ژنتیک نوین
دوره یازدهم، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۵
صفحه ٤٥٧ - ٤٤٩

شناسایی ژن‌های *frigida* و *vernalization insensitive3* مربوط به مسیر بهاره سازی گلدهی در گیاه چغندرقند

Identification of *frigida* and *vernalization insensitive3* genes related to vernalization pathway of flowering in sugar beet

مریم علیمیرزایی [۱]، اصغر میرزایی اصل*[۱]، محمدرضا عبداللهی[۲]، حسن ابراهیمی کولایی[۳]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، استادیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا همدان
۲- دانشیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا همدان
۳- مربی، بخش تحقیقات اصلاح و تهیه بذر چغندرقند، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان همدان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، همدان، ایران

Alimirzaee M[1], Mirzaie asl A[*1], Abdollahi MR[2], Ebrahimi Koulaei H[3]

1- MSc Student, Assistant Professor, Department of Biotechnology, Faculty of Agriculture, Hamedan Bu-Ali Sina University
2- Associate Professor, Department of Agronomy and Plant breeding, Faculty of Agriculture, Hamedan Bu-Ali Sina University
3- Instructor, Sugar Beet Seed Department, Hamedan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Hamedan, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: a.mirzaie@basu.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹٤/۲/۲٦ - تاریخ پذیرش: ۹٥/٦/۲۸)

چکیده

در مزارع تولید ریشه چغندرقند، ساقه‌دهی در سال اول باعث نقصان محصول ریشه و در نهایت کاهش عملکرد شکر می‌شود که این پدیده بولتینگ نامیده می‌شود. شناخت کنترل ژنتیکی گلدهی در چغندرقند می‌تواند در تولید ارقام مقاوم به بولتینگ راه‌گشا باشد. مکانیسم ملکولی کنترل گلدهی در گیاهان مشابه است. در این تحقیق توالی نوکلئوتیدی چغندرقند موجود در پایگاه داده Genbank که با توالی‌های پروتئین‌های FRIGIDA و VERNALIZATION INSENSITIVE 3 گیاه آرابیدوپسیس مشابه بودند با استفاده از نرم‌افزار tblastn جستجو شد. از دو توالی مشابه شناسایی شده آغازگرهایی طراحی و در واکنش PCR استفاده شد. از گیاهان کشت شده در مزرعه قبل از شروع سرما نمونه‌های برگی تهیه و استخراج RNA انجام شد. سپس cDNA حاصل به‌عنوان الگو در واکنش PCR استفاده شد. با انجام توالی یابی ۱۰۰۰ جفت‌باز از توالی رونوشت ژن *FRI* و ۸۹٦ جفت‌باز از توالی رونوشت ژن *VIN3* تعیین و در پایگاه داده Genbank ثبت شد. نتایج نشان داد که پروتئین FRI با افزایش سطح بیان ژن *FLC* باعث تأخیر در گلدهی می‌شود. پروتئین VIN3 دارای دومین PHD finger است که با متیلاسیون هیستون سه ژن *FLC* در طی سرما سبب سرکوب بیان *FLC* می‌شود.

واژه‌های کلیدی

بهاره‌سازی
بولتینگ
چغندرقند
ژن‌های گلدهی

مقدمه

چغندرقند (*Beta vulgaris ssp . vulgaris*) گیاهی دولپه‌ای، علفی و عضوی از خانواده Amaranthaceae است و دارای گونه‌های یکساله، دوساله و چندساله می‌باشد. چغندرقند زراعی دوساله بوده، در سال اول رشد رویشی داشته و برگ‌های روزتی همراه با ریشه‌ی ذخیره‌ای حاوی مواد غذایی (مقدار قند در محدوده ۱۵ و ۱۸ درصد) برای رشد در سال دوم را تولید می‌کند (Boudry et al. 2002). بعد از زمستان، چغندرقند شروع به ساقه‌دهی (بولتینگ[1]) کرده و در شرایط روزبلند به گل می‌رود. بنابراین، به مدت ۱۴-۱۰ هفته به دمایی در حدود چهار درجه سانتی‌گراد برای شروع بولتینگ و ورود به مرحله زایشی نیاز دارد (Boudry et al. 2002). سرمای نابه‌هنگام موجب القای بولتینگ زود هنگام در برخی ارقام می‌شود که نیاز سرمایی کم‌تری به بهاره‌سازی دارند. ریشه‌ی گیاهان به ساقه رفته، خشبی شده و مقدار ساکارز در آن‌ها کاهش می‌یابد (Abou-Elwafa et al. 2010). کنترل بولتینگ ممکن است با تغییرات ژنتیکی حاصل شود که توانایی ساقه‌دهی و گلدهی برای تولید بذر را هم فراهم نماید.

گونه‌های یکساله زمستانه آرابیدوپسیس نیز همانند چغندرقند، نیاز به بهاره‌سازی برای گلدهی دارند. مطالعات گسترده بر روی انتقال به گلدهی در گونه مدل آرابیدوپسیس (*Arabidopsis thaliana*) نشان می‌دهد که گلدهی از طریق کامل شدن نتایج حاصل از ژن-های چهار مسیر تنظیمی گلدهی شامل تناوب نوری، بهاره‌سازی، جیبرلین و مسیر خود انگیزی القا می‌شود (Kim et al. 2008؛ Adrian al. 2009؛ Gregis et al. 2009؛ Jung and Muller et al. 2009). در آرابیدوپسیس ژن *FLC*[2] به‌عنوان مانع اصلی گلدهی در این گیاه به شمار می‌رود. ژن *FLC*، عضوی از خانواده‌ی MADS-box می‌باشد که عمدتاً مسئول نیاز بهاره‌سازی در آرابیدوپسیس محسوب می‌شود (Michaels and Amasino 1999, 2001). پروتئین FLC از طریق پیوند با توالی تنظیم کننده سیس در ژن-های گلدهی *FT*[3] و *SOC1*[4] گلدهی را سرکوب می‌کند (Helliwell et al. 2006؛ Searle et al. 2006). قبل از اعمال سرمای طولانی، کروماتین FLC در حالت فعال است که به موجب آن هیستون‌های مشخص لیزین۴ هیستون۳[5] و لیزین۳۶ هیستون۳[6] فعال و استیلاسیون هیستون۳ انجام می‌شود (He et al. 2003; Kim et al. 2005; Zhao et al. 2005). بر اساس مطالعات ژنتیکی بر روی تنوع در نیاز بهاره سازی در آرابیدوپسیس اثبات شده است که این نیاز علاوه بر فعالیت ژن غالب *FLC* ناشی از ژن غالب *frigida* نیز می‌باشد. ژن *FRI* رمزکننده یک پروتئین حاوی دو دمین مارپیچ کویل (به ترتیب، بین اسیدهای آمینه ۱۰۰-۵۵ و ۴۵۰-۴۰۵) است که سبب افزایش بیان *FLC* در آرابیدوپسیس یکساله زمستانه می‌شود (Johanson et al. 2000؛ Ding et al. 2013). در غیاب آلل فعالی از *FRI* سطح بیان *FLC* کاهش یافته و گیاهان نیازی به بهاره‌سازی برای تسریع در گلدهی ندارند. مجموعه‌ای از ژن‌ها که توسط *FRI* موجب فعال شدن *FLC* می-شوند، اغلب در مسیر ویژه *FRI* عمل می‌کنند. این ژن‌ها شامل *FRL1*[7], *FRL2*[8], *SUF4*[9], *FLX*[10], *FLL4*[11] و *FES1*[12] می‌باشند (Michaels and Amasino 2004; Schmitz et al. 2005; Kim et al. 2006; Andersson et al. 2008; Ding et al. 2013; Lee and Amasino 2013). به‌نظر می‌رسد که این ژن‌ها برای عملکرد *FRI* لازم هستند. آنالیزهای ژنتیکی در هر دو آلل غالب و مغلوب از *FRI*، *FRL1* و *FES1* نشان می‌دهد که این ژن‌ها در یک مسیر خطی برای القای بیان *FLC* عمل نمی‌کنند، بلکه موازی با هم فعالیت کرده که شاید در یک مجموعه‌ی پروتئینی قرار داشته باشند (Schmitz et al. 2005). Choi et al. (2011) ساختاری را برای اشکال پروتئینی مجموعه فعال‌کننده رونویسی *FRI* (FRI-C) پیش‌بینی کردند که در این ساختار *FRI* به‌عنوان چارچوبی برای برهمکنش با سایر پروتئین‌های تنظیم‌کنندگان ویژه *FLC* عمل می‌کند. هر کدام از این مجموعه دارای نقش متمایزی بوده به نحوی که پروتئین FLX وFES1 پروتئین انگشت روی هستند و عامل فعال‌کننده رونویسی می‌باشند. پروتئین SUF4 در این

[1] Bolting
[2] FLOWERING LOCUS C
[3] FLOWERING LOCUS T
[4] SIPPERESSOR OF CONSTANS 1

[5] histone H3 Lys 4
[6] histone H3 Lys 36
[7] FRI-LIKE1
[8] FRI-LIKE2
[9] SUPRESSOR OF FRIGIDA 4
[10] FLC EXPRESSOR
[11] FLOWERING LOCUS C EXPRESSOR-LIKE 4
[12] FRIGIDA ESSENTIAL1

مجموعه دارای دمین لوسین زیپر است و از طریق توالی ۱۵ جفت بازی (-CCAAATTTTAAGTTT-) به ناحیه پروموتور *FLC* متصل می‌شود (Choi et al. 2011). جهش در این ژن‌ها عموماً گلدهی زود هنگام را حتی در حضور آلل فعال *FRI* در پی دارد، بنابراین این ژن‌ها برای عملکرد *FRI* لازم هستند (Kim and Sung 2014).

در آرابیدوپسیس اعمال دوره طولانی دمای پایین سرکوب اپی-ژنتیک *FLC* را در پی دارد که این سرکوب توسط بهاره‌سازی با تغییرات هیستونی این ژن همراه است. از جمله ژن‌های درگیر در تغییرات هیستونی ژن *VIN3*[1] و *VRN2*[2] می‌باشد. پروتئین VIN3، یک پروتئین حاوی موتیف PHD[3] است (Sung et al. 2006؛ Greb et al. 2007). موتیف‌های PHD عمدتاً در محدوده‌ای از پروتئین‌هایی می‌باشند که در تغییرات کروماتین و تشخیص برخی تغییرات هیستون‌ها درگیرند (Mellor 2006). سطح mRNAی VIN3 به‌طور مستقیم با پاسخ بهاره‌سازی در ارتباط است (Sung and Amasino 2004). بیان *VIN3* فقط زمانی صورت می‌گیرد که گیاه تحت دوره طولانی از دمای پایین نگهداری شود. زمانی که گیاه به رشد در دمای گرم باز می‌گردد، رونویسی از *VIN3* به سرعت کاهش می‌یابد (Sung and Amasino 2004; Kim and Sung 2014). بنابراین VIN3 یک ترکیب ویژه سرما در مسیر بهاره‌سازی در آرابیدوپسیس محسوب می‌شود (Kim and Sung 2014). پروتئین VIN3 برای متیلاسیون هر دو لیزین ۹ هیستون ۳ و لیزین ۲۷ هیستون ۳ (هر دو حالت مشخصه‌ی کروماتین غیرفعال می‌باشند) درکروماتین FLC لازم بوده که از طریق موتیف PHD به پپتیدهای لیزین ۹ هیستون ۳ متصل شده و نهایتاً منجر به سرکوب آن می‌شود (Bastow et al. 2004; Sung and Amasino 2004; Kim and Sung 2014). همولوگ ژن *FLC* آرابیدوپسیس که با عنوان ژن *BvFL1*[4] در چغندرقند شناسایی شده‌است (Reeves et al. 2007) در طی اعمال طولانی سرما تحت شرایط نور به‌تدریج بیانش کاهش می‌یابد. بیان ترکیبی از *BvFL1* در آرابیدوپسیس تراریخت که در اثر جهش دارای ژن مغلوب *flc* است، گلدهی را به‌طور معنی‌دار به تاخیر می‌اندازد (Reeves et al. 2007)، بنابراین حفاظت تکاملی از نظر عملکرد بین آرابیدوپسیس و چغندر مشاهده می‌شود. شناسایی ژن‌های کنترل‌کننده گلدهی در چغندرقند می‌تواند در شناخت و کنترل مولکولی پدیده بولتینگ کمک کند. در این تحقیق توالی دو ژن مهم گلدهی در چغندرقند بر اساس مشابهت با توالی گیاه مدل آرابیدوپسیس شناسایی شده‌است.

مواد و روش‌ها

بذر گیاه چغندرقند در مرداد سال ۱۳۹۲ در مزرعه مرکز تحقیقات کشاورزی همدان کشت شد و در معرض سرمای طبیعی قرار گرفت. نمونه‌برداری اول در اوایل پاییز قبل از سرما در مرحله چهار برگی انجام شد. نمونه‌برداری دوم در اوایل زمستان چهار ماه بعد از کشت صورت گرفت.

جهت شناسایی ژن‌های *FRI* و *VIN3*، استخراج RNA از نمونه-های جمع‌آوری شده با استفاده از محلول RNX-plus صورت گرفت. کمیت RNA بر اساس جذب نوری با دستگاه اسپکتروفوتومتر و کیفیت آن با مشاهده نوارهای مربوطه در ژل الکتروفورز بررسی شد. اولین رشته cDNA با استفاده از کیت AccuPower RocketScript RT PreMix شرکت بایونیر[5] و آغازگر Oligo dT از روی RNA استخراج شده، ساخته شد.

توالی‌های نوکلئوتیدی چغندرقند موجود در پایگاه داده Genbank با توالی‌های پروتئین‌های FRIGIDA و VERNALIZATION INSENSITIVE 3 گیاه آرابیدوپسیس با نرم‌افزار tblastn مورد جستجو قرار گرفت. دو توالی با شباهت معنی دار شناسایی شد. برای ژن *FRI* از نواحی شناسایی شده توالی DNA چغندرقند به شماره AYZW01032897 دو آغازگر FR2F با توالی TACTCAGTCCGTTGGTGTGC و FR2R با توالی ACGTTTTGCCAGAGTGTCCA طراحی شد و در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز بر روی cDNA نمونه گیاهان قبل از سرما استفاده شد. برای ژن *VIN3* از نواحی شناسایی شده توالی DNA به شماره AYZW01053336 دو آغازگر V3F با توالی CGGTGCTGCAGAAATGCTAC و V3R با توالی

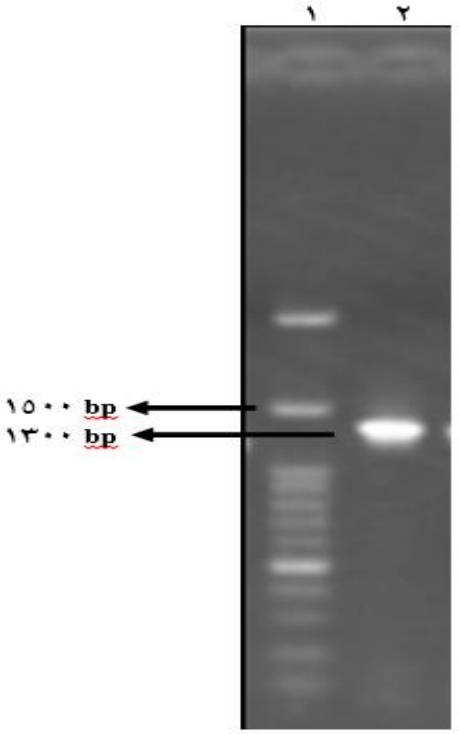
[1] VERNALIZATION INSENSITIVE 3
[2] VERNALIZATION 2
[3] plant homeodomain
[4] *B. vulgaris* FLC-LIKE 1
[5] Bioneer

CTGCTCTGAGAGGGATGCTG طراحی و در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز بر روی cDNA نمونه گیاهان سرمادهی شده استفاده شد. واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتری تهیه شد که بافرPCR با غلظت ۱X، dNTPmix با غلظت ۰/۲ میلی‌مولار، $MgCl_2$ با غلظت ۱/۵ میلی‌مولار، آغازگرهای پیشرو و پسرو هر کدام با غلظت ۰/۰۱ نانومول، cDNA الگو با غلظت ۲۰ نانوگرم و آنزیم Taq به مقدار دو واحد در این واکنش استفاده شد. در دستگاه ترموسایکلر دمای ۹٤ درجه سانتی‌گراد به مدت سه دقیقه برای واسرشته‌سازی اولیه و هم‌چنین ۳۵ چرخه شامل دمای ۹٤ درجه سانتی‌گراد واسرشته‌سازی ثانویه، دمای ٥٦ درجه سانتی‌گراد دمای اتصال آغازگرها و ۷۲ درجه سانتی‌گراد جهت گسترش توالی و در نهایت دمای ۷۲ درجه برای گسترش نهایی اعمال شد. محصول PCR توسط الکتروفورز روی ژل یک درصد آگارز بررسی شد. قطعات تکثیری توسط آغازگرها برای تعیین توالی به روش مستقیم به شرکت بایونیر کره ارسال شد.

نتایج و بحث

شناسایی ژن *FRI*

از توالی ژنومی چغندرقند مشابه با توالی ژن *FRI* در آرابیدوپسیس، آغازگرهایی طراحی شده و بر روی cDNA نمونه-ی قبل از سرما آزمون PCR صورت گرفت. طول ناحیه‌ی حاصل از تکثیر برای *FRI* در محدوده مورد انتظار حدود ۱۳۰۰ جفت باز بود (شکل ۱). قطعه تکثیر شده توسط آغازگر پیشرو مورد توالی-یابی قرار گرفت و توالی بدست آمده در بانک داده‌های توالی با سایر گیاهان با استفاده از نرم‌افزار blastx در پایگاه Reference protein مورد جستجو قرار گرفت. نتایج نشان داد میزان شباهت این توالی با پروتئین شبه FRIGIDA گیاه مدل آرابیدوپسیس تالیانا، ٦۲ درصد با ارزش E برابر ۲e-۱۲٦ می‌باشد (شکل۲). ترجمه پروتئینی قطعه‌ی توالی‌یابی شده در پایگاه داده ExPACy (Translate) صورت گرفت. این پروتئین دارای دمین Frigida superfamily با ارزش E برابر با ۳/۵۸e-٦٦ است. خانواده شبه frigida ترکیبی از پروتئین‌های گیاهی است که مشابه پروتئین FRIGIDA می‌باشد، که در آرابیدوپسیس بیان می‌شود. این پروتئین احتمالاً هسته‌ای بوده و برای تنظیم زمان گلدهی در فنوتیپ‌های دیر گل‌دهنده ضروری می‌باشد (Chao et al. 2013). قطعه توالی‌یابی شده در پایگاه داده Reference protein (RefSeq) مربوط به پایگاه NCBI مورد بررسی قرار گرفت و میزان شباهت آن با ژن‌های سایر گیاهان مشخص شد (جدول ۱). نتایج نشان داد که بیش‌ترین شباهت با ژن شبه *frigida* در گیاهان مختلف است. ژن شبه *FRI* در آرابیدوپسیس پروتئینی با ۵۵۸ اسیدآمینه را رمز می‌کند و دارای دمین Frigida superfamily می‌باشد. در این تحقیق امکان شناسایی ۱۰۰۰ جفت‌باز از توالی ژن *frigida* در چغندرقند فراهم شد که این قطعه پروتئینی با ۳۳۳ اسیدآمینه را رمز می‌کند. در نهایت قطعه مورد نظر به‌عنوان ژن شبه Frigida در ژنوتیپ جیادای چغندرقند با شماره دسترسی KJ755196.1 و پروتئین آن با شماره دسترسی AIG88464.1 در پایگاه NCBI ثبت شد. رخداد جهش‌های طبیعی در *FRI* باعث گلدهی زود هنگام، بدون اعمال بهاره‌سازی در بسیاری از گیاهان آرابیدوپسیس می‌شود.



شکل ۱- الگوی الکتروفورزی رونوشت ژن شبه *frigida* ۱- Ladder. ۲- نوار محصول PCR ژن شبه *frigida* چغندرقند

FRIGIDA-like protein [Arabidopsis thaliana]
Sequence ID: ref|NP_850923.1| Length: 558 Number of Matches: 1
See 5 more title(s)

Range 1: 22 to 350 GenPept Graphics Next Match Previous Match

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
389 bits(999)	2e-126	Compositional matrix adjust.	208/334(62%)	255/334(76%)	6/334(1%)	+3

```
Query  27    QKAFAELESHRAVSLNLKWKELEAHFHGLEKSLKRRFHELEDQEKEYESKTVEAQEMIEK  206
             QKAFAELES RAV+LNLKWKELE HFHGLE+SLKRRFHELEDQEKEYE+KT +AQE++EK
Sbjct  22    QKAFAELESQRAVTLNLKWKELEEHFHGLERSLKRRFHELEDQEKEYETKTRKAQELLEK  81

Query  207   RKTAVVAKEQASLEKLQEKRDAAVFAIAIAREKHRRVSCEEYSVDNSESQSGTMEETPTN  386
             +K AV AKE+A+LE+LQ+KRDAA+F I  A +K+      + SV     Q+  +E++
Sbjct  82    KKAAVEAKEKAALERLQKKRDAAMFTINSALDKYNNAPVSKPSVGERWPQNA-VEDSSNV  140

Query  387   SMISEITSDYTSGTVEDGSSEVQ-SADNGNGEVASYPELVKLCEEMDAEGLHNFISDNRK  563
                 IT D   G V+D    VQ S   GN EV +YP+L+KLC +MD+ GLH F+SDNRK
Sbjct  141   FAADSITDDNPDGIVQD----VQISPVMGNYEVKAYPQLLKLCGDMDSTGLHKFVSDNRK  196

Query  564   NLASMKEEIPQALNAAADPACLVLDSLKNFYRGDMTNLDAKKDSSLLGLRRTCIMLMECL  743
             NLAS+KEEIP A  AAA+PA LVLDSL+ FY  +    D KKD++LLG+RRTCIMLMECL
Sbjct  197   NLASLKEEIPMAFRAAANPASLVLDSLEGFYPMEAPTADGKKDANLLGMRRTCIMLMECL  256

Query  744   SILFMGLDAASVSEIISADVKARAKTIAEAWKPKLNGLDMEAGSGNSLEAHAFLQLLATF  923
             SIL  GLD   ++ ++S +VK RAKTIAE W P L  LDM+A +GNSLEAHAFLQLLATF
Sbjct  257   SILLSGLDRNCLAVVLSQNVKHRAKTIAEGWNPLLESLDMDACNGNSLEAHAFLQLLATF  316

Query  924   SIASDFNTEELTKLVPLVSRRRQAADLCRSLGLS  1025
             +I +DF  +EL KL+P+VSRRRQAA+LCRSLGL+
Sbjct  317   AIVADFKEDELLKLIPMVSRRRQAAELCRSLGLA  350
```

شکل ۲- نتیجه tblastn قطعه توالی‌یابی شده با پروتئین شبه FRIGIDA آرابیدوپسیس تالیانا

جدول ۱- میزان شباهت توالی شناسایی شده در چغندرقند با ژن‌های شبه *frigida* در آرابیدوپسیس و سایر گیاهان

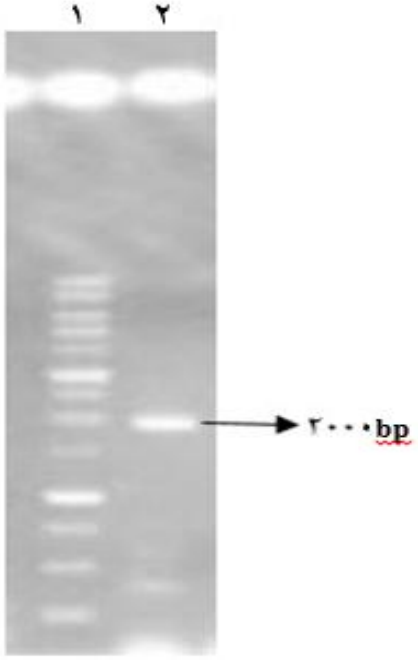
ارزش E	درصد هم‌پوشانی	درصد شباهت	مشخصات توالی	شماره دسترسی
۲e-۱۲۶	٪۸۲	٪۶۲	پروتئین شبه FRIGIDA آرابیدوپسیس تالیانا	NP_850923.1
صفر	٪۹۹	٪۶۹	پروتئین شبه FRIGIDA ایزوفرم ۱ در درخت کاکائو	XP_007049532.1
صفر	٪۹۹	٪۶۸	پروتئین شبه ۳ FRIGIDA در انگور	XP_003634846.1
صفر	٪۹۹	٪۶۷	پروتئین شبه۳ FRIGIDA در گوجه سبز	XP_008235869.1

در غیاب آلل فعالی از *FRI* سطح بیان *FLC* کاهش‌یافته و گیاهان نیازی به بهاره‌سازی برای تسریع در گلدهی ندارند (Johanson et al. 2000; Strong et al. 2011). دو پروتئین شبه frigida، در گیاه کلم (Brassica oleracea) به‌عنوان تنظیم کننده گلدهی شناسایی شده‌اند (Irwin et al. 2012). در تحقیقی ژن شبه *FRI* از گیاه شاه نمکی (Thellungiella halophila) جداسازی و به گیاه آرابیدوپسیس دارای ژن مغلوب *fri* منتقل شد، بیان ThFRI باعث تاخیر در گلدهی آرابیدوپسیس شد که نشان‌دهنده عملکرد مشابه FRI در هر دو گیاه است (Fang et al. 2008). همچنین بیان MsFRI-L[1] در آرابیدوپسیس تراریخت باعث تأخیر در گلدهی حتی در شرایط روز بلند می‌شود (Chao et al. 2013).

شناسایی ژن *VIN3*

از توالی DNA چغندرقند که شباهت معنی‌داری با توالی ژن *VIN3* در گیاه آرابیدوپسیس داشت، آغازگرهای پیشرو و پسرو طراحی شد. بر روی cDNA نمونه‌ی در معرض سرما آزمون PCR صورت گرفت (شکل ۳). نوار به دست آمده در محدوده قابل انتظارحدود ۲۰۰۰ جفت‌باز بود و با آغازگر پیشرو توالی‌یابی شد.

[1] Medicaco sativa FRIGIDA-LIKE



شکل ۳- الگوی الکتروفورزی رونوشت ژن شبه *VIN3*. ۱- Ladder. ۲- نوار محصول PCR ژن شبه *VIN3*

vernalization5/VIN3-like protein [Arabidopsis thaliana]

Sequence ID: ref|NP_849471.1| Length: 685 Number of Matches: 1

See 3 more title(s)

Range 1: 33 to 415 GenPept Graphics Next Match Previous Match

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
304 bits(778)	4e-92	Compositional matrix adjust.	188/401(47%)	252/401(62%)	41/401(10%)	+3

```
Query  21    FAILCSEMGKERKYTGLTKLKIIEHLLKVVSEKILVDHDNGVHEQQSSPSMAQKVPKKPR  200
               ILC+EMGKERKYTGLTK+KIIE LLK+VSEK   + +    +    P   Q+  K+ R
Sbjct  33    LQILCAEMGKERKYTGLTKVKIIETLLKIVSEKNSGECEGKKRDSDCLP--IQRNTKRQR  90

Query  201   KPDNPSRFLVSATN-------TSACNSDNDFDSST--YCKNSACKARMSKEDVFCKRCTC  353
             K DNPSR+++ ATN       + +C+S N    ST  YCKN AC+A + +ED FC+RC+C
Sbjct  91    KVDNPSRYVIPATNIVTSNNASGSCSSVNTKGESTTIYCKNLACRAVLRQEDSFCRRCSC  150

Query  354   CICHKYDDNKDPSLWLTCCSEPPFLGDSCNMSCHLECAIKHDRSGIARNGLVSQLDGS-F  530
             CIC KYDDNKDPSLWLTC S+PPF G+SC  SCHLECA   ++SG+ ++    Q +G  F
Sbjct  151   CICRKYDDNKDPSLWLTCSSDPPFEGESCGFSCHLECAFNTEKSGLGKD---KQSEGCCF  207

Query  531   YCISCGKMNDLMSCWRKQLIIAKETRRVDILCYRISLSQKLLAGTKKYQKPSDVVDDAIK  710
             YC+SCGK N L+ CW+KQL IAKETRRV++LCYR+ L QKLL  + KY+   +VVD+A+K
Sbjct  208   YCVSCGKANSLLECWKKQLTIAKETRRVEVLCYRLFLVQKLLKSSTKYRNLCEVVDEAVK  267

Query  711   LLEGEVGTLTGVPVKMGRGIVNRLSSGQEVQRLCGFCCGvv*vnvssnAIAPRANNISPA  890
              LE +VG LTG+P+KMGRGIVNRL SG +VQ+LC           S   IA    +++ A
Sbjct  268   TLEADVGPLTGLPMKMGRGIVNRLHSGPDVQKLCS------SALESLETIATTPPDVA-A  320

Query  891   LAIPRT--------ITSSINQSWKPLMQHSITVILGS**F-----LIRKRMWVTSLVPSQ  1031
             L  PR+         T S    ++ +   S+TV+L S        ++   +W    VP +
Sbjct  321   LPSPRSSKMQQDTATTGSTKIRFEDVNATSLTVVLASNEIPSPPNIVHYSIWHRK-VPEK  379

Query  1032  GY*QKRTRYTLLCTLVSSTNRFVVSGLSSGNKIHFQAISFN  1154
              Y +K T     CTL     RFVVSGL+  ++  F+ +S++
Sbjct  380   DYPEKST-----CTLFIPNTRFVVSGLAPASEYCFKVVSYS  415
```

شکل ٤- نتیجه tblastn قطعه رونوشت توالی‌یابی شده با پروتئین شبه vernalization5/VIN3 در آرابیدوپسیس تالیانا

توالی بدست آمده در بانک داده‌های توالی Reference (RefSeq) protein با سایر گیاهان با استفاده از نرم‌افزار blastx در پایگاه پروتئینی مورد جستجو قرار گرفت.

نتایج نشان داد میزان شباهت این توالی با پروتئین شبه vernalization5/VIN3 در آرابیدوپسیس تالیانا ٤٧ درصد با ارزش E برابر ٩٢-٤e است (شکل٤).

پروتئین‌های خانواده VIN3 دارای سه دمین مجزا PHD، FN3 و دمین برهمکنش با VIN3 (VID) هستند (Kim and Sung 2010). موتیف‌هایPHD عمدتاً در برخی از پروتئین‌هایی می‌باشند که در تغییرات کروماتین و تشخیص برخی تغییرات هیستون‌ها درگیرند (Mellor 2006). انگشتان PHD می‌توانند دنباله‌ی هیستونی تغییر یافته و تغییر نیافته را تشخیص دهند و بیان ژن را از طریق به کارگیری چند مجموعه پروتئینی از تنظیم کنندگان کروماتینی و فاکتورهای رونویسی کنترل نمایند[1]. دمین FN3عملکرد ساختار پیمانه‌ای را نشان می‌دهد. مکان‌های برهمکنش با مولکول‌های دیگر، توالی اسیدهای‌آمینه آرژنین-گلوتامات-آسپارتات (RGD) است که در دمین‌های مختلف FN3یافت می‌شود. در پروتیئن‌های گیاهی، دمین FN3 برای اولین بار از توالی یک گلیکو پروتئین گیاهی[2]PAP در لوبیا قرمز از طریق مدل ماکو[3] شناسایی شده است (Tsyguelnaia and Doolittle, 1998) و توسط ساختار کریستالی تایید شد (Strater et al. 1995). این ساختار موتیف در سایر PAPها شامل PPD1 و PAP سیب‌زمینی شیرین حضور دارد (Antonyuk et al. 2014).

[1] http://.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cddsrv.cgi?uid=275373
[2] purple acid phosphatase
[3] hidden Markov model (HMM)

قطعه توالی‌یابی شده مربوط به ژن *VIN3* در این تحقیق در پایگاه داده Reference protein (RefSeq) مربوط به پایگاه NCBI مورد بررسی قرار گرفت و میزان شباهت آن با ژن‌های سایر گیاهان مشخص شد (جدول ٢). نتایج نشان داد که این قطعه شباهت بالایی با پروتئین دوم شبه VIN3 در سایر گیاهان دولپه‌ای دارد. ژن *VIN3* از گیاه گوجه فرنگی همسانه‌سازی شده و درصد بالایی از مناطق حفاظت شده بین توالی پروتئینی SIVIN3 و پروتئین انگور و سایر پروتئین‌های گیاهان دولپه‌ای یافت شده‌است (Almutairi and Sadder 2014). ژن *VIN3* در آرابیدوپسیس پروتئینی با ٦٢٠ اسیدآمینه را کد می‌کند. در این پژوهش امکان شناسایی ٨٩٦ جفت‌باز از توالی *VIN3*ی چغندرقند فراهم شد که این قطعه پروتئینی با ٢٩٨ اسیدآمینه را رمزمی‌کند. بنابراین قطعه مورد نظر به‌عنوان ژن شبه vernalization insensitive 3 در ژنوتیپ سوپریمای چغندرقند با شماره KJ755197.1 و پروتئین آن با شماره دستیابی AIG88465.1 در پایگاه NCBI ثبت شد. با توجه به درصد بالای شباهت بین قطعات تکثیر شده در چغندرقند با توالی پروتئینی FRI و VIN3 در آرابیدوپسیس و سایر گیاهان دولپه‌ای، ژن‌های *FRI* و *VIN3* در چغندرقند دارای عملکردی مشابه با ژن‌های مذکور در این گیاهان می‌باشند. ژن *FRI* از طریق افزایش بیان FLC گلدهی را سرکوب می‌کند و ژن *VIN3* که در طی اعمال سرمای زمستانه بیان شده و از بیان ژن *FLC* جلوگیری می‌کند امکان گلدهی را فراهم می‌کند. شناسایی توالی نوکلئوتیدی و پروتئینی این ژن‌ها و عملکرد آن در چغندرقند ممکن است در شناخت کنترل ژنتیکی بولتینگ کمک نماید.

جدول ٢- میزان شباهت توالی شناسایی شده در چغندرقند با ژن‌های *VIN3* در آرابیدوپسیس و سایر گیاهان

ارزش E	درصد شباهت	درصد همپوشانی	مشخصات توالی	شماره دستیابی
٩٢-٤e	٪٤٧	٪٩٠	پروتئین شبه vernalization5/VIN3	NP_849471.1
صفر	٪٥٢	٪٩٩	پروتئین VERNALIZATION INSENSITIVE 3 درتوت سفید	XP_010094225.1
صفر	٪٥١	٪٩٩	پروتئین دوم شبه VIN3 در انگور	XP_002270335.1
صفر	٪٥١	٪٩٩	پروتئین دوم شبه VIN3 در درخت کاکائو	XP_007014247.1

منابع

Abou-Elwafa SF, Büttner B, Chia T, Schulze-Buxloh G, Hohmann U, Mutasa-Göttgens E, Jung C, and Müller AE (2010) Conservation and divergence of autonomous pathway genes in the flowering regulatory network of Beta vulgaris. Journal of experimental botany,erq321.

Adrian J, Torti S, and Turck F (2009) From decision to commitment: the molecular memory of flowering. Molecular plant 2: 628-642.

Almutairi Z, and Sadder M (2014) Cloning and expression profiling polycomb gene VERNALIZATION INSENSITIVE 3 in tomato. Biologia Plantarum 58: 419-426.

Andersson CR, Helliwell CA, Bagnall DJ, Hughes TP, Finnegan EJ, Peacock WJ, and Dennis ES (2008) The FLX gene of Arabidopsis is required for FRI-dependent activation of FLC expression. Plant and cell physiology 49: 191-200.

Antonyuk SV, Olczak M, Olczak T, Ciuraszkiewicz J, and Strange RW (2014) The structure of a purple acid phosphatase involved in plant growth and pathogen defence exhibits a novel immunoglobulin-like fold. IUCrJ 1: 101-109.

Bastow R, Mylne J S ,Lister C, Lippman Z, Martienssen R A, and Dean C (2004) Vernalization requires epigenetic silencing of FLC by histone methylation. Nature 427: 164-167.

Boudry P, Mccombie H, and Van Dijk H (2002) Vernalization requirement of wild beet Beta vulgaris ssp maritima: among population variation and its adaptive significance. Journal of Ecology 90, 693-703.

Catusse J, Strub J-M, Job C, Van Dorsselaer A, and Job D (2008) Proteome-wide characterization of sugarbeet seed vigor and its tissue specific expression .Proceedings of the National Academy of Sciences 105: 10262-10267.

Chao Y, Yang Q, Kang J, Zhang T, and Sun Y (2013) Expression of the alfalfa FRIGIDA-Like Gene, MsFRI-L delays flowering time in transgenic Arabidopsis thaliana. Molecular biology reports 4: 2083-2090.

Choi K, Kim J, Hwang H-J, Kim S, Park C, Kim S Y, and Lee I (2011) The FRIGIDA complex activates transcription of FLC, a strong flowering repressor in Arabidopsis, by recruiting chromatin modification factors. The Plant Cell Online 23: 289-303.

Ding L, Kim SY, and Michaels SD (2013) FLOWERING LOCUS C EXPRESSOR family proteins regulate FLOWERING LOCUS C expression in both winter-annual and rapid-cycling Arabidopsis. Plant physiology 163: 243-252.

Fang Q, Liu J, Xu Z, and Song R (2008) Cloning and characterization of a flowering time gene from Thellungiella halophila. Acta biochimica et biophysica Sinica 40: 747-753.

Gregis V, Sessa A, Dorca-Fornell C, and Kater MM (2009) The Arabidopsis floral meristem identity genes *AP1*, *AGL24* and SVP directly repress class B and C floral homeotic genes. The Plant Journal 60: 626-637.

He Y, Michaels SD, and Amasino RM (2003) Regulation of flowering time by histone acetylation in Arabidopsis. Science 302: 1751-1754.

Helliwell CA, Wood CC, Robertson M, James Peacock W, and Dennis E S (2006) The Arabidopsis FLC protein interacts directly in vivo with SOC1 and FT chromatin and is part of a high-molecular-weight protein complex. The Plant Journal 46: 183-192.

Irwin JA, Lister C, Soumpourou E, Zhang Y, Howell EC, Teakle G, and Dean C (2012) Functional alleles of the flowering time regulator FRIGIDA in the Brassica oleracea genome. BMC plant biology 12, 21.

Johanson U, West J, Lister C, Michaels S, Amasino R, and Dean C (2000) Molecular analysis of FRIGIDA, a major determinant of natural variation in Arabidopsis flowering time. Science 290: 344-347.

Jung C, and Müller A E (2009) Flowering time control and applications in plant breeding. Trends in plant science 14: 563-573.

Kim DH, and Sung S (2010) The Plant Homeo Domain finger protein, VIN3-LIKE 2, is necessary for photoperiod-mediated epigenetic regulation of the floral repressor, MAF5. Proceedings of the National Academy of Sciences 107: 17029-17034.

Kim DH, and Sung S (2013) Coordination of the vernalization response through a VIN3 and FLC gene family regulatory network in Arabidopsis. The Plant Cell Online 25: 454-469.

Kim DH, and Sung S (2014) Genetic and epigenetic mechanisms underlying vernalization. The Arabidopsis book/American Society of Plant Biologists 12.

Kim SY, He Y, Jacob Y, Noh Y-S, Michaels S, and Amasino R (2005) Establishment of the vernalization-responsive, winter-annual habit in Arabidopsis requires a putative histone H3 methyl transferase. The Plant Cell Online 17: 3301-3310.

Kim SY, and Michaels SD (2006) SUPPRESSOR OF FRI 4 encodes a nuclear-localized protein that is required for delayed flowering in winter-annual Arabidopsis. Development 133: 4699-4707.

Kim SY, Yu X, and Michaels SD (2008) Regulation of CONSTANS and FLOWERING LOCUS T expression in response to changing light quality. Plant physiology 148: 269-279.

Lee J, and Amasino RM (2013) Two FLX family members are non-redundantly required to establish the vernalization requirement in Arabidopsis. Nature communications 4.

Mellor J (2006) It takes a PHD to read the histone code. Cell 126: 22-24.

Michaels SD, and Amasino RM (1999) FLOWERING LOCUS C encodes a novel MADS domain protein that acts as a repressor of flowering. The Plant Cell Online 11: 949-956.

Michaels SD, and Amasino RM (2001) Loss of FLOWERING LOCUS C activity eliminates the late-flowering phenotype of FRIGIDA and autonomous pathway mutations but not responsiveness to vernalization. The Plant Cell Online 13: 935-941.

Michaels SD, Bezerra IC, and Amasino RM (2004) FRIGIDA-related genes are required for the winter-annual habit in Arabidopsis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 101: 3281-3285.

Reeves PA, He Y, Schmitz RJ, Amasino RM, Panella LW, and Richards CM (2007) Evolutionary conservation of the FLOWERING LOCUS C-mediated vernalization response: evidence from the sugar beet (Beta vulgaris). Genetics 176: 295-307.

Schmitz RJ, Hong L, Michaels S, and Amasino RM (2005) FRIGIDA-ESSENTIAL 1 interacts genetically with FRIGIDA and FRIGIDA-LIKE 1 to promote the winter-annual habit of Arabidopsis thaliana. Development 132: 5471-5478.

Searle I, He Y, Turck F, Vincent C, Fornara F, Kröber S, Amasino RA, and Coupland G (2006) The transcription factor FLC confers a flowering response to vernalization by repressing meristem competence and systemic signaling in Arabidopsis. Genes and Development 20: 898-912.

Strater N, Klabunde T, Tucker P, Witzel H, and Krebs B (1995) Crystal structure of a purple acid phosphatase containing a dinuclear Fe (III)-Zn (II) active site. Science 268: 1489-1492.

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

Tsyguelnaia I, and Doolittle RF (1998) Presence of a fibronectin type III domain in a plant protein. Journal of molecular evolution 46: 612-614.

Zhao Z, Yu Y, Meyer D, Wu C, and Shen WH (2005) Prevention of early flowering by expression of FLOWERING LOCUS C requires methylation of histone H3 K36. Nature cell biology 7: 1256-1260.

Modern Genetics Journal
Vol 11, Number 3, Autumn 2016, Quaternary

Identification of *frigida* and *vernalization insensitive3* genes related to vernalization pathway of flowering in sugar beet

Alimirzaee M[1], Mirzaie asl A[*1], Abdollahi MR[2], Ebrahimi Koulaei H[3]

1. MSc Student, Assistant Professor, Department of Biotechnology, Faculty of Agriculture, Hamedan Bu-Ali Sina University
2. Associate Professor, Department of Agronomy and Plant breeding, Faculty of Agriculture, Hamedan Bu-Ali Sina University
3. Instructor, Sugar Beet Seed Department, Hamedan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Hamedan, Iran
* Corresponding Author, Email: a.mirzaie @basu.ac.ir

A B S T R A C T

In sugar beet fields, shoot elongation in the first year called "Bolting"causes reduction of the root yield and white sugar yield. Identification of genetic control of flowering can be useful in development of bolting-resistant cultivars in sugar beet. A similar molecular mechanism for flowering control has been found in the most plants". In this study, sugar beet nucleotide sequences were searched in the Genbank database against protein sequences of FRIGIDA and VERNALIZATION INSENSITIVE 3 in Arabidopsis by tblastn software. Primers were designed from two similar founded records and used in PCR reactions. Two leaf samples were prepared from the field plants before and after vernalization. cDNA synthesized from extracted RNA of the samples and used as template in PCR reactions. cDNA fragments 896 bp and 1000 bp of VIN3 and FRI genes respectively were obtained from sequencing procedure and for the first time, these sequences were recorded in the Genbank database. FRIGIDA-like protein causes late flowering by increasing RNA levels of FLC gene.VIN3 protein containing a PHD-finger domain that acts as binding modules of methylated histone H3 in FLC gene and repressed expression of FLC gene in during vernalization.

Key Words

bolting, flowering gene, sugar beet, vernalization