

## طراحی، ساخت و انتقال سازه‌های ژنی جهت خاموش‌سازی ژن‌های $F3'H$ و $F3'5'H$ در انگور رقم شیراز

مریم پژمان مهر<sup>۱</sup>، علی عبادی<sup>۲\*</sup>، امیر موسوی<sup>۳</sup>، دبرا مکتدیوید<sup>۴</sup> و آماندا. ر. والکر<sup>۵</sup>  
 ۱ و ۲. دانشجوی سابق دکتری و استاد، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج  
 ۳. دانشیار پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران  
 ۴ و ۵. پژوهشگر و استاد مؤسسه CSIRO، ادلاید، استرالیا  
 (تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۲/۷ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۳/۳/۳)

### چکیده

به منظور مطالعه عملکرد ژن‌های  $F3'5'H$  و  $F3'H$  و برهم کنش آنها در مسیر بیوسنتز فلاونوئیدها در انگور، از طریق طراحی و ساخت سازه‌های مناسب ایجاد کننده ihpRNA، لاین‌های تراریخت حاوی سازه خاموش‌کننده ژن  $F3'H$  و سازه خاموش‌کننده هر دو ژن  $F3'5'H$  و  $F3'H$  ایجاد شدند. به این منظور، قطعاتی از دو ژن انتخاب و به صورت تکرارهای معکوس در ناقل pHANNIBAL درج و با بهره‌گیری از سیستم ناقل دوگانه، هر یک از سازه‌های تهیه شده وارد ناقل p27 mod GFP 4a شده و به آگروباکتری منتقل شدند. کالوس‌های جنین‌زای حاصل از کشت پرچم، توسط کشت توام با آگروباکتری تراریخت شدند. بیان ژن  $GFP$  در کالوس‌های جنین‌زا، پنج روز پس از تلقیح با میکروسکوپ مشاهده شد. در نهایت از کشت کالوس‌های جنین‌زای دارای سازه خاموشی ژن  $F3'H$  و سازه خاموشی همزمان  $F3'5'H$  و  $F3'H$  به ترتیب تعداد ۴۲ و ۳۴ لاین باززایی شدند که بر اساس واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، ۳۶ لاین برای سازه خاموشی ژن  $F3'H$  و ۲۷ لاین برای سازه خاموشی همزمان  $F3'5'H$  و  $F3'H$  مثبت ارزیابی شدند که این نتیجه نشان از کارایی بالای روش باززایی و تراریختی مورد استفاده بود.

### واژه‌های کلیدی: *Vitis vinifera*، سازه ژنی، خاموش‌سازی، $F3'5'H$ ، $F3'H$

#### مقدمه

مختلف انگور، به منظور درک نقش این ژن‌ها و تعیین ارتباط بین آنها انجام شده است (Castellarin *et al.*, 2006; Jeong *et al.*, 2006). بررسی بیوسنتز فلاونوئیدها در اندام‌های گل، ساقه، پیچک و بذر که سطح بالاتری از mRNA ژن  $F3'H$  نسبت به  $F3'5'H$  داشتند، مقادیر مناسبی از فلاونول‌ها و یا فلاوان-۳-ال‌ها را نشان داد. اندام‌هایی که سطح بالاتری از mRNA ژن  $F3'5'H$  نسبت به  $F3'H$  داشتند، دارای میزان بالای آنتوسیانین‌های مبتنی بر دلفینیدین و همچنین پرودلفینیدین بودند. با این حال تمام گروه‌های فلاونوئیدها تغییراتی منطبق با میزان mRNA ژن‌های  $F3'H$  و  $F3'5'H$  نشان ندادند. بر این

ژن‌های ساختاری در مسیر بیوسنتز فنیل پروپانوییدها که کدکننده فلاونوئید<sup>۳</sup>- و فلاونوئید<sup>۳</sup>،<sup>۵</sup>- هیدورکسیلازها (آنزیم‌های سیتوکروم P450) هستند، الگوی هیدورکسیلاسیون حلقه B فلاونوئیدها را تعیین می‌کنند و به ترتیب در بیوسنتز آنتوسیانین‌های مبتنی بر سیانیدین و دلفینیدین، فلاونول‌های مختلف (از جمله کوئرستین، میریستین) و همچنین پروسیانیدین و پرودلفینیدین (فلاوان-۳-ال‌ها) دخیل‌اند (Jeong *et al.*, 2006). مطالعه توالی، میزان ابراز mRNA ژن‌های  $F3'H$  و  $F3'5'H$  و همچنین ترکیب فلاونوئیدها در اندام‌های

که به صورت دو تکرار معکوس<sup>۷</sup> قرار گرفته‌اند تا RNA دو رشته‌ای تشکیل دهند. زمانی که اینترون به سازه hpRNA اضافه شود کارایی خاموش‌سازی افزایش می‌یابد. خاموش‌سازی به وسیله تشکیل RNA خود مکمل دارای اینترون<sup>۸</sup> (ihpRNA) در تعداد زیادی از گیاهان نسبت به سایر روش‌های مرسوم روشی بسیار مؤثرتر است که منجر به درجات مختلف خاموشی تا نزدیک ۱۰۰ درصد می‌شود (Wesley et al., 2001; Helliwell & Waterhouse, 2003). کارایی بالاتر ihpRNA می‌تواند به این علت باشد که فرایند ویرایش اینترون، بازوهای hpRNA را روبروی هم قرار داده و تشکیل RNA دو رشته‌ای را نسبت به حالتی که بازوهای hpRNA باید مکمل خود را به صورت تصادفی پیدا کنند، تسهیل می‌کند (Wesley et al., 2001).

ویژگی‌های خاموش‌سازی ژن به وسیله ihpRNA آن را برای کاربرد در ژنومیکس کارکردی جذاب می‌کند و اطلاعات مفیدی در مورد نقش ژن‌ها در فرایند رشد و نمو گیاه در اختیار می‌گذارد. سازه ihpRNA از نظر ژنتیکی غالب است و بنابراین فنوتیپ‌ها بدون نیاز به ایجاد لاین‌های خالص، در نسل تراریخت صفر (T0) یا اول (T1) قابل غربالگری و مطالعه هستند. از آنجا که اساس این خاموش‌سازی بر پایه توالی ساختاری است، استفاده از توالی‌های منحصر بفرد ژن‌های هدف خاص و البته امکان استفاده از توالی‌های حفاظت شده برای هدف قرار دادن خانواده‌های ژنی مختلف را امکان پذیر می‌کند (Helliwell & Waterhouse, 2003). همچنین با کاربرد سازه‌هایی که دو ژن متفاوت را هدف قرار می‌دهند، می‌توان موجب خاموشی هر دو ژن شده و عملکرد کلی آن دو را مطالعه نمود (Helliwell et al., 2002).

به منظور مطالعه عملکرد ژن‌های  $F3'5'H$  و  $F3'H$  و برهم کنش آنها در مسیر بیوسنتز فلاونوئیدها در انگور، در این تحقیق تلاش شده تا از طریق طراحی و ساخت سازه‌های مناسب ایجادکننده ihpRNA لاین‌های تراریخت حاوی سازه خاموش‌کننده ژن  $F3'H$  و سازه خاموش‌کننده هر دو ژن  $F3'5'H$  و  $F3'H$  (به منظور خاموشی همزمان آنها) ایجاد شود.

اساس پیشنهاد شد که مکانیزم‌های دیگری ممکن است در بیوسنتز هر یک از گروه‌های فلاونوئیدی دخیل باشد (Jeong et al., 2006).

تا به امروز نحوه تنظیم بیوسنتز فلاونوئیدها و عملکرد ژن‌های  $F3'5'H$  و  $F3'H$  در سرشاخه‌های بین فلاونول‌ها، آنتوسیانین‌ها و تانن‌ها کاملاً مشخص نشده است. به همین دلیل انجام مطالعاتی که بتواند عملکرد، اختصاصی بودن یا ترجیح سوبسترای برای هر یک از ژن‌های  $F3'5'H$  و  $F3'H$  را بطور مستقل و در ارتباط با یکدیگر بررسی کند، ضروری می‌باشد. استفاده از روش‌های مولکولی از جمله خاموش‌سازی ژن‌ها می‌تواند نقش مؤثری در شناسایی عملکرد ژن‌ها داشته باشد. RNAi (مداخله‌گر) ابزاری مؤثر جهت خاموش‌سازی پس از رونویسی ژن‌ها (PTGS)<sup>۱</sup> در موجودات مختلف از جمله گیاهان است (Wang & Waterhouse, 2000; Waterhouse et al., 1998).

طبق یک مکانیزم داخلی در لاین‌های تراریخت که تولید RNA دو رشته‌ای یا تک رشته‌ای خود مکمل (سنجاق سری)<sup>۲</sup> می‌کند، RNA دو رشته‌ای از طریق برش با اندونوکلازهایی بنام دایسر<sup>۳</sup> به قطعات کوچک دو رشته‌ای ۲۱ تا ۲۳ نوکلئوتیدی (si RNAs)<sup>۴</sup> تبدیل می‌شود. پیچ‌های si RNA و دو رشته آن قبل از ورود به کمپلکس چند پروتئینه القاءکننده خاموشی RNA (RISC)<sup>۵</sup> با صرف ATP باز شده و در این کمپلکس، si RNA تک‌رشته‌ای شده، سپس به RNA مکمل خود (مربوط به ژن هدف) چسبیده و به‌عنوان راهنما برای برش اندونوکلازی رشته mRNA اندوژن توسط اندونوکلاز موجود در RISC مورد استفاده قرار می‌گیرد (Scherer & Rossi, 2003).

RNAi شامل مکانیزم‌های متعدد مرتبط در خاموش‌سازی ژن است که اساس مشترکی دارند. روش ایجاد گیاهان تراریخت بیان‌کننده hpRNA<sup>۶</sup> از جمله کاربرد این مکانیزم‌هاست (Wang & Waterhouse, 2000). سازه‌های hpRNA نیازمند دو کپی از توالی هدف هستند

1. Post-Transcriptional Gene Silencing
2. Self-complementary (hairpin)
3. Dicer
4. Small interfering RNA
5. RNA-induced silencing complex
6. hairpin

7. Inverted repeats

8. intron-spliced hairpin RNA

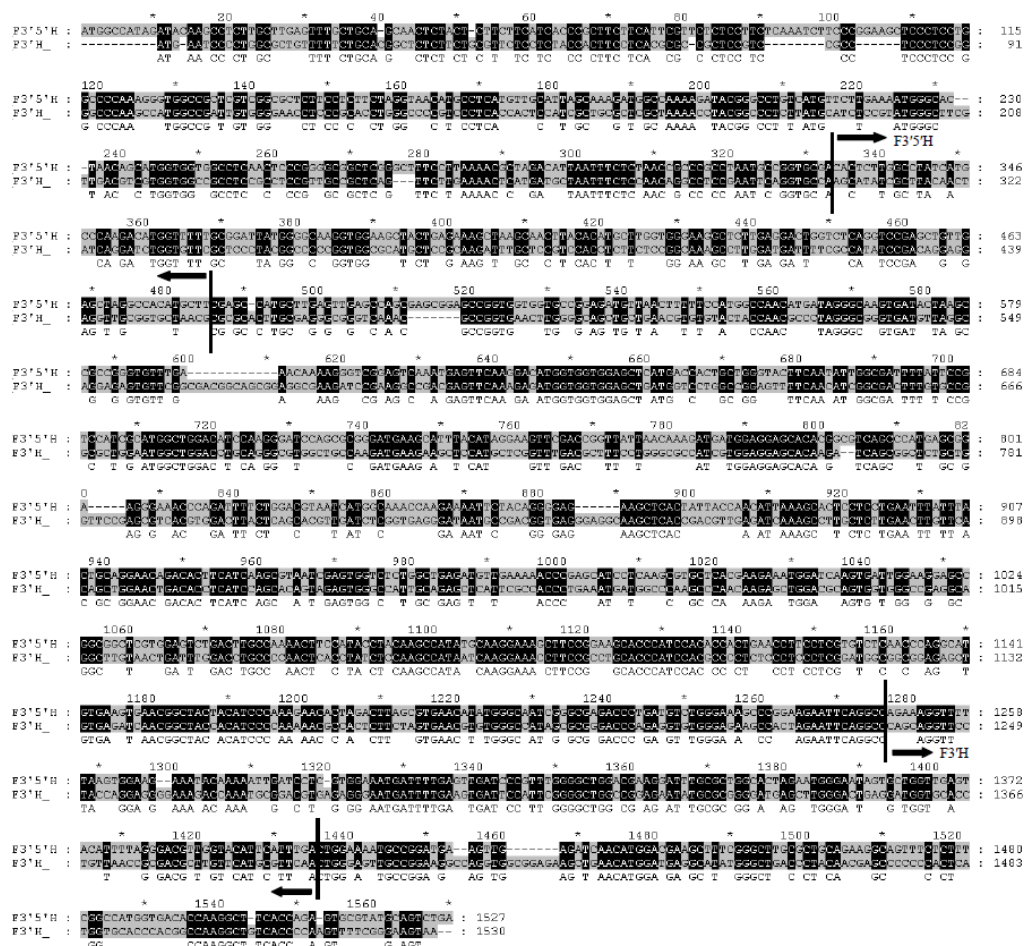
## مواد و روش‌ها

### طراحی سازه‌های ژنی

### انتخاب قطعه مناسب در دو ژن

مقایسه و از بین آنها قطعاتی که با هیچ کدام از دیگر ژن‌های انگور تطابق<sup>۲</sup> بالای ۲۰ نوکلئوتید نداشتند، انتخاب شدند. در ادامه، عدم وجود سایت‌های برشی آنزیم‌های مورد استفاده در این آزمایش، توسط نرم افزار Vector NTI بررسی شد. در نهایت قطعاتی با بهترین شرایط از ژن‌های *F3'5'H* و *F3'H* انتخاب شدند. توالی منتخب ژن *F3'H* شامل بازهای ۱۹۴۷ تا ۲۱۰۵ (بخشی از اگزون سوم ژن) به طول ۱۵۹ جفت باز و توالی گزینش شده از ژن *F3'5'H* شامل بازهای ۳۶۸ تا ۵۱۹ (بخشی از اگزون اول ژن) به طول ۱۵۲ جفت باز بود (شکل ۱). در ادامه، ساخت سازه ژنی با استفاده از تکرار معکوس این قطعات به صورت هم جهت<sup>۳</sup> و مخالف جهت<sup>۴</sup> درون ناقل انجام شد.

در گام نخست، توالی ژن‌های *F3'5'H* و *F3'H* از NCBI (به شماره دسترسی AB213605، GenBank: AB213606) استخراج شدند. سپس حذف اینترون‌ها جهت در اختیار داشتن نواحی کد شونده ژن‌ها صورت گرفت. به دلیل شباهت بالای این ژن‌ها، ناحیه کدکننده دو ژن توسط نرم‌افزارهای 11 Vector NTI Advanced، Gene doc و ClustalW مقایسه و بخش‌هایی با کمترین شباهت با طول حدوداً ۱۵۰ نوکلئوتید انتخاب شدند. سپس هر کدام از این قطعات با پایگاه اطلاعاتی مربوط به ژنوم انگور<sup>۱</sup>



الف

ب

شکل ۱. الف) قطعه انتخاب شده در ژن *F3'5'H*؛ ب) قطعه انتخاب شده در ژن *F3'H*

فلش‌های مشکی محدوده قطعات را نشان می‌دهند.

2. Identity
3. Sense
4. Antisense

1. Grape genome NCBI blast

5'CGGGATCCTTGAACGCATGAACAAGCGTC  
G3' طراحی و استفاده شد (زیر توالی سایت برشی آنزیم‌ها  
خط کشیده شده است).

تهیه سازه ژنی جهت خاموش‌سازی همزمان *F3'H* و  
*F3'5'H* نیاز به چهار جفت آغازگر دارد (دو جفت آغازگر  
جهت تکثیر قطعات مربوط به ژن *F3'H* و دو جفت آغازگر  
جهت تکثیر قطعات ژن *F3'5'H*). جهت افزودن قطعه  
مربوط به ژن *F3'5'H* به صورت هم جهت در سازه ژنی  
خاموش‌کننده *F3'H* (که در مرحله قبل تهیه شده)  
سایت‌های برشی آنزیم‌های *EcoRI* (در آغازگر پیشرو) و  
*Asp718* (در آغازگر پسرو) مورد استفاده قرار گرفتند. به  
این منظور آغازگر پیشرو (VvF3'5'HsiF1)

(5'CGGAATTCCTTGGCCTATCATGCC  
(VvF3'5'HsiR1) و آغازگر پسرو  
(5'GGGGTACCAAGCATGTGGCCTAGCTCAA  
(3' C3' طراحی و استفاده شدند. جهت اتصال قطعه مربوط به  
ژن *F3'5'H* به صورت مخالف جهت در سازه ژنی خاموش  
کننده *F3'H*، سایت‌های برشی آنزیم‌های *BamHI* (در  
آغازگر پیشرو) و *ClaI* (در آغازگر پسرو) مورد استفاده قرار  
گرفتند. آغازگر پیشرو (VvF3'5'HsiF2) با توالی  
5'CGGGATCCACTCTTGGCCTATCATGCC3'

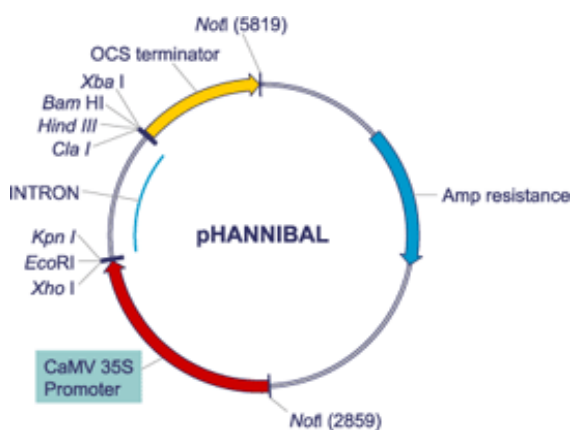
و آغازگر پسرو (VvF3'5'HsiR2) با توالی  
5'CCATCGATAAGCATGTGGCCTAGCTCAAC  
3' طراحی و استفاده شدند (زیر توالی سایت برشی آنزیم‌ها  
خط کشیده شده است). آغازگرها توسط شرکت  
GeneWorks<sup>۱</sup> سنتز شدند.

### ساخت سازه‌های ژنی

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز جهت تکثیر قطعات  
DNA ژنومی از برگ‌های تازه رقم شیراز بر اساس روش  
*Thomas et al.* (1993) استخراج شد. جهت تکثیر قطعات  
هم جهت و مخالف جهت ژن‌های *F3'H* و *F3'5'H* واکنش  
زنجیره‌ای پلیمرز انجام شد. هر مخلوط واکنش با حجم  
نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل یک میکرولیتر از DNA ژنومی  
با غلظت ۱۰ نانومول در میکرولیتر، ۲/۵ میکرولیتر بافر  
واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (۱۰x) فاقد منیزیم، ۰/۲۵  
میکرولیتر dNTPs با غلظت ۲۰ میلی‌مولار، ۰/۷۵  
میکرولیتر MgSO<sub>4</sub> با غلظت ۵۰ میلی‌مولار، ۰/۵

### طراحی آغازگر حاوی سایت برشی مناسب

آغازگرهای طراحی شده جهت تکثیر قطعات و همچنین  
اتصال آنها به ناقل، به ترتیب شامل حدود ۲۱ نوکلئوتید از  
انتهای یا ابتدای قطعه انتخاب شده، سایت برشی آنزیم (جهت  
و محل قرار گرفتن قطعه در ناقل را مشخص می‌کند)  
(شکل ۲) و یک یا دو باز بر حسب نوع آنزیم برشی برای  
حداکثر کارایی آنزیم بود. همچنین عدم ایجاد توالی‌هایی  
که موجب متیلاسیون سایت تشخیص آنزیم‌های برشی از  
نوع Dam و CG می‌شوند در نظر گرفته شد.



شکل ۲. ناقل pHANNIBAL و موقعیت

سایت‌های برشی روی آن

جهت تهیه سازه خاموش‌کننده از ناقل pHANNIBAL  
استفاده شد (GenBank: AJ311872.1). سازه ژنی جهت  
خاموش‌سازی ژن *F3'H* نیاز به دو جفت آغازگر داشت. به  
منظور اتصال قطعه مربوط به ژن *F3'H* به صورت هم جهت  
در ناقل pHANNIBAL سایت‌های برشی آنزیم‌های *XhoI*  
(در آغازگر پیشرو) و *EcoRI* (در آغازگر پسرو) مورد  
استفاده قرار گرفتند. آغازگر پیشرو (VvF3'5'HsiF1)  
(5'CCCTCGAGCAGCAGGTTCTACCAGGAG  
(VvF3'5'HsiR1) و آغازگر پسرو  
(5'CGGAATTCCTTGAACGCATGAACAAGCGT  
(3' CG3' طراحی و استفاده شد. جهت اتصال قطعه مربوط به  
ژن *F3'H* به صورت مخالف جهت در ناقل pHANNIBAL،  
سایت‌های برشی آنزیم‌های *XbaI* (در آغازگر پیشرو) و  
*BamHI* (در آغازگر پسرو) مورد استفاده قرار گرفتند.  
آغازگر پیشرو (VvF3'5'HsiF2) با توالی  
5'GCTCTAGACAGCAGGTTCTACCAGGAG  
3' و آغازگر پسرو (VvF3'5'HsiR2) با توالی

ترتیب که ۱ میکرولیتر از مخلوط واکنش اتصال با ۴۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلول‌های باکتری مستعد که بر روی یخ قرار داشتند مخلوط و به آرامی به کووت<sup>۱۱</sup> الکتروپوریشن سرد انتقال یافت. دستگاه الکتروپوریشن با مشخصات ۱/۸ کیلوولت، ۱۲۵ و ۲۰۰ اهم تنظیم شده بود. پس از برقراری جریان الکتریکی، به سرعت ۷۰۰ میکرولیتر محلول SOC به کووت اضافه کرده و پس از چند بار پیست کردن، محتوای کووت به تیوپ‌های نام‌گذاری شده منتقل شد. به منظور تحریک بیان ژن‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک، سلول‌های باکتری تراریخت به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ °C نگهداری شدند. سپس کشت باکتریایی در دو تکرار (غلیظ و رقیق) بر روی پلیت‌های LB آگار حاوی آمپی سیلین، IPTG و X-gal کشت و طی شب در دمای ۳۷ °C قرار گرفتند. پس از ظهور کلونی‌ها، بر اساس تشخیص کلونی‌های آبی از سفید<sup>۱۲</sup>، به دلیل غیرفعال شدن ژن lacZ' در باکتری‌های تراریخت، تک کلونی‌های سفید انتخاب و به محیط LB مایع حاوی آمپی سیلین منتقل شدند. سپس در شیکر انکوباتور ۳۷ °C با سرعت ۲۰۰ دور در دقیقه بمدت یک شب قرار گرفتند. استخراج DNA ناقل با استفاده از کیت مینی پرپ<sup>۱۳</sup> طبق دستورالعمل سازنده انجام شد و کمیت و کیفیت آن با دستگاه نانودراپ مورد ارزیابی قرار گرفت. برای اطمینان از درستی انجام کلون‌سازی، DNA پلاسمیدی به‌وسیله آنزیم EcoRI هضم شد و محصول هضم شده روی ژل آگارز ۱/۵ درصد (TAE) بارگذاری شد. بهترین نمونه‌ها انتخاب و جهت اطمینان کامل از صحت کار، برای هر قطعه ۴ تکرار با آغازگر SP6 5'CATTAGGTGACACTATAG3'<sup>۱۴</sup> توسط شرکت AGRF<sup>۱۵</sup> توالی‌یابی شد. در نهایت ۴ ناقل pDrive هر یک حاوی یکی از ۴ قطعه DNA هدف، به دست آمد. آنزیم‌های مورد استفاده در این تحقیق از شرکت‌های New England BioLabs, UK<sup>۱۶</sup> و Roche<sup>۱۷</sup> تهیه شدند.

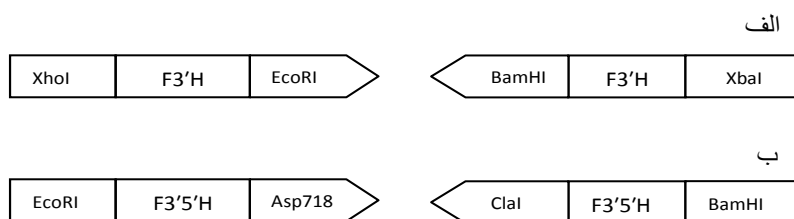
میکرولیتر مخلوط آغازگر با غلظت ۱۰ میکرومولار، ۰/۱ میکرولیتر آنزیم Taq DNA Polymerase<sup>۱</sup> و ۱۹/۹ میکرولیتر آب مقطر استریل نانوپور بود. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در دستگاه ترموسایکلر<sup>۲</sup> با شرایط دمایی یک سیکل ۲ دقیقه‌ای در دمای ۹۵ °C به منظور واسرشته‌سازی<sup>۳</sup> و فعال شدن آنزیم و به دنبال آن ۳۵ سیکل شامل ۳۰ ثانیه در دمای ۹۴ °C (واسرشته‌سازی)، ۳۰ ثانیه در دمای ۵۰ °C (اتصال)، ۶۰ ثانیه در دمای ۷۲ °C (گسترش) و یک سیکل ۱۰ دقیقه‌ای در ۷۲ °C انجام شد. محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمرز بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد (TAE) بارگذاری و الکتروفورز شد. باندهای DNA توسط کیت استخراج DNA از ژل<sup>۴</sup> خالص‌سازی و به‌وسیله دستگاه نانودراپ کمیت و کیفیت آن مورد ارزیابی قرار گرفت. در نتیجه ۴ قطعه DNA با سایت‌های برشی مناسب در دو انتها به دست آمد (شکل ۳).

#### کلون‌سازی قطعات DNA در ناقل pDrive

برای هر یک از قطعات، محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمرز خالص شده از ژل آگارز در ناقل کلون‌سازی pDrive (Gene Bank: DQ996013.1)، با استفاده از کیت کلون‌سازی<sup>۵</sup> طبق دستورالعمل سازنده درج گردید. مخلوط واکنش اتصال<sup>۶</sup> شامل ۵۰ نانوگرم ناقل pDrive ۱۰ نانوگرم محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، مخلوط مادر اتصال<sup>۸</sup> (۲x) و مقدار متناسب آب نانوپور استریل، با حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر تهیه و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۱۶ °C (دمای مناسب جهت فعالیت آنزیم لیگاز) قرار گرفت. پس از انجام مرحله اتصال، جهت غیرفعال سازی آنزیم لیگاز، تیوپ‌ها ۱۰ دقیقه در دمای ۷۰ °C قرار گرفتند. انتقال ناقل حاوی قطعه مورد نظر به سلول‌های مستعد باکتری *E. coli*<sup>۹</sup> سویه XL1-blue به روش الکتروپوریشن با استفاده از دستگاه Gene pulser<sup>۱۰</sup> انجام گرفت. به این

1. Platinum Taq DNA polymerase (www.invitrogen.com)
2. Icycler, Bio-Rad, USA
3. Denaturation
4. QIAGEN Gel Extraction Kit
5. QIAGEN PCR Cloning Kit (www.qiagen.com)
6. Ligation
7. Ligation Reaction
8. Ligation Master Mix, 2X
9. *Escherichia coli*
10. Gene pulser apparatus (Bio-Rad, CA, USA)

11. Cuvette
12. Blue White Screening
13. QIAprep Spin Miniprep Kit
14. www.geneworks.com.au
15. www.agrf.org.au
16. www.neb.com
17. www.roche-applied-science.com



شکل ۳. قطعات هم‌جهت و مخالف جهت مربوط به ژن‌های *F3'H* (الف) و *F3'5'H* (ب)

این صورت که ناقل pDrive دارای قطعه مخالف جهت و همین‌طور ناقل pHANNIBAL حاوی قطعه اول به‌وسیله آنزیم‌های *XbaI* و *BamHI* برش داده شدند. سایر مراحل تا درج قطعه مخالف جهت در ناقل pHANNIBAL حاوی قطعه اول بطور مشابه با مرحله قبل انجام شد. در پایان، برش آنزیمی DNA پلاسمیدی با آنزیم‌های *XbaI* و *BamHI* و چک کردن قطعات بر روی ژل آگاروز و همچنین توالی یابی جهت اطمینان از درستی کار انجام شد. به این ترتیب سازه خاموش‌کننده مناسب جهت خاموش‌سازی ژن *F3'H* در ناقل pHANNIBAL تهیه شد (شکل ۴).

جهت ساخت سازه ژنی خاموش‌کننده ژن‌های *F3'5'H* و *F3'H* درج قطعات هم‌جهت و مخالف جهت *F3'5'H* طی دو مرحله در ناقل pHANNIBAL حاوی قطعات هم‌جهت و مخالف جهت *F3'H*، به نحوی که برای افزودن قطعات قبلی گفته شد، انجام گردید. جهت افزودن قطعه هم‌جهت و مخالف جهت *F3'5'H*، به ترتیب از آنزیم‌های *EcoRI* و *Asp718* و آنزیم‌های *ClaI* و *BamHI* استفاده شد. هضم آنزیمی جهت بررسی صحت کار صورت گرفت. به این صورت سازه خاموش‌کننده ژن‌های *F3'H* و *F3'5'H* در ناقل pHANNIBAL نیز ایجاد شد (شکل ۵).

درج سازه‌های ژنی ایجاد شده در ناقل pART27 درج سازه‌های خاموش‌کننده ژن *F3'H* و ژن‌های *F3'5'H* و در ناقل pART27 (p27 mod GFP 4a) و (Gleave, 1992)، به‌طور مشابه انجام شد. پس از تهیه ناقل pHANNIBAL حاوی همه قطعات هم‌جهت و مخالف جهت لازم جهت خاموش‌سازی، ناقل pART27 به عنوان ناقل مقصد جهت انتقال به اگروباکتری<sup>۲</sup> مورد استفاده قرار گرفت. به این منظور ناقل‌های

#### درج قطعات در ناقل pHANNIBAL

به منظور درج قطعه اول (قطعه هم‌جهت جهت *F3'H*) در ناقل pHANNIBAL (شکل ۲)، ابتدا ناقل pDrive دارای قطعه هم‌جهت و همین‌طور ناقل pHANNIBAL به‌وسیله آنزیم‌های *XhoI* و *EcoRI* برش داده شدند. سپس DNA برش داده شده بر روی ژل ۱/۵ درصد آگاروز (TAE) بارگذاری شد و خالص‌سازی باند با استفاده از کیت استخراج DNA از ژل انجام گرفت. پس از اندازه‌گیری کیفیت و کمیت DNA با استفاده از نانودراپ و مقایسه باندهای حاصل با باندهای سایز مارکر Hyper ladder<sup>۱</sup> روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد، واکنش اتصال با نسبت غلظت ۲ (قطعه *F3'H*) به ۱ (ناقل pHANNIBAL) و استفاده از آنزیم T4 لیگاز انجام شد. در نهایت قطعه هم‌جهت در ناقل pHANNIBAL درج گردید. همچنین دو مخلوط واکنش کنترل، یکی شامل ناقل pHANNIBAL هضم آنزیمی شده و متصل شده با آنزیم T4 لیگاز بدون قطعه DNA و دیگری شامل فقط ناقل pHANNIBAL هضم آنزیمی شده جهت اطمینان از درستی روند آزمایش اتصال، تهیه شدند. انتقال pHANNIBAL حاوی قطعه هم‌جهت و کنترل‌ها به باکتری‌های مستعد *E. coli* سویه XL1-blue توسط الکتروپوریشن انجام گرفت. بعد از برداشت تک کلونی‌های باکتری‌های کشت‌شده، DNA پلاسمیدی استخراج و کمیت و کیفیت آن با نانو دراپ اندازه‌گیری شد. صحت کار توسط برش آنزیمی با آنزیم‌های *XhoI* و *EcoRI* و چک کردن قطعات بر روی ژل آگاروز تایید شد.

سپس درج قطعه دوم (قطعه مخالف جهت *F3'H*) در ناقل pHANNIBAL حاوی قطعه اول انجام شد به

2. *Agrobacterium tumefaciens*

1. www.bioline.com

گرفت و طی شب در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  نگهداری شد. پس از آن کلونی‌های تشکیل شده برداشت شدند. هر کلونی در تیوپ حاوی محیط LB مایع و اسپکتومایسین کشت و در شیکر انکوباتور  $37^{\circ}\text{C}$  با سرعت ۲۰۰ دور در دقیقه به مدت یک شب قرار گرفت. پس از آن استخراج پلاسمید انجام گرفت. کمیت و کیفیت پلاسمیدهای استخراج شده با نانو دراپ اندازه‌گیری شدند. سپس هضم مقداری از پلاسمید با آنزیم *NotI* و الکتروفورز روی ژل انجام گرفت. پس از مشاهده ۲ باندها با اندازه صحیح، صحت کار توسط توالی‌یابی از دو جهت با آغازگر پیشرو LH35SF (5'GCAAGTGGATTGATGTGACA3') و آغازگر پسرو OCS (5'GGCGTAAGGATCTGAGCTA3') تایید شد.

#### انتقال ناقل pART27 به اگروباکتری

پس از تهیه دو ناقل pART27، یکی حاوی سازه خاموش‌کننده ژن *F3'H* و دیگری شامل سازه خاموش‌کننده دوژن *F3'H* و *F3'5'H* انتقال آنها به اگروباکتری سویه EHA105 انجام شد. انتقال توسط روش الکتروپوریشن به‌طور مشابه با باکتری *E. coli* صورت گرفت. سپس تیوپ‌های حاوی اگروباکتری تراریخت به مدت ۳ ساعت در دمای  $28^{\circ}\text{C}$  جهت بیان ژن مقاومت به اسپکتومایسین نگهداری شدند. پس از آن کشت روی پلیت‌های محیط LB جامد حاوی ریفامپیسین<sup>۳</sup> و اسپکتومایسین انجام گرفت و پلیت‌ها ۳ روز در دمای  $28^{\circ}\text{C}$  جهت رشد باکتری‌ها قرار گرفتند. پس از این زمان تک کلونی‌ها برداشت و در محیط حاوی LB مایع، ریفامپیسین و اسپکتومایسین در دمای  $28^{\circ}\text{C}$  به مدت دو روز در شیکر انکوباتور قرار گرفتند. به دلیل اینکه اگروباکتری تعداد کمی از پلاسمید ایجاد می‌کند و همچنین گاهی توالی نوکلئوتیدی قرار گرفته بر روی TDNA را بازچینی<sup>۴</sup> می‌کند پلاسمیدها استخراج و به باکتری *E. coli* سویه XL1-blue با روش الکتروپوریشن منتقل شدند. کشت روی پلیت‌های محیط LB جامد حاوی اسپکتومایسین انجام گرفت و پلیت‌ها به مدت یک شب در انکوباتور

pHANNIBAL و pART27 توسط آنزیم *NotI* برش داده شدند و محصول هضم آنزیمی روی ژل ۰/۷ درصد آگاروز (TAE) بارگذاری شد. از آنجایی که سایت برشی آنزیم *NotI* در دو سمت پروموتور و ترمینیتور سازه خاموش‌کننده وارد شده، قرار دارد حاصل برش ناقل pHANNIBAL توسط آنزیم *NotI* دو باندها ایجاد کرد. قطعه حاوی آمپی سیلین ۲۸۶۴ جفت باز، قطعه حاوی قطعات هم جهت و مخالف جهت *F3'H* ۳۳۱۰ جفت باز و قطعه حاوی قطعات هم جهت و مخالف جهت *F3'H* و *F3'5'H* ۳۶۴۶ جفت باز بودند. به این جهت باندها بالایی به عنوان باندها هدف از ژل جدا و خالص‌سازی شد. حذف گروه فسفات از انتهای ۵' ناقل pART27 قبل از درج سازه ژنی، توسط آنتارکتیک فسفاتاز<sup>۱</sup> انجام شد. به این منظور مخلوط واکنش شامل ۱ میکرولیتر آنزیم آنتارکتیک فسفاتاز (U ۵)، ۴۰۰ نانوگرم DNA (حجم ۴۰ میکرولیتر) و ۵ میکرولیتر بافر آنتارکتیک فسفاتاز<sup>۲</sup> (۱۰x) تهیه و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  نگهداری شد. این آنزیم فسفر انتهای ۵' را حذف کرده و از اتصال مجدد دو انتهای بریده شده ناقل جلوگیری می‌کند. جهت غیرفعال‌سازی آنزیم، مخلوط واکنش ۵ دقیقه در دمای  $65^{\circ}\text{C}$  قرار داده شد. بعد از غیرفعال کردن آنزیم آنتارکتیک فسفاتاز، عمل اتصال سازه به ناقل pART27 به وسیله آنزیم T4 لیگاز و ۳۰ دقیقه قرار دادن در دمای  $16^{\circ}\text{C}$  انجام گرفت. در واکنش اتصال، سازه ژنی و ناقل با نسبت برابر (۱:۱) در مخلوط واکنش اتصال شرکت داشتند. به عنوان کنترل یک واکنش شامل ناقل pART27 هضم آنزیمی شده و متصل شده با آنزیم T4 لیگاز بدون سازه ژنی در نظر گرفته شد.

پس از غیرفعال‌سازی آنزیم T4 لیگاز، ناقل pART27 نوترکیب جهت جداسازی ناقل‌های نوترکیب حاوی سازه ژنی، ابتدا به باکتری *E. coli* سویه XL1-blue با روش الکتروپوریشن منتقل و به مدت یک ساعت جهت بیان ژن مقاومت به اسپکتومایسین در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  قرار داده شد (ژن اسپکتومایسین بر روی ناقل pART27 به عنوان نشانگر انتخابی جهت باکتری‌های تراریخت به کار می‌رود). کشت در محیط حاوی آنتی‌بیوتیک اسپکتومایسین صورت

3. Rifampicin  
4. Rearrange

1. Antarctic Phosphatase  
2. Antarctic Phosphatase Reaction Buffer

تاریکی و دمای  $28^{\circ}\text{C}$  نگهداری شدند. درکشت پرچم، در واقع بخشی که از آن کالوس جنین‌زا ایجاد می‌شود، میله پرچم است (Newton & Goussard, 1990). به منظور نگهداری کالوس‌ها، هر ۴ تا ۶ هفته واکشت روی محیط C1 (Torregrosa, 1998) انجام شد. محیط C1 نیز محیط کامل غذایی حاوی هورمون‌های اکسین (2,4D) ۵ میکرومولار و سایتوکنین (BAP) ۱ میکرومولار بود. در ادامه، انتقال کالوس‌ها به محیط GS1CA (Franks *et al.*, 1998) حاوی هورمون‌های اکسین (NOA) ۱۰ میکرومولار و سایتوکنین (BAP) ۱ میکرومولار، در زمان مناسب انجام گرفت (CSIRO unpublished). در این محیط کالوس‌ها شروع به تغییر و نمو می‌کنند. یک هفته بعد کالوس‌ها جهت تراریخت‌سازی آماده بودند. آگار مورد استفاده برای تهیه محیط تشکیل کالوس از پرچم‌ها و نگهداری کالوس‌های پیش‌جنینی، آگار Phytigel از کمپانی Sigma-Aldrich<sup>۸</sup> بود که نقش مهمی در موفقیت این فرایند دارد (Iocco *et al.*, 2001).

تراریختی کالوس‌های جنین‌زا توسط آگروباکتری انتقال ناقل pART27 به کالوس‌های جنین‌زا (کالوس‌های پیش‌جنینی) از طریق کشت توام<sup>۹</sup> آنها با آگروباکتری بر اساس روش Torregrosa *et al.* (2002) با برخی تغییرات انجام شد. از هر یک از پلیت‌های کلونی‌های آگروباکتری حاوی سازه‌های خاموش‌کننده، یک تک کلونی برداشته وارد ۳ میلی‌لیتر محیط MG/L (Garfinkel & Nester, 1980) حاوی اسپکتومایسین (۳ میکرولیتر) شد و در شیکر انکوباتور  $28^{\circ}\text{C}$  به مدت یک شبانه روز نگهداری شد. بعد از گذشت یک شبانه روز، ۵ میکرولیتر از هر کشت در ارلن‌های حاوی ۲۵ میلی‌لیتر MG/L به اضافه ۲۵ میکرولیتر اسپکتومایسین ریخته و یک شبانه روز در شیکر انکوباتور  $28^{\circ}\text{C}$  قرار گرفت. روز بعد غلظت باکتری با اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. زمانی که  $\text{OD}_{600}$  کشت‌ها به ۰/۸ تا ۱ رسید (رشد مناسب باکتری)، به مدت ۸ دقیقه، با دور ۵۰۰۰ در دقیقه در دمای اتاق سانتریفوژ شدند و روشنای<sup>۱۰</sup> دور

$37^{\circ}\text{C}$  نگهداری شدند. سپس تک کلونی‌های برداشت شده به محیط حاوی LB مایع و اسپکتومایسین منتقل و طی شب در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  در شیکر انکوباتور قرار گرفتند. استخراج پلاسمید انجام و کمیت و کیفیت پلاسمیدهای استخراج شده با نانو دراپ اندازه‌گیری شد. سپس هضم آنزیمی پلاسمید استخراج شده و پلاسمید اولیه که جهت تراریختی آگروباکتری استفاده شده بود، با آنزیم *NotI* انجام شد و قطعات هضم شده از طریق الکتروفورز روی ژل آگاروز مقایسه شدند. پس از اطمینان از صحت حضور قطعات و همچنین عدم بازچینی توالی DNA، از پلیت‌های اولیه تک کلونی انتخاب کرده، واکشت<sup>۱</sup> در پلیت جدید با محیط LB جامد حاوی ریفامپیسین و اسپکتومایسین انجام گرفت. پس از رشد مناسب باکتری‌ها پلیت‌ها جهت استفاده بعدی در یخچال نگهداری شدند. انتقال سازه خاموش‌کننده به کالوس‌های جنین‌زای<sup>۲</sup> انگور به روش آگرواینفکشن<sup>۳</sup> انجام شد.

#### تشکیل کالوس‌های جنین‌زا

باززایی کالوس‌های جنین‌زا بر اساس روش Torregrosa (1998) انجام شد. ابتدا جهت تهیه کالوس‌های جنین‌زا از پرچم، گل‌ها در مرحله‌ای که هنوز به صورت خوشه‌هایی با غنچه‌های باز نشده فشرده بودند، انتخاب و در آزمایشگاه با هیپوکلریت کلسیم و Tween 20 ضدعفونی و سپس سه مرتبه با آب نانوپور استریل آبشویی شدند.

پرچم‌ها با میله<sup>۴</sup> آنها از روی مادگی جدا و روی محیط PIV<sup>۵</sup> (Franks *et al.*, 1998) کشت شدند. محیط کامل غذایی حاوی مقادیر بالای هورمون‌های اکسین (2,4D) ۴/۵ میکرومولار و سایتوکنین (BAP)<sup>۶</sup> ۸/۹ میکرومولار بود. نحوه قرار دادن پرچم روی محیط کشت به نحوی بود که سمت دور از محور<sup>۷</sup> در تماس با محیط کشت قرار گرفت. پس از کشت، پلیت‌ها در

1. Subculture
2. Embryogenic callus
3. Agroinfection
4. Filament
5. PIV Medium
6. 6-Benzylaminopurine, benzyl adenine or BAP
7. Abaxial side

8. Sigma Chemical Co. USA

9. Co-culture

10. Supernatant



کانامایسین (CSIRO unpublished) و ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر تایمنتین منتقل شده و مجدداً در تاریکی و دمای ۲۸°C نگهداری شدند (پروآوری کالوس‌ها در محیط کشت انتخابی حاوی کانامایسین). ۴ هفته پس از تلقیح، کالوس‌ها به پلیت‌های حاوی محیط NN.T.K حاوی کانامایسین و تایمنتین منتقل شدند. در این محیط نیز کالوس‌ها در تاریکی و دمای ۲۸°C نگهداری شدند. سپس هر چهار هفته واکشت بر روی پلیت‌های حاوی محیط NN.T.K ادامه یافت تا زمانی که جنین‌ها جوانه بزنند (در واکشت‌های بعدی به تدریج غلظت کانامایسین کاهش یافت). از آنجایی که هیچ هورمونی به این محیط (NN.T.K) اضافه نشده، به جنین اجازه می‌دهد تا جوانه بزند. از ۱۲ هفته پس از تلقیح، جنین‌ها شروع به جوانه‌زدن کردند. جنین‌های جوانه‌زده که بیان ژن *GFP* را نشان دادند انتخاب و از محل محور زیر لپه در حدود ۵ میلی‌متر پایین لپه‌ها قطع و این ریزنمونه‌ها<sup>۵</sup> به محیط MS/2 (Murashige & Skoog, 1962) حاوی ۲ تا ۵ میکرومولار هورمون BAP منتقل شدند (این محیط اولین محیط بدون آنتی‌بیوتیک بوده و حاوی سایتوکینین BAP است که شاخه‌دهی را تحریک می‌کند). از این زمان به بعد جنین‌های جوانه‌زده تحت روشنایی و دمای ۲۸°C قرار گرفتند (نور کم و فتوپریود ۱۶:۸). زمانی که اولین شاخه‌ها ظاهر شدند، انتهای محور زیر لپه هرس و انتقال به محیط کشت MS/2 بدون هورمون انجام گرفت. پس از رشد ساقه در این محیط، ساقه‌ها بریده شده و در محیط ریشه‌زایی که حاوی اکسین (۵/۰ میلی‌مولار NAA) بود کشت شدند. پس از ریشه‌زایی و باززایی گیاهان کامل<sup>۶</sup>، برگ‌های کوچک از بالای ساقه برداشت و جهت آزمایش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز مورد استفاده قرار گرفتند. همچنین DNA ناقل pART27، به عنوان الگو جهت کنترل درستی کار در نظر گرفته شد. آغازگرهای پیشرو LH35SF

(5'GCAAGTGGATTGATGTGACA3') و پسر (5'GGCGTAAGGATCTGAGCTA3') OCS برای بررسی وجود یا عدم وجود سازه‌های ژنی در ژنوم لاین‌های باززایی شده مورد استفاده قرار گرفتند.

ریخته شد. در ادامه ۲۵ میلی‌لیتر محلول modLCM (محیط القا<sup>۱</sup>) اضافه و پس از حل شدن کامل پلت باکتری، مجدداً به مدت ۳ ساعت در شیکر انکوباتور ۲۸°C نگهداری شدند. پس از آن، کالوس‌های کشت شده بر روی محیط GS1CA را با احتیاط از روی محیط برداشته، در یک پلیت خالی ریخته، ۳ تا ۴ میلی‌لیتر از محلول باکتری روی آنها ریخته شد و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق رها شدند. سپس محلول اطراف کالوس‌ها حذف و به صورت دسته‌های کوچک با فواصل یک سانتی‌متر، روی محیط GS1CA در پلیت‌های نامگذاری شده قرار گرفتند (با برخی تغییرات بر اساس CSIRO unpublished) و در دمای ۲۲°C به مدت ۴۸ ساعت نگهداری شدند (دمایی که اگر باکتری در آن بی‌آنکه رشد چندانی داشته باشد توانایی آلوده‌سازی دارد).

در ادامه، کالوس‌های جنین‌زا با محلول LCM حاوی ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر تایمنتین<sup>۲</sup> شستشو داده شدند. محلول اضافی توسط کاغذ صافی گرفته شد و کالوس‌های جنین‌زا روی محیط GS1CA.T حاوی ۱۰ میکرومولار اکسین (NOA) و ۱ میکرومولار سایتوکینین (BAP) و ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر تایمنتین کشت شدند و به مدت ۹ تا ۱۰ روز بعد از تلقیح<sup>۳</sup> در دمای ۲۸°C در تاریکی قرار گرفتند. چند روز بعد از کشت در این محیط، کالوس‌ها مجدداً بررسی شدند زیرا در صورت مشاهده رشد اگر باکتری باید مرحله شستشو تکرار گردد. کالوس‌های جنین‌زا، ۵ روز پس از تلقیح، از نظر رنگ کالوس‌ها (قهوه‌ای نشدن) و عدم رشد اگر باکتری، با میکروسکوپ معمولی و جهت تشخیص رنگ سبز ناشی از بیان ژن نشانگر *GFP* با میکروسکوپ فلورسنت<sup>۴</sup> بررسی شدند. کالوس‌هایی که در مجاورت اگر باکتری قرار نگرفته بودند به عنوان کنترل در نظر گرفته شدند.

#### باززایی و تولید گیاه کامل

پس از گذشت ۱۰ روز از تلقیح، کالوس‌ها به پلیت‌های محیط GS1CA حاوی ۱۰ میکرومولار اکسین (NOA)، ۱ میکرومولار سایتوکینین (BAP)، غلظت مناسب

5. GFP positive  
6. Cotyledonary explant  
7. Plantlet

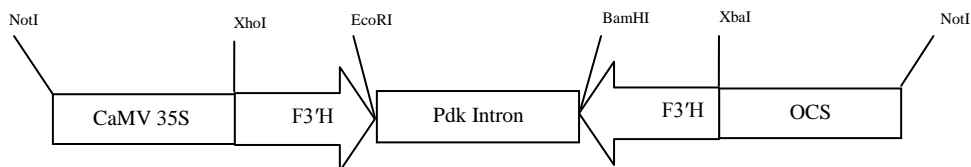
1. Induction medium  
2. Timentin  
3. Inoculation  
4. Leica DM/RXA ultra-violet microscope

اختصاصی، کلون‌سازی قطعات منتخب تکثیر شده از طریق واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، توسط ناقل pDrive در باکتری *E. coli* سویه XL1-blue با موفقیت انجام شد. درستی هر یک از مراحل انجام شده، توسط هضم DNA پلاسمیدی به‌وسیله آنزیم *EcoRI* و توالی‌یابی تایید شد. پس از ورود قطعات به ناقل pHANNIBAL، صحت درج قطعات مورد نظر در این ناقل، توسط برش آنزیمی تایید شد و سازه‌های خاموش‌کننده ژن *F3'H* و ژن‌های *F3'5'H* و همان‌طور که طراحی شده بودند (شکل‌های ۴ و ۵)، ایجاد شدند. بر اساس نتایج هضم آنزیمی (شکل ۶) و توالی‌یابی (شکل‌های ۷ و ۸) سازه‌های ژنی تهیه شده به درستی در ناقل pART27 درج شدند.

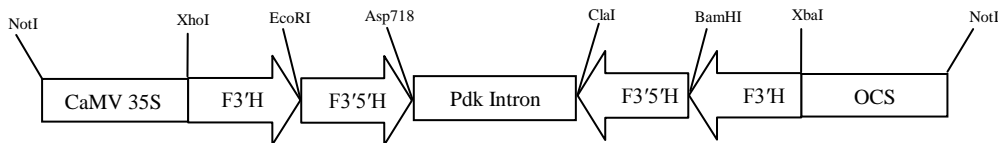
محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمرز بر روی ژل آگارز ۱ درصد (TBE) بارگذاری و الکتروفورز شد.

### نتایج و بحث

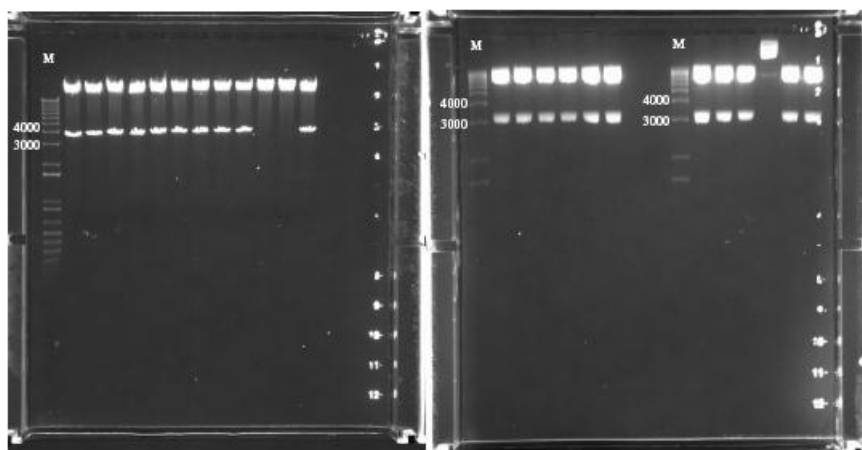
در این تحقیق، به منظور بهره‌گیری از روش ihpRNA جهت خاموش‌سازی ژن‌های *F3'H* و *F3'5'H* سازه‌های ژنی مناسب در ناقل pHANNIBAL طراحی، تهیه و از طریق ناقل pART27 به آگروباکتری منتقل شدند. سپس به‌روش آگرواینفکشن کالوس‌های جنین‌زای انگور، تراریخت شده و نهایتاً لاین‌های تراریخت با موفقیت باززایی شدند. به این منظور، پس از انتخاب قطعات مناسب از ژن‌های *F3'H* و *F3'5'H* طراحی آغازگرهای



شکل ۴. سازه خاموش‌کننده ژن *F3'H*



شکل ۵. سازه خاموش‌کننده ژن‌های *F3'5'H* و *F3'H*



ب

الف

شکل ۶. هضم آنزیمی ناقل pART27 نوترکیب با آنزیم *NotI* حاوی ژنی خاموش‌کننده *F3'H*

(ب) سازه ژنی خاموش‌کننده *F3'5'H* و *F3'H*



```

pHANNIBAL_ : -----* 20 * 40 * 60 * 80 * 100 *-----: -
F3'5'H_si_ : -----* 20 * 40 * 60 * 80 * 100 *-----: -
F3'H_si_fr : -----* 20 * 40 * 60 * 80 * 100 *-----: 110
Fw_Seq_Dou : -----* 20 * 40 * 60 * 80 * 100 *-----: 115

pHANNIBAL_ : -----* 120 * 140 * 160 * 180 * 200 * 220 *-----: -
F3'5'H_si_ : -----* 120 * 140 * 160 * 180 * 200 * 220 *-----: 60
F3'H_si_fr : -----* 120 * 140 * 160 * 180 * 200 * 220 *-----: 159
Fw_Seq_Dou : -----* 120 * 140 * 160 * 180 * 200 * 220 *-----: 230

pHANNIBAL_ : -----* 240 * 260 * 280 * 300 * 320 * 340 *-----: -
F3'5'H_si_ : -----* 240 * 260 * 280 * 300 * 320 * 340 *-----: 152
F3'H_si_fr : -----* 240 * 260 * 280 * 300 * 320 * 340 *-----: 159
Fw_Seq_Dou : -----* 240 * 260 * 280 * 300 * 320 * 340 *-----: 345

pHANNIBAL_ : -----* 360 * 380 * 400 * 420 * 440 * 460 *-----: -
F3'5'H_si_ : -----* 360 * 380 * 400 * 420 * 440 * 460 *-----: 106
F3'H_si_fr : -----* 360 * 380 * 400 * 420 * 440 * 460 *-----: 159
Fw_Seq_Dou : -----* 360 * 380 * 400 * 420 * 440 * 460 *-----: 460

pHANNIBAL_ : -----* 480 * 500 * 520 * 540 * 560 *-----: -
F3'5'H_si_ : -----* 480 * 500 * 520 * 540 * 560 *-----: 221
F3'H_si_fr : -----* 480 * 500 * 520 * 540 * 560 *-----: 159
Fw_Seq_Dou : -----* 480 * 500 * 520 * 540 * 560 *-----: 575

pHANNIBAL_ : -----* 580 * 600 * 620 * 640 * 660 * 680 *-----: -
F3'5'H_si_ : -----* 580 * 600 * 620 * 640 * 660 * 680 *-----: 336
F3'H_si_fr : -----* 580 * 600 * 620 * 640 * 660 * 680 *-----: 159
Fw_Seq_Dou : -----* 580 * 600 * 620 * 640 * 660 * 680 *-----: 690

pHANNIBAL_ : -----* 700 * 720 * 740 * 760 * 780 * 800 *-----: -
F3'5'H_si_ : -----* 700 * 720 * 740 * 760 * 780 * 800 *-----: 448
F3'H_si_fr : -----* 700 * 720 * 740 * 760 * 780 * 800 *-----: 159
Fw_Seq_Dou : -----* 700 * 720 * 740 * 760 * 780 * 800 *-----: 793

pHANNIBAL_ : -----* 820 * 840 * 860 * 880 * 900 * 920 *-----: -
F3'5'H_si_ : -----* 820 * 840 * 860 * 880 * 900 * 920 *-----: 563
F3'H_si_fr : -----* 820 * 840 * 860 * 880 * 900 * 920 *-----: 159
Fw_Seq_Dou : -----* 820 * 840 * 860 * 880 * 900 * 920 *-----: 742

pHANNIBAL_ : -----* 940 * 960 * 980 * 1000 * 1020 *-----: -
F3'5'H_si_ : -----* 940 * 960 * 980 * 1000 * 1020 *-----: 678
F3'H_si_fr : -----* 940 * 960 * 980 * 1000 * 1020 *-----: 159
Fw_Seq_Dou : -----* 940 * 960 * 980 * 1000 * 1020 *-----: 742

pHANNIBAL_ : -----* 1040 * 1060 * 1080 *-----: -
F3'5'H_si_ : -----* 1040 * 1060 * 1080 *-----: 742
F3'H_si_fr : -----* 1040 * 1060 * 1080 *-----: 159
Fw_Seq_Dou : -----* 1040 * 1060 * 1080 *-----: 742
    
```

شکل ۸. الف) هم‌ردیف‌سازی سازهٔ خاموش‌کنندهٔ ژن‌های *F3'5'H* و *F3'5'H si*، توالی‌یابی سازهٔ ژنی توسط آغازگر پیشرو LH35SF (FW Seq. Dou)، اینترون ناقل pHANNIBAL

```

Rev_Seq_Do : -----* 20 * 40 * 60 * 80 * 100 *-----: 115
F3'5'H_si_ : -----* 20 * 40 * 60 * 80 * 100 *-----: -
F3'H_si_fr : -----* 20 * 40 * 60 * 80 * 100 *-----: 51
pHANNIBAL_ : -----* 20 * 40 * 60 * 80 * 100 *-----: -

Rev_Seq_Do : -----* 120 * 140 * 160 * 180 * 200 * 220 *-----: 230
F3'5'H_si_ : -----* 120 * 140 * 160 * 180 * 200 * 220 *-----: 1
F3'H_si_fr : -----* 120 * 140 * 160 * 180 * 200 * 220 *-----: 159
pHANNIBAL_ : -----* 120 * 140 * 160 * 180 * 200 * 220 *-----: -

Rev_Seq_Do : -----* 240 * 260 * 280 * 300 * 320 * 340 *-----: 345
F3'5'H_si_ : -----* 240 * 260 * 280 * 300 * 320 * 340 *-----: 116
F3'H_si_fr : -----* 240 * 260 * 280 * 300 * 320 * 340 *-----: 159
pHANNIBAL_ : -----* 240 * 260 * 280 * 300 * 320 * 340 *-----: -

Rev_Seq_Do : -----* 360 * 380 * 400 * 420 * 440 * 460 *-----: 460
F3'5'H_si_ : -----* 360 * 380 * 400 * 420 * 440 * 460 *-----: 152
F3'H_si_fr : -----* 360 * 380 * 400 * 420 * 440 * 460 *-----: 159
pHANNIBAL_ : -----* 360 * 380 * 400 * 420 * 440 * 460 *-----: 47

Rev_Seq_Do : -----* 480 * 500 * 520 * 540 * 560 *-----: 575
F3'5'H_si_ : -----* 480 * 500 * 520 * 540 * 560 *-----: 159
F3'H_si_fr : -----* 480 * 500 * 520 * 540 * 560 *-----: 161
pHANNIBAL_ : -----* 480 * 500 * 520 * 540 * 560 *-----: -

Rev_Seq_Do : -----* 580 * 600 * 620 * 640 * 660 * 680 *-----: 690
F3'5'H_si_ : -----* 580 * 600 * 620 * 640 * 660 * 680 *-----: 159
F3'H_si_fr : -----* 580 * 600 * 620 * 640 * 660 * 680 *-----: 274
pHANNIBAL_ : -----* 580 * 600 * 620 * 640 * 660 * 680 *-----: -

Rev_Seq_Do : -----* 700 * 720 * 740 * 760 * 780 * 800 *-----: 805
F3'5'H_si_ : -----* 700 * 720 * 740 * 760 * 780 * 800 *-----: 159
F3'H_si_fr : -----* 700 * 720 * 740 * 760 * 780 * 800 *-----: 388
pHANNIBAL_ : -----* 700 * 720 * 740 * 760 * 780 * 800 *-----: -

Rev_Seq_Do : -----* 820 * 840 * 860 * 880 * 900 * 920 *-----: 920
F3'5'H_si_ : -----* 820 * 840 * 860 * 880 * 900 * 920 *-----: 159
F3'H_si_fr : -----* 820 * 840 * 860 * 880 * 900 * 920 *-----: 502
pHANNIBAL_ : -----* 820 * 840 * 860 * 880 * 900 * 920 *-----: -

Rev_Seq_Do : -----* 940 * 960 * 980 * 1000 * 1020 *-----: 979
F3'5'H_si_ : -----* 940 * 960 * 980 * 1000 * 1020 *-----: 159
F3'H_si_fr : -----* 940 * 960 * 980 * 1000 * 1020 *-----: 614
pHANNIBAL_ : -----* 940 * 960 * 980 * 1000 * 1020 *-----: -

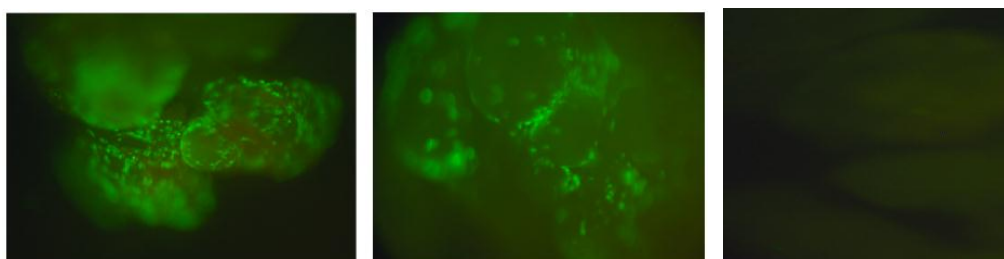
Rev_Seq_Do : -----* 1040 * 1060 * 1080 * 1100 * 1120 * 1140 *-----: -
F3'5'H_si_ : -----* 1040 * 1060 * 1080 * 1100 * 1120 * 1140 *-----: 731
F3'H_si_fr : -----* 1040 * 1060 * 1080 * 1100 * 1120 * 1140 *-----: 159
pHANNIBAL_ : -----* 1040 * 1060 * 1080 * 1100 * 1120 * 1140 *-----: 731

Rev_Seq_Do : -----* 1160 *-----: -
F3'5'H_si_ : -----* 1160 *-----: -
F3'H_si_fr : -----* 1160 *-----: -
pHANNIBAL_ : AGGAAAAAGA : 742
    
```

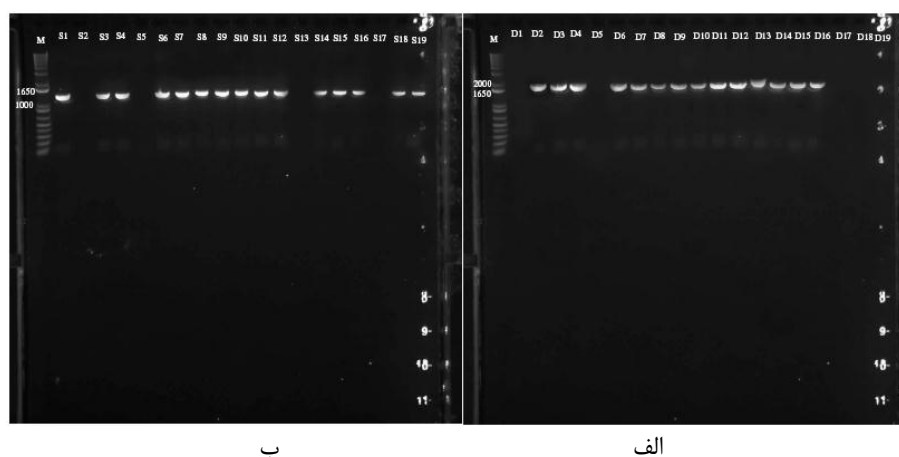
شکل ۸. ب) هم‌ردیف‌سازی سازهٔ خاموش‌کنندهٔ ژن‌های *F3'5'H* و *F3'5'H si*، توالی‌یابی سازهٔ ژنی توسط آغازگر پیشرو OCS (Rev Seq. Do)، اینترون ناقل pHANNIBAL

کالوس‌های جنین‌زای دارای سازه خاموشی ژن  $F3'H$  و سازه خاموشی همزمان  $F3'H$  و  $F3'5'H$  به ترتیب تعداد ۴۲ و ۳۴ لاین باززایی شدند که بر اساس واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، ۳۶ لاین برای سازه خاموشی ژن  $F3'H$  (۸۶ درصد از لاین‌های باززایی شده) و ۲۷ لاین برای سازه خاموشی همزمان  $F3'H$  و  $F3'5'H$  (۷۹ درصد از لاین‌های باززایی شده) مثبت ارزیابی شدند (شکل ۱۰). در این تحقیق تعداد لاین‌های باززایی شده و نیز لاین‌های تراریخت قابل ملاحظه بود و این نتیجه بیان‌کننده کارایی بالای روش باززایی و همچنین روش تراریختی مورد استفاده است. بهینه‌سازی روش ایجاد کالوس‌های جنین‌زا و روش تراریخت‌سازی در مؤسسه CSIRO استرالیا، موجب افزایش جنین‌زایی و کارایی تولید جنین‌های تراریخت در این مطالعه شد (unpublished).

پس از اطمینان از آرایش درست و کامل سازه‌های ژنی در ناقل pART27 نوترکیب، این ناقل به آگروباکتری منتقل شد. قطعه DNA قرار گرفته در بین RB و LB در سیستم ناقل دوگانه<sup>۱</sup>، توسط آگروباکتری به‌عنوان T-DNA در نظر گرفته شده و در نتیجه فعالیت ژن‌های ناحیه Vir، به درون ژنوم میزبان فرستاده می‌شود (Hooykaas & Schilperoort, 1992). در این تحقیق، کشت توام کالوس‌های جنین‌زا با آگروباکتری حاوی ناقل pART27 نوترکیب به خوبی انجام شد. در بررسی کالوس‌های جنین‌زا، پنج روز پس از تلقیح به‌وسیله میکروسکوپ فلورسنت، رنگ سبز ناشی از بیان ژن نشانگر *GFP* مشاهده شد (شکل ۹). این امر ثابت کرد که سازه‌های ژنی با موفقیت وارد ژنوم جنین‌های انگور شده‌اند و همان‌طور که انتظار می‌رفت کالوس‌های کنترل، رنگ سبز ناشی از *GFP* را نشان ندادند. از کشت



شکل ۹. بیان ژن GFP در کالوس‌های جنین‌زا پنج روز پس از تلقیح با آگروباکتری. الف-کالوس کنترل ب-کالوس‌های جنین‌زای دارای سازه خاموشی ژن‌های  $F3'H$  و  $F3'5'H$  ج-کالوس‌های جنین‌زای دارای سازه خاموشی ژن  $F3'H$



شکل ۱۰. الف) تکثیر قطعه DNA شامل سازه خاموش‌کننده ژن‌های  $F3'H$  و  $F3'5'H$  در لاین‌های D1 تا D19؛ ب) تکثیر قطعه DNA شامل سازه خاموش‌کننده ژن  $F3'H$  در لاین‌های S1 تا S19، توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمرز و آغازگرهای پیشرو LH35SF و پسرو OCS

دستیابی به گیاهانی با طیف متفاوت ترکیبات فلاونوئیدی در مطالعات مختلف انجام شده است (Davies *et al.*, 2003; Subramanian *et al.*, 2005; Wasson *et al.*, 2006; Nakatsuka *et al.*, 2007; Boase *et al.*, 2010; Mahajan *et al.*, 2011). جهت کاهش و یا خاموش نمودن بیان ژن‌ها از مکانیسم‌ها و ابزارهای مختلفی استفاده شده است که از مؤثرترین آنها کاربرد RNAi می‌باشد. خاموش‌سازی و کاهش بیان ژن با استفاده از RNAi ابزاری سودمند جهت مطالعه عملکرد ژن‌های کدکننده آنزیم‌های کلیدی مسیر بیوسنتز فلاونوئیدها از جمله *CHS*، *OMT*، *GT1*، *DFR* و *ANS* بوده است (Schwab *et al.*, 2011). روش *ihpRNA* روشی با کارایی بالا جهت اجرای خاموش‌سازی توسط RNAi می‌باشد. خاموش‌سازی به‌وسیله *ihpRNA* به همراه آنالیز طیف متابولیت‌ها برای مطالعه عملکرد ژن‌های ناشناخته در فرایند رشد و نمو بسیار مفید است (Hoffmann *et al.*, 2006). از جمله تاکنون برای خاموش‌سازی ژن *CHS* در *Medicago truncatula* (Wasson *et al.*, 2006) و توت‌فرنگی (Hoffmann *et al.*, 2006) استفاده شده و لاین‌های تراریخت خاموش شده با کارایی بالا ایجاد شده‌اند.

روش *ihpRNA* و مکانیسم خاموش‌سازی توسط RNAi در این تحقیق، به عنوان ابزاری قدرتمند جهت آگاهی و شناخت بیشتر از عملکرد ژن‌های *F3'H* و *F3'5'H* و برهم کنش آنها انتخاب و مورد استفاده قرار گرفت. مطالعه تأثیر هر یک از این ژن‌ها بر محتوای آنتوسیانین، فلاونول و تانن‌ها و یا سایر ترکیبات مسیر فلاونوئیدها در انگور، بررسی وابستگی و یا استقلال عمل محصولات آنها و همچنین آگاهی از مسیرهای احتمالی جایگزین، نیازمند خاموش‌سازی و کاهش بیان این ژن‌ها به طور جداگانه و یا همزمان می‌باشد. در این مطالعه، استفاده از روش‌ها و تکنیک‌های کارا و مؤثر منجر به دستیابی به تعداد قابل توجهی لاین‌های تراریخت شد که می‌توانند به عنوان ابزارهایی سودمند جهت اهداف ذکر شده مورد استفاده قرار گیرند.

Wesley *et al.* (2001) با معرفی روش خاموش‌سازی *ihpRNA* مبتنی بر استفاده از ناقل *pHANNIBAL*، کارایی بالای این روش نسبت به سایر روش‌های خاموش‌سازی و همچنین سادگی اجرای آن را گزارش کردند. روش *ihpRNA* در تعداد زیادی از گیاهان، روشی بسیار مؤثرتر از روش‌های قبلی گزارش شده است. نسبت بالای لاین‌های مستقل خاموش و میزان بالای خاموشی آنها از دیگر مزایای این روش می‌باشد (Wesley *et al.*, 2001; Helliwell & Waterhouse, 2003). در این تحقیق نیز استفاده از ناقل *pHANNIBAL* با بهره‌گیری از سایت شناسایی آنزیم‌های برشی، امکان تبدیل محصول ساده واکنش زنجیره‌ای پلیمرز را به سازه‌های خاموش‌کننده از طریق توالی‌های معکوس متصل به اینترون (*ihpRNA*) ژن هدف به راحتی فراهم نمود و تعداد قابل توجهی لاین تراریخت حاوی سازه ژنی ایجاد کرد.

در این مطالعه همچنین، ویژگی‌های ساختاری ناقل *pHANNIBAL*، امکان هدف قرار دادن همزمان دو ژن *F3'H* و *F3'5'H* را در یک سازه ژنی فراهم کرد. قابلیت دستکاری همزمان دو ژن امکان مطالعه نقش کلی آنها در یک مسیر بیوسنتزی را فراهم می‌سازد. به علاوه در مورد ژن‌هایی که فنوتیپ مشخصی ندارند از طریق خاموش‌سازی همزمان آنها با ژنی با فنوتیپ قابل مشاهده در قالب یک سازه ژنی، بیان ژن نشانگر، ردیابی بیان ژن هدف را به راحتی امکان پذیر نموده و می‌تواند نشان‌دهنده میزان خاموشی باشد (Fitzgerald *et al.*, 2004). در این تحقیق از ناقل *pART27* حاوی ژن *GFP* جهت انتقال سازه ژنی به اگروباکتری استفاده شد. افزودن ژن *GFP* به این ناقل در مؤسسه CSIRO استرالیا، امکان ردیابی کالوس‌های مثبت را تنها پس از گذشت ۵ روز از تراریخت‌سازی فراهم نموده است و به این ترتیب با ابزاری بسیار مطمئن، میزان موفقیت کار در زمانی کوتاه بررسی شد.

خاموش‌سازی ژن‌های مسیر بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه از جمله فلاونوئیدها با اهداف درک عمل ژن‌ها، نقش محصولات آنها در فرایندهای رشد و نمو و

## REFERENCES

1. Boase, M.R., Lewis, D.H., Davies, K.M., Marshall, G.B., Patel, D., Schwinn, K.E. & Deroles, S.C. (2010). Isolation and antisense suppression of flavonoid 3', 5'-hydroxylase modifies flower pigments and colour in cyclamen. *BMC Plant Biology*, 10, 107-118.
2. Castellarin, S.D., Di Gaspero, G., Marconi, R., Nonis, A., Peterlunger, E., Paillard, S., Adam-Blondon, A.F. & Testolin, R. (2006). Colour variation in red grapevines (*Vitis vinifera* L.): genomic organisation, expression of flavonoid 3'-hydroxylase, flavonoid 3',5'-hydroxylase genes and related metabolite profiling of red cyanidin-/blue delphinidin-based anthocyanins in berry skin. *BMC Genomics*, 7, 12-12.
3. Davies, K.M., Schwinn, K.E., Deroles, S.C., Manson, D.G., Lewis, D.H., Bloor, S.J. & Bradley, J.M. (2003). Enhancing anthocyanin production by altering competition for substrate between flavonol synthase and dihydroflavonol 4-reductase. *Euphytica*, 131, 259-268.
4. Fitzgerald, A., van Kan, J.A.L. & Plummer, K.M. (2004). Simultaneous silencing of multiple genes in the apple scab fungus, *Venturia inaequalis*, by expression of RNA with chimeric inverted repeats. *Fungal Genetics and Biology*, 41, 963-971.
5. Franks, T., He, D.G. & Thomas, M.R. (1998). Regeneration of transgenic *Vitis vinifera* L. Sultana plants: genotypic and phenotypic analysis. *Molecular Breeding*, 4, 321-333.
6. Garfinkel, D.J. & Nester, E.W. (1980). *Agrobacterium tumefaciens* mutants affected in crown gall tumorigenesis and octopine catabolism. *Journal of Bacteriology*, 144, 732-743.
7. Gleave, A.P. (1992). A versatile binary vector system with a T-DNA organizational structure conducive to efficient integration of cloned DNA into the plant genome. *Plant Molecular Biology*, 20, 1203-1207.
8. Helliwell, C. & Waterhouse, P. (2003). Constructs and methods for high-throughput gene silencing in plants. *Methods*, 30, 289-295.
9. Helliwell, C.A., Wesley, S.V., Wielopolska, A.J. & Waterhouse, P.M. (2002). High-throughput vectors for efficient gene silencing in plants. *Functional Plant Biology*, 29(10), 1217-1225.
10. Hoffmann, T., Kalinowski, G. & Schwab, W. (2006). RNAi-induced silencing of gene expression in strawberry fruit (*Fragaria x ananassa*) by agroinfiltration: a rapid assay for gene function analysis. *Plant Journal*, 48(5), 818-826.
11. Hooykaas, P.J.J. & Schilperoort, R.A. (1992). *Agrobacterium* and plant genetic engineering. *Plant Molecular Biology*, 19, 15-38.
12. Iocco, P., Franks, T. & Thomas, M.R. (2001). Genetic transformation of major wine grape cultivars of *Vitis vinifera* L. *Transgenic Research*, 10, 105-112.
13. Jeong, S. T., Goto-Yamamoto, N., Hashizume, K. & Esaka, M. (2006). Expression of the flavonoid 3'-hydroxylase and flavonoid 3', 5'-hydroxylase genes and flavonoid composition in grape (*Vitis vinifera*). *Plant Science*, 170, 61-69.
14. Mahajan, M., Ahuja, P.S. & Yadav, S.K. (2011). Post-Transcriptional Silencing of Flavonol Synthase mRNA in Tobacco Leads to Fruits with Arrested Seed Set. *PLoS ONE*, 6(12), e28315.
15. Murashige, T. & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473-497.
16. Nakatsuka, T., Abe, Y., Kakizaki, Y., Yamamura, S. & Nishihara, M. (2007). Production of red-flowered plants by genetic engineering of multiple flavonoid biosynthetic genes. *Plant Cell Reports*, 26, 1951-1959.
17. Newton, D.J. & Goussard, P.G. (1990). The ontogeny of somatic embryos from in vitro cultured grapevine anthers. *South African Journal for Enology and Viticulture*, 11(2), 70-75.
18. Scherer, L.J. & Rossi, J.J. (2003). Approaches for the sequence-specific knockdown of mRNA. *Nature Biotechnology*, 21(12), 1457-65.
19. Schwab, W., Hoffmann, T., Kalinowski, G. & Preu, B.A. (2011). Functional genomics in strawberry fruit through RNAi-mediated silencing. *Genes, Genomes and Genomics*, 5, 91-101.
20. Subramanian, S., Graham, M.Y., Yu, O. & Graham, T.L. (2005) RNA interference of soybean isoflavone synthase genes leads to silencing in tissue distal to the transformation site and to enhanced susceptibility to *Phytophthora sojae*. *Plant Physiology*, 137, 1345-1353.
21. Thomas, M. R., Matsumoto, S. & Cain P. (1993). Repetitive DNA of grapevine: classes present and sequences suitable for cultivar identification. *Theoretical and Applied Genetics*, 86, (2-3), 173-180.
22. Torregrosa, L. (1998) A simple and efficient method to obtain stable embryogenic cultures from anthers of *Vitis vinifera* L. *Vitis*, 37, 91-92.
23. Torregrosa, L., Iocco, P. & Thomas, M.R. (2002). Influence of *Agrobacterium* strain, culture medium, and cultivar on the transformation efficiency of *Vitis vinifera* L. *American Journal of Enology and Viticulture*, 53, 183-190.
24. Wang, M. B. & Waterhouse, P.M. (2000). High-efficiency silencing of a b-glucuronidase gene in rice is correlated with repetitive transgene structure but independent of DNA methylation. *Plant Molecular Biology*, 43, 67-82.

25. Wasson, A. P., Pellerone, F. I. & Mathesius, U. (2006). Silencing the flavonoid pathway in *Medicago truncatula* inhibits root nodule formation and prevents auxin transport regulation by Rhizobia. *Plant Cell*, 18, 1617-1629.
26. Wesley, V.S., Helliwell, C.A., Smith, N.A., Wang, M.B., Rouse, D.T., Liu, Q., Gooding, P.S., Singh, S.P., Abbott, D., Stoutjesdijk, P.A., Robinson, S.P., Gleave, A.P., Green, A.G. & Waterhouse, P. M. (2001). Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. *The Plant Journal*, 27, 581-590.