

تأثیر خاموشی ژن چالکون ایزومراز بر محتوای فلاونوئیدی گیاه اطلسی (*Petunia hybrida*) با استفاده از فناوری RNAi

فاطمه کیخا آخر^{۱*}، عبدالرضا باقری^۲، نسرین مشتاقی^۳ و مسعود فخرفشانی^۱

۱- استادیار، گروه ژنتیک و تولید گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه جهرم، جهرم

۲- استاد، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد

۳- دانشیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۴/۱۲ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۶/۲۰)

چکیده

رنگ گل یکی از مهم‌ترین اهداف برای به‌نژادگران گیاهی از دیدگاه باغبانی است. اخیراً ارقام جدیدی با رنگ گل تغییر یافته با استفاده از فناوری‌های نوین از قبیل مهندسی ژنتیک حاصل شده‌اند که یکی از مؤثرترین روش‌های آن، کاهش مقدار رنگ‌دانه‌های داخلی گل به وسیله ممانعت از فعالیت آنزیم‌های ضروری مورد نیاز برای بیوسنتز آن‌ها می‌باشد. روش RNAi امکان بررسی ژن‌های دخیل در تولید رنگ گل را فراهم کرده است. در این پژوهش، نقش ژن چالکون ایزومراز (*chi*) به عنوان یکی از ژن‌های کلیدی در مسیر بیوسنتزی آنتوسیانین‌ها با استفاده از روش RNAi بررسی شد. در این آزمایش، با طراحی و ساخت سازه RNAi ژن *chi*، انتقال پایدار سازه خاموشی به گیاه اطلسی مورد بررسی قرار گرفت. محتوای آنتوسیانین هر یک از گیاهان مورد بررسی نیز استخراج و اندازه‌گیری شد. بیشترین کاهش بیان ژن در فنوتیپ نوع ۱ مشاهده شد که ۵/۶ برابر نسبت به شاهد کاهش نشان داد. مقدار نارنجنین نیز در لاین‌های تراریخت کاهش ۲۴ درصدی را نسبت به شاهد نشان داد. به طور کلی، نتایج این پژوهش نشان داد که روش RNAi می‌تواند به عنوان یک روش کارآمد در خاموشی ژن‌های مرتبط با مسیر تولید رنگ‌دانه گل‌های اطلسی عمل کند و از این طریق به نقش آن ژن‌ها در مسیر بیوسنتزی ترکیبات مختلف از جمله آنتوسیانین‌ها پی برد. علاوه بر این، نقش ژن چالکون ایزومراز به عنوان یکی از ژن‌های مؤثر در مسیر بیوسنتزی آنتوسیانین‌ها در گیاه اطلسی مشخص شد که می‌تواند در تولید رنگ در این گیاه نقش داشته باشد.

واژگان کلیدی: آنتوسیانین، اطلسی، چالکون ایزومراز، خاموشی ژن، RNAi

* نویسنده مسئول، آدرس پست الکترونیکی: f.keykha@jahromu.ac.ir

مقدمه

به‌نژادی و تولید ارقام جدید گیاهان زینتی و تکثیر و پرورش آن‌ها، صنعتی رو به رشد و در حال گسترش است (Datta, 2020; Ahn). تلاطم تولید در صنعت گل و گیاهان زینتی، وابسته به ارائه ارقام جدید با رنگ و شکل متفاوت می‌باشد. به‌طور کلی، تنوع یک اصل اساسی در هر برنامه به‌نژادی است و امروزه اصلاح‌نباتات بر ایجاد تنوع، انتخاب، ارزیابی و تکثیر ژنوتیپ‌های مطلوب تکیه دارد (Ahloowalia and Maluszynski, 2001).

فناوری‌های زیستی با فراهم کردن شرایط لازم برای مهندسی مسیرهای متابولیکی و به‌تبع آن ایجاد خصوصیات جدید در گیاهان زینتی توانسته است کمک شایانی به بهبود کارایی برنامه‌های به‌نژادی و کوتاه کردن این فرآیندها نماید. به‌منظور ایجاد یک گیاه با رنگ و رایحه خاص، باید ترکیبات خاصی از طریق تغییر در مسیر متابولیکی تجمع یابند (Dixon, 2005).

از صفات مهمی که در مهندسی ژنتیک گیاهان گل‌دار بسیار مورد توجه قرار گرفته است می‌توان به رنگ گل اشاره داشت (To and Wang, 2006; Nishihara and Nakatsuka, 2011). مهم‌ترین عامل تعیین‌کننده رنگ گل، اجزای سازنده رنگ‌دانه‌ها می‌باشند (Tanaka et al., 2009; Keykha et al., 2016a). موفقیت‌هایی با استفاده از این روش در گیاهانی از قبیل رز، ژربرا، اطلسی، داوودی، میخک، تورنیا و ... ایجاد شده که نتیجه دستورزی‌هایی در مقدار محتوای آنتوسیانین (گروهی از فلاونوئیدها که ترکیبات قرمز، بنفش و آبی تولید می‌کنند) و کاروتنوئیدها (گروهی از ایزوپرنوئیدها که رنگ زرد، نارنجی و قرمز تولید می‌کنند) در این گیاهان می‌باشد (Potera, 2007).

فلاونوئیدها رایج‌ترین نوع رنگ‌دانه‌ها در گیاه با ساختار شیمیائی ۱۵ کربنی و محلول در آب می‌باشند که بیشترین تجمع آن‌ها در واکوئل‌ها مشاهده می‌گردد (Delgado-Vargas et al., 2000; Tanaka and Ohmiya, 2008). ساده‌ترین راهکار برای تغییر رنگ گل، کاهش مقدار رنگ‌دانه‌های داخلی گل به‌وسیله ممانعت آنزیم‌های ضروری مورد نیاز برای بیوسنتز آن‌ها می‌باشد که از این

طریق می‌توان به نقش آن ژن در تولید رنگ پی برد (Nishihara and Nakatsuka, 2011). روش RNAi به‌عنوان یک ابزار قدرتمند، فقط از چند مولکول RNA دو رشته‌ای کوچک (dsRNA) برای خاموشی بیان ژن در سلول استفاده می‌کند و به‌عنوان روشی آسان و سریع برای تعیین عملکرد ژن در نظر گرفته شده است. نتایج پژوهش‌های انجام شده نشان داده است که این روش در شناسایی ژن‌های دخیل در مسیر بیوسنتزی رنگ‌دانه‌ها و تغییر رنگ گل نیز مؤثر است (Sannikova, 2020; Khan et al., 2022).

اطلسی (*Petunia hybrida*) یکی از محبوب‌ترین گیاهان زینتی گل‌دانی از خانواده Solanaceae و بومی آمریکای جنوبی است که پتانسیل خوبی برای صادرات به‌عنوان یک گیاه گل‌دانی دارد، به‌علاوه به‌طور وسیعی در فضای سبز شهری در بسیاری از کشورها مورد استفاده قرار می‌گیرد (Tsuda et al., 2004). این گیاه دارای گل‌هایی با رنگ‌های مختلف و متنوع از قبیل بنفش، ارغوانی، زرشکی، صورتی، قرمز و سفید می‌باشد که به‌دلیل این تنوع در رنگ، جایگاه ویژه‌ای در صنعت تولید گل به خود اختصاص داده است (Keykha et al., 2016b)؛ بنابراین، با توجه به مطالب ذکر شده از جمله قابلیت روش RNAi در تعیین عملکرد یک ژن از طریق کاهش بیان آن و اهمیت آنزیم چالکون ایزومراز در مسیر بیوسنتزی فلاونوئیدها، این تحقیق با هدف بررسی نقش ژن *chi* در تولید رنگ‌دانه در گیاه اطلسی با استفاده از فن RNAi انجام شده است.

مواد و روش‌ها

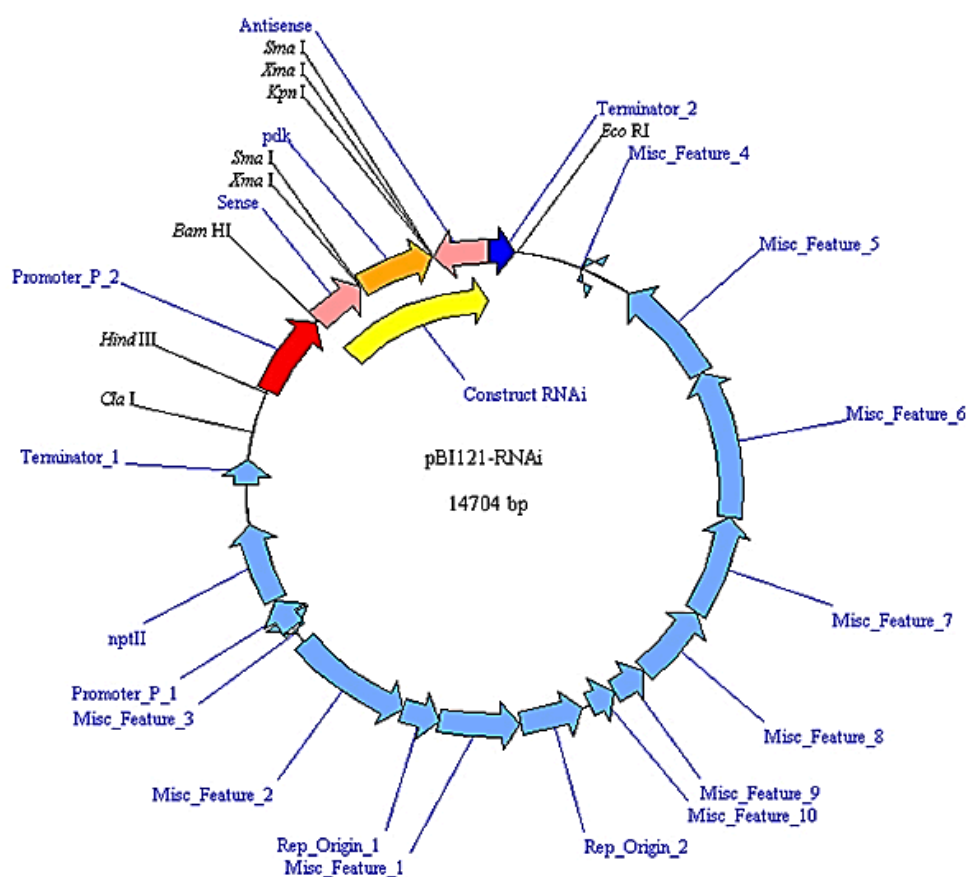
تهیه مواد گیاهی: بذر گیاهان اطلسی هلندی در گلدان‌های پلاستیکی در گلخانه دانشگاه فردوسی مشهد با شرایط دمایی ۱۷-۱۶ درجه سانتی‌گراد دمای شب و ۲۴-۲۱ درجه سانتی‌گراد دمای روز و دوره نوری ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی کشت شدند. در این آزمایش، از ۸-۶ برگگی استفاده شد.

طراحی سازه خاموشی حاوی ژن *chi*: سازه RNAi طراحی شده حاوی قطعه ۵۳۰ جفت‌باز ناحیه CDS توالی mRNA ژن چالکون ایزومراز (*chi*) گیاه اطلسی

شوک الکتريکی به باکتری *A. tumefaciens* منتقل شدند (Lin, 1995). کلنی‌هایی از باکتری که حاوی پلاسمیدهای مورد نظر بودند با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *chi* و با روش PCR شامل دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، دمای ۵۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه با ۳۵ چرخه تکثیر جداسازی شدند. طراحی آغازگرها به گونه‌ای انجام شد که یک جفت آغازگر ناحیه پیشبر 35S و بخشی از قطعه سنس ژن *chi* را تکثیر می‌کند و جفت آغازگر دوم، بخشی از قطعه آنتی‌سنس ژن *chi* و ناحیه ترمیناتور پلاسمید pBI121 را تکثیر می‌کند. توالی آغازگرها در جدول ۱ آورده شده است.

(نوکلئوتیدهای ۱۹۶۰-۱۴۳۰ با شماره دسترسی X14589) و قطعه ۷۴۱ جفت‌بازی از ژن پیرووات‌دهیدروژناز کیناز (*pdk*) به‌عنوان ایترون بود که بین ناحیه سنس و آنتی‌سنس ژن *chi* قرار گرفت. سپس سازه RNAi طراحی شده در ناقل pBI121 کلون گردید (شرکت بایونیر، کره جنوبی) (شکل ۱).

انتقال پلاسمید نو ترکیب حاوی سازه RNAi ژن *chi* به *Agrobacterium tumefaciens*
به‌منظور استفاده از سازه سنتز شده برای انتقال به گیاه، در مرحله نخست نیاز به تکثیر پلاسمید حاوی توالی ژنی سنتز شده از طریق تراریزش آن به باکتری *A. tumefaciens* بود. با این هدف، پلاسمیدهای pBI121 حاوی ژن *chi* با استفاده از روش



شکل ۱- سازه طراحی شده RNAi ژن *chi* همراه با آنزیم‌های برشی تعبیه شده در آن در ناقل pBI121. این سازه حاوی ۵۳۰ جفت‌باز از قطعه سنس و آنتی‌سنس توالی mRNA ژن چالکون ایزومراز (*chi*) و قطعه ۷۴۱ جفت‌باز از ژن پیرووات‌دهیدروژناز کیناز (*pdk*) به‌عنوان ایترون است که بین ناحیه سنس و آنتی‌سنس ژن *chi* قرار گرفته است. این سازه در پلاسمید pBI121 کلون شد که حاوی ژن مقاومت به کانامایسین، ترمیناتور NOS و پیشبر CaMV 35S است.

Figure 1. Schematic representation of the RNAi construct used for *chi* knockdown. *chi*-RNAi construct containing a 530 kb sense and antisense of *chi*'s mRNA and 741 kb of *pdk* gene as a spacer intron between sense and antisense of *chi* gene. This construct was cloned in pBI121 plasmid including kanamycin resistant gene, NOS terminator and CaMV35S promoter.

جدول ۱- توالی آغازگرهای اختصاصی ناقل خاموشی حاوی ژن *chi* استفاده شده جهت آزمون PCRTable 1. Sequence of specific primers for silencing vector containing *chi* gene for PCR

آغازگر Primer	آغازگر پیشرو Forward primer (5'→3')	آغازگر پسرو Reverse primer (5'→3')	طول محصول PCR (جفت باز) PCR size (bp)
ناحیه ابتدایی Promoter	CTATCCTTCGCAAGACCC	CAGCATTCGCAGTGCCAGTT	607
ناحیه انتهایی Terminator	AAACTTCTCAATGGCAGAC	GCGGGACTCTAATCATAAAA	568
توالی ویر Vir	GCGGTGAGACAATAGGCG'	GAAGTGTCTTGCTGTCGGC	2100

بین بردن آگروباکتریوم انجام شد. شاخه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک به محیط کشت ریشه‌زایی حاوی ۱ میلی گرم در لیتر IBA منتقل شدند. گیاهچه‌های تراریخت برای سازگاری به خاک منتقل شدند. بستر کشت گیاهچه شامل پیت ماس و پرلیت (۱:۱) بود و گیاهان جهت تأمین رطوبت، به اندازه کافی آبیاری شد. پس از استقرار و سازگاری کامل گیاهان، خصوصیات مورفولوژیکی گیاهان تراریخت و شاهد مورد بررسی قرار گرفت.

شناسایی ناقل RNAi حاوی ژن *chi* در گیاهان تراریخت: به‌منظور تأیید انتقال سازه خاموشی حاوی ژن *chi* به گیاهان تراریخت، استخراج DNA از برگ‌های گیاهان تراریخت و شاهد با استفاده از کیت ستونی استخراج DNA (شرکت دنا زیست آسیا با شماره کاتالوگ S-1030) انجام شد. واکنش PCR و تأیید گیاهان تراریخت با استفاده از دو جفت آغازگر ستر شده برای ناقل خاموشی حاوی ژن *chi* انجام شد. همچنین برای تأیید عدم آلودگی گیاهان تراریخت و شاهد، یک جفت آغازگر ژن *vir* طراحی و ستر شد (جدول ۱).

استخراج RNA و ستر cDNA: در این مرحله، استخراج RNA از گلبرگ‌های گیاهان تراریخت و شاهد با استفاده از کیت ستونی استخراج RNA (شرکت دنا زیست آسیا با شماره کاتالوگ S-1020) انجام شد و RNA استخراج شده به‌منظور حذف آلودگی‌های احتمالی با DNase I (Thermo Scientific DNase I#EN0525, USA) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه تیمار شد.

آزمون qRT-PCR: بیان ژن *chi* در گیاهان تراریخت حاوی ناقل خاموشی و گیاهان شاهد، با استفاده از روش qRT-PCR و تعیین تغییر بیان نسبی با استفاده از روش $\Delta\Delta CT$ محاسبه شد. دقت واکنش‌ها نیز با استفاده از نمودار ذوب رشته‌های تکثیرشده ارزیابی شد. در این واکنش از ژن *efl A* به‌عنوان ژن مرجع استفاده شد (جدول ۲).

انتقال سازه خاموشی حاوی ژن *chi* به گیاه اطلسی: جهت تراریختی گیاه اطلسی از روش دیسک برگ‌ی و هم‌کشتی با آگروباکتریوم استفاده شد. پس از کشت باکتری و هنگامی که OD_{600} باکتری به ۰/۵-۰/۴ رسید، سوسپانسیون باکتری به مدت ۱۰ دقیقه در ۴۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد (دمای ۴ درجه سانتی‌گراد). مایع رویی حذف شد و به رسوب باکتریایی موجود در انتهای فالتون، ۵۰ میلی‌لیتر از محیط کشت تلقیح اضافه شد (محیط کشت تلقیح شامل محیط کشت MS مایع حاوی ۵ درصد ساکارز و ۱۰۰ میکرومولار استوسرینگون بود). به‌منظور ضدعفونی برگ‌ها، ابتدا تمامی نمونه‌ها برای از بین بردن آلودگی‌های سطحی با آب شستشو شدند. سپس با محلول ۱ درصد هیپوکلریت سدیم به مدت ۱۰ دقیقه و پس از آن با محلول کاربندازیم ۱ در هزار، به مدت ۱۰ دقیقه تیمار شدند. شستشوی نهایی نمونه‌ها با ۳ مرتبه آبشویی با استفاده از آب مقطر استریل در زیر هود لامینار، انجام شد. برگ‌ها به قطعات کوچک ۰/۵ × ۰/۵ سانتی‌متر برش داده شده و به‌عنوان ریزنمونه استفاده شدند. ریزنمونه‌های برگ‌ی آماده شده به مدت ۱۰ دقیقه با محیط کشت تلقیح تیمار شدند. ریزنمونه‌ها به محیط کشت هم‌کشتی (محیط کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA فاقد آنتی‌بیوتیک و حاوی ۱۰۰ میکرومولار استوسرینگون) انتقال یافته و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد اتاق رشد و در تاریکی قرار داده شدند. پس از انجام هم‌کشتی، ریزنمونه‌ها به محیط کشت القای شاخه انتقال داده شدند که شامل نمک‌های محیط کشت MS، ۳۰ گرم در لیتر ساکارز، ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP، ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA، ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم و ۳۵ میلی‌گرم در لیتر آنتی‌بیوتیک کانامایسین بود. واکنش ریزنمونه‌ها هر دو هفته یک‌بار، روی محیط کشت القاء شاخساره حاوی کانامایسین برای گزینش لاین‌های تراریخت و آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم برای از

جدول ۲- توالی آغازگرهای ژن *chi* و *ef1 A* استفاده شده در qRT-PCR گیاه اطلسی

Table 2. *chi* and *ef1 A* primer sequences used in petunia qRT-PCR

نام آغازگر Primer name	آغازگر پیش رو Forward primer (5'→3')	آغازگر پس رو Reverse primer (5'→3')	طول محصول PCR (جفت‌باز) PCR size (bp)
ژن چالکون ایزومراز <i>chi</i>	TCTCCTCCAGTGTCCGTTAC	ACAAACTTCCCTTCTATCTCCAG	137
ژن مرجع <i>ef1 A</i>	CGGCGTCAACACCTACACC	GAAGTTTCTGCTGCGATGG	180

اندازه‌گیری مقدار نارنجین و چالکون با استفاده از اندازه‌گیری طیف جذبی: در این مرحله، استخراج فلاونوئیدها برای گیاهان تراریخت و شاهد با ۳ تکرار انجام شد و میزان چالکون (۳۶۹ نانومتر) و نارنجین (۲۹۰ نانومتر)، برای هر یک از گیاهان تراریخت و شاهد با استفاده از دستگاه نانودراپ (Tm-Anderson and (2000, Thermo Co. (Jordheim, 2006). برای اندازه‌گیری میزان چالکون (پیش ماده ژن *chi*) و نارنجین (فرآورده ژن *chi*)، منحنی استاندارد بر اساس نارنجین و چالکون استاندارد رسم شد و طبق منحنی استاندارد، مقدار هر یک از این مواد برحسب میکروگرم بر میلی‌لیتر تعیین شد.

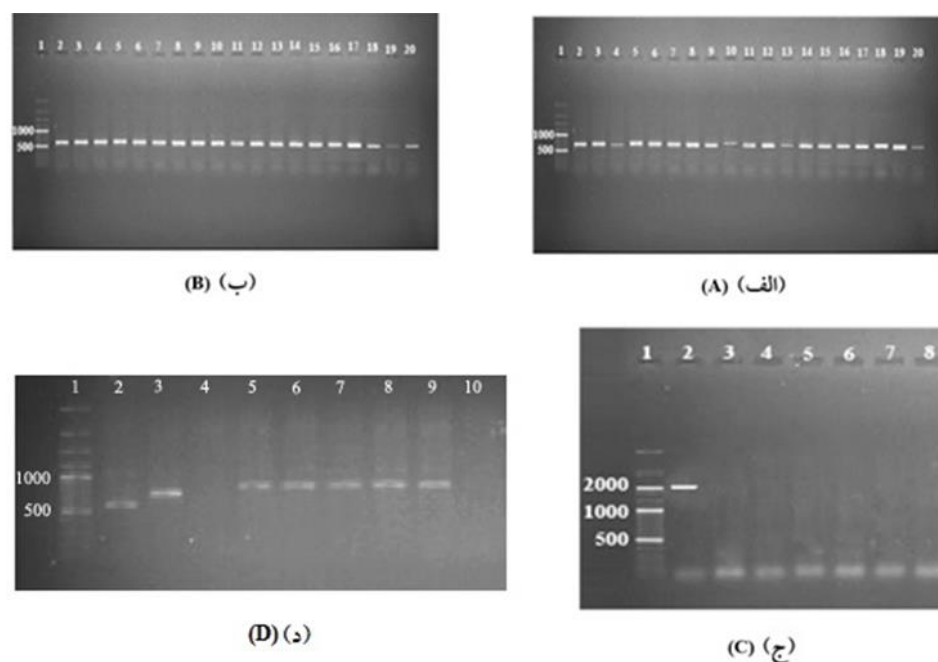
تجزیه و تحلیل‌های آماری: نمونه‌برداری‌ها و آزمون‌های مربوط به ارزیابی میزان بیان ژن و اندازه‌گیری طیف جذبی پژوهش حاضر در قالب طرح کاملاً تصادفی با شش تکرار (سه تکرار زیستی و دو تکرار فنی) انجام شدند. داده‌های حاصل با استفاده از نرم‌افزار SPSS (نسخه ۱۶) مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. مقایسه داده‌ها به روش آزمون *t* و آزمون چند دامنه‌ای دانکن ($P < 0.05$) انجام شد و اشکال مربوط به میانگین‌ها و خطوط انحراف معیار مربوط به هر میانگین نیز توسط نرم‌افزار Excel رسم گردید.

نتایج و بحث

بررسی درج ترانسژن در لاین‌های تراریخت: گیاهان سازگار شده از نظر درصد تراریختی و تغییرات مورفولوژیکی ارزیابی شدند. در جریان تراریختی اطلسی، ۱۲۰ لاین با رنگ گل آبی به‌دست آمد. به‌منظور بررسی درج ژن *chi* از بین کل نمونه‌های به‌دست آمده به‌صورت تصادفی ۱۰۰ نمونه انتخاب و در پنج گروه دسته‌بندی شدند که داخل هر گروه ۲۰ نمونه وجود داشت. سپس میانگین

تراریختی کل مورد بررسی و به‌عنوان درصد تراریختی آزمایش در نظر گرفته شد. بدین منظور، DNA ژنومی لاین‌های تراریخت استخراج شده و با استفاده از دو آغازگر اختصاصی تحت آزمون PCR قرار گرفتند (جدول ۱). از بین ۱۰۰ گیاه مورد بررسی، میزان تراریختی ۷۲ درصد به‌دست آمد (گروه ۱: ۱۶ نمونه از ۲۰ نمونه، گروه ۲: ۱۳ نمونه از ۲۰ نمونه، گروه ۳: ۱۵ نمونه از ۲۰ نمونه، گروه ۴: ۱۸ نمونه از ۲۰ نمونه و گروه ۵: ۱۰ نمونه از ۲۰ نمونه) (شکل ۲-الف و ب). کارایی انتقال ژن متفاوت است که در نتیجه منجر به تفاوت در درصد تراریختی در هر یک از گیاهان اطلسی مورد بررسی در این تحقیق شده است. به‌منظور بررسی عدم آلودگی نمونه‌های تراریخت، آزمون PCR با استفاده از ژن‌های *vir* انجام شد که در هیچ‌یک از نمونه‌های تراریخت بانندی مشاهده نشد (شکل ۲-ج).

بررسی خصوصیات مورفولوژیکی لاین‌های تراریخت: به‌منظور بررسی تغییرات مورفولوژیکی گیاهان تراریخت، تمامی نمونه‌ها در مرحله‌ای که گل‌های آن‌ها به‌طور کامل باز شده بود، مورد بررسی قرار گرفتند. در گیاهان تراریخت این آزمایش، تغییرات متنوعی در رنگ گل مشاهده شد. به‌طوری‌که این گیاهان در ۵ کلاس فنوتیپی قرار گرفتند. گیاهان فنوتیپ ۱ (B1) رنگ بنفش را نشان دادند (شکل ۳-الف و ب). بعضی از گیاهان کم‌رنگ‌تر از گیاهان شاهد بودند و در گروه ۲ (B2) قرار گرفتند (شکل ۳-ج). در تعدادی از گیاهان تراریخت آبی‌رنگ رگه‌های سفید (B3) مشاهده شد (شکل ۳-د) و تعدادی نیز حالت شیمری (B4) را بروز دادند، به این صورت که طیفی از رنگ‌های آبی و بنفش در گلبرگ‌ها قابل مشاهده بود (شکل ۳-ه). تعدادی از گل‌ها نیز آبی بوده و لبه‌هایی به رنگ بنفش داشتند که در گروه فنوتیپی ۵ (B5) قرار گرفتند (شکل ۳-و).



شکل ۲- آنالیز PCR جهت تأیید ورود سازه به ژنوم گیاه اطلسی. الف) قطعه ۶۰۷ bp تکثیر شده با آغازگرهای پیشبر و ناحیه سنس ژن *chi*؛ ب) قطعه ۵۶۸ bp تکثیر شده با آغازگرهای ترمیناتور و ناحیه آنتی سنس ژن *chi*؛ الف و ب) چاهک ۱: نشانگر ۱kbp؛ چاهک ۲۰-۲: گیاهان تراریخت؛ ج) قطعه ۲ kb ژن *vir*؛ چاهک ۱: نشانگر ۱kbp؛ چاهک ۲: پلاسمید خالص pBI121 (غیرنوترکیب)؛ چاهک ۳-۷: لاین‌های تراریخت اطلسی حاوی سازه RNAi ژن *chi*؛ چاهک ۸: گیاه اطلسی شاهد؛ د) تأیید حضور سازه خاموشی در پلاسمید pBI121 نوترکیب و عدم تکثیر در پلاسمید غیرنوترکیب؛ تأیید حضور ژن *kan* در گیاهان تراریخت و عدم حضور در گیاه شاهد؛ چاهک ۱: نشانگر ۱kbp؛ چاهک ۲: پلاسمید نوترکیب تکثیر شده با آغازگر *antisense*؛ چاهک ۳: پلاسمید نوترکیب تکثیر شده با آغازگر *sense*؛ چاهک ۴: پلاسمید غیرنوترکیب؛ چاهک ۵-۹: گیاهان تراریخت حاوی ژن *kan*؛ چاهک ۱۰: گیاه شاهد

Figure 2. PCR analysis for conformation of construct introduction to petunia genome. A) Synthesized 607 bp fragment with promoter and sense strand of *chi* primers; B) Synthesized 568 bp fragment with terminator and antisense of *chi* primers; A and B) lane 1: 1kbp size marker; lane 2-20: Transgenic plants; C) *vir* gene with 2 kb length; lane 1: 1kbp size marker; lane 2: Pure pBI121 plasmid (non-recombinant); lane 3-7: Petunia transgenic lines containing *chi*-RNAi construct; lane 8: Control plant; D) Presence of construct in recombinant pBI121 and its absence in non-recombinant plasmid; presence of *kan* gene in transgenic plants and its absence in control plant; lane 1: 1kbp size marker; lane 2: Recombinant plasmid replicated with antisense primers (568 bp); lane 3: recombinant plasmid replicated with sense primers (607 bp); lane 4: Non-recombinant plasmid; lane 5-9: Transgenic plants containing *kan* gene; lane 10: Control plant

در گیاهان تورنیا و توتون، ژن‌های *chs* و *chi* که ژن‌های ساختاری در مسیر بیوسنتزی تولید فلاونوئیدها هستند، با استفاده از روش RNAi خاموش شدند که در گیاهان تراریخت حاصل از دو نوع گیاه بررسی شده، کاهش قابل توجهی در شدت رنگ مشاهده شد (Fukusaki *et al.*, 2004; Nishihara *et al.*, 2005). به‌طوری که در گیاهان تراریخت توتون، دو لاین، گل‌هایی به رنگ سفید و ده لاین، گل‌هایی به رنگ صورتی روشن تولید کردند.

حضور فنوتیپ‌های شیمیر یا هیبرید نیز به احتمال زیاد نتیجه عمل سازه RNAi در برخی از سلول‌های بافت گلبرگ (فعالیت کمتر ژن *chi* و تولید رنگ‌دانه کمتر) و عدم فعالیت آن در

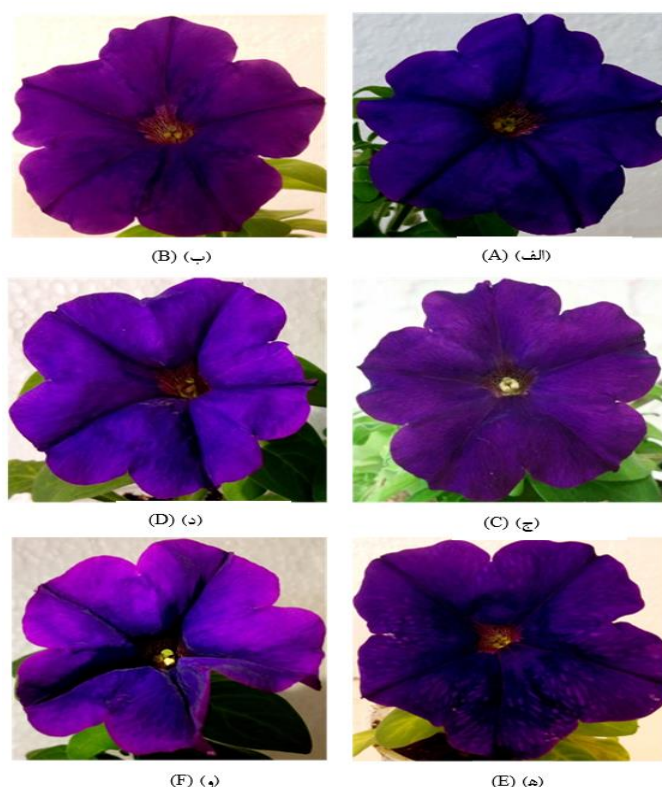
تمامی تغییرات فنوتیپی مشاهده شده در رنگ گل لاین‌های تراریخت مورد بررسی نتیجه فعالیت سازه RNAi مربوط به ژن *chi* و خاموشی نسبی مسیر تولید رنگ‌دانه‌های آنتوسیانینی بود که کاهش تولید رنگ‌دانه‌ها و در نتیجه کاهش رنگ و کم‌رنگ شدن لاین‌های تراریخت نسبت به شاهد را به دنبال داشته است. در فنوتیپ‌هایی که رگه‌های سفیدرنگ مشاهده شد، احتمالاً خاموشی در آن بخش‌ها بیشتر اتفاق افتاده بود (در این بخش‌ها خاموشی به‌صورت مطلق روی داده است) و منجر به متوقف شدن کامل مسیر تولید رنگ‌دانه و تجمع چالکون شده است که به‌صورت رنگ‌دانه‌های سفیدرنگ بروز کرده است.

شد که نشان‌دهنده کارایی سازه RNAi طراحی شده در خاموشی ژن چالکون ایزومراز (*chi*) می‌باشد که منجر به کاهش بیان ژن و ظهور فنوتیپ‌های جدید شده است. در پژوهش انجام شده، تفاوت در خصوصیات فنوتیپی و میزان بیان ژن *chi* نشان‌دهنده تفاوت در درجه خاموشی و کارایی سازه RNAi است. نتایج تحقیقات مختلف نشان‌دهنده کارایی بیشتر خاموشی در ژن‌های بالادست مسیر بیوسنتزی تولید آنتوسیانین‌ها است (Nakatsuka et al., 2010)، به‌طوری‌که در تحقیقاتی که بر روی گیاه جنتیانا (*Gentiana lutea*) انجام شده است، در گیاهان تراریخت جنتیانا که حاوی سازه RNAi ژن $\beta 5'h$ بودند، فراوانی خاموشی نسبت به گیاهان جنتیانای حاوی سازه خاموشی ژن‌های *chs* و *ans* کمتر بود (Nakatsuka et al., 2008; Chen et al., 2017). به‌عبارتی موقعیت ژن مورد نظر در چرخه بیوسنتزی تولید رنگ‌دانه و توالی ژن هدف مورد استفاده در روش RNAi نیز بر کارایی خاموشی مؤثر است (Heilersig et al., 2006; Nakatsuka et al., 2010).

بعضی از سلول‌های دیگر (عدم تغییر رنگ در این بخش از بافت گلبرگ) است که منجر به بروز طیفی از رنگ در بافت گلبرگ این نوع از گیاهان شده است (Nakamura et al., 2006; Nakatsuka et al., 2008).

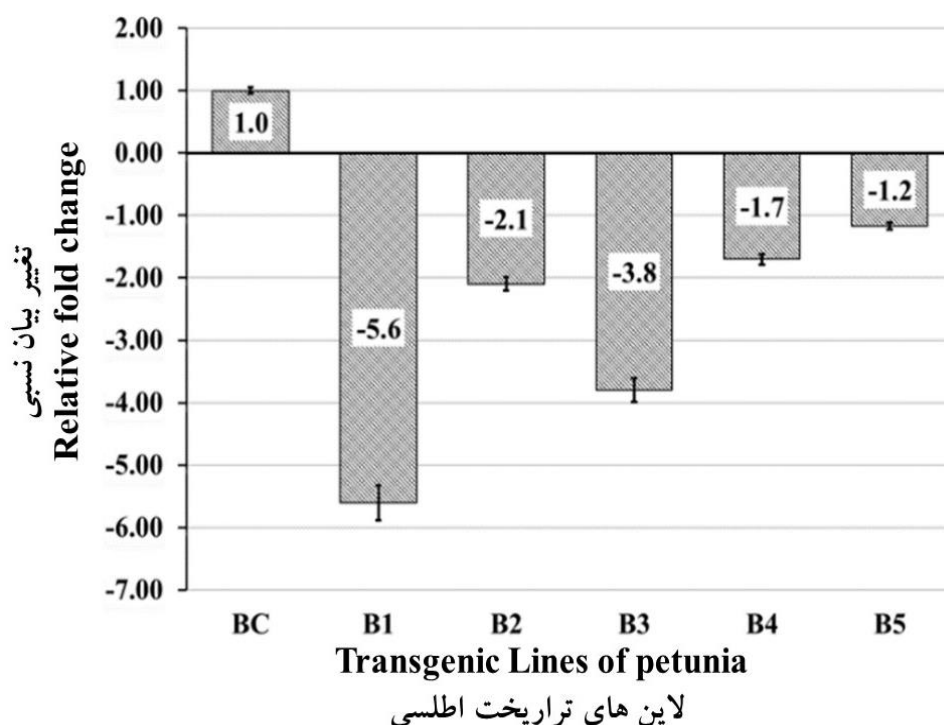
آزمون qRT-PCR: در گیاهان اطلسی تراریخت کاهش بیان ژن *chi* مشهود بود. به‌طوری‌که بیشترین کاهش بیان در فنوتیپ نوع ۱ (گل‌های بنفش‌رنگ) با ۵/۶ برابر کاهش نسبت به شاهد و کمترین کاهش بیان در فنوتیپ نوع ۵ (گلبرگ‌های آبی با لبه‌های بنفش) مشاهده شد که ۱/۲ برابر نسبت به شاهد کاهش یافته بود، اما این کاهش از نظر آماری معنی‌دار نبود. در گل‌های آبی با رگه‌های سفید، میزان بیان، ۳/۸ برابر نسبت به شاهد کاهش یافته بود، در حالی‌که در گل‌های آبی کم‌رنگ و آبی شیمیر، این کاهش به‌ترتیب ۲/۱ و ۱/۷ برابر نسبت به شاهد بود (شکل ۴).

در تمامی لاین‌های تراریخت مورد بررسی و فنوتیپ‌های مشاهده شده، کاهش بیان ژن *chi* نسبت به گیاهان شاهد مشاهده



شکل ۳- تغییرات فنوتیپی مشاهده شده در لاین‌های تراریخت اطلسی. الف) شاهد؛ ب) فنوتیپ B1: بنفش؛ ج) فنوتیپ B2: آبی کم‌رنگ؛ د) فنوتیپ B3: آبی با رگه‌های سفید؛ ه) فنوتیپ B4: آبی شیمیر؛ و) فنوتیپ B5: آبی با لبه‌های بنفش

Figure 3. Phenotypic changes in petunia transgenic lines. A) Control; B) B1 phenotype: violet; C) B2 phenotype: light blue; D) B3 phenotype: blue with white edges; E) B4 phenotype: chimeric blue; F) B5 phenotype: blue with violet edges



شکل ۴- تغییر بیان ژن *chi* در ۵ گروه فنوتیپی لاین‌های تراریخت اطلسی نسبت به شاهد. BC: شاهد؛ B1: بنفش؛ B2: آبی کمرنگ؛ B3: آبی با رگه‌های سفید؛ B4: آبی شمر؛ B5: آبی با لبه‌های بنفش

Figure 4. *chi* gene expression profile in 5 phenotypic groups of petunia transgenic lines in comparison to the control. BC: Control; B1: Violet; B2: Light blue; B3: Blue with white edges; B4: Chimeric blue; B5: Blue with violet edges

نارنجین در گیاهان شاهد آبی‌رنگ، ۰/۰۷۴۹ میکروگرم در میلی‌لیتر بود، در حالی که در فنوتیپ‌های تراریخت مورد بررسی (B5 تا B1) مقدار آن به ترتیب ۰/۰۵۳۴، ۰/۰۵۶۳، ۰/۰۵۵۷، ۰/۰۵۹۱ و ۰/۰۵۸۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر اندازه‌گیری شد که به‌طور میانگین نسبت به شاهد، کاهش ۲۴/۴ درصد مقدار نارنجین را نشان دادند (جدول ۳).

دلیل کاهش مقدار نارنجین در تمامی فنوتیپ‌های تراریخت، انتقال سازه RNAi ژن *chi* است که منجر به خاموشی نسبی این ژن و کاهش فعالیت آنزیم چالکون ایزومراز (CHI) شده است. عدم فعالیت و یا کاهش فعالیت آنزیم CHI مستقیماً بر فرآورده حاصل از آن که نارنجین است، تأثیرگذار بوده و به این دلیل کاهش مقدار نارنجین در تمامی لاین‌های تراریخت مورد بررسی مشهود بود.

روش RNAi به‌طور گسترده‌ای برای کاهش بیان ژن‌های ساختاری مؤثر در بیوسنتز آنتوسیانین‌ها به‌کار گرفته شده است که سبب ممانعت از تجمع آنتوسیانین‌ها و تغییر رنگ گل در گیاهان تراریخت می‌شود (Fukusaki *et al.*, 2004; Tsuda *et al.*, 2006; Nakamura *et al.*, 2006). برای مثال، در گیاهان جنتیانای تراریخت با رنگ گل یاسی، تغییر رنگ گل به دلیل تغییر در ترکیب آنتوسیانین‌ها نسبت داده شد، در حالی که در گیاهان تراریخت با رنگ گل آبی کمرنگ، کاهش در مقدار آنتوسیانین‌ها، دلیل اصلی تغییر رنگ در گیاهان مورد بررسی در نظر گرفته شده است (Nakatsuka *et al.*, 2010; Nayeri and Baghban., 2022).

اندازه‌گیری مقدار نارنجین در لاین‌های تراریخت و شاهد: مقدار نارنجین در تمامی ۵ گروه فنوتیپی گیاهان تراریخت با رنگ آبی نیز کاهش یافت. به‌طوری‌که مقدار

جدول ۳- مقدار نارنجنین و چالکون (میکروگرم بر میلی‌لیتر) در ۵ گروه فنوتیپی لاین‌های تراریخت اطلسی

Table 3. Values of naringenin and chalcone ($\mu\text{g/ml}$) in 5 phenotypic groups of petunia transgenic lines

Color رنگ	5 phenotypic groups in transgenic lines ۵ گروه فنوتیپی در لاین‌های تراریخت					
نوع فلاونوئید Flavonoid type	شاهد Control	بنفش Violet (B1)	آبی کم‌رنگ Light blue (B2)	آبی با لبه‌های سفید Blue with white edges (B3)	آبی شیمر Chimeric blue (B4)	آبی با لبه‌های بنفش Blue with violet edges (B5)
Naringenin نارنجنین	0.0749	0.0534*	0.0563*	0.0557*	0.0591*	0.0585*
Chalcone چالکون	0.0561	0.0550 ^{ns}	0.0560 ^{ns}	0.0587*	0.0550 ^{ns}	0.0563 ^{ns}

^{ns} و*: به ترتیب غیرمعنی‌دار و معنی‌دار در سطوح احتمال ۵ درصد

^{ns} and *: Non-significant and significant at 5% probability level, respectively

به‌عنوان یک آنزیم حدواسط عمل می‌کند. به عبارتی هنگام عدم حضور این آنزیم نیز فعالیت چرخه بیوسنتزی رنگ‌دانه به‌طور خود بخودی ادامه دارد، اما میزان فعالیت چرخه به‌طور چشمگیری پایین می‌آید که این امر نیز می‌تواند دلیل دیگری بر نتایج به‌دست آمده و عدم تفاوت در مقدار ماده چالکون در گیاهان تراریخت و شاهد باشد (Fujino *et al.*, 2018).

نکته جالب‌توجه، افزایش مقدار این ماده در فنوتیپ‌های با رگه‌های سفید است. همان‌طور که پیش از این اشاره شد، چون میزان فعالیت سازه RNAi مورد نظر در تمامی سلول‌ها به‌صورت یکنواخت نیست، در فنوتیپ‌هایی که کارایی خاموشی ژن در آن‌ها بیشتر بوده است و یا به عبارتی خاموشی مطلق در برخی از سلول‌های بافت این نوع گلبرگ‌ها بروز کرده است (حضور رگه‌های سفید که نشان دهنده توقف کامل مسیر بیوسنتزی تولید آنتوسیانین‌ها است)، افزایش تجمع مقدار ماده چالکون قابل مشاهده است.

نتایج این آزمایش به‌طور واضحی نشان داد که ممانعت از فعالیت ژن *chi* می‌تواند در گیاهان اطلسی با استفاده از خاموشی القا شده از طریق RNAi به‌دست آید و تغییر در مقدار ترکیبات فلاونوئیدی و رنگ در گلبرگ‌های این گیاهان واقع شود. در حقیقت نتایج این آزمایش مؤید حضور و نقش کلیدی این ژن در مسیر بیوسنتزی آنتوسیانین‌ها است که نقش اصلی را در واکنش تبدیل چالکون به فلاونون ایفا می‌کند.

اندازه‌گیری مقدار چالکون در لاین‌های تراریخت و شاهد:

در گیاهان تراریخت افزایش معنی‌دار مقدار ماده چالکون تنها در فنوتیپ‌هایی از لاین‌های تراریخت که دارای گل‌هایی به رنگ آبی با رگه‌های سفید بودند، مشاهده شد (جدول ۳) که نسبت به گیاهان شاهد افزایش یافته بود و در سایر فنوتیپ‌ها، تفاوت معنی‌داری از نظر مقدار این ماده به‌دست نیامد ($p \leq 0.05$).

چالکون پیش ماده آنزیم چالکون ایزومراز است. به‌طور قطع، خاموشی ژن *chi*، منجر به کاهش تولید نارنجنین و افزایش مقدار چالکون می‌شود (Wang *et al.*, 2018, Hajiahmadi *et al.*, 2018). دلیل عدم تفاوت معنی‌دار در میزان چالکون موجود در لاین‌های تراریخت نسبت به شاهد را می‌توان به کاهش نسبی بیان این ژن نسبت داد. از آنجایی که در اندازه‌گیری‌ها، برآیندی از تمام سلول‌های بافت گلبرگ ارزیابی می‌شود و ممکن است سازه خاموشی انتقال یافته در بعضی از سلول‌ها سبب خاموشی مطلق ژن و در بعضی دیگر منجر به کاهش نسبی فعالیت شود و یا در برخی از سلول‌ها بدون فعالیت بوده و عملکرد خاصی را نداشته باشد، از این‌رو ارزیابی فعالیت سازه خاموشی نیز برآیندی از فعالیت تمامی سلول‌های موجود در بافت گلبرگ است که می‌تواند منجر به عدم تفاوت معنی‌دار در مقدار ماده چالکون شده باشد (Voorhuijzen *et al.*, 2020). همچنین آنزیم چالکون ایزومراز

References

- Ahloowalia, B.S. and Maluszynski, M.** (2001). Induced mutations - a new paradigm in plant breeding. *Euphytica*, **118**: 167-173.
- Ahn, C.H., Ramya, M., An, H.R., Park, P.M., Kim, Y.J., Lee, S.Y. and Jang, S.** (2020). Progress and challenges in the improvement of ornamental plants by genome editing. *Plants*, **9**: 687-691.
- Anderson, O. and Jordheim, M.** (2006). *The Anthocyanins in Flavonoids Chemistry, Biochemistry and Application*. CRC Press Boca, Raton, FL, USA.
- Bhattacharai, K. and Van Huylenbroeck, J.** (2022). Breeding, genetics, and genomics of ornamental plants. *Horticulturae*, **8**: 148-156.
- Chen, G., Liu, H., Wei, Q., Zhao, H., Liu, J. and Yu, Y.** (2017). The acyl-activating enzyme PhAAE13 is an alternative enzymatic source of precursors for anthocyanin biosynthesis in petunia flowers. *Journal of Experimental Botany*, **68**: 457-467.
- Datta, S.K.** (2020). Induced mutations: technological advancement for development of new ornamental varieties. *The Nucleus*, **63**: 119-129.
- Delgado-Vargas, F., Jimenez, A.R. and Paredae-Lopez, O.** (2000). Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains: characteristics, biosynthesis, processing, and stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **40**: 173-289.
- Dixon, R.A.** (2005). Engineering of plant natural product pathways. *Current Opinion of Plant Biology*, **8**: 329-336.
- Fujino, N., Tenma, N., Waki, T., Ito, K., Komatsuzaki, Y. and Sugiyama, K.** (2018). Physical interactions among flavonoid enzymes in snapdragon and torenia reveal the diversity in the flavonoid metabolon organization of different plant species. *The Plant Journal*, **94**: 372-392.
- Fukusaki, E., Kawasaki, K., Kajayama, S., An, C., SuZuki, K., Tanaka, Y. and Kobayashi, A.** (2004). Flower color modulations of *Torenia hybrida* by down regulation of chalcone synthase gene with RNA interference. *Journal of Biotechnology*, **111**: 229-240.
- Hajiahmadi, Z., Shirzadian-Khorramabad, R., Kazemzad, M. and Sohani, M.M.** (2018). Expression of cryIAb driven by a wound inducible promoter (MPI) in tomato to enhance resistance to *Tuta absoluta*. *Plant Genetic Researches*, **4(2)**: 1-16 (In Persian).
- Heilersig, H.J.B., Loonen, A.E.H.M., Bergervoet, M., Wolters, A.M.A. and Visser, R.G.F.** (2006). Post-transcriptional gene silencing of GBSSI in potato: effects of size and sequence of the inverted repeats. *Plant Molecular Biology*, **60**: 647-662.
- Khan, Z., Razzaq, A., Sattar, T., Ahmed, A., Khan, S.H., and Ghouri, M.Z.** (2022). Understanding floral biology for CRISPR-based modification of color and fragrance in horticultural plants. *F1000Research*, **11(854)**: 854.
- Keykha, F., Bagheri, A. and Moshtaghi, N.** (2016a). Analysis of chalcone synthase and chalcone isomerase gene expression in pigment production pathway at different flower colors of *Petunia Hybrida*. *Journal of Cell and Molecular Research*, **8**: 8-14.
- Keykha, F., Bagheri, A., Moshtaghi, N., Bahrami, A.R. and Sharifi, A.** (2016b). RNAi-induced silencing in floral tissues of *Petunia hybrida* by agroinfiltration: a rapid assay for chalcone isomerase gene function analysis. *Cellular and Molecular Biology*, **62**: 26-31.
- Lin, J.J.** (1995). Electro transformation of Agrobacterium. In: Nickoloff, J.A., (ed.). *Methods in Molecular Biology*, pp. 177-178, Humana Press, Totowa, NJ, USA.
- Nakamura, N., Fukuchi-Mizutani, M., Miyazaki, K., Suzuki, K. and Tanaka, Y.** (2006). RNAi suppression of the anthocyanidin synthase gene in *Torenia hybrida* yields white flowers with high frequency and better stability than antisense and sense suppression. *Plant Biotechnology*, **23**: 13-17.
- Nakatsuka, T., Mishiba, K., Abe, Y., Kubota, A., Kakizaki, Y., Yamamura, S. and Nishihara, M.** (2008). Flower color modification of gentian plants by RNAi-mediated gene silencing. *Plant Biotechnology*, **25**: 61-68.
- Nakatsuka, T., Mishiba, K.I., Kubota, A., Abe, Y., Yamamura, S., Nakamura, N., Tanaka, Y. and Nishihara, M.** (2010). Genetic engineering of novel flower color by suppression of anthocyanin modification genes in gentian. *Journal of Plant Physiology*, **167**: 231-237.
- Nayeri, S. and Baghban Kohnehrouz, B.** (2022). Efficient agrobacterium-mediated transformation and analysis of transgenic plants in hybrid black poplar (*Populus × euromericana* Dode Guinier). *Plant Genetic Researches*, **8(2)**: 1-22 (In Persian).
- Nishihara, M., Nakatsuka, T. and Yamamura, S.** (2005). Flavonoid components and flower color change in transgenic tobacco plants by suppression of chalcone isomerase gene. *FEBS Letters*, **579**: 6047-6078.

- Nishihara, M. and Nakatsuka, T.** (2011). Genetic engineering of flavonoid pigments to modify flower color in floricultural plants. *Biotechnology Letter*, **33**: 433-441.
- Potera, C.** (2007). Blooming biotech. *Nature Biotechnology*, **25**: 963-965.
- Sannikova, V.Y.** (2020). Genetic engineering as a way to obtain ornamental plants with a changed flower color. *Plant Biotechnology and Breeding*, **3(1)**: 40-45.
- Tanaka, Y. and Ohmiya, A.** (2008). Seeing is believing: engineering anthocyanin and carotenoid biosynthetic pathways. *Current Opinion in Biotechnology*, **19**: 190-197.
- Tanaka, Y., Brugliera, F. and Chandler, S.** (2009). Recent progress of flower color modification by biotechnology. *International Journal of Molecular Sciences*, **10**: 5350-5369.
- To, K.Y. and Wang, C.K.** (2006). *Molecular Breeding of Flower Color. Floriculture, Ornamental and Biotechnology*. Global Science Books, Carrollton, GA, USA.
- Tsuda, S.H., Fukui, Y., Nakamura, N., Katsumoto, Y., Yonekura-Sakakibara, K., Fukuchi-Mizutani, M., Ohira, K., Ueyama, Y., Ohkawa, H., A.Holton, T., Kusumi, T. and Tanaka, Y.** (2004). Flower color modification of *Petunia hybrida* commercial varieties by metabolic engineering. *Plant Biotechnology*, **21**: 377-386.
- Voorhuijzen, M.M., Prins, T.W., Belter, A., Bendiek, J., Brünen-Nieweler, C., van Dijk, J.P., Goerlich, O., Kok, E.J., Pickel, B., Scholtens, I.M.J., Stolz, A. and Grohmann, L.** (2020). Molecular characterization and event-specific real-time PCR detection of two dissimilar groups of genetically modified *Petunia* (*Petunia x hybrida*) sold on the market. *Frontiers in Plant Science*, **11**: 1047.
- Wang, Y., Xie, X., Ran, X., Chou, S., Jiao, X., Li, E., Zhang, Q., Meng, X. and Li, B.** (2018). Comparative analysis of the polyphenols profiles and the antioxidant and cytotoxicity properties of various blue honeysuckle varieties. *Open Chemistry*, **16**: 637-646.

The Effect of Chalcone Isomerase (*Chi*) Gene Silencing on Flavonoids Content in *Petunia hybrida* using RNAi Technology

Fatemeh Keykha Akhar^{1,*}, Abdolreza Bagheri², Nasrin Moshtaghi³ and Masoud Fakhrfeshani¹

1- Assistant Professor, Department of Plant Genetic and Production, Faculty of Agriculture, Jahrom University, Jahrom, Iran

2- Professor, Department of Plant Biotechnology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

3- Associated Professor, Department of Plant Biotechnology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

(Received: July 3, 2022 – Accepted: September 11, 2022)

Abstract

From horticulture viewpoint, flower color is one of the key targets for plant breeders. New varieties have been bred with altered flower color using genetic engineering approaches. One of the most effective applications is the reduction of flower pigments by suppression of involved enzymes in their biosynthesis pathways. RNA interference (RNAi) has provided an effective tool for the knock down of genes involved in the production of flower pigments. In this study, a *chi*-RNAi construct was designed for chalcone isomerase (*chi*) gene to transform *Petunia* plants. Transgenic lines in one phenotype showed 5.6 fold reduction in *chi* expression in comparison to the control. Chalcone and naringenin were also extracted and quantified. A 24% reduction in naringenin content was obvious in all transgenic lines. Generally, the results of this research showed that RNAi technology can be used as an efficient method for silencing the flower pigments in *petunia*. In addition, the chalcone isomerase gene was identified as one of the effective genes in anthocyanin biosynthesis pathway in *Petunia* plants which is involved in the production of color in these plants; hence, *chi* gene silencing resulted in clear phenotypic alterations in this plant.

Keywords: Anthocyanin, *Petunia hybrida*, Chalcone isomerase, Gene silencing, RNAi

* Corresponding Author, E-mail: f.keykha@jahromu.ac.ir