

مقایسه مرحله پیری طبیعی و پیری پس از برداشت با تأکید بر جنبه‌های

مولکولی و ژئوتکنیک

سعید نواب پور

استادیار گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

*نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: s.navabpour@gau.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۰/۱۲/۱۸ - تاریخ پذیرش: ۹۱/۸/۹)

چکیده

پیری برگ یک مرحله نمو است که به لحاظ ژئوتکنیک و فیزیولوژیک بسیار حائز اهمیت است. ژن‌های زیادی در این مرحله فعال می‌شوند و افزایش قابل توجهی از نسخه برداری را نشان می‌دهند. از مشخصه‌های باز پیری کنترل روند تغییرات بسیار منظم و کنترل شده فعل و انفعالات فیزیولوژیک است. از جمله مهمترین این رخدادها توقف فتوستز، تجزیه کلروپلاست، کاهش چشم‌گیر کلروفیل و شکستن پروتئین‌ها و سایر مولکول‌های بزرگ است. پیری در گیاه بوسیله طیف وسیعی از عوامل داخلی و خارجی اتفاق می‌افتد. بروز پیری می‌تواند تحت اثر تنش‌های مختلف محیطی رخ دهد. از آنجا که گیاهان امکان حرکت ندارند پیری به عنوان یک سازوکار تکاملی فیزیولوژیک امکان مقابله با شرایط تنش را هموار می‌سازد. از موارد جالب توجه در بروز پیری، القای آن پس از برداشت است. این موضوع در برخی سبزی‌ها نظیر اسفناج، بروکلی، کاهو و کلم به خوبی دیده می‌شود. تعداد قابل توجهی از ژن‌های فعل در مرحله پیری شناسایی، جداسازی و همسانه‌سازی شده است. بیان نسبی این ژن‌ها در طیف گسترده فاز پیری و حتی پیش از بروز فتوتیپی پیری برگ تا آخرین مرحله پیری ملاحظه شد. براین اساس چنین به نظر می‌رسد که باید عوامل کنترلی نسبتاً زیادی در بیان این ژن‌ها دخیل باشند.

واژه‌های کلیدی

بیان ژن

پیری برگ

پیری پس از برداشت

مرگ برنامه‌ریزی شده سلول

مقدمه

چشمگیر کلروفیل و شکستن پروتئین‌ها و سایر مولکول‌های بزرگ است (Hörtensteiner and Feller, 2002; Navabpour et al., 2011). اما نکته مهم و در خور توجه اینکه همه این فرایندها کاملاً هدفمند و جهت‌دار هستند. هدف اصلی پیری در گیاه انتقال و بازیافت مواد آلی از برگ‌ها و اندام‌های پیر به دانه و سایر اندام‌های ذخیره‌ای است (Smart, 1994).

زمان القای پیری در گیاه

القای پیری در گیاه بوسیله طیف وسیعی از عوامل داخلی و خارجی حادث می‌شود (Nam, 1997). اساساً پیری مرحله نهایی نمو برگ است و زمان آغاز آن در گونه‌های مختلف گیاهی متفاوت است. برای مثال برگ‌های گیاه آرابیدوپسیس تقریباً بالافاصله پس از رسیدن به حداقل رشد رویشی وارد فاز پیری می‌شوند (Hanfrey et al., 1996). در حالی که پیری در برگ‌های گندم زمانی حادث می‌شود که سیگنال پر شدن دانه‌ها رخ می‌دهد. در مورد درختان خزان کننده القای پیری با تغییر شرایط آب و هوایی پاییز انجام می‌شود. در هر حال در کلیه موارد وقوع پیری به صورت یک برنامه هدفمند تحت کنترل عوامل ژنتیک است. علاوه بر این‌ها بروز پیری می‌تواند تحت تاثیر تنش‌های مختلف محیطی رخ دهد (Gan and Amasino, 1997). از آنجا که گیاهان امکان حرکت ندارند پیری به عنوان یک سازوکار تکاملی فیزیولوژیک امکان مقابله با شرایط تنش را هموار می‌سازد. تنش‌های عناصر غذایی و خشکی منجر به بروز پیری زودرس در گیاه می‌شود (Crafts- Brandner et al., 1998). در واقع گیاه در یک فرایند هموستاتیک انتقال مواد را در شرایط تنش از برگ‌های مسن‌تر به سوی جریان تولید دانه هدایت می‌کند. نتایج برخی پژوهش‌ها نشان می‌دهد گیاهان تحت تنش اکسیداتیو ناشی از پرتو تابی UV-B یا پرتو اوزون علائم پیری را بروز می‌دهند (Navabpour and Bagherieh Najjar, 2008). در عمل پرتو اوزون با عبور از غشا پلاسمایی سبب تولید رادیکال‌های فعل اکسیژن⁴ (ROS) می‌شود. چنانچه شدت پرتو بالا باشد سلول فرصت هیچگونه تمهید دفاعی را پیدا نمی‌کند و با وقوع لکه نکروزه مرگ سلولی حادث می‌شود. این پدیده بسیار شبیه به

4- Reactive Oxygen Species (ROS)

منظره چشم‌نواز پاییزی درختان خزان، تالو طلایی رنگ کشتزار گندم در زمان رسیدگی در عین زیبایی حکایت از تغییرات فیزیولوژیک و بنیادی در سطح سلولی و مولکولی دارد. در عرصه جهانی در هر دقیقه حدود ۲۰۰۰ تن کلروفیل تجزیه می‌شود. نزدیک به ۲۰۰ میلیون تن کاروتونوئید تخریب و بی‌گمان مقادیر به مراتب بیشتری از پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک و سایر مولکول‌های بزرگ تجزیه می‌شوند (Thomas, 1996). جنبه‌های زیادی به لحاظ بنیادی و کاربردی در پژوهش پروسه کاتابولیک پیری وجود دارد. ایده‌هایی چون تعویق و تاخیر پیری و یا تنظیم زمان‌بندی مراحل رشد که زمانی جنبه لوکس و فانتزی داشت به لطف استفاده از روش‌های نوین مولکولی در عرصه کاربردی مطرح هستند. تولید موتابنت‌های Gd₂d₁ سویا با تاخیر معنی‌دار پیری موجب افزایش حدود ۵۰ درصدی عملکرد دانه شده است. همچنین ایجاد گیاه تاریخته توتون با تولید فزاینده هورمون سایتوکینین ضمن تعویق مرحله پیری در جهت تولید اندام رویشی کیفی بیشتر عمل کرده است. معرفی تعداد بی‌شماری از موتابنت‌های مختلف گیاهی با ارزش اقتصادی و پژوهشی تنها بخش کوچکی از دستاوردهای این فناوری پویا در زمینه کنترل ژنتیک مرحله فیزیولوژیک پیری است. فرایند پیری برگ¹ در ظاهر ویرانگر و در باطن مفید و ارزشمند است. اساساً مفهوم پیری در سلول‌های گیاهی از آنجه در سلول‌های جانوری وجود دارد متفاوت است. پیری در سلول‌های جانوری با سالخوردگی² مترادف است. پدیده سالخوردگی فرایندی غیرفعال³ و بدون اهمیت است در حالی که پیری برگ یک مرحله نمو است که به لحاظ ژنتیک و فیزیولوژیک بسیار حائز اهمیت است. ژن‌های زیادی در این مرحله فعال می‌شوند. تعدادی از ژن‌ها افزایش قابل توجهی از نسخه‌برداری را نشان می‌دهند (Navabpour et al., 2003). از مشخصه‌های بارز پیری برگ روند تغییرات بسیار منظم و کنترل شده فعل و انفعالات فیزیولوژیک است. از جمله مهمترین این رخدادها توقف فتوستز، تجزیه کلروپلاست، کاهش

1- Leaf Senescence

2- Aging

3- Passive

آسپاراژین سیستیاز (King et al, 1990)، کاتالاز و متالوتایین (Page et al, 2001) نشان داد.

پیری و مرگ برنامه‌ریزی شده سلول^۸

انواع مختلفی از مرگ برنامه‌ریزی شده سلول (PCD) در گیاه رخ می‌دهد (Greenberg, 1996). از آن جمله تمایز جنسیت گل‌های نر و ماده در گیاهان یک پایه (مثل ذرت) از بافت‌های اولیه سلول‌های مولد گل (Chang, and Pareddy, 1994)، تشکیل آوند چوبی با مرگ سلول‌های مولد اولیه (Fukuda, 1997) و مرگ سلولی برگ‌های گیاه مونسترا که سبب تولید حفره‌هایی در برگ می‌شود. نوع دیگر PCD بروز واکنش HR در حمله عوامل Morel and Dangl, 1997) است (بهمویزه فرم ناسازگار) (Pennel, and Lamb, 1997). چنین مواردی از PCD شباهت قابل توجهی به مرگ سلولی در موجودات جانوری دارد (Pennel, and Lamb, 1997). اگرچه براساس نظر بسیاری از پژوهشگران پیری نیز از مصادیق PCD تلقی می‌شود و این امر با توجه به اینکه نتیجه نهایی پیری مرگ سلولی است قوت می‌یابد، ولی باید پذیرفت که روند طبیعی پیری به لحاظ فیزیولوژیک و بروز فنتوپیپی متفاوت از اغلب موارد Nooden and Guiamet, 1996) است. از جمله تفاوت‌های مهم در این زمینه این است که فرایند پیری یک مرحله کاملا هدفمند با پشتونه حضور فعال عوامل ژنتیک است. تمامیت مولکول دی.ان.ا. تا لحظه‌های پایانی مرحله پیری حفظ می‌شود و این امر به کترول دقیق و منظم فعل و انفعالات فیزیولوژیک مهم در این مرحله کمک می‌کند. روند بروز پیری به طور معمول در طی چندین روز (مدتها قبل از تظاهر فنتوپیپی) تنظیم و کدگذاری می‌شوند و تغییرات ژنتیک بسیاری در سطوح مولکولی حادث می‌شود (Bagherieh-Najjar et al, 2007; Buchanan-Wollaston and Ainsworth, 1997; Matile et al, 1998). بدیهی است این همه دقت عمل و سیستم‌های کترولی به صرف وقوع مرگ سلول از نظر بیولوژیک و فیزیولوژیک منطقی به نظر نمی‌رسد.

واکنش فوق حساسیت^۵ (HR) در حمله نژاد ناسازگار^۶ پاتوژن است (Sanderman et al, 1998). در حالی که پرتوتابی در شدت‌های پائین‌تر با تولید رادیکال‌های اکسیژن سبب کاهش میزان بیان ژن‌های فتوستتری و در مقابل افزایش فعالیت ژن‌های تجزیه کننده پروتئین‌ها (شبیه آنچه در پیری رخ می‌شود) (Page et al, 2001). اعمال تیمار پرتوتابی UV-B بر گیاه سبب افزایش چشم‌گیر مقادیر ROS و کاهش نسخه‌برداری ژن‌های فتوستتری و ساختمانی و افزایش ژن‌های کاتابولیک شد (Mackerness et al, 1997; Navabpour and Bagherieh Najjar, 2008). آلدگی گیاه با عوامل بیماری‌زای سازگار^۷ نیز منجر به تحریک پیری می‌شود و در بیشتر موارد زردی برگ‌ها (شاخصه فنتوپیپی پیری) ملاحظه می‌شود (Matthews, 1991). بروز پیری در سلول‌های آلدود به عنوان مانع فیزیولوژیک در جهت ممانعت از پراکندگی عامل بیماری‌زای تلقی می‌شود. برخی عوامل بیماری‌زای با تولید هورمون سایتوکینین در جهت دوام حیات سلول و Coghlilan, and Walters, 1992) در حمله عوامل بیماری‌زای ناسازگار موضوع متفاوت به نظر می‌رسد. در واقع در این واکنش مرگ سلولی بدون تظاهر علائم پیری حادث می‌شود. به نظر می‌رسد گیاه با القای سریع واکنش فوق حساسیت (HR) در محل آلدگی از رشد و پراکنش عامل بیماری‌زای جلوگیری می‌کند (Morel and Dangl, 1997). از موارد جالب توجه در بروز پیری، القای آن پس از برداشت است. این موضوع در برخی سیزیجات نظری اسفناج، بروکلی، کاهو و کلم به خوبی دیده می‌شود. در عمل تنش شدیدی که پس از برداشت این محصولات به دلیل قطع منابع تامین آب و مواد غذایی حاصل می‌شود سبب تحریک بروز پیری در سلول‌ها می‌شود (Navabpour and Sabouri, 2010; Page et al, 2001). در سطح سلولی تقریباً تمام تغییرات فیزیولوژیک (شامل تجزیه کلروفیل و پروتئین‌ها، تحلیل غشای سلولی تغییر بیان ژن‌ها) که در خلال پیری برگ حاصل می‌شود در اندام برداشت شده دیده می‌شود (King and Moriss, 1994). تغییرات بیان ژن‌ها نیز تشابه قابل توجهی را در مورد برخی همسانه‌های مورد بررسی نظری

5- Hypersensitive Response (HR)

6- Incompatible Pathogens

7- Compatible Pathogens

ژن‌های درگیر در فرآیند پیری در طیف گستردۀ زمانی و حتی پیش از بروز فنتیپی پیری برگ تا آخرین مرحله پیری ملاحظه می‌شود (Buchanan-Wollaston, 1997; Buchanan-Wollaston et al, 2007).(and Ainsworth, 1997; Nam, 1997; Navabpour et al, 2007) براین اساس چنین به نظر می‌رسد که باید عوامل کترولی نسبتاً زیادی در بیان این ژن‌ها دخیل باشند. از آنجا که کلیه فرآیندهای مهم فیزیولوژیک و فعل و افعالات بیوشیمیایی در سطح سلول ماحصل میزان فعالیت ژن‌هاست، بررسی الگوی افتراقی بیان ژن‌های حائز اهمیت زیادی است. در این راستا روش‌های مختلفی مدنظر است از جمله مهمترین آن‌ها لکه‌گذاری نورترن^{۱۳}، ارزیابی کمی نسخه‌برداری در زمان واقعی^{۱۴} و میکروواری^{۱۵} هستند. تکنیک تکنیک لکه‌گذاری نورترن هر چند قدیمی‌ترین روش است ولی همچنان در بسیاری از آزمایشگاه‌های مولکولی کاربرد دارد. در عمل اندازه‌گیری کیفی میزان بیان ژن‌ها با استخراج آر.ان.ا و انتقال آن به غشا حساس سلولزی و دورگ غشا در شرایط بافری مناسب با کاوشگرهای رادیواکتیو ژن‌های مورد نظر صورت می‌پذیرد. با انجام دورگ‌گیری و قرار دادن غشا بر روی فیلم رادیوگرافی شدت رنگ لکه‌ها پس از ظهرور فیلم میین بیان بیشتر ژن‌های مورد نظر در بافت و شرایط تیماری مذبور خواهد بود (Buchanan-Wollaston, 1997; Navabpour et al, 2003) ارزیابی کمی نسخه‌برداری در زمان واقعی یک روش درون شیشه‌ای^{۱۶} برای اندازه‌گیری رونوشت‌های توالی‌های شناخته شده است. این روش حساسیت و انعطاف‌پذیری بالایی دارد. در عمل پس از استخراج آر.ان.ا از بافت مورد نظر رشته دی.ان.ا مکمل (cDNA) ساخته می‌شود و با اتصال رنگ درج شونده اتیدیوم بر ماید در هر چرخه واکنش زنجیره‌ای میزان فلورستن حاصل توسط کامپیوتربصورت منحنی پلات می‌شود. بطور معمول با استفاده از ژن خانه‌دار^{۱۷} که واجد ثبات قابل قبول بیان در شرایط مختلف تیماری است، میزان بیان نسبی ژن‌های مورد پژوهش که با کمک آغازگرهای اختصاصی تکثیر شده اند مورد اندازه‌گیری قرار می‌گیرد (Buchanan-Wollaston et al, 2003). با کاربرد این

بررسی بیان برخی ژن‌ها و تغییرات فیزیولوژیک در خلال پیری تعداد قابل توجهی از ژن‌های فعال در مرحله پیری شناسایی، جداسازی و همسانه‌سازی شده است (Buchanan-Wollaston, 1997; Navabpour et al, 2007). بدین منظور از روش‌های مختلف مولکولی نظری غربالگری افتراقی^۹، دورگ‌گیری کاوشی^{۱۰}، DDRT-PCR^{۱۱} و cDNA-AFLP^{۱۲} استفاده شد. روش‌های مذبور مذبور واجد مزیت نسبی هستند. دو روش اول قدیمی‌تر هستند، روش غربالگری افتراقی کاربرد بیشتری نسبت به دورگ‌گیری کاوشی داشته و از مزایای مهم آن اینکه طیف وسیع‌تری از ژن‌ها را در شرایط مختلف تیماری یا محیطی شناسایی می‌کند. در عین حال روش دورگ‌گیری کاوشی پاسخ روش‌تری در شناسایی ژن‌هایی با افتراق بیان بالا را فراهم می‌کند (Buchanan and Ainsworth, 1997). روش DDRT-PCR اگرچه امکان شناسایی طیف وسیعی از ژن‌ها را در شرایط مختلف محیطی و تیماری فراهم می‌آورد ولی از معایب مهم آن ایجاد باندهای کاذب، عدم حساسیت بالا و پایین بودن راندمان تکرارپذیری است. در روش cDNA-AFLP با اتکا به استفاده از آغازگرهای اختصاصی، انجام تکثیر پس‌سی.آر و استفاده از ژل آکریلامید مشکلات مذبور به طور قابل توجهی مرتفع می‌شود (Navabpour et al, 2007). نواب‌پور و همکاران (۲۰۰۷) با استفاده از روش cDNA-AFLP و کاربرد ۲۵۶ آغازگر ترکیبی به شناسایی و همسانه سازی ژن‌های افتراقی در شرایط تیماری پرتوتابی اشعه فرابنفش، تنش شیمیایی نیترات نقره و مرحله پیری طبیعی در کلزا پرداختند (Navabpour et al, 2007). نتایج این پژوهش به شناسایی ۳۲ گروه افتراقی بیان ژن‌های جدید منجر شد که در شش گروه تقسیم‌بندی شدند. در میان ژن‌های مذبور فاکتورهای رونویسی از اهمیت بیشتری برخوردار بودند (Navabpour et al, 2007). پیچ و همکاران (۲۰۰۱) نیز با تکنیک cDNA-AFLP به شناسایی ژن‌های مشترک و افتراقی مرحله پیری طبیعی و پیری پس از برداشت در کلم بروکلی اقدام کردند (Page et al, 2001). نتایج پژوهش‌های زیادی نشان می‌دهد بیان نسبی

13- Northern Blot

14- Quantitative Real Time-PCR

15- Microarray

16- In Vitro

17- House Keeping

9- Differential Screening

10- Subtractive Hybridization

11- Differential Display Reverse Transcription-PCR

12- cDNA- Amplified Fragment Length

آسپارتیک پروتئاز در روزهای پس از برداشت بروکلی در شرایط دمای ۲۰ درجه سانتی گراد طی روزهای ۴ و ۶ بیان بالایی داشت در حالی که در دمای ۵ درجه سانتی گراد کاهش نسبی فعالیت این ژن طی روزهای مذبور محسوس بود. وضعیت بیان همسانه CL2 کد کننده پروتئین سیستئین پروتئاز به نحو جالب توجهی متفاوت بود. نتایج برخی پژوهش‌های دیگر نیز میبن تنوع بیان پروتئازها در خلال پیری در اندامهای مختلف گیاه نظیر برگ، ساقه، گل، Guerrero et al, 1998; King et al, 1995; Navabpour and Sabouri, 2010; Stephenson and Rubinstein, 1998.

همسانه CL3 کد کننده پروتئین سیستئین پروتئاز از ژن‌های کاملاً اختصاصی است که در مراحل پایانی پیری برگ بیان می‌شود (Lohman et al, 1994; Noh and Amasino, 1999). این ژن به طور چشم‌گیری در روزهای پس از برداشت بروکلی بیان شد. بیان این ژن در شرایط دمایی ۲۰ درجه سانتی گراد از ۴ روز پس از برداشت آغاز و در ششmin روز به طور قابل توجهی دیده شد. این مساله در شرایط دمایی ۵ درجه سانتی گراد در هشتmin روز پس از برداشت ملاحظه و در روز دوازدهم تشديد شده. نتایج پژوهش‌های ویور و همکاران (Weaver et al, 1998) در بررسی بیان این ژن در برگ‌های جدا شده آرابیدوپسیس میبن بیان بسیار ضعیف این ژن بود. همچنین اعمال تیمارهای شیمیایی در جهت تحريك ژن‌های واپسیه به پیری منجر به بیان این ژن نشد (Navabpour et al, 2003). از این رو چنین بهنظر می‌رسد که همبستگی بالایی در مسیر ژنتیک بیان این ژن در مراحل پیری برگ در گیاه و پیری پس از برداشت وجود دارد.

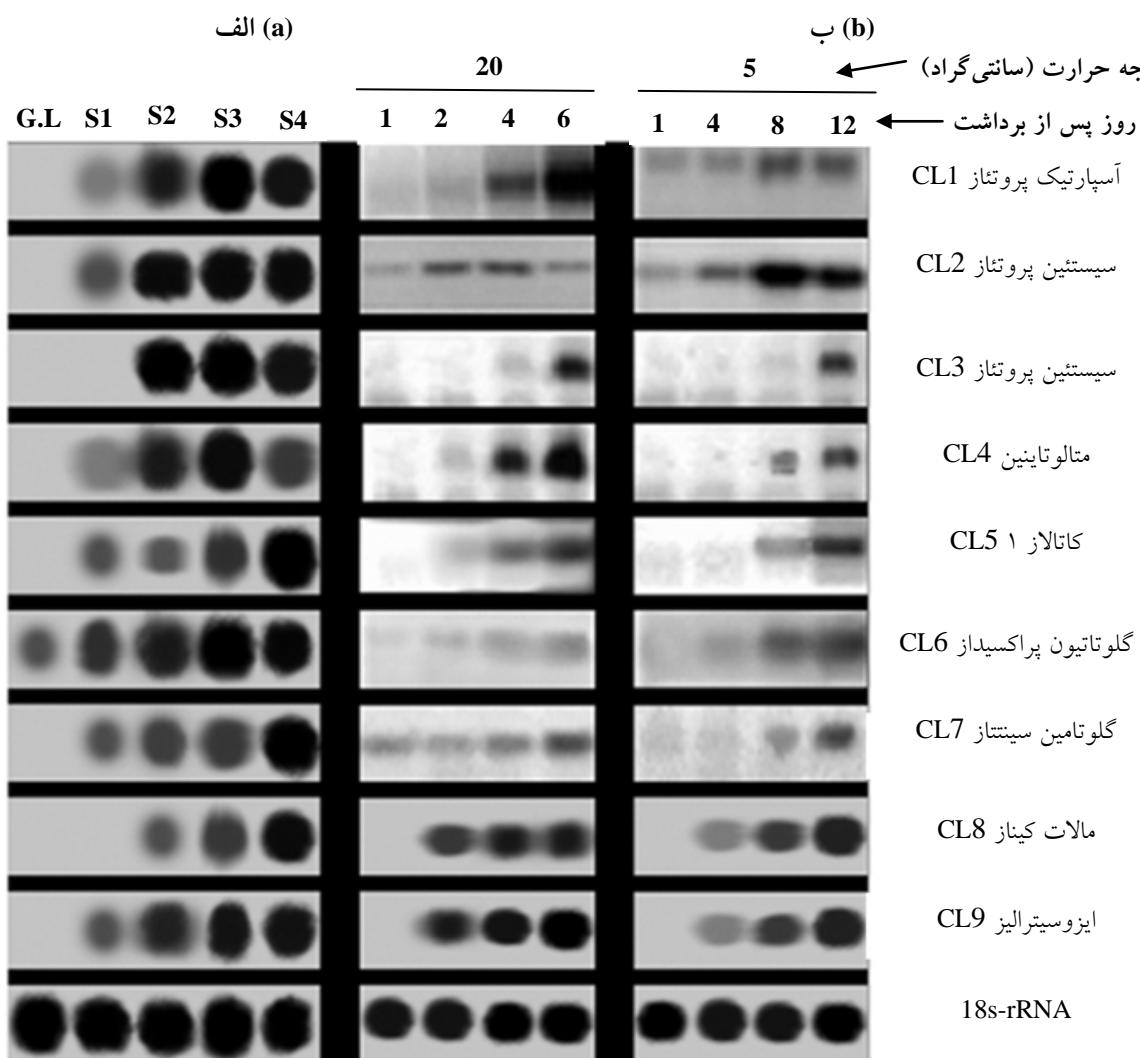
سه همسانه CL4 کد کننده پروتئین متالوتایشن، CL5 کد کننده پروتئین آنزیمی کاتالاز و CL6 کد کننده پروتئین گلتواتایون پروکسیداز از جمله ژن‌های آنتی اکسیدان است (Butt et al, 1998; Navabpour et al, 2011). دو همسانه CL4 و CL5 الگوی بیان مشابهی در مراحل مختلف پیری در کلزا نشان دادند، در حالی که الگوی بیان همسانه CL6 تا اندازه‌ای متفاوت بود. این همسانه‌ها در مرحله برگ سبز گیاه بیان بسیار ضعیفی داشتند در حالی که تمام آنها در مرحله پیری برگ افزایش بیان بالایی نشان دادند. نتایج مشابهی توسط سایر پژوهشگران نیز گزارش شده است

روش ارزیابی کمی بیان ژن کاتالاز در ارقام گندم در شرایط سطوح تنش شوری تحلیل مناسبی از الگوی روند بیان افتراقی این ژن در القای مقاومت نسبی به تنش شوری را فراهم کرد (Navabpour et al, 2011).

روش میکرواری ظرفیت بالایی در ارزیابی کافی بیان تعداد زیادی ژن در شرایط تیماری را داراست. این روش بر اساس طیف سنجی تراشه‌های واجد تعداد زیادی نمونه (معمولاً cDNA) که سطح رونوشت را با طیف رنگ‌های نور مرئی مرتبط می‌سازد، عمل می‌کند. نقاط با نور سفید بیشترین بیان و پس از آن قرمز، نارنجی، زرد، سبز، آبی روشن و آبی تیره قرار می‌گیرند. هزینه‌های بالای تجهیزات اولیه و تراشه‌های مربوطه کاربرد این روش را در بسیاری از آزمایشگاه‌های مولکولی محدود کرده است. در بررسی انجام شده در گیاه طبیعی آرابیدوپسیس و لاین ترازیخته NahG (ناتوان در تولید مولکول پیام اسید سالیسیلیک) بیشتر ژن‌ها سطح مشابهی از بیان را نشان دادند. تعداد محدودی ژن تفاوت قابل توجهی نشان داد که بطبع در ارتباط با مسیر Buchanan-ژنتیک تولید یا واکنش به اسید سالیسیلیک بوده‌اند (Wollaston et al, 2003). بدیهی است در ادامه امکان جداسازی، همسانه‌سازی و انجام پژوهش‌های تکمیلی در این راستا فراهم خواهد بود.

الگوی بیان برخی ژن‌های دخیل در فرایند پیری برگ در گیاه کلزا در مراحل مختلف پیری و تحت اثر تیمار تنش اکسیداتیو نیترات نقره با کاربرد تکنیک لکه گذاری نورترن در شکل ۱ الف نشان داده شده است. همچنین روند فعالیت همان ژن‌ها در مرحله پس از برداشت بروکلی در شرایط انبارداری دمای ۲۰ و ۵ درجه سانتی گراد در شکل ۱ ب آورده شده است.

تجزیه و تحلیل بیان برخی ژن‌های واپسیه به پیری نشان داد که کلیه همسانه‌های مورد بررسی به طور روشنی با افزایش سن گیاه کلزا افزایش فعالیت نشان دادند و در اغلب موارد یک روند خطی افزایش ملاحظه شد (شکل ۱-الف). همچنین بررسی بیان این ژن‌ها به طور متقابل در شرایط پس از برداشت در بروکلی مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۲-ب). سه همسانه اول که از دسته ژن‌های تجزیه کننده پروتئین‌ها هستند الگوی بیان تقریباً مشابهی در مراحل پیری کلزا داشتند. همسانه CL1 کد کننده پروتئین



شکل ۱- بیان ژنهای وابسته به پیری: الف- در خلال مراحل نمو در برگ کلزا، ب- طی روزهای پس از برداشت در گلچه بروکلی، با استفاده از روش لکه‌گذاری نورترن (اقتباس از منابع ۲۸، ۳۱، ۳۲ نگارنده).

الف- استخراج آر.ان.ا با استفاده از ۵ گرم برگ کلزا در هر مرحله صورت پذیرفت. ب- استخراج آر.ان.ا با استفاده از ۵ گرم ماده گلچه بروکلی تحت اثر تیمار آزمایشی صورت پذیرفت.

انتقال آر.ان.ا به غشاء سولولری انجام شد. کاوشگرهای رادیواکتیو خالص‌سازی و تک رشته شد و با غشا مربوطه دورگ شدند. با انتقال غشا به کاست رادیوگرافی و ظهور فیلم X-Ray نتایج مرتب شد. به منظور حصول اطمینان از بارگیری برابر آر.ان.ا از rRNA-18s استفاده شد.

مراحل نمو در کلزا به ترتیب شامل

G.L: مرحله بلوغ / S1: مرحله اول پیری، آغاز زرد شدن برگ‌ها / S2-S4: بطور متوسط به ترتیب ۲۰٪، ۵۰٪ و ۸۰٪ زرد شدگی برگ‌ها.

Figure 1- Senescence gene expression: a) During leaf growth stages in *Brassica* b) Days after harvesting of broccoli florets. By using northern blot technique (Result of author see references: Navabpour et al., 2003; Navabpour and Saburi, 2010; Navabpour et al., 2011, for more details)

a- RNA has been extracted by using 5gr of *Brassica* leaf. B- RNA has been extracted by using 5gr of treated broccoli florets.

RNA has been transferred into membrane and hybrid by radioactive signal standard pure probes. Result has been collected by developing radiographic x-ray film. In order of equal RNA loading into the gel r-RNA-18s has been used.

Growth stages in *Brassica* include:

GL: Mature leaf, S1: Senescence stage1 (starting of leaf yellowish), S2-S4: Including 20%, 50% and 80% of average leaf yellowish.

King et al, 1991). نتایج پژوهش کینگ و موریس (Kamachi et al, 1994) نشان داد افزایش میزان بیان این ژن ناشی از افزایش قابل توجه میزان آمونیوم تولید شده در خلال فرایند پیری در بروکلی بوده است. محصول پروتئینی همسانه‌های CL8 و CL9 آنزیم‌هایی هستند که در چرخه اسید گلی‌اکسیلیک حائز اهمیت هستند و جالب اینکه در خلال مرحله پیری نیز حضور دارند (Smart, 1994). فعالیت چرخه مزبور به همراه اکسیداسیون بتا و گلوکوجنیز امکان تبدیل اسید چرب به قند را فراهم می‌آورند. میزان افزایش فعالیت ژن‌های مزبور در بررسی Ettinger and Harada, (1990).

نتیجه‌گیری

فرایند پیری برگ قویا تحت کنترل ژنتیک بوده و الگوی بیان ژنهای زیادی در خلال آن تغییر می‌کند. بسیاری از فعل و انفعالات مولکولی و فیزیولوژیک مهم مشتمل بر چرخه‌های تنفسی و واکنش‌های کاتابولیک با تغییرات آنزیمی عوامل سیگنالی تنظیم می‌شوند. این واقعیت که عوامل گوناگون داخلی (نمود-هورمون) و محیطی می‌توانند محرك آغاز مرحله پیری برگ باشند نشان می‌دهد که مسیرهای مختلف ژنتیک (Signalizing Pathways) با اثرهای متقابل بردارهای مربوطه به طور مستقل یا غیر مستقل بر یکدیگر تاثیر گذاشته و در نهایت بیان ژنهای مرتبط با پیری را تنظیم می‌کند. عوامل پیام‌رسان حد واسطه تحت تاثیر برخی محرك‌ها برای مثال تنش خشکی با فعال نمودن فاکتورهای رونویسی (Transcription Factor) سبب بیان ژن‌های پیری می‌شوند. جالب اینکه در بسیاری از موارد ژن‌های نهایی هدف بطور مستقیم هیچ واکنشی به عامل محرك (شوری) نشان نمی‌دهند.

(Buchanan-Wollaston et al, 2003; Hanfrey et al, 1996) مورد بروکلی روند بیان هر سه همسانه الگوی بیان مشابهی را در شرایط مختلف تیماری طی روزهای پس از برداشت نشان دادند. همسانه CL4 (پروتئین متالوتایین) نقش مهمی در سمزدایی Murphy and Taiz, (1995) از طرفی شواهد انکارناپذیری در نقش این ژن در خلال پروسه پیری وجود دارد، به نظر می‌رسد این ژن در کمک به بقای سلول به منظور انتقال کلیه مواد پروتئینی و ذخیره‌ای به دانه و اندام‌های ذخیره‌ای فعالیت مهم و موثری می‌کند (Buchanan-Wollaston et al, 2003; Navabpour et al, 2003). همسانه CL6 کد کننده پروتئین گلوتاتایون پراکسیداز در تجزیه اسیدهای چرب ایفای نقش می‌کند. این ژن به انواع تنش‌های محیطی و مصنوعی نظیر شوری و تیمارهای شیمیایی واکنش نشان می‌دهد. بیان این ژن نقش مهمی در کاهش تنش اکسیداسیونی ناشی از تاثیر عوامل شیمیایی نظیر نیترات نقره در آراییدوپسیس ایفا کرده است (Navabpour et al, 2003). دو سازوکار واکنش مستقیم و آنزیمی در تنظیم سطح رادیکال‌های فعال اکسیژن برای این ژن معرفی شده است. در واکنش مستقیم پاکسازی رادیکال‌ها از طریق واکنش با گروه تیول پروتئین تولید شده توسط ژن گلوتاتایون صورت می‌گیرد. سازوکار آنزیمی از طریق احیا فسفولیپید هیدروژناز و کمپلکس هیدروپروکسی با هدف اختصاصی حفاظت غشا سلول در برابر نقش اکسیداسیون انجام می‌شود (Navabpour et al, 2003; Page et al, 2001). با توجه به روند افزایشی بیان این ژن طی روزهای پس از برداشت در هر دو شرایط دمایی و بیان بالای این ژن پس از اعمال تیمارهای تنش‌زا چنین به نظر می‌رسد که مسیر ژنتیک مشترکی در پیری برگ و پیری مصنوعی (تحریک بوسیله عوامل شیمیایی و محیطی) در ارتباط با کنترل این ژن دخالت دارند. این موضوع در مورد دو همسانه CL4 و CL5 نیز تا حد زیادی صادق است. همسانه‌های CL7، CL8 و CL9 که به ترتیب کد کننده پروتئین‌های گلوتامین سیتاتاز، ملات کیتاز و ایزوستیرالیز هستند. از دسته ژن‌های دخیل در انتقال مواد محسوب می‌شوند. همسانه CL7 در تبدیل اسیدهای آمینه حاصل از تجزیه پروتئین‌ها در خلال فرایند پیری برگ به پیتید گلوتامین ایفای نقش می‌کند

منابع

1. Bagherieh-Najjar MB, Navabpour S, Hille J, and Dijkwel PP. 2007. Isolation and molecular characterization of the rec-qsim gene in *Arabidopsis* rice (*Oryza sativa*) and rape (*Brassica napus*). *Int. J. of plant produc.* 1: 23-33.
2. Buchanan-Wollaston V. 1997. The molecular biology of leaf senescence. *J. Exp. Bot.* 48: 181-199.
3. Buchanan-Wollaston V, and Ainsworth C. 1997. Leaf senescence in *Brassica napus*: cloning of senescence related genes by subtractive hybridization. *Plant Mol. Biol.* 33: 821-834.
4. Buchanan-Wollaston V, Earl, S, Harrison E, Mathas E, Navabpour S, Page T, and Pink D. 2003 .The molecular analysis of leaf senescence – a genomics approach. *Plant Biotech.* 1(1):3-22.
5. Butt A, Mousley K, Morris K, Beynon J, Can C, Holub E, Greenberg JT, and Buchanan-Wollaston V. 1998. Differential expression of a senescence-enhanced metallothionein in *Arabidopsis* in response to isolates of *Peronospora parasitica* and *Pseudomonas syringae*. *Plant J* 16(2) 209-221.
6. Chang PC, and Pareddy DR. 1994. Morphology and development of the tassel and ear. In: *The Maize Handbook* Springer, New York, pp. 37-47.
7. Coglan SE, and Walters SR. 1992. Photosynthesis in green islands on powdery mildew-infected barley leaves. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 40: 31-38.
8. Crafts- Brandner SJ, Holzer R, and Feller U. 1998. Influence of nitrogen deficiency on senescence and the amounts of RNA and proteins in wheat leaves. *Physiol. Plant.* 102:192-200.
9. Ettinger WF, and Harada JJ. 1990. Translational or posttranslational processes affect differentially the accumulation of isocitrate lyase and malate synthase protein and enzyme activities in embryos and seedlings of *Brassica napus*. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 281: 139-143.
10. Fukuda H. 1997. Tracheary element differentiation. *Plant Cell* 9: 1147-1156.
11. Gan S, and Amasino RM. 1997. Making sense of senescence. *Plant Physiol.* 113: 313-319.
12. Greenberg JT. 1996. Programmed cell death: A way of life for plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 12094-12097.
13. Guerrero C, de la Calle M, Reid MS, and Valpuesta V. 1998. Analysis of the expression of two thiolprotease genes from daylily (*Hemerocallis spp.*) during flower senescence. 36: 565-571.
14. Hanfrey C, Fife M, and Buchanan-Wollaston V. 1996. Leaf senescence in *Brassica napus*: expression of genes encoding pathogenesis-related proteins. *Plant Mol. Biol.* 30: 597-609.
15. Hensel LL, Grbic V, Baumgarten DA, and Bleeker AB. 1993. Developmental and age-related processes that influence the longevity and senescence of photosynthetic tissues in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 5: 553-564.
16. Hörtensteiner S, and Feller U. 2002. Nitrogen metabolism and remobilization during senescence. *J. Exp. Bot.* 53: 927-937.
17. Kamachi K, Yamaya T, Mae T, and KOjima. 1991. A role for glutamine synthetase in the remobilisation of leaf nitrogen during natural senescence in rice leaves. *Plant Physiol.* 96:411-417.
18. King GA, and Moriss SC. 1994. Early compositional changes during postharvest senescence of broccoli. *J.Amer. Soc. Hort. Sci.* 199: 1000-1500.
19. King GA, Davies KM, Stewart RJ, and Borst WM. 1995. Similarities in gene expression during the postharvest-induced senescence of spears and the natural foliar senescence of asparagus. *Plant Physiol.* 108: 125-128.
20. King GA, Woolard DC, Irving DE, and Borts WM. 1990. Physiological changes in asparagus spear tips after harvest. *Physiol. Plant* 80: 393-400.
21. Lohman KN, Gan S, John MC, and Amasino RM. 1994. Molecular analysis of natural leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Physiol. Plant* 92: 322-328.
22. Mackerness S, Jordan BR, and Thomas B. 1997. UV-B effects on the expression of genes encoding proteins involved in photosynthesis, In: *Plants and UV-B: Responses to Environmental Change*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 113-134.
23. Matile P, Duggelin T, Schellenberg M, Rentsch D, Bortlik K, Peisker C, and Thomas H. 1998. How and why is chlorophyll broken down in senescent leaves? *Plant Physiol. Biochem.* 27:595-604.
24. Matthews REF. 1991. Disease symptoms and effects on metabolism. In: *Plant Virology*. 3rd end. London: Academic Press, 380-422.
25. Morel JB, and Dangl JL. 1997. The hypersensitive response and induction of cell death in plants. *Cell Death Diff.* 4: 671-683.
26. Murphy A, and Taiz L. 1995. Comparison of metallothionein gene expression and non-protein thiols in 10 *Arabidopsis* ecotypes. Correlation with copper tolerance. *Plant Physiol* 109: 1-10.
27. Nam HG. 1997. The molecular genetic analysis of leaf senescence. *Curr. Op. Biotech.* 8: 200-207.
28. Navabpour S, Morris K, Harrison E, Makerness S, Buchanan-Wollaston V. 2003. Expression of senescenceenhanced genes in response to oxidative stress. *J. Exp. Bot.* 54,2285-2292.
29. Navabpour S, Bagherieh-Najjar MB, Soltanloo H.

2007. Identification of novel genes expressed in *Brassica napus* during leaf senescence and in response to oxidative stress. *Int. J. of Plant Prod.* 1(1): 35-44.
30. Navabpour S, and Bagherieh Najjar MB. 2008. Molecular and biochemical analysis of oxidative stress and UV-B radiation in *Brassica napus*. *J. Agric. Sci. Natur. Resour.* Vol. 15(5) 23-33.
31. Navabpour S, and Sabouri H. 2010. Molecular and biochemical characterization of post-harvest senescence in broccoli. *Sci. and Tech. of Hort.* 12(2):23-34.
32. Navabpour S, Bagherieh-Najjar MB, and Haddad R. 2011. Comparison of induced gene response to stressful treatment in *Spinacia oleracea* and *Brassica napus*. *J. of Agric. Biotech.* 10(1)11-10.
33. Navabpour S, Kazemi G, and Ramezanpour SS. 2011. Evaluation of catalase gene expression and morphological traits in two wheat cultivar under salt stress. *J. of Iranian Gen.Society.* In Press.
34. Noh YS, and Amasino RM. 1999. Identification of a promoter region responsible for the senescence-specific expression of SAG12. *Plant Mol. Biol.* 41: 181-194.
35. Nooden LD, and Guiamet JJ. 1996. Genetic control of senescence and ageing in plants. In: *Handbook of the Biology of Ageing*. 4th Edn (eds E.L. Schneider, W. Rowe and J. Orland). Academic Press, London, pp. 94-118.
36. Page T, Griffiths G, and Buchanan-Wollaston V. 2001. Molecular and biochemical characterization of postharvest senescence in broccoli. *Plant Physiol.* 125: 718-727.
37. Pell EJ, Schlaginhauf CD, and Arteca RN. 1997. Ozone-induced oxidative stress: Mechanisms of action and reaction. *Physiologia Plantarum* 100: 264-273.
38. Pennel R, and Lamb C. 1997. Programmed cell death in plants: *Plant Cell.* 9: 1157-1168.
39. Sanderman H, Ernest D, Heller W, and Langebartels C. 1998. Ozone: an abiotic elicitor of plant defence reactions. *Trends Plant Sci.* 3: 47-49.
40. Smart CM. 1994. Gene expression during leaf senescence. *New Phytol.* 126: 419-448.
41. Stephenson P, and Rubinstein B. 1998. Characterization of proteolytic activity during senescence in daylilies. *Physiologia Plantarum.* 104: 463-473.
42. Thomas H. 1996. Scientists crack secret of keeping grass green. *The Sunday Times* 7 July.
43. Weaver LM, Gan S, Quirino B, and Amasino RM. 1998. A comparison of the expression patterns of several senescence associated genes in response to stress and hormone treatment. *Plant Mol. Biol.* 37: 455-469.