

آنالیز بیوانفورماتیکی فاکتور رونویسی MADS-box در گیاه *Brachypodium distachyon*

زهرا حاجی‌برات^۱، عباس سعیدی^{۲*}، زهره حاجی‌برات^۱

۱. دانشجوی دکتری، گروه زیست‌فناوری گیاهی و بیوتکنولوژی، دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

۲. استاد گروه زیست‌فناوری گیاهی و بیوتکنولوژی، دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۲/۱۹ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۷/۶/۴)

Bioinformatics analysis of MADS-box in *Brachypodium distachyon*

Zahra Hajibarat¹, Abbas Saidi^{2*}, Zohreh Hajibarat¹

1. Ph.D. Candidate, Department of Plant Biology & Biotechnology, Faculty of Bioscience and Biotechnology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran.

2. Professor, Department of Plant Biology & Biotechnology, Faculty of Bioscience and Biotechnology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran.

(Received: Mar. 10, 2018 - Accepted: Aug. 26, 2018)

Abstract

Flower initiation is an important factor influencing plant yield. Environmental factors significantly affect flowering initiation. Bioinformatic analysis was performed on MADS-box transcription factors which are considered as important components in the flower formation. *Brachypodium* is a new experimental model which used to understand the genetic, cellular mechanism and molecular biology of plants. In this study, 43 sequences of *Brachypodium* MADS-box genes were analyzed using phylogeny relationships, conserved motifs, chromosomal location, detection of transcription factor binding sites, and amino acid composition. The aim of this study was to better identify molecular mechanisms related to flowering. In this study, results showed that MADS-box genes distribute on all *Brachypodium* chromosomes, while gene clusters were located on all chromosomes except chromosome five. Analysis of the amino acid composition revealed that lucine, serine, and glutamate, with the highest amount, and tryptophan, with the least amount, elicit appreciable flowering. Based on the phylogeny analysis the genes were divided to four clusters. Tajima test indicated the presence of balancing selection in MADS-box sequences and as a result polymorphism is conserved in the sequences. Thus, the total diversity in MADS-box genes were high. Overall, our results provided useful information for the survey of flowering response genes, thereby detection of molecular mechanism and intergenic relationships facilitate flowering pathway.

Keywords: Phylogeny, MADS-box, Transcription factor, Flowering, Polymorphism.

چکیده

آغاز گلدهی فاکتور مهمی است که عملکرد گیاه را تحت تأثیر قرار می‌دهد. عوامل محیطی تأثیر معنی‌داری بر مرحله گلدهی می‌گذارند. آنالیز بیوانفورماتیک فاکتور رونویسی MADS-box که به عنوان اجزای مهم در تشکیل گلدهی انجام گرفت. برکپودیوم گیاه مدل جدیدی است که برای درک بهتر مکانیسم‌های ژنتیکی، سلولی و بیولوژی مولکولی گیاهان مورد استفاده قرار می‌گیرد. در این مطالعه ۴۳ توالی ژن‌های MADS-box برکپودیوم با استفاده از روابط فیلوژنی، موتیف‌های محافظت‌شده، نقشه کروموزومی، آنالیز جایگاه اتصال فاکتور رونویسی و ترکیبات آمینواسیدهای آنالیز شدند. هدف از این مطالعه شناخت بهتر مکانیسم‌های مولکولی مرتبط با گلدهی می‌باشد. در این مطالعه، نتایج نشان داد که ژن‌های MADS-box بر روی تمامی کروموزوم‌های برکپودیوم پراکنده هستند، درحالی‌که کلاسترهای ژنی بر روی تمامی کروموزوم‌ها به جز کروموزوم شماره پنج قرار داشتند. آنالیز ترکیبات آمینواسیدی نشان داد که لوسین، سرین و گلوتامات بالاترین مقدار و پایین‌ترین میزان مربوط به تربیتوفان بود که باعث القای گلدهی می‌شود. براساس آنالیز فیلوژنی ژن‌ها به ۴ گروه تقسیم بندی شدند. تست تاجیما وجود انتخاب متعادل را در توالی MADS-box پیش‌بینی می‌کند و در نتیجه، پلی‌مورفیسم در توالی‌ها حفظ می‌شود. در نتیجه می‌توان گفت که تنوع کل در ژن‌های MADS-box بالا بوده‌است. در مجموع، نتایج ما اطلاعات مفیدی برای بررسی ژن‌های درگیر در پاسخ به گلدهی فراهم نموده و شناخت مکانیسم مولکولی و روابط بین ژنی در مسیر گلدهی را تسهیل ساخته‌است.

واژه‌های کلیدی: فیلوژنی، MADS-box، فاکتور رونویسی، گلدهی، پلی‌مورفیسم.

مقدمه

ژن‌های بسیاری درگیر در کنترل گلدهی بوده که بیشتر آنها متعلق به خانواده بزرگ MADS-box هستند. علاوه بر این، MADS-box فاکتورهای رونویسی مهمی برای توسعه جانبی ریشه، تعیین نوع مریستم و مخصوصاً تشکیل گلدهی هستند (Causier *et al.*, 2002). موتیف MADS-box ناحیه محافظت‌شده ۵۶ آمینواسیدی هستند که در دمین اتصال DNA بسیاری از فاکتورهای رونویسی یوکاریوت مشاهده شده‌است. خانواده MADS-box به دو گروه اصلی تقسیم شده‌اند. نوع اول MADS-box شامل ژن‌های ARG80/SRF در حیوانات و قارچ‌ها و ژن‌های به فرم M-type در گیاهان مشاهده می‌شود و نوع دوم شامل ژن‌های MEF2 که در حیوانات و مخمر و نیز در گیاهان گلدار بیش از ۱۰۰ ژن شناسایی شده‌است. این ژن‌های MEF2 با نام MIKC نیز شناخته می‌شوند (Kofuji *et al.*, 2003). براساس اطلاعات تکاملی ژن‌های MADS-box دارای دمین‌های حفاظت‌شده هستند و به دو گروه I و II تقسیم می‌شوند. ژن‌های گروه II تنظیم‌کننده‌های کلیدی در فرآیندهای تکاملی مثل نوع مریستم، تکامل میوه و بذر هستند. گروه II شامل ۴ دمین حفاظت‌شده بوده که اعم از دمین‌های M، I، K و C هستند (Masiero *et al.*, 2011). از برجسته‌ترین ویژگی‌های خانواده ژنی MADS-box عملکرد متنوع اعضای آن است که جنبه‌های مختلف از رشد و توسعه گیاه را تحت تأثیر قرار می‌دهند. طبق مطالعات انجام شده خانواده ژنی از طریق مضاعف‌شدگی ژن‌ها و مضاعف‌شدگی در سطح ژنوم کامل برنج ایجاد شده‌اند (Yang *et al.*, 2012). عملکردهای MADS-box شامل کنترل زمان گلدهی، شناسایی مریستم و ارگان گلدهی، رسیدگی میوه، رشد جنین و همچنین رشد اندام‌های رویشی مانند ریشه و

برگ می‌باشد (Moore *et al.*, 2002). حضور ژن‌های MADS-box در آنژیواسپرماها و سرخس محدود به رشد و توسعه اندام زایشی نمی‌شود، بلکه به تشکیل گل و میوه نیز کمک می‌کنند (Münster *et al.*, 2002). درک چگونگی تکامل و نمو گل، مطالعه فعالیت و برهمکنش ژن‌های MADS-box با سایر عوامل رونویسی در تنظیم بیان ژن‌های دخیل در گلدهی مهم تلقی می‌شود. ژن‌های خانواده MADS-box عوامل رونویسی را کد نموده که در فرآیندهای گوناگون رشد و توسعه یوکاریوت‌ها دخیل بوده و نیز در گیاهان این ژن‌ها در تکامل گل و میوه دخالت دارند (Bowman *et al.*, 1999). آنالیز بیوانفورماتیکی ژن‌های MADS-box برای آراییدوپسیس و قهوه انجام شده- است (De oliveira *et al.*, 2010; Raes, 2003).

طبق بررسی‌های انجام‌شده آغاز گلدهی وابسته به بیان متعادل یک شبکه پیچیده ژنی است که توسط فاکتورهای محیطی و درونی تنظیم می‌شوند (Pezzopane *et al.*, 2008). براساس مطالعات انجام‌شده استرس‌های زیستی و غیرزیستی بر آغاز گلدهی تأثیر منفی داشته و در نهایت عملکرد گیاه را تحت شعاع قرار خواهد داد. از آنجایی که گلدهی اولیه صفت مهمی در عملکرد بوده و نیز بر روی کیفیت دانه در گندم و جو تأثیرگذار خواهد بود لذا در تحقیق حاضر برکپودیوم مورد آنالیز *in silico* قرار گرفت که به عنوان گیاه مدل جدید برای ژنومیک عملکردی گیاهان زراعی تک‌لپه است (Nitcher *et al.*, 2014). اکوتیپ دیپلوئید برکپودیوم (2n=۱۰) با ۵ کروموزم به آسانی قابل تمایز از یکدیگر هستند. ژنوم هسته‌ای برکپودیوم نسبت به آراییدوپسیس به لحاظ ساختاری ساده‌تر می‌باشد. برکپودیوم گیاهی یکساله، خودگرده افشان با سیکل زندگی کمتر از ۴ ماه و دارای نیاز حداقل رشدی می‌باشد. آنالیز ژن‌های خانواده MADS-box بر روی برکپودیوم گامی موثر برای شناخت ژن‌های دخیل در پاسخ به گلدهی در غلات است (Wu *et al.*, 2012). طبق گزارشات

آزمون بوت استرپ با ۱۰۰۰ تکرار استفاده شد. جایگاه هر ژن بر روی کروموزم‌های برکپودیوم با استفاده از نرم‌افزار MapChart ترسیم شد (Voorrips, 2002).

آنالیز پروتئین، موتیف و دمین محافظت‌شده MADS-box

از نرم‌افزار MEME برای نمایش موتیف‌های پروتئین‌های MADS-box در برکپودیوم استفاده شد (Bailey *et al.*, 2006). این برنامه موتیف‌های محافظت‌شده و نیز تکرار موتیف‌ها، ماکزیمم تعداد موتیف و محدوده موتیف‌ها را پیش‌بینی می‌کند. برای تایید موتیف‌های تعیین شده در MEME از پایگاه داده SMART (Letunic *et al.*, 2011) استفاده شد و با کمک این برنامه موتیف‌های شناسایی‌شده annotate در این مطالعه با استفاده از ProtParam server (Gasteiger *et al.*, 2005) خصوصیات فیزیکوشیمیایی شامل تعداد آمینواسید پروتئین، وزن مولکولی، نقطه ایزوالکتریک در برکپودیوم مورد بررسی قرار گرفت. برای بررسی دمین‌های MADS-box، توالی‌های پروتئینی این ژن‌ها با استفاده از نرم‌افزار ClustalX هم‌ردیف شدند. ویرایش توالی‌ها به کمک نرم‌افزار GENEDOC انجام شد و دمین‌های حفاظت‌شده پروتئین‌های MADS-box ترسیم شدند.

تست تاجیما و بررسی فشار انتخاب بر توالی MADS-box

برای بررسی انتخاب طبیعی در توالی‌های نوکلئوتیدی MADS-box از تست تاجیما (Tajima *test*) استفاده گردید. برای تعیین فشار انتخاب بر توالی‌های نوکلئوتیدی از برنامه SNAP استفاده شد. به کمک این برنامه نسبت جایگزینی غیرهم‌معنی (dN) به جایگزینی هم‌معنی (dS) با استفاده از روش Nei و Gojbori محاسبه گردید.

سایر محققان آنالیز ژنتیکی ژن‌های MADS-box بر روی آرابیدوپسیس، برنج، سیب، خربزه و سویا صورت گرفته‌است (Arora *et al.*, 2007; Niwa *et al.*, 2013; Tian *et al.*, 2015; Pařenicová *et al.*, 2003; Shu *et al.*, 2013; Hu and Liu, 2012). از آنجایی‌که بیان ژن تحت تأثیر فاکتورهای رونویسی قرار می‌گیرد و برهم‌کنش دمین اتصال فاکتور رونویسی با سیس‌المنت‌ها می‌تواند بیان ژن را تنظیم کند. لذا شناسایی و برهم‌کنش این فاکتورها با عناصر تنظیمی سیس به منظور درک بهتر روابط بین مولکولی و بیان ژن‌های پاسخگو به گلدهی ضروری به نظر می‌رسد. در مطالعه حاضر جایگاه اتصال فاکتور رونویسی به منظور بررسی تنظیم رونویسی ژن و بررسی میزان بیان ژن‌های درگیر در مسیر گلدهی مورد آنالیز قرار گرفت. هدف از این مطالعه، بررسی روابط تکاملی، ترکیبات آمینواسیدی، شناسایی موتیف‌ها، بررسی فشار انتخاب، خصوصیات فیزیکوشیمیایی ژن‌های خانواده MADS-box که در تعیین زمان گلدهی و تکامل اندام گل نقش دارد. از دیگر جنبه‌های کاربردی این تحقیق می‌توان به بررسی خصوصیات پروتئین‌ها و عناصر درگیر در پاسخگو به گلدهی اشاره کرد. در این مطالعه از آنالیز *in silico* استفاده شد که یک ابزار کارآمد و مهم برای تعیین ژن‌های عملکردی و تعیین روابط بین ژنی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

آنالیز فیلوژنتیک و محل ژن‌ها بر روی کروموزم‌های برکپودیوم

به منظور بررسی روابط فیلوژنتیک بین ۴۳ تا از اعضای خانواده ژنی MADS-box در برکپودیوم، هم‌ردیف‌سازی چندگانه توالی‌ها با استفاده از ClustalW انجام شد. درخت فیلوژنتیک با استفاده از روش اتصال همسایه (NJ) و نرم‌افزار MEGA6 رسم شد (Tamura *et al.*, 2013). همچنین جهت بررسی و صحت تکرارپذیری درخت ترسیم‌شده، از

تعداد آمینواسید، وزن مولکولی و نقطه ایزوالکتریک متفاوت هستند. تعداد آمینواسید در این خانواده از محدوده ۱۸۳ تا ۶۰۳ متغیر و از نظر وزن مولکولی بین ۳۲/۳۰۶۶۹ تا ۴۸۳۱۵/۸۶ متفاوت بودند. نقطه ایزوالکتریک در محدوده‌ی اسیدی تا بازی بودند که بالاترین و پایین‌ترین مقدار بین ۵/۱ تا ۹/۴۵ می‌باشند (جدول ۱).

موتیف‌های محافظت‌شده در پروتئین‌های MADS به کمک برنامه MEME شناسایی شد. بیشترین و کمترین موتیف به ترتیب ۱۰ و ۳ بوده و بهینه طول موتیف‌ها ۵۰ باز در نظر گرفته شد (شکل ۳). تنها یک موتیف به صورت محافظت‌شده در تمامی ژن‌های MADS-box وجود داشت. در رابطه با موتیف‌های محافظت‌شده تحقیقات گسترده‌ای انجام شده‌است. این حفاظت‌شدگی بالا در موتیف‌ها حاکی از اهمیت این نواحی در فعالیت ژن‌ها و نقش بیولوژیک آنها می‌باشد (Arora et al., 2007). موتیف محافظت‌شده MADS-box در دیگر گیاهان مانند برنج، انگور و موز نیز مشاهده شد (Arora et al., 2007; Yang et al., 2012; Liu et al., 2017).

بررسی ترکیبات آمینواسیدی ژن‌های MADS-box در *Brachypodium*

ترکیبات آمینواسیدی پروتئین‌های MADS-box با استفاده ابزار ProtParam و ExPASy محاسبه گردید. ترکیبات آمینواسیدی پروتئین MADS-box در شکل ۲ نمایش شده‌است. فراوانی‌های ۲۰ آمینواسید در پروتئین مورد آنالیز قرار گرفت.

تجزیه و تحلیل جایگاه اتصال رونویسی

هر یک از ژن‌های MADS-box ۱۰۰۰ جفت باز بالادست ناحیه آغاز رونویسی، توالی پرموتر در نظر گرفته شد. بررسی جایگاه اتصال فاکتورهای رونویسی با استفاده از پایگاه داده PlantPAN انجام شد (Chang et al., 2008).

نتایج و بحث

بررسی پروتئین‌ها و آنالیز توالی ژن‌های MADS-box

نتایج ارزیابی پروتئین‌های MADS-box نشان داد که خانواده MADS-box از جنبه‌های مختلف مانند

جدول ۱. مشخصات ۴۳ ژن MADS-box در *B. distachyon*

Protein Name	Gene Locus	Number of amino acid	Molecular weight	Theoretical pI	Protein Name	Gene Locus	Number of amino acid	Molecular weight	Theoretical pI
BdMADS1	Bradi1g08326	233	26565.43	7.69	BdMADS27	Bradi2g48690	196	22381.65	8.6
BdMADS2	Bradi1g08340	243	27900.7	9.17	BdMADS28	Bradi2g57000	209	24112.64	7.81
BdMADS4	Bradi1g20090	283	30315.37	6.36	BdMADS32	Bradi3g04880	365	38244.93	5.58
BdMADS5	Bradi1g21980	309	35159.5	8.49	BdMADS33	Bradi3g05260	265	29010.7	6.61
BdMADS8	Bradi1g35000	230	26034.57	8.95	BdMADS34	Bradi3g13570	232	26121.02	6.18
BdMADS9	Bradi1g39927	186	20283.19	9.45	BdMADS36	Bradi3g32090	227	25690.51	9.21
BdMADS10	Bradi1g45807	224	25047.15	5.92	BdMADS37	Bradi3g39177	330	36020.52	5.24
BdMADS11	Bradi1g48520	227	26133.54	7.65	BdMADS38	Bradi3g41260	250	28915.86	8.74
BdMADS12	Bradi1g57410	373	40667.46	4.62	BdMADS39	Bradi3g41297	203	23543.49	5.54
BdMADS14	Bradi1g57870	359	39885.58	4.88	BdMADS40	Bradi3g46920	240	27494.11	7.79
BdMADS15	Bradi1g58100	183	20669.32	5.85	BdMADS41	Bradi3g51800	268	30255.26	8.73
BdMADS16	Bradi1g59250	278	31748.88	9.24	BdMADS42	Bradi3g57017	240	27334.18	8.88
BdMADS17	Bradi1g69890	253	29191.92	7.6	BdMADS43	Bradi3g58220	229	25601.83	5.9
BdMADS18	Bradi1g72150	269	30248.29	5.82	BdMADS44	Bradi4g06867	221	24727.12	9.25
BdMADS19	Bradi1g77020	258	29272.34	8.82	BdMADS45	Bradi4g11097	372	41623.84	6.24
BdMADS20	Bradi2g06330	269	30317.06	9.25	BdMADS47	Bradi4g34680	247	28368.23	8.87
BdMADS21	Bradi2g24940	209	24434.97	9	BdMADS48	Bradi4g39420	258	27844.17	9.67
BdMADS22	Bradi2g25090	243	27455.93	9.1	BdMADS49	Bradi4g40350	251	28004	9.31
BdMADS23	Bradi2g26320	314	33279.51	9.18	BdMADS50	Bradi4g40357	188	21330.62	9.51
BdMADS24	Bradi2g30530	187	20300.33	9.65	BdMADS53	Bradi5g11270	202	23289.87	7.78
BdMADS25	Bradi2g32910	267	30521.34	9.06	BdMADS55	Bradi5g21700	240	27931.18	6.53
BdMADS26	Bradi2g43290	603	48315.86	5.1					

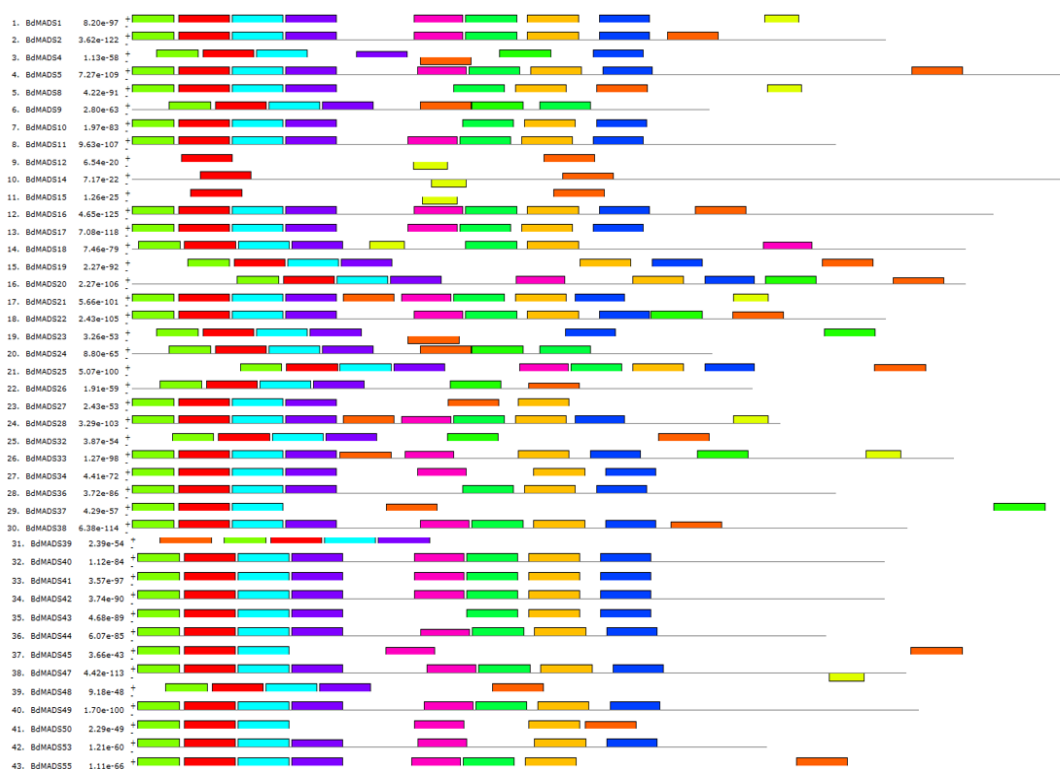
MADS-box برنج صورت گرفت. چهار دمین با گستره مشابه در طول پروتئین شناسایی شدند (Lim *et al.*, 2000).

بررسی ترکیبات آمینواسیدی پروتئین‌های MADS-box

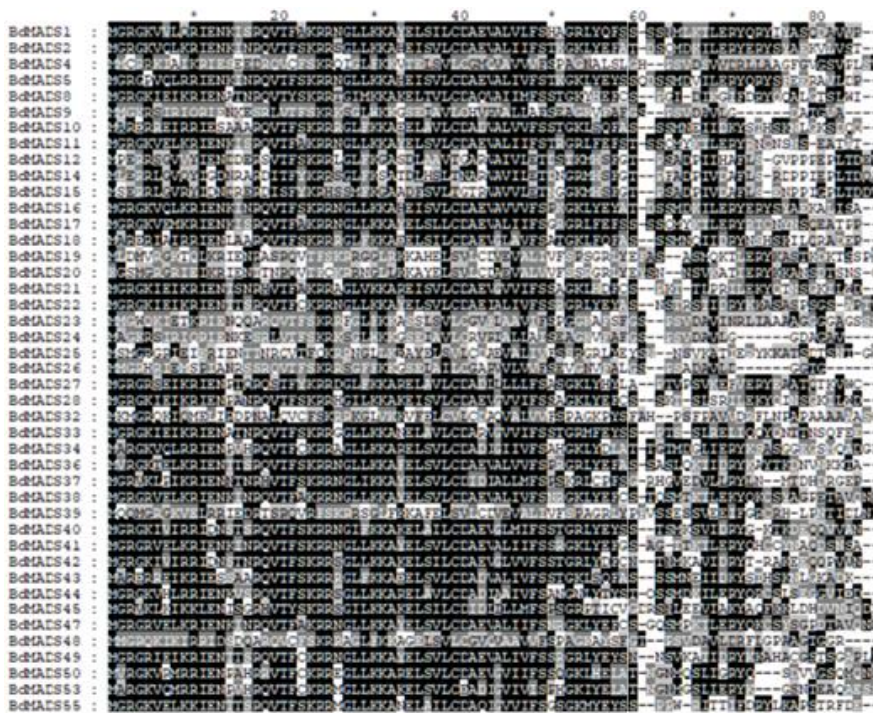
بررسی ترکیبات پروتئین‌ها نشان داد که فراوانی آمینواسیدها به شکل معنی‌داری متفاوت بودند. نتایج نشان داد که آلانین، سرین و لوسین بالاترین مقدار در ترکیبات پروتئینی داشتند و این در حالی است که تریپتوفان پایین‌ترین مقدار را در بین آمینواسیدها داشتند (شکل ۳). آلانین به کمک آنزیم آلانین آمینوترانسفراز در واکنش برگشت‌پذیر بین پیروات و گلوتمات تبدیل خواهد شد که منجر به اتصالی بین متابولیسم کربن با سنتز سایر آمینواسیدها می‌شود (Sousa and Sodek, 2003). آلانین نیز در شرایط استرس‌های مختلف در گونه‌های مختلف گیاهی تجمع می‌یابد (Miyashita *et al.*, 2007).

اگرچه ۱۰ موتیف شناسایی شده در برخی از ژن‌ها توزیع و جایگاه آن‌ها تا حدودی متفاوت است. نتایج مطالعه حاضر نشان داد پروتئین BdMADS15 کوتاهترین پروتئین را در بین سایر پروتئین‌ها به خود اختصاص داده و دارای کمترین موتیف نیز می‌باشد. موتیف‌های مربوط به پروتئین BdMADS15 به صورت متراکم کنار هم قرار گرفته‌اند (شکل ۱). براساس مطالعه‌ای که بر روی پروتئین‌هایی پلی آمین اکسیداز در انگور انجام گرفت. پروتئین‌هایی که طول کوتاه‌تری داشتند، موتیف‌ها به صورت پراکنده‌تر در سطح پروتئین توزیع شدند. نتایج ما با نتایج این پژوهش مطابقت داشت (Abedi *et al.*, 2017).

بعد از هم‌ردیفی چندگانه دمین‌های حفاظت‌شده MADS-box، چهار دمین حفاظت‌شده MADS-box شناسایی شدند. طول دمین M از ۱ تا ۵۹، دمین I از ۶۰ تا ۸۷، دمین K از ۸۸ تا ۱۷۳ و دمین ۱۷۴ تا ۲۴۰ پراکنش آمینواسیدها وجود داشت (شکل ۲). در مطالعه‌ای که بر روی دمین‌های



شکل ۱. موتیف‌های محافظت‌شده پروتئین BdMADS در *B. distachyon* با استفاده از پایگاه داده MEME



M

I



K

C

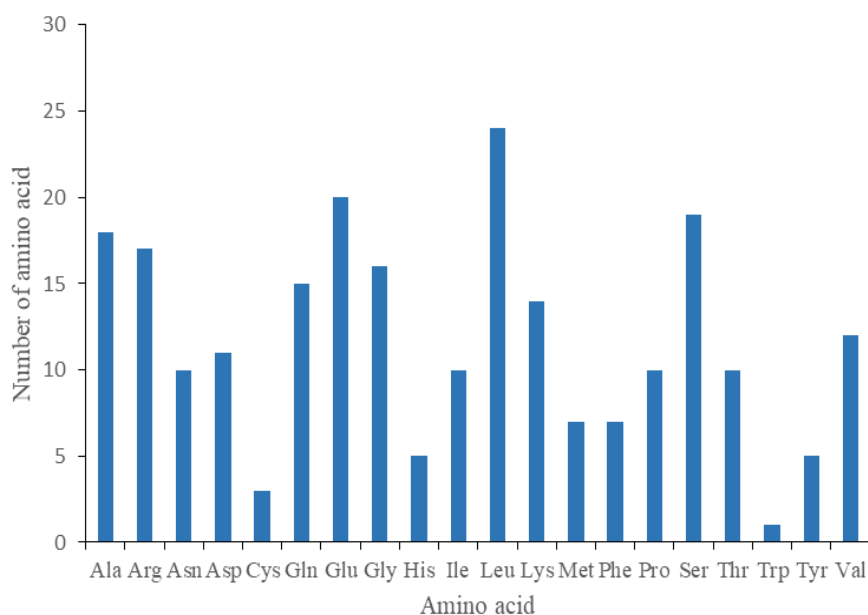
شکل ۲. هم‌ردیفی توالی‌های پروتئین MADS-box برکپودیوم با استفاده از نرم‌افزار Gendoc انجام شد. چهار موتیف محافظت‌شده اعم از M، I، K و C در دمین‌های MADS-box شناسایی شد. ستون‌های سیاه رنگ، نواحی کاملاً محافظت‌شده، ستون‌های خاکستری رنگ، نواحی نیمه محافظت‌شده را نشان می‌دهند. گستره دمین M در MADS-box از ۱ تا ۵۹، دمین I از ۶۰ تا ۸۷، دمین K از ۸۸ تا ۱۷۳ و دمین C از ۱۷۴ تا ۲۴۰ بوده‌است.

گزارش کردند اسیدآمینه‌ها به طور مستقیم از ریشه و برگ به گل هم منتقل می‌شوند (Maeda and Dudareva, 2012).

آنالیز جایگاه اتصال فاکتور رونویسی

جایگاه اتصال فاکتور رونویسی به عنوان بخش‌های از DNA هستند که یک یا بیشتر از یک پروتئین‌هایی با عملکرد متنوع به صورت اختصاصی به این جایگاه اتصال پیدا می‌کنند. این جایگاه‌ها بخشی از ناحیه پرموتر یا تشدیدکننده‌ای هستند که نقش مهمی در تنظیم رونویسی ژن داشته و میزان رونویسی را تنظیم می‌کنند (Mathelier *et al.*, 2014). براساس نتایج به‌دست‌آمده در این پژوهش، خانواده AP2 بالاترین تعداد جایگاه اتصال فاکتور رونویسی را به خود اختصاص داد. در آراییدوپسیس و غلات AP2 فراوان‌ترین و مهم‌ترین خانواده فاکتور رونویسی هستند (Peng *et al.*, 2016). خانواده AP2 نقش در تشکیل گل، متابولیت ثانویه، تکثیر سلولی و پاسخ به استرس‌های زیستی و غیر زیستی را دارا هستند. bZIP در فتومورفوزنز، تشکیل برگ و گل دخالت دارد. در مطالعه‌ای که بر روی برنج و گوجه‌فرنگی انجام شد.

Tanaka و همکاران در سال ۱۹۸۷ گزارش کردند که گلدهی در *Lemna pausicostata* تحت تأثیر آمینواسیدهای موجود در محیط کشت قرار می‌گیرد. زمانی که آلانین و سرین به محیط کشت اضافه شدند باعث ترغیب گلدهی شد و این‌درحالی است که افزودن سیستئین و تریپتوفان به محیط کشت، منجر به ممانعت از گلدهی می‌شود. محققان اعلام کردند که این اثرات مرتبط با ترغیب یا ممانعت از گلدهی ناشی از جذب آهن به‌وسیله گیاهان می‌باشد (Tanaka *et al.*, 1987; Maeda and Dudareva, 2012). نتایج پژوهش حاضر مشابه با پژوهش سایر محققان بود که آمینواسیدها فرآیندهای فیزیولوژیکی مانند گلدهی و نیز پاسخ به استرس‌های زیستی و غیر زیستی را تحت تأثیر قرار می‌دهند (Miyashita *et al.*, 2007). این واکنش از طریق برهم‌کنش‌های آمینواسید و تغییرات در دیواره غشا به کمک پمپ‌های غشایی صورت می‌پذیرد. طبق بررسی انجام شده توسط سایر محققان آمینواسیدها به عنوان بلوک‌های ساختمانی برای سنتز آنزیم‌ها، پروتئین‌های ساختاری، و متابولیت ثانویه در گل استفاده می‌شوند این‌درحالی‌است که محققان دیگر

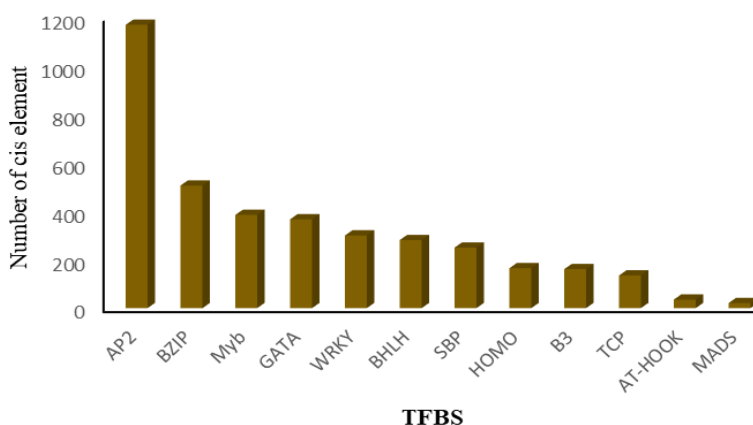


شکل ۳. ترکیبات آمینواسیدی پروتئین‌های مختلف BdMADS در *B. distachyon*

دارند (Alabadi *et al.*, 2008). AT-hook در تعیین اندازه گیاه و مسیر گلدهی مؤثر بوده‌است. طبق بررسی‌هایی که برای روی آراییدوپسیس انجام شد محققان به این نتیجه رسیدند که AT-hook انتقال از فاز رویشی به زایشی را تسهیل می‌کند (Lu *et al.*, 2010). MADS-box در رشد و توسعه بذر، گل، ریشه و تعیین زمان گلدهی نقش دارد. چندین گزارش اعلام کردند که بیان اعضای خانواده MADS-box در کنترل گلدهی نقش بسزایی داشته‌اند (Moon *et al.*, 2003; Petersen *et al.*, 2004). فاکتور رونویسی Myb در پاسخ به استرس‌های زیستی و غیر زیستی، ریتم شبانه‌روزی، رشد گیاه و متابولیت ثانویه نقش دارد (شکل ۴). براساس تحقیقات که بر روی اطلسی و آراییدوپسیس صورت گرفت که Myb درگیر در مسیرهای بیوسنتز رنگیزه‌های گیاهی دخالت دارد (Spelt *et al.*, 2002; Qin *et al.*, 2012).

خانواده B3 دخالت در کنترل زمان گلدهی، رشد اندام، قطبیت و تشکیل بذر دارد. براساس مطالعه‌ای که بر روی آراییدوپسیس نیز انجام شد این نتایج را تایید کرد (Xu *et al.*, 2008). بررسی در ناحیه جایگاه اتصال فاکتور رونویسی پیش بینی بیان ژن تحت شرایط مختلف را فراهم می‌سازد (Peng *et al.*, 2016).

bZIP فاکتورهای رونویسی درگیر با کمپلکس‌های پروتئینی مختلف بودند و زمان گلدهی را تعیین می‌کند (Lifschitz *et al.*, 2006). bHLH در پاسخ به نور، تشکیل گل و پاسخ به استرس غیر زیستی فعال می‌شوند. براساس پژوهشی که بر روی اطلسی صورت گرفت فاکتور رونویسی bHLH نقش مهمی در بلوغ گل داشته‌است (Yin *et al.*, 2015). WRKY در پاسخ دفاعی و HB (Homeodomain) در برگ، ریشه، جوانه، تخمدان و تمایز سلولی نقش دارد. براساس مطالعاتی که توسط محققان انجام شد، فاکتور رونویسی WRKY نقش مهمی در در کنترل زمان گلدهی و ارتفاع گیاه برنج داشته‌است (Cai *et al.*, 2014; Machens *et al.*, 2014). TCP در شکل‌گیری گل و تکامل اندام نقش داشته‌است. فاکتور رونویسی که با ژن‌های مربوط به گلدهی مانند FLU برهم‌کنش می‌دهد و باعث انتقال از فاز رویشی به فاز زایشی شده و در پاسخ‌های دفاعی نقش دارد (Niwa *et al.*, 2013). فاکتور رونویسی GATA که تنظیم‌کننده در مسیر سیگنالینگ GA بوده و همچنین جوانه‌زنی و گلدهی را نیز کنترل می‌کند. بر مبنای بررسی که بر روی آراییدوپسیس انجام شد GATA در پاسخ به نور فعال می‌شود و این موتیف با عنصر تنظیمی سیس وابسته به نور، مانند G-box برهم‌کنش دارند علاوه بر این در مسیرهای بیوسنتز رنگدانه‌ها فعالیت

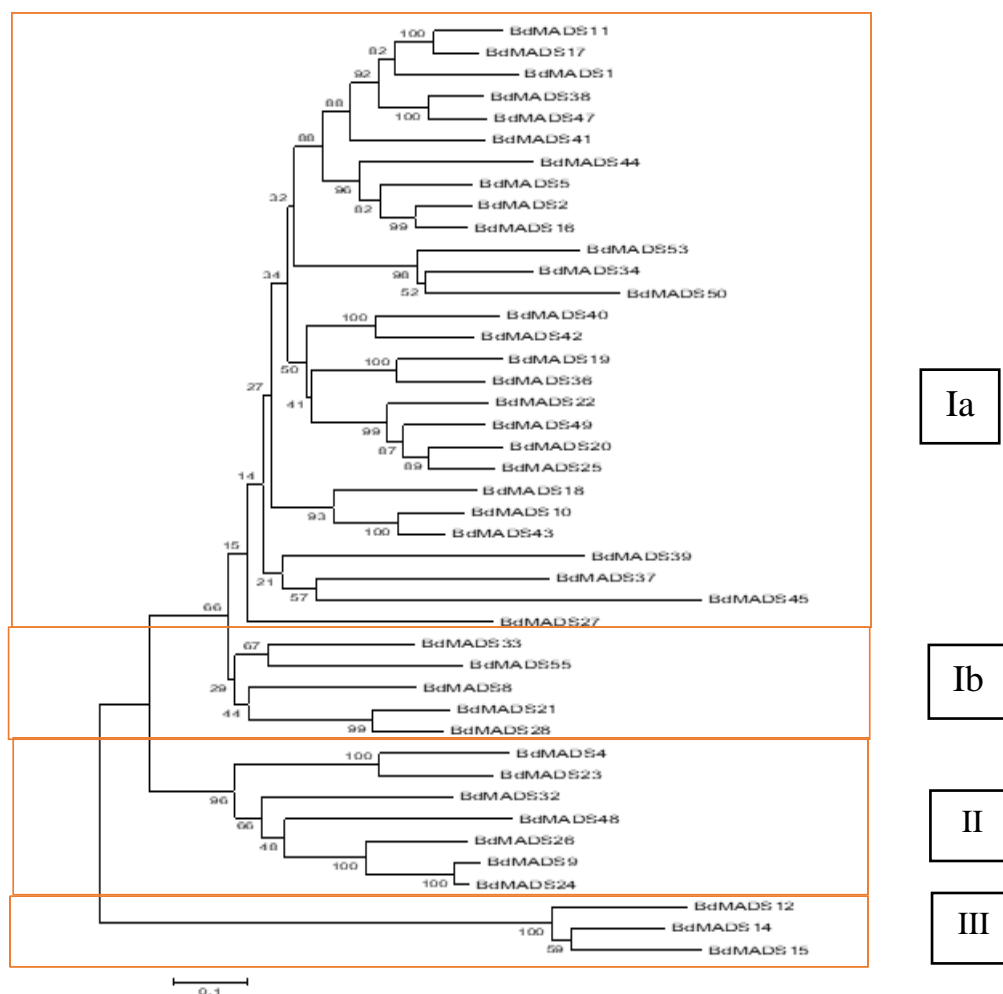


شکل ۴. توزیع جایگاه اتصال فاکتورهای رونویسی در توالی BdMADS

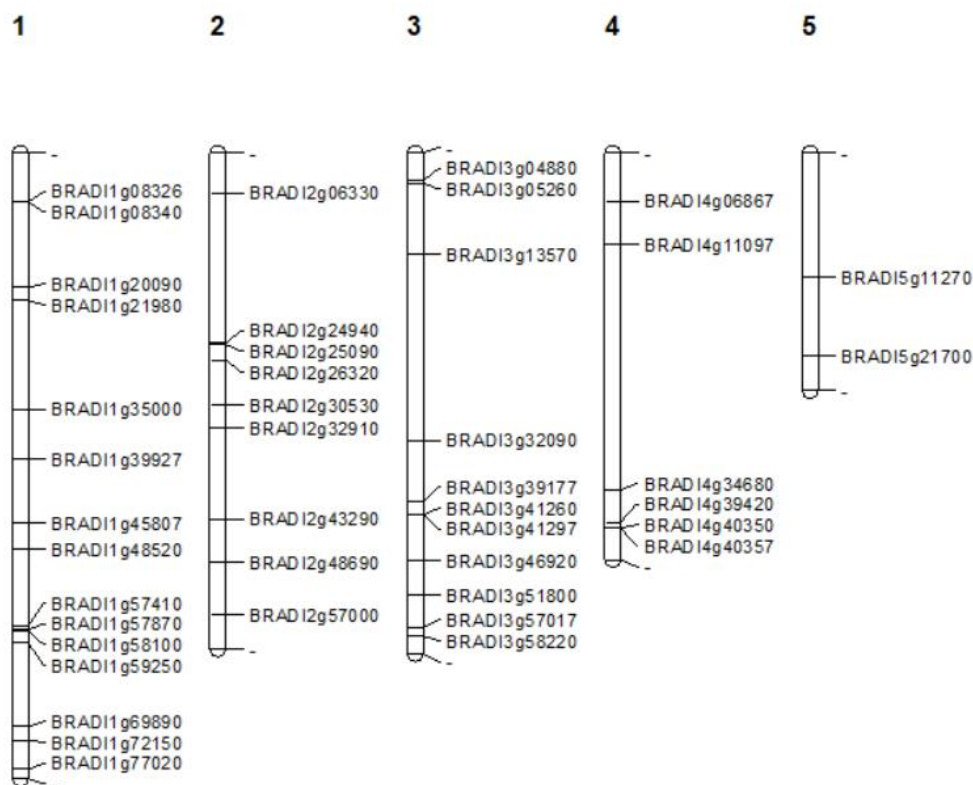
کروموزم ۵ واقع شدند (شکل ۶) نتایج ما مطابقت داشت با تحقیق دیگری که بر روی موز انجام شد. (Liu *et al.*, 2017). الگوی گروه‌بندی این ژن‌ها بر روی کروموزم با منشا کروموزمی مشابه بوده‌است. براساس معیار Holub's، کلاستر ژنی زمانی ایجاد می‌شود که ۲ یا بیشتر از ۲ ژن در فاصله ۲۰۰ کیلوبازی از یکدیگر قرار گرفته باشد. بر مبنای این معیار ۴ کلاستر ژنی بر روی ۴ تا از ۵ کروموزوم برکپودیوم مشاهده شد و این در صورتی‌است که فقط در کروموزوم ۵ کلاستر ژنی مشاهده‌نشده (De Oliveira *et al.*, 2010; Wei *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2017).

آنالیز فیلوژنتیکی و توزیع ژن‌های MADS-box بر روی کروموزوم

نتایج هم‌ردیفی توالی‌های ژنی با استفاده از نرم‌افزار MEGA 6 مشخص کرد که ژن‌ها به سه کلاستر تقسیم‌بندی می‌شوند (شکل ۵). نتایج توزیع ژن‌ها با استفاده از نرم‌افزار MapChart نشان داد که ژن‌های MADS-box بر روی تمامی کروموزوم‌های برکپودیوم واقع شدند. بیشترین تعداد این ژن‌ها بر روی کروموزوم ۱ و درحالی‌که پایین‌ترین تعداد بر روی کروموزوم ۵ قرار داشتند. ۱۵ تا از ژن‌ها روی کروموزوم ۱ و ۱۰ تا ژن بر روی کروموزوم ۲، ۱۱ تا ژن بر روی کروموزوم ۳، ۶ تا ژن روی کروموزوم ۴ و تنها دو ژن روی



شکل ۵. درخت فیلوژنتیکی پروتئین BdMADS مربوط به *B. distachyon* با استفاده از روش نزدیکترین همسایگی



شکل ۶. جایگاه ژن Bradi1g روی کروموزوم *B. distachyon*

تست تاجیما و نسبت dN/dS

تکامل بر فاکتور رونویسی MADS-box وجود داشته‌است از نسبت جایگزینی غیرهم‌معنی به هم‌معنی می‌توان به بررسی نوع فشار انتخاب توالی‌های ژنی پرداخت. این جایگزینی‌های نوکلئوتیدی به دو نوع تقسیم می‌شوند که جایگزینی غیرهم‌معنی منجر به تغییر آمینواسید در پروتئین‌ها شده و جایگزینی هم‌معنی باعث تغییر در توالی آمینواسید در پروتئین‌ها نمی‌شود. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که نسبت dN/dS به میزان ۱/۵ می‌باشد و این ژن‌های MADS-box دچار فشار انتخاب مثبت شده‌اند و تحت تأثیر این فشار پلی‌مورفیسم افتراقی در ژن‌ها حفظ می‌شود (جدول ۲). انتخاب مثبت زمانی رخ می‌دهد که نسبت dN/dS بزرگتر از ۱ باشد این حالت در شرایطی است که dN میزان جایگزینی نوکلئوتیدی غیرهم‌معنی و dS میزان جایگزینی نوکلئوتیدی هم‌معنی می‌باشد در حالی که انتخاب منفی زمانی رخ می‌دهد که نسبت dN/dS کمتر از ۱

تست تاجیما برای بررسی فشار انتخاب بر روی ژن‌ها به کار برده می‌شود. این تست تفاوت بین توالی‌های DNA را مشخص می‌سازد که به کمک فرآیند تصادفی و یا غیر تصادفی تکامل یافتند. هدف تست تاجیما، شناسایی توالی‌هایی که تحت تئوری خنثی بوده و تعادلی بین موتاسیون و رانش ژنتیکی وجود داشته‌باشد (Carlson *et al.*, 2005). آماره D تاجیما در بین توالی‌های MADS-box ۴/۱۵۴ بوده‌است. زمانی که تست تاجیما مثبت و معنی‌دار باشد حاکی از آن است که انتخاب متعادل رخ داده است و آلل نادر با فراوانی کم در توالی‌های مربوطه وجود داشته‌اند (جدول ۲). این نتایج بیانگر آن است که توالی‌های MADS-box از تنوع آلی بالایی برخوردار بوده و به نظر می‌رسد که چندشکلی ژن‌های MADS-box توسط انتخاب متعادل حفظ شده‌اند. با توجه به نوع فشار انتخابی که در طول

کمک به درک بهتری از مکانیسم‌های مولکولی ژن‌های پاسخگو به زمان گلدهی، رسیدگی میوه، پاسخ به استرس‌ها می‌کند. نتایجی که در این پژوهش از تست‌های آماری مختلف برای آنالیز توالی‌های MADS-box بدست‌آمد حاکی از آن بود که انتخاب مثبت در توالی MADS-box اتفاق داده‌است. انتخاب مثبت باعث تغییر اسیدآمینها، تمایز پروتئین‌ها و در نهایت باعث ایجاد عملکردهای جدید پروتئین‌ها می‌شود. این انتخاب موجب تغییر در فرآیند تکاملی ژن MADS-box شده‌است که نشان‌دهنده ضروری بودن عملکرد این ژن در تکامل و پیشرفت انتخاب در فرآیند گلدهی می‌باشد. علاوه بر این، AP2 بالاترین میزان جایگاه اتصال رونویسی را به خود اختصاص داده که نقش مهمی در گلدهی و پاسخ به استرس‌های مختلف زیستی دارد. تنظیم گلدهی فاکتوری مهم در تعیین میزان عملکرد است و از آنجا که عملکرد برای محصولات زراعی از اهمیت قابل توجهی برخوردار می‌باشد. لذا کمک به محققان و اصلاحگران برای شناسایی ژن‌های کاندیدای درگیر در مسیر گلدهی معطوف‌شده و انتخاب ژن مناسب را تسهیل می‌کند. نتایج به‌دست‌آمده از این تحقیق می‌توانند به شناسایی ژن‌های مهم برای پژوهش‌های آینده کمک نمایند.

REFERENCES

- Abedi A, Shirzadian-Khoramabad R, Sohani MM (2017) In silico. study of polyamine oxidase (PAO) gene family in grape. Genetic Engineering and Biosafety Journal. 1:49-63.
- Alabadí D, Gallego-Bartolomé J, Orlando L, García-Cárcel L, Rubio V, Martínez C, Frigerio M, Iglesias-Pedraz JM, Espinosa A, Deng XW, Blázquez MA (2008) Gibberellins modulate light signaling pathways to prevent Arabidopsis seedling de-etiolation in darkness. Plant J. 53: 324-335.
- Arora R, Agarwal P, Ray S, Singh AK, Singh VP, Tyagi AK, Kapoor S (2007)

باشد (Yang and Bielawski, 2000). نتایج تحقیق حاضر مطابقت داشت با مطالعه‌ایی که بر روی ژن‌های MADS-box گلایی انجام شده‌بود (Wang et al., 2017). پژوهش‌هایی دیگر نیز که بر روی ژن‌های MADS-box پنبه انجام شد، حاکی از آن است که این ژن‌ها در طی تکامل تحت تأثیر انتخاب مثبت قرار گرفتند و به احتمال زیاد طی دوبرابردگی ژن‌ها عملکرد جدید پیدا می‌کنند (Liu, 2007). زمانی که ژن‌ها تحت فشار انتخاب مثبت قرار می‌گیرند عملکردهای متفاوتی پیدا خواهند کرد. این رویداد منجر به عملکردهای متفاوت در آنزیم‌ها یا باعث افزایش فعالیت آنزیم‌ها می‌شوند. در مورد پروتئین‌ها نیز امکان افزایش بیان ژن در بافت‌ها در زمان رشد و توسعه گیاه را فراهم می‌کند.

جدول ۲. نتیجه تست تاجیما برای ژن MADS-box

m	S	p _s	π	D	dN/dS
۴۳	۳۴۳	۰/۹۶	۰/۴۷	۴/۱۵۴	۱/۵

آماره تست تاجیما D ، تنوع نوکلئوتیدی π ، تعداد کل سایت / تعداد سایت‌های مجزا p_s ، تعداد سایت‌های مجزا S ، تعداد توالی‌ها m ، جایگزینی هم‌معنی / جایگزینی غیرهم‌معنی dN/dS

آنالیز بیوانفورماتیکی ژن‌های MADS-box

MADS-box gene family in rice: genome-wide identification, organization and expression profiling during reproductive development and stress. BMC. Genomics. 8: 242.

Bailey TL, Williams N, Misleh C, Li WW (2006) MEME: discovering and analyzing DNA and protein sequence motifs. Nucleic. Acids. Res. 34:W369-W373.

Bowman JL, Baum SF, Eshed Y, Putterill J, Alvarez J (1999) Molecular Genetics of Gynoecium Development in Arabidopsis. In Current topics in developmental biology. Academic.

- Press. 45: 155-205.
- Cai Y, Chen X, Xie K, Xing Q, Wu Y, Li J, Du C, Sun Z, Guo Z (2014) Dlf1, a WRKY transcription factor, is involved in the control of flowering time and plant height in rice. *PLoS. ONE*. 9(7):e102529.
- Carlson CS, Thomas DJ, Eberle MA, Swanson JE, Livingston RJ, Rieder MJ, Nickerson DA (2005) Genomic regions exhibiting positive selection identified from dense genotype data, *Genome*. 15: 1553-1565.
- Causier B, Kieffer M, Davies B (2002) MADS-box genes reach maturity. *Science*. 296: 275-276.
- Chang JL, Chang MV, Barolo S, Cadigan KM (2008) Regulation of the feedback antagonist naked cuticle by Wingless signaling. *Dev. Biol*. 32: 446-454.
- De Oliveira RR, Chalfun-Junior A, Paiva LV, Andrade AC (2010) *In silico* and quantitative analyses of MADS-Box genes in *Coffea arabica*. *Plant. Mol. Biol. Rep.* 28: 460-472.
- Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Wilkins MR, Appel RD, Bairoch A (2005) Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. In the proteomics protocols handbook Humana press. pp 571-607.
- Hu L, Liu S (2012) Genome-wide analysis of the MADS-box gene family in cucumber. *Genome*. 55: 245-56.
- Kofuji R, Sumikawa N, Yamasaki M, Kondo K, Ueda K, Ito M, Hasebe M (2003) Evolution and divergence of the MADS-box gene family based on genome-wide expression analyses. *Mol. Biol. Evol.* 20: 1963-1977.
- Letunic I, Doerks T, Bork P (2011) SMART 7: recent updates to the protein domain annotation resource. *Nucleic. Acids. Res.* 40: D302-D305.
- Lifschitz E, Eviatar T, Rozman A, Shalit A, Goldshmidt A, Amsellem Z, Alvarez JP, Eshed Y (2006) The tomato FT ortholog triggers systemic signals that regulate growth and flowering and substitute for diverse environmental stimuli. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 6398-6403.
- Lim J, Moon YH, An G, Jang SK (2000) Two rice MADS domain proteins interact with OsMADS1. *Plant. Mol. Biol.* 44:513-27.
- Liu, W. (2007). Molecular Evolution of MADS-box Genes in Cotton (*Gossypium* L.).
- Liu J, Zhang J, Zhang J, Miao H, Wang J, Gao P, Hu W, Jia C, Wang Z, Xu B, Jin Z (2017) Genome-wide analysis of banana MADS-box family closely related to fruit development and ripening. *Sci. Rep.* 7: 3467.
- Lu H, Zou Y, Feng N (2010) Overexpression of AHL20 negatively regulates defenses in Arabidopsis. *J. Integr. Plant. Biol.* 52: 801-808.
- Machens F, Becker M, Umrath F, Hehl R (2014) Identification of a novel type of WRKY transcription factor binding site in elicitor responsive cis-sequences from Arabidopsis thaliana. *Plant. Mol. Biol.* 84: 371-385.
- Maeda H, Dudareva N (2012) The shikimate pathway and aromatic amino acid biosynthesis in plants. *Annu. Rev. Plant. Biol.* 63: 73-105.
- Masiero S, Colombo L, Grini PE, Schnittger A, Kater MM (2011) The emerging importance of type I MADS box transcription factors for plant reproduction. *Plant. Cell.* 23: 865-72.
- Mathelier A, Zhao X, Zhang AW, Parcy F, Worsley-Hunt R, Arenillas DJ, Buchman S, Chen CY, Chou A, Ienasescu H, Lim J (2014) JASPAR 2014: an extensively expanded and updated open-access database of transcription factor binding profiles. *Nucleic. Acids. Res.* 42: 142-147.
- Moon J, Suh SS, Lee H, Choi KR, Hong CB, Paek NC, Kim SG, Lee I (2003) The SOC1 MADS-box gene integrates vernalization and gibberellin signals

- for flowering in *Arabidopsis*. *Plant J.* 35: 613-623.
- Miyashita Y, Dolferus R, Ismond KP, Good AG (2007) Alanine aminotransferase catalyses the breakdown of alanine after hypoxia in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 49: 1108-1121.
- Moore S, Vrebalov J, Payton P, Giovannoni J (2002) Use of genomics tools to isolate key ripening genes and analyses fruit maturation in tomato. *J. Exp. Bot.* 53: 2023-2030.
- Münster T, Faigl W, Saedler H, Theißen G (2002) Evolutionary aspects of MADS-box genes in the eusporangiate fern *Ophioglossum*. *Plant. Biology.* 4: 474-483.
- Nitcher R, Pearce S, Tranquilli G, Zhang X, Dubcovsky J (2014) Effect of the hope FT-B1 allele on wheat heading time and yield components. *J. Hered.* 105: 666-675.
- Niwa M, Daimon Y, Kurotani K, Higo A, Pruneda-Paz JL, Breton G, Mitsuda N, Kay SA, Ohme-Takagi M, Endo M, Araki T (2003). BRANCHED1 interacts with FLOWERING LOCUS T to repress the floral transition of the axillary meristems in *Arabidopsis*. *Plant. Cell.* 25: 1228-1242.
- Peng FY, Hu Z, Yang RC (2016) Bioinformatic prediction of transcription factor binding sites at promoter regions of genes for photoperiod and vernalization responses in model and temperate cereal plants. *BMC. Genome.* 17: 573.
- Petersen K, Didion T, Andersen CH, Nielsen KK (2004) MADS-box genes from perennial ryegrass differentially expressed during transition from vegetative to reproductive growth. *J. Plant. Physiol.* 161: 439-447.
- Pezzopane JRM, Pedro Junior MJ, de Camargo MBP, Fazuoli LC (2008) Heat requirements of Mundo Novo coffee for the flowering-harvest phenological stage. *Cienc Agrotec.* 32: 1781-1786.
- Parenicová L, de Folter S, Kieffer M, Horner DS, Favalli C, Busscher J, Cook HE, Ingram RM, Kater MM, Davies B, Angenent GC (2003) Molecular and phylogenetic analyses of the complete MADS-box transcription factor family in *Arabidopsis*: new openings to the MADS world. *Plant. Cell.* 15: 1538-1551.
- Qin Y, Wang M, Tian Y, He W, Han L, Xia G (2012) Over-expression of TaMYB33 encoding a novel wheat MYB transcription factor increases salt and drought tolerance in *Arabidopsis*. *Mol. Biol. Rep.* 39: 7183-7192.
- Raes J (2003) Power in numbers: *In silico* analysis of multigene families in *Arabidopsis thaliana*. (Doctoral dissertation, Ghent University). pp: 208-210.
- Spelt C, Quattrocchio F, Mol J, Koes R (2002) ANTHOCYANIN1 of petunia controls pigment synthesis, vacuolar pH, and seed coat development by genetically distinct mechanisms. *Plant. Cell.* 49: 2121-2135.
- Shu Y, Yu D, Wang D, Guo D, Guo C (2013) Genome-wide survey and expression analysis of the MADS-box gene family in soybean. *Mol. Biol. Rep.* 40: 3901-3911.
- Sousa CAF, Sodek L (2003) Alanine metabolism and alanine aminotransferase activity in soybean (*Glycine max*) during hypoxia of the root system and subsequent return to normoxia. *Environ. Exp. Bot.* 50: 1-8.
- Tanaka O, Nasu Y, Sonoyama A, Maehara Y, Kobayashi T, Nawafune H, Kugimoto M (1987) Effects of exogenous amino acids on iron uptake in relation to their effects on photoperiodic flowering in *Lemna paucicostata*. 6746. *Plant. Cell. Physiol.* 28: 697-702.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipowski A, Kumar S (2013) MEGA6: molecular evolutionary genetics

- analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30: 2725-2729.
- Tian Y, Dong Q, Ji Z, Chi F, Cong P, Zhou Z (2015) Genome-wide identification and analysis of the MADS-box gene family in apple. *Gene*. 555: 277-290.
- Voorrips R.E (2002) 'MapChart: software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs', *J. Hered.* 93: 77-78.
- Wang R, Ming M, Li J, Shi D, Qiao X, Li L, Zhang S, Wu J (2017) Genome-wide identification of the MADS-box transcription factor family in pear (*Pyrus bretschneideri*) reveals evolution and functional divergence. *Peer J*. 5: e3776.
- Wei B, Zhang RZ, Guo JJ, Liu DM, Li AL, Fan RC, Mao L, Zhang XQ (2014) Genome-wide analysis of the MADS-box gene family in *Brachypodium distachyon*. *PLoS. One*. 9:e84781.
- Wu RM, Walton EF, Richardson AC, Wood M, Hellens RP, Varkonyi-Gasic E (2012) Conservation and divergence of four kiwifruits SVP-like MADS-box genes suggest distinct roles in kiwifruit bud dormancy and flowering. *J. Exp. Bot.* 63: 797-807.
- Xu ZS, Ni ZY, Liu L, Nie LN, Li LC, Chen M, Ma YZ (2008) Characterization of the TaAIDFa gene encoding a CRT/DRE-binding factor responsive to drought, high-salt, and cold stress in wheat. *Mol. Genet. Genomics*. 280: 497-508.
- Yin J, Chang X, Kasuga T, Bui M, Reid M S, Jiang CZ (2015) A basic helix-loop-helix transcription factor, PhFBH4, regulates flower senescence by modulating ethylene biosynthesis pathway in petunia. *Horticulture. Res.* 2: 15059.
- Yang Y, He M, Zhu Z, Li S, Xu Y, Zhang C, Singer SD, Wang Y (2012) Identification of the dehydrin gene family from grapevine species and analysis of their responsiveness to various forms of abiotic and biotic stress. *BMC Plant. Biol.* 12: 140.
- Yang Z, Bielawski JP (2000) Statistical methods for detecting molecular adaptation. *Trends. Ecol. Evol.* 15:496-503.