ژنتیک نوین
دوره هشتم، شماره ۱، بهار۱۳۹۲
صفحه ۵۸- ۴۷

مطالعه عملکرد ژن *AT1G77640* در آرابیدوپسیس

Functional analysis of *AT1G77640* in *Arabidopsis*

فاطمه دهقان‌نیری*[۱]، مسعود سلطانی‌نجف‌آبادی[۲]

۱- استادیار دانشگاه بین‌المللی امام خمینی، قزوین
۲- استادیار موسسه اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج

Dehghan nayeri F[*1], Soltani Najafabadi M[2]

1.Assistant Professor, Imam Khomeini International University, Faculty of Engineering, Qazvin.
2.Assistant Professor, Seed and Plant Improvement Research Institute, Karaj

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی:nayeri@ut.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۰/۱۰/۵ - تاریخ پذیرش: ۹۱/۳/۲۳)

چکیده

عوامل رونویسی، تنظیم کننده‌های مهم بیان ژن در فرآیندهای زیستی هستند و در علم ژنتیک از اهمیت زیادی برخوردار می‌باشند. براساس نتایج شناسایی عوامل رونویسی دخیل در چرخه سلولی به کمک روش qRT-PCR، ژن *AT1G77640* متعلق به خانواده عوامل رونویسی AP2، در تنظیم چرخه سلولی در آرابیدوپسیس دخالت دارد. الگوی بیان ژن *AT1G77640* طی مراحل مختلف چرخه سلولی نوسان دارد و سطح بیان آن در سوسپانسیون سلولی آرابیدوپسیس طی مراحل G2 و M کاهش می یابد. در این تحقیق جهت بررسی نقش ژن *AT1G77640* در رشد و نمو گیاه آرابیدوپسیس، عملکرد این ژن از طریق افزایش و کاهش سطح بیان آن مورد مطالعه قرار گرفت. درگیاهان تراریخته با افزایش سطح بیان ژن *AT1G77640*، کاهش میزان تولید بذر مشاهده شد. افزایش سطح بیان این ژن تعداد و اندازه سلول های برگ را نیز تحت تأثیر قرار داد. همچنین الگوی مکانی تظاهر این ژن با بررسی های بافت شناسی و تجزیه گیاهان تراریخته *GUS* و داده های میکرواری موجود در بانک های اطلاعاتی مطالعه شد بطوریکه تعیین میزان بیان ژن *AT1G77640* بوسیله qRT-PCR و نیز تعیین الگوی مکانی آن در گیاهان تراریخته راه‌انداز *GUS*-، بالا بودن میزان تظاهر این ژن را در آوندها، مریستم انتهایی ساقه، کوتیلدون، هیپوکوتیل و قسمت هایی از اندام های زایشی نشان داد. بطور کلی به نظر می‌رسد افزایش بیان *AT1G77640* بیش از میزان طبیعی بیان آن در گیاه، اثر منفی براندام های زایشی داشته است.

واژه‌های کلیدی

آرابیدوپسیس، چرخه سلولی، ژن *AT1G77640*، عوامل رونویسی AP2، نمو برگ

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

رونویسی در یوکاریوت‌ها توسط پروتئین‌های متعددی شامل عوامل عمومی دخیل در رونویسی، عوامل رونویسی متصل شونده به توالی‌های خاص DNA، کوفاکتورها و پروتئین‌های وابسته به کروماتین تنظیم می شود. عوامل رونویسی که اثر خود را از طریق برهم کنش با پروتئین‌های دیگر اعمال می‌کنند دارای دو دامین (domain) یکی مسئول اتصال به DNA و دامین دیگر (دامین فعال‌کننده) مسئول برهم‌کنش با سایر پروتئین‌ها می‌باشند. عوامل رونویسی براساس دامین متصل‌شونده به DNA، به خانواده‌های مختلفی تقسیم‌بندی می‌شوند (Rando 2007). در گیاهان، نسبت ژنومی ژن‌های رمزکننده عوامل رونویسی بیشتر از جانوران است که این به پیچیدگی متابولیسم ثانویه گیاه و واکنش‌های محیطی پیچیده لازم برای نوع زندگی گیاه بستگی دارد (Riechmann et al. 2000). در گیاه مدل آرابیدوپسیس ژن‌های رمزکننده عوامل رونویسی ۶ درصد کل ژن‌ها را بخود اختصاص می‌دهند (Riano-Pachon et al. 2007). خانواده عوامل رونویسی AP2/EREBP یکی از بزرگترین خانواده‌های عوامل رونویسی در سلسله گیاهان است که دارای ۱۴۶ عضو در آرابیدوپسیس می‌باشد (Goremykin and Moser 2009). پروتئین‌های این خانواده دارای یک یا دو دامین AP2 هستند که وظایف متعددی در پدیده‌های نموی و فیزیولوژیکی دارند.

یکی از چالش‌های اصلی بیولوژی، شناخت مکانیزم تنظیم بیان ژن است که با تغییر ساختار کروماتین و بطور عمده فعالیت عوامل رونویسی صورت می‌گیرد. عوامل رونویسی با اتصال به توالی‌های نوکلئوتیدی کوتاه و اغلب اختصاصی (موتیف[1]) در توالی‌های بالادست ژن‌های هدف خود (ناحیه راه‌انداز ژن) منجر به فعالیت یا عدم فعالیت این ژن‌ها می‌شوند (Kankainen and Holm 2004) . در شناسایی ژن‌های هدف عامل رونویسی نیز از روش های فعال سازی[2] و بازدارندگی[3] تظاهر عامل رونویسی استفاده می‌شود (Zhang 2003). فعال‌سازی یک ژن از طریق افزایش بیان دائم یا موقت آن توسط یک راه‌انداز قوی و فعال در همه بافت‌های گیاه به عنوان مثال، راه‌انداز ویروس موزائیک کلم (35S) صورت می‌گیرد. غیرفعال کردن یک ژن نیز مانند افزایش بیان آن بطور دائم یا موقت و در سطوح مختلف امکان‌پذیر است. از ایجاد جهش در ژن برای تولید و غربال فنوتیپ‌های موردنظر استفاده می‌شود. بعنوان مثال، نمونه های موجود در کلکسیون‌های T-DNA گیاهی شامل SALK (http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress) و GABI-KAT (http://www.gabi-kat.de) حاصل ایجاد جهش در ژن توسط انتقال T-DNA به آن می‌باشند (Alonso et al. 2003 و Strizhov et al. 2003). در مقابل از بین بردن کامل فعالیت ژن، سطوح مختلف بازدارندگی بیان ژن شامل بازدارندگی دائمی یا القایی نیز وجود دارند که با تکنیک RNAi[4] و یا تکنیک جدیدتر micro RNA بدست می‌آیند. مزیت اصلی این روش‌ها کاهش بیان ژن‌های اصلی و هدف قرار دادن ژن‌های همولوگ آنها می‌باشد (Chuang and Meyerowitz 2000 و Schwab et al. 2006).

براساس نتایج مطالعه قبلی ما در مورد عوامل رونویسی دخیل در چرخه سلولی در گیاهان (نتایج منتشر نشده است) و نیز داده‌های روش ریزآرایه، ژن *AT1G77640* در تنظیم چرخه سلولی دخالت دارد بطوریکه طی چرخه سلولی، *AT1G77640* در آخر مرحله G2 و مرحله M کاهش سطح بیان نشان داد. در بررسی منابع مشخص شد که تاکنون مطالعه‌ای در زمینه نقش ژن *AT1G77640* در رشد و نمو آرابیدوپسیس صورت نگرفته است. هدف از این تحقیق، مطالعه عملکرد ژن *AT1G77640* در گیاه مدل آرابیدوپسیس بویژه نقش آن در فرآیند نمو برگ در این گیاه می‌باشد.

مواد و روش‌ها

شرایط کشت باکتری و گیاه

باکتری اشرشیاکولای (*E. coli*) در محیط LB و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و آگروباکتریوم در محیط YEB و دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد براساس روش Sambrook et al. (2001) کشت شدند.

[1] Motif
[2] Activation
[3] Suppression
[4] RNA interference

Archive of SID
www.SID.ir

بذور آرابیدوپسیس در اتاقک رشد با طول روز ۱۶ ساعت، مجهز به نور فلورسنت با شدت ۸۰ یا ۱۲۰ $\mu mol\ m^{-2}s^{-1}$، دمای روز/ شب ۲۰/۱۶ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۶۰/۷۵ درصد کاشته شدند. شرایط کشت روز کوتاه شامل ۸ ساعت طول روز، با نور فلورسنت با شدت ۱۵۰ $\mu mol\ m^{-2}s^{-1}$ و دمای روز/ شب ۲۰/۱۸ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۶۰/۷۵ درصد بود. در کشت بافت، گیاهچه‌ها در محیط ۱/۲ موراشیک و اسکوگ (0.5 MS) غنی شده با یک درصد ساکارز و جامد شده توسط ۰/۷ درصد آگار تحت رژیم ۱۶ ساعت روز (۱۴۰ $\mu molm^{-2}s^{-1}$) و ۸ ساعت شب در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد کاشته شدند. برای آزمایش بررسی طول ریشه‌ها، گیاهان در بستر آگار یک درصد در پتری‌های مربعی و بطور عمودی تحت شرایط مذکور کاشته شدند. انتقال ژن به آرابیدوپسیس توسط نژاد GV3101 آگروباکتریوم و از طریق روش غوطه‌ور کردن گل (Floral dip) صورت گرفت.

استخراج RNA و ساخت cDNA

RNA کل براساس روش ترایزول (Invitrogen, Germany) استخراج شد. غلظت RNA استخراج شده با استفاده از اسپکتروفتومتر و کیفیت آن با استفاده از ژل یک درصد آگارز واسرشته‌ساز (حاوی فرمالدئید) بررسی شد. بقایای DNA ژنومی موجود در نمونه‌های RNA با *DNase*I عاری از *RNase* (Roche, Mannheim, Germany) هضم شد. نمونه‌های RNA پس از هضم، مجددا مورد ارزیابی کیفی و کمی (به ترتیب با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز واسرشته‌ساز و اسپکتروفتومتر) قرار گرفتند. وجود یا عدم وجود بقایای DNA ژنومی در نمونه‌های RNA تیمار شده با *DNase*I به‌وسیله qRT-PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی یک اینترون (Skirycz et al. 2007) دارای توالی‌های رفت و برگشت به ترتیب 5' - AACAGCAACAACAATGCAACTACTGATT - 3' و 5' - ACAAACAGAGACAAGAGACAAGACATGG - 3' مربوط به ژن *late elongated hypocotyl* بررسی شد و نمونه‌های دارای DNA ژنومی مجددا مورد هضم آنزیمی قرار گرفتند. mRNA موجود در نمونه‌های فاقد DNA ژنومی، توسط آنزیم رونوشت‌بردار معکوس (Invitrogen, Germany, Super script III reverse transcriptase kit) به cDNA تبدیل شد. غلظت cDNA ساخته شده بوسیله qRT-PCR و به ترتیب با استفاده از آغازگرهای اختصاصی *UBQ10* دارای توالی‌های رفت و برگشت 5'- GGCCTTGTATAATCCCTGATGAATAAG - 3' و 5'- AAAGAGATAACAGGAACGGAAACATAGT - 3' مورد ارزیابی قرار گرفت. کیفیت cDNA با استفاده از دو جفت آغازگر مربوط به دو انتهای ژن *GAPDH* دارای توالی‌های رفت و برگشت 5'- TTGGTGACAACAGGTCAAGCA - 3' و 5' - TCTCGATCTCAATTTCGCAAAA - 3' 5' - AAACTTGTCGCTCAATGCAATC - 3' و 5' - CGAAACCGTTGATTCCGATTC - 3' بررسی شد.

qRT-PCR

واکنش qRT-PCR در حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر با استفاده از پنج میکرولیتر معرف SYBR Green (Applied Biosystems, Fostercity, CA)، چهار میکرولیتر جفت آغازگر (۰/۵ میکرومولار) و یک میکرولیتر الگو (cDNA یا RNA کل)، در دستگاه ABI PRISM 7900 HT انجام شد. تجزیه داده‌های qRT-PCR با استفاده از نرم‌افزار SDS 2.2.1 (Applied Biosystems) و بررسی الگوی تظاهر ژن‌ها با استفاده از نرم‌افزار Excel صورت گرفت. نرمال‌سازی داده‌های qRT-PCR با استفاده از ژن مرجع *UBQ10* و طبق رابطه شماره یک انجام شد.(C_T ژن − C_T *UBQ10* = ΔC_T ژن :رابطه شماره یک) تغییر سطح تظاهر (C_T) ژن پس از نرمال‌سازی (یا ΔC_T) با استفاده از ΔC_T ژن در لاین شاهد طبق رابطه شماره دو محاسبه و بصورت FC (Fold change یا $-\Delta\Delta C_T$) ارائه شد. C_T عبارت است از تعداد چرخه‌ای که تغییر مقدار سیگنال فلورسنت SYBR Green طی فاز نمایی تکثیر DNA در واکنش PCR به یک مقدار مشخص برسد. (ژن در لاین شاهد $-\Delta C_T$ ژن در لاین تراریخته ΔC_T = ژن $-\Delta\Delta C_T$:رابطه شماره دو) (Skirycz et al. 2007).

تهیه سازواره‌ها[1]

سازواره 35S:*AT1G77640*

از جمله روش‌های شناسایی فعالیت یک ژن فعال‌سازی آن ژن از طریق افزایش بیان آن در همه بافت‌های گیاهی می‌باشد. بدین

[1] Constructs

Archive of SID
www.SID.ir

منظور ناحیه رمز کننده (CDS) ژن *AT1G77640* دارای ۷۳۴ جفت باز با استفاده از cDNA برگ آرابیدوپسیس کولتیوار Col-0 به عنوان الگو و آنزیم *DNA Pfu* پلیمراز بوسیله PCR تکثیر شد. توالی آغازگرهای رفت و برگشت به ترتیب - 5' GTTTAAACATGGTGAAACAAGAACTCAAGA - 3' 5' -TTAATTAATTAATTAATTAACTGAAACTCCA - 3' (جایگاه برشی *Pme*I و *Pac*I با خط مشخص شده است) بود. قطعه تکثیر شده پس از جداسازی از روی ژل در پلاسمید pCR-Blunt II-TOPO همسانه سازی شد. پس از تأیید توالی قطعه درج شده در پلاسمید مذکور بوسیله توالی‌یابی، قطعه موردنظر از طریق جایگاه‌های برشی *Pme*I/*Pac*I در پلاسمید pGreen0229 دارای راه‌اندازهای مضاعف 35S، ژن *Bar*، ژن *Npt*II و جایگاه‌های برشی *Pme*I/*Pac*I همسانه‌سازی شد. ژن *Bar* نشانگر انتخابی برای تراریزش گیاهان است، سلول‌های تراریخته و گیاهان بیان کننده این ژن به علف‌کش Basta مقاومت نشان می‌دهند. *Npt*II ژن مقاومت به کنامایسین، نشانگر انتخابی برای باکتری‌های تراریخته می‌باشد. وجود قطعه موردنظر و جهت قرار گرفتن آن در پلاسمید pGreen0229 توسط آنزیم‌های برشی تأیید شد. پلاسمید حاوی ژن *AT1G77640* به آگروباکتریوم انتقال داده شد. انتقال پلاسمید حاوی ژن به آگروباکتریوم با PCR تأیید شد. سازواره *AT1G77640* Promoter:*GUS*

جهت بررسی الگوی مکانی تظاهر *AT1G77640* از تجزیه گیاهان تراریخته *GUS* استفاده شد. برای این منظور ۱/۵ کیلوباز از ناحیه راه‌انداز ژن *AT1G77640* (از قسمت بالادست کدون آغاز ATG) با استفاده از DNA ژنومی برگ آرابیدوپسیس کولتیوار Col-0 به‌عنوان الگو، آنزیم *DNA Taq* پلیمراز و آغازگرهای رفت و برگشت 5'-TCTAGAGTTGAAGTGATTAATTCACTCAC 5'-CCATGGGTTATGTTGTAATGTTGTTATTGAC - -3' 3' (جایگاه برشی *Xba*I و *Nco*I با خط مشخص شده است) بوسیله PCR تکثیر شد. قطعه تکثیر شده در پلاسمید pCR2.1 همسانه‌سازی شد و پس از تأیید توالی، از طریق جایگاه‌های برشی *Xba*I/*Nco*I بجای راه‌انداز ژن *GUS* در پلاسمید pCAMBIA1305.1 دارای ژن‌های *Npt*II و *Hpt*II (به‌ترتیب، ژن‌های مقاومت به کانامایسین و هایگرومایسین برای انتخاب باکتری‌ها و گیاهان تراریخته) و ژن *GUS* همسانه سازی شد. وجود قطعه موردنظر و جهت قرار گرفتن آن در پلاسمید pCAMBIA1305.1 توسط آنزیم‌های برشی تأیید شد. پلاسمید حاوی راه‌انداز ژن *AT1G77640* به آگروباکتریوم انتقال داده شد و انتقال پلاسمید حاوی راه‌انداز به آگروباکتریوم با PCR تایید شد. سازواره 35S:amiRNA*AT1G77640*

از خاموش سازی یک ژن برای مطالعه عملکرد آن استفاده می‌شود (Ward et al. 2006). برای متوقف کردن بیان ژن *AT1G77640* سازواره خاموشی ژن به‌صورت زیر ساخته شد. آغازگرهای مورد استفاده در ساخت این سازواره دارای جایگاه‌های برشی *Xho*I/*Xba*I با استفاده از سایت microRNA (http://wmd.weigelworld.org/cgi-bin/mirnatools.pl) طراحی شدند. تکثیر قطعات بوسیله PCR و توسط آنزیم *DNA Pfu* پلیمراز، پلاسمید RS300 (miR319a pBSK) به‌عنوان الگو و آغازگرهای رفت و برگشت

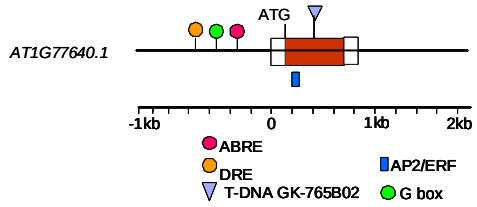
5'-GATAAATTCAAACAGCGATGGTTTCTACATATATATTCCT-3′
5'-GATAAATTCATACAGCGATGGGTTCTCTCTTTTGTATTCC-3' و
5'-GAACCCATCGCTGTATGAATTTATCAAAGAGAATCAATGA-3'
5′-GAAACCATCGCTGTTTGAATTTATCACAGGTCGTGATATG-3'

صورت گرفت و قطعه تکثیر شده در پلاسمید pCR-Blunt II-Topo همسانه‌سازی شد. پس از تأیید توالی، قطعه موردنظر از طریق جایگاه‌های برشی *Xho*I/*Xba*I در پلاسمید pJFH1 دارای ژن *Npt*II (برای انتخاب باکتری‌ها و گیاهان تراریخته) همسانه سازی شد. وجود و جهت قطعه موردنظر در پلاسمید pJFH1 توسط آنزیم‌های برشی تایید شد. انتقال پلاسمید حاوی قطعه موردنظر به آگروباکتریوم با PCR تایید شد.

ساختار ژن *AT1G77640*

ژن *AT1G77640* به گروه A-5 زیر خانواده DREB از خانواده عوامل رونویسی AP2/ERF تعلق دارد. چارچوب قرائت باز (ORF) این ژن دارای ۷۳۵ جفت باز است که پروتئینی با ۲۴۴ اسیدآمینه را رمز می‌کند. تجزیه توالی ژنومی نشان می‌دهد که ژن *AT1G77640* فاقد اینترون است و دارای ۵۸ جفت باز در ناحیه 5'UTR و ۱۴۴ جفت باز در ناحیه 3'UTR می‌باشد (http://www.arabidopsis.org/).

Archive of SID
www.SID.ir



شکل۱- ساختار ژن *AT1G77640* بدست آمده از سایت TAIR. مستطیل بزرگ نشان دهنده اگزون و مستطیل‌های کوچک نشان دهنده نواحی UTR می‌باشند. کدون آغاز ترجمه با ATG و موقعیت T-DNA در لاین موتانت با مثلث نشان داده شده‌اند. همچنین در بالادست ناحیه رونویسی، عناصر فعال کننده سیس و جعبه G با دایره نشان داده شده‌اند. موقعیت موتیف AP2/ERF نیز با مستطیل کوچک مشخص می‌باشد.

شکل۲- مقایسه توالی اسیدهای آمینه مربوط به دمین AP2/ERF پروتئین ژن *AT1G77640* با پروتئین های دارای تشابه توالی از زیر خانواده DREB. *RAP2.1*، *ARP2.9*، *RAP2.10* و *TINY* از آرابیدوپسیس و *Os06g0166400* و *OsDREB4* از برنج می‌باشند .در دمین AP2 توالی های حفاظت شده (توالی های ستاره دار) RGVR.R، EIREP،GKWV و RIWLG صفحات بتا و توالی RAYD مارپیچ آلفا را شکل می‌دهند.

دمین عامل رونویسی AP2 با توالی KYKGVRMRSWGSWVTEIRAPNQKTRIWLGSYSTAEAAARAYDAA LLCLKGPKANLNFP در موقعیت ۹۹-۴۲ پروتئین این ژن قرار گرفته است (http://www.uniprot.org/blast/) (شکل۱). در این گروه، عوامل رونویسی از جمله RAP2.1، RAP2.9 و RAP2.10 دارای تشابه توالی با پروتئین ژن *AT1G77640* نیز وجود دارند (شکل۲).

تجزیه *In Silico* عناصر تنظیم‌کننده در ناحیه راه‌انداز ژن *AT1G77640*

به منظور بررسی وجود عناصر تنظیم‌کننده سیس در ناحیه راه‌انداز ژن *AT1G77640*، توالی ۱/۵ کیلوباز این ناحیه با استفاده از سایت PLACE (www.dna.affrc.go.jp/htdocs/PLACE/) مورد مطالعه قرار گرفت. این عناصر شامل شش موتیف ABRE (ABRELATERD1, 5'-ACGTGG/TC-3') (Narusaka et al. 2003)، یک موتیف DRE (DRECRTCOREAT, 5'-RCCGAC-3') (Lata and Prasad 2011) ۱۵ موتیف شبه MYC (MYCATERD1, 5'-CATGTG-3'; MYCATRD22, 5'-CACATG-3' MYCCONSENSUSAT, 5'-CANNTG-3') (Kawagoe and Murai 1996)، ۱۳ موتیف WRKY (WRKY71OS, 5'-TGAC-3') (Yang et al. 2009) و شش موتیف CCAAT (5'-CCAAT-3') (Edwards et al. 1998) می‌باشند. همچنین در ناحیه راه‌انداز ژن *AT1G77640*، ۲۱ موتیف DOF (DOFCOREZM, 5'-AAAG-3') (Yanagisawa 2004) و دو جعبه G (5'-CACGTG-3') (Meier and Gruissem 1994)، ۱۹ موتیف ARR1 (5'-NGATT-3') که در تنظیم پاسخ به باکتری نقش دارند، دو موتیف ASF1 (ASF1MOTIFCAMV; 5'-TGACG-3') که در فعال‌سازی رونویسی بیشتر ژن‌ها توسط اکسین و یا سالیسیلیک‌اسید نقش دارند، یک موتیف BOXL (BOXLCOREDCPAL; 5'-ACCWWCC-3') که در مسیر سنتز فنیل پروپانوئید نقش دارد، دو جعبه GCC، عنصر وابسته به بیماریزایی (این عنصر در ژن‌های وابسته به بیماریزایی (*PR*) (Li et al. 2011) و سه عنصر CCAAT (CCAATBOX1; 5'-CCAAT-3') نیز وجود دارند. عنصر CCAAT در راه‌انداز بیشتر ژن‌های دخیل در مرحله گذر G1/S چرخه سلولی وجود دارد (Matuoka and Chen 2002).

نتایج و بحث

الگوی بیان *AT1G77640* در آرابیدوپسیس

برای بررسی الگوی بیان ژن *AT1G77640* در سطح بافت‌های مختلف گیاه، ژن گزارشگر *GUS* تحت کنترل ۱/۵ کیلوباز از راه‌انداز ژن *AT1G77640* به ژنوم آرابیدوپسیس انتقال داده شد. گیاهچه‌های تراریخته براساس مقاومت به هایگرومایسین در محیط کشت انتخاب شدند. جهت تجزیه بیان راه‌انداز ژن *AT1G77640*، رنگ آمیزی هیستوشیمیایی برای فعالیت *GUS* در گیاهچه و گیاه کامل نتاج نسل دوم صورت گرفت. بیان ژن *GUS*

Archive of SID
www.SID.ir

در ریشه‌های گیاهان تراریخته به‌ویژه در محل اتصال ریشه به ساقه و در طول ریشه‌ها مشاهده شد. در مرحله گیاهچه، ژن *GUS* در هیپوکوتیل، مریستم انتهایی ساقه و در بافت آوندی کوتیلدون-ها تظاهر بالایی نشان داد و فعالیت آن در مریستم انتهایی ساقه در مراحل بعدی نمو نیز قوی بود. در گیاهان کامل، *GUS* در بافت آوندی برگ‌های جوان و برگ‌های محور گل آذین بیان بالایی داشت. در برگ‌های محور گل آذین، رنگ *GUS* علاوه بر بافت آوندی، در لبه و نوک برگ‌ها نیز مشاهده شد. سیگنال *GUS* در پایه تریکوم‌های برگ‌های رزت، تریکوم‌های برگ‌های محور گل آذین و تریکوم‌های ساقه و نیز در محل انشعاب ساقه‌های فرعی مشاهده شدند. *GUS* فعالیت زیادی در قسمت‌های بریده شده ساقه، محل اتصال گل به ساقه و گره‌های روی ساقه نشان داد. میزان بالایی از تظاهر *GUS* در جوانه های گل، پرچم، میله پرچم، سیلیک‌های سبز و در محل اتصال سیلیک (خورجینک) به ساقه وجود داشت ولی در گلبرگ‌ها و سیلیک‌های رسیده فعالیت *GUS* مشاهده نشدند (شکل۳).

شکل۳- الگوی بیان ژن *AT1G77640* با تجزیه گیاهان AT1G77640-GUS در قسمت های مختلف شامل ریشه، مریستم انتهایی ساقه، بافت آوندی کوتیلدون ها و برگ های رزت، تریکوم های برگ‌های محور گل آذین، جوانه های گل و نوک سیلیک ها.

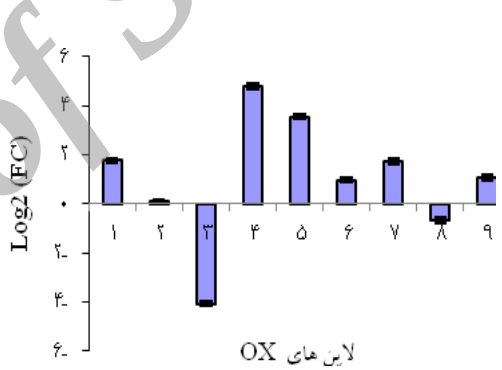
اثرات فنوتیپی افزایش بیان *AT1G77640* در آرابیدوپسیس

در ارزیابی اثر افزایش سطح بیان *AT1G77640* روی چرخه سلولی و نمو، گیاهان تراریخته آرابیدوپسیس حامل cDNA ژن *AT1G77640* تحت کنترل راه‌انداز مضاعف 35S (گیاهان $AT1G77640^{OX}$) تولید شدند. از گیاهان تراریخته با پلاسمید فاقد ژن *AT1G77640* (گیاهان EV) بعنوان گیاهان شاهد استفاده شد. گیاهچه‌های تراریخته براساس مقاومت به علف کش Basta در محیط کشت انتخاب شدند. صفات مورد مطالعه در مرحله رزت، شامل تعداد برگ، ساقه، سیلیک و بذر، طول و عرض برگ پنجم و میزان کلروفیل برگ بود که در ۹ لاین تراریخته نسل سوم و لاین شاهد و ۱۰ گیاه از هر لاین اندازه‌گیری شدند. برای بررسی تغییر برگ‌های رزت، سطح سلول‌های برگ در سه قسمت از پنجمین برگ رزت و پنج ناحیه از هر قسمت اندازه‌گیری شد و تعداد سلول‌ها توسط اندازه سلول‌ها و مساحت کل برگ تخمین زده شد (جدول۱). در گیاهان $AT1G77640^{OX}$، تعداد سلول ها نسبت به گیاه شاهد کاهش و اندازه آنها افزایش یافته بود. سطح بیان نسبی ژن *AT1G77640* در لاین‌های *35S:AT1G77640* و لاین شاهد به‌وسیله qRT-PCR اندازه‌گیری، با استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ محاسبه و بصورت Log_2FC ارائه شد. در این روش میزان بیان *AT1G77640* با استفاده از میزان بیان *UBQ10* نرمال‌سازی و با استفاده از لاین شاهد کالیبره شد. داده‌ها بصورت SD±میانگین و n=۱۰ هستند و حاصل سه تکرار بیولوژیکی می‌باشند. همانطور که در شکل ۴ نشان داده شده است لاین‌های ۱، ۲، ۴، ۵، ۶، ۷ و ۹ افزایش و لاین‌های ۳ و ۸ کاهش سطح بیان ژن *AT1G77640* را داشتند. در لاین‌های ۴ و ۵ بیشترین و در لاین ۳ کمترین میزان سطح بیان این ژن صورت گرفت. علیرغم افزایش زیاد بیان *AT1G77640* در آرابیدوپسیس، فنوتیپ جالب توجهی در برگ مشاهده نشد تنها در مرحله گیاهچه، لاین‌های $AT1G77640^{OX}$ دارای تعداد برگ بیشتر و بزرگتر از لاین شاهد بودند. این فنوتیپ رابطه‌ای با میزان بیان ژن در گیاه نداشت بطوریکه میانگین تعداد و اندازه برگ در سایر لاین‌های $AT1G77640^{OX}$ شبیه و یا حتی بیشتر از لاین‌های دارای حداکثر میزان بیان (لاین‌های ۴ و ۵) بود. برخلاف سایر لاین‌ها، تعداد برگ در لاین ۷ بطور معنی‌داری از لاین شاهد کمتر بود. در برخی از لاین‌های $AT1G77640^{OX}$ میزان کلروفیل کاهش یافته و رنگ برگ‌ها روشن تر از برگ‌های لاین شاهد بود ولی لاین ۷ برگ‌های تیره تر از لاین شاهد داشت. تعداد ساقه در لاین‌های تراریخته تفاوت معنی داری با تعداد ساقه در لاین شاهد نداشت. تعداد سیلیک بیشتر از سایر صفات اندازه‌گیری شده تحت تأثیر افزایش سطح بیان *AT1G77640* قرار گرفت و کمترین تعداد سیلیک در لاین‌های ۴، ۵ و ۹ شمارش شد. با اندازه‌گیری طول ریشه لاین‌های $AT1G77640^{OX}$ در مرحله رزت، مشخص شد که طول ریشه لاین‌های ۴، ۵ و ۹

Archive of SID
www.SID.ir

جدول۱- تجزیه سلول های اپیدرمی پنجمین برگ رزت در گیاهان پنج هفته‌ای لاین‌های EV و $AT1G77640^{OX}$ بوسیله میکروسکوپ نوری BX51 و نرم‌افزار cell^P (Olympus). سطح بالایی (Adaxial) و سطح پایینی (Abaxial) برگ است. داده ها، SE ± میانگین و n = ۶۵-۷۵ می‌باشند. علائم * و ** بترتیب معنی-دار بودن در سطح ۵ درصد و یک درصد را نشان می‌دهند.

سلول های اپیدرمی	EV	۸	۹
	اپیدرم سطح بالایی		
کل سلول ها	۲۴۰	۱۵۳	۱۵۷
سطح سلول ها (μm^2)	۲۸۷۳ ±۲۰۵	۴۵۲۰±۲۷۶**	۴۴۱۰±۲۳۱**
	اپیدرم سطح پایینی		
کل سلول ها	۲۷۳	۲۲۸	۱۳۶
سطح سلول ها (μm^2)	۲۵۲۸±۱۶۵	۴۰۲۸±۲۱۷*	۵۰۹۲±۲۸۷**



شکل ۴- سطح بیان نسبی ژن *AT1G77640* در ۹ لاین دارای افزایش بیان این ژن (لاین های OX).

بطور معنی‌داری کمتر از لاین شاهد بود. بذر لاین‌های ۱، ۴ و ۵ در شرایط روشنایی و تاریکی کامل پس از دو هفته جوانه نزدند. همانطور که ذکر شد سطح تظاهر *AT1G77640* در لاین ۳ کاهش یافته بود. برگ‌های لاین ۳ تیره‌تر از شاهد و قاشقی شکل با لبه-های به‌طرف داخل برگشته بودند (شکل۵). گلدهی در لاین ۳ زودتر از لاین شاهد و سایر لاین‌های تراریخته صورت گرفت. در مقایسه با لاین شاهد با ساقه ایستاده، ساقه لاین ۳ ورس کرده بود. سیلیک‌های این لاین کوچک‌تر و تعداد آنها کمتر از لاین شاهد بود (شکل۶).

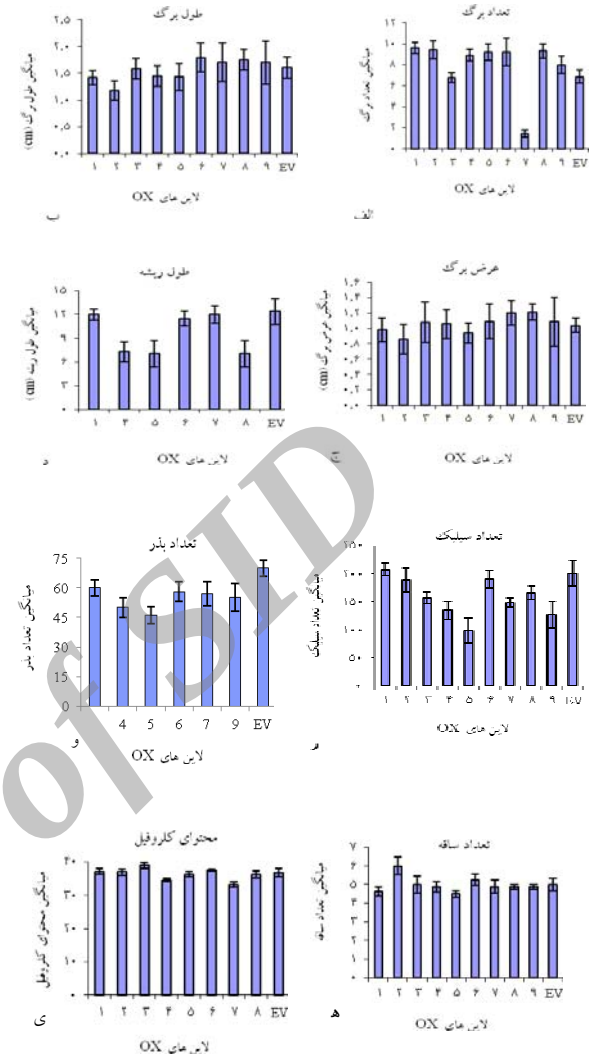
شکل۵- تاثیر افزایش بیان ژن *AT1G77640* در گیاهان $AT1G77640^{OX}$. الف و ب) گیاهان چهار هفته‌ای EV (سمت راست) و $AT1G77640^{OX}$ (سمت چپ). ج) مدل قاشقی برگ ها در لاین۳.

تهیه گیاهان $AT1G77640^{KD}$

برای مطالعه فعالیت *AT1G77640*، گیاهان دارای سازواره 35S:amiRNAAT1G77640 (گیاهان $AT1G77640^{KD}$ ، KD=Knock down) تهیه شدند. گیاه تراریخته با پلاسمید فاقد ژن $AT1G77640^{KD}$ بعنوان گیاه شاهد در نظر گرفته شد که با EV نشان داده شده است. گیاهان تراریخته براساس مقاومت به کنامایسین در محیط کشت انتخاب شدند. سطح تظاهر ژن *AT1G77640* در لاین‌های $AT1G77640^{KD}$ در ۳ لاین تراریخته با سازواره 35S:amiRNAAT1G77640 بوسیله qRT-PCR اندازه‌گیری شد. در این روش میزان بیان *AT1G77640* با استفاده از میزان بیان *UBQ10* نرمال‌سازی و با استفاده از لاین شاهد (EV) کالیبره شد. در شکل ۷ داده‌ها SD±میانگین و n=۱۰ هستند و حاصل سه تکرار بیولوژیکی می‌باشند. لاین‌های ۱ و ۳ کاهش بیشتری در سطح بیان ژن *AT1G77640* نسبت به لاین ۲ نشان دادند (شکل۷).

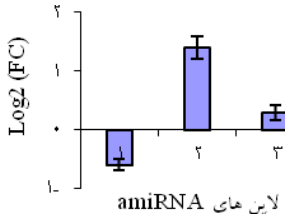
ارتفاع لاین‌های $AT1G77640^{KD}$ کمتر و تعداد ساقه‌های فرعی آنها بیشتر از لاین شاهد بود و بعضی از ساقه ها بطور کامل ورس

Archive of SID
www.SID.ir



شکل۶- صفات اندازه‌گیری شده در لاین‌های انتخابی $AT1G77640^{OX}$ و لاین شاهد (EV)، (OX: لاین های ۱ تا ۹ دارای افزایش سطح بیان ژن هستند) شامل الف) میانگین تعداد برگ در مرحله رزت، ب) میانگین طول برگ هفتم، ج) میانگین عرض برگ هفتم، د) میانگین طول ریشه اصلی، ر) میانگین تعداد سیلیک، و) میانگین تعداد بذر، ه) میانگین محتوای کلروفیل، ی) میانگین تعداد ساقه. داده‌ها SD±میانگین و n=۱۰ هستند.

کردند (شکل۸). برخلاف لاین شاهد، در اطراف برگ‌های رزت در لاین‌های $AT1G77640^{KD}$ جوانه های زیادی وجود داشت. با وجود آنکه تعداد سیلیک در هر ساقه لاین تراریخته کمتر از لاین شاهد بود ولی افزایش تعداد ساقه کاهش تعداد سیلیک را جبران نمود بطوریکه در مجموع، تفاوت چشمگیری بین تعداد سیلیک در لاین‌های تراریخته و شاهد وجود نداشت. نسبت به لاین



شکل۷- سطح بیان نسبی *AT1G77640* در ۳ لاین تراریخته 35S::amiRNAAT1G77640. لاین های ۱ تا ۳ دارای کاهش سطح بیان این ژن هستند (لاین‌های amiRNA).

شاهد، تفاوت چشمگیری در برگ گیاهان تراریخته از نظر تعداد، اندازه و رنگ مشاهده نشد. طول هیپوکوتیل در گیاهان تراریخته و شاهد تفاوت‌معنی‌دار نداشت. در لاین‌های $AT1G77640^{KD}$ ریشه‌های بسیار کوچکی مشاهده شد به طوریکه در این رابطه تفاوت‌معنی‌دار با این شاهد وجود داشت (شکل۹). در مرحله گیاه کامل، برگ‌های لاین‌های $AT1G77640^{KD}$ زودتر از لاین شاهد زرد شدند که می‌تواند حاکی از پیری زودرس باشد.

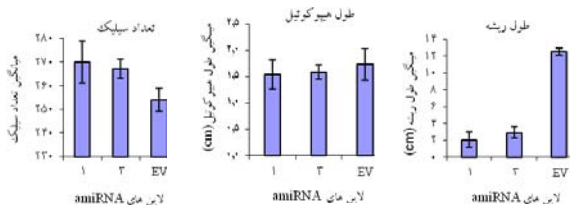
الف)

ب)

شکل۸- الف) ریشه گیاهان $AT1G77640^{KD}$ (سمت چپ) و گیاهان EV (سمت راست). ب) گیاهان $AT1G77640^{KD}$ برترتیب از سمت راست شامل لاین های ۱ تا ۳ و لاین EV، ورس ساقه در لاین های ۲ و ۳ مشخص می باشد.

Archive of SID

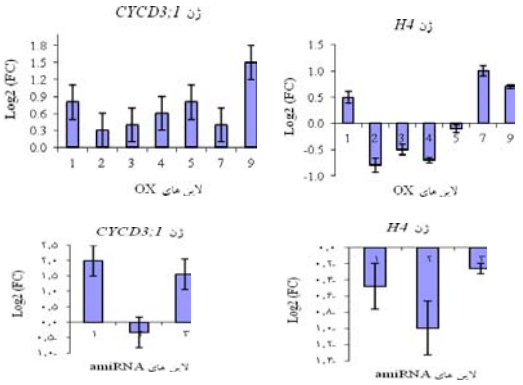
www.SID.ir



الف) ب) ج)

شکل۹- صفات اندازه‌گیری شده در لاین‌های انتخابی $AT1G77640^{KD}$ (لاین های ۱ و ۳ دارای کاهش سطح بیان این ژن هستند، لاین های amiRNA) و لاین شاهد (EV). این صفات شامل الف) میانگین طول ریشه در مرحله گیاهچه، ب) میانگین طول هیپوکوتیل و ج) میانگین تعداد سیلیک. داده‌ها SD±میانگین و n=۱۰ می‌باشند.

برای بررسی اثر احتمالی افزایش بیان *AT1G77640* بر چرخه سلولی، سطح بیان دو نشانگر چرخه سلولی مربوط به مراحل S و M یعنی ژن‌های هیستون *H4* و *CYCD3;1*، در لاین‌های $AT1G77640^{OX}$ و $AT1G77640^{KD}$ بوسیله qRT-PCR اندازه‌گیری و بصورت Log_2FC ارائه شد. در این روش میزان بیان *CYCD3;1* و *H4* با استفاده از میزان بیان *UBQ10* نرمال‌سازی و با استفاده از لاین شاهد کالیبره شد. داده‌ها SD± میانگین و n=۱۰ هستند و حاصل سه تکرار بیولوژیکی می‌باشند. میزان بیان *CYCD3;1* در لاین‌های $AT1G77640^{OX}$ افزایش نشان داد ولی سطح بیان *H4* در بیشتر لاین‌ها کاهش یافت. سطح بیان *CYCD3;1* در لاین ۲ $AT1G77640^{KD}$ منفی بود ولی در لاین‌های ۱ و ۳ افزایش یافت. سطح بیان *H4* در همه لاین‌های $AT1G77640^{KD}$ کاهش یافت (شکل۱۰).



شکل۱۰- سطح بیان ژن های *CYCD3;1* و *H4* الف) در لاین‌های $AT1G77640^{OX}$ (لاین های دارای افزایش سطح بیان ژن) و ب) در لاین‌های $AT1G77640^{KD}$ (لاین های دارای کاهش سطح بیان ژن)

جداسازی گیاهان آرابیدوپسیس دارای T-DNA در ژن *AT1G77640*

در بررسی نقش ژن *AT1G77640* طی نمو از خاموشی کامل ژن نیز استفاده شد. جستجو برای گیاهان حاوی T-DNA در ژن *AT1G77640* در مجموعه‌های SALK و GABI-KAT منجر به شناسایی یک لاین بالقوه (Knock out) KO از GABI-KAT دارای T-DNA در اگزون ژن *AT1G77640* و همچنین ژن مقاومت به سولفودیازین (لاین GK-765B02) شد. برای شناسایی گیاهان هموزیگوس، ابتدا بذرها روی محیط حاوی سولفودیازین انتخاب شدند و گیاهچه‌های مقاوم به سولفودیازین به خاک انتقال یافتند. DNA گیاهان انتخاب شده و کولتیوار Col-0 (گیاه شاهد) استخراج و PCR با آغازگرهای طراحی شده از دو انتهای CDS ژن *AT1G77640* و آغازگرهای مربوط به توالی T-DNA انجام شد. محصولات تکثیر شده PCR روی ژل آگارز بررسی شدند. از میان ۳۵ گیاه انتخاب شده دارای مقاومت به سولفودیازین، هیچ یک هموزیگوس نبودند زیرا همه آنها باندی مشابه با گیاه شاهد داشتند. در این گیاهان در مرحله گیاهچه و گیاه کامل از نظر ظاهری تفاوت قابل توجهی با گیاه شاهد مشاهده نشد.

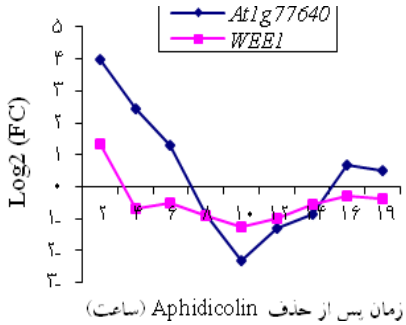
AT1G77640 به زیرخانواده DREB از خانواده عوامل رونویسی AP2 تعلق دارد. ژن‌های *DREB* پروتئین‌هایی را رمز می‌کنند که دارای یک دامین حفاظت شده AP2 با ۶۴ اسیدآمینه هستند. در دامین AP2 پروتئین‌های DREB، چهاردهمین اسیدآمینه والین و نوزدهمین اسیدآمینه گلوتامیک اسید مسوول اتصال اختصاصی به مولکول DNA هستند. بعنوان مثال، پروتئین OsDREB1A دارای اسیدآمینه والین در موقعیت ۱۴و فاقد اسیدآمینه گلوتامیک اسید در موقعیت ۱۹ می‌باشد و تمایل بیشتری برای اتصال به موتیف DRE با توالی GCCGAC نسبت به ACCGAC دارد. پروتئین OsDREB2A دارای اسیدهای آمینه والین در موقعیت ۱۴و گلوتامیک اسید در موقعیت ۱۹می‌باشد و با راندمان یکسان به هر دو موتیف DRE متصل می‌شود (Dubouzet et al. 2003).

جوانه‌زنی لاین‌های $AT1G77640^{OX}$ در تاریکی و روشنایی صورت نگرفت که احتمالا به علت تأخیر در جوانه‌زنی یا تغییر در بیوسنتز جیبرلین می‌باشد. ژن عامل رونویسی *LEP* در جوانه‌زنی توسط تنظیم مثبت بیوسنتز جیبرلین نقش دارد.

Archive of SID
www.SID.ir

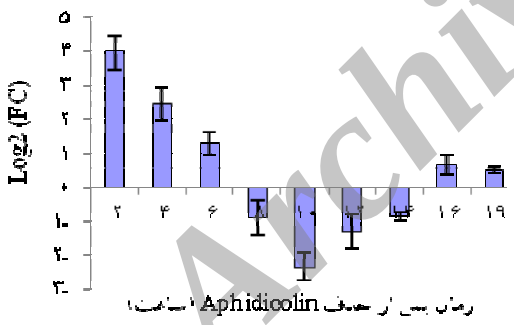
لاین‌های LEP^{OX} در روشنایی و تاریکی به ترتیب، گیاهچه و هیپوکوتیل کوچکتری نسبت به گیاه شاهد تولید کردند. (Ward et al. 2006).

ژن *WEE1* از ژن‌های پایه چرخه سلولی است که طی مرحله S بیان می‌شود و از ورود سلول‌ها به مرحله میتوز جلوگیری می‌کند تا سنتز DNA یا تعمیر آن کامل شود. میزان تظاهر این ژن هنگام شکستن دو رشته DNA طی حوادث نوترکیبی در میوز افزایش می‌یابد. *WEE1* علاوه بر دخالت در تنظیم نقاط گذر چرخه سلولی در مریستم انتهایی ساقه و بافت‌های آوندی ریشه و برگ‌های آرابیدوپسیس نیز بیان می‌شود. *WEE1* در گامت زایی نقش دارد زیرا بیان قوی آن در گل ها بویژه در قسمت مادگی گل و در نمو بساک گزارش شده است (Schutter et al. 2007) . بررسی الگوی بیان *AT1G77640* در گیاهان *AT1G77640* Promoter:*GUS* در آرابیدوپسیس بیان قوی این ژن را در قسمت پرچم گل نشان داد. همچنین در مطالعه الگوی بیان ژن‌های چرخه سلولی بوسیله qRT-PCR ژن‌های *WEE1* و *AT1G77640* الگوی بیان مشابهی دارند. هر دو ژن دارای افزایش بیان در مرحله G1/S و کاهش بیان در مرحله میتوز می‌باشند (شکل۱۱). بر این اساس احتمال آنکه هر دو ژن توسط یک مکانیزم مشترک تنظیم شوند وجود دارد. در شکل های ۸ و۹ ، زمان های ۴-۲ ساعت پس از حذف Aphidicolin مربوط به مرحله S، ۸-۶ ساعت مربوط به مرحله G2، ۱۴-۱۰ ساعت مربوط به مرحله M و ۱۹-۱۶ ساعت مربوط به مرحله G1 می‌باشند. سطح تظاهر ژن‌ها نسبت به زمان T0 (بلافاصله پس از حذف Aphidicolin) محاسبه و میانگین Log_2FC سه تکرار نشان داده شده است.



شکل۱۱- مقایسه الگوی بیان ژن های *AT1G77640* و *WEE1* طی چرخه سلولی.

برای مطالعه اثر احتمالی افزایش یا کاهش بیان *AT1G77640* روی بیان ژن‌های پایه چرخه سلولی، الگوی بیان دو ژن نشانگر مراحل S و M چرخه سلولی، بترتیب ژن‌های هیستون *H4* و *CYCD3;1*، در گیاهان $AT1G77640^{OX}$ و $AT1G77640^{KD}$ بوسیله qRT-PCR بررسی شد. نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که افزایش بیان *CYCD3;1* و کاهش بیان *H4* در لاین‌های $AT1G77640^{OX}$ و $AT1G77640^{KD}$ بطور مستقیم با تجمع یا کاهش میزان رونویسی *AT1G77640* رابطه ندارند. در راه‌انداز ژن‌های *AT1G77640*، هیستون *H4* و *CYCD3;1* جایگاه شناسایی ژن *E2F* وجود دارد و فعالیت آنها توسط این ژن تنظیم می‌شود. با وجود آنکه نتایج مطالعات میکروسکوپی نشان دادند که تعداد سلول‌ها در گیاهان $AT1G77640^{OX}$ نسبت به شاهد کاهش و اندازه سلول‌ها افزایش یافته بود ولی اندازه برگ ها تفاوت زیادی با گیاه شاهد نداشت. احتمالا کاهش تعداد سلول‌ها با افزایش اندازه‌ها آنها جبران شده است. مطابق نتایج آزمایش پروفایلینگ جهت شناسایی عوامل رونویسی دخیل در چرخه سلولی (داده ها نشان داده نشده‌اند)، ژن *AT1G77640* در چرخه سلولی دخالت دارد. الگوی بیان این ژن در سه تکرار آزمایش پروفایلینگ در شکل ۱۲ ارائه شده است.



شکل۱۲- الگوی بیان ژن *AT1G77640* دارای تظاهر پیوسته در چرخه سلولی طی ۱۹ ساعت.

افزایش بیان ژن *ANT* از خانواده AP2 منجر به افزایش بیان *CYCD3;1* و تغییرات متعددی در آرابیدوپسیس می‌شود (Autran et al. 2002). یکی از فنوتیپ‌های قابل توجهی که در لاین‌های $AT1G77640^{OX}$ مشاهده گردید کاهش میزان بذر در این لاین‌ها نسبت به لاین شاهد بود. در صورتیکه کاهش بیان این ژن در لاین‌های $AT1G77640^{KD}$ باعث افزایش تولید بذر شده است.

Archive of SID
www.SID.ir

کاهش طول ریشه در لاین‌های $AT1G77640^{OX}$ و $AT1G77640^{KD}$ مشاهده شد. بنابراین رشد ریشه به افزایش و کاهش بیان *AT1G77640* واکنش یکسان نشان می‌دهد. داده‌های ریزآرایه نیز بیشترین میزان فعالیت *AT1G77640* را در جنین، سیلیک و ریشه نشان می‌دهند (http:// www. bar.utoronto.ca /efp/cgi-bin/efpWeb.cgi). به‌نظر می‌رسد افزایش بیان *AT1G77640* در اندام‌های گل بازخورد منفی در فعالیت این ژن در اندام‌های مذکور داشته باشد.

از میان لاین‌های $AT1G77640^{OX}$، سطح بیان *AT1G77640* در لاین ۳ کاهش زیادی داشت. لاین ۳، فنوتیپ متفاوتی نسبت به سایر لاین‌ها نشان داد بطوریکه تنها در این لاین، برگ‌ها قاشقی شکل بودند. احتمال می‌رود ژن *AT1G77640* در لاین ۳ بطور ناقص خاموش شده باشد که این موضوع به مطالعه بیشتر نیاز دارد. پیدا نکردن لاین KO هموزیگوس احتمالا بیانگر آن است که درج T-DNA در دو رشته DNA ژن *AT1G77640* به‌علت اثر کشندگی، باعث از بین رفتن جنین می‌شود و امکان بدست آوردن گیاه هموزیگوس وجود ندارد.

نتیجه‌گیری

جهت مطالعه عملکرد ژن عامل رونویسی دخیل در چرخه سلولی، *AT1G77640* ، از تکنیک‌های افزایش و کاهش بیان ژن (35S و amiRNA) و برای بررسی الگوی بیان این ژن در اندام-های مختلف آرابیدوپسیس، از گیاهان تراریخته حامل سازواره راه‌انداز –GUS استفاده شد. *AT1G77640* یک عامل رونویسی از زیر خانواده DREB را رمز می کند. نوسان الگوی بیان این ژن طی چرخه سلولی مشاهده شد بطوریکه میزان تظاهر این ژن طی میتوز کاهش یافت. احتمالا *AT1G77640* در آندومیتوز نقش ندارد زیرا با وجود کاهش بیان آن طی میتوز، افزایش اندازه سلول‌های برگ درگیاهان تراریخته دارای افزایش سطح بیان *AT1G77640* مشاهده شد. بررسی الگوی بیان ژن *AT1G77640* در گیاهان تراریخته حامل سازواره راه‌انداز –GUS، بالا بودن میزان تظاهر آنها را در آوندها، مریستم انتهایی ساقه و قسمت‌هایی از اندام‌های زایشی نشان داد. بین الگوی بیان ژن و فنوتیپ های حاصل از افزایش بیان ژن در گیاهان تراریخته ارتباط وجود داشت. به‌عنوان مثال، الگوی بیان *AT1G77640* میزان بالای تظاهر این ژن را در اندام‌های زایشی گیاهان تراریخته حامل سازواره راه‌انداز –GUS نشان داد و در گیاهان تراریخته دارای افزایش سطح بیان ژن *AT1G77640* کاهش میزان تولید بذر مشاهده شد. به‌نظر می‌رسد افزایش بیان *AT1G77640* بیش از میزان طبیعی بیان آن در گیاه، اثر منفی براندام های زایشی داشته است.

سپاسگزاری

این مطالعه در گروه تحقیقاتی پروفسور Bernd Mueller-Roeber در موسسه تحقیقات فیزیولوژی مولکولی گیاهی ماکس پلانک آلمان انجام شد که بدین‌وسیله از حمایت‌های علمی و مالی ایشان تشکر و قدردانی می‌نماییم.

منابع

Alonso J M, Stepanova AN, Leisse TJ, Berry CC, Ecker JR (2003) Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. Science, 301: 653-657.

Autran D, Jonak C, Belcram K, Beemster G, Kronenberger J, Grandjean O, Inzé, Traas J (2002) Cell numbers and leaf development in *Arabidopsis*: a functional analysis of the *STRUWWELPETER* gene. EMBO Journal 21:6036-6049.

Chuang CF, Meyerowitz EM (2000) Specific and heritable genetic interference by double-stranded RNA in *Arabidopsis thaliana*. PNAS 97: 4985-4990.

Dubouzet JG, Sakuma Y, Ito Y, Yamaguchi-Shinozaki K (2003) *OsDREB* genes in rice, *Oryza sativa* L. encode transcription activators that function in drought-, high-salt- and cold-responsive gene expression. Plant Journal 33: 751-763

Edwards D, Murray JAH, Smith AG (1998) Multiple genes encoding the conserved CCAAT-Box transcription factor complex are expressed in *Arabidopsis*. Plant Physiology 117: 1015-1022

Goremykin V, Moser C (2009) Classification of the *Arabidopsis* ERF gene family based on bayesian inference. Molecular Biology 43: 789-794.

Kankainen M, Holm L (2004) POBO, transcription factor binding site verification with bootstrapping. Nucleic Acids Research, 32: 222-229.

Kawagoe Y, Murai N (1996) A novel basic region/helix-loophelix protein binds to a G-box motif CACGTG of the bean seed storage protein p-phaseolin gene. Plant Sci 116:47-57.

Lata C, Prasad M (2011) Role of DREBs in regulation of abiotic stress responses in plants. Journal of Experimental Botany. 1-18

Archive of SID
www.SID.ir

Narusaka Y, Nakashima K, Shinwari ZK, Yamaguchi-Shinozaki Y (2003) Interaction between two cis-acting elements, ABRE and DRE, in ABA-dependent expression of *Arabidopsis* rd29A gene in response to dehydration and high-salinity stresses. Plant Journal 34:137-148.

Li CW, Su RC, Cheng CP, Chan MT (2011) Tomato RAV transcription factor is a pivotal modulator involved in the AP2/EREBP-mediated defense pathway. Plant Physiology 156: 213-227

Matuoka K, Chen KY (2002) Tomato RAV transcription factor a pivotal CCAAT box-binding factor CBF/NF-Y. Ageing Research Reviews 1: 639-651

Meier I, Gruissem W (1994) Novel conserved sequence motifs in plant G-box binding proteins and implications for interactive domains. Nucleic Acids Research 22:470-478.

Rando OJ (2007) Chromatin structure in the genomics era. Trends in Genetics 23: 67-73.

Riaño-Pachón DM, Ruzicic S, Dreyer I, Mueller-Roeber B (2007) PlnTFDB: an integrative plant transcription factor database. BMC Bioinformatics 8: 1-10.

Riechmann JL, Heard J, Martin G, Reuber L, Jiang CZ, Keddie J, Adam L, Pineda L, Ratcliffe OJ, Samaha RR, Creelman R, Pilgrim M, Broun P, Zhang JZ, Ghandehari D, Sherman BK, Yu GL (2000) *Arabidopsis* transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. Science 290: 2105-2110.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press Plainview NY.

Schutter KD, Joubès J, Cools T, Verkest A, Corellou F, Babiychuk E, Schueren EVD, Beeckman T, Kushnir S, Inzé D, Veylder L De (2007) *Arabidopsis WEE1* kinase controls cell cycle arrest in response to activation of the DNA integrity checkpoint. Plant Cell 19: 211-225.

Schwab R, Ossowski S, Riester M, Warthmann N,Weigel D (2006) Highly specific gene silencing by artificial microRNAs in *Arabidopsis*. Plant Cell 18: 1121-1133.

Skirycz A, Jozefczuk S, Stobiecki M, Muth D, Zanor MI, Witt I, Mueller-Roeber B (2007) Transcription factor *AtDOF,2* affects phenylpropanoid metabolism in *Arabidopsis thaliana*. New Phytologist 175: 425-438.

Strizhov N, Li Y, Rosso MG, Viehoever P, Dekker KA, Weisshaar B (2003) High-throughput generation of sequence indexes from T-DNA mutagenized *Arabidopsis thaliana* lines. Biotechniques 35: 1164-1168.

Ward JM, Smith AM, Shah PK, Galanti SE, Yi H, Demianski AJ, Graaff E, Keller B, Neff MM (2006) A new role for the *Arabidopsis* AP2 transcription factor, *LEAFY PETIOLE*, in gibberellin-induced germination is revealed by the misexpression of a homologous gene, *SOB2/DRN-LIKE*. Plant Cell 18: 29-39.

Yang B, Jiang Y, Rahman MH, Deyholos MK, Kav NV (2009) Identification and expression analysis of *WRKY* transcription factor genes in canola *(Brassica napus* L.) in response to fungal pathogens and hormone treatments. BMC Plant Biology 9: 1-19

Yanagisawa Y (2004) Dof Domain Proteins: Plant-Specific Transcription Factors Associated with diverse phenomena unique to plants. Plant Cell Physiology 45: 386-391

Zhang JZ (2003) Over-expression analysis of plant transcription factors. Current Opinion in Plant Biology 6: 430-440.

Archive of SID

www.SID.ir