

جداسازی، توالی‌یابی و میزان بیان ژن ارتولوگ (FLC) FLOWERING LOCUS C در

اندام‌های مختلف خاکشیر بدل (*Sisymbrium irio*)فرخنده رضائزاد^{۱*}، فرزانه نصری^۱، رضا حیدری^۲ و زهرا بهمنی^۳^۱ ایران، کرمان، دانشگاه شهید باهنر کرمان، گروه زیست‌شناسی^۲ ایران، ارومیه، دانشگاه ارومیه، گروه زیست‌شناسی^۳ ایران، تبریز، دانشگاه تبریز، گروه زیست‌شناسی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۹/۲۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۵/۲۶

چکیده

تنظیم زمان گل‌دهی نیازمند فعالیت ژن‌های مختلفی است که تحت کنترل فاکتورهای محیطی و درونی می‌باشند. ژن *FLC* نقش کلیدی در گذر به گل‌دهی دارد و به‌عنوان ژن هدف مسیر بهاره شدن، گل‌دهی را مهار می‌کند. بهاره شدن یک سازگاری طبیعی برای تضمین گل‌دهی پس از زمستان است تا گل و دانه در شرایط مطلوب محیطی نمو یابند. در این مطالعه، شناسایی و بررسی بیان این ژن در خاکشیر بدل بررسی شد. RNA کل از برگ‌های لپه‌ای استخراج و cDNA ساخته شد. آغازگرهای اختصاصی براساس هم‌راستایی توالی ژن‌های هم‌ساخت *FLC*، طراحی و برای واکنش RT-PCR استفاده گردیدند. قطعه مورد نظر به طول ۴۴۹ نوکلئوتید، شناسایی و با نام *SiFLC* و شماره دسترسی KT156751 در پایگاه NCBI ثبت شد. مقایسه پروتئین استنباطی با ۱۵۰ آمینواسید با پروتئین‌های هم‌ساخت *FLC* در سایر گیاهان، نشان دهنده شباهت زیاد آن‌ها بود. میزان نسبی بیان با استفاده از روش نیمه کمی، در مرحله رویشی در برگ جوان، برگ بالغ، ساقه و ریشه بین ۸۶-۵۶ درصد بود، بالاترین میزان (۸۶) در برگ جوان و کم‌ترین میزان (حدود ۵۶) در ساقه مشاهده شد. در مرحله زایشی کاهش بیان در این اندام‌ها بویژه در برگ مشاهده شد که میزان بیان آن بسیار ناچیز (حدود یک درصد) اما در غنچه‌های گل به نسبت بالاتر بود و به حدود ۳۱ درصد رسید. کاهش بیان در برگ در فاز زایشی نشان دهنده تحریک گل‌دهی و افزایش آن در گل، پس از تحریک گل‌دهی، می‌تواند مربوط به تنظیم دوباره آن و آمادگی برای مهار طی فاز رویشی باشد.

واژه‌های کلیدی: برگ جوان، ساقه، گل‌دهی، تعیین توالی، RT-PCR، *Sisymbrium irio** نویسنده مسئول، تلفن: ۰۳۴۳۱۳۲۲۰۹۰، پست الکترونیکی: frezanejad@uk.ac.ir

مقدمه

زایشی شود. چنین دوره‌هایی در گونه‌های مختلف گیاهان متفاوت است برای مثال در غلات این دوره بسیار کوتاه می‌باشد. در گیاهان باغی، معمولاً با روش‌های اصلاح نباتات دوره بلوغ گل‌دهی را به حداقل می‌رسانند. مرحله دوم کسب استعداد گل‌دهی است که این ویژگی بخصوص در مناطق معتدله به صورت نیاز سرمایی درآمده است. یعنی اگر به گیاه مقداری سرما داده شود، استعداد گل‌دهی را کسب

تشکیل گل که در مریستم شاخساره رخ می‌دهد یک رویداد تکوینی و فیزیولوژیکی پیچیده است. آغاز گل‌دهی مستلزم بروز یک‌سری تغییرات اساسی در الگوی تمایز جوانه‌های انتهایی یا کناری است که منجر به تشکیل مریستم گل‌آذین و ایجاد و توسعه اندام‌های گل می‌گردد. برای انجام این فرایند، ابتدا گیاه باید به بلوغ گل‌دهی برسد که حداقل رشد رویشی است که گیاه باید انجام دهد تا بتواند وارد دوره

SUPPRESSOR of OVEREXPRESSION, LOCUS T (*FT*)، *APETALA1 (AP1)*، *LEAFY (LFY)*، *of CO1 (SOC1)* و *SEPALLATA (SEP)* باعث تحریک گل‌دهی و برخی دیگر نظیر *TERMINAL FLOWER 1 (TFL1)* و *FLOWERING LOCUS C (FLC)* مانع از گل‌دهی می‌شوند. اطلاعاتی که از مطالعات بر روی فرآیند گلدهی در گیاهان مدل به دست می‌آید، می‌تواند باعث فهم بهتر این فرآیند در سایر گیاهان شود (۳۲ و ۳۳). پاسخ به نشانه‌های محیطی، تولید مثل گیاهان پیشرفته را با تغییر فصول همگام می‌نماید. اساس ژنتیکی این پاسخ‌ها به‌طور مفصل در Brassicaceae مورد مطالعه قرار گرفته است. *FLC* که یک فاکتور رونویسی قلمرو *MADS* را رمز می‌کند که گل‌دهی *Arabidopsis thaliana* را در پاسخ به نشانه‌های فصلی کنترل می‌کند *FLC*، تا زمانی که رونویسی آن به‌طور پایدار با قرارگرفتن طولانی مدت در معرض دماهای پایین در پاییز یا زمستان سرکوب شود، گل‌دهی را سرکوب می‌کند، یعنی گل‌دهی را تا بهار محدود می‌کند. این استراتژی تولیدمثلی که گل‌دهی را در زمان مناسب پس از زمستان طبیعی ممکن می‌سازد بهاره کردن (Vernalization) نامیده می‌شود (۱۹ و ۲۵). نیاز به بهاره شدن یک صفت سازشی است که با مهار گذر به گل‌دهی قبل از زمستان، گل‌دهی در شرایط مطلوب بهار را موجب می‌شود. *FLC* با اتصال (باند) به ژن‌هایی که فعال‌کننده‌های گلدهی را کد می‌کنند و سرکوب رونویسی آنها، گذر به گل‌دهی را مهار می‌کند. در طول بهاره‌سازی، سطوح *FLC* mRNA کاهش می‌یابد و پس از بهاره‌سازی به‌طور پایدار سرکوب می‌شود و به ژن‌های هدف اجازه رونویسی و گلدهی را می‌دهد می‌شود (۲۳ و ۳۵). بیش از ۵۰۰ محل اتصال *FLC* در ژنوم *Arabidopsis thaliana* وجود دارد نشان دهنده اینکه *FLC* در مسیرهای (اعمال) دیگر غیر از بهاره شدن نیز نقش دارد. در تنظیم زمان گل‌دهی، به‌عنوان یک پروتئین مهارکننده عمل می‌کند و عمدتاً با سرکوب فعال‌سازی ژن‌های مهم تحریک گل‌دهی مانند *FT* و *SOC1* عمل می‌کند (۱۶ و ۱۸).

خواهد کرد (۱۴، ۱۵ و ۲۰). تولیدمثل جنسی موفق و به‌دنبال آن نمو میوه و دانه‌ها در گیاهان گل‌دار به توانایی آن‌ها در نمو گل وابسته است (۲۷). آگاهی از تکوین گل و ژن‌های درگیر در نمو آن، برای انجام برنامه‌های اصلاح نژادی مفید می‌باشد (۱۰). زمان گل‌دهی یکی از صفات کلیدی در سازگاری گیاهان است که از این طریق گیاه می‌تواند در زمان مناسب، گرده افشانی و تولید بذر نماید (۶). کنترل زمان گل‌دهی برای تولید دانه‌های موثر و کارا و برای کشت تابستانی محصولات دو ساله‌ی برگ‌دار ضروری است. در محصولاتی که هدف از کشت‌شان برگ یا زیست‌توده (بیومس) است تاخیر در زمان گل‌دهی منجر به رشد رویشی بیشتر می‌شود (۳۰). تحقیقات ژنتیک مولکولی در گیاه مدل آراییدوپسیس منجر به کشف تعداد زیادی از ژن‌ها شد که در پاسخ به عوامل محیطی و درونی باعث تنظیم زمان گل‌دهی می‌شوند (۳ و ۲۹). در آراییدوپسیس و گیاهان مختلف دیگر، ترکیبی از علائم محیطی و درونی مانند دوره نوری روزانه، ساعت زیستی، خودگردان، جیبرلیک اسید، بهاره شدن، دما، میزان قند و سن، موجب می‌شوند تا سرنوشت مریستم راس شاخساره (SAM) 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 تولید مثل موفق‌تر گیاهان می‌شوند (۴). 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 (Floral pathway integrator genes)، زمان گل‌دهی را کنترل می‌کنند. ژن‌های یکپارچه‌کننده مسیرهای گلدهی پس از فعال شدن به نوبه خود ژن‌های تعیین هویت مریستم گل (Floral identity genes) را فعال کرده و گلدهی رخ می‌دهد (۱، ۳، ۲۱، ۲۸ و ۴۰). برخی از این ژن‌های یکپارچه‌کننده گل‌دهی نظیر *CONSTANS (CO)*، *GIGANTEA (GI)*، *FLOWERING*

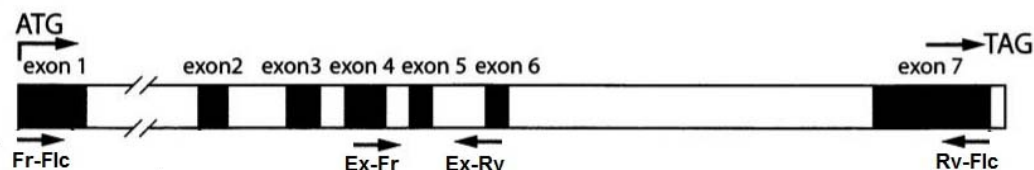
بذر گیاه خاک‌شیر بدل (*Sisymbrium irio L.*) از خانواده‌ی شب‌بو (Brassicaceae) از دانشگاه شهید باهنر کرمان جمع‌آوری شد. بذرها در گلدان‌های حاوی پرلیت در شرایط گلخانه‌ای با حرارت روز و شب 25°C - 23°C و دوره‌ی روشنایی ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی کشت داده شده و یک روز در میان محلول غذایی هوگلند داده شدند تا گیاه دوره رویشی ۴۹ روزه خود را بگذراند. برای مطالعات مولکولی از بافت‌های تازه در مراحل زیر استفاده شد: برگ‌های لپه‌ای برای تعیین توالی ژن FLC استفاده شدند. برای مطالعات بیان ژن از برگ، ساقه و ریشه در دو مرحله رویشی (۴روزگی-برگ لپه‌ای) و زایشی (هنگام تشکیل غنچه‌های گل) و نیز از غنچه‌های گل (۴۹روزگی-۱۴برگی) استفاده شد. اولین مرحله در شناسایی ژن و مطالعه‌ی بیان آن، طراحی آغازگرهای مناسب و استفاده از آنها در واکنش‌های PCR و یا RT-PCR (Reverse transcription polymerase chain reaction) است. از آنجاکه توالی ژن مورد نظر در گیاه مورد مطالعه نامشخص بود، آغازگرها بر اساس توالی‌های ژنی موجود از سایر گیاهان هم‌خانواده، طراحی گردیدند. بدین منظور توالی ژن همساخت *FLC* در (Accession no: JQ663617) *Arabidopsis thaliana* (Accession no: AY306125) *Brassica oleraceae* (Accession no: EF542803) *Sinapis alba* (Accession no: AB611009) *Raphanus sativus*، از بانک ژن NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) گرفته شد. هم‌ردیفی توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار ClustalW2 صورت گرفت. براساس نقاط حفاظت شده‌ی موجود، در ابتدا و انتهای ناحیه کدکننده ژن، آغازگرهایی با استفاده از نرم‌افزار GeneRunner طراحی گردیدند و سپس مناسب بودن آنها به وسیله‌ی نرم‌افزار BLAST و DNAMAN مورد بررسی قرار گرفت (۲). آغازگرها به طریقی طراحی گردید که بتوان در RT-PCR بیشترین طول ناحیه‌ی کدکننده‌ی ژن را به‌دست آورد و از محصول آنها جهت تعیین توالی استفاده

مکانیسم‌هایی که توسط آنها، بیان *FLC* به طور پایدار توسط سرما سرکوب می‌شود اخیراً مورد بررسی قرار گرفته است. سرکوب *FLC* به تدریج در طول قرارگرفتن در معرض سرما رخ می‌دهد و قرارگرفتن در معرض طولانی مدت چندین هفته‌ای که معمول زمستان است برای سرکوب پایدار مورد نیاز است. قرار گرفتن در معرض سرما برای دوره‌های کوتاه‌تر می‌تواند منجر به سرکوب نسبی *FLC* و پاسخ گلدهی ناقص شود. (۲۳). بهاره شدن منجر به کاهش سطح رونوشت *FLC* می‌شود و کاهش در بیان این ژن، پس از بازگشت گیاه به محیط گرم‌تر نیز حفظ می‌شود (۲۶). پایداری حالت مهار شده‌ی *FLC* و جدایی زمانی بین تیمار سرما و آغاز گل‌دهی سبب به وجود آمدن این فرضیه شد که، بهاره شدن از طریق کنترل اپی‌ژنتیک بیان *FLC* عمل می‌کند (۹). مطالعات مولکولی و ژنتیکی نشان داده است که سه سیستم اصلی *FLC* را تنظیم می‌کند (بهاره سازی، ژن *FRI* *FRIGIDA*) و مسیر خودمختار) که همگی روی کروماتین *FLC* تأثیر می‌گذارند، برای مثال برای فعال سازی بیان این ژن، متیلاسیون و استیلاسیون در هیستون 3 لیزین شماره 4 (H3K4)، و برای ممانعت از فعالیت این ژن، تغییراتی مانند داستیلاسیون، دی‌متیلاسیون لیزین ۲۷، H3K9 صورت می‌گیرد (۱۲ و ۲۳). ژن *FLC* در گیاه مدل آرابیدوپسیس با طولی بیش از 5Kb، روی کروموزم شماره ۵ و در ناحیه‌ی بالایی آن تعیین موقعیت شده است. این ژن شامل ۷ اگزون و ۶ اینترون است (۳۳). تاکنون در بسیاری از گونه‌های خانواده شب‌بو ژن‌های هم‌ساخت *FLC* شناسایی شده‌اند که از جمله آنها می‌توان *BnFLC* در کلزا، *BoFLC* در کلم (۲۰)، *BrFLC* در شلغم (۲۰)، *SaFLC* در خردل سفید (۷) و *BjFLC* در خردل هندی را نام برد. بررسی‌های مروری انجام شده، هیچ گزارش منتشر شده‌ای را در مورد شناسایی این ژن در خاکشیر بدل (*Sisymbrium irio*) از تیره شب‌بو نشان نداد.

مواد و روشها

شکل ۱، طرح شماتیک ژن FLC و محل تقریبی قرار گرفتن آغازگرهای پیش‌برنده و برگرداننده نشان داده شده است (۳۳). همچنین نام و توالی آغازگرها در جدول ۱ آمده است. سنتز آغازگرهای طراحی شده توسط شرکت تکاپوزیست صورت گرفت.

کرد. همچنین آغازگرهایی روی دو آگزون مختلف (آغازگر پیش‌برنده آگزون ۴ و آغازگر برگرداننده آگزون ۶) از ژن در نظر گرفته شد تا بتوان از محصول آن‌ها برای بررسی بیان ژن FLC استفاده کرد. همچنین برای اطمینان از صحت انجام کار، ژن GAPDH به‌عنوان ژن مرجع استفاده شد. در



شکل ۱- طرح شماتیک ژن FLC و محل قرار گرفتن آغازگرهای پیش‌برنده و برگرداننده روی آن (برگرفته از Schranz et al., 2002)

جدول ۱- نام، توالی و کاربرد آغازگرهای مورد استفاده

نام آغازگر	توالی (5'→3')	کاربرد
FrFLC	CCATGRGGAGGAAGAAAC	آغازگر پیش‌برنده ژن FLC در RT-PCR
RvFLC	CTAATWAAGTAGTGGGAGCGT	آغازگر برگرداننده ژن FLC در RT-PCR
Ex-frFLC	TAATGTAAGTGTCGGTTCCTC	آغازگر پیش‌برنده بیان ژن در RT-PCR
Ex-rvFLC	CTCTCTTCCAGTAATTCTCC	آغازگر برگرداننده بیان ژن در RT-PCR
Fr-GAPDH	CAAGGACTGGAGAG GTGG	آغازگر پیش‌برنده ژن FLC مرجع
Rv-GAPDH	TTCACTCGTTGTCGTACC	آغازگر برگرداننده ژن مرجع

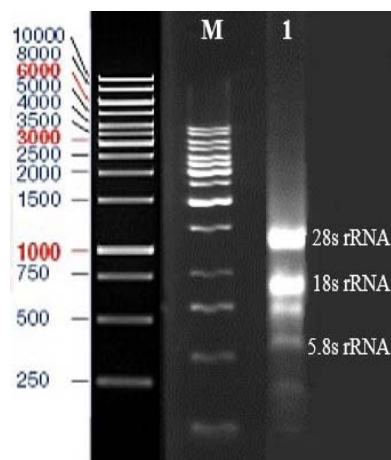
DNA الگو به‌همراه آغازگرهای Fr-FLC و Rv-FLC در واکنش PCR، برای شناسایی ژن هدف (FLC) استفاده گردید. به‌این منظور ۲ میکرولیتر cDNA، ۱ میکرولیتر آغازگر پیش‌برنده و ۱ میکرولیتر آغازگر برگرداننده، درون لوله لیوفیلیزه PCR (PCR PreMix، AccuPower^R PCR PreMix، BIONEER، Korea) ریخته و با آب دوبار تقطیر استریل (مخصوص تزریق) به حجم ۲۰ میکرولیتر رسانده و برنامه PCR توسط ترموسایکلر مدل PTC (1148 MJ Mini Personal Thermal Cycler BioRad, USA) و با مرحله واسرشتگی اولیه به‌مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد آغاز گردید و با انجام ۳۷ چرخه با دمای واسرشتگی ۹۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۴۵ ثانیه، دمای اتصال ۵۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱ دقیقه و دمای طولیل شدن، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت

برای شناسایی و جداسازی ژن همساخت FLC، از RT-PCR استفاده گردید. در این روش ابتدا RNA کل، از برگ‌های لپه‌ای (۲برگی، ۴روزگی) در مرحله‌ی رشد رویشی با استفاده از کیت استخراج RNA (Qiagen, RNeasy Plant Mini Kit, Germany) بر طبق روش ذکر شده در کیت استخراج شد. برای بررسی حضور و ارزیابی خلوص و تعیین غلظت RNA از روش‌های اسپکتوفتومتری در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر و الکتروفورز افقی روی ژل آگارز ۱ درصد استفاده شد (۱۳). سپس از روی mRNA های موجود، DNA مکمل (cDNA)، با استفاده از کیت ساخت cDNA شرکت فرمنتاز (RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit)، طبق روش ذکر در کیت، تهیه و از آن در PCR بعنوان DNA الگو استفاده شد. از این

شدت باندهای ژن مورد مطالعه و کنترل داخلی با نرم افزار محاسبه شد. پس از انجام پردازش بر روی داده‌های مورد مطالعه نسبت به کنترل داخلی، آنالیز آماری با استفاده از آزمون دانکن توسط نرم افزار SPSS و با ضریب اطمینان 95 درصد مورد مقایسه قرار گرفت و نمودارها با استفاده از نرم افزار Excel 2007 رسم شدند. در آزمایشات RT-PCR سه تکرار در نظر گرفته شد (۱۳).

نتایج

نتایج نشان داد که حضور سه باند پرننگ مربوط به RNA های ریبوزومی، نشان دهنده‌ی کیفیت مطلوب RNA استخراج شده برای انجام RT-PCR است (شکل ۲).



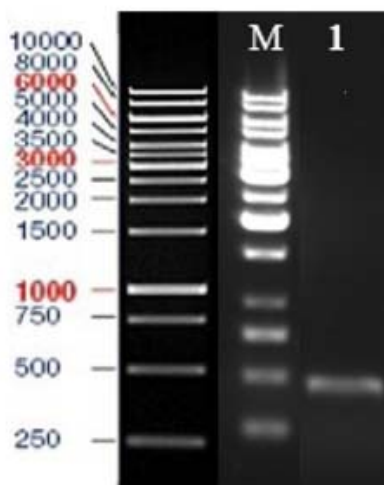
شکل ۲- نیم‌رخ الکتروفورزی RNA کل استخراج شده از برگ‌های لپه‌ای (*S. irio* L.) در مرحله‌ی رویشی. 1: RNA کل دارای سه باند واضح RNA های ریبوزومی 28s، 18s و 5.8s M: نشانگر مولکولی (Fermentase) DNA 1kb

پس از استخراج RNA کل از آن در RT-PCR استفاده گردید. واکنش PCR که در آن از cDNA به‌عنوان الگو و آغازگرهای Fr-FLC و Rv-FLC و برنامه Complete CDS استفاده گردید، منجر به تکثیر تک باند اختصاصی شد که در محدوده حدود ۵۰۰ نوکلئوتید می‌باشد (شکل ۳). وجود تک باند اختصاصی نشان دهنده طراحی مناسب پرایمرها و اختصاصی بودن آن‌ها است. با وجود ظاهر ساده، گاهی

۱ دقیقه ادامه یافت و با مرحله‌ی طولی شدن نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به اتمام رسید. پس از انجام PCR، کیفیت محصول بر روی ژل آگارز ۱ درصد بررسی شد. پس از انجام PCR، حضور و کیفیت محصول روی ژل آگارز ۱ درصد بررسی شد. به منظور تخلیص و تعیین توالی قطعه‌ی تکثیر شده‌ی ژن از طریق PCR، ۳۰ میکرولیتر از محصول PCR به همراه ۲۰ میکرولیتر از هریک از آغازگرهای پیش‌برنده و برگرداننده به شرکت تکاپوزیست فرستاده شد (۳۴). نتایج حاصل از تعیین توالی ابتدا با نرم‌افزارهای BLAST و ClustalW هم‌ردیف شده و سپس توالی اسید آمینه‌ای استنباطی و توالی‌های برخی از ارتولوگ‌های *FLC* موجود در بانک ژن NCBI با استفاده از نرم‌افزار MEGA 6.06 (6140226) با روش Parsimony Tree مقایسه و میزان شباهت آن‌ها بررسی شد. برای مطالعه بیان ژن، RNA کل از برگ، ریشه و ساقه در مراحل رویشی (۲ برگگی، ۴ روزگی) و زایشی (۱۴ برگگی، ۴۹ روزگی) و همچنین از گل با استفاده از محلول استخراج RNA (GeneAll, RiboEx, Total RNA isolation solution, Korea) و براساس دستورالعمل استفاده از این محلول استخراج شد. کیفیت و کمیت استخراج شده مورد بررسی قرار گرفت. سپس ساخت cDNA انجام و با استفاده از آغازگرهای بیان، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز انجام شد. واکنش PCR دیگری که در آن از cDNA به‌عنوان الگو و آغازگرهای Fr-GAPDH و Rv-GAPDH و برنامه بیان (Expression) استفاده شد انجام شد تا صحت انجام آزمایش را تایید کند. به منظور مشخص شدن بیان ژن ارتولوگ *FLC*، از الکتروفورز با ژل آگارز یک درصد استفاده شد. پس از اتمام واکنش PCR، محصول PCR روی ژل بارگیری و از این ژل زیر نور UV با استفاده از دستگاه UV-transilluminator عکس گرفته شد. سپس با استفاده از نرم‌افزار Image J، استفاده از ژن خانه نگه‌دار میزان بیان ژن بطور نسبی کمی شد. برای سنجش نیمه کمی میزان شدت باندهای بیان ژن مد نظر و نرمال‌سازی آن‌ها با کنترل داخلی با استفاده از ImageJ

Eutrema، *Sinapis alba*، *Brassica napus*، *Arabidopsis lyrata*، *salsugineum*، *Arabidopsis halleri*، بنابراین این توالی مربوط به ژن همساخت *FLC* در گیاه خاکشیر بدل (*Sisymbrium irio*) است.

طراحی یک پرایمر مناسب می‌تواند بسیار چالش‌آفرین باشد؛ زیرا زمانی که یک ژن برای نخستین بار شناسایی می‌شود، وجود حتی یک باز نامناسب در ناحیه 3' می‌تواند باعث عدم موفقیت PCR گردد.



شکل ۳- نیم‌رخ الکتروفورزی محصول RT-PCR، نشان‌دهنده تکثیر ناحیه‌ی مورد نظر از ژن *SiFLC*. I: باند حدود ۴۵۰ نوکلئیدی سنتز شده با استفاده از آغازگرهای پیش‌برنده FrFLC و برگرداننده RvFLC و برنامه cDNA-Conserve. M: نشانگر مولکولی DNA (Fermentase) 1kb

برای بررسی صحت خوانش هر یک از توالی‌های خوانده شده توسط آغازگرهای پیش‌برنده و برگرداننده، هم‌ردیفی این دو توالی با استفاده از نرم‌افزار BLAST انجام گرفت که نتیجه‌ی آن در شکل ۴ آمده است. نتایج هم‌ردیفی، نشان‌دهنده شباهت ۸۷ درصدی رشته‌های خوانده شده توسط آغازگرهای پیش‌برنده و برگرداننده بود.

در نهایت، پس از بررسی دو رشته‌ی پیش‌برنده و برگرداننده و اصلاح بعضی نقاط رشته‌ی پیش‌برنده بر اساس رشته‌ی برگرداننده، رشته‌ی پیش‌برنده که جهت آن به صورت 3'→5' است، برای ثبت در پایگاه داده‌ها (NCBI) آماده شد که در شکل ۵ آمده است. توالی خوانده شده (۴۴۹ نوکلئوتید) مربوط به توالی هر هفت آگرون است.

نتایج حاصل از BLAST، شباهت بسیار بالای این توالی را با سایر ژن‌های ارتولوگ (همساخت) *FLC* در گیاهان دیگر نشان داد. میزان شباهت این قطعه با همساخت‌هایش در خانواده‌ی شب بو به این شرح است: *Brassica rapa*

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
340 bits (184)	5e-98	263/302 (87%)	1/302(0%)	Plus/Plus
Query 95	GACGCATCCGTCGCTCTTCTCGTCGCTCTGCTCGGGAAAGCTCTACAGCTTCTCCTCC	154		
Sbjct 68	GACGCATCCATCGCTCTTCTAGTCGCTCTGCTCGGGAAAGCTATACAGCTTCTCGTCC	127		
Query 155	GGGGATATGGTGGTCAAGATCCTTGATCGATATGGAAAACAACATGCTGATGATCTTAAA	214		
Sbjct 128	GGGGATAACCTGGGCAAGATCCTTGATCGGTATTTAAAACAACATGCTGATGATTTTAAA	187		
Query 215	GCTTGGATCGTCAGTCAAAAAGGTCTGAACTACGGCTTACACCATTAGCAACTGCAAGTT	274		
Sbjct 188	GCCTTGGATCGTCAGTCAAAAAGGTCTGAACTACGGTTTACACCCTGAGCTACTGGAAATT	247		
Query 275	GTGGAAAGCATGCTTTTGGATTCCAATGTTGGTAATGCAAGTGCAATTCCCTCACGTT-	333		
Sbjct 248	GTGGAAAGCAAGCTTTTGGAAATCAAATGTTGGTAATGTAAGTGTCGATTCCGTCATTCCAG	307		
Query 334	CTGGAGGATCACCTTGATAAAGCCCACTACGAAATTGGAGCGAGGAAGACCGACCTGAAG	393		
Sbjct 308	CTGGAGGATCACCTTGATAACGCCCTCTCCGTAATTAGAGCTAGGAAGACAGAAGCTGATG	367		
Query 394	TT	395		
Sbjct 368	TT	369		

شکل ۴- نتایج هم‌ردیفی دو توالی پیش‌برنده و برگرداننده خوانده شده توسط آغازگرهای Fr-FLC و Rv-FLC توسط برنامه‌ی BLAST

5'CTCGTCCGCTTTCCCGACGCTGTGACGCATCCATCGCTCTTCTAGTCGTCTCTGCCTCGGGAAAGCTATACAG
 CTTCTCGTCCGGGATAAACCCTGGGCAAGATCCTTGCATCGGTATTTAAAACAACATGCTGATGATTTAAAGCCT
 TGGATCGTCAGTCAAAGGCTGAACCTACGGTTTACACCCCTGAGCTACTGGAATGTGGAAAGCAAGCTTTT
 GGAATCAAATGTTGGTAATGTAAGTGTGATTCGGTCCGTCATTGAGTGGAGGATCACCTTGATAACGCGCTCCG
 TAATTAGAGCTAGGAAGACAGAACTGATGTTGAAGCTTGTGCGAGAACCTTAAAGAAAAGGAGAAATTGCTGA
 AAGAGGAGAACCAGTTTTGGCTAGCCAGATGGAGAAAAATAATCTCGTCAGAGCCGAAGCTGATAATATGG
 AGATTCACCCG-3'

شکل ۵- توالی ثبت شده از ژن هم‌ساخت *FLC* در گیاه خاکشیر بدل (*S. Irio L.*) در پایگاه NCBI.

N-Terminal

ARPLSRRCDASIALLVVSASGKLYSFSSGDNLGKILDRLYKQHADDFKALDRQSKGLNYGLHPELLEIVESKLLSEN
 VGNVSVDSVIQLEDHLDNALS VIRARKTELMLKLVENLKEKEKLLKEENQVLASQMEKNNLVRAEADNMEIHP- C-
 Terminal

شکل ۶- توالی پروتئین استنباطی بخش تعیین توالی شده از ژن *SiFLC* در *S. Irio*

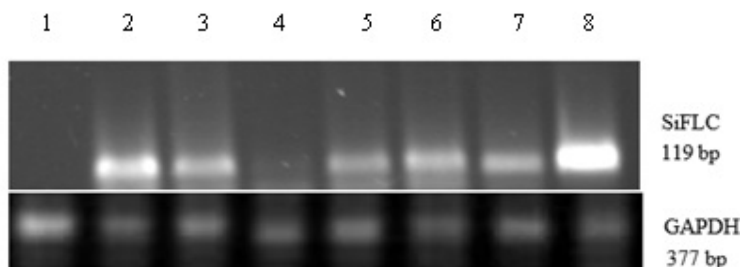
نرم افزار MEGA 6 به روش Parsimony Tree رسم شد (شکل ۸).

بیان *SiFLC* در اندام‌های مختلف گیاهان در مراحل نموی رویشی (۴ روزگی) و زایشی (۴۹ روزگی) بررسی گردید. نتایج حاصل از RT-PCR تکثیر قطعه‌ی 119 نوکلئوتیدی را برای ژن *SiFLC* در برخی از اندام‌ها و قطعه‌ی ۳۷۷ نوکلئوتیدی را برای ژن مرجع *GAPDH* در تمامی اندام‌ها، نشان داد که نشان دهنده صحت انجام آزمایش است. نتایج نشان داد که . نتایج نشان داد که میزان نسبی بیان ژن مرجع در اندام‌های مورد مطالعه در هر دو مرحله‌ی رشد رویشی و زایشی یکسان بود. میزان نسبی بیان در اندام‌های مختلف نشان داد که میزان بیان ژن *FLC*، در برگ، ساقه و ریشه در مرحله رویشی بیشتر از میزان بیان همین اندام‌ها در مرحله زایشی است. که میزان بیان ژن مرجع در اندام‌های هر دو مرحله‌ی رشد رویشی و زایشی یکسان بود. میزان نسبی بیان در اندام‌های مختلف نشان داد که میزان بیان ژن *FLC*، در برگ، ساقه و ریشه در مرحله رویشی بیشتر از میزان بیان همین اندام‌ها در مرحله زایشی است. در مرحله رویشی نیز، میزان نسبی بیان در برگ (بوژه در برگ جوان) و ریشه نسبت به ساقه بالاتر مشاهده شد (شکل‌های ۹ و ۱۰).

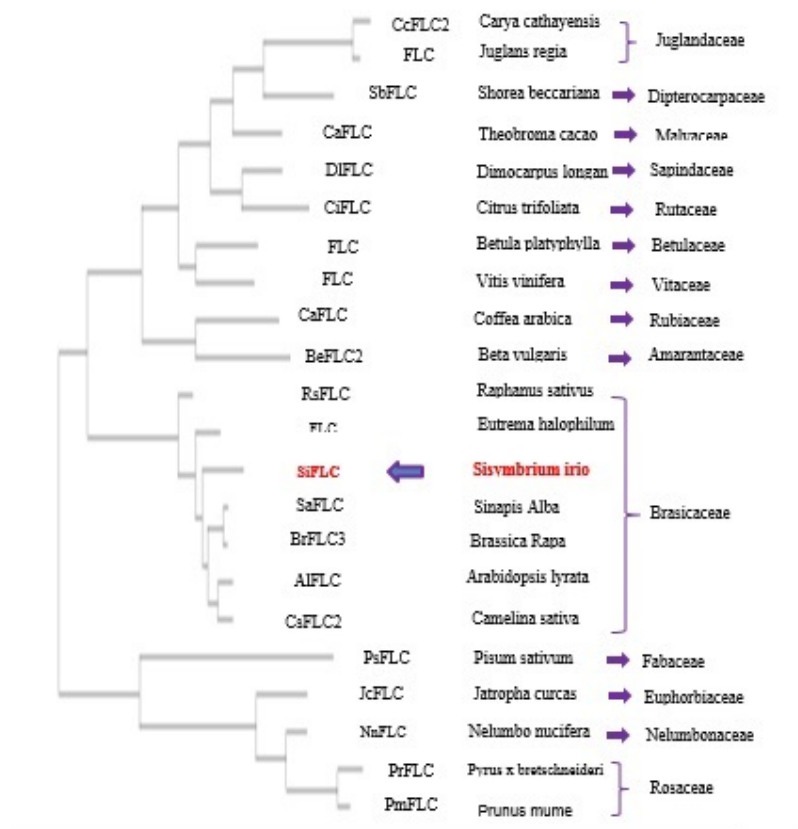
شباهت ۸۹ درصدی آن با *Brassica rapa* بیشترین شباهت توالی این ناحیه از دو ژن است. این ژن در بانک ژن NCBI با نام *SiFLC* و شماره‌ی دسترسی (Accession Number) 6751\1KT ثبت گردید. باتوجه به اینکه این ناحیه از ژن به‌طور تقریبی مربوط به هر ۷ آگزون است (توالی آگزون ۱ و ۷ به طور ناقص مشاهده می‌شوند)، می‌توان توالی پروتئین کد شده به‌وسیله این قطعه از ژن را به‌دست آورد. از این توالی پروتئین استنباطی که دارای ۱۵۰ اسید آمینه است در مراحل بعدی جهت بررسی شباهت آن با سایر پروتئین‌های هم‌ساخت *SiFLC* استفاده گردید (شکل ۶) به‌منظور بررسی نواحی حفاظت شده و همچنین میزان شباهت محصول ژن *SiFLC* با سایر هم‌ساخت‌های *FLC*، توالی پروتئین استنباطی آن با توالی سایر هم‌ساخت‌ها در گونه‌های دیگر، توالی پروتئین برخی از هم‌ساخت‌های *FLC* از سایت NCBI دریافت شد و پس از هم‌ردیفی به‌وسیله‌ی برنامه‌ی Clustalw2 نقاط مشترک آن‌ها با توالی پروتئین استنباطی *SiFLC* مشخص و مقایسه گردید (شکل ۷). نتیجه‌ی BLAST پروتئین *SiFLC* با هم‌ساخت آن در *Brassica rapa* شباهت ۸۱ درصدی نشان داد که نشان دهنده بالاترین شباهت است. همچنین درخت فیلوژنتیکی مربوط به شباهت (همولوژی) این پروتئین‌ها با استفاده از

AtFLC	MGRKKLEIKRIENKSSRQVTFSKRRNGLIEKARQLSVLCDASVALLVVSASGKLYSFSSG	60
AaFLC2	MGRKKLEIKRIENKSSRQVTFSKRRNGLIEKARQLSVLCDASVALLVVSASGKLYSFSSG	60
BnFLC4	MGRKKLEIKRIENKSSRQVTFSKRRNGLIEKARQLSVLCDASVALLVVSASGKLYNFSAG	60
BoFLC4-1	MGRKKLEIKRIENKSSRQVTFSKRRNGLIEKARQLSVLCDASVALLVVSASGKLYNFSAG	60
BnFLC2	MGRKKLEIKRIENKSSRQVTFSKRRNGLIEKARQLSVLCDASVALLVVSASGKLYNFSAG	60
BnFLC1	MGRKKLEIKRIENKSSRQVTFSKRRNGLIEKARQLSVLCDASVALLVVSASGKLYSFSSG	60
SaFLC	MGRKKLEIKRIENKSSRQVTFSKRRNGLIEKARQLSVLCDASVALLVVSASGKLYSFSSG	60
SiFLC	-----ARPLSRRCASIALLVVSASGKLYSFSSG	29
	*** ** *****	
AtFLC	DNLVKILDRYGRQHADD-LKALDHQSKALNYGSHYELLELVDSKLVGSNVKNSVIDALVQ	119
AaFLC2	DNLVKILDRYGRQHADD-LKALDIQSKALNYGPHHELLELVESKLVGSNVNVSADTLVQ	119
BnFLC4	DDLVKIVDRYGRQHADD-RKALDLQSEAPKYGSHHELLELVESKLVESNS-DVSVDSLQ	118
BoFLC4-1	DDLVKVIDRYGRQHADDLQSEAPKYGSHHELLELVESKLVESNS-DVSVDSLQ	119
BnFLC2	DNLVKILDRYGRQHADD-LKALDLQSKAPKYGSHHELLELVESKLVESNS-DVSVDSLQ	118
BnFLC1	DNLVKILDRYGRQHADD-LKALDRQSKALDCGSHHELLELVESKLEESNVNVSVGSVQ	119
SaFLC	DNLVKILDRYGRQHADD-LKALDRQSKPLNCGSHHELLELVESKLEESNDNVSVGSVQ	119
SiFLC	DNLGKILDRYLKQHADD-FKALDRQSKGLNYGLHPELLELVESKLEESNVGNVSVDSVIQ	88
	: * : :** ** ***** : . * * *****:*** ** :*** :.***:	
AtFLC	LEEHLLETALSVTRAKKTEMLKLVENLKEKEKMLKEENQVLASQMEKNNHHVGAEAEMEMS	179
AaFLC2	LEEHLGTALSVTRAKKELMLKLVENLKEKEKLLKEENQVLASQMKRNNHHVGAEAEMETS	179
BnFLC4	LENHLETALSVTRARKTEMLKLVDSLKEKEKLLKEENQGLASQMEKNNLAGAEADKMEV	178
BoFLC4-1	LENHLETALSVTRARKTEMLKLVDSLKEKEKLLKEENQGLASQMEKNNLAGAEADKMEV	179
BnFLC2	LEDHLETALSVTRARKTEMLKLVDSLKEKEKLLKEENQGLASQMEKNNLAGAEADKMEM	178
BnFLC1	LEEHLNALSIVTRARKTEMLKLVENLKEKEKLEENHVLAASQMEKSNLVRAEADNMDV	179
SaFLC	LEENLESALSVTRARKTEMLKLVENLKEKEKLEENHVLAASQMEKNNLVRAEADNMEV	179
SiFLC	LEDHLDNALSIVTRARKTEMLKLVENLKEKEKLLKEENQVLASQMEKNNLVRAEADNMEI	148
	: * : :*** ** *****: *****: *****: .***:	
AtFLC	PAGQISD-NLPVILPLL	196
AaFLC2	PAGQISD-NLPVILPLL	196
BnFLC4	SPGQISDINCPVILPLLY	196
BoFLC4-1	SPGQISDINCPVILPLLY	197
BnFLC2	SPGQISDINFPVILRLLY	196
BnFLC1	SPGQISDINLPVILPLL	197
SaFLC	SPGQISDINLPVILPLL	197
SiFLC	HP-----	150

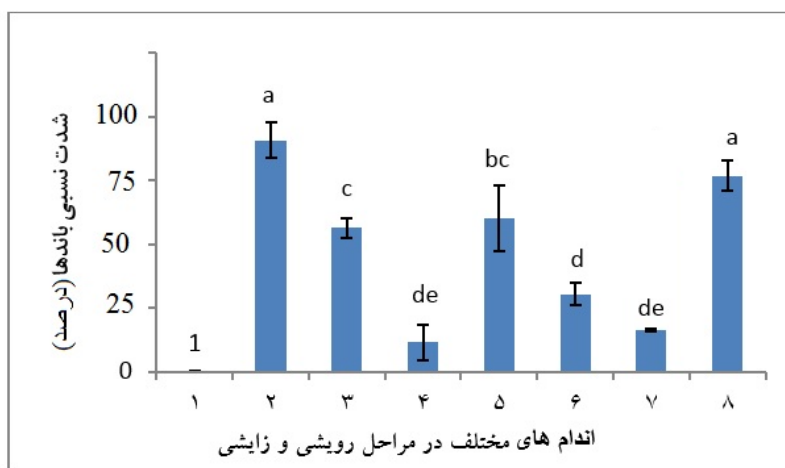
شکل ۷- مقایسه توالی پروتئین استنباطی *SiFLC* در *S. Irio* و برخی از پروتئین‌های هم‌ساخت *FLC* در گونه‌های دیگر با استفاده از برنامه Clustalw2. علائم (*), (:), و (.) در زیر هر ستون، به ترتیب نشان دهنده ریشه‌های آمینواسیدی مشابه هم، حفاظت شده (هم خانواده) و نیمه حفاظت شده در تمام توالی‌های هم‌ردیف شده، می‌باشد.



شکل ۹- بررسی بیان ژن *SiFLC* در اندام‌های مختلف طی دو مرحله‌ی نموی رویشی و زایشی در خاکشیر بدل. شماره‌ها به ترتیب عبارتند از: ۱: برگ زایشی، ۲: برگ جوان رویشی، ۳: برگ بالغ رویشی، ۴: ساقه زایشی، ۵: ساقه رویشی، ۶: گل، ۷: ریشه زایشی، ۸: ریشه رویشی. در تمامی واکنش‌ها بیان ژن *GAPDH* به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شده است.



شکل ۸- درخت فیلوژنی (شجره نامه) پروتئین‌های همساخت FLC در گونه‌های مختلف با استفاده از نرم‌افزار MEGA 6 به روش Parsimony Tree. در این شکل علامت پیکان زن SiFLC در *S. Irio* را نشان می‌دهد.



شکل ۱۰- شدت نسبی بیان ژن SiFLC در اندام‌های مختلف در *S. Irio* با استفاده از نرم‌افزار ImageJ و آزمون دانکن ($P < 0.05$). حروف متفاوت نشانه معنی‌دار بودن است. شماره‌ها به‌ترتیب عبارتند از: ۱- برگ در مرحله زایشی، ۲- برگ جوان در مرحله رویشی، ۳- برگ بالغ در مرحله رویشی، ۴- ساقه مرحله زایشی، ۵- ساقه مرحله رویشی، ۶- گل، ۷- ریشه مرحله زایشی، ۸- ریشه مرحله رویشی.

بحث و نتیجه‌گیری

این سوال به ذهن می‌رسد که سیگنال‌های متفاوت مسیرهای عمده گل‌دهی که با هم هم‌پوشانی دارند چگونه ادغام می‌شوند تا یک تصمیم‌نموی واحد اتخاذ شود؟ در حالی که صدها ژن ممکن است روی گذر به گل‌دهی تأثیر بگذارند اما تصمیم‌زمان ایجاد گل به مقدار نهایی بیان FT و دو ژن کلیدی دیگر، *SOC1* (*AGL20*) و *LFY* بستگی دارد. روی هم رفته به این سه ژن، ژن‌های یک پارچه ساز مسیر گلی می‌گویند (۳۹) مسیرهای مختلف به روش‌های متفاوتی یک پارچه‌سازی گلی را کنترل می‌کنند (۱۰). گذر به گل‌دهی یک تغییر‌نموی مهم برای به حداکثر رساندن موفقیت تولید مثل جنسی در چرخه‌ی زندگی نهان‌انگان است. ژن‌های بسیاری در مسیرهای ژنتیکی مختلف، فرآیند گذر به گل‌دهی را کنترل می‌کنند. از بین آن‌ها ژن *FLC* از خانواده فاکتورهای رونویسی MADS-box، نقش مهمی را در مهار گل‌دهی ایفا می‌کند. بخش اعظم اختلاف در آغاز گل‌دهی، به وسیله‌ی تنوع آللی در دو لوکوس *FRI* و *FLC* ایجاد می‌شود. از آنجا که تنوع آللی *FRI* و *FLC* در اکوتیپ‌های مختلف آراییدوپسیس بسیار معمول است، هم‌ساخت‌های آن‌ها لوکوس‌های اثرگذار بر زمان گل‌دهی، در سایر گیاهان در نظر گرفته شده‌اند (۱۲ و ۳۶) متضاد با نقش این ژن‌ها در مهار گذر به گل‌دهی، بهاره‌شدن به میزان زیادی تاخیر در آغاز گل‌دهی را از بین می‌برد (۳۸). بنابراین بهاره شدن به‌عنوان اولین قدم در ایجاد توانایی برای گل‌دهی عمل می‌کند (۷). تک‌باند اختصاصی حاصل از RT-PCR روی ژل آگارز در درجه‌ی اول بیانگر طراحی و عملکرد صحیح آغازگرها و مناسب بودن غلظت مواد بکار رفته در PCR است. هم‌چنین برنامه‌ی PCR مناسب (بخصوص دمای اتصال) از جمله عوامل موفقیت در کسب تک‌باند اختصاصی است (۳۱). واکنش RT-PCR با استفاده از RNA استخراجی از برگ لپه‌ای، وجود قطعه‌ی تکثیر شده با طول ۴۴۹ نوکلئوتید، بعنوان ژن *FLC* خاکشیر بدل

با شماره دسترسی KT156751 با نام *SiFLC* در بانک ژن ثبت شد. طول این قسمت از ناحیه‌ی کد کننده‌ی ژن ارتولوگ یا هم‌ساخت *FLC*، در آراییدوپسیس تالیانا (۸)، آراییدوپسیس هالری (۳۲)، کلزا (۳۷)، خردل سفید (۷)، کلم (۲۲)، شلغم، خردل سیاه، خردل زرد و خردل هندی (۲۴)، ۴۴۹ نوکلئوتید گزارش شده است. این قطعه‌ی توالی‌یابی شده هم‌ساخت *FLC*، مربوط به هر ۷ اگزون در خاکشیر بدل می‌باشد. نزدیک‌ترین توالی نوکلئوتیدی به *SiFLC*، مربوط به گیاه *Brassica rapa* می‌باشد که ۸۹ درصد با آن مشابهت دارد. پروتئین استنباطی این قطعه از ژن *SiFLC* دارای ۱۵۰ آمینواسید است که ۸۱ درصد یکسانی را با توالی آمینواسیدی *B. rapa* نشان می‌دهد. طول این قطعه از پروتئین *SiFLC* با طول سایر هم‌ساخت‌های *FLC* در خانواده‌ی شب بو برابر است. طول کامل پروتئین *FLC* در اکثر توالی‌های پروتئینی ثبت شده از این ژن در سایت NCBI که متعلق به خانواده‌ی شب بو می‌باشند، تقریباً ۱۹۶ آمینواسید است. تاکنون در بسیاری از جنس‌های خانواده‌های مختلف، ژن‌های هم‌ساخت *FLC* شناسایی شده‌اند. برای مثال *de Oliveria* و همکاران (2014) ناحیه کد کننده این ژن را در قهوه (*Coffea arabica*)، *L.* توالی‌یابی کرده‌اند (۸). تعداد نسخه‌های این ژن در جنس‌های مختلف خانواده شب‌بو متفاوت است، در ژنوم آراییدوپسیس تنها یک نسخه از این ژن (*AtFLC*) وجود دارد. در حالی که اعضای دیپلوئید جنس *Brassica* چندین نسخه از این ژن را شامل می‌شوند، این هم‌ساخت‌های چندتایی با اختلاف در آغاز گل‌دهی ارتباط دارند (۴۱). مقایسه‌ی توالی پروتئین استنباطی *SiFLC* با ۱۵۰ آمینواسید و دیگر هم‌ساخت‌های *FLC*، نشان‌دهنده‌ی شباهت زیاد آن‌ها بود. ژن‌های هم‌ساخت‌های *FLC* در خانواده شب‌بو، پروتئین‌هایی با تفاوت اندک در تعداد و نوع اسید آمینه کد می‌کنند. پروتئین استنباطی *FLC* در خردل سفید (۱۹۷)، تربچه (۱۹۷)، کلم (۱۹۷)، کلزا (۱۹۶)، شلغم (۱۹۷)، آراییدوپسیس تالیانا (۱۹۶)، خردل هندی (۱۹۷) و یوترما

یابد که گلدهی تحریک شود. بهرحال، میزان آن در گل (غنچه های گل) مقداری افزایش نشان داد که از برگ، ساقه و ریشه در مرحله رویشی کمتر بود. گزارش شده است که *FLC* در نسل بعدی، از سرکوب رها می‌شود و به نتایج (فرزندان) یک گیاه بهاره شده اجازه می‌دهد تا به زمستان پاسخ دهد. فعال‌سازی *FLC* در این نسل، تنظیم مجدد نامیده می‌شود تا بازیابی حالت پیش بهاره شده را به فرزندان یک گیاه بهاره شده اهدا نماید. مطالعات نشان است که ژن *FLC* به میزان زیادی در اکثر بافت‌های گیاه و در سراسر مراحل نمو آن، از جمله ابتدایی‌ترین مرحله نمو رویان در دانه‌های در حال بلوغ بیان می‌شود. فعالیت پروتئین *FLC* در تمامی مراحل نمو رویان، برای کنترل موثر آغاز گل‌دهی و به‌خصوص مهار آن مورد نیاز است. تصور می‌شود که تنظیم دوباره سبب حذف H3K27me3 و فعال‌سازی رونویسی *FLC* می‌شود که ممکن است قبل یا طی تشکیل گامت یا پس از لقاح در رویان در حال نمو رخ دهد (۱۲). بنابراین بیان دوباره این ژن در گل، پس از کاهش آن در فاز زایشی می‌تواند (که سبب گل‌دهی می‌شود)، می‌تواند مربوط به تنظیم دوباره آن و آمادگی برای مهار طی فاز رویشی باشد. همچنین مطالعات نشان داده است که سرکوب پیش‌رونده *FLC* در یک بافت به دلیل یک مکانیسم خودگردان سلولی است که در آن *FLC* به طور کامل و پایدار در برخی سلول‌ها سرکوب می‌شود اما در برخی دیگر اصلاً سرکوب نمی‌شود. پیامد این سرکوب پیش‌رونده خودگردان سلولی فعالیت *FLC* برای فعالیت ژن هدف، به‌احتمال برای ژن‌ها و بافت‌های مختلف متفاوت است (۲۳).

(۱۹۷) آمینو اسید دارد. توالی کامل ناحیه کد کننده‌ی این ژن، در گیاهان خانواده‌های دیگر نسبت به شب بو، به میزان کم‌تر شناسایی شده است. برای مثال پروتئین‌های هم‌ساخت *FLC* در قهوه ۲۰۶، پرتقال ۲۰۴، انگور ۲۱۰، کاکائو ۱۹۹، غان ۲۰۸ و گردو ۲۰۳ آمینواسید دارد. با توجه به توالی یابی کامل ناحیه کد کننده و شباهت بالای آن با سایر هم‌ساخت‌های *FLC* می‌توان نتیجه گرفت که ناحیه N ترمینال این پروتئین، بیش از سایر مناطق آن حفاظت شده است. بررسی نحوه‌ی قرارگیری گونه‌های گیاهی مختلف در درخت فیلوژنی رسم شده، نشان می‌دهد که گیاهان هم‌خانواده‌ی *Sisymbrium irio* همگی در شاخه‌های مجاور این گیاه قرار گرفته‌اند و این مطلب، تأییدی بر صحت توالی خوانده شده برای ژن *FLC* در این گیاه می‌باشد. باتوجه به نتایج حاصل از BLAST، پروتئین *SiFLC* با *BrFLC* (*Brassica rapa*) و *SaFLC* (*Sinapis alba*) (هم‌ساخت *FLC* در خردل سفید) در درخت فیلوژنی رسم شده، در یک شاخه قرار گرفته‌اند، که با شباهت بالای توالی‌های نوکلئوتیدی و پروتئینی این دو گیاه مطابقت دارد. همچنین در درخت فیلوژنی رسم شده، گیاهان خانواده شب‌بو از سایر گیاهان متعلق به خانواده‌های مختلف جدا شده‌اند. بیان ژن *SiFLC* در خاکشیر بدل، در فاز رویشی در برگ، ریشه و ساقه بطور قابل توجهی مشاهده شد، اما بیان آن در برگ، ساقه و ریشه در مرحله‌ی زایشی کاهش نشان داد و حتی در برگ دیده نشد. میزان بالاتر بیان آن در فاز رویشی، صحت نقش این ژن در مهار گلدهی را تأیید می‌کند و باتوجه به نقش آن در مهار گلدهی، بدیهی است که میزان آن در مرحله زایشی کاهش

منابع

- 1- Amasino, R.M., and Michaels, S.D., 2010. The timing of flowering, *Plant Physiology*, 154(2), PP: 516-520.
- 2- Asadi-Khanuki, M., Rezanejad, F, Sharifi-sirchi, G.R., and Sasan, H.A., 2015. Sequencing of LEAFY homologous gene in *Solanum villosum* Mill, *Journal of Cell & Tissue*, 6 (1), PP: 51-58.
- 3- Antoniou-Kourouniotti, R.L., Berggren, K., Selga, C., Tudor, E.H., Yates, B., Cox, D., Harris, B.R.C., Irwin, J.A., Howard, M., and Säll, T., 2020. Natural variation in autumn expression is the major adaptive determinant distinguishing *Arabidopsis FLC* haplotypes. *Elife*, 9, e57671 p.

- 4- Blázquez, M., Koornneef, M., and Putterill, J., 2001. Flowering on time: genes that regulate the floral transition. *EMBO reports*, 2(12), PP: 1078-1082.
- 5- Cho, L.H., Yoon, J., and An, G., 2017. The control of flowering time by environmental factors, *Plant Journal*. 90(4), PP: 708-19.
- 6- Cockram, J., Chiapparino, E., and Taylor, S.A., et al. 2007. Haplotype analysis of vernalization loci in European barley germplasm reveals novel VRN-H1 alleles and a predominant winter VRN-H1/VRN-H2 multi-locus haplotype, *Theoretical and Applied Genetics*, 115(7), PP: 993-1001.
- 7- D'Aloia, M., Tocquin, P., and Périlleux, C., 2008. Vernalization-induced repression of FLOWERING LOCUS C stimulates flowering in *Sinapis alba* and enhances plant responsiveness to photoperiod. *New Phytologist*, 178(4), PP: 755-765.
- 8- de Oliveira, R., Cesarino, I., Mazzafera, P., and Dornelas, M.C., 2014. Flower development in *Coffea arabica* L, new insights into MADS-box genes, *Plant reproduction*, 27(2), PP: 79-94.
- 9- Dennis, E.S., and Peacock, W.J., 2007. Epigenetic regulation of flowering. *Current opinion in plant biology*, 10(5), PP: 520-527.
- 10- Domagalska, M., 2006. Genetic analyses of brassinosteroid control of flowering time in *Arabidopsis thaliana*. (Doctoral dissertation, Universität zu Köln).
- 11- Dornelas, M.C., and Rodriguez, A.P.M., 2005. The rubber tree (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) homologue of the LEAFY/FLORICAULA gene is preferentially expressed in both male and female floral meristems, *Journal of Experimental Botany*, 56(417), PP: 1965-1974.
- 12- Finnegan, E.J., Robertson, M., and Helliwell, C.A., 2021. Resetting FLOWERING LOCUS C Expression After Vernalization Is Just Activation in the Early Embryo by a Different Name. *Frontiers in Plant Science*, 11, 2146 p.
- 13- Ganjalikhani Hakemi, F., Rezanejad, F., and 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 Researches (Iranian Journal of Biology)*, 33(3), PP: 456-467.
- 14- Glover, B.J., 2009. Understanding flowers and flowering: an integrated approach. Oxford University Press Oxford.
- 15- Hepworth, J., Antoniou-Kourounioti, R.L., Berggren, K., Selga, C., Tudor, E.H., Yates, B., Cox, D., Harris, B.R.C., Irwin, J.A., Howard, M., and Säll, T., 2020. Natural variation in autumn expression is the major adaptive determinant distinguishing *Arabidopsis* FLC haplotypes, *Elife*, 9, e57671 p.
- 16- Hu, Y., Liu, B., Sun, C., Liu, J., Wang, X., Cheng, F., Liang, J., Wang, X., and Wu, J., 2016. Evolution of TWIN SISTER of FT (TSF) genes in Brassicaceae. *Horticultural Plant Journal*, 2(1), PP: 16-25.
- 17- Kardailsky, I., Shukla, V.K., Ahn, J.H., and Dagenais, N. et al. 1999. Activation tagging of the floral inducer FT, *Science*, 286 (5446), PP: 1962-1965.
- 18- Kennedy, A., and Geuten, K., 2020. The role of FLOWERING LOCUS C relatives in cereals. *Frontiers in plant science*, 11, 2108 p.
- 19- Khan, M.R.G., Ai, X.Y., and Zhang, J.Z., 2014. Genetic regulation of flowering time in annual and perennial plants. *Wiley Interdiscip Rev: RNA*, 5(3), PP: 347-59.
- 20- Kim, D.H., Doyle, M.R., Sung, S., and Amasino, R.M., 2009. Vernalization: winter and the timing of flowering in plants. *Annual Review of Cell and Developmental*, 25, PP: 277-299.
- 21- Lin, F., Xue, S.L., Tian, D.G., and Li, C.J., et al., 2008. Mapping chromosomal regions affecting flowering time in a spring wheat RIL population. *Euphytica*, 164(3), PP: 769-777.
- 22- Lu, K., Huang, N., Liu, Y., and Yu, T., 2009. Brassica oleracea flowering locus T mRNA, complete cds. from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/EU984306.1>
- 23- Madrid, E., Chandler, J.W., and Coupland, G., 2021. Gene regulatory networks controlled by FLOWERING LOCUS C that confer variation in seasonal flowering and life history, *Journal of Experimental Botany*, 72(1), PP: 4-14.
- 24- Mayee, P., and Singh, A., 2013. Brassica juncea flowering locus T variant 3 gene, complete cds, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/EU984306.1>
- 25- Nocker, S., 2001. The molecular biology of flowering. *Horticultural Reviews*, 27, PP: 1-39.
- 26- Okamoto, T., and Okabe, S., 2000. Ultraviolet absorbance at 260 and 280 nm in RNA measurement is dependent on measurement solution, *International Journal of Molecular Medicine*, 5(6), PP: 657-666.

- 27-Putterill, J., Laurie, R., and Macknight, R., 2004. It's time to flower: the genetic control of flowering time, *Bioessays*, 26(4), PP: 363-373.
- 28-Quesada, V., Dean, C., and Simpson, G.G., 2005. Regulated RNA processing in the control of Arabidopsis flowering, *International Journal of Developmental Biology*, 49(5/6), 773 p.
- 29-Richter, R., Kinoshita, A., Vincent, C., Martinez-Gallegos, R., Gao, H., van Driel, A.D., Hyun, Y., Mateos, J.L., and Coupland, G., 2019. Floral regulators FLC and SOC1 directly regulate expression of the B3-type transcription factor TARGET OF FLC AND SVP 1 at the Arabidopsis shoot apex via antagonistic chromatin modifications. *PLoS genetics*, 15(4), p.e1008065.
- 30-Salehi, H., Ransom, C.B., Oraby, H.F., Seddighi, Z., and Sticklen, M. B., 2005. Delay in flowering and increase in biomass of transgenic tobacco expressing the Arabidopsis floral repressor gene Flowering Locus, C., *Journal of plant physiology*, 162 (6), PP: 711-717.
- 31-Sambrook, J., and Russel, D.W., 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual (3-volume set) (Vol. 999)*: Cold spring harbor laboratory press Cold Spring Harbor, New York:.
- 32-Satake, A., Kawagoe, T., Saburi, Y., Chiba, Y., Sakurai, G., and Kudoh, H., 2013. Forecasting flowering phenology under climate warming by modelling the regulatory dynamics of flowering-time genes, *Nature communications*, 4.2303, PP:1-8.
- 33-Schranz, M.E., Quijada, P., Sung, S.B., Lukens, L., Amasino, R., and Osborn, T.C., 2002. Characterization and effects of the replicated flowering time gene FLC in *Brassica rapa*. *Genetics*, 162(3), PP: 1457-1468.
- 34-Sheikhbahaei, M., Rezanejad, F., Sasan, H., and 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 Researches (Iranian Journal of Biology)*, 33(4), PP: 515-523.
- 35-Sheldon, C.C., Jean Finnegan, E., Dennis, E.S., and James Peacock, W., 2006. Quantitative effects of vernalization on FLC and SOC1 expression. *The Plant Journal*, 45(6), PP: 871-883.
- 36-Uptmoor, R., Li, J., Schrag, T., and Stützel, H., 2012. Prediction of flowering time in *Brassica oleracea* using a quantitative trait loci-based phenology model. *Plant Biology*, 14(1), PP: 179-189.
- 37-Wang, R., Farrona, S., and Vincent, C., et al. 2009. PEP1 regulates perennial flowering in *Arabis alpina*, *Nature*, 459(7245), PP: 423-427.
- 38-Weigel, D., 2012. Natural variation in Arabidopsis: from molecular genetics to ecological genomics. *Plant Physiology*, 158(1), PP: 2-22.
- 39-Wigge, P.A., 2011. FT, a mobile developmental signal in plants. *Current Biology*, 21(9), R374-R378.
- 40-Yi, X., Gao, H., Yang, Y., Yang, S., Luo, L., Yu, C., Wang, J., Cheng, T., Zhang, Q., and Pan, H., 2021. Differentially Expressed Genes Related to Flowering Transition between Once-and Continuous-Flowering Roses. *Biomolecules*, 12(1), 58 p.
- 41-Zou, X., Suppanz, I., Raman, H., Hou, J., and Wang, J., 2012. Comparative analysis of FLC homologues in Brassicaceae provides insight into their role in the evolution of oilseed rape, *PLoS ONE* 7(9): e45751p.

Isolation, sequencing and expression levels of FLOWERING LOCUS C ortholog gene (FLC) in different organs of *Sisymbrium irio* (Brassicaceae)

Rezanejad F.¹, Nasri F.^{1,2}, Heidari R.² and Bahmani Z.³

¹ Dept. of Biology, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, I.R. of Iran

² Dept. of Biology, Urmia University, Urmia, I.R. of Iran

³ Dept. of Biology, University of Tabriz, Tabriz, I.R. of Iran

Abstract

Regulation of flowering time requires the activity of various genes that are controlled by environmental and internal cues. The FLC gene plays a key role in transition to flowering and suppresses flowering as target gene of vernalization pathway. Vernalization is a natural adaptation to ensure flowering after winter so that flowers and seeds can develop in favorable environmental conditions. In this study, identification and expression of *FLC* gene was investigated in rocket mustard (*Sisymbrium irio*). Total RNA was extracted from cotyledon leaves and cDNA was made. Specific primers were designed based on tsequence alignment of *FLC* homogenous genes and used for RT-PCR reaction. The identified 449 nucleotids fragment was recorded as *SiFLC* with accession number KT156751 in the NCBI database. Sequencing of the coding region and comparison of its putative protein (with 150 amino acids) and FLC orthologues in other plants showed their high similarity. Expression relative rate using the semi-quantitative method, in vegetative stage in young leaves, mature leaves, stems and roots was between 56-86%, which the highest (about 86%) and the lowest (about 56%) levels were observed in young leaves and stems respectively. In the reproductive stage, a decrease in expression was observed in these organs especially in leaves (about one percent). However, expression level was higher in flower buds and reached about 31%. Decreasing leaf expression in the reproductive phase indicates flowering induction. *FLC* higher levels in flowers, after transition to flowering, allows the next generation to reregulate its rate and respond to winter during vegetative phase.

Key word: Young leaf, Stem, Flowering, Sequencing, RT-PCR, Rocket mustard