

ارزیابی کمی الگوی تظاهر و تجزیه *in silico* عناصر موجود در ناحیه راه انداز ژن انتقال دهنده کربوهیدرات (SuT4) در شرایط سرمادهی

در گندم (*Triticum aestivum* L.)

سیده ساناز رمضانپور^{۱*}، حسن سلطانلو^۲

۱-۲- استادیار گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی
گرگان، گرگان، ایران

*نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: ramezanpours@gau.ac.ir

(تاریخ دریافت: - تاریخ پذیرش:)

چکیده

اغلب گیاهان برای کسب تحمل به یخ زدگی بایستی در معرض دماهای غیرمنجمدکننده قرار گیرند که به این فرآیند سازگاری به سرما اطلاق می شود. مطالعات نشان داده اند، بیان ژن های القا شونده با سرما در گیاهان، برای تحمل و سازگاری به سرما ضروری است. در این تحقیق الگوی بیان یکی از ژن های دارای بیان افتراقی در شرایط سرمادهی با نام SuT4 از گروه ژن های انتقال دهنده کربوهیدرات در رقم مقاوم به یخ زدگی نورستار و لاین حساس به یخ زدگی PI181268 گندم مورد بررسی قرار گرفت و به منظور مطالعه نحوه بیان ژن، بررسی های بیشتری روی ناحیه ۵' بالادست (راه انداز) ژن مذکور انجام شد. به منظور اعمال تیمار سرمادهی از دمای ۴ درجه سانتی گراد روی گیاهچه های دو هفته ای استفاده گردید. نمونه برداری از گیاهان در زمان های پیش از شروع سرمادهی و پس از آن انجام شد. به منظور ارزیابی الگوی بیان ژن نیز از روش واکنش زنجیره ای پلی مرز کمی در زمان واقعی (QRT-PCR) با استفاده از رنگ فلورسنت سایبرگرین استفاده شد. توالی ناحیه راه انداز ژن نیز با روش پیمایش ژنومی با استفاده از PCR و نرم افزارهای PlantCARE و PLACE جداسازی و مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج ارزیابی الگوی بیان ژن، بیانگر افزایش فعالیت بیان ژن از روزهای آغازین شروع سرمادهی در گیاهان تحت تیمار سرمادهی در مقایسه با گیاهان تیمار نشده بود. ولی در تمام طول آزمایش بیان ژن در رقم مقاوم بیشتر از رقم حساس بود. طول راه انداز این ژن در حدود ۱۹۸۰ جفت باز است که فاقد جعبه TATA و جعبه CAAT می باشد. راه انداز شامل عناصر تنظیم کننده همسوساز مفروض متعددی شامل عناصر پاسخ دهنده به اسید آبسزیک (ABRE)، عناصر پاسخ دهنده به کم آبی (DRE)، عناصر پاسخ دهنده به دمای پایین (LTRE) و بسیاری از عناصر تنظیم کننده دیگر می باشد. از آنجایی که بیان این ژن در هر دو رقم افزایش معنی داری نشان داده است، احتمال می رود این ژن فقط در تنظیمات سلولی گیاه در شرایط تنش نقش فعالی را ایفا نماید و یا دارای نقش دوگانه در کنترل تنش سرما و بیماری کپک برفی باشد.

واژه های کلیدی

راه انداز،
عناصر همسوساز،
گندم،
انتقال دهنده کربوهیدرات،
الگوی تظاهر

مقدمه

سرما یکی از عوامل محیطی است که رشد بسیاری از گونه‌های گیاهی را محدود می‌کند و اغلب، اثرات مضر بر کیفیت و عملکرد گیاهان دارد. اغلب گیاهان برای کسب تحمل به یخ‌زدگی بایستی در معرض دماهای غیرمنجمدکننده قرار گیرند که به این فرآیند سازگاری به سرما^۱ اطلاق می‌شود. مطالعات نشان داده‌اند، بیان ژن‌های القا شونده با سرما در گیاهان، برای تحمل و سازگاری به سرما ضروری است. ژن‌های پاسخ‌دهنده به سرما پروتئین‌های متعددی مثل آنزیم‌های دخیل در تنفس و متابولیسم کربوهیدرات‌ها، لیپیدها، فیل پروپانوییدها و آنتی اکسیدانت‌ها، پروتئین‌های ضد یخ‌زدگی و پروتئین‌های دیگری که احتمالاً در تحمل به کاهش آب حاصل از یخ‌زدگی نقش دارند را رمز می‌کنند (۲).

در فرآیند سازگاری به سرما، سلول‌های گیاهی در معرض تغییرات فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و متابولیکی قرار می‌گیرند که در نهایت منجر به افزایش تحمل به یخ‌زدگی در سطح سلولی می‌گردد. یکی از این مکانیسم‌ها، القاء ژن‌های COR/Lea^۲ می‌باشد و پروتئین‌های COR/Lea با حفاظت اجزاء سلولی تحمل به یخ‌زدگی را افزایش می‌دهند (۱۷). بیان بسیاری از ژن‌های COR/Lea توسط عوامل مهم رونویسی از گروه CBF^۳، DREB^۴، AREB^۵ و ABF^۶ در شرایط تنش‌های غیرزنده مثل دمای پایین و تنش‌های اسمزی تنظیم می‌شود (۱۸).

AREB^۵ و ABF^۶ها به عنصر همسوساز ABRE^۷ متصل می‌شوند و با فعالیت غیرهمسوسازی^۸ خود بیان ژن پایین‌دست را فعال می‌نمایند. گیاهانی که تظاهر بالای AREB/ABF را دارند، واکنش فوق حساسیت به ABA نشان می‌دهند و تحمل آنها به تنش‌های غیرزنده مثل یخ‌زدگی، خشکی و شوری افزایش می‌یابد (۷، ۸، ۱۱، ۱۲).

به منظور بررسی این فرضیه که سرمادهی می‌تواند منجر به القاء ژن‌های مقاوم به یخ‌زدگی شود و سرمادهی در دماهای پایین ولی بالای صفر درجه می‌تواند مقاومت گیاهان را در برابر سرمای سخت زمستانه و دماهای زیر صفر درجه افزایش دهد؛ در این تحقیق الگوی بیان یکی از ژن‌های دارای بیان افتراقی در شرایط سرمادهی با نام *SuT4* از گروه ژن‌های انتقال‌دهنده کربوهیدرات در دو رقم حساس و مقاوم به یخ‌زدگی گندم مورد بررسی قرار گرفت و به منظور مطالعه نحوه بیان ژن، بررسی‌های بیشتری روی ناحیه ۵' بالادست (راه انداز) ژن مذکور انجام شد.

مواد گیاهی

حدود ۵۰۰ بذر از رقم نورستار^۹ (مقاوم به یخ‌زدگی) و لاین PI181268 (حساس به یخ‌زدگی) در داخل ظروف مخصوص ۷۰ سلولی کشت گردیدند (در هر سلول یک بذر). گیاهچه‌های ۲ هفته‌ای رشد یافته در دمای ۲۰°C، جهت اعمال تنش سرما به اتاقک رشد با دمای ۲°C انتقال داده شدند و نمونه‌برداری از طوقه‌های گیاهان در زمان‌های ۰، ۱، ۳، ۷ روز و ۲، ۳، ۵ و ۷ هفته سرمادهی در ۳ تکرار انجام شد. نمونه‌ها در ازت مایع منجمد و جهت نگهداری به دمای ۸۰°C- منتقل شدند.

استخراج RNA و ساخت cDNA

RNA کل^{۱۰} با استفاده از روش ترايزول^{۱۱} استخراج گردید. کمیت RNA با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری ارزیابی شد و جهت تعیین کیفیت RNA نیز مقدار ۵ میکروگرم از هر نمونه روی ژل آگارز ۱/۵٪ الکتروفورز شدند. RNA حاصل با استفاده از کیت «آران‌ایزی مینی کلین‌آپ»^{۱۲} شرکت کیاژن^{۱۳} تخلیص گردید. در این مرحله از تیمار DNase به منظور حذف آلودگی‌های احتمالی DNA نیز استفاده شد. در پایان مرحله تخلیص نیز کمیت و کیفیت RNA کل به روش اسپکتروفتومتری و الکتروفورز روی ژل ارزیابی گردید. cDNA تک‌رشته‌ای با استفاده از ۵

^۱ Cold acclimation^۲ Cold-responsive/late embryogenesis abundant^۳ C-repeat binding factor^۴ Dehydration responsive element binding protein^۵ ABA responsive element binding protein^۶ ABA responsive element binding factor^۷ ABA responsive (ABRE) cis-acting element^۸ Trans-action^۹ Norstar^{۱۰} Total RNA^{۱۱} Trizol^{۱۲} Rneasy mini clean up^{۱۳} Qiagen

مدت ۲۱ و ۴۹ روز (۱:۱) در دمای ۲°C قرار گرفته بودند به عنوان تیمار درایور^{۱۸} استفاده گردید و بنابراین ژن‌هایی که در پاسخ به فرآیند سرمادهی در اولین ساعات در رقم مقاوم تظاهر می‌یابند^{۱۹} جداسازی شدند. علت استفاده از لاین CI14106 این است که این لاین نیز همانند لاین PI181268 حساس به یخزدگی می‌باشد.

طراحی آغازگر برای انجام Real-time PCR

پس از انتخاب همسانه، ناحیه ترجمه نشده ۳' آن با استفاده از نرم افزار امباس^{۲۰} مورد بررسی قرار گرفت و به منظور طراحی آغازگر از نرم افزار پرایمر^{۲۱} استفاده گردید. در شکل ۲ جایگاه آغازگرها روی توالی مورد نظر نشان داده شده است.

میکروگرم RNA کل، آغازگر اولیگودی تی (۱۸-۲۰)^{۱۴} و آنزیم سوپر اسکرپیت III به عنوان آنزیم رونوشت‌بردار معکوس بر اساس دستورالعمل شرکت اینویترژن ساخته شد.

انتخاب همسانه مورد آزمایش

همسانه مورد استفاده در این آزمایش، از بین همسانه‌های جداسازی شده با روش SSH^{۱۵} روی لاین‌های CI14106 و PI181268 به عنوان لاین حساس به یخزدگی و رقم نورستار به عنوان رقم مقاوم به تنش یخزدگی انتخاب گردید. این همسانه در بانک اطلاعاتی NCBI هم‌پوشانی بالایی با یکی از ژن‌های انتقال‌دهنده هگزوز^{۱۶} در جو با شماره دسترسی CAD_58958.1 نشان داد (شکل ۱).

در جداسازی این همسانه از cDNA رقم مقاوم به سرمای نورستار که به مدت ۱ روز در شرایط دمایی ۲°C قرار گرفته بود به عنوان تیمار تستر^{۱۷} و از مخلوط cDNA لاین حساس CI14106 که به

¹⁸ Driver
¹⁹ Early-expressed genes
²⁰ Emboss
²¹ Primer3

¹⁴ Oligo dT₍₁₈₋₂₀₎
¹⁵ Suppression Subtractive Hybridization
¹⁶ Hexose transporter
¹⁷ Tester

```
gi|26986186|emb|CAD58958.1| hexose transporter [Hordeum vulgare subsp. vulgare]
Length = 743

Score = 257 bits (656), Expect = 3e-67
Identities = 136/148 (91%), Positives = 138/148 (93%)
Frame = +1

Sut4 :      187 SGAVLVAIAASIGNLLQGWDNATIAGAVLYIKKEFSLETQPLIEGLIVAMSLIGATVITT 366
            SGAVLVAIAASIGNLLQGWDNATIAGAVLYIKKEFSLETQPLIEGLIVAMSLIGATVITT
CAD58958:    3  SGAVLVAIAASIGNLLQGWDNATIAGAVLYIKKEFSLETQPLIEGLIVAMSLIGATVITT 62

Sut4:      367 FSGAVADAAGRRALLIASSVLYFVSGVLMWAPNVYVLLLRLLDRFGIGLAVTLVPLIYI 546
            FSGAVADA GRR LLIASSVLYFVSGVLMWAPNVYVLLLR RL+D FGIGLAVTLVPLIYI
CAD58958:   63  FSGAVADAVGRPLLIASSVLYFVSGVLMWAPNVYVLLRLIDGFGIGLAVTLVPLIYI 122

Sut4:      547 SETAPTDIRGL*NPCPKSGSGGMFFSY 630
            SETAPTDIRGL N P+ GSGGMF SY
CAD58958:  123 SETAPTDIRGLLNTLPQFSGSGGMFLSY 150
```

شکل ۱) همپوشانی و میزان شباهت آنزیم حاصل از همسانه مورد بررسی *Sut4* و آنزیم انتقال‌دهنده هگزوز در جو

[illegible]

شکل ۲- جایگاه آغازگرها روی توالی همسانه *SuT4* همانطور که در شکل مشخص است آغازگرها بر اساس انتهای ترجمه نشده ۳' طراحی شده است.

انجام روش QRT-PCR

در این تحقیق از دستگاه iCycler شرکت BioRAD و رنگ Quantitect SYBR Green از شرکت کیاژن به عنوان رنگ فلورسنس^{۲۲} برای ارزیابی کمی استفاده گردید. ۲۰ میکرولیتر مخلوط واکنش، شامل ۱۰ میکرولیتر مخلوط SYBR Green، ۰/۶ میکرولیتر از هر آغازگر اختصاصی پیشرو^{۲۳} (5'-AGTGCCTTGACAACCTTGCT-3') و پسرو^{۲۴} (5'-GGTTCGACATCCAGAACAT-3') با غلظت ۱۰ میکرومول، ۳/۳ میکرولیتر آب، ۰/۵ میکرولیتر فلورسئین^{۲۵} و ۵ میکرولیتر نمونه cDNA مورد بررسی بود. به منظور انجام واکنش از پلیت های ۹۶ خانه ای^{۲۶} استفاده شد. از سری های غلظت نیز به منظور کنترل راندمان واکنش زنجیره ای پلی مرز استفاده گردید. واکنش زنجیره ای پلی مرز استاندارد در دمای اتصال آغازگر انجام شد. طول محصول PCR در این واکنش ۱۵۶ نوکلئوتید بود.

ارزیابی توالی و عناصر موجود در ناحیه ۵' بالادست ژن

پس از مشخص شدن الگوی تظاهر ژن مورد بررسی، آزمایشاتی جهت بررسی توالی و عناصر موجود در ناحیه ۵' بالادست این ژن طراحی گردید. برای این منظور ابتدا بر اساس همولوگ این همسانه‌ها در بانک‌های اطلاعاتی تعداد تقریبی نوکلئوتیدهایی که می‌بایست توالی‌یابی شوند، تعیین گردید. بر اساس نتایج حاصل، تنها ۶ نوکلئوتید نامشخص در انتهای ۵' این ژن وجود داشت، بنابراین نیازی به انجام واکنش‌های RACE احساس نشد و توالی ژن مستقیماً وارد مراحل بعدی آزمایش گردید.

جهت ارزیابی راه‌انداز ژن *SuT4* از روش پیمایش ژنومی پیشنهادی توسط شرکت کلوتک استفاده شد. برای این منظور DNA ژنومی لاین PI181268 با استفاده از روش چانگ و گیل (۱۹۹۰) استخراج گردید (۱) و توسط چهار آنزیم *DraI*, *EcoRV*, *PvuII* و *StuI* برش داده شد تا کتابخانه ژنومی تهیه

22 Fluorescence

23 Forward

24 Reverse

Reverse
25 Fluorecein

26 96-Well pl

96-well plate

استاندارد تکثیر شدند. محصولات واکنش روی ژل آگارز ۱/۵٪ الکتروفورز شدند تا اندازه باندها تأیید شود (شکل ۴). پس از اطمینان از صحت باندهای جداسازی شده، از همسانه‌های مربوط به هر باند، ۲ همسانه انتخاب شدند و جهت تکثیر، در محیط کشت مایع LB حاوی آمپی‌سیلین کشت گردیدند. سپس پلاسمیدهای حاصل استخراج و ۵ میکرولیتر از پلاسمید روی ژل آگارز الکتروفورز گردید. ژل حاصله در دستگاه تی‌فون، اسکن گردید تا کمیت پلاسمیدها جهت انجام توالی‌یابی مشخص شود. دو نمونه جهت توالی‌یابی استفاده شد که نتایج توالی‌یابی برای هر دو نمونه یکسان بود و تفاوتی نشان نداد. جهت اطمینان از صحت توالی‌یابی ابتدا ناحیه‌ای از قطعه توالی‌یابی شده دارای همپوشانی با ژن مورد نظر شناسایی شد و کدون آغازین که همان کدون مربوط به باز متیونین (ATG) می‌باشد مشخص گردید. سپس قطعه مورد نظر از ناحیه شروع در انتهای ۵' ژن بریده شد و توالی کامل راه‌انداز مشخص گردید. توالی حاصل با استفاده از نرم‌افزار PlantCARE³² (۱۳) با آدرس اینترنتی <http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html> و PLACE³³ (۱۰) با آدرس اینترنتی <http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/index.html> مورد بررسی قرار گرفت و عناصر موجود در توالی راه‌انداز ژن مشخص گردید.

Error! Not a valid link

شکل ۳) مقایسه بیان ژن *SuT4* در رقم مقاوم نورستار و لاین حساس PI181268 در شرایط سرمادهی. بارها بیانگر یک انحراف معیار هستند.

DH: تعداد روز پس از شروع سرمادهی، WH: تعداد هفته پس از شروع سرمادهی

شود. پس از ساختن کتابخانه‌ها اولین واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز²⁷ با استفاده از آغازگر آداپتور بیرونی (AP1)²⁸ با توالی 5'-GTAATACGACTCACTATAGGGC-3' و آغازگر اختصاصی بیرونی (GSP)²⁹ با توالی 5'-TGGGTCTCCAAGCTGAACTC-3' و چرخه‌های حرارتی ۷ چرخه با دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۵ ثانیه و به دنبال آن دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۸۰ ثانیه، ۳۲ چرخه دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۵ ثانیه و دمای ۶۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۸۰ ثانیه و یک چرخه نیز دمای ۶۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۲۰ ثانیه انجام شد. سپس محصولات واکنش با استفاده از آب به نسبت ۱:۵۰ رقیق شدند و واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز ثانویه با استفاده از آغازگر آداپتور آشیانه‌ای (AP2)³⁰ با توالی 5'-ACTATAGGGCACGCGTGGT-3' و آغازگر اختصاصی ژن آشیانه‌ای (GSP2)³¹ با توالی 5'-GACATGGTCGCCGAATCT-3' انجام شد. چرخه‌های حرارتی برای واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز آشیانه‌ای مشابه واکنش زنجیره‌ای اولیه بود، با این تفاوت که به جای ۳۲ چرخه در مرحله دوم از ۲۰ چرخه استفاده می‌شود. بزرگترین باند محصول واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز ثانویه که طولی در حدود ۲۰۰۰ نوکلئوتید داشت، انتخاب و همسانه‌سازی شد. برای این منظور باند مربوط از روی ژل آگارز ۱/۵٪ به روش برداشتن قطعه‌ای از ژل و یا برداشتن نمونه کوچکی از روی ژل با استفاده از حباب و تکثیر مجدد آن جداسازی شدند. جهت اطمینان از صحت باندهای جداسازی شده و تعیین کمیت آنها، نمونه‌های جداسازی شده از روی ژل مجدداً روی ژل آگارز ۱/۵٪ همراه با ۱۰ میکرولیتر نشانگر DNA *HindIII* با غلظت ۵۰ نانوگرم در میکرولیتر الکتروفورز شد و ژل حاصله در دستگاه تی‌فون، اسکن گردید. سپس باندهای جداسازی شده از روی ژل، در ناقل pGEM-T همسانه‌سازی شدند و تعدادی از همسانه‌های سفیدرنگ مربوط به هر باند انتخاب و با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز

²⁷ Primary PCR

²⁸ Outer Adaptor primer

²⁹ Outer, gene-specific primer

³⁰ Nested Adaptor Primer

³¹ Nested gene-specific primer

³² Plant cis-acting regulatory elements

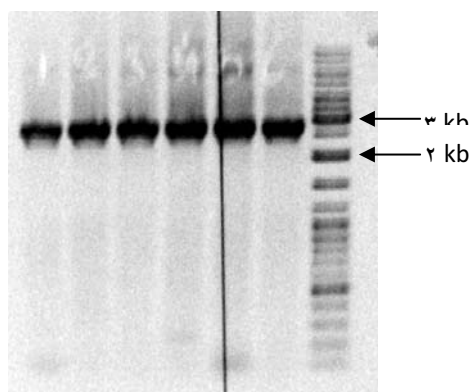
³³ Plant cis-acting regulatory DNA elements

نتایج و بحث

تظاهر ژن *SuT4* در هر دو رقم از اولین ساعات واکنش به سرمادهی افزایش معنی داری نشان داد. در رقم مقاوم نورستار بیشترین فعالیت ژن در روز سوم پس از شروع سرمادهی دیده شد که افزایش معنی داری نسبت به اولین روز نیز نشان می دهد، پس از آن بیان ژن کاهش معنی داری نشان داده است ولی هنوز افزایش سطح بیان آن نسبت به تیمار کنترل معنی دار است و تا پایان دوره سرمادهی در سطح ثابتی حفظ شده است (شکل ۳). در بررسی انجام شده توسط ساساکی و همکاران ۱۹۹۶ نیز بیشترین سطح تجمع کربوهیدرات ها ۳ روز پس از شروع سرمادهی گزارش شده است (۱۶) و احتمال می رود فعالیت بالای این ژن نیز در روز سوم سرمادهی بتواند بیانگر بالاترین سطح تجمع کربوهیدرات ها باشد. در لاین حساس نیز بیشترین سطح تظاهر ژن در سومین روز دیده شد و پس از آن کاهش معنی داری نشان داده است و تا پایان دوره سرمادهی در سطح نسبتاً پایداری باقی مانده است، ولی میزان افزایش در سطح تظاهر این ژن همواره از رقم مقاوم نورستار کمتر است که این امر خود می تواند دلیلی بر واکنش حساسیت این لاین به تنش یخ زدگی باشد. به عبارت دیگر تعداد نسخه ها و سطح بیان ژن می تواند در افزایش یا کاهش میزان تجمع کربوهیدرات ها و به دنبال آن واکنش گیاه به دماهای زیر صفر درجه مؤثر باشد. نتایج الگوی تظاهر ژن مؤید نحوه جداسازی آن نیز می باشد، زیرا در جداسازی این ژن انتظار می رفت که در اوایل واکنش به سرمادهی القا شده باشند. همانطور که از نتایج مشخص است بیشترین سطح تظاهر این ژن در روزهای اول سرمادهی بوده است و پس از آن کاهش معنی داری در سطح تظاهر ژن نسبت به اولین روزهای سرمادهی دیده شده است. از آنجایی که تفاوتی در فعالیت این ژن در رقم مقاوم و لاین حساس دیده نمی شود احتمال دیگری نیز وجود دارد که این ژن رمزکننده پروتئین هایی باشد که برای تنظیم سلولی طی فرآیند تنش سرما ضروری هستند و ارتباطی با افزایش تحمل به سرما ندارند (۴، ۵). از سوی دیگر ممکن است این ژن دارای فعالیت چندگانه در کنترل تنش سرما و تنش مقاومت به بیماری کپک برفی باشد و افزایش سطح بیان این ژن در لاین حساس به

تنش یخ زدگی PI181268 که مقاوم به بیماری کپک برفی می باشد، ناشی از دخالت این ژن در اعطا مقاومت به این بیماری باشد، زیرا القاء ژن های مقاومت به این بیماری طی واکنش سرمادهی انجام می شود و نیازی به ایجاد شرایط آلودگی بیماری ندارد. بنابراین این ژن می تواند به عنوان یکی از کاندیدهای ژن های *COR*^{۳۴} در القاء مقاومت به تنش سرما و بیماری کپک برفی معرفی شود و رمزکننده آنزیم هایی باشد که در انتقال کربوهیدرات های ساده و پلی ساکاریدها دخالت دارد. قرار گرفتن مقاومت به این دو تنش در کنار یکدیگر کاری دشوار به نظر می رسد زیرا در ارقام مقاوم به تنش سرما، میزان قندهای ساده بالا و میزان قندهای پلی ساکارید (فروکتان) پایین است. ولی یکی از مشخصات ارقام مقاوم به کپک برفی تمایل آنها به ذخیره کربوهیدرات ها به صورت قند فروکتان در واکوئول می باشد تا بتواند با تجزیه آن به قندهای ساده آنزیم هگزوکیناز را فعال نماید تا واکنش مقاومت القا شود (۹). به همین دلیل بررسی های بیشتر روی این ژن جالب توجه خواهد بود.

طول باند جداسازی شده برای راه انداز این ژن در حدود ۲۴۲۷ جفت باز بود که ۴۵۰ باز آن با انتهای ۵' ژن انتقال دهنده کربوهیدرات در برنج (*Oryza sativa*) در حدود ۹۱٪ هم پوشانی نشان داد. پس از حذف این ناحیه ۱۹۸۰ باز به عنوان توالی کامل راه انداز در نظر گرفته شد و مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت (شکل ۴). در شکل ۵ محل عناصر موجود در این راه انداز نشان داده شده است.



شکل ۴- الکتروفورز محصولات حاصل از PCR قطعه راه انداز ژن *SuT4* پس از همسان سازی آن

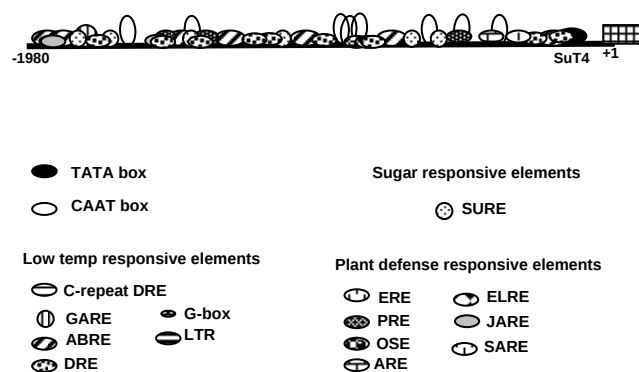
³⁴ Cold responsive

SURE⁴² وجود دارد. به طور کلی در حدود ۵۲ درصد عناصر موجود در راه انداز عناصر مسئول درجه حرارت پایین (LTRE)⁴⁵ شامل ABRE، G-box، DRE و GARE. ۲۹ درصد عناصر مسئول دفاع گیاهی (PDRE)⁴⁶ شامل ERE، ARE، OSE، PRE، JARE و SARE و ۱۹ درصد عناصر مسئول تجمع کربوهیدرات ها (SURE) هستند. به نظر می رسد ثلث میانی راه انداز در کنترل تظاهر ژن در شرایط تنش سرما نقش داشته باشد، زیرا در حدود ۵۸ درصد عناصر مسئول درجه حرارت پایین (LTRE) در این ناحیه قرار گرفته اند. همچنین به علت قرار گرفتن ۵۰ درصد عناصر مسئول دفاع گیاهی (PDRE) در ثلث سوم توالی راه انداز، احتمال می رود این ناحیه در کنترل تظاهر ژن در برابر تنش های زنده از جمله بیماری کپک برفی مؤثر است و ثلث ابتدایی راه انداز شامل عناصر راه انداز و تقویت گر می باشد که به عنوان عناصر راه انداز در شروع نسخه برداری ژن عمل می کنند. به طور کلی ارزیابی های *in silico* راه انداز و موتیف های تنظیم کننده آن آسان و دقیق نیست (۱۵) و بررسی های بیشتر روی ناحیه راه انداز ژن با استفاده از ژن گزارشگر نیاز می باشد تا عملکرد عناصر شناسایی شده توسط نرم افزار PlantCare تأیید شود.

این راه انداز دارای ۵۴/۴۹٪ بازهای گوانین-سیتوزین و ۴۵/۱۵٪ بازهای آدین و سیتوزین می باشد. جعبه TATA در موقعیت ۱۱۴- با توالی حفاظت شده TATA و اولین جعبه CAAT در موقعیت ۵۳۶- یعنی در فاصله ۴۲۰ بازی از جعبه TATA قرار گرفته است. از آنجایی که جعبه TATA معمولاً ۲۵-۳۰ نوکلئوتید بالادست نقطه شروع نسخه برداری و جعبه CAAT در حدود ۵۰ نوکلئوتید دورتر از جعبه TATA قرار دارد، احتمال می رود این ژن از گروه ژن های فاقد جعبه TATA باشد که توالی های دیگری به عنوان عوامل شروع رونویسی عمل می کنند. در بسیاری از ژن های گیاهی دخیل در فتوسنتز (۱۴) و بسیاری از ژن های خانه دار (۳، ۶) فقدان جعبه TATA گزارش شده است. از آنجایی که نرم افزارهای موجود جهت بررسی توالی های راه انداز خیلی دقیق نیستند، مطالعه بیشتر روی این ژن ممکن است جعبه TATA یا توالی های دیگری با عمل مشابه را در این ژن مشخص نماید همانطور که در ژن های دخیل در فتوسنتز دیده شده است (۱۳) در طول این راه انداز هشت جعبه CAAT، هشت توالی ABRE³⁵، یک توالی GARE³⁶، یک توالی G-box، ده توالی DRE³⁷، یک توالی ERE³⁸، دو توالی OSE³⁹، دو توالی ARE⁴⁰، سه توالی PRE⁴¹، یک توالی JARE⁴²، دو توالی SARE⁴³ و هفت توالی

- ⁴² Jasmonic acid responsive element
⁴³ Salicylic acid responsive element
⁴⁴ Sugar responsive element
⁴⁵ Low-temperature responsive element
⁴⁶ Plant defence responsive element

- ³⁵ Absciscic acid responsive element
³⁶ Gibberellic acid responsive element
³⁷ Dehydration responsive element
³⁸ Ethylene responsive element
³⁹ Organ-specific element
⁴⁰ Auxin responsive element
⁴¹ Pathogen responsive element



شکل ۵- جایگاه عناصر راه انداز ژن *SuT4*

منابع

- approaches to identify promoters and *cis*-regulatory elements in plant genomes. *Plant Physiol.* 132: 1162–1176.
16. Sasaki, H., Ichimura, K. and Oda, M. 1996. Changes in sugar content during cold acclimation and deacclimation of cabbage seedlings. *Ann Bot* 78: 365-369.
 17. Thomashow, M.F. 1999. Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50: 571–599
 18. Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K. 2006. Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57: 781–803
 1. Cheung, W.Y. and Gale, M.D. 1990. The isolation of high molecular weight DNA from wheat, barley and rye for analysis by pulsed-field gel electrophoresis. *Plant Mol Biol*, 14: 881-888
 2. Chinnusamy, V., Ohta, M., Kanrar, S., Lee, B., Hong, X., Agarwal M. and Zhu, J-K. 2003. ICE1: a regulator of cold-induced transcriptome and freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Genes & Dev.* 17: 1043-1054
 3. Chye, M.L., Tan, C.T. and Chua, N.H. 1992. Three genes encode 3-hydroxy-3- methylglutaryl-coenzyme A reductase in *Hevea brasiliensis*: *hmg1* and *hmg3* are differentially expressed. *Plant Mol. Biol.* 19: 473–484.
 4. Danyluk, J. and Sarhan, F. 1990. Differential mRNA transcription during the induction of freezing tolerance in spring and winter wheat. *Plant Cell Physiol.* 31: 609-619
 5. Danyluk, J., Rassart, E. and Sarhan, F. 1991. Gene expression during cold and heat shock in wheat. *Biochem Cell Biol.* 69: 383-391
 6. Dynan, W.S. 1986. Promoters for housekeeping genes. *Trends Genet.* 2: 196–197.
 7. Fujita, Y., Fujita, M., Satoh, R., Maruyama, K., Parvez, M.M., Seki, M., Hiratsu, K., Ohme-Takagi, M., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. 2005. AREB1 is a transcription activator of novel ABRE-dependent ABA signaling that enhances drought stress tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 17: 3470–3488
 8. Furihata, T., Maruyama, K., Fujita, Y., Umezawa, T., Yoshida, R., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. 2006. Absciscic acid-dependent multisite phosphorylation regulates the activity of a transcription activator AREB1. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 1988–1993
 9. Gaudet, D., Laroche, A. and Yoshida, M. 1999. Low temperature-wheat-fungal interaction: A carbohydrate connection. *Physiologia Plantarum* 106: 437-444
 10. Higo, K., Ugawa, Y. Iwamoto, M. and Korenaga, T. 1999. Plant *cis*-acting regulatory DNA elements (PLACE) database. *Nucleic Acids Research* 27 (1): 297-300.
 11. Kang, J., Choi, H., Im, M. and Kim, S.Y. 2002. *Arabidopsis* basic leucine zipper proteins that mediate stress-responsive abscisic acid signaling. *Plant Cell* 14: 343–357
 12. Kim, S., Kang, J., Cho, D., Park, J.H. and Kim, S.Y. 2004. ABF2, an ABRE-binding bZIP factor, is an essential component of glucose signaling and its overexpression affects multiple stress tolerance. *Plant J.* 40: 75–87
 13. Lescot, M., Déhais, P. Moreau, Y. De Moor, B. Rouzé, P. and Rombauts, S. 2002. PlantCARE: a database of plant *cis*-acting regulatory elements and a portal to tools for *in silico* analysis of promoter sequences. *Nucleic Acids Res., Database issue.* 30(1):325-327.
 14. Nakamura, M., sunoda, T.T., and Obokata, J. 2002. Photosynthesis nuclear genes generally lack TATA-boxes: a tobacco photosystem I gene responds to light through an initiator. *Plant J.* 29: 1–10.
 15. Rombauts, S., Florquin, K., Lescot, M., Marchal, K., Rouzé, P., and Van de Peer, Y. 2003. Computational