ژنتیک نوین
دوره یازدهم، شماره ۱، بهار ۱۳۹۵
صفحه ۱۲-۱

بهبود کارایی انتقال ژن به گیاه نارنج (*Citrus aurantium* L.) با استفاده از اگروباکتریوم تومفاشینس

Improvement of transformation efficiency in *Citrus aurantium* using *Agrobacterium tumefaciens*

مینا خوشبخت[۱]، محمدمهدی سوهانی*[۱]، محمدحسین رضادوست[۱]، امیرحسین زمانی[۱]، بنفشه فتاح[۱]، بهروز گلعین[۲]، علی‌رضا افشاریفر[۳]

۱- به‌ترتیب دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، استادیار، مربی، دانش‌آموختگان کارشناسی ارشد، دانشگاه گیلان، ایران

۲- استادیار، موسسه تحقیقات مرکبات کشور، رامسر، ایران

۳- دانشیار، دانشگاه شیراز، ایران

Khoshbakht M[1], Sohani MM[*1], Rezadoost MH[1], Zamani AH[1], Fatah B[1], Golein B[2], Afsharifar A[3]

1- Graduated MSc Student, Assistance Professor, Instructor, Graduate MSc Students, University of Guilan, Rasht, Iran
2- Assistance professor, Iran Citrus Research Institute, Ramsar, Iran
3- Associate professor, Shiraz University, Shiraz, Iran

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

(تاریخ دریافت: ۹۲/۱۰/۲٤ - تاریخ پذیرش: ۹٤/۱۱/۲۵)

چکیده

استفاده از اگروباکتریوم جهت انتقال ژن به مرکبات از روش‌های رایج و معمول است. در این تحقیق قطعه‌ای موزاییک از دو ژن کد کننده پوشش پروتئینی ویروس تریستزای مرکبات (CTV) جداسازی و در وکتور خاموشی pFGC5941 کلون شد. انتقال وکتور به روش الکتروپوریشن به اگروباکتریوم سویه EHA105 انجام و با استفاده از PCR حضور ژن خارجی تایید شد. دانهال-های نارنج به مدت ٤ هفته در تاریکی و ۱۰ روز در دوره نوری ١٦ ساعته در شرایط *In vitro* رشد کرده و سپس ریز نمونه از اپی‌کوتیل و هیپوکوتیل آن‌ها تهیه شد. ریزنمونه‌ها با اگروباکتریوم هم کشت و در محیط شامل غلظت‌های مختلف هورمون‌های BAP و NAA قرار گرفتند. تأثیر شکاف طولی در انتهای ریزنمونه‌ها، نقش غلظت‌های مختلف استوسرینگون در محیط القایی، هم‌چنین اثر استفاده از خلا جهت هم‌کشتی و نیز نقش منبع هیدروکربن (گلوکز و ساکارز) بر کارایی تراریختی بررسی شد. در این تحقیق شاخساره‌ها به روش باززایی مستقیم و بدون ورود به مرحله کالوس‌زایی از ریزنمونه‌ها تولید شد که مزیت مهمی در ممانعت از ایجاد تنوع سوماکلونال بود. تأیید انتقال تراژن به ژنوم گیاه میزبان با کشت ریزنمونه‌های حامل شاخساره در محیط گزینشی حاوی علف-کش بستا و انجام واکنش PCR با دو ژن داخل T-DNA انجام شد. بر اساس تکنیک Real- PCR Time نیز تعداد نسخه‌های رونوشت برداری شده ژن CTV در گیاهان تراریخت تعیین شد. بالاترین کارایی انتقال ژن در تیمارهای حاوی BAP ۲ mg/l و NAA ۰/۲۵ mg/l همچنین از ریز نمونه‌هایی به دست آمد که به روش هم‌کشتی تلقیح شده و دارای برش طولی در انتها بوده‌اند. در این تیمار برگزیده هم‌کشتی تحت تیمار استوسرینگون صفر، و با استفاده از منبع هیدروکربن گلوکز در محیط کشت القایی انجام شده بود.

واژه‌های کلیدی

استوسرینگون
Agrobacterium tumefaciens
باززایی
کارایی ترانسفورماسیون
نارنج

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-08-16]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1395.11.1.1.4]

مقدمه

مرکبات از جمله محصولات باغبانی مهمی محسوب شده که هر روزه میزان تولید آن‌ها افزایش می‌یابد و از نظر مقدار تولید جهانی مقام دوم را بعد از موز به خود اختصاص داده‌است (Storey and Walker 1999). یکی از مخرب‌ترین بیماری‌های مرکبات بیماری ویروس تریستزا است که به‌وسیله یک کلوستروویروس[1] محدود به آوند آبکش به‌نام (CTV) Citrus Tristeza Virus ایجاد می‌شود (Webber 1943). گیاه نارنج به‌سبب خواص خوب زراعی، مقاومت به تنش‌های محیطی و مزه مناسب پایه برگزیده برای مرکبات در بسیاری از مناطق کشور و جهان است اما به پاتوژن CTV حساس است. ناقل این ویروس نیز شته جالیز است که در ایران وجود دارد. لذا، صنعت مرکبات ایران در معرض خطر جدی بیماری ویروس تریستزای مرکبات قرار دارد (Deng et al. 2001; Alavi et al. 2005; Barzegar et al. 2006). گیاهان چوبی از جمله مرکبات دارای خصوصیاتی مانند عدم خلوص ژنتیکی، چند جنینی، هتروزیگوتی، عقیمی، خودناسازگاری و دگر ناسازگاری و دوره‌ی نو نهالی طولانی هستند که اصلاح این ارقام به روش کلاسیک را با مشکل روبرو کرده‌است (Soost and Roose 1996). از طرفی مکانیسم وراثت‌پذیری بسیاری از مرکبات شناخته شده نیست (Fang et al. 1998). لذا امروزه یکی از روش‌های مقاوم سازی ژنتیکی مرکبات روش مقاومت مشتق شده از پاتوژن (PDR) می‌باشد که اساس آن بر بیان توالی‌های ویروسی در گیاه استوار است (Dominguez et al. 2002). این روش که به‌طور اختصاصی‌تر خاموشی ژن القاء شده به وسیله ویروس (VIGS[2]) تعریف شده یک روش جدید و امیدوارکننده جهت مقاوم سازی گیاهان چوبی مانند مرکبات است (Katz et al. 2007).

این رهیافت وابسته به کشت بافت است و در آن از اگروباکتریوم جهت ترانسفورماسیون مرکبات استفاده می‌شود (Pena et al. 2009) از طرفی، باززایی در شرایط *In vitro* از مراحل مهم در کشت بافت هر گیاه است که به دو روش مستقیم و غیر مستقیم اتفاق می‌افتد. باززایی یا اندام‌زایی مستقیم به فرایندی اطلاق می‌شود که باززایی جوانه بدون تشکیل کالوس اتفاق می‌افتد و نوع غیرمستقیم زمانی است که باززایی اندام‌ها و جوانه پس از تشکیل کالوس رخ می‌دهد (Phillips, 2004; Silva 2010). مزیت روش مستقیم باززایی احتراز از ورود به مرحله کالوس‌زایی است که ریسک ایجاد تغییرات سوماکلونال را به دنبال دارد (Chiriqui, 2008). از طرفی کارایی باززایی نیز اهمیت دارد به گونه‌ای که باززایی بالای ٦٠ درصد جهت موفقیت روش ترانسفورماسیون ضروری و حیاتی است (Tavano et al. 2009). بر این اساس، لازم است روش‌های لازم جهت ایجاد چنین باززایی بالایی در هر آزمایشگاه مطالعه و پایه‌ریزی شود.

در این تحقیق نقش تعدادی از عوامل افزایش دهنده کارایی انتقال ژن با استفاده از اگروباکتریوم و ارتقاء باززایی گیاه نارنج بررسی شد. نقش ترکیب فنولی استوسیرینگون و تأثیر غلظت‌های مختلف آن، ایجاد خلا و همچنین تأثیر دو نوع منبع هیدروکربن بر افزایش کارایی تراریختی نارنج از نظر آماری مقایسه شد. علاوه بر این، مطالعه‌ای در خصوص تأثیرات سطوح مختلف و اثرات متقابل هورمون‌های NAA و BAP، تأثیرات زخم‌زنی بر کارایی باززایی انجام شد. در نهایت تراریخته بودن شاخسارهای تولید شده با استفاده از تکنیک PCR در خصوص سه ژن و رشد آن‌ها در محیط کشت حاوی عامل گزینشی علف کش تایید شد.

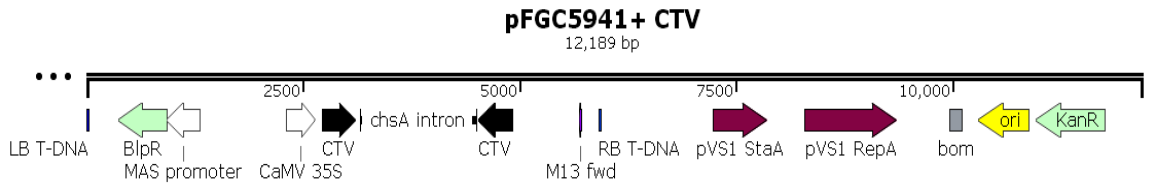
مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و رشد دانهال‌ها

در این تحقیق میوه تازه و رسیده نارنج از مرکز تحقیقات مرکبات (رامسر) تهیه شد. بذور از میوه خارج و پوست آن‌ها جدا و ضدعفونی سطحی شدند. برای ضدعفونی، ابتدا به مدت ١٥ دقیقه در محلول دو درصد هیپوکلریت سدیم در داخل ارلن به آرامی تکان داده شدند. سپس با آب مقطر اتوکلاو شده که دارای دمای ٢٥ درجه سانتی‌گراد بود سه بار و هر بار به مدت ٣ دقیقه آبکشی شدند. پس از آن بذور را به مدت یک دقیقه در محلول اتانول ٧٥ درصد تکان داده و در ادامه بذور سه بار و هر بار به مدت سه دقیقه توسط آب مقطر اتوکلاو شده مذکور آبکشی شد. در این مرحله بذور به محیط جوانه‌زنی منتقل شده و به مدت ٤ تا ٦ هفته در ٢٧ تا ٢٨ درجه سانتی‌گراد در تاریکی نگهداری شدند.

[1] Closterovirus
[2] Virus-induced gene silencing

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-08-16]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1395.11.1.1.4]



شکل ۱- نقشه خطی منطقه T-DNA ناقل خاموشی pFGC5941 شامل قطعه‌ای از ژن پوشش پروتئینی *CTV*. LB) تکرار منطقه مرزی چپ T-DNA؛ BlpR) ژن فسفینوتراریسین استیل ترانسفراز عامل مقاومت به بیالوفوس (بستا)؛ MAS) پروموتر مانوپین سنتتاز؛ CaMV 35S) پروموتر دائمی؛ CTV) نسخه دوگانه از یک قطعه موزاییک ۳۹٤ بازی از ژن پوشش پروتئینی ویروس تریستزای مرکبات (*CTV*)؛ chsA) اینترون A چالکون سنتتاز از گل اطلسی هیبرید؛ RB) تکرار منطقه مرزی راست T-DNA (رسم نقشه وکتور با استفاده از برنامه SnapGene)

بعد از این مدت بذور رشد یافته به مدت ۱۰ روز در دوره نوری ۱٦ ساعته قرار گرفت (Almeida et al. 2002).

تهیه ریزنمونه و تراریخت سازی آن‌ها

دانهال‌های حاصل از بذور نارنج کشت شده به مدت ٦ هفته، برای تهیه ریزنمونه‌ها استفاده شد. ابتدا لپه‌ها، ریشه و برگ‌ها و ساقه‌های زائد جدا شده و سپس از هر دانهال دو نوع ریزنمونه یک سانتی‌متری تهیه شد که یکی شامل هیپوکوتیل، گره کوتیلدونی و بخشی از اپی‌کوتیل و دیگری یک قطعه اپی‌کوتیل بود که در کم‌ترین فاصله از گره کوتیلدونی قرار داشت. اپی-کوتیل‌های رشد یافته از بذور جهت تهیه ریزنمونه و انجام تراریختی استفاده شد. بدین طریق که به قطعات یک سانتی‌متری برش خورده و در دو انتهای آن‌ها زخم طولی به اندازهٔ یک میلی-متر ایجاد شد. ریزنمونه‌ها پس از برش به محیط پیش‌کشت مایع شامل نمک‌های MS، ویتامین B5، ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر عصاره مالت، ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP، ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر NAA، ٤/۷ درصد ساکارز، ۸ گرم در لیتر آگار (Merck)، pH ۵/۸ منتقل و به مدت ۲ روز تاریکی و در دمای ۲۸°C به آرامی تکان داده شدند (تمام مواد مورد استفاده در این قسمت از شرکت سیگما تهیه شد مگر بدان اشاره شده باشد).

کلون کردن ژن *CTV* و وکتور خاموشی

در این پژوهش از یک قطعه موزاییک ژن کد کننده پوشش پروتئینی ویروس تریستزای مرکبات (CP25) مربوط به نژادهای CTV1 (FR871862.1) و CTV2 (EU288067.1) استفاده شد که در قطب علمی ویروس شناسی دانشگاه شیراز ایزوله شده بودند (Zamani 2009). توالی موزاییک مورد استفاده دارای حداکثر همولوژی با سایر توالی‌های نژادهای ویروسی موجود در بانک اطلاعاتی NCBI هستند. ناقل خاموشی مورد استفاده در این بررسی وکتور pFGC5941 بود. این ناقل از وکتور دوگانه[1] pCAMBIA1300 مشتق شده و برای ساخت RNA دو رشته‌ای و القای خاموشی ژن در گیاهان دو لپه تراریخت طراحی شده است. پلاسمید pFGC5941 دارای ژن *npt*II بوده که عامل ایجاد مقاومت به آنتی بیوتیک کانامایسین در باکتری، ژن *BAR*[2] عامل گزینشی گیاهی ایجاد مقاومت به علف‌کش غیرانتخابی آمونیوم گلوفوزینیت با نام تجاری بستا[3] می‌باشد. پروموتر قوی CaMV35S[4] و ترمیناتور NOS[5] است. این وکتور برای ایجاد ساختار سنجاق سری و تولید RNA دو رشته‌ای و القای خاموشی ژن، دارای اینترون میانی چالکون سینتاز ٦ گل اطلسی است. همچنین دارای یک ناحیه MCS[7] است. ژن موزاییک کد کننده پوشش پروتئینی ویروس تریستزای مرکبات (CP25) پس از تکثیر و هضم آنزیمی به صورت قطعات سنس و آنتی سنس تولید کننده dsRNA به‌صورت مکمل و معکوس در وکتور خاموشی وارد شدند (Zamani 2009). بر اساس توصیه محققین تولید کننده این سازه، طول قطعات سنس و آنتی سنس برای درج در وکتور pFGC5941 بهتر است بین bp ۷۰۰ –۳۰۰ باشد (شکل ۱).

نژاد *E. coli* سویه‌های GM2163 و JM107 (Fermentas) جهت تکثیر وکتور خاموشی استفاده شد. ترانسفورماسیون به قطعات هیپوکوتیل و اپی‌کوتیل نارنج صورت گرفت.

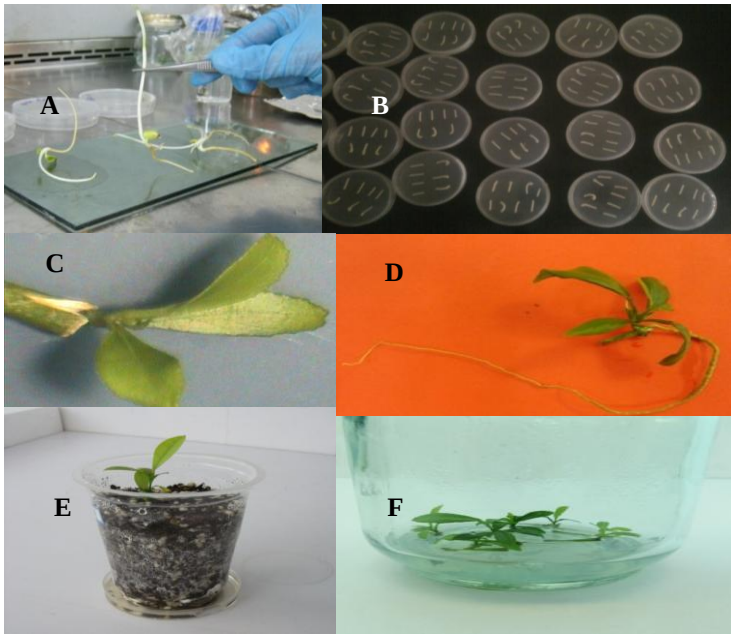
[1] Binary vector
[2] Phosphinothricin acetyl transferase
[3] Basta
[4] Cauliflower mosaic virus 35s
[5] Nopaline synthase
[6] CHSA intron
[7] Multiple cloning site

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-08-16]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1395.11.1.1.4]

محیط‌های کشت باکتری و گیاه مورد استفاده در این آزمایش

محیط‌های کشت‌های باکتری مورد استفاده به قرار زیر می‌باشند: LB (Luria Bertani) شامل ۱۰ g/l تریپتون، ۵ g/l عصاره مخمر، ۱۰ g/l NaCl، ۱۵ g/l آگار (برای تهیه محیط جامد) در pH=۷. محیط تلقیح شامل نمک‌های کامل محیط کشت MS، ۳۰ g/l ساکارز ، ۲۰۰ µM ، ۱۰۰ و صفر استوسیرینگون و pH= ۵/۷. محلول AB شامل ۲۰ml محلول بافر XAB ۵۰، ۵۰ ml محلول نمک ۲۰XAB (که با آب مقطر استریل به حجم یک لیتر رسیده). ساکارز با غلظت نهایی ۰/۵ درصد (Gelvin 2006). محیط کشت القایی AB شامل ۲ mM نمک‌های ۱XAB بافر فسفات، ۵۰ mM محلول ذخیره‌ی MES، ۰/۵ درصد گلوکز، ۱۰۰ µM محلول ذخیره استوسیرینگون، محلول بافر ۲۰XAB (AB buffer 20X) شامل ۶۰g/l K_2HPO4 و ۲۰g/l NaH_2PO4 و pH=۷ است. نمک-های ۲۰XAB (AB salts 20X) محلول نمک‌ها شامل g/l ۲۰ NH_4Cl، ۶ g/l $MgSO4.7H_2O$، ۳ g/l KCl، ۰/۲ g/l $CaCl_2$، ۵۰mg/l $FeSO4.7H_2O$ می‌باشد. محلول ذخیره استوسیرینگون (Sigma-Aldrich) با غلظت ۱۰۰ mM در متانول یا DMSO تهیه، در شرایط تاریکی و در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

محیط کشت جوانه‌زنی بذر شامل نمک‌های محیط کشت MS ۱/۲، ویتامین‌های کامل محیط کشت MS، ۳۰ g/l ساکارز، ۲ g/l فیتاژل (۸g/l آگار) pH=۵/۷. محیط هم‌کشتی شامل نمک‌های کامل محیط کشت MS، ویتامین‌های محیط B5، ۳۰g/l ساکارز، ۸ g/l آگار، (صفر، یک و دو میلی‌گرم بر لیتر) AP، (صفر، ۰/۲۵ و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر) NAA، pH= ۵/۷. محیط انتخابی شامل نمک‌های کامل محیط کشت MS، ویتامین‌های محیط B5، ۳۰g/l ساکارز، ۸ g/l آگار، (صفر، یک و دو میلی‌گرم بر لیتر) BAP، (صفر، ۰/۲۵ و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر) NAA، ۳۰۰ mg/l سفوتاکسیم، ۵۰ mg/l بستا و pH= ۵/۷. محیط رشد شاخساره شامل نمک‌های کامل محیط کشت MS، ویتامین‌های محیط B5، ۳۰ g/l ساکارز، ۸ g/l آگار، (صفر، یک و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر) GA 3، ۲۰۰ mg/l سفوتاکسیم، ۲۵ mg/l علف‌کش بستا، pH=۵/۷. محیط ریز پیوندی شامل نمک‌های کامل محیط کشت MS و ۷۵ g/l ساکارز و pH=۵/۷. پس از رشد دانهال‌های نارنج به مدت حدود ٦ هفته، ریزنمونه از آن‌ها تهیه شد.



شکل ۲- مراحل مختلف انتقال ژن با استفاده از اگروباکتریوم به *C. aurantium*. A) تولید دانهال‌های نارنج رشد یافته در شرایط *In vitro* در ٤ هفته تاریکی مطلق و ۱۰ روز دوره نوری ۱٦ ساعته به‌منظور تهیه ریز نمونه؛ B) ریزنمونه‌های استخراج شده از دانهال‌ها پس از تلقیح با اگروباکتریوم در محیط تولید شاخساره؛ C) ریزنمونه‌های حاوی شاخساره‌های تولید شده از طریق اندام‌زایی مستقیم همراه با بقایای برش‌های ایجاد شده در انتهای ریزنمونه؛ D) تولید ریشه‌های خود به خودی در شاخساره‌ها در مرحله قبل از انتقال به خاک؛ E) شاخساره‌های تولید شده در محیط کشت حاوی GA3 به‌منظور افزایش اندازه و رشد طولی؛ F) گلدان حاوی شاخساره نمونه‌های دارای ریشه و انتقال گیاهچه‌ها به خاک.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-08-16]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1395.11.1.1.4]

ابتدا لپه‌ها، ریشه و برگ‌ها و ساقه‌های زائد جدا و سپس از هر دانهال دو ریزنمونه یک سانتی‌متری تهیه شد که یکی شامل هیپوکوتیل، گره کوتیلدونی و بخشی از اپی‌کوتیل و دیگری یک قطعه اپی‌کوتیل بود که در کم‌ترین فاصله از گره کوتیلدونی قرار داشت. در تعدادی از ریزنمونه‌ها، برش‌های طولی سطحی به طول تقریبی یک میلی‌متر در دو طرف ریزنمونه ایجاد و تأثیر آن در ترانسفورماسیون بررسی شد. اگروباکتریوم نژاد EHA105 کشت و در ۱۰ میلی لیتر محیط MS مایع حل شد (Gelvin 2006). هر یک از مقادیر صفر، μM ۱۰۰ و μM ۲۰۰ استوسرینگون به آن اضافه و ریز نمونه‌ها در آن غوطه و برای مدت ۲۰ دقیقه به آرامی تکان داده شد. تعدادی از ریزنمونه‌ها پس از شناور شدن در محلول باکتری، با دستگاه وکیوم (Eppendorf) تحت خلا قرار گرفتند تا زمانی که محلول به حالت جوش مانند درآید. سپس ریزنمونه‌ها در سطح کاغذهای صافی استریل خشک و به پلیت-های حاوی محیط هم‌کشتی منتقل شدند. پس از طی سه روز دوره هم‌کشتی، ریزنمونه‌ها به مدت یک ساعت در محلول mg/l ۳۰۰ سفوتاکسیم خیسانده، سپس کاملاً با آب مقطر اتوکلاو شده آبکشی شدند.

در بخشی از این آزمایش تأثیر منبع هیدروکربن محیط القاء نیز بررسی شد. بدین صورت که در قسمتی از آزمایش به جای گلوکز از ساکارز به‌عنوان منبع هیدروکربن استفاده شد. در مرحله بعد ریزنمونه‌ها از محیط هم‌کشتی به محیط باززایی انتقال یافته و برای مدت یک هفته در دمای ۲۸°C و در فتوپریود ۱۶ ساعته قرار گرفتند. پس از مرحله باززایی ریزنمونه‌ها به محیط انتخابی حاوی علف کش بستا منتقل شدند. پس از ٤ – ۳ هفته، ریزنمونه‌هایی که دارای جوانه‌هایی به طول mm ۲–۱ شدند به محیط رشد شاخساره حاوی GA_3 ۰/۵ mg/l منتقل و هر ۲ هفته محیط کشت تعویض شد.

DNA ژنومی از مواد گیاهی استخراج (Edwards et al. 1991) و چرخه دمایی واکنش PCR به شرح زیر انجام شد: واسرشته سازی اولیه ۹۵ °C به‌مدت ۷ دقیقه و ۳۵ چرخه شامل ۹۵ °C به‌مدت ٤۰ ثانیه، ۵۷°C به مدت ۳۰ ثانیه، ۷۲ °C به‌مدت ٦۰–۳۰ ثانیه (بسته به نوع آغازگر) و بسط نهایی ۷۲ °C به‌مدت ۱۰ دقیقه.

جوانه‌هایی که طول آن‌ها در محیط رشد شاخساره (حاوی mg ۰/۵ GA_3) ۵–۳ سانتی‌متر طول و حدود ۱/۸–۱/٦ میلی‌متر قطر داشته‌اند جهت ریزپیوندی استفاده شد (Navarro 1992). پس از پیوند زدن، گیاه پیوندی به لوله‌های آزمایش ۱۵۰×۲۵ میلی‌متری حاوی ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع MS با ۷۵ گرم در لیتر ساکارز و ۵/۸ pH منتقل شد. به‌منظور استقرار شاخساره‌ها در لوله آزمایش از یک پل کاغذی استفاده شد و محیط کشت در اتاقک رشد در دمای ۲۸ °C در فتوپریود ۱٦ ساعته نگهداری شد.

این آزمایش در قالب طرح فاکتوریل با پایه طرح کاملاً تصادفی انجام شد. به‌منظور بررسی هر یک از فاکتورهای مورد نظر، شامل تیمارهای مختلف استوسرینگون، منبع هیدروکربن در محیط القاء و استفاده از وکیوم در ترانسفورماسیون، در آزمایش‌های جداگانه-ای مورد ارزیابی قرار گرفت. در مواردی که آزمایش‌ها با فاکتورهای مشابه تکرار شده بود میانگین نتایج گزارش شده است. هر تیمار دارای سه تکرار و هر تکرار یک پتری دیش mm ۸۰×۱۵ حاوی ٦ عدد ریزنمونه بود. آنالیز داده‌ها به وسیله نرم‌افزار SAS9.2 انجام شد.

بررسی بیان ژن *CTV* با استفاده از تکنیک Real-time PCR

RNA گیاهان استخراج وcDNA آن‌ها سنتز و بررسی بیان ژن *CTV* به روش Real-time PCR انجام شد. بررسی تغییرات نسبی بیان ژن، به روش ΔΔCt انجام گرفت (Livak and Schmittgen 2001; Kariola et al. 2004). یک میکرولیتر از cDNA ۱۰ برابر رقیق شده از نمونه‌ها به همراه ۱۰ میکرولیتر از SYBR GREEN (Bioneer) دو میکرولیتر (غلظت ٤ میکرومول) آغازگرهای رفت و برگشت از ژن *CTV* و تا حجم ۲۰ میکرولیتر آب اضافه شد. ترمال سایکلر Bio-Rad مدل CFX برای تکثیر استفاده شد.

ژن اکتین (جدول ۱) به‌عنوان کنترل داخلی و محاسبه فاکتور نرمال سازی (NFn, n = 3; Vandesompele et al. 2002) استفاده شد. شرایط انجام واکنش شامل ۷ دقیقه غیر فعال سازی در دمای ۹۵ °C، سپس ٤۵ چرخه در دمای ۹۵ °C، ٦۰ °C و ۷۲ °C همگی به‌مدت ۳۰ ثانیه و در نهایت منحنی ذوب از دمای ٦۰ °C الی ۹۵ °C با نرم افزار دستگاه محاسبه و رسم شد.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-08-16]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1395.11.1.1.4]

جدول ۱- توالی‌های رفت و برگشت آغازگرهای مورد استفاده

آغازگر	توالی آغازگر ('5-'3)	طول محصول PCR (bp)
CTV For1-1	CGGCGCGCCATGGACGACGAAACAAAG	۳۹۳
CTV Rev2	CCACTTCAATACCCTCCCG	
NOS For	GAATCCTGTTGCCGGTCT	۱٦۷
NOS Rev	TTGCGCGCTATATTTTGT	
BAR For	GACAAGCACGGTCAACTTCC	۲٤۷
BAR Rev	CTTCAGCAGGTGGGTGTAGAG	
KAN For	ATGTTGCTGTCTCCCAGGTC	۳۸۲
KAN Rev	GAAAGCTGCCTGTTCCAAAG	
ACT For	GAGTTCTTCACGCGATACCTCCA	۹۵
ACT Rev	GACCACCTTTATTAACCCCATTTACCA	

نتایج و بحث

به‌منظور دست‌یابی به بهترین ترکیب و تأثیر هورمون‌های BAP و NAA بر باززایی مطالعه‌ای انجام و بهترین نتایج در ادامه در سایر آزمایش‌ها استفاده شد.

در این آزمون تعداد ریزنمونه‌های دارای جوانه بعد از ٤ هفته ثبت و بررسی شد. هورمون‌های NAA و BAP دارای تأثیر متقابل در سطح یک درصد بودند. بررسی تأثیر سطوح مختلف NAA نیز نمایانگر اختلاف معنی‌دار در سطح یک درصد می‌باشد. علاوه بر این، در تیمارهای فاقد هورمون، باززایی به مقدار معنی‌داری کمتر بود. بهترین نتایج باززایی در ترکیبی از دو هورمون NAA و BAP حاصل شد. استفاده ۰/۲۵ mg/l NAA و ۲ mg/l هورمون BAP با میانگین ٦ جوانه دارای بیشترین کارایی در باززایی مستقیم نمونه-ها بود (شکل 2C). بنابراین، ترکیب هورمونی ذکر شده و نتیجه به دست آمده در ادامه در تمامی آزمایش‌ها استفاده شد.

BAP سیتوکینینی است که بالاترین تعداد جوانه را در ریزنمونه-های مرکبات ایجاد می‌کند (Moreira-Dias et al., 2000; Almeida et al. 2002; Silva et al. 2005a; Schinor et al. 2006). استفاده از BAP به جای کینتین (Moreira- Dias et al. 2001; Almeida et al. 2002; Silva et al. 2005; Schinor et al. 2006) و تیدیازورون (Germana et al. 2011) در باززایی ریزنمونه‌ها مؤثرتر بوده و ریزنمونه‌ها در اثر این هورمون شاخساره‌های بیش‌تری تولید می‌کنند. در مواردی مشاهده شده که باززایی فقط در محیط کشت حاوی تنظیم کننده BAP انجام شده است (Ghorbel et al. 1998).

مطالعات نشان داده که تقسیمات سلولی و تمایز سلول‌های تراریخت بیش‌تر در محیط باززایی حاوی ترکیبی از BAP و NAA تحریک می‌شود تا زمانی که فقط BAP در محیط موجود است (Ghorbel et al. 2000). این مطالعات هم‌چنین نشان داد که در اکثر ژنوتیپ‌ها برای ترانسفورماسیون بافت بالغ افزودن NAA در غلظت‌های مناسب به محیط باززایی به شدت در توسعه بخش‌های تراریخت موثر است (Ghorbel et al. 2001; Almeida et al. 2003a; 2003b; Molinari et al. 2004).

در آزمایش مقایسه‌ای بین KIN و BAP در ترکیب با NAA نشان داده شد که باززایی جوانه نابجا در اپی‌کوتیل‌ها و قطعات میان گره‌ای ساقه نارنج، تحت تأثیر مقدار ۲ mg/l BAP به همراه ۰/۳ mg/l NAA بهترین پاسخ را داده است (Silva et al. 2010).

نتایج آزمایش فعلی نشان داد که استفاده ۰/۲۵ mg/l هورمون NAA به تنهایی سبب تولید میانگین ٤ ریز نمونه جوانه‌دار شده که بالاتر از سایر تیمارهای این هورمون بود.

در پژوهشی بر روی ریزنمونه‌های سیترنج، بهترین باززایی در محیط حاوی ۱ mg/l BAP و ۰/۱ mg/l NAA گزارش شد که تعداد ۱۰/٤ جوانه برای هر ریزنمونه حاصل شد که ۷/۲ عدد از آن‌ها تبدیل به شاخساره شد (Moreira-Dias et al. 2000). نتایج حاصل از تأثیر هورمون BAP به تنهایی بسیار به هم نزدیک بوده و اختلاف معنی‌داری را نشان ندادند. با این وجود ۲ mg/l BAP با میانگین ۳/۵ جوانه بیش‌ترین مقدار را به خود اختصاص داد. در

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-08-16]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1395.11.1.1.4]

این زمینه آزمایش‌های دیگری نیز توسط پژوهشگران انجام گرفت و نشان داده شد که غلظت‌های بالای BAP از طویل شدن ساقه و بزرگ شدن اندازه برگ ممانعت می‌کند (Al-Khayri and Al-Bahrany 2001). غلظت بالای BAP در محیط باززایی، تأثیر معکوس بر تعداد شاخه‌های باززایی شده و سپس ریشه‌زایی آن‌ها دارد. طبق گزارشات آن‌ها مقدار BAP mg/l ۲/۵ و کم‌تر در محیط باززایی ممانعتی برای ریشه‌زایی ریزنمونه‌ها ایجاد نکرد ولی غلظت‌های بالاتر مانع ریشه‌زایی شد (Gutierrez et al. 1997).

به‌منظور بررسی روش تلقیح نیمی از هر گروه نمونه‌ها به مدت ۲۰-۱۵ دقیقه در تماس مستقیم با اگروباکتریوم بوده و تکان داده شده در حالی‌که باقی نمونه‌ها در سوسپانسیون اگروباکتریوم و محیط MS به‌مدت ۳۰ ثانیه در شرایط خلا قرار داده شدند. ایجاد خلأ و فراصوت از تکنیک‌های نوینی هستند که اخیراً برای نفوذ بیش‌تر اگروباکتریوم به قطعات اپی‌کوتیل به‌منظور افزایش راندمان ترانسفورماسیون استفاده شده است (Oliveira et al. 2009). در این روش با توجه به شرایط مکش و ایجاد خلا، فرض می‌شود باکتری آسان‌تر وارد ریزنمونه‌ها می‌شود. به منظور جلوگیری از رشد مازاد باکتری در دوره‌های رشدی بعد، ریزنمونه‌ها در چندین مرحله توسط آنتی بیوتیک سفوتاکسیم شستشو شدند.

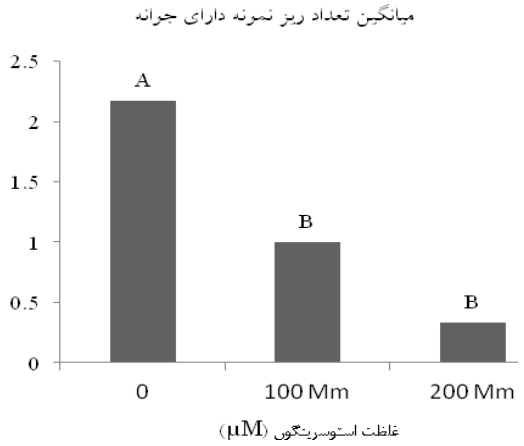
نتایج تجزیه واریانس نشان داد که باززایی در روش‌های هم‌کشتی به‌طور متوسط دو ریز نمونه دارای جوانه و وکیوم به‌طور متوسط ۱/۷ بوده که معنی‌دار نبود. تعداد میانگین جوانه‌ها در تلقیح به روش هم‌کشتی اندکی بالاتر بود که احتمالاً علت آن آسیب مکانیکی حاصل از وکیوم می‌باشد. عامل دیگر، نفوذ بیش از حد باکتری در اثر وکیوم در بافت‌ها بود که در ادامه رشد ریزنمونه‌ها سبب رشد بیش از حد باکتری بر روی آن‌ها و عامل زوال ریزنمونه‌ها شد.

به‌منظور بررسی تأثیر برش طولی بر میانگین تعداد ریز نمونه‌های دارای جوانه، در انتهای تعدادی از ریز نمونه‌ها یک برش طولی به عمق یک میلی‌متر ایجاد شد با این هدف که تماس اگروباکتریوم با منطقه کامبیومی بهتر و بیش‌تر شده به‌طورکلی باززایی افزایش یابد. نتایج بررسی تعداد ریز نمونه‌های دارای جوانه نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین تیمار برش طولی و فاقد برش در خصوص باززایی نمونه‌ها وجود ندارد (۱/۷ در مقابل ۱/۵). ایجاد برش طولی و سطوح استوسرینگون دارای اثر متقابل نبوده و داده‌ها تفاوت معنی‌داری را نسبت به هم نشان نمی‌دهند. با این وجود بین داده‌ها در سطوح مختلف استوسرینگون تفاوت معنی‌داری در سطح یک درصد مشاهده شد. در آزمایش دیگری زخم‌زنی ریزنمونه‌های Key lime از طریق بمباران ذره‌ای با ذرات تنگستن (قبل از انجام تلقیح با اگروباکتریوم) میزان باززایی و ترانسفورماسیون را کاهش داد (Gutierrez et al. 1997). سلول‌های زخمی و آسیب دیده مستعد ترانسفورماسیون به‌وسیله اگروباکتریوم هستند (Shimoda et al. 1990; Bidney et al. 1992). به‌عبارتی، تشکیل نقاط فعال مریستمی یا تکثیر سلولی نیز از جمله نقاط مستعد و آماده دریافت ژن خارجی می‌باشد. در همین خصوص ایجاد زخم در ریزنمونه-ها سبب القاء نقاط فعال مریستمی در بافت‌های گیاهی می‌شود (Escudero and Hohn 1997). زخم‌زنی بافت‌ها منجر به نتایجی شبیه به استعمال هورمون‌ها، الیسیتورها و تنظیم کنندهای رشد سنتتیک بر روی مثلاً اندام‌زایی می‌شود. جنین‌های زیگوتی هویج زخمی شده می‌تواند کشت‌های جنینی را در محیط کشت عاری از هورمون القاء کند (Smith and Krikorian 1990) و با ایجاد یک برش طولی در محل برش می‌توان کارایی باززایی را به نحو چشمگیری افزایش داد. همچنین مشاهده شده که برش طولی انتهای اپی‌کوتیل‌ها به شکل قابل توجهی موجب افزایش اندام‌زایی در محیط *In vitro* می‌شود اما، زمانی که ریزنمونه‌های دارای برش با اگروباکتریوم تلقیح شدند رشد بیش از حد اگروباکتریوم مانع باززایی شاخه شد (Almeida et al. 2003a). در گزارشی دیگر که با هدف مشابهی صورت گرفته، برش اریب مقطع ریزنمونه‌ها، بهترین تأثیر را از نظر فراوانی و کیفیت باززایی نشان داده (Duan et al. 2007). در تحقیقی مشاهده شد که با ایجاد یک شکاف طولی کارایی باززایی به میزان ۳/٦ تا ۳۷/۱ افزایش می یابد (Yu et al. 2002). همچنین گزارش شده که درصد باززایی در نارنج ۳٤/۷ تا ٤۷/۲ درصد افزایش می‌یابد (Luan et al. 2009). در این تحقیق شاخساره‌هایی به دست آمد که حاصل باززایی مستقیم از ریزنمونه‌ها بودند، لذا ریسک تنوع سوماکلونال در شاخساره‌های حاصل به کم‌ترین میزان رسید.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-08-16]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1395.11.1.1.4]

در آزمونی دیگر تأثیر سطوح مختلف استوسرینگون بر باززایی جوانه‌های تراریخت شده بررسی شد. ریزنمونه‌ها با استفاده از روش هم‌کشتی و سه غلظت مختلف استوسرینگون شامل صفر، ۱۰۰ µM و ۲۰۰ µM با اگروباکتریوم تلقیح شدند. سطوح استوسرینگون دارای اختلاف معنی‌داری در سطح پنج درصد بودند. به گونه‌ای که سطح صفر درصد حاوی دو ریزنمونه دارای جوانه و سطوح ۱۰۰ و ۲۰۰ µM به‌ترتیب ۱ و ۰/۳۳ بود که کارایی تیمار سطح صفر درصد به طور معنی‌داری از دو تیمار ۱۰۰ و ۲۰۰ µM بیشتر بود (شکل ۳).



شکل ۳- مقایسه میانگین تأثیر سطوح استوسرینگون بر باززایی در محیط گزینشی

بهترین نتیجه باززایی در سطح ۱۰۰ µM بدست آمد. مقدار ۱۰۰ میکرومولار استوسرینگون برای ترانسفورماسیون ریزنمونه‌های *Citrus paradise* نیز مناسب اعلام شده‌است (Luth and Moore 1999). این نتایج نشان می‌دهد که روش تلقیح و نیز سطوح استوسرینگون هر کدام به تنهایی تأثیر به سزایی در کارایی باززایی و در نتیجه میزان ترانسفورماسیون نارنج دارد. برخی مطالعات نشان داده که افزودن استوسرینگون در محیط هم‌کشتی سبب افزایش بیان ژن‌های *vir* و افزایش نرخ ترانسفورماسیون می‌شود (Henzi 2000). نمونه‌های فاقد استوسرینگون اختلاف معنی‌داری را نسبت به سایر سطوح استوسرینگون نشان دادند. با توجه به نقش استوسرینگون در فعال‌سازی ژن‌های *vir*، ممکن است نتیجه حاصل کمی دور از انتظار باشد اما در مواردی نتایج مشابهی گزارش شده است. استوسرینگون در ترانسفورماسیون بسیاری از گونه‌های مرکبات به کار برده شده‌است (Kaneyoshi et al., 1994; Bond and Roose 1998; Cervera et al. 1998; Yang et al. 2000; Li et al. 2002). در ترانسفورماسیون *Citrus sinenesis* گزارش شد که در تیمار فاقد استوسرینگون تعداد گیاهان تراریخت شده بیش‌تر بوده‌است (Almeida et al 2003a). با توجه به نتایج حاصل از انجام PCR با دو ژن داخل T-DNA شامل ژن‌های *CTV* و *BAR* از شاخساره‌هایی که در محیط کشت حاوی عامل گزینشی بستا (Bayer ،۳۰ mM) تولید شده بودند، تعدادی شاخساره تراریخت به دست آمد.

یکی از اهداف این آزمایش بررسی تأثیر غیر مستقیم منبع هیدروکربن (شامل ساکارز و گلوکز) بر افزایش کارایی ترانسفورماسیون و افزایش بیان ژن‌های *vir* بود که در قالب تعداد جوانه‌های تولید شده بر روی ریز نمونه‌ها در محیط کشت حاوی عامل گزینشی بستا ارزیابی شد. منبع هیدروکربن مختلف در روز سوم کشت باکتری یعنی در مرحله القاء استفاده شد که شامل گلوکز ۳۰ درصد و یا جایگزین آن ساکارز ۳۰ درصد بود. در این تیمار به‌طور متوسط ۱/۲ جوانه در ریزنمونه در محیط‌های حاوی ساکارز و ۲/۳ جوانه در محیط‌های حاوی گلوکز به دست آمد که اختلاف بین آن‌ها از لحاظ آماری در سطح پنج درصد معنی‌دار بود. بر اساس مقایسه میانگین تعداد شاخساره مشخص شد که بهترین نتیجه باززایی در روش هم‌کشتی و در حضور گلوکز حاصل شد. بنابراین استفاده از قند منوساکارید به همراه روش وکیوم می‌تواند سبب افزایش کارایی باززایی و در نتیجه افزایش کارایی تراریخت شود. ساده‌تر بودن گلوکز و دسترسی راحت‌تر گلوکز نسبت به ساکارز را می‌توان دلیل بر کارایی بیشتر گلوکز دانست (Ankenbauer and Eugene 1990). نتایج تایید کننده آن است که میزان دسترسی باکتری به کربن برای رشد و نمو در محیط حاوی گلوکز به دلیل ساده‌تر بودن بیشتر است. در پژوهشی مشابه نقش مونوساکاریدها بسیار موثرتر از دی ساکاریدها در فعال سازی ژن‌های *vir* بود (Ankenbauer and Eugene 1990). در این آزمون نیز از ۲۱ شاخساره به دست آمده ٦ شاخساره تراریخت شناسایی شد. در نهایت به منظور بررسی تأثیرات هر سه فاکتور منبع هیدروکربن، روش تلقیح و استوسرینگون بر

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-08-16]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1395.11.1.1.4]

بازرایی مستقیم ریزنمونه‌ها و درصد انتقال ژن یک آزمون در قالب طرح اسپلیت پلات فاکتوریل طراحی و اجرا شد. نتیجه تجزیه واریانس نشان داد که آزمایش نهایی ریزنمونه‌های دارای برش طولی پس از ۲۰ دقیقه تلقیح در محیط حاوی اگروباکتریوم بدون استوسرینگون دارای ساکارز در محیط انتخابی قرار گرفتند که از ٤٠ شاخساره حاصل تعداد ۱۸ عدد به سه واکنش PCR پاسخ مثبت نشان دادند (کارایی تراریخت ٤٥ درصد).

در این تحقیق به‌منظور تأیید تراریخته بودن شاخساره‌های رشد یافته، DNA آن‌ها استخراج، واکنش PCR با آغازگرهای ژن‌های داخل T-DNA انجام شد. DNA ژنومی استخراج شده از گیاه غیر-تراریخت رشد یافته در شرایط درون شیشه‌ای شاهد یا کنترل منفی و پلاسمید pFGC541 کنترل مثبت در آزمایشات PCR بوده است (شکل ٤). فقط شاخساره‌هایی تراریخت محاسبه شدند که هر سه واکنش PCR آن‌ها مثبت بود. به‌منظور تایید اصالت باندها و مطابقت با توالی ژن *CTV* محصول PCR خالص‌سازی و توالی-یابی شد(Bioneer, South Korea). نتیجه توالی‌یابی ویرایش و در سایت NCBI مقایسه و مطالعه شده به‌طوری‌که ژن تکثیر شده *CTV* بود.

ژن‌های تکثیر شده در طی آزمون‌های PCR ممکن است منشأ ژنوم گیاهی نداشته و یا به عبارتی منشأ آن‌ها اگروباکتریوم موجود در بخش‌های سطحی یا داخلی بافت گیاه باشد که پس از تلقیح باقی‌مانده باشند. بر این اساس، از آغازگرهای رفت و برگشت ژن *KAN* استفاده شد که خارج T-DNA قرار دارد. فقدان تکثیر نشانه آن است که آلودگی اگروباکتریوم در سطح وجود ندارد. نتیجه این‌که PCR با استفاده از آغازگرهای *KAN* در اغلب نمونه‌ها هیچ‌گونه باندی نشان نداده که به‌معنی صحت منشأ تکثیر و اثبات کارایی روش حذف اگروباکتریوم و آنتی‌بیوتیک‌های استفاده شده می‌باشد.

افزودن عامل گزینشی یعنی علف‌کش بستا به محیط رشد ریزنمونه mM ۳۰ سبب شد تا برگ‌های نمونه‌های تراریخت نشده بعد از سه روز رو به زردی رفته و بعد از مدت حدوداً یک هفته قهوه‌ای و از بین بروند در حالی‌که نمونه‌های تراریخت شده سبزینه برگ خود را حفظ کردند (شکل ٤).

شکل ٤- استفاده از عامل گزینشی علف کش بستا به منظور ایزولاسیون گیاهان تراریخت. تأثیر بستا بر نمونه تراریخت شده (A) که نمونه‌ها همچنان سبز باقی ماندند؛ و نمونه غیر تراریخت که در اثر علف کش پس از دو هفته به رنگ قهوه ای و در نهایت از بین رفتند (B).

تعدادی از شاخساره‌های کنترل مثبت پس از چهار هفته در محیط کشت *In vitro* شروع به تولید ریشه‌های خود به خودی کردند (شکل ۲E). این شاخساره‌ها دارای ریشه جهت رشد بیشتر و تولید تار کشنده به خاک منتقل شدند. خاک مورد استفاده شامل ٤٥ درصد پرلیت، ٤٥ درصد کوکوپیت و ۱۰ درصد ماسه بوده که پس از اتوکلاو شدن در گلدان‌های مخصوص ریشه‌زایی ریخته شده و شاخساره‌ها در آن قرار گرفتند. جهت حفظ و تأمین رطوبت نسبی ابتدا بر روی گلدان‌ها پوشش سلوفان قرار داده شد. پس از یک‌ماه شروع به سازگار سازی گیاهان به شرایط طبیعی رشد *In vivo* انجام شد و در نهایت به گلدان منتقل شدند. شاخساره‌های فاقد ریشه در ادامه جهت رشد بیشتر بر روی پایه-های ریشه‌دار ریزپیوندی شدند.

در بخش‌های قبلی آزمایش، تلفیق ژن‌های *BAR* و *CTV* در گیاهان تراریخت احتمالی با استفاده از تست علف‌کش و همچنین واکنش زنجیره‌ای پلی مراز به‌همراه توالی‌یابی محصول PCR تایید شد. در مرحله بعدی برای بررسی تعداد نسخه‌های رونوشت ژن *CTV* در گیاهان تراریخته از روش qPCR استفاده شد. کارایی و تکرارپذیری تکثیر ژن هدف با تهیه یک منحنی استاندارد بررسی

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-08-16]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1395.11.1.1.4]

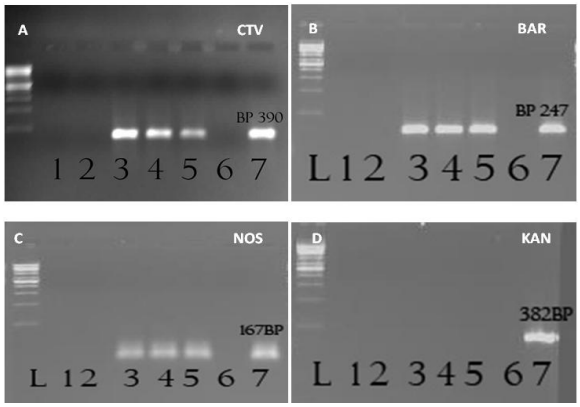
شد. ابتدا یک سری ۱۰- برابری از محصول ژن *CTV* تهیه شد که در نتیجه آن استانداردهایی با غلظت اولیه 10^{-7}- 10^{-1} نسخه از الگو در آن‌ها وجود داشت. پس از تکثیر، منحنی استاندارد توسط برنامه سیستم Bio-Rad به‌طور خودکار محاسبه و رسم شد. منحنی مذکور به‌صورت لگاریتم نسخه‌های اولیه در محور x و اعداد C_T مربوط در محور y محاسبه شد که میزان کارایی تکثیر برابر R^2=0.997 و E=105 درصد بوده که بیانگر کارایی تکثیر و شرایط PCR مطلوب است.

به‌منظور بررسی تکثیر غیر اختصاصی ژن *CTV* در انتهای واکنش تکثیر منحنی ذوب ژن مذکور تهیه شد. با افزایش کند و مرحله‌ای دما از ۶۰°C تا مقدار ۹۵°C میزان فلورسنت دریافتی در هر مرحله اندازه‌گیری شد. در انتهای واکنش فقط یک پیک منفرد در دمای ۸۹°C تشکیل شده که نشان دهنده تکثیر اختصاصی توسط آغازگرهای *CTV* می‌باشد.

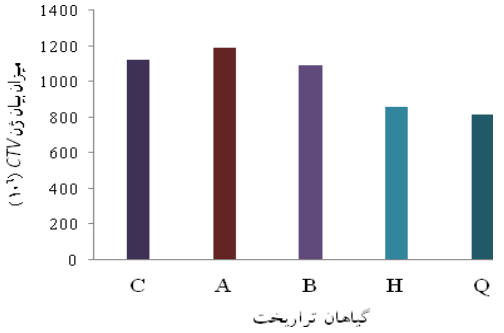
از میان گیاهان مطالعه شده که قبلا مثبت تشخیص داده شدند cDNA سنتز شد. تعداد نسخه‌های رونوشت تراژن *CTV* تعیین و مشخص شد گیاهان تراریخته A، B، C، H و Q دارای حداقل 8×10^{6} تا 11×10^{6} نسخه بودند (شکل ۶).

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از حمایت مالی ستاد توسعه زیست فناوری معاونت علمی و فناوری ریاست جمهوری تشکر و سپاسگزاری می‌شود.



شکل ۵- الکتروفورز محصولات واکنش PCR شاخساره‌های تراریخت با آغازگرهای مختلف. A) ژن *ctv*؛ B) ژن *BAR*؛ C) ژن *nos*؛ D) ژن *kan*؛ L) مارکر؛ ۱) شاهد آزمایشگاهی؛ ۲) شاهد گلخانه؛ ۳، ٤ و ٥) شاخساره‌های تراریخت؛ ٦) کنترل منفی (آب)؛ ۷) کنترل مثبت (پلاسمید).



شکل ٦- تعداد نسخه‌های رونوشت ژن *CTV* در پنج گیاه تراریخته A، B، C، H و Q. نتیجه واکنش Real-time PCR تایید کرد که ژن *CTV* در ژنوم گیاهان نارنج آزمون شده تلفیق شده است.

منابع

Alavi V, Khatabi B, Salekdeh H (2005) Comparison of biologically distinct isolated of Citrus tristeza virus from Iran using major coat protein sequences. Australasian Plant Pathology 34: 577-582.

Al-Khayri JM, Al-Bahrany AM (2001) *In vitro* micropropagation of *Citrus aurantifolia* (lime). Current science 81: 1242-1246.

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 AMP, 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, Rodriguez AMP (2002) *In vitro* organogenesis optimization and plantlet regeneration in *Citrus sinensis* and *C. limonia*. Scientia Agricola Piracicaba 59: 35-40.

Ankenbauer RG, Eugene WN (1990) Sugar-Mediated Induction of *Agrobacterium tumefaciens* Virulence Genes: Structural Specificity and Activities of Monosaccharides. American Society for Microbiology 6442-6446.

Barzegar A, Hashemi Sohi H, Rahimian H (2006) Characterization of Citrus tristeza virus isolates in northern Iran. Journal of Genetics and Plant Pathology 72: 46-51.

Bidney D, Scelonge C, Martich J, Burrus M, Sims L, Huffman G (1992) Microprojectile bombardment of plant tissues increases transformation frequency by *Agrobacterium* tumefaciens. Plant Molecular Biology. 18: 301-313.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-08-16]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1395.11.1.1.4]

Bond, JE, Roose M (1998) *Agrobacterium*-mediated transformation of the commercially important citrus cultivar Washington Navel orange. Plant Cell Reports 18: 229-234.

Cervera M, Lopez MM, Navarro L, Pena L (1998) Virulence and supervirulence of *Agrobacterium* tumefaciens in woody fruit plants. Physiological and Molecular Plant Patholology 52: 67-78.

Chriqui D (2008) Developmental Biology, In: George et al. (Eds.) Plant Propagation by Tissue Culture, 3rd edn. Springer, 283-333.

Deng Z, Huang S, Ling P, Yu C, Tao Q, Chen C, Wendell MK, Zhang HB, Gmitter FG(2001) Fine genetic mapping and BAC contig development for the *Citrus tristeza virus* resistance gene locus in *Poncirus trifolia* (raf). Molecular Genetics and Genomics 265: 739-747.

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.

Duan YX, Liu X, Fan J, Li DL, Wu RC, Guo WW (2007) Multiple shoot induction from seedling epicotyls and transgenic citrus plant regeneration containing the green fluorescent protein gene. Botanical Studies 48: 165-171.

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. Plant Cell 9: 2135-2142.

Fang DQ, Federici CT, Roose ML (1998) A high-resolution linkage map of the *Citrus tristeza virus* resistance gene region in *Poncirus trifoliate* (L.) Raf. Genetics 150: 883-890.

Gelvin SB (2006) Agrobacterium virulence gene induction. Methods in Biology 343: 77-84.

Germana MA, Micheli M, Chiancone B, Macaluso L, Standardi A (2011) Organogenesis and encapsulation of in vitro-derived propagules of Carrizo citrange (*Citrus sinensis* (L.) Osb.)×*Poncirus trifoliate* (L.) Raf). Plant Cell Tissue and Organ culture 106: 299-307.

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, Lopez C, Fagoaga C, Moreno P, Navarro L, Flores R, Pena L (2001) Transgenic citrus plants expressing the Citrus tristeza virus p23 protein exhibit viral-like symptoms. Molecular Plant Pathology 2: 27-36.

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 and Biotechnology 73: 323-327.

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.

Henzi MX, Christey MC, McNeil DL (2000) Factors that influence Agrobacterium rhizogenes-mediated transformation of broccoli (*Brassica oleracea* L. var. italica). Plant Cell Rep 19: 994-999.

Kaneyoshi J, Kobayashi S, Nakamura Y, Shigemoto N, Doi Y (1994) A simple and efficient gene transfer system of trifoliate orange. Plant Cell Reports 13: 541-545.

Katz E, Fon M, Lee YJ, Phinney BS, Sadka A, Blumwald E (2007) The citrus fruit proteome: insights into citrus fruit metabolism. Planta 226: 989-1005.

Li DD, Shi W, Deng XX (2002) Factors influencing Agrobacterium-mediated embryogenic callus transformation of Valencia sweet orange (*Citrus sinensis*) containing the pTA29-barnase gene. Tree Physiology 23: 1209-1215.

Luan A, Zeng L, Zeng H, Wang AH (2009) High efficiency in vitro plant regeneration from epicotyls explants of Ponkan Mandarin (*Citrus reticulate* Blanco). In Vitro Cell 45:559-564.

Luth D, Moore G (1999) Transgenic grapefruit plants obtained by *Agrobacterium* tumefaciens-mediated transformation. Plant Cell Tissue and Organ Culture 57: 219-222.

Molinari, HBC, Bespalhok JC, Kobayashi AK, Pereira LFP, Vieira GE (2004) *Agrobacterium* tumefaciens-mediated transformation of Swingle citrumelo (*Citrus paradisi* Macf. X *Poncirus trifoliata* L. Raf.) using thin epicotyl sections. Scientia Horticulturae 99: 379-385.

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.

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. Analysis of Botany 85: 103-110.

Navarro L (1992) Citrus shoot tip grafting *in vitro*. Biotechnology in agriculture and forestry 18: 327-338.

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 Report 28: 387-395.

Pena, L, Cervera M, Fagoaga C, Romero J, Ballester A, Soler N, Pons E, Rodriguez A, Peris J, Juarez J, NavarroL (2009) Citrus. In: Kole Hall TC (Eds) A compendium of Transgenic Crop Plants. Wiley-Blackwell, Malden, Mass, USA. 1-62.

Phillips RC (2004) *In vitro* morphogenesisin plants - recent advances. *In Vitro* Cellular and Developmental Biololy – Plant, Columbia 40: 342-345.

Rezadost MH, Sohani MM, Hatamzadeh A, Mirzaii MR (2013) In vitro regeneration of sour orange (*Citrus aurantium L.*) via direct organogenesis. Plant Knowledge Journal 2:150-156

Schinor EH, Paoli LG, Azevedo FA, Mourao Filho FAA, Mendes BMJ (2006) Organogenese in vitro a partir de

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-08-16]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1395.11.1.1.4]

diferentes regioes do epicotilo de *Citrus sp*. . Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal 28: 463-466.

Shimoda N, Toyoda-Yamamoto A, Nagamine J, Usami S, Katayama M, Sakagami Y, Machida Y (1990) Control of expression of *Agrobacterium vir* genes by synergistic action of phenolic signaling molecules and monosaccharides. Proceeding of National Academy of Science USA 87: 6684-6688.

Silva RP, Souza ES, Rebous FS, Almeida WAB (2005b) Otimizaçao de protocolos para regeneraçao de plantas *in vitro* de tangerina 'Cleopatra' (*Citrus reshni* Hort. ex Tan.). Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal 27: 484-487.

Silva RP, Costa MAPC, Souza AS, Almeida WAB (2005a) Regeneraçao de plantas de laranja-Pera via organogênese *in vitro*. Pesquisa Agropecuaria Brasileira Brasilia 40: 1153-1159.

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.

Smith DL, Krikorian AD (1990) Somatic proembryo production from excised wounded zygotic carrot embryos on hormone-free medium; evaluation of the effects of pH, ethylene and activated charcoal. Plant Cell Report 9: 34-37.

Soost RK, Roose ML (1996) Citrus. In: Janick J, Moore JN, (Eds.) Fruit breeding, Vol. I, John Wiley & Sons, New York, 257-323.

Storey R, Walker RR (1999) Citrus and salinity. Scientia Horticulturae 78: 39-81.

Tavano ECR, Stipp LCL, Muniz FR, Mourao Filho FAA, Mendes BMJ (2009) In vitro organogenesis of *Citrus volkameriana* and *Citrus aurantium*. Biologia Plantarum 53: 395-399.

Webber HJ (1943) The Tristeza disease of sour-orange rootstock. Proceeding of the American Society for Horticultural Science Journal 43:360-364.

Yang ZN, Ingelbrecht IL, Louzada E, Skaria M, Mirkov TE (2000) *Agrobacterium* mediated transformation of the commercially important grapefruit cultivar Rio Red *Citrus paradisi* Macf.). Plant Cell Reports 19: 1203-1211.

Yu C, Huang S, Chen C, Deng Z, Ling P, Gmitter FG (2002) Factors affecting *Agrobacterium*-mediated transformation of sweet orange and citrange. Plant Cell Tissue and Organ Culture 71: 147-155.

Zamani AH (2008) Cloning of citrus tristeza virus coat protein gene. Dissertation, University of Guilan, Iran. (In Farsi)

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-08-16]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1395.11.1.1.4]