مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
دوره اول، شماره ۱، بهار و تابستان ۱۳۹۱
صفحه ۳۶-۲۳

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- به‌ترتیب 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: ۹۱/۲/۱۰)

چکیده

لیموترش یکی از مهم‌ترین و اقتصادی‌ترین محصولات باغی 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 وتراریزش لیموترش با استفاده از قطعات میانگره و قطعات اپی‌کوتیل سفید در دو محیط کشت باززایی با غلظت‌های متفاوت BAP و NAA و دو سویه مختلف اگروباکتریوم شامل LBA4404 و EHA105، و پلاسمیدpBI حاوی کاست ژن *gus* به صورت آزمایش‌های فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی در ۴ تکرارانجام شد. از بین دو ریزنمونه بکار رفته، ریزنمونه اپی‌کوتیل سفید نسبت به میانگره کالوس‌زایی و باززایی بالاتری داشت.،اما بین دو محیط کشت باززایی مورد استفاده، تفاوت 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 ازواکنش زنجیره‌ای پلیمراز با آغازگرهای اختصاصی ژن*gus* بر روی دی.ان.اِی استخراجی از تمامی گیاهان باززا شده ۲۱ شاخساره دارای این ژن بدست آمد اما تنها ۸ شاخساره بیان این ژن را نشان دادند. همچنین عدم آلودگی ناشی از اگروباکتریوم در شاخساره های تراریخته به کمکPCR ژن های اختصاصی *virG* تایید شد.

واژه‌های کلیدی

آگروباکتریوم
انتقال ژن
ژن *gus*
لیموترش
مهندسی ژنتیک

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-02-03]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1391.1.1.4.1]

مقدمه

لیموترش یکی از مهم‌ترین و اقتصادی‌ترین محصولات باغی در جنوب ایران است که سطحی معادل ۴۱۸۰۰ 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 افزون 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 وارده از سال ۱۳۷۷ تا ۱۳۸۵ و پیش‌بینی رو به گسترش بیماری در صورتی که با این موضوع به صورت جدی و مستمر برخورد نشود حداکثر تا یک دهه آینده میزان تولید لیموترش در استان هرمزگان به صفر نزدیک خواهد شد و این بدان معناست که عملا اقتصاد روستایی در بسیاری از نقاط استان هرمزگان و پیروی آن اشتغال‌زایی روستانشینان این منطقه با خطر جدی مواجه است (IWBDLN 2009). مبارزه با این بیماری تاکنون کارایی لازم را نداشته و استفاده از روش‌های اصلاح سنتی 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 باززایی گیاه، پیش‌نیاز استفاده از تکنیک انتقال ژن است در این پژوهش سعی شده است با انتخاب ریزنمونه مناسب و اعمال تیمارهای مناسب، درصد باززایی 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 جنین‌زا (Yao et al. 1996)، اپی‌کوتیل (Ghorbel et al. 2000; Kaneyoshi et al.1994)، قطعات گره و میانگره ساقه (Moore et al. 1992)، کالوس (Hidaka et al. 1990) و پروتوپلاست (Feleming et al. 2000) استفاده شده است. از آنجا که ریزنمونه اپی‌کوتیل دارای بیش‌ترین پاسخ به اندام‌زایی است، همواره بیشترین کاربرد را در آزمایش‌های تراریزش مرکبات داشته است (Moore et al. 1992). همچنین استفاده از گیاهچه‌های آلبینوی رشد کرده در تاریکی، موجب افزایش راندمان باززایی گیاهان تراریخته شده است (Bond and Roose 1998). پنا و همکاران برای تهیه گیاهان تراریخته در لیموترش از آلودگی ریزنمونه میانگره با آگروباکتریوم استفاده کردند (Pena et al. 1995, 1997) که درصد باززایی ۶/۲ و فراوانی تراریزش، ۴/۳درصد بوده است (Pena et al. 1997). در سال ۱۹۹۸ پژوهشگران از ریزنمونه میانگره گیاهچه‌های ۶ ماهه لیموترش برای القای کالوس و سپس باززایی در محیط کشت MS حاوی ۳ میلی‌گرم در لیتر BAP، ۳ درصد ساکارز و یک درصد آگار(pH۵/۷) استفاده کردند و نتیجه باززایی را ۲-۱ درصد گزارش کردند (Cervera et al. 1998a). پژوهشگران با استفاده از اگروباکتریوم و ریزنمونه‌های اپی‌کوتیل‌و هیپوکوتیل، گیاهان تراریخته لیموترش تولید کردند که میزان تراریزش حدود ۲/۹ درصد گزارش شد (Koltunow et al. 2000). در سال ۲۰۰۰ پژوهشگران توانستند از۱۲۰۰ ریزنمونه میانگره، ۴۲ گیاه تراریخته لیموترش که حداقل یک نسخه از ژن پروتئین پوششی ویروس CTV را دارا بودند، تولید کنند (Dom´ınguez et al. 2000).

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

مواد و روش ها

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 مربایی 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

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-02-03]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1391.1.1.4.1]

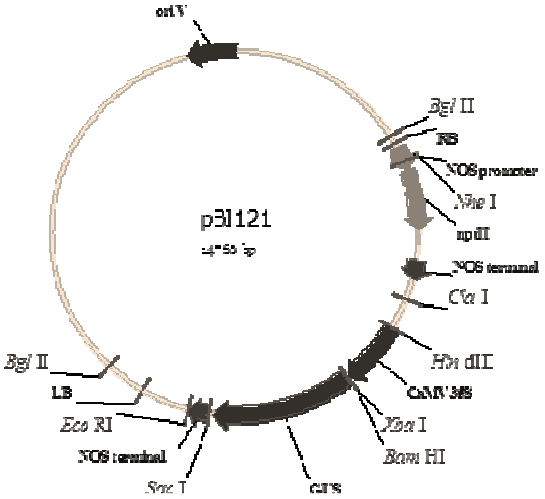
گرفتند و باقی‌مانده در سه هفته اول در تاریکی قرارگرفته و سپس به روشنایی منتقل شدند.

به منظور تعیین غلظت مناسب کانامایسین در انتخاب کالوس‌های تراریخته در محیط کشت باززایی از چهار غلظت کانامایسین شامل ۰، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر با سه تکرار و ۶ ریزنمونه اپی‌کوتیل در هر تکراراستفاده شد.

در این پژوهش، پلاسمید دوگانه pBI حاوی ژن *gus* تحت پیشبر CaMV35S و پایانبر NOS به عنوان حامل پلاسمیدی مورد استفاده قرار گرفت (شکل۱).

استخراج پلاسمید به روش لیز قلیایی در حجم کم (مینی پرب[1])، طبق روش سمبروک و راسل (۲۰۰۱)، انجام شد.

همچنین از روش ذوب – انجماد یا شوک حرارتی (2001 Sambrook and Russel)، جهت تراریزش اگروباکتریوم استفاده شد و تائید صحت تراریزش 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

تراریزش گیاه لیموترش با استفاده از دو سویه تراریخته اگروباکتریوم LBA4404، EHA105 حاوی پلاسمید pBI با دو ریزنمونه متفاوت شامل: قطعات یک سانتی‌متری میانگره گیاهچه‌های ۴-۳ ماهه و قطعات یک سانتی‌متری اپی‌کوتیل سفید گیاهچه‌های ۵-۳ 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 کاملا تصادفی در ۴ تکرار انجام گرفت.

پس از طی سه روزکشت مشترک در محیط حاوی نمک و ویتامین‌های MS، ۳ میلی‌گرم در لیتر BAP، ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA، ۰/۱ میلی‌گرم در لیترD-2,4، ۳۰ گرم در لیتر ساکارز، ۸ گرم در لیتر آگار، ۰/۵ گرم در لیتر MES، ۱۰۰ میکرومولار استوسرینگون[2] و pH بهینه ۵/۸، ریزنمونه‌های تلقیح شده به محیطکشت‌های باززایی انتخابی حاوی ۷۵ میلی‌گرم در لیتر کانامایسین و ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم جهت کنترل رشد باکتری و همچنین تحریک شاخه‌زایی منتقل شدند 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. واکشت ریزنمونه‌ها هر ۳ هفته یک بار در محیط‌کشت‌های فوق صورت گرفت و بعد از ۴۵ روز شاخساره‌های باززا شده ظاهر شدند. در طی این مدت، فاکتورهایی نظیر تاریخ کالوس‌زایی، درصد کالوس‌دهی، تاریخ شاخه‌زایی و درصد شاخه‌زایی بررسی شدند.

پیوند نوک شاخساره

شاخساره‌های باززا شده با طول ۱-۰/۵ 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

1-Mini preb

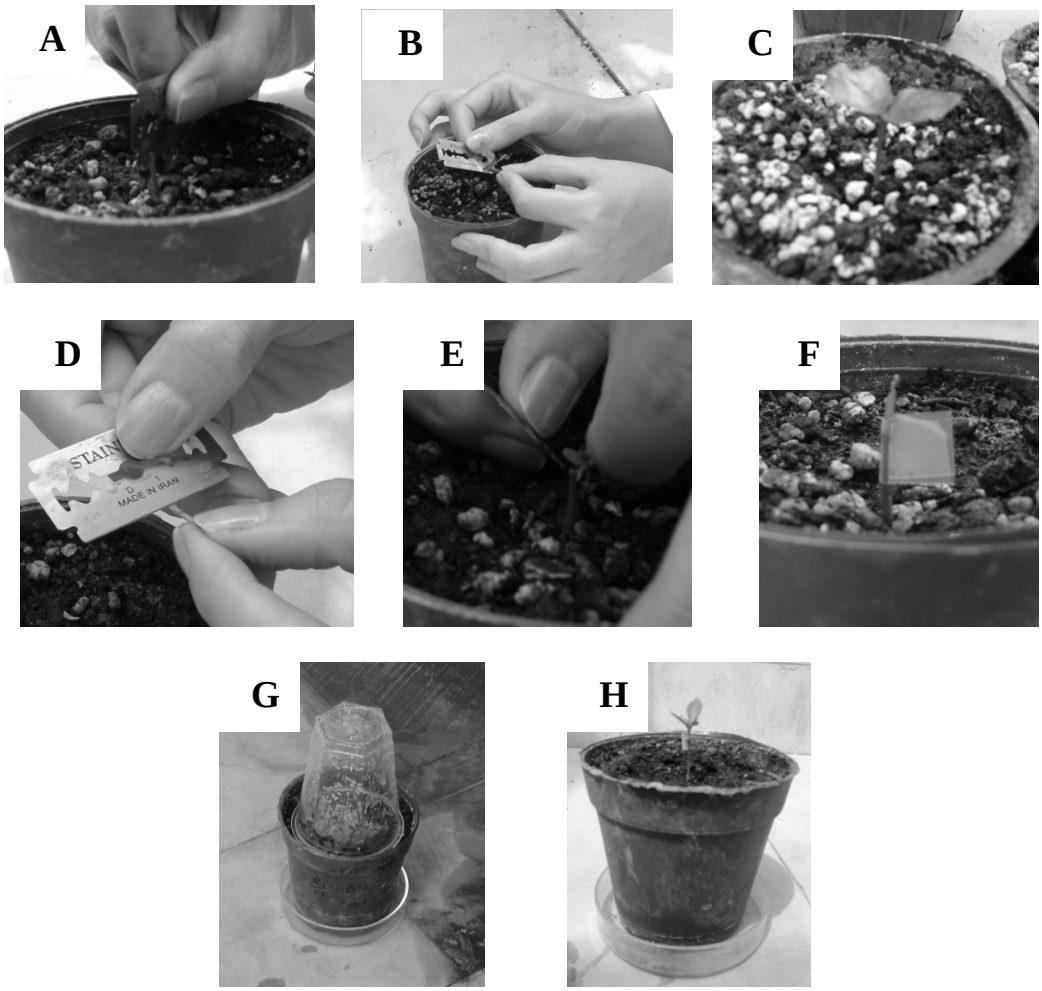
2-Acetosyringone

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-02-03]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1391.1.1.4.1]

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 دوبرگی نارنج،B. برش افقی پایه، C. برش عمودی پایه، D. برشv شکل 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. Prepration 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.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-02-03]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1391.1.1.4.1]

شدند (شکل ۲)، (Pena et al. 1997).

تجزیه گیاهان تراریخته احتمالی

در این پژوهش، استخراج دی.ان.اِ از برگ‌های شاخساره‌های تراریخته احتمالی به سبب کوچک بودن و کم بودن میزان برگ به روش احمد و همکاران انجام گرفت (Ahmed et al. 2009) و اثبات تراریزش شاخساره ها با استفاده از آزمون هیستوشیمیایی GUS و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با آغازگرهای اختصاصی ژن *gus* (جدول۲) بررسی شد. واکنش فوق در ۹۴ درجه سانتی‌گراد ۵ دقیقه و ۳۵ چرخه (هر چرخه شامل یک دقیقه در ۹۴ درجه، ۱ دقیقه در ۵۷ درجه و یک دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد و تکمیل بسط در ۷۲ درجه، ۷ دقیقه) انجام شد.

گیاهان تراریخته‌ای 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 (*vir*G) (جدول۲)، 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.

جدول ۲- توالی آغازگرهای مورد استفاده در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، قطعه تکثیری و دمای بهینه اتصال جهت تایید تراریزش گیاهان تراریخته احتمالی

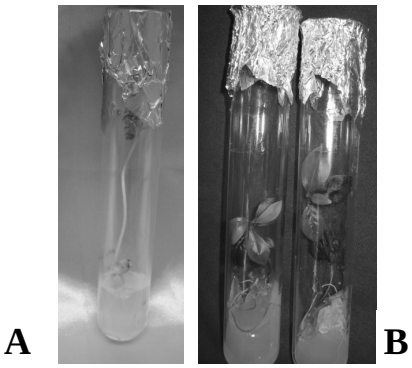
Table 2- Primers, Amplified fragment and annealing temperature that used in PCR reaction.

آغازگرها Primers	توالی sequence	طول قطعه تکثیری (bp) Leangth of amplified fragment (bp)	دمای بهینه اتصال (°C) Annealing
gus	Forward:CCCGCTTCGAAACCAATGCC 5´ Reverse:ACGTCCTGAAGAAACCCCAA5´	1097	57
*vir*G	Forward: 5´ATGATTGTACATCCTTCACG Reverse:TGCTGTTTTTATGAGTTGAG5´	850	58

نتایج و بحث

کشت بذور وریزازدیادی 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 (شکل۳).



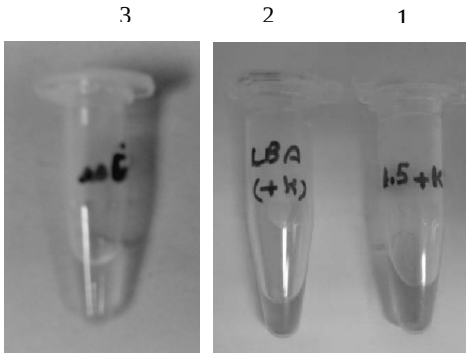
شکل ۳- گیاهچه‌های لیموترش رشد کرده از بذور کاشته شده در محیط کشت. A. گیاهچه سفید شده درنتیجه رشد در تاریکی، B. گیاهچه‌های رشد کرده در روشنایی

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

تائید صحت تراریزش اگروباکتریوم

نتیجه آزمون هیستوشیمیایی GUS در هر دو سویه اگروباکتریوم با استفاده از محلول رنگ‌آمیزی GUS مثبت بود. تشکیل رسوب نیلی رنگ داخل تیوپ، و عدم تشکیل آن در نمونه شاهد، دلیلی بر بیان ژن *gus* در باکتری‌های تراریخته است (شکل۴) همچنین آزمون زنجیره‌ای پلیمراز برای کلنی‌های تراریخته LBA4404

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-02-03]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1391.1.1.4.1]



شکل ۴- آزمون هیستوشیمیایی باکتری‌ها. ۱-سویه EHA105 حاوی پلاسمید pBI، ۲- سویهLBA4404 حاوی پلاسمید pBI، ۳- سویه اگروباکتریوم فاقد پلاسمید نوترکیب

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

و EHA105 که با آزمون رنگ آمیزی تایید شده بودند هر کدام در دو تکرار انجام شد. ظهور باند ۱۰۹۷ جفت بازی ژن *gus*، نشان دهنده صحت تراریزش سویه‌های اگروباکتریوم بود (شکل ۵).

تعیین غلظت آستانه آنتی بیوتیک کانامایسین

بررسی نتایج پس از ۴ هفته نشان داد که اختلاف معنی‌داری در میزان رشد و نکروزه شدن ریزنمونه‌ها در غلظت‌های مختلف کانامایسین وجود دارد به طوری که کالوس‌ها در غلظت‌های ۰ و ۵۰ میلی‌گرم در لیتر کانامایسین رشد کرده و میزان رشد به ترتیب ۱۰۰ درصد و۵۰ درصد بود (شکل۶- C، D)در حالی که ریزنمونه‌ها در غلظت‌های ۷۵ و ۱۰۰میلی‌گرم در لیترکاملا نکروزه شدند (شکل۶-A، B). از این رو غلظت ۷۵ میلی‌گرم در لیتر به عنوان غلظت آستانه آنتی‌بیوتیک کانامایسین 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 متقابلریزنمونه با سویه باکتری اختلاف معنی‌داری وجود دارد ولی بین دو سطح مختلف محیط کشت باززایی اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. مقایسه میانگین درصد کالوس‌زایی برای فاکتورهای ریزنمونه و سویه اگروباکتریوم نشان داد که با استفاده از ریزنمونه اپی‌کوتیل نسبت به میانگره وسویه اگروباکتریوم EHA105 نسبت به سویه LBA4404 درصد کالوس‌زایی بیشتری حاصل شد (شکل۷).

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

بررسی صفت شاخه‌زایی

نتایج حاصل از تجزیه واریانس صفت شاخه‌زایی نشان داد که بیشترین درصد شاخه‌زایی‌به 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 میانگره لیموترش در دو محیط کشت باززایی فوق دارند و همچنین ریزنمونه اپی‌کوتیل سفید نسبت به میانگره دارای قابلیت بیشتری برای کالوس‌دهی و شاخه‌زایی است (شکل۷ 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 باززایی انتخابی تولید کالوس نموده و باززا شدند (شکل۱۰) و ریزنمونه‌های غیرتراریخته و نمونه شاهد به تدریج پس از چند روز نکروزه شدند (شکل ۱۰).

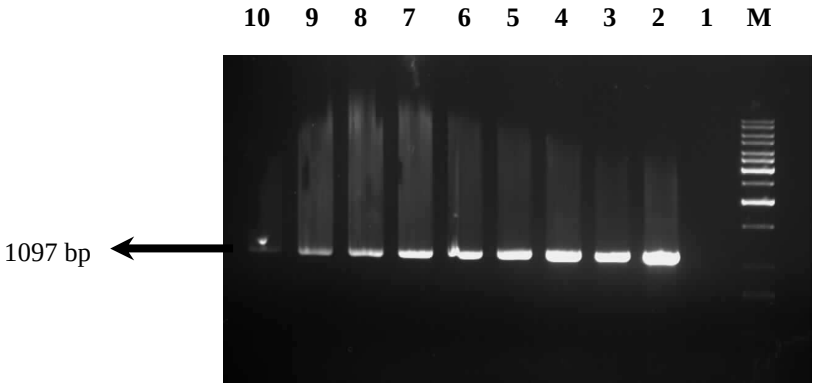
در این آزمایش برش ریزنمونه‌ها به صورت اریب صورت گرفت که موجب می‌شود سطح ناحیه برش افزایش یافته و در نتیجه فعالیت اگروباکتریوم افزایش یابد (شکل ۱۰. A و B).

تجزیه گیاهان تراریخته احتمالی

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

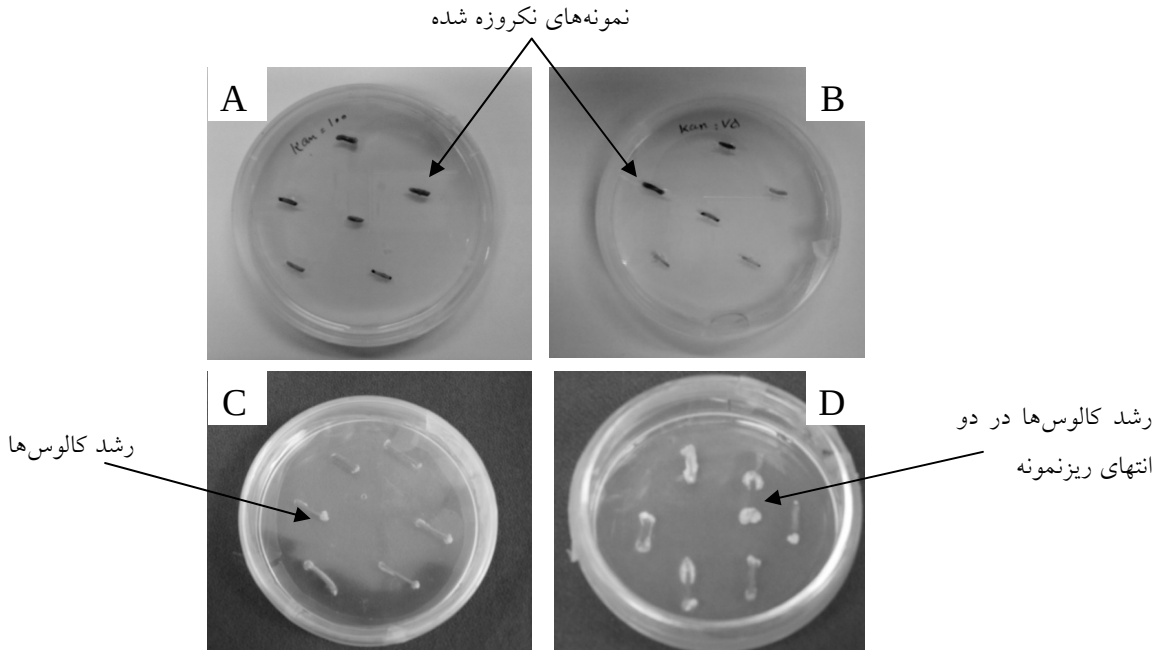
پس از رشد شاخساره‌ها در محیط رشد طولی، شاخساره‌ها مورد سنجش آزمون هیستوشیمیایی GUS قرار گرفتند. وجود نواحی

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-02-03]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1391.1.1.4.1]



شکل، ۵_ واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *gus* به منظور تایید صحت تراریزش اگروباکتریوم سویه‌های LBA4404 و M. EHA105. 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.

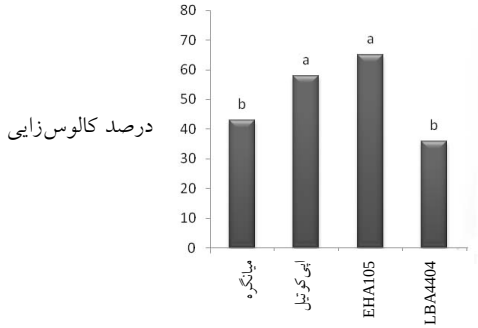
Figure, 5_ PCR analysis of genomic DNA of transformed *Agrobacterium* with *gus* specific primers which successfully amplified expected 1097 bp gene fragment. M: DNA marker. 1: Negative PCR control with no DNA (H_2O). 2: Positive PCR control with GUS plasmid DNA. 3_10 :Transformed *Agrobacterium* strain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



شکل ۶- تعیین غلظت آستانه آنتی‌بیوتیک کانامایسین. A. نکروزه شدن ریزنمونه‌ها در غلظت ۱۰۰میلی‌گرم 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.

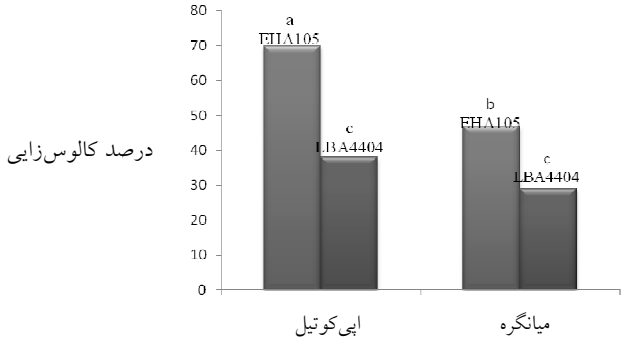
Figure 6- Evaluating appropriate dose of the selection agent on shoot regeneration. A. Concenteration of 100 mg/l kanamaycin killed Mexican lime explants, B. Concentration of 75mg/l kanamaycin killed Mexican lime explants, C. Shoot development and callus formation with 50 mg/l kanamaycin, D. No kanamaycin

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-02-03]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1391.1.1.4.1]



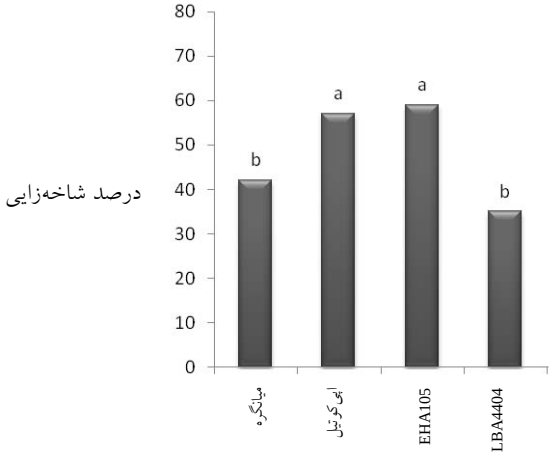
شکل ۷- نمودار مقایسه میانگین درصد کالوس زایی برای فاکتورهای ریزنمونه و سویه اگروباکتریوم.

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



شکل ۸- نمودار اثر متقابل ریزنمونه وسویه در درصد کالوس‌زایی.

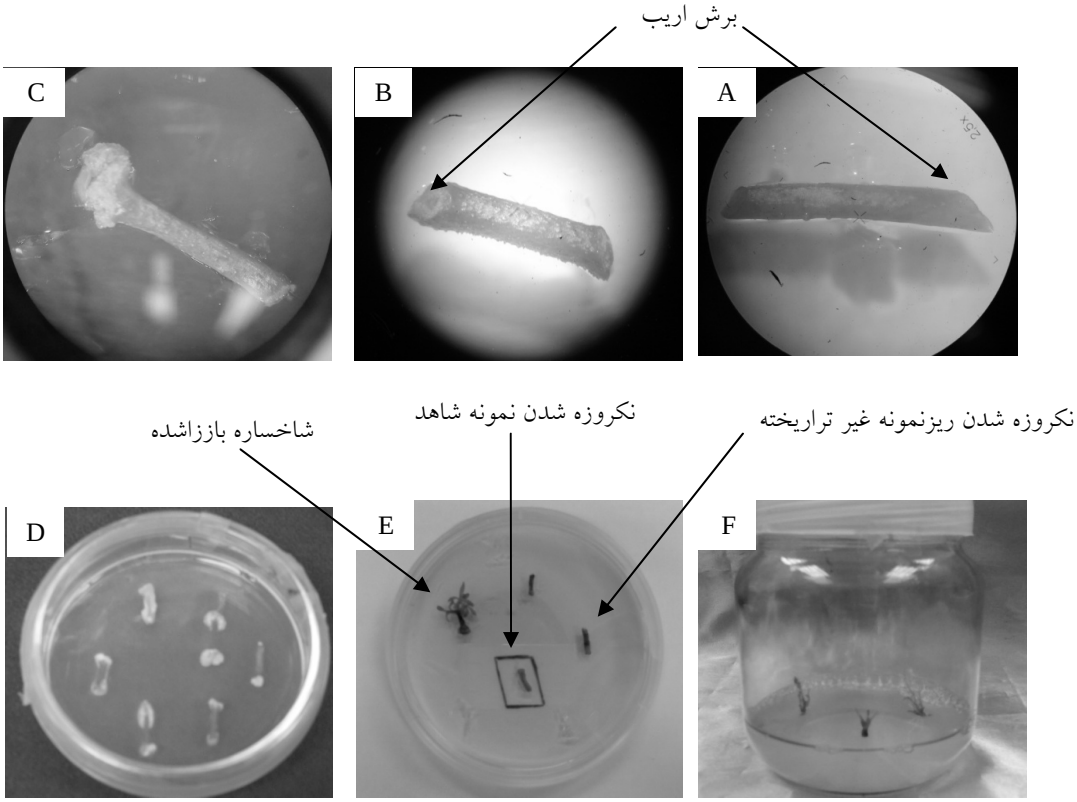
Figure 8- The interaction of explants and *Agrobacterium* strain effecs on callus induction percentage.



شکل ۹- نمودار مقایسه میانگین درصد شاخه‌زایی برای فاکتورهای ریزنمونه وسویه اگروباکتریوم.

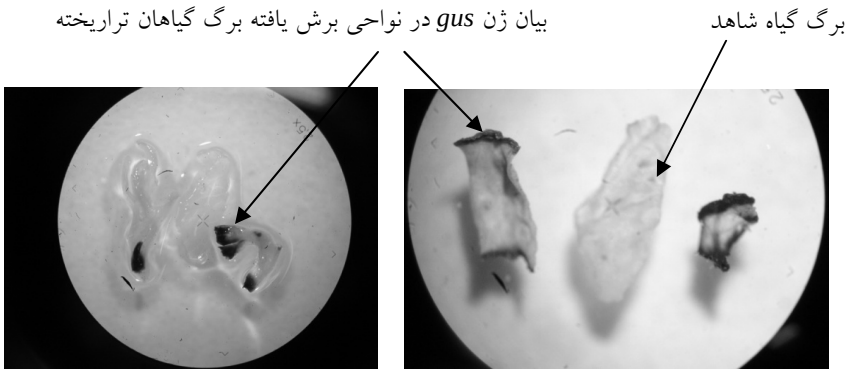
Figure 9-The effect of explants and *Agrobacterium* strains on shoot induction percentage

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-02-03]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1391.1.1.4.1]



شکل ۱۰- تراریزش ریزنمونه‌های لیموترش با استفاده از سویه‌های اگروباکتریوم LBA4404 و EHA105.. A .برش اریب انتهای ریزنمونه‌اپی‌کوتیل سفید، B.. برش اریب انتهای ریزنمونه‌میانگره، 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 رنگ‌آمیزی GUS. نواحی آبی رنگ در مناطق برش یافته نشان دهنده بیان ژن*gus* هستند.

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

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-02-03]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1391.1.1.4.1]

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

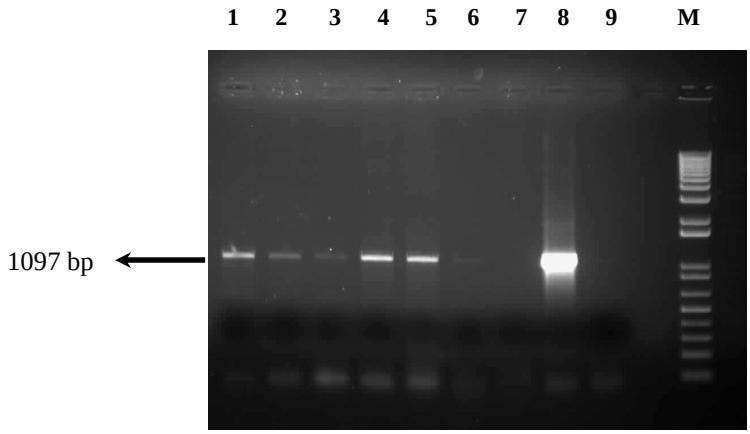
Table 3- Summry of transformation experiments

شماره آزمایش number	ریزنمونه Explant	سویه Strain	محیط باززایی Regenaration medium	درصد شاخساره‌های رنگ‌آمیزی *gus* مثبت Gus + shoots	درصد شاخساره‌ها PCR مثبت برای ژن *gus* PCR + shoots
1	Internode	EHA105	1	۰	۰
2	Internode	EHA105	2	10%	10%
3	Internode	EHA105	1	۰	۰
4	Internode	EHA105	2	۰	۰
5	Epicoty	EHA105	1	10%	30%
6	Epicoty	EHA105	2	۰	20%
7	Epicoty	EHA105	1	15%	15%
8	Epicoty	EHA105	2	۰	۰
9	Internode	LBA4404	1	5%	5%
10	Internode	LBA4404	2	۰	۰
11	Epicoty	LBA4404	1	۰	۰
12	Epicoty	LBA4404	2	۰	۰
13	Epicoty	LBA4404	1	۰	10%
14	Epicoty	LBA4404	2		15%
15	Internode	LBA4404	1	۰	۰
16	Internode	LBA4404	2	۰	۰

آبی رنگ در مناطق برش یافته برگ، نشان دهنده بیان این ژن در ۳۸ درصداز شاخساره‌های باززا 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 شد. ظهور باند ۱۰۹۷ جفت بازی وجود این ژن را در۸ 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

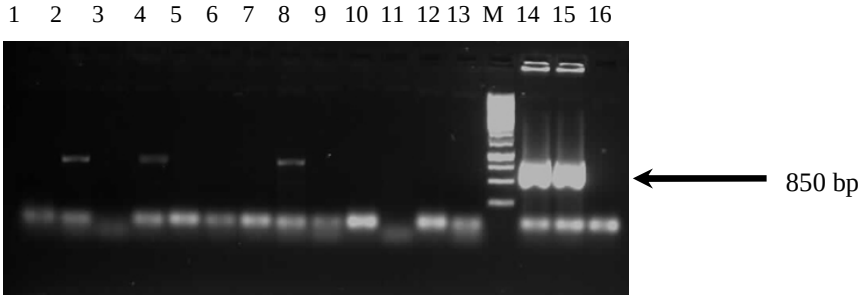
[Downloaded from gebsj.ir on 2026-02-03]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1391.1.1.4.1]



شکل ۱۲- واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی مستقیم و معکوس ژن *gus* برای اثبات تراریزش ۶ گیاه تراریخته احتمالی، چاهک ۵-۱. ۵ گیاه باززاشده (+GUS)، چاهک ۶. گیاه باززاشده (-GUS)، چاهک ۷. گیاه شاهد، چاهک ۸. پلاسمید (کنترل مثبت)، چاهک ۹. نمونه آب (کنترل منفی)،M: نشانگر وزن ملکولی دی.ان.اِ (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 (*vir*G). چاهک ۱۲-۱. ۱۲ گیاه تراریخته احتمالی، چاهک ۱۳. گیاه شاهد، M: نشانگر وزن ملکولی دی.ان.اِ (1 Kb)، چاهک۱۴. اگروباکتریوم فاقد پلاسمید نوترکیب (کنترل مثبت)، چاهک۱۵. اگروباکتریوم دارای پلاسمید نوترکیب، چاهک ۱۶. نمونه آب (کنترل منفی).

Figure 13- PCR analysis of genomic DNA of transgenic citrus plants with *vir*G 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).

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

اثبات عدم حضور اگروباکتریوم در گیاهان تراریخته احتمالی

جهت اثبات عدم حضور اگروباکتریوم در ۱۳ گیاه تراریخته 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 *vir*G انجام شد. باند ۸۵۰ جفت بازی در نمونه اگروباکتریوم وسه نمونه از این گیاهان مشاهده شد. این امر نشان دهنده حضور و پایداری اگروباکتریوم به همراه شاخساره‌های باززا شده و ماهیت غیرتراریخته این سه گیاه است. عدم ظهور این باند در ۱۰گیاه

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-02-03]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1391.1.1.4.1]

تراریخته دیگر، نشان‌دهنده عدم وجود آگروباکتریوم دراین گیاهان و اثبات صحت تراریزش آنها است (شکل۱۳).

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 اگروباکتریوم LBA4404 حاصل شده بود (جدول ۳). بنابراین سویه اگروباکتریوم EHA105 به عنوان بهترین سویه جهت تراریزش و باززایی ژنوتیپ‌های ایرانی لیموترش معرفی شد.EHA105 یک سویه غیرتومورزا است که از سویهA281 اشتقاق یافته است که به عنوان ناقل مناسب جهت تراریزش مرکبات معرفی شده است (Cervera et al. 1998b) و راندمان بالای تراریزش آن به ناحیه ژن‌های *vir* پلاسمید Ti(pTiBo542) در آن مربوط می‌شود (Ghorbel et al. . 2004 2001; li et al).

در این پژوهش استخراج دی.ان.اِ از برگ تمام گیاهان باززا 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 تراریخته باشد. این بدان معنی است که اگر فراوانی تراریزش مرکبات تنها بر مبنای بیان ژن گزارشگر تخمین زده شود، کمتر از مقدار واقعی محاسبه خواهد شد (Dom´ınguez et al. 2004).

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

Mexican lime از گونه‌های سرسخت مرکبات جهت تراریزش به وسیله اگروباکتریوم محسوب می‌شود. در سال ۱۹۹۷، ۱۴ گیاه لیموترش تراریخته از ۳۲۴ ریزنمونه (درصد تراریزش ۴/۳ درصد) بدست آمد (Pena et al. 1997). پژوهشگران در سال ۲۰۰۰ ، ۴۲ گیاه تراریخته لیموترش از ۱۲۰۰ ریزنمونه بدست آوردند ودرصد تراریزش را ۳/۵ درصد اعلام کردند (Dominguez et al. 2000). در پژوهش دیگری که در همین سال انجام گرفت، پژوهشگران میزان تراریزش لیموترش را ۲/۹ درصد گزارش کردند (Koltunow et al. 2000). کارایی تراریزش در لیموترش در بیشترین حالت ۸ درصد گزارش شده است (Dutt and Grosser.2009). در این پژوهش بیشترین درصد تراریزش(% ۵/۶) مربوط به ریزنمونه اپی کوتیل و سویه اگروباکتریوم EHA105 بود.

منابع

1. IWBDLN. 2009. Witches' Broom Disease of Lime Network. Available at
2. www.iwbdln.ir. (in farsi)
3. 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.
4. Bond JE, and Roose ML. 1998. *Agrobacterium*-mediated transformation of the commercially important citrus cultivar Washington navel orange.Plant Cell Rep 18:229–234.
5. Cervera M, Juarez J, Navarro A, Pina JA, Duran-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.
6. 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.
7. Dominguez A, Guerri J, Cambra M, Navarro L, Moreno P, and Pena L. 2000. Efficient production of transgenic citrus plants expressing the coat protein

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-02-03]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1391.1.1.4.1]

gene of citrus tristeza virus. Plant Cell Rep 19: 427–433.
8. Dom´ınguez A, Cervera M, P´erez R, Romero J, FagoagaC, Cubero J, L´opez MM, Ju´arez J, Navarro L, and Pe˜na L. 2004. Characterisation of regenerants obtainedunder 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 DevBiol-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 Pen˜a 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, L´opez C, Fagoaga C, Moreno P, Navarro L, Flores R, and Pe˜na 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 R A, Kavanagh T. A, and Bevan M W. 1987. Gus fusions: ß-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, Jua´rez 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, Rodr´ıguez A, Peris J, Ju´arez 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.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-02-03]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1391.1.1.4.1]