

ژن *etr1-1* کاندید برتر جهت دست‌ورزی ژنتیکی مسیر پیام‌رسانی علامت هورمون اتیلن در گل سرخ

فائزه خاتمی^{۱*}، فرزانه نجفی^۱، فتنه یاری^۲ و رمضانعلی خاوری‌نژاد^۱

^۱ ایران، تهران، دانشگاه خوارزمی، دانشکده علوم زیستی

^۲ ایران، تهران، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، پژوهشکده کشاورزی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۲/۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۸/۱۵

چکیده

از عوامل اصلی محدود کننده ماندگاری در مرحله پس از برداشت می‌توان به هورمون اتیلن اشاره نمود. لذا دست‌ورزی ژنتیکی این هورمون مورد توجه بوده و در پژوهش حاضر، لاین‌های تراریخته گل سرخ حاوی ژن جهش‌یافته *etr1* مورد ارزیابی قرار گرفتند. در ادامه بررسی‌های تکمیلی مولکولی، فیزیولوژیک و مورفولوژیک در لاین‌ها جهت انتخاب لاین ماندگار انجام شد. علاوه بر این، پاسخ‌های فیزیولوژیک لاین‌های ماندگار و شاهد در تیمارهای جیبرلین (صفر و 80 mg l^{-1}) و اتیلن (صفر و $1 \mu\text{l l}^{-1}$) مورد بررسی قرار گرفتند. بدین منظور ارزیابی‌ها در دو مرحله تجاری غنچه و نیمه باز انجام گرفت. آزمایش‌ها به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار اجرا شد. نتایج مطالعات مولکولی نشان دهنده انتقال موفقیت‌آمیز ژن هدف به لاین‌ها بوده است. باتوجه به ماندگاری مطلوب، کندتر شدن روند شکوفایی و حفظ گلبرگ‌ها به روی نهج گل تا آخرین روز در مطالعات فیزیولوژیک و مورفولوژیک، لاین شش در بین هفت لاین تراریخته، به‌عنوان لاین ماندگار انتخاب گردید. نتایج نشان داد که میزان تولید اتیلن به‌طور چشمگیری در هر دو مرحله غنچه و نیمه باز در لاین ماندگار در مقایسه با لاین شاهد در هر دو تیمار اتیلن بیرونی و جیبرلین کاهش یافت. لازم به ذکر است که محتوای اتیلن درونی لاین ماندگار، در سه مرحله (غنچه، نیمه باز و مرحله معادل با نیمه باز لاین شاهد) مورد بررسی قرار گرفت. بنابراین به نظر می‌رسد ژن *etr1-1* می‌تواند کاندید مناسبی، جهت به تأخیر انداختن فرایند پیری وابسته به اتیلن در گل‌های حساس باشد.

واژه‌های کلیدی: اتیلن بیرونی، اصلاح ژنتیکی، پیری گل، جیبرلین، گل سرخ شاخه بریده.

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۲۸۳۱۰۰۶۹، پست الکترونیکی: std_khatami@khu.ac.ir

مقدمه

که درخور ظرفیت‌های صادراتی و توانمندی‌های تولید گیاهان زینتی در کشور نمی‌باشد (۱۷). با در نظر گرفتن ارزش اقتصادی صنعت گل و گیاهان زینتی و رقابت شدید در این زمینه، لزوم تحقیقات بیشتر در بخش تولید محصولات جدید و همچنین بهبود کیفیت تولیدی آنها بیشتر از پیش اهمیت خواهد داشت. کیفیت گیاهان زینتی گلدار عموماً با میزان ماندگاری گل‌های آنها رابطه مستقیم داشته و عامل اصلی در بررسی کیفی محصولات زینتی

صنعت پرورش گل و گیاهان زینتی یکی از منابع پر درآمد غیرنفتی، با گردش مالی سالانه ده‌ها میلیارد دلار می‌باشد که امروزه سهم زیادی از تجارت را به خود اختصاص داده و کشور هلند، بزرگترین تولیدکننده تجاری گل و گیاهان زینتی در جهان، بیشترین سهم را در این عرصه دارا می‌باشد (۳ و ۴). در حال حاضر سهم ایران در تولید جهانی گل ۱/۲ درصد برآورد شده و درآمد ارزی صادرات گل در ایران بین ۲۰ تا ۳۰ میلیون دلار در سال تخمین زده می‌شود

تنظیم‌کننده‌های منفی پاسخ به اتیلن عمل می‌کنند و اتصال اتیلن به پذیرنده‌ها سبب غیرفعال شدن آنها می‌گردد (۵).

برای مثال تعدادی از گیاهان زینتی که حساس به اتیلن هستند و از لحاظ اقتصادی نیز حائز اهمیت می‌باشند عبارتند از: گل استکانی، برخی ارقام گل سرخ، کاکتوس عید پاک، گل اطلسی و گل میخک (۶ و ۱۷). با توجه به اهمیت روزافزون گل سرخ شاخه بریده، درک بهتر روابط بیولوژیکی پیچیده به منظور کاهش ضایعات در زنجیره تولید تا مصرف اهمیت به سزایی دارد. لذا اخیراً تمرکز بیشتر پژوهش‌ها در خصوص افزایش ماندگاری گل‌های شاخه بریده با استفاده از روش‌های نوین مهندسی ژنتیک است. در این میان، نقش اتیلن در فرایند پیری گل‌ها نیز از طریق تغییرات ژنتیکی در مسیر سیگنال‌دهی اتیلن مورد بررسی قرار گرفته است. انتقال ژن جهش‌یافته گیرنده اتیلن *etr1* از گیاه آرابیدوپسیس به اطلسی باعث کاهش حساسیت به اتیلن گردید و گیاهان تراریخته ماندگاری بیشتری را از خود نشان دادند. در رابطه با گیاه داودی نیز انتقال ژن جهش‌یافته گیرنده اتیلن *etr1-4* باعث کاهش حساسیت به اتیلن گردیده است (۱۲). به نظر می‌رسد گیرنده‌های اتیلن و ژن‌های پایین دست مسیر انتقال سیگنال اتیلن نقش مهمی در پیشبرد فرایند پیری ایفا می‌کنند. در گل سرخ، ارتباط مستقیمی بین پیری گل‌ها با افزایش میزان بیان *ETR1-3* گزارش شده است و نشان می‌دهد پیری گل می‌تواند از طریق دریافت اتیلن خارجی توسط گیرنده‌های اتیلن تسریع گردد (۹ و ۱۰).

علاوه بر اتیلن گزارشات متنوعی در مورد نقش اسید آبسزیک در فرایند پیری گل‌ها و افزایش این هورمون به هنگام مسن شدن گلپوش‌ها نیز در دست می‌باشد. نتایج بسیاری از پژوهش‌ها نشان داده است که کاربرد برون‌زای اسید آبسزیک، سبب افزایش تولید اسید آبسزیک درونی در بسیاری از گل‌های شاخه بریده و به دنبال آن پیری گردیده است (۱۰ و ۱۵). همچنین مشاهده شده است پس

می‌باشد (۱ و ۹). طول عمر گل‌های شاخه بریده توسط موارد متعددی کنترل می‌گردد: مرگ برنامه‌ریزی شده، پیری القا شده توسط اتیلن، دهیدراسیون و کمبود منابع غذایی که با دست‌ورزی هرکدام از این عوامل می‌توان فرایند پیری را تا حدودی کنترل نمود و از این طریق ماندگاری گل‌ها را افزایش داد (۴ و ۶). در بین انواع هورمون‌های گیاهی، اتیلن مهمترین تنظیم‌کننده فرایند پیری در گیاه محسوب شده و به‌عنوان هورمون محرک پیری در اکثر گیاهان زینتی شناخته می‌شود. حساسیت گل‌ها نسبت به اتیلن برای تولیدکنندگان صنعت گل مشکل مهمی محسوب می‌شود. لذا شناخت واکنش‌های بیوسنتزی اتیلن و دریافت آن توسط پذیرنده‌ها جهت مقابله با اثرات منفی آن، می‌تواند به افزایش طول عمر و کیفیت گیاهان زینتی کمک نماید (۲ و ۷).

تاکنون مسیر بیوسنتزی اتیلن، چرخه یانگ، در گیاهان عالی به تفصیل بررسی شده است (۱۶). براساس این چرخه، اتیلن از اسید آمینه متیونین به کمک آنزیم‌های ۱-آمینو سیکلو پروپان ۱-کربوکسیلیک اسید سنتاز و ACC اکسیداز سنتز می‌گردد. پس از سنتز، مولکول گازی اتیلن توسط پذیرنده‌های پروتئینی موجود در شبکه آندوپلاسمی سلول گیاهی دریافت می‌گردد. بدین ترتیب رونویسی و ترجمه ژن‌های پایین دست فعال می‌گردند (۴ و ۵). در پی فعالیت این ژن‌ها، پیری و مرگ سلول و اندام‌های گیاهی مشاهده می‌گردد (۱۰). به‌طور خلاصه، پاسخ به اتیلن توسط یک خانواده پنج عضوی شامل ETR1 (Ethylene Receptor1)، ETR2، ERS1، Ethylene Response Sensor1، ERS2 و EIN4 (Ethylene Insensitive4) هدایت می‌گردد (۱۰ و ۱۱). این پذیرنده‌ها مشابه پذیرنده‌های هیستیدین کینازی "دوجزئی" در پروکاریوت‌ها می‌باشند و از لحاظ ساختاری به دو زیر خانواده یک (ETR1 و ERS1) و دو (ETR1، ERS1 و EIN4) تقسیم می‌گردند (۱۰ و ۱۱). مطالعات ژنتیکی و بیوشیمیایی آشکار کرده است که پذیرنده‌های اتیلن به‌عنوان

تحقیقات صورت گرفته و ارزیابی موفولوژیک و بیان ژن در گیاهان تراریخته گل سرخ، لاین‌های مختلف این گل برای این پژوهش در نظر گرفته شد تا بتوان بهترین لاین تراریخته، دارای کلیه صفات مطلوب مورفولوژیک و فیزیولوژیک باتوجه به هدف به تأخیر انداختن پیری در این گل شناسایی و معرفی گردد. در عین حال نکته حائز اهمیت دیگر در این تحقیق بررسی برخی صفات فیزیولوژیک بیان این ژن در گل‌های سرخ شاخه بریده در پاسخ به تیمار اتیلن و جیبرلین بیرونی و مواجهه با آنتاگونیست طبیعی اتیلن، جیبرلین، بوده است. بنابراین، هدف از این پژوهش مطالعه برخی تغییرات بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی در هنگام پیری گل سرخ می‌باشد تا در آینده بتوان با توجه به نوع علائم پیری، تیمارهای پس از برداشت مناسبی جهت افزایش ماندگاری این رقم از گل سرخ معرفی نمود.

مواد و روشها

مواد گیاهی: لاین‌های تراریخته حاصل از گل سرخ شاخه بریده رقم "Vendetta" به شماره ثبت اختراع ۹۵۷۶۰ در مرحله غنچه تجاری با قطر تقریباً یکسان حدود ۳-۴ سانتی‌متر از گلخانه تحت قرارداد از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شدند (شکل ۱، الف). پس از انتقال به آزمایشگاه، برای یکسان کردن اندازه شاخه‌ها مجدداً انتهای آنها در زیرآب باز برش شده، به طوری که طول هر شاخه گل به 30 ± 0.5 سانتی‌متر رسید و همه برگ‌ها بجز سه برگ بالایی حذف شدند. در تمام مدت آزمایش گل‌ها در شرایط کنترل شده با دمای 25 ± 2 درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی 70 ± 5 درصد و شرایط نوری ۱۵ میکرومول بر مترمربع بر ثانیه با استفاده از لامپ‌های مهتابی سفید و تنگستن، با دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند (شکل ۱، ب). در ادامه باتوجه به نوع آزمایش‌ها که در ذیل ذکر شده است، تیمارها اعمال و اندازه‌گیری‌ها انجام شد.

از افزایش میزان اسید آسبیزیک درونی، میزان تولید اتیلن نیز افزایش یافته و بدین ترتیب کاربرد اسید آسبیزیک خارجی، میزان تولید اتیلن را به شدت افزایش داده است. در این راستا گزارش شده است که کاربرد بازدارنده فعالیت اتیلن همچون تیوسولفات نقره از پیری تحریک شده توسط اسید آسبیزیک جلوگیری نموده است. این نتایج نشان می‌دهد تأثیر اسید آسبیزیک بر تنظیم فرایند پیری در بسیاری از گل‌های شاخه بریده به واسطه تأثیر غیرمستقیم آن بر افزایش میزان تولید اتیلن می‌باشد (۱۴ و ۱۵). همچنین گزارش شده است که جیبرلین‌ها نیز فرایند پیری را در بسیاری از گیاهان زینتی نظیر میخک، نرگس و گل سرخ به تعویق می‌اندازند. در بسیاری از فرایندهای فیزیولوژیکی نظیر جوانه‌زنی بذر، مرگ برنامه‌ریزی شده سلول‌های لایه آلرون و بیوسنتز آنتوسیانین در گلبرگ گل اطلسی، جیبرلین‌ها به‌عنوان آنتاگونیست طبیعی اسید آسبیزیک عمل می‌کنند (۱۳). چنین به نظر می‌رسد که جیبرلین‌ها از طریق خنثی نمودن فعالیت اسید آسبیزیک، پیری گل‌ها را به تأخیر می‌اندازند (۴ و ۱۰). با این حال شواهد اندکی مبنی بر ارتباط مستقیم جیبرلین‌ها بر تنظیم فرایند پیری موجود است. اثرات سینرژیک و آنتاگونیسم هورمون‌ها در گیاهان می‌تواند منجر به تغییرات شاخصی در فنوتیپ گیاهان شوند. باتوجه به تحقیقات صورت گرفته مشخص شده که از بین هورمون‌های گیاهی، جیبرلین نسبت به اتیلن اثرات آنتاگونیستی داشته و لذا به نظر می‌رسد تغییر غلظت این هورمون‌ها به نفع بالاتر بردن غلظت جیبرلین در گیاه می‌تواند منجر به افزایش طول عمر شود. لذا به نظر می‌رسد از یک سو می‌توان با دست‌ورزی ژنتیکی اتیلن و از دیگر سو با افزایش محتوای جیبرلین به بهبود ماندگاری در گل سرخ کمک نموده. باتوجه به پتانسیل مطلوب دست‌ورزی ژنتیکی هورمون اتیلن در به تأخیر انداختن پیری، گزارش شده است که ژن موتانت *etr1-1* با موفقیت به گل سرخ رقم Vendetta منتقل شده و مطالعات اولیه مولکولی تأییدی بر انتقال این ژن می‌باشد. در ادامه به جهت تکمیل

کیفیت DNA های استخراج شده، از ژل آگارز ۱ درصد و عکس‌برداری در دستگاه ژل داگ (Gel doc 2000) استفاده شد. به منظور تعیین کمیت، جذب‌های نوری ۲۶۰ به ۲۸۰ و ۲۶۰ به ۲۳۰ نانومتر با غلظت نانوگرم در میکرولیتر توسط اسپکتروفتومتر Eppendorf BioPhotometer @D30 قرائت گردید.

سپس به منظور بررسی و تأیید تراریختی، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز برای تکثیر ژن‌های *etr1-1* و *nptII* انجام گردید. از نرم‌افزار AlleleID (ویرایش ۵/۷) جهت طراحی آغازگرهای مناسب رفت‌وبرگشت استفاده شد (جدول ۱). باکتری‌های حاوی پلاسمید PBEO210 به‌عنوان کنترل مثبت و گل‌های سرخ غیرتراریخته به‌عنوان کنترل منفی جهت استفاده در واکنش RT-PCR مورد ارزیابی قرار گرفتند. شرایط PCR شامل ۹۵ درجه به‌مدت ۲ دقیقه، ۹۴ درجه به‌مدت ۳۰ ثانیه، ۵۹ و ۶/۵۷ درجه به‌ترتیب برای ژن‌های *nptII* و *etr1-1* به‌مدت ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه به‌مدت ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه به‌مدت ۷ دقیقه در ۳۵ سیکل بود. برای بررسی تولیدات تکثیر شده از الکتروفورز افقی (Bio-Rad) بر روی ژل آگارز ۱ درصد به‌مدت یک ساعت با ولتاژ ثابت ۸۰ ولت استفاده شد. سپس از ژل حاصل در حضور تابش UV با استفاده دستگاه ژل داگ عکس‌برداری گردید.

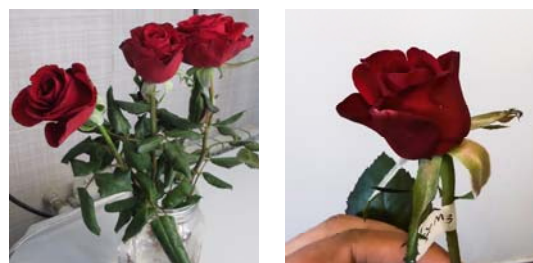
جدول ۱- مشخصات پرایمرهای به‌کار رفته برای تأیید تراریختی

پرایمر	توالی
	Fw5'-GTGCCAACTGGGAGTCATTT-3'
<i>etr1-1</i>	Rv5'-CACACGTCCATGAAGACCAC-3'
	Fw5'-TGAATGAACTGCAGGACGAG-3'
<i>nptII</i>	Rv5'-AATATCACGGGTAGCCAACG-3'

تعیین لاین ماندگار: دراین راستا طول عمر گل‌های شاخه بریده لاین‌های تراریخته بدون اعمال هیچ‌گونه تیمار پس از برداشت، مورد بررسی قرارگرفت. لاین ماندگار بر مبنای هدف دست‌ورزی ژنتیکی انجام شده، لاینی است که ضمن

آزمایش اول: تأیید مولکولی لاین‌های تراریخته و بررسی فیزیولوژیک به‌منظور انتخاب لاین ماندگار

تأیید مولکولی لاین‌ها: بدین منظور، ابتدا استخراج DNA طبق دستورالعمل کیت GABIT (Genetics and Agricultural Biotechnology Institute of Tabarestan) با شماره ثبت اختراع ۸۷۸۴۷ انجام گردید. بر این اساس ۱۰ میلی‌گرم از بافت گلبرگ در هاون به کمک نیتروژن مایع کاملاً آسیاب شده و به تیوب‌های استریل انتقال داده شد. سپس مطابق با پروتکل، فرایند استخراج DNA انجام گردید.



شکل ۱- الف) گل سرخ ترا ریخته شاخه بریده (*Rosa hybrida L.*) در مرحله غنچه تجاری، ب) در روز دهم انبارمانی در تیمار شاهد

به‌طور خلاصه، ابتدا بافر لیزکننده اضافه گردید. در ادامه نمونه‌ها در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه و سپس سانتریفیوژ گردیدند. پس از اتمام سانتریفیوژ محلول رویی به نانوستون منتقل شد، سپس در ادامه بافر اتصال اضافه و به‌شدت مخلوط شد تا به‌طور کامل نانو ذرات در محلول پخش شوند. سپس سانتریفیوژ انجام گردید و فاز رویی دور ریخته شد. در ادامه بافر شستشو به نانو ذرات اضافه و خوب مخلوط گردید. سپس بافر جداکننده به نانو ذرات اضافه گردید به‌طوری که نانوستون در آن به‌طور کامل معلق شده و سپس تیوب در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. در ادامه با استفاده از یک آهن‌ربای خارجی، نانوستون بی‌حرکت می‌گردد و فاز رویی که حاوی DNA بود، جمع‌آوری و به تیوب‌های استریل جدید منتقل و در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. برای بررسی

حفظ کلیه صفات فیزیولوژیک و مورفولوژیک رقم اولیه طول عمر بیشتری داشته باشد.

طول عمر گل: عمر گلدانی از زمان برداشت گل تا ظهور یکی از علائم پیری در گل اعم از خمیدگی گردن، ریزش گلبرگ‌ها، سیاه‌شدگی و از دست دادن تورژسانس گلبرگ-ها با واحد روز بیان می‌شود.

مراحل نمو و بررسی علائم پیری (ریزش، بدرنگی و خشک‌شدگی گلبرگ) از دیگر صفات مورد ارزیابی در طول دوره ماندگاری گل‌های شاخه بریده بودند.

قطر گل: قطر یا درشتی گل یکی از صفات تعیین‌کننده کیفیت ظاهری گل است که با عمر پس از برداشت گل نیز مرتبط است. ارزیابی قطر گل توسط کولیس دیجیتال مورد

ارزیابی قرارگرفت.

تعیین نسبت روابط آبی در گل: بدین منظور از گلبرگ‌ها، دیسک‌هایی با اندازه یکسان تهیه شد و میزان وزن تر و خشک دیسک‌های گلبرگی با استفاده از ترازوی Sartorius analytic A200S ساخت کشور آلمان به فاصله زمانی دو روز در میان در طول دوره ماندگاری گل‌های شاخه بریده یادداشت‌برداری شد. به‌منظور اندازه‌گیری وزن خشک، نمونه‌ها به مدت ۲ ساعت در دمای ۸۰ درجه‌ی سانتی-گراد در آون قرار داده شدند تا زمانی که تغییر وزنی مشاهده نشد.



شکل ۲- لاین‌های گل سرخ تراریخته و شاهد. به‌منظور بررسی طول عمر، شاخه‌های گل با ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر ۸-هیدروکسی کونینولین سولفات همراه با ساکارز ۴ درصد تیمار شدند. L1، لاین شاهد، L2-L8، به‌ترتیب لاین‌های تراریخته می‌باشند.

میزان وزن تر و خشک شاخه‌ها در روز پایانی طول عمر گل محاسبه گردید. به‌منظور اندازه‌گیری وزن خشک، نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۸۰ درجه‌ی سانتی‌گراد در آون قرار داده شدند. در ادامه محتوای آب در هر دو اندازه‌گیری براساس وزن‌تر اولیه (FW) و وزن خشک (DW) برحسب درصد تعیین گردید (۹).

$$\text{درصد محتوای آب} = [(FW - DW) / FW \times 100]$$

در ادامه صفت افت وزن ساقه بر مبنای وزن‌تر اولیه، ارزیابی شد.

آزمایش دوم: سنجش محتوای اتیلن درونی تحت شرایط

اتم‌سفر تعدیل یافته مجهول: بدین منظور گل‌های شاخه بریده در داخل بطری‌های پلاستیکی به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر تحت تیمارهای جیبرلین (صفر و 80 mg l^{-1}) یا اتیلن (صفر و $1 \text{ } \mu\text{l l}^{-1}$) قرارگرفتند. لازم به ذکر است که محلول نگه‌دارنده پایه، آب مقطر در نظر گرفته شده است. سپس گل‌ها درون کیسه‌های پلی‌اتیلنی با ضخامت ۶۰ میکرومتر که نفوذپذیری آنها نسبت به اکسیژن و بخار آب به ترتیب $7800 \text{ cm}^3 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{day}^{-1} \cdot \text{atm}^{-1}$ و $\text{g} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{day}^{-1} \cdot \text{atm}^{-1}$ در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد می‌باشند، بسته‌بندی شدند. تیمار جیبرلین به‌صورت محلول نگه‌دارنده مورد استفاده قرار گرفت و برای اعمال تیمار اتیلن از تزریق گاز

نمودار کالیبراسیون مربوطه رسم و معادله خط حاصله به دست آمد (شکل ۴).

تجزیه و تحلیل آماری: داده‌های حاصل توسط نرم‌افزار SAS (ویرایش ۹/۱) بر اساس واریانس (ANOVA یک-طرفه) در قالب طرح کاملاً تصادفی مورد تجزیه قرار گرفتند و همچنین مقایسه میانگین با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام شد. قابل ذکر است کلیه آزمایش‌ها در سه تکرار انجام و نتایج با استفاده از نرم‌افزار Excel رسم گردید.

نتایج

نتایج آزمایش اول: تأیید مولکولی لاین‌ها: واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *etr1-1* و *nptII* به ترتیب منجر به تکثیر قطعه‌ای به طول تقریبی ۷۸۸ و ۵۱۵ bp گردید که وجود باندهای درخشان، حاکی از تراریخته شدن نمونه‌های گیاهی می‌باشد (شکل ۵ الف و ب). در این گیاهچه‌ها، تکثیر نوار ۷۸۸ bp صورت گرفت که با نوار تکثیر شده با آگروباکتریوم حامل پلاسمید PBE0210 حاوی ژن *etr1-1* به‌عنوان شاهد مثبت مطابقت داشت. در گیاهان شاهد هیچ‌گونه باندهای تکثیر نشد که نشان‌دهنده عدم حضور تراژن در ژنوم این گیاهان بود.

طول عمر گل: نتایج تجزیه واریانس داده‌های حاصل از طرح کاملاً تصادفی، نشان داد که طول عمر پس از برداشت گل در لاین‌های مختلف تفاوت معنی‌داری در سطح یک درصد داشتند (جدول ۲)، به طوری که در طی ۱۵ روز مشاهده بصری گل‌ها در دمای اتاق (25 ± 5 °C)، لاین ۶ بیشترین ماندگاری را با میانگین ۱۴/۳۳ روز و لاین ۱ کمترین ماندگاری را با میانگین ۸/۶۶ روز داشت (شکل ۶).

پیری گل‌های شاخه بریده با پژمردگی، ریزش و تغییر رنگ گلبرگ‌ها همراه بود. این علائم در لاین‌های مختلف در

خالص به داخل کیسه‌ها توسط سرنگ بهره گرفته شد. گل‌های شاخه بریده به مدت ۲۴ ساعت در بسته‌بندی‌ها نگهداری شده، سپس گل‌ها از بسته خارج شدند و برای اندازه‌گیری محتوای اتیلن درونی در دو مرحله نمودی غنچه و نیمه باز، گل‌ها به مدت ۲ ساعت درون کیسه‌های پلی‌اتیلنی با شرایط سابق قرار گرفتند و از هوای داخل بسته نمونه‌گیری شد. لازم به ذکر است به منظور بررسی دقیق‌تر هم‌زمان با مرحله نمودی نیمه باز در لاین شاهد، محتوای اتیلن درونی بسته‌های حاوی لاین ماندگار که همچنان در مرحله غنچه تجاری بودند، نمونه‌برداری شدند. لذا برای لاین تراریخته ۳ مرحله اندازه‌گیری لحاظ شد. نمونه‌ها درون لوله‌های ونوجکت خلأ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد تا زمان اندازه‌گیری، نگهداری شدند. در ادامه با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی گازی (GC) مدل Agilent 6890N مجهز به آشکارگر FID و ستون موئین (طول ۵۰ متر، قطر ۵۳/۰ میلی‌متر) میزان اتیلن اندازه‌گیری شد. با توجه به تنظیمات دستگاه از دمای بخش تزریق، ستون و آشکارگر به ترتیب ۱۸۰، ۲۰۰ و ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد و گاز هلیوم به‌عنوان گاز حامل با سرعت ۵/۶ میلی‌لیتر بر دقیقه استفاده گردید. محاسبه میزان اتیلن با استفاده از فرمول زیر انجام گرفت:

$$EP (\text{nl g}^{-1} \text{FW h}^{-1}) = E \times V \times 60 / \text{FW} \times h$$

EP: مقدار اتیلن تولیدی E: مقدار اتیلن شناسایی شده

توسط بافت‌های گیاهی توسط دستگاه کروماتوگرافی گازی (میکرولیتر در لیتر)

V: حجم کیسه پلی‌اتیلنی h: مدت زمان قرار دادن نمونه‌ها (لیتر) در کیسه پلی‌اتیلنی (ساعت)

FW: وزن تر شاخه گل (گرم)

به‌منظور تهیه نمودار کالیبراسیون و معادله خط مربوطه، غلظت‌های ۰/۱، ۱، ۱۰، ۲۰ و ۳۰ میکرولیتر در لیتر اتیلن به دستگاه کروماتوگرافی گازی تزریق گردید و سپس با استفاده از مساحت سطح زیر منحنی استاندارد

روز عامل دوم بود و اثر متقابل لاین‌های مختلف و روزهای مورد بررسی تفاوتی را نشان ندادند (جدول ۳). شکل ۸ (ب) بیانگر این مطلب می‌باشد که اغلب لاین‌های تراریخته، مراحل نموی شکوفایی را به‌خوبی طی کرده و حتی برخی از لاین‌ها قادر بوده‌اند در طی مدت زمان طول عمر تجاری خود، بدون نشان دادن علائم پیری به‌طور کامل شکوفا شوند. این در حالی است که لاین شاهد قادر به طی مرحله کامل شکوفایی در مدت زمان ماندگاری خود نبوده و پس از گذر از مرحله نیمه باز وارد فاز پیری شده و علائم پیری را به‌صورت ریزش گلبرگ نشان داد که این خود دلیلی بر کامل نشدن مرحله باز شدن گل و شکوفایی کامل می‌باشد. در تضاد با اغلب لاین‌های تراریخته، مشاهده شد که لاین ۶ در مرحله نموی غنچه تجاری مانده و روند شکوفایی طبیعی را طی نکرده است (شکل ۸، الف).

قطر گل: نتایج به‌دست آمده از تجزیه واریانس داده‌های مربوط به قطر گل همچون داده‌های مربوط به مراحل نموی گل قابل تفسیر می‌باشد و نشان داد که اختلاف معنی‌داری در سطح یک درصد بین لاین‌های مختلف و زمان وجود دارد، در حالی که اثر متقابل لاین‌های مختلف و زمان تفاوتی را نشان ندادند (جدول ۳).

مدت ۱۵ روز مشاهده به‌صورت متفاوت بروز نمود و از این لحاظ اختلاف معنی‌داری در سطح یک درصد بین لاین‌ها مشاهده گردید. در عین حال شدت بروز بدرنگی و در ادامه خشکی گلبرگ در بین لاین‌های تراریخته متفاوت بود (جدول ۲). باتوجه به مشاهدات علائم پیری در لاین‌های مورد بررسی مشخص شد که این علائم در لاین شاهد به‌صورت ریزش گلبرگ‌ها بروز کرده و در لاین‌های تراریخته به‌صورت بدرنگی و تغییر رنگ در گلبرگ‌ها و خشکی تدریجی از لبه آنها مشاهده گردید. اگرچه این در حالی است که روز پایانی اندازه‌گیری‌ها بر اساس پایان طول عمر تجاری گل در تمامی لاین‌ها بوده و لاین ماندگار (L6) بدون رخداد هیچ‌یک از علائم ریزش یا بدرنگی و خشکی تدریجی، به‌طور ناگهانی خشک شد و به‌نظر می‌رسد در صورت فراهم بودن سایر شرایط مطلوب برای ماندگاری گل اعم از دمای کمتر و رطوبت بهتر یا شرایط بهینه محلول نگه‌دارنده این گل می‌توانسته طول عمر بیشتری نیز داشته باشد (شکل ۷).

نتایج به‌دست آمده از تجزیه واریانس داده‌های مربوط به مراحل نموی گل نشان داد که اختلاف معنی‌داری در سطح یک درصد بین لاین‌های مختلف و زمان وجود دارد، در این بررسی لاین، عامل اول طرح فاکتوریل (در قالب طرح کاملاً تصادفی) در نظر گرفته شد و مدت زمان بر اساس



ج

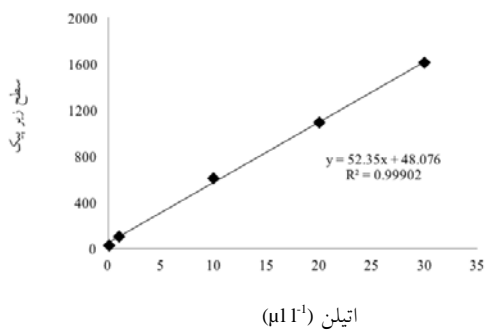


ب

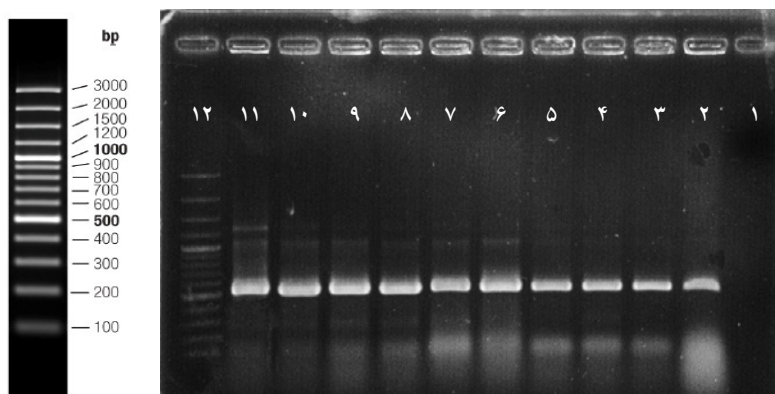


الف

شکل ۳- نحوه نمونه‌گیری اتیلن پس از ۲ ساعت و انتقال به ونوجکت‌های خلأ، به‌ترتیب مراحل انجام شده (الف، ب و ج)

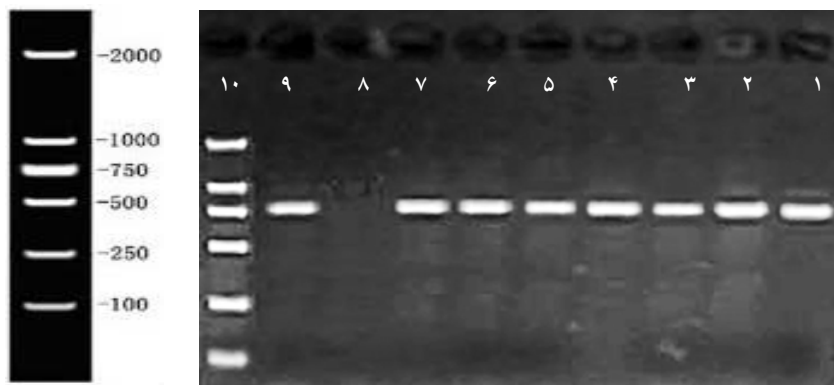


(الف)



شکل ۴- نمودار استاندارد اتیلین

(ب)

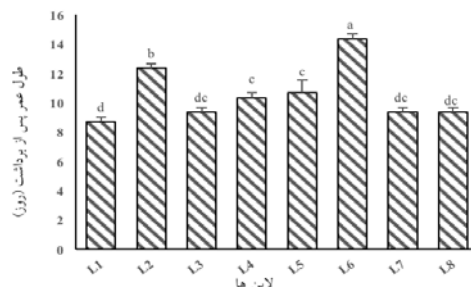


شکل ۵- واکنش PCR جهت تکثیر ژن *nptII* (الف) و *etr1-1* (ب). (الف) چاهک ۱۲: لدر ۳۰۰۰ جفت بازی ساخت شرکت Thermo Scientific، چاهک ۱۱: کنترل مثبت (پلاسمید pBEO210)، چاهک ۱: کنترل منفی (گیاه شاهد)، چاهک ۲ تا ۱۰ به ترتیب شامل لاین‌های تراریخته L2-L8 می‌باشد (ژل آگارز ۱٪ و میزان لود نمونه ۵ میکرولیتر). (ب) چاهک ۱۰: لدر ۲۰۰۰ D ساخت شرکت Thermo Scientific، چاهک ۹: کنترل مثبت (پلاسمید pBEO210)، چاهک ۸: کنترل منفی (گیاه شاهد)، چاهک ۱ تا ۷ به ترتیب شامل لاین‌های تراریخته L2-L8 می‌باشد (ژل آگارز ۱٪ و میزان لود نمونه ۵ میکرولیتر)

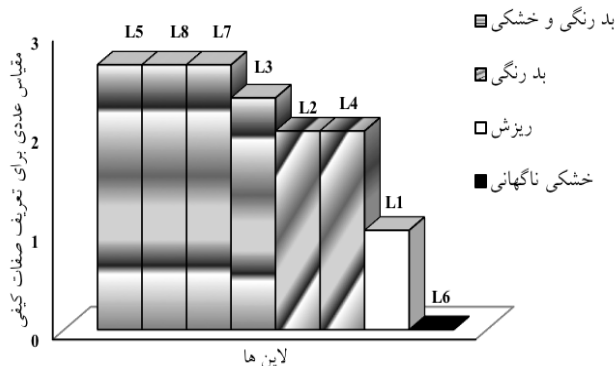
جدول ۲- نتایج تجزیه واریانس داده‌های طول عمر پس از برداشت لاین‌های گل سرخ شاخه بریده

میانگین مربعات		درجه آزادی	منابع تغییر
علائم پیری	طول عمر پس از برداشت	۷	لاین‌های گل سرخ
۷۴/۲**	۹۵/۱۰**	۱۶	خطا
۱۷/۰	۵۸/۰	-	ضریب تغییرات
۲۹/۲۱	۲۵/۷		

ns، **، * به ترتیب نشان‌دهنده معنی‌دار بودن اختلاف در سطح پنج، یک درصد و عدم معنی‌داری می‌باشد



شکل ۶- طول عمر پس از برداشت. L1، لاین شاهد، L2-L8، به ترتیب لاین‌های تراریخته می‌باشند (حروف غیرمشترک معرف تفاوت معنی‌دار در سطح پنج درصد و خطوط عمودی نشان‌دهنده خطای استاندارد از میانگین (n=4) است)

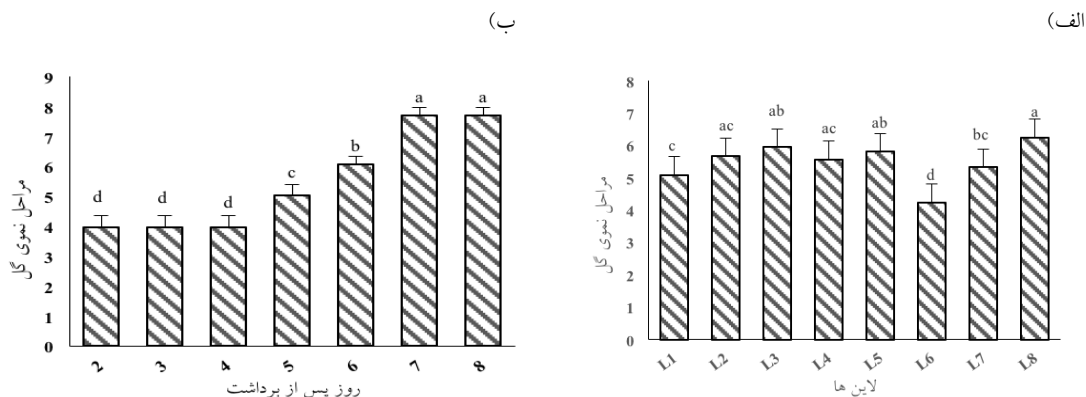


شکل ۷- بروز علائم پیری، L1، لاین شاهد، L2-L8، به ترتیب لاین‌های تراریخته می‌باشند، اعداد صفر، ۱، ۲ و ۳ در محور عمودی به ترتیب مقیاس عددی برای تعریف صفات کیفی: خشکی ناگهانی، ریزش، بدرنگی و بدرنگی و خشکی می‌باشند

جدول ۳- نتایج تجزیه واریانس داده‌های قطر گل در لاین‌های گل سرخ شاخه بریده

میانگین مربعات		درجه آزادی	منابع تغییر
مراحل نموی گل	قطر گل (سانتی‌متر)	۷	لاین‌های گل سرخ
۹۸/۷**	۱۴/۵**	۶	زمان (روز)
۷۳/۶۹**	۷۸/۹۱**	۴۲	لاین‌های گل سرخ × زمان
۰/۳۴ ^{ns}	۰/۴۰ ^{ns}	۱۱۲	خطا
۰۶/۱	۶۲/۰	-	ضریب تغییرات
۱۸/۸۱	۱۲/۴۱		

ns، **، * به ترتیب نشان‌دهنده معنی‌دار بودن اختلاف در سطح پنج، یک درصد و عدم معنی‌داری می‌باشد.

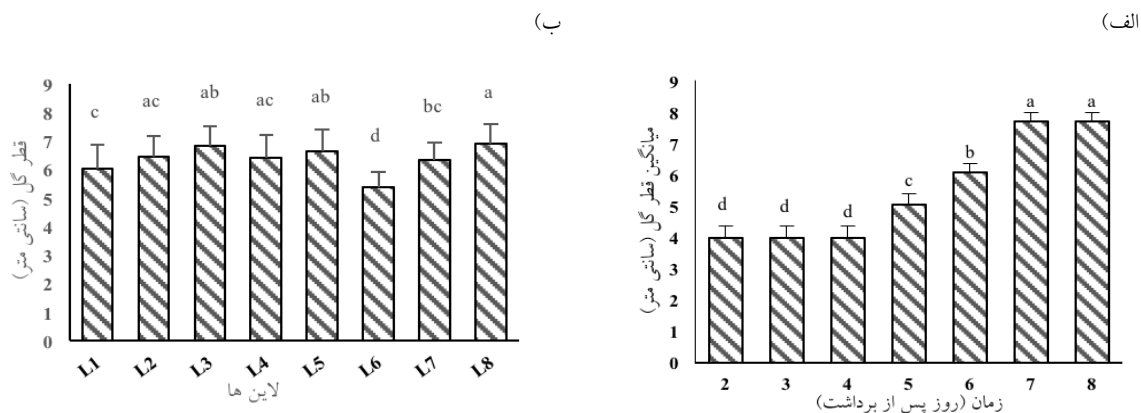


شکل ۸- الف) میانگین مراحل نمو گل‌ها در لاین‌های مختلف، ب) مراحل نمو گل‌ها تا روز هشتم پس از برداشت، L1، لاین شاهد، L2-L8. به ترتیب لاین‌های ترا ریخته می‌باشند (حروف غیرمشترک معرف تفاوت معنی‌دار در سطح پنج درصد و خطوط عمودی نشان‌دهنده خطای استاندارد از میانگین (n=4) است)

اختلاف معنی‌دار بین لاین‌هاست. همچنین نتایج این جدول نشان می‌دهد که افت وزن شاخه بر مبنای وزن‌تر اولیه آنها در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار گردید و به نظر می‌رسد تنها بین دو لاین ترا ریخته ۷ و ۸ از جهت افت وزن نسبت به مرحله اولیه غنچه تفاوت وجود دارد، اگرچه در مقایسه با سایر لاین‌ها و حتی لاین شاهد این افت وزن در مورد لاین ۷ و همین‌طور لاین ۸ معنی‌دار نیست (شکل ۱۰).

باتوجه به مقایسه میانگین‌ها، گل‌ها در روز هفتم پس از برداشت دارای بیشترین قطر بوده و تغییرات قطر تا روز پایانی اندازه‌گیری ثابت بوده است. این در حالی است که شروع شکوفایی گل‌ها در کلیه لاین‌ها تقریباً از روز چهارم رخ داده و در روز هفتم به اوج خود رسیده است. (شکل ۹، الف). همچنین، کمترین میزان قطر گل در لاین ۶ مشاهده گردید (شکل ۹، ب).

تعیین نسبت روابط آبی در گل: نتایج جدول ۴ در مورد صفت وزن‌تر و خشک شاخه‌های گل سرخ لاین‌های مختلف، در مرحله نهایی نمو گل، بیانگر عدم وجود

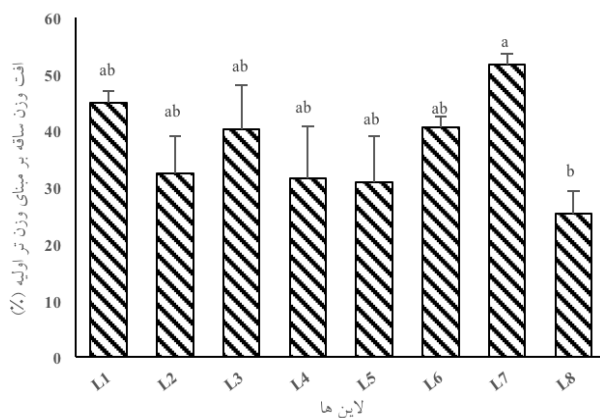


شکل ۹- الف) میانگین قطر گل‌ها تا روز هشتم پس از برداشت، ب) قطر گل‌ها در مدت ۸ روز در لاین‌های مختلف. L1، لاین شاهد، L2-L8. به ترتیب لاین‌های ترا ریخته می‌باشند (حروف غیرمشترک معرف تفاوت معنی‌دار در سطح پنج درصد و خطوط عمودی نشان‌دهنده خطای استاندارد از میانگین (n=4) است)

جدول ۴- نتایج تجزیه واریانس داده‌های وزن‌تر و خشک شاخه‌ها در مرحله نهایی نمو در لاین‌های گل سرخ شاخه بریده

میانگین مربعات				
افت وزن شاخه‌ها بر مبنای وزن‌تر اولیه آنها	وزن خشک شاخه‌ها در مرحله نهایی نمو گل	وزن‌تر شاخه‌ها در مرحله نهایی نمو گل	درجه آزادی	منابع تغییر
(%)	(گرم)	(گرم)		
۱۹۸/۳۳*	۰/۱۰۹ ^{ns}	۲۶/۳ ^{ns}	۷	لاین‌های گل سرخ
۸۴/۱۱۳	۵۲/۰	۲/۲۴	۱۶	خطا
۲۴/۲۹	۲۰/۷۷	۹۴/۱۷	-	ضریب تغییرات

*، **، ns به ترتیب نشان‌دهنده معنی‌دار بودن اختلاف در سطح پنج، یک درصد و عدم معنی‌داری می‌باشد.



شکل ۱۰- افت وزن شاخه‌ها بر مبنای وزن‌تر اولیه آنها. L1، لاین شاهد، L2-L8، به ترتیب لاین‌های تراریخته می‌باشند (حروف غیرمشترک معرف تفاوت معنی‌دار در سطح پنج درصد و خطوط عمودی نشان‌دهنده خطای استاندارد از میانگین (n=۴) است)

جدول ۵- نتایج تجزیه واریانس داده‌های محتوای نسبی آب دیسک گلبرگ در لاین‌های گل سرخ شاخه بریده

میانگین مربعات		
محتوای نسبی آب دیسک گلبرگ (%)	درجه آزادی	منابع تغییر
۹۴/۱۶ ^{ns}	۷	لاین‌های گل سرخ
۱۹۳/۶۳ ^{ns}	۲	زمان (روز)
۷۱/۰۸ ^{ns}	۱۴	لاین‌های گل سرخ × زمان
۶۲/۴۹	۴۸	خطا
۳۳/۲۲	-	ضریب تغییرات

*، **، ns به ترتیب نشان‌دهنده معنی‌دار بودن اختلاف در سطح پنج، یک درصد و عدم معنی‌داری می‌باشد.

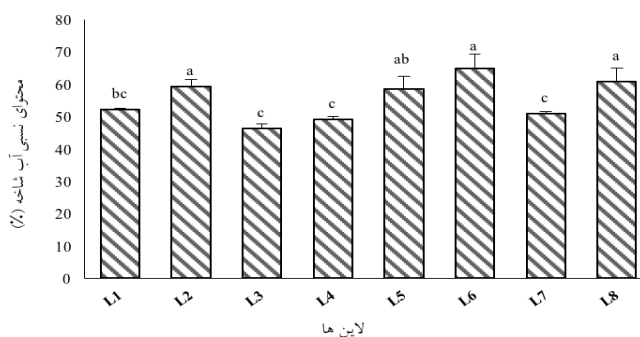
معنی‌داری در سطح یک درصد دارند. به طوری که لاین ۶ دارای بالاترین محتوای نسبی آب (۸۸/۶۴ درصد) نسبت به سایر لاین‌ها می‌باشد (شکل ۱۱). طبق شکل ۱۱ لاین ۶ با لاین‌های ۳، ۴، ۷ و شاهد تفاوت معنی‌داری دارد. همچنین بین لاین‌های ۶، ۲، ۵ و ۸ تفاوت آماری معنی‌داری مشاهده نشد.

نتایج داده‌های مربوط به محتوای نسبی آب دیسک گلبرگ (جدول ۵) بیانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح لاین‌ها، زمان و همچنین اثر متقابل لاین و زمان می‌باشد. طبق نتایج جدول ۶، محتوای نسبی آب شاخه‌ها برحسب درصد بین لاین‌ها، در مرحله نهایی نمو اختلاف

جدول ۶- نتایج تجزیه واریانس داده‌های محتوای نسبی آب شاخه در لاین‌های گل سرخ شاخه بریده

میانگین مربعات	درجه آزادی	منابع تغییر
محتوای نسبی آب شاخه‌ها (%)		
۲۷۹/۴۴**	۷	لاین‌های گل سرخ
۲۲/۰۷	۱۶	خطا
۹۷/۸	-	ضریب تغییرات

ns، *، ** و *** به ترتیب نشان‌دهنده معنی‌دار بودن اختلاف در سطح پنج، یک درصد و عدم معنی‌داری می‌باشد



شکل ۱۱- درصد محتوای نسبی آب شاخه‌ها در لاین‌های مختلف. L1، لاین شاهد، L2-L8، به ترتیب لاین‌های ترا ریخته می‌باشند (حروف غیر مشترک معرف تفاوت معنی‌دار در سطح پنج درصد و خطوط عمودی نشان‌دهنده خطای استاندارد از میانگین (n=۴) است)

نتایج شکل ۱۲ نشان می‌دهد که تیمار اتیلن در تمامی مراحل نمو چه در لاین ماندگار و چه در لاین شاهد باعث افزایش و کاربرد جیبرلین سبب کاهش محتوای اتیلن درونی می‌گردد (شکل ۱۲). همچنین نتایج ارائه شده در شکل ۱۲ گویای تأثیر معنی‌دار جیبرلین و اتیلن به- ترتیب در کاهش و افزایش غلظت اتیلن درونی در گل- های شاخه بریده (لاین شاهد و ماندگار) می‌باشد. مطابق با شکل ۱۲ محتوای اتیلن درونی در گل‌هایی که درون

نتایج آزمایش دوم:

محتوای اتیلن درونی: نتایج جدول ۷ بیانگر تفاوت معنی‌دار در محتوای اتیلن درونی بین اثرات متقابل سه‌گانه لاین، تیمار و زمان می‌باشد. همچنین شکل ۱۲ نشان می‌دهد که محتوای اتیلن درونی در لاین شاهد در تیمار با یک میکرولیتر در لیتر اتیلن ($1 \mu\text{l l}^{-1}$) در مرحله نیمه باز بیشترین مقدار و در لاین ماندگار در مرحله غنچه تجاری در تیمار با جیبرلین (80 mg l^{-1}) کمترین مقدار است.

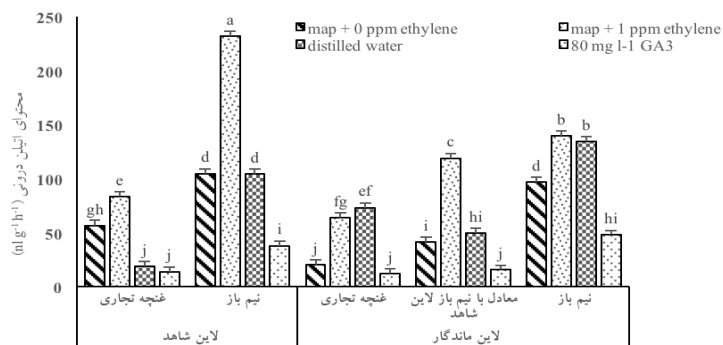
محتوای اتیلن درونی در مرحله نیمه باز در لاین شاهد در سایر تیمارها نسبت به مرحله معادل با نیمه باز و نیمه باز در لاین ماندگار افزایش قابل ملاحظه‌ای را نشان می‌دهد.

کیسه‌های پلی‌اتیلنی بدون تزریق گاز اتیلن تحت شرایط اتمسفر تعدیل یافته مجهول (صفر $\mu\text{l l}^{-1}$) قرار گرفتند. در مقایسه با گیاهانی که تنها در آب مقطر قرار داشتند (صفر mg l^{-1})، در تمامی مراحل نمو بیشتر بود. علاوه بر این،

جدول ۷- نتایج تجزیه واریانس داده‌های محتوای اتیلن درونی در لاین‌های گل سرخ شاخه بریده

میانگین مربعات	درجه آزادی	منابع تغییر
محتوای اتیلن درونی ($\text{nl g}^{-1} \text{FW h}^{-1}$)		
۸۲۰/۷۹**	۱	لاین‌های گل سرخ
۲۷۷۲۲/۹۷**	۳	تیمار
۲۸۸۳۶/۰۶**	۲	زمان
۵۱۷۹/۳۴**	۳	لاین‌های گل سرخ × تیمار
۴۹۵/۹۹**	۱	لاین‌های گل سرخ × زمان
۲۵۸۲/۶۶**	۶	تیمار × زمان
۱۵۳۳/۲۴**	۳	لاین‌های گل سرخ × تیمار × زمان
۵۸/۱۰	۳۹	خطا
۳۲/۱۰	-	ضریب تغییرات

، * و * به ترتیب نشان دهنده معنی دار بودن اختلاف در سطح پنج، یک درصد و عدم معنی داری می‌باشد.



شکل ۱۲- محتوای اتیلن درونی در لاین‌های مختلف (حروف غیرمشترک معرف تفاوت معنی دار در سطح پنج درصد و خطوط عمودی نشان‌دهنده خطای استاندارد از میانگین ($n=4$) است)

عمر گل‌ها می‌توان حساسیت به اتیلن را نام برد (۶ و ۷). گرچه میزان حساسیت به اتیلن در ارقام مختلف گل سرخ متفاوت گزارش گردیده است (۴). از بین پذیرنده‌های هورمون اتیلن به نظر می‌رسد پذیرنده ETR1 جهت دست‌ورزی ژنتیکی به‌منظور افزایش ماندگاری گل‌های

بحث و نتیجه‌گیری

اغلب ارقام تجاری شاخه بریده‌ی گل سرخ در شرایط بهینه به مدت ۸ روز از عمر گلدانی برخوردار می‌باشند، این در حالی است که بسیاری از مصرف‌کنندگان، ارقام دارای طول عمر طولانی را می‌پسندند. از دلایل عمده کوتاهی طول

بوده باشد. نکته حائز اهمیت دیگر در این بررسی رخداد متفاوت مراحل شکوفایی گل بوده و دیده شد که میزان شکوفایی لاین ۶ در مقایسه با سایر لاین‌ها از سرعت کمتری برخوردار بوده است که خود توجیهی بر دلیل افزایش طول عمر گل در این لاین می‌باشد. به نظر می‌رسد لاین تراریخته ۶ با تأخیر در زمانبندی رسیدن به مرحله اوج شکوفایی گل و مکانیسم‌های مرتبط با آنکه احتمالاً وابسته به نحوه پاسخگویی به اتیلن است، توانسته است مدت زمان لازم برای شکوفایی گل را افزایش دهد لذا در ادامه فرایند پیری در این گل دیرتر رخ داده است (۸ و ۱۰). از آنجایی که گذر لاین ماندگار از مرحله نموی غنچه تجاری به مرحله بعد آنقدر تأخیر داشت که حتی می‌توان گفت روند شکوفایی طبیعی را طی نکرده است، به نظر می‌رسد اگر شرایط نگهداری مطلوب در خصوص این لاین فراهم می‌شد، چه بسا شاهد طول عمر بیشتری بودیم که نیازمند بررسی‌های دقیقتری می‌باشد. اگرچه شایان توجه است گل‌های این لاین بر روی بوته مادری فرایند شکوفایی طبیعی را طی نمودند. با توجه به این‌که در برخی منابع ذکر شده است که اختلال در تولید و دریافت اتیلن می‌تواند فرایند شکوفایی گل را مختل نماید، اما بررسی این رخداد نشان می‌دهد که ژن انتقال یافته تأثیری در این مورد نداشته و گل‌ها بر روی پایه مادری به نظر کامل قادر به شکوفایی بوده‌اند. از دیگر سو موفقیت چشمگیر دیگر در فرایند انتقال ژن، عدم تأثیر بر روی سایر صفات فیزیولوژیک گل بوده که بین لاین‌ها در مورد وزن تر و خشک شاخه‌ها در پایان طول عمر تجاری آنها اختلافی مشاهده نمی‌شود و مراحل نموی تا آخرین مرحله روند طبیعی خود را داشته است. گرچه تفاوت معنی‌دار افت وزن شاخه بر مبنای وزن‌تر اولیه بین لاین‌های ۷ و ۸، احتمالاً ناشی از عوامل محیطی و یا کیفیت اولیه گل‌ها بوده و در کل می‌توان گفت هیچ‌گونه ارتباط منفی بین فرایند انتقال ژن و تغییرات حاصله در وزن گل‌ها مشاهده نمی‌شود. همچنین محتوای نسبی آب شاخه یکی از

حساس به اتیلن ضروری و کافی باشد (۸ و ۱۰). بیان‌شده که ماندگاری گیاهان تراریخته با ژن *etr1-1* همچون *Dianthus* و *Campanula*، *Kalanchoe* برداشت نسبت به گیاهان شاهد افزایش نشان داده است (۸). در عین حال تراریختی گیاهان *Nemesia strumosa* و *Torenia fournieri* با دیگر پذیرنده‌های اتیلن نیز انجام شده، اگرچه هر دو گیاه مذکور نسبت به اتیلن واکنش کمتری نشان داده‌اند، اما این کاهش در مقایسه با گیاهان تراریخته با ژن *etr1-1* چشمگیر نبوده است (۴ و ۸). نتایج آزمایشات حاصل از این پژوهش نیز می‌تواند تأیید دیگری بر این بررسی‌ها باشد، به گونه‌ای که طول عمر لاین ماندگار (L6) که حاوی ژن جهش یافته *etr1* می‌باشد، در شرایط پس از برداشت در دمای اتاق به‌طور میانگین به ۱۴/۳۳ روز رسید. این در حالی است که طول عمر لاین شاهد در همان شرایط به‌طور میانگین ۸/۶۶ روز بوده که توانسته افزایشی در حدود ۶ روز در ماندگاری گل‌ها نشان دهد. همچنین به نظر می‌رسد در صورت فراهم بودن سایر شرایط بهینه اعم از دمای کمتر و رطوبت بهینه، گل‌های تراریخته می‌توانستند طول عمر بیشتری نیز داشته باشند (داده‌ها ارائه نشده است). علائم شاخص پیری گل در رقم‌های مختلف گل سرخ معمولاً پژمردگی، ریزش و تغییر رنگ گلبرگ‌ها بیان شده است (۸ و ۱۰). به نظر می‌رسد فرایند تراریختی سبب بروز علائم متفاوت در لاین‌های مختلف گل سرخ به هنگام بروز رخداد پیری شده است. احتمال می‌رود ریزش گلبرگ‌های گل سرخ که در لاین شاهد مشاهده شده مرتبط با واکنش گل در مرحله پیری نسبت به اتیلن می‌باشد و به نظر می‌رسد انتقال ژن *etr1-1* با توجه به ایجاد کاهش حساسیت نسبت به اتیلن توانسته است فرایند ریزش را متوقف نماید. به طوری که لاین ماندگار در پایان طول عمر تجاری گل، بدون رخداد هیچ‌یک از علائم ریزش یا بدرنگی و خشکی تدریجی، به‌طور ناگهانی دچار خشکی گردید که می‌تواند به دلیل عدم امکان جذب آب و مواد غذایی در طی شرایط انبارمانی آن

پیری، ریزش و خمیدگی کردن در گل‌های شاخه بریده *Chrysanthemum*، *Gerbera*، *Carnation* و *Rose* با توجه به اثرات آنتاگونیستی آن با اتیلن شده است (۴ و ۶). نتایج حاصل از این پژوهش نیز مؤید این نکته است که میزان تولید اتیلن با روند باز شدن گل ارتباط مستقیم داشته است، اگرچه در هر دو مرحله غنچه و نیمه باز در لاین ماندگار به‌طور چشمگیری در مقایسه با لاین شاهد خواه در تیمار با اتیلن بیرونی و خواه جیبرلین کاهش نشان داده است. همان‌طور که اشاره شد انتقال ژن *etr1-1* به گل استکانی سبب کاهش حساسیت به اتیلن گردیده و طول عمر گل تا دو برابر افزایش پیدا کرده است (۸). در این راستا نتایج حاصل از این پژوهش مؤید این مطلب می‌باشد، لذا می‌توان گفت که در گل‌های حساس به اتیلن همچون گل سرخ، دست‌ورزی ژن جهش یافته *etr1* نقش مؤثری در بهبود و افزایش ماندگاری گل بدون تأثیر بر سایر صفات فیزیولوژیک با استناد به اخلاص ایجاد شده در فرایند درک اتیلن داشته است.

پارامترهای فیزیولوژیکی مهم است که تحت شرایط خشکی باعث محدود شدن رشد و برخی تغییرات فیزیولوژیکی و متابولیکی می‌شود. به عبارت بهتر تعادل آبی فاکتور اصلی تعیین کیفیت و ماندگاری گل‌های شاخه بریده می‌باشد (۸ و ۱۰). به گونه‌ای که افزایش محتوای نسبی آب شاخه در لاین ۶ نسبت به سایرین می‌تواند دلیلی محکم برافزایش ماندگاری در مقایسه با سایر لاین‌ها باشد.

گزارش شده است در گل‌های سرخ هنگامی که گل‌ها در مرحله غنچه هستند، میزان تولید اتیلن کم بوده و به‌تدریج با باز شدن گلبرگ‌ها از خارج به داخل (فرایند شکوفایی) میزان تولید اتیلن افزایش یافته است و در گل‌های کاملاً باز همزمان با پیری میزان تولید اتیلن به حداکثر خود رسیده است (۴ و ۶). این مشاهده، بیانگر یک افزایش شبه فراز گرا در تولید اتیلن در مرحله آخر در گل سرخ به هنگام پیری گلبرگ‌ها می‌باشد و این افزایش در تولید اتیلن، همراه با رخداد بدرنگی، پژمردگی و ریزش برگ‌گشت‌ناپذیر گلبرگ‌هاست (۴ و ۶). این در حالی است که بیان شده کاربرد تیمار جیبرلین منجر به تأخیر در فرایند

منابع

- گرایلو، س.، قاسم‌نژاد، م.، و شیری، م. ع.، ۱۳۹۳. تأثیر تیمار کوتاه مدت سالیسیلیک اسید در به تأخیر انداختن پیری گل‌های شاخه بریده رز (*Rosa hybrida* L.) رقم یلوآیسلند، مجله زیست‌شناسی ایران، جلد ۲۷، شماره ۲، صفحات ۳۰۹-۲۹۹.
- حاتمی، م.، حاتم‌زاده، ع.، و قاسم‌نژاد، م.، ۱۳۹۱. نقش آسکوربیک اسید در کنترل پراکسیده شدن لیپیدها و به تأخیر انداختن پیری در گل‌های بریده رز رقم رویال کلاس، مجله زیست‌شناسی ایران، جلد ۲۵، شماره ۴، صفحات ۶۰۵-۵۹۹.
- Al-Salem, M., and Serek, M., 2017. Expression analysis by RT-PCR of genes involved in ethylene synthesis and signal transduction in miniature roses. *Scientia Horticulturae*, 216, PP: 22-28.
- Iqbal, N., Khan, N. A., Ferrante, A., Trivellini, A., Francini, A., and Khan, M. I. R., 2017. Ethylene role in plant growth, development and senescence: interaction with other phytohormones, *Frontiers in Plant Science*, 8, PP: 1-19.
- Kim, H., Helmbrecht, E. E., Stalans, M. B., Schmitt, C., Patel, N., Wen, C. K., Wang, W., and Binder, B. M., 2011. Ethylene receptor ETHYLENE RECEPTOR1 domain requirements for ethylene responses in Arabidopsis seedlings. *Plant Physiology*, 156, PP: 417-429.
- Ma, N., Ma, C., Liu, Y., Shahid, M., Wang, C., and Gao, J., 2018. Petal senescence: a hormone view, *Journal of Experimental Botany*, PP: 1-14.
- Morgan, P. W., 2011. Another look at interpreting research to manage the effects of ethylene in ambient air. *Crop Science*, 51, PP: 903-913.
- Olsen, A., Lutken, H., Hegelund, J. N., and Muller, R., 2015. Ethylene resistance in flowering ornamental plants—improvements and future perspectives. *Horticulture Research*, 2, PP: 1-9.

9. Palma, M. A., Hall, C. R., and Collart, A., 2011. Repeat buying behavior for ornamental plants: A consumer profile. *Journal of Food Distribution Research*, 42, PP: 67-77.
10. Rani, P., and Singh, N., 2014. Senescence and postharvest studies of cut flowers: A critical Review, *Journal of Tropical Agriculture Science*, 37, PP: 159-201.
11. Schmitzer, V., Veberic, R., Osterc, G., and Stampar, F., 2010. Color and phenolic content changes during flower development in groundcover rose, *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 135, PP: 195-202.
12. Shibuya, K., 2012. Molecular mechanisms of petal senescence in ornamental plants, *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 81, PP: 140-149.
13. Shu, K., Zhou, W., and Yang, W., 2018. APETALA 2-domain-containing transcription factors: focusing on abscisic acid and gibberellins antagonism. *New Phytologist*, 217, PP: 977-983.
14. Sui, S., Luo, J., Liu, D., Ma, J., Men, W., Fan, L., Bai, Y., and Li, M., 2015. Effects of hormone treatments on cut flower opening and senescence in wintersweet (*Chimonanthus praecox*), *Horticultural Science*, 50, PP: 1365-1369.
15. Trivellini, A., Ferrante, A., Vernieri, P., and Serra, G., 2011. Effects of abscisic acid on ethylene biosynthesis and perception in *Hibiscus rosa-sinensis* L. flower development, *Journal of Experimental Botany*, 62, PP: 5437-5452.
16. Yang, S. F., and Hoffman, N. E., 1984. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology*, 35, PP: 155-189.
17. Zaky, A. A., 2013. Effect of pre- and post-harvest treatments on flower longevity of cut rose cv. 'GRAND PRIX'. *Egyptian Journal of Agricultural Research*, 91, PP: 1009-1021.

***ETR1-1*, A suitable candidate for genetic manipulation in rose (*Rosa hybrida* L.) ethylene signal transduction pathway**

Khatami F.¹, Najafi F.¹, Yari F.² and Khavari-Nejad R.A.¹

¹ Dept. of Plant Sciences, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, I.R. of Iran.

² Dept. of Agriculture, Iranian Research Organization for Science and Technology (IROST), Tehran, I.R. of Iran.

Abstract

One of the main factors that limit post-harvest shelf-life is ethylene hormone. Therefore, it has been suggested to genetically manipulate this hormone. The present study investigates transgenic lines of rose containing the mutant *etr1* gene. Complementary molecular, physiological, and morphological assessment of these lines was performed to select the long-lasting line. In addition, physiological responses to treatments with gibberellin (0 and 80 mg l⁻¹) and ethylene (0 and 1 μl l⁻¹) were investigated in long-lasting and control lines. The evaluation was carried out in budding and half-open commercial stages. Tests were performed in factorial form and totally random design with three replicates. The results of molecular studies showed the successful transfer of the target gene to these lines. Then, given the desired shelf-life, slower flowering process and preserving petals on the pedicel until the last day of physiological and morphological studies, line six of the seven transgenic lines was chosen as the lasting line. The results further showed a significant reduction in the production of ethylene in both budding and half-open stages in the longer-lasting line compared to control line with both external ethylene and gibberellin treatments. Therefore, *etr1-1* gene appears to be the right candidate for delaying ethylene-dependent aging in sensitive flowers.

Key words: Exogenous ethylene, Genetic manipulation, Flower senescence, Gibberellin, Cut rose.