سیده مریم افتخاری[*1]، مسعود توحیدفر[2]، امیرمحمد ناجی[1]،علاءالدین کردنائیج[1]،جابر کریمی[1]

[1] گروه بیوتکنولوژی و اصلاح نباتات دانشگاه شاهد

[2] پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران

m.eftekhari67@yahoo.com

یونجه یکی از گیاهان علوفه‌ای مهم است. سرخرطومی برگ یونجه هرساله خسارت شدیدی به مزارع یونجه وارد می‌کند. برای جلوگیری از خسارت این آفت و کاهش مصرف سموم، گیاه یونجه تراریخته حاوی ژن cry3A که از باکتری (Bacillus.turengensis.var.tenebrionis) جدا گشته، تولید شد و آنالیزهای مولکولی حضور ژن را در این گیاه تایید کرد. یکی از نگرانی های موجود در رابطه با تولید گیاهان تراریخته وجود جهش‌ها و انحرافات کروموزومی و تغییرات سوماکلونالی در کشت بافت و باززایی این گیاهان می‌باشد. هدف از این تحقیق بررسی یکنواختی ژنتیکی یونجه‌های تراریخته بیان کننده ژن cry3A در مقایسه با یونجه‌ی بومی غیرتراریخته و تعیین میزان شباهت ژنتیکی یونجه تراریخته با گیاه شاهد با استفاده از نشانگر مولکولی RAPD است. بدین منظور ابتدا DNA ژنومی از هر دو گیاه تراریخته و شاهد با روش CTAB استخراج شد و سپس با ۹ پرایمر تصادفی RAPD تکثیر شد و مورد ارزیابی قرارگرفت، ارزیابی‌ها شباهت ۹۵ تا ۱۰۰ درصدی گیاه تراریخته را نسبت به شاهد نشان داد و عدم وجود جهش و هرگونه تغییر ژنتیکی در گیاهان تراریخته تایید شد..

پایداری ژنتیکی، یونجه تراریخته، RAPD

بررسی الگوی بیان اندونوکلئاز CEL I در گیاه کرفس

میترا صفاریان طوسی ، احمد رضا بهرامی ، جعفر ذوالعلی ، مریم مقدم متین

کارشناسی ارشد فیزیولوژی گیاهی ، دانشکده علوم ، دانشگاه فردوسی مشهد

دانشیار گروه زیست شناسی ، دانشکده علوم ، دانشگاه فردوسی مشهد

استادیار گروه بیوتکنولوژی کشاورزی ، دانشگاه شهید باهنر کرمان

دانشیار گروه زیست شناسی ، دانشکده علوم ، دانشگاه فردوسی مشهد

MITRA_SAFARIAN@YAHOO.COM

اندونوکلئاز CEL I از خانواده نوکلئازهای S I ، اولین بار در گیاه کرفس شناسایی شد. این آنزیم دارای عملکرد اختصاصی برای برش لوپ های هترودوپلکس حامل موتاسیون نقطه ای در DNA می باشد. علیرغم کاربرد ارزشمند این آنزیم در مطالعات کشف موتاسیون ها ، دانش اندکی راجع به نقش آن در سطح سلول وجود دارد. هدف از این مطالعه بررسی الگوی بیان این آنزیم در گیاه کرفس می باشد. به منظور بررسی الگوی بیان این آنزیم در سطح پروتئین از تکنیک وسترن بلات استفاده شد. نتایج نشان دادند که آنزیم CEL I در واریته های مختلف گیاه کرفس به میزان یکسان بیان می شود. همچنین میزان بیان این آنزیم در اندامهای رویشی و زایشی گیاه کرفس مقایسه شد. میزان بیان CEL I در برگ بیشتر از گل آذین بود. به منظور بررسی ارتباط احتمالی آنزیم CEL I با مکانیسم ترمیمی DNA موتاسیون زایی با استفاده از اتیل متان سولفونات انجام گرفت. رشد غیر طبیعی همراه با لکه های نکروزه گسترده در گیاهان تیمار شده مشاهده شد. همچنین یک افزایش قابل توجه در سطح پروتئین CEL I در اندامهای رویشی و زایشی گیاهان تیمار شده با EMS اتفاق افتاد. با توجه به مکانیسم جهش زایی EMS انتظار می رفت که این افزایش بیان تنها در مرحله زایشی باشد. به نظر میرسد افزایش بیان CEL I در گیاهان تیمار شده به دلیل دخالت این آنزیم در پاسخ به تنش و مرگ سلولی القاء شده با EMS می باشد.

اندونوکلئاز CELI ، وسترن بلات، گیاه کرفس، اتیل متان سولفونات

بررسی میزان بیان ژن *FRY1* و فعالیت چرخه بیوسنتز اتیلن در گیاهان موتانت *old101*

سیده حمیده طاهری[۱]، رضا شیرزادیان خرم آباد[۲]، علی اعلمی[۲]، حبیب الله سمیع زاده[۳]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان

۲- استادیار گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان

۳- دانشیار گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان

Hamide.taheri2@gmail.com

اتیلن از جمله هورمونهای گیاهی است که نقش مهمی در القای فرایند پیری در گیاهان دارد. فعالیت چرخه بیوسنتز اتیلن در گیاه آرابیدوپسیس با استفاده از واکنش Triple Response بررسی میشود. در این روش بذور آرابیدوپسیس در محیط کشت MS حاوی ACC (پیش ساز اتیلن) کشت و برای مدت ۵ روز در تاریکی مطلق نگهداری میشوند. سپس طول ریشه چه و هیپوکوتیل در ژنوتیپهای مورد بررسی مقایسه میشوند. در این تحقیق طول ریشه چه گیاهچه های مادری Ler-0 با ژنوتیپ موتانت old101 مقایسه شدند. نتایج آنالیز داده ها با استفاده از نرم افزار SAS و طرح آماری مناسب نشان میدهد که روند کاهش طول ریشه‌چه با افزایش غلظت ACC، در دو ژنوتیپ اختلاف معنی داری ندارد. بنابراین ژنوتیپ موتانت مانند ژنوتیپ مادری از مسیر بیوسنتز نرمالی برخوردار است. لذا موتاسیون old101 موجب تغییر فعالیت مسیر بیوسنتزی اتیلن نشده است. از آنجائیکه گیاهچه های old101 حاوی یک موتاسیون نقطه ای در ژن FRY1 هستند، لذا میزان بیان نسبی ژن FRY1 در ژنوتیپهای Ler-0 و old101 تحت تیمار اتیلن در گیاهان۲۱ و ۳۸ روزه مورد بررسی قرار گرفت. میزان نسبی بیان ژن FRY1 در گیاهان ۲۱ روزه مادری و موتانت تفاوت معنی داری را نشان نداد. بیان این ژن در گیاهان ۳۸ روزه مادری در شرایط نرمال، افزایشی بمیزان ۴ برابر و تحت تیمار اتیلن، افزایشی بمیزان ۲/۵ برابر را در مقایسه با گیاهان موتانت نشان میدهد. این بدان معنی است که میزان بیان ژن *FRY1* با افزایش سن گیاهان افزایش می یابد. چون میزان بیان این ژن در گیاهان موتانت کمتر است لذا گیاهان موتانت از نظر مولکولی جوانتر هستند.

اتیلن، آرابیدوپسیس، *FRY1*، Triple Response

ردیابی مولکولی ویروس لکه حلقوی گوجه فرنگی در گیاه Albizia julibrissin

رضا پوررحیم، شیرین فرزادفر

استادیار پژوهش، بخش تحقیقات ویروس شناسی گیاهی، موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور، تهران.

استادیار پژوهش، بخش تحقیقات ویروس شناسی گیاهی، موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور، تهران.

pourrahim@yahoo.com

ویروس لکه حلقوی گوجه فرنگی (Tomato ring spot virus-ToRSV) از جمله ویروسهای مهم بیمارگر در گیاهان می باشد. گیاهان غیرزراعی میتوانند بعنوان منابع نگهداری آلودگی در حفظ و توسعه آلودگیهای ویروسی نقش مهمی ایفا نمایند. گیاه **Albizia julibrissin (درخت گل ابریشم) از جمله درختان غیرمثمره (خانواده Fabaceae) بوده و در مناطق شمال کشور رویش دارد. در بهار ۱۳۹۰ تعداد ۷ نمونه برگی از این گیاه با علائم سبزردی و پیسک جمع آوری و احتمال آلودگی آنها با ویروسهای موزائیک یونجه، موزائیک خیار، موزائیک آرابیس، پژمردگی لکه ای گوجه فرنگی، لکه حلقوی توتون و لکه حلقوی گوجه فرنگی با استفاده از آنتی بادیهای اختصاصی و به روش آزمون DAS-ELISA مورد**

بررسی الگوی بیان اندونوکلئاز CEL I در گیاه کرفس

میترا صفاریان طوسی* [1]، احمد رضا بهرامی، جعفر ذوالعلی، مریم مقدم متین

کارشناسی ارشد فیزیولوژی گیاهی،دانشکده علوم،دانشگاه فردوسی مشهد
دانشیار گروه زیست شناسی،دانشکده علوم،دانشگاه فردوسی مشهد
استادیار گروه بیوتکنولوژی کشاورزی دانشگاه باهنر کرمان
دانشیار گروه زیست شناسی دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد

MITRA_SAFARIAN@YAHOO.COM

اندونوکلئاز CEL I از خانواده نوکلئازهای S I ، اولین بار در گیاه کرفس شناسایی شد. این آنزیم دارای عملکرد اختصاصی برای برش لوپ های هترودوپلکس حامل موتاسیون نقطه ای در DNA می باشد. علیرغم کاربرد ارزشمند این آنزیم در مطالعات کشف موتاسیون ها ، دانش اندکی راجع به نقش آن در سطح سلول وجود دارد. هدف از این مطالعه بررسی الگوی بیان این آنزیم در گیاه کرفس می باشد. به منظور بررسی الگوی بیان این آنزیم در سطح پروتئین از تکنیک وسترن بلات استفاده شد. نتایج نشان دادند که آنزیم CEL I در واریته های مختلف گیاه کرفس به میزان یکسان بیان می شود. همچنین میزان بیان این آنزیم در اندامهای رویشی و زایشی گیاه کرفس مقایسه شد. میزان بیان CEL I در برگ بیشتر از گل آذین بود. به منظور بررسی ارتباط احتمالی آنزیم CEL I با مکانیسم ترمیمی DNA موتاسیون زایی با استفاده از اتیل متان سولفونات انجام گرفت. رشد غیر طبیعی همراه با لکه های نکروزه گسترده در گیاهان تیمار شده مشاهده شد. همچنین یک افزایش قابل توجه در سطح پروتئین CEL I در اندامهای رویشی و زایشی گیاهان تیمار شده با EMS اتفاق افتاد. با توجه به مکانیسم جهش زایی EMS انتظار می رفت که این افزایش بیان تنها در مرحله زایشی باشد. به نظر میرسد افزایش بیان CEL I در گیاهان تیمار شده به دلیل دخالت این آنزیم در پاسخ به تنش و مرگ سلولی القاء شده با EMS می باشد.

واژگان کلیدی اندونوکلئاز CELI ، وسترن بلات، گیاه کرفس، اتیل متان سولفونات

مقدمه

آنزیم CEL I از خانواده S1 یک اندونوکلئاز با وزن مولکولی 43 کیلو دالتن می باشد که اولین بار توسط اولیکفسکی و همکاران در سال 1998 در گیاه کرفس شناسایی شد.آنها آنزیم CEL I را به عنوان ابزاری حساس، قوی و ارزان جهت آشکارسازی جهش های تک نوکلئوتیدی در مولکول DNA معرفی کردند.آنزیم CEL I قادر است انتهای ´3 لوپ تشکیل شده در مناطق هترودوپلکس قطعات DNA را برش دهد. اگرچه این آنزیم در محدوده pH 5-9/5 فعال می باشد اما در pH خنثی بهترین فعالیت را دارد که این ویژگی آن را از سایر اندونوکلئازهای مشابه نظیر S1 و P1 متمایز می سازد(10 و 7). آنزیم مذکور یک گلیکو پروتئین با گروه گلیکوزیدی مانوزیل است که برای فعالیتش نیاز به Zn^{+2} و Mg^{+2} دارد(13). علی رغم کاربرد ارزشمند این آنزیم در کشف جهش های نقطه ای، عملکرد این آنزیم در سطح سلول ناشناخته می باشد.

تحقیق اخیر به منظور بررسی الگوی بیان این آنزیم و ایجاد دیدگاه هایی راجع به نقش آن در گیاهان انجام گرفته است. همچنین بیان این آنزیم در پاسخ به ماده موتاژن اتیل متان سولفونات (EMS) در گیاهان کرفس تیمار شده بررسی شد. EMS یکی از عوامل آلکیله کننده DNA می باشد که با آلکیله کردن گوانین منجر به جهش انتقالی G/C به A/T می گردد(3).

مواد و روش‌ها

گیاهان کرفس واریته های Golden Self Blanching (GSB)، Lathom Self Blanch (LSB)، Celebrity و یک نمونه از کرفس ایرانی در شرایط گلخانه کشت و نگهداری شدند.در سن 6ماهگی از اندامهای رویشی واریته های مختلف کرفس و در سن یکسالگی از اندامهای رویشی و زایشی آنها نمونه برداری شد. تعدادی از گیاهان کرفس در مراحل اولیه گلدهی با EMS تیمار شدند. پریموردیم اولیه گل با پنبه آغشته به محلول EMS 50 میلی مولار به مدت 12 ساعت پوشانیده شد و پس از زمان مذکور و برداشتن پنبه شستشو با آب جاری انجام گرفت.

استخراج و تعیین غلظت پروتئین: بافت تازه گیاهی در ازت مایع پودر گردید و سپس با بافر استخراج (100 میلی مولار Tris-HCl pH 8، 0/5 مولار EDTA pH 8، 125 میکرولیتر مرکاپتواتانول و 2٪ PMSF) هموژنیزه شد. سانتریفیوژ با دور 11000 rpm به مدت 20 دقیقه در دمای 4ċ انجام گرفت.غلظت پروتئین هر نمونه با استفاده از روش برادفورد تعیین شد(2). نمونه های پروتئینی با حجم مساوی از بافر نمونه (0/5 مولار Tris-HCl pH 6/8 ، 10٪ SDS ، 20٪ گلیسرول ،5٪ مرکاپتواتانول ، 2 0/0٪ بروموفنل بلو) مخلوط و به مدت 3 دقیقه جوشانده شدند.

وسترن بلات: مقادیر مساوی از نمونه های پروتئین بر روی ژل پلی آکریل آمید الکتروفورز شدند و به غشاء PVDF منتقل گردیدند. عمل انتقال به مدت 3 ساعت با ولتاژ100 در یخچال انجام شد. سپس مراحل زیر بروی غشاء انجام گرفت: بلوکه سازی در BSA 3٪ ، شستشو با محلول TBS-Tween، انکوبه سازی در آنتی بادی اولیه (anti CELI) با غلظت 1/500، شستشو مانند مرحله قبل، انکوبه سازی در آنتی بادی ثانویه (horseradish peroxidase conjugated) با غلظت

1/5000، شستشو ،پوشانیدن غشا با محلول ECL (Enhanced Chemiluminescent) به مدت 1 دقیقه و قرار دادن فیلم حساس به اشعه X بر روی غشا در تاریکی به مدت 10-5 دقیقه، آشکار سازی با استفاده از محلول های ثبوت و ظهور ،رنگ آمیزی غشاء با محلول Ponceau S به منظور کنترل یکسان بودن غلظت پروتئین لود شده

نتایج و بحث

1 2 3 4 5 6 7

شکل 1: بیان آنزیم CEL I در واریته های مختلف کرفس

1. LSB 2. LSB 3. LSB 4. Celebrity 5. Celebrity 6. GSB 7. جعفری(کنترل منفی)

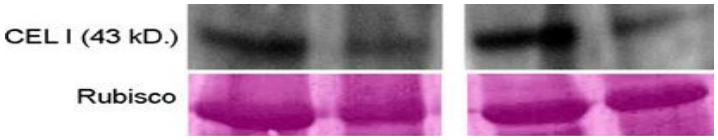
میزان بیان CEL I در واریته های مختلف کرفس مشابه می باشد و تفاوت چشمگیری نشان نمی دهد.

شکل 2: مقایسه بیان آنزیم CEL I در اندامهای رویشی و زایشی گیاه کرفس .

1.برگ 2. گل آذین بسته 3.برگ 4.برگ 5.گل آذین بسته 6.گل آذین باز

آنزیم CELI در اندامهای رویشی و زایشی بیان می شود ولیکن میزان بیان این آنزیم در اندامهای زایشی کمتر از اندامهای رویشی می باشد.

1 2 3 4

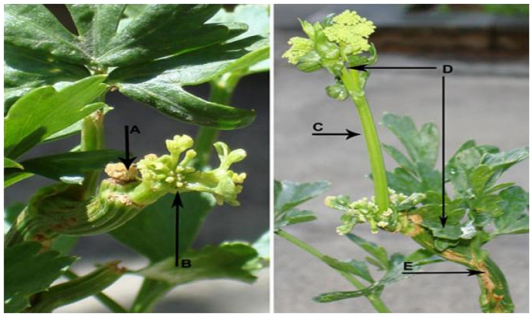


شکل3. مقایسه بیان آنزیم CEL I در گیاهان تیمار شده با EMS و کنترل.

1. گل آذین تیمار شده 2.گل آذین کنترل 3.برگ تیمار شده 4.برگ کنترل

ردیف پایین باندهای روبیسکو را به عنوان کنترل لودینگ نشان می دهد. رنگ آمیزی شده باPonceau S

میزان بیان این آنزیم در پاسخ به EMS در برگ و گل آذین تیمار شده نسبت به برگ و گل آذین کنترل افزایش یافته است.



شکل4.فنوتیپ ایجاد شده پس از تیمار با EMS.

A نکروزه شدن جوانه اولیه

B رویش و رشد جوانه جدید در کنار جوانه اولیه

C نازک شدن ساقه گل آذین

D رشد غیر طبیعی ساقه گل آذین

E ایجاد لکه های نکروزه در اثر تیمار با EMS

افزایش بیان CEL I در پاسخ به EMS از دو دیدگاه قابل بحث می باشد: 1- چنانچه عملکرد CEL I بخشی از مکانیسم ترمیمی DNA در گیاهان باشد بنا به فعالیت شناخته شده این آنزیم در برش لوپ های هترودوپلکس DNA باید این افزایش تنها در مرحله زایشی صورت گیرد ولیکن نتایج نشان داد که افزایش بیان در هر دو مرحله اتفاق می افتد بنابراین با قاطعیت نمی توان این افزایش را به مکانیسم ترمیمی DNA نسبت داد.2- ماده شیمیایی EMS علاوه بر جهش زایی موجب ایجاد تنش اکسیداتیو ، تولید گونه های فعال اکسیژن و القای مرگ سلولی نکروتیک می گردد (14و11). افزایش گونه های فعال اکسیژن یک پدیده کلیدی در مرگ سلولی محسوب می شود که در بسیاری از تنش های زیستی و غیر زیستی اتفاق می افتد(12 و6). فرآیند مرگ سلولی در گیاهان با فعالیت اندونوکلئازهای متعدد همراه می باشد که با عملکرد لاشخواری اسیدهای نوکلئیک به بازیافت اجزای آن در سلول کمک می کنند(5). همانطور که ذکر شد تیمار با EMS موجب نکروزه شدن و پژمردگی جوانه اولیه شد که به دلیل نقش EMS در ایجاد تنش اکسیداتیو و القای مرگ سلولی می باشد. به نظر میرسد افزایش بیان CEL I در تیمار با EMS به دلیل دخالت این آنزیم در فرآیند مرگ سلولی و مراحل اولیه تجزیه اسیدهای نوکلئیک در سلولهای در حال مرگ باشد. از طرفی ژن های کدکننده اورتولوگهای CEL I که تشابه زیادی با آن دارند از جمله ژن BFN1 در آرابیدوپسیس، ژن ZEN1 در گل آهار و DSA6 در سوسن در زمان مرگ برنامه ریزی شده سلولی القا می گردند(9و8و4و1) که احتمال دخالت CEL I در فرآیند مرگ سلولی را تقویت می کند.

تقدیر

با تشکر از پروفوسور Hornby اهداکننده آنتی بادی اولیه و پژوهشکده زیست فناوری دانشگاه فردوسی مشهد

منابع

1. Aoyagi, S., Sugiyama, M., Fukuda, H., 1998. BFN 1 and ZEN 1 cDNAs encoding S1-type DNases that are associated with programmed cell death in plants. FEBS Lett 429:134–138
2. Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram of protein dye binding, Analytical Biochemistry, 72: 248-254.
3. Greene, EA., Codomo, CA., Taylor, NA., et al, 2003. Spectrum of chemically induced mutations from a large scale reverse genetic screen in Arabidopsis. Genetics 164:731–740
4. Ito, J., Fukuda, H., 2002. ZEN 1 is a key enzyme in the degradation of nuclear DNA during programmed cell death of tracheary elements. Plant Cell 14:3201–3211
5. Krishnamurthy, K.V., Krishnaraj, R., Chozhavendan, R. and Christopher, F.S., 2000. The programme of cell death in plants and animals-a comparison, Current Science, 79 (9).
6. Lakimova, E.T., Michalczuk, L. and Woltering, E.J., 2005. Hypersensitive cell death in plants-It's mechanisms and role in plant defence against pathogens, Fruit and Ornamental Plant Research, 13: 135-158.
7. Oleykowski, C.A., Mullins, C.R.B., Godwin, A.K. and Yeung, A.T., 1998. Mutation detection using a novel plant endonuclease, Nucleic Acid Research, 26: 4597-4602.
8. Panavas, T., Pikula, A., Reid, P.D., Rubinstein, B., Walker, E.L., 1999. Identification of senescence associated genes from daylily petals. Plant Mol Biol 40:237–248
9. Perez-Amador, M.A., Abler, M.L., De Rocher, E.J., Thompson, D.M., et al., 2000. Identification of BFN 1, a bifunctional nuclease induced during leaf and stem senescence in Arabidopsis. Plant Physiol 122:169–179
10. Till, B.J., Burtner, C., Comai, L. and Henikoff, S., 2004. Mismatch cleavage by single strand specific nucleases, Nucleic Acid Research, 32 (8).
11. Tirmenstein, M.A., Nicholls-Grzemski, F.A., Zhang, J.G. and Fariss, M.W., 2000. Glutathione depletion and the production of reactive oxygen species in isolated hepatocyte suspentions, Chemico-Biological Interactins, 127: 201-217.
12. Yamada, M.K., Yoshinaga, K., Ogawa, T., Ohori, Y., 2005. Oxidative stress and plant cell death suppressors, Plant Biology, 22: 419-422.
13. Yang, B., Wen, X., Kodali, N.S., Oleykowski, C.A., Miller, C.G., Kulinski, J., Besack, D. and Yeung, A.T., 2000. Purification, Cloning and characterization of CELI nuclease, Biochemistry, 39: 3533-3541.
14. Zhang, J.G., Nicholls-Grzemski, F.A., Tirmenstein, M.A.et al., 2001. Vitamin E succinate protects hepatocytes against the toxic effect of reactive oxygen species generated at mitochondrial complexes I and II by alkylating agents, Chemico Biological Interactions, 138: 267-284.