

جداسازی ژن (GmNARK) ناقل کلسیم و بررسی الگوی بیانی آن در سویا
علی ایزدی دربندی^{1*}، مارک کینکما²، پیتر گرشوف²، بهمن یزدی صمدی³، منصور امیدی³

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 گره زایی 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 آرایه‌وپسیس است.

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

دوردست² بین ریشه و ساقه است، به طوری که 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 گرهرزایی هستند، از نظر گره زایی متحمل به نیترات هستند (Carroll et al., 1985a & b). همسانه کردن یکی از ژن های مسئول فنوتیپ فوق گرهرزایی³ در سویا به نام GmNARK⁴ یا گیرنده کینازی خود کنترلی گرهرزایی (Searle et al., 2003)، در Lotus معروف به فراگرهرزایی 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 گرهرزایی توسط ساقه کنترل می شود. در سازوکار

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

² Long-Distance Signaling

² Supernodulation

³ Glycine max nodule autoregulation receptor kinase

⁴ Hypernodulation and abnormal roots

⁵ Super nodule number

¹ Autoregulation of Nodulation

آلودگی نماتد ریشه نیز بسیار حساس است، بنابراین می توان گفت که HAR1 در سازوکار دفاعی علیه عوامل بیماریزای گیاهی نیز درگیر است. پیوند ساقه گیاه فوق گره زایی سویا به ریشه تیپ وحشی موجب پیدایش فنوتیپ فراگرهزایی گردید، در حالی که پیوند وارونه موجب پیدایش حالت نرمال گرهزایی شد (Delves et al., 1986). اگر چه این گیرنده های شبه کینازی در مسیرهای همزیستی و غیرهمزیستی دارای نقش مشخص می باشند، با این حال سازوکار های پایین دست آنها شناسایی نشده است (Lohar et al., 2003).

بررسی های زیادی با روش ژنتیک مستقیم جهت شناسایی ژن های درگیر در گرهزایی انجام شده است (Kinkema et al., 2006; Stacey et al., 2006). این ژن ها به عنوان گیرنده های آغازین پیام ریزوبیومی، پیش بینی شده اند که می توانند یک گیرنده شبه کینازی، دومین-LysM (Nakamura et al., 2003; Lohar et al., 2003)، گیرنده شبه کینازی غنی از لوسین LRR (Nishimura et al., 2002)، کانال های کاتیونی غشای پلاسمایی (Kanamori et al., 2006)، کیناز کالمادولین وابسته به کلسیم (Lévy et al., 2004; Mitra et al., 2004a)، عامل های رونویسی (Smit et al., 2005) و ناقل های سولفات (Krusell et al., 2002) باشند. عامل های گرهزایی توسط گیرنده های کینازی نوع LysM در غشای پلاسمایی دریافت می شوند (Radutoiu et al., 2003). در سویا ژن های NRF1

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; Delves et al., 1986). در ادامه فعالیت این گیرنده شبه کینازی منجر به تولید یک بازدارنده از ساقه گردیده که تعداد گره در ریشه را تنظیم می کند. تاکنون ماهیت پیام های ریشه و ساقه شناخته نشده است و معلوم نیست که چگونه گیرنده شبه کینازی LRR پیام رسانی دوردست را موجب می شود. جهش یافته های 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 یافته های har1, Gmnark و sunn در شرایط عدم تلقیح ریزوبیومی، نسبت به تیپ وحشی دارای ریشه های کوتاه تر و یا تعداد ریشه های جانبی بیشتر هستند. پیوند بین تیپ وحشی Lotus japonicus و جهش یافته فوق گره زایی har1 نشان داد که ژنوتیپ ساقه می تواند فوق گره زایی و همچنین انگیزش ریشه کوتاه یا افزایش ریشه های جانبی را باعث گردد. مشخص شده که ژنوتیپ ریشه، موجب تغییر در فنوتیپ ریشه ای غیر همزیست جهش یافته har1 نیز می گردد (Buzas et al., 2006; Day et al., 1986; Jiang & Gressoff, 2002; Schnabel et al., 2005; Szczyglowski, 1998). جهش یافته har1 به

خودتنظیمی گره‌زایی، می‌تواند بینش درستی از فرایند گره‌زایی و دست‌ورزی ژنتیکی را فراهم نماید. ژن ناقل کلسیمی از پیام‌رسان‌های مهم زیستی می‌باشد و تصور می‌شود اهمیت ویژه‌ای در کنترل گره‌زایی 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 هیپوکلیتیک و 4/2 درصد سدیم هیپوکلیت)، ضد عفونی سطحی گردیدند. اتاقک‌های 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 ریشه‌های گیاهچه‌ها با باکتری *Bradyrhizobium japonicum* سویه CB1809 تیمار شدند. برگ‌های گیاهان رقم جهش یافته nts1007 و ایزوژن وحشی Bragg آن (شامل مریستم انتهایی سویا) دو و پنج روز پس از تلقیح جمع‌آوری شدند. برگ و ریشه نمونه‌های تلقیح شده در دو تیمار زیستی (ایجاد آلودگی در گیاهچه‌های متفاوت و در زمان متفاوت) جمع‌آوری گردید و نمونه‌های غیر تلقیح شده به دلیل نبود تغییرات ناشی از تلقیح ریزوبیومی، فقط از یک تیمار زیستی جدا شدند. استخراج RNA برای آزمایش‌های ریزآرایه با کیت نوکلئوزپین (شرکت

Lohar & NRF5 این نقش را بر عهده دارند (Bird, 2003) که جهش در اینها یا همسانه‌های آنها در نخود فرنگی و *M.truncatula* موجب عدم گره‌زایی می‌شود. در ادامه یک گیرنده NBS-LRR، به نام‌های MsSYMRK, LjNORK, GmNORK و PsSYM19 به ترتیب از سویا، لوتوس، یونجه، شبدر و نخود اثر نموده و موجب تحریک کانال‌های یونی غشایی، نوکلئوپروتئین‌ها و پروتئین‌های کینازهای کالمادولین وابسته به کلسیم می‌گردند (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 تحلیل‌های بانک اطلاعاتی مشخص کرد که پروتئین‌های پیش‌بینی شده برای GmNARK, HAR1, SyM29 و SUNN بسیار مشابه گیرنده شبه کینازی LRR آرابیدوپسیس *CLAVATA1*(At CLV1) است، که تکثیر سلول‌های مریستمی ریشه و ساقه را کنترل می‌کند (Clark et al., 1997). پیام‌رسانی AtCLA1، همانند دیگر مسیرهای انتقال پیام وابسته به گیرنده، منجر به تنظیم رونویسی ژن‌های ویژه‌ای می‌گردد (Dievart & Clark 2004; Schoof et al., 2000). بررسی الگوی بیانی همراه با همسانه‌سازی و تعیین ویژگی‌های ژن‌های موثر در سازوکار

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°C چرخه از 95°C برای 10 ثانیه و 60°C برای یک دقیقه ادامه یافت. الگویابی منحنی ذوب از 60°C 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 آستانه²، 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 کالیبراتور³ یا نمونه 1x انتخاب شد. مقادیر نرمال شده هر یک از نمونه ها (ct ژن نرمال کردن ct ژن هدف Δct) به $2^{-\Delta\text{ct}}$ 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

(Macherey-Nagel) انجام و غلظت آنها با بیوآنالیزر 2001 تعیین شد.

آزمایش های QRT-PCR¹: 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 اینویترژن (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 $0/25\ \mu\text{M}$ از

² Threshold Cycle

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

³ 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

¹ Quantitative Reverse Transcription-PCR
کمی با رونویسی معکوس PCR

موتاسیون ثانویه (Searle et al., 2003) درون بخش تنظیمی ژن های نامزد قرار نگرفته است. PCR معکوس¹ و تعیین توالی: 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 سانتیفریژ 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 سانتیفریژ 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.

استفاده از توالی جزئی cDNA ژن های نامزد در بانک اطلاعاتی و یا توالی جدید حاصل از همسانه سازی آنها انجام شد. آغازگرهای مورد استفاده 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

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 ریزوبیومی، توسط GmNARK تنظیم می گردند. بیان ژن نامزد با شناسه GmaAffx.32318.1 (ناقل کلسیم) در ³WT نسبت به nts کمتر بود. بیان این ژن در آزمایش های ریزآرایه با حالتی مستقل از آلودگی ریزوبیومی در WT نسبت به تیپ جهش یافته، مطابق جدول 2 کاهش داشت.

آزمایش های PCR، با استفاده از آغازگرهای آشیانه ای¹ با مقادیر 1 تا 5 μ l از DNA الحاقی یا محصول حاصل از PCR اولیه انجام شدند. ژن نامزد پس از همسانه 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 در سطح پروتئین برای توالی های موجود و همردیفی توالی ها با استفاده از ClustalW (EMBL-EBI) انجام شد. بخش های آگزون و اینترون توالی ژنومی با مقایسه الگوی اسید آمینه ای حاصل و همردیفی 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 گیاهی² (PLACE) انجام گرفت.

¹ Nested PCR

² 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'	مستقیم (با پوشش ایترونی) ¹ Forward
	5'-CTCAGCAGAGGTGGTGAACA-3'	معکوس Reverse
ناقل کلسیم GmaAffx.32318.1 Ca Transporter	5'-GAGCAAGTGTTTAAGGCAGC-3'	مستقیم (با پوشش ایترونی) Forward
	5'-AGTATGCCCATGACTGCCATTG-3'	معکوس Reverse

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

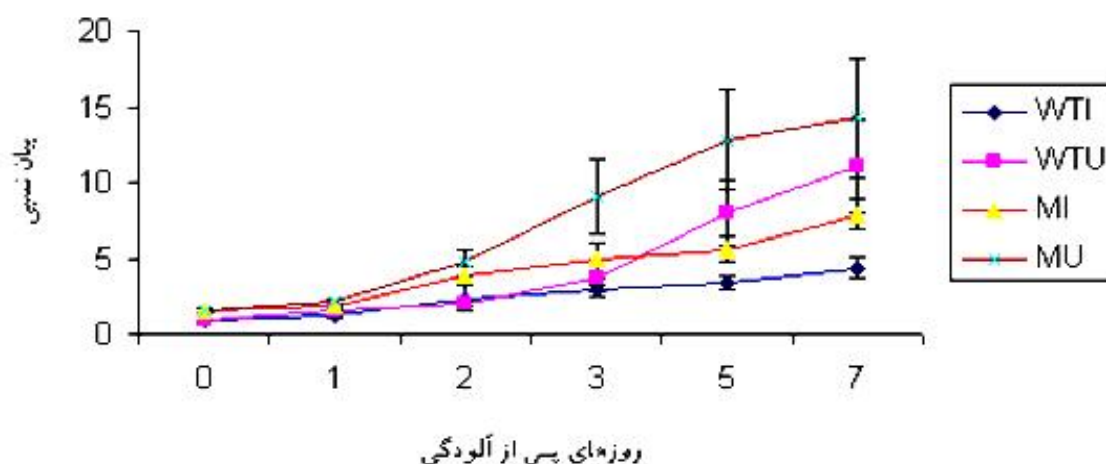
جدول 2- تغییرات میزان بیان (کاهش) ناقل کلسیمی تحت کنترل ژن GmNARK در تیپ وحشی نسبت به جهش یافته در آزمایش های ریزآرایه افیمتریکس.

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

برابر شاهد رسید. بیان نسبی در جهش یافته تلقیح 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

(ب) 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 ¹WTI نسبت به کالیبراتور (تیپ وحشی قبل از آلودگی یا ²WTU 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 ³MI دارای روند افزایشی بوده و تا 7

³ Wild type inoculated

⁴ Wild type uninoculated

⁵ Mutant inoculated

cDNA فاقد بخش ایترونی ذکر شده بود و شامل تمام چارچوب قرائت آزاد اول بخش پایین دست و جزیی از توالی حدواسط ناحیه ایترونی با چارچوب اول و 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

تیپ جهش یافته موجب حذف ویژگی بازدارندگی 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

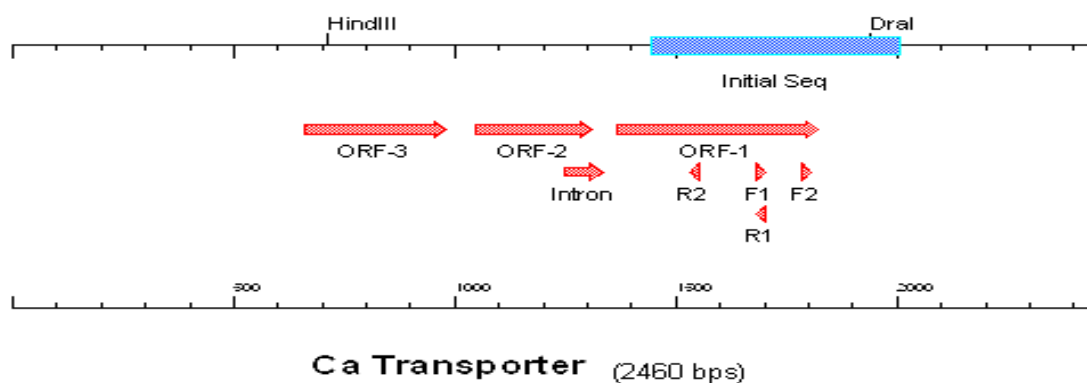
فرآورده های PCR معکوس و 5'RACE ژن ناقل کلسیم پس از همسانه سازی با روش TA¹، تعیین توالی شدند. برای این ژن از همسانه سازی فرآورده های PCR معکوس، حاصل از هضم های آنزیمی جداگانه *Dra I*، *Hind III* و *Nco I* یک توالی ژنومی به طول 2460 جفت باز به دست آمد (شکل 2). این توالی دارای سه چارچوب قرائت آزاد یک ایترون 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

² Editing

³ Leghemoglobin

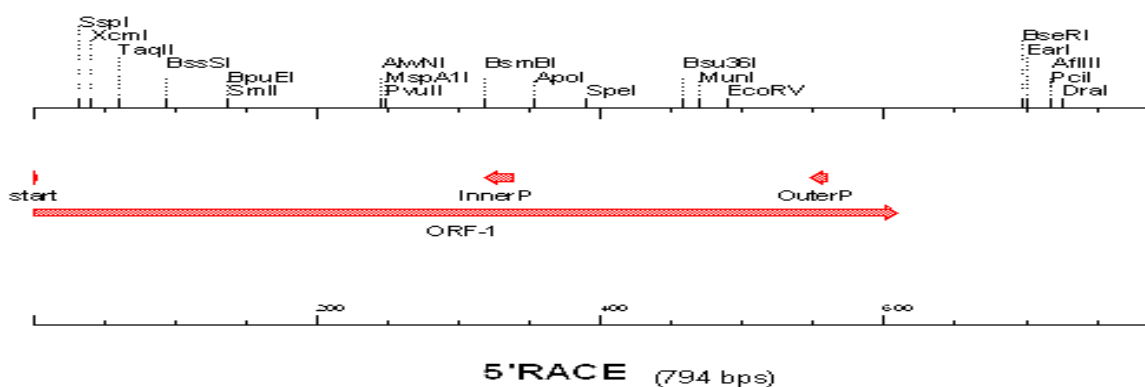
¹ TA-Cloning

(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).



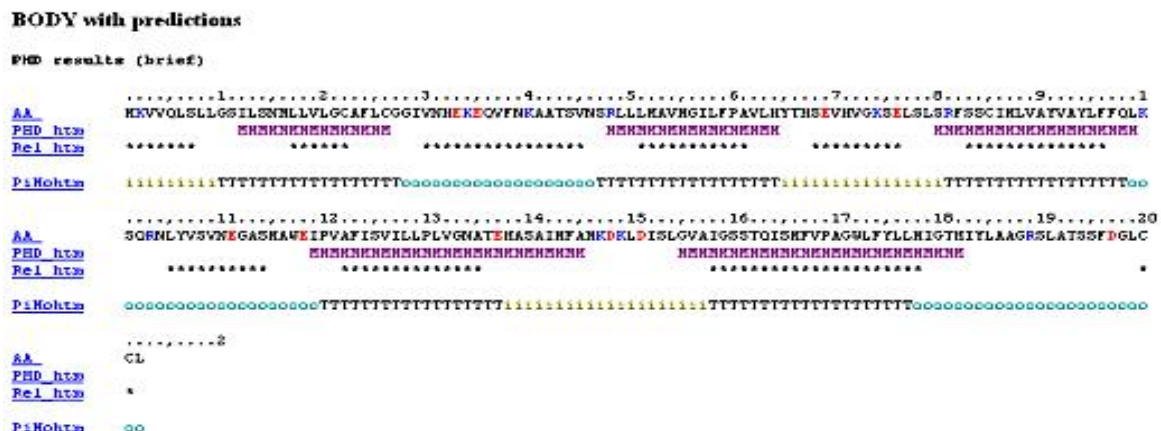
شکل 2- نقشه برشی DNA ژنومی مربوط به ژن همسانه سازی شده ناقل کلسیم سویا با مشخص کردن آنزیم های برشی هدف، توالی اولیه موجود در بانک اطلاعات، بخش های بالا دست و پایین دست تکثیر شده با IPCR و اینترون و چارچوب های قرائت آزاد آن.

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.



شکل 4- توالی پیش‌بینی شده پروتئین ژن ناقل کلسیم سویا و تعیین دومین‌های کارکردی آن با (ExPASy PredictProtein)؛ M: غشایی، i: درون حفره سلولی، T: بین غشایی، O: بیرون حفره‌ای.

Figure 4- the protein predicted sequence for soybean Ca transporter gene and detection of its functional domains using ExPASy PredictProtein. M: membranal, i: inner lumen, T: Trans membranal, O: outer lumen.

سپاسگزاری

بدینوسیله از دانشگاه تهران، دانشگاه کوینزلند و موسسه عالی تحقیقات تلفیقی حبوبات (CILR) کشور استرالیا، به دلیل تامین هزینه‌های پژوهشی و همه‌اعضای CILR به ویژه دکتر آتیلا کرسست به دلیل راهنمایی‌های ارزشمندشان در انجام این طرح سپاسگزاری می‌شود.

جستجوی بانک اطلاعاتی نشان داد که توالی این پروتئین حدود 70 درصد مشابهت با ناقل کلسیم آرآیدوپسیس دارد. این پروتئین نسبت به ناقل کلسیمی آرآیدوپسیس حدود 150 اسید آمینه از ابتدا کمبود دارد که احتمال می‌رود پدیده ویرایش به عنوان یک عامل تغییرات پس از رونویسی، عامل این کمبود در سطح پروتئین باشد. در کل الگوی بیانی ژن نامزد در این بررسی در آزمایش‌های ریزآرایه و PCR کمی رفتار واحدی را نشان دادند و همسانه‌سازی این ژن با کاربرد دو روش IPCR و 5'RACE با تعیین ویژگی‌های ساختاری و پیش‌بینی کارکردهای آن می‌تواند مقدمه مناسبی برای مطالعات ژنتیک برگشتی باشد.

1. Buzas DM, Gresshoff PM (2006) Short and long distance control of root development by LjHAR1 during the juvenile stage of *Lotus japonicus*. *Journal of Plant Physiology* 164: 452-459.
2. Caetano-Anollés G, Gresshoff PM (1991) Plant genetic control of nodulation. *Annual Review of Microbiology* 45: 345-382.
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, 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, 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, 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, Gresshoff PM (1986) Regulation of the soybean-Rhizobium nodule symbiosis by shoot and root factors. *Plant Physiology*. 82: 588-590.
9. Dievart A, 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, Delves AC (1986) Plant genetic approaches to symbiotic nodulation and nitrogen fixation in legumes. In: AD Blonstein, PJ 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, Emerson RB (2000). Functions and mechanisms of RNA editing. *Annual Review of Genetics* 34:499-531.
15. Jiang Q, 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, Stougaard J (2006) A nucleoporin is required for induction of Ca^{2+} 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, 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, 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, Debelle F (2004) A putative Ca²⁺ and calmodulin-dependent protein kinase required for bacterial and fungal symbiosis. *Science*, 303: 1361-1364.
20. Lohar DP, Bird D. McK (2003) *Lotus japonicus*: A new model to study root-parasitic nematodes. *Plant Cell Physiology*. 44: 1176-1184.
21. Marisa L, Wong, 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, 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, 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, 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, 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, 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, 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, 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, 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, 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, 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, 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, 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 leave 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 GmaAfx.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 (GmaAfx.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

*Corresponding author : A.Izadi-Darbandi Tel: 02923040615 Email: alizad110@yahoo.com & azizady@ut.ac.ir