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

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*

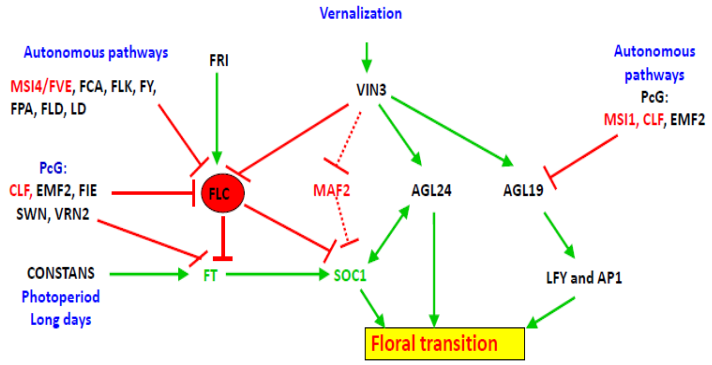
[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-05-27]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1403.17.3.1.3]

مقدمه

فیزیولوژی و پدیده‌شناسی انتقال نموی گیاه از رشد رویشی به رشد زایشی (گلدهی) سال‌ها است که مطالعه می‌شود، امّا مکانیسم مولکولی آن تنها در ۱۰ سال اخیر مورد توجّه دانشمندان قرار گرفته است (Nocker, 2001; Robustelli et al. 2025). گیاهان گلدار در چرخه زندگی خود از چندین مرحله‌ی نموی، مانند جوانه‌زنی، رشد رویشی، گلدهی، لقاح، نمو جنینی و بلوغ دانه عبور می‌کنند (Weidong et al. 2000) که در این میان آغاز گلدهی مرحله‌ی مهم و حیاتی برای گیاه می‌باشد (Kim et al., 2003, 2024). تحقیقات ژنتیک مولکولی در گیاه مدل آرابیدوپسیس منجر به کشف تعداد زیادی از ژن‌ها شد که شبکه‌ی تنظیمی پیچیده‌ای را تشکیل می‌دهند و با دو مسیر وابسته به عوامل محیطی (دوره‌ی نوری و بهاره کردن) و دو مسیر مستقل از عوامل محیطی (خود مختار و جیبرلین) زمان گلدهی را کنترل می‌کنند (شکل ۱) (Blazquez et al. 2000).

ژن *FT* مخفف *Flowering Locus T* یکی از کلیدی‌ترین ژن‌ها در تنظیم زمان گل‌دهی در گیاهان گلدار است. این ژن به‌عنوان «فلوریژن» شناخته می‌شود؛ سیگنالی متحرک که از برگ‌ها به مریستم انتهایی ساقه منتقل می‌شود و منجر به آغاز گل‌دهی می‌شود. در گیاه مدل *Arabidopsis thaliana*، ژن FT در سلول‌های همراه آوند آبکش برگ‌ها تحت شرایط روز بلند (long-day) بیان می‌شود. پس از ترجمه، پروتئین FT از طریق آوندها به مریستم انتهایی ساقه منتقل می‌شود، جایی که با فاکتور رونویسی FD تعامل می‌کند. این کمپلکس بیان ژن‌های کلیدی مانند (AP1) APETALA1 و (SOC1) Suppressor of Overexpression of Constans1 را فعال می‌کند و موجب آغاز گل‌دهی می‌شود (Lee et al. 2023).



شکل ۱- چهار مسیر عمده‌ی درگیر در فرایند شروع گلدهی. مسیر بهاره کردن و خودمختار از طریق مهار بیان *FLC* به روش اپی‌ژنتیک و هورمون جیبرلین هم از طریق AGL، باعث بیان فعّال ژن‌های گلدهی و آغاز گلدهی در شرایط محیطی مساعد می‌گردند. از طرف دیگر پروتئین CO درگیر در مسیر دوره‌ی نوری در پاسخ به طول روز بلند، از طریق افزایش بیان یک ژن گلدهی مهم دیگر به نام *FT* باعث شروع گلدهی می‌گردد

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-05-27]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1403.17.3.1.3]

بیان ژن FT به‌طور دقیق توسط عوامل محیطی و درونی تنظیم می‌شود. یکی از عوامل بنام فتوپریود یا طول روز، در شرایط روز بلند، فاکتور Constans (CO) بیان FT را القا می‌کند. عامل دیگر، ساعت زیستی، بیان FT تحت تأثیر ریتم شبانه‌روزی قرار دارد و در برخی شرایط، الگوی بیان دوگانه (صبح و غروب) نشان می‌دهد. عامل تنظیم اپی‌ژنتیک، تغییرات متیلاسیون در روی هیستون‌ها مانند H3K4me3 و H3K36me3 توسط پروتئین‌های MRG1 و MRG2 انجام می‌شوند و با تعامل با CO ، بیان FT را فعال می‌کنند. عوامل سرکوبگر مثل ژن‌های FLC و SVP با سرکوب مستقیم FT و SOC1، گل‌دهی را به تأخیر می‌اندازند. در گیاهان جهش‌یافته در این ژن‌ها، گل‌دهی زودتر رخ می‌دهد (Mirzaie-Asl et al. 2017). علاوه بر تحریک گل‌دهی، FT بر رشد رویشی نیز تأثیر می‌گذارد. در مطالعه‌ای، بیان بیش‌ازحد ژن FT از گیاه *Jatropha curcas* در تنباکو باعث تغییرات قابل‌توجهی در رشد ریشه، ساقه و برگ شد. بررسی‌های ترنسکریپتومی نشان داد که رشد ساقه به دلیل تغییرات در هسته، سیتوپلاسم و دیواره سلولی تحت تأثیر قرار گرفته است. ژن *FT* به‌عنوان یک سیگنال مرکزی در تنظیم زمان گل‌دهی عمل می‌کند و درک دقیق از عملکرد و تنظیم این ژن می‌تواند به بهبود عملکرد گیاهان و تسریع برنامه‌های اصلاح نژاد کمک کند. ژن‌های مشابه *FT* در بسیاری از گیاهان شناسایی شده‌اند و نقش‌های مشابهی در تنظیم گل‌دهی دارند. در درختان میوه، استفاده از ژن‌های مشابه *FT* برای کاهش دوره رویشی و تسریع گل‌دهی و به‌منظور تسریع در برنامه‌های اصلاح نژاد، موفقیت‌آمیز بوده است (Li et al. 2015a, 2015b). ژنوم آرابیدوپسیس حداقل ده گیرنده حساس به نور را کد می‌کند که شامل پنج فیتوکروم (PHYA تا PHYE)، سه کریپتوکروم (CRY1-3) و دو فتوتروپین می‌باشد. با بررسی گیاهان جهش یافته مشخص شد، همه گیرنده‌های نوری به جز فتوتروپین‌ها نقش مهمی در تنظیم زمان گلدهی نشان می‌دهند. CRY2 و PHYB احتمالا در بالا دست CO به ترتیب بعنوان تنظیم کننده‌های مثبت و منفی غیرمستقیم عمل می‌کنند (Yanovsky and Kay, 2002; Valverde et al. 2004). اونوچی و همکاران (۲۰۰۱) ارتباط بین CO و چندین ژن مسیر دوره نوری دیگر را با بیان S:CO۳۵ 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 روزکوتاه افزایش می‌یابد. محققان دریافتند

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-05-27]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1403.17.3.1.3]

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 در پاسخ به نورآبی و نورمادون قرمز پایدار می‌شود و در گیاه جهش‌یافته phyB پروتئین CO در نور قرمز تجزیه می‌شود. از آنجایی که، PHYB مهار گلدهی را از طریق نور قرمز واسطه‌گری می‌کند، درحالیکه CRY2 و PHYA 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 (Samach et al. 2000; Onouchi et al. 2001). در تاریکی پروتئین CO یوبی‌کوئیتینه شده و توسط S۲۶ 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 C* (FLC) یک ژن کلیدی در شبکه تنظیمی گلدهی آرابیدوپسیس می‌باشد که یک فاکتور رونویسی 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; Sheikhbahaei 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 شدهٔ 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 ژن ها 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 هویّت 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 نموّی گل می‌شود و نه تغییر موقعیّتی و مکانی گل، امّا FT باعث تغییر موقعیّتی گل می‌شود. یکی دیگر از

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-05-27]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1403.17.3.1.3]

ژن‌های FMI، *SOC1* می‌باشد که در بالادست *LFY* عمل می‌کند. بیان *FT* و *SOC1* به طور مثبت توسّط مسیر دوره‌ی نوری و به طور منفی توسّط 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 توسّط مسیر جیبرلین افزایش یابد. بر این اساس *LFY*، *SOC1* 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 مهمّی در تنظیم بیان *FT* ایفا می‌کنند، به طوری که افزایش بیان *FT* توسّط پروموتر 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 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 (شکل۲). همچنین دارای دو پروموتر *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 وکتورpENTRY207 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

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-05-27]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1403.17.3.1.3]

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

جدول ۱- آغازگرهای استفاده شده در این تحقیق

Name	Primer sequence	PCR product
AtFT F	GACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCATGTCTATAAATATAAGAGAC	cloning
AtFT R	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTCTAAAGTCTTCTTCCTCCGCA	528 bp
FT qPCR F	CTAGCAACCCTCACCTCCGA	qPCR
FT qPCR R	TCGTAACACACAATCTCATTGCCAAA	180 bp
35SPro F	AACATGGTGGAGCACGACACA	PCR
35SPro R	ATCACATCAATCCACTTGCTT	330 bp

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).

ترانسفورماسیون گیاه آفتابگردان

برای ترانسفورماسیون گیاهان از باکتری *Agrobacterium tumefaciens* استرین ۴۴۰۴ که قبلا 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

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-05-27]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1403.17.3.1.3]

هفته به محیط انتخابگر حاوی هیگرومایسین ۱۰mg/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.

استخراج DNA و PCR

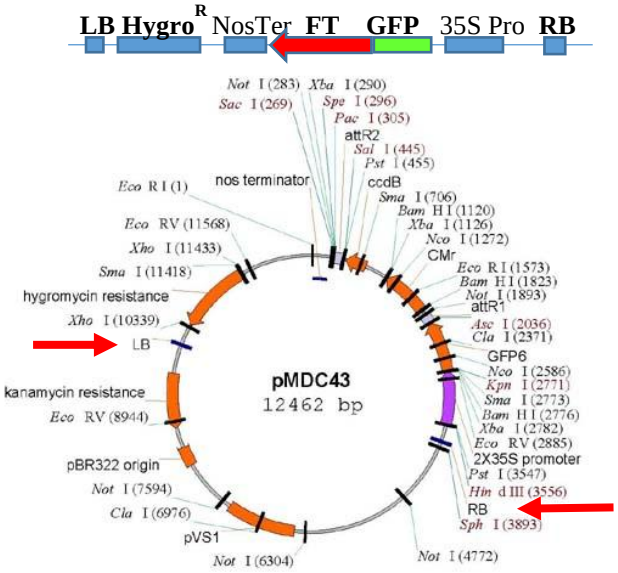
حدود ۲۰۰ میلی‌گرم از برگ‌های گیاه درون هاون چینی همراه با ۵۰۰ میکرولیتر از بافر CTAB مطابق پروتوکل (Doyle and Doyle, 2019) به خوبی ساییده شد. در ادامه همه محتویات هاون به تیوب استریل ۱/۵ میلی¬لیتری منتقل شده و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای 65 C° قرار گرفت (هر ۵ دقیقه به مدت ۱۰ ثانیه هم زده شد). سپس یک حجم از کلروفورم به نمونه اضافه و به مدت ۵ دقیقه ورتکس گردید. سپس سانتریفیوژ در دمای اتاق با سرعت rpm13000 انجام و فاز رویی به تیوب جدید منتقل شد. در انتها DNA به روش اتانول رسوب داده شد و بعد از خشک شدن ۵۰-۳۰ 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.

نتایج و بحث

محصول آفتابگردان وابسته به گلدهی آن می‌باشد. 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).

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-05-27]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1403.17.3.1.3]

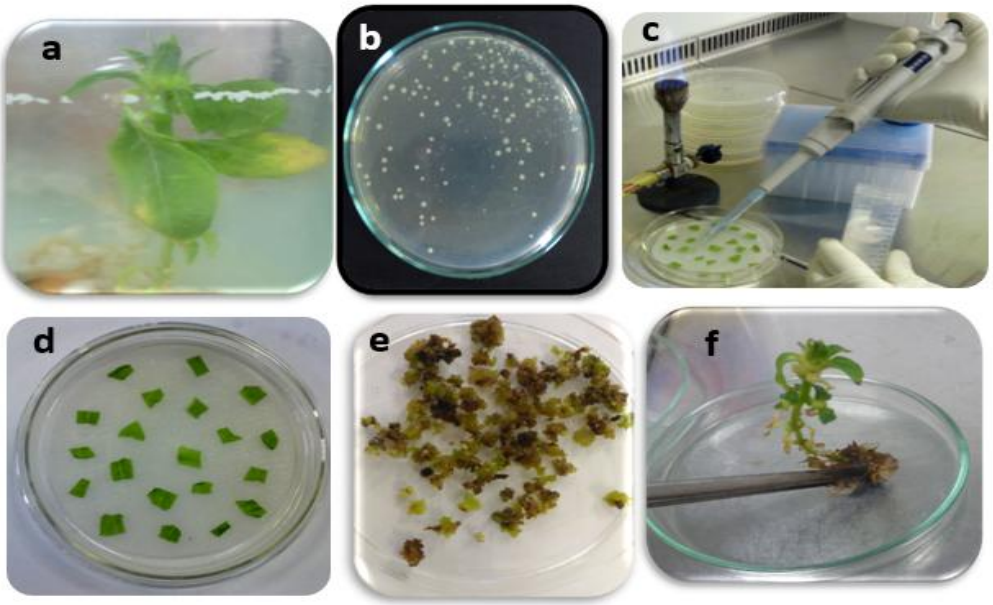


شکل ۲- نقشه پلاسمید pMDC43 و موقعیت ژن *FT* کلون شده در داخل T-DNA آن. (www.addgene.org)

وکتور pMDC43-FT به روش الکتروپوراسیون با ۲ کیلوولت در دستگاه الکتروپوراتور (اپندورف) به آگروباکتریوم تومفاشینز سویه ۴۴۰۴ منتقل شد و در روی محیط کشت حاوی کانامایسین 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 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 میلی‌گرم 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 (شکل۳).

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-05-27]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1403.17.3.1.3]



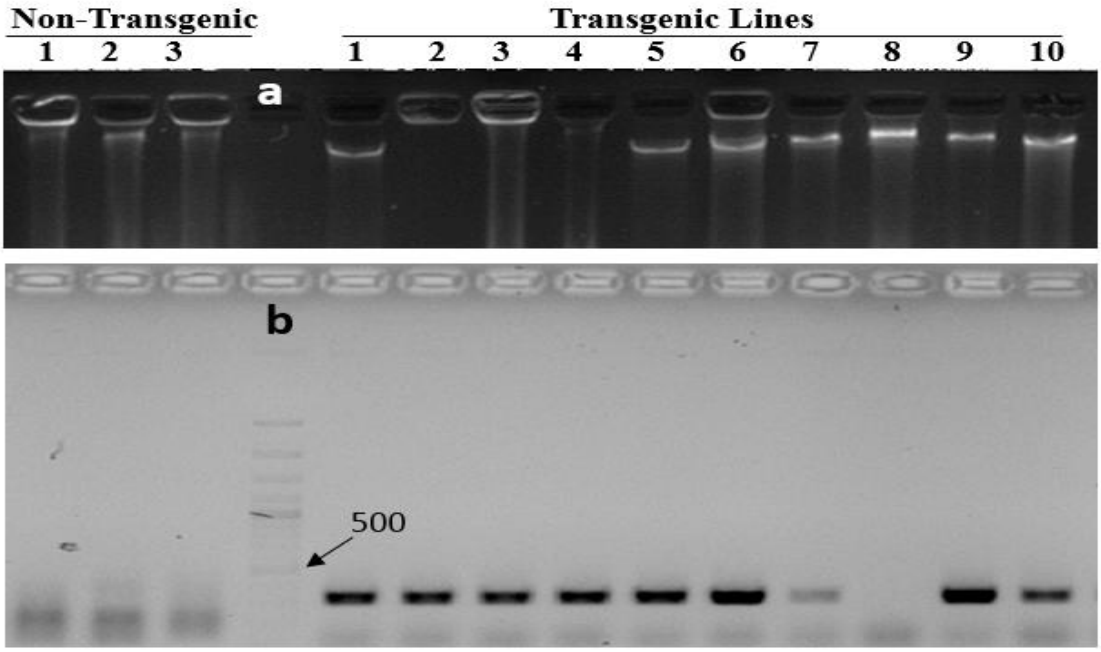
شکل ۳- تراریزش آفتابگردان با وکتور pMDC43-FT. a) گیاه درون شیشه‌ای آفتابگردان؛ b) کلنی‌های آگروباکتریوم حاوی وکتور pMDC43-FT. c) همکشتی ریزنمونه‌های آفتابگردان با آگروباکتریوم. d) ریزنمونه‌های آفتابگردان در طول کشت و بازکشت‌ها. e) کالوس های ایجاد شده از ریزنمونه‌ها. f) باززایی گیاه تراریخته از کالوس

.

در ادامه جهت تایید تراریخته بودن گیاهان، مجددا به محیط کشت MS حاوی آنتی‌بیوتیک هیگرومایسین با غلظت ۲۰ میلی‌گرم 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 *S۳۵* انجام گرفت (شکل ۴b) 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.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-05-27]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1403.17.3.1.3]

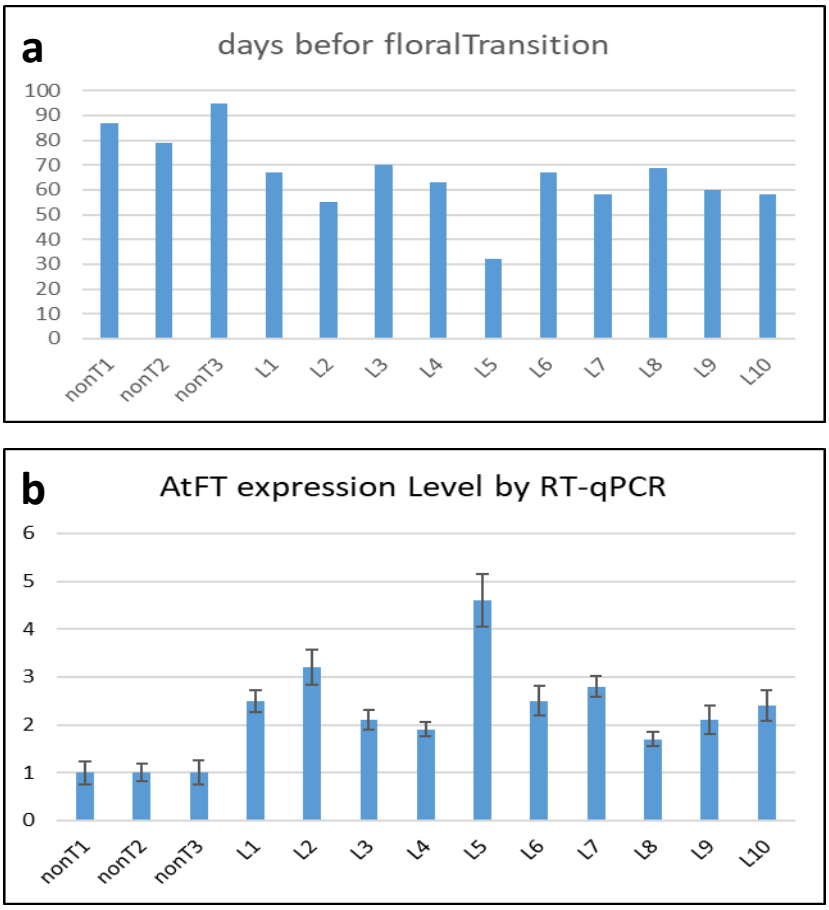


شکل ۴-a) ژل الکتروفورز کیفیت DNA استخراج شده از گیاهان آفتابگردان غیرتراتریخته و لاین های تراریخته.b) ژل الکتروفورز نتیجه PCR روی DNA گیاهان با آغازگرهای اختصاصی برای پروموتور 35S

حدود دو ماه پس از انتقال به خاک غنچه‌های 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 غنچه‌های 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 گلدهی کرده بودند نشان داد (شکل ۵b). از آنجایی که وکتورpMDC43 دارای دو پروموتور CaMV35S می‌باشد، پس انتظار می‌رفت با افزایش بیان *FT* گلدهی سریع در این گیاه اتفاق بیافتد. همچنین مشاهده شد که تولید جوانه‌های جانبی گیاه آفتابگردان بر اثر بیان شدید ژن *FT* افزایش یافته‌اند.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-05-27]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1403.17.3.1.3]



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

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 S۳۵ 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 بازشدن غنچه‌ها قهوه‌ای رنگ شدند. در ادامه باید سعی شود اثر ژن *FT* را در وکتورهای بیانی متفاوت با پروموتورهای ضعیف‌تر و یا قابل القا مورد بررسی قرار گیرد. همچنین بعلت پاکوتاه 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

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-05-27]

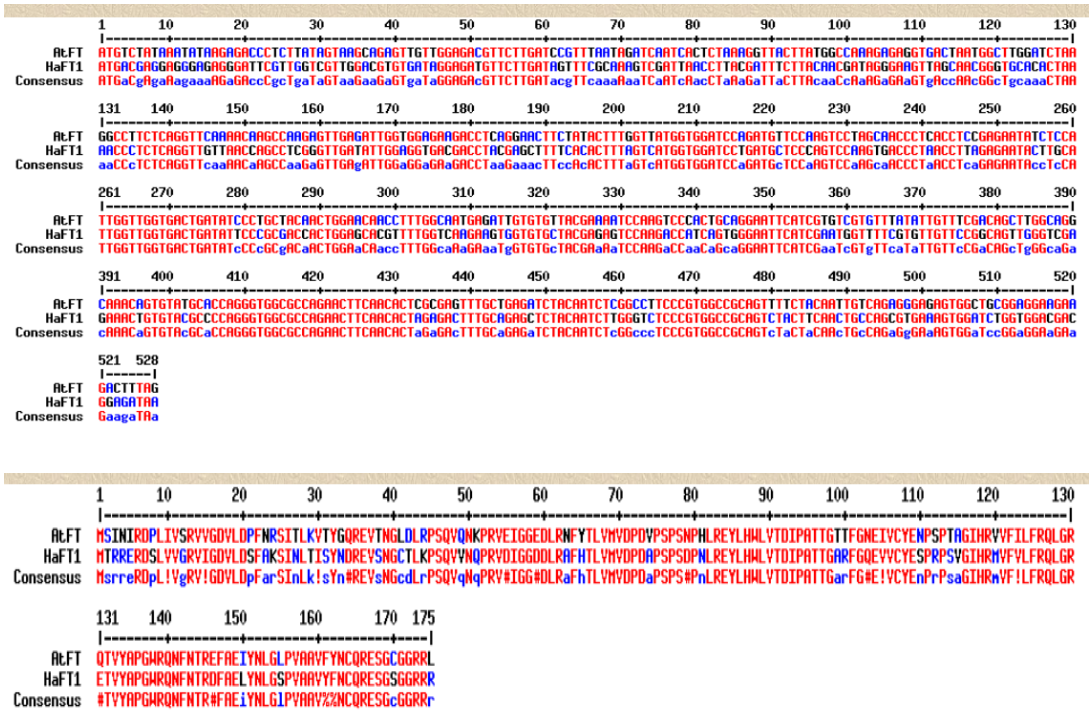
[DOR: 20.1001.1.27170632.1403.17.3.1.3]

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 اسکلروتینیا، تحمل به علف کش گلیفوسیت به کمک بیان ژن *Cp4* اگروباکتریوم 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 glucanase-3,1-β به آفتابگردان باعث کاهش تعداد لکه-های قارچ آلترناریا و نیز تاخیر در پیدایش این لکه ها 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, 2011; Todesco et al. 2020). مقایسه توالی اسید نوکلئیک CDS و همچنین توالی اسیدآمینه دو FT متعلق به آرابیدوپسیس و آفتابگردان (شکل ۶) نشان داد که شباهت بیش از ۸۰ درصد در اسیدآمینه‌های 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.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-05-27]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1403.17.3.1.3]



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

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-05-27]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1403.17.3.1.3]

time gene AGL20 is conserved in crucifers. Molecules and Cells. 16: 136-141. 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 helianthin*. Transgenic Plants Journal. 5(1): 50-56.

Lee N, Ozaki Y, Hempton AK, Takagi H, Purusuwashi 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.

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.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-05-27]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1403.17.3.1.3]

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. Abscisic 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.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-05-27]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1403.17.3.1.3]

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

Maghsoud Pazhouhandeh[1]*, Mohsen Sajjadi Fard[2], Akbar Shirzad[3], Mohammad Ahmadabadi[4]

1-Associate Professor, Departement 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

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-05-27]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1403.17.3.1.3]