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

مختار جلالی جواران[1]، حمید هاشم‌زاده[2] و امیر موسوی[3]

چکیده

بررسی گیاهان تراریخت در پروژهٔ 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 مقدارکلروفیل‌های 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 مرحلهٔ قبل از گل‌دهی (MG1) شروع به افزایش نموده و در زمان گل‌دهی (MG2) به بیشترین میزان رسید و در مرحلهٔ پیری برگ (SS) مقدار پروتئین کل کاهش نشان داد.

در مقایسهٔ بین تیمارها، تیمار A2 بیشترین میزان پروتئین و تیمار A6 کمترین مقدار را نشان دادند. از نظرمیزان کلروفیل‌های a و b بین تیمارهای مورد مطالعه اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ولی بین مراحل مختلف رشد کلزا تفاوت معنی دار بوده و مرحلهٔ MG2 بیشترین و SS کمترین میزان کلروفیل‌های a و b را نشان دادند. به‌منظور مطالعهٔ الگوهای باندی در پروتئین‌های استخراج شده از گیاهان تراریخت در مقایسه با گیاه شاهد از روش اس.دی.اس.پیج استفاده شد که در مقایسهٔ الگوهای باندی حاصل از مرحلهٔ MG1 تفاوت قابل ملاحظه‌ای بین باندها دیده نشد، ولی در باندهای حاصل از مراحل MG2 و YG تفاوت‌هایی مشاهده شد. در مرحلهٔ YG اختلاف بین تیمارهای A5 ، A3 ، 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 مرحلهٔ MG2 نیز بین تیمارهای A1، A3، A4 و A6 با تیمار شاهد در موقعیت وزنی۵۷ 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 می باشد.

واژه‌های کلیدی: *ژن گلوتامین سنتتاز، پروتئین، کلروفیل، آنتی سنس، تراریخته، کلزا*

۱. استادیار ژنتیک مولکولی(مهندسی ژنتیک)، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران
۲. کارشناس ارشد اصلاح نباتات، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران
۳. استادیار بیوتکنولوژی کشاورزی، مرکز ملی مهندسی ژنتیک و تحقیقات زیستی، تهران

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2026-11-26]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1383.8.2.9.7]

مقدمه

روغن و چربی مورد نیاز انسان از منابع مختلف گیاهی و حیوانی تأمین می‌شود. روغن‌های گیاهی به‌دلیل دارا بودن مقادیر زیادی پروتئین و به‌ویژه 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 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، 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 پاییزهٔ 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 توسعهٔ کشت این گیاه به‌عنوان نقطهٔ امیدی برای تأمین روغن خام مورد نیاز کشورمحسوب شود. اصلاح کلزا از سالیان پیش با روش‌های کلاسیک شروع شده و طی چند سال اخیر، از تکنیک‌های مهندسی ژنتیک به‌منظور 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 گلوتامین‌سنتتاز (Glutamine synthetase) می‌باشد (۲ و ۱۵). گلوتامین‌سنتتاز دارای اشکال ایزوآنزیمی متفاوتی است که با ارگان‌ها و اجزای سلولی ارتباط دارد(۲۰،٤و 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 (GS_1) 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، به‌ویژه ایزوفرمی که در سیتوپلاسم بیان می‌شود (GS_1) بعد از شروع مرحلهٔ 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 پدیدهٔ پیری برگ‌ها به شمار می‌رود که با کاهش موادی چون پروتئین ارتباط مستقیم دارد (۱۱).

تکنولوژی آر.ان.ای. آنتی سنس(RNA Antisense)، به‌عنوان یک ابزار تحقیقاتی، روش جایگزینی را برای به‌دست آوردن موتان‌ها به منظور مطالعهٔ عملکرد ژن ها فراهم می‌کند که این تکنیک کاربرد فراوانی در علم مهندسی ژنتیک گیاهی دارد (۲۳). تکنیک آر. ان. ای. آنتی‌سنس با موفقیت در تنظیم کاهشی فعالیت آنزیم‌های پلی‌گالاکتروناز(Polygalacturonase) متابولیسم دیوارهٔ سلول، پکتین‌استراز(Pectinesterase)، و هم‌چنین برای کاهش سنتز اتیلن در میوه‌های گوجه فرنگی به‌کار گرفته شده است (۷، ۱۸و۱۹). با این پیش فرض که استفاده از تکنیک آر. ان. ای. آنتی‌سنس گلوتامین سنتتاز سیتوپلاسمی (GS1) احتمالاً فعالیت آنزیم گلوتامین‌سنتتاز را کاهش یا بیان آن را متوقف می‌نماید، توالی ژن گلوتامین سنتتار سیتوپلاسمی (GS1) در گیاه کلزا شناسایی و جدا شد(۹). توالی دی.ان.ای (DNA) ژن (GS1)، که درجهت معکوس و پائین‌دست پروموتور(Promoter) 35S CaMV، جای داده شده بود به داخل ناحیهٔ تی- دی.ان.ای(T-DNA) یک سیستم انتقال (PVW259) کلون گردید. سپس دی.ان.ای آنتی‌سنس با استفاده از روش آگروباکتریوم (*Agrobacterium tumefacince*) به داخل ژنوم سلول‌های کلزا (رقم وستار) منتقل شد. سلول‌های تراریخت با استفاده از ژن مقاومت به کانامایسین(Kanamaycin resistance) که به آنتی‌سنس GS1 پیوسته بود، بر سطح محیط کشت حاوی ۲۰

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2026-11-26]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1383.8.2.9.7]

میلی‌گرم در لیتر کانامایسین انتخاب گردیدند و در ادامه از سلول‌های تراریخت شده گیاه تولید شد (۱۰). پژوهش حاضر در ادامهٔ تحقیق قبلی و به منظور بررسی مولکولی نسل دوم(T_1) گیاهان تراریخت کلزایی که ژن گلوتامین سنتتاز در جهت آنتی‌سنس به آنها منتقل شده بود، انجام پذیرفت. در این بررسی تغییرات کمی پروتئین کل محلول برگی و کلروفیل‌های a، b و کاروتنوئید گیاهان تراریخت کلزا در مقایسه با گیاه شاهد ارزیابی شده و هم‌چنین الگوهای باندی 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 آنتی‌سنس ژن گلوتامین سنتاز به تیمارهای تراریخت، قبلاً با روش اگروباکتریوم انجام شده بود (۱۰). بذور گیاهان تراریخت شده با آنتی‌سنس ژن GS1 که متعلق به رقم وستار (Westar) بود به همراه گیاه شاهد تراریخت نشده، مورد ارزیابی قرار گرفتند که شش تودهٔ بذری جمع‌آوری شده از گیاهان تراریخت نسل اول (T_0) به همراه شاهد (مجموعاً ۷ تودهٔ بذری) تیمارهای آزمایشی را تشکیل دادند. کشت گیاهان در شرایط گلخانه‌ای (دمای C ° ۲۴-۲۰و فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی) در اتاقک رشد گروه اصلاح نباتات دانشکدهٔ کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس انجام گردید. تیمارهای تراریخت آنتی‌سنس با علامت اختصاری A (A_1 تا A_6) 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 مرحلهٔ رشدی شامل، مرحلهٔ روزت (YG)، گل‌دهی (MG1)، مرحلهٔ تشکیل غلاف (MG2) و مرحلهٔ 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 برگی و کلروفیل‌های برگی با استفاده از روش تغییر یافتهٔ گوی و همکاران (٦) 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 ml ۳ بافر استخراج (تریس کلراید (Tris-Hcl) ۵۰ میلی مولار (pH ۷/۵)، ای.دی.تی.ا (EDTA) ۲ میلی مولار و ۲- مرکاپتواتانول(Mercapto ethanol) ٪۰/۰۴ (v/v)) مخلوط شد. سپس µl۲۰۰ از هر نمونه با میکروپیپت برداشته و در لوله‌های اپندورف (علامت‌گذاری شده) ریخته شدند وµl۸۰۰ استون سرد شده(Aceton-ice cold) به آنها اضافه گردید. نمونه‌ها به منظور سنجش مقدار کمی کلروفیل‌های گیاهی در C°۴ 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). بقیهٔ عصارهٔ استخراج شده را درون لولهٔ ml ۵ پلاستیکی سرپوش‌دار (ویژهٔ سانتریفیوژ) ریخته و مشخصات نمونه روی آن نوشته شد (لازم به توضیح است که کلیهٔ مراحل انجام آزمایش روی یخ انجام گرفت) و سپس نمونه‌ها با استفاده از اولترا سانتریفیوژ (۱۱۰۰۰ دور در دقیقه) به مدت ۲۳ دقیقه سانتریفیوژ شدند. در این مرحله قسمت صاف شدهٔ محلول هر لوله (µl۷۰۰) برداشته و به سرعت به فریزر C°۲۰- منتقل شدند (۸). مقدار کمی پروتئین نمونه‌ها به روش برادفورد(Bradford) اندازه‌گیری شد (۳). بقیهٔ محلول‌های استخراج شده با هم حجم از بافر مخصوص (تریس- کلراید ۰/۰۶۲۵ مولار (pH ۶/۸) ، ۲ ــ مرکاپتواتانول 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 (C°۱۰۰) قرار گرفتند و سپس به مدت ۲۰ دقیقه با۴۰۰۰ دور سانتریفیوژ شدند. در نهایت محتویات داخل لوله‌ها به دو قسمت تقسیم گردیده و در دو اپندورف (۱/۵ml) ریخته و در فریزر C°۲۰- (تا زمان مناسب جهت ارزیابی و بررسی الکتروفورزی) نگه‌داری شدند.

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2026-11-26]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1383.8.2.9.7]

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 ۴ °C به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردیده وسپس 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:

$$\text{Chl a } (\mu g\ ml^{-1}) = ۱۲/۵\ A_{۶۶۳} - ۲/۵۵\ A_{۶۴۶}$$

(chl a = a کلروفیل ، chl b = b کلروفیل ،

A = میزان جذب نور در طول موج مورد نظر) [۱]

$$\text{Chl } b\ (\mu g\ ml^{-1}) = ۱۸/۲۹\ A_{۶۴۶} - ۲/۵۸\ A_{۶۶۳} \quad [۲]$$

$$\text{Carotenoid } (\mu g\ ml^{-1}) = (۱۰۰۰\ A_{۴۷۰} - ۳/۲۷$$

$$\text{chl}a\ ۱۰۴ - \text{chl}\ b\ ) /۲۲۹ \quad [۳]$$

سنجش مقدار کمی پروتئین

برای سنجش مقدار کمی پروتئین از روش برادفورد استفاده شد (۳). در روش برادفورد برای به‌دست آوردن میزان کمی پروتئین نمونه‌ها لازم است تا منحنی استاندارد مربوطهٔ دستگاه بر اساس رابطهٔ رگرسیونی که قابل محاسبه می‌باشد، ترسیم گردد. برای این منظور پروتئین‌های استانداردی با غلظت‌های ۱/۵۶، ۳/۱۲۵، ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۶۰ و ۷۰ 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 به‌دست آمده در این مرحله، معادلهٔ خط رگرسیونی محاسبه و منحنی مربوطه ترسیم گردید. بعد از مشخص شدن معادلهٔ نهایی، غلظت پروتئین در نمونه‌های حاصل از تیمارهای تراریخت وگیاهان شاهد کلزا در زمان‌های مختلف نمونه‌برداری تعیین شد.

الکتروفورز پروتئین

الکتروفورز پروتئین با استفاده از روش اس.دی.اس.پیج با اعمال تغییراتی، انجام شد (۱۰). برای این منظور ژل جدا کنندهٔ ۱۴٪ و متراکم کنندهٔ ۴٪ تهیه گردید. سپس محلول رنگ آمیزی تهیه شد که برای این‌کار مقدار ۰/۵ گرم کوماسی برلیانت بلو (Comasy brliant blue) در ۵۰ ml اسید استیک(Actic acid) حل گردیده و ۲۰۰ml 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 رنگ‌آمیزی 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 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 به‌دست 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 اضافهٔ 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 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 به‌دلیل در دسترس نبودن مارکرهای مولکولی، وزن و موقعیت باندهای مولکولی پروتئین‌ها بر اساس عامل

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2026-11-26]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1383.8.2.9.7]

حـرکت نـسبی یاRf(Reletive mobility) محاسـبه گـردیـد. فـاصـلـه باندهای پروتئینی (لبه جلویی هر باند) و رنگ نشانگر از ابـتدای ژل جـدا کـنـنده انـدازه‌گیـری شد، سپس Rf هر باند پـروتئین از تقسـیم آن دو محاسـبه گردید. با توجه به اطلاعات مـربوط بـه وزن‌هـای مولکولـی و Rf پـروتئین‌هـای اسـتاندارد، منحنـی استاندارد روی کاغذ نیمه لگاریتمی رسم شد، که محور لگاریتمـی کاغـذ بـه وزن‌هـای مولکولـی اختصـاص دارد. وزن مولکولـی پـروتئین‌هـای مـورد بررسی از روی منحنی استاندارد محاسبه گردید.

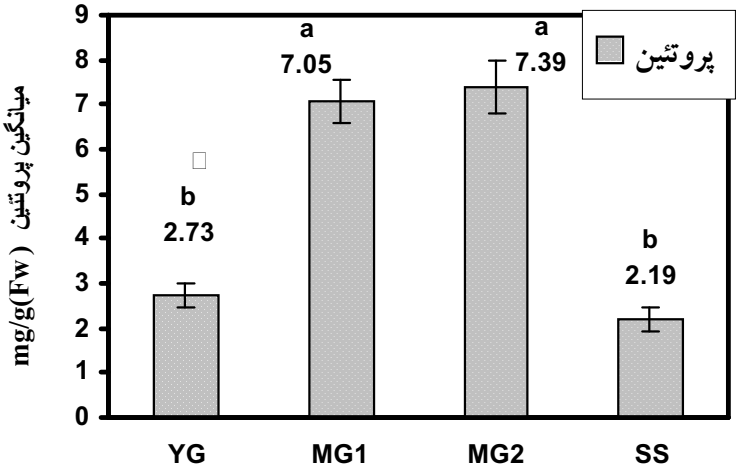
نتایج و بحث

مقایسـهٔ میـزان کمـی پـروتئین‌هـای محلول برگ در گیاهان تراریخت با شاهد

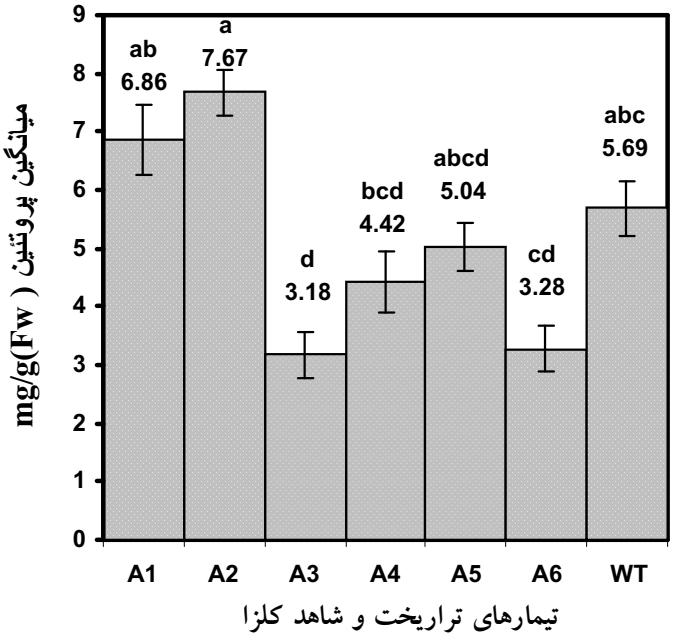
بـا جمـع‌آوری داده‌هـای مربوط به سنجش کمی مقدار پروتئین طـبق روش‌هـای ذکـر شـده در بخش مواد و روش‌ها، تجزیه و تحلـیل مـربوط بـه آنهـا انجـام گـرفت. نتایج حاصل به‌صورت شـکل‌هـای ۱ و ۲ ارائـه شـده است. با توجه به نتایج حاصل از تجـزیه واریـانس مـربوط بـه مقادیـر پروتئین‌های محلول برگ گـیاهان تراریخت و شاهد (غیر تراریخت) کلزا، وجود اختلاف معنـی‌دار بـین مراحل مختلف رشدی از نظر میزان پروتئین‌های کـل محلـول برگی در سطح احتمال ۱٪ به اثبات رسید. برای به دسـت آوردن اطلاعات دقیق‌تر از اختلاف آماری مشاهده شده، لازم بـود تـا مقایسـه میانگـین‌های مراحل مختلف رشدی انجام شـود، کـه این کار با استفاده از روش دانکن(Duncan) صورت گـرفته و نـتایج حاصـله در شـکل ۱ نشـان داده شـده اسـت. همـان‌طـور کـه در شکل ۱ ملاحظه می‌شود، میزان پروتئین‌های کـل محلـول برگـی در مراحل اولیه رشدی کم بوده و به تدریج کـه گـیاهان بـه مـرحله تشـکیل غلاف و پرشدن بذرها نزدیک مـی‌شوند، بر میزان آن افزوده می‌شود. به‌طوری‌که حداکثر میزان پـروتئین‌هـای کـل محلول برگی در مرحلهٔ بعد از گل‌دهی یا پر شـدن دانـه (MG2) مشاهده می‌شود. هرچه گیاه به سمت پیری پـیش مـی‌رود، از میـزان پروتئین‌های کل کاسته شده و کمترین میـزان آن در مـرحلهٔ پیـری (SS) به ثبت رسیده است. از لحاظ آماری مراحل گل‌دهی(MG1) و تشکیل غلاف (MG2) در یک گـروه و مـراحل روزت(YG) و پیری (SS) نیز در گروه دیگری قـرار گـرفتند (شکل۱). در کل نتایج به دست آمده نشان داد که میزان پروتئین در مرحلهٔ پیری کاهش می‌یابد. این فرآیند احتمالاً بـه‌دلـیل شکسـته شـدن پـروتئین‌هـا به واحدهای سازنده (اسید آمیـنه) بـرای انـتقال آنها از برگ‌ها و بافت‌های پیر به بافت‌های جـوان‌تـر یا بذور در حال پر شدن می‌باشد(۱۵). از طرفی نتایج تجـزیه واریـانس مـربوط به میزان پروتئین کل محلول برگی در تـیمارهای مختلف نشان داد که تیمارهای آزمایشی مورد مقایسه نیـز از نظـر میـزان کـل پـروتئین محلـول برگی دارای اختلاف معنـی‌دار آمـاری در سـطح احتمال۱٪ می‌باشند. انجام مقایسات میانگـین مربوط به تیمارهای آزمایشی به روش دانکن، نشان داد کـه تـیمار تـراریخت A۲ بیشـترین مقـدار و تیمار A۳ کمترین مقـدار پـروتئین را داشـته‌اند (شکل ۲). در این گروه‌بندی چهار تـیمارA۱، A۲، WT و A۵ در گـروه a قـرار گـرفته و تفـاوت آماری معنی‌داری با هم نداشتند. هم‌چنین تیمارهای A۱،WT، ۵ A و A۳ در گروه b و تیمارهایA۵،WT ، A۵ و A٦ در گروه c و بلاخـره تـیمارهای A۵، A٤، A٦ وA۳ نیـز در گـروه d قـرار گـرفتند. بـدین تـرتیب میـزان پـروتئین در تـیمار A۲ بـه‌طـور معنـی‌داری از تـیمارهای A٤، A٦ و A۳ بیشـتر بـوده و در تـیمارهای A۳ و A٦ نیـز بـه‌طور معنی‌داری از تیمارشاهد کمتر بـوده اسـت. در یـک نگـاه کلـی بـه شـکل ۲ دیـده می‌شود که چهارتـیمار A۳ ، A٤ ، A۵ و A٦ ، بـا داشـتن میانگـین کمتـر نسـبت بـه تیمارشـاهد و تـیمارهای A۱ و A۲ بیشـتر از شـاهد قـرار گـرفته‌انـد. بنابـرین مـی‌تـوان گفـت تکنیک آنتی‌سنس باعث کاهش میزان فعـالیـت ژن اصلی و یـا مـتوقف نمـودن فعالـیت کامـل ژن گـردیده کـه ایـن امـر بـه دلـیل ایجـاد زنجیـرهای آنتـی ام.ار.ان.ای (Anti-mRNA) اسـت کـه با اتصال به ام.ار.ان.ای‌های(mRNA) تولـید شـده از ژن اصـلی (رشـته سـنس (Sense)) مـانـع از تـرجـمـه آنـهـا و در نـهـایت مـانـع از بـیـان ژن

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2026-11-26]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1383.8.2.9.7]



شکل۱. روند تغییرات پروتئین کل محلول برگی در مراحل مختلف رشدی گیاهان تراریخت و شاهد کلزا
YG= مرحلهٔ روزت MG1 = مرحلهٔ گل‌دهی MG2 = مرحلهٔ تشکیل غلاف SS = مرحلهٔ پیری



شکل۲. روند تغییرات میزان پروتئین در تیمارهای تراریخت و شاهد گیاهان کلزا
WT = شاهد A1-A6 = گیاهان تراریخت شده

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2026-11-26]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1383.8.2.9.7]

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 گلوتامین‌سنتتاز 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 گلوتامین‌سنتتاز، 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 ۱(Hexo kinase1) با گیاهان غیرتراریخت مقایسه شدند که طی آن، با کاهش میزان فعالیت آنزیمی مذکور، میزان پروتئین کل، تا ۲۲ برابر در بعضی ازگیاهان تراریخت نسبت به گیاهان شاهد سیب‌زمینی کاهش نشان داد (۲۱). همان طور 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 GS1 با استفاده از روش‌های مختلف (PCR و ژن انتخاب کنندهٔ 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 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 مقایسهٔ میانگین (جدول۱) 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 ٪ واز 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 جدول۳ 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 مرحلهٔ 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 مرحلهٔ 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

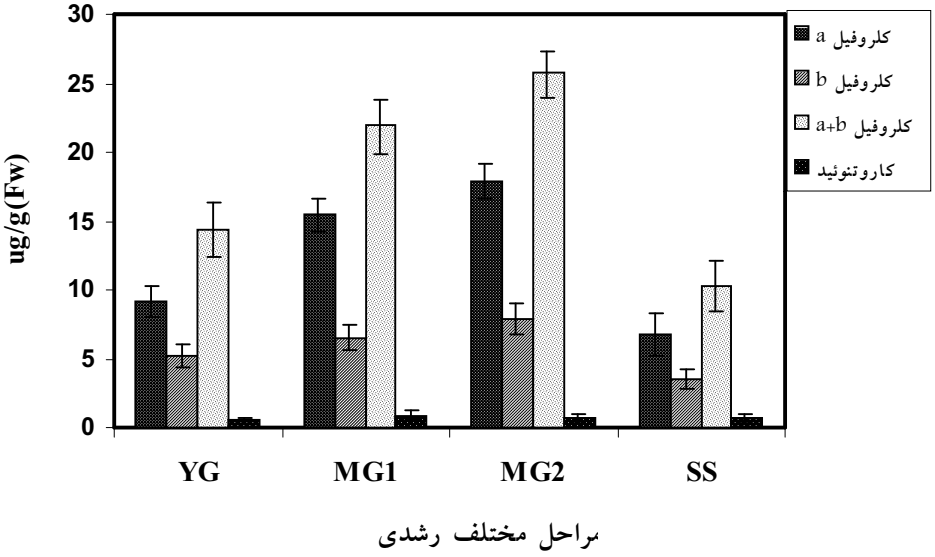
[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2026-11-26]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1383.8.2.9.7]

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

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

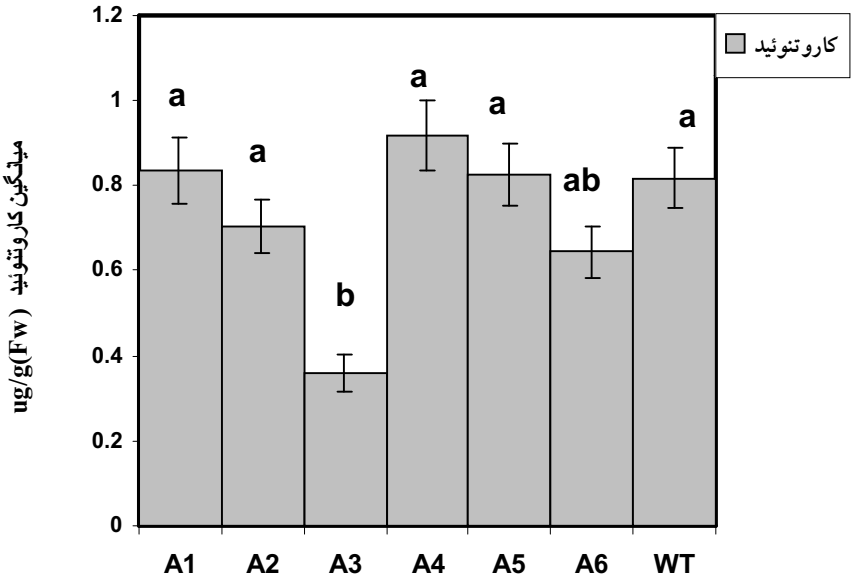
YG : مرحلهٔ روزت MG۱ : مرحلهٔ گل‌دهی
MG۲ : مرحلهٔ تشکیل غلاف SS : مرحلهٔ پیری



شکل۳. روند تغییرات میزان کلروفیل‌های a، b، (a+b) و کاروتنوئید در مراحل مختلف رشدی گیاه کلزا
YG : مرحلهٔ روزت MG۱ : مرحلهٔ گل‌دهی MG۲ : مرحلهٔ تشکیل غلاف SS : مرحلهٔ پیری

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 شکل۳ نشان داده شده است. نتیجه جالب توجه دیگری که به دست آمد، در مورد رنگدانه کاروتنوئید بود. به‌طوری‌که در مورد کاروتنوئید، حداکثر میزان آن در مرحلهٔ غنچه‌دهی (MG۱) و حداقل آن در مرحلهٔ روزت (YG) به دست آمد. هرچند در گروه‌بندی دانکن، مراحل MG۱، SS و MG۲ با پذیرفتن کد مشترک a در یک گروه آماری قرار گرفتند. به همین منوال مراحل SS، MG2 و YG نیز تفاوت

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2026-11-26]
[DOR: 20.1001.1.22518517.1383.8.2.9.7]



شکل۴. روند تغییرات کاروتنوئید در تیمارهای مختلف تراریخت و شاهد کلزای مورد مطالعه

WT : شاهد A1-A6 : گیاهان تراریخت شده

معنی‌داری را نشان نداده و در یک گروه جای گرفته‌اند (شکل٤). 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 A٤ بیشترین میزان کاروتنوئید و تیمار A۳ کمترین مقدار را داشته‌اند. هرچند از لحاظ آماری کلیهٔ تیمارها به‌جز A۳ در یک گروه و تیمارهای A٦ و A۳ نیز در گروه مجزای دیگری قرار گرفته‌اند. بنابراین فقط تیمار A۳ با بقیه تیمارها (به جز A٦) 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 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 کارتنوئید، 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 (۲۵-۴۰µl) برای هر تیمار در چاهک‌های الکتروفورزی

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2026-11-26]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1383.8.2.9.7]

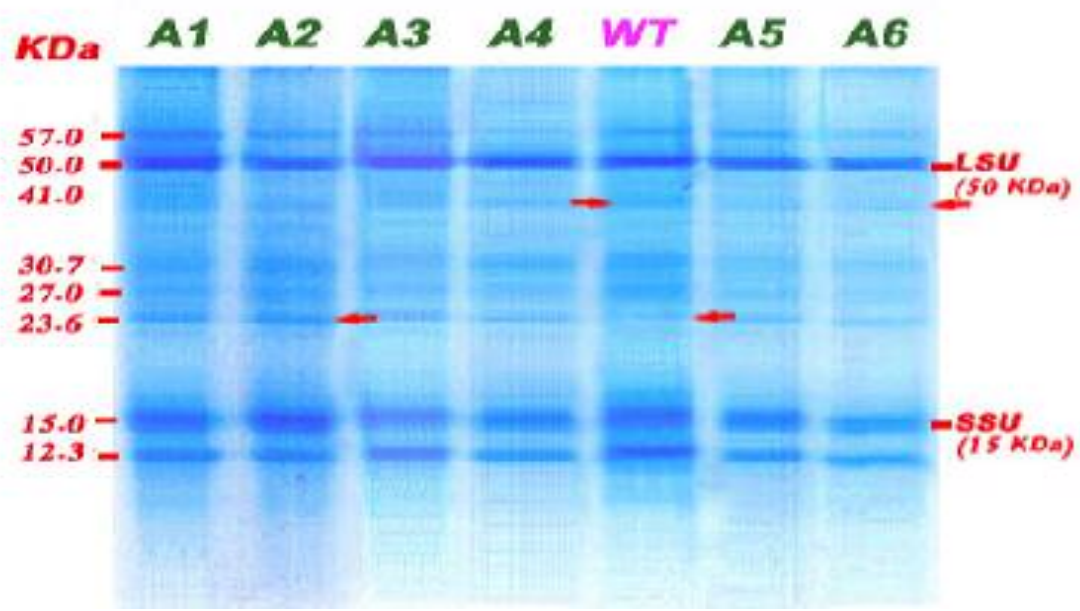
نمونه‌گذاری شد. بنابراین، غلظت پروتئینی در تیمارهای مختلف برابر بوده ولی حجم‌های متفاوتی از نمونه‌ها در هر چاهک نمونه‌گذاری گردید. دو باند واضح و مشخص در الکتروفورز پروتئین‌های برگی گیاهان تراریخت و شاهد دیده می‌شود که مربوط به زیر واحدهای کوچک و بزرگ آنزیم روبیسکو (Large and Small Sabunit of Rubisco) می‌باشند. زیر واحد بزرگ ۵۰ کیلو دالتون و زیر واحد کوچک ۱۵ کیلو دالتون وزن دارد. آنزیم روبیسکو 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 زیرواحدهای کلروپلاستی (GS۱) آنزیم گلوتامین سنتتاز درکلزا، حدوداً ۴۳ کیلو دالتون وزن داشته و آنزیم گلوتامین سنتتاز سیتوپلاسمی(GS۱)، 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.

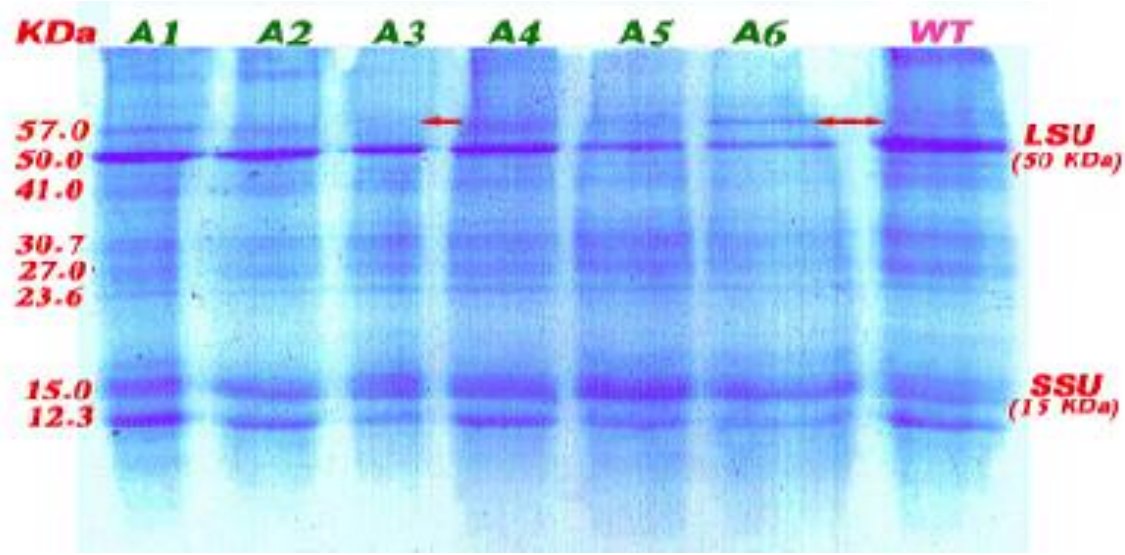
در ادامهٔ پژوهش الگوی باندی پروتئین‌های کل محلول برگی در گیاهان تراریخت و شاهد کلزا مورد بررسی قرار گرفت که در مرحله اول رشد گیاهان(YG) چند اختلاف بین باندهای شاهد و تراریخت دیده شد(شکل۵). در این مقایسه، کم‌رنگ شدن یک باند در تیمارهای A٦، A٥، A٤ و A٣ (اولین فلش از شکل ۵) در مقایسه با باند حاصل از تیمار شاهد، دیده شد. این باند در موقعیت تقریبی۴۱ کیلو دالتون قرار داشت و هم‌چنین، پررنگ و قطورتر شدن یک باند در تیمارهای A۱ و A۲ 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 باندی پروتئین در مرحلهٔ رشدی دوم (MG۱) تفاوت قابل ملاحظه‌ای بین باندهای حاصل از تیمارهای مختلف دیده نشد و الگوهای باندی تقریباً مشابه بودند. ولی در مورد الگوهای باندی پروتئین در مرحلهٔ سوم رشدی (MG۲) (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 A۱، A٤ و A٦ نسبت به باند مشابه آن در تیمار شاهد مشاهده گردید. این باند در تیمارهای A۲ و A۵ مشابه باند هم‌تراز آن درتیمار شاهد بود. در جمع‌بندی نتایج به‌دست آمده می‌توان چنین قضاوت 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 این‌که این موقعیت تقریباً در محدودهٔ 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 A۳، A٤، A۵ و A٦ الگوی باندی متفاوتی در آنها ایجاد شده است. از طرفی ضخیم شدن باند دیگر (فلش دوم از شکل ۵) در تیمارهای A۱ و A۲ 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 به‌دلیل اعمال حداکثر شرایط یکسان آزمایشی در مورد تمامی تیمارهای مورد آزمایش، بروز اختلاف قابل توجه در الگوهای باندی پروتئین بین تیمارهای شاهد و تراریخت، احتمالاً به دلیل تأثیر حضور آنتی‌سنس ژن گلوتامین سنتتاز بوده است. بنابراین هرچند اختلاف دیده شده در تیمارهای A۱ وA۲ در مرحله اول (فلش دوم از شکل ۵) نسبت به تیمار شاهد،

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2026-11-26]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1383.8.2.9.7]



شکل ۵. الگوی باندی حاصل از پروتئین‌های کل محلول برگی در تیمارهای تراریخت (A1- A6) و شاهد (WT) کلزای مورد مطالعه در مرحلهٔ اول نمونه برداری (YG) به‌روش 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 باندی حاصل از پروتئین‌های کل محلول برگی در تیمارهای تراریخت (A۱ -A٦) و شاهد (WT) کلزای مورد مطالعه در مرحلهٔ سوم نمونه برداری (MG۲) به‌روش اس.دی.اس.پیج. همان طور که نشان داده شده است وجود چند اختلاف در باند واقع در موقعیت KDa ۵۷ مشاهده می‌شود.

در موقعیت اختصاصی ژن گلوتامین‌سنتتاز نبوده، ولی بروز این اختلاف می‌تواند ناشی از فعالیت یا تأثیر حضور آنتی‌سنس ژن گلوتامین سنتتاز در این تیمارهای تراریخت باشد. در مورد الگوی باندی حاصل از مرحلهٔ MG۲ (شکل ۶) نیز همین احتمال وجود دارد به‌عبارتی می‌توان چنین قضاوت نمود که تفاوت دیده شده در باند موجود در موقعیت ۵۷ کیلو دالتون

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2026-11-26]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1383.8.2.9.7]

نیز می‌تواند ناشی از تأثیر غیر مستقیم حضور آنتی‌سنس ژن گلوتامین‌سنتتاز 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.

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.

منابع مورد استفاده

۱. احمدی، م. ۱۳۷۸. کشت گیاه کلزا در ایران رو به توسعه است. مجلهٔ 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. strrain pcc 9511 (oxyphotobacteria). Appl. and Environ. Microbial. 67: 2202- 2207.
3. Bradford, M. M. 1979. A rapiad 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 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 inhibitation 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 senescense 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.

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2026-11-26]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1383.8.2.9.7]

20. Stewart, G. R., A. F. Mann and P. A. Fentem. 1980. Enzymes of glotamate formation: glotamate dehydrogenase, glotamine synthase, and glotamate 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 hexokinas 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. Consoltant 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 *Arabiodopsis* cg1 mutant and in antisense plants. Plant Physiol. 123: 1097- 1108.

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2026-11-26]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1383.8.2.9.7]