مجله علوم گیاهان زراعی ایران
دوره ۴۴، شماره ۲، ۱۳۹۲ (۲۳۵-۲۲۷)

تظاهر برخی ژن‌های دخیل در تحمل سرما در برنج (*Oryza sativa* L.) با استفاده از روش RT-PCR

خزر ادریسی مریان [۱]، حبیب الله سمیع زاده لاهیجی [۲*]، محمد مهدی سوهانی [۳] و سید حسن حسنی [۴]
۱، دانشجوی سابق کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی، ۲، دانشیار، ۳ و ۴، استادیاران ، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان

(تاریخ دریافت: ۹۱/۶/۲۶ - تاریخ تصویب: ۹۲/۳/۱)

چکیده

تنش سرمای ابتدای فصل بطور معمول سبب آسیب گیاهان برنج در کشت زود هنگام شمال کشور است. در این تحقیق تظاهر چهار ژن *OsP5CS2*، *OsTTP1*، *OsCOIN* و *OsLti6a* در گیاهچه‌های ۱۴ روزه دو ژنوتیپ برنج متحمل به سرما PR و رقم حساس هاشمی، تحت تنش سرما (۵ درجه به مدت ۲۴ ساعت) با استفاده از روش تظاهر افتراقی بررسی شد. نرم افزار Total Lab (Ver 1.10) برای کمیت سنجی محصولات PCR حاصل از تکثیر ژن‌های اختصاصی بکار رفت و برای بررسی تفاوت معنی داری بیان ژن‌ها از آزمون ویلکاکسون نرم-افزار SPSS.ver.18 استفاده شد. ژن‌های مختلف، الگوی بیان متفاوتی را در ژنوتیپ متحمل و رقم حساس، تحت تیمار دمایی نشان دادند. سطح بیان ژن‌های *OsP5CS2* و *OsLti6a* در ژنوتیپ PR افزایش و در هاشمی کاهش معنی داری نشان داد. دو ژن دیگر یعنی *OsTTP1* و *OsCOIN* در ژنوتیپ PR به طور معنی داری افزایش بیان داشتند اما، سطح بیان قابل ردیابی در هاشمی نداشتند. بنابراین نتایج نشان داد که بیان ژن‌های مورد مطالعه، در پاسخ به تنش سرما تغییر کرده و بر این اساس احتمالاً تغییر بیان این ژن‌ها می‌توانند در پروژه‌های اصلاحی تحمل به سرما برنج موثر باشند.

واژه‌های کلیدی: برنج، تنش سرما، تظاهر افتراقی، پروتئین‌های کارکردی، اسمولیت‌ها

مقدمه

یکی از موانع تولید برنج در مناطق معتدل، وجود تنش سرما (۱۲°C- ۰) است که سبب کاهش عملکرد زراعی آن می‌شود. از این رو، تهیه ارقام متحمل به دمای پائین در مراحل بحرانی رشد از اهداف مهم برنامه‌های اصلاحی در این مناطق است (Nakagahra et al., 1997). ژن‌های دخیل در تنش‌های غیر زیستی را می‌توان به ۳ گروه طبقه‌بندی کرد: ژن‌های کد کننده اجزای مسیر انتقال پیام، ژن‌های کد کننده عامل‌های رونویسی و ژن‌های کد کننده پروتئین‌های کارکردی(Gao et al., 2008). در این بین، پروتئین‌های کارکردی بر اساس تغییر میزان رونوشت و یا ترجمه، سلول‌ها را در برابر تنش یا برداشت عناصر سمی، بازسازی هموستازی سلولی و احیای الگوی طبیعی رشد، حفاظت می‌کند. تحمل گیاه به تنش بستگی به تنظیم صحیح مکانیسم‌های فیزیولوژیکی دارد. این امر با فعالیت پروتئین‌های کارکردی درگیر در مسیرهای نموی، سنتتیکی و متابولیکی امکان پذیر است. پروتئین‌های کارکردی شامل پروتئین‌های غشایی و آنزیم‌های کلیدی بیوسنتز اسمولیت‌هایی مانند پرولین و تری هالوز است (Gao et al., 2008). اسمولیت‌ها تحت تنش‌های غیر زیستی تجمع یافته و پروتئین‌ها و اجزای سلولی را در برابر اثرات مخرب شرایط تنش پایدار نگه می‌دارند (Soren et al., 2010). در برنج واکنش‌های فیزیولوژیکی به تجمع اسمولیت‌های مختلف بررسی و رونوشت برداری ژن‌های رمز کننده آنزیم‌های سنتزکننده آن‌ها، تحت شرایط مختلف مطالعه شده است (Pillai et al., 2004). برای مثال، در برنج‌های تراریخت شده که افزایش رونوشت برداری ژن‌های دخیل

* نویسنده مسئول: حبیب الله سمیع زاده لاهیجی تلفن: ۰۹۱۱۱۴۳۹۵۶۹ E-mail: hsamizadeh@guilan.ac.ir

در متابولیسم اسمولیت‌هایی نظیر پرولین (Su & Wu, 2004) و تری هالوز (Ge et al., 2008) انجام شده، افزایش تحمل به تنش مشاهده شده است. ژن *OsTPP1*، *Oryza sativa* Trehalose-6-phosphate phosphotase1، در گروه ژن‌های کدکننده پروتئین‌های کارکردی قرار دارد و آنزیم تری‌هالوز-۶-فسفات فسفاتاز را کد می‌کند.

این آنزیم مسئول سنتز تری‌هالوز از گلوکز-۶-فسفات و UDP- گلوکز است. نقش تری هالوز در سلول‌ها تثبیت آنزیم‌ها و پروتئین‌های دهیدراته، حفظ کارایی غشاهای لیپیدی و حفاظت از ساختارهای بیولوژیکی تحت شرایط تنش‌ها است (Pramanik & Imai, 2005). ژن *OsP5CS2*، *Oryza sativa* Δ^1-pyrroline-5-carboxylate synthetase، از دیگر ژن‌های پروتئین‌های عملکردی است و آنزیم دلتا-۱ پرولین-۵- کربوکسیلات سنتز را کد می‌کند. این آنزیم مسئول تولید پرولین از گلوتامات است (Hong et al., 2000). پرولین یک ملکول آلی غالب است که به دنبال تنش‌های محیطی مانند خشکی، شوری و سرما تجمع می‌یابد (Zhu, 2001) و یک آنتی اکسیدان است که ساختار فراسلولی (غشا و پروتئین‌ها) را پایدار نگه می‌دارد و پتانسیل سلولی را طی تنش حفظ می‌کند (McNeil et al., 2000). پروتئین‌های غشایی دسته دیگر پروتئین‌های کارکردی هستند(Gao et al., 2008). غشای پلاسمایی در سلول‌های گیاهی، یک سیستم سازمان یافته است که غالباً نقش ساختاری داشته و رابط بین فضای داخلی و خارجی سلول و انتقال اطلاعات بوده و فرآیند پیام‌رسانی پاسخ به تنش‌های زیستی و غیرزیستی، در آن رخ می‌دهد. تنش‌های غیر زیستی مانند سرما، سبب تغییرات خاص در ساختار فراسلولی غشای پلاسمایی می‌شوند (Buchanan et al., 2001). بنابراین، شناخت بهتر پروتئین‌های غشا پلاسمایی به بهبود استراتژی دفاع طبیعی گیاهان کمک می‌کند (Marmagne et al., 2004). ژن *OsCOIN* (Liu et al., 2007) و *OsLTi6a* (Morsy & Stewart, 2006) از جمله ژن‌های کد کننده پروتئین‌های غشایی است.

ژن *OsCOIN*، *Oryza sativa* COld-Inducible، کد کننده یک پروتئین غشایی با ساختار انگشت حلقه ای[1] (دارای یک منطقه حفاظت شده ۶۰-۴۰ آمینواسیدی غنی از سیستئین و متصل به دو اتم روی) است و متعلق به خانواده پروتئین‌های انگشت روی[2] bZIP است که در هر دو غشای هسته‌ای و سیتوپلاسمی حضور دارد.

بررسی‌های بیوانفورماتیکی نشان داده که پیش‌برنده[3] ژن *OsCOIN*، حاوی عناصر تنظیمی تنش‌های سرما، خشکی و شوری و ABA است. به طوری که افزایش بیان این ژن تحمل به تنش‌های غیر زنده را افزایش می‌دهد. القاء بیان این ژن با کاربرد ABA خارجی، نشان می‌دهد که بیان این ژن *OsCOIN* در برنج از مسیری وابسته به ABA پیروی می‌کند (Liu et al., 2007). ژن *OsLTi6a*، *Oryza sativa* Low temperature-induced کد کننده یک پروتئین غشایی کوچک است که می‌تواند تغییراتی در نسبت پروتئین/ لیپید ایجاد کند و بنابراین سیالیت غشاء را تغییر دهد (Morsy & Stewart, 2006).

مطالعات نشان داده که تفاوت در میزان بیان ژن‌های دخیل در تحمل، احتمالاً در اثر زمان و شدت فعالیت رونویسی این ژن‌ها بوده، به طوری که آنالیز عملکرد ژن‌های با بیان متمایز جهت درک مکانیسم ملکولی تحمل و پاسخ گیاه به تنش اهمیت دارد (Kiedrowski er al., 1992). تشخیص ژن‌های جدید، تعیین الگوی تظاهر آن‌ها درپاسخ به تنش و عملکرد آن‌ها در سازگاری به تنش، زمینه‌ای را برای شناخت نحوه تحمل گیاهان زراعی به تنش‌ها از طریق دستکاری ژنی، فراهم می‌کند (Bohnert & Cushman, 2000) و از روش‌های متعددی مانند دورگ گیری کاهنده[4]، ریزآرایه[5] و تظاهر افتراقی[3] استفاده شده است (Kim et al., 2007).

در این تحقیق میزان تظاهر افتراقی چهار ژن کارکردی *OsCOIN*، *OsLti6a* ، *OsP5CS2* و *OsTPP1* در تحمل به سرما در دو ژنوتیپ PR (متحمل به سرما) و رقم هاشمی (حساس به سرما) با استفاده از روش تظاهر افتراقی (Liang & Pardee, 1992) مطالعه شد.

1 .Ring finger protein
2. Zing finger protein
3. Promoter
4. Subtractive hybridization
5.Differential display

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و شرایط رشد

این پژوهش در سال ۹۰-۱۳۸۹ در آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشگاه گیلان انجام گرفت. برنج رقم محلی هاشمی که گیاهچه‌های آن به سرمای ابتدای فصل حساس بوده و ژنوتیپ PR27137-CR153(PR) (متحمل به سرما) (Alah gholipour et al., 2010)، به ترتیب از موسسه تحقیقات برنج کشور و مرکز بین المللی تحقیقات برنج (IRRI) تهیه شد.

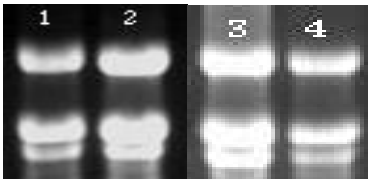
در ضدعفونی بذرها از وایتکس ۳۰ درصد استفاده شد و بذرها به مدت ۷ روز در انکوباتور و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و شدت نور ۲۰۰ لوکس، بین دو لایه کاغذ صافی استریل در داخل پتری دیش جهت جوانه زنی قرار گرفتند. بعد از ۷ روز بذرهای جوانه‌دار در گلدان‌های پلاستیکی نشاء و در اتاقک رشد در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و چرخه نوری ۹ ساعت روشنایی (به شدت ۲۰۰ لوکس) و ۱۵ ساعت تاریکی قرار داده شدند.

تیمار سرما

گیاهچه‌های برنج ۱۴ روزه در انکباتور تحت تیمار سرمای ۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت (Liu et al., 2007; Hur et al., 2004) قرار داده شدند. نمونه گیری از گیاهچه‌های دو هفته‌ای برنج در زمان‌های صفر (قبل از تیمار سرما) و ۲۴ ساعت بعد از تیمار سرما با سه تکرار و از هر تکرار ۳ نمونه برگی انجام شد و بعد از انجماد سریع در نیتروژن مایع، نمونه‌ها در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

استخراج RNA و ساخت DNA مکمل (cDNA)

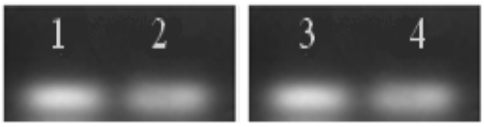
استخراج RNA کل با استفاده از کیت استخراج RNX-Plus Solution از شرکت (CinnaGen) طبق دستورالعمل آن انجام شد. پس از استخراج RNA، قبل و بعد از تیمار سرما، از دستگاه اسپکتروفتومتر(Eppendorph) برای کمیت سنجی و از ژل آگارز یک درصد برای کیفیت سنجی RNA استخراج شده، استفاده شد(شکل۱).



شکل ۱- RNA کل استخراج شده از ژنوتیپ‌های PR و هاشمی. ۱) PR در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد، ۲) هاشمی در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد، ۳) PR در دمای ۵ درجه سانتی گراد، ۴) هاشمی در دمای ۵ درجه سانتی گراد.

RNAها با آب DEPC رقیق شده و به غلظت ۰/۵ میکروگرم در میکرولیتر رسیدند. ساخت cDNA با استفاده از یک واحد آنزیم رونوشت‌بردار معکوس از شرکت (Fermentase) و با استفاده از آغازگرهای Oligo dT بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. تکثیر ژن‌های اختصاصی *OsP5CS2*، *OsTPP1*، *OsCOIN* و *OsLti6a* با استفاده از آغازگرهای اختصاصی برای هر ژن انجام شد (جدول ۱). واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در حجم ۲۰ میکرولیتر شامل ۴۰-۳۰ نانوگرم cDNA، ۱۰ میلی مولارdNTP ، ۰/۵ میلی مولار آغازگر، بافر PCR 1X و ۲ واحد آنزیم DNA پلی مراز انجام شد. چرخه حرارتی PCR شامل یک مرحله واسرشته سازی اولیه در ۹۴°C به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ چرخه واسرشته سازی در ۹۴°C به مدت ۴۰ ثانیه، اتصال با توجه به دمای ذوب هر آغازگر به مدت یک دقیقه (جدول ۱) و بسط در ۷۲°C به مدت یک دقیقه و بسط نهایی در ۷۲°C به مدت ۵ دقیقه بود. بیان چهار ژن کـــــارکردی ذکـــــر شـــــده با در نظـــــر گرفتن ژن *Oryza sativa* Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*OsGAPDH*) به عنوان کنترل مثبت برای تائید صحت ساخت cDNA (Jain et al., 2006) بررسی شد. طول قطعه تکثیر شده حاصل از PCR با آغازگرهای ژن کنترلی *GAPDH*، ۷۹ جفت باز بود که این باند در هر چهار نمونه مشاهده شد (شکل ۲). نرم افزار Total Lab (Ver 1.10) برای کمیت سنجی محصولات PCR حاصل از تکثیر ژن‌های اختصاصی بکار

رفت(Chivers et al., 2006) . به منظور بررسی معنی داری تفاوت بیان ژن‌ها قبل و بعد از تنش سرما، از نرم افزار SPSS Ver.18 و آزمون Wilcoxon Ranks Test استفاده شد.



شکل ۲- کمیت سنجی تظاهر ژن کنترلی *GAPDH* به منظور کمیت و کیفیت سنجی cDNA. ۱. PR (شاهد) ،۲. هاشمی (شاهد)، ۳. PR (تیمار سرما)، ۴. هاشمی (تیمار سرما).

جدول۱- آغازگرهای اختصاصی مورد استفاده در آزمایش

Accession No.	نام ژن	توالی بازها درآغازگر رو به جلو و رو به عقب ('3-'5)	دمای ذوب آغازگر (Tm)	منبع
AY571333	*OsP5CS2*	5'-TTTCACGAATTGATCCTGCG-3' 5'-TTAAGGTCATGCGAGGAGAG-3'	۵۸˚C	Hur et al., (2004)
AB120515	*OsTPP1*	5'-TCAGTCATGCCCGGTGGC-3' 5'-ACACTGAGTGCTTCTTCC-3'	۶۴˚C	Shima et al., (2007)
AK071071	*OsCOIN*	5'-ATGAGCTCTCTATGCCCCTTTGCCA-3' 5'-CTTGTCATCCAATTGTTTTTGTAGA-3'	۶۲˚C	Liu et al., (2007)
AY607689	*OsLTi6a*	5'-AATACTGCGAGAGAAATTAATCA-3' 5'-TAAGAGGGGAGCTTATTCACAC-3'	۵۸˚C	Liu et al., (2007)
AK064960	*OsGAPDH*	5'-AAGCCAGCATCCTATGATCAGATT-3' 5'-CGTAACCCAGAATACCCTTGAGTTT-3'	۶۳˚C	Jain et al., (2006)

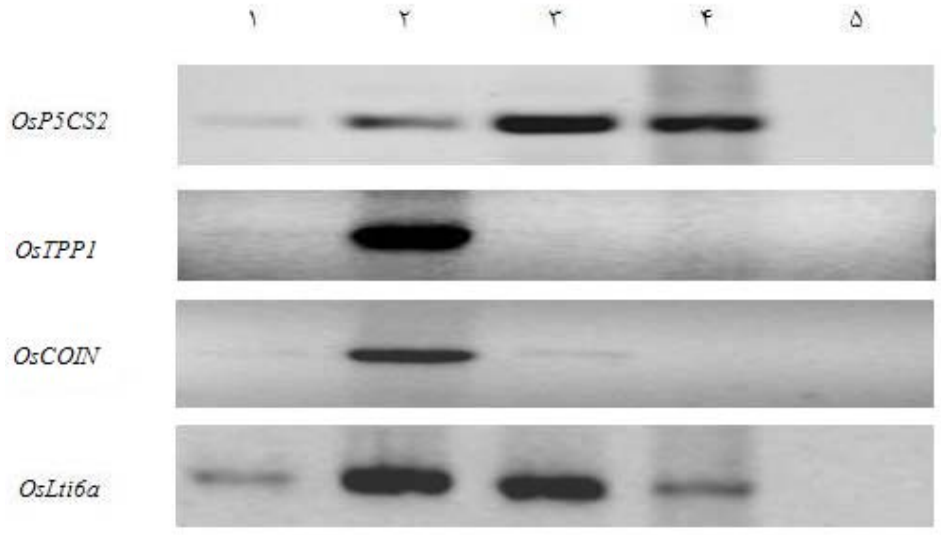
نتایج و بحث

تظاهر ژن *OsP5CS2*

بعد از ساخت cDNA و تائید صحت ساخته شدن آن با ژن کنترل، با استفاده از PCR و آغازگرهای اختصاصی تکثیر ژن *OsP5CS2* انجام شد. قطعه‌ای با طول تقریبی ۳۵۷ جفت باز تکثیر شد. کمیت سنجی با استفاده از نرم افزار Total Lab (Ver 1.10) نشان داد که در ژنوتیپ PR قبل و بعد از اعمال تیمار سرما به طور متوسط، به ترتیب میزان DNA ای معادل۱۷/۹۴۷ و ۹۳/۰۶۴ نانوگرم و در رقم هاشمی قبل و بعد از تیمار سرما مقدار DNA به ترتیب۲۱۴/۴۴۲ و ۱۷۲/۰۴ نانوگرم بود. بعد از اعمال تنش سرما افزایش ۷۵/۷۳۴ نانوگرمی بیان ژن در ژنوتیپ متحمل PR مشاهده شد، در حالی که کاهش ۴۲/۴۰۲ نانوگرمی در بیان این ژن در رقم هاشمی مشاهده شد (شکل ۳، جدول ۲). بر این اساس تحت تنش سرما افزایش بیان این ژن در ژنوتیپ متحمل معنی دار بوده، در حالی که بیان در رقم حساس کاهش یافته است. در گیاهان پاسخ به دمای پائین با تغییر ترکیب چربی‌های غشا، محتوای قند و پرولین، ترکیب پروتئینی و فراساختار برگ همراه است. در گیاهان عالی، پرولین از طریق مسیر گلوتامات و یا مسیر اورنتین، سنتز می‌شود که اولی، مسیر اصلی مخصوصاً در تنش اسمزی است. در این مسیر، پرولین از گلوتامات از طریق دو حدواسط گلوتامیک- سمی آلدهید و دلتا-۱ پرولین-۵- کربوکسیلات سنتز می‌شود. اولین مرحله از طریق پرولین-۵-کربوکسیلات سینتاز (P5CS) کاتالیز می‌شود (Hong et al., 2000). گزارش شده که بیان بالاتر ژن P5CS در لوبیا چشم بلبلی، توتون و برنج تراریخت، سبب تجمع بیشتر پرولین و رشد بهتر در شرایط تنش شوری و خشکی در مقایسه با گیاهان شاهد شد (Zhu, 2001). همچنین گیاهان آرابیدوپسیس آنتی سنس تراریخت شده با *AtP5CS*1، حساسیت بیشتری به تنش اسمزی نشان دادند (Nanjo et al., 1999).

بررسی‌ها نشان داده که سطح رونوشت دو ژن *P5CS1* و *P5CS2* در سرمای ۴ درجه سانتی‌گراد، در سرعت کمی افزایش داشتند. سطح رونوشت تا ۶ ساعت اول تغییری نکرد و در ۱۲ ساعت پس از تیمار روند افزایش را نشان داد(Hur et al., 2004). نتایج نشان داد که *OsP5CS1* یک ژن همگانی است که پرولین سلولی را تامین می‌کند، در حالی که *OsP5CS2* ژن مسئول تنش‌هاست. مقایسه بیان ژن‌های *P5CS* در آرابیدوپسیس و برنج نشان داد که این دو گیاه از نظر

زمان و میزان بیان این دو ژن در مواجه با تنش‌ها متفاوت عمل می‌کنند. با ایجاد موتانت‌های T-DNA دو ژن *P5CS1* و *P5CS2*، مشخص شد که گیاهان موتانت *P5CS2*، حساسیت بیشتری به تنش‌ها نشان می‌دهند. این بررسی نشان داد که ژن *P5CS2* ژن مسئول تنش در دو گیاه آرابیدوپسیس و برنج عمل می‌کند. در شرایط نرمال گیاهان موتانت T-DNA ژن *OsP5CS2*، رشد طبیعی داشتند و کاهش در عملکرد بذر معنی دار نبود. این نشان می‌دهد که نقش اصلی OsP5CS2 در پاسخ به تنش‌هاست تا متابولیسم پرولین پایه. بنابراین، *P5CS1* ژن مسئول بیوسنتز و تامین پرولین سلولی است و به عنوان یک ژن خانه‌دار شناخته شده است (Hur et al., 2004).



شکل ۳- نمونه‌ای از باندهای حاصل از تکثیر ژن‌های*OsP5CS2*، *OsTTP1*، *OsCOIN* و *OsLti6a* از بین سه تکرار. ۱) PR در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد (کنترل)، ۲) PR در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد ، ۳) هاشمی در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد (کنترل)، ۴) هاشمی در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد ، ۵) کنترل منفی.

جدول ۲- کمیت سنجی باندهای حاصل از PCR با استفاده از نرم افزار Total Lab (Ver. 01)

نام ژن	تعداد جفت باز	PR در ۲۵ درجه سانتی‌گراد	PR در ۵ درجه سانتی‌گراد	هاشمی در ۲۵ درجه سانتیگراد	هاشمی در ۵ درجه سانتیگراد
OsP5CS2	۳۵۷ bp	۱۷/۹۴۷ ±۰/۴	۹۳/۰۶۴ ±۱۵/۹	۲۱۴/۴۴۲±۰/۹۹	۱۷۲/۰۴ ± ۵/۶
OsTPP1	۱۰۰۰bp	۳/۳۱۴ ±۰/۹	۲۴۴/۱۱۸ ± ۵/۴	۱/۶۴۱±۰/۵	۰
OsCOIN	۱۰۰۰bp	۱/۴۴۹ ±۰/۷	۱۵۳/۱۱۶ ±۴/۳	۲/۸۵۵ ±۰/۳	۰
OsLti6a	۵۰۰bp	۹۴/۷۳۳ ±۰/۳	۲۶۰/۰۷۳ ±۹/۲	۲۳۰/۹۳۰ ±۹/۱	۶۳/۳۶۵ ±۰/۳

* مقادیر ذکر شده در جدول، متوسط مقدار بیان ژن‌ها در سه تکرار و در واحد نانوگرم می‌باشند. مقادیری از بیان ژن‌ها که توسط نرم افزار غیر قابل ردیابی بوده‌اند، صفر در نظر گرفته شده است. PR و هاشمی در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد کنترل می‌باشند.

بررسی تظاهر ژن *OsTPP1*

نتایج حاصل از کمیت سنجی ژن *OsTTP1* نشان داد که در شرایط نرمال رشدی، بیان این ژن در ژنوتیپ PR بسیار پائین و در حد ۳/۳۱۴ نانوگرم بوده، اما بعد از تنش افزایش معنی داری (بر اساس نتایج حاصل از آزمون ویلکاکسون) در میزان رونوشت آن مشاهده شد به طوری این میزان با ۲۴۰/۸۰۴ نانوگرم افزایش به ۲۴۴/۱۱۸ نانوگرم رسید. بیان (رونوشت) این ژن در رقم هاشمی قبل و بعد از تنش سرما به ترتیب ۱/۶۴۱ و صفر نانوگرم بود(شکل ۳، جدول ۲). میزان تری‌هالوز بیان شده در هر دو ژنوتیپ قبل و بعد از تنش چندان بالا نیست. توالی یابی ژنوم آرابیدوپسیس و برنج، سازماندهی ژنومی پیچیده‌ای را در ژن‌های بیوسنتز کننده تری‌هالوز گیاهی نشان داد. ۱۱ ژن *TPS* و ۱۰ ژن *TPP* در ژنوم

آرابیدوپسیس و ۹ ژن *TPS* و ۹ ژن TPP در ژنوم برنج یافت شده است(Shima et al., 2007). افزایش بیان ژن *OsTTP1* در ژنوتیپ PR، می‌تواند نشان دهنده عکس‌العمل این گیاه به تنش سرما باشد. این آنزیم با دفسفوریله کردن تری‌هالوز-۶-فسفات، تری‌هالوز تولید می‌کند. تلاش برای افزایش محتوای تری‌هالوز در گیاهان با بیان بالاتر ژن‌های *TPS* و *TPP* با منشا میکروبی در توتون و گوجه فرنگی تراریخت منجر به افزایش تحمل تنش شد (Shima et al., 2007). همچنین تظاهر آنزیم TPS-TPP در *E.coli*، در برنج تراریخت منجر به تجمع ۳ تا ۱۰ برابری تری‌هالوز در مقایسه با گیاهان برنج شاهد شد و تحمل به تنش غیر زیستی را بدون تغییر مورفولوژیکی نشان داد (Jang et al., 2003). مطالعات ژنتیکی نشان داده که ژن‌های بیوسنتز تری‌هالوز، بطور اختصاصی در تنظیم رشد و نمو گیاهی عمل می‌کنند (Eastmond et al., 2002). بررسی‌ها نشان داده‌اند که تری هالوز دخالتی مستقیم در تنظیم تظاهر ژنی دارد. در این صورت باید از طریق اثر گذاری بر تنظیم دیگر ژن‌های مسئول تنش به ایفای نقش بپردازد. تری‌هالوز خارجی، فعالیت و تظاهر ژنی ساکارز: فروکتان-۶- فروکتوسیل تراسفراز دخیل در بیوسنتز فروکتان در برگ‌های جوان را القا می‌کند (Pramanik & Imai, 2005). بنابراین، عملکرد تری هالوز در ابتدای تنش سرمازدگی، احتمالاً تنظیم ژن‌های متابولیسم قند است. البته برای تائید این موضوع باید بیان این دسته از ژن‌ها و همچنین محصولات آن‌ها مورد بررسی قرار گیرد تا بتوان با اطمینان بیشتری نتیجه‌گیری کرد.

تظاهر ژن *OsCOIN*

کمیت سنجی محصول PCR ژن *OsCOIN* نشان داد که در ژنوتیپ PR و رقم هاشمی در شرایط نرمال بطور متوسط، به ترتیب ۲/۱۰۶ و ۲/۸۵۵ نانوگرم بود. این میزان در ژنوتیپ PR بعد از اعمال تیمار سرما با ۱۵۱/۰۱ نانوگرم افزایش به ۱۵۳/۱۱۶ نانوگرم رسید، در صورتی که در رقم هاشمی بعد از تیمار سرما میزان بیان ژن به صفر رسید (شکل ۳، جدول ۲). افزایش تقریباً ۵۰ نانوگرمی بیان *OsCOIN* در ژنوتیپ PR احتمالاً به دلیل پاسخ سریع این گیاه به تنش سرما است. به این معنی که گیاه شرایط تنش را درک و بیان ژن‌های مسئول تنش افزایش یافته است. اما کاهش بیان این ژن در رقم هاشمی احتمالاً بیانگر اختلال در مسیر انتقال سیگنال‌های تنش و در نهایت بیان ژن بوده که همراه با آسیب غشا پلاسمایی بوده است. از آنجا که محصول نهایی این ژن، یک پروتئین غشایی است، شاید بتوان علت کاهش بیان آن را آسیب غشا در رقم هاشمی تحت تنش سرما دانست که با تاثیر بر روی مسیر انتقال پیام، بر روی سطح بیان این ژن تاثیر گذاشته است. Liu et al., (2007)، بیان ژن *OsCOIN* در اندام‌های مختلف برنج تیپ وحشی را در تنش سرما با روش نیمه کمی RT-PCR بررسی کردند. افزایش زیادی در سطح رونوشت *OsCOIN* در گیاهچه‌های برنج تیپ وحشی بعد از قرار گیری در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه مشاهده شد و سطح بالای بیان تا ۴۸ ساعت ادامه داشت. در ۷۲ ساعت بعد از تنش، بیان این ژن تا سطح اولیه قبل از تنش کاهش یافت. همچنین جهت آزمون تاثیر بیان بالاتر ژن *OsCOIN* بر تحمل سرما، گیاهچه‌های دو هفته‌ای تیپ وحشی و گیاهان تراریخت *OsCOIN* (نسل T2) در معرض دمای ۴ درجه به مدت ۶۰، ۷۲ و ۸۴ ساعت قرار گرفتند و سپس به مدت دو هفته جهت بهبود در گلخانه قرار گرفتند. گیاهان تحت تیمار ۶۰، ۷۲ و ۸۴ ساعت سرما، به ترتیب ۷۶/۲، ۷۱/۴ و ۵۰ درصد رشد مجدد داشتند. در حالی که در گیاهان تیپ وحشی، تنها به ترتیب ۵۲/۶، ۲۲/۲ و ۱۴/۸ درصد رشد مجدد مشاهده شد. در تشخیص مکانیسم‌های احتمالی تنظیم ژن، الگوی بیان ژن‌های *OsNAC6*، *OsP5CS2* و *OsLti6b* در گیاهان تراریخت *OsCOIN* در مقایسه با گیاه شاهد وحشی تحت تنش سرما افزایش یافت (Liu et al., 2007). همچنین افزایش بیان *OsCOIN* در برنج تراریخت بطور معنی داری محتوای پرولین سلول‌ها و تحمل به تیمار سرما، شوری و خشکی را افزایش داده به طوری که منجر به القا بیان بعضی از ژن‌های سرما و پرولین شد (Mukhopadhyay et al., 2004). نتایج به دست آمده در تحقیق حاضر نیز با نتایج حاصل از آزمایشات Liu et al. (2007) و Mukhopadhyay et al. (2004) همخوانی دارد. با توجه به اینکه بیان این ژن باعث افزایش بیان ژن P5CS

می‌شود و افزایش بیان این ژن منجر به افزایش پرولین سلولی می‌شود، اینطور می‌توان نتیجه گیری کرد که ژن *OsCOIN* بطور غیر مستقیم در فرآیند ایجاد تحمل در گیاه عمل می‌کند.

تظاهر ژن *OsLti6a*

در نتیجه تکثیر ژن *OsLti6a* میزان تظاهر ژن در برنج ژنوتیپ PR، در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد ۹۴/۷۳۳ نانوگرم بود که با ۱۶۵/۳۴ نانوگرم افزایش بعد از اعمال تنش سرما به ۲۶۰/۰۷۳ نانوگرم رسید(شکل ۳، جدول ۲). این میزان در برنج رقم هاشمی در شرایط دمای ۲۵ درجه سانتیگراد ۲۳۰/۹۳۰ نانوگرم بود که بعد از اعمال تنش سرما با ۱۶۷/۵۶۵ کاهش به ۶۳/۳۶۵ نانوگرم رسید. کاهش معنی دار در تظاهر این ژن که رمز کننده یک پروتئین غشایی دخیل در حفظ سیالیت غشا است، احتمال دارد دلیلی بر کاهش تظاهر دیگر ژن‌های مورد مطالعه در این تحقیق نیز باشد.

خسارت وارده به غشا پلاسمایی در اثر تنش سرما سبب کاهش سیالیت غشا شده که این امر تاثیر به سزایی بر دریافت پیام تنش و مسیر انتقال پیام می‌گذارد. حضور این پروتئین در غشا، به حفظ سیالیت غشا سلولی پرداخته و با این کار کمک می‌کند تا علاوه بر جلوگیری از نشت مواد محلول سلولی به خارج از سلول، آسیب کمتری به دریافت کننده‌ها و مسیرهای انتقال پیام خطر تنش وارد آید تا سلول بتواند با بیان به موقع، سریع و کامل ژن‌های القا شونده با تنش و ژن‌های مسئول تنش در جهت بقای خود در شرایط تنش گام بردارد (Morsy & Stewart, 2006).

نتیجه گیری کلی

عکس‌العمل گیاه به تنش سرما با تغییرات مورفولوژیکی، بیوشیمیایی و ملکولی همراه است که برحسب اکولوژی، زمان، شدت تنش و مرحله رشد متفاوت است (Grover et al., 2009). تغییرات در سطح ملکولی بصورت تغییر در بیان ژن ظاهر می‌شود (Cooper et al., 2003) و ژن‌های بسیاری در گیاهان در اثر تنش‌های غیرزیستی القا می‌شوند و این ژن‌ها در مسیرهای مختلفی برای اعطا تحمل تنش به گیاهان عمل می‌کنند (Hasegawa et al., 2000). شناسایی ژن‌های تحمل و ایجاد لاین‌های تراریخت با آن‌ها اگرچه می‌تواند تا حدی تحمل را به گیاه اعطا کند، اما توانایی گیاه در تحمل تنش‌های غیر زیستی مانند سرما، مستقل از یک ژن کارکردی بوده به طوری که ژن‌های کارکردی بسیاری در این فرآیند دخالت دارند. بنابراین، رسیدن به توانایی کنترل یک یا چند عامل تنظیمی کلیدی برای کمک به گیاه جهت رسیدن به پیشرفتی ایده آل، چندوجهی و کارکردی تحمل به تنش، اولویت دارد (Qiang et al., 2000). بررسی میزان بیان ژن چهار ژن کد کننده پروتئین‌های کارکردی *OsP5CS2*، *OsTTP1*، *OsCOIN* و *OsLti6a* در دو ژنوتیپ متحمل و حساس نشان داد که این ژن‌ها بیان بالایی بعد از تنش سرما در ژنوتیپ متحمل داشتند. این نتایج احتمالاً به عنوان برخی از شاخص‌های تمایز دو ژنوتیپ متحمل و حساس به سرما می‌تواند در تحقیقات در نظر گرفته شوند. در مطالعه میزان اثر این ژن‌ها در تحمل به تنش سرما در ارقام بومی، نیاز به تولید گیاهان تراریختی است که در مقایسه با گیاهان وحشی بررسی شوند و میزان تاثیر آن‌ها بر بیان دیگر ژن‌ها و محصولات آن‌ها مورد ارزیابی قرار گیرد.

REFERENCES

1. Alah gholipour, M., Moradi, S., Nahvi, A. & Niyazi, N. (2010). *Study and selection in segregating generation populations in order to identify cold-resistance rice lines*. The final report of Research Project. Iran Rice Research Institute. (In Farsi)
2. Bohnert, H. J. & Cushman, J. C. (2002). Plants and environmental stress adaptation strategies in: Plant Biotechnology and Transgenic Plants [Barz M and Oksman-Kaldentey D, eds]. *New York: Marcel Dekker*, pp. 635-664.
3. Buchanan, B. B., Gruissem, W. & Jones, R. L. (2001). Biochemistry and molecular biology of plants. American Society of Plant Physiologists. *Courier Companies, Inc., Rockville*.
4. Chivers, J. E., Gong, W., King, E., Seybold, J., Mak, J., Donnelly, L., Holden, N. & Newton, R. (2006). Analysis of the dissociated steroid RU24858 does not exclude a role for inducible genes in the anti inflammatory actions of glucocorticoids. *Mol Pharmacol,* 70, 2084–2095.

5. Cooper, B., Clark, J. D., Budworth, P., Kreps, J., Hutchison, D., Park, S., Guimil, S., Dunn, M., Luginbuhl, P., Ellero, C., Goff, S. A. & Glazebrook, J. (2003). A network of rice genes associated with stress response and seed development. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United states of America*, 100, 4945-4950.
6. Eastmond, P. J., Van Dijken, A. J., Spielman, M., Kerr, A., Tissier, A. F., Dickinson, H. G., Jones, J. D., Smeekens, S. C. & Graham, I. A. (2002). Trehalose-6-phosphate synthase 1, which catalyses the first step in trehalose synthesis, is essential for Arabidopsis embryo maturation. *Plant Journal*, 29, 225-235.
7. Gao, J. P., Chao, D. Y. & Lin, H. X. (2008). Toward Understanding Molecular Mechanisms of Abiotic Stress Responses in Rice. *Rice*, 1, 36-51.
8. Ge, L. F., Chao, D. Y., Shi, M., Zhu, M. Z., Gao, J. P. & Lin, H. X. (2008). Overexpression of the trehalose-6-phosphate phosphatase gene OsTPP1 confers stress tolerance in rice and results in the activation of stress responsive genes. *Planta*, 228, 191-201.
9. Grover, A., Mittal, D., Chakrabarti, S., Sarkar, A. & Singh, A. (2009). Heat shock factor gene family in rice: Genomic organization and transcript expression profiling in response to high temperature, low temperature and oxidative stresses. *Plant Physiology and Biochemistry*, pp 1-11.
10. Hasegawa, M., Bressan, R., Zhu, J. K. & Bohnert, H. J. (2000). Plant cellular and molecular responses to high salinity. Annu. Rev. Plant Physiol. *Plant Molecular Biol*ogy, 51, 463-499.
11. Hong, Z., Lakkineni, K., Zhang, Z. & Verma, D. P. (2000). Removal of feedback inhibition of delta(1)-pyrroline-5-carboxylate synthetase results in increased proline accumulation and protection of plants from osmotic stress. *Plant Physiology*, 122, 1129-1136.
12. Hur, J., Jung, K. H., Lee, C. H. & An, G. (2004). Stress-inducible OsP5CS2 gene is essential for salt and cold tolerance in rice. *Plant Science*, 167, 417- 426.
13. Jain, M., Nijhawan, A., Tyagi, K. & Khurana, J. P. (2006). Validation of housekeeping genes as internal control for studying gene expression in rice by quantitative real-time PCR. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 345, 646- 651.
14. Jang, I. C., Oh, S. J., Seo, J. S., Choi, W. B., Song, S. I., Kim, C. H., Kim, Y. S., Seo, H. S., choi, Y. D., Nahm, B. H. & Kim, J. k. (2003). Expression of a bifunctional fusion of the Esherichia coli genes for trehalose-6-phosphate synthase and trehalose-6-phosphate in transgenic rice plants increases trehalose accumulation and abiotic stress tolerance without stunting growth. *Plant Physiology*, 131, 516-524.
15. Kiedrowski, S., Kawalleck, P., Hahlbrock, K., Somssich, I. E. & Dangle, J. L. (1992). Rapid activation of a novel plant defense gene is strictly depend on the Arabidopsis RPM1 disease resistance locus. *European Molecular Biology Organization Journal*, 11, 4677-4684.
16. Kim, S. H., Kim, J. Y., Kim, S. J., An, K. S., An, G. & Kim, S. R. (2007). Isolation of cold stress-responsive genes in the reproductive organs, and characterization of the OsLti6b gene from rice (oryza sativa L.). *Plant Cell Reporst*, 26, 1097-1110.
17. Liang, P. & Pardee, A. B. (1992). Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science*, 257, 967-971.
18. Liu, K., Wang, L., Xu, Y., Chen, N., Ma, Q., Li, F. & Chong, K. (2007). Overexpression of OsCOIN, a putative cold inducible zinc finger protein, increased tolerance to chilling, salt and drought, and enhanced proline level in Rice. *Planta*, DOI 10.1007/s00425-007-0548-5.
19. Marmagne, A., Rouet, M. A., Ferro, M. & Rolland, N. (2004). Identification of new intrinsic proteins in Arabidopsis plasma membrane proteome. *Molecular and Cellular Proteomics*, 3, 675-691.
20. McNeil, S. D., Nuccio, M. L., Rhodes, D., Shachar-Hill, Y. & Hanson, A. D. (2000). Radiotracer and computer modeling evidence that phosphor-base methylation is the main route of choline synthesis in tobacco. *Plant Physilogy*, 123, 371-380.
21. Morsy, M. R. & Stewart, J. (2006). OsLti6a Protein-Protein interaction is not detected by the GAL4 yeast two-hybrid system . B.R. Wells *Rice Research Studies*, http://arkansasagnews.uark.edu/408.htm.
22. Mukhopadhyay, A., Vij, S. & Tyagi, A. K. (2004). Overexpression of a zing-finger protein gene from rice confers tolerance to cold, dehydration, and salt stress in transgenic tobacco. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United states of America*, 20,101(16),6309-14.
23. Nakagahra, M., Okuno, K. & Vaughan, D. (1997). Rice genetic resources: history, conservation, investigative characterization and use in Japan. *Plant Molecular Biology*, 35, 69–77.
24. Nanjo, T., Kobayashi, M., Yoshiba, Y., Sanda, Y., Wada, K., Tsukaya, H., Kakubari, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K. & Shinozaki, K. (1999). Biological functions of proline in morphogenesis and osmotolerance revealed in antisense transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, 18, 185- 193.

25. Pillai, M. A. & Akiyama, T. (2004). Differential expression of an S-adenosyl- L-methionine decarboxylase gene involved in polyamine biosynthesis under low temperature stress in japonica and indica rice genotypes. *Molecular Genetics and Genomics*, 271,141–9.
26. Pramanik, M. H. & Imai, R. (2005). Functional identification of a trehalose-6-phosphate phosphatase gene that is involved in transient induction of trehalose biosynthesis during chilling stress in rice. *Plant Molecular Biology*, 58, 751–762.
27. Qiang, L., Nanming, Z., Yamaguch-Shinozaki, K. & Shinozaki, K. (2000). Regulatory role of DREB transcription factors in plant drought, salt and cold tolerance. *Chinese Science Bulletin*, Vol. 45. No. 11.pp. 970-975.
28. Shima, S., Matsui, H., Tahara, S. & Imai, R. (2007). Biochemical characterization of rice trehalose-6-phosphate phosphatases supports distinctive functions of these plant enzymes. *Federation of European Biochemical Societies*, 274,1192-1201
29. Soren, K. R., Ali, K., Tyagi, V. & Tyagi, A. (2010). Recent advanced in molecular breeding of drought tolerance in rice (*Oryza sativa* L.). *Indian Journal of Biotechnology*, Vol 9, pp 233-251.
30. Su, J. & Wu, R. (2004). Stress-inducible synthesis of proline in transgenic rice confers faster growth under stress conditions than that with constitutive synthesis. *Plant Science*, 166, 941–8.
31. Zhu, J. K. (2001). Plant salt tolerance. Rev. *Trends in Plant Scienc*e, 6, 66–71.