

## کشت بافت و تراریزش نارنج (*Citrus aurantium*) با استفاده از ژن کد

### کننده‌ی پوشش پروتئینی ویروس تریستزای مرکبات (CTV)

بنفشه فتاح<sup>۱</sup>، محمدمهدی سوهانی<sup>۲\*</sup>، عبدالله حاتم‌زاده<sup>۳</sup>، علیرضا افشاری‌فر<sup>۴</sup>، بهروز گل‌عین<sup>۵</sup>، محمدحسین رضادوست<sup>۶</sup>، محمدرضا میرزایی<sup>۷</sup>، امیرحسین زمانی<sup>۸</sup>

۱، ۷ و ۸- کارشناس ارشد بیوتکنولوژی- دانشکده کشاورزی- دانشگاه گیلان

۲، ۳ و ۶- به ترتیب استادیار، دانشیار و مربی دانشکده کشاورزی- دانشگاه گیلان

۴- عضو هیات علمی دانشکده کشاورزی- دانشگاه شیراز

۵- عضو هیات علمی مرکز تحقیقات مرکبات کشور- رامسر

\* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: msohani@guilan.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۱/۷/۱۵ - تاریخ پذیرش: ۹۱/۸/۹)

### چکیده

#### واژه‌های کلیدی

*Agrobacterium tumefaciens*

ابی کوتیل

اندام‌زایی مستقیم

تنظیم کننده‌های رشد

زخم‌زنی

در این پژوهش به منظور به دست آوردن گیاهان تراریخته‌ی نارنج، از ریزنمونه‌های اپی کوتیل و هیپوکوتیل نارنج استفاده و بهبود اندام‌زایی مستقیم و تولید شاخساره در ریزنمونه‌ها با استفاده از تیمارهای مختلف بررسی شدند. تراریزش از طریق هم‌کشتی ریزنمونه‌ها با *Agrobacterium tumefaciens* سویه‌ی EHA105 حامل وکتور pFGC5941 و ژن کد کننده‌ی پوشش پروتئینی ویروس تریستزای مرکبات (CTV) انجام شد. پس از تراریزش، ریزنمونه‌ها به محیط کشت انتخابی حاوی علف‌کش بستا با ترکیبی از سطوح تنظیم کننده‌های رشد BAP (۰، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر) و NAA (۰، ۰/۲۵ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) منتقل شدند. اثر زخم‌زدن بر اندام‌زایی مستقیم و تولید شاخساره و اثر استفاده از وکیوم بر کارایی تراریزش، بررسی شدند. تأیید تراریخته بودن شاخساره‌ها در محیط انتخابی حاوی علف‌کش بستا و انجام واکنش پی.سی.آر با ژن‌های اختصاصی صورت گرفت. بهترین کارایی اندام‌زایی یا تولید شاخساره (۵۷ درصد) با استفاده از ترکیب تنظیم کننده‌های رشد به میزان ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر NAA حاصل شد ضمن این که، زخم‌زدن اثر معنی‌داری بر تولید شاخساره نداشت. بالاترین میزان شاخساره‌های تراریخته به میزان ۱۱/۲۵ درصد در تیمار وکیوم به دست آمد. در نهایت شاخساره‌های تراریخته بر روی دانه‌های رشد یافته در شرایط *in vitro* ریزپیوند شدند.

## مقدمه

(2004). پنا و همکاران از سویه‌ی EHA105 اگروباکتریوم برای ترانسفورماسیون قطعات اپی‌کوتیل دانه‌های رشد یافته در شرایط *in vitro* و بخش‌های میان‌گره‌ای ساقه گیاهان جوان گلخانه‌ای استفاده کردند (Pena et al. 1995a; 1995b; 1997). گزارش‌های زیادی از واردکردن تعدادی از ژن‌های مهم به مرکبات از جمله ژن کدکننده‌ی پوشش پروتئینی ویروس تریتزای مرکبات منتشر شده است (Yang et al. 2000). هدف از این پژوهش افزایش کارایی اندام‌زایی مستقیم در ریزنمونه‌های اپی‌کوتیل و هیپوکوتیل نارنج در محیط انتخابی و بررسی شرایط و عوامل دخیل در افزایش کارایی تراریخته‌سازی شاخساره‌های نارنج پس از هم‌کشتی با اگروباکتریوم بوده است.

## مواد و روش‌ها

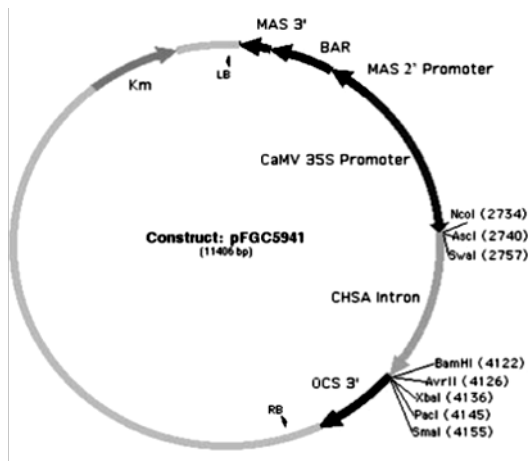
جهت تهیه‌ی ریزنمونه، میوه‌های تازه‌ی نارنج از مرکز تحقیقات مرکبات کشور، رامسر تهیه شد. بذور نارنج از میوه‌های تازه و سالم خارج شده و پس از جدا کردن پوسته خارجی، ضدعفونی سطحی شدند. برای ضدعفونی، بذرها در محلول ۲ درصد هیپوکلریت سدیم به همراه توئین ۲۰ با غلظت ۱ درصد به مدت ۱۵ دقیقه به آرامی تکان داده شده سپس ۳ مرتبه با آب استریل ۴۰ تا ۴۵ درجه سانتی‌گراد هر مرتبه به مدت ۳ دقیقه شستشو شدند. در ادامه بذور به مدت یک دقیقه در اتانل ۷۰ درصد قرار گرفته و ۳ مرتبه با آب مقطر استریل آبکشی شدند. بذرها ضد عفونی شده به محیط جوانه‌زنی شامل نمک‌های محیط کشت MS ۱/۲، ویتامین‌های کامل محیط کشت MS و ۳۰ گرم در لیتر ساکارز منتقل و برای مدت ۴ تا ۶ هفته در  $27 \pm 1$  درجه سانتی‌گراد در شرایط تاریکی نگهداری شدند. ژن موزاییک پوشش پروتئینی ویروس تریتزای مرکبات (CP-P25) مربوط به نژادهای CTV1 و CTV2، ایزوله شده در قطب علمی ویروس‌شناسی دانشگاه شیراز، استفاده شد. توالی‌های مذکور در یک ناقل خاموشی به نام pFGC5941 (ABRC) کلون شد (Zamani 2008). در این پژوهش از باکتری *Agrobacterium tumefaciens* نژاد

درخت نارنج (*Citrus aurantium*) به دلیل ویژگی‌های خوب زراعی به خصوص مقاومت به تنش‌های زیستی و غیرزیستی و اثر آن بر عملکرد و کیفیت میوه‌ی پیوندک مورد توجه بوده و در بیشتر مناطق مرکبات خیز دنیا پایه‌ی مادری است. اما ضعف بزرگ این گیاه عدم تحمل به ویروس تریتزای مرکبات (CTV<sup>1</sup>) است که از مهم‌ترین بیماری‌های صنعت مرکبات به شمار می‌آید و منجر به نابودی میلیون‌ها اصله درخت در سرتاسر دنیا شده است (Bar-Joseph et al. 1989). بنابراین، یکی از اهداف مهم در اصلاح مرکبات ایجاد مقاومت نسبت به بیماری تریتزاست. در سال‌های اخیر تلاش‌های زیادی برای ایجاد مقاومت به ویروس تریتزای انجام شده است. این روش‌ها بیش‌تر متکی بر خاموشی ژن پس از رونویسی (PTGS<sup>2</sup>) است که بر اساس بیان توالی‌های ویروسی در گیاه استوار است (Dominguez et al. 2002).

مرکبات دارای محدودیت‌هایی برای اصلاح به روش‌های سنتی هستند که بیشتر با زیست‌شناسی تولیدمثل آن‌ها مانند چند جنینی نوسلار، سطح بالای هتروزیگوسیتی و دوره‌ی طولانی جوانی آن‌ها در ارتباط است (Grosser and Gmitter 1990). امروزه انتقال ژن با استفاده از مهندسی ژنتیک به یک روش جایگزین مناسب برای اصلاح مرکبات و دیگر گونه‌ها تبدیل شده است زیرا با استفاده از این روش می‌توان علاوه بر حفظ ویژگی‌های مطلوب یک رقم، یک صفت دلخواه را در یک دوره زمانی تا حدودی کوتاه‌تر به آن افزود (Bond and Roose 1998).

انتقال ژن به ریزنمونه‌های جوان به واسطه‌ی اگروباکتریوم روشی متداول برای تولید گیاهان مرکبات تراریخته است. تراریزش نارنج از طریق کشت بافت ریزنمونه‌های مختلف از جمله اپی‌کوتیل و هیپوکوتیل، هم‌کشتی آن‌ها با اگروباکتریوم و سپس باززایی از ریزنمونه‌ها به گیاه تراریخته انجام می‌شود (Moore et al. 1992; Pena et al. 1995a). باززایی بیشتر به دو صورت مستقیم و غیرمستقیم است. در روش مستقیم، ابتدا جوانه‌ها و سپس شاخساره بر روی ریزنمونه‌ها تولید می‌شود اما، در روش باززایی غیرمستقیم قبل از ظهور اندام‌ها کالوس تشکیل می‌شود (Phillips;

1- Citrua tristeza virus  
2- Post transcriptional gene silencing



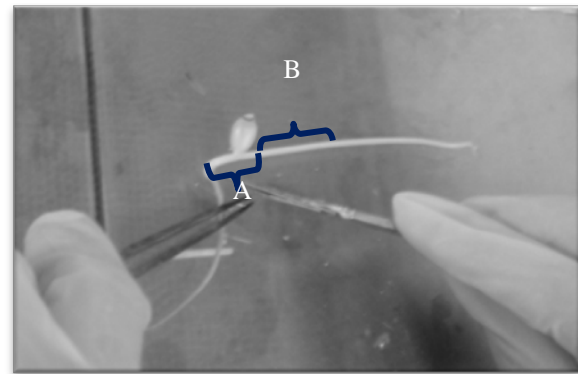
شکل ۱- نقشه ژنتیکی ناقل خاموشی pFGC5941

Figure 1- Map of pFGC5941 silencing vector

هیپوکوتیل، گره کوتیلدونی و بخشی از اپی کوتیل و دیگری نزدیکترین بخش اپی کوتیل به گره کوتیلدونی بود (شکل ۲). در تیمار زخم‌زنی، یک برش طولی به اندازه‌ی تقریبی ۲ میلی‌متر در دو انتهای ریزنمونه‌ها ایجاد و اثر آن در کارایی اندام‌زایی بررسی شد.

قطعات اپی کوتیل و هیپوکوتیل آماده شده جهت تراریزش در سوسپانسیون آگروباکتریوم تهیه شده در محیط تلقیح شامل نمک‌های کامل محیط کشت MS، ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و ۱۰۰ میکرومولار استوسیرینگون با pH=۵/۷ غوطه‌ور شده و برای مدت ۲۰ دقیقه در دمای  $27 \pm 1$  درجه سانتی‌گراد به آرامی تکان داده شدند. تعدادی از ریزنمونه‌ها پس از شناور شدن در محلول باکتری، با دستگاه وکیوم (Eppendorf) تحت شرایط خلا قرار گرفتند تا میزان اثر آن بر کارایی تراریزش بررسی شود. عمل وکیوم مدت ۳۰ ثانیه و تا خروج حباب از محلول محیط کشت انجام شد. ریزنمونه‌های تلقیح شده از محلول باکتری خارج و بر روی کاغذهای صافی استریل خشک شدند. در نهایت ریزنمونه‌ها به پلیت‌های حاوی محیط هم‌کشتی شامل نمک‌های کامل محیط کشت MS، ویتامین‌های محیط B5، ۳۰ گرم در لیتر ساکارز، ۸ گرم در لیتر آگار و تنظیم‌کننده‌های رشد مربوط با pH=۵/۷ منتقل شدند.

در آزمایش‌های مربوط به بررسی اثر سیتوکینین و اکسین بر



شکل ۲- قسمت‌های مورد استفاده‌ی گیاهچه‌های حاصل از بذور نارنج برای تهیه‌ی ریزنمونه. A) ریزنمونه‌ی هیپوکوتیل، B) ریزنمونه‌ی اپی کوتیل.

Figure 2- Explant sources from sour orange (*C. aurantium*). A) Hypocotyl segments-derived explant, B) Epicotyl segments-derived explants.

EHA105 استفاده شد. ناقل خاموشی pFGC5941 با استفاده از دستگاه الکتروپوریشن (Bio-Rad) به آگروباکتریوم انتقال یافت. کد شناسایی این پلاسمید در بانک اطلاعاتی AY310901 و شماره‌ی آن CD3-447 است. pFGC5941 دارای ژن *nptII* عامل ایجاد مقاومت به آنتی‌بیوتیک کانامایسین در باکتری، ژن *BAR*<sup>۴</sup> عامل ایجاد مقاومت به علف‌کش غیرانتخابی آمونیوم گلوپوزینیت با نام تجاری بستا<sup>۵</sup> به‌عنوان شاخص انتخابی گیاهی، پروموتور قوی *CaMV35S*<sup>۶</sup> و ترمیناتور *NOS*<sup>۷</sup> است (شکل ۱).

به منظور القای حداکثری ژن‌های بیماری‌زای (*vir*) آگروباکتریوم از دستورالعمل کشت سه روزه‌ی گلوین استفاده شد (Gelvin, 2006). باکتری‌های رشدیافته در محیط القا با انجام سانتریفیوژ در  $6000 \text{ rpm}$  به مدت ۵ دقیقه رسوب داده شدند و رسوب حاصل در محیط MS مایع و غلظت  $OD_{600} = 0.8-1$  حل و برای تراریزش ریزنمونه‌ها استفاده شد.

گیاهچه‌های اتیوله حاصل از بذور نارنج کشت شده در تاریکی، برای تهیه‌ی ریزنمونه‌ها استفاده شدند. ابتدا لپه‌ها، ریشه و برگ‌ها و ساقه‌های زاید جدا شده و سپس از گیاهچه‌ها دو نوع ریزنمونه به طول تقریبی ۸ تا ۱۰ میلی‌متر تهیه شد که یکی شامل

4- Phosphinothricin acetyl transferase

5- Basta

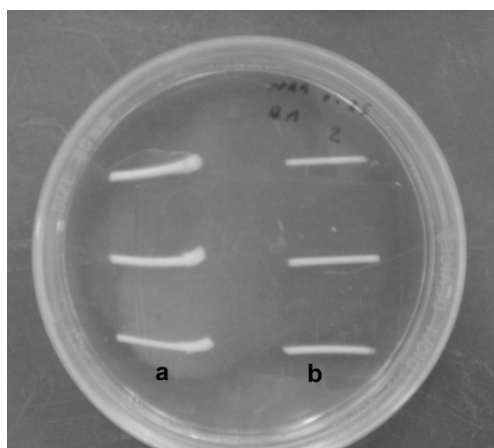
6- Cauliflower mosaic virus 35s

7- Nopaline synthase

جدول ۱- توالی‌های مستقیم و معکوس آغازگرهای مورد استفاده در پی.سی.آر

**Table 1-** Forward and reverse primer sequences used in PCR

| ردیف<br>Row | آغازگر<br>Primer | توالی آغازگر<br>Sequence of primer          | طول محصول PCR (bp)<br>Length of PCR product |
|-------------|------------------|---------------------------------------------|---------------------------------------------|
| 1           | CTV F            | 5'-GCTCTAGAGGCGCGCCTGCTGCTGAGTCTTCTTTCG-3'  | 393                                         |
| 2           | CTV R            | 5'-GCGGATCCATTTAAATCCGTGGTGTGCATCATCACTT-3' |                                             |
| 3           | NOS F            | 5'-GAATCCTGTTGCCGGTCT-3'                    | 167                                         |
| 4           | NOS R            | 5'-TTGCGCGCTATATTTTGT-3'                    |                                             |
| 5           | KAN F            | 5'-ATGTTGCTGTCTCCCAGGTC-3'                  | 382                                         |
| 6           | KAN R            | 5'-GAAAGCTGCCTGTTCCAAAG-3'                  |                                             |



شکل ۳- ریزنمونه‌های هیپوکوتیل (a) و اپی کوتیل (b) حاصل از دانه‌های رشد یافته در تاریکی در سطوح مختلف تنظیم کننده‌های رشد BAP و NAA

**Figure 3-** Hypocotyl- (a) and epicotyl- (b) segment-derived explants from seedlings grown in the dark in mediums supplemented with combinations of BAP and NAA

دستورالعمل ادوارد (۱۹۹۱) استخراج و واکنش پی.سی.آر انجام شد. واکنش‌های پی.سی.آر با آغازگرهای مستقیم و معکوس ژن موزاییک CTV شامل CTV F و CTV R و آغازگرهای ترمیناتور NOS شامل NOS F و NOS R انجام شد (جدول ۱). علاوه بر

باززایی، تیمارهای تنظیم کننده‌های رشد ۰، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر<sup>۸</sup> BAP و ۰، ۰/۲۵ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر<sup>۹</sup> NAA از زمان انتقال ریزنمونه‌ها به محیط هم‌کشتی اعمال شد. پس از انتقال به محیط هم‌کشتی پلیت‌ها به مدت ۳ روز در تاریکی و در دمای ۲۷±۱ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. در مرحله‌ی بعد ریزنمونه‌ها از محیط هم‌کشتی به محیط انتخابی شامل نمک‌های کامل محیط MS، ویتامین‌های محیط B5، ۳۰ گرم در لیتر ساکارز، ۸ گرم در لیتر آگار و همان ترکیب تنظیم کننده‌های رشد همراه با ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم و ۵۰ میکرومولار علف‌کش بست با pH=۵/۷ انتقال یافته و در دمای ۲۷±۱ درجه سانتی‌گراد در فتوپریود ۱۶ ساعته قرار گرفتند. پس از ۴ الی ۵ هفته، ریزنمونه‌هایی که دارای جوانه‌هایی به طول ۲-۱ میلی‌متر شدند به محیط رشد شاخساره شامل نمک‌های کامل محیط کشت MS، ویتامین‌های محیط B5، ۳۰ گرم در لیتر ساکارز، ۸ گرم در لیتر آگار، ۱ میلی‌گرم در لیتر<sup>۱۰</sup> GA<sub>3</sub>، ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم و ۲۵ میکرومولار علف‌کش بست با pH=۵/۷ منتقل و هر ۲ هفته محیط کشت تعویض شد.

جهت تایید تراریخته بودن گیاهان باززایی شده در محیط انتخابی، از نمونه‌های برگ گیاهچه‌های باززایی شده دی.ان.ا. طبق

8- Benzylaminopurine  
9- Naphthaleneacetic acid  
10- Gibberellic Acid

جدول ۲- نتایج تجزیه واریانس اثر سطوح BAP و NAA بر اندام‌زایی مستقیم شاخساره از ریزنمونه های نارنج

Table 2- Analysis of variance of effect of BAP and NAA on direct shoot organogenesis in explants of sour orange

| Source  | DF | MS                 |
|---------|----|--------------------|
| BAP     | 2  | 15.55**            |
| NAA     | 2  | 1.48*              |
| BAP*NAA | 4  | 0.68 <sup>ns</sup> |
| error   | 36 | 0.43               |

\*\* معنی دار در سطح ۱٪، \* معنی دار در سطح ۵٪، ns: غیر معنی دار

طول حداقل ۲-۱ میلی‌متر در مدت زمان حداکثر ۶ هفته در محیط انتخابی تولید کرده بودند. بر این اساس، بیش‌ترین میزان باززایی شاخساره با مقادیر ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر NAA به‌دست آمد و با دیگر تیمارها در سطح ۱ درصد اختلاف معنی‌داری نشان داد. در این سطح از تنظیم‌کننده‌های رشد میزان باززایی شاخساره به ۵۷ درصد رسید. بین سطوح مختلف BAP اختلاف معنی‌دار در سطح ۱ درصد و بین تیمارهای مختلف NAA اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد مشاهده شد (جدول ۲). علاوه بر این در محیط کشت‌های فاقد BAP هیچ اندام‌زایی مشاهده نشد در حالی‌که در محیط کشت‌های فاقد NAA اندام‌زایی صورت گرفت.

این نتایج با گزارش‌هایی مبنی بر لزوم وجود سیتوکینین BAP در باززایی گیاهچه و نقش حاشیه‌ای اکسین‌ها در این امر مطابقت دارد (Pena et al. 2004). پژوهش‌ها نشان داده‌اند که بهترین باززایی ریزنمونه‌های نارنج در حضور BAP در محیط کشت به دست می‌آید (Silva et al. 2008). BAP سیتوکینینی است که در مقایسه با سایر سیتوکینین‌ها بالاترین تعداد جوانه را در ریزنمونه‌های مرکبات ایجاد می‌کند (Moreira-Dias et al. 2001; Almeida et al. 2002; Silva et al. 2005; Schinor et al. 2006). در تعدادی از پژوهش‌های انجام شده روی مرکبات، باززایی در محیط کشتی انجام شده است که فقط حاوی تنظیم‌کننده BAP بوده است (Ghorbel et al. 1998). هم‌چنین نشان

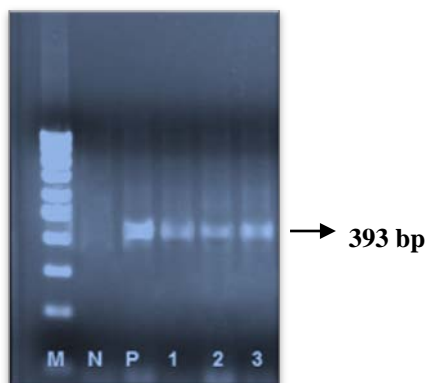
این، به منظور اجتناب از تراریخته دانستن یک گیاه به سبب حضور آگروباکتریوم در سطح آن، یک واکنش پی‌سی.آر با آغازگرهای مستقیم و معکوس ژن خارج KAN DNA-Ty KAN -عامل ایجاد مقاومت به آنتی‌بیوتیک کانامایسین در باکتری- شامل KAN R و KAN F انجام شد (جدول ۱). در ادامه الکتروفورز محصولات پی‌سی.آر روی ژل آگارز ۱ درصد بررسی و مشاهده شد.

پس از این که شاخساره‌های حاصل از باززایی ریزنمونه‌ها به اندازه‌ی حداقل ۲۰-۱۰ میلی‌متر رسیدند، از ریزنمونه‌ها جدا شده و به منظور دستیابی سریع‌تر و آسان‌تر به گیاه تراریخته کامل، بر روی دانه‌های نارنج رشد یافته در محیط درون شیشه ریزپیوندی شدند.

آزمایش‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. هر تیمار دارای ۵ تکرار و هر تکرار یک پتری دیش ۱۵×۸۰ میلی‌متر حاوی ۶ عدد ریزنمونه بود. به عبارتی هر تیمار دارای ۳۰ عدد ریزنمونه بود (شکل ۳). آنالیز داده‌ها به وسیله نرم افزار SAS انجام شد.

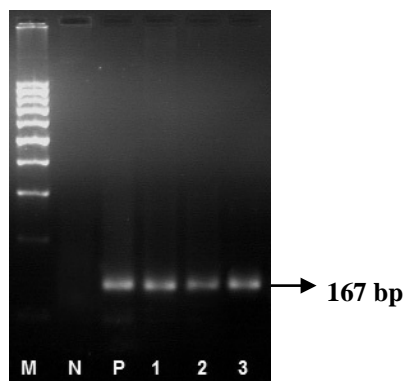
## نتایج و بحث

در این پژوهش اثر ترکیبی از سطوح تنظیم‌کننده‌های رشد BAP و NAA برای اندام‌زایی ریزنمونه‌های هیپوکوتیل و اپی‌کوتیل تلقیح شده‌ی نارنج بررسی شد. فقط ریزنمونه‌هایی باززایی شده تلقی شدند که جوانه‌هایی به



شکل ۴- الکتروفورز محصولات واکنش پی.سی.آر شاخساره‌های تراریخته با آغازگرهای ژن *CTV*، M نشانگر، N کنترل منفی، P کنترل مثبت و ۱، ۲ و ۳ شاخساره‌های تراریخته هستند.

**Figure 4-** PCR analysis of transgenic regenerated shoots by primers of *CTV* gene, M: 100bp ladder, N: Negative control, P: Positive control, 1, 2, 3: Transformed shoots.



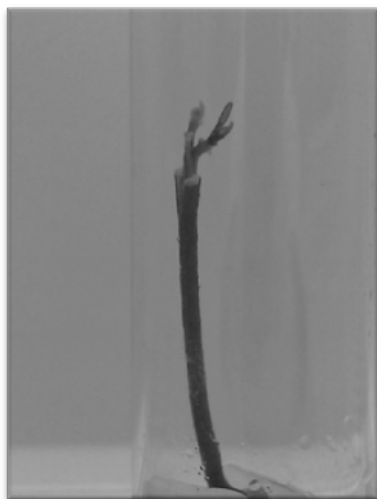
شکل ۵- الکتروفورز محصولات واکنش پی.سی.آر شاخساره‌های تراریخته با آغازگرهای ژن *NOS*، M نشانگر، N کنترل منفی، P کنترل مثبت و ۱، ۲ و ۳ شاخساره‌های تراریخته هستند.

**Figure 5-** PCR analysis of transgenic regenerated shoots by primers of *NOS* gene, M: 100bp ladder, N: negative control, P: positive control, 1, 2, 3: Transformed shoots.

شده استفاده شدند. ایجاد برش طولی انتهایی تغییر معنی‌داری در درصد ریزنمونه‌های جوانه‌دار (۵۳٪ در مقابل ۵۷٪) و میانگین تعداد شاخساره (۳/۲۵ در مقابل ۳/۳۲) ایجاد نکرد. پژوهش‌های آناتومیک اندام‌زایی از اپی‌کوتیل نشان داده است که تشکیل نقاط مرستمی در کامبیوم مسئول تشکیل جوانه است (Almeida *et al.* 2003a) و زخم زنی سبب القا و تشکیل نقاط مرستمی یا تکثیر سلولی در ریزنمونه‌ها می‌شود (Escudero and Hohn 1997). از طرفی، برش طولی در تیمار زخم‌زنی سبب تماس بیشتر آگروباکتریوم با منطقه کامبیوم می‌شود و احتمال دارد حضور باکتری و اثر آن بر کامبیوم علت عدم افزایش معنی‌دار در

داده شده است که تقسیمات سلولی و تمایز سلول‌های تراریخته بیش‌تر در محیط باززایی حاوی ترکیبی از BAP و NAA تحریک می‌شود تا BAP به تنهایی (Ghorbel *et al.* 2000). این پژوهش‌ها هم‌چنین نشان می‌دهد که احتمال دارد در بیشتر ژنوتیپ‌ها برای تراریزش بافت بالغ افزودن NAA در غلظت‌های مناسب به محیط باززایی در توسعه‌ی بخش‌های تراریخته نقش دارد (Ghorbel *et al.* 2000; Almeida *et al.* 2003b; Molinari *et al.* 2004).

در تیمار زخم‌زنی، فقط بهترین سطح تنظیم‌کننده‌های رشد که بیشترین درصد اندام‌زایی را داشته‌اند (۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر NAA) برای کشت ریزنمونه‌های تیمار



شکل ۷- ریزپیوندی شاخساره‌های تراریخته بر روی دانه‌های رشد یافته در شرایط درون شیشه.

**Figure 7-** Micro grafting of transformed shoots on *in vitro* grown seedlings.



شکل ۶- شاخساره‌های باززایی شده در محیط رشد شاخساره

**Figure 6-** Regenerated shoots in shoot induction medium

نکرده است، از آغازگرهای مستقیم و معکوس ژن KAN استفاده شد که یک ژن خارج T-DNA است. شاخساره‌ها فقط در صورتی که ژن KAN در آن‌ها تکثیر نشده (و هر دو ژن CTV و NOS در آن‌ها تکثیر شده بود) تراریخته تلقی شدند (عکس ژل نشان داده نشده است).

از ۶۹ شاخساره‌ی باززایی شده از ریزنمونه‌هایی که از طریق هم‌کشتی با اگروباکتریوم تلقیح شده بودند، ۶ شاخساره تراریخته و از ۸۰ شاخساره‌ی باززایی شده از ریزنمونه‌هایی که با انجام وکیوم تلقیح شدند، ۹ تای آن‌ها تراریخته بودند. درصد تراریزش از تقسیم تعداد شاخه‌های تایید شده با پی.سی.آر بر تعداد کل شاخساره‌های باززایی شده محاسبه شد.

نتایج محاسبات نشان می‌دهد که با انجام وکیوم، با وجود افزایش میزان ریزنمونه‌های جوانه‌دار از ۵۷ درصد تا ۶۰ درصد و افزایش میانگین تعداد شاخساره از ۳/۲۵ به ۳/۴۱ شاخساره به ازای هر ریزنمونه، اختلاف در این شاخصه‌های باززایی معنی‌دار نبود ولی کارایی تراریزش با انجام وکیوم از ۸/۷۰ درصد به ۱۱/۲۵ درصد افزایش یافت.

ایجاد خلا و فراصوت برای نفوذ بیش‌تر اگروباکتریوم به ریزنمونه‌ها و افزایش راندمان تراریزش استفاده شده است. مقایسه‌ی ترکیبی از این دو روش با روش تلقیح متعارف به

اندام‌زایی در این آزمایش بوده است. با بررسی غلظت‌های مختلف اگروباکتریوم، ممکن است بتوان کارایی اندام‌زایی را افزایش داد و در نهایت درصد بالاتری از تراریزش به دست آورد (Almeida et al. 2003a).

باززایی روی محیط انتخابی، موجب افزایش کارایی تراریزش می‌شود، با این حال تمامی گیاهان باززایی شده لزوماً تراریخته نیستند و به دلایل مختلفی ممکن است شاخه‌های غیرتراریخته یا شیمیر بر روی محیط انتخابی رشد کنند و یا سلول‌های تراریخته پس از مدتی تمام یا بخشی از ژن مورد نظر را از دست بدهند (Filho et al. 2001). به منظور محاسبه‌ی کارایی تراریزش در آخرین مرحله‌ی باززایی، علاوه بر محاسبه‌ی میزان باززایی، تعداد شاخساره‌هایی که احتمال داشت تراریخته باشند با استفاده از پی.سی.آر غربالگری شدند. به منظور تایید تراریخته بودن گیاه، واکنش پی.سی.آر با آغازگرهای ژن‌های داخل مرزهای چپ و راست T-DNA اگروباکتریوم استفاده شد (جدول ۱). دی.ان.ا. گیاه غیرتراریخته کنترل منفی و پلاسمید pFGC5941 حامل ژن CTV کنترل مثبت بوده است (شکل ۴ و شکل ۵).

علاوه بر این، برای تایید صحت ورود T-DNA به ژنوم گیاه و اطمینان از اینکه T-DNA اگروباکتریوم موجود در بخش‌های سطحی یا بین‌سلولی شاخساره‌ها در واکنش پی.سی.آر خطا ایجاد

شرایط در این پژوهش قطعات اپی کوتیل و هیپوکوتیل به دلیل راندمان بالای باززایی استفاده شدند (Almeida et al. 2002). برای غلبه بر مشکل بزرگ ریشه دار کردن شاخساره‌های تراریخته و هم‌چنین سرعت و سهولت دستیابی به گیاه تراریخته کامل، شاخساره‌های تراریخته‌ی تایید شده با پی.سی.آر و مقاوم در محیط انتخابی حاوی علف‌کش بستا که طول آن‌ها به ۱۰ تا ۲۰ میلی‌متر رسیده بود (شکل ۶) روی دانه‌های نارنج رشد یافته در شرایط درون شیشه ریزی‌یوندی شدند (Pena et al. 1995a, 1995b) (شکل ۷). از آنجا که ریشه‌زایی یکی از مهم‌ترین مراحل تولید گیاهان چوبی در شرایط *in vitro* است، لازم است یک پژوهش مستقل در خصوص شرایط ریشه‌زایی در شاخساره‌های حاصل از اندام‌زایی مستقیم در نارنج انجام شود.

واسطه‌ی آگروباکتریوم (روش شناوری) در پرتقال شیرین نشان داد که تراریزش زمانی که ریزنمونه‌ها ۱۰ دقیقه در خلا و سپس ۲ ثانیه در فراصوت قرار گرفتند به طور معنی‌داری بالاتر از روش شناوری بوده است (Oliveira et al. 2009).

پژوهش‌های پیشین بر روی نارنج نشان داده است که گونه‌ای بسیار سرسخت نسبت به تراریزش است و کارایی آن در بین مرکبات پایین‌ترین است (Gutierrez et al. 1997). سرسختی به سبب کارایی پایین تلفیق ژن خارجی در ژنوم میزبان و استعداد کم اندام‌زایی مستقیم و غیرمستقیم گیاه به وجود می‌آید. تراریزش در نارنج وابسته به عوامل متعدد مانند تیمار تنظیم‌کننده‌های رشد، محیط کشت و ترکیب‌های آن است و به‌طور اصولی یکی از مشکلات این گیاه کارایی پایین اندام‌زایی است (Moreira-Dias et al. 2000; Silva et al. 2010) بنابراین، به منظور بهینه‌سازی

#### منابع

- Almeida WAB, Mourao Filho FAA, Mendes BMJ, Pavan A, Rodriguez APM. 2003a. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Citrus sinensis* and *Citrus limonia* epicotyl segments. *Scientia Agricola* 60: 23-29.
- Almeida WAB, Mourao Filho FAA, Pino LE, Boscariol RL, Rodriguez APM, Mendes BMJ. 2003b. Genetic transformation and plant recovery from mature tissues of *Citrus sinensis* L. Osbeck. *Plant Science* 164: 203-211.
- Almeida WAB, Mourao Filho FAA, Mendes BMJ, Rodriguez APM. 2002. *In vitro* organogenesis optimization and plantlet regeneration in *Citrus sinensis* and *C. limonia*. *Scientia Agricola*, Piracicaba 59: 35-40.
- Bar-Joseph M, Marcus R, Lee RF. 1989. The continuous challenge of citrus tristeza virus control. *Annual Review of Phytopathology*. 27: 291-316.
- Bond JE, Roose ML. 1998. *Agrobacterium*-mediated transformation of the commercially important citrus cultivar Washington Navel orange. *Plant Cell Reports* 18: 229-234.
- Dominguez A, De Mendosa AH, Guerri J, Gamba M, Navarro L, Moreno P, Pena L. 2002. Pathogen-derived resistance to Citrus tristeza virus (CTV) in transgenic Mexican lime (*Citrus aurantifolia* (Chist.) Swing.) plants expressing its p25 coat protein gene. *Molecular Breeding* 10: 1-10.
- Edwards K, Johnstone C, Thompson C. 1991. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Research* 19: 1349
- Escudero J, Hohn B. 1997. Transfer and integration of T-DNA without cell injury in the host plant. *The Plant Cell* 9: 2135-2142.
- Filho JCB, Kobayashi AK, Pereira LFP, Hissano Z, Vieira LGE. 2001. *In vitro* adventitious shoot regeneration from sweet orange using thin epicotyl sections. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 1: 27-34.
- Gelvin SB. 2006. *Agrobacterium* virulence gene induction. *Methods in Biology* 343: 77-84.
- Ghorbel R, Dominguez A, Navarro L, Penna L. 2000. High efficiency genetic transformation of Sour orange (*Citrus aurantium*) and production of transgenic trees containing the coat protein gene of Citrus tristeza virus. *Tree Physiology* 20: 1183-1189.
- Ghorbel R, Navarro L, Duran-Vila N. 1998. Morphogenesis and regeneration of whole plants of grapefruit (*Citrus paradisi*), sour orange (*C. aurantium*) and alemow (*C. macrophylla*). *Journal of Horticultural Science & Biotechnology* 73: 323-327.
- Grosser JW, Gmitter-Jr FG. 1990. Protoplast fusion and citrus improvement. *Plant Breeding Reviews* 8: 339-374.
- Gutierrez EMA, Luth D, Moore GA. 1997. Factors affecting *Agrobacterium*-mediated transformation in citrus and production of Sour orange (*Citrus aurantium*) plants expressing the coat protein gene of Citrus tristeza virus. *Plant Cell Reports* 16: 745-753.
- Molinari HBC, Besspalhok JC, Kobayashi AK, Pereira LFP, Vieira LGE. 2004. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of Swingle citrumelo (*Citrus paradisi* Macf. X *Poncirus trifoliata*

- L. Raf.) using thin epicotyl sections. *Scientia Hort* 99: 379-385.
16. Moore GA, Jacano CC, Neidigh JL. 1992. *Agrobacterium*-mediated transformation of citrus stem segments and regeneration of transgenic plants. *Plant Cell Reports* 11: 238-242.
17. Moreira-Dias JM, Molina RV, Guardiola JL, Garcia-Luis A. 2001. Day-length and photon flux density influence the growth regulator effects on morphogenesis in epicotyl segments of Troyer citrange. *Scientia Horticulturae* 87: 275-290.
18. Moreira-Dias JM, Molina RV, Bordon Y, Guardiola JL, Garcia-Luis A. 2000. Direct and indirect shoot organogenic pathways in epicotyl cuttings of Troyer citrange differ in hormone requirements and in their response to light. *Annals of Botany* 85: 103-110.
19. Oliveira MLP, Febres VJ, Costa MGC, Moore GA, Otoni WC. 2009. High efficiency *Agrobacterium*-mediated transformation of Citrus via sonication and vacuum infiltration. *Plant Cell Reports* 28: 387-395.
20. Pena L, Cervera M, Juarez J, Navarro A, Pina JA, Navarro L. 1995a. *Agrobacterium*-mediated transformation of sweet orange and regeneration of transgenic plants. *Plant Cell Reports*. 14: 616-619.
21. Pena L, Cervera M, Juarez J, Ortega C, Pina JA, Duranvila N, Navarro L. 1995b. High-efficiency *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration of citrus. *Plant Science*. 104: 183-191.
22. Pena L, Perez RM, Cervera M, Juarez JA, Navarro L. 2004. Early events in *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of citrus explants. *Annals of Botany* 94: 67-74.
23. Phillips RC. 2004. *In vitro* morphogenesis in plants – recent advances. *In Vitro Cellular & Developmental Biolology – Plant*, Columbia 40: 342-345.
24. Schinor EH, Paoli LG, Azevedo FA., Mourao Filho FAA, Mendes BMJ. 2006. Organogenesis *in vitro* a partir de diferentes regioes do epicotilo de *Citrus sp.* *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal 28: 463-466.
25. Silva RP, Costa MAPC, Souza AS, Almeida WAB. 2005. Regeneração de plantas de laranja-Pera via organogênese *in vitro*. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, Brasilia 40: 1153-1159.
26. Silva RP, Souza AJ, Mendes BMJ, Mourao Filho FAA. 2010. Sour orange bud regeneration and *in vitro* plant development related to culture medium composition and explant type. *Revista Brasileira De Fruticultura* 32: 1-8.
27. Silva RP, Mendes BMJ, Mourao Filho FAA. 2008. Indução e cultivo *in vitro* de gemas adventicias em segmentos de epicotilo de laranja-azedada. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, Brasilia 43: 1331-1337.
28. Yang, ZN, Ingelbrecht IL, Louzada E, Skaria M, Mirkov TE. 2000. *Agrobacterium* mediated transformation of the commercially important grapefruit cultivar Rio Red (*Citrus paradise* Macf.). *Plant Cell Reports* 19: 1203-1211.
29. Zamani AH. 2008. Cloning of citrus tristeza virus (CTV) coat protein coding gene. Thesis submitted for MSc. degree, University of Guilan, Rasht, Iran (In Farsi with English abstract).