

بررسی الگوی بیان ژن کدکننده آنزیم *S-Like RNase* در مقابله با بیماری‌های قارچی در گندم نان

معصومه حبیبی^{۱*}، اسدالله آبیاری فینی^۲، ندا میرآخورلی^۳، محسن مردی^۴

۱، دانش‌آموخته کارشناسی ارشد اصلاح نباتات دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ۲، دانشجوی کارشناسی ارشد رشته بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ۳، استادیار گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ۴، دانشیار بخش ژنومیکس، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی، کرج.

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۰/۳ - تاریخ تصویب: ۹۲/۱۲/۱۵)

Study of Expression Pattern of *S-Like RNase* Gene to Several Fungal Diseases in Bread Wheat

M. HABIBI^{1*}, A. ABIAR FINI², N. MIRAKHORLI³, M. MARDI⁴

1, M.Sc. Graduated, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Shahrekord University, Shahrekord, Iran. 2, M.Sc. Student, Department of Agriculture Biotechnology, Faculty of Agriculture, Shahrekord University, Shahrekord, Iran. 3, Assistant Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Shahrekord University, Shahrekord, Iran. 4, Associate Professor, Department of Genomics, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Karaj, Iran.

(Received: Dec. 24, 2013- Accepted: Mar. 6, 2014)

Abstract

Bread wheat (*Triticum aestivum*) is one of the most important world food crops that are exposed to many pathogen. During the previous expression-profiling experiments, in addition to major resistant genes to disease in wheat, some defense-related genes such as *S-Like RNase* gene have been identified. Here to study expression pattern of this gene in several fungal wheat diseases, some bioinformatics and laboratory studies were performed. In bioinformatics studies, several microarray libraries infected with *Fusarium*, *Spike blight* and *Stripe rust* were considered. In laboratory experiments *Septoria tritici* blotch was studied. So the level of expression was measured at 8 time interval, from 0h to 6 days after inoculation by *Mycosphaerella graminicola* in Wangshuibai as a resistant wheat cultivar and Falat as a susceptible wheat cultivar by semi quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR). The results show that the maximum expression of this gene, depending on types of disease and resistant cultivars, is obtained up to 24 hours after the inoculation. Thus, according to this results it can be concluded that this gene plays an important role in resistance to diseases and, along with the main gene, increase and maintain resistance to many fungal diseases in wheat. Also this gene was confirmed by Nucleotide Blast.

Keywords: Fungal diseases, S-like RNase, *Triticum aestivum*, Expression of gene

چکیده

گندم نان (*Triticum aestivum* L.) یکی از مهمترین گیاهان زراعی در جهان می‌باشد که در معرض پاتوژن‌های زیادی قرار می‌گیرد. مطالعات قبلی در ارتباط با الگوی بیان ژن‌ها نشان داده است که علاوه بر ژن‌های اصلی ایجادکننده مقاومت به بیماری‌ها در گندم، ژن‌های دفاعی دیگری از جمله ژن کدکننده آنزیم‌های *S-Like RNase* نیز تظاهر می‌یابد. در این تحقیق به منظور بررسی الگوی بیان ژن *S-Like RNase* در مقابله با انواع بیماری‌های قارچی گندم، مطالعات بیوانفورماتیکی و آزمایشگاهی انجام شد. در مطالعات بیوانفورماتیکی چندین کتابخانه ریزآرایه با تیمار بیماری‌های قارچی فوزاریوم، بادزدگی و زنگ نواری گندم بررسی شدند و در مطالعات آزمایشگاهی سطح بیان ژن *S-Like RNase* در ۸ زمان (صفر تا ۶ روز) بعد از آلودگی با بیماری سپتوریوز برگ‌گی یکی از مخرب‌ترین بیماری‌های گندم در رقم مقاوم Wangshuibai و حساس فلات با استفاده از روش RT-PCR نیمه کمی اندازه‌گیری شد. نتایج این تحقیق نشان داد که بیان این ژن در اثر آلودگی با بیماری‌های قارچی در ارقام مقاوم بسته به نوع بیماری و رقم حداکثر در ۲۴ ساعت اولیه بعد از آلودگی افزایش می‌یابد. با توجه به این نتایج می‌توان گفت این ژن در ایجاد مقاومت علیه بیماری‌های قارچی نقش به‌سزایی دارد و در کنار ژن‌های اصلی ایجادکننده مقاومت باعث تشدید، حفظ و بهبود مقاومت خواهد شد. همچنین نتایج بلاست نوکلئوتیدی توالی این ژن در بانک ژن، هویت ژن مربوطه را مورد تأیید قرار داد.

واژه‌های کلیدی: بیماری‌های قارچی، *S-Like RNase*، *Triticum*

aestivum، تظاهر ژن

این آنزیم‌ها در فرایند خود ناسازگاری دخیل نمی‌باشند و در گیاهان خودسازگار نیز بیان می‌شوند (Bariola et al., 1999). بر خلاف آنزیم‌های S-RNase که بیان آن‌ها فقط محدود به خامه می‌باشد، آنزیم‌های S-Like RNase در همه اندام‌های گیاهی و تحت تحریکات محیطی بیان می‌شوند (Bariola et al., 1999). عملکرد S-Like RNase در دو مسیر فیزیولوژیکی گزارش شده است: الف) در تغذیه که به‌واسطه چرخش مجدد فسفات معدنی در طی کمبود فسفات می‌باشد و ب) در طی پیری یا دیگر مراحل رشدی شامل مرگ سلولی و دفاع در برابر پاتوژن‌ها (Deshpande and Shankar, 2002). مشخص شده است که S-RNase و S-Like RNase دارای ۵ ناحیه فوق‌العاده محافظت شده‌ای به نام C1-C5 می‌باشند. دو ناحیه C2 و C3 دارای ۲ تا ۳ مکان هیستیدین فعال هستند که برای فعالیت کاتالیک این آنزیم‌ها لازم است (Hillwig et al., 2010). آنزیم‌های S-Like RNase دارای یک ناحیه انتهایی N نیز هستند که این ناحیه پتانسیل شکاف‌دهندگی بالا دارد. آنالیزهای ژل پلی‌آکریل‌امید تأیید می‌کند که این پروتئین‌ها دارای وزن ۲۲ کیلودالتون می‌باشند (Hugot et al., 2002).

در این تحقیق نقش این ژن در ایجاد مقاومت به بیماری سپتوریوز برگ، بادزدگی و زنگ‌ناری به‌عنوان مخرب‌ترین بیماری‌های گندم مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مطالعات بیوانفورماتیکی

جهت بررسی تظاهر ژن در شرایط تنش زنده ابتدا کتابخانه‌های داده‌های ریزارایه مربوط به بررسی مقاومت گندم نان نسبت به بیماری قارچی از سایت www.ncbi.nlm.nih.gov قسمت GEO DataSet با پسوند Cell دانلود شد. کتابخانه اول (GEO accession: GSE43706) داده‌های آزمایشی مربوط به دو گندم مقاوم (EM0040) و (EM0168) و گندم حساس (Superb) *Fusarium graminearum* آلوده شده با توکسین قارچ (داکسی نیوالنول DON) در سه تیمار زمانی ۳، ۸ و ۲۴ ساعت پس از آلودگی در سه تکرار به همراه نمونه شاهد در هر تیمار زمانی بود. کتابخانه دوم (GEO accession: GSE43706) داده‌های آزمایشی مربوط به دو گونه گندم مقاوم (NIL1) و (NIL2) و گندم حساس (NIL S) آلوده شده با قارچ *Fusarium graminearum* سویه IFA-65

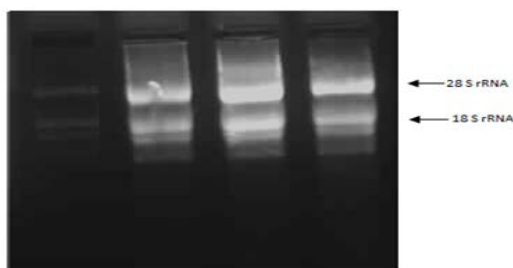
مقدمه

گندم نان (*Triticum aestivum* L.) یکی از مهمترین گیاهان زراعی در جهان می‌باشد که در معرض پاتوژن‌های زیادی قرار می‌گیرد. بر اساس آمار منتشرشده، بیماری‌های گیاهی منجر به کاهش ۲۵ درصد از تولیدات گندم می‌شود (Kia and Torabi, 2008). دفاع گیاه در برابر پاتوژن در نتیجه خصوصیات دفاعی ساختاری و بیان ژن‌های در گیر در مقاومت می‌باشد. مطالعات نشان داده است که گیاهان دارای ژن‌های مقاومت اختصاصی (R) هستند که به‌طور اختصاصی پاتوژنی را که دارای ژن بیماری‌زای (avr) متناظر با آن است را شناسایی می‌کنند (Agrios, 2005). بر اساس مطالعات انجام‌شده جهت شناسایی ژن‌های موثر در ایجاد مقاومت به بیماری‌ها از طریق تکنیک cDNA-AFLP نشان داده است که علاوه بر این نوع مقاومت اختصاصی یا تک‌ژنی، در طول پاسخ مقاومت گیاه تظاهر تعداد زیادی از ژن‌ها افزایش می‌یابد (Adhikari et al., 2007). تفاوت در الگوی بیان این ژن‌ها در ارقام مقاوم و حساس پس از آلودگی با بیماری ممکن است نقش اصلی را در مکانیزم‌های مقاومت به بیماری در گندم داشته باشد.

ژن کدکننده آنزیم S-Like RNase از جمله ژن‌هایی می‌باشد که در اثر آلودگی گیاه با بیماری به میزان زیادی بیان شده و باعث ایجاد مقاومت می‌شود. آنزیم‌های S-Like RNase گروهی از خانواده ریبونوکلازهای گیاهی می‌باشند. آنزیم‌های ریبونوکلاز گروهی از آنزیم‌ها هستند که باند فسفودی‌استر را در RNA برش می‌دهند. این پروتئین‌ها در بلوغ انواع مولکول‌های RNA دارای نقش کلیدی می‌باشند. یکی از زیرگروه‌های آنزیم‌های ریبونوکلاز، خانواده T2 می‌باشند. ابتدا این آنزیم‌ها از قارچ جداسازی شدند ولی بعد از آن در دامنه وسیعی از موجودات یافت شدند. در شرایط آزمایشگاهی نقش این آنزیم‌ها به‌صورت S-RNase شناخته شده است (Bariola et al., 1999). S-RNase‌ها در فرایند خودناسازگاری گامتوفیتی در حداقل سه خانواده گیاهی دخالت دارند (Hua et al., 2008). تراوش این آنزیم‌ها در خامه از رشد دانه گرده حاوی آلل s مشابه جلوگیری می‌کند (Clarke and Newbigin, 1993). گروه دیگری از ریبونوکلازهای گیاهی در خانواده T2، به نام S-Like RNase خوانده شده است. اگر چه وزن مولکولی این پروتئین‌ها با S-RNase شباهت دارد اما از لحاظ ساختار، بیان و فعالیت با S-RNase متفاوتند. مشخص شده است که

گردید که باعث چسبندگی اسپورها و باقی ماندن آن‌ها روی برگ در هنگام اسپورپاشی می‌شود. اسپورپاشی بوسیله اسپری دستی انجام شد. بعد از اسپورپاشی، گیاهان به مدت ۷۲ ساعت در داخل پاکت‌های پلاستیکی جهت تامین رطوبت قرار گرفتند و روی آن‌ها با پلاستیک سیاه پوشیده شد. بعد از ۷۲ ساعت گیاهان از پلاستیک خارج شده و در گلخانه با شرایط دمایی $22-26^{\circ}\text{C}$ و رطوبت نسبی ۹۵-۹۰٪ و حداقل ۱۶ ساعت روشنایی در روز قرار گرفتند. از گیاهان آلوده و شاهد دو رقم حساس و مقاوم نمونه‌های برگ در زمان‌های ۰، ۳، ۶، ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت و ۶ روز پس از آلودگی و هر کدام در سه تکرار گرفته شد و بعد از قرار گرفتن درون فویل سریعاً به وسیله ازت مایع منجمد گردید و به فریزر 80°C برای استخراج RNA انتقال یافت.

به منظور استخراج RNA، حدود ۱۰۰ میلی‌گرم از نمونه گیاهی منجمد شده به کمک نیتروژن مایع در هاون چینی به خوبی سائیده شده و به تیوپ ۲ میلی‌لیتری انتقال یافت. استخراج RNA با استفاده از کیت RNeasy[®] Mini Kit از شرکت QIAGEN (#74903) انجام شد. تعیین کمیت RNA استخراج شده با استفاده از روش اسپکتروفتومتری انجام شد و به منظور تعیین کیفیت نمونه‌ها از روش الکتروفورز ژل آگارز ۱/۳ درصد در بافر MOPS 1x استفاده گردید. نمونه‌ای از الکتروفورز RNA استخراج شده از برگ در شکل ۱ آورده شده است. تفکیک باندهای ۱۸S و ۲۸S نشان‌دهنده کیفیت خوب RNA می‌باشد.



شکل ۱- نمونه‌ای از الکتروفورز RNA استخراج شده از برگ بر روی ژل آگارز ۱/۳ درصد

سنتر رشته اول cDNA با استفاده از کیت-2 Viva steps RT-PCR Kit with M-MuLV RT/Taq DNA Polymerase (#RTPL12) ساخت شرکت Vivantis و برطبق دستورالعمل آن شرکت انجام شد. برای این منظور ۱ میکروگرم RNA استخراج شده مورد استفاده

عامل بیماری بادزدگی در سه تیمار زمانی ۸، ۲۴ و ۷۲ ساعت پس از آلودگی در سه تکرار به همراه نمونه شاهد در هر تیمار زمانی بود. کتابخانه سوم (GEO accession: GSE31753) داده‌های آزمایشی مربوط به دو گندم مقاوم (Yr5) و حساس (S yr5) در چهار تیمار زمانی ۶، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از آلودگی به *Puccinia striiformis* (عامل بیماری زنگ نواری) در سه تکرار به همراه نمونه شاهد در هر تیمار زمانی بود.

در مرحله بعد به منظور بررسی‌های آماری داده‌های خام ریزآرایه با استفاده از نرم‌افزار Expression Console نرمال‌سازی شدند و با استفاده از نرم‌افزار Flexarray (ver. 1.6.2) مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. در این بررسی با کمک آزمون t-test در p-value کمتر از ۰/۰۵ ژن‌هایی که در مقابله با بیماری در زمان‌های مختلف نسبت به تیمار کنترل افزایش بیان داشتند مشخص شدند. با استفاده از پروب‌ست *S-LikeRNase* در چیپ‌های ریزآرایه گندم (Ta.30631.1.S1_at) از میان ژن‌های افزایش بیان داشته الگوی بیانی ژن *S-Like RNase* در کتابخانه‌های فوق بررسی و نمودار آن رسم شد.

مطالعات آزمایشگاهی

در این تحقیق از دو رقم گندم، با نام‌های فلات و ونگشوبای که به ترتیب نسبت به بیماری سپتوریوز برگ حساس و مقاوم می‌باشند استفاده شد. جهت ایجاد آلودگی از ایزوله SA852-2 قارچ *M. graminicola* استفاده شد. ابتدا ایزوله‌های قارچ روی محیط کشت PDA (Potato Dextrose Agar) کشت داده شده و به مدت ۵ روز در دمای $18-22^{\circ}\text{C}$ در زیر لامپ فلورسنت نگهداری شدند. سپس میسلیوم‌های رشد کرده به داخل محیط کشت مایع YGA (Yeast Glucose Agar) منتقل شدند. محیط کشت مایع روی شیکر (۳۰ دور در دقیقه) در دمای 18°C به مدت ۵ روز گذاشته شد. بعد از این مدت که قارچ خوب رشد کرد، فلاسک‌های حاوی محیط کشت مایع به صورت کج روی پایه‌های فلزی به مدت ۵-۳ ساعت گذاشته شدند تا اسپورهای قارچ رسوب کنند. سپس فاز مایع خالی شده و اسپورهای رسوب کرده در آب مقطر حل شده و با استفاده از لام هموسایتومتر در زیر میکروسکوپ میزان غلظت قارچ‌ها تعیین گردید. غلظت نهایی برای اسپورپاشی 2×10^6 در نظر گرفته شد. پس از آنکه سوسپانسیون قارچ به غلظت موردنظر رسانده شد، به هر لیتر از سوسپانسیون، ۱۰ قطره توین ۲۰ اضافه

بافر (1x) PCR، 200 μ M dNTP، یک واحد Taq پلی‌مراز و 0.4 μ M از هر کدام از آغازگرها، انجام گرفت. شرایط دمایی برای تکثیر PCR، ۳ دقیقه در دمای ۹۴°C، ۳۰ ثانیه در دمای ۹۴°C، ۳۰ ثانیه در دمای ۷۲°C و سپس نگهداری در دمای ۱۰°C بود.

قرار گرفت. از واکنش RT-PCR نیمه کمی به منظور آنالیز الگوی بیان ژن S-Like RNase در دوره ۶ روزه پس از آلودگی استفاده شد. به منظور انجام واکنش RT-PCR، از ۱ میکرولیتر cDNA سنتز شده و آغازگرهای مربوط به ژن هدف و ژن کنترل داخلی اکتین (جدول ۱) استفاده گردید. لازم به ذکر است این آغازگرها با توجه به منابع مورد بررسی انتخاب شدند. واکنش PCR در حجم نهایی 20 μ l حاوی

جدول ۱- توالی آغازگرهای رفت و برگشت مربوط به ژن S-Like RNase و ژن اکتین مورد استفاده

ردیف	نام ژن	آغازگر رفت	آغازگر برگشت	محصول	منبع
۱	S-Like RNase	ATTTCGCTTGAACGCAACTCA	TGTCCTACGCCGAAGCATTC	۴۳۰	(Adhikari et al., 2007)
۲	Actin	GCCGTGCTTTCCCTCTATG	GCTTCTCCTTGATGTCCCTTA	۲۰۰	(Ji et al., 2011)

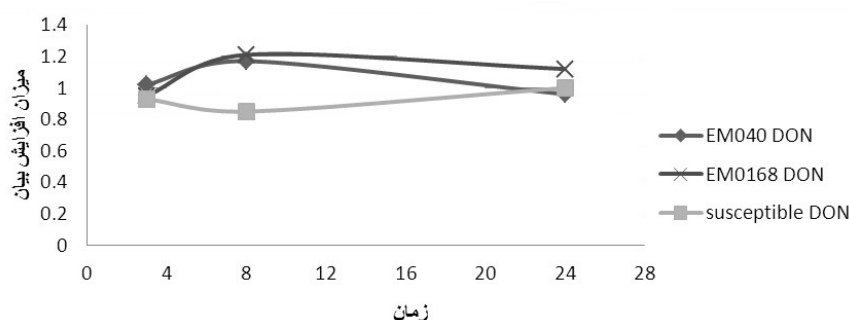
وکتور pJET1.2 کلون گردید. سپس وکتور درون باکتری *E. coli* سویه DH5 α انتقال داده شد و پس از انتخاب کلونی‌های تراریخته، استخراج پلازمید با استفاده از کیت استخراج پلازمید ساخت شرکت Vivantis (#GF-PL-) (050) انجام شد.

نتایج و بحث

بررسی الگوی بیان ژن S-Like RNase در کتابخانه‌های ریزآرایه گندم مربوط به بیماری‌های بادزدگی (شکل‌های ۲ و ۳) و زنگ نواری گندم (شکل ۴) بیانگر افزایش بیان این ژن در ۲۴ ساعت اولیه آلودگی در ارقام مقاوم نسبت به ارقام حساس است. زمان بروز حداکثر میزان بیان در ارقام مختلف و بسته به نوع بیماری متفاوت بود. در مقابله با سم فوزاریوم (عامل بیماری بادزدگی) ارقام مقاوم در زمان ۸ ساعت پس از آلودگی بیشترین بیان ژن S-Like RNase را نشان دادند، این در حالی است که رقم حساس در این زمان کمترین میزان بیان را نشان می‌دهد و بیان این ژن در رقم حساس در زمان ۲۴ به اوج می‌رسد (شکل ۲).

پس از اتمام واکنش PCR، فرآورده PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد با بافر TBE ۰/۵x الکتروفورز شد. و نهایتاً از ژل زیر نور UV با استفاده از دستگاه UV-transiluminator عکس گرفته شد. سپس با استفاده از نرم‌افزار Image J (Image J software; Rasband, 2011)، میزان بیان هر ژن کمی گردید و هر نمونه با توجه به اکتین خود نسبی شد و سپس میزان عددی به دست آمده برای هر دو حالت کنترل و تنش ارقام نسبت کنترل رقم حساس نسبی شدند و میانگین بیان هر ژن با استفاده از سه تکرار بیولوژیک محاسبه گردید. آزمون t-test دو طرفه به منظور بررسی اختلاف‌های معنی‌دار بین تیمارها استفاده گردید.

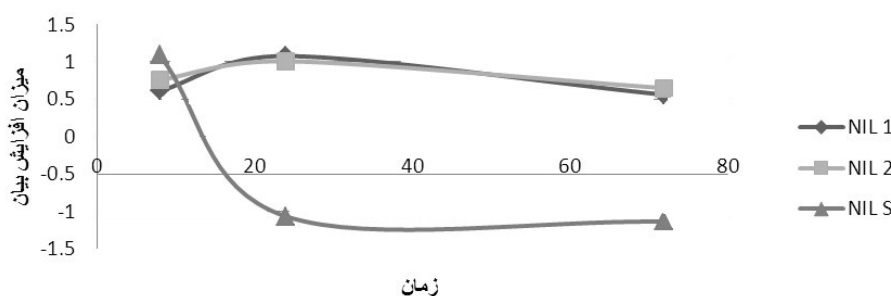
به منظور تأیید ژن S-Like RNase قطعه تکثیر شده به وسیله جفت آغازگر مربوطه در رقم فلات و ونگشوبایی، داخل باکتری *E. coli* کلون گردید و پس از تعیین توالی، این قطعه در سایت NCBI بلاست شد. به این منظور ابتدا فرآورده PCR توسط کیت PCR Clean-up kit ساخت شرکت Vivantis (#GF-PC-050) خالص‌سازی شد و سپس با استفاده از کیت CloneJET PCR Cloning kit ساخت شرکت فرمنتاز قطعه موردنظر به داخل



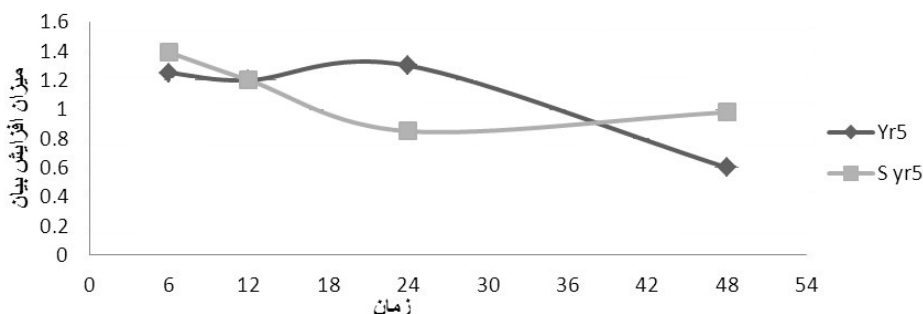
شکل ۲- الگوی بیانی ژن *s-Like RNase* در دو گندم مقاوم EM040 و EM0168 و گندم حساس Superb پس از تیمار با توکسین قارچ فوزاریوم (DON)

نمودار بیان ژن *S-Like RNase* در مقابله با بیماری زنگ نواری نشان می‌دهد بیان این ژن طی یک روز اول افزایش بیان و بعد کاهش داشته و در ارقام حساس طی یک روز اول کاهش داشته است (شکل ۴).

در رابطه با بیماری بادزدگی ارقام حساس در زمان ۲۴ ساعت پس از آلودگی بیشترین میزان بیان را از خود نشان می‌دهند. این در حالی است که بیان این ژن در رقم حساس در این زمان به شدت کاهش می‌یابد و حتی میزان آن نسبت به نمونه شاهد نیز کمتر می‌شود (شکل ۳).



شکل ۳- الگوی بیانی ژن *s-Like RNase* در دو گندم مقاوم (NIL1 و NIL2) و گندم حساس (NIL S) پس از تیمار با *Fusarium graminearum*



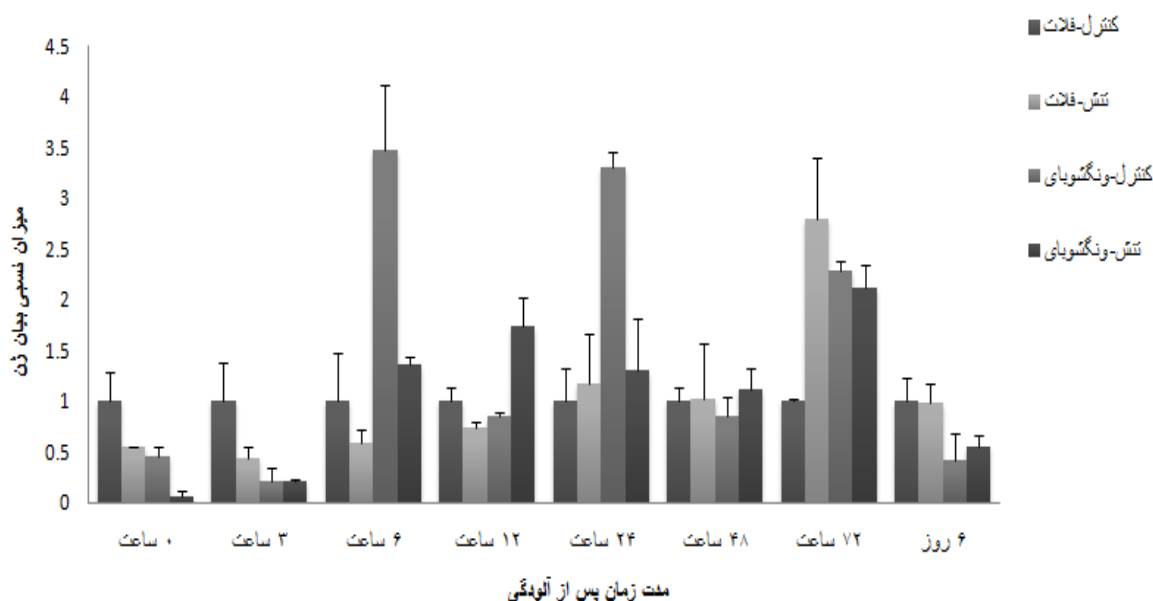
شکل ۴- الگوی بیانی ژن *s-Like RNase* در گندم مقاوم (Yr5) و گندم حساس (S yr5) پس از تیمار با *Puccinia striiformis*

ساعت پس از آلودگی در هر دو حالت کنترل و تنش نسبتاً بالا می‌باشد و اختلاف معنی‌داری ($p \leq 0.05$) با رقم حساس دارد و بیان این ژن سریع‌تر از رقم حساس و در زمان ۱۲ ساعت پس از آلودگی در اثر تنش بیماری ۲ برابر افزایش یافته و در سطح احتمال ۵٪ دارای اختلاف معنی‌داری با حالت کنترل می‌باشد. در مطالعات مختلف مشخص شده که این آنزیم‌ها در ایجاد مقاومت علیه بیماری‌های مختلف نقش مؤثری دارند. نخستین بار Lee و همکاران (۱۹۹۲)، گزارش کردند که بیان این آنزیم‌ها در تخمدان باعث ایجاد مقاومت علیه پاتوژن‌ها می‌شود. همچنین گزارش شده است که در گیاه تنباکو ژن *RNase NW* در اثر آلودگی با بیماری ویروس موزاییک تنباکو (Kurata and Kariu, 2002) و ژن *RNase Rkl*

در مطالعات آزمایشگاهی الگوی بیان ژن کدکننده آنزیم *s-Like RNase* در طی دوره ۶ روزه پس از آلودگی با عامل بیماری سپتوریوز برگ در دو رقم حساس فلات و مقاوم ونگشوبایی مورد بررسی قرار گرفت. بررسی الگوی بیانی ژن *s-Like RNase* نشان می‌دهد که بیان این ژن در اثر آلودگی با بیماری سپتوریوز برگ در طی دوره ۶ روزه پس از آلودگی افزایش می‌یابد. همان‌طور که در شکل ۵ دیده می‌شود، بیان ژن *s-Like RNase* در رقم فلات تا زمان ۳ روز پس از آلودگی هیچ افزایش معنی‌داری نسبت به حالت کنترل نداشته ولی در این زمان تقریباً ۳ برابر نسبت به حالت کنترل افزایش معنی‌داری ($p \leq 0.05$) یافته است. با توجه به نمودار، بیان این ژن در رقم مقاوم در فاصله زمانی ۶ تا ۲۴

رقم حساس هیچ افزایش قابل توجهی نشان نداده است. نقش این ژن در ایجاد مقاومت در گیاه در برابر دیگر استرس‌های محیطی نیز اثبات شده است: به‌طور مثال طی مطالعه‌ای که توسط Farkas و همکاران (۱۹۸۲) صورت گرفت مشخص شد که فعالیت این آنزیم‌ها در اثر زخم سریعاً افزایش می‌یابد. همچنین طبق مطالعه‌ای که توسط Tylor و همکاران (۱۹۹۳) و Bariola و همکاران (۱۹۹۴) صورت گرفت نیز مشخص شد که این آنزیم‌ها در سه گیاه *Arabidopsis Nicotina* و *Lycopersicum esculentum.thaliana* در طی پیری گیاه و در اثر کمبود فسفات بیان می‌شوند. همچنین Salekdeh و همکاران (۲۰۰۲) نیز نشان دادند که بیان ژن کدکننده آنزیم *S-Like RNase* در برنج در اثر تنش خشکی به میزان زیادی افزایش یافته و باعث ایجاد مقاومت خواهد شد.

در اثر آلودگی با بیماری ویروس موزاییک خیار (Ohno and Ehara, 2005) به میزان زیادی بیان می‌شود. و طی مطالعه‌ای که توسط Galiana و همکاران (۱۹۹۷) انجام شد نیز مشخص گردید که بیان ژن *S-Like RNase* در هنگام آلودگی با *Phytophthora parasitica* به میزان زیادی افزایش می‌یابد. همچنین Hugot و همکاران (۲۰۰۲) در شرایط آزمایشگاهی نشان دادند که این آنزیم‌ها می‌توانند از طولیل‌شدن هیف‌های دو قارچ *Phytophthora parasitica* و *Fusarium oxysporum* جلوگیری کنند بر اساس مطالعه‌ای که توسط Adhikari و همکاران (۲۰۰۷) بر روی الگوی بیان ژن *S-Like RNase* صورت گرفت نیز مشخص گردید که بیان این ژن در رقم مقاوم W7985 در ۳ روز پس از آلودگی با بیماری سپتوریوز برگی افزایش یافته و به حداکثر میزان خود می‌رسد در حالی که میزان بیان آن در دو



شکل ۵- الگوی بیان ژن *S-Like RNase* در دو رقم حساس (فلات) و مقاوم (ونگشوبای) در طی دوره ۶ روزه پس از آلودگی با بیماری سپتوریوز برگی گندم

S-LikeRNase موجود در گیاه‌جو (*rsh1*) با شماره دسترسی (AF182197.1) به میزان ۶۷٪ دارای شباهت می‌باشد. بنابر این مقایسه بیان ژن *S-Like RNase* در دو رقم حساس و مقاوم در این تحقیق نشان می‌دهد که میزان بیان این ژن در رقم مقاوم در فاصله زمانی ۶ تا ۲۴ ساعت پس از آلودگی به میزان زیادی بالاتر از رقم حساس است. در

در این تحقیق پس از بررسی و تأیید افزایش بیان ژن *S-Like RNase* قطعه تکثیرشده به‌وسیله جفت پرایمر داخل پلازمید کلون شد و پس از توالی‌یابی با استفاده از سایت NCBI بلاست نوکلئوتیدی انجام گرفت. توالی ژن کلون‌شده در جدول ۲ آورده شده است. توالی ژن *S-Like RNase* در هر دو رقم فلات و ونگشوبای با توالی گزارش شده برای ژن

جدول ۲- توالی نوکلئوتیدی مربوط به ژن *S-Like RNase* پس از حذف توالی پلاسمید

نمونه	توالی نوکلئوتیدی	شباهت دو رقم (%)
<i>S-Like RNase-Falat</i>	TTGTCCTACGCCGAAGCATTTCGAGATGGCCGGCGCCGCCATGG GATACTGAGCTGCAGCTGCAGATCGGTAGCCGGTTCGGGCCCTT GACCGGTCTCGTCTTGTGAGTTGCGTTCAAGCGAAT	99/2
<i>S-Like RNase-Wangshuibai</i>	TTGTCCTACGCCGAAGCATTTCGAGATGGCCGGCGCCGCCATGG GATACTGAGCTGCAGCTGCAGATCGGTAGCCGGTTCGGGCCCTT GACCGGTCTCGTCTTGTGAGTTGCGTTCAAGCGAATT	

S-Like RNase در ایجاد مقاومت تأثیر دارد بلکه زمان القاء بیان نیز از اهمیت بالایی برخوردار می‌باشد. بنابراین با توجه به نتایج این تحقیق و تحقیقات مشابه می‌توان چنین نتیجه گرفت که این ژن می‌تواند در کنار ژن‌های اصلی ایجاد کننده مقاومت (*STB*)، باعث تشدید، حفظ و بهبود مقاومت در گندم در مقابله با بیماری‌ها از جمله بیماری سپتوریوز برگی شوند.

واقع تولید و تجمع پروتئین‌های *S-Like RNase* در گیاه مقاوم می‌تواند از طریق تجزیه RNA قارچ عامل بیماری، از پیشروی و گسترش قارچ درون گیاه جلوگیری و باعث ایجاد مقاومت گردد (Bariola *et al.*, 1999). علاوه بر این سطح بیان این ژن در رقم مقاوم در اثر بیماری سپتوریوز برگی نسبت به حالت کنترل سریع‌تر افزایش می‌یابد و بر این اساس تصور می‌رود نه تنها بالابودن سطح بیان ژن

REFERENCES

- Kia Sh, Torabi M (2008) Effect of infection with *Septoria tritici* leaf Blotch (*Septoria tritici* Rob. ex Desm) at different growth stages on yield and yield components of wheat cultivars in Gorgan. Young Tree and Seed Magazine, 24(2): 237-250.
- Agrios GN (2005) Plant Pathology 3rd edition Academic Press Inc. San Diego, USA
- Adhikari TB, Balaji B, Breeden J Goodwin SB (2007) Resistance of wheat to *Mycosphaerella graminicola* involves early and late peaks of gene expression. PMPP 71:55-68.
- Bariola PA, Howard CJ, Tylor CB, Verburg MT, Jaglan VD, Green PJ (1994) The *Arabidopsis ribonuclease* gene RNs1 is tightly controlled in response to phosphate limitation. Plant J. 6: 673-685.
- Bariola PA, Macintosh GC, Green PJ (1999) Regulation of s-Like Ribonuclease level in *Arabidopsis antisense* inhibition RNs1 or RNs2 elevates anthocyanin accumulation Plant Physiol. 119: 331-342.
- Clarke AE, Newbigin E (1993) Molecular aspects of self-incompatibility in flowering plants. Annu. Rev. Genet. 27: 257-262.
- Deshpande RA, Shankar V (2002) Ribonucleases from T2 family. Crit. Rev. Microbiol. 28: 79-122.
- Farkas GL (1982) Ribonuclease and ribonucleic acid breakdown. In: Benno P, Donland Nucleic acid and protein in plants II. Structure Biochemistry and Physiology of Nucleic Acid. Springer-Verlag Berlin pp. 224-262
- Galiana E, Bonnet P, Conrod S, Keller H, Panabieres F, Ponchet M, Poupet A, Ricci P (1997) RNase activity prevent the growth of a fungal pathogen in tobacco leaves and increases upon induction of systemic acquired resistance with elicitor. Plant Physiol. 115: 1557-1567.
- Hillwig MS, Liu X, Liu G, Robert W, Thornburg RW, Gustavo C, MacIntosh GC (2010) Petunia nectar protein have ribonuclease activity. J. Exp. Bot. 61: 2951-2965.
- Hua ZH, Fields A, Kao TH (2008) Biochemical models for SRNase-based self-incompatibility. Mol. Plant. 1: 575-585.
- Hugot K, Ponchet M, Marais A, Ricci P, Galiana E (2002) A tobacco S-Like RNase inhibits hyphal elongation of plant pathogens. Mol. Plant-Microbe Interact. 15(3): 243-250.
- Ji X, Dong B, Shiran B, Talbot MJ, Edlington JE, White RG, Gubler F (2011) Control of abscisic acid catabolism and abscisic acid homeostasis is important

- for reproductive stage stress tolerance in cereals. *Plant Physiol.* 156: 617-662.
- Kurata N, Kariu T (2002) Molecular cloning of cDNAs encoding ribonuclease-related proteins in *Nicotiana glutinosa* leaves, as induced in response to wounding or to TMV-infection. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66 (2): 391-397.
- Lee HS, Singh A, Kao TH (1992) RNase X2 A pistil-specific ribonuclease from *Petunia inflata*, share sequence similarity with Solanaceous S protein. *Plant Mol. Biol.* 20: 1131-1141.
- Ohno H, Ehara Y (2005) Expression of ribonuclease gene in mechanically injured of virus-inoculated *Nicotiana tabacum* leaves. *Tohoku J. Agric. Res.* 55: 4-11.
- Patterson FL, Shaner GE, Huber DM, Ohm HW, Finney RE, Galun RL, Robert JJ (1979) Registration of Sullivan wheat. *Crop Sci.* 19: 279-284.
- Raman R, Milgate AW, Imtiaz M, Tan MK, Raman H, Lisle C, Coombes N, Martin P (2009) Molecular mapping and physical location of major gene conferring seedling resistance to *Septoria tritici* blotch in wheat. *Mol. Breeding.* 24: 153-164.
- Rasband WS (2011) Image J institutes of health. <http://image.nih.gov/ij/>.
- Salekdeh GH, Siopongco J, Wade LJ, Ghareyazie B, Bennet J (2002) Proteomic analysis of rice leaves during drought stress and recovery. *Proteomics* 2: 1131-1145.
- Taylor CB, Bariola PA, Delcardayer SB, Raines RT, Green PJ (1993) RNs2: A senescence-associated RNase of Arabidopsis that diverged from the s-RNase before speciation. *Proceeding of the National Academy of Sciences of USA* 90: 5118-5122.