

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

علی محمد شکیب^{1*}، چارلز اینزورث²

¹ پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران - کرج

² آزمایشگاه بیولوژی ملکولی گیاهی، امپریال کالج، دانشگاه لندن، 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، شناسایی ژن، تمایز جنسی، بیان ژن، *MADS- box*، *Rumex acetosa* L.

در گونه‌های گیاهی است (Charlesworth, 2002; Singer *et al.*, 2007; Tanurdzic and Banks, 2004). دو گیاه دو پایه *Silene latifolia* و *Rumex acetosa* 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 ژن‌های دخیل در تمایز اعضای گل می‌تواند در فهم مکانیزم‌های تعیین جنسیت گیاهان کمک نماید. قبلاً 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 *RADI* و (*Rumex acetosa DEFICIENS-like*) *RAD2* و (*Rumex acetosa PLENA-like*) *RAP1* مورد بررسی تفصیلی قرار گرفته (Ainsworth *et al.*, 1995) و نشان داده‌اند که در پرموردیاهای اعضای جنسی گل در پایه‌های نر و ماده ترشک بیان می‌شوند. با اینکه تا به حال چندین ژن از ترشک جداسازی و مشخصات مولکولی آنها تعیین شده اما نقش آنها بدلیل نبود روش انتقال ژن به ترشک تعیین نشده است. تعدادی

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 اعضاء گل نقش دارند (Davies *et al.*, 1996; Parenicova *et al.*, 2003; Reichman 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; Svensson 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. یکی از موضوعات مورد علاقه محققین، مطالعه مکانیزم‌های تظاهر جنسیت و نحوه تکامل آن

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 ³²P نشاندار شدند.

دورگه سازی سادرن و نوردن

پلات: کل RNA 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 استفاده از جستجوی BLAST برای تعیین اینکه آیا شباهتی با توالی‌های موجود در بانک اطلاعاتی دارند، مورد مقایسه قرار گرفتند. پیدا

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 ژن‌هایی 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 از برگ

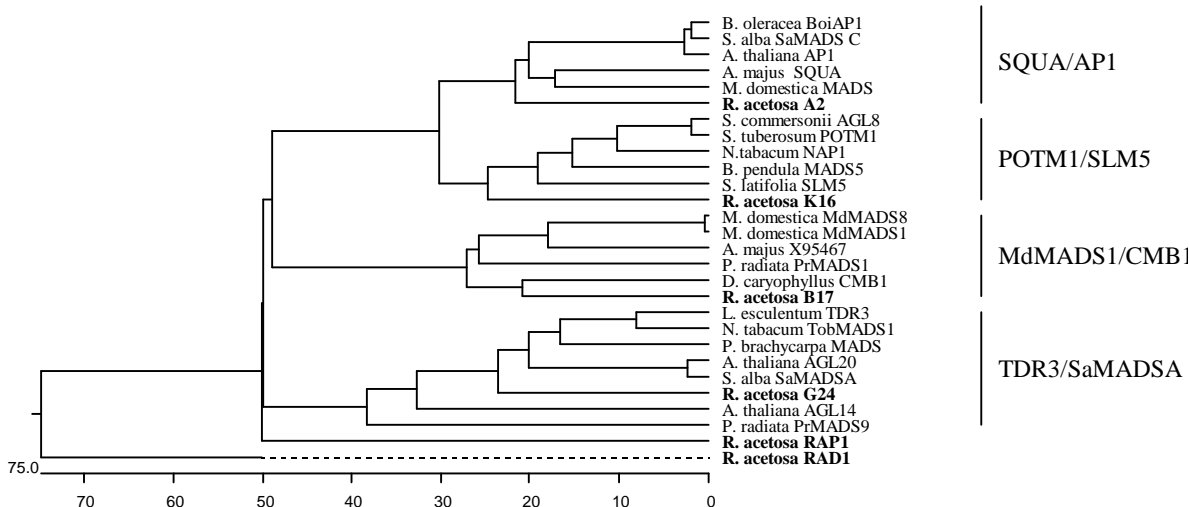
گیاهان نر و ماده DNA و از ریشه، ساقه، برگ و گل آذین گیاهان نر و ماده RNA کل به طور جداگانه مطابق روش‌های توصیه شده توسط اینزورث و همکاران (Ainsworth et al., 1995;) (Ainsworth, 1994) جداسازی گردیدند.

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 SQUAMOSA (SQUA) از گل میمون (*Antirrhinum majus*) (Huijser et al., 1992) و پروتئین APETALA1 (AP1) 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 An, 1997) دارد. هم‌ردیفی توالی پروتئین (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. میزان تشابه SQUA و AP1 با همدیگر 64/5 درصد می‌باشد. اعضای این گروه عموماً در تعیین هویت مریستم گل دخالت دارند. شکل‌های 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 MADS-box گل میمون با شماره بازیابی X95467 و تشابه توالی 51/6 درصدی با پروتئین MdMADS1 سیب (*Malus domestica*) (Sung and An, 1997) دارد.

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 SQUAMOSA (SQUA) از گل میمون (*Antirrhinum majus*) (Huijser et al., 1992) و پروتئین APETALA1 (AP1) 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 An, 1997) دارد. هم‌ردیفی توالی پروتئین

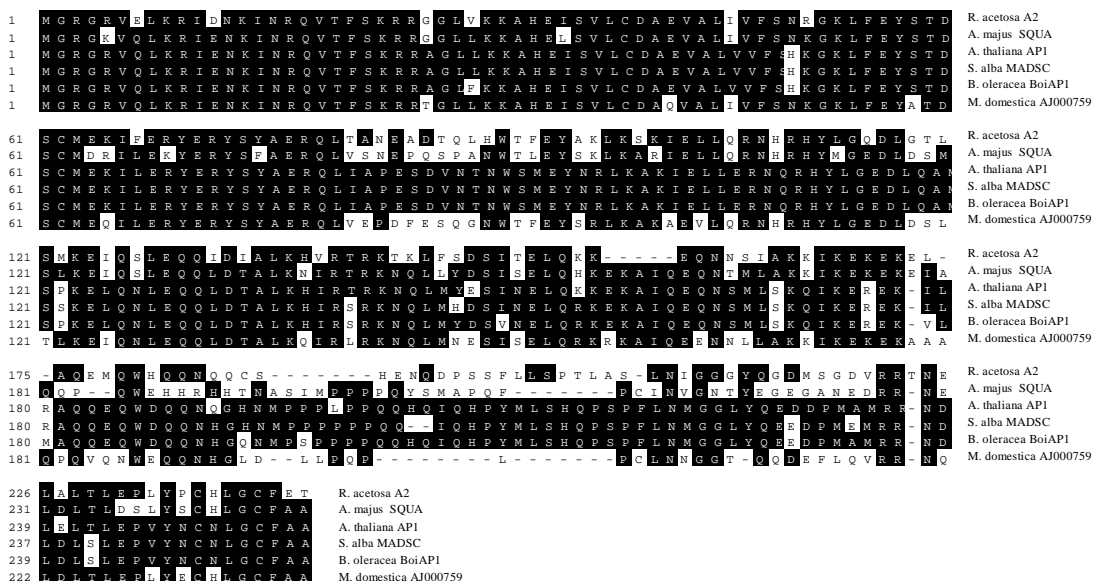
نشان داد که این پروتئین متعلق به گروه TDR3/SaMADS A می‌باشد (شکل 1). اعضای این گروه عموماً در هر دو اعضای رویشی و زایشی بیان می‌شوند و کارکردهای مختلفی مانند دخالت در تشکیل مریستم گل آذین و گل دارند. پروتئین RaG24 دارای تشابه 64/2 درصدی با TDR3 از گوجه فرنگی (*Lycopersicon esculentum*) (Pnueli et al., 1991)، تشابه 62/6 درصدی با AGL20 از *Arabidopsis thaliana* (با شماره بازیابی 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 بازیابی U90344) و پروتئین AGL14 از *Arabidopsis thaliana* (با شماره بازیابی U20184) می‌باشد. بررسی هم‌دیفی پروتئین RaG24 با سایر پروتئین‌های MADS گیاهی در شکل 5 نشان داده شده است.

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 سب (MdMADS1 و MdMADS8) بالاترین تشابه (99/6 درصد) را دارند. پروتئین MADS از گل میمون (با شماره بازیابی X9546) به ترتیب دارای تشابه 66/7 درصدی و 66/3 درصدی با پروتئین‌های سب 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 در نوکلئوتید 646 خاتمه یابد. مقایسه توالی پروتئین RaG24 با دیگر پروتئین‌های MADS



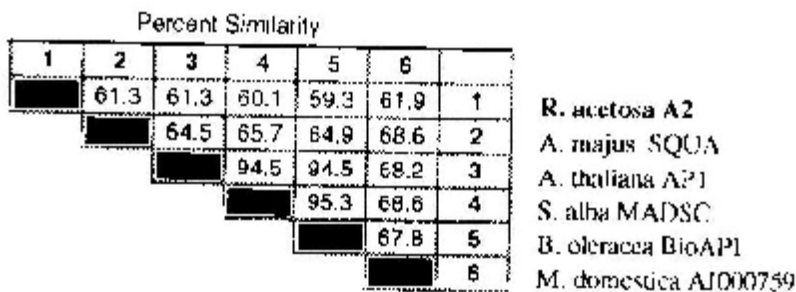
شکل 1- درخت فیلوژنی بر اساس همردیفی پروتئین‌های MADS ترشک (به صورت برجسته) با شبیه‌ترین پروتئین‌های MADS با استفاده از روش کلاستال (Clustal). *BoiAP1* از *Brassica oleracea* (شماره بازیابی U67451) (*Car*)، *SaMADS C* از *Sinapis alba* (شماره بازیابی X81480) (Menzel et al., 1995)، *AP1* (and Irish, 1997) از *Arabidopsis thaliana* (شماره بازیابی S27109) (Mendel et al., 1992)، *SQUA* از *Antirrhinum* (*majus* (شماره بازیابی S20886) (Huijser et al., 1992)، پروتئین MADS از *Malus domestica* (شماره بازیابی AJ000759)، *RaA2*; از *Rumex acetosa* همسان *AGL8* از *Solanum commersonii* (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* از *Malus domestica* (شماره بازیابی U78947)، *MdMADS1* (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 U42399)، *PrMADS1* از *Pinus radiata* (شماره بازیابی U78947)، *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.



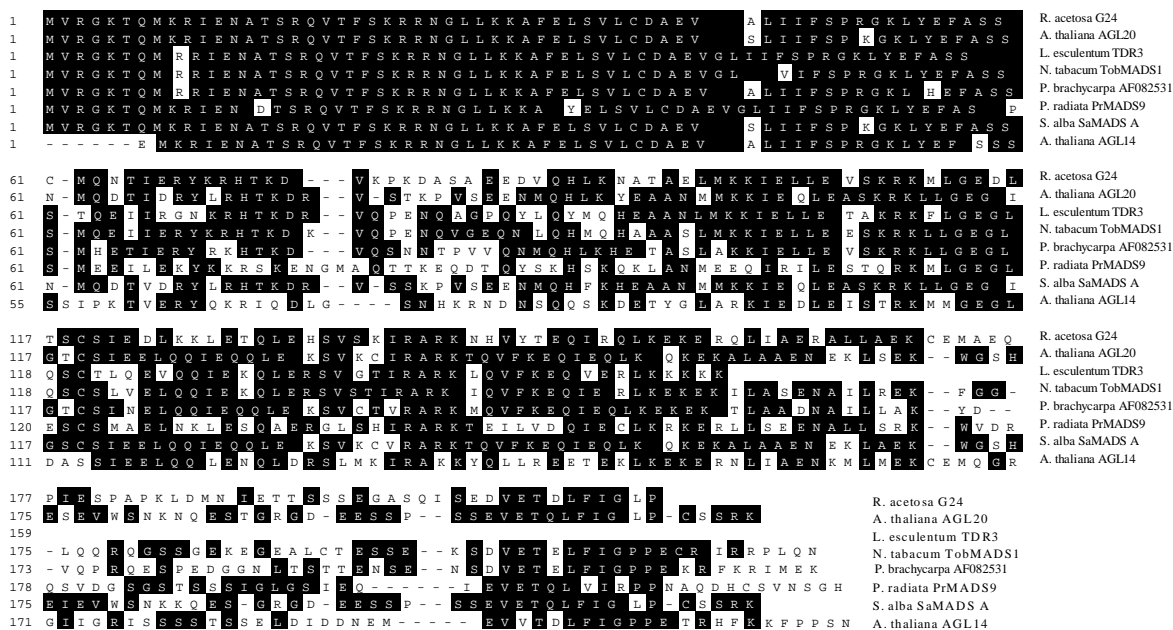
شکل 2 - هم‌ردیفی توالی‌های اسید آمینه هم‌سانه ژنی RaA2 ترشک با سایر پروتئین‌های MADS. SQUA از *Arabidopsis thaliana* (شماره بازیابی S20886) (Huijser et al., 1992) (AP1)، *Malus domestica* (شماره بازیابی S27109)، *Sinapis alba* (شماره بازیابی X81480) (Menzel et al., 1995)، پروتئین MADS از *Malus domestica* (شماره بازیابی AJ000759)، *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 BoiAPI.

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



شکل 5- همردیفی توالی‌های اسید آمینه همسانه ژنی RaG24 ترشک با سایر پروتئین‌های MADS. TDR3. MADS از *Lycopersicon esculentum* (شماره بازیابی X60756) (Penueli et al., 1991)، پروتئین AGL20 از *Arabidopsis thaliana* (شماره بازیابی AC003680)، TobMADS1 از *Nicotiana tabacum* (شماره بازیابی Menzel et al., 1994) (X76188)، SaMADS A از *Sinapis alba* (شماره بازیابی U25696) (Mandel et al., 1994)، PrMADS9 از *Pimpinella brachycarpa* (شماره بازیابی AF082531)، MADS از *P. radiata* (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 از *Solanum tuberosum* POTM1 (Kang and

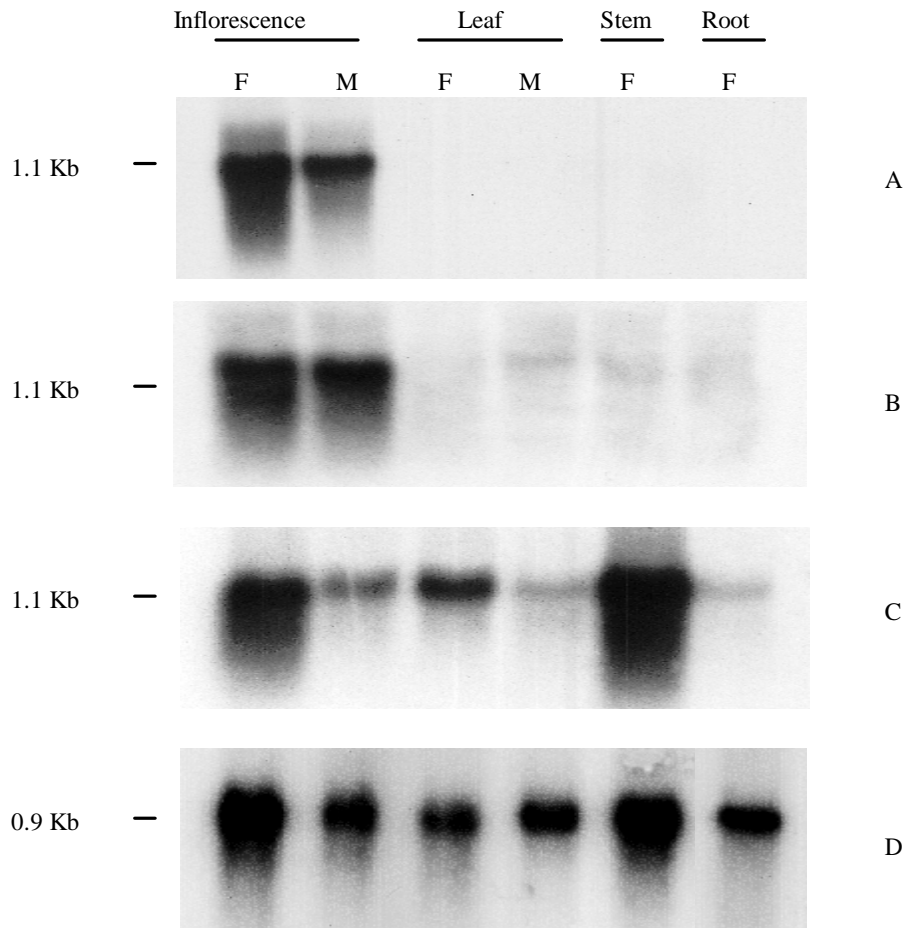
همسانه RaK16 ترشک دارای 969 جفت باز است که می‌تواند پروتئینی با 225 اسید آمینه با وزن 25/8 کیلوالتون را رمز نماید. مقایسه پروتئین RaK16 با سایر پروتئین‌های MADS گیاهی نشان داد که این

رويشی دیده شد، که می‌تواند ناشی از تشابه توالی با ديگر mRNAها باشد. همسانه-های 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.

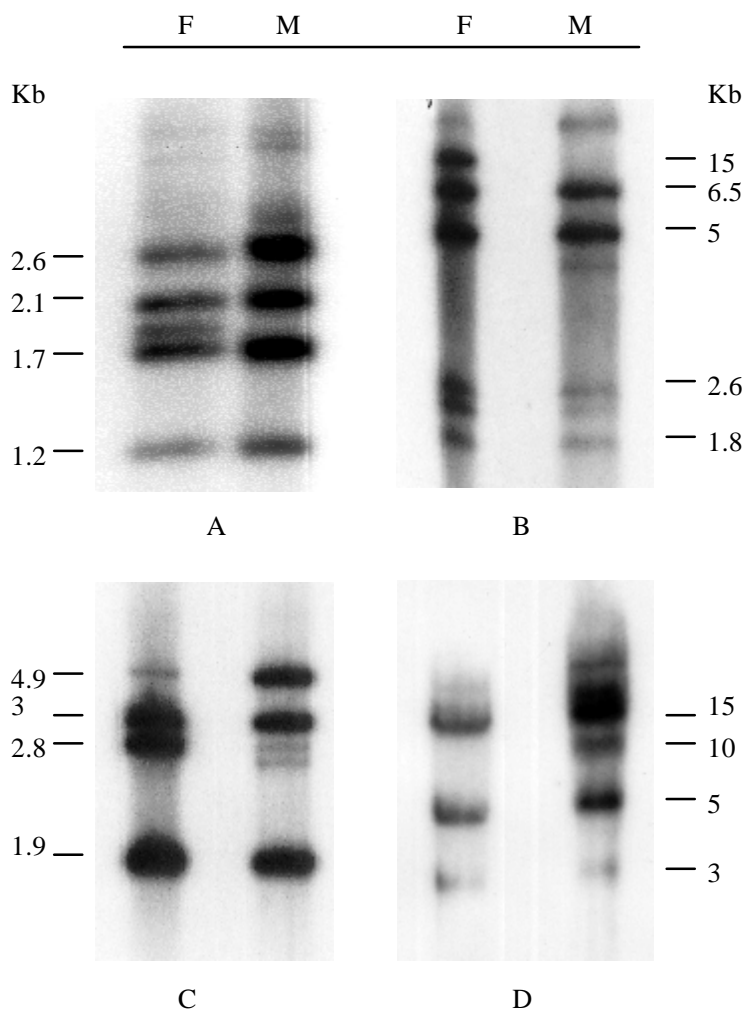
Hannapel, 1995) دارد. پروتئين RaK16 تشابه 62/2 درصدی با NAP1 از توتون *Nicotiana tabacum* (با شماره بازبای AF009126) و هومولوگ AGL8 از *Solanum commersonii* (با شماره بازبای AF002666) نیز نشان داد. این پروتئين همچنين تشابه 60/2 درصدی با SLM5 از *Silene latifolia* (Hardenack et al., 1994) دارد. در بین اعضای این گروه، POTM1 بالاترين تشابه (96 درصد) را با پروتئينی از *Solanum commersonii* و نیز تشابه 76/3 درصدی با NAP1 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 - 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. 20 μ 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 - 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 RaA2 (A), RaB17 (B), RaG24 (C), و RaK16 (D) بودند.

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

بحث

(*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 caryophyllus* و *PrMADS1* از *Pinus radiata* 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 عمده-ای 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 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*

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 *API1* علف تال (*Arabidopsis*) 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 (*Arabidopsis*)، ژن *API1* 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 *BoiAPI1* کلم *Brassica oleracea* (Shiraishi *et al.*, 1993) و پروتئین *SaMADS C* گیاه *Sinapis alba* (Menzel *et al.*, 1995) مشابهت نشان می‌دهد. در کلم، ژن *BoiAPI1* در کاسبرگ‌ها، گلبرگ‌ها و در پریموردیاهای پرچم بیان می‌شود. ژن *SaMADS C* نیز همانند ژن *API1* گیاه *S. alba* ابتدا در پریموردیاهای گل بیان می‌شود (Menzel

های 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 ژن-های *SQUA* و *API* بوده و در تمام مریستم گل، و در ادامه در کاسبرگ‌ها و گلبرگ‌ها بیان می‌شود (Kempin et al., 1993). بیان ژن 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 رویشی و زایشی دارد. آنالیز الگوهای بیان و تشابه 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 *RaG24* و *RaK16* در هر دو مرحله رویشی و زایشی کارکردهایی دارند، با این حال، نقش واقعی آنها را فقط می‌توان با آنالیز این ژن‌ها در گیاهان جهش یافته یا گیاهان تراریخته تعیین نمود.

(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 برگ-های 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 پرموردیاهای 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 (*Arabidopsis*) می‌باشد که تشابه بالایی با پروتئین AGL14 داشته و به طور اختصاصی در ریشه بیان می‌شود (Rounsley et al., 1995). آزمون نوردن بلات نشان داد که ژن *RaG24* در بافت‌های مختلف اعضای رویشی و زایشی بیان می‌شود. معمولاً، بیان ژن *RaG24* در بافت‌های گیاه ماده شدیدتر از بافت‌های گیاه نر بوده و بالاترین میزان نسخه‌برداری را در ساقه و گل آذین نشان می‌دهد. در گیاه سیلن (White Champion) 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 ژن-

منابع

1. Ainsworth C, Rahman A, Parker J, Ewards 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 NW (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 LP, Alvarez-Buylla ER (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 RM, Kater MM, 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 SD, Krogan NT, Ashton NW (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 ME, 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.^{*}, Ainsworth C.C.²

¹ Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Karaj.

² 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 are belongs 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