جداسازی و بررسی بیان واریانت *MdMYB10b* در سیب گوشت قرمز و مطالعه آللیسم ژنهای مسئول رنگ قرمز در سیب

ابراهیم محمودی[۱]، عباس یداللهی[۲]* و بهرام محمدسلطانی[۳]

[۱] **تهران، دانشگاه تربیت مدرس، گروه بیوتکنولوژی**

[۲] **تهران، دانشگاه تربیت مدرس، گروه علوم باغبانی**

[۳] **تهران، دانشگاه تربیت مدرس، گروه ژنتیک**

تاریخ دریافت: ۹۰/۳/۲۲ تاریخ پذیرش: ۹۱/۱۲/۲۳

چکیده

خانواده ژنی MYB به عنوان یکی از بزرگترین فاکتورهای رونویسی در گیاهان نقشهای متعددی بر عهده دارند که یکی از مهم ترین آنها تنظیم سطح آنتوسیانین در پیکره گیاه است. در سیب (*Malus ×domestica*) سه ژن *MdMYB1*، *MdMYBA* و *mdMYB10* با کنترل سطح آنتوسیانین مسئول توسعه رنگ قرمز می‌باشند. در این مطالعه ضمن جداسازی یک واریانت از ژن *MdMYB10*، با نام *MdMYB10b*، از یک سیب گوشت قرمز بومی ایران الگوی بیانی آن در بافتهای مختلف تعیین شد. این ژن در تمامی بافتهای قرمز گیاه شامل برگ، بذر، پوست و گوشت میوه بیان شد در حالی که در رقم کنترل(گوشت سفید) هیچ بیانی مشاهده نشد. با توجه به نتایج این مطالعه و بررسی بیوانفورماتیکی ژنهای مسئول رنگ قرمز و نیز استفاده از توالی کامل ژنوم سیب پیشنهاد شد که این سه همولوگ MYB(10,1,A) به عنوان آللهای یک لوکوس در نظر گرفته شوند. همچنین یک الگوی بیانی وابسته به بافت و ژنوتیپ ارائه شد که بر این اساس آلل *MdMYB1* و*MdMYBA* در هر دو ژنوتیپ گوشت سفید و قرمز وجود دارد و تنها در پوست عمل می‌کنند در حالی که*MdMYB10* تنها در ژنوتیپ گوشت قرمز موجود بوده و در همه بافتها عملکرد دارد.

واژه‌های کلیدی: آنتوسیانین، آلل، بیان ژن، سیب گوشت قرمز ، رنگ قرمز ، *MdMYB10*.

* نویسنده مسئول، تلفن: ۴۸۲۹۲۰۹۱، پست الکترونیکی: Yadollah@modares.ac.ir

مقدمه

سیب گوشت قرمز ایرانی یکی از گونه های سیب بومی ایران است که بدلیل وجود مقادیر بالای آنتوسیانین در کورتکس، گوشت قرمز رنگ دارد و همین امر سبب تمایز آن از سیب معمولی و ایجاد ظاهر جذاب شده است(۱۸). آنتوسیانین‌ها رنگدانه‌هایی هستند که به عنوان یک ترکیب ثانویه، از فلاونوئیدها مشتق می‌شوند. این ترکیبات به همراه کارتنوئیدها به صورت رنگ دهنده‌های طبیعی در گیاهان ساخته ومسئول طیف وسیعی از رنگها از قبیل نارنجی، آبی، بنفش و قرمز در گل، میوه، بذر و اندامهای رویشی گیاهان می‌باشد (۲).آنتوسیانین نقش مؤثری درجلوگیری ازبیماریهای قلبی،سرطان ودیابت دارد و همچنین در ایجاد مقاومت در مقابل آفات در گیاهان نیز نقش دارند (۱۰ و ۱۱). آنزیمهای مسیر آنتوسیانین (CHS, F3H, DFR, ANS, UFGT) توسط فاکتورهای رونویسی MYB تنظیم می شوند (۷). MYB ها یکی از بزرگترین خانواده‌های ژنی در گیاهان است که دارای یک تا سه تکرار محافظت شده (R1، R2، R3) در دمین متصل شونده به DNA بوده و اغلب با فاکتورهای رونویسی bHLH

همکاری می‌کنند (۸ و ۱۲).در گیاه آرابیدوپسیس (*Arabidopsis thaliana*) ۱۲۵ ژن MYB شناسایی شده که ژنهای *AtMYB75* و *AtMYB90*در تنظیم آنتوسیانین دخالت دارند (۱۵). در انگور (*Vitisvenifera*) ژنهای *VvMYBA1* و *VvMYBA2* در کنترل آنتوسیانین نقش دارند (۹ و ۱۸). در بسیاری از گیاهان دیگر ژنهای MYB به عنوان تنظیم کننده‌های آنتوسیانین نقش مؤثری در ایجاد رنگ دارند (۱۳). در سیب ژنهای *MdMYB1* و *MdMYBA* به عنوان مسئول ایجاد رنگ قرمز در پوست شناسایی شده‌اند (۱ و ۱۶). همچنین ژن *MdMYB10* که در بافت گوشت میوه بیان می‌شود کنترل رنگ قرمز در این بافت را بر عهده دارد (۴). وجود یک توالی ماهواره‌ای در ناحیه پیشبرنده این ژن سبب افزایش سطح رونویسی آن در بافت گوشت شده است (۳).

تعدادی از ارقام سیب وجود دارد که رنگ گوشت (ناحیه بین پوست میوه و هسته) آنها قرمز است و دارای مقادیر زیادی آنتوسیانین است و به صورت وحشی در جنگلهای آسیای مرکزی رشد می‌کند که از جمله این ارقام می‌توان به MaluspumilavarNiedzwetzkyana اشاره کرد. در واقع تجمع رنگیزه آنتوسیانین یا کاروتنوئید در کورتکس سیبهای گوشت قرمز، وجه تمایز آن با سیبهای گوشت سفید در نظر گرفته می شود. امروزه توجه زیادی به ارقام گوشت قرمز سیب در دنیا شده است زیرا به اثبات رسیده است که این ارقام خاصیت آنتی‌اکسیدانتی بسیار بالاتری نسبت به سیبهای معمولی دارند. تعدادی از ارقام سیب گوشت قرمز در چند منطقه مختلف از ایران وجود دارد که تاکنون هیچ بررسی مولکولی از نقطه نظر این صفت بر روی آنها انجام نشده است. به منظور جداسازی و تعیین توالی فاکتور رونویسی MYB10 (ژنی که به عنوان عامل تنظیم کننده آنتوسیانین در سیب گزارش شده است) و امکان استفاده این ژن در پروژه های انتقال ژن و همچنین بررسی میزان شباهت با همولگهای گزارش شده واریته‌های خارجی و نیز مطالعه الگوی بیان این ژن در بافتهای مختلف واریته سیب گوشت قرمز این پژوهش انجام شد.

مواد و روشها

جمع آوری مواد گیاهی: در اردیبهشت ۱۳۸۸ عملیات نمونه‌گیری از درختان سیب صورت گرفت. نمونه ها از کلکسیون درختان میوه کمال‌آباد وابسته به مؤسسه اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج انتخاب گردید. برای استخراج RNA و DNA برگهای جوان سرشاخه‌ها در ابتدای فصل رشد انتخاب و بلافاصله در ازت مایع منجمد گردید. جهت استخراج RNA، بافتهای برگ، بذر، پوست و گوشت میوه در مرحله رسیدگی (DAF ۱۰۲برای B.9 و ۱۲۰DAF برای خوانساری) تهیه و بلافاصله خرد و در ازت مایع فریز شد. تمامی نمونه ها برای نگهداری بلندمدت در دمای ۸۰- نگهداری شدند. آزمایشها بر روی کولتیوار B.9که دارای فنوتیپ گوشت قرمز و رقم خوانساری که دارای فنوتیپ گوشت سفید بود، انجام شد.

استخراج RNA و ساخت cDNA: استخراج RNA از ۵۰۰ میلی‌گرم بافت هدف مطابق روش گاسیک و همکاران انجام شد (۶). ساخت cDNA با استفاده از ۳۵۰ نانوگرم RNA کل در حجم ۲۰ میکرولیتر شامل ۴۰ واحد از آنزیم M-Mulv، بافر ۵x، ۲۰ واحد از RiboLock™ Rnase inhibitor، ۱۰ میلی‌مول از dNTPs، در دمای ۴۲ درجه سانتی گراد به مدت ۹۰ دقیقه انجام شد و در نهایت به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی گراد انکوبه شد. آغازگرهای اختصاصی مورد استفاده جهت جداسازی و بررسی بیان ژن MYB10 شامل Forward (5′- ATGGAGGGATATAACGAAAACC) و Revers (5′-TTCTTCTTTTGAATGATTCCA) بودند. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل بافر ۱۰x، ۱۰ میلی مولار از dNTPs ، ۴۰ میلی مولار از $MgCl_2$، ۵ میکرومولار از هر آغازگر و ۱ واحد از آنزیم تک‌پلیمراز (سیناژن) انجام شد. مراحل PCR شامل واسرشته سازی

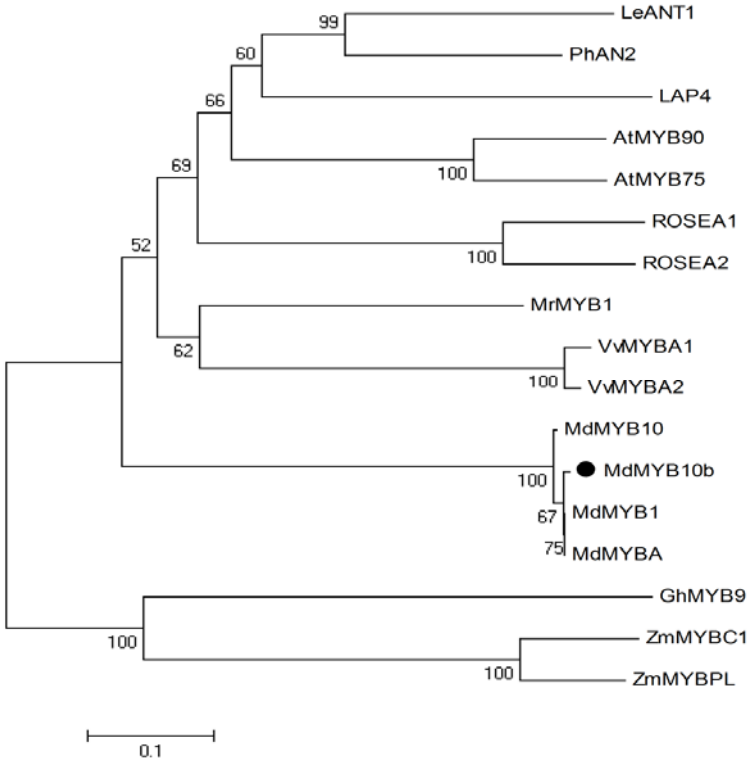
اولیه در ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۴ دقیقه، ۳۵ چرخه (۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۴۰ ثانیه، ۵۷ درجه به مدت ۴۰ ثانیه و ۷۲ درجه به مدت ۶۰ ثانیه) و در نهایت در ۷۲ درجه به مدت ۱۵ دقیقه بود. محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. الکتروفورز محصولات بر روی ژل آگارز ۱ درصد صورت گرفت و سپس رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید انجام شد.

بررسی و آنالیز: طراحی پرایمرها استفاده از نرم افزار Primer3 و نیز وب سایت http://eu.idtdna.com انجام شد. بررسی همردیفی توالیها توسط Clustal W (www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2) و ترسیم درخت فیلوژنی با استفاده از نرم افزار Genetics Analysis (MEGA4)Molecular Evolutionary، نسخه ۴/۰/۲ و استفاده از متد neighbor-joining صورت گرفت.همچنین جستجوی blast بر روی توالی کامل ژنوم سیب با استفاده از وب سایت http://www.rosaceae.org انجام شد.

نتایج

جداسازی یک واریانت ژن*MdMYB10* : ژن *MdMYB10* در سنتز آنتوسیانین در گوشت میوه سیب دخالت دارد. به منظور جداسازی این ژن در ابتدا total cDNA از بافت گوشت قرمز سیب (*Malus ×domestica*, cv. B.9) تهیه و سپس با استفاده از آغازگرهای اختصاصی یک کلون ۷۲۹bp تکثیر و توالی یابی شد.این ژن یک پروتئین ۲۴۳ اسید آمینه‌ای را کد می‌کند که حاوی دو دمین R1 و R2 می‌باشد. بررسی هم ردیفی توالی اسیدآمینه آن با ژنهای گزارش شده دخیل در رنگ قرمز سیب نشان داد که مشابهت بالایی (۹۹درصد) وجود دارد که به ترتیب یک اسیدآمینه با*MdMYB10A* و*MdMYB1* و دو اسیدآمینه با*MdMYB10* تفاوت دارد(شکل ۱). این ژن به عنوان یک واریانت از *MdMYB10* و مسئول رنگ قرمز گوشت میوه، با نام *MdMYB10b* ثبت گردید (AB592747.1).

الف)



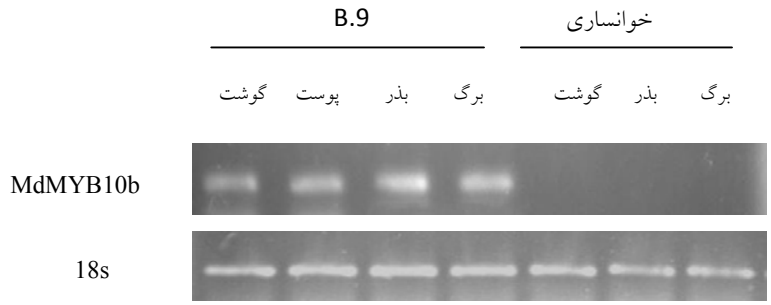
ب)

```
MdMYB1          ---MEGYNENLSVRKGAWTREEDNLLRQCVEIHGEGKWNQVSYKAGLNRCRKSCRQRWLN 57
MdMYBA          ---MEGYNENLSVRKGAWTREEDNLLRQCVEIHGEGKWNQVSYKAGLNRCRKSCRQRWLN 57
MdMYB10b        ---MEGYNENLSVRKGAWTREEDNLLRQCVEIHGEGKWNQVSYKAGLNRCRKSCRQRWLN 57
MdMYB10         ---MEGYNENLSVRKGAWTREEDNLLRQCVEIHGEGKWNQVSYKAGLNRCRKSCRLRWLN 57
VvMYBA1         ---ME----SLGVRKGAWIQEEDVLLRKCIEKYGEGKWHLVPLRAGLNRCRKSCRLRWLN 53
VvMYBA2         ---MK----SLGVRKGAWTQEEDVLLRKCIEKYGEGKWHLVPLRAGLNRCLKSCRLRWLN 53
MrMYB1          ---MEG---SLGVRKGAWTVEEDTLLKLYIEKYGEGKWHQVPPRAGLNRCRKSCRLRWLN 54
ROSEA1          ---MEK--NCRGVRKGTWTKEEDTLLRQCIEEYGEGKWHQVPHRAGLNRCRKSCRLRWLN 55
ROSEA2          ---MQK--NPRGVRKGTWTKEEDILLMECIDKYGEGKWHQVPLKAGLNRCRKSCRLRWLN 55
AtMYB90         ---MEG--SSKGLRKGAWTAEEDSLLRLCIDKYGEGKWHQVPLRAGLNRCRKSCRLRWLN 55
AtMYB75         ---MEG--SSKGLRKGAWTTEEDSLLRQCINKYGEGKWHQVPVRAGLNRCRKSCRLRWLN 55
LeANT1          --------------KGSWTDEEDFLLRKCIDKYGEGKWHLVPIRAGLNRCRKSCRLRWLN 46
PhAN2           MSTSNA--SSSGVRKGAWTEEEDLLLRECIEKYGEGKWHLVPVRAGLNRCRKSCRLRWLN 58
LAP4            --MEKC--KTRGVRKGAWTYEEDKLLKACMQKYGEGKWHLVPQRAGLNRCRKSCRLRWLN 56
ZmMYBC1         -MGRRACCAKEGVKRGAWTSKEDDALAAYVKAHGEGKWREVPQKAGLRRCGKSCRLRWLN 59
ZmMYBPL         -MGRRACCAKEGVKRGAWTAKEDDTLAAYVKAHGEGKWREVPQKAGLRRCGKSCRLRWLN 59
GhMYB9          -MGRSPCCEKAHTNKGAWTKEEDDRLIAYIRAHGEGCWRSLPKAAGLLRCGKSCRLRWIN 59
                              :*:*  :**  *   :  :*** *. :.  *** ** **** **:*

MdMYB1          YLKPNIKRGDFKEDEVDLIIRLHRLLGNRWSLIARRLPGRTANAVKNYWNTRLRID--S- 114
MdMYBA          YLKPNIKRGDFKEDEVDLIIRLHRLLGNRWSLIARRLPGRTANAVKNYWNTRLRID--S- 114
MdMYB10b        YLKPNIKRGDFKEDEVDLIIRLHRLLGNRWSLIARRLPGRTANAVKNYWNTRLRID--S- 114
MdMYB10         YLKPNIKRGDFKEDEVDLIIRLHRLLGNRWSLIARRLPGRTANAVKNYWNTRLRID--S- 114
VvMYBA1         YLKPDIKRGEFALDEVDLMIRLHNLLGNRWSLIAGRLPGRTANDVKNYWHSHHFKKKVQ- 112
VvMYBA2         YLKPDIKRGEFALDEVDLMIRLHNLLGNRWSLIAGRLPGRTANDVKNYWHGHHLKKKVQ- 112
MrMYB1          YLKPNIKRGEFKADEVDLMIRLHKLLGNRWSMIAGRLPGRTANDVKNYWNTHLRKNAIS- 113
ROSEA1          YLRPNIKRGRFSRDEVDLIVRLHKLLGNKWSLIAGRIPGRTANDVKNFWNTHVGKNLGE- 114
ROSEA2          YLRPNIKRGCFSKDEVDLIVRLHKLLGNKWSLIAGRIPGRTANDVKNFWNTHVGKNLGV- 114
AtMYB90         YLKPSIKRGRLSNDEVDLLLRLHKLLGNRWSLIAGRLPGRTANDVKNYWNTHLSKKHESS 115
AtMYB75         YLKPSIKRGKLSSDEVDLLLRLHRLLGNRWSLIAGRLPGRTANDVKNYWNTHLSKKHEP- 114
LeANT1          YLRPHIKRGDFEQDEVDLILRLHKLLGNRWSLIAGRLPGRTANDVKNYWNTNLLRKLNT- 105
PhAN2           YLRPHIKRGDFSLDEVDLILRLHKLLGNRWSLIAGRLPGRTANDVKNYWNTHLRKKLIA- 117
LAP4            YLNPTINRESFSEDEVDMILRLHKLLGNRWSLIAARLPGRTANDVKNYWHTHLRKKMVS- 115
ZmMYBC1         YLRPNIRRGNISYDEEDLIIRLHRLLGNRWSLIAGRLPGRTDNEIKNYWNSTLGRRAGA- 118
ZmMYBPL         YLRPNIKRGNISYDEEDLIVRLHKLLGNRWSLIAGRLPGRTDNEIKNYWNSTLGRRA--- 116
GhMYB9          YLRPDLKRGNFTEEEDELIIKLHSLLGNKWSLIAGRLPGRTDNEIKNYWNTHIRRKLLS- 118
                **.* :.*  :  :* :::::** ****:**:** *:**** * :**:*:

MdMYB1          -------RMKTVKNKSQEMRKTNVIRPQPQKFNRSSYYLSSK----------EPILDHIQ 157
MdMYBA          -------RMKTVKNKSQEMRKTNVIRPQPQKFNRSSYYLSSK----------EPILDHIQ 157
MdMYB10b        -------RMKTVKNKSQEMRETNVIRPQPQKFNRSSYYLSSK----------EPILDHIQ 157
MdMYB10         -------RMKTVKNKSQEMRETNVIRPQPQKFNRSSYYLSSK----------EPILDHIQ 157
VvMYBA1         -------FQKEGRDKPQTHSKTKAIKPHPHKFSKALPRFELK----------TTAVDTFD 155
VvMYBA2         -------FQEEGRKKPQTHSKTKAIKPHPHKFSKALPRFELK----------TTAVDTFD 155
MrMYB1          -------RIKDGGEKAQQTSKVNIIKPRPRTFAKNLTWFGGKP---------TIMAASFQ 157
ROSEA1          ----DGERCRKNVMNTKTIKLTNIVRPRARTFTGLH--------------VTWPREVGKT 156
ROSEA2          ----DGERRKKNVMNTKNSKETNIIRPRARTFNGLH--------------VTWPREHGKN 156
AtMYB90         CCKSKMKKKNIISPPTTPVQKIGVFKPRPRSFSVN--NGCSHLN--GLPEVDLIPSCLGL 171
AtMYB75         CCKIKMKKRDITPIPTTPALKNNVYKPRPRSFTVN--NDCNHLN--APPKVDVNPPCLGL 170
LeANT1          --TKIVPREKINNKCGEISTKIEIIKPQRRKYFSSTMKNVTNNN------VILDEEEHCK 157
PhAN2           --PHDQKQE-SKNKAMKITEN-NIIKPRPRTFSRPAMNHVSCWNGKSCSKNTIDKNEGDT 173
LAP4            --RKEEKKE--NEKPKESMQTHEVIKPQPRTFSSHSPWLNGKYNNFVTPIVTVSTNDGNV 171
ZmMYBC1         GAGAGGSWVVVAPDTGSHATPAATSGACETGQNSAAHRADPDSAGTTTTSAAAVWAPKAV 178
ZmMYBPL         ----GGSRVVFAPDTGSHATPAAGSREMTGGQKGAAPRADLGSP----ASAAVVWAPKAA 168
GhMYB9          RGIDPATHRPLN-EASQDVTTISFSGAKEEKEKINTNSNNNPIGFITKDEKKIPVQERCP 177

MdMYB1          SAEDLST-PPQTSSSTKNGNDWWETLLEG-EDTFERAAYPSIELEEELFTSFWFDDRLSP 215
MdMYBA          SAEDLST-PPQTSSSTKNGNDWWETLLEG-EDTFERAAYPSIELEEELFTSFWFDDRLSP 215
MdMYB10b        SAEDLST-PPQTSSSTKNGNDWWETLLEG-EDTFERAAYPSIELEEELFTSFWFDDRLSP 215
MdMYB10         SAEDLST-PPQTSSSTKNGNDWWETLLEG-EDTFERAAYPSIELEEELFTSFWFDDRLSP 215
VvMYBA1         TQVSTSSKPSSASPQPNDGIIWWESLLAEHAQMDQETDFSASG--EVLIASL-WTEETAT 212
VvMYBA2         TQVSTSSKPSSTSPQPNDDIIWWESLLAEHAQMDQETDFSASG--EMLIASL-WTEETAT 212
MrMYB1          PKDNVISDLPPAPLPSENSVKWGENLFDDKEAGDEIGTYDVGGLNEEPIATFRWAEAAPA 217
ROSEA1          DEFSNVRLT-TDEIPDCEKQTQFYNDVASPQDEVEDCIQWWSK-------LLETTEDGEL 208
ROSEA2          DAFSNVRITSTTENLDYEKQKPFHNNVASTPEEVDESIRWWSN-------LLETTED-EL 208
AtMYB90         KKNNVCENSITCNKD-DEKDDFVNNLMNGDNMWLENLLGENQE----ADAIVPEATTAEH 226
AtMYB75         NINNVCDNSIIYNKD-KKKDQLVNNLIDGDNMWLEKFLEESQE----VDILVPEATTTEK 225
LeANT1          EIIS---EKQTPDASMDNVDPWWINLLENCNDDIEEDEEVVINYEKTLTSLLHEEISPPL 214
PhAN2           EIIKFSDEKQKPEESIDDGLQWWANLLANN---IEIEELVSYN----SPTLLHEETAPSV 226
LAP4            AKDSEVDTILPINGDGDSAAQPYLENPTLSSMWWESLLNVSNDKIGSCSLLLPEEYS-KL 230
```

```
ZmMYBC1        RCTGGLFFFHRDTTPAHAGETATPMAGGGGGGGGEAGSSDDCSSAASVSLRVG-SHDEPC 237
ZmMYBPL        RCTGGLFFHRRDTHTPHAGGTETPTPMMAGGGGGEARSSDDCSSAASVSPLVGSSQHDPC 228
GhMYB9         DLNLDLRISPPYYQQTQPESFKTGGRTLCFICSLGVKNSKDCT-CSTITTAAGSSSSSSS 236
                                  ↓
MdMYB1         RSCAN---------FPEGQSRS-----------EFSFSTDLWNHSKEE------------ 243
MdMYBA         RSCAN---------FPEGQSRS-----------EFSFSTDLWNHSKEE------------ 243
MdMYB10b       RSCAN---------FPEGQSRS-----------EFSFSTDLWNHSKEE------------ 243
MdMYB10        RSCAN---------FPEGHSRS-----------EFSFSTDLWNHSKEE------------ 243
VvMYBA1        QKKG------PMDGMIEQIQGGE---------GDFPFDVGFWDTPNTQVN---HLI---- 250
VvMYBA2        QKKGTHSKTKAIKPHPHKFSKAL---------PRFELKTTAVDTFDTQVSTSSKLIHVTT 263
MrMYB1         ETVG-----TPLDEFGPSFWA------------EFPSNLDVWDFLDPLDP---------- 250
ROSEA1         GNLFE-------EAQQIG---------------------N-------------------- 220
ROSEA2         ENLFE-------DVQQTG---------------------KMSEW---------------- 224
AtMYB90        GATLA-------FDVEQL-------------------WSLFDGETVELD----------- 249
AtMYB75        GDTLA-------FDVDQL-------------------WSLFDGETVKFD----------- 248
LeANT1         NIGEG-------NSMQQGQISHENWGEFSLNLPPMQQGVQNDDFSAEID-LWNLL----- 261
PhAN2          NAES---------SLTQG-------------------GSGLSDFSVDIDDIWDLLN---- 254
LAP4           NVEN---------FLAEGPSTVG----------DFSWDSTICEFDSLLDDILN------- 264
ZmMYBC1        FSGDG-------DGDWMDDVR---------------ALASFLESDEDWLRCQTAGQLA-- 273
ZmMYBPL        FSGDG-------DGDWMDDVR---------------ALASFLESDEERLRCHTAEQLV-- 264
GhMYB9         HSNSN-------NSSGYDFLG---------------LKSGILEYRSLEMK---------- 264
```

شکل۱- مقایسه توالی اسیدآمینه MdMYB10b با پروتئینهای دیگر MYB. آنالیز فیلوژنی مشابهت MdMYB10b را به دیگرMYBهای مسئول رنگ قرمز سیب نشان می‌دهد. توالی ژنهای MYB از EMBL یا GenBank به دست آمد و شامل Malus ×domestica, MdMYB1 (DQ886414), MdMYB10 (DQ267896), MdMYBA (AB279598.1); Vitis venifera, VvMYBA1 (BAD18977), VvMYBA2 (AB097924); Lycopersicon esculentum, LeANT1 (AAQ55181); Arabidopsis thaliana, AtMYB75 (ABB03879), AtMYB90 (NP176813); Gossypium hirsutum, GhMYB9 (AAQ55181); Zea mays, ZmMYBC1 (AF320614), ZmMYBPL (L19496); Antirrhinum majus, ROSEA1 (ABB83826), ROSEA2 (ABB83827); Morus rubra, MrMYB1 (GQ340767); Medicago truncatula, LAP4 (FJ199997); Petunia hibrida, PhAN2 (AAF66727).. می‌باشد. درخت توسط نرم افزارMolecular EvolutionaryGenetics Analysis (MEGA4)و استفاده از متد neighbor-joining با ۱۰۰۰bootstrap replicates. ب) مقایسه توالی اسید آمینه MdMYB10b با فاکتورهای رونویسی MYB تنظیم کننده آنتوسیانین در گیاهان دیگر. توالیها با استفاده از برنامه Clustal W مقایسه شده است. محل پیکان نشان دهنده اسید آمینه متفاوت در ژنهای MYB در سیب است.

بررسی بیان ژن*MdMYB10b* : تعیین الگوی بیان ژن در بافتهای مختلف سیب با استفاده از RT-PCR مورد بررسی قرار گرفت. همان گونه که در شکل۲ نشان داده شده است در کولتیوار B9 در مرحله رسیدگی بیان این ژن در بذر، برگ، گوشت و پوست میوه قابل مشاهده است. در حالی که در کولتیوار گوشت سفید (خوانساری)که به عنوان نمونه کنترل استفاده گردید، هیچ رونوشتی از ژن ***MdMYB10b*** در هیچ بافتی مشاهده نشد (شکل۲).



شکل ۲- آنالیز بیان MYB10b در بافتهای مختلف دو رقم گوشت قرمز (B.9) و سفید (خوانساری) با استفاده از RT-PCR. چاهک ۱ تا ۴ (از راست) بیان ژن در گوشت، پوست، بذر و برگ در رقم B.9 در اواسط رسیدن را نشان می‌دهد. در رقم خوانساری هیچ بیانی دیده نمی‌شود (چاهک ۴ تا ۷).

بررسی موقعیت و ارتباط ژنهای مسول رنگ قرمز : سه ژن *MdMYB10*، *MdMYB1* و *MdMYBA* به عنوان مسئول رنگ قرمز در سیب معرفی شده است که اولی در گوشت میوه و برگ و دو ژن دیگر در پوست میوه عمل می‌کنند. از آنجا که موقعیت و ارتباط آنها با یکدیگر کاملاً مشخص نشده است و با توجه به مشابهت بالای این سه ژن (بیش از ۹۸ درصد)، یک برنامه PCR طراحی و با استفاده از آنزیم LA Taq polymerase جهت بررسی امکان پیوستگی این ژنها در ژنوم سیب اجرا گردید. همه ترکیبات پرایمری که در نواحی مختلف و مجاورت ژنها طراحی شده بود در برنامه PCR مورد استفاده قرار گرفت که در هیچ کدام از آنها محصولی مشاهده نشد. همچنین جستجو با استفاده از ناحیه پیشبرنده و ORF و cDNA ژن MYB10 و ژنهای همولوگ آن بر روی ژنوم انجام شد. این بررسی نشان داد که تنها یک کانتیگ (MDCO13323.319) به طور کامل مشابهت دارد. طول این کانتیگ ۲۲ kb است و در انتهای کروموزوم شماره ۹ (از نوکلئوتید ۲۹۴۶۵۵۳۸ تا ۲۹۴۸۸۲۶۵) قرار دارد. هیچ کانتیگ دیگری با مشابهت و همپوشانی قابل قبول یافت نشد.

بحث

یک لوکوس به عنوان مسئول رنگ قرمز: طول کامل یک فاکتور رونویسی R2R3-MYB جداسازی و تحت عنوان *MdMYB10b* نامگذاری شد. این ژن که با *MdMYB10*، *MdMYB1* و *MdMYBA* مشابهت بسیار بالایی دارد. همه این ژنها در بیوسنتز آنتوسیانین نقش دارند با این تفاوت که دو ژن *MdMYB1* و *MdMYB1* در پوست (۱ و ۱۶) و ژن *MdMYB10* در گوشت (۴) شناسایی شده است. *MdMYB10b*و *MdMYB10* هر دو در مراحل رسیدگی بیان بالایی در برگ و بافتهای میوه دارند در حالی که *MdMYB1* و *MdMYBA* هر دو در پوست میوه بیان می-شود (۱ و ۱۶). از آنجا که توالی کدکننده MYB1 و MYBA و نیز عملکرد و بافتی که این ژنها در آن بیان می-شود کاملاً یکسان است بنابراین به عنوان یک ژن در نظر گرفته می‌شوند. مشابهت بسیار بالای این ژنها (حدود ۹۹ درصد) و عملکرد یکسان آنها (تنظیم آنتوسیانین در بافتهای قرمز) پیشنهاد می‌کند که این ژنها در واقع آللهای یک ژن باشند. تاکنون هیچ شواهدی مبنی بر استقلال این ژنها گزارش نشده است. از طرف دیگر توالی کامل ژنوم سیب نیز این فرضیه را اثبات می‌کند. با استفاده از توالی ژنوم مشخص گردید که تنها یک ناحیه از ژنوم (کانتیگ MDC013323.319) در انتهای کروموزوم ۹ حاوی ژن MYB(10, A,1) است. همچنین جستجو بر اساس توالی پروتینی نیز تنها یک ناحیه (MDP0000259614) شناسایی گردید که در همان کانتیگ MDC013323.319 واقع است. براین اساس توالیهای دیگری نیز با درصد مشابهت کمتر شناسایی شد که نشان می دهد که احتمالاً ژنهای دیگری از خانواده ژنی MYB نیز در ژنوم سیب وجود دارد. از طرف دیگر در تمامی ارقام گوشت قرمز مورد بررسی در این تحقیق، لوکوس مورد نظر به صورت ناخالص (MYB10/ MYB1) وجود دارد در حالی که همه ارقام گوشت سفید خالص اند (MYB1[A] /MYB1[A]). نتایج بررسی موقعیت و ارتباط ژنهای مسول رنگ قرمز با استفاده از PCR نیز پیشنهاد می‌کند که به احتمال فراوان نه تنها این ژنهای همولوگ پیوستگی ندارند بلکه هیچ گونه نسخه تکراری متوالی از هر ژن نیز در ژنوم وجود ندارد. این نتایج با انتشار توالی کامل سیب (*Malus* ×*domestica* var. Golden delicious) در اواخر ۲۰۱۰ (۱۷) به تأیید رسید. همه شواهد فوق نشان می‌دهد که MYB10، MYB1 و MYBA آللهایی هستند که در یک لوکوس واقع شده و رنگ قرمز را در بافتهای مختلف سیب کنترل می کند. این پیشنهاد اخیراً نیز توسط (۱۴) تأیید شده است.

با وجود مشابهت بالای پیشبرنده و ناحیه کدکننده MYB1[A] و MYB10 اما تنها MYB10 سبب رنگ قرمز در برگها و گوشت میوه می‌شود. اسپلی و همکاران (۲۰۰۷) نشان دادند که القای بیش بیان ژن MYB10 در

برگهای تنباکو سبب تجمع آنتوسیانین شده است (۴). در حالی که انتقال MYBA هیچ اثری بر برگهای تنباکو نداشته است (۱). به نظر می رسد رنگ قرمز در سیب از یک الگوی وابسته به بافت و وابسته به ژنوتیپ تبعیت می کند. بر اساس این الگو در کولتیوارهای سیب پوست قرمز تنها *MdMYB1/MdMYBA* وجود دارد (همان گونه که در توالی ژنوم نشان داده شد) که در پاسخ به نور (۱۶) در پوست بیان شده و سبب رنگ قرمز می‌شود. در حالی که به نظر می رسد که نور برای بیان *MdMYB10* ضروری نبوده و لذا در همه بافتها (گوشت، پوست، بذر و برگ) بیان می‌شود.

منابع

1. Ban, Y., C.Honda., Y.Hatsuyama., M.Igarashi, H.Bessho and T.Moriguchi, 2007. Isolation and functional analysis of a myb transcription factor gene that is a key regulator for the development of red coloration in apple skin. Plant Cell Physiology, 48: 958–970.
2. Castaneda-Ovando, A., M. Pacheco-Hernandez., M. Paez-Hernandez.,J. Rodriguez and C. Galan-Vidal, 2009. Chemical studies of anthocyanins: A review. Food Chemistry, 113: 859–871.
3. Espley, R.V., C.Brendolise., D.Chagne., S.Kutty-Amma., S.Green., R.Volz., J.Putterill., H.J.Schouten., S.E.Gardiner., R.P.Hellens and A.C.Allan, 2009. Multiple repeats of a promoter segment causes transcription factor autoregulation in red apples. The Plant Cell, 21: 168–183.
4. Espley, R.V., R.P.Hellens., J.Putterill., D.E.Stevenson., S.Kutty-Amma andA.C.Allan, 2007. Red colouration in apple fruit is due to the activity of the MYB transcription factor MdMYB10. The Plant Journal, 49: 414–427.
5. Faramarzi S., Yadollahi A., Soltani B.M. and Abdollahi M.R (2011) Evaluation of Genetic Diversity and Relationships among Iranian Red-Fleshed Apples using Microsatellite (SSR) Markers. MSc.Thesis, Tarbiat Modares University.
6. Gasic, K., A.Hernandes and S.S.Korban, 2004. RNA extraction from different apple tissues rich in polyphenols and polysaccharides for cDNA library construction. Plant Molecular Biology Reporter, 22: 437a-437g.
7. Honda, C.,N.Kotoda., M.Wada., S.Kondo., S.Kobayashi., , J.Soejima., Z.Zhang., T.Tsuda and T.Moriguchi, 2002. Anthocyanin biosynthetic genes are coordinately expressed during red coloration in apple skin. Plant Physiology and Biochemistry, 40: 955–962.
8. Jin,Hand C.Martin, 1999. Multifunctionality and diversity within the plant MYB-gene family. Plant Molecular Biology, 41: 577–585.
9. Kobayashi, S., N.Goto-Yamamoto and H.Hirochika, 2004. Retrotransposon-induced mutations in grape skin color. Science 304, 982.
10. Konczak,Iand W. Zhang, 2004. Anthocyanins-more than nature´ s colours. Journal of Biomedicine and Biotechnology, 5: 239–240.
11. Makoi,J.H.J.R., A.K.Belane., S.B.M. Chimphango and F.D.Dakora, 2010. Seed flavonoids and anthocyanins as markers of enhanced plant defence in nodulated cowpea (*Vignaunguiculata*L. Walp.). Field Crops Research, 118: 21-27.
12. Ramsay, N.A and B.J.Glover, 2005. MYB–bHLH–WD40 protein complex and the evolution of cellular diversity. Trends in Plant Science, 10: 63-70.
13. Romero, I., A.Fuertes., M.J.Benito., J.M. Malpica., A. Leyva and J.Paz-Ares, 1998. More than 80 R2R3-MYBregulatory genes in the genome of *Arabidopsis thaliana*. Plant Journal, 14: 273–284.
14. Sekido, K., K.Yamada, K.Shiratake., H.Fukui and S.Matsumoto, 2010.MdMYB alleles responsible for apple skin and flesh color. Current Topics in Plant Biology, 11: 17 – 21.
15. Stracke, R., M.Werber and B.Weisshaar, 2001. The R2R3-MYB gene family in Arabidopsis thaliana. Current Opinion in Plant Biology,4: 447-456.
16. Takos, A.M., F.W.Jaffe., S.R.Jacob., J.Bogs., S.P.Robinson and A.R. Walker,2006. Light-induced expression of a MYB gene regulates anthocyanin biosynthesis in red apples. Plant Physiology, 142: 1216–1232.
17. Velasco, R.,A.Zharkikh., .Affourtit., A.Dhingra., A.Cestaro., A.Kalyanaraman., P. Fontana.,S.KBhatnagar.,M.Troggio.,D.Pruss and S.Salvi,et al., 2010. The genome of the domesticated apple (*Malus* × *domestica*Borkh.). Nature Genetics, 42: 833–839.
18. Walker, A.R., E.Lee., J.Bogs., , D.A.J. McDavid., M.R.Thomas and S.P.Robi, 2007. White grapes arose through the mutation of two similar and adjacent regulatory genes. The Plant Journal, 49: 772–785.

Isolation and expression analysis of the variant MdMYB10b in the red flesh apple genotype and study of allelism of the genes responsible for red color in apple

Mahmoudi E.[1], Yadollahi A.[2] and Mohammad Soltani B.[3]

[1] Agricultural Biotechnology Dept., Tarbiat Modares University, Tehran, I.R. of Iran

[2] Horticultural Sciences Dept., Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, I.R. of Iran

[3] Genetics Dept., Faculty of Biological Science, Tarbiat Modares University, Tehran, I.R. of Iran

Abstract

MYB gene family as one of the largest transcription factors in plants has a wide range of roles. One the most important functions of these genes is to regulate the anthocyanin level in different tissues. In apple (Malus ×domestica), three genes MdMYB1, MdMYBA and MdMYB10 are responsible for developing red color by controlling anthocyanin level. In this study a variant of MdMYB10, named MdMYB10b, was isolated from an Iranian domestic red flesh apple and its expression pattern in various tissues was described. This gene was expressed in all red tissues of the plant including leaves, seed, fruit skin and flesh while no expression was detected in the control cultivar. These results coupled with bioinformatics examination of the genes which regulate anthocyanin in apple suggested that three MYBs (10,1,A) are alleles of one locus. Furthermore, a specific expression pattern was presented based on this model: Alleles MdMYB1and MdMYBA are located in both red and white flesh genotypes and function only in the skin while MdMYB10 is located merely in red flesh genotype and function in all tissues .

Key words: Anthocyanin, Allele, Gene expression, Red Flesh apple, Red color , MdMYB10