

بهینه‌سازی باززایی و انتقال ژن به لیموترش (*Citrusaurantifolia*) به

کمک اگروباکتریوم و ژن گزارشگر *gus*

سیده مائده فیض بخش^۱، مسعود توحیدفر^{۲*}، سید حسن مرعشی^۳، نسرین مشتاقی^۴،
مطهره محسن پور^۵، محسن مردی^۶

۱، ۳ و ۴- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشیار و استادیار دانشکده کشاورزی
دانشگاه فردوسی مشهد

۲ و ۶- استادیار و دانشیار پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی کرج
۵- دانشجوی دکترا اصلاح نباتات دانشگاه کشاورزی ساری

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: gtohidfar@abrii.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۰/۱۰/۱۳ - تاریخ پذیرش: ۹۱/۰۲/۱۰)

چکیده

واژه‌های کلیدی

آگروباکتریوم
انتقال ژن
gus
لیموترش
مهندسی ژنتیک

لیموترش یکی از مهم‌ترین و اقتصادی‌ترین محصولات باقی در جنوب ایران است و نسبت به بیماری‌هایی از جمله ویروس تریستیزای مرکبات (CTV) و جاروی جادوگر (WBDL) حساس است. بنابراین بهینه‌سازی یک سیستم باززایی و تراریزش کارآمد در این گیاه جهت بهبود و اصلاح آن از طریق مهندسی ژنتیک ضروری است. به همین منظور بهینه‌سازی باززایی و تراریزش لیموترش با استفاده از قطعات میانگره و قطعات اپی کوتیل سفید در دو محیط کشت باززایی با غلظت‌های متفاوت BAP و NAA و دو سویه مختلف اگروباکتریوم شامل LBA4404 و EHA105 و پلاسمید pBI حاوی کاست ژن *gus* به صورت آزمایش‌های فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در ۴ تکرار انجام شد. از بین دو ریزنمونه بکار رفته، ریزنمونه اپی کوتیل سفید نسبت به میانگره کالوس‌زایی و باززایی بالاتری داشت. اما بین دو محیط کشت باززایی مورد استفاده، تقاضه معنی‌داری مشاهده نشد. همچنین از بین دو سویه اگروباکتریوم بکار رفته در این پژوهش، سویه EHA105 به عنوان بهترین سویه اگروباکتریوم جهت تراریزش و باززایی لیموترش شناخته شدند. با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با آغازگرهای اختصاصی ژن *gus* بر روی دی.ان.ای استخراجی از تمامی گیاهان باززا شده ۲۱ شاخصاره دارای این ژن بدست آمد. اما تنها ۸ شاخصاره بیان این ژن را نشان دادند. همچنین عدم آلودگی ناشی از اگروباکتریوم در شاخصاره‌های تواریخته به کمک PCR ژن‌های اختصاصی *virG* تایید شد.

مقدمه

بیشترین کاربرد را در آزمایش‌های تراریزش مرکبات داشته است (Moore et al. 1992). همچنین استفاده از گیاهچه‌های آلبنوی رشد کرده در تاریکی، موجب افزایش راندمان بازیابی گیاهان تراریخته شده است (Bond and Roose 1998). پنا و همکاران برای تهیه گیاهان تراریخته در لیموترش از آلودگی ریزنمونه میانگرها با آگروباکتریوم استفاده کردند (Pena et al. 1995, 1997) که درصد بازیابی ۶/۲ و فراوانی تراریزش، ۴/۳ درصد بوده است (Pena et al. 1997). در سال ۱۹۹۸ پژوهشگران از ریزنمونه میانگرها گیاهچه‌های ۶ ماهه لیموترش برای القای کالوس و سپس بازیابی در محیط کشت MS حاوی ۳ میلی‌گرم در لیتر BAP، ۳ درصد ساکاراز و یک درصد آگار(pH5/7) استفاده کردند و نتیجه بازیابی را ۱-۲ درصد گزارش کردند (Cervera et al. 1998a).

پژوهشگران با استفاده از آگروباکتریوم و ریزنمونه‌های اپیکوتیل و هیپوکوتیل، گیاهان تراریخته لیموترش تولید کردند که میزان تراریزش حدود ۲/۹ درصد گزارش شد (Koltunow et al. 2000). در سال ۲۰۰۰ پژوهشگران توانستند از ۱۲۰۰ ریزنمونه میانگرها، ۴۲ گیاه تراریخته لیموترش که حداقل یک نسخه از ژن پروتئین پوششی ویروس CTV را دارا بودند، تولید کنند (Dom'inguez 2000).

با توجه به بررسی‌های انجام شده، در این پژوهش از ریزنمونه‌ها و محیط کشت‌های مختلف جهت بازیابی، سویه‌های متفاوت اگروباکتریوم برای تراریزش لیموترش استفاده شده است تا ضمن شناسایی فاکتورها و عوامل موثر در تراریزش لیموترش بتوان به دستور عملی کارآمد برای تراریزش این گیاه اقتصادی دست یافته و زمینه‌ای مناسب برای انتقال ژن‌های مفید به این گیاه با اهداف اصلاحی فراهم آورد.

مواد و روش‌ها

میوه‌های حاوی بذر رقم Mexican lime از مرکز تحقیقات جهاد کشاورزی بندرعباس تهیه شد. پس از شستشو و ضدعفونی، تعداد ۵ عدد بذر داخل شیشه‌های مریابی حاوی محیط کشت جوانه‌زنی MS (Murashige and skoog 1962) قرار داده شد تا آماده‌ی جوانه‌زنی شوند. تعدادی از شیشه‌ها مورد تیمار دوره‌ی نوری ۱۶ ساعت با شدت نوری ۲۰۰۰ لوکس و ۸ ساعت تاریکی قرار

لیموترش یکی از مهم‌ترین و اقتصادی‌ترین محصولات باگی در جنوب ایران است که سطحی معادل ۴۱۸۰ هکتار و تولیدی بیش از ۵۰۰۰۰۰ تن را به خود اختصاص داده است. اما حساسیت زیادی به بیماری جاروی جادوگر دارد که از مهم‌ترین محدود کننده‌های کشت لیموترش در دنیا است (Garnier et al. 1991). گسترش روز افرون این بیماری در نواحی مرکبات خیز جنوب کشور تهدیدی جدی برای اقتصاد کشاورزی و درآمد کشاورزان این نواحی محسوب می‌شود. با توجه به هزینه‌ها و خسارات واردۀ از سال ۱۳۷۷ تا ۱۳۸۵ و پیش‌بینی رو به گسترش بیماری در صورتی که با این موضوع به صورت جدی و مستمر برخورد نشود حداًکثر تا یک دهه آینده میزان تولید لیموترش در استان هرمزگان به صفر نزدیک خواهد شد و این بدان معناست که عملاً اقتصاد روستایی در بسیاری از نقاط استان هرمزگان و پیروی آن اشتغال‌زایی روستائیان این منطقه با خطر جدی مواجه است (IWBDLN 2009). مبارزه با این بیماری تاکنون کارایی لازم را نداشته و استفاده از روش‌های اصلاح ستی مشکل و وقت‌گیر است (Pena et al. 2007). بعلاوه منبع مقاومتی برای این بیماری در ژرم پلاسمهای گیاهی وجود ندارد (IWBDLN 2009)، بنابراین به نظر می‌رسد که مهندسی ژنتیک راه حل مناسبی برای ایجاد مقاومت نسبت به این بیماری است.

از آنجا که وجود یک پروتکل کارا برای بازیابی گیاه، پیش‌نیاز استفاده از تکنیک انتقال ژن است در این پژوهش سعی شده است با انتخاب ریزنمونه مناسب و اعمال تیمارهای مناسب، درصد بازیابی غیر مستقیم برای ژنوتیپ‌های ایرانی لیموترش افزایش یابد و با استفاده از سیستم آگروباکتریوم و ژن گزارشگر gus، فرآیند انتقال ژن به لیموترش جهت فراهم آوردن زمینه‌های بعدی برای انتقال ژن به این گیاه بهینه شود.

در مرکبات از ریزنمونه‌های مختلفی از جمله سلول‌های جنین زا Ghorbel et al. 2000; (Yao et al. 1996)، اپیکوتیل (Moore et al. 1994)، قطعات گره و میانگرها ساقه (Kaneyoshi et al. 1994)، کالوس (Hidaka et al. 1990) و پروتوبلاست (al. 1992) استفاده شده است. از آنجا که ریزنمونه اپیکوتیل دارای بیشترین پاسخ به اندام‌زایی است، همواره

گیاهچه‌های ۳-۴ ماهه و قطعات یک سانتی‌متری اپی‌کوتیل سفید گیاهچه‌های ۳-۵ هفت‌های و دو محیط کشت باززایی شامل نمک و ویتامین‌های MS، ۸ گرم در لیتر آگار، ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و ۰/۵ گرم در لیتر MES با ترکیبات هورمونی متفاوت (جدول ۱) و pH بهینه ۵/۸ به صورت آزمایش‌های فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در ۴ تکرار انجام گرفت.

پس از طی سه روز کشت مشترک در محیط حاوی نمک و ویتامین‌های MS، ۳ میلی‌گرم در لیتر BAP، ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA، ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر D-2,4-چلوروبیوتون در لیتر ساکارز، ۸ گرم در لیتر آگار، ۰/۵ گرم در لیتر MES، ۱۰۰ میکرومولار استوسرین‌گون^۱ و pH بهینه ۵/۸ ریزنمونه‌های تلقیح شده به محیط کشت‌های باززایی انتخابی حاوی ۷۵ میلی‌گرم در لیتر کاناامایسین و ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم جهت کنترل رشد باکتری و همچنین تحیریک شاخه‌زایی متقل شدن پتری‌دیش‌های حاوی محیط کشت باززایی به مدت دو هفته در فیتوترون در تاریکی با شرایط دمایی ۲۶ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند و سپس به شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی با شدت ۳۶۰۰ لوکس و ۸ ساعت تاریکی و دمای ۲۶ درجه سانتی‌گراد انتقال یافت. واکنش ریزنمونه‌ها هر ۳ هفته یک بار در محیط کشت‌های فوق صورت گرفت و بعد از ۴۵ روز شاخص‌های باززا شده ظاهر شدند. در طی این مدت، فاکتورهایی نظیر تاریخ کالوس‌زایی، درصد کالوس‌دهی، تاریخ شاخه‌زایی و درصد شاخه‌زایی بررسی شدند.

پیوند نوک شاخص‌سازه

شاخص‌های باززا شده با طول ۰/۵-۱ سانتی‌متر و قطر ساقه حدود ۰/۲ میلی‌متر از محیط کشت خارج شد، انتهای ساقه آنها با آب استریل شستشو داده شد و بر روی گیاهچه‌های دو برگی نارنج در محیط گلخانه پیوند زده شد. محل پیوند با پارافیلم بسته شد و بر روی آن یک عدد لیوان پلاستیکی شفاف قرار گرفت. گلدان‌ها به مدت یک ماه در گلخانه در سایه قرار گرفتند. پس از طی این مدت لیوان‌های پلاستیکی برداشته شدند و گلدان‌ها به مکان دیگری در گلخانه که در معرض مستقیم آفتاب است منتقل شدند.

2-Acetosyringone

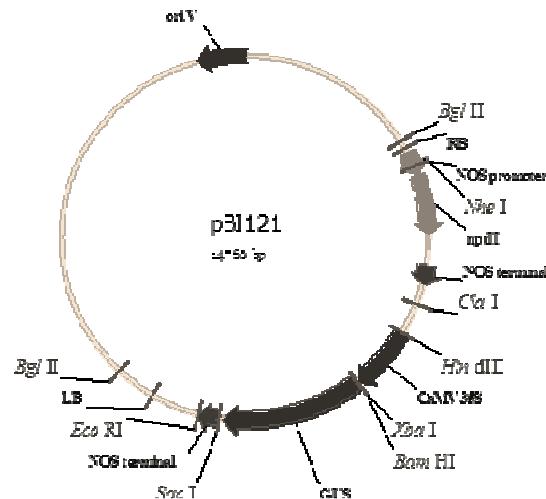
گرفتند و باقی‌مانده در سه هفته اول در تاریکی قرار گرفته و سپس به روشنایی منتقل شدند.

به منظور تعیین غلطت مناسب کاناامایسین در انتخاب کالوس‌های ترازیخته در محیط کشت باززایی از چهار غلطت کاناامایسین شامل ۰، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر با سه تکرار و ریزنمونه اپی‌کوتیل در هر تکرار استفاده شد.

در این پژوهش، پلاسمید دوگانه pBI تحت پیشبر CaMV35S و پایانبر NOS به عنوان حامل پلاسمیدی مورد استفاده قرار گرفت (شکل ۱).

استخراج پلاسمید به روش لیز قلیایی در حجم کم (مینی پرب^۲)، طبق روش سمبروک و راسل (۲۰۰۱)، انجام شد.

همچنین از روش ذوب-انجماد یا شوک حرارتی (Sambrook and Russel 2001)، جهت ترازیش اگروباکتریوم استفاده شد و تأیید صحت ترازیش اگروباکتریوم از طریق آزمون هیستوشیمیایی GUS (Jefferson et al. 1987) و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز انجام گرفت.



شکل ۱- نقشه فیزیکی وکتور دوگانه pBI استفاده شده در این

Figure 1- Binary vector pBI121

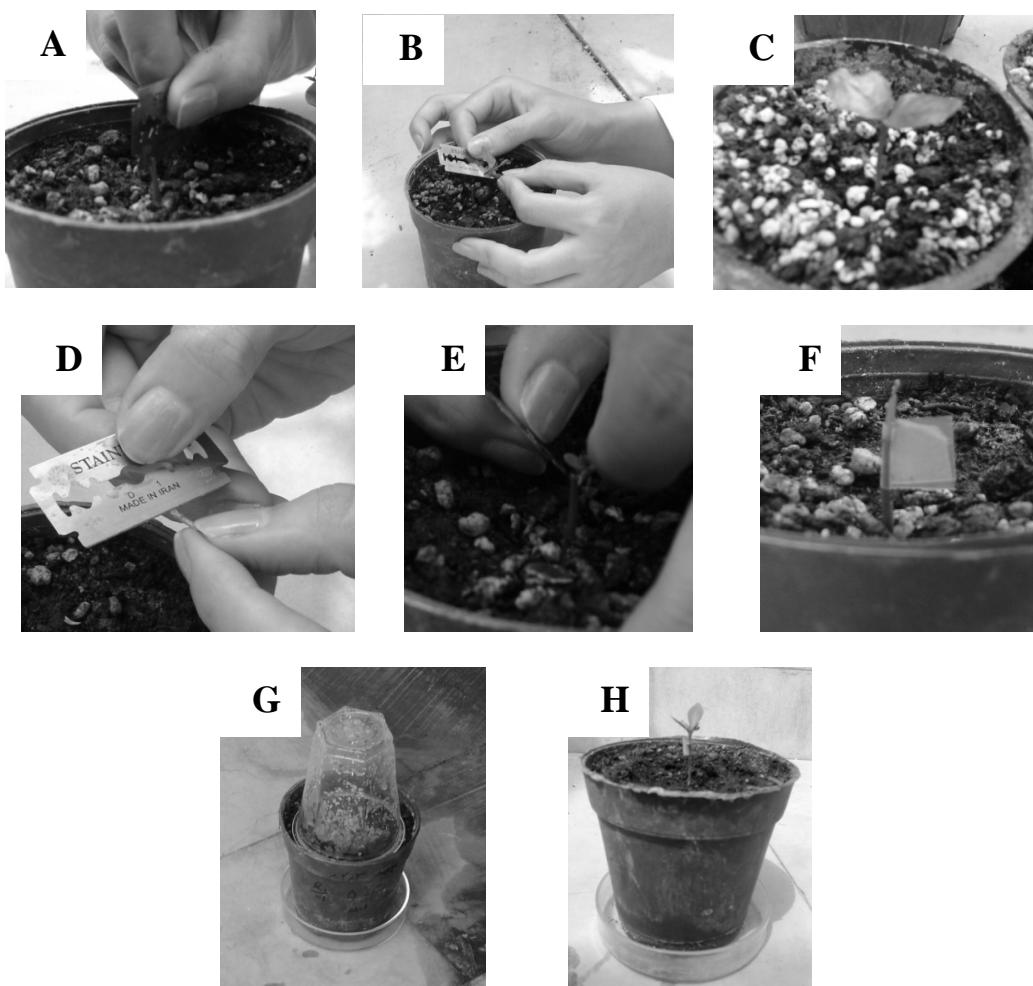
ترازیش گیاه لیموترش با استفاده از دو سویه ترازیخته اگروباکتریوم LBA4404، EHA105 حاوی پلاسمید pBI با دو ریزنمونه متفاوت شامل: قطعات یک سانتی‌متری میانگره

1-Mini preb

جدول ۱- ترکیبات هورمونی دو محیط کشت باززایی

Table 1- hormones which were used in 2 different regeneration media

محیط باززایی ۲ Regeneration medium2	محیط باززایی ۱ Regeneration medium 1	هورمون Hormone
1mg/L	3 mg/L	BAP
0/1 mg/L	0/4 mg/L	NAA



شکل ۲- مراحل پیوند گیاهچه‌های تراریخته روی گیاهچه‌های دو برگی نارنج، A. گیاهچه دو برگی نارنج، B. برش افقی پایه، C. برش عمودی پایه، D. برش انتهای پیوندک، E. قرارگیری پیوندک در برش عمودی پایه، F. بستن محل پیوند به وسیله پارافیلم، G. قرار دادن لیوان پلاستیکی و نگهداری در سایه، H. گیاهچه رشد یافته پس از قرارگیری در معرض نور آفتاب.

Figure 2- Shoot tip grafting. A. seedling of *Citrus aurantium*. B. Horizontal cut of rootstock (remove the 2 new leaves), C. vertical incision of rootstock, D. Preparation of Scion, E. The shoot-tip is placed inside the incision of the rootstock, F. Protection the incision area with parafilm, G. Grafted plants are kept in a shadow area and are covered with a closed plastic bag for about 1 month, H. The shoot starts to actively grow, plant is transferred to a greenhouse area with normal illumination.

دقیقه در ۵۷ درجه و یک دقیقه در ۷۲ درجه سانتی گراد و تکمیل بسط در ۷۲ درجه، ۷ دقیقه) انجام شد.

گیاهان تاریختهای که در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *gus*، قطعه مورد انتظار را تکثیر کردند، جهت اثبات عدم حضور اگروباکتریوم، با استفاده از آغازگرهای اختصاصی اگروباکتریوم (virG) (جدول ۲)، با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز مورد بررسی قرار گرفتند. واکنش فوق در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه و ۳۵ چرخه (هر چرخه شامل یک دقیقه در ۹۴ درجه، ۱ دقیقه در ۵۸ درجه و یک دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد و تکمیل بسط در ۷۲ درجه، ۵ دقیقه) انجام شد.

.(Pena et al. 1997)، (شکارچیان)

تجزیه گیاهان تاریخته احتمالی

در این پژوهش، استخراج دی.ان.ا از برگ‌های شاخصاره‌های تاریخته احتمالی به سبب کوچک بودن و کم بودن میزان برگ به روش احمد و همکاران انجام گرفت (Ahmed et al. 2009) و اثبات تاریزش شاخصاره‌ها با استفاده از آزمون هیستوشیمیایی GUS و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با آغازگرهای اختصاصی ژن *gus* (جدول ۲) بررسی شد. واکنش فوق در ۹۴ درجه سانتی‌گراد ۵ دققه و ۳۵ چرخه (هر چرخه شاما، یک دققه در ۹۴ درجه، ۱

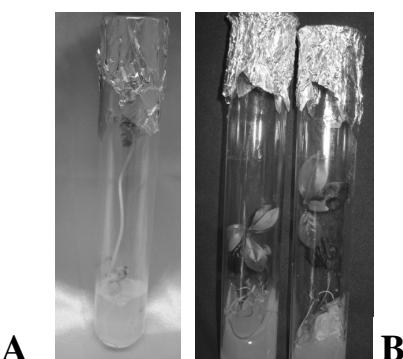
جدول ۲-۲ توالی آغازگرهای مورد استفاده در واکنش زنجیره‌ای پلیمران، قطعه تکثیری و دمای بهینه اتصال جهت تایید تراریزیش گیاهان تراویرخته احتمالی

Table 2- Primers, Amplified fragment and annealing temperature that used in PCR reaction.

آغازگرها	توالی	طول قطعه تکثیری (bp)	دماهی بهینه اتصال (°C)	
Primers	sequence	Leangth of amplified fragment (bp)	Annealing	
	Forward:CCCGCTTCGAAACCAATGCC 5' Reverse:ACGTCTGAAGAAACCCCAA5'	1097	57	<i>gus</i>
	Forward: 5'ATGATTGTACATCCTTCACG Reverse:TGCTGTTTTATGAGTTGAG5'	850	58	<i>virG</i>

نتایج و بحث

کشت بذور و ریزاسیدیادی گیاهچه‌های لیموترش
بذور کشت شده در محیط کشت MS پس از یک هفته جوانه زده
و شروع به رشد کردند. بذور کشت شده در تاریکی تولید
گیاهچه‌های سفید کردند که پس از سه هفته به روشنایی منتقل
شدند (شکا ۳).



شکل ۳- گیاهچه های لیموترش رشد کرده از بذور کاشته شده در محیط کشت A. گیاهچه سفید شده درنتیجه رشد در تاریکی، B. گیاهچه های رشد کرده در روشنایی،

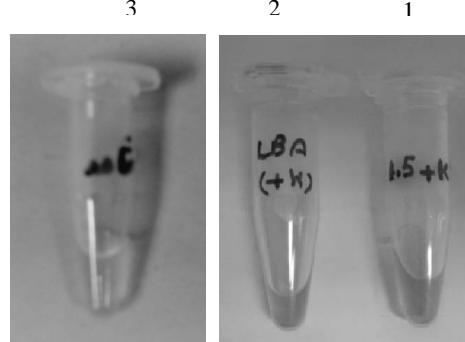
Figure 3- In vitro Mexican lime seedling. A. Etiolated seedling that grown in the dark, B. Seedling that grown in normal condition.

تأیید صحت تراریزش اگروباکتریوم

نتیجه آزمون هیستوشیمیایی GUS در هر دو سویه اگروباکتریوم با استفاده از محلول رنگ آمیزی GUS مثبت بود. تشکیل رسوب نیلی رنگ داخل تیپ، و عدم تشکیل آن در نمونه شاهد، دلیلی بر بیان ژن *gus* در باکتری های تراریخته است (شکل ۴) همچنین آزمون زنجیره ای پلیمر از برای کلنسی های تراریخته LBA4404

اپی‌کوتیل نسبت به میانگرۀ سویه اگروباکتریوم EHA105 نسبت به سویه LBA4404 درصد کالوس‌زایی بیشتری حاصل شد (شکل ۷).

بررسی اثرهای متقابل ریزنمونه با سویه اگروباکتریوم نشان داد که سویه EHA105 و ریزنمونه اپی‌کوتیل بیشترین درصد کالوس‌زایی را به همراه داشتند (شکل ۸).



شکل ۴- آزمون هیستوشیمیایی باکتری‌ها. ۱-سویه EHA105 حاوی پلاسمید pBI، ۲- سویه LBA4404 حاوی پلاسمید pBI، ۳- سویه اگروباکتریوم فاقد پلاسمید نوترکیب

Figure 4- Histochemical Gus expression in *Agrobacterium*. 1. Strain EHA105 carrying binary plasmid pBI121, 2. Strain LBA4404 carrying binary plasmid pBI121, 3. *Agrobacterium* without pBI121.

بررسی صفت شاخه‌زایی
نتایج حاصل از تجزیه واریانس صفت شاخه‌زایی نشان داد که بیشترین درصد شاخه‌زایی به ریزنمونه اپی‌کوتیل، سویه EHA105 تعلق دارد (شکل ۹).

نتایج بدست آمده بیانگر این مطلب است که سویه اگروباکتریوم مورد استفاده اثر قابل توجهی در میزان کالوس‌زایی و شاخه‌زایی ریزنمونه‌های اپی‌کوتیل و میانگرۀ لیموترش در دو محیط کشت بازیابی فوق دارند و همچنین ریزنمونه اپی‌کوتیل سفید نسبت به میانگرۀ دارای قابلیت بیشتری برای کالوس‌دهی و شاخه‌زایی است (شکل ۷ و شکل ۹). هنگامی که از سویه اگروباکتریوم EHA105 استفاده شد درصد کالوس‌زایی و به دنبال آن شاخه‌زایی افزایش یافت، این امر حاکی از آن است که این سویه نسبت به سویه LBA4404 جهت تراریزش ریزنمونه‌های لیموترش کارآمدتر بوده، در نتیجه تولید کالوس‌های تراریخته و به دنبال آن شاخه‌زایی در محیط کشت انتخابی افزایش می‌یابد. ریزنمونه‌های تراریخته در محیط کشت بازیابی انتخابی تولید کالوس نموده و بازرا شدند (شکل ۱۰) و ریزنمونه‌های غیرتراریخته و نمونه شاهد به تدریج پس از چند روز نکروزه شدند (شکل ۱۰).

در این آزمایش برش ریزنمونه‌ها به صورت اریب صورت گرفت که موجب می‌شود سطح ناحیه برش افزایش یافته و در نتیجه فعالیت اگروباکتریوم افزایش یابد (شکل ۱۰. B و A).

تجزیه گیاهان تراریخته احتمالی
اثبات بیان ژن gus در گیاهان تراریخته احتمالی با استفاده از آزمون هیستوشیمیایی GUS

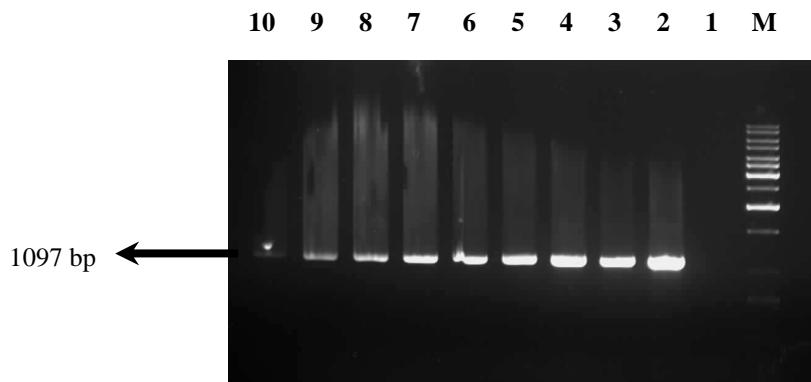
پس از رشد شاخصاره‌ها در محیط رشد طولی، شاخصاره‌ها مورد سنجش آزمون هیستوشیمیایی GUS قرار گرفتند. وجود نواحی

تعیین غلظت آستانه آنتی بیوتیک کاناامایسین

بررسی نتایج پس از ۴ هفته نشان داد که اختلاف معنی‌داری در میزان رشد و نکروزه شدن ریزنمونه‌ها در غلظت‌های مختلف کاناامایسین وجود دارد به طوری که کالوس‌ها در غلظت‌های ۰ و ۵۰ میلی‌گرم در لیتر کاناامایسین رشد کرده و میزان رشد به ترتیب ۱۰۰ درصد و ۵۰ درصد بود (شکل ۶-C، D) در حالی که ریزنمونه‌ها در غلظت‌های ۷۵ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر کاملا نکروزه شدند (شکل ۶-A، B). از این رو غلظت ۷۵ میلی‌گرم در لیتر به عنوان غلظت آستانه آنتی بیوتیک کاناامایسین در نظر گرفته شد.

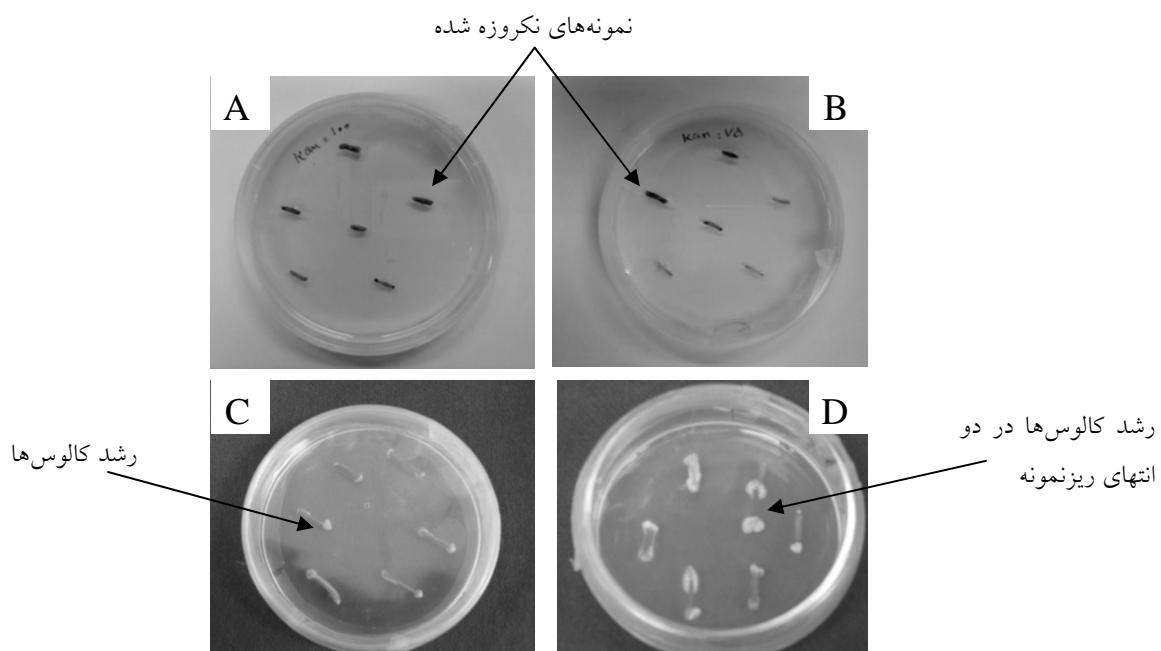
بررسی صفت کالوس‌زایی

نتایج حاصل از تجزیه واریانس صفت کالوس‌زایی نشان داد که بین سطوح مختلف فاکتور ریزنمونه، سویه باکتری و اثرهای متقابل ریزنمونه با سویه باکتری اختلاف معنی‌داری وجود دارد ولی بین دو سطح مختلف محیط کشت بازیابی اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. مقایسه میانگین درصد کالوس‌زایی برای فاکتورهای ریزنمونه و سویه اگروباکتریوم نشان داد که با استفاده از ریزنمونه



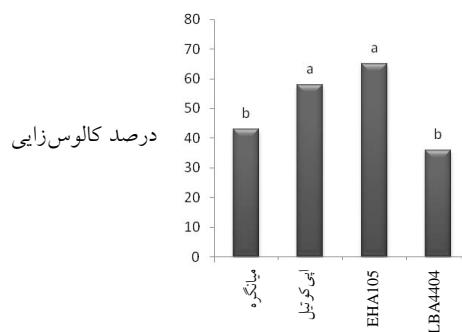
شکل، ۵_ واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *gus* به منظور تایید صحت تراریزش اگروباکتریوم سویه‌های M. نشانگر وزن مولکولی DNA (1Kb)، چاهک ۱. نمونه آب (کنترل منفی)، چاهک ۲. نمونه پلاسمید (کنترل مثبت)، چاهک ۳، ۵، ۷، ۹ سویه‌های اگروباکتریوم با غلظت ۲ میکرولیتر، چاهک ۴، ۶، ۸، ۱۰ سویه‌های اگروباکتریوم با غلظت ۱ میکرولیتر، وجود باند ۱۰۹۷bp نشان دهنده وجود ژن *gus* و تراریزش سویه‌های اگروباکتریوم است.

Figure, 5_ PCR analysis of genomic DNA of transformed *Agrobacterium* with *gus* specific primers which successfully amplified expected 1097 bp gene fragment. M: DNA marker. 1: Negative PCR control with no DNA (H_2O). 2: Positive PCR control with GUS plasmid DNA. 3_10 :Transformed *Agrobacterium* strain EHA105 and LBA4404.



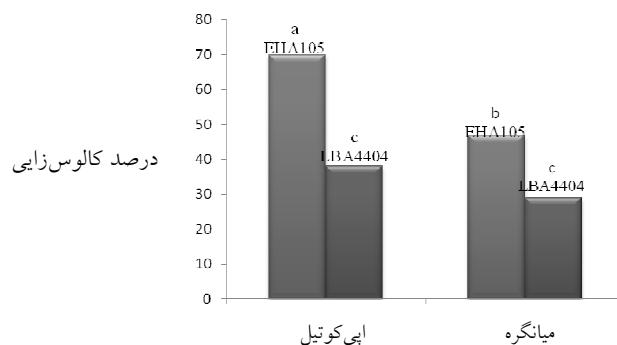
شکل ۶- تعیین غلظت آستانه آنتی‌بیوتیک کانامایسین. A. نکروزه شدن ریزنمونه‌ها در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر کانامایسین، B.. نکروزه شدن ریزنمونه‌ها در غلظت ۷۵ میلی‌گرم در لیتر کانامایسین، C. رشد کالوس‌ها در غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر کانامایسین، D.. رشد صد در صد کالوس‌ها در غلظت ۰ میلی‌گرم در لیتر کانامایسین.

Figure 6- Evaluating appropriate dose of the selection agent on shoot regeneration. A. Concentration of 100 mg/l kanamycin killed Mexican lime explants, B. Concentration of 75mg/l kanamycin killed Mexican lime explants, C. Shoot development and callus formation with 50 mg/l kanamycin, D. No kanamycin



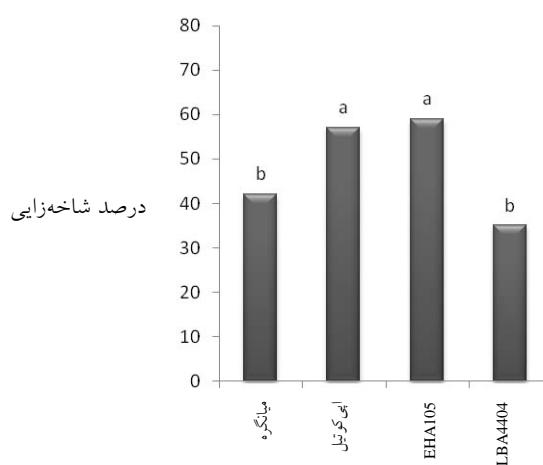
شکل ۷- نمودار مقایسه میانگین درصد کالوس زایی برای فاکتورهای ریزنمونه و سویه اگروبکتریوم.

Figure 7-The effect of explants and *Agrobacterium* strains on percentage of callus induction



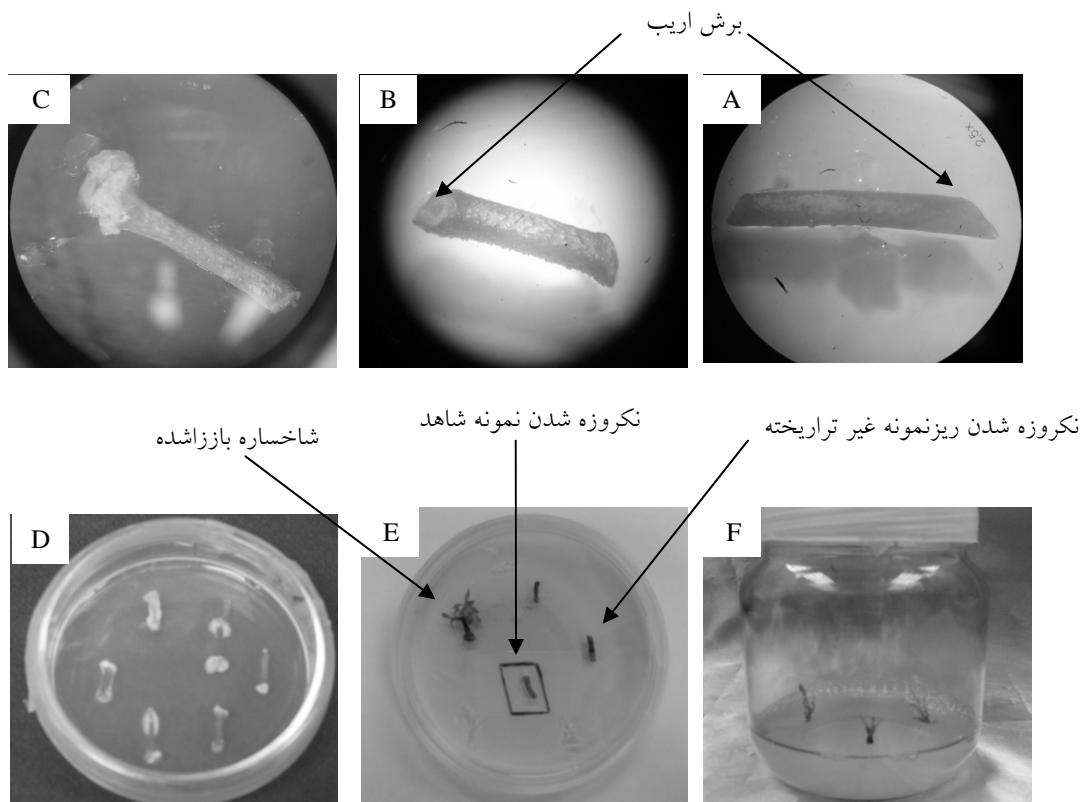
شکل ۸- نمودار اثر متقابل ریزنمونه و سویه در درصد کالوس زایی.

Figure 8- The interaction of explants and *Agrobacterium* strain effecs on callus induction percentage.



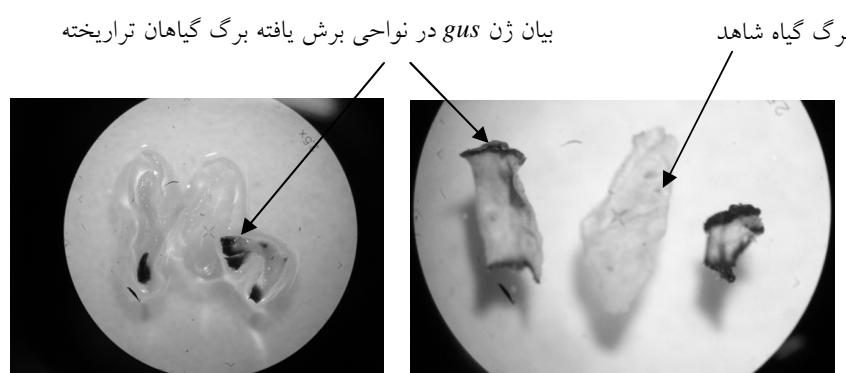
شکل ۹- نمودار مقایسه میانگین درصد شاخه‌زایی برای فاکتورهای ریزنمونه و سویه اگروبکتریوم.

Figure 9-The effect of explants and *Agrobacterium* strains on shoot induction percentage



شکل ۱۰- تراریژش ریزنمونه‌های لیموترش با استفاده از سوبیه‌های اگروباکتریوم LBA4404 و EHA105. A. برش اریب انتهای ریزنمونه‌ای کوتیل سفید، B. برش اریب انتهای ریزنمونه میانگر، C. تشکیل کالوس در انتهای بریده شده ریزنمونه، D. تولید کالوس در محیط کشت باززایی، E. شاخساره تراریخته احتمالی در حال رشد در محیط باززایی و نکروزه شدن کالوس‌های غیرتراریخته و نمونه شاهد، F. شاخساره باززا شده در محیط رشد طولی.

Figure 10- Transformation of explants. A. Obliquely cut of epicotyl, B. Obliquely cut of internode, C. Callus formation at the end of explants segments, D. callus formation in regeneration medium, E. Transgenic shoot regeneration , F. Transgenic shoots in shoot growth medium.



شکل ۱۱- آزمون هیستوشیمیایی GUS در برگ گیاهان تراریخته در محلول رنگ آمیزی GUS. نواحی آبی رنگ در مناطق برش یافته نشان دهنده بیان ژن *gus* هستند.

Figure 11- Histochemical GUS expression in transgenic citrus plants leaf.

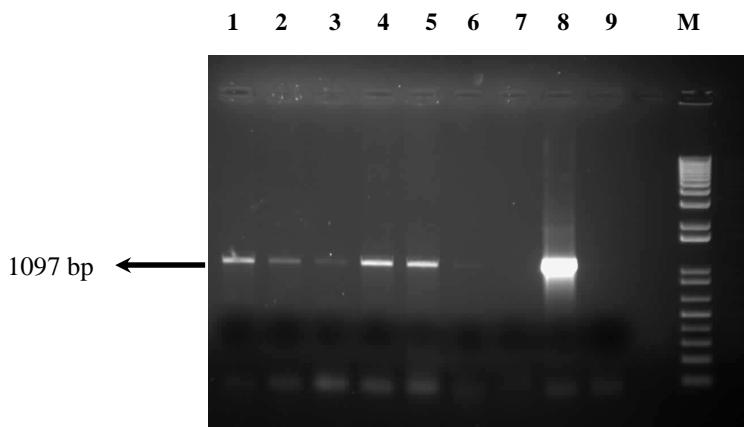
جدول ۳- خلاصه‌ای از آزمایشات انجام شده و نتایج بدست آمده

Table 3- Summary of transformation experiments

شماره آزمایش	ریزنمونه	سویه	محیط باززایی	درصد شاخصاره‌های شاخصاره‌ها	درصد
number	Explant	Strain	Regeneration medium	Gus ⁺ shoots	PCR ⁺ shoots
1	Internode	EHA105	1	.	.
2	Internode	EHA105	2	10%	10%
3	Internode	EHA105	1	.	.
4	Internode	EHA105	2	.	.
5	Epicoty	EHA105	1	30%	10%
6	Epicoty	EHA105	2	20%	.
7	Epicoty	EHA105	1	15%	15%
8	Epicoty	EHA105	2	.	.
9	Internode	LBA4404	1	5%	5%
10	Internode	LBA4404	2	.	.
11	Epicoty	LBA4404	1	.	.
12	Epicoty	LBA4404	2	.	.
13	Epicoty	LBA4404	1	10%	.
14	Epicoty	LBA4404	2	15%	.
15	Internode	LBA4404	1	.	.
16	Internode	LBA4404	2	.	.

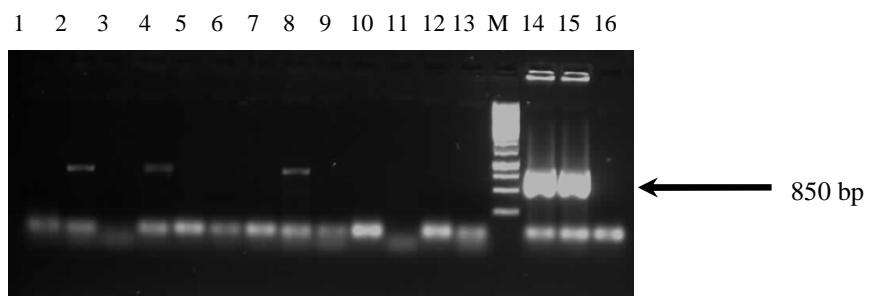
شد. ظهور باند ۱۰۹۷ جفت بازی وجود این ژن را در ۸ گیاه تراریخته‌ای که به آزمون هیستوشیمیایی GUS پاسخ مثبت داده بودند و همچنین ۱۳ عدد از گیاهانی که ژن *gus* در آن‌ها بیان نشده بود، اثبات کرد که این امر ممکن است ناشی از خاموشی و

آبی رنگ در مناطق برش یافته برگ، نشان دهنده بیان این ژن در ۳۸ درصد از شاخصاره‌های باززایی شده بود (شکل ۱۱) (جدول ۳). به منظور اثبات حضور ژن *gus*، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی مستقیم و معکوس این ژن انجام



شکل ۱۲- واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی مستقیم و معکوس ژن *gus* برای اثبات ترازیزش ۶ گیاه ترازیخته احتمالی، چاهک ۵ گیاه باززاشده (GUS+), چاهک ۶. گیاه شاهد، چاهک ۷. پلاسمید (کنترل مثبت)، چاهک ۹. نمونه آب (کنترل منفی)، M: نشانگر وزن ملکولی دی.ان.إ (1 Kb plus).

Figure 12- PCR analysis of genomic DNA of transgenic citrus plants with *gus* specific primers which successfully amplified expected 1097 bp gene fragment. 1-5: 5 individual transgenic shoots which expressed *gus* gene. 6: One regenerated shoot which don't express *gus* gene. 7: DNA from untransformed shoot. 8: Positive PCR control with GUS plasmid DNA. 9: Negative PCR control with no DNA (H_2O). M: DNA marker.



شکل ۱۳- واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی اگروباکتریوم (*virG*). چاهک ۱-۱۲. ۱۲ گیاه ترازیخته احتمالی، چاهک ۱۳. گیاه شاهد، M: نشانگر وزن ملکولی دی.ان.إ (1 Kb) ۱، چاهک ۱۴. اگروباکتریوم فاقد پلاسمید نوترکیب (کنترل مثبت)، چاهک ۱۵. اگروباکتریوم دارای پلاسمید نوترکیب، چاهک ۱۶. نمونه آب (کنترل منفی).

Figure 13- PCR analysis of genomic DNA of transgenic citrus plants with *virG* specific primers. 1-12 : DNA samples from transgenic shoots. 13: DNA from untransformed shoot. M: DNA marker. 14: *Agrobacterium* without pBI121. 15: *Agrobacterium* carring pBI121. 16: Negative PCR control with no DNA (H_2O).

احتمالی که بیان ژن *gus* را نشان ندادند اما واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای ژن *gus* در آنها مثبت شده بود، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی مستقیم و معکوس ژن *virG* انجام شد. باند ۸۵۰ جفت بازی در نمونه اگروباکتریوم و سه نمونه از این گیاهان مشاهده شد. این امر نشان دهنده حضور و پایداری اگروباکتریوم به همراه شاخصاره‌های باززا شده و ماهیت غیرترازیخته این سه گیاه است. عدم ظهور این باند در ۱۰ گیاه

یا بیان اندک این ژن در ۱۳ گیاه مذکور باشد (Dom'inguez et al. 2004) (شکل ۱۲). مطابق جدول ۳ بیشترین تعداد گیاهان ترازیخته زمانی به دست آمد که از ریزنمونه اپیکوتیل، سویه اگروباکتریوم EHA105 استفاده شد.

اثبات عدم حضور اگروباکتریوم در گیاهان ترازیخته احتمالی جهت اثبات عدم حضور اگروباکتریوم در ۱۳ گیاه ترازیخته

تاریخش مركبات تنها بر مبنای بیان ژن گزارشگر تخمین زده شود، کمتر از مقدار واقعی محاسبه خواهد شد (Domínguez et al. 2004).

گیاهان حاصل جهت ارزیابی حضور اگروبکتریوم توسط آغازگرهای اختصاصی ژن *virG* نیز مورد سنجش قرار گرفتند و آلدگی ناشی از اگروبکتریوم در سه نمونه دی.ان.ای استخراجی مشاهده شد. این امر بیانگر آن است که با وجود آنکه ریزنمونه‌ها بعد از هم کشتی به محیط کشت باززایی حاوی آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم، جهت جلوگیری از رشد بیش از اندازه باکتری، متقل شدند، اگروبکتریوم به طور کامل حذف نشد زیرا آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم بیشتر از رشد باکتری جلوگیری می‌کند تا اینکه باکتری را از بین ببرد (Pena et al. 2010).

Mexican lime از گونه‌های سرخخت مركبات جهت تاریخش به وسیله اگروبکتریوم محسوب می‌شود. در سال ۱۹۹۷، ۱۴ گیاه لیموترش تاریخته از ۳۲۴ ریزنمونه (درصد تاریخش ۴۳ درصد) بدست آمد (Pena et al. 1997). پژوهشگران در سال ۲۰۰۰، ۴۲ گیاه تاریخته لیموترش از ۱۲۰۰ ریزنمونه بدست آوردنده درصد تاریخش را ۳/۵ درصد اعلام کردند (Dominguez et al. 2000). در پژوهش دیگری که در همین سال انجام گرفت، پژوهشگران میزان تاریخش لیموترش را ۲/۹ درصد گزارش کردند (Koltunow et al. 2000). کارایی تاریخش در لیموترش در بیشترین حالت ۸ درصد گزارش شده است (Dutt and Grosser 2009). در این پژوهش بیشترین درصد تاریخش (۵/۶ %) مربوط به ریزنمونه اپی کوتیل و سویه اگروبکتریوم EHA105 بود.

منابع

- IWBDSL. 2009. Witches' Broom Disease of Lime Network. Available at www.iwbdln.ir. (in farsi)
- Ahmed I, Islam M, Arshad W, Mannan A, Ahmed W, and Mirza B. 2009. High quality plant DNA extraction for PCR: an easy approach. J Appl Genet 50: 105-107.
- Bond JE, and Roose ML. 1998. *Agrobacterium*-mediated transformation of the commercially important citrus cultivar Washington navel orange. Plant Cell Rep 18:229–234.
- Cervera M, Juarez J, Navarro A, Pina JA, Duran-

تاریخته دیگر، نشان‌دهنده عدم وجود آگروبکتریوم در این گیاهان و اثبات صحت تاریخش آنها است (شکل ۱۳).

بحث

پروتکل تکرار پذیر باززایی گیاه لیموترش ایرانی و انتقال ژن به این گیاه ارائه شد. در این پژوهش از ۳۲۰ ریزنمونه تلقیح یافته، ۷۲ شاخساره بدست آمد. مطابق جدول ۳، هشت شاخساره در آزمون هیستوشیمیایی *gus* بیان این ژن را نشان دادند که تنها یکی از آنها در نتیجه تلقیح با سویه اگروبکتریوم LBA4404 حاصل شده بود (جدول ۳). بنابراین سویه اگروبکتریوم EHA105 به عنوان بهترین سویه جهت تاریخش و باززایی ژنتیک‌های ایرانی لیموترش معرفی شد. EHA105 یک سویه غیرتومورزا است که از سویه A281 اشتقاق یافته است که به عنوان ناقل مناسب جهت تاریخش مركبات معرفی شده است (Cervera et al. 1998b) و راندمان بالای تاریخش آن به ناحیه ژن‌های *vir* پلاسمید Ghorbel et al. (2004) در آن مربوط می‌شود (pTiBo542)Ti (2001; li et al.

در این پژوهش استخراج دی.ان.ای برگ تمام گیاهان بازرا شده‌ای که آزمون هیستوشیمیایی *gus* در آنها منفی بود نیز انجام گرفت و از بین آنها ۱۳ گیاه در آزمون واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با آغازگرهای اختصاصی ژن *gus* مثبت شدند. این امر می‌تواند ناشی از خاموشی یا بیان بسیار اندک ژن گزارشگر *gus* در این گیاهان باشد. تعداد نسخه، اثرهای مکانی و سازماندهی ژن‌های مورد نظر می‌تواند مسئول سطوح بسیار متغیر بیان تراژن در گیاهان تاریخته باشد. این بدان معنی است که اگر فراوانی

- Vila N, Navarro L, and Pena L. 1998a. Genetic transformation and regeneration of mature tissues of woody fruit plants bypassing the juvenile stage. Transgenic Res 7: 51–59.
- Cervera M, L'opez MM, Navarro L, and Pe na L. 1998b. Virulence and supervirulence of *Agrobacterium tumefaciens* in woody fruit plants. Physiological and Molecular Plant Pathology 52: 67–78.
- Dominguez A, Guerri J, Cambra M, Navarro L, Moreno P, and Pena L. 2000. Efficient production of transgenic citrus plants expressing the coat protein

- gene of citrus tristeza virus. *Plant Cell Rep* 19: 427–433.
8. Domínguez A, Cervera M, Pérez R, Romero J, Fagoaga C, Cubero J, López MM, Juárez J, Navarro L, and Peña L. 2004. Characterisation of regenerants obtained under selective conditions after *Agrobacterium*-mediated transformation of citrus explants reveals production of silenced and chimeric plants at unexpected high frequencies. *Molecular Breeding* 14: 171–183.
 9. Dutt M, and Grosser EJW. 2009. Transgenic Evaluation of parameters affecting *Agrobacterium*-mediated transformation of citrus. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 98: 331–340.
 10. Fleming GH, Olivares-Fuster O, Fatta Del-Bosco S, and Grosser JW. 2000. An alternative method for the genetic transformation of sweet orange. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* 36: 450–455.
 11. Garnier M, Zreik L, and Bove J M. 1991. Witches' broom, a lethal mycoplasmal disease of lime in Sultanate of Oman and the United Arab Emirates. *Plant Dis* 75: 546–551.
 12. Ghorbel R, Dominguez A, Navarro, L, and Peña 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 Physiol* 20: 1183–1189.
 13. Ghorbel R, López C, Fagoaga C, Moreno P, Navarro L, Flores R, and Peña L. 2001. Transgenic citrus plants expressing the citrus tristeza virus p23 protein exhibit virallike symptoms. *Molecular Plant Pathology* 2: 27–36.
 14. Haldrup A, Petersen SG, and Okkels FT. 1998. Positive selection: a plant selection principle based on xylose isomerase, an enzyme used in the food industry. *Plant Cell Reports* 18: 76–81.
 15. Hidaka T, Omura M, Ugaki M, Tomiyama M, Kato A, Ohshima M, and Motoyoshi, F. 1990. *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration of Citrus spp. from suspension cells. *Jpn J Breed* 40: 199–207.
 16. Jefferson RA, Kavanagh T. A, and Bevan M W. 1987. Gus fusions: β-glucuronidase as a sensitive and versatile gene marker in higher plants. *EMBO Journal* 6: 3901–3907.
 17. Kaneyoshi J, Kobayashi S, Nakamura Y, Shigemoto N, and Doi Y. 1994. A simple and efficient gene transfer system of trifoliate orange. *Plant Cell Rep* 13: 541–545.
 18. Koltunow AM, Brennan P, Protopsaltis S, and Nito N. 2000. Regeneration of West Indian limes (*Citrus aurantifolia*) containing genes for decreased seed set. *Acta Hort* 535: 81–91.
 19. Li Z, Jayasankar S, and Gray D J. 2004. Bi-directional duplex promoters with duplicated enhancers significantly increase transgene expression in grape and tobacco. *Trans Res* 13: 143–154.
 20. Moore GA, Jacono CC, Neidigh JL, Lawrence SD, and Cline K. 1992. *Agrobacterium*-mediated transformation of citrus stem segments and regeneration of transgenic plants. *Plant Cell Rep* 11: 238–242.
 21. Murashige T, and Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiology* 15: 473–497.
 22. Pena L, Cervera M, Juarez J, Ortega C, Pina JA, Duran-Vila N, and Navarro L. 1995. High efficiency *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration of citrus. *Plant Sci* 104: 183–191.
 23. Pena L, Cervera M, Juarez J, Navarro A, Pina JA, and Navarro L. 1997. Genetic transformation of lime (*Citrus aurantifolia* Swing.): factors affecting transformation and regeneration. *Plant Cell Rep* 16: 731–737.
 24. Pena L, Cervera M, Fagoaga C, Romero J, Juárez J, Pina JA, and Navarro L. 2007. Biotechnology in Agriculture and Forestry Vol. 60.
 25. Pena L, Cervera M, Fagoaga C, Romero J, Ballester A, Soler N, Pons E, Rodríguez A, Peris J, Juárez J, and Navarro L. 2010. Compendium of Transgenic Crop Plants, Volume 5: Transgenic Tropical and Subtropical Fruits and Nuts: Citrus fruit.
 26. Sambrook J, and Russel D. 2001. Molecular Cloning, A Laboratory Manual. 3rd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. USA.
 27. Yao JL, Wu JH, Gleave AP, and Morris BAM. 1996. Transformation of citrus embryogenic cells using particle bombardment and production of transgenic embryos. *Plant Sci* 113: 175–183.