

افزایش بیان ژن زمان گلدهی خردل (*TFL1*)، گذر از فاز رویشی به زایشی را در گیاهان

تراریخته آراییدوپسیس به تأخیر می‌اندازد

محسن اسدی^۱، زهرا محمدی^۱ و فرخنده رضانژاد*^۱ ایران، کرمان، دانشگاه شهید باهنر کرمان، دانشکده علوم، بخش زیست‌شناسی^۲ ایران، دانشگاه فنی و حرفه‌ای، تهران، گروه علوم کشاورزی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۷/۲۶ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۲/۲۸

چکیده

تنظیم دقیق زمان گلدهی برای بهینه‌سازی تولیدات کشاورزی بسیار حائز اهمیت است چراکه به‌طور مستقیم روی کیفیت و کمیت برگ، گل، دانه و میوه‌ها و همچنین سهولت برداشت و بازاریابی آن‌ها اثر می‌گذارد. خردل بعنوان یک دانه روغنی مهم در سراسر جهان شناخته می‌شود و زمان گلدهی و ساختار گیاه نقش مستقیمی در افزایش عملکرد آن دارد. ژن *TERMINAL FLOWER 1* یکی از ژن‌های کلیدی است که در فرآیند گلدهی و تعیین شکل شاخساره در گیاهان نقش دارد. در مطالعه حاضر، این ژن از خردل کلون شد و عملکرد آن با استفاده از آزمایش‌های تراریخته‌سازی آراییدوپسیس مورد بررسی قرار گرفت. برای تعیین عملکرد ژن، سازه افزایش بیان با استفاده از روش Gateway کلونینگ طراحی شد و گیاهان تراریخته *Arabidopsis* با روش غوطه‌وری گل (*Floral dip*) تولید شدند. افزایش بیان ناحیه کد کننده در تیپ وحشی آراییدوپسیس (*Col-0*) باعث تأخیر زمان گلدهی و افزایش تعداد برگ‌های روزت، در مقایسه با گیاهان شاهد شد. با این حال، تعداد براکتها (برگ‌های گل‌آذین) بین گروه تراریخته و شاهد به نسبت یکسان باقی ماند. نتایج qRT-PCR نشان داد که ژن منتقل شده، در گیاهان آراییدوپسیس تراریخته بیان شد، در حالی که mRNA آن در گیاهان شاهد شناسایی نگردید. این نتایج نشان داد که ژن بررسی شده در این تحقیق ممکن است بعنوان مهارکننده گلدهی در خردل عمل کند و بتواند بعنوان یک هدف مهم در بهبود ژنتیکی این گیاه مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: بازدارنده گلدهی، بیان ژن، Gateway کلونینگ، غوطه‌وری گل، همساخت

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۳۴۳۲۱۱۲۶۰۶، پست الکترونیکی: Frezanejad@mail.uk.ac.ir

مقدمه

فرآیند گلدهی یکی از مهم‌ترین مراحل نمو گیاهان است. زمان مناسب گلدهی برای اکثر گیاهان حائز اهمیت بوده و می‌تواند تأثیر بسزایی در سازگاری آن‌ها داشته باشد. برای مثال، اگر گلدهی در زمانی با شرایط آب و هوایی مناسب و قابل اطمینان رخ دهد، در نهایت می‌تواند منجر به پراکنش موفق دانه‌ها شود. در مورد گونه‌های دگرلقاح نیز گلدهی باید با سایر افراد جمعیت و نیز گرده افشان‌های اصلی هماهنگ باشد. کنترل گذر از مرحله رویشی به زایشی از نظر کشاورزی و اقتصادی نیز بسیار مهم است (۲۴ و ۳۸). مطالعات نشان داده است که زمان مناسب گلدهی نمو گیاه را با تغییرات فصول هماهنگ کرده و موجب افزایش تولید میوه و دانه می‌شود (۴۷).

در گیاهان ترکیبی از عوامل محیطی و درونی مانند دوره نوری روزانه، ساعت زیستی، مسیر خودگردان، تنظیم‌کننده رشد گیاهی بخصوص هورمون جیبرلین، بهار شدن، دما، میزان قند و سن گیاه، موجب می‌شوند تا سرنوشت SAM^۱ از رویشی به زایشی تغییر کند. شبکه‌ای گسترده از ژن‌های تنظیمی، این عوامل درونی و محیطی را درک می‌کنند و با گذر به گلدهی در مناسب‌ترین زمان ممکن، باعث افزایش سازگاری و تولیدمثل موفق‌تر گیاهان می‌شوند (۳۷). این ژن‌های دخیل در گلدهی بسته به عملکردشان در مسیرهای مختلفی قرار گرفته‌اند که در نهایت همه این مسیرها با اثر روی گروهی از ژن‌ها به نام ژن‌های یکپارچه‌کننده مسیرهای گلدهی^۲؛ زمان گل‌دهی را کنترل می‌کنند. ژن‌های یکپارچه‌کننده مسیرهای گلدهی پس از فعال شدن به نوبه خود ژن‌های تعیین‌هویت مریستم گل^۳ را فعال کرده و گلدهی رخ می‌دهد (۲).

ژن *TERMINAL FLOWER 1 (TFL1)* بعنوان یک تنظیم‌کننده مهم زمان گلدهی و نیز هویت مریستم گل‌آذین، نقش مهمی در کنترل زمان گلدهی و موفقیت تولیدمثلی گیاهان دارد (۳۱ و ۴۶). ژن *TFL1* یک پروتئین محلول و کوچک ۲۰ کیلو دالتونی را رمز می‌کند که به خانواده پروتئینی متصل شونده به فسفاتیدیل اتانول آمین (PEBP) تعلق دارد (۹ و ۲۹). خانواده ژنی PEBP در تمامی موجودات از باکتری‌ها گرفته تا یوکاریوت‌ها یافت می‌شود. این خانواده نقش عمده‌ای در گلدهی گیاهان گوناگون ایفا می‌کند. خانواده PEBP در آرابدوپسیس علاوه بر *TFL1* دارای پنج عضو دیگر به نام‌های *FT*^۴، *TSF*^۵، *BFT*^۶، *ATC*^۷ و *MFT*^۸ است. این شش ژن را می‌توان در سه زیرخانواده تقسیم نمود. ژن‌های شبه *TFL1* (شامل *TFL1*، *BFT* و *ATC*)؛ ژن‌های شبه *FT* (شامل *FT* و *TSF*)؛ و ژن‌های شبه *MFT* (شامل *MFT*) (۳۵). ژن‌های شبه *TFL1* بازدارنده گلدهی و ژن‌های شبه *FT* فعال‌کننده گلدهی هستند. ژن‌های شبه *MFT* نیز در جوانه‌زنی دانه نقش دارند (۱۰).

ژن *TFL1* علاوه بر اینکه یک بازدارنده گلدهی است و زمان گلدهی را تنظیم می‌کند، باعث رشد نامحدود مریستم گل‌آذین نیز می‌شود. نشان داده شده که حتی یک جهش نقطه‌ای در آگزون شماره ۴ ژن *TFL1* در گیاه سویا (*Glycine max*) و لوبیا چشم‌بلبلی (*Vigna unguiculata*)، می‌تواند رشد نامحدود آن‌ها را به رشد محدود تبدیل کند (۱۲ و ۴۸).

شواهد ژنتیکی بسیاری نشان داده است که پروتئین‌های *LEAFY (LFY)* و *APETALA1 (AP1)* مستقیماً به نواحی تنظیمی سیس^۳ ژن *TFL1* متصل شده و بترتیب بعنوان فعال‌کننده و مهارکننده *TFL1* در فرآیند گلدهی عمل می‌کنند (۲۱، ۲۶ و ۵۴). در مقابل، بیان هر دو ژن *LFY* و *API* در مریستم گل‌آذین، توسط *TFL1* سرکوب شده و باعث حفظ حالت رویشی مریستم و جلوگیری از گل‌دهی در این ناحیه می‌شود. در تأیید این مطلب، نشان داده شده است که در موتانت‌های *tfl1* که پروتئین *TFL1* حضور ندارد، *LFY* و *API* در تمامی نواحی مریستم گل‌آذین بیان شده و باعث تبدیل کامل این مریستم به

^۱Shoot apical meristem^۲Floral pathway integrator genes^۳Floral identity genes^۴Phosphatidylethanolamine binding protein^۵FLOWERING LOCUS T^۶TWIN SISTER OF FT^۷BROTHER OF FT AND TFL1^۸ARABIDOPSIS THALIANA CENTRORADIALIS HOMOLOG^۹MOTHER OF FT AND TFL1

مریستم زایشی می‌شوند (۳۲ و ۴۰). برخی دیگر از فاکتورهای رونویسی متعلق به خانواده MADS-Box نظیر *SVP*، *SOC1* و *AGL24*^۳ می‌توانند از طریق API بیان *TFL1* را در گل‌های در حال نمو مهار کنند (۴، ۳۴ و ۴۴).

TFL1 و *FT* دو ژن کلیدی کنترل‌کننده‌ی زمان گلدهی هستند. اگرچه هر دو، زمان گلدهی و شکل ظاهری ساختار گیاه را تنظیم می‌کنند، اما نقشی متضاد یکدیگر دارند. همان‌طور که اشاره شد *TFL1* یک بازدارنده گلدهی و *FT* یک ژن محرک گلدهی است (۵۳). ساختار کلی پروتئین‌های *TFL1* و *FT* بسیار شبیه هم بوده و تقریباً ۵۶ درصد یکسانی در توالی آمینواسیدی آن‌ها مشاهده می‌شود (۲۲). پروتئین رمز شده توسط ژن *FT* در بافت‌های آوندی برگ به صورت یک مولکول پیام‌رسان متحرک از برگ به سمت رأس ساقه حرکت کرده و باعث شروع گلدهی می‌شود (۵۳). حرکت پروتئین *FT* از طریق آوندهای آبکش بوده و در نهایت از انتهای این آوندها بارگذاری می‌شود (۲۵). برعکس، *TFL1* در مریستم رأسی بیان شده و پروتئین آن تنها از لایه‌ای به لایه دیگر در رأس ساقه حرکت می‌کند. این حرکت به احتمال از راه پلاسمودسم‌ها صورت می‌گیرد (۱۱). الگوی بیان *TFL1* و *FT* با یکدیگر متفاوت است اما تفاوت توالی آمینواسید این دو پروتئین عامل مهم‌تری در تعیین عملکرد متضاد آن‌ها است (۲۳).

خردل یا *Brassica juncea* (L.) Czern and Coss از نظر اقتصادی یکی از مهم‌ترین دانه‌های روغنی و محصولات کشاورزی در دنیا است (۵۵ و ۵۷). از آنجا که روغن حاصل از دانه‌های این گیاه از نظر کمیت و کیفیت با کلزا برابری می‌کند، توانسته است بعنوان جایگزین آن در صنعت تولید روغن معرفی گردد. این گیاه که با نام خردل هندی نیز شناخته می‌شود نسبت به گرما، تنش خشکی و برخی بیماری‌های خاص مقاوم بوده و تولید آن کم هزینه است (۵۲). گیاه خردل متعلق به خانواده شب بو (*Brassicaceae*) و هم‌خانواده با گیاهان کلزا، کلم، کلم پیچ و گیاه مدل، آرابیدوپسیس (*Arabidopsis thaliana*) است. از منظر به‌نژادی محصولات کشاورزی، تنظیم زمان گلدهی در این گیاه مهم اقتصادی دارای اهمیت فراوان است. زیرا با توجه به تنش‌های فراوان زیستی و غیر زیستی، زمان مناسب گلدهی می‌تواند باعث افزایش محصول در این دانه روغنی شود (۵۰). همچنین نشان داده شده است تغییر ساختار شاخساره این گیاه می‌تواند بازده محصول را تغییر دهد (۲۷). با توجه به نقشی که ژن *TFL1* در زمان گلدهی، ساختار و شکل ظاهری گیاه از نظر رشد محدود یا نامحدود دارد و اهمیت بسیار زیاد این دو موضوع در گیاه خردل، در پژوهش حاضر ابتدا توالی ژن همساخت این ژن در گیاه مورد مطالعه شناسایی و در مرحله بعد نقش و عملکرد احتمالی آن در فرآیند گلدهی، با استفاده از آزمایش‌های تراریختی آرابیدوپسیس و استفاده از روش Gateway کلونینگ (۴۱)، بررسی شد.

مواد و روشها

گیاه مورد مطالعه: دانه گیاه آرابیدوپسیس (*Arabidopsis thaliana* Col-0) از TAIR^۵ دریافت و در اتاق کشت استاندارد، در شرایط دوره نوری روزبند (۱۶ ساعت روشنایی در دمای °C ۲۳ و ۸ ساعت تاریکی در دمای °C ۲۱) شدت نور ۱۰۰ μmol/m²/sec و ۶۰ درصد رطوبت، کشت گردید. این گیاهان در گلدان‌های ۱۰ سانتی‌متری (برای انتقال ژن) و یا سینی-

^۱SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF *CO1*

^۲SHORT VEGETATIVE PHASE

^۳AGAMOUS-LIKE 24

^۴SEPALLATA 4

^۵The *Arabidopsis* Information Resource

های کشت ۳۰ تایی (برای بررسی فنوتیپ) کشت گردیدند. برای این گیاهان از خاک‌های استاندارد اتوکلاو شده (خاک Debco Plugger مخلوط با کود Osmocote Extra Mini با غلظت ۳/۵ گرم بر لیتر و ۳ میلی‌لیتر بر لیتر Azamax) استفاده گردید. از گیاهان کشت شده در خاک برای رشد آراییدوپسیس جهت انتقال ژن و همچنین در مراحل بعد جهت بررسی فنوتیپ استفاده گردید. جهت شناسایی گیاهان تراریخت شده، دانه‌های آراییدوپسیس روی پلیت‌های آگار حاوی محیط جامد موراشیگ و اسکوگ کامل یا ۵۰ درصد (MS یا ۱/۲ MS) کشت گردیدند. گیاهان آراییدوپسیس پس از کشت دانه به مدت ۴۸ ساعت در تاریکی و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند (شکل ۱).

از جوانه رأسی گیاه خردل (*Brassica juncea*) در مرحله رشد رویشی و برگ و جوانه رأسی گیاه آراییدوپسیس در مرحله گلدهی برای استخراج RNA و DNA استفاده گردید (شکل ۲). همه بافت‌ها بلافاصله پس از جمع‌آوری در نیتروژن مایع منجمد و در فریزر ۸۰- نگهداری شد.

استخراج DNA و RNA: DNA ژنومی از برگ گیاه خردل و آراییدوپسیس با استفاده از کیت استخراج DNA (Qiagen, DNeasy Plant Mini Kit, Germany) بر طبق روش ذکر شده در کیت استخراج شد. RNA کل از جوانه رأسی خردل و برگ و جوانه رأسی آراییدوپسیس، با استفاده از کیت استخراج RNA (Qiagen, RNeasy Plant Mini Kit, Germany) بر طبق روش ذکر شده در کیت استخراج شد. بمنظور حذف آلودگی احتمالی DNA از آنزیم DNase شرکت فرمنتاز (Fermentas, DNase I, RNase-free) و به روش پیشنهادی شرکت تولید کننده استفاده شد.

برای انجام RT-PCR، از RNA کل استخراج شده از مریستم رأس شاخساره خردل که با آنزیم DNase تیمار شده بود استفاده گردید. بدین منظور با استفاده از کیت ساخت cDNA شرکت فرمنتاز (RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit) و طبق روش ذکر شده در آن از روی RNA تیمار شده، رشته اول cDNA تهیه گردید. در نهایت از این cDNA در PCR بعنوان DNA الگو استفاده شد. توالی کامل ناحیه کد کننده ژن همساخت *TFL1* در گیاه خردل (*B. juncea*) با پرایمرهای اختصاصی *bjTFL1-F* و *bjTFL1-R* (جدول ۱) توسط RT-PCR تکثیر و سپس جهت توالی‌یابی به شرکت تکاپو زیست ارسال گردید.

جدول ۱- فهرست آغازگرهای (پرایمر) استفاده شده در این پژوهش

کاربرد	توالی آغازگر (5' → 3')	نام آغازگر
توالی‌یابی <i>TFL1</i> خردل	ACGAGATCTATGGAGAATATGGGAGTTAG	<i>BjTFL1-F</i>
توالی‌یابی <i>TFL1</i> خردل	ATAGGTCACCGCATTGATAGGCATAAAC	<i>BjTFL1-R</i>
Gateway کلونینگ	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT ATGGAGAATATGGGAGTTAG	<i>Gate-BTFL1j-F</i>
Gateway کلونینگ	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT GCATTTGATAGGCATAAAC	<i>Gate-BjTFL1-R</i>
سنجش بیان <i>TFL1</i> خردل و تأیید تراریختی گیاهان	CTAGCATAGGGATACACAGGTTTC	<i>q-bjTFL1-F</i>

کاربرد	توالی آغازگر (5' → 3')	نام آغازگر
سنجش بیان <i>TFL1</i> خردل	CTCTGGGCGTTAAAGAAGACA	<i>q-bjTFL1-R</i>
سنجش بیان سایکلوپیلین	TGGACCAGGTGTACTTTCAATGG	<i>Cyclophilin-F</i>
سنجش بیان سایکلوپیلین	CCACTGTCTGCAATTACGACTTT	<i>Cyclophilin-R</i>
تأیید تراریختی گیاهان	CAGGAAACAGCTATGAC	<i>M13 Reverse</i>

TA کلونینگ و توالی یابی cDNA و ژن *TFL1* خردل: توالی کامل ناحیه کد کننده cDNA و توالی ژنومی ژن *TFL1* خردل (دارای ایترون و آگزون) در وکتور pTG19-T و با استفاده از کیت TA کلونینگ شرکت Vivantis و با روش پیشنهادی کیت کلون گردیدند. این وکتور دارای ژن *lacZ* در درون جایگاه کلونینگ چندگانه (MCS) خود بوده و دارای ژن مقاومت به آمپی‌سیلین نیز است. پس از کلونینگ، وکتورهای نوترکیب حاصل بترتیب *TA-BjTFL1-CDS* و *TA-BjTFL1-Gene* نامیده شدند. نهایتاً وکتورهای نوترکیب با روش پیشنهادی کیت به باکتری‌های مستعد *Escherichia coli* سویه DH5 α منتقل شدند. پس از تأیید کلنی‌های مثبت به روش کلونی PCR (۶)، از هر وکتور نوترکیب دو کلونی انتخاب و پس از استخراج پلاسمید توالی یابی شد. هرکدام از پلاسمیدها توسط پرایمرهای اختصاصی و M13 و در دو جهت توالی یابی گردیدند.

ساخت سازه افزایش بیان *TFL1* خردل به روش Gateway کلونینگ: برای ساخت سازه افزایش بیان ژن *TFL1* خردل از روش Gateway کلونینگ (کیت Invitrogen) و به روش پیشنهادی شرکت استفاده گردید. به‌طور کلی کلون سازی به روش Gateway شامل دو مرحله‌ی اصلی BP و LR است.

برای ساخت سازه افزایش بیان، توالی کد کننده cDNA ژن *TFL1* خردل با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن دارای جایگاه‌های attb در PCR تکثیر شد. محصول PCR پس از الکتروفورز، از ژل به روش توضیح داده شده در کیت تخلیص محصول PCR شرکت کیاژن (QIAquick® PCR Purification Kit)، تخلیص شد. این قطعه سپس با استفاده از واکنش BP به درون وکتور pDONR-Zeo منتقل گردید. این وکتور از نوع Entry و دارای ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک ژئوسین (Zeocin) است. پس از واکنش BP که توسط آنزیم BP Clonase انجام گرفت، وکتور نوترکیب حاصل به درون باکتری‌های مستعد *E. coli* (α -Select BIO-85027, Bioline) به روش شوک حرارتی منتقل گردید (۱۷). کلونی‌های تشکیل شده با کلونی PCR و تعیین توالی تأیید گردیدند. از کلونی‌های مثبت پلاسمید دارای ژن مورد نظر استخراج و در واکنش LR به وکتور مقصد pGWB602 Ω منتقل گردید. این واکنش توسط آنزیم LR Clonase انجام شد و توالی کد کننده ژن *TFL1* خردل در این وکتور تحت کنترل پروموتور CaMV 35S قرار گرفت. وکتور pGWB602 Ω دارای ژن مقاومت به اسپکتینومایسین (Spectinomycin) بوده و کلونی‌های تشکیل شده به روش هضم آنزیمی تأیید گردیدند. کلونی‌های مثبت در محیط مایع حاوی آنتی‌بیوتیک

¹ Multiple cloning site

اسپکتینومایسین به مدت یک شب رشد داده شده و سپس از آن جهت استخراج پلاسمید و تهیه گلیسرول استوک استفاده گردید. پلاسمید بیانی نوترکیب حاصل که دارای ژن *TFL1* خردل بود *35S::BjTFL1* نامیده شد. از این پلاسمید و وکتور خالی *pGWB602Ω* برای انتقال به آگروباکتریوم و در نهایت به گیاه آراییدوپسیس استفاده گردید.

انتقال به آگروباکتریوم: دو سازه افزایش بیان و وکتور خالی (*35S::BjTFL1* و *pGWB602Ω*) با روش الکتروپوریشن به درون باکتری‌های مستعد (electro-competent) آگروباکتریوم (*Agrobacterium tumefaciens*) سویه *GV3101* منتقل شدند. این انتقال با دستگاه الکتروپوریشن (Bio-Rad Gene Pulser II) با تنظیمات 200Ω ، 2.5 kV ، $25 \mu\text{F}$ برای زمان 5 msec انجام پذیرفت.

انتقال سازه افزایش بیان به گیاه آراییدوپسیس: جهت تأیید سازه، استخراج پلاسمید از آگروباکتریوم انجام و پلاسمید استخراج شده با هضم آنزیمی تأیید گردید. از آگروباکتریوم‌های دارای سازه‌های *35s::BjTFL1* و وکتور خالی *pGWB602Ω* برای انتقال ژن به گیاهان تیپ وحشی آراییدوپسیس به روش غوطه‌وری گل استفاده گردید (۵). سویه آگروباکتریوم در ابتدا درون محیط کشت کامل دارای آنتی‌بیوتیک جنتامایسین و ریفامپسین رشد می‌کند تا به مرحله اشباع برسد. در این مرحله باید درجه کدورت محلول به $0.8-1.0 \text{ OD}_{600}$ برسد. در مرحله بعد باکتری‌ها با سانتریفیوژ ته‌نشست شده و سپس ته‌نشست حاصل مجدداً در محلولی دارای ۵٪ ساکارز و ۰.۵٪ سورفاکتانت *Silwet L-77* حل می‌گردد (محلول تلقیح). ساکارز و *Silwet L-77* برای موفقیت این روش مهم هستند؛ اما نکته قابل توجه این است که *Silwet L-77* می‌تواند در غلظت‌های بالا برای گیاه سمی باشد. تکرار کردن غوطه‌وری در گل به فاصله چند روز شانس موفقیت را بالاتر می‌برد (۵). نگهداری گیاهان در شرایط مرطوب به مدت یک روز باعث افزایش نرخ انتقال ژن و تراریختی می‌شود.

غربالگری گیاهان ترانسفورم شده: دانه‌ها پس از ۶ هفته از انتقال ژن جمع‌آوری و استریل گردیدند (۳۳). دانه‌های ترانسفورم شده بر روی محیط $1/2 \text{ MS}$ دارای ۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر علف‌کش *BASTA* رشد کردند. پس از ۱۰ روز، گیاهان تراریخت شناسایی و به خاک منتقل شدند. این گیاهان در شرایط نوری روزبلند (۱۶ ساعت روشنایی، 23°C و ۸ ساعت تاریکی 21°C) رشد کردند. برای تأیید الحاق *T-DNA* درون ژنوم، از هر ژنوتیپ به‌طور تصادفی ۱۲ گیاه انتخاب گردید. پس از استخراج *DNA*، با *PCR* و استفاده از پرایمرهای اختصاصی ناحیه کد کننده *TFL1* خردل و وکتور، صحت الحاق ژن به درون ژنوم تأیید گردید. همه گیاهان تأیید شده T_0 برای بررسی فنوتیپ و اندازه‌گیری زمان گلدهی استفاده گردید.

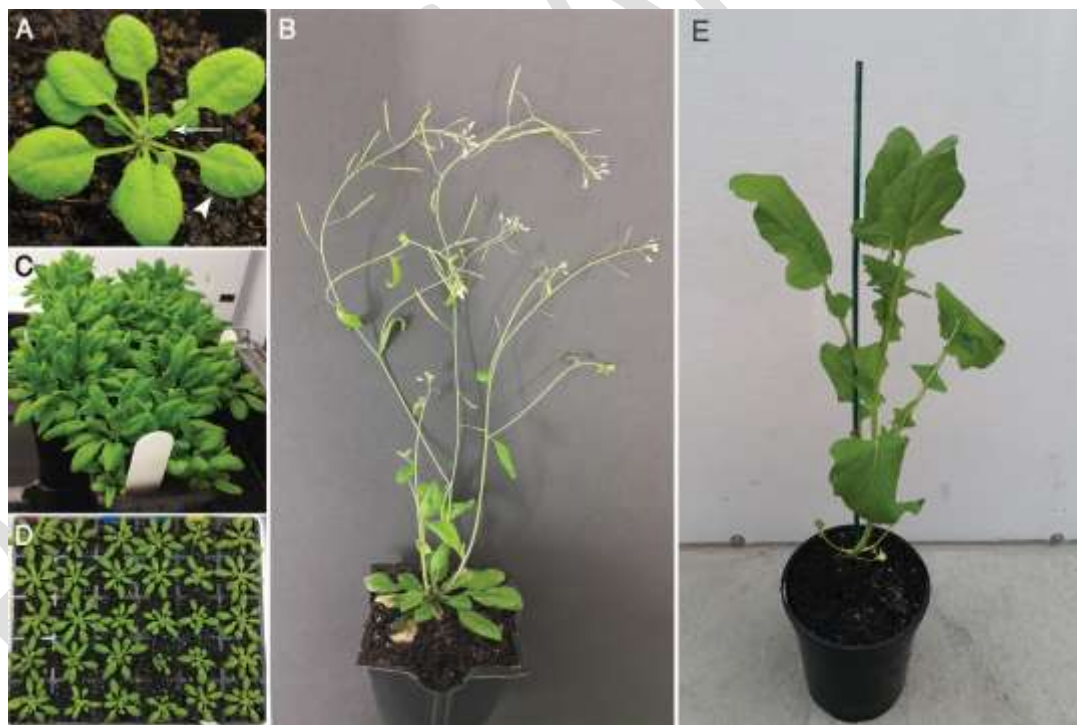
استفاده از qRT-PCR جهت تأیید عملکرد سازه: جهت استخراج *RNA* کل، از سه تکرار زیستی برای هر کدام از ژنوتیپ‌ها استفاده شد. برای هر تکرار از ۴ گیاه تراریخته مثبت نمونه‌برداری شد (در مجموع ۱۲ گیاه برای ژنوتیپ). نمونه‌برداری شامل مخلوطی از برگ، محور گل‌آذین و نواحی مریستم رأس ساقه، انجام شد. تیمار *RNA* استخراجی با *DNase* و ساخت *cDNA* به روش توضیح داده شده قبلی انجام شد. *cDNA* ساخته شده جهت کاهش احتمال خطای ناشی از برداشت با سمپلر در حجم‌های کم، ۵۰ بار با آب مقطر *Nuclease-free* رقیق گردید. دو پرایمر *qBjTFL1-F* و *qBjTFL1-R* نیز به گونه‌ای طراحی شدند که تنها قادر به تکثیر قطعه‌ای از ژن *TFL1* خردل باشند و ژن *TFL1* آراییدوپسیس را تکثیر نکنند. برای نرمال‌سازی سطح رونوشت‌ها از ژن *CYCLOPHILIN5* (*At2g29960*) بعنوان ژن مرجع استفاده شد. تمامی واکنش‌ها در دستگاه *Rotor-Gene Q* (*Gene Q real-time PCR machine*) (QIAGEN) و با سه تکرار انجام پذیرفت. از نرم‌افزار *Rotor-Gene Q* (QIAGEN) جهت سنجش کمی (comparative quantitation) استفاده شد. مقادیر هر ژن به‌صورت میانگین سه تکرار محاسبه گردید.

اندازه‌گیری زمان گلدهی: گیاهان تراریخت و شاهد هم‌زمان در خاک جوانه زده و در شرایط یکسان رشد نمودند. زمانی که گل‌آذین گیاهان به طول یک سانتی‌متر رسید، روز گلدهی ثبت گردید. همچنین تعداد برگ‌های روزتی^۱ و تعداد براکته (برگ گل‌آذین)^۲ نیز ثبت گردید. از تمامی گیاهان T₀ مربوط به هر ژنوتیپ در اندازه‌گیری زمان گلدهی استفاده گردید. سطح بیان *TFL1* خردل در گیاهان تراریخت افزایش بیان با پرایمرهای *q-bjTFL1-F* و *q-bjTFL1-R* به روش توضیح داده شده در قبل اندازه‌گیری شد.

بررسی آماری داده‌ها: داده‌های مربوط به اندازه‌گیری زمان گلدهی، تعداد برگ‌های روزتی و براکته و میزان بیان ژن به صورت میانگین \pm خطای استاندارد (SE) بیان گردید. تجزیه و تحلیل آماری با روش Independent Samples t Test ($P < 0.05$) و نرم‌افزار SPSS Statistics v 18 (SPSS Inc. Chicago, IL, USA) صورت پذیرفت.

نتایج

کشت گیاهان خردل (*Brassica juncea*) و آراییدوپسیس (*Arabidopsis thaliana*) بترتیب در گلخانه و اتاق رشد انجام و از گیاهان حاصل جهت مراحل بعدی استفاده شد (شکل ۱).

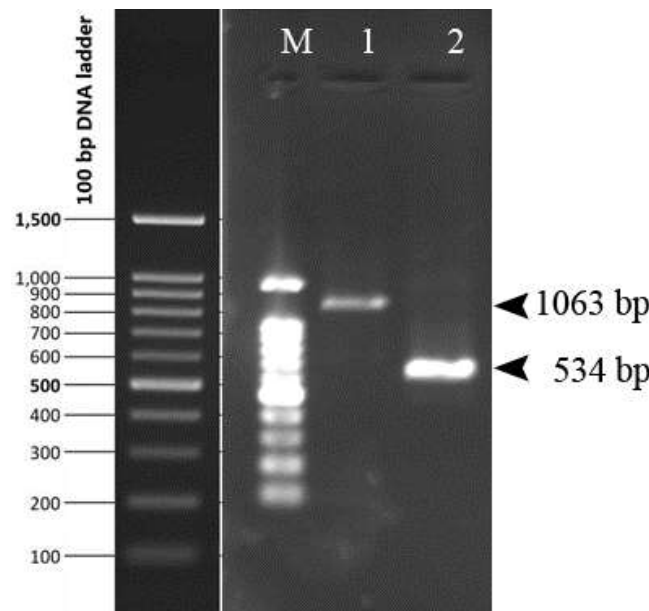


شکل ۱- گیاه آراییدوپسیس (*Arabidopsis thaliana*)؛ (A) گیاه آراییدوپسیس در مرحله گذر به گلدهی. نوک پیکان نشان دهنده برگ روزتی و پیکان نشان دهنده براکته (برگ گل‌آذین) (B) گیاه بالغ آراییدوپسیس در مرحله نمو میوه (C) رشد گیاه آراییدوپسیس جهت استفاده در انتقال ژن به روش غوطه‌وری گل (D) کاشت گیاه آراییدوپسیس در سینی‌های ۳۰ خانه جهت مشاهده فنوتیپ (E) تصویری از گیاه مورد مطالعه، خردل (*Brassica juncea*)، در ۵۵ روزگی.

^۱Rosette leaves

^۲Cauline leaves

جداسازی همساخت *TFL1* از گیاه خردل: با استفاده از پرایمرهای اختصاصی قطعات مربوط به DNA ژنومی و ناحیه کد کننده cDNA ژن همساخت *TFL1* در گیاه خردل با PCR و RT-PCR تکثیر شد (جدول ۱). وجود تک باندهای اختصاصی برای هر کدام از این قطعات نشان دهنده طراحی مناسب پرایمرها و اختصاصی بودن آنها است (شکل ۲).



شکل ۲- نیم‌رخ الکتروفورزی جداسازی ژن *TFL1* خردل (۱) قطعه مربوط به DNA ژنومی؛ (۲) قطعه مربوط به cDNA (M) لدر 100 bp هر دو قطعه پس از انتقال به پلاسمید TA و تأیید آن، به صورت مستقیم و معکوس تعیین توالی گردیدند. نتیجه تعیین توالی و هم‌ردیفی توالی‌ها نشان داد که قطعه ژنومی دارای طولی معادل ۱۰۶۳ نوکلئوتید بود که دارای یک چارچوب خوانش باز (ORF) به طول ۵۳۴ نوکلئوتید است و یک پروتئین ۱۷۷ آمینو اسیدی را کد می‌کند که ۹۵ درصد با پروتئین *TFL1* در آرآبیدوپسیس یکسانی دارد. توالی قطعه ژنومی و قطعه مربوط به cDNA با شماره‌های دستیابی MG272468 و MG272469، در بانک ژن ثبت گردیدند (شکل ۳).

```

ATGGAGAATATGGGAGTTAGAGTGATAGAGCCATTGATAATGGGAAGAGTGGTAGGAGATGTTCTTGATTCTTCACTCCAACAATTAAA
M E N M G V R V I E P L I M G R V V G D V L D F F T P T I K
ATGAATGTGAGCTACAACAAGAATCAAGTCTCCAACGGCCATGAGCTTTTGCCTTCTGTCTCCTCCAAGCCTAGGGTTGAGATCCAT
M N V S Y N K N Q V S N G H E L L P S S V S S K P R V E I H
GGTGGTGTCTCAGATCCTTCTTCCACCTTGGTATATATGCATATATTAAGATTATTCTGAAATCATCACTAATGTTGSAACGCTGGTTGT
G G D L R S F F T L
TATGGTCAAAACATATAAAAATCTCTTTCTTTTATCTTATATTTTACATGTTTGTAAATAACATGATGCTGTTATTTAAATTTTAT
CATTATTTTAAATATTTTATTTGATGGTAAACACAACCTTAATCGAAAACAGGTGATGATAGACCTGATGTTCCAGGTCCTAGTGACCC
V M I D P D V P G P S D P
CTTTCTAAAGAGCACCTGCATTGGTACGATCATTTTTCGTTTGTCTTTCATTTTGGGCCAATATTCATATGTTTTCATGAGAATTTT
F L K E H L H W
TAACCTTAATGATGTTTTTGTGTTTGTCTCTCGACTGATTTTATATGAACCTTGAGTTATTTTGGTCAAAATCTCTTCCATCACAACACG
GGGATTTCCCTAAACTTTTAGTAGAAAGATAAAGAAATTAATCTTGTAAATGTTTTTTTTCTTGTAAATGTTTAAACAGGATAGTAA
I V
CAAACATCCCGGTACACCCGATGCTACATTTGGTACGGACTCGTGCATGAATTTTTCGATACATAAATACTATAGTAAAATATTTTCACAT
T N I P G T T D A T F
ATTCAATTAAGACATTTGAATCGAAATAATAGGAAAAGAGGTGTTGAGCTATGAGTTGCCAAGCCCTAGCATAGGGATACACAGGTTCTGT
G K E V V S Y E L P R P S I G I H R F V
GTTTGTCTGTTCAAGCAGAAGCAAAGACGTGTTATCTTCCCAACATTCCTTCGAGAGATAACTCAACACTCGAAAATTTCCGATCGA
F V L F K Q K Q R R V I F P N I P S R D N F N T R K F A I E
GTATGATCTTGGTCTTCTCTGCTGCTGCTCTTTTAAACGCCAGAGAGAACTGCAGCTCGAAGACGTTAATCACGTTTATGCCTATC
Y D L G L P V A A V F F N A Q R E T A A R R R *

```

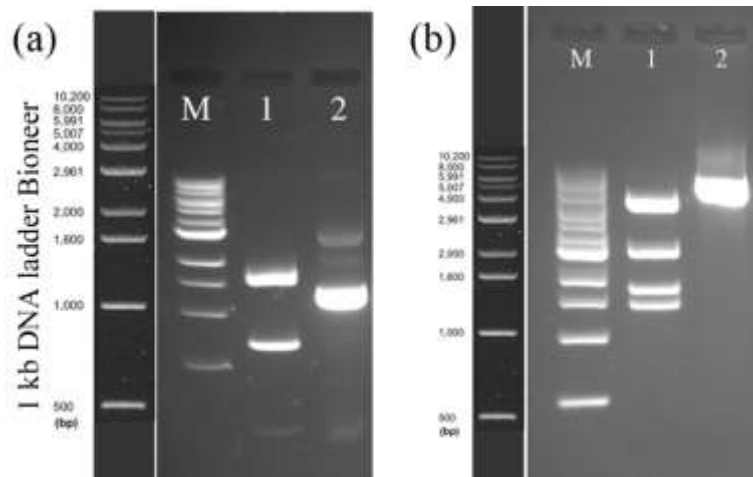
شکل ۳- توالی نوکلئوتیدی کامل ژن *TFL1* خردل که در بانک ژن با شماره دستیابی‌های MG272468 و MG272469 ثبت شده است. در شکل توالی آمینواسیدهای کد کننده توسط توالی اگزونها مشخص است.

ساخت سازه افزایش بیان *TFL1* خردل: برای روشن شدن نقش *TFL1* خردل در زمان گلدهی، وکتور دوگانه جهت افزایش بیان این ژن طراحی و ساخته شد. جهت ساخت سازه افزایش بیان، از روش Gateway کلونینگ استفاده گردید. در این روش، ناحیه کد کننده *TFL1* خردل به درون وکتور مقصد pGWB602Ω وارد گردید. این وکتور ناحیه کد کننده *TFL1* خردل را تحت کنترل پروموتور CAM35S قرارداد. این پروموتور منجر به افزایش بیان ژن هدف می‌شود. سازه نوترکیب حاصل 35S::BjTFL1 نامیده شد (شکل ۴).

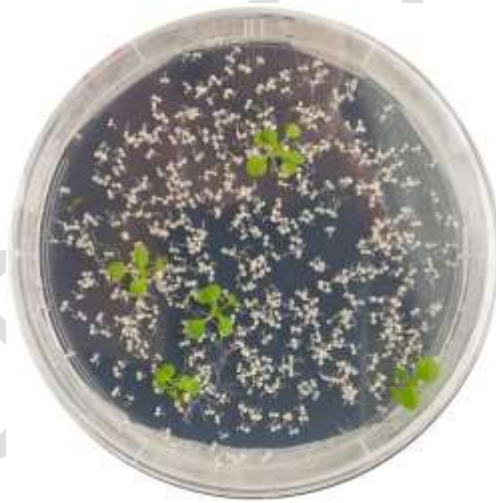


شکل ۴- تصویر شماتیک از وکتور نوترکیب 35S::BjTFL1 ساخته شده به روش Gateway کلونینگ. RB و LB نشان دهنده مرزهای راست و چپ T-DNA است.

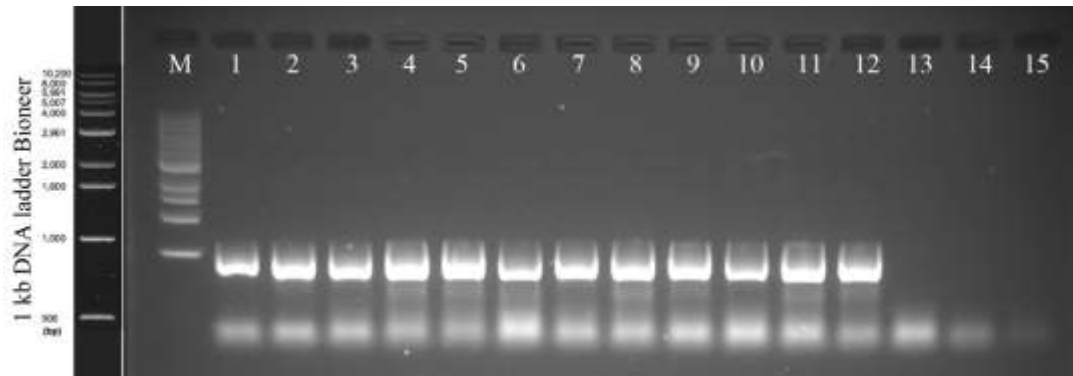
در هر مرحله از کلونینگ، بسته به شرایط از روش‌های PCR، هضم آنزیمی و تعیین توالی جهت تأیید صحت کلونینگ استفاده گردید (شکل ۵).



شکل ۵- (a) انجام هضم آنزیمی دوگانه بر روی پلاسمید pDONR/Zeo حاوی ژن TFL1 خردل توسط دو آنزیم *StuI* و *NcoI*؛ چاهک ۱ پلاسمید برش خورده و چاهک ۲ پلاسمید غیر برش خورده را نشان می‌دهد. (b) انجام هضم آنزیمی دوگانه بر روی پلاسمید pGWB602Ω حاوی ژن TFL1 خردل توسط دو آنزیم *StuI* و *NotI*؛ چاهک ۱ پلاسمید برش خورده و چاهک ۲ پلاسمید غیر برش خورده را نشان می‌دهد. انتقال سازه‌ها به گیاه آرابیدوپسیس: تمامی سازه‌ها به صورت مستقل به گیاه آرابیدوپسیس تیپ وحشی با واسطه آگروباکتریوم منتقل و دانه‌های T₀ حاصل، روی محیط کشت مناسب غربال شدند (شکل ۶). همچنین سازه‌های خالی نیز بعنوان شاهد به گیاهان تیپ وحشی آرابیدوپسیس منتقل شد.

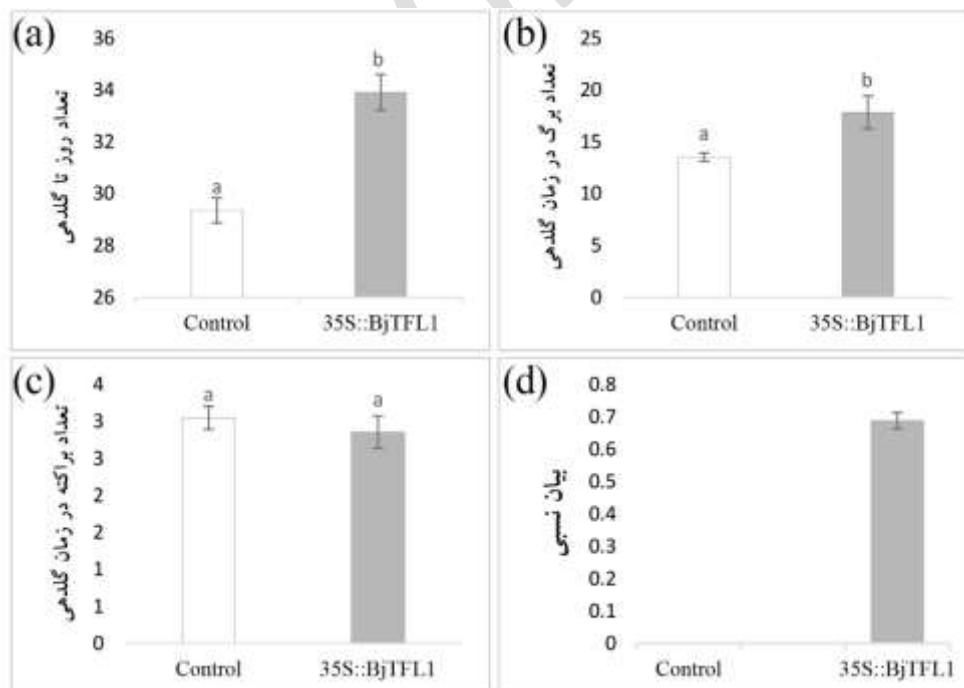


شکل ۶- کشت گیاهان ترانسفورم شده بر روی محیط MS حاوی علف‌کش باستا (BASTA). در شکل تنها گیاهان حاوی پلاسمید رشد کرده‌اند. برای تأیید تراریخت بودن گیاهان رشد کرده بر روی محیط انتخابی، حضور سازه در گیاهان با PCR تأیید شد (شکل ۷).



شکل ۷- تأیید انتقال ژن به درون گیاه؛ ۱ تا ۱۲) تأیید وجود سازه افزایش بیان ژن *TFL1* خردل (*35S::BjTFL1*) در ۱۲ گیاه آراییدوپسیس با استفاده از (PCR؛ ۱۳) پلاسمید *pGWB602Ω* بعنوان الگو در (PCR؛ ۱۴) DNA تیب وحشی آراییدوپسیس بعنوان الگو در (PCR؛ ۱۵) کنترل منفی، (M) مارکر.

در آزمایش افزایش بیان *TFL1* خردل، تعداد ۳۵ عدد گیاه منحصربه‌فرد ترانسفورم شده نسل T_0 برای سازه *35S::BjTFL1* و ۳۹ عدد گیاه منحصربه‌فرد که دارای وکتور *PGWB602Ω* خالی بودند بعنوان شاهد، به دست آمد. به‌طور متوسط گیاهان دارای سازه افزایش بیان *TFL1* خردل (*35S::BjTFL1*)، در روز $0/69 \pm 33/91$ و در حالی که تعداد $1/58 \pm 17/86$ عدد برگ روزتی و $0/16 \pm 2/86$ عدد براکته (برگ گل‌آذین) داشتند، شروع به گلدهی کردند؛ اما گیاهان شاهد که دارای وکتور خالی بودند، زودتر گل دادند. این گیاهان به‌طور متوسط در روز $0/49 \pm 29/36$ و در حالی که تعداد $0/41 \pm 13/54$ عدد برگ روزتی و $0/22 \pm 3/05$ براکته داشتند، گل دادند (شکل ۸).



شکل ۸- مقایسه فنوتیپ و بیان نسبی ژن *TFL1* در گیاهان شاهد (Control) دارای وکتور *PGWB602Ω* و تراریخت حاوی سازه افزایش بیان ژن (*35S::BjTFL1*) (a, b, c) مقایسه تعداد روز، تعداد برگ‌ها و براکته‌های گیاهان شاهد و گیاهان تراریخت *35S::BjTFL1* در زمان گلدهی. زمان گلدهی و تعداد برگ‌ها زمانی که گل‌آذین به طول یک سانتی‌متر رسید یادداشت شد. مقادیر برابر با میانگین \pm خطای استاندارد (SE). از روش

Independent Samples t Test برای مقایسه ژنوتیپ‌های مختلف استفاده گردید. حروف مختلف نشان دهنده تفاوت معنی‌دار گیاه نسبت به شاهد در هر نمودار است ($P < 0.05$). بررسی بیان نسبی *TFL1* خردل در گیاهان تراریخت با روش qRT-PCR. نتایج qRT-PCR بر اساس سه تکرار زیستی و سه تکرار تکنیکی برای هر نمونه RNA به دست آمد. از ژن *CYCLOPHYLIN* بعنوان مرجع استفاده گردید. طبق انتظار بیان این ژن در گیاهان شاهد مشاهده نشد.

سنجش تغییرات بیان *TFL1* خردل در گیاهان تراریخت شده آراییدوپسیس: در مرحله بعدی برای اثبات تفاوت‌های فنوتیپی مشاهده شده، از روش qRT-PCR استفاده و تغییرات سطح رونوشت‌های *TFL1* خردل بررسی گردید. برای هر ژنوتیپ از ۱۲ گیاه به صورت سه گروه ۴ تایی (سه تکرار) RNA کل از برگ و رأس آنها استخراج گردید. در گیاهان تراریخت شده با سازه 35S::BjTFL1 بیان ژن *TFL1* خردل مشاهده شد در صورتی که در گیاهان شاهد، طبق انتظار رونوشت این ژن مشاهده نگردید (شکل ۸ d).

بحث

گذر به گلدهی یک تغییر نموی بسیار مهم در زندگی گیاهان گل‌دار است. مکانیسم‌های تنظیمی زمان گلدهی در تولید محصولات کشاورزی نیز مهم است؛ زیرا می‌تواند کمیت و کیفیت برگ، گل، دانه، میوه و حتی سهولت برداشت و ذخیره‌سازی این محصولات را تحت تأثیر قرار دهد. علاوه بر این، فرآیند گلدهی می‌تواند تحت تأثیر تنش‌های محیطی، بسیار آسیب‌پذیر باشد (۲۸). گیاهان برای اینکه بتوانند تولیدمثل موفق داشته باشند، عوامل محیطی و درونی را کنترل و نسبت به آن‌ها پاسخ مناسب می‌دهند. گذر از فاز رویشی به زایشی یکی از مراحل نموی اصلی است که تحت کنترل ژنتیکی شدیدی قرار دارد. مسیرهای ژنتیکی در شبکه‌ای نسبتاً پیچیده این مرحله را تنظیم می‌کنند (۱۸). بررسی گل‌دهی در گیاه آرآبیدوپسیس بعنوان یک گیاه مدل متعلق به خانواده شب بو منجر به شناسایی ژن‌های مختلفی شده است که در این پدیده نقش ایفا می‌کنند. برخی از این ژن‌ها نظیر *API*، *LFY*، *SOCI*، *FT*، *CONSTANS (CO)* و *SEP* باعث تحریک گل‌دهی و برخی دیگر نظیر *TFL1* و *FLOWERING LOCUS C (FLC)* مانع از گل‌دهی می‌شوند (۳، ۳۸، ۴۳ و ۴۵).

در این پژوهش برای انتقال ژن به گیاه از روش انتقال ژن با واسطه آگروباکتریوم استفاده شد. در این روش معمولاً تعداد نسخه کمتری از ژن هدف به گیاه منتقل می‌شود (۱۴). یکی از روش‌های ساده و در عین حال کارآمد برای استفاده از آگروباکتریوم جهت انتقال ژن در گیاهان به‌ویژه گیاه آرآبیدوپسیس، روش غوطه‌وری گل است (۱). سالم بودن گیاهان و زمان مناسب انجام غوطه‌وری گل، اثر مستقیمی بر روی بالا رفتن درصد گیاهان تراریخت دارد. گیاهان ضعیف و یا انجام غوطه‌وری در زمان نامناسب گاهی می‌تواند باعث کاهش شدید و یا حتی عدم تولید گیاهان تراریخت شود. در این مطالعه، انتقال ژن به صورت موفقیت‌آمیز رخ داد که نشان دهنده شرایط صحیح رشد و سالم بودن گیاهانی است که برای غوطه‌وری گل استفاده شدند (شکل ۱).

تاکنون همساخت‌های *TFL1* در بسیاری از گیاهان گل‌دار نظیر آرآبیدوپسیس (*Arabidopsis thaliana*) (۸)، برنج (*Oryza sativa*) (۳۶)، نخود (*Pisum sativum*) (۱۶)، انگور (*Vitis vinifera*) (۷)، زعفران (*Crocus sativus*) (۴۹)، لوبیا (*Phaseolus vulgaris*) (۴۲)، توت‌فرنگی (*Fragaria vesca*) (۳۰)، سیب‌درختی (*Malus × domestica*) (۱۵)، گلابی (*Pyrus pyrifolia*) (۴)، انار (*Punica granatum*) (۳۹)، خیار (*Cucumis sativus*) (۵۶)، گل داوودی (*Chrysanthemum morifolium*) (۲۰) و بادمجان (*Solanum melongena*) (۴۶) شناسایی شده است. در تمامی تحقیقات نشان داده شده است که همساخت‌های *TFL1* در زمان گلدهی و ساختار گیاه نقش اساسی دارند. همچنین نشان داده شد این همساخت‌ها اکثراً بعنوان مهارکننده گلدهی عمل کرده و منجر به رشد رویشی نامحدود می‌شوند. *TFL1* بعنوان یک مسدود کننده مانع حرکت مولکول‌های پیام‌رسان (از جمله *FT*) به سمت رأس ساقه می‌شود؛ بنابراین، احتمالاً *TFL1* که در مرحله گذر از فاز رویشی به زایشی در کناره‌های *SAM* بیان می‌شود، مانع حرکت پروتئین *FT* به این قسمت‌ها می‌شود (۱۱ و ۲۵).

با توجه به شباهت توالی *TFL1* و *FT* و نقش کاملاً متضاد این دو، توالی یابی صحیح ژن مورد نظر، کلونینگ و انتقال آن به گیاه می‌تواند دارای حساسیت‌های بالایی باشد زیرا نشان داده شده تغییر تنها یک آمینواسید می‌تواند پروتئین *TFL1* را به *FT* و یا بالعکس تبدیل کند. جالب است که برای تغییر این یک اسیدآمینو تنها تغییر یک نوکلئوتید نیز کافی خواهد بود (۲۲ و ۵۳).

مقایسه توالی تعداد زیادی از همساخت‌های *TFL1* نشان داده است که ساختار این ژن‌ها بسیار حفاظت شده و عموماً دارای چهار اگزون و سه اینترون هستند. طول اگزون‌ها بسیار ثابت و همراه با تغییرات بسیار کم آمینواسیدها است. در سطح توالی پروتئینی، بین همساخت‌های *TFL1* تغییرات کمی مشاهده می‌شود. برخلاف اگزون، طول اینترون‌ها بسیار متفاوت است. همساخت‌های *TFL1* در دولپه‌ای‌ها دارای طول اگزونی بین ۵۱۹ تا ۶۰۹ نوکلئوتید هستند، حال آنکه طول اینترون‌ها بسیار متنوع‌تر و بین ۴۹۶ تا ۲۰۴۸ نوکلئوتید است (۱۹). در این تحقیق، توالی کامل ژن و ناحیه کد کننده cDNA ژن همساخت *TFL1* در گیاه خردل از جوانه رأسی استخراج، کلون و توالی‌یابی گردید. نتایج توالی‌یابی نشان داد که طول کامل ژن در ژنوم معادل ۱۰۶۳ جفت باز است. همچنین cDNA این ژن دارای چهارچوب خوانش باز (ORF) به طول ۵۳۴ نوکلئوتید است و یک پروتئین ۱۷۷ آمینواسیدی را کد می‌کند که ۹۵ درصد با پروتئین *TFL1* در آرابتیدوپسیس یکسانی دارد. مقایسه توالی cDNA و DNA ژنومی نشان داد که ژن *TFL1* خردل دارای چهار اگزون به طول‌های ۶۲، ۲۱۰، ۴۱ و ۲۲۱ جفت باز و سه اینترون به طول‌های ۲۰۲، ۲۳۸ و ۸۹ جفت باز است (شکل ۳). ژن *TFL1* در آرابتیدوپسیس نیز دارای طولی به اندازه ۱۰۳۷ جفت باز و ORF به طول ۵۳۴ نوکلئوتید است. این طول بسیار شبیه به طول ژن *TFL1* خردل است. *TFL1* آرابتیدوپسیس همانند *TFL1* خردل دارای چهار اگزون به طول ۶۲، ۲۱۰، ۴۱ و ۲۲۱ است. همچنین ژن *TFL1* آرابتیدوپسیس دارای سه اینترون به طول ۲۱۰، ۲۰۶ و ۸۷ جفت باز است که همگی تا حدودی با طول اینترون‌های *TFL1* خردل متفاوت هستند. اگرچه طول اینترون‌های *TFL1* خردل و *TFL1* آرابتیدوپسیس کاملاً برابر نیست اما تعداد و مکان قرارگیری اگزون‌ها و اینترون‌ها حفاظت شده است. حفاظت‌شدگی ناحیه کد کننده و ساختار اگزون-اینترون می‌تواند نشانه‌ای از شباهت عملکرد احتمالی بین *TFL1* خردل و *TFL1* آرابتیدوپسیس باشد. قبلاً نشان داده شده است که طول اینترون‌ها در نهاندانگان ابتدایی بلندتر از دولپه‌ها و تک‌لپه‌هاست. از این رو پیشنهاد شده است احتمالاً در طی تکامل به تدریج نواحی از اینترون‌های این ژن‌ها حذف شده‌اند. اینترون‌های طویل دارای موتیف‌های حفاظت شده‌ای هستند که به‌طور بالقوه قابلیت تنظیم بیان همساخت‌های *TFL1* را دارند. قبلاً پیشنهاد شده است که اینترون‌های بلندتر با داشتن عناصر سیس عملکردی بیشتر می‌توانند با تغییرات پیرایش RNA (RNA Splicing) بر روی بیان ژن همساخت *TFL1* در نهاندانگان ابتدایی اثرگذار باشد (۱۹).

انتقال پایدار یک ژن به گیاه می‌تواند اطلاعات فراوانی در رابطه با نقش و عملکرد یک ژن فراهم آورد (۱۳). در این تحقیق، عملکرد ژن *TFL1* خردل در گلدهی با افزایش بیان ناحیه کدکننده این ژن توسط پروموتور CaMV35S در گیاهان تیپ وحشی آرابتیدوپسیس، بررسی گردید. فنوتیپ گیاهان تراریخت شده مشاهده و افزایش بیان ژن *TFL1* خردل توسط روش qRT-PCR تأیید شد. نتایج مطالعات فنوتیپ نشان داد که زمان گلدهی در گیاهان تراریخت شده به‌طور معنی‌داری به تأخیر افتاد و این گیاهان به‌طور میانگین تعداد بیشتری برگ روزتی نسبت به گیاهان شاهد تولید نمودند. این نتایج نشان می‌دهد که *TFL1* خردل به‌احتمال یک بازدارنده گلدهی است.

در تحقیقات زیادی از روش افزایش بیان برای بررسی عملکرد یک ژن استفاده شده است. برای مثال، ژن همساخت *TFL1* مربوط به گیاهانی نظیر انگور (۷)، زعفران (۴۹)، لوبیا (۴۲)، تمشک سیاه (۵۱)، خیار (۵۶)، انار (۳۹) و گل داوودی (۲۰) در درون گیاه تیپ وحشی آرابتیدوپسیس افزایش بیان پیدا کرده است تا نقش و عملکرد این ژن‌های همساخت تعیین گردد. در اکثر این آزمایش‌ها افزایش بیان ژن همساخت *TFL1* در آرابتیدوپسیس، تأخیر در گلدهی و افزایش طول دوره رشد رویشی گیاهان تراریخت شده گزارش گردیده است. نتایج این تحقیقات نشان داد که همساخت‌های *TFL1* در گیاهان مذکور، بعنوان

مهارکننده گلدهی عمل می‌کنند، نتایجی که با نتیجه این تحقیق سازگار و همسو است. با استفاده از نتایج حاصل می‌توان در آینده با هدف قرار دادن این ژن در جهت بهبود عملکرد زراعی این دانه روغنی گام برداشت.

نتیجه‌گیری

در این پژوهش، یکی از ژن‌های کلیدی تنظیم‌کننده زمان گلدهی و شکل ظاهری گیاه خردل به نام *TFL1* شناسایی گردید. نتایج توالی‌یابی کامل ژن و cDNA نشان داد، ساختار ژن *TFL1* خردل مانند سایر همساخت‌های *TFL1* در گیاهان دیگر، کاملاً حفاظت شده است. تعداد آگزونها و اینترون‌ها در *TFL1* خردل بترتیب چهار و سه عدد بود که مشابه با سایر همساخت‌های خود در گیاهان دیگر است. طول آگزونها و مکان قرارگیری اینترون‌ها نیز در این ژن، کاملاً حفاظت شده بود. برای بررسی عملکرد احتمالی ژن *TFL1* خردل از روش تراریختی گیاه آراییدوپسیس استفاده گردید. بدین منظور توالی ناحیه کدکننده cDNA ژن *TFL1* خردل با روش Gateway کلونینگ در وکتور بیانی pGWB602Ω کلون و تحت کنترل پروموتور CaMV35S قرار گرفت. این سازه با نام 35S::BjTFL1 با واسطه آگروباکتریوم و به روش غوطه‌وری گل به آراییدوپسیس منتقل گردید. گیاهان آراییدوپسیس که در آنها *TFL1* خردل بیان گردیده بود نسبت به گیاهان کنترل، گلدهی دیرتر و دوره رشد رویشی بیشتری را نشان دادند. این نتایج نشان داد که *TFL1* خردل به احتمال یک بازدارنده گلدهی است و می‌تواند یک هدف مناسب جهت بهبود ژنتیکی در این محصول کشاورزی مهم باشد.

منابع

1. Ali, I., Sher, H., Ali, A., Hussain, S., Ullah, Z. 2022. Simplified floral dip transformation method of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Microbiological Methods*, 197, 106492. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mimet.2022.106492>
2. Amasino, R. M., Michaels, S. D. 2010. The Timing of Flowering. *Plant Physiology*, 154, 516-520. <https://doi.org/10.1104/pp.110.161653>
3. Asadi, M., Rezanejad, F., Sharifi, G., Sasan, H. 2015. Sequencing of LEAFY homologous gene in *Solanum villosum* Mill. *Cell and Tissue Journal*, 6, 51-58. <https://doi.org/10.52547/jct.6.1.51>
4. Bai, S., Tuan, P. A., Saito, T., Ito, A., Ubi, B. E., Ban, Y., Moriguchi, T., Wilson, Z. 2017. Repression of TERMINAL FLOWER1 primarily mediates floral induction in pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai) concomitant with change in gene expression of plant hormone-related genes and transcription factors. *Journal of Experimental Botany*, 68, 4899-4914. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx296>
5. Bent, A. 2006. *Arabidopsis thaliana* floral dip transformation method. *Methods in Molecular Biology*, 343, 87-103. <https://doi.org/10.1385/1-59745-130-4:87>
6. Bergkessel, M., Guthrie, C. 2013. Chapter Twenty Five - Colony PCR. In J. Lorsch (Ed.), *Methods in Enzymology* (Vol. 529, pp. 299-309). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-418687-3.00025-2>
7. Boss, P. K., Sreekantan, L., Thomas, M. R. 2006. A grapevine TFL1 homologue can delay flowering and alter floral development when overexpressed in heterologous species. *Functional Plant Biology*, 33, 31-41.
8. Bradley, D., Ratcliffe, O., Vincent, C., Carpenter, R., Coen, E. 1997. Inflorescence commitment and architecture in *Arabidopsis*. *Science*, 275, 80-83. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8974397>
9. Chen, W., Yao, J., Li, Y., Zhao, L., Liu, J., Guo, Y., Wang, J., Yuan, L., Liu, Z., Lu, Y., Zhang, Y. 2019. Nulliplex-branch, a TERMINAL FLOWER 1 ortholog, controls plant growth habit in cotton. *Theoretical and Applied Genetics*, 132, 97-112. <https://doi.org/10.1007/s00122-018-3197-0>
10. Chen, Y., Xu, X., Chen, X., Chen, Y., Zhang, Z., Xuhan, X., Lin, Y., Lai, Z. 2018. Seed-Specific Gene MOTHER of FT and TFL1 (MFT) Involved in Embryogenesis, Hormones and Stress Responses in

- Dimocarpus longan* Lour. *International Journal of Molecular Sciences*, 19, 2403. <https://doi.org/10.3390/ijms19082403>
11. Conti, L., Bradley, D. 2007. TERMINAL FLOWER1 is a mobile signal controlling Arabidopsis architecture. *The Plant cell*, 19, 767-778. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.049767>
 12. Dhanasekar, P., Reddy, K. S. 2015. A novel mutation in TFL1 homolog affecting determinacy in cowpea (*Vigna unguiculata*). *Molecular Genetics and Genomics*, 290, 55-65. <https://doi.org/10.1007/s00438-014-0899-0>
 13. Drabesova, J., Cerna, L., Masterova, H., Kolouskova, P., Potocky, M., Storchova, H. 2016. The Evolution of the FT/TFL1 Genes in Amaranthaceae and Their Expression Patterns in the Course of Vegetative Growth and Flowering in *Chenopodium rubrum*. *G3*, 6, 3065-3076. <https://doi.org/10.1534/g3.116.028639>
 14. Eskandari, F., Ebrahimi, M. A., Naseri, H. R., Zarinpanjeh, N. 2019. The Optimized Method of Agrobacterium Mediated Transformation in *Nitraria schoberi* (Ghar-e-Dagh in Persian). *Journal of Genetic Resources*, 5, 97-103. <https://doi.org/10.22080/jgr.2019.2362>
 15. Flachowsky, H., Szankowski, I., Waidmann, S., Peil, A., Trankner, C., Hanke, M. V. 2012. The MdTFL1 gene of apple (*Malus x domestica* Borkh.) reduces vegetative growth and generation time. *Tree Physiol*, 32, 1288-1301. <https://doi.org/10.1093/treephys/tps080>
 16. Foucher, F., Morin, J., Courtiade, J., Cadioux, S., Ellis, N., Banfield, M. J., Rameau, C. 2003. DETERMINATE and LATE FLOWERING Are Two TERMINAL FLOWER1/CENTRORADIALIS Homologs That Control Two Distinct Phases of Flowering Initiation and Development in Pea. *The Plant Cell*, 15, 2742-2754. <https://doi.org/10.1105/tpc.015701>
 17. Froger, A., Hall, J. E. 2007. Transformation of plasmid DNA into *E. coli* using the heat shock method. *J Vis Exp* 253. <https://doi.org/10.3791/253>
 18. Ganjalikhani Hakemi, F., Rezanejad, F., Asadi khanouki, M. 2020. Identification and the survey of gene expression CURLY LEAF homologous during developmental stages in vegetative and reproductive organs of *Brassica nigra* L. *Cellular and Molecular Research (Iranian Journal of Biology)*, 33, 370-381. https://cell.ijbio.ir/article_1600_43a919cc6f474f91d6678085cb4b7d18.pdf
 19. Gao, J., Huang, B.-H., Wan, Y.-T., Chang, J., Li, J.-Q., Liao, P.-C. 2017. Functional divergence and intron variability during evolution of angiosperm TERMINAL FLOWER1 (TFL1) genes. *Scientific Reports*, 7, 14830. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13645-0>
 20. Gao, Y., Gao, Y., Wu, Z., Bu, X., Fan, M., Zhang, Q. 2019. Characterization of TEMINAL FLOWER1 homologs CmTFL1c gene from *Chrysanthemum morifolium*. *Plant Molecular Biology*. <https://doi.org/10.1007/s11103-019-00838-6>
 21. Goslin, K., Zheng, B., Serrano-Mislata, A., Rae, L., Ryan, P. T., Kwaśniewska, K., Thomson, B., Ó'Maoiléidigh, D. S., Madueño, F., Wellmer, F., Graciet, E. 2017. Transcription Factor Interplay between LEAFY and APETALA1/CAULIFLOWER during Floral Initiation. *Plant Physiology*, 174, 1097-1109. <https://doi.org/10.1104/pp.17.00098>
 22. Hanzawa, Y., Money, T., Bradley, D. 2005. A single amino acid converts a repressor to an activator of flowering. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 102, 7748-7753. <https://doi.org/10.1073/pnas.0500932102>
 23. Ho, W. W., Weigel, D. 2014. Structural features determining flower-promoting activity of Arabidopsis FLOWERING LOCUS T. *Plant Cell*, 26, 552-564. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.115220>
 24. Huijser, P., Schmid, M. 2011. The control of developmental phase transitions in plants [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. *Development*, 138, 4117-4129. <https://doi.org/10.1242/dev.063511>
 25. Jaeger, K. E., Wigge, P. A. 2007. FT protein acts as a long-range signal in Arabidopsis. *Current Biology*, 17, 1050-1054. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.05.008>
 26. Kaufmann, K., Wellmer, F., Muino, J. M., Ferrier, T., Wuest, S. E., Kumar, V., Serrano-Mislata, A., Madueno, F., Krajewski, P., Meyerowitz, E. M., Angenent, G. C., Riechmann, J. L. 2010. Orchestration of floral initiation by APETALA1. *Science*, 328, 85-89. <https://doi.org/10.1126/science.1185244>

27. Kaur, H., Banga, S. S. 2015. Discovery and mapping of Brassica juncea Sdt 1 gene associated with determinate plant growth habit. *Theoretical and Applied Genetics*, 128, 235-245. <https://doi.org/10.1007/s00122-014-2424-6>
28. Kazan, K., Lyons, R. 2016. The link between flowering time and stress tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 67, 47-60. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv441>
29. Kobayashi, Y., Kaya, H., Goto, K., Iwabuchi, M., Araki, T. 1999. A pair of related genes with antagonistic roles in mediating flowering signals. *Science*, 286, 1960-1962.
30. Koskela, E. A., Mouhu, K., Albani, M. C., Kurokura, T., Rantanen, M., Sargent, D. J., Battey, N. H., Coupland, G., Elomaa, P., Hytonen, T. 2012. Mutation in TERMINAL FLOWER1 reverses the photoperiodic requirement for flowering in the wild strawberry *Fragaria vesca*. *Plant Physiology*, 159, 1043-1054. <https://doi.org/10.1104/pp.112.196659>
31. Lee, C., Kim, S.-J., Jin, S., Susila, H., Youn, G., Nasim, Z., Alavilli, H., Chung, K.-S., Yoo, S. J., Ahn, J. H. 2019. Genetic interactions reveal the antagonistic roles of FT/TSF and TFL1 in the determination of inflorescence meristem identity in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 99, 452-464. <https://doi.org/10.1111/tpj.14335>
32. Liljegren, S. J., Gustafson-Brown, C., Pinyopich, A., Ditta, G. S., Yanofsky, M. F. 1999. Interactions among APETALA1, LEAFY, and TERMINAL FLOWER1 specify meristem fate. *Plant Cell*, 11, 1007-1018.
33. Lindsey, B. E., 3rd, Rivero, L., Calhoun, C. S., Grotewold, E., Brkljacic, J. 2017. Standardized Method for High-throughput Sterilization of *Arabidopsis* Seeds. *J Vis Exp*. <https://doi.org/10.3791/56587>
34. Liu, C., Teo, Zhi Wei N., Bi, Y., Song, S., Xi, W., Yang, X., Yin, Z., Yu, H. 2013. A Conserved Genetic Pathway Determines Inflorescence Architecture in *Arabidopsis* and Rice. *Developmental Cell*, 24, 612-622. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2013.02.013>
35. Moraes, T. S., Dornelas, M. C., Martinelli, A. P. 2019. FT/TFL1: Calibrating Plant Architecture [Perspective]. *Frontiers in Plant Science*, 10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00097>
36. Nakagawa, M., Shimamoto, K., Kyojuka, J. 2002. Overexpression of RCN1 and RCN2, rice TERMINAL FLOWER 1/CENTRORADIALIS homologs, confers delay of phase transition and altered panicle morphology in rice. *Plant Journal*, 29, 743-750. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12148532>
37. Osnato, M. 2021. A COMPASS to guide vegetative growth and the floral transition. *Plant Cell*, 33, 3179-3180. <https://doi.org/10.1093/plcell/koab191>
38. Osnato, M., Cota, I., Nebhnani, P., Cereijo, U., Pelaz, S. 2022. Photoperiod Control of Plant Growth: Flowering Time Genes Beyond Flowering [Review]. *Frontiers in plant science*, 12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.805635>
39. Patil, H. B., Chaurasia, A. K., Azeez, A., Krishna, B., Subramaniam, V. R., Sane, A. P., Sane, P. V. 2018. Characterization of two TERMINAL FLOWER1 homologs PgTFL1 and PgCENa from pomegranate (*Punica granatum* L.). *Tree Physiol*, 38, 772-784. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpx154>
40. Ratcliffe, O. J., Amaya, I., Vincent, C. A., Rothstein, S., Carpenter, R., Coen, E. S., Bradley, D. J. 1998. A common mechanism controls the life cycle and architecture of plants. *Development*, 125, 1609-1615. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9521899>
41. Reece-Hoyes, J. S., Walhout, A. J. M. 2018. Gateway Recombinational Cloning. *Cold Spring Harb Protoc*, 2018, pdb top094912. <https://doi.org/10.1101/pdb.top094912>
42. Repinski, S. L., Kwak, M., Gepts, P. 2012. The common bean growth habit gene PvTFL1y is a functional homolog of *Arabidopsis* TFL1 [journal article]. *Theoretical and Applied Genetics*, 124, 1539-1547. <https://doi.org/10.1007/s00122-012-1808-8>
43. Rezanejad, F., Nasri, F., Heidari, R., Bahmani, Z. 2023. Isolation, sequencing and expression levels of FLOWERING LOCUS C ortholog gene (FLC) in different organs of *Sisymbrium irio* (Brassicaceae). *Cellular and Molecular Research (Iranian Journal of Biology)*, 36, 389-404. https://cell.ijbio.ir/article_2179_c797577feca33eb705bbc874ee81d5db.pdf

44. Serrano-Mislata, A., Fernandez-Nohales, P., Domenech, M. J., Hanzawa, Y., Bradley, D., Madueno, F. 2016. Separate elements of the TERMINAL FLOWER 1 cis-regulatory region integrate pathways to control flowering time and shoot meristem identity. *Development*, 143, 3315-3327. <https://doi.org/10.1242/dev.135269>
45. Sheikhbahaei, M., Rezanejad, F., Sasan, H., Ravan, H. 2020. Isolation and Sequencing of Flowering locus T (FT) homologous gene in *Lepidium sativum* L.: a Phylogeny study of its deduced protein. *Cellular and Molecular Research (Iranian Journal of Biology)*, 33, 465-473. https://cell.ijbio.ir/article_1615_1102200a2e4f8d32c901064d122909a9.pdf
46. Sheng, X., Mahendra, R. A., Wang, C. T., Brunner, A. M. 2023. CRISPR/Cas9 mutants delineate roles of *Populus* FT and TFL1/CEN/BFT family members in growth, dormancy release and flowering. *Tree Physiol.* <https://doi.org/10.1093/treephys/tpad027>
47. Srikanth, A., Schmid, M. 2011. Regulation of flowering time: all roads lead to Rome. *Cell Mol Life Sci*, 68, 2013-2037. <https://doi.org/10.1007/s00018-011-0673-y>
48. Tian, Z., Wang, X., Lee, R., Li, Y., Specht, J. E., Nelson, R. L., McClean, P. E., Qiu, L., Ma, J. 2010. Artificial selection for determinate growth habit in soybean. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107, 8563-8568. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000088107>
49. Tsaftaris, A., Pasentsis, K., Kalivas, A., Michailidou, S., Madesis, P., Argiriou, A. 2012. Isolation of a CENTRORADIALIS/TERMINAL FLOWER1 homolog in saffron (*Crocus sativus* L.): characterization and expression analysis. *Molecular Biology Reports*, 39, 7899-7910. <https://doi.org/10.1007/s11033-012-1634-8>
50. Tyagi, S., Sri, T., Singh, A., Mayee, P., Shivaraj, S. M., Sharma, P., Singh, A. 2019. SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS1 influences flowering time, lateral branching, oil quality, and seed yield in *Brassica juncea* cv. Varuna. *Functional & Integrative Genomics*, 19, 43-60. <https://doi.org/10.1007/s10142-018-0626-8>
51. Wang, Y., Pijut, P. M. 2013. Isolation and characterization of a TERMINAL FLOWER 1 homolog from *Prunus serotina* Ehrh. *Tree Physiol*, 33, 855-865. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpt051>
52. Wei, J., Xu, L., Shi, Y., Cheng, T., Tan, W., Zhao, Y., Li, C., Yang, X., Ouyang, L., Wei, M., Wang, J., Lu, G. 2023. Transcriptome profile analysis of Indian mustard (*Brassica juncea* L.) during seed germination reveals the drought stress-induced genes associated with energy, hormone, and phenylpropanoid pathways. *Plant Physiology and Biochemistry*, 200, 107750. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2023.107750>
53. Wickland, D. P., Hanzawa, Y. 2015. The FLOWERING LOCUS T/TERMINAL FLOWER 1 Gene Family: Functional Evolution and Molecular Mechanisms. *Mol Plant*, 8, 983-997. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2015.01.007>
54. Winter, C. M., Austin, R. S., Blanvillain-Baufume, S., Reback, M. A., Monniaux, M., Wu, M. F., Sang, Y., Yamaguchi, A., Yamaguchi, N., Parker, J. E., Parcy, F., Jensen, S. T., Li, H., Wagner, D. 2011. LEAFY target genes reveal floral regulatory logic, cis motifs, and a link to biotic stimulus response. *Developmental Cell*, 20, 430-443. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.03.019>
55. Yang, J., Liu, D., Wang, X., Ji, C., Cheng, F., Liu, B., Hu, Z., Chen, S., Pental, D., Ju, Y., Yao, P., Li, X., Xie, K., Zhang, J., Wang, J., Liu, F., Ma, W., Shopan, J., Zheng, H., . . . Zhang, M. 2016. The genome sequence of allopolyploid *Brassica juncea* and analysis of differential homoeolog gene expression influencing selection [Article]. *Nature Genetics*, 48, 1225. <https://doi.org/10.1038/ng.3657>
56. Zhao, W., Gu, R., Che, G., Cheng, Z., Zhang, X. 2018. CsTFL1b may regulate the flowering time and inflorescence architecture in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Biochem Biophys Res Commun*, 499, 307-313. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.03.153>
57. Zhou, W., Wei, D., Jiang, W., Wang, Z., Wang, H., Tang, Q. 2018. The protein J3 regulates flowering through directly interacting with the promoter of SOC1 in *Brassica juncea*. *Biochem Biophys Res Commun*, 496, 1217-1221. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.01.174>

Overexpression of mustard flowering time gene (*TFL1*) retards the transition from the vegetative to reproductive phase in transgenic *Arabidopsis* plants

Mohsen Asadi^{1,2}, Zahra Mohammadi¹, Farkhondeh Rezanejad^{*1}

¹ Iran, Kerman, Shahid Bahonar University of Kerman, Faculty of Science, Department of Biology

² Iran, Tehran, Technical and Vocational University (TVU), Department of Agricultural Science

Abstract

The precise regulation of flowering time is critical to optimize agricultural production since it directly affects the quality and quantity of leaf, flower, seed and fruit yields, as well as the ease of harvesting and marketing. Mustard is known as an important oilseed worldwide, and the timing of flowering and plant architecture play a direct role in increasing its yield. The *TERMINAL FLOWER 1* gene is one of the key genes involved in the flowering process and determining the shoot form in plants. In the present study, this gene was cloned from mustard, and its function was analyzed using transgenic *Arabidopsis* experiments. For functional analysis, the overexpression construct was designed using Gateway cloning and Transgenic *Arabidopsis* plants were generated by the floral dip method. Overexpression of the coding region in the wild-type *Arabidopsis* (Col-0) induced a delay in flowering time, with a simultaneous increase in rosette leaf numbers, compared to control plants; however, the number of cauline leaves remained relatively similar between the transgenic and the control groups. The qRT-PCR results showed the transformed gene is expressed in transgenic *Arabidopsis*, while its mRNA was not detected in control plants. The results demonstrate that the analyzed gene might function as a floral repressor in mustard and could be used as an important target for genetic improvement.

Key words: Floral dip, Floral repressor, Gateway cloning, Gene expression, Homolog