

توالی یابی ژن همساخت LEAFY در روپاس (*Solanum villosum Mill.*)

محسن اسدی خانوکی ^۱M.Sc.، فرخنده رضائزاد ^{۱*}Ph.D.، غلامرضا شریفی سپرچی ^۲Ph.D.، حسینعلی ساسان ^۱Ph.D.

۱- دانشگاه شهید باهنر کرمان، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی، کدپستی: ۷۶۱۶۹۱۴۱۱۱

۲- دانشگاه هرمزگان، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، گروه کشاورزی

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: frezanejad@gmail.com

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۷/۸

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱/۲۶

چکیده

هدف: هدف از این تحقیق شناسایی همساخت این ژن در گونه‌های تجاریزی به نام روپاس (*Solanum villosum Mill.*) است.

مواد و روش‌ها: RNA کل از مریستم راس شاخساره استخراج و برای ساخت cDNA استفاده گردید. آغازگرهای اختصاصی بر اساس توالی ژن‌های همساخت LEAFY در سایر گیاهان هم جنس و هم خانواده، طراحی و از آن‌ها در واکنش RT-PCR استفاده گردید. محصول RT-PCR پس از خالص سازی، توالی یابی گردید.

نتایج: نتایج نشان دهنده تکثیر قطعه مورد نظر از ژن به طول ۵۴۰ نوکلئوتید بود که SvLFY نامگذاری شد. مقایسه توالی پروتئین استنباطی SvLFY، با پروتئین‌های همساخت LEAFY در سایر گیاهان نشان دهنده شباهت زیاد این قطعه با ناحیه C ترمینال آن پروتئین‌ها بود.

نتیجه گیری: این نتایج نشان می‌دهد که به احتمال SvLFY نیز همانند LEAFY در نمو گل نقش دارد و می‌تواند به عنوان ژن تعیین هویت مریستم گل در روپاس عمل کند.

واژگان کلیدی: گل‌دهی، ژن LEAFY، RT-PCR، روپاس

مقدمه

LFY در نمو گل، تحریک رونویسی چهار کلاس ژنی (ABCE) تعیین هویت اندام گل است. اگرچه در نهاندانگان عمل کرد اصلی LFY، کنترل نمو گل است اما این ژن در برخی از گونه‌ها نقش‌های دیگری نیز بر عهده دارد. دخالت در نمو مریستم راس ساقه در تنباکو، نمو برگ‌های مرکب در حبوبات و گوجه فرنگی و منشعب شدن خوشه در برنج از جمله‌ی این عمل کردهاست (۱۶). همچنین یافته‌های اخیر در آرابیدوپسیس نشان می‌دهد LFY در طول رشد رویشی، مسیره‌های دفاعی گیاه را نیز تنظیم می‌کند (۱۷).

خانواده سیب زمینی دارای بیش از ۹۰ جنس و بین ۲۰۰۰ تا ۳۰۰۰ گونه است که در سراسر مناطق استوایی و معتدله پراکنده شده‌اند. در این خانواده جنس *Solanum* بزرگترین و پیچیده‌ترین جنس است. این جنس دارای بیش از ۱۵۰۰ گونه است که اکثر آن‌ها توزیع جهانی داشته و دارای اهمیت اقتصادی می‌باشند (۱۸). سیب زمینی، گوجه فرنگی و تنباکو از جمله گیاهان مشهور این خانواده هستند که علاوه بر مصارف غذایی و دارویی به عنوان گیاه مدل نیز شناخته می‌شوند.

گیاه روپاس (۱۹) یا تاجریزی (*Solanum villosum* Mill.) از راسته Solanales، خانواده Solanaceae، گیاهی یک ساله، بدون کرک یا کرک‌دار، سبب مات یا متمایل به زرد، بسیار کوتاه، خوابیده بر خاک و علفی است. ساقه منشعب، برگ‌ها تخم مرغی وسیع، مثلثی، کامل، لبدار یا دندانه‌دار می‌باشند. گل‌ها کوچک، سفید، هر ۵ تا ۸ عدد روی یک محور گل‌دهنده، گل‌پوش ۵ بخشی، میوه سته، کروی شکل، ابتدا سبز سپس قرمز رنگ (هرگز سیاه نمی‌شود) و به قطر ۵ تا ۷ میلی‌متر است (۲۰). این گیاه از جمله گونه‌های دارویی و مهم جنس *Solanum* به‌شمار می‌آیند و در بسیاری از کشورهای در حال توسعه علاوه بر مصارف دارویی گوناگون از برگ، ساقه و میوه آن به‌عنوان سبزی و میوه استفاده می‌شود (۱۸). تاکنون خواص ضد ویروسی، ضد هیپاتیتی، ضد توموری، ضد انگلی، ضد هیستامینی و ضد حساسیتی ترکیبات موجود در میوه و سایر اندام‌های آن شناخته شده است (۲۱-۲۵).

در برخی از گونه‌های خانواده سیب زمینی ژن‌های همساخت LFY شناسایی گردیده‌اند که تعدادی از آن‌ها عبارتند از: StLFY (۲۶)، FALSIFLORA (FA) در گوجه فرنگی (۲۶)، CaLFY در فلفل قرمز (۲۸)،

گل به‌عنوان ساختار زایشی موثر، عامل اصلی موفقیت تکاملی گیاهان گل‌دار یا نهاندانگان است که بزرگ‌ترین گروه گیاهان را تشکیل می‌دهند (۱). گذر به گل‌دهی تحت کنترل شبکه ژنتیکی پیچیده‌ای است که متأثر از محرک‌های درونی و محیطی گوناگون است (۲ و ۳). در آرابیدوپسیس ۴ مسیر دوره نوری، بهاره شدن، خودگردان و جیبرلیک اسید زمان گل‌دهی را تحت تاثیر قرار می‌دهند. (۴). مسیره‌های دوره نوری و بهاره شدن به علائم محیطی مانند نور و دما واکنش می‌دهند، اما مسیره‌های خودگردان و جیبرلیک اسید متأثر از وضعیت نموی داخلی گیاه هستند (۵ و ۶). ژن LFY (LFY) این مسیره‌ها را یکی کرده و نقش مهمی در تنظیم و کنترل گل‌دهی دارد (۴ و ۷). همچنین این ژن در تحریک سایر ژن‌های دخیل در نمو گل نقش دارد (۱ و ۸).

ژن FLORICULA (FLO) به‌عنوان هم‌ساخت ژن LFY در گیاه گل میمون شناسایی شده است (۹). تاکنون در بسیاری از گونه‌های دیگر نیز ژن‌های همساخت LFY شناسایی شده‌اند (۴). همگی این ژن‌ها به‌صورت منفرد یا تعداد نسخه‌های کم در ژنوم وجود دارند (۱۰). در آرابیدوپسیس، بیان LFY برای نمو راس شاخساره و مریستم‌های جانبی و نیز آغاز گل‌دهی لازم بوده و اثر مشابهی در سایر گونه‌های دو لپه و تک لپه دارد (۱۱). این ژن در آرابیدوپسیس روی کروموزوم شماره پنج قرار دارد (۱۲) و دارای سه اگزون و دو اینترون در نواحی حفاظت شده بوده و یک فاکتور رونویسی مخصوص گیاه را کد می‌کند. LFY در بین تمامی گونه‌های گیاهان خشکی از خزها تا گیاهان گل‌دار، حفاظت شده است (۱۳). اخیراً Sayou و همکاران (۱۴) موفق به شناسایی ژن LFY در برخی گونه‌های جلبک سبز شدند. بنابراین LFY تنها اختصاص به گیاهان خشکی ندارد (۱۳). همساختی توالی آمینو اسید بین پروتئین‌های همساخت LFY بین ۴۴ تا ۹۹ درصد متغیر است (۴).

LFY قبل از سایر ژن‌های تعیین هویت مریستم گل بیان می‌شود. اگرچه خود به‌عنوان تنظیم کننده هویت مریستم عمل می‌کند اما فعالیت سایر تنظیم کنندگان مهم هویت مریستم را نیز افزایش می‌دهد (۷ و ۱۵). جهش در این ژن شدیدترین اثر را روی هویت مریستم راسی دارد. در زمانی که گیاهان تیپ وحشی شروع به گل‌دهی می‌کنند، جهش یافته‌های Ify همچنان تولید برگ و شاخساره جانبی می‌کنند (۷). یکی دیگر از نقش‌های

استخراج RNA کل از مریستم راس شاخساره و با استفاده از کیت استخراج RNA (Qiagen, RNeasy Plant Mini Kit, Germany) به روش ذکر شده در کیت استخراج شد. برای بررسی حضور و ارزیابی خلوص از روش الکتروفورز افقی روی ژل آگارز ۱ درصد استفاده شد (۳۱). به منظور حذف آلودگی احتمالی DNA از آنزیم DNase شرکت فرمنتاز (Fermentas DNase I, RNase-free) به روش توصیه شده شرکت استفاده گردید. همچنین با استفاده از کیت ساخت cDNA شرکت فرمنتاز (RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit) و به روش ذکر شده در آن از روی RNA تیمار شده، رشته اول cDNA تهیه گردید. در نهایت از این cDNA در PCR به عنوان الگو استفاده شد.

برای PCR، مقدار ۲۰۰ نانوگرم از cDNA و ۱ میکرولیتر از آغازگرهای پیش‌برنده و برگرداننده با غلظت نهایی ۰/۵ میکرومولار، درون لوله لیوفیلیزه PCR (BIONEER, AccuPower® PCR PreMix, Korea) ریخته و با آب دوبار تقطیر استریل به حجم ۲۰ میکرولیتر رسانده و با پیپت کردن، به طور کامل مخلوط شد. انجام PCR توسط ترموسایکلر مدل PTC (MJ Mini Personal Thermal 1148) (Cycler BioRad, USA) و با مرحله واسرشتگی اولیه به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد آغاز گردید و با انجام ۳۰ چرخه با دمای واسرشتگی ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، دمای اتصال، ۶۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و دمای طویل شدن، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه ادامه یافت و با مرحله طویل شدن به مدت ۸ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به اتمام رسید. پس از انجام PCR، کیفیت محصول بر روی ژل آگارز ۱ درصد بررسی شد.

توالی یابی محصول PCR محصول PCR، به وسیله کیت تخلیص محصول PCR شرکت کی‌تاژن (QIAquick® PCR Purification Kit) و به روش ذکر شده در کیت، تخلیص شده و به همراه آغازگرهای پیش‌برنده و برگرداننده جهت تعیین توالی به شرکت سینژن ارسال گردید. نتایج حاصل از تعیین توالی ابتدا با نرم‌افزارهای BLAST و ClustalW هم‌ردیف شده و سپس توالی اسید آمینه استنباطی و توالی‌های برخی از همساخت‌های LFY موجود در بانک ژن NCBI با استفاده از نرم‌افزار DNAMAN 5.2.2 مقایسه و میزان شباهت آن‌ها بررسی گردید.

در ABERRANT LEAF AND FLOWER (ALF) اطلسی (۲۹)، NFL1 و NFL2 در تنباکو (۳۰).

بر اساس جستجوهای انجام شده، پژوهشی در رابطه با شناسایی ژن‌ها و مکانیسم‌های دخیل در گل‌دهی گیاه روپاس صورت نگرفته است. از این رو با توجه به اهمیت جنس *Solanum* و نقش کلیدی ژن LEAFY در پیش‌برد گل‌دهی، شناسایی و تعیین توالی این ژن می‌تواند اولین قدم در راه درک ساختار، عمل کرد و نقش آن در گل‌دهی و سایر مراحل نمو گیاه مورد مطالعه باشد.

مواد و روش‌ها

گیاه مورد مطالعه: بذر روپاس (*Solanum villosum Mill.*) از شهر ساردوئیه واقع در ۸۰ کیلومتری جیرفت (طول جغرافیایی "13°29'14" N، "21°18'57" E و عرض جغرافیایی "13°29'14" N)، جمع آوری گردید. در خردادماه، بذرها در گلدان‌هایی حاوی مخلوط ۱:۱ از خاک و ماسه کشت شدند. پس از گل‌دهی و پدیدار شدن اولین غنچه‌های گل، از بافت مریستم راس شاخساره (۵ میلی‌متر از راس ساقه) برای مطالعات مولکولی استفاده گردید.

طراحی آغازگرها: برای شناسایی ژن همساخت LFY در روپاس، آغازگرهای مناسب بر اساس توالی‌های ژن موجود از سایر گیاهان هم جنس و هم خانواده طراحی و از آن‌ها در واکنش RT-PCR استفاده گردید. بدین منظور توالی ژن همساخت LFY در سبب زمینی (Accession no: EF062357)، گوجه (Accession no: AF197935)، فلفل قرمز (Accession no: EU000254) و اطلسی (Accession no: AF030171) از بانک ژن NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) گرفته شد. هم‌ردیفی توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار ClustalW2 صورت گرفت. براساس نقاط حفاظت شده موجود در نیمه انتهایی ژن، آغازگرهایی با استفاده از نرم‌افزار GeneRunner 3.05 طراحی گردید و سپس مناسب بودن آن‌ها به وسیله نرم‌افزار BLAST مورد بررسی قرار گرفت. سنتز آغازگرهای طراحی شده توسط شرکت سینژن صورت گرفت. توالی آغازگرها به صورت زیر می‌باشد:

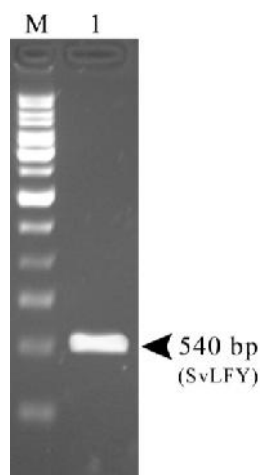
F-SvLFY < 5 -GCGAGAGACAAAGGGAGCATC-3 >

R-SvLFY < 5 -ATTAGAAATGTGGCAGGTGATC-3 >

نتایج

نتایج حاصل از توالی یابی محصول PCR، نشان دهنده توالی یابی مطلوب قطعه ۵۴۰ جفت بازی مربوط به ناحیه کد کننده ژن LFY بود. توالی خوانده شده مربوط به بخش‌هایی از اگزون ۲ (۱۶۴ نوکلئوتید) و طول کامل اگزون ۳ (۳۷۵ نوکلئوتید) است (شکل ۲).

حضور سه باند پرننگ مربوط به RNAهای ریبوزومی که نشان دهنده کیفیت مطلوب RNA استخراج شده برای انجام RT-PCR است روی ژل آگارز دیده شد. الکتروفورز محصول PCR روی ژل آگارز ۱ درصد نشان داد که قطعه اختصاصی برای ژن LFY به طول ۵۴۰ جفت باز به خوبی تکثیر شده است (شکل ۱). این مطلب نشان دهنده طراحی و عملکرد صحیح آغازگرها و برنامه PCR مناسب (به خصوص دمای اتصال) می‌باشد.



شکل ۱: تکثیر ناحیه حفاظت شده *SvLFY* توسط RT-PCR (۱) محصول PCR ۵۴۰ جفت بازی با استفاده از آغازگرهای *F-SvLFY* و *M-R-SvLFY* نشانگر مولکولی *DNA 1kb* (Fermentase).

```

F-SvLFY
1 AGAGACAAAGGAGCATCCGTTTATCGTGACGGAGCCTGGAGAAGTGGCACGTGGCAAAAAGAACGGCTTAGATTACTTATTCCATCTTT
1 R Q R E H P F I V T E P G E V A R G K K N G L D Y L F H L
91 ATGAACAATGCCGCGATTTTTTAATCCAAGTTCAGAATATTTGCTAAGGAAACGAGGTCAAAAATGTCCCACTAAGCGTACGCAATCAGGTGT
30 Y E Q C R D F L I Q V Q N I A K E R G E K C P T K V T N Q V
181 TCAGGTACGCGAAGAAGGCAGGAGCAAGCTACATAAACAAGCCAAAAATGCGACACTATGTGCATTGCTATGCACCTTCATTGCGCTTGATG
60 F R Y A K K A G A S Y I N K P K M R H Y V H C Y A L H C L D
271 AGGATGCTTCCAATGCTCTGAGGAGAGCTTTCAAGCAGCCAGGAGAGAACGTTGGGGCATCGAGACAGCGGTGTTACAACCTCTCGGTGG
90 E D A S N A L R R A F K E R G E N V G A W R Q A C Y K P L V
361 CCATAGCTGCTCGACAAGGCTGGGATATCGATGCCATCTTCAATGCACATCCTCGACTTGGCCATTTGGTATGTCGCCACCAAGCTCCGGC
120 A I A A R Q G W D I D A I F N A H P R L A I W Y V P T K L R
451 AGCTCTGCCATCTGAAAGAAGCAACCGCGCTGCAGCTGCTTCTAGCTCCGTTTCTGGTGGTGTGGCTGATCACCTGNCNNNTTCTAAT
150 Q L C H S E R S N A A A A A S S S V S G G V A D H L X X F *
R-SvLFY

```

شکل ۲: توالی نوکلئوتید و آمینواسید استنباطی *cdna* ژن *SvLFY* علامت ستاره نشان دهنده کدون ختم است. X نشان دهنده آمینواسیدهای نامشخص و پیکان‌های بالای توالی‌ها نشان دهنده آغازگرهای استفاده شده در RT-PCR است.

زمینی (Accession no: EF062357)، گوجه (Accession no: AF197935) و اطلسی (Accession no: AF030171) به ترتیب ۹۴، ۹۳ و ۸۹ درصد شباهت دارد. بنابراین این توالی

نتایج حاصل از BLAST نشان دهنده شباهت بسیار بالای این قطعه با سایر ژن‌های همساخت LFY است. به عنوان مثال این قطعه در سطح نوکلئوتیدی با ژن‌های همساخت LFY در سیب

۱۷۸ اسید آمینه است (۲ اسید آمینه نامشخص) در مراحل بعدی جهت بررسی شباهت آن با سایر پروتئین‌های همساخت LFY استفاده گردید (شکل ۳).

مربوط به ژن همساخت LFY در گیاه روپاس (*Solanum villosum*) است. این ژن با نام SvLFY (Accession no:KF752589) در بانک ژن ثبت گردید. با توجه به ۵۴۰ جفت باز تعیین توالی شده، توالی پروتئین استنباطی این قطعه از ژن به دست آمد. از توالی این پروتئین استنباطی که دارای

LFY	MDR.EEETSSG.LFRWNEITRALVQCF.....PYDFF.....LCCQVTV...POTRAFQKMKKQOQORRRKEM...LT	60
FLO	MDR.DAF...LEKWDHITRALVQCF.....LDAVAF...PAPP...FOAPSYV.SGKAPQRRRKNYK...SE	56
ALF	MDR.EAFSAS.LFKWDFPGAMEPFSR...LLEAVAF...QEPPEFLPFPQ...LPPAYS.SGGMRQRRRQVY...VER	67
NFL1	MDR.EAFSAS.LFKWDFPGAMEPFSR...LLEAVAF...PEPPVLPFPQ...LSAAYSAGGGMRQRRRQVY...TGR	69
NFL2	MDR.EAFSAS.LFKWDFPGAMEPFSR...LLEAVAF...PEPPVLPFPQ...LSAAYSAGGGMRQRRRQVY...AAR	69
CaLFY	MDR.EAFSAS.LFKWDFPGAMEPFSR...LDFVAF...ELLPLSTAP...YSIRSS.GGRLKQRRRQVY...ATGR	67
FA	MDR.EAFSAS.LFKWDFPGAMEPFSR...LLEVAF...PEPPVLPFPQ...LPTSSY.GGMRQRRRQVY...GR	67
StLFY	MDR.EAFSAS.LFKWDFPGAMEPFSR...LLEVAF...PEPPVLPFPQ...LPTSSY.GGMRQRRRQVY...ATTATGR	71
SvLFY	0
Consensus	m d p e a f s a s l f k w d p g a m e p f s r r l l e a v a p p e p p p q p l s g g g m r q r r r k v y v e r	
LFY	SVET.....DED...VHEGDDLDGMDNGHGG...SGLGTSQREHPPIVTV...EPGEVARGKKNGLDYLFHYEQC	122
FLO	SRMASME.DDDDD...ETEGALD...DENLY.....SGLGTSQREHPPIVTV...EPGEVARGKKNGLDYLFHYEQC	118
ALF	ERRR.SS.MEEDDET...EE.GQEDNEDYNINNEG...GICISERQREHPPIVTV...EPGEVARGKKNGLDYLFHYEQC	135
NFL1	ERRRCAS..AEDEDET...EE.GQED...DWNIN.DAG...GICISERQREHPPIVTV...EPGEVARGKKNGLDYLFHYEQC	135
NFL2	ERRRCAS..AEDEDET...EE.GQED...DWNIN.DAG...GICISERQREHPPIVTV...EPGEVARGKKNGLDYLFHYEQC	135
CaLFY	ERRR.MS..GDDDET...EEFGDD...DENINEAGGGGGGCTSERQREHPPIVTV...EPGEVARGKKNGLDYLFHYEQC	138
FA	ERR.....GDDDET...EELGDD...DENINCGGG...GGGISERQREHPPIVTV...EPGEVARGKKNGLDYLFHYEQC	132
StLFY	ERRR.AS..GDDDET...EYFGDD...DENINEGGGA...GGGISERQREHPPIVTV...EPGEVARGKKNGLDYLFHYEQC	141
SvLFY	33
Consensus	e r r r s s e e d e t e e g e d n i n g g g i s e r g e h p p i v t v e p g e v a r g k k n g l d y l f h y e q c	
LFY	RFPLGVNNAKRGKCEPTKVTNQVFRMAKAGASYINKPKRHRYHGYALHCLDEDASNAIRRAFKERGENVGAWQA	202
FLO	RFPLGVNNAKRGKCEPTKVTNQVFRMAKAGASYINKPKRHRYHGYALHCLDEDASNAIRRAFKERGENVGAWQA	198
ALF	RFPLGVNNAKRGKCEPTKVTNQVFRMAKAGASYINKPKRHRYHGYALHCLDEDASNAIRRAFKERGENVGAWQA	215
NFL1	RFPLGVNNAKRGKCEPTKVTNQVFRMAKAGASYINKPKRHRYHGYALHCLDEDASNAIRRAFKERGENVGAWQA	215
NFL2	RFPLGVNNAKRGKCEPTKVTNQVFRMAKAGASYINKPKRHRYHGYALHCLDEDASNAIRRAFKERGENVGAWQA	215
CaLFY	RFPLGVNNAKRGKCEPTKVTNQVFRMAKAGASYINKPKRHRYHGYALHCLDEDASNAIRRAFKERGENVGAWQA	218
FA	RFPLGVNNAKRGKCEPTKVTNQVFRMAKAGASYINKPKRHRYHGYALHCLDEDASNAIRRAFKERGENVGAWQA	212
StLFY	RFPLGVNNAKRGKCEPTKVTNQVFRMAKAGASYINKPKRHRYHGYALHCLDEDASNAIRRAFKERGENVGAWQA	221
SvLFY	RFPLGVNNAKRGKCEPTKVTNQVFRMAKAGASYINKPKRHRYHGYALHCLDEDASNAIRRAFKERGENVGAWQA	113
Consensus	r d f l g v n n a k r g k c e p t k v t n q v f r m a k a g a s y i n k p k r h y h g y a l h c l d e d a s n a i r r a f k e r g e n v g a w q a	
LTY	CYKPLVNAAR.DGWD.DAIFNAPRLAIWYVPTLRQLCHSERNA.AAAASSS...VSGG.VADHLEPE.....	279
FLO	CYKPLVNAAR.DGWD.DAIFNAPRLAIWYVPTLRQLCHSERNA.AAAASSS...VSGG.PADHLPF.....	263
ALF	CYKPLVNAAR.DGWD.DAIFNAPRLAIWYVPTLRQLCHSERNA.AAAASSS...VSGG.VYV.DHLPF.....	280
NFL1	CYKPLVNAAR.DGWD.DAIFNAPRLAIWYVPTLRQLCHSERNA.AAAASSS...VSGG.VYV.DHLPF.....	280
NFL2	CYKPLVNAAR.DGWD.DAIFNAPRLAIWYVPTLRQLCHSERNA.AAAASSS...VSGG.VYV.DHLPF.....	283
CaLFY	CYKPLVNAAR.DGWD.DAIFNAPRLAIWYVPTLRQLCHSERNA.AAAASSS...VSGG.VYV.DHLPF.....	285
FA	CYKPLVNAAR.DGWD.DAIFNAPRLAIWYVPTLRQLCHSERNA.AAAASSS...VSGG.VADHLEPE.....	277
StLFY	CYKPLVNAAR.DGWD.DAIFNAPRLAIWYVPTLRQLCHSERNA.AAAASSS...VSGG.VADHLEPE.....	206
SvLFY	CYKPLVNAAR.DGWD.DAIFNAPRLAIWYVPTLRQLCHSERNA.AAAASSS...VSGG.VADHLEPE.....	178
Consensus	c y k p l v n a a r d g w d d a i f n a p r l a i w y v p t l r q l c h s e r n a a a a s s s v a g g v a d h l p e	

شکل ۳: مقایسه توالی پروتئین SvLFY با برخی دیگر از پروتئین‌های همساخت LFY (شماره بازیابی درون پرانتز). LFY در *Arabidopsis thaliana* (NP_200993)، FLO در *Antirrhinum majus* (AAA62574)، ALF در *Petunia x hybrid* (O22621)، NFL1 و NFL2 در *Nicotiana glauca* (AAF66101)، CaLFY در *Solanum lycopersicum* (Q40504 و Q40505)، FA در *Capsicum annuum* (ABS18396)، StLFY در *Solanum tuberosum* (ABY77762). نواحی سیاه رنگ نشان دهنده آمینو اسیدهای یکسان و نوک پیکان نشان دهنده دنباله هیستیدینی حفاظت شده است. مثلث‌ها نشان دهنده اسید آمینه‌های حفاظت شده دخیل در تشخیص موتیف DNA ژن‌های هدف.

CaLFY در فلفل قرمز (۲۸)، FA در گوجه فرنگی (۲۶) و StLFY در سیب زمینی (۲۷) مقایسه گردید (شکل ۳). مقایسه توالی آمینو اسید استنباطی SvLFY و دیگر همساخت‌های LFY، نشان دهنده شباهت زیاد آن‌ها بود. این پروتئین‌ها معمولاً دارای دو ناحیه حفاظت شده در N ترمینال و C ترمینال خود هستند. این نواحی حفاظت شده در بسیاری از بازدانگان و نهاندانگان وجود دارد (۳۴ و ۳۵). با توجه به ناحیه‌ای که توالی یابی گردیده است و شباهت بالای آن با سایر همساخت‌های LFY می‌توان نتیجه گرفت که ناحیه حفاظت شده C ترمینال، در پروتئین SvLFY نیز وجود دارد. بسیاری از پروتئین‌های همساخت LFY در نهاندانگان دارای ناحیه غنی از پرولین

بحث

پروتئین‌های همساخت LFY از جمله مهم‌ترین فاکتورهای رونویسی دخیل در نمو گل گیاهان به‌شمار می‌آیند (۳۲). برای درک بهتر مکانیسم‌های مولکولی دخیل در گل‌دهی گیاه روپاس، SvLFY به‌عنوان همساخت ژن LFY آراییدوپسیس شناسایی گردید که برخی گیاهان تیره سیب زمینی نیز مانند آراییدوپسیس به‌عنوان گیاهان مدل مورد مطالعه و بررسی قرار می‌گیرند. توالی آمینو اسید استنباطی SvLFY با توالی پروتئین‌های LFY در آراییدوپسیس (۳۳)، FLO در گل میمون (۹)، ALF در اطلسی (۲۹)، NFL1 و NFL2 در تنباکو (۳۰)،

ناحیه کد کننده این ژن توالی یابی و با نام SvLFY (Accession no:KF752589) در بانک ژن ثبت گردید. توالی پروتئین استنباطی این قطعه از ژن دارای شباهت بالایی با ناحیه C ترمینال سایر همساخت های LFY بود. از این رو می توان SvLFY را نیز به عنوان فاکتور رونویسی در نظر بگیریم که به احتمال مانند LFY در گل دهی و نمو گل نقش ایفا می کند. شناسایی توالی کامل ناحیه کد کننده، بررسی الگوی بیانی، مشخص کردن برهم کنش احتمالی آن با سایر ژن های تنظیم کننده گل دهی و انجام آزمایش هایی نظیر وسترن بلات برای اطمینان از حضور پروتئین SvLFY می تواند در روشن شدن نقش این ژن کلیدی در گل دهی گیاه مورد مطالعه موثر باشد.

منابع

1. Vachon G, Tichtinsky G, Parcy F. LEAFY, a master regulator of flower development. *Biol Aujourd'hui*. 2012; 206(1): 63-67.
2. Araki T. Transition from vegetative to reproductive phase. *Curr. Opin Plant Biol*. 2001; 4(1): 63-68.
3. Amasino R. Seasonal and developmental timing of flowering. *Plant J*. 2010; 61(6): 1001-1013.
4. Wang Aj, Tang Jf, Zhao Xy, Zhu Lh. Isolation of LiLFY1 and Its Expression in Lily (*Lilium longiflorum* Thunb.). *Agric Sci China*. 2008; 7(9): 1077-1083.
5. Moon J, Lee H, Kim M, Lee I. Analysis of flowering pathway integrators in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol*. 2005; 46(2): 292-299.
6. Parcy F. Flowering: a time for integration. *Int J Dev. Biol*. 2005; 49(5-6): 585-593.
7. Blazquez MA, Soowal LN, Lee I, Weigel D. LEAFY expression and flower initiation in Arabidopsis. *Development*. 1997; 124(19): 3835-3844.
8. Lu S, Li Z, Zhang J, Yi S, et al. Isolation and expression analysis of a LEAFY/FLORICAULA homolog and its promoter from London plane (*Platanus acerifolia* Willd.). *Plant Cell Rep*. 2012; 31(10): 1851-1865.
9. Coen ES, Romero JM, Doyle S, Elliott R, et al. floricaula: a homeotic gene required for flower development in *antirrhinum majus*. *Cell*. 1990; 63(6): 1311-1322.

هستند که تقریباً در ۴۰ آمینواسید ابتدایی آن ها قرار گرفته است. Coen و همکاران (۹) گزارش کردند که ناحیه غنی از پرولین نقش مهمی در فعالیت رونویسی این پروتئین دارد اما Maizel و همکاران (۳۶) نشان دادند که در برخی از همساخت های LFY، این ناحیه C ترمینال است که به توالی های تقویت کننده ژن های همئوتیک گل دهی نظیر APETALA1 و AGAMOUS متصل می شود. بسیاری از پروتئین های همساخت LFY در گیاهان خشکی (نهان دانگان، بازدانگان، سرخس ها و جگرواش ها) به موتیفی از DNA متصل می شوند که LFY در آرابیدوپسیس به آن وصل می شود اما PpLFY1 (همساخت LFY در خزه) و KsLFY (همساخت LFY در جلبک سبز) به انواع دیگری از موتیف ها متصل می شوند (۱۴). پروتئین LFY می تواند به توالی پالیندرومیک کاذب (CCANTGT/G) در پروموتورهای ژن های هدف خود متصل شود. دو اسید آمینه در C ترمینال LFY در تشخیص این توالی موثر هستند (۳۵). با توجه به پروتئین استنباطی به دست آمده از SvLFY، این دو اسید آمینه در این پروتئین نیز حفاظت شده هستند (شکل ۳).

مطالعات ساختاری نشان داده اند که هنگام اتصال پروتئین LFY به DNA، اسید آمینه های قرار گرفته در ناحیه حفاظت شده C ترمینال، که در قسمت های درونی تر پروتئین قرار گرفته اند در مجاورت DNA قرار می گیرند اما اسید آمینه هایی که در سطح پروتئین و دور از DNA قرار دارند نسبتاً متغیر هستند. برمبنای این مدل ساختاری می توان دریافت که چرا این ناحیه متصل شونده به DNA در نهان دانگان چندان متغیر نیست (۱۳). به علاوه مشخص شده است که دنباله هیستیدینی حفاظت شده، در ناحیه C ترمینال نقشی ضروری در اتصال به DNA دارد. پروتئین PpLFY1 که فاقد این دنباله است، نمی تواند به ناحیه اتصال ژن LFY در آرابیدوپسیس متصل شود. به جز خزه، این ناحیه تقریباً در سایر همساخت های LFY حفاظت شده است (۳۶). لازم به ذکر است که دنباله هیستیدینی حفاظت شده نیز در این ناحیه از پروتئین SvLFY وجود دارد که با نوک پیکان مشخص گردیده است (شکل ۳).

نتیجه گیری

نتایج این پژوهش حضور ژن LEAFY (LFY) در گیاه *S.villosum* را به اثبات رساند. قطعه ۵۴۰ جفت بازی مربوط به

10. Zhang JX, Wu KL, Zeng SJ, Duan J, et al. Characterization and expression analysis of PhalLFY, a homologue in Phalaenopsis of FLORICAULA/LEAFY genes. *Sci Horti-Amsterdam*. 2010; 124(4): 482-489.
11. Dornelas MC. The rubber tree (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) homologue of the LEAFY/FLORICAULA gene is preferentially expressed in both male and female floral meristems. *J Exp. Bot.* 2005; 56(417): 1965-1974.
12. Schultz EA, Haughn GW. LEAFY. A Homeotic Gene That Regulates Inflorescence Development in Arabidopsis. *Plant Cell*. 1991; 3(8): 771-781.
13. Moyroud E, Tichtinsky G, Parcy F. The LEAFY Floral Regulators in Angiosperms: Conserved Proteins with Diverse Roles. *J Plant Biol*. 2009; 52(3): 177-185.
14. Sayou C, Monniaux M, Nanao MH, Moyroud E, et al. A promiscuous intermediate underlies the evolution of LEAFY DNA binding specificity. *Science*. 2014; 343(6171): 645-648.
15. Pidkowich MS, Klenz JE, Haughn GW. The making of a flower: control of floral meristem identity in Arabidopsis. *Trends Plant Sci*. 1999; 4(2): 64-70.
16. Siriwardana NS, Lamb RS. The poetry of reproduction: the role of LEAFY in Arabidopsis thaliana flower formation. *Int J Dev Biol*. 2012; 56(4): 207-221.
17. Winter CM, Austin RS, Blanvillain-Baufume S, Reback MA, et al. LEAFY target genes reveal floral regulatory logic, cis motifs, and a link to biotic stimulus response. *Dev Cell*. 2011; 20(4): 430-443.
18. Edmonds JM, Chweya JA. Black nightshades, *Solanum nigrum* L. and related species, Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. 15th Ed. Rome: IPGRI; 1997.
19. Karimi H. Dictionary of Iran's vegetations (Plants). 1th Ed. Tehran: Parcham Publisher; 2002.
20. Ghahreman A. Flora of Iran in colour. Tehran: Research Institute of Forests & Rangelands; 1984.
21. Javed T, Ashfaq UA, Riaz S, Rehman S, et al. In-vitro antiviral activity of *Solanum nigrum* against Hepatitis C Virus. *Virol J*. 2011; 8: 26.
22. Lin HM, Tseng HC, Wang CJ, Lin JJ, et al. Hepatoprotective effects of *Solanum nigrum* Linn extract against CCl₄-induced oxidative damage in rats. *Chem Biol Interact*. 2008; 171(3): 283-293.
23. Li J, Li Q, Feng T, Zhang T, et al. Antitumor activity of crude polysaccharides isolated from *Solanum nigrum* Linne on U14 cervical carcinoma bearing mice. *Phytother Res*. 2007; 21(9): 832-840.
24. Hammami H, Ayadi A. Molluscicidal and antiparasitic activity of *Solanum nigrum villosum* against *Galba truncatula* infected or uninfected with *Fasciola hepatica*. *J Helminthol*. 2008; 82(3): 235-239.
25. Nirmal SA, Patel AP, Bhawar SB, Pattan SR. Antihistaminic and antiallergic actions of extracts of *Solanum nigrum* berries: Possible role in the treatment of asthma. *J Ethnopharmacol*. 2012; 142(1): 91-97.
26. Molinero-Rosales N, Jamilena M, Zurita S, Gomez P, et al. FALSIFLORA, the tomato orthologue of FLORICAULA and LEAFY, controls flowering time and floral meristem identity. *Plant J*. 1999; 20(6): 685-693.
27. Guo J-I, Yang Q. Molecular Cloning and Expression Analysis of a LFY Homologous Gene from Potato. *Plant Mol Biol Rep*. 2008; 26(4): 324-334.
28. Kim D, Han M, Cho H, Kim D, et al. Molecular cloning of the CaLFY, putative pepper ortholog of FLO/LFY. *Mol Breeding*. 2008; 22(3): 443-453.
29. Souer E, van der Krol A, Kloos D, Spelt C, et al. Genetic control of branching pattern and floral identity during *Petunia* inflorescence development. *Development*. 1998; 125(4): 733-742.
30. Kelly AJ, Bonnlander MB, Meeks-Wagner DR. NFL, the tobacco homolog of FLORICAULA and LEAFY, is transcriptionally expressed in both vegetative and floral meristems. *Plant Cell*. 1995; 7(2): 225-234.
31. Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3th Ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor; 2001.
32. Meng Q, Zhang C, Huang F, Gai J, et al. Molecular cloning and characterization of a LEAFY-like gene highly expressed in developing soybean seeds. *Seed Sci Res*. 2007; 17(4): 297-302.
33. Weigel D, Alvarez J, Smyth DR, Yanofsky MF, et al. LEAFY controls floral meristem identity in Arabidopsis. *Cell*. 1992; 69(5): 843-859.
34. Shiokawa T, Yamada S, Futamura N, Osanai K, et al. Isolation and functional analysis of the CjNdly gene, a homolog in *Cryptomeria japonica* of FLORICAULA/LEAFY genes. *Tree Physiol*. 2008; 28(1): 21-28.

35. Hames C, Ptchelkine D, Grimm C, Thevenon E, et al. Structural basis for LEAFY floral switch function and similarity with helix-turn-helix proteins. EMBO J. 2008; 27(19): 2628-2637.

36. Maizel A, Busch MA, Tanahashi T, Perkovic J, et al. The Floral Regulator LEAFY Evolves by Substitutions in the DNA Binding Domain. Science. 2005; 308(5719): 260-263.

Sequencing of LEAFY Homologous Gene in *Solanum villosum* Mill.

Asadi-Khanuki M, M.Sc.¹, Rezanejad F, Ph.D.^{1*}, Sharifi-sirchi GR, Ph.D.², Sasan HA, Ph.D.¹

1. Department of Biology, faculty of science, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman 7616914111, Iran

2. Department of Agriculture, College of Agriculture and Natural Resources, Hormozgan University, Hormozgan, Iran

* Email corresponding author: frezanejad@gmail.com

Received: 15 Apr. 2014

Accepted: 30 Sep. 2014

Abstract

Aim: The purpose of this study was to identify LEAFY homologous genes in a type of nightshade (*Solanum villosum* Mill.).

Material and Methods: Total RNA was isolated from shoot apical meristem tissue of *S. villosum* and was used for First-strand cDNA synthesis. The specific primers were designed based on nucleotide sequence alignment of LEAFY homologous genes from other plants and were used in RT-PCR. The RT-PCR products were purified and sequenced.

Results: The results indicated amplification of 540 nucleotides fragment, and named SvLFY. Comparison of SvLFY deduced protein sequences with LEAFY homologous proteins from other species showed high similarity between this fragment and in other C-terminal regions.

Conclusion: These results suggest that SvLFY may play a similar role as LEAFY in flower development and could act as a flower meristem identity gene in *Solanum villosum* Mill.

Keywords: Flowering, LEAFY, RT-PCR, *Solanum villosum* Mill.