

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

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

مینا خوشبخت^۱، محمد مهدی سوهانی^{۱*}، محمدحسین رضادوست^۱، امیرحسین زمانی^۱، بنفشه فتاح^۱، بهروز گلچین^۲، علی رضا افشاریفر^۳

۱- به ترتیب دانش آموخته کارشناسی ارشد، استادیار، مربی، دانش آموختگان کارشناسی ارشد، دانشگاه گیلان، ایران

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

۳- دانشیار، دانشگاه شیراز، ایران

Khoshbakht M¹, Sohani MM^{*1}, Rezadoost MH¹, Zamani AH¹, Fatah B¹, Golein B², Afsharifard A³

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: ۹۲/۱۰/۲۴ - تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۱/۲۵)

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. دانه‌های نارنج به مدت ۴ هفته در تاریکی و ۱۰ روز در دوره نوری ۱۶ ساعته در شرایط *In vitro* رشد کرده و سپس ریز نمونه از اپی کوتیل و هیپوکوتیل آن‌ها تهیه شد. ریز نمونه‌ها با اگروباکتریوم هم کشت و در محیط شامل غلظت‌های مختلف هورمون‌های BAP و NAA قرار گرفتند. تأثیر شکاف طولی در انتهای ریز نمونه‌ها، 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 ریز نمونه‌ها تولید شد که مزیت مهمی در ممانعت از ایجاد تنوع سوماکلونال بود. تأیید انتقال تراژن به ژنوم گیاه میزبان با کشت ریز نمونه‌های 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 ۲ mg/l BAP و ۰/۲۵ mg/l NAA 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

مقدمه

مركبات 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 تریتزا است که به‌وسیله یک کلوستروویروس^۱ محدود به آوند آبکش به نام Citrus (CTV) Tristeza Virus ایجاد می‌شود (Webber 1943). گیاه نارنج به- سبب 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 تریتزای مرکبات قرار دارد (Deng et al. 2001; Alavi et al. 2005; Barzegar et al. 2006). گیاهان چوبی از جمله مرکبات دارای خصوصیتی 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 وراثت- پذیری 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 اختصاصی تر خاموشی ژن القاء شده به وسیله ویروس (VIGS^۲) 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 آگروباکتریوم 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 می-

شود 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 ۶۰ 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 آگروباکتریوم 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 گرینشی علف کش تایید شد.

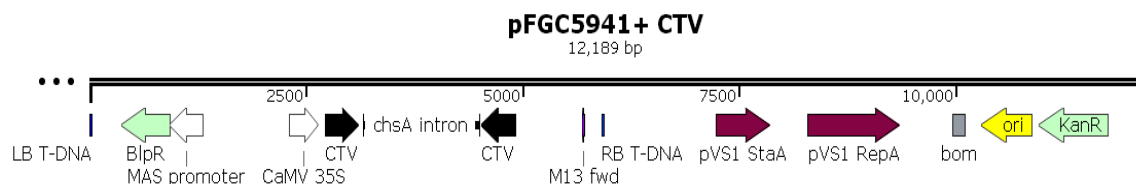
مواد و روش‌ها

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 ۱۵ دقیقه در محلول دو درصد هیپوکلریت سدیم در داخل ارلن به آرامی تکان داده شدند. سپس با آب مقطر اتوکلاو شده که دارای دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد بود سه بار و هر بار به مدت ۳ دقیقه آبکشی شدند. پس از آن بذور را به مدت یک دقیقه در محلول اتانول ۷۵ 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 ۴ تا ۶ هفته در ۲۷ تا ۲۸ درجه سانتی‌گراد در تاریکی نگهداری شدند.

^۱ Closterovirus

^۲ Virus-induced gene silencing



شکل ۱- نقشه خطی منطقه T-DNA ناقل خاموشی pFGC5941 شامل قطعه‌ای از ژن پوشش پروتئینی CTV (LB T-DNA) تکرار منطقه مرزی چپ (T-DNA؛ BlpR) ژن فسفینوتراسین استیل ترانسفراز عامل مقاومت به بیالوفوس (بستا)؛ MAS) پروموتور مانوپین سنتتاز؛ CaMV 35S) پروموتور دائمی؛ CTV) نسخه دوگانه از یک قطعه موزاییک ۳۹۴ 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)

اطلاعاتی NCBI هستند. ناقل خاموشی مورد استفاده در این بررسی وکتور pFGC5941 بود. این ناقل از وکتور دوگانه^۱ 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 *nptII* بوده که عامل ایجاد مقاومت به آنتی بیوتیک کانامایسین در باکتری، ژن *BAR*^۲ عامل گزینشی گیاهی ایجاد مقاومت به علفکش غیرانتخابی آمونیوم گلوکوزینیت با نام تجاری بستا^۳ می‌باشد. پروموتور قوی CaMV35S^۴ و ترمیناتور NOS^۵ است. این وکتور برای ایجاد ساختار سنجاق سری و تولید RNA دو رشته‌ای و القای خاموشی ژن، دارای اینترون میانی چالکون سنتتاز ۶ گل اطلسی است. همچنین دارای یک ناحیه MCS^۷ 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 به صورت 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 ۷۰۰-۳۰۰ bp باشد (شکل ۱).

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

بعد از این مدت بذور رشد یافته به مدت ۱۰ روز در دوره نوری ۱۶ ساعته قرار گرفت (Almeida et al. 2002).

تهیه ریزنمونه و تراریخت سازی آن‌ها

دانه‌های حاصل از بذور نارنج کشت شده به مدت ۶ هفته، برای تهیه ریزنمونه‌ها استفاده شد. ابتدا لپه‌ها، ریشه و برگ‌ها و ساقه‌های زائد جدا شده و سپس از هر دانه‌ها دو نوع ریزنمونه یک سانتی‌متری تهیه شد که یکی شامل هیپوکوتیل، گره کوتیلدونی و بخشی از اپی کوتیل و دیگری یک قطعه اپی کوتیل 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 اندازه 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، ۴/۷ 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

¹ Binary vector

² Phosphinothricin acetyl transferase

³ Basta

⁴ Cauliflower mosaic virus 35s

⁵ Nopaline synthase

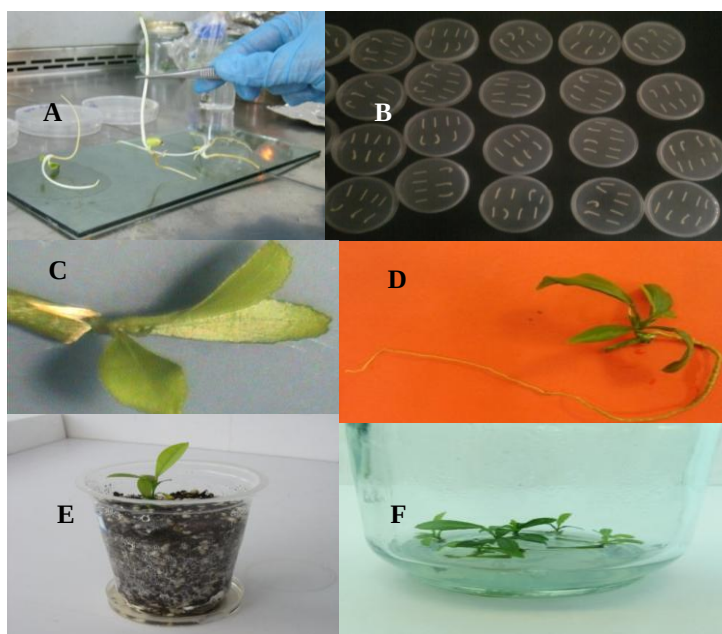
⁶ CHSA intron

⁷ Multiple cloning site

در شرایط تاریکی و در فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد.

محیط کشت جوانه زنی بذر شامل نمک های محیط کشت MS ۱/۲، ویتامین های کامل محیط کشت MS، ۳۰ g/l ساکارز، ۲ g/l فیتاژل (۸ g/l آگار) pH=۵/۷. محیط هم کشتی شامل نمک های کامل محیط کشت MS، ویتامین های محیط B5، ۳۰ g/l ساکارز، ۸ g/l آگار، (صفر، یک و دو میلی گرم بر لیتر) AP، (صفر، ۰/۲۵ و ۰/۵ میلی گرم بر لیتر) NAA، pH=۵/۷. محیط انتخابی شامل نمک های کامل محیط کشت MS، ویتامین های محیط B5، ۳۰ g/l ساکارز، ۸ g/l آگار، (صفر، یک و دو میلی گرم بر لیتر) BAP، (صفر، ۰/۲۵ و ۰/۵ میلی گرم بر لیتر) NAA، ۳۰۰ mg/l سفوتاکسیم، ۵۰ mg/l بستا و pH=۵/۷. محیط رشد شاخساره شامل نمک های کامل محیط کشت MS، ویتامین های محیط B5، ۳۰ g/l ساکارز، ۸ g/l آگار، (صفر، یک و ۰/۵ میلی گرم بر لیتر) GA ۳، ۲۰۰ mg/l سفوتاکسیم، ۲۵ mg/l علف کش بستا، pH=۵/۷. محیط ریز پیوندی شامل نمک های کامل محیط کشت MS و ۷۵ g/l ساکارز و pH=۵/۷. پس از رشد دانهال های نارنج به مدت حدود ۶ هفته، ریز نمونه از آن ها تهیه شد.

محیط های کشت باکتری و گیاه مورد استفاده در این آزمایش محیط های کشت های باکتری مورد استفاده به قرار زیر می باشند: 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 نمک های کامل محیط کشت MS، ۳۰ g/l ساکارز، ۲۰۰ μM، ۱۰۰ و صفر استوسیرینگون و pH=۵/۷. محلول AB شامل ۲۰ ml 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 نمک های XAB ۱ بافر فسفات، ۵۰ mM محلول ذخیره ی MES، ۰/۵ درصد گلوکز، ۱۰۰ μM محلول ذخیره استوسیرینگون، محلول بافر ۲۰XAB (AB buffer 20X) شامل ۲۰ g/l K₂HPO₄ و ۲۰ g/l NaH₂PO₄ و pH=۷ است. نمک های ۲۰XAB (AB salts 20X) محلول نمک ها شامل ۲۰ g/l NH₄Cl، ۶ g/l MgSO₄·7H₂O، ۳ g/l KCl، ۰/۲ g/l CaCl₂، ۵۰۰ mg/l FeSO₄·7H₂O می باشد. محلول ذخیره استوسیرینگون (Sigma-Aldrich) با غلظت ۱۰۰ mM در متانول یا DMSO تهیه،



شکل ۲- مراحل مختلف انتقال ژن با استفاده از اگروباکتریوم به *C. aurantium* (A). تولید دانهال های نارنج رشد یافته در شرایط *In vitro* در ۴ هفته تاریکی مطلق و ۱۰ روز دوره نوری ۱۶ ساعته به منظور تهیه ریز نمونه؛ (B) ریز نمونه های استخراج شده از دانهال ها پس از تلقیح با اگروباکتریوم در محیط تولید شاخساره؛ (C) ریز نمونه های حاوی شاخساره های تولید شده از طریق اندامزایی مستقیم همراه با بقایای برش های ایجاد شده در انتهای ریز نمونه؛ (D) تولید ریشه های خود به خودی در شاخساره ها در مرحله قبل از انتقال به خاک؛ (E) شاخساره های تولید شده در محیط کشت حاوی GA3 به منظور افزایش اندازه و رشد طولی؛ (F) گلدان حاوی شاخساره نمونه های دارای ریشه و انتقال گیاهچه ها به خاک.

جوانه‌هایی که طول آن‌ها در محیط رشد شاخساره (حاوی mg GA₃ ۰/۵) ۳-۵ سانتی‌متر طول و حدود ۱/۸-۱/۶ میلی‌متر قطر داشته‌اند جهت ریزپیوندی استفاده شد (Navarro 1992). پس از پیوند زدن، گیاه پیوندی به لوله‌های آزمایش ۲۵×۱۵۰ 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 ۱۶ 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 ۱۵×۸۰ حاوی ۶ 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 و cDNA آن‌ها سنتز و بررسی بیان ژن CTV به روش Real-time PCR انجام شد. بررسی تغییرات نسبی بیان ژن، به روش $\Delta\Delta Ct$ 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 ۴ 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 ۴۵ چرخه در دمای ۹۵ °C، ۶۰ °C و ۷۲ °C همگی به مدت ۳۰ ثانیه و در نهایت منحنی ذوب از دمای ۶۰ °C الی ۹۵ °C با نرم افزار دستگاه محاسبه و رسم شد.

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. اگر باکتریوم نژاد EHA105 کشت و در ۱۰ میلی‌لیتر محیط MS مایع حل شد (Gelvin 2006). هر یک از مقادیر صفر، ۱۰۰ μM و ۲۰۰ μM 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 درآمد. 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 ۴-۳ هفته، ریزنمونه‌هایی که دارای جوانه‌هایی به طول ۱-۲ mm شدند به محیط رشد شاخساره حاوی mg/l ۰/۵ GA₃ 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 به مدت ۷ دقیقه و ۳۵ چرخه شامل ۹۵ °C به مدت ۴۰ ثانیه، ۵۷ °C به مدت ۳۰ ثانیه، ۷۲ °C به مدت ۶۰-۳۰ ثانیه (بسته به نوع آغازگر) و بسط نهایی ۷۲ °C به مدت ۱۰ دقیقه.

جدول ۱- توالی های 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	۱۶۷
NOS Rev	TTGCGCGCTATATTTTGT	
BAR For	GACAAGCACGGTCAACTTCC	۲۴۷
BAR Rev	CTTCAGCAGGTGGGTGTAGAG	
KAN For	ATGTTGCTGTCTCCCAGGTC	۳۸۲
KAN Rev	GAAAGCTGCCTGTCCAAAG	
ACT For	GAGTTCTTCACGCGATACCTCCA	۹۵
ACT Rev	GACCACCTTTATTAACCCCATTTACCA	

نتایج و بحث

به منظور دستیابی به بهترین ترکیب و تأثیر هورمون های BAP و NAA بر باززایی مطالعه ای انجام و بهترین نتایج در ادامه در سایر آزمایش ها استفاده شد.

در این آزمون تعداد ریزنمونه های دارای جوانه بعد از ۴ هفته ثبت و بررسی شد. هورمون های NAA و BAP دارای تأثیر متقابل در سطح یک درصد بودند. بررسی تأثیر سطوح مختلف NAA نیز نمایانگر اختلاف معنی دار در سطح یک درصد می باشد. علاوه بر این، در تیمارهای فاقد هورمون، باززایی به مقدار معنی داری 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 ۶ جوانه دارای بیشترین کارایی در باززایی مستقیم نمونه ها بود (شکل ۲C). بنابراین، ترکیب هورمونی ذکر شده و نتیجه به دست آمده در ادامه در تمامی آزمایش ها استفاده شد.

BAP سیتوکینینی است که بالاترین تعداد جوانه را در ریزنمونه های مرکبات ایجاد می کند (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 تیدیاورون (Germana et al. 2011) در باززایی ریزنمونه ها مؤثرتر بوده و ریزنمونه ها در اثر این هورمون شاخساره های بیش تری تولید می کنند. 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 سلول های تراریخت بیش تر در محیط باززایی حاوی ترکیبی از BAP و NAA تحریک می شود تا زمانی که فقط BAP در محیط موجود است (Ghorbel et al. 2000). این مطالعات هم چنین نشان داد که در اکثر ژنوتیپ ها برای ترانسفورماسیون بافت بالغ افزودن NAA در غلظت های مناسب به محیط باززایی به شدت در توسعه بخش های تراریخت موثر است (Ghorbel et al. 2001; Almeida et al. 2004a; 2003b; Molinari et al. 2004).

در آزمایش مقایسه ای بین KIN و BAP در ترکیب با NAA نشان داده شد که باززایی جوانه نابجا در اپی کوتیل ها و قطعات میان گره ای 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 ۴ ریز نمونه جوانه دار شده که بالاتر از سایر تیمارهای این هورمون بود.

در پژوهشی بر روی ریزنمونه های سیترنج، بهترین باززایی در محیط حاوی ۱ mg/l BAP و ۰/۱ mg/l NAA گزارش شد که تعداد ۱۰/۴ جوانه برای هر ریزنمونه حاصل شد که ۷/۲ عدد از آن ها تبدیل به شاخساره شد (Moreira-Dias et al. 2000). نتایج حاصل از تأثیر هورمون BAP به تنهایی بسیار به هم نزدیک بوده و اختلاف معنی داری را نشان ندادند. با این وجود ۲ mg/l BAP با میانگین ۳/۵ جوانه بیش ترین مقدار را به خود اختصاص داد. در

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 $2/5 \text{ mg/l}$ 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 حالی که باقی نمونه‌ها در سوسپانسیون اگروباکتریوم و محیط MS به مدت 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 $1/7$ 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.

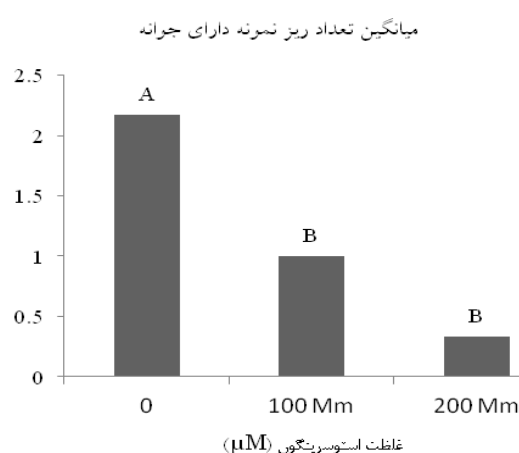
به‌منظور بررسی تأثیر برش طولی بر میانگین تعداد ریز نمونه‌های دارای جوانه، در انتهای تعدادی از ریز نمونه‌ها یک برش طولی به عمق یک میلی‌متر ایجاد شد با این هدف که تماس اگروباکتریوم با منطقه کامبیومی بهتر و بیش‌تر شده به‌طورکلی باززایی افزایش یابد. نتایج بررسی تعداد ریز نمونه‌های دارای جوانه نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین تیمار برش طولی و

فاقد برش در خصوص باززایی نمونه‌ها وجود ندارد ($1/7$ در مقابل $1/5$). 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. 1992; Bidney et al. 1990). به‌عبارتی، تشکیل نقاط فعال مرستمی یا تکثیر سلولی نیز از جمله نقاط مستعد و آماده دریافت ژن خارجی می‌باشد. در همین خصوص ایجاد زخم در ریزنمونه‌ها سبب القاء نقاط فعال مرستمی در بافت‌های گیاهی می‌شود (Escudero and Hohn 1997). زخم‌زنی بافت‌ها منجر به نتایجی شبیه به استعمال هورمون‌ها، الیستورها و تنظیم کننده‌های 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 $3/6$ تا $37/1$ افزایش می‌یابد (Yu et al. 2002). همچنین گزارش شده که درصد باززایی در نارنج $34/7$ تا $47/2$ 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.

گزارش شده است. استوسرینگون در ترانسفورماسیون بسیاری از گونه‌های مرکبات به کار برده شده است (Kaneyoshi et al., 1994; Bond and Roose 1998; Cervera et al. 1998; Yang et al. 2000; Li et al. 2002). در ترانسفورماسیون *Citrus sinensis* گزارش شد که در تیمار فاقد استوسرینگون تعداد گیاهان تراریخت شده بیش تر بوده است (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 (۳۰ mM, Bayer) تولید شده بودند، تعدادی شاخساره تراریخت به دست آمد.

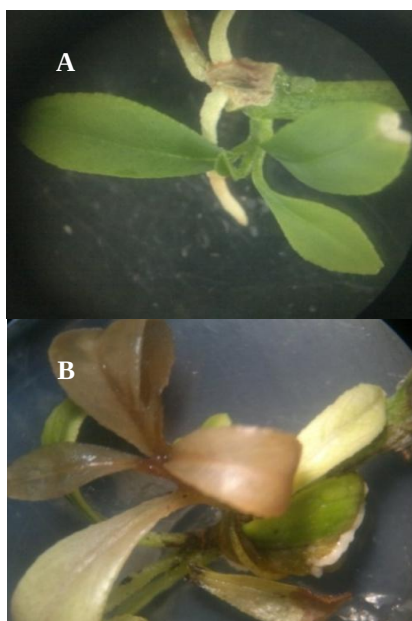
یکی از اهداف این آزمایش بررسی تأثیر غیر مستقیم منبع هیدروکربن (شامل ساکارز و گلوکز) بر افزایش کارایی ترانسفورماسیون و افزایش بیان ژن‌های *vir* بود که در قالب تعداد جوانه‌های تولید شده بر روی ریز نمونه‌ها در محیط کشت حاوی عامل گزینشی بستا ارزیابی شد. منبع هیدروکربن مختلف در روز سوم کشت باکتری یعنی در 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 ۶ شاخساره تراریخت شناسایی شد. در نهایت به منظور بررسی تأثیرات هر سه فاکتور منبع هیدروکربن، روش تلقیح و استوسرینگون بر

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 آگروباکتریوم 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 به ترتیب 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 شده است (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



شکل ۴- 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 قهوه‌ای 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 ۴۵ درصد پرلیت، ۴۵ 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 سلفوفان 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 پایه‌های ریشه‌دار ریزپیوندی شدند.

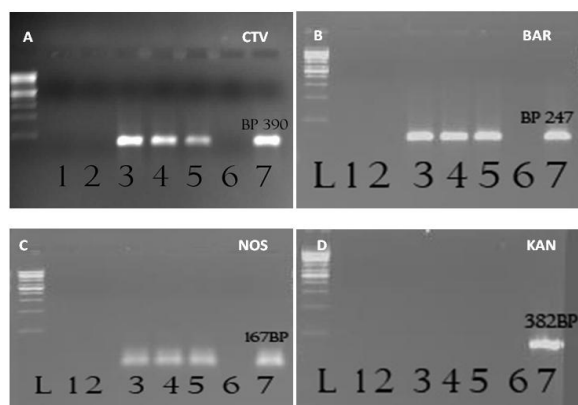
در بخش‌های قبلی آزمایش، تلفیق ژن‌های *BAR* و *CTV* در گیاهان تراریخت احتمالی با استفاده از تست علف‌کش و همچنین واکنش زنجیره‌ای پلی مرز به همراه توالی‌یابی محصول PCR تایید شد. در مرحله بعدی برای بررسی تعداد نسخه‌های رونوشت ژن *CTV* در گیاهان تراریخته از روش qPCR استفاده شد. کارایی و تکرارپذیری تکثیر ژن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

باززایی 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 آگروباکتریوم بدون استوسرینگون دارای ساکارز در محیط انتخابی قرار گرفتند که از ۴۰ شاخساره حاصل تعداد ۱۸ عدد به سه واکنش PCR پاسخ مثبت نشان دادند (کارایی تراریخت ۴۵ درصد).

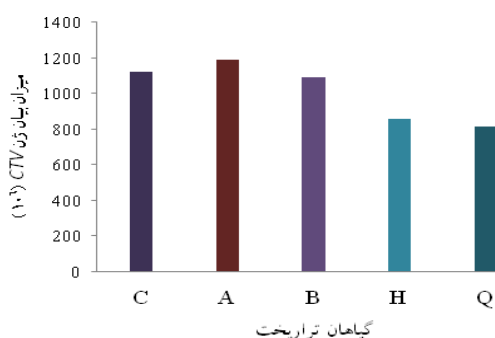
در این تحقیق به‌منظور تأیید تراریخته بودن شاخساره‌های رشد یافته، DNA آن‌ها استخراج، واکنش PCR با آغازگرهای ژن‌های داخل T-DNA انجام شد. DNA ژنومی استخراج شده از گیاه غیر-تراریخت رشد یافته در شرایط درون شیشه‌ای شاهد یا کنترل منفی و پلاسמיד pFGC541 کنترل مثبت در آزمایشات PCR بوده است (شکل ۴). فقط شاخساره‌هایی 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 توالی‌یابی شد (Bioneer, South Korea). نتیجه توالی‌یابی و پیرایش 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 آگروباکتریوم 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 آگروباکتریوم در سطح وجود ندارد. نتیجه این‌که PCR با استفاده از آغازگرهای *KAN* در اغلب نمونه‌ها هیچ‌گونه باندهای نشان نداده که به‌معنی صحت منشأ تکثیر و اثبات کارایی روش حذف آگروباکتریوم و آنتی‌بیوتیک‌های استفاده شده می‌باشد.

افزودن عامل گزینشی یعنی علف‌کش بستا به محیط رشد ریزنمونه ۳۰ mM 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 ۴).



شکل ۵- الکتروفورز محصولات واکنش PCR شاخصه‌های تراریخت با آغازگرهای مختلف. (A) ژن *ctv*; (B) ژن *BAR*; (C) ژن *nos*; (D) ژن *kan*. مارکر؛ (۱) شاهد آزمایشگاهی؛ (۲) شاهد گلخانه؛ ۳، ۴ و ۵) شاخصه‌های تراریخت؛ (۶) کنترل منفی (آب)؛ (۷) کنترل مثبت (پلاسمید).



شکل ۶- تعداد نسخه‌های رنوشت 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, Boscarior 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

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 60°C تا مقدار 95°C میزان فلورسنت دریافتی در هر مرحله اندازه‌گیری شد. در انتهای واکنش فقط یک پیک منفرد در دمای 89°C تشکیل شده که نشان دهنده تکثیر اختصاصی توسط آغازگرهای CTV می‌باشد.

از میان گیاهان مطالعه شده که قبلاً 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.

- 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.

- 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 Pathology* 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 trifoliata* (raf). *Molecular Genetics and Genomics* 265: 739-747.
- Dominguez A, De Mendosa AH, Guerri J, Gamba 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 trifoliata* (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 trifoliata* (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 reticulata* 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, Bepalhok 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* morphogenesis in plants - recent advances. *In Vitro Cellular and Developmental Biololoy - 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) Organogenesis in vitro a partir de

- 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) Otimização de protocolos para regeneração 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) Regeneração de plantas de laranja-Pera via organogênese *in vitro*. Pesquisa Agropecuaria Brasileira Brasília 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)