

جداسازی ژن (GmNARK) ناقل کلسیم و بررسی الگوی بیانی آن در سویا جداسازی

ژن (GmNARK) ناقل کلسیم و بررسی الگوی بیان آن در سویا

علی ایزدی دربندی^{1*}، مارک کینکما²، پیتر گرشوف²، بهمن یزدی صمدی³، منصور امید³

¹ عضو هیأت علمی گروه علوم زراعی و اصلاح نباتات، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران

² اعضای هیأت علمی موسسه عالی تحقیقات تلفیقی حبوبات (CILR)، دانشگاه کوینزلند استرالیا

³ اعضای هیأت علمی گروه زراعت و اصلاح نباتات، پردیس کرج، دانشگاه تهران

چکیده

برخی گیاهان از طریق تثبیت زیستی قادر به استفاده از نیتروژن هوا هستند. در سویا گره‌های تثبیت نیتروژن حاصل از اثر متقابل بین باکتری *Bradyrhizobium japonicum* و ریشه گیاه است. از این همزیستی هر دو موجود سود می‌برند باکتری قند و گیاه، نیتروژن احیاء شده به دست می‌آورد. خود تنظیمی گره‌زایی حاصل از بیان ژن GmNARK در برگ سویا، مهمترین سازوکار ژنتیکی تنظیم این فرایند است. این سازوکار یک شبکه پیام‌رسانی دوردست می‌باشد که پس از آغاز گره‌زایی از حالت بیش افزایی آن جلوگیری می‌شود. آزمایش‌های ریزآرایه افیمتریکس و Real time RT-PCR روی برگ انواع وحشی و جهش‌یافته GmNARK یا فوق گره‌زایی، سویا نشان داد که بیان ژن با شناسه افیمتریکس GmaAffx.32318.1 در تیپ وحشی نسبت به جهش یافته در بافت برگ با رفتاری مستقل از آلودگی ریزوبیومی کاهش یافته است. نتایج همسانه‌سازی و تعیین توالی نشان داد که این ژن نامزد رمز کننده یک ناقل کلسیمی است. توالی حاصل با 2460 جفت باز شامل بخش رمز کننده و قسمتی از نواحی بالادست و پایین دست ژن بوده است. پروتئین پیش بینی شده شامل 202 اسید آمینه و دارای 5 دومین بین غشایی است که می‌تواند نقش گیرنده سلولی یا ناقل مولکولی را داشته باشد که دارای 70 درصد همسانی با هترولوگوس ناقل کلسیمی خود در آراییدوپسیس است.

کلمات کلیدی: سویا، خودتنظیمی گره‌زایی، ناقل کلسیم، همسانه سازی، ژنهای تثبیت ازت و PCR کمی.

رخدادهای آغازین گره زایی حالت بازدارنده برای مراحل بعدی تشکیل گره دارد (Gresshoff, 2003). بیشتر جهش یافته های AON که دارای فنوتیپ فراگرهزایی یا بیش گرهزایی هستند، از نظر گره زایی متحمل به نترات هستند (Carroll et al., 1985a & b). همسانه کردن یکی از ژن های مسئول فنوتیپ فوق گرهزایی³ در سویا به نام GmNARK⁴ یا گیرنده کینازی خود کنترلی گرهزایی (Searle et al., 2003)، در Lotus معروف به فراگرهزایی و ریشه های غیر نرمال یا HAR1⁵ (Krusell et al., 2002; Nishimura et al., 2002) و در یونجه به نام SUNN⁶ یا تعداد گره فوق العاده، نشان داد که یک پروتئین شبه گیرنده کینازی غنی از لوسین و بین غشایی، نقش کلیدی را در مسیر پیام رسانی AON بر عهده دارد. یک جهش نقطه ای در این ژن ها عامل فنوتیپ جهش یافته است. اگر چه رونوشت های GmNARK، HAR1 و SUNN در دو بافت ریشه و ساقه به صورت فعال دیده می شود (Yamamoto et al., 2000; Schnabel et al., 2005)، آزمایش های پیوند زدن نشان داده است که فنوتیپ گرهزایی توسط ساقه کنترل می شود. در سازوکار AON، پیام ریشه ای حاصل از تحریک ریزوبیومی، به فعال شدن گیرنده شبه کینازی غنی از LRR در شاخه می انجامد (Caetano-Anollés et al., 1991);

نیاز گیاهان به نیتروژن، بیشترین محدودیت غذایی آنها محسوب می شود. تامین این عنصر از طریق کودهای شیمیایی علاوه بر هزینه های هنگفت، آثار منفی زیست محیطی جبران ناپذیری دارد. تثبیت زیستی نیتروژن به روش همزیستی یک سری از باکتری های خاک به نام ریزوبیوم و ریشه این گیاهان (مانند سویا، نخود، لوبیا، شبدر و...) صورت می گیرد. در این همزیستی، اندام جدیدی به نام گره تشکیل می شود و هر دو موجود از همدیگر سود می برند؛ باکتری قند و گیاه نیتروژن احیا شده اتمسفر را به دست می آورد. این همیاری منحصر به فرد، موجب شده است تا حبوبات از جنبه کشاورزی پایدار با تامین کود زیستی نیتروژنه، فوق العاده مفید و مورد توجه قرار گیرند. افزون بر این، تشکیل گره از جنبه نموی نیز مهم می باشد. (Gresshoff, 2004). برخلاف اطلاعات موجود درباره تشکیل گره، آگاهی کمی از حوادث مولکولی درگیر در تنظیم گره زایی وجود دارد. تنظیم گره زایی در حبوبات برای برقراری توازن بین فواید تثبیت نیتروژن با رشد و نمو گیاه لازم است (Gresshoff et al., 1986; Caetano-Anollés et al., 1991). مسیر اصلی کنترل گره زایی تحت عنوان خود تنظیمی گره زایی یا AON¹ خوانده می شود. خود تنظیمی گره زایی شامل پیام رسانی دوردست² بین ریشه و ساقه است، به طوری که

² Supernodulation

³ Glycine max nodule autoregulation receptor kinase

⁴ Hypernodulation and abnormal roots

⁵ Super nodule number

¹ Autoregulation of Nodulation

² Long-Distance Signaling

موجب پیدایش فنوتیپ فراگره‌زایی گردید، در حالی که پیوند وارونه موجب پیدایش حالت نرمال گره‌زایی شد (Delves et al., 1986). اگر چه این گیرنده‌های شبه‌کینازی در مسیرهای همزیستی و غیرهمزیستی دارای نقش مشخص می‌باشند، با این حال سازوکارهای پایین دست آنها شناسایی نشده است (Lohar et al., 2003).

بررسی‌های زیادی با روش ژنتیک مستقیم جهت شناسایی ژن‌های درگیر در گره‌زایی انجام شده است (Kinkema et al., 2006; Stacey et al., 2006). این ژن‌ها به عنوان گیرنده‌های آغازین پیام ریزویومی، پیش بینی شده‌اند که می‌توانند یک گیرنده شبه‌کینازی، دومین-LysM (Nakamura et al., 2003; Lohar et al., 2003)، گیرنده شبه‌کینازی غنی از لوسین LRR (Nishimura et al., 2002)، کانال‌های کاتیونی غشای پلاسمایی (Kanamori et al., 2006)، کیناز کالمادولین وابسته به کلسیم (Lévy et al., 2004; Mitra et al., 2004a)، عامل‌های رونویسی (Smit et al., 2005) و ناقل‌های سولفاتی (Krusell et al., 2002) باشند. عامل‌های گره‌زایی توسط گیرنده‌های کینازی نوع LysM در غشای پلاسمایی دریافت می‌شوند (Radutoiu et al., 2003). در سویا ژن‌های NRF1 و NRF5 این نقش را بر عهده دارند (Lohar & Bird, 2003) که جهش در اینها یا همسانه‌های آنها در نخود فرنگی و *M. truncatula* موجب عدم گر-زایی می‌شود. در ادامه یک گیرنده NBS-LRR، به

(Delves et al., 1986). در ادامه فعالیت این گیرنده شبه‌کینازی منجر به تولید یک بازدارنده از ساقه‌گردیده که تعداد گره در ریشه را تنظیم می‌کند. تاکنون ماهیت پیام‌های ریشه و ساقه شناخته نشده است و معلوم نیست که چگونه گیرنده شبه‌کینازی LRR پیام‌رسانی دوردست را موجب می‌شود. جهش یافته‌های AON، با تغییرات دیگری در رشد ریشه (Day et al., 1986; Schnabel et al., 2005; Szczyglowski et al., 1998)، افزایش میکوریزا (Solaiman et al., 2000; Meixner et al., 2005) و مقاومت نماتدی (Mitra et al., 2004a) همراه است. جهش یافته‌های har1, Gmnrk و sunn در شرایط عدم تلقیح ریزویومی، نسبت به تیپ وحشی دارای ریشه‌های کوتاه‌تر و یا تعداد ریشه‌های جانبی بیشتر هستند. پیوند بین تیپ وحشی *Lotus japonicus* و جهش یافته فوق‌گره‌زایی har1 نشان داد که ژنوتیپ ساقه می‌تواند فوق‌گره‌زایی و همچنین انگیزش ریشه کوتاه یا افزایش ریشه‌های جانبی را باعث گردد. مشخص شده که ژنوتیپ ریشه، موجب تغییر در فنوتیپ ریشه‌ای غیر همزیست جهش یافته har1 نیز می‌گردد (Buzas et al., 2006; Day et al., 1986; Jiang & Gressoff, 2002; Schnabel et al., 2005; Szczyglowski, 1998). جهش یافته har1 به آلودگی نماتد ریشه نیز بسیار حساس است، بنابراین می‌توان گفت که HAR1 در سازوکار دفاعی علیه عوامل بیماری‌زای گیاهی نیز درگیر است. پیوند ساقه گیاه فوق‌گره‌زایی سویا به ریشه تیپ وحشی

زیستی می‌باشد و تصور می‌شود اهمیت ویژه ای در کنترل گره زایی داشته باشد.

مواد و روش‌ها

رشد گیاهان و استخراج RNA

بذور گیاهان سویا به مدت 24 ساعت (درون اتاقک محتوی گاز کلرین: 100 میلی لیتر محلول با 3/5 میلی لیتر از 32 درصد اسید هیپوکلریک و 4/2 درصد سدیم هیپوکلریت)، ضد عفونی سطحی گردیدند. اتاقک های رشد دارای شرایط ثابت دمایی 28°C روز و 25°C شب با رطوبت 80 درصد و 16 ساعت روشنایی بودند. به منظور استخراج RNA سه روز پس از کشت ریشه های گیاهچه ها با باکتری *Bradyrhizobium japonicum* سویه CB1809 تیمار شدند. برگ های گیاهان رقم جهش یافته nts1007 و ایزوژن وحشی Bragg آن (شامل مریستم انتهایی سویا) دو و پنج روز پس از تلقیح جمع آوری شدند. برگ و ریشه نمونه های تلقیح شده در دو تیمار زیستی (ایجاد آلودگی در گیاهچه های متفاوت و در زمان متفاوت) جمع آوری گردید و نمونه های غیر تلقیح شده به دلیل نبود تغییرات ناشی از تلقیح ریزوبیومی، فقط از یک تیمار زیستی جدا شدند. استخراج RNA برای آزمایش های ریزآرایه با کیت نوکلئوزپین (شرکت Macherey-Nagel) انجام و غلظت آنها با بیوانالیزر 2001 تعیین شد.

آزمایش های QRT-PCR¹

نام های MsSYMRK, LjNORK, GmNORK و MtDM12 و PsSYM19 به ترتیب از سویا، لوتوس، یونجه، شبدر و نخود اثر نموده و موجب تحریک کانال‌های یونی غشایی، نوکلئوپروتئین ها و پروتئین کینازهای کالمادولین وابسته به کلسیم می گردند (Capoen et al., 2005; Endr'e et al., 2002; Mitra et al., 2004a). نشانه ناشناخته ریشه‌ای Q، موجب پیام‌رسانی برگ می‌شود که در اثر بیان GmNARK در برگ سرانجام علامت بازدارندگی برگی (SDI) به ریشه می‌آید که اثر بازدارندگی بر گره‌زایی دارد.

تجزیه و تحلیل های بانک اطلاعاتی مشخص کرد که پروتئین های پیش بینی شده برای GmNARK, HAR1, SyM29 و SUNN بسیار مشابه گیرنده شبه کینازی LRR آرابیدوپسیس CLAVATA1 (At CLV1) است، که تکثیر سلول های مریستمی ریشه و ساقه را کنترل می کند (Clark et al., 1997). پیام رسانی AtCLA1، همانند دیگر مسیرهای انتقال پیام وابسته به گیرنده، منجر به تنظیم رونویسی ژن های ویژه ای می گردد (Dievart & Clark 2004; Schoof et al., 2000). بررسی الگوی بیانی همراه با همسانه سازی و تعیین ویژگی‌های ژن های موثر در سازوکار خودتنظیمی گره‌زایی، می‌تواند بینش درستی از فرایند گره زایی و دست‌ورزی ژنتیکی را فراهم نماید. ژن ناقل کلسیمی از پیام رسان‌های مهم

¹ Quantitative Reverse Transcription-PCR

چرخه از 95°C برای 10 ثانیه و 60°C برای یک دقیقه ادامه یافت. الگویابی منحنی ذوب از 60 تا 95°C در پایان واکنش برای هر PCR جهت تشخیص اختصاصیت واکنش انجام گردید. برای هر نمونه دو تکرار وجود داشت که عموماً تفاوت در مقدار چرخه آستانه¹، یا ct آنها کمتر از 0/5 بود. متوسط مقادیر ct وارد محاسبات ارزیابی کمی بیان نسبی ژن گردید. تجزیه و تحلیل داده ها با روش کمی سنجی نسبی بیان ژن ها انجام شد. در این روش یکی از نمونه های آزمایشی (WTU) به عنوان کالیبراتور² یا نمونه 1x انتخاب شد. مقادیر نرمال شده هر یک از نمونه ها (ct ژن نرمال کردن ct ژن هدف = Δct) به $2^{-\Delta ct}$ تبدیل گردید تا برآوردی از میزان فرآورده حاصل و مقدار اولیه آن در نمونه آزمایشی باشد، هر یک از این مقادیر پس از تبدیل به درصد، تقسیم بر اندازه برآوردی نمونه کالیبراتور شد تا میزان بیان نسبی محاسبه شد (Marisa et al., 2005). طراحی آغازگر برای انجام واکنش Real Time با نرم افزار P rimer Express با رعایت پیش فرض های آن و استفاده از توالی جزیی cDNA ژن های نامزد در بانک اطلاعاتی و یا توالی جدید حاصل از همسانه سازی آنها انجام شد. آغازگرهای مورد استفاده

آزمایش های تجزیه و تحلیل بیان ژن با روش QRT-PCR از نمونه های برگ با سه تیمار زیستی و برای ریشه در دو شرایط تلقیح (ده روز پس از کشت بذر) و عدم تلقیح با ریزوبیوم درون گلخانه با شرایط 28 °C و 16 ساعت روشنایی صورت گرفت. ریشه و برگ گیاهان مورد نظر در 0، 1، 2، 3، 5 و 7 روز پس از تلقیح با ریزوبیوم جمع آوری شدند و استخراج RNA به روش ترایزول (Trizol) صورت گرفت. واکنش PCR با رونویسی معکوس Real time دو مرحله ای شامل سنتز cDNA در مرحله اول و انجام واکنش PCR کمی Real time در مرحله دوم به شرح ذیل انجام شد.

یک میکروگرم از RNA هر یک از نمونه های آزمایشی با DNase تیمار گردید و فرآورده هضم در دو واکنش مجزا یکی برای سنتز cDNA با آنزیم Superscript III و دیگری برای کنترل حذف آلودگی DNA نمونه ها، طبق دستورالعمل شرکت اینویترورژن (Invitrogen) با یک سری تغییرات انجام گردید. نمونه های cDNA به صورت 1:10 رقیق شدند. 5 میکرولیتر از cDNA های رقیق شده به همراه 20 میکرو لیتر از محلول پایه SYBR green PCR و 0/25 μM از هر آغازگر در چاهک های 96 تایی با استفاده از ABI PRISM 7000 وارد واکنش گردیدند. برنامه واکنش، 95°C به مدت 10 دقیقه و سپس با 40

¹ Threshold Cycle

در فاز لگاریتمی که نقطه PCR چرخه آستانه معادل چرخه ای از عطف علامت فلئورسانسی واکنش نسبت به سطح مبنی است

² Calibrator

. نمونه کالیبراتور معمولاً سطح بیان مبنی را دارد و تیمارهای مورد مطالعه بر روی نمونه های آزمایشی انجام می شود. مقادیر بیان نسبی بر اساس میزان تغییرات نسبت به آن سنجیده می شود

کمی با رونویسی معکوس PCR

نقشه برشی توالی جزئی (564 نوکلئوتید) موجود از ژن مورد مطالعه، بر اساس بانک اطلاعاتی EST، تعیین شد و سپس هضم DNA ژنومی با آنزیم های برشی نزدیک دنباله 3' توالی هدف، برای امکان تکثیر آن در جهت 5' و بر عکس صورت گرفت. بدین منظور 10µg از DNA ژنومی با 10/5 واحد از آنزیم برشی مورد نظر و بافر مناسب با حجم نهایی 100µl در طول شب و دمای 37°C هضم گردید. به مخلوط واکنش 100µl آب و 100µl فنل/کلروفرم افزوده شد و به مدت 5 دقیقه در 13000 دور سانتریفوژ گردید، سپس به مایع فوقانی، یک حجم استات سدیم 3M (pH=5/2) و دو حجم اتانول 96 درصد افزوده شد و در دمای 20°C- به مدت 2 ساعت قرار داده شدند و در ادامه به مدت 20 دقیقه در 4°C سانتریفوژ گردید. رسوب DNA حاصل پس از شستشو با اتانول 70 درصد در 50µl آب حل و تعیین غلظت گردید. خود الحاقی DNA ژنومی هضم شده توسط 10/5 واحد DNA لیگاز T4 در بافر لازم و حجم کل 100µl در دمای 16°C به مدت 18 ساعت انجام شد و برای حذف آنزیمی محصول واکنش با تیمار دمایی 75°C به مدت 15 دقیقه صورت گرفت. آزمایش های PCR، با استفاده از آغازگرهای آشیانه ای² با مقادیر 1 تا 5 µl از DNA الحاقی یا محصول حاصل از PCR اولیه انجام شدند. ژن نامزد پس از همسانه

برای ژن های مورد مطالعه به شرح جدول 1 هستند. برای تأیید درستی داده های ریزآرایه و یافتن الگوی بیانی با جزئیات بیشتر از ژن نامزد، تجزیه و تحلیل بیان ژن با QRT-PCR در چندین دوره زمانی و شرایط متفاوت از آزمایش های ریزآرایه صورت گرفت. اول اینکه گیاهان برخلاف آزمایش های ریزآرایه به جای رشد در کیسه های رشد درون اتاقک رشد، درون گلخانه و در گلدان های محتوی ورمیکولیت رویدند. همچنین تیمار گیاهچه با ریزوبیوم به جای سه روز پس از کشت بذر، 10 روز پس از کشت بذر صورت گرفت، زیرا ژن هایی که تحت تاثیر GmNARK قرار می گیرند، بایستی دارای بیان مشابه در شرایط رشدی متفاوت باشند. از آنجا که AON در هر دو زمان 3 و 10 روز پس از کشت القاء می گردد (Solaiman et al., 2000)، بنابراین، ژن های نامزد بایستی بیان متفاوت در هر دو شرایط نشان دهند. دوم اینکه آزمایش های QRT-PCR مربوط به هر نمونه در 6 مقطع زمانی متفاوت و در سه تکرار زیستی صورت گرفت. علاوه بر این، دو جهش یافته با آلل های متفاوت GmNARK را در تیمارهای زیستی (دو تیمار با 1007nts و یک تیمار با 382nts) وارد شد تا مطمئن شویم که تغییرات در بیان ژن تحت تاثیر موتاسیون ثانویه (Searle et al., 2003) درون بخش تنظیمی ژن های نامزد قرار نگرفته است.

PCR معکوس¹ و تعیین توالی

² Nested PCR

¹ Inverse PCR (IPCR)

نتایج و بحث

الف) نتایج آرایه ژنی

در تجزیه و تحلیل آرایه های ژنی از طریق مقایسه های دو تایی با نرم افزار Dchip و روش سری غیر متغیر نرمال شدند، تعداد معدودی ژن در برگ شناسایی شدند که با رفتاری مستقل از آلودگی ریزویومی، توسط GmNARK تنظیم می گردند. بیان ژن نامزد با شناسه GmaAffx.32318.1 (ناقل کلسیم) در WT² نسبت به nts کمتر بود. بیان این ژن در آزمایش های ریزآرایه با حالتی مستقل از آلودگی ریزویومی در WT نسبت به تیپ جهش یافته، مطابق جدول 2 کاهش داشت.

سازی مکرر فراورده های حاصل از JPCR، 5'RACE (تکثیر دنباله های cDNA) با کیت (RLM-RACE)، تعیین توالی شدند.

تجزیه و تحلیل توالی

تجزیه و تحلیل توالی های ژنومی و cDNA توسط نرم افزار Clone Manager صورت گرفت و چارچوب قرائت آزاد و توالی اسید آمینه ای ژن های مورد مطالعه تعیین شد. جستجو **بلاست** در سطح پروتئین برای توالی های موجود و هم ردیفی توالی ها با استفاده از ClustalW (EMBL-EBI) انجام شد. بخش های آگرون و ایترون توالی ژنومی با مقایسه الگوی اسید آمینه ای حاصل و هم ردیفی با توالی پروتئین های شناخته شده، تعیین گردید. الگوها و پیش بینی موتیف های پروتئین ها توسط ScanProsit سیستم پیشرفته تجزیه و تحلیل پروتئین (ExpASY) به دست آمد. تعیین محل احتمالی قرار گرفتن پروتئین های حاصل توسط نرم افزار Target1.1 مرکز تجزیه و تحلیل زیستی (CBI) صورت گرفت و پیش بینی عناصر تنظیمی Cis یا همسو در توالی راه انداز با برنامه تعیین علامت عناصر تنظیمی Cis در DNA گیاهی¹ (PLACE) انجام گرفت.

¹ Plant *cis*-acting Regulatory DNA Elements

² Wild type

جدول 1- توالی آغازگرهای مورد استفاده در آزمایشات PCR کمی.

نام ژن Gene name	توالی آغازگر Primer Sequence	
اکتین با شناسه بانک اطلاعاتی V00450 (ژن نرمالیزر) Actin (Normalizer Gene)	5'-GGTCGCACAACCTGGTATTGTATTG-3' 5'-CTCAGCAGAGGTGGTGAACA-3'	مستقیم (با پوشش ایترونی) ¹ Forward معکوس Reverse
ناقل کلسیم GmaAffx.32318.1 Ca Transporter	5'-GAGCAAGTGTTTAAGGCAGC-3' 5'-AGTATGCCCATGACTGCCATTG-3'	مستقیم (با پوشش ایترونی) Forward معکوس Reverse

Table 1- The sequences of primers used in QRT-PCR experiments.

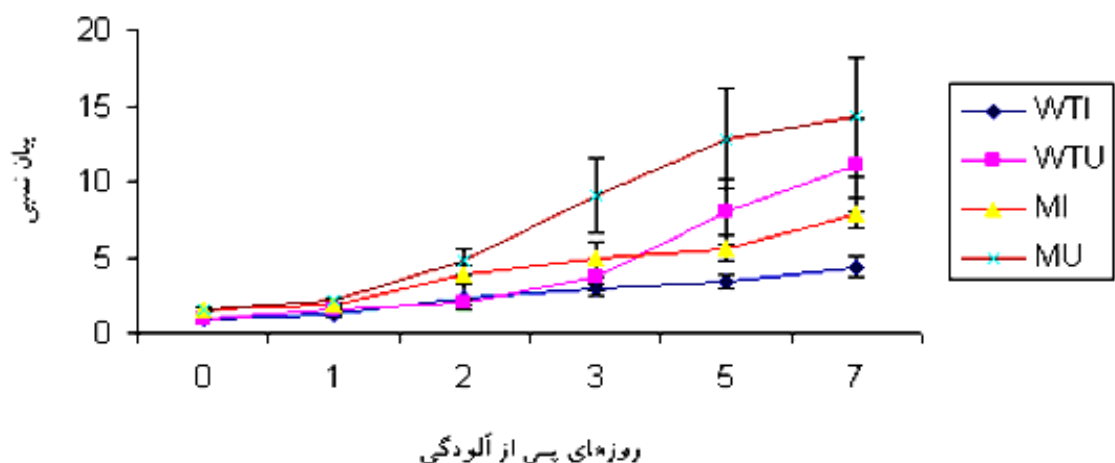
جدول 2- تغییرات میزان بیان (کاهش) ناقل کلسیمی تحت کنترل ژن GmNARK در تیپ وحشی نسبت به جهش یافته در آزمایش های ریزآرایه افیمتریکس.

تیپ وحشی تلقیح نشده علیه جهش یافته تلقیح شده		تیپ وحشی تلقیح شده علیه جهش یافته تلقیح شده				نام پیش بینی شده ژن Predicted name	شناسه افیمتریکس Affymetrix identity
Uninoculated wild type/inoculated mutant		inoculated wild type/inoculated mutant					
روز پنجم 5 th day	روز دوم 2 th day	5 th day	روز پنجم	2 th day	روز دوم		
تکرار one Replication	یک	تکرار دوم 2 th Rep	تکرار اول 1 th Rep	تکرار دوم 2 th Rep	تکرار اول 1 th Rep		
-2.57	-11.52	-4.38	-2.65	-9.43	-3.18	ناقل کلسیم Ca transporter	GmaAffx.32318.1

* علامت منفی بیانگر کاهش در بیان ژن و اعداد لازم معرف چند برابر مورد نظر است.

Table 2- The expression changes (decreasing rate) of Ca transporter that is under the control of GmNARK gene, in wild type related to mutant in affymetrix microarray experiments.

¹ Intron spanning



شکل 1- بیان نسبی ژن ناقل کلسیم در تیپ وحشی (WT) و جهش یافته (M) سویا در حالت‌های تلقیح شده (I) و تلقیح نشده با ریزوبیوم.

Figure 1- The relative expression of Ca transporter gene in wild type and mutant soybeans at inoculated and uninoculated condition with Rhizobium.

نشده یا MU، در سطحی بالاتر از همه نمونه‌ها قرار گرفت و تا 12 برابر شاهد رسید. مشاهده می‌شود که بیان نسبی این ژن در تیپ WTI نسبت به MI، مشابه آزمایش‌های ریزاریه کاهش داشته است، ولی بیان نسبی آن در WTU از روز پنجم بعد از آلودگی MI بیشتر گردید (ناشی از اثر یک تیمار زیستی). روند افزایشی بیان این ژن در روزهای پس از آلودگی، می‌تواند ناشی از رابطه مستقیم آن با جریان نمو گرهزایی باشد. گمان می‌رود پس از تلقیح ریزوبیومی، القای سازوکار خودتنظیمی در تیپ وحشی موجب شده است تا بیان این ژن در این تیپ نسبت به جهش یافته در سطحی پائین‌تر قرار گیرد و نبود این سازوکار در تیپ جهش یافته موجب حذف ویژگی بازدارندگی

(ب) تائید نتایج آرایه ژنی

آنالیز PCR کمی ژن با شناسه GmaAffx.32318.1 یا ناقل کلسیم نشان داد که بیان این ژن از روز دوم به بعد در برگ تیپ وحشی تلقیح شده با ریزوبیوم یا WTI¹ نسبت به کالیبراتور (تیپ وحشی قبل از آلودگی یا WTU² در روز صفر آلودگی) 2 تا 4 برابر افزایش یافت، این روند افزایشی برای خود WTU در روزهای بعدی نسبت به پیش از آلودگی آن، 2 تا 10 برابر گردید (شکل 1). بیان نسبی این ژن در جهش یافته تلقیح شده یا MI³ دارای روند افزایشی بوده و تا 7 برابر شاهد رسید. بیان نسبی در جهش یافته تلقیح

³ Wild type inoculated

⁴ Wild type uninoculated

⁵ Mutant inoculated

بخش عمده ای از چارچوب دوم می باشد، اما حضور یک توالی 6 جفت بازی (ATGAAA) در انتهای این cDNA که متفاوت از توالی ژنومی این ژن است می تواند از وقوع یک ویرایش² و جایگزینی توالی مکمل آن یعنی UACUUU باشد که از ویژگی های ویرایش، جایگزینی قطعات غنی از اوراسیل می باشد (Gott and Emerson, 2000). با مقایسه توالی ژنومی و cDNA بخش بالادست تعیین توالی شده به طول 1136 جفت باز که بالاتر از کدون شروع است به عنوان جزء راه انداز ژن محسوب گردید و پیش بینی عناصر تنظیمی Cis یا همسو در توالی راه انداز تعداد زیادی جعبه توالی مورد توافق مانند CAATBOX1 مخصوص ژن لگ هموگلوبین³، جعبه WRKY71OS دخیل در تداخل میزبان و میکروب، جعبه BIHD1OS مربوط به مقاومت در برابر بیماری ها، جعبه NODCON2GM ویژه خانواده ژن های دخیل در گره زایی سویا و تعدادی جعبه TATA می باشد. بنابراین، انتظار می رود راه انداز این ژن در دریافت پیام های سلولی و علایم تنظیمی گره زایی و پاسخ به بیماری ها نقش کارکردی داشته باشد. پروتئین پیش بینی شده آن (شکل 4) دارای 5 دومین بین غشایی بوده که می تواند نقش گیرنده سلولی یا ناقل مولکولی را داشته باشند (Lévy et al., 2004; Sanders et al., 2004).

آن شده است. بیان متوسط این ژن در هر یک از تیپ های گیاهی تلقیح نشده بالاتر از حالت تلقیح شده آن است (این روند حداقل در دو تیمار زیستی دیده شد).

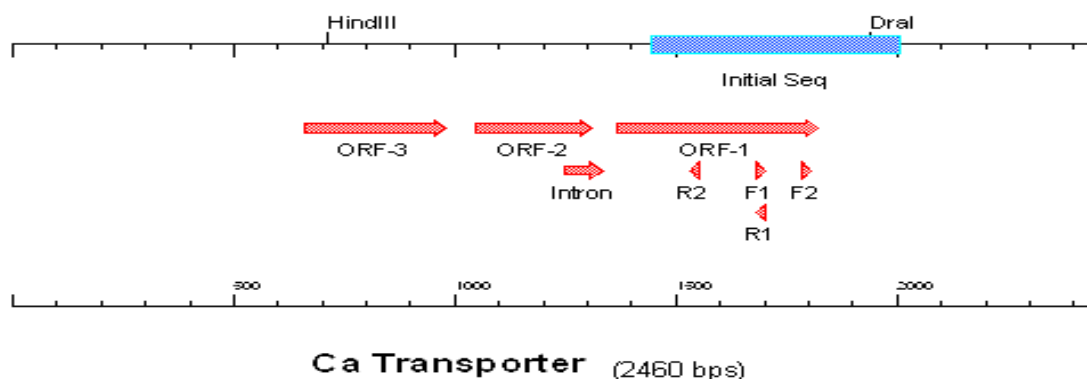
ج) همسانه سازی و تعیین توالی

فرآورده های PCR معکوس و 5'RACE ژن ناقل کلسیم پس از همسانه سازی با روش TA¹، تعیین توالی شدند. برای این ژن از همسانه سازی فرآورده های PCR معکوس، حاصل از هضم های آنزیمی جداگانه *Nco I* و *Dra I*، *Hind III* یک توالی ژنومی به طول 2460 جفت باز به دست آمد (شکل 2). این توالی دارای سه چارچوب قرائت آزاد یک اینترون به طول 82 نوکلئوتید از نوع GT..AG، درون چارچوب قرائت آزاد دوم تا قبل از چارچوب قرائت آزاد اول می باشد. این دو چارچوب در بانک اطلاعاتی، مشابه ژن ناقل کلسیمی بودند و برای توالی چارچوب قرائت سوم هیچ مشابهت کارکردی پروتئینی در بانک اطلاعات یافت نشد. این توالی شامل بخش رمز کننده و قسمتی از نواحی بالا دست و پائین دست ژن است. تعیین توالی فرآورده حاصل از 5'RACE، انتهای 5' cDNA یا شروع بخش رمز کننده را تعیین نمود (شکل 3). توالی cDNA فاقد بخش اینترونی ذکر شده بود و شامل تمام چارچوب قرائت آزاد اول بخش پایین دست و جزیی از توالی حدواسط ناحیه اینترونی با چارچوب اول و

² Editing

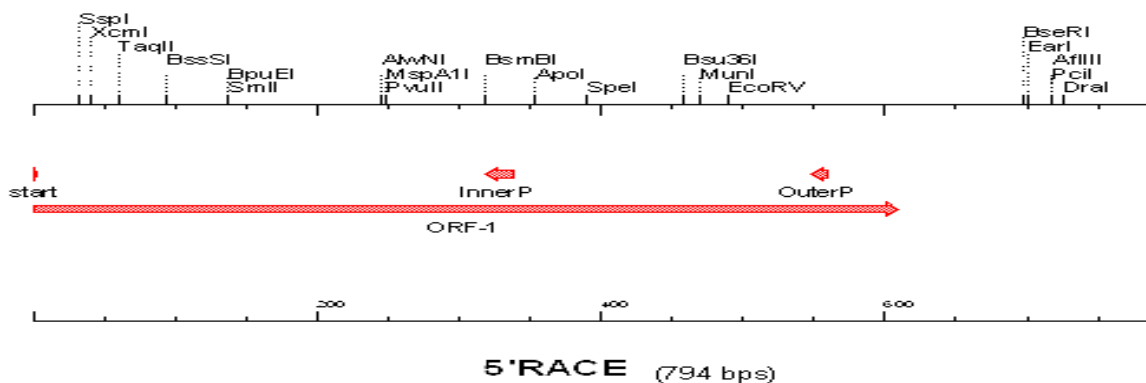
³ Leghemoglobin

¹ TA-Cloning



شکل 2- نقشه برشی DNA ژنومی مربوط به ژن همسانه سازی شده ناقل کلسیم سویا با مشخص کردن آنزیم های برشی هدف، توالی اولیه موجود در بانک اطلاعات، بخش های بالا دست و پایین دست تکثیر شده با IPCR و اینترون و چارچوب های قرائت آزاد آن.

Figure 2- The genomic DNA restriction map of soybean Ca transporter gene that has been cloned using IPCR, containing of its up/downstreams, Introns and ORFs.



شکل 3- نقشه برشی cDNA مربوط به ژن همسانه سازی شده ناقل کلسیم سویا از طریق 5'RACE با نمایش محل آغازگرهای درونی استفاده شده بر روی توالی اولیه و بخش بالادستی توالی یابی شده آن.

Figure 3- The cDNA restriction map of soybean Ca transporter gene that has been cloned using 5'RACE, containing of its Outer/inner primers on initial sequence with its sequenced upstream part.

3. Carroll BJ, McNeil DL, Gresshoff PM (1985a) Isolation and properties of soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] mutants that nodulate in the presence of high nitrate concentrations. *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA*, 82: 4162-4166.
4. Carroll BJ, McNeil DL and Gresshoff PM (1985b). A supernodulation and nitrate tolerant symbiotic (nts) soybean mutant. *Plant Physiology*. 78: 34-40.
5. Capoen W, Goormachtig S, De Rycke R, Schroevers K and Holsters M (2005) SrSymRK, a plant receptor essential for symbiosome formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA*, 29, 10369-10374.
6. Clark SE, Williams RW and Meyerowitz EM (1997) The CLAVATA1 gene encodes a putative receptor kinase that controls shoot and floral meristem size in *Arabidopsis*. *Cell*, 89: 575-585.
7. Day DA, Lambers H, Bateman J, Carroll BJ and Gresshoff PM (1986) Growth comparisons of a supernodulating soybean (*Glycine max*) mutant and its wild-type parent. *Physiologia Plantarum*. 68: 375-382.
8. Delves AC, Mathews A, Day DA, Carter AS, Carroll BJ and Gresshoff PM (1986) Regulation of the soybean-Rhizobium nodule symbiosis by shoot and root factors. *Plant Physiology*. 82: 588-590.
9. Dievart A and Clark SE (2004) LRR-containing receptors regulating plant development and defense. *Development*, 131: 251-261
10. Endr'e G, Kereszt A, Kevei Z, Mihacea S, Kalo P, Kiss GP (2002) A receptor kinase regulating symbiotic nodule development. *Nature* 417: 962-6.
11. Gresshoff, PM and Delves AC (1986) Plant genetic approaches to symbiotic nodulation and nitrogen fixation in legumes. In: A.D. Blonstein and P.J. King (eds.): *Plant Gene Research III. A Genetical Approach to Plant Biochemistry*, pp. 159-206. Springer Verlag, Wien.
12. Gresshoff PM, (2004) *Genetics and Genomics of Nodulation and Symbiotic Nitrogen Fixation Handbook of Plant Biotechnology*. John Wiley & Sons Ltd. ISBN 0-471-85199-X.
13. Gresshoff P M, (2003) Post-genomic insights into plant nodulation symbiosis, *BioMed Central Ltd., Genome Biology*. 4:201.
14. Gott JM and Emerson RB (2000). Functions and mechanisms of RNA editing. *Annual Review of Genetics* 34:499-531.
15. Jiang Q and Gresshoff PM (2002) Shoot control of hypernodulation and aberrant root formation in the *har1-1* mutant of *Lotus japonicus*. *Functional Plant Biology* 29, 1371-1376.
16. Kanamori N, Madsen LH, Radutoiu S, Frantescu M, Quistgaard EMH, Miwa H, Downie JA, James EK, Felle HH, Haaning LL, Jensen TH, Sato S, Nakamura Y, Tabata S, Sandal N and Stougaard J (2006) A nucleoporin is required for induction of Ca²⁺ spiking in legume nodule development and essential for rhizobial and fungal symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences .USA*, 103: 359-364.
17. Kinkema M, Scott PT, and Gresshoff PM, (2006) Legume nodulation: successful symbiosis through short- and long-distance signalling, *Functional Plant Biology* 33: 707-721.
18. Krusell L, Madsen LH, Sato S, Aubert G, Genua A, Szczyglowski K, Duc G, Kaneko T, Tabata S, de Bruijn F, Pajuelo E, Sandal N and Stougaard J (2002) Shoot control of root development and nodulation is mediated by a receptor-like kinase. *Nature*, 420: 422-426.

19. Lévy J, Bres C, Geurts R, Chalhoub B, Kulikova O, Duc G, Journet EP, Ané JM, Lauber E, Bisseling T, Dénarié J, Rosenberg C and Debelle F (2004) A putative Ca²⁺ and calmodulin-dependent protein kinase required for bacterial and fungal symbiosis. *Science*, 303: 1361-1364.
20. Lohar DP and Bird D.McK (2003) *Lotus japonicus*: A new model to study root-parasitic nematodes. *Plant Cell Physiology*. 44: 1176-1184.
21. Marisa L, Wong and JF, Medrano (2005) Real- time PCR for mRNA quantitation *BioTechniques*. 39:75-85.
22. Meixner C, Ludwig-Müller J, Miersch O, Gresshoff P, Staehelin C And Vierheilig H (2005) Lack of mycorrhizal autoregulation and phytohormonal changes in the supernodulating soybean mutant nts1007. *Planta*, 222: 709-715.
23. Mitra RM, Gleason CA, Edwards A, Hadfield J, Downie JA, Oldroyd GE and Long SR (2004a) A Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase required for symbiotic nodule development: Gene identification by transcript-based cloning. *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA*, 101, 4701-4705.
24. Nakamura Y, Tabata S, Sandal N and Stougaard J (2003) Plant recognition of symbiotic bacteria requires two LysM receptor-like kinases. *Nature*, 425: 585-592.
25. Nishimura R, Hayashi M, Wu GJ, Kouchi H, Imaizumi-Anraku H, Murakami Y, Kawasaki S, Akao S, Ohmori M, Nagasawa M, Harada K and Kawaguchi M (2002) HAR1 mediates systemic regulation of symbiotic organ development. *Nature*: 420, 426-429.
26. Radutoiu S, Madsen LH, Madsen EB, Felle HH, Umehara Y, Gronlund M, Sato S, Nakamura Y, Tabata S, Sandal N, Stougaard J (2003). Plant recognition of symbiotic bacteria requires two LysM receptor-like kinases. *Nature*: 425: 585–592.
27. Sanders D, J Pelloux, C Brownlee, JF Harper (2002) Calcium at the Crossroads of signaling, *The Plant Cell*, Supplement: 401-417.
28. Schnabel E, Journet, EP, de Carvalho-Niebel F, Duc, G and Frugoli J (2005) The *Medicago truncatula* SUNN gene encodes a CLV1-like leucine-rich repeat receptor kinase that regulates nodule number and root length. *Plant Molecular Biology* 58: 809-822.
29. Schoof H, Lenhard M, Haecker, A, Mayer KF, Jürgens G and Laux, T (2000) The stem cell population of Arabidopsis shoot meristems is maintained by a regulatory loop between the CLAVATA and WUSCHEL genes. *Cell*, 100: 635-644.
30. Searle IR, Men AE, Laniya TS, Buzas DM, Iturbe-Ormaetxe I, Carroll BJ and Gresshoff PM (2003) Long-distance signaling in nodulation directed by a clavata1-like receptor kinase. *Science*, 299: 109-112.
31. Solaiman MZ, Senoo K, Kawaguchi M, Imaizumi-Anraku H, Akao S, Tanaka A and Obata H (2000) Characterization of mycorrhizas formed by *Glomus* sp. on roots of hypernodulating mutants of *Lotus japonicus*. *Journal of plant research*. 113:443-448.
32. Smit P, Raedts J, Portyanko V, Debelle F, Gough C, Bisseling T and Geurts R (2005) NSP1 of the GRAS protein family is essential for rhizobial Nod factor-induced transcription. *Science*, 308: 1789-1791.
33. Stacey G, Libault M, Brechenmacher L, Wan J and May GD (2006) Genetics and functional genomics of legume nodulation. *Curr. Opin. Plant Biology*. 9: 110-121.
34. Szczyglowski K, Shaw RS, Wopereis J, Copeland S, Hamburger D, Kasiborski B, Dazzo, FB and de Bruijn FJ (1998) Nodule organogenesis and symbiotic mutants of the model legume *Lotus japonicus*. *Mol. Plant Microbe Interaction*. 11, 684-697.

35. Yamamoto E, Caglar H and Knap HT (2000) Molecular characterization of two soybean homologs of *Arabidopsis thaliana* CLAVATA1 from the wild type and fasciations mutant. *Biochimica et Biophysica. Acta.* 1491, 333-340.

Ca Transporter gene Isolation and Analysis of Its Expression Pattern in Soybean

Izadi-Darbandi A.*¹, Kinkema M.², Gresshoff P.M.², Yazdi-Samadi B.³, Omid M.³

¹ Department of Agronomy and Plant Breeding Science College of Abouraihan, University of Tehran,

² ARC Centre of Excellence for Integrative Legume Research, The University of Queensland, Australia,

³ Department of Agronomy and Plant Breeding, Campus of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran.

ABSTRACT

Some plants are naturally able to acquire nitrogen from the air through a process called symbiotic nitrogen fixation. In soybean, a close interaction between the root and *Bradyrhizobium japonica*, results in the formation of nitrogen-fixing nodules. Both partners benefit from this interaction: the bacterium gains sugar from the plant, and the plant obtains reduced nitrogen. Autoregulation of Nodulation (AON) through the expression of GmNARK in soybean leaf is the main genetically-controlled mechanism that regulates nodulation. Autoregulation of nodulation (AON), is a long-distance signaling network which acts to limit the proliferation of nodules which operates to limit the proliferation of nodules Affymetrix microarray and quantitative real-time reverse-transcriptase (QRT) PCR in wild type and the GmNARK AON mutant confirmed that the expression of GmaAffx.32318.1 has been decreased in wild type related to mutant and regulated in the leaf by GmNARK in a rhizobia-independent manner. This gene (GmaAffx.32318.1) that was cloned and sequenced, is predicted to encode a Ca-transporter. It has 2460 bp with the coding sequence, upstream and downstream of gene. The predicted protein included 202 amino acids and contains 5 transmembrane domains that can be act as cell receptor or carrier with 70% similarity to a heterologous gene in *Arabidopsis*.

Key Words: Autoregulation of Nodulation (AON), QRT-PCR, Soybean. Gene isolation, Gene expression