مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
دوره اول، شماره ۲، پاییز و زمستان ۱۳۹۱
صفحه ۸۳-۹۲

کشت بافت و تراریزش نارنج (*Citrus aurantium*) با استفاده از ژن کد کننده‌ی پوشش پروتئینی ویروس تریستزای مرکبات (CTV)

بنفشه فتاح[۱]، محمدمهدی سوهانی *[۲]، عبدالله حاتم‌زاده[۳]، علیرضا افشاری‌فر[٤]، بهروز گلعین[٥]، محمدحسین رضادوست[٦]، محمدرضا میرزایی[۷]، امیرحسین زمانی[۸]

۱، ۷ و ۸- کارشناس‌ارشد بیوتکنولوژی- دانشکده کشاورزی- دانشگاه گیلان
۲، ۳ و ٦- به ترتیب استادیار، دانشیار و مربی دانشکده کشاورزی- دانشگاه گیلان
٤- عضو هیات علمی دانشکده کشاورزی- دانشگاه شیراز
٥- 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

در این پژوهش به‌منظور به دست آوردن گیاهان تراریخته‌ی نارنج، از ریزنمونه‌های اپی‌کوتیل و هیپوکوتیل نارنج استفاده و بهبود اندام‌زایی مستقیم و تولید شاخساره در ریزنمونه ها با استفاده از تیمارهای مختلف بررسی شدند. تراریزش از طریق هم‌کشتی ریزنمونه ها 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 زخم زدن 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، زخم زدن اثر معنی‌داری بر تولید شاخساره نداشت. بالاترین میزان شاخساره‌های تراریخته به میزان ۱۱/۲۵ دزصد در تیمار وکیوم به دست آمد. در نهایت شاخساره‌های تراریخته بر روی دانهال‌های رشد یافته در شرایط *in vitro* ریزپیوند شدند.

واژه‌های کلیدی

Agrobacterium tumefaciens
اپی‌کوتیل
اندام‌زایی مستقیم
تنظیم کننده‌های رشد
زخم‌زنی

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-01-02]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1391.1.2.3.2]

مقدمه

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 مرکبات‌خیز دنیا پایه‌ی مادری است. اما ضعف بزرگ این گیاه عدم‌تحمل به ویروس تریستزای مرکبات (CTV[1]) 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 تریستزا است. در سال‌های اخیر تلاش‌های زیادی برای ایجاد مقاومت به ویروس تریستزا انجام شده است. این روش‌ها بیش‌تر متکی بر خاموشی ژن پس از رونویسی (PTGS[2]) 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; 2004). پنا و همکاران از سویه‌ی EHA105 اگروباکتریوم برای ترانسفورماسیون قطعات اپی‌کوتیل دانهال‌های 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 کد کننده‌ی پوشش پروتئینی ویروس تریستزای مرکبات منتشر شده است (Yang *et al.* 2000).

هدف از این پژوهش افزایش کارآیی اندام‌زایی مستقیم در ریزنمونه‌های اپی‌کوتیل و هیپوکوتیل نارنج در محیط انتخابی و بررسی شرایط و عوامل دخیل در افزایش کارآیی تراریخته‌سازی شاخساره‌های نارنج پس از هم‌کشتی با اگروباکتریوم بوده است.

مواد و روش‌ها

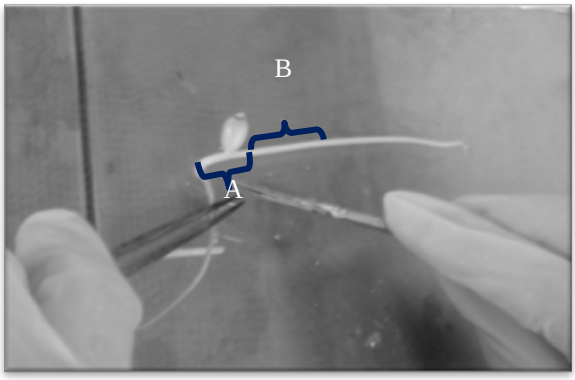
جهت تهیه‌ی ریزنمونه، میوه‌های تازه‌ی نارنج از مرکز تحقیقات مرکبات کشور، رامسر تهیه شد. بذور نارنج از میوه‌های تازه و سالم خارج شده و پس از جدا کردن پوسته خارجی، ضدعفونی سطحی شدند. برای ضدعفونی، بذرها در محلول ۲ درصد هیپوکلریت سدیم به همراه توئین ۲۰[3] با غلظت ۱ درصد به مدت ۱۵ دقیقه به آرامی تکان داده شده سپس ۳ مرتبه با آب استریل ٤٠ تا ٤٥ 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. بذرهای 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 ٤ تا ٦ هفته در ۱± ۲۷ درجه سانتی‌گراد در شرایط تاریکی نگهداری شدند.

ژن موزاییک پوشش پروتئینی ویروس تریستزای 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

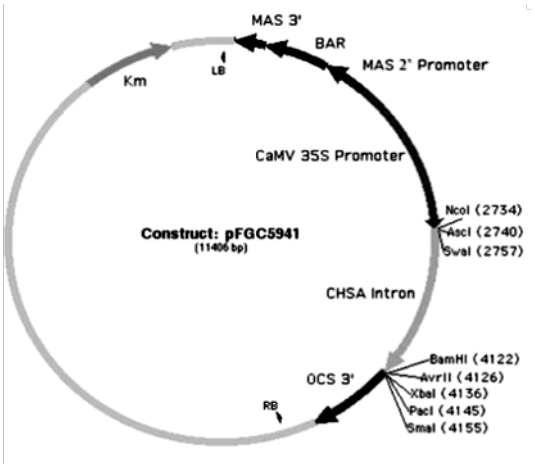
1- Citrua tristeza virus
2- Post transcriptional gene silencing
3- Tween 20

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-01-02]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1391.1.2.3.2]



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

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



شکل ۱- نقشه ژنتیکی ناقل خاموشی pFGC5941

Figure 1- Map of pFGC5941 silencing vector

EHA105 استفاده شد. ناقل خاموشی pFGC5941 با استفاده از دستگاه الکتروپوریشن (Bio-Rad) به اگروباکتریوم 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[4] عامل ایجاد مقاومت به علف‌کش غیرانتخابی آمونیوم گلوفوزینیت با نام تجاری بستا[5] به‌عنوان شاخص انتخابی گیاهی، پروموتر قوی CaMV35S[6] و ترمیناتور NOS[7] است (شکل ۱).

به منظور القای حداکثری ژن‌های بیماری‌زای (*vir*) اگروباکتریوم از دستورالعمل کشت سه روزه‌ی گلوین استفاده شد (Gelvin, 2006). باکتری‌های رشدیافته در محیط القا با انجام سانتریفیوژ در ۶۰۰۰rpm به مدت ۵ دقیقه رسوب داده شدند و رسوب حاصل در محیط MS مایع و غلظت OD_{600}=۰/۸-۱ 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 هیپوکوتیل، گره کوتیلدونی و بخشی از اپی‌کوتیل و دیگری نزدیک‌ترین بخش اپی‌کوتیل 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 اپی‌کوتیل و هیپوکوتیل آماده شده جهت تراریزش در سوسپانسیون اگروباکتریوم 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 ۱±۲۷ 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 تنظیم کننده‌های رشد مربوط با pH=۵/۷ منتقل شدند.

در آزمایش‌های مربوط به بررسی اثر سیتوکینین و اکسین بر

4- Phosphinothricin acetyl transferase
5- Basta
6- Cauliflower mosaic virus 35s
7- Nopaline synthase

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-01-02]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1391.1.2.3.2]

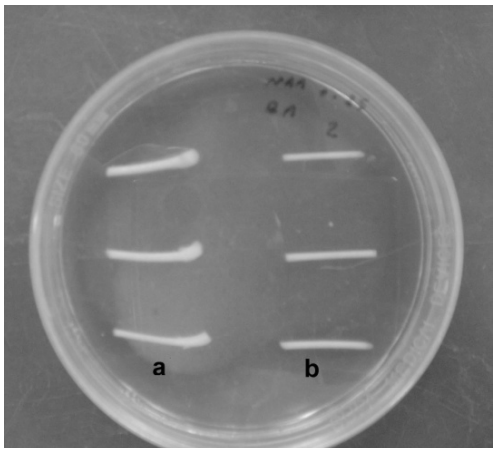
جدول۱- توالی‌های مستقیم و معکوس آغازگرهای مورد استفاده در پی.سی.آر

Table 1- Forward and reverse primer sequences used in PCR

ردیف Row	آغازگر Primer	توالی آغازگر Sequence of primer	طول محصول PCR (bp) Length of PCR product
1	CTV F	5'-GCTCTAGAGGCGCGCCTGCTGCTGAGTCTTCTTTCG-3	393
2	CTV R	5'-GCGGATCCATTTAAATCCGTGGTGTCATCATCACTT-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'	

باززایی، تیمارهای تنظیم کننده‌های رشد ۰، ۱ و ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP[8] و ۰، ۰/۲۵ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA[9] 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 ۱±۲۷ 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 تنظیم‌کننده‌های رشد همراه با ٤۰۰ میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم و ۵۰ میکرومولار علف‌کش بستا با pH=۵/۷ انتقال یافته و در دمای ۱±۲۷ درجه سانتی‌گراد در فتوپریود ١٦ ساعته قرار گرفتند. پس از ٤ 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 GA_3[10]، ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم و ۲۵ میکرومولار علف‌کش بستا 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 برگی گیاهچه‌های باززایی شده دی. اِن. اِ. طبق 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



شکل ۳- ریزنمونه‌های هیپوکوتیل (a) و اپی‌کوتیل (b) حاصل از دانهال‌های رشد یافته در تاریکی در سطوح مختلف تنظیم **کننده‌های** رشد BAP و NAA

Figure3- Hypocotyl- (a) and epicotyl- (b) segment-derived explants from seedlings grown in the dark in mediums supplemented with combinations of BAP and NAA

8- Benzylaminopurine
9- Naphthaleneacetic acid
10- Gibberellic Acid

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-01-02]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1391.1.2.3.2]

جدول۲- 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 ns
error	36	0.43

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

این، به منظور اجتناب از تراریخته دانستن یک گیاه به سبب حضور اگروباکتریوم در سطح آن، یک واکنش پی.سی.آر با آغازگرهای مستقیم و معکوس ژن خارج T-DNAی KAN -عامل ایجاد مقاومت به آنتی بیوتیک کانامایسین در باکتری- شامل KAN F و KAN R انجام شد (جدول ۱). در ادامه الکتروفورز محصولات پی.سی.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 دانهال‌های 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 ۸۰×۱۵ میلی‌متر حاوی ٦ عدد ریزنمونه بود. به عبارتی هر تیمار دارای ۳۰ عدد ریزنمونه بود (شکل ۳). آنالیز داده‌ها به وسیله‌ی نرم افزار SAS انجام شد.

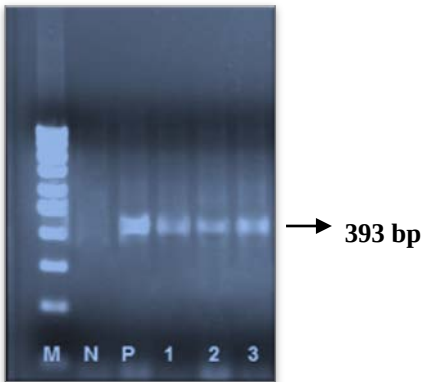
نتایج و بحث

در این پژوهش اثر ترکیبی از سطوح تنظیم کننده‌های رشد BAP و NAA برای اندام‌زایی ریزنمونه‌های هیپوکوتیل و اپی‌کوتیل تلقیح شده‌ی نارنج بررسی شد.

فقط ریزنمونه‌هایی باززایی شده تلقی شدند که جوانه‌هایی به طول حداقل ۲-۱ میلی‌متر در مدت زمان حداکثر ٦ 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 لیترNAA به‌دست آمد و با دیگر تیمارها در سطح ۱ درصد اختلاف معنی‌داری نشان داد. در این سطح از تنظیم کننده‌های 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.

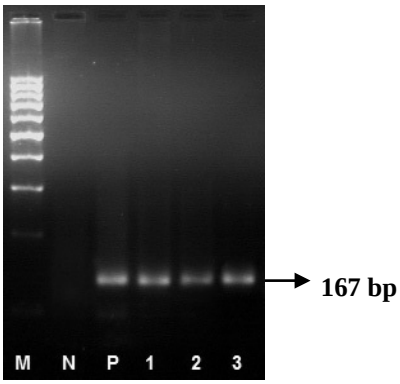
این نتایج با گزارش‌هایی مبنی بر لزوم وجود سیتوکینین BAP در باززایی گیاهچه و نقش حاشیه‌ای اکسین‌ها در این امر مطابقت دارد (Pena *et al.* 2004). پژوهش‌ها نشان داده‌اند که بهترین باززایی ریزنمونه‌های نارنج در حضور BAP در محیط کشت به دست می‌آید (Silva *et al.* 2008). BAP سیتوکینینی است که در مقایسه با سایر 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 تنظیم کننده‌ی BAP بوده است (Ghorbel *et al.* 1998). هم‌چنین نشان

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-01-02]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1391.1.2.3.2]



شکل ٤- 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 ٥- 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.

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 تنظیم کننده‌های رشد که بیشترین درصد اندام‌زایی را داشته‌اند (۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر NAA) برای کشت ریزنمونه‌های تیمار 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 مریستمی در کامبیوم مسئول تشکیل جوانه است (Almeida *et al*. 2003a) و زخم زنی سبب القا و تشکیل نقاط مریستمی یا تکثیر سلولی در ریزنمونه‌ها می‌شود (Escudero and Hohn 1997). از طرفی، برش طولی در تیمار زخم‌زنی سبب تماس بیشتر اگروباکتریوم با منطقه کامبیوم می‌شود و احتمال دارد حضور باکتری و اثر آن بر کامبیوم علت عدم افزایش معنی‌دار در

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-01-02]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1391.1.2.3.2]

شکل ٦- شاخساره های باززایی شده در محیط رشد شاخساره

Figure 6- Regenerated shoots in shoot induction medium

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

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

اندام‌زایی در این آزمایش بوده است. با بررسی غلظت‌های مختلف اگروباکتریوم، ممکن است بتوان کارآیی 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 لزوما تراریخته نیستند و به دلایل مختلفی ممکن است شاخه‌های غیرتراریخته یا شیمر 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.اِن.اِ. گیاه غیرتراریخته کنترل منفی و پلاسمید pFGC5941 حامل ژن CTV کنترل مثبت بوده است (شکل ٤ و شکل ٥).

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 نکرده است، از آغازگرهای مستقیم و معکوس ژن KAN استفاده شد که یک ژن خارج T-DNA است. شاخساره‌ها فقط در صورتی‌که 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 ٦٩ شاخساره‌ی باززایی شده از ریزنمونه‌هایی که از طریق هم‌کشتی با اگروباکتریوم تلقیح شده بودند، ٦ 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 ٦۰ درصد و افزایش میانگین تعداد شاخساره از ۳/۲۵ به ۳/٤۱ 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

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-01-02]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1391.1.2.3.2]

واسطه‌ی اگروباکتریوم (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 شرایط در این پژوهش قطعات اپی‌کوتیل 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 ۲۰میلی‌متر رسیده بود (شکل ٦) روی دانهال‌های نارنج رشد یافته در شرایط درون شیشه ریزپیوندی 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.

منابع

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. Bar-Joseph M, Marcus R, Lee RF. 1989. The continuous challenge of citrus tristeza virus control. Annual Review of Phytopathology. 27: 291-316.
5. Bond JE, Roose ML. 1998. *Agrobacterium*-mediated transformation of the commercially important citrus cultivar Washington Navel orange. Plant Cell Reports 18: 229-234.
6. Dominguez A, De Mendosa AH, Guerri J, Gambra 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.
7. 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
8. Escudero J, Hohn B. 1997.Transfer and integration of T-DNA without cell injury in the host plant. The Plant Cell 9: 2135-2142.
9. 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.
10. Gelvin SB. 2006. *Agrobacterium* virulence gene induction. Methods in Biology 343: 77-84.
11. 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.
12. 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.
13. Grosser JW, Gmitter-Jr FG. 1990. Protoplast fusion and citrus improvement. Plant Breeding Reviews 8: 339-374.
14. 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.
15. Molinari HBC, Bespalhok JC, Kobayashi AK, Pereira LFP, Vieira LGE. 2004.*Agrobacterium* tumefaciens-mediated transformation of Swingle citrumelo (*Citrus paradisi* Macf. X *Poncirus trifoliata*

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-01-02]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1391.1.2.3.2]

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* morphogenesisin plants – recent advances. *In Vitro* Cellular & Developmental Biololy – Plant, Columbia 40: 342-345.
24. Schinor EH, Paoli LG, Azevedo FA., Mourao Filho FAA, Mendes BMJ. 2006. Organogenese 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. Regeneraçao 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 cuture medium composition and explant type. Revista Brasileira De Fruticultura 32: 1-8.
27. Silva RP, Mendes BMJ, Mourao Filho FAA. 2008. Induçao e cultivo *in vitro* de gemas adventicias em segmentos de epicotilo de laranja-azeda. 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).

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-01-02]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1391.1.2.3.2]