بهبود تحمل به شوری در آرابیدوپسیس تالیانا از طریق بیش بیانی یک ژن حسگر کلسیم

لیلا شرقی[۱]، فاطمه محمودی کردی[۱*] و محمد احمدآبادی[۲]

[۱] تبریز، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی

[۲] تبریز، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، دانشکده کشاورزی، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی

تاریخ دریافت: ۹۲/۱۲/۲۵ تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۱/۱۹

چکیده

افزایش در سطح بیان برخی ژن‌های دخیل در تحمل به شوری منجر به بهبود عملکرد گیاه در تنش شوری می شود. تنش شوری مسیر SOS (SALT OVERLY SENSITIVE) را در آرابیدوپسیس تالیانا القا می‌کند. پروتئین SOS۳ نقش مهمی در این مسیر تنظیمی دارد. در این مطالعه cDNAی ژن حسگر کلسیم SOS۳ از گیاه آرابیدوپسیس تالیانا جداسازی و در ناقل pBIN61 و پایین دست پروموتر بیانی CaMV35S کلون شد. پس از انتقال ناقل حاصل به آگروباکتریوم، گیاهان آرابیدوپسیس با استفاده از این سلول‌ها و به روش فلورال دیپ تراریخت شدند. بذرهای گیاهان تراریخت شده جمع‌آوری و در محیط حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین انتخاب شدند. از گیاهان انتخاب شده، DNA استخراج شده و وجود ژن SOS۳ انتقال یافته در ژنوم گیاهان تراریخت به وسیله PCR تایید شد. آزمون میزان تحمل به شوری گیاهان نسل دوم که در محیط‌های با درجات شوری صفر، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌مولار NaCl کشت شده نشان داد که گیاهان تراریخت حاصل، تحمل بیشتری نسبت به گیاهان وحشی در شرایط شوری دارند.

واژه های کلیدی: انتقال ژن، فلورال دیپ، همسانه سازی، تحمل به شوری، *AtSOS3*

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۴۱۲۴۳۲۷۵۰۰ ، پست الکترونیکی: ac.mahmoodi@azaruniv.ac.ir

مقدمه

تنش شوری یکی از تنش‌های مهم غیرزیستی است که اثر منفی بر مقدار و کیفیت محصول گیاهان زراعی دارد. این موضوع از مهم‌ترین مشکلات تولید محصولات کشاورزی در بسیاری از نقاط جهان و به ویژه کشور ما ایران به شـــمار می‌رود. غلظت‌های بالای یون‌های محلول سدیم و کلر در خاک برای بسیاری از گیاهان و از جمله گیاهان زراعی مضر هستند(۲۰). غلظت‌های بالای نمک منجر به تنش یونی و اسمزی شده که آن هم سبب بروز تنش‌های ثانویه مثل تنش اکسیداتیو و اختلالات تغذیه‌ای در گیاه شده و در نهایت منجر به مرگ گیاه می‌شود (۳و۸).

سریع‌ترین پاسخ به تنش شوری، کاهش سرعت رشد سطح برگ است به طوری که با افزایش غلظت نمک رشد برگ متوقف می‌شود(۱۷). تحقیقات نشان داده است که شوری موجب کاهش شدید وزن شاخه‌ها، طول گیاه، تعداد برگ‌ها طول ریشه ، محتوای کلروفیل ،محتوای نسبی آب و در مقابل افزایش نشت الکترولیت در گیاه می‌شود (۱۳و۱).

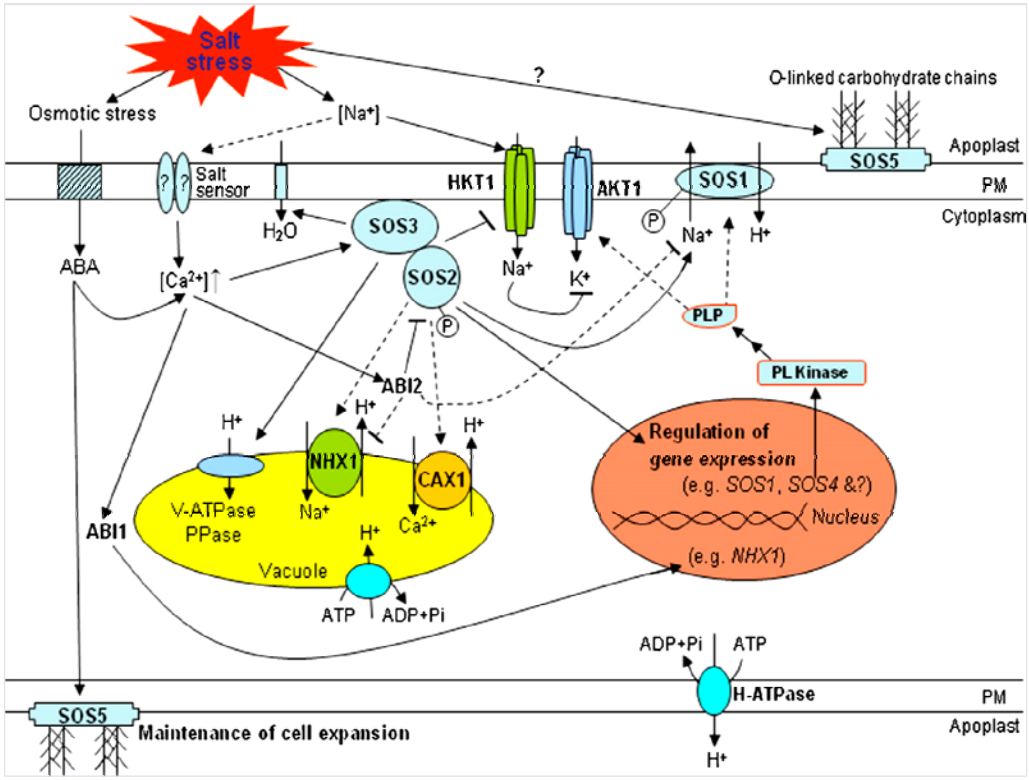
معمولاً مقدار کاروتنوئیدها و کلروفیل b برگ در شرایط تنش شوری کاهش می‌یابد و برگ‌های مسن‌تر زرد می‌شوند هم‌چنین سرعت فتوسنتز در گیاهانی که تحت تاثیر شوری قرار گرفته‌اند پایین است (۲). یکی از راه‌کارهای مهم در جهت بهبود تحمل گیاه به تنش شوری، تولید گیاهان تراریخت از طریق انتقال ژن‌های جدید و یا افزایش در سطح بیان ژن‌هایی است که با تنش شوری

الــقا می‌شوند و برای تحمل به تنش در حد معمولی ضروری هستند(۹).

بخش عمده‌ای از تحمل به شوری در نتیجه‌ی عملکرد ژن‌هایی است که سرعت جذب نمک از خاک و انتقال آن به سراسر گیاه را محدود کرده و تعادل اسمزی و یونی را در ریشه‌ها و اندام‌های هوایی برقرار می‌کنند (۶). مطالعات نشان داده است که افزایش در سطح بیان برخی ژن‌های دخیل در تحمل به شوری منجر به بهبود عملکرد گیاه در تنش شوری شده است (۳). افزایش در سطح بیان ژن‌های تنظیمی مانند فاکتورهای رونویسی و پروتئین کینازها در مسیرهای پیام رسانی سلولی تحمل گیاه را نسبت به شوری افزایش داده است (۱۰و۱۵).

مسیر تنظیمی SOS (SALT OVERLY SENSITIVE) در *Arabidopsis thaliana* نقش مهمی در تنظیم هم ایستایی یونی دارد (۳)و از سه جزء اصلی تشکیل شده است .*SOS1* آنتی پورتر Na^{+}/H^{+} را کد می‌کند که نقش مهمی در خروج یون‌های سدیم از سلول دارد (۱۴). *SOS2* یک پروتئین کیناز سرین/ترئونین را کد می‌کند.*SOS3*پروتئین متصل شونده به Ca^{2+} را کد می‌کند که در ساختار خود دارای ۴ ناحیه اتصال به Ca^{2+} با موتیف EF- hand است و به عنوان حسگر Ca^{2+} عمل می‌کند (۱۱). پروتئین SOS3 برای عملکرد خود، در انتهای Nمریستیله می‌شود.–Nمریستیله شدن، اتصال کووالان اسیدمریستیک به گلیسین واقع در انتهای N، توسط پیوند آمیدی است(۱۹). مقدار Ca^{2+} سیتوپلاسمی پس ازدریافت تنش شوری بوسیله حسگرهای موجود در غشا پلاسمایی بهم می‌خورد. این آشفتگی در مقدار سیتوزولی Ca^{2+}به وسیله SOS3 دریافت می‌شود، سپس SOS3با SOS2 برهم‌کنش می‌کند. مطالعات نشان داده فسفریله شدن سرین در انتهای C در پروتئینSOS3در اثر برهم کنش موثرآن با پروتئین کیناز SOS2یک مکانیسم تنظیمی معمول در آرابیدوپسیس است و این فسفریله شدن موجب تقویت برهم‌کنش این دو پروتئین می‌شود(۵). با اتصال SOS2/SOS3، کمپلکس پروتئین‌کیناز به وسیله موتیف مریستیله SOS3، SOS1را که یک آنتی‌پورتر Na^{+}/H^{+}در غشا پلاسمایی است، فسفریله و فعال می‌کند. فعالیت آنتی‌پورتری SOS1 موجب خروج یون‌هایNa^{+} اضافی می‌شود. از طرفی کمپلکس SOS2/SOS3موجب فعال شدن پروتئین واکوئلی AtNHX1 می‌شود که آن هم ورود یون‌هایCa^{2+} به واکوئل را وساطت می‌کند و به این ترتیب مجموعه برهم‌کنش‌ها در نهایت موجب خروج یون‌هایNa^{+} اضافی از سیتوزول می‌شود (۱۱) (شکل ۱).

هم‌چنین SOS3 از طریق تنظیم ژن AIR1 در تولید و تجمع فلاونوئیدها و آنتوسیانین در مواجهه با تنش شوری نقش دارد (۱۶). علاوه بر این اخیرا مشخص شده که SOS3 در آرابیدوپسیس از طریق شرکت در فرایند تشکیل مجدد وابسته به کلسیم ریزرشته‌های اکتین در تحمل به شوری نقش مهمی ایفا می‌کند(۱۹). گیاهانی که در میزان پروتئین SOS3 کمبود دارند نسبت به تنش شوری بسیار حساس هستند که این پدیده را می‌توان با افزودن کلسیم جبران کرد. تحقیقات نشان داده است که بیان ژن *SOS3* در پاسخ به تنش NaCl افزایش می‌یابد (۱۸). از آنجا که SOS1 برای فعالیت حداکثری خود نیاز به کمپلکس SOS2/SOS3دارد و فعالیت پروتئین AtNHX1 بوسیله مسیر SOS کنترل می‌شود احتمالا فعالیت حداکثری SOS1 و AtNHX1در گیاهان تراریخت نیاز به پروتئین SOS3 دارد. بنابراین بیان بیشینه این ژن می‌تواند توان گیاه را در تحمل به شوری تا حد زیادی بهبود بخشد. اخیرا مشخص شده که بیان بیشینه برخی از ژن‌های دخیل در مسیر تنظیمی SOS در گیاه تنباکونیز موجب افزایش مقاومت به شوری از طریق افزایش خروج یون‌های سدیم از سیتوزول می‌شود (۴).در این مطالعه ما امکان افزایش تحمل به تنش شوری در گیاه آرابیدوپسیس را، از طریق انتقال و افزایش سطح بیان ژن*SOS3* در گیاهان تراریخت مورد بررسی قرار دادیم.



شکل ۱- تنظیم هم ایستایی یونی توسط مسیر تنظیمی SOS برای سازگاری با تنش شوری در گیاه. SOS1، SOS2 و SOS3 سه جزء اصلی این مسیر پیام‌رسانی هستند. تنش شوری سیگنال Ca^{2+} را القا می‌کند که کمپلکس SOS2/SOS3 را فعال می‌سازد که این کمپلکس، آنتی‌پورتر Na^+/H^+ (SOS1) را در غشا فعال می‌کند و هم‌چنین بیان برخی از ژن‌ها را در هسته تنظیم می‌کند. SOS2 هم‌چنین آنتی‌پورتر Na^+/H^+ تونوپلاست را فعال می‌کند که باعث انباشته شدن Na^+ در واکوئل می‌شود (۴).

مواد و روشها

مواد گیاهی و شرایط رشد: بذرهای استریل گیاه آرابیدوپسیس تالیانا اکوتیپ کلمبیا (Col-0) روی محیط موراشیگ و اسکوگ(Murashige–Skoog) به مدت ۷ روز در اتاقک کشت در شرایط ۸ ساعت تاریکی و ۱۶ ساعت روشنایی رشد داده شدند و سپس برگ‌های آرابیدوپسیس به منظور استخراج RNA در نیتروژن مایع منجمد شد.

سنتز و تکثیر cDNA ژن *SOS3* : برای ساخت cDNA ژن *SOS3*، RNA کلی از گیاهان آرابیدوپسیس ۷ روزه استخراج شد. سپس سنجش کمی RNA استخراج شده با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر انجام، و کیفیت آن با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز بررسی شد (شکل ۳-االف).

در ادامه، cDNA ژن *AtSOS3* به طول ۶۶۹ bp با روش RT-PCR و با استفاده از جفت پرایمرهای اختصاصی Forward: 5´ATC CAT GGT CTA GAG GAT GGG) CTG CTC TGT ATC GAA 3´ و Reverse: 5´ATG AAT TCA GAT CTT TAG GAA GAT ACG TTT TGC AA 3´) سنتز شد. سپس روی cDNA، PCR به کمک پرایمرهای اختصاصی ژن که حاوی محل‌های برش آنزیمی *Nco*I و *Xba*I در پرایمر Forward و محل‌های برش آنزیمی *Eco*RI و *Bgl*II درپرایمر Reverse بودند انجام شد. محصول PCR روی ژل آگارز الکتروفورز شد (شکل ۳-ب).

همسانه‌سازی ژن *SOS3* در ناقل بیانی pBIN61: برای ایجاد امکان همسانهسازی قطعه cDNA در ناقل pBIN61، محل‌های برشی آنزیم‌های *Xba*I و *Bgl*II در پرایمرهای

روبه جلو (Forward) و روبه عقب (Reverse) طراحی شد.cDNAژن *SOS3* پس از برش با آنزیم‌های *Xba*I و *Bgl*II و خالص سازی با استفاده از ژل آگارز با دمای ذوب پایین، در بین محل‌های برشی *Xba*I و *Bam*HI ناقل pBIN61 قرار داده شد. این ناقل دارای دو ژن مربوط به مقاومت به آنتی‌بیوتیک کانامایسین است که انتخاب گیاه و باکتری واجد پلاسمید را فراهم می‌کند. در این ناقل ژن *SOS3* در بین پروموتر و ترمیناتور CaMV35S قرار گرفت (شکل ۴).

انتقالناقلpBIN61-SOS3 به گیاه آرابیدوپسیس تالیانا: ناقلpBIN61-SOS3 نوترکیب حاصل به روش شوک الکتریکی به باکتری *Agrobacterium tumefaciens*، سویه LBA4404، منتقل شد. کلنی‌های بدست آمده، پس از تایید به روش PCR، برای انتقال ژن *SOS3* به گیاهان آرابیدوپسیس به روش Floral dip استفاده شدند. بدین ترتیب که ابتدا تک کلنی‌های آگروباکتریوم حاوی پلاسمیدهای نوترکیب در ۳ میلی‌لیتر محیط LBای مایع حاوی آنتی‌بیوتیک‌های کانامایسین و ریفامپیسین تلقیح شده و به مدّت یک شب در انکوباتور شیکردار با سرعت rpm ۲۰۰ و دمای ^{o}C ۲۸ رشد داده شدند. سپس، ۱۰۰ میکرولیتر از کشت باکتری‌ها به ۲۵ میلی‌لیتر از محیط LB مایع حاوی همان آنتی‌بیوتیک‌ها انتقال یافته و به مدّت یک شب در شرایط قبلی رشد داده شدند. در مرحله بعد، کشت‌های آگروباکتریوم به مدّت ۱۰ دقیقه و با سرعت rpm ۴۰۰۰ سانتریفیوژ شده و رسوب سلول‌های باکتری در ۲۵ میلی‌لیتر از محیط کشت مایع دوباره حل شد. در نهایت، از غلظت‌های باکتری با OD_{600} برابر ۰/۵-۰/۴ برای فرایند تراریختی گیاهان آرابیدوپسیس استفاده شد. به ااین ترتیب که، گیاهان آرابیدوپسیس (اکوتیپ کلمبیا) در گلخانه نگهداری شدند تا به مرحله گلدهی وارد شوند. سپس، گل‌های گیاه آرابیدوپسیس درون محلول آگروباکتریوم حاوی ناقل نوترکیب فرو برده شده و به مدّت یک روز توسط پلاستیکی تیره رنگ پوشانده شدند (شکل۲). بذرهای گیاهان آرابیدوپسیس تلقیح شده به وسیله باکتری‌های تراریخت جمع آوری شدند و متعاقب کشت آن‌ها گیاهان تراریخت انتخاب شدند.

شکل ۲- مراحل مختلف ایجاد گیاهان آرابیدوپسیس تراریخت به روش فلورال دیپ. (A) گیاه آماده برای فلورال دیپ. (B) محلول سلولی آگروباکتریوم. (C) وارد کردن گل آذین گیاه به محلول‌سلولی به مدت ۲دقیقه. (D) پوشاندن گل‌ها با نایلون مشکی جهت حفظ رطوبت بالاو تاریکی به مدت ۲۴ ساعت.

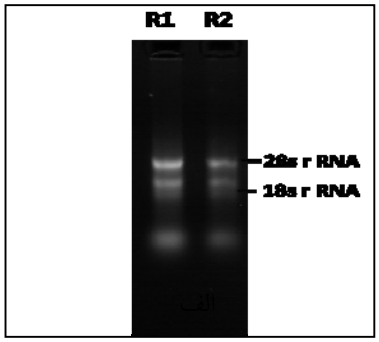
گزینش گیاهان آرابیدوپسیس تراریخت شده: بذرهای بدست آمده از گیاهان آرابیدوپسیس در محیط انتخابی (MS+kanamycin) کشت شدند. گیاهان تراریخت دریافت کننده ژن مقاومت به کانامایسین به رنگ سبز از گیاهان غیر تراریخت که در محیط انتخابی به رنگ زرد بودند، شناسایی شدند (شکل ۵). به منظور تایید حضور ژن *SOS3* در گیاهان آرابیدوپسیس تراریخت، استخراج DNA ژنومی از گیاهان انتخاب شده به روش CTAB انجام گرفت. بدین ترتیب که حدود ۲۰۰ میلی‌گرم از برگ‌های گیاه درون هاون چینی همراه با ۵۰۰ میکرولیتر از بافر CTAB به خوبی ساییده شد. سپس محتویات هاون به تیوب استریل ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل شده و به مدّت ۲۰ دقیقه در دمای ۶۵°C قرار گرفت. سپس یک حجم کلروفرم به نمونه‌ها اضافه و به مدّت ۵ دقیقه ورتکس انجام گرفت. پس از ۵ دقیقه سانتریفیوژ در دمای اتاق با سرعت rpm۱۳۰۰۰، فاز

رویی به تیوب جدید منتقل شده و DNA به روش اتانول رسوب داده شد. رسوب حاصل پس از خشک شدن، در ۳۰ میکرولیتر آب استریل حل شد.

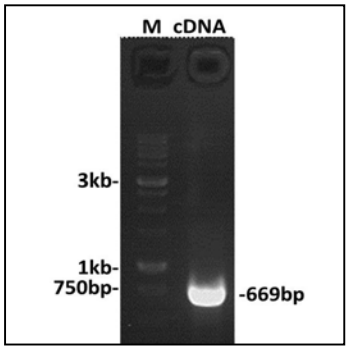
بررسی گیاهان آرابیدوپسیس تراریخت از نظر تحمل به تنش شوری: بمنظور بررسی گیاهان تراریخت آربیدوپسیس از نظر تحمل به شوری گیاهان تراریخت نسل اول (T_1) به گلدان منتقل شد و از آن‌ها بذر تهیه شد. بذرهای بدست آمده از هریک از گیاهان آرابیدوپسیس تراریخت T_1 به طور مجزا در محیط حاوی کانامایسین کشت شد. گیاهان تراریخت نسل دوم (T_2) در محیط انتخابی، فنوتیپ سبز (دریافت عامل تحمل به کانامایسین) و یا فنوتیپ زرد (عدم دریافت عامل تحمل به کانامایسین) را نشان دادند. برای بررسی میزان تحمل آرابیدوپسیس‌های تراریخت به شوری، بذرهای استریل گیاهان نوع وحشی و گیاهان تراریخت نسل دوم در غلظت‌های مختلف صفر، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌مولار NaCl کشت شد (شکل۷).

نتایج و بحث

در میان تنش‌های غیر زیستی که گیاهان با آن مواجه می‌شوند تنش شوری مهم‌ترین عامل محدود کننده میزان محصول گیاهان زراعی بشمار می‌رود.به همین دلیل کاربرد روش‌های مهندسی ژنتیک و بیوتکنولوژی مولکولی بمنظور تولید گیاهان مقاوم به شوری برای فراهم کردن نیاز غذایی جمعیت در حال افزایش جهان از اهمیت بالایی برخوردار است. یک رویکرد مهم برای تولید گیاهان زراعی مقاوم به شوری انتقال ژن‌های عامل تحمل به شوری به گیاهان زراعی می‌باشد (۷). مطالعات نشان داده افزایش بیان اجزای دخیل در مسیر پیام رسانی مقابله با تنش شوری، تحمل گیاهان را در تنش شوریبهبود می‌بخشد. برای مثال افزایش بیان آنتی‌پورتر Na^+/H^+ غشا تونوپلاستی آرابیدوپسیس، AtNHX1، تحت کنترل پروموتور ساختمانی قوی باعث ایجاد آرابیدوپسیس و کلزا (*Brassica napus*) و گوجه‌فرنگی (*Lycopersicum esculentum*) مقاوم به شوری شده است (۹و۱۲). در این تحقیق به منظور بهبود میزان تحمل شوری در گیاه مدل آرابیدوپسیس، پس از استخراج RNA (شکل ۳-الف) cDNA ژن *SOS3* که یک ژن کلیدی در مسیر پیام رسانی SOSدر پاسخ به تنش شوری است و فعالیت آن باعث به راه افتادن چندین مسیر پیام رسانی در پایین دست می‌شود، با استفاده از تکنیک RT-PCRجداسازی (شکل ۳-ب) و به منظور افزایش بیان آن در گیاه پایین دست یک پروموتور قوی در پلاسمید نوترکیب همسانه‌سازی شد.



(الف)

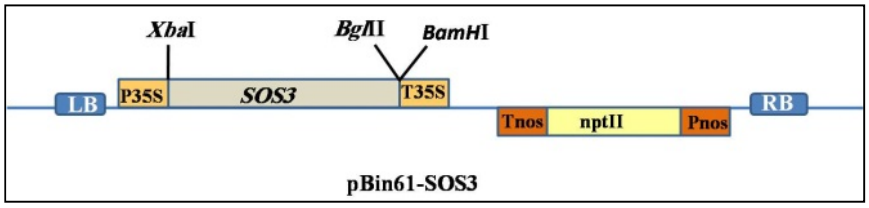


(ب)

شکل ۳- (الف)- نتیجه سنجش کیفیت RNA استخراج شده از گیاه آرابیدوپسیس روی ژل آگارز ۱٪. R1و R2 نشان دهنده دو تکرار جداگانه می باشند. (ب)- الکتروفورز نتیجه PCR حاصل از تکثیر cDNAی ژن *SOS3* (۶۶۹ bp)، با استفاده از جفت پرایمر اختصاصی. M : نشانگر.

به منظور انتقال ژن با روش آگروباکتریوم به آرابیدوپسیس، این ژن در ناقلبیانی pBIN61همسانه سازی شد. در این ناقل ژن *SOS3* در بین پروموتور CaMV35S و ترمیناتور 35S قرار گرفت. پروموتور 35S یک پروموتر ساختمانی قوی

است و باعث بیان بیشینه ژن تقریبا در همه انواع سلول‌ها و بافت‌های گیاه در هر مرحله از نمو گیاه می‌شود (شکل ۴).



شکل ۴- ناقل pBIN61-SOS3: ژن *SOS3* بین پروموتر و ترمیناتور 35S وارد شده است. ژن مورد استفاده برای انتخاب گیاهان تراریخته، *nptII* تحت کنترل پروموتر و ترمیناتور ژن نوپالین سنتاز می‌باشد.

این ناقل دارای ژن تحمل به کانامایسین، تحت کنترل پروموتر یوکاریوتی NOS (نوپالین سنتاز)، در بین توالی‌های مرز برای انتخاب گیاه و یک ژن تحمل به کانامایسین برای انتخاب باکتری است. این ژن باعث ایجاد تحمل در برابر کانامایسین می‌شود. کانامایسین به دلیل برهم‌کنش با زیر واحد 35S ریبوزوم پروکاریوتی از پروتئین‌سازی ممانعت می‌کند. با توجه به شباهت ریبوزوم کلروپلاست با ریبوزوم پروکاریوت‌ها، کانامایسین سبب مختل شدن پروتئین سازی در کلروپلاست و ممانعت از سنتز رنگدانه‌ها می‌شود و همان‌گونه که در نتایج حاصل از گزینش گیاهان تراریختدر این آزمایش قابل مشاهده است (شکل۵)، در نهایت باعث زرد رنگ شدن برگهای گیاه می‌شود (۴). گیاهان تراریخت که ژن *nptII* را دریافت کرده بودند، توانایی سنتز کلروفیل را داشته و قادر به ادامه زندگی در محیط حاوی کانامایسین بودند و به رنگ سبز دیده شدند.

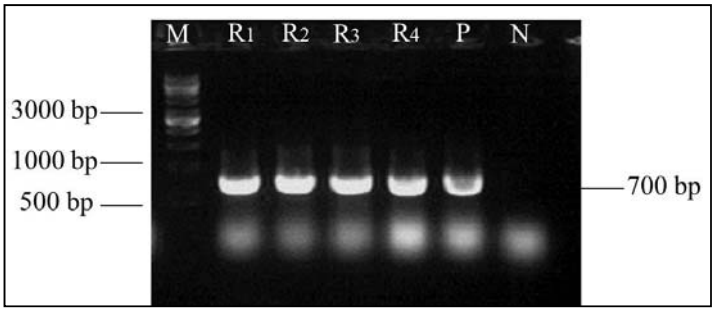
در این مطالعه برای انتقال ژن همسانه‌سازی شده به گیاه آرابیدوپسیس از روش فلورال دیپ استفاده شد که در مقایسه با روش کشت بافت، روشی ساده و سریع است و تنوع سوماکلونال در آن دیده نمی‌شود. همچنین میزان موفقیت در این روش بیشتر است.

برای تایید حضور ترانس‌ژن مورد نظر در گیاهان تراریخته‌ی آرابیدوپسیس، پس از استخراج DNA ژنومی از بافت‌های گیاهان انتخاب شده، واکنش PCR با استفاده از جفت پرایمرهای SOS3F و 35STR انجام شد (شکل ۶).

شکل ۵- گزینش گیاهان تراریخت شده بر روی محیط MS حاوی کانامایسین. گیاهچه‌های سبز مقاوم به کانامایسین با فلش نشان داده شده‌اند.

برای تایید مجدد انتقال موفق کاست‌های ژنی به ژنوم هسته، از آزمون نتاج و نحوه توارث ژن مقاومت به کانامایسین استفاده شد. برای این منظور بذرهای دو گیاه تراریخت نسل اول از نظر بروز صفت سبز و زرد روی محیط گزینشی حاوی کانامایسین شمارش شدند. از نتاج یکی از گیاهان تراریخت نسل اول، تعداد ۱۰۹ گیاه دارای فنوتیپ سبز و ۴۸ گیاه دارای فنوتیپ زرد بودند و از نتاج حاصل از گیاه تراریخت دوم تعداد ۱۴۰ گیاه دارای فنوتیپ سبز و ۶۰ گیاه دارای فنوتیپ زرد بودند(نتایج نشان داده نشده‌اند).تجزیه و تحلیل آماری توسط آزمون کای اسکور در سطح احتمال ۱٪، نشان داد که گیاهان T2 دارای

فنوتیپ سبز و زرد به نسبت ۳ به ۱ بودند. این نتایج، انتقال موفق و توارث مندلی ژن مقاومت به کانامایسین را در گیاهان تراریخت تایید می‌کند.



شکل ۶- الکتروفورز محصول PCR از DNAهای استخراج شده از گیاهان آرابیدوپسیس تراریخت. R1-R4: PCR حاصل از ۴ گیاه تراریخت مستقل،P: کنترل مثبت (DNAی پلاسمید pBIN61-*SOS3*)،N: کنترل منفی (گیاه غیر تراریخت) و M: نشانگر.

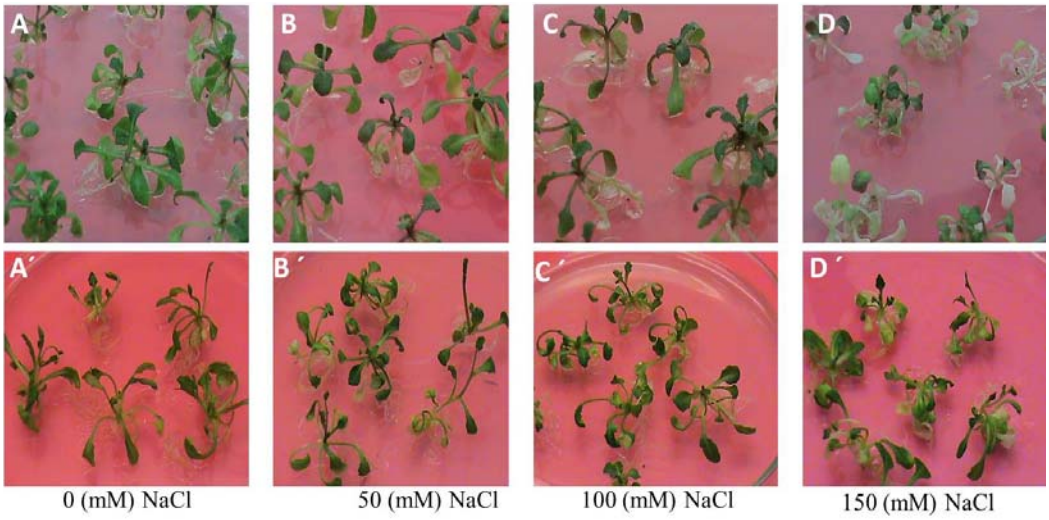
اساسا در تراریختی آرابیدوپسیس به روش فلورال دیپ، به دلیل این‌که فرایند ورود T-DNA در گیاه T_0 بعد از تفکیک گامتوفیت‌های نر و ماده اتفاق می‌افتد، گیاهان T_1 در همه جایگاه‌های ورود T-DNA همی‌زیگوس هستند (۱۳). به دلیل همی‌زیگوس بودن گیاهان T_1 برخی از گیاهان T_2 حاصل از گیاهان T_1 خودگشن، تراریخت نبوده و همان‌طور که در نتایج این آزمایش نیز قابل مشاهده است در محیط انتخابی دارای آنتی‌بیوتیک از بین می‌روند. برخی از گیاهان T_1 دارای چندین جایگاه ورود T-DNA هستند و به همین دلیل نسبت تفکیک مندلی ۳:۱ را نشان نمی‌دهند.در این آزمایش بررسی گیاهان T_2 حاصل از دو گیاه آرابیدوپسیس متفاوت T_1 از نظر آماری صادق بودن نسبت مندلی ۳:۱ رادر مورد این گیاهان نشان داد و وجود فقط یک جایگاه ورود T-DNA در ژنوم این دو گیاه T_1 به اثبات رسید.

بررسی گیاهان تراریخت T_2 آرابیدوپسیس از نظر میزان تحمل به شوری نشان داد که گیاهان آرابیدوپسیس تراریخت نسبت به غلظت (mM) ۱۵۰ از NaClتحمل بیشتری در مقایسه با گیاهان آرابیدوپسیس وحشی دارند و بهتر می‌توانند به رشد خود ادامه دهند، و این بررسی تاییدکننده میزان متفاوت بیان ژن تحمل به شوری و نشان دهنده انتقال و بیان موفق ژن *SOS3*در گیاهان تراریخت می‌باشد (شکل۷).

نتیجه مطالعه تاثیر افزایش بیان ژن‌های *SOS* بر تحمل به شوری توسط Yangو همکارانش بر روی گیاه آرابیدوپسیس، نتایج بدست آمده از افزایش بیان ژن *SOS3* در این مطالعه را تایید می‌کند.با این تفاوت که سازه مورد استفاده در این پژوهش به صورت کاملا مستقل تهیه و به گیاه آرابیدوپسیس منتقل شد (۱۹)و از روش گزینشی کاملا متفاوتی برای انتخاب گیاهان تراریخت شده استفاده شد و به این ترتیب نتایج حاصل از دو پژوهش در تقویت اینکه افزایش بیان ژن *SOS3* سبب افزایش تحمل آرابیدوپسیس به شوری می‌شود، تکمیل کننده هم می‌باشند.

نتیجه‌گیری:

نتایج به دست آمده از این تحقیق بر روی گیاه مدل آرابیدوپسیس نشان داد که افزایش بیان ژن *SOS3* در این گیاهموجب بهبودتحمل به شوری می‌شود. با توجه به گسترش سریع زمین‌های شور در کشور، این مطالعه می‌تواند سرآغاز راهی برای اصلاح سایر گیاهان زراعی و مهم از نظر اقتصادی و کشاورزی در زمینه افزایش تحمل به شوری باشد.



شکل ۷- نتایج حاصل ازبررسی تحمل گیاهان آرابیدوپسیس وحشی و آرابیدوپسیس تراریخت به شوری. شکل نشان‌دهنده گیاهان آرابیدوپسیس وحشی (A-D) و تراریخت (A'-D') تیمار شده با غلظت‌های صفر، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰میلی مولارNaCl است.

تشکر و قدردانی:

از دانشگاه شهید مدنی آذربایجان برای حمایت‌های مادی و معنوی در انجام این پژوهش تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

۱. عموآقایی، ر .قربان نژاد نیریزی، ه.مستاجران، ا. ۱۳۹۳، بررسی اثر شوری بر رشد گیاهچه ، میزان کلروفیل،محتوای نسبی آب و پایداری غشا در دو رقم کلزا. مجله زیست شناسی ایران،جلد۲۷، شماره۲، صفحات ۲۶۸-۲۵۶.

2. Agastian, P., Kingsley, S.J., Vivekanandan, M.2000. Effect of salinity on photosynthesis and biochemical characteristics in mulberry genotypes. Photosynthetica. 38: p. 287–290.

3. Chinnusamy, V., Zhu, J., and Zhu, J.K.(2006).Salt stress signaling and mechanisms of plant salt tolerance. Genet Eng.(N Y). 27: p. 141–177.

4.Demiral, I.T.T.2009. Recent developments in understanding salinity tolerance. Envirnmental and Experimental Botany,. 67: P. 2-9.

5. Du, W., *et al.* 2011.Phosphorylation of SOS3-like calcium-binding proteins by their interacting SOS2-like protein kinases is a common regulatory mechanism in Arabidopsis. PlantPhysiol 156.4: P.2235-2243.

6. Greenway, H., Munns, R. 1980. Mechanisms of salt tolerance in nonhalophytes. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 31: p. 149–190.

7. Hasegawa, P.M., Bressan, R.A., Zhu, J.K., and Bohnert, H.J. 2000. Plant cellular and molecular responses to high salinity.Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 51: p. 463–499.

8. Hagemann, M., Erdmann, N.1997. In: Environmental stresses. Springer,. Heidelberg, Narosa Publishing House, NewDelhi , India(Cyanobacterial Nitrogen Metabolism and Environmental Biotechnology): p. 156–221.

9. Hayashi, H and Murata, N. 1998. Genetically engineered enhancement of salt tolerance in higher plants. Elsevier, Amsterdam: p. 133–148

10. Kasuga, M., Liu, Q., Miura, S., Yamaguchi-Shinozaki, K., and Shinozaki, K. 1999. Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. Nat. Biotechnol. 17: p. 287–291.

11. Liu, J., Zhu, J.-K.1998.A calcium sensor homolog required for plant salt tolerance. Science, 280: p. 1943–1945.

12. Li, D., *et al.* 2013. Overexpression of tomato enhancer of SOS3-1 (LeENH1) in tobacco enhanced salinity tolerance by excluding Na+ from the cytosol. Plant Physiol Biochem-70: P.158-150.

13. Mohammad, M., Shibli ,R., Ajouni, M., Nimri, L.1998. Tomato root and shoot responses to salt stress under different levels of phosphorus nutrition. J. Plant Nutr. 21: P. 1667–1680.

14. Shi, H., Ishitani, M., Kim, C., Zhu, J.-K. 2000. *Arabidopsis thaliana* salt tolerance gene SOS1 encodes a putative Na+/H+ antiporter. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97: p. 6896-6901.

15. Teige, M., Scheikl, E., Eulgem, T., Doczi, R., Ichimura, K., Shinozaki, K., Dangl, J.L., and Hirt, H. 2004. The MKK2 pathway mediates cold and salt stress signaling in Arabidopsis. Mol. Cell.

15:P. 141–152.

16. Van Oosten, M. J., *et al*. 2013. The *Arabidopsis thaliana* mutant air1 implicates SOS3 in the regulation of anthocyanins under salt stress. Plant MolBiol83(4-5): P. 405-415

17. Wang, Y., Nil, N.2000.Changes in chlorophyll, ribulose biphosphate carboxylase oxygenase, glycine betaine content, photosynthesis and transpiration in *Amaranthus tricolor* leaves during salt stress. J. Hortic. Sci. Biotechnol,. 75: P. 623–627.

18. Yang, Q., Z. Z. Chen, *et al*, 2009. Overexpression of SOS (Salt Overly Sensitive) Genes Increases Salt Tolerance in Transgenic Arabidopsis. Mol Plant,. 2(1): p.22-31.

19. Ye, J., *et al*. 2013. Arabidopsis SOS3 plays an important role in salt tolerance by mediating calcium-dependent microfilament reorganization. Plant Cell Rep 32(1): P. 139-148.

20. Zhu, J.K. 2001. Plant salt tolerance. Trends Plant Sci., 6: P. 66–71.

Improving salt tolerance in *Arabidopsis thaliana* via overexpression of a calcium sensor gene

Sharghi L.[1],Mahmoodi Kordi F.[1]and Ahmadabadi M.[2]

[1] Biology Dept., Faculty of Sciences, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, I.R. of Iran

[2] Biotechnology Dept., Faculty of Agriculture , Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, I.R. of Iran

Abstract

Soil salinity is a major limiting factor of agricultural crops in the world. Increase in the level of expression of some genes that involved in salt tolerance of plants, can lead to improving performance. The salt stress induces SALT-OVERLY-SENSITIVE (SOS) pathway in Arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*). SOS3 protein has an important role in this regulatory pathway. In this study, we have isolated the cDNA of AtSOS3 gene and cloned it into the pBIN61 vector under control of CaMV35S expression promoter. Then we have transformed Arabidopsis plants by Agrobacterium containing the recombinant plasmid, by Floral dip method. The mature seeds of transformed plants was selected on the culture media with kanamycin. The presence of the SOS3 transgene in the transgenic plant cells was verified by the PCR method. Analysis of second generation of transgenic and wild type plants for their salt tolerance in different doses (0,50,100,150mM) of NaCl showed that transgenic plants are more tolerant to salinity stress.

Key words: Gene Transformation, Floral dip, Cloning, Salt tolerance, *AtSOS3*.