

بررسی تغییرات کمی و کیفی میزان پروتئین، کلروفیل و کاروتوئید در کلزای تراریخت شده با آنتیسنس ژن گلوتامین سنتتاز (GS1)

محترار جلالی جواران^۱، حمید هاشم‌زاده^۲ و امیر موسوی^۳

چکیده

بررسی گیاهان تراریخت در پروژه انتقال ژن، از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. در این پژوهش، نسل دوم (T_1) گیاهان تراریخت کلزا که ژن گلوتامین سنتتاز در جهت آنتیسنس به آنها منتقل شده بود، سورد بررسی قرار گرفت. میزان پروتئین کل محلول برگ و مقدار کلروفیل‌های a، b و کاروتوئید، با استفاده از روش اسپکتروفوتومتری و معادلات مربوطه تعیین شد. میزان کمی پروتئین در برگ‌های کلزا در مراحل مختلف رشدی گیاه و تیمارهای مختلف بررسی شد که در مرحله قبل از گل‌دهی (MGI) شروع به افزایش نموده و در زمان گل‌دهی (MG2) به بیشترین میزان رسید و در مرحله پیری برگ (SS) مقدار پروتئین کل کاهش نشان داد.

در مقایسه بین تیمارها، تیمار A2 بیشترین میزان پروتئین و تیمار A6 کمترین مقدار را نشان دادند. از نظر میزان کلروفیل‌های a و b بین تیمارهای مورد مطالعه اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ولی بین مراحل مختلف رشد کلزا تفاوت معنی‌دار بوده و مرحله MG2 بیشترین و SS کمترین میزان کلروفیل‌های a و b را نشان دادند. به منظور مطالعه الگوهای باندی در پروتئین‌هایی استخراج شده از گیاهان تراریخت در مقایسه با گیاه شاهد از روش اس.دی.اس. پیج استفاده شد که در مقایسه الگوهای باندی حاصل از مرحله MGI تفاوت قابل ملاحظه‌ای بین باندهای دیده نشد، ولی در باندهای حاصل از مراحل MG2 و YG تفاوت‌هایی مشاهده شد. در مرحله YG اختلاف بین تیمارهای A3، A5 و A6 با شاهد در موقعیت وزنی ۴۱ کیلو دالتون و بین تیمارهای A1 و A2 با تیمار شاهد در موقعیت وزنی ۲۳/۶ کیلو دالتون مشاهده گردید. در سورد باندهای حاصل از مرحله MG2 نیز بین تیمارهای A1، A3 و A4 و A6 با تیمار شاهد در موقعیت وزنی ۵۷ کیلو دالتون اختلافاتی وجود داشت. با توجه به این که کلیه شرایط برای رشد، استخراج پروتئین و آنالیز ماکرومولکول‌ها در گیاهان تراریخت و شاهد کاملاً کترل شده و مشابه بوده است، در نتیجه می‌توان احتمال داد که تفاوت‌های مشاهده شده در گیاهان تراریخت نسبت به گیاهان شاهد به دلیل اثر آنتیسنس ژن گلوتامین سنتتاز می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: ژن گلوتامین سنتتاز، پروتئین، کلروفیل، آنتیسنس، تراریخته، کلزا

۱. استادیار ژنتیک مولکولی (مهندسی ژنتیک)، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

۲. کارشناس ارشد اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

۳. استادیار بیوتکنولوژی کشاورزی، مرکز ملی مهندسی ژنتیک و تحقیقات زیستی، تهران

مقدمه

توانایی جذب آمونیاک حاصل از فرآیندهای تشییت ازت و کاتابولیسم اسیدهای آمینه را دارد (۲). در تحقیقی که اوچر و همکاران در سال ۱۹۹۹ انجام دادند، روشن شد که ایزوفرم‌های مختلف این ژن، بهویژه ایزوفرمی که در سیتوپلاسم بیان می‌شود (GS₁) بعد از شروع مرحله پیری در بافت‌های برگی گیاه کلزا، افزایش محسوسی نشان می‌دهند که حاکی از نقش ژن گلوتامین سنتتاز در فرآیند پیری برگ گیاه کلزاست (۱۵). بنابراین از بین رفتن کلروفیل، یک پارامتر مناسب برای ثبت پدیده پیری برگ‌ها به شمار می‌رود که با کاهش موادی چون پروتئین ارتباط مستقیم دارد (۱۱).

تکنولوژی آر.ان.ای. آنتی سنس (RNA Antisense)، به عنوان یک ابزار تحقیقاتی، روش جایگزینی را برای به دست آوردن موتان‌ها به منظور مطالعه عملکرد ژن‌ها فراهم می‌کند که این تکنیک کاربرد فراوانی در علم مهندسی ژنتیک گیاهی دارد (۲۳). تکنیک آر. ان. ای. آنتی سنس با موفقیت در تنظیم کاهشی (Polygalacturonase) فعالیت آنزیم‌های پلی‌گالاکتروروناز (Pectinesterase)، و متابولیسم دیواره سلول، پکتین استراز (Pectinesterase)، و هم‌چنین برای کاهش سنتز اتیلن در میوه‌های گوجه فرنگی به کار گرفته شده است (۷ و ۱۸). با این پیش فرض که استفاده از تکنیک آر. ان. ای. آنتی سنس گلوتامین سنتتاز سیتوپلاسمی (GS₁) احتمالاً فعالیت آنزیم گلوتامین سنتتاز را کاهش یا بیان آن را متوقف می‌نماید، توالی ژن گلوتامین سنتتاز سیتوپلاسمی (GS₁) در گیاه کلزا شناسایی و جدا شد (۹). توالی دی.ان.ای (DNA) ژن (GS₁، که درجهت معکوس و پائین‌دست پرومотор (Promoter) CaMV 35S جای داده شده بود به داخل ناحیه تی- دی.ان.ای (T-DNA) یک سیستم انتقال (PVW259) کلون گردید. سپس دی.ان.ای آنتی سنس با استفاده از روش آگروباکتریوم (*Agrobacterium tumefacince*) به داخل ژنوم سلول‌های کلزا (رقم و ستار) منتقل شد. سلول‌های تراریخت با استفاده از ژن مقاومت به کانامایسین (Kanamycin resistance) که به آنتی سنس GS₁ پیوسته بود، بر سطح محیط کشت حاوی ۲۰

روغن و چربی مورد نیاز انسان از منابع مختلف گیاهی و حیوانی تأمین می‌شود. روغن‌های گیاهی به دلیل دارا بودن مقادیر زیادی پروتئین و بهویژه اسیدهای چرب غیراشبع، نقش مهمی در کنترل کلسترول خون و تندrstی جوامع انسانی دارند. کلزا یکی از مهم‌ترین دانه‌های روغنی جهان محسوب می‌شود (۲۲). حدود ۱۴٪ از کل تولید روغن‌نباتی جهانی توسط کلزا تأمین می‌شود که تولید جهانی آن طی سال ۲۰۰۱ میلادی برابر ۴۸ میلیون تن گزارش گردیده است. با توجه به این که میزان روغن حاصل از دانه‌های روغنی تولید داخل، حداقل به ۸۶ هزار تن می‌رسد، که چیزی حدود ۸٪ از نیاز روغن خام کشور را تأمین می‌کند، اهمیت گیاه روغنی کلزا بیش از پیش آشکار می‌شود. بررسی‌های انجام شده در سال‌های اخیر، سازگاری ارقام مختلف تیپ‌های بهاره و پاییزه کلزا را با شرایط اقلیمی مناطق مختلف ایران نشان می‌دهد (۱). ویژگی‌های خاص گیاه کلزا و سازگاری آن با شرایط آب و هوایی اکثر نقاط کشور سبب شده است که توسعه کشت این گیاه به عنوان نقطه امیدی برای تأمین روغن خام مورد نیاز کشور محسوب شود. اصلاح کلزا از سالیان پیش با روش‌های کلاسیک شروع شده و طی چند سال اخیر، از تکنیک‌های مهندسی ژنتیک به منظور بهنژادی این گیاه بهره گرفته می‌شود.

آنزیم‌های مختلفی در روند تشکیل و تولید ترکیبات گیاهی (پروتئین‌ها، اسیدهای آمینه و...) نقش دارند. یکی از این ترکیبات آنزیم گلوتامین سنتتاز (Glutamine synthetase) می‌باشد (۲ و ۱۵). گلوتامین سنتتاز دارای اشکال ایزوآنزیمی متفاوتی است که با ارگان‌ها و اجزای سلولی ارتباط دارد (۴ و ۲۰ و ۱۳). در گیاهان غالباً دو نوع ایزوآنزیم گلوتامین سنتتاز یافت می‌شود. یکی از آنها گلوتامین سنتتاز سیتوپلاسمی (GS₁) و دیگری گلوتامین سنتتاز کلروفیل‌است (GS₂) است که در کلروفیل‌است بیان می‌گردد. گلوتامین سنتتاز کلروفیل‌است (GS₂) قادر به جذب آمونیاک آزاد شده در طی فرآیند تنفس نوری می‌باشد، از طرفی گلوتامین سنتتاز سیتوپلاسمی (GS₁) نیز

کلروفیل‌های برگی با استفاده از روش تغییر یافته گوی و همکاران (۶) انجام شد.

روش استخراج پروتئین و کلروفیل

نمونه‌های یک گرمی برگ از ازت مایع بیرون آورده و در هاون چینی کوچک، با مقداری ازت مایع، ساییده و به پودر تبدیل شدند. پودر حاصل با 3 ml بافر استخراج (تریس کلرايد (EDTA) 50 میلی مولار pH $7/5$ ، ای.دی.تی.ا (Tris-HCl) 50 میلی مولار - 2-مرکاپتوواتانول (Mercapto ethanol) 2 میلی مولار و 2 مخلوط شد. سپس $200\text{ }\mu\text{l}$ از هر نمونه با میکروپیپت برداشته و در لوله‌های اپندورف (علامت گذاری شده) ریخته شدند و $800\text{ }\mu\text{l}$ استون سرد شده (Aceton-ice cold) به آنها اضافه گردید. نمونه‌ها به منظور سنجش مقدار کمی کلروفیل‌های گیاهی در 4°C نگهداری شدند (که قابل نگهداری به مدت طولانی نبوده و لازم است که با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتری میزان رنگدانه‌ها در اسرع وقت اندازه‌گیری شوند). بقیه عصاره استخراج شده را درون لوله 5 ml پلاستیکی سرپوش دار (ویژه سانتریفیوژ) ریخته و مشخصات نمونه روی آن نوشته شد (لازم به توضیح است که کلیه مراحل انجام آزمایش روی یخ انجام گرفت) و سپس نمونه‌ها با استفاده از اولترا سانتریفیوژ ($11000\times$ دور در دقیقه) به مدت 23 دقیقه سانتریفیوژ شدند. در این مرحله قسمت صاف شده محلول هر لوله ($700\text{ }\mu\text{l}$) برداشته و به سرعت به فریزر 20°C - منتقل شدند (Bradford) (۸). مقدار کمی پروتئین نمونه‌ها به روش برادفورد (Bradford) اندازه‌گیری شد (۳). بقیه محلول‌های استخراج شده با هم حجم از بافر مخصوص (تریس-کلرايد $0/0625\text{ مولار}$ pH $6/8$)، 2 میلی مولار - 2-مرکاپتوواتانول (۷/v)، اس.دی.اس.دی.اس. (۰.۲% w/v)، گلیسرول $10\text{٪} (v/v)$ و بروموفنل بلو $10\text{٪} (v/v)$ مخلوط شده و به مدت 2 دقیقه در آب جوش (100°C) قرار گرفتند و سپس به مدت 20 دقیقه با $4000\times$ دور سانتریفیوژ شدند. در نهایت محتويات داخل لوله‌ها به دو قسمت تقسیم گردیده و در دو اپندورف ($1/5\text{ ml}$) ریخته و در فریزر 20°C - (تا زمان مناسب جهت ارزیابی و بررسی الکتروفورزی) نگهداری شدند.

میلی‌گرم در لیتر کانامایسین انتخاب گردیدند و در ادامه از سلول‌های تاریخت شده گیاه تولید شد (۱۰). پژوهش حاضر در ادامه تحقیق قبلی و به منظور بررسی مولکولی نسل دوم (T_1) گیاهان تاریخت کلزا ای که ژن گلوتامین سنتتاز در جهت آنتی‌سننس به آنها منتقل شده بود، انجام پذیرفت. در این بررسی تغییرات کمی پروتئین کل محلول برگی و کلروفیل‌های a و b و کاروتونید گیاهان تاریخت کلزا در مقایسه با گیاه شاهد ارزیابی شده و هم‌چنین الگوهای باندی حاصل از الکتروفورز پروتئین در گیاهان تاریخت و شاهد، با استفاده از روش اس.دی.اس.پیج (SDS-PAGE) مقایسه و بررسی شد.

مواد و روش‌ها

کار انتقال آنتی‌سننس ژن گلوتامین سنتتاز به تیمارهای تاریخت، قبلًا با روش اگریو-باکتریوم انجام شده بود (۱۰). بذور گیاهان تاریخت شده با آنتی‌سننس ژن GS1 که متعلق به رقم و ستار (Westar) بود به همراه گیاه شاهد تاریخت نشده، مورد ارزیابی قرار گرفتند که شش توده بذری جمع‌آوری شده از گیاهان تاریخت نسل اول (T_0) به همراه شاهد (مجموعاً 7 توده بذری) تیمارهای آزمایشی را تشکیل دادند. کشت گیاهان در شرایط گلخانه‌ای (دماه $20-24^{\circ}\text{C}$ و قتوپریود 16 ساعت روش‌نایی) در اتاقک رشد گروه اصلاح نباتات دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس انجام گردید. تیمارهای تاریخت آنتی‌سننس با علامت اختصاری A₁ تا A₆ و تیمار شاهد با W.T معرفی شدند. تیمارها در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با داده‌های چند مشاهده‌ای طراحی شده و داده‌های حاصل جمع‌آوری و مورد آنالیز قرار گرفتند. برای نمونه‌برداری از گیاهان 4 مرحله رشدی شامل، مرحله روزت (MG1)، گل‌دهی (YG)، مرحله تشکیل غلاف (MG2) و مرحله پیری (SS) در نظر گرفته شد. در هر مرحله، یک گرم از برگ‌های معین و مشابه برداشته و پس از بسته‌بندی در کاغذ الومینیومی و نوشتن مشخصات دقیق روی نمونه، در ازت مایع نگهداری شد. استخراج پروتئین کل محلول برگی و

الکتروفورز پروتئین

الکتروفورز پروتئین با استفاده از روش اس.دی.اس.پیج با اعمال تغییراتی، انجام شد (۱۰). برای این منظور ژل جدا کننده ۱۴٪ و متراکم کننده ۴٪ تهیه گردید. سپس محلول رنگ آمیزی تهیه شد که برای این کار مقدار ۰/۵ گرم کوماسی برلیانت بلو (Actic acid) (Comasy brilliant blue) در ۵۰ ml (Chlorophyll a, b and carotenoid) به آن اضافه شد، حل گردید و ۲۰۰ ml متانول (Methanol) به آن اضافه شد، سپس حجم نهایی با آب مقطر به ۵۰۰ ml رسانده شد. محلول رنگ آمیزی پس از صاف شدن با کاغذ صافی مخصوص، در دمای آزمایشگاه نگهداری شد. محلول رنگبری نیز مشابه محلول رنگ آمیزی تهیه شد با این تفاوت که در محلول رنگبری کوماسی برلیانت حذف گردید. در ادامه نمونه‌های پروتئینی که در فریزر ۲۰°C - نگهداری شده بودند به تدریج در دمای آزمایشگاه ذوب نموده و از هر کدام، بسته به غلظت پروتئین موجود در نمونه، بین ۲۵ تا ۴۵ μl در درون هر چاهک به آرامی بارگذاری گردید. دستگاه الکتروفورز به منبع تغذیه آن متصل گردید و نخست دستگاه روی ولتاژ ثابت ۶۰ ولت قرار داده شد تا نمونه‌ها به طور کامل به داخل ژل بالایی (متراکم کننده) نفوذ کنند، سپس ولتاژ به ۱۰۰ ولت افزایش داده شد. در نهایت ژل‌های به دست آمده ابتدا رنگ آمیزی و سپس رنگبری شد و بسته به مورد از آنها عکس و اسکن تهیه گردید.

تعیین وزن مولکولی پروتئین‌ها

مجموعه‌های پلی‌پیتیدی به اضافه اس.دی.اس. حاصله، که دارای بار الکتریکی منفی هستند، در ژل پلی اکریل آمید براساس وزن مولکولی خود از قطب منفی به سمت قطب مثبت حرکت می‌کنند. تحت چنین شرایطی مسافت نسبی طی شده توسط پروتئین‌ها با لگاریتم وزن مولکولی آنها رابطه خطی دارد. بنابراین با استفاده از پروتئین‌های شناخته شده با وزن مولکولی معین، به عنوان استانداردهای وزنی (Molecular Weight Markers)، می‌توان وزن مولکولی پروتئین‌های مورد مطالعه را براساس آنها تخمین زد که به دلیل در دسترس نبودن مارکرهای مولکولی، وزن و موقعیت باندهای مولکولی پروتئین‌ها بر اساس عامل

اندازه‌گیری مقادیر کلروفیل‌های a، b و کاروتنوئید (Carotenoid)

در این مرحله نمونه‌هایی که در هنگام استخراج پروتئین به منظور سنجش میزان کمی رنگدانه‌ها (کلروفیل و کاروتنوئید) برداشته شده بود، در دور ۱۱۰۰ rpm و دمای ۴°C به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردیده و سپس محلول بالایی به لوله‌های جدید منتقل شدند. در ادامه مقدار جذب نور در ۳ طول موج ۴۷۰، ۶۴۶ و ۶۶۳ نانومتر، توسط دستگاه اسپکتروفوتومتری اندازه‌گیری شد که پس از جمع‌آوری داده‌ها، مقادیر کلروفیل‌های a، b و کاروتنوئید طبق معادلات زیر محاسبه گردید:

$$\text{Chl a } (\mu\text{g ml}^{-1}) = \frac{12/5}{A_{663} - 2/55} A_{646}$$

$$(\text{chla} = \text{chl a} + \text{chl b})$$

$$A = \text{میزان جذب نور در طول موج مورد نظر}$$

$$\text{Chl b } (\mu\text{g ml}^{-1}) = \frac{18/29}{A_{646} - 2/58} A_{663}$$

$$\text{Carotenoid } (\mu\text{g ml}^{-1}) = (1000 A_{470} - 3/27)$$

$$\text{chla} = \frac{\text{chla} - \text{chl b}}{229}$$

سنجش مقدار کمی پروتئین

برای سنجش مقدار کمی پروتئین از روش برادفورد استفاده شد (۳). در روش برادفورد برای به دست آوردن میزان کمی پروتئین نمونه‌ها لازم است تا منحنی استاندارد مربوطه دستگاه بر اساس رابطه رگرسیونی که قابل محاسبه می‌باشد، ترسیم گردد. برای این منظور پروتئین‌های استانداردی با غلظت‌های ۱/۵۶، ۳/۱۲۵، ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰ و ۶۰ μgml⁻¹ تهیه شده و میزان جذب نور در نمونه‌ها با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتری و در طول موج ۵۹۵ نانومتر مورد سنجش قرار گرفت. با استفاده از داده‌های به دست آمده در این مرحله، معادله خط رگرسیونی می‌تواند مربوطه ترسیم گردد. بعد از مشخص شدن معادله نهایی، غلظت پروتئین در نمونه‌های حاصل از تیمارهای تراریخت و گیاهان شاهد کلزا در زمان‌های مختلف نمونه‌برداری تعیین شد.

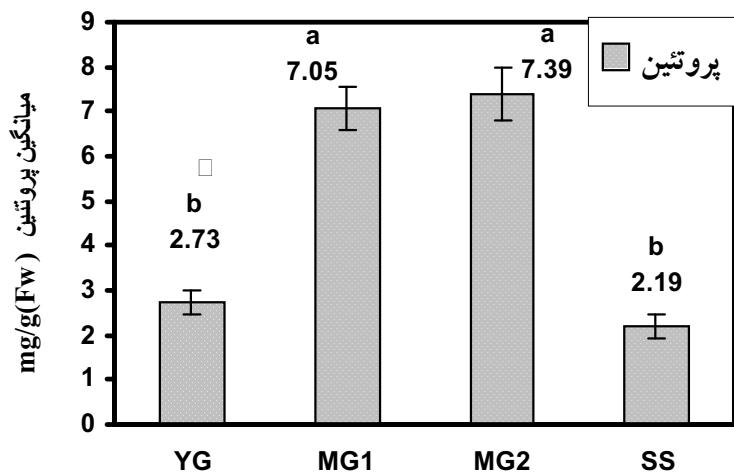
میزان آن در مرحله پیری (SS) به ثبت رسیده است. از لحاظ آماری مراحل گل دهی (MG1) و تشکیل غلاف (MG2) در یک گروه و مراحل روزت (YG) و پیری (SS) نیز در گروه دیگری قرار گرفتند (شکل ۱). در کل نتایج به دست آمده نشان داد که میزان پروتئین در مرحله پیری کاهش می‌یابد. این فرآیند احتمالاً به دلیل شکسته شدن پروتئین‌ها به واحدهای سازنده (اسید آمینه) برای انتقال آنها از برگ‌ها و بافت‌های پیر به بافت‌های جوانتر یا بذور در حال پرشدن می‌باشد (۱۵). از طرفی نتایج تجزیه واریانس مربوط به میزان پروتئین کل محلول برگی در تیمارهای مختلف نشان داد که تیمارهای آزمایشی مورد مقایسه نیز از نظر میزان کل پروتئین محلول برگی دارای اختلاف معنی دار آماری در سطح احتمال ۱٪ می‌باشند. انجام مقایسات میانگین مربوط به تیمارهای آزمایشی به روش دانکن، نشان داد که تیمار تاریخت A۲ بیشترین مقدار و تیمار A۳ کمترین مقدار پروتئین را داشته‌اند (شکل ۲). در این گروه‌بندی چهار تیمار A۱، A۲، A۴ و A۵ در گروه a قرار گرفته و تفاوت آماری معنی داری با هم نداشتند. هم‌چنین تیمارهای A۱، WT، A۵ و A۳ در گروه b و تیمارهای A۵، WT، A۶ و A۷ در گروه c و بالاخره تیمارهای A۴، A۶ و A۳ نیز در گروه d قرار گرفتند. بدین ترتیب میزان پروتئین در تیمار A۲ به‌طور معنی داری از تیمارهای A۴، A۶ و A۳ بیشتر بوده و در تیمارهای A۳ و A۶ نیز به‌طور معنی داری از تیمار شاهد کمتر بوده است. در یک نگاه کلی به شکل ۲ دیده می‌شود که چهارتیمار A۳، A۴، A۵ و A۶، با داشتن میانگین کمتر نسبت به تیمار شاهد و تیمارهای A۱ و A۲ بیشتر از شاهد قرار گرفته‌اند. بنابرین می‌توان گفت تکنیک آتنی‌سنس باعث کاهش میزان فعالیت زن اصلی و یا متوقف نمودن فعالیت کامل زن گردیده که این امر به دلیل ایجاد زنجیرهای آتنی ام.ار.ان.ای (mRNA) است که با اتصال به ام.ار.ان.ای‌های (Anti-mRNA) تولید شده از زن اصلی (رشته سنس (Sense)) مانع از ترجمه آنها و در نهایت مانع از بیان زن

حرکت نسبی یا (Rf mobility) محاسبه گردید. فاصله باندهای پروتئینی (به جلویی هر باند) و رنگ نشانگر از ابتدای ژل جدا کننده اندازه‌گیری شد، سپس Rf هر باند پروتئین از تقسیم آن دو محاسبه گردید. با توجه به اطلاعات مربوط به وزن‌های مولکولی و Rf پروتئین‌های استاندارد، منحنی استاندارد روی کاغذ نیمه لگاریتمی رسم شد، که محور لگاریتمی کاغذ به وزن‌های مولکولی اختصاص دارد. وزن مولکولی پروتئین‌های مورد بررسی از روی منحنی استاندارد محاسبه گردید.

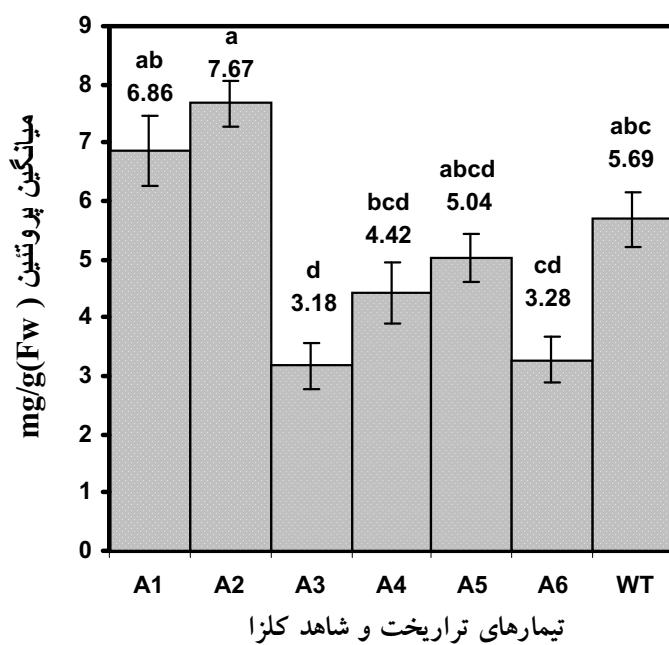
نتایج و بحث

مقایسه میزان کمی پروتئین‌های محلول برگ در گیاهان تاریخت با شاهد

با جمع‌آوری داده‌های مربوط به سنجش کمی مقدار پروتئین طبق روش‌های ذکر شده در بخش مواد و روش‌ها، تجزیه و تحلیل مربوط به آنها انجام گرفت. نتایج حاصل به صورت شکل‌های ۱ و ۲ ارائه شده است. با توجه به نتایج حاصل از تجزیه واریانس مربوط به مقادیر پروتئین‌های محلول برگ گیاهان تاریخت و شاهد (غیر تاریخت) کلزا، وجود اختلاف معنی دار بین مراحل مختلف رشدی از نظر میزان پروتئین‌های کل محلول برگی در سطح احتمال ۱٪ به اثبات رسید. برای به دست آوردن اطلاعات دقیق‌تر از اختلاف آماری مشاهده شده، لازم بود تا مقایسه میانگین‌های مراحل مختلف رشدی انجام شود، که این کار با استفاده از روش دانکن (Duncan) صورت گرفته و نتایج حاصله در شکل ۱ نشان داده شده است. همان‌طور که در شکل ۱ ملاحظه می‌شود، میزان پروتئین‌های کل محلول برگی در مراحل اولیه رشدی کم بوده و به تدریج که گیاهان به مرحله تشکیل غلاف و پرشدن بذرها نزدیک می‌شوند، بر میزان آن افزوده می‌شود. به‌طوری که حداکثر میزان پروتئین‌های کل محلول برگی در مرحله بعد از گل دهی یا پر شدن دانه (MG2) مشاهده می‌شود. هرچه گیاه به سمت پیری پیش می‌رود، از میزان پروتئین‌های کل کاسته شده و کمترین



شکل ۱. روند تغییرات پروتئین کل محلول برگی در مراحل مختلف رشدی گیاهان تراریخت و شاهد کلزا
مرحله روزت = MG1 مرحله گلدهی = MG2 مرحله تشکیل غلاف = SS مرحله پیری = YG



شکل ۲. روند تغییرات میزان پروتئین در تیمارهای تراریخت و شاهد گیاهان کلزا
شاهد = WT گیاهان تراریخت شده = A1-A6

ستنتاز در این تیمارها شده با افزایش میزان بیان ژن اصلی در خود گیاه و با تولید فرآورده‌های پروتئینی حاصل از آن، موجب افزایش میزان پروتئین کل محلول برگی در این تیمارها گردیده است.

اندازه‌گیری مقادیر کلروفیل a، b و کاروتوئید

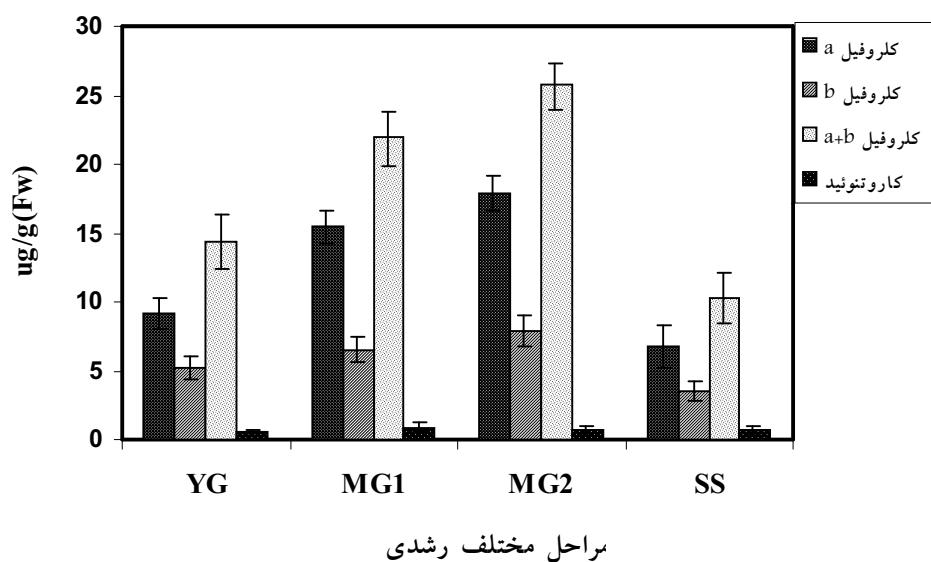
نتایج حاصل از اندازه‌گیری مقادیر رنگدانه‌های برگی طی مراحل مختلف رشدی گیاهان تاریخت و شاهد (غیر تاریخت) در قالب جدول مقایسه میانگین (جدول ۱) و اشکال ۳ و ۴ نشان داده شده است. تجزیه واریانس مربوط به میزان کلروفیل نشان داد که بین مراحل مختلف رشد گیاهان، اختلاف بسیار معنی‌داری از نظر میزان کلروفیل a و b در سطح احتمال ۰/۱٪ واژ نظر میزان کاروتوئید در سطح احتمال ۵٪ وجود دارد. از این رو برای به دست آوردن اطلاعات بیشتر، مقایسه میانگین مراحل مختلف رشدی با استفاده از آزمون دانکن صورت گرفته و نتایج در جدول ۳ آورده شده است. نتایج به دست آمده نشان داد که به‌طور کلی، کلروفیل نیز همانند پروتئین در مراحل ابتدایی رشد گیاهان کم بوده و هرچه به سن بلوغ فیزیولوژیکی بذر نزدیک‌تر می‌شود میزان آن افزایش یافته، که احتمالاً این امر به دلیل نیازهای شدید گیاه از لحاظ تأمین ذخایر بذری بوده است. در نهایت با آغاز مرحله پیری و زرد شدن برگ، میزان کلروفیل‌ها کاهش محسوسی نشان داده‌اند. همان‌طور که در جدول ۳ نشان داده شده، حداقل میزان کلروفیل‌های a و b در مرحله تشکیل غلاف (MG2) و حداقل آن در مرحله پیری برگ (SS) مشاهده شده است. در مورد کلروفیل a تمام مراحل مختلف رشدی مورد آزمون از لحاظ آماری در گروه‌های مجزایی قرار گرفته و تفاوت معنی‌داری را با هم نشان داده‌اند. در مورد کلروفیل b، علی‌رغم وجود حداقل میزان این رنگدانه در مرحله MG2، مرحله مذکور با MG1 در یک گروه آماری قرار داشته و مراحل MG1 و YG نیز به‌طور

اصلی می‌گردند. نظر به این‌که شرایط یکسان برای کلیه تیمارهای آزمایشی اعمال گردیده و با توجه به این نکته که تنها اختلاف موجود بین تیمارهای تاریخت و شاهد، در وجود یا عدم وجود آنتی‌سنس ژن گلوتامین‌ستنتاز بوده است، بنابراین اختلاف مشاهده شده بین تیمارهای مختلف تاریخت به دلیل تعداد احتمالی کپی‌های ژن منتقل شده و محل احتمالی استقرار آن در ژنوم این گیاهان است. احتمالاً بیان آنتی‌سنس ژن گلوتامین‌ستنتاز، سبب کاهش میزان زنجیرهای ام.ار.ان.ای. قابل ترجیمه از ژن اصلی گلوتامین‌ستنتاز و در نتیجه موجب کاهش محصول ژن (که همان پروتئین‌های حاصل یا آنزیم GS1 می‌باشد) گردیده است. گرچه فقط تیمار A3 با تیمارهای A1 و A2 تفاوت معنی‌داری نشان داد، ولی نتایج به دست آمده با نتایج ورامندی و همکاران در سال ۱۹۹۹ مطابقت دارد (۲۱). در پژوهش یاد شده، گیاهان سیب‌زمینی تاریخت شده با آنتی‌سنس ژن هگزوکیناز (Hexokinase1) با گیاهان غیرتاریخت مقایسه شدند که طی آن، با کاهش میزان فعالیت آنزیمی مذکور، میزان پروتئین کل، تا ۲۲ برابر در بعضی از گیاهان تاریخت نسبت به گیاهان شاهد سیب‌زمینی کاهش نشان داد (۲۱). همان طور که در شکل ۲ ملاحظه می‌شود تیمارهای تاریخت A1 و A2، میزان پروتئین بیشتری نسبت به تیمار شاهد و سایر تیمارهای تاریخت داشته‌اند، که دلیل این امر از چند جنبه قابل بررسی است: اولاً نظر به این‌که انتقال آنتی‌سنس ژن GS1 با استفاده از روش‌های مختلف (PCR و ژن انتخاب کننده کانامایسین) در گیاهان تاریخت به اثبات رسیده است (۹) بنابراین نمی‌توان قضاوت کرد که ژن منتقل نشده است، بلکه این احتمال وجود دارد که بیان ژن آنتی‌سنss گلوتامین‌ستنتاز در این تیمارها در حدی نبوده که بتواند میزان بیان ژن اصلی را تا حد زیادی کاهش دهد و این کاهش، تفاوت معنی‌داری را در میزان پروتئین کل به وجود آورد. از طرفی احتمالاً ژن منتقل شده در قسمتی از ژنوم گیاه تاریخت وارد گردیده که در آن جایگاه، امکان بیان نداشته است. بدین ترتیب، احتمالاً هر عاملی که سبب عدم بیان آنتی‌سنss ژن گلوتامین

جدول ۱. مقایسه میانگین کلروفیل های a، b و کاروتوئید در مراحل مختلف رشدی در سطح احتمال ۵٪

کاروتوئید	کلروفیل b	کلروفیل a	مراحل
میانگین μg / g(Fw)	میانگین μg / g(Fw)	مراحل	میانگین μg / g(Fw)
۰/۹۰۲	MG2 ^a	۷/۸۷	MG1 ^a
۰/۷۴۲	MG1 ^{ab}	۶/۵۱	SS ^{ab}
۰/۷۳۹	YG ^{bc}	۵/۲۳	MG2 ^{ab}
۰/۵۳۶	SS ^c	۳/۵۳	YG ^b
۶/۷۷	SS ^d	۱۷/۸۹	YG
۹/۱۶	YG ^c	۱۵/۴۳	MG1 ^b

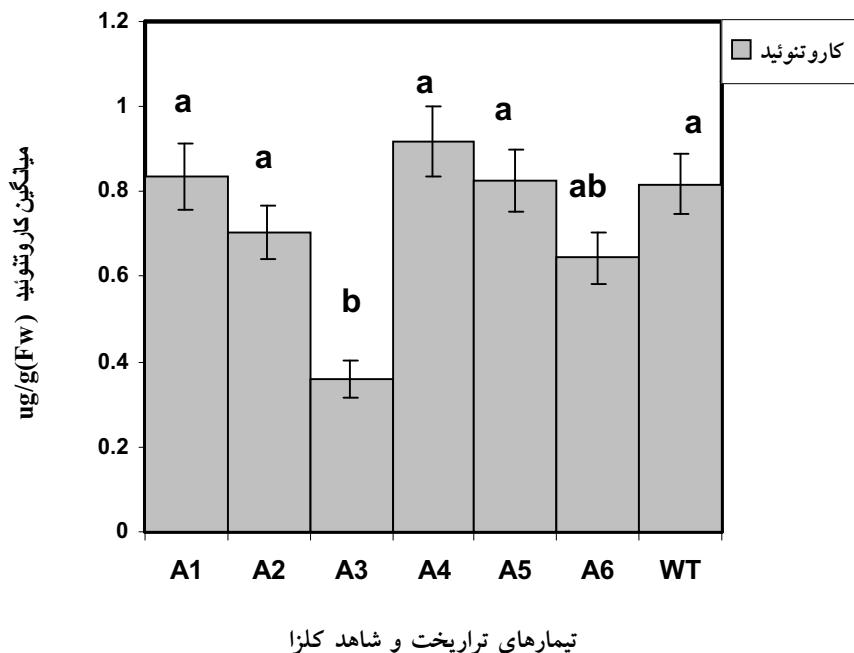
YG : مرحله روزت MG1 : مرحله گل دهی
 SS : مرحله پیری MG2 : مرحله تشکیل غلاف



شکل ۳. روند تغییرات میزان کلروفیل های a، b، (a+b) و کاروتوئید در مراحل مختلف رشدی گیاه کلزا
 MG1 : مرحله گل دهی MG2 : مرحله روزت YG : مرحله پیری SS : مرحله تشکیل غلاف

به طوری که در مورد کاروتوئید، حداقل میزان آن در مرحله غنچه دهی (MG1) و حداقل آن در مرحله روزت (YG) به دست آمد. هرچند در گروه بندی دانکن، مراحل MG1 و MG2 با پذیرفتن کد مشترک a در یک گروه آماری قرار گرفتند. به همین منوال مراحل SS و MG2 و YG نیز تفاوت

مشابهی در گروه آماری یکسانی قرار گرفته اند. به همین ترتیب مرحله YG علی رغم برتری نسبی از لحاظ میزان کلروفیل b نسبت به مرحله SS، در یک گروه آماری قرار گرفته اند. این نتایج در شکل ۳ نشان داده شده است. نتیجه جالب توجه دیگری که به دست آمد، در مورد رنگدانه کاروتوئید بود.



شکل ۴. روند تغییرات کاروتونوئید در تیمارهای مختلف تاریخت و شاهد کلزا مورد مطالعه
WT: شاهد A1-A6: گیاهان تاریخت شده

کاهش میزان کلروفیل a در طی مراحل پیری گیاه با سرعت بیشتری صورت می‌گیرد (۹). از طرفی کاروتونوئید در ترکیبات پروتئینی غشای تیلاکوئید (Thylakoid) وجود داشته و نقش آن دفع رادیکال‌های آزاد تولید شده در فرآیند اکسیداسیون نوری که توسط کلروفیل‌ها انجام می‌گیرد، می‌باشد (۵). بنابراین روند دیده شده در کاهش میزان کاروتونوئید در طی مراحل مختلف رشدی احتمالاً، برای نگهداری کاروتونوئید در حد اشباع جهت دفع رادیکال‌های آزاد تولید شده در خلال تجزیه کلروفیل بوده است. چنین روندی در مورد کلروفیل‌های a، b و کارتنوئید، در گیاه زراعی جو نیز گزارش شده است (۱۲).

مقایسه الگوهای الکتروفورزی پروتئین‌ها

با توجه به نتایج به دست از سنجش میزان کمی پروتئین بر اساس اسپکتروفوتومتری، مقادیر مساوی از غلظت‌های پروتئینی (۲۵-۴۰ μl) برای هر تیمار در چاهک‌های الکتروفورزی

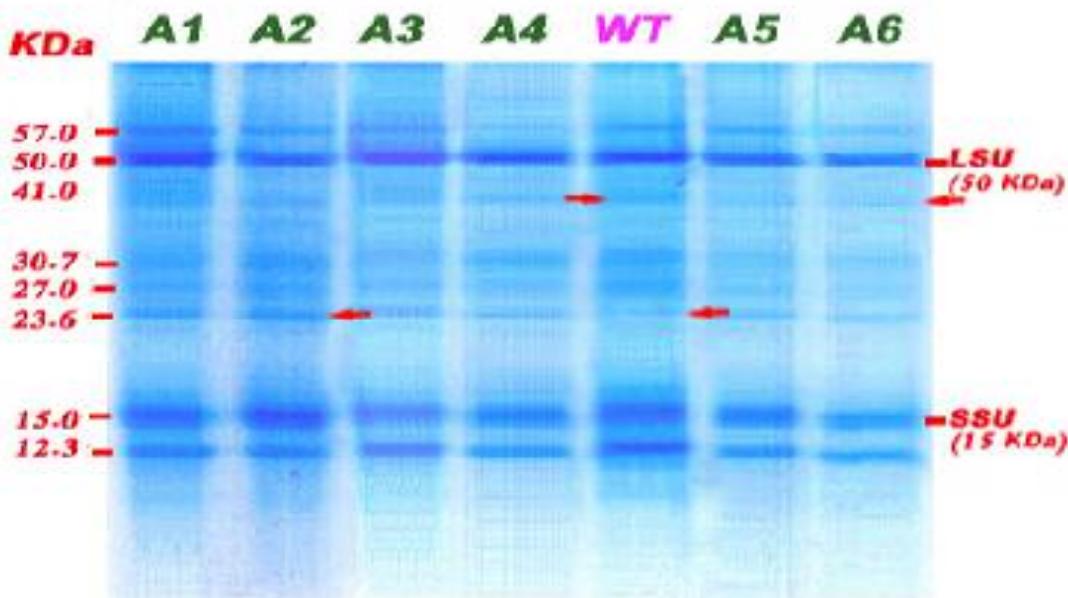
معنی‌داری را نشان نداده و در یک گروه جای گرفته‌اند (شکل ۴). تیمارهای آزمایشی مورد مقایسه تفاوت آماری معنی‌داری را از لحاظ میزان کلروفیل‌های a و b نشان ندادند. ولی در مورد میزان کاروتونوئید تفاوت آماری در سطح احتمال ۵٪ دیده شد و با توجه به معنی‌دار بودن آن، آزمون دانکن در این مورد انجام گردیده و نتایج در شکل ۴ نشان داده شده است. بر اساس نتایج آزمون دانکن (شکل ۴) معلوم گردید که تیمار A4 بیشترین میزان کاروتونوئید و تیمار A3 کمترین مقدار را داشته‌اند. هرچند از لحاظ آماری کلیه تیمارها به جز A3 در یک گروه و تیمارهای A6 و A3 نیز در گروه مجزای دیگری قرار گرفته‌اند. بنابراین فقط تیمار A3 با بقیه تیمارها (به جز A6) تفاوت آماری معنی‌داری در سطح احتمال ۵٪ نشان داده است. بررسی‌های دقیق نشان داده است که کلروفیل و کاروتونوئید با نسبت‌های مختلفی تجزیه می‌شوند. روند کاهش میزان کاروتونوئید تقریباً مشابه با کلروفیل b می‌باشد. در حالی که

به دست آمده در این ژل (شکل ۵) اختلاف مشخصی دیده نشد. در بررسی الگوهای باندی پروتئین در مرحله رشدی دوم (MG1) تفاوت قابل ملاحظه‌ای بین باندهای حاصل از تیمارهای مختلف دیده نشد و الگوهای باندی تقریباً مشابه بودند. ولی در مورد الگوهای باندی پروتئین در مرحله سوم رشدی (MG2) (شکل ۶) نیز چند اختلاف مشاهده گردید. از جمله ناپدید شدن یک باند پروتئینی در موقعیت وزنی ۵۷ کیلو دالتون (فلش مربوطه در شکل ۶) در تیمار تاریخت A3 در مقایسه با تیمار شاهد و سایر تیمارهای تاریخت و هم‌چنین قطورتر شدن همین باند در تیمارهای A1، A4 و A6 نسبت به باند مشابه آن در تیمار شاهد مشاهده گردید. این باند در تیمارهای A2 و A5 مشابه باند هم‌تراز آن در تیمار شاهد بود. در جمع‌بندی نتایج بدست آمده می‌توان چنین قضاؤت کرد که در مرحله اول نمونه‌برداری (YG) (شکل ۵) وجود اختلاف در باندی که تقریباً در موقعیت وزنی ۴۱ کیلو دالتون قرار گرفته بود، به‌وضوح دیده شد. با توجه به این که این موقعیت تقریباً در محدوده موقعیت وزنی زیر واحدهای گلوتامین سنتتاز سیتوپلاسمی کلزا است، از این رو احتمالاً به دلیل فعالیت آنزیم گلوتامین سنتتاز در برگ گیاهان کلزای شاهد و عدم فعالیت یا فعالیت محدود آن در تیمارهای تاریخت A3، A4 و A6 و A5 باندی که تقریباً در آنها ایجاد شده است. از طرفی ضخیم شدن باند دیگر (فلش دوم از شکل ۵) در تیمارهای A1 و A2 نسبت به همان باند در تیمار شاهد و سایر تیمارهای تاریخت، احتمالاً به دلیل تأثیر آنتی‌سنس ژن گلوتامین سنتتاز روی میزان سایر پروتئین‌های موجود در گیاه (مثلًاً پروتئینی که در موقعیت وزنی ۲۳/۶ قرار دارد) در این تیمارها بوده است. بدیهی است به‌دلیل اعمال حداقل شرایط یکسان آزمایشی در مورد تمامی تیمارهای مورد آزمایش، بروز اختلاف قابل توجه در الگوهای باندی پروتئین بین تیمارهای شاهد و تاریخت، احتمالاً به دلیل تأثیر حضور آنتی‌سنس ژن گلوتامین سنتتاز بوده است. بنابراین هرچند اختلاف دیده شده در تیمارهای A1 و A2 در مرحله اول (فلش دوم از شکل ۵) نسبت به تیمار شاهد،

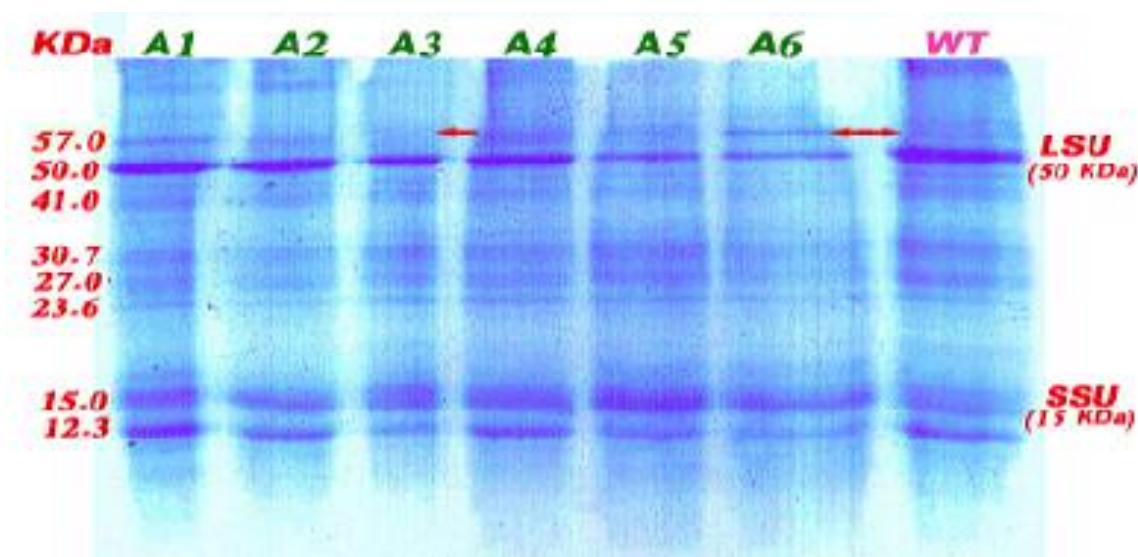
نمونه‌گذاری شد. بنابراین، غلظت پروتئینی در تیمارهای مختلف برابر بوده ولی حجم‌های متفاوتی از نمونه‌ها در هر چاهک نمونه‌گذاری گردید. دو باند واضح و مشخص در الکتروفوروز پروتئین‌های برگی گیاهان تاریخت و شاهد دیده می‌شود که مربوط به زیر واحدهای کوچک و بزرگ آنزیم رو بیسکو (Large and Small Subunit of Rubisco) می‌باشند. زیر واحد بزرگ ۵۰ کیلو دالتون و زیر واحد کوچک ۱۵ کیلو دالتون وزن دارد. آنزیم رو بیسکو تقریباً ۵۰٪ پروتئین محلول برگ و حدوداً ۳۰٪ کل پروتئین گیاهی را تشکیل می‌دهد (۱۶).

آزمایش‌های وسترن بلات (Western blotting) و اس.دی.اس. پیج نشان داده است که زیر واحدهای کلروپلاستی (GS1) آنزیم گلوتامین سنتتاز در کلزا، حدوداً ۴۳ کیلو دالتون وزن داشته و آنزیم گلوتامین سنتتاز سیتوپلاسمی (GS1)، عموماً دو باند پروتئینی باریک با سایزهای مختلف (۴۱/۸ و ۴۱/۳ کیلو دالتون) را نشان داده است (۱۷). بدیهی است انجام وسترن بلات با آنزیم خالص گلوتامین سنتتاز حضور قطعی باندهای پروتئینی مربوط به این آنزیم را با وزن ملکولی دقیق آن نشان می‌دهد (۱۵). البته این احتمال وجود دارد که آنزیم گلوتامین سنتتاز با تأثیر روی محظوا و میزان سایر پروتئین‌های موجود در گیاه، مقادیر آنها را کم و یا زیاد کرده و سبب بروز اختلاف در باندهای حاصله گردد.

در ادامه پژوهش الگوی باندی پروتئین‌های کل محلول برگی در گیاهان تاریخت و شاهد کلزا مورد بررسی قرار گرفت که در مرحله اول رشد گیاهان (YG) چند اختلاف بین باندهای شاهد و تاریخت دیده شد (شکل ۵). در این مقایسه، کمرنگ شدن یک باند در تیمارهای A6، A5، A4 و A3 (اولین فلش از شکل ۵) در مقایسه با باند حاصل از تیمار شاهد، دیده شد. این باند در موقعیت تقریبی ۴۱ کیلو دالتون قرار داشت و هم‌چنین، پرنگ و قطورتر شدن یک باند در تیمارهای A1 و A2 در مقایسه با باند مذکور در تیمار شاهد و بقیه تیمارهای تاریخت (دومین فلش از شکل ۵) مشاهده گردید. باند اخیر در موقعیت تقریبی ۲۳/۶ کیلو دالتون قرار داشت. در سایر باندهای



شکل ۵. الگوی باندی حاصل از پروتئین‌های کل محلول برگی در تیمارهای تاریخت (A1-A6) و شاهد (WT) کلزا مورد مطالعه در مرحله اول نمونه برداری (YG) به روش اس.دی.اس پیج. موقعیت زیر واحد بزرگ و کوچک آنزیم رویسکو و وزن مولکولی هر کدام از باندها (بر حسب کیلو دالتون) در شکل مشخص گردیده است. وجود اختلاف در دو باند (فلش‌های اول و دوم از بالای ژل) در موقعیت‌های ۴۱ و ۲۳/۶ کیلو دالتون نشان داده شده است.



شکل ۶. الگوی باندی حاصل از پروتئین‌های کل محلول برگی در تیمارهای تاریخت (A1-A6) و شاهد (WT) کلزا مورد مطالعه در مرحله سوم نمونه برداری (MG2) به روش اس.دی.اس پیج. همان طور که نشان داده شده است وجود چند اختلاف در باند واقع در موقعیت ۵۷ KDa مشاهده می‌شود.

الگوی باندی حاصل از مرحله MG2 (شکل ۶) نیز همین احتمال وجود دارد به عبارتی می‌توان چنین قضاوت نمود که تفاوت دیده شده در باند موجود در موقعیت ۵۷ کیلو دالتون

در موقعیت اختصاصی ژن گلوتامینستتاز نبوده، ولی بروز این اختلاف می‌تواند ناشی از فعالیت یا تأثیر حضور آنتی‌سنس ژن گلوتامین استتاز در این تیمارهای تاریخت باشد. در مورد

سپاسگزاری

در پایان لازم است از آقایان دکتر کارل موریس و دکتر ویکی بوکانان ولستون از دانشگاه لندن که در جداسازی، همسانه‌سازی و انتقال ژن همکاری داشته‌اند کمال تشکر را داشته باشم. همچنین از دانشگاه تربیت مدرس که بخش اعظم این پژوهش در آنجا انجام گردیده، و به خاطر مساعدت در فراهم شدن امکانات و تجهیزات لازم صمیمانه تشکر و قدردانی می‌شود.

نیز می‌تواند ناشی از تأثیر غیر مستقیم حضور آنتی‌سنس ژن گلوتامین‌ستتااز در تیمارهای تاریختی که با تیمار شاهد اختلاف داشته‌اند، باشد. بدیهی است با روش‌های تكمیلی مانند وسترن بلات می‌توان نتایج به دست آمده و تفاوت‌های دیده شده را بهطور دقیق تر مورد ارزیابی قرار داده و پروتئین اختصاصی مربوط به هر باند و وزن دقیق مولکولی آن را تعیین نمود.

منابع مورد استفاده

۱. احمدی، م. ۱۳۷۸. کشت گیاه کلزا در ایران رو به توسعه است. *مجله زیتون* ۱۴۱: ۲۸-۲۱.
2. Alaoui, S. E., J. Diez, L. Humanes, F. Toribio, F. Partensky and J. F. Manuel. 2001. *In vivo* regulation of glutamine synthetase activity in the marine chlorophyll b-containing *Cyanobacterium prochlorococcus* sp. strain pcc 9511 (oxyphotobacteria). *Appl. and Environ. Microbial.* 67: 2202- 2207.
3. Bradford, M. M. 1979. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein for the utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248- 254.
4. Callimore, J. V. and B. J. Miflin, 1984. Immunological studies on glutamine synthetase using antisera raised to the two plant form of the isozyme from Phaseolous root nodules. *J. Exp. Bot.* 35:581-587.
5. Gay, A. P., S. Hortensteiner and H. Thomas. 1995. Leaf development in *Lolium-temulentum* l-photosynthesis in relation to growth and senescence. *New Physiol.* 130: 159-168.
6. Guy, C. L., K. J. Niemi and R. Brambl. 1985. Alterd gene expression during cold acclimation of spinach. *Proc. Nation. Acad. Sci.* 82: 3673-3677.
7. Hall, L. N., G. A. Tucker, C. J. S. Smith, C. F. Watson, G. B. Seymour and D. Grierson. 1993. Antisense inhibition of pectinesterase gene expression in transgenic tomatoes. *The Plant J.* 3: 121-129.
8. Hames, B. D. and D. Richwood. 1990. *Gel Electrophoresis of Proteins*. 2nd ed., Oxford: IRL Press, USA.
9. Jalali- Javarani, M., M. Karl and V. Bouchanan-Wollaston. 2001. Biochemical and molecular analysis of glutamine synthetase gene in *Brassica napus* L. *Iran Agric. Res.* 20: 17-36.
10. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-85.
11. Makino, A., T.Mae and K.Ohira. 1985. Photosynthesis and ribulose 1,5- bisphosphate carboxylase/oxygenase in rice leaves from emergence through senescence. Quantitative analysis by carboxylation/oxygenation and regeneration of ribulose 1,5-bisphosphate. *Planta* 166:414-420.
12. Matile, P., S. Hortensteiner, H. Thomas and B. Krautler. 1996. Chlorophyll breakdown in senescent leaves. *Plant Physiol.* 112:1403-1409.
13. McNally, S. F., B.Hirel, P.Gadal, A. F.Mann and G. R Stewart. 1983. Glutamine synthetase of higher plants. Evidence for a specific isoform content related to their possible physiological role and their compartmentation within the leaf. *Plant Physiol.* 72: 22-25.
14. Ochs, G., G. Schock and A.Wild. 1995. Purification and characterisation of glutamine synthetase isoenzymes. *J. Plant Physiol.* 147:1-8.
15. Ochs, G., G. Schock, M.Trischer, K. Kosemund and A. Wild. 1999. Complexity and expression of the glutamine synthetase multigene family in the amphidiploid crop *Brassica napus*. *Plant Molecular Biol.* 39: 395- 405.
16. Peoples, M. B., S. P. Beilhurz-Waters, R. J. Simpson and M. J. dalling. 1980. Nitrogen redistribution during grain growth in wheat (*Triticum aestivum*. L). II. Chloroplast senescence and the degradation of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase . *Planta* 149:214-215.
17. Peterman, T. K and H. M. Goodman. 1991. The glutamine synthetase gene family expression in leaves , roots and seeds. *Molgen Genet.* 230: 145- 154.
18. Sheehy, R. E., J. Pearson, C. J. Brady and W. R. Hiatt. 1988. Molecular characterization of tomato fruit polygalacturonase. *Mol. Gen. Genet.* 208:30-36.
19. Sindelar, L., M Sindelarova and L. Burketova. 1998. Hexokinases of tobacco leaves: influence of plant age on praticulate and soluble isozyme composition . *Plant Biol.* 40: 469-474.

20. Stewart, G. R., A. F. Mann and P. A. Fentem. 1980. Enzymes of glutamate formation: glutamate dehydrogenase, glutamine synthase, and glutamate synthase. In: B. J. miflin (ed.), The Biochem. Plant 5: 271-327.
21. Vermendi, J., U. Roessner, A. Renz, L. Willmitzer and R. N. Trethewey. 1999. Antisense repression of hexokinase 1 leads to an overaccumulation of starch in leaves of transgenic potato plant but not to significant changes in tuber carbohydrate metabolism. Plant Physiol. 121: 123-133.
22. Weiss, E. A. 2000. Oilseed Crops. Consultant in Tropical Agriculture. Blackwell Science Pub. Victoria, Australia.
23. Wenderoth, I. and A. V. Schaewen. 2000. Isolation and characterization of plant N-Acetyl Glucosaminyltransferase I(GntI) cDNA sequences. Functional analyses in the *Arabidopsis* cgl mutant and in antisense plants. Plant Physiol. 123: 1097- 1108.