مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
ISSN 2588-5073 چاپی
ISSN 2588-5081 الکترونیکی
دوره ۹، شماره ۲، پاییز و زمستان ۹۹
صفحه ۱۴۸-۱۳۶

https://dorl.net/dor/20.1001.1.25885073.1399.9.2.5.0

DOR:20.1001.1.25885073.1399.9.2.5.0

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 9, Number 2
2021

http://gebsj.ir/

https://ecc.isc.ac/showJournal/23064

ایجاد دیرگلدهی در کاهو با استفاده از خاموشی ژن *MSI4* به کمک RNA Silencing

Delayed flowering in lettuce using MSI4 gene silencing by RNAi

محمد منظری فلاح، مقصود پژوهنده* و منا بردبار
Mohammad Manzari-Fallah, Maghsoud Pazhouhandeh* and Mona Bordbar

گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان
Biotechnology Department, Agriculture Faculty, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, IRAN

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: pazhouhandeh@gmail.com

(تاریخ دریافت: ۹۹/۴/۱۴ – تاریخ پذیرش: ۹۹/۶/۱۹)

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-12-08]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.2.5.0]

چکیده

دیرگلدهی در کاهو باعث تولید برگهای زیاد و حفظ کیفیت خوراکی محصول آن می‌باشد. شروع زمان گلدهی در گیاهان پدیده ای است کاملا هدایت شده که به پارامترهای محیطی و درونی گیاه وابسته است و توسط شبکه تنظیمی ژنهای زیادی کنترل می‌شود. یکی از مشکلات در زمینه پرورش و عملکرد بالای محصولات زراعی و باغی عدم تطابق زمان گلدهی با شرایط مطلوب است. با افزایش جمعیت، تولید گیاهان کارا و با بیوماس بالاتر ضروری می‌باشد. در شبکه تنظیمی گلدهی، Flowering Locus C (FLC)، یک فاکتور رونویسی، جعبه MADS است که مانع از گلدهی می‌شود. مسیر خودمختار شروع گلدهی را به طور مستقل از طول روز، از طریق سرکوبی FLC، تسریع می‌کند. ژن *MSI4/FVE* یک ژن کلیدی مسیر خودمختار است که در کنترل زمان تکثیر و تمایز آغازین سلول، رشد اندام و زمان گلدهی درگیر است و نقش کلیدی در تعیین زمان گلدهی دارد و توسط تغییرات اپی‌ژنتیکی موجب کاهش بیان ژن *FLC* می‌گردد. هدف این تحقیق استفاده از تکنیک RNA Silencing برای مهار کردن ژن *MSI4* در سطح بعد از رونویسی در گیاه کاهو می‌باشد. برای بهینه کردن کشت بافت گیاه کاهو در محیط کشت MS از هورمونهای BAP، کاینتین و NAA و جهت باززایی مستقیم از ریزنمونه‌های کوتیلدون و برگ در مدت سه هفته استفاده شد و تیمار هورمونی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر BAP بیشترین باززایی را نشان داد. برای سنتز ساختار سنجاق‌سری مورد نیاز در تکنیک RNA silencing، قطعه ای از انتهای ژن *MSI4* آرابیدوپسیس توسط PCR تکثیر و با دو همسانه سازی متوالی در دو جهت سنس و آنتی‌سنس درون وکتور خاموشی pFGC5941 قرار داده شد. آنگاه ساختار سنجاق‌سری در این وکتور نوترکیب به واسطه آگروباکتریوم به گیاه کاهو انتقال یافت. گیاهان تراریخته بدست آمده به منظور تائید حضور ژن انتقالی در آنها توسط PCR بررسی شد و مطالعه روی فنوتیپ گلدهی این گیاهان تراریخت نشان داد که خاموشی *MSI4* در کاهو باعث دیرگلدهی این گیاه (حدود یک و نیم ماه تاخیر) و تولید بیشتر برگ در آن می‌شود.

واژه‌های کلیدی

زمان گلدهی،
FLC،
MSI4/FVE،
RNA silencing،
کاهو

مقدمه

گیاهان گلدار برای تولید مثل موفق یک سازوکار تکامل یافته ایجاد کرده‌اند و با تمامی اجزاء زمان مناسب برای انتقال از فاز رویشی به فاز زایشی را متعادل می‌کنند (Kim *et al*., 2009). آغاز مرحله رویشی به زایشی در مریستم نوک شاخه تحت تاثیر عوامل محیطی شامل نور و دما، گذران دوره سرما، فاکتورهای درونی مثل مرحله نموی و تغییر میزان تولید برخی هورمون‌های گیاهی است. در آرابیدوپسیس زمان آغاز گلدهی توسط چهار مسیر اصلی تنظیم می‌شود، شامل: دوره نوری، بهاره‌سازی، خودمختار (autonomous) و مسیر وابسته به جیبرلین (Boss *et al*., 2004; Simpson 2004). این چهار مسیر نیز بیان یک سری از ژن‌های موسوم به مداخله کننده یا انتگریتورها، FT، SOC1 (AGL20) و LEAFY (LFY) (Kardailsky *et al*., 1999; Weigel *et al*., 2000) را کنترل می‌کند. بیان اکثر ژن‌های مسیر گلدهی از طریق تغییرات متعدد کروماتینی (اپی ژنتیکی) تنظیم می‌شود، دو ژن تنظیم کننده اصلی و کلیدی در این شبکه تنظیمی وجود دارد که شامل Flowering Locus (FLC) و Flowering Locus T (FT) می‌باشد. FLC یک فاکتور رونویسی جعبه MADS است که از آغاز گلدهی ممانعت به عمل می‌آورد و یک نقش اصلی و مهم در تنظیم زمان گلدهی در آرابیدوپسیس بازی می‌کند (Michaels and Amasino 1999). FT از طریق طول شبانه روزی، زمان گلدهی را تنظیم می‌نماید (Sheldon *et al*., 1999) . مطالعات مولکولی و ژنتیکی نشان داده است که سه سیستم اصلی FLC را تنظیم می‌کند، (بهاره سازی، FRI و مسیر خودمختار) که همگی روی کروماتین FLC تاثیر می‌گذارند، برای مثال برای فعال سازی بیان این ژن، تری، دی متیلاسیون در هیستون ۳ لیزین شماره ٤ (H3K4)، استیلاسیون هیستون، و برای ممانعت از فعالیت این ژن، تغییراتی مانند داستیلاسیون، دی متیلاسیون H3K9,27 صورت می‌گیرد (He and Amasino 2005) . ژن FLC بیشتر در قسمت‌هایی مثل آوندهای چوبی و مریستم انتهای شاخساره بیان می‌شود. یکی از مسیرهای تنظیمی بیان FLC، مسیر خودمختار می‌باشد. این مورد توسط ژن‌های موتانت موجود در این مسیر به اثبات رسیده است، که در اثر جهش در این ژن‌ها آرابیدوپسیس-های حاصل همگی دیر گلده بوده و افزایش ۳ تا ۸ برابری بیوماس را نشان می‌دهند، با توجه به اطلاعات رسیده تا به امروز ۸ نوع ژن در این مسیر یافت شده است شامل: LD , FCA, FY, FPA, FVE, FLK, REF6, FLD و (Simpson 2004; Noh *et al*., 2004; Lee *et al*., 1994; Ausín *et al*., 2004).

ژن FVE که به اسم Multicopy Suppressor of IRA1 4 (MSI4) نیز شناخته می‌شود، عضوی از خانواده پروتئینی MSI-like (MSI1-MSI5) در آرابیدوپسیس می‌باشد (Ausín *et al*., 2004; Kim *et al*., 2004; Hennig *et al*., 2003)، پروتئین‌های این خانواده در چندین کمپلکس تغییر کروماتین در موجودات یوکاریوتی یافت شده است (Hennig *et al*., 2005). مطالعات نشان می‌دهد که همولوگ این ژن در موجودات دیگر مثل انسان (RbA46/48)، مگس سرکه (P55)، برنج (osFVE) یافت شده که فقط در چند اسیدامینه تفاوت دارد، این ژن در یوکاریوت‌ها حفاظت‌شدگی بالایی دارند (Neer *et al*., 1994). عمل این ژن در داستیلاسیون هیستون، کروماتین FLC درگیر است و باعث خاموشی ژن FLC میگردد (Ausín *et al*., 2004). بنابراین بی شک هومولوگ این ژن در خانواده گیاهان کاهو نیز وجود دارد.

FVE، یک پروتئین حاوی ۵۰۷ اسیدآمینه، دارای ٦-۷ دمین تکرار WD-40 یا WDR شناخته شده است (Li and Roberts 2001)، توالی آن در یوکاریوت‌ها یافت شده است و در فرآیندهای تنظیمی پایه‌ای و مهم سلول شرکت دارند (Van Nocker and Ludwig 2003).آزمایشات مولکولی در آرابیدوپسیس نشان می‌دهد که پروتئین‌های WDR در سرتاسر یوکاریوت‌ها حفظ شدگی بالایی داشته و نقش کلیدی در فرآیندهای مختلف گیاه بازی می‌کنند (Turck *et al*., 2007). MSI4 در زمان گلدهی باعث سرکوب ژن TFL2/LHP1 (باعث تعیین هویت اندام گل، تقسیم میوزی، بلوغ بذر) در زمان گلدهی نیز می‌گردد و همچنین یک نقش حسگر دمایی در گیاهان به طور مستقل ایفا می‌کند (Kim *et al*., 2004). با توجه به نتایج تحقیقات این ژن نقش حیاتی در مسیر شروع زمان گلدهی در گیاهان دارد. بنحوی که می‌توان از طریق مهندسی ژنتیکی روی این ژن گیاهانی با فنوتیپ و

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-12-08]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.2.5.0]

ژنوتیپ خاص بدست آورد که از جنبه‌های تحقیقی و اقتصادی و دارویی و غیره حائز اهمیت باشند.

گیاه کاهو با توجه به نوع مصرف و بیوماس آن دارای پتانسیل مطلوب برای تبدیل شدن به یک بیوراکتور جهت تولید پروتئین‌های نوترکیب و واکسنهای خوراکی است و برای کارهای مهندسی ژنتیکی مورد توجه قرار دارد. تکنیک مبتنی بر RNA Silencing یکی از ابزارهای ژنتیکی جدید و کاربردی است که اولین بار در سال ۱۹۹۰ توسط ون و همکاران در گیاه اطلسی تشخیص داده شد و امروزه در بیوتکنولوژی گیاهی با خاموشی ژن‌ها جهت اهداف مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرد و با توجه به پیشرفت‌های صورت گرفته آمار گیاهان تراریخته مبتنی بر این مکانیسم در حال افزایش است. در این مکانسیم از طریق تولید siRNAهای ژن مورد نظر باعث تخریب بیان آن در سطح پس از رونویسی شده و در نتیجه پروتئین مورد نظر تولید نخواهد شد. هدف این مطالعه خاموش کردن ژن *MSI4* در گیاه دارویی کاهو و تولید گیاه تراریخت با فنوتیپ دیرگلده می‌باشد. نتایج این تحقیق علاوه بر کاربردی بودن گیاه حاصل، مقدمه تحقیات دیگر را روی گیاهان استراتژیک زراعی و باغی که دیر گلده بودن آن‌ها حائز اهمیت است و از نظر اقتصادی مهم هستند فراهم می‌نماید.

مواد و روش‌ها

جداسازی و تکثیر ژن MSI4 از گیاه آرابیدوپسیس

با استفاده از cDNA ساخته شده از بافتهای گل آرابیدوپسیس یک PCR با پرایمرهای اختصاصی که با نرم‌افزار A Plasmid Editor طراحی شده بودند، ابتدا و انتهای ژن *MSI4* که حاوی سایت برشی آنزیم‌های *Nde*I در ′5 و *Bam*HI در ′3 بودند (جدول۱) انجام شد و ژن *MSI4* به طول ۱۵۲٤ جفت باز تکثیر گردید. در ادامه، برش آنزیمی روی محصول PCR و همزمان روی وکتور pGBKT7 انجام و پس از جداسازی باندها از ژل و خالص سازی، واکنش الحاق بین آن‌ها انجام پذیرفت. کلنی‌های مثبت روی محیط کشت حاوی کانامایسین تکثیر و انتخاب شدند و پلاسمید آنها استخراج گردید. پس از تایید درستی این ژن با PCR، پلاسمید های حاصل در مرکز توالی یابی IBMP-France توالی یابی شدند و یک توالی درست مطابق شماره دسترسی NCBI At2g19520 برای ادامه کار انتخاب گردید.

همسانه‌سازی قطعات ژن MSI4 به صورت سنس و آنتی‌سنس در پلاسمید pFGC5941

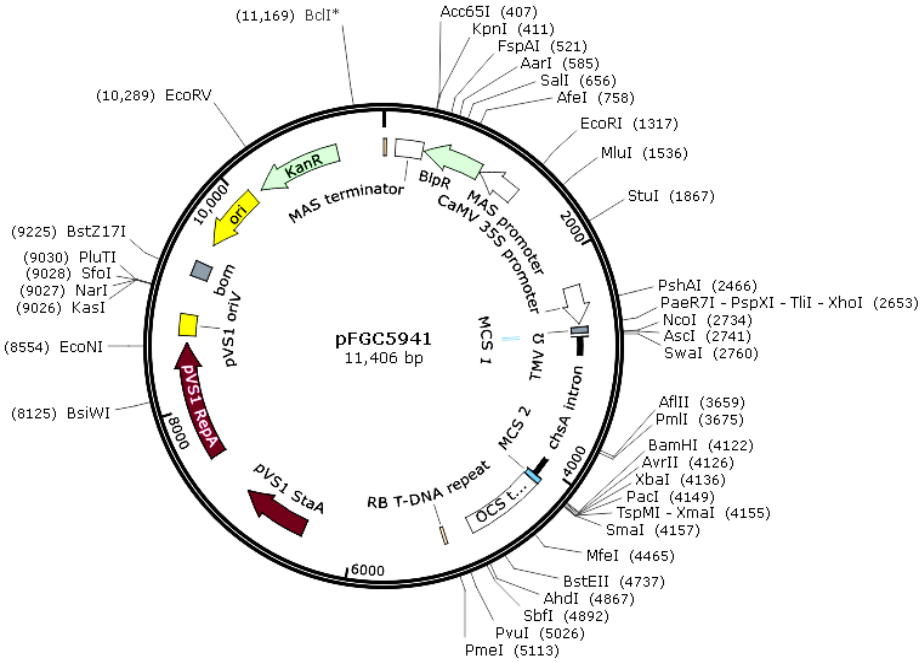
برای تهیه سازه تولید کننده سنجاق سری، PCR برای دو قطعه ابتدا و انتهای ژن *MSI4/FVE* با پرایمرهایی که دارای جایگاه برش برای آنزیم‌های مورد نظر پژوهش بودند انجام گرفت برای این‌کار یک جفت پرایمر طراحی شد (جدول۱) که دارای جایگاه برشی *Xho*I–*Xba*I ´۵– در پرایمر رو به جلو و *Nco*I–*Bam*HI - ´۵ در پرایمر برگشتی باشند. تکثیر قطعات از روی پلاسمید pGBKT7-MSI4 تایید شده به عنوان الگو انجام گرفت. سپس محصول PCR ، توسط الکتروفورز بررسی و خالص سازی شد.

در این تحقیق پلاسمید pFGC5941 برای همسانه‌سازی استفاده شد. این پلاسمید مخصوص RNAi (RNA interference) است. پلاسمید pFGC5941 با ۱۱٤۰۷ جفت باز طول، به دلیل داشتن یک توالی اینترونی CHSA بین دو جایگاه همسانه سازی چندگانه (Multiple cloning site) یک پلاسمید مناسب برای اهداف خاموشی RNA است. بدین نحو که می‌توان با همسانه‌سازی یک قطعه ژن در دو جهت سنس و آنتی‌سنس در بالادست و پایین-دست این اینترون، یک سازه RNAi برای ژن موردنظر طراحی نمود. اینترون CHSA از ژن کد کننده آنزیم چالکون سینتاز (Chalcone synthase) گیاه اطلسی گرفته شده است. پروموتر CaMV 35S موجود در این پلاسمید نیز از ویروس موزاییک گل‌کلم (Cauliflower Mosaic Virus) گرفته‌شده است. خاتمه دهنده این پلاسمید هم Octopine synthase (OCS) است. این پلاسمید همچنین دارای ژن مقاومت به کانامایسین (Kanamycin resistance gene)خارج از T-DNA، برای انتخاب در محیط کشت *E. coli* و ژن مقاومت به علف‌کش basta (Basta resistance gene) داخل T-DNA برای انتخاب در محیط کشت گیاهی است (شکل ۱).

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-12-08]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.2.5.0]

جدول۱- توالی آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق Table 1. Primer sequences in this study

Primer	Sequence
MSI4 NdeI F	aaCATATGATGGAGAGCGACGAAGCAGCA
MSI4 BamHI R	aaGGATCCTTAAGGCTTGGAGGCACAAGT
Forward primer A: F XbaI-XhoI	aaTCTAGA CTCGAGATGGAGAGCGACGAAGCA
Revers primer A: R BamHI-NcoI	AAGGATCCCCATGGAGCTGCGGACCCCATCTGCA
Forward primer B: F XbaI-XhoI	aaTCTAGA CTCGAG ACAAAGTTGTTGATTTCCAC
Revers primer B : R BamHI-NcoI	AAGGATCCCCATGGTTAAGGCTTGGAGGCACAA
pFGC5941 Fext	AATCCCACTATCCTTCGCAAGACC
pFGC5941 Rint	CTTTCTACCTTCCCACAATTCGTCG
pFGC5941 Fint	CAGACAGATGTTTCCCAGCGAG3
pFGC5941 Rext	AAACCGGCGGTAAGGATCTGAG



شکل ۱- نقشه پلاسمید pFGC5941 که شامل جایگاه برش آنزیم EcoRI (1317)، راه‌انداز CaMV-35S، جایگاه‌های همسانه‌سازی (MCS)، دو جایگاه برش برای آنزیم HindIII (3388, 5229)، خاتمه دهنده OCS (Octopine synthase)، مرز سمت راست (RB) و مرز سمت چپ (LB) است.

Figure 1. pFGC5941 plasmid map including EcoRI (1317) enzyme cleavage site, CaMV-35S promoter, cloning sites (MCS), two cleavage sites for HindIII (3388, 5229), OCS terminator (Octopine synthase), the right border (RB) and the left border (LB).

برای همسانه‌سازی دو قطعه‌ی ژن *MSI4* (A و B) همچنین برای وکتور خالی pFGC5941 با آنزیم‌های *Xho*I و *Nco*I واکنش برش صورت گرفت سپس در روی ژل LMP ۱٪ قطعات جداسازی و خالص سازی شد و قطعه مورد نظر به داخل پلاسمید به کمک آنزیم *T4* DNA ligase (Fermentase) انتقال یافت. محصول لیگاسیون خالص‌سازی شد و به روش الکتروپوراسیون به باکتری *E. coli* نژاد Top10 انتقال یافت. پس از انتخاب کلنی ها با PCR از روی محیط انتخابی حاوی کانامایسین، استخراج پلاسمید به روش Miniprep (Sambrook *et al.* 1989) و تایید پلاسمید نوترکیب با استفاده از PCR و برش آنزیمی انجام شد. یکی از پلاسمیدهایی که PCR مثبت بود برای انجام کلونینگ دوم جهت وارد کردن همان قطعه ولی این بار در جهت آنتی‌سنس استفاده

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-12-08]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.2.5.0]

شد. در این مرحله ابتدا برش آنزیمی قطعه تکثیر یافته وهمچنین پلاسمید نوترکیب جدید با آنزیم‌های *XbaI* و*BamHI* انجام گرفت. محصول این برش آنزیمی پس از جداسازی و خالص سازی از ژل جهت انجام لیگاسیون استفاده شد. محصول لیگاسیون دوم با روش الکتروپوراسیون به *E. coli* فرستاده شده و کلنی‌های مثبت در محیط حاوی کانامایسین انتخاب گردیدند. تایید کلون‌های نوترکیب با کمک PCR با آغازگرهای اختصاصی پلاسمید pFGC5941 Fext به عنوان آغازگر رو به جلو و pFGC5941 Rint به عنوان آغازگر برگشتی برای تایید همسانه-سازی اول در جهت سنس و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی pFGC5941 Fint به عنوان آغازگر رو به جلو و pFGC5941 Rext به عنوان آغازگر برگشتی (جدول ۱) برای تایید همسانه-سازی دوم در جهت آنتی‌سنس انجام گرفت. کلونینگ قطعه B تایید شد و ادامه کار با پلاسمید حاوی قطعه B یعنی pFGC5941BB انجام شد.

ترانسفورماسیون پلاسمید نوترکیب به آگروباکتریوم

سویه آگروباکتریومLB4404 برای ترانسفورماسیون گیاه کاهو مورد استفاده قرار گرفت. پلاسمید pFGC5941BB نوترکیب بعد از اینکه در هر دو جهت سنس و آنتی‌سنس توسط PCRها و توالی‌یابی تائید شد، به روش الکتروپوراسیون به سلول‌های شایسته *Agrobacterium tumefaciens* منتقل شد و در محیط LB جامد همراه با آنتی‌بیوتیک‌های کانامایسین (عامل مقاومت روی پلاسمید pFGC5941) و ریفامپیسین (عامل مقاومت خود آگروباکتریوم) (۱۰۰ میکروگرم بر میکرولیتر) رشد داده شدند. تک کلنی آگروباکتریوم حاوی پلاسمید نوترکیب در محیط LB مایع حاوی کانامایسین و ریفامپیسین تکثیر یافت تا OD_{600} آن به ۰/۷ رسید. بعد از حذف محیط کشت، سلول‌های حاصل در محیط کشت MS مایع (Murashige and Skoog 1962) با غلظت نصف حاوی استوسیرنگون به غلظت ۱۰۰ میکرومولار سوسپانسیون شدند.

تراریزش گیاه کاهو: برای بدست آوردن محیط باززایی مناسب برای کشت بافت گیاهان کاهو در ٦ سطح هورمونی سیتوکنین شامل BAP, TDZ, Kinetin و اکسین شامل NAA و با دو ریزنمونه برگ و کوتیلدون مورد بررسی قرار گرفت. که بهترین ترکیب هورمونی برای جنین‌زایی و به دنبال آن باززایی در ۰/۰۱ میلی گرم در لیتر BAP و ۰/۱ میلی گرم در لیتر NAA بدست آمد. ریزنمونه‌های مورد استفاده برای تراریزش کوتیلدون‌های با سن ۳ و ٤ روزه بودند. برای تراریزش از محیط کشت MS به عنوان محیط کامل و پایه استفاده شد. همکشتی به مدت ۲ شب در تاریکی و دمای ۲۸ درجه سانتیگراد نگهداری گردید. سپس قطعات گیاهی به محیط باززایی MS حاوی ۳۵۰ میلی‌گرم در لیتر آنتی‌بیوتیک Cefotaxime برای حذف آگروباکتریوم انتقال داده شد و در شرایط ١٦ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی به مدت دو هفته نگهداری شدند. بعد از دو تا ۳ هفته به محیط جدید حاوی تنظیم‌کننده‌های رشدی، Cefotaxime و Phosphinothricine (PPT: 10 mg/l) برای گزینش نمونه‌های تراریخت انتقال داده شدند. فقط گیاهان تراریخت که T-DNA موردنظر را در کنار ژن مقاومت به PPT دریافت کرده بودند، در این مرحله به رشد و جوانه‌زنی ادامه دادند. سپس نمونه‌ها به محیط ریشه‌زایی انتقال داده شدند و تا به دست آوردن گیاهان کامل کشت و واکشت در محیط MS انجام شد.

روش‌های مولکولی تائید تراریخته بودن گیاهان

پس از گزینش گیاهان تراریخته در محیط انتخابی حاویPPT و تکثیر شدن گیاهان در شرایط درون شیشه‌ای DNA از بافت‌ها به روش CTAB (Doyle and Doyle, 1987) استخراج و روی آن PCR انجام شد و شروع زمان گلدهی و همینطور بیوماس گیاهان تراریخت نسبت به نوع غیرتراریخت مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج و بحث

ژن *MSI4* ژن مداخله کننده در فرایند آغاز گلدهی است و یک ژن کلیدی تنظیم کننده مسیر خودمختار است و از طریق تغییرات روی کروماتین عمل می‌کند، مکانیسم عمل آن از طریق داستیلاسیون FLC باعث تسریع گلدهی می‌شود. ما تلاش کردیم تا با استفاده از تکنیک RNA silencing این ژن را در گیاه سبزی و دارویی کاهو خاموش کرده و در نتیجه باعث افزایش بیوماس

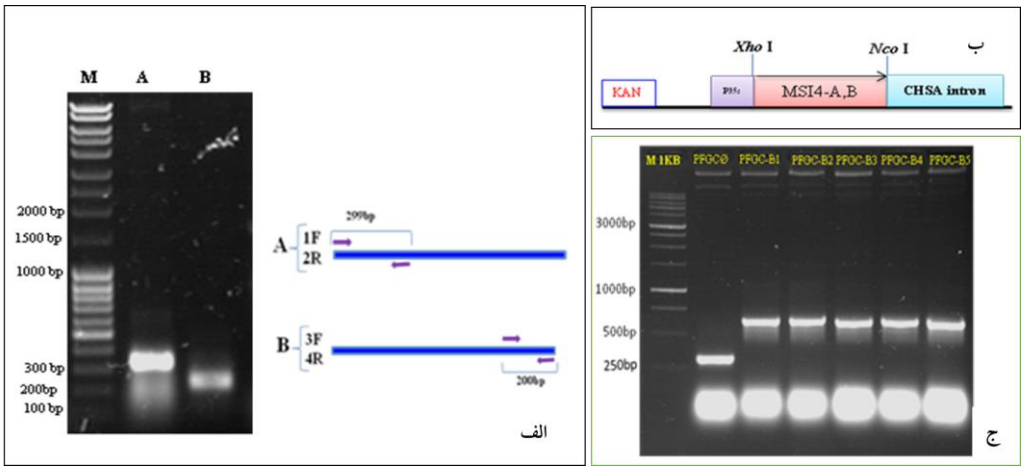
[Downloaded from gebsj.ir on 2025-12-08]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.2.5.0]

گیاهان تراریخته و دیرگلده‌تر شدن نسبت به نوع معمولی شویم. برای اینکار ابتدا ژن *MSI4* گیاه آرابیدوپسیس که اطلاعات خوبی در مورد آن وجود دارد (Pazhouhandeh *et al*., 2011) در وکتور پایه pGBKT7 با توجه به سایت‌های برشی آن کلون شد و پساز تایید توالی از روی این پلاسمید یک قطعه از انتهای ژن *MSI4* از طریق برش آنزیمی و لیگاسیون بصورت سنس و آنتی‌سنس در وکتور خاموشی pFGC5941 کلون گردید. سپس ترانسفورماسیون کاهو به کمک آگرباکتریوم انجام گرفت و بعد گیاهان تراریخته در روی محیط انتخابی گزینش و انتخاب شدند و پس از تایید وجود ترانسژن فنوتیپ گلدهی آنها مورد بررسی قرار گرفت.

همسانه سازی ژن *MSI4* در پلاسمید pGBKT7

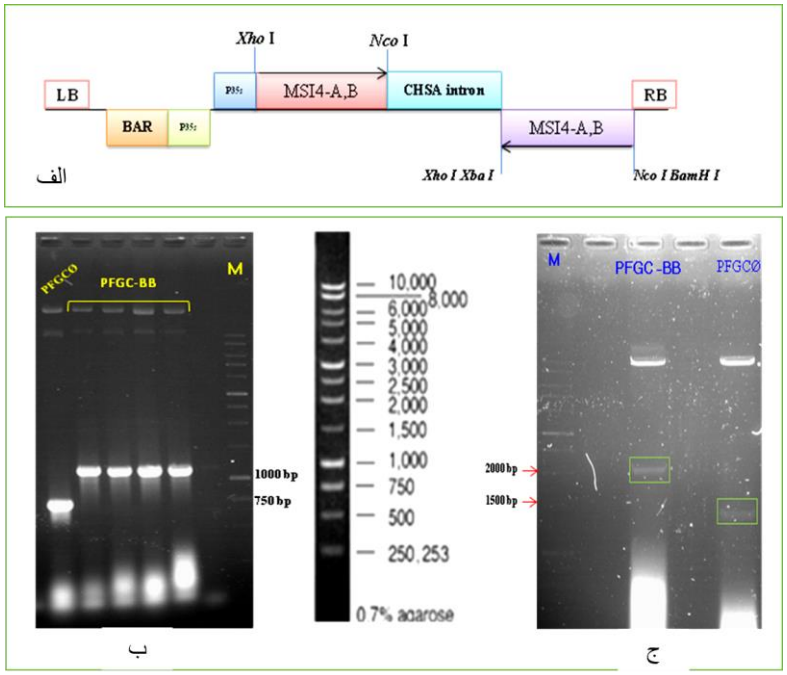
مطابق روش ذکر شده در مواد و روشها با استفاده از cDNA ساخته شده از بافتهای گل آرابیدوپسیس یک PCR با پرایمرهای اختصاصی ابتدا و انتهای *MSI4* انجام و همسانه سازی آن داخل وکتور pGBKT7 با آنزیمهای برشی *Nde*I و *Bam*HI صورت گرفت و ژن *MSI4* به طول ۱۵۲٤ جفت کلون گردید. توالی ژن در پلاسمید حاصل مطابق شماره دسترسی NCBI At2g19520 بود. به منظور ساخت سازه سنجاق سری ژن MSI4 در وکتور pFGC5941 ابتدا از دو انتهای ژن PCR با توجه به آنچه که در قسمت مواد و روشها اشاره گردید، انجام شد برای اینکار از روی این ژن در وکتور pGBKT7 با پرایمرهای اختصاصی که دارای جایگاه آنزیم‌های برشی ویژه بودند PCR انجام گرفت. قطعه ۳۰۰bp برای نمونه A از ابتدای ژن و قطعه ۲۰۰bp برای نمونه B از انتهای ژن بدست آمد (شکل۲ الف). محصول PCR، A و B بعد از تخلیص و همچنین وکتور خالی pFGC5941 در معرض برش آنزیمی با *Xho*I و *Nco*I قرار داده شد. بعد از تخلیص بر روی ژل LMP ۲٪ ران شد. در ادامه باندها از روی ژل LMP جداسازی شد و لیگاسیون انجام گرفت که این قطعات بصورت سنس و قبل از اینترون CHSA بعد از پروموتور 35S داخل پلاسمید اتصال داده شدند (شکل۲ ب). محصول لیگاسیون به روش الکتروپوراسیون به باکتری *E. coli* انتقال داده شد. در نهایت به محیط دارای کانامایسین بخاطر pFGC5941 انتقال یافت. از روی کلنی‌های تشکیل شده استخراج پلاسمید وPCR انجام شد که باندهای حاصل نشان از درستی کار بود (شکل۲ ج). جهت تایید نهایی از یکی از پلاسمیدهایی که در PCR نتیجه مثبت داده بود برش آنزیمی با *Xho*I و *Nco*I انجام شد. چون طبق استراتژی، این پلاسمیدها در جهت Sense قطعه *MSI4* را دریافت کرده بودند، از یکی از آن‌ها برای شروع کلونینگ دوم در جهت Antisense استفاده شد.



شکل۲- الف: تصویر ژل الکتروفورز محصول PCR تکثیر ابتدا و انتهای ژن *MSI4* که قطعه A۳۰۰ جفت‌باز و قطعه B ۲۰۰ جفت‌باز است. ب: شکل شماتیک ورود قطعات سنس A و B قبل از اینترون و بعد از راه‌انداز. ج: تصویر ژل الکتروفورز محصول PCR تایید کلونینگ قطعه B در جهت سنس با پرایمرهای روی پلاسمید. چاهک کنار مارکر پلاسمید خالی و چاهک‌های بعدی PCR از استخراج پلاسمید نوترکیب حاوی قطعه B را نشان می‌دهد.

Figure 2. A: Gel electrophoresis of PCR results for amplification of the beginning and end of the *MSI4* gene. fragment A with 300 bp and fragment B with 200 bp. B: Schematic figure of the entrances place for A and B fragments in sense direction before the intron and after the promoter. C: Gel electrophoresis of PCR results with primers on the plasmid confirms that B fragment was cloned in sense direction into plasmid. The well just next to the marker is empty plasmid and subsequent wells are the recombinant plasmids.

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-12-08]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.2.5.0]



شکل ۳– الف: سازه RNAi که شامل راه‌انداز، قطعه B ژن *MSI4* در جهت Sense، Intron و همان قطعه ژن در جهت Antisense است. ب: تایید ورود رشته آنتی-سنس که وجود قطعه‌ی ۱۰۰۰ جفت‌باز صحت کار را نشان می‌دهد. ج: تایید ورود رشته‌ی آنتی‌سنس با روش برش آنزیمی.

Figure 3. A: The RNAi construct which includes the promoter, the B fragment of *MSI4* gene in the sense direction, the intron, and the gene in the antisense direction. B: Confirmation of the entry of the antisense sequence, which indicates the existence of an 1000 bp. C: Confirmation of the entry of antisense sequence by enzymatic digestion method.

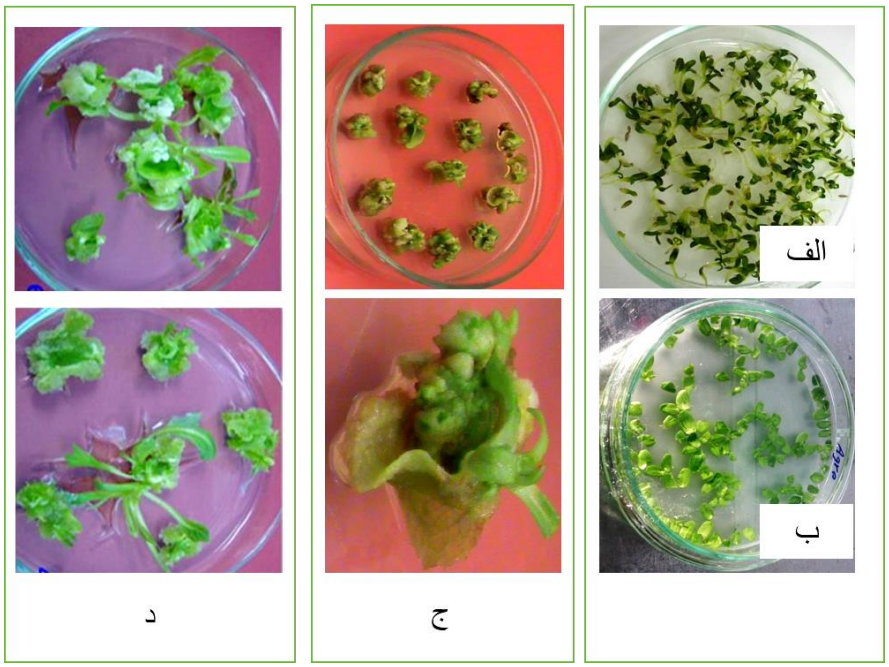
در ادامه کار با توجه به قسمت مواد و روشها مرحله دوم کلونینگ انجام و قطعه B مجددا تکثیر و به همراه پلاسمید حاصل از کلونینگ قبلی یعنی pFGC5941B با آنزیمهای *Xba*I و *Bam*HI برش یافت. پس از جداسازی از ژل LMP و خالص سازی، لیگاسیون بین آنها انجام گرفت (شکل ۳ الف) و محصول لیگاسیون به روش الکتروپوراسیون به باکتری *E. coli* انتقال داده شد. گزینش باکتری حاوی وکتور نوترکیب روی محیط دارای کانامایسین انجام و از دو روش برای تایید ورود قطعه در جهت آنتی‌سنس به وکتور استفاده شد: ۱) به روش PCR با پرایمرهای روی پلاسمید که باند مورد نظر حدوداً به اندازه 1000 bp در شکل (۳ ب) دیده می‌شود و این پرایمرها روی پلاسمید خالی باند ۷۵۰ جفت باز نتیجه می‌دهند ۲) به روش برش با آنزیم *Xho*I که باند مورد نظر به اندازه 1790 bp در شکل (۳ ج) نشان داده شده است. بخاطر ورود قطعه در جهت آنتی سنس سایت برشی آنزیم *Xho*I در انتهای آن ایجاد شده و در اثر برش با این آنزیم قطعه مورد نظر خارج شده است. توالی‌یابی پلاسمید نوترکیب حاصل در انستیتو IBMP-Strasbourg-France انجام و بررسی توالی های حاصل درستی توالی همسانه سازی قطعه B را در دوجهت تائید کرد.

تراریزش کاهو با پلاسمید نوترکیب pFGC5941BB حاوی سازه سنجاق سری *MSI4* به کمک آگروباکتریوم

پلاسمید pFGC5941BB نوترکیب بعد از اینکه در هر دو جهت sense و antisense توسط PCRها و توالی‌یابی تائید شد، به روش الکتروپوراسیون به سلول‌های آگروباکتریوم منتقل شد. سلول‌های آگروباکتریوم حاصل در محیط LB جامد همراه با آنتی‌بیوتیک‌های کانامایسین (عامل مقاومت روی پلاسمید pFGC5941) و ریفامپسین (عامل مقاومت خود آگروباکتریوم) رشد داده شدند. جهت تائید نهایی حضور سازه RNAi در آگروباکتریوم‌های ترانسفورم شده برای چند تک کلنی استخراج پلاسمید و سپس PCR انجام گرفت. برای PCR، از آغازگرهای جهت sense و از آغازگرهای جهت antisense، استفاده شد. از سویه آگروباکتریوم LB4404 برای تراریزش کاهو استفاده گردید.

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-12-08]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.2.5.0]

یک کلنی مثبت جهت ترانسفورماسیون گیاهان انتخاب شد. کوتیلدون‌های ٤ روزه کاهو (شکل٤-الف) جهت تلقیح با آگروباکتریوم حاوی پلاسمید نوترکیب pFGC5941BB استفاده شد (شکل٤ ب). گیاهان بعد از ۲۰ دقیقه هم کشتی در محیط MS مایع با سلول‌های آگروباکتریوم و دو روز قرارگیری در محیط هم‌کشتی، برای کالوس‌زایی در محیط MS غنی از هورمون و آنتی‌بیوتیک Cefotaxime برای حذف آگروباکتریوم قرار داده شدند. تقریباً بعد از دو هفته تمام ریزنمونه‌ها تولید کالوس کردند (شکل ٤-ج). بعد از دو هفته قرارگیری در محیط کالوس‌زایی، ریزنمونه‌ها به مدت چهار هفته در محیط حاوی عامل انتخاب‌گر درT-DNA، یعنی PPT و همچنین Cefotaxime برای اطمینان از عدم رشد آگروباکتریوم‌های باقیمانده برده شدند و جوانه‌زنی ریزنمونه‌ها که در برابر PPT مقاوم بودند آغاز و ادامه یافت (شکل٤-د). جوانه‌های حاصل به ترتیب ظهور جداسازی و شماره‌گذاری شدند و در محیط ریشه زایی قرار گرفتند. حداقل ۲ گیاه مستقل شماره گذاری و در شرایط درون شیشه‌ای نگهداری شدند. گیاهان حاصل (در سن چهار هفتگی برای آنالیزهای مولکولی استفاده شدند. همزمان با این ترانسفورماسیون در کاهو، به عنوان کنترل منفی، پلاسمید خالی pFGC5941 نیز با آگروباکتریوم سویه LB4404 به کاهو منتقل و گیاهان حاصل نگهداری شدند.



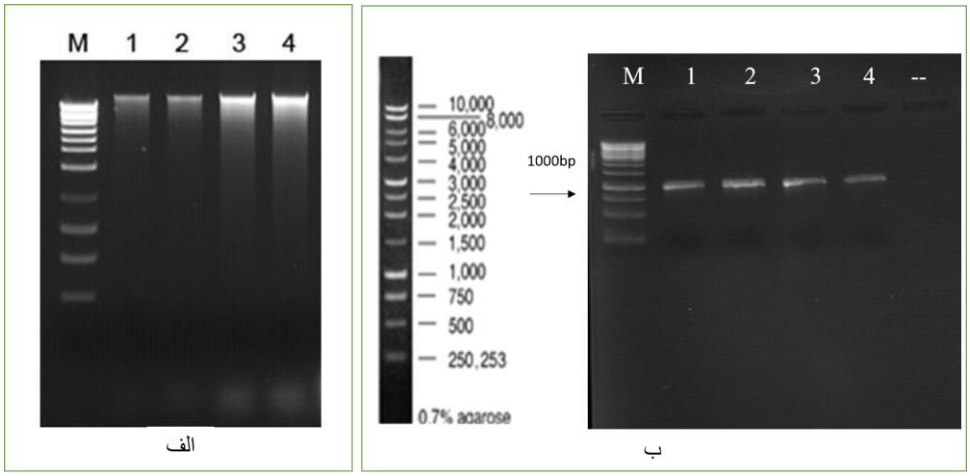
شکل ٤- الف: جوانه‌زنی بذرهای کاهو. ب: تلقیح کوتیلدون‌های ٤ روزه با آگروباکتریوم. ج: کالوس‌زایی و باززایی بعد از دو هفته. د: گیاهان تراریخت در محیط گزینشی.

Figure 4. A: Germination of lettuce seeds. B: Inoculation of 4-day cotyledons with Agrobacterium. A: Callus formation and regeneration after two weeks. D: Transgenic plants on a selective medium.

بررسی وجود ترانس ژن در DNA گیاهان حاصل

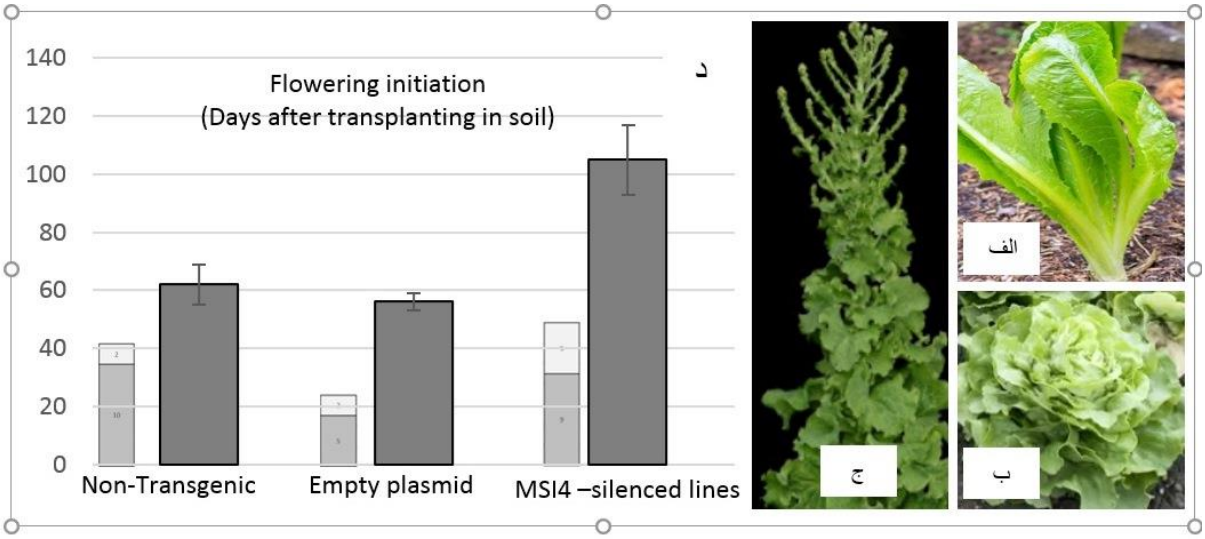
استخراج DNA ژنومی چند گیاه حاصل از محیط انتخاب‌گر، به روش CTAB انجام گرفت (شکل٥-الف). برای تائید وجود T-DNA پلاسمید Ti آگروباکتریوم در داخل ژنوم این گیاهان، از PCR با آغازگرهای پلاسمید برای قطعه کلون شده در جهت انتی سنس در پلاسمید استفاده شد (شکل٥-ب). نتیجه این PCR برای هر چهار DNA ژنومی گیاهان مثبت بود. بدین ترتیب وجود قطعه ژن *MSI4* در این گیاهان تائید شد.

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-12-08]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.2.5.0]



شکل ۵- الف: استخراج DNA گیاهان تراریخت با روش CTAB. ب: تایید حضور قطعه B در جهت آنتی سنس در T-DNA در DNA ژنومی گیاهان تراریخت.در چاهک‌های یک تا چهار وجود باند ۱۰۰۰ جفت باز درستی کار را تایید کرد.

Figure 5. A: DNA extraction of transgenic plants by CTAB method. B: Confirmation of the presence of fragment B in the genomic DNA of transgenic plants. In wells one to four, the presence of a band of 1000 bp Confirmed the correctness of the work.



شکل ٦- الف) گیاهان تراریخته کاهو دو هفته پس از انتقال به گلدان، ب) گیاهان پس از دوماه، ج) ظهور شاخه گلده، د) نمودار شروع ظهور شاخه گلده در گیاهان شاهد غیر تراریخت، تراریخت با پلاسمید خالی و تراریخت با سازه خاموشی MSI4. باکس های کمرنگ در هر تیمار نشان دهنده تعداد گیاهی که شروع به گلدهی کرده در پایین و پررنگ و تعداد گیاهی که گلدهی نکردند در بالا. به ترتیب غیر تراریخت ۱۰ از ۱۲، در تیمار پلاسمید خالی ۵ از ۷ و در تیمار خاموشی ۹ از ١٤ گیاه از تعداد کل، گلدهی را آغاز کردند. زمان استخراج DNA گیاهان تراریخت با روش CTAB. ب: تایید حضور قطعه B در جهت آنتی سنس در T-DNA در DNA ژنومی گیاهان تراریخت.در چاهک‌های یک تا چهار وجود باند ۱۰۰۰ جفت باز درستی کار را تایید کرد.

Figure 6. A) Lettuce transgenic plants two weeks after transplanting on soil. B) plants after 2 months. C) Bolting stage of a plant. D) Flowering initiation time (days after transplanting on soil) boxes show number of plant starting to flower (below) and not-starting to flower (above)

بررسی زمان گلدهی گیاهان تراریخته کاهو

گیاهان تراریخته حاصل به گلدانهای حاوی پیت ماس منتقل وپس از سازگار شدن در گلخانه نگهداری شدند (شکل ٦ الف) و شرایط دوره نوری روز بلند ١٦ ساعت نور در شبانه روز برای آنها اعمال شد. گیاهان هر هفته یکبار با محیط کشت مایع MS با غلظت نصف آبیاری شدند و رشد رویشی خوبی داشتند (شکل ٦

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-12-08]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.2.5.0]

ب). دو ماه بعد شرایط دمایی از ۲٤ به ۳۰ درجه سانتیگراد افزایش یافت و تقریبا ٤ ماه پس از انتقال به گلدان شاخه گلده در گیاهان غیر تراریخت وهمچنین تراریخت شاهد با پلاسمید خالی ظاهر و بلند شد (شکل ٦ ج). روز انتقال به گلدان روز اول حساب شده و تاریخ ظهور شاخه گلده از مرکز گیاه و وسط برگها یادداشت برداری شد.

نتایج نشان داد که گیاهان تراریخته با سازه خاموشی ژن MSI4 حدود یک ماه و نیم دیرتر از گیاهان شاهد وتراریخت با پلاسمید خالی شروع به گلدهی کردند (شکل٦-د). این تاخیر درگلدهی با توجه به وجود شاهد غیرتراریخت وشاهد تراریخت با پلاسمید خالی فقط می‌تواند مربوط به کارایی سازه خاموشی MSI4 باشد چون در بیش از نصف گیاهان تراریخت مستقل که محل ورود تصادفی T-DNA در آنها متفاوت بود این دیرگلدهی مشاهده شد. به نظر میرسد این یک ماه ونیم تاخیر در گلدهی بواسطه خاموشی ژن هومولوگ MSI4 در کاهو یک صفت خوبی برای تولید بیشتر برگ و بیوماس بالا باشد وفرصت کافی را برای اتمام فصل به گیاه میدهد. با توجه به اینکه در کشت کاهو در مزارع، یک و ماه نیم تاخیر در گلدهی مصادف با اواخر فصل می باشد بنابراین هوای محیط نیز به طرف سردی پیش خواهد یافت و احتمالا در مزرعه این سرمای آخر فصل باعث افزایش دیرگلدهی در این گیاهان تراریخت خواهد شد که ادامه تحقیق و مشاهدات را می طلبد.

زمان گلدهی از فاکتورهای اساسی در میزان و کیفیت محصول گیاهان محسوب می‌شود. در محصولات برگی به عنوان مثال کاهو، کلم و چغندر قند یا محصولات علوفه ای ایجاد ساقه گل‌دهنده و گلدهی زود هنگام می‌تواند کمیت وکیفیت محصول را محدود کند یا تداخل با عملیات برداشت محصول داشته باشد. با توجه به اطلاعات موجود ترتیب توالی پروتئینهای همولوگ MSI در یوکاریوتها و بین تک لپه ها و دولپه ها حفاظت بالای دارد که همولوگ پروتئین‌های رتینوبلاستومای انسانی هستند و این نوع پروتئین‌ها در تغییرات هیستونی وتجمع کروماتینی نقش ایفا می‌کنند. همان طور که قبلا هم اشاره شد در سال ۱۹۹۷ پنج نوع مشابه ژن MSI تشخیص داده شده (Ach *et al.*, 1997; Kenzior and Folk 1998; Hennig *et al.*, 2003) که با توجه به مقایسه توالی آمینو اسید های آن نشان می‌دهد که پروتئین‌های AtMSI1، AtMSI2، AtMSI3 و RbAp48، RbAp46 انسانی در بین گیاهان و انسان به شدت حفاظت شده‌اند(Ach *et al.*, 1997). تا به حال مطالعات بر روی MSI1 صورت گرفته که نشان می‌دهد که این پروتئین با کمپلکس CAF، FIS و کمپلکس‌های PCG مانند MEDEA تعامل دارد همچنین در نمو بذر و مرحله گامتوفیت ایفای نقش می‌کند و به صورت اپی‌ژنتیک در روی کروماتین SOC1 وارد عمل می‌شود (Bouveret *et al.*, 2006). با استفاده از ترکیب روشهای ژنتیکی، مولکولی، هیستولوژی، اثرات پلیوتروپی موتانت‌های MSI4 که استفاده شد نشان می‌دهد که این ژن در تمام سلولها حضور دارد همولوگ این ژن در موجودات دیگر مثل انسان (RbAp46/48)، مگس سرکه (P55)، برنج (osFVE) و همچنین در مورد ارتولوگ FVE در ذرت که ZmkbAP1 نام دارد تحقیقاتی انجام شده و میانکنش آن با پروتئین رتینوبلاستوما بررسی شده است. توالی این همولوگ ها که فقط در چند اسید امینه تفاوت دارد یافت شده است (Humphrey *et al.*, 2001; Hennig *et al.*, 2003). در واقع پروتئین MSI4 از یک طرف با یک سیستم تجزیه کننده پروتئین ها وابسته به یوبی- کوئیتیناسیون در کمپلکس CUL4-DDB1 در ارتباط است که همچون پلی عمل کرده و باعث ایفای نقش این کمپلکس تجزیه کننده پروتئین ها در روی هیستون ها می‌شود (Pazhouhandeh *et al.*, 2011). با اینکه تاکنون اطلاعات زیادی در مورد مکانیسم مولکولی انتقال از مرحله رویشی به زایشی کاهو در دست نیست ولی اخیرا کارهای زیادی در این زمینه انجام شده است. در مطالعه‌ای با خاموش کردن ژن FT توسط RNA تداخلگر به طور چشمگیری باعث تاخیر در گلدهی کاهو شدند (Chen *et al.*, 2018). همچنین از طریق خاموش کردن ژن LsSOC1 توسط RNA تداخلگر باعث تاخیر در گلدهی کاهو شدند (Zhao *et al.*, 2018). در مطالعه‌ای دیگر گزارش شده است که از دست دادن عملکرد ژن HOS15 باعث گلدهی زودرس تحت شرایط روز بلند می‌شود (Park *et al.*, 2019).

بر پایه مکانیسم ژنی کشف شده در گیاه مدل آرابیدوپسیس، با خاموش کردن ژن MSI4 اثر ممانعتی از روی ژن FLC برداشته

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-12-08]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.2.5.0]

شده و بدلیل کلیدی بودن ژن FLC که یک ممانعت کننده در شبکه تنظیمی گلدهی محسوب می‌شود در این صورت گیاهان حاصل دیر گلده خواهند شد و افزایش در بیوماس را در پی خواهد داشت در همین راستا ما با استفاده از تکنیک مدرن RNA silencing با استفاده از همسانه سازی قطعه کوچک ۲۰۰bp از ژن MSI4 در وکتور خاموشی pFGC5941 ، این وکتور نوترکیب سنجاق سری (hp) توسط آگروباکتریوم به روش کشت بافت به ریزنمونه‌های کوتیلدونی کاهو تراریزش شد و گیاهان حاصل در محیط گزینشی حاوی علف کش بستا انتخاب شدند. پس از رونویسی سازه سنجاق سری قطعه MSI4 از روی T-DNA وارد شده در این گیاهان، توسط آندونوکلئازهای بنام DCL (dicer-like) به تعداد زیاد siRNA های ۲۱ نوکلئوتیدی این قطعه تولید شده و در کمپلکس بزرگی بنام RNA induced Silencing complex (RISC) جای گرفته تا اینکه در صورت وجود mRNA ژن MSI4 یا همولوگ‌های آن در مرحله پس از رونویسی با مکمل شدن و با استفاده از خاصیت RNase H باعث شکستن mRNAی گیاهی مشابه ومکمل می‌گردد و در نتیجه خاموشی این ژن در گیاه در این صورت ژن FLC فعال شده و از گلدهی ممانعت به عمل می آورد.

منابع

Ach RA, Taranto P, & Gruissem W. (1997). A conserved family of WD-40 proteins binds to the retinoblastoma protein in both plants and animals. The Plant Cell, 9(9), 1595-1606.

Ausín I, Alonso-Blanco C, Jarillo JA, Ruiz-García L, & Martínez-Zapater JM. (2004). Regulation of flowering time by FVE, a retinoblastoma-associated protein. Nature genetics, 36(2), 162-166.

Bastow R, Mylne JS, Lister C, Lippman Z, Martienssen R A, & Dean C. (2004). Vernalization requires epigenetic silencing of FLC by histone methylation. Nature, 427(6970), 164-167.

Bäurle I, & Dean C. (2006). The timing of developmental transitions in plants. Cell, 125(4), 655-664.

Boss PK, Bastow R M, Mylne J S, & Dean C. (2004). Multiple pathways in the decision to flower: enabling, promoting, and resetting. The Plant Cell, 16(suppl 1), S18-S31.

Bouveret R, Schönrock N, Gruissem W, & Hennig L. (2006). Regulation of flowering time by Arabidopsis MSI1. Development, 133(9), 1693-1702.

Chen Z, Han Y, Ning K, Ding Y, Zhao W, Yan S, ... & Wang Q. (2018). Inflorescence development and the role of LsFT in regulating bolting in lettuce (Lactuca sativa L.). Frontiers in plant science, 8, 2248.

He Y, & Amasino R M. (2005). Role of chromatin modification in flowering-time control. Trends in plant science, 10(1), 30-35.

Hennig L, Bouveret R, & Gruissem W. (2005). MSI1-like proteins: an escort service for chromatin assembly and remodeling complexes. Trends in cell biology, 15(6), 295-302.

Hennig L, Taranto P, Walser M, Schönrock N, & Gruissem W. (2003). Arabidopsis MSI1 is required for epigenetic maintenance of reproductive development. Development, 130(12), 2555-2565.

Hennig L, Taranto P, Walser M, Schönrock N, & Gruissem W. (2003). Arabidopsis MSI1 is required for epigenetic maintenance of reproductive development. Development, 130(12), 2555-2565.

Huang J, Pray C, & Rozelle S. (2002). Enhancing the crops to feed the poor. Nature, 418(6898), 678-684.

Humphrey GW, Wang Y, Russanova VR, Hirai T, Qin J, Nakatani Y, & Howard BH. (2001). Stable histone deacetylase complexes distinguished by the presence of SANT domain proteins CoREST/kiaa0071 and Mta-L1. Journal of Biological Chemistry, 276(9), 6817-6824.

Kardailsky I, Shukla VK, Ahn JH, Dagenais N, Christensen SK, Nguyen JT, ... & Weigel D. (1999). Activation tagging of the floral inducer FT. Science, 286(5446), 1962-1965.

Kenzior AL, & Folk WR. (1998). AtMSI4 and RbAp48 WD-40 repeat proteins bind metal ions. FEBS letters, 440(3), 425-429.

Kim DH, Doyle MR, Sung S, & Amasino R M. (2009). Vernalization: winter and the timing of flowering in plants. Annual Review of Cell and Developmental, 25, 277-299.

Kim HJ, Hyun Y, Park JY, Park M J, Park MK, Kim MD, ... & Kim J. (2004). A genetic link between cold responses and flowering time through FVE in Arabidopsis thaliana. Nature genetics, 36(2), 167-171.

Lee I, Aukerman M J, Gore SL, Lohman KN, Michaels SD, Weaver LM, ... & Amasino RM. (1994). Isolation of LUMINIDEPENDENS: a gene involved in the control of flowering time in Arabidopsis. The Plant Cell, 6(1), 75-83.

Li D, & Roberts R. (2001). Human Genome and Diseases: WD-repeat proteins: structure characteristics, biological function, and their involvement in human diseases. Cellular and Molecular Life Sciences CMLS, 58(14), 2085-2097.

Macknight R, Bancroft I, Page T, Lister C, Schmidt R, Love K, ... & Dean C. (1997). FCA, a gene controlling flowering time in Arabidopsis, encodes a protein containing RNA-binding domains. Cell, 89(5), 737-745.

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-12-08]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.2.5.0]

Michaels SD, & Amasino RM. (1999). FLOWERING LOCUS C encodes a novel MADS domain protein that acts as a repressor of flowering. The Plant Cell, 11(5), 949-956.

Neer E J, Schmidt CJ, Nambudripad R, & Smith TF. (1994). The ancient regulatory-protein family of WD-repeat proteins. Nature, 371(6495), 297-300.

Noh B, Lee SH, Kim HJ, Yi G, Shin EA, Lee M, ... & Noh YS. (2004). Divergent roles of a pair of homologous jumonji/zinc-finger–class transcription factor proteins in the regulation of Arabidopsis flowering time. The Plant Cell, 16(10), 2601-2613.

Park HJ, Baek D, Cha JY, Liao X, Kang SH, McClung CR, ... & Kim WY. (2019). HOS15 interacts with the histone deacetylase HDA9 and the evening complex to epigenetically regulate the floral activator GIGANTEA. The Plant Cell, 31(1), 37-51.

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. Proceedings of the national Academy of Sciences, 108(8), 3430-3435.

Putterill J, Laurie R, & Macknight R. (2004). It's time to flower: the genetic control of flowering time. Bioessays, 26(4), 363-373.

Schomburg FM, Patton DA, Meinke DW, & Amasino RM. (2001). FPA, a gene involved in floral induction in Arabidopsis, encodes a protein containing RNA-recognition motifs. The Plant Cell, 13(6), 1427-1436.

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. The Plant Cell, 11(3), 445-458.

Simpson GG. (2004). The autonomous pathway: epigenetic and post-transcriptional gene regulation in the control of Arabidopsis flowering time. Current opinion in plant biology, 7(5), 570-574.

Sung S, & Amasino RM. (2004). Vernalization in Arabidopsis thaliana is mediated by the PHD finger protein VIN3. Nature, 427(6970), 159-164.

Turck F, Roudier F, Farrona S, Martin-Magniette ML, Guillaume E, Buisine N, ... & Colot V. (2007). Arabidopsis TFL2/LHP1 specifically associates with genes marked by trimethylation of histone H3 lysine 27. PLoS Genet, 3(6), e86.

Van Nocker S, & Ludwig P. (2003). The WD-repeat protein superfamily in Arabidopsis: conservation and divergence in structure and function. BMC genomics, 4(1), 50.

Weigel D, Ahn JH, Blázquez MA, Borevitz JO, Christensen SK, Fankhauser C, ... & Nguyen JT. (2000). Activation tagging in Arabidopsis. Plant physiology, 122(4), 1003-1014.

Zhao W, Chen Z Ge D, Han Y, Ning K, Luo C, ... & Wang Q. (2018). LCM-seq reveals the crucial role of LsSOC1 in heat-promoted bolting of lettuce (Lactuca sativa L.). The Plant Journal, 95(3), 516-528.

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-12-08]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.2.5.0]

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 9, Number 2
2021

Delayed flowering in lettuce using MSI4 gene silencing by RNAi

Mohammad Manzari-Fallah, Maghsoud Pazhouhandeh* and Mona Bordbar

Biotechnology Department, Agriculture Faculty, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, IRAN

*Corresponding Author, Email: pazhouhandeh@gmail.com

Abstract

Late flowering in lettuce produces additional leaves and maintains the edible quality of its product. Control of flowering time in plants is vital for plant fitness and for agricultural purposes and is an important factor in successful reproduction and seed crop yield and depends on the environmental and internal parameters of the plant and it is controlled by the regulatory network of genes. One of the problems in the field of crops and horticulture is the mismatch of flowering time with favorable environmental conditions. by increase in population, it is necessary to produce efficient plants with higher biomass. In the flowering regulatory network, Flowering Locus C (FLC), a MADS box transcription factor, prevents flowering. The autonomous pathway accelerates the onset of flowering independently of daylight by suppressing FLC. The MSI4/FVE gene is a key gene in the autonomous pathway. It is involved in controlling cell proliferation and early differentiation, organ growth and plays a key role in accelerating flowering by reducing the expression of FLC gene via epigenetic changes. in this study, using the RNA Silencing technique, MSI4/FVE gene expression was repressed at post transcriptional level. To this end, first, the tissue culture of lettuce in MS culture medium was optimized using BAP, Kinetin and NAA hormones for direct regeneration from cotyledon and leaf explants. The MS medium containing 0.1 mg/l NAA and 0.01 mg/l BAP has the highest regeneration rate for cotyledon explants. Then, for construction of silencing hairpin construct, a fragment of *Arabidopsis thaliana MSI4* gene was amplified by PCR and then cloned in sense and in antisense directions into pFGC5941 vector by two consecutive cloning. The hairpin structure in this recombinant vector was then transferred to the lettuce plant by Agrobacterium. The obtained transgenic plants were tested by PCR to confirm the presence of the transgene and the study on the flowering phenotype of these transgenic plants showed that the silencing of MSI4 in lettuce caused the plant to flower late (about 1.5 months delay) and produce additional leaves.

Kay words: Flowering time, *Lactuca sativa*, MSI4/FVE, RNA Silencing

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-12-08]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.2.5.0]