

بررسی بیان ژنهای عوامل رونویسی MADS-box موثر در تشکیل گل در زعفران (*Crocus sativus* L.)

سونیا جدیر و فاطمه دهقان نیری*

قزوین، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره)، دانشکده فنی و مهندسی، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی

تاریخ دریافت: ۹۳/۹/۱۳ تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۲/۲۳

چکیده

بسیاری از ژنهای کنترل کننده گلدهی در گیاهان شناسایی شده‌اند که بیشتر آنها متعلق به خانواده بزرگ عوامل رونویسی MADS-box هستند. گیاه زعفران (*Crocus sativus*) یک گیاه تریپلوئید نرعقیم و ارزشمند است که به منظور استفاده از گل و به ویژه کلاله آن کشت می‌شود. درک چگونگی تشکیل گل در گیاه زعفران به افزایش عملکرد و کاهش هزینه‌های تولید آن کمک زیادی می‌کند. در این تحقیق بیان ژنهای دو گروه *Ag1* و *Sep3* از خانواده MADS-box که در تشکیل گل به ویژه در شکل‌گیری کلاله نقش دارند با روش PCR نیمه کمی (semi quantitative RT-PCR) در زعفران وارسته ایرانی بررسی شد و میزان بیان این ژنها در کلاله و سایر اندامهای گل و نیز اندامهای رویشی مورد مقایسه قرار گرفت. ژنهای *Ag1b* و *Ag1a* از کلاس C خانواده MADS-box در سه اندام جنسی تخمدان، کلاله و پرچم بیان شدند به طوری که میزان بیان آنها در اندامهای کلاله و پرچم نسبت به تخمدان بیشتر بود. بیان این ژنها در اندامهای گلبرگ، برگ، پیاز و ریشه در مقایسه با کلاله و پرچم پایین بود. بیان ژنهای *Sep3a*، *Sep3b*، *Sep3c* و *Sep3d* از کلاس E این خانواده ژنی در چهار اندام گلبرگ، پرچم، کلاله و تخمدان تعیین شد در صورتی که میزان بیان با روش PCR نیمه کمی در اندامهای رویشی برگ، پیاز و ریشه تعیین نگردید.

واژه‌های کلیدی: بیان ژن، زعفران، عوامل رونویسی MADS-box، روش PCR نیمه کمی.

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۸۳۳۹۰۱۱۵۷، پست الکترونیکی: nayeri@eng.ikiu.ac.ir

مقدمه

۴۶). برای درک چگونگی تکامل و نمو گل مطالعه فعالیت و برهمکنش ژنهای MADS-box با سایر عوامل رونویسی در تنظیم بیان ژنهای دخیل در گلدهی ضروری است (۱۶ و ۱۷). در اوایل دهه ۱۹۹۰ میرز و کوئن براساس مطالعات مورفولوژیکی و ژنتیکی جهشهای هومئوتیک گل در دو گیاه آرابیدوپسیس و آنتوریوم مدلی برای تکامل و تمایز اندامهای گل پیشنهاد کردند. این مدل بعدها به عنوان مدل ABC شناخته شد و به دلیل سادگی و قابل اجرا بودن به طور گسترده برای بسیاری از گونه‌های نهاندانگان مورد توجه قرار گرفت (۴۲). گل آرابیدوپسیس مانند بسیاری از گونه‌های نهاندانگان شامل چهار نوع اندام است که در

مطالعه جهشهای هومئوتیک (Homeotic) گل منجر به شناسایی بسیاری از ژنهای کنترل کننده فرآیند تکامل گل شده است (۱۲ و ۳۴). اغلب این ژنها متعلق به خانواده بزرگ عوامل رونویسی MADS-box هستند (۳۵). عوامل MADS-box علاوه بر گیاهان در مخمر و جانوران نیز وجود دارند و نقش مهمی در کنترل فرآیندهای مهم به ویژه تمایز ایفاء می‌کنند به طور مثال، در جانوران سبب تمایز بافت ماهیچه می‌شوند (۴۰). ژنهای MADS-box علاوه بر تعیین نوع اندام گل و تکامل آن در گیاه، در فعالیتهای تنظیمی مثل تعیین نوع مریستم، توسعه جانبی ریشه و کنترل زمان گلدهی نیز دخالت دارند (۲۵، ۲۶ و

توسعه می‌یابد پیش‌بینی نماید. ممکن است فرض شود که اگر همه ژنهای کلاسهای A، B و C مورد نیاز برای تعیین نوع اندام گل حذف شوند، اندام حاصل برگ است. اما واقعیت این است که در جهشهای سه‌گانه نوع اندامی که به وجود می‌آید دارای ظاهری مشابه با برگ و مادگی است. بنابراین باید ژنهای دیگری وجود داشته باشند که در عدم حضور ژنهای کلاس C سبب ظهور مادگی شده‌اند (۶ و ۹). از سوی دیگر بیان نابه‌جای ژنهای ABC به طور مثال ژنهای کلاس B (۲۵) و یا ژنهای کلاس C (۱۱، ۱۴، ۱۵ و ۳۱) تغییری را در اندامهای رویشی ایجاد نکرد. این یافته‌ها نشان می‌دهد که ژنهای ABC برای تشکیل اندامهای گل ضروری هستند اما کافی نیستند و این ژنها تنها می‌توانند در بافتهای گل که از پیش تثبیت شده‌اند دارای فعالیت باشند. به خوبی مشخص شده است که عوامل رونویسی MADS-box از طریق تشکیل ساختارهای همودایمر و یا هتروداایمر به DNA متصل می‌شوند (۳۸). بنابراین این فرضیه پیش آمد که فعالیت ترکیبی عوامل رونویسی MADS-box جهت تعیین نوع اندام از طریق تشکیل ساختارهای پیچیده صورت می‌گیرد. به طور مثال در تشکیل پرچم برهمکنش میان عوامل کلاس B و C و ایجاد ساختارهای دایمر مکانیسمی را برای اتصالات مختلف با DNA فراهم می‌کند. اما شواهد نشان داد که پروتئینهای کلاس B به طور مستقیم هیچ برهمکنشی با سایر عوامل ABC ندارند و تنها به یکدیگر متصل می‌شوند (۱۶ و ۳۷). برای اولین بار عوامل موثر بر فعالیت ژنهای ABC شامل ژنهای *Fbp2* و *Tm5* بترتیب در گونه‌های اطلسی و گوجه-فرنگی شناسایی شدند (۲۰). غیرفعال کردن این ژنها منجر به فنوتیپی مشابه فنوتیپ جهش یافته‌های کلاسهای B و C شد (۴، ۵، ۱۶ و ۳۴). سپس سه ژن *Sep1*، *Sep2* و *Sep3* از گیاه آراییدوپسیس جداسازی شدند. در هیچ یک از جهشهای منفرد و دوگانه این ژنها فنوتیپ قابل توجهی مشاهده نشد در حالی که جهش سه‌گانه در ژنهای *Sep1*، *Sep2* و *Sep3* فنوتیپی مشابه لاینهای *Tm5* و *Fbp2* نشان

چهار محور متحدالمرکز سازماندهی شده‌اند. در محور شماره ۱ (خارجی‌ترین محور) کاسبرگها، در محور شماره ۲ گلبرگها، در محور شماره ۳ پرچمها و در محور شماره ۴ که داخلی‌ترین محور است مادگی قرار دارد (۸ و ۱۰). مطالعه ژنتیکی جهشهای هومئوتیک که سبب اختلال در فرآیند تکامل گل و تغییر هومئوتیک یک اندام به اندام دیگر می‌شود منجر به ارائه مدل ABC شد (۱۳). این جهشها در سه کلاس A، B و C گروه‌بندی می‌شوند. در جهشهای کلاس A که شامل جهش در ژنهای *Ap1* و *Ap2* هستند نقص اندام در محورهای ۱ و ۲ باعث جایگزینی مادگی در محور اول به جای کاسبرگها می‌شود و در محور دوم به جای گلبرگ، پرچمها توسعه می‌یابند. در جهش ژن *Ap2* علاوه بر نقص اندام، نوعی نقص در تعیین مریستم گل نیز به وجود می‌آید و بخشی از مریستم گل به شاخه تبدیل می‌شود. جهشهای کلاس B (جهش در ژنهای *Pi* و *Ap3*) منجر به توسعه کاسبرگ به جای گلبرگ در محور ۲ و تبدیل مادگی به پرچم در محور ۳ می‌شود. جهش در کلاس C (جهش در ژن *Ag*) سبب نقص اندام در محورهای ۳ و ۴ می‌شود به طوری که در محور ۳ گلبرگها و در حلقه ۴ کاسبرگها توسعه می‌یابند. براساس مدل ABC، ژنهای کلاس A، B و C در دو محور مجاور فعالیت دارند و فعالیت هر یک از آنها به تنهایی و یا به صورت ترکیبی در هر محور گل نوع اندام را تعیین می‌کند. در محور اول فعالیت ژنهای کلاس A به تنهایی سبب تشکیل کاسبرگها می‌شود. بیان همزمان ژنهای کلاس A و B گلبرگها را در محور دوم ایجاد می‌کند. در محور سوم پرچمها از فعالیت مشترک ژنهای کلاس B و C به وجود می‌آیند و سرانجام مادگی در محور چهارم نتیجه بیان ژنهای کلاس C به تنهایی است (۷ و ۹).

مدل ABC فنوتیپ اندامهای گل را در بسیاری از جهشهای منفرد، دوگانه و سه‌گانه پیش‌بینی می‌کند اما در جهشهای سه‌گانه‌ای که همه ژنهای کلاسهای A، B و C غیرفعال شده‌اند مدل نمی‌تواند نوع اندامی را که در هر محور

پروتئینهای ABC طی دوره تکامل گل می‌شوند بلکه در بسیاری دیگر از فرآیندهای تنظیمی گیاه که توسط پروتئینهای MADS-box کنترل می‌شوند نیز نقش دارند (۴۲).

آنچه در بالا ذکر شد مکانیسم تکامل گل در گیاهان دولپه‌ای بود. ساختمان گل در گیاهان تک‌لپه‌ای با گیاهان دولپه‌ای تفاوت دارد و از این رو تکامل گل در گیاهان تک‌لپه‌ای با مدل ABC در گیاهان دولپه‌ای متفاوت است. در گیاهان تک‌لپه‌ای به طور مثال در خانواده لیلیاسه مانند گیاهان دولپه‌ای دو محور داخلی شامل پرچم و مادگی است اما برخلاف گیاهان دولپه‌ای در گیاهان تک‌لپه‌ای پوشش گل تنها شامل یک نوع اندام است که در دو محور مجزا قرار گرفته‌اند. در این گونه‌ها در محورهای اول و دوم بجای کاسبرگ و گلبرگ، اندامهای گلبرگ مانند وجود دارد. علت این امر دخالت ژنهای کلاس B در حلقه دوم است (۲۸).

ژنهای خانواده MADS-box عوامل رونویسی را رمز می‌کنند که در فرآیندهای گوناگون در یوکاریوتها نقش دارند. در گیاهان این ژنها در تکامل گل و میوه دخالت دارند (۶). براساس منشاء تکاملی، عوامل رونویسی MADS-box به دو گروه I و گروه II تقسیم می‌شوند. ژنهای گروه II بیشتر مورد مطالعه قرار گرفته‌اند و تنظیم کننده‌های کلیدی در فرآیندهای تکاملی مانند تعیین نوع مریستم، زمان گلدهی و تکامل میوه و بذر هستند، در مقابل ژنهای گروه I خیلی شناخته شده نیستند. گروه II دارای ۴ دامین و گروه I تنها دارای ۱ دامین حفاظت شده هستند (۳۲ و ۴۱).



ساختار عوامل رونویسی MADS-box. عوامل گروه I دارای ۱ دامین و عوامل گروه II دارای ۴ دامین هستند.

می‌داد که در تمام محورها کاسبرگ تشکیل شده بود (۵ و ۳۵). این فنوتیپها که یادآور جهشهای دوگانه C و B (Pi, B) و Ag) و Ap3, Ag) بودند نشان دادند که اولاً این گروه از ژنها برای فعالیت کلاسهای B و C ضروری هستند و جهش یک یا دو ژن *Sep* بر نوع اندام گل اثری ندارد اما حذف به طور همزمان هر سه ژن *Sep* نقص چشمگیری را در نوع اندام گل ایجاد می‌کند. با وجود این بعید بنظر نمی‌رسد که بیان ژنهای *Sep* به طور کامل بی‌تأثیر باشد. اگر این ژنها یکی باشند هیچ مزیت انتخابی در حفظ کپیهای این سه ژن وجود ندارد در حالی که آنالیزهای تکاملی نشان می‌دهد که ژنهای *Sep* برای میلیون‌ها سال در گیاهان حفظ شده‌اند (۲۰). از طرفی الگوی بیان *Sep3* در مقایسه با *Sep1* و *Sep2* متفاوت است. ژنهای *Sep1* و *Sep2* در مراحل اولیه تکامل گل و در همه محورها بیان می‌شوند (۲۱ و ۳۶). اما *Sep3* تنها در محورهای دوم، سوم و چهارم بیان می‌شود (۲۹). بررسی بیان این ژنها و نیز ژنهای مرتبط از گیاه آنتوریوم (ژنهای *Defh200* و *Derh72*) (۱۷ و ۳۹) این نکته را آشکار کرد که این ژنها بعد از بیان ژنهای تعیین کننده مریستم گل و پیش از بیان ژنهای ABC تعیین کننده نوع اندام هستند. این یافته‌ها نقش این ژنها را در ایجاد بافت اولیه گل به خوبی مشخص می‌کند. قبلاً این گروه ژنها به عنوان ژنهای حدواسط MADS نامیده می‌شدند اما اکنون در همراهی با نام‌گذاری مدل ABC به عنوان ژنهای کلاس E شناخته می‌شوند. براساس مطالعاتی که روی پروتئینها صورت گرفته است پروتئینهای کلاس E به طور مستقیم با پروتئینهای کلاس C برهمکنش دارند (۱۶، ۱۹ و ۲۲). پروتئینهای *Sep* با هترودايمرهاي کلاس B برهمکنش دارند و نیز در حضور *Sep3* میان هترودايمر *Pi-Ap3* و پروتئین *Ag* برهمکنش صورت می‌گیرد (۲۴). این نتایج آشکار می‌کند که مدل ترکیبی ABC برای واکنش میان پروتئینهای تعیین کننده نوع اندام به حضور پروتئینهای *Sep* به عنوان حدواسط نیاز دارد. به نظر می‌رسد که پروتئینهای *Sep* نه تنها سبب ایجاد کمپلکسهای پیچیده میان

زعفران دوجنسی و عقیم است. پوشش گل در این گیاه شامل ۶ قسمت گلبرگ مانند است که ۳ گلبرگ در محور اول (گلبرگهای خارجی) و ۳ گلبرگ در محور دوم (گلبرگهای داخلی) قرار دارند. نرینگی شامل ۳ پرچم مجزا است و مادگی آن از یک تخمدان که در وسط قرار گرفته تشکیل شده است. از قسمت تخمدان خامه باریک و بلندی خارج می‌شود که در انتها به کلاه بوقی شکل ختم می‌شود (۴۱). درک چگونگی رشد گل در گیاه زعفران به افزایش عملکرد و کاهش هزینه‌های تولید گل به ویژه کلاه کمک به سزایی خواهد کرد. در این مطالعه بیان ژنهایی از خانواده MADS-box که در تشکیل گل بویژه کلاه نقش دارند مورد بررسی قرار گرفت و میزان بیان آنها با یکدیگر در کلاه و سایر اندامهای گل و اندامهای رویشی مقایسه شد.

مواد و روشها

مواد گیاهی مورد استفاده در این تحقیق شامل اندامهای تخمدان، کلاه، پرچم، گلبرگ، برگ، پیاز و ریشه گیاه زعفران بود. پس از برداشت گلها از منطقه قائنات استان خراسان، اندامهای ذکر شده توزین و درون ورقه‌های آلومینیومی پیچیده شدند. نمونه‌های آماده شده فوراً درون ایزت مایع تثبیت و در دمای -80°C درجه سانتی‌گراد تا زمان استخراج RNA نگهداری شدند.

استخراج RNA: استخراج RNA از ۷ اندام رویشی و زایشی گیاه زعفران شامل ریشه، پیاز، برگ، گلبرگ، پرچم، کلاه و تخمدان با کیت استخراج RNA (ساخت شرکت سیناکلون (RNXTM-PLUS)) صورت گرفت.

واکنش نسخه‌برداری معکوس (سنتز cDNA): سنتز cDNA با استفاده از ۱ میکروگرم از RNA کل با استفاده از Oligo dT به عنوان آغازگر عمومی توسط آنزیم ترانسکریپتاز معکوس با نام تجاری M-MuLV Reverse Transcriptase Rnase H صورت گرفت. برای انجام روش PCR نیمه کمی، غلظت cDNA نمونه‌های حاصل از

تسافتاریس و همکاران (۲۰۰۴) بیان ۳ ژن همولوگ *Apl* را در گیاه زعفران وارپته یونانی بررسی و آنها را به صورت *CsApl1*، *CsAplb* و *CsAplc* نام‌گذاری کردند. این ژنها اولین ژنهای MADS-Box بودند که در گیاه زعفران شناسایی شدند. توالی اسیدآمینه‌ای این ۳ ژن همولوژی بالایی را با عوامل رونویسی MADS-Box به ویژه خانواده *Apl-like* نشان دادند. تمامی توالیهای جدا شده فاقد موتیف CAAX بودند. این موتیف در پروتئینهای *Apl* گیاهان تک‌لپه‌ای برخلاف گیاهان دولپه‌ای وجود ندارد. آنالیز فیلوژنی ژنهای جداسازی شده در سطح اسیدهای آمینه نشان داد که آنها دارای اجداد مشترکی با ژنهای *Apl* گیاهان تک‌لپه‌ای ذرت، جو و برنج هستند (۴۶).

تسافتاریس و همکاران (۲۰۱۱) همسانه‌سازی چهار ژن از کلاس E خانواده MADS-Box با نامهای *Sep3a*، *Sep3b*، *Sep3c* و *Sep3c-as* را گزارش کردند. نتایج توالی‌یابی نشان داد که توالی *Sep3c-as* محصول پردازش ژن *Sep3c* است. نتایج بررسی خویشاوندی نشان داد که این توالیها بسیار مشابه با توالیهای *Sep3-like* جدا شده از سایر گیاهان تک‌لپه‌ای هستند. هر چهار توالی به طور قوی در تمام اندامهای گل بیان شدند. تسافتاریس و همکاران اظهار داشتند که بیان ژنهای *Sep3-like* به همراه ژنهای کلاس A و کلاس B اولاً تشکیل گلبرگ بجای کاسبرگ در محور اول و ثانیاً توسعه مدل تکامل گل را از ABC به ABCE توضیح می‌دهد. از سوی دیگر بیان ژنهای کلاس C به همراه ژنهای کلاس E و B در اندام مادگی نشان داد که برای یافتن نقش این ژنها در تشکیل مادگی باید آزمایشات بیشتری صورت گیرد (۴۳).

زعفران (*Crocus sativus*) گیاهی تک لپه و تریپلوئید از خانواده زنبقیان (Iridaceae) و دارای گل‌هایی با ارزش اقتصادی بالاست. کلاه قرمز رنگ آن با نام تجاری زعفران یک افزودنی محبوب در صنایع غذایی با خواص دارویی به شمار می‌رود که دارای رایحه و رنگ جذابی است. گل

واکنش نسخه‌برداری معکوس با اسپکتروفتومتری تعیین شد و سپس جهت انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز از هر یک از نمونه‌ها استوک کاری با غلظت $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ تهیه شد.

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR): در این تحقیق از روش PCR نیمه کمی جهت بررسی بیان ژنهای مورد نظر استفاده شد. برای این منظور ابتدا با استفاده از یک جفت آغازگر ژن *18S rRNA* به عنوان ژن خانه‌دار شرایط انجام واکنش بهینه شد. ژن *18S rRNA* براساس منابع موجود از گیاه زعفران انتخاب شد (۳). سپس واکنش زنجیره‌ای پلیمرز برای ۶ ژن اختصاصی شامل *Ag1a* و *Ag1b* از ژنهای کلاس C و *Sep3a*، *Sep3b*، *Sep3c* و *Sep3d* از ژنهای کلاس E صورت گرفت. آغازگرهای اختصاصی ژن با استفاده از توالیهای موجود ژنها در پایگاه NCBI (EU424140.1، EU424139.1، EU424138.1)

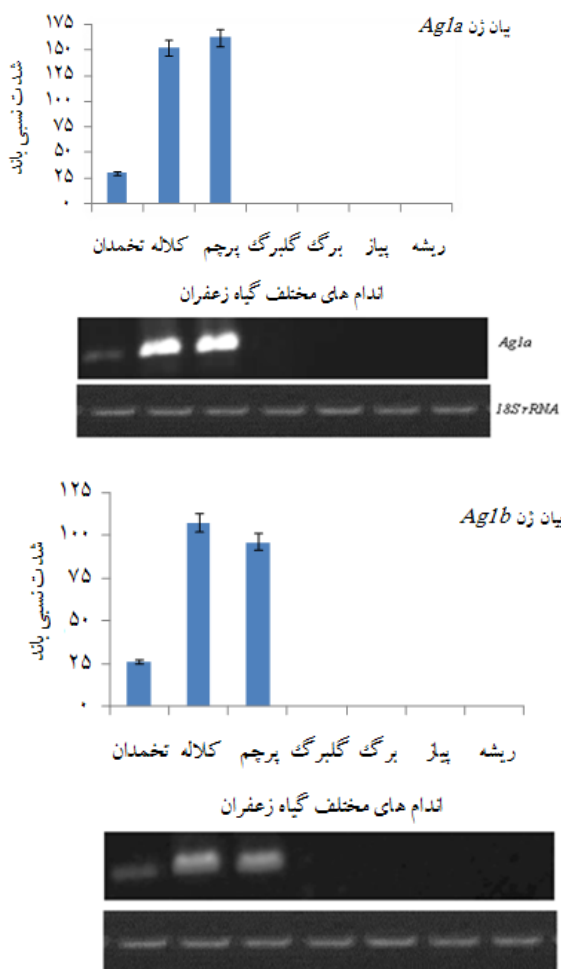
جدول ۱- مشخصات آغازگرهای مورد استفاده برای ژنهای MADS-Box گیاه زعفران. در این جدول F و R به ترتیب نشان دهنده آغازگرهای Forward (رفت) و Reverse (برگشت) هستند.

آغازگرها	توالی ۵' به ۳' آغازگرها	طول قطعه	دمای اتصال (°C)	GC%
Ag1a F	5'-AACGGATCCATGGGGAgGGGGAATCG-3'	۶۸۱	۶۰	۶۰
Ag1a R	5'-TGCGGATCCTTACCCTAgTTGGAAGGCAgTC-3'		۶۰	
Ag1b F	5'-TAGGATCCATGGGGAgGGGGAATCG-3'	۶۸۶	۶۰	۵۷
Ag1b R	5'-CGCGGATCCCTACACAAAACCTAgTTGGA-3'		۶۰	۵۵
Sep3a F	5'-ATGGGATCCATGGGGAgAgGAAgAgTCGAg-3'	۷۱۶	۵۸	۵۷
Sep3aR	5'-ATCGGATCCTCATTGCAACCATCCAAGCA-3'		۵۸	۵۱
Sep3bF	5'-AAGGATCCATGGGGAgAgGGAgAgTCGAg-3'	۷۱۹	۵۸	۵۹
Sep3bR	5'-GTCGGATCCTCATTGCAACCATCCAAGCA-3'		۵۸	۵۵
Sep3cF	5'-ACCGGATCCATGGGTAgAgGGAgAgTCGAgC-3'	۷۲۴	۵۸	۶۰
Sep3cR	5'-ACGGGATCCTCATGGGAACCATCCTGGA-3'		۵۸	۵۹
Sep3dF	5'-ATCGGATCCATGGGTAgAgGGAgAgTCGAg-3'	۷۲۰	۵۸	۵۷
Sep3dR	5'-ATCGGATCCTCATGGGAACCATCCTGGA-3'		۵۸	۵۵
18smaF	5'-TTCAATCCGTAGGAGCGACA-3'	۷۰۳	۵۶	۵۰
18smaR	5'-CGAACGAGACCTCAGTCTGCTAA-3'		۵۶	۵۲

بررسی بیان ژنها: در بررسی بیان هر ژن به ازای هر نمونه، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز ۳ بار تکرار شد. پس از انجام این واکنش مقدار $5 \mu\text{l}$ محصول واکنش روی ژل $1/2$ درصد

آگارز الکتروفورز و سپس به وسیله نرم‌افزار 1.42q v ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/index.html>) شدت باند موجود روی ژل آنالیز شد. این نرم‌افزار قادر است

۱۰۵۹ جفت باز است. مقایسه میانگین بیان ژن *Sep3a* در اندام‌های مختلف گیاه زعفران معنی‌دار شد.



شکل ۱- بیان ژنهای *Agla* و *Aglb* در اندام‌های مختلف زعفران. این ژنها در اندام‌های تخمدان و به ویژه در کلاله و پرچم بیان بالایی دارند ولی در اندام‌های رویشی (برگ، پیاژ و ریشه) بیان نمی‌شوند یا بیان بسیار کمی دارند. شکل پایین بیان ژن *18S rRNA* را نشان می‌دهد که در همه اندامها به یک میزان بیان شده است. طول قطعه مربوط به ژن *Aglb* ۶۸۱، ژن *Agla* ۶۸۶ و ژن *18S rRNA* ۷۰۳ جفت باز است.

آنالیزهای آماری بیشترین میزان شدت باند را در اندام‌های گلبرگ و پرچم و سپس در اندام‌های تخمدان و کلاله نشان داد. شکل ۲ تفاوت در میزان بیان *Sep3a* را در اندام‌های مختلف گیاه زعفران نشان می‌دهد، این ژن در اندام‌های گل شامل تخمدان، کلاله، پرچم و گلبرگها بیان می‌شود ولی در اندام‌های رویشی برگ، ریشه و پیاژ بیان نمی‌شود. مقایسه

شدت نسبی باند موجود روی ژل را اندازه‌گیری کند و به صورت عدد نمایش دهد. در نهایت آنالیز آماری داده‌های حاصل و رسم نمودارها با نرم‌افزارهای SPSS v15 (www.spss.com) و Excel انجام شد.

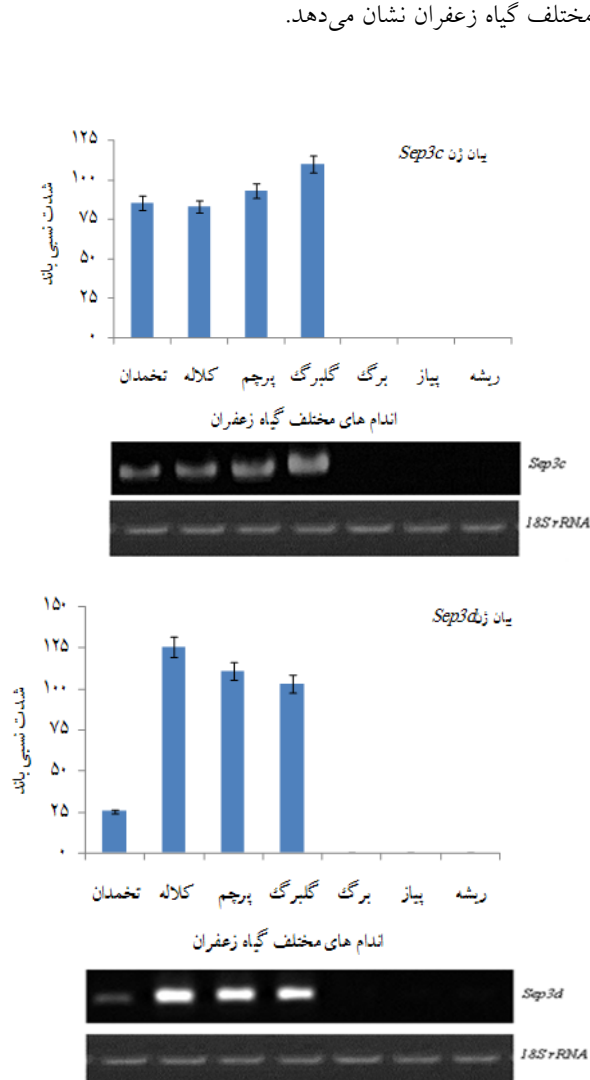
نتایج

بررسی بیان ژنهای کلاس C: ژنهای *Agla* و *Aglb*
 کلاس C خانواده MADS-box به ترتیب دارای طول ۱۰۷۸ و ۱۱۲۷ جفت باز هستند. مقایسه میانگین داده‌های مربوط به بیان ژن *Agla* در اندام‌های مختلف گیاه زعفران نشان داد که اختلاف بین اندامها در سطح ۱ درصد معنی‌دار شد. آنالیزهای آماری، شدت باند *Agla* در اندام‌های مختلف زعفران را در دو سطح کاملاً متفاوت قرار می‌دهد به طوری که شدت باند در اندام‌های کلاله و پرچم خیلی زیاد است در حالی که در اندام‌های تخمدان، گلبرگ، برگ، پیاژ ریشه در مقایسه با کلاله و پرچم پایین است. از سوی دیگر همان گونه که در شکل ۱ نشان داده شده است ژن *agla* در اندام‌های کلاله، پرچم و تخمدان بیان شده است، با این تفاوت که میزان بیان آن در اندام‌های کلاله و پرچم نسبتاً به تخمدان بیشتر است.

اختلاف میانگین بیان ژن *Aglb* در اندام‌های مختلف گیاه زعفران در سطح ۱ درصد معنی‌دار بود. براساس آنالیزهای آماری شدت باند ژن *Aglb* بدست آمده در اندام‌های مختلف گیاه زعفران نیز مانند ژن *Agla* در دو سطح متفاوت قرار می‌گیرد و در اندام‌های کلاله و پرچم نسبت به سایر اندامها اختلاف معنی‌داری دارد. با وجود این، شکل ۱ نشان می‌دهد که این ژن در اندام‌های تخمدان، کلاله و پرچم بیان می‌شود، البته با این تفاوت که میزان بیان آن در اندام‌های کلاله و پرچم نسبتاً به تخمدان بیشتر است.

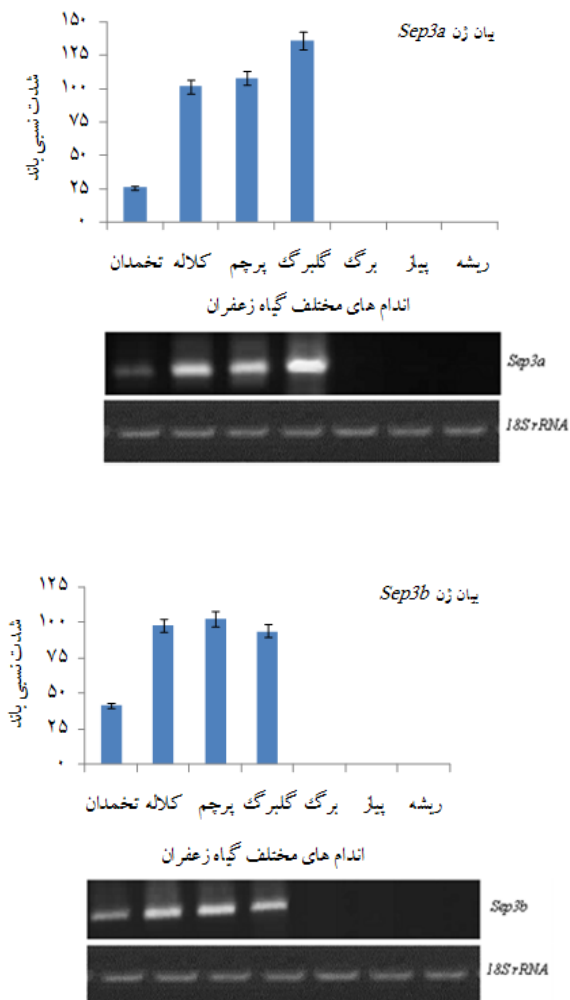
بررسی بیان ژنهای کلاس E: ژنهای *Sep3a* و *Sep3b*
Sep3d و *Sep3c* متعلق به کلاس E خانواده MADS-box هستند. طول این ژنها به ترتیب ۱۱۱۰، ۱۱۵۷، ۱۰۷۰ و

آماري شدت باندها در اندام‌های مختلف را در سطح ۳ متفاوت قرار داد به طوری که اندام‌های کلاله، پرچم، گلبرگ و سپس تخمدان دارای بیشترین شدت باندها بودند و اندام‌های رویشی برگ، پیاز و ریشه کمترین شدت باندها را نشان دادند. شکل ۲ میزان بیان این ژن را در اندام‌های مختلف گیاه زعفران نشان می‌دهد.



شکل ۲- بررسی بیان ژنهای کلاس E خانواده MADS box در اندام‌های مختلف گیاه زعفران. این ژنها در اندام‌های گل شامل تخمدان، کلاله، پرچم و گلبرگ بیان بالایی دارند ولی در اندام‌های رویشی (برگ، پیاز و ریشه) بیان نمی‌شوند یا بیان بسیار کمی دارند. شکل پایین بیان ژن *18S rRNA* را نشان می‌دهد که در همه اندامها به یک میزان بیان شده است. طول قطعه ژن *Sep3a* ۷۱۶، ژن *Sep3b* ۷۱۹، ژن *Sep3c* ۷۲۴، ژن *Sep3d* ۷۲۰ و ژن *18S rRNA* ۷۰۳ جفت باز است.

میانگین بیان ژن *Sep3b* در اندام‌های مختلف زعفران در سطح ۱ درصد معنی‌دار بود. بیشترین میزان شدت باندها در اندام‌های کلاله، پرچم، گلبرگ و سپس در اندام تخمدان مشاهده شد. همانطور که در شکل ۲ نشان داده شده است این ژن در اندام‌های برگ، ریشه و پیاز بیان نمی‌شود.



اختلاف میانگین بیان ژن *Sep3c* در اندام‌های مختلف گیاه زعفران در سطح ۱ درصد معنی‌دار شد. آنالیزهای آماری شدت باندها در اندام‌های مختلف گیاه زعفران را در سطح ۲ شامل تخمدان، کلاله، پرچم و گلبرگ بیان می‌شود ولی در اندام‌های غیر گل شامل برگ، پیاز و ریشه بیان نمی‌شود (شکل ۲). اختلاف میانگین بیان ژن *Sep3d* در اندام‌های مختلف زعفران در سطح ۱ درصد معنی‌دار شد. آنالیزهای

بحث

تک‌لپه‌ای زعفران نسبت به آنچه در گیاهان دو لپه‌ای گفته شد کمی متفاوت است. بررسی بیان ژن *Ag1a* در سه اندام کلاله، پرچم و برگ زعفران وارسته ایرانی نشان داد که ژن *Ag1a* در اندامهای کلاله و پرچم دارای بیان ولی در برگ فاقد بیان است (۴۴ و ۴۵). نتایج این تحقیق نشان داد که ژنهای *Ag* فقط در اندامهای جنسی زعفران شامل تخمدان، کلاله و پرچم بیان می‌شوند و در گلبرگ و سایر اندامهای رویشی بیان نمی‌شوند.

بیان ژنهای کلاس E: ژنهای *Sep* در کلاس E ژنهای خانواده MADS-box تقسیم‌بندی می‌شوند و نقش مهمی در تکامل گل دارند. عوامل رونویسی *Sep* تشکیل اندامهای مختلف گل را کنترل می‌کنند. ژنهای *Sep1*، *Sep2* و *Sep3* از ژنهای تعیین‌کننده اندام هستند که برای تکامل گلبرگ، پرچم و مادگی ضروری می‌باشند (۳۴). الگوی بیان ژنهای *Sep* در گیاهان دو لپه‌ای و تک‌لپه‌ای با هم متفاوت است. در گیاهان دو لپه‌ای بیان این ژنها در محورهای دوم، سوم و چهارم همراه با ژنهای ABC سبب تشکیل اندامهای مختلف گل می‌شود (۳۳). این در حالی است که ژنهای *Sep* در محور اول بیان نمی‌شوند و بیان ژنهای کلاس A به تنهایی در این محور سبب تشکیل کاسبرگ می‌شود. مطالعه ژنهای *Sep* در گیاهان تک لپه‌ای و به ویژه در برنج و ذرت صورت گرفته است (۲۳). برخلاف گیاهان دو لپه‌ای، بررسی بیان ژنهای *Sep* در گیاهان تک لپه‌ای نشان می‌دهد که این ژنها در همه محورهای گل این گیاهان بیان می‌شوند. بیان ژنهای *Sep3* در وارسته یونانی گیاه زعفران در هر چهار حلقه گل در اندامهای کلاله، پرچم و گلبرگ شناسایی شده است (۴۳).

در این تحقیق بیان ژنهای *Sep3* در اندامهای مختلف گیاه زعفران وارسته ایرانی مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس نتایج به دست آمده ژنهای *Sep3* در همه اندامها و محورهای گل زعفران بیان می‌شوند. به نظر می‌رسد این ژنها در تشکیل همه اندامهای گل زعفران و یا به عبارت دیگر در تشکیل بافت اولیه گل جهت فعالیت ژنهای ABC نقش دارند. این نتایج با مدل تکامل گل ABCE در گیاهان

زعفران از گیاهان زراعی و ارزشمندی است که از جنبه‌های مختلفی مورد مطالعه قرار گرفته است. از جمله تحقیقات صورت گرفته در ایران می‌توان به تکثیر سریع و انبوه بنه‌های سالم زعفران در شرایط آزمایشگاهی اشاره کرد که توسط رجب پور و همکاران (۱۳۹۰) انجام شده است. براساس گزارش این محققین از آنجایی که روش سنتی به علت حمله عوامل بیماری‌زا به بنه‌ها زمان‌بر است می‌توان از روشهای آزمایشگاهی برای تولید بنه‌های عاری از بیماری استفاده نمود (۱). همچنین در تحقیق دیگری که توسط رضوانی و همکاران (۱۳۹۳) صورت گرفته است تأثیر هورمون اکسین و عنصر مس روی خصوصیات ظاهری ریشه و برگ زعفران مطالعه شده است. براساس نتایج این مطالعه اثر متقابل اکسین و مس باعث افزایش تعداد ریشه و وزن خشک برگ و ریشه می‌شود (۲). در تحقیق حاضر نیز بیان ژنهای دو گروه *Ag1* و *Sep3* متعلق به کلاسهای C و E خانواده عوامل رونویسی MADS-box که در تشکیل گل به ویژه در تشکیل کلاله نقش دارند با روش PCR نیمه کمی در زعفران وارسته ایرانی بررسی شد و میزان بیان این ژنها در کلاله و سایر اندامهای گل و نیز اندامهای رویشی مورد مقایسه قرار گرفت.

بیان ژنهای کلاس C: ژنهای *Ag* متعلق به کلاس C خانواده MADS-box هستند. دو ژن *Ag1a* و *Ag1b* فرمهای حاصل از پیرایشهای متفاوت ژن *AG1* می‌باشند که ۹۹ درصد تشابه توالی نوکلئوتیدی دارند. مطالعه الگوی بیان ژنهای *Ag* در سطح رونویسی طی دوره تکامل گل در گیاه آراییدوپسیس، بیان این ژنها را در پریموردیای پرچم و مادگی نشان داد در صورتی که در اندامهای کاسبرگ و گلبرگ بیانی مشاهده نشد (۱۸، ۲۷ و ۳۰). بیان این ژنها در محورهای سوم و چهارم نقش مهمی در تشکیل اندامهای جنسی پرچم و مادگی در این محورها دارد. ژنهای *Ag* در گیاهان دو لپه‌ای در محور سوم همراه با ژنهای کلاس B و E بیان می‌شوند. در محور چهارم این ژنها با ژنهای کلاس E به طور مشترک بیان می‌شوند. اما الگوی بیان در گیاه

(۳۴). هونما و گوتو (۲۰۰۱) نشان دادند پروتئینهای کلاس B از طریق پروتئینهای *Sep*، با پروتئینهای *Ap1* و *Ag* برهمکنش دارند. در این بررسی بیان نابجای *Pi*، *Ap3* و *Ap3* همچنین بیان نابجای *Pi*، *Ap3* و *Sep3* سبب تبدیل برگ به گلبرگ شد. بیان نابجای *Pi*، *Ap3*، *Ap3* و *Sep3* *Ag* باعث تغییر برگ به پرچم شد (۲۴).

درک چگونگی رشد گل در گیاه زعفران می‌تواند راه را برای افزایش عملکرد آن و کاهش هزینه‌های تولید گل به ویژه کلاله هموار سازد. در تحقیق حاضر بیان ژنهایی از خانواده MADS-Box را که در تشکیل گل به ویژه کلاله نقش دارند مورد بررسی قرار گرفت و میزان بیان آنها با یکدیگر در کلاله، سایر اندامهای گل و نیز اندامهای رویشی مقایسه شد. گام بعدی استفاده از مهندسی ژنتیک برای افزایش بیان ژنهایی است که در کلاله بیان می‌شوند.

سازگار است. با وجود این، جهت درک بیشتر چگونگی تشکیل گل زعفران و به خصوص مادگی آن آزمایشهای بیشتری در ارتباط با چگونگی تجمع پروتئینهای MADS و برهمکنش عوامل A، B، C و E باید انجام شود.

پلاز و همکاران (۲۰۰۰) نشان دادند که در گیاه آراییدوپسیس فعالیت ژنهای کلاس B و C به فعالیت ۳ ژن *Sep1*، *Sep2* و *Sep3* از خانواده MADS-Box نیاز دارد. در گیاهان جهش یافته سه‌گانه که فاقد فعالیت هر سه ژن *Sep* بودند در تمام محورهای گل کاسبرگ تشکیل شد. براین اساس پلاز و همکاران اعلام کردند که ژنهای *Sep1*، *Sep2* و *Sep3* از ژنهای تعیین کننده اندام هستند که برای تکامل گلبرگ، پرچم و مادگی ضروری می‌باشند. پلاز و همکاران (۲۰۰۱) طی آزمایشهایی توانستند در گیاه آراییدوپسیس برگ را به گلبرگ تبدیل کنند. ترکیب فعالیت ژنهای *Sep* با ژنهای A و B سبب تغییر برگهای رزت به گلبرگ شد

منابع

۱. رجب پور، ش. صبورا، ع. وطن پور ازغندی، ع. ۱۳۹۰. تغییر غلظت هورمونهای برونزا و تاثیر آن بر روی بلوغ رویانهای بدنی و ریزینه‌زایی زعفران زراعی (*Crocus sativus* L.). مجله زیست‌شناسی گیاهی ایران. شماره ۸، ص ۴۱-۵۸.
۲. رضوانی، ن. سروش زاده، ع. شریفی، م. ۱۳۹۳. تاثیر اکسین و عنصر مس بر رشد زعفران. مجله زیست‌شناسی گیاهی ایران. شماره ۱۹، ص ۱۱۱-۱۲۴.
3. Ahrazem, O., Rubio-Moraga, A., Trapero, A., Gomez-Gomez, L. 2011. Developmental and stress regulation of gene expression for a 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase, *CstNCED*, isolated from *Crocus sativus* stigmas. Journal of Experimental Botany. 1-14.
4. Angenent, G.C., John, F., Marco, B., Lucia, C., Tunen, A.J. 1993. Petal and stamen formation in *petunia* is regulated by the homeotic gene *Fbp1*. The Plant Journal. 1: 101-112.
5. Angenent, G.C., Franken, J., Busscher, M., Weiss, D., Tunen, A.J. 1994. Co-suppression of the *petunia* homeotic gene *Fbp2* affects the identity of the generative meristem. The Plant Journal. 1: 33-44.
6. Bowman, J.L., Baum, S.F., Eshed, Y., Putterill, J., Alvarez, J. 1999. Molecular genetics of gynoecium development in *Arabidopsis*. Current Topics in Developmental Biology. 45: 155-205.
7. Bowman, J.L. 1997. Evolutionary conservation of angiosperm flower development at the molecular and genetic levels. Journal of Biosciences. 4: 515-527.
8. Bowman, J.L., Alvarez, J., Weigel, D., Meyerowitz, E.M., Smyth, D.R. 1993. Control of flower development in *Arabidopsis thaliana* by *Apetala1* and interacting genes. Development. 3: 721-743.
9. Bowman, J.L., David, R.S., Meyerowitz, E.M. 1991. Genetic interactions among floral homeotic genes of *Arabidopsis*. Development. 1: 1-20.
10. Bowman, J.L., David, R.S., Meyerowitz, E.M. 1989. Genes directing flower development in *Arabidopsis*. The Plant Cell. 1: 37-52.
11. Bradley, D., Rosemary, C., Hans, S., Nigel, H., Coen, E. 1993. Complementary floral homeotic phenotypes result from opposite orientations of a

- transposon at the plena locus of *Antirrhinum*. *Cell*. 1: 85-95.
12. Carpenter, R., Coen, E.S. 1990. Floral homeotic mutations produced by transposon-mutagenesis in *Antirrhinum majus*. *Genes and Development*. 4: 1483-1493.
 13. Causier, B., Schwarz-Sommer, Z., Davies, B. 2010. Floral organ identity: 20 years of ABCs. *Seminars in Cell and Developmental Biology*. 21: 73-79.
 14. Causier, B., Rosa, C., Zhou, J., Ingram, R., Xue, Y., Schwarz-Sommer, Z., Davies, B. 2005. Evolution in action: following function in duplicated floral homeotic genes. *Current Biology*. 16: 1508-1512.
 15. Coen, E.S., Meyerowitz, E.M. 1991. The war of the whorls: genetic interactions controlling flower Development. *Nature*. 6339: 31-37.
 16. Davies, B., Egea-Cortines, M., Silva, E.D.A., Saedler, H., Sommer, H. 1996. Multiple interactions amongst floral homeotic MADS-box proteins. *The EMBO Journal*. 16: 4330-4343.
 17. Davies, B., Rosa, A., 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*. 4: 663-677.
 18. Drews, G.N., Bowman, J.L., Meyerowitz, E.M. 1991. Negative regulation of the *Arabidopsis* homeotic gene *Agamous* by the *Apetala2* product. *Cell*. 6: 991-1002.
 19. Fan, H.Y., Hu, Y., Tudor, M., Ma, H. 1997. Specific interactions between the k domains of Ag and Agls, members of the MADS-domain family of DNA binding proteins. *The Plant Journal*. 5: 999-1010.
 20. Ferrario, S., Immink, R.G.H., Shchennikova, A., Busscher-Lange, J., Angenent, G.C. 2003. The MADS-box gene *Fbp2* is required for sepallata function in *Petunia*. *The Plant Cell Online*. 4: 914-925.
 21. Flanagan, C.A., Ma, H. 1994. Spatially and temporally regulated expression of the MADS-box gene *Ag12* in wild-type and mutant *Arabidopsis* flowers. *Plant Molecular Biology*. 2: 581-595.
 22. Folter, S., Immink, R.G.H., Kieffer, M., Pařenicová, L., Henz, S.R., Weigel, D., Busscher, M., Kooiker, M., Colombo, L., Kater, M.M. 2005. Comprehensive interaction map of the *Arabidopsis* MADS-box transcription factors. *The Plant Cell Online*. 5: 1424-1433.
 23. Gao, X., Liang, W., Yin, C., Ji, S., Wang, H., Su, X., Guo, C., Kong, H., Xue, H., Zhang, D. 2010. The *SEPALLATA* like gene *OsMADS34* is required for rice inflorescence and spikelet development. *Plant Physiology*. 153: 728-740.
 24. Honma, T., Goto, K. 2001. Complexes of MADS-box proteins are sufficient to convert leaves into floral organs. *Nature*. 6819: 525-529.
 25. Huijser, P., Klein, J., Lönnig, W.E., Meijer, H., Saedler, H., Sommer, H. 1992. Bracteomania, an inflorescence anomaly, is caused by the loss of function of the MADS-box gene *squamosa* in *Antirrhinum majus*. *The EMBO Journal*. 4: 1239-1249.
 26. Jofuku, K.D., Boer, B.G.D., Montagu, M.V., Okamoto, J.K. 1994. Control of *Arabidopsis* flower and seed development by the homeotic gene *Apetala2*. *The Plant Cell Online*. 9: 1211-1225.
 27. Kempin, S.A., Savidge, B., Yanofsky, M.F. 1995. Molecular basis of the cauliflower phenotype in *Arabidopsis*. *Science*. 5197: 522-525.
 28. Krizek, A.B., Meyerowitz, E.M. 1996. The *Arabidopsis* homeotic genes *Apetala3* and *Pistilata* are sufficient to provide the B class organ identity function. *Development*. 4: 11-22.
 29. Liu, Z., Meyerowitz, E.M. 1995. *Leunig* regulates *Agamous* expression in *Arabidopsis* flowers. *Development*. 4: 975-991.
 30. Mandel, M.A., Yanofsky, M.F. 1998. The *Arabidopsis* *Ag19* MADS-box gene is expressed in young flower primordia. *Sexual Plant Reproduction*. 1: 22-28.
 31. Martienssen, R., Irish, V. 1999. Copying out Our Abcs: The role of gene redundancy in interpreting genetic hierarchies. *Trends in Genetics*. 11: 435-437.
 32. Masiero, S., Colombo, L., Grini, P.E., Schnittger, A., Kater, M.M. 2011. The emerging importance of type I MADS-box transcription factors for plant reproduction. *The Plant Cell Online*. 3: 865-872.
 33. Pařenicová, L., Folter, S.D., Kieffer, M., Horner, D.S., Favalli, C., Busscher, J., Cook, H.E., Ingram, R.M., Kater, M.M., Davies, B. 2003. Molecular and phylogenetic analyses of the complete MADS-box transcription factor family in *Arabidopsis* new openings to the MADS world. *The Plant Cell Online*. 7: 1538-1551.
 34. Pelaz, S., Ditta, G.S., Baumann, E., Wisman, E., Yanofsky, M.F. 2000. B and C floral organ

- identity functions Require sepallata MADS-box genes. *Nature*. 6783: 200-203.
35. Pnueli, L., Hareven, D., Broday, L., Hurwitz, C., Lifschitz, E. 1994. The *Tm5* MADS-box gene mediates organ differentiation in the three inner whorls of tomato flowers. *The Plant Cell Online*. 2: 175-186.
 36. Riechmann, J.L., Meyerowitz, E.M. 1997. MADS-domain proteins in plant development. *Biological Chemistry*. 10: 1079-1102.
 37. Riechmann, J.L., Krizek, B.A., Meyerowitz, E.M. 1996. Dimerization specificity of *Arabidopsis* MADS-domain homeotic proteins *Apetalal*, *Apetalal3*, *Pistillata*, and *Agamous*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 10: 4793-4798.
 38. Savidge, B., Rounsley, S.D., Yanofsky, M.F. 1995. Temporal relationship between the transcription of two *Arabidopsis* MADS-box genes and the floral organ identity genes. *The Plant Cell Online*. 6: 721-733.
 39. Schwarz-Sommer, Z., Hue, I., Huijser, P., Flor, P.J., Hansen, R., Tetens, F., Lönnig, W.E., Saedler, H., Sommer, H. 1992. Characterization of the *Antirrhinum* floral homeotic MADS-box gene *deficiens*: evidence for DNA binding and autoregulation of its persistent expression throughout flower development. *The EMBO Journal*. 1: 251-263.
 40. Schwarz-Sommer, Z., Huijser, P., Nacken, W., Saedler, H., Sommer, H. 1990. Genetic control of flower development by homeotic genes in *Antirrhinum majus*. *Science*. 4983: 931-936.
 41. Theissen, G., Kim, J.T., Saedler, H. 1996. Classification and phylogeny of the MADS-box multigene family suggest defined roles of MADS-box gene subfamilies in the morphological evolution of eukaryotes. *Journal of Molecular Evolution*. 5: 484-516.
 42. Thomas, J. 2001. Relearning our ABCs: new twists on an old model. *Trends in Plant Science*. 7: 310-316.
 43. Tsaftaris, A., Pasentsis, K., Makris, A., Darzentas, N., Polidoros, A., Kalivas, A., Argiriou, A. 2011. The study of the E-class Sepallata3-like MADS-box genes in wild-type and mutant flowers of cultivated saffron crocus (*Crocus sativus* L.) and its putative progenitors. *Journal of Plant Physiology*. 14: 1675-1684.
 44. Tsaftaris, A., Alexios, S., Polidoros, N., Pasentsis, K., Kalivas, A. 2006. Tepal formation and expression pattern of B-class paleo Ap3-like MADS-box genes in crocus (*Crocus sativus* L.). *Plant Science*. 2: 238-246.
 45. Tsaftaris, A.S., Pasentsis, K., Polidoros, A.N. 2005. Isolation of a differentially spliced C-type flower specific Ag-Like MADS-box gene from *Crocus sativus* and characterization of its expression. *Biologia Plantarum*. 4: 499-504.
 46. Tsaftaris, A.S., Pasentsis, K., Iliopoulos, I., Polidoros, A.N. 2004. Isolation of three homologous Ap1-like MADS-box genes in crocus (*Crocus sativus* L.) and characterization of their expression. *Plant Science*. 5: 1235-1243.

Study of expression of the MADS-box transcription factors involved in flower formation in saffron (*Crocus sativus* L.)

Jodeir S. and Dehghan Nayeri F.

Agricultural Biotechnology Dept., Engineering and Technology Faculty, Imam Khomeini International University, Qazvin, I.R. of Iran

Abstract

In plants many genes have been identified with a significant role in the control of flowering pathway. Most of these genes belong to a large family of MADS-box transcription factors. *Crocus sativus* is a triploid sterile plant characterized by its long red stigmas having commercial value. Understanding flower development in this plant can be useful in increasing yield and reducing production cost. In the present study, the expression pattern of two classes of MADS-box genes (*Ag1* and *Sep3*) involved in flower formation was analyzed in both flower parts and vegetative organs by semi quantitative RT-PCR. Based on the analysis, two C classes of MADS-box genes including *Ag1a* and *Ag1b* were expressed in three sexual organs including ovary, stigma and stamens. These two genes showed higher expression in saffron stigma and stamens compared to ovary. Expression level of *Ag1a* and *Ag1b* genes was low in petal, leaf, corn and root organs. The expression of *Sep3a*, *Sep3b*, *Sep3c* and *Sep3d* genes from class E of MADS-box family detected in petal, stamen, stigma and ovary while it was not detectable in vegetative organs including corn and root by semi quantitative RT-PCR.

Key words: Gene expression, Saffron, MADS-box transcription factors, Semi quantitative RT-PCR.