

شناسایی ژن‌های *frigida* و *vernalization insensitive3* مربوط به

مسیر بهاره سازی گلدهی در گیاه چغندر قند

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 چغندر قند، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان

همدان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، همدان، ایران

Alimirzaee M¹, Mirzaie asl A^{*1}, Abdollahi MR², Ebrahimi Koulaei H³

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: ۹۴/۲/۲۶ - تاریخ پذیرش: ۹۵/۶/۲۸)

چکیده

در مزارع تولید ریشه چغندر قند، 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 چغندر قند می‌تواند در تولید ارقام مقاوم به بولتینگ راه‌گشا باشد. مکانیسم ملکولی کنترل گلدهی در گیاهان مشابه است. در این تحقیق توالی نوکلئوتیدی چغندر قند موجود در پایگاه داده Genbank که با توالی‌های پروتئین‌های *FRIGIDA* و *VERNALIZATION INSENSITIVE 3* گیاه آراییدو پسیس 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 برگ‌گی تهیه و استخراج *RNA* انجام شد. سپس *cDNA* حاصل به‌عنوان الگو در واکنش *PCR* استفاده شد. با انجام توالی‌یابی ۱۰۰۰ جفت‌باز از توالی رونوشت ژن *FRI* و ۸۹۶ 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

چغندر قند

ژن‌های گلدهی

مقدمه

طولانی، کروماتین FLC در حالت فعال است که به موجب آن هیستون‌های مشخص لیزین ۴ هیستون^۳ و لیزین ۳۶ هیستون^۳ فعال و استیل‌اسیون هیستون ۳ 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 آرآیدوپسیس 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 آرآیدوپسیس 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 می‌شوند، اغلب در مسیر ویژه *FRI* عمل می‌کنند. این ژن‌ها شامل ^{۱۱}*FLLA*، ^{۱۰}*FLX*، ^۹*SUF4*، ^۸*FRL2*، ^۷*FRL1* و ^{۱۲}*FES1* می‌باشند (Michaels and Amasino 2004; Schmitz et al. 2005; Kim et al. 2006; Andersson et al. 2008; Ding et al. 2013; Lee and FRI 2013). به نظر می‌رسد که این ژن‌ها برای عملکرد *FRI* لازم هستند. آنالیزهای ژنتیکی در هر دو آلل غالب و مغلوب از *FRI* و *FRL1* 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* و *FES1* پروتئین انگشت روی هستند و عامل فعال‌کننده رونویسی می‌باشند. پروتئین *SUF4* در این

چغندرقد (*Beta vulgaris ssp. vulgaris*) گیاهی دولپه‌ای، علفی و عضوی از خانواده Amaranthaceae است و دارای گونه‌های یکساله، دوساله و چندساله می‌باشد. چغندرقد 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، چغندرقد شروع به ساقه‌دهی (بولتینگ^۱) کرده و در شرایط روزبلند به گل می‌رود. بنابراین، به مدت ۱۰-۱۴ 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 آرآیدوپسیس نیز همانند چغندرقد، نیاز به بهاره‌سازی برای گلدهی دارند. مطالعات گسترده بر روی انتقال به گلدهی در گونه مدل آرآیدوپسیس (*Arabidopsis thaliana*) نشان می‌دهد که گلدهی از طریق کامل شدن نتایج حاصل از ژن‌های چهار مسیر تنظیمی گلدهی شامل تناوب نوری، بهاره‌سازی، جیبرلین و مسیر خود انگیزی القا می‌شود (Kim et al. 2008; Jung and Muller et al. 2009; Adrian al. 2009; Gregis et al. 2009). در آرآیدوپسیس ژن *FLC* به‌عنوان مانع اصلی گلدهی در این گیاه به شمار می‌رود. ژن *FLC*، عضوی از خانواده‌ی MADS-box می‌باشد که عمدتاً مسئول نیاز بهاره‌سازی در آرآیدوپسیس محسوب می‌شود (Michaels and Amasino 1999, 2001). پروتئین FLC از طریق پیوند با توالی تنظیم کننده سیس در ژن‌های گلدهی *FT*^۳ و *SOC1*^۴ گلدهی را سرکوب می‌کند (et al. 2006; Helliwell 2006; Searle et al. 2006). قبل از اعمال سرمای

⁵ histone H3 Lys 4⁶ histone H3 Lys 36⁷ FRI-LIKE1⁸ FRI-LIKE2⁹ SUPPRESSOR OF FRIGIDA 4¹⁰ FLC EXPRESSOR¹¹ FLOWERING LOCUS C EXPRESSOR-LIKE 4¹² FRIGIDA ESSENTIAL1¹ Bolting² FLOWERING LOCUS C³ FLOWERING LOCUS T⁴ SUPPRESSOR OF CONSTANS 1

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 چغندر قند می‌تواند در شناخت و کنترل مولکولی پدیده بولتینگ کمک کند. در این تحقیق توالی دو ژن مهم گلدهی در چغندر قند بر اساس مشابهت با توالی گیاه مدل آرابیدوپسیس شناسایی شده‌است.

مواد و روش‌ها

بذر گیاه چغندر قند 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 نمونه‌های 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^۵ و آغازگر Oligo dT از روی RNA استخراج شده، ساخته شد.

توالی‌های نوکلئوتیدی چغندر قند موجود در پایگاه داده Genbank با توالی‌های پروتئین‌های *FRIGIDA* و *VERNALIZATION 3* INSENSITIVE گیاه آرابیدوپسیس با نرم‌افزار tblastn مورد جستجو قرار گرفت. دو توالی با شباهت معنی‌دار شناسایی شد. برای ژن *FRI* از نواحی شناسایی شده توالی DNA چغندر قند به شماره AYZW01032897 دو آغازگر FR2F با توالی TACTCAGTCCGTTGGTGTGC و FR2R با توالی ACGTTTTGCCAGAGTGCCA طراحی شد و در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز 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

مجموعه دارای دمین لوسین زیر 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 آل 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*^۱ و *VRN2*^۲ می‌باشد. پروتئین *VIN3*، یک پروتئین حاوی موتیف *PHD*^۳ 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 mRNA *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 مشخصه کروماتین غیرفعال می‌باشند) در کروماتین *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 *BvFLI*^۴ در چغندر قند شناسایی شده‌است (Reeves et al. 2007) در طی اعمال طولانی سرما تحت شرایط نور به تدریج بیانش کاهش می‌یابد. بیان ترکیبی از *BvFLI* در آرابیدوپسیس تراریخت که در اثر جهش دارای ژن

¹ VERNALIZATION INSENSITIVE 3

² VERNALIZATION 2

³ plant homeodomain

⁴ *B. vulgaris* FLC-LIKE 1

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 آرابتیدوپسیس 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 چغندر قند فراهم شد که این قطعه پروتئینی با ۳۳۳ اسیدآمینه را رمز می‌کند. در نهایت قطعه مورد نظر به‌عنوان ژن شبه Frigida در ژنوتیپ جیادای چغندر قند 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 آرابتیدوپسیس می‌شود.



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

CTGCTCTGAGAGGGATGCTG طراحی و در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز بر روی cDNA نمونه گیاهان سرمادهی شده استفاده شد. واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتری تهیه شد که بافر PCR 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 ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت سه دقیقه برای واسرشته‌سازی اولیه و هم‌چنین ۳۵ چرخه شامل دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد واسرشته‌سازی ثانویه، دمای ۵۶ 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 چغندر قند مشابه با توالی ژن *FRI* در آرابتیدوپسیس، 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 جفت‌باز 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 آرابتیدوپسیس تالیانا، ۶۲ درصد با ارزش E برابر ۱۲۶-۲e می‌باشد (شکل ۲). 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-۶۶ است. خانواده شبه *frigida* ترکیبی از پروتئین‌های گیاهی است که مشابه پروتئین FRIGIDA می‌باشد، که در آرابتیدوپسیس بیان می‌شود. این

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	QKAFAELESHRAVSLNPKWKELEAHFHGLEKSLKRRFHELEDQEKEYESKTVEAQEMIEK				206	
Sbjct 22	QKAFAELESRAV+LNPKWKELE HFHGLE+SLKRRFHELEDQEKEYE+KT +AQE++EK				81	
Query 207	RKTAVVAKAQASLEKLQEKRDAAVFAIAIAREKRRVSCVEYSVDNSESQSGTMEETPTN				386	
Sbjct 82	+K AV AKE+A+LE+LQ+KRDAAF I A +K+ + SV Q+ +E++				140	
Query 387	SMISEITSDYISGTVEDGSSEVQ-SADNGNGEVASYPELVKLCCEMDAEGLHNFISDNRK				563	
Sbjct 141	IT D G V+D VQ S GN EV +YP+L+KLC +MD+ GLH F+SDNRK				196	
Query 564	NLASMKEEIPQALNAAADPAQLVDSLKNFYRGDMINLDAKDDSSLLGLRRTICIMLMECL				743	
Sbjct 197	NLAS+KEEIP A AAA+PA LVLDL+ FY + D KKD++LLG+RRRTICIMLMECL				256	
Query 744	SILFMDLDAASVSEIISADVKARAKTIAEANKPKLNGLDMEAGSGNSLEAHAFQLLATF				923	
Sbjct 257	SIL GLD ++ ++S +VK RAKTIAE W P L LDM+A +GNSLEAHAFQLLATF				316	
Query 924	SIASDFNTEELTKLVPLVSRRRQAADLCRSLGLS		1025			
Sbjct 317	+I +DF +EL KL+P+VSRRRQAA+LCRSLGL+			350		

شکل ۲- نتیجه tblastn قطعه توالی یابی شده با پروتئین شبه FRIGIDA آرابتیدوپسیس تالیانا

جدول ۱- میزان شباهت توالی شناسایی شده در چغندر قند با ژن‌های شبه *frigida* در آرابتیدوپسیس و سایر گیاهان

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

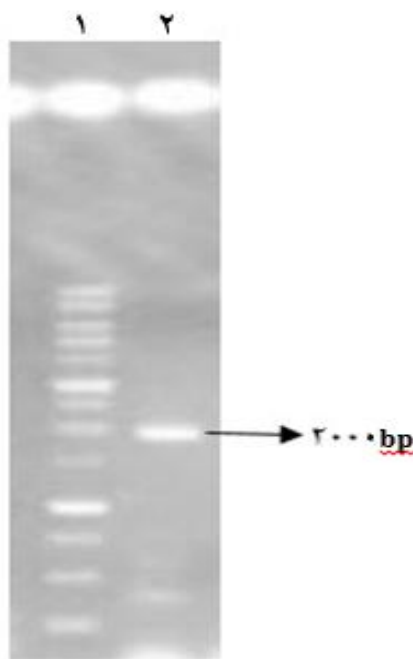
^۱ MsFRI-L در آرابتیدوپسیس ترا ریخت باعث تأخیر در گلدهی حتی در شرایط روز بلند می‌شود (Chao et al. 2013).

شناسایی ژن *VIN3*

از توالی DNA چغندر قند که شباهت معنی‌داری با توالی ژن *VIN3* در گیاه آرابتیدوپسیس 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 انتظار حدود ۲۰۰۰ جفت‌باز بود و با آغازگر پیشرو توالی‌یابی شد.

در غیاب آلل فعالی از *FRI* سطح بیان *FLC* کاهش یافته 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 تنظیم‌کننده گلدهی شناسایی شده‌اند (Irwin et al. 2012). در تحقیقی ژن شبه *FRI* از گیاه شاه نمکی (*Thellungiella halophila*) جداسازی و به گیاه آرابتیدوپسیس دارای ژن مغلوب *fri* منتقل شد، بیان ThFRI باعث تأخیر در گلدهی آرابتیدوپسیس شد که نشان‌دهنده عملکرد مشابه *FRI* در هر دو گیاه است (Fang et al. 2008). همچنین بیان

^۱ Medicago 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	
Sbjct 33	IILC+EMGKERKYTGLTK+KIIE LLK+VSEK + + + P Q+ K+ R				90	
Query 201	KPDNPSRFLVSATN-----TSACNSDNDFFDSST--YCKNSACKARMSKEDVFCRCRTC				353	
Sbjct 91	K DNP SR+++ ATN + +C+S N ST YCKN AC+A + +ED FC+RC+C				150	
Query 354	CICRKYDDNKDPSLWLTCCSEPPFLGDSNMSCHLECAIKHDRSGIARNGLVSQLDGS-F				530	
Sbjct 151	CICRKYDDNKDPSLWLTCSDDPPFEGESCGFSCHLECAFNTEKSGLGKD---KQSEGCCF				207	
Query 531	YCISCGKMNMDLMSWCRKQLIIAKETRRVDILCYRISLSQKLLAGTKKYQKPSDVVDDAIK				710	
Sbjct 208	YC+SCGK N L+ CW+KQL IAKETRRV++LCYR+ L QKLL + KY+ +VVD+A+K				267	
Query 711	LLEGEVGTILGVPVVMGRGIVNRLSSGQEVQRLCGFCCGvv*vnvssnAIAPRANNISPA				890	
Sbjct 268	LE +VG LTG+P+RMGRGIVNRL SG +VQ+LC S IA +++ A				320	
Query 891	LAIPRT-----ITSSINQSWKPLMQHSITVILGS**F-----LIRKRMVWTSLVPSQ				1031	
Sbjct 321	L PR+ T S ++ + S+IV+L S ++ +W VP +				379	
Query 1032	GY*QKRTRYTLTLCILVSSSTNRFVVSGLSSGNKIHFQAI SFN 1154					
Sbjct 380	Y +K I CTL RFVVSGL+ ++ F+ +S++					
	DYPEKST-----CTLFIPNTRFVVSGLAPASEYCFKVVSY S 415					

شکل ۴- نتیجه tblastn قطعه رونوشت توالی یابی شده با پروتئین شبه vernalization5/VIN3 در آرکیدوپسیس تالیانا

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 ۲). نتایج نشان داد که این قطعه شباهت بالایی با پروتئین دوم شبه *VIN3* در سایر گیاهان دوپله‌ای 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 دوپله‌ای یافت شده است (Almutairi and Sadler 2014). ژن *VIN3* در آرکیدوپسیس پروتئینی با ۶۲۰ اسیدآمینو را کد می‌کند. در این پژوهش امکان شناسایی ۸۹۶ جفت‌باز از توالی *VIN3*ی چغندر قند فراهم شد که این قطعه پروتئینی با ۲۹۸ اسیدآمینو را رمز می‌کند. بنابراین قطعه مورد نظر به‌عنوان ژن شبه *3 vernalization insensitive* در ژنوتیپ سوپریمای چغندر قند 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 چغندر قند با توالی پروتئینی *FRI* و *VIN3* در آرکیدوپسیس و سایر گیاهان دوپله‌ای، ژن‌های *FRI* و *VIN3* در چغندر قند 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 چغندر قند ممکن است در شناخت کنترل ژنتیکی بولتینگ کمک نماید.

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 آرکیدوپسیس تالیانا ۴۷ درصد با ارزش E برابر ۹۲-۴e است (شکل ۴). پروتئین‌های خانواده *VIN3* دارای سه دمین مجزا PHD، FN3 و دمین برهمکنش با *VIN3* (VID) هستند (Kim and Sung 2010). موتیف‌های PHD 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. دمین FN3 عملکرد ساختار پیمان‌های را نشان می‌دهد. مکان‌های برهمکنش با مولکول‌های دیگر، توالی اسیدهای آمینه آرژنین-گلوتامات-آسپاراتات (RGD) است که در دمین‌های مختلف FN3 یافت می‌شود. در پروتئین‌های گیاهی، دمین FN3 برای اولین بار از توالی یک گلیکو پروتئین گیاهی^۱ PAP در لوبیا قرمز از طریق مدل ماکو^۲ 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)

جدول ۲- میزان شباهت توالی شناسایی شده در چغندر قند با ژن‌های *VIN3* در آرکیدوپسیس و سایر گیاهان

ارزش E	درصد شباهت	درصد همپوشانی	مشخصات توالی	شماره دستیابی
۴e-۹۲	٪۴۷	٪۹۰	پروتئین شبه <i>vernalization5/VIN3</i>	NP_849471.1
صفر	٪۵۲	٪۹۹	پروتئین <i>3 VERNALIZATION INSENSITIVE</i> در توت سفید	XP_010094225.1
صفر	٪۵۱	٪۹۹	پروتئین دوم شبه <i>VIN3</i> در انگور	XP_002270335.1
صفر	٪۵۱	٪۹۹	پروتئین دوم شبه <i>VIN3</i> 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*, 61: 321-331.
- 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 Sadler 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 *API*, *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.

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

Alimirzaee M¹, Mirzaie asl A^{*1}, Abdollahi MR², Ebrahimi Koulaei H³

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

ABSTRACT

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