

## بررسی الگوی تظاهر ژن‌های مربوط به چرخه سلولی در آرابیدوپسیس Expression patterns of cell cycle-related genes in *Arabidopsis thaliana*

فاطمه دهقان نیری<sup>۱</sup>، هوشمنگ علیزاده<sup>۲</sup>، محمد رضا نقوی<sup>۳</sup>، سید ابوالقاسم محمدی<sup>۴</sup> و  
مسعود سلطانی نجف آبادی<sup>۵</sup>

### چکیده

دهقان نیری، ف.، ۵. علیزاده، م. ر. نقوی، س. ا. محمدی و م. سلطانی نجف آبادی. ۱۳۸۹. بررسی الگوی تظاهر ژن‌های مربوط به چرخه سلولی در آرابیدوپسیس. مجله علوم زراعی ایران. ۱۲ (۳) ۳۶۳-۳۴۶.

چرخه سلولی اساس تقسیم سلولی و رشد موجودات زنده است که تنظیم بیان ژن‌ها سازو کار مهمی در کنترل چرخه سلولی در موجودات زنده‌ی باشد. در این تحقیق با استفاده از کشت سلولی همزمان شده آرابیدوپسیس توسط aphidicolin توسط qRT-PCR مورد بررسی قرار گرفت. از میان ژن‌هایی که طی پیشرفت چرخه سلولی تغییر سطح بیان نشان دادند، ژن‌های سایکلین نوع A و B و ژن‌های CDK نقش کلیدی داشتند. اغلب ژن‌های سایکلین نوع A و B الگوی تظاهر بسیار مشابهی داشتند. ژن‌های CYCA3 با حداقل سطح تظاهر در مرحله S از کینازهای اصلی مرحله S می‌باشند. ژن‌های CDK نیز در مراحل گذر G1/S و G2/M نقش مهمی دارند. سطح تظاهر ژن‌های خانواده‌های مختلف عوامل رونویسی در چرخه سلولی با نوساناتی هموار بود که در کنترل دقیق فرآیندهای چرخه سلولی نقش اساسی ایفا می‌کنند.

واژه‌های کلیدی: چرخه سلولی، ژن‌های پایه چرخه سلولی، سوسپانسیون سلولی آرابیدوپسیس و عوامل رونویسی.

تاریخ دریافت: ۱۳۸۸/۷/۲۶ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۸/۱۰/۱۰

- ۱- دانشجوی دکتری اصلاح نباتات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران (مکاتبه کننده) (پست الکترونیک: fatemeh-dn@yahoo.com)
- ۲- دانشیار پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران
- ۳- دانشیار پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران
- ۴- دانشیار داشکده کشاورزی دانشگاه تبریز
- ۵- استادیار مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج

## مقدمه

زیرگروههای دیگری تقسیم می‌شوند، به عنوان مثال *CYCD3;1* و *CYCD3;3* در گروه سایکلین‌های *CYCD3* قرار دارند (Inzé, 2007). ژن‌های *CDK* نقش مهمی در شروع، پیشرفت (تداوم) و تکمیل وقایع چرخه سلولی دارند (Planchais *et al.*, 2000). در گیاهان دو گروه اصلی از ژن‌های *CDK* (نوع A و B) همراه با سایکلین‌ها، گذر از مراحل G1 به S و G2 به M را تنظیم می‌کنند. واسطه برهم کنش پروتئین‌های *CDK* و سایکلین‌ها، گروه دیگری از ژن‌های پایه چرخه سلولی به نام *CKS* هستند (Inzé, 2007). فعالیت مجموعه پروتئینی *-CDK* سایکلین بطور منفی با فسفوریلاسیون زیر واحد *CDK* به وسیله *WEE1* کیناز و بطور مثبت با حذف گروههای بازدارنده فسفات توسط *CDC25* فسفاتاز تنظیم می‌شود. بازدارنده‌گی فعالیت *CDK* میتوزی توسط *WEE1*، یکی از سازوکارهای بازدارنده گذر سلول از مرحله G2 به M می‌باشد (Vandepoele *et al.*, 2002).

به دنبال وقوع تنش یا تولید عوامل بازدارنده پیشرفت مراحل چرخه سلولی در سلول، مجموعه پروتئینی *-CDK* سایکلین به وسیله پروتئین‌های بازدارنده *CKI* (CKI) از بین می‌رود. در آرابیدوپسیس *(Arabidopsis thaliana)* هفت ژن *CKI* شناسایی و به نام‌های *KRP1* تا *KRP7* نامگذاری شده‌اند (Inzé, 2007). در گیاهان، کشت سوسپانسیون سلولی شامل جمعیت همگنی از سلول‌ها است که در مراحل مختلف چرخه سلولی قرار دارند و مطالعه تقسیم سلولی را در غیاب فرآیندهای نموی سلول امکان‌پذیر می‌سازد. از آنجاییکه با استفاده از روش‌های موجود امکان مطالعه چرخه سلولی در تک سلول وجود ندارد، مطالعه فرآیندهای سلولی به جمعیتی از سلول‌ها در یک مرحله خاص از چرخه سلولی نیاز دارد. برای این منظور از روش‌های مختلف همزمان‌سازی (Synchronization) سلول‌ها استفاده می‌شود. همزمان‌سازی روشهای برای غنی‌سازی جمعیت سلولی در یک مرحله خاص چرخه سلولی مورد استفاده قرار می‌گیرد. روش‌های

چرخه سلولی فرآیند حیاتی در همه موجودات زنده است که تنظیم آن از دقت بالایی برخوردار است. برای شناسایی چگونگی تنظیم رشد موجودات زنده، شناسایی تنظیم کننده‌های تقسیم سلولی ضروری است. طی چرخه سلولی به دنبال همانندسازی DNA، توزیع دقیق مواد ژنتیکی به سلول‌های دختری صورت می‌گیرد (Planchais *et al.*, 2000). چرخه سلولی براساس تغییرات مولکولی و سیتوژنیکی به چهار مرحله شامل: همانندسازی DNA (مرحله S)، مرحله تقسیم (M یا میتوز) و مراحل رشدی G1 و G2 به ترتیب برای آمادگی سلول جهت ورود به مراحل S و M تقسیم می‌شود. طی مرحله G1 اندازه و محیط داخل سلول برای همانندسازی DNA کنترل می‌شود در صورتی که در مرحله G2 صحبت DNA همانندسازی شده و آمادگی سلول برای ورود به مرحله میتوز تعیین می‌شود (De Veylder *et al.*, 2003). مراحل مختلف چرخه سلولی به وسیله ژن‌های پایه چرخه سلولی (Core cell cycle genes) و عوامل رونویسی (Transcription factors (TFs)) متعددی کنترل می‌شوند. ژن‌های کیناز وابسته به سایکلین (CDKs)، ژن‌های کیناز *CAKs* (CDK) و ژن‌های بازدارنده *KRPs* (Inzé, 2007). پیشرفت چرخه سلولی از طریق تولید و تجزیه سایکلین‌ها کنترل می‌شود. میزان بیان ژن‌های رمز کننده سایکلین‌ها در چرخه سلولی متغیر و تعیین کننده اصلی زمان فعالیت ژن‌های *CDK* است. سایکلین‌ها به دو گروه سایکلین‌های میتوزی نوع A و B (*CYCA*, *CYCB*) و سایکلین‌های اختصاصی مرحله G1 (*CYCD*) تقسیم‌بندی می‌شوند. سایکلین‌های نوع A دارای زیرگروههای A1، A2 و A3 (از جمله *CYCA1*)، نوع B دارای زیرگروههای B1 و B2 (از جمله *CYCB2*) و نوع D دارای زیرگروههای D1 تا D7 (از جمله *CYCD3*) می‌باشند. این زیرگروه‌ها نیز به

مرحله G1/S با استفاده از aphidicolin گزارش نمودند. ارزیابی همزمانی سلول‌ها با روش‌های مختلف شامل روش‌های سیتولوژیکی (شاخص متافاز-آنفاز)، فلوسیتومتری و بهره‌گیری از نشانگرهای مولکولی امکان‌پذیر است (Planchais *et al.*, 2000). جهت ارزیابی میزان همزمانی سلول‌ها، از سطح ظاهر برخی ژن‌های تنظیم کننده چرخه سلولی به عنوان نشانگرهای مولکولی استفاده می‌شود. به عنوان مثال در سلول‌های آرایدوبسیس، رونوشت‌های ژن هیستون H4 در مرحله S و ژن‌های سایکلین میتوزی در مرحله G2/M آشکار می‌شوند. همچنین افزایش سطح بیان سایکلین نوع D معرف مرحله G1 است (Planchais *et al.*, 2000). با استفاده از تکنیک qRT-PCR (Quantitative real time polymerase chain) می‌توان سطح بیان ژن‌های معرف مرحله مختلف چرخه سلولی را اندازه‌گیری نمود و الگوی برای میزان همزمانی سلول‌ها ارائه کرد.

هدف از این آزمایش بررسی تغییرات سطح بیان تعدادی از ژن‌های پایه چرخه سلولی و عوامل رونویسی در مرحله مختلف چرخه سلولی به منظور شناسایی ژن‌های تأثیرگذار در مرحله مختلف چرخه سلولی بود. برای این منظور از القاء همزمانی در کشت سلولی آرایدوبسیس با استفاده از aphidicolin استفاده شد.

## مواد و روش‌ها

### کشت سوسپانسیون سلولی آرایدوبسیس

سوسپانسیون لاین سلولی سریع الرشد MM2d آرایدوبسیس تالیانا تهیه شده از ریزنمونه ساقه اکوتیپ آرایدوبسیس *Landsberg erecta* از دانشگاه کمبریج دریافت گردید. واکشت سلول‌های MM2d بصورت هفتگی در محیط MSS تازه (نمک موراشیگ و اسکوگ، ۳ درصد ساکارز، ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر کینتین، pH=۵/۸) انجام شد. جهت واکشت، ۳/۵ میلی‌لیتر از کشت سوسپانسیون MM2d به

متعددی برای القاء همزمانی در سوسپانسیون سلولی وجود دارد که بیشتر آنها روی مراحل گذر چرخه سلولی (G2/M، G1/S) تاثیر می‌گذارند. طی سال‌های اخیر، اطلاعات مربوط به فرآیندهای مولکولی مؤثر در چرخه سلولی بعلت استفاده از سوسپانسیون سلولی همزمان شده، بطور قابل توجهی افزایش یافته است. کشت سلولی همزمان شده مدل مناسبی برای مطالعه رفتار ژن‌های چرخه سلولی محسوب می‌شود (Planchais *et al.*, 2000).

روش‌های القاء همزمان‌سازی شامل روش‌های فیزیکی از قبیل فلوسیتومتری (مرتب کردن سلول‌ها براساس اندازه و محتوای DNA آنها) و روش‌های شیمیایی با استفاده از اعمال بازدارنده‌های اختصاصی مراحل مختلف چرخه سلولی و یا حذف و اضافه نمودن مجدد یک ماده ضروری برای رشد از قبیل فسفات، نیترات، هورمون‌ها یا ساکارز می‌باشد Menges and Murray, 2005؛ Tate and Ferrigno, 2002 (2002). به عنوان مثال، فرست و همکاران (Fuerst *et al.*, 1996) با استفاده از غلظت کم سیکلوهگزامید، سلول‌های آرایدوبسیس را در مرحله G1 متوقف نمودند، ولی پس از ۱۲ ساعت از حذف این ماده، همزمانی سلول‌ها از بین رفت. Riou-Xhamlichی و همکاران (Riou-Khamlichی *et al.*, 2000) با حذف ساکارز و افزودن مجدد آن به کشت سوسپانسیون سلولی آرایدوبسیس، همزمانی سلول‌ها را در مرحله گذر از G1 به S گزارش نمودند. بازدارنده‌های مرحله S چرخه سلولی عموماً "با کاهش میزان dNTPs سلول یا ورود در رشته‌های DNA در حال ساخت تأثیر می‌گذارند. یکی از بازدارنده‌های مرحله S چرخه سلولی aphidicolin است. این ماده شیمیایی مانع اتصال dNTPs به DNA پلیمراز آلفا می‌شود ولی روی فعالیت DNA پلیمرازهای بتا و سیگما تأثیر ندارد (Tate and Ferrigno, 2005) در آزمایشی همزمانی حدود ۸۰ درصد سلول‌های آرایدوبسیس را در

فواصل ۲، ۴، ۶، ۱۰، ۱۲، ۱۴، ۱۶ و ۱۹ ساعت پس از شستشو برداشت شدند. برای کنترل آزمایش، سلول‌های MM2d با (Dimethylsulfoxide) DMSO (aphidicolin) تیمار شدند و پس از نگهداری به مدت ۲۴ ساعت در شرایط ذکر شده، شستشوی سلول‌ها و نمونه‌گیری انجام شد. سلول‌ها پس از نمونه‌گیری، در نیتروژن مایع منجمد و سپس در دمای -۸۰ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. همزمانی سلول‌های MM2d با استفاده از روش‌های فلوسیتومری (انجام شده در آزمایشگاه Gent بلژیک)، میکروسکوپی و نشانگرهای مولکولی مورد تأیید قرار گرفت (نتایج ارائه نشده است).

### استخراج RNA و ساخت cDNA

RNA کل از سلول‌های تیمار شده با aphidicolin و (Invitrogen، Germany) براساس روش ترایزول استخراج شد. غلظت RNA استخراج شده با استفاده از اسپکتروفوتومتر تخمین زده شد و کیفیت آن با استفاده از ژل یک درصد آگارز و اسرشته‌ساز (حاوی فرمالدئید) بررسی گردید. بقایای DNA ژنومی موجود در RNase عاری از DNaseI RNA با (Roche، Mannheim، Germany) هضم شد. نمونه‌های RNA پس از هضم، مجدداً "مورد ارزیابی کیفی و کمی (به ترتیب با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز و اسرشته‌ساز و اسپکتروفوتومتر) قرار گرفتند. وجود یا عدم وجود بقایای DNA ژنومی در نمونه‌های RNA تیمار شده با DNaseI بوسیله qRT-PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی یک ایترنون (Skirycz et al., 2007) دارای توالی‌های:

forward primer: 5'-AACAGCAACAACAATGCAACTACTGATT-3'  
reverse primer: 5'-ACAAACAGAGACAAGAGACAAGACATGG-3'

آنژیمی قرار گرفتند. mRNA موجود در نمونه‌های قادر DNA ژنومی، توسط آنزیم رونوشتبردار معکوس

فلاسک‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط MSS تازه انتقال یافت و در دمای ۲۶ درجه سانتیگراد، تاریکی ممتد و روی شیکر انکوباتور با ۱۳۰ دور در دقیقه نگهداری شد. برای بررسی دینامیک رشد سلول‌های MM2d، هر ۲۴ ساعت نمونه‌گیری از کشت سوسپانسیون انجام شد و تعداد سلول‌ها با استفاده از لام‌هموسیوتومتر (Neubauer، Germany) شمارش گردید. مطالعات میکروسکوپی کشت سوسپانسیون سلولی با Olympus BX51 استفاده از میکروسکوپ اپی فلورسنس (Olympus، Tokyo، Japan) انجام شد.

### القای همزمان‌سازی سلول‌های MM2d

سلول‌های MM2d با استفاده از aphidicolin (Sigma) در مرحله G1/S بطور برگشت‌پذیر متوقف می‌شوند (Planchais et al., 2000). برای القای همزمان‌سازی ۲۰ میلی‌لیتر از سوسپانسیون سلولی در ابتدای مرحله سکون (Early stationary phase) (۵ روز پس از واکشت) به ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط MSS تازه حاوی ۴ میکروگرم در میلی‌لیتر aphidicolin انتقال یافت و به مدت ۲۴ ساعت تحت شرایط فوق نگهداری گردید. برای شستشوی سلول‌ها و حذف aphidicolin، سلول‌ها با استفاده از صافی نایلونی مخصوص (با اندازه سوراخ‌های ۴۷ میکرومتر) و یک نیم لیتر محیط MSS به آرامی شستشو داده شدند و به فласک‌های حاوی ۱۲۰ میلی‌لیتر محیط MSS تازه انتقال داده شدند. فласک‌ها در شرایط مذکور (۱۳۰ دور در دقیقه، ۲۶ درجه سانتیگراد، تاریکی ممتد) نگهداری شدند. اولین نمونه‌گیری بلاfacile پس از شستشو (T0) و نمونه‌های بعدی در

مربط به ژن late elongated hypocotyl و نمونه‌های دارای DNA ژنومی مجدداً "مورد هضم

ساخته شده بواسیله qRT-PCR و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی *UBQ10* دارای توالی‌های:

Invitrogen, Germany, Super script III reverse )  
cDNA به cDNA تبدیل شد. غلظت (transcriptase kit

forward primer: 5'-GGCCTTGTATAATCCCTGATGAATAAG-3'  
reverse primer: 5'-AAAGAGATAACAGGAACGGAACATAAGT-3'

دارای توالی‌های زیر مورد ارزیابی قرار گرفته: مورد ارزیابی قرار گرفت. کیفیت cDNA با استفاده از دو جفت آغازگر مربوط به دو انتهای ژن *GAPDH*

|                         |                             |
|-------------------------|-----------------------------|
| GAPDH3' forward primer: | 5'-TTGGTGACAACAGGTCAAGCA-3' |
| GAPDH3' reverse primer: | 5'-AAACTTTCGCTCAATGCAATC-3' |
| GAPDH5' forward primer: | 5'-TCTCGATCTCAATTGCAAAA-3'  |
| GAPDH5' reverse primer: | 5'-CGAAACCGTTGATTCCGATTC-3' |

تغییرات سطح ظاهر ( $C_T$ ) هر یک از ژن‌ها پس از نرمال‌سازی (یا  $\Delta C_T$ ) بحسب میزان ظاهر بالاصله پس از حذف *aphidicolin* ( $T_0$ ) با استفاده از رابطه ۲ محاسبه و بصورت (Fold change) (یا  $FC = -\Delta \Delta C_T$ ) ارائه شد.  $C_T$  عبارت است از تعداد چرخه‌ای که تغییر مقدار سیگنال فلورستن SYBR green طی فاز نمایی تکثیر DNA در واکنش PCR به یک مقدار مشخص برسد.

$$-\Delta \Delta C_T = \Delta C_{T,T_0} - \Delta C_{T, \text{نور نظر}} \quad (2)$$

## نتایج

### الگوی رشد لاین سلولی MM2d

سوپاپنسیون سلولی لاین سلولی سریع الرشد MM2d حاوی گروه‌های نسبتاً "کوچک از سلول‌های کرمی رنگ" است. این سلول‌ها توانایی تولید کلروفیل را پس از انتقال به شرایط نوری دارا می‌باشند (Menges and Murray, 2002). سلول‌های MM2d در محیط کشت MSS و شرایط نگهداری ذکر شده در قسمت مواد و روش‌ها تقریباً "از هم جدا بوده و به سرعت تقسیم می‌شوند. شمارش سلول‌ها با استفاده از لام هموسیتومر تا هشت روز پس از واکشت و تعیین

**qRT-PCR**  
واکنش qRT-PCR در حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر با استفاده از پنج میکرولیتر معرف (Applied Biosystems, Fostercity, CA) SYBR Green چهار میکرولیتر جفت آغازگر (۵۰ میکرومولار) و یک میکرولیتر الگو (RNA کلی یا cDNA) در دستگاه Gene 7300 Amp انجام شد. تجزیه داده‌های qRT-PCR با استفاده از نرمافزار SDS 2.2.1 (Applied Biosystems) و تجزیه خوش‌ای و بررسی الگوی تظاهر ژن‌ها با استفاده از نرمافزارهای Excel و MeV (نسخه ۴/۳) صورت گرفت.

جهت تکثیر ۶۹ ژن پایه چرخه سلولی و ۸۱ ژن رمزکننده عوامل رونویسی از cDNA نمونه‌های تیمار شده با *aphidicolin* (T11, T12, ..., T19) استفاده شد. رقیق‌سازی cDNA و استفاده از آن در واکنش qRT-PCR براساس تکثیر ژن *UBQ10* صورت گرفت. نرمال‌سازی داده‌های qRT-PCR با استفاده از ژن *UBQ10* و بر اساس رابطه ۱ انجام شد.

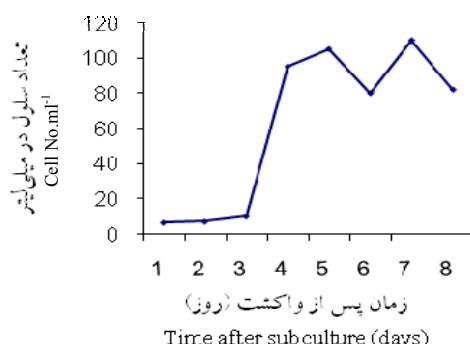
$$\Delta C_T = C_{T, \text{UBQ10}} - C_{T, \text{نور نظر}} \quad (1)$$

یعنی رشد و بزرگ شدن اندازه سلول را نشان دادند (نتایج ارائه نشده است). پس از رسیدن به مرحله سکون، نوسانات کوچکی در وضعیت رشدی این سلول ها مشاهده گردید که در مورد این لاین سلولی کاملاً طبیعی است (Menges and Murray, 2002).

#### ارزیابی همزمانی سلول های MM2d توسط نشانگرهای مولکولی

سطح ظاهر ۶۹ ژن پایه دخیل در فرآیند چرخه سلولی و ۸۱ ژن رمزکننده عامل رونویسی در زمان های مختلف پس از شستشوی سلول های تیمار شده با qRT-PCR با استفاده از aphidicolin

لگاریتم تعداد سلول ها در میلی لیتر محیط کشت نشان داد که سلول های MM2d به سرعت رشد کرده و الگوی رشدی سیگموئیدی داشتند (شکل ۱). از زمان واکشت تا روز سوم، سلول ها در فاز تأخیری بودند. به طوری که سرعت تکثیر کم و شب منحنی کند بود. از روز سوم، منحنی وارد فاز نمایی شد که بیانگر رشد تصاعدی سلول ها است. این روند تا روز پنجم ادامه داشت به طوری که پنج روز پس از واکشت، تعداد سلول ها به حداقل رسید. در این زمان، سلول های MM2d در ابتدای مرحله سکون بودند و براساس مشاهدات میکروسکوپی، خصوصیات رشدی این مرحله



شکل ۱- الگوی رشد لاین سلولی MM2d و ابتدای فاز سکون (D5). سرعت رشد سلول های MM2d با شمارش تعداد سلول ها ( $\times 10^5$ ) در میلی لیتر محیط کشت بوسیله هموسیتو مت تعیین شد

Fig.1. Growth pattern of the MM2d cell line and early stationary phase (D5). Cells were subcultured and cell growth of cell lines MM2d monitored by determination of the number of cells ( $\times 10^5$ ) per mL culture medium by hemocytometer

جدول ۱- میانگین  $C_T$  ژن های خانه دار *UBQ10*, *ACTIN2*, *GAPDH*, *PDF2* و *EXPRES* در سه تکرار آزمایش القای همزمانی در زمان های مختلف پس از حذف aphidicolin. زمان ها بر حسب ساعت می باشند

Table1. Mean  $C_T$  value of the several housekeeping genes including *UBQ10*, *ACTIN2*, *GAPDH*, *PDF2* and *EXPRES* obtained from three replications of checking synchronization experiment in 10 time points after removal of aphidicolin. Times indicate hours in sampling

| Housekeeping genes | زمان (ساعت) |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|--------------------|-------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
|                    | 0           | 2    | 4    | 6    | 8    | 10   | 12   | 14   | 16   | 19   |
| <i>UBQ10</i>       | 18.1        | 18.2 | 18.6 | 17   | 16.8 | 17.4 | 17.4 | 16.8 | 17.4 | 16.9 |
| <i>ACTIN2</i>      | 21.8        | 21.9 | 22.2 | 20.5 | 20.6 | 20.8 | 20.6 | 20.2 | 20.8 | 20.2 |
| <i>GAPDH</i>       | 22.4        | 22.5 | 22.2 | 20.7 | 20.4 | 21.1 | 21.1 | 20.7 | 21.3 | 20.7 |
| <i>PDF2</i>        | 19.2        | 19.5 | 19   | 17.1 | 17.2 | 17.9 | 18.1 | 17.3 | 18   | 17.1 |
| <i>EXPRES</i>      | 26          | 26.2 | 25.3 | 23.6 | 22.9 | 23.9 | 23.7 | 23   | 24   | 22.7 |

مختلف، نرمال کردن داده‌های  $C_T$  هر ژن با استفاده از  $C_T$  ژن *UBQ10* و رابطه شماره ۱ انجام شد. با وجود آنکه تغییرات مطلق FC ژن‌ها در زمان‌های مختلف پس از حذف *aphidicolin* نسبت به زمان T0 چندان زیاد نبود، وجود نوسانات افزایش سطح ظاهر (تصورت داده‌های مثبت) و کاهش سطح ظاهر (تصورت داده‌های منفی) منجر به مقادیر بالای ضربی تغییرات برای هر ژن گردید که نشان دهنده نوسانات زیاد ظاهر ژن‌ها طی زمان‌های مختلف می‌باشد.

### الگوی ظاهر ژن‌های مربوط به چرخه سلولی در زمان‌های مختلف پس از حذف *aphidicolin*

سطح ظاهر ژن‌ها در زمان‌های مختلف پس از حذف *aphidicolin* با نوساناتی همراه بود. این نوسانات حتی در تکرارهای مختلف یک تیمار زمانی خاص نیز مشاهده شد. با وجود این، تعدادی از ژن‌ها از یک الگوی خاص تغییر سطح ظاهر در زمان‌های خاص پیروی می‌کنند به طوری که می‌توان برای تعدادی از ژن‌ها، زمان معینی را به عنوان زمان خاص تأثیرگذاری در نظر گرفت. برای گروه‌بندی ژن‌ها براساس بیان آنها در زمان‌های مختلف پس از حذف *aphidicolin*، تجزیه خوش‌ای با منظور، ژن‌هایی که دارای بیش از یک داده از دست رفته بودند از تجزیه حذف شدند. تجزیه خوش‌ای با روش Complete linkage و در نظر گرفتن فاصله اقلیدسی، قادر به تفکیک گروه‌هایی از ژن‌ها شد که بطور پیوسته در تمامی زمان‌ها دچار کاهش یا افزایش سطح ظاهر نسبی بودند (شکل ۲). همه ژن‌هایی که بطور پیوسته دچار کاهش شدید سطح ظاهر نسبی بودند عوامل رونویسی می‌باشند (گروه I شکل ۲). گروهی از ژن‌ها در مراحل S و G2 کاهش سطح ظاهر نسبی نشان دادند در صورتی که در مراحل M و G1 سطح ظاهر آنها افزایش یافته بود (گروه II شکل ۲). همچنین تعدادی از ژن‌ها (که شامل عوامل رونویسی می‌باشند) در مراحل S و G2 کاهش سطح ظاهر نسبی نشان دادند که پس از

میانگین سطح ظاهر پنج ژن مرجع *UBQ10*, *Actin2*, *EXPRES*, *PDF2* و *GAPDH* در نمونه‌های تیمار شده با *aphidicolin* در سه تکرار آزمایش القاء همزمانی برحسب مقادیر  $C_T$  ارائه شده است (جدول ۱).

این ژن‌ها در سه تکرار آزمایش و در زمان‌های مختلف پس از شستشوی سلول‌ها تقریباً "یکسان بود که بر پایداری سطح ظاهر این ژن‌ها در مراحل مختلف چرخه سلولی و عدم تأثیرپذیری آنها از شرایط محیطی دلالت دارد.

سطح ظاهر تعدادی از ژن‌ها نوسانات شدیدی حتی داخل هر زمان، بین تکرارهای مختلف نشان داد به طوری که در برخی از تیمارها سطح ظاهر قابل اندازه‌گیری برای برخی ژن‌ها مشاهده نشد. در تجزیه و تحلیل داده‌ها، تنها اطلاعاتی به عنوان قابل اطمینان در نظر گرفته شد که در هر زمان تیمار، حداقل دو تکرار واجد اطلاعات باشند.

جهت تعیین الگوی تغییر ظاهر ژن‌ها در زمان‌های مختلف، میانگین حسابی سطح ظاهر سه تکرار (یا دو تکرار در مواردی که فقط دو تکرار واجد اطلاعات می‌باشند) محاسبه و میانگین تغییرات در زمان‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفت. سطح ظاهر ژن‌ها در زمان‌های مختلف تفاوت بسیار چشمگیری داشت به طوری که حداقل مقدار ضربی تغییرات (CV) (براساس واریانس و میانگین ظاهر هر ژن در سه تکرار) معادل ۱۱/۱ مربوط به ژن *CDKDI* بود. این ژن دارای مقدار ظاهر حداقل در زمان ۱۰ ساعت پس از حذف *aphidicolin* بود. با وجود پایین بودن میانگین CV بین همه ژن‌ها، بعلت ماهیت بسیار حساس تکیک PCR حتی تغییرات کم نیز حائز اهمیت می‌باشد.

به منظور مقایسه بین انجام PCR های مختلف و نیز نمونه‌های cDNA متفاوت، از ژن‌های مرجع *ACTIN2*, *EXPRES*, *PDF2*, *GAPDH*, *UBQ10* در هر سه استفاده شد. بعلت سطح ظاهر نسبتاً بالاتر (C<sub>T</sub>=17±1) و پایداری ظاهر *UBQ10* در نمونه‌های

ناگهانی پس از شش ساعت مجدداً "کاهش یافت و پس از ۱۲ ساعت به بعد افزایش یافت (گروه VI شکل ۲).

تجزیه روند تغییرات سطح ظاهر ژن‌ها طی زمان، امکان جداسازی ژن‌هایی را که از یک الگوی زمانی ظاهر خاص پیروی می‌کنند، فراهم می‌نماید (شکل ۳). در این روندها، ژن‌هایی که دارای حداقل یا حداقل‌تر مطلق یا محلی در زمان یا مراحل مختلف چرخه سلولی می‌باشند قابل شناسایی هستند. به عنوان مثال، چهار ساعت پس از حذف aphidicolin سطح ظاهر هفت ژن به سطح ظاهر زمان حذف رسید و مجدداً بطور یکنواخت در سرتاسر زمان‌های باقی‌مانده افزایش یافت (پانل ۲۰ شکل ۳). ۱۲ ژن تا حدود شش ساعت پس از حذف تیمار، افزایش سطح ظاهر نشان دادند و پس از آن با کاهش سطح ظاهر بطور یکنواخت بیان شدند (پانل ۱۸ شکل ۳). چهار ژن در مرحله S سطح ظاهر پایینی داشتند و پس از رسیدن به سطح ظاهر زمان حذف تیمار، در تمامی مراحل باقی‌مانده افزایش سطح ظاهر نشان دادند (پانل ۴ شکل ۳). گروهی از ژن‌ها که پس از حذف aphidicolin کاهش سطح ظاهر داشتند پس از حدود چهار ساعت به سطح ظاهر زمان حذف رسیدند و بطور ثابت ظاهر یافته و سپس روند افزایشی نشان دادند (پانل ۱۴ شکل ۳). سطح ظاهر هفت ژن بلاfaciale پس از حذف aphidicolin افزایش یافت و پس از حدود هشت ساعت تقریباً بطور ثابت ادامه پیدا کرد (پانل ۱۱ شکل ۳).

## بحث

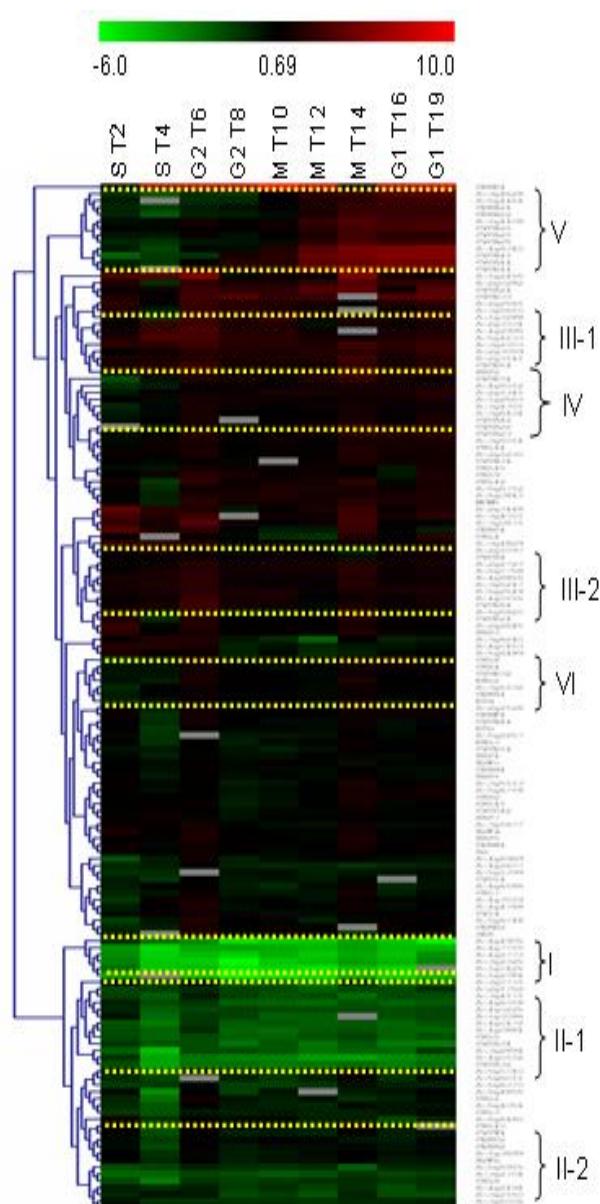
تغییر ظاهر ژن‌های دخیل در چرخه سلولی نقش اصلی در کنترل چرخه سلولی و پیشرفت آن یافا می‌کند (De Veylder *et al.*, 2003). بیشتر ژن‌های تنظیم کننده چرخه سلولی در کشت سلولی MM2d آراییدوپسیس بیان می‌شوند، بعارت دیگر ظاهر ژن‌های موثر در چرخه سلولی به یک بافت خاص اختصاص ندارد (Menges *et al.*, 2005). بنابراین، کشت سلولی

آن در سایر مراحل، سطح ظاهر آنها افزایش یافته بود (گروه ۷ شکل ۲).

صرف نظر از نوساناتی که در سطح ظاهر ژن‌ها در زمان‌ها و مراحل مختلف دیده شد، سطح ظاهر تعدادی از ژن‌ها در تمامی مراحل و زمان‌ها حفظ شد. این گروه از ژن‌ها در دو دسته شامل ژن‌هایی با کاهش سطح بیان و ژن‌هایی با افزایش سطح بیان طبقه‌بندی شدند. در دسته پیوسته سطح ظاهر نسبی بسیار پایینی داشتند (گروه I شکل ۲) در صورتی که گروه‌های دیگری بودند که نوسان کمی در سطح ظاهر نشان دادند و براساس شدت کاهش سطح ظاهر به دو دسته I-II- II (شکل ۲) طبقه‌بندی شدند. دسته ژن‌هایی که بطور پیوسته افزایش سطح ظاهر نشان دادند نسبت به دسته ژن‌های با کاهش سطح ظاهر بسیار کمتر بودند. در این دسته دو گروه از ژن‌ها قابل تشخیص بودند: گروه I-III، که سطح کلی ظاهر آنها نسبت به گروه دیگر، 2-III بالاتر بود (شکل ۲).

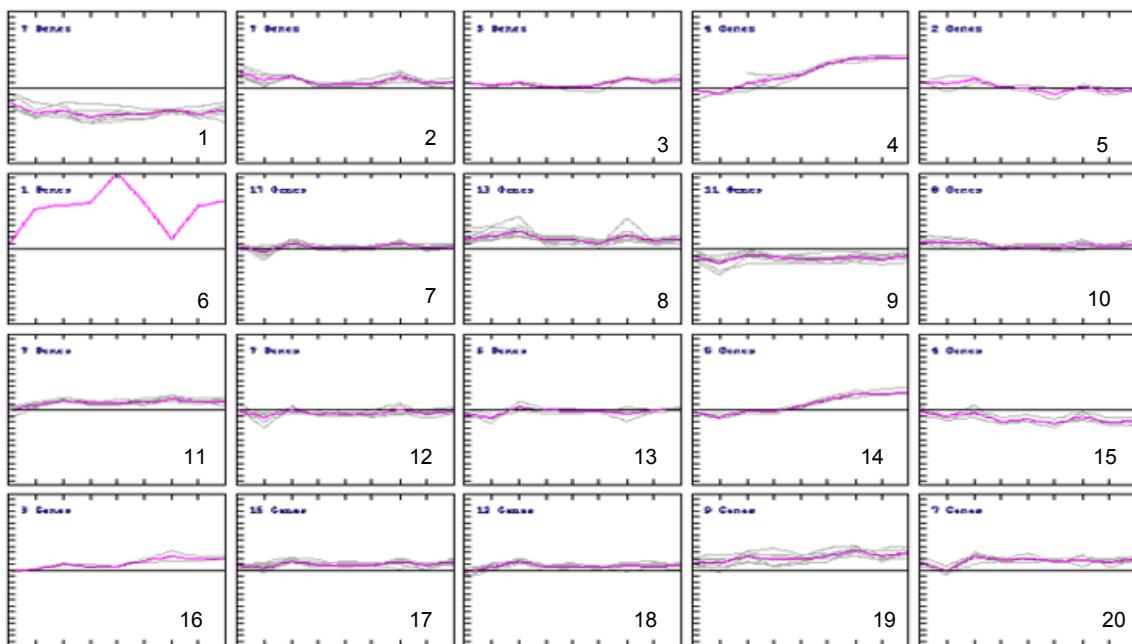
تغییر ماهیت سطح ظاهر ژن‌ها، یعنی از سطح ظاهر نسبی مثبت به منفی و بالعکس، در تعداد زیادی از ژن‌ها در طی زمان مشاهده شد. تعدادی از ژن‌ها تغییرات وابسته به مرحله‌ای از چرخه سلولی را نشان دادند. برای مثال، گروهی از ژن‌ها در مرحله S سطح ظاهر منفی داشتند حال آنکه در سایر مراحل چرخه سلولی سطح ظاهر آنها مثبت بود (گروه IV شکل ۲).

گروهی از ژن‌ها در مراحل اولیه پس از حذف aphidicolin دارای سطح ظاهر نسبی بسیار پایینی بودند (منفی)، ولی پس از مدتی (شش تا ۱۰ ساعت) سطح ظاهر آنها افزایش یافت به طوری که از ۱۲ ساعت به بعد سطح ظاهر آنها بسیار افزایش یافت و به سطح مثبت رسید (گروه V شکل ۲). بجز ژن‌های مذکور، تعدادی از ژن‌ها نوسانات زیادی طی زمان‌ها و مراحل مختلف داشتند. برای مثال، در ژن‌های گروه VI، ابتدا سطح ظاهر ژن‌ها بسیار پایین بود و سپس با یک افزایش



شکل ۲- الگوی بیان ژن‌های تنظیم کننده چرخه سلولی شامل ۶۹ ژن پایه چرخه سلولی و ۸۱ ژن عامل رونویسی با استفاده از نرم افزار MeV (نسخه ۴.۳). گروه‌بندی Hierarchical ژن‌های تنظیم کننده چرخه سلولی. نسبت سطح تظاهر در زمان ۰ (T0) (FC) بدست آمده از تکنیک qRT-PCR محاسبه و میانگین حسابی لگاریتم در مبنای دو مبنای دو روی سه تکرار نشان داده شده است (Log<sub>2</sub> FC). درجه اشباع رنگ، منعکس کننده مقدار میانگین FC Log<sub>2</sub> است. برای هر زمان، میزان بیان بیشتر و کمتر از میزان بیان در زمان صفر بترتیب با رنگ‌های قرمز و سبز مشخص شده است. دندروگرام عمودی (سمت چپ) ارتباط بین ژن‌های دخیل در چرخه سلولی را با توجه به الگوی بیان آنها نشان می‌دهد. مقیاس رنگ (بالای شکل) رنگ منتنسب به هر Log<sub>2</sub> FC را نشان می‌دهد

Fig. 2. Expression pattern of cell cycle- regulated genes including 69 core cell cycle genes and 81 transcription factors using MeV software, version 4.3. Hierarchical clustering of cell cycle-regulated genes. The fold change values for each sample relative to time zero as control were log<sub>2</sub> transformed. The mean values for the three independent biological replications were subjected to complete linkage hierarchical clustering. The color saturation reflects the magnitude of the averaged log<sub>2</sub>FC. Expression values higher and lower than those of the control are shown in red and green. The vertical dendrogram (left) indicates the relationship among the genes regarding their expression patterns. The color scale (top) indicates the color assigned to each log<sub>2</sub>FC



شکل ۳- الگوی بیان ژن‌های تنظیم کننده چرخه سلولی شامل ۶۹ ژن پایه چرخه سلولی و ۸۱ ژن عامل رونویسی با استفاده از نرم افزار MeV (نسخه ۴.۳). نسبت سطح ظاهر در زمان T0 (FC) (بدست آمده از تکنیک qRT-PCR) محاسبه و میانگین حسابی لگاریتم در مبنای دو روی سه تکرار نشان داده شده است ( $\text{Log}_2 \text{FC}$ ). اعداد محور افقی نشان‌دهنده زمان‌های مختلف پس از حذف aphidicolin می‌باشد

Fig. 3. Expression pattern of cell cycle- regulated genes including 69 core cell cycle genes and 81 transcription factors using MeV software, version 4.3. Cell cycle-regulated gene expression profiles were plotted against the different time points after removal of aphidicolin

همزمان شده مدل مناسبی برای تعیین الگوی ظاهر ژن‌های مربوط به چرخه سلولی است (Menges and Murray, 2002). از آنجاییکه تیمار سلول‌های MM2d با aphidicolin همزمانی بالایی را در مرحله S چرخه سلولی القاء می‌کند (Menges and Murray, 2002)، در این تحقیق بوسیله تکنیک qRT-PCR الگوی بیان ژن‌های دخیل در فرآیندهای سلولی شامل کنترل چرخه سلولی، رونویسی، فسفوریلاسیون و پاسخ به هورمون در سلول‌های همزمان شده آراییدوپسیس مورد بررسی قرار گرفت.

براساس نتایج حاصل از این آزمایش، اغلب ژن‌های سایکلین نوع A و B الگوی بیان بسیار مشابهی داشتند (پانل ۴ شکل ۳) که مطابق با نتایج منگز و همکاران

یافت. این ژن عامل محدود کننده سرعت برای گذر G1/S است (Menges *et al.*, 2006). افزایش بیان CYCD3;1 در آراییدوپسیس منجر به افزایش تقسیمات سلولی و جلوگیری از خروج سلول از میتوز می‌شود (Dewitte *et al.*, 2003). همچنین ژن‌های CYCD2;1 و CYCD5;1 الگوی ظاهر تقریباً "یکسانی نشان دادند که CYCD5;1 دارای بیان بیشتری بود (شکل ۴، ر). گزارش شده است که افزایش بیان CYCD2;1 در توتون باعث افزایش سرعت رشد می‌شود ولی روی اندازه و شکل برگ تأثیری ندارد (De Veylder *et al.*, 2003).

برگ CYCD1;1 و CYCD3;3 الگوی بیان متفاوتی نسبت به سایر ژن‌های CYCD نشان دادند. سطح ظاهر این دو ژن همواره بیشتر از سایر ژن‌های CYCD بود (شکل ۴، ن). در آراییدوپسیس، به کمک ریزآرایه‌ها، سطح ظاهر بالای سه ژن گروه CYCD3 و ژن‌های CYCD1;1، CYCD6;1، CYCD2;1 و CKL15 در گل‌های این گیاه گزارش شده است (Menges *et al.*, 2005). قرار گرفتن ژن‌های CDKB2;1 و CDKB2;2 در یک گروه (گروه ۷ شکل ۲ و پانل ۴ شکل ۳) همراه با سایکلین‌های میتوزی (CYCA) با نتایج منگز و همکاران (Menges *et al.*, 2005) مطابقت دارد. ژن‌های CDKB2 حدود شش ساعت پس از حذف aphidicolin افزایش سطح ظاهر نشان دادند (گروه ۷ شکل ۲). میزان ظاهر ژن‌های CDKB2;2 و CDKB2;1 تا شش ساعت پس از حذف aphidicolin بسیار پایین بود و پس از آن میزان ظاهر افزایش یافت به طوری که ۱۰-۱۲ ساعت پس از حذف aphidicolin (مطابق با مرحله G2/M، منگز و همکاران Menges *et al.*, 2005) سطح ظاهر به بیشترین مقدار خود رسید (گروه ۷ شکل ۲، پانل ۴ شکل ۳ و شکل ۴).

عوامل رونویسی تنظیم کننده مرحله میتوز (Menges *et al.*, 2003) در گروه ۷ همراه با ژن‌های CYCA و CYCB (سایکلین‌های میتوزی) قرار گرفتند. در این گروه، عامل رونویسی

الگوی بیان ژن‌های CYCA3;2 و CYCA3;1 مشابه بود ولی ژن CYCA3;1 نوسان بیشتری در مراحل مختلف داشت (شکل ۴، ب). گروه ژن‌های CYCA3 دارای حداقل سطح ظاهر در مرحله S بودند در صورتی که سایر سایکلین‌های نوع A و B افزایش سطح ظاهر در G2/M نشان دادند که احتمالاً "یانگر نقش تنظیمی آنها در این مراحل است (شکل ۴، ج). اثر تنظیمی این ژن‌ها در گذر G2/M توسط منگز و همکاران (Menges *et al.*, 2005) نیز گزارش شده است. الگوی بیان ژن‌های CYCB شباهت زیادی به یکدیگر داشت به طوری که این ژن‌ها در مرحله M حداقل میزان بیان نشان دادند (شکل ۴، ج). از میان ژن‌های CYCB مورد بررسی در این تحقیق (شکل ۴، ۲۴، ۱۴، CYCB1;1، ۲۵ و ۳۱)، ژن‌های CYCB2;4 و CYCB2;5 الگوی بیان تقریباً "یکسانی داشتند، به طوری که برای هر دو ژن سطح ظاهر در مرحله G1 حدود سه برابر مرحله S بود. بالاترین میزان بیان در مراحل M و G1 متعلق به CYCB1;4 بود (شکل ۴، ج). با وجود این، CYCB1;4 نوسان بیشتری در سطح ظاهر داشت، طی مرحله S کاهش بیان داشت و در G2/M به حداقل میزان بیان CYCA2;4 و CYCB2;4 خود رسید ولی ژن‌های CYCB2;4 و CYCA2;4 نوسان کمتری در سطح ظاهر نشان دادند. تحقیق صورت گرفته روی سطح ظاهر این ژن‌ها به کمک ریزآرایه Menges *et al.*, (Microarray) نیز مؤید این یافته است (2005). ژن‌های CYCD در گروه‌های نزدیک قرار گرفتند (گروه ۲-III و VI شکل ۲). در مشاهدات مربوط به آزمایش حاضر، الگوی بیان CYCD6;1 و CYCD3;2 آنکه در ابتدای مرحله G2، میزان ظاهر ژن CYCD6;1 دو برابر CYCD3;2 بود (شکل ۴، د). الگوی ظاهر CYCD3;1 و CYCD4;1 نیز شباهت زیادی داشت و لی میزان بیان CYCD3;1 حدود ۲/۵ برابر CYCD4;1 بود (شکل ۴، ذ). ظاهر CYCD3;1 در مرحله S حداقل بود و از مرحله G2 افزایش و مجدداً در G1 کاهش

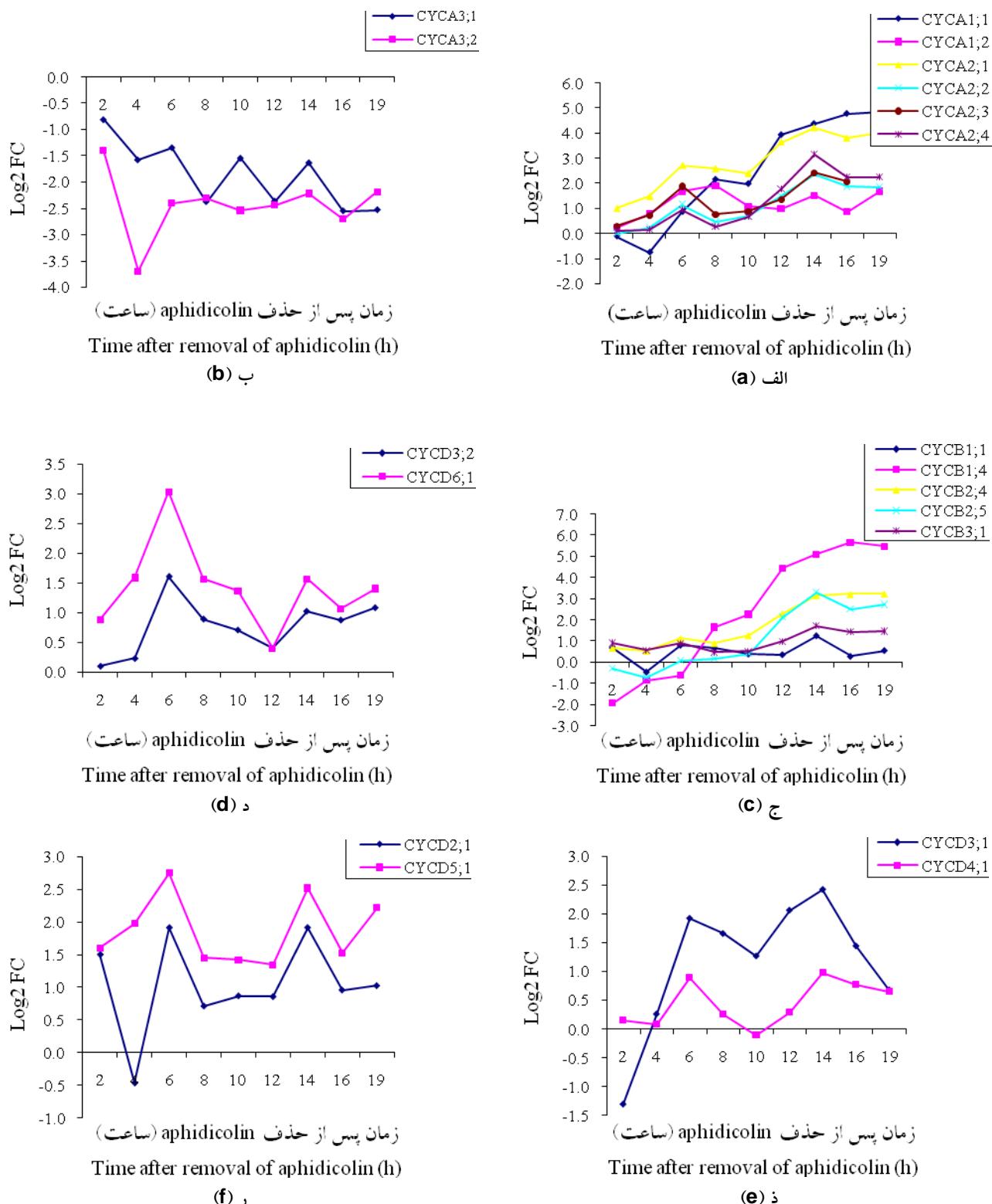
راه انداز خود می‌باشد (Inzé, 2007). این جایگاه توسط عوامل رونویسی خانواده MYB شناسایی می‌شود (Inzé, 2007). در آراییدوپسیس، ژن *AtMYB3R4* بیان ژن‌های دارنده جایگاه MSA را تنظیم می‌کند (Menges et al., 2005). جالب توجه اینکه در راه انداز ژن *AtMYB3R4* نیز سه جایگاه MSA وجود دارد (Menges et al., 2005). پروتئین ژن *At4g11080* بسوی پلاستید هدف گیری می‌شود. با توجه به قرار گرفتن این ژن در گروه V (گروه V شکل ۲) همراه با چند عامل رونویسی دیگر و ژن‌های پایه چرخه سلولی، وجود رابطه بین تقسیم هسته و پلاستید محتمل است (Menges et al., 2005). در این مطالعه ژن‌های *CDKC* در گروه II-2 قرار گرفته‌اند (گروه II-2 شکل ۲ و پانل ۲ شکل ۳). ژن‌های این گروه سطح تظاهر پایینی دارند. پروتئین *CDKC* با تشکیل کمپلکس با پروتئین *CYCT* به عنوان تنظیم کننده مثبت رونویسی عمل می‌کند در صورتی که پروتئین *CDKE* همراه با پروتئین *CYCC* به عنوان جزئی از هولوآنزیم RNA پلیمراز II اثر منفی بر رونویسی دارند (Inzé, 2007). عوامل رونویسی خانواده‌های متعددی شامل *WRKY* (*At5g22570*) و *C2H2* (*At5g18550*) و *C2H2* (*At5g10510*) و *CKL* (*At5g61600*) همراه ژن‌های پایه چرخه سلولی شامل *CKL* و *CDKG* و *CKL* دارای الگوی تظاهر یکسانی بودند (گروه II-2 شکل ۲). ژن‌های *CKL* در مراحل کترل چرخه سلولی G1/S و G2/M افزایش سطح تظاهر نشان دادند (Inzé, 2007 و Menges et al., 2005). در بین ژن‌های تنظیم کننده چرخه سلولی، بیشتر اعضاء این خانواده بطور استثنایی بیان زیادی را در اندام یا بافت خاصی از گیاه نشان نمی‌دهند (Menges et al., 2005). در گروه II-2، ژن‌های *E2F* (شامل *E2Fa*, *E2Fb*, *E2Fc*) نیز قرار گرفته‌اند (گروه II-2 شکل ۲). ژن‌های *E2F* در گذر G1/S تنظیم کننده افزایش سطح تظاهر نشان می‌دهند (Inzé, 2007). افزایش بیان *E2Fa* و *E2Fb* در آراییدوپسیس، بعلت تحریک تقسیم سلولی منجر به تغییر

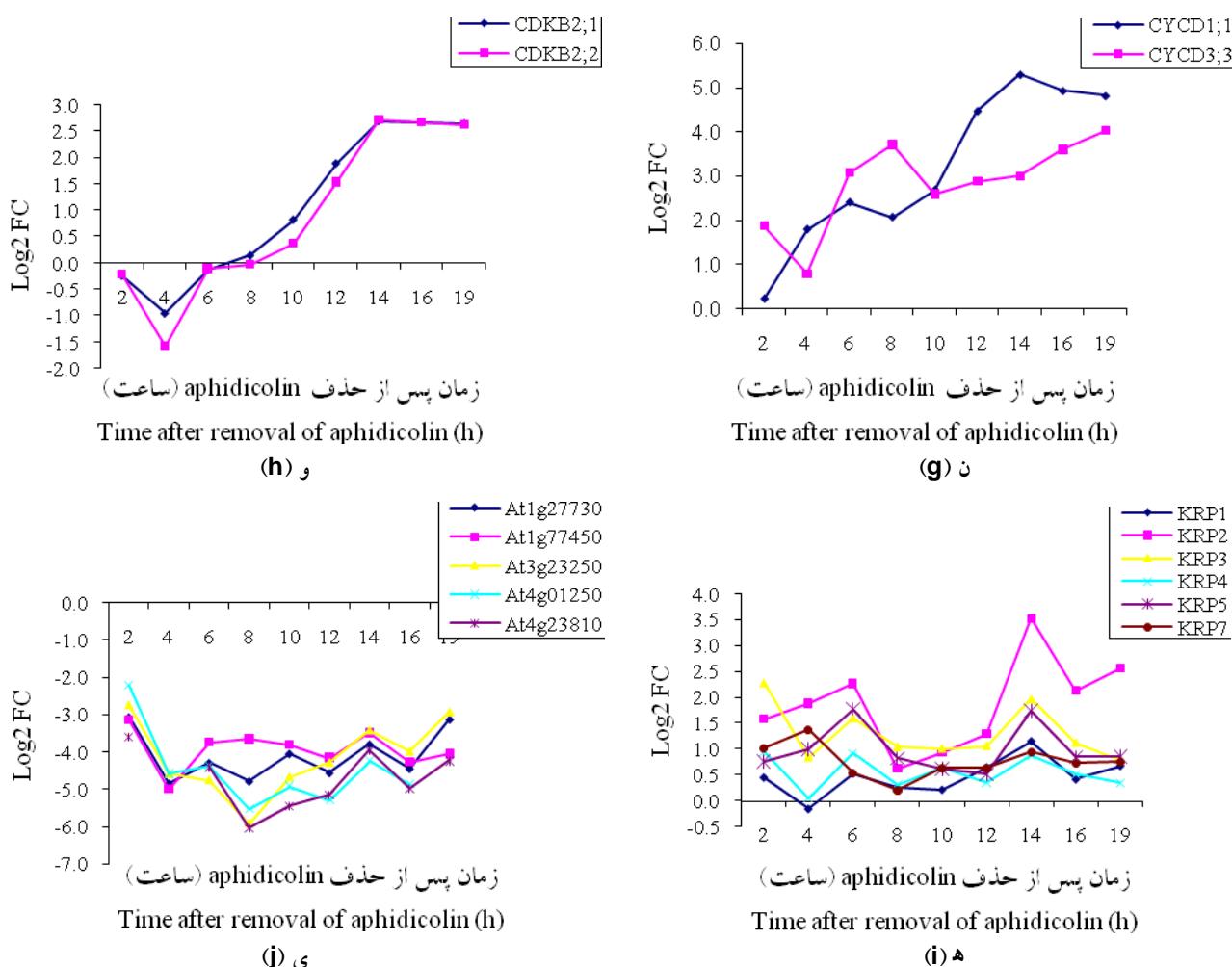
(*At3g16280*) متعلق به خانواده AP2 قرار دارد. گزارش شده است که افزایش بیان این ژن طی مراحل رویشی و زایشی مانع تقسیم سلول و بعلت کاهش طول سلول، باعث کاهش اندازه اندام‌ها در آراییدوپسیس می‌شود (Marsch- Martinez et al., 2006). برخی از اعضای خانواده AP2 در تنظیم ژن‌های مربوط به چرخه سلولی دخالت دارند، به عنوان مثال، در آراییدوپسیس افزایش بیان یک ژن از خانواده AP2 (*ANT*) باعث فعال شدن *CYCD3* می‌شود. این ژن نمو گل را تنظیم می‌کند و برای تشکیل تخمک ضروری است (Autran et al., 2002). افزایش بیان یک عامل رونویسی از خانواده AP2 (*BOLITA*) باعث افزایش بیان ژن‌های *CYCD3;1* و *RB* می‌شود. *BOLITA* روی تعداد سلول، رشد و تمایز آن تأثیر دارد (Marsch- Martinez et al., 2006). ژن‌های *CYCD* و *RB* نیز در تقسیم سلولی و تمایز نقش دارند (Menges et al., 2005). بنابراین، عامل رونویسی AP2 و ژن‌های پایه چرخه سلولی (*CYCD* و *RB*) با تأثیر گذاری بر تقسیم و تمایز سلول، بین این دو فرآیند رابطه برقرار می‌کند. همچنین در گروه V، عامل رونویسی *At1g63100* (*SCARECROW*) متعلق به خانواده عوامل رونویسی bZIP، که دارای سطح بیان حداقل در G1 است در تقسیم سلولی نامتقارن نقش دارد (Oyama et al., 1997). ژن‌های bZIP دارای جایگاه اتصال در راه انداز ژن‌های هیستون هستند و تظاهر این ژن‌ها را طی مرحله S تنظیم می‌کند (Okanami et al., 1996). از خانواده عوامل رونویسی *At5g11510* (*AtMYB3R4*) نیز در گروه V ژن MYB، ژن *AtMYB3R4* ساختار ژن با ژن‌های *NtmybA1* و *NtmybA2* توelon شbahat زیادی دارد و رونویسی ژن‌های پایه چرخه سلولی مربوط به G2/M را تنظیم می‌کند (Ito et al., 2001). ژن‌های القاء شونده در مرحله میتوуз دارای جایگاه فعال‌سازی اختصاصی میتوуз (MSA) در

آراییدوپسیس می‌شود (Shin *et al.*, 2007). اکسین فیزیولوژی گیاه را با تنظیم برهم کنش عوامل رونویسی با عناصر پاسخ‌دهنده به اکسین در ژن‌های دارنده آن تنظیم می‌کند (Ulmasov *et al.*, 1997). ژن‌های متعددی از خانواده عوامل رونویسی (*At1g01530*) MADS box و *AP2* (*At5g61890*) و انگشت روی (*At3g18290*) پروتئین القاء‌شونده با اکسین (IAA20) دارای الگوی MADS یکسانی هستند (پانل ۱۷ شکل ۳). ژن‌های *KRP3* در جنبه‌های مختلف رشد و نمو گیاه نقش دارند و *et al.*, 2008) بر تعداد و اندازه سلول‌ها تأثیر می‌گذارند (*Tapia-López*). در میان عوامل رونویسی تنظیم کننده چرخه سلولی، خانواده‌های HD-ZIP و DOF نیز وجود HD-ZIP دارند. در این مطالعه ژن *At4g32880* از خانواده *At4g32880* در این مطالعه ژن *At4g32880* از خانواده *HD-ZIP* دارای ظاهر حداکثر در مرحله S می‌باشد. عوامل رونویسی *HD-ZIP* نیز توسط اکسین القاء می‌شوند (*Mattsson et al.*, 2003) و تنظیم کننده‌های کلیدی سرنوشت سلول و تخصیص شدن سلول در مراحل اولیه جنین زایی هستند (Inzé, 2007). در این تحقیق، عوامل DOF رونویسی *At2g34140* و *At3g50410* از خانواده *DOF* دارای حداکثر سطح ظاهر در مرحله G1 بودند. ژن‌های این خانواده، به عنوان مثال ژن *OBP1*، با هدف قرار دادن ژن‌های پایه چرخه سلولی (*CYCD3;3* و *KRP7*) در *Skirycz et al.*, 2007) کنترل مراحل G1 و S نقش دارند (.

نتایج تحقیق حاضر بیانگر فعالیت دو گروه ژن‌های پایه و عوامل رونویسی در فرآیند چرخه سلولی است. از آنجائیکه عوامل رونویسی به عنوان جایگاه‌های کلیدی و کنترل تنظیم سایر ژن‌ها مطرح می‌باشند، شناسایی الگوی تأثیرگذاری آنها در مراحل مختلف چرخه سلولی، امکان مهندسی فرآیند چرخه سلولی را فراهم می‌سازد. ژن‌های پایه دارای تأثیر مستقیم در کنترل مراحل مختلف چرخه سلولی می‌باشند که شناخت آنها و نیز زمان تأثیرگذاری آنها ابزاری جهت کنترل مراحل خاصی از چرخه سلولی می‌باشد. مطالعاتی در مورد نقش برخی از

مورفوولوژی ریشه‌ها، کوتیلدون و برگ‌ها می‌شود (Boniotti and Griffith, 2008). ژن‌هایی که در مرحله G1/S فعال می‌شوند (مانند *MCM5*) دارای جایگاه اتصال عوامل رونویسی *E2F* در راه انداز خود می‌باشند (*Menges and Murray, 2002*) مورد بررسی در این تحقیق، الگوی ظاهر ژن‌های *KRP3* و *KRP4* شباهت زیادی با یکدیگر و شباهت کمتری با *KRP1* داشتند. ژن‌های *KRP3* و *KRP4* حداکثر سطح *KRP1* بیان را در مرحله S نشان دادند (شکل ۴، ۵). بیان ژن‌های *KRP3* و *KRP7* در گذر *G1/S* افزایش و پس از آن *KRP1* کاهش یافت. سطح ظاهر *KRP4* در ابتدای G2 و *KRP1* در انتهای M حداکثر بود (شکل ۴، ۵). عوامل *WRKY* رونویسی از خانواده *NAC* (*At1g77450*) و *At4g23810* و *At4g01250*)، پروتئین انگشت روی *AtMYB15* (*At1g27730*) و *At3g23250*) در مراحل G1 و M افزایش سطح ظاهر نشان دادند (گروه I شکل ۲، پانل ۱۱ شکل ۳ و شکل ۴، ۵). یک عامل رونویسی از خانواده *NAC* (*NTM1*) با فعال کردن ژن‌های بازدارنده فعالیت *KRPs* (*CDK*) فعالیت ژن‌های هیستون H4 را از بین می‌برد و منجر به کاهش تقسیم سلولی می‌شود. ژن‌های *I1, CYCD3;3*، *KRP2* و *KRP7* توسط *NTM1* تنظیم می‌شوند. این ژن سیگنال‌دهی اکسین طی تشکیل ریشه‌های جانبی را تنظیم می‌کند (Kim *et al.*, 2006). اعضاء گروه I همراه با ژن‌های *KRP* در مراحل گذر *G1/S* و *G2/M* افزایش سطح بیان نشان دادند (گروه I شکل ۲). عوامل رونویسی نقش مهمی در انتقال سیگنال هورمون‌ها دارند و مسیرهای مختلف را به یکدیگر ارتباط می‌دهند. عوامل رونویسی با تغییر سیگنال‌های هورمونی روی تکثیر و اندازه سلول تأثیر می‌گذارند (Marsch-Martinez *et al.*, 2006). در این تحقیق، ژن *AtMYB77* (*At3g50060*) افزایش سطح ظاهر در مرحله میتوز نشان داد. *AtMYB77* با عوامل پاسخ‌دهنده به اکسین (ARFs) برهم کنش داشته و منجر به کاهش شدید تعداد ریشه‌های جانبی در





شکل ۴- الگوی تغییر بیان تعدادی از ژن‌های تنظیم کننده چرخه سلولی در سلول‌های همزمان شده آراییدوپسیس در زمان‌های مختلف پس از حذف aphidicolin. نسبت سطح تظاهر در زمان T0 (FC) (بدست آمده از تکنیک qRT-PCR) محاسبه و میانگین حسابی لگاریتم در مبنای دو روی سه تکرار نشان داده شده است (Log<sub>2</sub> FC). a) الگوی تظاهر ژن‌های CYCA. b) الگوی بیان ژن‌های CYCA3;2 و CYCA3;1. c) الگوی بیان ژن‌های CYCB. d) الگوی بیان ژن‌های CYCD. e) الگوی بیان ژن‌های CYCD4;1 و CYCD3;1. f) الگوی بیان ژن‌های CYCD3;2 و CYCD6;1. g) الگوی بیان ژن‌های CYCD3;3 و CYCD1;1. h) الگوی بیان ژن‌های CDKB2;1 و CDKB2;2. i) الگوی بیان ژن‌های KRP. j) الگوی بیان چند عامل رونویسی موثر در چرخه سلولی

Fig. 4. Several cell cycle-regulated gene expression patterns in aphidicolin-induced synchrony. The fold change values for each sample relative to time zero as control were log<sub>2</sub> transformed. The mean values for the three independent biological replications were plotted as Log<sub>2</sub>FC. a) Expression pattern of *CYCA* genes. b) Expression pattern of *CYCA3;2* and *CYCA3;1*. c) Expression pattern of *CYCB* genes. d) Expression pattern of *CYCD6;1* and *CYCD3;2*. e) Expression pattern of *CYCD4;1* and *CYCD3;1*. f) Expression pattern of *CYCD2;1* and *CYCD5;1*. g) Expression pattern of *CYCD3;3* and *CYCD1;1*. h) Expression pattern of *CDKB2;1* and *CDKB2;2*. i) Expression pattern of *KRP* genes. j) Expression pattern of several cell cycle-related transcription factors

Bernd Mueller-Roeber در موسسه تحقیقات فیزیولوژی مولکولی گیاهی ماکس پلانک آلمان انجام شد که بدین وسیله از حمایت‌های علمی و مالی ایشان تشکر و قدردانی می‌شود. از دکتر Armin Schlereth از موسسه ماکس پلانک جهت برنامه‌ریزی ربات برای انجام واکنش‌های PCR و دکتر Aleksandra Skirycz از داشنگاه Gent بذریک جهت اندازه‌گیری همزمانی کشت سوپاپانسیون سلولی آرابیدوپسیس بوسیله فلوسیتو متر سپاسگزاری می‌شود. از وزارت علوم، تحقیقات و فناوری جهت همکاری‌های همه‌جانبه سپاسگزاری می‌شود.

این ژن‌ها در فرآیندهای رشد و نمو صورت گرفته است که به چند مورد از آنها اشاره گردید. سالیان متعددی است که فرآیندهای رشدی به ژن‌ها منتبث شده‌اند، لیکن نحوه اثر این ژن‌ها که از طریق مراحل مختلف چرخه سلولی نقش خود را اینجا می‌کنند از جمله مواردی است که نقاط کلیدی مبهم موجود در شناسایی فرآیندهای رشد و نمو را بر جسته‌تر می‌سازد. برای شناسایی تأثیر این ژن‌ها روی رشد و نمو از طریق کنترل مراحل مختلف چرخه سلولی، تحقیقات بیشتری لازم می‌باشد.

### سپاسگزاری

این آزمایش در گروه تحقیقاتی پروفیسور

### منابع مورد استفاده

- Autran, D., C. Jonak, K. Belcram, T. S. Beemster, G. Kronenberger, O. Grandjean, D. Inzé and J. Traas. 2002.** Cell numbers and leaf development in *Arabidopsis*: a functional analysis of the STRUWWELPETER gene. *The EMBO J.* 21: 6036-6049.
- Boniotto, M. and M. E. Griffith. 2002.** Cross-talk between cell division cycle and development in plants. *The Plant Cell* 14: 11-16.
- De Veylder, L., J. Joubès and D. Inzé. 2003.** Plant cell cycle transitions. *Current Opinion in Plant Biol.* 6: 536-543.
- Dewitte, W., C. Riou-Khamlichi, S. Scofield, J. M. Healy, A. Jacqmard, N. J. Kilby and J. A. H. Murray. 2003.** Altered cell cycle distribution, hyperplasia, and inhibited differentiation in *Arabidopsis* caused by the D-type cyclin CYCD3. *The Plant Cell* 15: 79-92.
- Fuerst, R. A. U. A., R. Soni, J. A. H. Murray and K. Lindsey. 1996.** Modulation of cyclin transcript levels in cultured cells of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 112: 1023-1033.
- Inzé, D. 2007.** Cell cycle control and plant development. Blackwell Publishing Ltd, UK. 364 PP.
- Ito, M., S. Araki, S. Matsunaga, T. Itoh, R. Nishihama, Y. Machida, J. H. Doonan, and A. Watanabe. 2001.** G2/M-phase-specific transcription during the plant cell cycle is mediated by c-Myb-like transcription factors. *The Plant Cell* 13: 1891-1905.
- Kim, Y. S., S. G. Kim, J. E. Park, H. Y. Park, M. H. Lim, N. H. Chua and C. M. Park. 2006.** A membrane bound NAC transcription factor regulates cell division in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 18: 3132-3144.
- Marsch-Martinez, N., R. D. Greco, J. Becker, S. H. W. Dixit, J. Bergervoet, A. Karaba, S. De Folter and A. Pereira. 2006.** *BOLITA*, an *Arabidopsis* AP2/ERF – like transcription factor that affects cell expansion and proliferation/differentiation pathways. *Plant Mol. Biol.* 62: 825-843.

- Mattsson, J., W. Ckurshumova and T. Berleth.** 2003. Auxin signaling in *Arabidopsis* leaf vascular development. *Plant Physiol.* 131: 1327–1339.
- Menges, M. and J. A. H. Murray.** 2002. Synchronous *Arabidopsis* suspension cultures for analysis of cell-cycle gene activity. *The Plant J.* 30: 203-212.
- Menges, M., L. Hennig, W. Gruissem, and J. A. H. Murray.** 2003. Genome-wide gene expression in an *Arabidopsis* cell suspension. *Plant Mol. Biol.* 53: 423-442.
- Menges, M., S. M. De Gager, W. Gruissem, and J. A. H. Murray.** 2005. Global analysis of the core cell cycle regulators of *Arabidopsis* identifies novel genes, reveals multiple and highly specific profiles of expression and provides a coherent model for plant cell cycle control. *The Plant J.* 41: 546-566.
- Menges, M., A. K. Samland, S. Planchais and J. A. H. Murray.** 2006. The D-type cyclin CYCD3;1 is limiting for the G1-to-S-phase transition in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 18: 893-906.
- Okanami, M., T. Meshi, H. Tamai, and M. Iwabuchi.** 1996. *HALF-1*, a bZIP- type protein, interacting with the wheat transcription factor *HBP- 1a* contains a novel transcriptional activation domain. *Genes to Cells* 1: 87-99.
- Oyama, T., Y. Shimura and K. Okada.** 1997. The *Arabidopsis HY5* gene encodes a bZIP protein that regulates stimulus-induced development of root and hypocotyl. *Genes and Develop.* 11: 2983-2995.
- Planchais, S., N. Glab, D. Inzé and C. Bergounioux.** 2000. Chemical inhibitors: a tool for plant cell cycle studies. *FEBS Lett.* 476: 78-83.
- Riou-Khamlich, C., M. Menges, J. M. Healy and J. A. H. Murray.** 2000. Sugar control of the plant cell cycle: differential regulation of *Arabidopsis* D-type cyclin gene expression. *Mol. Cell Biol.* 20: 4513-4521.
- Shin, R., A. Y. Burch, K. A Huppert, S. B Tiwari, A. S. Murphy, T. J. Guilfoyle and D. P. Schachtman.** 2007. The *Arabidopsis* transcription factor *MYB77* modulates auxin signal transduction. *The Plant Cell* 19: 2440-2453.
- Skirycz, A., S. Jozefczuk, M. Stobiecki, D. Muth, M.I. Zanor, I. Witt, and B. Mueller-Roeber.** 2007. Transcription factor *AtDOF;2* affects phenylpropanoid metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol.* 175: 425-438.
- Tapia-López, R., B. García-Ponce, J. G. Dubrovsky, A. Garay Arroyo, R. V. Pérez-Ruiz, S. Kim, F. Acevedo, S. Pelaz and E.R. Alvarez-Buylla.** 2008. An *AGAMOUS*-related MADS-box gene, *XAL1* (*AGL12*), regulates root meristem cell proliferation and flowering transition in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol. Prev.* 107 PP.
- Tate, S. and P. K. Ferrigno.** 2005. Cell cycle: synchronization at various stages. *Encyclopedia of Life Sciences*, 1-5.
- Ulmasov, T., G. Hagen and T.J. Guilfoyle.** 1997. *ARF1*, a transcription factor that binds to auxin response elements. *Science*, 276: 1865-1868.
- Vandepoele, K., J. Raes, L. De Veylder, P. Rouzé, S. Rombauts and D. Inzé.** 2002. Genome- wide analysis of core cell cycle genes in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 14: 903-916.

## Expression patterns of cell cycle-related genes in *Arabidopsis thaliana*

**Dehghan Nayyari, F.<sup>1</sup>, H. Alizedeh<sup>2</sup>, M. R. Naghavi<sup>3</sup>, S. A. Mohammadi<sup>4</sup> and  
M. Soltani-Najaf-Abadi<sup>5</sup>**

### ABSTRACT

**Dehghan Nayyari, F., H. Alizadeh, M. R. Naghavi, S. A. Mohammadi and M. Soltani-Najafabadi.** 2010. Expression patterns of cell cycle-related genes in *Arabidopsis thaliana*. *Iranian Journal of Crop Sciences*. 12 (3) 346-363.

(In Persian)

Cell cycle, which is the basic reference for cell division and growth, is precisely regulated. Control of cell cycle progression in animal and plants needs regulation of gene expression. In this study, by means of inducing synchronization of *Arabidopsis* suspension cells using aphidicolin, trend of expression changes in several genes involving in different stages and biochemical pathways of cell cycle was investigated. Application of highly sensitive detection method, qRT-PCR enabled us to precisely monitor the behavior of the genes in different stages of the cell cycle. Expression patterns of 69 core cell cycle-related genes and 81 transcription factors were compared, and their possible roles in the specific stages of the cell cycle were analysed. Among the genes showing differential expression during progression of the cell cycle, cyclin type A and B and CDK have been reported to play key roles. The expression patterns of most of cyclin type A and B genes appeared to be similar. A subset of the cyclins, CYCA3 showed maximum expression in S phase which is considered as the most important kinases involved in this phase. CDK genes showed important role in G1/S and G2/M transition stages. Many transcription factors belonging to different transcription factor families showed fluctuations in different time of progression of the cell cycle that play significant role in the precise control of the cell cycle processes.

**Keywords:** *Arabidopsis* cell suspension, Gene expression, Cell cycle, Core cell cycle genes and Transcription factors.

---

**Received: October, 2009      Accepted: December, 2010**

1- Ph.D. student, The University of Tehran, Karaj, Iran (Corresponding author) (Email: fatemeh-dn@yahoo.com)

2- Associate Prof., The University of Tehran, Karaj, Iran

3- Associate Prof., The University of Tehran, Karaj, Iran

4- Associate Prof., The University of Tabriz, Tabriz, Iran

5- Assistant Prof., Seed and Plant Improvement Institute, Karaj, Iran