دانشکده کشاورزی
گروه آموزشی بیوتکنولوژی و به‌نژادی گیاهی

رساله دکتری

ارزیابی بیان ژن آنتی پورتر Na^+/H^+ غشای پلاسمایی گیاه *Aeluropus littoralis* در شرایط تنش شوری و جداسازی و انتقال این ژن به گیاه توتون

ولی اله قاسمی عمران

اسفند ۱۳۹۱

دانشکده کشاورزی

رساله دکتری

ارزیابی بیان ژن آنتی پورتر Na^+/H^+ غشای پلاسمایی گیاه هالوفیت *Aeluropus littoralis* در شرایط تنش شوری و جداسازی و انتقال این ژن به گیاه مدل توتون

ولی اله قاسمی عمران

استادان راهنما

دکتر عبدالرضا باقری

دکتر قربانعلی نعمت‌زاده

استادان مشاور

دکتر امین میرشمسی

دکتر نادعلی بابائیان جلودار

اسفند ۱۳۹۱

دانشکده کشاورزی، گروه بیوتکنولوژی و به‌نژادی گیاهی

از این رساله دکتری توسط **ولی اله قاسمی عمران** دانشجوی مقطع **دکتری تخصصی** رشته **بیوتکنولوژی کشاورزی** در تاریخ **۹۱/۱۲/۱۴** در حضور هیات داوران دفاع گردید. پس از بررسی های لازم، هیات داوران این پایان نامه را با نمره عدد ..... حروف ..... و با درجه ..... مورد تایید قرار داد/نداد.

عنوان رساله : **ارزیابی بیان ژن آنتی پورتر Na^+/H^+ منشای پلاسمایی گیاه هالوفیت *Aeluropus littoralis* در شرایط تنش شوری و جداسازی و انتقال این ژن به گیاه مدل توتون**

سمت در هیات داوران	نام و نام خانوادگی	مرتبه علمی	گروه	موسسه / دانشگاه	امضاء
داور خارجی	**منصور امیدی**	**استاد**	**اصلاح نباتات**	**تهران**	
داور خارجی	**مریم مقدم متین**	**دانشیار**	**زیست شناسی**	**فردوسی مشهد**	
داور	**فرج اله شهریاری**	**دانشیار**	**بیوتکنولوژی**	**فردوسی مشهد**	
داور	**سعید ملک‌زاده**	**دانشیار**	**بیوتکنولوژی**	**فردوسی مشهد**	
استاد راهنما	**عبدالرضا باقری**	**استاد**	**بیوتکنولوژی**	**فردوسی مشهد**	
استاد راهنما	**قربانعلی نعمت‌زاده**	**استاد**	**اصلاح نباتات**	**کشاورزی ساری**	
استاد مشاور	**امین میرشمسی**	**استادیار**	**بیوتکنولوژی**	**فردوسی مشهد**	
استاد مشاور	**نادعلی بابائیان جلودار**	**استاد**	**اصلاح نباتات**	**کشاورزی ساری**	
نماینده تحصیلات تکمیلی	**نسرین مشتاقی**	**استادیار**	**بیوتکنولوژی**	**فردوسی مشهد**	

تعهد نامه

عنوان رساله: ارزیابی بیان ژن آنتی پورتر Na^+/H^+ غشای پلاسمایی گیاه *Aeluropus littoralis* در شرایط تنش شوری و جداسازی و انتقال این ژن به گیاه توتون

اینجانب ولی اله قاسمی عمران دانشجوی دوره دکتری رشته بیوتکنولوژی در کشاورزی

دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد تحت راهنمایی دکتر عبدالرضا باقری و دکتر قربانعلی نعمت زاده متعهد می شوم:

- نتایج ارائه شده در این پایان نامه حاصل مطالعات علمی و عملی اینجانب بوده، مسئولیت صحت و اصالت مطالب مندرج را به طور کامل بر عهده می گیرم.
- در خصوص استفاده از نتایج پژوهشهای محققان دیگر به مرجع مورد نظر استناد شده است.
- مطالب مندرج در این پایان نامه را اینجانب یا فرد یگری به منظور اخذ هیچ نوع مدرک یا امتیازی تاکنون به هیچ مرجعی تسلیم نکرده است.
- کلیه حقوق معنوی این اثر به دانشگاه فردوسی مشهد تعلق دارد. مقالات مستخرج از پایان نامه، ذیل نام دانشگاه فردوسی مشهد (Ferdowsi University of Mashhad) به چاپ خواهد رسید.
- حقوق معنوی تمام افرادی که در به دست آمدن نتایج اصلی پایان نامه تاثیر گذار بوده اند در مقالات مستخرج از رساله رعایت خواهد شد.
- در خصوص استفاده از موجودات زنده یا بافتهای آنها برای انجام پایان نامه، کلیه ضوابط و اصول اخلاقی مربوطه رعایت شده است.

تاریخ

نام و امضاء دانشجو

ولی اله قاسمی عمران

مالکیت نتایج و حق نشر

- **کلیه حقوق معنوی این اثر و محصولات آن (مقالات مستخرج، برنامه‌های رایانه‌ای، نرم افزارها و تجهیزات ساخته شده) به دانشگاه فردوسی مشهد تعلق دارد و بدون اخذ اجازه کتبی از دانشگاه قابل واگذاری به شخص ثالث نیست.**
- **استفاده از اطلاعات و نتایج این پایان نامه بدون ذکر مرجع مجاز نیست.**

سپاسگزاری

پس از شکرگزاری از خداوند متعال که توفیق تحصیل علم را در کنار بارگاه ثامن الائمه حضرت علی بن موسی الرضا برای من فراهم آورد، وظیفه خود می دانم تا از زحمات تمامی عزیزانی که مرا در انجام این پایان نامه یاری داده اند تشکر و قدردانی نمایم. از اساتید راهنمای بزرگوارم، جناب آقای دکتر باقری و جناب آقای دکتر نعمت زاده که همیشه مرا مورد لطف خود قرار دادند و از راهنمایی‌های علمی و اخلاقی این بزرگواران بهره‌مند شده ام و جناب آقای دکتر بابائیان و جناب آقای دکتر میرشمسی که زحمت مشاورت این پایان نامه را بر عهده داشتند، کمال تشکر و امتنان را دارم. از جناب آقای دکتر کریستین باخم که زمینه لازم جهت انجام قسمتی از پایان نامه در آزمایشگاه گروه اصلاح نبات مولکولی دانشگاه واخنینگن را فراهم نمودند، کمال تشکر را دارم. از اساتید بزرگوار جناب آقای دکتر شهریاری، جناب آقای دکتر ملک زاده، جناب آقای دکتر امیدی و سرکار خانم دکتر متین که زحمت مطالعه و داوری این رساله را بر عهده داشتند بسیار سپاسگزارم. از نماینده محترم تحصیلات تکمیلی سرکار خانم دکتر مشتاقی که زحمت برگزاری این جلسه را بر عهده داشتند، تشکر می نمایم. از جناب آقای دکتر پیردشتی معاونت محترم پژوهشی و جناب آقای مهندس علوی، جناب آقای مهندس هاشمی، جناب آقای مهندس قاسمی و جناب آقای مهندس شکری، کارشناسان محترم آزمایشگاه بیوتکنولوژی و کشت بافت، جناب آقای نورالهی مسئول روابط عمومی پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان و تمامی مسئولین محترم پژوهشکده کمال تشکر را دارم. از دوست عزیزم جناب آقای مهندس ملک زاده، از همکلاسی عزیزم جناب آقای مهندس پاکدین و دوستان عزیز آقایان مهندس ملک‌زاده، مهندس اکبرپور، مهندس صحرایی، مهندس کریمی و مهندس نظیفی به خاطر کمک هایی که در انجام این تحقیق داشتند، نهایت تشکر و قدردانی را دارم. در پایان از همسر عزیزم که در تمام مراحل انجام پایان نامه در کنارم بودند و خانواده ام که مشوق همیشگی من بودند کمال تشکر را دارم.

چکیده

شوری و به طور عمده کلرید سدیم، از رشد گیاهان جلوگیری نموده و سبب کاهش تولیدات کشاورزی می‌شود. در گیاهان عالی دفع یون سدیم از غشاء سلولی و هدایت و انتقال یون سدیم به واکوئل بواسطه آنتی پورترهای موجود در غشاهای پلاسمایی و واکوئلی انجام می شود. یکی از کارکردهای آنتی پورترسدیم/پروتون در غشای پلاسمایی دفع یون سدیم از سلول‌هاست. ژن *Salt Overly Sensitive 1* آنتی پورترسدیم/پروتون غشای پلاسمایی را کد می کند که نقش مهمی در ایجاد مقاومت به شوری در گیاهان دارد. گیاهان جهش یافته فاقد *SOS1* حساسیت بسیار زیادی به تنش کلرید سدیم داشته و یون سدیم بیشتری نسبت به گیاهان نوع وحشی تجمع می دهند. در این مطالعه، ژن آنتی پورترسدیم/پروتون *SOS1* از گیاه آلوروپوس تحت تنش شوری ناشی از کلرید سدیم جداسازی شد. cDNA جداسازی شده با طول ۳۹۸۱ جفت باز بوده و حاوی چارچوب قرائت آزاد فرضی ۳۴۳۸ جفت بازی می‌باشد. توالی آمینواسیدیSOS1 مشابهت بالایی با ترانسپورترهای گیاهی SOS1 نشان می دهد. پیش بینی می شود AlSOS1 دارای ۱۲ ناحیه فراغشایی فرضی در انتهای آمینی و دم طویل آبگریز سیتوپلاسمی در انتهای کربوکسیلی باشد. در این مطالعه، الگوی بیان این ژن در پاسخ به تیمار شوری ۲۵۰ میلی مولار ۶ ساعت، ۱، ۳، ۸ و ۱۷ روز پس از اعمال تنش مورد بررسی قرار گرفت. بیان ژن *AlSOS1* در بافت برگ پس از ۶ ساعت افزایش یافت. در بافت گره و میان گره سطوح نسخه برداری ژن *AlSOS1*، ۲۴ ساعت پس از اعمال تنش به حداکثر خود رسید و سپس در ۳ و ۸ روز بعد از اعمال تنش به تدریج کاهش یافت تا در نهایت ۱۷ روز پس از تنش به حالت پایدار شاهد بدون تنش بازگشت. میزان بیان این ژن در بافت های ریشه به آهستگی بعد از اعمال تنش افزایش یافت و پس از ۳ روز به میزان حداکثر رسید و این میزان بیان تا ۸ روز پس از تنش ادامه یافت و پس از ۱۷ روز همچنان بیان دو برابر شاهد بود. بیش‌بیان ژن *AlSOS1* در توتون (*Nicotiana tabacum* cv. samsun) صورت پذیرفت و پاسخ گیاهان تراریخته به غلظت های مختلف کلرید سدیم مورد بررسی قرار گرفت. بیش‌بیان ژن *AlSOS1* در توتون مقاومت به شوری را در این گیاه افزایش داد و منجر به افزایش رشد گیاه و تغییر پارامترهای مرفولوژیک و فیزیولوژیک در پاسخ به تنش شوری شد. بیش‌بیان ژن *AlSOS1* در توتون منجر به افزایش طول ساقه، تعداد برگ، وزن تر و خشک و نسبت یون پتاسیم به سدیم در مقایسه با گیاهان نوع وحشی گردید. این نتایج نقش *AlSOS1* را مشخص تر نموده و نشان دهنده اینست که این ژن می تواند جهت تولید گیاهان تراریخته مقاوم به شوری مورد استفاده قرار گیرد.

کلید واژه ها: انتقال ژن، *Aeluropus littoralis* ، *AlSOS1* ، RACE، Real Time.

فهرست مطالب

فصل اول..... ۱

مقدمه..... ۱

فصل دوم..... ۵

بررسی منابع..... ۵

۲-۱-شوری..... ۵

۲-۲- اثرات شوری بر رشد گیاهان..... ۸

۲-۳- شوری در ایران و جهان..... ۹

۲-۴-تنوع گیاهان در مقاومت به شوری..... ۱۰

۲-۵-پاسخ گیاهان به شوری..... ۱۳

۲-۵-۱- انواع پاسخ گیاه یا انواع مقاومت..... ۱۳

۲-۶- درک تنش شوری در گیاهان..... ۱۵

۲-۷-ورود یون سدیم به سلول گیاهی..... ۱۷

۲-۸-سازوکارهای تحمل و مقاومت به شوری در گیاهان..... ۱۷

۲-۸-۱- کنترل جذب یونی به داخل و ممانعت از انتقال نمک..... ۱۸

۲-۸-۲- حذف و ترشح نمک (غدد نمکی و آب دان ها)..... ۱۹

۲-۸-۳- رقیق سازی نمک..... ۲۲

۲-۸-۴- هورمون های گیاهی..... ۲۳

۲-۸-۵-وقایع فیزیولوژیکی و متابولیکی..... ۲۴

۲-۸-۵-۱-پروتئین های شوک گرمایی..... ۲۴

۲-۸-۵-۲- پروتئین‌های نوع LEA..... ۲۵

۲-۸-۵-۳- ترکیبات سازگارساز..... ۲۶

۲-۸-۵-۴- آنتی‌اکسیدان ها و سم‌زداها..... ۲۹

۲-۸-۵-۵- راهبرد های مبتنی بر تنظیم هموستازی یون تحت شرایط تنش شوری..... ۳۰

۲-۸-۶- دفع یون سدیم به خارج ۳۱
۲-۸-۷-حجره بندی یون سدیم در واکوئل ۳۳
۲-۸-۸- هموستازی K^+/ Na^+ ۳۴
۲-۹- بهبود مقاومت به شوری گیاهان از طریق اصلاح سنتی و مهندسی ژنتیک ۳۶
۲-۹-۱-انتخاب و اصلاح برای تحمل به تنش شوری-روش سنتی ۳۷
۲-۹-۲-مهندسی گیاهان برای افزایش مقاومت به شوری: روش تراریختگی ۳۸
۲-۹-۲-۱-گیاهان تراریخته برای محلول های آلی سازگار ساز ۳۹
۲-۹-۲-۲-گیاهان تراریخته برای افزایش تولید آنتی اکسیدانت ها ۴۱
۲-۹-۲-۳-گیاهان تراریخته برای انتقال دهنده های یون ۴۳
۲-۱۰- هالوفیت ۵۴
۲-۱۱- مشخصات جنس *Aeluropus* ۵۷
۲-۱۲- کلید شناسایی گونه های *Aeluropus* در ایران ۵۷
۲-۱۳- مشخصات گونه *Aeluropus littoralis* ۵۸
۲-۱۴- اهداف تحقیق ۵۹
فصل سوم ۶۱
مواد و روش ها ۶۱
۳-۱- بخش اول: جداسازی و شناسایی ژن *AlSOS1* ۶۱
۳-۱-۱- مقدمه ۶۱
۳-۱-۲- مواد گیاهی و شرایط رشد ۶۱
۳-۱-۳- جداسازی ژن *AlSOS1* ۶۲
۳-۱-۳-۱- استخراج RNA کل ۶۲
۳-۱-۳-۲- بررسی کیفیت RNA استخراج شده ۶۳
۳-۱-۳-۳- الکتروفورز ۶۳
۳-۱-۳-۴- اسپکتروفوتومتری ۶۴

۳-۱-۳-۵-تیمار RNA با آنزیم DNase ۶۴
۳-۱-۳-۶- بررسی RNA پس از حذف DNA ۶۵
۳-۱-۳-۷- تکثیر قطعه مورد نظر ۶۶
۳-۱-۳-۸- استخراج محصول PCR از روی ژل آگارز ۶۸
۳-۱-۳-۹- واکنش RACE ۷۰
۳-۱-۳-۱۰- ساخت cDNA آماده سازی شده برای RACE ۷۲
۳-۱-۳-۱۱- استخراج RNA کل ۷۲
۳-۱-۳-۱۲- ساخت رشته اولcDNA ۷۳
۳-۱-۳-۱۳- واکنش RACE-PCR ۷۴
۳-۱-۳-۱۴- استخراج از ژل با استفاده از NucleoTrap® ۷۷
۳-۱-۳-۱۵- همسانه سازی قطعات حاصل از RACE ۷۹
۳-۱-۳-۱۶- واکنش اتصال ۷۹
۳-۱-۳-۱۷- ترانسفورماسیون ۸۱
۳-۱-۳-۱۸- تهیه محیط کشت باکتریایی حاوی آنتی بیوتیک آمپی سیلین، Xgal و IPTG ۸۱
۳-۱-۳-۱۹- تهیه سلول های مستعد و ترانسفورماسیون ۸۱
۳-۱-۳-۲۰- تایید کلونی های نوترکیب با استفاده از Colony PCR ۸۳
۳-۱-۳-۲۱- جداسازی DNA پلاسمیدی ۸۴
۳-۱-۳-۲۲- تعیین توالی نهایی قطعه وارد شده به پلاسمید ۸۷
۳-۲- بخش دوم: بررسی بیان ژن های *AlSOS1* و *AlNHX* در گیاه هالوفیت *Aeluropus littoralis* Parl. تحت تنش شوری ناشی از کلرید سدیم ۸۸
۳-۲-۱- مواد گیاهی و شرایط رشد ۸۸
۳-۲-۲- بررسی بیان ۸۸
۳-۲-۳- انجام Real –Time PCR ۹۰
۳-۲-۴- روش انجام Real –Time PCR ۹۱

۳-۳- بخش سوم: انتقال ژن *AlSOS1* به توتون و اعمال تنش شوری ۹۵
۳-۳-۱- مقدمه ۹۵
۳-۳-۲- مواد و روش ۹۵
۳-۳-۲-۱- مواد گیاهی و شرایط رشد ۹۵
۳-۳-۲-۲- تکثیر ژن *AlSOS1* با استفاده از PCR ۹۶
۳-۳-۲-۴- همسانه سازی ژن در پلاسمید pGEM® –T Vector ۹۸
۳-۳-۲-۵- اتصال قطعه DNA موردنظر به وکتور توسط آنزیم T4 DNA Ligase ۹۸
۳-۳-۲-۶- تراریخته کردن سلول مستعد ای کولی توسط محصول اتصال با استفاده از روش شوک حرارتی ۹۹
۳-۳-۲-۷- تایید کلونی های نوترکیب با استفاده از Colony PCR ۱۰۰
۳-۳-۲-۸- جداسازی DNA پلاسمیدی ۱۰۱
۳-۳-۲-۹- همسانه سازی محصول PCR تکثیر شده ژن *SOS1* در پلاسمید pENTR™ TOPO® ۱۰۱
۳-۳-۲-۱۰- مشخصات وکتور pENTR™/D-TOPO® ۱۰۲
۳-۳-۲-۱۱- طراحی آغازگر ۱۰۴
۳-۳-۲-۱۲- واکنش همسانه سازی TOPO® ۱۰۵
۳-۳-۲-۱۳- تراریخته کردن سلول مستعد ای کولی توسط محصول اتصال با استفاده از روش شوک حرارتی ۱۰۷
۳-۳-۲-۱۴- تایید کلونی های نوترکیب با استفاده از Colony PCR ۱۰۷
۳-۳-۲-۱۵- جداسازی DNA پلاسمیدی ۱۰۸
۳-۳-۲-۱۶- واکنش نوترکیبی LR ۱۰۹
۳-۳-۲-۱۷- تراریخته کردن سلول مستعد ای کولی با استفاده از روش شوک حرارتی ۱۱۲
۳-۳-۲-۱۸-تایید کلونی های نوترکیب با استفاده از Colony PCR ۱۱۳
۳-۳-۲-۱۹- جداسازی DNA پلاسمیدی ۱۱۴
۳-۳-۲-۲۰- انتقال سازه pK7WG2-*AlSOS1* به اگروباکتریوم ۱۱۵

۳-۳-۲-۲۱- روش انتقال پلاسمید pK7WG2-*AlSOS1* به باکتری اگروباکتریوم..... ۱۱۶
۳-۳-۲-۲۲- تایید کلونی های نوترکیب با استفاده از Colony PCR..... ۱۱۸
۳-۳-۲-۲۳- بررسی پایداری پلاسمید pK7WG2-*AlSOS1*..... ۱۱۸
۳-۳-۲-۲۴- انتقال ژن *AlSOS1* به گیاه توتون (*Nicotiana tabacum* L. cv Samsun)..... ۱۱۹
۳-۳-۲-۲۵- سازگاری گیاهان تراریخته احتمالی..... ۱۲۲
۳-۳-۲-۲۶- تایید مولکولی گیاهان تراریخته احتمالی با استفاده از PCR..... ۱۲۲
۳-۳-۲-۲۷- اعمال تیمار شوری..... ۱۲۳
۳-۳-۲-۲۸- اندازه گیری غلظت کلروفیل برگ..... ۱۲۴
۳-۳-۲-۲۹- اندازه گیری میزان نشت الکترولیتها (ELP)..... ۱۲۴
۳-۳-۲-۳۰- اندازه گیری میزان یون سدیم و پتاسیم..... ۱۲۵
فصل چهارم..... ۱۲۷
نتایج و بحث..... ۱۲۷
۴-۱- بخش اول: جداسازی و شناسایی ژن *AlSOS1*..... ۱۲۷
۴-۲- بخش دوم: بررسی بیان ژن های *AlSOS1* و *AlNHX* در گیاه هالوفیت *Aeluropus littoralis* Parl. تحت تنش شوری ناشی از کلرید سدیم..... ۱۳۸
۴-۳- بخش سوم: انتقال ژن *AlSOS1* به توتون و اعمال تنش شوری..... ۱۴۵
۴-۳-۱- تکثیر ژن *AlSOS1* با استفاده از PCR..... ۱۴۵
۴-۳-۲- انتقال ژن *AlSOS1* به گیاه توتون (*Nicotiana tabacum* L. cv Samsun)..... ۱۵۲
۴-۳-۳- اعمال تیمار شوری..... ۱۵۳
فصل پنجم..... ۱۶۵
نتیجه گیری کلی و پیشنهادات..... ۱۶۵
منابع..... ۱۶۸

فهرست شکل‌ها

عنوان شکل	صفحه
شکل ۲-۱. تنوع در مقاومت به شوری گونه های مختلف	۱۲
شکل۲-۲. مسیر انتقال پیام که بیان و فعالیت انتقال دهنده‌های یون را تنظیم می‌کند	۱۵
شکل ۲-۳. نمایی شماتیک از 5'-RACE	۴۶
شکل ۲-۴. نمایی شماتیک از 3'-RACE	۴۷
شکل ۲-۵. گل آذین و گیاه کامل *Aeluropus littoralis*	۵۸
شکل ۲-۶. *Aeluropus littoralis* در رویشگاه های طبیعی و در آزمایشگاه	۵۹
شکل۳-۱. ارتباط بین آغازگرهای مورد استفاده در واکنشهای SMARTer RACE با الگو و با محصولات RACE حاصله	۷۱
شکل ۳-۲. تصویر شماتیکی از ساختار وکتور pTZ57R/T	۸۲
شکل۳-۳. گیاهان آلوروپوس مورد استفاده برای اعمال تنش شوری	۸۸
شکل۳-۴. الکتروفورز RNAی کل به ترتیب قبل و بعد از تیمار DNase روی ژل آگارز ۱/۲ درصد در نمونه بافت برگی	۸۹
شکل۳-۵. شمایی کلی از محیط نرم افزاری دستگاه C1000™ Thermal Cycler شرکت BioRAD	۹۴
شکل۳-۶. نقشه ژنتیکیpGEM®-TVector شرکت Promega	۹۸
شکل۳-۷. نمایی شماتیک از چگونگی عملکرد توپوایزومراز	۱۰۴
شکل۳-۸. شیوه طراحی درست آغازگر مورد نیاز برای همسانه سازی در pENTR™/D-TOPO®.	۱۰۵
شکل۳-۹. شمای کلی از پلاسمیدpENTR™ TOPO® (شرکت Invitrogen)	۱۰۶
شکل ۳-۱۰. نمایی شماتیک از ناقل بیان دو گانه pK7WG2	۱۰۹
شکل۳-۱۱. نمایی شماتیک از واکنش LR	۱۱۰
شکل۳-۱۲. نمایی شماتیک با جزئیات بیشتر از واکنش LR	۱۱۰
شکل۳-۱۳. نحوه قرار دادن نمونه پلاسمید داخل کاوت	۱۱۶
شکل۳-۱۴. نمایی شماتیک از دستگاه الکتروپوراسیون شرکت Biorad و تنظیمات آن	۱۱۷
شکل۳-۱۵. مراحل مختلف انتقال ژن *AlSOS1* به گیاه توتون	۱۲۱

شکل۴-۱. الکتروفورز ژل آگارز RNAی کل استخراج شده از نمونه های ریشه و ساقه..... ۱۲۸
شکل۴-۲. الکتروفورز ژل آگارز محصول واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای دجنره و cDNA گیاه آلوروپوس تحت تنش شوری..... ۱۲۸
شکل۴-۳. همردیفی قطعه بدست آمده در NCBI..... ۱۲۹
شکل ۴-۴. الکتروفورز محصولات حاصل از RACE PCR..... ۱۳۰
شکل ۴-۵. برش باند های مورد نظر از روی ژل آگارز..... ۱۳۱
شکل ۴-۶. الکتروفورز محصولات حاصل از RACE PCR پس از خالص سازی..... ۱۳۱
شکل۴-۷. کلونی های سفید و آبی تشکیل شده مربوط به ترانسفورماسیون محصولات 5'-RACE و 3'-RACE درج شده در پلاسمید pTZ57R/T..... ۱۳۱
شکل ۴-۸. الکتروفورز محصولات Colony PCR کلونیهای سفید مربوط به واکنش درج محصولات 5'-PCR..... ۱۳۲
شکل ۴-۹. الکتروفورز محصولات Colony PCR کلونی های سفید مربوط به واکنش درج محصولات 3'-PCR..... ۱۳۲
شکل۴-۱۰. همردیفی توالی اسید آمینه AlSOS1 از گیاه آلوروپوس..... ۱۳۵
شکل۴-۱۱. درخت فیلوژنتیکی آنتی پورترهای سدیم/پروتون..... ۱۳۶
شکل ۴-۱۲. الکتروفورز ژل آگارز محصولات حاصل از Real time PCR ژن β-Actin..... ۱۳۸
شکل۴-۱۳. منحنی ذوب مربوط به ژن های *AlNHX* و *AlSOS1* و β-Actin در بافت برگی..... ۱۳۹
شکل۴-۱۴. فراوانی نسبی mRNAی ژن های *AlNHX* و *AlSOS1* در برگ های گیاه آلوروپوس.. ۱۴۰
شکل۴-۱۵. فراوانی نسبی mRNAی ژن های *AlNHX* و *AlSOS1* در ریشه های گیاه آلوروپوس. ۱۴۱
شکل۴-۱۶. فراوانی نسبی mRNAی ژن های *AlNHX* و *AlSOS1* در گره و میان گره های گیاه آلوروپوس..... ۱۴۲
شکل۴-۱۷. الکتروفورز ژل آگارز محصول واکنش PCR با استفاده از آغازگرهایF (SOS1) و R (SOS1) و cDNA گیاه آلوروپوس تحت تنش شوری..... ۱۴۵
شکل۴-۱۸. برش باند مورد نظر از روی ژل آگارز و الکتروفورز آن پس از خالص سازی..... ۱۴۶
شکل۴-۱۹. الکتروفورز محصولات Colony PCR کلونیهای سفید..... ۱۴۶
شکل۴-۲۰. الکتروفورز محصولات Colony PCR کلونیهای سفید حاصل انتقال سازه pENTR™/D-*AlSOS1*-TOPO® به ای کولی..... ۱۴۷

شکل۴-۲۱. الکتروفورز محصولات Colony PCR کلونیهای سفید حاصل انتقال سازه-pK7WG2 *AlSOS1* به ای کولی..... ۱۴۸
شکل ۴-۲۲. الکتروفورز محصولات PCR پلاسمیدهای استخراج شده..... ۱۴۹
شکل۴-۲۳. هضم پلاسمیدهای نوترکیب با آنزیم برشی *Eco*RV..... ۱۵۰
شکل۴-۲۴. الکتروفورز محصولات Colony PCR کلونیهای اگروباکتریوم..... ۱۵۱
شکل ۴-۲۵. الکتروفورز محصولات Colony PCR کلونیهای ای کولی..... ۱۵۱
شکل۴-۲۶. تایید مولکولی گیاهان تراریخته احتمالی نسل T0 با استفاده از روش RT-PCR..... ۱۵۳
شکل ۴-۲۷. گیاهان توتون تراریخته و شاهد۲۰ روز پس از اعمال تنش شوری..... ۱۵۴
شکل ۴-۲۸. اثر تنش شوری ۴ هفته پس از اعمال تنش روی ارتفاع گیاهان تراریخته و شاهد..... ۱۵۴
شکل۴-۲۹. اثر تنش شوری ۴ هفته پس از اعمال تنش روی تعداد برگ های گیاهان تراریخته و شاهد..... ۱۵۵
شکل ۴-۳۰. اثر تنش شوری ۴ هفته پس از اعمال تنش روی وزن تر اندام های هوایی گیاهان تراریخته و شاهد..... ۱۵۶
شکل ۴-۳۱. اثر تنش شوری ۴ هفته پس از اعمال تنش روی وزن خشک اندام های هوایی گیاهان تراریخته و شاهد..... ۱۵۶
شکل ۴-۳۲. اثر تنش شوری ۴ هفته پس از اعمال تنش روی میزان تجمع یون سدیم در اندام های هوایی گیاهان تراریخته و شاهد..... ۱۵۸
شکل ۴-۳۳. اثر تنش شوری ۴ هفته پس از اعمال تنش روی نسبت یون پتاسیم به سدیم اندام های هوایی گیاهان تراریخته و شاهد..... ۱۵۹
شکل ۴-۳۴. اثر تنش شوری ۴ هفته پس از اعمال تنش روی درصد نشت الکترولیت برگهای گیاهان تراریخته و شاهد..... ۱۵۹

فهرست جدول‌ها

عنوان جدول	صفحه
جدول۲-۱. اثر تنش شوری روی گیاهان	۱۲
جدول۲-۲. مکانیزم های مقاومت به شوری تنظیم شده توسط فرایندهای گیاهی	۱۴
جدول ۳-۱. ترکیبات واکنش تیمار RNA با آنزیم DNase	۶۵
جدول ۳-۲. ترکیبات واکنش ساخت رشته اول cDNA	۶۶
جدول ۳-۳. اجزاء مخلوط واکنش PCR با استفاده از آنزیم Taq DNA polymerase	۶۷
جدول ۳-۴. برنامه چرخه ای واکنش زنجیره ای پلی مراز با استفاده از آنزیم Platinum® Taq High Fidelity	۶۸
جدول۳-۵. مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در RACE	۷۲
جدول۳-۶. مواد مورد استفاده در واکنش RACE	۷۴
جدول۳-۷. مواد مورد استفاده در واکنش RACE-PCR	۷۵
جدول ۳-۸. واکنش5'-RACE	۷۵
جدول ۳-۹. واکنش3'-RACE	۷۶
جدول ۳-۱۰. برنامه دمایی RACE-PCR	۷۶
جدول۳-۱۱. اجزای واکنش اتصال	۷۹
جدول ۳-۱۲. مقادیر مناسب محصول PCR برای واکنش اتصال	۸۰
جدول۳-۱۳. اجزاء مخلوط واکنش PCR با استفاده از آنزیم Taq DNA polymerase	۸۴
جدول ۳-۱۴. برنامه چرخه ای واکنش زنجیره ای پلی مراز با استفاده از آنزیم Taq	۸۴
جدول۳-۱۵. بافرهای استخراج پلاسمید و اجزای آنها	۸۶
جدول۳-۱۶. توالی‌های مربوط به آغازگرهای عمومی M13	۸۷
جدول۳-۱۷. مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در Real-time	۹۱
جدول۳-۱۸. اجزاء مخلوط واکنش Real-time PCR	۹۲
جدول۳-۱۹. برنامه دمایی Real-time PCR	۹۲
جدول ۳-۲۰. اجزاء مخلوط واکنش PCR با استفاده از آنزیم Taq DNA polymerase	۹۶
جدول ۳-۲۱. برنامه چرخه ای واکنش زنجیره ای پلی مراز با استفاده از آنزیم Platinum® Taq High Fidelity	۹۷
جدول۳-۲۲. اجزای مخلوط واکنش اتصال	۹۹
جدول۳-۲۳. توالی‌های مربوط به آغازگرهای مورد استفاده برای Colony PCR	۱۰۰
جدول۳-۲۴. توالی‌های مربوط به آغازگرهای عمومی M13	۱۰۱
جدول ۳-۲۵- ترکیب مواد جهت همسانه سازی® TOPO	۱۰۶
جدول۳-۲۶. توالی‌های مربوط به آغازگرهای مورد استفاده برای Colony PCR	۱۰۸

جدول ۳-۲۷- اجزاء واکنشLR..... ۱۱۲
جدول۳-۲۸. توالی‌های مربوط به آغازگرهای مورد استفاده برای Colony PCR..... ۱۱۳
جدول۳-۲۹. توالی آغازگرهای مورد استفاده در PCR پلاسمیدها..... ۱۱۴
جدول ۳-۳۰. ترکیبات واکنش هضم با آنزیم *Eco*RV..... ۱۱۵
جدول۳-۳۱. توالی‌های مربوط به آغازگرهای مورد استفاده برای Colony PCR..... ۱۱۸
جدول ۳-۳۲. توالی‌های مربوط به آغازگرهای مورد استفاده برای تایید مولکولی گیاهان تراریخته احتمالی..... ۱۲۳
جدول ۴-۱. اثر تنش شوری در میزان کلروفیل برگها ۴ هفته پس از اعمال تنش..... ۱۵۷

فهرست علامت ها و اختصارها

معادل فارسی	معادل انگلیسی	علامت
پروتئین کیناز فعال شونده با AMP جانوری	Animal AMP-activated kinase	AMPK
اسکوربات‌پراکسیداز	Ascorbate peroxidase	APX
دی ان ای مکمل	Complementary DNA	cDNA
چرخه آستانه	Cycle Threshold	CT
دی تیو تریتول	Dithiothreitol	DTT
میزان نشت الکترولیت‌ها	Electrolytic leakage percentage	ELP
برچسب های توالی بیان شده	Expressed sequence tags	EST
آغازگر اختصاصی ژن	Gene-Specific Primer	GSP
پروتئین پرتمایل انتقال دهنده پتاسیم	High affinity Potassium Transport protein	HKT
پروتئین های شوک گرمایی	Heat Shock Protein	HSPs
پروتئین‌های فراوان در اواخر جنین زایی	Late Embryogenesis Abundant	LEA
جایگاه همسانه سازی چندگانه	Multiple cloning site	MCS
آغازگر آشیانه‌ای اختصاصی ژن	Nested Gene-Specific Primer	NGSP
چارچوب قرائت آزاد	Open Reading Frame	ORF
اورنتین آمینوترانسفراز	Ornitine amino transsferase	OAT
دلتا ۱-پیرولین-۵-کربوکیسلات سینتتاز	Δ1-pyrroline-5-carboxylate synthetase	P5CS
واکنش زنجیره ای پلیمراز	Polymerase Chain Reaction	PCR

علامت	معادل انگلیسی	معادل فارسی
RACE	Rapid Amplification of cDNA Ends	تکثیر سریع انتهاهای دی ان ای مکمل
RNAi	RNA interference	RNAی مداخله‌گر
ROS	Reactive oxygen species	گونه های فعال اکسیژن
RT-PCR	Reverse Transcription-PCR	واکنش زنجیره ای پلیمراز نسخه برداری معکوس
SOD	Super Oxide Dismutase	سوپراکسید دیسموتاز
UTR	Untranslated Region	نواحی ترجمه نشونده

فصل اول

مقدمه

شوری و به طور عمده کلرید سدیم، رشد کلی گیاهان را محدود نموده و سبب کاهش تولید در محصولات کشاورزی می‌شود. در بسیاری از گیاهان بویژه غلات، یون سدیم علت اصلی آسیب ویژه یونی محسوب می‌شود (تستر و دونپورت، ۲۰۰۳). به دلیل اینکه سدیم فراوان‌ترین کاتیون در خاک‌های شور بشمار می رود و از لحاظ شیمیایی شباهت بسیار زیادی به یون پتاسیم دارد، سمیت سدیم در سیتوزول اغلب با کمبود پتاسیم همراه است (پاردو و روبیو،۲۰۱۱). بسیاری از آنزیم‌های سیتوزولی با یون پتاسیم فعال می‌شوند و توسط یون سدیم مهار می‌شوند (فلاورز و یئو، ۱۹۹۵). سدیم در غلظت‌های بالا، به دلیل اثرات مضر روی جذب مواد معدنی و آب، فعالیت‌های آنزیمی، فتوسنتز و سوخت و ساز، برای گیاه سمی است (نیو و همکاران، ۱۹۹۵). حساسیت به شوری آنزیم‌های سیتوزولی هم در گیاهان حساس به شوری و هم در گیاهان شورپسند مشابه است و بیانگر این نکته است که نگهداری نسبت پتاسیم به سدیم در سطح غلظتی بالا، به عنوان پیش نیاز کلیدی برای رشد گیاه در شرایط شوری بالا بشمار می‌رود (گلن و همکاران، ۱۹۹۹).

گیاهان از راهکارهای متفاوتی با هدف جلوگیری از تجمع سدیم اضافی استفاده می‌نمایند که این راهکارها شامل بهبود جذب یون توسط ریشه، بارگیری در آوند چوبی جهت توزیع در فواصل دور، بازجذب یون توسط پروتئین‌های پرتمایل انتقال دهنده پتاسیم (HKT) در بافت‌های گیاهی ویژه و حجره بندی واکوئلی در پیکره گیاه و در برگ‌های مسن‌تر می‌باشد (نیو و همکاران، ۱۹۹۵; ژو، ۲۰۰۱; پاردو و روبیو، ۲۰۱۱). در درون سلول های گیاهی غلظت‌های سدیم سیتوزولی عموما توسط حجره‌بندی یا دفع سدیم

در سطح غیرسمی نگهداشته می‌شود (بلوموالد، ۲۰۰۰). در محیط‌های شور، حجره‌بندی یون‌هایی که بطور بالقوه برای سوخت و ساز سلولی آسیب رسان هستند (بطور مثال کلر و سدیم) راهکار موثری جهت سمیت‌زدایی یونی فراهم می آورد و در عین حال نسبت بالای پتاسیم به سدیم را در سیتوزول حفظ می‌کند. بعلاوه، انباشتگی یون‌ها در داخل واکوئل فشار اسمزی مناسبی را در جهت بهبود جذب آب فراهم می‌نماید (پاردو و روبیو، ۲۰۱۱). آنتی‌پورترهای واکوئلی سدیم/پروتون پروتئین‌های غشایی هستند که تبادل سدیم را در مقابل پروتون در غشاء واکوئل تحت گرادیانت الکتروشیمیایی پروتون تولید شده توسط H-ATPase و H-PP$_i$ase کاتالیز می‌کنند (بارکلا و بلوموالد، ۱۹۹۱; یاماگوچی و همکاران، ۲۰۰۳). بیش‌بیان ژن آنتی-پورتر واکوئلی سدیم/پروتون حاصل از گیاه آرابیدوپسیس (*AtNHX1*) منجر به افزایش مقاومت به شوری در گیاهان تراریخته کلزا (یاماگوچی و همکاران، ۲۰۰۳)، گوجه فرنگی (ژانگ و بلوموالد، ۲۰۰۱) و گندم (ژو و همکاران، ۲۰۰۸) شده است.

از طرف دیگر، مسیر وابسته به کلسیم (SOS) که تنظیم‌کننده تعادل یونی سدیم و پتاسیم و انتقال دوربرد[1] سدیم می‌باشد، در گیاه آرابیدوپسیس گزارش شده است. در مسیر SOS پروتئین متصل شونده به کلسیم یا SOS3، سیگنال تنش شوری را دریافت و منتقل می نماید. SOS3 پروتئین SOS2 را فعال نموده و به سمت غشای پلاسمایی هدایت می‌نماید تا فسفریلاسیون ترانسپورتر سدیمی SOS1 توسط کمپلکسSOS2-SOS3 فراهم شود (گیو و همکاران، ۲۰۰۲; ژو، ۲۰۰۳) . پروتئین آنتی پورتر سدیم/پروتون SOS1، پروتئین غشای پلاسمایی ۱۲۷ کیلو دالتونی با ۱۲ دومین فراغشایی فرضی در انتهای N و دنباله بلند سیتوپلاسمی آبدوست در انتهای C می باشد (شی و همکاران، ۲۰۰۰). یکی از کارکردهای این آنتی پورتر در غشای پلاسمایی، دفع سدیم از سلول ها است (بلوموالد، ۲۰۰۰). ژن های *SOS1* در گیاهان حساس به شوری نظیر برنج (*OsNHA1* و*OsSOS1*)(ژوو و همکاران، ۲۰۰۶; مارتینز-آتینزا و همکاران، ۲۰۰۷)، گندم نانوایی (*TaSOS1*)(زو و همکاران، ۲۰۰۸) *Phragmites australis* (*PhaNHA1*-u)(تاکاهاشی و همکاران، ۲۰۰۹) و همچنین گیاهان مقاوم به شوری نظیر *Thellungiella halophila* (

[1] - Long-Distance