

ارزیابی بیان موقت ژن‌های *ASI* و *4'CGT* در گلبرگ‌های بنفشه آفریقایی با سیستم اگر و اینفیلتریشن جهت تولید رنگ جدید در گل

امیر رجبی^۱، لیلا فهمیده^{۲*}، مجتبی کیخصابر^۳ و ولی‌اله قاسمی عمران^۴

^۱ ایران، زابل، دانشگاه زابل، دانشکده کشاورزی، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی

^۲ ایران، گرگان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، دانشکده تولید گیاهی، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی

^۳ ایران، زابل، دانشگاه زابل، دانشکده کشاورزی، گروه گیاهپزشکی

^۴ ایران، ساری، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری طبرستان

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۷/۱۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۸/۲۴

چکیده

تولید ارقام زینتی با رنگ‌های جدید هدف اصلی در صنعت گل و گیاهان زینتی است. بنفشه آفریقایی از لحاظ تجاری به خوبی شناخته شده و در رنگ‌های مختلفی به جز گل زرد موجود است. این پژوهش با هدف تغییر رنگ گلبرگ‌های بنفشه آفریقایی و تولید مسیر بیوسنتزی رنگدانه آئورون از طریق دست‌ورزی ژنتیکی ژن‌های *ASI* و *4'CGT* انجام شد. بدین منظور، این ژن‌ها با استفاده از PCR با آغازگرهای اختصاصی از گلبرگ گل میمون زرد جداسازی و بترتیب در ناقل بیانی pCAMBIA1304 و pBI121 اتصال گردید. پلاسمیدهای نو ترکیب pBI121+4'CGT و pCAMBIA1304+ASI با استفاده از بررسی‌های Colony PCR، هضم آنزیم، توالی‌یابی و هم‌ردیف سازی آن‌ها در بانک اطلاعاتی، مورد تایید قرار گرفت. سپس به روش الکتروپوریشن به آگروباکتریوم سویه *LBA4404* منتقل و با استفاده از سیستم بیان موقت در گلبرگ‌های گیاه بنفشه آفریقایی مورد بررسی قرار گرفت. در این سیستم سوسپانسیون آگروباکتریوم حامل سازه ژنی با استفاده از سرنگ در پایه گلبرگ‌ها تزریق شد. نتایج مورفولوژیکی پس از ۳ روز به وضوح تغییر رنگ گلبرگ‌های سفید به زرد کم رنگ را نشان داد و هیچ تغییری در گلبرگ‌های شاهد مشاهده نشد. آنالیز PCR و مشاهده با میکروسکوپ نوری بترتیب بیان ژن و تغییرات فنوتیپی را تایید کردند. همچنین آنوروسیدین-۶-او- گلوکزید (*AOG*) با استفاده از HPLC-DAD-MSⁿ در گلبرگ‌های تراریخت شناسایی شد. با بکارگیری این سیستم می‌توان سازه ژنی را با اعتماد بیشتری برای تراریختگی دائم به گیاهان زینتی انتقال داد. همچنین این پژوهش می‌تواند راهی را برای مهندسی ایجاد رنگ زرد در گونه‌های گیاهان زینتی که فاقد این نوع رنگ هستند باز نماید.

واژه‌های کلیدی: آنورون، آنتوسیانین، رنگ گل، گیاهان زینتی، مهندسی ژنتیک

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۱۷۳۲۲۵۱۶۷۲، پست الکترونیکی: l.fahmideh@gau.ac.ir

مقدمه

بنفشه آفریقایی (*Saintpaulia ionantha*) از خانواده Gesneriaceae، یکی از مهم‌ترین گیاهان زینتی تجاری محبوب با ارقام بسیار در سراسر جهان بشمار می‌رود (۲۵). امروزه پرورش این گونه گیاهی در حوزه علوم باغبانی به شکل صنعت در آمده است. همچنین تا سال ۲۰۱۷ حدود ۲۵ گونه در این جنس با رنگ‌های متنوع گل گزارش شده است (۲۴) که فاقد واریته‌های زرد رنگ و نارنجی هستند (۲۵). از جمله موفقیت‌های حاصل از بکارگیری مهندسی ژنتیک در اصلاح گیاهان زینتی، می‌توان به ایجاد رنگ‌های ویژه نوین در گل‌های زینتی اشاره کرد (۱۷). تنوع در رنگ

گل با استفاده از مهندسی ژنتیک بر ایجاد تغییر در مسیرهای متابولیکی تولید فلاونوئیدها متمرکز شده است (۱۶). رنگدانه‌ها در گیاهان عالی، در چهار گروه بزرگ کلروفیل‌ها، کاروتنوئیدها، فلاونوئیدها (آنتوسیانین‌ها) و بتالائین‌ها قرار دارند (۶، ۲۳).

همچنان که در شکل ۱ نشان داده شده است، مسیر بیوسنتزی فلاونوئیدها یکی از گسترده‌ترین مسیرهای تحقیق در متابولیسم گیاهی است که از مسیر فنیل پروپانوئیدی و از اسیدآمینو فنیل آلانین ساخته می‌شوند (۵). اولین مرحله در ساخت فلاونوئیدها، تولید ترکیب واسطه‌ای مهم، به نام تتراهیدروکسی چالکون (Tetrahydroxy chalcone) (*THC*) توسط آنزیم چالکون سنتاز (*Chalcone synthase*) (*CHS*) می‌باشد. تتراهیدروکسی چالکون به وسیله آنزیم چالکون ایزومراز (*Chalcone isomerase*) (*CHI*) به نارینجین (*Naringenin*) تبدیل می‌شود (۱۴). با وجود تعداد زیادی از آنتوسیانین‌ها و تنوع رنگ گل، تنها شش کلاس اصلی آنتوسیانیدین وجود دارد: پلارگونیدین، سیانیدین، پونیدین، دلفینیدین، پتونیدین و مالویدین. دارای طیف گسترده‌ای از رنگ‌ها، از زرد کم رنگ تا آبی هستند (۲۶). گل‌های به رنگ آبی/بنفش حاوی آنتوسیانین‌های مبتنی بر دلفینیدین ۳-گلوکوزید، گل‌های قرمز/قرمز حاوی آنتوسیانین‌های غنی از سیانیدین ۳-گلوکوزید و گل‌های نارنجی/قرمز آجری حاوی آنتوسیانین‌های مبتنی بر پلارگونیدین ۳-گلوکوزید هستند (۲۹).

از آنجا که انتقال ژن و بازایی بیشتر گیاهان عالی زمان‌بر و پرهزینه است، بنابراین بیان موقت ژن‌های بیگانه در بافت‌های گیاهی، روشی ارزشمند در بیوتکنولوژی گیاهی است و برای آنالیز عملکرد ژن در زمان کوتاه روش کارآمدی می‌باشد. این روش سریع، انعطاف‌پذیر، ساده، بی‌نیاز به کشت‌بافت و در بافت‌های تمایز یافته قابل اجرا بوده و همچنین تحت تأثیر محیط نیست (۷). آزمون‌های بیان موقت ژن (سیستم اگرواینفیلتریشن) بعنوان یک راهکار مناسب برای پیش‌بینی وضعیت تراریختی پایدار بکار می‌رود و امکان بررسی بیان و عملکرد برخی از ژن‌ها را در چند روز فراهم می‌نماید (۲۸).

هر چند که امروزه همچنان از این روش برای بررسی مکانیزم خاموشی ژن با تحریک ویروس بهره‌گیری می‌شود (۳۱). در حالت بیان پایدار ژن و تراریخت کردن با آگروباکتریوم، T-DNA حامل ژن یا ژن‌های مورد نظر با ژنگان میزبان تلفیق می‌شود. در حالی که در بیان موقت، نسخه‌هایی از T-DNA تلفیق نشده در هسته یاخته‌های میزبان وارد شده و می‌توانند ۱۰۰۰ مرتبه بیشتر از حالت پایدار بیان شوند (۱۱). همچنین می‌توان با این روش میزان بیان ژن‌ها را در یک زمان کوتاه بدون نیاز به بازایی یاخته‌های تراریخت، ارزیابی کرد. از طرف دیگر این روش برای بیان ژن‌های نسبتاً بزرگ (بزرگتر از ۲ kb) هم مناسب است (۱۱). در پژوهشی با استفاده از سیستم بیان موقت اگرواینفیلتریشن و با انتقال دو سازه ژنی فلاونوئید ۳، ۵-هیدروکسیلاز از گل اطلسی و *DFR* از زنبق در گلبرگ‌های

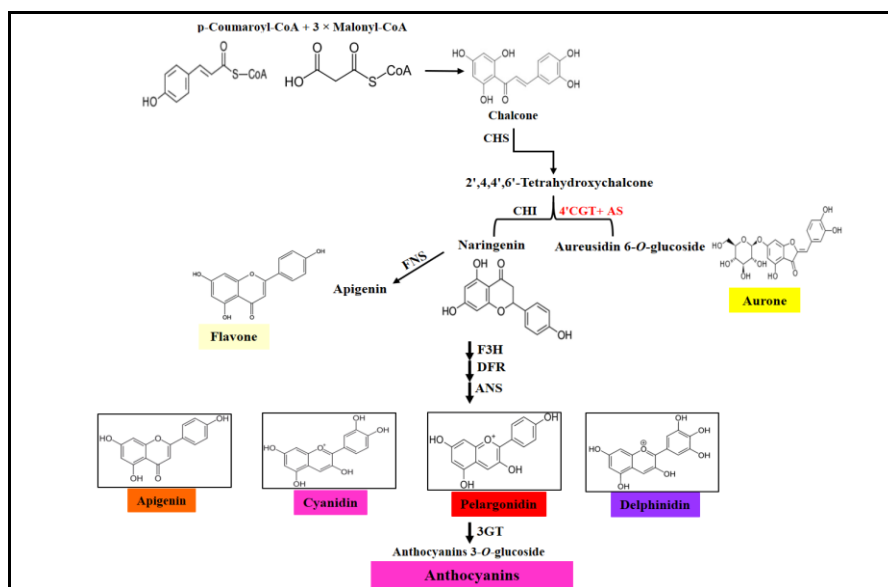
گل با استفاده از مهندسی ژنتیک بر ایجاد تغییر در مسیرهای متابولیکی تولید فلاونوئیدها متمرکز شده است (۱۶). رنگدانه‌ها در گیاهان عالی، در چهار گروه بزرگ کلروفیل‌ها، کاروتنوئیدها، فلاونوئیدها (آنتوسیانین‌ها) و بتالائین‌ها قرار دارند (۶، ۲۳).

همچنان که در شکل ۱ نشان داده شده است، مسیر بیوسنتزی فلاونوئیدها یکی از گسترده‌ترین مسیرهای تحقیق در متابولیسم گیاهی است که از مسیر فنیل پروپانوئیدی و از اسیدآمینو فنیل آلانین ساخته می‌شوند (۵). اولین مرحله در ساخت فلاونوئیدها، تولید ترکیب واسطه‌ای مهم، به نام تتراهیدروکسی چالکون (*Tetrahydroxy chalcone*) (*THC*) توسط آنزیم چالکون سنتاز (*Chalcone synthase*) (*CHS*) می‌باشد. تتراهیدروکسی چالکون به وسیله آنزیم چالکون ایزومراز (*Chalcone isomerase*) (*CHI*) به نارینجین (*Naringenin*) تبدیل می‌شود (۱۴). با وجود تعداد زیادی از آنتوسیانین‌ها و تنوع رنگ گل، تنها شش کلاس اصلی آنتوسیانیدین وجود دارد: پلارگونیدین، سیانیدین، پونیدین، دلفینیدین، پتونیدین و مالویدین. دارای طیف گسترده‌ای از رنگ‌ها، از زرد کم رنگ تا آبی هستند (۲۶). گل‌های به رنگ آبی/بنفش حاوی آنتوسیانین‌های مبتنی بر دلفینیدین ۳-گلوکوزید، گل‌های قرمز/قرمز حاوی آنتوسیانین‌های غنی از سیانیدین ۳-گلوکوزید و گل‌های نارنجی/قرمز آجری حاوی آنتوسیانین‌های مبتنی بر پلارگونیدین ۳-گلوکوزید هستند (۲۹).

آنورون (*Aurone*)، یک کلاس از فلاونوئیدهای کمیاب می‌باشد که گل‌های زرد روشن‌تری را نسبت به چالکون‌ها می‌دهد و در تعداد محدودی از گونه‌ها مانند گل شاه اشرفی یا ستاره (*Cosmos bipinnatus*)، گل شصت‌عروسان (لیمونوم) و گل میمونی (*Antirrhinum majus*) یافت می‌شود (۲۳). تشکیل آنوروسیدین و براکتیاتین بترتیب از تتراهیدروکسیلاز چالکون و پنتا

فلاونوئید ۵،۳- هیدروکسیلاز از گل بنفشه و ژن *DFR* از زنبق هلندی) به گلبرگ‌های گل ژاله تولید دلفینیدین مشاهده شد (۱۵).

ژاله، رنگ آبی در کلاله و دانه‌های گرده ایجاد شد (۱۰). در پژوهشی دیگر با استفاده از سیستم بیان موقت و با انتقال سازه‌های تک ژنی (حمل‌کننده ژن فلاونوئید ۵،۳- هیدروکسیلاز از گل بنفشه) و دو ژنی (حمل‌کننده ژن



شکل ۱- مسیر زیست‌ساخت فلاونوئیدها (آئورون) از اسید آمینه فنیل آلانین برای ایجاد رنگ گل در گیاهان زینتی (۱۸).

گلبرگ‌های گیاه بنفشه آفریقایی سفید، انتقال سازه‌های ژنی از طریق روش انتقال بیان موقت و ارزیابی مولکولی گیاهان تراریخته بنفشه آفریقایی با روش بیان موقت از طریق روش‌های آزمون‌های PCR و میکروسکوپ نوری.

مواد و روشها

طراحی و ساخت سازه‌های ژنی *ASI* و *4'CGT*: در این پژوهش که در پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری طبرستان انجام شد از دو سازه ژنی برای ایجاد تغییر رنگ گل به رنگ زرد و تولید مسیر بیوسنتزی رنگدانه آئورون استفاده شد. با استفاده از بانک اطلاعاتی NCBI و BLAST، توالی نوکلئوتیدی و اسید آمینه‌ای ژن‌های *4'CGT* و *ASI* در گیاه زینتی گل میمونی بترتیب با شماره دسترسی- AB198665 و AB044884 به همراه سایر ویژگی‌ها (ویژگی‌های توالی‌های مورد بررسی از جمله طول mRNA، cDNA، تعداد اگزون و اینترون، طول پروتئین و شماره دسترسی توالی‌ها) مورد بررسی قرار گرفت. پس از دریافت

با وجود پالت بزرگ رنگی موجود در میان گونه‌های بنفشه آفریقایی، تغییر رنگ گل توسط مهندسی ژنتیک هنوز در بنفشه آفریقایی گزارش نشده است. اگر چه منابع غنی در ارقام گیاه زینتی بنفشه آفریقایی با رنگ‌های متنوع وجود دارد ولی فاقد واریته زرد رنگ است. بنابراین با توجه به محبوبیت گیاه زینتی بنفشه آفریقایی در میان گل‌های زینتی، در صورت موفقیت و دستیابی به گلبرگ‌هایی با رنگ نوین زرد، گیاه زینتی مورد نظر از لحاظ تجاری بسیار با ارزش خواهد شد و می‌تواند دارای اهمیت قابل توجهی در بازار باشد. لذا این پژوهش به مطالعه‌ی تغییر رنگ گل بنفشه آفریقایی و تولید مسیر بیوسنتزی رنگدانه آئورون با استفاده از سیستم اگرواینفیلتریشن می‌پردازد. اهداف این پژوهش عبارتند: جداسازی ژن‌های درگیر در مسیر بیوسنتزی آئورون در گل میمون، ساخت سازه‌های ژنی *pCambia1304+ASI* و *pBI121+4'CGT* و انتقال دو سازه ژنی با هم به اگروباکتریوم سویه *LBA4404* تغییر مسیر بیوسنتزی به سمت آئورون برای ایجاد رنگ زرد در

در ناقل pBI121 و ژن *ASI* در ناقل pCambia1304 در سمت ۵' و ۳' کلون شد و پلاسمیدهای نوترکیب به دست آمده بترتیب pBI121-4'*CGT* و pCambia1304-*ASI* (شکل ۲) نامیده شدند. پلاسمیدهای نوترکیب حاصل با استفاده از روش‌های کلونی PCR، الگوی هضم آنزیمی توسط آنزیم‌های ذکر شده برای هر ناقل و توالی‌یابی مورد بررسی صحت همسانه‌سازی قرار گرفت.

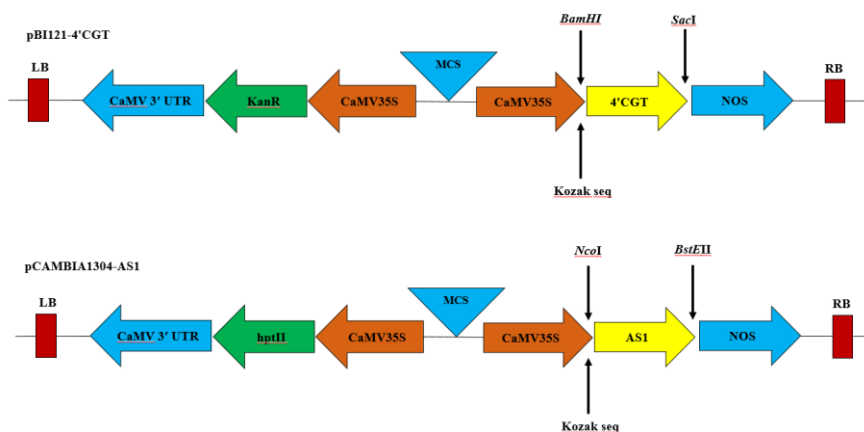
از آگروباکتریوم سویه *LBA4404* برای انتقال ژن به گیاه استفاده شد. پس از تهیه سلول‌های مستعد از آگروباکتریوم، انتقال پلاسمیدهای نوترکیب بطور همزمان با همدیگر و با میزان مناسب از هر دو ناقل (۱۰۰ ng/μl) با استفاده از روش الکتروپوریشن انتقال داده شد و بر روی محیط انتخابی LB آگار حاوی آنتی‌بیوتیک‌های مناسب ریفامپیسین ۵۰ mg l⁻¹ و کانامایسین ۵۰ mg l⁻¹ کشت شدند و در ۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ شبانه روز در تاریکی انکوبه گردیدند. سپس مجدد درستی تراریخته بودن کلونی‌های نوترکیب که بر روی محیط انتخابی رشد کرده بودند با آزمون کلونی PCR به تایید رسید.

انتقال سازه ژنی با سیستم بیان زودگذر (اگرواینفیلتریشن) در گلبرگ بنفشه آفریقایی: جهت آماده‌سازی محلول اگرواینفیلتریشن برای تزریق، ابتدا آگروباکتریوم حاوی سازه ژنی روی محیط‌کشت جامد لوریا-برتانی (LB) دارای آنتی‌بیوتیک‌های ریفامپیسین ۵۰ mg l⁻¹ و کانامایسین ۵۰ mg l⁻¹ به مدت ۳ روز در تاریکی و در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد کشت شد.

تمام توالی‌ها، توالی‌های تکراری حذف و در نهایت تائید وجود ژن‌ها در توالی‌های شناسایی شده با استفاده از پایگاه داده CDD انجام گردید. پرایمرهای اختصاصی ژن *ASI* با توجه به توالی جایگاه‌های برشی آنزیم‌های *Nco I* و *BstE* II در ناقل pCambia1304 و ژن 4'*CGT* با توالی جایگاه‌های برشی آنزیم‌های *Sac I* و *BamH I* در ناقل pBI121 با استفاده از نرم‌افزار Oligo 7 طراحی شدند. به منظور افزایش کارایی هضم توسط آنزیم‌های برشی از جدول Cleavage Close to the End of DNA Fragments استفاده شد. رشته‌های اولیگونوکلوئوتیدی استفاده شده بعنوان آغازگر در این پژوهش در جدول ۱ آورده شده‌اند. واکنش‌های تکثیر ژن‌های مورد بررسی به ترتیب بصورت جداگانه با آغازگرهای اختصاصی مربوطه و با برنامه دمایی، واسرشتگی اولیه ۵ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد، واسرشتگی ۱ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، اتصال ۱ دقیقه در ۶۰ درجه سانتی‌گراد، گسترش ۴ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد و گسترش نهایی ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد طی ۳۵ چرخه انجام شد. در واکنش PCR از cDNA بعنوان الگو استفاده شد. پس از بررسی نتایج واکنش PCR روی ژل آگاروز یک درصد و تأیید اندازه، قطعات تکثیری با استفاده از کیت استخراج از ژل شرکت طبق دستورالعمل شرکت سازنده جداسازی و خالص سازی شدند. پس از خالص سازی قطعات، واکنش اتصال بین این قطعات و پلاسمیدهای مورد نظر توسط آنزیم DNA لیگاز T4 انجام شد. در ادامه پلاسمیدهای نوترکیب حاصل با استفاده از روش شوک حرارتی به باکتری مستعد *E. coli* سویه DH5α منتقل شدند. بدین ترتیب، ژن 4'*CGT*

جدول ۱- پرایمرهای مورد استفاده برای PCR و توالی‌یابی

No	پرایمر رفت	توالی (5'-Sequence-3')	پرایمر برگشت	توالی (5'-Sequence-3')
۱	<i>BamH I</i> - 4' <i>CGT</i> -FW	GGGGATCCATGGGAGAAGAATA CAAGAAA	<i>Sac I</i> - 4' <i>CGT</i> -RV	GGGAGCTCTTAACGAGTGAC CGAGTTGAT
۲	<i>Nco I</i> - <i>ASI</i> -FW	GGCCATGGATGTTCAAAAATCCT AATATC	<i>BstE</i> II - <i>ASI</i> -RV	GGGGTTACCTTAGCCATCAAG CTCAATCTT



شکل ۲- طرح شماتیک سازه‌های ژنی. (الف): pBI121-4'CGT این سازه دارای ژن مقاومت به کانامایسین (KanR)، محل‌های برشی *BamH I* و *Sac I*، پیش‌برنده *CaM35S*، توالی خاتمه‌دهنده نسخه‌برداری (NOS)، توالی افزایش دهنده بیانی (Kozak sequence)، توالی‌های مرزی چپ (LB) و راست (RB) و ژن (*4'CGT*) می‌باشد. (ب): pCambia1304-ASI این سازه دارای ژن مقاومت به هیگرومایسین (*hpt II*)، محل‌های برشی *Nco I* و *BstE II*، پیش‌برنده *CaM35S*، توالی خاتمه‌دهنده نسخه‌برداری (NOS)، توالی افزایش دهنده بیانی (Kozak sequence)، توالی‌های مرزی چپ (LB) و راست (RB) و ژن (*ASI*) می‌باشد.

محلول آگرواینفیلتریشن بدون سازه ژنی و نمونه تزریق شده با محلول آگرواینفیلتریشن حاوی سازه ژنی در بخش-های پایه گلب‌رگ‌های سفید بنفشه آفریقایی سرنگ بدون سوزن تزریق شد. پس از ۳ روز از تزریق محلول آگرواینفیلتریشن و مشاهده چشمی تغییر وضعیت نمونه‌ها، گلب‌رگ‌های که تزریق شده بودند جدا شدند و در دمای ۸۰- نگهداری شدند.

آنالیز میکروسکوپ نوری: گلب‌رگ‌های شاهد و تراریخت موقت (زرد رنگ) به قطعات ۵×۵ میلی‌متر برش عرضی داده شده و در ۴٪ آگارز تعبیه شدند. بخش‌های نازک (ضخامت ۱۰۰ میلی‌متر) با میکرو برش‌دهنده DTK-1000 (D.S.K.) برش داده شدند. سپس برای بررسی دقیق‌تر تغییر رنگ گلب‌رگ‌ها با استفاده از میکروسکوپ نوری مدل VH-Z75 (Keyence) مورد بررسی قرار گرفت.

آنالیزهای مولکولی: گلب‌رگ‌های شاهد و گلب‌رگ‌هایی تراریخته احتمالی تغییر رنگ یافته پس از استخراج DNA ژنومی برای تایید حضور بررسی دو قطعه ژنی با آزمون واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی طراحی شده آنالیز شدند.

آنالیز آنوروسیدین-۶-او- گلوکزید (AOG) با استفاده از HPLC-DAD-MSⁿ: ارزیابی AOG که محصول نهایی

پس از ۳ روز، با بهره‌گیری از کلونی‌های آگروباکتریوم رشد یافته، ۲۰ میلی‌لیتر محیط‌کشت مایع LB دارای آنتی-بیوتیک‌های ریفامپیسین 50 mg l^{-1} و کانامایسین 50 mg l^{-1} مایه کوبی شده و یک شبانه روز در دمای ۲۸ درجه سانتی-گراد و در شرایط تاریکی تکان داده شد. با گذشت یک روز، باکتری‌های رشد یافته در ۲۰ میلی‌لیتر LB، در ۳۲۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شده و بخش شناور آن را دور ریخته و رسوب چسبیده به ته فالكون را در محیط‌کشت AB (۲۲) به همراه ۲۴۰ میلی‌گرم مونوفسفات سدیم (NaH_2PO_4)، ۱۴/۷ گرم ۲-ان-مورفولینو اتان سولفونیک اسید (MES)، ۱۰ گرم در لیتر گلوکز و ۱۰۰ میکرومول استوسیرینگون (pH 5/5) رشد تعلیق کرده و به مدت ۶ ساعت در دمای اتاق و در تاریکی تکان داده شدند. سپس برای بار دوم این سوسپانسیون باکتری در ۳۲۰۰ دور در دقیقه و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردید و رسوب چسبیده به ته فالكون در محیط اینفیلتریشن (گلوکز ۱٪ و ۱۰۰ میکرومول استوسیرینگون) تعلیق شده و به گونه‌ای رقیق شد که چگالی چشمی (OD) آن به ۰/۵ تا ۰/۶ رسید. در این مرحله ۱ تا ۱/۵ میلی‌لیتر از محلول آگرواینفیلتریشن آماده شده با OD مورد نظر به نمونه‌های شاهد (بدون تزریق)، شاهد تزریق شده با

pCAMBIA1304: قرار گرفتن دو کاست ژنی *4'CGT* و *ASI* بترتیب در دو پلاسمید *pBI121* و *pCAMBIA1304* با هضم آنزیمی، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز و توالی‌یابی تایید شدند. بدین صورت که در محیط کشت *LB* حاوی *pBI121+4'CGT* اکثر کلونی‌های مقاوم در محیط انتخابی، باند مربوطه با اندازه (۱۳۷۴ جفت باز) دارا بودند، در حالیکه محیط کشت *LB* حاوی *ASI* *pCAMBIA1304+* تنها دو کلونی‌های مقاوم در محیط انتخابی، باند با اندازه مورد نظر (۱۶۸۹ جفت باز) را ایجاد کرد (شکل ۳). نتایج بدست آمده مشخص نمود که انتقال همزمان دو ناقل‌های نو ترکیب *pBI121+4'CGT* و *ASI* *pCAMBIA1304+* به سلول‌های مستعد آگروباکتریوم موفقیت آمیز بود و کلونی‌های نو ترکیب بر روی محیط انتخابی مشاهده شدند، که با آزمون *PCR* ترا ریخته بودن و وجود پلاسمیدها در آگروباکتریوم اثبات شد. کلونی‌های نو ترکیب در سطح محیط کشت *LB* حاوی آنتی‌بیوتیک‌های (ریفامپیسین 100 mg l^{-1} + کانامایسین 50 mg l^{-1}) انتخاب شده و سپس با روش *Colony PCR* و با استفاده از آگارگرهای اختصاصی، حضور دو قطعه ژنی (*4'CGT* و *ASI*) با همدیگر بترتیب با اندازه‌های ۱۳۷۴ و ۱۶۸۹ جفت بازی تایید شد (داده‌ها آورده نشده‌اند).

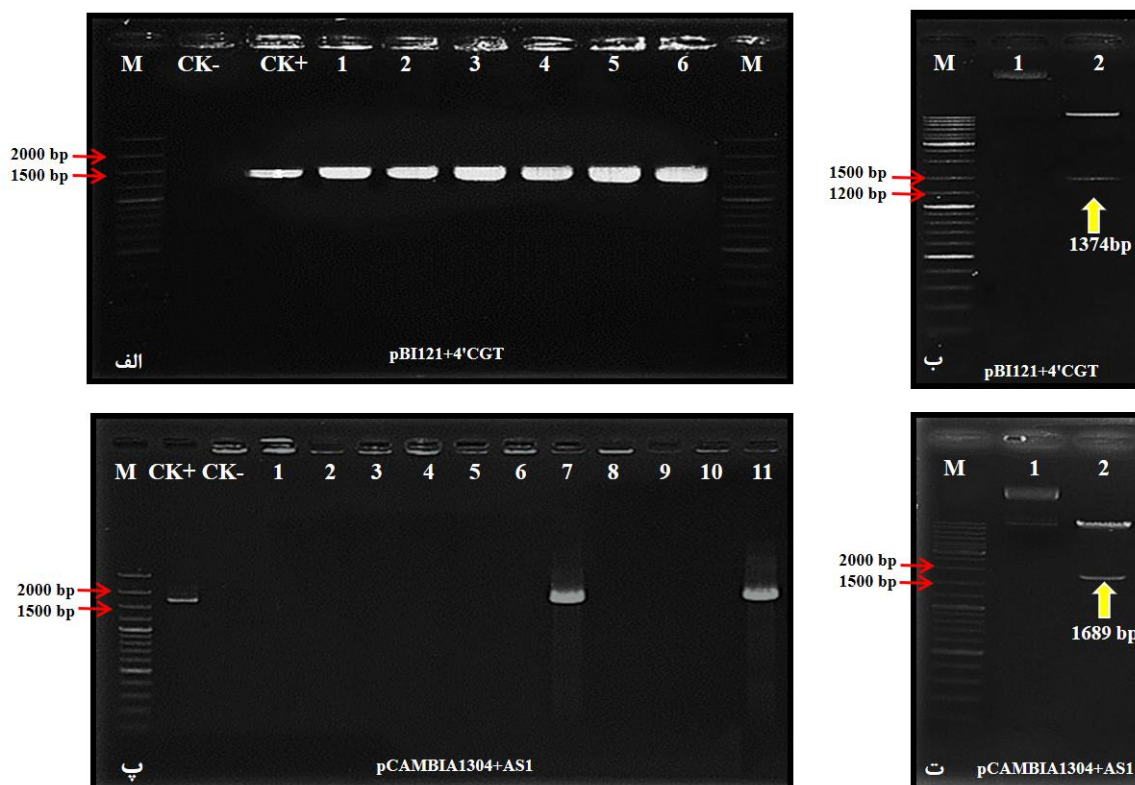
انتقال سازه ژنی و بررسی فنوتیپی گلبرگ‌های بنفشه آفریقایی ترا ریخت: گیاهان زینتی بنفشه آفریقایی- (*Saintpaulia* 'Jolly Diamond') برای ترا ریخته‌سازی موقت استفاده شدند. ابتدا بررسی تغییر رنگ گلبرگ‌ها با مشاهده چشمی مورد مطالعه قرار گرفتند.

مشاهده چشمی این آزمایش پس از ۳ روز بواضح تغییر رنگ گلبرگ‌های سفید بنفشه آفریقایی با هاله‌ی زرد کم رنگ را در نمونه تزریق شده با سازه ژنی *4'CGT* و *ASI* را نشان داد در حالی که هیچ تغییری در گلبرگ‌های شاهد و تزریق با محلول آگروا فیلتریشن بدون سازه ژنی مشاهده نشد (شکل ۴). این آزمایش دو بار تکرار شد و نتایج مشابهی بدست آمد (داده‌ها نشان داده نشده‌اند).

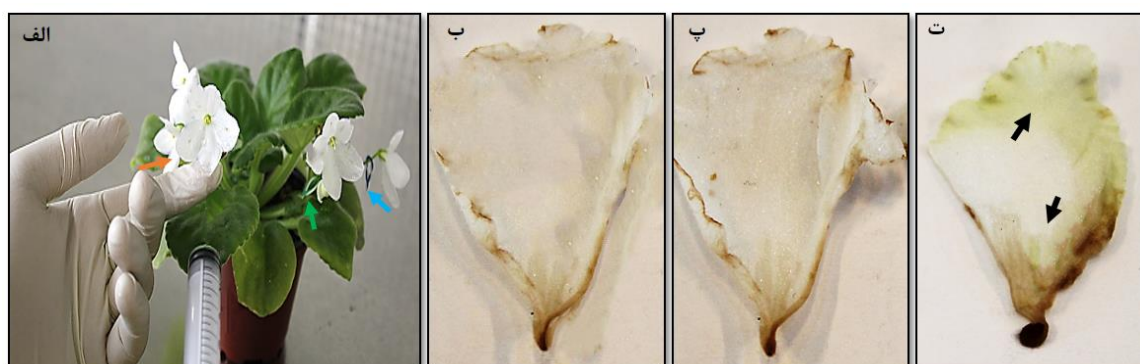
آئورون می‌باشد با استفاده از دستگاه *HPLC-DAD-MSⁿ* مورد آنالیز قرار گرفت. این سیستم *HPLC* بصورت آنالین با یک طیف سنج جرمی یونی *Bruker* (Bremen, Germany) همراه با منبع *ESI* بود. بدین منظور از گلبرگ‌های بنفشه آفریقایی ترا ریخت تغییر یافته به رنگ زرد، بنفشه آفریقایی سفید (غیر ترا ریخت) و گل میمونی زرد رنگ عصاره متانولی تهیه گردید. پس از تهیه عصاره غلیظ جهت بررسی کمی و کیفی میزان *AOG* در مسیر بیوستتزی آئورون، آنتوسیانیدین و فلاون‌ها به دستگاه تزریق شد. فاز متحرک دستگاه شامل ۲ قسمت *A* و *B* می‌باشد. فاز متحرک *A* شامل ۱٪ *TFA/water* (eluent *A*) و فاز متحرک *B* نیز از ۹۰۰ ml استونیتریل و ۱۰۰ ml آب تشکیل شده است. نمونه‌ها در طول موج‌های خاص ۴۰۰، ۳۶۰ و ۵۲۰ نانومتر بطور جداگانه برای پیک‌های آئورون، فلاون‌ها و آنتوسیانیدین‌ها به ترتیب مورد بررسی قرار گرفت و طی زمان ۴۰ دقیقه اندازه‌گیری و شناسایی شد. اجزای محلول با بهره‌گیری از یک ستون (*XDB-C18*) با ابعاد $150 \times 4/6 \text{ mm}$ ، دکتور *UV* با طول موج‌های خاص، پمپ *Quaternary*، سرعت جریان 1 ml/min ، سوزن تزریق کننده همیلتون $2 \mu\text{l}$ ، حجم تزریق ۲۰ میکرو لیتر و نرم افزار *ChemStation* بررسی گردید. نمونه‌های استاندارد (*AOG*)، نارینجین و چالکون که ماده‌ای پودری است به میزان ۱ میلی‌گرم بود در ۱۰۰ cc متانول حل نمودیم و به جز چالکون بقیه در آب رقیق گردید. برای بدست آوردن منحنی‌های کالیبراسیون دیگر نمونه‌ها نیز از کالیبراسیون استاندارد *UV* استفاده شد. پیک‌های مربوط به *AOG*، نارینجین و چالکون با استاندارد مقایسه و مقادیر هر یک براساس کروماتوگرام بر حسب میلی‌گرم در گرم طیف استاندارد محاسبه شد. جمع آوری و پردازش داده‌ها با استفاده از نرم افزار *Bruker* انجام شد. طیف سنج جرمی در حالت یونی مثبت و خودکار *MSn* با دامنه اسکن از ۱۰۰ تا 1000 m/z عمل می‌کند.

نتایج

ساب کلونینگ ژن *4'CGT* و *ASI* در ناقل *pBI121* و



شکل ۳- انتخاب کلونی‌های مثبت و تایید ساب کلونینگ با استفاده از تکنیک Colony PCR با آگارگرهای اختصاصی ژن و هضم آنزیمی ناقل نوترکیب. (الف): CK-: کنترل منفی (بدون DNA)، CK+: کنترل مثبت (الگوی cDNA)، شماره‌های ۱ تا ۶: نتایج حاصل از Colony PCR (نوترکیب). (ب): CK-: کنترل منفی (بدون DNA)، CK+: کنترل مثبت (الگوی cDNA)، شماره‌های ۱ تا ۱۱: نتایج حاصل از Colony PCR (نوترکیب). (ت): چاهک ۱: نشانگر مولکولی تعیین اندازه ۱KB، چاهک ۲: ناقل هضم نشده، چاهک ۳: هضم آنزیمی ناقل نوترکیب با دو آنزیم *BstE II* و *Nco I* ۱۰۰ bp. (پ): چاهک ۱: نشانگر مولکولی تعیین اندازه ۱KB، چاهک ۲: ناقل هضم نشده، چاهک ۳: هضم آنزیمی ناقل نوترکیب با دو آنزیم *BamH I* و *Sac I*. (ب): چاهک ۱: نشانگر مولکولی تعیین اندازه ۱KB، چاهک ۲: ناقل هضم نشده، چاهک ۳: هضم آنزیمی ناقل نوترکیب با دو آنزیم *BamH I* و *Sac I*.



شکل ۴- نتایج حاصل از نفوذ آگروباکتریوم با سیستم بیان زود گذر در گلبرگ‌های بنفشه آفریقایی. (الف): شیوه تزریق محلول آگروباکتریوم در گلبرگ‌های سفید بنفشه آفریقایی با سرنگ بدون سوزن (فلش سبز: نمونه شاهد، فلش آبی: نمونه شاهد تزریق شده با محلول آگروباکتریوم بدون سازه ژنی و فلش نارنجی: نمونه تزریق شده با محلول آگروباکتریوم حاوی سازه ژنی)، (ب): بررسی فنوتیپی گلبرگ‌های سفید شاهد (بدون تزریق)، (پ): نمونه تزریق شده با محلول آگروباکتریوم بدون سازه ژنی، (ت): نمونه تزریق شده با محلول آگروباکتریوم حاوی سازه ژنی. (ت): تغییر رنگ با لکه‌های زرد کم رنگ در بخش‌هایی از گلبرگ‌های تزریق یافته حاوی سازه ژنی *ASI+4'CGT* نشان داده شده است.

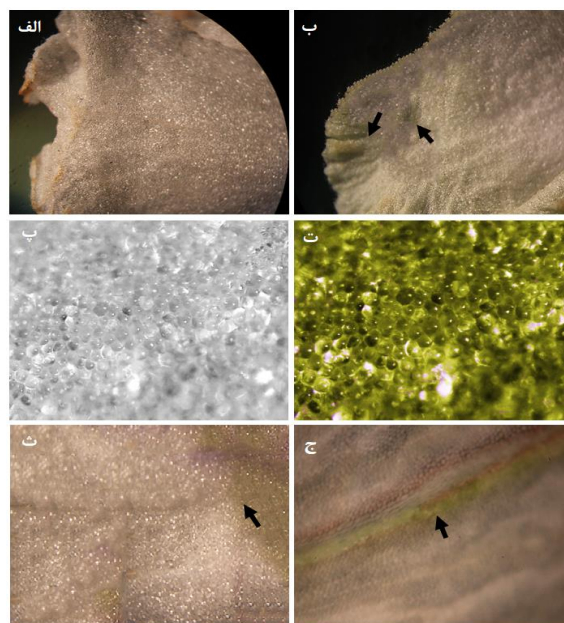
بدون سازه ژنی و گلبرگ تزریق شده با محلول اگرواینفیلتریشن حاوی سازه ژنی، استخراج و سپس روی ژل آگارز ۰/۸٪ برده شدند (شکل ۶).

برای تأیید حضور قطعات ژنی *4'CGT* و *ASI* در گلبرگ-های تراریخته موقت آنالیز PCR با آگارگرهای اختصاصی بصورت با همدیگر انجام گردید. نتایج بدست آمده نشان داد که گیاهان تراریخته موقت مورد مطالعه باند مربوط به هر دو قطعه ژن مورد بررسی را دارا بودند. همچنین این نتایج بررسی وجود دو تا ژن درگیر در مسیر بیوسنتزی آنورون با PCR حضور ژن‌های *4'CGT* و *ASI* را با همدیگر به ترتیب با اندازه ۱۳۷۴ و ۱۶۸۹ جفت‌بازی تأیید نمود. بدین ترتیب، این نتایج به وضوح حضور و بیان ژن-های *ASI+ 4'CGT* را برای تولید مسیر بیوسنتزی رنگدانه آنورون جهت تغییر رنگ گلبرگ از سفید به زرد نشان داد لذا می‌توان سازه ژنی را با اعتماد بیشتری برای تراریخته شدن دائم به گیاهان زینتی انتقال داد (شکل ۶).

تجمع آنوروسیدین-۶-۱-و- گلوکزید با استفاده از $HPLC-DAD-MS^n$: نتایج کروماتوگرام HPLC نشان داد که گل‌های میمونی زرد رنگ حاوی ترکیبی است که بطور طبیعی در بنفشه آفریقایی تولید نمی‌شود (شکل ۷-ب)، پیک‌های ۱ و ۱)، در حالی پیک‌های ایجاد شده در گلبرگ-های بنفشه آفریقایی تراریخته نشان‌دهنده وجود این ترکیبات می‌باشد (شکل ۷-ج، پیک‌های ۱ و ۱).

این ترکیبات در گل‌های میمون زرد رنگ در زمان RT ۳/۹ و ۲/۵ دقیقه به عنوان فلاونوئید *AOG* (۴، ۶، ۴/۳-*tetrahydroxyaurone-6-O* - گلوکزید) شناخته شده است (شکل ۷-الف، پیک‌های ۱ و ۱). اجزای *AOG* (پیک ۱، RT ۳/۹ دقیقه) در گلبرگ‌های بنفشه آفریقایی تراریخته تغییر یافته به رنگ زرد و گل میمونی زرد رنگ به ترتیب ۲/۹۵ و ۳/۴۵ میلی‌گرم در گرم می‌باشد. در حالیکه، در گلبرگ‌های سفید بنفشه آفریقایی (غیر تراریخت) پیک مشاهده نشد (جدول ۲).

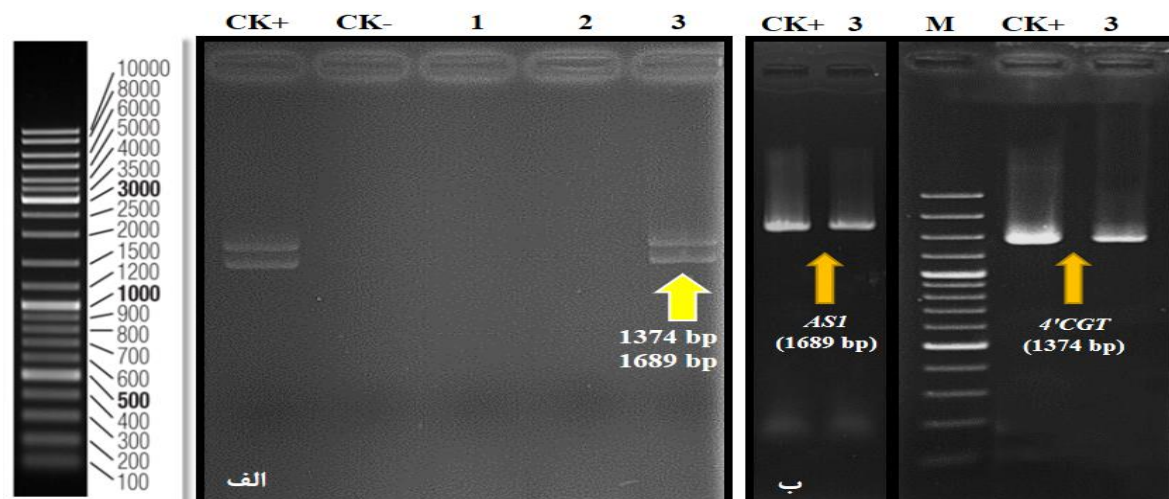
بررسی گلبرگ‌ها بنفشه آفریقایی ترایخت با میکروسکوپ نوری: نتایج میکروسکوپ نوری بطور واضح و کامل تغییر رنگ به سمت زرد کم رنگ در نمونه-های تزریق شده حاوی سازه ژنی را نشان داد و در نمونه-های تزریق یافته بدون سازه ژنی تغییری مشاهده نشد. همچنین قسمت تزریق شده با فلش مشخص نمود محدود به اپیدرم مایع رنگی ساخت ژن است. بطور کلی نتایج مشخص نمود که نفوذ با سیستم بیان زودگذر در گلبرگ بنفشه آفریقایی با موفقیت انجام گردید (شکل ۵). این نشان می‌دهد که نه تنها به سطح گلبرگ نفوذ کرده است بلکه کاملاً درون ژنوم گیاه وارد شده است.



شکل ۵- مشاهده فوتویی گلبرگ‌ها با میکروسکوپ نوری. (الف و ب): مشاهده فوتویی تغییر رنگ گلبرگ‌های زیر میکروسکوپ به ترتیب در نمونه‌های بدون سازه ژنی و با سازه ژنی، (ب و پ): مشاهده دقیق و واضح تغییر رنگ گلبرگ‌های در محل تولید شده بترتیب در نمونه‌های بدون سازه ژنی (رنگ سفید) و با سازه ژنی (رنگ زرد)، (ث و ج): قسمت تزریق شده با فلش محدود به اپیدرم مایع رنگی ساخت ژن است.

آنالیز مولکولی

بررسی گلبرگ‌های تراریخت بیان زودگذر با PCR: نمونه‌های DNA از گلبرگ‌های شاهد سفید بنفشه آفریقایی بدون تزریق، شاهد تزریق شده با محلول اگرواینفیلتریشن



شکل ۶- بررسی DNA ژنومی استخراج شده از گلبرگ‌های تزریق شده و شاهد با استفاده از تکنیک PCR و آغازگرهای اختصاصی. (الف): نتایج حاصل از PCR: CK+ کنترل مثبت (سازه ژنی pBI121-4'CGT و pCambia1304-ASI تخلیص شده)، چاهک دوم: CK- (آب مقطر بدون DNA)، چاهک سوم: گلبرگ شاهد (بدون تزریق)، چاهک چهارم: گلبرگ‌های شاهد تزریق یافته با محلول بدون آگرواینفیلتریشن بدون سازه ژنی، چاهک پنجم: گلبرگ‌های شاهد تزریق یافته با محلول آگرواینفیلتریشن با سازه ژنی، (ب): بررسی جداگانه دقیق‌تر وجود دو ژن

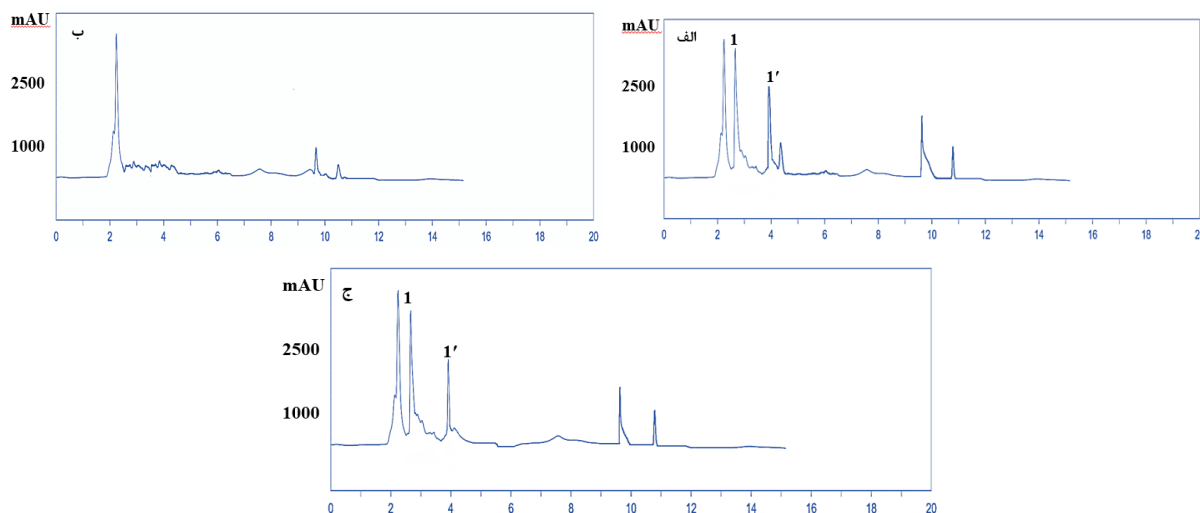
جدول ۲- تجزیه و تحلیل فلاونوئیدها از گلبرگ‌ها

No	ژنوتیپ	آنورون در ۴۰۰ نانومتر	آنتوسیانیدینها	فلاون	فوتیپ
		پیک ۱ (۲,۵) دقیقه	پیک ۱ (۳,۹) دقیقه	در ۵۲۰ نانومتر	ها در ۳۶۰ نانومتر
شاهد	Senk's Alchemy Parakeet'	-	-	-	۰/۹۸۶ سفید
بنفشه تراریخته	4'CGT+ ASI	۰/۵۲۸	۲/۹۵	-	۱/۲۳ زرد
گل میمون زرد	cv. Snap Yellow (Endogenous Am4'CGT and AmASI)	۰/۶۳۲	۳/۴۵	-	۱/۵ زرد

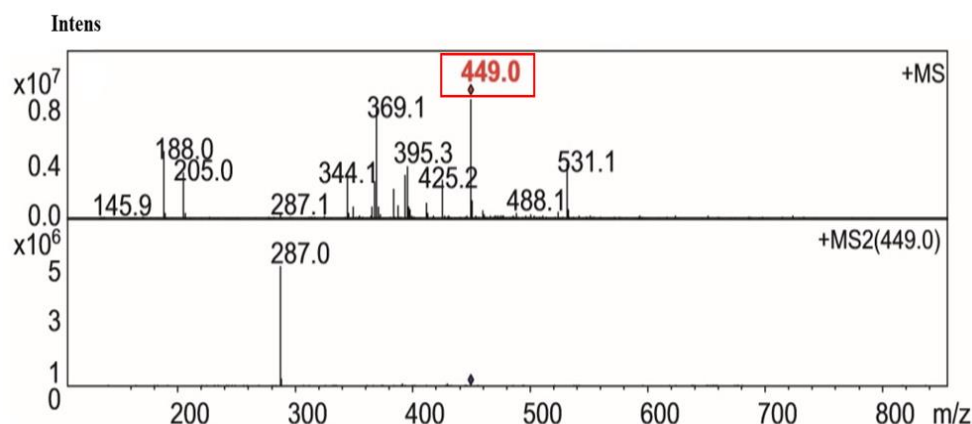
فلاونوئیدها در گیاهان تراریخته و غیر تراریخته توسط HPLC شناسایی شدند و داده‌ها جمع‌بندی شدند. پیک‌های ۱ و ۱': آنوروسیدین-۶-او-گلوکزید (AOG)، پیک‌های ۲، ۳ و ۴: آنتوسیانیدین‌ها و پیک‌های ۵، ۶ و ۷: فلاون (NC: نارینجین چالکون و مشتقات آن).

دیگر بخوبی جدا شدند. تجمع چالکون باعث تشکیل آنوروسیدین-۶-او-گلوکزید در گلبرگ‌های بنفشه آفریقایی تراریخته گردید.

آنالیز MS-MS پیک ۱' از m/z ۴۴۹ مشخص نمود که در جداسازی MS2 یک قطعه گلوکز در m/z ۲۸۷ به دلیل از دست دادن ۱۶۲ واحد جرم اتمی بدست آمد (شکل ۸). همچنین، کروماتوگرام HPLC نشان داد که اجزا از هم



شکل ۷- آزمون کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا جهت ارزیابی آنوروسیدین-۶-او-گلوکزید. (الف): کروماتوگرام HPLC گلبرگ گل میمونی زرد رنگ، (ب): کروماتوگرام HPLC گلبرگ بنفشه آفریقایی غیر تراریخته، (ج): کروماتوگرام HPLC گلبرگ بنفشه آفریقایی تراریخته. کروماتوگرام HPLC گلبرگ‌های گل میمونی زرد رنگ و بنفشه آفریقایی تراریخته (AOG) را در پیک‌های ۱ و ۱' در ۴۰۰ نانومتر نشان می‌دهد.



شکل ۸- آزمون طیف جرمی و جداسازی MS-MS از ($m/z = 449$) AOG گل میمون

اما مطالعات اخیر نیز از ترکیبات رنگی چالکون و آنورون برای تولید گل‌های زرد رنگ استفاده کرده‌اند (۲۶).

در پژوهش حاضر برای اولین بار با مهندسی ژنتیکی مسیر بیوسنتزی آنورون ($4'CGT+ASI$) و با استفاده از سیستم بیان موقت اگرواینفیلتریشن ایجاد رنگ جدید زرد در گلبرگ‌های بنفشه آفریقایی سفید انجام شد. این نتایج نشان می‌دهد که گلبرگ‌های بنفشه آفریقایی سفید چالکون تولید می‌کنند و وجود مالونیل ترانسفراز باعث تجمع آنورون می‌شود. چالکون یک آنزیم کلیدی در بیوسنتز فلاونوئید گیاهان گلدار از جمله آنورون است که به نارینجین بی-

بحث

ایجاد صفات جدید مانند رنگ گل در صنعت گیاهان زینتی بطور مستقیم با ارزش تجاری آن مرتبط است (۶، ۲۴). استراتژی‌های تراریخته دارای پتانسیل عظیمی برای تولید فنوتیپ‌های جدیدی هستند که در طبیعت یافت نمی‌شوند (۱۹). گزارش شده است که گیاه زینتی بنفشه آفریقایی (۲۵)، شمعدانی، نگون‌سار دارای رنگ‌های متفاوت بجز رنگ زرد و نارنجی هستند (۹، ۲۹). رنگدانه‌های اصلی هدف اصلاح رنگ گل، آنتوسیانین‌ها بوده‌اند که به تولید رنگ‌های مختلف مانند قرمز، صورتی و آبی کمک می‌کند،

زمان امکان‌پذیر می‌کند. این سیستم آزمایش سریع تراریخته‌ها را در جوانه‌های گیاه پامچال بطورت موقت امکان پذیر نمود. بیان GUS در کوتیلدون، برگ‌ها و ریشه جوانه‌های گیاه پامچال پس از چند روز مشاهده شد (۸). بررسی اگرواینفیلتریشن RNAi ژن چالکون سنتاز در گلبرگ‌های گل میمون مشخص نمود که با خاموشی این ژن، هیچگونه رنگیزه‌ای در گلبرگ‌های گل میمون تولید نمی‌شود و رنگ آن‌ها از بنفش به سفید تغییر می‌کند (۲۲). انتقال سازه دارای ژن فلاونوئید ۵'،۳'-هیدروکسیلاز از گل اطلسی و ژن DFR از زنبق به گلبرگ‌های ژاله با استفاده از این سیستم اگرواینفیلتریشن منجر به تغییر میزان آنتوسیانین‌های گلبرگ‌های تزریق یافته و ایجاد رنگ آبی در کلاله و دانه‌های گرده گردید (۱۰). استفاده از تکنیک RNAi جهت خاموشی ژن چالکون ایزومراز در مسیر بیوسنتزی تولید رنگدانه گل اطلسی (*Petunia hybrida*) توسط اگرواینفیلتریشن سبب تجمع آنتوسیانین و کاهش mRNAهای اندوژن هدف‌های مربوطه در ناحیه نفوذی گلبرگ‌های چهار رنگ گل گیاه اطلسی شد (۱۳). در پژوهشی جهت تولید آنتوسیانین دلفینیدین در گلبرگ‌های گل ژاله (ژبررا) با استفاده از سیستم بیان موقت اگرواینفیلتریشن به این نتیجه رسیدند که انتقال سازه‌های تک ژنی (حمل‌کننده ژن فلاونوئید ۵'،۳'-هیدروکسیلاز از گل بنفشه) و دو ژنی (حمل‌کننده ژن فلاونوئید ۵'،۳'-هیدروکسیلاز از گل بنفشه و ژن DFR از زنبق هلندی) به گلبرگ‌های گل ژاله (ژبررا) به ترتیب منجر به تولید دلفینیدین به میزان ۴۴ و ۷۵ درصد شدند و با موفقیت باعث تغییر در رنگ گلبرگ‌ها به رنگ آبی گردید. همچنین میزان تولید آنتوسیانین‌ها دلفینیدین، سیانیدین، پلارگونیدین و پئونیدین با دستگاه HPLC آنالیز نمودند و پیشنهاد کردند که رقم *Bismarck* بهترین رقم برای تراریختی و انتقال پایدار ژن‌های درگیر در مسیر بیوسنتزی آنتوسیانین‌ها، با هدف تغییر رنگ گل به ویژه تولید دلفینیدین می‌باشد (۱۵).

رنگی تبدیل می‌شود و نقش مهمی را در ایجاد رنگ در گل‌های زینتی ایفا می‌کند (۱۲، ۲۷، ۳۰). اخیراً گزارش شده است که به دلیل عدم وجود مونوئیل ترانسفراز در کلاله گیاه سفید (*Ipomoea nil*) قادر به تجمع رنگدانه آئورون و رنگ زرد در گلبرگ‌ها نمی‌باشد (۹). در پژوهشی آنالیز مولکولی مشخص نمود که دو ژن مجزا چالکون سنتاز *SaCHSD* و *SaCHSA* در گیاهان زینتی بنفشه آفریقایی وجود دارد (۴). این نتایج وجود چالکون در گیاه زینتی بنفشه آفریقایی برای بررسی پژوهش حاضر بسیار مهم و ضروری می‌باشد.

به نقل از انو و همکاران در سال (۲۰۰۶) بیان همزمان ژن‌های *Am4'CGT* و *AmASI* از گل میمون زرد رنگ همراه با خاموشی ژن‌های بیوسنتز آنتوسیانین (*DFR*، *F3H*) با موفقیت باعث تولید اورئوسیدین ۶-O-گلوکوزید و در نتیجه منجر به گلبرگ‌های زرد رنگ در گیاهان زینتی تورنیا می‌شود (۱۸). در پژوهشی دیگر بیان همزمان ژن‌های *Am4'CGT* و *AmASI* همراه با خاموشی ژن چالکون ایزومراز برای ایجاد مسیر بیوسنتزی پیشنهاد داده‌اند (۹). در حالیکه، در پژوهش حاضر انتقال همزمان ژن‌های *4'CGT* و *ASI* در دو وکتور متفاوت با موفقیت باعث ایجاد آئورون و رنگ زرد در گلبرگ سفید گردید. رزمی و همکاران (۱۳۹۲) در تحقیقاتی ژن لوسیفراز حشره شب تاب گونه ایرانی *Lampyrus turkestanicus* را با استفاده از آگروباکتريوم به گیاه زینتی بنفشه آفریقایی جهت نشر نور قرمز منتقل کردند. حضور ژن در ژنوم گیاه و نسخه‌برداری با استفاده از آنالیزهای PCR و PCR-RT تأیید شد. همچنین نتایج حاصل از سنجش لومینومتری، فعالیت آنزیم لوسیفراز را در بافت‌های برگ‌های بعضی از گیاهان نشان داد، در حالی که در گیاهان شاهد نشر نوری مشاهده نشد (۱).

استفاده از سیستم اگرواینفیلتریشن عملکرد سازه‌های ژنی مورد بررسی و تغییر رنگ گل را بدون نیاز به کشت بافت، انتخاب گیاهان تراریخت، بدون هزینه و در کوتاهترین

براکتاتین ۶-گلوکوزید و *THC4*-گلوکوزید به ترتیب کاهش می‌یابد (۲۰).

نتیجه‌گیری کلی

با انجام پژوهش حاضر آشکار شد که روش آگرواینفیلتریشن روشی مناسب برای بررسی بیان موقت ژن‌های رنگ گل با صرف وقت کمتر و هزینه خیلی کمتر در گلبرگ گیاه زینتی بنفشه آفریقایی می‌باشد، زیرا انتقال این ژن‌ها به صورت پایدار و نیازمند بررسی بیشتر بوده و گزینش گیاهان تراریخت احتمالی نیز وقت گیر بوده و به هزینه بالایی نیاز دارد. همچنین نتایج این پژوهش می‌تواند راهی را برای مهندسی ایجاد رنگ زرد در گونه‌های گیاهان زینتی که فاقد این نوع رنگ هستند باز نماید. از طرفی با کاربردی شدن این گیاهان با رنگ نوین زرد و عرضه آن بصورت تجاری و با توجه به اهمیت اقتصادی قابل توجه گیاهان زینتی در جهان و محبوبیت گیاه زینتی بنفشه آفریقایی در میان گل‌های زینتی، از لحاظ تجاری بسیار با ارزش خواهد بود و دارای اهمیت قابل توجهی در بازار گل و گیاه می‌باشد. از طرف دیگر قوانین آزاد سازی گیاهان تراریخته خصوصا در مورد گیاهان زینتی در بعضی از کشورها تصویب و در بعضی کشورهای دیگر در حال تصویب می‌باشند، لذا در آینده شاهد نقش موثرتر در اصلاح گل و گیاهان زینتی خواهیم بود.

سپاسگزاری

این پژوهش با کمک مالی شماره ۹۸۰۹۰۱ ستاد توسعه زیست فناوری انجام شده است. بدینوسیله از حمایت مالی توسعه زیست فناوری جهت انجام تحقیق حاضر قدردانی می‌شود.

در پژوهشی بررسی خاموشی موقت ژن *BBE1* در گیاه شقایق (*Papaver somniferum L.*)، با تزریق به سطح پشتی برگ این گیاه با سرنگ‌های یک میلی‌لیتری انجام شد. آنالیزهای PCR و RT-qPCR با موفقیت وجود رونوشت‌های این ژن و میزان خاموشی در گیاهان تراریخت در مقایسه با گیاهان شاهد نشان داد (۲). در حالیکه در پژوهش حاضر با موفقیت بررسی فنوتیپی تغییر رنگ گلبرگ و حضور بیان ژن‌های *4'CGT* و *ASI* در گلبرگ‌های تراریخت با استفاده از میکروسکوپ نوری و سپس آنالیز PCR با موفقیت تایید شد. با توجه به عملکرد سریع و ساده، اقتصادی، این سیستم یک روش مناسب و کارآمدی برای پیش‌بینی وضعیت تراریختی پایدار می‌باشد که سازه‌های ژنی با احتمال خیلی بالایی پس از تایید انتقال شوند. انباشته شدن ترکیب جدیدی *AOG* که محصول نهایی مسیر آئورون با موفقیت براساس زمان و طیف جرمی در گلبرگ‌های تراریخت موقت بنفشه آفریقایی شناسایی شد و در گلبرگ‌های غیر تراریخت مشاهده نشد. در پژوهشی (۲۱) با استفاده از سیستم *HPLC-DAD-MSⁿ* این ترکیب را در طول مرحله رشد تنباکو تراریخت مشاهده شد و در غیر تراریخت پیک مخصوص به این ترکیب شناسایی نشد. این ترکیب در گلبرگ‌های تراریخته *Ipomoea nil* براساس زمان و طیف جرمی شناسایی شد (۹). که با نتایج این پژوهش مطابقت دارد. مطالعات آنالیز *HPLC* توسط انو و همکاران سال (۲۰۰۶) نشان داد که *AOG* در گیاهان تراریخته (۰/۴۲۲ میلی‌گرم در گرم) تولید شده و در گیاهان غیر تراریخته تولید نشده است (۱۸). تشکیل آنزیمی آئورون‌ها در عصاره گل‌های زرد گل میمون با استفاده از *HPLC* مشخص نمود که مسیر رنگدانه‌های اصلی در گل‌ها برای ایجاد آئوروسیدین-۶-او- گلوکزید باز است و به دنبال آن در *PHC*-گلوکوزید،

منابع

turkestanicus با نشر نور قرمز به گیاه بنفشه آفریقایی (*Saintpaulia ionantha*). مجله پژوهش‌های سلولی و

۱- رمزی، آ، جلالی جواران، م. و حسین خانی، س. ۱۳۹۲. انتقال ژن لوسیفراز حشره شب تاب گونه ایرانی *Lampyris*

- استفاده از تکنیک خاموشی ژن القا شده توسط ویروس (VIGS) در ژنوتیپ ایرانی گیاه شقایق (*Papaver somniferum*. L). مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی (مجله زیست‌شناسی ایران). جلد ۳۱، شماره ۳، ص ۳۲۵-۳۳۶.
- 3- Azadi, P., Bagheri, H., Nalosi, AM., Nazari F., Chandler SF., 2016. Current status and biotechnological advances in genetic engineering of ornamental plants. *J Biotechnology Advances* 34(6): 1073–1090. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.06.006>.
- 4- Caro, S.E., Stampfle, J.M., Greene, M.J., Kotarski, M.A., 2006. Using a chalcone synthase Gene to Infer Phylogenies in the Genus *Saintpaulia*. *Bios*. 77(3): 72–76.
- 5- Falcone Ferreyra, M.L., Rius, S.P., Casati, P., 2012. Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. *Frontiers in Plant Science*. 3: 222.
- 6- Gandía-Herrero, F., García-Carmona, F., 2013. Biosynthesis of betalains: yellow and violet plant pigments. *Trends in Plant Science*. 18(6): 334–343.
- 7- Goodin, M.M., Dietzgen, R.G., Schichnes, D., Ruzin, S., Jackson, A.O., 2002. pGD vectors: versatile tools for the expression of green and red fluorescent protein fusions in agroinfiltrated plant leaves. *The Plant Journal*. 31(3): 375–383.
- 8- Hayta, S., Smedley, M.A., Li, J., Harwood, W.A., Gilmartin P.M., 2018. *Agrobacterium*-mediated transformation systems of *Primula vulgaris*. *Plant Methods*. 14: 93.
- 9- Hoshino, A., Mizuno, T., Shimizu, K., Mori, S., Fukada-Tanaka, S., Furukawa, K., Ishiguro, K., Tanaka, Y., Iida, S., 2019. Generation of Yellow Flowers of the Japanese Morning Glory by Engineering Its Flavonoid Biosynthetic Pathway toward Aurones. *Plant and Cell Physiology*. 60(8):1871-1879.
- 10- Hussein, G.M., Abu El-Heba, G.A., Abdou, S.M., Abdallah, N.A., 2013. Optimization of transient gene expression system in *Gerbera jemesonii* petals. *GM Crops & Food*. 4(1): 50–57.
- 11- Kapila, J., De Rycke, R., Van Montagu, M., Angenon, G., 1997. An *Agrobacterium*-mediated transient gene expression system for intact leaves. *Plant Science*. 122(1): 101–108.
- 12- Kazemian, M., Kazemi, E.M., Kolahi M., Omran, V.G., 2020. Floral ontogeny and molecular evaluation of anthocyanin biosynthesis pathway in pinwheel phenotype of *Saintpaulia inontha* Wendl. periclinal chimera. *Scientia Horticulturae*. 263, 109142.
- 13- Keykha, F., Bagheri, A., Moshtaghi, N., Bahrami, A.R., Sharifi, A., 2016. RNAi-induced silencing in floral tissues of *Petunia hybrida* by Agroinfiltration: A rapid assay for chalcone isomerase gene function analysis. *Cellular and Molecular Biology (Noisy-Le-Grand, France)*. 62: 26–31.
- 14- Li, F., Jin, Z., Qu, W., Zhao, D., Ma, F., 2006. Cloning of a cDNA encoding the Saussurea medusa chalcone isomerase and its expression in transgenic tobacco. *Plant Physiology and Biochemistry: PPB / Société Française de Physiologie Végétale*. 44: 455–461.
- 15- Nazari, F., Khoshkhui, M., Azadi, P., 2017. Production of Delphinidin Anthocyanin in the Flower Petals of *Gerbera* by Agroinfiltration of Flower Color Gene Constructs. *Journal of Plant Production Research*. 23(4): 145–164. (In Persian).
- 16- Nishihara, M., Nakatsuka, T., 2011. Genetic engineering of flavonoid pigments to modify flower color in floricultural plants. *Biotechnology Letters*. 33(3): 433–441.
- 17- Noman, A., Aqeel, M., Deng, J., Khalid, N., Sanaullah, T., Shuilin, H., 2017. Biotechnological Advancements for Improving Floral Attributes in Ornamental Plants. *Frontiers in Plant Science*. 8: 530.
- 18- Ono, E., Fukuchi-Mizutani, M., Nakamura, N., Fukui, Y., Yonekura-Sakakibara, K., Yamaguchi, M., Nakayama, T., Tanaka, T., Kusumi, T., Tanaka, Y., 2006. Yellow flowers generated by expression of the aurone biosynthetic pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 103(29): 11075–11080.
- 19- Roberts, WR., Roalson, EH., 2017. Comparative transcriptome analyses of flower development in four species of *Achimenes* (Gesneriaceae). *BMC Genomics* 18(1): 240. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-3623-8>
- 20- Sato, T., Nakayama, T., Kikuchi, S., Fukui, Y., Yonekura-Sakakibara, K., Ueda, T., Nishino T.,

- Tanaka, Y., Kusumi, T., 2001. Enzymatic formation of aurones in the extracts of yellow *snapdragon* flowers. *Plant Science*. 160(2): 229–236.
- 21- Shakya, R., Ye, J., Rommens, C.M., 2012. Altered leaf colour is associated with increased superoxide-scavenging activity in aureusidin-producing transgenic plants. *Plant Biotechnology Journal*. 10(9): 1046–1055.
- 22- Shang, Y., Schwinn, K.E., Bennett, M.J., Hunter, D.A., Waugh, T.L., Pathirana, N.N., Brummell, D.A., Jameson, P.E., Davies, K.M., 2007. Methods for transient assay of gene function in floral tissues. *Plant Methods*. 3(1): 1–12.
- 23- Tanaka, Y., Sasaki, N., Ohmiya, A., 2008. Biosynthesis of plant pigments: Anthocyanins, betalains and carotenoids. *Plant Journal*. 54(4): 733–749.
- 24- The plant List. , 2017. *Saintpaulia*. [http://www.theplantlist.org/tpl1.1/search?q= Saintpaulia](http://www.theplantlist.org/tpl1.1/search?q=Saintpaulia).
- 25- Teixeira da Silva, J., Dewir, Y., Wicaksono, A., Sahijram, L., Kim, H.H., Zeng, S., Chandler, S., Hosokawa, M., 2017. African violet (*Saintpaulia ionantha* H. Wendl.): Classical breeding and progress in the application of biotechnological techniques. *Folia Horticulturae*. 29: 99–111.
- 26- To, K.Y., Wang, C.K., 2006. Molecular Breeding of Flower Color. In *Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology* (Vol. 1). 300-310.
- 27- WU, Y., Zhu, M., Jiang, Y., Zhao, D., Tao, J., 2018. Molecular characterization of *chalcone isomerase* (*CHI*) regulating flower color in herbaceous peony (*Paeonia lactiflora* Pall.). *Journal of Integrative Agriculture*. 17(1): 122–129.
- 28- Yasmin, A., Debener, T., 2010. Transient gene expression in rose petals via *Agrobacterium* infiltration. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* (PCTOC). 102: 245–250.
- 29- Yoshida, K., Mori, M., Kondo, T., 2009. Blue flower color development by anthocyanins: from chemical structure to cell physiology. *Natural Product Reports*. 26(7): 884–915.
- 30- Zhao, D., Jiang, Y., Ning, C., Meng, J., Lin, S., Ding, W., Tao, J., 2014. Transcriptome sequencing of a chimaera reveals coordinated expression of anthocyanin biosynthetic genes mediating yellow formation in herbaceous peony (*Paeonia lactiflora* Pall.). *BMC Genomics*. 15(1): 689.
- 31- Zottini, M., Barizza, E., Costa, A., Formentin, E., Ruberti, C., Carimi, F., Lo Schiavo, F., 2008. Agroinfiltration of grapevine leaves for fast transient assays of gene expression and for long-term production of stable transformed cells. *Plant Cell Reports*. 27(5): 845–853.

Evaluation of transient expression of *ASI* and *4'CGT* genes in African violets petals by agroinfiltration for production new color in the flower

Rajabi A.¹, Fahmideh L.^{2*}, Keykhasaber M.³ and Ghasemi Omran V.⁴

¹ Dept. of Plant Breeding and Biotechnology, University of Zabol, Zabol, I.R. of Iran

² Dept. of Plant Breeding and Biotechnology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, I.R. of Iran

³ Dept. of Plant Pathology, University of Zabol, Zabol, I.R. of Iran

⁴ Genetic and Agricultural Biotechnology Institute of Tabarestan, University of Agriculture Science and Natural Resources, Sari, I.R. of Iran

Abstract

The production of ornamental cultivars with new colors is the main goal in the flower and ornamental plants industry. African violet is well known commercially and available in different colors except yellow flower. The aim of this study was to change the color of A. violet petals and to produce the biosynthetic pathway of auron pigment through genetic manipulation of *ASI* and *4'CGT* genes. To this end, t genes were isolated from *Antirrhinum majus* petals yellow using PCR with specific primers and ligated into the expression vectors pCAMBIA1304 and pBI121, respectively. Recombinant pBI121+*4'CGT* and pCAMBIA1304+*ASI* vectors were confirmed using colony PCR, enzyme digestion, sequencing and comparative analysis in the database. They were then transferred to *Agrobacterium* strain *LBA4404* by electroporation method and were examined in the petals of A. violet using a temporary expression system. In this system, *Agrobacterium* suspension carrying the gene structure was injected using a syringe at the base of the petals. Morphological results after 3 days clearly showed discoloration of white to pale yellow petals and no change was observed in control petals. PCR analysis and light microscopy confirmed gene expression and phenotypic changes, respectively. As well, aureusidin-6-*O*-glucoside (*AOG*) was detected in transgenic petals using HPLC-DAD-MSⁿ. By using this system, the gene structure can be transferred to ornamental plants with more confidence for permanent transgenic. In addition, this research can open the way for engineering the creation of yellow color in ornamental plant species that do not have this type of color.

Key words: aurone, anthocyanin, flower color, ornamental plants, genetic engineering