مجله بیوتکنولوژی کشاورزی (دوره 1، شماره 1، پاییز 1388)

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

علی محمد شکیب[1*]، چارلز اینزورث[2]

[1] پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران- کرج

[2] 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 می دهد 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

* نویسنده مسئول: علی محمد شکیب تلفن: **0261 -2703536** **E-mail: a_shakib@abrii.ac.ir**

**مقدمه**

ژن‌های MADS- box خانواده ژنی بزرگی هستند که تقریبا در تمام موجودات پر سلولی یافت می‌شوند (Krogan *et al.*, 2000; Martinez *et al.*, 2003; Singer *et al.*, 2007; Svensson and Engstron, 2002; Tanabe *et al.*, 2005; Tanabe *et al.*, 2003). 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; 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 Engestron, 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.*, 1998; Puneli *et al.*, 1991). 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 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 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 *Rumex acetosa DEFICIENS*-like) *RAD1*)، *RAD2* و *Rumex acetosa RAP1* (*PLENA*-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

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

**تهیه کاوشگر: توالی کاوشگر**های مورد استفاده از بخش 3´ همسانه‌ها، بدون ناحیه MADS، تهیه شدند. برای همسانه *RaA2* یک قطعه 480 جفت بازی با استفاده از برش آنزیمی *Sst*1 بکار رفت. برای همسانه *Ra17* یک قطعه 780 جفت بازی با برش آنزیم‌های *Kpn*1/ *Eco*R1 و برای همسانه *RaG24* و همسانه *RaK16* به ترتیب یک قطعه 740 جفت بازی با برش آنزیم *Hin*dIII و یک قطعه 530 جفت بازی با برش آنزیم‌های *Kpn*1/ *Xba*1 مورد استفاده قرار گرفت. قطعات DNA بالا سپس با $^{32}$P نشاندار شدند.

**دورگه سازی سادرن و نوردرن 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 $^{o}$C شستشو و مجاور فیلم X-ray قرار داده شدند.

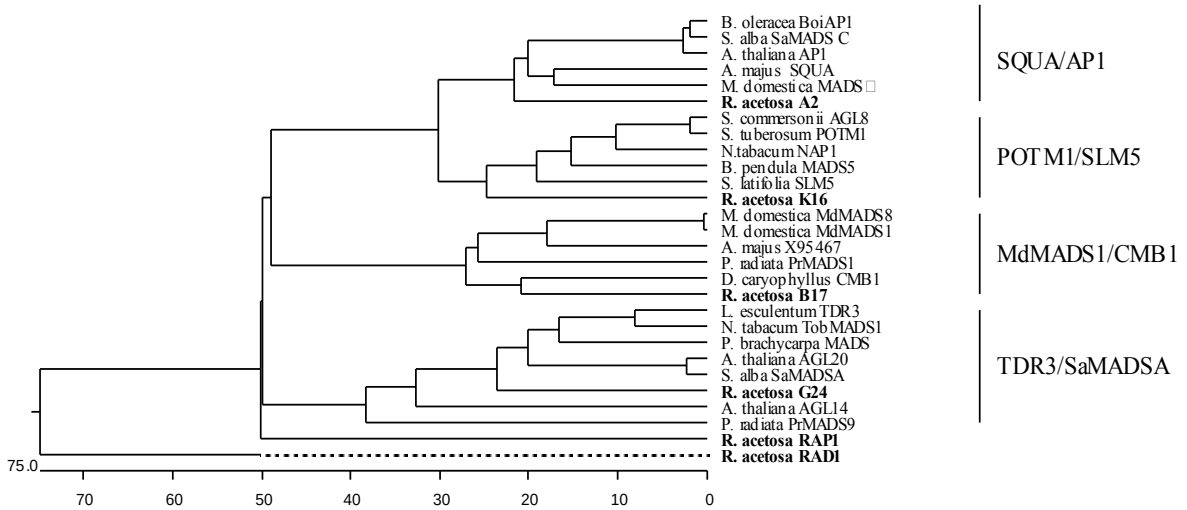
## نتایج و بحث

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 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 گروه های اصلی SQUA/AP1، MdMADS1/CMB1، TDR3/SaMADSA و POTM1/SLM5 قرار گرفتند (شکل1). همسانه RaA2 شامل یک cDNA به طول 1113 جفت باز است که یک پروتئین با 243 اسید امینه به وزن 28/2 کیلو دالتون رمز می-کند. 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 (شکل1) 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 پروتئینBoiAP1 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. SQUA وAP1 با همدیگر 64/5 درصد تشابه نشان می‌دهند. اعضای این گروه عموما 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 (شکل1). 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. همردیفی توالی پروتئین پیش بینی شده RaB17 با سایر پروتئین‌های MADS در شکل4 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 بازیابی X9546) به ترتیب دارای تشابه 66/7 درصدی و 66/3 درصدی با پروتئین‌های سیب هستد. پروتئین CMB1 تشابه 63/9 درصدی با PrMADS1 دارد. ژن *MdMADS1* در اعضای گل و میوه های جوان بیان می‌شود (Sung and An, 1997). با اینحال، اطلاعات زیادی در باره الگوی بیان یا کارکرد ژن‌های این گروه وجود ندارد.

همسانه 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 نشان داد که این پروتئین متعلق به گروه TDR3/SaMADS A می‌باشد (شکل1). اعضای این گروه عموما 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 (*Lycopersicun esculentum*) (Pnueli *et al.*, 1991)، تشابه 62/6 درصدی با AGL20از *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. پائین-ترین درصد تشابه (43/3 درصد) بین پروتئین PrMADS9 از *Pinus radiate* (با شماره بازیابی U90344) و پروتئین AGL14 از *Arabidopsis thaliana* (با شماره بازیابی U20184) می‌باشد. بررسی همردیفی پروتئین RaG24 با سایر پروتئین‌های MADS گیاهی در شکل5 نشان داده شده است.

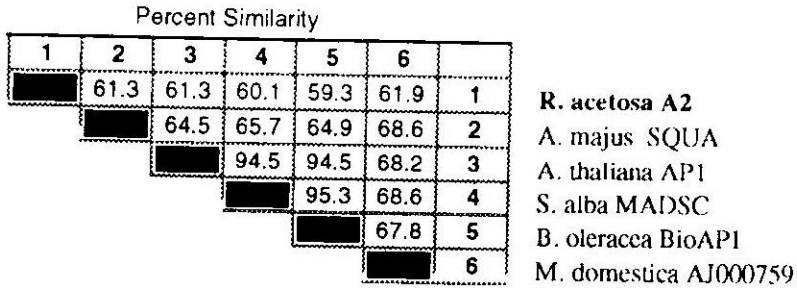



**شکل 1- درخت فیلوژنی بر اساس همردیفی پروتئین‌های MADS ترشک (به صورت برجسته) با شبیه‌ترین پروتئین‌های MADS با استفاده از روش کلاستال (Clustal). BoiAP1 از *Brassica oleracea* (شماره بازیابی U67451) ( Car and Irish, 1997)، SaMADS C از *Sinapis alba* (شماره بازیابی X81480) (Menzel *et al.*, 1995)، AP1 از *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 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 امینه همسانه ژنی RaA2 ترشک با سایر پروتئین‌های MADS. SQUA از *Antirrhinum majus* (شماره بازیابی S20886) (Huijser *et al.*, 1992)، AP1 از *Arabidopsis thaliana* (شماره بازیابی S27109)، SaMADS از *Sinapis albas* (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، SaMADS، MADSC، 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 امینه همسانه ژنی RaB17 ترشک با سایر پروتئن‌های MADS. CMB1 از *Dianthus caryophyllus* (شماره بازیابی Q39685)، PrMADS1 از *Pinus radiata* (شماره بازیابی U42399)، MdMADS8 از *Malus domestica* (شماره بازیابی AJ001681) MdMADS1 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 امینه همسانه ژنی RaG24 ترشک با سایر پـروتئن‌هـای MADS. TDR3 از *Lycopersicon esculentum* (شماره بازیابی X60756) (Penueli *et al.*, 1991)، پـروتئین AGL20 از *Arabidopsis thaliana* (شـماره بازیـابی AC003680)، TobMADS1 از *Nicotiana tabacum* (شماره بازیـابی X76188 ) (Mandel *et al.*, 1994)، SaMADS A از *Sinapis alba* (شـماره بازیـابی U25696) (Menzel *et al.*, 1996)، پروتئین MADS از *Pimpinella brachycarpa* (شـماره بازیـابی AF082531)، PrMADS9 از *Pinus radiata* (شـماره بازیـابی U90344)، AGL14 از *Arabidopsis thaliana*(شماره بازیابی U20184) (Rounsley *et al.*, 1995).**

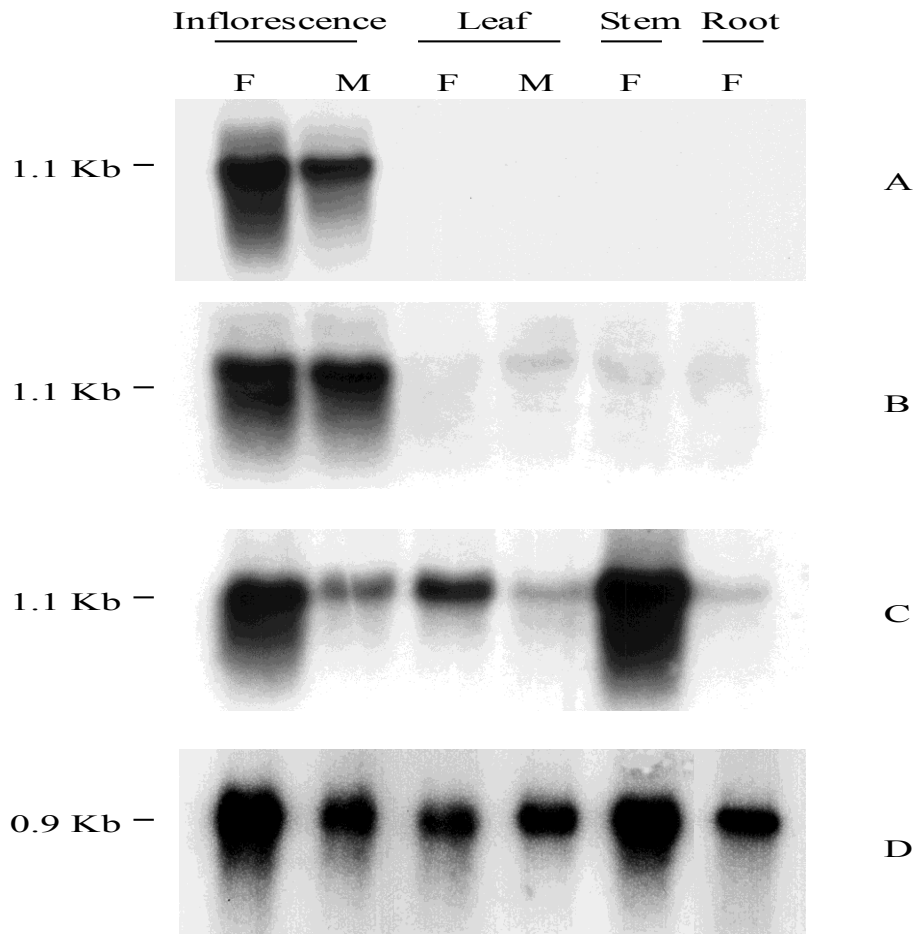
**Figure 5- Alignment of amino acid sequence of the sorrel RaG24 clone and other MADS-box proteins.**

همسانه RaK16 ترشک دارای 969 جفت باز است که می‌تواند پروتئینی با 225 اسید آمینه با وزن 25/8 کیلودالتون را رمز نماید. مقایسه پروتئین RaK16 با سایر پروتئین‌های MADS گیاهی نشان داد که این پروتئین به پروتئین‌های گروه POTM1/SLM5 خیلی نزدیک است (شکل1). RaK16 تشابه توالی 63/1 درصدی با MADS5 از *Betula pendula* (با شماره بازیابی X99655) و POTM1 از *Solanum tuberosum* ( Kang

and Hannapel, 1995) دارد. پروتئین RaK16 تشابه 62/2 درصدی با NAP1 از توتون *Nicotiana tabacum* (با شماره بازیابی AF009126) و هومولوگ AGL8 از *Solanum commersonii* (با شماره بازیابی AF002666) نیز نشان داد. این پروتئین همچنین تشابه 60/2 درصدی با SLM5 از *Silene latifolia* (Hardenack *et al.*, 1994) دارد. در بین اعضای این گروه، POTM1 بالاترین تشابه (96 درصد) را با پروتئینی 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.

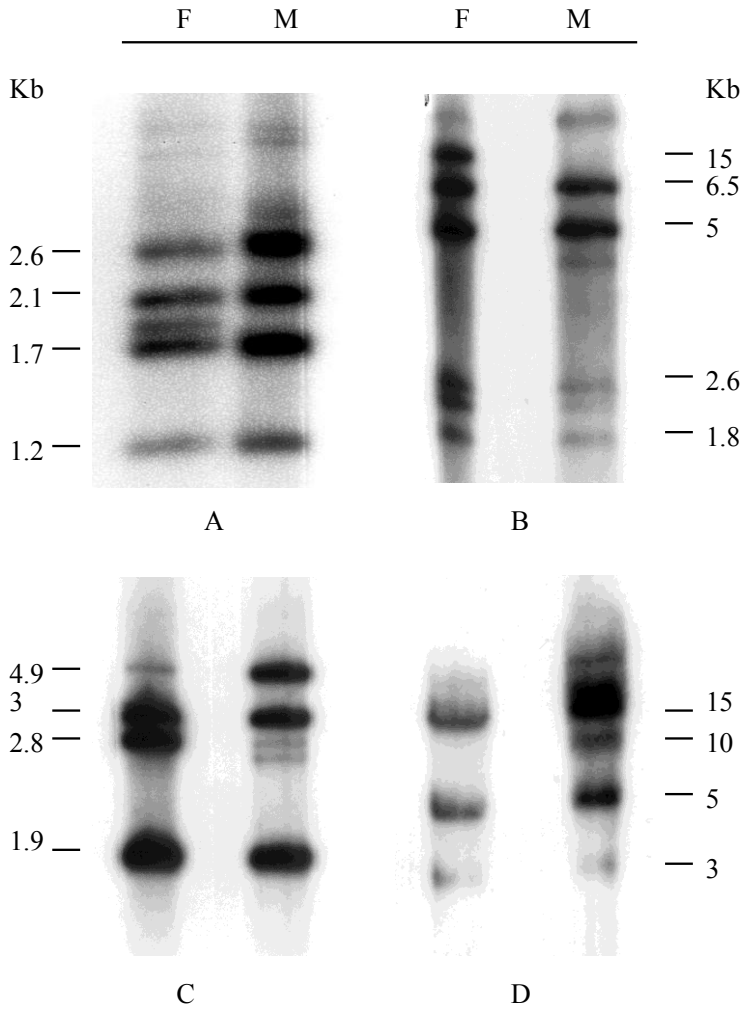
برای بررسی الگوی بیان همسانه‌های ژنی ترشک، RNA از بافت‌های مختلف شامل ریشه، ساقه، برگ و گل آذین گیاهان نر و ماده استخراج و پس از جداسازی روی ژل به غشاء نایلونی منتقل و غشاءها با کاوشگر مربوطه دورگه سازی شدند. همسانه‌های RaA2 و RaB17 در نمونه‌های RNAی بافت گل آذین هر دو گیاه نر و ماده بیان بالایی نشان دادند (شکل‌های 6A و 6B) ولی بیان آنها در سایر بافت‌ها دیده نشد. با اینحال، در همسانه RaB17 علایم بیان خیلی ضعیفی در بافت‌های رویشی دیده شد، که می‌تواند ناشی از تشابه توالی با دیگر mRNAها باشد. همسانه-های RaG24 و RaK16 در همه بافت‌ها بیان 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 شدیدتر 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 *Hin*dIII یا *Eco*RI انجام گرفت (شکل7). الگوهای دورگه سازی بین گیاهان نر و ماده تفاوت دارند. این تفاوت‌ها ممکن است مربوط به چند شکلی‌هایی باشد که معمولا 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 می-دهد.




**شکل 6** – آنالیز نوردرن بلات. مقدار **20** میکروگرم RNA از بافت‌های گل آذین، برگ، ساقه و ریشه گیاهان نر (M) و ماده (F) الکتروفورز شده وسپس 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 µg 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 *Hin*dIII (A، B و C) یا *Eco*RI (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 analysis. 10 µg DNA from male (M) and female (F) plants after digestion with *Hin*dIII (A, B and C) or *Eco*RI (D) were used for hybridization. and RaK16 (D) were used as probes. RaA2 (A), RaB17 (B), RaG24 (C)**

**بحث**

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 AP1 علف تال دارد. در گل میمون، پروتئین SQUA در مریستم‌های گل به میزان بالایی بیان می شود 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 *AP1* 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 BoiAP1 کلم *Brassica oleracea* (Shiraishi *et al.*, 1993) و پروتئین SaMADS C گیاه *Sinapis alba* (Menzel *et al.*, 1995) مشابهت نشان می‌دهد. در کلم، ژن *BoiAP1* در کاسبرگ‌ها، گلبرگ‌ها و در پریموردیاهای پرچم بیان می‌شود. ژن *SaMADS C* نیز همانند ژن *AP1* گیاه *S. alba* ابتدا در پریموردیاهای گل بیان می‌شود (Menzel *et al.*, 1995). آزمون‌های نوردرن 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*، PrMADS1 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 نوردرن 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 al.*, 1996) بیشترین تشابه را دارد. ژن *TDR*3 در برگ‌ها و مریستم‌های گل اما نه در اعضای گل گوجه فرنگی بیان می‌شود (Pnueli *et al.*, 1991). ژن *TobMADS1* در هردو اعضای رویشی و زایشی توتون بیان می‌شود ولی بیان آن در برگ‌های بالغ و گلبرگ‌ها نسبتا 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* فوق الذکر نیز تشابه بالایی دارد. پروتئین این ژن همچنین مشابه پروتئین AGL علف تال می-باشد 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. معمولا، 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 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 همانندSQUA/AP1 با پروتئین MADS5 گیاه *Betula pendula*، پروتئین NAP1 توتون و SLM5 سیلن (*Silene latifolia*) تشابه نشان داد. ژن *SLM5* مشابه ژن‌های *SQUA* و *AP1* 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 احتمالا 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 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, 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. 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, Lonnig 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.*[1], 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