Archive of SID

زیست فناوری دانشگاه تربیت مدرس
دوره 5، شماره 1، بهار و تابستان 1393

جداسازی بخشی از یک ژن جدید فاکتور رونویسی MYB از توت

ابراهیم محمودی[1*]، بهرام محمدسلطانی[2]

1- کارشناسی ارشد گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران
2- استادیار گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

*** تهران، صندوق پستی**
eb.mahmoudi@gmail.com

چکیده- فاکتورهای رونویسی MYB نقش‌های ساختاری و عملکردی متنوعی را در طیف وسیعی از گیاهان بر عهده دارند. برای مثال، مسیر سنتز آنتوسیانین که یک متابولیت ثانویه بوده و مسئول رنگ‌دهی در بافت‌های مختلف می‌باشد، به وسیله این فاکتورها کنترل می‌شوند. در این مطالعه، با استفاده از ژن‌های همولوگ در گونه‌های نزدیک به توت (*Morus Alba*)، قطعه‌ای از یک ژن جدید متعلق به خانواده فاکتورهای رونویسی MYB از این گیاه جداسازی شد. ابتدا توالی پروتئینی 14 ژن مختلف تنظیم کننده آنتوسیانین از گونه‌های (ترجیحاً) نزدیک به خانواده توت (Moraceae) انتخاب و هم‌ردیف شدند و سپس ناحیه دارای بیشترین مشابهت انتخاب شد. در مرحله بعد توالی cDNA این ژن‌ها مورد همردیفی قرار گرفت و منطقه‌ای که بیشترین تشابه را داشت، انتخاب شد. با توجه به پلی‌مورفیسم موجود در این ناحیه آغازگرهای دجنریت طراحی گردید و این ناحیه از ژن، از میوه توت جداسازی شد. محصول تکثیر شده در پلاسمید کلون و تعیین توالی شد که نتایج تعیین توالی نشان داد طول ناحیه جداسازی شده از ژن 140 جفت باز است و در دمین متصل شونده به DNA (دمین Myb) و بطور اختصاصی در موتیف‌های R1 و R2 فاکتور رونویسی قرار دارد. ارزیابی توالی تعیین شده توسط نرم افزارBLAST نشان داد این توالی با داده‌های موجود در بانک ژن همپوشانی و تشابه قابل توجهی دارد. تمامی ژن‌های مشابه از خانواده فاکتور رونویسی MYB بودند که اغلب آنها در کنترل سنتز آنتوسیانین نقش دارند. بنابراین به نظر می‌رسد ژن مورد مطالعه، مطابق انتظار از خانواده MYB بوده که در مسیر ساخت آنتوسیانین دخالت دارد.

کلیدواژگان: MYB، توت (*Morus Alba*)، فاکتور رونویسی، آنتوسیانین.

1- مقدمه

فاکتورهای رونویسی پروتئین‌های متصل شونده به DNA هستند که بطور اختصاصی به ناحیه‌ای از پروموتر ژن‌های هدف متصل شده و میزان شروع سنتز mRNA به وسیله

www.SID.ir

Archive of SID

RNA پلیمراز را تنظیم می‌کنند و به این تربتیب بیان ژن‌های دخیل در مسیرهای بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی را کنترل می‌کنند. فاکتورهای رونویسی، تشکیل خانواده‌های چند ژنی را می‌دهند که از لحاظ اندازه و عملکرد بسیار متنوع هستند [1]. یکی از این خانواده‌ها MYB (myeloblastosis) است که دارای یک دمین محافظت شده متصل شونده به DNA می‌باشد. براساس تعداد تکرارهای مجاور در دمین MYB، این خانواده به سه دسته تقسیم میشود که مهمترین و بزرگترین آنها در گیاهان R1R2-MYB است و تنها دسته کوچکی از آنها جزء R1R2R3 ها هستند [۳،۲]. گیاهان حاوی طیف وسیعی از ژن‌های MYB است که تنوع بسیار بالایی در ساختمان و عملکرد دارد بطوری که خانواده ژنی MYB یکی از بزرگ‌ترین فاکتورهای رونویسی در گیاهان است و به عنوان ابرخانواده ژنی در نظر گرفته می‌شوند. علاوه بر گیاهان این ژن‌ها در انسان، قارچ، مهره‌داران و حشرات نیز وجود دارند [۵،۴].

C1 اولین ژن MYB شناسایی شده در گیاهان است که در بیوسنتز فلاونوئید در ذرت به عنوان فعال کننده عمل می‌کند [6]. بررسی صورت گرفته در گیاه آرابیدوپسیس نشان داد که این گیاه مدل دارای 198 عضو MYB می‌باشد. بطورکلی MYB ها در مسیرهای بیوسنتزی ثانویه، کنترل مرفولوژی سلول، تقسیم سلول، دخالت در بیماری‌ها یا مقاومت به آن و پاسخ به استرس‌های بیرونی دخالت دارند [7]. بسیاری از ژن‌های R1R2-MYB در تنظیم پاسخ به استرس‌های محیطی مانند سرما، خشکی و شوری نقش دارند که احتمالاً از طریق تغییر هورمونی اکسین و ابسزیک اسید انجام میشود [۸،۹]. ژن‌های MYB در بسیاری از گیاهان تک لپه و دو لپه شناسایی شده اند [8]. مهمترین مسیر بیوسنتزی ثانویه که توسط ژن‌های MYB تنظیم می‌شوند ساخت فلاونوئید است. این متابولیت ثانویه گروهی از ترکیبات فنولیکی گیاهی هستند که اهمیت زیادی در فیزیولوژی گیاهی و تغذیه انسان دارد. این مواد در رشد و توسعه گیاه شامل جوانه زنی دانه گرده، مقاومت به حشرات، تشکیل پیگمنت‌های گیاهی جذاب مانند آنتوسیانین‌ها، محافظت در برابر اشعه UV، مقاومت به پاتوژن‌ها، فعالیت به عنوان مولکوهای پیام‌رسان در برهمکنش‌های گیاه-میکروب، نقش دارند [۱۰،۱۱]. شواهد روزافزونی مبنی بر تاثیرات مثبت فلاونوئیدها در سلامتی انسان وجود دارد [۱۲،۱۳]. یکی از مهمترین مشتقات فلاونوییدها، آنتوسیانین‌ها هستند که به عنوان رنگ دهنده‌های گیاهی، به همراه کاروتنوئیدها در صنایع غذایی استفاده می‌شوند. از دیگر ویژگی‌های مهم آنتوسیانین‌ها فعالیت آنتی‌اکسیدانی آنها است که نقش حیاتی در جلوگیری از امراض قلبی و عصبی، سرطان، دیابت و بعضی دیگر دارد [14]. در سال‌های اخیر ژن‌های MYB -که تنظیم کننده این رنگیزه هستند- بصورت وسیعی در گیاهان مختلف شناسایی شده‌اند [15]. با وجود کشف ژن‌های MYB در طیف وسیعی از گیاهان، در توت (*Morus alba*) که یک گیاه معتدله از خانواده Moraceae بوده و بسیاری از کولتیوارهای آن قرمز است، تاکنون گزارشی از ژن‌های MYB ثبت نشده است. در این مطالعه با استفاده از ژن‌های همولوگ در گونه‌های نزدیک به توت، یک ژن جدید از خانواده MYB در این گیاه جداسازی و شناسایی شد.

2- مواد و روشها

2-1- جمع‌آوری مواد گیاهی

در اردیبهشت ماه 1389 عملیات نمونه‌گیری از درخت صورت گرفت. نمونه‌ها از درختان توت محوطه دانشگاه تربیت مدرس انتخاب شد. برای استخراج RNA میوه‌های تازه سرشاخه‌ها در ابتدای فصل میوه‌دهی انتخاب و بلافاصله در ازت مایع منجمد شدند. برای استخراج RNA، بافت میوه در مرحله رسیدگی تهیه و بلافاصله

www.SID.ir

Archive of SID

خرد و در ازت مایع فریز شد. تمامی نمونه‌ها برای نگه‌داری بلندمدت در دمای 80- نگه‌داری شدند.

2-2- استخراج RNA و ساخت cDNA

استخراج RNA از 500 میلی‌گرم بافت هدف مطابق روش گاسیک و همکاران انجام شد [16]. ساخت cDNA با استفاده از 350 نانوگرم RNA کل در حجم 20 میکرولیتر شامل 40 واحد از آنزیم M-Mulv، بافر 5x، 20 واحد از RiboLock™ Rnase inhibitor، 10 میلی‌مول از dNTPs، آغازگر الیگو dT در دمای 42 °C به مدت 90 دقیقه انجام شد و در نهایت به مدت 10 دقیقه در دمای 70 °C انکوبه شد.

آغازگرهای دجنریت مورد استفاده برای جداسازی ژن شامل:

Forward (5′- AGCVGGNYTRAAYAGRTGYMGRAARAG)

و Revers (5′- CCARTARTTYTTSACATCRTTHGCNGTHCKNCC)

بودند. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در حجم 25 میکرولیتر شامل بافر 10x، 10 میلی‌مولار از dNTPs، 40 میلی‌مولار از $MgCl_2$، 5 میکرومولار از هر آغازگر و 1 واحد از آنزیم تک‌پلیمراز (سیناژن) انجام شد. مراحل PCR شامل واسرشته‌سازی اولیه در 94°C به مدت 4 دقیقه، 35 چرخه (95°C به مدت 40 ثانیه، 57°C به مدت 40 ثانیه و 72°C به مدت 30 ثانیه) و در نهایت در 72°C به مدت 15 دقیقه بود. محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در دمای 4°C نگهداری شدند. الکتروفورز محصولات بر روی ژل آگارز 1 درصد صورت گرفت و سپس رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید انجام شد. محصول PCR با استفاده از کیت QIAGEN از ژل تخلیص و در نهایت جهت تعیین توالی در پلاسمید pTZ57R/T کلون شد.

2-3- بررسی و آنالیز

برای همردیفی توالی‌ها از برنامه:

Clustal W(www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2)

استفاده شد و طراحی پرایمرها با کمک نرم‌افزار Primer3 و نیز وب سایت http://eu.idtdna.com انجام شد. همچنین از ابزارهای NCBI نیز برای انجام آنالیز توالی استفاده شد.

3- نتایج و بحث

ابتدا توالی پروتئینی 14 ژن که مسئول تنظیم ساخت آنتوسیانین هستند از 14 گونه که ترجیحاً به توت (خانواده Moraceae) نزدیک باشند، (جدول 1) انتخاب و هم-ردیف شدند و سپس ناحیه دارای بیشترین مشابهت انتخاب شد. در مرحله بعد آنها mRNA مورد همردیفی قرار گرفت و منطقه‌ای که بیشترین مشابهت را داشت انتخاب شد. با مشاهده پلی‌مورفیسم موجود در این ناحیه، برای افزایش شانس تکثیر ژن هدف، آغازگرهای دجنریت طراحی گردید و با استفاده از PCR این ناحیه از ژن از میوه توت (*Morus Alba*) جداسازی شد.

جدول 1 گونه‌ها و ژن‌های استفاده شده جهت طراحی آغازگرهای دجنریت

گونه	ژن (شماره دسترسی)	گونه	ژن (شماره دسترسی)
Rubus idaeus	EU155165	*Antirrhinum majus*	ABB83828
Fragaria vesca	EU155163	*Vitis vinifera*	DQ403721
Malus domestica	EU518248	*Capsicum annuum*	AJ608992
Pyrus communis	EU153575	*Petunia integrifolia*	EF423837
Prunus persica	EU155160	*Solanum lycopersicum*	FJ705328
Prunus avium	EU153581	*Arabidopsis thaliana*	NM_105310
Morella rubra	GQ340767	*Medicago truncatula*	FJ199997

www.SID.ir

Archive of SID

محصول تکثیر شده از PCR در پلاسمید pTZ57R/T کلون و تعیین توالی شد. آنالیز توالی با کمک موتور جستجوی BLAST انجام شد و مشاهده گردید که طول توالی جداسازی شده از ژن 140 جفت باز است که در دمین متصل شونده به DNA (دمین Myb) و دقیقاً در موتیف‌های R1 و R2 فاکتور رونویسی واقع شده است. نقش هر موتیف در فاکتور رونویسی ایجاد سه آلفا-هلیکس است که گفته می‌شود در شناسایی توالی کوتاه DNA جهت اتصال به آن دخالت دارد [17] با توجه اینکه فاکتورهای رونویسی MYB در گیاهان حاوی یک یا دو یا سه توالی تکرار (تعداد R) هستند [18]، بنابراین نمی‌توان بطور قطع ادعا کرد که ژن یافت شده از کدام دسته است، اما به دلیل اینکه بیش از دو سوم از MYB های شناسایی شده در گیاهان از نوع دو تکراره (R2R3) هستند [18]، احتمال می‌رود این ژن نیز متعلق به همین گروه باشد. در حالی که ناحیه R2R3 و انتهای آمینی بسیار محافظت شده‌اند، انتهای کربوکسیلی فاکتورهای MYB دارای تنوع زیادی است [19].

استفاده از جستجوی BLAST برای آنالیز بیشتر توالی مورد مطالعه نشان داد که این ناحیه بیشترین مشابهت را با ژن‌های خانواده ***MYB*** دارند (جدول 2).

بیشترین مشابهت بیش از 80 درصد بود که مربوط به ژن‌های *MYBA7* و *MYBA6* (انگور)، *MYB2* (*Morella rubra*) و *MYB114*-like (سیب) می‌باشد. نکته قابل توجه این است که عملکرد تمامی ژن‌های بدست آمده از جستجوی مشابهت (به جز دو ژن که عملکرد آنها هنوز تعیین نشده است) تنظیم رنگ قرمز در بافت‌های مختلف گیاه شامل میوه و اندام‌های رویشی است. به بیان دیگر افزایش بیان ژن ***MYB*** منجر به افزایش نسخه‌برداری ژن‌های مسیر آنتوسیانین شده که در نهایت این رنگدانه، رنگ قرمز را در گیاه سبب می‌شود.

جدول 2 نتایج جستجوی BLAST مشخصات ژنهایی که بیشترین مشابهت را با توالی جداشده داشته‌اند

نام ژن	گیاه	شماره دسترسی ژن	عملکرد	میزان مشابهت (درصد)
MYBA7	انگور *Vitis vinifera*	NM_001281073	نامشخص	86
MYB2	*Morella rubra*	GQ340768	آنتوسیانین	83
MYBA6-c	انگور *Vitis vinifera*	FJ556914	نامشخص	82
MYB114-like	سیب *Malus domestica*	NM_001293830	آنتوسیانین	81
MYB110a	سیب *Malus domestica*	JN711473	آنتوسیانین	80
MYB family	*Actinidia chinensis*	KF157390	آنتوسیانین	80
(Myb) RUBY	پرتغال *Citrus sinensis*	NM_001288889	آنتوسیانین	80
MYB10	هلو Prunus persica	GU936492	آنتوسیانین	79
MYBA1	انگور Vitis venifera	FJ687575	آنتوسیانین	79
MYB10	گلابی Pyrus pyrifolia	HM585181	آنتوسیانین	79
MYB105	هلو Prunus persica	KF999986	آنتوسیانین	79
MYB1	Morella rubra	GQ340767	آنتوسیانین	79
VvmybA3	انگور Vitis venifera	AB097925	آنتوسیانین	79

www.SID.ir

Archive of SID

هر چند که ابرخانواده MYB یکی از بزرگترین خانواده های ژنی یافت شده می‌باشد، اما نقش‌های عملکردی بیشتر این ژن‌ها در گیاه تا به امروز نا شناخته باقی مانده است [19]. برای مثال در گیاه مدل آرابیدوپسیس که ژنوم آن نیز توالی‌یابی شده است، حدود 198 ژن MYB گزارش شده است، اما نکته حایز اهمیت این است که تنها تعداد بسیار محدودی از این ژن‌ها تعیین هویت شده‌اند [18]، همچنین این ژن‌ها به لحاظ ساختاری و عملکردی متنوع هستند. با این وجود، چندین مطالعه کامل از نقش این فاکتورهای رونویسی صورت گرفته است که مهمترین این اعمال شامل: 1- کنترل متابولیسم های ثانویه به‌خصوص فلاونوئیدها [20]؛ 2- تنظیم مرفولوژی سلول [21]؛ و 3- دخالت در مسیرهای انتقال سیگنال [22] می‌باشد. با توجه به تأثیر مثبت آنتوسیانین‌ها بر سلامت انسان و نیز بازارپسندی میوه‌های دارای آنتوسیانین که سبب ایجاد رنگ می‌شود، مکانیسم های ملکولی آن امروزه بسیار مورد توجه می‌باشد. مطالعات روز افزون سبب شناسایی ژن‌های MYB تنظیم کننده مسیر بیوسنتز آنتوسیانین در گیاهان میوه‌دار مانند سیب [۲۴،۲۳] انگور [25]، هلو، زردالو، بادام، آلو، گلابی، توت‌فرنگی شده است [15]. هدف نهایی این مطالعه نیز شناسایی ژن یا ژن‌های دخیل در تنظیم آنتوسیانین و بررسی الگوی‌های بیانی آن در مراحل رشدی مختلف است، لذا تحقیقات آزمایشگاهی بیشتر در این زمینه مورد نیاز است.

نکته قابل توجه اینکه با وجود مزایای زیاد، اما غلظت کم و سطح تولید پایین این مواد در گیاهان قابل تأمل است. یکی از راه‌های حل این مسأله، استفاده از این فاکتورهای رونویسی برای فعال کردن مسیرهای بیوسنتزی است. از این فعال کننده‌ها می‌توان به عنوان ابزارهای ملکولی ارزشمند برای مهندسی متابولیت‌های گیاهی در جهت افزایش و تولید ترکیبات با ارزش استفاده کرد [26]. به این ترتیب بدون نیاز به دانش کافی در یک مسیر بیوسنتزی و همچنین صرفه‌جویی در زمان می‌توان محصولات مورد نظر را تولید کرد.

4- منابع

[1] Riechmann, J. L., Heard, J., Martin, G., Reuber, L., Jiang, C., Keddie, J., Adam, L., Pineda, O., Ratcliffe, O. J., Samaha, R. R., et al. (2000) Arabidopsis transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. Science. 290, pp. 2105–2110.

[2] Martin, C., and Paz-Ares, M. Y. B. (1997) Transcription factors in plants. Trends Genetics. 13, pp. 67–73.

[3] Romero, I., Fuertes, A., Benito, M. J., Malpica, J. M., Leyva, A., and Paz-Ares, J. (1998) More than 80 *R2R3-MYB* regulatory genes in the genome of *Arabidopsis thaliana*. Plant Journal. 14, pp. 273-284.

[4] Du, H., Zhang, L., Liu, L., Tang, X. F., Yang, W. J., Wu, Y. M., Huang, Y. B., and Tang, Y. X. (2009) Biochemical and Molecular Characterization of Plant MYB Transcription Factor Family. Biochemistry (Moscow). 74, pp. 1-11.

[5] 5. Gantet, P., and Memelink, J. (2002) Transcription factors: tools to engineer the production of pharmacologically active plant metabolites. Trends in Pharmacological Sciences. 23, pp. 563- 569.

[6] Gonda, T. J. (1998) The c-Myb oncoprotein. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. 30, pp. 547-551.

[7] Du, H., Zhang, L., Liu, L., Tang, X. F., Yang, W. J., Wu, Y. M., Huang, Y. B., and Tang, Y.X. (2009) Biochemical and Molecular Characterization of Plant MYB Transcription Factor Family. Biochemistry. 74, pp. 1-11.

[8] Jianga, C., Gua, J., Chopraa, S., Gua, X., and Peterson, T. (2004) Ordered origin of the typical two- and three- repeat Myb genes. Gene. 326, pp. 13–229.

[9] Paz-Ares, J., Ghosal, D., Wienand, U., Peterson, P., and Saedler, H. (1987) The regulatory *c1* locus of *Zeamays* encodes a protein with homology to *myb* oncogene products and with structural similarities to transcriptional activators. EMBO Journal. 6, pp. 3553–3558.

[10] Harborne, J. B., and Grayer, R. J. (1994) Flavonoids and insects. In The Flavonoids: Advances in Research Since 1986 (Harborne, J.B.,ed.). London: Chapman & Hall, pp. 589–618.

www.SID.ir

Archive of SID

[11] Koes, R. E., Quattrocchio, F., and Mol, J. N. M. (1994) The flavonoid biosynthetic pathway in plants: function and evolution. BioEssays. 16, pp. 123–132.
[12] Knekt, P., Kumpulainen, J., Jarvinen, R., Rissanen, H., Heliovaara, M., Reunanen, A., Hakulinen, T., and Aromaa, A. (2002) Flavonoid intake and risk of chronic diseases. The American Journal of Clinical Nutrition. 76, pp. 560–568.
[13] Eberhardt, M. V., Lee, C. Y., and Liu, R. H. (2000) Nutrition: Antioxidan activity of fresh apples. Nature. 405, pp. 903–904.
[14] Castaneda-Ovando, A., Pacheco-Hernandez, M. d. L., Paez-Hernandez, M. E., and Rodriguez, J. A. (2009) Chemical studies of anthocyanins: A review. Food Chemistry. 113, pp. 859–871.
[15] Lin-Wa, K., Bolitho, K., Grafton, K., Kortstee, A., Karunairetnam, S., et al. (2010) An R2R3 MYB transcription factor associated with regulation of the anthocyanin biosynthetic pathway in Rosaceae. BMC Plant Biology. 10, pp. 3-17.
[16] Gasic, K., Hernandes A., and Korban, S. S. (2004) RNA extraction from different apple tissues rich in polyphenols and polysaccharides for cDNA library construction. Plant Molecular Biology Reporter. 22, pp. 437a-437g.
[17] Rabinowicz, P. D., Braun, E. L., Wolfe, A. D., Bowen, B., and Grotewold, E. (1999) Maize R2R3 Myb genes: sequence analysis reveals amplification in the higher plants. Genetics. 153, pp. 427-444.
[18] Stracke, R., Werber, M., and Weisshaar, B. (2001) The R2R3-MYB gene family in Arabidopsis thaliana, Current Opinion in Plant Biology. 4, pp. 447–456.
[19] Cizhong, J., Gua, J., Chopra, S., Gua, X., and Petersona, T. (2004) Ordered origin of the typical two- and three-repeat Myb genes. Gene. 326, pp. 13–22.
[20] Grotewold, E., Drummond, B. J., Bowen, B., Peterson, T. (1994) The Myb-homologous P gene controls phlobaphene pigmentation in maize floral organs by directly activating a flavonoid biosynthetic gene subset. Cell. 76, pp. 543-553.
[21] Oppenheimer, D. G., Herman, P. L., Sivakumaran, S., Esch, J., and Marks, M. D. (1991) A myb gene required for leaf trichome differentiation in Arabidopsis is expressed in stipules. Cell. 67, pp. 483–493.
[22] Urao, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., Urao, S., and Shinozaki, K. (1993) An Arabidopsis myb homolog is induced by dehydration stress and its gene product binds to the conserved Myb recognition sequence. Plant Cell. 5, pp. 1529-1539.
[23] Espley, R. V., Hellens, R. P., Putterill, J., Stevenson, D. E., Kutty-Amma, S., and Allan, A. C. (2007) Red colouration in apple fruit is due to the activity of the MYB transcription factor MdMYB10. The Plant Journal. 49, pp. 414-427.
[24] Mahmoudi, E., Soltani, M. B., Yadollahi A., and Hosseini, E. (2012) Independence of color intensity variation in red flesh apples from the number of repeat units in promoter region of the MdMYB10 gene as an allele to MdMYB1 and MdMYBA. Iranian Journal of Biotechnology. 10, pp. 153-160.
[25] Walker, A. R., Lee, E., Bogs, J., McDavid, D. A. J.., Thomas, M. R., and Robi, S. P. (2007) White grapes arose through the mutation of two similar and adjacent regulatory genes. The Plant Journal. 49, pp. 772–785.
[26] Gantet, P., and Memelink, J. (2002) Transcription factors: tools to engineer the production of pharmacologically active plant metabolites. Trends in Pharmacological Sciences. 23, pp. 563- 569.

www.SID.ir