

## مطالعه الگوی تظاهر و تنظیم ژن انتقال‌دهنده کربوهیدرات (*SuT1*) در شرایط سرمادهی در دو رقم گندم زمستانه (*Triticum aestivum* L.)

سیده ساناز رمضانپور<sup>۱\*</sup>، حسن سلطانلو<sup>۱</sup> و آندره لاروج<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup> گرگان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، دانشکده تولیدات گیاهی، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی

<sup>۲</sup> کانادا، مرکز تحقیقات کشاورزی لتبریج، مؤسسه غذا و کشاورزی، بخش ژنتیک مولکولی

تاریخ پذیرش: ۸۸/۷/۲۰

تاریخ دریافت: ۸۷/۴/۳

### چکیده

فرآیند سرمادهی در گیاهان منجر به تغییرات بیوشیمیایی، فیزیولوژیکی و متابولیکی می‌شود که اغلب این تغییرات در سطح تظاهر ژن و توسط دماهای پایین غیرمنجمدکننده (۴- تا ۰- درجه سانتی گراد) تنظیم می‌شوند. این تغییرات می‌توانند ظرفیت گیاهان را برای تحمل دماهای زیر صفر درجه سانتی گراد افزایش دهند. به نظر می‌رسد تجمع کربوهیدراتها یکی از مهم ترین تغییرات در گیاهان است که با تغییر در تظاهر ژنهای انتقال‌دهنده کربوهیدرات تنظیم می‌شود. در این تحقیق الگوی بیان ژن انتقال‌دهنده کربوهیدرات *SuT1* در شرایط سرمادهی (۲ درجه سانتی گراد) در رقم مقاوم به یخزدگی (نورستار) و لاین حساس به یخزدگی (PI181268) با استفاده از روش QRT-PCR مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد تظاهر ژن در رقم مقاوم و حساس ۱ روز پس از سرمادهی بترتیب ۳ برابر افزایش و ۳ برابر کاهش معنی‌دار نسبت به شرایط بدون سرمادهی دارد. ارزیابی توالی راه‌انداز این ژن با روش پیمایش ژنومی وجود عناصر همسوساز مسئول درجه‌حرارت پایین، تجمع کربوهیدراتها، کم‌آبی و بسیاری از عناصر تنظیم‌کننده دیگر را تأیید نمود. با توجه به نتایج می‌توان این ژن را به عنوان یکی از ژنهای کاندید القاء شده توسط سرما (*COR*) در اعطاء مقاومت به تنش یخزدگی در گندم معرفی نمود که افزایش تظاهر آن در شرایط سرمادهی ممکن است منجر به تجمع کربوهیدراتها و کاهش خسارتهای حاصل از یخزدگی در شرایط سخت زمستان شود.

**کلمات کلیدی:** گندم، سرمادهی، کربوهیدرات، راه‌انداز

\* نویسنده مسئول، تلفن تماس: ۰۹۱۲۲۹۱۰۱۶۴، پست الکترونیکی: ramezanpours@gau.ac.ir

### مقدمه

سرمادهی یکی از عوامل محیطی محدودکننده توسعه جغرافیایی فصل رشد بسیاری از گونه‌های گیاهی است و اغلب اثرات مضر بر کیفیت و عملکرد گیاهان وارد می‌آورد (۳۲). اغلب گیاهان گرمسیری اگر در معرض دماهای پایین غیرمنجمدکننده قرار گرفته باشند می‌توانند دماهای یخزدگی را تحمل نمایند، فرآیندی که به آن سرمادهی (*Cold acclimation*) اطلاق می‌شود (۲، ۱۰ و ۱۵). سرمادهی گیاهان را قادر می‌سازد تا مکانیسمهای ضروری برای تحمل شرایط سخت زمستان و تحمل به یخزدگی

(Freezing tolerance) را توسعه دهند. در طی فرآیند سرمادهی، فعالیتهای بیوشیمیایی، فیزیولوژیکی و متابولیکی متعددی در گیاهان تغییر می‌نماید و این تغییرات اغلب توسط درجه حرارت پایین در سطح تظاهر ژن تنظیم می‌شوند. بنابراین، برای درک اساس مولکولی سرمادهی بایستی ژنهای مسئول دمای پایین شناسایی شوند. ژنهای القاء شده در شرایط سرما و محصولات آنها در بسیاری از گونه‌های گیاهی جداسازی و مطالعه شده‌اند. در گندم و غلات دیگر، بیان ژنهای متعددی طی فرآیند سرمادهی

که ممکن است این mRNAها رمزکننده پلی پپتیدهایی باشند که برای تنظیم سلولی طی فرآیند تنش سرما ضروری بوده و ارتباطی با افزایش تحمل به سرما ندارند (۴ و ۵).

با مطالعه ناحیه راه انداز (Promoter) ژنهای پاسخ دهنده به سرما ( $COR=Cold\ Regulated\ genes$ ) عناصر همسوساز متعددی در این ناحیه مشخص شده است که در آبشار انتقال سیگنال در شرایط سرمادهی نقش دارند. اولین بار یاماگوچی و شینوزاکی (۱۹۹۴) در مطالعه راه انداز یکی از این ژنها ( $COR78$ ) در آرآبیدوپسیس عنصر ۹ بازی DRE با توالی TACCGACAT را شناسایی نمود. این عنصر تظاهر ژن را در پاسخ به دمای پایین، خشکی و شوری بالا تحریک می کند (۳۵) و LTRE (Low Temperature Responsive Element) یا CRT/DRE نیز نامیده می شود (۱۷، ۲۴، ۲۸).

بسیاری از ژنهای مسئول سرما و کم آبی در راه اندازهای خود دارای یک یا چند نسخه از عناصر همسوساز CBF/CRT (*Cis-acting element*) هستند که دارای توالی مرکزی CCCAC می باشد (۲۹ و ۳۶). یک خانواده از عوامل رونویسی با نام CBFها یا DREB1ها به این عنصر متصل می گردد و رونویسی ژنهای پایین دست مسئول سرما و کم آبی فعال می شود (۲۰ و ۳۵). القای ژنهای  $COR$  با تظاهر فعال کننده نسخه برداری CBF1 ( $CRT/DRE\ binding$ ) انجام می شود (۲۹). این فاکتور به عنصر تنظیم کننده CRT/DRE در راه انداز ژنهای  $COR$  متصل می شود و تظاهر آنها را بدون نیاز به دمای پایین فعال می کند (۱۶، ۲۹، ۳۴). ژاگو و همکاران (۱۹۹۸) نشان دادند با بیان ژن  $CBF1$  و در نتیجه تنظیم کننده CRT/DRE تحمل به یخ زدگی در آرآبیدوپسیس ۳/۳ درجه سانتی گراد افزایش می یابد. این نتایج بیانگر نقش ژنهای  $COR$  در تحمل به یخ زدگی می باشد.

به طور کلی وجود تفاوت های نوکلئوتیدی در توالی اطراف نواحی رمزکننده ژنها، می تواند منجر به تفاوت در سطح

همبستگی مثبت با توانایی ژنوتیپ و بافت برای تحمل به یخ زدگی نشان داده است (۲۷). شناسایی ژنهای جدید دخیل در پاسخ به سرما ابزار ارزشمندی را برای درک بیشتر مسیرهای متابولیکی سرمادهی و استفاده از ژنوتیپهای قوی در تحمل به یخ زدگی فراهم می آورد (۱۲).

به نظر می رسد تغییر در میزان مواد محلول از قبیل اسیدآمینها، پلی آمینها و کربوهیدراتها از مکانیسمهای مهم تحمل به یخ زدگی هستند (۳، ۸، ۲۱ و ۲۲). تغییر در میزان کربوهیدراتها به دلیل ارتباط مستقیم آنها با فرآیندهای فیزیولوژیکی مثل فتوسنتز و تنفس از اهمیت ویژه ای برخوردار است. فروکتان نقش مهمی در فرآیند متابولیکی تنش القاء شده توسط سرما ایفا می کند (۱۳). فروکتان به مقادیر زیادی در خانواده گرامینه در شرایط دمای پایین تجمع می یابد که ممکن است در نتیجه تقاضای کم گیاه برای مواد فتوسنتزی در دمای پایین باشد. ارتباط بین متابولیسم فروکتان و تنظیم اسمزی هنوز ناشناخته است، ولی حقیقت این است که دخالت قندهای اصلی (سوکروز، فروکتوز و گلوکز) در متابولیسم فروکتان می تواند دلیلی بر نقش آنها در فرآیندهای سازگاری به سرما باشد (۷ و ۳۵).

سرمادهی در ارقام گندم زمستانه متحمل به سرما با نام فردریک (Fredrick) و نورستار (Norstar) و رقم گندم بهاره حساس با نام گلنلئا (Glenlea) منجر به القاء دو گروه mRNA گردید. گروه اول شامل mRNAهایی است که در طول سرمادهی در ارقام متحمل به یخ زدگی بیشتر از رقم حساس بیان می شوند. پس از برگشت سرمادهی ( $Dehardening$ ) سطح بیان این ژنها به میزان اولیه پیش از سرمادهی بازگشت که نشان دهنده همبستگی مثبت بین سطح بیان این ژنها و ظرفیت ژنوتیپ برای افزایش مقاومت به سرما است. به نظر می رسد پروتئینهای رمز شده توسط این mRNAها نقش مهمی را در فرآیند افزایش تحمل به سرما ایفا می کنند (۴). گروه دوم mRNAها به میزان یکسانی طی فرآیند سرمادهی در هر سه ژنوتیپ بیان شدند

دمای ۲ درجه سانتی گراد انتقال داده شدند. شرایط نوری اتاقکهای رشد ۱۶ ساعت روشنایی با شدت نور  $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$  ۳۰۰ و ۸ ساعت تاریکی بود. نمونه برداری از طوقه گیاهان در زمانهای ۰، ۱، ۳، ۷ روز و ۲، ۳، ۵ و ۷ هفته پس از شروع سرمادهی در ۳ تکرار انجام شد. نمونه ها در ازت مایع منجمد گردید و تا زمان استخراج در دمای ۸۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

**استخراج RNA و ساختن cDNA:** جهت استخراج RNA از روش "ترایزول" شرکت اینویترژن استفاده گردید. به منظور نمک زدایی از RNA استخراج شده، خالص نمودن RNA از ترکیبات آنزیمی و حذف آلودگی DNA از کیت "آران ای ایزی مینی کلین آپ" شرکت "کیژن" همراه با آنزیم DNase استفاده شد. رشته اول cDNA بر اساس دستورالعمل شرکت "اینویترژن" با استفاده از آغازگر "اولیگو دی تی (۱۸)" و آنزیم "سوپراسکرپت III" ساخته شد. از cDNAهای حاصل به عنوان الگو در روش QRT-PCR استفاده گردید.

**واکنش زنجیره ای پلی مرز کمی در زمان واقعی (-QRT-PCR):** در این تحقیق از دستگاه "آی سایکلر" شرکت "بیوراد" و رنگ "سایبرگرین" از شرکت کیژن به عنوان رنگ فلورسنس برای ارزیابی کمی استفاده گردید. از سری های غلظت نیز به منظور کنترل راندمان واکنش زنجیره ای پلی مرز استفاده شد. ژن عامل بسط ترجمه (*TEF-1 $\alpha$* ) به عنوان ژن خانه دار جهت نرمال سازی داده ها و نمونه cDNA طوقه هایی که پیش از شروع سرمادهی نمونه برداری شده بودند، نیز برای کالیبراسیون داده ها استفاده شد (۳۰). هر مرحله واکنش با ۳ تکرار تکنیکی و دو تکرار بیولوژیکی انجام گردید. آغازگرهای پیشرو و پسرو مورد نیاز با استفاده از نرم افزار "پرایمر ۳" بر اساس ناحیه ترجمه نشده ۳' ژن *SuT1* و به ترتیب با توالی ۳'-CAACCAAAGACGGCAGTGAT-۵' و ۳'-CGAAGGGCAGACGTGAATAC-۵' طراحی

بیان ژن شده و در نتیجه به عنوان اولین علت در کاهش رشد و نمو موجودات تلقی شود. به طوری که تغییر در توالی راه انداز، تقویت گرها (Enhancer) و یا دیگر عناصر تنظیم کننده می تواند منجر به تغییر یا کاهش بیان ژن شود. بنابراین به منظور بررسی کامل نقش یک ژن لازم است یک ناحیه وسیع کروموزومی شامل توالی رمزکننده و توالی اطراف ژن مورد نظر تجزیه و تحلیل شود. هرچند برخی از توالیهای تنظیم کننده بسیار دورتر از ژن اصلی واقع می باشند.

بررسی طبیعت ژنها، مکانیسمهای مسئول برای تحمل به یخ زدگی و مکانیسمهای دریافت کننده و تنظیم کننده ای که پاسخ سازگاری به سرما را فعال می کنند، پتانسیلی برای تعریف استراتژیهای جدید جهت اصلاح صفت تحمل به یخ زدگی گیاهان زراعی ایجاد می کنند. برخی استراتژیها مثل روشهای اصلاح سنتی گیاهان موفقیت های محدودی در اصلاح تحمل به یخ زدگی داشته اند (۲۶).

در این مطالعه الگوی تظاهر یکی از ژنهای دخیل در انتقال کربوهیدراتها با نام *SuT1* (Sugar Transporter 1) در شرایط سرمادهی در دو نمونه از گندم زمستانه با استفاده از روش QRT-PCR (Quantitative Real-Time) مورد بررسی قرار گرفت. همچنین توالی و عناصر موجود در ناحیه ۵' بالادست این ژن با روش پیمایش ژنومی مشخص گردید تا راه گشای مطالعات بعدی در جهت ارزیابی الگوی تنظیم این ژن و ژنهای بالادست آن در شرایط سرمادهی باشد.

## مواد و روشها

**شرایط رشد:** بذور رقم نورستار (مقاوم به یخ زدگی) و لاین PI181268 (حساس به یخ زدگی) پس از کاشت در مخلوط کرنل در شرایط دمایی ۲۰ درجه سانتی گراد و در اتاقک رشد بمدت ۲ هفته قرار گرفتند تا گیاهچه ها رشد نمایند و سپس جهت اعمال سرمادهی به اتاقک رشد با

دو آغازگر پسر و مورد نیاز در نرم افزار پرایمر ۳ طراحی گردیدند. واکنش زنجیره ای پلی مرز اول با استفاده از آغازگر آدپتور اول با توالی (۳'-  
 5'-CCATCCTAATACGACTCACTATAGGGC-  
 3') و آغازگر اختصاصی پسر و دورتر از انتهای 5' با توالی (۳'-  
 5'-GGTACAGAAGCTGCGTTGACGAAA-  
 3') انجام شد و محصولات حاصل از واکنش زنجیره ای پلی مرز اول با استفاده از بافر "تریسین - ای دی تی ای" به نسبت ۱:۵۰ رقیق گردیدند و به عنوان الگو در واکنش زنجیره ای پلی مرز دوم (همسایه ای) (Nestes) استفاده شدند، با این تفاوت که به جای آغازگر آدپتور اول از آغازگر آدپتور دوم با توالی (۳'-  
 5'-ACTCACTATAGGGCTCGAGCGGC-  
 3') استفاده شد و همچنین به جای آغازگر اختصاصی اول از آغازگر اختصاصی دوم (که نزدیکتر به انتهای 5' می باشد) با توالی (۳'-  
 5'-GGGCCACACAAGTGGTGGCGATG-  
 3') استفاده گردید. در پایان نیز ۵ میکرو لیتر از محصول واکنش روی ژل آگارز ۱/۲ درصد مورد بازیابی قرار گرفت و باندی با اندازه تقریبی ۴۰۰ جفت باز همسانه سازی شد.

**همسانه سازی محصولات حاصل از RACE-PCR:** باند مورد نظر با طول حدود ۴۰۰ جفت باز با استفاده از دستورالعمل شرکت کیاژن از ژل آگارز استخراج گردید. به منظور تکثیر DNA خالص سازی شده از روی ژل، مجدداً واکنش زنجیره ای پلی مرز دوم با استفاده از آغازگر آدپتور دوم و آغازگر اختصاصی دوم انجام شد. ۵ میکرو لیتر از محصول واکنش زنجیره ای پلی مرز روی ژل آگارز یک درصد الکتروفورز گردید و در صورت اطمینان از وجود باند مورد نظر به صورت یک باند قوی، باقیمانده محصول واکنش زنجیره ای پلی مرز (حداقل ۵۰ میکرو لیتر) با استفاده از روش پیشنهادی "کیاژن" خالص سازی شد. سپس همسانه سازی این قطعات در داخل ناقلهای تیمین-آدنین مثل pGEM-T انجام شد. به منظور الحاق DNA به پلاسمید pGEM-T از کیت شرکت "پرومگا" استفاده شد. سلولهای پذیرنده با استفاده از باکتری *E. coli* نژاد k12

گردیدند. این ژن توسط محققین مرکز تحقیقاتی لتبریج (LRC) کانادا با روش SSH در شرایط سرمادهی جداسازی شده بود و EST حاصل با ژن انتقال دهنده کربوهیدرات در برنج با شماره دسترسی BAD23725.1 همولوژی بالایی نشان داد. تجزیه و تحلیل داده های حاصل از QRT-PCR با استفاده از نرم افزار REST انجام شد (۲۵).

**تکثیر سریع انتهای 5' رشته cDNA (RACE-5):** با بررسیهای انجام شده در پایگاههای اطلاعاتی در حدود ۳۵۰ نوکلئوتید با توالی نامشخص در انتهای 5' این EST وجود داشت که می بایست با استفاده از روش RACE-PCR تکثیر و توالی یابی می گردید. برای این منظور ابتدا با استفاده از دستورالعمل "پلی ای پیوریت" شرکت "امبیون" رشته های mRNA از RNA کل خالص سازی شدند و سپس از دستورالعمل "ماراتون" شرکت "کلونتک" برای انجام RACE-PCR استفاده شد. برای ساختن cDNA از آغازگر lock-docking oligo(dT) استفاده شد که دارای دو موقعیت نوکلئوتید متغیر (Degenerate) در انتهای 3' می باشد. این نوکلئوتیدها آغازگر را در قسمت ابتدایی "دم پلی ای" قرار می دهند و ناهمگنی انتهای 3' حاصل از آغازگرهای معمولی اولیگودی تی حذف می شود. ساخت رشته دوم cDNA با استفاده از آنزیم DNA پلی مرز I باکتری *E. coli* RNase H و آنزیم DNA لیگاز باکتری *E. coli* انجام شد. سپس با استفاده از آنزیم T4 DNA پلی مرز انتهای صاف در cDNA دو رشته ای ایجاد شد و عمل الحاق آدپتور به cDNA توسط آنزیم T4 DNA لیگاز انجام گردید. عملکرد cDNA تک رشته ای و دورشته ای ساخته شده با استفاده از ماده رادیواکتیو  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$  با غلظت  $3000\text{ Ci/mmol}$  و دستگاه "شمارنده رادیواکتیو" (Geiger counter) بررسی گردید. محلول cDNA الحاق شده به آدپتور جهت استفاده در واکنش RACE-PCR با استفاده از محلول "تریسین-ای دی تی ای" (Tricine-EDTA) رقیق گردید.

عنوان الگو برای واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز ثانویه یا همسایه‌ای (Nested PCR) استفاده شد که در آن از آغازگر آداپتور همسایه‌ای با توالی (۳'-<sup>۵'</sup>ACTATAGGGCACGCGTGGT- و آغازگر همسایه‌ای اختصاصی ژن با توالی (۳'-<sup>۵'</sup>CGAGCTGTAAACCAGCTGTC- استفاده گردید. قطعه مورد نظر که بلندترین قطعه در کتابخانه با طولی حدود ۲ کیلو باز بود، مشابه روشهایی که در بخش RACE توضیح داده شد همسانه‌سازی و توالی‌یابی گردید.

نتایج توالی‌یابی با استفاده از نرم افزار "سکوئنچر" مورد بررسی قرار گرفت. از آنجایی که در هر مرحله توالی‌یابی در حدود ۵۰۰ نوکلئوتید از انتهای ۳' و ۵۰۰ نوکلئوتید از انتهای ۵' هر همسانه با اطمینان بالایی توالی‌یابی می‌شوند در حدود ۱۰۰ نوکلئوتید میانی همسانه مجدداً توالی‌یابی گردید. برای این منظور آغازگر پیشرو با توالی (۳'-<sup>۵'</sup>CCACGAGATCGTAATGGCTA- و آغازگر پسرو با توالی (۳'-<sup>۵'</sup>GCCCGTATTGATGAGAATCC- بر اساس نتایج حاصل از توالی‌یابی مرحله اول طراحی گردید و توالی‌یابی قطعات با استفاده از آغازگرهای جدید انجام شد.

توالیهای حاصله پس از تجزیه و تحلیل با نرم‌افزار "سکوئنچر" با یکدیگر ادغام شد. از آنجایی که بخشی از توالی انتهای ۵' ژن نیز در پیمایش ژنومی شرکت داشت به همین دلیل ابتدا کل توالی حاصله با استفاده از نرم‌افزار "بلاست-ایکس" در پایگاه اینترنتی NCBI مورد بررسی قرار گرفت و انتهای ۵' ژن (در حدود ۲۳۰ نوکلئوتید) با در نظر گرفتن اولین توالی رمزکننده متیونین (ATG) حذف گردید و بدین ترتیب توالی کامل ناحیه ۵' بالادست ژن حاصل شد سپس توالی این نواحی با استفاده از نرم‌افزار PlantCARE (Plant cis-acting regulatory elements) PLACE و (۱۹) elements (۱۱) بررسی و عناصر موجود در آنها مشخص

در محیط کشت LB و کلرید کلسیم آماده‌سازی شدند (۱). سپس DNA نوترکیب به سلولهای پذیرنده منتقل شد و باکتریهای حاصل روی محیط کشت جامد LB دارای ماده ایکس‌گال و آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین به مدت یک شب در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت گردیدند. کلونیهای سفید حاصل با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز برای وجود ژن مورد نظر بررسی شدند و در صورت مشاهده باند در اندازه مورد نظر (در حدود ۷۰۰ جفت باز) محصولات حاصل توالی‌یابی گردیدند. به منظور توالی‌یابی از روش دینامیک ای‌تی‌ترمیناتور و دستگاه ABI Prism 377 DNA Sequencer استفاده شد.

نتایج حاصل از توالی‌یابی با استفاده از نرم افزار "سکوئنچر" تجزیه و تحلیل شد. ابتدا قطعات مربوط به ناقل از هر توالی حذف شده و توالی دقیق هر همسانه مشخص گردید. سپس این توالیها با استفاده از نرم‌افزار "بلاست-ایکس" در پایگاه NCBI مورد ارزیابی قرار گرفته و نتایج حاصل با نتایج حاصل از "بلاست" روی توالیهای اولیه مقایسه شد و صحت توالی‌یابی تأیید گردید.

پیمایش ژنومی و توالی‌یابی ناحیه راه‌انداز ژن: در این مرحله نیز از کیت شرکت "کلونتک" استفاده گردید. استخراج DNA با استفاده از روش "شارپ و گیل" انجام شد. محلولهای جداگانه DNA با آنزیمهای برشی *DraI*, *EcoRI*, *PvuII* و *StuI* با انتهای صاف کاملاً هضم شدند. سپس هر گروه از DNA هضم‌شده به صورت جداگانه به آداپتورها متصل گردید و بدین ترتیب کتابخانه‌ها آماده شدند.

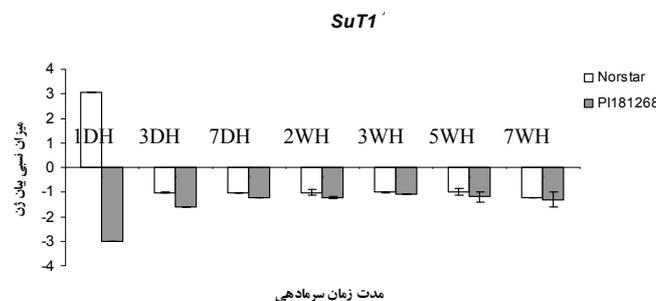
پس از ساختن کتابخانه‌ها اولین واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با استفاده از آغازگر آداپتور بیرونی با توالی (۳'-<sup>۵'</sup>GTAATACGACTCACTATAGGGC- و آغازگر اختصاصی دورتر از ناحیه ۵' با توالی (۳'-<sup>۵'</sup>CTGAAGATGCAACGGAGAGC- انجام گردید. محصول واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز اولیه رقیق شده و به

گردید.

## نتایج و بحث

همانطور که در شکل ۱ ملاحظه می‌شود، تظاهر ژن *SuT1* طی ۲۴ ساعت اولیه تنش سرمادهی افزایش معنی‌داری در رقم مقاوم (۳/۰۵۴ برابر) و کاهش معنی‌داری در لاین حساس (۳/۰۰۳ برابر) در سطح احتمال ۱ درصد نسبت به تیمار کنترل (بدون سرمادهی) نشان داده است. در لاین حساس ۳ روز پس از سرمادهی سطح بیان ژن افزایش ناچیزی نشان داده است، ولی نکته مهم این است که همچنان سطح بیان ژن نسبت به تیمار شاهد کمتر بوده است. از روز سوم پس از تیمار سرمادهی تا پایان دوره

آزمایش (۷ هفته پس از شروع سرمادهی) سطح بیان ژن در هر دو رقم در حالت نسبتاً پایداری حفظ شده است. نکته جالب توجه این است که در رقم مقاوم ۳ روز پس از شروع سرمادهی بیان ژن نسبت به تیمار شاهد کاهش یافته است و تا پایان آزمایش همانند رقم حساس در سطح پایداری باقی مانده است و افزایش یا کاهش چشمگیری نشان نداده است. با توجه به شکل ۱ می‌توان دریافت علی‌رغم کاهش سطح بیان ژن در رقم مقاوم ولی در تمام مدت آزمایش میزان بیان ژن در رقم مقاوم بیشتر از رقم حساس بوده است که این امر خود می‌تواند منجر به افزایش مقاوم رقم نورستار نسبت به لاین PI181268 شود.



شکل ۱- مقایسه تظاهر کمی تظاهر ژن *SuT1* در رقم مقاوم نورستار و لاین حساس PI181268  
DH: روز پس از شروع سرمادهی WH: هفته پس از شروع سرمادهی

پس از تأیید بیان افتراقی این ژن در شرایط سرمادهی در رقم مقاوم و لاین حساس به یخ‌زدگی مطالعات بعدی در زمینه بررسی عناصر موجود در ناحیه راه‌انداز این ژن آغاز شد. برای این منظور ابتدا می‌بایست توالی انتهایی ۵' این ژن به طور کامل مشخص شود تا بتوان بر اساس آن آغازگرهای مناسب را طراحی و راه‌انداز ژن را توالی‌یابی نمود. همان‌طور که قبلاً ذکر گردید با بررسیهای گسترده‌ای که در پایگاه‌های اطلاعاتی انجام شد ۳۵۰ نوکلئوتید توالی‌یابی نشده در انتهای ۵' این ژن وجود داشت که برای مشخص نمودن آنها از روش RACE-PCR استفاده گردید. در شکل ۲ نتایج بلاست روی توالی جدید ارائه شده است که با نتایج اولیه بلاست روی توالی اولیه ژن *SuT1* کاملاً مطابقت دارد.

پیمایش ژنومی: طول باند جداسازی شده برای این ژن در حدود ۲۵۱۰ باز بود که ۲۴ باز با انتهای ۵' ژن انتقال‌دهنده کربوهیدرات در برنج با شماره دسترسی BAD23725.1، ۷۲ درصد هم‌پوشانی نشان داد و ۲۲۷۶ باز به عنوان راه‌انداز در نظر گرفته شد. پس از تجزیه و تحلیل توالی حاصل در نرم‌افزارهای PlantCARE و PLACE مکان "عناصر همسوساز" موجود روی راه‌انداز مشخص گردید که در شکل ۳ موقعیت تقریبی این عناصر نسبت به یکدیگر نشان داده شده است.

[gi|48717036|dbj|BAD23725.1](http://gi|48717036|dbj|BAD23725.1) phosphate translocator-like [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]  
Length=341

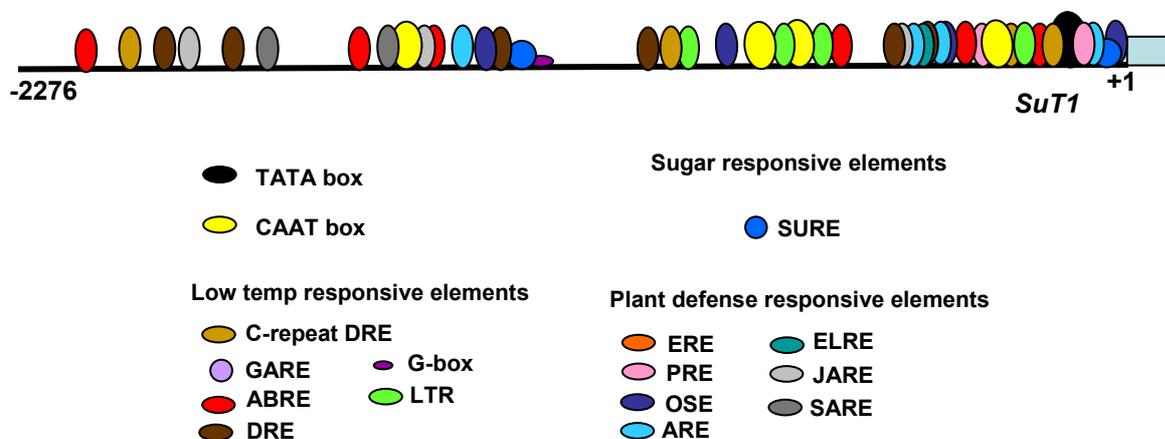
Score = 213 bits (541), Expect(2) = 9e-61  
Identities = 123/138 (89%), Positives = 130/138 (94%), Gaps = 0/138 (0%)  
Frame = +3

```
Query 168 MTAGLQLGvigsllalsvassvaiviCNKALISTLGFPPFATTLTSWHLMVTYCTLHVAQRL 347
          MTAG QLGVIGSL LSVASSV+IVICNKALISTLGFPPFATTLTSWHLMVT+CTLHVAQR+
Sbjct 1 MTAGFQLGVIGSLTTLVASSVSIVICNKALISTLGFPPFATTLTSWHLMVTFCTLHVAQRM 60

Query 348 HFFEPKAIDGHTVILFGFLNGTSIGLLNLSLGFNSIGFYQMTKLAIIPFTVLELETIFLNK 527
          FFEPKAIDG TVILFG LNGTSIGLLNLSLGFNSIGFYQMTKLAIIPFTV+LETIFL K
Sbjct 61 RFFEPKAIDGQTVILFGLLNGTSIGLLNLSLGFNSIGFYQMTKLAIIPFTVMLETIFLKK 120

Query 528 RFSETIKLSLMVLLLEVG 581
          RFSE+IK SL++LLL VG
Sbjct 121 RFSESIKFSLLILLLLGVG 138
```

شکل ۲- نتایج بلاست توالی انتهای ۵' ژن *SuT1* ساخته شده با روش RACE



شکل ۳- جایگاه عناصر روی راه انداز ژن *SuT1*

عناصر مسئول درجه حرارت پایین در ثلث اول توالی راه انداز قرار گرفته اند که بیانگر اهمیت این ناحیه در کنترل تظاهر ژن در شرایط تنش سرما می باشد. بنابراین احتمال می رود با حذف این ناحیه از راه انداز بیان ژن گزارشگر در شرایط تنش فوق ناموفق باشد.

### نتیجه گیری کلی

آنچه که مسلم است اثبات وجود این عناصر روی این راه اندازها نیاز به بررسیهای بیشتر دارد. برای این منظور می بایست توالی راه انداز توسط آنزیمهای برشی هضم شود و سپس قطعات حاصل به ژن گزارشگر (*GUS*) متصل شده و بیان ژن گزارشگر مورد بررسی قرار گیرد. تنها در این صورت است که با اطمینان بالایی می توان در مورد

ترکیب بازی این راه انداز شامل ۵۱/۴۱ درصد بازهای گوانین-سیتوزین و ۴۷/۱۰ درصد بازهای آدنین-تیمین می باشد. جعبه TATA در جایگاه ۱۶۰- از نقطه شروع نسخه برداری و اولین جعبه CAAT در فاصله ۱۵۹- بازی از جعبه TATA قرار گرفته است. در این راه انداز عناصر متعدد و زیادی شناسایی شدند ولی مهمترین آنها که می تواند در شرایط آزمایش حاضر مورد بررسی بیشتر قرار گیرد شامل ۷ توالی ABRE، ۱ توالی جعبه G، ۴ توالی CRT/DRE، ۷ توالی DRE، ۴ توالی LTR، ۲ توالی SURE و ۴ جعبه CAAT بود که در مطالعات انجام شده پیشین در ایجاد مقاومت به سرما و کم آبی حاصل از آن نقش داشته اند (۶، ۱۴، ۱۵، ۱۸، ۲۴، ۳۰ و ۳۳). ۴۳ درصد

به طور کلی می‌توان ژن *SuTI* را به عنوان یکی از ژنهای *COR* کاندید در اعطاء مقاومت به یخزدگی در گندم معرفی نمود. زیرا احتمال می‌رود افزایش بیان این ژن در شرایط سرمادهی منجر به تجمع کربوهیدراتها در بافتهای گیاهی بخصوص طوقه شود و از خسارتهای بیشتر در مواجهه با شرایط سخت زمستان ممانعت خواهد نمود. از آنجایی که طوقه گیاه تنها بافتی از گیاه است که می‌تواند پس از بین رفتن ریشه و اندامهای هوایی، با رشد مجدد خود، ریشه‌ها و اندامهای هوایی را تولید نماید بنابراین، زنده ماندن و بقاء این اندام در شرایط سرد زمستان در گندم از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است و یکی از مهمترین مکانیزمهای حفظ این خصوصیت همان تجمع کربوهیدراتها است (۴ و ۲۳، ۳۱).

**تشکر و قدردانی:** بدینوسیله از همکاری و مساعدت محققین و کارشناسان مرکز تحقیقات کشاورزی شهر تبریز کانادا به خصوص دکتر دنیس گودت و بایرون پوچالسکی و خانم مهندس میشل فریک سپاسگزاری و قدردانی می‌گردد. کلیه هزینه‌های این طرح از محل بودجه تحقیقاتی این مرکز تأمین شده است.

وجود این عناصر اظهار نظر نمود. بخش اعظم عناصر موجود روی راه‌انداز ژن مورد بررسی را عناصر مسئول درجه حرارت پایین (LTREها) شامل DRE، CRT/DRE، ABRE، LTR و G-box تشکیل می‌دهند که این خود می‌تواند شهادتی بر حضور این ژن در کنترل واکنش گیاه به درجه حرارت پایین باشد. همچنین بخشی از عناصر موجود متعلق به عناصر مسئول دفاع گیاه (PDRE) (Plant Defence Responsive Element شامل ARE Auxin)، (Jasmonic Acid JARE، Responsive Element)، (Elicitor Responsive ELRE، Responsive Element)، (Ethylene responsive Element) ERE، (Salicylic Acid Responsive Element) SARE، (Organ-Specific Element) (Pathogen PRE و Responsive Element) می‌باشد. از آنجایی که تنشهای زنده در گیاه از جمله بیماریها نیز همانند تنشهای غیرزنده منجر به تغییر در میزان و ترکیب کربوهیدراتها می‌شوند (۹ و ۳۷)، بنابراین وجود این عناصر در ژنهای انتقال‌دهنده کربوهیدرات دور از انتظار نخواهد بود.

## منابع

۱. رمضانپور، س. س. ۱۳۸۶. بررسی الگوی تظاهر ژنهای گندم در شرایط تنش سرما. پایان‌نامه دکتری. ۲۰۰ صفحه
۲. Browse, J. and Xin, Z. 2001. Temperature sensing and cold acclimation. *Current Opinion of Plant Biology* 4: 241–246.
۳. Colmer T.D., Epstein E. and Dvorak, J. 1995. Differential solute regulation in leaf blades of various ages in salt-sensitive wheat and a salt-tolerant wheat x *Lophopyrum elongatum* (Host) amphiploid, *Plant Physiology* 108:1715–1724.
۴. Danyluk, J. and Sarhan, F. 1990. Differential mRNA transcription during the induction of freezing tolerance in spring and winter wheat. *Plant Cell Physiology* 31: 609-619.
۵. Danyluk, J., Rassart, E. and Sarhan, F. 1991. Gene expression during cold and heat shock in wheat. *Biochemical Cell Biology* 69: 383-391.
۶. Dunn, MA, White, A.J, Vural, S. and Hughes, M.A. 1998. Identification of promoter elements in a low-temperature-responsive gene (blt4.9) from barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant molecular biology* 38(4):551-64.
۷. Galiba, G., Kerepesi, I., Snape, J.W. and Sutka, J. 1997. Location of a gene regulating cold-induced carbohydrate production on chromosome 5A of wheat. *Theor and Appl Genetic* 95: 265–270.
۸. Galiba, G. 1994. In vitro adaptation for drought and cold hardiness in wheat, in: J. Janick (Ed.), *Plant breeding reviews*, John Wiley and Sons, New York, pp. 115–162 Vol. 2.
۹. Gaudet, D., Laroche, A. and Yoshida, M. 1999. Low temperature-wheat-fungal interaction: A

- carbohydrate connection. *Physiologia Plantarum* 106: 437-444.
10. Guy, C.L. 1990. Cold acclimation and freezing stress tolerance: Role of protein metabolism. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 41: 187-223.
  11. 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.
  12. Houde, M., Belcaid, M., Ouellet, F., Danyluk, J., Monroy, A.F., Dryanova, A., Gulick, P., Bergeron, A., Laroche, A., Links, M.G., MacCarthy, L., Crosby, W.L. and Sarhan, F. 2006. Wheat EST resources for functional genomics of abiotic stress. *BMC genomics* 7: 149.
  13. Housley, T.L. and Pollock, C.J. 1993. The metabolism of fructans in higher plants, in: M. Suzuki, N.J. Chatterton (Eds.), *Science and Technology of Fructans*, CRC Press, Boca Raton, FL, pp.191-225.
  14. Hudson, M.E. and Quail, P.H. 2003. Identification of promoter motifs involved in the network of phytochrome A - regulated gene expression by combined analysis of genomic sequence and microarray data. *Plant Physiol.* 133: 1605-1616.
  15. Hughes, M. and Dunn, M. 1996. The molecular biology of plant acclimation to low temperature. *J. Exp. Bot.* 47: 291-305.
  16. Jaglo-Ottosen, K.R., Gilmour, S.J., Zarka, D.G., Schabenberger, O. and Thomashow, M.F. 1998. *Arabidopsis* CBF1 overexpression induces *COR* genes and enhances freezing tolerance. *Science* 280:104-6.
  17. Jiang, C., Iu, B. and Singh, J. 1996. Requirement of a CCGAC *cis*-acting element for cold induction of the *BN115* gene from winter *Brassica napus*. *Plant Mol Biol* 30: 679-684.
  18. Kim, H-J., Kim, Y-K., Park, J-Y., Kim, J. 2002. Light signalling mediated by phytochrome plays an important role in cold-induced gene expression through the C-repeat/dehydration responsive element (C/DRE) in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant J.* 29 (6): 693-704.
  19. Lescot, M., Déhais, P., Moreau, Y., DeMoor, 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.
  20. Liu, Q., Sakuma, Y., Abe, H., Kasuga, M., Miura, S., Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki K. 1998. Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain, separate two cellular signal transduction pathways in drought and low temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 10: 1391-1406.
  21. Martin, M., Miceli, F., Morgan, J.A., Scalet, M. and Zerbi, G. 1993. Synthesis of osmotically active substrates in winter wheat leaves as related to drought resistance of different genotypes. *J. Agr. Crop Sci.* 171: 176-184.
  22. McKersie, B.D. and Leshem, Y.Y. 1994. *Stress and Stress Coping in Cultivated Plants*, Kluwer academic Publishers, Dordrecht, pp. 79-103.
  23. Murelli, C., Rizza, F., Albini, F.M., Dulio, A., Terzi, V. and Cattivelli, L. 1995. Metabolic changes associated with cold-acclimation in contrasting cultivars of barley. *Physiol Plant* 94: 87-93.
  24. Nordin, K., Vahala, T. and Palva, E.T. 1993. Differential expression of two related, low temperature- induced genes in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Mol. Biol.* 21:641-53.
  25. Pfaffl M.W., Horgan, G.W. and Dempfle, L. 2002. Relative expression software tool (REST©) for group-wide comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acid Res.* 30(9): e36.
  26. Sarhan, F. and Danyluk, J. 1998. Engineering cold-tolerant crops—throwing the master switch. *Trends Plant Sci.* 3:289-90.
  27. Sarhan, F., Ouellet, F. and Vazquez-Tello, A. The wheat *wcs120* gene family. A useful model to understand the molecular genetics of freezing tolerance in cereals. *Physiol Plant* 1997. 101: 439-445.
  28. Simpson, S.D., Nakashima, K., Narusaka, Y., Seki, M., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. 2003. Two different novel *cis*-acting elements of *erd1*, a *clpA* homologous *Arabidopsis* gene function in induction by dehydration stress and dark-induced senescence. *The plant j.* 33 (2): 259-270.
  29. Stockinger, E.J., Gilmour, S.J. and Thomashow, M.F. 1997. *Arabidopsis thaliana* CBF1 encodes an AP2 domain-containing transcription activator that binds to the C-repeat/DRE, a *cis*-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and

- water deficit. Proc. Natl. Acad. Sci. 94: 1035–1040.
30. Suzuki, M., Ketterling, M.G and McCarty, D.R. 2005. Quantitative Statistical Analysis of cis-Regulatory Sequences in ABA/VP1- and CBF/DREB1-Regulated Genes of Arabidopsis. Plant Physiol. 139: 437-447.
  31. Tabaei-Aghdaei, S.R., Pearce, R.S. and Harrison, P. 2003. Sugars regulate cold-induced gene expression and freezing-tolerance in barley cell cultures. J. of Exp. Bot. 54 (387): 1565-1575.
  32. Thomashow, M.F. 1999. Plant cold acclimation, freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 50: 571–599.
  33. Urao, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., Urao, S. and Shinozaki, K. 1993. An arabidopsis myb homolog is induced by dehydration stress and its gene product binds to the conserved MYB recognition sequence. Plant Cell 5: 1529-1539.
  34. Xue, G-P. 2003. The DNA-binding activity of an AP2 transcriptional activator HvCBF2 involved in regulation of low-temperature responsive genes in barley is modulated by temperature. The plant J. 33: 373-383.
  35. Wagner W. and A. Wiemken. 1986. Properties and subcellular localization of fructan hydrolase in leaves of barley (*Hordeum vulgare* L. cv. Gerbel), J. Plant Physiol. 123: 429–439.
  36. Yamaguchi-Shinozaki, K., and Shinozaki, K. 1994. A novel cis-acting element in an Arabidopsis gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature or high-salt stress. Plant Cell 6: 251–264.
  37. Yoshida, M., Abe, J., Moriyama, M. and Kuwabara, T. 1998. Carbohydrate levels among winter wheat cultivars varying in freezing tolerance and snow mold resistance during autumn and winter. Physiol Plant 103: 8–16

## Study on expression profile and regulation pattern of sugar transporter gene (*SuT1*) during cold acclimation in two winter wheats (*Triticum aestivum* L.)

Ramezanpour S.S.<sup>1\*</sup>, Soltanloo H.<sup>1</sup> and laroche A.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Plant breeding and biotechnology Dept., Faculty of Plant Protection, University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, I.R. of IRAN

<sup>2</sup> Molecular Genetic Dept., Lethbridge Research Centre, Agriculture and Agri-Food, Canada

### Abstract

Cold acclimation leads to biochemical, physiological and metabolic changes in plants which regulated in gene expression level by non-freezing temperature (0-4°C) These changes improve plant capacity to survive under freezing temperature. Carbohydrates accumulation is one of the most important changes which regulates by alternation in expression of sugar transporter genes. In this paper, gene expression profile of one sugar transporter gene (*SuT1*) was studied in freezing tolerant and susceptible variety under cold acclimation (2°C) by Quantitative real-time PCR. Results showed differential expression pattern of this gene. *SuT1* gene showed 3 times up-regulation and 3 times down-regulation after 1 day cold acclimation in freezing tolerant and susceptible variety, respectively. Evaluation of promoter sequence of this gene confirms the existence of low temperature responsive elements (LTRE), sugar responsive elements (SURE), dehydration responsive elements (DRE) and many other regulatory elements. Therefore, *SuT1* gene can be introduced as a *COR* candidate gene to induce freezing tolerance in wheat. It is probable, the up regulation of *SuT1* gene leads to accumulate carbohydrate and decrease following freezing damages in hard winter condition.

**Keywords:** *Triticum aestivum*, carbohydrate, cold acclimation, promoter