

بررسی تاثیر پنبه حاوی ژن *chi* بر روی جمعیت باکتریایی خاک

ابراهیم کریمی^۱، مسعود توحیدفر^۲، سولماز خسروی^۳ و اکرم صادقی^۴

۱- کارشناس ارشد بیماری شناسی گیاهی، ۳- مربی پژوهشی بیوتکنولوژی کشاورزی، ۴- استادیار ژنتیک مولکولی، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

۲- دانشیار گروه مهندسی بیوتکنولوژی، دانشکده مهندسی انرژی و فناوری های نوین، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

aksadeghi@abrii.ac.ir

چکیده

جمعیت های میکروبی عنصری کلیدی در کیفیت و حاصلخیزی خاک هستند. هدف این پژوهش مطالعه تاثیر پنبه تراریخته رقم کوکر حاوی ژن *chi* لوبیا بر جمعیت های باکتریایی خاک بود. لاین R8 به عنوان گیاه تراریخته حامل ژن *chi* حاصل از چهار بار تلاقی درون جمعیتی و لاین ۱۰۱۱ به عنوان شاهد غیر تراریخته (تیپ وحشی) تهیه شد و در گلخانه گیاهان تراریخته (سطح ایمنی ۲) واقع در پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران (ABRII) کشت شد. نمونه برداری از خاک ناحیه ریزوسفر و بالک گیاهان ۳۰، ۶۰ و ۹۰ روزه انجام شد. تعیین جمعیت باکتری کل و اکتینومیسیتها با استفاده از محیط TSA، آب آگار و ISP2 انجام شد. ماده وراثتی (دی ان ای) از یک گرم خاک و با استفاده از Ultra Clean soil DNA kit استخراج شد. سپس PCR-DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) برای نشان دادن تنوع باکتریایی در نمونه های خاک انجام شد. تعداد کل باکتری های قابل کشت در نمونه های خاک ۱۰^۶ و ۱۰^۷ واحد تشکیل دهنده کلنی (CFU) در هر گرم خاک خشک به ترتیب برای خاک بالک و ریزوسفر بود. تعداد باکتری کل و اکتینومیسیت های خاک ریزوسفر گیاهان ۳۰ و ۶۰ روزه تراریخته بیشتر از شاهد غیر تراریخته بود. اگرچه در پایان دوره رشد (۹۰ روز پس از کشت بذر) جمعیت باکتریایی گیاه تراریخته و غیر تراریخته برابر بود. بررسی مولکولی بر اساس PCR-DGGE نیز الگوی مشابهی را برای جمعیت کل باکتریایی و اکتینومیسیتی مشخص کرد. نتایج ارائه شده در این پژوهش تفاوت معنی داری را بین تعداد باکتری کل و اکتینومیسیتی موجود در خاک ریزوسفری و بالک پنبه تراریخته و غیر تراریخته در پایان دوره رشد گیاه (۹۰ روز) نشان نداد. علاوه بر این به نظر می رسد دوره رشد گیاه تاثیر قابل توجهی بر جمعیت میکروبی دارد.

واژه های کلیدی: اکتینومیسیت، تراریخته، جمعیت باکتریایی، ریزوسفر، DGGE

اکتیو میست های خاک در دوره های مختلف رشد گیاه مطالعه شد.

مواد و روش ها

بررسی گلخانه ای و تهیه نمونه خاک

بذور پنبه رقم کوکر لاین ۱۰۱۱ به عنوان شاهد غیر تراریخته و لاین R8 (گیاه تراریخته حاصل از چهار بار تلاقی درون جمعیتی) در گلدان های پلی اتیلن ۲ کیلویی پر شده با خاک مزرعه پنبه واقع در ورامین کشت شد (شکل ۱). گلدان ها در گلخانه مخصوص گیاهان تراریخته (سطح ایمنی ۲) واقع در پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی-کرج با شرایط مشابه مزرعه شامل ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و دمای روز ۳۰ درجه سلسیوس و دمای شب ۲۵ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۵۵ درصد نگهداری شد. این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. نمونه برداری از خاک ناحیه بالک و رایزوسفر ۳۰، ۶۰ و ۹۰ روز پس از کشت بذر انجام شد. نمونه ها تا زمان بررسی در آزمایشگاه در فریزر با دمای منفی ۸۰ درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

بررسی جمعیت میکروبی خاک

یک گرم از خاک بالک و یا ناحیه ریزوسفری به ۱۰ میلی لیتر سرم فیزیولوژی حاوی ۰/۹ درصد کلرید سدیم اضافه و به مدت ۱۵ دقیقه در شیکر با دور rpm ۸۰ نگهداری شد. مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون حاصل بر روی محیط جامد TSA (Tryptic Soy Agar) و یا آب آگار (۲۰ گرم آگار/لیتر ۷/۲ pH) ریخته و با استفاده از پاروی شیشه ای بر روی سطح محیط پخش شد. پلیت ها در انکوباتور در دمای ۲۸

پنبه (*Gossypium spp*) به علت استفاده در صنایع نساجی، تولید روغن و علوفه از ارزش اقتصادی ارزش اقتصادی زیادی دارد و از گیاهان زراعی مهم دنیا است. پژمردگی ورتیسلیومی (*Verticillium wilt*) یکی از مهمترین بیماری های پنبه و از مشکلات اساسی برای تولید تجاری آن است. کنترل این بیمارگر گیاهی به وسیله قارچ کش مشکل است. قارچ به داخل بافت آوند چوب نفوذ می کند و می تواند به صورت سیستماتیک در تمام قسمت های گیاه گسترش پیدا کند (۱). کاشت گیاهان تراریخته با ویژگی مقاومت به آفات و بیماری ها به عنوان راهی ایمن برای محیط زیست توانایی بالقوه خوبی برای کاهش مصرف سموم شیمیایی در کشاورزی دارند (۲). در این تحقیق از پنبه تراریخته مقاوم به قارچ ورتیسلیوم *داهلیا* (*Verticillium dahlia*) و حامل ژن کیتیناز لوبیا (*Phaseolus vulgaris*) تحت کنترل پیشبر CaMV35S که در مطالعات قبلی تولید شده بود استفاده شد (۳). بزرگترین مزیت استفاده از این پنبه تراریخته کاهش مصرف قارچ کش شیمیایی برای مقابله با بیمارگرهای قارچی مانند ورتیسلیوم که در مناطق کشت پنبه ایران شیوع زیادی دارد است (۴). اکتیو میست ها باکتری مفید خاک هستند که نقش مهمی در حاصلخیزی و بازگرداندن مواد عالی حاصل از تجزیه باقیمانده های محصولات کشاورزی به خاک دارند (۵). استفاده از گیاهان تراریخته به واسطه ناشناخته بودن تاثیرات احتمالی اجزای گیاه شامل ترشحات ریشه، برگ های بر زمین ریخته و باقیمانده های پس از برداشت بر فلور میکروبی خاک نگرانی هایی را به همراه دارد. در این پژوهش تاثیر پنبه تراریخته تولید شده توسط پژوهشگران ایرانی بر جمعیت یوباکتریها و

"کربمی و همکاران، بررسی تاثیر پنبه حاوی ژن *chi*..."

(clamp) GC
CGCCCCGCCGCGCCCCGCGCCCCGTCCCCGCC
GCCCCCGCCCCG
شد. برنامه دمایی واکنش زنجیره‌ای پلیمرز شامل دمای
واسرشت اولیه ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۳ دقیقه،
۳۵ چرخه تکثیر با دمای واسرشت ۹۴ درجه سلسیوس
به مدت ۱ دقیقه، دمای اتصال ۵۵ درجه سلسیوس به
مدت ۱ دقیقه، دمای تکثیر ۷۲ درجه سلسیوس به مدت
۱ دقیقه و دمای تکثیر نهایی ۷۲ درجه سلسیوس به
مدت ۵ دقیقه بود (۶). محصول واکنش زنجیره‌ای
پلیمرز با استفاده از سامانه DGGE ساخت شرکت
Bio-Rad و بر روی ژل پلی اکریل آمید ۸ درصد
محتوی شیب ۷۰-۲۰ درصد از مواد واسرشت کننده
اوره و فرمامید و با دمای ۶۰ درجه سلسیوس به مدت
۵ ساعت با ولتاژ ۱۵۰ ولت الکتروفورز شد. پس از
الکتروفورز، ژل‌ها ظرف حاوی ژل رد (۱:۱۰۰۰ رقیق
شده در آب مقطر) به مدت ۳۰ تا ۴۵ دقیقه در شرایط
تاریکی رنگ آمیزی و با استفاده از نور UV سیستم ژل
داکیومننت (Syngene GBox Gel Documentation)
مشاهده شد (۷).

درجه سلسیوس نگهداری شد. پس از ۲۴ ساعت
کلنی‌های ظاهر شده بر روی محیط TSA و پس از یک
هفته کلنی‌های تشکیل شده بر روی آب آگار شمارش
شد. باکتری‌های مشاهده شده بر روی آب آگار برای
اطمینان و بررسی مشخصات ظاهری به محیط
اختصاصی ISP2 (۱۰ گرم در لیتر عصاره مالت، ۴ گرم
در لیتر عصاره مخمر، ۴ گرم در لیتر گلوکز و ۱۸ گرم
در لیتر آگار با اسیدیته ۷/۲) منتقل شد.

آنالیز مولکولی جمعیت میکروبی با استفاده از سامانه DGGE

استخراج DNA از ۱ گرم خاک با استفاده از کیت
استخراج دی ان ا از خاک (Ultra Clean soil DNA
kit (MO BIO Laboratories, Inc) و بر اساس
دستورالعمل آن انجام شد. آنالیز PCR-DGGE (PCR-
Denaturing Gradient Gel Electrophoresis
استفاده از جفت آغازگر اختصاصی ژن 16srRNA با
توالی -GCF357:5-CCTACGGGAGGCAGCAG-
3; R518:5-ATTACCGCGGCTGCTGG-
5-GCStrepB:
5-ACAAGCCCTGGAAACGGGGT-3
StrepE:5- CACCAGGAATTCCGATCT-3
و گیره جی سی



شکل ۱. کشت و نگهداری پنبه تراریخته (سمت راست) و شاهد غیر تراریخته (سمت چپ) در گلخانه تراریخته

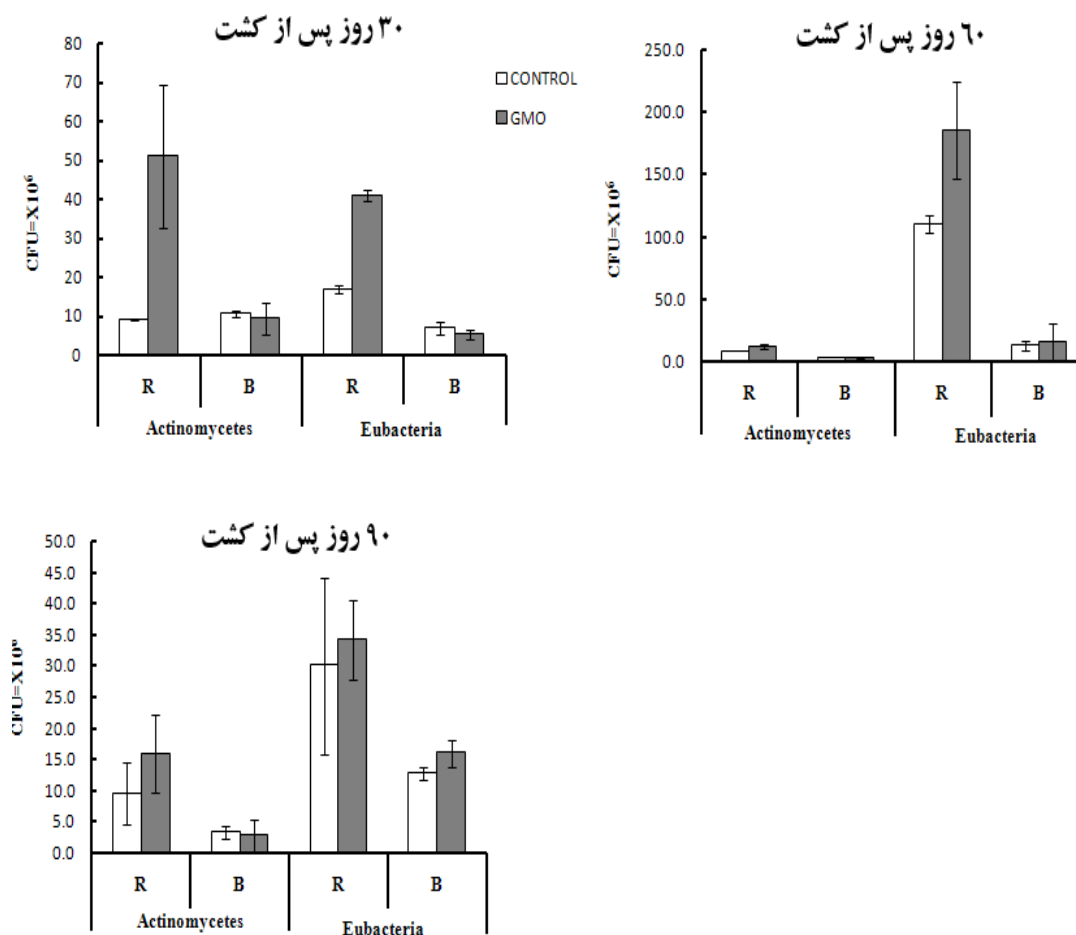
نتایج

بررسی وزن تر و خشک اندام هوایی و ریشه نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین گیاهان تراریخته و غیر تراریخته (شاهد) وجود نداشت (داده‌ها نشان داده نشده است).

بررسی جمعیت باکتریایی خاک

بر اساس شمارش‌های انجام شده از سری رقت‌های خاک مشخص شد که در هر گرم خاک خشک ریزوسفر مضرپی از 10^7 و در ناحیه بالک مضرپی از 10^6 واحد تشکیل کلنی (cfu) وجود داشت. جمعیت باکتری در خاک ناحیه ریزوسفر و بالک اگر چه در دوره‌های مختلف رشد گیاه تغییر کرد اما در هر سه دوره و برای هر دو گروه تراریخته و غیر تراریخته در ناحیه ریزوسفر بیشتر از بالک بود. جمعیت باکتری ریزوسفر گیاه غیر تراریخته ۳۰، ۶۰ و ۹۰ روز پس از کشت به ترتیب 2×10^7 ، 10×10^7 و $3/5 \times 10^7$ و برای

گیاه تراریخته به ترتیب 5×10^7 ، 15×10^7 و $3/5 \times 10^7$ بود. مقایسه میانگین‌ها نشان داد جمعیت باکتریایی ریزوسفر گیاه تراریخته ۳۰ و ۶۰ روز پس از کشت بیشتر از گیاه غیر تراریخته بود. در حالیکه در آخرین مرحله نمونه برداری این تفاوت معنی دار نبود. جمعیت باکتری خاک ناحیه بالک گیاه غیر تراریخته ۳۰، ۶۰ و ۹۰ روز پس از کشت به ترتیب $0/68 \times 10^7$ ، $1/2 \times 10^7$ و $1/2 \times 10^7$ و برای گیاه تراریخته به ترتیب $0/51 \times 10^7$ ، $1/58 \times 10^7$ و $1/6 \times 10^7$ بود. مقایسه میانگین‌ها نشان داد تفاوت جمعیت باکتریایی خاک ناحیه بالک گیاه تراریخته و غیر تراریخته در هیچ یک از سه دوره رشد گیاه معنی دار نبود. الگوی افزایش جمعیت باکتری خاک ناحیه بالک در طول دوره رشد و ثبات آن با افزایش سن گیاه بر خلاف خاک ریزوسفری بود. الگوی تغییرات جمعیت در ریزوسفر و بالک برای گیاه تراریخته و شاهد یکسان بود (شکل ۲).



شکل ۲. تعداد باکتری کل و اکتینومیستی خاک ناحیه رایزوسفر (R) و بالک (B) پنبه تراریخته (GM) و شاهد (CONTROL) ۳۰، ۶۰ و ۹۰ روز پس از کشت

تراریخته بود. این تفاوت اگر چه ۶۰ روز پس از همچنان وجود داشت اما در نهایت در آخرین مرحله نمونه برداری بی معنی شد. الگوی جمعیت اکتینومیستی در طول دوره رشد گیاه از نوع کاهشی بود (شکل ۲).

آنالیز مولکولی جمعیت میکروبی با استفاده از سامانه DGGE

نتایج به دست آمده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز حاصل از جفت آغازگرهای GCF357/ R518 و GCStrepB/

بررسی جمعیت اکتینومیستی خاک

تفاوت جمعیت اکتینومیستی خاک رایزوسفر و ناحیه بالک در گیاه غیر تراریخته معنی دار نیست. در حالیکه در گیاه تراریخته در سطح ۵ درصد تفاوت معنی دار دیده شد. تفاوت در جمعیت ناحیه رایزوسفر و بالک در هر سه دوره رشد گیاه وجود داشت. جمعیت اکتینومیستی گیاه تراریخته در اولین مرحله نمونه برداری (۳۰ روز پس از کشت بذر) بیشتر از گیاه غیر

از والد غیر تراریخته بود. دیگر توده‌های باکتریایی در اطراف ریشه تراریخته و غیر تراریخته تفاوت نداشت (۹). اگر چه این تغییرات گذرا هستند و در صورت تغییر الگوی کشت به وضعیت سابق برمیگردند اما آزمایش این همانی متابولیت‌های گیاه تراریخته و والد می‌تواند نگرانی‌های احتمالی را از بین ببرد. در این تحقیق تاثیر ترشحات و یا حضور ریشه پنبه تراریخته بر فلور میکروبی منطقه رایزوسفر به خوبی نشان داده شد. همچنین مشخص شد که در نواحی دورتر از ریشه (خاک ناحیه بالک) فلور میکروبی خاک گیاه تراریخته و شاهد در طول دوره رشد گیاه بر اساس یک الگوی یکسان تغییر می‌کند و تفاوت معنی داری با یکدیگر ندارند. ارتباط مستقیم ریشه گیاهان و فلور میکروبی از چندین دهه پیش شناخته شده است (۱۰). تغییر قابل توجه فلور میکروبی خاک در نتیجه کشت گندم اصلاح شده به روش سنتی در پی جانشینی یک جفت کروموزوم یک رقم گندم بهاره نسبتاً مقاوم به بیماری پوسیدگی ریشه با کروموزوم متناظر آن از یک رقم گندم بهاره بسیار حساس گزارش شده است (۱۱-۱۲). این مطالعه نشان داد که ویژگی‌های کمی و کیفی میکروفلور رایزوسفر می‌تواند در اصلاح نبات سنتی با جانشینی اطلاعات ژنتیکی از رقمی به رقم دیگر تغییر کند. نتایج پژوهش حاضر نشان داد تفاوت جمعیت یوباکتریایی پنبه *chi* که تنها در یک ژن با والد خود تفاوت دارد گذرا است و در طول رشد گیاه ناپایدار بود. با توجه به اینکه تولید پنبه بی تی پیشینه بیشتری دارد، تاثیر آن بر فلور میکروبی خاک در حدود ۲۰ سال پیش انجام شد. نتایج این پژوهشگران همسو با نتایج پژوهش حاضر افزایش گذرا در جمعیت قابل کشت باکتری و قارچ در دو لاین از سه لاین پنبه تراریخته مورد آزمایش را نشان داد (۱۳). تفاوت صفات فیزیولوژیکی بین لاین‌های گوناگون گیاهان تراریخته

StrepE به ترتیب مربوط به ژن 16S rDNA یوباکتریایی و اکتینومیستی بر روی ژل آگارز ۱٪، یک باند نزدیک به ۳۰۰ bp را در همه نمونه‌های تهیه شده از ناحیه بالک و رایزوسفر گیاه تراریخته و غیر تراریخته (کنترل) نشان داد. این باند در نمونه‌های مربوط به خاک رایزوسفر گیاه تراریخته واضح تر و ضخیم تر بود (شکل ۳). الکتروفورز این تک باند با دستگاه DGGE بر روی ژل اکریل آمید ۸ درصد حاوی شیب مواد دنا توره کننده قادر به نشان دادن تنوع موجود در جمعیت یوباکتریایی و یا اکتینومیستی نبود.

بحث و نتیجه گیری

بر پایه گزارش سرویس بین المللی دستیابی به کاربرد بیوتکنولوژی در کشاورزی (www.isaaa.org)، در حال حاضر نزدیک به ۱۲ میلیون هکتار از اراضی کشاورزی دنیا به کشت پنبه بی تی (BT) اختصاص دارد. ایالات متحده آمریکا و هند یکی از تولید کنندگان عمده پنبه تراریخته هستند. پنبه بی تی با مقاومت به آفات پروانه‌ای موجب کاهش مصرف سموم شیمیایی شده است. بر اساس آزمون‌های گلخانه‌ای پنبه *chi* مقاومت خوبی نسبت به پژمردگی آوندی ورتیسیلیومی نشان داده است (۸). این گیاه تراریخته و یا نتاج حاصل از تلاقی آن با ارقام بومی و تجاری مورد استفاده در کشور پس از گذراندن آزمون‌های مربوط به ایمنی زیستی می‌تواند در مزارع کشت شود. چنانچه گیاه تراریخته متابولیت جدیدی را تولید و از طریق ریشه وارد خاک کند ممکن است رشد برخی از میکروب‌ها بویژه در فضای رایزوسفری را تغییر دهد. نمونه‌ای که به خوبی این تاثیر را نشان می‌دهد گیاه تراریخته *لوتوس کورنیکولاتوس* (*Lotus corniculatus*) است که به واسطه ترشح اپینها (*opines*) جمعیت باکتری‌های مصرف کننده اپین در رایزوسفر آن پنج تا ده برابر بیشتر

"کربمی و همکاران، بررسی تاثیر پنبه حاوی ژن *chi*..."

باز شدن غوزه اگر چه جمعیت باکتری‌های اکسید کننده آمونیوم در هر دو گروه کاهش قابل توجه نشان داد اما برای هر گروه متفاوت از دیگری بود. در مجموع تغییرات باکتری‌های مفید در رایزوسفر گیاه تراریخته ملایم تر بود که می‌تواند یکی از مزایای آن باشد (۱۶). همسو با این نتایج تفاوت جمعیت اکتینومیستی پنبه *Chi* و شاهد در خاک رایزوسفری معنی دار بود. افزایش قابل توجه این باکتری‌های مفید اوایل و اواسط دوره رشد گیاه در خاک رایزوسفری گیاه تراریخته می‌تواند یکی از مزایای آن باشد.

نتایج حاصل از مقایسه کمی تکثیر قطعات ۳۰۰ جفت بازی (با استفاده از جفت آغازگر اختصاصی برای یوباکتری‌ها و اکتینومیستها) از روی ژن 16s rRNA ماده وراثتی استخراج شده از مقدار مشخص (یک گرم) خاک ناحیه بالک و رایزوسفر گیاه تراریخته و شاهد نشان داد تعداد کپی‌های بیشتری از الگو در رایزوسفر و بالک گیاه تراریخته نسبت به شاهد وجود دارد. تفکیک قطعات تکثیر شده با استفاده از سامانه DGGE قادر به نمایش تنوع قطعات تکثیر شده نبود. بررسی متاژنومی خاک ناحیه رایزوسفری لاین‌های پنبه تراریخته در دوره‌های مختلف رشد در مطالعات آتی به بررسی دقیق تر تاثیر پنبه تراریخته بر فلور باکتریایی خاک کمک خواهد کرد.

گزارش شده است. مطالعه دونگان و همکاران تاثیر متفاوت لاین‌های مختلف پنبه بی تی بر فلور میکروبی را نیز تایید کرد. همچنین تاثیر متفاوت وارپته‌های مختلف کلزای تراریخته بر جمعیت میکروبی قابل کشت خاک گزارش شده است (۱۴). در مجموع از مطالعات انجام شده می‌توان این برداشت را داشت که تاثیر هر لاین تراریخته بر فلور میکروبی خاک باید به طور جداگانه بررسی شود.

مطالعه فلور میکروبی خاک کشت شده با پنبه حامل ژن کیتیناز و گلوکاناز و مقایسه آن با پنبه غیر تراریخته در دوره‌های مختلف رشد نشان داد که تعداد باکتری‌های قابل کشت دو گروه گیاه مورد نظر تفاوت معنی داری نداشت. تنوع بین جنس‌های باکتریایی شناسایی شده در رایزوسفر گیاه تراریخته کمتر از گیاه غیر تراریخته بود که با افزایش سن گیاه و در طول دوره رشد و تکامل این تفاوت کاهش پیدا کرد (۱۵).

مطالعه فلور میکروبی رایزوسفر پنبه *Bt+CpTI* و مقایسه آن با والد غیر تراریخته انجام شده است. نتایج این مطالعه نیز تفاوت معنی داری را در کمیت جمعیت باکتری‌های قابل کشت حتی در طول دوره کشت گزارش نکرد. هر چند در مورد باکتری‌هایی با عملکرد مشخص مانند باکتری‌های اکسید کننده آمونیوم تفاوت‌هایی مشاهده شد. در مرحله تشکیل کاسبرگ تعداد این باکتری‌ها در گیاه غیر تراریخته و تراریخته به ترتیب ۴ و ۲ برابر افزایش پیدا کرد. در مرحله گل دهی جمعیت این باکتری‌ها در رایزوسفر گیاه شاهد کاهش و در گیاه تراریخته افزایش پیدا کرد. در مرحله غوزه باکتری‌های مورد نظر در شاهد افزایش نشان داد در حالیکه در رایزوسفر پنبه تراریخته تغییر نکرد. پس از

1. Fradin EF, Thomma BP. Physiology and molecular aspects of *Verticillium* wilt diseases caused by *V. dahliae* and *V. albo-atrum*. *Molecular Plant Pathology*, 2006; 7(2): 71-86.
2. Lucht JM. Public Acceptance of Plant Biotechnology and GM Crops. *Viruses*, 2015; 7(8): 4254-4281.
3. Tohidfar M, Mohammadi M, Ghareyazie B. Agrobacterium-mediated transformation of cotton (*Gossypium hirsutum*) using a heterologous bean chitinase gene. *Plant cell, tissue and organ culture*, 2005; 83(1): 83-96.
4. Sanei SJ, Razavi SE, Lotfalinezhad E. Epidemiology of Cotton *Verticillium* wilt in Golestan Province, the North of Iran. *Annual Review and Research in Biology*, 2013; 3 (4): 564-573.
5. El-Tarabily K. Promotion of tomato (Mill.) plant growth by rhizosphere competent 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase-producing streptomycete actinomycetes. *Plant and Soil*, 2008; 1 (308): 161-174.
6. Saito A, Ikeda S, Ezura H, Minamisawa, K. Microbial analysis of the phytosphere using culture-independent methodologies. *Microbes and Environments*, 2007; 22 (2): 93-105.
7. Das M, Royer TV, Leff LG. Diversity of Fungi, Bacteria, and Actinomycetes on Leaves Decomposing in a Stream. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007; 73 (3): 756-767.
8. Tohidfar M, Hossaini R, Shokhandan Bashir N, Tabatabaei M. Enhanced Resistance to *Verticillium dahliae* in Transgenic Cotton Expressing an Endochitinase Gene from *Phaseolus vulgaris*. *Czech J. Genet. Plant Breed*, 2012; 48 (1): 33-41.
9. Oger P, Petit A, Dessaux Y. Genetically engineered plants producing opines alter their biological environment. *Nature Biotechnology*, 1997; 15 (4): 369-372.
10. Rovira AD. Interactions between plant roots and soil microorganisms. *Annual Review of Microbiology*, 1965; 19: 241-266.
11. Neal JL, Atkinson TG, Larson RI. Changes in the rhizosphere microflora of spring wheat induced by disomic substitution of a chromosome. *Canadian Journal of Microbiology*, 1970; 16: 153-158.
12. Neal JL, Larson RI, Atkinson TG. Changes in rhizosphere populations of selected physiological groups of bacteria related to substitution of specific pairs of chromosomes in spring wheat. *Plant and Soil*, 1973; 39 (1): 209-212.
13. Donegan KK, Palm CJ, Fieland VJ, Porteous LA, Ganio LM, Schaller DL, Bucao LQ, Seidler RJ. Changes in levels, species and DNA fingerprints of soil microorganisms associated with cotton expressing the *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* endotoxin. *Applied Soil Ecology*, 1995; 2: 111-124.
14. Siciliano SD, Germida JJ. Taxonomic diversity of bacteria associated with the roots of field-grown transgenic *Brassica napus* cv. *Quest*, compared to the non-transgenic *B. napus* cv. *Excel* and *B. rapa* cv. *Parkland*. *FEMS Microbiology Ecology*, 1999; 29 (3): 263-272.
15. Li Z, Feng Z, Zhao L, Shi Y, Feng H, Zhu H. Effects of transgenic cotton expressing chitinase and glucanase genes on the diversity of soil bacterial community. *Yi Chuan*, 2015; 37 (8): 821-827.
16. Dong L, Meng Y, Wang J. Effects of transgenic Bt + CpTI cotton on rhizosphere bacteria and ammonia oxidizing bacteria population. *Wei Sheng Wu Xue Bao*, 2014; 54 (3): 309-318.

"کریمی و همکاران، بررسی تاثیر پنبه حاوی ژن *chi*..."

"مجله ایمنی زیستی، دوره ۱۰، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۶"