مقاله پژوهشی

مجله سلول و بافت (علمی - پژوهشی)
جلد ٦، شماره ١، بهار ١٣٩٤، ٥٨-٥١

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

محسن اسدی خانوکی .M.Sc[1]، فرخنده رضانژاد .Ph.D[1*]، غلامرضا شریفی سیرچی .Ph.D[2]، حسینعلی ساسان .Ph.D[1]

١- دانشگاه شهید باهنر کرمان، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی، کدپستی: ٧٦١٦٩١٤١١١
٢- دانشگاه هرمزگان، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، گروه کشاورزی

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: frezanejad@gmail.com

تاریخ دریافت: ١٣٩٣/١/٢٦ تاریخ پذیرش: ١٣٩٣/٧/٨

چکیده

هدف: هدف از این تحقیق شناسایی همساخت این ژن در گونه‌ای تاجریزی به‌نام روپاس (*Solanum villosum Mill.*) است.

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

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

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

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

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

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

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

LFY قبل از سایر ژن‌های تعیین هویت مریستم گل بیان می‌شود. اگرچه خود به‌عنوان تنظیم کننده هویت مریستم عمل می‌کند اما فعالیت سایر تنظیم کنندگان مهم هویت مریستم را نیز افزایش می‌دهد (۷ و ۱۵). جهش در این ژن شدیدترین اثر را روی هویت مریستم راسی دارد. در زمانی که گیاهان تیپ وحشی شروع به گل‌دهی می‌کنند، جهش یافته‌های lfy همچنان تولید برگ و شاخساره جانبی می‌کنند (۷). یکی دیگر از نقش‌های LFY در نمو گل، تحریک رونویسی چهار کلاس ژنی (ABCE) تعیین هویت اندام گل است. اگرچه در نهاندانگان عمل‌کرد اصلی LFY، کنترل نمو گل است اما این ژن در برخی از گونه‌ها نقش‌های دیگری نیز بر عهده دارد. دخالت در نمو مریستم راس ساقه در تنباکو، نمو برگ‌های مرکب در حبوبات و گوجه فرنگی و منشعب شدن خوشه در برنج ازجمله‌ی این عمل‌کردهاست (۱۶). همچنین یافته‌های اخیر در آرابیدوپسیس نشان می‌دهد LFY در طول رشد رویشی، مسیرهای دفاعی گیاه را نیز تنظیم می‌کند (۱۷).

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

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

در برخی از گونه‌های خانواده سیب زمینی ژن‌های همساخت LFY شناسایی گردیده‌اند که تعدادی از آن‌ها عبارتند از: FALSIFLORA (FA) در گوجه فرنگی (۲۶)، StLFY در سیب زمینی (۲۷)، CaLFY در فلفل قرمز (۲۸)،

Archive of SID
www.SID.ir

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

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

مواد و روش‌ها

گیاه مورد مطالعه: بذر روپاس (*Solanum villosum Mill.*) از شهر ساردوئیه واقع در ۸۰ کیلومتری جیرفت (طول جغرافیایی "18'57/21° E57 و عرض جغرافیایی "13'29/14° N29)، جمع آوری گردید. در خردادماه، بذرها در گلدان‌هایی حاوی مخلوط ۱:۱ از خاک و ماسه کشت شدند. پس از گل‌دهی و پدیدار شدن اولین غنچه‌های گل، از بافت مریستم راس شاخساره (۵ میلی‌متر از راس ساقه) برای مطالعات مولکولی استفاده گردید.

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

F-SvLFY < 5′-GCGAGAGACAAAGGGAGCATC-3′ >

R-SvLFY < 5′-ATTAGAAATGTGGCAGGTGATC-3′ >

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

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

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

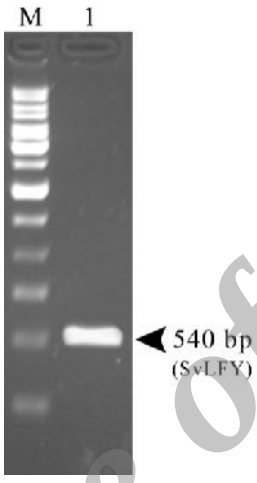
Archive of SID

www.SID.ir

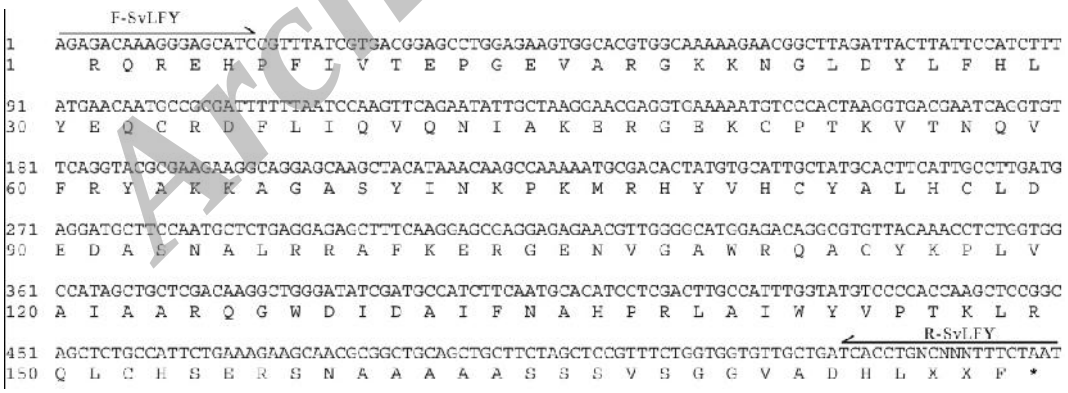
نتایج

حضور سه باند پررنگ مربوط به RNAهای ریبوزومی کـه نشـان دهنده‌ی کیفیت مطلوب RNA استخراج شده برای انجـام RT-PCR است روی ژل آگارز دیده شد. الکتروفـورز محصـول PCR روی ژل آگارز ۱ درصد نشان داد که قطعه اختصاصـی بـرای ژن LFY به‌طول ۵۴۰ جفت باز به خوبی تکثیر شـده اسـت (شـکل ۱). این مطلب نشان دهنده طراحی و عملکرد صحیح آغازگرها و برنامه PCR مناسب (به‌خصوص دمای اتصال) می‌باشد.

نتایج حاصل از توالی یابی محصـول PCR، نشـان دهنـده تـوالی یابی مطلوب قطعه ۵۴۰ جفت بازی مربوط به ناحیه کـد کننـده ژن LFY بود. توالی خوانده شده مربوط به بخش‌هایی از اگـزون ۲ (۱۶۴ نوکلئوتیـد) و طـول کامـل اگـزون ۳ (۳۷۵ نوکلئوتیـد) است (شکل ۲).



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

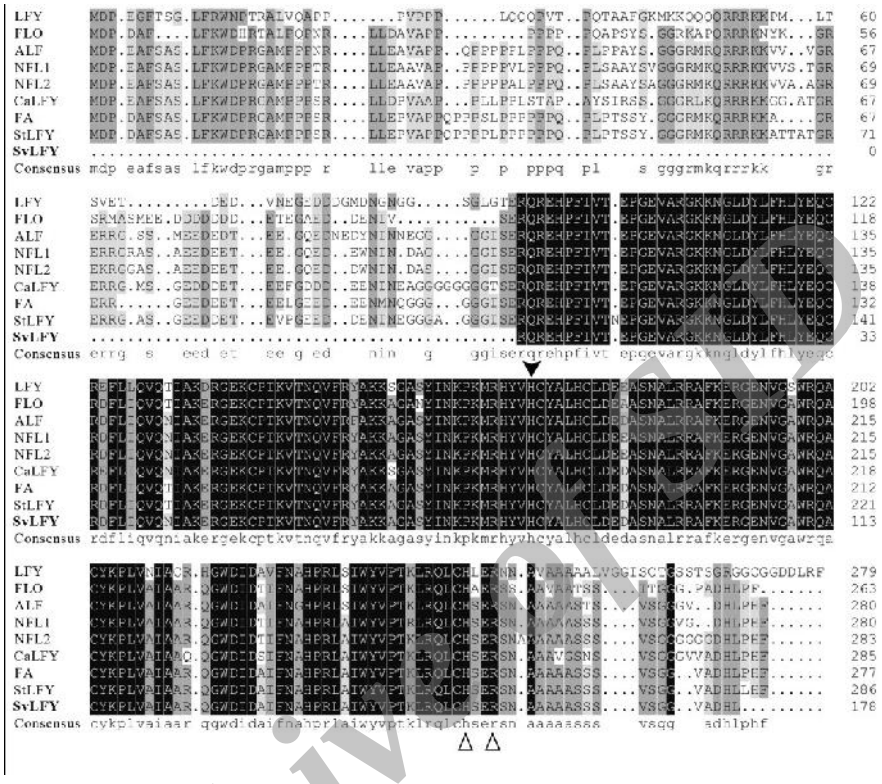


شکل ۲: توالی نوکلئوتید و آمینواسید استنباطی cDNA ژن SvLFY علامت ستاره نشان‌دهنده کـدون خـتم اسـت. X نشـان دهنـده آمینـو اسـیدهای نامشخص و پیکان‌های بالای توالی‌ها نشان دهنده آغازگرهای استفاده شده در RT-PCR است.

نتایج حاصل از BLAST نشان دهنده شباهت بسیار بـالای ایـن قطعه با سایر ژن‌های همساخت LFY است. به‌عنوان مثـال ایـن قطعه در سطح نوکلئوتیدی با ژن‌های همساخت LFY در سـیب زمینـی (Accession no: EF062357)، گوجـه (Accession no: AF197935) و اطلسـی (Accession no: AF030171) به‌ترتیب ۹۴، ۹۳ و ۸۹ درصد شباهت دارد. بنـابراین ایـن تـوالی

Archive of SID
www.SID.ir

مربوط به ژن همساخت LFY در گیاه روپاس (*Solanum villosum*) است. این ژن با نام SvLFY (Accession no:KF752589) در بانک ژن ثبت گردید. با توجه به ۵۴۰ جفت باز تعیین توالی شده، توالی پروتئین استنباطی این قطعه از ژن به‌دست آمد. از توالی این پروتئین استنباطی که دارای ۱۷۸ اسید آمینه است (۲ اسید آمینه نامشخص) در مراحل بعدی جهت بررسی شباهت آن با سایر پروتئین‌های همساخت LFY استفاده گردید (شکل ۳).



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

بحث

پروتئین‌های همساخت LFY از جمله مهم‌ترین فاکتورهای رونویسی دخیل در نمو گل گیاهان به‌شمار می‌آیند (۳۲). برای درک بهتر مکانیسم‌های مولکولی دخیل در گل‌دهی گیاه روپاس، SvLFY به‌عنوان همساخت ژن LFY آرابیدوپسیس شناسایی گردید که برخی گیاهان تیره سیب زمینی نیز مانند آرابیدوپسیس به‌عنوان گیاهان مدل مورد مطالعه و بررسی قرار می‌گیرند. توالی آمینواسید استنباطی SvLFY با توالی پروتئین‌های LFY در آرابیدوپسیس (۳۳)، FLO در گل میمون (۹)، ALF در اطلسی (۲۹)، NFL1 و NFL2 در تنباکو (۳۰)، CaLFY در فلفل قرمز (۲۸)، FA در گوجه فرنگی (۲۶) و StLFY در سیب زمینی (۲۷) مقایسه گردید (شکل ۳). مقایسه توالی آمینو اسید استنباطی SvLFY و دیگر همساخت‌های LFY، نشان دهنده شباهت زیاد آن‌ها بود. این پروتئین‌ها معمولا دارای دو ناحیه حفاظت شده در N ترمینال و C ترمینال خود هستند. این نواحی حفاظت شده در بسیاری از بازدانگان و نهاندانگان وجود دارد (۳۴ و ۳۵). با توجه به ناحیه‌ای که توالی‌یابی گردیده است و شباهت بالای آن با سایر همساخت‌های LFY می‌توان نتیجه گرفت که ناحیه حفاظت شده C ترمینال، در پروتئین SvLFY نیز وجود دارد. بسیاری از پروتئین‌های همساخت LFY در نهاندانگان دارای ناحیه غنی از پرولین

www.SID.ir
Archive of SID

هستند که تقریبا در ۴۰ آمینواسید ابتدایی آن‌ها قرار گرفته است. Coen و همکاران (۹) گزارش کردند که ناحیه غنی از پرولین نقش مهمی در فعالیت رونویسی این پروتئین دارد اما Maizel و همکاران (۳۶) نشان دادند که در برخی از همساخت‌های LFY، این ناحیه C ترمینال است که به توالی‌های تقویت کننده ژن‌های همئوتیک گل‌دهی نظیر APETALA1 و AGAMOUS متصل می‌شود. بسیاری از پروتئین‌های همساخت LFY در گیاهان خشکی (نهاندانگان، بازدانگان، سرخس ها و جگرواش‌ها) به موتیفی از DNA متصل می‌شوند که LFY در آرابیدوپسیس به آن وصل می‌شود اما PpLFY1 (همساخت LFY در خزه) و KsLFY (همساخت LFY در جلبک سبز) به انواع دیگری از موتیف‌ها متصل می‌شوند (۱۴). پروتئین LFY می‌تواند به توالی پالیندرومیک کاذب (CCANTGT/G) در پروموتورهای ژن‌های هدف خود متصل شود. دو اسید آمینه در C ترمینال LFY در تشخیص این توالی موثر هستند (۳۵). با توجه به پروتئین استنباطی به‌دست آمده از SvLFY، این دو اسید آمینه در این پروتئین نیز حفاظت شده هستند (شکل ۳).

مطالعات ساختاری نشان داده‌اند که هنگام اتصال پروتئین LFY به DNA، اسید آمینه‌های قرار گرفته در ناحیه حفاظت شده C ترمینال، که در قسمت‌های درونی‌تر پروتئین قرار گرفته‌اند در مجاورت DNA قرار می‌گیرند اما اسید آمینه‌هایی که در سطح پروتئین و دور از DNA قرار دارند نسبتا متغیر هستند. برمبنای این مدل ساختاری می‌توان دریافت که چرا این ناحیه متصل شونده به DNA در نهاندانگان چندان متغیر نیست (۱۳). به‌علاوه مشخص شده است که دنباله هیستیدینی حفاظت شده، در ناحیه C ترمینال نقشی ضروری در اتصال به DNA دارد. پروتئین PpLFY1 که فاقد این دنباله است، نمی‌تواند به ناحیه اتصال ژن LFY در آرابیدوپسیس متصل شود. به‌جز خزه، این ناحیه تقریبا در سایر همساخت‌های LFY حفاظت شده است (۳۶). لازم به ذکر است که دنباله هیستیدینی حفاظت شده نیز در این ناحیه از پروتئین SvLFY وجود دارد که با نوک پیکان مشخص گردیده است (شکل ۳).

نتیجه گیری

نتایج این پژوهش حضور ژن LEAFY (LFY) در گیاه S.villosum را به اثبات رساند. قطعه ۵۴۰ جفت بازی مربوط به ناحیه کد کننده این ژن توالی‌یابی و با نام SvLFY (Accession no:KF752589) در بانک ژن ثبت گردید. توالی پروتئین استنباطی این قطعه از ژن دارای شباهت بالایی با ناحیه C ترمینال سایر همساخت‌های LFY بود. از این‌رو می‌توان SvLFY را نیز به‌عنوان فاکتور رونویسی در نظر بگیریم که به احتمال مانند LFY در گل‌دهی و نمو گل نقش ایفا می‌کند. شناسایی توالی کامل ناحیه کدکننده، بررسی الگوی بیانی، مشخص کردن برهم‌کنش احتمالی آن با سایر ژن‌های تنظیم کننده گل‌دهی و انجام آزمایش‌هایی نظیر وسترن بلات برای اطمینان از حضور پروتئین SvLFY می‌تواند در روشن شدن نقش این ژن کلیدی در گل‌دهی گیاه مورد مطالعه موثر باشد.

منابع

1. Vachon G, Tichtinsky G, Parcy F. LEAFY, a master regulator of flower development. Biol Aujourdhui. 2012; 206(1): 63-67.

2. Araki T. Transition from vegetative to reproductive phase. Curr. Opin Plant Biol. 2001; 4(1): 63-68.

3. Amasino R. Seasonal and developmental timing of flowering. Plant J. 2010; 61(6): 1001-1013.

4. Wang Aj, Tang Jf, Zhao Xy, Zhu Lh. Isolation of LiLFY1 and Its Expression in Lily (Lilium longiflorum Thunb.). Agric Sci China. 2008; 7(9): 1077-1083.

5. Moon J, Lee H, Kim M, Lee I. Analysis of flowering pathway integrators in Arabidopsis. Plant Cell Physiol. 2005; 46(2): 292-299.

6. Parcy F. Flowering: a time for integration. Int J Dev. Biol. 2005; 49(5-6): 585-593.

7. Blazquez MA, Soowal LN, Lee I, Weigel D. LEAFY expression and flower initiation in Arabidopsis. Development. 1997; 124(19): 3835-3844.

8. Lu S, Li Z, Zhang J, Yi S, et al. Isolation and expression analysis of a LEAFY/FLORICAULA homolog and its promoter from London plane (Platanus acerifolia Willd.). Plant Cell Rep. 2012; 31(10): 1851-1865.

9. Coen ES, Romero JM, Doyle S, Elliott R, et al. floricaula: a homeotic gene required for flower development in antirrhinum majus. Cell. 1990; 63(6): 1311-1322.

Archive of SID

www.SID.ir

10. Zhang JX, Wu KL, Zeng SJ, Duan J, et al. Characterization and expression analysis of PhalLFY, a homologue in Phalaenopsis of FLORICAULA/LEAFY genes. Sci Hortic-Amsterdam. 2010; 124(4): 482-489.

11. Dornelas MC. The rubber tree (Hevea brasiliensis Muell. Arg.) homologue of the LEAFY/FLORICAULA gene is preferentially expressed in both male and female floral meristems. J Exp. Bot. 2005; 56(417): 1965-1974.

12. Schultz EA, Haughn GW, LEAFY. A Homeotic Gene That Regulates Inflorescence Development in Arabidopsis. Plant Cell. 1991; 3(8): 771-781.

13. Moyroud E, Tichtinsky G, Parcy F. The LEAFY Floral Regulators in Angiosperms: Conserved Proteins with Diverse Roles. J Plant Biol. 2009; 52(3): 177-185.

14. Sayou C, Monniaux M, Nanao MH, Moyroud E, et al. A promiscuous intermediate underlies the evolution of LEAFY DNA binding specificity. Science. 2014; 343(6171): 645-648.

15. Pidkowich MS, Klenz JE, Haughn GW. The making of a flower: control of floral meristem identity in Arabidopsis. Trends Plant Sci. 1999; 4(2): 64-70.

16. Siriwardana NS, Lamb RS. The poetry of reproduction: the role of LEAFY in Arabidopsis thaliana flower formation. Int J Dev Biol. 2012; 56(4): 207-221.

17. Winter CM, Austin RS, Blanvillain-Baufume S, Reback MA, et al. LEAFY target genes reveal floral regulatory logic, cis motifs, and a link to biotic stimulus response. Dev Cell. 2011; 20(4): 430-443.

18. Edmonds JM, Chweya JA. Black nightshades, Solanum nigrum L. and related species, Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. 15th Ed. Rome: IPGRI; 1997.

19. Karimi H. Dictionary of Iran's vegetations (Plants). 1th Ed. Tehran: Parcham Publisher; 2002.

20. Ghahreman A. Flora of Iran in colour. Tehran: Research Institute of Forests & Rangelands; 1984.

21. Javed T, Ashfaq UA, Riaz S, Rehman S, et al. In-vitro antiviral activity of Solanum nigrum against Hepatitis C Virus. Virol J. 2011; 8: 26.

22. Lin HM, Tseng HC, Wang CJ, Lin JJ, et al. Hepatoprotective effects of Solanum nigrum Linn extract against CCl(4)-induced oxidative damage in rats. Chem Biol Interact. 2008; 171(3): 283-293.

23. Li J, Li Q, Feng T, Zhang T, et al. Antitumor activity of crude polysaccharides isolated from Solanum nigrum Linne on U14 cervical carcinoma bearing mice. Phytother Res. 2007; 21(9): 832-840.

24. Hammami H, Ayadi A. Molluscicidal and antiparasitic activity of Solanum nigrum villosum against Galba truncatula infected or uninfected with Fasciola hepatica. J Helminthol. 2008; 82(3): 235-239.

25. Nirmal SA, Patel AP, Bhawar SB, Pattan SR. Antihistaminic and antiallergic actions of extracts of Solanum nigrum berries: Possible role in the treatment of asthma. J Ethnopharmacol. 2012; 142(1): 91-97.

26. Molinero-Rosales N, Jamilena M, Zurita S, Gomez P, et al. FALSIFLORA, the tomato orthologue of FLORICAULA and LEAFY, controls flowering time and floral meristem identity. Plant J. 1999; 20(6): 685-693.

27. Guo J-l, Yang Q. Molecular Cloning and Expression Analysis of a LFY Homologous Gene from Potato. Plant Mol Biol Rep. 2008; 26(4): 324-334.

28. Kim D, Han M, Cho H, Kim D, et al. Molecular cloning of the CaLFY, putative pepper ortholog of FLO/LFY. Mol Breeding. 2008; 22(3): 443-453.

29. Souer E, van der Krol A, Kloos D, Spelt C, et al. Genetic control of branching pattern and floral identity during Petunia inflorescence development. Development. 1998; 125(4): 733-742.

30. Kelly AJ, Bonnlander MB, Meeks-Wagner DR. NFL, the tobacco homolog of FLORICAULA and LEAFY, is transcriptionally expressed in both vegetative and floral meristems. Plant Cell. 1995; 7(2): 225-234.

31. Sambrook J, Russell DW. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3th Ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor; 2001.

32. Meng Q, Zhang C, Huang F, Gai J, et al. Molecular cloning and characterization of a LEAFY-like gene highly expressed in developing soybean seeds. Seed Sci Res. 2007; 17(4): 297-302.

33. Weigel D, Alvarez J, Smyth DR, Yanofsky MF, et al. LEAFY controls floral meristem identity in Arabidopsis. Cell. 1992; 69(5): 843-859.

34. Shiokawa T, Yamada S, Futamura N, Osanai K, et al. Isolation and functional analysis of the CjNdly gene, a homolog in Cryptomeria japonica of FLORICAULA/LEAFY genes. Tree Physiol. 2008; 28(1): 21-28.

Archive of SID

www.SID.ir

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

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

Archive of SID

www.SID.ir

Journal of Cell & Tissue (JCT)
Spring 2015; 6(1): 51-58

Original Article

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

Asadi-Khanuki M, M.Sc. [1], Rezanejad F, Ph.D.[1*], Sharifi-sirchi GR, Ph.D.[2], Sasan HA, Ph.D.[1]

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

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

* Email corresponding author: frezanejad@gmail.com

Received: 15 Apr. 2014 Accepted: 30 Sep. 2014

Abstract

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

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

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

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

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

Archive of SID

www.SID.ir