایی بیمارگرها، تنوع زیادی وجود دارد. با این حال مشخص شده است که ژن‌های مقاوم، پروتئین‌هایی با موتیف‌های متداول خاصی کد می‌کنند. لازم به ذکر است که اکثر این ژن‌های مقاوم به طور طبیعی در ارقام وحشی وجود دارند. احتمالاً در طی فرایند اصلاح با تمرکز بر عملکرد، مقاومت در برابر بیمارگر از بین می‌رود. مقاومت ناشی از ژن مقاوم را می‌توان به ارقام یک گونه (انتقال درون‌گونه‌ای) یا سایر گونه‌های گیاهی (انتقال بین‌گونه‌ای) منتقل کرد. با انتقال ژن به گیاهان حساس، مقاومت به سرعت تولید می‌شود. یک سیستم دفاعی القایی، مقاومت در

سطح بالاتری را ایجاد نموده و از منابع گیاهی کم‌تری استفاده می‌کند. این رویکرد به طور خاص در گیاهان زراعی که فاقد ژن‌های مقاوم مؤثر بوده و انتقال بین‌گونه‌ای ژن‌های مقاوم را فراهم می‌کند، مورد توجه قرار گرفته است. یکی از این نمونه‌ها، انتقال ژن مقاوم Bs۲ از گوجه‌فرنگی به فلفل است که در آن فلفل‌های تراریخته به بیماری لکه باکتریایی مقاوم شدند. با این حال، انتقال بین‌گونه‌ای ژن‌های مقاوم، به خصوص در بین گونه‌هایی که رابطه خویشاوندی دورتری دارند، اغلب ناموفق است و بر این اساس پیشنهاد شده است که ژن‌های مقاوم جدا شده از یک گونه، ممکن است ضرورتاً با ترکیبات سیگنالی مقاومت در گونه‌ای دیگر، سازگار نباشد (Tai *et al.*, 1999; Yan and Ping, 2013). همان‌طور که عملکرد موتیف‌های مختلف ژن مقاوم بیش‌تر شناخته می‌شود، این امکان وجود دارد تا ژن‌های نو ترکیب با خصوصیات مقاومتی جدیدی طراحی نموده و ساخت. در این ارتباط، ژن‌هایی با مقاومت پایا (با دوام) درست شده‌اند که خصوصیات حفاظت شده در طیف وسیعی از بیمارگرها را تشخیص می‌دهند. یک مثال خوب از این مورد، تولید برنج مقاوم به باکتری *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* با وارد کردن چهار ژن مختلف به برنج است (Li *et al.*, 2001). تلاش‌ها برای ایجاد مقاومت با طیف وسیع، محدود به ژن‌های مقاوم نیست بلکه شامل پاسخ‌های دفاعی گیاه که توسط این ژن‌های مقاوم بروز پیدا می‌کنند نیز است. از جمله این پاسخ‌های دفاعی، واکنش فوق‌حساسیت موضعی است که به دنبال آن، واکنش اکتسابی سیستمیک در گیاه استقرار می‌یابد. واکنش فوق‌حساسیت مشابه آپوپتوسیس (apoptosis) یا مرگ برنامه‌ریزی شده در پستانداران، با مرگ سریع و موضعی سلول‌ها در نقطه حمله بیمارگر یا نقطه تشخیص بیمارگر توسط سیستم دفاعی گیاه تشخیص داده می‌شود. یک رویکرد امیدوارکننده جهت مهندسی مقاومت در برابر بیماری، بیان یکی از اجزاء بیمارگر در گیاه است. شناسایی این اجزاء که مولکول‌های محرک یا الیسیتور (elicitor) هستند، منتج به فعال شدن یک پاسخ دفاعی کامل می‌شود که برای جلوگیری از بیمارگر کافی است. اجزاء بیمارگر شامل پروتئین‌های ساختمانی شبیه فلاژلین (flagellin)، توکسین، پروتئین‌های بیماری‌زایی و وامنش فوق‌حساسیت (Hypersensitive response and pathogenicity; Hrp)، اجزاء دیواره سلولی مانند کیتین و ملانین و پروتئین‌های پوششی ویروس می‌باشند. یکی از مثال‌های موفق، تولید توتون‌های مقاوم به *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* است. بدین منظور، ژن یک الیسیتور از بیمارگر به نام cryptogein به توتون‌های تراریخت وارد شد. در شرایط غیرآلودگی و غیرالقایی، این ترانس‌ژن غیرفعال (خاموش) بوده و بیان نمی‌شود اما پس از آلودگی به این بیمارگر، بیان شده و منتج به بروز واکنش فوق‌حساسیت می‌شود (Keller *et al.*, 1999; Yan and Ping, 2013). برای جلوگیری از بیان ژن‌های بیمارگر هم در سطح نسخه‌برداری و هم پس از نسخه‌برداری می‌توان از استراتژی تداخل ریبونوکلیک اسید (RNA interface; RNAi) استفاده کرد. تداخل ریبونوکلیک اسید یک پدیده طبیعی در موجودات زنده بوده که به منظور کنترل بیان ژن پس از نسخه‌برداری به

کار گرفته می‌شود. رشته‌های ریبونوکلیک اسید دورشته‌ای توسط آنزیمی به نام آنزیم اندوریبونوکلئاز (endoribonuclease) به نام دایسر (dicer) به قطعات کوچک دورشته‌ای به نام ریبونوکلیک اسید مداخله‌گر کوچک (small interfering RNA; siRNA) تبدیل می‌شوند که عناصر کلیدی در این پدیده هستند. سپس یک مجموعه پروتئینی القاء شده توسط ریبونوکلیک اسید (RNA-induced silencing complex; RISC) به این قطعات دورشته‌ای کوچک متصل شده و این مجموعه قادر به شناسایی و برش ریبونوکلیک اسید پیک (mRNA) ژن مورد هدف است. اکثر گزارشات موفق مربوط به مقاومت گیاهان (خرپزه، کدو، گوجه‌فرنگی، بادمجان، توتون و پاپایا) در برابر ویروس از طریق وارد کردن پروتئین‌های پوششی ویروس به داخل گیاهان هستند. بحران ناشی از شیوع ویروس لکه حلقوی پاپایا (Papaya ringspot virus; PRSV) در هاوایی باعث شد تا پاپایاهای تراریخته تولید شده و به طور تجاری کشت شوند. در این پاپایاهای تراریخته، ژن پروتئین پوششی این ویروس وارد شده و بیان می‌شود و در نتیجه از بیان پروتئین پوششی مورد نیاز ویروس پس از آلودگی، ممانعت می‌شود (Fermin, 2005). ژن‌های کلید اصلی (master switch) مانند ژن‌های کدکننده آنزیم کینازها و فاکتورهای نسخه‌برداری، ژن‌هایی هستند که در تنظیم چندین ژن در بیمارگر نقش دارند. یکی از ایده‌های ارائه شده، دست‌ورزی این ژن‌هاست که منجر به تحریک یک شبکه سیگنال‌دهی برای افزایش مقاومت گیاه در برابر بیماری می‌شود. ذکر این نکته ضروری است که دست‌ورزی بعضی از این ژن‌ها می‌تواند برای رشد و نمو گیاه مضر باشد. بیان بیش از حد یک فاکتور نسخه‌برداری به نام AtWRKY18 در آرابیدوپسیس، پاسخ‌های دفاعی و مقاومت در برابر *Pseudomonas syringae* را تقویت کرد (Chen and Chen, 2002). علاوه بر کینازها و فاکتورهای نسخه‌برداری، ژن‌های کدکننده پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی (pathogenesis-related protein; PR protein) و ژن‌هایی که در بیوسنتز اسید سالیسیلیک و جاسمونیک اسید نقش دارند نیز می‌توانند مورد هدف دست‌ورزی قرار گیرند. پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی، سطح موانع پیش‌ساخته در برابر تهاجم بیمارگر را افزایش می‌دهند. گیاهان اغلب پروتئین‌های ضدقارچی، فیتوالکسین‌ها (ترکیبات ضد میکروبی با وزن مولکولی پایین)، آنزیم‌های تقویت‌کننده دیواره سلولی یا آنزیم‌های شکننده ساختارهای بیمارگر تولید می‌کنند. بنابراین یک استراتژی طولانی مدت برای مهندسی مقاومت پایدار (با دوام)، بیان پروتئین‌هایی با فعالیت‌های ضد میکروبی در گیاهان است (van der Biezen, 2001; Yan and Ping, 2013). پپتیدهای کوچک غنی از سیستمین، آلبومین‌های ۲S، پروتئین‌های متصل به کیتین، پروتئین‌های منتقل‌کننده لیپید، تیونین‌ها، دفنسنین‌ها (defensin) و آنزیم‌های تولیدکننده پراکسید هیدروژن از پروتئین‌های ضدقارچی در گیاهان هستند. بیان بیش از حد ژن کدکننده تیونین (Thi2.1) از آرابیدوپسیس در گوجه‌فرنگی منجر به افزایش مقاومت در برابر پژمردگی باکتریایی و پژمردگی فوزاریومی در گوجه‌فرنگی شد (Chan et al., 2005). یکی از پیشرفت‌های جالب توجه این استراتژی، استفاده از آنتی‌بادی‌های اختصاصی بیمارگر است که به

پپتیدهای ضد میکروبی گیاه جوش (پیوند) خورده است. بیان پروتئین‌های (پپتیدها) ضد قارچی متصل به آنتی‌بادی اختصاصی آنتی‌ژن سطح فوزاریوم در آراییدوپسیس تراریخته باعث افزایش مقاومت در برابر *Fusarium oxysporum* f.sp. *matthiola* شد در حالی که در بوته‌هایی که آنتی‌بادی اختصاصی قارچ و یا پپتیدهای ضد قارچی به تنهایی بیان شدند، سطح مقاومت متوسط بود (Peschen et al., 2004). لازم به ذکر است که با وجود تلاش‌ها و استراتژی‌های زیاد، تولید و توسعه تجاری گیاهان مقاوم در برابر امراض قارچی و باکتریایی از طریق وارد کردن ترانس‌ژن‌ها به طور کلی ناموفق بوده است. مشکل اصلی این است که بیان بیش از حد ژن‌ها، به طور کلی بر اندازه و تولید دانه اثر منفی دارند. پاسخ به این مشکل، بیان ترانس‌ژن‌ها فقط در زمان و مکان مورد نیاز است (Yan and Ping, 2013).

۴- مقاومت به حشرات: ترانس‌ژن‌های مقاوم به حشرات با منشاء گیاهی، باکتریایی یا با هر گونه منشاء دیگر را می‌توان به گیاهان وارد کرد تا سطح مقاومت به حشرات افزایش یابد. در سال ۱۹۹۷، اولین ذرت و توتون تراریخته که در آن‌ها یک توکسین تغییر یافته (*Bacillus thuringiensis* (Bt) بیان شده بود، تولید شد. تاکنون بیش از ۴۰ ژن مختلف که باعث مقاومت در برابر حشرات می‌شوند، به گیاهان زراعی وارد شده‌اند. تحمل به حشرات از طریق تولید گیاهان تراریخته به عنوان ابزاری برای کنترل آفات زراعی مطرح بوده و در مقایسه با حشره‌کش‌های سنتی می‌تواند مزایای خاصی داشته باشد از جمله تاثیر بیش‌تر بر حشره داخل گیاه، انعطاف‌پذیری بیش‌تر در برابر شرایط محیطی، تجزیه‌پذیری سریع توسط میکروارگانیسم‌ها، کاهش قرار گرفتن استفاده‌کننده‌ها در معرض سم و کاهش هزینه مالی. استفاده از گیاهان تراریخته ممکن است منجر به کاهش استفاده از حشره‌کش‌های وسیع‌الطیف شود، بنابراین عمر مفید این ترکیبات افزایش یافته و آسیب‌های اکولوژیکی ناشی از آن‌ها، کاهش می‌یابد. استفاده از پنبه‌های تراریخته Bt در هند باعث کاهش ۷۰ درصدی استفاده از حشره‌کش‌ها شد و عملکرد نیز بین ۸۰ تا ۸۷ درصد افزایش یافت (Qaim and Zilberman, 2003; Yan and Ping, 2013). باکتری *B. thuringiensis* (Bt) یک باکتری خاک‌زاد است که اسپور تولید می‌کند و در داخل سلول‌هایش در طی تشکیل اسپور، کریستال‌های پروتئینی حشره‌کشی به نام Bt toxin، اندوتوکسین یا پروتئین‌های کریستالی تولید می‌کند. از دهه ۱۹۵۰، اسپورها و کریستال‌های پروتئینی تعدادی از استرین‌های این باکتری به عنوان حشره‌کش میکروبی مورد استفاده قرار می‌گیرند و به دلیل انتخاب‌پذیری آن‌ها، در بعضی از سیستم‌های مدیریت تلفیقی آفات نقش مهمی دارند. در ۲۰ سال گذشته، اندوتوکسین‌ها از زیرگونه‌های این باکتری برای محافظت گیاهان از آفات مورد استفاده قرار گرفته‌اند. این پروتئین پس از ورود به بخش میانی دستگاه گوارش حشره (midgut)، توسط آنزیم پروتئیناز حل شده و فعال می‌شود و در نهایت خسارت جبران‌ناپذیری به دیواره این بخش از دستگاه گوارش حشره وارد می‌شود. استرین‌های خاصی از Bt، انواع توکسین‌های کریستالی با دامنه میزبانی مشخص تولید می‌کنند. حداقل ۱۰ ژن کدکننده توکسین‌های مختلف Bt

مانند cry1Ca و cry1Aa، cry1Ba در داخل گیاهان مهندسی شده است. اکثر پروتئین‌های cry، دارای طیف حشره‌کشی مشخص هستند. ژن‌های cry1A و cry1C که به ترتیب پروتئین‌های Cry1A و Cry1C کد می‌کنند، اختصاصی لاروهای بال‌پولک‌دارانی مانند کرم سیب (*Cydia pomonella*) و ساقه‌خوار اروپایی ذرت (*Ostrinia nubilalis*) هستند. در مقابل، پروتئین Cry3A برای سخت‌بال‌پوشانی مانند سوسک کلرادوی سیب‌زمینی (*Leptinotarsa decemlineata*) سمی است (Yan and Ping, 2013). به منظور افزایش مقاومت در برابر حشرات یا افزایش مقاومت در برابر طیف وسیع‌تری از حشرات، توکسین Bt به طور دائمی اصلاح شده و بهتر می‌شود. امروزه ژن‌های بهینه‌سازی شده (codon-optimized gene) به برخی محصولات زراعی مانند ذرت، پنبه، سیب‌زمینی، کلم و یونجه منتقل شده‌اند تا فعالیت حشره‌کشی افزایش یابد. تکنیک بهینه‌سازی کدون ژن به طور وسیعی جهت افزایش بیان پروتئین‌های خارجی استفاده شده و معمولاً تولید پروتئین هدف بین ۱۰ تا ۵۰ برابر افزایش می‌یابد. در این تکنیک، با جایگزینی مترادف، یک توالی کدکننده برای پروتئین مورد نظر طراحی می‌شود تا سطح بیان آن افزایش یابد. در جایگزینی مترادف، با جایگزین کردن یک باز در توالی کدکننده، آمینواسید پروتئین سنتز شده تغییر نمی‌کند (Hibbard et al., 2005; Yan and Ping, 2013). یکی دیگر از استراتژی‌ها، استفاده از چند ژن مقاوم است تا طیف مقاومت در برابر حشرات، وسیع‌تر شود. برای کنترل سه آفت مهم برنج در هند یعنی برگ‌خوار برنج (*Cnaphalocrocis medinalis*، rice leaf folder)، کرم ساقه‌خوار زرد (*Scirpophaga incertulas*، yellow stem borer) و زنجبرک قهوه‌ای (*Nilaparvata lugens*)، سه پروتئین حشره‌کشی شامل Cry2A، Cry1Ac و GNA به برنج وارد شدند. پروتئین‌های Bt، برگ‌خوار و ساقه‌خوار را مورد هدف قرار داده ولی آفت مورد هدف پروتئین GNA، زنجبرک است (Maqbool et al., 2001). لکترین‌ها پروتئین‌های متصل‌شونده به کربوهیدرات‌ها هستند که از گیاهان مشتق شده و برای حشرات سمی هستند. نحوه عمل لکترین‌ها در برابر حشرات ناشناخته است ولی مشخص شده است که برخی از آن‌ها به سلول‌های ناحیه میانی دستگاه گوارش حشره متصل می‌شوند. با این حال برخی از لکترین‌ها با خاصیت حشره‌کشی (مانند لکترین‌های جوانه گندم و سویا)، برای پستانداران سمی بوده و برای انتقال و تولید گیاهان تراریخته مناسب نیستند. مطالعات اخیر بر استفاده از آگلوتینین (از انواع لکترین‌ها) گل برفی (*Galantus nivalis agglutinin*; GNA) متمرکز شده است. زمانی که این پروتئین توسط حشره استفاده می‌شود، این پروتئین از طریق دیواره لوله گوارش حشره وارد همولنف می‌شود. پروتئین GNA در نه محصول زراعی مختلف مانند سیب‌زمینی، کلزا و گوجه‌فرنگی بیان شده است. اثر این پروتئین به صورت ضدتغذیه‌ای است تا حشره‌کشی (Fitches et al., 2004; Yan and Ping, 2013). گروه بزرگ دیگری از ژن‌های گیاهی که برای مقاومت در برابر حشرات مفید هستند، بازدارنده‌های آنزیم‌های گوارشی یا بازدارنده‌های پروتئیناز می‌باشند که بخشی از سیستم دفاع طبیعی گیاه در برابر گیاه‌خواران است. تاکنون حداقل ۱۴ ژن گیاهی بازدارنده پروتئیناز به گیاهان زراعی وارد شده است. با

این حال، به طور کلی بازدارنده‌های پروتئیناز اثر کم بر آفات دارند. امروزه هیچ‌گونه گیاه زراعی که در آن‌ها ژن‌های بیان‌کننده بازدارنده پروتئیناز بیان شده باشد، تجاری نشده‌اند. از علل این عدم تاثیر می‌توان به توانایی حشرات گیاه‌خوار جهت تجزیه پروتئین‌ها و قدرت پایین بازدارنده‌های پروتئیناز خاصی اشاره کرد (Yan and Ping, 2013). با توجه به این که اندوتوکسین‌های Bt بر تمام حشرات مؤثر نیستند، برای شناسایی سایر پروتئین‌های حشره‌کشی، تلاش‌هایی صورت گرفته است. در طی رشد رویشی *B. thuringiensis*، پروتئین‌های حشره‌کشی رویشی (vegetative insecticidal protein; VIP) تولید می‌شود. این پروتئین‌ها در برابر طیف وسیع‌تری از آفات حشره‌ای، فعالیت حشره‌کشی دارند. پنبه‌های تراریخته‌ای که این پروتئین در آن‌ها بیان می‌شود، در سال ۲۰۰۵ در آمریکا و استرالیا تجاری شده‌اند (Yu et al., 1997; Yan and Ping, 2013). گروه جدید دیگری از سموم ضد حشرات، از باکتری‌های *Photohabdus* و *Xenorhabdus* بوده و از طریق عفونت خونی (septicemia) یا واکنش التهابی باعث مرگ حشره می‌شوند. بوته‌های آرابیدوپسیس که در آن‌ها ژن توکسین A از باکتری *Photorhabdus luminescens* بیان می‌شد، فعالیت ضدحشره‌ای قوی در برابر یک آفت از بال‌پولک‌داران و فعالیت ضدحشره‌ای متوسط در برابر یک آفت از سخت‌بال‌پوشان نشان دادند (Liu et al., 2003). علیرغم پذیرش وسیع و موفقیت تجاری محصولات تراریخته مقاوم به حشرات، پایداری و دوام مقاومت در برابر حشرات همچنان مورد بحث است. با توجه به وجود جهش‌هایی با فراوانی پایین در جمعیت آفات، پیش‌بینی شده است که در جمعیت‌های حشرات، مقاومت در برابر پروتئین‌های Bt ظاهر خواهد شد. گیاهانی که در آن‌ها چند ژن بیان می‌شود در مقایسه با گیاهانی که فقط دارای یک توکسین هستند، احتمالاً این توانایی را دارند که به طور مؤثری بروز مقاومت در جمعیت حشرات هدف را به تاخیر بیندازند (Yan and Ping, 2013).

۵- مقاومت به نماتد: نماتدهای انگل بر روی تعداد زیادی از گیاهان تغذیه نموده و هر ساله خسارت‌های اقتصادی شدیدی وارد می‌کنند. اگرچه چندین گروه مختلف از نماتدها، انگل گیاهی هستند اما نماتد مولد غده (Meloidogyne) و نماتدهای سیست (از جمله Heterodera و Globodera)، بیش‌ترین خسارت را وارد می‌کنند. نماتدکش‌های موفق برای کنترل آن‌ها تولید شده‌اند اما هزینه و سمیت محیط زیست فاکتورهایی هستند که استفاده وسیع از آن‌ها را محدود می‌کنند. استفاده از میزبان مقاوم در برابر نماتدها، گزینه ارجح است. چندین گیاه هستند که با استفاده از ژن مقاوم (R) از خود در برابر نماتدها محافظت می‌کنند. در تعدادی از گیاهان زراعی، ژن‌های مقاوم به نماتد وجود دارند و جزء مهمی از برنامه‌های اصلاحی در گوجه‌فرنگی، سیب‌زمینی و غلات هستند. اولین ژن مقاوم به نماتد، ژن Hs1pro-1 از چغندر بود. این ژن پروتئینی کد می‌کند که باعث ایجاد مقاومت در برابر *H. schachtii* (نماتد سیست چغندر) می‌شود (Williamson and Kumar, 2006; Yan and Ping, 2013). به طور کلی مقاومت در گیاهان در برابر نماتدها با عدم موفقیت نماتدها در تولید مکان‌های تغذیه‌ای

پس از آلودگی گیاه و همچنین عدم ظهور ماده‌های بارور مشخص می‌شود. در برخی برهمکنش‌ها بین نماتد و ژن مقاوم، رشد محل‌های تغذیه به صورت ناقص یا غیرطبیعی بوده و یا نسبت بالایی از نماتدهای نر ظاهر می‌شوند. استفاده از گیاهان تراریخته مقاوم به نماتد، کاهش استفاده از نماتدکش‌های بسیار سمی را به دنبال دارد. انتقال ژن Mi-1 به گوجه‌فرنگی‌های حساس منجر به بروز مقاومت مؤثر در برابر نماتد شد، اما زمانی که به توتون یا آرابیدوپسیس وارد شد، عملکردی نداشت. علت انتقال ضعیف مقاومت به نماتد به گونه‌ای دیگر، فقدان ژن‌های مورد نیاز برای شناسایی نماتد در میزبان یا برای سیگنال‌دهی دفاع میزبان می‌تواند باشد. یک استراتژی مولکولی جایگزین برای ایجاد مقاومت در گونه‌های گیاهی، ایجاد مقاومت مصنوعی است. هدف از این رویکرد، تولید مقاومت مؤثر و پایدار برای کنترل طیف وسیعی از نماتدهای انگل گیاهی است. هر کدام از مراحل حمله نماتد به بافت ریشه، به چرخه زندگی نماتد و گونه نماتد بستگی دارد و این مراحل می‌تواند مورد هدف سیستم دفاع مصنوعی قرار گیرند. ترانس‌ژن‌ها می‌توانند بازدارنده‌های آنزیمی کد کنند که فرایندهای فیزیولوژیکی نماتد را بلوکه کنند، یا ترکیبات سمی تولید کنند که توسط نماتد خورده شوند، یا آنزیم‌هایی کد کنند که با نماتد برهمکنش داشته و موادی تولید کنند که ساختارهای تغیه‌ای خاصی را از بین ببرند. یکی از این نمونه‌ها، وارد کردن ژن کدکننده یک بازدارنده پروتئیناز به نام سیستاتین (cystatin) است که بیان آن در گیاهان تراریخته از رشد و نمو نماتد ماده جلوگیری نموده و باعث کاهش اندازه و باروری آن‌ها می‌شود. با این حال باید ثابت شود که آیا کاهش باروری برای مقاومت کامل در برابر نماتدهای انگل گیاهی در مزرعه کافی است؟ (Lilley et al., 2004; Yan and Ping, 2013).

۶- تحمل در برابر تنش‌های غیرزنده مانند خشکی و شوری: در محیط طبیعی، گیاهان باید تنش‌های محیطی مختلفی مانند شوری، گرما، سرما و خشکی را تحمل کنند. این تنش‌های غیرزنده به خصوص شوری و خشکی، عامل اصلی کاهش محصول در دنیا هستند. فعالیت‌های انسان، اوضاع را بدتر کرده است. به عنوان مثال، دود تولید شده توسط ماشین‌ها و دیگر فعالیت‌های صنعتی در نتیجه سوخت روغن فسیلی و زغال سنگ به طور قابل ملاحظه‌ای بر تاثیر اثر گلخانه‌ای بر اقلیم نقش داشته و متوسط دمای اتمسفر و زمین به طور چشمگیری افزایش یافته است. کشاورزی مدرن با پمپاژ کردن آب‌های زیرزمینی با مواد معدنی بیش‌تر برای آبیاری علاوه بر این که سطح آب‌های زیرزمینی را کاهش داده و میزان مواد معدنی در خاک پس از تبخیر آب را افزایش داده است، به وخیم‌تر شدن شرایط شوری و خشکی کمک کرده است. در حال حاضر، خشکی و شوری در بسیاری از مناطق گسترده است و انتظار می‌رود تا سال ۲۰۵۰ باعث شور شدن جدی بیش از ۵۰ درصد کل اراضی قابل کشت شود. سازگاری گیاه با تنش‌های محیطی توسط شبکه‌های مولکولی کنترل می‌شود. این شبکه‌ها، مکانیسم‌های پاسخ‌دهنده را فعال می‌کنند تا حالت هوموستاسیس (homeostasis) مجدداً برقرار شده و علاوه بر حفاظت از غشاءها و پروتئین‌ها، غشاءها و پروتئین‌های خسارت دیده نیز ترمیم

شوند. هوموستاسیس عبارت است از توانایی حفظ حالت نسبتاً پایدار داخلی علیرغم وجود شرایط ناپایدار خارجی. به طور کلی پاسخ‌ها به تنش‌های غیرزنده، چندزنی است، بنابراین کنترل و مهندسی آن‌ها بسیار مشکل است. سه استراتژی کلی برای ایجاد تحمل در برابر تنش‌های غیرزنده از طریق تغییر ژنتیکی وجود دارد (Yan and Ping, 2013):

- ▶ بیان ژن‌هایی که در مسیر سیگنال‌دهی و تنظیمی قرار دارند.
- ▶ بیان ژن‌هایی که پروتئین‌های عامل تحمل به تنش را کد می‌کنند.
- ▶ بیان آنزیم‌ها برای سنتز متابولیت‌های ساختاری و عملکردی

پروتئین‌های شوک حرارتی (heat shock proteins; Hsps) و چاپرون‌های مولکولی (chaperon) و به علاوه پروتئین‌های فراوان در اواخر جنین‌زایی (late embryogenesis abundant; LEA) در تحمل گیاه به تنش‌های غیرزنده نقش دارند. چاپرون‌های مولکولی به تاخوردن پروتئین‌های تازه ساخته شده یا پروتئین‌هایی که تا نخورده‌اند، کمک می‌کنند. پروتئین‌های شوک حرارتی به پروتئین‌های خاصی گفته می‌شود که در شرایط دمایی بالاتر از دمای طبیعی رشد، ساخته می‌شوند. پروتئین‌های فراوان در اواخر جنین‌زایی گروه بزرگی از پروتئین‌ها هستند که نقش اصلی آن‌ها ایجاد تحمل در گیاهان در برابر خشکی و دیگر تنش‌های غیرزنده است. بیان بالای HSP101 از آرابیدوپسیس در برنج باعث بهتر شدن چشمگیر عملکرد رشد در هنگام بهبودی از تنش گرمایی شد. همچنین بیان بیش از حد یک پروتئین LEA در برنج، باعث تحمل برنج‌های تراریخته به خشکی در مزرعه شد (Katiyar-Agarwal *et al.*, 2003; Xiao *et al.*, 2007; Yan and Ping, 2013). یکی دیگر از جنبه‌های تنش محیطی در گیاهان، تولید گونه‌های فعال (واکنش‌پذیر) اکسیژن (reactive oxygen species; ROS) تحت تأثیر تنش است. گونه‌های فعال اکسیژن مولکول‌های کوچک، ناپایدار و بسیار واکنش‌پذیری هستند که می‌توانند پروتئین‌ها، لیپیدها و دئوکسی‌ریبونوکلیک اسید را اکسید کنند و شامل آنیون‌های اکسیژن، رادیکال‌های آزاد از جمله سوپراکسید و رادیکال‌های هیدروکسیل و پراکسیدها مانند پراکسید هیدروژن (H_2O_2) هستند. وارد کردن آنتی‌اکسیدانت‌ها و مهارکننده‌های (scavenger) گونه‌های فعال اکسیژن می‌تواند مقاومت گیاه را در برابر شوری و خشکی افزایش دهد. در نتیجه واکنش‌های جنبی گونه‌های فعال اکسیژن با لیپیدها و پروتئین‌ها، آلدئیدهای سمی در داخل سلول انباشته می‌شوند. آلدئید دهیدروژنازها، اکسیداسیون آلدئیدهای سمی را کاتالیز (تسریع) می‌کنند. بیان بسیار بالای یک ژن کدکننده آنزیم آلدئید دهیدروژناز به نام AtALDH3 در آرابیدوپسیس منجر به ایجاد تحمل در برابر خشکی و شوری شد (Sunkar *et al.*, 2003; Yan and Ping, 2013). تنش‌های غیرزنده منجر به تنش اسمزی می‌شوند که می‌توانند باعث تغییرات مضر در اجزاء سلول شوند. طیف وسیعی از متابولیت‌ها مانند پرولین، گلیسین بتائین (glycine-betaine)، پلی‌آمین‌ها، انواع قندها و الکل‌های قندی می‌توانند از این تغییرات مضر جلوگیری کنند. برای تحمل به تنش‌های غیرزنده، این متابولیت‌ها می‌توانند

تنظیم شوند. گلايسين بتائين که یک محافظت کننده اسمزی است، به طور گسترده‌ای مورد مطالعه قرار گرفته است. با وارد کردن ژن کدکننده آنزیم کولين دهیدروژناز (choline dehydrogenase; codA) از باکتری به چندین گیاه، بیان بالای گلايسين بتائين حاصل شد و مقاومت بوته‌های تراریخته در برابر تنش‌های غیرزنده، افزایش یافت. این آنزیم اکسیداسیون کولين به گلايسين بتائين را کاتالیز می‌کند. کولين یک ماده مغذی ضروری است که برخی غذاها وجود دارد و به عنوان یک مکمل غذایی در دسترس است. تری‌هالوز (trehalose) که قندی نادر و غیراحیاء کننده است، در تعداد زیادی از باکتری‌ها و قارچ‌ها و برخی گیاهان عالی متحمل به خشکی وجود دارد. بیان بالای این قند در برنج باعث ایجاد تحمل به چندین تنش غیرزنده شده است (Jang *et al.*, 2003; Yan and Ping, 2013).

۷- گیاه‌پالایی (Phytoremediation): گیاه‌پالایی استفاده از گیاهان برای پاک‌سازی منابع آب و خاک آلوده است. اگرچه برخی گیاهان توانایی ذاتی برای غیرسمی کردن آلاینده‌های محیطی را دارند، اما به طور کلی در مقایسه با میکروارگانیسم‌ها و پستانداران فاقد یک مسیر کاتابولیک برای تخریب کامل هستند. اصلاح ژنتیکی از طریق بیان بیش از حد ژن‌های گیاهی و یا وارد کردن ژن‌های دیگر موجودات زنده، امکان تولید گیاهان مهندسی شده با توانایی تخریب برتر را فراهم می‌کند. گیاه‌پالایی با گیاهان تراریخته ممکن است یک روش ارزان، مؤثر و غیرمخرب برای محیط زیست را ارائه دهد. گیاه‌پالایی شامل چندین فرایند است: آلاینده‌های آب و خاک می‌توانند به داخل گیاه کشیده شوند (گیاه استخراجی یا phytoextraction) و یا توسط ریشه جذب شوند (تصفیه ریشه‌ای یا rhizofiltration)؛ آلاینده‌های داخل بافت‌های گیاه می‌توانند توسط آنزیم‌های گیاه تغییر یابند (گیاه تغییری یا phytotransformation) یا تبخیر شده و وارد اتمسفر شوند (گیاه تبخیری یا phytovolatilization)؛ آلاینده‌های داخل خاک می‌توانند توسط میکروب‌های منطقه ریشه تجزیه شوند (پالایی بیولوژیکی یا bioremediation) یا با مواد داخل خاک ترکیب شوند تثبیت گیاهی یا (phytostabilization) (Yan and Ping, 2013).

گیاهان تراریخته برای گیاه‌پالایی، اولین بار جهت بهبود تحمل به فلزات سنگین تولید شدند. به عنوان مثال برای تحمل بیش‌تر توتون به کادمیوم، ژن متالوتیونین (metallothionein) از مخمر در بوته‌های توتون بیان شد. متالوتیونین یک پروتئین غنی از سیستئین با وزن مولکولی پایین است. در تحقیقی دیگر با بیان بیش از حد ژن کدکننده آنزیم رداکتاز یون جیوه (mercuric ion reductase) در آرابیدوپسیس، تحمل این گیاه به جیوه افزایش یافت. در سال‌های اخیر، برای غیرسمی کردن یا جذب کادمیوم، جیوه، سرب، آرسنیک و سلنیوم، از ژن‌هایی که در جذب، جابجایی، ترسیب و انتقال فلزات نقش دارند برای تولید گیاهان تراریخته استفاده می‌شود. یک نمونه، وارد کردن ژن کدکننده آنزیم glutamylcysteine synthetase از باکتری به خردل است. بوته‌های تراریخته توانستند در مقایسه با غیرتراریخته‌ها مقدار کادمیوم، مس، سرب، روی و کروم بیش‌تری جذب کنند (Zhu *et al.*, 1999; Yan and Ping, 2013). آلودگی هوا توسط ترکیبات آلی مانند آفت‌کش‌ها، ترکیبات

نفته و دارویی یک مشکل جهانی است. برای افزایش گیاه‌پالایی و تجزیه بیولوژیکی آلاینده‌های آلی، گیاهان تراریخته تولید شده‌اند. در اولین تلاش استفاده از گیاهان تراریخته برای گیاه‌پالایی، تجزیه مواد منفجره مورد هدف بود. توتون‌های تراریخته‌ای که ژن کدکننده آنزیم pentaerythritol tetranitrate reductase از باکتری در آن‌ها بیان می‌شود، توانایی تجزیه تری‌نیترات گلیسرین منفجره را دارند (French *et al.*, 1999). یک پروتئین تجزیه‌کننده نیز می‌تواند با وارد شدن به داخل رایزوسفر، آلاینده‌ها را تجزیه کند. مزیت این استراتژی، عدم جذب آلاینده‌ها برای غیرسمی کردن آن‌ها است. ژن کدکننده آنزیم لاکاس (laccase) از قارچ *Coriolus versicolor* به بوته‌های توتون وارد شد و لاکاس تولید شده، وارد رایزوسفر گردید. این بوته‌های تراریخته توانستند بیسفنول (bisphenol A) یا پنتاکلروفنول را از خاک حذف کنند (Sonoki *et al.*, 2005). در تحقیقی دیگر، صنوبرهای تراریخته‌ای تولید کردند که آنزیم سیتوکروم P450 از پستانداران در آن‌ها بیش از حد بیان شد. این آنزیم در متابولیسم ترکیبات سمی، نقش دارد. در این صنوبرهای تراریخته، متابولیسم تری‌کلرواتیلن (trichloroethylene) و توانایی حذف طیفی از آلاینده‌های آلی فرار سمی مانند وینیل کلرید، تتراکلرید کربن، کلروفرم و بنزن افزایش یافت (Doty *et al.*, 2007). با وجود تلاش‌های زیاد، گیاه‌پالایی با گیاهان تراریخته هنوز کاربرد وسیعی ندارد. یک دلیل این است که کارایی آن پایین است. دومین نگرانی، تجمع ترکیبات سمی در گیاهان است که می‌تواند بعداً وارد محیط شده یا زنجیره غذایی را آلوده کند. در ارتباط با آلاینده‌هایی که در گیاهان انباشته می‌شوند، مسئله دفع این گیاهان نیز یک نگرانی جدی است. تولید گیاهان تراریخته با کارایی بیش‌تر برای گیاه‌پالایی، ترجیحاً برای تبدیل کامل آلاینده‌ها به ترکیبات غیرسمی، ضروری است. از طرفی دیگر، برای تصویب مقررات و پذیرش بهتر مردم، کنترل پراکندگی ترانس‌ژن‌ها در محیط نیز ضروری است (Yand and Ping, 2013).

۸- فناوری زیستی جنگل: درختان جنگل دو نقش اصلی برای انسان دارند: استفاده تجاری به عنوان محصولات چوبی و حفظ و نگهداری اکوسیستم زمین. انتظار می‌رود که تقاضا برای چوب در دهه آینده، ۲۰ درصد افزایش یابد، در حالی که پوشش جنگل‌های جهان به علت سایر استفاده‌ها و یا از بین رفتن طبیعی در دهه گذشته، در حدود ۱۳ میلیون هکتار کاهش یافته است (FAO, 2010). به منظور پاسخ به تقاضای روزافزون برای محصولات چوبی، تولید و توسعه درختان جنگلی سریع‌الرشد در حال افزایش است. تکنیک‌های سنتی اصلاح و پرورش درختان جنگلی، به تنهایی برای تامین این نیازها کافی نیستند چون دوره‌های نوجوانی درخت طولانی است و درختان بومی فاقد ژن‌های مورد نیاز برای انتقال صفات تجاری مهم هستند. پیشرفت‌های اخیر در بیولوژی مولکولی درختان جنگل، از جمله کشف ژن، پروفایل ژن نسخه‌برداری شده، تعیین توالی ژنوم و نقشه‌برداری ژنتیکی، راه را برای مهندسی ژنتیک درختان به منظور تولید درختانی با عملکرد بالا هموار کرده‌اند. اصلاح ژنتیکی به مسیری مهم برای تسريع در اهلی کردن درختان جنگل تبدیل شده است و مزیت اصلی

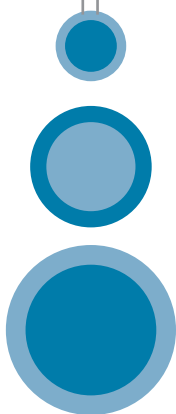
این کار، افزودن صفات تجاری مهم به کلون‌های برتر است. دومین مزیت، کاهش مدت زمان طولانی تولید است که ویژگی اکثر درختان جنگل است. بیش‌ترین تلاش در مهندسی ژنتیک درختان به اصلاح مقادیر و ترکیب لیگنین در درخت جهت بهبود قابلیت استخراج‌پذیری لیگنین در طی مرحله تهیه خمیر کاغذ، اختصاص یافته است. دومین ترکیب آلی فراوان روی زمین پس از سلولز، لیگنین است که ۲۵ درصد چوب را تشکیل می‌دهد. در صنعت تهیه خمیر کاغذ و کاغذسازی، لیگنین باید در طی یک فرایند با مصرف انرژی و با استفاده از مواد شیمیایی آلوده‌کننده محیط زیست حذف شود. درختان تراریخته‌ای تولید شده‌اند که در فرایند تهیه خمیر کاغذ جهت جداکردن لیگنین از سلولز، از مواد شیمیایی کم‌تری استفاده می‌شود، بنابراین مصرف انرژی و تاثیر اکولوژیکی بر محیط کاهش می‌یابد. یک آنزیم کلیدی برای بیوسنتز لیگنین، آنزیم Cinnamyl alcohol dehydrogenase (CAD) است که با کاهش بیان این آنزیم، کیفیت چوب برای تهیه خمیر کاغذ با مواد شیمیایی بهتر شد و مواد شیمیایی کم‌تری برای تولید بیس‌تر خمیر کاغذ، مورد استفاده قرار گرفت. لازم به ذکر است که در این درختان تراریخته، هیچ‌گونه فنوتیپ نامطلوبی در رشد و سلامت درخت در عرصه مشاهده نشد. افزایش بیان آنزیم ferulate-5-hydroxylase (F5H) و کاهش بیان آنزیم CAD به طور همزمان در صنوبر، منجر به کاهش لیگنین، افزایش سلولز و کاهش لیگنین متراکم شد. علاوه بر کیفیت، بهره‌وری چوب نیز یک صفت مهم است (Pilate et al., 2002; Huntley et al., 2003; Li et al., 2003; Yan and Ping, 2013). مشاهده شده است که تعداد زیادی ژن که در فرایندهای مختلف نقش دارند، بر رشد صنوبرهای تراریخته اثر می‌گذارند. بیان بسیار زیاد آنزیم cytosolic pine glutamine synthase (GS) که یک آنزیم کلیدی در همگونی‌سازی ازت (nitrogen assimilation) است، باعث افزایش ارتفاع درخت تا ۴۱ درصد و قطر درخت تا ۳۶ درصد شد. با بیان بسیار زیاد آنزیم xyloglucanase در صنوبر، رشد و تولید سلولز افزایش یافت ولی منجر به کاهش لیگنین شد. این آنزیم، ارتباط بین سلولز و همی‌سلولز را قطع کرده و باعث توسعه و گسترش سلول می‌شود (Park et al., 2004). همچنین تحقیقاتی برای افزایش تحمل به تنش‌های غیرزنده مانند خشکی، شوری و دمای پایین که در کاهش بهره‌وری جنگل نقش دارند، انجام شده است. بیان بالای یک فاکتور نسخه‌برداری از فلفل به نام ERF/AP2 در کاج سفید شرقی، تحمل به خشکی، یخبندان و شوری را افزایش داد. افزایش این تحمل به علت بیوسنتز پلی‌آمین بود. با بیان بالای ژن کدکننده آنزیم کولین اکسیداز (choline oxidase; codA) باکتری *Arthrobacter globiformis* در کاکتوس، تحمل به شوری افزایش یافت (Tang et al., 2007; Yu, 2009). از طرفی دیگر، مقاومت به حشرات از طریق مهندسی ژنتیک، نه تنها باعث افزایش بهره‌وری جنگل می‌شود بلکه به دلیل کاهش نیاز به آفت‌کش‌های مصنوعی دفع آفات، از نظر زیست‌محیطی نیز سودمندتر است. ژن کدکننده توکسین Bt و بازدارنده‌های پروئیناز، در درختان جنگلی بیان شده است. در سال ۲۰۰۲، تجاری‌سازی صنوبر سیاه که در آن توکسین Bt بیان شده است، تایید گردید (Ye et al., 2000).

مقاومت به بیماری‌ها، مقاومت به علف‌کش، افزایش رشد و نمو ریشه، کنترل گل‌دهی و گیاه‌پالایی آلاینده‌های هوا از دیگر صفات درختان تراریخته است. مهندسی ژنتیک درختان، فرصتی برای تولید پایدار محصولات جنگلی فراهم می‌کند. با این حال، دستاوردها تاکنون بیش‌تر مربوط به جنس *Populus* است. درختان این جنس، دارای ژنوم کوچک بوده، سریع‌الرشد هستند و قابلیت اصلاح ژنتیکی را دارند. برای رسیدن به همان سطح موفقیت در سایر درختان جنگلی، مدتی طول می‌کشد. با این حال، موانع اجتماعی و مقرراتی از تجاری‌سازی درختان تراریخته جلوگیری کرده است. پایداری ترانس‌ژن و جریان احتمالی ژن (gene flow)، دو نگرانی اصلی هستند. جریان ژن، جابجایی و انتقال آلل‌های یک ژن از یک جمعیت به جمعیتی دیگر است. علاوه بر این موضوعات فنی، برای کسب مقبولیت عمومی مهم است تا شفافیت بیش‌تری در ارتباط با تولید و توسعه درختان تراریخته داشت (Yan and Ping, 2013).

۹- واکسن‌های سبز و داروهای بیولوژیکی (Biopharmaceuticals): ساخت دارو توسط گیاه اصطلاحی است که برای توصیف استفاده از گیاهان تراریخته جهت تولید آنتی‌ژن‌های واکسن و پروتئین‌های دارویی استفاده می‌شود. واکسیناسیون، مؤثرترین و مقرون به صرفه‌ترین روش برای مقابله با امراض مسری است. با این حال، هزینه تولید و حمل و تحویل واکسن، این امر را برای اکثر افراد ساکن در کشورهای در حال توسعه غیرقابل قبول کرده است. امروزه تمایل به استفاده از یک یا دو پروتئین به جای استفاده از بیمارگرهای ضعیف یا غیربیماری‌زا برای تولید واکسن است. تولید واکسن توسط گیاهان تراریخته و سپس استفاده خوراکی، به دلیل داشتن مزایایی مانند عدم نیاز به تخمیر، خالص‌سازی، نگهداری در انبار سرد، حمل و نقل و تحویل در شرایط استریل که هزینه بالایی دارند، به گزینه‌ای جذاب تبدیل شده است. واکسن‌های خوراکی از طریق تحریک سیستم ایمنی در بافت لنفاوی در داخل لوله گوارش عمل می‌کنند. آنتی‌ژن سطح ویروس هپاتیت B، اولین واکسنی بود که در برگ توتون بیان شد. غده‌های سیب‌زمینی که در آن‌ها آنتی‌ژن هپاتیت B بیان می‌شد، به داوطلبانی که قبلاً واکسینه شده بودند تجویز گردید و دیده شد که عیار آنتی‌بادی علیه این آنتی‌ژن در سرم بیش از نیمی از افرادی که دو دز از سیب‌زمینی‌های تراریخته مصرف کرده بودند، افزایش یافت. اخیراً آنتی‌ژن هپاتیت B در دانه‌های برنج نیز بیان شده است (Thanavala et al., 2005; Qian et al., 2008; Yan and Ping, 2013). از جمله واکسن‌های ویروسی که بیان شده است می‌توان به بیان گلیکوپروتئین ویروس هاری و پروتئین پوششی ویروس نورواک (Norwalk virus) در گوجه‌فرنگی اشاره کرد. آنتی‌ژن‌های باکتریایی نیز در گیاهان جهت تولید واکسن علیه بیماری‌های باکتریایی، بیان شده است که می‌توان به آنتی‌ژن سیاه‌زخم و سل اشاره کرد. پروتئین‌های AMA1 و MSP1 از عامل بیماری مالاریا در کلروپلاست توتون و کاهو بیان شدند. تجویز زیرجلدی یا خوراکی به موش منجر به تولید آنتی‌بادی با عیار بالا

شد و به طور کامل از تکثیر عامل بیماری مالاریا ممانعت گردید (Davoodi-Semiromi *et al.*, 2010). به همین ترتیب، می‌توان از گیاهان تراریخته برای تولید پروتئین‌های دارویی استفاده کرد. عامل و محرک اصلی این کار، احتمالاً هزینه پایین بوده است. اولین پروتئین دارویی ساخته شده در گیاه، هورمون رشد انسان بود که در سال ۱۹۸۶ در توتون بیان شد. سپس در سال ۱۹۸۹، در برگ‌های توتون یک آنتی‌بادی ترشحی علیه باکتری *Streptococcus mutans* (عامل حفره دندانی)، بیان شد. اخیراً پروتئین griffithsin (در جلبک قرمز)، در توتون تولید شده و دیده شد که می‌تواند انتقال سلول به سلول ویروس عامل بیماری ایدز را بلوکه کند (Yan and Ping, 2013). یکی از نمونه‌های برجسته در تولید پروتئین دارویی، تولید آنزیم glucocerebrosidase (از آنزیم‌های انسانی) در سلول‌های هویج است. این آنزیم نوترکیب از نظر بیولوژیکی فعال بوده و مشخص شد که با ایمنی ذاتی یا هومورال، هیچ‌گونه واکنش قابل توجهی ندارد. کمبود آنزیم glucocerebrosidase در انسان باعث بیماری گوشه (Gaucher's disease) می‌شود که یک بیماری ارثی است. مرحله سوم آزمایشات کلینیکی برای درمان مبتلایان به این بیماری با استفاده از این آنزیم نوترکیب در حال انجام است (Aviezer *et al.*, 2009). لیست مولکول‌های نوترکیب که در پزشکی اهمیت دارند و می‌توانند در گیاهان تراریخته بیان شوند، در حال زیاد شدن است (Yan and Ping, 2013). غده سیب‌زمینی برای اولین بار جهت تولید و تجویز واکسن خوراکی به انسان، مورد استفاده قرار گرفت. همچنین از غده‌های سیب‌زمینی برای تولید آنتی‌بادی‌ها و آلبومین سرم انسان نیز استفاده شده است. از گیاهانی مانند گوجه‌فرنگی، موز، هویج، کاهو، یونجه، آرابیدوپسیس، ذرت و شبدر سفید نیز برای تولید واکسن استفاده می‌شود. برای حمل و انتقال واکسن‌های نوترکیب در اندام‌های خوراکی گیاه، استفاده از گیاهان محلی برای اقدامات واکسیناسیون مفید خواهد بود. برای تولید عمده داروهای بیولوژیکی، بسیاری از پروتئین‌های نوترکیب اولیه، در توتون‌های تراریخته تولید شده و به طور مستقیم از برگ‌های برداشت شده، استخراج شدند. توتون میزبان خوبی برای تغییر ژنتیکی قوی است. عملکرد بالای بیوماس و مقیاس‌پذیری سریع، توتون را برای کشاورزی مولکولی تجاری، بسیار مناسب کرده است. علاوه بر این، توتون یک محصول غیرغذایی و غیرخوراکی است و از این رو خطر آلوده شدن غذا و زنجیره غذایی انسان به مواد تراریخته و پروتئین‌های نوترکیب، کاهش می‌یابد. با این حال، توتون دارای نیکوتین بالا و دیگر آلکالوئیدهای سمی است که باید حذف شوند. پروتئین‌هایی که در برگ‌ها بیان می‌شوند، ناپایدار بوده و در برگ‌های برداشت شده، طول عمر محدودی دارند. بنابراین باید بلافاصله پس از برداشت، فرآوری شوند. در مقابل، پروتئین‌هایی که در دانه‌های غلات بیان می‌شوند، در برابر تجزیه آنزیمی محافظت می‌شوند و پایداری طولانی‌تری دارند. چندین غلات مختلف مانند برنج، ذرت، گندم و جو به عنوان میزبان بالقوه برای تولید پروتئین‌های نوترکیب مورد بررسی قرار گرفته‌اند (Yan and Ping, 2013).





فصل پنجم:

وضعیت جهانی محصولات اصلاح شده (تغییر یافته) ژنتیکی (گیاهان تراریخته)

اهداف رفتاری:

فراگیران پس از مطالعه این فصل قادر خواهند بود:

- ۱- سطح زیر کشت محصولات تراریخته را بیان کنند.
- ۲- محصولات زراعی اصلی که تراریخته شده‌اند را نام ببرند.
- ۳- وضعیت تولید تجاری محصولات تراریخته در دنیا را تشریح کنند.
- ۴- وضعیت محصولات تراریخته در ایران را بیان کنند.

وضعیت جهانی محصولات اصلاح شده (تغییر یافته) ژنتیکی (گیاهان تراریخته)

جمعیت انسان در نیم قرن گذشته، دو برابر شده است و انتظار می‌رود که تا اواسط قرن حاضر به حدود نه میلیارد نفر برسد. با افزایش جمعیت، میزان مصرف مواد غذایی افزایش یافته و منجر به فشار برای عرضه جهانی مواد غذایی می‌شود. از هر هفت نفر، بیش از یک نفر از کمبود مواد غذایی اصلی و یا سوءتغذیه ریز مغذی‌ها رنج می‌برند. علاوه بر این، تغییرات جهانی اقلیم به علت فعالیت‌های بشر، وضعیت را بدتر کرده است. بنابراین اطمینان از امنیت غذایی پایدار و عادلانه، ضروری است و به نظر می‌رسد که محصولات اصلاح شده ژنتیکی، دوستان بالقوه‌ای باشند (Barrows *et al.*, 2014; Mathur *et al.*, 2017).

محصولات اصلاح شده ژنتیکی در ابتدا توسط شرکت‌هایی مانند مونسانتو (Monsato) و پایونیر (Pioneer) برای کشاورزان آمریکا که بازارهای جهانی را هدف قرار می‌دادند، معرفی شد (Uzogara, 2000). در حال حاضر محصولات تراریخته دارای پتانسیل عظیمی برای بازارهای صادراتی هستند و می‌توانند در ایجاد ثبات در اکوسیستم ناپایدار ما نقش داشته باشند. برای دستیابی به عملکرد بالا، ترکیباتی با فعالیت زیستی بالقوه، تصفیه آب و خاک، متابولیت‌ها بر علیه حملات عومال زنده مانند بیمارگرها، گیاه‌خوارها و حشرات و مقاومت در برابر آفات، این محصولات تحت تحقیقات گسترده‌ای هستند. بنابراین استفاده از فناوری اصلاح و تغییر ژنتیکی، ممکن است با افزایش امنیت غذایی از طریق افزایش عملکرد محصول، ارقام مقاوم در برابر گرما و خشکی، افزایش قابلیت انبارداری و بهبود ارزش غذایی و دارویی به تجدید اکوسیستم کمک کند (Huang *et al.*, 2002a, b; Qaim and Zilberman, 2003; Paarlberg, 2006).

با کمک فناوری اصلاح و تغییر ژنتیکی، صفات جدید به موجودات زنده مانند ماهی، دام، طیور و گیاهان وارد می‌شوند تا بهره‌وری، مقاومت در برابر تنش‌های زنده یا غیرزنده و دیگر ارزش‌های تجاری و زیبایی آن‌ها بهبود یابد (Xiao *et al.*, 2014). این تکنیک‌ها امکان جستجو در جنبه‌های مولکولی جهان بیولوژیک را فراهم می‌کند تا جمعیت در حال رشد تقویت شود. با این حال در ارتباط با روش اصلاح و تغییر ژنتیکی، ملاحظات وجود دارد. ضروری است که باید مشخص شود آیا محصولات تراریخته از نظر امنیت غذایی و همچنین عواقب مربوط به ایمنی زیستی و استفاده انسان از فناوری‌های تراریخته، گزینه پایداری هستند (Azadi and Ho, 2010; McHughen and Wager, 2010).

چندین کمپین در دنیا و عمدتاً در اروپا، تأثیرات منفی آن بر محیط زیست و انسان را زیر سوال می‌برند. علاوه بر این، در مورد تعداد کمی از شرکت‌های بین‌المللی که بذر تراریخته تهیه می‌کنند و از تسلط و کنترل کامل بر بازار برخوردار هستند، نگرانی‌هایی وجود دارد. مسئله جدی دیگر، دامنه تحقیقات در اکثر کشورهای در حال توسعه است تا به تحقیقات همراه با توانایی‌شان جهت ارزیابی بازده محصولات تراریخته و استفاده از آن‌ها کمک کنند. اگر بتوان این نگرانی‌ها را با روشی پایدار برطرف کرد، ممکن است فناوری تولید گیاهان تراریخته برای مشکلات مختلف بهداشت جهانی و زیست محیطی، حیاتی باشد (Mathur *et al.*, 2017).

۱- رشد جهانی در تجاری‌سازی محصولات تراریخته

در تمام شش قاره در سراسر دنیا، تجاری‌سازی محصولات تراریخته گزارش شده است. در بیست‌وسومین سال تجاری‌سازی محصولات تراریخته در سال ۲۰۱۸، در مجموع ۷۰ کشور از طریق کشت یا وارد کردن محصولات تراریخته، محصولات زیست‌فناوری را تصویب کرده و پذیرفته‌اند. در این سال، در ۱۸ کشور بزرگ (mega-country) از ۲۶ کشور، محصولات تراریخته در سطح ۵۰۰۰۰ هکتار یا بیش‌تر کشت شده است. سطح زیر کشت محصولات تراریخته در کشورهای آمریکا، برزیل، آرژانتین، کانادا و هند برابر با ۹۱ درصد سطح زیر کشت این محصولات در دنیاست (جدول ۴) (ISAAA, 2018). در سال ۲۰۱۸، متوسط نرخ پذیرش محصولات تراریخته در پنج کشور اصلی تولیدکننده این محصولات افزایش یافته و به حد اشباع رسید. این پذیرش در آمریکا به ۹۳/۳ (بر اساس میانگین پذیرش سویا، ذرت و پنبه)، در برزیل به ۹۳ درصد، در کانادا به ۹۲/۵، در آرژانتین به ۱۰۰ درصد و در هند به ۹۵ درصد رسید (ISAAA, 2018).

جدول ۴- لیست کشورهای اصلی تولیدکننده محصولات تراریخته

رتبه	کشور	مساحت (میلیون هکتار)	محصولات تراریخته
۱	آمریکا	۷۵	ذرت، سویا، پنبه، کلزا، چغندر قند، یونجه، پاپایا، کدو، سیب‌زمینی و سیب
۲	برزیل	۵۱/۳	سویا، ذرت، پنبه و نیشکر
۳	آرژانتین	۲۳/۹	سویا، ذرت و پنبه
۴	کانادا	۱۲/۷	کلزا، ذرت، سویا، چغندر قند، یونجه و سیب
۵	هند	۱۱/۶	پنبه
۶	پاراگوئه	۳/۸	سویا، ذرت و پنبه
۷	چین	۲/۹	پنبه و پاپایا
۸	پاکستان	۲/۸	پنبه
۹	آفریقای جنوبی	۲/۷	ذرت، سویا و پنبه
۱۰	اروگوئه	۱/۳	سویا و ذرت
۱۱	بولیوی	۱/۳	سویا
۱۲	استرالیا	۰/۸	پنبه و کلزا
۱۳	فیلیپین	۰/۶	ذرت
۱۴	میانمار	۰/۳	پنبه
۱۵	سودان	۰/۲	پنبه
۱۶	مکزیک	۰/۲	پنبه
۱۷	اسپانیا	۰/۱	ذرت
۱۸	کلمبیا	۰/۱	پنبه و ذرت

از سال ۱۹۹۶ که تجاری‌سازی محصولات تراریخته شروع شد، سطح زیر کشت این محصولات در دنیا تقریباً ۱۱۳ برابر افزایش یافته است. سطح زیر کشت محصولات تراریخته در طی ۲۳ سال گذشته همه ساله با رشد چشمگیری روبه‌رو بوده و این فناوری به سریع‌ترین فناوری پذیرفته شده در کشاورزی مدرن تبدیل شده است. سطح زیر کشت محصولات تراریخته در دنیا در سال ۲۰۱۸ در ۲۶ کشور (۲۱ کشور در حال توسعه و پنج کشور صنعتی) به ۱۹۱/۷ میلیون هکتار رسید که در مقایسه با سال ۲۰۱۷، یک درصد افزایش نشان می‌دهد (جدول ۵). سطح زیر کشت محصولات تراریخته در کشورهای در حال توسعه، ۵۴ درصد مساحت کل این محصولات در دنیا است. در ۳۰ کشور جهان، بیش از ۱۸ میلیون کشاورز که اکثراً از کشورهای در حال توسعه بودند، محصولات تراریخته کشت کردند (James, 2014; Mathur et al., 2017; ISAAA, 2016, 2017, 2018).

جدول ۵ - سطح زیر کشت محصولات تراریخته از سال ۱۹۹۶ تا ۲۰۱۸

سال	مساحت (میلیون هکتار)
۱۹۹۶	۱/۷
۱۹۹۷	۱۱
۱۹۹۸	۲۷/۸
۱۹۹۹	۳۹/۹
۲۰۰۰	۴۴/۲
۲۰۰۱	۵۲/۶
۲۰۰۲	۵۸/۷
۲۰۰۳	۶۷/۷
۲۰۰۴	۸۱
۲۰۰۵	۹۰
۲۰۰۶	۱۰۲
۲۰۰۷	۱۱۴/۳
۲۰۰۸	۱۲۵
۲۰۰۹	۱۳۴
۲۰۱۰	۱۴۸
۲۰۱۱	۱۶۰
۲۰۱۲	۱۷۰/۳
۲۰۱۳	۱۷۵/۲
۲۰۱۴	۱۸۱/۵
۲۰۱۵	۱۷۹/۷
۲۰۱۶	۱۸۵/۱
۲۰۱۷	۱۸۹/۸
۲۰۱۸	۱۹۱/۷

بر اساس سطح زیر کشت هر محصول در کشورهایی که محصولات تراریخته کشت می‌کنند، سویا، پنبه، ذرت و کلزا چهار محصول عمومی تراریخته هستند (جدول ۶) (James, 2014; Mathur *et al.*, 2017; ISAAA, 2016, 2017, 2018). در سال ۲۰۱۸ سطح زیر کشت سویا در دنیا، ۱۲۴ میلیون هکتار بود که در حدود ۷۷ درصد آن، سویای تراریخته کشت شده بود. در سال ۲۰۱۸، از ۳۲ میلیون هکتار سطح زیر کشت پنبه در دنیا، ۲۴/۹ میلیون هکتار به کشت پنبه تراریخته اختصاص داشت. در این سال سطح زیر کشت ذرت در دنیا، ۱۹۳ میلیون هکتار بود که ۳۰ درصد آن، مربوط به ذرت تراریخته بود. در سال ۲۰۱۸ از ۳۷ میلیون هکتار کشت کلزا، ۱۰/۱ میلیون هکتار به کشت کلزای تراریخته اختصاص داشت (FAOSAT, 2018; ISAAA, 2018). با وجود مخالفت‌هایی در مورد کشت محصولات تراریخته در برخی کشورها، سطح زیر کشت این محصولات از زمان معرفی، به طور پیوسته در حال افزایش است. بنگلادش در سال ۲۰۱۴، با آزادسازی یک بادمجان تراریخته با Bt (به نام Bt brinjal)، روش اصلاح و تغییر ژنتیکی را به کار گرفت. اخیراً تولید تجاری محصولات تراریخته در اندونزی و ویتنام مجاز شده است (Mathur *et al.*, 2017).

جدول ۶ - تولید سویا، پنبه، کلزا و ذرت تراریخته در طی سال‌های ۲۰۰۷ تا ۲۰۱۸

سال	کل مساحت تولید (میلیون هکتار)			
	سویا	پنبه	کلزا	ذرت
۲۰۰۷	۵۸/۶	۱۵	۵/۵	۳۵/۲
۲۰۰۸	۶۵/۸	۱۵/۵	۵/۹	۳۷/۳
۲۰۰۹	۶۹/۲	۱۶/۱	۶/۴	۴۱/۷
۲۰۱۰	۷۳/۳	۲۱	۷	۴۶
۲۰۱۱	۷۵/۶	۲۴/۷	۸/۲	۵۱
۲۰۱۲	۸۰/۷	۲۴/۳	۹/۲	۵۵/۱
۲۰۱۳	۸۴/۵	۲۳/۸	۸/۱۶	۵۶/۶۴
۲۰۱۴	۹۱/۰۲	۲۵/۱۶	۹	۵۵/۲
۲۰۱۵	۹۲/۱	۲۴	۸/۵	۵۳/۶
۲۰۱۶	۹۱/۴	۲۲/۳	۸/۶	۶۰/۶
۲۰۱۷	۹۴/۱	۲۴/۱	۱۰/۲	۵۹/۷
۲۰۱۸	۹۵/۹	۲۴/۹	۱۰/۱	۵۸/۹

۱-۱- آمریکا: آمریکا همراه با فرانسه، در سال ۱۹۸۶ که توتون تراریخته مقاوم به علف‌کش‌ها تولید شد، پیشگام آزمایشات مزرعه‌ای مربوط به گیاهان تراریخته بودند (James and Krattiger, 1996). این کشور در کشف، توسعه و تجاری‌سازی محصولات تراریخته، پیشگام است. حمایت قاطع آمریکا از فناوری زیستی و تعهد سازمان غذا و داروی این کشور جهت قانونمند کردن محصولات تراریخته نشان‌دهنده این است که این کشور در پذیرش و به رسمیت شناختن اساس علمی این فناوری، پیشرو

است. در حال حاضر، آمریکا با سطح زیر کشت ۷۵ میلیون هکتار (۳۹ درصد مساحت محصولات تراریخته در دنیا)، تولیدکننده برتر محصولات تراریخته است. سطح زیر کشت چهار محصول تراریخته اصلی در آمریکا یعنی سویا، ذرت، پنبه و کلزا در سال ۲۰۱۸ به ترتیب ۳۴ میلیون هکتار، ۳۳ میلیون هکتار، ۵ میلیون هکتار و ۹۰۰۰۰۰ هکتار بوده است. درآمد حاصله از کشت محصولات تراریخته در آمریکا در طی سال‌های ۱۹۹۶ تا ۲۰۱۶، در حدود ۸۰/۳ میلیارد دلار بوده است. سیب‌زمینی پس از برنج، گندم و ذرت چهارمین ماده غذایی اصلی است. در سال ۲۰۱۵، سیب‌زمینی Innate™ توسط دولت آمریکا برای کشت تایید شد. این سیب‌زمینی مقدار آکریل‌آمید کم‌تری دارد، ضایعات آن پایین است، برای مدتی طولانی سفید باقی می‌ماند و در برابر کبودی و کوفتگی مقاوم است. آکریل‌آمید در صورت پخت در دمای بالا، خاصیت سرطان‌زایی دارد. در سال ۲۰۱۸، محصولات غذایی تراریخته شامل برنج چینی مقاوم به حشرات و برنج طلایی تایید شدند. همچنین نسل جدید پنبه مقاوم به علف‌کش، کلزا با اسید اولئیک بالا و پنبه با گوسپول (gossypol) پایین نیز از جنبه زیست محیطی مورد تایید قرار گرفتند (James, 2014; Mathur et al., 2017; ISAAA, 2018).

۱-۲- کانادا: در کانادا کاشت محصولات تراریخته برای اولین بار همراه با آمریکا در سال ۱۹۹۶ تایید شد. دولت کانادا، رویکرد "محصول نهایی، نه فرایند" را دنبال می‌کند و برای حفاظت از سلامت انسان و حیوانات و پایداری محیط زیست، به استفاده از ارزیابی‌های ایمنی مبتنی بر علم، متکی است. حدود ۸۵ درصد کلزای تراریخته در دنیا، در کانادا کشت می‌شود. چغندر قند، ذرت و سویا دیگر محصولات تراریخته اصلی در کانادا هستند. بر اساس قوانین کانادا، نیازی به برچسب زدن به محصولات تراریخته وارداتی نیست (Pesante, 2003; James, 2014; Macdonald, 2014). سطح زیر کشت شش محصول تراریخته در این کشور در سال ۲۰۱۸، ۱۲/۷۵ میلیون هکتار (معادل هفت درصد مساحت این محصولات در دنیا) بوده است که در مقایسه با سال ۲۰۱۷، کاهش سه درصدی را نشان می‌دهد. درآمد به دست آمده از کشت محصولات تراریخته در طی سال‌های ۱۹۹۶ تا ۲۰۱۶، در حدود هشت میلیارد دلار بوده است. در سال ۲۰۱۸، سطح زیر کشت محصولات تراریخته در کانادا شامل سویا با ۲/۴ میلیون هکتار، ذرت با ۱/۶ میلیون هکتار، کلزا با ۸/۷ میلیون هکتار، چغندر قند با ۱۵۰۰۰ هکتار، یونجه با ۴۰۰۰ هکتار و سیب‌زمینی با ۶۵ هکتار گزارش شده است. در سال ۲۰۱۸، سه رقم سیب تراریخته شامل Arctic® Golden Delicious، Arctic® Granny Smith و Arctic® Fuji برای برنامه‌های تجاری، تغذیه دام و انسان تایید شدند. همچنین نیشکر مقاوم به حشرات و برنج طلایی تراریخته نیز تاییدیه سلامت را دریافت کرده‌اند (ISAAA, 2018).

۱-۳- برزیل: از زمان پذیرش محصولات تراریخته، رشد اقتصادی برزیل در سال ۲۰۰۳ به ۱۱/۸ میلیارد دلار افزایش یافت و این رشد فقط در سال ۲۰۱۳، ۳/۴ میلیارد دلار بوده است (Brookes and Barfoot, 2015). درآمد به دست آمده از کشت محصولات تراریخته در طی سال‌های ۱۹۹۶ تا ۲۰۱۶، ۱۹/۸ میلیارد دلار

بوده است. برزیل با کاشت محصولات تراریخته در سطح ۵۱/۳ میلیون هکتار در سال ۲۰۱۸ (۲۷ درصد سطح زیر کشت این محصولات در دنیا)، بعد از آمریکا، در مقام دوم قرار گرفت. سویا، ذرت و پنبه سه محصول تراریخته مهم در برزیل هستند که سطح زیر کشت آن‌ها در سال ۲۰۱۸ به ترتیب ۳۵ میلیون هکتار، ۱۵ میلیون هکتار و یک میلیون هکتار بوده است. در سال ۲۰۱۸، برای اولین بار چغندر قند تراریخته در سطح ۴۰۰ هکتار در این کشور کشت شد. برزیل صادرکننده اصلی سویای تراریخته به چین است و در تلاش است تا صادرات ذرت تراریخته را افزایش دهد. محصولات دیگر مانند نیشکر مقاوم به حشرات برای تولید شکر و اتانل نیز در حال توسعه هستند. برنج، اکالیپتوس، گندم و مرکبات از محصولات تراریخته‌ای هستند که جهت کشت، در دست تولید هستند (James, 2013; Mathur et al., 2017; ISAAA, 2018).

۴-۱- آرژانتین: این کشور با کشت محصولات تراریخته در سال ۲۰۱۸ در سطح ۲۳/۹ میلیون هکتار (معادل ۱۲ درصد سطح زیر کشت این محصولات در سال ۲۰۱۸)، به مقام سوم جهان رسید. سطح زیر کشت محصولات تراریخته شامل سویا، ذرت و پنبه در سال ۲۰۱۸، به ترتیب ۱۸ میلیون هکتار، ذرت ۵/۵ میلیون هکتار و پنبه ۳۷۰۰۰۰ هکتار بوده است. خشک‌سالی شدید در ماه‌های اوج گرما در تابستان، سطح زیر کشت سویای تراریخته را در آرژانتین کاهش داد و در نتیجه برای اولین بار، سویا از آمریکا وارد این کشور شد. در سال ۲۰۱۵، یک رقم سویا با چندین صفت تراریخته به نام Intacta™ به کشاورزان معرفی و در سطح ۷۰۰۰۰ هکتار کشت گردید و علاوه بر کاهش هزینه‌ها، درآمد کشاورزان نیز افزایش یافت. پس از تصویب قانون در سال‌های گذشته، دولت آرژانتین در سال ۲۰۱۸ از طریق کمیته مشورتی ملی آرژانتین در فناوری زیستی کشاورزی، استفاده از هشت محصول تراریخته شامل چهار رقم ذرت با صفات مقاومت به حشرات و متحمل به علف‌کش، دو رقم سویای متحمل به علف‌کش، یک رقم یونجه و کلزا برای غذا، علوفه و فراوری را تایید کرد (ISAAA, 2018). آرژانتین یکی از صادرکنندگان اصلی محصولات تراریخته یعنی سویا، پنبه و ذرت است. این کشور یکی از کشورهای پیشگام است که محصولات تراریخته را در سال ۱۹۹۶ کشت داد. سود به دست آمده از کشت محصولات تراریخته در طی ۲۱ سال کشت این محصولات (از ۱۹۹۶ تا ۲۰۱۶)، حدود ۲۳/۷ میلیارد دلار تخمین زده شده است (ISAAA, 2017).

۵-۱- اروپا: اتحادیه اروپا، ۸۶ گیاه زراعی تراریخته را تایید کرده است که در بین آن‌ها پنبه، ذرت، کلزا، سویا و چغندر قند جهت مصرف غذایی، به ثبت رسیده‌اند. دو نوع ذرت و همچنین سیب‌زمینی تراریخته به نام BASF's Amflora™ (دارای نشاسته آمیلوپکتین‌دار) به دلیل مقاومت جامعه و عدم پایداری شرکت به مراحل اخذ مجوز، کنار گذاشته شده‌اند. در ابتدای سال ۲۰۱۸، ورود شش محصول تراریخته شامل چهار رقم سویا، یک رقم کلزا و ذرت جهت غذا و علوفه به اتحادیه اروپا تصویب شد. تنها محصول تراریخته که در اتحادیه اروپا توسط کشورهای اسپانیا و پرتغال کشت می‌شود، ذرت مقاوم به حشرات است. به علت آلودگی مزارع ذرت به ساقه‌خوار اروپایی، این دو کشور اقدام به کشت ذرت

تراریخته کردند. کل مساحت کشت محصولات تراریخته در اتحادیه اروپا در سال ۲۰۱۸، ۱۲۰۹۹۰ هکتار بوده است که در مقایسه با سال ۲۰۱۷، کاهش هشت درصدی نشان می‌دهد. در سال ۲۰۱۵، اتحادیه اروپا قانونی تصویب کرد و به اعضا خود اجازه داد تا در مورد کشت یا ممنوعیت محصولات تراریخته تصمیم‌گیری کنند (James, 2014; Mathur et al., 2017; ISAAA, 2018). مدتی است که لهستان کشت محصولات تراریخته را کنار گذاشته است. در حال حاضر، اتریش و یونان به شدت به استفاده از محصولات تراریخته مخالف هستند. دولت و مردم فنلاند با ایده کشت محصولات تراریخته موافق هستند. با این حال، به دلیل شرایط اقلیمی، هیچ‌گونه محصول تراریخته تجاری در این کشور کشت نمی‌شود. دولت آلمان، علیرغم مخالفت مردم، با کشت محصولات تراریخته موافق است زیرا اعتقاد دارد که این امر برای رشد اقتصادی مهم است. در سال ۲۰۰۴، کشت ذرت تراریخته در آلمان شروع شد اما در اواخر سال ۲۰۰۸، متوقف گردید. اگرچه در هلند مقبولیت عمومی برای کشت محصولات تراریخته بیش‌تر از دیگر کشورهای اروپایی است، اما به دلیل نقش فعال مخالفان، این محصولات تجاری نشده‌اند (Mathur et al., 2017; ISAAA, 2017). اسپانیا طولانی‌ترین تجربه را در کشت محصولات تراریخته دارد. ذرت از سال ۱۹۹۸ در اسپانیا، تجاری شد. سطح زیر کشت ذرت Bt در اسپانیا در سال ۲۰۱۸، حدود ۱۱۵۲۴۶ هکتار گزارش شده است. به همین دلیل این کشور توسط سرویس بین‌المللی دستیابی به برنامه‌های کاربردی فناوری زیستی کشاورزی (International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Applications; ISAAA)، به عنوان کشور بزرگ فناوری زیستی (biotech me-ga-country) نامیده شده است. بیش‌ترین مطالعه جهانی بر روی محصولات تراریخته توسط انگلیس انجام شده است اما به دلیل مقاومت مصرف‌کننده و تاثیر قوانین اتحادیه اروپا، تجارت محصولات تراریخته توسط دولت مهار شده است (Jacqui et al., 2013; Mathur et al., 2017; ISAAA, 2018). سطح زیر کشت محصولات تراریخته در پرتغال در سال ۲۰۱۸، ۵۷۳۳ هکتار گزارش شده است که در مقایسه با سال ۲۰۱۷، کاهش ۲۰ درصدی نشان می‌دهد (ISAAA, 2017, 2018).

۱-۶- آفریقا: محصولات تراریخته فقط در سه کشور آفریقایی یعنی آفریقای جنوبی، سودان و بورکینافاسو به صورت تجاری کشت می‌شوند. با این حال، صنعت فناوری زیستی و همچنین برنامه‌های کشت محصولات تراریخته در آفریقا از پتانسیل قوی برخوردار است چون فاکتورهای محیطی مانند گرما، خشکی، خاک‌های ضعیف و سیلاب، همراه با منابع آب ناکافی و دیگر فشارهای اقتصادی و اجتماعی، مشکل کمبود مواد غذایی در آفریقا را تشدید کرده است (Eicher et al., 2006; Mathur et al., 2017). با توجه به افزایش آگاهی عمومی و داشتن چارچوب‌های نظارتی بر روی ایمنی زیستی و ساختار کافی در زمینه تحقیق و توسعه فناوری زیستی مدرن، آفریقا جنوبی تنها کشوری است که کشت محصولات تراریخته را تصویب کرده است. ذرت، سویا و پنبه سه محصول تراریخته اصلی این کشور هستند که تجاری شده‌اند. این قاره در سال ۲۰۱۸ با کشت ۲/۷ میلیون هکتار محصولات تراریخته

در کشور آفریقای جنوبی، رشد چشمگیری را به ثبت رساند. علاوه بر این، تایید نخود (cowpea) برای اولین بار در دنیا توسط کشور نیجریه صورت گرفت (ISAAA, 2018). اگرچه محصولات تراریخته در آمریکا و کانادا اساسا برای تغذیه حیوانات و سوخت‌های زیستی استفاده می‌شوند، اما ۸۰ درصد کل ذرت سفید که یک جزء اصلی رژیم غذایی افراد در آفریقای جنوبی است، به ذرت تراریخته اختصاص دارد. آفریقای جنوبی اولین کشوری بود که در سال ۱۹۹۸، کشت اولین پنبه Bt را تصویب کرد. کشت محصولات تراریخته در آفریقای جنوبی در طی سال‌های ۱۹۹۸ تا ۲۰۱۳، منجر به سود اقتصادی ۱۱۵۳ میلیون دلاری شد و این سود تنها در سال ۲۰۱۳، ۳۱۳ میلیون دلار بود (Brookes and Barfoot, 2014). اولین کشور در غرب آفریقا که تولید تجاری محصولات تراریخته را آغاز کرد، بورکینافاسو بود. در این کشور، به دلیل یک صعود بزرگ در تولید ملی پس از معرفی پنبه تراریخته در سال ۲۰۰۸، از آن به عنوان یک داستان موفق فناوری زیستی یاد شده است. به منظور تقویت کشت پنبه تراریخته در بورکینافاسو، در سال ۲۰۱۴ انجمن زنان کشاورز تشکیل شد. سود تقریبی این کشور از کشت محصولات تراریخته در طی سال‌های ۲۰۰۸ تا ۲۰۱۳، ۱۳۷ میلیون دلار بود که این سود تنها در سال ۲۰۱۳، به ۳۷ میلیون دلار رسید. سازمان‌های غیردولتی محلی ادعا می‌کنند که کشت پنبه تراریخته توسط کشاورزان در سطح کوچک، منجر به کاهش محصول و سود آن‌ها می‌شود. در نتیجه کاهش کشت پنبه تراریخته در آفریقای جنوبی و بورکینافاسو، اتیوپی مجبور به برنامه‌ریزی برای کشت تجاری پنبه تراریخته شده است. در سال ۲۰۱۶، کشت پنبه Bt در بورکینافاسو به حالت تعلیق درآمد (Zacune, 2011; James, 2014; Waithaka et al., 2015; ISAAA, 2017)). در سودان در سال ۲۰۱۸، پنبه تراریخته برای هشتمین سال به طور تجاری کشت شد. سطح زیر کشت پنبه تراریخته در سودان در سال‌های ۲۰۱۷ و ۲۰۱۸، به ترتیب ۱۹۲۰۰۰ و ۲۴۳۰۰۰ هکتار بود (ISAAA, 2017, 2018). در سال ۲۰۱۲ در سودان، درست یک سال پس از شروع کشت تجاری پنبه تراریخته، هزینه تولید پنبه تا ۳۷ درصد کاهش یافت. در نتیجه کشاورزانی که پنبه تراریخته کاشتند در مقایسه با کشاورزانی که پنبه معمولی کشت کردند، در هکتار ۴۰۰ دلار سود بردند. یکی دیگر از مزایای کشت پنبه تراریخته در سودان، کاهش کرم قوزه پنبه بود و در نتیجه بدون برهم‌خوردن تعادل محیط زیست، بهره‌وری پنبه افزایش یافت (James, 2014). کشورهای آفریقایی که محصولا تراریخته کشت می‌کنند قصد دارند تا به منظور یافتن راه حل‌های بهتر و احتمالا رویکردهای موفق‌تر، دانش محلی خود را با تحقیقات موجود و در حال پیشرفت ترکیب کنند. در زمینه افزودن مواد مغذی و ریزمغذی‌های ضروری به محصولات کشاورزی اصلی مانند موز، کاساوا و سیب‌زمینی شیرین، تحقیقات فعالی برای بازارهای آفریقا در حال انجام است. در سال ۲۰۱۳، برای بهبود میزان ویتامین A در کاساوا تراریخته، آزمایشاتی در مزارع نیجریه اجرا شد (ISAAA, 2013; Mathur et al., 2017). کشورهای کامرون، اوگاندا، مالاوی، نیجریه، غنا و اتیوپی در حال هماهنگی برای اجرای آزمایشات مزرعه‌ای هستند و ممکن است به زودی، علیرغم

خشم عمومی، این مسیر را ادامه دهند. اگرچه مشاغل تاثیرگذار و ارگان‌های مربوطه در حال لابی‌گری برای رفع موانع هستند، اما فناوری محصولات تراریخته در آفریقا هنوز از توافق مثبتی برخوردار نیست. در کشورهایی مانند آنگولا، اتیوپی، لسوتو، ماداگاسکار، مالاوی، موزامبیک، سوازیلند، زامبیا و زیمبابوه تا حدودی کشت تجاری محصولات تراریخته ممنوع شده است، با این حال این کشورها جهت پذیرش این محصولات، با فشار بیش‌تری روبه‌رو هستند (Mathur et al., 2017). از سال ۲۰۰۲، محصولات تراریخته به صورت کمک غذایی برای آفریقا عرضه می‌شود. با این حال، به دلیل وجود ابهاماتی در ارتباط با تاثیرات احتمالی محصولات تراریخته در بلندمدت، چندین کشور نسبت به استفاده از آن‌ها به عنوان کمک غذایی ابراز نگرانی کرده‌اند. بسیاری از کشورها در جنوب آفریقا به دلیل تاثیرات احتمالی محصولات تراریخته بر سلامت انسان و محیط زیست، خصوصی‌سازی بازار و همچنین مسائل اخلاقی و حقوقی، این محصولات را رد کرده‌اند. مبارزات جهانی بر علیه مواد غذایی محصولات تراریخته، بر نظر مردم آفریقا تاثیر گذاشته است. فدراسیون بین‌المللی مصرف‌کننده که در سال ۱۹۶۰ برای حمایت از حقوق مصرف‌کننده تشکیل شده است، نقش مهمی در تشکیل یک رویکرد جهانی در مورد مواد غذایی تراریخته در بین کشورهای آفریقایی داشته است. با توجه به این رویکرد، تمام مواد غذایی تراریخته ممکن است مورد آزمایش ایمنی دقیق و مستقل قرار گرفته، و به برچسب‌گذاری و قابلیت ردیابی نیاز داشته باشند و همچنین تولیدکننده مسئول هرگونه آسیب به سلامت و محیط خواهد بود (Zerbe, 2004; Bodulovic, 2005; Mathur et al., 2017).

۷-۱- آسیا-اقیانوسیه: آسیا مهم‌ترین نقش کلیدی و مؤثر در تعیین آینده تولید محصولات تراریخته دارد چون در مقایسه با دیگر قاره‌ها، بیش‌ترین جمعیت و بیش‌ترین تعداد کشاورز را دارد. اگرچه حدود ۴۵ کشور آسیایی در حال اجرای تحقیقات بر روی محصولات تراریخته هستند، اما به دلیل وجود دلهره‌هایی، فقط در ۱۸ کشور این محصولات به طور تجاری کشت می‌شوند. یکی از مهم‌ترین مشکلات در آسیا و اقیانوسیه، تاخیر در تایید آزمایشات و محصولات تراریخته جدید در چین، ویتنام و فیلیپین است. استرالیا، چین، اندونزی، فیلیپین و هند کشورهای برجسته در تولید محصولات تراریخته هستند. در هند، میانمار، چین و پاکستان، پنبه تراریخته مقاوم به حشرات و در فیلیپین ذرت تراریخته کشت می‌شود. بنگلادش در سال ۲۰۱۴، با تایید کشت تجاری بادمجان تراریخته (به نام brinjal)، بیست‌وهشتمین کشوری شد که فناوری محصولات تراریخته را تایید کرد (James, 2014; Mathur et al., 2017; IASSS, 2018). هند و چین، قوی‌ترین حامیان محصولات تراریخته و تحقیقات فناوری زیستی هستند. دولت هند در معرفی غذاهای غنی شده (bio-fortified) از قبیل بادام زمینی و خردل تمایل زیادی نشان داد. با این حال از زمان پذیرش محصولات تراریخته در هند، بحث در مورد این محصولات با واکنش‌های مختلفی روبه‌رو بوده است. هند در سال ۲۰۱۸، با سطح زیر کشت ۱۱/۶ میلیون هکتار پنبه تراریخته، بزرگ‌ترین کشور تولیدکننده محصولات تراریخته

در آسیا و اقیانوسیه بوده و بیش‌ترین سطح زیر کشت پنبه در دنیا را دارد که حدود ۴۶ درصد آن به کشت پنبه Bt اختصاص دارد. بین سال‌های ۲۰۱۸ و ۲۰۱۹، کشت پنبه Bt در هند توسط بیش از شش میلیون کشاورز به ۱۱/۶ میلیون هکتار رسید که در مقایسه با سال ۲۰۱۷-۲۰۱۸، افزایشی در حدود ۲۰۰۰۰۰ هکتار نشان می‌دهد (James, 2013; Mathur *et al.*, 2017; ISAAA, 2018). در نتیجه، تجاری‌سازی محصولات تجاری، ۲۳۰ برابر افزایش یافت. کشت محصولات تراریخته در هند در طی سال‌های ۱۹۹۶ تا ۲۰۱۶، درآمد کشاورزان را تا ۲۱/۱ میلیارد دلار افزایش داد (IASSS, 2018). کمیته ارزیابی مهندسی ژنتیک (Genetic Engineering Appraisal Committee; GEAC) در هند در سال ۲۰۱۴، برای آزمایش مزرعه‌ای نخود Bt، بادمجان Bt، خردل تراریخته و برنج با کارایی استفاده از ازت (nitrogen use efficiency; NUE)، مجوز صادر کرد (James, 2014). چین نه تنها در سال ۲۰۰۴، مجور ورود محصولات تراریخته از آمریکا را صادر کرد، بلکه در حال حاضر تقریباً ۱۱۲ میلیون دلار در زمینه تحقیقات فناوری زیستی، سرمایه‌گذاری کرده است که در این زمینه پس از آمریکا در مقام دوم است. برنج، سیب‌زمینی، ذرت و گوجه‌فرنگی از محصولات تراریخته‌ای هستند که توسط چین تولید شده و مورد آزمایش قرار گرفته‌اند (Huang *et al.*, 2002a, b; Huang *et al.*, 1999). دولت چین مقررات سخت‌گیرانه‌ای وضع کرده است که در آن اگرچه کشت برخی محصولات تراریخته مانند پنبه ترویج شده و سویا وارد شده، اما تجارت محصولات تراریخته‌ای مانند برنج و گندم در بازار آزاد ممنوع شده است (Paarlberg, 2002). اگرچه چین یکی از بزرگ‌ترین تولیدکنندگان برنج در دنیاست، اما به دنبال اعتراضات عمومی و وجود نگرانی‌ها در ارتباط با تأثیرات منفی برنج طلایی، این برنج به طور تجاری تولید نشده است. به علاوه، دولت چین در سال ۲۰۱۴، به دلیل افزایش نگرانی‌های عمومی، از تمدید مجورهای ایمنی زیستی در مورد ذرت و برنج تراریخته خودداری کرده است (Qiu, 2012; Mathur *et al.*, 2017). در سال ۲۰۱۴، سطح زیر کشت پنبه تراریخته و پایایی مقاوم به ویروس در چین به ترتیب در حدود ۳/۹ میلیون هکتار و ۸۰۰۰ هکتار بود. این کشور در سال ۲۰۱۸ با سطح زیر کشت ۲/۹ میلیون هکتار پنبه و پایایی تراریخته، بعد از هند، در مقاوم دوم آسیا و اقیانوسیه قرار گرفت. تخمین زده شده است که حدود ۷/۱ میلیون کشاورز، پنبه تراریخته کشت کردند. گزارش شد که سطح زیر کشت صنوبر تراریخته در چین در سال ۲۰۱۴، ۵۴۳ هکتار بوده است. سود اقتصادی به دست آمده از کشت محصولات تراریخته در طی سال‌های ۱۹۹۶ تا ۲۰۱۶ در چین، ۱۹/۶ میلیارد دلار بوده است (James, 2014; ISAAA, 2018). در تایلند، به مدت ۲۰ سال بر روی محصولات تراریخته مانند برنج، پایا و ذرت تحقیقات انجام شده است، ولی برای تولید تجاری این محصولات مجوز صادر نشده است. پس از سه سال ممنوعیت، سرانجام دولت تایلند به دنبال اعتراضات گسترده، فعالیت آزمایشات مزرعه‌ای محصولات تراریخته را به حالت تعلیق درآورد. با این حال، همچنان انتظار می‌رود که برای محصولات تراریخته در تایلند، مجوز صادر شود (Cohen, 2005; Davidson, 2008).

(Lowe, 2013). فیلیپین از اولین کشورهای آسیایی بود که از تجاری سازی محصولات تراریخته دفاع کرد و در سال ۲۰۰۴، تنها حدود ۰/۱ میلیون هکتار به کشت محصولات تراریخته اختصاص داد. کشت ذرت و پنبه تراریخته در این کشور تجاری شده است (Brookes and Barfoot, 2014). فیلیپین یکی از ۱۴ کشوری است که توسط سرویس بین المللی دستیابی به برنامه های کاربردی فناوری زیستی کشاورزی (ISAAA)، به عنوان کشورهای بزرگ در فناوری زیستی نام گذاری شده است. دولت فیلیپین به منظور محافظت از یکپارچگی و ساختار اکوسیستم، فناوری زیستی و استفاده از آن را تقویت می کند. فیلیپین در حال اجرای آزمایشاتی برای کشت برنج طلایی است، اما علیرغم داشتن مزایایی مانند مقابله با کمبود ویتامین A، به دلیل آگاهی محدود مردم، هنوز کشت آن تجاری نشده است (Ludlow and Yorobe, 2014). از طرفی دیگر، سطح زیر کشت ذرت تراریخته در این کشور در سال ۲۰۱۸ به ۶۳۰۰۰۰ هکتار رسید که در مقایسه با سال ۲۰۱۷، حدود ۱/۸ درصد کاهش نشان می دهد. از سال ۲۰۰۲، حدود ۸۸ محصول تراریخته از جمله چغندر قند، سویا، برنج، سیب زمینی، ذرت، پنبه، کلزا و یونجه توسط دولت فیلیپین جهت استفاده غذایی و علوفه تایید شده اند (James, 2014, IASSS, 2018). اندونزی تا حدود زیادی از محصولات تراریخته حمایت می کند، با این حال، در طی کشت و تجاری سازی این محصولات در این کشور، چندین موانع وجود دارد و با این وجود، هنوز تحقیقات در حال انجام است (Cohen and Paarlberg, 2002; Cohen, 2005). ژاپن به عنوان بزرگ ترین واردکننده مواد غذایی در دنیا، پتانسیل بزرگی برای محصولات تراریخته دارد. با این حال، بررسی های انجام شده در طی سال های ۱۹۹۱ تا ۲۰۰۰ در این کشور نشان داد که نگرانی ها در مورد محصولات تراریخته و خشم عمومی افزایش یافته است و این باعث توقف آزمایشات مربوط به برنج تراریخته شد. علاوه بر این، در سال ۲۰۰۶ واردات برنج از کشورهایی که برنج تراریخته کشت می کردند، ممنوع گردید. تصمیم دولت ژاپن برای واردات فقط محصولات غیر تراریخته، بسیاری از کشورها را تحت تاثیر قرار داده است تا از ترس از دست دادن بازار بزرگ صادرات، گزینه عاری از محصولات تراریخته را در نظر بگیرند (Macer and Ng, 2000; Paarlberg, 2002; Vermif, 2006). بسیاری از کشورهای آسیایی نگران از دست دادن صادرات به کشورهای بدون محصولات تراریخته هستند، اگر کشت محصولات تراریخته داشته باشند. این کشورها، با سه گزینه روبه رو هستند:

◀ پیش بردن روند تولید تجاری

◀ عدم صدور مجوز برای تولید تجاری وسیع

◀ کشت هر دو نوع محصول (تراریخته و غیر تراریخته) و فروش آن ها با قیمت های مختلف

۲- کشورهای واردکننده محصولات تراریخته: در دنیا، کشورهایی وجود دارند که با وارد کردن محصولات تراریخته جهت غذا، علوفه و فراوری، این محصولات را تایید کرده و پذیرفته اند. کشورها از زمان آغاز تجاری سازی محصولات تراریخته در سال ۱۹۹۶، به منظور تسهیل در ورود این محصولات از

منابع خارجی، قوانین ایمنی زیستی را تصویب کرده‌اند. به منظور ردیابی محصولات تراریخته غیرمجاز در کشور، آزمایشگاه‌هایی آماده و تجهیز شده‌اند. تصویب محصولات تراریخته هرگز در سطح جهان هماهنگ نشده است چون هر کشور بر اساس نیاز و اولویت‌های خود، محصولات تراریخته جدید را تصویب می‌کند. این امر، تجارت را مختل نموده و یک ضرر بزرگ برای کشاورزان در کشور مبدا می‌باشد. به منظور همگام‌سازی مؤثر مصوبات به نفع کشاورزان، مصرف‌کنندگان و توسعه‌دهندگان فناوری، باید تدابیری اندیشید. از سال ۱۹۹۶، تعداد ۴۳ کشور که محصولات تراریخته کشت نمی‌کنند، واردات این محصولات را برای غذا، علوفه و فراوری تصویب کرده‌اند (جدول ۷). بیش‌ترین مجوز واردات به ترتیب به ذرت (۱۴ کشور)، سویا (۱۰ کشور)، پنبه (هشت کشور) و کلزا (هفت کشور) داده شده است. در سال ۲۰۱۷، مجوز ورود رقم‌های جدید از این محصولات و یک رقم سیب‌زمینی تراریخته با صفات مقاوم به بادزدگی، کبودی، قهوه‌ای شدن و با آکرل امید پایین توسط ۳۳ کشور صادر شد (ISAAA, 2016, 2017). به طور کلی در سال ۲۰۱۸، ۷۰ کشور رسماً محصولات تراریخته را برای غذا، علوفه و کشت تجاری پذیرفته‌اند. در سال ۲۰۱۸، تعداد مجوزهای داده شده توسط مقام‌های نظارتی این ۷۰ کشور، به ۴۳۴۹ مجوز رسیده است (جدول ۸). این مجوزها به ۳۸۷ رقم تراریخته از ۲۷ محصول تراریخته، به جز میخک، رز و اطلسی داده شده است. از این مجوزها، تعداد ۲۰۶۳ مجوز برای غذا (برای استفاده یا فراوری)، ۱۴۶۱ مجوز برای علوفه (برای استفاده یا فراوری) و ۸۲۵ مجوز برای کشت بوده است. در سال ۲۰۱۸، بیش‌ترین ارقام تصویب شده مربوط به ذرت (۱۳۷ رقم در ۳۵ کشور) بود و پنبه (۶۳ رقم در ۲۷ کشور)، سیب‌زمینی (۴۹ رقم در ۱۳ کشور)، سویا (۳۸ رقم در ۳۱ کشور) و کلزا (۳۷ رقم در ۱۵ کشور) در رتبه‌های بعدی قرار گرفتند. بیش‌ترین تعداد مجوز به ذرت متحمل به علف‌کش (NK603) داده شده است. سویای متحمل به علف‌کش (GTS-40-3-2)، ذرت مقاوم به حشرات (MON810)، ذرت متحمل به علف‌کش و مقاوم به حشره (Bt11)، ذرت متحمل به علف‌کش و مقاوم به حشره (TC1507)، ذرت مقاوم به حشرات (MON89034)، ذرت متحمل به علف‌کش (GA21)، سویای متحمل به علف‌کش (MON89788)، سویای متحمل به علف‌کش (A2704-12)، ذرت متحمل به علف‌کش و مقاوم به حشره (MON88017)، پنبه مقاوم به حشرات (MON531)، ذرت مقاوم به حشرات (MIR162) و ذرت متحمل به علف‌کش (T25) در رتبه‌های بعدی قرار دارند (ISAAA, 2018).

جدول ۷ - کشورهای غیر کشت کننده محصولات تراریخته که از سال ۱۹۹۶ تا ۲۰۱۷ مجوز واردات برای غذا، علوفه و فراوری صادر

کرده‌اند (ISAAA, 2017)

ردیف	کشور	محصولات تایید شده برای واردات	
		۲۰۱۷	۱۹۹۶ - ۲۰۱۶
۱	بورکینافاسو	-	پنبه
۲	کوبا	-	ذرت
۳	مصر	-	ذرت
۴	اندونزی	-	ذرت، سویا و نیشکر
۵	ایران	-	برنج، سویا و کلزا
۶	ژاپن	ذرت	یونجه، سویا، میخک، کلزا، پنبه، ذرت، پاپایا، سیبزمینی، برنج، رز و چغندر قند
۷	مالزی	پنبه، ذرت و سویا	کلزا، میخک، پنبه، ذرت، سیبزمینی و سویا
۸	نیوزیلند	کلزا و سیبزمینی	یونجه، کلزا، پنبه، ذرت، سیبزمینی، برنج، چغندر قند و گندم
۹	نروژ	-	میخک
۱۰	پاناما	-	ذرت
۱۱	روسیه	-	ذرت، سیبزمینی، برنج، سویا و چغندر قند
۱۲	سنگاپور	-	یونجه، کلزا، پنبه، ذرت، سویا و چغندر قند
۱۳	کره جنوبی	کلزا، پنبه، ذرت و سویا	یونجه، کلزا، پنبه و ذرت
۱۴	سوئیس	-	ذرت و سویا
۱۵	تایوان	کلزا، پنبه، ذرت و سویا	کلزا، پنبه، ذرت، سویا و چغندر قند
۱۶	تایلند	-	ذرت و سویا
۱۷	ترکیه	ذرت و سویا	-
۱۸	۲۶ کشور اتحادیه اروپا	کلزا، پنبه، ذرت و سویا	کلزا، میخک، پنبه، ذرت، سیبزمینی، سویا و چغندر قند

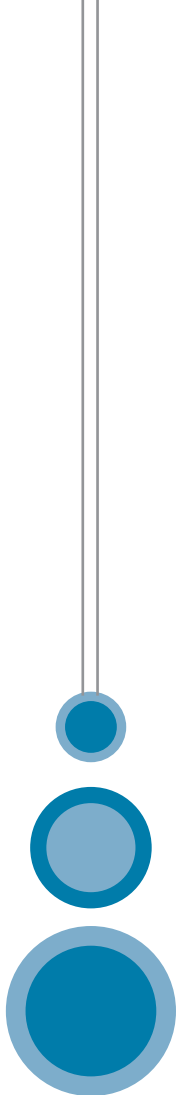
جدول ۸ - ده کشور برتر که مجوز غذا، علوفه، فراوری و کشت صادر کرده‌اند (ISAAA, ۲۰۱۸)

رتبه	کشور	تعداد مجوزها		
		غذا	علوفه	کشت
۱	آمریکا	۱۹۰	۱۸۰	۱۷۴
۲	ژاپن	۱۸۵	۱۷۷	۱۳۰
۳	کانادا	۱۴۷	۱۳۸	۱۴۴
۴	کره جنوبی	۱۵۶	۱۴۸	۰
۵	برزیل	۸۹	۸۹	۸۵
۶	مکزیک	۱۸۸	۲۹	۱۵
۷	آرژانتین	۷۶	۶۸	۷۴
۸	فیلیپین	۱۰۳	۱۰۲	۱۳
۹	اتحادیه اروپا	۹۹	۱۰۰	۳
۱۰	استرالیا	۱۱۸	۱۹	۳۹
۱۱	سایر کشورها	۷۱۲	۴۱۱	۱۴۸
	مجموع	۲۰۶۳	۱۴۶۱	۸۲۵

ایران: ایران با ۸۰ میلیون جمعیت، اراضی محدودی برای تولید محصولات کشاورزی در یک محیط خشک دارد و این با منابع محدود آب تشدید می‌شود. این امر به خصوص برای برنج که تحت تاثیر تنش‌های غیرزنده مانند خشکی و شوری و تنش‌های زنده مانند آفات و بیماری‌ها بهره‌وری آن محدود می‌شود، حائز اهمیت است (James, 2005). سطح زیر کشت برنج در ایران سال ۲۰۱۸ بر اساس آمار فائو، ۵۸۰۰۰۰ هکتار با تولید کل ۱۹۹۰۰۰۰ تن گزارش شده است (FAO, 2018). ایران همراه با اندونزی، بنگلادش و برزیل یکی از چهار کشور اصلی واردکننده برنج در دنیاست که سالانه در حدود یک میلیون تن یا بیش‌تر، برنج وارد می‌کند. پژوهشگاه بیوتکنولوژی ایران در کرج یک رقم برنج مقاوم به کرم ساقه‌خوار (برنج Bt) تولید کرد که به طور رسمی در سال ۲۰۰۴ در سطح ۴۰۰۰ هکتار کشت شد. در این سال و هم‌زمان با سال بین‌المللی برنج و با حضور معاون اول رئیس‌جمهور وقت، برای اولین بار برنج تراریخته در ایران برداشت شد. برنج تراریخته (Bt) در یک برنامه اصلاح نباتات تولید شد و به منظور رعایت مقررات ملی محصولات تراریخته، این برنج در طی سال‌های ۱۹۹۹ تا ۲۰۰۴ در آزمایشات گلخانه‌ای و مزرعه‌ای مورد آزمایش قرار گرفت. یک ژن مصنوعی به نام Cry1Ab وارد ژنوم یک رقم برنج معطر محلی با کیفیت بالا به نام طارم مولایی گردید و باعث ایجاد مقاومت در برابر کرم ساقه‌خوار، به خصوص کرم ساقه‌خوار نواری برنج، که مهم‌ترین آفت اقتصادی برنج در ایران است، شد. در سال ۲۰۰۴ در ایران، در حدود ۴۰۰۰ هکتار توسط صدها کشاورز، برنج Bt کشت گردید (James, 2005). چند روز پس از برگزاری مراسم برداشت برنج تراریخته در ایران در سال ۲۰۰۴ (۱۳۸۳)، سازمان حفاظت محیط زیست اعلام کرد به دلیل تولید بدون مجوز و بدون قرنطینه برنج تراریخته در مزرعه توسط مؤسسه بیوتکنولوژی کشاورزی، تولید این برنج باید هرچه سریع‌تر متوقف شود. رئیس وقت سازمان حفاظت محیط زیست اعلام کرد که مجریان طرح تولید برنج تراریخته، هرگونه ارزیابی زیست‌محیطی و بررسی آثار سوء کوتاه و بلندمدت این محصول را انجام نداده‌اند. با وجود این مخالفت‌ها، وزارت جهاد کشاورزی در آن هنگام علاوه بر تاکید بر سلامت و ایمنی کامل برنج تراریخته، ضرورت کشت انبوه این محصول با رعایت کامل جنبه‌های ایمنی را با اهمیت دانست. در سال ۱۳۸۳، برای روشن شدن مسئله و آگاه‌سازی مسئولان و دست‌اندرکاران فن‌آوری زیستی و نیز عموم جامعه، یک کارگروه تخصصی تشکیل شد و مسئله به صورت دقیق و تخصصی مورد ارزیابی قرار گرفت. این کارگروه در سال ۱۳۸۴ در گزارش خود ضمن تایید مقاومت کامل برنج تولیدی در برابر کرم ساقه‌خوار، تاکید کرد که برنج تراریخته طارم مولایی مشابهت عمده‌ای با برنج طارم مولایی (والد غیر تراریخته) دارد و شواهدی مبنی بر اثبات نگرانی احتمالی برای رهاسازی آن به دست نیامده است. از سوی دیگر ژن انتقال یافته به این برنج، در گیاهان تراریخته دارای مجوز رهاسازی و کشت شده در سطوح چند میلیون هکتار در دنیا، مورد استفاده قرار می‌گیرد و اثرات بهداشتی و غذایی آن و فرآورده پروتئینی حاصل، مشخص شده و در مجموع، توافق عمومی جهان بر اثبات شدن هیچ اثر

سوئی برای این پروتئین است. در سال ۱۳۸۴ به دلیل مخالفت رئیس جدید سازمان حفاظت محیط زیست و وزیر و معاونین جدید وزارت جهاد کشاورزی در دولت جدید، علاوه بر متوقف شدن رسمی کشت برنج تراریخته در ایران، سایر فعالیت‌ها در تولید محصولات تراریخته نیز که تا آستانه کشت مزرعه‌ای چندین گونه تراریخته از محصولات استراتژیک زراعی در کشور پیش رفته بود، در مرحله تحقیقاتی و آزمایشگاهی متوقف گردید (قره‌یاضی، ۱۳۸۶). ایران از سال ۲۰۰۶ از لیست کشورهای دارای محصولات تراریخته که همه ساله توسط سرویس بین‌المللی دستیابی به برنامه‌های کاربردی فناوری زیستی کشاورزی (ISAAA) منتشر می‌شود، خارج گردید. با توجه به گزارشات منتشر شده توسط این سرویس، ایران تنها در سال ۲۰۰۴ کشت محصولات تراریخته (فقط برنج Bt) داشته و بنابراین همراه با سه کشور اروپایی یعنی پرتغال، جمهوری چک و فرانسه به عنوان کشورهای جدید تولیدکننده تجاری محصولات تراریخته، در لیست ارائه شده در سال ۲۰۰۵ توسط این سرویس، قرار گرفتند (James, 2005, 2007). برنامه برنج تراریخته در ایران بسیار پیشرفته است و این تنها یکی از چندین برنامه محصولات تراریخته در ۲۳ موسسه تحقیقاتی در ایران است. در این موسسات، محققین بر روی چندین محصول تراریخته شامل پنبه مقاوم به حشرات (Bt)، کلزای متحمل به علف‌کش و چغندر قند مقاوم به ویروس در حال مطالعه هستند (James, 2007). محققان پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران به ارقام متنوع گیاهی حاصل از حدود ۱۴۷ رخداد تراریخته دست یافته‌اند که بیش‌ترین این رخدادها مربوط به برنج، سیب زمینی و کلزا است و علاوه بر آن هفت رخداد مختلف گلرنگ تراریخته نیز در مرحله تحقیقات گلخانه‌ای و چهار رقم دیگر در مرحله تحقیقات آزمایشگاهی قرار دارند. رییس این پژوهشگاه ابراز امیدواری کرد که سیب زمینی تراریخته در اوایل سال آینده، آماده اخذ مجوز تایید شود (روابط عمومی پژوهشگاه بیوتکنولوژی ایران، ۱۳۹۸). بر اساس گزارش سرویس بین‌المللی دستیابی به برنامه‌های کاربردی فناوری زیستی کشاورزی، ایران در سال ۲۰۱۶، به عنوان یک کشور غیر تولیدکننده محصولات تراریخته بوده اما این محصولات را که شامل برنج، سویا و کلزا می‌باشد، وارد می‌کند (ISAAA, 2017).





فصل ششم:

منابع

- حیدری، ا. و پاکدامن، ب. ۱۳۸۳. گیاهان تراریخته (ترانسژنیک) (ترجمه). سیزاندیشان. ۱۴۵ صفحه.
- روابط عمومی پژوهشگاه بیوتکنولوژی ایران. (۱۳۹۸). سیب زمینی تراریخته، اوایل سال آینده آماده اخذ مجوز است/هفت رخداد گلرنگ تراریخته به آزمایش گلخانه‌ای رسید. <http://www.abrii.ac.ir/ShowNews/415/> (مشاهده شده در ۲۳ مهر ۱۳۹۹).
- صالحی جوزانی، غ.، توحیدفر، م. و صادقی، ا. ۱۳۸۹. ایمنی زیستی محصولات تراریخته. انتشارات پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، ۲۹۸ صفحه.
- صالحی جوزانی، غ. و سلیمانی، ا. ۱۳۹۷. بررسی وضعیت قوانین و مقررات حوزه محصولات تراریخته و ایمنی زیستی در کشور. مرکز پژوهش‌های مجلس شورای اسلامی ایران.
- قره‌یاضی، ب. ۱۳۸۶. مجری طرح تولید برنج تراریخته در گفت‌وگو با ایسنا خبر داد: حذف ایران از فهرست جهانی تولیدکنندگان گیاهان تراریخته. <https://www.isna.ir/news/8612-17483> (مشاهده شده در ۲۳ مهر ۱۳۹۹).
- Agarwal, S., Loar, S., Steber, C. and Zale, J. 2008. Floral transformation of wheat. In: Jones, H.D. and Shewry, P.R. (eds). *Methods in molecular biology, transgenic wheat, Barley and oats*. Humana Press, New York, USA, p. 349.
- Ali, A., Bang, S.W., Chung, S.-M. and Staub, J.E. 2015. Plant transformation via pollen tube-mediated gene transfer. *Plant Molecular Biology Reporter*, 33:742-747.
- Andow, D. and Hutchison, W. 1998. Bt-corn resistance management. In: Mellon, M. and Rissler, J. (eds). *Now or never: serious new plans to save natural pest control*. Union of Concerned Scientists, Cambridge, MA, p. 149.
- Aviezer, D., Brill-Almon, E., Shaaltiel, Y., Hashmueli, S., Bartfeld, D., Mizrachi, S., Liberman, Y., Freeman, A., Zimran, A. and Galun, E. 2009. A plant-derived recombinant human glucocerebrosidase enzyme - a preclinical and phase I investigation. *PLOS One*, 4:e4792.
- Azadi, H. and Ho, P. 2010. Genetically modified and organic crops in developing countries: a review of options for food security. *Biotechnology Advances*, 28:160-168.
- Barrows, G., Sexton, S. and Zilberman, D. 2014. Agricultural biotechnology: the promise and prospects of genetically modified crops. *Journal of Economic Perspectives*, 28:99-119.
- Bates, G.W. 1999. Plant transformation via protoplast electroporation, In: Hall, R.D. (ed). *Plant cell culture protocols*. Humana Press, USA, p. 421.
- Bauer, P. and Berczky, Z. 2003. Gene networks involved in iron acquisition strategies in plants. *Agronomie* 23: 447-454.
- Bicar, E.H., Woodman-Clíkeman, W., Sangtong, V., Peterson, J.M., Yang, S.S., Lee, M. and Scott, M.P. 2008. Transgenic maize endosperm containing a milk protein has improved amino acid balance. *Transgenic Research*, 17:59-71.

- Binns, A. and Campbell, A. 2001. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of plant cells. In: Encyclopedia of Life Sciences. Nature Publishing Group, London, UK, p. 15000.
- Birch, R.G. 1997. Plant transformation: problems and strategies for practical application. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 48:297-326.
- Bodulovic, G. 2005. Is the European attitude to GM products suffocating African development? Functional Plant Biology, 32:1069-1075.
- Brinch-Pedersen, H., Galili, G., Knudsen, S. and Holm, P.B. 1996. Engineering of the aspartate family biosynthetic pathway in barley (*Hordeum vulgare* L.) by transformation with heterologous genes encoding feedback-insensitive aspartate kinase and dihydrodipicolinate synthase. Plant Molecular Biology, 32:611-620.
- Brookes, G and Barfoot, P. 2014. Economic impact of GM crops, GM Crops and Food: Biotechnology in Agriculture and the Food Chain, 5:65-75.
- Brookes, G. and Barfoot, P. 2015. Global income and production impacts of using GM crop technology 1996-2013. GM crops and food, 6:13-46.
- Cerdeira, A.L. and Duke, S.O. 2006. The current status and environmental impacts of glyphosate-resistant crops. Journal of Environmental Quality, 35:1633-1658.
- Chakraborty, S., Chakraborty, N., Agrawal, L., Ghosh, S., Narula, K., Shekhar, S., Naik, P.S., Pande, P.C., Chakraborty, S.K. and Datta, A. 2010. Nextgeneration protein-rich potato expressing the seed protein gene AmA1 is a result of proteome rebalancing in transgenic tuber. Proceedings of the National Academy of Sciences, 107:17533-17538.
- Chan, Y.-L., Prasad, V., Sanjaya, Chen, K.H., Liu, P.C., Chan, M.-T. and Cheng, C.P. 2005. Transgenic tomato plants expressing an Arabidopsis thionin (Thi2.1) driven by fruit-inactive promoter battle against phytopathogenic attack. Planta, 221:386-393.
- Chawla, H.S. 2002. Introduction to plant biotechnology. Science Publishers, US, p. 538.
- Chen, C. and Chen, Z. 2002. Potentiation of developmentally regulated plant defense response by AtWRKY18, a pathogen-induced Arabidopsis transcription factor. Plant Physiology, 129:706-716.
- Chilton, M.D. 2001. *Agrobacterium*. A memoir. Plant Physiology, 125, 9-14.
- Chilton, M.D., Drummond, M.H., Merlo, D.J., Sciaky, D., Montoya, A.L., Gordon, M.P. and Nester, E.W. 1977. Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: the molecular basis of crown gall tumorigenesis. Cell, 11:263-271.
- Chong, D.K.X., Roberts, W., Arakawa, T., Illes, K., Bagi, G., Slattery, C.W. and Langridge, W.H.R. 1997. Expression of the human milk protein β -casein in transgenic potato plants. Transgenic Research, 6:289-296.
- Chugh, A., Vikrant, M.A. and Khurana, P. 2012. A novel approach for *Agrobacterium*-mediated germ line transformation of Indian bread wheat (*Triticum aestivum*) and pasta wheat (*Triticum durum*). Journal of Phytochemical Research, 4:22-29.
- Cohen, J.I. 2005. Poorer nations turn to publicly developed GM crops. Nature Biotechnology, 23:27-33.
- Cohen, J.I. and Paarlberg, R. 2002. Explaining restricted approval and availability of GM crops in

developing countries. *AgBiotechNet*, 4:1-6.

Davey, M.R., Anthony, P., Power, J.B. and Lowe, K.C. 2005. Plant protoplasts: status and biotechnological perspectives. *Biotechnology Advances*, 23:131-171.

Davey, M.R., Soneji, J.R., Rao, M.N., Kourmpetli, S., Bhattacharya, A. and Kole, C. 2010. Generation and deployment of transgenic crop plants: an overview. In: Kole, C., Michler, C.H., Abbott, A.G. and Hall, T.C. (eds). *Transgenic crop plants, Volume 1: principles and development*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, p. 339.

Davidson, S.N. 2008. Forbidden fruit: transgenic papaya in Thailand. *Plant Physiology*, 147:487-493.

Davies, H.M. 2010. Commercialization of whole-plant systems for biomanufacturing of protein products: Evolution and prospects. *Plant Biotechnology Journal*, 8:845-861.

Davoodi-Semiromi, A., Schreiber, M., Nalapalli, S., Verma, D., Singh, N.D., Banks, R.K., Chakrabarti, D. and Daniell, H. 2010. Chloroplast-derived vaccine antigens confer dual immunity against cholera and malaria by oral or injectable delivery. *Plant Biotechnology Journal*, 8:223-242.

de Framond, A.J., Barton, K.A. and Chilton, M.D. 1983. Mini-Ti: a new vector strategy for plant genetic engineering. *Biotechnology*, 5:262-269.

Dewar, A.M., Haylock, L.A., Bean, K.M. and May, M.J. 2000. Delayed control of weeds in glyphosate-tolerant sugar beet and the consequences on aphid infestation and yield. *Pest Management Science*, 56:345-350.

Ding, L., Li, S., Gao, J., Wang, Y., Yang, G. and He, G. 2009. Optimization of *Agrobacterium*-mediated transformation conditions in mature embryos of elite wheat. *Molecular Biology Reporter*, 36:29-36.

Doty, S.L., James, C.A., Moore, A.L., Vajzovic, A., Singleton, G.L., Ma, C., Khan, Z., Xin, G., Kang, J.W., Park, J.Y., Meilan, R., Strauss, S.H., Wilkerson, J., Farin, F. and Strand, S.E. 2007. Enhanced phytoremediation of volatile environmental pollutants with transgenic trees. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104:16816-16821.

Drakakaki, G., Marcel, S., Glahn, R.P., Lund, E.K., Pariagh, S., Fischer, R., Christou, P. and Stoger, E. 2005. Endosperm-specific co-expression of recombinant soybean ferritin and *Aspergillus* phytase in maize results in significant increases in the levels of bioavailable iron. *Plant Molecular Biology*, 59:869-880.

Dufourmantel, N., Tissot, G., Garçon, F., Pelissier, B. and Dubald, M. 2006. Stability of soybean recombinant plastome over six generations. *Transgenic Research*, 15:305-311.

Eccleston, V. S. and Ohlrogge, J.B. 1998. Expression of lauroyl-acyl carrier protein thioesterase in *Brassica napus* seeds induces pathways for both fatty acid oxidation and biosynthesis and implies a set point for triacylglycerol accumulation. *Plant Cell*, 10:613-622.

Eicher, C.K., Maredia, K. and Sithole-Niang, I. 2006. Crop biotechnology and the African farmer. *Food Policy*, 31:504-527.

Falco, S.C., Guida, T., Locke, M., Mauvais, J., Sanders, C., Ward, R.T. and Webber, P. 1995. Transgenic canola and soybean seeds with increased lysine. *Biotechnology*, 13:577-582.

- Falco, S.C. 2001. Increasing lysine in corn. *Amino Acids*, 21:57-58.
- FAO. 2010. Global forest resources assessment. Rome.
- FAO. 2020. Genetically modified crops. <http://www.fao.org/3/i2490e/i2490e04d.pdf> (accessed on 14 October 2020).
- FAOSTAT. 2018. Available online: <http://www.fao.org/faostat/en/#home> (accessed on 14 October 2020).
- Fermin, G. 2005. Comparative development and impact of transgenic papayas in Hawaii, Jamaica, and Venezuela. *Methods in Molecular Biology*, 286:399-430.
- Finer, J.J. 2016. Transgenic Plant Production. In: Stewart, C.N. (ed). *Plant biotechnology and genetics: principles, techniques, and applications*. John Wiley & Sons, Inc., USA, p. 447.
- Fitches, E., Edwards, M.G., Mee, C., Grishin, E., Gatehouse, A.M., Edwards, J.P. and Gatehouse, J.A. 2004. Fusion proteins containing insect-specific toxins as pest control agents: snowdrop lectin delivers fused insecticidal spider venom toxin to insect haemolymph following oral ingestion. *Journal of Insect Physiology*, 50:61-71.
- Fontes, E.M., Pires, C.S., Sujii, E.R. and Panizzi, A. R. 2002. The environmental effects of genetically modified crops resistant to insects. *Neotropical Entomology*, 31:497-513.
- French, C.E., Rosser, S.J., Davies, G.J., Nicklin, S. and Bruce, N.C. 1999. Biodegradation of explosives by transgenic plants expressing pentaerythritol tetranitrate reductase. *Nature Biotechnology*, 17:491-494.
- Frizzi, A., Caldo, R.A., Morrell, J.A., Wang, M., Lutfiyya, L.L., Brown, W.E., Malvar, T.M. and Huang, S. 2010. Compositional and transcriptional analyses of reduced zein kernels derived from the opaque2 mutation and RNAi suppression. *Plant Molecular Biology*, 73:569-585.
- Gafni, Y., Icht, M. and Rubinfeld, B.-Z. 1995. Stimulation of *Agrobacterium tumefaciens* virulence with indole-3-acetic acid. *Letters in Applied Microbiology*, 20:98-101.
- Ganeshan, S. and Chibbar, R.N. 2010. Gene transfer methods. In: Kole, C., Michler, C.H., Abbott, A.G. and Hall, T.C. (eds). *Transgenic crop plants, Volume 1: principles and development*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, p. 339.
- Gaub, P. 2012. Transgenic plants. *Journal of Pharmacy Research*, 5:4856-4859.
- Gelvin, S.B. 2003. *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the “gene-jockeying” tool. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67:16-37.
- Ghandilyan, A., Vreugdenhil, D. and Aarts, M.G.M. 2006. Progress in the genetic understanding of plant iron and zinc nutrition. *Physiologia Plantarum* 126:407-417.
- Goto, F., Yoshihara, T., Shigemoto, N., Toki, S. and Takaiwa, F. 1999. Iron fortification of rice seed by the soybean ferritin gene. *Nature Biotechnology*, 17:282-286.
- Graf, L., Hayder, H. and Mueller, U. 2014. Endogenous allergens in the regulatory assessment of genetically engineered crops. *Food and Chemical Toxicology*, 73:17-20.
- Hallberg, G.R. 1986. From hoes to herbicides: agriculture and groundwater quality. *Journal of Soil and Water Conservation*, 41:357-364.
- Haughton, A.J., Bell, J.R., Boatman, N.D. and Wilcox, A. 2001. The effect of the herbicide glyphosate

on non-target spiders: Part II. Indirect effects on *Lepthyphantes tenuis* in field margins. Pest Management Science, 57:1037-1042.

Hawes, C., Haughton, A., Osborne, J., Roy, D., Clark, S., Perry, J., Rothery, P., Bohan, D., Brooks, D. and Champion, G. 2003. Responses of plants and invertebrate trophic groups to contrasting herbicide regimes in the farm scale evaluations of genetically modified herbicide-tolerant crops. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 358:1899-1913.

Herrera-Estrella, L., Simpson, J. and Martínez-Trujillo, M. 2005. Transgenic plants: an historical perspective. In: Peña, L. (ed). Methods in molecular biology, volume 286, Transgenic plants: Methods and protocols. Humana Press, USA, p. 448.

Hibbard, B.E., Vaughn, T.T., Oyediran, I.O., Clark, T.L. and Ellersieck, M.R. 2005. Effect of Cry3Bb1-expressing transgenic corn on plant-to-plant movement by western corn rootworm larvae (Coleoptera: Chrysomelidae). Journal of Economic Entomology, 98:1126-1138.

Huang, H. and Ma, H. 1992. An improved procedure for transforming *Arabidopsis thaliana* (Landsberg erecta) root explants. Plant Molecular Biology Reporter, 10:372-383.

Huang, J.K., Rozelle, S. and Rosegrant, M.W. 1999. China's food economy to the twenty-first century: supply, demand, and trade. Economic Development and Cultural Change, 47:737-766.

Huang, J., Pray, C. and Rozelle, S. 2002a. Enhancing the crops to feed the poor. Nature, 418:678-684.

Huang, J., Rozelle, S., Pray, C. and Wang, Q. 2002b. Plant biotechnology in China. Science, 295:674-676.

Huntley, S.K., Ellis, D., Gilbert, M., Chapple, C. and Mansfield, S.D. 2003. Significant increases in pulping efficiency in C4H-F5H-transformed poplars: Improved chemical savings and reduced environmental toxins. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51:6178-6183.

Hwang, H.-H., Yu, M. and Lai, E.-M. 2017. Agrobacterium-mediated plant transformation: biology and applications. Arabidopsis Book, 15:e0186.

ISAAA. 2013. Vitamin A cassava launched in Nigeria, Crop Biotech Update, ISAAA.

ISAAA. 2016. Global status of commercialized biotech/GM crops in 2016: Biotech Crop Adoption Surges as Economic Benefits Accumulate in 21 Years. ISAAA Brief No. 52. ISAAA: Ithaca, NY.

ISAAA. 2017. Global status of commercialized biotech/GM crops in 2017: Biotech Crop Adoption Surges as Economic Benefits Accumulate in 22 Years. ISAAA Brief No. 53. ISAAA: Ithaca, NY.

ISAAA. 2018. Global status of commercialized biotech/GM crops in 2018: Biotech Crop Adoption Surges as Economic Benefits Accumulate in 23 Years. ISAAA Brief No. 54. ISAAA: Ithaca, NY.

Ishimaru, Y., Suzuki, M., Tsukamoto, T., Suzuki, K., Nakazono, M., Kobayashi, T., Wada, Y., Watanabe, S., Matsushashi, S., Takahashi, M., Nakanishi, H., Mori, S. and Nishizawa, N.K. 2006. Rice plants take up iron as an Fe³⁺-phytosiderophore and as Fe²⁺. Plant Journal, 45:335-346.

Jackson, R.E. and Pitre, H.N. 2004. Influence of roundup ready soybean production systems and glyphosate application on pest and beneficial insects in wide-row soybean. Journal of Agricultural and Urban Entomology, 21:61-70.



- Jacqui, D., Gibbs, D. and Cocklin, C. 2013. Framing GM crops as a food security solution. *Journal of Rural Studies*, 29:59-70.
- James, C. 2005. Global status of commercialized biotech/GM crops in 2005. ISAAA Brief No. 34. ISAAA: Ithaca, NY.
- James, C. 2007. Global status of commercialized biotech/GM crops in 2007. ISAAA Brief No. 37. ISAAA: Ithaca, NY.
- James, C. 2011. Global status of commercialized biotech/GM crops. ISAAA Brief 43, SAAA, Ithaca, NY.
- James, C. 2013. Global status of commercialized biotech/GM crops: 2013. ISAAA Brief No. 46. ISAAA: Ithaca, NY.
- James, C. 2014. Global status of commercialized biotech/GM crops: 2014. ISAAA Brief No. 49. ISAAA: Ithaca, NY.
- James, C. and Krattiger, A. F. 1996. Global review of the field testing and commercialization of transgenic plants: 1986 to 1995, ISAAA briefs. ISAAA, Ithaca.
- Jang, I.C., Oh, S.J., Seo, J.S., Choi, W.B., Song, S.I., Kim, C.H., Kim, Y.S., Seo, H.S., Choi, Y.D., Nahm, B.H. and Kim, J.K. 2003. Expression of a bifunctional fusion of the *Escherichia coli* genes for trehalose-6-phosphate synthase and trehalose-6-phosphate phosphatase in transgenic rice plants increases trehalose accumulation and abiotic stress tolerance without stunting growth. *Plant Physiology*, 131:516-524.
- Jousma, H., Talsma, H., Spies, F., Joosten, J.G.H., Junginger, H.E. and Crommelin, D.J.A. 1987. Characterization of liposomes-the influence of extrusion of multilamellar vesicles through polycarbonate membranes on particle size, particle size distribution and number of bilayers. *International Journal of Pharmaceutics*, 35:263-274.
- Kaeppeler, H. and Somers, D. 1994. DNA delivery into maize cell cultures using silicon carbide fibers. In: Freeling, M. and Walbot, V. (eds). *The maize handbook*. Springer, New York, p. 761.
- Katiyar-Agarwal, S., Agarwal, M. and Grover, A. 2003. Heat-tolerant basmati rice engineered by over-expression of hsp101. *Plant Molecular Biology*, 51:77-686.
- Keller, H., Pamboukdjian, N., Ponchet, M., Poupet, A., Delon, R., Verrier, J.L., Roby, D. and Ricci, P. 1999. Pathogen-induced elicitor production in transgenic tobacco generates a hypersensitive response and nonspecific disease resistance. *Plant Cell*, 11:223-235.
- Keller, W.A. and Melchers, G. 1973. Effect of high pH and calcium on tobacco leaf protoplast fusion. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 28:737-741.
- Kikkert, J.R., Vidal, J.R. and Reisch, B.I. 2004. Stable transformation of plant cells by particle bombardment/biolistics. In: Pena, L. (ed). *Transgenic plants: methods and protocols*. Humana Press Inc., Totowa, p. 437.
- Kiyokawa, K., Yamamoto, S., Sakuma, K., Tanaka, K., Moriguchi, K. and Suzuki, K. 2009. Construction of disarmed Ti plasmids transferable between *Escherichia coli* and *Agrobacterium* species. *Applied and Environmental Microbiology*, 75:1845-1851.

- Klein, T.M., Gradziel, T., Fromm, M.E. and Sanford, J.C. 1988. Factors influencing gene delivery into *Zea mays* cells by high-velocity microprojectiles. *Nature Biotechnology*, 6:559-563.
- Klein, T.M., Wolf, E.D., Wu, R. and Sanford, J.C. 1987. High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. *Nature*, 327:70-73.
- Komori, T., Imayama, T., Kato, N., Ishida, Y., Ueki, J. and Komari, T. 2007. Current status of binary vectors and superbinary vectors. *Plant Physiology*, 145:1155-1160.
- Kozziel, M.G., Beland, G.L., Bowman, C., Carozzi, N.B., Crenshaw, R., Crossland, L., Dawson, J., Desai, N., Hill, M. and Kadwell, S. 1993. Field performance of elite transgenic maize plants expressing an insecticidal protein derived from *Bacillus thuringiensis*. *Nature Biotechnology*, 11:194-200.
- Kumar, K., Gambhir, G., Dass, A., Tripathi, A.K., Singh, A., Jha, A.K., Yadava, P., Choudhary, M. and Rakshit, S. 2020. Genetically modified crops: current status and future prospects. *Planta*, 251:91.
- Lee, L.Y. and Gelvin, S.B. 2008. T-DNA binary vectors and systems. *Plant Physiology*, 146:325-32.
- Lee, S.I., Kim, H.U., Lee, Y.H., Suh, S.C., Lim, Y.P., Lee, H.Y. and Kim, H.I. 2001. Constitutive and seed-specific expression of a maize lysine-feedback-insensitive dihydrodipicolinate synthase gene leads to increased free lysine levels in rice seeds. *Molecular Breeding*, 8:75-84.
- Li, H.Q., Xu, J., Chen, L. and Li, M. R. 2007. Establishment of an efficient *Agrobacterium tumefaciens* mediated leaf disc transformation of *Thellungiella halophila*. *Plant Cell Reporters*, 26:1785-1789.
- Li, L., Zhou, Y., Cheng, X., Sun, J., Marita, J.M., Ralph, J. and Chiang, V.L. 2003. Combinatorial modification of multiple lignin traits in trees through multigene cotransformation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100:4939-4944.
- Li, Z.K., Sanchez, A., Angeles, E., Singh, S., Domingo, J., Huang, N. and Khush, G.S. 2001. Are the dominant and recessive plant disease resistance genes similar? A case study of rice R genes and *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* races. *Genetics*, 159:757-765.
- Lilley, C.J., Urwin, P.E., Johnston, K.A. and Atkinson, H.J. 2004. Preferential expression of a plant cystatin at nematode feeding sites confers resistance to *Meloidogyne incognita* and *Globodera pallida*. *Plant Biotechnology*, 2:3-12.
- Liu, D., Burton, S., Glancy, T., Li, Z.S., Hampton, R., Meade, T. and Merlo, D.J. 2003. Insect resistance conferred by 283-kDa *Photobacterium luminescens* protein TcdA in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Biotechnology*, 21:1222-1228.
- Liu, W., Stewart, C.N. and Miki, B. 2016. Promoters and marker genes. In: Stewart, C.N. (ed). *Plant biotechnology and genetics: principles, techniques, and applications*. John Wiley and Sons, Inc., USA, p. 447.
- Lowe, M. 2013. Opinion divided on GM crops in Thailand. *CCTV.com*
- Ludlow, K. and Yorobe, J. 2014. Oceania: Australia, New Zealand, Japan and the Philippines. In: Smyth, S.J., Phillips, P.W.B. and Castle, D. (eds). *Handbook on agriculture, biotechnology and development*. Edward Elgar Publishing Ltd, Cheltenham, p. 868.
- Lundgren, J.G. 2009. Relationships of natural enemies and non-prey foods. Springer, Dordrecht, p. 453.

- Luo, Z.X. and Wu, R.A. 1988. Simple method for the transformation of rice via the pollen-tube pathway. *Plant Molecular Biology Reporter*, 6:165-174.
- Macdonald, P. 2014. Genetically modified organisms regulatory challenges and science: a Canadian perspective. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*, 9:59-64.
- Macer, D. and Ng, M.A. C. 2000. Changing attitudes to biotechnology in Japan. *Nature Biotechnology*, 18:945-947.
- Mamrutha, H.M., Kumar, R., Venkatesh, K., Tiwari, V. and Sharma, I. 2014. Genetic transformation of wheat-present status and future potential. *Journal of Wheat Research*, 6:107-119.
- Manickavasagam, M., Ganapathi, A., Anbazhagan, V.R., Sudhakar, B., Selvaraj, N., Vasudevan, A. and Kasthuriengan, S. 2004. Agrobacterium-mediated genetic transformation and development of herbicide-resistant sugarcane (*Saccharum* species hybrids) using axillary buds. *Plant Cell Repprters*, 23:134-143.
- Maqbool, S.B., Riazuddin, S., Loc, N.T., Gatehouse, A.M.R., Gatehouse, J.A. and Christou, P. 2001. Expression of multiple insecticidal genes confers broad resistance against a range of different rice pests. *Molecular Breeding*, 7:85-93.
- Mathias, R.J. and Boyd, L.A. 1986. Cefotaxime stimulates callus growth, embryogenesis and regeneration in hexaploid bread wheat (*Triticum aestivum* L. EM. Thell). *Plant Science*, 46:217-223.
- Mathur, V., Javid, L., Kulshrestha, S., Mandal, A. and Reddy, A.A. 2017. World cultivation of genetically modified crops: opportunities and risks. In: Lichtfouse, E. (ed). *Sustainable agriculture reviews* 25, Springer International Publishing AG, p. 304.
- Mayavan, S., Subramanyam, K., Arun, M., Rajesh, M., Kapil Dev, G., Sivanandhan, G., Jaganath, B., Manickavasagam, M., Selvaraj, N. and Ganapathi, A. 2013. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated in planta seed transformation strategy in sugarcane. *Plant Cell Reporter*, 32:1557-1574.
- McHughen, A. and Wager, R. 2010. Popular misconceptions: agricultural biotechnology. *New Biotechnology*, 27:724-728.
- Meyers, B., Zaltsman, A., Lacroix, B., Kozlovsky, S.V. and Krichevsky, A. 2010. Nuclear and plastid genetic engineering of plants: Comparison of opportunities and challenges. *Biotechnology Advances*, 28:747-756.
- Mizuno, K., Kawasaki, T., Shimada, H., Satoh, H., Kobayashi, E., Okumura, S., Arai, Y. and Baba, T. 1993. Alteration of the structural properties of starch components by the lack of an isoform of starch branching enzyme in rice seeds. *Journal of Biological Chemistry*, 268:19084-19091.
- Moiseeva, Y.M., Velikov, V.A., Volokhina, I.V., Gusev, Y.S., Yakovleva, O.S. and Chumakov, M.I. 2014. Agrobacterium-mediated transformation of maize with antisense suppression of the proline dehydrogenase gene by an in planta method. *British Biotechnology Journal*, 4:116-125.
- Neumann, E. and Rosenhec, K. 1972. Permeability changes induced by electric impulses in vesicular membranes. *Journal of Membrane Biology*, 10:279-290.
- Nugent, G.D., Coyne, S., Nguyen, T.T., Kavanagh, T.A. and Dix, P.J. 2006. Nuclear and plastid

transformation of *Brassica oleracea* var. botrytis (cauliflower) using PEG-mediated uptake of DNA into protoplasts. *Plant Science*, 170:135-142.

Oerke, E.C. 2006. Crop losses to pests. *Journal of Agricultural Science*, 144:31.

Otten, L., Burr, T. and Szegedi, E. 2007. *Agrobacterium*: a disease-causing bacterium. In: Tzifra, T. and Citovsky, V. (eds). *Agrobacterium: from biology to biotechnology*. Springer, New York, p. 750.

Ozyigit, I.I. 2012. *Agrobacterium tumefaciens* and its use in plant biotechnology. 2012. In: Ashraf, M., Öztürk, M., Ahmad, M.S.A. and Aksoy, A. (eds). *Crop production for agricultural improvement*. Springer, Netherlands, p. 796.

Paarlberg, R. 2006. Are genetically modified (GM) crops a commercial risk for Africa? *International Journal of Technology and Globalisation*, 2 (1/2):81.

Paarlberg, R.L. 2002. The real threat to GM crops in poor countries: consumer and policy resistance to GM foods in rich countries. *Food Policy*, 27:247-250.

Paine, J.A., Shipton, C.A., Chaggar, S., Howells, R.M., Kennedy, M.J., Vernon, G., Wright, S.Y., Hinchliffe, E., Adams, J.L., Silverstone, A.L. and Drake, R. 2005. Improving the nutritional value of golden rice through increased provitamin A content. *Nature Biotechnology*, 23:482-487.

Park, Y.W., Baba, K., Furuta, Y., Iida, I., Sameshima, K., Arai, M. and Hayashi, T. 2004. Enhancement of growth and cellulose accumulation by overexpression of xyloglucanase in poplar. *FEBS Letters*, 564:183-187.

Pesante, A. 2003. Market outlook report: fresh papayas. Honolulu HI, available online at <http://hawaii.gov/hdoa/add/research-and-outreports/papaya%20outlook%20report.pdf> (accessed on 14 October 2020).

Peschen, D., Li, H.P., Fischer, R., Kreuzaler, F. and Liao, Y.C. 2004. Fusion proteins comprising a *Fusarium*-specific antibody linked to antifungal peptides protect plants against a fungal pathogen. *Nature Biotechnology*, 22:732-738.

Peyret, H. and Lomonosoff, G.P. 2015. When plant virology met *Agrobacterium*: the rise of the deconstructed clones. *Plant Biotechnology Journal*, 13:1121-1135.

Pichersky, E. and Gershenzon, J. 2002. The formation and function of plant volatiles: perfumes for pollinator attraction and defense. *Current Opinion in Plant Biology*, 5:237-243.

Pilate, G., Guiney, E., Holt, K., Petit-Conil, M., Lapierre, C., Leple, J.C., Pollet, B., Mila, I., Webster, E.A., Marstorp, H.G., Hopkins, D.W., Jouanin, L., Boerjan, W., Schuch W., Cornu, D. and Halpin, C. 2002. Field and pulping performances of transgenic trees with altered lignification. *Nature Biotechnology*, 20:607-612.

Qaim, M. and Zilberman, D. 2003. Yield effects of genetically modified crops in developing countries. *Science*, 299:900-902.

Qian, B., Shen, H., Liang, W., Guo, X., Zhang, C., Wang, Y., Li, G., Wu, A., Cao, K. and Zhang, D. 2008. Immunogenicity of recombinant hepatitis B virus surface antigen fused with preS1 epitopes expressed in rice seeds. *Transgenic Research*, 17:621-631.

Qiu, J. 2012. China sacks officials over Golden Rice controversy. *Nature News*, 10.

- Rachmawati, D. and Anzai, H. 2006. Studies on callus induction, plant regeneration and transformation of Javanica rice cultivars. *Plant Biotechnology*, 23:521-524.
- Raja, N.I., Bano, A., Rashid, H., Chaudhry, Z. and Ilyas, N. 2010. Improving Agrobacterium-mediated transformation protocol for integration of *XA21* gene in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Pakistan Journal of Botany*, 42:3613-3631.
- Regina, A., Bird, A., Topping, D., Bowden, S., Freeman, J., Barsby, T., Kosar-Hashemi, B., Li, Z., Rahman, S. and Morell, M. 2006. High-amylose wheat generated by RNA interference improves indices of large bowel health in rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103:3546-3551.
- Regina, A., Kosar-Hashemi, B., Ling, S., Li, Z., Rahman, S. and Morell, M. 2010. Control of starch branching in barley defined through differential RNAi suppression of starch branching enzyme IIa and IIb. *Journal of Experimental Botany*, 61:1469-1482.
- Reich, T.J., Iyer, V.N., Haffner, M., Holbrook, L.A. and Miki, B.L. 1986. The use of fluorescent dyes in the microinjection of alfalfa protoplasts. *Canadian Journal of Botany*, 64:1259-1267.
- Repalli, S.K., Geda, C.K and Rao, G.J.N. 2019. MMT, a high promising, cost effective micro-carrier for gene delivery. *Journal of Microbial & Biochemical Technology*, 11: 417.
- Rod-in, W., Sujipuli, K. and Ratanasut, K. 2014. The floral-dip method for rice (*Oryza sativa*) transformation. *International Journal of Agricultural Technology*, 10:467-474.
- Rogers, S.G., Klee, H., Horsch, R.B. and Fraley, R.T. 1988. Use of cointegrating Ti plasmid vectors. *Plant Molecular Biology Manual*, A2:1-12.
- Sanford, J. C. 1990. Biolistic plant transformation. *Physiologia Plantarum*, 79:206-209.
- Sanford, J.C., De Vit, M.J., Russell, J.A., Smith, F.D., Harpending, P.R., Roy, M.K. and Johnston, S.A. 1991. An improved helium-driven biolistic device. *Techniques*, 3:3-16.
- Sanglestawai, S., Rejesus, R.M. and Yorobe, J.M. 2014. Do lower yielding farmers benefit from Bt corn? Evidence from instrumental variable quantile regressions. *Food Policy*, 44:285-296.
- Sathishkumar, R., Kumar, S.R., Hema, J. and Baskar, V. 2019. Advances in plant transgenics: methods and applications, Springer, Singapore, p. 374.
- Schönbrunn, E., Eschenburg, S., Shuttleworth, W.A., Schloss, J.V., Amrhein, N., Evans, J.N.S. and Kabsch, W. 2001. Interaction of the herbicide glyphosate with its target enzyme 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase in atomic detail. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98:1376-1380.
- Seštali, F., Janni, M., Doherty, A., Botticella, E., D'Ovidio, R., Masci, S., Jones, H.D. and Lafiandra, D. 2010. Increasing the amylose content of durum wheat through silencing of the SBEIIa genes. *BMC Plant Biology*, 10:144.
- Sharma, K.K., Bhatnagar-Mathur, P., Thorpe, T.A. 2005. Genetic transformation technology: status and problems. *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant*, 41:102-112.
- Shaul, O. and Galili, G. 1993. Concerted regulation of lysine and threonine synthesis in tobacco plants expressing bacterial feedback-insensitive aspartate kinase and dihydrodipicolinate synthase. *Plant Molecular Biology*, 23:759-768.

- Sisterson, M.S., Biggs, R.W., Manhardt, N.M., Carrière, Y., Dennehy, T.J. and Tabashnik, B.E. 2007. Effects of transgenic Bt cotton on insecticide use and abundance of two generalist predators. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 124:305-311.
- Slater, A., Scott, N. and Fowler, M. 2008. Plant biotechnology: the genetic manipulation of plants. 2th edition. Oxford University Press Inc., USA, p. 400.
- Soman, J., Hema, J. and Subramanian, S. 2019. Plant tissue culture and DNA delivery methods. In: Sathishkumar, R., Kumar, S.R., Hema, J. and Baskar, V. (eds). *Advances in plant transgenics: methods and applications*, Springer, Singapore, p. 374.
- Soneji, J.R., Nageswara Rao, M., Chen, C. and Gmitter, F.G. 2007. Regeneration from transverse thin cell layers of mature stem segments of citrus. In: *Plant and Animal Genome XV Conference*, San Diego, California, USA.
- Song, J., Lu, S., Chen, Z.Z., Lourenco, R. and Chiang, V.L. 2006. Genetic transformation of *Populus trichocarpa* genotype Nisqually-1: a functional genomics tool for woody plants. *Plant Cell Physiology*, 47:1582-1589.
- Sonoki, T., Kajita, S., Ikeda, S., Uesugi, M., Tatsumi, K., Katayama, Y. and Imura, Y. 2005. Transgenic tobacco expressing fungal laccase promotes the detoxification of environmental pollutants. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 67:138-142.
- Souza, C.E.D. and Beck, E. 2013. Embryogenic callus induction on the scutellum and regeneration of plants as basis for genetic transformation of spring wheath (*Triticum aestivum* L.) cultivars from Argentina. *Journal of Basic and Applied Genetics*, 24: Article 6-research.
- Spangenberg, G., Neuhaus, G. and Schweiger, H.G. 1986. Expression of foreign genes in a higher plant cell after electrofusion-mediated cell reconstitution of a microinjected karyoplast and a cytoplast. *European Journal of Cell Biology*, 42:236-238.
- Steinrucken, H.C. and Amrhein, N. 1980. The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvyl-shikimic acid-3-phosphate synthase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 94:1207-1212.
- Streit, L.G., Beach, L., Register, J.C., Jung, R. and Fehr, W.R. 2001. Association of the Brazil nut protein gene and Kunitz trypsin inhibitor alleles with soybean protease inhibitor activity and agronomic traits. *Crop Science*, 41:1757-1760.
- Sunkar, R., Bartels, D. and Kirch, H.H. 2003. Overexpression of a stressinducible aldehyde dehydrogenase gene from *Arabidopsis thaliana* in transgenic plants improves stress tolerance. *Plant Journal*, 35:452-464.
- Tai, T.H., Dahlbeck, D., Clark, E.T., Gajiwala, P., Pasion, R., Whalen, M.C., Stall, R.E. and Staskawicz, B.J. 1999. Expression of the Bs2 pepper gene confers resistance to bacterial spot disease in tomato. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96:14153-14158.
- Takahashi, W., Shimada, T., Matsushita, J. and Tanaka, O. 2000. Aluminium borate whisker-mediated DNA delivery into callus of rice and production of transgenic rice plant. *Plant Production Science*, 3:219-224.



- Tang, W., Newton, R.J., Li, C. and Charles, T.M. 2007. Enhanced stress tolerance in transgenic pine expressing the pepper CaPF1 gene is associated with the polyamine biosynthesis. *Plant Cell Reporter*, 26:115-124.
- Terakawa, T., Hasegawa, H. and Yamaguchi, M. 2005. Efficient whisker-mediated gene transformation in a combination with supersonic treatment. *Breeding Science*, 55:465-468.
- Thanavala, Y., Mahoney, M., Pal, S., Scott, A., Richter, L., Natarajan, N., Goodwin, P., Arntzen, C. J. and Mason, H.S. 2005. Immunogenicity in humans of an edible vaccine for hepatitis B. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102:3378-3382.
- Torney, F., Trewyn, B.G., Lin, V.S.-Y. and Wang, K. 2007. Mesoporous silica nanoparticles deliver DNA and chemicals into plants. *Natural Nanotechnology*, 2:295-300.
- Townsend, J.A. and Thomas, L.A. 1996. Method of *Agrobacterium*-mediated transformation of cultured soybean cells. U.S. Patent, Patent No.:5563055.
- Tzfira, T. and Citovsky, V. 2000. From host recognition to T-DNA integration: the function of bacterial and plant genes in the *Agrobacterium*-plant cell interaction. *Molecular Plant Pathology*, 1:201-212.
- Ubalua, A.O. 2009. Transgenic plants: successes and controversies. *Biotechnology and Molecular Biology Reviews*, 4:118-127.
- Uzogara, S.G. 2000. The impact of genetic modification of human foods in the 21st century: a review. *Biotechnology Advances*, 18:179-206.
- van der Biezen, E.A. 2001. Quest for antimicrobial genes to engineer disease-resistant crops. *Trends in Plant Science*, 6:89-91.
- Van Haute, E., Joos, H., Maes, M., Warren, G., Van Montagu, M. and Schell, J. 1983. Intergeneric transfer and exchange recombination of restriction fragments cloned in pBR322: a novel strategy for the reversed genetics of the Ti plasmids of *Agrobacterium tumefaciens*. *EMBO Journal*, 2:411-417.
- van Wordragen, M.F. and Dons, H.J.M. 1992. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of recalcitrant crops. *Plant Molecular Biology Reporter*, 10:12-36.
- Vasconcelos, M., Datta, K., Oliva, N., Khalekuzzaman, M., Torrizo, L., Krishnan, S., Oliveira, M., Goto, F. and Datta, S.K. 2003. Enhanced iron and zinc accumulation in transgenic rice with the ferritin gene. *Plant Science*, 164:371-378.
- Vermif, P. 2006. EU and Japan block unapproved GM rice. *Nature Biotechnology*, 24:1186.
- Vladimirov, I.A., Matveeva, T.V. and Lutova, L.A. 2015. Opine biosynthesis and catabolism genes of *Agrobacterium tumefaciens* and *Agrobacterium rhizogenes*. *Russian Journal of Genetics*, 51:121-129.
- Waithaka, M., Belay, G., Kyotalimye, M. and Karembu, M. 2015. Progress and challenges for implementation of the Common Market for Eastern and Southern Africa policy on biotechnology and biosafety. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 3:1-9.
- Wakasa, K., Hasegawa, H., Nemoto, H., Matsuda, F., Miyazawa, H., Tozawa, Y., Morino, K., Komatsu, A., Yamada, T., Terakawa, T. and Miyagawa, H. 2006. High-level tryptophan accumulation in seeds of transgenic rice and its limited effects on agronomic traits and seed metabolite profile. *Journal of Experimental Botany*, 57:3069-3078.

- Wang, K., Drayton, P., Frame, B., Dunwell, J. and Thompson, J. 1995. Whisker-mediated plant transformation-an alternative technology. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 31:101-104.
- Ward, M.H. 2009. Too much of a good thing? Nitrate from nitrogen fertilizers and cancer. *Reviews on Environmental Health*, 24:357-363.
- Wiesman, Z., Ben Dom, N., Sharvit, E., Grinberg, S., Linde, C., Heldman, E. and Zaccai, M. 2007. Novel cationic vesicle platform derived from vernonia oil for efficient delivery of DNA through plant cuticle membranes. *Journal of Biotechnology*, 130:85-94.
- Williamson, V.M. and Kumar, A. 2006. Nematode resistance in plants: The battle underground. *Trends in Genetics*, 22:396-403.
- Xiao, B., Huang, Y., Tang, N. and Xiong, L. 2007. Over-expression of a LEA gene in rice improves drought resistance under the field conditions. *Theoretical and Applied Genetics*, 115:35-46.
- Xiao, S., Shiloach, J., Betenbaugh, M. J. 2014. Engineering cells to improve protein expression. *Current Opinion in Structural Biology*, 26:32-38.
- Yan, H. and Ping, B.U. 2013. Transgenic plants. In: Kun, L.Y. (ed). *Microbials biotechnology: principles and applications*, 3th edition, World Scientific Publishing Company, Singapore, p. 898.
- Ye, X., Al-Babili, S., Kloti, A., Zhang, J., Lucca, P., Beyer, P. and Potrykus, I. 2000. Engineering the provitamin A (beta-carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm. *Science*, 287:303-305.
- Yu, C.G., Mullins, M.A., Warren, G.W., Koziel, M.G. and Estruch, J.J. 1997. The *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A lyses midgut epithelium cells of susceptible insects. *Applied and Environmental Microbiology*, 63:532-536.
- Yu, X. 2009. Establishment of the evaluation system of salt tolerance on transgenic woody plants in the special netted house. *Plant Biotechnology*, 26:135-141.
- Zacune, J. 2011. Who benefits from GM crops? An industry built on myths. *Friends of the Earth*, Amsterdam.
- Zaenen, I., Van Larebeke, N., Teuchy, H., Van Montagu, M. and Schell, J. 1974. Supercoiled circular DNA in crown-gall inducing *Agrobacterium* strains. *Journal of Molecular Biology*, 86:109-127.
- Zahm, P., Hohmeyer, C. and Geider, K. 1984. Site-specific mutagenesis of the Ti plasmid by transformation of *Agrobacterium tumefaciens* with mutagenized T-DNA fragments cloned in *E. coli* plasmids. *Molecular and General Genetics*, 194:188-194.
- Zerbe, N. 2004. Feeding the famine? American food aid and the GMO debate in Southern Africa. *Food Policy*, 29:593-608.
- Zhengquan, H., Xiaochun, D., Wei, Y. and Jianwu, D. 2008. Pharmaceutical proteins produced in plant bioreactor in recent years. *African Journal of Biotechnology*, 7:4917-4925.
- Zhou, G.Y., Weng, J., Zeng, Y., Huang, J., Qian, S. and Liu, G. 1983. Introduction of exogenous DNA into cotton embryos. *Methods in Enzymology*, 101:433-481.
- Zhu, C., Naqvi, S., Breitenbach, J., Sandmann, G., Christou, P. and Capell, T. 2008. Combinatorial



genetic transformation generates a library of metabolic phenotypes for the carotenoid pathway in maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105:18232-18237.

Zhu, C., Naqvi, S., Gomez-Galera, S., Pelacho, A.M., Capell, T. and Christou, P. 2007. Transgenic strategies for the nutritional enhancement of plants. *Trends in Plant Science*, 12:548-555.

Zhu, Y.L., Pilon-Smits, E.A., Tarun, A.S., Weber, S.U., Jouanin, L. and Terry, N. 1999. Cadmium tolerance and accumulation in Indian mustard is enhanced by overexpressing gamma-glutamylcysteine synthetase. *Plant Physiology*, 121:1169-1178.

Zupan, J.R. and Zambryski, P. 1995. Transfer of T-DNA from *Agrobacterium* to the plant cell. *Plant Physiology*, 107:1041-1047.

Zupan, J., Muth, T.R., Draper, O. and Zambryski, P. 2000. The transfer of DNA from *Agrobacterium tumefaciens* into plants: a feast of fundamental insights. *Plant Journal*, 23:11-28.

