مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
دوره اول، شماره ۲، پاییز و زمستان ۱۳۹۱
صفحه ۶۳-۷۲

مقایسه مرحله پیری طبیعی و پیری پس از برداشت با تاکید برجنبه‌های مولکولی و ژنتیک

سعید نواب‌پور*

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 ژنتیک و فیزیولوژیک بسیار حائز اهمیت است. ژن‌های زیادی در این مرحله فعال می‌شوند و افزایش قابل توجهی از نسخه‌برداری را نشان می‌دهند. از مشخصه‌های بارز پیری کنترل روند تغییرات بسیار منظم و کنترل شده فعل و انفعالات فیزیولوژیک است. از جمله مهمترین این رخدادها توقف فتوسنتز، 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 فعال در مرحله پیری شناسایی، جداسازی و همسانه‌سازی شده است. بیان نسبی این ژن‌ها در طیف گسترده فاز پیری و حتی پیش از بروز فنوتیپی پیری برگ تا آخرین مرحله پیری ملاحظه شد. براین اساس چنین به نظر می‌رسد که باید عوامل کنترلی نسبتا زیادی در بیان این ژن‌ها دخیل باشند.

واژه‌های کلیدی

بیان ژن
پیری برگ
پیری پس از برداشت
مرگ برنامه‌ریزی شده سلول

مقدمه

منظره چشم‌نواز پاییزی درختان خزان، تلالو طلایی رنگ کشتزار گندم در زمان رسیدگی در عین زیبایی حکایت از تغییرات فیزیولوژیک و بنیادی در سطح سلولی و مولکولی دارند. در عرصه جهانی در هر دقیقه حدود ۲۰۰۰ تن کلروفیل تجزیه می‌شود. نزدیک به ۲۰۰ میلیون تن کاروتنوئید 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 ویا تنظیم زمان‌بندی مراحل رشد که زمانی جنبه لوکس و فانتزی داشت به لطف استفاده از روش‌های نوین مولکولی در عرصه کاربردی مطرح هستند. تولید موتانت‌های Gd_1d_2 سویا با تاخیر معنی‌دار پیری موجب افزایش حدود ۵۰ درصدی عملکرد دانه شده است. همچنین ایجاد گیاه تراریخته توتون با تولید فزاینده هورمون سایتوکنین ضمن تعویق مرحله پیری در جهت تولید اندام رویشی کیفی بیشتر عمل کرده است. معرفی تعداد بی‌شماری از موتانت‌های 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 برگ[1] در ظاهر ویرانگر و در باطن مفید و ارزشمند است. اساسا مفهوم پیری در سلول‌های گیاهی از آنچه در سلول‌های جانوری وجود دارد متفاوت است. پیری در سلول‌های جانوری با سالخوردگی[2] مترادف است. پدیده سالخوردگی فرایندی غیرفعال[3] و بدون اهمیت است در حالی‌که 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 فتوسنتز، تجزیه کلروپلاست، کاهش 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 کاملا 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).

1- Leaf Senescence
2- Aging
3- Passive

زمان القای پیری در گیاه

القای پیری در گیاه بوسیله طیف وسیعی از عوامل داخلی و خارجی حادث می‌شود (Nam, 1997). اساسا پیری مرحله نهایی نمو برگ است و زمان آغاز آن در گونه‌های مختلف گیاهی متفاوت است. برای مثال برگ‌های گیاه آرابیدوپسیس تقریبا بلافاصله پس از رسیدن به حداکثر رشد رویشی وارد فاز پیری می‌شوند (Hanfrey et al, 1996). در حالی‌که 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 به‌عنوان 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 فعال اکسیژن[4] (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)

واکنش فوق حساسیت [5](HR) در حمله نژاد ناسازگار[6] پاتوژن است (Sanderman et al, 1998). در حالی‌که پرتوتابی در شدت‌های پائین‌تر با تولید رادیکال‌های اکسیژن سبب کاهش میزان بیان ژن‌های فتوسنتزی و در مقابل افزایش فعالیت ژن‌های تجزیه کننده پروتئین‌ها (شبیه آنچه در پیری رخ می‌دهد) می‌شود (Page et al, 2001). اعمال تیمار پرتوتابی UV-B بر گیاه سبب افزایش چشم‌گیر مقادیر ROS و کاهش نسخه‌برداری ژن‌های فتوسنتزی و ساختمانی و افزایش ژن‌های کاتابولیک شد (Mackerness et al, 1997; Navabpour and Bagherieh Najjar, 2008). آلودگی گیاه با عوامل بیماری‌زای سازگار[7] نیز منجر به تحریک پیری می‌شود و در بیشتر موارد زردی برگ‌ها (شاخصه فنوتیپی پیری) ملاحظه می‌شود (Matthews, 1991). بروز پیری در سلول‌های آلوده به عنوان مانعی فیزیولوژیک در جهت ممانعت از پراکندگی عامل بیماری‌زا تلقی می‌شود. برخی عوامل بیماری‌زا با تولید هورمون سایتوکنین در جهت دوام حیات سلول و جلوگیری از بروز پیری تلاش می‌کنند (Coghlan, 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 آلودگی از رشد و پراکنش عامل بیماری‌زا جلوگیری می‌کند (Morel and Dangl, 1997). از موارد جالب توجه در بروز پیری، القای آن پس از برداشت است. این موضوع در برخی سبزیجات نظیر 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 تقریبا تمام تغییرات فیزیولوژیک (شامل تجزیه کلروفیل و پروتئین‌ها، تحلیل غشا 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 نظیر آسپاراژین سینتتاز (King et al, 1990) ، کاتالاز و متالوتاینین (Page et al, 2001) نشان داد.

پیری و مرگ برنامه‌ریزی شده سلول[8]

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 بیماری‌زا (به‌ویژه فرم ناسازگار) است (Morel and Dangl, 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 فنوتیپی متفاوت از اغلب موارد PCD نظیر اقسام یاد شده است (Nooden and Guiamet, 1996). از جمله تفاوت‌های مهم در این زمینه این است که فرایند پیری یک مرحله کاملا هدفمند با پشتوانه حضور فعال عوامل ژنتیک است. تمامیت مولکول دی.ان.اِ تا لحظه‌های پایانی مرحله پیری حفظ می‌شود و این امر به کنترل دقیق و منظم فعل و انفعالات فیزیولوژیک مهم در این مرحله کمک می‌کند. روند بروز پیری به‌طور معمول در طی چندین روز (مدت‌ها قبل از تظاهر فنوتیپی پیری) 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 کنترلی به صرف وقوع مرگ سلول از نظر بیولوژیک و فیزیولوژیک منطقی به نظر نمی‌رسد.

5- Hypersensitive Response (HR)
6- Incompatible Pathogens
7- Compatible Pathogens
8- Programmed Cell Death (PCD)

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 نظیر غربالگری افتراقی[9]، دورگ‌گیری کاهشی[10]، DDRT-PCR[11] و cDNA–AFLP[12] استفاده شد. روش‌های مزبور مزبور واجد مزیت نسبی هستند. دو روش اول قدیمی‌تر هستند، روش غربالگری افتراقی کاربرد بیشتری نسبت به دورگ‌گیری کاهشی 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 کاهشی پاسخ روشن‌تری در شناسایی ژن‌هایی با افتراق بیان بالا را فراهم می‌کند (Buchanan-Wollaston and Ainsworth, 1997; Nam, 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 پس.سی.آر و استفاده از ژل آکریلامید مشکلات مزبور 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 مزبور فاکتورهای رونویسی از اهمیت بیشتری برخوردار بودند (Navabpour et al, 2007). پیج 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 ژن‌های درگیر در فرآیند پیری در طیف گسترده زمانی و حتی پیش از بروز فنوتیپی پیری برگ تا آخرین مرحله پیری ملاحظه می‌شود (Buchanan-Wollaston, 1997; Buchanan-Wollaston and Ainsworth, 1997; Nam, 1997; Navabpour et al, 2007). براین اساس چنین به نظر می‌رسد که باید عوامل کنترلی نسبتا زیادی در بیان این ژن‌ها دخیل باشند. از آنجا که کلیه فرآیندهای مهم فیزیولوژیک و فعل و انفعالات 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[13]، ارزیابی کمی نسخه‌برداری در زمان واقعی[14] و میکروواری[15] 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.اِ 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 ظهور فیلم مبین بیان بیشتر ژن‌های مورد نظر در بافت وشرایط تیماری مزبور خواهد بود (Buchanan-Wollaston, 1997; Navabpour et al, 2003).

ارزیابی کمی نسخه‌برداری در زمان واقعی یک روش درون شیشه‌ای[16] برای اندازه‌گیری رونوشت‌های توالی‌های شناخته شده است. این روش حساسیت و انعطاف‌پذیری بالایی دارد. در عمل پس از استخراج آر.ان.اِ از بافت مورد نظر رشته دی.ان.ا مکمل (cDNA) ساخته می‌شود و با اتصال رنگ درج شونده اتیدیوم برماید در هر چرخه واکنش زنجیره‌ای میزان فلورسنت حاصل توسط کامپیوتر بصورت منحنی پلات می‌شود. بطور معمول با استفاده از ژن خانه‌دار[17] 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

9- Defferential Screening
10- Subtractive Hybridazation
11- Differential Display Reverse Transcription-PCR
12- cDNA- Amplified Fragment Length
13- Northern Blot
14- Quantitative Real Time-PCR
15- Microarray
16- In Vitro
17- House Keeping

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).

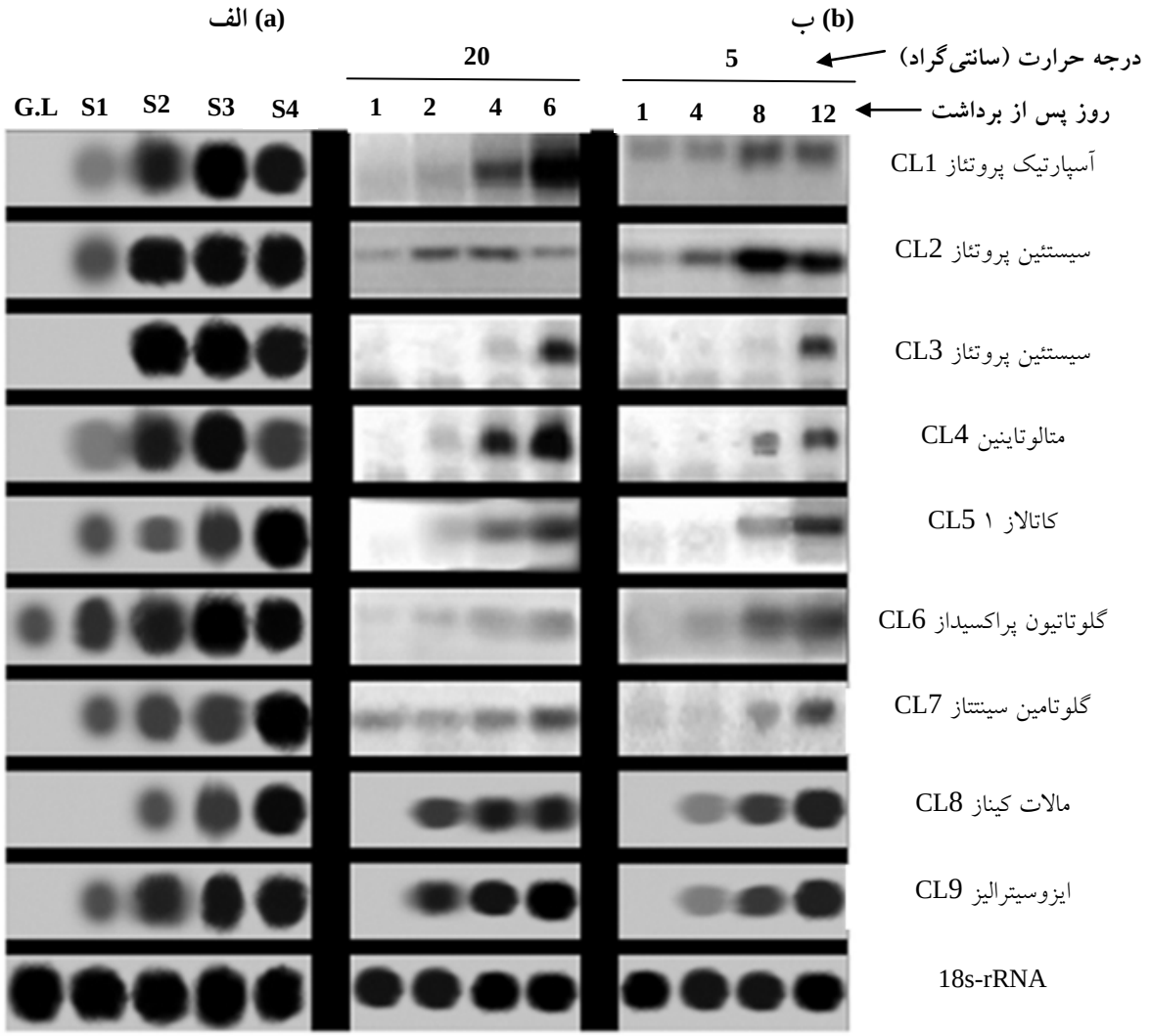
روش میکرواری ظرفیت بالایی در ارزیابی کیفی بیان تعداد زیادی ژن در شرایط تیماری را داراست. این روش بر اساس طیف سنجی تراشه‌های واجد تعداد زیادی نمونه (معمولا cDNA) که سطح رونوشت را با طیف رنگ‌های نور مرئی مرتبط می‌سازد، عمل می‌کند. نقاط با نور سفید بیشترین بیان و پس از آن قرمز، نارنجی، زرد، سبز، آبی روشن 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 تراریخته 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 ژنتیک تولید یا واکنش به اسید سالیسیلیک بوده‌اند (Buchanan-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 درگیاه کلزا در مراحل مختلف پیری و تحت اثر تیمار تنش اکسیداتیو نیترات نقره با کاربرد تکنیک لکه‌گذاری نورترن در شکل۱ الف نشان داده شده است. همچنین روند فعالیت همان ژن‌ها در مرحله پس از برداشت بروکلی در شرایط انبارداری دمای ۲۰ و ۵ درجه سانتی‌گراد در شکل ۱ ب آورده شده است.

تجزیه و تحلیل بیان برخی ژن‌های وابسته به پیری نشان داد که کلیه همسانه‌های مورد بررسی به‌طور 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 به‌طور متقابل در شرایط پس از برداشت در بروکلی مورد بررسی قرار گرفت (شکل۲-ب). سه همسانه اول که از دسته ژن‌های تجزیه کننده پروتئین‌ها هستند الگوی بیان تقریبا مشابهی در مراحل پیری کلزا داشتند. همسانه CL1 کد کننده پروتئین آسپارتیک پروتئاز در روزهای پس از برداشت بروکلی در شرایط دمای ۲۰ درجه سانتی گراد طی روزهای ٤ و ٦ بیان بالایی داشت در حالی‌که در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد کاهش نسبی فعالیت این ژن طی روزهای مزبور محسوس بود. وضعیت بیان همسانه CL2 کد کننده پروتئین سیستئین پروتئاز به‌نحو جالب توجهی متفاوت بود. نتایج برخی پژوهش‌های دیگر نیز مبین تنوع بیان پروتئازها در خلال پیری در اندام‌های مختلف گیاه نظیر برگ، ساقه، گل، ریشه و گلچه‌های بروکلی پس از برداشت است (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 سانتی‌گراد از ٤ روز پس از برداشت آغاز و در ششمین روز به‌طور قابل توجهی دیده شد. این مساله در شرایط دمایی ۵ درجه سانتی‌گراد در هشتمین روز پس از برداشت ملاحظه و در روز دوازدهم تشدید شد. نتایج پژوهش‌های ویور و همکاران (Weaver et al, 1998) در بررسی بیان این ژن در برگ‌های جدا شده آرابیدوپسیس مبین بیان بسیار ضعیف این ژن بود. همچنین اعمال تیمارهای شیمیایی در جهت تحریک ژن‌های وابسته به پیری منجر به بیان این ژن نشد (Navabpour et al, 2003). از این‌رو 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 کدکننده پروتئین متالوتایئنین، CL5 کدکننده پروتئین آنزیمی کاتالاز و CL6 کد کننده پروتئین گلتوتایون پروکسیداز از جمله ژن‌های آنتی‌اکسیدان 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 حالی‌که الگوی بیان همسانه CL6 تا اندازه‌ای متفاوت بود. این همسانه‌ها در مرحله برگ سبز گیاه بیان بسیار ضعیفی داشتند در حالی‌که تمام آنها در مرحله پیری برگ افزایش بیان بالایی نشان دادند. نتایج مشابهی توسط سایر پژوهشگران نیز گزارش شده است



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

انتقال آر.ان.اِ به غشای سلولزی 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.اِ 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.

(Buchanan-Wollaston et al, 2003; Hanfrey et al, 1996). در مورد بروکلی روند بیان هر سه همسانه الگوی بیان مشابهی را در شرایط مختلف تیماری طی روزهای پس از برداشت نشان دادند. همسانه CL4 (پروتیین متالوتاینین) نقش مهمی در سم‌زدایی اثرهای سو فلزات سنگین در محیط سلول دارد (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 گلوتاتیون 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 آرابیدوپسیس 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 گلوتاتیون صورت می‌گیرد. سازوکار آنزیمی از طریق احیا فسفولیپید هیدروژناز و کمپلکس هیدروپروکسی با هدف اختصاصی حفاظت غشا سلول در برابر نقش اکسیداتیو 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 به‌نظر 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 سینتتاز، مالات 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 پپتید گلوتامین ایفای نقش می‌کند (Kamachi et al, 1991). نتایج پژوهش کینگ و موریس (King and Moriss, 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 جوانه‌زنی کلزا نیز گزارش شده است (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 چرخه های تنفسی و واکنش های کاتابولیک با تغییرات آنزیمی عوامل سیگنالی تنظیم می‌شوند. این واقعیت که عوامل گوناگون داخلی (نمو- هورمون) و محیطی می‌توانند محرک آغاز مرحله پیری برگ باشند نشان می‌دهد که مسیرهای مختلف ژنتیک (Signaling 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 واسط تحت تاثیر برخی محرک‌ها 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 محرک (شوری) نشان نمی‌دهند.

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 Psendomonas syringae. Plant J 16(2) 209-221.
6. Chang PC, and Pareddy DR. 1994. Morphology and development of the tassel and ear. In: Tbe Maize Handbook Springer, New York, pp. 37-47.
7. Coghlan 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 feficiency 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 differention. 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. Progrommed 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 Valpuesta1 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 Bleecker 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 Thonas 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 Phsiol. 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 senescenceehanced 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, Schlagnhaufer CD, and Arteca RN. 1997. Ozone-induced oxidative stress: Mechanisms of action and reaction. Physiolgia 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.