بررسی بیان ژن *OsPP2C5*، در شرایط تنشهای غیر زنده (شوری، خشکی و سرما) در برنج

سوده تیرناز[1]، زهرا سادات شبّر[2]*، قاسم محمدی نژاد[3]، غلام حسین شهیدی بنجار [4]

[1، 3 و 4] به ترتیب دانشجوی کارشناسی و اعضای هیأت علمی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان

[2] عضو هیأت علمی بخش بیوانفورماتیک، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی

چکیده

پروتئین فسفاتازهای 2C، گروهی از سرین/ترئونین فسفاتازها 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 اسیدآبسیزیک شناخته‌شده‌اند. نه پروتئین در برنج شناسایی شده‌اند، که دارای تمامی نواحی حفظ شده زیرخانواده مذکور هستند، تنها میزان بیان رونوشت‌های *OsPP2C5* به شدت تحت تأثیر تنش خشکی و هورمون آبسیزیک‌اسید افزایش و با آبیاری مجدد یا حذف اسیدآبسیزیک کاهش می‌یابد. در این پژوهش، الگوی بیان ژن *OsPP2C5* تحت تنش‌های شوری (۱۰۰ میلی مولار نمک (NaCl))، خشکی (۱۸۰ میلی‌مولار مانیتول) و سرما (۱۵ درجه سانتیگراد) در دانه رست‌های دو روزه لاین های IR29 و FL478 (به ترتیب مرجع حساسیت و تحمل به شوری) با استفاده از روش‌های رونویسی معکوس- واکنش زنجیره-ای پلیمراز (RT-PCR) نیمه‌کمی و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در زمان واقعی (Real-time PCR) بررسی شد. میزان بیان ژن *OsPP2C5* در دانه رست‌های هر دو لاین IR29 و FL478 در تنش‌های خشکی و سرما نسبت به تیمارهای شوری و شاهد افزایش یافت. بر اساس نتایج به دست آمده از روش RT-PCR نیمه‌کمی و همردیفی توالی‌های گزارش شده برای ژن مورد نظر در بانک ژن، سه رونوشت برای این ژن شناسایی شد. بیان دو رونوشت قابل تکثیر با آغازگرهای مورد استفاده در روش RT- PCR نیمه‌کمی در هر دو لاین مشاهده شد، اما میزان بیان رونوشت بزرگتر در لاین IR29 و میزان رونوشت کوچکتر (رونوشت اصلی) در لاین FL478 (در شرایط خشکی و سرما) بیشتر بود. به نظر می‌رسد نوع رونوشت و سطح بیان با میزان حساسیت لاین به تنش مورد بررسی، مرتبط است.

واژه های کلیدی: *برنج (Oryza sativa)، بیان ژن، پروتئین فسفاتاز 2C ، تنش‌های محیطی.*

* نویسنده مسئول : زهرا سادات شبر تلفن:0261-2703536 Email: shobbar@abrii.ac.ir

مقدمه

پروتئین فسفاتازهای 2C (PP2Cs) گروهی از سرین/ترئونین فسفاتازهای فراگیر[1] و حفظ‌شده در طی تکامل هستند که در ترارسانی پیام تنش[2] در مخمر، جانوران و گیاهان نقش دارند. گیاهان دارای خانواده بسیار بزرگتر و متنوع‌تری از پروتئین فسفاتازهای 2C نسبت به مخمر و جانوران می باشند (Luan, 2003). ABI1 و ABI2، زیرخانواده‌ای از پروتئین فسفاتازهای 2C، به عنوان جزئی از مسیر ترارسانی پیام اسید آبسیزیک در آرابیداپسیس شناخته شده‌اند (Rodriguez *et al*., 1998; Leung *et al*., 1997). پروتئین فسفاتازهای ABI1 و ABI2 تنظیم‌کننده منفی پیام‌رسانی اسید آبسیزیک می باشند و نقش‌های هم‌پوشانی در کنترل عمل اسید آبسیزیک دارند (Merlot *et al*., 2001). گیاهانی که دارای جهش در نواحی حفظ شده دامنه پروتئین فسفاتازهای C 2 (PP2C) هستند، به طوری که پروتئین ABI1 حاصل بدون هر گونه فعالیت فسفاتازی باشد، نسبت به گیاهان وحشی، در مورد جوانه‌زنی دانه و رشد دانه‌رست‌ها حساسیت بیشتری به اسید آبسیزیک نشان می-دهند. همچنین خفتگی بذر و پاسخ‌های تطابقی به خشکی، در آنها بیشتر است (Gosti *et al*., 1999). نه پروتئین در برنج یافت شدند (OsPP2C1 تا OsPP2C9) که دارای تمامی نواحی حفظ شده و حائز اهمیت زیرخانواده یاد شده بودند. از میان اعضای زیرخانواده *OsPP2C*، تنها میزان رونوشت‌های *OsPP2C5* به شدت تحت تأثیر تنش خشکی و هورمون آبسیزیک اسید افزایش می‌یابد و با آبیاری مجدد یا حذف اسید آبسیزیک، از بیان *OsPP2C5* کاسته می‌شود (Shobbar *et al*., 2007). مطالعه الگوی بیان ژن *OsPP2C5* در تنش شوری، خشکی و سرما روشن خواهد ساخت که آیا این پروتئین فسفاتاز در ترارسانی پیام تمامی این تنش‌ها نقش دارد یا ویژه تنش‌خشکی می‌باشد. از آنجا که خشکی، شوری و سرما مهمترین تنش‌های محیطی هستند که روی رشد و محصول‌دهی گیاهانی مثل برنج تأثیر می‌گذارند، شناسایی ژن‌های درگیر و تعیین الگوهای بیان آنها در پاسخ به تنش‌ها و درک عملکرد آنها در سازگاری با تنش، بستر لازم را برای یافتن راهکارهایی کارآمدتر برای افزایش تحمل به تنش فراهم خواهدساخت.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و اعمال تنش‌ها- این پژوهش در سال 87-1386 در پژوهشکده بیوتکنولوژی

[1] Ubiquitous
[2] Stress signal transduction

کشاورزی[1] انجام گرفت. بذور برنج (*Oryza sativa* L.) دو لاین برگزیده مرجع حساس و متحمل به شوری IR29 و FL478 از موسسه تحقیقات بین المللی برنج[2] تهیه گردید. به منظور بررسی اثر تنش‌های شوری، خشکی و سرما روی دانه‌رست‌ها، ۲ روز پس از جوانه زنی بذور در شرایط شاهد (روی محیط پایه موراشیگی-اسکوگ و دمای 25 درجه سانتیگراد (Murashige & Skoog, 1962) به محیط‌های تنشی مورد نظر منتقل‌شدند. برای تنش شوری و خشکی به ترتیب، دانه‌رست‌ها در محیط مشابه شاهد اما حاوی غلظت ۱۰۰ میلی مولار NaCl و ۱۸۰ میلی مولار مانیتول (غلظت ایزواسموتیک با تیمار شوری) و برای سرما در دمای ۱۵ ^{o}C قرار داده شدند.

استخراج ریبونوکلئیک اسید(RNA) و ساخت DNA مکمل(cDNA)

نمونه برداری دو روز پس از آغاز تنش انجام شد و RNA کل با استفاده از محلول ترایزول ((Trizol reagent (Invitrogen, life technology) از بافت گیاهی (نوساقه دانه‌رست)[3] استخراج گردید. به منظور اطمینان از کیفیت و غلظت مناسب RNA استخراج شده، جذب نمونه-ها در طول موج‌های 260 و 280 نانومتر با استفاده از دستگاه نانودراپ (NanoDrop1000spectrophotometer) خوانده شد، همچنین کیفیت RNAها توسط الکتروفورز ژلی بررسی شد. با توجه به غلظت‌های خوانده شده، RNA ها با آب تیمار شده با دپس (DEPC)[4] رقیق شده و به غلظت 0/5 میکروگرم در میکرولیتر رسیدند. RNA های رقیق شده با آنزیم Promega, RQ1 RNase-free DNase1 (DNase) تیمار شدند سپس RNA های تیمار شده با غلظت‌های مورد استفاده در RT-PCR نیمه‌کمی و Real time PCR به عنوان الگو در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز قرار گرفتند و هیچ تکثیری که نشان‌دهنده‌ی آلوده بودن نمونه‌ها به DNA ژنومی باشد را نشان ندادند. ساخت DNA مکمل با استفاده از کیت (BIO-RAD, iScript cDNA synthesis kit) انجام شد.

طراحی آغازگر- طراحی جفت آغازگرها با استفاده از برنامه الیگو(OLIGO) صورت گرفت. ژن مورد بررسی دارای سه ناحیه کد شونده (اگزون) و دو ناحیه غیرکد شونده (اینترون) می باشد. برای واکنش RT-PCR نیمه‌کمی، جفت آغازگرهای اختصاصی به گونه‌ای طراحی شدند که آغازگر برگشتی در محدوده ناحیه غیر ترجمه شونده ٣´ (٣´ UTR) که برای هر ژن یگانه است و

[1] Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII)

[2] International Rice Research Institute (IRRI)

[3] Seedling shoot

[4] Diethylpyrocarbonate

آغازگر رو به جلو در اگزون ماقبل آخر باشد به طوری که اندازه محصول PCR و RT-PCR متفاوت بوده و قابل تشخیص باشند (جدول 1).

جدول 1- فهرست آغازگرهای اختصاصی ژن *OsPP2C5*.

موقعیت آغازگر Primer position	آغازگر رو به جلو Forward primer	آغازگر برگشتی Reverse primer	دمای ذوب Melting temperature
اینترون- اگزون Exon-Intron	5' GCCCAATCTAACTCTTGCTGC 3'	5' TCGTCCTTGTCCGTCCTCTC 3'	64°C
اینترون-اینترون Intron-Intron	5' CCAAGGACGCAGGTAGTAGG 3'	5' AACCACCCAAGCGACAGTATC 3'	64°C
اگزون- اگزون Exon-Exon	5' TCCATAGGCGACTACTACCTG3'	5' GTTCCTGGCGATCTTGCACG 3'	64°C
اگزون-3'UTR[a] Exon-3'UTR	5' GTCATCAACTGGAACGGTTAC 3'	5' GCGCGATGCCCAAATTAATAG 3'	64°C

a: 3' Untranslated region

Table 1- List of specific primers for *OsPP2C5* gene.

با توجه به نتایج بدست آمده از RT-PCR نیمه‌کمی و مشاهده دو باند در محصول واکنش، مشخص شد که احتمالاً ژن *OsPP2C5* به علت پردازش جایگزین[1] رمزده رونوشت‌های مختلفی است و به منظور بررسی الگوی بیان رونوشت‌های مختلف با روش Real time PCR طراحی آغازگرها به گونه‌ای صورت‌گرفت که با استفاده از هر جفت آغازگر تنها رونوشت مورد نظر به طور اختصاصی تکثیر شود. به این منظور از طریق همردیف کردن توالی‌های گزارش شده برای ژن مورد نظر در بانک ژن NCBI[2] اعم از DNA مکمل (cDNA) و برچسب توالی بیان شونده (EST) انواع رونوشت‌های مختلف آن مشخص شده و سه جفت آغازگر طراحی گردید. جفت اول آغازگرها (معادل قطعه کوچکتر در روش RT-PCR نیمه کمی)، به گونه‌ای طراحی شد که نیمی از آغازگر رو به جلو آن در یک اگزون و نیمه دیگرآن در اگزون بعدی قرار گرفته و آغازگر برگشتی به طور کامل در اگزون آخر قرار گرفته است (اگزون- اگزون). به این ترتیب،

[1] Alternative splicing

[2] National Center for Biotechnology Information

در واکنش PCR تنها DNA مکمل رونوشت اصلی ژن قابل تکثیر هستند. جفت آغازگر دوم معادل قطعه بزرگتر در روش RT-PCR نیمه کمی، به گونه‌ای طراحی شد که آغازگر رو به جلو آن در ناحیه اینترونی دوم قرار گرفته و آغازگر برگشتی به طور کامل در اگزون سوم قرار گرفته (اگزون- اینترون). جفت آغازگر سوم قادر به تکثیر رونوشتی از ژن است که قسمتی از ناحیه اینترونی اول را شامل می‌شود بدین ترتیب آغازگر رو به جلو و برگشتی هر دو در ناحیه اینترونی اول طراحی شدند (اینترون – اینترون) (جدول 1).

مطالعه الگوی بیان ژن – الگوی بیان ژن مورد نظر توسط RT-PCR نیمه‌کمی[1] با استفاده از کیت یک مرحله ای اینویتروژن (SuperScript One-Step RT-PCR with Platinum *Taq*, Invitrogen) و Real-time PCR در سه تکرار آزمایشی با استفاده از کیت BIO-RAD (BIO-RAD, iQ Sybr Green Supermix) و دستگاه (iCycler iQ real-time PCR, Bio-Rad) مطالعه شد. ژن های گلیسرول 3- فسفات دهیدروژناز (*GAPDH*)[2] و ریبونوکلئیک اسید ریبوزومی 18s (18s rRNA) (Jain *et al.*, 2006) به ترتیب در روش‌های RT-PCR نیمه‌کمی و Real time PCR به عنوان کنترل داخلی در نظر گرفته شدند. میزان بیان ژن در روش Real time PCR با روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak *et al.*, 2001) محاسبه شد. در این روش، همه داده‌ها با ژن ریبونوکلئیک اسید ریبوزومی 18s به عنوان کنترل داخلی نرمال (هنجار) شده و سپس میزان تغییرات بیان ژن در تنش‌های مختلف نسبت به شاهد سنجیده شد.

نتایج و بحث

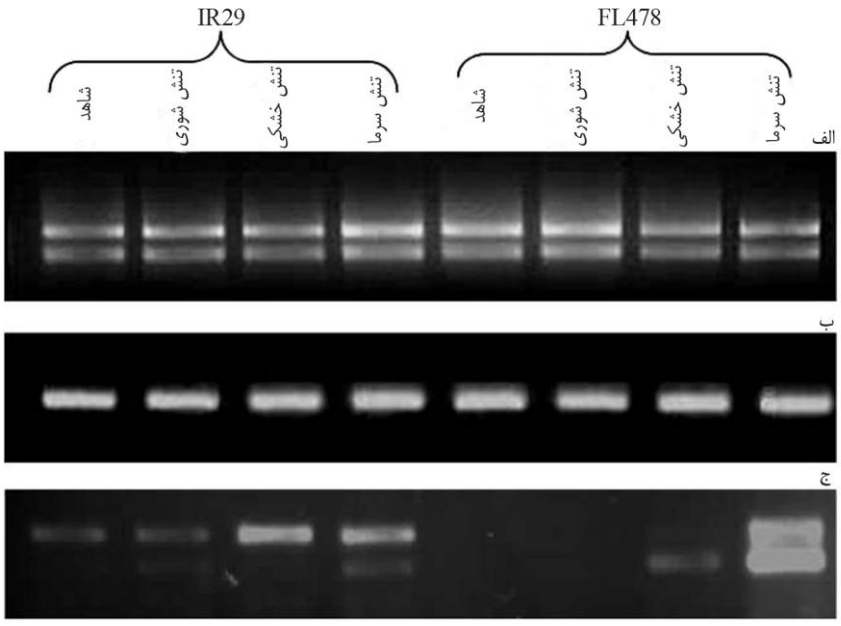
طبق نتایج به دست آمده با روش RT-PCR نیمه‌کمی، میزان بیان ژن *OsPP2C5* در دانه‌رست‌های چهار روزه‌ی (دو روز پس از اعمال تنش) هر دو لاین IR29 و FL478 در تنش‌های خشکی و سرما نسبت به تیمارهای شوری و شاهد افزایش یافت (شکل1 ج). این در حالی است که میزان ریبونوکلئیک اسید به کار رفته در تمامی موارد یکسان بوده (شکل1 الف) و مشابهت میزان بیان ژن گلیسرول 3-فسفات دهیدروژناز نشان دهنده یکسان بودن تکثیرپذیری و عدم وجود DNA ژنومی در ارقام و تیمارهای مختلف است (شکل1 ب). همانطور که در شکل1 (ج) مشاهده می‌شود، برای ژن *OsPP2C5* دو قطعه تکثیر شده که باند کوچکتر دقیقاً معادل اندازه مورد انتظار از ریبونوکلئیک اسید پردازش شده و باند بزرگتر معادل همین اندازه بدون حذف اینترون پایانی است. با توجه به اینکه RNA ها با آنزیم DNase1 تیمارشدند و

[1] Semi Quantitative Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction
[2] Glycerol 3-phosphate dehydrogenase

همچنین قطعه تکثیر شده برای ژن گلیسرول 3-فسفات دهیدروژناز به صورت تک باند و مطابق با اندازه مورد انتظار از DNA مکمل است (نه DNA ژنومی) که نشان دهنده عدم وجود DNA ژنومی در ارقام و تیمارهای مختلف است (شکل 1 ب)، می‌توان نتیجه گرفت به احتمال زیاد این دو قطعه تکثیرشده نمایانگر رونوشت‌های متفاوتی از ژن مورد نظر هستند. وجود رونوشت‌های مختلف از ژن *OsPP2C5* پیش از این نیز گزارش شده است (Shobbar *et al.*, 2007). حذف نشدن اینترون، نوع رایج پردازش جایگزین در برنج و آرابیدوپسیس است (50٪>). با توجه به اینکه پردازش جایگزین به طور تصادفی روی ژن‌ها اتفاق نمی‌افتد، احتمال وقوع پردازش جایگزین در گیاهان روی RNA پیک (mRNA) ژن‌های کدکننده‌ی فاکتورهای رونویسی، گیرنده‌ها و پروتئین‌های درگیر در ترارسانی پیام‌های تنشی بیشتر است (Mazzucotelli *et al.*, 2008). این احتمال وجود دارد که پردازش جایگزین با ایجاد رونوشت‌های ناقص از ژن و از طریق مکانیسم های miRNA[1] و RNAi[2] باعث خاموشی ژن شوند و بیان ژن را تحت تاثیر قرار دهند. با توجه به شکل 1 (ج) بیان هر دو رونوشت در هر دو لاین مشاهده می‌شود، اما میزان بیان رونوشت بزرگتر (جایگزین) در لاین حساس IR29 و میزان رونوشت کوچکتر (اصلی) در لاین مقاوم به شوری FL478 (در شرایط خشکی و سرما) بیشتر مشاهده می‌شود. به نظر می‌رسد میزان بیان با میزان حساسیت لاین به تنش مورد بررسی همخوانی دارد. شبّر و همکاران (2008) در شرایط مشابه کشت، اثر تنش‌های شوری، خشکی و سرما را بر رشد، سطح هیدروژن پراکسید و مالون دی آلدهید، نشت الکترولیتی، محتوای کلروفیل‌ها و کاروتنوئیدها بررسی نمودند و نشان دادند اثر تنش سرمای اعمال شده بر صفات مورد بررسی بیشتر از تنش-های خشکی و شوری بوده است. همچنین نتایج به‌دست آمده تحمل بالاتر لاین FL478 را در مقایسه با IR29، نه تنها نسبت به شوری بلکه نسبت به تنش خشکی نیز مشخص نمود در حالی که در برابر سرما چنین نبود (Shobbar *et al.*, 2008). نتایج حاصل از بررسی میزان بیان رونوشت اصلی ژن *OsPP2C5* (معادل قطعه کوچکتر در روش RT-PCR نیمه کمی) در لاین‌ها و تیمارهای مختلف با روش Real time PCR با نتایج قبلی مطابقت داشت و نشان دهنده ی افزایش بیان تحت تنش‌های خشکی و سرما در دو لاین بود. در تنش شوری رونوشت اینترون-اگزون در هر دو لاین FL478 و IR29 و رونوشت اگزون- اگزون تنها در لاین IR29،

[1] microRNA
[2] RNA interference

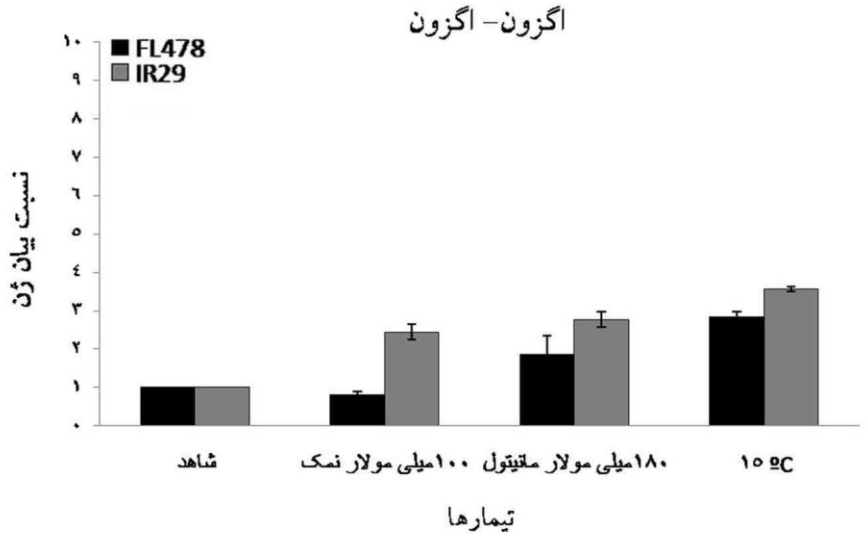
افزایش بیان نشان داد. در تنش خشکی رونوشت اینترون- اگزون در هر دو لاین بیان مشابه نشان داد. برای رونوشت اینترون-اینترون در لاین IR29 در تنش‌های مورد بررسی افزایش بیان قابل توجهی مشاهده نشد، در حالی که بیان این رونوشت در لاین FL478 تحت تنش سرما افزایش بیان یافت (شکل 2).



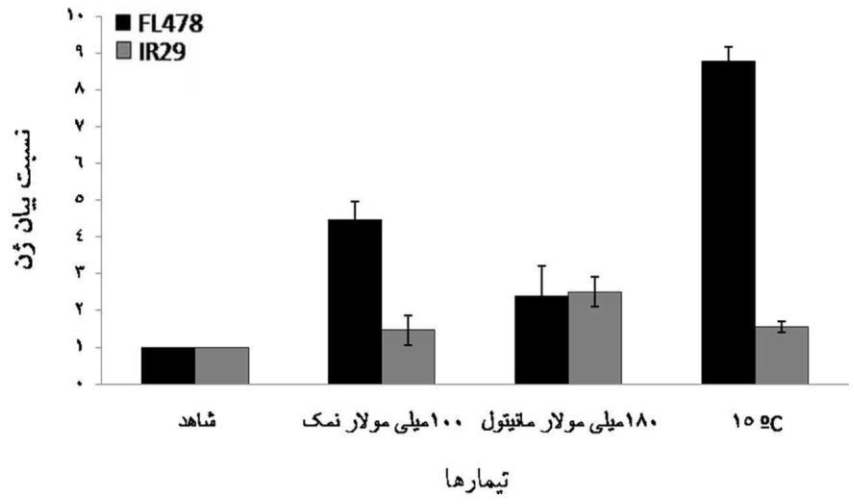
شکل 1- مقایسه الگوی بیان ژن *OsPP2C5* با روش RT-PCR نیمه‌کمی تحت تنش‌های شوری (۱۰۰ میلی مولار نمک (NaCl))، خشکی (۱۸۰ میلی مولار مانیتول) و سرما (۱۵ درجه سانتیگراد) در گیاهچه-های دو روزه دو لاین FL478 و IR29. الف: RNA هنجار شده ب: تشابه میزان بیان ژن گلیسرول 3-فسفات دهیدروژناز در تیمارهای مختلف در دو لاین IR29 و FL478 (که نشان دهنده‌ی یکسان بودن تکثیرپذیری و میزان RNA مورد استفاده و عدم وجود DNA ژنومی است.) ج : الگوی بیان رونوشت اصلی (باند پایینی) و یک رونوشت جایگزین (باند بالایی) ژن *OsPP2C5* تحت شرایط شاهد و تنش های خشکی (۱۸۰ میلی مولار مانیتول)، شوری (۱۰۰ میلی مولار نمک (NaCl) و سرما (۱۵ درجه سانتیگراد).

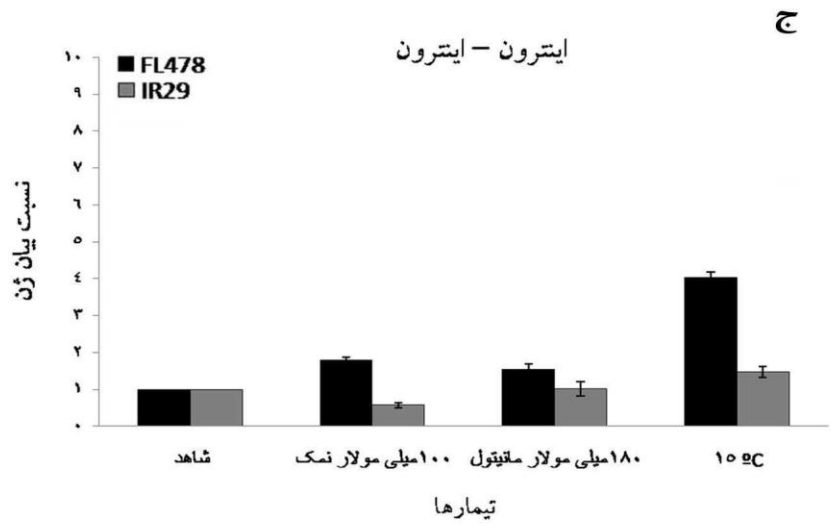
Figure 1- Comparative analysis of *OsPP2C5* gene expression under salt (100 mM NaCl), drought (180 mM mannitol) and cold (15°C) stresses in 2-day-old seedlings of FL478 and IR29 by semi quantitative RT-PCR method.

الف


اگزون- اگزون
FL478
IR29
نسبت بیان ژن
۰
۱
۲
۳
۴
۵
۶
۷
۸
۹
۱۰
شاهد
۱۰۰میلی مولار نمک
۱۸۰میلی مولار مانیتول
۱۵ ºC
تیمارها

ب


اگزون- اینترون
FL478
IR29
نسبت بیان ژن
۰
۱
۲
۳
۴
۵
۶
۷
۸
۹
۱۰
شاهد
۱۰۰میلی مولار نمک
۱۸۰میلی مولار مانیتول
۱۵ ºC
تیمارها



شکل 2- مقایسه الگوی بیان سه رونوشت مختلف ژن *OsPP2C5* با روش Real time PCR تحت تنش های شوری (۱۰۰ میلی مولار نمک (NaCl))، خشکی (۱۸۰ میلی مولار مانیتول) و سرما (۱۵ درجه سانتیگراد) در گیاهچه‌های دو روزه دو لاین FL478 وIR29. هر جفت آغازگر تنها یک رونوشت را به طور اختصاصی تکثیر می‌کند. میله‌های عمودی نشان‌دهنده ± خطای استاندارد سه تکرار آزمایشی هستند. الف : آغازگر اگزون- اگزون: نیمی از آغازگر رو به جلو دراگزون دوم و نیمه دیگرآن در اگزون سوم و آغازگر برگشتی به طور کامل در اگزون سوم قرار گرفته است و بنابراین رونوشت اصلی را تکثیر می‌کند. ب : آغازگر اگزون- اینترون : آغازگر رو به جلو آن در ناحیه اینترونی دوم و آغازگر برگشتی در اگزون سوم قرار گرفته است. ج : آغازگر اینترون – اینترون : آغازگر رو به جلو و برگشتی هر دو در ناحیه اینترونی اول قرار گرفته اند.

Figure 2- Comparative analysis of the expression pattern of three different transcripts of *OsPP2C5* gene under salt (100 mM NaCl), drought (180 mM mannitol) and cold (15°C) stresses in 2-day-old seedlings of FL478 and IR29 by Real time PCR method.

به طور کلی، نتایج نشان دهنده‌ی درگیر بودن ژن *OsPP2C5* در مسیر ترارسانی پیام‌های تنشی می‌باشد، زیرا میزان بیان این ژن در شرایط مختلف تنشی در لاین های مورد مطالعه دستخوش تغییر می‌شود. با توجه به اینکه میزان رونوشت‌های *OsPP2C5* در حضور هورمون آبسیزیک اسید افزایش یافته و با حذف اسید آبسیزیک، از بیان آن کاسته می‌شود (Shobbar *et al.*, 2007) این امکان وجود دارد که تنش‌های شوری، خشکی و سرما از طریق تغییر میزان ABA، بیان این ژن را تحت تأثیر قرار دهند. همچنین بر اساس نتایج به دست آمده، احتمال وقوع پردازش جایگزین در ژن *OsPP2C5* در تنش‌های غیرزیستی تأیید می‌شود. مطالعات اخیر بیانگر این است که پردازش جایگزین، مکانیسم تنظیمی مهمی در بیان ژن و سرانجام عملکرد گیاهان است و تنش‌ها تأثیر قابل توجهی بر پردازش جایگزین mRNA های نابالغ دارند (Reddy, 2007).

مطالعه پروتئین این ژن می‌تواند روشنگر این موضوع شود که تغییراتی که به دلیل پردازش جایگزین روی mRNA اتفاق می‌افتد، آیا می‌تواند منجر به تولید پروتئین‌هایی شود که با حفظ وظیفه در مسیرهای مختلف انتقال پیام و یا شرایط مختلف محیطی ایفای نقش کنند و یا اینکه رونوشت‌های تغییر یافته ترجمه نمی‌شوند و به عنوان یک مکانیسم تنظیمی بیان ژن در مرحله رونویسی عمل می‌کنند. به منظور درک بهتر عملکرد این ژن در شرایط تنش همچنین می‌توان میزان بیان رونوشت‌های مختلف این ژن را در واریته‌های مختلف برنج با درجات متفاوت تحمل به تنش مورد بررسی قرار داد و به رابطه میان میزان بیان رونوشت‌های این ژن و سطح تحمل پی برد. همچنین بررسی بیان ژن در سطوح مختلف تنشی می‌تواند بیانگر وجود و نبود همبستگی میان میزان بیان ژن و شدت تنش باشد. تهیه‌ی جهش یافته های غیر عملگر[1] و بیش بیان[2] برای ژن مورد نظر و بررسی فنوتیپ ها و پاسخ های آنها به تنش‌های غیر زیستی برای درک بهتر عملکرد این ژن مفید خواهد بود.

[1] Knock out mutants
[2] Over expression mutants

منابع

1. 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: 1897-910.
2. Jain M, Nijhawan A, Tyagi AK, Khurana JP (2006) Validation of housekeeping genes as internal control for studying gene expression in rice by quantitative real-time PCR. Biochemical and Biophysical Research Communications 345: 646–651.
3. Kim E, Magen A, Ast G (2006) Different levels of alternative splicing among eukaryotes. Nucleic Acids Research 00(00): 1-7.
4. Leung J, Merlot S, Giraudat J (1997) The Arabidopsis abscisic acid insensitive (ABI2) and ABI1 genes encode homologous protein phosphatases 2C involved in ABA signal transduction. Plant Cell 9: 759–71.
5. Livak KJ, Schmittgen T D (2001) Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Method. Methods 25: 402–408.
6. Luan S (2003) Protein phosphatases in plants. Annual Review of Plant Biology 54: 63–92.
7. Mazzucotelli E, Mastrangelo AM, Crosatti C, Guerra D, Stanca AM, Cattivelli L (2008) Abiotic stress response in plants: When post-transcriptional and post-translational regulations control transcription. Plant Science 174: 420–431.
8. 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 Journal 25: 295-303.
9. Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15: 473-497.
10. Reddy AS (2007) Alternative splicing of pre-messenger RNAs in plants in the genomic era. Annual Review in Plant Biology 58: 267-94.
11. 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.
12. Shobbar MS**,** Shobbar ZS**,** Azhari O, Niknam V, Askari H (2008) Comparative analysis of cold, salinity and drought stresses effects on some physiological parameters of rice seedlings. Proc. of the 1st National Plant Biology Congress. Aug. 13-15, Talesh, Iran. pp. 168-169.
13. Shobbar Z, Malboobi MA, Jalali Javaran M, Karimzadeh Gh, Bennett J (2007) *OsPP2C5*, an ABA and drought stress inducible protein phosphatase 2C in rice. Proc. of the 5th National Biotechnology Congress of Iran. Nov. 24-26, Tehran, Iran. pp. 103.
14. 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.

Gene expression analysis of *OsPP2C5*, a candidate protein phosphatase involved in ABA signal transduction, under salt, drought and cold stress in rice

Tirnaz S.[1], Shobbar Z.S.*[2], Mohamadi-Nejad Gh.[3] , Shahidi Bonjar Gh.H.[4]
[1,3,4] College of Agricultural, Shahid Bahonar University of Kerman, Iran,
[2] Bioinformatics Department, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran

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 these protein phosphatases in Arabidopsis, including ABI1 and ABI2, are known as components of ABA signal transduction pathway. Nine OsPP2C proteins were found in rice (*OsPP2C1* to *OsPP2C9*), carrying all the conserved motifs of this subfamily. 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. In this research, we investigated the effect of drought (180 mM mannitol), salt (100 mM NaCl) and cold (15°C) stresses on *OsPP2C5* gene expression in 2-days-old seedlings of FL478, IR29 by semi quantitative RT-PCR and Real time PCR methods. The expression levels of *OsPP2C5* gene in both cultivars were upregulated by cold and drought stresses compared to control and salt treatment. Three alternative transcripts were identified based on the achieved results by semi quantitative RT-PCR and the alignment of the reported sequences for *OsPP2C5* gene including cDNA and ESTs. The expression of two transcripts amplifiable by the used primers in semi quantitative RT-PCR method were detected in both cultivars while the transcript levels of the bigger transcript was more in IR29 and the transcript levels of the smaller one (original transcript) was higher in FL478 (under drought and cold stress). It seems the transcript type and the expression level is correlated with the cultivar sensitivity to the respected stress.

Key words : *Rice (Oryza sativa), Protein phosphatase 2C, Abiotic stresses, Gene expression*

* Corresponding author :Z.Shobbar Email: shobbar@abrii.ac.ir