مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌فناوری گیاهان زراعی
سال اول، شماره اول، پاییز ۱۳۹۰ (۳۳-۲۳)

شناسایی و بررسی بیان یک پروتئین فسفاتاز ۲C القا شونده توسط تنش خشکی و آبسیزیک‌اسید در برنج

زهرا سادات شبّر[1]* و جان بنت[2]
۱، استادیار، بخش فیزیولوژی مولکولی، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران
۲، استاد، مؤسسه تحقیقات بین المللی برنج
(تاریخ دریافت: ۹۰/۸/۲۵- تاریخ تصویب: ۹۰/۹/۲۸)

چکیده

پروتئین فسفاتازهای ۲C گروهی از سرین/ ترئونین فسفاتازهای حفظ‌شده در طی تکامل هستند که در ترارسانی پیام تنش نقش دارند. زیرخانواده‌ای از این پروتئین فسفاتازها در آرابیداپسیس، شامل ABI1 و ABI2، به عنوان جزئی از مسیر ترارسانی پیام ABA شناخته شده‌اند که جهش‌یافته‌های آن‌ها حساسیت بیشتری به ABA نشان داده، خواب بذر و پاسخ‌های تطابقی به خشکی در آن‌ها بیشتر است. از آنجا که برنج نسبت به تنش‌های غیرزیستی به‌ویژه خشکی بسیار حساس است، شناسایی این زیرخانواده ژنی در برنج و مطالعه نقش آن‌ها در پاسخ به این تنش‌ها ارزشمند خواهد بود. در این پژوهش، طی بررسی‌های بیوانفورماتیکی تعداد ۹ پروتئین در برنج شناسایی شدند (OsPP2C1 تا OsPP2C9) که دارای تمامی نواحی حفظ‌شده و حائز اهمیت زیرخانواده مذکور بودند. از میان آن‌ها، تنها میزان رونوشت‌های *OsPP2C5* تحت تأثیر تنش خشکی و هورمون آبسیزیک‌اسید به شدت افزایش و با آبیاری مجدد یا حذف ABA کاهش یافت. تنش خشکی در تمامی بافت‌های مورد مطالعه موجب القای ژن *OsPP2C5* شد و بر اساس نتایج دورگه‌سازی در محل، رونوشت‌های این ژن، در تمامی سلول‌ها به‌ویژه در دسته‌های آوندی اولیه و ثانویه، سلول‌های همراه آوند آبکشی و پارانشیم آوند چوبی، سلول‌های اپیدرمی و سلول‌های پیش‌ساز اسکلرانشیم و کلرانشیم ناحیه تقسیم‌سلولی دمگل‌های در معرض تنش مشاهده گردید و در بیشتر سلول‌ها رونوشت‌های زیادی در هسته تمرکز یافته‌بودند. براساس نتایج به دست آمده به نظر می‌رسد که ژن *OsPP2C5* در مسیر ترارسانی پیام ABA/تنش خشکی در برنج نقش دارد. امید است اصلاحات ژنتیکی مناسب در این ارتباط، تحمل به تنش خشکی را افزایش دهد.

واژه‌های کلیدی: تنش خشکی، برنج (*Oryza sativa*)، آبسیزیک‌اسید (ABA)، پروتئین فسفاتازهای 2C (PP2Cs)، بیان ژن

* نویسنده مسئول: زهرا سادات شبّر
E-mail: shobbar@abrii.ac.ir

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

تنش‌های غیرزیستی به شدت محصول‌دهی گیاهان زراعی را کاهش می‌دهند (Sreenivasulu *et al*. 2007). هورمون گیاهی آبسیزیک‌اسید (ABA) تحت شرایط محیطی تنشی تولید می‌شود و نقش مهمی در تحمل گیاهان به این تنش‌ها ایفا می‌کند (Soon *et al*. 2011). سازوکار کنترل مولکولی تحمل به تنش‌های غیرزیستی بر پایه فعال‌سازی و تنظیم ژن‌های ویژه مرتبط با تنش است (Boneh *et al*. 2011). پروتئین فسفاتازهای ۲C (PP2Cs) گروهی از سرین/ترئونین فسفاتازهای حفظشده در طی تکامل هستند که در ترارسانی پیام تنش[1] در مخمر، جانوران و گیاهان نقش دارند. گیاهان دارای خانواده بسیار بزرگتر و متنوع‌تری از پروتئین فسفاتازهای ۲C نسبت به مخمر و جانوران می باشند (Luan, 2003). در آرابیداپسیس، ABI1 و ABI2، که زیرخانواده‌ای از پروتئین فسفاتازهای ۲C را تشکیل می‌دهند، به‌عنوان جزئی از مسیر ترارسانی پیام ABA شناخته شده‌اند (Rodriguez *et al*. 1998; Meyer *et al*. 1994, Leung *et al*. 1994 and 1997). گیاهانی که دارای جهش در نواحی حفظشده دامنه PP2C هستند، به‌طوری که پروتئین ABI1 حاصل فاقد هر گونه فعالیت فسفاتازی باشد، نسبت به گیاهان وحشی، در مورد جوانه‌زنی دانه و رشد دانه‌رست‌ها[2] حساسیت بیشتری به ABA نشان می‌دهند. همچنین خواب‌بذر و پاسخ‌های تطابقی به خشکی در آن‌ها بیشتر است (Gosti *et al*. 1999). پروتئین فسفاتازهای ABI1 و ABI2 تنظیم‌کننده منفی پیام‌رسانی پاسخ به ABA می‌باشند و نقش‌های هم‌پوشانی در کنترل عمل ABA دارند. اندازه‌گیری فعالیت PP2C نشان داده است که فعالیت فسفاتازی ABI1 و ABI2 در پاسخ به ABA افزایش می‌یابد. این نتایج پیشنهاد می‌کند که ABI1 و ABI2 در یک حلقه تنظیمی پس خورد منفی[3] از مسیر پیام‌رسانی ABA عمل کنند (Merlot *et al*. 2001). از دیگر اعضای این زیرخانواده چندژنی از پروتئین فسفاتازهای ۲C *آرابیداپسیس تالیانا* می‌توان از AtP2C-/AtHAB1 HA و AHG3/AtPP2CA نام برد. بیان ژن AtHAB1 توسط تیمار ABA افزایش می‌یابد (Rodriguez *et al*. 1998) و AtPP2CA نیز یک تنظیم‌کننده منفی در پیام‌رسانی ABA است (Yoshida *et al*. 2006; Kuhn *et al*. 2006).

برنج که غذای اصلی بیش از نصف مردم جهان را تأمین می‌کند؛ اغلب به‌عنوان یکی از حساس‌ترین گیاهان زراعی نسبت به تنش‌های غیرزیستی به ویژه خشکی محسوب می‌شود (Lafitte *et al*. 2004). بنابراین، شناسایی این زیرخانواده ژنی در برنج و مطالعه الگوی بیان آن‌ها در پاسخ به این تنش‌ها ارزشمند خواهد بود. این پژوهش، به شناسایی این زیرخانواده ژنی و اورتولوگ احتمالی *ABI1* و *ABI2* در برنج می‌پردازد و القای بیان در شرایط تنش خشکی و تیمار ABA را مورد بررسی قرار می‌دهد. همچنین برای اولین بار با استفاده از روش دورگه‌سازی در محل، الگوی بیان یکی از اعضای این زیرخانواده (*OsPP2C5*، اورتولوگ احتمالی *ABI1* و *ABI2*) را در سطح سلول به نمایش می‌گذارد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی: بذور برنج (*Oryza sativa* L., cv. IR64) از موسسه تحقیقات بین‌المللی برنج (IRRI) تهیه گردید. برای مطالعه اثر خشکی، تنش خشکی سه روز پیش از ظهور خوشه با خالی‌کردن آب سطحی گلدان‌ها آغاز گردید و آبیاری برای مدت سه روز متوقف شد. وضعیت آب گیاهان با

1. Stress signal transduction
2. Seedlings
3. Negative feedback regulatory loop

Archive of SID

www.SID.ir

اندازه‌گیری محتوای آب نسبی برگ‌پرچمی و دمگل بررسی گردید (Shobbar *et al*. 2008). نمونه‌برداری از دمگل گیاهان در شرایط آبیاری کافی (محتوای آب نسبی برگ پرچم و دمگل به ترتیب در حدود ۹۰ درصد و ۷۵ درصد)، تنش خشکی (محتوای آب نسبی برگ‌پرچم و دمگل در آخرین روز تنش به ترتیب حدود ۴۰ درصد و ۵۰ درصد) و آبیاری مجدد (محتوای آب نسبی برگ‌پرچم و دمگل یک روز پس از آبیاری مجدد به ترتیب در حدود ۵۰ درصد و ۶۵ درصد) صورت گرفت. نمونه‌ها بلافاصله پس از برداشت در نیتروژن مایع منجمد شده و سپس تا زمان استخراج RNA در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

برای بررسی اثر هورمون‌ها، تعداد پنجه کافی در مرحله خروج خوشه از رقم IR64 با آبیاری کافی برداشت شد و دمگل آن‌ها از بالای بالاترین گره و زیر گره ماقبل آن قطع شد (شکل ۳- الف). نمونه دمگل بریده‌شده در زمان صفر به عنوان شاهد استفاده شد. پنج عدد از دمگل‌های جداشده برای ۱۸ ساعت در ۳۰۰ میلی‌لیتر آب‌خالص بدون‌افزودنی (شاهد غوطه‌ور در آب) و یا حاوی ۱۰۰ میکرومولار از هورمون‌های موردنظر شامل جیبرلیک‌اسید و (GA3, Sigma, G7645)، آبسیزیک‌اسید (Abscisic acid, Sigma A1049) و یا هر دو (GA+ABA) قرار داده شدند و طول آن‌ها هر ۶ ساعت اندازه‌گیری شد (Shobbar *et al*. 2008). نمونه‌ها بلافاصله پس از برداشت در نیتروژن مایع منجمدشده و سپس تا زمان استخراج RNA در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

شناسایی اعضای خانواده ژنی موردنظر در برنج: توالی پروتئینی ABI1 (CAA54383) آرابیدوپسیس به عنوان الگو برای جستجوی tBLASTn در ژنوم برنج استفاده شد. ژن‌های یافت‌شده با امتیاز مشابهت زیاد و انتظار تصادفی‌بودن (E value) پایین انتخاب و حضور نواحی حفظ شده و حائز اهمیت برای عمل پروتئین در آن‌ها بررسی گردید. همچنین درخت فیلوژنتیکی این پروتئین‌های برنج و پروتئین‌های شناخته‌شده از آرابیداپسیس رسم گردید.

استخراج RNA و مطالعه الگوی بیان ژن‌ها: RNA تام با استفاده از محلول ترایزول[1] طبق دستورالعمل سازنده از بافت‌های مختلف (دمگل، پانیکول، پهنک، غلاف برگ‌پرچمی و پهنک برگ اول) استخراج گردید. کمیت و کیفیت RNA براساس جذب نوری با دستگاه اسپکتروفوتومتر و بررسی باندهای مربوطه در ژل الکتروفورز تعیین و تأیید شد. RNAهای استخراج‌شده با آنزیم RNase-free DNase I (Promega Corporation, Madison, WI) تیمار شدند، عدم وجود DNA توسط PCR تأیید شد و همسان‌سازی غلظت RNAهای مختلف بر اساس 28S & 18S rRNA صورت گرفت. جفت پرایمر اختصاصی مناسب برای ژن خانه‌دار *GAPDH*[2] و ژن *OsVP1* طراحی شد. شرایط بهینه RT-PCR و تعداد چرخه مناسب برای مشاهده تفاوت بیان بین تیمارهای مختلف تعیین شد. الگوی بیان توسط RT-PCR (با استفاده از کیت یک‌مرحله‌ای اینویتروژن (Invitrogen, Carlsbad, CA) مطالعه گردید. سه تکرار زیستی مورد بررسی قرار گرفت و دو تکرار آزمایشی برای هر تکرار زیستی انجام شد.

دورگه‌سازی در محل[3]: جفت پرایمر مناسب برای تکثیر کاوشگر اختصاصی طراحی شد. محصول RT–PCR در ناقل pGEM-T Easy vector (Promega) همسانه‌سازی گردید. کاوشگرهای سنس و آنتی‌سنس[4] توسط digoxigenin-11-UTP با استفاده از DIG RNA labelling mix (Roche Molecular Systems, Pleasanton, CA) نشان‌دار شدند. جهت قطعه همسانه‌سازی شده

1. Invitrogen
2. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
3. RNA in situ hybridization
4. Sense and anti-sense riboprobes

Archive of SID

www.SID.ir

در ناقل به‌وسیله توالی‌یابی مشخص شد (Macrogen, Seoul, Korea). بافت‌ها تثبیت، آب‌گیری، قالب‌گیری و برش‌گیری (۱۰-۲۰µm) شدند. نوارهای بافتی روی لام میکروسکوپی مناسب[1] قرار داده شد. اسلایدها به منظور افزایش کارایی اتصال بافت‌ها به لام به مدت دو شبانه روز در ۴۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. مراحل پیش‌دورگه‌سازی[2]، دورگه‌سازی[3]، شستشو و تشخیص ایمونولوژیکی[4] انجام گرفت (Shobbar *et al.* 2008). اسلایدها با استفاده از میکروسکوپ نوری (bright field microscope, Zeiss, Axioplan 2) و نرم‌افزار مناسب (Image-Pro Plus 5.1 software) مشاهده و عکس‌برداری شدند. دورگه‌سازی با بافر هیبریداسیون بدون کاوشگر و حاوی کاوشگرهای سنس به عنوان شاهد منفی در نظر گرفته شدند.

نتایج و بحث

پروتئین فسفاتازهای ۲C مشابه ABI1 و ABI2 در برنج: در این مطالعه طی بررسی‌های بیوانفورماتیکی ۹ پروتئین در برنج یافت شدند که دارای دامنه کاتالیتیک پروتئین فسفاتازهای ۲C، موتیف‌های دخیل در اتصال به یون‌های فلزی و فسفات و ۷ بلوک حفظشده موجود در زیرخانواده ABI1 و ABI2 پروتئین فسفاتازهای ۲C بودند که به ترتیب، براساس مشابهت بیشتر OsPP2C1 تا OsPP2C9 نامیده شدند (جدول ۱). توالی پروتئینی OsPP2C1 تا OsPP2C9 با ۸ پروتئین فسفاتاز ۲C شناخته‌شده آرابیدوپسیس (از زیرگروه Plant #1 PP2C-1b,c) هم‌ردیف شدند و درخت فیلوژنتیکی آن‌ها رسم گردید (شکل ۱). این درخت به دو شاخه اصلی تقسیم می‌شود که هر یک شامل اعضایی از برنج و آرابیدوپسیس است.

مکان‌کروموزومی ژن‌های خانواده *OsPP2C*: نتایج حاصل از بررسی‌های بیوانفورماتیکی روی داده‌های پروژه ژنوم برنج نشان داد که تعداد زیادی از اعضای این زیر خانواده، یعنی *OsPP2C1* تا *OsPP2C7*، روی بازوی بلند کروموزوم ۱ یا ۵ واقع شده‌اند (جدول ۱)، جایی که یک دوتاشدگی[5] کهن رخ داده است (Valarik *et al.* 2006). *OsPP2C1* و *OsPP2C2*، *OsPP2C4* و *OsPP2C5*، *OsPP2C7* و *OsPP2C6*، مثال‌های خوبی از دو تا شدگی مذکور می‌باشند. تاکنون بیش از ۵۰ QTL مربوط به تیمار ABA یا تنش خشکی روی نواحی مذکور از کروموزوم ۱ و ۵ برنج یافت شده است.

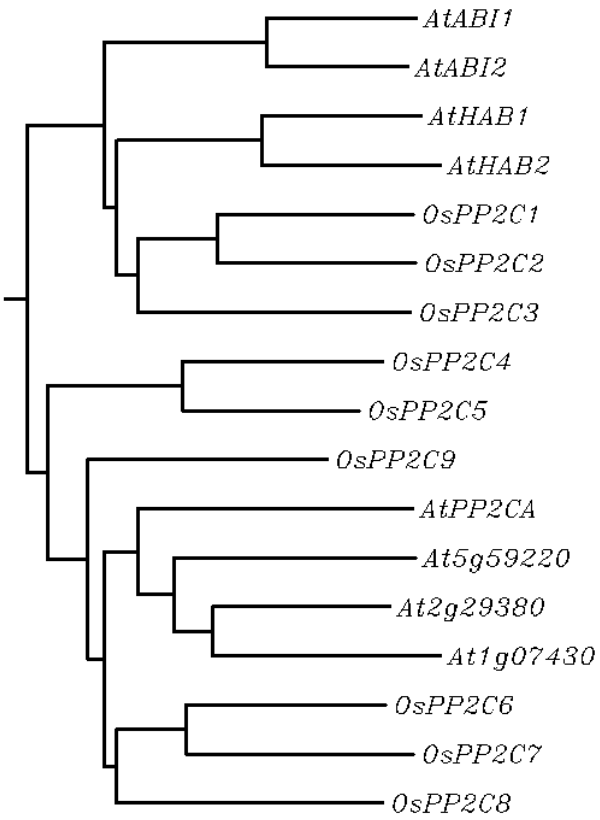
1. Superfrost/Plus or ProbeOn Plus microscope slides
2. Pre-hybridization
3. Hybridization
4. Immunological detection
5. Duplication

جدول ۱- پروتئین فسفاتازهای ۲C مشابه ABI1 و ABI2 در برنج

نام ژن	کروموزوم	جایگاه ژنی	cDNA
OsPP2C1	۱	Os01g0583100	AK242616
OsPP2C2	۵	Os05g0592800	AK067627, AK104323, AK070388
OsPP2C3	۵	Os05g0537400	-
OsPP2C4	۱	Os01g0656200	AK068272
OsPP2C5	۵	Os05g0572700	AK108969, AK119929
OsPP2C6	۱	Os01g0846300	AK065949, AK119400
OsPP2C7	۵	Os05g0457200	AK242098
OsPP2C8	۳	Os03g0268600	AK069274
OsPP2C9	۹	Os09g0325700	AK063334

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۱- درخت فیلوژنتیکی پروتئین فسفاتازهای ۲C مشابه ABI1 و ABI2

جایگاه ژنی پروتئین‌های برنج در جدول ۱ و جایگاه ژنی پروتئین‌های آرابیدوپسیس به همراه اسامی مترادف آن‌ها در ادامه آمده است؛ ABI1 (At4g26080), ABI2 (At5g57050), HAB1/AtP2C-HA (At1g72770), HAB2 (At1g17550), AtPP2CA/AHG3 (At3g11410)

افزایش میزان بیان *OsPP2C5* توسط تنش خشکی و تیمار ABA: از میان اعضای زیرخانواده *OsPP2C*، تنها میزان رونوشت‌های *OsPP2C5* به شدت تحت تأثیر تنش خشکی و هورمون آبسیزیک‌اسید در دمگل برنج افزایش یافت (شکل۲). با آبیاری مجدد یا حذف ABA از بیان OsPP2C5 کاسته شد، اما به نظر می‌رسید حضور جیبرلیک‌اسید نمی‌توانست از اثر القاکنندگی آبسیزیک‌اسید بکاهد. احتمال می‌رود سایر اعضا در سطح پروتئین و تغییرات پس از ترجمه به‌ویژه فسفوریلاسیون به تنش خشکی و ABA واکنش نشان دهند.

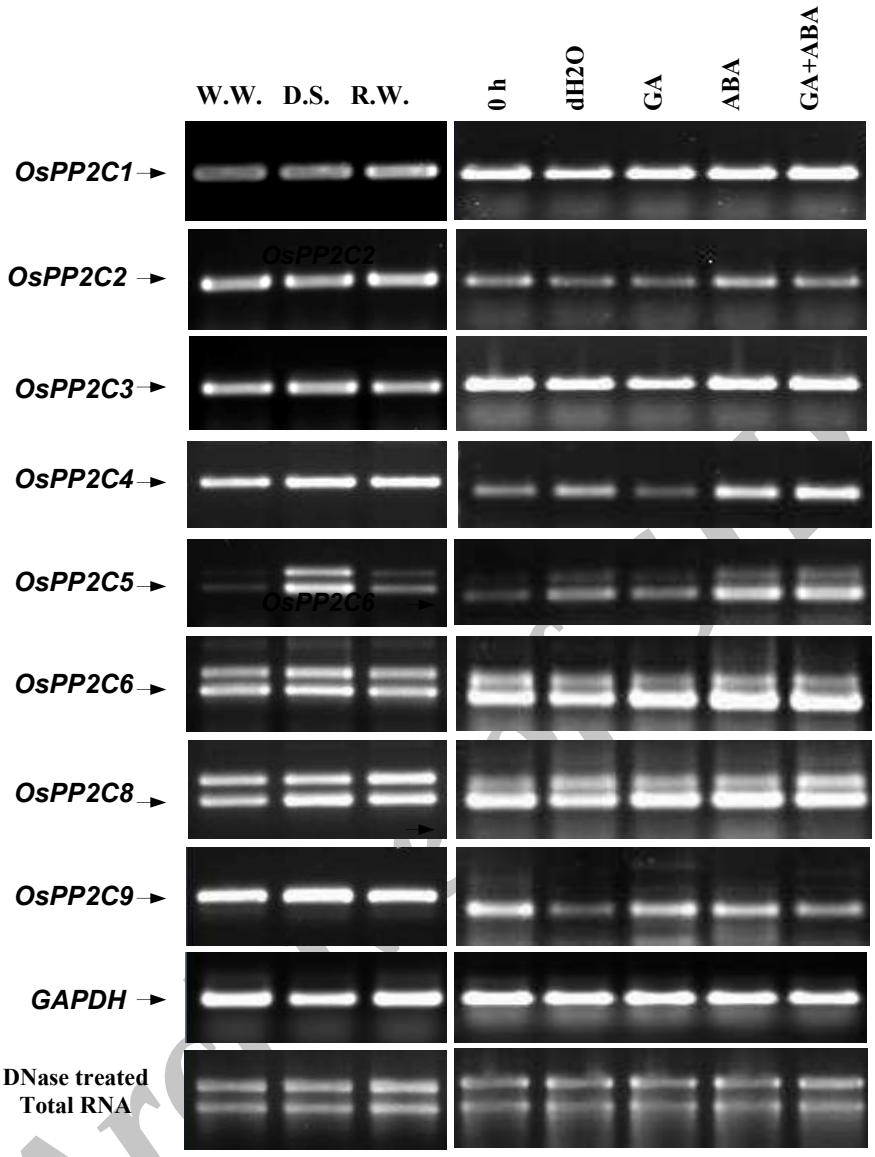
دمگل، یعنی بالاترین میانگره برنج را می‌توان متشکل از سه ناحیه تقسیم سلولی، رشدطولی و تمایز دانست (شکل ۳-الف). اگرچه مرز خیلی روشنی بین این نواحی وجود ندارد، اما تشخیص حدودی آن‌ها از روی اندازه و خصوصیات سلول‌ها امکان‌پذیر است. بیان ژن *OsPP2C5* به شدت تحت تأثیر تنش خشکی در تمامی نواحی دمگل القا شد و میزان بیان آن در نواحی مختلف دمگل تفاوت عمده‌ای نداشت (شکل۳). همچنین افزایش رونوشت‌های *OsPP2C5* توسط تنش به‌روشنی در تمامی بافت‌های مورد مطالعه (غلاف و پهنک برگ پرچم، پهنک برگ اول و خوشه) دیده شد (شکل ۴).

لازم به ذکر است که در برخی موارد دو باند در محصول RT-PCR مشاهده گردید که باند پایینی دارای اندازه مورد انتظار براساس توالی mRNA موجود در بانک‌های اطلاعات توالی (۴۷۵ bp) و باند بالایی با اندازه قابل محاسبه از RNA پیرایش[1] نشده

1. Splicing

Archive of SID

www.SID.ir



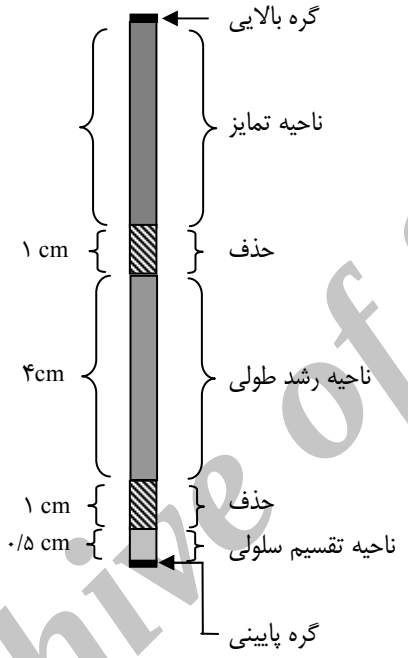
شکل ۲- تأثیر تنش خشکی و هورمون‌های گیاهی بر بیان اعضای خانواده *OsPP2C* در دمگل برنج (IR64). اسامی ژن‌ها در سمت چپ تصویر ژل الکتروفورز محصول RT-PCR آن آورده شده است. علامت پیکان نشان‌دهنده باند مورد انتظار (برای *OsPP2C1* تا *OsPP2C9*، به ترتیب ۵۳۲، ۴۶۹، ۴۵۹، ۶۱۴، ۴۷۵، ۵۰۲، ۵۲۸ و ۵۹۰ جفت باز) است. تصویر RNA تام تیمارشده با آنزیم DNase و هنجارشده[1]، نشان‌دهنده سلامت آن و شاهد یکسان‌بودن میزان RNA مورد استفاده در RT-PCR برای تیمارهای مختلف می‌باشد. *GAPDH* شاهد قابلیت تکثیر کارآمد RNA طی RT-PCR و عدم وجود DNA ژنومی است. برای تیمارهای هورمونی دمگل‌ها از گیاهان تحت آبیاری کافی جدا شده (0 h) و برای ۱۸ ساعت در آب (dH2O) محلول حاوی ۱۰۰ میکرومولار جیبرلیک‌اسید (GA3)، آبسیزیک‌اسید (ABA) و یا هر دو (GA+ABA) شناور شدند. W.W.: Well Watered (آبیاری کافی) :D.S. Drought Stressed, (تنش خشکی) R.W.: Re–Watered, (آبیاری مجدد)

1. Normalized

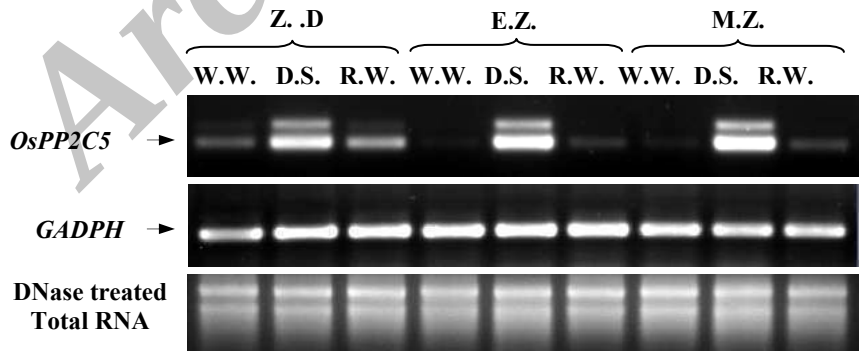
www.SID.ir

(۵۶۷ bp) بود (آغازگر برگشتی در محدوده ناحیه غیرترجمه‌شونده ´۳ و آغازگر رو به جلو در صورت امکان در اگزون ماقبل آخر طراحی گردید، به‌طوری که یک اینترون را شامل شود). به منظور اطمینان از عدم‌حضور DNA ژنومی، تمامی RNAهای استخراج‌شده با آنزیم DNAآز (DNase) تیمار شدند. همچنین، RNAهای مذکور به عنوان الگوی واکنش PCR مورد استفاده قرار گرفت و عدم تکثیر باند، فقدان DNA ژنومی در این RNAها را اثبات نمود.

الف



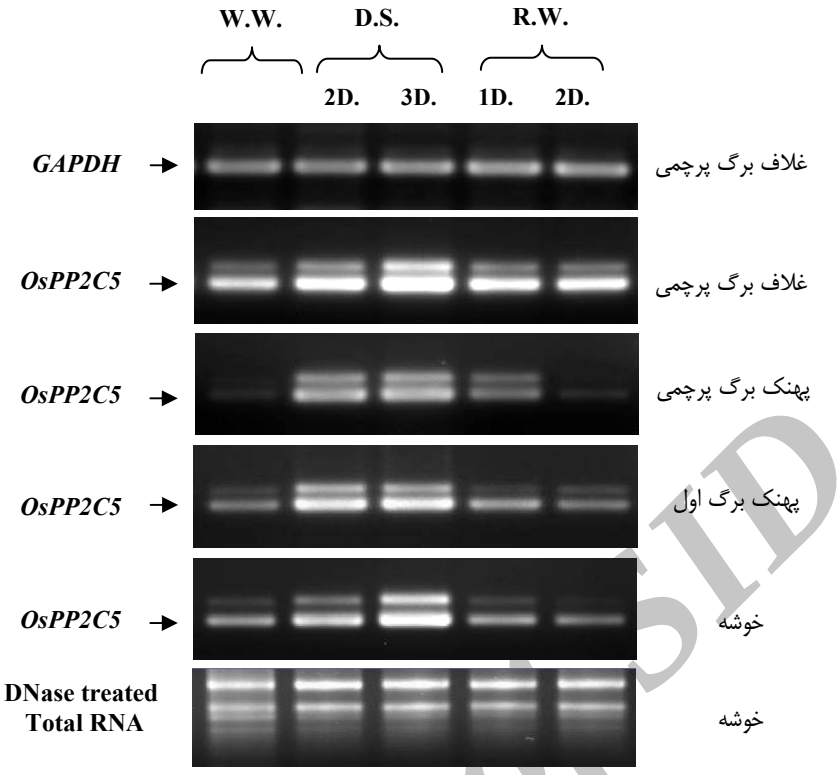
ب



شکل ۳- الف) تصویر نمادین سه ناحیه تقسیم سلولی، رشد طولی و تمایز دمگل برنج (IR64) برای استخراج RNA و بررسی بیان ژن. ب) تأثیر تنش خشکی بر بیان ژن *OsPP2C5* در نواحی مختلف دمگل. تعداد چرخه‌ها برای *OsPP2C5* ۳۸ بود. تصویر RNA تام تیمارشده با آنزیم DNase و هنجارشده، نشان‌دهنده سلامت آن و شاهد یکسان‌بودن میزان RNA مورد استفاده در RT-PCR برای تیمارهای مختلف می‌باشد. *GAPDH* شاهد قابلیت تکثیر کارآمد RNA طی RT-PCR و عدم وجود DNA ژنومی است. W.W.: Well Watered (آبیاری کافی)، D.S.: Drought Stressed (تنش خشکی)، R.W.: Re–Watered (آبیاری مجدد)، D.Z.: Division Zone (ناحیه تقسیم‌سلولی)، E.Z.: Elongation Zone (ناحیه رشدطولی)، M.Z.: Maturation Zone (ناحیه تمایز)

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۴- تأثیر تنش خشکی بر بیان OsPP2C5 در خوشه، پهنک برگ اول، غلاف و پهنک برگ پرچم برنج (IR64). تصویر ژل الکتروفورز محصول RT-PCR (۴۵ چرخه) ارائه شده است. علامت پیکان نشان‌دهنده باند مورد انتظار (۴۷۵ جفت باز) است. تصویر RNA تام تیمار شده با آنزیم DNase و هنجارشده، نشان‌دهنده سلامت آن و شاهد یکسان‌بودن میزان RNA مورد استفاده در RT-PCR برای تیمارهای مختلف می‌باشد. GAPDH شاهد قابلیت تکثیر کارآمد RNA طی RT-PCR و عدم وجود DNA ژنومی است. W.W.: Well Watered (آبیاری کافی), D.S.: Drought Stressed (تنش خشکی), R.W.: Re–Watered (آبیاری مجدد) و روز : D

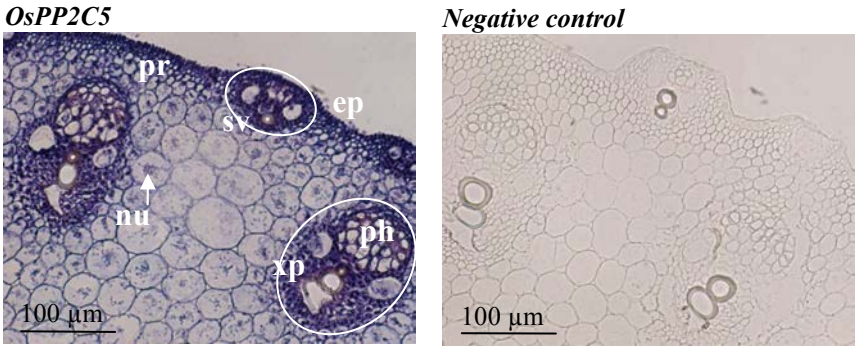
بنابراین، این احتمال وجود دارد که باند بزرگتر مربوط به محصولات پیرایش متفاوتی باشد که در آن‌ها اینترون موجود در محدوده آغازگرها حذف نشده است. یعنی احتمالاً ژن *OsPP2C5* به علت پردازش جایگزین رمزده رونوشت‌های مختلفی است. Xue *et al.* (2008) گزارش کردند در ۲۵ و ۲۱ عضو از خانواده ژنی *PP2C* به ترتیب در آرابیدوپسیس و برنج پردازش جایگزین اتفاق می‌افتد. اخیراً دانشمندان تأیید کردند مکانیسم‌های پس از رونویسی مانند پردازش جایگزین در تنش‌های غیرزیستی به عنوان یک پاسخ به شرایط تنش محسوب می‌شوند و روی محتوای رونوشت‌ها[1] تأثیر می‌گذارند.

مطالعه جایگاه بیان‌ژن *OsPP2C5* با استفاده از روش دورگه‌سازی در محل: در بررسی الگوی بیان ژن *OsPP2C5* در ناحیه تقسیم‌سلولی دمگل‌های گیاهان برنج (IR64) تحت تنش خشکی، رونوشت‌های آن در دسته‌های آوندی اولیه و ثانویه، به‌ویژه در سلول‌های همراه آوند آبکشی و پارانشیم آوند چوبی، سلول‌های اپیدرمی و سلول‌های پیش‌ساز اسکلرانشیم و کلرانشیم مشاهده گردید. در بیشتر موارد به نظر می‌رسید که رونوشت‌های زیادی در هسته تمرکز یافته‌اند (شکل ۵).

1. Transcriptome

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۵- الگوی بیان ژن *OsPP2C5* و شاهد منفی (بدون کاوشگر) در ناحیه تقسیم سلولی دمگل گیاهان برنج (IR64) تحت تنش خشکی به روش دورگه‌سازی در محل. (دسته‌جات آوندی اولیه) pv; primary vascular bundles، (دسته‌جات آوندی ثانویه) sv; secondary vascular bundles، (آوند آبکشی) ph; phloem، (پارانشیم آوندچوبی) xp; xylem parenchyma، (سلول‌های اپیدرمی) ep; epidermal cells، (سلول‌های پیش‌ساز اسکلرانشیم و کلرانشیم) pr; sclerenchyma and chlorenchyma precursors، (هسته) nu; nucleus. از آنجا که شاهد منفی حاوی کاوشگر سنس نیز عیناً مثل شاهد منفی بدون کاوشگر فاقد رنگ بود از نمایش آن صرفنظر شد.

اعضای شناخته‌شده زیرخانواده A از پروتئین فسفاتازهای ۲C شامل ABI1 و ABI2 به‌عنوان جزئی از مسیر ترارسانی پیام ABA عمل می‌کنند (Sheen, 1998; Xiong *et al.* 2001; Yoshida *et al.* 2006; Nishimura *et al.* 2007; Xue, *et al*. 2008). براساس نتایج بررسی‌های انجام شده در این پژوهش *OsPP2C5* دارای تمامی نواحی حفظ‌شده و حائز اهمیت زیرخانواده مذکور بود و در تمامی بافت‌های مورد مطالعه، میزان رونوشت‌های آن به شدت تحت تأثیر تنش خشکی و هورمون آبسیزیک‌اسید افزایش و با آبیاری مجدد یا حذف ABA کاهش یافت. همچنین براساس نتایج دورگه‌سازی در محل، رونوشت‌های این ژن، در تمامی سلول‌ها به‌ویژه در دسته‌های آوندی اولیه و ثانویه، سلول‌های همراه آوند آبکشی و پارانشیم آوند چوبی، سلول‌های اپیدرمی و سلول‌های پیش‌ساز اسکلرانشیم و کلرانشیم ناحیه تقسیم‌سلولی دمگل‌های دچار تنش مشاهده گردید و در بیشتر سلول‌ها رونوشت‌های زیادی در هسته تمرکز یافته بودند. بنابراین به نظر می‌رسد که ژن *OsPP2C5* نیز در مسیر ترارسانی پیام تنش خشکی/ ABA در برنج نقش داشته باشد. همچنین مشاهده دو باند برای ژن موردنظر احتمال وقوع پردازش جایگزین را مطرح کرد. شایان ذکر است که مطالعه عملکرد این ژن از طریق مطالعه جهش‌یافته‌ها و بررسی بیان رونوشت‌های مختلف این ژن در پاسخ به تنش‌های غیر زیستی در دست انجام است.

سپاسگزاری

بدین وسیله از مؤسسه تحقیقات بین المللی برنج و پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران به‌دلیل فراهم‌آوردن امکانات مالی و اجرایی این پروژه تشکر و قدردانی می‌گردد.

REFERENCES

Boneh U, Biton I, Zheng C, Schwartz A, Ben-Ari G (2011) Characterization of potential ABA receptors in *Vitis vinifera*. Plant Cell Rep. [Epub ahead of print]

Gosti F, Beaudoin N, Serizet C, Webb AA, Vartanian N, Giraudat J (1999) ABI1 protein phosphatase 2C is a negative regulator of abscisic acid signaling. Plant Cell. 11: 1897-

Archive of SID
www.SID.ir

910.
Ji XM, Raveendran M, Oane R, Ismail A, Lafitte R, Bruskiewich R, Cheng SH, Bennett J (2005) Tissue-specific expression and drought responsiveness of cell-wall invertase genes of rice at flowering. Plant Mol. Biol. 59: 945-964.
Kuhn JM, Boisson-Dernier A, Dizon MB, Maktabi MH, Schroeder JI (2006) The Protein Phosphatase AtPP2CA Negatively Regulates Abscisic Acid Signal Transduction in Arabidopsis, and Effects of abh1 on AtPP2CA mRNA1. Plant Physiol. 140: 127-139.
Lafitte HR, Ismail A, Bennet J (2004). Abiotic stress tolerance in rice for Asia: progress and the future, in New directions for a diverse planet: Proceedings of the 4th International Crop Science Congress, ed. by Fischer T, Turner N, Angus J, McIntyre L, Robertson M, Borrell A and Lloyd D, Brisbane, Australia.
Leung J, Bouvier-Durand M, Morris PC, Guerrier D, Chefdor F, Giraudat J (1994) Arabidopsis ABA response gene ABI1: features of a calcium-modulated protein phosphatase. Science. 264: 1448-1452.
Leung J, Merlot S, Giraudat J (1997) The Arabidopsis Abscisic Acid Insensitive2 (ABI2) and ABI1 genes encode homologous protein phosphatases 2C involved in ABA signal transduction. Plant Cell. 9: 759-771.
Luan S (2003) Protein phosphatases in plants. Annual Review of Plant Biology, 54: 63-92.
Merlot S, Gosti F, Guerrier D, Vavasseur A, Giraudat J (2001) The ABI1 and ABI2 protein phosphatases 2C act in a negative feedback regulatory loop of the abscisic acid signalling pathway. Plant J. 25:295-303.
Meyer K, Leube MP, Grill E (1994) A protein phosphatase 2C involved in ABA signal transduction in Arabidopsis thaliana. Science. 264: 1452-1455.
Nishimura N, Yoshida T, Kitahata N, Asami T, Shinozaki K, Hirayama T (2007) ABA-Hypersensitive Germination1 encodes a protein phosphatase 2C, an essential component of abscisic acid signaling in *Arabidopsis* seed. Plant J. 50(6): 935-49.
Rodriguez PL, Benning G, Grill E (1998) ABI2, a second protein phosphatase 2C involved in abscisic acid signal transduction in Arabidopsis. FEBS Letter. 421:185-90.
Sheen J (1998) Mutational analysis of protein phosphatase 2C involved in abscisic acid signal transduction in higher plants. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 95: 975-80.
Shobbar S, Oane R, Gamuyao R, de Palma J, Malboobi M A, Karimzadeh G, Jalali Javaran M, Bennett J (2008) Abscisic acid regulates gene expression in cortical fiber cells and silica cells of rice shoots. New Phytol. 178 (1): 68-79.
Shobbar ZS, Malboobi MA, Karimzadeh G, Jalali Javaran M, Mohammadi Negad G, Bennett J (2008) Drought stress and plant hormonal impact on rice peduncle elongation. Iranian Journal of Biology. 21(3): 411-420.
Soon FF, Ng LM, Zhou XE, West GM, Kovach A, Tan MH, Suino-Powell KM, He Y, Xu Y, Chalmers MJ, Brunzelle JS, Zhang H, Yang H, Jiang H, Li J, Yong EL, Cutler S, Zhu JK, Griffin PR, Melcher K, Xu HE (2011) Molecular Mimicry Regulates ABA Signaling by SnRK2 Kinases and PP2C Phosphatases. Science. [Epub ahead of print]
Sreenivasulu N, Sopory SK, Kavi Kishor PB (2007) Deciphering the regulatory mechanisms of abiotic stress tolerance in plants by genomic approaches. Gene. 388: 1-13.
Valarik M, Linkiewicz AM, Dubcovsky J (2006) A microcolinearity study at the earliness per se gene Eps-A(m)1 region reveals an ancient duplication that preceded the wheat-rice divergence. Theor. Appl. Genet. 112: 945-57.
Xiong L, Gong Z, Rock CD, Subramanian S, Guo Y, Xu W, Galbraith D, Zhu, JK (2001) Modulation of abscisic acid signal transduction and biosynthesis by an Sm-like protein in Arabidopsis. Dev. Cell. 1:771-81.

Archive of SID

www.SID.ir

Xue T, Wang D, Zhang S, Ehlting J, Ni F, Jakab S, Zheng S, Zhong Y (2008) Genome-wide and expression analysis of protein phosphatase 2C in rice and Arabidopsis. BMC Genomics. 9: 550.

Yoshida T, Nishimura N, Kitahata N, Kuromori T, Ito T, Asami T, Shinozaki K, Hirayama T (2006) ABA-hypersensitive germination3 encodes a protein phosphatase 2C (AtPP2CA) that strongly regulates abscisic acid signaling during germination among *Arabidopsis* protein phosphatase 2Cs. Plant Physiol. 140:115-126.

Archive of SID

www.SID.ir

Crop Biotech. Vol. 1, No. 1, 2011

Identification and Functional Analysis of an ABA and Drought Stress Inducible Protein Phosphatase 2C in Rice

Z. S. SHOBBAR[1]* AND J. BENNETT[2]
1, Assistant Professor, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Karaj, Iran, 2, Professor, International Rice Research Institute (IRRI), Metro Manila, Philippines
(Received: Nov. 16, 2011 - Accepted: Dec. 19, 2011)

ABSTRACT

Protein phosphatase 2C family consists of a group of evolutionary-conserved serine/threonine phosphatases which play a role in stress signal transduction. A subfamily of this protein phosphatases in *Arabidopsis*, including ABI1 and ABI2, are known as components of Abscisic acid signal transduction pathway. Their mutants are hypersensitive to ABA showing an increased expression during seed dormancy and adaptive responses to drought. Considering sensitivity of rice to abiotic stresses, particularly drought, identification of this gene family in rice and studying their role in response to stress would be beneficial. In this research, nine OsPP2C proteins (OsPP2C1 to OsPP2C9), carrying all the conserved motifs of this subfamily were found in rice, Among them, only *OsPP2C5* transcript levels were significantly up-regulated by drought and abscisic acid which is down-regulated by re-watering or ABA removal. Drought stress induced *OsPP2C5* gene expression in all the studied tissues. Based on the RNA *in situ* hybridization experiments, *OsPP2C5* transcripts were observed in almost all cells and accumulated more in the nuclei in divisional zone of the drought stressed peduncles. However, the transcripts of this gene were accumulated at higher levels in the primary and secondary vascular bundles, phloem and xylem parenchyma, epidermal cells and sclerenchyma/ chlorenchyma precursors. Based on the achieved results, the *OsPP2C5* gene seems to play a role in ABA/ drought stress signal transduction. It is expected that appropriate genetic manipulations of this gene family would increase rice tolerance to abiotic stresses.

Keywords: Drought stress, Rice (*Oryza sativa*), Abscisic acid (ABA), Protein phosphatase 2C (PP2C), Gene expression

*Corresponding author: Z. S. Shobbar E-mail: shobbar@abrii.ac.ir

Archive of SID

www.SID.ir