

## بهبود تحمل به شوری در آرابیدوپسیس تالیانا از طریق بیش‌بیانی یک ژن حسگر کلسیم

لیلا شرقی<sup>۱</sup>، فاطمه محمودی کردی<sup>۱\*</sup> و محمد احمدآبادی<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup> تبریز، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی

<sup>۲</sup> 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 می‌شود. تنش شوری مسیر SOS (SALT OVERLY SENSITIVE) را در آرابیدوپسیس تالیانا القا می‌کند. پروتئین SOS<sup>۳</sup> نقش مهمی در این مسیر تنظیمی دارد. در این مطالعه cDNA ژن حسگر کلسیم SOS<sup>۳</sup> از گیاه آرابیدوپسیس تالیانا جداسازی و در ناقل pBIN61 و پایین دست پروموتور 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. بذره‌های گیاهان تراریخت شده جمع‌آوری و در محیط حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین انتخاب شدند. از گیاهان انتخاب شده، DNA استخراج شده و وجود ژن SOS<sup>۳</sup> 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.

واژه‌های کلیدی: انتقال ژن، فلورال دیپ، همسانه‌سازی، تحمل به شوری، AtSOS3

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

### مقدمه

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 (۱۳ و ۱). 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

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 شمار 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 (۳ و ۸).

سریع‌ترین پاسخ به تنش شوری، کاهش سرعت رشد سطح برگ است به طوری که با افزایش غلظت نمک رشد برگ

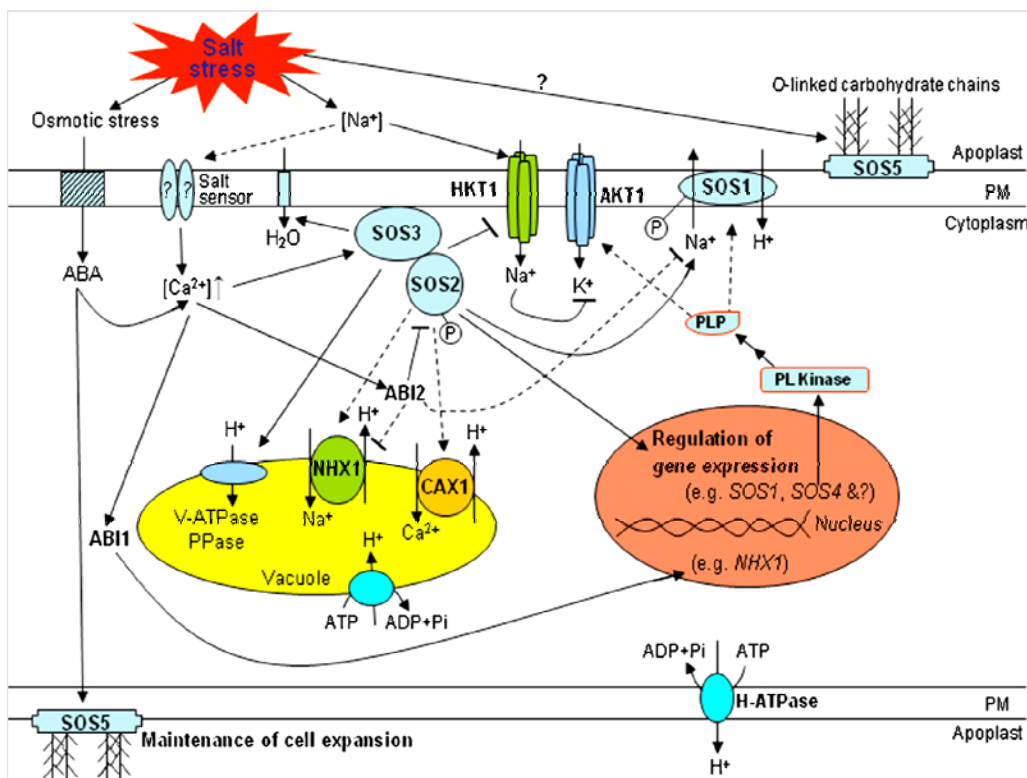
القا می‌شوند و برای تحمل به تنش در حد معمولی ضروری هستند (۹).

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 پروتئین‌کینازها در مسیرهای پیام‌رسانی سلولی تحمل گیاه را نسبت به شوری افزایش داده است (۱۵ و ۱۰).

مسیر تنظیمی (SOS (SALT OVERLY SENSITIVE) در *Arabidopsis thaliana* نقش مهمی در تنظیم هم‌ایستایی یونی دارد (۳) و از سه جزء اصلی تشکیل شده است. *SOS1* آنتی‌پورتر  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  را کد می‌کند که نقش مهمی در خروج یون‌های سدیم از سلول دارد (۱۴). *SOS2* یک پروتئین کیناز سرین/ترونین را کد می‌کند. *SOS3* پروتئین متصل‌شونده به  $\text{Ca}^{2+}$  را کد می‌کند که در ساختار خود دارای ۴ ناحیه اتصال به  $\text{Ca}^{2+}$  با موتیف EF-hand است و به عنوان حسگر  $\text{Ca}^{2+}$  عمل می‌کند (۱۱). پروتئین *SOS3* برای عملکرد خود، در انتهای N، مریستیل می‌شود. N مریستیل شدن، اتصال کووالان اسید مریستیک به گلوسین واقع در انتهای N، توسط پیوند آمیدی است (۱۹). مقدار  $\text{Ca}^{2+}$  سیتوپلاسمی پس از دریافت تنش شوری بوسیله حسگرهای موجود در غشا پلاسمایی بهم می‌خورد. این آشفستگی در مقدار سیتوزولی  $\text{Ca}^{2+}$  به وسیله *SOS3* دریافت می‌شود، سپس *SOS3* با *SOS2* برهم‌کنش می‌کند. مطالعات نشان داده فسفریله شدن سرین در انتهای C در پروتئین *SOS3* در اثر برهم‌کنش موثر آن با پروتئین کیناز *SOS2* یک مکانیسم تنظیمی معمول در آرابیدوپسیس است و این فسفریله شدن موجب تقویت برهم‌کنش این دو

پروتئین می‌شود (۵). با اتصال *SOS2/SOS3*، کمپلکس پروتئین کیناز به وسیله موتیف مریستیل *SOS3*، *SOS1* را که یک آنتی‌پورتر  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  در غشا پلاسمایی است، فسفریله و فعال می‌کند. فعالیت آنتی‌پورتری *SOS1* موجب خروج یون‌های  $\text{Na}^+$  اضافی می‌شود. از طرفی کمپلکس *SOS2/SOS3* موجب فعال شدن پروتئین واکوئلی *AtNHX1* می‌شود که آن هم ورود یون‌های  $\text{Ca}^{2+}$  به واکوئل را وساطت می‌کند و به این ترتیب مجموعه برهم‌کنش‌ها در نهایت موجب خروج یون‌های  $\text{Na}^+$  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 اخیراً 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  $\text{NaCl}$  افزایش می‌یابد (۱۸). از آنجا که *SOS1* برای فعالیت حداکثری خود نیاز به کمپلکس *SOS2/SOS3* دارد و فعالیت پروتئین *AtNHX1* بوسیله مسیر *SOS* کنترل می‌شود احتمالاً فعالیت حداکثری *SOS1* و *AtNHX1* در 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. اخیراً 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. SOS2، SOS1 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:** بذره‌های استریل گیاه آراییدوپسیس 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 آراییدوپسیس به منظور استخراج RNA در نیتروژن مایع منجمد شد.

**سنتز و تکثیر cDNA ژن SOS3:** برای ساخت cDNA ژن SOS3، RNA کلی از گیاهان آراییدوپسیس 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-الف).

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 ) Reverse: 5' ATG و CTG CTC TGT ATC GAA 3' AAT TCA GAT CTT TAG GAA GAT ACG TTT به (TGC AA 3' سنتز شد. سپس روی cDNA، PCR به کمک پرایمرهای اختصاصی ژن که حاوی محل‌های برش آنزیمی *XbaI* و *NcoI* در پرایمر Forward و محل‌های برش آنزیمی *BglIII* و *EcoRI* در پرایمر 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 *XbaI* و *BglIII* در پرایمرهای

(شکل ۲). بذره‌های گیاهان آراییدوپسیس تلقیح شده به وسیله باکتری‌های تراریخت جمع‌آوری شدند و متعاقب کشت آن‌ها گیاهان تراریخت انتخاب شدند.



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

**گزینش گیاهان آراییدوپسیس تراریخت شده:** بذره‌های بدست آمده از گیاهان آراییدوپسیس 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 آراییدوپسیس 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 مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۶۵°C قرار گرفت. سپس یک حجم کلروفرم به نمونه‌ها اضافه و به مدت ۵ دقیقه ورتکس انجام گرفت. پس از ۵ دقیقه سانتریفیوژ در دمای اتاق با سرعت ۱۳۰۰۰rpm، فاز

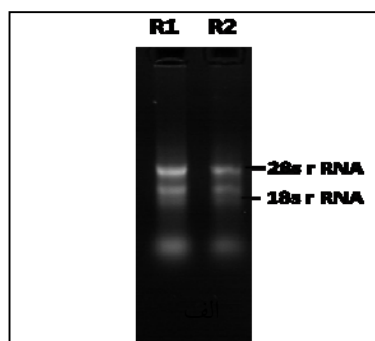
روبه جلو (Forward) و روبه عقب (Reverse) طراحی شد. cDNA ژن *SOS3* پس از برش با آنزیم‌های *XbaI* و *BglIII* و خالص سازی با استفاده از ژل آگارز با دمای ذوب پایین، در بین محل‌های برشی *XbaI* و *BamHI* ناقل pBIN61 قرار داده شد. این ناقل دارای دو ژن مربوط به مقاومت به آنتی‌بیوتیک کانامایسین است که انتخاب گیاه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

#### انتقال ناقل pBIN61-SOS3 به گیاه آراییدوپسیس تالیانا:

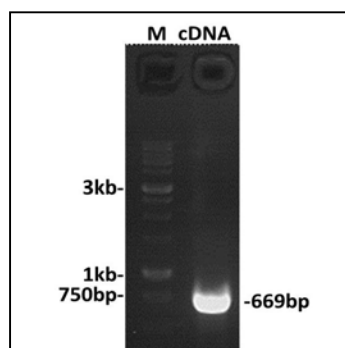
ناقل pBIN61-SOS3 نوترکیب حاصل به روش شوک الکتریکی به باکتری *Agrobacterium tumefaciens* سویه LBA4404، منتقل شد. کلنی‌های بدست آمده، پس از تایید به روش PCR، برای انتقال ژن *SOS3* به گیاهان آراییدوپسیس به روش Floral dip استفاده شدند. بدین ترتیب که ابتدا تک کلنی‌های آگروباکتریوم حاوی پلاسمیدهای نوترکیب در ۳ میلی‌لیتر محیط LB ای مایع حاوی آنتی‌بیوتیک‌های کانامایسین و ریفامپیسین تلقیح شده و به مدت یک شب در انکوباتور شیکردار با سرعت ۲۰۰ rpm و دمای ۲۸°C رشد داده شدند. سپس، ۱۰۰ میکرولیتر از کشت باکتری‌ها به ۲۵ میلی‌لیتر از محیط LB مایع حاوی همان آنتی‌بیوتیک‌ها انتقال یافته و به مدت یک شب در شرایط قبلی رشد داده شدند. در مرحله بعد، کشت‌های آگروباکتریوم به مدت ۱۰ دقیقه و با سرعت ۴۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شده و رسوب سلول‌های باکتری در ۲۵ میلی‌لیتر از محیط کشت مایع دوباره حل شد. در نهایت، از غلظت‌های باکتری با OD<sub>600</sub> برابر ۰/۴-۰/۵ برای فرایند تراریختی گیاهان آراییدوپسیس استفاده شد. به این ترتیب که، گیاهان آراییدوپسیس (اکوتیپ کلمبیا) در گلخانه نگهداری شدند تا به مرحله گلدهی وارد شوند. سپس، گل‌های گیاه آراییدوپسیس درون محلول آگروباکتریوم حاوی ناقل نوترکیب فرو برده شده و به مدت یک روز توسط پلاستیکی تیره رنگ پوشانده شدند

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 آراییدوپسیس تراریخت از نظر تحمل به تنش شوری:** بمنظور بررسی گیاهان تراریخت آراییدوپسیس از نظر تحمل به شوری گیاهان تراریخت نسل اول (T<sub>1</sub>) به گلدان منتقل شد و از آن‌ها بذر تهیه شد. بذرهای بدست آمده از هریک از گیاهان آراییدوپسیس تراریخت T<sub>1</sub> به طور مجزا در محیط حاوی کانامایسین کشت شد. گیاهان تراریخت نسل دوم (T<sub>2</sub>) 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 آراییدوپسیس‌های 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 (شکل ۷).



(الف)



(ب)

شکل ۳- (الف)- نتیجه سنجش کیفیت RNA استخراج شده از گیاه آراییدوپسیس روی ژل آگارز ۱٪. R1 و R2 نشان دهنده دو تکرار جداگانه می‌باشند. (ب)- الکتروفورز نتیجه PCR حاصل از تکثیر cDNAی ژن *SOS3* (۶۶۹ bp)، با استفاده از جفت پرایمر اختصاصی. M: نشانگر.

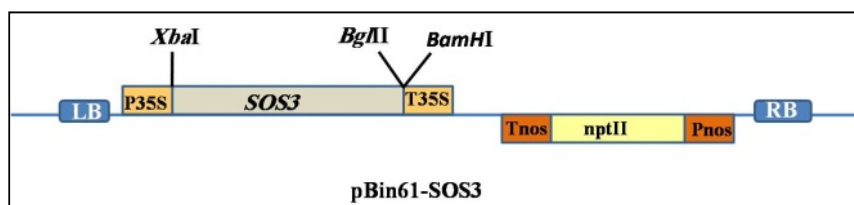
به منظور انتقال ژن با روش آگروباکتریوم به آراییدوپسیس، این ژن در ناقلیانی pBIN61 همسانه سازی شد. در این ناقل ژن *SOS3* در بین پروموتور CaMV35S و ترمیناتور 35S قرار گرفت. پروموتور 35S یک پروموتور ساختمانی قوی

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 پیام‌رسانی مقابله با تنش شوری، تحمل گیاهان را در تنش شوریهبهد می‌بخشد. برای مثال افزایش بیان آنتی‌پورتر  $Na^+/H^+$  غشا تونوپلاستی آراییدوپسیس، *AtNHX1*، تحت کنترل پروموتور ساختمانی قوی باعث ایجاد آراییدوپسیس و کلزا (*Brassica napus*) و گوجه‌فرنگی (*Lycopersicon*)

## نتایج و بحث

نتایج حاصل از بررسی‌های انجام شده در این مطالعه نشان داد که گیاهان تراریخت آراییدوپسیس در مقایسه با گیاهان وحشی، تحمل بیشتری به تنش شوری دارند. این یافته‌ها با نتایج سایر محققان در زمینه تحمل گیاهان زراعی به تنش شوری همخوانی دارد. همچنین، نتایج این مطالعه نشان داد که گیاهان تراریخت آراییدوپسیس در مقایسه با گیاهان وحشی، تحمل بیشتری به تنش شوری دارند. این یافته‌ها با نتایج سایر محققان در زمینه تحمل گیاهان زراعی به تنش شوری همخوانی دارد. همچنین، نتایج این مطالعه نشان داد که گیاهان تراریخت آراییدوپسیس در مقایسه با گیاهان وحشی، تحمل بیشتری به تنش شوری دارند. این یافته‌ها با نتایج سایر محققان در زمینه تحمل گیاهان زراعی به تنش شوری همخوانی دارد.

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



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

این ناقل دارای ژن تحمل به کانامایسین، تحت کنترل پروموتور 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 پروتئین‌سازی در کلروپلاست و ممانعت از سنتز رنگدانه‌ها می‌شود و همان‌گونه که در نتایج حاصل از گزینش گیاهان تراریخته‌تر این آزمایش قابل مشاهده است (شکل ۵)، در نهایت باعث زرد شدن برگ‌های گیاه می‌شود (۴). گیاهان تراریخته 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.



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

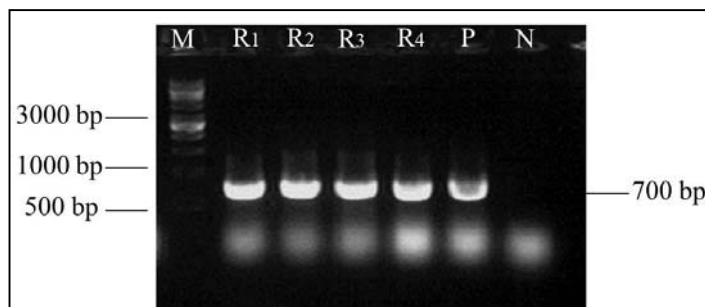
برای تایید مجدد انتقال موفق کاست‌های ژنی به ژنوم هسته، از آزمون نتاج و نحوه توارث ژن مقاومت به کانامایسین استفاده شد. برای این منظور بذرهاى دو گیاه تراریخته نسل اول از نظر بروز صفت سبز و زرد روی محیط گزینشی حاوی کانامایسین شمارش شدند. از نتاج یکی از گیاهان تراریخته نسل اول، تعداد ۱۰۹ گیاه دارای فنوتیپ سبز و ۴۸ گیاه دارای فنوتیپ زرد بودند و از نتاج حاصل از گیاه تراریخته 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

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

فنوتیپ سبز و زرد به نسبت ۳ به ۱ بودند. این نتایج، انتقال موفق و توارث مندلی ژن مقاومت به کاناماسین 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 (DNA پلاسمید pBIN61-SOS3)، N: کنترل منفی (گیاه غیر تراریخت) و M: نشانگر.

دهنده انتقال و بیان موفق ژن *SOS3* در گیاهان تراریخت می‌باشد (شکل ۷).

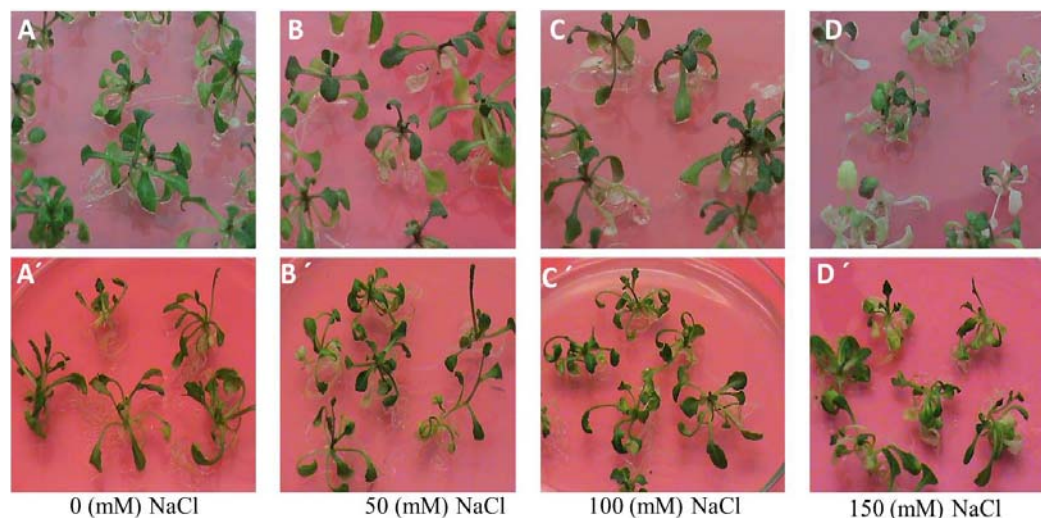
نتیجه مطالعه تاثیر افزایش بیان ژن‌های *SOS* بر تحمل به شوری توسط Yang و همکارانش بر روی گیاه آرابیدوپسیس، نتایج بدست آمده از افزایش بیان ژن *SOS3* در این مطالعه را تایید می‌کند. با این تفاوت که سازه مورد استفاده در این پژوهش به صورت کاملاً مستقل تهیه و به گیاه آرابیدوپسیس منتقل شد (۱۹) و از روش گزینشی کاملاً 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 گیاه موجب بهبود تحمل 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.

اساساً 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 هم‌زیگوس هستند (۱۳). به دلیل هم‌زیگوس 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 را در 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 ۱۵۰ (mM) NaCl تحمل 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



شکل ۷- نتایج حاصل از بررسی 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 ۱۵۰ میلی مولار NaCl است.

معنوی در انجام این پژوهش تشکر و قدردانی می‌شود.

#### تشکر و قدردانی:

از دانشگاه شهید مدنی آذربایجان برای حمایت‌های مادی و

#### منابع

۱. عمواقی، ر. قربان نژاد نیری، ه. مستاجران، ا. ۱۳۹۳، بررسی اثر شوری بر رشد گیاهچه، میزان کلروفیل، محتوای نسبی آب و responses to high salinity. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 51: p. 463-499.
۲. Agastian, P., Kingsley, S.J., Vivekanandan, M. 2000. Effect of salinity on photosynthesis and biochemical characteristics in mulberry genotypes. *Photosynthetica*. 38: p. 287-290.
۳. 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.
۴. Demiral, I.T.T. 2009. Recent developments in understanding salinity tolerance. *Environmental and Experimental Botany*. 67: P. 2-9.
۵. 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. *Plant Physiol* 156.4: P.2235-2243.
۶. Greenway, H., Munns, R. 1980. Mechanisms of salt tolerance in nonhalophytes. *Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 31: p. 149-190.
۷. Hasegawa, P.M., Bressan, R.A., Zhu, J.K., and Bohnert, H.J. 2000. Plant cellular and molecular factor. *Nat. Biotechnol.* 17: p. 287-291.
۸. Hagemann, M., Erdmann, N. 1997. In: *Environmental stresses*. Springer, Heidelberg, Narosa Publishing House, New Delhi, India (Cyanobacterial Nitrogen Metabolism and Environmental Biotechnology): p. 156-221.
۹. Hayashi, H and Murata, N. 1998. Genetically engineered enhancement of salt tolerance in higher plants. Elsevier, Amsterdam: p. 133-148
۱۰. 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.
۱۱. 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<sup>+</sup> 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<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> 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 Mol Biol*83(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.<sup>1</sup>, Mahmoodi Kordi F.<sup>1</sup> and Ahmadabadi M.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Biology Dept., Faculty of Sciences, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, I.R. of Iran

<sup>2</sup> 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, 150 mM) of NaCl showed that transgenic plants are more tolerant to salinity stress.

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