شناسایی miRNAهای دخیل در مسیر گل‌دهی گیاه چغندرقند (*Beta vulgaris* L.)

Identification of microRNAs involved in flowering pathway in sugar beet (*Beta vulgaris* L.)

میشانه عسگری[۱]، اصغر میرزائی-اصل[۲*]، محمدرضا عبداللهی[۳]، لیلا خدائی[۴]

تاریخ دریافت: ۹۷/۰۳/۱۱ ؛ تاریخ پذیرش: ۹۷/۰۷/۱۸

م. عسگری، ا. میرزائی اصل، م.ر. عبدالهی و ل. خدائی. ۱۳۹۷. شناسایی miRNAهای دخیل در مسیر گل‌دهی گیاه چغندرقند (*Beta vulgaris* L.). **چغندرقند، ۳٤(۲): ۱٤۷- ۱٦۳.** DOI: 10.22092/jsb.2019.122102.1199

چکیده

یکی از فرآیندهای کنترلی در بسیاری از گیاهان از جمله چغندرقند انتقال از مرحله رشد رویشی به زایشی می‌باشد که توسط شبکه پیچیده‌ای از پروتئین‌ها تنظیم می‌شود. تاکنون چندین مسیر تنظیمی دخیل در مسیر گل‌دهی و بولتینگ و ژن‌های مؤثر در آن‌ها در گیاه مدل آرابیدوپسیس شناسایی شده است. یک مسیر مؤثر در انتقال از مرحله رویشی به زایشی مسیر وابسته به سن است که تحت‌تاثیر دو *miRNA172* و *miRNA156* می‌باشد. ژن‌های کدکننده *miRNA* ها در بین گیاهان بسیار گسترده و حفاظت‌شده هستند. در این تحقیق، برای شناسایی توالی این دو ژن در ژنوم چغندرقند، توالی آن‌ها از چندین گیاه جمع‌آوری و با توالی‌های Refseq-genomic چغندرقند مورد هم‌ردیفی قرار گرفتند. نواحی با توالی مشترک شناسایی و اطلاعات آن‌ها به طور دقیق مورد بررسی قرارگرفت. نتایج نشان داد که در ژنوم چغندرقند برای ژن کدکننده *miR156* فقط ۱۲۷ جفت باز از کروموزوم شماره ۲ و ژن کدکننده *miR172* فقط ۱۱۰ جفت باز از کروموزوم شماره ۹ دارای توالی‌های کامل پیش‌ساز miRNA بودند. جداسازی ژن کدکننده *miR156* از ژنوم گیاه چغندرقند، با طراحی آغازگرهای اختصاصی از نواحی ابتدا و انتهای ژن انجام گرفت. ژن کدکننده *miR156* توسط تکنیک واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی MIRF و MIRR از روی DNA ژنومی چغندرقند تکثیر شد. همانگونه که انتظار می‌رفت قطعه DNA ۱۲۷ جفت باز تکثیر شد و در نهایت از طریق توالی‌یابی مشابهت ۹۹ درصدی توالی تکثیر شده با توالی شناسایی شده ژن کدکننده *miR156* به دست آمد و صحت توالی شناسایی شده به عنوان ژن کدکننده *miR156* در چغندرقند تأیید گشت. شناسایی و مطالعه این ژن‌های مؤثر در فرآیند گل‌دهی راه را برای قابلیت بررسی عملکرد دقیق آن‌ها در فرآیندهای گل‌دهی و بولتینگ چغندرقند خواهد گشود.

واژه‌های کلیدی: چغندرقند، ژن کدکننده، مسیر گل‌دهی، *miR156*، *miR172*

۱- دکتری بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا. همدان، ایران

۲- دانشیار گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا. همدان، ایران. *- نویسنده مسئول a.mirzaie@basu.ac.ir

۳- دانشیار گروه اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا. همدان، ایران.

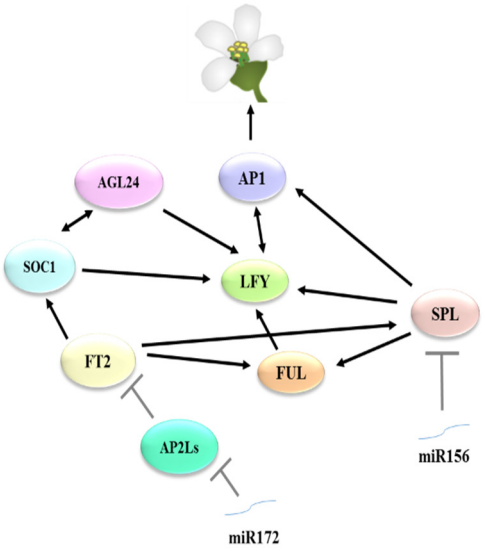
۴- استادیار گروه کشاورزی، دانشگاه پیام نور همدان. همدان، ایران.

مقدمه

یکی از مراحل کلیدی مهم در گیاهان گل‌دار، انتقال از مرحله رویشی به زایشی می‌باشد که توسط شبکه پیچیده‌ای از پروتئین‌ها تنظیم می‌شود. این پروتئین‌ها مسئولیت دریافت و ترکیب سیگنال‌های محیطی و نموی برای پیشرفت یا ممانعت از رشد زایشی را بر عهده دارند (Bäurle and Dean 2006; Blázquez *et al*. 2001; Deng *et al*. 2011; Parcy 2005; Pin *et al*. 2012). یکی از این محصولات گل‌دار با اهمیت چغندرقند (*Beta vulgaris* L.) است که یک گیاه علفی، دولپه و دوساله از خانواده اسفناجیان (*Amaranthaceae*) می‌باشد. در چرخه زندگی چغندرقند، سال اول مرحله رویشی با تولید یک بوته برگی و یک ریشه بزرگ آغاز شده و در سال دوم، مرحله زایشی پس از طی یک دوره با دمای پایین با تشکیل ساقه‌های گل‌دهنده (بولتینگ) و گل‌دهی ادامه می‌یابد (Biancardi *et al*. 2005; Chia *et al*. 2008; Matthias *et al*. 1999). تاکنون چندین مسیر تنظیمی دخیل در گل‌دهی و بولتینگ در گیاه مدل آرابیدوپسیس (*Arabidopsis thaliana*) شناسایی شده است (Jahanbakhsh-Pour *et al*. 2012; Mirzaie-Asl *et al*. 2017; Pin *et al*. 2012). از آنجا که اهمیت کشت چغندرقند در میزان رشد رویشی و مقدار ساکارز در ریشه آن می‌باشد، مطالعه فرآیندگل‌دهی و ژن‌های مؤثر در آن یکی از مباحث با اهمیت در اصلاح چغندرقند می‌باشد. فرآیند بولتینگ و گل‌دهی گیاه چغندرقند در سال اول عامل محدودکننده کشت پاییزه چغندرقند در برخی مناطق کشور است چرا که در تعدادی از روزهای زمستان، دمای هوا به کمتر از ۱۰ درجه سانتیگراد کاهش می‌یابد. قرارگیری این گیاه تحت شرایط دمای پایین منجر به ساقه‌روی و به تبع آن کاهش درصد قند، عملکرد ریشه و خلوص شربت خام شده و مطلوب نیست (Hébrard *et al*. 2016; Kim *et al*. 2007; Michaels 2009; Pfeiffer *et al*. 2014; Sadeghian and Johansson 1992). با کنترل کامل بولتینگ و گل‌دهی امکان کشت پائیزه چغندرقند در عرض‌های جغرافیایی شمالی ایجاد می‌شود. این تغییر از یک محصول بهاره به زمستانه به زارعین امکان کشت محصول در پاییز را می‌دهدکه این عامل موجب رشد بیشتر برگ‌ها در بهار و در نهایت افزایش رشد چغندرقند و محصول آن می‌شود. کشت بهاره چغندرقند نیاز آبی بالایی دارد و با کاهش منابع زیرزمینی و خشکسالی در ایران سطح زیر کشت بهاره چغندرقند در حال کاهش است.

پس از توالی‌یابی ژنوم ژنوتیپ KWS2320، محتوای DNA چغندرقند ۵۶۷ مگاباز تخمین زده شده است. هم‌چنین، تعداد ۲۷۴۲۱ ژن کدکننده پروتئین از طریق اطلاعات ترانس‌کریپت در ژنوتیپ KWS2320 پیش‌بینی و براساس شباهت توالی تفسیر شده است (Dohm *et al*. 2012). در این میان، ژن‌های متعددی در انتقال به مرحله رشد زایشی دخالت دارند. طی مطالعات انجام گرفته در رقم‌های یکساله گیاه آرابیدوپسیس زمستانه عوامل مختلفی شامل مسیر وابسته به سن (Age-related)، بهاره شدن (Vernalization)، فتو پریود (Photoperiod)، جیبرلیک اسید و مسیر خودمختار (Autonomous) در ورود به مرحله زایشی مؤثر می‌باشند (Kobayashi and Weigel 2007; Simpson 2004; Sung and Amasino 2004; Wang *et al*. 2008; Wang *et al*. 2009). یک مسیر مؤثر در انتقال از مرحله رویشی به زایشی مسیر وابسته به سن است که تحت تأثیر دو miR172 و miR156 می‌باشد. miRNAها (miR) مولکول‌های RNA کوچک (حدود ۲۲ نوکلئوتید) غیرکدکننده هستند که در گیاهان،

حیوانات و برخی ویروس‌ها وجود دارند (Ambros 2004; Bartel 2004; Lau *et al*. 2001; Palatnik *et al*. 2003; Reinhart *et al*. 2002). miRها در فرآیندهای پیچیده سلولی نظیر خاموشی RNA، تنظیم پس از رونویسی بیان ژن و مرگ سلولی و هم‌چنین در نمو برگ‌ها و گل‌ها دخالت دارند (Aukerman and Sakai 2003; Krol *et al*. 2004; Palatnik *et al*. 2003; Rana 2007; Schwarz and Zamore 2002; Xu *et al*. 2003). در آرابیدوپسیس، miR156ها در مرحله رویشی به فراوانی وجود دارند و برش رونوشت‌های فاکتورهای رونویسی SQUAMOSA (SPL) PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE را بر عهده دارند. این فاکتورهای رونویسی موجب تسهیل انتقال به مرحله گل‌دهی با فعال‌سازی بیان ژن‌های *LFY* (*LEAFY*)، *FUL* (*FRUITFULL*)، *SOC1* (*SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CO1*)، *AP1* (*APETALA1*) و *AGL24* (*AGAMOUS-LIKE24*) در جوانه انتهایی می‌شوند. هم‌چنین، این فاکتورها در برگ، بیان miR172 را فعال می‌کنند که الگوی بیانی مشابه *miR156* دارد و در طول بلوغ تجمع می‌یابد. در آرابیدوپسیس *miR172* موجب گل‌دهی زودهنگام از طریق بازدارندگی ترجمه خانواده فاکتورهای رونویسی AP2-like می‌شود (Jung *et al*. 2007; Kim *et al*. 2012; Mlotshwa *et al*. 2006; Navarro *et al*. 2015) (شکل ۱).



شکل ۱ نمایش برخی از ژن‌های مؤثر در فرآیند گل‌دهی تحت‌تأثیر *miR156* و *miR172* در چغندرقند. در مرحله رویشی *miR156* مانع از عمل فاکتورهای SPL می‌شود. فاکتورهای SPL موجب فعال‌سازی ژن‌های *FUL*، *LFY* و *AP1* و در نهایت تحریک ورود به مرحله زایشی می‌گردند. در حالت مقابل *miR172* مانع از عمل ژن‌های *AP2Ls* می‌شود. ژن‌های *AP2Ls* مانع از عمل FT2 که محرک گل‌دهی است می‌گردد (Pin 2012).

براساس یافته‌های پایگاه اطلاعاتی miR Registry (Release 22, June 2018)، ۳۸۵۸۹ miR از ۲۷۱ گونه گیاهی شناسایی شده‌اند که پس از پردازش ۴۸۸۸۵ miR بالغ تولید می‌شود . انواع مختلفی از miR ها در گیاهان از طریق

روش‌های متفاوتی از جمله غربال‌گری ژنتیکی، کلونینگ مستقیم و توالی‌یابی یک کتابخانه کوچک RNA، پیش‌بینی محاسباتی براساس توالی‌های کل ژنوم و آنالیز توالی نشانمند از ردیف (EST) شناسایی شده‌اند (Han *et al*. 2013; Wang *et al*. 2012; Zhang *et al*. 2006; Zhang *et al*. 2005). شناسایی محاسباتی miRها و اهداف آن‌ها در گیاهان و حیوانات تاکنون مسیر پیچیده تنظیم miRها و شرکت آن‌ها در کنترل بسیاری از فعالیت‌های بیولوژیکی اساسی در موجودات چند سلولی را آشکار ساخته است (Li *et al*. 2005).

اطلاعات و توالی‌های پیش‌ساز دو ژن کدکننده *miR156* و *miR172* در بسیاری از گیاهان شناسایی شده است، ولی با وجود اهمیت این دو ژن در فرآیند گل‌دهی در چغندرقند تاکنون هیچ گزارشی ثبت نشده است. در این مطالعه به منظور شناخت نقش miRهای مؤثر در بولتینگ و گل‌دهی چغندرقند که یکی از عوامل بازدارنده توسعه کشت پاییزه چغندرقند است، توالی‌های ژن‌های کدکننده *miR156* و *miR172* در ژنوم چغندرقند مورد شناسایی قرار گرفته است. مطالعه این ژن‌های دخیل در فرآیند گل‌دهی راه را برای قابلیت بررسی عملکرد دقیق آن‌ها در فرآیندهای گل‌دهی و بولتینگ چغندرقند خواهد گشود.

مواد و روش‌ها

ابتدا نسخه‌های مختلف توالی‌های پیش‌ساز *miR156* و *miR172* از قبل شناسایی شده، از ۱۱ گیاه مختلف شامل آناناس (*Ananas comosus*)، آرابیدوپسیس (*Arabidopsis thaliana*)، کاملیا (*Camellia sinensis*)، *Ceratopteris thalictroides*، پرتقال (*Citrus sinensis*)، موز (*Musa AAB*)، برنج (*Oryza sativa*)، توتون (*Nicotiana tabacum*)، سورگوم (*Sorghum bicolor*)، انگور (*Vitis vinifera*) و ذرت (*Zea mays*) از پایگاه‌های اطلاعاتی NCBI (National Center for Biotechnology Information, http://www.ncbi.nlm.nih.gov) و miRBase (http://www.mirbase.org) به‌دست آمد. به منظور بررسی میزان تغییرات، توالی‌های miR از توالی‌های پیش‌ساز شناسایی و از طریق نرم‌افزار Lasergene برنامه MegAlign مورد هم‌ردیفی قرار گرفتند. از آنجا که ژنوم چغندرقند به طور کامل توالی‌یابی شده است، refseq-genomicهای چغندر مرتبط با توالی‌های پیش‌ساز *miR156* و *miR172* هر یک از گیاهان، از طریق Blastn شناسایی و ذخیره شد. در صورتی که در هر توالی refseq-genomic چندین ناحیه مشابه miR موردنظر وجود داشت، هر یک از آن‌ها به صورت جداگانه ذخیره شد. توالی‌های refseq-genomic چغندرقند حاصل و توالی پیش‌ساز miR هر یک از گیاهان از طریق برنامه Seqman از نرم‌افزار Lasergene هم‌ردیف شدند. توالی‌های مشترک بین توالی‌های هم‌ردیف شده شناسایی و به عنوان miRهای موردنظر در چغندرقند درنظرگرفته شدند. هم‌چنین، بررسی میزان شباهت توالی‌های چغندرقند و miRهای شناخته شده قبلی گیاهان ذکر شده با روش درخت فیلوژنتیک مورد مقایسه قرار گرفت. برای اطمینان از توالی‌های شناسایی شده مجددا از Blastn در توالی سایر گیاهان استفاده شد. به منظور شناسایی توالی کامل هریک از ژن‌های موردنظر، refseq-genomicهای چغندر حاوی توالی ژن‌ها از پایگاه اطلاعاتی NCBI شناسایی و قسمت‌های مختلف آن‌ها از طریق هم‌ردیفی به طور کامل بررسی شد. پس از شناسایی توالی ژن کدکننده *miR156* از طریق توالی ژنوم چغندرقند موجود در پایگاه‌های اطلاعاتی، جداسازی آن از ژنوم گیاه چغندرقند از طریق طراحی

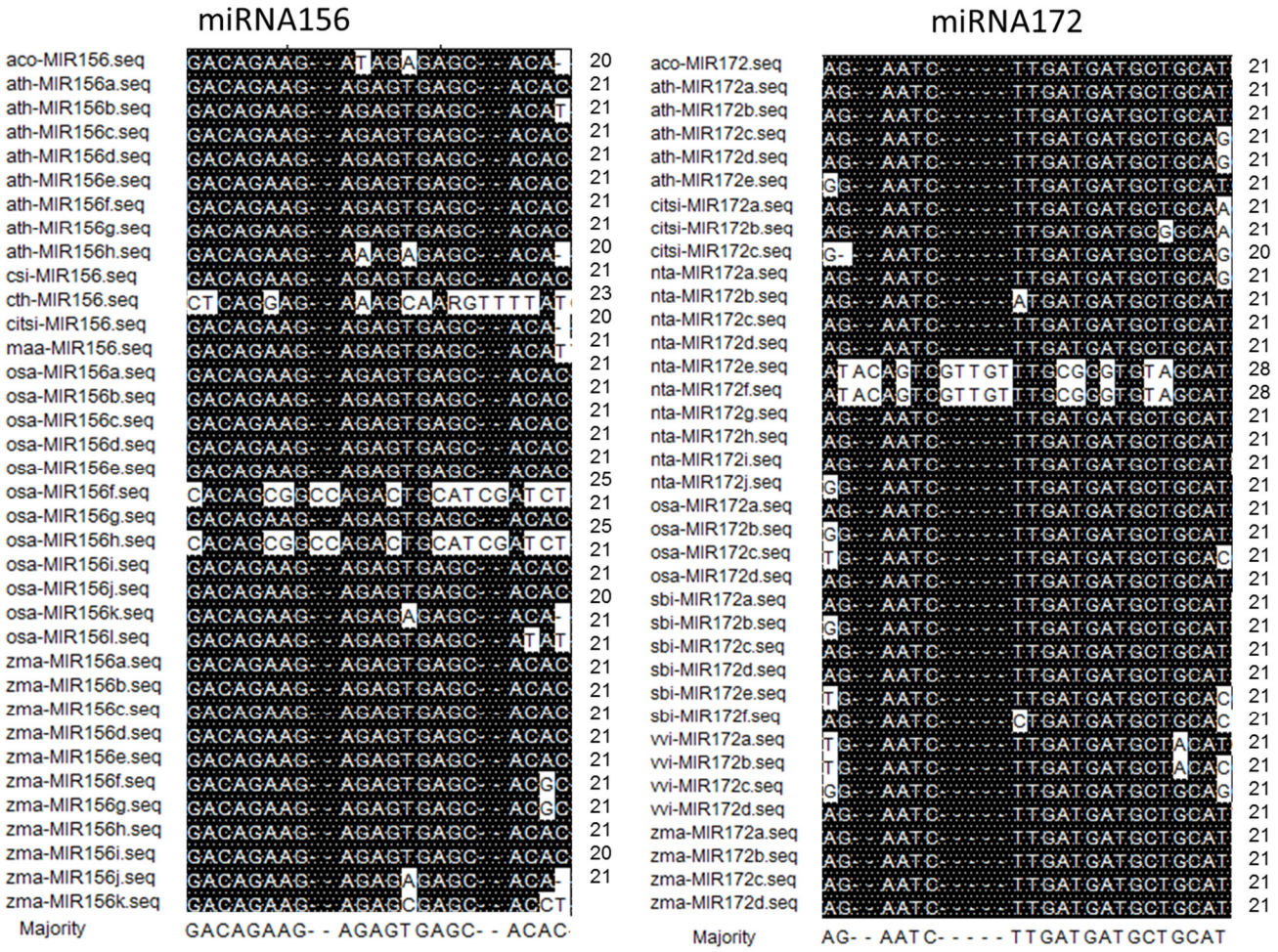
آغازگرهای اختصاصی انجام گرفت. در طراحی آغازگر رفت (MIRF) (5'- AAGAGGGAGGTGACAGAAGA -3') توالی بازی ابتدای '5 ژن کدکننده *miR156* و در طراحی آغازگر برگشت (MIRR) (5'- GAAAGGGAGAGAAGGGGAT -3') توالی بازی انتهای '3 ژن در نظر گرفته شد. استخراج DNA ژنومی از برگ‌های جوان گیاه چغندرقند رقم شوش توسط روش CTAB (Murray and Thampson 1980) صورت گرفت. سپس واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی برروی DNA چغندرقند با استفاده از دستگاه ترموسایکلر انجام شد. مخلوط واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۵۰ میلی مولار $MgCl_2$، ۲۰۰ میلی مولار dNTPs، از هر آغازگر ۱۰ پیکومول، ۱۰۰ نانوگرم DNA، ۰/۵ یونیت DNA Taq پلیمراز و ۲/۵ میکرولیتر از ۱۰ x PCR buffer تهیه شد. شرایط تکثیر، شامل ۵ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به عنوان پیش دما، ۳۵ چرخه در دمای واسرشت‌سازی ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، دمای اتصال آغازگرها ۵۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، دمای بسط ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، و در نهایت ۵ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به عنوان بسط نهایی استفاده گردید. سپس محصول واکنش بر روی ژل آگارز دو درصد مشاهده شد. قطعه DNA (ژن تکثیر شده) توسط آغازگرهای اختصاصی (MIRF و MIRR)، از روی ژل آگارز تخلیص و به منظور اطمینان از تطابق توالی تکثیر شده با توالی شناسایی شده ژن کدکننده *miR156*، برای توالی‌یابی با استفاده از آغازگر رفت (MIRF) به شرکت Bioneer کره ارسال شد.

نتایج

تعداد ۳۶ توالی *miR172* از هشت گونه گیاهی از پایگاه‌های اطلاعاتی NCBI و miRBase جداسازی و ناحیه miR بالغ از این توالی‌های پیش‌ساز مورد هم‌ردیفی قرار گرفتند. هم‌چنین، تعداد ۳۹ توالی *miR156* بالغ نیز در هشت گونه گیاهی مقایسه شدند. تعداد بازهای *miR156*های بالغ در گیاهان مختلف بین ۲۰–۲۵ نوکلئوتید متغیر است. برخی *miR156*های متعلق به گیاهان برنج و *Ceratopteris thalictroides* دارای بیشترین اختلاف نسبت به سایر گیاهان بودند و در سایر گیاهان اختلاف بسیار جزئی (در حد یک باز) بود. در بررسی *miR172* مشخص شد که دو *miR172e* و *miR172f* مربوط به گیاه توتون دارای بیشترین اختلاف نسبت به سایر *miR172*ها بودند. تعداد بازها در این دو *miR172* ۲۸ جفت‌باز می‌باشد، درحالی که *miR172*های بالغ در سایر گیاهان عموماً دارای ۲۱ باز می‌باشند و اختلافات بسیار جزئی و از نوع تک‌بازی می‌باشد (شکل ۲).

توالی‌های پیش‌ساز *miR156* و *miR172* مربوط به هریک از گیاهان ذکر شده در توالی‌های Refseq-genomic چغندرقند جستجو شد و توالی‌های همولوگ شناسایی گردید (جدول ۱ و ۲).

از بین ۳۹ قطعه شناسایی شده برای ژن کدکننده *miR156*، بیشترین میزان شباهت بین توالی NC_025813 شناسایی شده از کروموزوم شماره دو چغندرقند، با *miR156* گیاهان آناناس، پرتقال، کاملیا و ذرت به‌دست آمد. در بین این گیاهان، بیشترین میزان شباهت توالی NC_025813 چغندرقند با *miR156* گیاه کاملیا به‌دست آمد. طول این قطعه توالی ژنومی چغندرقند ۴۰۳۹۳۳۸۹ جفت‌باز می‌باشد که ۱۲۷ باز آن کاملاً مشابه با توالی پیش‌ساز *miR156* گیاه کاملیا و ۸۵– ۸۹ جفت‌باز نیز کاملاً مشابه با سه گیاه دیگر می‌باشد.



شکل ۲ بررسی میزان حفاظت‌شدگی توالی‌های *miR156* و *miR172* بالغ در گیاهان مختلف. *miR156*: *A. comosus* (aco)، *A. thaliana* (ath)، *C. sinensis* (csi)، *C. thalictroides* (cth)، *C. sinensis* (citsi)، *M. AAB* (maa)، *O. sativa* (osa) و *Z. mays* (zma). *miR172*: *A. comosus* (aco)، *A. thaliana* (ath)، *C. sinensis* (citsi)، *N. tabacum* (nta)، *O. sativa* (osa)، *S. bicolor* (sbi)، *V. vinifera* (vvi) و *Z. mays* (zma). (حروف a تا k مربوط به نسخه‌های مختلف ژن‌های *miR* در هریک از گیاهان می‌باشد.)

از لحاظ ژن کدکننده *miR172*، از بین ۳۶ قطعه شناسایی شده، توالی چغندرقند با شماره NC_025820 دارای توالی مشابه با توالی پیش‌ساز *miR172* سایر گیاهان مورد مقایسه شامل آناناس، آرابیدوپسیس، توتون، برنج و انگور بود. توالی NC_025820 در چغندرقند با طول ۴۵۲۷۴۱۷۳ جفت‌باز روی کروموزوم شماره ۹ قرار دارد، که ۱۱۰ باز آن نسبتاً مشابه با توالی پیش ساز *miR172* گیاهان موردنظر بود. این در حالی است که توالی‌های ژنومی چغندرقند دیگر از جمله NC_025818، NC_025813 و NW_011048314، دارای حدود ۳۰ جفت‌باز توالی مشترک از ناحیه ابتدایی پیش‌ساز *miR172* سایر گیاهان بودند.

جدول ۱. مشخصات توالی‌های ژنومی چغندرقند حاصل از همردیفی *miR156* شناخته شده گیاهان مختلف

گیاهان	توالی‌های پیش‌ساز miR (نوکلئوتید)	تعداد نتایج همردیفی	شماره توالی‌های refseq-genomic با بیشترین میزان شباهت	E value	جهت	refseq-genomicهای چغندرقند	
						ابتدا	انتها
Ananas comosus	۴۹۵	۱۰۵	NC_025813a*	۵e-۰۹	+	۴۱۲۵۰۷۲	۴۱۲۵۱۶۴
			NC_025813b	۵e-۰۹	+	۴۱۳۳۹۹۲	۴۱۳۴۰۷۹
			NC_025813c	۲e-۰۷	+	۴۱۲۴۸۳۶	۴۱۲۴۹۲۴
			NC_025817	۰/۲۰	-	۵۴۶۴۴۴۳۶	۵۴۶۴۴۴۱۰
			NW_011048191	۰/۰۱۷	+	۴۱۳۲۵۲	۴۱۳۲۸۵
			NW_011048214	۲e-۰۷	+	۲۰۲۰۰۲۶	۲۰۲۰۰۶۶
			NW_011048295	۰/۲۰	-	۳۰۵۵۸۰۹	۳۰۵۵۷۸۳
			NW_011048467	۵e-۱۵	+	۲۵۷۵۷۲	۲۵۷۶۶۰
Arabidopsis thaliana	۸۲	۲۴	-	-		-	-
Camellia sinensis	۱۳۲	۱۴۸	NC_025813	۵e-۲۷	-	۱۴۱۲۸۰۹۷	۱۴۱۲۷۹۷۲
			NW_011048201	۵e-۲۷	-	۱۶۷۴۳۶۳	۱۶۷۴۲۳۸
Ceratopteris thalictroides	۲۲۱	۱۷	NC_025817	۵e-۰۵	-	۷۱۷۴۶۱۷	۷۱۷۴۵۷۷
			NW_011048271	۵e-۰۵	-	۱۷۲۰۵۱۵	۱۷۲۰۴۷۵
Citrus sinensis	۱۰۳	۲۱	NC_025813	۰/۰۰۹	-	۱۴۱۲۸۰۸۴	۱۴۱۲۸۰۰۱
			NW_011048197	۰/۰۳۳	+	۹۱۴۹۸۶۳	۹۱۴۹۸۹۴
			NW_011048201	۰/۰۰۹	-	۱۶۷۴۳۵۰	۱۶۷۴۲۶۷
Musa AAB	۱۰۸	۴۹	NC_025818	۳e-۰۹	+	۱۱۰۹۰۹۷۹	۱۱۰۹۱۰۴۳
			NW_011048300	۳e-۰۹	+	۱۰۷۴۷۶۱	۱۰۷۴۸۲۵
			NW_011048314	۵e-۰۷	+	۸۰۹۹۲۳۷	۸۰۹۹۲۸۲
Oryza sativa	۷۴۰	۲۳	NC_025814	۴e-۰۶	+	۱۸۸۹۴۷۳۴	۱۸۸۹۴۷۶۴
			NC_025815	۰/۰۸۹	+	۳۲۳۰۲۲۹۷	۳۲۳۰۲۳۲۷
			NC_025817	۰/۳۱	+	۴۸۸۷۹۳۹	۴۸۸۷۹۶۰
			NW_011048223	۴e-۰۶	+	۱۲۰۲۶۳۸	۱۲۰۲۶۶۸
			NW_011048243	۰/۰۸۹	+	۳۵۹۸۰۹۹	۳۵۹۸۱۲۹
			NW_011048270	۰/۳۱	+	۲۷۹۷۰۴۳	۲۷۹۷۰۶۴
			NW_011048295	۰/۳۱	+	۳۰۵۵۷۸۶	۳۰۵۵۸۰۷
			NW_011048664	۰/۰۲۶	-	۶۶۰۵۳	۶۶۰۱۵
Zea mays	۷۶۴	۱۱۲	NC_025813a	۲e-۱۶	-	۱۴۱۲۸۰۸۷	۱۴۱۲۷۹۹۸
			NC_025813b	۳e-۱۴	-	۱۴۱۲۸۰۸۴	۱۴۱۲۸۰۰۱
			NC_025813c	۰/۳۲	+	۹۱۴۹۸۴۴	۹۱۴۹۸۹۴
			NC_025813d	۰/۳۲	+	۹۱۴۹۸۷۳	۹۱۴۹۸۹۴
			NC_025815	۰/۳۲	-	۱۵۶۸۹۵۷۰	۱۵۶۸۹۵۴۴
			NW_011048201a	۲e-۱۶	-	۱۶۷۴۳۵۳	۱۶۷۴۲۶۴
			NW_011048201b	۳e-۱۴	-	۱۶۷۴۳۵۰	۱۶۷۴۲۶۷
			NW_011048232	۰/۳۲	-	۲۱۷۲۳۹۶	۲۱۷۲۳۷۰
			NW_011048242	۰/۳۲	-	۱۱۴۳۰۴۵	۱۱۴۳۰۱۹
			NW_011048259	۰/۳۲	-	۳۵۶۱۰۱۴	۳۵۶۰۹۸۷
			NW_011048267	۰/۳۲	-	۶۱۵۶۵۲	۶۱۵۶۲۶
			NW_011048332	۰/۰۹۲	-	۴۹۸۲۱۱	۴۹۸۱۸۶
			NW_011048563	۰/۳۲	+	۲۱۱۴۰۰	۲۱۱۴۲۴

*حروف a تا d مربوط به حضور چندین توالی مشترک با miRهای گیاهان مختلف در بین Refseq-genomic چغندرقند می‌باشد.

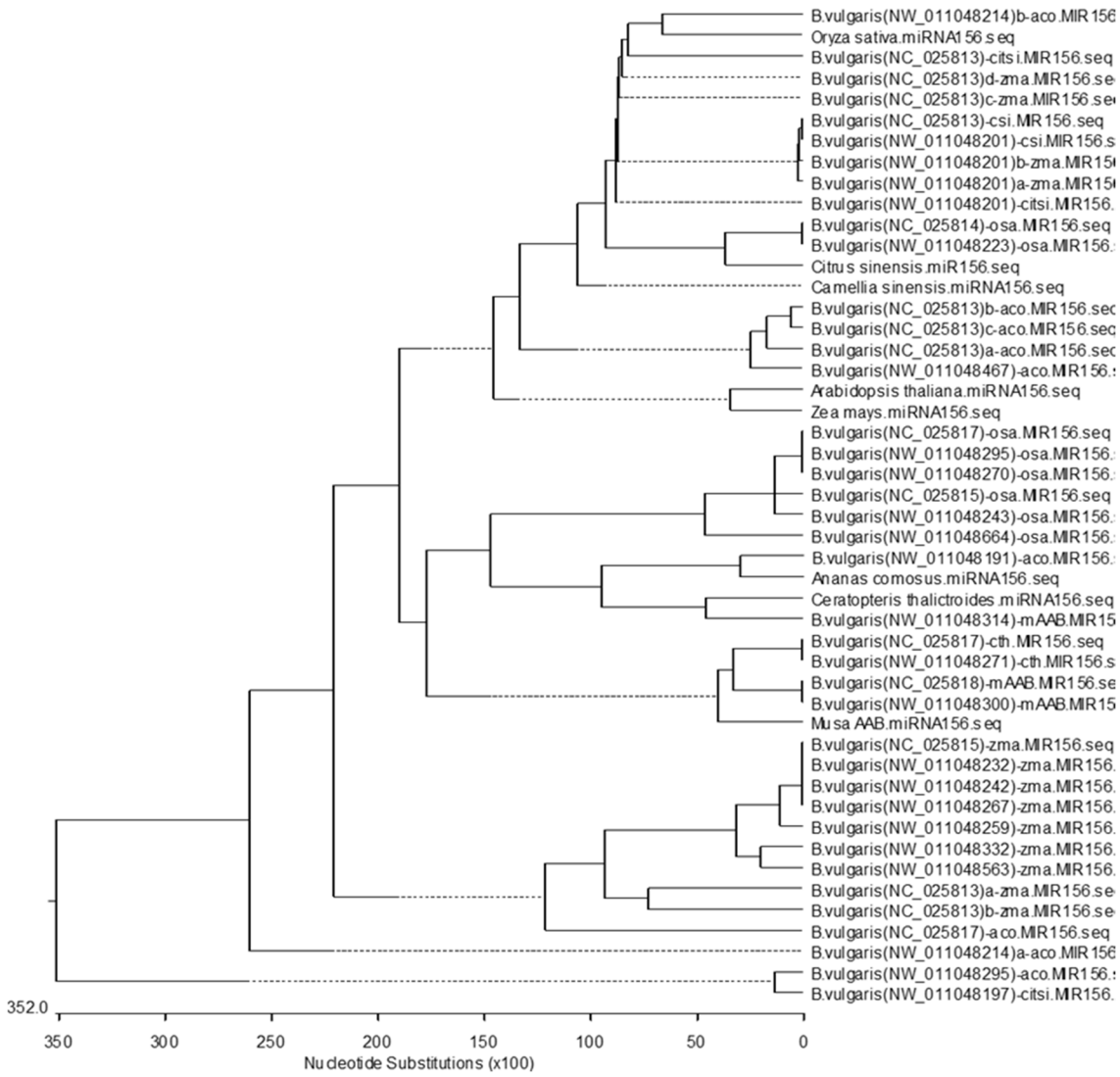
جدول ۲ مشخصات توالی‌های ژنومی چغندرقند حاصل از همردیفی *miR172* شناخته شده گیاهان مختلف

گیاهان	توالی‌های پیش‌ساز miR (نوکلئوتید)	تعداد نتایج همردیفی	شماره توالی‌های refseq-genomic با بیشترین میزان شباهت	E value	جهت	refseq-genomicهای چغندرقند ابتدا	refseq-genomicهای چغندرقند انتها
Ananas comosus	۲۱	۲۰۰	NC_025818	۰/۰۰۱	-	۴۰۹۸۰۰۴۵	۴۰۹۸۰۰۶۵
			NW_011048314	۰/۰۰۱	-	۷۲۴۸۵۳۳	۷۲۴۸۵۵۳
			NC_025813	۰/۰۰۴	+	۱۷۹۴۲۴۷	۱۷۹۴۲۶۶
			NC_025820	۰/۰۰۴	-	۷۷۶۸۰۸	۷۷۶۸۲۷
Arabidopsis thaliana	۱۰۲	۷۶	NW_011048396	۰/۰۳۳	+	۶۰۴۱۸۷	۶۰۴۲۱۴
			NC_025818	۰/۰۳۳	-	۴۰۹۸۰۰۴۱	۴۰۹۸۰۰۶۷
			NW_011048314	۰/۰۳۳	-	۷۲۴۸۵۲۹	۷۲۴۸۵۵۵
			NC_025820	۰/۰۳۳	-	۷۷۶۸۰۴	۷۷۶۸۳۰
Citrus sinensis	۱۶۲	۷۸	NC_025813	۳e−۰۶	+	۱۷۹۴۲۴۴	۱۷۹۴۲۸۳
			NC_025818	۰/۰۵۹	-	۴۰۹۸۰۰۶۷	۴۰۹۸۰۰۴۶
			NW_011048314	۰/۰۵۹	-	۷۲۴۸۵۳۴	۷۲۴۸۵۵۵
Nicotiana tabacum	۱۱۷	۵۱	aNC_025813	۳e−۰۴	+	۱۷۹۴۰۶۲	۱۷۹۴۰۹۵
			bNC_025813	۲e−۰۵	+	۱۷۹۴۲۴۴	۱۷۹۴۲۷۶
			cNC_025813	۰/۰۰۳	-	۱۷۹۴۰۶۴	۱۷۹۴۰۹۲
			aNC_025818	۰/۰۱۱	-	۴۰۹۸۰۱۴۱	۴۰۹۸۰۱۷۱
			bNC_025818	۲e−۰۵	-	۴۰۹۸۰۰۴۰	۴۰۹۸۰۰۶۷
			NC_025820	۲e−۰۵	-	۷۷۶۸۰۰	۷۷۶۹۰۹
			NW_011048314a	۰/۰۱۱	-	۷۲۴۸۶۲۹	۷۲۴۸۶۵۹
			NW_011048314b	۲e−۰۵	-	۷۲۴۸۵۲۸	۷۲۴۸۵۵۵
			NW_011048198	۰/۰۱۱	-	۲۲۱۰۴۶	۲۲۱۰۶۸
			NW_011048767	۰/۰۳۹	+	۲۷۹۱۶	۲۷۹۴۲
Oryza sativa	۱۰۹	۳۲	NC_025818a	۲e−۰۵	-	۴۰۹۸۰۰۳۸	۴۰۹۸۰۰۶۸
			NC_025818b	۰/۰۳۶	+	۴۰۹۸۰۱۴۱	۴۰۹۸۰۱۷۲
			NW_011048314a	۲e−۰۵	-	۷۲۴۸۵۲۶	۷۲۴۸۵۵۶
			NW_011048314b	۰/۰۳۶	+	۷۲۴۸۶۲۹	۷۲۴۸۶۶۰
			.NC_025813	۰/۰۱۰	-	۱۷۹۴۰۶۰	۱۷۹۴۰۹۲
			NC_025820	۰/۰۱۰	+	۷۷۶۸۷۹	۷۷۶۹۱۱
Sorghum bicolor	۱۰۲	۱۲۶	NC_025818	۰/۰۰۹	-	۴۰۹۸۰۰۴۵	۴۰۹۸۰۰۶۷
			NW_011048314	۰/۰۰۹	-	۷۲۴۸۵۳۳	۷۲۴۸۵۵۵
Vitis vinifera	۱۱۰	۴۵	NC_025813a	۶e−۰۶	-	۱۷۹۴۲۳۸	۱۷۹۴۲۷۵
			NC_025813b	۲e−۰۴	-	۱۷۹۴۰۶۰	۱۷۹۴۰۹۵
			NC_025820	۷e−۰۵	-	۷۷۶۸۰۲	۷۷۶۹۰۷
			NC_025818	۸e−۰۴	+	۴۰۹۸۰۱۴۱	۴۰۹۸۰۱۷۲
			NW_011048314	۸e−۰۴	+	۷۲۴۸۶۲	۷۲۴۸۶۶۰
Zea mays	۸۳	۲۹	NC_025818	۰/۰۰۷	-	۴۰۹۸۰۰۴۵	۴۰۹۸۰۰۶۷
			NW_011048314	۰/۰۰۷	-	۷۲۴۸۵۳۳	۷۲۴۸۵۵۵

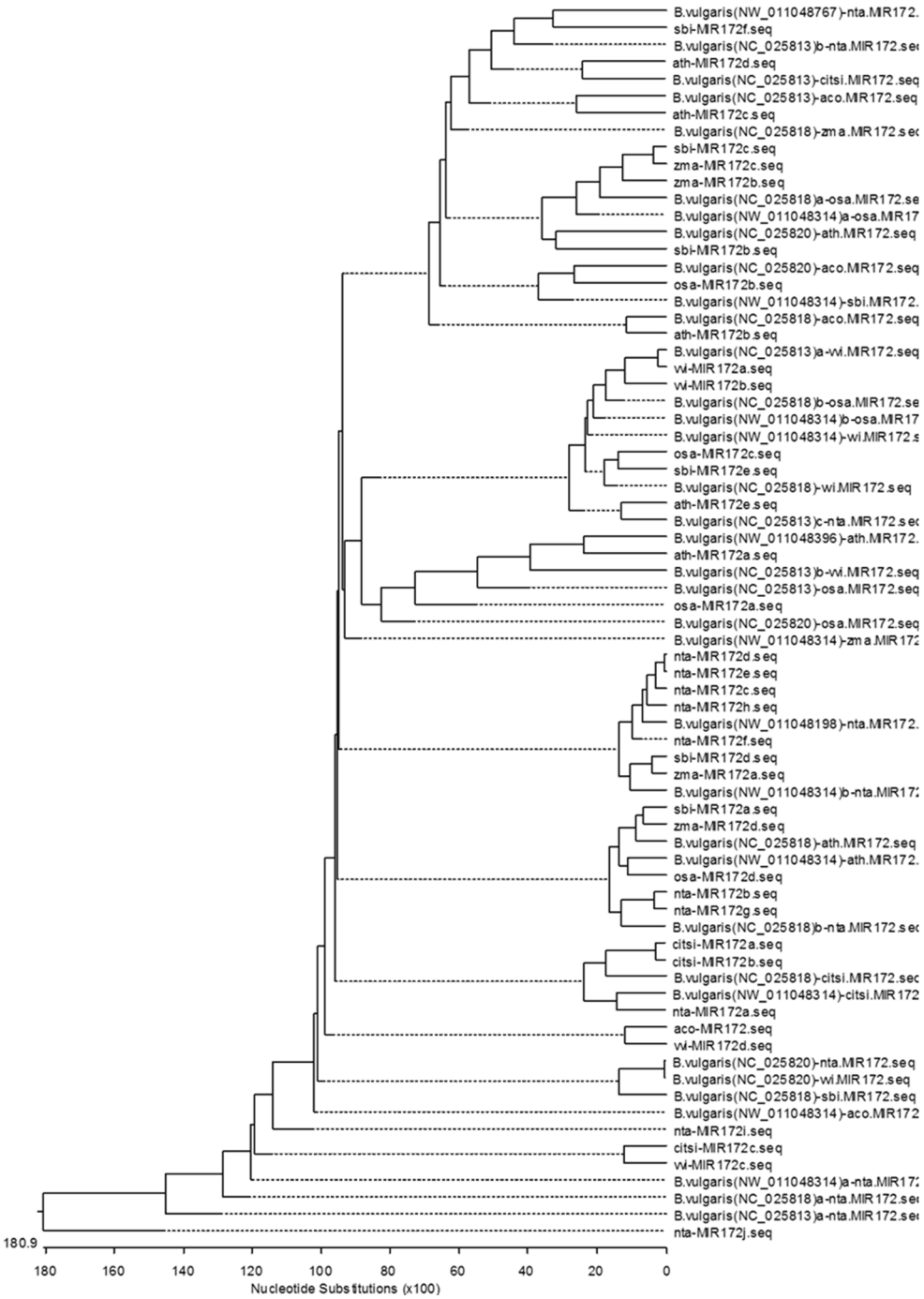
*حروف a تا d مربوط به حضور چندین توالی مشترک با miRهای گیاهان مختلف در بین Refseq-genomic چغندرقند می‌باشد.

هم‌چنین، مقایسه توالی‌های *miR156* و *miR172* در گیاهان مختلف و توالی‌های شناسایی شده در چغندرقند از طریق درخت فیلوژنتیک انجام گرفت. از لحاظ *miR156* توالی NC_025813 چغندرقند دارای بیشترین شباهت با توالی

miR156 در سایر گیاهان مانند آناناس، پرتقال، کاملیا و ذرت بود. هم‌چنین در مورد *miR172*، توالی NC_025820 چغندرقند دارای توالی مشابه با توالی پیش‌ساز *miR172* سایر گیاهان شامل آناناس، آرابیدوپسیس، توتون، برنج و انگور بود (شکل ۳ و ۴).



شکل ۳ شباهت توالی‌های ژنومی چغندرقند و *miR156*های شناخته شده قبلی چند گیاه با روش درخت فیلوژنتیک. a. مقایسه توالی*miR156* موجود در چند گیاه (*A. comosus* (aco)، *A. thaliana* (ath)، *C. sinensis* (csi)، *C. thalictroides* (cth)، *C. sinensis* (citsi)، *M. AAB* (maa)، *O. sativa* (osa) و *Z. mays* (zma)) با توالی‌های ژنومی چغندرقند. (حروف a تا k مربوط به نسخه‌های مختلف ژن‌های کدکننده *miR156* در هریک از گیاهان می‌باشد.)



شکل ٤ شباهت توالی‌های ژنومی چغندرقند و *miR172*های شناخته شده قبلی چند گیاه با روش درخت فیلوژنتیک. مقایسه توالی*miR172* موجود در چند گیاه (*A. comosus* (aco)، *A. thaliana* (ath)، *C. sinensis* (citsi)، *N. tabacum* (nta)، *O. sativa* (osa)، *S. bicolor* (sbi)، *V. vinifera* (vvi) و *Z. mays* (zma).) با توالی‌های ژنومی چغندرقند. (حروف a تا k مربوط به نسخه‌های مختلف ژن‌های کدکننده *miR172* در هریک از گیاهان می‌باشد.)

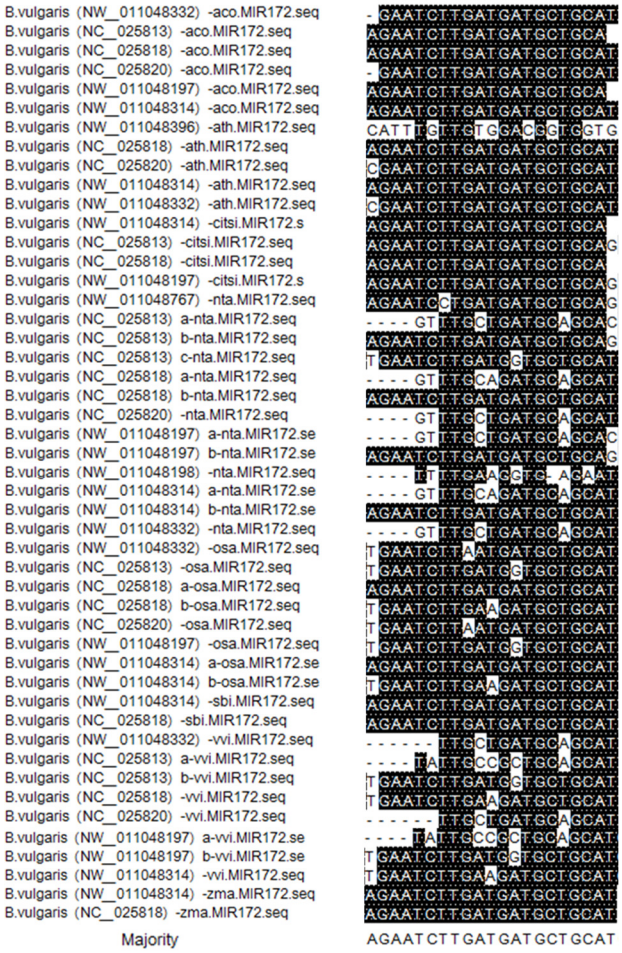
پس از شناسایی پیش‌ساز *miR156* در چغندرقند، مقایسه توالی اصلی *miR156* بالغ انجام گرفت. توالی‌های *miR156* موجود در توالی NC_025813 چغندرقند که مشابه با *miR156*های گیاهان آناناس، پرتقال، کاملیا و ذرت بود با یکدیگر هم‌ردیف شدند. همانطور که در شکل مشاهده می‌شود همه توالی‌های مشابه دارای طول ۲۱ جفت‌باز می‌باشند و توالی‌های چغندرقند که دارای توالی مشابه با سه گیاه کاملیا، پرتقال و ذرت بودند، کاملاً یکسان بوده و فقط بخشی از توالی مشابه گیاه آناناس دارای اختلافات جزئی با توالی مشابه سایر گیاهان می‌باشد. بنابراین توالی مشترک ژنوم چغندرقند با توالی ژن *miR156* در این گیاهان، به عنوان توالی اصلی ژن *miR156* بالغ در چغندرقند در نظر گرفته شد. (شکل ۵).

شکل ۵ تغییرات توالی‌های شناسایی شده *miR156* در گیاه چغندرقند مشابه توالی *miR156* گیاهان *A. comosus* (aco)، *C. sinensis* (csi)، *C. sinensis* (citsi) و *Z. mays* (zma)

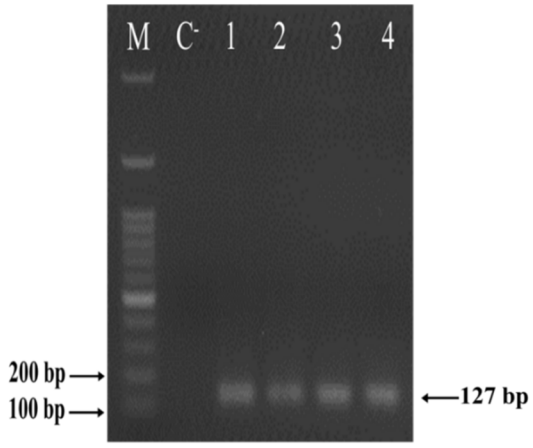
پس از تأیید شباهت توالی NC_025820 چغندرقند با توالی‌های پیش‌ساز *miRNA172* در سایر گیاهان ذکرشده، مقایسه ناحیه اصلی miRNA172 بالغ در این توالی‌ها انجام شد. مشاهده شد که همه توالی‌های ژنومی مورد بررسی در چغندر مشابه با توالی ژن *miR172* در گیاهان آناناس، آرابیدوپسیس، پرتقال، برنج، ذرت و سورگوم دارای یک ناحیه نسبتاً مشترک *miRNA172* با طول حدود ۲۱ جفت‌باز می‌باشند. توالی *miRNA172* چغندرقند مشابه با دو گیاه توتون و انگور دارای تفاوت‌های بیشتری نسبت به توالی‌های مشابه سایر گیاهان بود. در نهایت، توالی مشترک ژنوم چغندرقند مشابه با توالی ژن *miR172* در این گیاهان به عنوان توالی اصلی ژن *miR172* بالغ در چغندرقند در نظر گرفته شد (شکل ۶).

ژن کدکننده *miR156* توسط تکنیک واکنش رنجیره‌ای پلیمراز و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی MIRF و MIRR از روی DNA ژنومی چغندرقند تکثیر شد. تکثیر قطعه ژنی ۱۲۷ جفت‌باز در نمونه‌های DNA چغندرقند و عدم تکثیر آن در نمونه کنترل منفی (آب) تأییدی بر جداسازی این ژن از ژنوم چغندرقند بود (شکل ۷).

پس از تخلیص باندهای مشاهده شده بر روی ژل، توالی‌یابی قطعه DNA تکثیر شده با استفاده از آغازگر اختصاصی MIRF انجام شده و مشابهت با توالی شناسایی شده ژن کدکننده *miR156* را نشان داد (شکل ۸).



شکل ٦ تغییرات توالی‌های شناسایی شده *miR172* در گیاه چغندرقند مشابه توالی *miR172* گیاهان *A. comosus* (aco)، *A. thaliana* (ath)، *C. sinensis* (citsi)، *N. tabacum* (nta)، *O. sativa* (osa)، *S. bicolor* (sbi)، *V. vinifera* (vvi) و *Z. mays* (zma).



شکل ۷ محصول حاصل از تکثیر قطعه مربوط به ژن کدکننده *miR156* با آغازگرهای طراحی شده بر روی ژل آگارز ۲ درصد، M: نشانگر وزن مولکولی (۱۰۰ جفت‌باز)، **C-**: کنترل منفی (آب به عنوان الگو)، ۴-۱: قطعه تکثیر شده مربوط به ژن کدکننده *miR156*.

شکل ۸ مقایسه توالی قطعه تکثیر شده توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و توالی شناسایی شده ژن کدکننده *miR156*.

بحث

از آنجا که بررسی مسئله گل‌دهی و بولتینگ در بسیاری از گیاهان و به خصوص در چغندرقند از مباحث مهم و عمده کشاورزی نوین می‌باشد، شناسایی عوامل مؤثر و نقش هریک از آن‌ها در این مسیرها از اهمیت بالایی برخوردار می‌باشد. مطالعات پیشین در یوکاریوت‌ها نشان می‌دهد که انواع مختلفی از miRها در فرآیندهای پیچیده کنترل و تنظیم بیان ژن دخیل می‌باشند. miRها در سلسله گیاهی بسیار وسیع و حفاظت شده هستند و این احتمالاً نشان از یک جد مشترک در اوایل دوران تکامل می‌باشد (Zhang *et al*. 2006). روش‌های محاسباتی نشان می‌دهند که در آرابیدوپسیس و دروزوفیلا یک درصد از ژن‌های کدکننده پروتئین را miRها تشکیل می‌دهند. در صورتی که چنین شباهتی در ژنوم چغندرقند نیز موجود باشد، احتمالاً از بین ۲۷۴۲۱ ژن کدکننده پروتئین تعداد حدود ۲۷۴ ژن کدکننده miR در ژنوم چغندرقند موجود باشد. این ژن‌ها در فرآیندهای مختلفی دخالت دارند و تاکنون هیچ یک از آنها در چغندرقند شناسایی نشده‌اند. در مسیر گل‌دهی آرابیدوپسیس، دو miR شامل *miR156* و *miR172* تاکنون شناسایی شده است که هر یک از آنها دارای نقش‌های متفاوتی می‌باشند. ژن کدکننده *miR156* و ژن‌های هدف آن شامل SPLها از عوامل ژنتیکی اصلی مؤثر بر طول plastochron و تغییرات مرحله در آرابیدوپسیس می‌باشند. در این گیاه، ۱۱ ژن از بین ۱۷ ژن *SPL* شناسایی شده دارای نواحی هدف برای اتصال به miR156 می‌باشند. miR156 پس از شناسایی این نواحی به آن‌ها متصل شده و با ایجاد شکاف در DNA مانع از ادامه فعالیت آنها در انتقال به مرحله زایشی می‌شود (Wang *et al*. 2009). مطالعات اخیر نشان می‌دهد miR172 که توسط ژن‌های *SPL3* , *SPL4*، *SPL5* و *SPL9* مورد هدف miR156 فعال می‌شود، بر فاکتورهای رونویسی AP2-like اثر می‌گذارد و این فاکتورها نیز به طور معکوس بیان FT در برگ‌ها را کنترل می‌کنند (Yant *et al*. 2010). در این مطالعه، شناسایی miR های دخیل در مسیر گل‌دهی چغندرقند به روش محاسباتی انجام گرفت. به دلیل اینکه توالی چغندرقند به طور کامل شناسایی شده است، از طریق مقایسه Refseq-genomicهای چغندر با توالی‌های miR در سایر گیاهان، توالی کامل این miRها به طور کامل به دست آمد. در مورد *miR156*، توالی NC_025813 در چغندرقند به دست آمد و هیچ توالی مشابه دیگری در ژنوم چغندرقند شناسایی نشد. همچنین در *miR172*، توالی NC_025820 دارای توالی کامل پیش‌سازهای miR است و سایر توالی‌های شناسایی شده فقط دارای ناحیه اصلی miR بودند. نسخه‌های مختلف *miR156* های شناسایی

شده همگی دارای ۲۱ جفت‌باز بوده، درحالی که در مورد *miR172* اختلاف miRهای شناخته شده بین ۱۵–۲۰ جفت‌باز بود. این نواحی شناسایی شده به عنوان *miR156* و *miR172* تشکیل ساختار stem-loop را می‌دهند که در انجام عملکرد آنها بسیار با اهمیت می‌باشد. در نهایت، شناسایی انواع مختلف miR دخیل در فرآیندهای مختلف بیولوژی و نواحی هدف این miRها از مباحث با اهمیت در شناسایی هرچه دقیق‌تر فرآیندهای مهم از جمله مسیر گلدهی در چغندرقند و سایر گیاهان خواهد بود. مطالعه این ژن‌های مؤثر در فرآیند گل‌دهی راه را برای قابلیت بررسی عملکرد دقیق آن‌ها در فرآیندهای گل‌دهی و بولتینگ چغندرقند خواهد گشود. در صورتی‌که بتوان سازه مناسب برای کنترل گل‌دهی چغندرقند تهیه نمود که با وجود دوره سرمایی نسبتاً طولانی مانع از گل‌دهی گیاه چغندرقند شود، می‌توان از آن در تولید ارقام تراریخت مقاوم به بولتینگ استفاده نمود. در صورت تحقق این هدف، امکان تولید ارقام مقاوم به بولتینگ چغندرقند و توسعه کشت پاییزه چغندرقند در برخی مناطق که زمستان ملایمی دارند، فراهم می‌گردد.

منابع مورد استفاده:

References:

Ambros V. The functions of animal microRNAs. Nature 2004; 431(7006): 350–355. Retrieved from http://dx.doi.org/10.1038/nature02871

Aukerman MJ, Sakai H. Regulation of flowering time and floral organ identity by a MicroRNA and its APETALA2-like target genes. Plant Cell 2003; 15(11): 2730–2741.

Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. Cell 2004; 116(2): 281–297.

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

Biancardi E, Campbell LG, Skaracis GN, De Biaggi M. Genetics and breeding of sugar beet. Science Publishers.2005; Retrieved from https://www.crcpress.com/Genetics-and-Breeding-of-Sugar-Beet/Biancardi-Biaggi-Campbell/p/book/9781578083664

Blázquez M, Koornneef M, Putterill J. Flowering on time: Genes that regulate the floral transition: Workshop on the molecular basis of flowering time control. EMBO Reports 2001; 2(12): 1078–1082.

Chia TYP, Müller A, Jung C, Mutasa-Göttgens ES. Sugar beet contains a large CONSTANS-LIKE gene family including a CO homologue that is independent of the early-bolting (B) gene locus. Journal of Experimental Botany 2008; 59(10): 2735–2748.

Deng W, Ying H, Helliwell CA, Taylor JM, Peacock WJ, Dennis ES. Flowering Locus C (FLC) regulates development pathways throughout the life cycle of Arabidopsis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2011; 108(16): 6680–6685.

Dohm JC, Lange C, Holtgräwe D, Sörensen TR, Borchardt D, Schulz B, Lehrach H, Weisshaar B, Himmelbauer H. Palaeohexaploid ancestry for Caryophyllales inferred from extensive gene-based physical and genetic mapping of the sugar beet genome (Beta vulgaris). Plant Journal 2012; 70(3): 528–540.

Han J, Kong ML, Xie H, Sun QP, Nan ZJ, Zhang QZ, Pan JB. Identification of miRs and their targets in wheat (*Triticum aestivum* L.) by EST analysis. Genetics and Molecular Research 2013; 12(3): 3793–3805.

Hébrard C, Peterson DG, Willems G, Delaunay A, Jesson B, Lefèbvre M, Barnes S, Maury S. Epigenomics and bolting tolerance in sugar beet genotypes. Journal of Experimental Botany 2016; 67(1): 207–225.

Jahanbakhsh-Pour MH, Paknejad F, Habibi D, Aghaeezadeh M, Shahsavan-Baghdadi M. Effect of cycocel on decreasing of bolting in autumn planting of sugar beet in Karaj region. Open Science Journal 2012; 8(2): 137–146.

Jung J-H, Seo Y-H, Seo PJ, Reyes JL, Yun J, Chua N-H, Park C-M. The GIGANTEA-Regulated MicroRNA172 mediates photoperiodic flowering independent of CONSTANS in Arabidopsis. Plant Cell Online 2007; 19(9): 2736–2748.

Kim JJ, Lee JH, Kim W, Jung HS, Huijser P, Ahn JH. The microRNA156-SQUAMOSA promoter binding protein-like3 module regulates ambient temperature-responsive flowering via flowering Locus T in Arabidopsis. Plant Physiology 2012; 159(1): 461–478.

Kim SY, Park BS, Kwon SJ, Kim J, Lim MH, Park YD, Kim DY, Suh SC, Jin YM, Ahn JH, Lee YH. Delayed flowering time in Arabidopsis and Brassica rapa by the overexpression of FLOWERING LOCUS C (FLC) homologs isolated from Chinese cabbage (Brassica rapa L. ssp. pekinensis). Plant Cell Reports 2007; 26(3): 327–336.

Kobayashi Y, Weigel D. Move on up, it's time for change - Mobile signals controlling photoperiod-dependent flowering. Genes & Development 2007; 21(19): 2371–2384.

Krol J, Sobczak K, Wilczynska U, Drath M, Jasinska A, Kaczynska D, Krzyzosiak WJ. Structural features of microRNA (miR) precursors and their relevance to miR biogenesis and small interfering RNA/short hairpin RNA design. Journal of Biological Chemistry 2004; 279(40): 42230–42239.

Lau NC, Lim LP, Weinstein EG, Bartel DP. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in Caenorhabditis Elegans. Science 2001; 294(5543): 858–862.

Li Y, Li W, Jin Y-X. Computational identification of novel family members of microRNA genes in Arabidopsis thaliana and Oryza sativa. Acta Biochimica et Biophysica Sinica 2005; 37(2): 75–87.

Matthias PO, Ulrike B, Sarah D, Rene HP, Marcus L, Claudia M, Detlef B. Overwintering of genetically modfied sugar vulgaris L. subsp. vulgaris, as a source for dispersal of transgenic pollen. Euphytica. 1999; 108(3): 181–186.

Michaels SD. Flowering time regulation produces much fruit. Current Opinion in Plant Biology 2009; 12(1): 75–80.

Mirzaie-Asl A, Asgari M, Alimirzaie M. Evaluation of Flowering Pathways in Arabidopsis thaliana (in Persian). Journal of Crop Biotechnology 2017; 7(18): 57–72. Retrieved from http://ocam.journals.pnu.ac.ir/article_4207_652.html

Mlotshwa S, Yang Z, Kim Y, Chen X. Floral patterning defects induced by Arabidopsis APETALA2 and microRNA172 expression in Nicotiana benthamiana. Plant Molecular Biology 2006; 61(4–5): 781–793.

Murray HG, Thompson WF. Rapid isolation of high molecular weight DNA. Nucleic Acids Research 1980; 8, 4321-4325.

Navarro C, Cruz-Oró E, Prat S. Conserved function of FLOWERING LOCUS T (FT) homologues as signals for storage organ differentiation. Current Opinion in Plant Biology 2015; 23 45–53.

Palatnik JF, Allen E, Wu X, Schommer C, Schwab R, Carrington JC, Weigel D. Control of leaf morphogenesis by microRNAs. Nature 2003; 425(6955): 257–263.

Parcy F. Flowering: A time for integration. The International Journal of Developmental Biology 2005; 49(5–6): 585–593.

Pfeiffer N, Tränkner C, Lemnian I, Grosse I, Müller AE, Jung C, Kopisch-Obuch FJ. Genetic analysis of bolting after winter in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). Theoretical and Applied Genetics 2014; 127(11): 2479–2489.

Pin PA, Zhang W, Vogt SH, Dally N, Büttner B, Schulze-Buxloh G, Jelly NS, Chia TY, Mutasa-Göttgens ES, Dohm JC, Himmelbauer H, Weisshaar B, Kraus J, Gielen JJ, Lommel M, Weyens G, Wahl B, Schechert A, Nilsson O, Jung C, Kraft T, Müller AE. The role of a pseudo-response regulator gene in life cycle adaptation and domestication of beet. Current Biology 2012; 22(12): 1095–1101.

Pin P, Life cycle and flowering time control in beet. Dissertation, Department of Forest Genetics and Plant Physiology, Umeå. 2012.

Rana TM. Illuminating the silence: Understanding the structure and function of small RNAs. Nature Reviews Molecular Cell Biology 2007; 8(1): 23–36.

Reinhart BJ, Weinstein EG, Rhoades MW, Bartel B, Bartel DP. MicroRNAs in plants. Genes & Development 2002; 16(13): 1616–1626.

Sadeghian SY, Johansson E. Genetic study of bolting and stem length in sugar beet (Beta vulgaris L.) using a factorial cross design. Euphytica 1992; 65(3): 177–185.

Schwarz DS, Zamore PD. Why do miRs live in the miRNP? Genes & Development 2002; 16(9): 1025–1031.

Simpson GG. The autonomous pathway: Epigenetic and post-transcriptional gene regulation in the control of Arabidopsis flowering time. Current Opinion in Plant Biology 2004; 7(5): 570-574.

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

Wang CM, Liu P, Sun F, Li L, Liu P, Ye J, Yue GH. Isolation and identification of miRs in Jatropha curcas. International Journal of Biological Sciences 2012; 8(3): 418–429.

Wang JW, Schwab R, Czech B, Mica E, Weigel D. Dual effects of miR156-targeted SPL genes and CYP78A5/KLUH on plastochron length and organ size in Arabidopsis thaliana. Plant Cell Online 2008; 20(5): 1231–1243.

Wang JW, Czech B, Weigel D. MiR156-regulated SPL transcription factors define an endogenous flowering pathway in Arabidopsis thaliana. Cell 2009; 138(4): 738–749.

Xu P, Vernooy SY, Guo M, Hay BA. The drosophila microRNA mir-14 suppresses cell death and is required for normal fat metabolism. Current Biology 2003; 13(9): 790–795.

Yant L, Mathieu J, Dinh TT, Ott F, Lanz C, Wollmann H, Chen X, Schmid M. Orchestration of the floral transition and floral development in Arabidopsis by the bifunctional transcription factor Apetala2. Plant Cell Online 2010; 22(7): 2156–2170.

Zhang B, Pan X, Cobb GP, Anderson TA. Plant microRNA: A small regulatory molecule with big impact. Developmental Biology 2006; 289(1): 3–16.

Zhang BH, Pan XP, Wang QL, Cobb GP, Anderson TA. Identification and characterization of new plant microRNAs using EST analysis. Cell Research 2005; 15(5): 336–360.