

ایجاد گیاهان زودگلده آرابیدوپسیس از طریق خاموش کردن ژن *CLF* به روش RNA silencingندا دیدار^۱، مقصود پژوهنده*^۲، فاطمه محمودی^۳^۱ دانشجوی کارشناسی ارشد بیولوژی سلولی و مولکولی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان^۲ عضو هیأت علمی گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان^۳ عضو هیأت علمی گروه بیولوژی سلولی و مولکولی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۰۱/۳۰، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۰۳/۳۰

چکیده

کنترل زمان گلدهی نیازمند فعالیت متوالی ژن‌های مختلفی است که خود تحت کنترل فاکتورهای محیطی و درونی می‌باشند. برخی از این ژن‌ها از قبیل *Curly Leaf (CLF)* نقش مهارکنندگی در آغاز گلدهی دارند. بنابراین، با خاموش کردن این قبیل ژن‌ها می‌توان آغاز گلدهی در گیاهان را تسریع کرد. در این تحقیق، از تکنیک RNA Silencing برای خاموش کردن ژن *CLF* در گیاه آرابیدوپسیس جهت بررسی قابلیت‌های این روش در تولید گیاهان زودگلده استفاده شد. ابتدا، برای تولید ساختار سنجاق سری (Hairpin)، قطعه‌ای از ژن *CLF* آرابیدوپسیس به روش PCR تکثیر و در دو مرحله، در دو جهت سنس و آنتی‌سنس در وکتور pFGC5941 همسانه سازی شد. در مرحله بعد، وکتور حاصل به روش آگروباکتریوم، به گیاه آرابیدوپسیس انتقال یافت. همانطور که انتظار می‌رفت، گلدهی در گیاهان تراریخته بدست آمده، زودتر از گیاهان طبیعی صورت گرفت. در تایید نتایج بدست آمده، آزمایش RT-qPCR نشان داد که در مقایسه با گیاهان طبیعی، بیان ژن *CLF* در گیاهان تراریخته کاهش و برعکس، بیان ژن *FT* که یک ژن محرک گلدهی است، افزایش یافته است. نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که از RNA Silencing، می‌توان به عنوان یک روش جدید و سریع به منظور ایجاد گیاهان زودگلده استفاده کرد.

کلمات کلیدی: *Arabidopsis thaliana* گلدهی، *CLF*، گیاه تراریخته زودگلده، RNA Silencing

مقدمه

بیان آن گلدهی را به تأخیر می‌اندازد (Sheldon et al., 1999). بیان ژن *FLC* نیز به نوبه خود توسط فعال کننده‌ها و مهار کننده‌های متعددی کنترل می‌شود. برای مثال، فعال شدن مسیرهای خودمختار و بهاره کردن در پاسخ به سرما، باعث مهار بیان ژن *FLC*، و در نتیجه شروع گلدهی می‌شود (Michaels et al., 2001). در غیاب مسیر بهاره کردن نیز کمپلکس مهم دیگری بنام CLF-PRC2 بیان *FLC* و همچنین *FT* را مهار می‌کند (He, 2009). در این شبکه پیچیده تنظیمی، CLF یک همولوگ گیاهی *E(z)* شناخته شده در *Drosophila* می‌باشد که در کمپلکس PRC2 نقش کلیدی داشته و یک هیستون متیل ترانسفراز است که با عملکرد خود، بیان *FT* و *FLC* را مهار می‌نماید و این کار را به روش اپی-ژنتیک و با انتقال سه گروه متیل بر روی لیزین ۲۷ هیستون H3 (*H3K27me3*)، در کروماتین آنها انجام می‌دهد (Czermin et al., 2002).

محققان با بررسی گیاهان جهش یافته آرابیدوپسیس توانسته‌اند عملکرد دقیق برخی از ژن‌های درگیر در مسیر گلدهی را تعیین کنند. تحقیقات انجام شده روی گیاهان جهش یافته *clf* نشان داد که در غیاب این ژن، بیان ژن‌های *FT* و *FLC* افزایش یافته و گلدهی گیاه تسریع می‌یابد. این فنوتیپ نشان می‌دهد که کمپلکس CLF-PRC2 اثر مهار کنندگی قوی‌تری روی بیان *FT* نسبت به *FLC* دارد. بنابراین *FT* توانسته در گیاه جهش یافته *clf* با بیان قوی خود باعث تسریع

گیاهان گلدار طی چرخه زندگی خود از چندین مرحله نمو مانند جوانه زنی، رشد رویشی، گلدهی، لقاح، نمو جنینی و بلوغ دانه عبور می‌کنند (Weidong et al., 2000) که در این میان، آغاز گلدهی (انتقال از فاز رویشی به فاز زایشی) مرحله مهم و حیاتی برای گیاه می‌باشد (Kim et al., 2003). تحقیقات ژنتیک مولکولی در گیاه مدل آرابیدوپسیس منجر به کشف تعداد زیادی از ژن‌ها شد که در پاسخ به عوامل محیطی و درونی باعث تنظیم زمان گلدهی می‌شوند. این ژن‌ها شبکه تنظیمی پیچیده‌ای را تشکیل می‌دهند که با دو مسیر وابسته به عوامل محیطی (دوره‌ی نوری^۱ و بهاره کردن^۲) و مستقل از عوامل محیطی (خودمختار^۳ و وابسته به جیبرلین) زمان گلدهی را کنترل می‌کنند (Blazquez et al., 2001). یکی از ژن‌های کلیدی در این شبکه، *FLC*^۴ می‌باشد که یک فاکتور رونویسی MADS-box را کد می‌کند. این فاکتور مستقیماً به لوکوس *FT*^۵ (ژنی مهم در مسیر دوره نوری که در پاسخ به افزایش طول روز باعث آغاز گلدهی می‌شود) (Kardailsky et al., 1999)، متصل شده و از طریق ممانعت از

1. Photoperiod

2. Vernalization

3. Autonomous

4. Flowering Locus C

5. Flowering Locus T

مواد و روش‌ها

همسانه سازی قطعه‌ای از ژن *CLF* در وکتور **pFGC5941** جهت ساخت وکتور حاوی ساختار سنجاق سری، ابتدا یک قطعه از cDNA ژن *CLF* آراییدوپسیس تالیانا به طول ۴۰۰ جفت باز با استفاده از یک جفت آغازگر اختصاصی تکثیر گردید (شکل ۱-A و ۳-A). برای همسانه سازی این قطعه در دو جهت، به ترتیب جایگاه‌های برشی *XbaI-XhoI* و *BamHI-NcoI* در آغازگرها تعبیه شد. توالی آغازگر مستقیم (Forward: AAT CTA GAC TCG) و آغازگر معکوس (Reverse: AAC CAT) (AGA TGG CGT CAG AAG CTT CGC C و آغازگر معکوس (Reverse: AAC CAT) GGG GAT CCT AGG ACG TAA GGA AAT TTT GAC) بود. واکنش PCR با ۳۰ چرخه °C ۹۲ به مدت ۲۰ ثانیه، °C ۵۰ به مدت ۲۰ ثانیه و °C ۷۴ به مدت ۳۰ ثانیه انجام شد. محصول PCR پس از برش با آنزیم‌های *NcoI* و *XhoI* و خالص سازی با استفاده از ژل آگارز با دمای ذوب پایین، در بین جایگاه‌های برشی *NcoI* و *XhoI* وکتور pFGC5941 همسانه سازی شد. این وکتور که حاوی ژن مقاومت به کانامایسین به عنوان انتخابگر در باکتری و ژن مقاومت به علف کش Basta به عنوان انتخابگر در گیاه می-باشد، دارای دو MCS (Multiple Cloning Site) است که توسط اینترون *CHS* (Chalcone Synthase) از هم جدا شده‌اند (شکل ۲). بنابراین، در این مرحله، قطعه تکثیر شده در جهت سنس، در بالادست اینترون *CHS* و پایین-

گلدھی شود (Jiang et al., 2008; Pazhouhandeh et al., 2011). بنابراین، ژن *CLF* یک نقش کلیدی در آغاز گلدھی دارد و از طریق دستکاری بیان این ژن و در نتیجه، دستکاری زمان گلدھی، می‌توان اهداف مختلف تحقیقاتی و اقتصادی را دنبال کرد.

اکثر محصولات مهم کشاورزی و گیاهان دارویی و زیتی به نحوی وابسته به گلدھی می-باشند، به گونه‌ای که گلدھی یا هدف اولیه محصول است و یا تولید یک محصول مستلزم گلدھی آن می‌باشد. بنابراین، با داشتن شرایط آب و هوایی مناسب، تسریع گلدھی در چنین گیاهانی می‌تواند نتیجه بسیار مطلوبی داشته باشد. تا به حال کارهای زیادی در کنترل زمان گلدھی از طریق مهندسی شرایط محیطی و یا بکارگیری تنظیم کننده‌های رشد انجام شده است. از آنجا که این ابزار باعث افزایش هزینه‌های تولید شده و همچنین استفاده از ترکیبات شیمیایی محدود شده است، لذا روش‌های جایگزین برای مهندسی گلدھی (شامل بیوتکنولوژی) آغاز شده‌اند که مستلزم فهم مکانیسم‌های مولکولی وابسته به آن می‌باشد (Nocker, 2001). در این تحقیق، امکان تولید گیاهان زودگلده از طریق خاموش کردن ژن *CLF* در گیاه آراییدوپسیس، با استفاده از تکنیک RNA Silencing یا RNA Interference مورد بررسی قرار گرفته است.

D-1). برای این کار، تک کلنی‌های آگروباکتریوم حاوی وکتور نوترکیب در ۳ میلی‌لیتر محیط LB مایع حاوی آنتی‌بیوتیک‌های کانامایسین (mg/l) (۳۰) و ریفامپیسین (mg/l) (۱۰۰) کشت و به مدت یک شب در انکوباتور شیکردار با سرعت rpm ۲۰۰ و دمای °C ۲۸ رشد داده شدند. سپس، ۱۰۰ میکرولیتر از کشت باکتری‌ها به ۲۵ میلی‌لیتر از محیط LB مایع حاوی همان آنتی‌بیوتیک‌ها انتقال یافت و به مدت یک شب در شرایط قبلی رشد داده شدند. در مرحله بعد، کشت‌های آگروباکتریوم به مدت ۱۰ دقیقه و با سرعت rpm ۴۰۰۰ سانتریفیوژ شد و رسوب سلول‌های باکتری در ۲۵ میلی‌لیتر از محیط کشت مایع دوباره غوطه ور شد. در نهایت، از غلظت‌های باکتری با OD₆₀₀ برابر ۰/۴-۰/۵ برای ترانسفورماسیون گیاهان آرابیدوپسیس استفاده شد. بدین ترتیب که، گیاهان آرابیدوپسیس (اکوتیپ کلمبیا) در گلخانه نگهداری شدند تا به فاز گلدهی وارد شوند. سپس، گل‌های گیاه آرابیدوپسیس درون محلول آگروباکتریوم حاوی وکتور نوترکیب یک دقیقه فرو برده شد و به مدت دو روز توسط پلاستیکی تیره رنگ پوشانده شدند. بذره‌های گیاهان آرابیدوپسیس ترانسفورم شده جمع‌آوری و در محیط انتخابی (MS¹ + Basta² 10 mg/l)

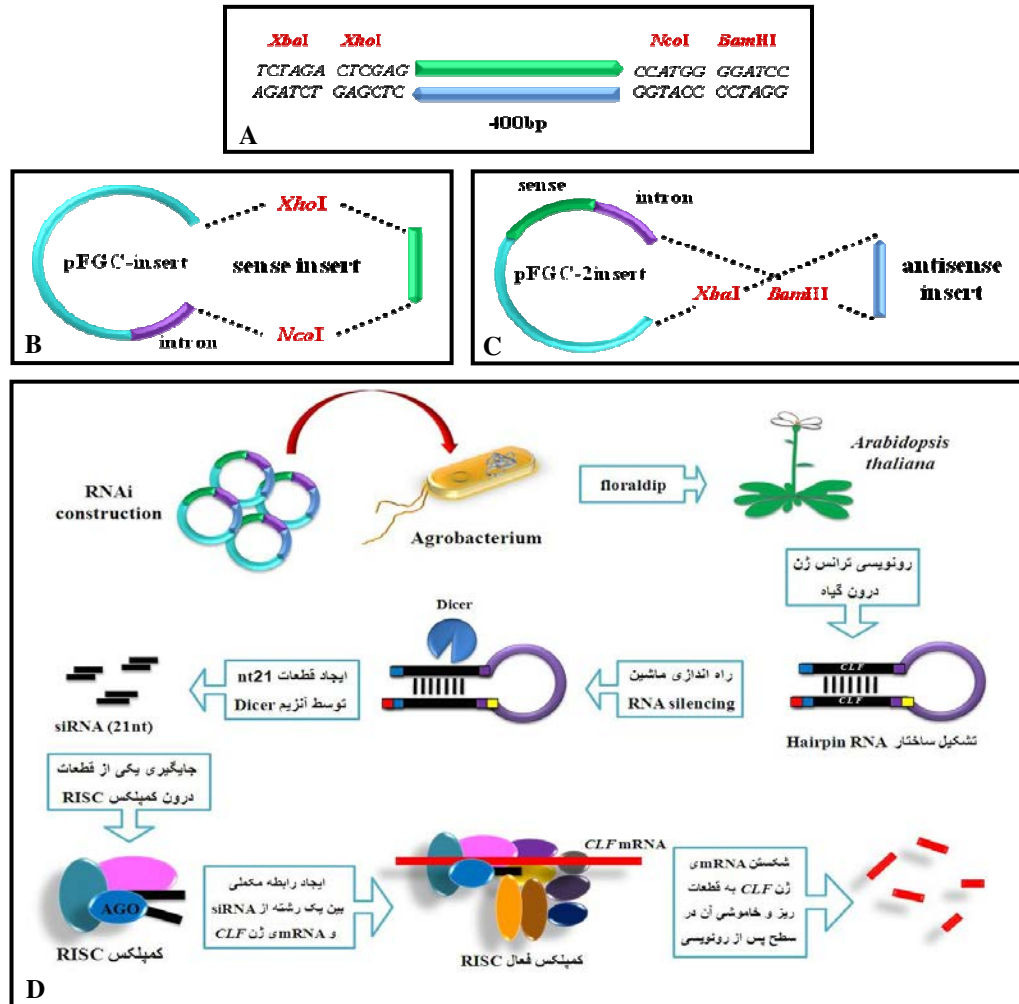
دست پروموتور CaMV 35S قرار گرفت (شکل-۱B). در مرحله دوّم، پس از تایید همسانه سازی این قطعه در جهت سنس با استفاده از واکنش PCR با جفت آغازگر (-5': pFGC-F-2587: AAT CCC ACT ATC CTT CGC AAG ACC-3' و pFGC-R-2917: 5'-CTT TCT ACC-3', ACC TTC CCA CAA TTC GTC G-3' شکل B-۳)، قطعه ۴۰۰ جفت بازی با استفاده از آنزیم‌های *XbaI* و *BamHI* در جایگاه MCS دوّم وکتور حاصل از مرحله اوّل، همسانه سازی شد. با این عمل، قطعه مذکور در جهت آنتی-سنس (خلاف جهت قطعه وارد شده در مرحله اوّل) و در پایین‌دست اینترون CHS وارد گردید (شکل C-۱). همسانه سازی مرحله دوّم نیز به روش PCR و با استفاده از یک جفت آغازگر متصل شونده به وکتور در نواحی بالا دست و پایین دست محل همسانه سازی (-pFGC-F-3505: 5'-CAG ACA GAT GTT TCC CAG pFGC-R-4291: 5'-AAA CCG و CGA G-3', GCG GTA AGG ATC TGA G-3' شکل C-۳) تایید گردید. انتقال وکتور طراحی شده به گیاه آرابیدوپسیس: وکتور نوترکیب

pFGC5941 حاصل که حاوی ساختار سنسجاق سری قطعه ۴۰۰ جفت بازی از cDNA ژن *CLF* می‌باشد، به روش شوک الکتریکی به باکتری *Agrobacterium tumefaciens* استرین LBA4404، منتقل شد. کلنی‌های بدست آمده، پس از تایید به روش PCR، برای انتقال ساختار سنسجاق سری به گیاهان آرابیدوپسیس به روش Floral dip (Bent, 2006) استفاده شدند (شکل

¹ Murashige and Skoog

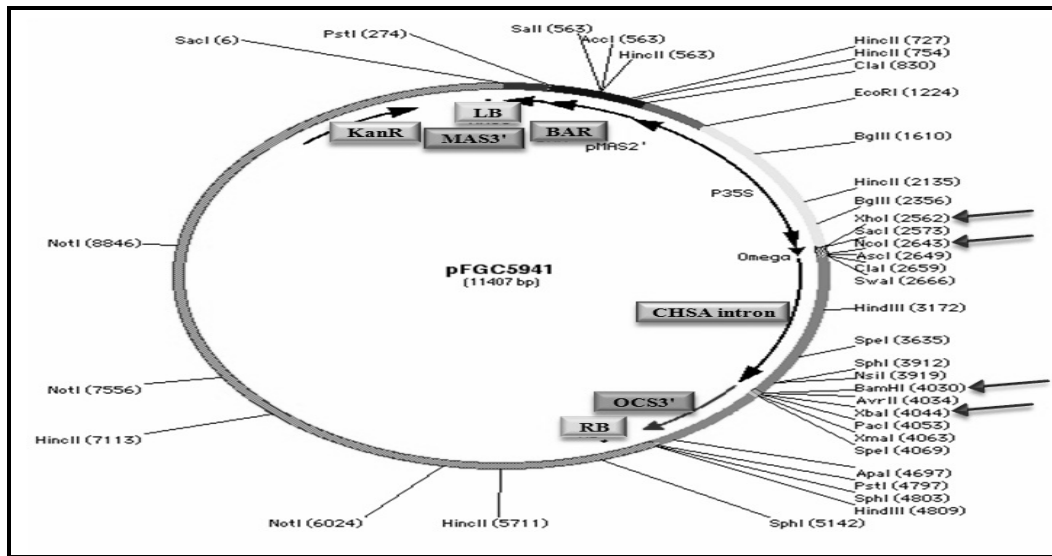
² Phosphinothricin

کشت و گیاهان تراریخته انتخاب و گزینش شدند (شکل A-۴ و B-۴).



شکل ۱- مراحل ایجاد سازه RNAi و انتقال آن به گیاه آرابیدوپسیس به منظور خاموشی ژن *CLF*. (A) تکثیر یک قطعه ۴۰۰ جفت بازی از ابتدای ژن *CLF* توسط آغازگرهای حاوی جایگاه‌های برشی آنزیمی. (B) همسانه سازی این قطعه در وکتور pFGC5941 در جهت سنس. (C) همسانه سازی همین قطعه در وکتور pFGC-insert در جهت آنتی سنس. (D) انتقال این سازه نهایی به آرابیدوپسیس.

Figure 1- Steps of making RNAi construct and transformation to *Arabidopsis* in order to extinction of *CLF* gene. A) 400 bp fragment amplification from the beginning of *CLF* gene with primers containing enzyme cutting sites. B) Cloning of this fragment into pFGC5941 vector in sense direction. C) Cloning of this fragment into pFGC-insert in antisense direction. D) Transformation of final construction into *Arabidopsis*.

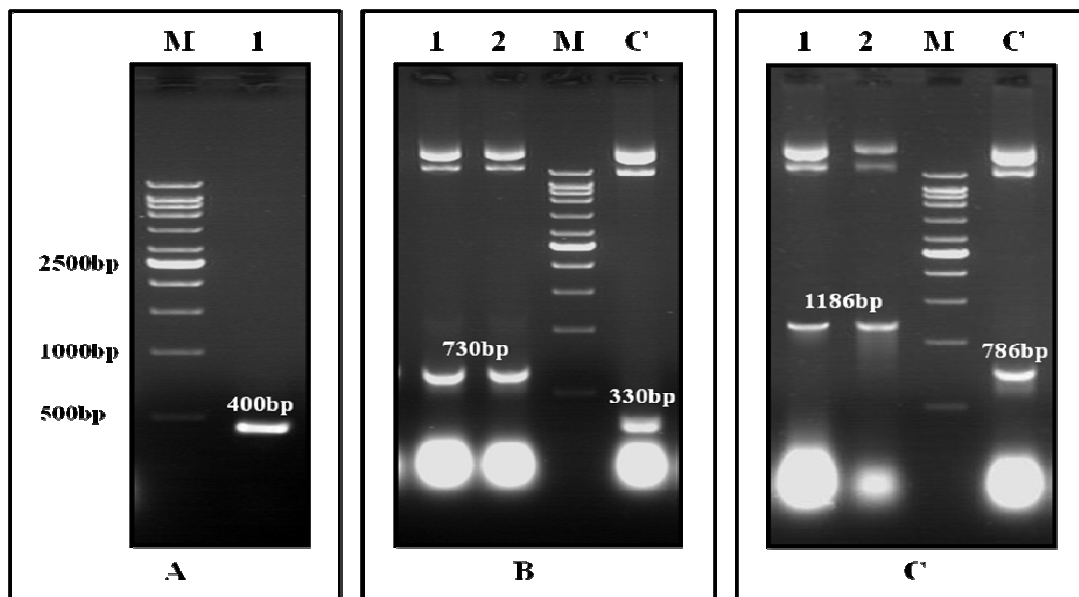


شکل ۲- نقشه‌ی وکتور pFGC5941 حاوی اینترون CHSA مابین دو MCS که برای ایجاد سازه RNAi مناسب است.

Figure 2- pFGC5941 vector map containing CHSA intron between two MCSs that is suitable for creation of RNAi construction.

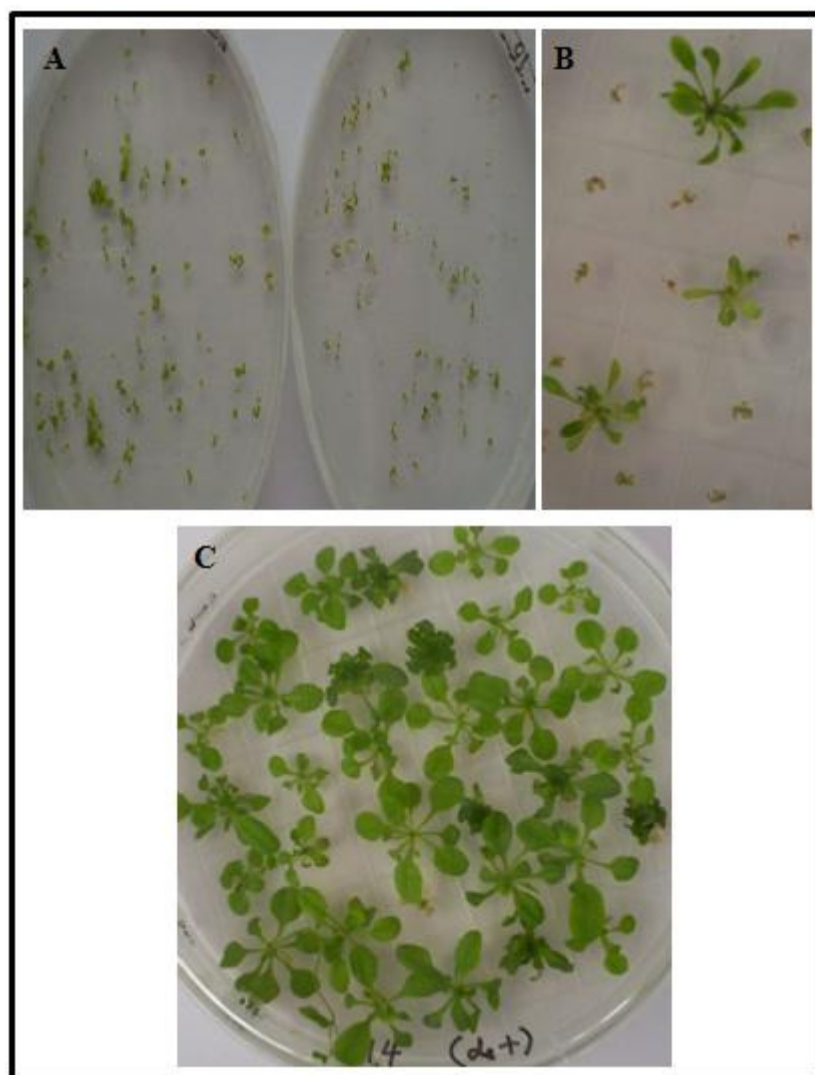
ورتکس انجام گرفت. پس از ۵ دقیقه سانتریفیوژ در دمای اتاق با سرعت ۱۳۰۰۰ rpm، فاز رویی به تیوب جدید منتقل شده و DNA به روش اتانول رسوب داده شد. رسوب حاصل پس از خشک شدن در دمای آزمایشگاه، در ۳۰-۵۰ میکرولیتر آب مقطر استریل حل گردید. برای تایید حضور ترانسژن مورد نظر در گیاهان تراریخته آراییدوپسیس، پس از استخراج DNA ژنومی از بافت‌های گیاهان گزینش شده، واکنش PCR با استفاده از جفت آغازگرهای اختصاصی متصل شونده به وکتور با ۳۰ چرخه 92°C به مدت ۲۰ ثانیه، 50°C به مدت ۲۰ ثانیه و 74°C به مدت ۳۰ ثانیه، انجام گرفت.

بررسی گیاهان تراریخته: زمان گلدهی گیاهان تراریخته نسل دوم و مقایسه آنها با گیاهان شاهد با تعیین تاریخ دقیق شروع گلدهی و تعداد برگ در زمان گلدهی بررسی شد (شکل ۵-B و ۵-C). استخراج DNA و تایید حضور فیزیکی ساختار سنجاج سری در ژنوم: برای استخراج DNA ژنومی از روش CTAB استفاده گردید (Clarke, 2009). برای این منظور، حدود ۲۰۰ میلی‌گرم از برگ‌های گیاه درون هاون چینی همراه با ۵۰۰ میکرولیتر از بافر CTAB به خوبی ساییده شد. در ادامه همه محتویات هاون به تیوب استریل ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل شده و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای 65°C قرار گرفت. سپس یک حجم از کلروفورم به نمونه‌ها اضافه و به مدت ۵ دقیقه



شکل ۳- نتیجه الکتروفورز محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱٪ (A) تکثیر قطعه ۴۰۰ جفت بازی از ابتدای ژن *CLF* (۱) و مارکر DNA (M)، تایید همسانه سازی در جهت سنس به وسیله آغازگرهای pFGC-R-2917 و pFGC-F-2587: تکثیر قطعه ۳۳۰ جفت بازی از روی وکتور pFGC خالی (c) و قطعه ۷۳۰ جفت بازی از روی وکتورهای نوترکیب حاصل از مرحله اول همسانه سازی (۱و۲) نشان دهنده همسانه سازی موفق قطعه ۴۰۰ جفت بازی در جهت سنس می‌باشد. (C) تایید همسانه سازی در جهت آنتی‌سنس به وسیله آغازگرهای pFGC-R-4291 و pFGC-F-3505: تکثیر قطعه ۷۸۶ جفت بازی از روی وکتور pFGC خالی (c) و قطعه ۱۱۸۶ جفت بازی از روی وکتورهای نوترکیب حاصل از مرحله دوم همسانه سازی، (۱و۲) نشان دهنده همسانه سازی موفق قطعه ۴۰۰ جفت بازی در جهت آنتی‌سنس می‌باشد...

Figure 3- Electrophoresis result of PCR production on 1% agarose gel. A) 400 bp fragment amplification from the beginning of *CLF* gene (1) DNA ladder (M). B) Confirmation of cloning in sense direction by pFGC-R-2917 and pFGC-F-2587 primers: Amplification of 330 bp and 730 bp fragments respectively from pFGC-Ø (c) and recombination vectors have been obtained from first cloning (1and 2), illustrating successful cloning of 400 bp fragment in sense direction. C) Confirmation of cloning in antisense direction by pFGC-F-3505 and pFGC-R-4291 primers: Amplification of 786 bp and 1186 bp fragments respectively from pFGC-Ø (c) and recombination vectors have been obtained from second cloning (1and 2), illustrating successful cloning of 400 bp fragment in sense direction.



شکل ۴- گزینش گیاهان تراریخته آراییدوپسیس در محیط انتخابی MS+Basta (مقاومت روی T-DNA). A) گیاهان نسل اول. B) گزینش گیاهان تراریخته نسل اول. C) گیاهان نسل دوم بدست آمده از بذرهای گیاه منتخب نسل اول.

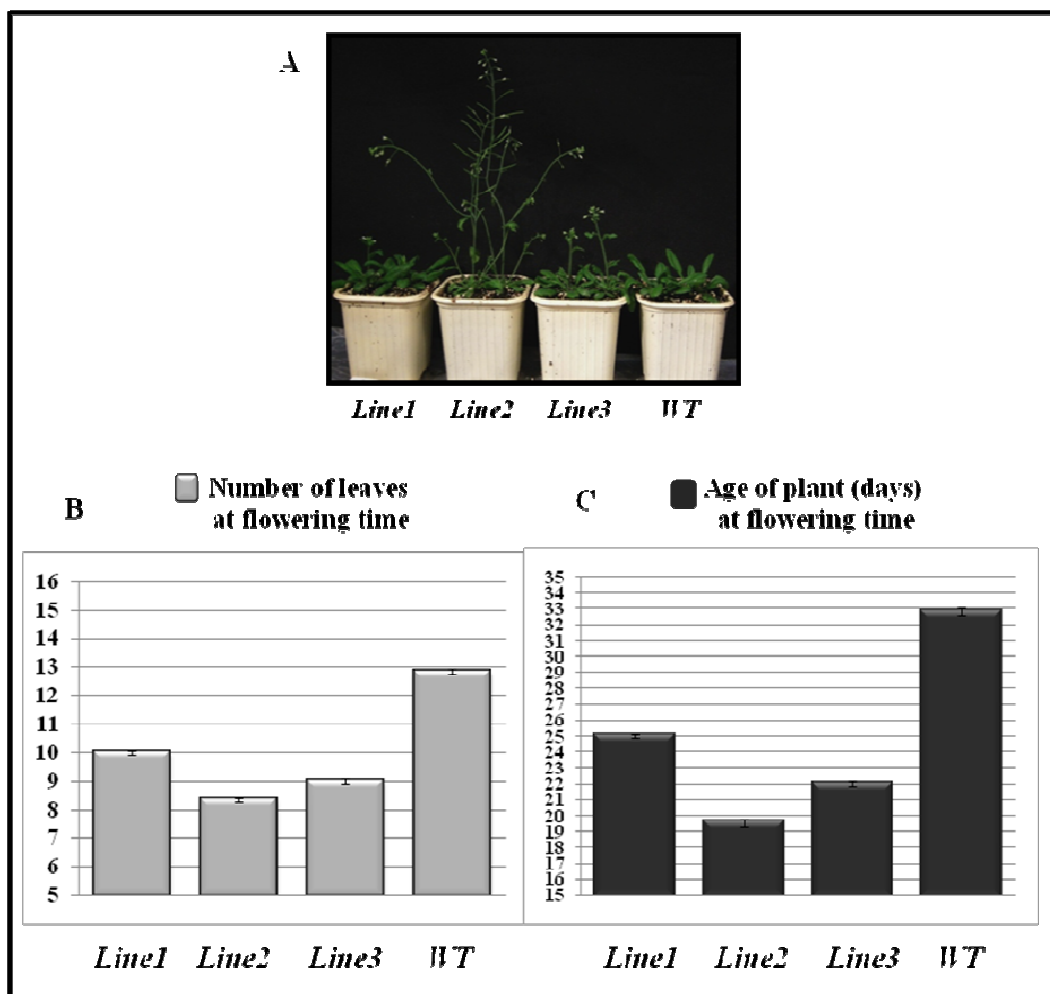
Figure 4- Selection of transgenic Arabidopsis plants by the selection medium MS+Basta (resistance on T-DNA). A) T1 plants. B) Selection of T1 transgenic plants. C) Obtained T2 plants from seeds of selected T1 plant.

۰/۲ گرم بافت گیاهی در ازت مایع خرد شده و در یک میلی‌لیتر تریزول ذوب شد. سپس، ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم اضافه شده و پس از مخلوط شدن، نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت rpm ۱۵۰۰۰ در °C ۴ سانتریفیوژ شدند. پس از انتقال

استخراج RNA، سنتز cDNA و PCR کمی: استخراج RNA کل از بافت‌های مختلف گیاهان آراییدوپسیس تراریخته نسل دوم با روش تریزول (Trizol، میکروژن) انجام شد (Pazhouhandeh *et al.*, 2011). برای این کار

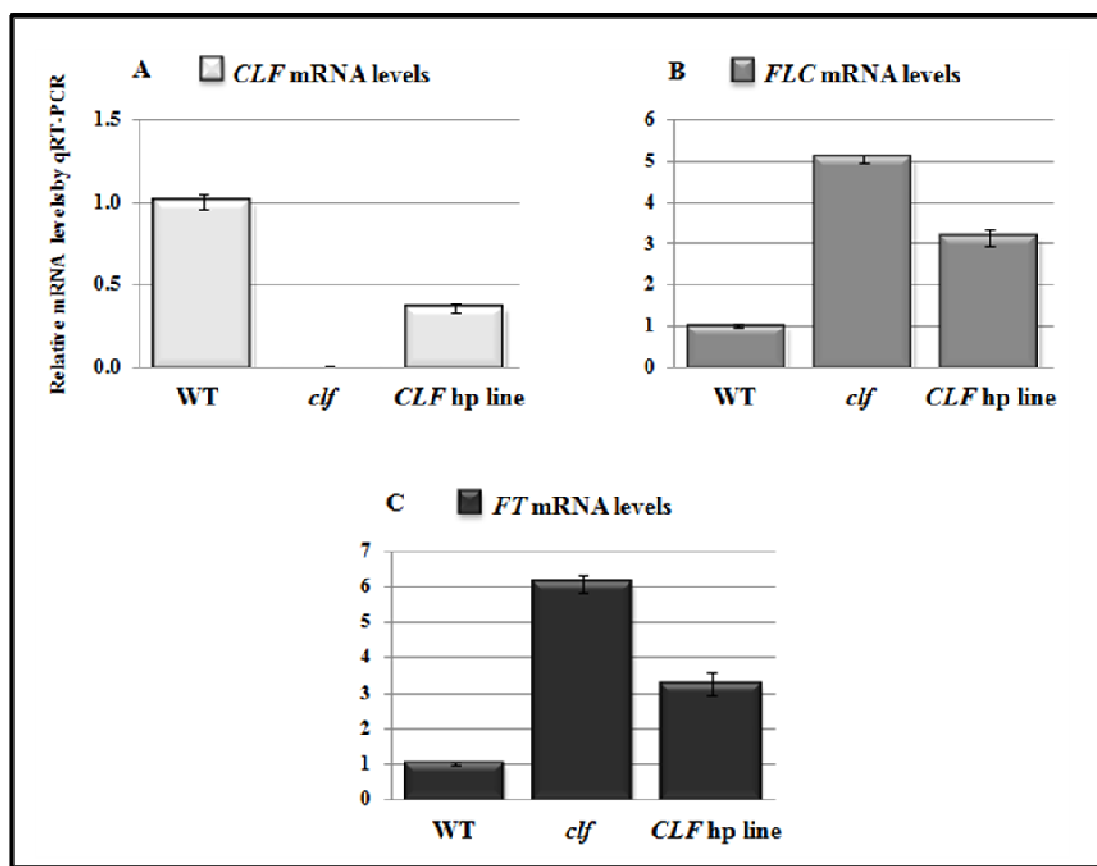
تصادفی همگزامر و بر اساس روش ذکر شده برای کیت RT Superscript III (شرکت Invitrogen) ساخته شد. سپس برای بررسی میزان بیان ژنهای *CLF*، *FT* و *FLC*، PCR کمی با آغازگرها و روش توصیف شده توسط Pazhouhandeh و همکاران (۲۰۱۱) انجام گرفت (شکل ۶).

فاز رویی به تیوب جدید، RNA با استفاده از ایزوپروپانول رسوب داده شد. کیفیت و کمیت نمونه‌ها با دو روش الکتروفورز ژل آگارز (۱٪) و اسپکتروفوتومتر بررسی شدند. سنتز cDNA با استفاده از ۴ میکروگرم از RNA استخراج شده از گل‌ها و با استفاده از آغازگر dT و آغازگر



شکل ۵- A) گیاهان تراریخته آرابیدوپسیس نسل دوم (*Line1*، *Line2*، *Line3*) و گیاه تیپ وحشی (*WT*). B) مقایسه تعداد برگ‌های گیاهان تراریخته و تیپ وحشی در زمان گلدهی. C) مقایسه سن گیاهان تراریخته و تیپ وحشی در زمان گلدهی.

Figure 4- A) T2 transgenic *Arabidopsis* (*Line1*, *Line2*, *Line3*) and wild type plant (*WT*). B) The comparison of leaves number in transgenic and wild type plants at flowering time. C) The comparison of transgenic and wild type plants age at flowering time.



شکل ۶- مقایسه سطوح mRNAهای *CLF* (A)، *FLC* (B) و *FT* (C) گیاهان تراریخته بیان کننده *CLF hp* با گیاهان موتانت *clf* و گیاهان تیپ وحشی با استفاده از RT-PCR کمی.

Figure 6- Comparison of *CLF* (A), *FLC* (B) and *FT* (C) mRNA levels in *CLF hp* transgenic plants with the *clf* mutant and wild type plants by the qRT-PCR technique.

مولکول از نظر توالی با ژن هدف *CLF* همولوگ است و RNAهای کوچک حاصل از آن (siRNA) می‌توانند منجر به تجزیه mRNAهای ژن *CLF* شوند (شکل ۱). برای این منظور قطعه ۴۰۰ جفت بازی از ژن *CLF* گیاه مدل آرابیدوپسیس به کمک PCR تکثیر (شکل A-۳) و در دو جهت سنس و آنتی سنس درون وکتور pFGC5941 به کمک جایگاه‌های برشی در

نتایج و بحث

این تحقیق به منظور بررسی امکان تسریع گلدهی از طریق خاموش کردن بیان ژن *CLF* با استفاده از تکنیک RNA Silencing انجام گرفت. برای این کار، ابتدا قطعه کوچکی از ژن *CLF* به گونه‌ای در وکتور همسانه سازی pFGC5941 ساخته شد که بتواند در سلول‌های گیاه هدف، یک RNA دو رشته‌ای (dsRNA) تولید کند. این

همچنین، تعدادی از گیاهان تراریخته نسل دوم قادر به رشد نبودند که می‌تواند به دلیل خاموش شدن شدید ژن *CLF* در این گیاهان باشد. به نظر می‌رسد در گیاهان زودگلده حاصل، بیان ژن *CLF* بطور نسبی کاهش یافته است و حتی تفاوت در زمان گلدهی لاین‌های مختلف حاصل را نیز می‌توان به تفاوت در میزان خاموشی *CLF* نسبت داد. این موضوع با استفاده از آزمون RT-PCR کمی تایید شد، بطوریکه بیان *CLF* در لاین دوم که گلدهی آن سریعتر از همه لاین‌ها صورت گرفت، نسبت به بقیه لاین‌ها کاهش بیشتری نشان داد. کاهش بیان این ژن به اندازه‌ای در مکانیسم شروع گلدهی نقش اساسی دارد که مسیرهای موثر دیگر در این مکانیسم توان جبران کمبود بیان این ژن را ندارند. همچنان که انتظار می‌رفت، RT-PCR کمی روی گیاهان تراریخته نشان داد که بیان *FT* در این گیاهان به شدت افزایش یافته است (شکل ۶-C). می‌توان گفت که برطرف شدن مهار متیلاسیون از روی کروماتین *FT* در اثر کاهش بیان *CLF* (که یک متیل ترانسفراز است) به وسیله ساختار سنجاک سری ایجاد شده، باعث افزایش بیان *FT* شده است.

ایجاد صفت زودگلدهی علاوه بر اینکه می‌تواند منجر به تولید میوه نوبر با ارزش اقتصادی بالاتر شود، در برخی مناطق نیز می‌تواند برای انجام کشت دوم در یک فصل زراعی (به دلیل کوتاه بودن دوره رشد گیاه) کاربرد داشته باشد. در تحقیقاتی با استفاده از انتقال ژن *FT* در

پایین دست پروموتور CaMV 35S همسانه سازی شده و همسانه سازی صحیح این قطعه در دو جهت سنس و آنتی‌سنس، با استفاده از PCR تایید گردید (شکل ۳-B و ۳-C). وکتور حاصل، به کمک آگروباکتریوم و به روش Floral dip به گیاه آراییدوپسیس انتقال یافته و گیاهان تراریخت روی محیط MS حاوی Basta گزینش شدند (شکل ۴). انتظار می‌رود در گیاهان تراریخت پس از رونویسی قطعه انتقال یافته، مولکول‌های سنجاک سری dsRNA از طریق اتصال توالی‌های تکرار معکوس تولید شوند. این ساختار سنجاک سری در گیاه توسط اندونوکلیتازهایی به نام Dicer شناسایی و به siRNA می‌شکنند. یک رشته از این RNAهای دو رشته‌ای کوچک، درون کمپلکس RISC (RNA Induced Silencing Complex) جای می‌گیرد تا اینکه mRNA رونویسی شده از ژن *CLF* را شناسایی کرده و با آن جفت شود. این کمپلکس با خاصیت RNase H خود باعث خرد شدن mRNA ژن *CLF* و در نتیجه، خاموشی آن در سطح پس از رونویسی می‌شود (Tehseen et al., 2010) (شکل ۱-D). وقوع این پدیده در گیاهان تراریخت بطور غیر مستقیم به اثبات رسید، به طوری که بر اساس نتایج آزمون RT-PCR کمی، سطوح رونوشت-های ژن *CLF* در گیاهان تراریخت حاصل بطور معنی داری نسبت به گیاهان تیپ وحشی کاهش یافته بود (شکل ۶-A). همچنانکه انتظار می‌رفت، گیاهان تراریخته نسل دوم سریعتر از گیاهان تیپ وحشی وارد مرحله گلدهی شدند (شکل ۵-A).

کردن دیگر گیاهان مهم از نظر اقتصادی و کشاورزی از این تکنولوژی استفاده کرد. همچنین، گیاهان تراریخت ایجاد شده، می‌توانند برای کشف وظایف دیگر *CLF* در گیاه و بررسی جنبه‌های مختلف این ژن مورد استفاده قرار گیرند.

سپاسگزاری

با تشکر از آزمایشگاه گروه بیوتکنولوژی کشاورزی دانشگاه شهید مدنی آذربایجان خصوصا آقای دکتر محمد احمدآبادی بخاطر مشاوره‌های ارزشمندشان و همچنین از همکاری انیستیتو بیولوژی سلولی و مولکولی گیاهی (IBMP) استراسبورگ فرانسه. این مقاله برگرفته از پایان نامه کارشناسی ارشد خانم ندا دیدار می‌باشد که توسط معاونت پژوهشی دانشگاه شهید مدنی آذربایجان حمایت مالی شده است.

آرابیدوپسیس، اطلسی و ارکیده گیاهان زودگلده ایجاد شده است (Huang *et al.*, 2012) و تحقیق چاپ نشده نویسنده). در تحقیقی دیگر در گیاه زینتی *Gloxinia* با خاموش کردن *miR159* در این گیاه فنوتیپ زودگلده و با بیان کردن زیاد آن صفت دیرگلدهی را بدست آوردند (Li *et al.*, 2013). بیان بیش از حد *miR171* نیز در جو سبب دیرگلدهی این گیاه شد (Curaba *et al.*, 2013). همزمان با بیان بیشتر ژن *SOCI* در ارکیده باعث تولید گیاهان زودگلده شدند (Ding *et al.*, 2013). بیان بیشتر ژن *Long Vegetative Phase One (LOV1)* متعلق به آرابیدوپسیس نیز در یک تک لپه ای باعث تاخیر در گلدهی آن شد (Xu *et al.*, 2012). پژوهش حاضر به نوبه خود جزو اولین پروژه‌های تحقیقاتی در راستای کاربردی کردن *RNA Silencing* در ایران می‌باشد و نتایج این تحقیق روی گیاه مدل آرابیدوپسیس نشان داد که می‌توان برای زودگلده

منابع

- Blazquez M, Koornneef M, Putterill J (2001). Flowering on time: gene that regulate the floral transition. *EMBO reports* 2: 1078-1082.
- Bent A (2006). *Arabidopsis thaliana* floral dip transformation method. *Methods Molecular Biology*. 343: 87-103.
- Clarke JD (2009). Cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB) DNA miniprep for plant DNA isolation. Adapted from *Arabidopsis: A Laboratory Manual* (eds. Weigel and Glazebrook). CSHL Press, Cold Spring Harbor, NY, USA.
- Curaba J, Talbot M, Li Z, Helliwell C (2013). Over-expression of microRNA171 affects phase transitions and floral meristem determinancy in barley. *BMC Plant Biology* 7:13-6.
- Czernin B, Melfi R, McCabe D, Seitz V, Imhof A, Pirrotta V (2002). *Drosophila* enhancer of Zeste/ESC complexes have a histone H3 methyltransferase activity that marks chromosomal Polycomb sites. *Cell* 111: 185-196.

- Ding L, Wang Y, Yu H (2013). Over-expression of *DOSOC1*, an ortholog of Arabidopsis *SOC1*, promotes flowering in the orchid *Dendrobium Chao Parya Smile*. *Plant and Cell Physiology* 54:595-608.
- He Y (2009). Control of the transition to flowering by chromatin modifications. *Molecular Plant* 2: 554-564.
- Huang W, Fang Z, Zeng S, Zhang J, Wu K, Chen Z, Teixeira da Silva JA, Duan J. (2012). Molecular cloning and functional analysis of three *FLOWERING LOCUS T (FT)* homologous genes from Chinese cymbidium. *International Journal of Molecular Sciences* 13:11385-98.
- Jiang D, Wang Y, Wang Y, He Y (2008). Repression of flowering locus *c* and Flowering Locus *T* by the *Arabidopsis* polycomb repressive complex 2 components. *Plos one* 3: 1-12.
- Kardailsky I, Shukla VK, Ahn JH, Dagenais N, Christensen SK, Nguyen JT, Chory J, Harrison MJ, Weigel D (1999). Activation tagging of the floral inducer *FT*. *Science*. 286: 1962-1965.
- Kim K W, Shin J H, Moon J, Kim M, Lee J, Park M Ch, Lee I (2003). The Function of the Flowering Time Gene *AGL20* Is Conserved in Crucifers. *Molecules and Cells*. 16: 136-141.
- Li X, Bian H, Song D, Ma S, Han N, Wang J, Zhu M (2013). Flowering time control in ornamental gloxinia (*Sinningia speciosa*) by manipulation of miR159 expression. *Annals of Botany* 111:791-9.
- Michaels S D, Amasino R M (2001). Loss of FLOWERING LOCUS C activity eliminates the late flowering phenotype of FRIGIDA and autonomous pathway mutations but not responsiveness to vernalization. *Plant Cell* 13: 935-941.
- Nocker S (2001). The molecular biology of flowering. *Horticultural Reviews* 27: 1-40.
- Pazhouhandeh M, Molinier J, Berr A, Genschik P (2011). MSI4/FVE interacts with CUL4-DDB1 and a PRC2-like complex to control epigenetic regulation of flowering time in Arabidopsis. *PNAS*. 108: 3430-5.
- Sheldon CC, Burn JE, Perez PP, Metzger J, Edwards JA, Peacock WJ, Dennis ES. (1999). The *FLF* MADS box gene: a repressor of flowering in Arabidopsis regulated by vernalization and methylation. *Plant Cell*. 11: 445-458.
- Tehseen M, Imran M, Hussain M, Irum Sh, Ali Sh, Mansoor Sh, Zafar Y (2010). Development of male sterility by silencing *Bcp1* gene of *Arabidopsis* through RNA interference. *African Journal of Biotechnology* 9: 2736-2741.
- Weidong Y, Kang Ch, Zhihong X, Kehui T, Zhiqing Zh (2000). Gene control of flowering time in higher plants. *Chinese Science Bulletin* 45: 1633-1642.
- Xu B, Sathitsuksanoh N, Tang Y, Udvardi MK, Zhang JY, Shen Z, Balota M, Harich K, Zhang PY, Zhao B. (2012). Over-expression of *AtLOV1* in Switchgrass alters plant architecture, lignin content, and flowering time. *PLoS One* 7:e47399.

Generation of Arabidopsis early flowering plants by destruction of *CLF* transcripts via RNA silencingDidar N.¹, Pazhouhandeh M.*², Mahmoudi F.¹¹ Department of Cellular and Molecular Biology, Azarbaijan Shahid Madani University.² Department of Agricultural Biotechnology, Azarbaijan Shahid Madani University. Km 35 Tabriz-Azarshahr Road, Iran**Abstract**

The control of flowering time requires activation of a cascade of successive genes which are affected by several internal and external factors. Some of these genes, such as *Curly Leaf (CLF)*, have inhibitory effect on flowering. Thus, by silencing of these genes, initiation of flowering can be accelerated. In this research, the RNA Silencing technology is used to investigate the possibility of production of early-flowering plants via *CLF* silencing. First, in order to produce hairpin structure, a fragment of *CLF* gene of *Arabidopsis thaliana* was amplified by PCR and then cloned in two sense and antisense directions, into pFGC5941 vector. The resulted recombinant vector was then transferred into Arabidopsis plants via Agrobacterium method. As expected, initiation of flowering was accelerated in transgenic plants in comparison with the wild-type plants. In agreement to the obtained results, RT-qPCR analysis showed that *CLF* expression in transgenic plants was decreased in comparison with the wild-type plants. In contrast, *FT* (a gene which induces flowering) expression was increased in transgenic plants. These results show that RNA silencing as a novel and time-saving biotechnological method could be applied to generate early-flowering plants.

Key words: *Arabidopsis thaliana*, Flowering, *CLF* gene, Early flowering, RNA silencing.

* Corresponding Author: Pazhouhandeh M.

Tel: 09144084074

E-mail: pazhouhandeh@azaruniv.edu