

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

مریم پژمان‌مهر<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  $F3'H$  و  $F3'5'H$  و برهمکنش آن‌ها در مسیر بیوسنتز فلاونوئیدها در انگور، از طریق طراحی و ساخت سازه‌های مناسب ایجادکننده ihpRNA لاین‌های تراریخت حاوی سازه خاموش‌کننده ژن  $F3'H$  و سازه خاموش‌کننده هر دو ژن  $F3'H$  و  $F3'5'H$  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 تهیه‌شده وارد ناقل p27 mod GFP 4a و به آگروباکتری منتقل شد. کالوس‌های جنین‌زای حاصل از کشت پرچم، توسط کشت توأم 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 ۴۲ و ۳۴ لاین باززایی شدند که براساس 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 استفاده‌شده بود.

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

### مقدمه

ژن‌های ساختاری در مسیر بیوسنتز فینیل پروپانوییدها که کدکننده فلاونوئید<sup>۳</sup>- و فلاونوئید<sup>۵،۳</sup>- هیدورکسیلازا (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-ال) ها دخیل‌اند (Jeong et al., 2006).  
 مطالعه توالی، میزان ابراز mRNA ژن‌های  $F3'H$  و

$F3'5'H$  و همچنین ترکیب فلاونوئیدها در اندام‌های 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

که به صورت دو تکرار معکوس<sup>۷</sup> قرار گرفته‌اند تا RNA دورشته‌ای تشکیل دهند. زمانی که اینترون به سازه<sup>۸</sup> hpRNA اضافه شود، کارایی خاموش‌سازی افزایش می‌یابد. خاموش‌سازی به وسیله<sup>۹</sup> تشکیل RNA خود مکمل دارای اینترون<sup>۱۰</sup> (ihpRNA) در تعداد زیادی از گیاهان نسبت به سایر روش‌های مرسوم روشی بسیار مؤثرتر است که به درجات مختلف خاموشی تا نزدیک ۱۰۰ درصد منجر می‌شود (Wesley et al., 2001; Helliwell & Waterhouse, 2003). کارایی بالاتر ihpRNA می‌تواند به این علت باشد که فرایند ویرایش اینترون بازوهای hpRNA را روبه‌روی هم قرار می‌دهد و تشکیل RNA دورشته‌ای 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<sup>۱۱</sup> 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<sup>۱۲</sup> 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 آنجاکه اساس این خاموش‌سازی بر پایه<sup>۱۳</sup> توالی ساختاری است، استفاده از توالی‌های منحصر به فرد ژن‌های هدف خاص و البته امکان استفاده از توالی‌های حفاظت‌شده برای هدف قراردادن خانواده‌های ژنی مختلف را امکان‌پذیر می‌کند (Helliwell & Waterhouse, 2003). همچنین با کاربرد سازه‌هایی که دو ژن متفاوت را هدف قرار می‌دهند، می‌توان موجب خاموشی هر دو ژن شد و عملکرد کلی آن دو را مطالعه کرد (Helliwell et al., 2002).

به منظور مطالعه<sup>۱۴</sup> عملکرد ژن‌های  $F3'5'H$  و  $F3'H$  و برهمکنش آن‌ها در مسیر بیوسنتز فلاونوئیدها در انگور، در این پژوهش تلاش شده است از طریق طراحی و ساخت سازه‌های مناسب ایجادکننده<sup>۱۵</sup> ihpRNA لاین‌های تراریخت حاوی سازه<sup>۱۶</sup> خاموش‌کننده<sup>۱۷</sup> ژن  $F3'H$  و سازه<sup>۱۸</sup> خاموش‌کننده<sup>۱۹</sup> هر دو ژن  $F3'5'H$  و  $F3'H$  (به منظور خاموشی هم‌زمان آن‌ها) ایجاد شود.

mRNA ژن‌های  $F3'5'H$  و  $F3'H$  نشان ندادند. بر این اساس پیشنهاد شد که سازوکارهای دیگری ممکن است در بیوسنتز هر یک از گروه‌های فلاونوئیدی دخیل باشد (Jeong et al., 2006).

تا کنون نحوه<sup>۲۰</sup> 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 به طور مستقل و در ارتباط با یکدیگر بررسی کند، ضروری است. استفاده از روش‌های مولکولی از جمله خاموش‌سازی ژن‌ها می‌تواند نقش مؤثری در شناسایی عملکرد ژن‌ها داشته باشد. RNAi (RNA مداخله‌گر) ابزاری مؤثر برای خاموش‌سازی پس از رونویسی ژن‌ها (PTGS)<sup>۲۱</sup> در موجودات مختلف از جمله گیاهان است (Wang & Waterhouse, 2000; Waterhouse et al., 1998).

بر اساس یک مکانیزم داخلی در لاین‌های تراریخت که تولید RNA دورشته‌ای یا تک‌رشته‌ای خود مکمل (سنجاق سری)<sup>۲۲</sup> می‌کنند، RNA دورشته‌ای از طریق برش با اندونوکلازهایی به نام دایسر<sup>۲۳</sup> به قطعات کوچک دورشته‌ای ۲۱ تا ۲۳ نوکلئوتیدی (si RNAs)<sup>۲۴</sup> تبدیل می‌شوند. پیچ‌های si RNA قبل از ورود به کمپلکس چندپروتئینه<sup>۲۵</sup> الفاکندة خاموشی RNA (RISC)<sup>۲۶</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 به منزله<sup>۲۷</sup> راهنما برای برش اندونوکلاز رسته<sup>۲۸</sup> mRNA اندونون توسط اندونوکلاز موجود در RISC استفاده می‌شود (Scherer & Rossi, 2003).

RNAi شامل مکانیزم‌های متعدد مرتبط در خاموش‌سازی ژن است که اساس مشترکی دارند. روش ایجاد گیاهان تراریخت بیان‌کننده<sup>۲۹</sup> hpRNA 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

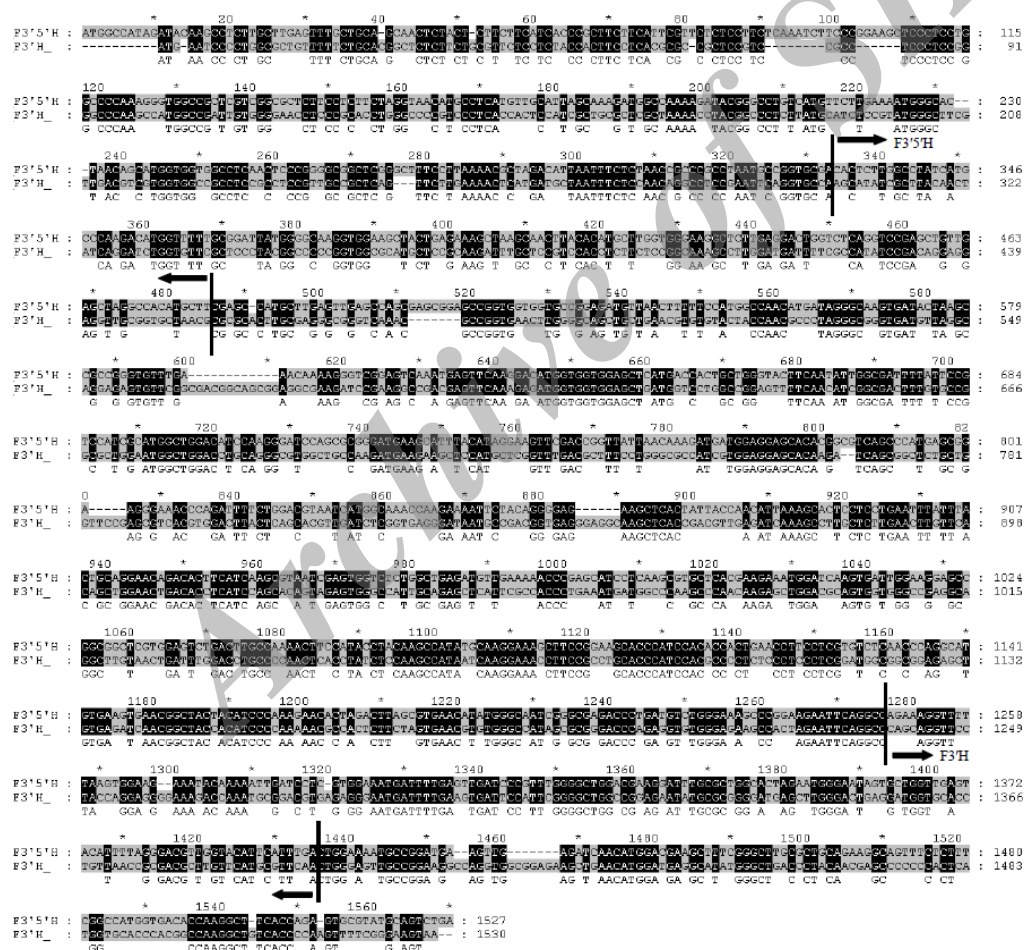
قطعاتی که با هیچ‌کدام از دیگر ژن‌های انگور تطابق<sup>۲</sup> بالای ۲۰ نوکلئوتید نداشتند، انتخاب شدند. در ادامه وجودنداشتن سایت‌های برشی آنزیم‌های استفاده‌شده در این آزمایش، توسط نرم‌افزار Vector NTI بررسی شد. در نهایت قطعاتی با بهترین شرایط از ژن‌های *F3'5'H* و *F3'H* انتخاب شدند. توالی منتخب ژن *F3'H* شامل بازهای ۱۹۴۷ تا ۲۱۰۵ (بخشی از اگزون سوم ژن) به طول ۱۵۹ جفت باز و توالی گزینش‌شده 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 هم‌جهت<sup>۳</sup> و مخالف جهت<sup>۴</sup> درون ناقل انجام شد.

## مواد و روش‌ها

### طراحی سازه‌های ژنی

#### انتخاب قطعه مناسب در دو ژن

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



شکل ۱. الف) قطعه انتخاب‌شده در ژن *F3'5'H* (ب) قطعه انتخاب‌شده در ژن *F3'H*

فلش‌های مشکی محدوده قطعات را نشان می‌دهند.

2. Identity
3. Sense
4. Antisense

1. Grape genome NCBI blast

CG3' طراحی و استفاده شد (زیر توالی سایت برشی آنزیم‌ها خط کشیده شده است).

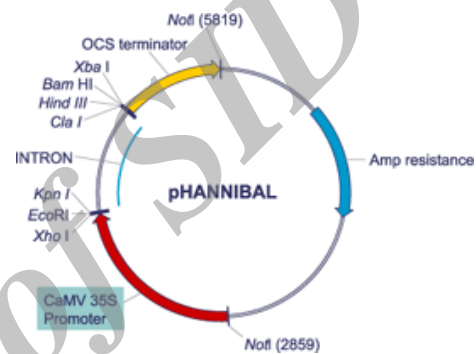
تهیه سازه ژنی برای خاموش‌سازی هم‌زمان *F3'H* و *F3'5'H* نیاز به چهار جفت آغازگر دارد (دو جفت آغازگر برای تکثیر قطعات مربوط به ژن *F3'H* و دو جفت آغازگر برای تکثیر قطعات ژن *F3'5'H*). برای افزودن قطعه مربوط به ژن *F3'5'H* به صورت هم‌جهت در سازه ژنی خاموش‌کننده *F3'H* (که در مرحله قبل تهیه شده است) سایت‌های برشی آنزیم‌های *EcoRI* (در آغازگر پیشرو) و *Asp718* (در آغازگر پسرو) استفاده شدند. به این منظور آغازگر پیشرو (VvF3'5'HsiF1) (5'CGGAATTCCACTCTTGGCCTATCATGCC (3' و آغازگر پسرو (VvF3'5'HsiR1) (5'GGGGTACCAAGCATGTGGCCTAGCTCA (3' طراحی و استفاده شدند. جهت اتصال قطعه مربوط به ژن *F3'5'H* به صورت مخالف جهت در سازه ژنی خاموش‌کننده *F3'H*، سایت‌های برشی آنزیم‌های *BamHI* (در آغازگر پیشرو) و *ClaI* (در آغازگر پسرو) استفاده شدند. آغازگر پیشرو (VvF3'5'HsiF2) با توالی 5'CGGGATCCCCTTGGCCTATCATGCC (3' و آغازگر پسرو (VvF3'5'HsiR2) با توالی 5'CCATCGATAAGCATGTGGCCTAGCTCAA (3' طراحی و استفاده شد (زیر توالی سایت برشی آنزیم‌ها خط کشیده شده است). آغازگرها توسط شرکت GeneWorks سنتز شدند.

#### ساخت سازه‌های ژنی

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز برای تکثیر قطعات DNA ژنومی از برگ‌های تازه رقم شیراز براساس روش Thomas *et al.* (1993) استخراج شد. برای تکثیر قطعات هم‌جهت 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 ۲/۵ میکرولیتر بافر واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (۱۰x) فاقد منیزیم، ۰/۲۵ میکرولیتر dNTPs با غلظت ۲۰ میلی‌مولار، ۰/۷۵ میکرولیتر MgSO4 با غلظت ۵۰ میلی‌مولار، ۰/۵ میکرولیتر مخلوط آغازگر با غلظت ۱۰

#### طراحی آغازگر حاوی سایت برشی مناسب

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



شکل ۲. ناقل pHANNIBAL و موقعیت سایت‌های برشی روی آن

برای تهیه سازه خاموش‌کننده از ناقل pHANNIBAL استفاده شد (GenBank: AJ311872.1). سازه ژنی برای خاموش‌سازی ژن *F3'H* نیاز به دو جفت آغازگر داشت. به منظور اتصال قطعه مربوط به ژن *F3'H* به صورت هم‌جهت در ناقل pHANNIBAL سایت‌های برشی آنزیم‌های *XhoI* (در آغازگر پیشرو) و *EcoRI* (در آغازگر پسرو) استفاده شدند. آغازگر پیشرو (VvF3'HsiF1) (5'CCCTCGAGCAGCAGGTTCTACCAGGA (3' و آغازگر پسرو (VvF3'HsiR1) (5'CGGAATTCTTGAACGCATGAACAAGCG (3' 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) استفاده شدند. آغازگر پیشرو (VvF3'HsiF2) با توالی 5'GCTCTAGACAGCAGGTTCTACCAGGAG (3' و آغازگر پسرو (VvF3'HsiR2) با توالی 5'CGGGATCCTTGAACGCATGAACAAGCGT

انجام گرفت. به این ترتیب که ۱ میکرولیتر از مخلوط واکنش اتصال با ۴۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلول‌های باکتری مستعد که بر روی یخ قرار داشتند، مخلوط شد 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 و پس از چند بار پیست کردن، محتوای کووت به تیوپ‌های نام‌گذاری شده منتقل شد. به منظور تحریک بیان ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک، سلول‌های باکتری تراریخت به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. سپس کشت باکتریایی در دو تکرار (غلیظ و رقیق) بر روی پلیت‌های LB آگار حاوی آمپی‌سیلین، IPTG و X-gal کشت و طی شب در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. پس از ظهور کلونی‌ها، براساس 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 آمپی‌سیلین منتقل شدند. سپس در شیکر انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۲۰۰ دور در دقیقه به مدت یک شب قرار گرفتند. استخراج DNA ناقل با استفاده از کیت مینی‌پِرپ<sup>۱۳</sup> طبق دستورالعمل سازنده انجام و کمیت و کیفیت آن با دستگاه نانودراپ ارزیابی شد. برای اطمینان از درستی انجام کلون‌سازی، DNA پلاسمیدی به وسیله آنزیم *EcoRI* هضم شد و محصول هضم‌شده روی ژل آگارز ۱/۵ درصد (TAE) بارگذاری شد. بهترین نمونه‌ها انتخاب و برای اطمینان کامل از صحت کار، برای هر قطعه چهار تکرار با آغازگر 5' CATTAGGTGACACTATAG3' SP6<sup>۱۴</sup> توسط شرکت AGRF<sup>۱۵</sup> توالی‌یابی شد. در نهایت چهار ناقل pDrive هر یک حاوی یکی از چهار قطعه DNA هدف، به دست آمد. آنزیم‌های استفاده‌شده در این پژوهش از شرکت‌های New England BioLabs, UK<sup>۱۶</sup> و Roche<sup>۱۷</sup> تهیه شدند.

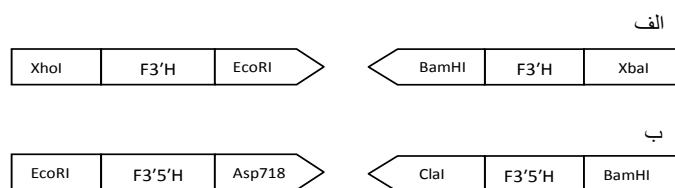
میکرومولار، ۰/۱ میکرولیتر آنزیم Taq DNA Polymerase<sup>۱</sup> و ۱۹/۹ میکرولیتر آب مقطر استریل نانوپور بود. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در دستگاه ترموسایکلر<sup>۲</sup> با شرایط دمایی یک سیکل ۲ دقیقه‌ای در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به منظور واسرشته‌سازی<sup>۳</sup> و فعال شدن آنزیم و به دنبال آن ۳۵ سیکل شامل ۳۰ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد (واسرشته‌سازی)، ۳۰ ثانیه در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد (اتصال)، ۶۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد (گسترش) و یک سیکل ۱۰ دقیقه‌ای در ۷۲ درجه سانتی‌گراد 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 به وسیله دستگاه نانودراپ کمیت و کیفیت آن ارزیابی شد. در نتیجه چهار 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 خالص‌شده از ژل آگارز در ناقل کلون‌سازی pDrive (Gene Bank: DQ996013.1)، با استفاده از کیت کلون‌سازی<sup>۵</sup> طبق دستورالعمل سازنده درج<sup>۶</sup> شد. مخلوط واکنش اتصال<sup>۷</sup> شامل ۵۰ نانوگرم ناقل pDrive، ۱۰ نانوگرم محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، مخلوط مادر اتصال<sup>۸</sup> (2x) و مقدار متناسب آب نانوپور استریل، با حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر تهیه شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۱۶ درجه سانتی‌گراد (دمای مناسب برای فعالیت آنزیم لیگاز) قرار گرفت. پس از انجام مرحله اتصال، برای غیرفعال سازی آنزیم لیگاز، تیوپ‌ها ۱۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. انتقال ناقل حاوی قطعه مورد نظر به سلول‌های مستعد باکتری *E. coli* سویه XL1-blue<sup>۹</sup> به روش الکتروپوریشن با استفاده از دستگاه<sup>۱۰</sup> Gene pulser

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)

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

برای ساخت سازه ژنی خاموش‌کننده ژن‌های *F3'H* و *F3'5'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 شد. برای 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 برای 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 ایجادشده در ناقل pART27**  
درج سازه‌های خاموش‌کننده ژن *F3'H* و ژن‌های *F3'5'H* در ناقل pART27 (p27 mod GFP 4a) (Gleave, 1992)، به‌طور مشابه انجام شد. پس از تهیه ناقل pHANNIBAL حاوی همه قطعات هم‌جهت و مخالف جهت لازم برای خاموش‌سازی، ناقل pART27 به‌عنوان ناقل مقصد برای انتقال به اگروباکتری<sup>۲</sup> استفاده

### درج قطعات در ناقل pHANNIBAL

به‌منظور درج قطعه اول (قطعه هم‌جهت *F3'H*) در ناقل pHANNIBAL (شکل ۲)، ابتدا ناقل pDrive دارای قطعه هم‌جهت و همین‌طور ناقل pHANNIBAL به‌وسیله آنزیم‌های *EcoRI* و *XhoI* برش داده شدند. سپس DNA برش داده‌شده بر روی ژل ۱/۵ درصد آگارز (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> بر روی ژل آگارز 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 شد. همچنین دو مخلوط واکنش کنترل، یکی شامل ناقل pHANNIBAL هضم آنزیمی شده و آنزیم T4 لیگاز بدون قطعه DNA و دیگری شامل فقط ناقل pHANNIBAL هضم آنزیمی شده برای 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 تک‌کلونی‌های باکتری‌های کشت‌شده، DNA پلاسمیدی استخراج و کمیت و کیفیت آن با نانودراپ اندازه‌گیری شد. صحت کار توسط برش آنزیمی با آنزیم‌های *EcoRI* و *XhoI* و چک کردن قطعات بر روی ژل آگاروز تأیید شد.

سپس درج قطعه دوم (قطعه مخالف جهت *F3'H*) در ناقل pHANNIBAL حاوی قطعه اول انجام شد به این صورت که ناقل pDrive دارای قطعه مخالف جهت و

2. *Agrobacterium tumefaciens*

1. www.bioline.com

در محیط حاوی آنتی‌بیوتیک اسپکتومایسین صورت گرفت و طی شب در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سپس کلونی‌های تشکیل‌شده برداشت شدند. هر کلونی در تیوپ حاوی محیط LB مایع و اسپکتومایسین کشت و در شیکر انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۲۰۰ دور در دقیقه به مدت یک شب قرار گرفت. پس از آن استخراج پلاسمید انجام شد. کمیت و کیفیت پلاسمیدهای استخراج‌شده با نانودراپ اندازه‌گیری شدند. سپس هضم مقداری از پلاسمید با آنزیم *NotI* و الکتروفورز روی ژل انجام گرفت. پس از مشاهده ۲ باند با اندازه صحیح، صحت کار توسط توالی‌یابی از دو جهت با آغازگر پیشرو LH35SF (5'GCAAGTGGATTGATGTGACA3') و آغازگر پسرو OCS (5'GGCGTAAGGATCTGAGCTA3') تأیید شد.

#### انتقال ناقل pART27 به اگروباکتری

پس از تهیه دو ناقل pART27، یکی حاوی سازه خاموش‌کننده ژن *F3'H* و دیگری شامل سازه خاموش‌کننده دو ژن *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 ۲۸ درجه سانتی‌گراد برای 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 ۲۸ درجه سانتی‌گراد برای رشد باکتری‌ها قرار گرفتند. سپس تک‌کلونی‌ها برداشت شدند و در محیط حاوی LB مایع، ریفامپیسین و اسپکتومایسین در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت دو روز در شیکر انکوباتور قرار گرفتند. به دلیل اینکه اگروباکتری تعداد کپی‌های کمی از پلاسمید ایجاد می‌کند و همچنین گاهی توالی نوکلئوتیدی قرارگرفته 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

شد. به این منظور ناقل‌های pART27 و pHANNIBAL توسط آنزیم *NotI* برش داده شدند و محصول هضم آنزیمی روی ژل ۰/۷ درصد آگارز (TAE) بارگذاری شد. از آنجاکه سایت برشی آنزیم *NotI* در دو سمت پروموتور و ترمینیتور سازه خاموش‌کننده وارد شده قرار دارد، حاصل برش ناقل pHANNIBAL توسط آنزیم *NotI* دو باند ایجاد کرد. قطعه حاوی آمپی‌سیلین ۲۸۶۴ جفت باز، قطعه حاوی قطعات هم‌جهت و مخالف جهت *F3'H* ۳۳۱۰ جفت باز و قطعه حاوی قطعات هم‌جهت و مخالف جهت *F3'H* و *F3'5'H* ۳۶۴۶ جفت باز بودند. به این دلیل باند بالایی به‌منزله باند هدف از ژل جدا و خالص‌سازی شد. حذف گروه فسفات از انتهای ۵' ناقل کلون‌سازی 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 ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. این آنزیم فسفر انتهایی ۵' را حذف و از اتصال مجدد دو انتهای بریده‌شده ناقل جلوگیری می‌کند. برای غیرفعال سازی آنزیم، مخلوط واکنش ۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. بعد از غیرفعال کردن آنزیم آنتارکتیک فسفاتاز، عمل اتصال سازه به ناقل pART27 به‌وسیله آنزیم T4 لیگاز و ۳۰ دقیقه قرار دادن در دمای ۱۶ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت. در واکنش اتصال سازه ژنی و ناقل با نسبت برابر (۱:۱) در مخلوط واکنش اتصال شرکت داشتند. به‌منزله کنترل یک واکنش شامل ناقل pART27 هضم آنزیمی شده و آنزیم T4 لیگاز بدون سازه ژنی در نظر گرفته شد.

پس از غیرفعال‌سازی آنزیم T4 لیگاز، ناقل pART27 نو ترکیب برای خالص‌سازی و اطمینان از صحت کار، ابتدا به باکتری *E. coli* سویه XL1-blue با روش الکتروپوریشن منتقل و به مدت یک ساعت برای بیان ژن مقاومت به اسپکتومایسین در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد (ژن اسپکتومایسین بر روی ناقل pART27 به‌منزله نشانگر انتخابی جهت باکتری‌های تراریخت به کار می‌رود). کشت

3. Rifampicin  
4. Rearrange

1. Antarctic Phosphatase  
2. Antarctic Phosphatase Reaction Buffer

کشت قرار گرفت. پس از کشت، پلیت‌ها در تاریکی و دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. درکشت پرچم، درواقع بخشی که از آن کالوس جنین‌زا ایجاد می‌شود، میله پرچم است (Newton & Goussard, 1990).

به‌منظور 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 سایتوکینین (BAP) ۱ میکرومولار بود. در ادامه، انتقال کالوس‌ها به محیط GS1CA (Franks *et al.*, 1998) حاوی هورمون‌های اکسین (NOA) ۱۰ میکرومولار و سایتوکینین (BAP) ۱ میکرومولار، در زمان مناسب انجام گرفت (CSIRO unpublished). در این محیط کالوس‌ها شروع به تغییر و نمو می‌کنند. یک هفته بعد کالوس‌ها برای تراریخت‌سازی آماده بودند. آگار استفاده‌شده 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 توأم<sup>۹</sup> آن‌ها با آگروباکتری براساس روش Torregrosa و همکاران (2002) با برخی تغییرات انجام شد. از هر یک از پلیت‌های کلونی‌های آگروباکتری حاوی سازه‌های خاموش‌کننده، یک تک‌کلونی برداشته و وارد ۳ میلی‌لیتر محیط MG/L (Garfinkel & Nester, 1980) حاوی اسپکتومایسین (۳ میکرولیتر) شد و در شیکر انکوباتور ۲۸ درجه سانتی‌گراد به‌مدت یک شبانه‌روز نگهداری شد. بعد از گذشت یک شبانه‌روز، ۵ میکرولیتر از هر کشت در ارلن‌های حاوی ۲۵ میلی‌لیتر MG/L به اضافه ۲۵ میکرولیتر اسپکتومایسین ریخته شد و یک شبانه‌روز در شیکر انکوباتور ۲۸ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت.

روز بعد غلظت باکتری با اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. زمانی که OD<sub>600</sub> کشت‌ها به ۰/۸ تا ۱ رسید (رشد مناسب باکتری)، به‌مدت ۸ دقیقه، با دور ۵ هزار در

اسپکتومایسین انجام گرفت و پلیت‌ها به‌مدت یک شب در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. سپس تک‌کلونی‌های برداشت‌شده به محیط حاوی LB مایع و اسپکتومایسین منتقل و طی شب در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در شیکر انکوباتور قرار گرفتند. استخراج پلاسمید انجام و کمیت و کیفیت پلاسمیدهای استخراج‌شده با نانودراپ اندازه‌گیری شد. سپس هضم آنزیمی پلاسمید استخراج‌شده و پلاسمید اولیه که برای تراریختی آگروباکتری استفاده شده بود، با آنزیم *NotI* انجام شد و قطعات هضم‌شده از طریق الکتروفورز روی ژل آگاروز مقایسه شدند. پس از اطمینان از صحت حضور قطعات و همچنین عدم بازچینی توالی DNA، از پلیت‌های اولیه تک‌کلونی 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 برای 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 براساس روش Torregrosa (1998) انجام شد. ابتدا برای تهیه کالوس‌های جنین‌زا از پرچم، گل‌ها در مرحله‌ای که هنوز به‌صورت خوشه‌هایی با غنچه‌های باز نشده فشرده بودند، انتخاب و در آزمایشگاه با هیپوکلریت کلسیم و Tween 20 ضد عفونی و سپس سه‌مرتب با آب نانوپور استریل آشوبی شدند.

پرچم‌ها با میله<sup>۴</sup> 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 سایتوکینین (BAP) ۸/۹ میکرومولار بود. نحوه قراردادن پرچم روی محیط کشت به نحوی بود که سمت دور از محور<sup>۷</sup> در تماس با محیط

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



### باززایی و تولید گیاه کامل

پس از گذشت ۱۰ روز از تلقیح، کالوس‌ها به پلیت‌های محیط GSICA حاوی ۱۰ میکرومولار اکسین (NOA)، ۱ میکرومولار سایتوکینین (BAP)، غلظت مناسب کانامایسین (CSIRO unpublished) و هزار میکروگرم در میلی‌لیتر تایمنتین منتقل و دوباره در تاریکی و دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (پراوری کالوس‌ها در محیط کشت انتخابی حاوی کانامایسین). چهار هفته پس از تلقیح، کالوس‌ها به پلیت‌های حاوی محیط NN.T.K حاوی ۱۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر کانامایسین و هزار میکروگرم در میلی‌لیتر تایمنتین منتقل شدند. در این محیط نیز کالوس‌ها در تاریکی و دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. سپس هر چهار هفته واگشت بر روی پلیت‌های حاوی محیط NN.T.K ادامه یافت تا زمانی که جنین‌ها جوانه بزنند (در واگشت‌های بعدی به تدریج غلظت کانامایسین تا ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر کاهش یافت). از آنجا که هیچ هورمونی به این محیط (NN.T.K) اضافه نشده است، به جنین اجازه جوانه‌زدن می‌دهد. از ۱۲ هفته پس از تلقیح، جنین‌ها شروع به جوانه‌زدن کردند، جنین‌های جوانه‌زده که بیان ژن GFP<sup>۶</sup> را نشان دادند انتخاب و از محل محور زیر لپه در حدود ۵ میلی‌متر پایین لپه‌ها قطع، و این ریزنمونه‌ها<sup>۷</sup> به محیط MS/2 (Murashige & Skoog, 1962) حاوی ۲ تا ۵ میکرومولار هورمون BAP منتقل شدند (این محیط اولین محیط بدون آنتی‌بیوتیک و حاوی سایتوکینین BAP است که شاخه‌دهی را تحریک می‌کند). از این زمان به بعد جنین‌های جوانه‌زده تحت روشنایی و دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد 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 و در محیط ریشه‌زایی که حاوی اکسین (۰/۵ میلی‌مولار NAA) بود کشت شدند. پس از ریشه‌زایی و باززایی گیاهان کامل<sup>۸</sup>، برگ‌های کوچک از بالای ساقه برداشت و برای آزمایش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز استفاده شد. همچنین DNA

دقیقه در دمای اتاق سانتریفوژ شدند و روشنآور<sup>۱</sup> دور ریخته شد. در ادامه ۲۵ میلی‌لیتر محلول modLCM (محیط القا<sup>۲</sup>) اضافه و پس از حل شدن کامل پلت باکتری، دوباره به مدت ۳ ساعت در شیکر انکوباتور ۲۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. سپس کالوس‌های کشت شده بر روی محیط GSICA با احتیاط از روی محیط برداشته و در یک پلیت خالی ریخته، شد و 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 شد و به صورت دسته‌های کوچک با فواصل یک سانتی‌متر، روی محیط GSICA در پلیت‌های نامگذاری شده قرار گرفتند (با برخی تغییرات براساس CSIRO unpublished) و در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت نگهداری شدند (دمایی که اگر باکتری در آن بی‌آنکه رشد چندانی داشته باشد توانایی آلوده‌سازی دارد).

سپس کالوس‌های جنین‌زا با محلول LCM حاوی هزار میکروگرم در میلی‌لیتر تایمنتین<sup>۳</sup> شست‌وشو داده شدند. محلول اضافی توسط کاغذ صافی گرفته شد و کالوس‌های جنین‌زا روی محیط GSICA.T حاوی ۱۰ میکرومولار اکسین (NOA) و ۱ میکرومولار سایتوکینین (BAP) و هزار میکروگرم در میلی‌لیتر تایمنتین کشت شدند و به مدت ۹ تا ۱۰ روز بعد از تلقیح<sup>۴</sup> در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد در تاریکی قرار گرفتند. چند روز بعد از کشت در این محیط کالوس‌ها دوباره چک شدند، زیرا در صورت مشاهده رشد اگر باکتری باید مرحله شست‌وشو تکرار شود. کالوس‌های جنین‌زا، ۵ روز پس از تلقیح، از نظر قهوه‌ای‌نشدن و رشد نکردن اگر باکتری، با میکروسکوپ معمولی و برای تشخیص رنگ سبز ناشی از بیان ژن نشانگر GFP با میکروسکوپ فلورسنت<sup>۵</sup> بررسی شدند. کالوس‌هایی که در مجاورت اگر باکتریوم قرار نگرفته بودند به منزله کنترل در نظر گرفته شدند.

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

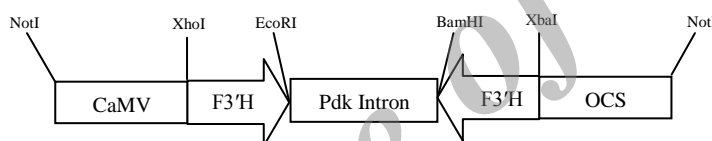
6. GFP positive
7. Cotyledonary explant
8. Plantlet

نهایت لاین‌های تراریخت با موفقیت باززایی شدند. به این منظور پس از انتخاب قطعات مناسب از ژن‌های  $F3'H$  و  $F3'5'H$  و طراحی آغازگرهای اختصاصی، کلون‌سازی قطعات منتخب تکثیرشده از طریق واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، توسط ناقل pDrive در باکتری *E. coli* سویه XL1-blue با موفقیت انجام شد. درستی هر یک از مراحل انجام‌شده توسط هضم DNA پلاسمیدی به‌وسیله آنزیم *EcoRI* و توالی‌یابی تأیید شد. پس از ورود قطعات به ناقل pHANNIBAL، صحت درج قطعات مورد نظر در این ناقل، توسط برش آنزیمی تأیید شد و سازه‌های خاموش‌کننده ژن  $F3'H$  و ژن‌های  $F3'H$  و  $F3'5'H$  همان‌طور که طراحی شده بودند (شکل‌های ۴ و ۵)، ایجاد شدند. براساس نتایج هضم آنزیمی (شکل ۶) و توالی‌یابی (شکل‌های ۷ و ۸) سازه‌های ژنی تهیه‌شده به‌درستی در ناقل pART27 درج شدند.

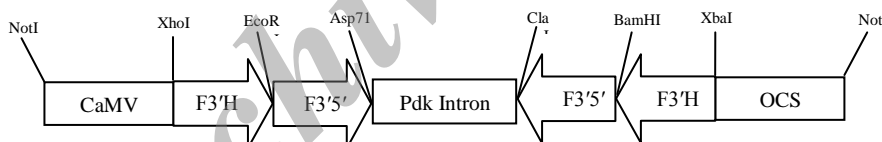
ناقل pART27، به‌منزله الگو برای کنترل درستی کار در نظر گرفته شد. آغازگرهای پیشرو LH35SF (5'GCAAGTGGATTGATGTGACA3') و پسرو (5'GGCGGTAAGGATCTGAGCTA3') OCS بررسی وجودداشتن یا نداشتن سازه‌های ژنی در ژنوم لاین‌های باززایی‌شده استفاده شدند. محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمرز بر روی ژل آگارز ۱ درصد (TBE) بارگذاری و الکتروفورز شد.

### نتایج و بحث

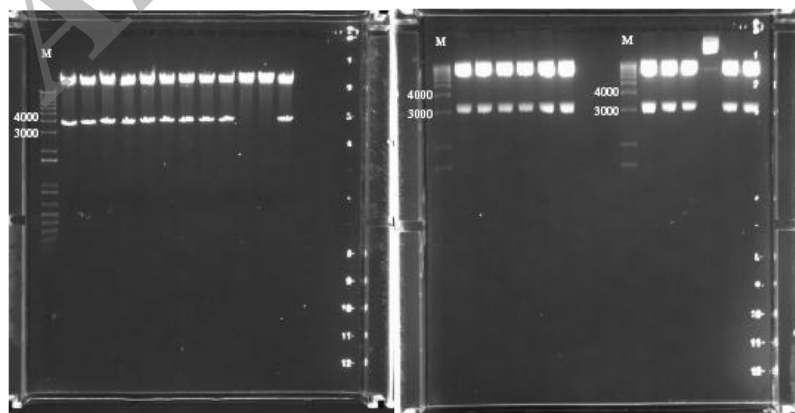
در این پژوهش به‌منظور بهره‌گیری از روش ihpRNA برای خاموش‌سازی ژن‌های  $F3'H$  و  $F3'5'H$  سازه‌های ژنی مناسب در ناقل pHANNIBAL طراحی، تهیه و از طریق ناقل pART27 به اگروباکتری منتقل شدند. سپس به روش اگرواینفکشن کالوس‌های جنین‌زای انگور، تراریخت و در



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 Not I حاوی الف) سازه ژنی خاموش‌کننده  $F3'H$ ؛ ب) سازه ژنی خاموش‌کننده  $F3'5'H$  و  $F3'H$

```

F3'H_si_fr : -----CAGAGGGTTCCATCCAGGAGGGGAAACAAATCGGAGCGTGGAGGGGATGATTTGAAGTGAATCCATTCGCGGCTGGCCGAGGAAATGCGCGGGGATGACCTTC : 109
Fw_Seq_si : CTCGACGAGAGGGTTCCATCCAGGAGGGGAAACAAATCGGAGCGTGGAGGGGATGATTTGAAGTGAATCCATTCGCGGCTGGCCGAGGAAATGCGCGGGGATGACCTTC : 114
pHANNIBAL : -----
cag aggttctaccaggaggggaaagccaaatcggaactggagagggaaatgatttgaagt-gattccatcggggctggccggaggaatagcgggggagagcttg

F3'H_si_fr : -----CGACTGAGGATGGTGACCTGTAAACCGCGAGCGTGTTCATCGGTTCA : 159
Fw_Seq_si : CGACTGAGGATGGTGACCTGTAAACCGCGAGCGTGTTCATCGGTTCAAGAAATCGGTAACCCAGCTTGGTAAGGAAATAATATATTCCTTTTCTCTTTAGTATAAAATAGT : 229
pHANNIBAL : -----
ggactgaggtggtgcaactgttaacogcgacgcttgttcatgcttcaa tctttttctcttttagtataaaatagt

F3'H_si_fr : -----TAAAGTGAATGTTAATGATGATATATAATATAGTTCATATATTTGTAAGAAATAATTTATAAATATAGTTCATATAACCAATAGTAATGTAAATAAATATGACAAGT : 344
Fw_Seq_si : TAAAGTGAATGTTAATGATGATATATAATATAGTTCATATATTTGTAAGAAATAATTTATAAATATAGTTCATATAACCAATAGTAATGTAAATAAATATGACAAGT : 344
pHANNIBAL : -----
taagt-gatgcttaactgattgattataaatatagttgttatatgtgtaaaastattataaatatgtgtttacataaacacaatagtaagtgaataaatatgacaagt

F3'H_si_fr : -----GATGTCGAGGACGAGGAGGATAAAGCTGAGAGTAAGTATATATTTTAAATGAATTTGATCGAACATTAAGCAATGADATAGTACDATTAAATATTTCTTTAAATCAATAAGTAA : 459
Fw_Seq_si : GATGTCGAGGACGAGGAGGATAAAGCTGAGAGTAAGTATATATTTTAAATGAATTTGATCGAACATTAAGCAATGADATAGTACDATTAAATATTTCTTTAAATCAATAAGTAA : 459
pHANNIBAL : -----
gatggtgaagcgaagataaaagtggaggt-aagtataatttttaacgaattgtagcaacatgtaagt-gataatactagcattataatttgttttaatacataatagtaa

F3'H_si_fr : -----TTCACGCTGTTTGAATTAATATCAATGATAAATACATATAGTAAATAAAGAAATAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAAT : 574
Fw_Seq_si : TTCACGCTGTTTGAATTAATATCAATGATAAATACATATAGTAAATAAAGAAATAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAAT : 574
pHANNIBAL : -----
ttctagctggtttgatgaaataaatatcaatgat.aaatactata.aaatagaat.aaatagaat.aaatagaat.aaatagaat.aaatagaat.aaatagaat.aaatagaat.aaatagaat

F3'H_si_fr : -----CTATACCAATACCAAAATATTTAGTTAAAGCTTAATAAATATTTTGTGTAATCCCAATCTGCTGTAATTTATCAATAAACAAAATATAAATAACACGCTAAATCTAACA : 659
Fw_Seq_si : CTATACCAATACCAAAATATTTAGTTAAAGCTTAATAAATATTTTGTGTAATCCCAATCTGCTGTAATTTATCAATAAACAAAATATAAATAACACGCTAAATCTAACA : 659
pHANNIBAL : -----
ctataccattactaaatattttagtttaaaagttaataaatatgtttgagaastccaactgctgttaattatcaataaacasaatattaaa taacagctaaa gtaaca

F3'H_si_fr : -----AATAATATCAAACTAATAGAACAGTAATTCATATCTAAACAAAATTAATCTAATGCTAATTAACAAAGGCGCAAGATCTATCAATGATTAATAGCTATATTTCTAATCAACAG : 804
Fw_Seq_si : AATAATATCAAACTAATAGAACAGTAATTCATATCTAAACAAAATTAATCTAATGCTAATTAACAAAGGCGCAAGATCTATCAATGATTAATAGCTATATTTCTAATCAACAG : 804
pHANNIBAL : -----
aataaatacaactaaatagaaacagtaa tctaagtacaacaaactaaactctatgctaataataaacaaagcgcaagatctata ttttatatagttattttt caatcaaacat

F3'H_si_fr : -----CTTAAATATTTTAAATTAATCTTCTAGTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCT : 910
Fw_Seq_si : CTTAAATATTTTAAATTAATCTTCTAGTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCT : 910
pHANNIBAL : -----
tcttataattttctaaataactt gtagtttt attaa cttc taatggattgactatt attaaatgaattagt cgaacatgaaasaca ggtaacatga agatcat

F3'H_si_fr : -----GTCATGCTGTT : 929
Fw_Seq_si : GTCATGCTGTT : 929
pHANNIBAL : -----
gtcaattggtt : 742

```

شکل ۷. الف) هم‌دیف‌سازی سازه خاموش‌کننده ژن *F3'H* (F3'H si fr)، توالی یابی سازه ژنی تهیه‌شده برای خاموش‌سازی ژن *F3'H* توسط آغازگر پیشرو (FW Seq. si) LH35SF، اینترون ناقل pHANNIBAL

```

F3'H_si_rc : -----TCTTTTTCTTTAGTATAAAATAGTTAAGTGAATGATTAATGATGATTAATAAATAATAGTTGTTATAAATGTGAAAAAATAATTTATAAATAATATGTTTACATAAACCAAG : 115
pHANNIBAL : -----
Rev_Seq_rc : -----
ataaataatagttgttataat gtgaaaaataaattataaatat tghtt acataaacac

F3'H_si_rc : -----ATAGTAATGTAAAAAATATGACAAGTGAATGTCTGACGAGGAGAGATAAAGTTGAGAGTAAGTATATATTTTAAATGAATTTGATCGAACATGTAAGATGATATACTAGCAT : 230
pHANNIBAL : -----
Rev_Seq_rc : -----
atagtaatgtaaaaaaatatgacaagtgatggtgtaagcgaagaagataaaagtggaggt-aagtataatttttaacgaattgtagcaacatgtaagt-gataatactagcat

F3'H_si_rc : -----TAATATTTGTTTTAAACATAATAGTAATCTAGCTGGTGTGATGAATTAATATCAATGATAAATACATAGTAAAAATAAGAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAA : 345
pHANNIBAL : -----
Rev_Seq_rc : -----
taatatttgttttaatacataatagtaattcttagctggtttgatgaaataaatatcaatgat.aaatactata.aaatagaat.aaatagaat.aaatagaat.aaatagaat.aaatagaat.aaatagaat.aaatagaat

F3'H_si_rc : -----TTAATAGCTTAAATATATAATTAATATCTATACCATTACTAAATATTTAGTTTAAAGTTAATAAATAATTTTGTAGAAATCCCAATCTGCTGTAATTTATCAATAAACAAA : 460
pHANNIBAL : -----
Rev_Seq_rc : -----
ttaatagtttatataatbbaatctataccattactaaatattttagtttaaaagttaataaatatgtttagaataatccaactgctgttaattatcaataaacaaaa

F3'H_si_rc : -----TATTAATAACAAGCTAAAGTAAACAAATAATATCAAACTAATAGAACAGTAATTCATATCTAAACAAAATTAATCTAATGCTAATTAACAAAGGCGCAAGATCTATCA : 574
pHANNIBAL : -----
Rev_Seq_rc : -----
tattaataagcaagctaaagtacaataaatacaactaaatagaacagtaactcaatgtacaacaaataaataatgctaatataaacaaagcgcaagatctatca ttttat

F3'H_si_rc : -----ATAGTATTAATTTCAATCAACATTTCTTATTAATTTCTAAATAACTTGTAGTTTATTAATCTTAAATGGATTGACTATTAATTAATGAATAGTTCGAACATGAATAACA : 688
pHANNIBAL : -----
Rev_Seq_rc : -----
atagtatattttt caatcaaacattcttataaatttcaataaacttcaatgatttttaacttcaatggattgactattaaataatgaattagtcgaacatgaataaaca

F3'H_si_rc : -----AGGTAACATGATAGATCATGTCATTGTTGTTATCATTGATCTTACATTTGGATTG : 742
pHANNIBAL : -----
Rev_Seq_rc : -----
aggtaaacatgatagatcatgctcattggttatcattgatcttaacttggattgattacagttgggaagctgggttcgaaatcgataagcttggatctttagaacgcatgaaacaag

F3'H_si_rc : -----CGTCGCGTTAAACAGTGCACCATCCGAGTCCCAAGCTCATCCCGCGCATATTTCCGCGCAGCCGCGAATGGAATCACTTCAAATGATTCCTCTCACGTCGGCATTTGGG : 132
pHANNIBAL : -----
Rev_Seq_rc : -----
cgtcgcggttaaacagtgcaacctcctcagtcocaaagctcatcccgcgcatatttccgcgccagcccgaaatggaatcacttcaaaatcattccctctcagctcgcgatttggg

F3'H_si_rc : -----CTTTCCCTCTCTGTAAGAACCTGCTG : 159
pHANNIBAL : -----
Rev_Seq_rc : -----
ctttccctctctg taggaacctgctg

```

شکل ۷. ب) هم‌دیف‌سازی سازه خاموش‌کننده ژن *F3'H* (F3'H si rc)، توالی یابی سازه ژنی تهیه‌شده برای خاموش‌سازی ژن *F3'H* توسط آغازگر پسرو (Rev Seq. rc) OCS، اینترون ناقل pHANNIBAL

```

pHANNIBAL_ : -----* 20 * 40 * 60 * 80 * 100 *-----: -
F3'5'H_si_ : .....GAGTCTCCACAGAGGGGAAAGCAAAACGGAGGCGAGAGGGAAAGATTTGAGGCGATTCCATCCGGGCTGGGAGGAAARCGCGGGGATGAGCTGG: 115
F3'H_si_fr : .....CAGCAGCTACAGAGGGGAAAGCAAAATCGGACCTGAGAGGAAATGATTTGAAAGCGATTCCATCCGGGCTGGGAGGAAATCGCGGGGATGAGCTGG: 115
Fw_Seq_Dou : CTCGGACAGAGTCTCCACAGAGGGGAAAGCAAAATCGGACCTGAGAGGAAATGATTTGAAAGCGATTCCATCCGGGCTGGGAGGAAATCGCGGGGATGAGCTGG: 115

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

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

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

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

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

pHANNIBAL_ : -----700 * 720 * 740 * 760 * 780 * 800 *-----: -
F3'5'H_si_ : .....TTTATGATTAATAGTATATATATAAATTAATATCTAATCACTACTAATATTTAGCT.....AAAGCT.....ATAAATAATTT.....TTAGCAAGC.....GCAATCTCTGTAATTAT: 445
F3'H_si_fr : .....TTTATGATTAATAGTATATATATAAATTAATATCTAATCACTACTAATATTTAGCT.....AAAGCT.....ATAAATAATTT.....TTAGCAAGC.....GCAATCTCTGTAATTAT: 445
Fw_Seq_Dou : TTTATGATTAATAGTATATATATAAATTAATATCTAATCACTACTAATATTTAGCT.....AAAGCT.....ATAAATAATTT.....TTAGCAAGC.....GCAATCTCTGTAATTAT: 795

pHANNIBAL_ : -----820 * 840 * 860 * 880 * 900 * 920 *-----: -
F3'5'H_si_ : .....CAATAAACAATAATTAATAACAAGCTAAAGTAAACAATAATCAAACTAATAGAAACAGTAACTAATGTAAACAACAATAATCTAATGTAAACAACAATAATCTAATGTAAACAACAAGCAAGTC: 565
F3'H_si_fr : .....CAATAAACAATAATTAATAACAAGCTAAAGTAAACAATAATCAAACTAATAGAAACAGTAACTAATGTAAACAACAATAATCTAATGTAAACAACAATAATCTAATGTAAACAACAAGCAAGTC: 565
Fw_Seq_Dou : CAATAAACAATAATTAATAACAAGCTAAAGTAAACAATAATCAAACTAATAGAAACAGTAACTAATGTAAACAACAATAATCTAATGTAAACAACAATAATCTAATGTAAACAACAAGCAAGTC: 565

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

pHANNIBAL_ : -----1040 * 1060 * 1080 *-----: -
F3'5'H_si_ : .....TGAATAACAAGTAAACATGATAGTCAATGCTGTTTCACTGATCTTACATTTGGATG: 742
F3'H_si_fr : .....TGAATAACAAGTAAACATGATAGTCAATGCTGTTTCACTGATCTTACATTTGGATG: 742
Fw_Seq_Dou : TGAATAACAAGTAAACATGATAGTCAATGCTGTTTCACTGATCTTACATTTGGATG: 742

```

شکل ۸. الف) هم‌دیف‌سازی سازهٔ خاموش‌کنندهٔ ژن‌های  $F3'5'H$  و  $F3'H$  (F3'5'H si, F3'H si fr)، 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_ : .....GAGTCTCCACAGAGGGGAAAGCAAAATCGGACCTGAGAGGAAATGATTTGAAAGCGATTCCATCCGGGCTGGGAGGAAARCGCGGGGATGAGCTGG: 115
F3'H_si_fr : .....CAGCAGCTACAGAGGGGAAAGCAAAATCGGACCTGAGAGGAAATGATTTGAAAGCGATTCCATCCGGGCTGGGAGGAAATCGCGGGGATGAGCTGG: 115
pHANNIBAL_ : .....GAGTCTCCACAGAGGGGAAAGCAAAATCGGACCTGAGAGGAAATGATTTGAAAGCGATTCCATCCGGGCTGGGAGGAAARCGCGGGGATGAGCTGG: 115

Rev_Seq_Do : -----120 * 140 * 160 * 180 * 200 * 220 *-----: 230
F3'5'H_si_ : .....ACTCTGGGCTATCATGCCGAGAGATGGTTTTGGGATATGGGGAGGCTGAAAGC: 60
F3'H_si_fr : .....CAGCTGAGGATGGTCAAGCTGTAAACCGGACGGTGTTCATGGCTCAA.....ACTCTGGGCTATCATGCCGAGAGATGGTTTTGGGATATGGGGAGGCTGAAAGC: 159
pHANNIBAL_ : .....ACTCTGGGCTATCATGCCGAGAGATGGTTTTGGGATATGGGGAGGCTGAAAGC: 60

Rev_Seq_Do : -----240 * 260 * 280 * 300 * 320 * 340 *-----: 345
F3'5'H_si_ : .....TACTGAGAAAGCTAAGCAACTTACACATGCTTGGTGGGAGGCTCTGAGGACTGGCTCAGTCCGAGCTGTGAGCTAGGCCACATGGTGGTACCCGAGCTTGGTAAGGAAA: 152
F3'H_si_fr : .....TACTGAGAAAGCTAAGCAACTTACACATGCTTGGTGGGAGGCTCTGAGGACTGGCTCAGTCCGAGCTGTGAGCTAGGCCACATGGTGGTACCCGAGCTTGGTAAGGAAA: 152
pHANNIBAL_ : .....TACTGAGAAAGCTAAGCAACTTACACATGCTTGGTGGGAGGCTCTGAGGACTGGCTCAGTCCGAGCTGTGAGCTAGGCCACATGGTGGTACCCGAGCTTGGTAAGGAAA: 152

Rev_Seq_Do : -----360 * 380 * 400 * 420 * 440 * 460 *-----: 460
F3'5'H_si_ : .....GTTTTTCTCTTTAGTATAAATAGTAAAGGAGGTAAATAGTATGATATAAATAATAGTGTATAAATGGAAAAATAATTTATAAATATATGTTTAC: 106
F3'H_si_fr : .....GTTTTTCTCTTTAGTATAAATAGTAAAGGAGGTAAATAGTATGATATAAATAATAGTGTATAAATGGAAAAATAATTTATAAATATATGTTTAC: 106
pHANNIBAL_ : .....GTTTTTCTCTTTAGTATAAATAGTAAAGGAGGTAAATAGTATGATATAAATAATAGTGTATAAATGGAAAAATAATTTATAAATATATGTTTAC: 106

Rev_Seq_Do : -----480 * 500 * 520 * 540 * 560 *-----: 575
F3'5'H_si_ : .....ATAAATAAATAAGTAAATGAAAAAATAGCAAGGAGGTGAGGCTGAGCAGAGAAAGAAAGTTCAGAGTAAAGTATATATTTTAAAGCATTTTATGGACAGCTGAAAGGAT: 221
F3'H_si_fr : .....ATAAATAAATAAGTAAATGAAAAAATAGCAAGGAGGTGAGGCTGAGCAGAGAAAGAAAGTTCAGAGTAAAGTATATATTTTAAAGCATTTTATGGACAGCTGAAAGGAT: 221
pHANNIBAL_ : .....ATAAATAAATAAGTAAATGAAAAAATAGCAAGGAGGTGAGGCTGAGCAGAGAAAGAAAGTTCAGAGTAAAGTATATATTTTAAAGCATTTTATGGACAGCTGAAAGGAT: 221

Rev_Seq_Do : -----580 * 600 * 620 * 640 * 660 * 680 *-----: 690
F3'5'H_si_ : .....TAGCAGCTTAAATGTTTTATTCATCAAGAGTAAATTCAGCGCTTCAAGGATTAATATCAATGATAAAGTAAATAGCAAAATAGCAAAATAGCAAAATAGCAAAAT: 336
F3'H_si_fr : .....TAGCAGCTTAAATGTTTTATTCATCAAGAGTAAATTCAGCGCTTCAAGGATTAATATCAATGATAAAGTAAATAGCAAAATAGCAAAATAGCAAAATAGCAAAAT: 336
pHANNIBAL_ : .....TAGCAGCTTAAATGTTTTATTCATCAAGAGTAAATTCAGCGCTTCAAGGATTAATATCAATGATAAAGTAAATAGCAAAATAGCAAAATAGCAAAATAGCAAAAT: 336

Rev_Seq_Do : -----700 * 720 * 740 * 760 * 780 * 800 *-----: 805
F3'5'H_si_ : .....TTTATGATTAATAGTATATATATAAATTAATATCTAATCACTACTAATATTTAGCT.....AAAGCT.....ATAAATAATTT.....TTAGCAAGC.....GCAATCTCTGTAATTAT: 445
F3'H_si_fr : .....TTTATGATTAATAGTATATATATAAATTAATATCTAATCACTACTAATATTTAGCT.....AAAGCT.....ATAAATAATTT.....TTAGCAAGC.....GCAATCTCTGTAATTAT: 445
pHANNIBAL_ : .....TTTATGATTAATAGTATATATATAAATTAATATCTAATCACTACTAATATTTAGCT.....AAAGCT.....ATAAATAATTT.....TTAGCAAGC.....GCAATCTCTGTAATTAT: 445

Rev_Seq_Do : -----820 * 840 * 860 * 880 * 900 * 920 *-----: 920
F3'5'H_si_ : .....CAATAAACAATAATTAATAACAAGCTAAAGTAAACAATAATCAAACTAATAGAAACAGTAACTAATGTAAACAACAATAATCTAATGTAAACAACAATAATCTAATGTAAACAACAAGCAAGTC: 565
F3'H_si_fr : .....CAATAAACAATAATTAATAACAAGCTAAAGTAAACAATAATCAAACTAATAGAAACAGTAACTAATGTAAACAACAATAATCTAATGTAAACAACAATAATCTAATGTAAACAACAAGCAAGTC: 565
pHANNIBAL_ : .....CAATAAACAATAATTAATAACAAGCTAAAGTAAACAATAATCAAACTAATAGAAACAGTAACTAATGTAAACAACAATAATCTAATGTAAACAACAATAATCTAATGTAAACAACAAGCAAGTC: 565

Rev_Seq_Do : -----940 * 960 * 980 * 1000 * 1020 *-----: 975
F3'5'H_si_ : .....TATCATTATATAGTATATTTCAATCAACACTCTAATAATTTCTAAATAACTCTGAGTTTTAACTCTAAATGGATTGACATTAATTAATGAATTAGCGAACA: 678
F3'H_si_fr : .....TATCATTATATAGTATATTTCAATCAACACTCTAATAATTTCTAAATAACTCTGAGTTTTAACTCTAAATGGATTGACATTAATTAATGAATTAGCGAACA: 678
pHANNIBAL_ : .....TATCATTATATAGTATATTTCAATCAACACTCTAATAATTTCTAAATAACTCTGAGTTTTAACTCTAAATGGATTGACATTAATTAATGAATTAGCGAACA: 678

Rev_Seq_Do : -----1040 * 1060 * 1080 * 1100 * 1120 * 1140 *-----: 731
F3'5'H_si_ : .....TGAATAACAAGTAAACATGATAGTCAATGCTGTTTCACTGATCTTACATTTGGATG: 742
F3'H_si_fr : .....TGAATAACAAGTAAACATGATAGTCAATGCTGTTTCACTGATCTTACATTTGGATG: 742
pHANNIBAL_ : .....TGAATAACAAGTAAACATGATAGTCAATGCTGTTTCACTGATCTTACATTTGGATG: 742

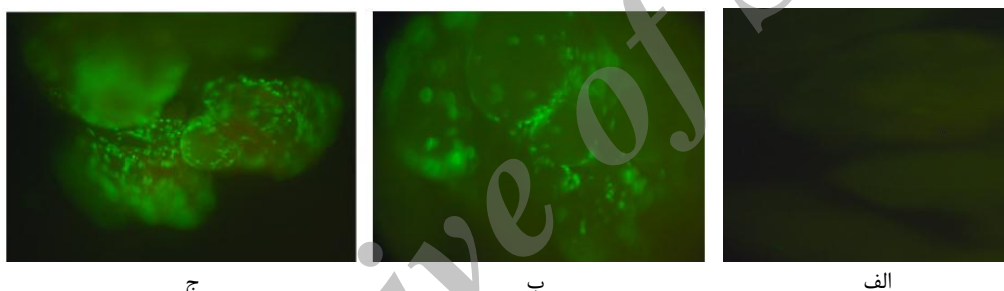
Rev_Seq_Do : -----1160 *-----: 742
F3'5'H_si_ : .....AGGAAAAAGA: 742
F3'H_si_fr : .....AGGAAAAAGA: 742
pHANNIBAL_ : .....AGGAAAAAGA: 742

```

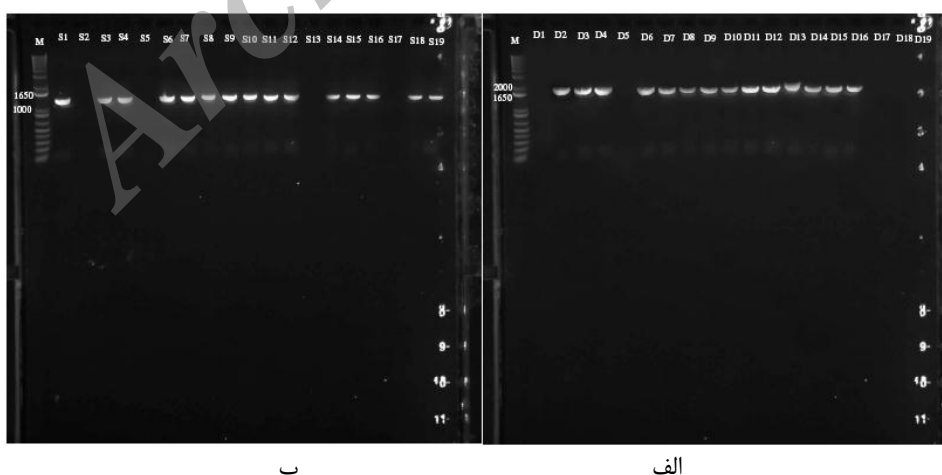
شکل ۸. ب) هم‌دیف‌سازی سازهٔ خاموش‌کنندهٔ ژن‌های  $F3'5'H$  و  $F3'H$  (F3'5'H si, F3'H si fr)، توالی‌یابی سازهٔ ژنی توسط آغازگر پسرو OCS (Rev Seq. Do)، اینترون ناقل pHANNIBAL

جنین‌زای دارای سازه‌ی خاموشی ژن *F3'H* و سازه‌ی خاموشی هم‌زمان *F3'H* و *F3'5'H* به ترتیب ۴۲ و ۳۴ لاین باززایی شدند که براساس واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، ۳۶ لاین برای سازه‌ی خاموشی ژن *F3'H* (۸۶ درصد از لاین‌های باززایی‌شده) و ۲۷ لاین برای سازه‌ی خاموشی هم‌زمان *F3'H* و *F3'5'H* (۷۹ درصد از لاین‌های باززایی‌شده) مثبت ارزیابی شدند (شکل ۱۰). در این پژوهش تعداد لاین‌های باززایی‌شده و نیز لاین‌های تراریخت قابل ملاحظه بود و این نتیجه بیانگر کارایی بالای روش باززایی و همچنین روش تراریختی استفاده‌شده 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 (CSIRO unpublished).

پس از اطمینان از آرایش درست و کامل سازه‌های ژنی در ناقل pART27 نوترکیب، این ناقل به آگروباکتری منتقل شد. قطعه DNA فرارگرفته در بین RB و LB در سیستم ناقل دوگانه<sup>۱</sup>، توسط آگروباکتری به‌منزله T-DNA در نظر گرفته و در نتیجه فعالیت ژن‌های ناحیه Vir، به درون ژنوم میزبان فرستاده می‌شود (Hooykaas & Schilperoort, 1992). در این پژوهش کشت توأم کالوس‌های جنین‌زا با آگروباکتری حاوی ناقل pART27 نوترکیب به‌خوبی 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 کالوس‌های



شکل ۹. بیان ژن *GFP* در کالوس‌های جنین‌زا ۶ روز پس از تلقیح با آگروباکتری: الف) کالوس کنترل؛ ب) کالوس‌های جنین‌زای دارای سازه‌ی خاموشی ژن *F3'H* و *F3'5'H*؛ ج) کالوس‌های جنین‌زای دارای سازه‌ی خاموشی ژن *F3'H*



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

نقش محصولات آنها در فرایندهای رشد و نمو و 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). برای کاهش یا خاموش کردن بیان ژن‌ها از مکانیسم‌ها و ابزارهای مختلفی استفاده شده است که از مؤثرترین آنها کاربرد RNAi است. خاموش‌سازی و کاهش بیان ژن با استفاده از RNAi ابزاری سودمند برای مطالعه عملکرد ژن‌های کدکنندهٔ آنتی‌ژن‌های کلیدی مسیر بیوسنتز فلاونوئیدها از جمله *CHS*، *OMT*، *GTI*، *DFR* و *ANS* بوده است (Schwab *et al.*, 2011). روش *ihpRNA* روشی با کارایی بالا برای اجرای خاموش‌سازی توسط RNAi است. خاموش‌سازی به وسیلهٔ *ihpRNA* به همراه آنالیز طیف متابولیت‌ها برای مطالعهٔ عملکرد ژن‌های ناشناخته در فرایند رشد و نمو بسیار مفید است (Hoffmann *et al.*, 2006). از جمله تا کنون برای خاموش‌سازی ژن *CHS* در *Medicago truncatula* (Wasson *et al.*, 2006) و توت‌فرنگی (Hoffmann *et al.*, 2006) استفاده شده و لاین‌های تراریخت خاموش‌شده با کارایی بالا ایجاد شده‌اند.

روش *ihpRNA* و مکانیسم خاموش‌سازی توسط RNAi در این پژوهش به‌منزلهٔ ابزاری قدرتمند برای آگاهی و شناخت بیشتر از عملکرد ژن‌های *F3'H* و *F3'5'H* و برهمکنش آنها انتخاب و استفاده شد. مطالعهٔ 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 به‌طور جداگانه یا هم‌زمان است. در این مطالعه استفاده از روش‌ها و تکنیک‌های کارا و مؤثر منجر به دستیابی به تعداد درخور توجهی لاین‌های تراریخت شد که می‌توانند به‌منزلهٔ ابزارهایی سودمند برای اهداف یادشده استفاده شوند.

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 است (Wesley *et al.*, 2001; Helliwell & Waterhouse, 2003). در این پژوهش نیز استفاده از ناقل *pHANNIBAL* با بهره‌گیری از سایت شناسایی آنتی‌ژن‌های برشی، امکان تبدیل محصول سادهٔ واکنش زنجیره‌ای پلیمرز را به سازه‌های خاموش‌کننده از طریق توالی‌های معکوس متصل به اینترون (*ihpRNA*) ژن هدف به راحتی فراهم کرد و تعداد قابل توجهی لاین تراریخت حاوی سازهٔ ژنی ایجاد کرد.

در این مطالعه همچنین، ویژگی‌های ساختاری ناقل *pHANNIBAL*، امکان هدف قراردادن هم‌زمان دو ژن *F3'H* و *F3'5'H* را در یک سازهٔ ژنی فراهم کرد. قابلیت دستکاری هم‌زمان دو ژن امکان مطالعهٔ نقش کلی آنها در یک مسیر بیوسنتزی را فراهم می‌سازد. به‌علاوه در مورد ژن‌هایی که فنوتیپ مشخصی ندارند از طریق خاموش‌سازی هم‌زمان آنها با ژنی با فنوتیپ قابل مشاهده در قالب یک سازهٔ ژنی، بیان ژن نشانگر، ردیابی بیان ژن هدف را به راحتی امکان‌پذیر کرده است و می‌تواند نشان‌دهندهٔ میزان خاموشی باشد (Fitzgerald *et al.*, 2004). در این پژوهش از ناقل *pART27* حاوی ژن *GFP* برای انتقال سازهٔ ژنی به اگروباکتری استفاده شد. افزودن ژن *GFP* به این ناقل در مؤسسهٔ CSIRO استرالیا، امکان ردیابی کالوس‌های مثبت را تنها پس از گذشت ۵ روز از تراریخت‌سازی فراهم کرده 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،

## REFERENCES

- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Garfinkel, D.J. & Nester, E.W. (1980). *Agrobacterium tumefaciens* mutants affected in crown gall tumorigenesis and octopine catabolism. *Journal of Bacteriology*, 144, 732-743.
- 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.
- Helliwell, C. & Waterhouse, P. (2003). Constructs and methods for high-throughput gene silencing in plants. *Methods*, 30, 289-295.
- 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.
- 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.
- Hooykaas, P.J.J. & Schilperoort, R.A. (1992). *Agrobacterium* and plant genetic engineering. *Plant Molecular Biology*, 19, 15-38.
- Iocco, P., Franks, T. & Thomas, M.R. (2001). Genetic transformation of major wine grape cultivars of *Vitis vinifera* L. *Transgenic Research*, 10, 105-112.
- 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.
- 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.
- Murashige, T. & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473-497.
- 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.
- 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.
- Scherer, L.J. & Rossi, J.J. (2003). Approaches for the sequence-specific knockdown of mRNA. *Nature Biotechnology*, 21(12), 1457-65.
- 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.
- 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.
- 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.
- Torregrosa, L. (1998) A simple and efficient method to obtain stable embryogenic cultures from anthers of *Vitis vinifera* L. *Vitis*, 37, 91-92.
- 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.
- 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.

Archive of SID