



ارائه شده توسط:

سایت ترجمه فا

مرجع جدیدترین مقالات ترجمه شده

از نشریات معتبر

جهش متفاوت در ساختمان گیاه کوشاد گل سفید

چکیده

ژاپنی ها گیاهان gentian را که به طور طبیعی گل های آبی دارند کشت می دهند اما تعدادی گیاه گل سفید از طریق جهش های خود به خودی در میان آن ها پراکنده شد. برای تعیین مبنای مولکولی رنگ پذیری سفید در گل های gentian ، ما 2 گیاه گل سفید polano , Homoi را با یک گیاه گل آبی maciry با استفاده از مسیرهای بیوشیمیایی و مولکولی مقایسه کرده ایم. اجرای کروماتوگرافی مایع (HPLC) در جهت تجزیه و تحلیل داده ها نشان می دهد که سطح فلاون در polano سفید تنها حدود نیمی از میزان اندازه گیری شده در 2 گونه ی دیگر بود در حالی که آنتوسیانین در دو گونه گل سفید در مقایسه با maciry که میزان بالایی جمع کرده اند وجود ندارد. تجزیه و تحلیل northern ژن های ساختاری بیوسنتز فلاونوئید قبلا به طور موقتی گزارش شده است که در maciry تنظیم شده است نشان می دهد که Homoi فاقد رونوشت های ژن سنتز آنتوسیانین است در حالی polano سفید برای بیان ANS به اندازه کالکون سنتز (CHS) ، فلاوانون 3 هیدروکسیلاز (F3H) ، فلاونوئید 3 و 5

هیدروکسیلاز (F,3,5,H) ، دی هیدروفلانول 4 ردوکتاز (DFR) ، UDP گلوکز فلاونوئید 3 گلوکوزیل ترانسفراز (3 GT) و آنتوسیانین 5- آروماتیک آسیل ترانسفراز (5 AT) کاهش یافته است .

تجزیه و تحلیل ساترن بلاست کمبود یکی از دو لوکوس ANS در Homoi را تأیید می کند. بیان زودگذر ANS در گلبرگ های گل به طور قوی پیشنهاد می کند که گل های سفید در Homoi از جهش ANS ناشی می شود. علاوه بر این تجزیه و تحلیل تنش تحریک کننده رنگیزه سازی در گل پیشنهاد می کند که بیشتر از جهش ها در ژن های ساختاری چندتایی عامل بوده است یک نقص در یک عامل تنظیمی یا بیشتر مراحل بعدی بیوسنتز فلاونوئیدهای مسئول رنگ سفید در polano سفید را کنترل می کند.

مقدمه

یکی از اهداف مهم پرورش گل های زینتی به دست آوردن محدوده ی وسیعی از رنگ های گل است. رنگ بندی گل نتیجه تجمع متابولیت های ثانویه است مثل فلاونوئید، کاروتنوئید و ترکیبات تبالاین. از اینها، رنگیزه های فلاونوئید که گستره ی وسیعی در گیاهان عالی دارند به طور وسیعی مطالعه شده اند. فلاونوئیدها یک گروه متنوع از ترکیبات فنولیک شامل 2 حلقه آروماتیک متصل شده توسط یک واحد C3 هستند. علاوه بر نقش آن ها در رنگیزه سازی گل آن ها همچنین در جذب گرده افشان ها نقش دارند بر هم کنش های گیاه و میکروارگانیسم از اشعه UV مضر حفاظت می کند و رشد لوله ی گرده و

رنگیزه سازی بافت. بیوشیمی، ژنتیک و زیست مولکولی فلاونوئیدها به خصوص راجع به رنگیزه آنتوسیانین در ذرت، kernel گل های snapdragon , petunia و دانه ها و برگ های آرابیدوپسیس تالیانا نشان داده شده است. جهش هایی که رنگ گل را تغییر می دهند قبلا انتخاب شده اند و توسط پرورش دهندگان گل برای پرورش انواع جدید استفاده می شوند. جهش یافته های طبیعی اول از منابع ژنتیکی وحشی انتخاب شدند اما امروزه جهش های مهاجم به طور متداول در میان راهکارهای مصنوعی وجود دارند مثل تابش اشعه و جهش زهای شیمیایی. جهش یافته های رنگ گل همچنین برای تشخیص ساختار انزیمی (ژن ها) و فاکتورهای تنظیمی مربوط به بیوسنتز فلاونوئید و برای جداسازی عناصر قابل جابه جایی استفاده می شوند. به علاوه این یافته ها به طور مستقیم برای اصلاح رنگ گل توسط تکنولوژی انتقال ژنتیکی استفاده می شود .

تنوع در رنگ گل به طور کلی نتیجه تفاوت ها هم در ژن های ساختاری و هم در ژن های تنظیمی درگیر در مسیر بیوسنتز فلاونوئید است. در اکثر موارد تغییرات قابل رؤیت به علت تفاوت ها در میزان و اجزای رنگیزه های گل است. برای مثال جهش هایی که مراحل اولیه بیوسنتز فلاونوئید را مسدود می کنند در ساختار گل های سفید از طریق تجمع رنگیزه های بدون رنگ نتیجه می دهد در حالی که مسدود کردن در مراحل پایانی باعث ساختار متفاوت گل های رنگی از طریق تجمع آنتوسیانین های خاص می شود. علاوه بر این فنوتیپ های گل های سفید تنوع رنگی از سفید خالص تا عاج فیلی را بسته

به اینکه چه مرحله ای از بیوسنتز فلاونوئید مسدود شده است را نشان می دهند. برای مثال در *Eustoma*, *Dianthus*, *pharbitis*, *A.majus* گل های عاج فیلی با تجمع فلاونوئیدهای بی رنگ در گلبرگ هایشان در نتیجه جهش در ژن های کد کننده ی فلاونون 3 هیدروکسیلاز (F3H) ، دی هیدروفلانول 4 ردوکتاز (DFR) یا آنتوسیانین سنتاز (ANS) در طول مراحل انتهایی بیوسنتز فلاونوئید شناسایی شده اند. از طرف دیگر گل های سفید خالص با تجمع ارگانیک اسیدها اما نه ترکیبات فلاونوئیدی شناخته شده اند که به عنوان نتیجه یک جهش *niv* در *A.majus* و جهش *f* در *matthiola* و هر دو کالکون سنتاز را تحت تأثیر قرار دادند. جهش یافته های متنوعی از فاکتورهای تنظیمی بیوسنتز فلاونوئید باعث فنوتیپ های گل سفید شدند برای مثال جهش یافته های *an2*, *an1* در *p.hybrida* و جهش یافته *g* در *m.incana* در مورد *A.majus* کنترل ترکیبی توسط 3 آلل، *rosea*, *eluta*, *delida* شناخته شده است که در تنظیم فضایی رنگیزه سازی گل درگیر است. ژاپنی ها *gentian* کشت می دهند مثل *G.scabra*, *G.triflora* و هیبریدهایشان که گل های زینتی شناخته شده ای در ژاپن هستند گل ها را می برند و در گلدان می کارند. اگرچه به طور عمده به علت منابع طبیعی محدود تنوع رنگی آنها یک محدوده ی کمی از رنگ سازی گل دارند (آبی اصلی، آبی کم رنگ، صورتی و سفید). هیچ جهش مصنوعی به جز برای فنوتیپ کوتولوگی به نام *Agrobacterium gentian* بیان نمی شود. چندین گزارش ژن های ساختاری بیوسنتز فلاونوئید

را مشخص کرده است که این ژن ها از gentian های گل آبی به واسطه انجام آنالیز رنگیزه جدا شده اند. اخیرا ما 4 ژن ساختاری جدا کرده ایم ANS, F3H فلاونوئید 3 هیدروکسی لاز و فلاون سنتاز و یک ارتباط قوی بین الگوهای بیان شان و تجمع رنگیزه در پرورش دهندگان گل آبی گزارش شده است. (میکروارگانیسم خاکی)

در این مطالعه ما به بررسی علت رنگ سازی گل سفید در گیاهان gentian کمک کردیم و دو جهش متفاوت در دو میکروارگانیسم خاکی رنگ سفید مربوطه آشکار شده اند. یکی یک جهش ژنی ساختاری (ANS) و دیگری یک جهش عامل تنظیمی کنترل کننده بیان ژن های کاتالیز کننده در طول گام های آخر بیوسنتز فلاونوئید بود. به عنوان بهترین اطلاعات ما در این خصوص اولین گزارش مکتوب تجزیه و تحلیل مولکولی جهش های رنگ گل در گیاهان gentian است.

مواد و روش ها

مواد گیاهی

(Gentiana tri گل های آبی، (Homoi گل های سفید) و (G.triflora X G.polano گل های سفید) در زمین مرکز تحقیقاتی کشاورزی رشد کرده اند گلبرگ در دو مرحله ی متفاوت نمو گل (مرحله جوانه SI و دقیقا قبل از پرچم زایی (S3 همانطور که توسط Nakatsuka توضیح داده شده است و

نمونه های برگگی از همه میکروارگانسیم ها انتخاب شده اند و تا زمان استفاده در دمای 80- درجه سانتی گراد نگه داری شدند.

چکیده فلاونوئیدهای گلبرگ و تجزیه و تحلیل آن

نمونه های گلبرگی از هر وارپته gentian از طریق کروماتوگرافی مایع (HPLC) جدا شدند و بر روی فلاونوئیدهایش تجزیه و تحلیل انجام گرفت. برای تجزیه و تحلیل آنتوسیانین گلبرگ، برگ و نمونه های ساقه در نیتروژن مایع زمینه سازی شدند سپس با استفاده از 1 میلی لیتر محلول EAA در 4 درجه در طول شب تخلیص شده است. برای هیدرولیز آنتوسیانین 4/5 میلی لیتر اسید کلریدریک 3/2 نرمال به سوپرناتانت قبل از اینکوباسیون در 100 درجه برای 90 دقیقه اضافه می کنیم.

محلول هیدرولیز با 1 میلی لیتر ایزوآمیل الکل جدا شده است و از طریق یک فیلتر 0/22 میکرومتری فیلتر شده است. نمونه های فیلتر شده توسط HPLC با فاز ستونی معکوس با استفاده از 15 درصد استونیتریل و 3 درصد استات اسید به عنوان برای 20 دقیقه در 40 درجه در یک جریان سرعتی 1 میلی لیتر بر دقیقه تجزیه و تحلیل شدند. آنتوسیانیدین ها توسط مشاهده منطقه اوج جذب در 500 نانومتر با استفاده از ترکیبات استاندارد تعیین کیفیت شدند. برای بررسی رنگیزه بدون رنگ، فلاون و

فلاونول در گلبرگ ها استخراج شدند و به شرحی که قبلا گفته شد تشخیص داده شدند. فلاون و

فلاونول توسط مشاهده منطقه اوج جذب به ترتیب در 330 و 360 نانومتر شناسایی می شوند.

بررسی بیان ژن های ساختاری بیوسنتز فلاونوئید

RNAهای کلی از گلبرگ های همه 3 واریته gentian در دو مرحله ی متفاوت نمو گلی جدا شدند.

تجزیه نورسن بلات ژن های ساختاری بیوسنتز فلاونوئید با استفاده از سیستم DIG همانطور که توسط

Nakatsuka توصیف شده است انجام شد.

بررسی ساترن بلات ژن های ساختاری بیوسنتز فلاونوئید

همه DNA ژنومی از نمونه های برگ (10 گرم) با استفاده از روش CTAB همانطور که توسط

Murray و Thompson توصیف شده است جداسازی شدند. پس از هضم با ECORI یا HindIII

DNA ژنومی روی آگارز 6 درصد، ژل جدا شد سپس به اعضای N نیترا منتقل شد. بررسی ساترن

بلات اجرا شد. پراب ANS با یک کیت نشان دار DNA آغازگر DIG بان آماده شد که از قاب باز

خواندن در gentian CDNA استفاده می کرد. پراب ها برای همه ژن های ساختاری دیگر آماده شده

بود و برای بررسی نورسن بلات استفاده شد.

کاربرد و تعیین سکونس ژن DNS ژنومی gentian

همه ی DNA ژنومی استخراج شده همانطور که در بالا توضیح داده شد برای کاربرد ژن ANS ژنومی با استفاده از جفت های آغازگر بالا استفاده شد. آن ها سپس درون وکتور TA تکثیر شدند و تعیین سکونس شدند. بررسی های سکونس با استفاده از یک کیت تعیین سکونس چرخه ای پایان دهنده ی BigDye انجام شد.

ساخت یک پلاسمید نو ترکیب

پروتکل های مرسوم زیست شناسی مولکولی لزوما طبق موارد توصیفی توسط sambrook پیگیری می شوند ORF. در Maciry با آغازگرهای بالا استفاده شد سپس درون وکتور pcr2.1 تکثیر شد. قطعه GtANS توسط هضم با XhoI, BamHI از مکان تکثیر چندتایی وکتور حذف شدند. سپس منطقه حامل GtANS تحت کنترل پروموتور ویروس موزائیک تنباکو توسط جایگزینی ژن gus ساخته شد. وکتوری که شامل یک ژن اصلاح شده است به عنوان انتقال دهنده ی پلاسمید کنترل استفاده شد.

متمم گیری ANS از طریق انتقال بیان به گلبرگ های Homoi

برای بررسی میزان اثر ژن ANS در Homoi یک آزمایش متمم گیری توسط انتقال بیان با استفاده از انجام شد. گلبرگ های S3 از Homoi دو بار با آب استریل شسته شدند سپس در مرکز محیط کشت تکثیر جایگیری شدند برای 2 روز با استفاده از سیستم تحویل قطعات بیولیستیک اجرا شدند. 2 میکروارگانسیم های پلاسمید DNA روی 0/5 میلی گرم قطعات طلا طبق پروتوکل توصیفی per1

تیمار شدند. گلبرگ ها در یک فشار 7/5 میلی پاسکال از یک فاصله 10 سانتی متری دور از نگه دارنده شدند هر نمونه دو بار مشاهدات میکروسکوپی طی 3 روز پس تحت چراغ یا لامپ mercury انجام شدند.

نتایج

تجمع فلاونوئید در گل آبی و سفید واریته های gentian

3 واریته gentian در این مطالعه استفاده شده اند و در شکل 1 نشان داده شده اند (A). واریته گل آبی maciry است در حالی که (B) و (C) به ترتیب واریته های گل سفید Homoi , polano هستند هر دو دارای سفید هستند ولی نه سفید خالص maciry و polano تجمع آنتوسیانین در Stemها را نشان می دهند در حالی که Homoi هیچ رنگیزه ای را نشان نمی دهد.

برای مقایسه تجمع ترکیبات فلاونوئیدی در میان گلبرگ های واریته های آبی و سفید رنگیزه های فلاونوئید از گلبرگ های S4 استخراج شدند و تجزیه و بررسی HPLC را مورد مطالعه قرار دادند (جدول 1 و شکل 1). بررسی های انجام شده روی آنتوسیانین نشان می دهد که گل های آبی Maciry در گلبرگ هایشان دلفینیدین تجمع کرده است در حالی که واریته هایی گل سفید سطوح غیرقابل ردیابی از آنتوسیانین طبق رنگ های پیش بینی شده برای گل هایشان تجمع کرده اند. فلاون که به طور کلی به عنوان ذخیره در گلبرگ های gentian شناخته شده اند (همانطور که رنگیزه های بی رنگ) نیز

تجزیه و تحلیل شدند. در گلبرگ های Homoi و gentian اپی ژنین در یک میزان بالاتری از لوتئولین تجمع یافته اند و این فلاون به همان که در Maciry گل آبی هست شباهت دارد (شکل 1). از سوی دیگر کیفیت ترکیبات فلاون در گلبرگ های polano به اندازه حدود نیمی از گلبرگ های Maciry و Homoi کاهش یافته است. هیچ فلاونولی در گلبرگ های هر سه واریته پیدا نشد.

Cultivar	Flower color	Flavonoid concentration ($\mu\text{g/g}$ FW)		
		Anthocyanidin	Flavone	
		Delphinidin	Apigenin	Luteolin
Maciry	Blue	602.3	86.1	13.9
Homoi	Ivory white	ND ^b	74.2	27.3
Polano White	Ivory white ^a	ND	47.5	17.1

جدول 1. محتوی فلاونوئید در گلبرگها ی 3 واریته gentian تعیین شده توسط آنالیز HPLC

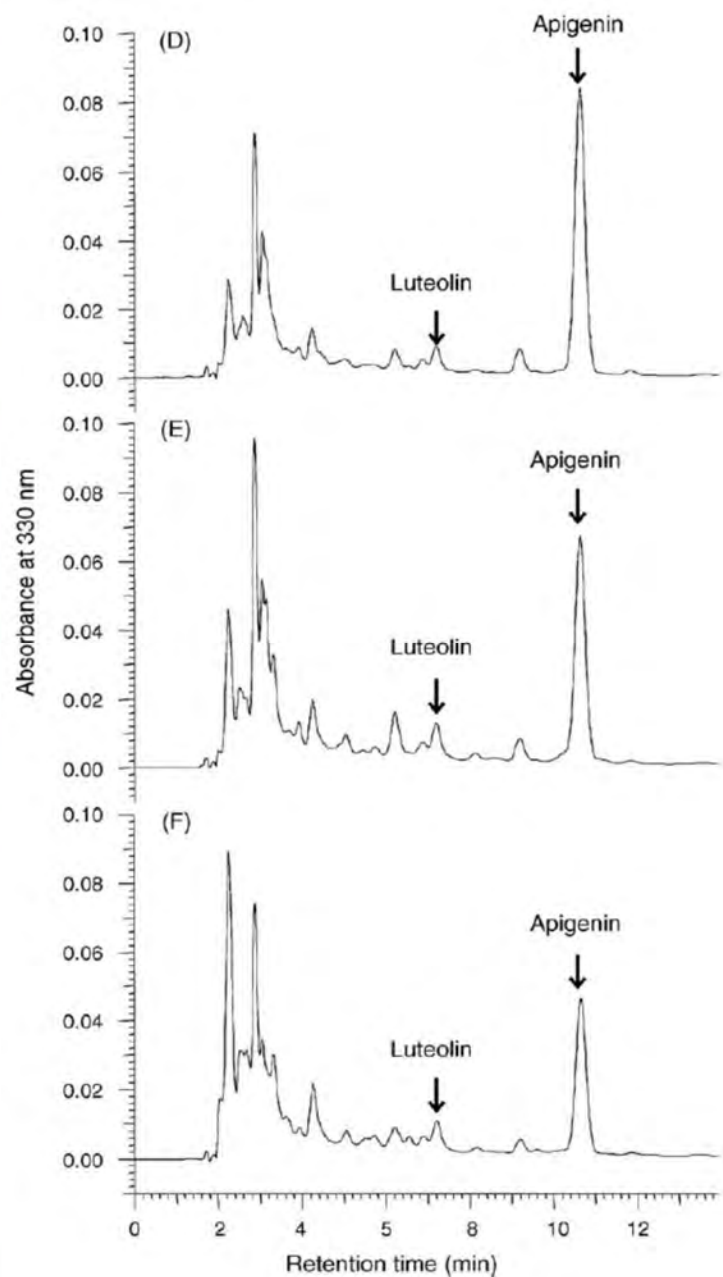
بررسی بیان ژن های ساختاری بیوسنتز فلاونوئید

سطوح بیان ژن های ساختاری بیوسنتز 10 فلاونوئید بین گلبرگ های واریته های گل سفید و آبی در دو سطح نمو گل مقایسه شدند (S3, S1)، (شکل 2) تجزیه و تحلیل نورسون بلات نشان می دهد که همه ژن های امتحان شده در گلبرگ های Maciry در سطح جوانه بدون رنگیزه (S1) و یا دقیقا قبل از شکفتن (S3) بیان شده اند. نمودارهای بیان این ژن ها در گلبرگ های Homoi شبه به همان ها در Maciry بود به جز برای ژن ANS. به علاوه بررسی واکنش زنجیره پلی مرز رونویسی معکوس (RT-

(PCR) با استفاده از چندین جفت آغازگر رونوشت های ANS را در Homoi افزایش نداده است. این

نتایج پیشنهاد می کند که رنگ پذیری سفید Homoi به دست آمده از توقف تأثیر ژن ANS است. از

سوی دیگر هیچ رونوشتی ضعیف در گلبرگ های polano در مقایسه با Maciry پیدا شده است.



شکل 1. فنوتیپ و فلاوون در وارپته های gentian گل سفید

ساختار ژنومی ژن ANS در Homoi و والدینش

چون ما نمی توانیم سکونس ژنومی ANS را در Homoi با استفاده از چندین جفت آغازگر طرح شده

در سکونس CDNA در ANS ، Maciry تقویت کنیم تنها سکونس ANS ژنومی Maciry پس از

افزایش ناحیه ANS ORF در PCR تشخیص داده شد نتایج نشان می دهد که ANS ژنومی

Maciry محتوی 2 اگزون و 1 اینترون 840 جفت بازی مکان یابی شده در 516 جفت باز دورتر از

محل آغاز ترجمه است. برای بدست آوردن بینشی عمیق از جهش های یافت شده در Homoi ساختار

ژن ANS در ژنوم gentian بیشتر توسط آنالیز ساترن بلات با استفاده CDNA در ANS در

Maciry به عنوان یک پراب آنالیز شده است. (شکل 3) از آنجایی که Homoi به عنوان یک هیبرید

F1 از والدین گل سفید بوجود آمده والدین همچنین در معرض تجزیه و تحلیل هستند تاناخیه جهش

مشخص شود. پراب نشان دار ANS در ORF در CDNA ، ANS از Maciry با استفاده از DNA

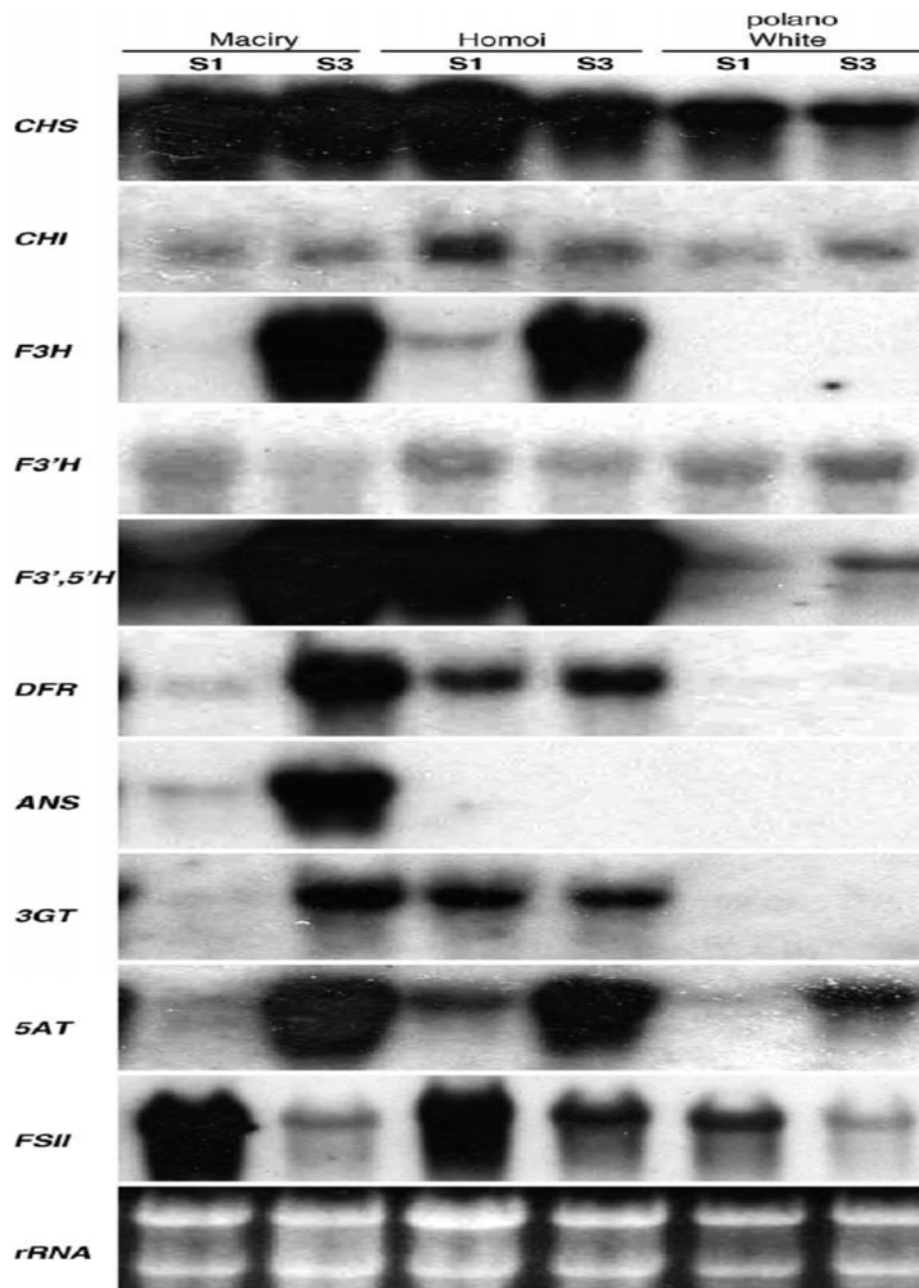
ژنومی از هر وارپته هضم شده توسط آنزیم های محدود کننده HindIII یا ECORI هیبرید شده اند.

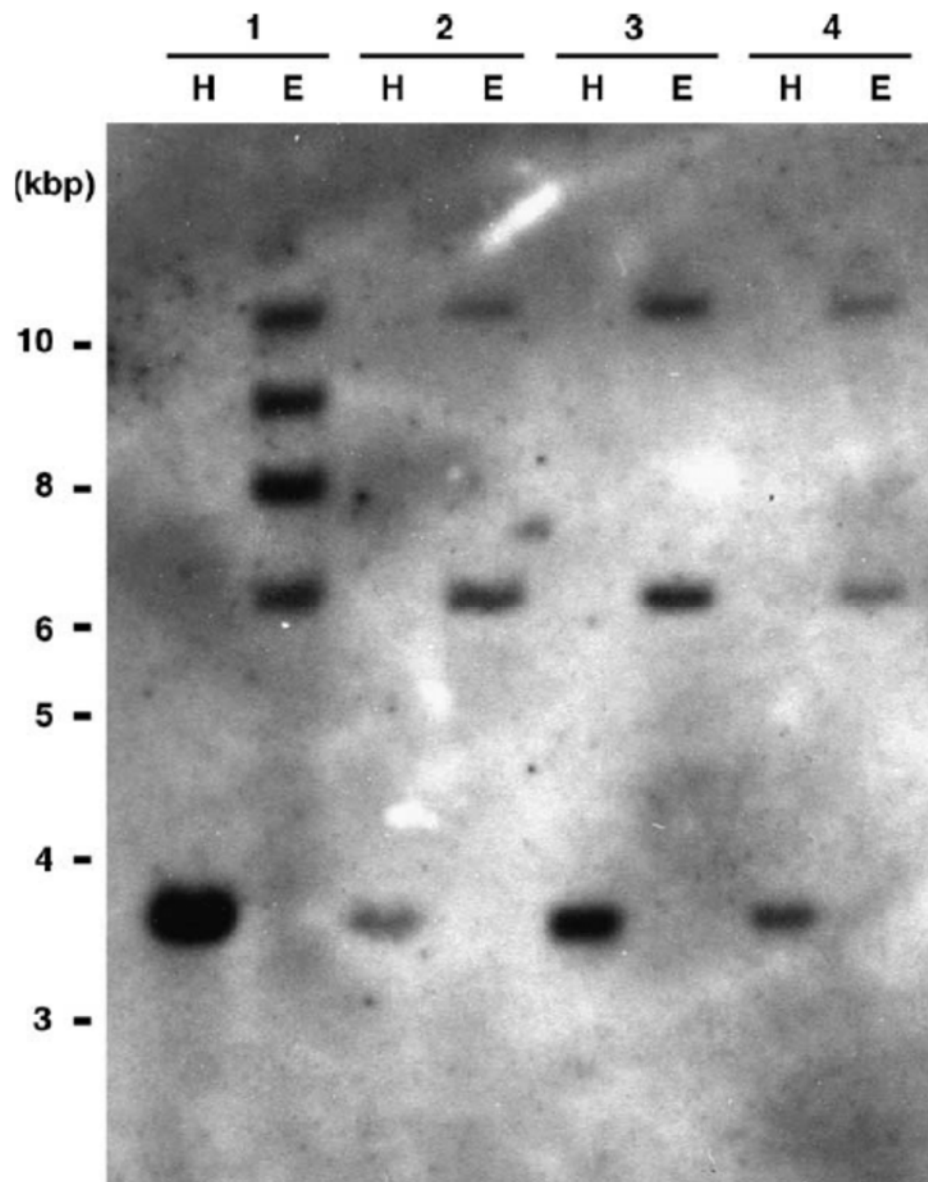
گل آبی Maciry یک قطعه HindIII منحصر به فرد و 4 قطعه ECORI را نشان می دهد که نشانگر

حضور 2 لوکوس در ژنوم است (شکل 3). از سوی دیگر 2 تا قطعات ECORI در Homoi گل سفید

حضور ندارد و قطعه Hind III تراکم سبگنال ضعیف تری در مقایسه با Maciry نشان می دهد.

والدین Homoi همچنین همان الگویی که توسط آنالیز ساترن بلات مشخص شد را نشان می دهد از آنجایی که سکونس ژنومی ANS محتوی یک اینترون در ECORI است (اما در HindIII ندارد) این نتایج پیشنهاد می کند که Homoi به طور کامل یکی از دو لوکس ANS حاضر در Maciry گل آبی را از دست داده است و این عیب را به عنوان یک جهش تهی در همان لوکس ANS مشتق شده از هر دو والد را به ارث برده است.





شکل 3. ژن سنتز آنتوسیانین آنالیز ساترن بلات

بهبود تجمع آنتوسیانین در گلبرگ های Homoi توسط بمباران ذره ایی

برای تعیین اینکه رنگ پذیری سفید گل های Homoi از غیبت رونوشت های ANS به دست آمده ما

یک امتحان متمم توسط بیان ANS ناپایدار با استفاده از بمباران ذره ای انجام داده ایم-P35s .

GTANS در Maciry, ANS CDNA توسط پروموتور camv35s تحریک شده است و-p35s

GtANS به عنوان یک کنترل دگرگونی داخلی به درون ذرات طلا پرتاب شدند و درون گلبرگ های

دور از محور Homoi در استقبال از شکوفتن بمباران شدند. پس از 72 ساعت اینکوباسیون نقاط قرمز به

آسانی در مقایسه با زمینه سفید در برخی سلول های اپیدرمی تحت مشاهده میکروسکوپ دو چشمی

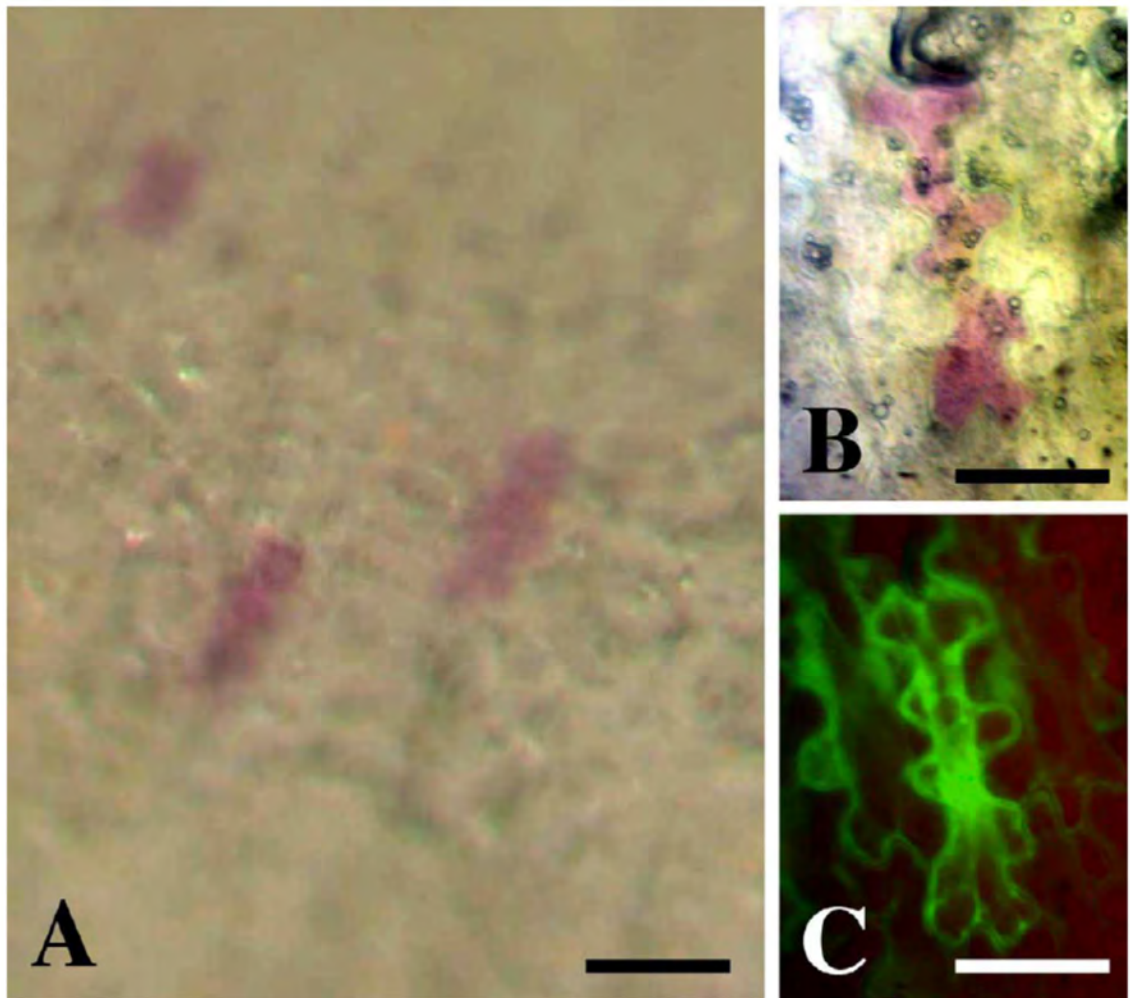
مشاهده شد. (شکل 4 A) بزرگ نمایی بسته تأیید می کند که نقاط قرمز منحصر به فرد از سلول های

تنها مشتق شده اند (شکل 4 B) که GFP فلورسنس را تحت میکروسکوپ UV نشان می دهد (شکل

4 C) نشانگر این است که ساختار آنتوسیانین در گلبرگ های Homoi می تواند توسط بیان انتقال

ANS کامل شود. وقتی با P35S-SGFP به تنهایی بمباران شود هیچ نقاط قرمز رنگی مشاهده نمی

شود. تنش تجمع آنتوسیانین را در گلبرگ های سفید polano تحریک می کند.



شکل 4.

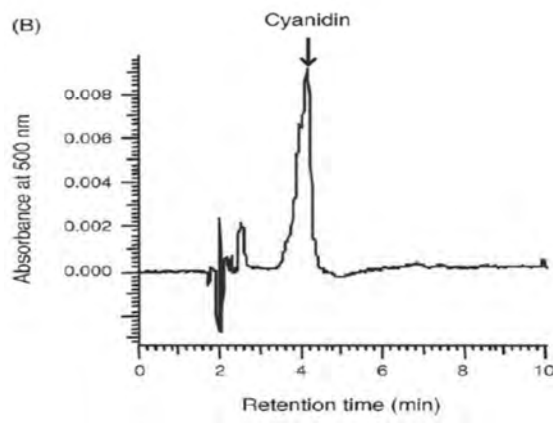
گلبرگ های سفید polano معمولاً سفیدعاجی هستند اما اغلب به قرمز می گرایند وقتی که در معرض محیط تنش زا مثل سرما و در طول پیری باشند (شکل A5). تنش سرما رنگیزه سازی تحریک می کند و اکثر وارپته های gentian رنگیزه سازی را در گلبرگ هایشان در برگ ها تحریک می کنند و در اواخر پاییز به جز Homoi گل سفید آنالیز HPLC, polano, سفید نشان می دهد که این رنگیزه سازی با

تولید آنتوسیانین در شکل تجمع مشتقات سیانیدین در گلبرگ ها (شکل B5) و برگ ها همراه است. کل RNA استخراج شده از بافت های گلبرگ رنگیزه دار و بدون رنگیزه در polano سفید در شکوفایی در آنالیز نورسرن بلات برای ژن های ساختاری بیوسنتز فلاونوئید به کار رفته است. (شکل C5) رونوشت های ANS به طور قابل توجهی پس از تحریک رنگیزه سازی در گلبرگ ها افزایش یافته است در حالی که بیان ژن ها AT5 کاهش یافته است. نتایج مشابهی توسط آنالیز RT-PCR با استفاده از RNA جدا شده از برگ های polano سفید رنگیزه دار و بدون رنگیزه مشاهده شده است.

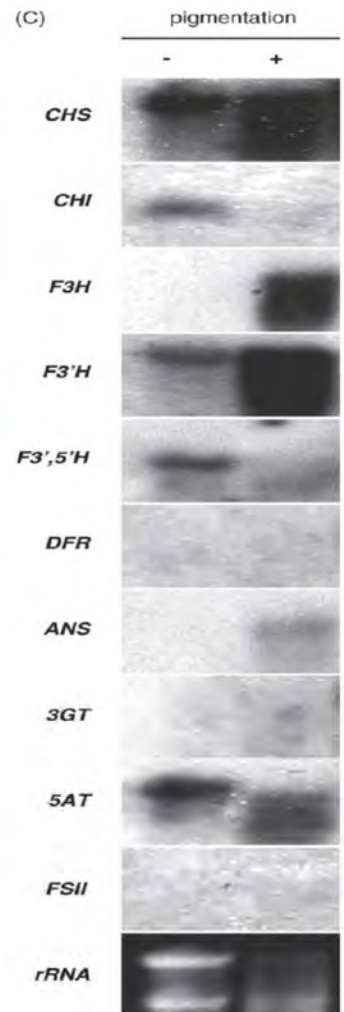
(A)



(B)



(C)



شکل 5. مقایسه رنگیزه های برگ های polano توسط آنالیز PCR



این مقاله، از سری مقالات ترجمه شده رایگان سایت ترجمه فا میباشد که با فرمت PDF در اختیار شما عزیزان قرار گرفته است. در صورت تمایل میتوانید با کلیک بر روی دکمه های زیر از سایر مقالات نیز استفاده نمایید:

لیست مقالات ترجمه شده ✓

لیست مقالات ترجمه شده رایگان ✓

لیست جدیدترین مقالات انگلیسی ISI ✓

سایت ترجمه فا ؛ مرجع جدیدترین مقالات ترجمه شده از نشریات معتبر خارجی