

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

مختار 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، مورد بررسی قرار گرفت. میزان پروتئین کل محلول برگ و مقدار کلروفیل‌های a ، b و کاروتنوئید، 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 ($MG1$) 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 بانندی در پروتئین‌های استخراج شده از گیاهان تراریخت در مقایسه با گیاه شاهد از روش اس.دی.اس. پیچ استفاده شد که در مقایسه الگوهای بانندی حاصل از مرحله $MG1$ تفاوت قابل ملاحظه‌ای بین باندها دیده نشد، ولی در باندهای حاصل از مراحل $MG2$ و YG تفاوت‌هایی مشاهده شد. در مرحله YG اختلاف بین تیمارهای $A3$ ، $A5$ ، $A4$ و $A6$ با شاهد در موقعیت وزنی ۴۱ کیلو دالتون و بین تیمارهای $A1$ و $A2$ با تیمار شاهد در موقعیت ۲۳/۶ کیلو دالتون مشاهده گردید. در مورد باندهای حاصل از مرحله $MG2$ نیز بین تیمارهای $A1$ ، $A3$ ، $A4$ و $A6$ با تیمار شاهد در موقعیت وزنی ۵۷ کیلو دالتون اختلافاتی وجود داشت. با توجه به این‌که کلیه شرایط برای رشد، استخراج پروتئین و آنالیز ماکرومولکول‌ها در گیاهان تراریخت و شاهد کاملاً کنترل 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، آنتی سنس، 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

روغن و چربی مورد نیاز انسان از منابع مختلف گیاهی و حیوانی تأمین می‌شود. روغن‌های گیاهی به دلیل دارا بودن مقادیر زیادی پروتئین و به ویژه اسیدهای چرب غیراشباع، نقش مهمی در کنترل کلسترول خون و تندرستی جوامع انسانی دارند. کلزا یکی از مهم‌ترین دانه‌های روغنی جهان محسوب می‌شود (۲۲). حدود ۱۴/۷٪ از کل تولید روغن نباتی 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، حداکثر 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 امید 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، ۲۰ و ۱۳). در گیاهان غالباً دو نوع ایزوآنزیم گلوتامین سنتتاز یافت می‌شود. یکی از آنها گلوتامین سنتتاز سیتوپلاسمی (*GS1*) و دیگری گلوتامین سنتتاز کلروپلاستی (*GS2*) است که در کلروپلاست بیان می‌گردد. گلوتامین سنتتاز کلروپلاستی (*GS2*) قادر به جذب آمونیاک آزاد شده در طی فرآیند تنفس نوری می‌باشد، از طرفی گلوتامین سنتتاز سیتوپلاسمی (*GS1*) نیز

توانایی جذب آمونیاک حاصل از فرآیندهای تثبیت ازت و کاتابولیسم اسیدهای آمینه را دارد (۲). در تحقیقی که اوچز و همکاران در سال ۱۹۹۹ انجام دادند، روشن شد که ایزوفرم‌های مختلف این ژن، به ویژه ایزوفرمی که در سیتوپلاسم بیان می‌شود (*GS1*) بعد از شروع مرحله پیری در بافت‌های برگ 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 فعالیت آنزیم‌های پلی‌گالاکتوروناز (*Polygalacturonase*) متابولیسم دیواره سلول، پکتین استراز (*Pectinesterase*)، و هم‌چنین برای کاهش سنتز اتیلن در میوه‌های گوجه فرنگی به کار گرفته شده است (۷، ۱۸ و ۱۹). 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 در جهت معکوس و پائین دست پرموتور (*35S CaMV (Promoter)*) 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 tumefaciens*) به داخل ژنوم سلول‌های کلزا (رقم وستار) 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

کلروفیل‌های برگ‌گی 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 ۳ ml بافر استخراج (تریس کلراید (Tris-HCl) ۵۰ میلی مولار (pH ۷/۵)، ای.دی.تی.۱ (EDTA) ۲ میلی مولار و ۲- مرکاپتواتانول (Mercapto ethanol) ۰/۰۴٪ (v/v)) مخلوط شد. سپس ۲۰۰ μl از هر نمونه با میکروپیپت برداشته و در لوله‌های اپندورف (علامت گذاری شده) ریخته شدند و ۸۰۰ μl استون سرد شده (Aceton-ice cold) به آنها اضافه گردید. نمونه‌ها به منظور سنجش مقدار کمی کلروفیل‌های گیاهی در ۴°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 ۵ ml پلاستیکی سرپوش دار (ویژده سانتیفریوژ) 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 سانتیفریوژ (۱۱۰۰۰ دور در دقیقه) به مدت ۲۳ دقیقه سانتیفریوژ شدند. در این مرحله قسمت صاف شده محلول هر لوله (۷۰۰ μl) برداشته و به سرعت به فریزر ۲۰°C منتقل شدند (۸). مقدار کمی پروتئین نمونه‌ها به روش برادفورد (Bradford) اندازه‌گیری شد (۳). بقیه محلول‌های استخراج شده با هم حجم از بافر مخصوص (تریس- کلراید ۰/۰۶۲۵ مولار (pH ۶/۸)، ۲- مرکاپتواتاتول ۵٪ (v/v)، اس.دی.اس ۲٪ (w/v)، گلیسرول ۱۰٪ (v/v) و برومو فنل بلو ۰/۰۱٪ (w/v)) مخلوط شده و به مدت ۲ دقیقه در آب جوش (۱۰۰°C) قرار گرفتند و سپس به مدت ۲۰ دقیقه با ۴۰۰۰ دور سانتیفریوژ شدند. در نهایت محتویات داخل لوله‌ها به دو قسمت تقسیم گردیده و در دو اپندورف (۱/۵ ml) ریخته و در فریزر ۲۰°C (تا زمان مناسب جهت ارزیابی و بررسی الکتروفورزی) نگهداری شدند.

میلی گرم در لیتر کانامایسین انتخاب گردیدند و در ادامه از سلول‌های تراریخت شده گیاه تولید شد (۱۰). پژوهش حاضر در ادامه تحقیق قبلی و به منظور بررسی مولکولی نسل دوم (T₁) گیاهان تراریخت کلزایی که ژن گلوتامین سنتتاز در جهت آنتی سنس به آنها منتقل شده بود، انجام پذیرفت. در این بررسی تغییرات کمی پروتئین کل محلول برگگی و کلروفیل‌های a, b و کاروتنوئید گیاهان تراریخت کلزا در مقایسه با گیاه شاهد ارزیابی شده و هم چنین الگوهای بانندی حاصل از الکتروفورز پروتئین در گیاهان تراریخت و شاهد، با استفاده از روش اس.دی.اس. پیج (SDS- PAGE) مقایسه و بررسی شد.

مواد و روش‌ها

کار انتقال آنتی سنس ژن گلوتامین سنتتاز به تیمارهای تراریخت، قبلاً با روش اگروباکتريوم انجام شده بود (۱۰). بذور گیاهان تراریخت شده با آنتی سنس ژن GS1 که متعلق به رقم وستار (Westar) بود به همراه گیاه شاهد تراریخت نشده، مورد ارزیابی قرار گرفتند که شش توده بذری جمع‌آوری شده از گیاهان تراریخت نسل اول (T₀) به همراه شاهد (مجموعاً ۷ توده بذری) تیمارهای آزمایشی را تشکیل دادند. کشت گیاهان در شرایط گلخانه‌ای (دمای ۲۴-۲۰°C و فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی) در اتاقک رشد گروه اصلاح نباتات دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس انجام گردید. تیمارهای تراریخت آنتی سنس با علامت اختصاری A (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 ۴ مرحله رشدی شامل، مرحله روزت (YG)، گل‌دهی (MG1)، 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 آلومینیومی و نوشتن مشخصات دقیق روی نمونه، در ازت مایع نگهداری شد. استخراج پروتئین کل محلول برگگی 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 (Comasy brilliant blue) در ۵۰ ml اسید استیک (Actic acid) حل گردیده 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 20°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 گردیده 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 پلی‌پپتیدی به اضافه اس.دی.اس. حاصله، که دارای بار الکتریکی منفی هستند، در ژل پلی‌اکریل 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 پروتئین 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 ۱۱۰۰۰ rpm و دمای 4°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:

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

$$\text{، کلروفیل a = chl a ، کلروفیل b = chl b}$$

$$A = \text{میزان جذب نور در طول موج مورد نظر} \quad [1]$$

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

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

$$\text{chl a } 104 - \text{chl b}) / 229 \quad [3]$$

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 استاندارد با غلظت‌های ۱/۵۶، ۳/۱۲۵، ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۶۰ و $70 \mu\text{gml}^{-1}$ 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 محاسبه و منحنی مربوطه ترسیم گردید. بعد از مشخص شدن معادله نهایی، غلظت پروتئین در نمونه‌های حاصل از تیمارهای تراریخت و گیاهان شاهد کلزا در زمان‌های مختلف نمونه‌برداری تعیین شد.

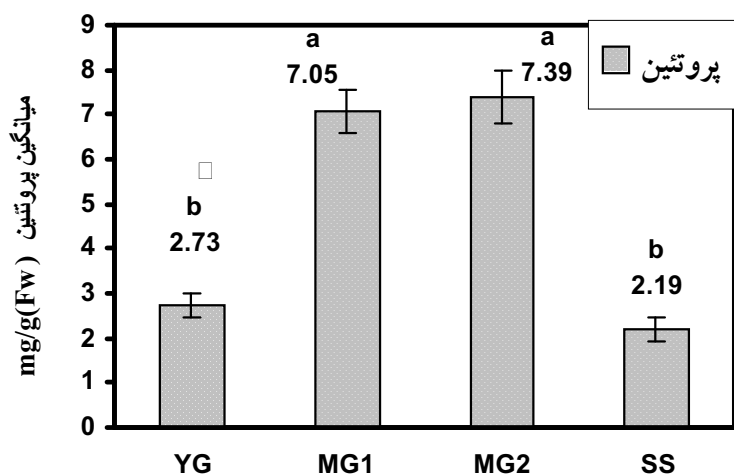
حرکت نسبی یا Rf (Relative mobility) محاسبه گردید. فاصله باندهای پروتئینی (لبه جلویی هر باند) و رنگ نشانگر از ابتدای ژل جدا کننده اندازه گیری شد، سپس Rf هر باند پروتئین از تقسیم آن دو محاسبه گردید. با توجه به اطلاعات مربوط به وزنهای مولکولی و Rf پروتئینهای استاندارد، منحنی استاندارد روی کاغذ نیمه لگاریتمی 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 تراریخت با شاهد

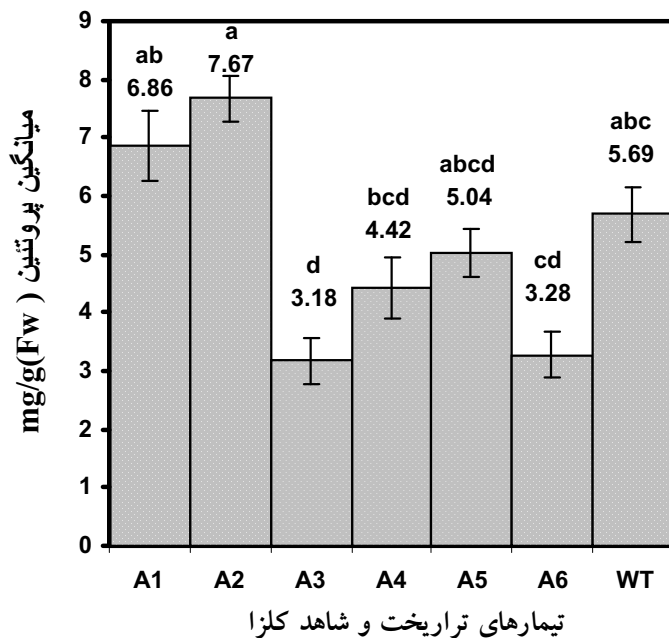
با جمع آوری دادههای مربوط به سنجش کمی مقدار پروتئین طبق روشهای ذکر شده در بخش مواد و روشها، تجزیه و تحلیل مربوط به آنها انجام گرفت. نتایج حاصل به صورت شکل های ۱ و ۲ ارائه شده است. با توجه به نتایج حاصل از تجزیه واریانس مربوط به مقادیر پروتئینهای محلول برگ گیاهان تراریخت و شاهد (غیر تراریخت) کلزا، وجود اختلاف معنی دار بین مراحل مختلف رشدی از نظر میزان پروتئینهای کل محلول برگ در سطح احتمال ۱٪ به اثبات رسید. برای به دست آوردن اطلاعات دقیق تر 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 می شود، میزان پروتئینهای کل محلول برگ در مراحل اولیه رشدی کم بوده و به تدریج که گیاهان به مرحله تشکیل غلاف و پر شدن بذرها نزدیک می شوند، بر میزان آن افزوده می شود. به طوری که حداکثر میزان پروتئینهای کل محلول برگ در مرحله بعد از گل دهی یا پر شدن دانه (MG2) مشاهده می شود. هرچه گیاه به سمت پیری پیش می رود، از میزان پروتئینهای کل کاسته شده و کمترین

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 می یابد. این فرآیند احتمالاً به دلیل شکسته شدن پروتئینها به واحدهای سازنده (اسید آمینه) برای انتقال آنها از برگها و بافتهای پیر به بافتهای جوان تر یا بذور در حال پر شدن می باشد (۱۵). از طرفی نتایج تجزیه واریانس مربوط به میزان پروتئین کل محلول برگ در تیمارهای مختلف نشان داد که تیمارهای آزمایشی مورد مقایسه نیز از نظر میزان کل پروتئین محلول برگ دارای اختلاف معنی دار آماری در سطح احتمال ۱٪ می باشند. انجام مقایسات میانگین مربوط به تیمارهای آزمایشی به روش دانکن، نشان داد که تیمار تراریخت A2 بیشترین مقدار و تیمار A3 کمترین مقدار پروتئین را داشته اند (شکل ۲). در این گروه بندی چهار تیمار A1، A2، WT، و A5 در گروه a قرار گرفته و تفاوت آماری معنی داری با هم نداشتند. همچنین تیمارهای WT، A1، A5 و A3 در گروه b و تیمارهای WT، A5، A6 در گروه c و بلاخره تیمارهای A5، A4، A6، و A3 نیز در گروه d قرار گرفتند. بدین ترتیب میزان پروتئین در تیمار A2 به طور معنی داری از تیمارهای A4، A6، و A3 بیشتر بوده و در تیمارهای A3 و A6 نیز به طور معنی داری از تیمار شاهد کمتر بوده است. در یک نگاه کلی به شکل ۲ دیده می شود که چهار تیمار A3، A4، A5، و A6، با داشتن میانگین کمتر نسبت به تیمار شاهد و تیمارهای A1 و A2 بیشتر از شاهد قرار گرفته اند. بنابراین می توان گفت تکنیک آنتی سنس باعث کاهش میزان فعالیت ژن اصلی و یا متوقف نمودن فعالیت کامل ژن گردیده که این امر به دلیل ایجاد زنجیرهای آنتی ام.ار.ان.ای (Anti-mRNA) است که با اتصال به ام.ار.ان.ایهای (mRNA) تولید شده از ژن اصلی (رشته سنس (Sense)) مانع از ترجمه آنها و در نهایت مانع از بیان ژن



مراحل مختلف رشدی

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



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

سنتتاز در این تیمارها شده با افزایش میزان بیان ژن اصلی درخود 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 کاروتنوئید

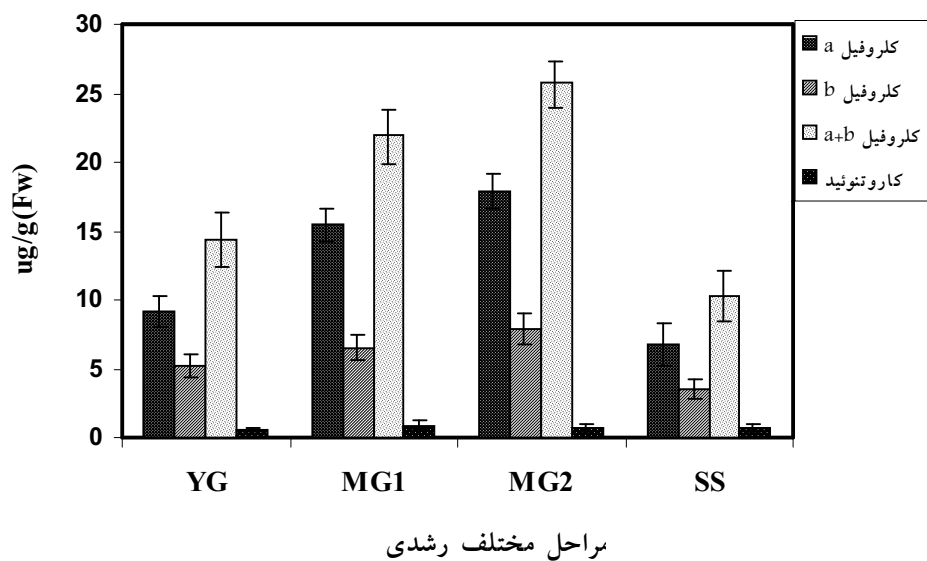
نتایج حاصل از اندازه‌گیری مقادیر رنگدانه‌های برگی طی مراحل مختلف رشدی گیاهان تراریخت و شاهد (غیر تراریخت) در قالب جدول مقایسه میانگین (جدول ۱) و اشکال ۳ و ۴ نشان داده شده است. تجزیه واریانس مربوط به میزان کلروفیل نشان داد که بین مراحل مختلف رشد گیاهان، اختلاف بسیار معنی‌داری از نظر میزان کلروفیل a و b در سطح احتمال ۰/۱٪ و از نظر میزان کاروتنوئید 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 به‌دست 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 می‌شویم 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، حداکثر میزان کلروفیل‌های a و b در مرحله تشکیل غلاف (MG۲) 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 دادند. در مورد کلروفیل b، علی‌رغم وجود حداکثر میزان این رنگدانه در مرحله MG۲، مرحله مذکور با MG۱ در یک گروه آماری قرار داشته و مراحل MG۱ و YG نیز به طور

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 تراریخت و شاهد، در وجود یا عدم وجود آنتی‌سنس ژن گلوتامین سنتتاز بوده است، بنابراین اختلاف مشاهده شده بین تیمارهای مختلف تراریخت به دلیل تعداد احتمالی کپی‌های ژن منتقل شده و محل احتمالی استقرار آن در ژنوم این گیاهان است. احتمالاً بیان آنتی‌سنس ژن گلوتامین سنتتاز، سبب کاهش میزان زنجیرهای ام.ار.ان.ای. قابل ترجمه از ژن اصلی گلوتامین سنتتاز و در نتیجه موجب کاهش محصول ژن (که همان پروتئین‌های حاصل یا آنزیم GS۱ می‌باشد) گردیده است. گرچه فقط تیمار A۳ با تیمارهای WT، A۱ و A۲ تفاوت معنی‌داری نشان داد، ولی نتایج به‌دست آمده با نتایج ورامندی و همکاران در سال ۱۹۹۹ مطابقت دارد (۲۱). در پژوهش یاد شده، گیاهان سیب‌زمینی تراریخت شده با آنتی‌سنس ژن هگزوکیناز (Hexo kinase 1) با گیاهان غیرتراریخت مقایسه شدند که طی آن، با کاهش میزان فعالیت آنزیمی مذکور، میزان پروتئین کل، تا ۲۲ برابر در بعضی از گیاهان تراریخت نسبت به گیاهان شاهد سیب‌زمینی کاهش نشان داد (۲۱). همان‌طور که در شکل ۲ ملاحظه می‌شود تیمارهای تراریخت A۱ و A۲، میزان پروتئین بیشتری نسبت به تیمار شاهد و سایر تیمارهای تراریخت داشته‌اند، که دلیل این امر از چند جنبه قابل بررسی است: اولاً نظر به این‌که انتقال آنتی‌سنس ژن GS۱ با استفاده از روش‌های مختلف (PCR و ژن انتخاب‌کننده کانامایسین) در گیاهان تراریخت به اثبات رسیده است (۹) بنابراین نمی‌توان قضاوت کرد که ژن منتقل نشده است، بلکه این احتمال وجود دارد که بیان ژن آنتی‌سنس گلوتامین سنتتاز 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 تراریخت وارد گردیده که در آن جایگاه، امکان بیان نداشته است. بدین ترتیب، احتمالاً هر عاملی که سبب عدم بیان آنتی‌سنس ژن گلوتامین

جدول ۱. مقایسه میانگین کلروفیل‌های a، b و کاروتنوئید در مراحل مختلف رشدی در سطح احتمال ۵٪

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

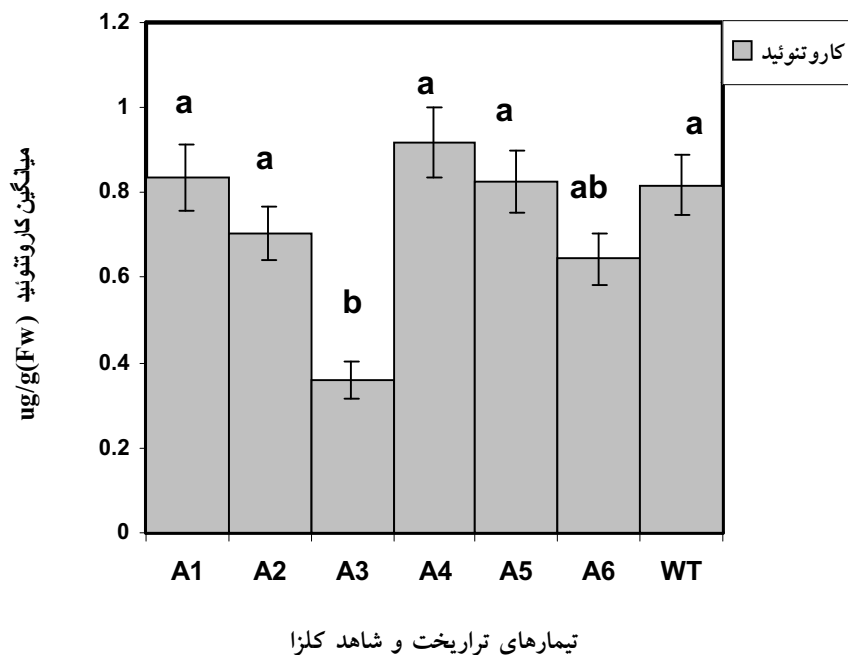
YG : مرحله روزت
MG1 : مرحله گل‌دهی
MG2 : مرحله تشکیل غلاف
SS : مرحله پیری



شکل ۳. روند تغییرات میزان کلروفیل‌های a، b، (a+b) و کاروتنوئید در مراحل مختلف رشدی گیاه کلزا
YG : مرحله روزت MG1 : مرحله گل‌دهی MG2 : مرحله تشکیل غلاف SS : مرحله پیری

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

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



شکل ۴. روند تغییرات کاروتنوئید در تیمارهای مختلف تراویخت و شاهد کلزای مورد مطالعه

WT : شاهد A1-A6 : گیاهان تراویخت شده

کاهش میزان کلروفیل a در طی مراحل پیری گیاه با سرعت بیشتری صورت می‌گیرد (۹). از طرفی کاروتنوئید 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 کاروتنوئید در طی مراحل مختلف رشدی احتمالاً، برای نگهداری کاروتنوئید در حد اشباع جهت دفع رادیکال‌های آزاد تولید شده در خلال تجزیه کلروفیل بوده است. چنین روندی در مورد کلروفیل‌های a ، b و کاروتنوئید، در گیاه زراعی جو نیز گزارش شده است (۱۲).

مقایسه الگوهای الکتروفورزی پروتئین‌ها

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

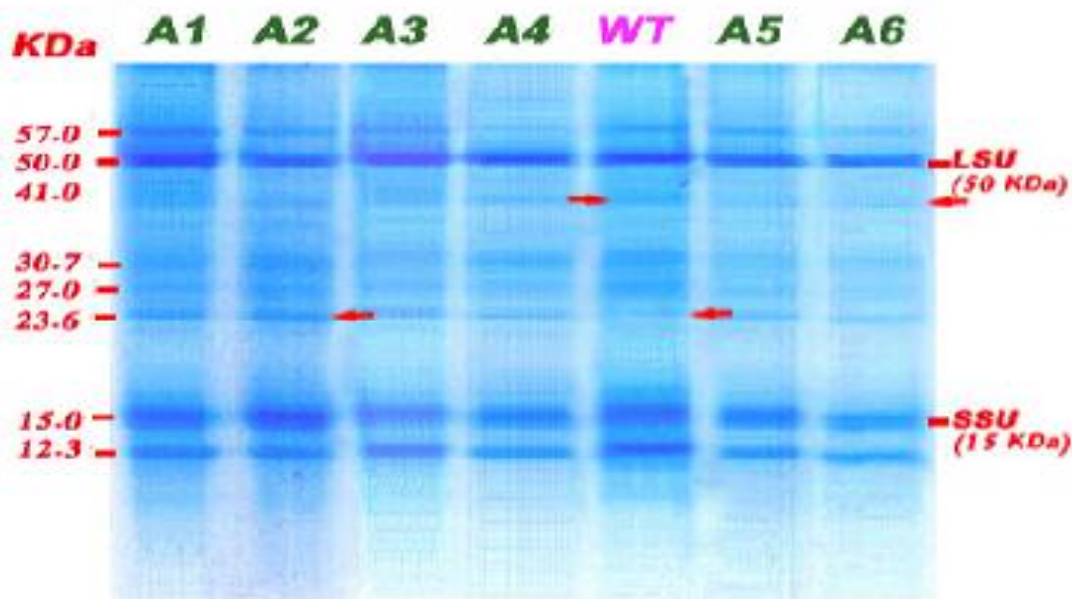
معنی‌داری را نشان نداده و در یک گروه جای گرفته‌اند (شکل ۴). تیمارهای آزمایشی مورد مقایسه تفاوت آماری معنی‌داری را از لحاظ میزان کلروفیل‌های a و b نشان ندادند. ولی در مورد میزان کاروتنوئید تفاوت آماری در سطح احتمال ۵٪ دیده شد و با توجه به معنی‌دار بودن آن، آزمون دانکن در این مورد انجام گردیده و نتایج در شکل ۴ نشان داده شده است. بر اساس نتایج آزمون دانکن (شکل ۴) معلوم گردید که تیمار A۴ بیشترین میزان کاروتنوئید و تیمار A۳ کمترین مقدار را داشته‌اند. هرچند از لحاظ آماری کلیه تیمارها به جز A۳ در یک گروه و تیمارهای A۶ و A۳ نیز در گروه مجزای دیگری قرار گرفته‌اند. بنابراین فقط تیمار A۳ با بقیه تیمارها (به جز A۶) تفاوت آماری معنی‌داری در سطح احتمال ۵٪ نشان داده است. بررسی‌های دقیق نشان داده است که کلروفیل و کاروتنوئید با نسبت‌های مختلفی تجزیه می‌شوند. روند کاهش میزان کاروتنوئید تقریباً مشابه با کلروفیل b می‌باشد. در حالی که

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 الکتروفورز پروتئین‌های برگ گیاهان تراریخت و شاهد دیده می‌شود که مربوط به زیر واحدهای کوچک و بزرگ آنزیم رویسکو (Large and Small Ssabunit of Rubisco) می‌باشند. زیر واحد بزرگ ۵۰ کیلو دالتون و زیر واحد کوچک ۱۵ کیلو دالتون وزن دارد. آنزیم رویسکو تقریباً ۵۰٪ پروتئین محلول برگ و حدوداً ۳۰٪ کل پروتئین گیاهی را تشکیل می‌دهد (۱۶).

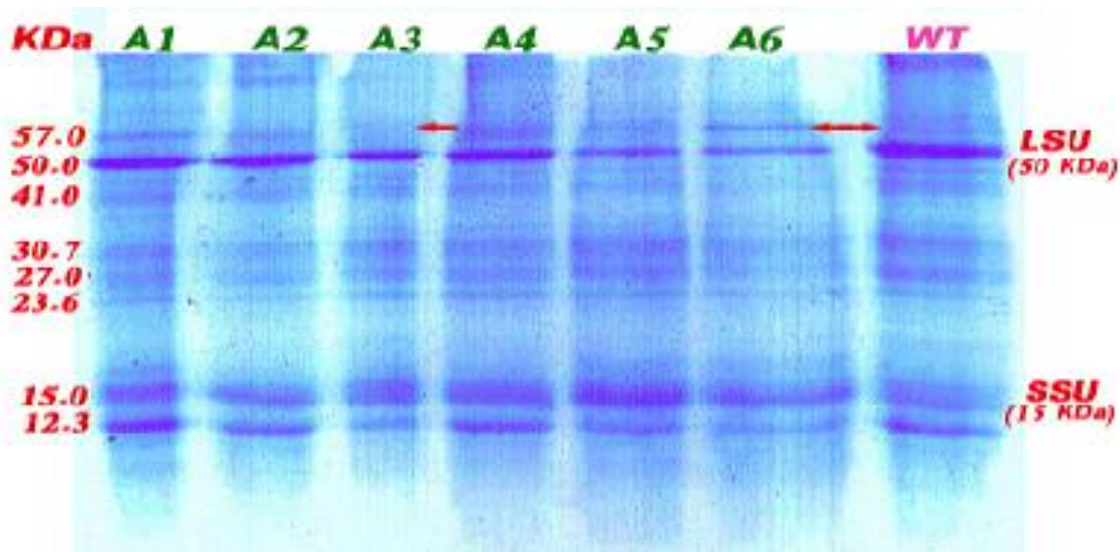
آزمایش‌های وسترن بلات (Western blotting) و اس.دی.اس. پیچ نشان داده است که زیرواحدهای کلروپلاستی (GS1) آنزیم گلوتامین سنتتاز در کلزا، حدوداً ۴۳ کیلو دالتون وزن داشته و آنزیم گلوتامین سنتتاز سیتوپلاسمی (GS1)، عموماً دو باند پروتئینی باریک با سایزهای مختلف (۴۱/۸ و ۴۱/۳ کیلو دالتون) را نشان داده است (۱۷). 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 محتوا 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 باندهای پروتئین‌های کل محلول برگ گیاهان تراریخت و شاهد کلزا مورد بررسی قرار گرفت که در مرحله اول رشد گیاهان (YG) چند اختلاف بین باندهای شاهد و تراریخت 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، پررنگ و قطورتر شدن یک باند در تیمارهای A1 و A2 در مقایسه با باند مذکور در تیمار شاهد و بقیه تیمارهای تراریخت (دومین فلش از شکل ۵) مشاهده گردید. باند اخیر در موقعیت تقریبی ۲۳/۶ کیلو دالتون قرار داشت. در سایر باندهای

به دست آمده در این ژل (شکل ۵) اختلاف مشخصی دیده نشد. در بررسی الگوهای باندهای پروتئین در مرحله رشدی دوم (MG1) تفاوت قابل ملاحظه‌ای بین باندهای حاصل از تیمارهای مختلف دیده نشد و الگوهای باندهای مشابه بودند. ولی در مورد الگوهای باندهای 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 تراریخت A3 در مقایسه با تیمار شاهد و سایر تیمارهای تراریخت 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 به دست آمده می‌توان چنین قضاوت کرد که در مرحله اول نمونه‌برداری (YG) (شکل ۵) وجود اختلاف در باندهای که تقریباً در موقعیت وزنی ۴۱ کیلو دالتون قرار گرفته بود، به وضوح دیده شد. با توجه به این که این موقعیت تقریباً در محدوده موقعیت وزنی زیرواحدهای گلوتامین سنتتاز سیتوپلاسمی کلزاست، از این رو احتمالاً به دلیل فعالیت آنزیم گلوتامین سنتتاز در برگ گیاهان کلزای شاهد و عدم فعالیت یا فعالیت محدود آن در تیمارهای تراریخت A3، A4، A5 و A6 الگوی باندهای متفاوتی 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 تراریخت، احتمالاً به دلیل تأثیر آنتی‌سنس ژن گلوتامین سنتتاز روی میزان بیان سایر پروتئین‌های موجود در گیاه (مثلاً پروتئینی که در موقعیت وزنی ۲۳/۶ قرار دارد) در این تیمارها بوده است. بدیهی است به دلیل اعمال حداکثر شرایط یکسان آزمایشی در مورد تمامی تیمارهای مورد آزمایش، بروز اختلاف قابل توجه در الگوهای باندهای پروتئین بین تیمارهای شاهد و تراریخت، 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،



شکل ۵. الگوی بانندی حاصل از پروتئین‌های کل محلول برگ‌گی در تیمارهای تراریخت (A1- A6) و شاهد (WT) کلزای مورد مطالعه در مرحله اول نمونه برداری (YG) به روش اس.دی.اس.پیج. موقعیت زیر واحد بزرگ و کوچک آنزیم روبیسکو 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 بانندی حاصل از پروتئین‌های کل محلول برگ‌گی در تیمارهای تراریخت (A1- A6) و شاهد (WT) کلزای 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 بانندی 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 گلوتامین سنتتاز نبوده، ولی بروز این اختلاف می‌تواند ناشی از فعالیت یا تأثیر حضور آنتی‌سنس ژن گلوتامین سنتتاز در این تیمارهای تراریخت باشد. در مورد

سیاسگزاری

در پایان لازم است از آقایان دکتر کارل موریس و دکتر ویکی بوکانان و لستون از دانشگاه لندن که در جداسازی، همسانسازی 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 گلوتامین سنتتاز در تیمارهای تراریختی که با تیمار شاهد اختلاف داشته‌اند، باشد. بدیهی است با روش‌های تکمیلی 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. Microbiol.* 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. Mifflin, 1984. Immunological studied on glutamine synthetase using antiseraraised 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- Javaran, 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 struatural 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 mutigene family in the amphidipliod 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 degration 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. Mifflin (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. Schaeven. 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.