



بررسی الگوی بیانی ژن PIC2 مؤثر در گلدهی زعفران (*Crocus sativus* L.)

ایمان یوسفی جوان^{۱*} و فائزه قراری^۲

تاریخ پذیرش: ۲۸ دی ۱۳۹۵

تاریخ دریافت: ۱۸ مرداد ۱۳۹۵

یوسفی جوان، ا. و قراری، ف. ۱۳۹۶. بررسی الگوی بیانی ژن PIC2 مؤثر در گلدهی زعفران (*Crocus sativus* L.). زراعت و فناوری زعفران، ۵(۱): ۷۳-۹۰.

چکیده

زعفران (*Crocus sativus* L.) گیاهی است که به منظور استفاده از گل و کلاله قرمز رنگ گل، با اهداف زیادی از جمله مصرف در صنایع غذایی، رنگ و پزشکی کشت می‌شود. به علت با ارزش بودن گل، شناخت ژن‌های شرکت‌کننده در مسیر گلدهی یکی از مهم‌ترین مسائل این گیاه است، که با روشن شدن این مسیر می‌توان ابتکار عمل در نظم گلدهی و تا حدودی زمان گلدهی و عوامل محیطی مؤثر بر آن را در دست گرفت. برای کشف و شناخت بهتر از مکانیزم مولکولی مؤثر در آغاز گلدهی گل، به‌طور اختصاصی ژن و میزان بیان ژن (PIC2) Pistillata-like MADS box مورد بررسی قرار گرفت. توالی این ژن همسانی بالایی با اعضای خانواده جعبه MADS (از عوامل رونویسی در بیان پروتئین‌های کنترل اندام‌های گل) دارند. در این پژوهش، ژن PIC2 با استفاده از منابع بیوانفورماتیک، مورد مطالعه قرار گرفت و آغازگرها جهت تکثیر این ژن طراحی شدند. در ادامه، cDNA آن توسط آنزیم رونوشت بردار معکوس ساخته شد و به عنوان الگو برای تکثیر ژن PIC2 در واکنش PCR مورد استفاده قرار گرفت. میزان بیان ژن PIC2 در کلاله گل بیشترین و در بنه زعفران کمترین مقدار را نشان داد. طی واکنش PCR قطعه‌ای به طول ۹۰۰ جفت باز از cDNA و قطعه‌ای به طول ۱۳۰۰ جفت باز از DNA ژنومی تکثیر یافت. این قطعه ژنی، یک پروتئین ۲۱۰ اسیدآمینوای را رمز می‌کند که دارای منطقه با توالی جعبه MADS می‌باشد. با تجزیه و تحلیل ساختار مولکولی پروتئین رونوشت شده و بر اساس مدل‌سازی همولوژیکی، شکل فضایی آن نشان داد که این پروتئین ساختاری منظم دارد.

کلمات کلیدی: بیان ژن، زعفران، ژن Pistillata-like MADS box، جعبه MADS، مدل‌سازی همولوژیکی.

مقدمه

گیرد (Fernandez, 2004). کلاله این گیاه به‌علت دارا بودن کروسین، پیکروکروسین و سافرانال، در صنایع دارویی، تغذیه‌ای و آرایشی طرفداران زیادی دارد. این گیاه به‌عنوان گرانترین محصول کشاورزی و دارویی جهان جایگاه ویژه‌ای در بین محصولات صنعتی و صادراتی ایران داشته و یکی از محصولات مهم استراتژیک کشاورزی به‌شمار می‌رود. علیرغم وجود مواد مؤثره در گل زعفران، تحقیقات بسیار اندکی بر روی مسیرهای گلدهی و ژن‌های مؤثر بر آن صورت گرفته و بیشتر تحقیقات معطوف به بالا بردن عملکرد از طریق عملیات به‌زراعی است.

زعفران (*Crocus sativus* L.) گیاهی پایا، بدون ساقه با ارتفاع ۱۰ تا ۳۰ سانتی‌متر و دارای غده‌های پیاز مانند توپر به نام بنه است. تکثیر زعفران به‌علت تریپلوئید بودن و عقیمی، از طریق جداسازی بنه‌های دختری از بنه‌های مادری انجام می‌-

۱- استادیار گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربت حیدریه

۲- کارشناس ارشد ژنتیک و اصلاح دام، کارشناس نشریات، دانشگاه تربت حیدریه

(*) نویسنده مسئول: L.javan@torbath.ac.ir

DOI: 22048/jsat.2017.63141.1200

گل در گیاهان گلدار ضامن بقای گیاه به شمار می‌آید، چرا که در ادامه تشکیل گل، بذر تولید می‌گردد. برای انتقال به فاز گلدهی در ابتدا باید گیاه رشد رویشی خود را تکمیل کرده و سپس از طریق دریافت علائم و مسیرهای چندگانه وارد این مرحله از رشد خود شود، گیاهان از لحاظ واکنش به طول روز متفاوت عمل کرده و انتقال به مرحله گلدهی توسط علامت‌ها و مسیرهای چندگانه تنظیم می‌شود. اخیراً ژن‌هایی مؤثر در تشکیل اندام‌های گل شناسایی شده‌اند. چنین مباحثی، روزنه جدیدی بر نظارت ژنتیکی نمو تولید مثلی گیاه باز می‌کنند (Kafi, 2004)؛ بنابراین در گیاهی مثل زعفران به علت با ارزش بودن گل آن، شناخت ژن‌های شرکت‌کننده در این مسیر، یکی از مسائل مهم در این گیاه بوده که با روشن شدن این مسیر می‌توان ابتکار عمل در نظم گلدهی و تا حدودی زمان گلدهی و عوامل محیطی مؤثر بر آن را در دست گرفت (Kafi et al., 2010).

علائم نمو که منجر به گل‌انگیزی می‌شود، شامل عوامل درونی نظیر روندهای سیرکادین، تغییر فاز، هورمون‌ها و عوامل بیرونی نظیر دوره‌ی نوری و بهاره‌سازی می‌باشند که دو مکانیسم زیربنایی پاسخ‌های فصلی هستند؛ بنابراین در گیاهی مثل زعفران به علت با ارزش بودن گل آن شناخت ژن‌های شرکت‌کننده در این مسیر یکی از مسائل مهم در این گیاه است که با روشن شدن این مسیر می‌توان ابتکار عمل در نظم گلدهی و تا حدودی زمان گلدهی و عوامل محیطی مؤثر بر آن را در دست گرفت (Kafi et al., 2010). مطالعه مراحل نمو اندام‌های زایشی بعد از مرحله لقاح حائز اهمیت است. چرا که تحقیقات انجام گرفته بر روی زعفران نشان داده است که بسیاری از متابولیت‌های ثانویه، در مراحل مختلف نمو گل تولید می‌گردند. ژن‌هایی که هویت اندام گل را کنترل می‌کنند، انواع ژن‌های homo box هستند. اکثر ژن‌های homo box موجود در

گیاهان دارای جعبه MADS می‌باشند. جهش در این ژن‌ها، هویت اندام گل را که در دو حلقه مجاور هم تشکیل می‌شوند، تغییر می‌دهد (Kafi et al., 2010).

ژن‌های MADS-box علاوه بر تعیین نوع اندام گل و تکامل آن در گیاه، در فعالیت‌های تنظیمی مثل تعیین نوع مریستم، توسعه جانبی ریشه و کنترل زمان گلدهی نیز دخالت دارند (Tsaftaris et al., 2004). برای درک چگونگی تکامل و نمو گل مطالعه فعالیت و برهمکنش ژن‌های MADS-box با سایر عوامل رونویسی در تنظیم بیان ژن‌های دخیل در گلدهی ضروری است (Davies et al., 1996).

ژن‌های Pistilata از کلاس B از ژن‌های مرتبط با گل‌دهی بوده که نه تنها مسئول باز کردن حلقه دوم و سوم گل می‌باشند، بلکه وظیفه باز کردن کاسبرگ‌های گل را نیز بر عهده دارد (Theissen et al., 2000). ژن‌های AGAMOUS از کلاس C در سطح رونویسی، طی دوره تکامل گل زعفران در پرچم‌ها و کلاله گل، فعالیت خود را نشان داده است و بر خلاف آن در کاسبرگ‌ها و گلبرگ‌ها فعالیت نشان نداده است (Tsaftaris et al., 2005; Tsaftaris et al., 2006). همچنین ژن‌های SEPALLATA در کلاس E خانواده MADS-box برای تکامل گلبرگ، پرچم و مادگی گل زعفران ضروری می‌باشد (Pelaz et al., 2000).

در تحقیقی که توسط جدیر و نیری (Jodeir & Dehghan, 2016) روی ژن‌های MADS-box گل زعفران انجام شد، میزان بیان شدن ژن Ag1a در اندام‌های کلاله و پرچم خیلی زیاد است در حالی که در اندام‌های تخمدان، گلبرگ، برگ، پیاز و ریشه در مقایسه با کلاله و پرچم پایین است. بیشترین میزان شدت باند از ژن Sep3b در اندام‌های کلاله، پرچم، گلبرگ و سپس در اندام تخمدان مشاهده شده است و اندام‌های رویشی برگ، پیاز و ریشه کمترین شدت باند وجود

گلدهی هستند، شاخه STMADS11-like با ژن‌های SHORT VEGETATIVE PHASE (SVP) و AGL24 رپرسور گلدهی در بافت رویشی هستند و ژن SUPPRESSOR OF OVEREXP RESSION (SOC1) OF CONSTANS 1 در شاخه (TM3-like) 3-like در گیاه گوجه‌فرنگی در تنظیم زمان گلدهی نقش دارد (Becker & Theissen, 2003).

در یوکاریوت‌ها خانواده فاکتور نسخه‌برداری MADS وجود دارد (Becker & Theissen, 2003; Messenguy & Dubois, 2003). ژن‌های MADS-box حاوی دُمین حفاظت شده بوده و به دو دسته اصلی تیپ I و تیپ II تقسیم می‌شوند که این تیپ‌ها در گیاهان، حیوانات و قارچ‌ها دیده شده است (Ahrazem et al., 2010). ژن‌های گروه II ساختار خاصی از MIKC هستند (De Bodt et al., 2003) و تنظیم‌کننده‌های کلیدی در فرآیندهای تکاملی مانند تعیین نوع مریستم، زمان گلدهی و تکامل میوه و بذر هستند، در مقابل ژن‌های گروه I تنها دارای یک دُمین حفاظت شده هستند (Masiero et al., 2011).

همه انواع ژن‌های MIKC در گیاهان به ۱۲ شاخه اصلی تقسیم می‌شود که هر کدام شامل یک تا شش پارالوگ در آرکیدوپسیس و اورتولوگ‌هایی در دیگر گیاهان هستند (Becker & Theissen, 2003).

در مورد ژن‌هایی که در نمو اندام‌های گل در زعفران دخالت دارند هنوز گزارش جامعی منتشر نشده است، اما در مورد سنتز متابولیت‌ها در زمان نمو گل در این گیاه تحقیقاتی صورت پذیرفته است. در زعفران آپوکاروتنوئیدها تنها در کلاله سنتز می‌شوند و به طور ویژه در مرحله توسعه این اندام تولید می‌گردد، اما مکانیزم تنظیم این مسیر بیوسنتزی مشهود است. از این‌رو، نیاز است که مسیر بیوسنتزی کاروتنوئیدها و پاراکاروتنوئیدها و تنظیم این مسیر در گیاه زعفران مورد مطالعه قرار گیرد.

داشت (Jodeir & Dehghan Nayeri, 2016)

در تحقیق اشرف و همکاران (Ashraf et al., 2015) بر روی زعفران انجام گرفت نشان داد که همه ژن‌های MADS-box در تشکیل گل نقش دارند و همچنین نقش احتمالی این ژن‌ها را در فرایندهای فیزیولوژیکی از قبیل انتقال به مرحله گلدهی و تشکیل بنه در گیاه زعفران بی‌تأثیر ندانستند. در واقع MADS box توالی‌های تکرارداری هستند، که به‌صورت محافظت شده در اطراف خانواده عوامل رونویسی پروتئین‌های MADS box قرار گرفته‌اند. طول توالی این جعبه در پژوهش‌های مختلف، متفاوت بوده و در حدود ۱۶۸ تا ۱۸۰ جفت نوکلئوتید می‌باشد. پروتئین‌های MADS box دارای یک دُمین متصل به DNA در منطقه N ترمینال بوده. این پروتئین‌ها، گاهی اوقات نیاز به پیوستن به دimer را دارند، چنانچه در کنترل فعالیت‌های سلولی نقش دارند. بسیاری از متابولیت‌ها در مرحله نمو گل تولید می‌شوند، ژن‌های مختلف مرتبط با توسعه گل در کلاس‌های A، B، C و E در شاخه‌هایی دسته‌بندی می‌شوند. این ژن‌ها شامل APETALA1/FRUITFULL (AP1/FUL) یا SQUAMOSA (SQUA) در کلاس A، ژن‌های PETALA3 (AP3) و PISTILLATA (PI) یا DEF (DEF) و GLOBOSA و DEFICIENS (Szczyglowski & Amyot, 2003) در کلاس B و ژن AGAMOUS (AG) در کلاس C و D و AGAMOUS-like6 (AGL6) و SEPALLATA (SEP) در کلاس E قرار می‌گیرند (Theissen et al., 2000). تمامی ژن‌های نامبرده شده در تمایز یابی اندام گل نقش ندارند. ژن‌های دیگری نیز در آغاز گلدهی و تمایز اندام‌ها دخیل می‌باشند. در این تحقیق به دنبال شناسایی توالی‌های ژن PISTILLATA (PI) بوده، تا بتوان مسیر تمایز یابی اندام‌های گل را توسط این ژن شناسایی کرد. در شاخه C-like FLOWERING LOCUS C (FLC-) (like) در آرکیدوپسیس، ژن‌های FLC و AGL27 مهارکنندگان

در پژوهشی که با هدف شناسایی فاکتورهای نسخه‌برداری این مسیر بیوسنتزی و چگونگی تنظیم آن در گیاه زعفران به منظور بررسی محل سنتز این ترکیبات مهم انجام گرفت، مشخص گردید که محل سنتز این ترکیبات مهم در کلاله این گیاه است (Castillo et al., 2005; Moraga et al., 2009). به همین جهت، تلاش شد تا الگوی تجمع کروسین در قسمت‌های مختلف گل و مراحل مختلف توسعه کلاله ارائه گردد. در مطالعه (D'Agostino et al., 2007) پنج فاکتور نسخه‌برداری را از پنج خانواده ژنی مختلف از بانک ژن انتخاب و الگوی بیانی آن‌ها بررسی گردید. نتایج نشان داد که ژن ULTRAPETALA (ULT) از کلاس B به مقدار زیادی در بافت کلاله بیان می‌شود و بیان آن در روزهای گلدهی افزایش و به دنبال آن کاهش می‌یابد، در واقع این ژن یک پروتئین غنی از سیستین را رمز می‌کند که همچنین در گیاه آرابیدوپسیس نیز در مسیر انتهایی سلول اولیه گلدهی نقش دارد (Ashraf et al., 2015). به علت انطباق الگوی بیان این ژن با تجمع کروسین، می‌توان نتیجه‌گیری کرد که این الگوی بیان در این ژن با الگوی تجمع کروسین در زعفران مطابقت دارد و بدان جهت می‌توان گفت که این ژن در مسیر بیوسنتزی متابولیت‌های ثانویه از جمله پاراکارتونوئیدها نقش دارد (Ashraf et al., 2015). در مطالعه‌ای که بر روی ژن DEFICIENS (DEF) از کلاس B انجام گرفت، DNA از برگ‌ها استخراج گردید و با استفاده از آغازگرهای طراحی شده ژن مورد نظر استخراج گردید و ناحیه راه‌انداز ژن (پروموتور ژن) نیز مشخص شد، بعد از توالی‌یابی و تعیین ناحیه راه‌انداز ژن DEF به گیاه آرابیدوپسیس منتقل گردید و آزمایشات هیستوشیمیایی با استفاده از ژن گاس برای ردیابی محل فعالیت آنزیم انجام گرفت. نتایج این آزمایش نشان داد که بیان ژن گاس تنها در گل‌ها وجود دارد و هیچ نشانه‌ای در بافت رویشی از جمله ساقه و ریشه وجود نداشت،

همچنین بیان ژن گاس در جوانه‌های بالغ گل قبل از باز شدن نیز دیده مشاهده نشد و تنها بیان در هنگامی که گل کاملاً باز شد مشاهده گردید (Ahrazem et al., 2010).

از طرفی در مسیر بیوسنتزی کاروتنوئیدها، یکی از آنزیم‌های کلیدی در این مسیر آنزیم ۹-سیس-اپوکسی کاروتنوئید دی اکسیژناز (NCED) می‌باشد که فعالیت این آنزیم سبب شکست اکسیداتیو سیس-اپوکسی کاروتنوئیدها می‌گردد. هورمون ABA در گیاهان باعث خواب، ریزش گل و همچنین سبب کنترل پاسخ به انواع استرس‌های محیطی می‌شود. قسمتی از مسیر بیوسنتزی هورمون ABA و کاروتنوئیدها مشترک است. در مطالعه‌ای که بر روی یکی از ژن‌های NCED به نام CstNCED انجام گرفت، محققان موفق به جداسازی این ژن از کلاله‌های زعفران شدند. توالی اسیدآمینه‌ای این ژن، مشابهت زیادی به NCED های تک‌لپه‌ای‌ها دارد و همین‌طور ارتباط نزدیکی با آنزیم‌های Liliopsida دارد. در این تحقیق این ژن به درون کلروپلاست منتقل و بیان CstNCED و ABA درونی در کلاله و بنه بررسی گردید. نتایج حاصل از این آزمایش نشان داد که با افزایش میزان ABA ریزش کلاله‌های گرده‌افشانی نشده بیشتر می‌گردد. از طرفی در بنه‌ها، بین بیان ژن CstNCED و خواب بنه، همبستگی مشاهده شد. نتایج این تحقیق حاکی از وجود ارتباط بین وجود زاکسانتین (که ماده حواسط در تولید ABA بشمار می‌آید) و خواب بنه‌های در حال خواب داشت. در ادامه هنگامی که در شرایط مزرعه برگ‌ها و کلاله‌ها جدا شده و در شرایط تنش آب و نمک قرار گرفتند، در مقدار mRNA ی این ژن، افزایش مشاهده شد. نتایج نشان داد که این ژن در فرایندهای تنظیمی ABA مثل ریزش گل و خواب بنه در گیاه تک‌لپه‌ای زعفران نقش دارد (Ahrazem et al., 2012).

در پژوهش حاضر، پروتئین بیان‌شده از ژن PIC2 مدل

به طرز ناصحیحی تا بخورد برای سلول‌های مجاور نیز ایجاد اختلال می‌نماید. معمولاً نحوه تاخوردن یک پروتئین به پیشگوئی تاخوردن پروتئین یا پیشگوئی ساختار پروتئینی معروف است. در روش‌های نوین جهت ترسیم ساختار پروتئینی دنباله‌ای از اسیدآمینها به عنوان ورودی دریافت می‌شود و الگوریتم سعی می‌کند بهترین روش تاخوردن آن را که به ساختار اصلی این پروتئین نزدیک‌تر است به عنوان خروجی تولید نماید.

از دیگر عوامل تأثیرگذار در این ساختار و تاخوردگی ویژگی‌های اسیدآمینها سازنده آن هستند که می‌توان خاصیت آب دوستی و آبگریزی را به آن‌ها نسبت داد.

مواد و روش‌ها

گیاهان مورد استفاده

ابتدا یک توده بومی از بنه‌های زعفران بومی منطقه تربت-حیدریه تهیه گردیده و طی فرایندهای سالانه در گلخانه دانشکده کشاورزی دانشگاه تربت‌حیدریه کشت شدند. بنه‌ها در کرت‌هایی حاوی مخلوط 1:1 از خاک و ماسه کشت شدند. برای مطالعات مولکولی از اندام‌های کلالة، پرچم، گلبرگ، برگ و بنه گیاه زعفران استفاده شد. بافت‌های اندام مادگی گل‌ها (کلالة‌ها) در مراحل جوانی گل‌ها استفاده گردید.

استخراج DNA ژنومی

استخراج از بافت گیاه به علت ویژگی‌هایی همچون بالا بودن سن گیاه و یا حضور کربوهیدرات‌ها، ترکیبات پلی‌فنلی و پروتئین‌ها که بر کیفیت DNA اثر منفی می‌گذارد (Alaey et al., 2007)، برای افزایش کیفیت و کمیت DNA استخراج شده و اطمینان از حضور درصد قابل ملاحظه‌ای از ژن مورد مطالعه (افزایش احتمال حضور ژن‌های مسیر گلدهی در اصلی‌ترین بخش‌های تولیدمثل گل) DNA از کلالة تازه گل‌ها استخراج گردید. کلالة‌های گل درون ورقه‌های آلومینیومی پیچیده شدند،

سازی شده، اساس پیش بینی توسط مدل سازی همولوژیکی این است که توالی پروتئین با یک یا تعداد بیشتر پروتئین با ساختار شناخته شده شباهت داشته باشد. این روش، مدل سازی مقایسه‌ای (CA) نیز نامیده می‌شود بر اساس این واقعیت که پروتئین‌هایی با توالی‌های مشابه، ساختارهای مشابه دارند. این روش بر آن اساس که پروتئین‌های یک خانواده، بیشتر توالی‌های آمینواسیدی حفاظت شده است، آسان می‌باشد. چراکه وقتی ساختار یک پروتئین از یک خانواده به وسیله‌ی آزمایش تعیین شود، اعضای دیگر آن خانواده می‌توانند بر اساس تطابق‌شان با ساختار شناخته شده مدل سازی شوند. دقت پیش‌گویی با این روش به میزان تشابه بین توالی پروتئین هدف و ساختارهای الگو بستگی دارد. مشکل عمده مدل‌سازی همولوژیکی پیدا کردن توالی هدفی است که به عنوان الگو استفاده می‌شود. تقریباً ۵۷٪ همه‌ی توالی‌های شناخته شده حداقل یک دمین دارند که به یک پروتئین با ساختار شناخته شده وابسته می‌باشد (Mihasan, 2010).

با توجه به بررسی منابع صورت گرفته، به علت تجمع و تولید متابولیت‌های ثانویه در زمان گلدهی، وجود ارتباط بین ژن‌های دخیل در تولید متابولیت‌های ثانویه و ژن‌های درگیر در گلدهی مسلم به نظر می‌رسد. از این رو، در تحقیق حاضر ارتباط با ژن PIC2 مؤثر در ایجاد گل‌دهی و توالی پروتئینی صورت پذیرفت تا بتوان مسیر تمایزیابی اندام‌های گل را توسط این ژن شناسایی کرد. توجه به ساختار نوکلئوتیدی این ژن و ساختار پروتئین حاصل از تظاهر این ژن شناختی عمیق‌تر بر نحوه گلدهی در گیاه زعفران را ایجاد می‌کند.

عملکرد پروتئین حاصل از بیان شدن ژن PIC2 تا حدود زیادی بستگی به ساختار سه‌بعدی این پروتئین دارد. گاهی نحوه تاخوردگی رشته‌های پلی‌پپتید این پروتئین و قرارگیری شکل-های فضایی متفاوت اسیدآمینها سازنده این پروتئین، می‌تواند در اثرگذاری عملکرد این پروتئین دخالت نماید. چنانچه پروتئینی

Transcriptase Rnase H صورت گرفت. برای انجام روش PCR نیمه کمی، غلظت cDNA نمونه‌های حاصل از واکنش نسخه‌برداری معکوس با اسپکتروفتومتری تعیین شد و سپس جهت انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز از هر یک از نمونه‌ها استوک کاری با غلظت $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ تهیه شد. غلظت و کیفیت cDNA نمونه‌های حاصل از واکنش نسخه‌برداری معکوس با اسپکتروفتومتری تعیین شد.

طراحی آغازگر

برای شناسایی و تکثیر ژن PIC2، طراحی آغازگرهای مناسب و استفاده از آن‌ها در واکنش PCR لازم بوده. اولین مرحله در یافتن توالی ژن مورد نظر در گیاهان هم‌جنس و یا هم-خانواده می‌باشد، از آنجا که توالی ژن مورد نظر نامشخص بود، آغازگرها بر اساس توالی‌های ژن موجود از سایر گیاهان طراحی شدند. اگرچه اولویت با گیاهان هم‌جنس یا هم‌خانواده است اما از آنجا که تاکنون ژن Pistillata در هیچ گیاه هم‌جنس یا هم-خانواده گیاه زعفران شناسایی نشده بود از توالی‌های ژن PI ثبت شده در پایگاه GenBank با شماره‌های دسترسی HM047440.1 (*Medicago sativa*)، KJ470631.1 (*Brassica napus*)، HM047443.1 (*Brassica napus*) و DQ988043.1 (*Vitis vinifera*) استفاده گردید، پس از آن همریدیف‌سازی برای پیدا کردن نقاط حفاظت شده صورت پذیرفت.

با بلاست کردن و بررسی توالی‌های ژن Pistillata حاضر در گیاهان کلزا، انگور و یونجه، توالی مشابهی یافته شد؛ که پس از آن، از روی توالی آغازگرهای الیگونوکلوئیدی پیش برنده و برگردانده توسط نرم افزار 3 Primer و با استفاده از توالی‌های فوق طراحی گردید.

همچنین بررسی مناسب بودن آغازگر از لحاظ عدم اتصال غیراختصاصی و تشکیل دایمر با ابزاری مثل Primer Blast

سپس نمونه‌ها سریعاً درون ازت مایع تثبیت و در دمای -80°C درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. استخراج DNA بر اساس کیت تجاری DNeasy Mini شرکت Qiagen انجام گرفت. برای ارزیابی کمی و کیفی DNA از روش اسپکتروفتومتری (Eppendorf AG, Germany) و الکتروفورز افقی (Bio-RAD powerpac, USA) روی ژل آگارز 0.8% درصد استفاده گردید (Sambrook & Russell, 2001).

استخراج RNA

استخراج RNA کل با استفاده از کیت Vivantis شرکت سیگما و از اندام‌های کلاله، پرچم، گلبرگ، برگ و بنه انجام گرفت. کمیت و کیفیت RNA ی استخراج شده به ترتیب با استفاده از روش اسپکتروفتومتری صورت پذیرفت. شناسایی دقیق غلظت RNA ی کل برای اندازه‌گیری تعداد کپی mRNA بسیار مهم بوده است و هر گونه آلودگی DNA می‌تواند منجر به کمی کردن غیر دقیق میزان RNA شود. بنابراین، هر نوسانی در تعداد کپی mRNA بسیار مهم می‌باشد و تفاوت در نتایج میزان بیان ژن می‌تواند ناشی از سطوح متفاوت آلودگی با DNA میان نمونه‌ها باشد. بدلیل اطمینان از عدم حضور هر گونه آلودگی و تأثیر آن بر نتایج RT-PCR کمی، از آنزیم DNase استفاده گردید (Mohammad Hashem et al., 2011).

واکنش نسخه برداری معکوس (سنتز cDNA)

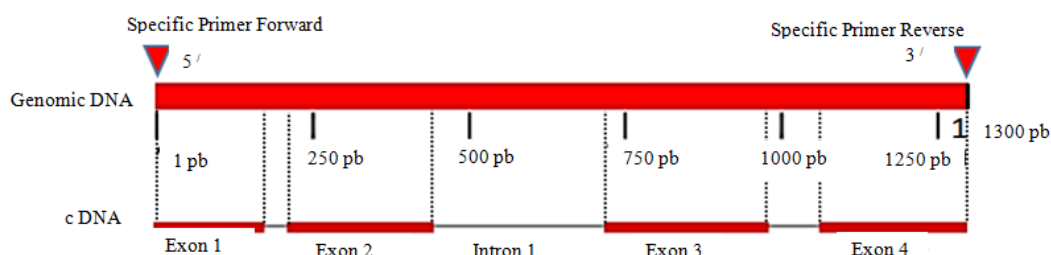
سنتز cDNA با استفاده از کیت cDNA synthetase شرکت Sigma و آغازگرهای طراحی شده به کمک آنزیم ترانسکریپتاز معکوس، صورت پذیرفت.

سنتز cDNA با استفاده از $1 \mu\text{g}$ میکروگرم از RNA کل با استفاده از Oligo dT به عنوان آغازگر عمومی توسط آنزیم ترانسکریپتاز معکوس با نام تجاری M-MuLV Reverse

ارزیابی گردید؛ که به صورت زیر هستند:

شکل ۱ نشان دهنده ساختار ژن و مکان تقریبی آغازگرهای این آغازگرها، قطعه‌ای به طول جفت باز را تکثیر می‌کنند. اختصاصی در گلزا، انگور و گندم است.

Forward Primer: 5' -GAGTTAGAAAGGGGAGTTGTA- 3' (۱)
Reverse Primer: 3' -CTATTTAGCCTCCTGCAAGTT- 5'



شکل ۱- شکل شماتیک ژن PIC2 و محل تقریبی قرار گرفتن آغازگرهای طراحی شده در مقایسه با cDNA آن
Figure 1- The schematic structure of PIC2 gene and approximate location of the designed primers compared to its cDNA.

سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، دمای اتصال، ۵۳ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و دمای طولی شدن، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه صورت پذیرفت و در نهایت با مرحله طولی شدن به مدت ۸ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به اتمام رسید. پس از انجام PCR کیفیت محصول بر روی ژل آگارز ۰/۸ درصد بررسی و درون ژل داک قابل مشاهده بوده است.

بررسی بیان ژن PIC2

بیان ژن PIC2 با همان شرایط تکثیر gDNA بوده است. در بررسی بیان این ژن، واکنش Real-Time PCR با استفاده از کیت SYBR Premix Ex Taq II شرکت تاکارا صورت گرفت. میزان مواد به کار رفته در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز برای بیان ژن PIC2 در اندام‌های ذکرشده‌ی مورد آزمایش، یکسان بوده. چرخه‌دمایی استفاده شده شامل دمای واسرشت سازی ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه، اتصال آغازگرها در دمای ۵۳ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه، توسعه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد، به مدت ۳۰ ثانیه و توسعه‌نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد.

شناسایی ژن PIC2 با استفاده از PCR

به این منظور از DNA ژنومی و cDNA استخراج شده به همراه آغازگرهای طراحی شده در PCR استفاده شدند. برای PCR مقدار ۲۰۰ نانوگرم از DNA و ۱ میکرولیتر از آغازگرهای پیش برنده و برگرداننده با غلظت نهایی ۰/۵ میکرومولار، درون لوله استریل PCR ریخته و با آب دوبار تقطیر استریل و با استفاده از Master Mix PCR، به حجم ۲۰ میکرولیتر رسانده و با پیپت کردن، به طور کامل مخلوط می‌شود.

انجام PCR توسط ترموسایکلر مدل (Personal Thermal) Biorad (Cycler BioRad 1148MJ USA Mini) و با مرحله واسرشتگی اولیه به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد آغاز گردید. بهینه‌سازی دمای اتصال جهت تکثیر اختصاصی و تک‌باند شدن محصول PCR در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد با استفاده از (PCR Master Mix سیناژن، ایران) صورت پذیرفت. دمای لازم جهت اتصال آغازگرهای اختصاصی، به کمک معادله، $[0/41 \times (\%GC) - 650/L] + 3/69$ بدست آمد. در ادامه، انجام ۳۰ چرخه با دمای واسرشتگی ۹۴ درجه

برای اطمینان از میزان بیان ژن مورد نظر، این بخش از تحقیق، به کمک واکنش PCR بر روی cDNA صورت پذیرفت. مقدار ۵ میکرولیتر محصول PCR را روی ژل ۰/۸ درصد آگارز، الکتروفورز نموده و سپس به وسیله نرم افزار v ImageJ 1.42q (www.rsb.info.nih.gov/ij/index.html) شدت باند موجود روی ژل آنالیز شد (شدت باند از بین ۰ تا ۱۰۰ درجه بندی شد). این نرم افزار قادر است شدت نسبی باند موجود روی ژل را اندازه گیری کند و به صورت عدد نمایش دهد. در نهایت داده های حاصل و رسم نمودارها با نرم افزارهای SPSS v15 (www.spss.com) و Excel انجام شد.

تخلیص و توالی یابی محصول PCR

مقدار ۲۰ میکرولیتر از محصول PCR خالص سازی شده و به همراه ۲/۵ میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای رفت و برگشت با غلظت ۱۰ پیکومول برای توالی یابی به شرکت تکاپوزیست ارسال گردید. نمونه ها توسط شرکت تکاپوزیست به کره جنوبی ارسال شده تا در آنجا توسط دستگاه Illumina Hiseq2000 توالی یابی گردند.

مطالعه فیلوژنیک، انطباق و بررسی توالی پروتئینی ژن PIC2

قطعه مستخرج شده از ژل آگارز، توالی یابی شده و پس از بررسی و ترجمه هر یک از توالی های نوکلئوتیدی کدکننده پروتئین به وسیله پایگاه داده مولکولی (www.expasy.ch) Expasy، آنالیز می شود (Varjonen et al., 2002). در این بخش از پژوهش، جهت مطالعه ساختار فیلوژنیک و شکل پروتئین، لازم است که توالی اسید آمینه ای پروتئین بیان شده از ژن PIC2 با توالی اسید آمینه ای دیگر توالی های پروتئینی در بانک های ژنی، بلاست گردد. با این هم ردیف سازی می توان به ساختار احتمالی پروتئین مورد مطالعه دست یافت. مطالعات

هم ردیف سازی چند تایی پروتئینی (Multiple sequence alignments) با استفاده از BLAST موجود در پایگاه اطلاعاتی NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) و CLUSTAL W موجود در پایگاه اطلاعاتی (www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/Expasy) صورت پذیرفت (Johnson et al., 2008).

مطالعات مدلینگ توالی پروتئینی، ژن PIC2 گونه بومی تربت حیدریه و پروتئین های مشابه با استفاده از پایگاه GeneBee (www.genebee.msu.su) اجرا شد (et al., 2011; Edstam 2011; Emamzadeh et al., 2006; Goff et al., 2002). محاسبه تئوری نقطه ایزوالکتریک و وزن مولکولی پروتئین با استفاده از ابزارهای موجود در پایگاه داده Expasy (http://www.expasy.ch/tools/pi_tool.html) انجام شد. موتیف ها و اسید آمینه های موجود بر روی ساختار پروتئینی ژن PIC2 مورد بررسی قرار گرفتند (www.expasy.ch/motif) (scan). همچنین با استفاده از روش Kolaskar & Tongaonkar و بر اساس نتایج تجربی، اپی توپ های موجود این پروتئین نیز شناخته شد (Hartz et al., 2010; Kolaskar 1990; Van & van, 1999).

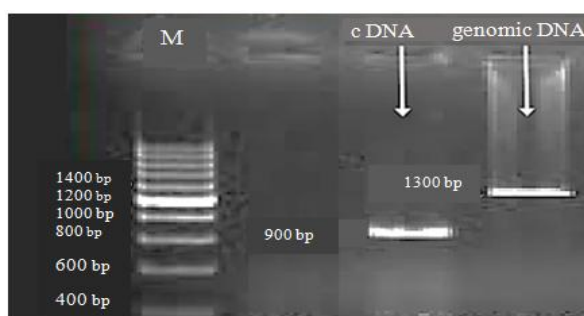
ساختار سوم پروتئین هدف با استفاده از نرم افزار Modeller9V7 (Sali Blundell, 1993) با استفاده از مدل سازی مقایسه ای ایجاد شده و با استفاده از نرم افزار weblab viewer مشاهده و بررسی گردید (این نکته لازم به ذکر است که با استفاده از نرم مدل ساخته شد ۱۰۰۰۰ (Modeller9V7).

مدل سازی پروتئین PIC2

مدل سه بعدی پروتئین ژن PIC2 زعفران تربت حیدریه، ابتدا با استفاده از پایگاه (<http://manaslu.aecom.yu.edu/M4T>) M4T و به روش مدل سازی بر اساس تشابه (Homology

نتایج و بحث

الکتروفورز محصول PCR روی ژل آگارز ۰/۸ درصد نشان داد که قطعه اختصاصی برای ژن PIC2 به طول تقریبی ۱۳۰۰ جفت باز به خوبی تکثیر شده است (شکل ۲) این مطلب نشان دهنده طراحی و عملکرد صحیح آغازگرها و برنامه PCR مناسب (به خصوص دمای اتصال) می باشد (Murry & Thompson, 1980).



شکل ۲- ژل الکتروفورز پس از PCR، قطعه ۱۳۰۰ و ۹۰۰ جفت بازی تکثیر شده از DNA ژنومی و cDNA.
Figure 2- Electrophoresis gel of PCR reaction, part of 1300 and 900 amplified bp of genomic DNA and cDNA.

بررسی بیان ژن PIC2

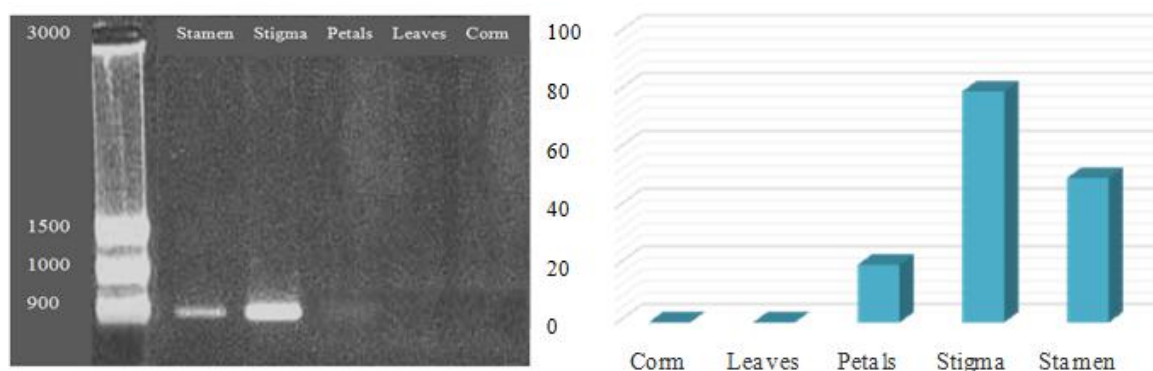
با استفاده از آغازگرهای اختصاصی طراحی شده برای ژن PIC2، قطعه‌ای به طول ۶۳۳ جفت باز از cDNA تهیه شده از RNA استخراج شده‌ی کلاله‌های زعفران طی واکنش زنجیره‌ای پلیمرز تکثیر شد. الگوی بیان ژن در اندام‌های مختلف زعفران با استفاده از RT-PCR مورد بررسی قرار گرفت. مقایسه میانگین داده‌های مربوط به بیان ژن PIC2 در اندام‌های مختلف گیاه زعفران نشان داد که اختلاف بین اندام‌ها در سطح ۱ درصد معنی‌دار شده است. آنالیزهای آماری، شدت باند PIC2 در اندام‌های مختلف زعفران را در چهار سطح کاملاً متفاوت قرار می‌دهد به طوری که شدت باند در اندام‌های جنسی کلاله و پرچم در مقایسه با گلبرگ گل‌های زعفران بالا است. همچنین به نظر می‌رسد که هیچ رونوشتی از ژن PIC2 در بافت‌های برگ و بنه زعفران دیده نشده است، با این تفاوت که میزان بیان آن در اندام‌های کلاله نسبت به پرچم بیشتر بوده است.

نتایج مشابهی از بیان ژن‌های خانواده MADS-box در اندام‌های مختلف زعفران، مشاهده گردید. بیان ژن‌های Ag1a و Ag1b در اندام‌های مختلف زعفران نشان داد این ژن‌ها در اندام‌های تخمدان و به ویژه در کلاله و پرچم بیان بالایی دارند ولی در اندام‌های رویشی (برگ، پیاز و ریشه) بیان نمی‌شوند یا بیان بسیار کمی دارند (Jodeir & Dehghan Nayeri, 2016). ژن Sep3c در اندام‌های مختلف گل شامل تخمدان، کلاله، پرچم و گلبرگ بیان می‌شود ولی در اندام‌های غیر گل شامل برگ، پیاز و ریشه بیان نمی‌شود. بررسی بیان ژن Ag1a در سه اندام کلاله، پرچم و برگ زعفران واریته ایرانی نشان داد که ژن Ag1a در اندام‌های کلاله و پرچم دارای بیان ولی در برگ فاقد بیان است. بیان ژن‌های Sep3 در واریته یونانی گیاه زعفران در هر چهار حلقه گل در اندام‌های کلاله، پرچم و گلبرگ شناسایی شده است (Tsaftaris et al., 2005؛ Tsaftaris et al., 2006؛ Tsaftaris et al., 2011).

تفاوت در نوکلئوتیدهای آن می‌باشد (Shakib & Ainsworth, 2009). آنالیز الگوهای بیان و تشابه توالی ۴ ژن عضو خانواده MADS-box جدا شده از ترشک نشان داد که ژن‌های RaA2 و RaB17 در نمو گل نقش داشته و ژن‌های RaG24 و RaK16 در هر دو مرحله رویشی و زایشی کارکردهایی دارند، با این حال، نقش واقعی آن‌ها را می‌توان با آنالیز این ژن‌ها در گیاهان جهش یافته یا گیاهان تراریخته تعیین نمود (Shakib & Ainsworth, 2009). در *Arabidopsis* نیز ژن APETALA1 مانند PIC2 در پریموردیاهای گل و اعضای گل مانند گلبرگ‌ها بیان می‌شود. بیان این ژن برای تبدیل مریستم گل‌آذین به مریستم گل و نیز تعیین هویت گلبرگ لازم است (Mandel et al., 1992).

نتایج تحقیق حاصل نشان می‌دهد، ژن‌های خانواده MADS-box در کلاله و پرچم و گلبرگ بیان می‌شود ولی در برگ و بنه فاقد بیان است که مشابه با نتایج تحقیقات (Tsaftaris et al., 2005; Jodeir & Dehghan Nayeri, 2011; Tsaftaris et al., 2006; 2016) در اندام‌های مختلف زعفران است.

بر اساس نتایج به دست آمده این مطالعه، ژن PIC2 در اکثر اندام‌ها و محورهای گل زعفران بیان می‌شوند و به نظر می‌رسد این ژن در تشکیل حلقه‌های گل زعفران و یا به عبارتی، در تشکیل بافت اولیه گل جهت فعالیت ژن‌های، کلاس B نقش دارند. فعالیت این ژن نشان دهنده کارکردهای مختلف، طی نمو رویشی و زایشی گیاه است. این نتایج با مدل تکامل گل از همان کلاس‌های A, B, C و E در گیاهان سازگار است (Jodeir & Dehghan Nayeri, 2016). بیان ژن PIC1 که در تشکیل گل زعفران به ویژه در ایجاد کلاله نقش دارند، میزان بیان آن‌ها در کلاله، نسبت به سایر اندام‌های گل و نیز اندام‌های رویشی بیشتر گزارش گردید (Kalivas et al., 2007). از سوی دیگر اثبات شده، ژن‌های کلاس B پروتئین‌های MADS در انگور، در زمان‌های متفاوتی بیان می‌شود، ژن‌های کلاس B، توسعه اندام‌های جنسی گیاه را بر عهده دارد و در رشد و نمو میوه نیز مؤثر بوده است (Josefina Poupin et al., 2007). آنالیز الگوهای بیان و تشابه توالی ژن‌های عضو خانواده MADS-box جدا شده از ترشک نیز نشان داد که بعضی از ژن‌های این خانواده در یکی از مراحل و بعضی دیگر از این ژن‌ها در هر دو مرحله رویشی و زایشی، کارکردهای جداگانه‌ای دارند که ناشی از



شکل ۳- بیان ژن PIC2 از کلاس B خانواده MADS box
Figure 3- Gene expression of PIC2, B class, MADS box family.

PIC2 در اندام‌های رویشی از جمله برگ و بنه‌های زعفران بیان نمی‌شوند (شکل ۳).

بررسی بیان ژن PIC2 در اندام‌های مختلف گیاه زعفران نشان می‌دهد که این ژن‌ها در اندام‌های جنسی گل شامل کلاله و پرچم نسبت به گلبرگ‌های گل بیشتر بیان می‌شوند و ژن

		Forward Primer	
Query	1	ATGTTGAGGGGAAAGATTGAGATAAAGAGGATAGAGAAGCTCTACCAACAGGCAGGTGACC	60
Query_16851	1	ATGTTGAGGGGAAAGATTGAGATAAAGAGGATAGAGAAGCTCTACCAACAGGCAGGTGACC	60
Query	61	TTCTCCAAGAGGAGGAATGGGATCATCAAGAAAGCCAGAGAGATCAGTGTCTCTTGTAC	120
Query_16851	61	TTCTCCAAGAGGAGGAATGGGATCATCAAGAAAGCCAGAGAGATCAGTGTCTCTCT	115
Query	121	CTGATTCTTCTGCATTTCTAACATTTCTTCTGGTGAGTGTGAGGTCTCTCTGGTCATCT	180
Query_16851	116	GTGAGTGTGAGGTCTCTCTGGTCATCT	142
Query	181	TTTCAAGCCTAGGCAAGATGAGTGAATACTGCAGCCCAACACTAAGTTGCCAAAGATAA	240
Query_16851	143	TTTCAAGCCTAGGCAAGATGAGTGAATACTGCAGCCCAACACTAAGTTGCCAAAGATAA	202
Query	241	TGGAGAAGTACCAGCAGAACTCTGGGAAGAGGCTCTGGGAAGCCAAGCATGAGAATCTGA	300
Query_16851	203	TGGAGAAGTACCAGCAGAACTCTGGGAAGAGGCTCTGGGAAGCCAAGCATGAGAATCTGA	262
Query	301	GTGCCGAGATCGAAAGGATCAAAAGAGAGAATGACAACATGCAGATTGAACTGAGGCACT	360
Query_16851	263	GTGCCGAGATCGAAAGGATCAAAAGAGAGAATGACAACATGCAGATTGAACTGAGGCACT	322
Query	361	TGAAGGGTGACGATCTGAATTCCTTTGAAAGTTCATCGTTTCTTCTTTAGTTT	420
Query_16851	323	TGAAGGGTGACGATCTGAATTCCT	346
Query	421	CGCGACTTCTGCTTCTAGCTCCATAGTATAGGCCTGTTGTGAGAGAAGATGCACAGTTTG	480
Query	481	CTGCAAAATCGAATAATGCTGGAGGAATCTTTGGTGATTTGCTCTATGCTGGGAATAATA	540
Query	541	CAGGGCTTGCAATTTGGATATCATCAAGCTAATAGTAGGAACACAGGTTTAATGGCTGGTA	600
Query	601	GTATCCCTAACAGAATGGTGAACTGTTATTAGTCTGCTAATTTGCCACTGAATGCAT	660
Query_16851	347	TGCAT	351
Query	661	CCAAAGGAATTGATCCCTATAGAAGAAGCCTTGCAAGCGGTTTAACCGGTGTTTCAGAA	720
Query_16851	352	CCAAAGGAATTGATCCCTATAGAAGAAGCCTTGCAAGCGGTTTAACCGGTGTTTCAGAA	411
Query	721	AAGCAGATGGATTCTTTGAAGATGATGAAGAAAAATGAGAGGTTGATGGAAGAGGAGAAT	780
Query_16851	412	AAGCAGATGGATTCTTTGAAGATGATGAAGAAAAATGAGAGGTTGATGGAAGAGGAGAAT	471
Query	781	AAGAGGCTGACTTATTTATTGCATCATCAACAATTGGCAATGGAAGGAAACATGAGAGAC	840
Query_16851	472	AAGAGGCTGACTTATTTATTGCATCATCAACAATTGGCAATGGAAGGAAACATGAGAGAC	531
Query	841	ATGGATCTTGGGTACCAACAGAAAGAGAGGGCATATCCTTCTCAGATGCCAATGACCTTC	900
Query_16851	532	ATGGATCTTGGGTACCAACAGAAAGAGAGGGCATATCCTTCTCAGATGCCAATGACCTTC	591
Query	901	CGTATGCAACCTTTACCATGGACCAGTTTGTGTCCGTCTTAAGCATCGCCTTTTAGCTCC	960
Query_16851	592	CGTATGCAACC	602
Query	961	CTTTTGAAGGTTTCATCTTTCTATAACCTGAGATCCAGCCCAACTTGCAAGGAGGCTAAAT	1020
Query_16851	603	GATCCAGCCCAACTTGCAAGGAGGCTAAAT	631
Query	1021	AG	1022
Query_16851	632	AG	633
		Reverse	

شکل ۴- مقایسه توالی نوکلئوتیدی ژن PIC2 استخراج شده از DNA ژنومی و cDNA

Query نشان‌دهنده DNA ژنومی g و Query16851 نشان‌دهنده آغازگرهای اختصاصی و مناطق اینترونی cDNA می‌باشد

Figure 4- Comparing the nucleotide sequence of PIC2 genes that derived from genomic DNA and cDNA.

Query indicates genomic DNA of g and Query16851 indicates specific primers and intronic regions of cDNA.

توالی یابی محصولات PCR

دارند.

در مقایسه این دو توالی از ژن مذکور پس از مقایسه همدیفی مشخص شد که DNA ژنومی این ژن دارای چهار منطقه اگزونی و سه ناحیه اینترونی می باشد. مناطق اگزونی اول، دوم، سوم و چهارم به ترتیب شامل ۱۱۵، ۲۳۱، ۲۵۶ و ۳۱ جفت باز و مناطق اینترونی به ترتیب شامل ۳۸، ۲۷۱ و ۸۰ جفت باز نوکلئوتیدی می باشند. توالی مناطق اینترونی شامل توالی هایی بوده که گاهی کوتاه بوده و نقش مثبتی در ایجاد بیان ژن PIC2 دارد.

نتایج بدست آمده از تعیین توالی DNA ژنومی و cDNA از ژن PIC2، ۱۰۲۲ و ۶۳۳ نوکلئوتید مشخص شدند. با بلاست کردن و مقایسه توالی های نوکلئوتیدی ژن PIC2 استخراج شده توسط پرایمرهای اختصاصی (جایگاه تقریبی پرایمر پیشبرنده بین نوکلئوتید شماره ۱ تا ۱۶ و پرایمر برگرداننده بین نوکلئوتید شماره ۶۲۷ تا ۶۳۳)، از DNA ژنومی و cDNA، نتایجی که بدست آمد در شکل ۴ نشان داده شد که نواحی قرمز رنگ نشان دهنده مناطق اینترونی بوده و تنها در DNA ژنومی حضور

```

1 atgttgaggggaaagattgagataaagaggatagagaactetaccaacagggcaggtgacc 60
1 M L R G K I E I K R I E N S T N R Q V T 20
61 ttctccaagaggaggaatgggatcatcaagaaagccagagagatcagtgctctctgtgag 120
21 F S K R R N G I I K K A R E I S V L C E 40
121 tgtgaggtctctctgtgcatcttttcaagcctaggcaagatgagtgaatactgcagccca 180
41 C E V S L V I F S S L G K M S E Y C S P 60
181 aacactaagttgccaagataatgggagaagtaccagcagaactctgggaagaggctctgg 240
61 N T K L P K I M E K Y Q Q N S G K R L W 80
241 gaagccaagcatgagaatctgagtgccgagatcgaaaggatcaaaagagagaatgacaac 300
81 E A K H E N L S A E I E R I K R E N D N 100
301 atgcagattgaactgaggcacttgaaggggtgacgatctgaattccctgcattccaaaggaa 360
101 M Q I E L R H L K G D D L N S L H P K E 120
361 ttgatccctatagaagaagccttgcaaacgggtttaaccgggtgttcgagaaaagcagatg 420
121 L I P I E E A L Q N G L T G V R E K Q M 140
421 gattccttgaagatgatgaagaaaaatgagagggttgatggaagaggagaataagaggctg 480
141 D S L K M M K K N E R L M E E E N K R L 160
481 acttatttattgcatcatcaacaattggcaatggaaggaacatgagagacatggatctt 540
161 T Y L L H H Q Q L A M E G N M R D M D L 180
541 gggtaccaaacagaaagagaggggcatactctctcagatgccaatgacctccgtatgcaa 600
181 G Y Q Q K E R A Y P S Q M P M T F R M Q 200
601 ccgatccagcccaacttgcaggaggctaaatag 633
201 P I Q P N L Q E A K Stop 210

```

شکل ۵- توالی نوکلئوتید و آمینواسید استنباطی ژن PIC2 در کلاله گل زعفران

Figure 5- sequences of Nucleotide and amino acid analyzed of PIC2 gene in stigma of saffron.

بیوانفورماتیکی، اسیدآمینوهای تشکیل دهنده آن صورت گرفت، نشان داد که پروتئین حاصل دارای ۲۱۰ اسیدآمینو می باشد. نقطه ایزوالکتریک و وزن مولکولی این پروتئین با کمک ابزارهای پایگاه Expasy به ترتیب ۹/۲۶ و ۲۴۷۶۰/۷۰ kDa محاسبه شد. ساختار واحدهای آمینواسیدی این پروتئین طبق شکل ۶ و جدول ۱ مشخص شده است. فرمول اتمی این پروتئین عبارت از: C1067H1764N318O323S17 است.

نتایج تعیین توالی در شکل ۵ نیز نشان دهنده خوانش ۶۳۳ نوکلئوتید مربوط به تمامی چهار اگزون ژن PIC2 در کلاله زعفران را نمایش داده است. حاصل رونویسی و ترجمه این بخش از ژن PIC2، پروتئینی در حدود ۲۱۰ اسیدآمینو را تشکیل داده است.

ساختار پروتئین

مطالعات پروتئینی این ژن که از تجزیه و تحلیل های

خواص عملکردی پروتئین‌ها به میزان زیادی، از چگونگی ساختار سه‌بعدی آن‌ها منشأ می‌گیرد که بر اساس مدل‌سازی همولوژیکی از این پروتئین ترسیم شده است. شکل فضایی بخش‌های متفاوت هر پروتئین، در واقع تعیین‌کننده کاربرد و عملکرد ویژه همان بخش از پروتئین بوده و هر نوع تغییری در این ساختار می‌تواند موجب اختلال در عملکرد آن شود.

در این پژوهش ساختار سه‌بعدی بخشی از پروتئین PISTILLATA-LIKE MADS BOX شبیه‌سازی شد. همچنین بررسی ساختار سه‌بعدی این پروتئین با هم‌رديف‌سازی کردن (Blast کردن) ساختار اول رشته‌های پلی‌پپتیدی این پروتئین، با توالی‌های مشابه اسیدآمینه‌های دیگر از ساختار پروتئین‌های دیگر انجام پذیرفت و بر اساس مدل‌سازی همولوژیکی بخش‌هایی از این پروتئین، شناخت بهتری از عملکرد این پروتئین حاصل شد. مدل ساختار مولکولی پروتئین PIC2 در شکل ۲ نشان می‌دهد که شکل ترسیم شده از موقعیت مکانی اسیدآمینه مکان اول تا اسیدآمینه مکان ۱۷۸ می‌باشد. هم‌رديف‌سازی توالی اسیدآمینه پروتئین PISTILLATA-like MADS box با همولوگ‌های پروتئین عامل تقویت Myocyte 2B (نوعی پروتئین هیستونی) بیشترین تشابه را در نتیجه‌گیری نشان داده است، این توالی‌ها با یکدیگر

در حدود ۴۷ درصد هم‌آرایی داشتند.

منطقه بین اسیدآمینه مکان ۱ تا ۷۶ در پروتئین رونویسی شده از ژن PIC2، اصولاً از مناطق منظم پروتئینی بوده که شامل دو ساختار آلفا هلیکس، دو ساختار صفحات بتا و چهار ساختار رندوم کویل می‌باشند. ساختارهای ثانویه آلفا هلیکس و صفحات بتا در دسته ساختارهای دوم منظم و پیچ‌های تصادفی، جزو ساختارهای ثانویه نامنظم تکرارناپذیر و تصادفی طبقه‌بندی می‌شوند. اصل منظم‌شدن ساختار این قسمت از پروتئین، بدلیل حضور توالی آمینواسیدهای تیروزین، تریپتوفان، فیل‌آلانین، لوسین، ایزولوسین، والین، سیستئین و آسپارژین می‌باشد. عوامل دیگری از جمله آب‌دوستی، انعطاف‌پذیری، وزن مولکولی و نقطه ایزوالکتریک نیز در منظم شدن این ساختار نقش دارد. منطقه دیگر این پروتئین مکان بین اسیدآمینه‌ای ۷۶ تا ۱۷۸ می‌باشد؛ که این منطقه دارای دو شکل مارپیچ آلفا با یک اتصال راندوم کویل که این منطقه را نیز می‌توان از جمله مناطق منظم این پروتئین در نظر گرفت.

انتهای آمینی این پروتئین می‌تواند از پلی‌پپتید جدا شده و به عنوان یک پروتئین بالغ در مسیر ترشحی به خارج از سلول، هدایت شود که آمینواسیدهای غیرقطبی یا هیدروفوبی گویای فعالیت این پروتئین را در سطح محلول سلول را نشان می‌دهد.

جدول ۱- واحد‌های آمینواسیدی تشکیل دهنده پروتئین بیان شده از ژن PIC2
Table 1- The amino acid units of the expressed proteins from PIC2 gene

درصد	ترکیب	آمینو اسید	درصد	ترکیب	آمینواسید
%	Composition	Amino Acid	%	Composition	Amino Acid
10.5	22	Leu (L)	3.3	7	Ala (A)
10	21	Lys (K)	7.6	16	Arg (R)
6.7	14	Met (M)	6.7	14	Asn (N)
1.4	3	Phe (F)	2.9	6	Asp (D)
3.8	8	Pro (P)	1.4	3	Cys (C)
6.2	13	Ser (S)	6.7	14	Gln (Q)
2.9	6	Thr (T)	11.9	25	Glu (E)
0.5	1	Trp (W)	4.8	10	Gly (G)
2.4	5	Tyr (Y)	2.4	5	His (H)
2.4	5	VaL (V)	6.7	14	Ile (I)

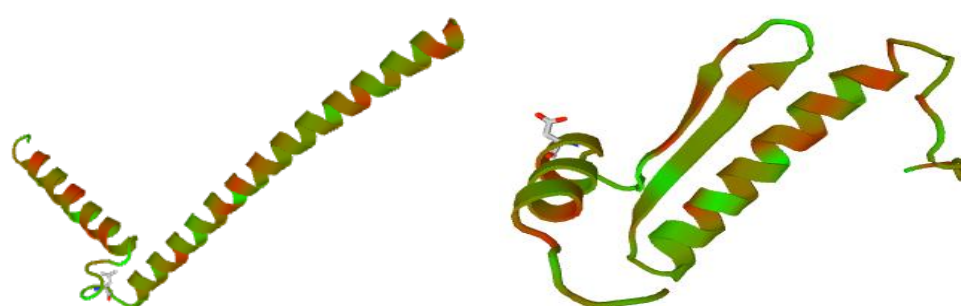
تعداد بار منفی باقیمانده (آسپارتیک + گلوتامیک): 30. تعداد بار مثبت باقیمانده (آرژنین + لیزین): 37

Total number of negatively charged residues (Asp + Glu): 30. Total number of positively charged residues (Arg + Lys): 37

Target	MLRGKIEIKRIENSTNRQVTFESKRRNGIIRKAREISVLCCEVSLVIFSSLGKMSEYCSPTNKLPRIMEKYQQNSGKRLW	80
1tqe.1.D	MRRAKIQISRIIDQENRQVTFEKRRKGDKKAELSVLCCEIALIENSANLEQYSTE--MDRVLLKYTEISEPH--	76
Target	EAKHENLSAEIERIKRENDNMQIELRHLKGGDDLNSLHPKELIPIEEALQNGLTGVREKQMDSL---KMMKKNER	151
4ox0.1.B	SSQQEYLLKIKERYDAIQRTQRNLGGDLGFLSKKELESLEERQLDSSLKQIRALRTQFMDDQLNDLQSKER	164
Target	LMEEENKRLTYLLHHQQLAMEGNMRDMDLGYQQKERAYPSQMPMTFRMQPIQPNLQEA	210
4ox0.1.B	MLTETNKTLLRLLA-----	178

شکل ۶- هم آرائی توالی اسیدهای آمینه تشکیل دهنده قسمت اعظم پروتئین بیان شده ژن PIC2 با توالی اسیدآمینه های موجود در نرم افزار swissmodel

Figure 6- Alignment of amino acids sequence that forming major parts of expressed protein of PIC2 gene by the amino acid sequence that existing in the swissmodel software.



Phylogenetic sequence of amino acids (84-178)

PISTILLATA-like MADS box Protein

(a)

Phylogenetic sequence of amino acids (1-76)

PISTILLATA-like MADS box Protein

(b)

شکل ۷- a: شکل فضایی و ساختار سه بعدی بخش اعظم پروتئین بیان شده از ژن PIC2 برای مکان اسیدآمینه های بین ۱ تا ۷۶

b: شکل فضایی و ساختار سه بعدی بخش اعظم پروتئین بیان شده از ژن PIC2 برای مکان اسیدآمینه های بین ۷۶ تا ۱۷۸

Figure 7- a: Space shapes and three-dimensional structure of major part of expressed protein of the PIC2 gene for place of 1-76 amino acids.

b: Space shapes and three-dimensional structure of major part of expressed protein of the PIC2 gene for place of 76-178 amino acids.

می نماید.

نتیجه گیری

در نتیجه افزایش بیان ژن PIC2 باعث افزایش معنی داری در گلدهی بنه های زعفران شده است. این افزایش معنی دار، نشان دهنده تأثیر افزایش بیان ژن کلاس B اعضای خانواده MADS box بر روی رشد و نمو گل و زمان گلدهی زعفران می باشد. بیان بالاتر ژن PIC2 در مراحل اولیه نمو گل های زعفران دلالت بر آن دارد که این ژن در شروع نمو اعضای زایشی نقش عمده ای ایفا می کند. مسلماً بررسی توالی های پروموتوری این ژن و مطالعه برای افزایش بیان ژن هایی، مانند PIC2 در پژوهش های آتی مفید واقع خواهد بود.

در تحقیق حاضر الگوی بیان ژن PIC2 و توالی پروتئینی آن بررسی گردید. بیان ژن PIC2 متعلق به کلاس B و از ژن های خانواده MADS-box تقسیم بندی می شوند که نقش مهمی در تکامل گل زعفران به خصوص زعفران کشت شده در منطقه تربت حیدریه دارند. بررسی عوامل رونویسی PISTILLATA-LIKE MADS BOX، به روش PCR نیمه کمی در اندام های رویشی، کلاله و سایر اندام های گل، مشخص نمود که میزان بیان این ژن در تشکیل اندام های مختلف گل، به ویژه در تشکیل کلاله گل ها نقش مهمی را ایفا

لیپیدها را دارند. این پروتئین می‌تواند در گروه هموفیلیکی با پروتئین‌هایی قرار گیرد که دارای توالی‌های مشابه بوده، به-علاوه نتایج نشان‌دهنده کاربرد توالی‌ها و ژن‌های جدید در تعیین روابط بین گونه‌ای در گیاهان می‌باشد.

با تأکید بر این نکته که مطالعه ژن‌های مسیر گلدهی در زعفران و نحوه توسعه گل در این گیاه مهم و ضروری به نظر می‌رسد و با توجه به اینکه اهمیت اقتصادی زعفران تنها به چرخه گلدهی در این گیاه خلاصه می‌شود، نیاز است تا با استفاده از روش‌های مولکولی و بیوتکنولوژیکی، بتوان ژن‌ها و پروتئین‌های رونوشت و ترجمه شده، مسیر گلدهی در گیاه زعفران را شناخت و به نحوه و زمان گلدهی در این گیاه توجه بیشتری کرد، چرا که با تحقیق بر روی بیان ژن‌های این مسیر و مشخص کردن اینکه چه ژن‌هایی در زعفران، در آغازش گلدهی نقش دارند، مهم به نظر می‌رسد. بنابراین لزوم مطالعه بیشتر برای درک مکانیزم آغاز گلدهی و تمایز اندام‌ها در این گیاه استراتژیک لازم و ضروری می‌نماید. از طرفی به علت تجمع و تولید متابولیت‌های ثانویه در زمان گلدهی وجود ارتباط بین ژن‌های دخیل در تولید متابولیت‌های ثانویه و ژن‌های درگیر نیز در گلدهی مسلم بنظر می‌رسد. از این رو توجه به نحوه گلدهی و ارتباط آن با تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاه زعفران از نکات قابل پژوهش می‌باشد.

نتایج تحقیق حاضر نشان می‌دهد دو ژن PIC1 و PIC2 فرم‌های حاصل از پیرایش‌های متفاوت ژن PISTILLATA از خانواده MADS BOX می‌باشند که ۹۸ درصد تشابه توالی نوکلئوتیدی را دارا هستند. اختلاف دو درصدی آن بدلیل حضور ۵ تک نوکلئوتید متفاوت در بین دو توالی این دو ژن می‌باشد، تک نوکلئوتیدها می‌توانند به عنوان نشانگرهای تک نوکلئوتیدی (SNPs) معرف حضور این ژن‌ها در گیاه و اندام مورد مطالعه باشند. با این وجود، جهت یافتن چگونگی تشکیل گل زعفران و به خصوص بخش مادگی آن، آزمایش‌های بیشتری در ارتباط با چگونگی تجمع پروتئین‌های MADS و برهمکنش عوامل کلاس‌های A، B، C و E را می‌طلبید. درک چگونگی رشد گل در گیاه زعفران می‌تواند راه را برای افزایش عملکرد آن و کاهش هزینه‌های تولید گل به ویژه کالاه هموار سازد.

مقایسه، هم‌آرایی و به دست آوردن خصوصیات ساختار ژنی و همچنین آنالیز ساختار سه‌بعدی پروتئین حاصل از بیان این ژن، در سایت پایگاه‌های اطلاعاتی پروتئین‌ها انجام شد. توالی اسیدآمینه کد شده برای پروتئین PIC2 نشان داد که این پروتئین، همسانی بالایی با اعضای خانواده جعبه MADS که از عوامل رونویسی می‌باشد را دارد، در این بررسی، با در نظر گرفتن شرایط طبیعی، شبیه‌سازی‌ها نشان می‌دهند که ساختار این پروتئین کوچک و بر اساس اسیدآمینه‌های غیرقطبی سازنده آن، در مخلوط آب، ماتریکسی را شکل می‌دهد، این ماتریکس آب را دور می‌کند و قابلیت اتصال و انتقال انواع

منابع

- Ahrazem, O., Almudena Trapero, Gómez, M.D., Rubio-Moraga, A., and Gómez-Gómez, L. 2010. Genomic analysis and gene structure of the plant carotenoid dioxygenase 4 family: A deeper study in *Crocus sativus* and its allies. *Genomics* 96: 239-250.
- Ahrazem, O., Rubio-Moraga, A., Trapero, A., and

- Gomez-Gomez, L. 2012. Developmental and stress regulation of gene expression for a 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase, CstNCED, isolated from *Crocus sativus* stigmas. *Journal of Experimental Botany* 63 (2): 681-694.
- Alaey, M., Naderi, R., Khalighi, A., Vezvaeoi, A., and Salami, A.R. 2007. Study on effective

- components on the quantity and quality of genomic DNA extracted from Iran cyclamen, Pajouhesh and Sazandegi 73: 11-16.
- Ashraf, N., Deepti, J., and Vishwakarma, R.A. 2015. Identification, cloning and characterization of an ultrapetala transcription factor CsULT1 from *Crocus*: a novel regulator of apocarotenoid. *BMC Plant Biology* 15 (25): 1-12.
- Becker, A., and Theissen, G. 2003. The major clades of MADS-box genes and their role in the development and evolution of flowering plants, *Molecular Phylogenetics and Evolution* 29 (3): 464-489.
- Castillo, R., Fernandez, J., and Gomez-Gomez, L. 2005. Implications of carotenoid biosynthetic genes in apocarotenoid formation during the stigma development of *Crocus sativus* and its closer relatives. *Plant Physiology* 139: 674-89.
- D'Agostino, N., Pizzichini, D., Chiusano, M.L. and Giuliano, G. 2007. An EST database from saffron stigmas. *BMC Plant Biology* 7 (53): 1-8.
- Davies, B., Rosa, A., Eneva, T., Saedler, H., and Sommer, H. 1996. Alteration of tobacco floral organ identity by expression of combinations of *Antirrhinum* MADS-box genes. *The Plant Journal* 4: 663-677.
- De Bodt, S., Raes, J., Florquin, K., Rombauts, S., Rouze, P., Theissen, G., and Van de Peer, Y. 2003. Genomewide structural annotation and evolutionary analysis of the type I MADS-box genes in plants. *Journal of Molecular Evolution* 56: 573-586.
- Edstam, M.M., Viitanen, L., Salminen, T.A., and Edqvist, J. 2011. Evolutionary history of the non-specific lipid transfer proteins. *Molecular Plant* 4 (6): 947-964.
- Emamzadeh, A.R., Hosseinkhani, S., Sadeghizadeh, M., Nikkhah, M., Chaichi, M.J., and Mortazavi, M. 2006. cDNA cloning, expression and homology modeling of a luciferase from the firefly *Lampyroidea maculata*. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 39 (5): 578.
- Fernandez, J.A. 2004. Biology, biotechnology and biomedicine of saffron. *Recent Research Developments in Plant Science* 2: 127-159.
- Fernandez-Fuentes, N., Madrid-Aliste, C.J., Rai, B.K., Fajardo, J.E., and Fiser, A.S. 2007. M4T: A comparative protein structure modeling server. *Nucleic Acids Research* 35 (2): 363-368.
- Goff, S.A., Ricke, D., Lan, T.H., Presting, G., Wang, R., Dunn, M., Glazebrook, J., Sessions, A., Oeller, P., Varma, H., Hadley, D., Hutchison, D., Martin, C., Katagiri, F., Lange, B.M., Moughamer, T., Xia, Y., Budworth, P., Zhong, J., Miguel, T., Paszkowski, U., Zhang, S., Colbert, M., Sun, W.L., Chen, L., Cooper, B., Park, S., Wood, T.C., Mao, L., Quail, P., Wing, R., Dean, R., Yu, Y., Zharkikh, A., Shen, R., Sahasrabudhe, S., Thomas, A., Cannings, R., Gutin, A., Pruss, D., Reid, J., Tavtigian, S., Mitchell, J., Eldredge, G., Scholl, T., Miller, R.M., Bhatnagar, S., Adey, N., Rubano, T., Tusneem, N., Robinson, R., Feldhaus, J., Macalima, T., Oliphant, A., and Briggs, S. 2002. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. japonica). *Science* 296 (5565): 92-100.
- Hartz, C., Lauer, I., Del Mar San Miguel Moncin, M., Cistero-Bahima, A., Foetisch, K., Lidholm, J., and Scheurer, S. 2010. Comparison of IgE-binding capacity, cross-reactivity and biological potency of allergenic non-specific lipid transfer proteins from peach, cherry and hazelnut. *International Archives of Allergy and Immunology* 153 (4): 335-346.
- Jodeir, S., and Dehghan Nayeri, F. 2016. Study of expression of the MADS-box transcription factors involved in flower formation in saffron (*Crocus sativus* L.). *Cellular and Molecular*

- Researches 4 (28): 488-499.
- Johnson, M., Zaretskaya, I., Raytselis, Y., Merezuk, Y., McGinnis, S., and Madden, T.L. 2008. NCBI BLAST: a better web interface. *Nucleic Acids Research* 36 (2): 5-9.
- Josefina Poupin, M., Federici, F., Medina, C., Tomás Matus, J., Timmermann, T., and Arce-Johnson, p. 2007. Isolation of the three grape sub-lineages of B-class MADS-box TM6, PISTILLATA and APETALA3 genes which are differentially expressed during flower and fruit development. *Gene* 404 (1): 10-24
- Kafi, M. 2004. Saffron (technology, production and processing). First Edition, Publication of Ferdowsi University of Mashhad. pp, 21-171.
- Kafi, M., Zand, E., Mahdavi Damghani, B., and abbasi, F. 2010. Plant Physiology. Fourth Edition. Publication of Ferdowsi University of Mashhad 676.
- Kalivas, A., Pasentsis, K., Polidoros, A.N., and Tsaftaris, A.S. 2007. Heterotopic expression of B-class floral homeotic genes PISTILLATA-GLOBOSA supports a modified model for crocus (*Crocus sativus* L.) flower formation. *DNA Sequence* 18: 120-130.
- Kolaskar A.S., and Tongaonkar P.C. 1990. A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens. *FEBS Letters* 276 (1): 172-174.
- Mandel, M.A., Gustafson-Brown, C., Savidge, B., and Yanofsky, M.F. 1992. Molecular characterisation of the Arabidopsis floral homeotic gene APETALA1. *Nature* 360: 273-277.
- Masiero, S., Colombo, L., Grini, P.E, Schnittger, A., and Kater, M.M. 2011. The emerging importance of type I MADS-box transcription factors for plant reproduction. *The Plant Cell Online* 3: 865-872.
- Messenguy, F., and Dubois, E. 2003. Role of MADS box proteins and their cofactors in combinatorial control of gene expression and cell development. *Gene* 316: 1-21.
- Mihasan, M. 2010. Basic protein structure prediction for the biologist. *Archives of Biological Sciences, Belgrade* 62 (4): 857-871.
- Mohammad Hashem, F., Nikpour, P., and Emadi-Baygi, M. 2011. Evaluation and optimization of various procedures of RNA extraction from human frozen tissues. *Journal of Isfahan Medical School* 29 (133): 327-335.
- Moraga, A.R., Rambla, J.L., Ahrazem, O., Granell, A., and Gómez-Gómez, L. 2009. Metabolite and target transcript analyses during *Crocus sativus* stigma development. *Phytochemistry* 70: 1009-1016.
- Murry, M., and Thompson, W.F. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acid Research* 8: 4321-4325.
- Pelaz, S., Ditta, G.S., Baumann, E., Wisman, E., and Yanofsky, M.F. 2000. B and C floral organ identity functions require sepallata MADS-box genes. *Nature* 6783: 200-203.
- Sambrook, J., and Russell, D.W. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 628 pp.
- Sarowar, S., Kim, Y.J., Kim, K.D., Hwang, B.K., Ok, S.H., and Shin, J.S. 2009. Overexpression of lipid transfer protein (LTP) gene enhances resistance to plant pathogens and LTP functions in long-distance systemic signaling in tobacco. *Plant Cell Reports* 28 (3): 419-427.
- Shakib, A.M., and Ainsworth, C.C. 2009. Expression study of four gene clones belonging to MADS- box family in the dioecious plant sorrel (*Rumex acetosa* L.). *journal of Agricultural biotechnology* 1 (1): 1-18.
- Szczygłowski, K., and Amyot, L. 2003. Symbiosis, inventiveness by recruitment? *Plant Physiology* 131: 935-940.
- Theissen, G., Becker, A., Di Rosa, A., Kanno, A., Tsaftaris, A., Alexios, S., Polidoros, N., Pasentsis,

- K., and Kalivas, A. 2006. Tepal formation and expression pattern of B-class paleo Ap3- like MADS-box genes in crocus (*Crocus sativus* L.). Plant Science 2: 238-246.
- Tsaftaris, A., Pasentsis, K., Makris, A., Darzentas, N., Polidoros, A., Kalivas, A., and Argiriou, A. 2011. The study of the E-class Sepallata3-like MADS-box genes in wild-type and mutant flowers of cultivated saffron crocus (*Crocus sativus* L.) and its putative progenitors. Journal of Plant Physiology 14: 1675-1684.
- Tsaftaris, A.S., Pasentsis, K., and Polidoros, A.N. 2005. Isolation of a differentially spliced C-type flower specific Ag-Like MADS-box gene from *Crocus sativus* and characterization of its expression. Biologia Plantarum 4: 499-504.
- Tsaftaris, A.S., Pasentsis, K., Iliopoulos, I., and Polidoros, A.N. 2004. Isolation of three homologous Ap1-like MADS-box genes in crocus (*Crocus sativus* L.) and characterization of their expression. Plant Science 5: 1235-1243.
- Van Loon, L.C. and Van Strien, E.A. 1999. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. Physiological and Molecular Plant Pathology 55 (2): 85-97.
- Varjonen, E., Vainio, E., Kalimo, K., and Juntunen-Backman, K. 2002. Clinical importance of non-specific lipid transfer proteins as food allergens. Biochemical Society Transactions 30 (6): 910-913.
- Kim, J.T., Munster, T., Winter, K.U., and Saedler, H. 2000. A short history of MADS-box genes in plants. Plant Molecular Biology 42: 115-149

The structure of the protein and gene expression of PIC2 affecting blooming flowers (*Crocus sativus* L.)

Iman Yousefi Javan^{1*} and Faezeh Gharari²

Submitted: 8 August, 2016

Accepted: 17 January, 2017

Yousefi Javan, I., and Gharari, F. 2017. The structure of the protein and gene expression of PIC2 affecting blooming flowers (*Crocus sativus* L.). Saffron Agronomy & Technology 5(1): 73-90.

Abstract

Saffron is grown for using its flower and red color stigma. This plant has many uses in the food industry, paints and medicine. Due to its high monetary worth, identification of genes involved in the flowering is very important. In order to better understand the molecular mechanisms involved in the onset of flowering, Gene and gene expression of Pistillata-Like MADS box (PIC2) were studied. The Gene sequences have high homology with other family members of the MADS-box family (one of the transcription factors control the expression of proteins flowers). In this research, the gene was studied using bioinformatics resources. Primers were designed for amplification of the gene and then the total DNA and RNA were extracted from the leaves of saffron. cDNA synthesis was performed by the reverse transcriptase enzyme and it was used as a template for amplification of PIC2 gene by PCR reaction. The reaction was amplified to a fragment with length 900 bp from cDNA and another fragment with length 2100 bp from genomic DNA. This gene encodes a protein that includes 210 amino acids. By analyzing the molecular structure of protein transcripts based on modeling of the gene homology, the spatial figure showed that they have a regular structure.

Keywords: saffron, Pistillata-like MADS box gene, MADS box, homology modeling.

1- Assistant Professor, Department of Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Torbat Heydarieh

2- M.Sc. Animal Genetics, Journal Expert, University of Torbat Heydarieh

(*- Corresponding author Email: I.javan@torbath.ac.ir)

DOI: 22048/jsat.2017.63141.1200