DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.3.7.5
مقاله پژوهشی

شناسایی عامل رونویسی موثر بر پروموتر مسیر بیوسنتزی کاروتنوئیدی/آپوکاروتنوئیدی در *Crocus sativus L.*

زهرا عزیزی و علی دلجو*

ایران، همدان، دانشگاه بوعلی سینا همدان، دانشکده کشاورزی، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۱/۲۰ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۲/۲۵

چکیده

این حقیقت به خوبی اثبات شده که کلاله به عنوان بخشی از گل زعفران محل اصلی برای سنتز بسیاری از کاروتنوئیدها و آپوکاروتنوئیدها مهم است و آن نیز در مرحله خاصی از مراحل رشد صورت می‌گیرد، اما هیچ چیز در خصوص مکانیسمی که سنتز آن را تنظیم می‌کند شناخته نشده است. تحقیقات گسترده در مورد آنزیم‌هایی که در بیوسنتز آپوکاروتنوئیدهای زعفران بخصوص کروسین نقش دارند نشان دهنده‌ی فراوانی حضور یکی از این آنزیم‌ها یعنی CsLcy-β2a در کلاله است. هم‌چنین مشخص شده است این آنزیم باعث فعال‌سازی و افزایش تجمع بتاکاروتن می‌شود. عوامل رونویسی به عنوان یکی ازگروه‌های تنظیم‌کننده با تنظیم بیان ژن به صورت بافت اختصاصی و زمان اختصاصی از طریق توانایی آن‌ها در اتصال به پروموتر ژن‌های هدف در بسیاری از فرآیندهای بیولوژیکی و تکاملی گیاهان نقش حیاتی ایفا می‌کنند. در این تحقیق با استفاده از سیستم GoldenBraid سازه‌های حاوی عوامل رونویسی CsMYB، CsARF8، CsERF2 و CsZinc-figer CCCH و توالی پروموتر ژن CsLcy-β2a در اتصال با ژن گزارشگر لوسیفراز (Firefly) ساخته شد و با روش آگروایفیلتریشن به برگ‌های گیاه توتون گونه بنتامیانا (*Nicotiana.bentamiana*) تزریق شدند و میزان فعال‌سازی پروموتر تحت تاثیر عوامل رونویسی از طریق سنجش دوگانه لوسیفراز مورد بررسی قرار گرفت. تنها برای یکی از عوامل رونویسی یعنی CsMYB، نسبت لومینسانس لوسیفراز بر رنیلا (LUC/REN) تغییر کرد. در مجموع، یافته‌های این پژوهش نشان می‌دهد که CsMYB یک تنظیم‌کننده مثبت مسیر بیوسنتز کاروتنوئید/آپوکاروتنوئیدها در زعفران است.

واژه های کلیدی: *Crocus sativus L.*، عوامل رونویسی، GoldenBriad، آگروایفیلتریشن، سنجش دوگانه لوسیفراز.

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۸۱۱۱۱۵۶۷، پست الکترونیکی: 110deljou@gmail.com

مقدمه

کاروتنوئیدها گروه بزرگی از ترکیبات هستند که از پیش ماده‌های ایزوپرونوئیدی مشتق می‌شوند و به عنوان اجزای سازنده مسیرهای فتوسنتزی، یعنی به عنوان پیش‌سازهای فیتوهورمون‌ها مانند اسیدآبسیزیک (ABA) واستریگولاکتون‌ها عمل می‌کنند. این ترکیبات مسئول ایجاد رنگ‌های زرد تا قرمز در بسیاری از میوه‌ها و گل‌ها هستند. آپوکاروتنوئیدها ترکیبات زیستی مشتق شده از کاروتنوئیدها بوده که به طور متابولیکی حاصل از تجزیه اکسیداتیو کاروتنوئید C40 می‌باشند (۶). برخی از آپوکاروتنوئیدها به دلیل خواص رنگدانه‌ای خود توسط انسان مورد بهره برداری قرار می‌گیرند، به عنوان مثال بیکسین (۲۹)، هترانتین و دیتاکسین (۲۳) و زعفران (۷). آپوکاروتنوئیدهای زعفران به عنوان اجزای فعال در نظر گرفته می‌شوند زیرا آن‌ها قادر به درمان بیماری‌های مزمن و کاهش خطر ابتلا به سرطان هستند و اثرات مثبتی بر اختلالات عصبی دارند (۱۱).

کلاله‌های قرمز خشک شده *C. sativus L.* در تهیه زعفران مورد استفاده قرار می‌گیرند. این ادویه یکی از قدیمی‌ترین

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.3.7.5

مواد افزودنی طبیعی غذایی است که هم به عنوان طعم-دهنده و هم یک عامل رنگ‌آمیزی مورد استفاده قرار می-گیرد. کلاله زعفران به طور استثنایی حاوی سطح بالایی از آپوکاروتنوئید قطبی معروف به کروسین است که رنگ را به ادویه زعفران می‌بخشد. بیوسنتز کروسین در زعفران شامل یک مسیر بیوسنتز کاروتنوئیدی ویژه در کروموپلاست است. در این اندامک سنتز کاروتنوئید برای تولید آپوکاروتنوئیدهای رنگی تجمع یافته در کلاله زعفران با کمک آنزیم‌های ویژه‌ی این مسیر (CsPSY2، CsLCY-β2، CsBCH2 و CCD2) صورت می‌گیرد. بیان ژن‌های کد کننده این چهار آنزیم موثر در بیوسنتز آپوکاروتنوئیدها در کلاله زعفران، در طول توسعه آن به طور هماهنگ افزایش می‌یابد و در نتیجه باعث فعال شدن شدید جریان متابولیکی مسیر آپوکاروتنوئیدی می‌شود (۶).

شناخت روزافزون ما از آنزیم‌های کاروتنوژنیک که به طور ویژه در بافت‌های کروموپلاستی بیان می‌شوند، نقطه عطفی در مطالعه تنظیم کاروتنوژنسیس در بافت‌های با ارزش اقتصادی بالا فراهم آورده است. چرخه لیکوپن، یک نقطه انشعاب کلیدی در مسیر بیوسنتز کاروتنوئیدها می‌باشد که عمیقا بر ترکیب محتوای کاروتنوئیدی تاثیرگذار است. ویژگی منحصربفرد کلاله زعفران به واسطه دارا بودن مقادیر قابل توجه آپوکاروتنوئیدهای مشتق از بتا کاروتن و زئاگزانتین می‌باشد. در بررسی‌های فیلوژنتیکی و بیانی انجام شده بروی ژن CsLcy-β2a در زعفران مشخص شده است که این ژن، لیکوپن سیکلازهای کروموپلاستی را کد می‌کند و فراوانی حضور آن در کلاله با افزایش تجمع بتاکاروتن همراه است. از طرفی نتایج بیانی ژن CsLcy-β2a در کلاله گونه‌های مختلف جنس کروکوس نشان داده است که تنظیم رونویسی این ژن بر محتوای کاروتنوئید و آپوکاروتنوئید در بافت کلاله تاثیر می‌گذارد (۷).

عوامل رونویسی بسیاری از فرآیندهای مرتبط با رشد و فیزیولوژی در گیاهان را از طریق توانایی اتصال آن‌ها به پروموترهای ژن‌های هدف و کنترل بیان این ژن‌ها تنظیم می‌کنند. مشخص شده است که ژن‌های AGAMOUS-like 1 و FRUITFULL متعلق به خانواده عوامل رونویسی MADS-box می‌توانند تجمع کاروتنوئید را هنگام رسیدن در گیاه گوجه‌فرنگی تنظیم کنند (۹) و در مطالعه‌ای توسط Martel و همکاران (۲۰۱۱) نشان داده شده است که بازدارنده رسیدن گوجه‌فرنگی (MADS-RIN) ازطریق برهمکنش با پروموتر PSY1، غلظت کاروتنوئید میوه را تنظیم می‌کند. همچنین گزارشاتی مبنی بر نقش عوامل رونویسی متعلق به زیر گروه AP2/ERF ارائه شده است که نشان می‌دهد این عوامل نقش مهمی در تجمع کاروتنوئیدی دارند (۱۸). در گوجه‌فرنگی نشان داده شده دو فاکتور از خانواده عوامل رونویسی NAC (SINAC1 و SINAC2) تجمع کاروتنوئید را هنگام رسیدن میوه تعدیل می‌کنند (۲۲ و ۳۸). در مرکبات CsMADS6، بیان ژن آنزیم‌های PSY، PDS و CCD1 را از طریق اتصال مستقیم به پروموترهای این ژن‌ها تنظیم می‌کند، و این بدان معنی است که CsMADS6 تنظیم کاروتنوژنسیس چندین ژن هدف را تحت کنترل خود دارد (۲۰).

پژوهش‌های دیگر نقش عامل رونویسی MYB را در تنظیم کاروتنوئیدی توصیف کرده‌اند. عوامل رونویسی MYB یکی از بزرگترین خانواده‌های عوامل رونویسی در گیاهان است و در فرآیندهای بسیاری از رشد گل و بذر، تا سیگنال‌دهی هورمون‌ها، بیوسنتز متابولیت‌ها و رنگدانه-سازی بافت‌ها نقش دارند که توسط جینومارتین (۱۹۹۹) بررسی شده‌است. در مطالعه‌ای بر روی *Erythranthelewisii* از طریق تجزیه و تحلیل داده‌های تفرق بالک یک عامل رونویسی R2R3 MYB، کاهش-دهنده رنگدانه کاروتنوئید ۱ (RCP1) شناسایی شد که تنظیم‌کننده مثبت سطح کاروتنوئید در گل‌ها می‌باشد (۳۰). در جهش یافته‌های *E. lewisii* با کاهش رنگ گلبرگ، نشان داده شد که RCP1 کل مسیر بیوسنتز کاروتنوئید را کنترل می‌کند. RCP1 به زیر گروه MYB21 تعلق دارد (۳۳) که

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.3.7.5

تاکنون نقش این عامل رونویسی در تنظیم تولید رنگدانه-های گیاهان مورد مطالعه قرار نگرفته است. پژوهشی دیگر بر روی جهش یافته‌های *Citrus reticulate* به منظور توصیف نقش عوامل رونویسی MYB در تجمع کاروتنوئیدی، عملکرد بسیار متفاوتی ارائه داد. این پژوهشگران موفق به شناسایی یک عامل رونویسی MYB (CrMYB68) شدند، که به نظر می‌رسد بافعالیت ژن‌های مسیر بیوسنتز کاروتنوئیدها رابطه منفی داشته باشد (۳۹). در مطالعه‌ی دیگری بر روی کیوی یک عامل رونویسی MYB شناسایی شد که از طریق اتصال به پروموتر ژن AdLcy-β منجر به فعال‌سازی آن و در نهایت افزایش رونویسی در گیاهان مدل گردید (۹).

عوامل رونویسی درگیر در رشد گیاه معمولاً از طریق تجزیه و تحلیل فنوتیپ‌های ایجادکننده آن‌ها شناسایی می-شوند. با این حال، شناسایی عوامل رونویسی کنترل‌کننده مسیر بیوسنتز کاروتنوئیدی با استفاده از این روش احتمالاً به دلیل کشنده بودن جهش‌های ایجاد شده در گیاهان با محدودیت مواجه شده است. از این رو، تله‌های پروموتری (Promoter traps)، روش‌های عمیق توالی‌یابی یا اتصال عوامل رونویسی کاندید به پروموترهای ژن‌های هدف، در درک تنظیم مسیر کاروتنوئیدی مورد توجه قرار گرفته‌اند (۹).

با توجه به مطالب فوق پیدا کردن شناخت کافی پیرامون عوامل رونویسی کلیدی تنظیم‌کننده مسیر بیوسنتز کاروتنوئید/آپوکاروتنوئید در زعفران ضروری بنظر می‌رسد. پیش‌تر توسط تیم تحقیقاتی پروفسور گومز یک خزانه ژنی از قسمت‌های مختلف کلاله در گونه‌های مختلف جنس کروکوس با هدف شناسایی عوامل رونویسی زعفران ساخته شده است (۴ و ۵). با توجه به مطالب بالا و اهمیت بررسی نقش عوامل رونویسی در مسیر بیوسنتزی کاروتنوئیدی، در این تحقیق از چهار عامل رونویسی با طول کامل (CsARF8، CsMYB، CsERF2 و CsZinc-finger CCCH) به منظور بررسی اثر این عوامل در تنظیم بیان ژن لیکوپن بتا سیکلاز به عنوان یکی از آنزیم‌های اصلی در مسیر بیوسنتز آپوکاروتنوئید کروسین در طول فرآیند تکامل کلاله زعفران استفاده شد. از سوی دیگر با توجه به آنالیزهای انجام گرفته و شناسایی توالی پروموتر ژن CsLcy-β2a (۷)، در این پژوهش از این پروموتر استفاده شد تا نحوه اثر عوامل رونویسی منتخب در فعال-سازی بیان آنزیم CsLcy-β2a از طریق اتصال به این پروموتر مورد بررسی قرار گیرد.

مواد و روشها

در تحقیق حاضر از نتایج آنالیز ترانسکریپتوم کلاله زعفران در مراحل مختلف توسعه با روش RNA-seq، که توسط تیم تحقیقاتی پرفسور گومز انجام شده بود استفاده گردید. چهار ژن کاندید عوامل رونویسی CsARF8، CsMYB، CsERF2 و CsZinc-finger CCCH برای آنالیزهای بعدی انتخاب شدند.

استخراج RNA و سنتز cDNA: استخراج RNA از بافت-های مختلف زعفران مثل کلاله، برگ‌ها و کروم (غده) (طبق روش روبیو و همکاران، ۲۰۰۸) باکیت Direct-zol RNA MiniPrep (Zymo Research) طبق پروتکل شرکت سازنده انجام گرفت وسپس جذب نمونه‌ها با استفاده از اسپکتروفتومتر مرئی–فرابنفش اندازه گیری شد. برای سنتز cDNA از First Strand cDNA Synthesis Kit استفاده شد.

آنالیز Real-time PCR: با روش Real-timePCR، در مراحل مختلف از گلدهی زعفران و هم‌چنین در اندام‌های متفاوت (گل، برگ و غده) عوامل رونویسی فوق مورد ارزیابی قرار گرفتند. تا ضمن تایید نتایج حاصل از RNA-seq، اندام‌های مختلف از نظر بیان این ژن‌ها مورد ارزیابی قراربگیرند. در این آنالیز از MasterLight Cycler 480 SYBR Green I شرکت Roche شد. شرایط انجام واکنش

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.3.7.5

بدین شرح بود: واسرشتگی اولیه بمدت ۵ دقیقه در دمای ۹۴ صورت گرفت. سپس ۴۰ چرخه، شامل واسرشتگی بمدت ۲۰ ثانیه در دمای ۹۴، اتصال بمدت ۲۰ ثانیه در دمای بهینه شده برای هر آغازگر و تکیثر بمدت ۲۰ ثانیه در دمای ۷۲ انجام شد. در آخر تکثیر نهایی بمدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ صورت پذیرفت. جهت ارزیابی و نرمال-سازی نتایج از ژن رفرنس 18srRNA استفاده شد. آغازگرهای اختصاصی عوامل رونویسی و همچنین ژن رفرنس (۸) در جدول ۱ آورده شده است.

جدول ۱- آغازگرهای استفاده شده برای ارزیابی بیان عوامل رونویسی و ژن رفرنس.

TFs	Forward sequence	Reverse sequence
ARF8	5′- ATGAACTGGACTTTAGCTTTAGGA-3′	5′- AACTCCTGGTTTCCCTACTTTCT-3′
MYB	5′- GATATGGGAAGACCTCCTTGT -3′	5′- TCATAACAATTCATCAGAGAAAGT -3′
ERF2	5′- ATGTGTGGAGGATCCATCATCT -3′	5′-TCAGTAGACATCATCCCAGATC -3′
Zinc-finger CCCH	5′- CCGTCGCTGGATCTCTACTC -3′	5′-CAGCCGCCTTTCTTGTAGTC -3′
18s Rrna	5′- TTCAATCCGTAGGAGCGACA -3′	5′- CGAACGAGACCTCAGTCTGCTAA - 3′

تکثیر و خالص سازی توالی‌ها: توالی عوامل رونویسی و پروموتر در ابتدا از طریق واکنش زنجیره ای پلیمراز با استفاده از TaqAdavantage (شرکت Promega) تکثیر شدند. طبق پروتکل کیت Wizard SV Gel and PCR Clean –Up System خالص‌سازی باندهای تکثیر شده از روی ژل آگارز صورت گرفت. سپس کیفیت و کمیت DNA خالص‌سازی شده توسط اسپکتروفتومتر مرئی-فرابنفش در OD_{260} نانومتر صورت گرفت.

باکتری‌ها و ناقل‌های مورد استفاده: در این تحقیق از سلول‌های مستعد Stellar (اشریشیاکلای سویه HST08) شرکت تاکارا، برای کلونینگ و از آگروباکتریوم توموفشینز سویه GV3101 برای آگروایفیلتریشن گیاه و آزمایشات ترانسفورماسیون استفاده شد. هم‌چنین از روش GoldenBraid و ناقل‌های آن (برای ساخت و سرهم بندی ناقل‌های ورودی، مقصد و بیانی) استفاده گردید. در ابتدا توالی عوامل رونویسی، پروموتر و ژن گزارشگر لوسیفراز (Firefly) به صورت مجزا درناقل pUPD2 که حاوی ژن مقاومت به کلرامفنیکل است کلون شدند. برای ساخت ناقل‌های مقصد، ابتدا توالی عوامل رونویسی کلون شده در ناقل pUPD2 در ناقل pDGBα1 درج و سازه (pDGBα1:p35s-TFs-T35s) ایجاد شد و سپس با استفاده از ناقل pDGBα2، سازه (pDGBα2:pCsLcy-β2-LUC-T35s) ساخته شد هر دو ناقل α1 و α2 دارای ژن مقاومت به کانامایسین هستند (در توالی ناقل pDGBα2 ژن گزارشگر رنیلا (Renilla) از قبل درج شده است). برای تهیه ناقل‌های بیانی ازناقل pDGBΩ1 استفاده شد این ناقل دارای ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک اسپکتینومایسین می‌باشد. در نهایت سازه pDGBΩ1: pDGBα1 [p35s-TFs-T35s]-pDGBα2 ([pCsLcy-β2-LUC-T35s]) ایجاد شد. در این آزمایشات از آنزیم T4 DNALigase (M108B) شرکت Promegaو Esp3I/BsmbI شرکت فرمنتاز استفاده شد. شرایط واکنش ۳ ساعته در دستگاه ترموسایکلر به صورت زیر می‌باشد: ۲۵ چرخه، ۲ دقیقه در ۳۷، ۵ دقیقه در ۱۶.

انتقال ناقل به باکتری و خالص‌سازی آن‌ها: پس از هر مرحله از سرهم‌بندی و ساخت ناقل، ترانسفورم کردن باکتری‌های مستعد stellar انجام شد و محصول ترانسفورماسیون روی پلیت‌های جداگانه‌ی محیط LB حاوی آنتی بیوتیک‌های مربوط به هر ناقل با غلظت ۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر، IPTG با غلظت ۰/۵ میلی‌مولار و XGal با غلظت ۴۰ میکروگرم در میلی‌لیتر پخش گردید و به مدت یک شب در دمای ۳۷ نگهداری شد. سپس گزینش آبی-سفید صورت گرفت و روز بعد واکنشPCR انجام و محصول واکنش روی ژل الکتروفورز با تشکیل باند کلنی‌های مثبت را مشخص کرد. این کلنی‌های در

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.3.7.5

محیط مایع LB حاوی آنتی بیوتیک‌ها به مدت یک شب در شکیر انکوباتور با شرایط دمایی فوق نگهداری شدند. سپس خالص‌سازی ناقل‌ها با کیت QIAprep Spin MiniprepKit، طبق پروتکل شرکت سازنده صورت گرفت.

هضم آنزیمی ناقل‌ها: کلون‌هایی که پس از الکتروفورز مثبت بودند یک مرحله واکنش هضم با آنزیم‌های DarI، EcoRI، BamHI، NedI، XohI داشتند. پس از آماده‌سازی واکنش هضم نمونه‌ها به مدت یک شب در انکوباتور در دمای ۳۷ نگهداری و سپس روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز شدند. غلظت نمونه‌های DNA در هر مرحله با دستگاه اسپکتروفتومتر مرئی–فرابنفش در OD_{260} نانومتر سنجیده شد.

آگروباکتریوم گیاه توتون: از باکتری *Agrobacterium tumefaciens* سویه GV30101 که حاوی ناقل‌های نوترکیب pDGBΩ1 است برای بررسی آنالیزهای برهمکنش عوامل رونویسی با پروموتر استفاده شد. از سویه GV30101 که حاوی ناقل استاندارد GB0166 است به عنوان کنترل مثبت و از ناقل pDGBΩ1 که فاقد ژن‌های مورد نظر بود به عنوان کنترل منفی استفاده شد.

آماده‌سازی سلول‌های مستعد و تراریختی آگروباکتریوم سویه GV30101 به روش الکتروپوریشن انجام شد. نمونه-های آگروباکتریوم ترانسفورم شده روی محیط کشت (YEB= Yeast Extract Beef (YEB) Broth) حاوی آنتی-بیوتیک‌های جنتامایسین، رافامپیسین و اسپکتینومایسین کشت داده شدند و در دمای ۲۸ به مدت ۷۲–۴۸ ساعت انکوبه شدند. آماده‌سازی سلول‌ها جهت تزریق بر اساس روش اورزاز و همکاران (۲۰۰۶) انجام شد. بدین منظور کلنی‌های آگروباکتریوم نوترکیب در ۵ میلی لیتر از محیط کشت در شیکرانکوباتور با شرایط ۱۶۰ دور در دقیقه و دمای ۲۸ به مدت یک شب نگهداری شدند. سپس به کشت‌های سلولی باکتری ۵۰ میلی لیتر از محیط القایی اضافه شد و مجددا در شرایط ذکر شده در بالا قرار گرفتند. باکتری‌ها با سانتریفیوژدر ۴۰۰ دور در دقیقه رسوب داده شدند و در محیط اینفیلتریشن حاوی MES (۱۰ mM)، $MgCl_2$ (۱۰ mM) و استوسرینگون (۲۰۰µM) حل شدند و به مدت دو ساعت در دمای اتاق روی یک شکیر افقی تا حصول به OD_{600}=۰/۸ نانومتر نگهداری شدند. عمل آگروباکتریوم در برگ‌های جوان گیاه توتون گونه بنتامیانا با سرنگ ۲ میلی لیتر بدون سوزن انجام گرفت. سوسپانسیون‌های باکتریایی به اپیدرم پشت برگ‌های متصل به گیاه تزریق شدند. سپس گیاهان شب اول را در اتاق تاریک و سپس در دستگاه ژرمیناتور برای مدت ۴ تا ۵ روز تحت شرایط ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی در دمای ۲۰ نگهداری شدند.

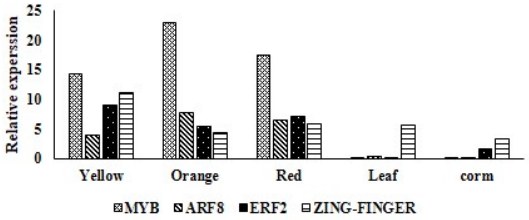
آزمون سنجش دوگانه لوسیفراز: در این پژوهش برای سنجش فعالیت لوسیفراز از کیت Dual-Luciferase Assay Activity System (Promega: ایالات متحده) استفاده شد. در ابتدا برش‌های دیراه‌ای به قطر ۰/۸ سانتی-متر و وزن تقریبی ۱۹–۱۸ میلی‌گرم از هر برگ آگروباکتریوم شده جدا شد و در ویال‌های ۱/۵ میلی-لیتری با استفاده ازگوی‌های فلزی و دستگاه RETSCH ball Mill MM400 همگن شدند. طبق پروتکل کیت مراحل آماده‌سازی عصاره گیاه انجام شد. برای تعیین فعالیت لوسیفراز از یک پلیت ۹۶ چاهکی سفید استفاده شد. سنجش فعالیت لوسیفراز (LUC) و رنیلا (REN) طبق پروتکل شرکت سازنده کیت با استفاده از دستگاه GloMax 96 MicroplateLuminometer (Promega)صورت گرفت.

نتایج

بررسی الگوی بیان عوامل رونویسی از طریق تجزیه و تحلیل داده‌های Real-time PCR: بیان عوامل رونویسی انتخاب شده در مراحل مختلف توسعه کلاله و در اندام-های برگ و کروم به واسطه‌ی بررسی نتایج آنالیز Real-time PCR صورت گرفته برای توالی عوامل

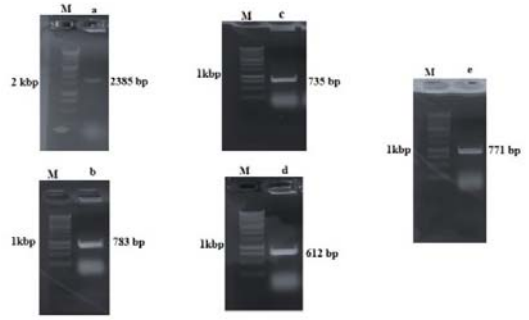
DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.3.7.5

رونویسی مذکور (CsMYB،CsERF2،CsARF8و-CsZinc finger CCCH) به تایید رسید (نمودار ۱) که با توجه به تجمع کروسین به عنوان اصلی‌ترین ماده موثره در کلاله زعفران گام اول در انتخاب این عوامل رونویسی را تقویت بخشید.



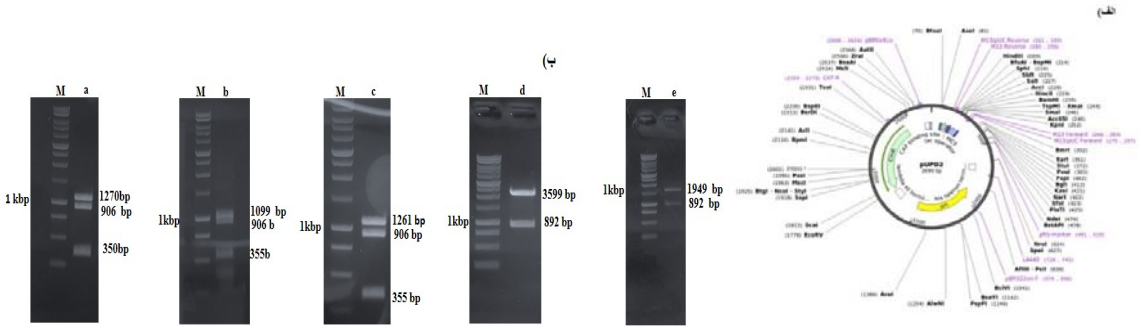
نمودار ۱- بررسی بیان عوامل رونویسی در اندام‌های مختلف زعفران. این عوامل در بافت کلاله در مراحل مختلف توسعه (Yellow، Orange و Red) بیان بالایی دارند ولی در اندام‌های برگ و کروم بیان نمی‌شوند یا بیان کمی دارند.

بررسی تکثیر و خالص‌سازی توالی‌ها: واکنش PCR عوامل رونویسی CsARF8،CsMYB،CsERF2 و-CsZinc finger CCCH به ترتیب منجر به تکثیر قطعاتی به طول ۲۳۸۵bp، ۷۸۳bp، ۶۱۲bp و ۷۳۵bp گردید. مطابق انتظار بدنبال واکنش PCR برای تکثیر توالی پروموتر ژن CsLcy-β2a، قطعه با طول ۷۷۱bp تکثیر شد. محصول PCR توالی فاکتورهای رونویسی و پروموتر ودر الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد (شکل ۱) از روی ژل استخراج و توسط کیت مراحل خالص‌سازی آن انجام شد. سنجش کمیت و کیفیت خالص‌سازی با دستگاه اسپکتروفتومتر مرئی-فرابنفش در OD_{260} نانومتر صورت گرفت.



شکل ۱- تکثیر توالی عوامل رونویسی و پروموتر. چاهک‌های a-eبه ترتیب CsARF8، CsMYB، CsZinc-finger CCCH، CsERF2، CsLcy-β2a. M: مارکر مولکولی Promega 1kb.

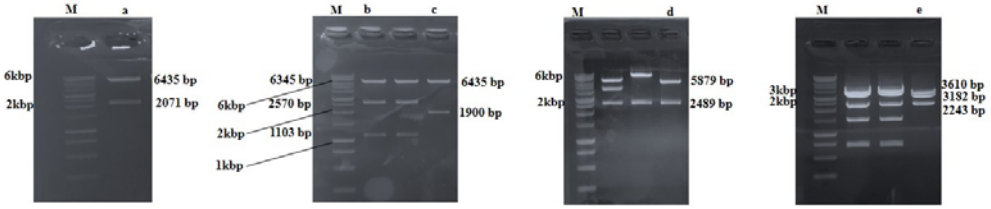
همسانه‌سازی توالی‌ها در ناقل pUPD2: نقشه ناقل همسانه‌سازی pUPD2 در شکل ۲- الف نشان داده شده است. برای تهیه ناقل نوترکیب، ابتدا طی واکنش انجام شده در ترموسایکلر توالی عوامل رونویسی، پروموتر و ژن گزارشگر در ناقل pUPD2 سرهم‌بندی شد. محصول واکنش اتصال (توالی‌ها و ناقل) به سلول‌های مستعد Stellar منتقل و سپس به منظور تایید درج توالی‌ها در ناقل واکنش هضم با آنزیم‌های DraI و XohI انجام شد (شکل ۲- ب). نتایج حاصل از الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱ درصد تولید ناقل‌های نوترکیب را تایید کرد.



شکل ۲- الف: تصویر شماتیک ناقل pUPD2. ب: تصاویر الکتروفورز ژل آگارز مربوط به ناقل‌های pUPD2 پس از هضم آنزیمی. چاهک‌هایa-c، به ترتیب محصول هضم آنزیمی ناقل‌های pUPD2-CsMYB، pUPD2-CsERF2، pUPD2-CsLcy-β2a، با آنزیم DraI و چاهک‌های d و e محصول هضم آنزیمی ناقل‌های pUPD2-CsARF8 و pUPD2-CsZinc-finger CCCH با آنزیمXohI. M: مارکر مولکولی Promega 1kb.

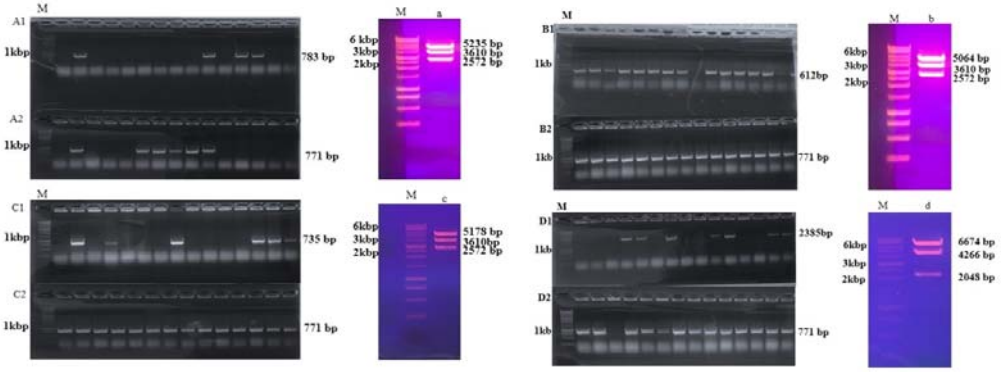
DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.3.7.5

تهیه ناقل‌های نوترکیب pDGBα1 و pDBGα2: برای تهیه این ناقل‌ها، واکنش سرهم‌بندی و اتصال در ترموسایکلر برای ناقل‌های pUPD2 حاوی توالی عوامل رونویسی در ناقل pDGBα1 و ناقل‌های pUPD2 حاوی توالی پروموتر و ژن لوسیفراز در ناقل pDBGα2 انجام شد. محصول واکنش به سلول‌های مستعد باکتری ترانسفورم و در نهایت هضم آنزیمی سازه‌های ژنتیکی ساخته شده با آنزیم‌هایEcorI، NedI و DraI انجام شد. نتایج حاصل از هضم آنزیمی و تایید وجود توالی‌های درج شده در ناقل-های نوترکیب در شکل ۳ نشان داده شده است. نتایج حاصل از الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱ درصد تولید ناقل‌های نوترکیب را تایید کرد.



شکل ۳- تصاویر الکتروفورز ژل آگارز مربوط به ناقل‌های pDGBα1 و ناقل pDGBα2 پس از هضم آنزیمی.چاهک‌هایa-c، به ترتیب محصول هضم آنزیمی ناقل‌های pDGBα1-CsMYB، pDGBα1-CsARF8، pDGBα1-CsERF2، با آنزیم EcorI(طول توالی باندهای تشکیل شده برای چاهک b در سمت چپ ژل نشان داده شده است). چاهک d، محصول هضم آنزیمی ناقل pDGBα1-CsZinc-finger CCCH با آنزیم NedI. چاهک e، محصول هضم آنزیمی ناقل pDGBα2 با آنزیم DraI. M: مارکر مولکولیPromega 1kb.

ساخت ناقل‌های بیانی pDGBΩ1: برای تهیه ناقل نهایی نوترکیب، از دستگاه ترموسایکلر برای درج توالی‌های موجود درناقل‌هایα1 و α2 و ساخت ناقل pDGBΩ1 استفاده شد و محصول واکنش طبق مراحل قبل به سلول-های Stellar منتقل و درنهایت غربالگری باکتری‌های تراریخت از طریق گزینش آبی–سفید انجام شد. تایید درج توالی‌ها در ناقل‌های نوترکیب، از طریق واکنش هضم با آنزیم‌های DraI و BamHIانجام شد (شکل ۴). نتایج حاصل از الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱ درصد تولید ناقل‌های نوترکیب را تایید کرد.

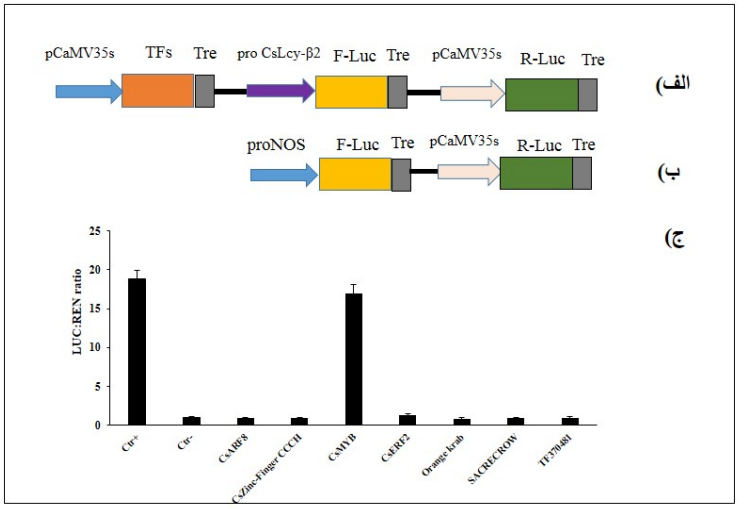


شکل ۴- تصاویر الکتروفورز ژل آگارز مربوط به واکنش PCR ناقل‌های بیانی (pDGBΩ1) و هضم آنزیمی ناقل‌ها. A1-D1، به ترتیب محصول PCR توالی عوامل رونویسی CsMYB، CsERF2، CsZinc-fingerCCCH، CsARF8، A2-D2، محصول PCR توالی پروموتر CsLcy-β2a، چاهک‌هایa-c، به ترتیب محصول هضم آنزیمی ناقل‌های pDGBΩ1-CsMYB، pDGBΩ1-CsERF2، pDGBΩ1-CsZinc-finger CCCH، با آنزیم DraI. چاهک d، محصول هضم آنزیمی ناقل pDGBΩ1-ARF8 با آنزیم BamHI. M، مارکر مولکولیPromega 1kb.

آگروایانفیلتریشن گیاه توتون و بررسی فعال‌سازی پروموتر با آزمون سنجش دوگانه لوسیفراز: به منظور بررسی بیان پروموتر تحت کنترل عوامل رونویسی، ناقل-های بیانی pDGBΩ1 بر اساس متد الکتروپوریشن به

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.3.7.5

سلول‌های *Agrobacterium tumefaciens* (pGV3101) منتقل شدند، سپس آگروباکتریوم‌های تراریخت شده جهت تراریختی برگ‌های گیاه توتون با استفاده از روش آگروانفیلتریشن بصورت بیان موقت (transient) استفاده شد. نتایج آزمون سنجش دوگانه لوسیفراز به منظور ارزیابی فعالیت عوامل رونویسی و چگونگی اثر مثبت یا منفی آنها بروی فعال‌سازی رونویسی پروموتر ژن CsLcy-β2a نشان داد که در مقایسه با کنترل مثبت و منفی تنها عامل رونویسی CsMYB به طور مستقیم منجر به فعال‌سازی رونویسی پروموتر ژنCsLcy-β2a می‌شود (شکل ۶).



شکل ۶–فعال‌سازی موقت پروموتر CsLys-β2a توسط عوامل رونویسی. الف و ب، به ترتیب نقشه‌ی سازه بیانی تهیه شده در ناقل‌های pDGBΩ1 و ناقل بیانی کنترل (GB0166). ج، نسبت لومینسانس (LUC/REN) اندازه گیری‌شده برای ژن گزارشگر لوسیفراز در برگ‌های توتون تراریخت با استفاده از ناقل‌های حاوی توالی عوامل رونویسی و ناقل کنترل (استاندارد). ناقل pDGBΩ1 (empty) بعنوان کنترل منفی (-C) استفاده شد. نتایج به صورت میانگین (Means) ± انحراف استاندارد (SE) سه تکرار نمایش داده شده‌اند.

بحث و نتیجه‌گیری

در پژوهش حاضر فعالیت چهار عامل رونویسیCsMYB، CsARF8، CsERF2 و CsZinc-finger CCCH با روش Real-TimePCR در بافت‌های مختلف زعفران مشخص شد که این عوامل در بافت کلاله به عنوان اندام اصلی بیوسنتز کننده کاروتنوئیدها و آپوکاروتنوئیدها، بیشترین میزان بیان را نشان می‌دهند که حاکی از نقش احتمالی این عوامل رونویسی در مسیر بیوسنتز ماده موثره زعفران می‌باشد. این پژوهش با مطالعات پیشین در خصوص بررسی بیان عوامل رونویسی در بافت‌های مختلف زعفران و گونه‌های مختلف جنس Crocus به منظور آگاهی از وجود یا عدم وجود عوامل رونویسی در کلاله و نقش آن‌ها در مسیر بیوسنتزی کاروتنوئید/آپوکاروتنوئید زعفران مطابقت دارد (۱۰ و ۱۶). با توجه به اینکه عوامل رونویسی می‌توانند بر روی ژن‌های مسیر بیوسنتزی کاروتنوئیدی گیاهان تاثیر بگذارند، در این تحقیق از پروموتر ژن CsLcy-β2a بعنوان یکی از آنزیم‌های اصلی مسیر بیوسنتزی کاروتنوئیدی زعفران استفاده شد (۷).

در این مطالعه با استفاده از سیستم بیان موقت بر پایه آگروانفیلتریشن و آزمون دوگانه لوسیفراز، اثر عوامل رونویسی بر روی پروموتر ژنCsLcy-β2a در ساختار ناقل بیانی pDGBΩ1 مورد بررسی قرار گرفت. با توجه کاربردهای متعدد گیاه توتون (*Nicotiana.bentamiana*) در مهندسی ژنتیک به منظور بررسی انتقال ژن‌ها و مطالعه عوامل موثر در انتقال ژن (۱ و ۲) در این تحقیق از آن به عنوان گیاه مدل برای بررسی بیان موقت استفاده شد.

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.3.7.5

عوامل بسیاری در کارایی آگروایفیلتریشن موثرند. کیفیت مواد گیاهی، مراحل مختلف بافت گیاهی یا سنین مختلف بافت، طول روز، سویه آگروباکتریوم مورد استفاده، ترکیبات فنولی و مدت زمان سپری شده بعد از آگروایفیلتریشن از جمله عوامل مهم تاثیرگذار هستند (۷). در میان عوامل مختلفی که بر بیان موقت تاثیر می‌گذارند می‌توان به مدت زمان کشت با آگروباکتریوم اشاره کرد. یک دوره زمانی کافی برای اتصال و انتقال قطعه T-DNA به نمونه، برای آگروباکتریوم مورد نیاز است (۲۱). دوره‌ی زمانی مناسب ۷-۳ روز است و مدت زمان بیش از این حد به کارایی ترانسفورماسیون کمک نمی‌کند (۲۱). در این پژوهش سطح بیان ژن گزارشگر چهار روز بعد از ترزیق ارزیابی شد. انتخاب این دوره براساس مطالعات انجام شده صورت گرفت. ترکیبات فنولی مانند استوسرینگون از دیگر عوامل تاثیر گذارند. ترکیبات فنولی با تاثیر بر ژن‌های بیماری‌زای باکتری میزان بیان راتحت تاثیر قرار می‌دهند. ازاینرو در پژوهش خود از استوسرینگون با غلظت ۲۰۰ میکرومولار استفاده شد. کاستا و همکاران (۲۰۰۶) با اضافه کردن استوسرینگون در محیط القایی برای انتقال ژن در بادام کارایی ترانسفورماسیون را سه برابر افزایش دادند. عامل تاثیرگذار دیگر سویه باکتری مورد استفاده می‌باشد. زمینه ژنتیکی سویه‌های آگروباکتریوم به طور قابل ملاحظه‌ای سطح بیان موقت را تحت تاثیر قرار می‌دهد و مشخص شده است که تفاوت ترانسفورماسیون در بین سویه‌ها به طور معنی‌داری نوسان دارد (۱۴). در پروهش حاضر از آگروباکتریوم سویه GV3101 استفاده شد، زیرا در تحقیقات قبلی گزارش شده که اینفیلتریشن با سویه GV3101 بیشترین میزان بیان ژن را در مقایسه با سویه‌های دیگر آگروباکتریوم (LBA4404، C58C1) نشان می‌دهد (۳۲). کارایی استفاده از بیان موقت بر پایه آگروباکتریوم به منظور بررسی برهمکنش عوامل رونویسی با پروموتر ژن‌های هدف در تحقیقات متعدد اثبات شده است (۳۸).

تاکنون در مطالعات فراوانی از سیستم آزمون دوگانه گزارشگر مبتنی بر لوسیفراز کرم شب تاب به منظور تایید برهمکنش عوامل رونویسی با پروموتر مربوط به ژن‌ها استفاده شده است (۳۵، ۳۶ و ۳۷). در این پژوهش درون ناقل بیانی pDGBΩ1 بعد از توالی پروموتر ژن CsLcy-β2a، توالی ژن‌های گزارشگر لوسیفراز (LUC) و رنیلا (REN) درج شد تا امکان اندازه‌گیری سطح بیان ژن‌های گزارشگر و در نتیجه بررسی برهمکنش عوامل رونویسی با توالی پروموتر این ژن فراهم شود (ژن رنیلا تحت پروموتر جداگانه بیان شده و برای نرمال‌سازی نتایج آزمون دوگانه لوسیفراز استفاده شد). زو و همکاران از روش لوسیفراز برای بررسی اثر عوامل رونویسی CpbHLH1/2 بر روی ژن‌های لیکوپن بتا سیکلاز استفاده کردند. آنها نشان دادند که استفاده از CpbHLH1/2 به عنوان تنظیم کننده مثبت سبب افزایش تکثیر پروموتر ژن‌های CpLCY-B و CpCYC-C می‌شود (۳۷). فو و همکاران نشان دادند که افزایش بیان لوسیفراز وابسته به سطح بیان عامل رونویسی CpNAC1 و در نتیجه فعال‌سازی پروموتر ژن‌ها ی CpPDS2/4 می‌باشد (۱۲). از نتایج سنجش لوسیفراز در این مطالعه مشخص شد تنها بیان عامل رونویسی CsMYB در برگ‌های گیاه تراریخت *N. bentamiana* منجر به افزایش نسبت لومینسانس ژن گزارشگر لوسیفراز (LUC) بر رنیلا (REN) می‌شود که این امر حاکی از برهمکنش CsMYB با توالی پروموتر ژن CsLcy-β2a می‌باشد. آمپومه-دوامنا و همکاران از روش لوسیفراز برای بررسی اتصال عامل رونویسی به پروموتر ژن LCY-β استفاده کردند. آنها نشان دادند که استفاده از AdMYB7 به عنوان یک تنظیم‌کننده مثبت سبب افزایش تکثیر ژن گزارشگر لوسیفراز و در نتیجه افزایش رونویسی ژن LCY-β در گیاهان مدل می‌شود (۹). بر این اساس، نتایج بدست آمده در مطالعه حاضر نقش CsMYB را در متابولیسم کاروتنوئید/آپوکاروتنوئید احتمالاً ازطریق فعال‌سازی رونویسی ژن‌های مسیر بیوسنتزی کاروتنوئیدی نشان می-

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.3.7.5

دهد. نتیجه این تحقیق ازپیشرفت‌های اخیر در توضیح نقش عوامل رونویسی MYB در تنظیم مسیر کاروتنوئیدی پشتیبانی می‌کند. یکی از محدودیت‌های این تحقیق عدم امکان بررسی نقش عوامل رونویسی مورد استفاده در بررسی فعال‌سازی بیان سایر آنزیم‌های مسیر بیوسنتزی کاروتنوئیدی/آپوکاروتنوئیدی می‌باشد که امید است در پژوهش‌های بعدی مورد استفاده قرار گیرد. آنالیزهای بیشتر عوامل رونویسی بر روی سایر ژن‌های مسیر بیوسنتری ماده موثره زعفران درک ما را از چگونگی تنظیم ژن‌های این مسیر به منظور بهینه‌سازی بیان آنها و افزایش تولید و تجاری سازی آپوکاروتنوئید کروسین به عنوان اصلی ترین ترکیب ضد سرطانی زعفران ارتقا خواهد بخشید.

منابع

۱- حسامی، ر.، شریعتی، م. ۱۳۹۱. پاسخ شاخص کارایی فتوسنتزی (PI_{ABS}) نسبت به کمبود نیترات در گیاهان تنباکو (*Nicotianaplumbaginifolia*) تراریخته شده با ژن ناقل نیترات AtNRT2.1 با استفاده از فلئورسنس کلروفیل a. مجله پژوهش‌های گیاهی (مجله زیست شناسی ایران). ۴ (۲۷): ۵۶۹-۵۷۹.

۲- کوهی، ل.، زراع، ن.، امانی، ا.، شیخزاده مصدق، پ. ۱۳۹۶. تأثیر امواج فراصوت بر زنده‌مانی سلول‌های توتون. مجله پژوهش‌های گیاهی (مجله زیست شناسی ایران). ۲ (۲۹): ۴۴۱-۴۵۱.

۳- فروزنده، س.، میزآخورلی، ن.، صفار، ب.، مهنام، ک. ۱۳۹۲. تعیین نقش دفنزین بیان شده در سیستم گیاهی جهت جذب فلز روی. پایان نامه کارشناسی ارشد رشته بیوتکنولوژی در کشاورزی. دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد.

4- Ahrazem O, Argandona, J., Fiore, A., Aguado, C., Lujan, R., Rubio-Moraga, A., Marro, M., Araujo-Andrade, C., Loza-Alvarez, P., Diretto, G. and Gomez-Gomez, L. 2018. Transcriptome analysis in tissue sectors with contrasting crocins accumulation provides novel insights into apocarotenoid biosynthesis and regulation during chromoplast biogenesis. Scientific reports. 8.1: 1-17.

5- Ahrazem, O., Argandoña,J., Fiore,A., Andrea, Rujas., Rubio-Moraga,A., Castillo, R., Gómez-Gómez, L. 2019. Multi-species transcriptome analyses for the regulation of crocins biosynthesis in Crocus. BMC Genomics. 20.1: 1-15.

6- Ahrazem, O., José López, A., Argandoña, J., Castillo, R., Rubio-Moraga, A., Gómez-Gómez, L. 2020.Differential interaction of Or proteins with the PSY enzymes in saffron.Scientific Reports.10.1: 1-11.

7- Ahrazem, O., Rubio-Moraga, A., Lopez, R. C. and Gomez-Gomez, L. 2010. The expression of a chromoplast-specific lycopene beta cyclase gene is involved in the high production of saffron'sapocarotenoid precursors. Journal of experimental botany. 61.1: 105-119.

8- Ahrazem, O., Rubio-Moraga, A., Trapero, A.,Gomez-Gomez, L. 2011. Developmental andstress regulation of gene expression for a 9-cisepoxycarotenoiddioxygenase, CstNCED,isolated from Crocus sativus stigmas. Journal ofExperimental Botany. 63.2: 681-694.

9- Ampomah-Dwamena, C., Thrimawithana, A.H., Dejnoprat, S., Lewis, D., EspleyR,V., Allan, A.C. 2018. A kiwifruit (Actinidia deliciosa) R2R3-MYB transcription factor modulates chlorophyll and carotenoid accumulation. New Phytologist. 221.1: 309-325.

10- Ashraf, N., Jain, D., Vishwakarma, R. 2015. Identification, cloning and characterization of an ultrapetala transcription factor CsULT1 from Crocus: a novel regulator of apocarotenoid Biosynthesis. BMC Plant Biology. 15.1: 1-12.

11- Bukhari, S. I., Manzoor, M. and Dhar, M. K. 2018. A comprehensive review of the pharmacological potential of Crocus sativus and its bioactive apocarotenoids. Biomed. Pharmacother. 98: 733–745.

12- Chang-chun, F., Han, Y.- C., Fan, Z.- Q., Chen, J.- Y., Chen, W.- X., Lu, W.- J. and Kuang, J.- F. 2016. The Papaya Transcription Factor CpNAC1 Modulates Carotenoid Biosynthesis through Activating Phytoene Desaturase Genes CpPDS2/4 during Fruit Ripening. J. Agric. Food Chem. 64. 27: 5454-5463.

13- Costa, M.S., Miguel, C.M. and Oliveira, M.M. 2006. An improved selection strategy and the use of acetosyringone in shoot induction medium increase almond transformation efficiency by 100-fold. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 85.2: 205-209.

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.3.7.5

14- Gill, M.I.S., Singh, Z. and Agres V. 2004. Factors affecting Agrobacterium-mediated genetic transformation in fruit and nut crops– An overview. Food Agriculture. Environment. 2: 327–347.

15- Gomez-Gomez, L., Parra-Vega, V., Rivas-Sendra, A., Segui-Simarro, J.M., Molina, RV., Pallotti, C., Rubio-Morga, A., Diretto, G., Prieto, A. and Ahrazem, O. 2017. Unraveling Massive Crocins Transport and Accumulation through Proteome and Microscopy Tools during the Development of Saffron Stigma. International journal of molecular sciences. 18.1: 76.

16- Gomez-Gomez, L., Trapero-Mozos, A., Dolores Gomez, M., Rubio-Moraga, A., Ahrazem, O. 2012. Identification and possible role of a MYB transcription factor from saffron (Crocus sativus). Journal of Plant Physiology. 169.5: 509-515.

17- Jin, H. and Martin, C. 1999. Multifunctionality and diversity within the plant MYBgene family. Plant Molecular Biology. 41: 577–585.

18- Lee, J.- M., Joung, J.- G., McQuinn, R., Chung, M.-Y., Fei, Z., Tieman, D., Klee, H. and Giovannoni, J. 2012. Combined transcriptome, genetic diversity and metabolite profiling in tomato fruit reveals that the ethylene response factor SlERF6 plays an important role in ripening and carotenoid accumulation. The Plant Journal. 70.2: 191-204.

19- Lu, S. and Li, L. 2008. Carotenoid metabolism: biosynthesis, regulation and beyond.Journal of Integrative Plant Biology. 50.7: 778-785.

20- Lu, SW., Zhang, Y., Zhu, K., Yang, W., Ye, J., Chai, L., Xu, Q., Deng, X. 2018. The citrus transcription factor CsMADS6 modulates carotenoid metabolism by directly regulating carotenogenic genes. Plant Physiol. 176.4: 2657-2676.

21- Mannan, A., Noorseyyed, T. and Mirza, B. 2009. Factors Affecting Agrobacterium Tumefacience Mediated Transformation of Artemisia absinthinium L. Pakistan Journal of Botany. 41.6: 3239-3246.

22- Ma, N., Feng, H., Meng, X., Li, D., Yang, D., Wu, C., Meng, Q. 2014. Overexpression of tomato SlNAC1 transcription factor alters fruit pigmentation and softening. BMC Plant Biology. 14.1: 1-14.

23- Méndez-Robles, M.D., Permady, H.H., Jaramillo-Flores, M.E., Lugo-Cervantes, E.C., Cardador-Martínez, A., Canales-Aguirre, A.A., Lopez-Dellamary, F., Cerda-Garcia-Rojas, C.M. and Tamariz, J. 2006. C-26 and C-30 Apocarotenoids from Seeds of Ditaxis h eterantha with Antioxidant Activity and Protection against DNA Oxidative Damage. Journal of natural products. 69.8: 1140-1144.

24- Milajerdi, A., Djafarian, K., Hosseini, B. 2016. The toxicity of saffron *(Crocus sativus L.)* and its constituents against normal and cancer cells. Journal of Nutrition & Intermediary Metabolism 3: 23-32.

25- Mitsuda, N. and Ohme-Takagi, M. 2009. Functional analysis of transcription factorsin Arabidopsis. Plant and Cell Physiology. 50.7: 1232–1248.

26- Moraga, A.R., Rambla, J.L., Ahrazem, O., Granell, A., Gómez-Gómez, L. 2009. Metabolite and target transcript analyses during Crocus sativus stigma development. Phytochemistry.70.8: 1009–1016.

27- Orzaez, D., Mirabel, S., Wieland, W.H., Granell, A. 2006. Agroinjection of tomato fruits: a tool for rapid functional analysis of transgenes directly in fruit. Plant Physiol. 140.1: 3-11.

28- Pireyre, M. and Burow, M. 2015. Regulation of MYB and bHLH Transcription Factors: A Glance at the Protein Level. Molecular Plant. 8.3: 378–388.

29- Rivera-Madrid, R., Aguilar-Espinosa, M., Cárdenas-Conejo, Y. and Garza-Caligaris, L.E. 2016. Carotenoid Derivates in Achiote (Bixaorellana) Seeds: Synthesis and Health Promoting Properties. Frontiers in plant science. 7: 1406.

30- Sagawa, J.M., Stanley, L.E., LaFountain, A.M., Frank, H.A., Liu, C., Yuan, Y.W. 2016. An R2R3-MYB transcription factor regulates carotenoid pigmentation in Mimuluslewisii flowers. New Phytologist. 209.3: 1049–1057.

31- Schwinn, K., Venail, J., Shang, Y., Mackay, S., Alm, V., Butelli, E., Oyama, R., Bailey, P., Davies, K. and Martin, C. 2006. A Small Family of MYB-Regulatory Genes Controls Floral Pigmentation Intensity and Patterning in the Genus Antirrhinum. The Plant Cell. 18.4: 831-851.

32- Shamloul, M., Trusa, J., Mett, V., Yusibov, V. 2014. Optimization and Utilization of Agrobacterium-mediated Transient Protein Production in Nicotiana. JoVE (Journal of Visualized Experiments). 86: e51204.

33- Stracke, R., Werber, M., Weisshaar, B. 2001. The R2R3-MYB gene family in Arabidopsis

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.3.7.5

thaliana. Current Opinion in Plant Biology.4.5: 447-456.

34- Winterhalter, P. and Rouseff, R.L. 2002. Carotenoid-derived aroma compounds. Washington, DC: American Chemical Society. 1-17.

35- Xiang, L., Liu, X., Li, H., Yin, X., Grierson, D., Li, F., Chen, K. 2019. CmMYB#7, an R3 MYB transcription factor, acts as a negative regulator of anthocyanin biosynthesis in chrysanthemum. Journal of Experimental Botany. 70.12: 3111-3123.

36- Xu, Y., Jin, Z., Xu, B., Li, J., Li, Y., Wang, X., Wang, A., Hu, W., Huang, D., Wei, Q., Xu, Z. and Song, S. 2020. Identification of transcription factors interacting with a 1274 bp promoter of MaPIP1;1 which confers high-level gene expression and drought stress Inducibility in transgenic Arabidopsis thaliana. BMC Plant Biology. 20.1: 1-14.

37- Zhou, D., Shen, Y., Zhou, P., Fatima, M., Lin, J., Yue, J., Zhang, X., Chen, L.- Y. and Ming, R. 2019. Papaya CpbHLH1/2 regulate carotenoid biosynthesis-related genes during papaya fruit ripening. Horticulture Research. 6.1: 1-13.

38- Zhu, M.K., Chen, G.P., Zhou, S., Tu, Y., Wang, Y., Dong, T.T., Hu, Z.L. 2014. A new tomato NAC (NAM/ATAF1/2/CUC2) transcription factor, SlNAC4, functions as a positive regulator of fruit ripening and carotenoid accumulation. Plant and Cell Physiology. 55.1: 119–135.

39- Zhu, F., Luo, T., Liu, C., Wang, Y., Yang, H., Yang, W., Yang, H., Yang, W., Zheng, L., Xiao, X., Zhang, M., Xu, R., Xu, J., Zeng, Y., Xu, J., Xu, Q., Guo, W., Larkin, R.M., Deng, X. and Cheng, Y. 2017. An R2R3-MYB transcription factor represses the transformation of a- and b-branch carotenoids by negatively regulating expression of CrBCH2 and CrNCED5 in flavedo of Citrus reticulate. New Phytologist. 216: 178–192.

مقاله پژوهشی
DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.3.7.5

Identification of transcription factor affecting a promoter of carotenoid/apocartenoid biosynthetic pathway in *Crocus sativous L.*

Azizi Z. and Deljo A.

Dept. of Agricultural Biotechnology, Engineering and Technology Faculty, Bu-Ali SinaUniversity, Hamedan. I.R. of Iran

Abstract

It is a well established fact that stigma part of the *Crocus sativus L.* flower is the actual site for synthesis of many important carotenoids and apocarotenoids,and that too done at specific stages of development,but nothing is known about the mechanism that regulates its synthesis.Extensive researches on enzymes involved in the biosynthesis of saffron apocartenoids, especially crocin, indicates the presence of one of these enzymes, CsLcy-β2a in the stigma and also it activates and boosts b-carotene accumulation. Transcription factors, as a group of regulators,regulate many developmental and physiological processes in plants via their ability to tissue-specific and time-specific binding to promoters of target genes in order to control of gene expression. In this study, constructs contains of sequences CsMYB, CsARF8, CsERF2, CsZinc-finger CCCH and sequence CsLcyβ2a promoter fused with firefly luciferase reporter gene made by GoldenBriad system, and they was transferred to tobacco leaves (*Nicotianabenthamiana*) by agro-infiltration .The interaction between transcription factors and promoter was evaluated using Dual-Luciferase System assays .luciferase/Renilla (Luc/Ren) luminescence ratio was changed for only one transcription factor (CsMYB). Taken together, our findings illustrate that CsMYB is a positive regulator of carotenoid/apocarotenoid biosynthetic pathway in saffron.

Key words: *Crocus sativus L.*, transcription factors, GoldenBriad, agro-infiltration, Dual-Luciferase System Assays.