Crop Biotech.
Autumn and Winter (2013) 5: 85-92

مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌فناوری گیاهان زراعی
سال سوم، شماره پنجم، پائیز و زمستان ۱۳۹۲ (۹۲- ۸۵)

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

معصومه حبیبی[۱]*، اسدالله آبیار فینی[۲]، ندا میرآخورلی[۳]، محسن مردی[۴]
۱، دانش‌آموخته کارشناسی ارشد اصلاح نباتات دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ۲، دانشجوی کارشناسی‌ارشد 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 FINI[2], N. MIRAKHORLI[3], M. MARDI[4]
1, M.Sc. Gradated, 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 (*Triticumaestivum*) 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 studied were performed. In bioinformatics studies, several microarray libraries infected with *Fusarium*, *Spike blight* and *Stripe rust* were considered. In laboratory experiments *Septoria tritici* bloth 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 ازجمله ژن کدکننده آنزیم‌های *S-Like RNase* نیز تظاهر می‌یابد. در این تحقیق به‌منظور بررسی الگوی بیان‌ژن *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 برگی یکی از مخرب‌ترین بیماری‌های گندم در رقم مقاوم Wangshuibai و حساس فلات با استفاده از روش RT-PCR نیمه‌کمی 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 می توان 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 بانک‌ژن، هویت ژن مربوطه را مورد تأیید قرار داد.

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

* نویسنده مسئول: معصومه حبیبی
E-mail: Masoomeh.habibi@yahoo.com

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 ۳۵ 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 ریبونوکلئازهای گیاهی می‌باشند. آنزیم‌های ریبونوکلئاز 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 ریبونوکلئاز، 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 فرآیند 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 ریبونوکلئازهای 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 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 به‌نام C1-C5 می‌باشند. دو ناحیه C2 و C3 دارای ۲ تا ۳ مکان هیستیدین فعال هستند که برای فعالیت کاتالیکی 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 پلی‌آکریل‌آمید 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 برگی، بادزدگی و زنگ‌نواری به‌عنوان مخرب‌ترین بیماری‌های گندم مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مطالعات بیوانفورماتیکی

جهت بررسی تظاهر ژن در شرایط تنش زنده ابتدا کتابخانه‌های داده‌های ریزآرایه 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) آلوده شده با توکسین قارچ *Fusarium graminearum* (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

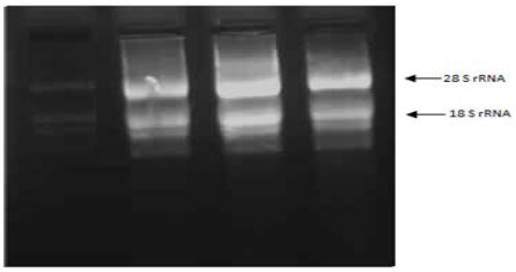
عامل بیماری بادزدگی در سه تیمار زمانی ۸، ۲۴ و ۷۲ ساعت پس از آلودگی در سه تکرار به همراه نمونه شاهد در هر تیمار زمانی بود. کتابخانه سوم (GEO accession: GSE31753) داده‌های آزمایشی مربوط به دو گندم مقاوم (Yr5) و حساس (S yr5) در چهار تیمار زمانی ۶، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از آلودگی به *Puccinia striiformis*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

در مرحله بعد به‌منظور 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 به‌ترتیب نسبت به بیماری سپتوریوز برگی 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 به‌مدت ۵ روز در دمای ۲۲–۱۸ ^{o}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 ۱۸^{o}C به‌مدت ۵ روز گذاشته شد. بعد از این مدت که قارچ خوب رشد کرد، فلاسک‌های حاوی محیط کشت مایع به‌صورت کج روی پایه‌های فلزی به‌مدت 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 گردید که باعث چسبندگی اسپورها و باقی‌ماندن آن‌ها روی برگ در هنگام اسپورپاشی می‌شود. اسپورپاشی بوسیله اسپری دستی انجام شد. بعد از اسپورپاشی، گیاهان به‌مدت 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 دمایی۲۶–۲۲^{o}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 برگی 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 قرارگرفتن درون فویل سریعاً به‌وسیله ازت مایع منجمد گردید و به فریزر^{o}C ۸۰– برای استخراج RNA انتقال یافت.

به‌منظور استخراج RNA، حدود ۱۰۰ میلی‌گرم از نمونه گیاهی منجمد شده به‌کمک 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 به‌منظور تعیین کیفیت نمونه‌ها از روش الکتروفورز ژل آگارز ۱/۳ درصد در بافرMOPS 1x استفاده گردید. نمونه‌ای از الکتروفورز RNA استخراج‌شده از برگ در شکل ۱ آورده شده است. تفکیک باندهای ۱۸s و ۲۸s نشان‌دهنده کیفیت خوب RNA می‌باشد.



شکل ۱– نمونه‌ای از الکتروفورز RNA استخراج‌شده از برگ بر روی ژل آگارز ۱/۳ درصد

سنتز رشته اولcDNA با استفاده از کیت-Viva 2 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 ۱میکروگرم RNA استخراج شده مورد استفاده

قرار گرفت. از واکنش RT-PCR نیمه‌کمی به‌منظور آنالیز الگوی بیان ژن s-Like RNase در دوره ۶ روزه پس از آلودگی استفاده شد. به‌منظور انجام واکنشRT-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 20µl حاوی بافر (1x) PCR، 200µM dNTP، یک واحد Taq پلی‌مراز و 0.4µM از هر کدام ازآغازگرها، انجام گرفت. شرایط دمایی برای تکثیر PCR، ۳ دقیقه در دمای ۹۴°C، ۳۰ ثانیه در دمای ۹۴°C، ۳۰ ثانیه در دمای اتصال مربوط به هر جفت آغازگر، ۱ دقیقه در ۷۲°C و سپس نگهداری در دمای ۱۰°C بود.

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

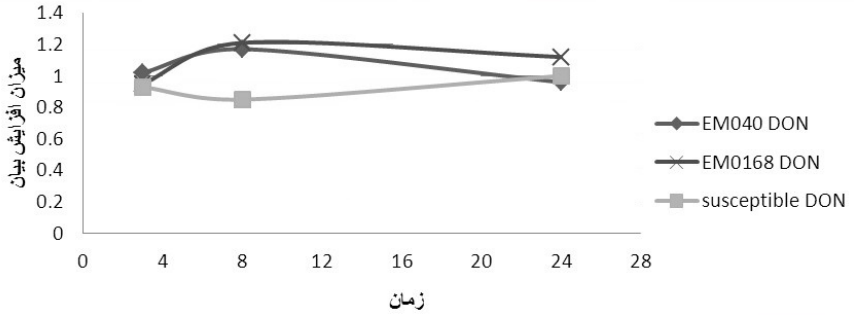
ردیف	نام ژن	آغازگر رفت	آغازگر برگشت	محصول	منبع
۱	*S-Like RNase*	ATTCGCTTGAACGCAACTCA	TGTCCTACGCCGAAGCATTC	۴۳۰	(Adhikari *et al*., 2007)
۲	Actin	GCCGTGCTTTCCCTCTATG	GCTTCTCCTTGATGTCCCTTA	۲۰۰	(Ji *et al*., 2011)

پس از اتمام واکنش PCR، فراورده PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵درصد با بافرTBE 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 (ImageJ software; Rasband, 2011)، میزان بیان هر ژن کمی گردید و هر نمونه با توجه به اکتین خود نسبی شد و سپس میزان عددی به‌دست 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. آزمونt-test دو طرفه به‌منظور بررسی اختلاف‌های معنی‌دار بین تیمارها استفاده گردید.

به‌منظور تأیید ژن *S-Like RNase* قطعه تکثیرشده به‌وسیله 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 فراورده 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 (#k1231) ساخت شرکت فرمنتاز قطعه موردنظر به داخل وکتور pJET1.2 کلون گردید. سپس وکتور درون باکتری *E.coli* سویه DH5α 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

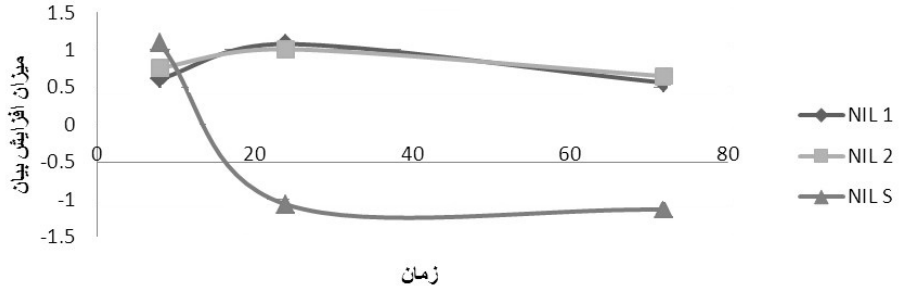
بررسی الگوی بیان ژن *S-Like Rnase* در کتابخانه‌های ریزآرایه گندم مربوط به بیماری‌های بادزدگی (شکل‌های ۲ و ۳) و زنگ نواری گندم (شکل ۴) بیانگر افزایش بیان این ژن در ۲۴ ساعت اولیه‌ی آلودگی در ارقام مقاوم نسبت به ارقام حساس است. زمان بروز حداکثر میزان بیان در ارقام مختلف و بسته به نوع بیماری متفاوت بود. 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).



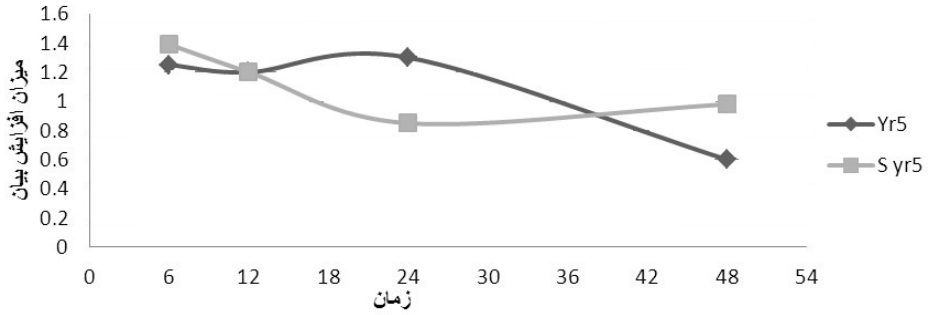
شکل ۲- الگوی بیانی ژن s-Like RNase در دو گندم مقاوم EM040 و EM0168 وگندم حساس Superb پس از تیمار با توکسین قارچ فوزاریوم (DON)

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 (شکل۳).

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 (شکل۴).



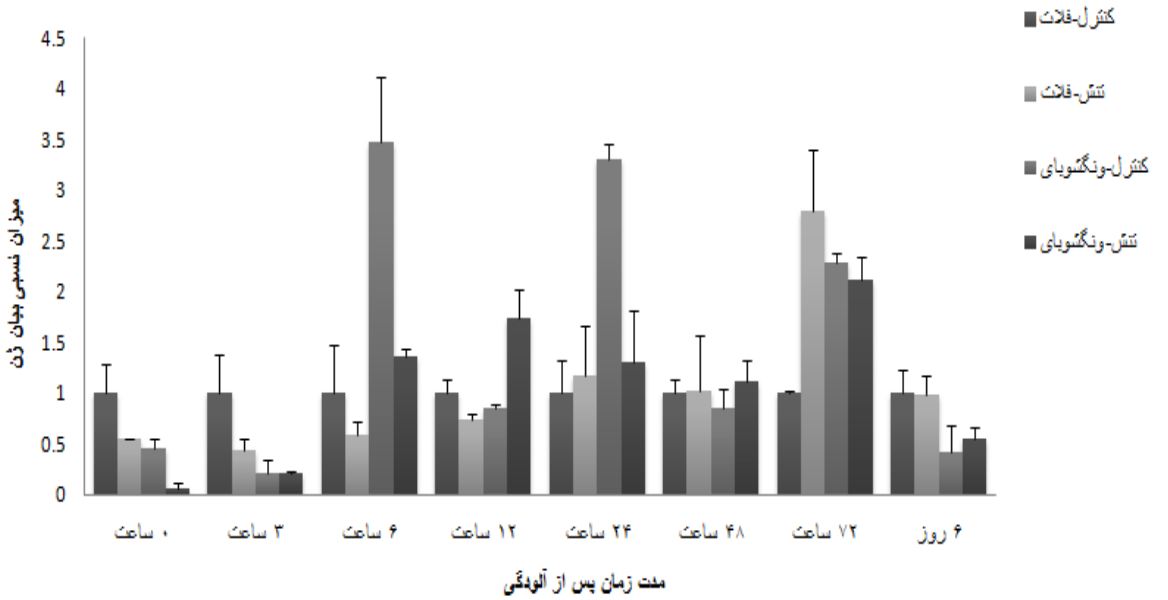
شکل ۳- الگوی بیانی ژن s-Like RNase در دو گندم مقاوم (NIL1 و NIL2) و گندم حساس (NIL S) پس از تیمار با *Fusarium graminearum*



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

در مطالعات آزمایشگاهی الگوی بیان ژن کدکننده آنزیم *S-Like RNase*، در طی دوره ۶ روزه پس از آلودگی با عامل بیماری سپتوریوز برگی 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 برگی 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 ($p\leq0.05$) یافته است. با توجه به نمودار، بیان این ژن در رقم مقاوم در فاصله زمانی ۶ تا ۲۴ ساعت پس از آلودگی در هر دو حالت کنترل و تنش نسبتاً بالا می‌باشد و اختلاف معنی‌داری ($p\leq0.05$) 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 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 طویل‌شدن 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 حالی‌که میزان بیان آن در دو 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 thaliana*، *Lycopersicum esculentum* و *Nicotina alata* 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.



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

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 *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

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

نمونه	توالی نوکلئوتیدی	شباهت دو رقم (٪)
S-Like RNase-Falat	TTGTCCTACGCCGAAGCATTCGAGATGGCCGGCGCCGCCATGG GATACTGAGCTGCAGCTGCAGATCGGTAGCCGGTCGGGCCCTT GACCGGTCTCGTCTTGTGAGTTGCGTTCAAGCGAAT	99/2
S-Like RNase-Wangshuibai	TTGTCCTACGCCGAAGCATTCGAGATGGCCGGCGCCGCCATGG GATACTGAGCTGCAGCTGCAGATCGGTAGCCGGTCGGGCCCTT GACCGGTCTCGTCTTGTGAGTTGCGTTCAAGCGAATT	

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 *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.

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 elicitin. 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 homoeostasis 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 inflate*, 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 helth. htpp://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.

Tylor 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.