فصلنامه (علمی)

زیست شناسی تکوینی

سال پانزدهم، شماره ۴، پاییز ۱۴۰۲ ص. ۳۴-۲۷

مقاله پژوهشی

بررسی بیوانفورماتیکی FLORICAULA (FLO) در گیاه زینتی بنفشه آفریقایی (*Saintpaulia ionantha* H.Wendl.)

مینا کاظمیان[۱*]، الهام محجل کاظمی[۱]، مریم کلاهی[۲]، ولی اله قاسمی[۳]

[۱] گروه گیاهی، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.

[۲] گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.

[۳] پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری طبرستان، ساری، مازندران، ایران.

[*] (نویسنده مسئول مکاتبات): mina.kazemian69@gmail.com

تاریخ دریافت: آبان ۱۴۰۱ تاریخ پذیرش: دی ۱۴۰۱

https:// dorl.net/dor/20.1001.1.2008692.1402.15.4.4.8 DOI: 10.30495/jdb.2023.1972705.1339

چکیده

گذر مرحله رویشی به زایشی در گیاه زینتی بنفشه آفریقایی با نام علمی *Saintpaulia ionantha* H.Wendlبا کنترل فاکتورهایی از جمله FLORICAULA (FLO) صورت می‌گیرد. فرآیند تعیین سرنوشت مریستم گل و الگوی شکل‌گیری آن توسط ژن FLO و القای ژن‌های همئوتیک مشخص می‌شود. در این پژوهش تعیین توالی پروتئین FLO، ویژگی‌های پروتئینی، ساختار دوم، موقعیت درون - سلولی و درخت فیلوژنتیکی توسط ابزارهای بیوانفورماتیک برای نخستین‌بار در بنفشه آفریقایی مورد ارزیابی قرارگرفته است. نتایج نشان داد که موقعیت درون سلولی این پروتئین در هسته پیش بینی شده است. این پروتئین (FLO) به خانواده FLO/LFY تعلق دارد. ساختار ثانویه پروتئین ۵۳% آلفا هلیکس و ۴% صفحات بتا تشکیل شده است. بررسی درخت فیلوژنی، گونه‌های مربوط به یک خانواده در یک شاخه جای گرفتند. همچنین هم‌ترازی توالی پروتئین نشان داده است که در گیاهان هم‌خانواده توالی به‌شدت حفاظت شده است. شناسایی ویژگی‌های پروتئین FLO می‌تواند به عنوان فاکتور اصلي در برنامه‌ريزي عملكرد بافت و به دنبال آن کنترل عملکرد این پروتئین حائز اهمیت باشد.

کلیدواژه‌ها: توالی‌یابی، خانواده FLO، صفحات بتا، فیلوژنی.

مقدمه

سابقه تجاري گل و گياهان زينتي ايران به حدود ۹۰ سال پيش بر مي‌گردد [۱]. ایران خاستگاه گونه‌های مهمی در حوزه گیاهان زینتی جهان است. به طوریکه مهمترین آنان شامل لاله، لاله واژگون، میخک، گلایول و زنبق می‌باشد که هم‌اکنون در جهان به شکل اصلاح‌شده و تجاری مورد استفاده قرار می‌گیرند [۱]. هنر گلکاری و پرورش گل‌های زینتی به عنوان یک فعالیت اقتصادی از سال‌های گذشته آغاز شده است. در این میان نقش گل و گیاهان زینتی (اعم از درختان، درختچه‌ها، گل‌های فصلی و دائمی) در تولید و ایجاد جاذبه های گردشگری و در پی آن توسعه

شهری و اجتماعی غیر قابل انکار می‌باشد. با توجه به موقعیت طبیعي ایران به دلیل تنوع اقلیم و پدیده‌هاي آب و هوایي مناسب، گل‌ها و گیاهان زینتي از محصولاتي هستند که در اکثر نقاط ایران قابل تولید هستند و حتي قابل رقابت در عرصه‌هاي جهاني مي‌باشند [۲].

بنفشه‌ی آفریقایی با نام علمی *Saintpaulia ionantha* Wendl (مترادف *Streptocarpus ionanthus*) به عنوان گیاه گلدار زینتی متعلق به خانواده‌ی Gesneriaceae شناخته می‌شود [۲]. بیش از هزار رقم بنفشه آفریقایی توسط تکنیك‌هاي پیشرفته تولید شده است و سالانه چندین رقم جدید به آن اضافه مي‌گردد که شکل رویشي و زمان‌گلدهي در ارقام جدید بهبود یافته است [۲]. تغییر الگوی گل طی تکوین به عنوان یک تحول گیاهی در نظر گرفته می‌شود [۳]. گل نامنظم به عنوان عامل پیشرفت در توانایی برهمکنش بین گیاه و گرده افشان به شمار می‌رود [۴]. در خانواده Gesneriaceae تغییر و تبدیل گل نامنظم به منظم نیز دیده می‌شود که اهمیت مطالعه‌ی مولکولی و ساختاری شکل‌گیری اندام‌های گل در گونه‌های این خانواده را نشان می‌دهد [۴].

مریستم گل‌آذین در بنفشه آفریقایی از میان برگ‌ها پدیدار می‌شود. هر محور گل دارای براکته‌های جانبی می‌باشد و در انتهای هر محور، یک گل انتهایی دیده می‌شود [5]. Teixeira و همکاران (۲۰۱۶)، تکوین یک انشعاب در گل‌آذین گرزن دوسویه بنفشه آفریقایی را در ۸ مرحله گزارش کردند:

۱- ظهور جوانه در محور برگ، ۲- ظهور ساقه گل‌دهنده، ۳- خمیده شدن ساقه گل‌دهنده، ۴- چرخش ۹۰ درجه‌ای دمگل‌ها، ۵- خمیدگی دمگل‌ها و ظهور جوانه‌های ثانویه در قسمت بالایی گل‌آذین، ۶- افزایش زاویه بین ساقه گل‌دهنده و دمگل، ۷- صاف شدن محور گل انتهایی، ۸- گلبرگ‌ها عمود بر ساقه گل‌دهنده.

به طور معمول اعضای گل‌هاي گیاهان دولپه‌اي در چهار حلقه مرکزي سازماندهي مي‌شوند: کاسبرگ‌ها، گلبرگ‌ها، پرچم‌ها و برچه‌ها. این اعضا به طور متوالي از مریستم‌هاي گل‌دار ناشي مي‌شوند [۷]. Yang و همکاران (۲۰۱۷) در بررسی مراحل نموی گل بنفشه آفریقایی گزارش کردند که ابتدا پریموردیوم‌های کاسبرگ و سپس گلبرگ ظاهر می‌شوند. در گل‌های بنفشه آفریقایی سلول‌های گلبرگ منشأ گرفته از لایه L_1 مریستم رویشی، با تقسیم مماسی به تدریج با گلبرگ کناری تماس پیدا کرده و در نهایت با یکدیگر ادغام می‌شوند و گلبرگ پیوسته را ایجاد می‌کنند [۸]. با ادامه تقسیمات مریستم زایشی، پریموردیوم‌های پرچمی ظاهرشده و با رشد پریموردیوم‌های پرچمی و فاصله‌گیری آنها از هم، پریموردیوم برچه به صورت یک برجستگی ظاهر می‌شود [۸].

بنیان‌گذاری گل‌ها با شبکه ژنی کنترل می‌شود که در مرحله بلوغ گیاه، زمان گل‌دهی و فرآیندهای مرتبط دیگر دخالت دارد [۹]. از ژن‌های موثر در تکوین گل می‌توان به ژن‌های همئوتیک اشاره کرد که در دو فرآیند ریخت‌زایی گیاهی موثرند: هویت سلولی و تعیین سرنوشت سلول. جهش در برخی ازین ژن‌ها منجر به افزایش تعداد حلقه‌های گل می‌شود [۱۰]. تغییر فاز رویشی به زایشی با کنترل ژن‌هایی از جمله LEAFY (LFY) صورت می‌گیرد که با برهمکنش دیگر ژن‌ها، گل‌دهی را تنظیم می‌کنند. فرآیند تعیین سرنوشت مریستم گل و الگوی شکل‌گیری آن توسط ژن LFY و القای ژن‌های همئوتیک مشخص می‌شود [۱۰]به عبارتی این ژن با فعال کردن ژن‌های APETALATA1 و AGAMOUS الگوی مریستم گل را در گیاه آرابیدوپسیس تعیین می‌کند [۱۱].

ژن FLORICAULA (FLO) همولوگ ژنLFY در آرابیدوپسیس به شمار می‌رود [۱۲] که اولین بار توسط Coen و همکاران (۱۹۹۰) در گیاه *Antirrhinum majus* شناسایی شد. این ژن با برهمکنش ژن‌های دیگر موجب شکل‌گیری الگوی مریستم گل می‌شود [۱۴]. ژن FLO به عنوان تنظیم‌کننده طی تکوین گل به شمار می‌رود که با ژن‌های مرتبط با تعیین هویت، بنیان‌گذاری مریستم گل و تعداد اندام‌های گل همکاری می‌کند [۹]. این ژن در گذر مریستم رویشی به زایشی موثر است [۱۵۱]. ژن LFY/FLO با فرآیندهای بهاره‌سازی، فتوپریود، مسیر کربوهیدرات و هورمون ژیبرلین همکاری دارد [۱۰]. بیشترین میزان بیان ژن FLO در مرحله پریموردیوم کاسبرگ و سپس گلبرگ بوده و در مرحله گل بالغ بیان این ژن کمتر مشاهده شده است. در واقع FLO در تبدیل مریستم گل‌آذین به مریستم گل موثر بوده و در جاییکه قرار است پریموردیوم اندام‌های کاسبرگ و گلبرگ شکل گیرند، بیان می‌شود [۱۰].

شناسایی ژن می‌تواند براي کشف و درک پدیده‌هاي ناشناخته، رفع اثرات نابه‌هنجار ژنتیکي و پیش‌گویي برخي پدیده‌ها استفاده شود [۱۶]. ازین رو شناسایی ژن FLO به همراه بررسی‌های بیوانفورماتیکی برای نخستین‌بار در گیاه بنفشه آفریقایي از اهداف این پژوهش می‌باشد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه: گیاهان یک‌ساله به منظور مطالعات مولکولی با سه تکرار از گلخانه پژوهشکده ژنتیک و بیوتکنولوژی طبرستان جمع‌آوری شدند (۱۶ ساعت روشنایی، ۸ ساعت تاریکی و دمای ۲۵درجه سانتی‌گراد). سپس نمونه‌ها سریعا به نیتروژن مایع انتقال داده شدند.

طراحی پرایمر: جهت طراحی پرایمر، ابتدا توالی ژن FLO در جنس‌های هم‌خانواده با شماره دسترسی AAS93254.1 و AAS93253.1 از پایگاه NCBI مورد مطالعه قرار گرفتند. بعد از هم‌ترازی توالی‌ها با نرم‌افزار MEGA 7، نقاط حفاظت شده به عنوان الگوی طراحی پرایمر با کمک نرم‌افزار Primer3 plus وOligo Analyzer در نظر گرفته شد [۱۷].

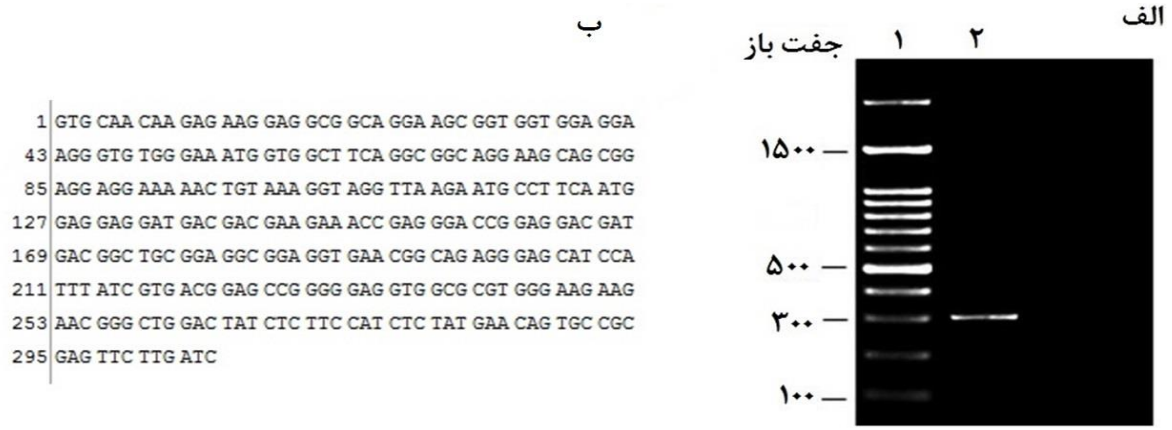
بررسی مولکولی: RNA کل از نمونه‌های تازه گیاهی با استفاده از کیت Trizol مطابق با دستورالعمل شرکت صورت پذیرفت. جهت حذف آلودگی احتمالی محلول استخراج شده با DNA ژنومی، از آنزیم DNase1 شرکت Thermo fisher scientific استفاده گردید. واکنش cDNA Synthesis بر اساس دستورالعمل Kit شرکت Thermo fisher scientific صورت گرفت. سپس واکنش PCR با برنامه دمایی 95 C° (5min)، 95 C°(30 S)، 58 C°(1min)، 72 C°(1min) و 72 C° (7min) در ۳۵ چرخه با دستگاه T100 Thermal Cycler شرکت Bio-Rad(USA) انجام شد [۱۸]. در نهایت محصول واکنش PCR بعد از خالص سازی با کیت سیناکلون، توسط شرکت Macrogen کره جنوبی توالی‌یابی شد.

بررسی بیوانفوراتیکی: توالی بدست آمده توسط نرم‌افزار Mega7 به پروتئین ترجمه شد و از قابلیت NCBI-Blast جهت جستجو پروتئین‌های مشابه و تایید توالی استفاده شد. سپس به کمک نرم‌افزار Mega7 درخت فیلوژنتیکی رسم گردید. به منظور تعیین مکان احتمالی پروتئین از نرم‌افزارهای آنلاین LOCtree3 وDeepLoc-1.0 استفاده شد. ساختار ثانویه توسط دو نرم‌افزار I-TASSER و Phyre2 بدست آمد. پیشبینی ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و موتیف پروتئینی توسط نرم‌افزار Pfam، ProtParam و PROSITE به ترتیب صورت گرفت [۱۷و۱۸].

نتایج

شناسایی و تعیین توالی ژن FLO در بنفشه آفریقایی

بخشی از توالی ژن FLO (اگزون ۲) در بنفشه آفریقایی به کمک پرایمرهای گونه‌های خویشاوند شناسایی شد و محصول PCR با باند ۳۰۶ جفت‌بازی مشاهده گردید (شکل ۱. الف). پس از بررسی‌های اولیه، در نهایت این ژن با شماره دسترسی MN128018.1 در گیاه بنفشه آفریقایی برای نخستین بار در بانک داده NCBI ثبت شده است.



شکل ۱: شناسایی ژن FLO در گیاه بنفشه آفریقایی. الف: محصول PCR ژن FLO به کمک پرایمرهای گونه‌های خویشاوند. ۱: لدر ۱۰۰ و ۲: محصول PCR. ب: بخشی از توالی ژن FLO.

پیش‌بینی ساختار و موقعیت درون‌سلولی پروتئین FLO

به منظور پیش‌بینی ساختار دوم، دو نرم افزار I-TASSER و Phyre2 مورد استفاده قرار گرفتند. ساختار دوم پروتئین FLO بنفشه آفریقایی اساسا از ۵۳% آلفا هلیکس و ۴% صفحات بتا تشکیل شده است (شکل ۳. الف). پیش‌بینی ساختار دوم پروتئین FLO با دقت ۷۹% در نرم‌افزار Phyre2 مشخص شد. در آنالیز نرم‌افزار I-TASSER، فاکتور B بیانگر تحرک گرمائی ذاتی رزیدی‌ها در پروتئین می‌باشد (شکل۳. ب). نتایج توزیع وسیع آلفا هلیکس را در ساختار پیش‌بینی شده پروتئین FLO در گیاه بنفشه آفریقایی نشان می‌دهد.

نرم‌افزار DeepLoc-1.0 و LOCtree3 جهت پیش‌بینی موقعیت درون‌سلولی پروتئین FLO مورد استفاده قرار گرفتند. نتایج هر دو نرم‌افزار مطابق با یکدیگر نشان داد که FLO پروتئین با قابلیت حلالیت می‌باشد که اصولاً در هسته و در مسیر غیرترشحی سلول قرار گرفته است.

ویژگی ساختار اولیه پروتئین FLO

بخشی از ناحیه کدکننده ژن FLO در بنفشه آفریقایی با ۳۰۶ نوکلئوتید، ۱۰۲ اسیدآمینه با وزن مولکولی ۱۱۴۴۱ دالتون را کد می‌کند. همترازی توالی پروتئین FLO در گیاهان هم‌خانواده حاکی از شباهت و حفاظت‌شدگی بالای اسیدآمینه‌های این پروتئین می‌باشد (شکل ۲. الف). نتایج Blast پروتئین در پایگاه NCBI تعیین کرد که بیشترین میزان شباهت (با بیش از ۹۸%) به گیاه *Streptocarpus rexi* متعلق به خانواده Gesneriaceae وجود دارد.

موتیف RRRK با حفاظت‌شدگی زیاد در سمت N-ترمینال پروتئین دیده می‌شود (شکل ۲. الف). نرم‌افزار pfam نیز توالی این پروتئین را از خانواده‌ی پروتئینی LFY/FLO پیش‌بینی کرده است (شکل ۲. ب). همچنین در سمت C-ترمینال توالی، توانایی اتصال به DNA برای پروتئین FLO فراهم شده است (شکل ۲. ب).

در نرم‌افزار ProtParam، نقطه ایزوالکتریک این پروتئین ۵/۱۲ تخمین زده شد. بیشترین اسیدآمینه‌ها مربوط به (۱۶%) Gly و (۱۴%) Glu و کمترین مربوط به (۱%) Trp می‌باشد. تعداد اسیدآمینه‌های بار مثبت و منفی به ترتیب برابر ۱۷ و ۲۲ عدد است. مطالعه ویژگی‌های پروتئین مورد نظر نشان داد که نیمه عمر این پروتئین در باکتری و مخمر(*in vivo*) به ترتیب حدود ۱۰ و ۲۰ ساعت ارزیابی شد. همچنین شاخص Instability و Aliphatic به ترتیب ۵۷/۱ و ۴۴/۹ تعیین شد.

الف

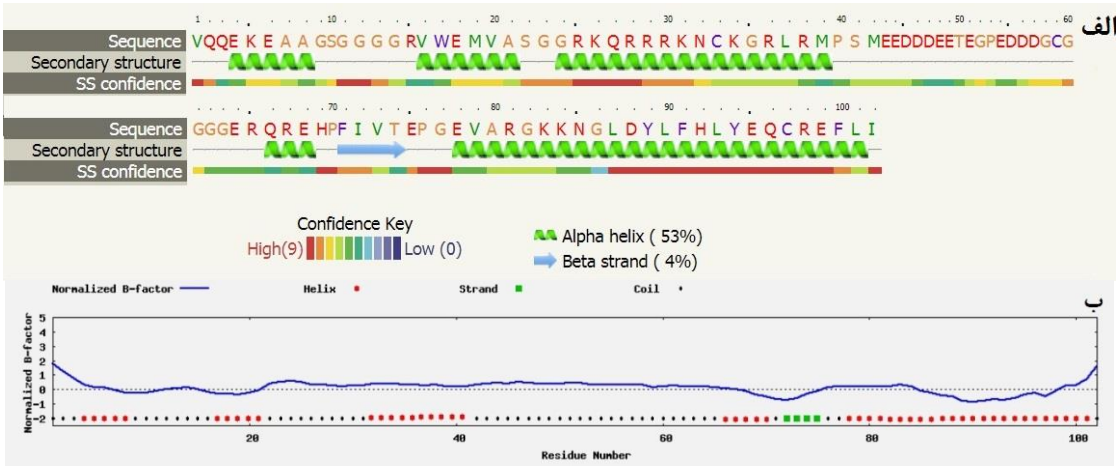
```
AAS93253.1      ALDALSQEGLSEEPVQQEKEAAGSGGGGGGVWEMVVATGGRKQRRRKNYKGRSRLMASME  60
AAS93254.1      ALDALSQEGLSEEHVQQEKEAAGSGG-GGRVWEMV-ASGGRKQRRRKNCKGRLRM-XSME  57
▶QED21093.1     --------------VQQEKEAAGSGG-GGRVWEMV-ASGGRKQRRRKNCKGRLRM-PSME  43
                              *********** ** ***** *:**********  *** *:  ***

AAS93253.1      EEEDEETEGAEDDENGGGGGGSERQREHPFIVTEPGEVARGKKNGLDYLFHLYEQCREFL  120
AAS93254.1      EDDDDETEGPEDDDNCGG--GGERQREHPFIVTEPGEVARGKKNGLDYLFHLYEQCREFL  115
QED21093.1      EDDDEETEGPEDDDGCGG--GGERQREHPFIVTEPGEVARGKKNGLDYLFHLYEQCREFL  101
                *::*:**** ***:. **  *.************************************

AAS93253.1      IQ---------------       122
AAS93254.1      IQVQNIAKERGEKCPAK       132
QED21093.1      I----------------       102
                *
```

ب

Pfam Matches

	Family		Clan	Description	Cross-references	Start	End
	Id	Accession					
>	C_LFY_FLO	PF17538.2	CL0123	DNA Binding Domain (C-terminal) Leafy/Floricaula		56	102

شکل۲. بررسی توالی پیش‌بینی شده پروتئین FLO. الف: میزان حفاظت‌شدگی بالای توالی پروتئین FLO در گیاهان هم‌خانواده وجود دارد. گیاهان هم‌خانواده *Streptocarpus rexii* (AAS93254.1) و *Corytoplectus* (AAS93253.1) هستند. اسیدآمینه‌های آرژنین (R) و لایزین (K) با مستطیل مشخص شده است که در ناحیه N-ترمینال پروتئین قرار دارد. در شکل، (*) معادل نقاط بسیار حفاظت‌شده، (:) شباهت زیاد و (.) شباهت کم می‌باشد. گیاه بنفشه آفریقایی با فلش مشخص شده است. ب: پیش‌بینی توالی مورد مطالعه در نرم‌افزار pfam بیانگر تعلق این پروتئین به خانواده‌ی LFY/FLO می‌باشد.



شکل ۳: ساختار دوم پروتئین FLO. الف: ساختار دوم توسط نرم‌افزار Phyre2 پیش‌بینی شده است که مارپیچ‌ها بیانگر آلفا هلیکس می‌باشد. صفحات بتا با فلش مشخص شده است. ب: نمودار فاکتور B (تحرک گرمائی ذاتی رزیدی‌ها) ساختار دوم پروتئین FLO پیش‌بینی شده توسط نرم‌افزار I-TASSER.

مطالعه فیلوژنتیکی پروتئین FLO

جهت مطالعه‌ی درخت فیلوژنتیکی، گونه‌های گیاهی متعلق به خانواده‌های متفاوت از پایگاه NCBI انتخاب شدند. در بررسی فیلوژنتیکی مشخص شد که اعضای خانواده‌های گیاهی متفاوت، به خوبی تفکیک و گروه‌بندی شدند.

به طوریکه گونه‌های مربوط به هر کدام از خانواده‌های Gesneriaceae، Brassicaceae، Fabaceae، Plantaginaceae، Oleaceae و Poaceae در یک شاخه جای گرفتند. در واقع این نتایج وجود نقاط حفاظت‌شده در توالی پروتئین FLO مربوط به هر خانواده را آشکار می‌کند (شکل ۴). اما اعضای خانواده Phrymaceae نسبت به دیگر خانواده‌ها در دو شاخه متفاوت قرار گرفته‌اند. توالی پروتئین FLO گیاه بنفشه آفریقایی به همراه گیاهان هم‌خانواده به خوبی در میان خانواده Gesneriaceae قرار گرفت. این تقسیم‌بندی شباهت بالای پروتئین FLO را با گیاهان هم‌خانواده نشان می‌دهد.

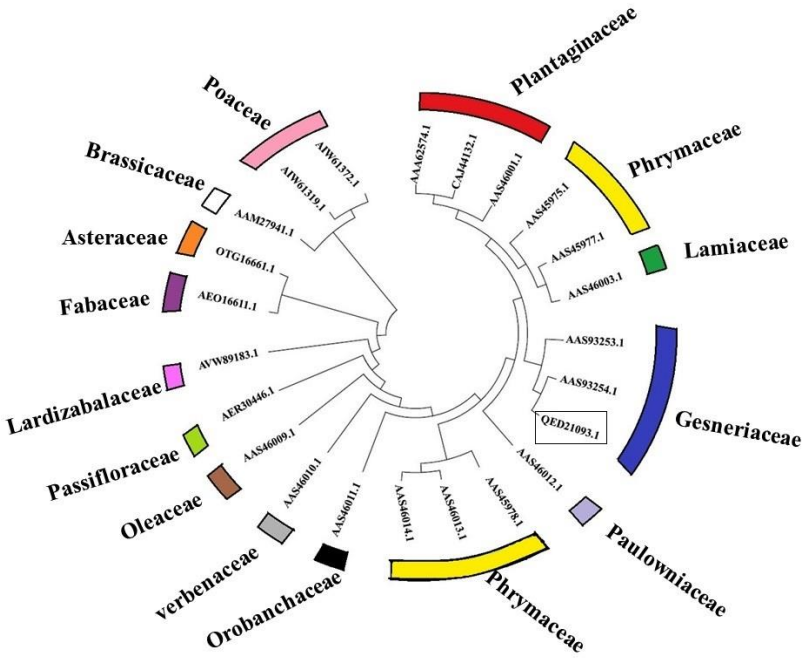
همولوگ پروتئین FLO (LFY) در خانواده‌ی Brassicaceae نیز در درخت فیلوژنی قرار گرفته است. در واقع می‌توان خانواده‌های Lamiaceae و Paolowniaceae متعلق به راسته‌ی Lamiales را از لحاظ فیلوژنی پروتئین FLO، به عنوان نزدیکترین گیاهان به خانواده‌ی Gesneriaceae معرفی نمود (شکل ۴).

بحث

تغییر فاز رویشی به زایشی با کنترل ژن‌هایی از جمله FLO صورت می‌گیرد که با برهمکنش دیگر ژن‌ها، گل‌دهی را تنظیم می‌کنند. فرآیند تعیین سرنوشت مریستم گل و الگوی شکل‌گیری آن توسط ژن FLO و القای ژن‌های همئوتیک مشخص می‌شود [۱۰]. این پژوهش شناسایی ژن FLO و مطالعه *In silico* آن در گیاه بنفشه آفریقایی را مورد بررسی قرار داده است.

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که ناحیه کدکننده ژن FLO (اگزون ۲) در بنفشه آفریقایی با ۳۰۶ نوکلئوتید، ۱۰۲ اسیدآمینه با وزن مولکولی ۱۱۴۴۱ دالتون را کد می‌کند. همترازی توالی پروتئین FLO در گیاهان هم‌خانواده حاکی از شباهت و حفاظت‌شدگی بالای اسیدآمینه‌های این پروتئین می‌باشد. بیشترین میزان شباهت توالی این ژن (با بیش از ۹۸%) با گیاه *Streptocarpus rexi* متعلق به خانواده Gesneriaceae مشاهده می‌شود.

با توجه به مطالعات Wang و همکاران (۲۰۰۴) در گیاه *Titanotrichum* مشخص شد که ژن FLO دارای سه اگزون، ناحیه غنی از پرولین و ناحیه غنی از بازهای A و T در اینترون‌ها می‌باشد. این ژن ۳۹۳ آمینواسید را کد می‌کند که شباهت ۷۷% را با دیگر گیاهان خانواده Gesneriaceae نشان می‌دهد [۱۹]. پروتئین LFY/FLO در گیاه *Castanea*، ۳۸۶ اسیدآمینه را کد می‌کند. این پروتئین حداقل شباهت ۷۸% و حفاظت‌شدگی بالایی را با پروتئین LFY/FLO گیاهان دیگر نشان داد [۱۵]. توالی کد کننده ژن LFY/FLO در گیاه *Daucus carota*، ۳۹۱ آمینواسید را کد می‌کند [۲۰]. نقطه ایزوالکتریک و وزن مولکولی LFY/FLO به ترتیب ۸/۰۸ و ۴۴ KDa گزارش شده است. این پروتئین حداقل شباهت ۶۷% را در گیاه *Daucus carota* نسبت



شکل ۴: درخت فیلوژنتیکی پروتئین FLO در گیاهان مختلف. درخت به روش Neighbor joining و با نرم افزار Mega7. مربع نمایانگر توالی این پروتئین در گیاه بنفشه آفریقایی (خانوادهی Gesneriaceae) میباشد. لیست گیاهان به ترتیب زیر است:

Antirrhinum, *Misopates*, *Chelone*, *Mimulus*, *Diplacus*, *Salvia*, *Corytoplectus*, *Streptocarpus rexii*, *Streptocarpus ionanthus*, *Paulownia*, *Leucocarpus*, *Erythranthe lewisii*, *Erythranthe guttata*, *Pedicularis*, *Verbena*, *Syringa*, *Passiflora*, *Akebia*, *Medicago*, *Helianthus*, *Arabidopsis*, *Himalayacalamus*, *Chimonocalamus*.

به دیگر گیاهان نشان داد [۲۰]. Li و همکاران (۲۰۱۳) گزارش کردند که پروتئین LFY در گیاه *Gossypium* شباهت بالایی با پروتئین FLO نشان داده است. این ژن در گیاه *Gossypium*، ۳ اگزون و دو اینترون دارد [۲۱].

نتایج پژوهش حاضر در گیاه بنفشه آفریقایی مشخص کرد که موتیف RRRK با حفاظتشدگی زیاد در سمت N-ترمینال پروتئین وجود دارد. ساختار دوم پروتئین FLO بنفشه آفریقایی از ۵۳% آلفا هلیکس و ۴% صفحات بتا تشکیل شده است. پروتئین LFY/FLO متعلق به خانواده پروتئینی LFY-FLO میباشد. مکان پروتئین LFY/FLO در هسته مشخص شده است [۲۱]. حفاظتشدگی بالای این پروتئین نشانگر حفظ عملکرد و نقش آن در گیاهان گلدار میباشد [۲۰]. ناحیه C-ترمینال پروتئین FLO شامل موتیف اتصال به DNA و ناحیه N-ترمینال به عنوان ناحیه عملکردی و فعال شناخته شده است (An et al., 2012). پروتئین LFY/FLO در گیاه *Prunus* با وزن مولکولی ۴۵ KDa دارای ناحیه C-ترمینال بسیار حفاظت شده میباشد [۲۲]. جهش در موتیف RRRK موجب اختلال در عملکرد این پروتئین شد [۲۲].

بررسی فیلوژنی توالی پروتئین FLO در گیاه بنفشه آفریقایی مشخص کرد که این گونه گیاهی به همراه گیاهان هم‌خانواده به خوبی در میان خانواده Gesneriaceae گروهبندی شده است. خانوادههای Lamiaceae و Paolowniaceae متعلق به راستهی Lamiales به عنوان نزدیکترین گیاهان به خانوادهی Gesneriaceae قرار گرفتند. مطالعات فیلوژنی Tang و همکاران (۲۰۱۶) نشان داد که پروتئین LFY و FLO هر دو در یک کلاد قرار میگیرند. همچنین مشخص شد که اگزون‌ها در LFY/FLO بسیار حافظتشده هستند [۹]. قرار گرفتن گونه‌های مربوط به هر خانواده در کنار هم، ویژگی‌هاي مشترک این پروتئین را در هر خانوادهی گیاهی مشخص میکند و بیانگر حفاظتشدگی توالی پروتئین FLO در بین گونه‌های مختلف گیاهی است [۹].

فاکتور رونویسی FLO در *Antirrhinum*، حاوی ۳۹۷ اسیدآمینه است که در ناحیهی N-ترمینال غنی از پرولین میباشد. ناحیه شدیدا اسیدی با موقعیت گلوتامیک ۱۹۶ و ۲۱۳ وجود دارد. همچنین یک ناحیه بین آرژنین ۱۱۵ تا ۱۲۶ به صورت

basic-acidic-basic گزارش شده است [۱۳] مطالعات Ahmad و همکاران (۲۰۱۹) تعیین کرد که دمین اسیدی در ناحیه N-ترمینال پروتئین وجود دارد. ناحیه اسیدی در توالی پروتئین FLO شامل اسیدآمینه‌های آسپارتات و گلوتامات می‌باشد [۲۲]. در توالی میانی پروتئین، ناحیه غنی از آرژنین و لیزین گزارش شده است که از ویژگی‌های فاکتورهای رونویسی به شمار می‌رود [۱۰]. مطالعات Liu و همکاران (۲۰۱۱) مشخص کرد که ۴ دمین در توالی پروتئین LFY/FLO وجود دارد که ۲ دمین بسیار حفاظت‌شده هستند (HTH و MADS) و عملکرد پروتئین LFY/FLO به این دمین‌ها وابسته می‌باشد. منطقه غنی از پرولین یا آلانین در ناحیه N-ترمینال پروتئین FLO گزارش شده است که ممکن است این دمین‌ها در شرایط محیطی تحول یابند [۲۳]. حضور نواحی اتصال دمین MADS در توالی LFY/FLO نشان داد که فاکتور رونویسی SOC1 می‌تواند به پروتئین LFY متصل شود و بر بیان آن اثر گذارد (Li et al., 2013). پروتئین LFY/FLO توانایی اتصال به DNA دارد که به لطف موتیف HTH امکان پذیر است. در ناحیه‌ی C-ترمینال بین آمینواسید گلوتامیک ۲۸۰ و آرژنین ۴۳۶ ناحیه شدیدا حفاظت شده وجود دارد [۲۳].

نتیجه‌گیری

در این پژوهش توالی ژن FLO (اگزون ۲) در بنفشه آفریقایی به کمک پرایمرهای گونه‌های خویشاوند با ۳۰۶ جفت‌باز شناسایی گردید. همچنین نتایج مشخص کرد که بخشی از ناحیه کدکننده ژن FLO در بنفشه آفریقایی، ۱۰۲ اسیدآمینه با وزن مولکولی ۱۱۴۴۱ دالتون را کد می‌کند. همترازی توالی در گیاهان هم‌خانواده حاکی از شباهت و حفاظت‌شدگی بالای اسیدآمینه‌های این پروتئین می‌باشد. در بررسی فیلوژنتیکی مشخص شد گونه‌های مربوط به یک خانواده به خوبی تفکیک شده‌اند. پیش‌بینی ساختار پروتئین، وجود آلفا هلیکس و پیچش‌های تصادفی را در پروتئین FLO گیاه بنفشه آفریقایی نشان می‌دهد. شناسایی ژن FLO در این گیاه می‌تواند به درک بهتر عملکرد این ژن در فرآیند تغییر فاز زایشی و به دنبال آن کنترل عملکرد اینپروتئین کمک کند. در انتها بررسی موتانت ژن FLO در مراحل تکوینی گل پیشنهاد می‌گردد.

منابع

[1] Ghalecahi B, Aslanpour M, Shoor M, Sharifi A, Kharazi M. Effect of light variables treatments on growth and flowering of saintpaulia (*Saintpaulia ionantha*). ITJEMAST, 2018; 9(6): 597-609.

[2] Mercuri A, De Benedetti L, Burchi G. Agrobacterium-mediated transformation of African violet. PCTOC, 2000; 60: 39.

[3] Lowenstein DM, Matteson KC, Minor ES. Evaluating the dependence of urban pollinators on ornamental, non-native, and 'weedy' floral resources. Urban Ecosystem, 2019; 22(2): 293-302,.

[4] Weber A, Clark JL, Moller M. A new formal classification of Gesneriaceae. Selbyana, 2013; 31(2): 68-94.

[5] Haston E, De Craene LPR. Inflorescence and floral development in Streptocarpus and Saintpaulia (Gesneriaceae) with particular reference to the impact of bracteole suppression. Plant Sys Evol, 2007; 265: 13–25.

[6] Teixeira da Silva J.A, Dewir Y, Wicaksono A, Kher M, Kim H, Hosokawa M, Zeng S. Morphogenesis and developmental biology of African Violet (*Saintpaulia ionantha* H. WENDL.). J Plant Dev, 23: 15-25, 2016.

[7] Roberts W.R, Roalson E.H. Comparative transcriptome analyses of flower development in four species of Achimenes (Gesneriaceae). BMC Genomics, 2017; 18:1-26.

[8] Yang S.J, Ohno Sh, Deguchi A, Sato M, Goto M, Doi M. The histological study in sympetalous corolla development of pinwheel-type flowers of *Saintpaulia*. Scientiae Horticulturae. 2017; 223: 10-18.

[9] Tang M, Tao YB, Fu Q, Song Y, Niu L, Xu ZF. An ortholog of LEAFY in Jatropha curcas regulates flowering time and floral organ development. Science Reports, 2016; 6:37306.

[10] Ahmad S, Li Y, Yang Y, Zhou Y, Zhao K, Zhang Q. Plant Cell Tiss Organ Cult, 2019; 136: 523.

[11] Moyroud E, Minguet E.G, Ott F, Yant L, Posé D, Monniaux M, Blanchet S, Bastien O, Thévenon E, Weigel D, Schmid M, Parcy F. Prediction of regulatory interactions from genome sequences using

a biophysical model for the Arabidopsis LEAFY transcription factor. Plant Cell, 2011; 23: 1293–1306.

[12] Winter CM, Austin R.S, Blanvillain-Baufume S, Reback MA, Monniaux, M, Wu MF. LEAFY target genes reveal floral regulatory logic cis motifs, and a link to biotic stimulus response. Development Cell, 2011; 20: 430–443.

[13] Coen E, Romero J, Doyle S, Elliott R, murphy G, Carpenter R. Floricaula: A Homeotic Gene Required for Flower Development in *Antirrhinum majus*. Cell, 1990; 63:1311-1322.

[14] McKim S, Hay A. Patterning and evolution of floral structures – marking time. Curr. Opin. Genet. Dev. 2010; 20: 448-453.

[15] Liu B, Wang L, Wang Sh, Li W, Liu D, Guo X, Qu B. Transcriptomic analysis of bagging-treated 'Pingguo' pear shows that MYB4-like1, MYB4-like2, MYB1R1 and WDR involved in anthocyanin biosynthesis are up-regulated in fruit peels in response to light. Scietia Horticulturae. 2019; 244: 428-434.

[16] Kalpana K, Manjuvani S, Shoba K. 2018. *In Silico* Comparative Modeling of Maturase K Protein in *Cymbopogon martinii* Plant. 2018; J Bioinformatics, 5(3): 30-36.

[17] Faghani E, Kolahi M, Kazemian M, Goldson-Barnaby A, Razzaghi MH. Effect of irrigation regimes on starch biosynthesis pathway, cotton (Gossypium hirsutum) yield and in silico analysis of ADP-glucose-pyrophosphorylase. Int. J. Environ. Sci. Technol, 2022; 19: 10809–10830.

[18] Kazemian M, Mohajel Kazemi E, Kolahi M, Ghasemi Omran V. Floral ontogeny and molecular evaluation of anthocyanin biosynthesis pathway in pinwheel phenotype of *Saintpaulia inontha* Wendl. periclinal chimera. Scientia Horticulturae, 2020; 263: 109142.

[19] Wang CN, Möller M, Cronk QC. Altered expression of GFLO, the Gesneriaceae homologue of FLORICAULA/LEAFY, is associated with the transition to bulbil formation in *Titanotrichum oldhamii*. Dev Genes Evolution, 214(3):122-7, 2004.

[20] Zhang Ch, Zhang H, Zhan Z, Liang Y. Molecular cloning, expression analysis and subcellular localization of LEAFY in carrot (*Daucus carota* L.). Mol. Breed, 2016;36:1-9.

[21] Li J, Fan SL, Song MZ, Pang CY, Wei HL, Li W, Ma JH, Wei JH, Jing JG, Yu SX. Cloning and characterization of a FLO/LFY ortholog in *Gossypium hirsutum* L. Plant Cell Rep., 2013; 32(11):1675-86.

[22] An L, Lei H, Shen X, Li T. Plant Mol. Biol Report, 2012; 30:1488.

[23] Jang S. Functional Characterization of PhapLEAFY, a FLORICAULA/ LEAFY Ortholog in Phalaenopsis aphrodite. Plant Cell Physiology, 2016; 56(11): 2234-2247.

Journal of Developmental Biology
Vol. 15, No.4, Autumn 2023

FLORICAULA (FLO) insilico analysis in Saintpaulia ionantha H. Wendl

Kazemian M.[1*], Mohajel Kazemi E.[1], Kolahi M.[2], Ghasemi V.[3]

[1] Department of Plant Biology, Faculty of Natural Sciences, University of Tabriz, Tabriz, Iran.
[2] Department of Biology, Faculty of Sciences, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
[3] Genetics and Agricultural Biotechnology Institute of Tabarestan, Sari, Iran.

* (Corresponding author): mina.kazemian69@gmail.com

DOI: 10.30495/jdb.2023.1972705.1339 https:// dorl.net/dor/20.1001.1.2008692.1402.15.4.4.8

Received: October 2022 Accepted: December.2023

Abstract

The transition from vegetative to reproductive stage in Saintpaulia ionantha H.Wendl is controlled by factors such as FLORICAULA (FLO). The process of determining the fate of the flower meristem and its formation pattern is determined by the FLO and the induction of homeotic regulators. In this research, FLO sequencing, protein characteristics, secondary structure, intracellular position and phylogenetic tree have been evaluated by bioinformatics tools for the first time in African violet. The results showed that the intracellular location of this protein is predicted in the nucleus. This protein (FLO) belongs to the FLO/LFY family. The secondary structure of the protein consists of 53% alpha helix and 4% beta sheets. Examining the phylogeny tree, species related to one family were placed in one branch. Also, protein sequence alignment has shown that the sequence is highly conserved in plants of the same family. Identifying the characteristics of FLO protein can be important as the main factor in planning the function of the tissue and then controlling the function of this protein.

Keywords: Sequencing, FLO family, beta sheets, phylogeny.