

مجله ایمنی زیستی

دوره ۱۷، شماره ۳، پاییز ۱۴۰۳

ISSN 2716-9804 الکترونیکی، ISSN 2717-0632 چاپی

انتقال ژن *FT* به گیاه آفتابگردان و بررسی تاثیر آن بر زمان گلدهی



نوع مقاله: پژوهشی [20.1001.1.27170632.1403.17.3.1.3](https://doi.org/10.1001.1.27170632.1403.17.3.1.3)

مقصود پژوهنده^{۱*}، محسن سجادی فرد^۲، اکبر شیرزاد^۳، محمد احمدآبادی^۴

۱- دانشیار گروه زیست شناسی گیاهی، سلولی و مولکولی، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

۲- دانشجوی کارشناسی ارشد گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران

۳- دانشیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران

۴- دانشیار گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران

Pazhouhandeh@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۶/۰۲، تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۹/۲۳

صفحه ۱۶-۱

چکیده

گیاهان به نحوی وابسته به گل می‌باشند بطوری که گل یا هدف اصلی محصول می‌باشد یا برای تولید محصول مورد نیاز است. آغاز گلدهی (انتقال از فاز رویشی به فاز زایشی) مرحله مهم و حیاتی برای گیاه محسوب می‌شود. مطالعات ژنتیکی در مورد گلدهی حداقل چهار مسیر مهم گلدهی را مشخص کرده است که شامل مسیر نوری، مسیر بهاره کردن، مسیر خودمختار و مسیر جیبرلین می‌باشد. در مسیر نوری گلدهی، ژن *Flowering Locus T (FT)* تحت تاثیر ژن *CONSTANS (CO)* با افزایش مدت تابش نور خورشید سبب آغاز فرایند گلدهی می‌شود. در این مطالعه ابتدا cDNA ژن *FT* گیاه مدل آرابیدوپسیس به کمک آغازگرهای اختصاصی با PCR تکثیر و جداسازی و در وکتور بیانی pMDC43 همسانه سازی شد. پس از تایید توالی، به سلول‌های آگروباکتریوم منتقل و به قطعات کوتیلدون و برگ گیاه آفتابگردان منتقل شد. ریزنمونه‌ها به کالوس و گیاه القا شدند و گیاهان تراریخته مستقل تحت انتخاب با هیگرومایسین به غلظت ۱۰ mg/l تولید، تکثیر و بررسی فنوتیپی از لحاظ زمان گلدهی شدند. استخراج DNA از گیاهان تراریخته انجام و حضور تراژن در آنها توسط تکنیک PCR تایید شد. گیاهان تراریخته گلدهی زود هنگامی نسبت به گیاهان غیرتراریخته نشان دادند. نتایج این تحقیق نشان داد که می‌توان با انتقال ژن *FT* گلدهی را در آفتابگردان تسریع نمود و زودتر به محصول رسید.

واژه‌های کلیدی: آفتابگردان، تراریزش، کشت بافت، گلدهی، ژن *FT*

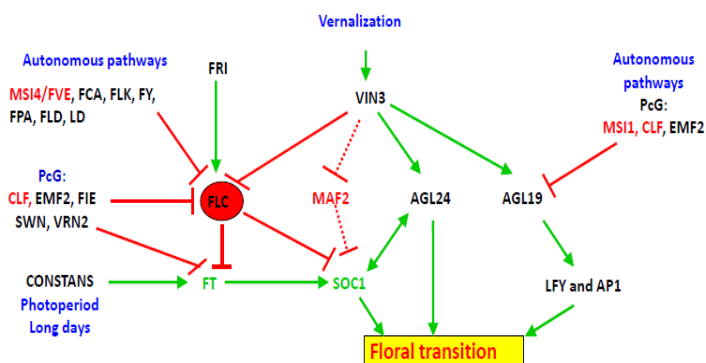
مقدمه

مختار و جیبرلین) زمان گلدهی را کنترل می کنند

(شکل ۱) (Blazquez et al. 2000).

ژن *FT* مخفف *Flowering Locus T* یکی از کلیدی ترین ژن ها در تنظیم زمان گل دهی در گیاهان گلدار است. این ژن به عنوان «فلوریژن» شناخته می شود؛ سیگنالی متحرک که از برگ ها به مریستم انتهایی ساقه منتقل می شود و منجر به آغاز گل دهی می شود. در گیاه مدل *Arabidopsis thaliana*، ژن *FT* در سلول های همراه آوند آبکش برگ ها تحت شرایط روز بلند (long-day) بیان می شود. پس از ترجمه، پروتئین *FT* از طریق آوندها به مریستم انتهایی ساقه منتقل می شود، جایی که با فاکتور رونویسی *FD* تعامل می کند. این کمپلکس بیان ژن های کلیدی مانند (*AP1*) *Suppressor of APETALA1* (*SOC1*) و *Overexpression of Constans1* را فعال می کند و موجب آغاز گل دهی می شود (Lee et al. 2023).

فیزیولوژی و پدیده شناسی انتقال نموی گیاه از رشد رویشی به رشد زایشی (گلدهی) سال ها است که مطالعه می شود، اما مکانیسم مولکولی آن تنها در ۱۰ سال اخیر مورد توجه دانشمندان قرار گرفته است (Nocker, 2001; Robustelli et al. 2025). گیاهان گلدار در چرخه زندگی خود از چندین مرحله ی نموی، مانند جوانه زنی، رشد رویشی، گلدهی، لقاح، نمو جنینی و بلوغ دانه عبور می کنند (Weidong et al. 2000) که در این میان آغاز گلدهی مرحله ی مهم و حیاتی برای گیاه می باشد (Kim et al., 2003, 2024). تحقیقات ژنتیک مولکولی در گیاه مدل آرابیدوپسیس منجر به کشف تعداد زیادی از ژن ها شد که شبکه ی تنظیمی پیچیده ای را تشکیل می دهند و با دو مسیر وابسته به عوامل محیطی (دوره ی نوری و بهاره کردن) و دو مسیر مستقل از عوامل محیطی (خود



شکل ۱- چهار مسیر عمده ی درگیر در فرایند شروع گلدهی. مسیر بهاره کردن و خودمختار از طریق مهار بیان *FLC* به روش اپی ژنتیک و هورمون جیبرلین هم از طریق *AGL*، باعث بیان فعال ژن های گلدهی و آغاز گلدهی در شرایط محیطی مساعد می گردند. از طرف دیگر پروتئین *CO* درگیر در مسیر دوره ی نوری در پاسخ به طول روز بلند، از طریق افزایش بیان یک ژن گلدهی مهم دیگر به نام *FT* باعث شروع گلدهی می گردد

"پژوهنده و همکاران، انتقال ژن FT به گیاه آفتابگردان و بررسی تاثیر آن بر زمان گلدهی"

عملکرد و تنظیم این ژن می تواند به بهبود عملکرد گیاهان و تسريع برنامه های اصلاح نژاد کمک کند. ژن های مشابه FT در بسیاری از گیاهان شناسایی شده اند و نقش های مشابهی در تنظیم گل دهی دارند. در درختان میوه، استفاده از ژن های مشابه FT برای کاهش دوره رویشی و تسريع گل دهی و به منظور تسريع در برنامه های اصلاح نژاد، موفقیت آمیز بوده است (Li et al. 2015a, 2015b). ژنوم آرابیدوپسیس حداقل ده گیرنده حساس به نور را کد می کند که شامل پنج فیتوکروم (PHYA تا PHYE)، سه کریپتوکروم (CRY1-3) و دو فتوتروپین می باشد. با بررسی گیاهان جهش یافته مشخص شد، همه گیرنده های نوری به جز فتوتروپین ها نقش مهمی در تنظیم زمان گلدهی نشان می دهند. CRY2 و PHYB احتمالاً در بالا دست CO به ترتیب بعنوان تنظیم کننده های مثبت و منفی غیرمستقیم عمل می کنند (Yanovsky and Kay, 2002; Valverde et al. 2004). اونیوچی و همکاران (۲۰۰۱) ارتباط بین CO و چندین ژن مسیر دوره نوری دیگر را با بیان S:CO³⁵ در گیاهان جهش یافته روشن ساختند. افزایش بیان CO برای شروع گلدهی کافی است و سطوح mRNA در گیاهان آرابیدوپسیس رشد یافته تحت شرایط روز بلند نسبت به گیاهان رشد یافته تحت شرایط روز کوتاه افزایش می یابد. محققان دریافتند

بیان ژن FT به طور دقیق توسط عوامل محیطی و درونی تنظیم می شود. یکی از عوامل بنام فتوپریود یا طول روز، در شرایط روز بلند، فاکتور Constans (CO) بیان FT را القا می کند. عامل دیگر، ساعت زیستی، بیان FT تحت تأثیر ریتم شبانه روزی قرار دارد و در برخی شرایط، الگوی بیان دوگانه (صبح و غروب) نشان می دهد. عامل تنظیم اپی ژنتیک، تغییرات متیلاسیون در روی هیستون ها مانند H3K4me3 و H3K36me3 توسط پروتئین های MRG1 و MRG2 انجام می شوند و با تعامل با CO، بیان FT را فعال می کنند. عوامل سرکوبگر مثل ژن های FLC و SVP با سرکوب مستقیم FT و SOC1، گل دهی را به تأخیر می اندازند. در گیاهان جهش یافته در این ژن ها، گل دهی زودتر رخ می دهد (Mirzaie-Asl et al. 2017). علاوه بر تحریک گل دهی، FT بر رشد رویشی نیز تأثیر می گذارد. در مطالعه ای، بیان بیش از حد ژن FT از گیاه *Jatropha curcas* در تنباکو باعث تغییرات قابل توجهی در رشد ریشه، ساقه و برگ شد. بررسی های ترنسکریپتومی نشان داد که رشد ساقه به دلیل تغییرات در هسته، سیتوپلاسم و دیواره سلولی تحت تأثیر قرار گرفته است. ژن FT به عنوان یک سیگنال مرکزی در تنظیم زمان گل دهی عمل می کند و درک دقیق از

MADS-box را کد می‌کند و باعث مهار گلدهی می‌شود. FLC به لوکوس FT متصل شده و بیان آن را مهار می‌کند و بنابراین از فعالیت آن توسط CO ممانعت می‌کند (González-Suárez et al. 2025). ژن‌های مسیر خودمختار سبب سرکوب بیان ژن FLC شده و گلدهی را آغاز می‌کنند (Sheldon et al. 1999; Sheikhabaei et al. 2020). در بسیاری از گیاهان، گلدهی می‌تواند توسط قرارگیری طولانی مدت در معرض سرمای نزدیک دمای انجماد تسریع و یا القا شود. این امر یک استراتژی تولیدمثلی به کار گرفته شده معمول است که باعث گلدهی و تولید دانه در دوره مساعد از نظر محیطی، به دنبال زمستان طبیعی می‌شود. این پدیده که Vernalization (بهاره کرده) نامیده می‌شود با قرارگیری گیاه در معرض سرما سبب فعال شدن یکسری ژن‌ها می‌شود که این ژن‌ها سبب سرکوب بیان ژن FLC (شکل ۱) و در نتیجه تسریع در بیان FT می‌شوند (Koornneef et al. 1991). چهار مسیر ژنتیکی ذکر شده در القای ژن‌های تعیین هویت مریستم گل (FMI) Floral Meristem Identity با همدیگر همگرا هستند. یکی از ژن‌های FMI که نقش کلیدی هم در این همگرایی دارد LFY می‌باشد. پروتئین LFY باعث تغییر نمو گل می‌شود و نه تغییر موقعیتی و مکانی گل، اما FT باعث تغییر موقعیتی گل می‌شود. یکی دیگر از

که CO هم در برگ و هم در ساقه به عنوان یک فاکتور رونویسی بیان می‌شود (Putterill et al. 1995; Samach et al. 2000; Suarez et al. 2001). آنالیز پروتئین CO در گیاهان جهش یافته در ژن‌های گیرنده نوری نشان داد که در گیاهان جهش یافته cry1/cry2 و phyA، پروتئین CO پاسخ به نورآبی و نورمادون قرمز پایدار می‌شود و در گیاه جهش یافته phyB پروتئین CO در نور قرمز تجزیه می‌شود. از آنجایی که PHYB مهار گلدهی را از طریق نور قرمز واسطه‌گری می‌کند، درحالی‌که PHYA و CRY2 به ترتیب تسریع گلدهی را از طریق نور آبی و مادون قرمز باعث می‌شوند. طی تحقیقات انجام شده، مشخص شده است که ژن FT به عنوان اولین هدف پایین دست فعالیت CO است (Onouchi et al. 2001). در تاریکی پروتئین CO یوبی کوئیتینه شده و توسط S26 پروتئازوم تجزیه می‌شود اما در نور سفید این پروتئین تا حدی پایدار است و در حضور نور، بیان FT توسط CO فعال می‌شود. ژن FT در آوندها بیان شده و متعاقباً، پروتئین FT از آوندها به رأس جوانه جابه‌جا می‌شود تا گلدهی آغاز گردد. علاوه بر مسیر نوری مسیر خودمختار (غیر وابسته به نور) در گلدهی موثر بوده و Flowering Locus (FLC) یک ژن کلیدی در شبکه تنظیمی گلدهی آرابیدوپسیس می‌باشد که یک فاکتور رونویسی

"پژوهنده و همکاران، انتقال ژن *FT* به گیاه آفتابگردان و بررسی تاثیر آن بر زمان گلدهی"

محصول با میزان نور خورشید همراه است، ما در این تحقیق امکان تولید گیاهان زود گلده آفتابگردان با انتقال ژن *FT* و تاثیر آن بر روی زمان گلدهی را مورد بررسی قرار دادیم.

مواد و روش‌ها

معرفی وکتور و آغازگرها

وکتور pMDC43 یک وکتور Gateway با طول ۱۲۴۶۲ جفت باز و دارای T-DNA برای انتقال ژن بواسطه آگروباکتریوم بوده که ژن‌های مقاومت به کانامایسین و هیگرومایسین به ترتیب برای انتخاب در محیط کشت *Escherichia coli* و گیاه را دارا می‌باشد (شکل ۲). همچنین دارای دو پروموتور *CaMV35S* و ترمیناتور *NOS* (nopaline synthase) می‌باشد. کلونینگ *FT* آرابیدوپسیس در وکتور pMDC43 با استفاده از PCR به کمک آغازگرهای اختصاصی (جدول ۱) ژن *FT* آرابیدوپسیس از روی cDNA این گیاه با PCR تکثیر و در وکتور pENTRY207 کلون گردید. پس از انتخاب کلون مثبت و استخراج پلاسمید از آن، به توالی یابی در انستیتو بیولوژی مولکولی گیاهی CNRS استراسبورگ فرانسه ارسال شد و توالی آن مطابق شماره دسترسی At1g65480 تایید شد. سپس از این وکتور به پلاسمید pMDC43 در مقابل دو پروموتور *CaMV35S* به روش Gateway منتقل شد. در این روش ابتدا دو

ژن‌های *FMI*، *SOC1* می‌باشد که در بالادست *LFY* عمل می‌کند. بیان *FT* و *SOC1* به طور مثبت توسط مسیر دوره‌ی نوری و به طور منفی توسط مسیر خودمختار از طریق FLC کنترل می‌شود (Blazquez et al. 2000). مسیر بهاره کردن هم احتمالاً بیان *SOC1* را با کاهش بیان *FLC* افزایش می‌دهد و بیان *SOC1* می‌تواند توسط مسیر جیبرلین افزایش یابد. بر این اساس *SOC1*، *LFY* و *FT* به عنوان ژن‌های همگرایی هر چهار مسیر عمل می‌کنند (Borner et al. 2000). بنابراین، *FT* به عنوان تنظیم کننده‌ی زمان گلدهی عمل می‌کند که پیام‌های دریافتی از مسیر دوره‌ی نوری و سایر مسیرهای گلدهی وساطت شده با *FLC* را با هم به کار می‌گیرد، تا زمان دقیق گلدهی تعیین شود. مطالعات اخیر نشان داده که تغییرات کروماتین نقش مهمی در تنظیم بیان *FT* ایفا می‌کنند، به طوری که افزایش بیان *FT* توسط پروموتور ویروسی قوی *S۳۵*، منجر به گلدهی خیلی سریع و مستقل از دوره‌ی نوری می‌شود (Jiang et al. 2008). آفتابگردان (با نام علمی *Helianthus annuus* L. و نام انگلیسی Sunflower) از نظر جهانی یکی از مهمترین دانه‌های روغنی و محصول تجاری کشورهای تولید کننده آن می‌باشد و در حال حاضر بعد از گیاهان کلزا و سویا به عنوان مهمترین گیاه روغنی در نظر گرفته می‌شود. میزان گلدهی آفتابگردان و به تبع آن افزایش میزان

pMDC43-FT هستند. استخراج پلاسمید از یکی از کلونی‌ها انجام شد و مستقیماً به آگروباکتریوم به روش الکتروپوراسیون انتقال یافت. چون انتقال FT از پلاسمید دهنده pENTRY207 به پلاسمید مقصد pMDC43-FT مستقیماً و با نو ترکیبی صورت می‌گیرد لذا نیازی به توالی یابی مجدد نیست.

پلاسمید دهنده و مقصد و آنزیم LR clonase مخلوط و به مدت یک ساعت در دمای محیط نگهداری می‌شوند و سپس به باکتری *E. coli* به روش شوک حرارتی انتقال می‌یابد. انتخاب در محیط کشت حاوی آنتی‌بیوتیک مربوط به پلاسمید مقصد یعنی کانامایسین انجام می‌شود و تمامی کلنی‌های حاصل مثبت و دارای پلاسمید

جدول ۱- آغازگرهای استفاده شده در این تحقیق

Name	Primer sequence	PCR product
AtFT F	GACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCATGTCTATAAAATATAAGAGAC	cloning
AtFT R	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTAAAGTCTTCTCTCCGCA	528 bp
FT qPCR F	CTAGCAACCCTCACCTCCGA	qPCR
FT qPCR R	TCGTAACACACAATCTCATTGCCAAA	180 bp
35SPro F	AACATGGTGGAGCAGCAGACA	PCR
35SPro R	ATCACATCAATCCACTTGCTT	330 bp

ترانسفورماسیون گیاه آفتابگردان

برای ترانسفورماسیون گیاهان از باکتری *Agrobacterium tumefaciens* استرین ۴۴۰۴ که قبلاً وکتور pMDC43-FT به آن با الکتروپوراسیون (۲ کیلوولت به مدت ۵ هزارم ثانیه با دستگاه مولتی پوراتور اپندروف) منتقل شده بود استفاده گردید. ریزنمونه‌های کوتیلدون و قطعات برگ برای کشت همزمان با آگروباکتریوم به مدت ۲ روز پس از آغشته کردن به مدت ۱۵ دقیقه با سوسپانسیون باکتری استفاده شدند (Hewezi et al. 2002; Sujatha et al. 2012). سپس ریزنمونه‌ها چندین بار با آب استریل شستشو داده شده و به محیط باززایی MS حاوی BAP (0.1 mg/l) GA₃ (0.1 mg/l) منتقل شدند. پس از ۲

بذر و استریل بذرها

بذر گیاهان آفتابگردان مورد استفاده در این پژوهش از موسسه اصلاح بذر کرج تهیه گردید. ابتدا بذور آفتابگردان (رقم مشهور خوی) بمدت دو دقیقه با اتانول ۷۵٪ ضدعفونی سپس با آب مقطر استریل شستشو داده شدند. در مرحله بعد بذور در هیپوکلرید سدیم ۱۰٪ به همراه یک قطره Tween20 به مدت ۱۵ دقیقه غوطه‌ور شدند. سپس با آب مقطر استریل به مدت ۳ بار آبکشی شدند و در پتریهای استریل حاوی محیط کشت MS کشت شدند (Murashige and Skoog, 1962).

"پژوهنده و همکاران، انتقال ژن *FT* به گیاه آفتابگردان و بررسی تاثیر آن بر زمان گلدهی"

هفته به محیط انتخابگر حاوی هیگرومایسین 10 mg/l انتقال یافتند. گیاهان زنده مانده در این محیط، به محیط MS پایه منتقل گردیدند. برای حذف آگروباکتری از سفوتاکسیم در محیط کشت استفاده شد.

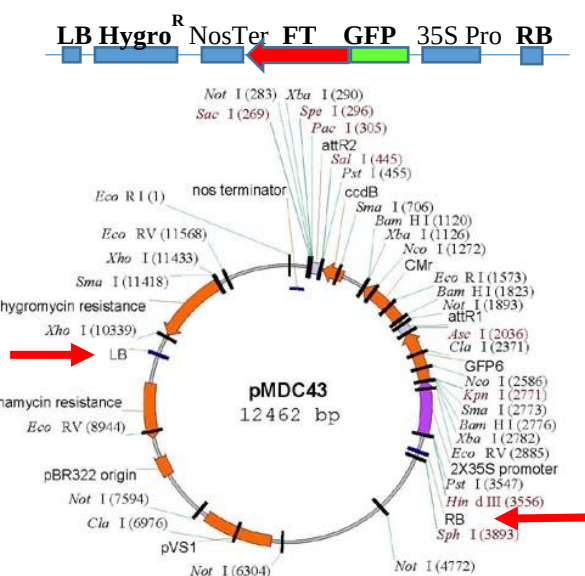
اتانول رسوب داده شد و بعد از خشک شدن 50°C - 30°C میکرولیتر آب استریل اضافه و در 20°C نگهداری گردید. جهت تایید وجود تراژن مورد نظر در گیاهان تراریخته آفتابگردان، واکنش PCR با استفاده از جفت پرایمرهای اختصاصی انجام گرفت.

استخراج DNA و PCR

حدود 200 mg میلی گرم از برگ های گیاه درون هاون چینی همراه با 500 mg میکرولیتر از بافر CTAB مطابق پروتوکول (Doyle and Doyle, 2019) به خوبی ساییده شد. در ادامه همه محتویات هاون به تیوب استریل 1.5 ml میلی لیتری منتقل شده و به مدت 20 min دقیقه در دمای 65°C قرار گرفت (هر 5 min دقیقه به مدت 10 min ثانیه هم زده شد). سپس یک حجم از کلروفورم به نمونه اضافه و به مدت 5 min دقیقه ورتکس گردید. سپس سانتریفیوژ در دمای اتاق با سرعت 13000 rpm انجام و فاز روئی به تیوب جدید منتقل شد. در انتها DNA به روش

نتایج و بحث

محصول آفتابگردان وابسته به گلدهی آن می باشد. به منظور دستیابی به گیاه آفتابگردان زودگلده در این تحقیق از انتقال ژن *FT* آرابیدوپسیس به این گیاه مهم از نظر زراعی استفاده شد تا تاثیر این ژن در گلدهی آفتابگردان بررسی شود. ابتدا جداسازی و کلونینگ *FT* از cDNA آرابیدوپسیس در وکتور pMDC43 انجام و توالی آن مطابق AT1G65480 (528 bp) در انستیتو بیولوژی مولکولی گیاهی CNRS استراسبورگ فرانسه تایید شد (شکل ۲).

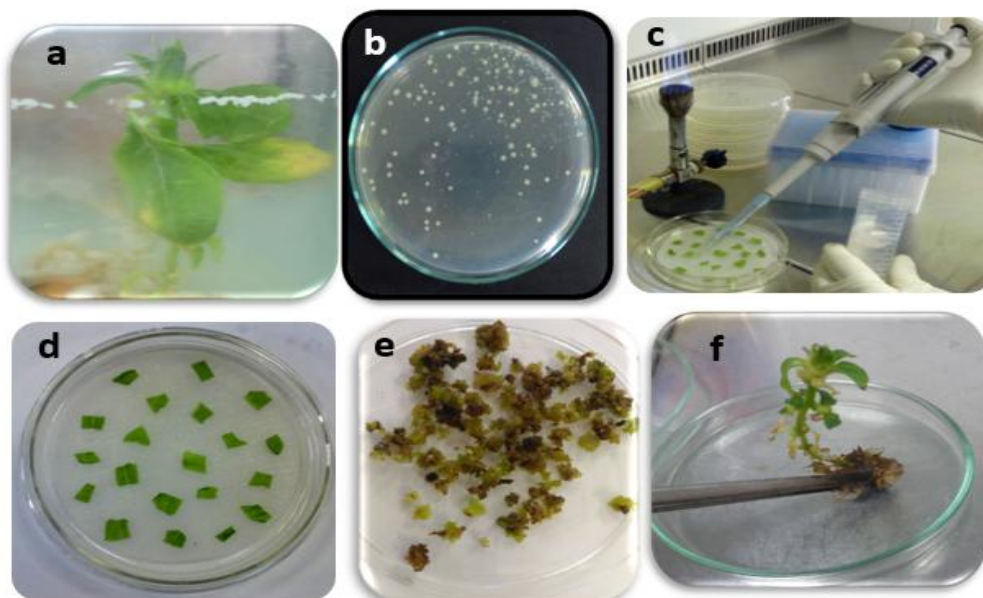


شکل ۲- نقشه پلاسمید pMDC43 و موقعیت ژن FT کلون شده در داخل T-DNA آن. (www.addgene.org)

دقیقه همکشتی یک شب نگهداری و سپس شستشو داده شدند تا آگروباکتریوم حذف گردد. محیط کشت MS حاوی سفوتاکسیم ۳۵۰ میلیگرم در لیتر برای ریزنمونه‌ها استفاده شد و مرتب تجدید کشت شدند (شکل ۲). ۲۰ روز پس از رشد به محیط رشد MS همراه با آنتی بیوتیک هیگرومایسین با غلظت ۱۰ میلی گرم بر لیتر بمدت ۱۵ روز منتقل گردید که تنها ۱۰ درصد ریزنمونه‌ها زنده ماندند. از هورمونه‌ای اکسین و سیتوکنین (IAA 0.1 mg/l و BAP 1mg/l) برای تبدیل ریزنمونه‌ها به کالوس و سپس جوانه زنی و باززایی آنها به گیاه استفاده شد (شکل ۳).

وکتور pMDC43-FT به روش الکتروپوراسیون با ۲ کیلوولت در دستگاه الکتروپوراتور (اپندورف) به آگروباکتریوم توفاشینز سویه ۴۴۰۴ منتقل شد و در روی محیط کشت حاوی کانامایسن و ریفامپیسین انتخاب کلنی مثبت انجام گرفت. از یک تک کلنی کشت مایع در ۲۸ درجه سانتیگراد در محیط کشت LB روی شیکر انجام و از آن برای تلقیح کشت اصلی تا رسیدن به OD600=0.8 استفاده شد. سلولهای آگروباکتریوم در آب شکر سه درصد باز یافت و سوسپانسیون شده و برای هم کشتی با ریزنمونه های گیاه آفتابگردان استفاده شد. همکشتی با قطعات کوتیلدون و برگ آفتابگردان صورت پذیرفت. ریزنمونه‌ها پس از ۱۵

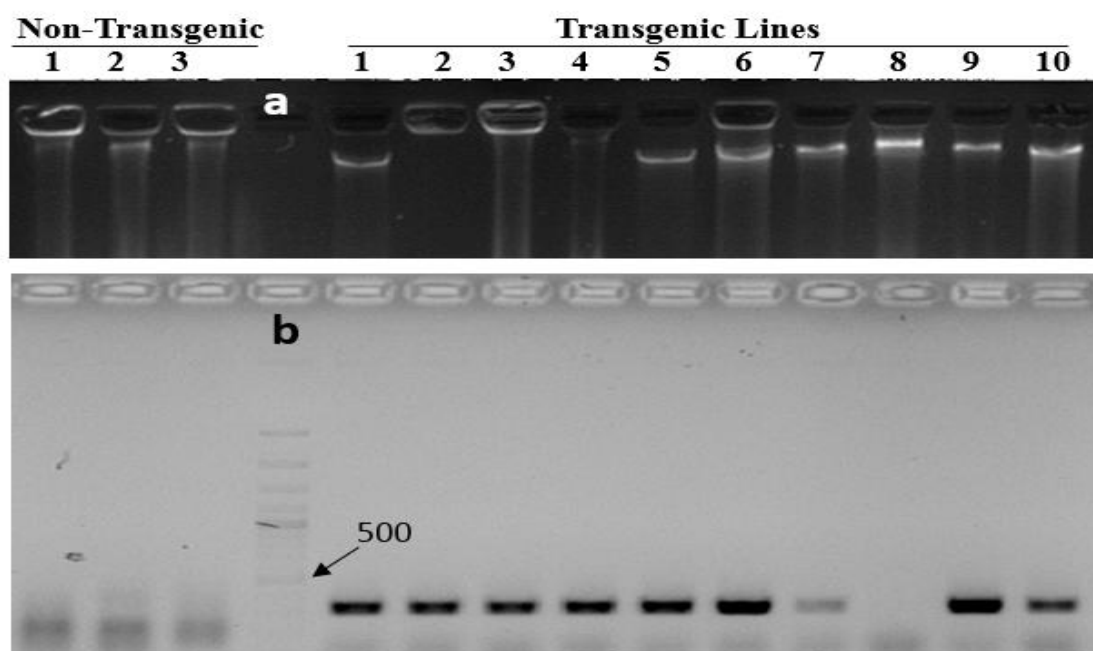
"پژوهنده و همکاران، انتقال ژن *FT* به گیاه آفتابگردان و بررسی تاثیر آن بر زمان گلدهی"



شکل ۳- تراریزش آفتابگردان با وکتور pMDC43-FT. (a) گیاه درون شیشه‌ای آفتابگردان؛ (b) کلنی‌های آگروباکتریوم حاوی وکتور pMDC43-FT. (c) همکشتی ریزنمونه‌های آفتابگردان با آگروباکتریوم. (d) ریزنمونه‌های آفتابگردان در طول کشت و بازکشت‌ها. (e) کالوس‌های ایجاد شده از ریزنمونه‌ها. (f) باززایی گیاه تراریخته از کالوس

و نتایج نشان داد که ۹ لاین از ده لاین برگزیده حاوی تراژن *FT* هستند. چون احتمال تکثیر *FT* درونی خود آفتابگردان با آغازگرهای اختصاصی برای تراژن *FT* آرابیدوپسیس وجود داشت لذا از آغازگرهای پروموتور استفاده شد. گیاهان به خاک منتقل و به همراه شاهد غیرتراریخته با ۳ تکرار از نظر گلدهی در شرایط روز بلند بررسی شدند.

در ادامه جهت تایید تراریخته بودن گیاهان، مجدداً به محیط کشت MS حاوی آنتی‌بیوتیک هیگرومایسین با غلظت ۲۰ میلی گرم بر لیتر بمدت ۱۰ روز منتقل شدند و پس از اطمینان از تراریخته بودن آنها استخراج DNA از ۱۰ گیاه مستقل انجام شد (شکل ۴a) و PCR به کمک آغازگرهای اختصاصی پروموتور *S35* انجام گرفت (شکل ۴b)

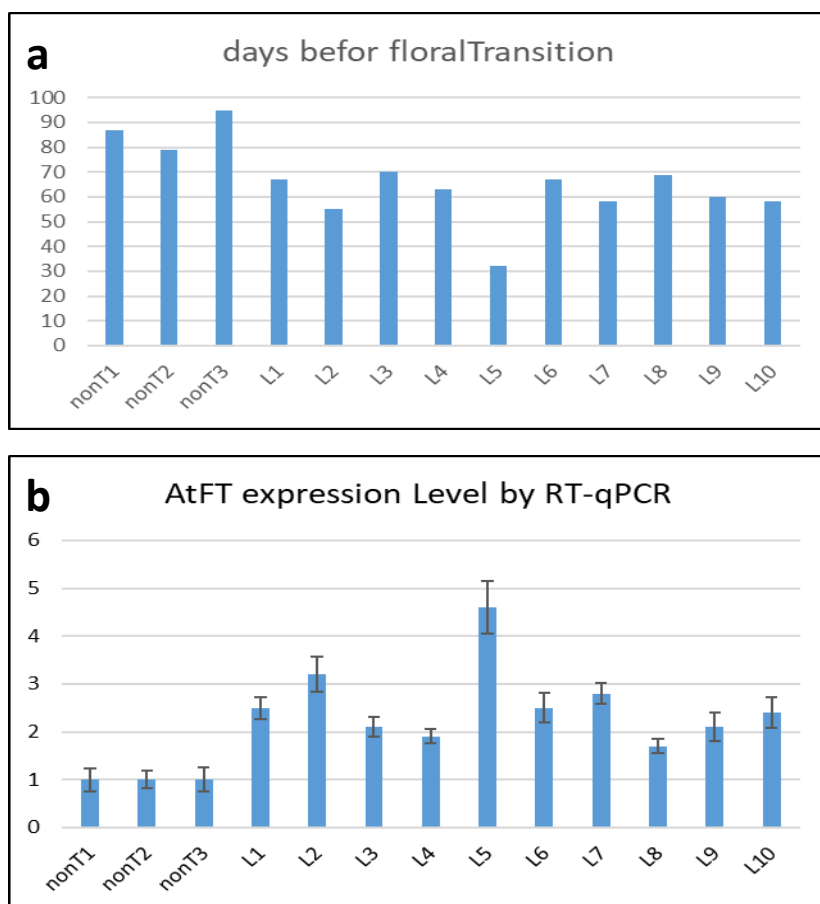


شکل ۴- (a) ژل الکتروفورز کیفیت DNA استخراج شده از گیاهان آفتابگردان غیرتراریخته و لاین های تراریخته. (b) ژل الکتروفورز نتیجه PCR روی DNA گیاهان با آغازگرهای اختصاصی برای پروموتور 35S

گلدهی کرده بودند نشان داد (شکل ۵b). از آنجایی که وکتور pMDC43 دارای دو پروموتور CaMV35S می باشد، پس انتظار می رفت با افزایش بیان *FT* گلدهی سریع در این گیاه اتفاق بیافتد. همچنین مشاهده شد که تولید جوانه های جانبی گیاه آفتابگردان بر اثر بیان شدید ژن *FT* افزایش یافته اند.

حدود دو ماه پس از انتقال به خاک غنچه های گل بر روی گیاه ظاهر شدند این در حالی است که گیاهان غیرتراریخته (گیاهان رشد یافته در مزرعه) با تاخیری قابل توجه شروع به گلدهی کردند (شکل ۵a). به محض شروع اولین غنچه های گل استخراج RNA روی گیاهان انجام شد و RT-qPCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی *FT* بیان بالای این ژن را در گیاهانی که شروع به

"پژوهنده و همکاران، انتقال ژن *FT* به گیاه آفتابگردان و بررسی تاثیر آن بر زمان گلدهی"



شکل ۵- (a) نمودار زمان گلدهی گیاهان غیرتراریخته (nonT) و لاینهای تراریخته (L) آفتابگردان از زمان انتقال به خاک تا پیدایش غنچه اولین گل (b) میزان بیان ژن *FT* در همین گیاهان به کمک qPCR

بازشدن غنچه‌ها قهوه‌ای رنگ شدند. در ادامه باید سعی شود اثر ژن *FT* را در وکتورهای بیانی متفاوت با پروموتورهای ضعیف‌تر و یا قابل القای مورد بررسی قرار گیرد. همچنین بعلا پاكوتاه بودن برخی لاین‌های گیاهان حاصل، می‌توان از این روش جهت ایجاد گیاهان گل‌دانی آفتابگردان زینتی استفاده کرد. گیاه آفتابگردان جهت گلدهی به نور فراوان و طول روزهای بلند نیاز دارد که امید هست با تولید گیاهان اصلاح شده با روش سریع انتقال ژن، گیاهانی با خصوصیات مطلوب‌تر

این تحقیق نشان داد که ژن *FT* آرابیدوپسیس در گلدهی آفتابگردان موثر بوده و بطور معنی داری باعث تسریع گلدهی در آن شد، اما بدلیل بیان شدید این ژن که در مقابل دو نسخه از پروموتور 35S قرار داشت در برخی لاینهای تراریخته گلدهی با تسریع زیاد و قبل از آمادگی رویشی گیاه صورت پذیرفت. بنابراین گیاه پس از گل دادن قادر به بذردهی نبود که این را می‌توان به دلیل عدم تامین انرژی لازم جهت بذر دهی توسط گیاه نسبت داد. گیاهان پس از گذشت ۱۰ روز از

تولید کرد که بتواند در مناطق با فصل کشتی کوتاه، نور کم بتوان آفتابگردان را به نحو مطلوب کشت کرد. تاکنون مقالات زیادی موفقیت انتقال ژن به گیاه آفتابگردان را گزارش کرده‌اند (Hewezi et al. 2002; Nabipour et al. 2021).

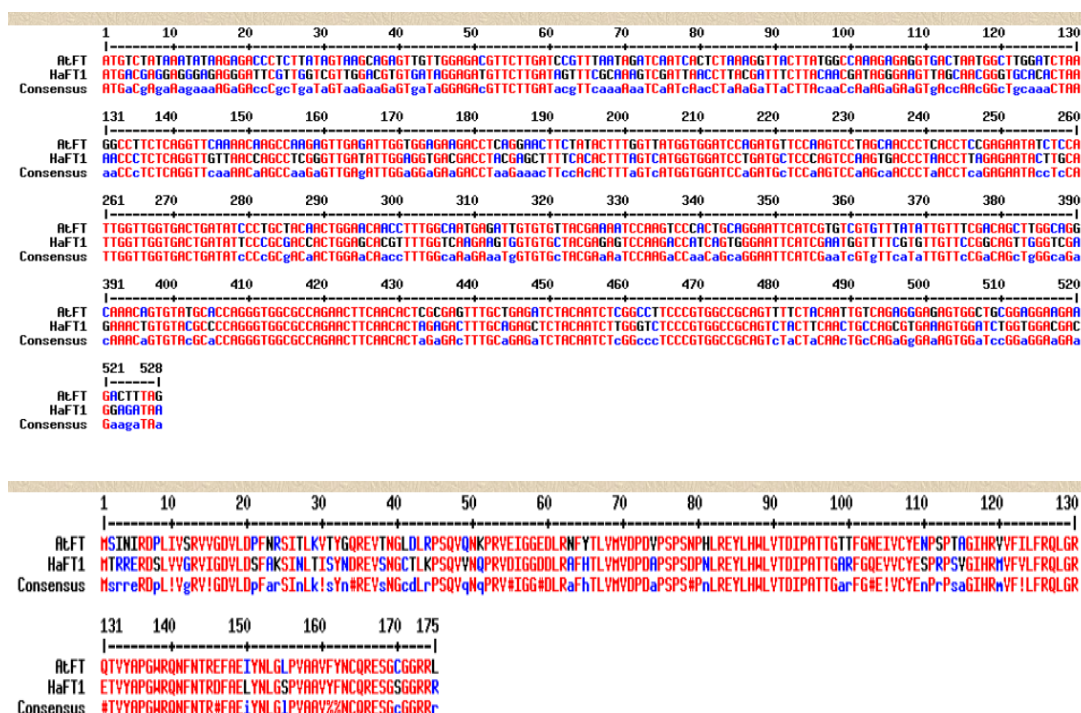
از این میان می‌توان به بیان ژن اگزالات اکسیداز برای مقاومت به بیماری‌های قارچی به ویژه اسکروتینیا، تحمل به علف کش گلیفوسیت به کمک بیان ژن *Cp4* آگروباکتریوم و ژن *Cry1* برای کنترل حشره لپیدوپترا اشاره کرد. هدفهای بعدی شامل مهندسی ژنتیک برای تحمل به دیگر علفکش‌ها و نیز انتقال سایر واریانتهای ژن *Cry1* برای کنترل آفات آن می‌باشند. وارد کردن ژن رمزگذار $\text{glucanase-3,1-}\beta$ به آفتابگردان باعث کاهش تعداد لکه‌های قارچ آلترناریا و نیز تاخیر در پیدایش این لکه‌ها شد (Kumar et al. 2011).

وارد کردن و بیش بیان ژن *TaNHX2* گندم به آفتابگردان باعث بهبود عملکرد و تحمل به شوری در آفتابگردان شد (Mushke et al. 2019).

پارالوگ ژن *FT* آرابیدوپسیس در آفتابگردان نیز شناسایی شده است که *HaFT* نام دارد (شماره دسترسی NCBI: MN517758) و بخاطر نام علمی این گیاه (*Helianthus annuus*) به این نام مشهور شده است و اهمیت آن در گلدهی و افزایش بیان آن در فتوپریود ثابت شده است (Blackman et al. 2010, 2020; Todesco et al. 2011).

مقایسه توالی اسید نوکلئیک CDS و همچنین توالی اسیدآمینو دو *FT* متعلق به آرابیدوپسیس و آفتابگردان (شکل ۶) نشان داد که شباهت بیش از ۸۰ درصد در اسیدآمینوهای دو *FT* وجود دارد و موتیف حفاظت شده (Nakamura et al. 2014) در هر دو موجود است و *FT* آرابیدوپسیس می‌تواند بجای *FT* آفتابگردان به خوبی کار کند.

"پژوهنده و همکاران، انتقال ژن *FT* به گیاه آفتابگردان و بررسی تاثیر آن بر زمان گلدهی"



شکل ۶- مقایسه و زیر همچینی توالی اسید نوکلئیک CDS و همچنین اسید آمینه‌های دو پروتئین FT در آرابی‌دوپسیس و آفتابگردان به کمک نرم افزار آنالین Multalin

References

فهرست منابع

- Blackman BK, Strasburg JL, Raduski AR, Michaels SD, Rieseberg LH. 2010. The role of recently derived *FT* paralogs in sunflower domestication. *Current Biology*. 20(7): 629-635. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.01.059>.
- Blackman BK, Michaels SD, Rieseberg LH. 2011. Connecting the sun to flowering in sunflower adaptation. *Molecular Ecology*. 20(17): 3503-3512. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05166.x>.
- Blazquez M, Koornneef M, Putterill J. 2000. Flowering on time: genes that regulate the floral transition. *EMBO Reports*. 2: 1078-1082. <https://doi.org/10.1093/embo-reports/kve254>.
- Borner R, Kampmann G, Chandler J, Gleissner R, Wisman E. 2000. A MADS domain gene involved in the transition to flowering in Arabidopsis. *Plant Journal*. 24: 591-99. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2000.00906.x>.
- Doyle JJ, Doyle JL. 2019. CATB isolation: The true story. *Plant Science Bulletin*. 65: 15-18. <https://doi.org/10.1126/science.aax3901>.
- González-Suárez P, Lock T, Penfield S, Hepworth J. 2025. Seasons and shape: Inflorescences from autumn to summer. *Journal of Experimental Botany*. eraf261. <https://doi.org/10.1093/jxb/eraf261>.
- Hewezi T, Perrault A, Alibert G, Kallerhoff J. 2002. Dehydrating immature embryo split apices and rehydrating with *Agrobacterium tumefaciens*: A new method for genetically transforming recalcitrant sunflower. *Plant Molecular Biology Reports*. 20: 335-345. <https://doi.org/10.1007/BF02772121>.
- Jiang D, Wang Y, He Y. 2008. Repression of FLOWERING LOCUS C and FLOWERING LOCUS T by Arabidopsis polycomb repressive complex 2 components. *Plos One*. 3: 1-12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003404>.
- Kim KW, Shin JH, Moon J, Kim M, Lee J, Park MCH, Lee I. 2003. The function of the flowering

time gene AGL20 is conserved in crucifers. *Molecules and Cells*. 16: 136-141. [https://doi.org/10.1016/S1016-8478\(23\)13778-2](https://doi.org/10.1016/S1016-8478(23)13778-2).

Kim H, Kang HW, Hwang DY, Lee N, Kubota A, Imaizumi T, Song YH. 2024. Low temperature-mediated repression and far-red light-mediated induction determine morning FLOWERING LOCUS T expression levels. *Journal of Integrative Plant Biology*. 66(1): 103-120. <https://doi.org/10.1111/jipb.13595>.

Koornneef M, Hanhart CJ, Van der Veen JH. 1991. A genetic and physiological, analysis of late flowering mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular and General Genetics*. 229: 57-66. <https://doi.org/10.1007/BF00264213>.

Kumar MA, Sundaresha S, Rohini S. 2011. Transgenic sunflower (*Helianthus annuus* L.) with enhanced resistance to a fungal pathogen *Alternaria helianthi*. *Transgenic Plants Journal*. 5(1): 50-56.

Lee N, Ozaki Y, Hempton AK, Takagi H, Purusuwashii S, Song YH, Endo M, Kubota A, Imaizumi T. 2023. The FLOWERING LOCUS T gene expression is controlled by high-irradiance response and external coincidence mechanism in long days in *Arabidopsis*. *New Phytologist*. 239(1): 208-221. <https://doi.org/10.1111/nph.18932>.

Li C, Luo L, Fu Q, Niu L, Xu ZF. 2015a. Identification and Characterization of the FT/TFL1 Gene Family in the Biofuel Plant *Jatropha curcas*. *Plant Molecular Biology Reporter*. 33: 326-333. <https://doi.org/10.1007/s11105-014-0747-8>.

Li C, Zhang Y, Zhang K, Guo D, Cui B, Wang X, Huang X. 2015b. Promoting flowering, lateral shoot outgrowth, leaf development, and flower abscission in tobacco plants overexpressing cotton FLOWERING LOCUS T (FT)-like gene GhFT1. *Frontiers in Plant Science*. 6: 454. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00454>.

Mirzaie-Asl A, Asgari M, Alimirzaee M. 2017. Genetic control of flowering in *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*). *Crop Biotechnology*. 6(4): 57-72.

Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 15: 473-497. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>.

Mushke R, Yarra R, Kirti PB. 2019. Improved salinity tolerance and growth performance in transgenic sunflower plants via ectopic expression of a wheat antiporter gene (*TaNHX2*). *Molecular Biology Reports*. 46(6): 5941-5953. <https://doi.org/10.1007/s11033-019-05028-7>.

Nabipour A, Darvishzadeh R, Sarrafi A. 2021. Conventional and molecular breeding of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Crop Biotechnology*. 10(3): 35-78. <https://doi.org/10.30473/cb.2021.58978.1838>.

Nakamura Y, Andrés F, Kanehara K, Liu Y, Dörmann P, Coupland G. 2014. Arabidopsis florigen FT binds to diurnally oscillating phospholipids that accelerate flowering. *Nature Communications*. 5: 3553. <https://doi.org/10.1038/ncomms4553>.

Nocker S. 2001. The molecular biology of flowering. *Horticultural Reviews*. 27: 1-40. <https://doi.org/10.1002/9780470650813.ch1>.

Onouchi H, Valverde F, Coupland G. 2001. CONSTANS mediates between the circadian clock and the control of flowering in *Arabidopsis*. *Nature*. 410: 1116-1120. <https://doi.org/10.1038/35074138>.

Putterill J, Robson F, Lee K, Simon R, Coupland G. 1995. The CONSTANS gene of *Arabidopsis* promotes flowering and encodes a protein showing similarities to zinc finger transcription factors. *Cell* 80: 847-857. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90288-0](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90288-0).

Samach A, Onouchi H, Gold SE, Ditta GS, Schwarz Z, Yanofsky MF, Coupland G. 2000. Distinct roles of CONSTANS target genes in reproductive development of *Arabidopsis*. *Science*. 288: 1613-1616. <https://doi.org/10.1126/science.288.5471.1613>.

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(4): 465-473. DOR: 20.1001.1.23832738.1399.33.4.10.6.

"پژوهنده و همکاران، انتقال ژن *FT* به گیاه آفتابگردان و بررسی تاثیر آن بر زمان گلدهی"

Sheldon CC, Burn JE, Perez PP, Metzger J, Edwards JA. 1999. The *FLF MADS-box* gene: a repressor of flowering in Arabidopsis regulated by vernalization and methylation. *Plant Cell*. 11: 445-458. <https://doi.org/10.2307/3870872>.

Suarez P, Wheatley K, Robson F, Onouchi H, Valverde F, Coupland G. 2001. CONSTANS mediates between the circadian clock and the control of flowering in Arabidopsis. *Nature*. 410: 1116-1120. <https://doi.org/10.1038/35074138>.

Sujatha M, Vijay S, Vasavi S, Reddy PV, Rao C. 2012. *Agrobacterium*-mediated transformation of cotyledons of mature seeds of multiple genotypes of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Plant Cell Tissue Organ Culture*. 110: 275-287. <https://doi.org/10.1007/s11240-012-0149-2>.

Test AR, Perrella G, Landoni B, Colanero S, Sutti A, Krukowski PK, Xu T, Vellutini E, Castorina G, Galbiati M, Martignago D, Kaiserli E, Tonelli C, Conti L. 2025. Absciscic acid and GIGANTEA signalling converge to regulate the recruitment of CONSTANS to the *FT* promoter and activate floral transition. *Journal of Experimental Botany*. eraf199. <https://doi.org/10.1093/jxb/eraf199>.

Todesco M, Owens GL, Bercovich N, Légaré JS, Soudi S, Burge DO, Huang K, Ostevik KL, Drummond EBM, Imerovski I, Lande K, Pascual-Robles MA, Nanavati M, Jahani M, Cheung W, Staton SE, Muños S, Nielson R, Donovan LA, Burke JM, Yeaman S, Rieseberg LH. 2020. Massive haplotypes underlie ecotypic differentiation in sunflowers. *Nature*. 584(7822): 602-607. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2467-6>.

Valverde F, Mouradov A, Soppe WJ, Ravenscroft D, Samach A, Coupland G. 2004. Photoreceptor regulation of CONSTANS protein in photoperiodic flowering. *Science*. 303: 1003-1006. <https://doi.org/10.1126/science.1091761>.

Weidong Y, Kang CH, Zhihong X, Kehui T, Zhiqing Zh. 2000. Gene conyrol of flowering time in higher plants. *Chinese Science Bulletin*. 45: 1633-1642. <https://doi.org/10.1007/BF02898977>.

Yanovsky MJ, Kay SA. 2002. Molecular basis of seasonal time measurement in Arabidopsis. *Nature*. 419: 308-312. <https://doi.org/10.1038/nature00996>.

Transformation of *FT* Gene into Sunflower and Investigation of Its Effect on Flowering Time

Maghsoud Pazhouhandeh^{1*}, Mohsen Sajjadi Fard², Akbar Shirzad³, Mohammad Ahmadabadi⁴

1-Associate Professor, Department of Plant, Cell and Molecular Biology, Faculty of Natural Sciences, University of Tabriz, Tabriz, Iran

2-MS student, Department of Biotechnology, Faculty of Agriculture, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran

3-Associate Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran

4-Associate Professor, Department of Biotechnology, Faculty of Agriculture, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran
Pazhouhandeh@gmail.com

Abstract

Plants are dependent on flowering in a way that the flower is either the main purpose of the crop or is required for crop production. Flowering initiation (transition from the vegetative to reproductive phase) is an important and vital stage for the plant. Genetic studies on flowering have identified at least four important flowering pathways, including the photoperiod, the vernalization, the autonomous, and the gibberellin pathway. In the photoperiod pathway of flowering, the Flowering Locus T (FT) gene, under the influence of the CONSTANS (CO) gene, initiates the flowering process with increasing sunlight exposure. In this study, the cDNA of the FT gene of the Arabidopsis model plant was first amplified and isolated by PCR with the help of specific primers and cloned into the pMDC43 expression vector. After sequence confirmation, it was transferred to Agrobacterium cells and transferred to cotyledon and leaf segments of sunflower. The explants were induced to callus and plant, and independent transgenic plants were produced under selection with hygromycin at a concentration of 10 mg/l, then propagated and phenotypically examined in terms of flowering time. DNA extraction was performed from the transgenic plants and the presence of the transgene in them was confirmed by PCR technique using Ca35S promoter specific primers. Transgenic plants showed earlier flowering than non-transgenic plants. The results of this study showed that by transformation of the FT gene, flowering in sunflower can be accelerated and the crop can be ripened earlier.

Keywords: Sunflower, Transformation, Tissue Culture, Flowering, *FT* gene