فصلنامه (علمی – پژوهشی)

زیست شناسی تکوینی

سال چهاردهم، شماره ۳، تابستان ۱۴۰۱ ص.۷۰-۶۱

مقاله پژوهشی

شناسایی، توالی‌یابی و بررسی فیلوژنی ژن ارتولوگ *APETALA1* (AP1) در مناداب (*Eruca sativa*)

فرخنده رضانژاد[1*]، الهه ابوالحسنی[1]، محبوبه شیخ‌بهایی[1]

[1] گروه زیست‌شناسی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران.

[*] (نویسنده مسئول مکاتبات): frezanejad@uk.ac.ir

تاریخ دریافت: آبان ۱۴۰۰ تاریخ پذیرش: دی ۱۴۰۰

چکیده

گذر از فاز رویشی به زایشی یک مرحله‌ی نموی مهم، تحت کنترل شدید ژنتیکی است. این تغییر فاز نیازمند فعالیت مجموعه‌ای از ژنها در مریستم رأس شاخساره است که بیان سبب تبدیل مریستم رویشی به زایشی می‌شود. ژن APETALA1 (AP1) در پیشبرد مرحله‌ی گذر و نیز تعیین هویت مریستم گل نقش مهمی دارد. شناسایی و هم‌ساختی (هومولوژی) این ژن و پروتئین استنباطی (Deduced Protein) در گیاه منداب (*Eruca sativa*) بررسی شد. RNA کل از غنچه‌های گل منداب استخراج و cDNA ساخته شد. آغازگرهای اختصاصی بر اساس هم‌راستایی توالی ژن‌های هم‌ساخت AP1 در گیاهان هم‌خانواده، طراحی و برای واکنش RT-PCR استفاده گردیدند. قطعه مورد نظر به طول ۷۸۲ نوکلئوتید بود که EvsAP1 نامیده و در پایگاه داده NCBI با شماره KX524132.1 ثبت شد. BLAST این توالی، نشان داد که نزدیک‌ترین توالی نوکلئوتیدی بهEvsAP1 مربوط به گیاه تربچه (*Raphanus sativus*) و خردل سفید (*Sinapis alba*) با ۸۷% شباهت است). پروتئین استنباطی ژن EvsAP1، دارای ۲۵۶ آمینواسید است که ۸۲% شباهت با توالی آمینواسیدی تربچه نشان می‌دهد. طول کامل پروتئین AP1 در اکثر توالی‌های پروتئینی ثبت شده از این ژن در سایت NCBI که متعلق به خانواده‌ی شب بو می‌باشند، ۲۵۶ آمینو اسید است که تاییدی برای توالی مورد نظر است. مطالعات درخت فیلوژنی نشان داد که گیاهان هم‌خانواده *Eruca sativa* ، همگی در شاخه‌های (کلادهای) مجاور قرار گرفته‌اند و با خردل سیاه (*Brassica nigra*) و تربچه (*Raphanus sativus*) شباهت بالاتری دارد بطوری که با تربچه در یک کلاد قرار دارند که تأییدی بر صحت توالی خوانده شده ژن AP1 در این گیاه می‌باشد.

کلیدواژه‌ها: پروتئین استنباطی، خانواده شب بو، گل‌دهی، منداب، EvsAP1.

مقدمه

به منظور همزمانی گلدهی با شرایط بهینه و افزایش موفقیت گلدهی و میوه دهی، باید گذر از مرحله رویشی به زایشی تنظیم شود. زمان گل‌دهی تحت کنترل عوامل ژنتیکی است که به نسل بعدی قابل انتقال است. مطالعات نشان داده است که زمان گل‌دهی تحت کنترل چند مکان ژنی و از وراثت بالایی برخوردار است. درختان میوه در تمام طول سال با شرایط محیطی در حال واکنش هستند و گل‌دهی درختان ارتباط نزدیکی با تغییرات فصلی

آب و هوا دارد و بطور معمول مقدار معینی سرما ضروری و سپس مقداری گرما لازم است تا گل‌ها ظاهر شوند. تنظیم زمان گل‌دهی باید طوری باشد که به سرما برخورد نکند تا گل‌ها به مرحله باردهی و تولید محصول برسد و به صرفه اقتصادی منجر گردد [۱، ۲].

تولید مثل جنسی موفق و به دنبال آن نمو میوه و دانه در گیاهان گل‌دار به توانایی آن‌ها در نمو گل وابسته است. آگاهی از تکوین گل در گیاهان برای انجام برنامه های اصلاح نژادی و نیز درک روند تکاملی درگیر در نمو اندام‌های گل لازم است. گیاهان گل‌دار بر اساس مکانیسم‌هایی برای به حداکثر رساندن موفقیت تولید مثلی تکامل یافته‌اند. یکی از عوامل بهینه شدن این موفقیت زمان بندی مناسب گذر از فاز رویشی به زایشی است [۳]. گذر به گل‌دهی تحت کنترل شبکه ژنتیکی پیچیده‌ای است که متاثر از محرک‌های درونی و محیطی گوناگون است [۴، ۵]. در این گذر گیاهان از رشد رویشی به رشد زایشی تغییر وضعیت داده و مریستم راس شاخساره رویشی (SAM[1]) هویت مریستم گل آذین (IM[2]) را می‌پذیرد. در نهایت IM یا به مریستم گل (FM[3]) تبدیل می‌شود و یا تولید مریستم‌های جانبی می‌کند که می‌توانند به مریستم‌های گل تبدیل شوند. این فرآیند نموی یک ویژگی گونه‌ای است که تعیین کننده نوع گل‌آذین می‌باشد [۶]. به طور کلی گذر به گل‌دهی به دو فرآیند مشخص تقسیم می‌شود که عبارتند از: تحریک و راه اندازی. تحریک گل دهی، الزام گیاه به آغاز تولید گل است که اغلب در نتیجه‌ی فرآیندهای رخ داده در برگ‌ها اتفاق می‌افتد. با یک تحریک، گیاه در مسیر گل دهی قرار می‌گیرد، اگرچه هنوز هیچ گلی در این مرحله تولید نشده است. سپس گیاه تحریک شده، از طریق راه اندازی تغییرات در بیان ژن در مریستم رأس ساقه (SAM) تولید گل‌ها را آغاز می‌کند. هنگامی که القای گل دهی رخ می‌دهد، بسیاری از تغییرات فیزیولوژیک به منظور آماده شدن گیاه برای ورود به مرحله گذر در مریستم راس ساقه ایجاد می‌شود. بدون این تغییرات، گذر به گل دهی معمولا با موفقیت رخ نخواهد داد. افزایش در میزان سنتز RNA یکی از اولین تغییراتی است که در مریستم رأس ساقه در جهت رونویسی ژن‌های جدید رخ می‌دهد و میزان سنتز پروتئین نیز افزایش می‌یابد. سنتز RNA و پروتئین تنها فرآیندهای متابولیکی نیستند که در مریستم تحت گذر به مرحله زایشی رخ می‌دهد، بلکه افزایش در سطح ساکارز و ATP نیز در برخی گیاهان ثبت شده است. افزایش فعالیت اینورتاز و تعداد میتوکندری نیز با تغییر در وضعیت مریستم مرتبط می‌شود، که موجب افزایش فعالیت متابولیکی خواهد شد [۷].

حداقل پنج مسیر، زمان گل دهی را در آرابیدوسیس کنترل می‌کنند: مسیرهای دوره نوری[4]، ژیبرلیک اسید، بهاره شدن، خودگردان[5] و مسیر سن. مسیرهای دوره نوری و بهاره شدن به علایم محیطی مانند نور و دما واکنش می‌دهند، اما مسیرهای خودگردان و ژیبرلیک اسید متأثر از وضعیت نموی داخلی گیاه هستند. مسیر سن نیز در آخر کشف شد که یک مسیر درونزا برای کنترل گل‌دهی می‌باشد [۸، ۹].

دوره نوری یا فتوپریود، یکی از مهم‌ترین عوامل کنترل زمان گل دهی در نواحی معتدله است. تاکنون تعدادی از ژن‌های دخیل در پاسخ به طول روز شناسایی شده‌اند. برخی از این ژن‌ها کد کننده پروتئین‌های تنظیمی هستند که به طور ویژه در تنظیم گل دهی دخالت دارند اما برخی دیگر یا در عملکرد شبانه روزی دخالت دارند و یا اجزای مسیرهای انتقال سیگنال نور را کد می‌کنند. ژن‌های *WAGENINGEN* (FWA)، FLOWERING CONSTANS (CO)، CRYPTOCHOROME2 (CRY2)، GIGANTEA (GI)، FLOWERING LOCUS T (FT)، SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CO1 (SOC1) از جمله ژن‌های تشکیل دهنده مسیر نوری هستند. این ژن‌ها در پاسخ به طول روز موجب گل‌دهی می‌شوند [۱۰]. در بین ژن‌های شناخته شده این مسیر، CO آخرین ژن و ویژه این مسیر است، سایر ژن‌ها یا اثرات عمومی بیشتری دارند و یا در دیگر مسیرها نقش ایفا می‌کنند. FT و FWA که در پایین دست CO فعالیت می‌کنند، در سایر مسیرها نیز حضور دارند. GI وCRY2 نیز در بالا دست CO فعالیت می‌کنند. ژن SOC1 که (AGL20) AGAMOUS LIKE 20نیز نامیده می‌شود به عنوان یک میانجی گلدهی عمل می‌کند. جهش یافته‌های *soc1* در روز بلند و کوتاه، دیر گل می‌دهند. این ژن بیشتر در برگ‌ها و مریستم رأس

[1] Shoot Apical Meristem
[2] Inflorescence Meristem
[3] Floural Meristem
[4] Photoperiod Pathway
[5] Autonomous pathway

ساقه[1] بیان می‌گردد. بیان آن در طول زمان افزایش یافته و حین گذر به گل‌دهی در رأس به بیشترین میزان خود می‌رسد [۱۰]. FT، به عنوان ژن مؤثر در تحریک گل‌دهی زودرس در گیاهان شناخته شده است. در آرابیدوپسیس پروتئین FT، تحت دوره‌ی نوری روز بلند از برگ‌ها به سمت رأس شاخساره حرکت می‌کند و در آنجا با FLOWERING LOCUS D (FD) تشکیل کمپلکس می‌دهد. کمپلکس FT-FD به طور مستقیم یا غیرمستقیم ژن‌های گل‌دهی از قبیل APETALA1 (AP1) را فعال می‌کند و سرانجام باعث تحریک گل‌دهی می‌شود. به علاوه ژن FT می‌تواند تغییرات نموی دانه، تخمدان و برخی قسمت‌های دیگر گیاه را نیز تنظیم کند [۱۰].

یکی از مشخصات عمده ژن‌های تعیین هویت مریستم گل این است که بسیاری از آن‌ها در فعل و انفعالات متقابل دخالت دارند. آن‌ها در طبیعت برای فراهم کردن یک سپر علیه سیگنال‌های ناخواسته‌ی محیطی و اطمینان از اینکه تبدیل مریستم به درستی رخ دهد به کار می‌روند. ژن‌های LEAFY، APETALA1 و CAULIFLOWER به عنوان مهم‌ترین ژن‌های تعیین هویت مریستم گل در نظر گرفته می‌شوند. ژن AP1 چندین نقش مهم در آرابیدوپسیس ایفا می‌کند که عبارتند از دخیل بودن در مرحله گذر، تعیین هویت مریستم گل، بنیان گذاری مشخصات اندام‌های گل در دو حلقه بیرونی به عنوان ژن کلاس A و سرکوب مریستم‌های نابه جایی که اغلب در گل‌های جهش یافته ap1 به وجود می‌آیند [۵، ۱۱]. ژن AP1 در آرابیدوپیس روی کروموزومهای شماره ی یك، دو، سه و پنج قرار دارد و دارای ۸ اگزون و ۷ اینترون است و یك فاکتور رونویسی متعلق به MADS-box را کد می‌کند [۱۱]. طول ناحیه‌ی کدکننده‌ی آن در گیاهان مختلف از ۱۰۰۰-۷۵۰ نوکلئوتید متغیر می‌باشد. ژن AP1 تاکنون در برخی از گونه‌های خانواده شببو شناسایی و تعیین توالی شده است. بهرحال، مطالعات کتابخانه ای، هیچ گزارش منتشر شده در باره ساختار این ژن در منداب نشان نداد. با توجه به اهیمت گلدهی و تولید میوه و نقش مهم این ژن در فرایند گلدهی، در این مطلعه شناسایی و توالی یابی ژن AP1 در منداب از خانواده مدل شب بو گیاه مورد بررسی قرار گرفت. روغن دانه منداب در صنایع غذایی، بهداشتی، دارویی، و در صنعت برای ساخت صابون، مواد جلا دهنده، روغن ماساژ و ثابت کننده واکس کاربرد دارد

مواد و روش‌ها

بذرگیاه منداب (*Eruca sativa*) از خانواده شب‌بو (Brassicaceae) از شرکت توسعه صادرات گیاهان دارویی ساغر رفسنجان خریداری گردید. بذرها در گلدان‌های حاوی پرلیت در شرایط گلخانه‌ای کشت شدند. از غنچه‌های گل قبل از باز شدن، به‌منظور شناسایی و توالی‌یابی ژن هم‌ساخت AP1 استفاده شدند.

طراحی آغازگر: اولین مرحله در شناسایی ژن و مطالعه بیان آن، طراحی آغازگرهای مناسب و استفاده از آنها در واکنش‌های PCR و یا RT-PCR است. از آنجاکه توالی ژن مورد نظر در گیاه مورد مطالعه نامشخص بود، آغازگرها بر اساس توالی‌های ژنی موجود از سایر گیاهان هم‌خانواده، طراحی گردیدند. بدین منظور توالی ژن هم‌ساخت AP1 در آرابیدوپسیس تالیانا (Accession no: AF466780.1)، آرابیدوپسیس هالری (Accession no: AB465587.1)، آرابیدوپسیس لیراتا (Accession no: AF466786.1)، خردل سفید (Accession no: X81480.1)، شاهی (Accession no: JX103194.1)، کلم (Accession no:Z37968.1)، گل عنکبوتی (Accession no: JX103199.1)، ترتیزک (Accession no: AB372085.1)، شاهی (Accession no: KP070728.2) و خردل سیاه (Accession no: KT156724.1) 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، یک جفت آغازگر با استفاده از نرم‌افزار GeneRunner طراحی گردیدند. سنتز آغازگرهای طراحی شده توسط شرکت پیشگام صورت گرفت.

آغازگرها به گونه‌ای طراحی گردیدند که بتوان در RT-PCR بیشترین طول ناحیه‌ی کدکننده ژن را بدست آورد و از محصول آن‌ها جهت تعیین توالی استفاده کرد. توالی آغازگرها در جدول ۱ آمده است.

[1] Shoot apical meristem

جدول ۱. نام، توالی و کاربرد آغازگرهای مورد استفاده

کاربرد	توالی (5' ⟶ 3')	نام آغازگر
آغازگر پیش‌برنده در RT-PCR	GGAAGGGGTAGGGTTCA	FrAP1
آغازگر برگرداننده در RT-PCR	TGGAATTGTTTCATGCGG	RvAP1

برای شناسایی و جداسازی ناحیه کد کننده (cDNA) ژن همساخت AP1، از RT-PCR استفاده گردید. در این روش ابتدا RNA کل، از غنچه‌های گل با استفاده از محلول استخراج RNA (GeneAll, RiboEx, Total RNA isolation solution, Korea) و براساس دستورالعمل استفاده از این محلول استخراج شد. برای ارزیابی خلوص، تعیین غلظت و کیفیت RNA از روش‌های اسپکتوفتومتری در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر و الکتروفورز افقی روی ژل آگارز یک درصد استفاده شد [۲].

برای انجام RT-PCR، با استفاده از کیت cDNA ساخت شرکت فرمنتاز (RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit) و طبق روش ذکر شده در آن از رویRNA، رشته اول cDNA تهیه گردید. در نهایت از این‌cDNA در PCR بعنوان DNA الگو استفاده شد (۱). برنامه PCR، برنامه معمول با دمای اتصال ۵۵ درجه سانتی گراد به مدت یک دقیقه بود [۲]. پس از انجام PCR، حضور و کیفیت محصول روی ژل آگارز۱% بررسی شد.

به منظور تعیین توالی قطعه تکثیر شده ژن از طریق PCR، ۴۰ میکرولیتر از محصول PCR به همراه ۲۰ میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای پیش‌برنده و برگرداننده به شرکت پیشگام فرستاده شد.

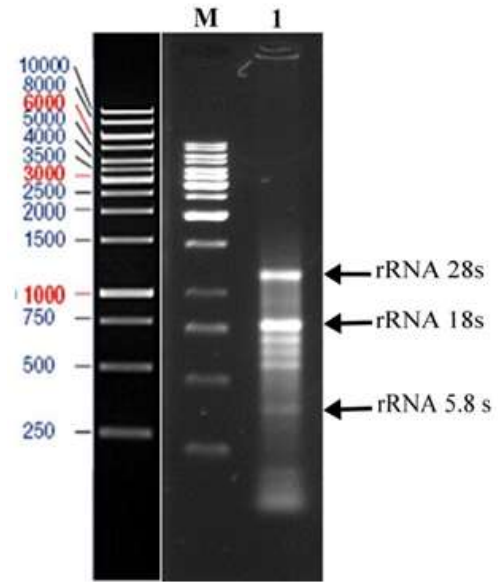
نتایج حاصل از تعیین توالی ابتدا با نرم‌افزارهای BLAST و ClustalW هم‌ردیف شده و سپس توالی اسید آمینه‌ای استنباطی و توالی‌های برخی از ارتولوگ‌های AP1 موجود در بانک ژن NCBI با استفاده از نرم‌افزار MEGA 6.06 (6140226) با روش Neighbor-Joining مقایسه و میزان شباهت آنها بررسی شد.

نتایج

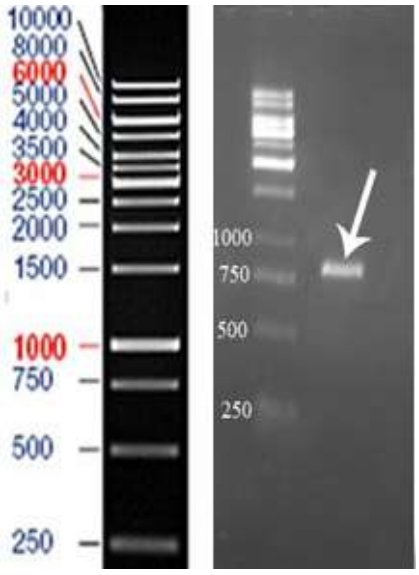
نتایج حاصل از نانودراپ نشان داد که نسبت جذب ۲۶۰/۲۸۰ نانومتر در حدود ۱/۹-۲/۱ و غلظت RNA، ۱۰۰۰ نانوگرم در هر میکرولیتر بود. حضور سه باند پررنگ مربوط به RNA های ریبوزومی، نشان دهنده کیفیت مطلوب RNA استخراج شده برای انجام RT-PCR است (شکل ۱).

چندین PCR با استفاده از cDNA حاصله، آغازگرهای Fr-AP1 و Rv-AP1 و برنامه PCR ذکر شده انجام شد و در نهایت پس از بهینه سازی واکنش، تک باند اختصاصی مربوط به تکثیر قطعه‌ای ۷۸۲ نوکلئوتیدی به دست آمد (شکل ۲). محصول PCR حاصل از آغازگرهای Fr-AP1 و Rv-AP1 توالی یابی شد که نتیجه هم‌ردیفی دو توالی پیش‌برنده و برگرداننده، که با استفاده از نرم افزار BLAST انجام گرفت در شکل ۳ نشان داده شده است (شکل ۳).

نتایج حاصل از BLAST، نشان دهنده شباهت بالای این قطعه با سایر ژن های ارتولوگ AP1 است. میزان شباهت این قطعه با هم‌ساخت‌های آن در خانواده شب بو به این شرح است: تربچه (*Raphanus sativus*) ۸۷%، (Accessin no: XM018612772)، خردل سفید (*Sinapis alba*) ۸۷%، (Accessin no: X81480) *Brassica rapa* ۸۶%، (Accession no: XM 009129455) *Camelina sativa*، (Accession no: XM010472583) *Brassica oleracea* ۸۶%، (Accession no: XM013734836). بنابراین این توالی مربوط به ناحیه کد کننده ژن هم‌ساخت APETALA1 در گیاه منداب (*Eruca sativa*) است که با نام *EvsAP1* با شماره دسترسی KX524132.1 ثبت شد (شکل۴). این ناحیه کد کننده بیشترین شباهت را با تربچه (*Raphanus sativus*) و خردل سفید (*Sinapis alba*) به میزان ۸۷ درصد و کمترین شباهت را با *Brassica oleracea* به میزان ۸۴ درصد داشت. شکل ۵ نتیجه‌ی BLAST ژن*EvsAP1* با هم‌ساخت آن در تربچه (*Raphanus sativus*) را نشان می‌دهد که مشخص کننده‌ی شباهت ۸۷ درصدی توالی این ناحیه از دو ژن است (شکل ۵).



شکل ۱. نیم‌رخ الکتروفورزی**RNA** کل استخراج شده از غنچه گل مناداب (*Eruca sativa*)1: RNA کل دارای سه باند واضح RNAهای ریبوزومی 28s، 18s و 5.8s. M: نشانگر مولکولی DNA 1kb(Fermentase).



شکل ۲. نیم‌رخ الکتروفورزی محصول **RT-PCR**، نشان دهنده‌ی‌تکثیر ناحیه‌ی مورد نظر از ژن AP1. در منداب .1: باند مربوط به قطعه‌ی ۷۸۲ جفت بازی سنتزشده با استفاده از آغازگرهای پیش‌برنده‌یFrAP1 و برگرداننده‌ی RvAP1.. M: نشانگر مولکولیDNA 1kb(Fermentase).

5′ATGGGAAGGGGGAGGGTTCAATTGAAGAGGATGGAGAATAAGATCAGTCGACAAGCGACATTG
TCGAGAAGAAGAGCTGGTCTGATGAAGAAAGCTAATGAGATCTCTGTTCTCTGTGATGCTGAAGTC
GCCGTTGTTGTCTTCTCCCATAAGGGGAAACTCGTCGAATACTCCGCCGATTCTAGTATGGAGAAG
ATACTAGAACGTTATGAGAGGTACTACTACGAGGAGAGACAACTTGCTGCACCGGAGGACGACGA
TAATACGAAGTGGTCGATGGAGTACAACAGGAAGAAGGAGAAGAAGGAGCTGGTGGAGAGAAAC
CAGCGGCATTATGGTGGGGAAGAGCAGCAAGCAATGAGCTCTAAGGAGCTGCAGAAGGAGGAGC
AGCAGCACGACGCTGCTATTAAGCACCTCCGCTCTAGAAAAAAGCAGCTGATGTACGACTCCATCA
ATGAGCAGCAGAGAAAGGAGAAAGCCCTGCAACAACAAAACAGCATGCTTTCTAAGCAGATGAAG
GAGAGGGAGAAGATTATTAGGGCACAACAAGAACAGTGGGACCAGCAACAACAAGGCCACAATA
CTCCTCCTCCTCCTCCCCCACAGCAGCATCAAATGCAGCATCCATACATGCTCTCTCATCAGCCATC
TCCTTTTCTAAACATGGGTGGCCTGTATCAAGAAGAAGATCCAATGGCAATGAGGAGGAACGACCT
TGATCTGTCTCTTGAACCCGTCTACAACTGCTGCCTTGGCTGCTTCGCCGCGTGA 3′-3′

شکل۳. توالی ثبت شده از ژن هم‌ساخت AP1 در گیاه مناداب (*Eruca sativa*) در پایگاه NCBI **با شماره دسترسی** KX524132.1

شکل ۴. ناحیه کد کننده کامل ژن AP1 که با شماره دسترسی KX524132.1 در پایگاه داده NCBI ثبت شده است.

Raphanus sativus mRNA
Sequence ID: XM_018612772.1Length: 1102Number of Matches: 1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
878bits(475)	0.0	679/781(87%)	0/781(0%)	Plus/plus

```
Query  1    ATGGGAAGGGGGAGGGTTCAATTGAAGAGGATGGAGAATAAGATCAGTCGACAAGCGACA  60
            |||||||||||| |||||||||||||||||||| |||||||||||||| | | |||| ||||
Sbjct  148  ATGGGAAGGGGTAGGGTTCAATTGAAGAGGATAGAGAATAAGATCAATAGGCAAGTGACA  207

Query  61   TTGTCGAGAAGAAGAGCTGGTCTGATGAAGAAAGCTAATGAGATCTCTGTTCTCTGTGAT  120
            || |||| ||||||||||||||  |||||||||||| |||||||||||||||| ||||||
Sbjct  208  TTTTCGAAAAGAAGAGCTGGTCTTCTGAAGAAAGCTCATGAGATCTCTGTTCTGTGTGAT  267

Query  121  GCTGAAGTCGCCGTTGTTGTCTTCTCCCATAAGGGGAAACTCGTCGAATACTCCGCCGAT  180
            |||||||| ||| ||||||||||||||||||||||||||||| | ||||||||| | |||
Sbjct  268  GCTGAAGTTGCCCTTGTTGTCTTCTCCCATAAGGGGAAACTCTTTGAATACTCCACTGAT  327

Query  181  TCTAGTATGGAGAAGATACTAGAACGTTATGAGAGGTACTACTACGAGGAGAGACAACTT  240
            ||| ||||||||||||||| ||||||||||||||||||  ||||  |||||||| |||
Sbjct  328  TCTTGTATGGAGAAGATACTTGAACGTTATGAGAGGTACTCTTACGCAGAGAGACAGCTT  387

Query  241  GCTGCACCGGAGGACGACGATAATACGAAGTGGTCGATGGAGTACAACAGGAAGAAGGAG  300
               |||||| |||  |||||  |||||||| |||||||||||||| ||||||   ||||
Sbjct  388  ATTGCACCTGAGTCCGACGTCAATACGAACTGGTCGATGGAGTATAACAGGCTTAAGGCT  447

Query  301  AAGAAGGAGCTGGTGGAGAGAAACCAGCGGCATTATGGTGGGGAAGAGCAGCAAGCAATG  360
            ||||  |||||  |||||||||||||| |||| |||  |||||||||   |||||| |||
Sbjct  448  AAGATTGAGCTATTGGAGAGAAACCAGAGGCACTATCTTGGGGAAGACTTGCAAGCGATG  507

Query  361  AGCTCTAAGGAGCTGCAGAAGGAGGAGCAGCAGCACGACGCTGCTATTAAGCACCTCCGC  420
            |||||||||||||| |||||   |||||||||||  ||| ||||| |||||||| |||||
Sbjct  508  AGCTCTAAGGAGCTCCAGAATCTGGAGCAGCAGCTTGACACTGCTCTTAAGCACATCCGC  567

Query  421  TCTAGAAAAAAGCAGCTGATGTACGACTCCATCAATGAGCAGCAGAGAAAGGAGAAAGCC  480
            ||||| ||||| || || ||||||||||||||||||||||  || |||||||||| |||
Sbjct  568  TCTAGGAAAAACCAACTTATGTACGACTCCATCAATGAGCTCCAAAGAAAGGAGAAGGCC  627

Query  481  CTGCAACAACAAAACAGCATGCTTTCTAAGCAGATGAAGGAGAGGGAGAAGATTATTAGG  540
             | ||  |||||||||||| ||||||| || ||||| |||||||||||| |||||| |||||
Sbjct  628  ATACAGGAACAAAACAGCTTGCTTTCCAAACAGATCAAGGAGAGGGAAAAGATTCTTAGG  687

Query  541  GCACAACAAGAACAGTGGGACCAGCAACAACAAGGCCACAATACTCCTCCTCCTCCTCCC  600
            |||||||||||| || |||||||||||| | || ||||||||||  || ||||||||||||
Sbjct  688  GCACAACAAGAGCAATGGGACCAGCAAAACCATGGCCACAATATGCCCCCTCCTCCTCCC  747

Query  601  CCACAGCAGCATCAAATGCAGCATCCATACATGCTCTCTCATCAGCCATCTCCTTTTCTA  660
            || |||||||||||||| ||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  748  CCGCAGCAGCATCAAATCCAGCAGCCATACATGCTCTCTCATCAGCCATCTCCTTTTCTC  807

Query  661  AACATGGGTGGCCTGTATCAAGAAGAAGATCCAATGGCAATGAGGAGGAACGACCTTGAT  720
            |||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||| || |||
Sbjct  808  AACATGGGTGGCCTGTATCAAGAAGAAGATCCAATGACAATGAGGAGGAACGAGCTCGAT  867

Query  721  CTGTCTCTTGAACCCGTCTACAACTGCTGCCTTGGCTGCTTCGCCGCGTGAAAAATTTCC  780
            |||||||||||||| || |||||||||   |||||||||| ||||| ||||| | ||||
Sbjct  868  CTGTCTCTTGAACCTGTTTACAACTGCAATCTTGGCTGCTTTGCCGCATGAAACAATTCC  927

Query  781  A  781
            |
Sbjct  928  A  928
```

شکل ۵. نتیجه‌ی BLAST ژن EvsAP1 با هم‌ساخت آن در تربچه (*Raphanus sativus*)

با توجه به این ناحیه از ژن، می‌توان توالی پروتئین کد شده به وسیله‌ی این قطعه از ژن را به دست آورد که در شکل ۶ نشان داده شده است. شباهت این پروتئین استنباطی که دارای ۲۵۶ اسید آمینه است با همساخت آن در تربچه در شکل ۷ نشان داده شده است.

به منظور بررسی میزان شباهت محصول EvsAP1 با سایر هم‌ساخت‌های (ارتولوگ‌های) AP1، توالی پروتئین استنباطی آن با توالی سایر هم‌ساخت‌ها در گونه‌های دیگر، مقایسه گردید. به این منظور توالی پروتئینی برخی از همساخت‌های AP1 از سایت NCBI دریافت شد و درخت فیلوژنتیکی این پروتئین‌ها با استفاده از نرم افزار MEGA 6 رسم شد (شکل ۸). همانطور که در شکل دیده می شود منداب (*Eruca sativa*) در گروه دولپه‌ای‌ها و خانواده شب بود قرار دارد که تایید بر درستی تحقیق است. در این خانواده، با خردل سیاه (*Brassica nigra*) و تربچه (*Raphanus sativus*) شباهت بالاتری دارد بطوری که با تربچه در یک کلاد قرار دارند. همچنین، همانطور که انتظار می‌رود با برخی دولپه‌ای‌ها که در شکل نشان داده شده از جمله خانواده سیب زمینی (فلفل و سیب زمینی)، گل سرخ (گلابی، *Prunus persica*)، انگور (*Vitis vinifera*)، تک‌لپه‌ای‌ها، بازدانگان و سرخس‌ها فاصله داشته و از آنها دور می‌باشد (شکل ۸).

بحث و نتیجه‌گیری

گل به عنوان ساختار زایشی مؤثر، عامل اصلی موفقیت تکاملی گیاهان گل‌دار یا نهان‌دانگان است که بزرگ‌ترین گروه گیاهان را تشکیل می‌دهند. گذر به گل‌دهی نیازمند فعال شدن مجموعه‌ای از ژن‌ها در مریستم رأسی است که بیان این ژن‌ها مریستم را از حالت رویشی به حالت گل‌آذین (IM) تبدیل می‌کند. گل‌ها در اثر بیان ژن‌های تنظیمی به نام ژن‌های تعیین هویت مریستم گل از جمله FUL، AP1، LFY در سلول‌های مریستم رأسی به وجود می‌آیند [۹]. ژن AP1 یک پروتئین MADS-box است و باعث تحریک گل‌دهی می‌شود. مهمترین نقش AP1 در مرحله گذر به

N- Terminal
MGRGRVQLKRMENKISRQATLSRRRAGLMKKANEISVLCDAEVAVVVFSHKGKLVEYSADSSMEKIL
ERYERYYYEERQLAAPEDDDNTKWSMEYNRKKEKKELVERNQRHYGGEEQQAMSSKELQKEEQQHD
AAIKHLRSRKKQLMYDSINEQQRKEKALQQQNSMLSKQMKEREKIIRAQQEQWDQQQQGHNTPPPPPP
QQHQMQHPYMLSHQPSPFLNMGGLYQEEDPMAMRRNDLDLSLEPVYNCCLGCFAA C-Terminal

شکل ٦. توالی پروتئین استنباطی بخش تعیین توالی شده از ژن EvsAP1

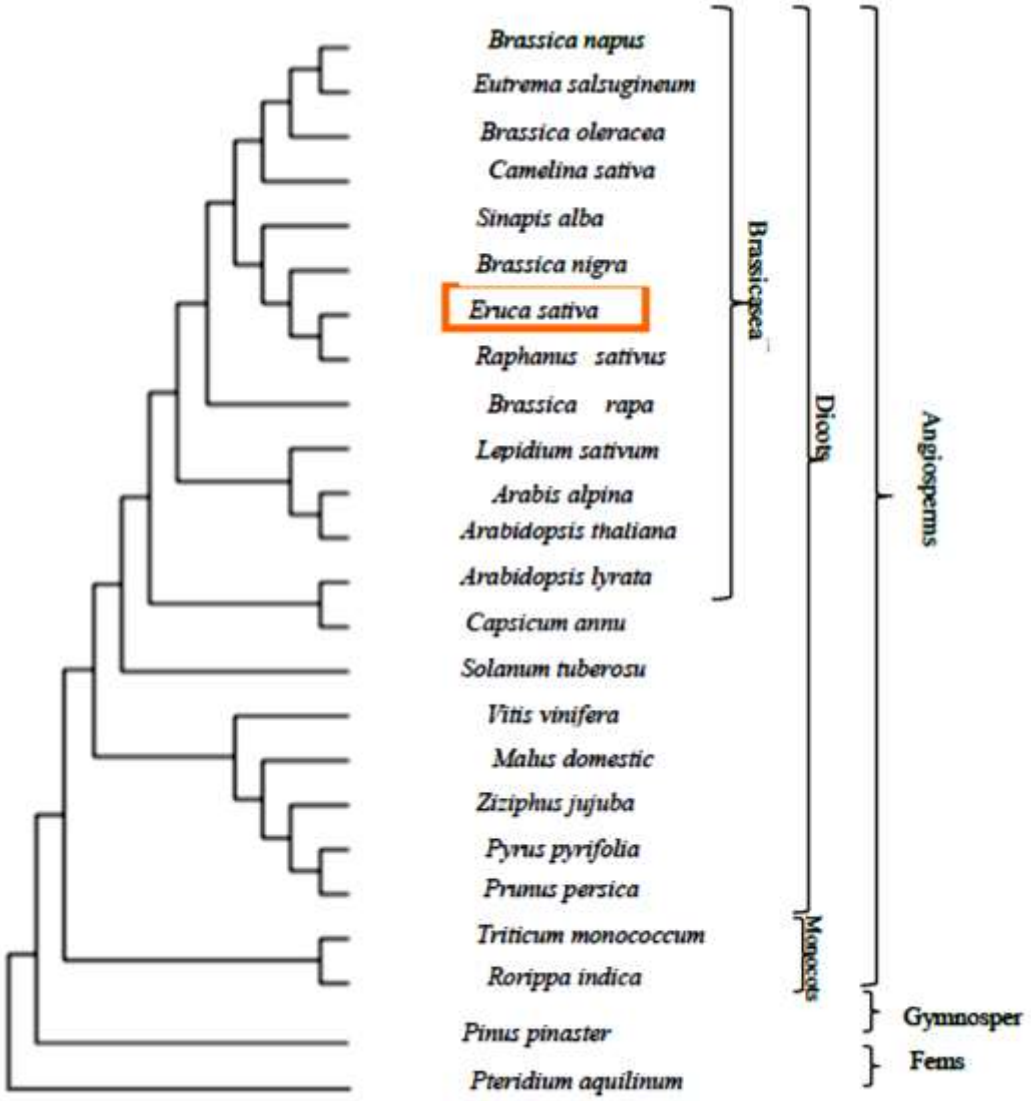
protein [Raphanus sativus]

Sequence ID: XP_018468274.1 Length: 256 Number of Matches

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
409 bits(1051)	8e-143	Compositional matrix adjust.	211/256(82%)	228/256(89%)	0/256(0%)

```
Query  1    MGRGRVQLKRMENKISRQATLSRRRAGLMKKANEISVLCDAEVAVVVFSHKGKLVEYSAD  60
            MGRGRVQLKR+ENKI+RQ T S+RRAGL+KKA+EISVLCDAEVA+VVFSHKGKL EYS D
Sbjct  1    MGRGRVQLKRIENKINRQVTFSKRRAGLLKKAHEISVLCDAEVALVVFSHKGKLFEYSTD  60

Query  61   SSMEKILERYERYYYEERQLAAPEDDDNTKWSMEYNRKKEKKELVERNQRHYGGEEQQAM  120
            S MEKILERYERY Y ERQL APE D NT WSMEYNR K K EL+ERNQRHY GE+ QAM
Sbjct  61   SCMEKILERYERYSYAERQLIAPESDVNTNWSMEYNRLKAKIELLERNQRHYLGEDLQAM  120

Query  121  SSKELQKEEQQHDAAIKHLRSRKKQLMYDSINEQQRKEKALQQQNSMLSKQMKEREKIIR  180
            SSKELQ  EQQ D A+KH+RSRK QLMYDSINE QRKEKA+Q+QNS+LSKQ+KEREKI+R
Sbjct  121  SSKELQNLEQQLDTALKHIRSRKNQLMYDSINELQRKEKAIQEQNSLLSKQIKEREKILR  180

Query  181  AQQEQWDQQQQGHNTPPPPPPQQHQMQHPYMLSHQPSPFLNMGGLYQEEDPMAMRRNDLD  240
            AQQEQWDQQ  GHN PPPPPPQQHQ+Q PYMLSHQPSPFLNMGGLYQEEDPM MRRN+LD
Sbjct  181  AQQEQWDQQNHGHNMPPPPPPQQHQIQQPYMLSHQPSPFLNMGGLYQEEDPMTMRRNELD  240

Query  241  LSLEPVYNCCLGCFAA  256
            LSLEPVYNC LGCFAA
Sbjct  241  LSLEPVYNCNLGCFAA  256
```

شکل ۷ نتیجه‌ی BLAST پروتئین EvsAP1 با هم‌ساخت آن در تربچه (*Raphanus sativus*)



شکل ۸. درخت فیلوژنتیکی پروتئین‌های هم ساخت **AP1** در گونه‌های مختلف. EvsAP1 درون کادر قرار گرفته است.

گلدهی، تعیین هویت مریستم گل و همچنین تعیین هویت دو حلقه بیرونی اندام‌های گل به عنوان ژن کلاس A می‌باشد. AP1 همچنین برای کنترل بیان ژن های دخیل در بسیاری از فرآیندهای سلولی و رشد، از جمله پاسخ‌های هورمونی و الگودهی مریستم نیز مشخص شده است [۱۲]. ارتولوگ‌ها یا هم‌عملکردهای[1] AP1 آرابیدوپسیس در دو لپه‌ای‌های اصلی که شامل اکثریت گونه‌های نهان‌دانگان هستند به صورت حفاظت شده وجود دارند و در تنوع ساختار گلپوش در گیاهان گل‌دار نقش‌های مهمی ایفا می‌کنند [۱۳].

طراحی آغازگر برای تمامی مطالعات و روش‌های تشخیصی که بر پایه PCR بنا شده‌اند، بسیار مهم است. با وجود تمامی مطالعات و تحقیقاتی که در سال‌های اخیر روی طراحی آغازگر صورت گرفته است، هنوز تمامی عوامل مؤثر در تکثیر محصول مورد نظر شناخته نشده است [۱۳]. کارایی و حساسیت PCR، به میزان زیادی به کارایی آغازگرها بستگی دارد. احتمالاً طراحی آغازگرها، اصلی‌ترین عامل موفقیت PCR است. طراحی ضعیف آغازگر، مانع از انجام صحیح PCR می‌شود [۱۴].

توالی آغازگرهای طراحی شده باید با استفاده از BLAST (/http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) مورد بررسی قرار گیرد و از این طریق هومولوژی احتمالی آنها با جایگاه‌های

[1] Orthologs

ژنی دیگر در ژنوم شناسایی شود. این هومولوژی‌ها می‌توانند باعث عمل‌کرد غلط و تولید محصولات غیر اختصاصی شوند. در این مطالعه به دست آمدن تک باند اختصاصی حاصل از PCR روی ژل آگارز بیانگر طراحی و عملکرد صحیح آغازگرها می‌باشد.

سنجش مناسب بودن غلظت RNA از طریق اندازه‌گیری جذب UV در طول موج‌های ۲۶۰ نانومتر و ۲۸۰ نانومتر با استفاده از دستگاه نانودراپ انجام می‌شود. علاوه بر این، خلوص RNA با نسبت ۲۶۰/۲۸۰ نانومتر تشخیص داده می‌شود. غلظت RNA استخراج شده در این پژوهش۱۰۰۰ نانوگرم بر میکرولیتر و نسبت جذب ۲۶۰/۲۸۰ نانومتر در حدود ۲/۱-۱/۹ بود که نشان دهنده مناسب بودن غلظت و کیفیت RNAهای استخراجی است. مطالعات دیگر، گویای این است که یک نسبت پایین جذب، می‌تواند نشان دهنده‌ی آلودگی به وسیله‌ی پروتئین باشد [۱۴].

تک باند اختصاصی حاصل از RT-PCR روی ژل آگارز در درجه اول بیانگر طراحی و عملکرد صحیح آغازگرها و مناسب بودن غلظت مواد بکار رفته در PCR است. همچنین برنامه‌ی PCR مناسب (بخصوص دمای اتصال) از جمله عوامل موفقیت در کسب تک باند اختصاصی است [۱۶]. واکنش RT-PCR با استفاده از RNA استخراجی از غنچه‌های گل و آغازگرهای اختصاصی انجام گرفت. طول باند مشاهده شده پس از توالی یابی، طول کامل ناحیه کد کننده، ۷۸۲ نوکلئوتید تعیین شد که نشان دهنده بخش کدکننده‌ی ژن EvsAP1 در منداب می‌باشد. طول کامل ناحیه‌ی کد کننده ژن همساخت AP1، در اکثر جنس‌های خانواده شب بو۱۰۰۰-۷۵۰ نوکلئوتید گزارش شده است که مشابه قطعه خوانده شده در این مطالعه است. BLAST این ناحیه کد کننده در خانواده شب بو نشان داد که نزدیک‌ترین توالی نوکلئوتیدی بهEvsAP1 مربوط تربچه (*Raphanus sativus*) و خردل سفید (*Sinapis alba*) به میزان ۸۷ درصد و کمترین شباهت مربوط *Brassica oleracea* به میزان ۸۴ درصد است. پروتئین استنباطی ژن EvsAP1، دارای ۲۵۶ آمینواسید است که ۸۲% شباهت با توالی آمینواسیدی تربچه نشان می‌دهد. طول کامل پروتئین AP1 در اکثر توالی‌های پروتئینی ثبت شده از این ژن در سایت NCBI که متعلق به خانواده‌ی شب بو می‌باشند، ۲۵۶ آمینو اسید است. بررسی نحوه‌ی قرارگیری گونه‌های گیاهی مختلف در درخت فیلوژنی رسم شده، نشان می‌دهد که گیاهان هم‌خانواده‌ی *Eruca sativa* همگی در شاخه‌های (کلادهای) مجاور این گیاه قرار گرفته‌اند. نزدیک کلادها در این درخت به گونه مورد مطالعه، *Brassica nigra* و *Raphanus sativus* هستند. گونه‌هایی از خانواده سیب زمینی (فلفل و سیب زمینی)، گل سرخ (گلابی، *Prunus persica*)، انگور (*Vitis vinifera*)، تک‌لپه‌ای‌ها، بازدانگان و سرخس‌ها نیز در این درخت فیلوژنتیکی قرار داشتند که مطابق انتظار این گیاهان در کلادهای دورتری از گونه مورد مطالعه قرار داشتند و برای مثال بازدانگان و سرخس‌ها بیشترین فاصله را با منداب داشتند که تأییدی بر صحت توالی خوانده شده برای ژن AP1 در این گیاه می‌باشد. بطور مشابه رفیعی و همکاران (۲۰۱۵) در مطالعه ژن AP1 در خردل سیاه یا *Brassica nigra*، بیشترین مشابهت توالی این ژن را با خردل سفید *Sinapis alba* پیدا کردند که در این تحقیق هم ژن AP1 دو گونه ذکر شده (هم در توالی نوکلئوتیدی و هم بر اساس درخت فیلوژنتیکی)، در مجاورت نزدیک با AP1 منداب قرار دارد [۱۶].

منابع

[1] Lin F, Xue SL, Tian DG, Li CJ, Cao Y, Zhang ZZ, Zhang CQ, Ma ZQ. Mapping Chromosomal Regions Affecting Flowering Time in A Spring Wheat RIL Population. Euphytica. 2008; 164 (3): 769-77.

[2] Sheikhbahaei M., Rezanejad F., Sasan H., Ravan H. Isolation and Sequencing of Flowering Locus T (FT) Homologous Gene in *Lepidium sativum* L.: A Phylogeny Study of Its Deduced Protein, Cell Mol. R. 2020; 33 (4): 515-523.

[3] Kim DH, Doyle MR, Sung S, Amasino RM. Vernalization: Winter and the Timing of Flowering in Plants. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 2009; 25: 277-99.

[4] Amasino R. Seasonal and Developmental Timing of Flowering. Plant J. 2010; 61(6):1001-13.

[5] Han Y, Tang A, Yu J, Cheng T, Wang J, Yang W, Pan H, Zhang Q. RcAP1, a Homolog of APETALA1, Is Associated with Flower Bud Differentiation and Floral Organ Morphogenesis in *Rosa chinensis*. Int. J. Mol. Sci. 2019; 20 (14): 3557.

[6] Huijser P, Schmid M. The Control of Developmental Phase Transitions in Plants. Development. 2011;138 (19): 4117-29.
[7] Goetz M, Godt DE, Roitsch T. Tissue-Specific Induction of The Mrna for an Extracellular Invertase Isoenzyme of Tomato by Brassinosteroids Suggests a Role for Steroid Hormones in Assimilate Partitioning. Plant J. 2000; 22 (6): 515-22.
[8] Mouradov A, Cremer F, Coupland G. Control of Flowering Time: Interacting Pathways as a Basis for Diversity. Plant Cell. 2002; 14 (suppl_1): S111-30.
[9] Wang JW. Regulation of Flowering Time by the miR156-Mediated Age Pathway. J. Exp. Bot. 2014; 65(17): 4723-30.
[10] Parcy F. Flowering: a Time for Integration. Int. J. Dev. Biol. 2004; 49 (5-6): 585-93.
[11] Gustafson-Brown C, Savidge B, Yanofsky MF. Regulation of the Arabidopsis Floral Homeotic Gene APETALA1. Cell J. 1994; 76 (1): 131-43.
[12] Wellmer F, Riechmann JL. Gene Networks Controlling tThe Initiation of Flower Development. Trends Genet. 2010; 26 (12): 519-27.
[13] Litt A, Irish VF. Duplication and Diversification in the APETALA1/FRUITFULL Floral Homeotic Gene Lineage: Implications for the Evolution of Floral Development. Genetics. 2003; 165(2): 821-33.
[14] Okamoto TO, Okabe SU. Ultraviolet Absorbance At 260 And 280 nm in RNA Measurement is Dependent on Measurement Solution. Int. J. Mol. Med. 2000; 5 (6): 657-66.
[15] Marone M, Mozzetti S, De Ritis D, Pierelli L, Scambia G. Semiquantitative RT-PCR Analysis to Assess the Expression Levels of Multiple Transcripts from the Same Sample. Biol. Proced. 2001; 3 (1): 19-25.
[16] Rafiei A., Rezanejad F. Identification, Sequencing and Determination of Deduce Protein APETALA1 (AP1) Homologous Gene in *Brassica nigra*. Q. J. Dev. Biol. 2015; 7 (3): 1-8.

Journal of Developmental Biology
Vol. 14, No. 3, Summer 2022

Identification, sequencing and phylogeny of APETALA1 ortholog gene (AP1) in *Eruca sativa* (Brassicaceae)

Rezanejad F.[1]*, Abulhassani E.[1], Sheikh bahaei M.[1]

[1] Department of Biology, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran.

* (Corresponding author): frezanejad@uk.ac.ir

Received: November 2021 Accepted: December 2021

Abstract

The transition from vegetative to reproductive phase is an important developmental under genetic control. This stage requires the activation of a set of genes in apical meristem, the expression of which transforms the meristem from vegetative to reproductive. The APETALA1 (AP1) gene plays an important role in transition phase and flower meristem identity. The identification and homology of this gene and its deduced protein in *Eruca sativa* was studied. Total RNA was extracted from flower buds and cDNA made. Specific primers were designed and then used for RT-PCR reaction. The results showed that the desired fragment of the gene contains 782 nucleotides (complete cds). This fragment was called EvsAP1 and recorded in the NCBI database (KX524132.1). BLAST of this sequence with other species, showed that *Raphanus sativus* and *Brassica nigra* have the highest similarity (87%) with EvsAP1. The deduced protein of the EvsAP1 gene contains 256 amino acids, which is 82% similar to *Raphanus sativus*. The total length of AP1 protein obtained from NCBI databases in most species of Brassicace is 256 amino acids confirming the sequence. Examination of location of the different species in the phylogenetic tree showed that all species of Brassicaceae place in clads close to *Eruca sativa.* The species has the highest similarity with *Brassica nigra* and *Raphanus sativus* so that the later and *Eruca sativa* located in one clade. These results confirm the accuracy of the obtained sequence for the AP1 gene in this specie.

Keywords: Deduced protein, Brassicaceae family, flowering, *Eruca sativa*, EvsAP1.