Crop Biotech.
Winter (2020) 10(2): 37-53. DOI: 10.30473/CB.2021.57688.1832

مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌فناوری گیاهان زراعی
سال دهم، شماره دوم، پیاپی سی‌ودوم، زمستان ۱۳۹۹ (۵۳-۳۷)

ارزیابی عوامل مؤثر در افزایش بازده انتقال ژن به *Citrus aurantifolia* L. به‌واسطه *اگروباکتریوم* و کاهش شیمری‌شدن شاخساره‌های تراریخته

سعید سهیلی‌وند[1*]، امیر موسوی[2]، محمدرضا صفرنژاد[3]

۱. استادیار، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی کرج، ایران.

۲. دانشیار، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران.

۳. دانشیار، مؤسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۰/۲ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۲/۲۶)

Assessment of factors affecting *Agrobacterium*-mediated transformation of *Citrus aurantifolia* L. to increase transformation efficiency and reduce chimeric transgenic shoots

Saeed Soheilivand[1*], Amir Mousavi[2], Mohammadreza Safarnejad[3]

1. Assistant Professor, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.
2. Associate Professor, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran.
3. Associate Professor, Iranian Research Institute of Plant Protection, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran.

(Received: 23 Dec. 2020 - Accepted: 17 Mar.2021)

چکیده

انتقال ژن به لیموترش (*Citrus aurantifolia* L.)، به‌عنوان یکی از گیاهان چوبی سرسخت، چالش‌برانگیز است. تأکید این مطالعه بر عوامل مهمی است که در افزایش موفقیت انتقال ژن و کاستن شیمری شدن شاخساره‌های تراریخته، مؤثر هستند. ریزنمونه‌های اپی‌کوتیل و میانگره، با سه سویه *اگروباکتریوم* (LBA4404، GV3101 و GV3850)، حامل پلاسمیدهای pBI121 و pCAMBIA3301 دارای ژن گزارشگر *بتا گلاکتوزیداز* (*GUS*)، جهت بررسی عوامل دخیل در انتقال ژن، استفاده شدند. فاکتورهای اصلی همچون OD_{600} *اگروباکتریوم* (۰/۳، ۰/۵ و ۱)، زمان تلقیح ریزنمونه (۵ ثانیه، ۱۰ دقیقه و ۳۰ دقیقه)، مدت هم‌کشتی (۲ و ۳ روزه) و انتخاب نوع و میزان عامل انتخابگرهای فسفینوتراسین (۱، ۳، ۵ و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر) و کانامایسین (۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر) ارزیابی شدند. بدین منظور، بازدهی تراریختی با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و میزان حالت شیمری شاخساره‌های تراریخته به‌کمک آزمون هیستوشیمیایی GUS، تأیید گردیدند. نتایج نشان داد که *اگروباکتریوم* سویه LBA4404، با OD_{600} ۰/۵ و زمان تلقیح پنج ثانیه برای اپی‌کوتیل و ۱۰ دقیقه برای میانگره با هم‌کشتی دو روزه، مناسب‌ترین تیمارها برای هر دو ریزنمونه بودند. فراوانی انتقال ژن بین ۰/۹۳٪ در ریزنمونه میانگره روی محیط DKW حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر فسفینوتراسین و ۱٤/۲۹ درصد، در ریزنمونه اپی‌کوتیل روی محیط DKW حاوی ۵۰ میلی‌گرم در لیتر کانامایسین حاصل شد. همچنین مشخص گردید، به‌کار بردن سطوح بالای عامل انتخابگر، بازدهی تراریزش را با کاهش پدیده شیمری و جلوگیری از فرار شاخساره‌های غیرتراریخته، بهبود می‌بخشد. یافته‌های این مطالعه، راهکارهای مؤثری را در باززایی شاخساره‌های تراریخته غیرشیمری در لیموترش، ارائه می‌دهد.

واژه‌های کلیدی: ژن گزارشگر *GUS*، *اگروباکتریوم*، نشانگر انتخابگر، بافت شیمر.

Abstract

Sour lime (*Citrus aurantifolia* L.) is one of the most important woody plants is widely known for its recalcitrance to genetic transformation. We aimed herein to evaluate effective factors influencing the transformation efficiency and the reduction of chimeric transgenic shoots in sour lime. Epicotyl and internode explants were genetically transformed with different *Agrobacterium tumefaciens* strains e.g., LBA4404, GV3850, and GV3101, harboring the vectors pBI121 and pCAMBIA3301 containing *β-glucuronidase* (*GUS*) as a reporter gene. The effect of the following factors was evaluated: *Agrobacterium* concentration (OD_{600}=0.3, 0.5 and 1), during inoculation (5 seconds, 10 minutes and 30 minutes), co-culture (2 and 3 days), and the selection regime (phosphinothricin at 1, 3, 5 and 10 mg/l and kanamycin at 25, 50, 75 and 100 mg/l). In following, transformation efficiency and the chimeric transgenic shoots rate were respectively confirmed by PCR and GUS assays. The results showed that *Agrobacterium* strain LBA4404, at the OD_{600} of 0.5, with 5 seconds (for epicotyl) and 10 minutes (for internode) inoculation at two-day co-culture period, were identified the most suitable treatments for both explants. The transformation frequencies ranged from 0.93% for internode on DKW medium containing 1.0 mg/l of phosphinothricin to 14.29% for epicotyl on DKW medium containing 50 mg/l of kanamycin. Inclusion of the high-level of selective treatments, improved the transformation rate through decreasing frequency escape and chimeric transgenic shoots. These findings provide novel insights into the appropriate procedure to constitute non-chimeric lime transgenic shoots.

Keywords: *Agrobacterium*, chimeric tissue, *GUS* Reporter gene, selectable marker.

* نویسنده مسئول: سعید سهیلی‌وند
E-mail: soheilivand@gmail.com; soheilivand@abrii.ac.ir

مقدمه

لیموترش (*Citrus aurantifolia* L.) از جمله مهمترین محصولات باغی، جنوب کشور است. براساس آخرین آمار رسمی وزارت جهاد کشاورزی سال ۱۳۹۸، سطح کل باغات لیموترش ایران، ۴۲۲۳۹ هکتار و تولید میوه آن حدود ۶۶۳۲۹۲ تن بوده است (Agricultural Statistics, 2019). از دیدگاه اقتصاد خرد و درآمد محلی حاصل از فعالیت‌های کشاورزی، بهبود کمیت و کیفیت محصول و بالابردن مقاومت این گیاه به آفات و بیماری‌های مهلک، می‌تواند درآمد خانوار باغدار آن منطقه را افزایش دهد. یکی از راهکارهای اساسی، استفاده از تکنیک‌های انتقال ژن است. با مرور منابع انتقال ژن به لیموترش، مشخص می‌شود، به‌جز برخی موارد معدود مانند انتقال ژن‌های کدکننده پروتئین پوششی ویروس تریستزای مرکبات *Citrus tristeza virus* (CTV) (Gutiérrez *et al*., 1997; Ghorbel *et al*., 2000; Domínguez *et al*., 2000; Ghaderi *et al*., 2018)، سازه‌های خاموشی ژن ویروس تریستزا (Lopez *et al*., 2010)، و انتقال ژن CBF3، جهت بررسی اثر آن بر القای مقاومت به خشکی و شوری (Romero-Romero *et al*., 2020)، بقیه موارد صرفاً در رابطه با بهینه‌سازی انتقال ژن به گیاه لیموترش بوده است.

انتقال ژن به گیاهان چوبی نسبت به دیگر گیاهان دشوارتر بوده و دلیل اصلی آن بافت چوبی و پاسخ کم ریزنمونه‌ها به تیمارهای مختلف هورمونی است که همین عامل باعث کم‌شدن میزان باززایی می‌شود. مرکبات نیز به‌عنوان گیاهان چوبی چند ساله از این قاعده مستثنی نیستند. یکی از دلایل اصلی مشکل‌بودن انتقال ژن و رشد و فرار بالای شاخساره‌های غیرتراریخت در مرکبات، می‌تواند ذکر این مورد باشد که این گیاهان، به‌طور طبیعی میزبان اگروباکتریوم نبوده و بازدهی بالایی در قبول ژن نوترکیب از طریق اگروباکتریوم ندارند (Dutt & Grosser, 2009). با این وجود حتی در بین گونه‌ها و ژنوتیپ‌های مختلف یک خانواده، میزان موفقیت در انتقال ژن متفاوت است. گیاه لیموترش در بین بقیه گیاهان همخانواده مرکبات، به‌طور معنی‌داری پایین‌ترین درصد موفقیت را دارد. با یک مقایسه ساده، مشخص می‌شود که از میان شاخساره‌های تراریخته تولید شده در بین چهار ژنوتیپ مختلف مرکبات Carrizo، Duncan، Hamlin و Mexican Lime، به ترتیب ۴۷٪، ۴۰٪، ۲۵٪ و ۸٪، پایین‌ترین میزان با اختلاف بارز، مربوط به لیموترش با ۸٪ تراریختگی است. (Dutt & Grosser, 2009). بنابراین، براساس گزارشات علمی گیاه لیموترش، به‌دلیل باززایی پایین و همچنین فرار شاخساره‌های غیرتراریخت در پاسخ به انتقال ژن، سرسخت‌ترین بوده و میزان موفقیت در آن، در مقایسه با بقیه گیاهان هم‌خانواده، به‌طور معنی‌داری کمتر است (Fang *et al*., 2017; Cheng *et al*., 2015). با این وجود، روش‌های مختلفی با تیمارهای گوناگون برای انتقال ژن به لیموترش و و ژنوتیپ‌های هم‌خانواده آن مطالعه شده‌اند. به‌طور مثال، هر دو روش متداول انتقال ژن یعنی *اگروباکتریوم* با سویه‌های مختلف (Zhang *et al*., 2017) و روش تفنگ ژنی (Wu *et al*., 2019)، بررسی شده‌اند. انتخاب ریزنمونه مناسب مانند اپی‌کوتیل (Niedz *et al*., 2015)، کوتیلدون (Oliveira *et al*., 2015) و میانگره (Hu *et al*., 2016) و حتی روش برش آنها (Jardak *et al*., 2020)، تأثیر معنی‌داری در باززایی انواع ژنوتیپ‌های مرکبات داشته و استفاده از عوامل انتخابگر سلول‌های تراریخته همانند فسفینوتراسین[۱] (Ganjeh *et al*., 2021)، هایگرومایسین[۲] و کانامایسین[۳] (Acanda *et al*., 2017; Zhang *et al*., 2017)، برای بالابردن بازدهی انتقال ژن به لیموترش و ژنوتیپ‌های مختلف *Citrus* آزمون شده‌اند. علاوه بر موارد ذکرشده، یکی از

۱ DL-phosphinothricin

۲ Hygromycin

۳ Kanamycin sulphate monohydrate

مشکلات اساسی در انتقال ژن به این گیاه، پدیده فرار شاخساره‌های غیرتراریخت در محیط انتخابی است. لازم به ذکر است با وجود درصد کم تراریختگی، پدیده شیمری نیز، مشکل را دوچندان کرده و باعث کاهش معنی‌دار موفقیت، حتی در بین شاخساره‌های تراریخته PCR مثبت می‌شود. متأسفانه این مهم در اکثر پژوهش‌ها از نظر دور مانده و صرفا به ارائه آمار تراریختگی بسنده شده است (Domínguez *et al*., 2004). بنابراین بهینه‌کردن شرایط انتقال ژن و انتخاب مناسبترین عامل انتخاب سلول‌های تراریخته، یک چالش محسوب می‌شود. نکته قابل توجه این است که در مورد گیاهانی مانند لیموترش، تهیه نسل‌های بعدی گیاهان تراریخته، یک پروسه طولانی داشته و احتیاج به صرف وقت و هزینه زیادی دارد. بنابراین بهینه کردن انتقال ژن در چنین گیاهانی، با استفاده از ژن‌های گزارشگری همچون *gus* و *gfp* و بررسی فاکتورهای دیگر و دخیل در تولید گیاهان تراریخته همگون، می‌تواند راه را برای انتقال ژن‌های اصلی هموار سازد.

با توجه به موارد ذکرشده، هدف از این تحقیق، بررسی عوامل مؤثر در بالابردن میزان انتقال ژن به لیموترش بوده که جزو سرسخت‌ترین گونه‌ها در بین مرکبات هستند. همچنین علاوه بر آن، به‌طور ویژه تمرکز بر روی حالت شیمری شدن و مطالعه نقش عوامل انتخابگر (نوع و میزان آن)، در انتخاب و امکان تمایز سلول‌های تراریخته از بین سلول‌های غیرتراریخته بوده است. برای این منظور عوامل اصلی همچون نوع ریزنمونه‌ها، سویه‌های مختلف *اگروباکتریوم* به‌همراه پلاسمیدهای واجد ژن‌های عوامل انتخابگر جهت بررسی اثر (نوع و میزان) عوامل انتخابی، ODهای مختلف *اگروباکتریوم*، مدت زمان‌های متفاوت تلقیح و هم‌کشتی *اگروباکتریوم* با ریزنمونه‌ها، به‌کمک بررسی شاخص‌هایی همچون کنترل یا عدم کنترل رشد *اگروباکتریوم* در محیط کشت گیاهی، میزان سالم‌بودن و سوختگی ریزنمونه‌ها و قدرت تحمل آنها نسبت به *اگروباکتریوم*، درصد تولید شاخساره‌های تراریخته و میزان شیمری‌شدن آنها و همچنین مجموع اثرات عوامل ذکرشده در میزان رشد شاخساره‌ها و ریشه‌زایی آنها به‌صورت کمی و کیفی بررسی شده است.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و روش ضدعفونی سطحی آنها

در این تحقیق از توده بذری لیموترش منطقه جهرم به‌عنوان منبع تأمین‌کننده ریزنمونه‌ها در محیط درون‌شیشه‌ای[1] استفاده شد. بدین منظور بذرها در محلول هیپوکلریت سدیم ۲درصد حاوی Tween-20، ۰/۱ درصد، با تکان ملایم، به‌مدت حدود ۱۵ دقیقه ضدعفونی شده و قبل از استقرار بر روی محیط کشت، سه بار با آب مقطر سترون شستشو و با کاغذ واتمن خشک شدند. برای نمونه‌های بذری با آلودگی بالا از روش کشت میکروپلیت که باعث ایزوله شدن مواد گیاهی از هم می‌شد، استفاده گردید.

ریزنمونه‌ها، محیط‌های کشت و شرایط رشد

اپی‌کوتیل و میانگره دو ریزنمونه‌ای هستند که برای انتقال ژن به ژنوتیپ‌های مختلف مرکبات استفاده می‌شوند (Poles *et al*., 2020). این دو ریزنمونه از گیاهچه‌های حاصل از بذر کشت شده در محیط سترون *in vitro* جدا و به اندازه‌های ۱۰-۴ میلی‌متری، به‌طور اریب، از دو طرف به‌کمک تیغ اسکالپل تیز، برش داده می‌شدند (Jardak *et al*., 2020).

محیط‌های مورد استفاده در انتقال ژن شامل محیط کشت بذر، پیش‌تیمار[2] تلقیح، هم‌کشتی، باززایی و ریشه‌زایی بود که اجزای آن در جدول ۱ آورده شده است.

---

۱. *In vitro*

۲. برای حفظ طراوت و شادابی ریزنمونه‌ها، بعد از جداکردن آنها از گیاهچه و تا مرحله تلقیح با *اگروباکتریوم*، در محیط پیش‌تیمار قرار داده می‌شدند.

جدول ۱. محیط‌های مورد استفاده به‌همراه اجزای تشکیل دهنده آن

محیط*	نوع محیط	BAP (mg/l)	NAA (mg/l)	Acetosyringone µM	آگار (g/l)	MES[1] (mg/l)	Cefotaxime (mg/l)	عامل انتخابگر**
استقرار بذر	½MS	–	–	–	8	–	–	–
پیش‌تیمار	½MS	–	–	100	–	–	–	–
تلقیح	½MS	–	–	100	–	–	–	–
هم‌کشتی	½MS	–	–	100	8	–	–	–
باززایی (از اپی‌کوتیل)	DKW	7	1	–	8	500	250	موجود
باززایی (از میانگره)	DKW	1	–	–	8	500	250	موجود
ریشه‌زایی	DKW	–	1	–	6	–	250	–

* کلیه محیط‌ها شامل ۳۰ گرم در لیتر ساکاروز بوده و pH آنها قبل از اتوکلاو بین ۵/۸-۵/۷ تنظیم می‌شد.
** آنتی‌بیوتیک کانامایسین (۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم) و علف‌کش فسفینوتراسین (۱ و ۳ میلی‌گرم) برحسب ژن انتخابگر و تیمار، بعد از اتوکلاو محیط باززایی به آن اضافه می‌شد.
1. 2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid, Duchefa

برحسب نوع ریزنمونه و نوع محیط کشت، از هورمون‌های گوناگون با مقادیر مختلف، BAP[1] و NAA[2] فیلترشده، به محیط‌های اتوکلاوی اضافه می‌شد. جوانه‌زنی بذرها، به‌مدت چهار هفته و در شرایط تاریکی صورت گرفت. شرایط اتاق رشد برای تمامی مراحل، باززایی، رشد و ریشه‌زایی یکسان بوده و در دمای ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد و با رژیم نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی تنظیم شده بود (Silva *et al*., 2010).

سویه‌های *اگروباکتریوم*، پلاسمیدها و ژن‌های انتخابگر

دو پلاسمید pBI121 و pCambia3301 که حاوی ژن *gus* می‌باشند، برای بررسی شاخص‌های مختلف انتقال ژن به لیموترش استفاده شد. در وهله اول پلاسمیدها به‌طور جداگانه با استفاده از روش ذوب- انجماد[3] به سویه‌های LBA4404، GV3101 و GV3850 *اگروباکتریوم* (*Agrobacterium tumefaciens*)، منتقل شدند (Holsters *et al*., 1978). برای کنترل *اگروباکتریوم‌ها* و جلوگیری از رشد آنها در محیط‌های کشت گیاهی، در قدم اول از ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم[4] و در مراحل بعدی در صورت مشاهده رشد *اگروباکتریوم* در اطراف ریزنمونه‌ها یا شاخساره‌ها از غلظت ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر از این آنتی‌بیوتیک استفاده شد.

میزان رشد *اگروباکتریوم*، مدت زمان آلوده‌سازی ریزنمونه‌ها و مدت زمان هم‌کشتی

برای بررسی زمان و میزان *اگروباکتریوم* موجود در تلقیح با ریزنمونه و تأثیر آن در روند انتقال ژن، از زمان‌های آلوده‌سازی ۵ ثانیه، ۱۰ دقیقه و ۳۰ دقیقه و سه OD_{600} مختلف، ۰/۳، ۰/۵ و ۱ استفاده و قبل از اعمال عوامل انتخابگر، تیمارهای ۲ و ۳ روز هم‌کشتی در نظر گرفته شد. چون ریزنمونه‌های استفاده شده در این تحقیق (به‌ویژه اپی‌کوتیل)، عکس‌العمل و حساسیت بالایی نسبت به حمله اگروباکتریوم داشتند. بنابراین معیار انتخاب بهترین تیمارها، براساس مشاهدات ظاهری ریزنمونه‌ها و براساس میزان سوختگی آنها و کنترل یا عدم کنترل رشد *اگروباکتریوم* در اطراف آنها، حداقل بعد از دو واکشت متوالی، بصورت کیفی امتیازدهی، دسته‌بندی و انتخاب شد.

تعیین آستانه تحمل ریزنمونه‌ها به عوامل انتخابگر

دو عامل انتخابگر، آنتی‌بیوتیک کانامایسین که با القای مقاومت توسط ژن *nptII* واقع در پلاسمید pBI121 و دیگری علف‌کش فسفینوتراسین[5] با القای مقاومت

1. 6-Benzylaminopurine
2. 1-Naphthaleneacetic acid
۳ Freeze-Thaw
۴ Cefotaxime sodium, Duchefa
۵ DL-phosphinothricin, Duchefa

توسط ژن *bar* در پلاسمید pCAMBIA3301، در نظر گرفته شد و برای تعیین حد آستانه انتخاب، هر تیمار بدون تلقیح با *اگروباکتریوم* در چهار تکرار به‌کار رفت. در منابع علمی، سطوح متفاوتی از عوامل کنترل، برای ژنوتیپ‌ها و گونه‌های مختلف مرکبات عنوان شده است (Domínguez *et al*., 2000; Dutt *et al*., 2011; Cevik *et al*., 2012)؛ بنابراین برای مطالعه دقیق‌تر و بررسی تأثیرات گوناگون این عوامل بر میزان کمیت و کیفیت انتقال ژن، از سطوح مختلف با دامنه وسیع‌تر استفاده شد. برای آنتی‌بیوتیک کانامایسین چهار سطح ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر و در مورد فسفینوتراسین چهار سطح ۱، ۳، ۵ و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر بررسی شد. معیار انتخاب بهترین غلظت عوامل کنترل کننده و متوقف کننده رشد، عدم باززایی و یا توقف رشد شاخساره‌ها، پس از گذشت حدود ۸–۶ هفته از کشت ریزنمونه‌ها در محیط انتخابی بود.

مراحل آماده‌سازی *اگروباکتریوم* و انتقال ژن به لیموترش

یک تک‌کلونی *اگروباکتریوم* از *محیط جامد* انتخاب و در محیط مایع LB حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر ریفامپیسین[۱] به‌همراه ۵۰ میلی‌گرم در لیتر کانامایسین، در شیکر- انکوباتور با دور ۲۰۰ rpm و دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد کشت شد. بعد از ۳۲–۱۸ ساعت از کشت آن، یک میلی‌لیتر از محیط کشت مایع حاوی *اگروباکتریوم*، دوباره به محیط جدید با همان نوع و میزان آنتی‌بیوتیک‌ها به‌اضافه ۱۰۰ میکرومولار استوسرینگان[۲] (ماده القاگر)، منتقل و تا رسیدن به ODهای موردنظر، دوباره در شیکر- انکوباتور رشد داده شد (Dutt *et al*., 2012).

ریزنمونه‌های اپی‌کوتیل و میانگره از گیاهچه‌های *in vitro*ای تهیه و حدود دو ساعت قبل از تلقیح آنها با *اگروباکتریوم*، در محیط پیش‌تیمار قرار داده شدند. میزان رشد *اگروباکتریوم* با سنجش کدورت و تعیین ODهای محیط کشت آنها، مشخص شده و به‌مدت ۲۰ دقیقه در ۳۵۰۰rpm سانتریفیوژ و رسوب باکتری به‌دست‌آمده، دوباره در محیط پیش‌تیمار حاوی ریزنمونه‌ها، به حالت تعلیق درآمد. بعد از اعمال تیمارهای مدت زمان تلقیح ریزنمونه‌ها با *اگروباکتریوم*، ریزنمونه‌ها به‌کمک کاغذ صافی، خشک و برای اعمال تیمارهای مدت زمان هم‌کشتی به محیط موردنظر منتقل شدند. پس از اعمال تیمارهای هم‌کشتی، ریزنمونه‌ها در محیط باززایی، واکشت و به‌طور دوره‌ای، هر ۱۵–۱۰ روز یک‌بار در محیط جدید دوباره واکشت می‌شدند (Dutt *et al*., 2011).

غربال شاخساره‌های تراریخته و بررسی پدیده شیمری

پس از باززایی و ظهور شاخساره، از برگ انتهایی آنها، نمونه‌ای جدا و داخل ویال ۲ میلی‌لیتری، DNA آنها به روش CTAB اصلاح شده و با ریختن بافر سرد در ویال و له‌کردن بافت نرم، استخراج شد (Doyle and Doyle, 1990). سنجش کمیت و کیفیت DNA و همسان‌سازی DNAها، به‌کمک دستگاه نانودراپ و ژل آگارز انجام و غربال شاخساره‌های تراریخته با آزمون PCR و به‌کمک جفت آغازگرهای جدول ۲ و با آنزیم Taqپلیمراز و dNTPs شرکت Fermentas[۳] انجام شد. شرایط دمایی و زمانی چرخه‌ها، برای تکثیر قطعات مربوط، با درنظرگرفتن تکثیر طولانی‌ترین قطعه و بهترین دمای مشترک برای هر سه جفت آغازگر، بدین صورت بهینه شد؛ چرخه اول یک تکرار به‌مدت چهار دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد؛ چرخه دوم ۴۰ تکرار با یک دقیقه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۴۰ ثانیه در

۱ Rifampicin

۲ Acetosyringone

۳ Taq DNA Polymerase and dNTPs (Fermentas Inc.)

۵۸ درجه سانتی‌گراد و ۴۰ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد؛ و در آخر، چرخه سوم یک تکرار با هفت دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد.

جدول ۲. مشخصات جفت آغازگرهای مربوط به ژن‌های *gus*، *virG* *اگروباکتریوم* و *18s* گیاهی

نام آغازگر	توالی آغازگر (3'-5')	طول آغازگر	طول محصول
Gus1400-F	5'- tgcggtcactcattacgg -3'	18	1380
Gus1400-R	5'- catacctgttcaccgacg -3'	18	
VirG-FW	5'- atgattgtacatccttca -3'	18	738
VirG-RW	5'- tgctgtttttatcagttgag -3'	20	
18s FW	5'- cttcgggatcggagtaatgattaa -3'	24	619
18s RW	5'- gcccagaacatctaagggcatcacaga -3'	27	

براساس نتایج PCR و مشخص‌شدن شاخساره‌های تراریخته، نمونه برگ انتهایی شاخساره آن جدا شده و در بافر x-gluc و طبق پروتکل تغییر یافته Jefferson و همکاران (۱۹۸۷) عمل شد. با یک تفاوت جزئی که برای رنگ‌بری کامل نمونه‌ها، علاوه بر الکل ۷۰ درصد، از الکل مطلق نیز استفاده شد. نتایج پس از شستشو و حذف کامل کلروفیل برگ‌ها، زیر لوپ بررسی شد (Hu *et al*., 2017). شاخساره‌های با طول بیش از یک سانتی‌متر، از ریزنمونه جدا (Jardak *et al*., 2020) و به محیط ریشه‌زایی منتقل شدند (جدول ۱). گیاهچه‌های با رشد ریشه مناسب برای سازگاری با محیط خارج شیشه، به خاک منتقل و گیاهچه‌هایی که ریشه‌دار نشدند، برای ریزپیوندی بر روی پایه‌های لیموترش استفاده شدند.

نتایج و بحث

در این مطالعه، اثرات تیمارهای مختلف بر روند انتقال ژن به گیاه لیموترش و میزان اثربخشی آنها بررسی شد. لازم به توضیح است که به دلیل مشکلات عدیده در کشت بافت و انتقال ژن به لیموترش، اعم از آلودگی‌ها، میزان پایین باززایی و تولید کم شاخساره‌های تراریخته در این گیاه سرسخت، جمع‌بندی داده‌ها و مطالعه آنها برای کم‌کردن خطا و ارائه بازتاب واقعی و روشن از مشاهدات، به دو صورت کیفی (علائم ظاهری) و کمی (تعداد و درصد)، به تفکیک ماهیت آنها در جداول مربوطه ارائه شده است.

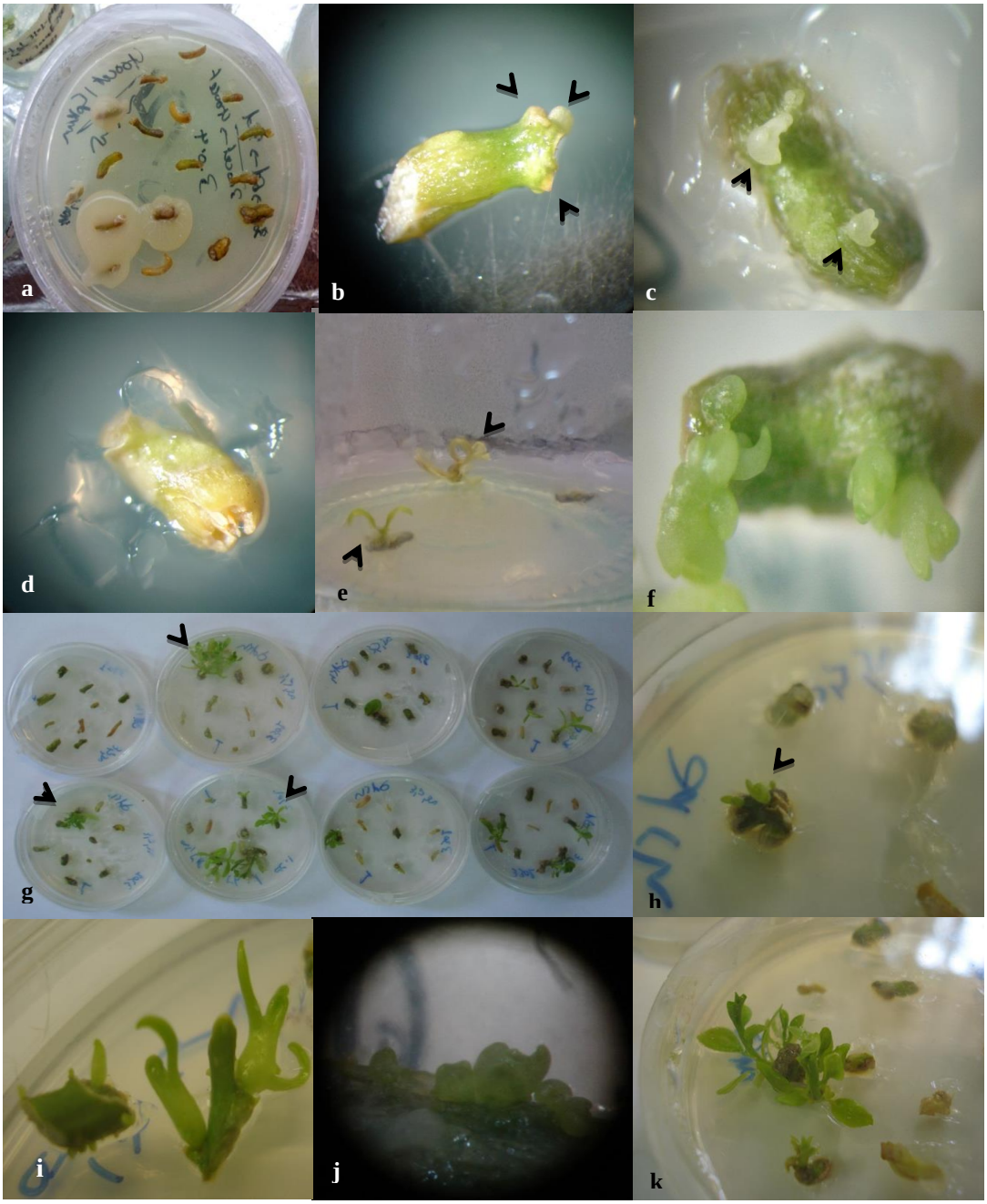
انتخاب مناسب‌ترین سویه *اگروباکتریوم*

واکنش سویه‌های مختلف *اگروباکتریوم* نسبت به غلظت آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم، متفاوت بود. به‌طوری که سویه‌های GV3101 و GV3850، حتی در ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم، بعد از چندین بار واکشت ریزنمونه‌ها در محیط کشت DKW، در اطراف آنها رشد می‌کردند (شکل ۱a). برخلاف این دو سویه، رشد LBA4404 در محیط حاوی ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم، کاملاً مهار شده و هیچ رشدی نداشت. رشد *اگروباکتریوم* و ناتوانی در کنترل آن در مراحل بعدی، حتی با داشتن بهترین درصد تراریختی، باعث لیز شدن ریزنمونه‌ها و شاخساره‌های تراریخته شده و آنها را از بین می‌برد. سویه‌های GV3101 و GV3850 حتی در ODها و مدت زمان تلقیح کم، پس از سپری شدن چندین واکشت، غیرقابل کنترل بودند. بنابراین با توجه به فاکتور مهم کنترل رشد *اگروباکتریوم* در فرایند انتقال ژن، بقیه تیمارها توسط سویه LBA4404، انجام شد.

تعیین بهترین غلظت *اگروباکتریوم*، و مدت زمان‌های تلقیح و هم‌کشتی برحسب نوع ریزنمونه

نتایج تیمارهای مختلف OD *اگروباکتریوم*، و مدت زمان‌های تلقیح و هم‌کشتی به‌وسیله بررسی دو شاخص مهم میزان سوختگی ریزنمونه‌ها و شدت آلوده‌شدن آنها با هاله‌ای از *اگروباکتریوم* اطراف آنها سنجیده شد. با توجه به داده‌های کیفی جدول ۳، بهترین OD برای هر دو ریزنمونه ۰/۵ و بهترین مدت زمان تلقیح برای ریزنمونه اپی‌کوتیل، ۵ ثانیه و برای میانگره، ۱۰ دقیقه

مشخص گردید. ریزنمونه‌های اپی‌کوتیل دارای بافت نرم‌تر و حساس‌تر بوده و به همین دلیل زمانی که بیشتر در معرض حمله اگروباکتریوم قرار داشتند، دچار آسیب شده و علائم لیزشدن و سوختگی در آنها دیده می‌شد.



شکل ۱. نتایج حاصل از تیمارهای مختلف برای بهینه کردن شرایط انتقال ژن به لیموترش (ریزنمونه‌های شکل‌های b، c، d، e و f جهت تعیین سطح آستانه و بدون تلقیح با *اگروباکتریوم* و شکل‌های g، h، j و k تلقیح شده با *اگروباکتریوم*). a. عدم کنترل *اگروباکتریوم* سویه GV3850 در محیط حاوی ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم، b. تأثیر کانامایسین بر ریزنمونه اپی‌کوتیل با ظهور علائم سفید شدن بافت‌ها و جوانه‌ها در مراحل اولیه تمایز و رشد، c. توقف رشد در مراحل اولیه و سفید شدن شاخساره‌ها در ۲۵ میلی‌گرم در لیتر کانامایسین در ریزنمونه میانگره، d. تأثیر ۳ میلی‌گرم در لیتر فسفینوتراسین بر اپی‌کوتیل (بدون باززایی شاخساره و کاملا از بین رفته)، e. اپی‌کوتیل‌ها در ۱ میلی‌گرم در لیتر فسفینوتراسین، سفید شدن شاخساره‌های باززاشده بعد از رشدشان، f. ریزنمونه میانگره با باززایی شاخساره از قسمت فوقانی در ۱ میلی‌گرم در لیتر فسفینوتراسین، g. رشد و فرار شاخساره‌ها در پلیت‌های حاوی ۱ میلی‌گرم در لیتر فسفینوتراسین، h. ظهور شاخساره از ریزنمونه اپی‌کوتیل (در ۳ میلی‌گرم در لیتر فسفینوتراسین)، i. باززایی شاخساره‌های سبز و شاداب، در محیط شاهد (بدون عامل انتخابگر)، j. سیاه شدن

کامل ریزنمونه میانگره تلقیح شده و باززایی شاخساره‌های سبز از آن (در ۳ میلی‌گرم در لیتر فسفینوتراپسین)، k. ظهور شاخساره از ریزنمونه اپی‌کوتیل تلقیح شده (در ۱ میلی‌گرم در لیتر فسفینوتراپسین)

یکی از فاکتورهای مهم، در مهار رشد اگروباکتریوم در واکشت‌های بعدی، مدت زمان هم‌کشتی بود. هم‌کشتی سه روزه، فرصت مناسبی برای اگروباکتریوم ایجاد می‌کرد تا با تکثیر بیشتر بتواند حتی پس از انتقال به محیط دارای سفوتاکسیم، در اطراف ریزنمونه‌ها، هاله‌ای از اگروباکتریوم ایجاد کند. بنابراین، مدت زمان دو روز، به‌عنوان بهترین مدت زمان برای هم‌کشتی انتخاب شد.

تعیین غلظت مناسب کانامایسین و فسفینوتراپسین به‌عنوان عوامل انتخابگر

مشاهدات حاصل از تعیین حد آستانه دو نوع مختلف عامل انتخابگر آنتی‌بیوتیک کاناماسین و علف‌کش فسفینوتراپسین با استفاده از سطوح مختلف آنها، بررسی شد. دو ریزنمونه اپی‌کوتیل و میانگره، هر یک پاسخ متفاوتی به سطوح ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر کانامایسین داشتند و اپی‌کوتیل در مواجه با کانامایسین حساس‌تر از میانگره بود (شکل ۱b). باززایی در سطوح بالای ۲۵ میلی‌گرم در لیتر مشاهده نشد. حتی اگر شاخساره‌ای هم باززا می‌شد، رنگ آن از سبز به سفید تغییر کرده و در همان مراحل اولیه رشد ۳-۲ میلی‌متری، از بین می‌رفت (شکل ۱c). مشاهدات در مورد عامل انتخابی فسفینوتراپسین با چهار سطح ۱، ۳، ۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر نشان داد که در سطح ۱ میلی‌گرم در لیتر از این عامل، شاخساره‌ها باززا می‌شدند. ولی در سطوح بالاتر از آن، باززایی مشاهده نشد. فشار انتخاب و کنترل باززایی و رشد شاخساره‌ها، در عامل انتخابی فسفینوتراپسین کاملاً با کانامایسین فرق داشت. به‌طوری که رشد شاخساره‌ها در این محیط‌ها به‌ویژه در ریزنمونه میانگره، معمولاً بیشتر از حالتی بود که در محیط انتخابی کانامایسین دیده می‌شد (شکل ۱e,d).

جدول ۳. نتایج تیمارهای مدت زمان تلقیح و ODهای متفاوت *اگروباکتریوم* بر میزان سوختگی ریزنمونه‌ها و آلودگی ریزنمونه‌ها با LBA4404

مدت زمان تلقیح	OD_{600} *اگروباکتریوم*	نوع ریزنمونه	میزان سوختگی ریزنمونه‌ها*	شدت آلودگی ریزنمونه‌ها
5 sec	0.3	اپی‌کوتیل	−	−
		میانگره	−	
	0.5	اپی‌کوتیل	−	−
		میانگره	−	
	1	اپی‌کوتیل	+	+
		میانگره	−	
10 min	0.3	اپی‌کوتیل	−	−
		میانگره	−	
	0.5	اپی‌کوتیل	+	−
		میانگره	−	
	1	اپی‌کوتیل	+++	++
		میانگره	−	
30 min	0.3	اپی‌کوتیل	+	−
		میانگره	−	
	0.5	اپی‌کوتیل	++	++
		میانگره	−	

1	اپی‌کوتیل	+++	++
	میانگره	+	

* علامت (–) نشان‌دهنده عدم سوختگی و یا عدم رشد اگروباکتریوم در اطراف ریزنمونه است. به همین ترتیب علامت (+) و تعداد آن حاکی از شدت سوختگی و طغیان رشد اگروباکتریوم در تیمار مورد نظر است.

بدین صورت که قسمت‌های زیرین میانگره که با سطح محیط انتخابی در تماس بود، از بین رفته، ولی قسمت‌های بالاتر سبز مانده و باززایی از این قسمت‌ها صورت می‌گرفت (شکل ۱f). با این وجود، پس از گذشت چند روز این شاخساره‌ها نیز، از بین می‌رفتند. بنابراین برحسب نتایج به‌دست‌آمده، برای انتقال ژن *gus*، از دو سطح غلظت در هر انتخابگر استفاده شد. اولین سطح همان سطح آستانه و دومین آن، یک سطح پایین‌تر از سطح آستانه در نظر گرفته شد. سطح پایین‌تر از سطح آستانه، با این فرض انتخاب شد که در شرایط انتقال ژن، حضور *اگروباکتریوم* و اضافه کردن آنتی‌بیوتیک مهار کننده آن (سفوتاکسیم)، علاوه بر فشار عوامل انتخابگر (کانامایسین یا فسفینوتراسین) برای انتخاب سلول‌های تراریخته، سبب تنش و کاهش شدید میزان باززایی می‌شود. بنابراین داشتن تیماری که یک سطح از سطح آستانه تحمل ریزنمونه‌ها، پایین‌تر باشد، می‌تواند باززایی بیشتری را موجب شود و در نهایت می‌توان با استفاده از PCR، شاخساره‌های تراریخته باززا شده در میان غیرتراریخته‌ها را، غربال کرد. بنابراین در ادامه، برای کانامایسین دو سطح ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم در لیتر و برای فسفینوتراسین، دو سطح ۱ و ۳ میلی‌گرم در لیتر انتخاب شدند.

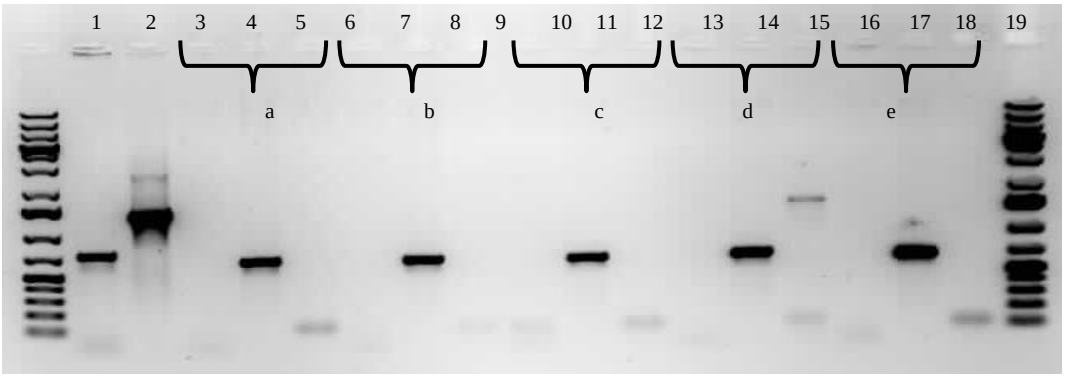
غربال شاخساره‌های تراریخته و تعیین درصد تراریختی با PCR و آزمون GUS

نتایج حاصل از سه نوع PCR با جفت آغازگرهای متفاوت برای هر شاخساره باززا شده در محیط انتخابی، بررسی و برای انتخاب شاخساره تراریخته در نظر گرفته شد. اولین PCR، جهت اطمینان از آلوده نبودن شاخساره به *اگروباکتریوم* بود[۱]؛ بنابراین آغازگرهای *virG* برای این منظور به‌کار رفت. برای کنترل مثبت *virG* از کلونی– PCR، *اگروباکتریوم* استفاده شد (شکل ۲). جفت پرایمر 18s لیموترش نیز جهت بالابردن اطمینان از قابلیت تکثیر DNA و صحت PCR، برای هر نمونه گیاهی، در نظر گرفته شد. بدیهی است به‌دلیل وجود قطعه مورد نظر 18s در ژنوم لیموترش، در تمامی نمونه‌های گیاهی که DNA آنها به‌درستی استخراج شده باشد، بایستی، باند مربوطه روی ژل مشاهده گردد. با این ترفند، احتمال از دست دادن شاخساره‌های تراریخته به سبب DNA استخراج شده نامطلوب و به دنبال آن، نبود باند قطعه ژنی *gus* (منفی کاذب)، به حداقل می‌رسد. جفت آغازگر سوم، مربوط به تکثیر قطعه ژنی *gus* است و نمونه‌هایی که دارای این باند بوده و باند مربوط به *virG اگروباکتریوم* را نداشتند، به‌عنوان شاخساره‌های تراریخته انتخاب شدند (شکل ۲). نتایج حاصل از انتقال ژن شامل تعداد شاخساره باززاشده و تعداد شاخساره‌های تراریخته حاصل از آنها و درصد تراریختی در جدول ۴ آورده شده است.

تعداد شاخساره‌های باززاشده، تعداد شاخساره‌های تراریخته حاصل و درصد تراریختی در دو نوع عامل انتخابگر فسفینوتراسین و کانامایسین و همچنین در سطوح مختلف آنها برای دو ریزنمونه اپی‌کوتیل و میانگره کاملا باهم متفاوت بود. فشار انتخاب در مورد

۱. لازم به ذکر است فقط ژن *gus* موجود در پلاسمید pBI121، قابلیت بیان در *اگروباکتریوم* را دارد. در مورد پلاسمیدpCAMBIA3301، چون ژن *gus* حاوی اینترون است، بیان آن فقط در یک سلول یوکاریوتی (گیاه) می‌تواند اتفاق بیافتد.

عامل انتخابگر کانامایسین، به مراتب بیشتر بود. به‌طوری که گیاهان باززا شده در این نوع محیط‌ها، به نسبت در هر دو ریزنمونه، کمتر از آنهایی بود که در محیط انتخابی فسفینوترایسین قرار داشتند. (جدول ۴). این روند در بررسی وضعیت ظاهری شاخساره‌ها و باززایی آنها در شرایط و تحت عوامل گوناگون نیز، مشهود بود.



شکل ۲. نتایج PCR برای غربال شاخساره‌های تراریخته باززا شده در محیط انتخابی حاوی ۲۵ میلی‌گرم در لیتر کانامایسین. a: شاخساره شاهد منفی (غیرتراریخته)، b، c، d و e: شاخساره‌های تراریخته احتمالی. ردیف‌های ۱ و ۱۹: 1kb plus ladder، ۲: PCR-کلونی *اگروباکتریوم* LBA4404 با آغازگر VirG (کنترل مثبت)، ۳: پلاسمید pBI121 با آغازگر GUS (کنترل مثبت)، ردیف‌های ۴، ۷، ۱۰، ۱۳ و ۱۶ نمونه‌های گیاهی با آغازگر VirG، ردیف‌های ۵، ۸، ۱۱، ۱۴ و ۱۷ نمونه‌های گیاهی با آغازگر 18s و ردیف‌های ۶، ۹، ۱۲، ۱۵ و ۱۸ نمونه‌های گیاهی با آغازگر GUS.

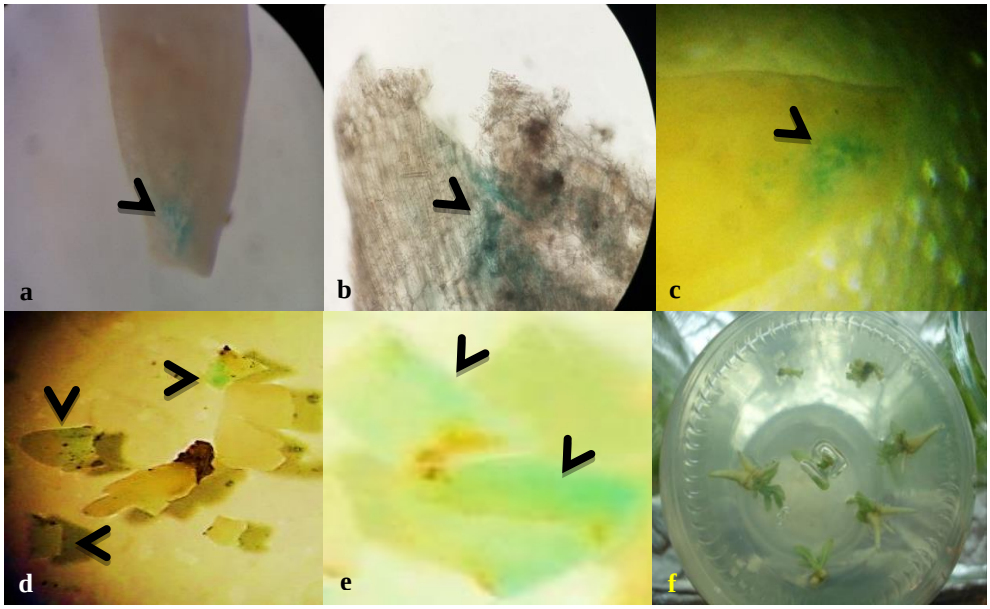
جدول ۴. تأثیر نوع ریزنمونه و نوع و سطح عامل انتخابگر در تعداد شاخساره‌های تراریخته و غیرتراریخته باززاشده

نوع ریزنمونه	عامل انتخابگر	سطح انتخاب (mg/l)	تعداد کل ریزنمونه‌ها	تعداد شاخساره‌های باززاشده در محیط انتخابی	تعداد شاخساره-های PCR^+	تعداد شاخساره‌های GUS^+	درصد تراریختی (٪)
میانگره	فسفینوترایسین	1	120	107	1	1	0.93
		3	120	74	3	3	4.05
	کانامایسین	25	120	18	1	1	5.56
		50	120	4	0	0	0
اپی‌کوتیل	فسفینوترایسین	1	120	98	2	2	2.04
		3	120	62	5	5	8.06
	کانامایسین	25	120	20	1	1	5
		50	120	7	1	1	14.29
جمع کل			960	390	14	14	3.59

شادابی و رشد طبیعی شاخساره‌های باززاشده شاهد که تحت هیچ تنش انتخاب و فشار *اگروباکتریوم* نبوده‌اند، در مقایسه با شاخساره‌های تحت تنش، نشان داد که هر چقدر فشار عامل انتخابگر بیشتر باشد، تعداد شاخساره‌ها و همچنین رشد طولی آنها به شدت کاهش می‌یابد (شکل ۱g,h,i). به‌طوری که شاخساره‌های تولیدی در محیط انتخابی با سطح ۳ میلی‌گرم در لیتر فسفینوترایسین، از رشد پایین‌تری نسبت به سطح ۱ میلی‌گرم در لیتر، برخوردار بودند (شکل ۱j,k). در مقابل پدیده فرار شاخساره‌ها، در محیطی با عامل انتخابی کمتر، بیشتر اتفاق می‌افتاد.

جهت بررسی کیفی شاخساره‌های تراریخته از نظر شیمریک و همچنین اطمینان از غربال صحیح آنها توسط PCR، آزمون هیستوشیمیایی GUS، انجام شد (شکل ۳). از اوایل هفته سوم پس از تلقیح، با مطالعه ریزنمونه‌ها توسط آزمون GUS، در اوایل تمایز بافت‌ها و تشکیل هسته‌های رشد، مشخص شد که انتخاب سلول تراریخته در محیط انتخابی و تقسیم آن (با تشکیل توده سلولی یکنواخت آبی‌رنگ) در مراحل اول مطلوب بوده (شکل ۳a,b) و احتمالاً پس از رشد توده سلولی تراریخته و با کاهش یا خنثی‌کردن اثر عامل انتخابگر، سلول‌های غیرتراریخته اطراف این توده، فرصت تقسیم و تمایز پیدا کرده و به‌همراه سلول‌های تراریخته در تشکیل

شاخساره‌ها مشارکت می‌کنند. نتایج مقایسه دو روش PCR و آزمون GUS، نشان داد که تمامی شاخساره‌های غربال شده با PCR، تراریخته بود. با این وجود، در برخی نمونه‌های باززا شده در محیط فسفینوترایسین، پدیده شیمریک مشاهده شد (شکل ۳؛ c و d). اما در مورد شاخساره‌های حاصل از محیط انتخابی کانامایسین، آبی شدن نمونه‌ها یکنواخت بوده و بافت شیمری در آنها مشاهده نگردید (شکل ۳e).



شکل ۳. نتایج آزمون هیستوشیمیایی GUS و ریشه‌زایی شاخساره‌ها. a. تشخیص مراحل اولیه رشد و تمایز سلول‌های تراریخته در ریزنمونه اپی‌کوتیل به‌کمک آزمون GUS، b. سلول‌های تراریخته ریزنمونه اپی‌کوتیل با درشت‌نمایی بیشتر c. سلول‌های تراریخته در ریزنمونه میانگره d. تشخیص بافت‌های شیمری در برگ و قطعات شاخساره‌های باززاشده در محیط‌های حاوی فسفینوترایسین e. آزمون GUS و تشخیص آبی شدن یکنواخت کل دو قطعه برگی در شاخساره‌های باززاشده در محیط‌های حاوی کانامایسین f. ریشه‌زایی شاخساره‌های حاصل از محیط انتخابی فسفینوترایسین.

با بررسی تعداد کل شاخساره‌های باززاشده و درصد تراریختی برای هر ریزنمونه اپی‌کوتیل و میانگره و مقایسه آنها باهم، بدون در نظر گرفتن نوع و سطح عامل انتخابگر مشخص گردید که ریزنمونه اپی‌کوتیل، با این‌که از نظر تعداد شاخساره باززاشده (۱۸۷ عدد) از میانگره (۲۰۳ عدد) کمتر بود، ولی درصد تراریختی آن بیشتر و حدود دو برابر میانگره بوده و این نتیجه حاکی از این بود که فرار شاخساره‌ها در میانگره نسبت به اپی‌کوتیل بیشتر اتفاق می‌افتاد (جدول ۵). در مقایسه دو نوع عامل انتخابگر کانامایسین و فسفینوترایسین باهم (بدون در نظر گرفتن بقیه عوامل)، تعداد شاخساره باززاشده در محیط کانامایسین، حدود ۷ برابر کمتر از فسفینوترایسین بود. با این وجود درصد تراریختی در عامل انتخابگر کانامایسین حدود دوبرابر فسفینوترایسین مشاهده شد. انتخاب سطح مؤثر عامل انتخابگر، یک عامل بسیار مهم در موفقیت انتقال ژن است. نتایج تجمیع شده اطلاعات تحقیق حاضر، در جدول ۵ نشان می‌دهد که با وجود تعداد بیشتر شاخساره‌های (تراریخته و غیرتراریخته) باززاشده در محیط‌های با سطح انتخابی کمتر، درصد تراریختی و همچنین تعداد شاخساره‌های تراریخته در محیط‌هایی با سطح بالای عامل انتخابگر به‌مراتب بیشتر بوده و این درصد حدود سه برابر است. با این وجود با بررسی دقیق‌تر اطلاعات حاصل از جدول ۴ در مورد سطح بالای کانامایسین و عدم تولید هیچ

شاخساره تراریخته‌ای در این سطح، می‌توان چنین استنتاج کرد که در اغلب موارد در سطوح بالای انتخاب، درصد بالای تراریختی حاصل خواهد شد. ولی این امکان نیز وجود دارد که به‌دلیل فشار زیاد عامل انتخابگر، در تعداد کم ریزنمونه، هیچ شاخساره تراریخته‌ای باززا نشود. با این وجود برای اطمینان از موفقیت، بایستی تعداد ریزنمونه‌های تلقیح شده با اگروباکتریوم را به حدی بالا برد تا با بالابردن تعداد شاخساره‌های باززاشده، بتوان حداقل تعدادی شاخساره تراریخته در سطوح بالای انتخاب، به‌دست آورد.

جدول ۵. بررسی جداگانه اثرگذاری هر یک از عوامل بدون در نظر گرفتن تأثیر عوامل دیگر در تعداد شاخساره‌های باززاشده و میزان تراریختی

عامل موردمطالعه	کل شاخساره‌های باززاشده	تعداد شاخساره‌های تراریخته	درصد تراریختی (٪)
میانگره	203	5	2.5
اپی‌کوتیل	187	9	4.8
فسفینوتراپسین	341	11	3.2
کاناماپسین	49	3	6.12
سطوح پایین انتخابگرها	243	5	2.1
سطوح بالای انتخابگرها	147	9	6.1

شاخساره‌های تراریخته حاصل از دو نوع محیط انتخابگر کاناماپسین و فسفینوتراپسین، از ریزنمونه‌ها جدا شده و به محیط ریشه‌زایی منتقل شدند (جدول ۱). شاخساره‌هایی که در محیط انتخابی فسفینوتراپسین باززاشده بودند، قادر به ریشه‌زایی بودند (شکل ۳f). ولی شاخساره‌های حاصل از محیط انتخابی کاناماپسین به شدت نسبت به ریشه‌دهی سرسخت بوده و توانایی ریشه‌دهی نداشتند؛ بنابراین بهترین گزینه برای حفظ و انتقال آنها به محیط خارج شیشه، استفاده از روش ریزپیوندی بود. گیاهچه‌های ریشه‌دار برای سازگاری با محیط خارج شیشه، در مخلوطی از خاک، پیت‌ماس و پرلیت به نسبت ۲:۱:۱ منتقل شدند.

با مقایسه نتایج پژوهش‌های مختلف با نتایج حاصل از تحقیق حاضر، میتوان به روشنی به موانع ممکن و رفع آنها، در رسیدن به یک انتقال ژن موفق به گیاه لیموترش پی برد. معمولا، آسانترین روش استفاده از ژن‌های گزارشگر به‌طور انفرادی، ترکیب باهم و یا به‌همراه ژن اصلی است که به آسانی قابل ردیابی هستند و می‌توان در هر مرحله‌ای از انتقال ژن، میزان موفقیت آنها را ارزیابی کرد. به‌طور مثال شدت بیان چهار نوع راه‌انداز[1] به‌کمک ژن *gus* در لیموترش، در شرایط گوناگون، با هم مقایسه شدند (Dutt *et al*., 2012). در مطالعه دیگری، انتقال سازه‌های سنجاق‌سری-RNA خاموشی ژن[2] حاوی ژن‌های *bar* و ژن *wus* متصل به ژن *gus*، به پوملو (*C. maxima*) pommelo، صورت گرفت. بازدهی تراریختی به ترتیب در سازه‌های دارای ژن *Hyg* مقاومت به هایگرومایسین[3] (۲۰/۴۱ درصد)، ژن *bar* مسئول ایجاد مقاومت به فسفینوتراپسین (۱۹/۳۷ درصد) و همچنین ژن *nptII*، عامل مقاومت به کاناماپسین (۳/۲۱ درصد)، گزارش شد (Zhang *et al*., 2017). در حالیکه بیشترین درصد تراریختگی در تحقیق ما، در کاناماپسین به‌دست آمد و به‌طور متوسط درصد تراریختگی، در تیمارهای مربوط به کاناماپسین حداقل دو برابر فسفینوتراپسین بود. در پژوهش دیگری، سازه‌های خاموشی ژن بر علیه ویروس تریستزای متصل به ژن‌های *gus* و *gfp*، به ریزنمونه میانگره لیموترش انتقال و شاخساره‌های

۱ Promoter

۲ Hairpin RNA-mediated gene silencing

۳ Hygromycin

تراریخته، با کمک ژن‌های گزارشگر انتخاب و با تکنیک ریزپیوندی حفظ شدند (Soler *et al*., 2012). میزان باززایی و درصد تراریختی در لیموترش نسبت به بقیه مرکبات کمتر است و معمولاً برای حفظ شاخساره‌های تراریخته در مرکبات بایستی از تکنیک ریزپیوندی استفاده کرد (Cheng *et al*., 2015). به‌طور مثال، تعداد معدود شاخساره‌های تراریخته لیموترش دارای سازه خاموشی ژن *p23*، جهت بررسی تأثیر آن بر ویروس تریستزای مرکبات، با روش پیوند به گیاهان غیرتراریخت مطالعه گردید (Fagoaga *et al*., 2006). همچنین در پژوهش دیگری نیز، انتقال ژن *CBF3* گیاه آرابیدوپسیس به لیموترش با استفاده از ریزنمونه اپی‌کوتیل و محیط انتخابی هیگرومایسین با غلظت ۴ میلی‌گرم در لیتر، انجام شد که در نهایت محققین فقط سه گیاه تراریخته به‌دست آورند که از لحاظ مقاومت به خشکی و شوری با گیاه شاهد تفاوت معنی‌داری داشتند (Romero-Romero *et al*., 2020). در تحقیق دیگری، ژن *Attacin* را با راه‌انداز AtSuc2 مخصوص آوند آبکش به پرتقال *C. sinensis* ‘Hamlin’، برای القای مقاومت به *Candidatus* Liberibacter spp. منتقل کردند. در کل ۳۴ شاخساره تراریخته از ریزنمونه اپی‌کوتیل در محیط انتخابی کانامایسین، توسط PCR غربال شد. شاخساره‌ها بر روی پایه *C. Carrizo citrange* (*sinensis* × *Poncirus trifoliata*) در شرایط *in vitro* ریزپیوند شدند (Tavano *et al*., 2015). در نارنج *C. aurantium*، دیگر گیاه همخانواده لیموترش، انتقال سازه‌هایی برای کنترل بیماری تریستزا، با کمک ژن گزارشگر صورت گرفته است. سازه‌های خاموشی ژن برای سه ژن *p20*، *p23* و *p25* ویروس تریستزای مرکبات، با اتصال به ژن گزارشگر *gus* طراحی و از طریق ریزنمونه اپی‌کوتیل و با سطح انتخاب ۵۰ میلی‌گرم در لیتر کانامایسین، به آن منتقل شد (Cheng *et al*., 2015). اتصال ژن گزارشگر *gus* به‌منظور ردیابی و غربال شاخساره‌های تراریخته انجام شده بود. با این حال، در این تحقیق، هیچ گیاهچه‌ای از سازه *p23* به‌دست نیامد و تنها گیاه حاصل از سازه *p25*، به دلیل ضعف شدید و عدم رشد از تحقیقات حذف شد و فقط ۸ گیاهچه *p20* در آزمون‌های بعدی استفاده شدند. همانطور که ذکر شد براساس نتایج تحقیق حاضر، بالاترین درصد تراریختگی در سطح ۵۰ میلی‌گرم در لیتر کانامایسین، بدون حالت شیمری از ریزنمونه اپی‌کوتیل، حاصل شد. تیمارهای مربوط به *اگروباکتریوم* نیز جزء عوامل مؤثر در موفقیت انتقال ژن و بهبود آن است. در پژوهشی، سازه خاموشی ژن پوشش پروتئینی ویروس تریستزا، به نارنج *C. aurantium* منتقل شد (Sohani *et al*., 2015). در این تحقیق، تیمارهایی با مقادیر مختلف استوسرینگان (۰، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومول)، مدت زمان‌های تلقیح جداکشت با *اگروباکتریوم* (۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۲۵ دقیقه) و مدت زمان‌های هم‌کشتی (۱، ۲، ۳ و ۴ روزه)، انتقال ژن به ریزنمونه اپی‌کوتیل بررسی شده بود که بهترین نتیجه، با ۱۳/۷ درصد تراریختی، در تیمار ۵۰ میکرومول استوسرینگان، ۱۵ دقیقه تلقیح، و ۲ روز هم‌کشتی به‌دست آمد و شاخساره‌های تراریخته به‌کمک تکنیک ریزپیوندی در شرایط *in vitro* تبدیل به گیاهچه‌های کامل ریشه‌دار شدند.

در بسیاری از تحقیقات علمی، حتی با وجود ارائه داده‌های موثق، گزارشی که از میزان موفقیت انتقال یک ژن عنوان می‌شود، می‌تواند شبهه‌برانگیز باشد. به این دلیل که میزان یا درصد موفقیت انتقال ژن با استفاده از تکنیک‌های ملکولی همچون PCR، سادرن و یا وسترن عنوان می‌گردد. متاسفانه این تکنیک‌ها قادر به تفکیک گیاهان خالص از گیاهان شیمری نبوده و به همین دلیل برای دستیابی به

اطمینان کامل و به‌دست آوردن گیاهان یکدست تراریخته، بایستی، حداقل نتاج حاصل از نسل T_0 را بررسی کرد (Onwimol *et al*., 2017). برای رفع مشکل شیمری شدن در برخی پژوهش‌ها، یا سطح عامل انتخابگر را بالا می‌برند که همین عامل خود باعث پایین آمدن درصد تراریختگی است و یا از عوامل انتخابگر جایگزین استفاده می‌کنند (Domínguez *et al*., 2004). با این وجود حالت شیمری شدن در مرکبات و به‌ویژه لیموترش، پیچیده بوده و یک معضل اساسی محسوب می‌شود. در تحقیقی، با بررسی که بر روی لاین‌های تراریخته ژنوتیپ‌های مرکبات صورت گرفته، مشخص شد که حداقل در ۲۵ درصد آنها بیان ژن کم بوده و یا به‌طور کامل خاموش شده است. با بررسی‌های بیشتر مشخص گردید که این حالت ناشی از پدیده شیمری است که موجب شده حتی شاخساره‌های تراریخته PCR مثبت، عملا کارآیی نداشته و بازده انتقال ژن پایین‌تر از حالتی باشد که قبلا گزارش شده است. بنابراین پدیده شیمری شدن شاخساره‌های تراریخته یکی از عوامل کلیدی است که باعث بروز مشکلات زیاد اعم از صرف وقت و هزینه اضافی شده و یکی از علت‌های اصلی سخت بودن انتقال ژن به مرکبات و به‌ویژه لیموترش می‌باشد (Domínguez *et al*., 2004). پدیده شیمری شدن بوضوح در تحقیق حاضر در مورد عامل انتخابگر فسفینوتراسین مشاهده گردید.

یکی از فرضیه‌های دیگر در مورد سرسخت بودن برخی گیاهان به انتقال ژن، تقسیم سلولی کند آنها است و زمانی که تنش‌های ناشی از تلقیح با *اگروباکتریوم* نیز بر آن اضافه می‌شود، باعث بازدهی به مراتب کمتر آن می‌گردد. بنابراین برای کاهش این تنش‌ها، به‌کمک انواع آنتی‌اکسیدان‌ها، و ردیابی انواع تأثیرات آنها به‌کمک ژن *gus-egfp* مطالعه اخیر روی لیموترش صورت گرفت و نشان داد که می‌توان به‌کمک برخی از این آنتی‌اکسیدانها، تنش‌های حاصل از *اگروباکتریوم* را کاهش داد (Dutt *et al*., 2011). در تحقیق حاضر نیز، تنش بالای ناشی از حضور طولانی مدت *اگروباکتریوم* در کنار ریزنمونه‌ها، حتی در برخی تیمارها باعث لیز شدن و از بین رفتن کامل ریزنمونه‌ها می‌شد. ولی به نظر می‌رسد برعکس آنچه که عامل اصلی بازدهی کم تراریختگی، را ناشی از تقسیم سلولی کند عنوان می‌کند، در تحقیق ما، رشد سریعتر شاخساره‌ها و فرار آنها از فشار انتخابی در محیط حاوی فسفینوتراسین، دلیل اصلی درصد پایین تراریختی بوده است. زیرا فرض این‌که رشد و تمایز سریع باعث فرار شاخساره‌های غیر تراریخته شده و میزان شیمری شدن را شاخساره‌های تراریخته را افزایش داده، منطقی‌تر به نظر می‌رسد. فرضیه دیگری نیز برای به‌وجودآمدن حالت شیمری در ژنوتیپ‌های مختلف مرکبات بررسی شده است و آن حضور *اگروباکتریوم* است. حضور *اگروباکتریوم*، علاوه بر لیز کردن و از بین بردن ریزنمونه، می‌تواند یکی از عوامل شیمری شدن شاخساره‌ها باشد. در تحقیقی، اثر مدت زمان هم‌کشتی *اگروباکتریوم* با ژنوتیپ‌های مختلف مرکبات مطالعه شد و با استفاده از ژن‌های گزارشگر *gus* و *gfp* مشخص شد که هم‌کشتی با مدت زمان طولانی باعث حضور بیشتر *اگروباکتریوم*، در کنار ریزنمونه‌ها و ایجاد مقاومت القائی کاذب برای رشد و تمایز و فرار شاخساره‌های غیرتراریخته می‌شود که همین عامل، موجب ۱۲ درصدِ حالت شیمری شاخساره‌های تراریخته بوده است (Domínguez *et al*., 2004).

نتیجه‌گیری

عوامل زیادی در موفقیت انتقال ژن به یک گیاه دخیل هستند که برخی از آنها در این مطالعه بر روی انتقال ژن به گیاه سرسخت لیموترش بررسی شدند. براساس نتایج این تحقیق، تعیین شرایط بهینه برای تیمارهای *اگروباکتریوم* نشان داد که می‌توان با *اگروباکتریوم* LBA4404 و OD_{600} ۰/۵ و مدت زمان تلقیح بهینه برحسب نوع ریزنمونه و با مدت

زمان هم‌کشتی دو روزه، علاوه بر کنترل کامل رشد باکتری، به درصد مناسبی از انتقال ژن نیز دست یافت. از عوامل مهم دیگر و بسیار مؤثر، ایجاد شرایطی است که سلول‌های تراریخته، فرصت رشد و تمایز داشته باشند. به‌صورت پیش‌فرض، عوامل انتخابگر، باعث توقف رشد و یا از بین رفتن سلول‌های غیرتراریخته شده و بدین طریق با انتخاب سلول‌های تراریخته، اجازه تمایز و رشد را به آنها می‌دهند. ولی تأثیر فرایند انتخاب، پیچیده‌تر از یک فرض ساده است. چرا که تأثیر بهینه انتخابگرها، به عوامل بسیاری همچون، نوع گیاه و ژنوتیپ آن، نوع و اندازه ریزنمونه و سن آن، القای ترکیبات هورمونی و تأثیر آنها بر سرعت رشد و تمایز سلول‌ها و همچنین مکانیسم اثر عامل انتخابگر و بسیاری از عوامل محیطی و شرایط کشت بستگی دارد. به همین خاطر انتقال ژن در برخی از گیاهان مانند لیموترش، دشوارتر از بقیه گیاهان است و بهینه کردن این شرایط امری حیاتی در موفقیت آن خواهد بود. علاوه بر این، تأکید اصلی این مطالعه، بر روی کمیت و کیفیت انتقال ژن به لیموترش بوده است. جمع‌بندی نتایج این مطالعه در انتقال ژن به گیاه لیموترش نشان می‌دهد که به‌طور کلی استفاده از ریزنمونه اپی‌کوتیل نسبت به میانگره می‌تواند بازدهی بهتری داشته باشد. به نظر می‌رسد بافت نرم‌تر اپی‌کوتیل حساسیت بیشتری نسبت به بافت چوبی‌تر میانگره داشته و سلول‌های غیرتراریخته بهتر با عامل انتخابگر روبرو شده و از بین می‌روند. همچنین با مشاهدات دقیق‌تر مشخص شد که لایه‌های زیرین میانگره زودتر از بین رفته و تا از بین رفتن لایه‌های بالاتر، فرصتی برای تمایز و مقاومت در برابر عامل انتخابگر به سلول‌های غیرتراریخته داده می‌شود. همچنین با مقایسه کلی دو عامل انتخابگر مشخص شد با وجود این‌که تعداد باززایی شاخساره و تعداد شاخساره تراریخته در محیط فسفینوتریسین بیشتر از محیط‌های حاوی کانامایسین بوده است، ولی با این وجود بازده تولید شاخساره‌های تراریخته در مورد کانامایسین چه از نظر کمی (درصد تراریختی) و چه از نظر کیفی (شیمری نشدن) بیشتر از فسفینوتریسین است. هرچند ریشه‌زایی در شاخساره‌های رشد کرده در محیط کانامایسین با مشکل مواجه بود، ولی استفاده از تکنیک ریزپیوندی می‌تواند یک راه‌حل ایده‌آل باشد.

REFERENCES

Acanda Y, Canton M, Wu H, Zale J (2017). Kanamycin selection in temporary immersion bioreactors allows visual selection of transgenic citrus shoots. Plant Cell Tiss Org. 129(2): 351-357.

Agricultural Statistics (2019). Ministry of agriculture-jahad of Iran. Volume III. p. 163.

Cevik B, Lee RF, Niblett CL (2012). *Agrobacterium*-mediated transformation of grapefruit with the wild-type and mutant RNA-dependent RNA polymerase genes of Citrus tristeza virus. Turk J Agric For. 36(2): 195-206.

Cheng CZ, Yang JW, Yan HB, Bei XJ, Zhang YY, Lu ZM, Zhong GY (2015). Expressing p20 hairpin RNA of *Citrus tristeza* virus confers *Citrus aurantium* with tolerance/resistance against stem pitting and seedling yellow CTV strains. J. Integr. Agric. 14(9): 1767-1777.

Domínguez A, Cervera M, Pérez R M, Romero J, Fagoaga C, Cubero J, López M M, Juárez J A, Navarro L, Peña L (2004). Characterisation of regenerants obtained under selective conditions after *Agrobacterium*-mediated transformation of citrus explants reveals production of silenced and chimeric plants at unexpected high frequencies. Mol. Breed. 14(2): 171-183.

Domínguez A, de Mendoza A H, Guerri

J, Cambra M, Navarro L, Moreno P, Peña L (2002). Pathogen-derived resistance to *Citrus tristeza* virus (CTV) in transgenic Mexican lime (*Citrus aurantifolia* (Christ.) Swing.) plants expressing its *p25* coat protein gene. Mol. Breed. 10(1): 1-10.

Dominguez A, Guerri J, Cambra M, Navarro L, Moreno P, Pena L (2000). Efficient production of transgenic citrus plants expressing the coat protein gene of citrus tristeza virus. Plant Cell Rep. 19(4): 427-433.

Doyle JJ, Doyle JL (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus. 12(13): 39-40.

Dutt M, Ananthakrishnan G, Jaromin M K, Brlansky R H, Grosser J W (2012). Evaluation of four phloem-specific promoters in vegetative tissues of transgenic citrus plants. Tree Physiol. 32(1): 83-93.

Dutt M, Grosser J W (2009). Evaluation of parameters affecting Agrobacterium-mediated transformation of citrus. Plant Cell Tiss Org. 98(3): 331-340.

Dutt M, Vasconcellos M, Grosser JW (2011). Effects of antioxidants on *Agrobacterium*-mediated transformation and accelerated production of transgenic plants of Mexican lime (*Citrus aurantifolia* Swingle). Plant Cell Tiss Org. 107(1): 79-89.

Fagoaga C, López C, de Mendoza A H, Moreno P, Navarro L, Flores R, Peña L (2006). Post-transcriptional gene silencing of the p23 silencing suppressor of Citrus tristeza virus confers resistance to the virus in transgenic Mexican lime. Plant Mol. Biol. 60(2): 153-165.

Fang LI, Dai SM, Deng ZN, Li DZ, Long GY, Na LI, Yi LI, Gentile A (2017). Evaluation of parameters affecting *Agrobacterium*-mediated transient expression in citrus. J. Integr. Agric. 16(3): 572-579.

Ganjeh A, Rahimian H, Basavand E (2021). *Agrobacterium tumefaciens* causing crown and stem gall disease of citrus propagation nursery in Iran. J. Plant Pathol. 103(1): 355-355.

Ghaderi I, Sohani M M, Mahmoudi A (2018). Efficient genetic transformation of sour orange, *Citrus aurantium* L. using *Agrobacterium tumefaciens* containing the coat protein gene of Citrus tristeza virus. Plant Gene 14:7-11.

Ghorbel R, Domínguez A, Navarro L, Peña L (2000). High efficiency genetic transformation of sour orange (*Citrus aurantium*) and production of transgenic trees containing the coat protein gene of citrus tristeza virus Tree Physiol. 20(17): 1183-1189.

Gutiérrez-e M A, Luth D, Moore G A (1997). Factors affecting *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 Rep. 16(11): 745-753.

Holsters M, De Waele D, Depicker A, Messens E, Van Montagu M, Schell J, (1978). Transfection and transformation of *Agrobacterium tumefaciens*. Molec. gen. Genet.163(2): 181-187.

Hu W, Fagundez S, Katin-Grazzini L, Li Y, Li W, Chen Y, Wang X, Deng Z, Xie S, McAvoy RJ, Li Y (2017). Endogenous auxin and its manipulation influence *in vitro* shoot organogenesis of citrus epicotyl explants. Hortic. Res. 4(1):1-6.

Hu W, Li W, Xie S, Fagundez S, McAvoy R, Deng Z, Li Y (2016). *Kn1* gene overexpression drastically improves genetic transformation efficiencies of citrus cultivars. Plant Cell Tiss Org. 125(1): 81-91.

Jardak R, Boubakri H, Zemni H, Gandoura S, Mejri S, Mliki A, Ghorbel A (2020). Establishment of an *in vitro* regeneration system and genetic transformation of the Tunisian 'Maltese half-blood' (*Citrus sinensis*): an agro-economically important variety. 3 Biotech. 10(3): 1-11.

Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW (1987). GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. EMBO J. 6(13): 3901-3907.

Lopez C, Cervera M, Fagoaga C, Moreno P, Navarro L, Flores R, Pena L (2010). Accumulation of transgene derived siRNAs is not sufficient for RNAi mediated protection against Citrus tristeza virus in transgenic Mexican lime. Mol. Plant Pathol. 11(1): 33-41.

Niedz RP, Albano JP, Marutani-Hert M (2015). Effect of various factors on shoot regeneration from citrus epicotyl explants. J Appl Hortic 17(2):121-128.

Oliveira M L P, Moore G, Thomson J G (2015). Agrobacterium-Mediated Transformation of Mexican Lime (*Citrus aurantifolia* Swingle) Using Optimized Systems for Epicotyls and Cotyledons. Adv Biosci Biotechnol. 6(11): 657.

Onwimol P, Chanprame S, Chanprame S (2017). *Agrobacterium*-mediated transformation of *Cry1Ab* gene into *Tectona grandis* L. (teak). J. Assoc. 23(1): 68-78.

Poles L, Licciardello C, Distefano G, Nicolosi E, Gentile A, La Malfa S (2020). Recent advances of in vitro culture for the application of new breeding techniques in Citrus. Plants. 9(8): 938.

Romero-Romero J L, Inostroza-Blancheteau C, Reyes-Díaz M, Matte J P, Aquea F, Espinoza C, Gil P M, Arce-Johnson P (2020). Increased drought and salinity tolerance in *Citrus aurantifolia* (Mexican lemon) plants overexpressing arabidopsis CBF3 gene. J. Soil Sci. Plant Nutr. 20(1): 244-252.

Silva R P D, Souza A J D, Mendes B M J, Mourão Filho F D A A (2010). Sour orange bud regeneration and *in vitro* plant development related to culture medium composition and explant type. Rev Bras Frutic. 32(1): 1-8.

Sohani M M, Rezadoost M H, Zamani A H, Mirzaei M R, Afsharifar A (2015). High efficiency *Agrobacterium*-mediated transformation of sour orange (*Citrus aurantium* L.) using gene encoding Citrus Tristeza Virus coat protein. J. Appl. Hortic. 17(2): 109-114.

Wu H, Acanda Y, Canton M, Zale J (2019). Efficient biolistic transformation of immature citrus rootstocks using phosphomannose-isomerase selection. Plants. 8(10): 390.

Zhang Y Y, Zhang D M, Zhong Y, Chang X J, Hu M L, Cheng CZ (2017) A simple and efficient in planta transformation method for pommelo (*Citrus maxima*) using *Agrobacterium tumefaciens*. Sci. Hortic. 214: 174-179.