



The Effect of Chalcone Isomerase Gene Silencing on Pigment Production Pathway in *Petunia hybrida* with RNAi Technology

F. Keykha Akhar^{1*}, A.R. Bagheri², N. Moshtaghi³, M. Fakhrfeshani⁴

Received: 12-04-2022

Revised: 03-08-2022

Accepted: 26-09-2022

Available Online: 26-09-2022

How to cite this article:

Keykha Akhar, F., Bagheri, A.R., Moshtaghi, N., & Fakhrfeshani, M. (2023). The effect of chalcone isomerase gene silencing on pigment production pathway in *Petunia hybrida* with RNAi technology. *Journal of Horticultural Science*, 37(2), 409-421. (In Persian with English abstract).
<http://doi.org/10.22067/jhs.2022.76190.1162>

Introduction

Flower color is one of the most significant characteristics in ornamental plant breeding. New varieties of various plants in relation to their flower color have been obtained by monitoring the expression levels of genes involved or regulating the flavonoid and anthocyanin biosynthesis pathway. Flavonoids possess significant and diverse biological functions. They are the major pigments for flowers, fruits, seeds, and leaves. They are natural products that contain a C6-C3-C6 carbon framework and are synthesized by a branched pathway that yields both colored and colorless compounds. The gene encoding chalcone isomerase (CHI) is among the genes and enzymes identified in the flavonoid pathway. This enzyme catalyzes the isomerization of naringenin chalcone into the corresponding flavanone. CHI enzyme belongs to the family of isomerases, specifically the class of intramolecular lyases. Chalcone isomerase has a core 2-layer alpha/beta structure and has attracted much attention recently due to its role in stress response and pigment production. One of the most effective methods of genetic engineering is the reduction of flower pigments by suppression of required enzymes for their biosynthesis. RNA interference (RNAi) has provided the tool for the investigation of genes involved in the production of flower color. Silencing of any gene in the anthocyanin biosynthetic pathway can result in reduced or inhibited anthocyanin production. RNAi technology is an effective gene silencing method and a powerful tool for studying gene function and development of new traits by transformation of viral RNA or hairpin RNA (hpRNA) constructs into plants. The processing of dsRNA into 21-23-nt small interfering RNAs (siRNAs), and the mediators of RNAi, triggers cognate mRNA degradation. The hpRNAi methodology simply requires a transgene construct containing an inversely-repeated sequence of the target gene flanked with a promoter and terminator which effectively function in plants.

Material and Methods

In this research, with the design and construction of chiRNAi, the transformation of the RNAi construct was carried out of *Petunia* plants. Potted plants of *P. hybrida* were grown under standard greenhouse conditions (16-17°C night temperature and 21-24°C day temperature and photoperiod 16/8 (light/dark)). The RNAi construct including the 530 bp cds of the chalcone isomerase (*chi*) gene and 741 bp of *pdk* gene as intron between *chi* sense and antisense were used for transient RNAi-induced silencing. The pBI121-*chi*530 plasmids were introduced into *A. tumefaciens* strain LBA4404 by electroporation method. Colonies of *A. tumefaciens* carrying the desired plasmid were screened by PCR with specific primers for *chi* gene. RNAi construct co-cultured with *petunia*'s leaf. Samples were kept in dark condition for 3 days and then transferred to branch induction media. Samples were investigated for phenotypical changes and *chi* gene expression by qRT-PCR.

1 and 4- Assistant Professors, Department of Plant Genetic and Production, Faculty of Agriculture, Jahrom University, Jahrom, Iran

(*- Corresponding Author Email: F.Keykha@jahromu.ac.ir)

2 and 3- Professor and Associate Professor, Department of Plant Biotechnology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran, respectively.

DOI: [10.22067/jhs.2022.76190.1162](https://doi.org/10.22067/jhs.2022.76190.1162)

Results and Discussion

Transgenic lines showed a reduced number of pigments and a faded flower color. So that, in purple petunia, was shown 5 phenotypical groups. These groups was indicated different levels of *chi* gene silencing. In pink petunia was seen two groups of phenotypical changes. In these plants, *chi*-RNAi construct was reduced pigment production and so, these plants had faded colors in petals. Also, the *chi* gene expression was reduced in all transgenic lines. Generally, the results of this research showed that RNAi can be used as an efficient method for gene silencing. The application of gene silencing can indicate the gene's function in biosynthesis pathways of various components such as anthocyanins. In addition, the chalcone isomerase gene was identified as one of the effective genes in anthocyanin biosynthesis pathway in Petunia plants that could be involved in the production of color in these plants; hence, *chi* gene silencing resulted in clear phenotypic alterations in this plant.

Conclusion

In general the concentration of the target mRNA in a particular tissue could be a factor that influences silencing efficiency. At very low levels of gene expression, small amounts of the silencing target, mRNA, could be completely degraded by the RNA-induced silencing complex (RISC), whereas the presence of higher amounts of the target mRNA may result in incomplete silencing, allowing some residual functional mRNA to be translated into the corresponding protein. This research demonstrated the hpRNA construct has been successfully established for floral tissues of *P. hybrida*. The hpRNA construct was developed for *chi*-RNAi silencing of one of the key genes in the anthocyanin biosynthetic pathway in Petunia flowers. The silencing of the *chi* gene is a prototype for the modification of the anthocyanin biosynthetic pathway in Petunia through gene suppression. This strategy could also be useful for rapid functional analysis of other genes involved in flower development.

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

مقاله پژوهشی

جلد ۳۷، شماره ۲، تابستان ۱۴۰۲، ص. ۴۲۱-۴۰۹

اثر خاموشی ژن چالکون ایزومراز بر مسیر تولید رنگ در گیاه اطلسی با استفاده از فناوری RNAi

فاطمه کیخا آخر^{۱*} - عبدالرضا باقری^۲ - نسرين مشتاقی^۳ - مسعود فخرنشانی^۴

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۱/۲۳

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۱/۰۵/۱۲

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۷/۰۴

چکیده

رنگ گل یکی از مهمترین خصوصیات گیاهان زینتی است که نقش ویژه ای را در فروش این نوع گیاهان ایفا می کند. در سال های اخیر با استفاده از فناوری های نوین از قبیل مهندسی ژنتیک ارقام جدیدی وارد بازار شده است که یکی از موثرترین روش های آن، کاهش مقدار رنگدانه های داخلی گل بوسیله ممانعت از فعالیت آنزیم های ضروری مورد نیاز برای بیوسنتز آن ها می باشد. روش RNAi یک فناوری نوین خاموشی ژن است که امکان بررسی ژن های دخیل در تولید رنگ گل را فراهم کرده است. در این پژوهش، با استفاده از این فناوری نوین، نقش ژن چالکون ایزومراز (*chi*) به عنوان یکی از ژن های کلیدی در مسیر بیوسنتزی آنتوسیانین ها مورد بررسی قرار گرفت. در این آزمایش سازه RNAi ژن *chi* طراحی شد و به اطلسی های با رنگ گل بنفش و صورتی انتقال یافت. لاین های تراریخته، تغییرات متنوعی را در رنگ گل نشان دادند و به گروه های فنوتیپی متفاوتی تقسیم شدند. این تغییرات بیشتر به صورت کاهش مقدار تجمع رنگدانه ها و کم رنگ شدن گل ها بود. با بررسی بیان ژن *chi*، کاهش معنی دار بیان این ژن نیز مشاهده شد. بطور کلی نتایج این تحقیق نشان داد که خاموشی ژن با استفاده از فناوری RNAi می تواند روش مناسبی برای کاهش بیان ژن باشد به طوری که با استفاده از این روش می توان به نقش ژن های مختلف در مسیرهای بیوسنتزی ترکیبات از جمله آنتوسیانین ها پی برد. علاوه بر این، ژن چالکون ایزومراز به عنوان یکی از ژن های موثر در مسیر بیوسنتزی آنتوسیانین ها در گیاه اطلسی شناخته شد که می تواند در تولید رنگ در این گیاه نقش داشته باشد.

واژه های کلیدی: آنتوسیانین، اطلسی، چالکون ایزومراز، خاموشی ژن، RNAi

مقدمه

است نقش قابل توجهی را در صنعت گل و گیاهان زینتی ایفا نماید بطوریکه با استفاده از روش های خاموشی و یا بیش بیان ژن های مرتبط، به تولید ارقام جدیدی از رز (*Rosa sp.*) گل سپاسی (*Gentian sp.*) میخک (*Dianthus sp.*) تورنیا (*Torenia* *fournieri*) با رنگ متفاوت، اطلسی (*Petunia hybrida*) میخک (*Dianthus sp.*) با رایحه و ماندگاری بیشتر و ... کمک شایان توجهی داشته است (Dixone, 2005; Voorhujzen *et al.*, 2020).

رنگ گل یکی از مهمترین صفاتی است که در روش های اصلاحی گیاهان زینتی به آن توجه ویژه ای شده است (Wang, 2006; Nishihara and Nakatsuka, 2011). مهم ترین عامل تعیین کننده رنگ گل، اجزای سازنده رنگدانه ها می باشند (Tanaka and Chandler, 2009; Keykha *et al.*, 2016a). فلاونوئیدها یکی از مهمترین مسیرهای بیوسنتزی رنگ در گیاهان

در سال های اخیر، صنعت تولید گیاهان زینتی گسترش زیادی یافته است که یکی از دلایل آن، تولید و اصلاح ارقام جدید می باشد (Nishihara and Nakatsuka, 2012; Chandler and Sanchez, 2012). یکی از الزامات مورد نیاز برای تداوم این صنعت و گسترش آن، ایجاد تنوع در این نوع گیاهان است تا قادر باشد نیاز بازار را تامین نماید (Ahloowalia and Maluszynski, 2001).

مهندسی ژنتیک از طریق دستورزی مسیرهای متابولیکی توانسته

۱ و ۴- استادیاران گروه ژنتیک و تولید گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه چهرم
* - نویسنده مسئول: (Email: f.keykha@jahromu.ac.ir)

۲ و ۳- به ترتیب استاد و دانشیار گروه بیوتکنولوژی گیاهی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

مواد و روش‌ها

تهیه مواد گیاهی

بزرگیاهان اطلسی هلندی از شرکت بذر شکوفه اصفهان خریداری شده و در گلدان‌های پلاستیکی در گلخانه با شرایط دمایی ۱۶-۱۷ درجه سانتی‌گراد دمای شب و ۲۴-۲۱ درجه سانتی‌گراد دمای روز و فتوپریود ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی رشد یافتند. گیاهان در مرحله ۸-۶ برگی در این آزمایش مورد استفاده قرار گرفتند.

طراحی سازه خاموشی حاوی ژن *chi*

سازه RNAi حاوی قطعه ۵۳۰ جفت باز ناحیه cds توالی mRNA ژن چالکون ایزومراز (*chi*) گیاه اطلسی (نوکلئوتیدهای ۱۹۶۰-۱۴۳۰ با شماره دسترسی X14589) و قطعه ۷۴۱ جفت باز از ژن پیرووات دهیدروژناز کیناز (*pdh*) به عنوان اینترون (که بین ناحیه سنس و آنتی سنس ژن *chi* قرار گرفته است)، طراحی و سپس سازه طراحی شده در وکتور pBI121 کلون گردید (شرکت بایونیر، کره جنوبی) (شکل ۱).

به منظور استفاده از سازه خاموشی طراحی شده برای انتقال به گیاه، در مرحله نخست نیاز به تکثیر پلاسمید حاوی توالی ژنی سنتز شده از طریق تراریزش آن به باکتری *A. tumefaciens* است. با این هدف پلاسمیدهای pBI121 حاوی ژن *chi* با استفاده از روش الکتروپوریشن به باکتری *A. tumefaciens* سویه LBA4404 منتقل شدند (Lin, 1995). کلنی‌هایی از باکتری که حاوی پلاسمیدهای مورد نظر بودند با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *chi* و با برنامه PCR شامل دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، دمای ۵۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه با ۳۵ سیکل تکثیر و جداسازی شدند. طراحی آغازگرها به گونه‌ای انجام شد که یک جفت آغازگر ناحیه پیشبر 35S و بخشی از قطعه سنس ژن *chi* را تکثیر می‌کند (sense primer) و جفت آغازگر دوم، بخشی از قطعه آنتی‌سنس ژن *chi* و ناحیه ترمیناتور پلاسمید pBI121 را تکثیر می‌کند (antisense primer). توالی آغازگرها در جدول ۱ آورده شده است.

انتقال سازه خاموشی حاوی ژن *chi* به گیاه اطلسی

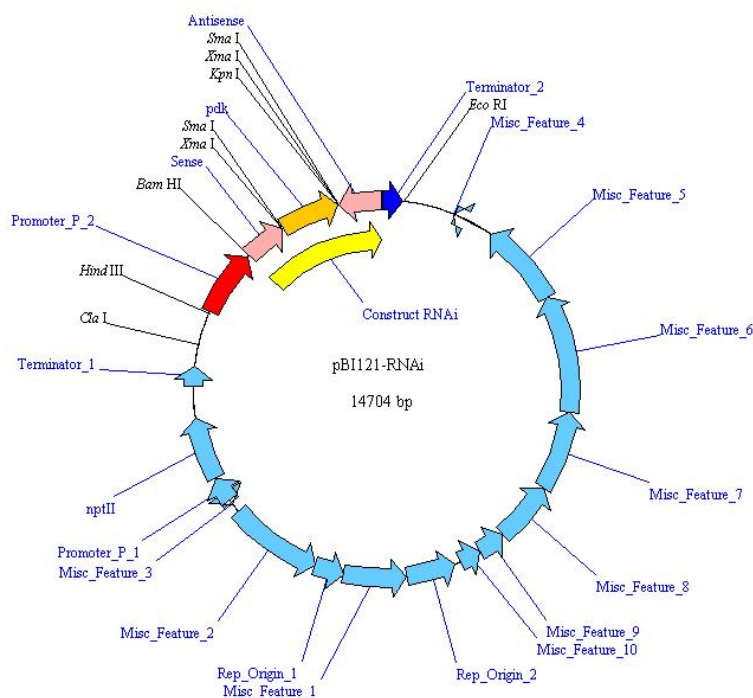
جهت تراریختی گیاه اطلسی از روش دیسک برگی و هم‌کشتی با آگروباکتريوم استفاده شد. پس از کشت باکتری و هنگامی که OD₆₀₀ باکتری به ۰/۴-۰/۵ رسید، سوسپانسیون باکتری به مدت ۱۰ دقیقه در ۴۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد (دمای ۴ درجه سانتی‌گراد). مایع رویی حذف شده و به پلت باکتریایی موجود در انتهای فالتکون، ۵۰ میلی‌لیتر از محیط کشت تلقیح اضافه شد (محیط کشت تلقیح شامل محیط کشت MS مایع حاوی ۵ درصد ساکارز و ۱۰۰ میکرومولار استوسرینگون).

مختلف می‌باشند. بگونه ای که بسیاری از روش‌های اصلاحی به ویژه مهندسی ژنتیک به شناسایی ژن‌های دخیل در مسیر بیوسنتزی فلاونوئیدها و نقش کارکردی هر یک از آنها در تولید رنگ پرداخته است. محاصل چنین دستورزی‌هایی تولید ارقام جدیدی از گیاهان می‌باشد. برای مثال در گیاهانی از قبیل اطلسی، رز، میخک و ژربرا نمونه‌های دستورزی شده‌ای شناسایی شده است (Potera, 2007; Voorhuijzen et al., 2020) که تغییراتی را در مقدار محتوای آنتوسیانین (گروهی از فلاونوئیدها که ترکیبات قرمز، بنفش و آبی تولید می‌کنند) و کاروتنوئید (گروهی از ایزوپرنوئیدها که رنگ زرد، نارنجی و قرمز تولید می‌کنند) نشان می‌دهند (Potera, 2007; Voorhuijzen et al., 2020).

فلاونوئیدها ترکیبات دارای اسکلت ۱۵ کربنی بوده و محلول در آب می‌باشند که در واکنش‌ها تجمع می‌یابند (Delgado-Vargas et al., 2000; Tanaka and Ohmiya, 2008). ساده‌ترین راهکار برای تغییر رنگ گل، کاهش مقدار رنگدانه‌های داخلی گل از جمله فلاونوئیدها است که از بیوسنتز آنزیم‌های ضروری ممانعت کرده و از این طریق می‌توان به نقش آن ژن در تولید رنگ دست یافت (Wang et al., 2018; Nishihara and Nakatsuka, 2011). RNAi یک فناوری قدرتمند است که با استفاده از چند مولکول RNA دو رشته‌ای کوچک (dsRNA) سبب خاموشی بیان ژن در سلول می‌شود و به عنوان روشی آسان و سریع برای تعیین عملکرد ژن در نظر گرفته شده است (Thakur, 2003; Kim and Rossi, 2008).

در بین گیاهان زینتی، اطلسی (*Petunia hybrida*) یکی از محبوب‌ترین گیاهان گلدانی است که پتانسیل خوبی را برای صادرات به عنوان یک گیاه گلدانی و یا گیاه زینتی مورد استفاده در فضای سبز شهری در بسیاری از کشورها دارا می‌باشد (Tsuda et al., 2004; Chen et al., 2017). از آنجایی که این گیاه به عنوان گیاه مدل استفاده می‌شود، توجه بسیاری بر روی این گیاه و شناسایی ژن‌های موثر در مسیرهای متابولیکی مختلف شده است. خصوصیات ظاهری این گیاه از جمله شکل زیبا، گل‌هایی با رنگ جذاب و همچنین مدت زمان طولانی گلدهی، موقعیت ویژه‌ای را برای آن فراهم کرده است، بطوری که در لیست گیاهان گلدانی برتر جهان قرار دارد (Park and Chen, 2006; Keykha et al., 2016b).

لذا با توجه به مطالب ذکر شده از جمله قابلیت روش RNAi در تعیین عملکرد یک ژن از طریق کاهش بیان آن و اهمیت آنزیم چالکون ایزومراز در مسیر بیوسنتزی فلاونوئیدها، این تحقیق با هدف بررسی نقش ژن *chi* در تولید رنگدانه در گیاهان اطلسی بنفش رنگ و صورتی با استفاده از تکنیک RNAi انجام شده است.



شکل ۱- سازه طراحی شده RNAi ژن *chi* همراه با آنزیم‌های برشی تعیین شده در آن در وکتور pBI121

این سازه حاوی ۵۳۰ جفت باز از قطعه سنس و آنتی سنس توالی mRNA ژن چالکون ایزومراز (*chi*) و قطعه ۷۴۱ جفت باز از ژن پیرووات دهیدروژناز کیناز (*pdk*) به عنوان اینترون است که بین ناحیه سنس و آنتی سنس ژن *chi* قرار گرفته است. این سازه در پلاسمید pBI121 کلون شد که حاوی ژن مقاومت به کانامایسین، ژن گزارشگر *gus*، ترمیناتور NOS و پیشبر CaMV 35S است.

Figure 1- Designed RNAi construct for *chi* gene with restriction enzyme in pBI121 vector

chi-RNAi construct containing 530 kb sense and antisense of *chi*'s mRNA and 741 kb of *pdk* as intron that it replaced between sense and antisense of *chi* gene. This construct was cloned in pBI121 plasmid including kanamycin resistant gene, *gus* gene, NOS terminator and CaMV35S promoter.

جدول ۱- توالی آغازگرهای اختصاصی وکتور خاموشی حاوی ژن *chi* استفاده شده جهت آزمون PCR

Table 1- Sequence of specific primers for silencing vector containing *chi* for PCR

Primer name	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')	Synthesized fragment length
sense	CTATCCTTCGCAAGACCC	CAGCATTCGCAGTGCCAGTT	607
antisense	AAACTTCTCAATGGCAGCAC	GCGGGACTCTAATCATAAAA	568
<i>vir</i>	GCGGTGAGACAATAGGCG'	GAACTGCTTGCTGTCGGC	2100
<i>kan</i>	ATTGGCTATGACTGGGCAC	GTAAGCACGAGGAAGCGGT	676

شده به مدت ۱۰ دقیقه با محیط کشت تلقیح تیمار شدند. ریزنمونه‌ها به محیط کشت هم‌کشتی (محیط کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر BA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA فاقد آنتی‌بیوتیک و حاوی ۱۰۰ میکرومولار استوسرینگون) انتقال یافته و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد اتاق رشد و در تاریکی قرار داده شدند. پس از انجام هم‌کشتی، ریزنمونه‌ها به محیط کشت القای شاخه انتقال داده شدند که شامل نمک‌های محیط کشت MS، ۳۰ گرم در لیتر ساکارز،

به منظور ضدعفونی برگ‌ها، ابتدا تمامی نمونه‌ها برای از بین بردن آلودگی‌های سطحی با آب شستشو شدند. سپس با محلول ۱ درصد هیپوکلریت سدیم به مدت ۱۰ دقیقه و پس از آن با محلول کاربندایزیم ۱ در هزار به مدت ۱۰ دقیقه، تیمار شدند. شستشوی نهایی نمونه‌ها، ۳ مرتبه با استفاده از آب مقطر استریل در زیر هود لامینار انجام شد. برگ‌ها به قطعات کوچک ۰/۵ × ۰/۵ سانتی‌متر برش داده شده و به عنوان ریزنمونه استفاده شدند. ریزنمونه‌های برگ‌ی آماده

شاهد، یک جفت آغازگر ژن *vir* و به منظور تایید ورود وکتور به گیاهان تراریخته، یک جفت آغازگر ژن کانامایسین (*kan*) طراحی و سنتز شد (جدول ۱).

استخراج RNA و سنتز cDNA

در این مرحله، استخراج RNA از گلبرگ‌های گیاهان تراریخته و شاهد با استفاده از کیت ستونی استخراج RNA شرکت دنایست آسیا (#S-1020, Iran) انجام شد و RNA استخراج شده به منظور حذف آلودگی‌های احتمالی با DNase I در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه تیمار شد (Thermo Scientific DNase I, #EN0525, USA).

آزمون qRT-PCR

در این مرحله از پژوهش، بیان ژن *chi* در گیاهان تراریخته حاوی وکتور خاموشی این ژن و گیاهان شاهد، با استفاده از روش qRT-PCR مورد بررسی قرار گرفت و از ژن *ef1A* به عنوان مرجع استفاده شد (جدول ۲).

۲ میلی‌گرم در لیتر BAP، ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA، ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم و ۳۵ میلی‌گرم در لیتر آنتی‌بیوتیک کانامایسین بود. واکنش ریزنمونه‌ها هر دو هفته یک بار روی محیط کشت القاء شاخساره حاوی کانامایسین برای گزینش لاین‌های تراریخته و آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم برای از بین بردن آگروباکتریوم انجام شد. گیاهچه‌های تراریخته برای سازگاری به خاک منتقل شدند. محیط کشت گیاهچه شامل پیت ماس و پرلیت (۱:۱) بوده و جهت تامین رطوبت به اندازه کافی آبیاری شد. پس از استقرار و سازگاری کامل گیاهان، خصوصیات مورفولوژیک در گیاهان تراریخته و شاهد مورد بررسی قرار گرفت.

شناسایی وکتور RNAi حاوی ژن *chi* در گیاهان تراریخته

به منظور تایید انتقال سازه خاموشی حاوی ژن *chi* به گیاهان تراریخته، استخراج DNA از برگ‌های گیاهان تراریخته و شاهد با استفاده از کیت ستونی استخراج DNA شرکت دنایست آسیا (#S-1030, Iran) انجام شد. واکنش PCR و تایید گیاهان تراریخته با استفاده از دو جفت آغازگر سنتز شده برای وکتور خاموشی حاوی ژن *chi* انجام شد. همچنین برای تایید عدم آلودگی گیاهان تراریخته و

جدول ۲- توالی آغازگرهای ژن *chi* و *ef1A* استفاده شده در qRT-PCR گیاه اطلسی

Table 2- *chi* and *ef1A* primer sequences used in petunia qRT-PCR

Primer name	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')	Synthesized fragment length
<i>chi</i>	TCTCCTCCAGTGTCCGTTAC	ACAAACTTCCCTTCTATCTCCAG	137
<i>ef1A</i>	CGGCGTCAACACCTACACC	GAAGTTTCTGCTGCGATGG	180

نمونه مورد بررسی قرار گرفت و درصد تراریختی در این گیاهان ۸۴ درصد در نظر گرفته شد (گروه ۱: ۲۰ نمونه از ۲۰ نمونه، گروه ۲: ۱۸ نمونه از ۲۰ نمونه، گروه ۳: ۱۵ نمونه از ۲۰ نمونه، گروه ۴: ۱۸ نمونه از ۲۰ نمونه و گروه ۵: ۱۳ نمونه از ۲۰ نمونه) (شکل ۲ الف و ب). تفاوت در درصد تراریختی هر یک از گل‌های اطلسی با رنگ گل مختلف می‌تواند ناشی از تفاوت رقم در دریافت باکتری باشد. به عبارت دیگر کارایی انتقال ژن در ارقام مختلف، متفاوت است که در نتیجه منجر به تفاوت در درصد تراریختی در هر یک از گیاهان اطلسی مورد بررسی در این تحقیق شده است. به منظور بررسی عدم آلودگی نمونه‌های تراریخته، آزمون PCR با استفاده از ژن‌های *vir* انجام شد که در هیچیک از نمونه‌های تراریخته و شاهد (غیر تراریخت) بانندی مشاهده نشد در حالی که در پلاسمید خالص pBI121 حضور این ژن تایید شد (شکل ۲ ج). همچنین به منظور تایید ورود وکتور به گیاهان تراریخت، حضور یا عدم حضور ژن *kan* (ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک کانامایسین موجود در وکتور pBI121) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که این ژن در تمامی گیاهان

تجزیه و تحلیل‌های آماری

پژوهش حاضر در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. داده‌های حاصل با استفاده از نرم افزار SPSS v.16 مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. مقایسه داده‌ها به روش آزمون t در سطح $\alpha = 95\%$ انجام شد و اشکال مربوط به میانگین‌ها و خطوط انحراف معیار مربوط به هر میانگین نیز توسط نرم‌افزار Excel رسم گردید.

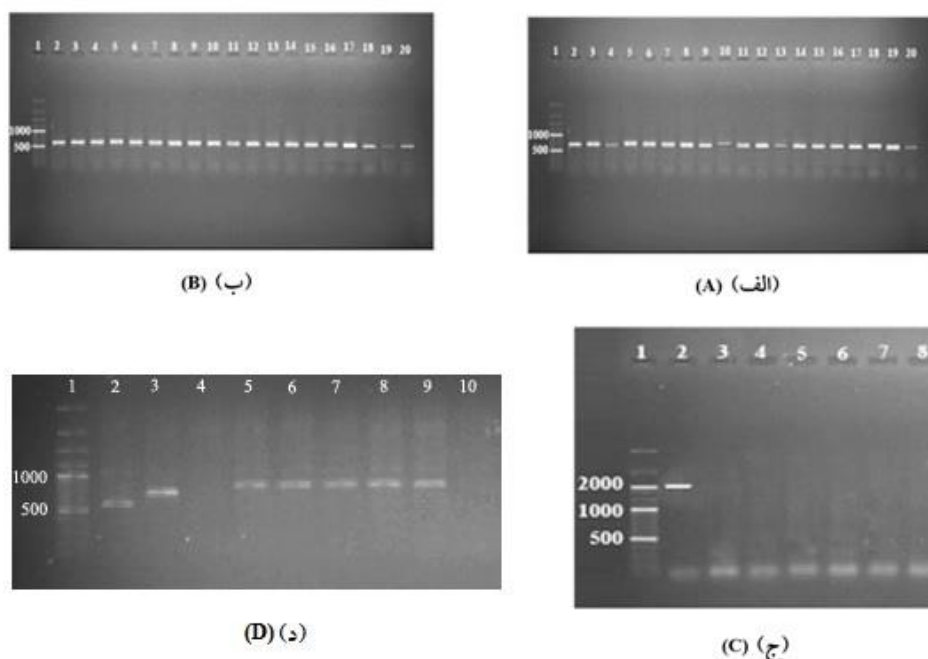
نتایج و بحث

بررسی درج ترانسژن در لاین‌های تراریخته

گیاهان سازگار شده از نظر درصد تراریختی و تغییرات مورفولوژیکی ارزیابی شدند. از بین ۳۸ لاین مورد بررسی در گل‌های صورتی، ۲۲ لاین، باند ۶۰۷ bp و ۵۶۸ bp مربوط به هر یک از آغازگرهای استفاده شده در واکنش PCR را نشان دادند (راندمان تراریختگی ۵۷/۸۹ درصد)، در حالی که در ۱۶ لاین دیگر هیچ بانندی مشاهده نشد (شکل ۲ الف و ب). در گیاهان با گل بنفش نیز ۱۰۰

انجام شد که در وکتورهای نوترکیب، حضور قطعات ۶۰۷ و ۵۶۸ جفت باز مربوط به هر یک از آغازگرها تایید شد در حالی که در پلاسمید خالص (غیر نوترکیب) pBI121 باندی مشاهده نشد (شکل ۲-د).

تراریخت که سازه خاموشی را دریافت کرده‌اند حضور دارد در صورتی که در گیاهان شاهد (غیر تراریخت) این ژن حضور نداشت (شکل ۲-ب). به منظور تایید حضور سازه در وکتور، PCR با آغازگرهای terminator و promoter که توالی آنها در جدول ۱ آورده شده است



شکل ۲- آنالیز PCR جهت تایید ورود سازه به ژنوم گیاه اطلسی

الف) قطعه ۶۰۷ تکثیر شده با آغازگرهای پیشبر و ناحیه سنس ژن *chi*; ب) قطعه ۵۶۸ تکثیر شده با آغازگرهای ترمیناتور و ناحیه آنتی-سنس ژن *chi*; الف و ب) چاهک ۱: سایز مارکر ۱۰۰ bp؛ چاهک ۲-۲۰: گیاهان تراریخته؛ ج) قطعه ۲ kb ژن *vir*؛ چاهک ۱: سایز مارکر ۱۰۰ bp؛ چاهک ۲: پلاسمید خالص pBI121 (غیر نوترکیب)؛ چاهک ۳-۷: لاین‌های تراریخته اطلسی حاوی سازه RNAi ژن *chi*؛ چاهک ۸: گیاه اطلسی شاهد؛ د) تایید حضور سازه خاموشی در پلاسمید pBI121 نوترکیب و عدم تکثیر در پلاسمید غیرنوترکیب؛ تایید حضور ژن *kan* در گیاهان تراریخته و عدم حضور در گیاه شاهد؛ چاهک ۱: سایز مارکر ۱۰۰ bp؛ چاهک ۲: پلاسمید نوترکیب تکثیر شده با آغازگر antisense؛ چاهک ۳: پلاسمید نوترکیب تکثیر شده با آغازگر sense؛ چاهک ۴: پلاسمید غیر نوترکیب؛ چاهک ۵-۹: گیاهان تراریخته حاوی ژن *kan*؛ چاهک ۱۰: گیاه شاهد.

Figure 2- PCR analysis for confirmation of construct introduction to petunia genome

A) Synthesized 607 bp fragment with promoter and sense strand of *chi* primers; B) synthesized 568 bp fragment with terminator and antisense of *chi* primers; A and B) lane 1: 100 bp size marker; lane 2-20: transgenic plants; C) *vir* gene with 2 kb length; lane 1: 100 bp size marker; lane 2: pure pBI121 plasmid (non-recombinant); lane 3-7: petunia transgenic lines containing *chi*-RNAi construct; lane 8: control plant; D) presence of construct in recombinant pBI121 and its absence in non-recombinant plasmid; presence of *kan* gene in transgenic plants and its absence in control plant; lane 1: 100 bp size marker; lane 2: recombinant plasmid replicated with antisense primers (568 bp); lane 3: recombinant plasmid replicated with sense primers (607 bp); lane 4: non-recombinant plasmid; lane 5-9: transgenic plants containing *kan* gene; lane 10: control plant.

تغییر یافته بود (شکل ۳-ب). در فنوتیپ V2، گل‌ها رنگ بنفش خود را حفظ کرده اما رگه‌های سفید رنگی در گلبرگ‌ها قابل مشاهده بود (شکل ۳-ج). گلبرگ‌های فنوتیپ V3، نسبت به شاهد کاملاً کم‌رنگ بودند (شکل ۳-د). فنوتیپ V4، گل‌هایی را تشکیل دادند که علاوه بر کم‌رنگ شدن رنگ گلبرگ‌ها، حالت شیمیری یا به عبارتی هیبرید داشتند. به اینصورت که بعضی از نقاط روی گلبرگ‌ها به صورت لکه‌هایی با شدت رنگ بیشتر مشهود بود (شکل ۳-ه). تعداد گیاهان با فنوتیپ V5 کم بود و تنها دو گیاه این فنوتیپ را نشان داده و دو

بررسی خصوصیات مورفولوژیک در لاین‌های تراریخته

در گیاهان تراریخته حاصل از گل‌های اطلسی مورد بررسی در این آزمایش، تغییرات متنوعی در رنگ گل مشاهده شد. بطوری‌که بیشترین تغییرات فنوتیپی مشاهده شده و بارز در گیاهان با رنگ گل بنفش بود. در بین نمونه‌های تراریخته در گیاهان بنفش، پنج فنوتیپ رنگ گل به صورت مجزا در نظر گرفته شد و با گیاهان اطلسی بنفش رنگ به عنوان شاهد مقایسه شدند (شکل ۳-الف). فنوتیپ V1، گیاهانی بودند که رنگ گل آن‌ها بطور کامل از بنفش به سرخابی

بساک زرد بود. در حالی که در ۱۲۳ لاین تراریخته بنفش، رنگ بساک از زرد به بنفش تغییر یافته بود (شکل ۴). این در حالی بود که در سایر گیاهان رنگ بساک زرد بوده و تغییری از نظر رنگ در آنها مشاهده نشد.

رنگ بودند. به عبارتی نیمی از گلبرگ‌ها به رنگ بنفش و نیمی از گلبرگ‌ها سرخابی بودند (شکل ۳-و).

علاوه بر تغییراتی که در رنگ گل گیاهان بنفش اطلسی مشاهده شد، در بین ۴۰۲ لاین تراریخته، ۱۲۳ گیاه دارای بساک‌هایی با رنگی متفاوت از سایرین بودند. در تمامی گیاهان اطلسی طبیعی، رنگ



(ب)(B)



(الف)(A)



(د)(D)



(ج)(C)



(و)(F)



(ه)(E)

شکل ۳- تغییرات فنوتیپی مشاهده شده در لاین‌های تراریخته اطلسی با رنگ گل بنفش

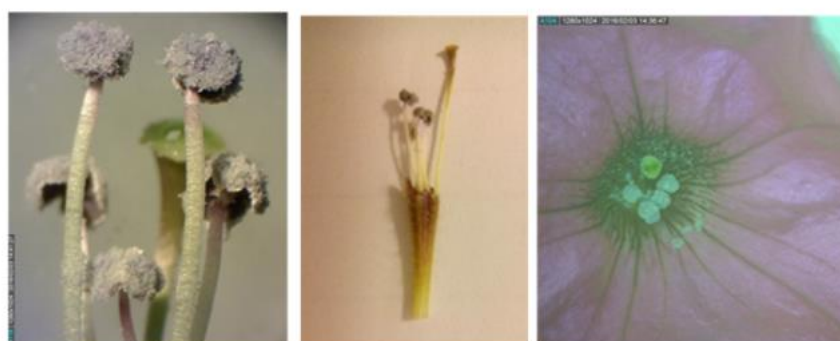
(الف شاهد؛ ب) فنوتیپ V1: سرخابی؛ ج) فنوتیپ V2: بنفش با رگه‌های سفید؛ د) فنوتیپ V3: بنفش کمرنگ؛ ه) فنوتیپ V4: بنفش شیمیر یا هیبرید؛ و) فنوتیپ V5: سرخابی و بنفش (دو رنگ).

Figure 3- Observed phenotypical changes in transgenic petunia with purple flowers

A) wild type; B) V1 phenotype: magenta; C) V2 phenotype: purple with white streaks; D) V3 phenotype: light purple; E) V4 phenotype: chimera or hybrid purple; F) V5 phenotype: magenta and purple (two colors).



(الف) (A)



(ب) (B)

شکل ۴- تغییرات مشاهده شده در رنگ بساک لاین‌های تراریخته بنفش

(الف) گل و بساک گیاهان شاهد (حالت طبیعی)؛ (ب) تغییر رنگ بساک در گیاهان تراریخته با رنگ گل بنفش.

Figure 4- Observed changes in anther of transgenic purple petunia

A) flower and anther in wild type; B) color change in anther of transgenic purple flowers.



(ج) (C)

(ب) (B)

(الف) (A)

شکل ۵- تغییرات فنوتیپی مشاهده شده در لاین‌های تراریخته اطلسی با رنگ گل صورتی

(الف) شاهد؛ (ب) فنوتیپ P1: صورتی کم‌رنگ؛ (ج) فنوتیپ P2: صورتی با رگه‌های سفید.

Figure 5- Observed phenotypic changes in of transgenic pink petunia

A) wild type; B) P1 phenotype: light pink; C) P2 phenotype: pink with white streaks.

تغییرات فنوتیپی مشاهده شده در رنگ گل لاین‌های تراریخته مورد بررسی، نتیجه فعالیت سازه خاموشی ژن *chi* است که سبب خاموشی نسبی مسیر تولید رنگدانه‌های آنتوسیانین شده است که تولید کم رنگدانه‌ها و کم‌رنگ شدن لاین‌های تراریخته نسبت به شاهد را

در بررسی لاین‌های تراریخته صورتی نیز تنها دو فنوتیپ مشاهده شد. گیاهانی که نسبت به شاهد کم‌رنگ بودند (P1) (شکل ۵-الف و ب) و گیاهان صورتی که رگه‌های سفید (P2) در آن‌ها مشخص بود و در گروه فنوتیپی دوم طبقه‌بندی شدند (شکل ۵-ج).

دلفینیدین است، تنوعی از رنگ گل (آبی تا صورتی) از طریق تجمع مشتقات سیانیدین مشاهده شد (Nakamura؛ Tsuda *et al.*, 2004؛ Nakatsuka *et al.*, 2008؛ *et al.*, 2006).

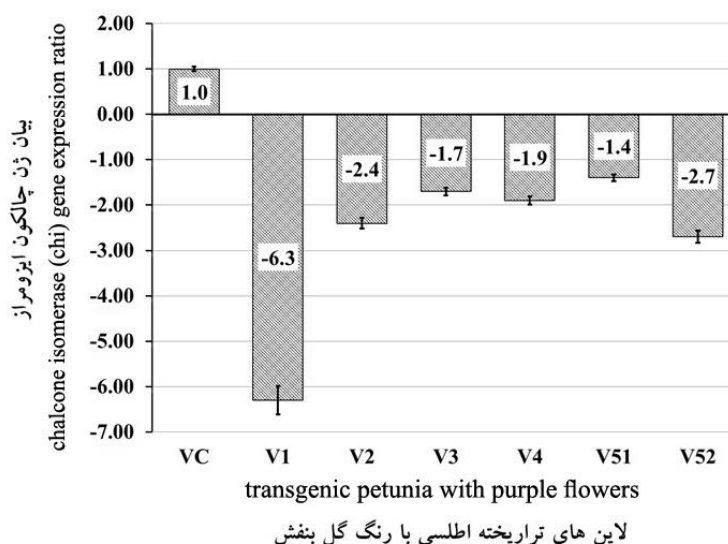
آزمون qRT-PCR

در بررسی بیان ژن *chi* در ۵ گروه فنوتیپی لاین‌های تراریخته اطلسی با شاهد، بیشترین کاهش بیان در فنوتیپ سرخابی (V1) مشاهده شد که بیان ژن *chi* در آن ۶ برابر نسبت به شاهد کاهش یافته بود. پس از آن کمترین بیان در لاین‌های تراریخته بنفش با رگه‌های سفید (V2)، بنفش شیمیری (V4) و بنفش کم‌رنگ (V3) مشاهده شد که به ترتیب ۲/۴، ۱/۹ و ۱/۷ برابر نسبت به شاهد کاهش یافته بود. در مورد گروه فنوتیپی پنجم (V5) که دو رنگ بود، استخراج RNA از هر دو بخش بنفش (V51) و سرخابی (V52) انجام شد و آنالیز بیان برای هر بخش در ابتدا نسبت به شاهد و سپس با مقایسه دو بخش با هم صورت گرفت. در مقایسه بین V51 کاهش بیان ژن *chi* به میزان ۱/۴ نسبت به شاهد مشاهده شد اما این کاهش از نظر آماری معنی‌دار نبود ($p \leq 0.05$), در حالی که کاهش بیان بخش سرخابی (V52) نسبت به شاهد ۲/۷ برابر بود. همچنین در مقایسه‌ای که بین دو بخش انجام شد (V51 و V52)، بیان ژن *chi* در بخش سرخابی ۱/۹ برابر نسبت به بخش بنفش رنگ کاهش یافته بود (شکل ۶).

بدنبال داشته است. در فنوتیپ‌هایی با رگه‌های سفید رنگ، احتمالاً خاموشی در بخش‌های سفید با فعالیت بیشتری عمل کرده (در این بخش‌ها خاموشی به صورت مطلق روی داده است) و منجر به متوقف شدن کامل مسیر تولید رنگدانه و تجمع نارنجین چالکون شده است که ماحصل آن تولید رنگدانه‌های سفید و فنوتیپ سفیدرنگ می‌باشد. خاموشی ژن‌های چالکون سنتاز و چالکون ایزومراز در گیاهان تورنیا و توتون با استفاده از فناوری RNAi منجر به تولید گیاهانی شد که کاهش شدید رنگ را نشان دادند (Fukusaki *et al.*, 2004؛ Nishihara *et al.*, 2005). بطوری که در گیاهان تراریخته توتون، دو لاین، گل‌هایی به رنگ سفید و ده لاین، گل‌هایی به رنگ صورتی روشن تولید کردند.

در این آزمایش فنوتیپ‌های شیمیر یا هیبرید نیز مشاهده شد که احتمالاً نتیجه عمل سازه RNAi در برخی از سلول‌های بافت گلبرگ (فعالیت کمتر ژن *chi* و تولید رنگدانه کمتر) و عدم فعالیت آن در بعضی از سلول‌های دیگر (عدم تغییر رنگ در این بخش از بافت گلبرگ) است که منجر به بروز طیفی از رنگ در بافت گلبرگ این نوع از گیاهان شده است، اما تولید رنگ سرخابی در لاین‌های تراریخته حاصل از گیاهان اطلسی بنفش رنگ، احتمالاً گویای توقف مسیر سنتز ترکیبات دلفینیدین و فعال شدن مسیر تولید ترکیبات سیانیدین در این نوع گیاهان است.

در تحقیقات انجام شده نیز این موضوع گزارش شده است، بطوری که در گیاهان تراریخته تورنیا، اطلسی و جنتیانای آبی با کاهش بیان ژن *f3'5'h* که یک آنزیم کلیدی موثر در تولید ترکیبات



شکل ۶- تغییر بیان ژن *chi* در ۵ گروه فنوتیپی لاین‌های تراریخته اطلسی با رنگ گل بنفش نسبت به شاهد
Figure 6- *chi* gene expression in 5 phenotypic groups of purple transgenic lines rather than wild type

داشتند و در هیچیک از گیاهان شاهد و یا گیاهان تراریخته دیگر، تغییر رنگی در بساک گل مشاهده نشد، بیان ژن *chi* در این گیاهان

از آنجایی که در کل نمونه‌های آزمایشی پژوهش حاضر، بساک‌های تغییر رنگ یافته فقط در ۱۲۳ لاین تراریخته بنفش رنگ حضور

باشد.

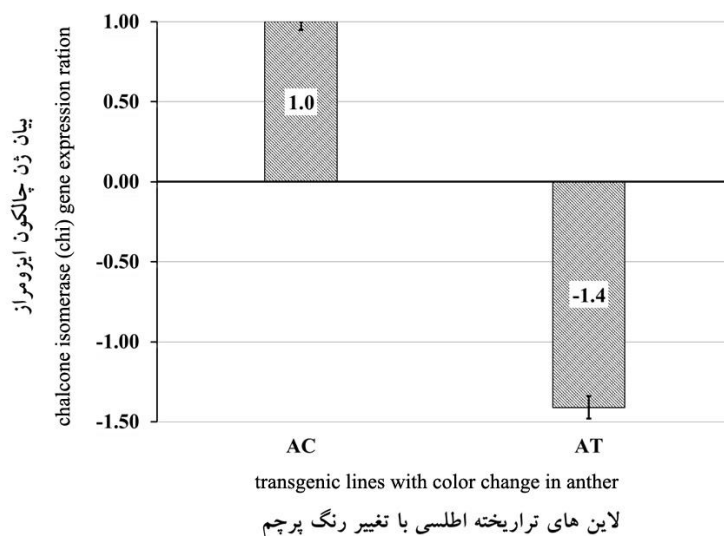
در گل‌های تراریخته صورتی نیز کاهش ۶ و ۴ برابری بیان ژن چالکون ایزومراز نسبت به شاهد مشاهده شد که به ترتیب مربوط به لاین‌های صورتی کم‌رنگ (P1) و لاین‌های صورتی دارای رگه‌های سفید (P2) بود (شکل ۸).

در تمامی لاین‌های تراریخته مورد بررسی و فنوتیپ‌های مشاهده شده، کاهش بیان ژن *chi* نسبت به گیاهان شاهد مشاهده شد که نشان‌دهنده کارایی سازه RNAi طراحی شده در خاموشی ژن چالکون ایزومراز (*chi*) می‌باشد که منجر به کاهش بیان ژن و ظهور فنوتیپ‌های جدید شده است.

در پژوهش انجام شده، تفاوت در خصوصیات فنوتیپی و میزان بیان ژن *chi* و سایر ژن‌های بررسی شده در لاین‌های تراریخته، نشان‌دهنده تفاوت در درجه خاموشی و کارایی سازه RNAi مورد ارزیابی در اطلسی‌های مورد مطالعه است. بطوری‌که این تفاوت در بین گیاهان تراریخته موجود در یک رنگ نیز بوضوح قابل مشاهده است.

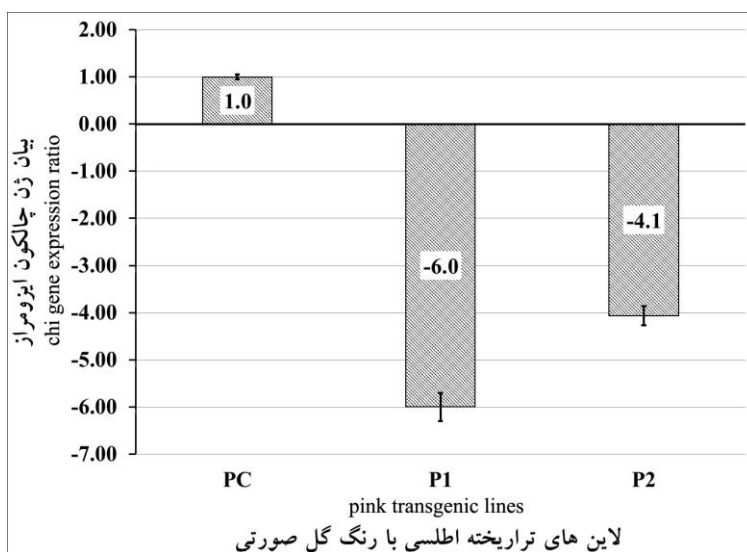
در گیاهان تراریخته توتون حاوی سازه‌های خاموشی مربوط به ژن‌های *f3h* و *fls* (فلاونول سنتاز) نیز تفاوت در درجه خاموشی در بین گیاهان تراریخته مشاهده شد (Nakatsuka et al., 2008؛ Fujino et al., 2018). در گیاهان جنتیانای تراریخته با رنگ گل یاسی، تغییر رنگ گل بدلیل تغییر در ترکیب آنتوسیانین‌ها نسبت داده شد، در حالی‌که در گیاهان تراریخته با رنگ گل آبی کم‌رنگ، کاهش در مقدار آنتوسیانین‌ها، دلیل اصلی تغییر رنگ در گیاهان مورد بررسی در نظر گرفته شده است (Nakatsuka et al., 2010).

نیز مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور استخراج RNA از بساک گیاهان تراریخته و شاهد (۳ تکرار) انجام شد و پس از ساخت cDNA، بیان ژن مورد بررسی قرار گرفت. نتایج آزمون qRT-PCR نشان‌دهنده کاهش معنی‌دار ($p \leq 0.05$) ژن *chi* بود، بطوری‌که کاهش ۱/۶ برابری بیان این ژن در بساک گیاهان تراریخته نسبت به بساک گیاهان شاهد مشاهده شد (شکل ۷). ژن چالکون ایزومراز در بساک و دانه گرده گل نیز فعالیت دارد. پس کاهش بیان این ژن در بساک گیاهان تراریخته را می‌توان به اثر سازه خاموشی منتقل شده به ژنوم این گیاهان نسبت داد. اما در مورد تغییر رنگ پرچم‌ها به رنگ بنفش، گزارش خاصی وجود ندارد. رنگ بساک در لاین‌های تراریخته گیاه توتون حاوی سازه خاموشی ژن *chi* به زرد تغییر کرده بود (Nishihara et al., 2005؛ Wang et al., 2018)، انتظار می‌رفت کاهش بیان این ژن در لاین‌های تراریخته اطلسی نیز منجر به افزایش تجمع نارنجین چالکون و افزایش شدت رنگ زرد در بساک این گیاهان شود. ممکن است تجمع چالکون در بساک این گیاهان نیز اتفاق افتاده باشد، اما عوامل دیگری در عدم بروز رنگ زرد و تولید رنگدانه‌های بنفش در بساک این گیاهان نقش داشته باشد. برای مثال می‌تواند سایر مسیرهای موجود در چرخه فلاونوئیدها در بساک فعال شده باشد یا شرایط بیوفیزیکی محل تجمع رنگدانه‌ها (سیتوپلاسم، سیتوسل و بالاخص واکوئل) از قبیل تغییر در pH و یا فعال شدن عناصر یا یون‌هایی که بر روی تولید و تجمع رنگدانه در این مناطق نقش دارند، منجر به تجمع رنگدانه‌های بنفش در این لاین‌ها شده باشد. حتی ممکن است برهمکنشی از تمامی موارد ذکر شده، علت بروز رنگ بنفش در بساک این گیاهان باشد. هر چند تایید و تعیین دلیل یا دلایل قطعی این مشاهده نیازمند آزمایش‌های تکمیلی می



شکل ۷- تغییر بیان ژن *chi* در لاین‌های تراریخته اطلسی با تغییر رنگ بساک نسبت به گیاهان شاهد

Figure 7- *chi* gene expression in purple transgenic lines with color change in anther rather than wild type



شکل ۸- تغییر بیان ژن *chi* در ۲ گروه فنوتیپی لاین‌های تراریخته اطلسی با رنگ گل صورتی نسبت به شاهد
Figure 8- *chi* gene expression in 2 phenotypical groups of pink transgenic lines rather than wild type

ساختاری موثر در بیوسنتز آنتوسیانین‌ها بکار گرفته شده است که سبب ممانعت از تجمع آنتوسیانین‌ها و تغییر رنگ گل در گیاهان تراریخته می‌شود (Nakatsuka et al., 2010؛ Chen et al., 2017؛ Fujino et al., 2018).

نتیجه‌گیری

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

نتایج تحقیقات مختلف نشان‌دهنده کارایی بیشتر خاموشی در ژن‌های بالادست مسیر بیوسنتزی تولید آنتوسیانین‌ها است، بطوری‌که در تحقیقاتی که بر روی گیاه جنتیانا انجام شده است، در گیاهان تراریخته جنتیانا که حاوی سازه RNAi ژن 5' h بودند، فراوانی خاموشی نسبت به گیاهان جنتیانای حاوی سازه خاموشی ژن‌های *chs* و *ans* کمتر بود (Nishihara et al., 2005). به عبارتی موقعیت ژن مورد نظر در چرخه بیوسنتزی تولید رنگدانه و توالی ژن هدف مورد استفاده در روش RNAi نیز بر کارایی خاموشی موثر است. همچنین طول توالی ژن هدف نیز در فراوانی خاموشی ژن در گیاهان تراریخته تاثیر دارد. بطوری‌که قطعات با طول 500-700 bp بیشترین تاثیر را در خاموشی ژن خواهند داشت، با اینحال، بسته به گونه گیاهی، طول قطعه انتخابی برای خاموشی می‌تواند از 100-1000 bp متفاوت باشد (Nakatsuka et al., 2010؛ Heilersig et al., 2006).
روش RNAi بطور گسترده‌ای برای کاهش بیان ژن‌های

منابع

- Ahloowalia, B.S., & Maluszynski, M. (2001). Induced mutations - A new paradigm in plant breeding. *Euphytica* 118, 167-173. <https://doi.org/10.1023/A:1004162323428>
- Andersen, Y.M., & Makhum, K.R. (2006). *Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications*. CRS Press, Taylor & Francis group, Sound Parkway NW. 1212p. <https://doi.org/10.1201/9781420039443>
- Chandler, S.F., & Sanchez, C. (2012). Genetic modification: the development of transgenic ornamental plant varieties. *Wiley Online Library*, 10, 891-903. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2012.00693.x>
- Chen, G., Liu, H., Wei, Q., Zhao, H., Liu, J., & Yu, Y. (2017). The acyl-activating enzyme PhAAE13 is an alternative enzymatic source of precursors for anthocyanin biosynthesis in petunia flowers. *Journal of Experimental Botany*, 68, 457-467. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw426>
- Delgado-Vargas, F., Jimenez, A.R., & Paredae-Lopez, O. (2000). Natural pigments: Carotenoids, Anthocyanins, and Betalains: characteristics, biosynthesis, processing, and stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 40, 173-289. <https://doi.org/10.1080/10408690091189257>
- Dixon, R.A. (2005). Engineering of plant natural product pathways. *Current Opinion of Plant Biology*, 8, 329-336. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2005.03.008>

7. Fujino, N., Tenma, N., Waki, T., Ito, K., Komatsuzaki, Y., & Sugiyama, K. (2018). Physical interactions among flavonoid enzymes in snapdragon and torenia reveal the diversity in the flavonoid metabolon organization of different plant species. *The Plant Journal*, *94*, 372–392. <https://doi.org/10.1111/tpj.13864>
8. Fukusaki, E., Kawasaki, K., Kajayama, S., An, C., SuZuki, K., Tanaka, Y., & Kobayashi, A. (2004). Flower color modulations of *Torenia hybrida* by down regulation of chalcone synthase gene with RNA interference. *Journal of Biotechnology*, *111*, 229–240. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2004.02.019>
9. Heilersig, H.J.B., Loonen, A.E.H.M., Bergervoet, M., Wolters, A.M.A., & Visser, R.G.F. (2006). Post-transcriptional gene silencing of GBSSI in potato: effects of size and sequence of the inverted repeats. *Plant Molecular Biology*, *60*, 647–662. <https://doi.org/10.1007/s11103-005-5280-6>
10. Keykha, F., Bagheri, A., & Moshtaghi, N. (2016a). Analysis of chalcone synthase and chalcone isomerase gene expression in pigment production pathway at different flower colors of *Petunia hybrida*. *Journal of Cell and Molecular Research*, *8*, 8–14. <https://doi.org/10.22067/jcmr.v8i1.50406>
11. Keykha, F., Bagheri, A., Moshtaghi, N., Bahrami, A. R., & Sharifi, A. (2016b). Cellular and Molecular Biology RNAi-induced silencing in floral tissues of *Petunia hybrida* by agroinfiltration: a rapid assay for chalcone isomerase gene function analysis. *Cellular and Molecular Biology*, *62*, 26–31. <https://doi.org/10.14715/cmb/2016.62.10.4>
12. Kim, D.H., & Rossi, J.J. (2008). RNAi mechanisms and applications. *Biotechniques*, *44*, 613–616. <https://doi.org/10.2144/000112792>
13. Lin, J.J. (1995). *Electrotransformation of Agrobacterium*, in *Methods in Molecular Biology*, 47, Nickoloff, J. A., ed. Humana Press, Totowa, NJ. 171pp. <https://doi.org/10.1385/0-89603-310-4:171>
14. Nakamura, N., Fukuchi-Mizutani, M., Miyazaki, K., Suzuki, K., & Tanaka, Y. (2006). RNAi suppression of the anthocyanidin synthase gene in *Torenia hybrida* yields white flowers with high frequency and better stability than antisense and sense suppression. *Plant Biotechnology*, *23*, 13–17. <https://doi.org/10.5511/PLANTBIOTECHNOLOGY.23.13>
15. Nakatsuka, T., Mishiba, K., Abe, Y., Kubota, A., Kakizaki, Y., Yamamura, S., & Nishihara, M. (2008). Flower color modification of gentian plants by RNAi-mediated gene silencing. *Plant Biotechnology*, *25*, 61–68. <https://doi.org/10.1007/s10529-010-0461-z>
16. Nakatsuka, T., Mishiba, K. I., Kubota, A., Abe, Y., Yamamura, S., Nakamura, N., Tanaka, Y., & Nishihara, M. (2010). Genetic engineering of novel flower color by suppression of anthocyanin modification genes in gentian. *Journal of Plant Physiology*, *167*, 231–237. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2009.08.007>
17. Nishihara, M., Nakatsuka, T., & Yamamura, S. (2005). Flavonoid components and flower color change in transgenic tobacco plants by suppression of chalcone isomerase gene. *FEBS Letters*, *579*, 6047–6078. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.09.073>
18. Nishihara, M., & Nakatsuka, T. (2010). Genetic engineering of novel flower colors in floricultural plants: recent advances via transgenic approaches. *Methods in Molecular Biology*, *589*, 325–347. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-114-1_29
19. Nishihara, M., & Nakatsuka, T. (2011). Genetic engineering of flavonoid pigments to modify flower color in floricultural plants. *Biotechnology Letter*, *33*, 433–441. <https://doi.org/10.1007/s10529-010-0461-z>
20. Park, E.J & Chen, T.H.H. (2006). Improvement of cold tolerance in horticultural crops. *Haworth Food & Agricultural Products, Singapore* 69–120. https://doi.org/10.1300/J411v17n01_04
21. Potera, C. (2007). Blooming biotech. *Nature Biotechnology*, *25*, 963–965. <https://doi.org/10.1038/nbt0907-963>
22. Tanaka, Y., & Ohmiya, A. (2008). Seeing is believing: engineering anthocyanin and carotenoid biosynthetic pathways. *Current Opinion in Biotechnology*, *19*, 190–197. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2008.02.015>
23. Tanaka, Y., Brugliera, F., & Chandler, S. (2009). Recent progress of flower color modification by biotechnology. *International Journal of Molecular Sciences*, *10*, 5350–5369. <https://doi.org/10.3390/ijms10125350>
24. Thakur, A. (2003). RNA interference revolution. *Electronic Journal of Biotechnology*, *6*, 39–49. <https://doi.org/10.4067/S0717-34582003000100007>
25. To, K.Y., & Wang, C.K. (2006). *Molecular breeding of flower color*. Floriculture, Ornamental and Biotechnology Volume. Global Science Books, UK. pp, 300–310.
26. Tsuda, SH., Fukui, Y., Nakamura, N., Katsumoto, Y., Yonekura-Sakakibara, K., Fukuchi-Mizutani, M., Ohira, K., Ueyama, Y., Ohkawa, H., A.Holton, T., Kusumi, T., & Tanaka, Y. (2004). Flower color modification of *Petunia hybrida* commercial varieties by metabolic engineering. *Plant Biotechnology*, *21*, 377–386. <https://doi.org/10.5511/PLANTBIOTECHNOLOGY.21.377>
27. Voorhuijzen, M.M., Prins, T.W., Belter, A., Bendiek, J., Brünen-Nieweler, C., van Dijk, J.P., Goerlich, O., Kok, E.J., Pickel, B., Scholtens, I.M.J., Stolz, A., & Grohmann, L. (2020). Molecular characterization and event-specific real-time PCR detection of two dissimilar groups of genetically modified *Petunia x hybrida* sold on the market. *Frontiers in Plant Science*, *11*, 11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.01047>. eCollection 2020
28. Wang, Y., Xie, X., Ran, X., Chou, S., Jiao, X., Li, E., Zhang, Q., Meng, X., & Li, B. (2018). Comparative analysis of the polyphenols profiles and the antioxidant and cytotoxicity properties of various blue honeysuckle varieties. *Open Chemistry*, *16*, 637–646. <https://doi.org/10.1515/chem-2018-0072>