ژنتیک نوین
دوره چهارم، شماره ٤، زمستان ۱۳۸۸
صفحه۳۲-۵۳

ارزیابی کمّی الگوی تظاهر و تجزیه *in silico* عناصر موجود در ناحیه راه‌انداز ژن انتقال‌دهنده کربوهیدرات (*SuT4*) در شرایط سرمادهی در گندم (*Triticum aestivum* L.)

سیده‌ساناز رمضانپور[۱*]، حسن سلطانلو[۲]
۱و۲- 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 یخزدگی بایستی در معرض دماهای غیرمنجمدکننده قرار گیرند که به این فرآیند سازگاری به سرما اطلاق می‌شود. مطالعات نشان داده‌اند، بیان ژن‌های القاشونده با سرما در گیاهان، برای تحمل و سازگاری به سرما ضروری است. در این تحقیق الگوی بیان یکی از ژن‌های دارای بیان افتراقی در شرایط سرمادهی با نام SuT4 از گروه ژن‌های انتقال‌دهنده کربوهیدرات در رقم مقاوم به یخزدگی نورستار و لاین حساس به یخزدگی PI181268 گندم مورد بررسی قرار گرفت و به منظور مطالعه نحوه بیان ژن، بررسی‌های بیشتری روی ناحیه '۵ بالادست (راه انداز) ژن مذکور انجام شد. به منظور اعمال تیمار سرمادهی از دمای ٤ درجه سانتی‌گراد روی گیاهچه‌های دو هفته‌ای استفاده گردید. نمونه‌برداری از گیاهان در زمان‌های پیش از شروع سرمادهی و پس از آن انجام شد. به منظور ارزیابی الگوی بیان ژن نیز از روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز کمّی در زمان واقعی (QRT-PCR) با استفاده از رنگ فلورسنت سایبرگرین استفاده شد. توالی ناحیه راه‌انداز ژن نیز با روش پیمایش ژنومی با استفاده از PCR و نرم‌افزارهای 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 تیمارنشده بود. ولی در تمام طول آزمایش بیان ژن در رقم مقاوم بیشتر از رقم حساس بود. طول راه‌انداز این ژن در حدود ۱۹۸۰ جفت باز است که فاقد جعبه TATA و جعبه CAAT می‌باشد. راه‌انداز شامل عناصر تنظیم‌کننده همسوساز مفروض متعددی شامل عناصر پاسخ‌دهنده به اسیدآبسیزیک (ABRE)، عناصر پاسخ‌دهنده به کم‌آبی (DRE)، عناصر پاسخ‌دهنده به دمای پایین (LTRE) و بسیاری از عناصر تنظیم‌کننده دیگر می‌باشد. از آنجایی که بیان این ژن در هر دو رقم افزایش معنی‌داری نشان داده است، احتمال می‌رود 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 کپک‌برفی باشد.

واژه‌های کلیدی

راه‌انداز،
عناصر همسوساز،
گندم،
انتقال‌دهنده کربوهیدرات،
الگوی تظاهر

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1388.4.4.5.5]

مقدمه

سرما یکی از عوامل محیطی است که رشد بسیاری از گونه‌های گیاهی را محدود می‌کند و اغلب، اثرات مضری 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[1] اطلاق می‌شود. مطالعات نشان داده‌اند، بیان ژن‌های القاشونده 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، فنیل‌پروپانوئیدها و آنتی‌اکسیدانت‌ها، پروتئین‌های ضدیخزدگی 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[2] 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[3]، DREB[4]، AREB[5]و ABF[6] در شرایط تنش‌های غیرزنده مثل دمای پایین و تنش‌های اسمزی تنظیم می‌شود (۱۸).

AREBها و ABFها به عنصر همسوساز ABRE[7] متصل می‌شوند و با فعالیت غیرهمسوسازی[8] 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[9] (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

RNAی کل[10] با استفاده از روش ترایزول[11] 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 «آرایازی‌مینی‌کلین‌آپ»[12] شرکت کیاژن[13] 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 RNAی کل به روش اسپکتروفتومتری و الکتروفورز روی ژل ارزیابی گردید. cDNA تک‌رشته‌ای با استفاده از ۵

[1] Cold acclimation
[2] Cold-responsive/late embryogenesis abundant
[3] C-repeat binding factor
[4] Dehydration responsive element binding protein
[5] ABA responsive element binding protein
[6] ABA responsive element binding factor
[7] ABA responsive (ABRE) *cis*-acting element
[8] *Trans*-action
[9] Norstar
[10] Total RNA
[11] Trizol
[12] Rneasy mini clean up
[13] Qiagen

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1388.4.4.5.5]

میکروگرم RNAی کل، آغازگر اولیگودی‌تی (۲۰-۱۸)[14] و آنزیم سوپر اسکریپت III به عنوان آنزیم رونوشت‌بردار معکوس بر اساس دستورالعمل شرکت اینویتروژن ساخته شد.

انتخاب همسانه مورد آزمایش

همسانه مورد استفاده در این آزمایش، از بین همسانه‌های جداسازی شده با روش SSH[15] 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[16] 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[17] و از مخلوط cDNA لاین حساس CI14106 که به مدت ۲۱ و ۴۹ روز (۱:۱) در دمای ۲°C قرار گرفته بودند به عنوان تیمار درایور[18] استفاده گردید و بنابراین ژن‌هایی که در پاسخ به فرآیند سرمادهی در اولین ساعات در رقم مقاوم تظاهر می‌یابند[19] 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[20] مورد بررسی قرار گرفت و به منظور طراحی آغازگر از نرم افزار پرایمر۳[21] استفاده گردید. در شکل ۲ جایگاه آغازگرها روی توالی مورد نظر نشان داده شده است.

[14] Oligo $dT_{(18\text{-}20)}$
[15] Suppression Subtractive Hybridization
[16] Hexose transporter
[17] Tester

[18] Driver
[19] Early-expressed genes
[20] Emboss
[21] Primer3

```
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 FSGAVADAAGRRALLIASSVLYFVSGLVMLWAPNVYVLLLGRLLDRFGIGLAVTLVPLYI 546
                 FSGAVADA GRR LLIASSVLYFVSGLVMLWAPNVYVLLL RL+D FGIGLAVTLVPLYI
CAD58958:    63  FSGAVADAVGRRPLLIASSVLYFVSGLVMLWAPNVYVLLLARLIDGFGIGLAVTLVPLYI 122

Sut4:        547 SETAPTDIRGL*NPCPKSGGSGGMFPSY 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

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1388.4.4.5.5]



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[22] برای ارزیابی کمّی استفاده گردید. ۲۰ میکرولیتر مخلوط واکنش، شامل ۱۰ میکرولیتر مخلوط SYBR Green، ۰/۶ میکرولیتر از هر آغازگر اختصاصی پیشرو[23] (5'-AGTGCCTTGACAACCTTGCT-3') و پسرو[24] (5'-GGTTCCGACATCCAGAACAT-3') با غلظت ۱۰ میکرومول، ۳/۳ میکرولیتر آب، ۰/۵ میکرولیتر فلورسئین[25] و ۵ میکرولیتر نمونه cDNA مورد بررسی بود. به منظور انجام واکنش از پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای[26] استفاده شد. از سری‌های غلظت نیز به منظور کنترل راندمان واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز استفاده گردید. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز استاندارد در دمای اتصال آغازگر انجام شد. طول محصول PCR در این واکنش ۱۵۶ نوکلئوتید بود.

[22] Fluorescence
[23] Forward
[24] Reverse
[25] Fluorecein
[26] 96-Well plate

آزمون ارزیابی‌های کمّی با دو تکرار بیولوژیکی و سه تکرار تکنیکی انجام شد تا صحت و دقت نتایج تأیید گردد.

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 کلونتک استفاده شد. برای این منظور DNA ژنومی لاین PI181268 با استفاده از روش چانگ و گیل (۱۹۹۰) استخراج گردید (۱) و توسط چهار آنزیم *Dra*I، *Eco*RV، *Pvu*II و *Stu*I برش داده شد تا کتابخانه ژنومی تهیه

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1388.4.4.5.5]

شود. پس از ساختن کتابخانه‌ها اولین واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز [۲۷] با استفاده از آغازگر آداپتور بیرونی (AP1)[۲۸] با توالی (5'-GTAATACGACTCACTATAGGGC-3') و آغازگر اختصاصی بیرونی (GSP)[۲۹] 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)[۳۰] با توالی (5'-ACTATAGGGCACGCGTGGT-3') و آغازگر اختصاصی ژن آشیانه‌ای (GSP2)[۳۱] 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 λ/*Hind*III DNA 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 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 PlantCARE[۳۲] (۱۳) با آدرس اینترنتی http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html / و PLACE[۳۳] (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

[27] Primary PCR
[28] Outer Adaptor primer
[29] Outer, gene-specific primer
[30] Nested Adaptor Primer
[31] Nested gene-specific primer

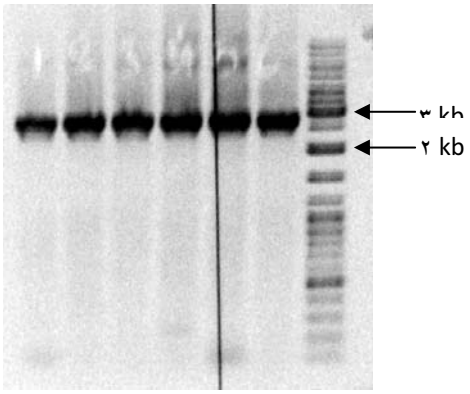
[32] Plant *cis*-acting regulatory elements
[33] Plant *cis*-acting regulatory DNA elements

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1388.4.4.5.5]

نتایج و بحث

تظاهر ژن *SuT4* در هر دو رقم از اولین ساعات واکنش به سرمادهی افزایش معنی‌داری نشان داد. در رقم مقاوم نورستار بیشترین فعالیت ژن در روز سوم پس از شروع سرمادهی دیده شد که افزایش معنی‌داری نسبت به اولین روز نیز نشان می‌دهد، پس از آن بیان ژن کاهش معنی‌داری نشان داده است ولی هنوز افزایش سطح بیان آن نسبت به تیمار کنترل معنی‌دار 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 کربوهیدرات‌ها ۳ روز پس از شروع سرمادهی گزارش شده است (۱۶) و احتمال می‌رود فعالیت بالای این ژن نیز در روز سوم سرمادهی بتواند بیانگر بالاترین سطح تجمع کربوهیدرات‌ها باشد. در لاین حساس نیز بیشترین سطح تظاهر ژن در سومین روز دیده شد و پس از آن کاهش معنی‌داری 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 می‌تواند دلیلی بر واکنش حساسیت این لاین به تنش یخزدگی باشد. به عبارت دیگر تعداد نسخه‌ها و سطح بیان ژن می‌تواند در افزایش یا کاهش میزان تجمع کربوهیدرات‌ها و به دنبال آن واکنش گیاه به دماهای زیر صفر درجه مؤثر باشد. نتایج الگوی تظاهر ژن مؤید نحوه جداسازی آن نیز می‌باشد، زیرا در جداسازی این ژن انتظار می‌رفت 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 معنی‌داری 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 نمی‌شود احتمال دیگری نیز وجود دارد که این ژن رمزکننده پروتئین‌هایی 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 کپک‌برفی باشد و افزایش سطح بیان این ژن در لاین حساس به تنش یخزدگی PI181268 که مقاوم به بیماری کپک برفی می‌باشد، ناشی از دخالت این ژن در اعطا مقاومت به این بیماری باشد، زیرا القاء ژن‌های مقاومت به این بیماری طی واکنش سرمادهی انجام می‌شود و نیازی به ایجاد شرایط آلودگی بیماری ندارد. بنابراین این ژن می‌تواند به عنوان یکی از کاندیدهای ژن‌های *COR*[34] در القاء مقاومت به تنش سرما و بیماری کپک برفی معرفی شود و رمزکننده آنزیم‌هایی باشد که در انتقال کربوهیدراتهای ساده و پلی‌ساکاریدها دخالت دارد. قرار گرفتن مقاومت به این دو تنش در کنار یکدیگر کاری دشوار به نظر می‌رسد زیرا در ارقام مقاوم به تنش سرما، میزان قندهای ساده بالا و میزان قندهای پلی‌ساکارید (فروکتان) پایین است. ولی یکی از مشخصات ارقام مقاوم به کپک برفی تمایل آنها به ذخیره کربوهیدرات‌ها به صورت قند فروکتان در واکوئول می‌باشد تا بتواند با تجزیه آن به قندهای ساده آنزیم هگزوکیناز را فعال نماید تا واکنش مقاومت القا شود (۹). به همین دلیل بررسی‌های بیشتر روی این ژن جالب توجه خواهد بود.

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



شکل ۴- الکتروفورز محصولات حاصل از PCR قطعه راه‌انداز ژن *SuT4* پس از همسانه‌سازی آن

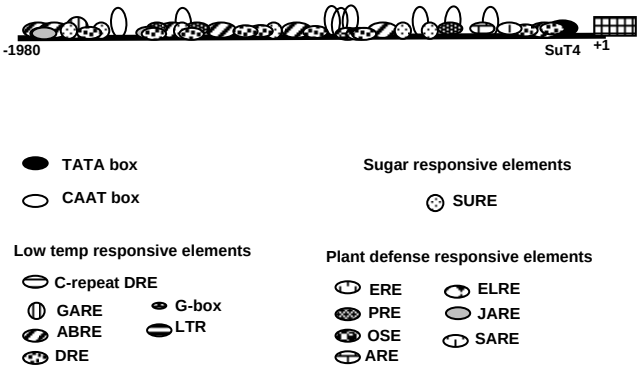
[34] Cold responsive

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1388.4.4.5.5]

این راه‌انداز دارای ۵۴/۴۹٪ بازهای گوانین-سیتوزین و ۴۵/۱۵٪ بازهای آدنین و سیتوزین می‌باشد. 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 ۳۰-۲۵ نوکلئوتید بالادست نقطه شروع نسخه‌برداری و جعبه CAAT در حدود ۵۰ نوکلئوتید دورتر از جعبه TATA قرار دارد، احتمال می‌رود این ژن از گروه ژن‌های فاقد جعبه TATA باشد که توالی‌های دیگری به عنوان عوامل شروع رونویسی عمل می‌کنند. در بسیاری از ژن‌های گیاهی دخیل در فتوسنتز (۱۴) و بسیاری از ژن‌های خانه‌دار (۳، ۶) فقدان جعبه TATA گزارش شده است. از آنجایی که نرم‌افزارهای موجود جهت بررسی توالی‌های راه‌انداز خیلی دقیق نیستند، مطالعه بیشتر روی این ژن ممکن است جعبه TATA یا توالی‌های دیگری با عمل مشابه را در این ژن مشخص نماید همانطور که در ژن‌های دخیل در فتوسنتز دیده شده است (۱۳) در طول این راه‌انداز هشت جعبه CAAT، هشت توالی ABRE[35]، یک توالی GARE[36]، یک توالی G-box، ده توالی DRE[37]، یک توالی ERE[38]، دو توالی OSE[39]، دو توالی ARE[40]، سه توالی PRE[41]، یک توالی JARE[42]، دو توالی SARE[43] و هفت توالی SURE[44] وجود دارد. به طور کلی در حدود ۵۲ درصد عناصر موجود در راه‌انداز 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 کربوهیدرات‌ها (SURE) هستند. به نظر می‌رسد ثلث میانی راه‌انداز 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 گرفته‌اند. همچنین به علت قرار گرفتن ۵۰ درصد عناصر مسئول دفاع گیاهی (PDRE) در ثلث سوم توالی راه‌انداز، احتمال می‌رود این ناحیه در کنترل تظاهر ژن در برابر تنش‌های زنده از جمله بیماری کپک برفی مؤثر است و ثلث ابتدایی راه‌انداز شامل عناصر راه‌انداز و تقویت‌گر می‌باشد که به عنوان عناصر راه‌انداز در شروع نسخه‌برداری ژن عمل می‌کنند. به طور کلی ارزیابی‌های *in silico* راه‌انداز و موتیف‌های تنظیم‌کننده آن آسان و دقیق نیست (۱۵) و بررسی‌های بیشتر روی ناحیه راه‌انداز ژن با استفاده از ژن گزارشگر نیاز می‌باشد تا عملکرد عناصر شناسایی شده توسط نرم‌افزار PlantCare تأیید شود.

[35] Abscisic acid responsive element
[36] Gibbrellic acid responsive element
[37] Dehydration responsive element
[38] Ethylen responsive element
[39] Organ-specific element
[40] Auxin responsive element
[41] Pathogen responsive element

[42] Jasmonic acid responsive element
[43] Salicylic acid responsive element
[44] Sugar responsive element
[45] Low-temprature responsive element
[46] Plant defence responsive element



شکل ۵- جایگاه عناصر راه‌انداز ژن *SuT4*

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1388.4.4.5.5]

منابع

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. Abscisic 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 approaches to adentify 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

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1388.4.4.5.5]