

بررسی بیان چهار همسانه ژنی عضو خانواده MADS- box در گیاه دوپایه ترشک (*Rumex acetosa* L.)

علی محمد شکیب<sup>1\*</sup>، چارلز اینزورث<sup>2</sup>

<sup>1</sup> پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران - کرج

<sup>2</sup> آزمایشگاه بیولوژی ملکولی گیاهی، ایمپریال کالج، انگلستان

### چکیده

بررسی ژن‌هایی که در تشکیل گل دخالت دارند می‌توانند ما را در فهم بیشتر مکانیسم‌های تعیین جنسیت کمک نماید. در این تحقیق، الگوی بیان چهار ژن از اعضای خانواده ژنی MADS- box شامل *RaA2*، *RaB17*، *RaG24* و *RaK16* جداسازی شده از گیاه دو پایه ترشک (*Rumex acetosa* L.) مورد مطالعه قرار گرفتند. برای استخراج RNA از بافت‌های مختلف (گل آذین، ساقه، برگ و ریشه) گیاهان نر و ماده برای آزمون نورترن بلات استفاده گردید. ژن‌های *RaA2* و *RaB17* در اعضای زایشی گیاه بیان می‌شوند اما ژن‌های *RaG24* و *RaK16* هم در اعضای رویشی و هم در اعضای زایشی بیان می‌شوند. هم ردیفی توالی پروتئینی این همسانه‌های ژنی با پروتئین‌های MADS- box شناخته شده سایر گیاهان نشان داد که آنها متعلق به زیر خانواده‌های مجزایی هستند. توالی پروتئینی ژن‌های *RaA2* و *RaB17* بیشترین تشابه را به ترتیب با پروتئین‌های MADS- box سیب (*Malus domestica*) و CMB1 گیاه *Diantus caryophyllus* نشان دادند. توالی پروتئینی ژن‌های *RaG24* و *RaK16* بیشترین تشابه را به ترتیب با پروتئین TDR3 گوجه فرنگی (*Lycopersicon esculentum*) و پروتئین MADS5 گیاه *Betula pendula* و پروتئین POTM1 سیب زمینی (*Solanum tuberosum*) نشان داد که هر دو در مراحل رویشی و زایشی بیان می‌شوند. در آزمون سادرن بلات الگوی دورگه سازی متفاوتی بین نر و ماده وجود داشت. الگوی دورگه سازی سادرن بلات نشان می‌دهد که این ژن‌ها به حالت تک کپی و به صورت خانواده‌های ژنی کوچک در ژنوم قرار دارند.

کلمات کلیدی: گیاه دو پایه، بیان ژن، MADS- box، *Rumex acetosa* L.

یکی از موضوعات مورد علاقه محققین، مطالعه مکانیزم‌های تظاهر جنسیت و نحوه تکامل آن در گونه‌های گیاهی است ( Charlesworth, 2002; Singer *et al.*, 2007; Tanurdzic and Banks, 2004). دو گیاه دو پایه *Rumex acetosa* و *latifolia* به عنوان گیاهان مدل در مطالعات تظاهر جنسیت مورد استفاده قرار می‌گیرند (Ainsworth *et al.*, 2005). در گیاه دو پایه ترشک (*Rumex acetosa* L.)، که در آن گل‌های نر و ماده به صورت جدا گانه روی گیاهان منفرد تشکیل می‌شود، مطالعه ژن-های دخیل در تمایز اعضای گل می‌تواند در فهم مکانیزم‌های تعیین جنسیت گیاهان کمک نماید. قبلا با هدف جداسازی ژن‌های MADS- box، یک خزانه cDNA ساخته شده از گل آذین‌های نر و ماده ترشک با استفاده از دو ژن *DEFICIENS* و *PLENA* به عنوان کاوشگر غربال گردیدند (Ainsworth *et al.*, 1995). هفت همسانه با طول کامل انتخاب شدند که سه مورد از این همسانه‌ها به نام‌های *RAD1* (*DEFICIENS-Rumex acetosa*) و *RAD2* (*Rumex acetosa RAPI* like)، مورد بررسی تفصیلی قرار گرفته (Ainsworth *et al.*, 1995) و نشان داده‌اند که در پریموردیاهای اعضای جنسی گل در پایه‌های نر و ماده ترشک بیان می‌شوند. با اینکه تا به حال چندین ژن از ترشک

ژن‌های MADS- box خانواده ژنی بزرگی هستند که تقریباً در تمام موجودات پر سلولی یافت می‌شوند (Krogan *et al.*, 2000; Martinez *et al.*, 2003; Singer *et al.*, 2007; Svensson and Engstrom, 2002; Tanabe *et al.*, 2003; Tanabe *et al.*, 2005). در بازدانگان، خیلی از ژن‌های خانواده MADS- box در مراحل مختلف نمو گل، به ویژه در تعیین هویت مریستم گل و اعضای گل نقش دارند (Davies *et al.*, 1996; Parenicova *et al.*, 2003; Reiechman and Meyerowitz, 1997). بیشتر اعضای این خانواده دارای بخش مشترک بنام MADS- box هستند (Schwarz-Sommer *et al.*, 1990) که به DNA متصل می‌شوند (Huang *et al.*, 1995; Shiraishi *et al.*, 1993; Shore and Sharrocks, 1995). جداسازی و تعیین نقش ژن‌های این خانواده در موجودات مختلف در حال بررسی است (Henschel *et al.*, 2002; Singer *et al.*, 2007; Sevensson and Engstrom, 2002). بخش مشترک بین ژن‌های MADS- box به عنوان ابزاری برای جداسازی ژن‌های این خانواده در گونه‌های مختلف گیاهی مورد استفاده قرار می‌گیرد (Kater *et al.*, 1991; Puneli *et al.*, 1998). این روش به ویژه در گیاهانی که جهش یافته‌های فنوتیپی در آنها مشاهده نشده است، ارزشمند است.

جداگانه مطابق روش‌های توصیه شده توسط اینزورث و همکاران (Ainsworth *et al.*, 1994; Ainsworth, 1995) جداسازی گردیدند.

#### تهیه کاوشگر: توالی کاوشگرهای

مورد استفاده از بخش 3' همسانه‌ها، بدون ناحیه MADS، تهیه شدند. برای همسانه *RaA2* یک قطعه 480 جفت بازی با استفاده از برش آنزیمی *Sst1* بکار رفت. برای همسانه *Ra17* یک قطعه 780 جفت بازی با برش آنزیم‌های *Kpn1/ EcoR1* و برای همسانه *RaG24* و همسانه *RaK16* به ترتیب یک قطعه 740 جفت بازی با برش آنزیم *HindIII* و یک قطعه 530 جفت بازی با برش آنزیم‌های *Kpn1/ Xba1* مورد استفاده قرار گرفت. قطعات DNA بالا سپس با  $^{32}\text{P}$  نشاندار شدند.

#### دورگه سازی سادرن و نوردن

بلات: RNA کل تهیه شده از بافت‌های مختلف روی ژل آگارز فرمالدهید 1/2 درصد جداسازی گردید. سپس RNA به غشاء نایلونی منتقل و با کاوشگر نشاندار شده دورگه شد. غشاءها با بافر شستشو با شدت بالا (0.2 x SSC) و دمای 65 °C شستشو و مجاور فیلم X-ray قرار داده شدند.

#### نتایج و بحث

توالی‌های اسید آمینه‌ای پیش بینی شده برای چهار همسانه MADS-box ترشک با

جداسازی و مشخصات مولکولی آنها تعیین شده اما نقش آنها بدلیل نبود روش انتقال ژن به ترشک تعیین نشده است. تعدادی از ژن‌های این خانواده از گونه‌های گیاهی دیگر جداسازی شده و نقش آنها تعیین گردیده است. هم اکنون تعداد بسیار زیادی توالی ژنی در بانک اطلاعات DNA وجود دارد که می‌توان در حد امکان، از آنها برای کسب اطلاعات بیشتر در باره تشابه توالی و پیش بینی کارکرد ژن‌های جدیداً جداسازی شده یا ژن-هایی که کارکرد ناشناخته دارند، استفاده کرد. این اطلاعات می‌تواند در بحث‌های تکاملی و جنبه‌های مهندسی ژنتیک کاربرد داشته باشند. در اینجا خصوصیات چهار همسانه ژنی جدا شده از *Rumex acetosa* شامل: (*RaA2*), (*RaB17*), (*RaG24*) و (*RaK16*) از نظر تشابه توالی و بررسی بیان تشریح شده است.

#### مواد و روش‌ها

گیاهان نر و ماده ترشک *Rumex acetosa* L.) به عنوان مواد گیاهی مورد استفاده قرار گرفتند. بررسی‌ها در آزمایشگاه زیست شناسی مولکولی، امپریال کالج مستقر در وای، انگلستان صورت گرفت.

#### استخراج DNA، RNA، DNA برگ

گیاهان نر و ماده و RNA کل ریشه، ساقه، برگ و گل آذین گیاهان نر و ماده به طور

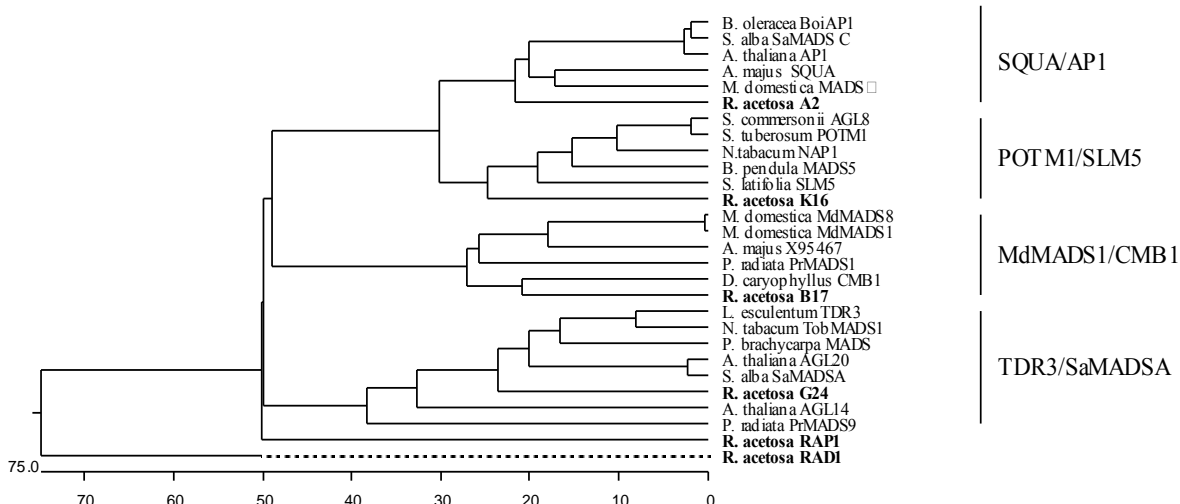
استفاده از جستجوی BLAST برای تعیین اینکه آیا شباهتی با توالی‌های موجود در بانک اطلاعاتی دارند، مورد مقایسه قرار گرفتند. پیدا کردن شبیه‌ترین توالی‌ها برای هم‌ردیفی توالی، با استفاده از برنامه MegAlign انجام و درخت فیلوژنتیک با استفاده از روش کلاستال (Clustal) تهیه گردید. بر اساس این بررسی، پروتئین‌های MADS-box ترشک در گروه‌های اصلی SQUA/AP1، TDR3/SaMADSA، MdMADS1/CMB1 و POTM1/SLM5 قرار گرفتند (شکل 1). همسانه RaA2 شامل یک cDNA به طول 1113 جفت باز است که یک پروتئین با 243 اسید آمینه به وزن 28/2 کیلو دالتون رمز می‌کند. مقایسه انجام گرفته با استفاده از بانک اطلاعات پروتئین نشان داد که ژن رمز کننده این پروتئین، یعنی RaA2 به گروه SQUA/AP1 نزدیک بوده (شکل 1) و تشابه توالی 61/9 درصدی با پروتئین MADS-box از سیب (*Malus domestica*) (شماره بازیابی AJ000759) و تشابه توالی 61/3 درصدی با پروتئین (SQUA) (SQUAMOSA) از گل میمون (*Antirrhinum majus*) (Huijser et al., 1992) و پروتئین (AP1) (APETALA1) از *Arabidopsis thaliana* (Martinez et al., 2003) دارد. همچنین تشابه توالی 60/1 درصدی با SaMADS C، هومولوگ AP1، از

*Sinapis alba* (Menzel et al., 1995) و تشابه توالی 59/3 درصدی با پروتئین BoiAP1 از *Brassica oleracea* (شماره بازیابی U67451) (Car and Irish, 1997) نشان داد. در این گروه، بالاترین تشابه (95/3 درصد و 94/5 درصد) بین پروتئینی از *B. oleracea* با شماره بازیابی U67451 و پروتئین‌های AP1 از *S. alba* و *A. thaliana* مشاهده گردید. نشان می‌دهند. اعضای این گروه عموماً در تعیین هویت مریستم گل دخالت دارند. شکل-های 2 و 3 به ترتیب هم‌ردیفی و درصد تشابه توالی پروتئین RaA2 با دیگر پروتئین‌های این گروه را نشان می‌دهد. همسانه RaB17 دارای 1140 جفت باز است که پیش بینی می‌شود یک پروتئین با 251 اسید آمینه به وزن 28/8 کیلو دالتون با کدون آغاز ترجمه (ATG) در موقعیت 159، از آن رمز شود. مقایسه پروتئین RaB17 با دیگر پروتئین‌های MADS نشان داد که RaB17 می‌تواند در گروه MdMADS1/CMB1 قرار گیرد (شکل 1). در این گروه، RaB17 تشابه توالی 63/9 درصدی با پروتئین CMB1 از *Dianthus caryophyllus* با شماره بازیابی Q39685 و تشابه توالی 54/7 درصدی با PrMADS1 از *Pinus radiata* با شماره بازیابی U42399، تشابه توالی 52/2 درصدی با پروتئین

استفاده از جستجوی BLAST برای تعیین اینکه آیا شباهتی با توالی‌های موجود در بانک اطلاعاتی دارند، مورد مقایسه قرار گرفتند. پیدا کردن شبیه‌ترین توالی‌ها برای هم‌ردیفی توالی، با استفاده از برنامه MegAlign انجام و درخت فیلوژنتیک با استفاده از روش کلاستال (Clustal) تهیه گردید. بر اساس این بررسی، پروتئین‌های MADS-box ترشک در گروه‌های اصلی SQUA/AP1، TDR3/SaMADSA، MdMADS1/CMB1 و POTM1/SLM5 قرار گرفتند (شکل 1). همسانه RaA2 شامل یک cDNA به طول 1113 جفت باز است که یک پروتئین با 243 اسید آمینه به وزن 28/2 کیلو دالتون رمز می‌کند. مقایسه انجام گرفته با استفاده از بانک اطلاعات پروتئین نشان داد که ژن رمز کننده این پروتئین، یعنی RaA2 به گروه SQUA/AP1 نزدیک بوده (شکل 1) و تشابه توالی 61/9 درصدی با پروتئین MADS-box از سیب (*Malus domestica*) (شماره بازیابی AJ000759) و تشابه توالی 61/3 درصدی با پروتئین (SQUA) (SQUAMOSA) از گل میمون (*Antirrhinum majus*) (Huijser et al., 1992) و پروتئین (AP1) (APETALA1) از *Arabidopsis thaliana* (Martinez et al., 2003) دارد. همچنین تشابه توالی 60/1 درصدی با SaMADS C، هومولوگ AP1، از

در نوکلئوتید 646 خاتمه یابد. مقایسه توالی پروتئین RaG24 با دیگر پروتئین‌های MADS نشان داد که این پروتئین متعلق به گروه TDR3/SaMADS A می‌باشد (شکل 1). اعضای این گروه عموماً در هر دو اعضای رویشی و زایشی بیان می‌شوند و کارکردهای مختلفی مانند دخالت در تشکیل مریستم گل آذین و گل دارند. پروتئین RaG24 دارای تشابه 64/2 درصدی با TDR3 از گوجه فرنگی (*Lycopersicon esculentum*) (Pnueli et al., 1991)، تشابه 62/6 درصدی با AGL20 از *Arabidopsis thaliana* (با شماره بازبازی AC003680)، تشابه 61/9 درصدی با TobMADS1 از توتون (Mandel et al., 1994) و تشابه 61/5 درصدی با SaMADS A از *Sinapis alba* (Menzel et al., 1996) می‌باشد. در این گروه، AGL20 تشابه 94/4 درصدی با SaMADS A و TRD3 تشابه 95/5 درصدی با TobMADS1 دارند. پائین‌ترین درصد تشابه (43/3 درصد) بین پروتئین PrMADS9 از *Pinus radiata* (با شماره بازبازی U90344) و پروتئین AGL14 از *Arabidopsis thaliana* (با شماره بازبازی U20184) می‌باشد. بررسی هم‌ریدی پروتئین RaG24 با سایر پروتئین‌های MADS گیاهی در شکل 5 نشان داده شده است.

MADS-box گل میمون با شماره بازبازی X95467 و تشابه توالی 51/6 درصدی با پروتئین MdMADS1 سیب (*Malus domestica*) (Sung and An, 1997) دارد. هم‌ریدی توالی پروتئین پیش بینی شده RaB17 با سایر پروتئین‌های MADS در شکل 4 نشان داده شده است. مانند دیگر پروتئین‌های MADS گیاهی تشابه بالایی در بخش MADS بین پروتئین B17 با سایر اعضای خانواده MADS و تشابه کمی در توالی‌های پائین دست بخش MADS وجود دارد. در این گروه دو پروتئین از سیب (MdMADS8 و MdMADS1) بالاترین تشابه (99/6 درصد) را دارند. پروتئین MADS از گل میمون (با شماره بازبازی X9546) به ترتیب دارای تشابه 66/7 درصدی و 66/3 درصدی با پروتئین‌های سیب هستند. پروتئین CMB1 تشابه 63/9 درصدی با PrMADS1 دارد. ژن *MdMADS1* در اعضای گل و میوه‌های جوان بیان می‌شود (Sung and An, 1997). با اینحال، اطلاعات زیادی در باره الگوی بیان یا کارکرد ژن‌های این گروه وجود ندارد. همساز RaG24 دارای یک cDNA به طول 1122 جفت باز است که پیش بینی می‌شود یک پروتئین 214 اسید آمینه‌ای با وزن 32/4 کیلو دالتون رمز کند که از نوکلئوتید 5 آغاز و



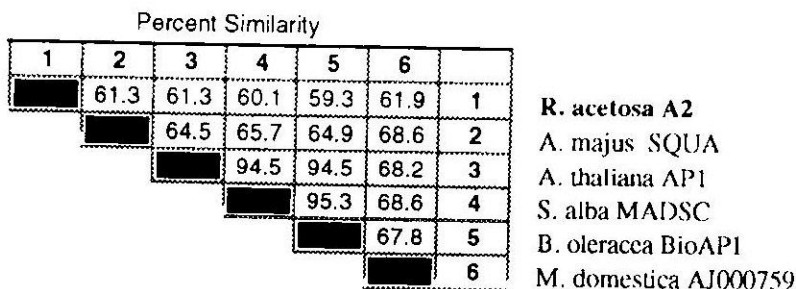
شکل 1- درخت فیلوژنی بر اساس همردیفی پروتئین‌های MADS ترشک (به صورت برجسته) با شبیه‌ترین پروتئین‌های MADS با استفاده از روش کلاستال (Clustal). *Brassica oleracea* از BoiAPI (شماره بازیابی U67451) (Car and Irish, 1997) SaMADS C از *Sinapis alba* (شماره بازیابی X81480) (Menzel et al., 1995) SQUA از *Antirrhinum* از *Arabidopsis thaliana* (شماره بازیابی S27109) (Mendel et al., 1992) AGL8 همسان از *Rumex acetosa* از RaA2 (AJ000759); *Solanum commersonii* از AGL8 (شماره بازیابی S20886) (Huijser et al., 1992) MADS از *Malus domestica* (شماره بازیابی AF002666) POTM1 از *Solanum tuberosum* (شماره بازیابی Q42429) (Kang and Hannapel, 1995) NAP1 از *Nicotiana tabacum* (شماره بازیابی AF009126) MADS5 از *Betula pendula* (شماره بازیابی X99655) NAP1 از *Nicotiana tabacum* (شماره بازیابی AF009126) SLM5 از *Silene latifolia* (شماره بازیابی X80492) (Hardenack et al., 1994) RaK16 از *Rumex acetosa* MdMADS8 ، *Malus domestica* (شماره بازیابی AJ001681) MdMADS1 از *Malus domestica* (شماره بازیابی U78947) (Sung and An, 1997) پروتئین MADS از *Antirrhinum majus* (شماره بازیابی X95467) MdMADS1 از *Malus domestica* (شماره بازیابی U78947) PrMADS1 از *Pinus radiata* (شماره بازیابی U42399) CMB1 از *Dianthus caryophyllus* (شماره بازیابی Q39685) RaB17 از *Rumex acetosa* TDR3 از *Lycopersicon esculentum* (شماره بازیابی X60756) (Pnueli et al., 1991) TobMADS1 از *Nicotiana tabacum* (شماره بازیابی X76188) (Mandel et al., 1994) پروتئین MADS از *Pimpinella brachycarpa* (شماره بازیابی AF082531) AGL20 از *Arabidopsis thaliana* (شماره بازیابی AC003680) SaMADS A از *Sinapis alba* (شماره بازیابی U25696) (Menzel et al., 1996) RaG24 از *Rumex acetosa* AGL14 از *Arabidopsis thaliana* (شماره بازیابی U20184) (Rounsley et al., 1995) PrMADS9 از *Pinus radiata* (شماره بازیابی U90344) RAP1 از *Rumex acetosa* (شماره بازیابی X89107) (Ainsworth et al., 1995) RAD1 از *Rumex acetosa* (شماره بازیابی X89113) (Ainsworth et al., 1995).

Figure 1- Phylogenetic tree produced from an alignment of sorrel MADS-box proteins (in bold) with the most similar MADS-box proteins using Clustal method.



شکل 2 - هم‌ردیفی توالی‌های اسید آمینه همسانه ژنی RaA2 ترشک با سایر پروتئین‌های MADS. SQUA از *Arabidopsis thaliana* (شماره بازیابی S20886) (Huijser *et al.*, 1992)، AP1 از *Arabidopsis thaliana* (شماره بازیابی X81480) (Menzel *et al.*, 1995)، پروتئین MADS از *Malus domestica* (شماره بازیابی AJ000759)، BoiAP1 از *Brassica oleracea* (شماره بازیابی U67451) (Car and Irish, 1997).

Figure 2- Alignment of amino acid sequence of the sorrel RaA2 clone and other MADS-box proteins.



شکل 3- درصد تشابه پروتئین همسانه ژنی RaA2 ترشک با پروتئین‌های SQUA، AP1، MADSC، SaMADS، پروتئین MADS از *M. domestica* و BoiAP1.

Figure 3- Sequence similarity percentage of the sorrel RaA2 clone with other MADS proteins.



شکل 4 - همردیفی توالی‌های اسید آمینه همسانه ژنی RaB17 ترشک با سایر پروتئین‌های MADS. CMB1 از *Dianthus caryophyllus* (شماره بازیابی Q39685)، PrMADS1 از *Pinus radiata* (شماره بازیابی U42399)، MdMADS8 از *Malus domestica* (شماره بازیابی U78947) (Sung and An, 1997)، پروتئین MADS از *Antirrhinum majus* (شماره بازیابی X95467).

Figure 4- Alignment of amino acid sequence of the sorrel RaB17 clone and other MADS-box proteins.





شکل 5 - هم‌ردیفی توالی‌های اسید آمینه همسانه ژنی RaG24 ترشک با سایر پروتئین‌های MADS. TDR3 از *Lycopersicon esculentum* (شماره بازیابی X60756) (Penueli *et al.*, 1991)، پروتئین AGL20 از *Nicotiana tabacum* (شماره بازیابی AC003680)، TobMADS1 از *Arabidopsis thaliana* (شماره بازیابی X76188) (Mandel *et al.*, 1994)، SaMADS A از *Sinapis alba* (شماره بازیابی U25696) (Menzel *et al.*, 1996)، پروتئین MADS از *Pimpinella brachycarpa* (شماره بازیابی AF082531) (PrMADS9 از *Pinus radiata* (شماره بازیابی U90344)، AGL14 از *Arabidopsis thaliana* (شماره بازیابی U20184) (Rounsley *et al.*, 1995).

Figure 5- Alignment of amino acid sequence of the sorrel RaG24 clone and other MADS-box proteins.

پروتئین به پروتئین‌های گروه POTM1/SLM5 خیلی نزدیک است (شکل 1). RaK16 تشابه توالی 63/1 درصدی با MADS5 از *Betula pendula* (با شماره بازیابی X99655) و POTM1 از *Solanum tuberosum* (Kang

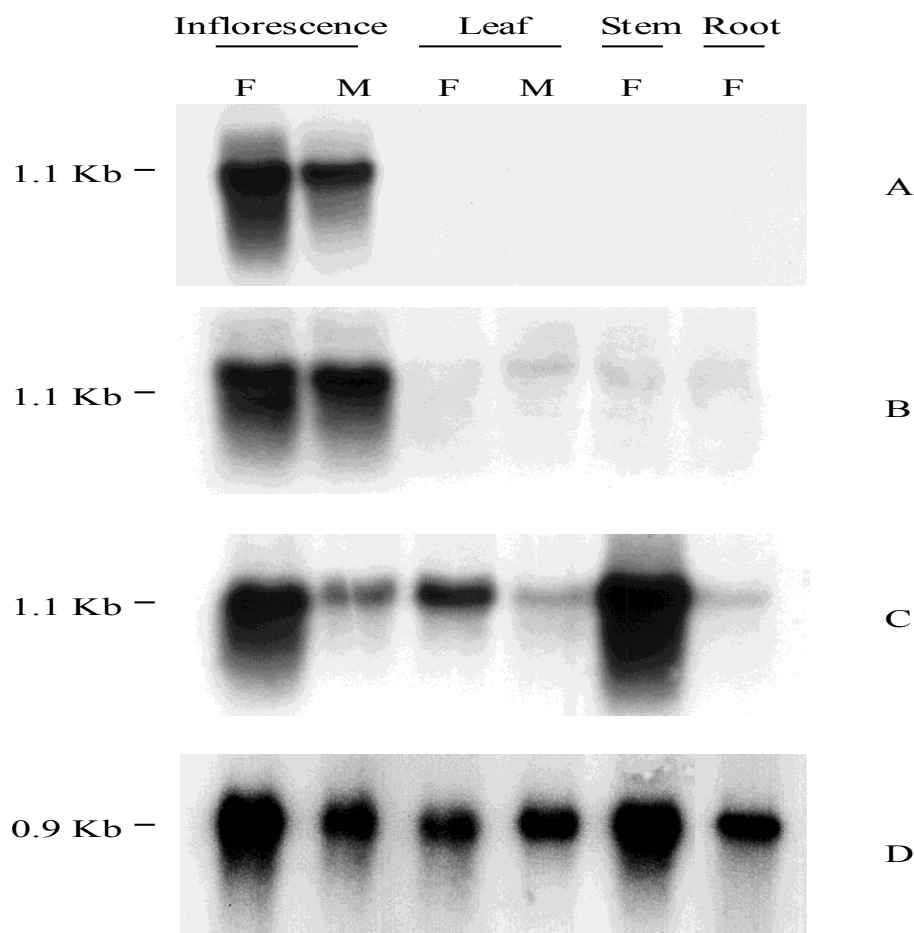
همسانه RaK16 ترشک دارای 969 جفت باز است که می‌تواند پروتئینی با 225 اسید آمینه با وزن 25/8 کیلوالتون را رمز نماید. مقایسه پروتئین RaK16 با سایر پروتئین‌های MADS گیاهی نشان داد که این

رويشی دیده شد، که می‌تواند ناشی از تشابه توالی با ديگر mRNAها باشد. همسانه‌های RaK16 و RaG24 در همه بافت‌ها بيان شدند (شکل‌های 6C و 6D). اگرچه بسته به نوع بافت، سطح بیان همسانه‌ها تفاوت‌هایی نشان داد. بیان RaG24 در بافت گل آذین ماده نسبت به گیاهان نر شديدتر بود. همه بافت‌های گیاهان نر در مقایسه با بافت‌های مشابه در گیاهان ماده سطح بیان پائین نشان دادند. سطح بیان RaG24 در ساقه بالاتر از میزان آن در برگ‌ها بود و میزان بیان آن در ریشه‌ها کمترین مقدار را داشت. بیان RaK16 در بافت ساقه و گل آذین گیاهان ماده بالاتر از سایر بافت‌ها بود.

به منظور تعیین تعداد کپی این ژن‌ها، آنالیز سادرن بلات پس از هضم با آنزیم *HindIII* یا *EcoRI* انجام گرفت (شکل 7). الگوهای دورگه سازی بین گیاهان نر و ماده تفاوت دارند. این تفاوت‌ها ممکن است مربوط به چند شکلی‌هایی باشد که معمولاً در یک گونه دگرگشن انتظار می‌رود. الگوی دورگه سازی نشان از وجود یک کپی منفرد و خانواده ژنی کوچک از هر یک از ژن‌ها در ژنوم می‌دهد.

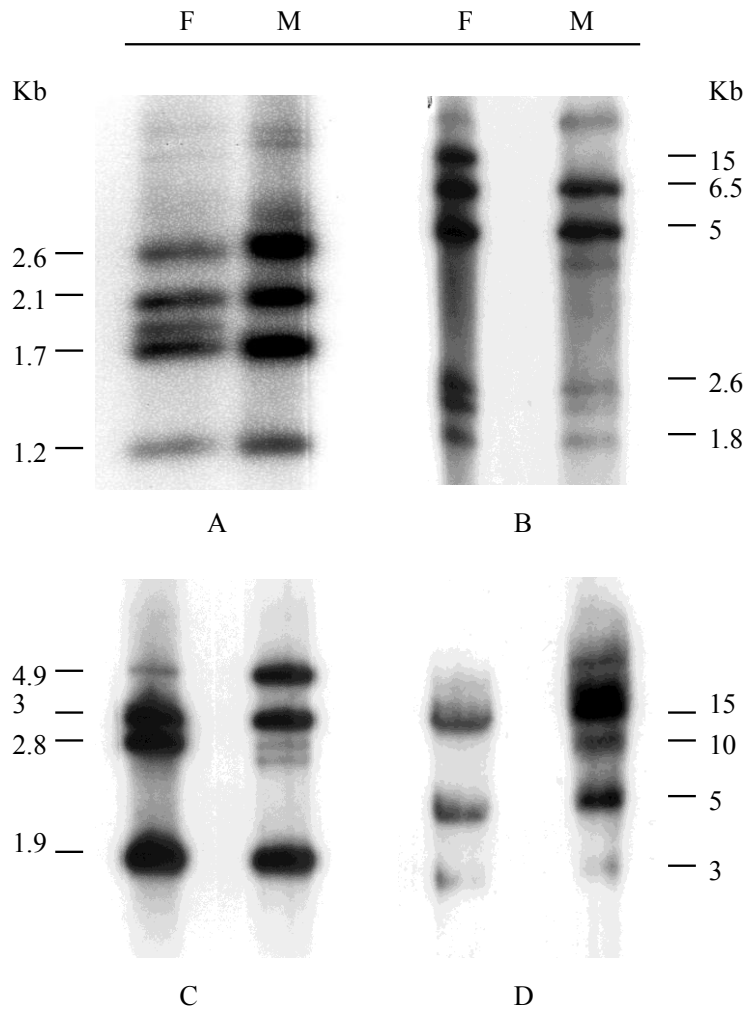
دارد. پروتئين RaK16 (and Hannapel, 1995) تشابه 62/2 درصدی با NAPI از توتون *Nicotiana tabacum* (با شماره بازيايی AF009126) و هومولوگ AGL8 از *Solanum commersonii* (با شماره بازيايی AF002666) نیز نشان داد. این پروتئين همچنين تشابه 60/2 درصدی با SLM5 از *Silene latifolia* (Hardenack et al., 1994) دارد. در بين اعضاي این گروه، POTM1 بالاترين تشابه (96 درصد) را با پروتئينی از *Solanum commersonii* و نیز تشابه 76/3 درصدی با NAPI از *N. tabacum* دارد. MADS5 تشابه 69/3 درصدی با POTM1 و نیز تشابه 66/9 درصدی با SLM5 دارد.

برای بررسی الگوی بیان همسانه‌های ژنی ترشک، RNA از بافت‌های مختلف شامل ریشه، ساقه، برگ و گل آذین گیاهان نر و ماده استخراج و پس از جداسازی روی ژل به غشاء نایلونی منتقل و غشاءها با کاوشگر مربوطه دورگه سازی شدند. همسانه‌های RaA2 و RaB17 در نمونه‌های RNA بافت گل آذین هر دو گیاه نر و ماده بیان بالایی نشان دادند (شکل‌های 6A و 6B) ولی بیان آنها در سایر بافت‌ها دیده نشد. با اینحال، در همسانه RaB17 علایم بیان خیلی ضعیفی در بافت‌های



شکل 6 - آنالیز نوردن بلات. مقدار 20 میکروگرم RNA از بافت‌های گل آذین، برگ، ساقه و ریشه گیاهان نر (M) و ماده (F) الکتروفورز شده و سپس به غشاء نایلونی منتقل شدند و با کاوشگرهای RaA2 (A)، RaB17 (B)، RaG24 (C) و RaK16 (D) دورگه سازی گردید.

**Figure 6- Northern blot analysis. 20  $\mu$ g RNA from inflorescence, leaf, stem and root tissues of male (M) and female (F) plants after electrophoresis were transferred to membrane. Hybridizations were carried out using RaA2 (A), RaB17 (B), RaG24 (C) and RaK16 (D) as probes.**



شکل 7 - آزمون سادرن بلات. مقدار 10 میکروگرم DNA از گیاهان نر (M) و ماده (F) پس از هضم با *HindIII* (A, B و C) یا *EcoRI* (D) برای دورگه سازی مورد استفاده قرار گرفت. کاوشگرهای مورد استفاده شامل (A) RaA2، (B) RaB17، (C) RaG24 و (D) RaK16 بودند.

**Figure 7- Southern blot analysis. 10  $\mu$ g DNA from male (M) and female (F) plants after digestion with *HindIII* (A, B and C) or *EcoRI* (D) were used for hybridization. and RaK16 (D) were used as probes. RaA2 (A), RaB17 (B), RaG24 (C)**

بحث

گلبرگ‌ها و در پریموردیاهای پرچم بیان می‌شود. ژن *SamADS C* نیز همانند ژن *API* گیاه *S. alba* ابتدا در پریموردیاهای گل بیان می‌شود (Menzel et al., 1995). آزمون‌های نوردن بلات نشان دادند که ژن *A2* ترشک به میزان بالایی در گل آذین‌های نر و ماده بیان می‌شود چرا که mRNA مربوط به ژن *A2* در ریشه‌ها، ساقه‌ها و برگ‌ها قابل ردیابی نبود. بر اساس الگوی بیان و تشابه توالی، به نظر می‌رسد که ژن *RaA2* در مرحله زایشی بیان و احتمالاً کارکردی همانند ژن *SQUA* داشته باشد. پروتئین *RaB17* تشابه توالی بالایی با پروتئین‌های *CMB1* از *Dianthus* و *PrMADS1 caryophyllus* از *Pinus radiate* یک پروتئین *MADS* گل میمون و پروتئین‌های *MdMADS1* و *MdMADS8* از سیب (*M. domestica*) نشان داده است. ژن *MdMADS1* در همه اعضای گل و میوه‌های جوان بجز در برگ‌ها بیان می‌شود (Sung and An, 1997). بیان بالاتر این ژن در مراحل اولیه نمو گل و میوه دلالت بر آن دارد که این ژن در شروع نمو اعضای زایشی نقش عمده‌ای ایفا می‌کند. آنالیز نوردن بلات نشان داد که ژن *RaB17* در زمان نمو گل به شدت بیان می‌شود و بیان آن در هر دو گیاه نر و ماده بیانگر آن است که این ژن در نمو گل گیاهان

الگوی بیان ژن‌های ترشک و مقایسه توالی پروتئینی آنها با ژن‌های شناخته شده از سایر گیاهان بررسی گردید. بر اساس مقایسه توالی پروتئین *pRaA2*، ترشک تشابه توالی بالایی با پروتئین *MADS* سیب (*Malus domestica*)، پروتئین *SQUA* گل میمون (*Antirrhinum majus*) و پروتئین *API* علف تال دارد. در گل میمون، پروتئین *SQUA* در مریستم‌های گل به میزان بالایی بیان می‌شود و بیان آن تا مراحل بعدی ریخت زایی اعضای گل بجز در تمایز پرچم تداوم می‌یابد (Huijser et al., 1992). جهش در ژن *SQUA* باعث ایجاد گل‌هایی با تعداد زیاد براکت و گل‌های تغییر شکل یافته و ناقص می‌شود (Huijser et al., 1992). در علف تال، ژن *API* در پریموردیاهای گل و اعضای گل مانند کاسبرگ‌ها و گلبرگ‌ها بیان می‌شود. بیان این ژن برای تبدیل مریستم گل آذین به مریستم گل و نیز تعیین هویت کاسبرگ و گلبرگ لازم است (Mandel et al., 1992). محصول ژن *RaA2* نیز با پروتئین هومیوتیک *BoiAPI* کلم (*Brassica oleracea*) (Shiraishi et al., 1993) و پروتئین *SaMADS C* گیاه *Sinapis alba* (Menzel et al., 1995) مشابهت نشان می‌دهد. در کلم، ژن *BoiAPI* در کاسبرگ‌ها،

شدیدتر از بافت‌های گیاه نر بوده و بالاترین میزان نسخه‌برداری را در ساقه و گل آذین نشان می‌دهد. در گیاه سیلن (White Campion) بیان هر دو ژن *SLM4* و *SLM5* در گل‌های گیاه ماده نسبت به گیاه نر بیشتر بود اما میزان بیان ژن‌های *SLM2* و *SLM3* در گل‌های نر نسبت به ماده بالاتر بوده است (Hardenack *et al.*, 1994). الگوی بیانی ژن *RaG24* در اعضای رویشی و زایشی و تشابه توالی با بعضی از ژن‌های خانواده MADS بیانگر آن است که این ژن در هر دو مرحله رویشی و مرحله نمو گل نقش دارد. پروتئین *RaK16* همانند پروتئین *AGL8*، بالاترین تشابه را با پروتئین *POTM1* از سیب زمینی (*Solanum tuberosum*) دارد که بیان آن در اعضای رویشی بالا است (Kang and Hannapel, 1995). پروتئین *RaK16* نیز همانند *SQUA/AP1* با پروتئین *MADS5* گیاه *Betula pendula*، پروتئین *NAP1* توتون و *SLM5* سیلن (*Silene latifolia*) تشابه نشان داد. ژن *SLM5* مشابه ژن‌های *SQUA* و *API* بوده و در تمام مریستم گل، و در ادامه در کاسبرگ‌ها و گلبرگ‌ها بیان می‌شود (Kempin *et al.*, 1993). بیان *RaK16* در اعضای گل دیده نشد و در بافت‌های گل آذین، برگ، ساقه و ریشه مشاهده گردید. این نتایج نشان می‌دهد که این ژن احتمالاً کارکردهای مختلفی طی نمو

نر و ماده نقش دارد. پروتئین *RaB17* با بعضی از ژن‌های MADS که کارکرد آنها روشن نشده است، تشابه توالی دارد. پروتئین *RaG24* با پروتئین‌های *TDR3* گوجه فرنگی (*Lycopersicon esculentum*) (Pnueli *et al.*, 1991)، *AGL20* علف تال، *TobMADS1* توتون (Mandel *et al.*, 1994) و *SaMADS* A گیاه *Sinapis alba* (Menzel *et al.*, 1996) بیشترین تشابه را دارد. ژن *TDR3* در برگ‌ها و مریستم‌های گل اما نه در اعضای گل گوجه فرنگی بیان می‌شود (Pnueli *et al.*, 1991). ژن *TobMADS1* در هر دو اعضای رویشی و زایشی توتون بیان می‌شود ولی بیان آن در برگ‌های بالغ و گلبرگ‌ها نسبتاً پائین است (Mandel *et al.*, 1994). بیان ژن *SaMADS* A پس از القا گلدهی در مریستم‌های انتهایی و در مریستم‌های گل پس از نمو پریموردیاهای کاسبرگ، مشاهده شده است (Menzel *et al.*, 1996). ژن *RaG24* با ژن *TobMADS1* فوق‌الذکر نیز تشابه بالایی دارد. پروتئین این ژن همچنین مشابه پروتئین *AGL* علف تال می‌باشد که تشابه بالایی با پروتئین *AGL14* داشته و به طور اختصاصی در ریشه بیان می‌شود (Rounsley *et al.*, 1995). آزمون نوردرن بلات نشان داد که ژن *RaG24* در بافت‌های مختلف اعضای رویشی و زایشی بیان می‌شود. معمولاً، بیان ژن *RaG24* در بافت‌های گیاه ماده

رویشی و زایشی دارد. آنالیز الگوهای بیان و متشابه توالی 4 ژن عضو خانواده MADS-box جدا شده از ترشک نشان داد که ژنهای *RaA2* و *RaB17* در نمو گل نقش داشته و ژنهای *RaK16* و *RaG24* در هر دو مرحله رویشی و

زایشی کارکردهایی دارند، با اینحال، نقش واقعی آنها را فقط می‌توان با آنالیز این ژن‌ها در گیاهان جهش یافته یا گیاهان تراریخته تعیین نمود.

#### منابع

1. Ainsworth C, Rahman A, Parker J, Edwards G (2005) Intersex inflorescences of *Rumex acetosa* demonstrate that sex determination is unique to each flower. *New Phytologist* 165: 711-720.
2. Ainsworth CC (1994) Isolation of RNA from floral tissue of *Rumex acetosa* (sorrel). *Plant Molecular Biology Reporter* 12: 198-203.
3. Ainsworth CC, Crossley S, Buchanan-Wollaston V, Tangavelu M, Parker J (1995) Male and female flowers of the dioecious plant sorrel show different patterns of MADS box gene expression. *The Plant Cell* 7: 1583-1598.
4. Carr SM, Irish VF (1997) Floral homeotic gene expression defines developmental arrest stages in *Brassica oleracea* L. vars. *botrytis* and *italica*. *Planta* 201: 179-188.
5. Charlesworth D (2002) Plant sex determination and sex chromosomes. *Heredity* 88: 94-101.
6. Davies B, Di Rosa E, Eneva T, Saedler H, Sommer H (1996) Alteration of tobacco floral organ identity by expression of combinations of *Antirrhinum* MADS box genes. *The Plant Journal* 10: 663-677.
7. Hardenack S, Ye D, Saedler H, Grant S. (1994) Comparison of MADS box gene expression in developing male and female flowers of the dioecious plant white campion. *The Plant Cell* 6: 1775-1787.
8. Henschel K, Kofuji R, Hasebe M, Saedler H, Munster T, Theissen G (2002) Two ancient classes of MIKC-type MADS-box genes are present in the moss *Physcomitrella patens*. *Molecular Biology Evolution* 19: 801-14.
9. Huang H, Mizukami Y, Hu Y, Ma H (1995) Isolation and characterisation of the binding sequences for the product of the *Arabidopsis* floral homeotic gene AGAMOUS. *Nucleic Acids Research* 21: 4769-4776.
10. Huijser P, Klein J, Lonig W-E, Meijer H, Saedler H, Sommer H (1992) Bractomania, an inflorescence anomaly, is caused by the loss of function of the MADS box gene *SQUAMOSA* in *Antirrhinum majus*. *The EMBO Journal* 11: 1239-1249.
11. Kang SG, Hannapel DJ (1995) Nucleotide sequences of novel potato (*Solanum tuberosum* L.) MADS box cDNAs and their expression in vegetative organs. *Gene* 12: 329-330.
12. Kater MM, Colombo L, Franken J, Busscher M, Masiero S, M (1998) Multiple AGAMOUS homologues from cucumber and petunia differ in their ability to induce reproductive organ fate. *The Plant Cell* 10: 171-182.

13. Kempin SA, Mandel MA, Yanofsky MF (1993) Conversion of perianth into reproductive organs by ectopic expression of the tobacco floral homeotic gene *NAG1*. *Plant Physiology* 103: 1041-1046.
14. Krogan NT, Ashton N W (2000) Ancestry of plant MADS-box genes revealed by bryophyte (*Physcomitrella patens*) homologues. *New Phytologist* 147: 505-517.
15. Mandel MA, Gustafson-Brown C, Savidge B, Yanofsky MF (1992) Molecular characterisation of the *Arabidopsis* floral homeotic gene *APETALA1*. *Nature* 360: 273-277.
16. Mandel T, Lutziger I, Kuhlemeier CA (1994) Ubiquitously expressed MADS box gene from *Nicotiana tabacum*. *Plant Molecular Biology* 25: 319-321.
17. Martinez-Castilla L P, Alvarez-Buylla E R (2003) Adaptive evolution in the *Arabidopsis* MADS-box gene family inferred from its complete resolved phylogeny. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 100: 13407-13412.
18. Menzel G, Apel K, Melzer S (1995) Isolation and analysis of *SaMADS C*, the *APETALA1* cDNA homologue from mustard. *Plant Physiology* 108: 853-854.
19. Menzel G, Apel K, Melzer S (1996) Identification of two MADS box genes that are expressed in the apical meristem of the long-day plant *Sinapis alba* in transition to flowering. *The Plant Journal* 9: 399-408.
20. Parenicova L, de Folter S, Kieffer M, Horner D S, Favalli C, Busscher J, Cook H E, Ingram R M, Kater M M, Davies B, Angenent G C, Colombo L (2003) Molecular and phylogenetic analyses of the complete MADS-box transcription factor family in *Arabidopsis*: new openings to the MADS world. *Plant Cell* 15: 1538-51.
21. Pnueli L, Abu-Abeid M, Zamir D, Nacken W, Schwarz-Sommer Z, Lifschitz E (1991) The MADS box gene family in tomato: temporal expression during floral development, conserved secondary structures and homology with homeotic genes from *Antirrhinum* and *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 1: 255-266.
22. Riechmann JL, Meyerowitz EM (1997) MADS box proteins in plant development. *Biological Chemistry* 378: 1079-1101.
23. Rounsley SD, Ditta, GS, Yanofsky MF (1995) Diverse roles for MADS box genes in *Arabidopsis* development. *The Plant Cell* 7: 1259-1269.
24. Schwarz-Sommer Z, Huijser P, Nacken W, Saedler H, Sommer H (1990) Genetic control of flower development by homeotic genes in *Antirrhinum majus*. *Science* 250: 931-936.
25. Shiraishi H, Okada K, Shimura Y (1993) Nucleotide sequences recognised by the AGAMOUS MADS domain of *Arabidopsis thaliana* in vitro. *The Plant Journal* 4: 385-398.
26. Shore P, Sharrocks AD (1995) The MADS box family of transcription factors *European Journal of Biochemistry* 229: 1-13.
27. Singer S D, Krogan N T, Ashton N W (2007) Clues about the ancestral roles of plant MADS-box genes from a functional analysis of moss homologues. *Plant Cell Rep* 26: 1155-69.
28. Sung SK, An G (1997) Molecular cloning and characterisation of a MADS box cDNA clone of the Fuji apple. *Plant Cell Physiology* 38: 484-489.



29. Svensson M E, Engström P (2002) Closely related MADS-box genes in club moss (*Lycopodium*) show broad expression patterns and are structurally similar to, but phylogenetically distinct from, typical seed plant MADS-box genes. *New Phytologist* 154: 439-450.
30. Tanabe Y, Hasebe M, Sekimoto H, Nishiyama T, Kitani M, Henschel K, Munster T, Theissen G, Nozaki H, Ito M (2005) Characterization of MADS-box genes in charophycean green algae and its implication for the evolution of MADS-box genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 102: 2436-41.
31. Tanabe Y, Uchida M, Hasebe M, Ito M (2003) Characterization of the *Selaginella remotifolia* MADS-box gene. *Journal of Plant Research* 116:71-95.
32. Tanurdzic M, Banks J A (2004) Sex-determining mechanisms in land plants. *The Plant Cell* 16: S61-S71.

**Expression study of four gene clones belonging to MADS- box family in the dioecious plant sorrel (*Rumex acetosa* L.)**

**Shakib A. M.\*<sup>1</sup>, Ainsworth C.C.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Karaj.

<sup>2</sup> Plant Molecular Biology Laboratory, Imperial College, Wye Campus, UK.

**Abstract.**

Study of genes involved in flower formation could help to increase our understanding of floral organ identity mechanisms. In this research, the expression pattern of four MADS-box gene family including *RaA2*, *RaB17*, *RaG24* and *RaK17* isolated from the dioecious plant *Rumex acetosa* was studied. RNA extracted from different tissues (inflorescence, stem, leaf and root) of male and female plants, was used for Northern blot analysis. *RaA2* and *RaB17* genes are expressed in reproductive organs but *RaG24* and *Ra K17* genes were shown to be expressed in both vegetative and reproductive organs. Alignment of their deduced proteins with other known MADS box proteins showed that they belong to distinct subfamily groups. The proteins of *RaA2* and *RaB17* genes showed the highest similarity to MADS proteins from *Malus domestica* and CMB1 from *Diantus caryophyllus*, respectively. The proteins of *RaG24* and *Ra K17* genes have the highest similarity to TDR3 protein from *Lycopersicon esculentum* and MADS5 protein from *Betula pendula* and POTM1 protein from *Solanum tuberosum* which are expressed in both vegetative and reproductive phases. In Southern blot analysis, there is a difference in hybridisation pattern between male and female. The simple pattern of hybridisation indicated that there is a single copy and small gene family of each gene in the genome.

**Key words:** *MADS- box, Rumex acetosa* L., *dioecious plant, gene expression*

---

\* Corresponding Author: Shakib Ali Mohammad

Tel: 0261-2703536

E-mail: a\_shakib@abrii.ac.ir