

مقایسه توالی پیشبر ژن‌های کنترل گل‌دهی، *FTI* و سه نسخه از ژن *VIN3* در ژنوتیپ‌های چغندر قند حساس و مقاوم به بولتینگ

آزاده سوری^۱، اصغر میرزائی اصل^{۲*}، لایلا خدائی^۳ و محمدرضا عبداللهی^۴

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی‌سینا، همدان

۲- دانشیار، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی‌سینا، همدان

۳- استادیار، گروه کشاورزی، دانشگاه پیام نور، تهران

۴- دانشیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی‌سینا، همدان

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۷/۲۶ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۰/۲۹

چکیده

کشت پاییزه چغندر قند به‌عنوان کشت مناسب در کشاورزی پایدار به‌شمار می‌رود. ساقه‌روی چغندر قند در سال اول کشت (بولتینگ) پدیده نامطلوبی است که موجب کاهش عملکرد چغندر قند می‌شود و مهم‌ترین عامل محدودکننده در کشت پاییزه است. شناسایی و مقایسه توالی ژن‌های گل‌دهی در ژنوتیپ‌های مختلف می‌تواند به درک کنترل مولکولی بولتینگ کمک کند. در پژوهش‌های پیشین، مشخص شده است که میزان بیان ژن‌های *FTI* و *VIN3* در چغندر قند با صفت مقاومت به بولتینگ در ارتباط است. در این تحقیق، توالی پیشبر ژن *FTI* و توالی پیشبر سه نسخه از ژن *VIN3* مربوط به گیاه چغندر قند، در سه ژنوتیپ مقاوم به بولتینگ و سه ژنوتیپ حساس به بولتینگ مورد مقایسه قرار گرفت. طراحی آغازگرهای مربوط به هر ژن با استفاده از توالی‌های DNA موجود در پایگاه NCBI انجام شد. از گیاهان کشت شده در گلدان، نمونه‌های برگ‌گی تهیه و DNA آنها استخراج شد و به‌عنوان الگو در واکنش PCR مورد استفاده قرار گرفت. قطعات تکثیر شده، در حدود ۱۰۰۰ جفت‌باز برای هر پیشبر ژن، در ژنوتیپ‌های حساس و مقاوم به بولتینگ که از نظر طول توالی پیشبر مشابه بودند، برای بررسی دقیق‌تر توالی‌یابی شدند. در پیشبر ژن *FTI* جهشی شناسایی نشد اما، در پیشبر سه نسخه از ژن *VIN3* تعداد ۶۲۴ جهش از نوع جهش جایگزینی و جهش حذف و اضافه مشاهده شد. در پیشبر ژن *VIN3-like1*، ناحیه حذف و اضافه‌ای به طول ۲۲۸ جفت‌باز شناسایی شد. این ناحیه عناصر پیشبر داشته و به‌نظر می‌رسد عملکرد کنترلی دارد. مقایسه جهش‌های شناسایی شده بین ژنوتیپ‌های حساس و مقاوم الگوی متمایزی برای صفت بولتینگ نشان نداد.

واژگان کلیدی: بولتینگ، پیشبر، جهش، چغندر قند، *FTI*، *VIN3*

* نویسنده مسئول، آدرس پست الکترونیکی: a.mirzaie@basu.ac.ir

مقدمه

چغندر قند (*Beta vulgaris* L. ssp. *vulgaris*) یک محصول تجاری عمده است که به علت غلظت بالای ساکارز خود، به منظور تولید قند کشت می‌شود و حدود ۱۵ درصد شکر جهان را تأمین می‌کند (FAO, 2102). چغندر قند زراعی گیاهی دوساله است که در فصل بهار کشت می‌شود. در سال اول دارای رشد رویشی بوده و ریشه‌ی ذخیره‌ای حاوی مواد غذایی تولید می‌نماید که در پاییز همان سال برداشت می‌گردد. برای القاء ساقه‌دهی (بولتینگ) و ورود به مرحله زایشی در سال دوم، نیاز به سرمای ۱۰-۲ درجه سانتی‌گراد تحت شرایط روز بلند دارد که به بهاره‌سازی معروف است (Boudry et al., 2002). در بعضی مناطق سردسیر، سرمای نابهنگام بهاره موجب القای گلدهی در ژنوتیپ‌هایی می‌شود که نیاز سرمای کمتری برای بهاره‌سازی دارند. ریشه‌ی بوته‌های به ساقه رفته، ساکارز خود را از دست داده و به شدت خشبی می‌گردند.

کشت پاییزه چغندر قند نیاز به آبیاری کمتری دارد، هم‌چنین از آن‌جایی که ذخیره‌سازی قند در ریشه چغندر قند تا زمان ساقه‌روی ادامه می‌یابد، یکی از راه‌های افزایش دوره رشدی چغندر کشت پاییزه آن می‌باشد که این امر مستلزم کنترل بولتینگ و کشت چغندرهایی است که بدون ساقه‌روی قادر به رشد در این فصول باشند (Abou-Elwafa et al., 2011).

گیاه آرابیدوپسیس تالیانا به دلیل مشخص بودن مسیرهای گلدهی آن یک گیاه مدل در بسیاری از مطالعات مرتبط با گلدهی به شمار می‌رود. در گیاهان، مکانیسم کنترل گلدهی به‌ویژه در دولپه‌ای‌ها مشابه است. صفت گلدهی توسط دو فاکتور ژنتیکی و اپی‌ژنتیکی تنظیم می‌شود (Jung and Müller, 2009). در این گیاه، یک سری تغییرات در سطح بیان ژن‌های گلدهی وابسته به محیط و مسیرهای داخلی گلدهی به صورت همگرا اتفاق می‌افتد که باعث تنظیم ژن‌های گلدهی می‌گردد، از جمله این ژن‌ها می‌توان *FT*، *SOC* و *AGL24* را نام برد (Kim et al., 2004). برای اطمینان از زمان بهینه گلدهی، گیاهان از

مسیرهای مشخصی برای بیان ژن‌های گلدهی استفاده می‌کنند. از اجزای اصلی این مسیرها دو ژن مهم تنظیم کننده زمان گلدهی یعنی *FT* و *FLC* می‌باشند (Sheldon et al., 2000; Johanson et al., 1999). ژن *FLC* یک پروتئین متصل‌شونده به DNA از خانواده MADS-box را کد می‌کند که به عنوان بازدارنده رونویسی عمل می‌کند. پروتئین *FLC* به صورت مستقیم به قسمت‌های پائین دست ژن‌های گلدهی از جمله *FT*، *FD* و *SOC1* متصل شده و مانع رونویسی آن‌ها می‌شود و از انتقال گیاه به فاز رویشی جلوگیری می‌کند (Helliwell et al., 2006; Searle et al., 2006). بنابراین می‌توان گفت *FLC* به عنوان یک سرکوبگر گلدهی عمل می‌کند و زمانی که بیان آن بالا باشد، گلدهی حتی در روزهای بلند نیز سرکوب می‌گردد. پس سطح بیان بالای *FLC* مسئول نیاز به بهاره‌سازی در آرابیدوپسیس می‌باشد (Sheldon et al., 2000; Johanson et al., 1999). بهاره‌سازی منجر به یک سری از تغییرات هیستونی در کروماتین *FLC* می‌شود که شامل داستیلاسیون هیستون مرکزی، دمیتلاسیون لیزین ۴ هیستون ۳ و دی و تری متیلاسیون لیزین ۲۷ هیستون ۳ می‌باشد. این تغییرات سرکوب کننده، باعث تغییر کروماتین ژن *FLC* فعال به یک حالت هتروکروماتینی می‌شود، در نتیجه بیان *FLC* طی سرما و بعد از ظهور سرمای طولانی سرکوب می‌گردد (Henderson and Dean, 2004). به طور طبیعی بیان *FLC* توسط تیمار بهاره‌سازی مهار می‌شود و به محض این که محرک سرما برداشته شود، این خاموشی در طی نمو حفظ شده و فقط در نسل بعدی و بعد از میوز این خاموشی برداشته می‌شود که نشان‌دهنده سرکوب اپی‌ژنتیکی *FLC* است. تیمار سرما سرکوبگر مؤثری برای *FLC* است. در اکوتیپ‌های دیر گل دهنده، قرار گرفتن در معرض دماهای پایین در مرحله گیاهچه، *FLC* را سرکوب می‌کند و گل‌دهی را سرعت می‌بخشد (Blázquez et al., 2001). بهاره‌سازی در گیاهان عمدتاً به دو ژن غالب *frigida* و *FLC* نیاز دارد (Michaels and Amasino, 1999; Johanson et al., 2000; Strange et al., 2011). فعالیت

که تاکنون عملکرد بیوشیمیایی آن ناشناخته مانده است (Kardailsky *et al.*, 1999; Kobayashi *et al.*, 1999). ژن *FT* اولین بار به‌عنوان ترکیبی از مسیر دوره نوری شناخته شد که منجر به شروع گلدهی در پاسخ به افزایش طول روز می‌شود (Takada and Goto, 2003). تنظیم زمان گلدهی در چغندرقد توسط فعل و انفعالات دو پارالوگ از ژن *FT* صورت می‌گیرد (*BvFT1* و *BvFT2*). این دو ژن به صورتی تکامل یافته‌اند که دارای عملکردهای متضاد می‌باشند. عملکرد *FT2* توسط *FT1* محدود می‌شود که برای گلدهی ضروری می‌باشد. در مقابل آن *FT1* گلدهی را سرکوب می‌کند و یک تنظیم‌گر منفی مهم در پاسخ به بهاره‌سازی چغندرقد می‌باشد (Kardailsky *et al.*, 1999).

شناسایی ژن‌های کلیدی کنترل‌کننده گلدهی چغندرقد انجام شده (Shojaei *et al.*, 2017) و مقایسه توالی رونوشت برخی از ژن‌های کنترل‌کننده گلدهی نیز مورد بررسی قرار گرفته‌است (Alimirzaee *et al.*, 2015). هم‌چنین بیان برخی ژن‌های گلدهی در ژنوتیپ‌های حساس و مقاوم به بولتینگ مقایسه شده است (Hami, 2016; Hamzaei, 2016). نتایج به‌دست آمده از این پژوهش‌ها مبین افزایش بیشتر بیان ژن‌های *FT1* و *VIN3* در ژنوتیپ‌های مقاوم نسبت به ژنوتیپ‌های حساس به بولتینگ در معرض سرما است. شاید تفاوت بیان این ژن‌ها ناشی از تفاوت در توالی پیش‌بر آن‌ها باشد. در این پژوهش پیش‌بر ژن *FT1* و پیش‌بر سه نسخه از ژن *VIN3* در ژنوتیپ‌های حساس و مقاوم به بولتینگ مقایسه شدند.

مواد و روش‌ها

بذور ژنوتیپ‌های حساس به بولتینگ جلگه، ۹۵۹۷، ۷۱۱۲ و ارقام مقاوم به بولتینگ ویکو، پسودا، مونوتونا از موسسه اصلاح و تهیه بذر چغندرقد کرج تهیه شدند. این بذور در آبان ماه داخل گلدان‌های پلاستیکی در محل گلخانه دانشکده کشاورزی دانشگاه بوعلی‌سینا همدان کشت شدند. نمونه‌برداری از برگ‌ها در مراحل مختلفی از رشد گیاه (به‌دلیل عدم محدودیت زمانی و نمونه‌برگی) صورت گرفت. استخراج DNA به روش دوپل و دوپل

اصلی پروتئین FRIGIDA تنظیم بالادست رونویسی ژن *FLC* و افزایش بیان آن است و در نیاز بهاره‌سازی در آرابیدوپسیس یک‌ساله زمستانه عمل می‌کند (Michaelis and Amasino, 2001). در حالت طبیعی که هر دو ژن *frigida* و *FLC* به‌صورت فعال می‌باشند، گلدهی زودهنگام نیاز به بهاره‌سازی دارد (Koorneef *et al.*, 1991; Michaelis and Amasino, 2001). آرابیدوپسیس یک‌ساله زمستانه، تنظیم بیان *FLC* توسط مجموعه FRI، با افزایش میزان تری‌متیلاسیون لیزین ۴ هیستون ۳ و تری‌متیلاسیون لیزین ۳۶ هیستون ۳ و کاهش متیلاسیون لیزین ۹ هیستون ۳ در مکان *FLC* صورت می‌گیرد (Ding *et al.*, 2013).

یکی دیگر از ژن‌های مختص بهاره‌سازی، ژن *VIN3* می‌باشد. mRNA مربوط به این ژن، تنها پس از گذراندن دوره‌ی سرما ظاهر می‌شود و به‌طور تجمعی در طول دوره‌ی بهاره‌سازی افزایش می‌یابد و سریعاً پس از بازگشت به دوره‌ی گرما کاهش می‌یابد (Sung and Amasino, 2004). پروتئین *VIN3*، یک پروتئین حاوی موتیف PHD است (Sung *et al.*, 2006; Greb *et al.*, 2007). موتیف‌های PHD در پروتئین‌هایی که در تغییرات کروماتین و تشخیص برخی تغییرات هیستونی درگیرند، یافت می‌شوند (Mellor, 2006). پاسخ به بهاره‌سازی در آرابیدوپسیس به پروتئین‌های *VIN3* و *VRN2* نیاز دارد، به‌طوری‌که کاهش عملکرد این پروتئین‌ها منجر به کاهش اثر بهاره‌سازی و از بین رفتن کاهش بیان *FLC* پس از بهاره‌سازی می‌شود (Wood *et al.*, 2006). پروتئین *VIN3* همراه با PRC2 (مجموعه دارای متیل ترانسفراز لیزین ۲۷ هیستون ۳) سبب ایجاد یک‌سری تغییرات در کروماتین *FLC* در پاسخ به سرما می‌شود (Kim *et al.*, 2009). پروتئین *VIN3* برای متیلاسیون دو لیزین ۹ و ۲۷ هیستون ۳ (دو حالت مشخصه‌ی کروماتین غیرفعال) در کروماتین *FLC* که نهایتاً منجر به سرکوب آن می‌شود، لازم است (Bastow *et al.*, 2004; Sung and Amasino, 2004).

ژن Flowering Locus T یا *FT* در گیاهان، عضوی از خانواده پروتئینی با ساختار مشابه دمین‌های PEBP است

شد. محصول PCR در ژل آگارز یک درصد الکتروفورز شد. قطعات تکثیر شده برای تعیین توالی با روش سنگر، با آغازگرهای پیشرو و پسرو به شرکت بایونیر کره ارسال شدند. کیفیت توالی‌یابی نمونه‌ها مورد بررسی قرار گرفت و برخی نمونه‌ها، برای دستیابی به توالی‌یابی مطمئن و همپوشانی لازم برای خوانش دوطرفه، چندین بار توالی‌یابی شدند. بررسی نتایج حاصل از توالی‌یابی ناحیه پیشبر این ژن‌ها، جهت شناسایی جهش نقطه‌ای با استفاده از نرم‌افزار Lasergene (DNA Star, Inc, Madison, Wisconsin) صورت گرفت.

نتایج و بحث

مقایسه توالی پیشبر ژن *FTI*: با استفاده از آغازگرهای طراحی شده، امکان بررسی ۱۰۶۲ جفت‌باز از پیشبر ژن *FTI* در ژنوتیپ‌های چغندر قند فراهم شد. نتایج مقایسه اندازه این توالی در سه رقم مقاوم به بولتینگ ویکو، پسودا و مونوتونا و سه ژنوتیپ حساس ۷۱۱۲، ۹۵۹۷ و جلگه روی ژل آگارز تفاوتی نشان نداد (شکل ۱). هم‌چنین با مقایسه توالی به اندازه ۹۷۰ جفت‌باز پیشبر ژن *FTI* در ۶ ژنوتیپ و توالی مرجع، هیچ‌گونه جهشی مشاهده نشد، که احتمالاً به دلیل اهمیت بیان این ژن است که ناحیه پیشبر آن به‌خوبی حفاظت شده است.

(Doyle and Doyle, 1987) و با استفاده از بافر استخراج CTAB صورت گرفت. کمیت DNA بر اساس جذب نوری با دستگاه اسپکتروفوتومتر و کیفیت آن با مشاهده نوارهای مربوطه در ژل الکتروفورز بررسی شد.

با استفاده از توالی ژن‌های *FTI*، *VIN3-like1*، *VIN3-like2* و *like2* در پایگاه NCBI، حدود ۱۰۰۰ جفت‌باز، بالاتر از نقطه آغاز رونویسی هر ژن به‌عنوان پیشبر در نظر گرفته شد (جدول ۱). سپس، آغازگرهای اختصاصی پیشبر ژن‌های مورد نظر با استفاده از نرم‌افزار primer blast بررسی شدند (جدول ۲) و در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز بر روی DNA نمونه گیاه مورد استفاده قرار گرفتند.

واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر تهیه شد که بافر PCR با غلظت 1X، dNTPmix با غلظت ۰/۲ میلی‌مولار، ۱/۵ میلی‌مولار MgCl₂، آغازگرهای پیشرو و پسرو هر کدام با غلظت ۰/۰۱ نانومول، DNA الگو با غلظت ۲۰ نانوگرم در میکرولیتر و آنزیم Pfu به مقدار دو واحد در این واکنش استفاده شد. در دستگاه ترموسایکلر، دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت سه دقیقه برای واسرشته‌سازی اولیه و هم‌چنین ۳۵ چرخه شامل واسرشته‌سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، اتصال آغازگرها در دمای ۵۶ درجه سانتی‌گراد، گسترش توالی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و در نهایت دمای ۷۲ درجه برای گسترش نهایی اعمال

جدول ۱- مشخصات ژن‌های *VIN3* و *FTI* چغندر قند در پایگاه NCBI

Table 1. Characteristics of *VIN3* and *FTI* sugar beet genes in NCBI

نام ژن	شماره کروموزوم	شماره بانک ژن	شماره ژن
Gene name	Chromosome number	Gene bank ID	Gene ID
<i>VIN3-like2-2</i>	8	NC_025819	104902403
<i>VIN3-like2</i>	1	NC_025812.1	104888402
<i>VIN3-like1</i>	8	NC_025819.1	104902166
<i>FTI</i>	9	NC_025820.2	104903949

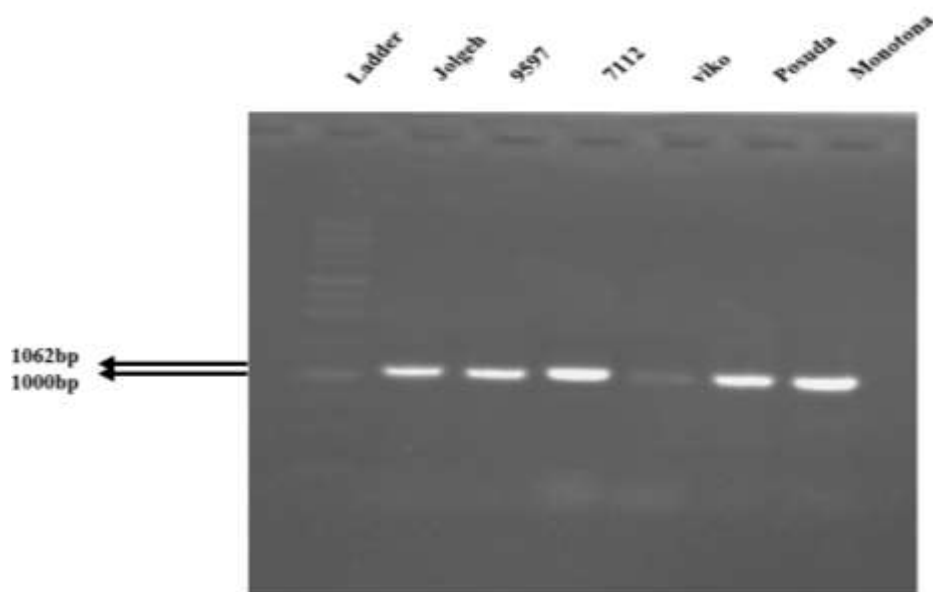
جدول ۲- مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز

Table 2. Characteristics of primers used in polymerase chain reaction

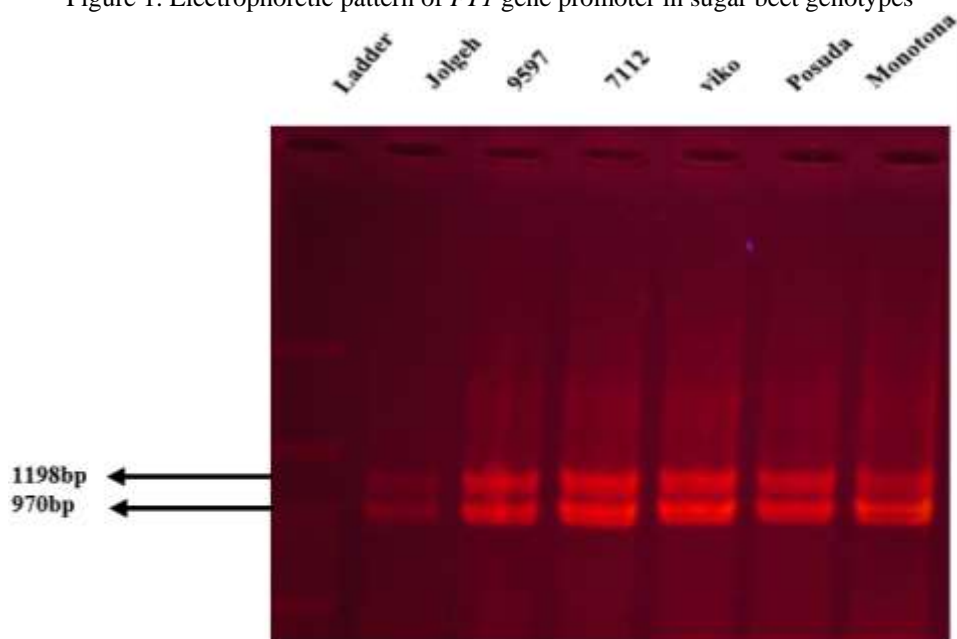
نام ژن	نام آغازگر	توالی آغازگر	دمای اتصال (°C)
Gene name	Primer name	Primer sequence	Annealing temperature(°C)
<i>FTI</i>	<i>MFT1F</i>	AGTTCAGTTCGGTGTGTGGT	60
	<i>MFT1R</i>	ATGGATCTCTGGCGCACTT	
<i>VIN3-like1</i>	<i>M1VIN3F</i>	TTGATGAGAGAGGCGCGTG	58
	<i>M1VIN3R</i>	GACTCCCCATGTCCTTTAGGC	
<i>VIN3-like2</i>	<i>M2VIN3F</i>	CCTTAATGGAAAGGAAGGAGCG	58
	<i>M2VIN3R</i>	AAGCGGCATGTCATCTT	
<i>VIN3-like2-2</i>	<i>M2VIN32F</i>	AGCCATAGAAAAGCGATGTCA	58
	<i>M2VIN32R</i>	GGGAGGACTGAGGAGCAAAG	

ژن، روی ژل آگارز تفاوتی نشان نداد. نتایج حاصل از توالی‌یابی برای هر کدام از نوارهای باز یابی شده از ژل با اندازه‌های ۱۰۶۹ و ۹۷۰ جفت‌باز، نشان‌دهنده تعدادی جهش نقطه‌ای در بین ژنوتیپ‌های حساس و مقاوم بود (جدول ۳). این جهش‌ها در بین ژنوتیپ‌های حساس و مقاوم الگوی متفاوتی نشان ندادند، بنابراین احتمالا ارتباطی با صفت مقاومت به بولتینگ ندارند (جدول ۳).

مقایسه توالی پیشبر ژن *VIN3-like1* در چغندر قند: با استفاده از آغازگر طراحی شده برای ناحیه پیشبر این ژن، امکان تکثیر ۱۱۹۸ جفت‌باز از توالی ژن *VIN3-like1* در ارقام چغندر قند فراهم شد. نتایج الکتروفورز محصول PCR دو نوار ۹۷۰ و ۱۱۹۸ جفت‌باز در ژنوتیپ‌ها نشان داد (شکل ۲). با تکرار PCR برای جفت آغازگر به کار رفته، هر دو نوار در همه ژنوتیپ‌ها مشاهده گردید، اما در سه رقم حساس و سه رقم مقاوم طول توالی پیشبر این



شکل ۱- الگوی الکتروفورزی پیشبر ژن *FTI* در ژنوتیپ‌های چغندر قند
Figure 1. Electrophoretic pattern of *FTI* gene promoter in sugar beet genotypes



شکل ۲- الگوی الکتروفورزی پیشبر ژن *VIN3-like1* در ژنوتیپ‌های چغندر قند
Figure 2. Electrophoresis pattern of *VIN3-like1* gene promoter in sugar beet genotypes

جدول ۳- مشخصات جهش در پیشبر ژن *FTI* و نسخه های مختلف ژن *VIN3* در ژنوتیپ‌های جلگه، ۷۱۱۲، ۹۵۹۷، ویکو، پسودا و مونوتونا در چغندر قند

Table 3. Mutation characteristics of *FTI* gene promoters and different versions of *VIN3* gene promoter in Jolgeh, 7112, 9597, Vico, Pseudo and Monotuna genotypes of sugar beet

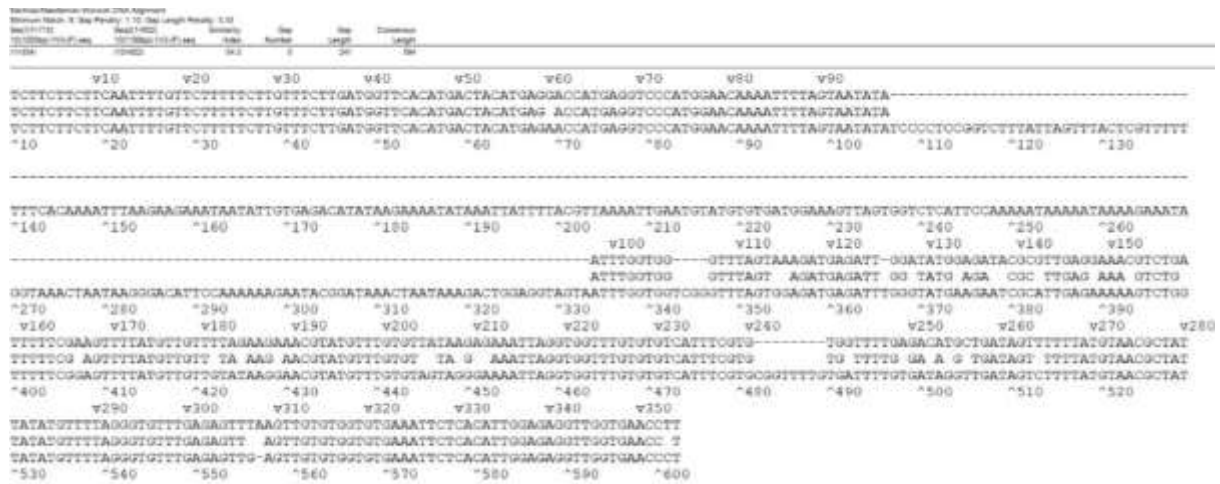
نام ژن Gene name	انواع جهش Types of mutations		
	حذف و اضافه Deletion and insertion	جایگزینی هم جنس Homogeneous substitution	جایگزینی غیر هم جنس Homogeneous substitution
	<i>FTI</i>	0	0
<i>VIN3</i> -like1 (970 bp)	83	55	83
<i>VIN3</i> -like1 (1198 bp)	4	18	42
<i>VIN3</i> -like2	49	59	73
<i>VIN3</i> -like2-2	42	38	78

عملکرد پیشبر ژن *VIN3*-like1 نقش تنظیمی داشته باشد، اما به دلیل حضور این قطعه به صورت هتروزیگوت در ژنوتیپ‌های حساس و مقاوم مورد بررسی، به نظر نمی‌رسد ارتباطی با مقاومت به بولتینگ داشته باشد.

مقایسه توالی پیشبر ژن *VIN3*-like2 و *VIN3*-like2-2
در چغندر قند: با استفاده از آغازگر طراحی شده برای ژن‌های *VIN3*-like2 و *VIN3*-like2-2 به ترتیب امکان تکثیر ۱۰۲۷ و ۱۱۴۷ جفت‌باز از ناحیه پیشبر این دو ژن فراهم شد. با استفاده از آزمون PCR و تکنیک الکتروفورز، طول توالی پیشبر هر کدام از این دو ژن به تفکیک در سه رقم مقاوم ویکو، پسودا و مونوتونا و سه ژنوتیپ حساس جلگه، ۷۱۱۲ و ۹۵۹۷ مورد بررسی قرار گرفت. اندازه قطعه تکثیر شده برای هر کدام از پیشبر ژن‌ها در ژنوتیپ‌های مختلف در ژل آگارز یکسان بود (شکل ۴ و ۵).

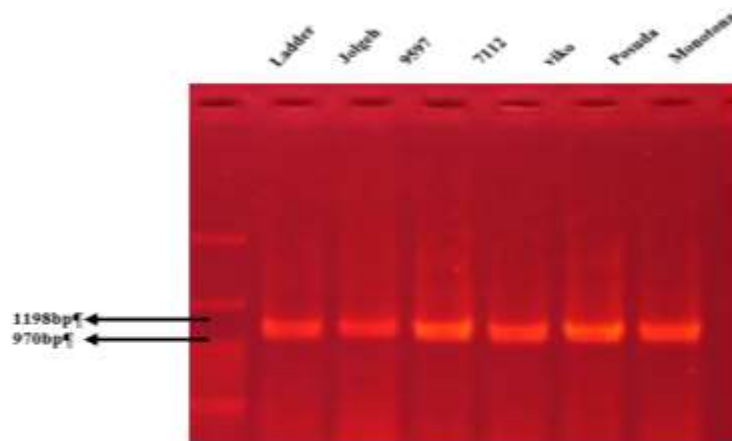
بررسی توالی هر یک از ژن‌های *VIN3*-like2 و *VIN3*-like2-2 با اندازه‌های ۹۷۶ و ۱۰۵۴ جفت‌باز امکان‌پذیر شد. تعداد ۱۸۱ جهش برای پیشبر ژن *VIN3*-like2 (شکل ۶) و تعداد ۱۵۸ جهش نقطه‌ای برای پیشبر ژن *VIN3*-like2-2 مشاهده شد که با توجه به نحوه وقوع این جهش‌ها در ژنوتیپ‌های حساس و مقاوم، نمی‌توان از آن‌ها جهت تمایز بین ارقام حساس و مقاوم استفاده کرد (جدول ۳).

مشاهده دو نوار بین ژنوتیپ‌ها، می‌تواند به دلیل تکثیر غیراختصاصی توالی هدف و یا هتروزیگوت بودن ژنوتیپ‌ها در این مکان باشد. جهت بررسی این فرضیات نوارها از ژل بازیابی و در هر ۶ ژنوتیپ توالی‌یابی شدند. توالی‌های دو نوار پیشبر ژن *VIN3*-like1 در هر ژنوتیپ، با استفاده از نرم‌افزار Lasergene (Megalign) مقایسه شدند. قطعه حذف/اضافه بزرگی به طول ۲۲۸ جفت‌باز بین دو توالی در همه ژنوتیپ‌ها مشاهده شد (شکل ۳). همدردی هر دو توالی با ژنوم چغندر قند صورت گرفت. توالی‌ها به یک ناحیه از کروموزوم شماره ۸ چغندر قند، شباهت معنی‌داری داشتند و در هیچ مکان دیگری این توالی‌ها تکرار نشده بودند. این نتایج فرضیه وجود حذف/اضافه در ناحیه پیشبر ژن *VIN3*-like1 را تأیید کرد و نمی‌تواند ناشی از تکثیر غیراختصاصی ناحیه دیگری از ژنوم باشد. ناحیه ۲۲۸ جفت‌بازی در پیشبر ژن *VIN3*-like1 جداسازی گردید و توالی موردنظر با استفاده از پایگاه داده PLANTPAN و PlantCARE بررسی و عناصر آن مشخص گردید. بررسی این ناحیه، عناصر تنظیمی جعبه CAAT، جعبه TATA، موتیف‌های Dof، AP2، AT-HOOK، TBP، MYb/SANT، Trihelix، bZIP، TCP و MADSbox در این ناحیه را مشخص کرد که هر یک از عناصر، عملکردهای مختلفی در ژنوم دارند و در فرآیند رونویسی ژن تاثیرگذار هستند. با توجه به نتایج به‌دست آمده به نظر می‌رسد که ناحیه اضافی در

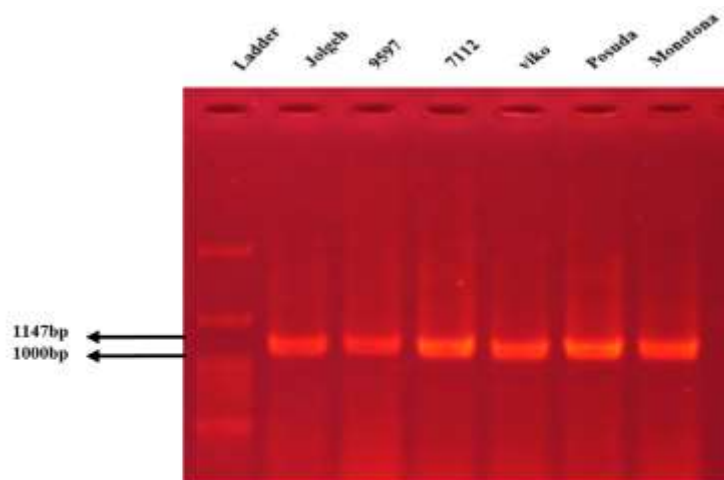


شکل ۳- هم‌ردیفی بخشی از دو نواری ۹۷۰ و ۱۱۹۸ جفت‌بازی در ژنوتیپ ویکو در پیشبر ژن *VIN3*-like1
 Figure 3. Partial Alignment of sequences of 970 and 1198 bp bands in *VIN3*-like1 gene promoter of Vico genotype

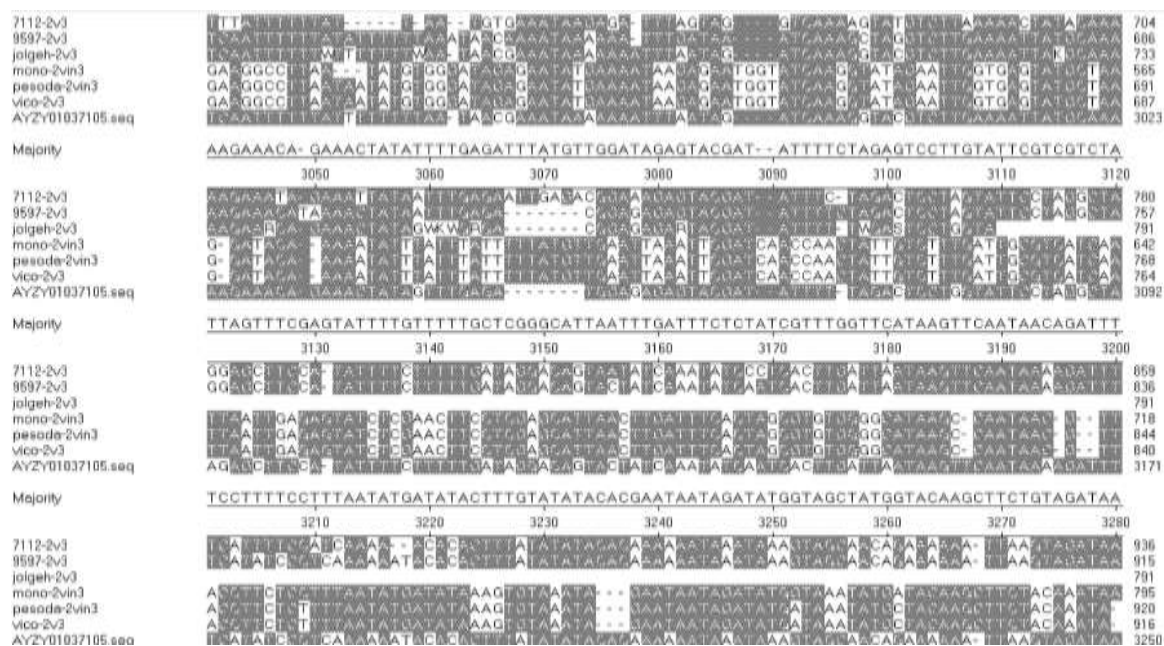
توالی بالا مربوط به نوار کوچک، توالی پایینی مربوط به نوار بزرگ و توالی وسط، توافقی است.
 The upper sequence is related to the smaller band, the lower sequence is related to bigger band and the middle one is the consensus sequence.



شکل ۴- الکتروفورز DNA پیشبر ژن *VIN3*-like2 در چغندرقد
 Figure 4. DNA electrophoresis of *VIN3*-like2 gene promoter in sugar beet



شکل ۵- الکتروفورز DNA پیشبر ژن *VIN3*-like2-2 در ژنوتیپ‌های چغندرقد
 Figure 5. DNA electrophoresis of *VIN3*-like2-2 gene promoter in sugar beet genotypes



شکل ۶- بخشی از هم‌ردیفی توالی پیشبر ژن *VIN3-like2* در ژنوتیپ‌های جلگه، ۷۱۱۲، ۹۵۹۷، ویکو، پسودا و مونوتونا و

توالی مرجع AYZY01037105

Figure 6. Partial multialignment of the sequence of *VIN3-like2* gene promoter in Jolgeh, 7112, 9597, Vico, Pesoda, Monotona genotypes and reference sequence AYZY01037105

اتصال گروه متیل (CH3) به موقعیت ۵ جزایر CpG در ساختار DNA است که در نهایت منجر به تغییر فعالیت و یا غیرفعال شدن آن می‌شود (Zilberman *et al.*, 2007). بنابراین افزایش بیان، ممکن است به دلیل سایر عوامل تاثیرگذار، نظیر متیلاسیون در توالی این دو ژن باشد. مکانیسم کنترل مولکولی بولتینگ هنوز مشخص نشده است. هبراد و همکاران (Hébrard *et al.*, 2013, 2016) میزان متیلاسیون در مریستم انتهایی ژنوتیپ‌های حساس و مقاوم به بولتینگ را مقایسه کردند. نتایج آن‌ها نشان داد که متیلاسیون DNA در مقاومت به بولتینگ در چغندرقد نقش دارد و میزان متیلاسیون نسبی در برخی ژن‌ها متفاوت است. میزان متیلاسیون نسبی برای ژن *FTI* در ژنوتیپ‌های حساس بیشتر از ژنوتیپ‌های مقاوم به بولتینگ است. تاکنون میزان متیلاسیون DNA ژن *VIN3* در ژنوتیپ‌های مختلف گزارش نشده است. بررسی این موضوع می‌تواند به روشن شدن مکانیسم کنترل مولکولی مقاومت به بولتینگ کمک کند. در این پژوهش مشخص شد که پیشبر ژن *FTI* در ژنوتیپ‌های حساس و مقاوم به بولتینگ تفاوت توالی ندارد. در پیشبر سه نسخه از ژن

حامی و حمزه‌ای (Hami, 2016; Hamzaei., 2016) افزایش بیان ژنهای *FTI* و *VIN3* بعد از سرمادهی را گزارش کردند. این افزایش بیان، در ژنوتیپ‌های مقاوم به‌طور معنی‌داری، بیش از افزایش بیان در ژنوتیپ‌های حساس است. در طی بهاره‌سازی بیان این ژن‌ها در ژنوتیپ‌های حساس به بولتینگ نسبت به ارقام مقاوم به بولتینگ، زودتر کاهش می‌یابد. هدف این تحقیق، تعیین علت افزایش بیان ژن *FTI* و *VIN3* در ژنوتیپ‌های مقاوم بود که با توجه به نتایج پژوهش، پیشبر این ژن‌ها در افزایش بیان نقشی نداشته است. با توجه به عدم وجود تفاوت توالی پیشبر ژن *FTI* در ژنوتیپ‌های حساس و مقاوم به بولتینگ، ممکن است که تغییرات اپی‌ژنتیکی در ناحیه پیشبر و یا نواحی اینترونی این ژن‌ها اتفاق بیافتد. این تغییرات ناشی از اثر متقابل بین محیط و ژنوتیپ هستند که منجر به بروز یک فنوتیپ جدید می‌شود و می‌تواند موجب تغییر بیان ژن‌ها، بدون تغییر در توالی آن‌ها (DNA و RNA) شوند. متیلاسیون DNA یکی از جنبه‌های مهم تنظیم اپی‌ژنتیکی در گیاهان است. متیلاسیون یک واقعه بعد از همانندسازی است که شامل

برای مقاومت به بولتینگ ایجاد نمی‌کنند. با مقایسه توالی پیشبر سایر ژن‌های گلدهی در ژنوتیپ‌های حساس و مقاوم می‌توان اطلاعات بیشتری در مورد کنترل ژنتیکی این صفت در گیاه چغندر قند فراهم نمود. این احتمال وجود دارد که تفاوت در توالی پیشبر این ژن‌ها و یا تغییرات اپی‌ژنتیکی، نقش مؤثری در مکانیسم مولکولی کنترل بولتینگ داشته باشد.

VIN3 موجود در ژنوم چغندر قند، تعداد ۶۲۴ جهش در ژنوتیپ‌های مقاوم و حساس به بولتینگ شناسایی شد. در پیشبر ژن *VIN3-like1* ناحیه حذف و اضافه‌ای به طول ۲۲۸ جفت‌باز شناسایی شد و مشخص شد این ناحیه نقش عملکردی دارد اما در کنترل مولکولی مقاومت به بولتینگ نقشی ندارد. به‌نظر می‌رسد، ناحیه پیشبر ژن‌های *FTI* و *VIN3* تفاوت الگوی بیانی در ژنوتیپ‌های چغندر قند،

References

- Abou-Elwafa, S.F., Buttner, B., Chia, T., Schulze-Buxloh, G. Hohmann, U., Mutasa-Gottgens, E., Jung, C. and Muller, A.E. (2011). Conservation and divergence of autonomous pathway genes in the flowering regulatory network of *Beta vulgaris*. *Journal of Experimental Botany*, **62**: 3359-3374.
- Alimirzaee, M., Mirzaie-asl, A., Abdollahi, M.R. and Ebrahimi Koolai, H. (2015). The of mRNA sequence polymorphism of flowering key genes in bolting sensitive and tolerant sugar beet genotypes. *Journal of Biotechnology, Computational Biology and Bionanotechnology*, **98**: 209-217.
- Bastow, R., Mylne, J.S., Lister, C., Lippman, Z., Martienssen, R.A. and Dean, C. (2004). Vernalization requires epigenetic silencing of FLC by histone methylation. *Nature*, **427**: 164-167.
- Blázquez, M., Koornneef, M. and Putterill, J. (2001). Flowering on time: genes that regulate the floral transition. *EMBO Reports*, **2**: 1078-1082.
- Boudry, P., McCombie H. and Van Dijk, H. (2002). Vernalization requirement of wild beet *Beta vulgaris* ssp *maritima*: among population variation and its adaptive significance. *Journal of Ecology*, **90**: 693-703.
- Ding, L., Kim, S.Y. and Michaels, S.D. (2013). FLOWERING LOCUS C EXPRESSOR family proteins regulate FLOWERING LOCUS C expression in both winter-annual and rapid-cycling *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, **163**: 243-252.
- Doyle, J.J. and Doyle, J.L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, **19**: 11-15.
- FAO. (2012). Food and Agriculture Organization, FAOSTAT. <http://faostat.fao.org>. Accessed 10 January 2014.
- Greb, T., Mylne, J.S., Crevillen, P., Geraldo, N., An, H., Gendall, A.R. and Dean, C. (2007). The PHD finger protein VRN5 functions in the epigenetic silencing of *Arabidopsis* FLC. *Current Biology*, **17**: 73-78.
- Hami, M. (2016). Comparison expression of photoperiod pathway key genes in susceptible and resistant genotypes for bolting in sugar beet. M.Sc. Thesis, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran (In Persian).
- Hamzaei, A. (2016). Comparison expression of vernalization pathway key genes in susceptible and resistant genotypes for bolting in sugar beet. M.Sc. Thesis, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan Iran (In Persian).
- Hébrard, C., Peterson, D.G., Willems, G., Delaunay, A., Jesson, B., Lefèbvre, M.P., Barnes, S. and Maury, S. (2016). Epigenomics and bolting tolerance in sugar beet genotypes. *Journal of Experimental Botany*, **67**(1): 207-225.
- Hébrard, C., Trap-Gentil, M.V., Lafon-Placette, C., Delaunay, A., Joseph, C., Lefèbvre, M., Barnes, S. and Maury, S. (2013). Identification of differentially methylated regions during

- vernalization revealed a role for RNA methyltransferases in bolting. *Journal of Experimental Botany*, **64**: 651-663.
- Helliwell, C.A., Wood, C.C., Robertson, M., James Peacock, W. and Dennis, E.S.** (2006). The Arabidopsis FLC protein interacts directly in vivo with SOC1 and FT chromatin and is part of a high-molecular-weight protein complex. *The Plant Journal*, **46**: 183-192.
- Henderson, I.R. and Dean, C.** (2004). Control of Arabidopsis flowering: the chill before the bloom. *Development*, **131**: 3829-3838.
- Johanson, U., West, J., Lister, C., Michaels, S., Amasino, R. and Dean, C.** (2000). Molecular analysis of FRIGIDA, a major determinant of natural variation in Arabidopsis flowering time. *Science*, **290**: 344-347.
- Jung, C. and Müller, A.E.** (2009). Flowering time control and applications in plant breeding. *Trends in Plant Science*, **14**: 563-573.
- Kardailsky, I., Shukla, V.K., Ahn, J.H., Dagenais, N., Christensen, S.K., Nguyen, J.T., Chory, J., Harrison, M.J. and Weigel, D.** (1999). Activation tagging of the floral inducer FT. *Science*, **286**: 1962-1965.
- Kim, H.J., Hyun, Y., Park, J.Y., Park, M.J., Park, M.K., Kim, M.D. and Kim, J.** (2004). A genetic link between cold responses and flowering time through FVE in Arabidopsis thaliana. *Nature Genetics*, **36**: 167-171.
- Kim, D.H., Doyle, M.R., Sung, S. and Amasino, R.M.** (2009). Vernalization: winter and the timing of flowering in plants. *Annual Review of Cell and Developmental*, **25**: 277-299.
- Kobayashi, Y., Kaya, H., Goto, K., Iwabuchi, M. and Araki, T.** (1999). A pair of related genes with antagonistic roles in mediating flowering signals. *Science*, **286**: 1960-1962.
- Koornneef, M., Hanhart, C. and Van der Veen, J.** (1991). A genetic and physiological analysis of late flowering mutants in Arabidopsis thaliana. *Molecular and General Genetics*, **229**: 57-66.
- Mellor, J.** (2006). It takes a PHD to read the histone code. *Cell*, **126**: 22-24.
- Michaels, S.D. and Amasino, R.M.** (1999). FLOWERING LOCUS C encodes a novel MADS domain protein that acts as a repressor of flowering. *The Plant Cell*, **11**: 949-956.
- Michaels, S.D. and 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. *The Plant Cell*, **13**: 935-941.
- Searle, I. He, Y., Turck, F., Vincent, C., Fornara, F., Kröber, S., Amasino, R.A. and Coupland, G.** (2006). The transcription factor FLC confers a flowering response to vernalization by repressing meristem competence and systemic signaling in Arabidopsis. *Genes & Development*, **20**: 898-912.
- Sheldon, C.C., Burn, J.E., Perez, P.P., Metzger, J., Edwards, J.A., Peacock, W.J. and Dennis, E.S.** (1999). The FLF MADS box gene: a repressor of flowering in Arabidopsis regulated by vernalization and methylation. *The Plant Cell*, **11**: 445-458.
- Shojaei, E., Mirzaie-asl, A., Mahmoudi, S.B. and Nazeri, S.** (2017). Identification of sugar beet flowering genes based on Arabidopsis homologous genes. *Journal of Agricultural Science and Technology*, **19**: 719-729.
- Strange, A., Li, P., Lister, C., Anderson, J., Warthmann, N., Shindo, C., Irwin, J., Nordborg, M. and Dean, C.** (2011). Major-effect alleles at relatively few loci underlie distinct vernalization and flowering variation in Arabidopsis accessions. *PLoS One*, **6**: e19949.
- Sung, S. and Amasino, R.M.** (2004). Vernalization in Arabidopsis thaliana is mediated by the PHD finger protein VIN3. *Nature*, **427**: 159-164.
- Sung, S., Schmitz, R.J. and Amasino, R.M.** (2006). A PHD finger protein involved in both the vernalization and photoperiod pathways in Arabidopsis. *Genes & Development*, **20**: 3244-3248.
- Takada, S. and Goto, K.** (2003). TERMINAL FLOWER2, an Arabidopsis homolog of HETEROCHROMATIN PROTEIN1, counteracts the activation of FLOWERING LOCUS T by CONSTANS in the vascular tissues of leaves to regulate flowering time. *The Plant Cell*, **15**: 2856-2865.

- Wood, C.C., Robertson, M., Tanner, G., Peacock, W.J., Dennis, E.S. and Helliwell, C.A.** (2006). The *Arabidopsis thaliana* vernalization response requires a polycomb-like protein complex that also includes VERNALIZATION INSENSITIVE 3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**: 14631-14636.
- Zilberman, D., Gehring, M., Tran, R.K., Ballinger, T. and Henikoff, S.** (2007). Genome-wide analysis of *Arabidopsis thaliana* DNA methylation uncovers an interdependence between methylation and transcription. *Nature Genetics*, **39**: 61-69.

Comparison of Promoter Sequences of Flowering Control Genes, *FT1* and Three Versions of *VIN3*, in Susceptible and Resistant Sugar Beet Genotypes to Bolting

Azadeh Souri¹, Asghar Mirzaie-Asl^{2,*}, Leila Khodaei³
and Mohammad Reza Abdollahi⁴

- 1- Former M.Sc. Student, Department of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran
- 2- Associate Professor, Department of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran
- 3- Assistant Professor, Department of Agriculture, Payame Noor University, Tehran, Iran
- 4- Associate Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran

(Received: October 18, 2019 – Accepted: January 19, 2020)

Abstract

Autumn sowing of sugar beet is a suitable way in sustainable agriculture. Bolting is an undesirable phenomenon which reduces sugar beet yield and it is the most important limiting factor in autumn sowing of sugar beet. Identification and comparison of the sequence of flowering genes in various genotypes can help to understand the molecular mechanisms controlling bolting. In the previous studies, it was revealed that expression level of *FT1* and *VIN3* genes in sugar beet is associated with bolting resistance. In this study, the sequence of *FT1* gene promoter and three versions of *VIN3* gene promoters of sugar beet were compared in three bolting resistant and three bolting susceptible genotypes. Primer design for each gene was carried out using the DNA sequences found at the NCBI database. DNA was extracted from leaf samples growing in pots and was used as template in PCR reactions. Similar length of amplified fragments for each promoter gene in bolting susceptible and bolting resistant genotypes were selected and sequenced for more accurate assessment. There was no mutation in the *FT1* gene promoter, however 624 substitution and insertion/deletion mutations were observed in the promoter of three versions of *VIN3* gene. A 228-bp ins/del region was detected in the *VIN3*-like1 promoter. This region contains promoter elements and seems to have a control function. Comparison of detected mutations between susceptible and resistant genotypes did not show a distinct pattern for bolting.

Keywords: Sugar Beet, Bolting, Promotor, Mutation, *FT1*, *VIN3*

* Corresponding Author, E-mail: a.mirzaie@basu.ac.ir