استخراج و توالی‌یابی ژن هم‌ساخت *Flowering locus T* (*FT*) در *شاهی* (*Lepidium sativum* L.): بررسی فیلوژنتیکی پروتئین استنباطی آن

محبوبه شیخ بهائی، فرخنده رضانژاد*، حسینعلی ساسان و هادی روان

ایران، کرمان، دانشگاه شهید باهنر کرمان، گروه زیست‌شناسی

تاریخ دریافت: **۹۸/۳/۷** تاریخ پذیرش: ۹۸/۵/۱۲

چکیده

گذر به گل‌دهی، یک تغییر فاز اصلی در چرخه‌ی زندگی گیاهان است. ژن *Flowering locus T* (*FT*)، به عنوان ژن هدف مسیر فتوپریود، گل‌دهی را تحریک می‌کند. پروتئین FT، از اجزای اصلی هورمون گلدهی (فلوریژن) است. این پژوهش با هدف شناسایی و تعیین توالی این ژن در گیاه *شاهی* (*Lepidium sativum* L.) انجام شد. RNA کل از برگ جوان گیاه در مرحله‌ی زایشی، استخراج و برای ساخت cDNA استفاده گردید. آغازگرهای اختصاصی بر اساس توالی ژن‌های همساخت *FT* در گیاهان هم خانواده، طراحی و برای واکنش RT-PCR استفاده گردید. محصول این واکنش پس از خالص سازی، توالی یابی شد. نتایج، نشان دهنده‌ی تکثیر قطعه‌ی مورد نظر از ژن به طول ۲۹۴ نوکلئوتید بود که *LsFT* نامیده و در پایگاه ژن NCBI با شماره‌ی دسترسی KP070729 ثبت شد. این قطعه از ژن، کدکننده‌ی بخش عمده‌ی قلمرو پروتئین متصل شونده به فسفاتیدیل اتانول آمین (PEBP) است که توالی آمینواسیدی آن در گیاهان، به‌میزان بسیار زیادی حفاظت شده است. مقایسه‌ی توالی پروتئین استنباطی LsFT با سایر هم‌ساخت‌های FT نشان دهنده‌ی شباهت بین ۶۱ تا ۹۴ درصدی این توالی با توالی‌های مشابه بود. مطابق این نتایج، LsFT نیز به عنوان هومولوگ FT در تحریک گل‌دهی نقش دارد و می‌تواند به‌عنوان ژن محرک گل‌دهی در شاهی عمل کند.

واژه های کلیدی: هم‌ردیفی، پروتئین، فیلوژنی، گل‌دهی، RT-PCR

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۳۴۳۱۳۲۲۰۹۰، پست الکترونیکی: frezanejad@uk.ac.ir

مقدمه

بمنظور همزمان کردن گل‌دهی با شرایط مطلوب و درنتیجه، به حداکثر رساندن موفقیت زایشی گیاه، باید گذر از نمو رویشی به زایشی تنظیم شود. گل‌دهی به‌وسیله‌ی مسیرهای ژنتیکی متأثر از محرک‌های محیطی (از قبیل دما و طول روز) و سطح نمو گیاه، کنترل می‌شود. بر اساس مطالعات انجام شده، مسیرهای محرک گل‌دهی موجب افزایش بیان مجموعه‌ای از ژن‌های میانجی گل‌دهی شامل *FLOWERING LOCUS T* (*FT*)، *TWIN SYSTER* (*TSF*)، *OF FT* و *SUPPRESSOR OF CONSTANS1* (*SOC1*)، *AGAMOUS LIKE 24* (*AGL24*) و *LEAFY* (*LFY*) کاهش بیان بازدارنده‌های گل‌دهی از قبیل *FLOWERING LOCUS C* (*FLC*)، *SHORT VEGETATIVE PHASE* (*SVP*) و *TERMINAL FLOWER 1* (*TFL1*) می‌شوند و بنابراین تأیید کننده‌ی آمادگی گیاه برای گل‌دهی هستند (۱۶).

ژن *FT*، اولین مرتبه در سال ۱۹۹۹ از گیاه *آرابیدوپسیس تالیانا* جداسازی شد (۸). این ژن، همچنین در بسیاری دیگر از خانواده‌های گیاهی، مطالعه و شناسایی شده است (۱۷). *FT* به‌عنوان ژن موثر در تحریک گل‌دهی زودرس در گیاهان، شناخته شده است. در آرابیدوپسیس، پروتئین FT،

در شرایط دوره‌ی نوری روز بلند از برگ‌ها به سمت رأس شاخساره حرکت می‌کند و در آن‌جا با *FLOWERING LOCUS D* (*FD*) تشکیل کمپلکس می‌دهد. کمپلکس FT-FD به‌طور مستقیم یا غیرمستقیم، ژن‌های گلدهی از قبیل *APETALA1* (*AP1*) را فعال می‌کند و سرانجام باعث تحریک گلدهی می‌شود. به‌علاوه، ژن FT، می‌تواند تغییرات نموی دانه، تخمدان و برخی قسمت‌های دیگر گیاه را نیز تنظیم کند (۱۶). در سال ۲۰۰۷، Corbesier و همکاران اعلام کردندکه هورمون گل‌دهی (فلوریژن) از جنس پروتئین FT می‌باشد. مطالعات بعدی نیز نشان دادند که پروتئین کد شده به‌وسیله‌ی ژن *FT*، جزء اصلی هورمون گل‌دهی است (۱۶).

FT در *آرابیدوپسیس* روی کروموزوم‌های شماره‌ی یک، دو، چهار و پنج قرار دارد و دارای چهار اگزون و سه اینترون است. طول ناحیه‌ی کدکننده‌ی آن به‌طور تقریبی، ۵۲۸ نوکلئوتید می‌باشد (۱۵).

خانواده ای کوچک از ۶ ژن شبه *FT* در *آرابیدوپسیس* شناسایی شده‌اند که می‌توانند عملکردهای مرتبطی در تحریک گل‌دهی داشته باشند. پروتئین‌های کدشده به وسیله ی این ژن ها شامل یک ناحیه اتصال به فسفاتیدیل اتانول آمین (PEBP: Phosphatidyl Ethanolamin Binding Protein) می‌شوند. عملکرد فیزیولوژیکی پروتئین‌های PEBP به‌طوروسیعی در جانوران مطالعه شده است و تصور می شود که در آبشارهای سیگنالینگ و از طریق برهم‌کنش‌های پروتئین–پروتئین عمل می‌کنند (۲). پروتئین‌های FT-Like علاوه بر نقش مؤثرشان در کنترل زمان گل‌دهی، باعث پیشبرد فرآیندهای نموی دیگر شامل رشد، کنترل سازمان‌یابی گیاه، تنظیم میوه و تشکیل غده می‌شوند (۱۱).

نمونه‌ی مورد مطالعه، گیاه شاهی با نام علمی *Lepidium sativum* L.، از خانواده‌ی شب بو (Brassicaceae)، گیاهی علفی، یکساله، کمی کرک دار، با ارتفاع ۳۰–۵۰ سانتیمتر می‌باشد. گل‌های این گیاه، سفید و مجتمع در گل‌آذین‌های خوشه‌ی طویل و میوه‌ی آن خورجینک است (۶). بذر شاهی دارای مقادیر بالایی از آهن و کلسیم می‌باشد. همچنین این بذر به‌دلیل محتوای بالای ترکیبات فنلی به میزان زیادی دارای خاصیت آنتی اکسیدانی است (۹). به‌علاوه، مطالعاتی در مورد کاربرد بذر این گیاه به عنوان داروی مسکن، ضد اضطراب و ضد درد که ناشی از میزان بالای آلکالوئیدها در آن می‌باشد انجام شده است (۱۴).

ژن FT تاکنون در برخی از گونه‌های خانواده‌ی شب بو شناسایی و تعیین توالی شده است (مواد و روش‌ها را ملاحظه نمایید). همچنین بررسی‌های مروری انجام شده، هیچ گزارش منتشر شده‌ای را در مورد شناسایی این ژن در گیاه مورد مطالعه نشان نداد. بنابراین با توجه به اهمیت پدیده‌ی گل‌دهی در گیاهان گل‌دار و حفظ بقای نسل و نیز نقش اساسی ژن FT در پیش‌برد این پدیده، تلاش در جهت شناسایی و توالی‌یابی این ژن در گیاه مورد مطالعه که در خانواده‌ای مدل قرار دارد و بذر آن نیز از نظر دارویی حائز اهمیت است مفید و هدف تحقیق حاضر می‌باشد.

مواد و روشها

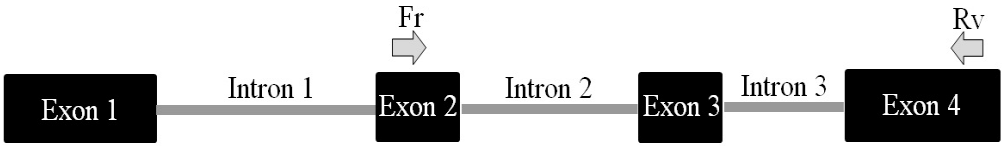
بذر *شاهی* از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه شد. در مرداد ماه سال ۱۳۹۳، بذرها در گلدان‌های حاوی پرلیت در شرایط گلخانه ای با دمای ۲۵°C و دوره‌ی نوری ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی کشت شدند. گیاهان درحال رشد، به صورت یک روز در میان با ۲۵ میلی لیتر محلول هوگلند x ۱/۲ تغذیه شدند. پس از ظاهرشدن گل‌ها، نمونه برداری از برگ‌های جوان، جهت مطالعات مولکولی انجام شد.

از آن‌جا که توالی ژن مورد نظر نامشخص بود، آغازگرها بر اساس توالی‌های ژنی موجود از سایر گیاهان هم جنس و هم خانواده، و بر اساس اصول مرسوم طراحی گردیدند

(Dieffenbach *et al.*, 1993). بدین منظور توالی ژن همساخت FT در *آرابیدوپسیس تالیانا* (Accession no: AB027504.1)، *آرابیدوپسیس هالری* (Accession no: KC505460.1)، *یوترما* (Accession no: HQ667761.1)، *خردل زرد* (Accession no: JN786314.1)، *خردل هندی* (Accession no: JN786311.1)، کلزا (Accession no: FJ848918.1)، *خردل سیاه* (Accession no: JN786309.1)، *کلم* (Accession no: EU984306.1)، *شلغم* (Accession no: JN699545.1) و *خردل سفید* (Accession no: FJ613328.1)از بانک ژن NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) گرفته شد. هم‌ردیفی توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار ClustalW2 صورت گرفت. براساس نقاط حفاظت شده‌ی موجود، آغازگرهایی با استفاده از نرم‌افزار GeneRunner طراحی گردیدند و سپس مناسب بودن آن‌ها به وسیله‌ی نرم‌افزار BLAST مورد بررسی قرار گرفت. آغازگرها به گونه‌ای طراحی شدند که بتوان در RT-PCR، بیشترین طول ناحیه‌ی کدکننده‌ی ژن را به‌دست آورد و از محصول آن‌ها برای تعیین توالی استفاده کرد. در شکل۱، طرح شماتیک ژن *FT* و محل تقریبی قرار گرفتن آغازگرهای پیش‌برنده و برگرداننده نشان داده شده است. ساخت آغازگرهای طراحی شده توسط شرکت پیشگام صورت گرفت. توالی آغازگرها به صورت زیر است:

Fr-LsFT< 5′-CAGATGTTCCAAGTCCTAGC -3′ >

Rv-LsFT< 5′- AGCCACTCTCCCTCTGACA-3′ >



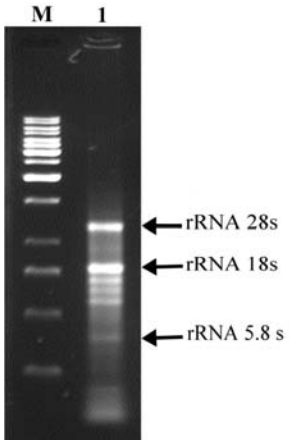
شکل ۱- طرح شماتیک ژن FT و محل قرار گرفتن آغازگرهای پیش‌برنده و برگرداننده روی آن.

RNA کل از برگ‌های جوان در مرحله‌ی زایشی با استفاده از محلول استخراج RNA (GeneAll, RiboEx, Total RNA isolation solution, Korea) و براساس دستورالعمل شرکت سازنده، استخراج شد. برای بررسی حضور، ارزیابی خلوص و تعیین غلظت RNA از روش‌های اسپکتوفتومتری در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر و الکتروفورز افقی روی ژل آگارز ۱٪ استفاده شد (۱۳).

تهیه‌ی cDNA با استفاده از کیت ساخت cDNA شرکت فرمنتاز (RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit) و مطابق دستورالعمل آن انجام شد. بمنظور شناسایی و تعیین توالی ژن هم‌ساخت FT از RT-PCR استفاده شد. برای انجام این واکنش، مقدار ۲۰۰ نانوگرم از cDNA، ۱ میکرولیتر از آغازگرهای پیش‌برنده و برگرداننده با غلظت ۱۰ پیکومولار و ۱۲/۵ میکرولیتر از PCR MasterMix (SinaClone) درون لوله ۰/۲ میکرولیتری فاقد DNase و RNase ریخته و با آب دوبارتقطیر استریل به حجم ۲۵ میکرولیتر رسانده و با پیپت کردن، به طور کامل مخلوط شد. تکثیر در دستگاه ترموسایکلر مدل PTC (MJ 1148 Mini Personal Termal Cycler BioRad, USA) و با مرحله‌ی واسرشتگی اولیه به مدت ۱ دقیقه در دمای ۹۵°C آغاز گردید و با انجام ۳۲ چرخه با دمای واسرشتگی ۹۴°C به مدت ۱ دقیقه، دمای اتصال ۵۵°C به مدت ۱ دقیقه و دمای طویل شدن ۷۲°C به مدت ۱ دقیقه ادامه یافت و با مرحله طویل شدن به مدت ۷ دقیقه در دمای ۷۲°C به اتمام رسید. پس از انجام PCR، حضور و کیفیت محصول بر روی ژل آگارز ۱٪ بررسی شد.

بمنظور تعیین توالی قطعه‌ی تکثیر شده‌ی ژن از طریق PCR، ۴۰ میکرولیتر از محصول PCR بهمراه ۲۰ میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای پیش‌برنده و برگرداننده به شرکت تکاپوزیست فرستاده شد.

نتایج حاصل از تعیین توالی ابتدا با نرم‌افزارهایBLAST و ClustalW هم‌ردیف شده وسپس توالی اسید آمینه‌ای استنباطی و توالی‌های برخی از همساخت‌هایFT موجود در بانک ژن NCBI با استفاده از نرم‌افزار MEGA 6.06(6140226) مقایسه و میزان شباهت آن‌ها بررسی گردید. همچنین با استفاده از ابزار PDBsum (http://www.ebi.ac.uk/pdbsum)، ساختار دوم شبیه ترین پروتئین به LsFT که از طریق کریستالوگرافی اشعه‌ی x تعیین ساختار شده است گرفته و بخش‌های مختلف آن بررسی گردید.

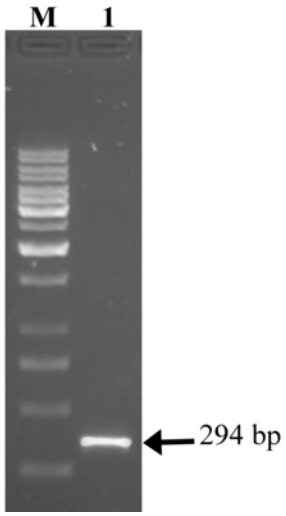


شکل ۲- نیم‌رخ الکتروفورزیRNA کل: این RNA از برگ جوان شاهی در مرحله‌ی زایشی استخراج شده است. 1: RNA کل دارای سه باند واضح RNAهای ریبوزومی 28s، 18s و 5.8s. M: نشانگر مولکولی DNA 1kb (Fermentase).

محصول PCR حاصل از آغازگرهای *Fr-FT* و *Rv-FT* به طور کامل توالی یابی گردید. به‌گونه‌ای که توالی آغازگرهای پیش‌برنده‌ی*Fr-FT* و برگرداننده *Rv-FT* نیز در توالی خوانده شده قابل شناسایی است (شکل ۴). توالی

نتایج

جذب RNA ها در طول موج ۲۶۰ نانومتر به طور متوسط ۰/۰۶–۰/۰۵ و نسبت جذب ۲۶۰/۲۸۰ نانومتر در حدود ۲–۱/۹ بود که نشان‌دهنده‌ی مناسب بودن غلظت و کیفیت RNAهای استخراجی است. هم‌چنین مشاهده‌ی سه باند پررنگ مربوط به RNA های ریبوزومی روی ژل آگاروز ۱٪، تأییدکننده‌ی کیفیت مطلوب RNA استخراج شده برای انجام RT-PCR است (شکل ۲).پس از بهینه سازی واکنشPCR، تک باند اختصاصی مربوط به تکثیر قطعه‌ی ۲۹۴ نوکلئوتیدی روی ژل آگارز مشاهده شد. این قطعه مربوط به نیمه‌ی انتهایی ناحیه‌ی کد کننده‌ی ژن است (شکل ۳).



شکل ۳- نیم‌رخ الکتروفورزی محصول RT-PCR: باند مورد مشاهده، تکثیر ناحیه‌ی مورد نظر از ژن *LsFT* را نشان می‌دهد. 1: باند مربوط به قطعه‌ی ۲۹۴ جفت بازی سنتزشده با استفاده از آغازگرهای پیش‌برنده‌ی *FrFT* و برگرداننده‌ی *RvFT*. M: نشانگر مولکولی DNA 1kb (Fermentase).

خوانده شده مربوط به بخش‌هایی از اگزون ۲ (۴۹ نوکلئوتید)، طول کامل اگزون ۳ (۴۱ نوکلئوتید) و بخش اعظم اگزون ۴ (۲۰۴ نوکلئوتید) است. نتایج حاصل از BLAST، نشان دهنده‌ی شباهت بسیار بالای این قطعه با سایر ژن‌های همساخت*FT* است. میزان شباهت این قطعه

با همساخت‌هایش در خانواده‌ی شب بو به این شرح است: *آرابیدوپسیس هالری* ٪۹۱، *آرابیدوپسیس تالیانا* ٪۹۰، *یوترما* ٪۸۹، *خردل هندی*، *خردل زرد* و *خردل سیاه* ٪۸۷، *شلغم* و *خردل سفید* ٪۸۶، *کلم* ٪۸۵. بنابراین این توالی مربوط به ژن همساخت FT در گیاه *شاهی* (*Lepidium sativum*) است. از این‌رو این ژن *LsFT* نام‌گذاری شد. طول باند مشاهده شده پس از توالی یابی، ۲۹۴ نوکلئوتید تعیین شد که مشابه با طول این قطعه از ژن در سایر گیاهان خانواده‌ی شب بو که از آن‌ها برای طراحی آغازگر استفاده گردید، می‌باشد.

پروتئین استنباطی این قطعه از ژن *LsFT*، دارای ۹۷ اسیدآمینه است (شکل ۴) که دارای بیش‌ترین شباهت با AhgFT در *آرابیدوپسیس هالری* به میزان ٪۹۴ می‌باشد. طول این قطعه از پروتئین LsFT با متناظر آن در سایر پروتئین‌های همساخت FT متعلق به خانواده‌ی شب بو برابر است. بمنظور بررسی میزان شباهت محصول ژن *LsFT* با سایر هم‌ساخت‌های *FT*، توالی پروتئین استنباطی آن با توالی سایر هم‌ساخت‌ها در گونه‌های دیگر، مقایسه گردید به‌این منظور درخت فیلوژنتیکی این پروتئین‌ها با استفاده از نرم افزار MEGA رسم شد (شکل ۵).

به‌علاوه، با استفاده از ابزار PDBsum (http://www.ebi.ac.uk/pdbsum)، ساختار دوم شبیه ترین پروتئین به LsFT از نظر توالی (ساختار اول) که از طریق کریستالوگرافی اشعه‌ی x تعیین ساختار شده است گرفته شد و بخش‌های مختلف آن بررسی گردید.

این ساختار مربوط به پروتئین FT در گیاه *آرابیدوپسیس تالیانا* است که از نظر توالی (ساختار اول)، ٪۹۰.۶ با پروتئین LsFT شباهت دارد (شکل ۶).

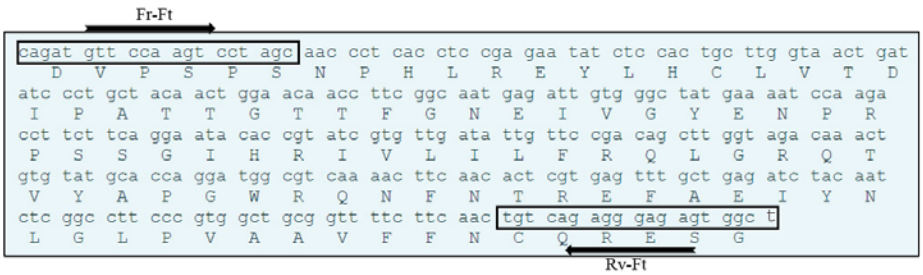
در نهایت، توالی نوکلئوتیدی و همچنین توالی پروتئین استنباطی این ژن در بانک ژن NCBI با شماره‌ی دسترسی KP070729 ثبت گردید.

بحث

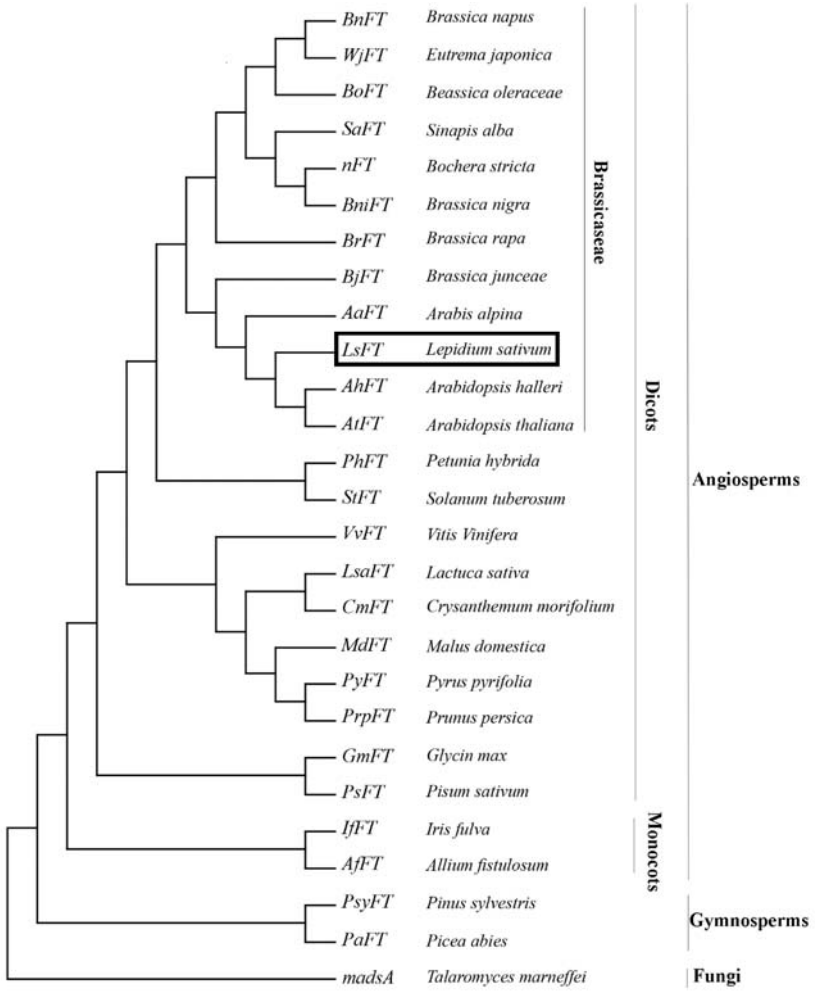
در گیاه *آرابیدوپسیس*، پروتئین FLOWERIMG LOCUS T (FT) که به‌عنوان یکی از اجزای فلوریژن، شناخته شده است نقشی اصلی در شروع گل‌دهی دارد. به‌نظر می‌رسد که ژن‌های *FT-Like* در تنظیم گذر به گل‌دهی در همه‌ی نهان‌دانگان شناخته شده تا این کنون شرکت داشته باشند. بنابراین نقش FT در وقوع گل‌دهی، حفاظت شده است.

مشاهده‌ی تک باند در الکتروفورز در درجه‌ی اول بیانگر طراحی و عملکرد صحیح آغازگرها و مناسب بودن غلظت مواد به‌کار رفته در PCR است. هم‌چنین برنامه‌ی PCR مناسب (بخصوص دمای اتصال) از جمله عوامل موفقیت در کسب تک باند اختصاصی است (۱۳).

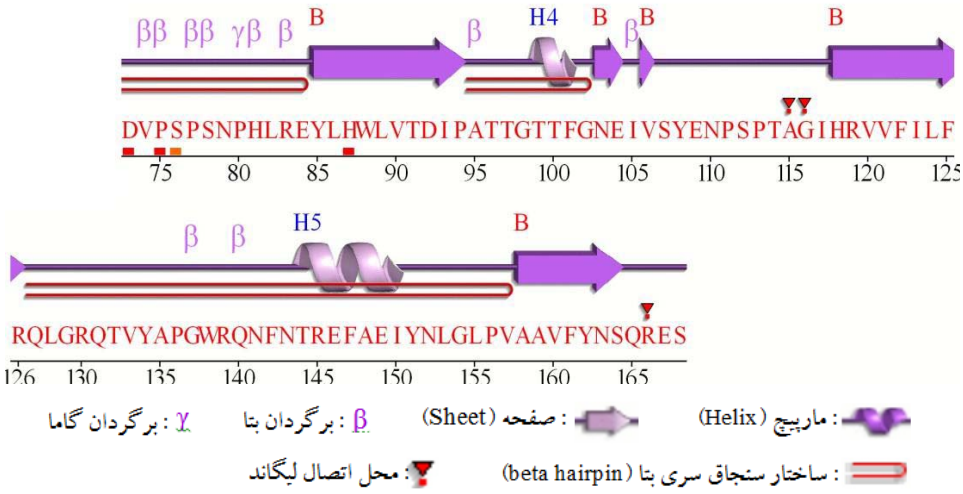
قطعه‌ی توالی‌یابی شده از هم‌ساخت *FT* در شاهی، مربوط به اگزون‌های دو تا چهار از این ژن است. تحقیقات نشان داده‌اند با وجود این‌که طول اینترون‌های *FT* در گونه‌های گیاهی مختلف تا حد زیادی با هم متفاوت است اما به‌نظر می‌رسد که طول اگزون‌های دو و سه در گیاهان متفاوت، حفاظت شده باشد (۵ و۷).



شکل ۴- توالی ثبت شده از ژن هم‌ساخت *FT* و پروتئین استنباطی آن در گیاه *شاهی* (*Lepidiumsativum* L.) در پایگاه NCBI: توالی آغازگر پیش‌برنده در ابتدای رشته و آغازگر برگرداننده در انتهای رشته مشخص شده است.



شکل ۵- درخت فیلوژنتیکی پروتئین‌های همساخت FT در گونه‌های مختلف: در این شکل، LsFT درون کادر قرار گرفته است.



شکل ۶- ساختار دوم بخش تعیین توالی شده از پروتئین LsFT که در آرابیدوپسیس تالیانا مشخص شده است.

طول کامل پروتئین FT در اکثر توالی‌های پروتئینی ثبت شده از این ژن در سایت NCBI که به خانواده‌ی شب بو تعلق دارند، ۱۷۵ آمینو اسید است. در بین توالی‌های آمینواسیدی کامل ثبت شده از پروتئین FT در این سایت، توالی مربوط به نوعی قارچ به نام *Talaromyces marneffei* دارای کم‌ترین طول (۱۰۵ آمینواسید) و توالی مرتبط با توت فرنگی (*Fragaria vesca*) دارای بیشترین طول (۱۹۹ آمینواسید) می‌باشد (۱۰و۴). همولوگ FT در قارچ *Talaromyces marneffei*، در مرحله‌ی گذر از فاز میسلی به فاز مخمری نقش عمده‌ای دارد، به‌گونه‌ای که بیان آن در این مرحله‌ی افزایش می‌یابد (۴).

بررسی نحوه‌ی قرارگیری گونه‌های گیاهی مختلف در درخت فیلوژنی رسم شده، نشان می‌دهد که گیاهان هم‌خانواده‌ی *Lepidium sativum*، همگی در شاخه‌های مجاور این گیاه قرار گرفته‌اند و این مطلب، تأییدی بر صحت توالی خوانده شده برای ژن *FT* در این گیاه می‌باشد.

با توجه به ناحیه‌ای که توالی یابی شده است و شباهت بالای آن با سایر همساخت‌های FT می‌توان نتیجه گرفت که ناحیه‌ی حفاظت شده‌یPEBP، در این پروتئین نیز وجود دارد. آنالیز PEBPها و کمپلکس‌هایی که با فسفواتانول آمین‌ها تشکیل می‌دهند، یک جایگاه مشخص و شدیداً حفاظت شده‌ی اتصال آنیون را تشخیص داده است که می‌تواند برای تشخیص ریشه‌های فسفریله‌ی این فسفواتانول آمین‌ها به‌کار رود. بررسی موتانت‌های فاقد این جایگاه، نشان دهنده‌ی اهمیت وجود آن برای عمل‌کرد این دسته از پروتئین‌ها میباشد (۱۲). هم‌چنین وجود یک صفحه‌ی بتا بزرگ مرکزی که در یک طرف آن، جایگاه اتصال آنیون قرار دارد، ویژگی بارز ساختار دوم پروتئین‌های خانواده‌ی PEBP می‌باشد که همه‌ی این بخش‌ها در ساختار گرفته شده توسط ابزار PDB sum قابل مشاهده‌اند (شکل ۷).

نتیجه‌گیری

مفهوم فلوریژن، اولین بار به‌عنوان محرک گل‌دهی در سال ۱۹۳۶ توسط Chailakhyan معرفی شد (۱). اما شواهدی که نشان می‌دهند پروتئین FT در *آرابیدوپسیس* به‌عنوان یک مولکول سیگنالینگ برای تحریک گل‌دهی عمل می‌کند، از حدود یک دهه قبل مشخص شد. مطابق این تحقیقات، FT همان فلوریژن یا حداقل قسمتی از فلوریژن می‌باشد. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که *LsFT*، همولوگ *FT* را در *شاهی* (*Lepidium sativum*) کد می‌کند و بنابراین می‌تواند به‌عنوان یک فعال کننده‌ی گل‌دهی عمل نماید. ۲۹۴ نوکلئوتید از ناحیه‌ی کدکننده‌ی ژن هم‌ساخت *FT* توالی یابی و پس از مثبت بودن نتایج BLAST، این ژن به نام *LsFT* نام‌گذاری شد. مقایسه‌ی توالی پروتئین استنباطی LsFT با سایر هم‌ساخت‌های FT نشان دهنده‌ی شباهت بین ۶۱ تا ۹۴ درصدی این توالی با توالی‌های مشابه بود. تعیین توالی کامل mRNA ژن *LsFT* با استفاده از روش RACE-PCR، شناسایی توالی پروموتور این ژن و بررسی بیان آن در دوره‌های نوری بلند و کوتاه می‌تواند به تشخیص بهتر رابطه‌ی این ژن با دیگر هم‌ساخت‌هایش، چگونگی تنظیم عملکرد و نقش آن در القای گل‌دهی کمک کند.

منابع

1- Chailakhyan, M.K. 1936 . New facts in support of the hormonal theory of plant development. USSR Academy of Sciences. 13:79-83.

2- Chardon, F., and Damerval, C. 2005 . Phylogenomic analysis of the PEBP gene family in cereals. Journal of Molecular Evolution. 61:579-590.

3- Dieffenbach, C., Lowe, T., and Dveksler, G. 1993 . General concepts for PCR primer design. PCR Methods and Applications. 3:30-37.

4- Ence, Y.W. N., Chow G., Wang; Patrick C. Y., Woo; Susanna K. P., Lau; Kwok-Yung, Yuen; Xiaorong, Lin; James J., Cai. 2014 . Signature Gene Expression Reveals Novel Clues to the Molecular Mechanisms of Dimorphic Transition in Penicillium marneffei. PLoS Genetics. 10:1-13.

5- Fukuda, M., Matsuo, S., Kikuchi, K., Kawazu, Y., Fujiyama, R., and Honda, I. 2011 . Isolation and functional characterization of the *FLOWERING LOCUS T* homolog, the *LsFT* gene, in lettuce. Journal of Plant Physiology. 168:1602-1607.

6- Ghahraman, A. 1977 . Flora of Iran. Research Institute of Forests and Rangelands. Tehran (in persian).

7- Harig, L., Beinecke, F.A., Oltmanns, J., Muth, J., Müller, O., Rüping, B., Twyman, R.M., Fischer, R., Prüfer, D., and Noll, G.A. 2012 . Proteins from the *FLOWERING LOCUS T-like* subclade of the PEBP family act antagonistically to regulate floral initiation in tobacco. The Plant Journal. 72:908-921.

8- Kardailsky, I., Shukla, V.K., Ahn, J.H., Dagenais, N., Christensen, S.K., Nguyen, J.T., Chory, J., Harrison, M.J., and Weigel, D. 1999 . Activation tagging of the floral inducer FT. Science. 286:1962-1965.

9- Kasabe, P.J., Patil, P.N., Kamble, D.D., and Dandge, P.B. 2012 . Nutritional, elemental analysis and antioxidant activity of garden cress (*Lepidium sativum* L.) seeds. International Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences. 4:392-395.

10- Ning, G.G., Wang,Z., Zuo,Y. and Bao,M.Z. 2010 . flowering locus T protein [Fragaria vesca]. National Center for Biotechnology Information. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/CBY25183.25181. 1 December 2010.

11- Pin, P., and Nilsson, O. 2012 . The multifaceted roles of FLOWERING LOCUS T in plant development. Plant, Cell & Environment. 35:1742-1755.

12- Pnueli, L., Gutfinger, T., Hareven, D., Ben-Naim, O., Ron, N., Adir, N., and Lifschitz, E. 2001 . Tomato SP-interacting proteins define a conserved signaling system that regulates shoot architecture and flowering. The Plant Cell. 13:2687-2702.

13- Sambrook, J., Russell, D.W., and Russell, D.W. 2001 . Molecular cloning: a laboratory manual (3-volume set). Cold spring harbor laboratory press, New York.

14- Shukla, A., Singh, C.S., and Bigoniya, P. 2011 . Phytochemical and CNS activity of Lepidium sativum Linn seeds total alkaloid. Der Pharmacia Lett. 3:226-237.

15- Theologis, A., Ecker, J.R., Palm, C.J., Federspiel, N.A., Kaul, S., White, O., Alonso, J., Altafi, H., Araujo, R., and Bowman, C.L. 2000 . Sequence and analysis of chromosome 1 of the plant *Arabidopsis thaliana*. Nature. 408:816-820.

16- Turck, F., Fornara, F., and Coupland, G. 2008 . Regulation and identity of florigen: FLOWERING LOCUS T moves center stage. Annual Review of Plant Biology. 59:573-594.

17- Xu, F., Rong, X., Huang, X., and Cheng, S. 2012 . Recent advances of *flowering locus T* gene in higher plants. International Journal of Molecular Sciences. 13:3773-3781.

Isolation and Sequencing of *Flowering locus T* (*FT*) homologous gene in *Lepidium sativum* L.: a Phylogeny study of its deduced protein

Sheikhbahaei M., Rezanejad F., Sasan H. and Ravan H.

Dept. of Biology, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, I. R. of Iran.

Abstract

The transition to flowering is a major phase change in life cycle of plants. *Flowering locus T* (*FT*) gene is the final signaling target gene of the photoperiod pathway that promotes flowering. FT protein is a major component of flowering hormone (florigen). This study was performed to identify *FT* homologus gene in garden cress (*Lepidium sativum* L.). Total RNA was isolated from young leaf tissues of *L. sativum* in reproductive phase and was used for first-strand cDNA synthesis. The specific primers were designed based on nucleotide sequence alignment of *FT* homologus genes from other plants and were used in RT-PCR. The RT-PCR product were purified and sequenced. The results indicated amplification of 294 nucleotides fragment that was named *LsFT* and registered in NCBI database with access number KP070729. This part of *FT* gene codes major part of phosphatidyl ethanolamine-binding Protein (PEBP) domain of FT protein that is conserved in amino acid sequence in many plants. Comparison of this deduced protein with FT homologous proteins from other species showed %61 to %94 identity. According to these results, LsFT can play a similar role as FT in flowering induction and could act as a flowering inducer gene in *Lepidium sativum* L.

Key words: Alignment, Flowering, Phylogeny, Protein, RT-PCR