تعیین توالی و بررسی فیلوژنی ژن هم‌سان APETALA1 در شاهی

محبوبه شیخ بهائی*، فرخنده رضانژاد و حسینعلی ساسان

دریافت: ۱۳۹۵/۰۶/۲۹ / اصلاح: ۱۳۹۷/۱۰/۱۰ / پذیرش: ۱۳۹۷/۱۰/۱۵ / انتشار: ۱۳۹۷/۱۲/۲۸

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، ، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران
*مسئول مکاتبات: mh.sheikhbahaei@sci.uk.ac.ir

چکیده. پیش‌روی فرایند گل‌دهی در گیاهان، از طریق تحریک مریستم گل‌آذین به‌وسیله‌ی چندین مسیر آغاز می‌شود. بسیاری از ژن‌های دخیل در این مسیرها فاکتورهای رونویسی خانواده‌ی دومین MADS را کد می‌کنند. فاکتور رونویسی APETALA1 (AP1)، یکی از تنظیم کننده‌های کلیدی نمو گل، از این خانواده است. اولین قدم برای فهم مکانیسم‌های مولکولی تحت عمل‌کرد هر ژن در یک گیاه، شناسایی، تعیین توالی و سپس بررسی فیلوژنی ژن مورد نظر است. بدین منظور، RNA کل از غنچه‌ی گل شاهی (*Lepidium sativum* L.) استخراج و برای ساخت cDNA استفاده گردید. آغازگرهای اختصاصی بر اساس توالی ژن‌های همسان AP1 در گیاهان هم خانواده، طراحی و برای واکنش RT-PCR مورد استفاده قرار گرفت. پس از بررسی الگوی مناسب الکتروفورزی آن و حصول اطمینان از کیفیت محصول PCR بدست آمده، قطعه‌ی تکثیر شده برای توالی یابی فرستاده شد. نتیجه‌ی توالی یابی پس از دریافت، با نرم افزارهای BLAST، MUSCLE، Gene Runner و MEGA6 مورد بررسی قرار گرفت. نتایج، نشان دهنده‌ی تکثیر طول کامل ناحیه‌ی کدشونده‌ی ژن به‌تعداد ۷۸۷ نوکلئوتید بود که LsAP1 نامیده شد و با شماره دست‌رسی KP070728 در پایگاه NCBI ثبت گردید. بررسی‌ها بیانگر تشابه بالا و همچنین هم‌پوشانی زیاد توالی‌های موجود در بانک ژن با توالی پروتئین استنباطی LsAP1، بود. مطابق با این نتایج، LsAP1 نیز به‌احتمال به عنوان هومولوگ ژن AP1 در گذر به گل‌دهی نقش دارد و می‌تواند به عنوان ژن تعیین هویت مریستم گل عمل کند.

واژه‌های کلیدی. آغازگر، پروتئین، درخت فیلوژنی، گل‌دهی، هم ردیفی

Sequencing and phylogenetic study of APETALA1 homologous gene in garden cress (*Lepidium sativum* L.)

Mahboubeh Sheikhbahaei*, Farkhondeh Rezanejad & Hossein-Ali Sasan

Received 19.09.2016/ Revised 31.12.2018 / Accepted 05.01.2019 / Published 19.03.2019

Department of Biology, Faculty of Sciences, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran
*Correspondent author: mh.sheikhbahaei@sci.uk.ac.ir

Abstract. The flowering process in plants proceeds through the induction of an inflorescence meristem triggered by several pathways. Many of the genes associated with these pathways encode transcription factors of the MADS domain family. The MADS-domain transcription factor APETALA1 (AP1) is a key regulator of flower development. The first step in the understanding of molecular mechanisms under the function of each gene in a plant is identification, sequencing and phylogeny analysis of that gene. For this purpose, total RNA was isolated from the flower bud of garden cress (*Lepidium sativum* L.) and used for cDNA synthesis. The specific primers were designed on the basis of nucleotide sequence alignment of AP1 homologus genes from plants of the same family Brassicaceae and used in RT-PCR. After observing its electrophoretic pattern and ensuring the quality of PCR product, the amplicon was sent for sequencing. Once the results of sequencing were received, the sequence was examined by BLAST, MUSCLE, Gene Runner and MEGA6 software. The results indicated the amplification of 787 nucleotides fragment namely LsAP1, which was recorded by accession number KP070728 in NCBI database. The studies showed high similarity and overlapping of gene bank sequences with LsAP1 illative protein. According to these results, LsAP1 might play a similar role as AP1 in flower induction and could act as a flower meristem identity gene in *Lepidium sativum* L.

Keywords. Alignment, flowering, phylogenetic tree, primer, protein

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-04-28]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1397.5.4.1.5]
[DOI: 10.29252/nbr.5.4.411]

مقدمه

نمو گل در اثر بیان مجموعه‌ای از ژن‌ها اتفاق می‌افتد و به عنوان یک پدیده‌ی زیستی قابل اهمیت، مطرح است. یک رده‌ی ژنی دخیل در این فرایند، ژن‌های زمان گل‌دهی هستند که زمان گل‌دهی را تحت تأثیر قرار داده و قادر به کنترل ریخت‌شناسی گل و گل‌آذین هستند (Guo *et al.*, 1998). تحقیق روی مکانیسم مولکولی و کنترل ژنتیکی گل‌دهی در آرابیدوپسیس نشان داده است که APETALA1 (AP1) یک ژن تعیین هویت مریستم گل است. این ژن نه‌تنها کنترل کننده‌ی گذر از مرحله‌ی رویشی به مریستم‌های گل‌آذین و گل است بلکه همچنین رشد دو حلقه‌ی بیرونی اندام‌های گل شامل کاسبرگ و گلبرگ را تحت کنترل دارد (Irish & Sussex, 1990). در مدل ابتدایی ABC مربوط به اندام‌های گل، ژن AP1 متعلق به کلاس A (به‌وجودآورنده‌ی کاسبرگ و گلبرگ) است و می‌تواند فعال‌کننده‌ی ژن‌های کلاس B (به‌وجودآورنده‌ی گلبرگ و پرچم) باشد (Mandel & Yanofsky, 1995; Jack, 2004).

آنالیز بیانی در گونه‌ی *Nelumbo nucifera* نشان داد که AP1 به‌طور مداوم در پریموردیوم پرچمی و طی تمایز اندام‌های گل بیان می‌شود (Kong *et al.*, 2015). بنابراین AP1 نقش مهمی در کنترل تعیین هویت مریستم گل و تشکیل اندام‌های گل ایفا می‌کند. در بررسی روی گلدهی آرابیدوپسیس، LEAFY (LFY) مشابه با AP1 به‌عنوان یک ژن مهم برای تعیین هویت مریستم گل شناخته شد. این دو ژن کاملا مستقل نیستند و بیان LFY قبل از AP1 اتفاق می‌افتد (Sessions *et al.*, 2000; Grandi *et al.*, 2012). بنابراین AP1 در تعیین هویت مریستم به عنوان ژن پایین دست LFY نقش دارد (Ng & Yanofsky, 2001). AP1 با بیان زود هنگام خود تحت تأثیر LFY، بر روی سایر ژن‌های تعیین هویت مریستم گل اثر می‌گذارد. AP1 همچنین در تعیین ویژگی‌های اندام‌های گل در مرحله‌ی بعد عمل می‌کند که در این مرحله به‌طور غیر مستقیم تحت تأثیر LFY است (Mandel *et al.*, 1992; Liljegren *et al.*, 1999).

ژن AP1 در آرابیدوپسیس روی کروموزوم‌های شماره‌ی یک، دو، سه و پنج قرار دارد و دارای هشت اگزون و هفت اینترون است. طول ناحیه‌ی کدکننده‌ی آن در گونه‌های مختلف این گیاه در حدود ۸۰۰ نوکلئوتید است (Theologis *et al.*, 2000). تا به امروز محققان، ژن‌های هومولوگ AP1 را در بسیاری از گیاهان ازجمله گوجه، رز، لاله مردابی، جاتروفا و خشخاش شناسایی کرده‌اند (Mibus *et al.*, 2011; Pabón-Mora *et al.*, 2012; Burko *et al.*, 2013; Kong *et al.*, 2015; Tang *et al.*, 2016). ژن‌های AP1، بسیار محافظت شده هستند (Peña *et al.*, 2001). مطالعات Lü و همکاران نشان داد زمانی که ژن هومولوگ AP1 به گل داوودی انتقال می‌یابد، موجب تسریع فرایند گلدهی در این گیاه می‌شود (Lü *et al.*, 2007). همچنین یافته‌های اخیر نشان می‌دهد که AP1 در بیان ژن‌های دخیل در بسیاری از فرایندهای سلولی و رشد از جمله پاسخ‌های هورمونی ایفای نقش می‌کند (Wellmer & Riechmann, 2010).

گونه مورد مطالعه در تحقیق حاضر، گیاه شاهی با نام علمی *Lepidium sativum* L.، از تیره شب بو (Brassicaceae)، گیاهی علفی، یکساله، کمی کرک دار، با ارتفاع ۵۰-۳۰ سانتیمتر است. گل‌های این گیاه، سفید و مجتمع در گل‌آذین‌های خوشه‌ی طویل و میوه‌ی آن خورجینک است. بذر شاهی دارای مقادیر بالایی از آهن و کلسیم است. همچنین این بذر به‌دلیل محتوای بالای ترکیبات فنلی، خاصیت آنتی اکسیدانی بسیار بالایی دارد (Kasabe *et al.*, 2012). بعلاوه، بذر این گونه به دلیل میزان بالای آلکالوئیدها به عنوان داروی مسکن، ضد اضطراب و ضد درد کاربرد بسیاری در طب سنتی دارد (Shukla *et al.*, 2011).

ژن AP1 تاکنون در برخی از گونه‌های تیره شب بو شناسایی و تعیین توالی شده است (Mandel *et al.*, 1992; Menzel *et al.*, 1995; Aikawa *et al.*, 2010). همچنین بررسی‌های مروری ما نشان داد تاکنون در رابطه با شناسایی این ژن در گونه مذکور، مطالعه ای صورت نگرفته و یا گزارشی منتشر نشده است. بنابراین با توجه به اهمیت پدیده‌ی گل‌دهی در گیاهان گل‌دار و حفظ بقای نسل و نیز نقش اساسی ژن AP1 در پیشبرد این پدیده، تلاش در جهت شناسایی این ژن در گیاه مورد مطالعه که در تیره‌ای مدل قرار دارد و بذر آن نیز از نظر دارویی حائز اهمیت است مفید و هدف تحقیق حاضر است.

مواد و روش‌ها

بذر شاهی از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه شد. در مرداد ماه، بذرها در گلدان‌های حاوی پرلیت در شرایط گلخانه‌ای با دمای ۲۵

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-04-28]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1397.5.4.1.5]
[DOI: 10.29252/nbr.5.4.411]

درجه سانتیگراد و دوره‌ی نوری ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی کشت شدند. گیاهان درحال رشد، به‌صورت یک روز در میان با ۲۵ میلی‌لیتر محلول هوگلند x ۱/۲ تغذیه شدند. پس از نمایان شدن غنچه‌های گل، نمونه برداری از این اندام‌ها انجام گرفت و برای مطالعات مولکولی استفاده شد.

از آن‌جا که توالی ژن مورد نظر نامشخص بود، آغازگرها بر اساس توالی‌های ژنی موجود از سایر گیاهان هم‌جنس و هم‌خانواده، و بر اساس اصول مرسوم طراحی گردیدند (Dieffenbach *et al.*, 1993). به این منظور توالی ژن همسان AP1 در *Arabidopsis thaliana* (Accession no: Z16421.1)، *Arabidopsis halleri* (Accession no: AB465587.1)، *Camelina sativa* (Accession no: XM010472583.1)، *Rorippa indica* (Accession no: JX103196.1)، *Lepidium perfoliatum* (Accession no: JX103194.1)، *Cardamine* sp. (Accession no: AB372085.1) و *Sinapis alba* (Accession no: X81480.1) از بانک ژن NCBI (http://www.ncbi-.nlm.nih.gov) استخراج شد. هم‌ردیفی توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار MUSCLE (https://www.ebi.ac.uk/Tools/-msa/muscle) صورت گرفت. براساس نقاط حفاظت شده‌ی موجود و با مبنا قرار دادن ابتدا و انتهای ناحیه‌ی cds (Coding DNA Sequense) و همچنین با توجه به نواحی 5′ UTR (Untranslated Region) و 3′ UTR (به‌منظور تعیین توالی کامل ناحیه‌ی کدکننده‌ی ژن)، آغازگرهایی با استفاده از نرم‌افزار Gene Runner طراحی گردیدند و سپس مناسب بودن آن‌ها به وسیله‌ی نرم‌افزار BLAST مورد بررسی قرار گرفت. در شکل شماره ۱، طرح شماتیک mRNAی AP1 و محل تقریبی قرار گرفتن آغازگرهای پیش‌برنده و برگرداننده نشان داده شده است. ساخت آغازگرهای طراحی شده توسط شرکت پیشگام انجام شد.

توالی آغازگرها به صورت زیر است:

Fr-LsAP1< 5′- ATGGGAAGGGGTAGGGTT -3′ >
Rv-LsAP1< 5′- TGGAATTGTTTCATGCGG -3′ >

RNA کل از غنچه‌های گل با استفاده از محلول استخراج RNA (GeneAll, RiboEx, Total RNA isolation solution, Korea) و براساس دستورالعمل شرکت سازنده، استخراج شد. برای بررسی حضور، ارزیابی خلوص و تعیین غلظت RNA از روش‌های اسپکتروفتومتری در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر و الکتروفورز افقی روی ژل آگارز ۱٪ استفاده شد (Sambrook *et al.*, 2001). تهیه‌ی cDNA با استفاده از کیت ساخت cDNA شرکت فرمنتاز (RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit) و مطابق دستورالعمل آن انجام شد. به‌منظور شناسایی و تعیین توالی ژن هم‌سان AP1 از RT-PCR استفاده شد. مواد لازم برای انجام این واکنش به حجم ۲۵ میکرولیتر، طبق جدول ۱ درون لوله ۰/۲ میلی‌لیتری فاقد DNase با یکدیگر مخلوط شده و در نهایت، ۱ میکرولیتر cDNA به مخلوط واکنش، افزوده شد. سپس برنامه‌ی PCR ذکرشده در جدول ۲ با استفاده از دستگاه ترموسایکلر مدل PTC (MJ Mini Personal Termal 1148 Cycler BioRad, USA) اجرا شد. پس از انجام PCR، حضور و کیفیت محصول بر روی ژل آگارز ۱٪ بررسی شد. به منظور تعیین توالی قطعه‌ی تکثیر شده‌ی ژن از طریق PCR، ۳۰ میکرولیتر از محصول PCR به همراه ۲۰ میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای پیش‌برنده و برگرداننده به شرکت تکاپوزیست فرستاده شد.

نتایج حاصل از تعیین توالی ابتدا با نرم‌افزار BLAST هم‌ردیف شده وسپس توالی اسید آمینه‌ای استنباطی و توالی‌های برخی از همساخت‌های AP1 موجود در بانک ژن NCBI با استفاده از نرم‌افزار MEGA 6.06 (6140226) مقایسه و میزان شباهت آن‌ها بررسی گردید. همچنین با استفاده از بانک اطلاعاتی نواحی حفاظت شده (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure-/cdd/cdd.shtml)، دومین‌های پروتئینی حفاظت شده‌ی همسان AP1 در شاهی بررسی شد.

نتایج

جذب RNA در طول موج ۲۶۰ نانومتر ۰/۰۶ بود که پس از جایگزینی در فرمول، غلظت RNAی استخراج شده، ۴۸۰ng/ul برآورد شد. به‌علاوه نسبت جذب ۲۶۰/۲۸۰ نانومتر در حدود ۲-۱/۹ بود که نشان‌دهنده‌ی مناسب بودن غلظت و کیفیت RNAی استخراجی است. هم‌چنین مشاهده‌ی سه باند پررنگ مربوط به RNA های ریبوزومی روی ژل آگارز ۱٪، تأییدکننده‌ی کیفیت مطلوب RNA استخراج شده برای انجام RT-PCR است (شکل ۲). با اولین مرتبه اجرای واکنشPCR، تک باند اختصاصی مربوط به تکثیر طول کامل ناحیه‌ی کد کننده‌ی ژن به طول ۷۸۷ نوکلئوتید روی ژل آگارز مشاهده شد (شکل ۳).

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-04-28]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1397.5.4.1.5]
[DOI: 10.29252/nbr.5.4.411]

شکل ۱- طرح شماتیک mRNAی AP1 و محل قرار گرفتن آغازگرهای پیش‌برنده و برگرداننده روی آن.

Fig. 1. Schematic illustration of AP1 mRNA and the position of the forward and reverse primers on it.

جدول ۱- اجزاء مخلوط واکنش PCR در حجم ۲۵ µl.

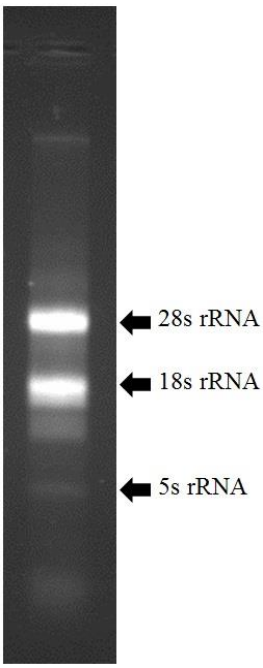
Table 1. The PCR reaction mixture components in volume of 25µl.

مقدار مصرف در هر واکنش (µl)	مواد مورد نیاز
۹/۵ µl	آب دوبار تقطیر دیونیزه
هر کدام ۱ µl	آغازگرهای Fr و Rv با غلظت ۱۰ پیکومولار
۱۲/۵ µl	PCR MasterMix (Sina clone)
۲۰۰ng	cDNA

جدول ۲- برنامه‌ی چرخه‌ای واکنش زنجیره‌ی پلیمراز.

Table 2. The cyclic program of PCR.

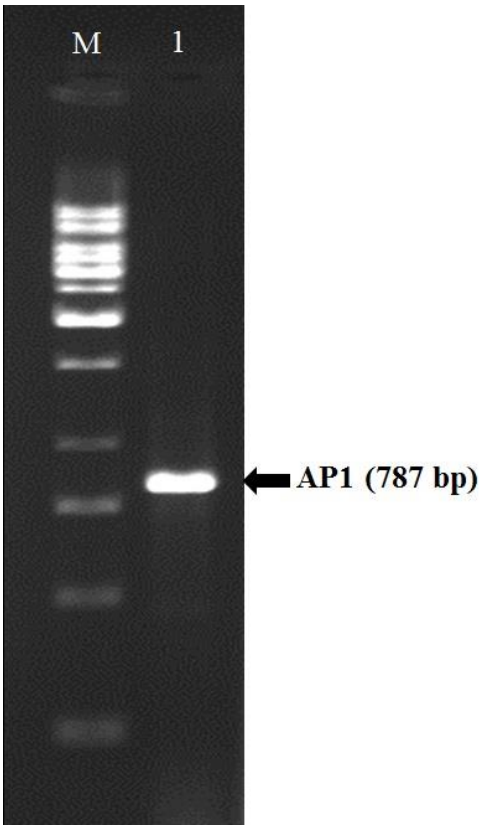
تعداد چرخه	مرحله	حرارت (°C)	زمان
۱	واسرشتگی اولیه	۹۵	۵ دقیقه
	واسرشتگی	۹۴	۱ دقیقه
۲۸	اتصال	۵۷	۱ دقیقه
	طویل‌شدن	۷۲	۱ دقیقه
۱	طویل‌شدن نهایی	۷۲	۷ دقیقه



شکل ۲- نیم‌رخ الکتروفورزی RNA کل استخراج شده از غنچه‌ی گل شاهی دارای سه باند واضح RNAهای ریبوزومی 28s، 18s و 5s.

Fig. 2. The electrophoretic profile of extracted total RNA from *Lepidium sativum* flower bud consists of three clear bands of 28s rRNA, 18s rRNA and 5s rRNA.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-04-28]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1397.5.4.1.5]
[DOI: 10.29252/nbr.5.4.411]



شکل ۳- نیم‌رخ الکتروفورزی محصول RT-PCR، نشان دهنده‌ی تکثیر طول کامل ناحیه‌کدکننده‌ی ژن همسان AP1 در شاهی. 1: باند مربوط به قطعه‌ی ۷۸۷ جفت بازی سنتزشده با استفاده از آغازگرهای پیش‌برنده‌ی FrAP1 و برگرداننده‌ی RvAP1. M: نشانگر مولکولی DNA 1kb (Fermentase).

Fig. 3. The electrophoretic profile of RT-PCR product represents duplication of full length from cds AP1 homologus gene in *Lepidium sativum*. 1: The band associated with 787-bp fragment was synthesized using FrAP1 forward and RvAP1 reverse primers. M: 1kb DNA ladder (Fermentase).

محصول PCR حاصل از آغازگرهای Fr-AP1 و Rv-AP1 به طور کامل توالی یابی گردید. به‌گونه‌ای که کدون‌های آغاز و ختم ناحیه‌ی کدکننده‌ی ژن و همچنین توالی آغازگرهای طراحی شده نیز در توالی خوانده شده قابل شناسایی است (شکل ۴). طول باند مشاهده شده پس از توالی یابی، ۷۸۷ نوکلئوتید تعیین شد که به‌طور تقریبی مشابه با طول ناحیه‌ی کدکننده‌ی این ژن در سایر گیاهان خانواده‌ی شب بو که از آن‌ها برای طراحی آغازگر استفاده گردید، است. پس از BLAST، مشخص شد که نزدیک‌ترین توالی به توالی ما، همسان AP1 در گیاه *Camelina sativa* با ٪۹۴ شباهت است. بنابراین این توالی مربوط به ژن همسان AP1 در گیاه شاهی (*Lepidium sativum*) است. از این رو این ژن LsAP1 نامگذاری شد. پروتئین استنباطی ژن LsAP1، حاوی ۲۵۶ اسیدآمینه است (شکل ۵). طول پروتئین LsAP1 تقریباً با سایر پروتئین‌های همسان AP1 متعلق به خانواده‌ی شب بو برابر است. همچنین داده‌های حاصل از بانک اطلاعاتی نواحی حفاظت‌شده (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.sht-ml) نشان داد که توالی پروتئین LsAP1 نیز همانند سایر همسان‌های پروتئین AP1، دومین‌های پروتئینی حفاظت شده‌ای را تشکیل می‌دهد (شکل ۶). دومین MEF2 از خانواده‌ی جعبه‌ی MADS (MADS-box)، از تنظیم‌کننده‌های بیان ژن در یوکاریوت‌ها است که به‌طور مستقیم به DNA متصل می‌گردد و نقش مهمی در نمو گیاهان و جانوران دارد. این دومین های تنظیمی در قارچ‌ها نیز گزارش شده‌اند. دومین جعبه‌ی K (K-box) نیز به‌صورت مجتمع با فاکتور بیانی SRF مشاهده میشود و نقش آن در تشکیل مولتیمر پروتئینی است (Marchler-Bauer *et al.*, 2016). در نهایت، به‌منظور بررسی میزان شباهت محصول ژن LsAP1 با سایر هم‌سان‌های AP1، توالی پروتئین استنباطی آن با توالی سایر هم‌سان‌ها در گونه‌های دیگر، مقایسه گردید به‌این منظور درخت فیلوژنی این پروتئین‌ها با استفاده از نرم افزار MEGA رسم شد (شکل ۷).

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-04-28]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1397.5.4.1.5]
[DOI: 10.29252/nbr.5.4.411]

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-04-28]

[DOR: 20.1001.1.24236330.1397.5.4.1.5]

[DOI: 10.29252/nbr.5.4.411]

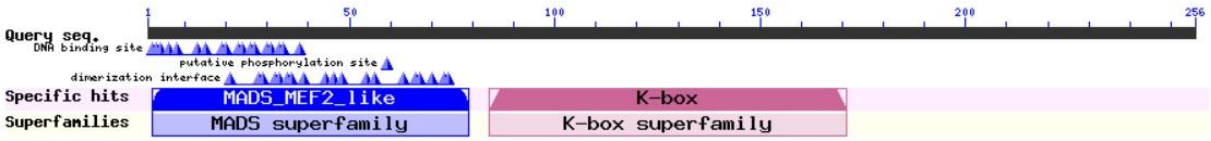
شکل ٤- توالی ثبت شده از ناحیه‌ی کدکننده‌ی LsAP1 در پایگاه NCBI. پیکان‌ها نشان‌دهنده‌ی توالی آغازگرهای مورد استفاده است. همچنین کدون‌های آغاز و ختم، با کشیدن کادر دور آن‌ها مشخص شده‌اند.

Fig. 4. The NCBI registered sequence of LsAP1 cds region. Arrows show that primer sequences were used. Start and stop codons have been marked by boxes around them.

MGRGRVQLKRIENKINRQVTFSKRRAGLLKKAHEISVLCDAEVALVVFSHKGKLFEYSTDSCMEKILERYERYSYAERQLIAPESDVNT
NWSMEYNRLKAKIELLERNQRHYLGEDLQAMSSKELQNLEQQLDTALKHIRARKNQLMYESINELQRKEKAIQEQNSMLSKQIKERE
KILRAQQEQWEQQNHGHNMPPPLAPPQQHQIQHPYMLSHQPSPFLNMGGLYQEDPMEMRRNDLDLSLEPVYNCNLGCFAA

شکل ٥- توالی پروتئین استنباطی LsAP1.

Fig. 5. LsAP1 inferred protein sequence.



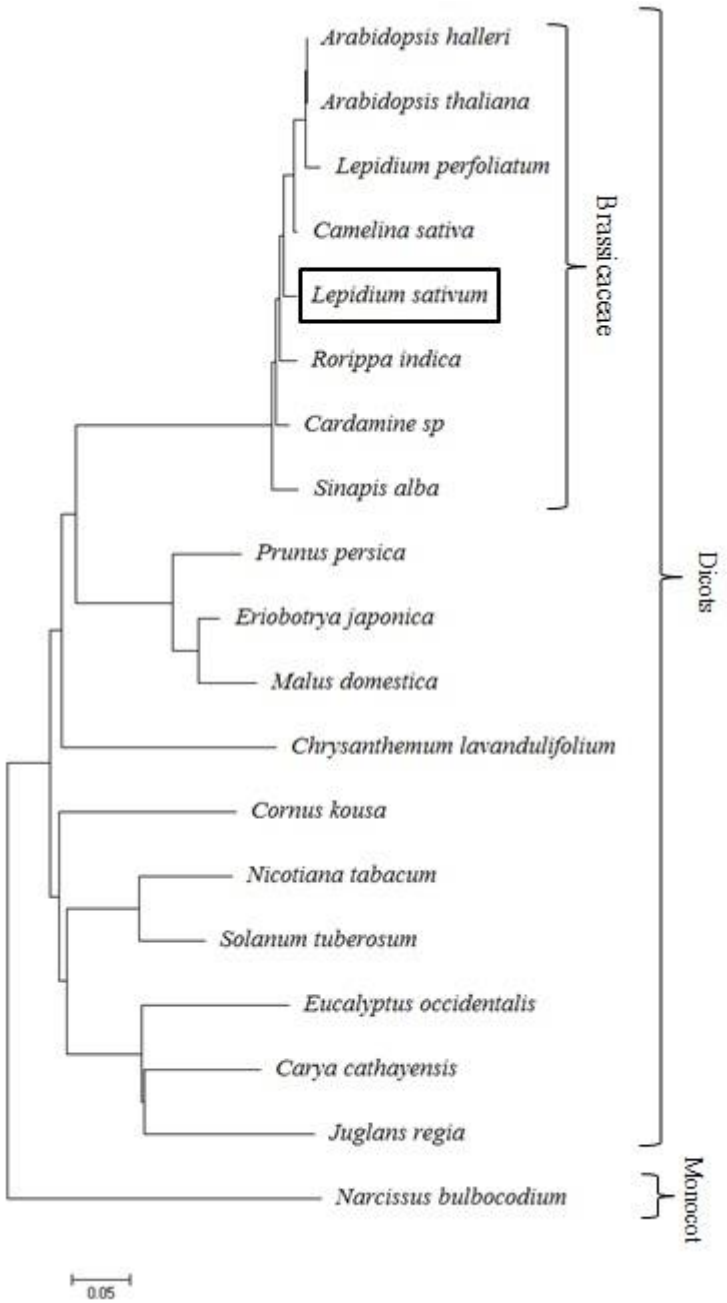
شکل ٦- دومین‌های حفاظت‌شده‌ی LsAP1.

Fig. 6. LsAP1 conserved domains.

بحث

در سال‌های اخیر، ژن‌های هومولوگ AP1 در بسیاری از گیاهان شناسایی شده‌اند. AP1 برای تنظیم نمو گل ضروری است که این مطلب به‌طور مثال در گل میمون و آرابیدوپسیس ثابت شده است (Mandel & Yanofsky, 1995; Liu *et al.*, 2009). طی این مطالعه، ما توالی کامل ژن AP1 را در شاهی شناسایی و ویژگی‌های این توالی را بررسی کردیم. توالی آمینواسیدی LsAP1 شامل ناحیه‌های جعبه‌ی MADS و جعبه‌ی K است که نشان‌دهنده‌ی متعلق بودن آن به خانواده‌ی ژنی AP1 است (Jack, 2004). توالی آمینواسیدی LsAP1 در Gene Bank با برنامه‌ی BLAST مورد بررسی قرار گرفت و LsAP1 با ژن های هومولوگ AP1 در سایر گیاهان، شباهت ۷۵ تا ۹۴ درصدی را نشان داد. در این میان، ناحیه‌ی جعبه‌ی MADS دارای بالاترین میزان شباهت و حفاظت‌شدگی بود. ژن AP1 از طریق جعبه‌ی MADS قادر به اتصال به توالی خاصی از DNA است و به این وسیله در جهت تنظیم بیان تعدادی از ژن‌ها عمل می‌کند (Suárez-López *et al.*, 2001; Melzer *et al.*, 2010).

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-04-28]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1397.5.4.1.5]
[DOI: 10.29252/nbr.5.4.411]



شکل ۷- درخت فیلوژنی گونه‌های مختلف گیاهی بر اساس میزان شباهت در توالی پروتئین همسان AP1. در این شکل، LsAP1 درون کادر قرار گرفته است.

Fig. 7. Phylogenetic tree from different plant species based on the AP1 protein sequence homology. In this figure, *Lepidium sativum* is placed in a box.

پروتئین‌های جعبه‌ی MADS همچنین قادر به تشکیل دایمر و انجام عمل‌کردهای دیگر هستند (Jack *et al.*, 1992; Shore & Sharrocks, 1995). دایمرهای پروتئینی می‌توانند تنوع پروتئین‌های متصل شونده به DNA و تمایل بین کمپلکس پروتئینی و محل اتصال به DNA را افزایش دهند. طی بررسی پروتئین‌های دایمری جعبه‌ی MADS در آرابیدوپسیس، مشاهده شد که AP1 و AGL1 (AGAMOUS LIKE1) دایمرهای پروتئینی مشترک تشکیل می‌دهند (Riechmann *et al.*, 1996; Pelaz *et al.*, 2001). AP1 و CAL (CAULIFLOWER) نیز قادر به تشکیل دایمرهای پروتئینی هستند (Pelaz *et al.*, 2001). طبق یک مدل مولکولی پیشنهادی، دو دایمر پروتئینی جعبه‌ی MADS می‌توانند با جعبه‌ی CArG ترکیب شده و یک مدل مولکولی چهاربخشی از طریق برهمکنش پروتئینی ایجاد کنند که باعث نمو اندام‌های گل می‌شود (Theissen & Saedler,

2001). بنابراین در آرابیدوپسیس، دایمرهای AP1/AP2 و SEP/AP1 قادر به تشکیل تترامری هستند که کنترل کننده‌ی تشکیل کاسبرگ‌هاست و دایمرهای AP3/AP1 و SEP/AP1 تترامری تشکیل می‌دهند که تشکیل گلبرگ‌ها را تحت کنترل دارد (Honma & Goto, 2001; Favaro *et al*., 2003). در نتیجه، پلی‌مریزاسیون پروتئینی برای کنترل بیان ژن مهم است و ژن‌های جعبه‌ی MADS نقش مهمی در نمو گل ایفا می‌کنند. در اینجا ما یک توالی جعبه‌ی MADS را شناسایی کردیم که در تنظیم نمو گل دخیل است. آنالیز توالی LsAP1 نشان داد که این توالی علاوه بر داشتن جعبه‌ی MADS، شباهت بالایی نیز با AP1ها در گیاهان دیگر دارد بنابراین می‌توانیم عمل‌کرد مشابه را نیز از روی تشابه ساختاری حدس بزنیم (Xu *et al*., 2011).

سپاسگزاری

از همفکری و مشاوره ی دکتر هادی روان، عضو هیئت علمی گروه زیست شناسی دانشگاه شهید باهنر کرمان، قدردانی می نماییم.

REFERENCES

Aikawa, S., Kobayashi, M.J., Satake, A., Shimizu, K.K. and Kudoh, H.J. 2010. Robust control of the seasonal expression of the Arabidopsis FLC gene in a fluctuating environment. – Proc. Natl. Acad. Sci. 107: 11632-11637.

Burko, Y., Shleizer-Burko S., Yanai, O., Shwartz, I., Zelnik, I.D., Jacob-Hirsch, J., Kela, I., Eshed-Williams, L. and Ori, N. 2013. A role for APETALA1/FRU-ITFULL transcription factors in tomato leaf develo-pment. – Pl. Cell. 25: 2070-2083.

Dieffenbach, C., Lowe, T. and Dveksler, G. 1993. General concepts for PCR primer design. – PCR Methods Appl. 3: S30-S37.

Favaro, R., Pinyopich, A., Battaglia, R., Kooiker, M., Borghi, L., Ditta, G., Yanofsky, M., Kater, M., and Colombo, L. 2003. MADS-box protein complexes control carpel and ovule development in *Arabidopsis*. – Pl. Cell. 15: 2603-2611.

Grandi, V., Gregis, V. and Kater, M.M. 2012. Uncovering genetic and molecular interactions among floral meristem identity genes in *Arabidopsis thaliana*. – Plant J. 69: 881-893.

Guo, H., Yang, H., Mockler, T.C. and Lin, C. 1998. Regulation of flowering time by *Arabidopsis photoreceptors*. – Science. 279: 1360-1363.

Honma, T. and Goto, K. 2001. Complexes of MADS-box proteins are sufficient to convert leaves into floral organs. – Nature 409: 525-529.

Irish, V.F. and Sussex, I.M. 1990. Function of the apetala-1 gene during *Arabidopsis* floral development. – Pl. Cell. 2: 741-753.

Jack, T. 2004. Molecular and genetic mechanisms of floral control. – Pl. Cell. 16: S1-S17.

Jack, T., Brockman, L.L. and Meyerowitz, E.M. 1992. The homeotic gene APETALA3 of *Arabidopsis thaliana* encodes a MADS box and is expressed in petals and stamens. – Cell 68: 683-697.

Kasabe, P.J., Patil, P.N., Kamble, D.D. and Dandge, P.B. 2012. Nutritional, elemental analysis and antioxidant activity of garden cress (*Lepidium sativum* L.) seeds. – Int. J. Pharm. Pharm. Sci. 4: 392-395.

Kong, D., Shen, X., Guo, B., Dong, J., Li, Y. and Liu, Y. 2015. Cloning and expression of an APETALA1-like gene from Nelumbo nucifera. – Genet. Molec. Res. 14: 6819.

Liljegren, S.J., Gustafson-Brown, C., Pinyopich, A., Ditta, G.S. and Yanofsky, M.F. 1999. Interactions among APETALA1, LEAFY, and TERMINAL FLOWER1 specify meristem fate. – Pl. Cell. 11: 1007-1018.

Liu, C., Xi, W., Shen, L., Tan, C. and Yu, H. 2009. Regulation of floral patterning by flowering time genes. – Dev. Cell. 16: 711-722.

Lü, J., Wu, Y., Sun, L. and Zhang, Q. 2007. Genetic transformation of Chrysanthemum morifolium cv.'Yu Ren Mian'with AP1 gene mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. – Sci. Silvae Sin. 43: 128-132.

Mandel, M.A., Gustafson-Brown, C., Savidge, B. and Yanofsky, M.F.J.N. 1992 Molecular characterization

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-04-28]

[DOR: 20.1001.1.24236330.1397.5.4.1.5]

[DOI: 10.29252/nbr.5.4.411]

of the *Arabidopsis* floral homeotic gene APETALA1. – Nature 360: 273-277.

Mandel, M.A., and Yanofsky, M.F. 1995. A gene triggering flower formation in *Arabidopsis*. – Nature 377: 522-524.

Marchler-Bauer, A., Bo, Y., Han, L., He, J., Lanczycki, C.J., Lu, S., Chitsaz, F., Derbyshire, M.K., Geer, R.C. and N.R. Gonzales. 2016. CDD/SPARCLE: functional classification of proteins via subfamily domain architectures. – Nucl. Acids Res. 45: D200-D203.

Melzer, R., Wang, Y. and Theißen, G. 2010. The naked and the dead: the ABCs of gymnosperm reproduction and the origin of the angiosperm flower. – Semin. Cell Dev. Biol. 21: 118-128.

Menzel, G., Apel, K. and Melzer, S. 1995. Isolation and analysis of SaMADS C, the APETALA 1 cDNA homolog from mustard. – Pl. Physiol. 108: 853.

Mibus, H., Heckl, D. and Serek, M. 2011. Cloning and characterization of three APETALA1/FRUITFULL-like genes in different flower types of Rosa× hybrida L. – J. Pl. Growth Regulat. 30: 272-285.

Ng, M. and Yanofsky, M.F. 2001. Activation of the *Arabidopsis* B class homeotic genes by APETALA1. – Pl. Cell. 13: 739-753.

Ó'Maoiléidigh, D.S., Graciet, E. and Wellmer, F. 2014. Gene networks controlling *Arabidopsis thaliana* flower development. – New Phytol. 201: 16-30.

Pabón-Mora, N., Ambrose, B.A. and Litt, A. 2012. Poppy APETALA1/FRUITFULL orthologs control flowering time, branching, perianth identity, and fruit development. – Pl. Physiol. 158: 1685-1704.

Pelaz, S., Gustafson-Brown, C., Kohalmi, S.E., Crosby, W.L. and Yanofsky, M.F. 2001. APETALA1 and SEPALLATA3 interact to promote flower development. – Plant J. 26: 385-394.

Peña, L., Martín-Trillo, M., Juárez, J., Pina, J.A., Navarro, L. and Martínez-Zapater, J.M. 2001. Constitutive expression of *Arabidopsis* LEAFY or APETALA1 genes in citrus reduces their generation time. – Nat. Biotechnol. 19: 263-267.

Riechmann, J.L., Krizek, B.A. and Meyerowitz, E.M. 1996. Dimerization specificity of *Arabidopsis* MADS domain homeotic proteins APETALA1, APETALA3, PISTILLATA, and AGAMOUS. – Proc. Natl. Acad. Sci. 93: 4793-4798.

Sambrook, J., Russell, D.W. and Russell, D.W. 2001. Molecular cloning: a laboratory manual (3-volume set). – Cold spring harbor laboratory press, New York, 2: 300

Sessions, A., Yanofsky, M.F. and Weigel, D. 2000. Cell-cell signaling and movement by the floral transcription factors LEAFY and APETALA1. – Science 289: 779-781.

Shore, P. and Sharrocks, A.D. 1995. The MADS-box family of transcription factors. – Eur. J. Biochem. 229: 1-13.

Shukla, A., Singh, C.S. and Bigoniya, P. 2011. Phytochemical and CNS activity of *Lepidium sativum* Linn seeds total alkaloid. – Der Pharmacia Lett. 3: 226-237.

Suárez-López, P., Wheatley, K., Robson, F., Onouchi, H., Valverde, F. and Coupland, G. 2001. CONSTANS mediates between the circadian clock and the control of flowering in *Arabidopsis*. – Nature. 410: 1116-1120.

Tang, M., Tao, Y.B. and Xu, Z.F. 2016. Ectopic expression of Jatropha curcas APETALA1 (JcAP1) caused early flowering in *Arabidopsis*, but not in Jatropha. – Peer J. 4: e1969.

Theissen, G. and Saedler, H. 2001. Plant biology: floral quartets. – Nature. 409: 469-471.

Theologis, A., Ecker, J.R., Palm, C.J., Federspiel, N.A., Kaul, S., White, O., Alonso, J., Altafi, H., Araujo, R. and Bowman, C.L. 2000. Sequence and analysis of chromosome 1 of the plant *Arabidopsis thaliana*. – Nature 408: 816-820.

Wellmer, F. and Riechmann, J.L. 2010. Gene networks controlling the initiation of flower development. – Trends Genet. 26: 519-527.

Xu, Z., Ali, Z., Yi, J., He, X., Zhang, D., Yu, G., Khan, A., Khan, I. and Ma, H. 2011. Expressed sequence tag-simple sequence repeat-based molecular variance in two *Salicornia* (Amaranthaceae) populations. – Genet. Molec. Res. 10: 1262-1276.

*****

How to cite this article:

Sheikhbahaei, M., Rezanejad, F. and Sasan, H.A. 2019. Sequencing and phylogenetic study of APETALA1 homologous gene in garden cress (*Lepidium sativum* L.). – Nova Biol. Reperta 5: 411-419.

شیخ‌بهائی، م.، رضانژاد، ف. و ساسان، ح.ع. ۱۳۹۷. تعیین توالی و بررسی فیلوژنی ژن هم‌سان APETALA1 در شاهی.– یافته‌های نوین در علوم زیستی ۵: ۴۱۹-۴۱۱.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-04-28]

[DOR: 20.1001.1.24236330.1397.5.4.1.5]

[DOI: 10.29252/nbr.5.4.411]