نشریه پژوهش‌های تولید گیاهی
جلد بیست و سوم، شماره چهارم، ۱۳۹۵
http://jopp.gau.ac.ir

تولید آنتوسیانین دلفینیدین در گلبرگ‌های گل ژاله (ژربرا) با اگرواینفیلتریشن سازه‌های ژنی رنگ گل

*فرزاد نظری[۱]، مرتضی خوشخوی[۲] و پژمان آزادی[۳]

[۱]دانشجوی سابق دکتری گیاهان زینتی دانشگاه شیراز و استادیار گروه علوم باغبانی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران، [۲]استاد بخش علوم باغبانی دانشگاه شیراز، [۳]استادیار پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی کرج و ایستگاه ملی تحقیقات گیاهان زینتی محلات

تاریخ دریافت: ۱۳۹٤/۱۱/۱۸؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/٤/۵

چکیده

سابقه و هدف: بررسی کارکرد ژن‌های عامل ایجاد رنگ گل در ژاله (ژربرا)، به‌دلیل کارآیی پایین شیوه‌های تراریختی و نیز زمان طولانی موردنیاز برای تولید گیاهان تراریخت پایدار، به‌طور معمول به کندی انجام می‌شود. بنابراین برای واکاوی کارکرد این ژن‌ها می توان از بیان موقت آن ها با شیوه اگرواینفیلتریشن به عنوان یک راه چاره بهره‌گیری کرد.

مواد و روش‌ها: این آزمایش در ۲ مرحله انجام شد. نخست در ۱۲ رقم گل ژاله به رنگ‌های مختلف آزمایش اگرواینفیلتریشن با ۳ سازه ژنی رنگ گل در مسیر آنتوسیانین‌ها (۱-CcF3´5´H: دارای یک ژن رنگ، ۲-Del2: دارای ۳ ژن رنگ گل و ۳- Del8: دارای پنج ژن رنگ گل) انجام شد. برای اگرواینفیلتریشن از آگروباکتریوم (*A. tumefaciens*) نژاد EHA 101 با پلاسمید pBIH و دارای یک یا چند ژن از ژن‌های فلاونوئید ۳'،۵'- هیدروکسیلاز (F3´5´H)، دی‌هیدروفلاونول ٤- ریداکتاز (DFR)، آنتوسیانیدین سنتاز (ANS)، فلاونون ۳ بتا- هیدروکسیلاز (F3H)، چالکون ایزومراز (CHI) و یک ژن نشانگر انتخابی مقاومت به هایگرومایسین (*hpt*) بهره‌گیری شد. پس از کشت آگروباکتریوم در محیط کشت‌های رشد، انگیزش و نیز اینفیلتریشن، تعلیق آگروباکتریوم حامل سازه‌های ژنی با استفاده از سرنگ در پایه گلبرگ‌ها تزریق شد. سپس بر

*مسئول مکاتبه: f.nazari433@gmail.com

اساس نتایج آزمایش اول، برای بار دوم این آزمایش با ٤ رقم تقریباً صورتی رنگ ('Aqua Melone'، 'Bismarck'،'Esmara' و 'Rosalin') و با همان سازه‌ها تکرار شد.

یافته‌ها: مشاهده ظاهری نتایج آزمایش اول نشان داد که گلبرگ‌های رقم‌های به رنگ صورتی دارای تغییر رنگ گلبرگ گل به سمت آبی و تولید آنتوسیانین دلفینیدین هستند. همچنین، نتایج واکاوی HPLC چهار نوع آنتوسیانین دلفینیدین، سیانیدین، پلارگونیدین و پئونیدین گلبرگ‌های تزریق یافته چهار رقم ژاله در آزمایش دوم نشان داد که، گلبرگ‌های رقم 'Bismarck' با سازه پنج ژنی pBIH-35S-Del8 بیشترین مقدار دلفینیدین را تولید می‌کنند.

نتیجه‌گیری: بنابراین می‌توان رقم 'Bismarck' ژاله را برای انتقال پایدار ژن‌های درگیر در مسیر آنتوسیانین‌ها، با هدف تغییر رنگ گل به ویژه تولید دلفینیدین پیشنهاد کرد.

واژه‌های کلیدی: اگرواینفیلتریشن، ژن فلاونوئید '۳،'۵- هیدروکسیلاز، دلفینیدین، ژاله (ژربرا)

مقدمه

گل ژاله (*Gerbera Jamesonii* Bolus ex. Hooker. F.) از تیره کلاهپرک سانان[1] یکی از مهم‌ترین گیاهان زینتی محبوب در جهان می‌باشد و در صنعت گلکاری رتبه پنجم در بین ۱۰ گل بریدنی برتر، با حجم معاملات ۱۳٤ میلیون یورو در حراجی‌های گل کشور هلند دارد (۹). در ژاله، گل‌ها دارای رنگ‌های گوناگونی شامل زرد، نارنجی، سفید، کرم، صورتی، قرمز آجری، قرمز روشن، قرمز آلبالویی و زمینه‌های بین آن‌ها بوده ولی تا کنون رنگ آبی حقیقی در آن مشاهده نشده است (۱۲).

صنعت باغبانی زینتی، در تلاش برای تولید و گسترش انواع رقم‌های جدید و متنوع به‌منظور پاسخگویی به تقاضای مصرف‌کنندگان و حفظ سهم بازار از گونه‌های ویژه می‌باشد. یکی از شیوه‌های کارآمد برای ایجاد چنین گونه‌های بدیع[2]، دستورزی[3] رنگ گل می‌باشد، که یکی از بارزترین ویژگی‌هایی است که گل‌ها را از یکدیگر متمایز می‌نماید و به مراتب مؤثرتر از تغییرها در اندازه، شکل و تقارن می‌باشد و نیز سبب ارزش‌گذاری گیاهان زینتی در بازارها و حراجی‌های گل می‌شود (٤). به‌طور معمول رنگ، نتیجه رسوب رنگدانه[4] در گلبرگ‌ها می‌باشد. گیاهان بیش از ۲۰۰ هزار نوع مختلف از ترکیب‌های رنگی را تولید می‌کنند که دربرگیرنده بسیاری از رنگدانه‌ها می‌شود. فلاونوئیدها[5]، کاروتنوئیدها[6] و بتالائین‌ها[7] سه گروه رنگدانه اصلی در گیاهان هستند که سبب تولید دامنه وسیع رنگ در گل‌ها، میوه‌ها، بذرها و برگ‌ها می‌شوند.

همچنان که در شکل ۱ نشان داده شده است، فلاونوئیدها از مسیر فنیل پروپانوئید و از اسید آمینه فنیل‌آلانین ساخته می‌شوند (۳، ١٤). اولین مرحله در ساخت فلاونوئیدها، تولید ترکیب واسطه‌ای مهم در ساخت تمام فلاونوئیدها به‌نام تتراهیدروکسی چالکون توسط آنزیم چالکون سنتاز می‌باشد. تتراهیدروکسی چالکون به‌وسیله آنزیم چالکون ایزومراز به نارینجنین تبدیل می‌شود. ممکن است نارینجنین توسط آنزیم فلاونون ۳ بتا- هیدروکسیلاز به دی‌هیدروکائمفرول تبدیل شود. این ماده با فعالیت دو آنزیم فلاونوئید '۳- هیدروکسیلاز و فلاونوئید '۳، '۵- هیدروکسیلاز به‌ترتیب به

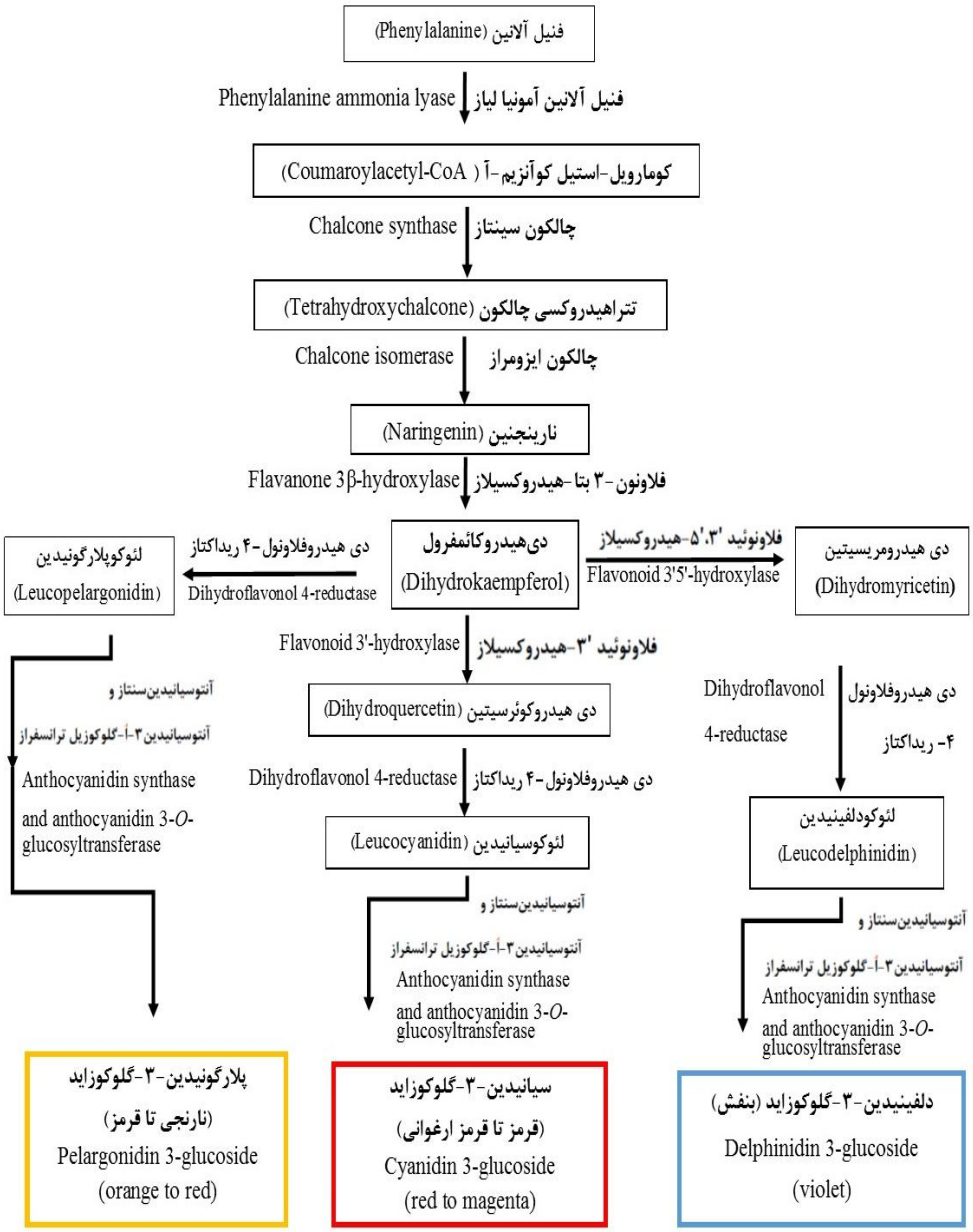
1- Asteraceae (Compositae)
2- Novel
3- Manipulation
4- Pigment
5- Flavonoids
6- Carotenoids
7- Betalains

دی‌هیدروکوئرستین و دی‌هیدرومیریستین تبدیل می‌شود. همچنین این دو ماده همراه با دی‌هیدروکائمفرول توسط سه آنزیم دی‌هیدروفلاونول ٤- ریداکتاز، آنتوسیانیدین‌سنتاز و آنتوسیانیدین ۳-اُ- گلوکوزیل ترانسفراز به آنتوسیانین‌های سیانیدین ۳- گلوکوزاید (به رنگ قرمز تا قرمز ارغوانی)، پلارگونیدین ۳- گلوکوزاید (به رنگ نارنجی تا قرمز) و دلفینیدین ۳- گلوکوزاید (به رنگ بنفش) تبدیل می‌شوند (١٤).

از آنجا که انتقال ژن و باززایی بیشتر گیاهان عالی کاری پرزحمت، زمان‌بر و گران قیمت است، همچنین سطح بیان ژن در گیاهان تراریخته از یک گیاه به گیاه دیگر تفاوت دارد و اغلب پدیده خاموشی ژن به‌علت اثر مکانی ژن انتقال داده شده در گیاهان تراریخته اتفاق می‌افتد، بنابراین آزمون‌های بیان موقت ژن به عنوان یک راهکار مناسب برای پیش‌بینی وضعیت تراریختی پایدار به‌کار می‌رود و امکان بررسی بیان و عملکرد برخی از ژن‌ها را در چند روز فراهم می‌نماید (۱۵). به همین دلیل ابتدا اگرواینوکولیشن[1] به عنوان یک ابزار ساده برای بررسی برهمکنش گیاه با ویروس معرفی شد و یک روش کارآمد برای واکاوی ژن‌های کارکردی در ژنگان[2] ویروس‌ها بود. با رشد روزافزون آگهی‌های ژنومی و توسعه ناقل‌های پیشرفته برای تشریح کارکرد ژن‌های گیاهی، به یک روش قابل اعتماد و شناخته شده به نام اگرواینفیلتریشن تغییر نام داد. هر چند که امروزه همچنان از این روش برای بررسی مکانیزم خاموشی ژن با تحریک ویروس بهره‌گیری می‌شود (۱۵). نفوذ آگروباکتریوم به شیوه خلاء[3] و یا به وسیله تزریق با سرنگ به داخل بافت‌های گیاه به ویژه برگ‌ها، به طور کارآمدی از حدود ۲۵ سال پیش در گونه‌های متفاوتی برای واکاوی راهبرد خاموشی ژن‌ها و بررسی درون بدنی پیشبرها (پروموترها)[4] و عوامل رونویسی[5] و نیز تجمع فرآورده‌های ژنی درون یاخته‌ای[6] بهره‌گیری شده است (۲۰).

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 (٦). همچنین می‌توان با این روش میزان بیان ژن را در یک زمان کوتاه بدون نیاز به باززایی یاخته‌های تراریخت، ارزیابی کرد (۷).

1- Agroinoculation
2- Genome
3- Vacuum infiltration
4- Promoters
5- Transcription factors
6- Intracellular trafficking of gene products



شکل ۱- مسیر زیست ساخت فلاونوئیدها از اسید آمینه فنیل‌آلانین برای ایجاد رنگ گل در گیاهان زینتی (۳، ۱٤).

Figure 1. Flavonoid biosynthetic pathway derived from phenylalanine amino acid for producing of flower color.

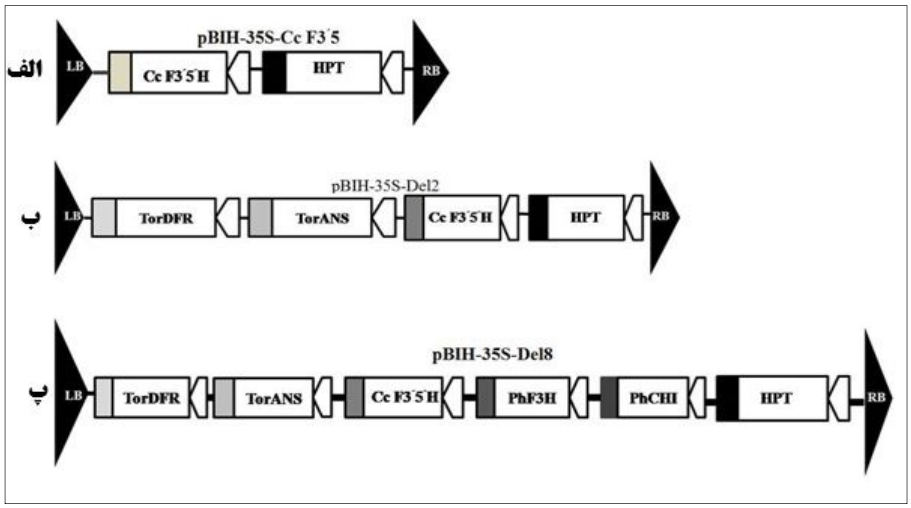
در همین راستا یاسمین و دبنر (۲۰۱۱) اثر نوع رقم، سن گل، موقعیت گلبرگ در گل، نوع نژاد باکتری و دمای هم-کشتی[1] را بر کارایی بیان موقت ژن بتا- گلوکورونیداز (GUS) را در پنج رقم گل ورد (رز) بررسی کردند. این پژوهشگران، تزریق تعلیق باکتری حاوی ژن GUS را با دو شیوه یکی توسط سرنگ به پایه گلبرگ‌های گل و دیگری توسط غوطه‌ور کردن گلبرگ‌ها در آن انجام شد. بیشترین بیان این ژن در گلبرگ‌های چرخه‌های میانی گل‌های نیمه باز دو رقم 'Pariser Charme' و 'Marvel' به‌دست آمد (۱۸).

با توجه به اهمیت گل ژاله و جایگاه پنجم آن در بین گل‌های بریدنی این پژوهش با تزریق تعلیق آگروباکتریوم حامل سه سازه ژنی رنگ گل (pBIH-35S-CcF3´5´H، pBIH-35S-Del2 و pBIH-35S-Del8) به گلبرگ‌های آن، میزان تولید آنتوسیانین‌های دلفینیدین، سیانیدین، پلارگونیدین و پئونیدین با دستگاه HPLC بررسی می‌شود. در پایان می‌توان با این روش بهترین رقم را برای تراریختی و انتقال پایدار ژن‌های عامل ایجاد رنگ آبی گل در ژاله معرفی نمود.

مواد و روش‌ها

سازه‌های ژنی: در بخش اگروانفیلتریشن از سه سازه ژنی بهره‌گیری شد از دانشگاه چیبا در ژاپن تهیه شد. در هر سه سازه ژنی از نژاد EHA 101 آگروباکتریوم (*A. tumefaciens*) که هر کدام دارای پلاسمید pBIH با ژن‌های مرتبط با رنگ گل و یک ژن نشانگر انتخابی مقاومت به هایگرومایسین (*hpt*) و نیز توالی‌های پیشبر و پایان دهنده بهره‌گیری شده بود (۱۹). ساختار این سازه‌ها در شکل ۲ آورده شده است که در آن سازه الف (pBIH-35S-CcF3´5´H): دارای ژن فلاونوئید ۳'،۵'- هیدروکسیلاز از گیاه یکساله علفی *Commelina communis* L. با نام انگلیسی Asiatic dayflower و ژن *hpt* در کنترل پیشبر 35S *Cauliflower mosaic virus* است. سازه ب (pBIH-35S-Del2): افزون بر ژن‌های همسان با سازه الف، دارای ژن‌های دی هیدروفلاونول ٤-ریداکتاز (DFR) و آنتوسیانیدین سنتاز (ANS) از گل ترانه (*Torenia* spp.) می‌باشد و سازه پ (pBIH-35S-Del8): افزون بر ژن‌های همسان با سازه ب، دارای ژن‌های فلاونون ۳ بتا- هیدروکسیلاز (PhF3H) و چالکون ایزومراز (PhCHI) از ارکید شب پره (*Phalaenopsis* spp.) می‌باشد.

1- Co-cultivation



شکل ۲- شکل شماتیک سه سازه ژنی (الف: CcF3´5´H، ب: Del2 و پ: Del8) بهره‌گیری شده در این پژوهش که دارای ژن‌های رنگ گل و *hpt* هستند (۱۹) [تصاویر سازه‌های ژنی با اجازه پروفسور "می" از دانشگاه چیبا در ژاپن استفاده شده‌اند].

Figure 2. Schematic representation of three gene constructs used in this study that have flower color and *hpt* genes (19) [The picture of gene constructs used by permission of Prof. M. Mii at the Chiba University, Japan].

انجام آزمایش اگرواینفیلتریشن: در این آزمایش ابتدا ۱۲ رقم گل ژاله به رنگ‌های مختلف از یکی از گلخانه‌های پاکدشت تهران تهیه شد و سپس از هر رقم ۳ شاخه گل انتخاب و در هر شاخه گل، ۳ گلبرگ مورد آزمایش اگرواینفیلتریشن قرار گرفت. مشاهده چشمی نتایج این آزمایش نشان داد که بیشتر در گلبرگ‌های رقم‌های به تقریب صورتی، تغییر رنگ به سمت آبی مشاهده می‌شود. بنابراین، آزمایش بار دوم با ٤ رقم به تقریب صورتی رنگ به نام‌های 'Aqua Melone'، 'Bismarck'،'Esmara' و 'Rosalin' انجام شد (شکل ۳- الف). این آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح به‌طور کامل تصادفی با ۲ عامل که در آن عامل اول سازه ژنی در ٤ سطح: شامل ۳ سازه ژنی و تیمار شاهد (محلول اینفیلتریشن بدون باکتری) و عامل دوم رقم در ٤ سطح و در ۳ تکرار (هر تکرار یک شاخه گل و در هر شاخه گل ٤ گلبرگ) انجام شد.

آماده‌سازی باکتری‌های دارای ژن‌های رنگ گل برای تزریق: روش آماده‌سازی باکتری‌های دارای سازه‌های رنگ گل برای تزریق به گلبرگ‌های ٤ رقم گل ژاله و بررسی انواع آنتوسیانین‌های گلبرگ‌ها به شرح زیر است (۱۱):

۱- آگروباکتریوم‌های حاوی سازه‌های ژنی روی محیط کشت جامد لوریا- برتانی (LB)[1] دارای آنتی بیوتیک‌های هایگرومایسین[2] به غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر و کلرامفنیکول[3] به غلظت ۲۵ میلی‌گرم در لیتر به مدت ۳ روز در تاریکی و در دمای ۲۸ درجه سلسیوس کشت شدند. برای تهیه محیط کشت جامد LB، ۱۵ گرم آگار (ساخت شرکت Wako ژاپن) به آن اضافه شد.

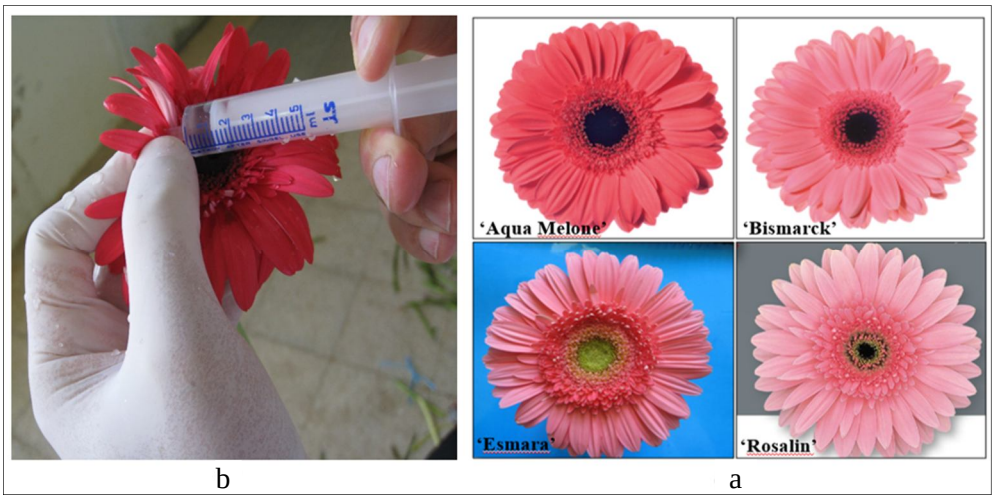
۲- پس از ۳ روز، با بهره‌گیری از کلونی‌های آگروباکتریوم‌های رشد یافته، ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع LB دارای آنتی‌بیوتیک‌های هایگرومایسین به غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر و کلرامفنیکول به غلظت ۲۵ میلی‌گرم در لیتر مایه کوبی شده و یک شبانه روز در دمای ۲۸ درجه سلسیوس و در شرایط تاریکی تکان داده شدند.

۳- با گذشت یک روز، باکتری‌های رشد یافته در ۲۰ میلی‌لیتر LB، در ۳۲۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ کرده و بخش شناور آن را دور ریخته و رسوب[4] چسبیده به ته فالکون را در محیط انگیزش و رشد تعلیق کرده و به‌مدت ٦ ساعت در دمای اتاق و در تاریکی تکان داده شدند. یک لیتر محیط کشت مایع انگیزش و رشد باکتری، دارای یک گرم کلرید آمونیوم (NH_4Cl)، ۰/۳ گرم سولفات منیزیم ($MgSO_4$)، ۰/۱۵ گرم کلرید پتاسیم (KCl)، ۰/۰۱ گرم کلرید کلسیم ($CaCl_2$) و ۲/۵ گرم سولفات آهن ($FeSO_4$)، ۱٤/۷ گرم در لیتر بافر ۲- (ان- مورفولینو) اتان سولفونیک اسید (MES[5])، ۲٤۰ میلی‌گرم در لیتر مونوفسفات سدیم (NaH_2PO_4)، ۱ درصد مانیتول و ۱۰۰ میکرومول استوسیرینگون[6] با pH ۵/۵ است.

٤- سپس برای بار دوم این سوسپانسیون باکتری در ۳۲۰۰ دور در دقیقه و زمان ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد و رسوب چسبیده به ته فالکون در محیط اینفیلتریشن تعلیق شده و به گونه‌ای رقیق شد که چگالی

1- Luria-Bertani
2- Hygromycin B
3- Chloramphenicol
4- Pellets
5- 2-(*N*-morpholino) ethanesulfonic acid= MES
6- Acetosyringone (3',5'-Dimethoxy-4'- hydroxyacetophenone)

چشمی[1] (OD) آن به ۰/۵ تا ۰/٦ برسد. محیط اینفیلتریشن باکتری در واقع همان محلولی است که همراه با باکتری به گلبرگ‌ها تزریق می‌شود و دارای ۱۰ میلی‌مول MES با pH ۵/۵ می‌باشد. در مرحله پایانی بی‌درنگ ۱ تا ۱/۵ میلی‌لیتر از محیط اینفیلترشن حاوی باکتری با OD موردنظر با سرنگ بدون سوزن در پایه گلبرگ‌ها تزریق شد (شکل ۳- ب). سپس شاخه‌های گل با گلبرگ‌های تزریق یافته را داخل شیشه‌های نوشابه (۲۵۰ سی‌سی) با محلول سوکروز ٤ درصد و ۰/۰۲ میلی‌گرم در لیتر نیترات نقره قرار داده و سپس شیشه‌ها در انکوباتور با دمای ۱۸ تا ۲۰ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۸۵ Figure به‌مدت ۸ روز قرار داده شدند.



شکل ۳- الف: چهار رقم گل ژاله بهره‌گیری شده در آزمایش دوم اگرواینفیلتریشن (تصاویر رقم‌های ژاله از سایت شرکت Florist تهیه شده‌اند) و ب: شیوه تزریق محلول اینفیلتریشن آگروباکتریوم در بخش پایینی گلبرگ‌های گل ژاله با سرنگ بدون سوزن.

Figure 3. Right: Four cultivars of gerbera used in the second experiment of agroinfiltration (The pictures of gerbera cultivars prepared from Florist Company). Left: The injection method of *Agrobacterium* infiltration solution in the base of petal by syringe without needle.

۵- پس از هشت روز از تزریق محلول اگرواینفیلتریشن، شاخه‌های گل را از دستگاه انکوباتور خارج کرده و گلبرگ‌هایی که پیش‌تر تزریق شده بودند را از کلاپرک گل جدا کرده و بی‌درنگ به فریزر ۸۰-

1- Optical Density (OD)

به‌مدت یک شبانه روز منتقل شدند. سپس این گلبرگ‌ها با دستگاه خشک‌کن انجمادی[1] ساخت کشور کره (Woosung Vacuum Co. LTD.) در دمای ۳۵- درجه سلسیوس و زمان حدود ٢٤ ساعت خشک شدند.

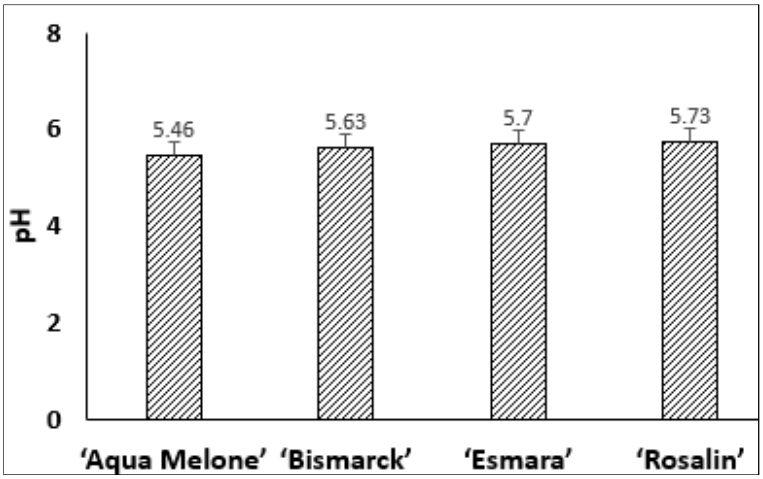
٦- در پایان واکاوی کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC)[2] با هدف شناسایی میزان آنتوسیانین‌ها در گلبرگ‌های خشک شده در پژوهشکده بیوتکنولوژی کرج انجام شد. برای انجام این آزمون حدود ۰/۵ گرم از نمونه‌های گلبرگ خشک شده با دستگاه خشک‌کن انجمادی، با نیتروژن مایع پودر شده و به آن ۲ میلی‌لیتر متانول اسیدی ۱ درصد افزوده و سپس با دور ۳۰۰۰ به‌مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس به آن کلریدریک اسید[3] ۳ نرمال افزوده و به‌مدت ۹۰ دقیقه در دستگاه بن ماری[4] با دمای ۱۰۰ درجه سلسیوس قرار داده شدند. پس از این، فالکون‌ها را از بن‌ماری خارج کرده و با افزودن ۱ میلی‌لیتر پنتانول به هر کدام و سپس ورتکس[5] آن‌ها، دو فاز ایجاد شد که فاز رویی برداشته و در ویال‌های ۲ میلی‌لیتری ریخته و آن‌ها را به‌مدت ۱۲ ساعت در دستگاه خشک‌کن انجمادی قرار داده تا پودر آن‌ها باقی بماند. سپس این پودرها را در متانول حل کرده و با گذراندن نمونه‌ها ازفیلترپلی‌تترافلوئورواتیلن[6] ۰/٤٥ میکرو به ستون دستگاه HPLC ساخت شرکت Knquer آلمان تزریق شدند. اجزای محلول با بهره‌گیری از یک ستون (Spheri 80 ODS2, i.d. 4 µm) به طول ۱۵ سانتی‌متر و در دمای ٤۰ درجه سلسیوس و نیز با یک آشکارکننده Diode array در طول موج ۵۳۰ نانومتر بررسی شد (۸).

نتایج و بحث

pH گلبرگ: آزمایش اول اگرواینفیلتریشن در ۱۲ رقم گل ژاله با رنگ‌های متفاوت، نشان داد که رقم‌های با گلبرگ‌های به رنگ صورتی، دارای تغییر رنگ به سمت رنگ آبی هستند در حالی که در رقم‌های به رنگ سفید، زرد و قرمز پررنگ چنین تغییر رنگی مشاهده نشد. به همین دلیل آزمایش دوم اگرواینفیلتریشن با ٤ رقم صورتی رنگ انجام شد. نتایج بررسی pH گلبرگ نشان داد که تمامی چهار

1- Freeze dryer
2- High-performance liquid chromatography (HPLC)
3- HCl
4- Benmary
5- Vertex
6- Polytetrafluoroethylene filter

رقم دارای pH بالای ۵ بوده و تفاوت معنی‌داری بـا هـم نداشـتند. رقـم 'Aqua Melone' کـه رنـگ گلبرگ‌های آن صورتی پررنگ بود دارای کمترین pH و رقم 'Rosalin' بالاترین pH را داشت (شکل ٤). pH گلبرگ یکی از ویژگی های است که می‌تواند در نوع رنگ ایجاد شده در آن توسط رنگدانه‌ها اثر گذار باشد. بنابراین در این پژوهش از چهار رقم ژاله بهره‌گیری شد که تقریباً pH یکسانی داشتند.



شکل ٤- مقدار pH گلبرگ‌های چهار رقم گل ژاله بهره‌گیری شده در آزمایش اگرواینفیلتریشن.

Figure 4. The amount of petal pH of four cultivars of gerbera used in the agroinfiltration experiment.

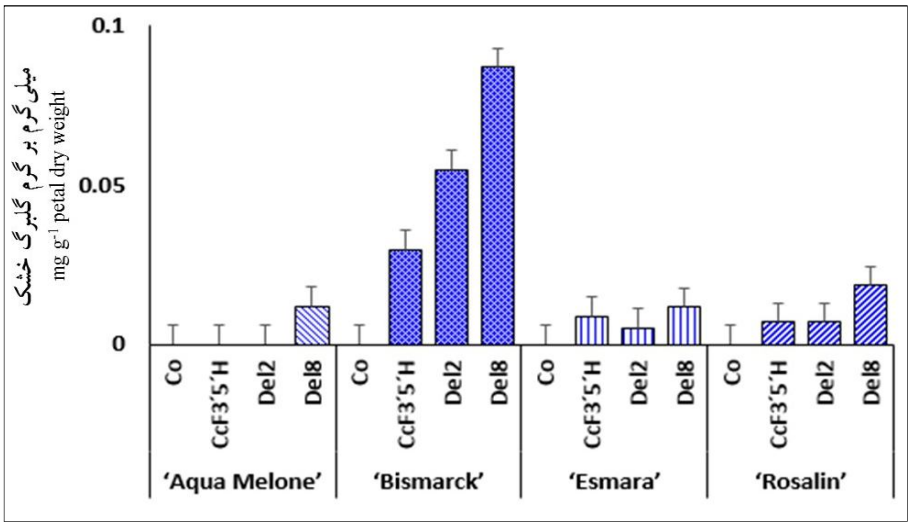
آنتوسیانین دلفینیدین: واکاوی نتایج گلبرگ‌های تزریق یافته با سه سازه ژنی رنگ گل توسط دسـتگاه HPLC نشان داد که با تزریق آگروباکتریوم حامل ژن‌های رنگ گل، آنتوسیانین دلفینیدین در گلبرگ‌ها ساخته می‌شود. در گلبرگ‌های شاهد (Co: تزریق یافته با محلول اینفیلتریشن بدون آگروباکتریوم) هـر چهار رقم، دلفینیدین مشاهده نشد. در رقم 'Aqua Melone' تنها در سازه ژنی Del8 در گلبرگ‌هـای تزریق یافته دلفینیدین مشاهده شـد، ولـی در رقـم 'Bismarck' در هـر ۳ سـازه ژنـی دلفینیـدین در گلبرگ‌ها ساخته شد که بیشترین آن (۰/۰۸٦ میلی‌گرم بر گرم گلبرگ خشک شده با دستگاه خشک‌کن انجمادی) در سازه Del8 بود که به نوعی بیشترین میزان دلفینیدین تولید شده در بین هر سه سازه ژنی و در هر ٤ رقم بود (شکل‌های ۵ و ٦). میزان دلفینیدین در دو رقم 'Esmara' و 'Rosalin' به تقریب همسان با هم بود و در هر دو رقم میزان آن در گلبرگ‌های تزریق یافته با ژن‌های Del8 بیشتر بود. در بین ٤ رقم تزریق یافته با سه سازه ژنی، کمترین میزان دلفینیدین تولید شده (۰/۰۰۵ میلی‌گرم بـر گـرم

گلبرگ خشک) در سازه ژنی Del2 و در رقم 'Esmara' مشاهده شد (نگاره ۵). گل ژاله همسان با گل‌هایی مانند ورد (رز)، به‌دلیل نداشتن ژن کلیدی فلاونوئید '۳،'۵- هیدروکسیلاز، توانایی تولید آنتوسیانین دلفینیدین در گلبرگ‌ها را ندارند، ولی چون نوع رنگدانه‌های موجود در گل‌های صورتی، بنفش و نارنجی رنگ آن از نوع آنتوسیانین‌ها بوده به‌ویژه در رقم‌های صورتی که دارای پیش ماده دی‌هیدروکائمفرول هستند، با تزریق این ژن به داخل گلبرگ‌ها توانایی تولید رنگ آبی (دلفینیدین) را دارند (۸). با توجه به‌این که در گلبرگ‌های تزریق شده تمام رقم‌های مورد بهره‌گیری در این پژوهش دلفینیدین ساخته شده است، بنابراین در بررسی اولیه می‌توان نتیجه گرفت که هر چهار رقم برای انتقال سازه‌های CcF3´5´H، Del2 و Del8 مناسب می‌باشند.

کاتسومو و همکاران (۲۰۰۷) در بررسی‌های اولیه بیش از ۱۰۰ رقم ورد (رز)، برای گزینش رقم مناسب برای انتقال ژن فلاونوئید'۳،'۵- هیدروکسیلاز و تولید دلفینیدین در گلبرگ‌ها و تولید گل‌های ورد با گلبرگ‌های آبی، نشان دادند که رقم هایی با ویژگی‌های مانند: ۱- زیاد بودن مقدار فلاونول‌های مانند کوئرستین و کائمفرول در گلبرگ‌ها، ۲- بالا بودن pH در واکوئل گلبرگ‌ها، ۳- غیرفعال بودن و یا فعالیت اندک ژن فلاونوئید '۳- هیدروکسیلاز (چون این ژن با ژن فلاونوئید '۳،'۵- هیدروکسیلاز برای بهره‌گیری از پیش‌ماده دی‌هیدروکائمفرول با هم رقابت دارند) و ٤- بالا بودن نسبت آنتوسیانین پلارگونیدین به سیانیدین مناسب هستند. این پژوهشگران از رقم‌های به رنگ قرمز و قرمز تیره به‌دلیل نداشتن فلاونول‌ها و pH بالای واکوئل و نیز رقم‌های سفید و زرد به‌دلیل نداشتن آنتوسیانین‌ها برای انتقال ژن فلاونوئید '۳،'۵- هیدروکسیلاز بهره‌گیری نکردند. در پایان از بین بیش از ۱۰۰ رقم گل ورد ارزیابی شده، تنها ٦ رقم را برای انتقال ژن برگزیدند (۸). در پژوهشی دیگر شانگ و همکاران (۲۰۰۷) با اگروواینفیلتریشن RNA مداخله گر[1] ژن چالکون سینتاز (CHS) در گلبرگ‌های گل میمون نشان دادند که با خاموشی این ژن، در بخشی از گلبرگ‌های گل میمون هیچگونه رنگیزه‌ای تولید نمی‌شود و رنگ آن‌ها از بنفش به سفید تغییر می‌کند (۱۱). پژوهش اگروواینفیلتریشن حاضر در ٤ رقم گل ژاله نشان داد که با وجود نداشتن تفاوت معنی‌داری از نظر pH واکوئلی بین آن‌ها، رقم 'Bismarck' توانایی تولید میزان بالای دلفینیدین را دارد و این مقدار در سازه ژنی Del8 نسبت به دو سازه دیگر بیشتر بوده است (شکل ۵). از دلایل این مقدار بالای تولید دلفینیدین در این سازه، می توان به وجود ژن‌های فلاونون ۳ بتا- هیدروکسیلاز (PhF3H) و چالکون ایزومراز (PhCHI) در مقایسه با دو سازه

1- RNAi=RNA interference

دیگر و توانایی این سازه در تغییر جهت پیش‌ماده دی‌هیدروکائمفرول به سمت ساخت دلفینیدین اشاره کرد. همسو با نتایج ما و البته در انتقال ژن به صورت پایدار، کاتسومو و همکاران (۲۰۰۷) گزارش کردند که با انتقال سازه ژنی دارای ژن‌های F3'5'H از گل بنفشه و ژن DFR از زنبق هلندی و نیز RNA مداخله گر ژن DFR خود ورد (رز) به رقم‌های صورتی ورد (رز)، گل‌های به نمای رنگ آبی با میزان آنتوسیانین دلفینیدین بالای ۹۵ درصد را ایجاد کردند. در صورتی‌که در همین پژوهش با انتقال سازه‌های تک ژنی (ژن F3'5'H از گل بنفشه) و دو ژنی (ژن‌های F3'5'H از گل بنفشه و ژن DFR از زنبق هلندی) به‌ترتیب میزان تولید دلفینیدن ٤٤ درصد و ۷۵ درصد بود که کمتر از سازه سه ژنی بود (۸). همچنین در پژوهشی دیگر با انتقال سازه دارای ژن‌های فلاونوئید ۳'،۵'- هیدروکسیلاز از گل اطلسی و DFR از زنبق به صورت اگروانفیلتریشن به گلبرگ‌های ژاله، تغییر در میزان آنتوسیانین‌های گلبرگ‌های تزریق یافته را مشاهده کردند و نیز ایجاد رنگ آبی را در کلاله و دانه‌های گرده مشاهده نمودند (۵).



شکل ۵- نتایج واکاوی HPLC دلفینیدین در گلبرگ‌های تزریق یافته با سه سازه ژنی رنگ گل و گلبرگ‌های تزریق یافته با محلول اینفیلتریشن بدون آگروباکتریوم (Co). انحراف استاندارد توسط میله‌های اشتباه در سطح ستون‌ها نشان داده شده است.

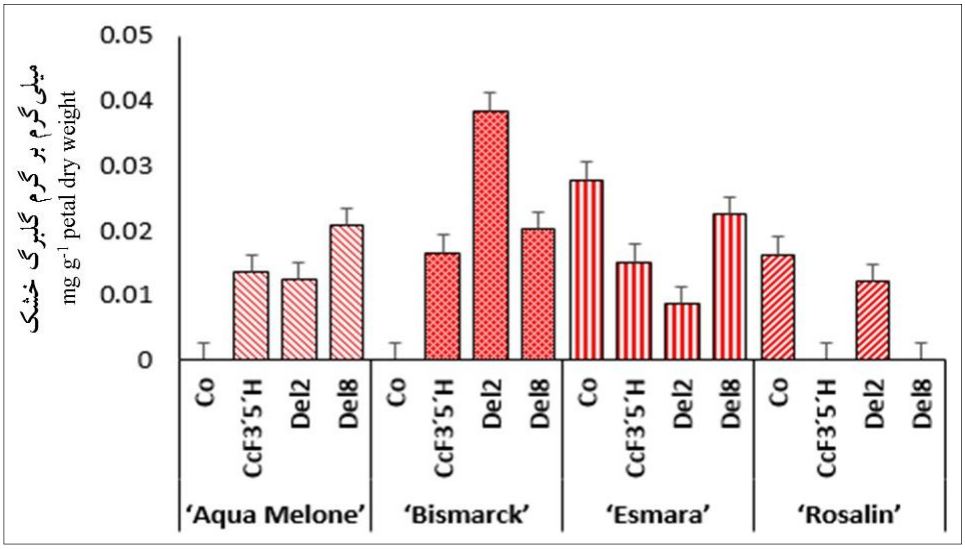
Figure 5. The results of delphinidin HPLC analysis in the petals injected with three flower color gene constructs and petal injected with agroinfiltration solution without *Agrobacterium* (Co). Standard deviation is shown by the mistake bars in the top of columns.

شکل ٦- به‌ترتیب از راست به چپ: گلبرگ‌های تزریق‌یافته با سازه‌های Del2 و Del8، بدون تزریق و تزریق یافته با محلول اگرواینفیلتریشن در رقم 'Bismarck' گل ژاله. تغییر رنگ از صورتی به سمت آبی در بخش‌هایی از گلبرگ تزریق یافته با سازه Del8 نشان داده شده است.

Figure 6. In order form right to left: petals injected with Del2 and Del8, non-injected, injected with agroinfiltration solution without *Agrobacterium.* It has been shown color change from pink to blue in parts of the petal injected by Del8.

آنتوسیانین سیانیدین: نتایج بررسی آنتوسیانین‌ها در گلبرگ‌های ژاله با دستگاه HPLC نشان داد که تفاوت‌های بارزی بین میزان آنتوسیانین سیانیدین چهار رقم گل ژاله مشاهده می‌شود. بیشترین میزان سیانیدین در گلبرگ‌های تزریق نیافته در رقم 'Esmara' مشاهده شد. همسان با نتایج دلفینیدین، بیشترین میزان سیانیدین (۰/۰۳۸ میلی‌گرم در گرم گلبرگ خشک) در رقم 'Bismarck' ولی در تزریق با ژن‌های Del2 در گلبرگ‌های تزریق یافته مشاهده شد. همچنین در گلبرگ‌های تزریق نیافته با آگروباکتریوم این رقم سیانیدین وجود نداشته است. البته مشابه این نتایج در رقم 'Aqua Melone' مشاهده شد که در گلبرگ‌های شاهد بدون سیانیدین بوده ولی در گلبرگ‌های تزریق یافته با سه سازه ژنی دارای سیانیدین هستند. در رقم 'Esmara' هم در گلبرگ‌های شاهد و هم در گلبرگ‌های تزریق یافته سیانیدین مشاهده شد ولی میزان آن در گلبرگ‌های شاهد بیشتر بود. در رقم 'Rosalin' آنتوسیانین سیانیدین تنها در گلبرگ‌های شاهد و تزریق یافته با Del2 مشاهده شد (شکل ۷). پژوهش ما، میزان سیانیدین در گلبرگ‌های تزریق یافته ژاله با سازه تک ژنی CcF3´5´H در مقایسه با سازه سه ژنی Del2 و پنج ژنی Del8 بیشتر بوده (شکل ۷) که این نشان می‌دهد پیش‌ماده دی‌هیدروکائمفرول

در مسیر زیست ساخت آنتوسیانین ها کمتر به سمت دلفینیدین تغییر جهت داده و بیشتر در جهت تولید سیانیدین بوده است.

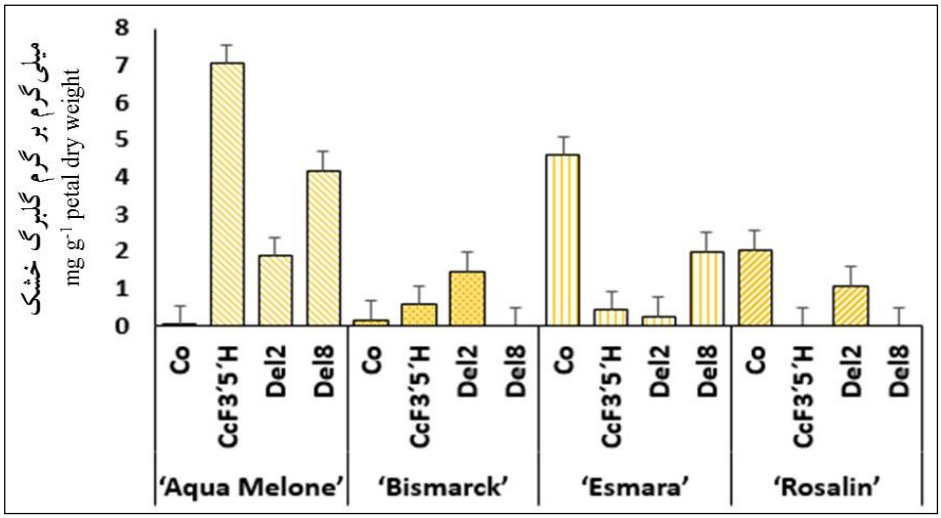


شکل ۷- نتایج واکاوی HPLC سیانیدین در گلبرگ‌های تزریق یافته با سه سازه ژنی رنگ گل و گلبرگ‌های تزریق یافته با محلول اینفیلتریشن بدون آگروباکتریوم (Co). انحراف استاندارد توسط میله‌های اشتباه در سطح ستون‌ها نشان داده شده است.

Figure 7. The results of cyanidin HPLC analysis in the petals injected with three flower color gene constructs and petal injected with agroinfiltration solution without *Agrobacterium* (Co). Standard deviation is shown by the mistake bars in the top of columns.

آنتوسیانین پلارگونیدین: نتایج نشان داد که در گلبرگ‌های شاهد چهار رقم بیشترین و کمترین میزان پلارگونیدین به‌ترتیب مربوط رقم‌های'Esmara' و 'Rosalin' بود. بیشترین میزان آنتوسیانین پلارگونیدین (۷/۰۴۳ میلی‌گرم در گرم گلبرگ خشک) در بین ٤ رقم بررسی شده با سه سازه ژنی در گلبرگ‌های تزریق یافته رقم 'Aqua Melone' با سازه تک ژنی CcF3´5´H به‌دست آمد. در همین رقم میزان پلارگونیدین در گلبرگ‌های تزریق یافته با سازه ژنی Del8 بیشتر از Del2 بود ولی در مقایسه با سازه CcF3´5´H به میزان بارزی کمتر بودند. این آنتوسیانین در گلبرگ‌های تزریق یافته رقم 'Bismarck' با سازه Del8 و نیز در گلبرگ‌های تزریق یافته رقم 'Rosalin' با سازه‌های ژنی Del8 و CcF3´5´H مشاهده نشد. در رقم 'Esmara' هم در گلبرگ‌های شاهد و هم در گلبرگ‌های تزریق یافته با سه سازه ژنی پلارگونیدین مشاهده شد (شکل ۸). به احتمال دلیل میزان بالای پلارگونیدین در رقم 'Aqua Melone' و در گلبرگ‌های تزریق

یافته با سازه CcF3´5´H این است که با وجود میزان به نسبت بالای سیانیدین در این رقم و نیز pH به نسبت پایین‌تر واکوئل گلبرگ‌ها، این ژن به تنهایی در تغییر جهت مسیر زیست ساخت‌ها به سمت دلفینیدین ناتوان بوده و بیشتر به سمت تولید پلارگونیدین بوده است. از نتایج جالب توجه این است که در رقم 'Bismarck' میزان پلارگونیدین به نسبت کمتر از سایر رقم ها بوده است (شکل ۸) و در اینجا با احتمال زیاد می توان نتیجه گرفت که مسیر زیست ساخت آنتوسیانین‌ها در این رقم با سه سازه ژنی رنگ گل و بیش بیان برخی از آنزیم‌های درگیر در این مسیر، به میزان زیادی به سمت تولید دلفیندین تغییر جهت داده است. رنگ زرد گل ارکید رقم 'Gower Ramsey' از گونه *Oncidium* به‌دلیل فرو- تنظیم[1] ژن‌های OgCHI و OgDFR می‌باشد، حال چنانچه این دو ژن در کنترل پیشبر ژن مرتبط با کاروتنوئید ویژه کروموپلاست[2] (Pchrc) در داخل زبانه[3] گل بیان شوند، تولید آنتوسیانین‌های به رنگ قرمز می‌کنند (۱).



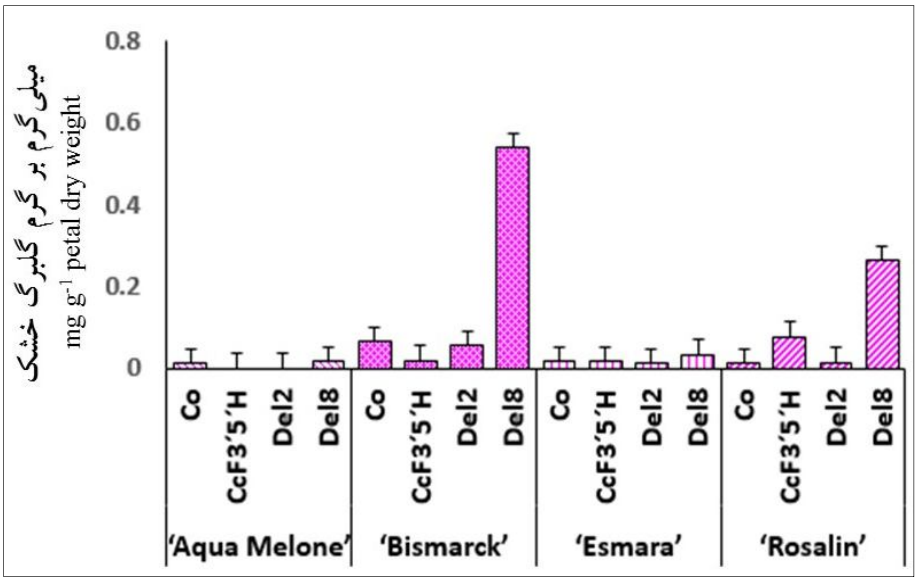
شکل ۸- نتایج واکاوی HPLC پلارگونیدین در گلبرگ‌های تزریق یافته با سه سازه ژنی رنگ گل و گلبرگ‌های تزریق یافته با محلول اینفیلتریشن بدون آگروباکتریوم (Co). انحراف استاندارد توسط میله‌های اشتباه در سطح ستون‌ها نشان داده شده است.

Figure 8. The results of pelargonidin HPLC analysis in the petals injected with three flower color gene constructs and petal injected with agroinfiltration solution without *Agrobacterium* (Co). Standard deviation is shown by the mistake bars in the top of columns.

1- Down-regulation
2- Chromoplast-specific carotenoid-associated gene
3- Lip

آنتوسیانین پئونیدین: نتایج بررسی آنتوسیانین‌ها با دستگاه HPLC نشان داد که رقم 'Bismarck' گل ژاله در تیمار شاهد دارای بیشترین میزان آنتوسیانین پئونیدین نسبت به سه رقم دیگر است. همچنین این رقم دارای بیشترین میزان پئونیدین (۰/۵۳۸ میلی‌گرم در گرم گلبرگ خشک) در گلبرگ‌های تزریق یافته با Del8 بود که تفاوت آن با سایر رقم‌ها بارز بود. در رقم 'Aqua Melone' با این که در تیمار شاهد و Del8 دارای پئونیدین بود، اما در گلبرگ‌های تزریق یافته با سازه ژنی Del8 و ژن CcF3´5´H این آنتوسیانین مشاهده نشد. در ۲ رقم 'Esmara' و 'Rosalin' هم در تیمار شاهد و هم در تیمارهای ژنی دارای آنتوسیانین پئونیدین در گلبرگ‌ها بودند ولی تفاوت آن‌ها بارز نبودند (شکل ۹). همچنان که در این پژوهش با تزریق سه سازه ژنی CcF3´5´H، Del2 و Del8 در گلبرگ‌های ٤ رقم صورتی رنگ گل ژاله و واکاوی با HPLC نشان داد که این ٤ رقم توانایی تولید آنتوسیانین دلفینیدین در گلبرگ‌ها را دارند و میزان تولید چهار نوع آنتوسیانین دلفینیدین، سیانیدین، پلارگونیدین و پئونیدین در آن‌ها متفاوت بود (شکل‌های ۵ تا ۹). بیشترین میزان آنتوسیانین‌های دلفینیدین، سیانیدین و پئونیدین در رقم 'Bismarck' مشاهده شد و رقم 'Aqua Melone' دارای بیشترین میزان پلارگونیدین بود. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که اگروانیفیلتریشن به عنوان یک روش تحلیلی مناسب برای بررسی عملکرد ژن‌ها در گیاهان اهمیت دارد (۱۸). با انجام این پژوهش آشکار شد که روش اگروانیفیلتریشن روشی مناسب برای بررسی بیان موقت ژن‌های رنگ گل با صرف وقت کمتر و هزینه خیلی کمتر در گل ژاله می‌باشد، زیرا انتقال این ژن‌ها به صورت پایدار و نیز بررسی و گزینش گیاهان تراریخت احتمالی وقت‌گیر بوده و به هزینه بالایی نیاز دارد. شیوه اگروانیفیلتریشن در برخی از گونه‌های گیاهی مانند تنباکو (۱۳)، انگور (۱۰)، کاهو، گوجه فرنگی و آرابیدوپسیس (۱۷)، کتان، نخود و هویج (١٦) برای بیان موقت انواع ژن‌ها بررسی شده است. بنابراین بهره‌گیری از این روش برای غربالگری رقم‌های مناسب پیش از انجام انتقال پایدار ژن‌ها، ضروری است.

همچنین این پژوهش نشان داد که با وارد کردن و بیش بیان برخی از ژن‌های درگیر در مسیر زیست ساخت آنتوسیانین‌ها می‌توان آن‌ها را به سمت ساخت دلفینیدین هدایت کرد. هر چند که تولید دلفینیدین در گلبرگ‌های گیاهان تراریخت یافته با انتقال پایدار ژن‌های عامل رنگ گل و نیز اگروانیفیلتریشن ژن‌ها در گلبرگ‌ها به عوامل فراوانی وابسته است، ولی در پایان می‌توان بر اساس نتایج به‌دست آمده رقم 'Bismarck' را برای انتقال پایدار ژن‌های درگیر در مسیر آنتوسیانین‌ها، با هدف تغییر رنگ گل و تولید آنتوسیانین دلفینیدین در ژاله‌های با رنگ گل صورتی پیشنهاد نمود.



شکل ۹- نتایج واکاوی HPLC پئونیدین در گلبرگ‌های تزریق یافته با سه سازه ژنی رنگ گل و گلبرگ‌های تزریق یافته با محلول اینفیلتریشن بدون آگروباکتریوم (Co). انحراف استاندارد توسط میله‌های اشتباه در سطح ستون‌ها نشان داده شده است.

Figure 9. The results of peonidin HPLC analysis in the petals injected with three flower color gene constructs and petal injected with agroinfiltration solution without *Agrobacterium* (Co). Standard deviation is shown by the mistake bars in the top of columns.

سپاسگزاری

بدین وسیله از آقای پروفسور "می" از کشور ژاپن به خاطر در اختیار قرار دادن سازه‌های ژنی رنگ گل، آقای دکتر خوشحال سرمست به پاس کمک در انجام آزمایش و از خانم دکتر زینی پور برای زحماتی که در واکاوی HPLC رنگدانه‌ها متقبل شدند، سپاسگزاری می‌شود.

منابع

1. Chiou, C.Y. and Yeh, K.W. 2008. Differential expression of MYB gene (OgMYB1) determines color patterning in floral tissue of *Oncidium* cv. 'Gower Ramsey'. Plant Mol. Biol. 66: 379–388.
2. Elomaa, P., Honkanen, J., Puska, R., Seppiinen, P., Helariutta, Y., Mehto, M., Kotilainen, M., Nevalainen, L. and Terri, T.H. 1993. *Agrobacterium*-mediated transfer of antisense chalcone synthase cDNA to *Gerbera hybrida* inhibits flower pigmentation. Biotechnol. 11: 508-511.

3. Falcone Ferreyra, M.L., Rius, S.P. and Casati, P. 2012. Flavonoids: Biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. Front Plant Sci. 3: 1-15.
4. Glover, B.J. 2007. Understanding flowers and flowering. Oxford University Press. New York. 226p.
5. Hussein, G.M., Abu El-Heba, G.A., Abdou S.M. and Abdallah, A.N. 2013. Optimization of transient gene expression system in *Gerbera jamesonii* petals. GM Crops and Food: Biotechnol. Agr. Food Chain 4: 50-57.
6. Janssen, B.J. and Gardner, R.C. 1989. Localized transient expression of GUS in leaf discs following co-cultivation with Agrobacterium. Plant Mol. Biol. 14: 61–72.
7. Kapila, J., Rycke, R.D., Montagu, M.V. and Angenon, G. 1997. An *Agrobacterium* mediated transient gene expression system for intact leaves. Plant Sci. 122: 101-8.
8. Katsumoto, Y., Mizutani, M. and *et al*. 2007. Engineering of the rose flavonoid biosynthetic pathway successfully generated blue-hued flowers accumulating delphinidin. Plant Cell Physiol. 48: 1589–1600.
9. Nazari, F., Khosh-Khui, M., Azadi, P., Salehi, H. and Niazi, A. 2014. Growth regulators affected in vitro propagation of pot gerbera (*Gerbera jamesonii* cv. Royal Soft Pink). Intl. J. Agr. Biosci. 3: 185-189.
10. Santos-Rosa, M., Poutaraud, A., Merdinoglu, D. and Mestre, P. 2008. Development of a transient expression system in grapevine via agroinfiltration. Plant Cell Rep. 27: 1053–1063.
11. Shang, Y., Schwinn, K.E. and *et al*. 2007. Methods for transient assay of gene function in floral tissues. Plant Meth. 3: 1.
12. Sheela, V.L. 2006. Gerbera. In: Advances in Ornamental Horticulture. 2. (Bhattacharjee, S.K., Ed.). Pointer Publ. India. 129-149.
13. Sheludko, Y.V., Sindarovska, Y.R., Gerasymenko, I.M., Bannikova, M.A. and Kuchuk, N.V. 2007. Comparison of several *Nicotiana* species as host for high-scale *Agrobacterium*-mediated transient expression. Biotechnol. Bioeng. 96: 608–614.
14. Tanaka, Y. and Brugliera, F. 2006. Flower colour. In: Flowering and its Manipulation (Ainsworth, C., Ed.). Ann. Plant Rev. Vol. 20. Oxford: Blackwell Publishing. 201–239.
15. Vaghchhipawala, Z., Rojas, C.M., Senthil-Kumar, M. and Mysore, K.S. 2011. Agroinoculation and agroinfiltration: simple tools for complex gene function analyses. In: Pereira A, editor. Plant Reverse Genet. 65–76.
16. Van der Hoorn, R.A.L., Laurent, F., Roth, R. and De Wit, P.J. 2000. Agroinfiltration is a versatile tool that facilitates comparative analysis of Avr9/Cf-9-induced and Avr4/Cf-4-induced necrosis. Mol. Plant Microbe Interact. 13: 439–446.

17. Wroblewski, T., Tomczak, A. and Michelmore, R. 2005. Optimization of *Agrobacterium* mediated transient expression assays for lettuce, tomato and *Arabidopsis*. Plant Biotechnol. J. 3: 259–273.
18. Yasmin, A. and Debener, T. 2011. Transient gene expression in rose petals via Agrobacterium infiltration. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 102: 245-250.
19. Yuki, S., Araki, S. and Suzuki, T. 2009. Flavonoid-3', 5'-hydroxylase gene of *Commelina communis*. Patents. EP 2119776 A1. Ishihara Sangyo Kaisha, Ltd. Osaka, Japan.
20. Zottini, M., Barizza, E., Costa, A., Formentin, E., Ruberti, C., Carimi, F. and Schiavo, F.L. 2008. Agroinfiltration of grapevine leaves for fast transient assays of gene expression and for long-term production of stable transformed cells. Plant Cell Rep. 27: 845–853.