Archive of SID

تراریختی مینو و دارابی با واسطه *آگروباکتریوم* و باززایی ریزنمونه‌های بیان‌کننده ژن بتاگلوکورونیداز

علی برزگر[1*]، حشمت الله رحیمیان[2] و هاله هاشمی سهی[3]

[1] ساری، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی، گروه علوم پایه

[2] ساری، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی، گروه گیاهپزشکی

[3] تهران، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و تکنولوژی زیستی

تاریخ دریافت: ۸۸/۳/۲٦ تاریخ پذیرش: ۸۹/٤/۱٦

چکیده

تراریختی دو ژنوتیپ بومی مرکبات شامل مینو (Minou, *Citrus* sp.) و دارابی (*Citrus grandis*) با واسطه *آگروباکتریوم تومه فاشینس*، در شرایط مناسبی که برای بسیاری از گونه‌های مرکبات معرفی شده است، انجام شد. تأثیر دو تیمار مختلف شامل مدت زمان هم‌کشتی (۲٤، ۷۲ و ۱۲۰ ساعت) و غلظتهای متفاوت هورمون بنزیل آمینوپورین (۲، ۳ و ٤ میلی‌گرم در لیتر)، که تأثیر زیادی بر روی میزان تراریختی و باززایی دارند، در یک مجموعه ۵۰ تایی از جداکشتها بررسی گردید. ناحیه میان گره شاخه نهالهای ۸–٦ ماهه رشد یافته در گلخانه، به طول حدود ۱ سانتیمتر بریده شده و به عنوان ریزنمونه برای تراریختی مورد استفاده قرار گرفت. جداکشتها به همراه سویه C58C1 (GV3850) *آگروباکتریوم تومه فاشینس* واجد پلاسمید pBI121 ، واجد ژن بتا گلوکورونیداز (*uid* A)، در محیط هم‌کشتی قرار گرفتند. هفتاد و دو ساعت هم‌کشتی در محیط غنی از هورمون BAP (۵ میلی‌گرم در لیتر) باعث افزایش تعداد سلولهای مستعد برای تراریختی در دو انتهای بریده شده و در نتیجه افزایش میزان تراریختی و باززایی گردید. بیان ژن بتا گالاکتورونیداز در ریزنمونه‌های تراریخت احتمالی با روش بیوشیمیایی و حضور آن با روش PCR بررسی شد. با به کارگیری شرایط بهینه، ۳٤/۸ درصد از ریزنمونه‌های مینو و ۳۰/۱ درصد از ریزنمونه‌های دارابی تراریخت شده، ژن گزارشگر β–گلوکورونیداز را بیان نمودند. پس از انتقال به محیط نوساقه، ریزنمونه‌های تراریخت رشد کرده و شاخه‌های ۱۰–۵ سانتیمتری قابل پیوند شدن ایجاد کردند. این اولین گزارش از تراریختی و باززایی ارقام بومی مرکبات ایران می‌باشد.

واژه های کلیدی: مینو، دارابی، آگروباکتریوم، تراریختی، باززایی

*نویسنده مسئول، تلفن: ۳۸۲۲۵۷٤–۰۱۵۱ پست الکترونیکی:alibar647@yahoo.com

مقدمه

مرکبات قدمت ۲۵۰۰ ساله در ایران دارد و این ناحیه منشاء، محل انتشار و یا تکامل تعدادی از ارقام اولیه مرکبات از قبیل بالنگ (*Citrus medica* L.) می‌باشد (۵). ارقام محلی و بومی مختلفی از قبیل دارابی، شل محله، مینو و بکرایی در کشور وجود دارد که برخی به صورت تجاری و بعضی در مراکز تحقیقاتی مورد استفاده قرار می‌گیرند. دارابی(*C. grandis* L.) که به عنوان گیاه زینتی یا خانگی در منازل کاشته می‌شود دارای میوه‌هایی با پوست ضخیم و کم آب است. به نظر می رسد مینو (Minou) دورگ بین پرتقال (*C. sinensis* (L.) Osb.) و نارنج (*C. aurantium* L.) بوده و به عنوان پایه در سطوح محدودی مورد استفاده قرار می‌گیرد (۲). این دو رقم حساسیت شدیدی به

www.SID.ir

Archive of SID

ویروس تریستزا (۲ و ۱۳) دارند که از شایع‌ترین بیماریها در مناطق تولید مرکبات می‌باشد (۳). با توجه به بومی بودن این دو رقم و باقی ماندن در طول سالیان، به نظر می‌رسد که با تغییر یک یا چند صفت نامطلوب در آنها می‌توان از آنان ارقام مناسبی برای برخی مناطق ایران به وجود آورد. به علاوه می‌توان ذخایر ژنتیکی جدید و تغییریافته‌ای از مرکبات را نیز معرفی کرد.

علی رغم تنوع ژنتیکی و قابلیت لقاح داخل گونه‌ای، جنس مرکبات واجد گونه‌هایی است که اصلاح ژنتیکی آنها با روشهای معمول با مشکلات عمده‌ای همراه می‌باشد (۱۵). دوره جوانی در مرکبات بسیار طولانی بوده، اغلب گونه‌ها هتروزیگوزیتی زیادی دارند و از آمیزش گونه‌های مختلف، جنینهایی با صفات متفاوت ایجاد می‌شوند. بسیاری از ارقام مرکبات نیز از نظر جنسی با یکدیگر سازگار نبوده و نابارور بودن دانه‌های گرده و تخمک پدیده‌هایی نسبتا" معمول در آنها است (۷ و ۲۵). استفاده از روشهای دستکاری ژنتیکی مستقیم، روش مناسبی جهت تولید گیاهان با خصوصیات مطلوب می‌باشد. روشهای تراریختی امکان تغییر تنها یک یا دو صفت بدون تغییر خصوصیات اصلی گیاه را امکان‌پذیر کرده است. خصوصیاتی را که با تراریختی ژنتیکی مرکبات می‌توان تغییراتی در آنها به وجود آورد شامل مقاومت به بیماری و آفات، بهبود کیفیت میوه و تغییر خصوصیات رشدی می‌باشد (۸ و ۳۸). تراریختی و باززایی گونه‌های مختلف مرکبات از جمله پرتقال (*C. sinensis* (L.) Osb.]، (٤، ٦ و ۲۸)، لیمو (*C.* [*aurantifolia* (Christm.) Swingle، (۱٦، ۳۰ و ۳۲)، نارنج (*C. aurantium*]، (۱٦)، گریپ‌فروت (*C.* [*paradisi* Macf., Marsh, Duncan، (۳۹)، نارنگی ناگپور (Nagpur mandarin, *C.reticulata* Blanco]، (۲۱) و سیترنج (*Poncirus trifoliata* × *C. sinensis*]، (۹، ۲٤ و ۲۹) باواسطه *آگروباکتریوم تومه فاشینس* (*Agrobacterium tumefaciens*) و *آگروباکتریوم رایزوژنز* (*Agrobacterium rhizogenes*) انجام شده است. فرآیند تراریختی مرکبات اغلب به دلیل رشد نوساقه‌های غیر تراریخت، تولید گیاهان شیمر و عدم ریشه‌زائی یا ریشه‌زایی ضعیف گیاهان تراریخت با مشکلاتی مواجه است (۸، ۱٦ و ۲۵) که البته بعضی از آنها با به کارگیری روشهای مؤثرتر از جمله بهینه کردن زمانها و مقادیر ترکیبات و هورمونهای مورد استفاده در تراریختی و باززایی، سویه باکتری و نوع پلاسمید برطرف شده است (۱۰، ۱۱ و ۲۳). محدودیت مربوط به ریشه‌زایی گیاهان تراریخت را می‌توان از طریق پیوند زدن شاخه‌های تراریخت برروی پایه‌های مناسب برطرف کرد (۲۸، ۲۹، ۳٤ و ٤۰).

در این پژوهش تراریخت کردن دو ژنوتیپ بومی مرکبات ایران، مینو و دارابی، با ژن گزارشگر بتا گلوکورونیداز (β–glucuronidase, *uid A*) از طریق *آگروباکتریوم تومه فاشینس* و باززایی آنها مورد بررسی قرار گرفت تا مقدمه ای برای شروع فعالیتها در زمینه تغییر صفات نامطلوب و جایگزینی آنها با ویژگیهای مطلوب از طریق مهندسی ژنتیک باشد.

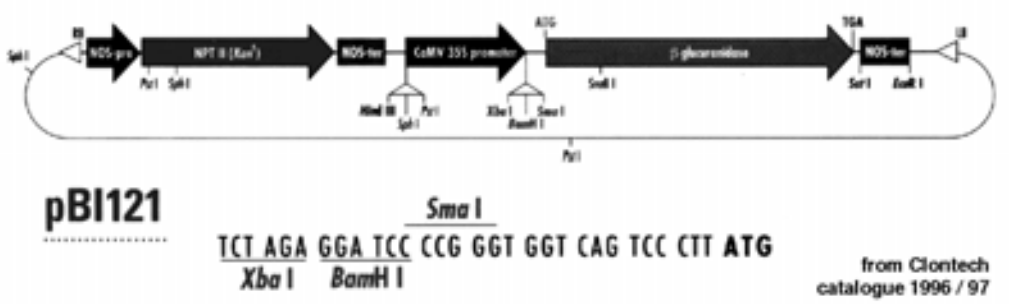
مواد و روشها

ژنوتیپ و ریزنمونه‌های گیاهی: دو ژنوتیپ بومی مرکبات شامل مینو و دارابی مورد استفاده قرار گرفت. بذرها از میوه‌های رسیده جدا شده، با محلول ۳ در هزار بنومیل یا کاپیتان (مرک، آلمان) به مدت ۱۰ دقیقه ضدعفونی و سه بار با آب مقطر استریل شستشو شدند تا لعاب سطحی بذرها از بین رود (٤). پس از خشک شدن در مجاورت هوا، دانه‌ها در دمای ٤ درجه سانتی گراد نگهداری گردیدند. هنگام کاشت، دانه‌ها با کلروراکس (هیپوکلریت سدیم) ۱۰ درصد و توئین–۲۰ ۰/۱ درصد به مدت نیم ساعت ضدعفونی و ۵ بار با آب مقطر استریل شستشو شدند. دانه‌ها در خاک استریل کاشته شده و در شرایط گلخانه (دمای ۲۵ درجه سانتی گراد، رطوبت ٦۰ درصد و ۱٦ ساعت روشنایی در روز با نور فلورسنت با شدت نور ۳۰۰۰ لوکس) قرار گرفتند (٤ و ۲۸). نهالهای ٦ تا ۸ ماهه

www.SID.ir

Archive of SID

به عنوان جداکشت جهت تراریختی مورد استفاده قرار گرفتند (٤).



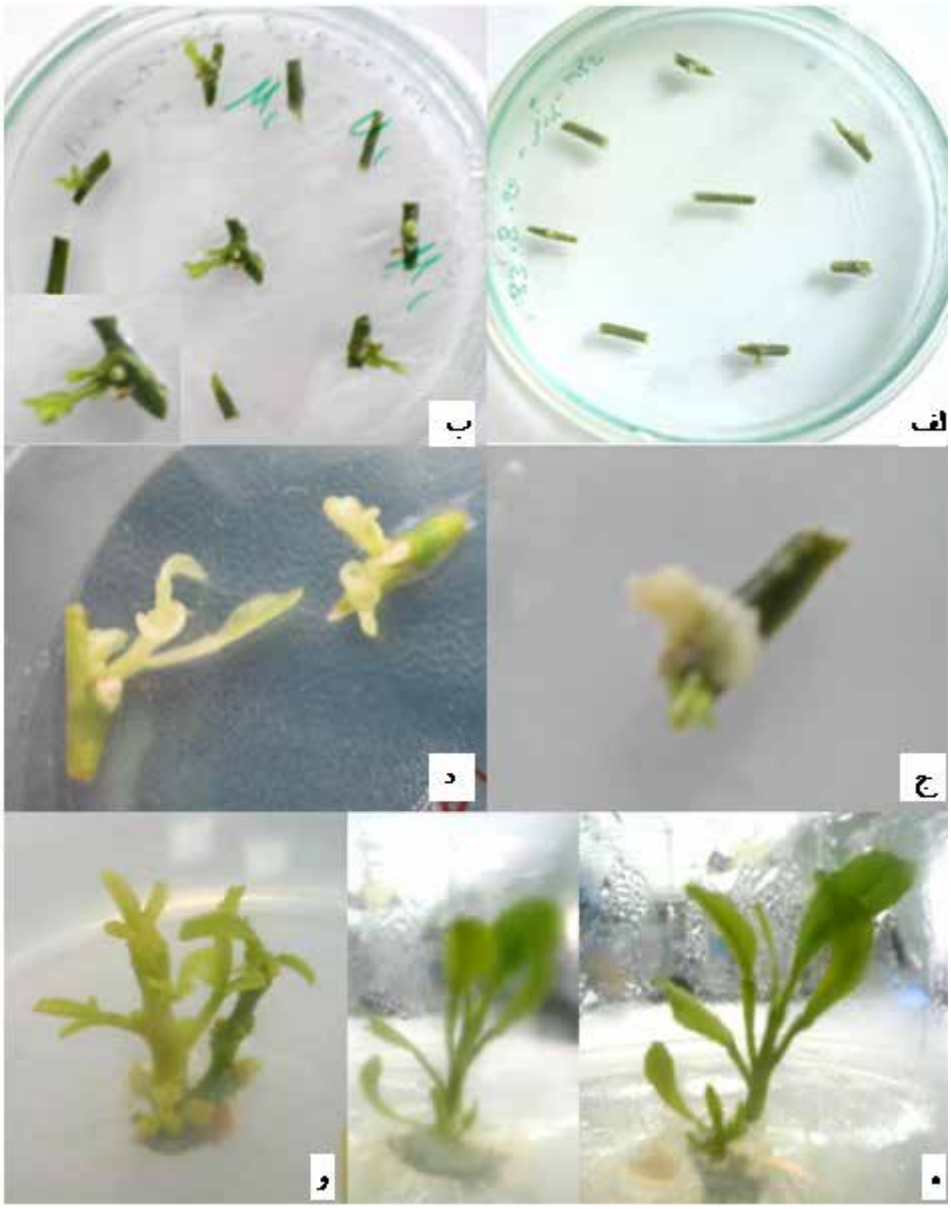
شکل ۱ – ساختمان حامل دوتایی pBI121 حاوی ژن بتا گلوکورونیداز. NOS؛ نوپالین سنتتاز، *NPTII*؛ نئومایسین فسفوترانسفراز، RB؛ ناحیه مرزی راست، LB؛ ناحیه مرزی چپ.

آماده‌سازی باکتری جهت تراریختی : سویه C58C1 (GV3850) *آگروباکتریوم تومه فاشینس* و پلاسمید pBI121 (Clontech, Palo Alto, CA, USA) حامل ژن گزارشگر بتا گلوکورونیداز (*uid A*) باکتریایی تحت کنترل راه انداز CaMV35S مورد استفاده قرار گرفت (شکل ۱). پلاسمید با روش انجماد و ذوب به باکتری منتقل شد (۳۳). ابتدا باکتری در محیط LB (تریپتون ۱ درصد، عصاره مخمر ۰/۵ درصد، NaCl ۱ درصد، pH ۷) به مدت یک شب رشد یافته و پس از سانتریفوژ در ۱۰۰۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه، رسوب باکتری در ۱۰۰ میکرولیتر محلول کلرید کلسیم ۲۰ میلی مولار سوسپانسیون گردید. چهار میکرولیتر از پلاسمید به مجموعه اضافه و با قرار دادن در نیتروژن مایع منجمد گردید. پس از قرار دادن نمونه به مدت ۵ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی گراد، ۱ میلی‌لیتر محیط LB به آن اضافه شده و به مدت ٤ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد بر روی شیکر قرار گرفت. باکتریهای رشد یافته واجد پلاسمید، بر روی محیط کشت جامد LB واجد آنتی بیوتیک کانامایسین (۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) کشت داده شد. حضور پلاسمید در باکتری با استخراج پلاسمید و PCR تایید گردید. جهت آماده سازی باکتری برای تراریختی گیاه، باکتری *آگروباکتریوم* حاوی پلاسمید به مدت یک شبانه روز در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد در محیط کشت LB مایع حاوی ۵۰ میلی‌گرم در لیتر کانامایسین کشت داده شد (۳۳). پس از سانتریفوژ ۱/۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری به مدت ۲۰ دقیقه در ۳۵۰۰ دور در دقیقه و دمای ٤ درجه سانتی گراد، رسوب باکتری در محیط تلقیح شامل نمکهای معدنی محیط کشت MS (۲۷)، ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر تیامین ، ۱ میلی‌گرم در لیتر پیریدوکسین ، ۱ میلی‌گرم در لیتر نیکوتینیک اسید، ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر میواینوزیتول، ۵ درصد ساکاروز، ۲۰۰ میکرومولار استوسرینگون ، ۵/۵ pH ، معلق شد. سوسپانسیون حاصل به مدت ۳–۲ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد تا رسیدن جمعیت باکتری به غلظت 10^7 سلول در میلی‌لیتر رشد داده شدند (١٤).

هم‌کشتی و تراریختی ریزنمونه‌های گیاهی : قطعات شاخه به طول ۲۰ سانتیمتر از نهالهای ۸–٦ ماهه دو رقم مینو و دارابی که در شرایط گل خانه رشد کرده بودند انتخاب و برگها و خارهای آنها جدا گردید. این قطعات ۲۰ دقیقه با محلول هیپوکلریت سدیم ۰/۵ درصد ضدعفونی و سه بار با آب مقطر استریل شستشو شدند. در ادامه جداکشتها به مدت ۳۰ ثانیه در الکل ۷۰ درصد قرار گرفته و سه بار شستشو با آب مقطر استریل انجام گرفت (١٤). ناحیه اپی کوتیل هر شاخه (شامل بخش میان گره) به طول حدود ۱ سانتیمتر به صورت مورب توسط اسکالپل استریل بریده شده و به عنوان ریزنمونه برای تراریختی مورد استفاده قرار گرفت (۹ و ۲۲). جداکشتها به مدت ٤۵ دقیقه در داخل پتری حاوی ۱۵ میلی‌لیتر محیط تلقیح دارای باکتری غوطه‌ور شده و به آرامی تکان داده شدند (١٤).

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۲– مراحل مختلف تراریختی و باززایی ریزنمونه‌ها. الف– تهیه ریزنمونه‌ها و قرار دادن آنها روی محیط هم‌کشتی. ب– باززایی مستقیم ریزنمونه‌ها از ناحیه گره در محیط باززایی. ج– کالوسهای سفید و پنبه ای تولید شده از ناحیه گره. د– ریزنمونه‌های غیر تراریخت که در محیط حاوی کانامیسین نوساقه‌های سفید ایجاد کرده است. هـ– غربال‌گری و شاخه‌زائی نمونه‌ها در محیط شاخه‌زایی واجد کانامیسین. و– انتقال نمونه‌ها به محیط ریشه‌زایی؛ در این محیط نمونه‌ها فقط ۲ تا ۳ هفته، بدون رشد، دوام آورده ولی ریشه تولید نکرده، به تدریج زرد و در نهایت (پس از ٤ تا ٥ هفته) خشک شدند.

ریزنمونه‌ها از محیط تلقیح خارج و روی کاغذ صافی استریل قرار داده شدند و پس از خشک شدن سطح آنها، برروی محیط هم‌کشتی قرار گرفتند (شکل ۲–الف). تأثیر دو تیمار مختلف شامل غلظتهای متفاوت هورمون بنزیل‌آمینوپورین (BAP) و زمانهای متفاوت هم‌کشتی بر روی میزان تراریختی ارزیابی شد. محیطهای هم‌کشتی دارای نمکهای معدنی MS به همراه ۰/۲ میلی‌گرم تیامین ، ۱ میلی‌گرم پیریدوکسین ، ۱ میلی‌گرم نیکوتینیک اسید، ۲۰۰ میلی‌گرم میواینوزیتول، ۰/۱ میلی‌گرم نفتالن استیک اسید (NAA)، ۳۰ گرم ساکاروز و ۷ گرم آگارز در لیتر بود. pH محیط قبل از افزودن آگار به ۵/۵ تنظیم شد. سه غلظت ۲ میلی‌گرم، ۳ میلی‌گرم و ٤ میلی‌گرم در لیتر BAP به

www.SID.ir

Archive of SID

عنوان تیمار های ۱ تا ۳ بکار برده شد. پتریها به مدت ۷۲ ساعت در درجه حرارت ۲۵ درجه سانتی گراد بدور از نور قرار گرفتند (٤ و ١٤). همچنین، به منظور بررسی تأثیر مدت زمان هم‌کشتی برروی میزان تراریختی، ریزنمونه‌ها به مدت ٢٤، ۷۲ و ۱۲۰ ساعت در محیط هم‌کشتی شماره ۳ قرار داده شدند (٦). تأثیر تیمارهای مختلف برروی میزان باززایی گیاهان در یک گروه ۵۰ عددی از ریزنمونه‌ها و با ۳ تکرار در قالب یک طرح کاملاً تصادفی (CRD) بررسی شد.

غربالگری، باززایی و ریشه‌زایی : نمونه‌ها در محیط کشت MS مایع حاوی ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر سفاتوکسیم (رش، آلمان) شستشو داده شد تا سلولهای *آگروباکتریوم* اضافی حذف گردند. پس از خشک کردن قطعه‌ها روی کاغذ صافی استریل، نمونه‌ها به محیط باززایی با ترکیبی مشابه محیط هم‌کشتی ولی حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر کانامایسین (رش، آلمان) و ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر سفاتوکسیم منتقل شده و در شرایط گل خانه در درجه حرارت ۲۵ درجه سانتی گراد، رطوبت ٦۰ درصد و دوره نوری ١٦ ساعت روشنایی/ ۸ ساعت تاریکی با شدت ۳۰۰۰ لوکس قرار گرفتند. به منظور جلوگیری از آلودگی باکتریایی، هر هفته نمونه‌ها با آب مقطر استریل حاوی ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر سفاتوکسیم شستشو داده شدند. پس از حدود ۳۰ روز، نمونه‌هایی که باززایی مستقیم داشتند، به محیط نوساقه‌زایی متشکل از نمکهای معدنی و ویتامینهای MS به همراه ۵ میلی‌گرم BAP و ۱ میلی‌گرم نفتالن استیک اسید در لیتر، درون شیشه‌های استوانه ای منتقل شدند تا رشد طولی شاخه‌ها افزایش یابد. در این مرحله نیز در صورت وجود آلودگی باکتریایی، آن نمونه با سفاتوکسیم با غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر شستشو و سپس به محیط منتقل گردید. پس از ۸–٦ هفته، شاخه‌های با طول مناسب برای پیوند شدن ایجاد شدند. همچنین به منظور بررسی ریشه‌زایی در محیط کشت، شاخه‌های تراریخت از قسمت پایه جدا شده و به محیط ریشه‌زایی شامل محیط MS حاوی ۵ میلی‌گرم BAP ، ۱ میلی‌گرم NAA و ۵۰۰ میلی‌گرم عصاره مخمر در لیتر منتقل شدند (۳۷).

بررسی هیستوشیمیایی فعالیت بتاگلوکورونیداز(GUS) : قطعات ۲–۱ میلی‌متری از شاخه یا برگ نمونه‌های تراریخت احتمالی و شاهد تیمار نشده جدا و در طول شب در محلول رنگ آمیزی GUS شامل ۱ مولار بافر فسفات ۷ pH، ۱۰ میلی مولار EDTA ، ۰/۵ میلی مولار فری سیانید ، ۰/۵ میلی مولار پتاسیم فروسیانید ، ۰/۱ درصد تریتون X–۱۰۰ و۲۰ میلی‌گرم X–Gluc در میلی‌لیتر (فرمنتاس، آلمان)، در درجه حرارت ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شدند. پس از انجام رنگ آمیزی، کلروفیل حاصل از بافتهای سبز گیاه به وسیله ۳ یا ٤ بار شستشو با محلول ۷۰ درصد اتانول و ۳۰ درصد اسید استیک جدا شده و مطابق روش استامپ (۳٦) بافت شفاف گردید.

آنالیز PCR : حضور ژن *uid A* در گیاهان تراریخت احتمالی با روش PCR و به کمک پرایمرهای اختصاصی که یک قطعه ۵۲۵ جفت بازی از این ژن را تکثیر می‌کنند، بررسی گردید. DNA ژنومی از نمونه‌های تراریخت شده و همچنین نمونه‌های غیر تراریخت به عنوان شاهد منفی استخراج گردید (۲۰). از پلاسمید pBI121 حاوی ژن *uid A* نیز به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. دو میکرولیتر از DNA استخراج شده به عنوان الگو در هر واکنش PCR مورد استفاده قرار گرفت. واکنش PCR در حجم ۲۰ میکرولیتر شامل غلظت 1X بافر PCR آنزیم *Taq*، ۲۰۰ میکرومولار dNTP ، ۳ میلی مولار MgCl2 ، ۱/۵ میلی مولار از هر کدام از پرایمرهای مستقیم (5'–GGTGGTCAGTCCCTTATGTTAGG–3') و معکوس (5'–CCGGCATAGTTAAATCATG–3') و ۲ واحد آنزیم *Taq* (۵u/µl) (فرمنتاس، آلمان) انجام شد. شرایط دمایی PCR شامل یک چرخه واسرشته‌سازی اولیه در ۹٤ درجه سانتی گراد به مدت ٤ دقیقه، ۳۰ چرخه تکثیر DNA

www.SID.ir

Archive of SID

شامل مرحله واسرشته‌سازی در دمای ۹٤ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال پرایمر در دمای ۵۸ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه و تکثیر قطعه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ٤۵ ثانیه انجام شد. یک مرحله تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه نیز در نظر گرفته شد. محصول تکثیر در ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز شده و با اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی شد (۳۳).

بررسی آماری : تجزیه و تحلیل اطلاعات به دست آمده از بررسی دو تیمار دوره‌های مختلف هم‌کشتی و غلظتهای مختلف BAP، با روش تجزیه واریانس (ANOVA) بر اساس طرح کاملا" تصادفی (CRD)، در نرم‌افزار SPSS ver 11.5.0 انجام شد. در صورت وجود اختلاف معنی‌دار در میزان باززایی در شرایط متفاوت، مقایسه میانگین داده‌های مربوط به تعداد جداکشتهای تراریخت با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح $P\leq0.01$ مطالعه شد (۳۵).

جدول ۱–تجزیه واریانس (ANOVA) تأثیر مدت زمان مختلف هم‌کشتی بر روی میزان باززایی مینو و دارابی براساس طرح کاملا" تصادفی.

منابع تغییر	درجه آزادی (df)	میانگین مربع ها (MS)
زمان	۲	۹٦۹/۳۸۹***
رقم	۱	۱۸/۰۰^{ns}
رقم × زمان	۲	۳/۱٦۷^{ns}
Error	۱۲	۱۹٦/۰۰
Total	۱۸	

ns: Non significant (غیر معنی دار)

CV=(√Mse/mean)×۱۰۰=۲۱/۸٦

*= Significant (معنی دار)

جدول ۲–مقایسه میانگین داده‌های مربوط به تعداد جداکشتهای تراریخت مینو و دارابی ناشی از دوره‌های مختلف هم‌کشتی با آزمون دانکن

زمان (ساعت)	زیرمجموعه		
	۱	۲	۳
۲٤	۲/۵۰۰۰ a		
۷۲		۱۷/۰۰۰b	
۱۲۰			۲۷/۸۳۳۳c

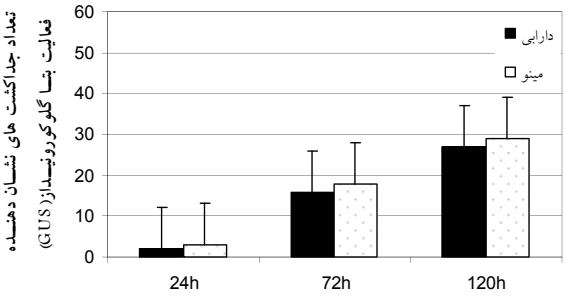
نتایج

کشت بافت و تراریختی : سه تا چهار هفته پس از هم‌کشتی باکتری و ریز شاخه‌های مینو و دارابی، در ۱۰–۵ درصد نمونه‌ها وقوع آلودگی و رشد کالوس (شکل ۲–ج) و در مابقی، جوانه‌های اولیه (شکل ۲–ب) مشهود بود. از آن‌جایی که هدف بررسی حاضر، امکان تدوین و معرفی یک روش ایجاد گیاهان تراریخت بود، نمونه‌هایی که تولید کالوس (کالوسهای سفید پنبه ای و متراکم) نموده بودند حذف گردیدند و ادامه بررسی به گیاهچه‌های فاقد کالوس و دارای جوانه‌های اولیه محدود گردید. در بررسیهای هیستوشیمیایی نمونه‌ها مشخص گردید که در تیمار هم‌کشتی ۲٤ ساعته، تعداد نمونه‌های تراریخت شده کم بوده و با افزایش طول این زمان تا ۱۲۰ ساعت، میزان تراریختی به بالاترین حد رسید (شکل ۳). بررسیهای آماری نیز نشان داد که دوره‌های مختلف هم‌کشتی تأثیر معنی‌داری بر روی میزان تراریختی دارد (جدول ۱). با وجود این، تیمار مربوط به رقم مرکبات و همچنین تأثیر متقابل آنها معنی‌دار نیست. مقایسه میانگینها با روش دانکن نشان داد که در مورد هر دو رقم، داده‌ها در سه رده مختلف طبقه‌بندی می شوند و تفاوت بین هر سه تیمار وجود دارد (جدول۲). هر چند افزایش زمان هم‌کشتی باعث افزایش میزان تراریختی گردید اما به علت رشد بیش از حد *آگروباکتریوم* و در پی آن کاهش میزان باززایی (اطلاعات نشان داده نشده است)، در ادامه بررسیها از زمان هم‌کشتی ۷۲ ساعت استفاده گردید. آنالیز واریانس نشان داد که غلظتهای مختلف BAP تأثیر معنی‌داری بر روی میزان تراریختی دارد. اما تیمار مربوط به رقم مرکبات و همچنین تأثیر متقابل آنها معنی‌دار نیست (جدول ۳). با ارزیابی محیطهای مختلف هم‌کشتی نیز مشخص شد که با افزایش غلظت BAP میزان تراریختی افزایش می‌یابد. درصد ریزنمونه‌های GUS مثبت رشد یافته در محیط هم‌کشتی شماره ۳ بیشتر از محیطهای ۱ و ۲ بود (شکل ٤). همچنین

www.SID.ir

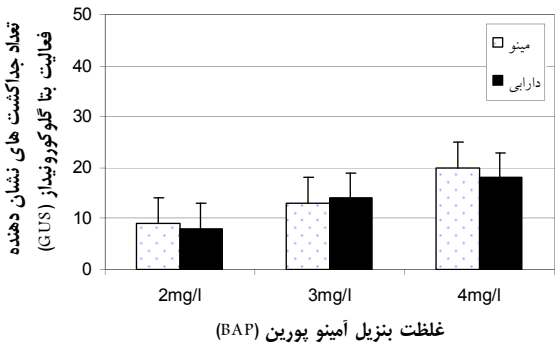
Archive of SID

مقایسه میانگینها با روش دانکن نشان داد که داده‌ها در سه رده مختلف طبقه‌بندی می‌شوند و تفاوت بین هر سه تیمار هورمونی وجود دارد (جدول ٤). بدین سبب در ادامه بررسی‌ها فقط از محیط هم‌کشتی شماره ۳ استفاده گردید. پس از مشخص شدن شرایط بهینه، ۱۳۵ قطعه شاخه مینو و ۱٤۷ قطعه شاخه دارابی برای تراریختی مورد استفاده قرار گرفتند. از نمونه‌های مینو، ٦۹ قطعه معادل ۵۱/۱ درصد از نمونه‌ها، در محیط هم‌کشتی و باززایی شاخه‌های مقاوم به کانامایسین تولید کردند (جدول ۵). بقیه قطعات از ناحیه جوانه کالوس تولید کرده و یا خشک شدند. تعداد شاخه‌های مقاوم به کانامایسین در نمونه‌های دارابی روی محیط شماره سه ۷۳ قطعه معادل ٤۹/٦ درصد بود (جدول ۵). شش تا هشت هفته پس از انتقال به محیط شاخه‌زایی، نمونه‌های باززایی شده رشد کرده و شاخه‌های ۱۰–۵ سانتیمتری ایجاد کردند (شکل ۲–هـ) که قابل پیوند شدن بودند. اما پایه‌های مناسب برای پیوند شاخه‌های تراریخت در دسترس نبود. همچنین در محیط ریشه‌زایی مورد بررسی نیز تولید ریشه القاء نگردید و دو هفته پس از انتقال، نمونه‌ها زرد شده و برگها شروع به ریزش کردند و به تدریج خشک شدند (شکل ۲–و).



شکل ۳– تأثیر مدت زمان هم‌کشتی بر روی میزان تراریختی ریزنمونه‌های مینو (*Citrus* sp.) و دارابی (*Citrus grandis*) رشد یافته در محیط هم‌کشتی شماره ۳ (٤ میلی‌گرم در لیتر BAP). میزان تراریختی به صورت تعداد نمونه‌های GUS مثبت در یک مجموعه ۵۰ تایی با ۳ تکرار نشان داده شده است.

ارزیابی هیستوشیمیایی بیان ژن *uid A* و میزان تراریختی : قطعه ای از شاخه نمونه‌های باززایی شده و یا برگ آنها قبل از انتقال به محیط شاخه‌زایی برای بررسی فعالیت ژن *uid A* به کار برده شدند. نمونه‌های برگی ترانسفورم نشده نیز به عنوان نمونه‌های شاهد منفی مورد استفاده قرار گرفت. ایجاد رنگ آبی نشانگر حضور ژن *uid A* در نمونه‌ها تلقی گردید (شکل ۵). درصد تراریختی در مرکبات عموماً براساس تعداد یا درصد شاخه‌های GUS مثبت به تعداد کل شاخه‌های باززایی شده محاسبه می‌گردد (٤، ٦، ۱٦ و ۲۳). بر این اساس از تعداد قطعات باززایی شده نمونه مینو در محیط شماره سه، ۲۵ قطعه (۳٦/۲ درصد)، GUS مثبت و لذا تراریخت شده بودند. در مورد دارابی تعداد نمونه‌های تراریخت شده ۲٤ قطعه (۳۲/۹ درصد) بود (جدول ۵).



شکل ٤– تأثیر غلظت هورمون بنزیل آمینوپورین (Benzyl aminopurine, BAP) بر روی میزان تراریختی ریزنمونه‌های مینو (*Citrus* sp.) و دارابی (*Citrus grandis*) با زمان هم‌کشتی ۷۲ ساعت. میزان تراریختی به صورت تعداد نمونه‌های GUS مثبت در یک مجموعه ۵۰ تایی با ۳ تکرار نشان داده شده است.

جدول ۳–جدول تجزیه واریانس (ANOVA) تأثیر غلظتهای مختلف هورمون BAP بر روی میزان باززایی مینو و دارابی براساس طرح کاملا" تصادفی

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربع ها
BAP	۲	۱٦۰/۳۸۹***
رقم	۱	۲/۰۰۰^{ns}
رقم × BAP	۲	۵/۱٦۷^{ns}
Error	۱۲	۹/۲۲۲
Total	۱۸	

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ٤– مقایسه میانگین داده‌های مربوط به تعداد جداکشتهای مینو و دارابی تراریخت ناشی از غلظتهای مختلف هورمون BAP با آزمون دانکن

BAP	زیرمجموعه		
	۲	۳	۱
۱/۰۰	۸/۸۳۳۳ c		
۲/۰۰		۱۳/٦٦٦۷ b	
۳/۰۰			۱۹/۱٦٦۷ a

تأیید تراریخت شدن گیاهان از طریق اثبات وجود ژن *uid A* : چهار تا پنج هفته پس از انتقال نمونه‌ها به محیط شاخه‌زایی، شاخه‌های تراریخت با اندازه کافی رشد کرده و معدود نمونه‌های غیر تراریخت (حساس به کانامیسین) برگهای سفید ایجاد کردند (شکل ۲–د). DNA از ۲۵ گیاه مینو که در آزمون فعالیت GUS مثبت بودند استخراج و در آزمون PCR بکار برده شد. قطعه ۵۲۵ جفت بازی در واکنشهای PCR ۲٤ نمونه مینو، پس از الکتروفورز روی ژل آگاروز دیده شد. در مورد نمونه‌های دارابی نیز این قطعه در ۲۲ نمونه از ۲٤ نمونه GUS مثبت مشاهده گردید (شکل ٦). چنین قطعه ای در هیچ یک از نمونه‌های غیر تراریخت که به عنوان شاهد منفی به کار برده شده بودند دیده نشد ولی در نمونه DNA پلاسمیدی آگروباکتریوم (شاهد مثبت) وجود داشت، لذا به عنوان بخشی از ژن *uid A* تلقی گردید.

بحث

در بررسی حاضر تراریختی دو ژنوتیپ مرکبات بومی ایران، مینو و دارابی، از طریق سویه C58C1 (GV3850) باکتری *آگروباکتریوم تومه فاشینس* واجد پلاسمید دوتایی pBI121 حامل ژن گزارشگر بتاگلوکورونیداز تحت کنترل راه‌انداز CaMV35S انجام شد و شرایط مناسب برای انجام هم‌کشتی و باززایی محدود نمونه‌های تراریخت تعیین گردید. روشهای به کار رفته توسط محققین روی گونه‌ها و ارقام دیگر مرکبات، در این تحقیق به عنوان روش پایه به کار برده شد و سعی بر این بود که روشی ساده‌تر و سریع‌تر برای هم‌کشتی، باززایی و تراریختی، ارزیابی و معرفی گردد.

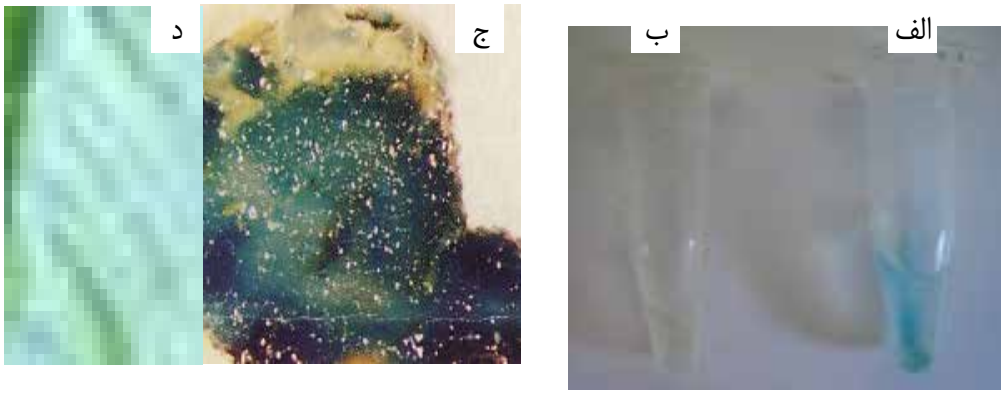
در مورد نمونه‌های درختی در صورت استفاده از بافتهای جوان حاصل از رشد بذر به عنوان جداکشت، گیاهچه‌های باززایی شده ویژگیهای مرحله جوانی داشته و مدت زمان زیادی (حتی بیش از ۲۰ سال) لازم است تا این مرحله را سپری کرده و رشد و محصولی مشابه گیاه مادری تولید کنند. با استفاده از بافتهای بالغ به عنوان جداکشت، دوره جوانی کوتاه شده و درختان تراریخت در مدت زمان کوتاهی (۲–۱ سال) میوه مشابه گیاه مادری تولید می کنند (۱٤ و ۲٤). البته استفاده از بافتهای بالغ درصد تراریختی را کاهش می دهد (٦ و۲۲). در تحقیق حاضر شاخه‌های جوان و بالغ به عنوان جداکشت به کار برده شدند. ناحیه میان گره شاخه‌های جوان به صورت مورب بریده شده و به عنوان جداکشت برروی محیط کشت قرار داده شدند. سویه باکتری و نوع پلاسمید مورد استفاده تأثیر زیادی در میزان تراریختی دارد. به علت راندمان بالای تراریختی با سویه C58C1 (GV3850) در مقایسه با سویه‌های دیگر (٤ و ۳۹)، در این تحقیق از این سویه باکتری *آگروباکتریوم* استفاده شد. اخیراً از پلاسمید pBI121 برای تراریخت کردن نارنگی ناگپور (Nagpur mandarin, *C.reticulata* Blanco) استفاده گردیده و به واسطه آن ۳٤/۵ درصد تراریختی حاصل شده است (۲۱). با توجه به درصد تراریختی بدست آمده، به نظر می‌رسد که در مورد دو رقم مینو و دارابی مورد بررسی در این تحقیق استفاده از این شرایط مطلوب می‌باشد.

به منظور بهینه نمودن شرایط تراریختی طول مدت زمان هم‌کشتی و غلظتهای مختلف BAP، که تأثیر زیادی بر روی میزان تراریختی و باززایی دارند (۹ و ۳۱)، در محیط هم‌کشتی مورد ارزیابی قرار گرفتند. میزان باززایی در تیمار ۵ روز هم‌کشتی در بالاترین حد بود ولی این مدت زمان باعث رشد زیاد *آگروباکتریوم* و در ادامه کاهش میزان

www.SID.ir

Archive of SID

باززایی شاخه‌های تراریخت گردید. برای پرهیز از این مشکل مدت زمان ۳ روز برای هم‌کشتی مناسب‌تر تشخیص داده شد. در هم‌کشتی ارقام و گونه‌های دیگر نیز چنین مشکلاتی مشاهده شده است (۱، ٦، ۱۲، ۱۹و ۲٦).



شکل ٥– ارزیابی هیستوشیمیایی بیان GUS در بافت گیاه مینو تراریخت شده با ژن *uid A*. ایجاد رنگ آبی در نمونه تراریخت شده (الف) و عدم حضور آن در گیاه کنترل تراریخت نشده (ب). ب: ارزیابی بیان GUS در نمونه بافتی تراریخت (ج) و غیرتراریخت (د)

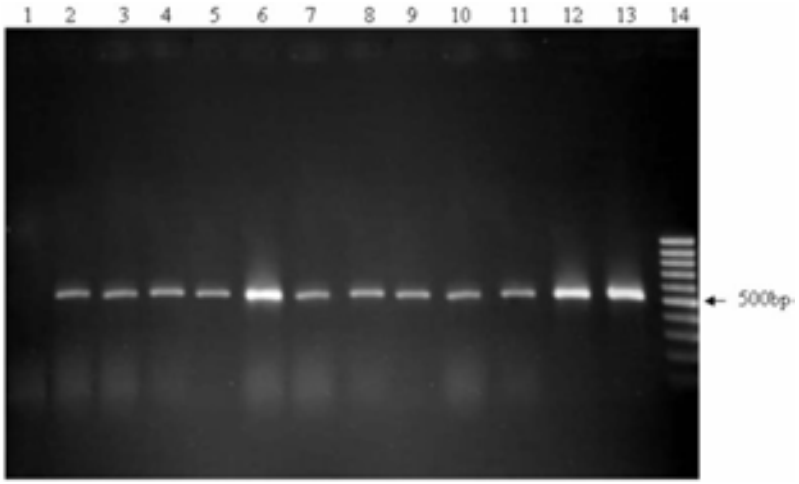
جدول ٥– ارزیابی باززایی و تراریختی قطعات ساقه مینو و دارابی با سویه C58C1 (GV3850)*آگروباکتریوم تومه فاشینس* حامل ژن *uid A*

گیاه	تعداد قطعات استفاده شده	تعداد و درصد شاخه‌های باززایی شده*	تعداد (درصد) گیاهان تبدیل (ترانسفورم) شده براساس ارزیابی:	
			بروز فعالیت GUS†	تکثیر قطعه (ژن *uid A*) با PCR§
مینو	۱۳٥	٦۹ (٪ ۵۱/۱)	۲٥ (٪ ۳٦/۲)	۲٤ (٪ ۳٤/۸)
دارابی	۱٤۷	۷۳ (٪ ٤۹/٦)	۲٤ (٪ ۳۲/۹)	۲۲ (٪ ۳۰/۱)

* تعداد و درصد شاخه‌های باززایی شده نسبت به کل شاخه‌های مورد استفاده قرار گرفته.

† تعداد و درصد شاخه‌های نشان دهنده فعالیت GUS نسبت به تعداد شاخه‌های باززایی شده.

§ تعداد و درصد شاخه‌های واجد ژن *uid A* نسبت به تعداد شاخه‌های باززایی شده.



شکل ٦– تکثیر قطعه ۵۲۵ جفت بازی از ژن *uid A* در نمونه‌های تراریخته احتمالی GUS مثبت به وسیله پرایمرهای اختصاصی. ۱: کنترل منفی؛ گیاه تراریخت نشده. ۱۲–۲: تکثیر قطعه در تعدادی از نمونه‌های تراریخت شده. ۱۳: کنترل مثبت؛ پلاسمید حاوی ژن *uid A*. ۱٤: مارکر ۱۰۰bp (فرمنتاس)

www.SID.ir

Archive of SID

میزان شاخه‌زایی در محیط هم‌کشتی شماره سه بیشتر از محیطهای دیگر بود. افزایش غلظت BAP باعث تحریک سلولهای پذیرنده در قسمتهای بریده شده جهت تراریختی و در نتیجه موجب افزایش میزان شاخه‌زایی می‌گردد (٦، ١٦، ٣٠، ٣١ و ٣٢). البته افزایش بیش از حد آن (بیش از ٥mg/l) باعث کندی رشد تراریخته‌ها می‌گردد (١٦، ٣١ و ٣٢). بدین لحاظ دامنه محدودی از غلظت BAP را می توان برای هر رقم مناسب دانست. نتایج حاصل از بررسی های آماری نیز نشان داد که اختلاف مشاهده شده در مورد میزان باززایی جداکشتهای هر دو رقم ناشی از دوره‌های مختلف هم‌کشتی و غلظتهای مختلف BAP معنی‌دار می باشد (جداول ٤–١).

از جمله عوامل دیگری که بر روی میزان تراریختی مؤثر بوده و در مطالعات مختلفی مورد ارزیابی قرار گرفته است، استفاده از استوسیرینگون در محیط تلقیح می‌باشد که باعث افزایش میزان تراریختی تا حد دو برابر می‌گردد (١، ٣٩). در تحقیق حاضر از استوسیرینگون در غلظت ٢٠٠ میکرومولار استفاده گردید. علاوه بر این، کانامیسین نیز در غلظت ١٠٠ میلی‌گرم در لیتر استفاده شد که بیشترین تأثیر را برروی میزان تراریختی و نیز جلوگیری از ایجاد جوابهای مثبت کاذب دارد (١، ٦، ١٧، ١٨ و ٣٩). در بررسی اخیر، کشتهای تراریخت به صورت موفقیت‌آمیزی در شرایط و با کارآیی قابل قبول و مناسبی از هر دو گونه گیاه به دست آمده و ساقه‌های ٦–٥ برگی (به طول ١٠–٥ سانتی متر) در محیط نوساقه‌زایی تولید گردید که قابل پیوند شدن بر روی پایه‌های مناسب بودند (شکل ٢–هـ). به طور کلی در مورد مرکبات به منظور جلوگیری از مشکلات مربوط به ریشه‌زایی از قبیل همراه بودن جوانه‌های تراریخت با ناحیه غیر تراریخت و رشد کند شاخه‌های تراریخت، جوانه‌های ٣–٢ میلی متری تا چند سانتیمتری تراریخت بر روی پایه‌های سه ماهه یا مسن‌تر پیوند می‌شوند (٤). در ایران نیز گیاهچه‌ها یا جداکشتهای ضعیف یا کند رشد بجای انتقال به خاک پس از مرحله رشد درون شیشه ای روی نهالهای بذری ٩–٣ ماهه پیوند می‌شوند (٣٤ و ٤٠). در این تحقیق بعلت عدم دسترسی به پایه‌های مناسب این مرحله انجام نشد. همچنین در محیط ریشه‌زایی توصیه شده برای چند رقم مرکبات (٦، ٣٧ و ٣٩) شاخه‌های انتقالی ریشه تولید نکرده و به تدریج از بین رفتند.

به طور کلی، تفاوت در میزان تراریختی، به نوع و رقم مرکبات، روشهای مورد استفاده در تراریختی و باززایی، سویه باکتری و نوع پلاسمید به کار گرفته شده بستگی دارد (١٠، ١١ و ٢٣). با به کارگیری مجموعه این موارد میزان تراریختی ٣٤/٨ درصد در مورد مینو و ٣٠/١ درصد در مورد دارابی به دست آمد. کارآیی تراریختی به دست آمده بیشتر از درصد تراریختی *Citrus paradisi* cv. Duncan (١٣/٩ درصد) (١٠، ١١)، Key lime (٢٢/٧ درصد)، نارنج (١١ درصد) و Pineapple sweet orange (٩ درصد) (١٦) و کمتر از میزان تراریختی در مورد واشنگتن ناول (٤٥ درصد) (٤) و سیترنج (٪ ٤١/٣) (٩) و تقریبا مشابه میزان آن در مورد سیترنج (٣٢/٦ درصد) (١٦)، گریپ فروت (٣٣ درصد) (٣٩) و نارنگی ناگپور (*C. reticulata* cv. Nagpur) (٢١) است.

در این تحقیق تراریختی و باززایی دو ژنوتیپ بومی مرکبات ایران با شرایط بهینه و ساده‌ای که برای سایر گونه‌های مرکبات معرفی شده است، با راندمان مناسب انجام شد. به علاوه، تأثیر دو عامل مؤثر بر میزان تراریختی شامل مدت زمان هم‌کشتی و غلظتهای متفاوت هورمون BAP در محیط هم‌کشتی مطالعه گردید که این تأثیر افزایشی بود. لذا بررسی سطوح بالاتر این دو عامل در مطالعات بعدی پیشنهاد می‌گردد. تحقیق حاضر اولین گزارش در ارتباط با تراریختی ارقام بومی مرکبات بوده و نتایج بدست آمده، در مقایسه با روشهای دیگر در این زمینه، مطلوب تر و مؤثرتر می‌باشد. در ادامه بررسیها در این زمینه می‌توان تلاشهایی در جهت انتقال ژنهای مطلوب

www.SID.ir

Archive of SID

به ارقام و گونه‌های ویژه و همچنین انتخاب پایه‌های مناسب به منظور باززایی کامل آنها انجام داد.

منابع

1. Almeida, W.A.B., Filho, F.A.A.M., Mendes, B.M.J., Pavan, A. and Rodriguez, A.P.M., 2003. *Agrobacterium*–mediated transformation of *citrus sinensis* and *citrus limonia* epicotyl segments. Scientia Agricola, 60: 23–29.
2. Anvari, F., 1985. Citrus varieties present in northern Iran (Kotra experiment station). P143–155, In: Proceeding of Citrus Symposium. Bandar Abbas, Iran.
3. Bar–Joseph, M. and Lee, R.F., 1989. *Citrus tristeza virus*. AAB Description of Plant Viruses No. 353. Commonw. Mycol. Inst./Assoc. Appl Biol. Kew, Surrey England.
4. Bond, J.E. and Roose, M.L., 1998. *Agrobacterium*–mediated transformation of the commercially important citrus cultivar Washington navel orange. Plant Cell Reports, 18: 229–234.
5. Bove, J.M., 1995. Virus and virus–like disease of citrus in the near–east region. FAO ed., Rome. Pp. 149–173.
6. Cervera, M., Juarez, J., Navarro, A., Pina, J.A., Duran–Vila, N., Navarro, L., Pena, L. 1998a. Genetic transformation and regeneration of mature tissues of woody fruit plants bypassing the juvenile stage. Transgenic Res., 7: 51–59
7. Cervera, M., Navarro, A., Navarro, L. and Peña, L., 2008. Production of transgenic adult plants from clementine mandarin by enhancing cell competence for transformation and regeneration. Tree Physiol., 28:55–66.
8. Cervera, M., Navarro, L. and Peña, L, 2009. Gene stacking in 1–year–cycling APETALA1 citrus plants for a rapid evaluation of transgenic traits in reproductive tissues. J Biotechnol., 140:278–82
9. Cervera, M., Pina, J.A., Juarez, J., Navarro, L. and Pena, L., 1998b. *Agrobacteium*–mediated transformation of citrange: Factors affecting transformation and regeneration. Plant Cell Reports, 18: 271–278.
10. Cevik, B., 2001. Characterization of RNA–dependent RNA polymerase gene of *citrus tristeza Closterovirus*. PhD thesis: 138 p.
11. Cevik, B., Lee, R.F. and Niblett, C.L., 2006. Genetic transformation of *citrus paradisi* with antisense and untranslatable RNA–dependent RNA polymerase genes of *citrus tristeza Closterovirus*. Turk J Agric For, 30 173–182.
12. Dong, J.Z., Yang, M.Z., Jia, S.R. and Chua, N.H., 1991. Transformation of melon (*Cucumis melo* L.) and expression from the *cauliflower mosaic virus* 35S promoter in transgenic melon plants. Biotechnology, 9: 858–863.
13. Ebrahimi, Y., 1983. Citrus history and its economic importance in Iran. P139–144, In: Proceeding of Citrus Symposium. Tonekabun, Iran.
14. Ghorbel, R., Juarez, J., Navarro, L. and Pena, L., 1999. Green fluorescent protein as a screenable marker to increase the efficiency of generating transgenic woody fruit plants. Theor. Appl. Genet., 99: 350–358.
15. Gmitter, F.G.J., Grosser, J.W. and Moore, G.A., 1992. Citrus. P335–369, In: Hammerschlag F.A. and R.E. Litz (eds.), Biotechnology of perennial fruit crops. Wallingford, UK. Cab International.
16. Gutierrez–E, M.A., Luth, D. and Moore, G.A., 1997. Factors affecting the *Agrobacterium*–mediated transformation in citrus and production of sour orange (*Citrus aurantium* L.) plants expressing the coat protein gene of *citrus tristeza virus*. Plant Cell Reports, 16: 745–753.
17. James, D.J. Uratsu, S. Cheng, J. Negri, P.Viss, P. Dandekar, A.M., 1993. Acetosyringone and osmoprotectants like betaine or proline synergistically enhance *Agrobacterium*–mediated transformation of apple. Plant cell reports, 12 559–563.
18. Janssen, B.J. and Gardner, R.C., 1993. The use of transient GUS expression to develop an *Agrobacterium*–mediated gene transfer system for kiwifruit. Plant cell reports, 13: 28 31.
19. Jia, S.R., Yang, M.Z., Ott, R. and Chua, N.H., 1989. High frequency transformation of *Kalanchoe laciniata*. Plant cell reports, 8: 336–340.
20. Kawata, M. Matsumura, Y. Oikawa, T. Kimizu, M. Fukumoto, F. Kuroda, S., 2003. Analysis of DNA extraction buffer components from plant tissue by polymerase chain reaction. Anal Biochem, 318: 314–317.
21. Khawale, R.N., Singh, S.K., Garg, G., Baranwal, V.K. and Alizade Ajirlo, S., 2006. *Agrobacterium*–mediated genetic transformation

www.SID.ir

Archive of SID

of Nagpur mandarin (*Citrus reticulata* Blanco). Current Sciences, 19: 1700–1705.

22. Kobayashi, A.K., Bespalhok, J.C., Pereira, L.F.P. and Vieira, L.G.E., 2003. Plant regeneration of sweet orange (*Citrus sinensis*) from thin sections of mature stem segments. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 74: 99–102.

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

24. Moore, G.A., Jacono, C.C., Neidigh, J.L., Lawrence, M. and Cline, K., 1992. *Agrobacterium*–mediated transformation of citrus stem segments and regeneration of transgenic plants. Plant Cell Reports, 11: 238–242.

25. Moore, G.A., Jacono, C.C., Neidigh, J.L., Lawrence, M. and Cline, K., 1993. Transformation in citrus. Biotechnology in Agriculture and Forestry, 23: 194–208.

26. Mourgues, F., Chevreau, E., Lambert, C. and De Bondt, A., 1996. Efficient *Agrobacterium*–mediated transformation and recovery of transgenic plants from pear (*pyrus communis* L.). Plant cell reports, 16: 245–249.

27. Murashige T. and Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Plant Physiology, 5: 473–497.

28. Pena, L. Cervera, M., Juarez, J., Navarro, L., Pina, J.A. and Duran–Vila, N. 1995a. *Agrobacterium*–mediated transformation and regeneration of transgenic plants. Plant Cell Reports, 14: 616–619.

29. Pena, L. Cervera, M., Juarez, J., Ortega, C., Pina, J.A., Duran–Vila, N. and Navarro, L. 1995b. High efficiency *Agrobacterium*–mediated transformation of sweet orange and regeneration of citrus. Plant Science, 104: 183–191.

30. Pena, L., Cervera, M., Juarez, J., Navarro, L. and Pina, J.A., 1997. Genetic transformation of lime (*Citrus aurantifolia* Swing.): Factors affecting transformation and regeneration. Plant Cell Reports, 17: 731–737.

31. Pena, L., Perez, R.M., Cervera, M., Juarez, J. and Navarro, L., 2004. Early events in *Agrobacterium*–mediated genetic transformation of citrus explants. Annals of Botany, 94: 67–74

32. Perez–Molphe–Balch, E. and Ochoa–Alejo, N., 1997. *In vitro* plant regeneration of Mexican lime and mandarin by direct organogenesis. HortScience, 32(5): 931–934.

33. Sambrook, J., Fritsh, E. and Maniatis, T., 1989. Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor. Second edition.

34. Shahsavar, A. and Khosh Khui, M., 1994. The effects of several variables on shoot tip grafting of Clementine mandarin onto Tryor citrange. Iran agriculture Research, 13: 1–18.

35. Steel, R.G.D., Torrie J.H., 1980. Principles and procedures of statistics: a biometrical approach, 2nd edn. New York: McGraw–Hill Book Co.

36. Stomp, A.M., 1992. Histochemical localization of β–glucuronidase. P103–113. In: Gallagher, SR (eds.) GUS protocols. Academic Press, SanDiego.

37. Vadadi, C., Rahimi, M., Miri, S. M., Majd, F., Naserian B., Rahmani, E., Neshan, N., 2003. Comparison of different media for callus formation and regeneration of tangerine (*Citrus reticulata* cv. c*lemantin*). P507–507, In: Proceedings of 3rd Iranian Biotechnology Congress, Mashhad, Iran.

38. Xu, X., Hu, Z., Li, J., Liu, J. and Deng, X., 2007. Asymmetric somatic hybridization between UV–irradiated *Citrus unshiu* and *C. sinensis*: regeneration and characterization of hybrid shoots. Plant Cell Rep., 26:1263–73.

39. Yang, Z.N., Ingelbrecht, I.L., Louzada, E., Skaria, M. and Mirkov, T.E., 2000. *Agrobacterium*–mediated transformation of the commercially important grapefruit cultivar Rio Red (*Citrus paradisi* Macf.). Plant Cell Reports, 19: 1203–1211.

40. Zarei, A. and Rahimain, H., 1997. Elimination of *citrus tristeza virus* from two cultivars of sutsuma mandarin through shoot–tip grafting. Iranian Journal of Plant Pathology, 33: 28–30

www.SID.ir

Archive of SID

Agrobacterium–mediated transformation of Minou (*Citrus* sp.) and Darabi (*Citrus grandis*) and regeneration of transgenic explants expressing β–glucoronidase (*uid A*) gene.

Barzegar A.[1], Rahimian H.[2], and Hashemi Sohi H.[3]

[1] **Basic Sciences Dept., University of Agriculture Sciences and Natural Resources, Sari, I.R. of IRAN**

[2] **Plant Pathology Dept., University of Agriculture Sciences and Natural Resources, Sari, I.R. of IRAN**

[3] **National Research Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, I.R. of IRAN**

Abstract

Agrobacterium–mediated transformation and regeneration of two Iranian citrus genotypes, including Minou (*Citrus* sp.) and Darabi (*Citrus grandis*) was carried out in optimized conditions developed for most of citrus species. Additionally the effects of cocultivation period and concentration of Benzyl aminopurin (BAP), notably affecting transgenesis, were also evaluated on a set of 50 explants. Internodal stem segments of 1 cm length from 6–8 month old greenhouse grown seedlings were cocultivated with *A. tumefaciens* strain C58C1 (GV 3850) caring pBI121 plasmid with introduced β–glucoronidase (*uid A*) gene. A 72 hr cocultivation on a medium rich in BAP (5 mg/l) markedly improved transformation frequencies as it increased dividing cells competent for transformation at the cut ends of explants. In these conditions, a transformation efficiency of 34.8 % and 30.1 % was achieved for Minou and Darabi, respectively, as surveyed by GUS expression biochemical assay and confirmed by PCR amplification of *uid A* gene. The transgenic explants continued to growth in shoot induction medium and produced 5–10 cm shoots competent for grafting. This is the first report of transformation and regeneration of Iranian citrus genotypes.

Keywords: Minou, Darabi, *Agrobacterium*, Transformation, Regeneration

www.SID.ir