

بررسی عملکرد ژن *OsVPI* از طریق مطالعه لاین‌های جهش‌یافته برنج

فاطمه هاشمی¹، زهرا سادات شبر^{2*}، محمد مهدی مجیدی³

1- کارشناس ارشد اصلاح نباتات، گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشگاه صنعتی اصفهان.

2- استادیار بخش فیزیولوژی مولکولی پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران.

3- استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه صنعتی اصفهان.

تاریخ دریافت: 1390/12/7، تاریخ پذیرش: 1391/4/27

چکیده

ژن‌های *ABI3* و *VPI* کدکننده عوامل رونویسی هستند که در ترانسانی پیام آبسزیک اسید نقش دارند. هدف این پروژه، مطالعه عملکرد ژن *OsVPI*، اورتولوگ *VPI* و *ABI3* در برنج از طریق مطالعه جهش‌یافته‌های آن است. به همین منظور، برای روشن ساختن نقش این ژن، ویژگی‌های گیاهان جهش‌یافته *osvp1-1* (لاین‌های با T-DNA ورودی در ناحیه پروموتور ژن *OsVPI*) و *osvp1-2* (لاین‌های با DNA T-ورودی در ناحیه کدکننده ژن *OsVPI*) در مراحل مختلف رویشی و زایشی با وحشی مورد مقایسه قرار گرفت و همچنین بررسی مقایسه‌ای پاسخ گیاهان جهش‌یافته *osvp1-1* و وحشی به تیمار آبسزیک اسید و تنش‌های غیرزیستی به همراه مطالعه الگوی بیان ژن *OsVPI* در گیاهچه‌های 12 روزه با استفاده از RT-PCR انجام شد. گیاهان *osvp1-2* نسبت به گیاهان وحشی رنگ پریده، نحیف‌تر و فاقد عملکرد بودند. گیاهان *osvp1-1* نسبت به گیاهان وحشی از ارتفاع کوتاه‌تری برخوردار بودند و خوشه‌دهی و پر شدن دانه آنها نیز چند روز دیرتر از گیاهان وحشی صورت گرفت. همچنین سطح بیان رونوشت‌های ژن *OsVPI* در گیاهان *osvp1-1* نسبت به گیاهان وحشی چند برابر شده بود. با اعمال تنش‌های غیرزیستی و ABA کاهش رشد در گیاهچه مشاهده شد و سطح رونوشت‌های ژن *OsVPI* نسبت به شرایط شاهد افزایش نشان داد. نتایج حاضر نشان می‌دهد ژن *OsVPI* می‌تواند در ترانسانی پیام آبسزیک اسید و کاهش رشد در شرایط تنش نقش داشته باشد.

واژه‌های کلیدی: برنج (*Oryza Sativa*)، *OsVPI*، تنش‌های غیرزیستی، آبسزیک اسید، بررسی عملکرد

شود که براساس مطالعات قبلی نقش مهمی در تحمل گیاهان به این تنش‌ها دارد (Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki, 2000; Zhu *et al.*, 2002). گروهی از ژن‌های پاسخگو به تنش‌های غیرزیستی در مسیر پیام‌رسانی آبسیزیک اسید عمل می‌کنند. بطوری‌که بیان این ژن‌ها توسط آبسیزیک اسید تحریک شده و فراورده پروتئینی آنها به عنوان یک عامل رونویسی میزان بیان ژن‌های دیگر را تنظیم می‌کند. از مهمترین این ژن‌ها *ABI3* آرابیدوپسیس است (Molina *et al.*, 2001). این ژن به طور گسترده در تنظیم بیان ژن‌های پاسخگو به آبسیزیک اسید در طی مرحله میانی و انتهای جنین‌زائی¹ نقش دارد (Hu *et al.*, 2006). ایجاد جهش در این مکان ژنی باعث ایجاد تغییرات متعددی در مرحله نمو و جوانه‌زنی بذر می‌گردد که ناشی از کاهش حساسیت به آبسیزیک اسید است (Giraudat *et al.*, 1992). پروتئین *ABI3* و *VP1* از گیاه آرابیدوپسیس و ذرت عوامل رونویسی با دامنه *B3*² می‌باشند که با توجه به شرایط ایجاد شده در گیاه و فعالیت ژن‌های هدف تحت تاثیر تنش‌های غیرزیستی می‌توانند به هر دو صورت فعال‌کننده³ و مهارکننده⁴ عمل کنند (Hernandez *et al.*, 2007). با بررسی گیاه تراریخته حامل *VP1::GUS* در مرحله رویشی در شرایط طبیعی هیچ بیانی از *VP1* مشاهده نشده است اما به محض قرارگیری تحت تنش کم‌آبی و شوری بالا میزان بیان آن در

خشکی، شوری و سرما از شایع‌ترین تنش‌های محیطی هستند که بر رشد و نمو و عملکرد محصولات کشاورزی در سراسر جهان تاثیر می‌گذارند و بنابراین برای مقابله با این محدودیت‌ها و بهبود عملکرد گیاهان تحت تنش، اصلاح گیاهان حائز اهمیت است. گیاه برنج حساس به تنش‌های غیرزیستی خشکی، شوری و سرما می‌باشد (Lafitte *et al.*, 2004). براساس تحقیقات، تعدادی از ژن‌ها به وسیله این تنش‌های محیطی تحریک شده و انتظار می‌رود که در پاسخ و تحمل به تنش نقش داشته باشند (Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki, 2000). شناسایی ژن‌های دخیل، تعیین الگوی بیان آنها در پاسخ به تنش‌ها و درک عملکرد آنها در سازگاری به تنش، زمینه لازم به منظور یافتن راهکارهای کارآمد برای افزایش تحمل به تنش‌ها را فراهم خواهد ساخت (Zhang *et al.*, 2006). مطالعه روی گیاهان تراریخته تولیدکننده ساختار *RNAi* ژن مربوطه و جهش‌یافته‌های حاصل از ترانسپوزون‌ها و *T-DNA* نشاندار روشی مناسب در جهت شناسایی و مطالعه عملکرد ژن‌های پاسخگو به تنش‌های غیرزیستی می‌باشد که بر-اساس فنوتیپ فاقد عملکرد و یا بیان بیش از حد ژن مربوطه صورت می‌گیرد (Shinozaki *et al.*, 2007). از لحاظ مولکولی هم‌پوشانی‌های بسیاری بین پاسخ به خشکی، شوری و سرما و مسیر ترانس‌اسی علامت آبسیزیک اسید مشاهده می‌شود (Zhang *et al.*, 2006). هورمون آبسیزیک اسید در زمان اعمال این نوع تنش‌ها در گیاه تولید می-

¹ Morphogenesis

² Domain

³ Activator

⁴ Repressor

ورودی در ناحیه پروموتور ژن *OsVPI*، *osvp1-2* (لاین‌های با T-DNA ورودی در ناحیه کدکننده ژن *OsVPI*) نسبت به گیاهان وحشی در مراحل مختلف رویشی و زایشی برای روشن ساختن نقش این ژن صورت گرفت. همچنین در جهت شناخت مکانیسم پاسخ به تنش‌های غیرزیستی، بررسی بیان ژن *OsVPI* در گیاه جهش‌یافته *osvp1-1* نسبت به گیاه وحشی تحت تنش‌های غیرزیستی و تیمار آبسزیک اسید انجام شد.

بافت‌های آوندی و ساقه‌های هوایی مشاهده شده است (Cao et al., 2007). بیان ژن *OsVPI* به طور قابل‌توجهی توسط تنش خشکی و تیمار آبسزیک اسید در بافت‌های گیاه چون دمگل افزایش می‌یابد (Shobbar et al., 2008).

هدف این پروژه مطالعه عملکرد ژن *OsVPI* در گیاه برنج از طریق مطالعه جهش-یافته‌های آن است. مقایسه ویژگی‌های گیاهان برنج جهش‌یافته *osvp1-1* (لاین‌های با T-DNA

جدول 1- بانک‌های اطلاعاتی / ابزارهای جستجوی مورد استفاده.

Table 1- Databases or search tools.

Database or Search tool	URL Address
Genbank	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank
Blocks	http://blocks.fhcrc.org/
Prodom	http://prodom.prabi.fr/prodom/current/html/home.php
plexdb	http://www.plexdb.org
plantcare	http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html
pfm	http://www.sanger.ac.uk/software/pfm/

مواد و روش‌ها

بررسی ساختار ژن *OsVPI* (Os01g0911700)

با استفاده از بانک‌های اطلاعاتی و ابزارهای بیوانفورماتیک

توالی نوکلئوتیدی (GI:297598172) و پروتئینی (GI:629807) ژن مورد نظر از بانک ژن دریافت و به عنوان الگو برای جستجوهای مختلف مورد استفاده قرار گرفت. برای یافتن ساختار ژن، موقعیت ژن *OsVPI* روی کروموزوم، ساختار پروتئین و دومین‌های مهم آن، ساختار پروموتور از نظر عناصر عملگر مرتبط و الگوی بیان ژن *OsVPI* تحت شرایط تنش‌های غیرزیستی (خشکی، شوری، سرما) از بانک‌های اطلاعاتی و ابزارهای بیوانفورماتیک متنوعی استفاده شد که نام و آدرس اینترنتی آنها در جدول 1 آمده است.

تهیه بذور گیاهان جهش‌یافته و وحشی

بذور گیاه برنج رقم Dongjin جهش-یافته *osvp1-1* و *osvp1-2* از طریق جستجوی توالی ژن *OsVPI* در بین لاین‌های جهش‌یافته حاصل از ترانسپوزون‌ها و T-DNA بانک‌های اطلاعاتی انتخاب و در نهایت از بانک اطلاعاتی RiceGE (<http://signal.salk.edu/cgi-bin/RiceGE>) Jeong *et al.*, (2002) خریداری گردید. T-DNA ورودی در گیاهان جهش‌یافته، حاوی ژن‌های گزارشگر گاس (GUS) و چندین

افزاینده از پروموتور 35S ویروس موزائیک گل کلم می‌باشد.

کشت و مقایسه گیاهان جهش‌یافته نسبت به گیاهان وحشی در طی مراحل رویشی و زایشی کشت بذور نسل اول و دوم گیاهان وحشی، گیاهان جهش‌یافته *osvp1-1* و کشت بذور نسل اول گیاهان جهش‌یافته *osvp1-2* (گیاهان جهش‌یافته نسل اول *osvp1-2* فاقد عملکرد بذری بوده است) در شرایط گلخانه صورت گرفت و مطالعه ویژگی‌های آن در مراحل رویشی و زایشی در مقایسه با گیاهان وحشی انجام شد. صفات مورد بررسی شامل طول برگ پرچم، برگ دوم، طول پانیکول، محور پانیکول، تعداد خوشه، ارتفاع بوته، تعداد بذر و وزن هزار دانه بود. مقایسه‌ی فنوتیپی بین گلچه‌های 1، 2 و 4 روزه گیاهان جهش‌یافته در مقایسه با گلچه وحشی انجام شد و نمونه‌برداری به منظور استخراج DNA از برگ گیاهان صورت گرفت.

ارزیابی ژن گزارشگر گاس

جهت تأیید جهش ایجاد شده و بررسی بیان ژن گزارشگر گاس نمونه‌های برگ و گلچه در محلول Glus-X (1 میلی‌مولار D-glucuronic-X-Gluc (5-bromo-4-Cholro-3-βacid indolyl) در 50 میلی‌مولار NaHPO₄ (PH=7) و 0/1 درصد Triton X-100 حل شده) قرار گرفته و به مدت 12-24 ساعت در دمای اتاق نگهداری شد و بعد از خارج سازی از محلول

250-230 به مدت 10 روز قرار گرفتند و به منظور اعمال تنش سرما گیاهچه‌ها به محیط MS پایه جامد منتقل و در دمای 18 درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. به جز دما کلیه شرایط نگهداری آنها با شرایط گیاهچه‌های دیگر یکسان بود. نمونه‌برداری به منظور استخراج RNA از ساقه گیاهچه‌های دوازده روزه صورت گرفت.

مطالعه الگوی بیان ژن

RNA کل با استفاده از محلول ترایزول (Invitrogen, Carlsbad, CA) طبق دستورالعمل شرکت سازنده استخراج گردید. کمیت و کیفیت RNA براساس جذب نوری با دستگاه اسپکتروفتومتر و بررسی باندهای مربوطه در ژل الکتروفورز تعیین و تأیید شد. RNAهای استخراج شده با آنزیم (RNase-free DNase I) (Promega Corporation, Madison, WI) تیمار شدند، عدم وجود DNA توسط PCR تأیید شد و همسان‌سازی غلظت RNAهای مختلف براساس 28S & 18S rRNA صورت گرفت. جفت پرایمر اختصاصی مناسب برای ژن خانه‌دار (18S) و ژن *OsVPI* طراحی شد. شرایط بهینه RT-PCR و تعداد چرخه مناسب برای مشاهده تفاوت بیان بین تیمارهای مختلف تعیین شد. سنتز cDNA با استفاده از کیت iScript cDNA (BIO-RAD) synthesis Kit صورت گرفت و در نهایت الگوی بیان ژن‌ها با استفاده از RT-PCR¹ مورد بررسی قرار گرفت (Shobbar et al., 2007).

¹ Reverse transcription-polymerase chain reaction

Glus-X چندین بار در الکل 70 درصد (70 میلی‌لیتری اتانول در 30 میلی‌لیتر آب مقطر) شستشو داده شد.

تصدیق جهش موردنظر و همچنین بررسی هموزیگوت و هتروزیگوت بودن جهش‌یافته‌ها در جهت تصدیق جهش مورد نظر و همچنین بررسی هموزیگوت و هتروزیگوت بودن جهش‌یافته‌ها ابتدا طراحی جفت آغازگرهای اختصاصی با استفاده از برنامه الیگو (Oligo 5) انجام شد. سپس استخراج DNA ژنومی (Dellaporta et al., 1983) و فرایند PCR صورت گرفت.

کشت بذور نسل سوم گیاه جهش‌یافته *osvp1-1* و اعمال تنش‌های غیرزیستی

بذور مورد مطالعه پس از ضدعفونی در پتری‌های شیشه‌ای حاوی محیط MS پایه جامد کشت شدند با این تفاوت که گیاهان جهش‌یافته در محیط MS پایه جامد حاوی هایگرومیسین کشت شدند سپس بذور کشت شده به مدت دو روز در دمای 25 درجه سانتی‌گراد و شدت نور $230-250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ قرار گرفتند. به منظور بررسی اثر تنش‌های شوری، خشکی، سرما و تیمار ABA، دو روز پس از جوانه‌زنی گیاهچه‌ها به ترتیب به محیط‌های MS حاوی 150 میلی-مولار NaCl، 275 میلی‌مولار مانیتول و 10 میکرومولار ABA منتقل شدند و در دمای 25 درجه سانتی‌گراد و شدت نور $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$

تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل آماری نتایج بدست آمده در این پژوهش براساس طرح کاملاً تصادفی نا-متعادل (3 تکرار زیستی و در 2 تکرار آزمایشی) انجام گرفت و مقایسه میانگین به وسیله آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح خطای 0/05 با استفاده از نرم افزارهای MSTATS و SAS صورت پذیرفت.

نتایج و بحث

بررسی ژن *OsVPI* با استفاده از بانک‌های اطلاعاتی

ژن *OsVPI* به تعداد یک نسخه است که در روی کروموزم شماره 1 برنج واقع شده و توالی نوکلوتیدی این ژن از 6 اگزون و 5 اینترون تشکیل شده است. طی فرایند پردازش جایگزین¹ دو ایزوفرم مختلف برای این ژن گزارش شده است که ایزوفرم اول توالی 727 اسید آمینه‌ای و ایزوفرم دوم توالی 704 اسید آمینه‌ای را کد می‌نماید. توالی 728 اسید آمینه‌ای این پروتئین دارای 7 دومین حفظ شده می‌باشد (شکل 1) که دومین B3 به عنوان سومین دومین بازی بیشترین حفظ‌شدگی را داراست و به عنوان DNA-binding در تنظیم رونویسی ژن‌های دیگر به ویژه ژن‌های ویژه بذری نقش دارد. در پروموتور ژن *OsVPI* (1Kb بالاتر از نقطه UTR 5') عناصر عملگر هدف² مختلفی شناسایی گردید، از جمله

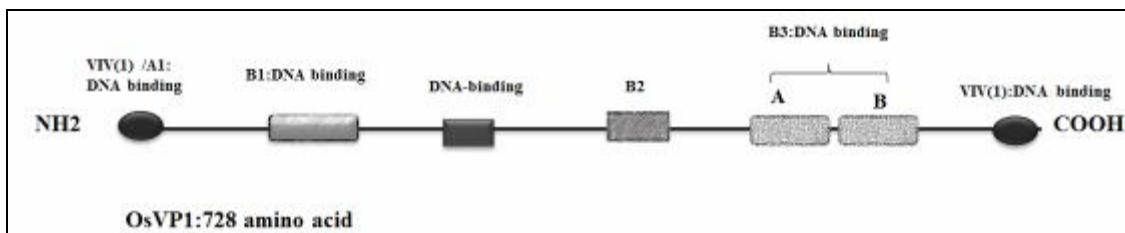
توالی‌های پاسخگو به هورمون‌هایی چون آبسزیک اسید و ژیرلین، توالی‌های پاسخگو به تنش‌های غیرزیستی چون نور، سرما و توالی‌های که در فرایندهای رشدی چون متابولیسم زئین، آندوسپرم و فعالیت مریستم دخیل می‌باشند (شکل 2). نتایج بدست آمده از سایت plexdb نشان داد که بیان ژن *OsVPI* تحت تاثیر تنش خشکی افزایش یافته است (نتایج به صورت تصویری نمایش داده نشده است)

بررسی بیان ژن گزارشگر گاس در روی نمونه-های برگ و گلچه گیاهان جهش‌یافته

رنگ آبی مشاهده شده در روی برگ‌ها و گلچه‌های گیاهان جهش‌یافته *osvp1-1* و گلچه-های گیاهان جهش‌یافته *osvp1-2* مؤید ایجاد جهش و نشان‌دهنده فعالیت پروموتور ژن *OsVPI* در این قسمت از بافت‌های گیاهی بوده است (شکل 3).

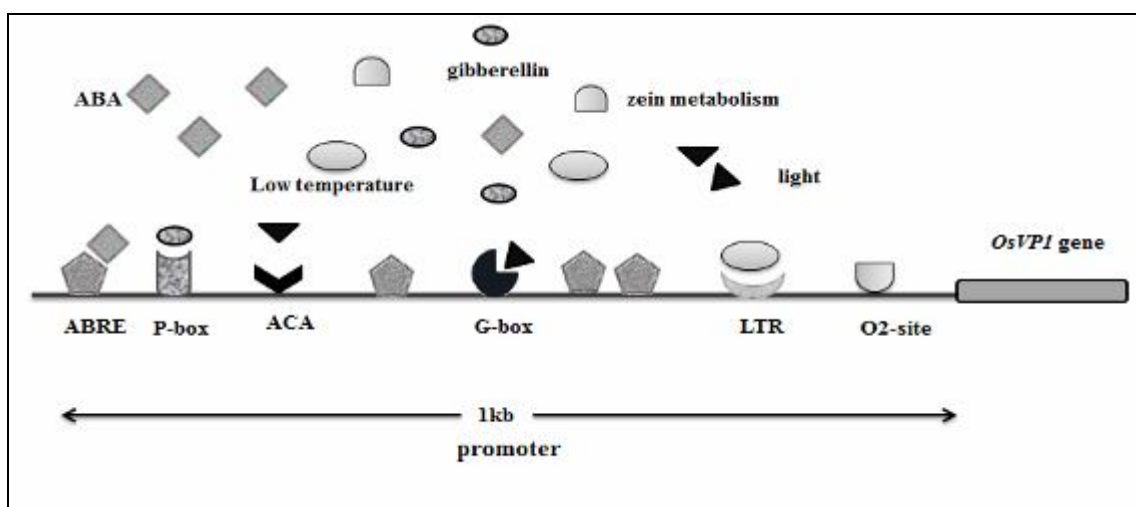
¹ alternative splicing

² Cis-acting



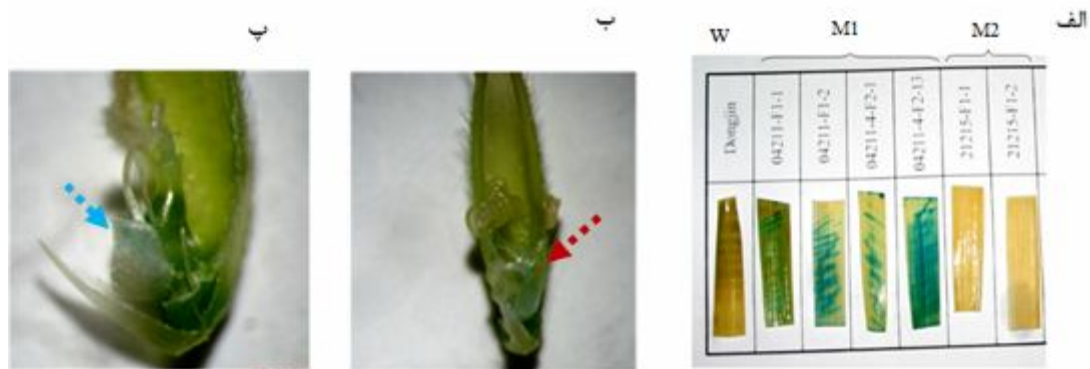
شکل 1- هفت دومین حفظ شده در توالی پروتئین OsVP1 (برگرفته از بانک اطلاعاتی Prodom).
 NH2: انتهای آمین و COOH: انتهای کربوکسیل توالی پروتئین OsVP1 با 728 اسید آمینه.

Figure 1: Seven conserved domains in OsVP1 protein sequence (derived from Prodom database).



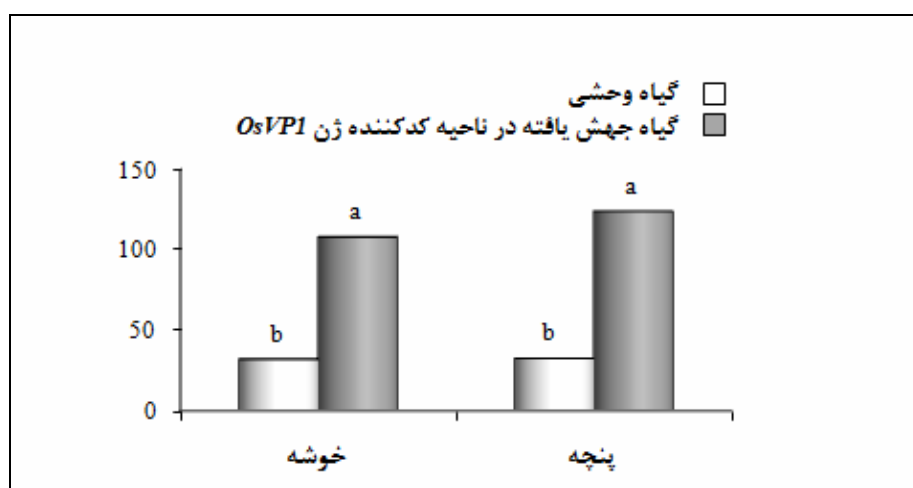
شکل 2- برخی از عناصر عملگر موجود در ناحیه پروموتور ژن OsVP1 (برگرفته از سایت plantcare).
 ABA: آبسزیک اسید، Low temperature: دمای پایین، gibberellin: ژیببرلین، light: نور، zein metabolism: متابولیسم زئین، ABRE: محل دریافت سیگنال ABA، ACA، G-box: محل دریافت سیگنال ABA، P-box: محل دریافت سیگنال هورمون ژیببرلین، LTR: محل دریافت سیگنال دمای پایین، O2-site: محل دریافت سیگنال متابولیسم زئین، promoter: پروموتور ژن OsVP1.

Figure 2- Some of the cis-acting elements available in OsVP1 promoter (derived from plant care), ABRE: ABA-responsive element, ACA, G-box: light responsive element, P-box: gibberellin responsive element, LTR: Low temperature responsive element, O2-site: zein metabolism responsive element.



شکل 3- بررسی بیان ژن گزارشگر گاس (GUS) در بافت‌های گلچه و برگ‌های گیاه وحشی (W)، گیاهان جهش‌یافته *osvp1-1* (M1) و *osvp1-2* (M2) (ب) گلچه گیاه جهش‌یافته *osvp1-2* (پ) گلچه گیاه جهش‌یافته *osvp1-1*.

Figure 3- GUS Reporter gene expression assay at leaves and florets: (A) leaves of wild type plant (W) and mutant plants *osvp1-1* (M1), *osvp1-2* (M2) B) floret of *osvp1-2* mutant plant (C) floret of *osvp1-1* mutant plant.



شکل 4- مقایسه تعداد خوشه و پنجه گیاهان جهش‌یافته *osvp1-2* نسبت به گیاهان وحشی، حروف a, b نشان‌دهنده‌ی اختلاف معنی‌دار بین گیاهان وحشی و جهش‌یافته براساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح 0/05 است.

Figure 4- Tiller and ear numbers of *osvp1-2* mutant plants compared to the wild type. a and b shows statistically significant difference based on Duncan's multiple range test ($P < 0.05$).

خوشه بیشتری داشتند (شکل 4) و دارای ساقه و برگ‌های رنگ پریده و نحیف‌تری بودند. نتایج تحقیقات پیشین حاکی از آن بوده است که *ABI3/VP1* طی برهمکنش با سایر عوامل

مقایسه فنوتیپی گیاه جهش‌یافته

osvp1-2 نسبت به گیاه وحشی در طی مراحل رویشی و زایشی: گیاهان جهش‌یافته *osvp1-2* نسبت به گیاهان وحشی تعداد پنجه و

این که گیاهان مذکور از لحاظ جهش مورد بحث هتروزیگوت بودند این احتمال مطرح می‌شود که در نتیجه تغییر فراورده ژنی، الی دیگر نیز تا حدی مهار شده و یا تظاهر این جهش به نحوی غالبیت نسبی داشته باشد.

مقایسه فنوتیپی گیاه جهش یافته

osvp1-1 نسبت به گیاه وحشی در طی

مراحل رویشی و زایشی: گیاهان جهش یافته *osvp1-1* نسبت به گیاهان وحشی از طول پانیکول، محور پانیکول، برگ دوم و ارتفاع کوتاه‌تری برخوردار می‌باشند (شکل 6). خوشه-دهی و پر شدن دانه نیز چند روز دیرتر از گیاهان وحشی صورت گرفت و مادگی گلچه وحشی از جهش یافته متورم‌تر بود (شکل 5، ب). براساس مطالعات پژوهشگران ژن *VPI* از عوامل رونویسی مهم در مسیر ترانسسانی آبسزیک اسید بوده و بیانش تحت تاثیر تنش‌های غیرزیستی افزایش می‌یابد به نظر می‌رسد که *OsVPI* در کاهش رشد در پاسخ به تنش‌های غیرزیستی همانند خشکی دخیل باشد (Shobbar *et al.*, 2008). نظر به ورود T-DNA حامل چندین افزاینده از پروموتور ویروس موزایک گل کلم در ناحیه پروموتور ژن *OsVPI*، افزایش چندین برابری بیان این ژن نسبت به شرایط طبیعی متصور است. بنابراین دور از انتظار نیست که افزایش بیان این ژن در گیاهان جهش یافته، کاهش ارتفاع را به دنبال داشته باشد. همچنین طبق مطالعات صورت گرفته، از آنجایی که بیان

رونویسی نقش بسزایی در ممانعت و فعالیت بیان ژن‌های متعددی دارد (Finkelstein *et al.*, 2002; Suzuki *et al.*, 2003)، بنابراین دور از انتظار نیست که جهش در ژن *OsVPI* باعث ایجاد تغییرات فنوتیپی قابل توجهی گردد. مطالعات صورت گرفته بر روی جهش یافته *abi3* نشان داده است که بیان این ژن علاوه بر اینکه حساسیت بذر را نسبت به آبسزیک اسید تغییر می‌دهد، در توسعه پلاست و دوره خواب جوانه نیز نقش داشته و با ژن‌های درگیر در تنظیم نور نیز بر-همکنش دارد (Rohde *et al.*, 2000). ممکن است با تغییر فراورده ژن *OsVPI* برهمکنش این ژن با ژن‌های درگیر در تنظیم نور به هم خورده و یا اینکه تکامل پلاست به خوبی صورت نگرفته و فرایند فتوسنتز طبق شرایط معمولی رخ نداده و به همین دلیل برگ‌ها و ساقه گیاهان جهش یافته نسبت به گیاهان وحشی رنگ پریده‌تر مشاهده شدند. در گیاهان جهش یافته خروج خوشه از غلاف برگ پرچم نسبت به گیاهان وحشی زودتر و به صورت غیرطبیعی صورت گرفت. گلچه‌های این گیاهان جهش یافته دارای بساک‌های ضعیف، مچاله شده و رنگ پریده‌ای نسبت به گیاهان وحشی بودند (شکل 5، الف) و به همین دلیل گرده‌افشانی و تولید بذر در این نوع از جهش یافته رخ نداد. از آنجایی که با ورود T-DNA به ناحیه کدکننده ژن *OsVPI*، تکامل گلچه‌های گیاهان جهش یافته مخصوصاً بساک دچار مشکل شده است به نظر می‌رسد محصول این ژن به نوعی در تکامل این اندام‌ها نقش داشته باشد. با توجه به

همچنین مطابق انتظار، سطح بیان رونوشت‌های *OsVPI* در گیاهان جهش‌یافته *osvp1-1* حتی در شرایط شاهد نسبت به گیاهان وحشی چند برابر شده بود (شکل 8) زیراکه T-DNA وارد شده حامل چندین افزاینده از پروموتور 35S ویروس موزاییک گل کلم می‌باشد.

جمع‌بندی کلی

براساس نتایج بدست آمده:

- 1 - عدم تولید بذر در گیاهان جهش‌یافته *osvp1-1*
- 2 حکایت از نقش مهم و کلیدی این ژن دارد. رنگ پریدگی و نحیف بودن بساک‌ها، ساقه و برگ‌های این گیاهان نسبت به گیاهان وحشی احتمال دخالت این ژن را در تکامل بساک و ساخت سبزینه مطرح می‌سازد.
- 2- کاهش ارتفاع ساقه در تمامی گیاهچه‌های مورد مطالعه و افزایش سطح رونوشت‌های *OsVPI* تحت تأثیر تنش‌های غیرزیستی (خشکی، شوری، سرما و ABA) نسبت به شرایط شاهد و همچنین افزایش سطح بیان رونوشت‌های *OsVPI* در گیاهان جهش‌یافته *osvp1-1* نسبت به گیاهان وحشی و کاهش ارتفاع این گیاهان پیشنهاد می‌کند که ژن *OsVPI* به عنوان یک عامل تنظیم‌کننده مثبت در مسیر ترانسسانی هورمون آبسزیک اسید فعالیت می‌کند و در کاهش رشد در پاسخ به تنش نقش دارد.

ABI3/VP1 در بذر گزارش شده (Miyoshi *et al.*, 2002) و به نظر می‌رسد که این ژن در نمو بذر نقش مهمی ایفا کند (Giraudat *et al.*, 1992) تأخیر در پر شدن دانه در گیاهان جهش‌یافته در این ژن نیز با نتایج پژوهش‌های پیشین همخوانی دارد.

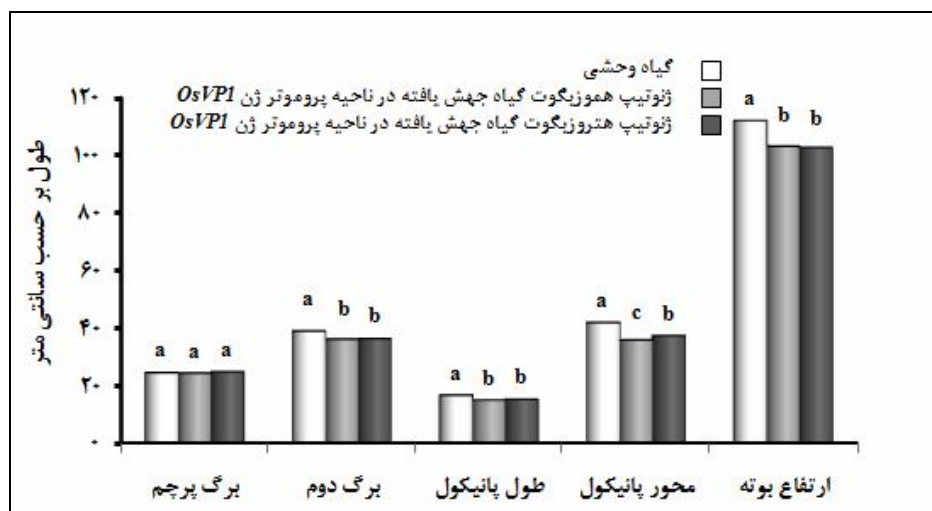
تأثیر تنش‌های غیرزیستی بر رشد رویشی و الگوی بیان ژن *OsVPI*

طبق نتایج بدست آمده تحت تأثیر تنش‌های غیرزیستی کاهش ارتفاع ساقه در گیاهچه‌های مورد مطالعه مشاهده شد (شکل 7) و نتایج حاصل از بررسی بیان ژن *OsVPI* در گیاهچه‌های جهش‌یافته *osvp1-1* و گیاهچه‌های وحشی تحت تنش‌های غیرزیستی و تیمار با ABA نشان داد که در گیاهچه‌های وحشی سطح رونوشت‌های *OsVPI* در تنش‌های غیرزیستی خشکی، شوری، سرما و ABA نسبت به شرایط شاهد افزایش داشته است (شکل 8) که با شواهد قبلی همخوانی دارد. براساس نظر پژوهشگران، ژن *OsVPI* در برنج ارتولوگ ژن *ABI3* در آرابیدوپسیس است (Hattori *et al.*, 1994) و بیان *OsVPI* و *VP1* در شرایط عادی در بافت‌های رویشی فوق‌العاده کم بوده و آبسزیک اسید و تنش اسمزی باعث افزایش بیان آن می‌گردد (Shobbar *et al.*, 2008; Cao *et al.*, 2007).



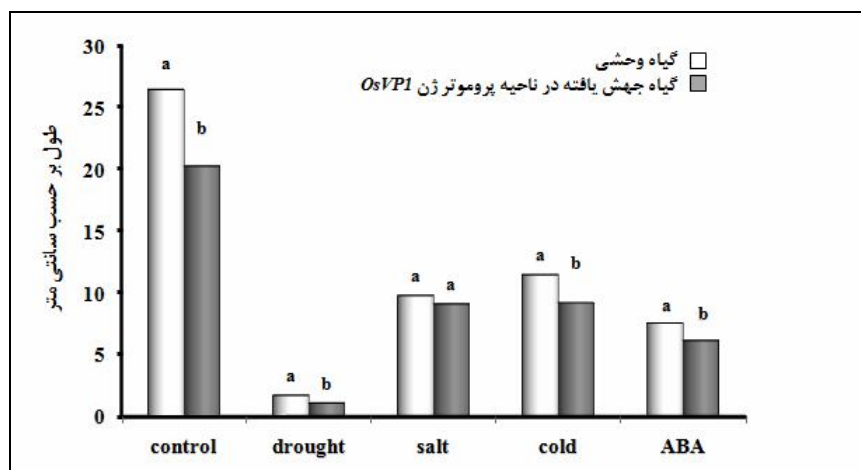
شکل 5- مقایسه فنوتیپی گلچه‌های 4 روزه گیاهان جهش یافته با گیاهان وحشی (الف) فلش آبی رنگ نشان‌دهنده پرچم‌های مچاله و رنگ پریده گلچه جهش یافته *osvp1-2* نسبت به گلچه وحشی است (ب) فلش قرمز رنگ نشان‌دهنده مادگی متورم گلچه وحشی نسبت به گلچه جهش یافته *osvp1-1* است.

Figure 5- A phenotypic comparison of 4 days florets in wild type and mutant plants, A) blue arrow shows crouched and colorless anthers in *osvp1-2* mutant plant compared to the wild type, B) red arrow shows inflated pistil in *osvp1-1* mutant plant compared to the wild type.



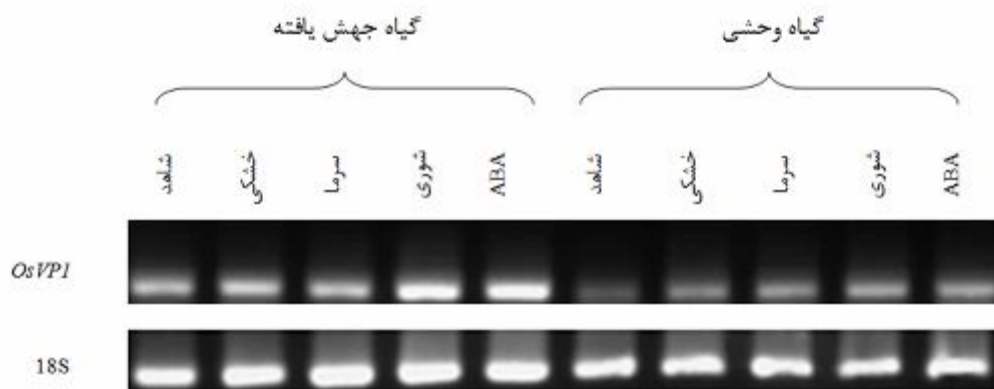
شکل 6- مقایسه صفات فنوتیپی گیاهان جهش یافته *osvp1-1* در دو ژنوتیپ هموزیگوت و هتروزیگوت نسبت به گیاهان وحشی، حروف a, b نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار براساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح 0/05 است.

Figure 6- Phenotypic comparison of *osvp1-1* mutant plants (homozygous and heterozygous genotypes) and the wild type, a-c shows statistically significant difference based on Duncan's multiple range test ($P < 0.05$).



شکل 7- مقایسه رشد رویشی ساقه گیاهچه‌های دوازده روزه از گیاهان جهش یافته *osvp1-1* نسبت به گیاهان وحشی در شرایط خشکی (275 میلی‌مولار مانیتول)، شوری (150 میلی‌مولار NaCl)، سرما (18 درجه سانتی‌گراد) و آبسزیک اسید (10 میکرومولار) حروف a, b نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین گیاهان وحشی و جهش یافته براساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح 0/05 است.

Figure 7- Effects of drought (275 mM manitol), salt (150 mM NaCl), ABA (10 μ M) and cold (18 0C) on shoot length of *osvp1-1* mutant plants compared to the wild type in 12 days seedlings. a and b shows statistically significant difference based on Duncan's multiple range test (P<0.05).



شکل 8- مقایسه بیان ژن *OsVPI* در ساقه گیاهچه‌های دوازده روزه، گیاهان جهش یافته *osvp1-1* نسبت به گیاهان وحشی در خشکی 275 میلی‌مولار، شوری 150 میلی‌مولار NaCl، سرما 18 درجه سانتی‌گراد و آبسزیک اسید 10 میکرومولار. ژن 18S rRNA به عنوان کنترل داخلی در نظر گرفته شده است.

Figure 8- Effects of drought (275 mM manitol), salt (150 mM NaCl), ABA (10 μ M) and cold (18 0C) on *OsVPI* gene expression of *osvp1-1* mutant plants compared to the wild type in 12 days seedlings shoot using RT-PCR. 18S rRNA gene is used as the internal control.

منابع

Cao X, Costa LM, Biderre-Petit C, Kbhaya B, Dey N, Perez P, McCarty DR, Gutierrez Marcos JF, Becraft PW (2007). Abscisic Acid and Stress Signals Induce *Viviparous1* Expression in Seed and Vegetative Tissues of Maize. *Plant Physiology* 143: 720–731.

- Dellaporta L, Wood DJ, And Hicks JB (1983). A plant DNA miniprep: version II. *Plant Molecular Biology* 1: 19-21.
- Finkelstein RR, Rock CD (2002). Abscisic acid biosynthesis and response. *In* CR Somerville, EM Meyerowitz, eds, *The Arabidopsis Book*. American Society of Plant Biologists, Rockville, MD, pp 1–52. <http://www.aspb.org/publications/Arabidopsis>
- Giraudat J, Hauge BM, Valon C, Smalle J, Parcy F, Goodman HM (1992). Isolation of the *Arabidopsis* ABI3 gene by positional cloning. *Plant Cell* 4: 1251-1261.
- Hattori T, Terada T, Hamasuna S (1994). Sequence and functional analyses of the rice gene homologous to the maize *Vp1*. *Plant Molecular Biology* 24: 805-810.
- Hernandez BC, Feng DX, Hu J, Sanchez-Vallet A, Deslandes L, Llorente F, M Berrocal-Lobo, Keller H, Barlet X, Sanchez-Rodriguez C, Anderson LK (2007). Impairment of cellulose synthases required for Arabidopsis secondary cell wall formation enhances disease resistance. *Plant Cell* 19: 890-903.
- Hu H, Dai M, Yao J, Xiao B, Li X, Zhang Q, Xiong L (2006). Overexpressing a NAM, ATAF, and CUC (NAC) transcription factor enhances drought resistance and salt tolerance in rice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 103:12987-12992.
- Jeong, DH, An S, Kang HG, Moon S, Han JJ, Park S, Lee HS, An K, An G (2002). T-DNA Insertional Mutagenesis for Activation Tagging in Rice. *Plant Physiology* 130: 1636-1644.
- 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, Lloyd D, Brisbane, Australia
- Molina L, Mongrand LS, Chua N H (2001). A post germination developmental arrest check point is mediated by abscisic acid and requires the ABI5 transcription factor in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 98: 4782–4787.
- Miyoshi K, Kagaya Y, Ogawa Y, Nagato Y, Hattori T (2002). Temporal and spatial expression pattern of the OSVP1 and OSEM genes during seed development in rice. *Plant Cell Physiology* 43: 307–313.
- Rohde A, De Rycke R, Beeckman T, Engler G, Van Montagu M, Boerjan W (2000). *ABI3* affects plastid differentiation in dark-grown Arabidopsis seedlings. *Plant Cell* 12: 35–52.
- Shinozaki K, Shinozaki YK (2000). Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways. *Curr. Opin. Plant Biology* 3: 217–223.
- Shinozaki K, Shinozak YK (2007). Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *Journal of Experimental Botany* 58: 221–227.
- Shobbar ZS, Oane R, Gamuyao R, de palma J, Malboobi MA, Karimzadeh G, Jalali Javaran M, Bennett J (2008). Abscisic acid stimulates gene expression in cortical fiber and silica cells of rice shoots. *New phytologist* 178.
- Suzuki M, Ketterling MG, Li QB, and McCarty DR (2003). *Viviparous1* alters global gene expression patterns through regulation of abscisic acid signaling. *Plant Physiology* 132: 1664-77.
- Zhang J, Jia W, Yang J, and Ismail AM (2006). Role of ABA in integrating plant responses to drought and salt stresses. *Field Crops Research* 97: 111–119.
- Zhu, JK (2002). Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annual Review of Plant Biology* 53: 247–73.

Functional Analysis of *OsVPI* Using Rice Mutant Lines

Hashemi F.¹, Shobbar Z.S.^{2*}, Majidi M.M.³

1- MSc student, Plant Breeding Department, College of Agriculture, Isfahan University, Esfehan, Iran.

2- Assistant Professor, Department of Molecular Physiology, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Mahdasht Road, Karaj, Alborz, Iran.

3- Assistant Professor, Plant Breeding Department, College of Agriculture, Isfahan University, Isfahan, Iran.

Abstract

ABA-Insensitive3/Viviparous1 (*ABI3/VPI*) genes encode transcription factors involved in ABA signal transduction. The objective of this research is the functional analysis of *OsVPI* gene - ortholog of the maize *VPI* and Arabidopsis *ABI3* in rice- through studying related mutant lines. Therefore, characteristics of the mutants (T-DNA inserted lines in the promoter or coding region of *OsVPI* gene) and wild type rice plants were compared in the vegetative and reproductive stages to clarify the role of this gene. As well, the comparative analysis of the wild and mutant lines (T-DNA inserted in the promoter of *OsVPI* gene) response to abscisic acid treatment and abiotic stresses were done, in addition to the expression analysis of *OsVPI* gene and the candidate downstream genes in 12 day seedlings using real time PCR. Mutant plants in *OsVPI* coding region were pale, subtle and short compared to the wild type, in both vegetative and reproductive growth stages with no yield. Plant height of mutants in *OsVPI* promoter region were less than the wild type. Panicle emergence and grain filling were also delayed compared to the wild type. Abiotic stress induced growth reduction in seedlings of both wild type and mutant plants. Gene expression analysis was revealed that *OsVPI* transcripts levels have been increased under drought, salinity, cold and ABA treatments compared to the control condition. Also, *OsVPI* has up regulated considerably in mutant plant at *OsVPI* promoter region, which were expected because the T-DNA insertion carries several enhancers from 35S promoter of cauliflower mosaic virus. Therefore, it seems *OsVPI* encodes a transcription factor which can play a role in ABA signal transduction pathway and stress induced growth arrest.

Key Words: Rice (*Oryza sativa*), *OsVPI* (*OsViviparous1*), abiotic stress, ABA (Abscisic acid), functional analysis.

* Corresponding Author: Shobbar Z.S.

Tel: 02632703536

Email: shobbar@abrii.ac.ir