اگروواینفیلتریشن گلبرگ های گل ژاله (ژربرا) با آگروباکتریوم حامل سازه های ژنی رنگ گل به منظور تولید آنتوسیانین دلفینیدین

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

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

*نویسنده مسئول: f.nazari433@gmail.com

چکیده

بررسی عمل ژن های رنگ گل در ژاله (ژربرا) به دلیل کارایی پایین شیوه های تراریختی و نیز زمان طولانی مورد نیاز برای تولید گیاهان تراریخت به طور معمول به کندی انجام می شود. برای واکاوی کارکرد این ژن ها می توان از بیان موقت آن ها به عنوان یک راه چاره استفاده کرد. به همین دلیل این آزمایش در۲ مرحله انجام شد، نخست در ۱۲ رقم گل ژاله به رنگ های مختلف آزمایش اگروواینفیلتریشن با ۳ سازه ژنی رنگ گل (pBIH-35S-CcF3´5´H، pBIH-35S-Del2 و pBIH-35S-Del8) انجام شد. مشاهده ظاهری نشان داد که رقم های به رنگ صورتی دارای تغییر رنگ گل به سمت آبی و تولید آنتوسیانین دلفینیدین هستند. سپس این آزمایش برای بار دوم با ۴ رقم به رنگ صورتی و با همان سازه ها تکرار شد. نتایج واکاوی HPLC چهار نوع آنتوسیانین دلفینیدین، سیانیدین، پلارگونیدین و پئونیدین نشان داد که، گلبرگ های تزریق شده رقم 'Bismarck' با سازه ژنی pBIH-35S-Del8 بیشینه مقدار دلفینیدین را تولید کردند.

کلمات کلیدی: اگروواینفیلتریشن، ژن های رنگ گل، دلفینیدین، ژاله (ژربرا).

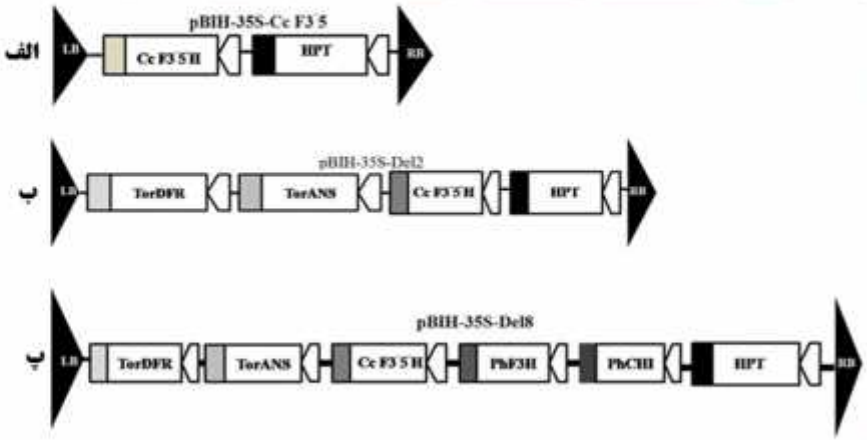
مقدمه

نفوذ آگروباکتریوم به شیوه خلاء(Vacuum infiltration) و یا به وسیله تزریق با سرنگ به داخل بافت های گیاه به طور کارآمدی برای سنجش بیان موقت ژن ها به کار می رود. از حدود ۱۶ سال پیش در گونه های متفاوتی این روش برای واکاوی سازوکار خاموشی ژن ها و بررسی درون بدنی پیشبرها(Promoters) و عوامل رونویسی و نیز تجمع فرآورده ژنی درون یاخته ای بهره گیری شده است. این روش در واقع برای اهداف ویژه‌ای به کاربرد می شود و یک روش برای بررسی بیان موقت ژن مورد نظر می‌باشد، وقت کمتری صرف شده، خسته کننده نیست و هزینه کمتری نیز دارد (Wroblewski *et al*., 2005). در حالت بیان پایدار ژن و تراریخت کردن با اگروباکتریوم، T-DNA حامل ژن یا ژن های مورد نظر با ژنگان(Genome) میزبان تلفیق می شود در حالی که در بیان موقت، نسخه‌هایی از T-DNA تلفیق نشده در هسته یاخته های میزبان وارد شده و می توانند ۱۰۰۰ مرتبه بیشتر از حالت پایدار بیان شوند (Janssen and Gardner, 1989). با توجه به اهمیت گل ژاله و جایگاه پنجم آن در بین گل های بریدنی (نظری، ۱۳۹۳، Nazari *et al*., 2014) این پژوهش با تزریق تعلیق آگروباکتریوم حامل ۳ سازه ژنی رنگ گل (pBIH-35S-CcF3´5´H، pBIH-35S-Del2 و pBIH-35S-Del8) به گلبرگ های آن، میزان تولید آنتوسیانین های دلفینیدین، سیانیدین، پلارگونیدین و پئونیدین با دستگاه HPLC بررسی می شود.

مواد و روش‌ها

از ۳ نژاد EHA 101 آگروباکتریوم (*A. tumefaciens*) که هر کدام دارای پلاسمید pBIHبا ژن های مرتبط با رنگ گل به ویژه ژن CcF3´5´H و یک ژن نشانگر انتخابی مقاومت به هایگرومایسین (*hpt*) بود، بهره گیری شد (نگاره ۱). در این آزمایش ابتدا

۱۲رقم گل ژاله به رنگ های مختلف تهیه شد و سپس از هر رقم ۳ شاخه گل انتخاب و در هر شاخه گل، ۳ گلبرگ مورد آزمایش اگروانفیلتریشن قرار گرفت. مشاهده چشمی نتایج این آزمایش نشان داد که بیشتر در گلبرگ های رقم های به تقریب صورتی، تغییر رنگ به سمت آبی دیده می شود. بنابراین، آزمایش بار دوم با ۴ رقم به تقریب صورتی رنگ به نام های 'Aqua Melone'، 'Bismarck'، 'Esmara' و 'Rosalin' انجام شد. در بخش واکاوی کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) به دلیل هزینه بر بودن بررسی انواع آنتوسیانین ها در همه تکرارها، آمیخته ای از گلبرگ های خشک شده با دستگاه خشک کن انجمادی هر ۳ تکرار در هر تیمار به عنوان یک تزریق برای دستگاه HPLC در نظر گرفته شد. روش آماده سازی باکتری های دارای ژن های رنگ گل برای تزریق به گلبرگ های گل ژاله و بررسی انواع آنتوسیانین های گلبرگ ها بر اساس روش Shang و همکاران (۲۰۰۷) بود. به طور خیلی خلاصه، از محیط کشت های رشد، انگیزش و اینفیلتریشن آگروباکتریوم بهره گیری شد. یعنی در واقع تعلیق آگروباکتریوم حامل ژن های رنگ گل با چگالی چشمی (OD) ۰/۵ تا ۰/۶ تهیه و ۱ تا ۱/۵ میلی لیتر از آن با سرنگ بدون سوزن در پایه گلبرگ ها تزریق شد. سپس شاخه های گل با گلبرگ های تزریق یافته را داخل شیشه های با محلول سوکروز ۴٪ و ۰/۰۲ میلی گرم در لیتر نیترات نقره قرار داده و سپس در انکوباتور با دمای ۱۸ تا ۲۰ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۸۵٪ به مدت ۸ روز گذاشته شدند. سپس گلبرگ ها با دستگاه خشک کن انجمادی در دمای ۳۵- درجه سلسیوس و زمان حدود ۲۴ ساعت خشک شدند. در پایان واکاوی HPLC با هدف شناسایی میزان آنتوسیانین ها در گلبرگ های خشک شده در پژوهشکده بیوتکنولوژی کرج انجام شد.



نگاره ۱: سازه های ژنی بهره گیری شده در این پژوهش که دارای ژن های رنگ گل (**الف**: CcF3′5′H، **ب**: Del2 و **پ**: Del8) و مقاومت به هایگرومایسین (*hpt*) هستند.

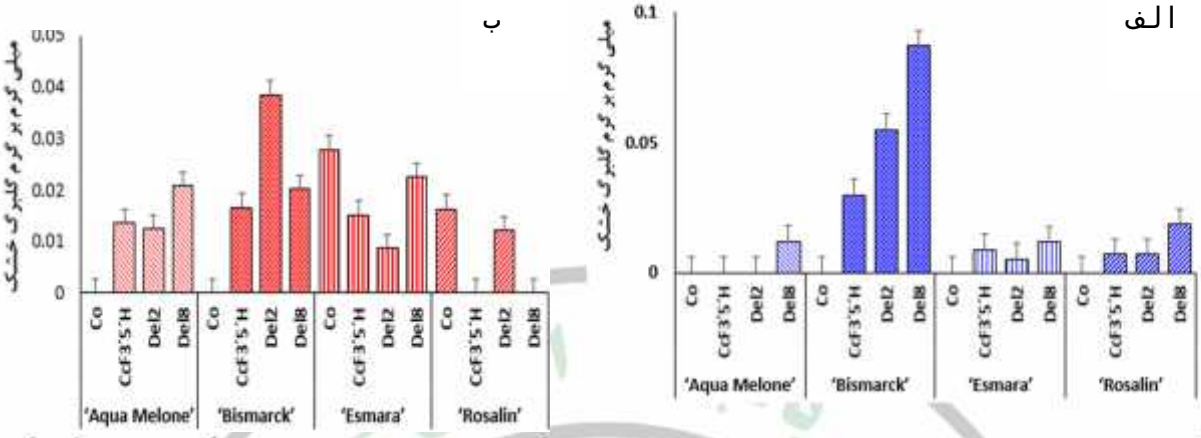
نتایج

با انجام آزمایش اگروانفیلتریشن با ۳ سازه ژنی pBIH-35S-CcF3′5′H، pBIH-35S-Del2 و pBIH-35S-Del8 در گلبرگ های ۴ رقم گل ژاله، نتایج واکاوی HPLC چهار نوع آنتوسیانین دلفینیدین (Delphinidin)، سیانیدین (Cyanidin)، پلارگونیدین (Pelargonidin) وپئونیدین (Peonidin) گلبرگ های تزریق یافته به شرح زیر بود:

۱- دلفینیدین: در گلبرگ های شاهد (تزریق یافته با محلول اینفیلتریشن بدون آگروباکتریوم) هر ۴ رقم، دلفینیدین دیده نشد. در رقم 'Aqua Melone' تنها در سازه ژنی Del8 در گلبرگ های تزریق یافته دلفینیدین مشاهده شد، ولی در رقم 'Bismarck' در هر ۳ سازه ژنی دلفینیدین در گلبرگ ها ساخته شد که بیشترین آن (۰/۰۸۶ میلی گرم بر گرم گلبرگ خشک شده با دستگاه خشک کن انجمادی) در سازه Del8 بود که به نوعی بیشترین میزان دلفینیدین تولید شده در بین هر ۳ سازه ژنی و در هر ۴ رقم بود (نگاره ۲ -الف).

۲- سیانیدین: همسان با نتایج دلفینیدین، بیشترین میزان سیانیدین (۰/۰۳۸ میلی گرم در گرم گلبرگ خشک) در رقم 'Bismarck' ولی در تزریق با ژن های Del2 در گلبرگ های تزریق یافته دیده شد. همچنین در گلبرگ های تزریق نیافته با

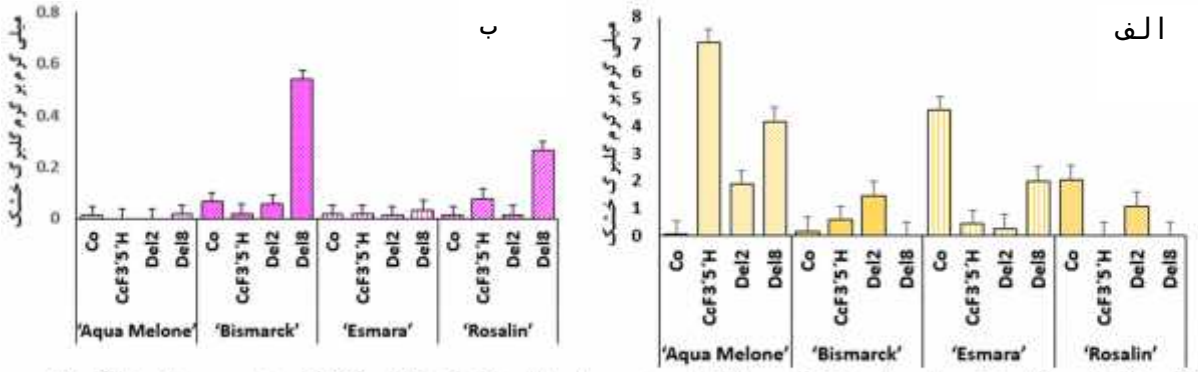
آگروباکتریوم این رقم سیانیدین وجود نداشته است. البته مشابه این نتایج در رقم 'Aqua Melone'دیده شد که در گلبرگ های شاهد بدون سیانیدین بوده ولی در گلبرگ های تزریق یافته با سه سازه ژنی دارای سیانیدین هستند(نگاره ۲-ب).



نگاره-۲: نتایج واکاوی آنتوسیانین های دلفینیدین (الف) و سیانیدین (ب)، پلارگونیدین (پ) و پئونیدین (ت) با دستگاه HPLC در گلبرگ های تزریق یافته گل ژاله با آگروباکتریوم دارای ژن های رنگ گل در ۴ رقم گل ژاله(Co: گیاهان شاهد تزریق یافته با محلول اینفیلتریشن بدون آگروباکتریوم ، CcF3′5′H: ژن فلاونوئید ۳′،۵′-هیدروکسیلاز از گیاه .*Commelinacommunis* L، Del2: دارای ژن های فلاونوئید ۳′،۵′-هیدروکسیلاز از گیاه .*Commelinacommunis* L، دی هیدروفلاونول۴-ریداکتاز (DFR) و آنتوسیانیدین سنتاز (ANS) از گل ترانه (*Torenia*) و Del8: دارای ژن های فلاونوئید ۳′،۵′-هیدروکسیلاز از گیاه *Commelinacommunis*، دی هیدروفلاونول۴-ریداکتاز (DFR) و آنتوسیانیدین سنتاز (ANS) از گل ترانه (*Torenia*) و ژن های فلاونون ۳ بتا-هیدروکسیلاز (PhF3H) و چالکون ایزومراز (PhCHI) از گل ارکید شب پره دورگه .*Phalaenopsis* spp و نیز انحراف استاندارد توسط میله های اشتباه در سطح ستون ها نشان داده شده است).

۳- پلارگونیدین: بیشترین میزان آنتوسیانین پلارگونیدین (۷/۰۴۳ میلی گرم در گرم گلبرگ خشک) در بین چهار رقم بررسی شده با سه سازه ژنی در گلبرگ های تزریق یافته رقم 'Aqua Melone' با ژن CcF3′5′H مشاهده شد. این آنتوسیانین در گلبرگ های تزریق یافته رقم 'Bismarck' با مجموعه ژنی Del8و نیز در گلبرگ های تزریق یافته رقم 'Rosalin'با سازه های ژنی Del8و CcF3′5′Hمشاهده نشد(نگاره ۳ -الف).

٤- پئونیدین: نتایج بررسی آنتوسیانین ها با دستگاه HPLCنشان 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 میلی گرم در گرم گلبرگ خشک) در گلبرگ های تزریق یافته با Del8بود که تفاوت آن با سایر رقم ها بارز بود. در رقم 'Aqua Melone'با این که در تیمار شاهد و Del8دارای پئونیدین بود، اما در گلبرگ های تزریق یافته با سازه ژنی Del8و ژن CcF3′5′H این آنتوسیانین مشاهده نشد. در دو رقم 'Esmara' و 'Rosalin' هم در تیمار شاهد و هم در تیمارهای ژنی دارای آنتوسیانین پئونیدین در گلبرگ ها بودند ولی تفاوت آن ها بارز نبودند (نگاره ۳ -ب).



نگاره-۳: نتایج واکاوی آنتوسیانین های پلارگونیدین (الف) و پئونیدین (ب) با دستگاه HPLC در گلبرگ های تزریق یافته با آگروباکتریوم دارای ژن های رنگ گل در ۴ رقم گل ژاله (توضیح مشابه نگاره ۲).

بحث

چنین به نظر می رسد که روش اگروانفیلتریشن روشی مناسب برای بررسی بیان موقت ژن های رنگ گل با صرف وقت کمتر و هزینه خیلی کمتر می باشد، زیرا انتقال این ژن ها به صورت پایدار و نیز بررسی و گزینش گیاهان تراریخت احتمالی وقت گیر بوده و به هزینه بالایی نیاز دارد. شیوه اگروانفیلتریشن در برخی از گونه های گیاهی برای بیان موقت انواع ژن ها بررسی شده است. بنابراین بهره گیری از این روش برای غربالگری رقم های مناسب پیش از انجام انتقال ژن، ضروری است. گل ژاله همسان با گل هایی مانند ورد، به دلیل نداشتن ژن فلاونوئید ۳'،۵'-هیدروکسیلاز توانایی تولید آنتوسیانین دلفینیدین در گلبرگ ها را ندارند، ولی چون نوع رنگیزه های موجود در گل آن از نوع آنتوسیانین ها بوده به ویژه در رقم های صورتی، با تزریق این ژن توانایی تولید رنگ آبی (دلفینیدین) را دارند (Katsumoto *et al*., 2007). همچنان که در این پژوهش با تزریق سازه های ژنی CcF3´5´H، Del2 و Del8 در گلبرگ های ۴ رقمگل ژاله و واکاوی با HPLC نشان داد که این ۴ رقم توانایی تولید آنتوسیانین دلفینیدین در گلبرگ ها را دارند. بنابراین در بررسی اولیه می توان گفت هر ۴ رقم برای انتقال ۳ سازه ژنی مناسب می باشند. Shang و همکاران (۲۰۰۷) با اگروانفیلتریشن RNA مداخله گر (RNAi=RNA interference) ژن چالکون سینتاز (CHS) در گلبرگ های گل میمون نشان دادند که با خاموشی این ژن، در بخشی از گلبرگ های گل میمون هیچگونه رنگیزه ای تولید نمی شود و رنگ آن ها از بنفش به سفید تغییر می کند. پژوهش اگروانفیلتریشن در۴ رقم گل ژاله نشان داد که با وجود نداشتن تفاوت معنی داری از نظر pH واکوئلی، رقم 'Bismarck'توانایی تولید میزان بالایی دلفینیدین را دارد و این مقدار در سازه ژنی Del8 نسبت به ۲ سازه دیگر بیشتر بوده است. از دلایل این مقدار بالای تولید دلفینیدین در این سازه، می توان به وجود ژن های فلاونون ۳ بتا-هیدروکسیلاز (PhF3H) و چالکون ایزومراز (PhCHI) از گل ارکید شب پره دورگه *Phalaenopsis* spp. در مقایسه با ۲ سازه دیگر اشاره کرد. افزون بر این، میزان سیانیدین در گلبرگ های تزریق یافته با ژن CcF3´5´H در مقایسه با ژن های Del2 و Del8 بیشتر بوده که این نشان می دهد که پیش ماده دی هیدروکانمفرول در مسیر زیست ساخت آنتوسیانین ها کمتر به سمت دلفینیدین تغییر جهت داده و بیشتر در جهت سیانیدین بوده است. همچنین این پژوهش نشان داد که با وارد کردن و بیش بیان برخی از ژن های درگیر در مسیر زیست ساخت آنتوسیانین ها می توان آن ها را به سمت ساخت دلفینیدین هدایت کرد. هر چند که تولید دلفینیدین در گلبرگ ها و نیز اگروانفیلتریشن ژن ها در گلبرگ ها به عوامل فراوانی وابسته است.

منابع

۱. نظری، ف. ۱۳۹۳. باززایی و امکان انتقال ژن گزارشگر GUS و مهندسی متابولیک در مسیر زیست ساخت آنتوسیانین‌ها در گل ژربرا. رساله دکتری در بخش علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز. ۱۶۳ ص.

2. Janssen, B.J. and R.C. Gardner. 1989. Localized transient expression of GUS in leaf discs following co-cultivation with Agrobacterium. Plant Mol. Biol. 14:61–72.
3. Katsumoto, Y., M. Mizutani, and *et al*. 2007. Engineering of the rose flavonoid biosynthetic pathway successfully generated blue-hued flowers accumulating delphinidin. Plant Cell Physiol. 48:1589–1600.
4. Nazari, F., M. Khosh-Khui, P. Azadi, H. Salehi, and A. Niazi. 2014. Growth regulators affected in vitro propagation of pot gerbera (Gerbera jamesonii cv. Royal Soft Pink). Intl. J. Agr. Biosci. 3:185-189.
5. Shang, Y., K.E. Schwinn, and *et al*. 2007. Methods for transient assay of gene function in floral tissues. Plant Meth. 3:1.
6. Wroblewski, T., A. Tomczak, and R. Michelmore. 2005. Optimization of *Agrobacterium* mediated transient expression assays for lettuce, tomato and *Arabidopsis*. Plant Biotechnol. J. 3:259–273.

Agroinfiltration of flower petals of gerbera by *Agrobacterium* carrying flower color gene constructs to produce of delphinidin anthocyanin

Farzad Nazari[1*], Morteza Khosh-Khui1[2]and Pejman Azadi[3,4]

1-Department of Horticultural Science, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran. 2-Department of Horticultural Science, College of Agriculture, Shiraz University. 3-Agriculture Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII) and 4-Ornamental Plants Research Institute of Iran (OPRII), Mahallat, Iran.

*Corresponding author: f.nazari433@gmail.com

Abstract

The study of flower color genes function in gerbera is hampered by low efficiency of transformation methods and the long time span needed for production of transgenic plants. For some functional analysis, the transient expression of genes could be an efficient alternative. Therefore, this study was conducted in two stages. In first stage, the agroinfiltration experiment with 3 flower color constructs (pBIH-35S-CcF3´5´H, pBIH-35S-Del2 and pBIH-35S-Del8) in 12 cultivars of gerbera was investigated. Visual observations of injected petals showed that cultivars with pink color have shifted flower color from pink to blue and produced delphinidin. In the second stage, this experiment was repeated with 4 pink cultivars and mentioned constructs. The results of HPLC analysis of 4 anthocyanins (delphinidin, cyaniding, pelargonidin and peonidin) showed that the injected petals of ‘Bismarck’ cultivar with pBIH-35S-Del8 construct have the highest delphinidin production.

Key words: agroinfiltration, flower color genes, delphinidin, gerbera.