

بررسی بیوانفورماتیکی ژن‌های خانواده‌ی عوامل رونویسی WRKY در گندم

In Silico Analysis of the WRKY Transcription Factors Gene Family in Wheat

غفار خضری^۱، زهراسادات شبر^{۲*} و امیرمحمد ناجی^۳

تاریخ پذیرش: ۹۳/۰۹/۱۹

تاریخ دریافت: ۹۳/۰۲/۲۴

چکیده

خانواده‌ی ژنی *WRKY* رمزکننده گروه بزرگی از عوامل رونویسی هستند که در تنظیم ژن‌های پاسخ‌دهنده به تنش‌های زیستی و غیرزیستی به‌خصوص در تنش خشکی دخیل می‌باشند؛ برای شناسایی اعضاء این خانواده ژنی در گندم، جستجوی چندگانه در پایگاه‌های اطلاعاتی مرتبط و *tblastn* براساس توالی‌های حفظ‌شده‌ی این خانواده در برنج در داده‌های nr، EST، HTGS انجام شد. توالی‌هایی مثل EST و cDNA (فاقد پروتئین) توسط نرم‌افزارهای DNASTAR و NCBI ORF finder ترجمه شدند. هم‌ردیفی و آنالیز فیلوژنتیکی با استفاده از نرم‌افزارهای MEGA4 و BioEdit انجام گردید. الگوی بیانی این خانواده‌ی ژنی با استفاده از داده‌های ریزآرایه و در پایگاه‌های PLEXdb، GENEVESTGATOR بررسی شد. براساس نتایج به‌دست آمده، ۹۴ عضو از خانواده‌ی ژنی *WRKY* در گندم یافت شد. برای ۷۶ عضو پیدا شده ساختار حفظ شده خانواده *WRKY* به‌طور کامل وجود داشت و برای دیگر اعضاء توالی کامل پروتئین پیدا نشد. عوامل رونویسی *WRKY* در گندم همانند برنج بر مبنای ساختار دمین حفاظت‌شده *WRKY* به سه گروه تقسیم شدند. ۷ عضو از این خانواده، با توجه به بیان افتراقی آن‌ها در پاسخ به تنش خشکی در ارقام حساس و متحمل گندم، به‌عنوان ژن‌های منتخب برای افزایش تحمل به خشکی در گندم انتخاب شدند.

واژه‌های کلیدی: آنالیز فیلوژنتیکی، الگوی بیان، تنش غیرزیستی، دمین حفاظت‌شده *WRKY*، هم‌ردیفی توالی‌ها

۱. فارغ‌التحصیل کارشناسی‌ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شاهد، تهران

۲. استادیار ژنتیک مولکولی و مهندسی ژنتیک پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، کرج

۳. استادیار اصلاح نباتات - بیومتری، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شاهد، تهران

Email: shobbar@abrii.ac.ir

*: نویسنده مسوول

پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد مصوب با عنوان "بررسی بیوانفورماتیکی خانواده‌ی ژنی عوامل رونویسی *WRKY* در گندم" در دانشکده کشاورزی دانشگاه شاهد تهران

مقدمه

غلات مهم‌ترین منابع تأمین‌کننده غذای بشر می‌باشند. در بین غلات، گندم از جمله مهم‌ترین گیاهان زراعی مورد استفاده انسان محسوب می‌شود هریتی و همکاران (Rharrabti et al., 2003). بخش وسیعی از سرزمین‌های جهان در مناطق خشک و نیمه‌خشک واقع است که رشد گیاهان در آن‌ها به دلیل محدودیت منابع آب با دشواری‌های زیادی روبه‌رو هست دیناکس و همکاران (Dean-Knox et al., 1998). با توجه به محدودیت‌های شدید منابع آبی در اکثر مناطق کشور، در کشور ما تنش خشکی به‌عنوان مهم‌ترین تنش تأثیرگذار بر گیاهان زراعی معرفی شده است کافی و همکاران (Kafi et al., 2009). اولین ژن‌های نامزد برای انتقال به گیاهان به‌منظور مقابله با تنش خشکی، ژن‌هایی تک عملی بودند که از قبیل آنزیم‌های کلیدی در تولید عواملی مانند پرولین، بتایین و بعضی از قندها و آنزیم‌هایی که در سم‌زدایی نقش داشتند؛ اما به دلیل پیچیده بودن و مؤثر بودن تعداد زیادی ژن در فرآیند تحمل به تنش خشکی، پژوهشگران در ادامه سعی کردند از ژن‌هایی استفاده کنند که نقش تنظیمی دارند و تحت شرایط تنش بیان می‌شوند مانند عوامل رونویسی که می‌توانند در تنظیم بیان چندین ژن دخالت داشته باشند / اینگرام و بارتلس (Ingram and Bartels, 1996). عوامل رونویسی WRKY از بزرگ‌ترین خانواده‌های تنظیم‌کننده رونویسی در گیاهان می‌باشند و در تنظیم بسیاری از فرآیندهای زیستی شرکت می‌کنند. این خانواده ژنی در مقاومت به تنش‌های غیرزیستی و زیستی و همچنین مراحل نمو نقش گسترده‌ای دارند. در آراییدوپسیس و برنج نقش این عوامل رونویسی در تحمل به تنش خشکی به اثبات رسیده است راشتون و همکاران (Rushton et al., 2010). دلیل نام‌گذاری این خانواده‌ی ژنی به WRKY وجود ۶۰ اسیدآمینوای است در توالی پروتئین‌های این خانواده هست که در انتهای آمینی این دمین پروتئینی موتیف حفاظت‌شده WRKYGQK وجود دارد راشتون و همکاران؛ یولگم و همکاران (Rushton et al., 1996; Eulgem et al., 2000). همچنین در انتهای کربوکسیلی این دمین، ساختار انگشت‌روی حاوی اسیدآمینوهای سیستمین و هیستیدین به‌صورت حفاظت‌شده وجود دارد یولگم و همکاران (2000) ساختار انگشت‌روی به فرم‌های Cys2-His/Cys و Cys2-His2 وجود دارند. موتیف WRKYGQK و ساختار انگشت‌روی برای اتصال به عناصر سیس (cis element) W ضروری می‌باشند. حضور توالی حفاظت‌شده W(TTGACT/C) روی شیار بزرگ DNA و در پروموتور ژن‌های هدف توسط عوامل رونویسی WRKY

شناسایی شده و پس از اتصال به آن‌ها موجب تنظیم بیان ژن‌های موردنظر می‌گردند یولگم و همکاران (2000) راشتون و همکاران (2010). این خانواده‌ی ژنی بر مبنای تعداد دمین WRKY و خصوصیات موتیف انگشت‌روی آن‌ها به سه گروه تقسیم می‌شوند. گروه I دارای دو دمین WRKY و گروه II و III دارای یک دمین WRKY می‌باشند، ساختار انگشت‌روی در گروه III با گروه‌های I و II متفاوت است به‌طوری‌که این موتیف در گروه III به‌صورت Cys2-His/Cys و در گروه‌های I و II به‌صورت Cys2-His2 می‌باشد. گروه II نیز بر مبنای تفاوت ساختار در دمین WRKY نیز به زیرگروه‌های IIa تا IIe تقسیم‌بندی می‌شوند. از دو دمین موجود در گروه اول فقط یکی از دمین‌ها (دمین موجود در انتهای کربوکسیلی) کار شناسایی توالی W را بر عهده دارد و دمین دیگر (انتهای آمینی) آن به اختصاصی بودن اتصال کمک می‌کند در واقع دمین انتهای کربوکسیلی گروه I عملکرد مشابهی با دمین WRKY پروتئین‌های گروه II و III دارد یولگم و همکاران (2000). در این مطالعه تلاش شده است اعضای خانواده ژنی WRKY در گندم شناسایی، طبقه‌بندی و مورد تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی قرار گیرند و در نهایت با بررسی الگوی بیان آن‌ها به ژن‌های کاندید این خانواده که در فرآیند تنش خشکی درگیر هستند مشخص شوند.

روش

شناسایی اعضای خانواده پروتئینی با استفاده از پایگاه‌های اطلاعاتی مرتبط

ابتدا با استفاده از داده‌های جمع‌آوری‌شده در پایگاه‌های اطلاعاتی مرتبط با عوامل رونویسی در گیاه مانند PlantTFDB, GramineaeTFDB, Graingenes, جستجو شروع شد. جستجو در پایگاه‌های اطلاعاتی مهم و اساسی مرتبط مانند EMBL, TriFLDB و NCBI انجام شد. تمام توالی نوکلئوتیدی و پروتئینی اعضای خانواده‌ی WRKY ثبت شد.

جهت جلوگیری از ثبت تکراری توالی‌های مشابه گزارش‌شده برای هر ژن، توالی‌های یافت شده در پایگاه‌های مختلف، در NCBI جستجو شدند تا یونیچین توالی در صورت وجود پیدا شود. انواع رونوشت‌های گزارش‌شده یک ژن (اعم از mRNA, cDNA, EST) در یک یونیچین جمع‌آوری شده است. در صورت عدم وجود یونیچین، موارد تکراری از طریق هم‌ردیفی، شناسایی و تلفیق شدند.

رسم شد و مناطق مشابه و حفظ شده هر گروه توسط نرم افزارهای BioEdit و MEME مشخص شد.

به دست آوردن داده‌های بیان از پایگاه‌های ذخیره‌کننده داده

جهت به دست آوردن داده‌های بیانی اعضای خانواده ژنی در شرایط تنش و به خصوص تنش خشکی از پایگاه‌های داده‌ای GEO NCBI، GENEVESTIGATOR، PLEXDB استفاده شد. در پایگاه‌های اطلاعاتی PLEXDB و GEO NCBI توالی‌های نوکلئوتیدی خانواده ژنی WRKY، علیه داده‌های نوکلئوتیدی کاوشگرهای موجود blast شده و پس از شناسایی کاوشگرها تغییرات بیان ژن مورد نظر در داده‌های موجود برای آزمایش‌های مربوط به تنش خشکی بررسی گردید. در پایگاه اطلاعاتی GENEVESTIGATOR با استفاده از شماره‌های شناسایی یونینجین ابتدا شماره شناسایی کاوشگر به دست آمده و سپس آزمایش‌های مربوط به این کاوشگرها و تفاوت بیان آن‌ها بررسی شد.

نتایج و بحث

شناسایی اعضاء خانواده‌ی ژنی WRKY

در این بررسی ۹۴ عضو پیدا شد (جدول ۱)، برای ۷۶ عضو پیدا شده ساختار حفظ شده خانواده WRKY به طور کامل وجود داشت و برای دیگر اعضاء، توالی کامل پروتئین پیدا نشد.

در زمان انجام این پژوهش، در پایگاه PlantTFDB، ۵۵ عضو و در پایگاه GramineaTFDB، ۳۶ عضو خانواده ژنی WRKY گندم معرفی شده بودند.

در این مطالعه به دلیل قرابت ژنتیکی گندم به برنج و همچنین تک‌لپه‌ای بودن هر دو گیاه، از توالی‌های پروتئینی حفاظت شده هر کدام از زیرگروه‌های برنج (وو و همکاران، ۲۰۰۵) برای پیدا کردن اعضاء جدید خانواده WRKY در گندم استفاده شد. در پایگاه‌های اطلاعاتی، توالی‌های نوکلئوتیدی بسیار بیشتری نسبت به توالی‌های پروتئینی موجود می‌باشد؛ بنابراین برای پیدا کردن اعضاء جدید اطلاعات بیشتری را در دسترس قرار می‌دهند، از طرفی چون برای پیدا کردن اعضاء جدید و داشتن عملکرد مشابه نیاز به توالی حفاظت شده پروتئین می‌باشد، استفاده از نرم افزار tblastn برای پیدا کردن اعضاء جدید از میان توالی‌های نوکلئوتیدی با استفاده از توالی‌های حفاظت شده پروتئینی منطقی به نظر می‌رسد. در پیدا کردن اعضاء خانواده ژنی WRKY داشتن ساختار حفاظت شده WRKYGQK و توالی انگشت روی به دقت بررسی و تأیید

tblastn براساس توالی‌های حفاظت شده در برنج

با استفاده از توالی‌های حفاظت شده‌ی اعضای خانواده WRKY در گیاه برنج وو و همکاران (Wu *et al.*, 2005)، tblastn علیه داده‌های نوکلئوتیدی گندم در پایگاه داده‌های est، nr و HTGS بانک اطلاعاتی NCBI انجام شد. دمین‌های حفاظت شده WRKY (Consensus) تمامی زیرگروه‌های خانواده پروتئینی برنج (JaC، JaN، Jb، Ja، Jc، Jd، Id، Ia، Ib و IIIb) در tblastn مورد استفاده قرار گرفت. آستانه خطا در این روش $Evalue \leq 10^{-5}$ در نظر گرفته شد. جهت تشخیص اعضاء خانواده WRKY وجود ساختار حفاظت شده و کلیدی این خانواده به عنوان شاخص استفاده شد؛ یعنی توالی‌های پیدا شده در صورت داشتن ساختارهای حفاظتی خانواده پروتئینی WRKY مثل WRKYGQK و انگشت روی (Cx₄₋₅Cx₂₂₋₂₃HxH یا Cx₇Cx₂₃HxC) به عنوان توالی‌های جدید ثبت شدند.

پیدا کردن ORF و ترجمه توالی‌های بدون پروتئین

برای مشخص کردن ORF و ترجمه آن (در مورد توالی‌هایی که پروتئینی برای آن‌ها ثبت نشده است مثل ESTها و برخی cDNAها) از ۳ طریق عمل شد: ۱- نرم افزار DNA STAR (Edit seq) ۲- نرم افزار ORF Finder موجود در پایگاه اطلاعاتی NCBI ۳- همپوشانی ESTهای موجود در ESTAnnotator در پایگاه اطلاعاتی TIGR (Plant Gene Indices).

بررسی وجود دمین WRKY در تمامی توالی‌های پروتئینی در پایگاه اطلاعاتی SMART

تمامی توالی‌های پروتئینی به دست آمده جهت اثبات وجود دمین WRKY در پایگاه SMART مورد بررسی قرار گرفتند.

طبقه‌بندی و مطالعات فیلوژنتیک

دمین‌های WRKY تمامی اعضاء توسط نرم افزار MEGA4 تامورا و همکاران (Tamura *et al.*, 2007) هم‌ردیف شدند و درخت فیلوژنتیکی براساس روش اتصال همسایه رسم شد. هم‌ردیفی بر مبنای ماتریکس وزنی Gonnet انجام شد. شاخص Bootstrap در این روش پس از ۱۰۰۰ بار تکرار مشخص گردید. علاوه بر گزارش‌های موجود، تعیین مناطق حفاظت شده هر گروه و زیرگروه که شاخص تعیین کننده هر گروه و یا زیرگروه مورد نظر می‌باشد، مجدداً مورد بررسی قرار گرفت. همه اعضاء خانواده WRKY با توجه به گروه‌بندی که در درخت فیلوژنتیک بود مرتب شدند و نمای گرافیکی آن‌ها توسط نرم افزار BioEdit

کربوکسیلی WRKY این گروه از ژن‌ها با پسوند C (برای مثال TaWRKY4C) مشخص شده‌اند؛ اما در این بین ژن‌های TaWRKY66، TaWRKY75، TaWRKY56، TaWRKY43، TaWRKY51 و TaWRKY1 دارای یک دمین هستند ولی در گروه I قرار گرفته‌اند (پسوند N یا C ندارند) و نشان‌دهنده این است که یا ارتباط تکاملی نزدیکی با گروه I دارند یا توالی آن‌ها به‌طور کامل کشف نشده است. ژن‌های TaWRKY66، TaWRKY75 و TaWRKY43 توالی EST هستند که احتمالاً به دلیل ناقص بودن توالی فقط یکی از دو دمین WRKY موجود در ژن شناسایی شده است. ژن TaWRKY56 از داده‌های پروژه توالی‌یابی ژنوم در حال انجام (HTGS) به‌دست آمده است و احتمال ناقص بودن این ژن به دلیل عدم شناسایی تمام توالی آن زیاد است. در مطالعاتی که بر روی آرآبیدوپسیس و گوجه-فرنگی صورت گرفته است نشان داده شده است که بعضی از ژن‌ها مثل AtWRKY10 فقط دارای یک دمین می‌باشد اما در گروه‌بندی این ژن در گروه ژن‌های دو دمینی (گروه I) قرار گرفته است یولگم و همکاران (2000). توالی‌های TaWRKY51 و TaWRKY1 باوجود اینکه تک دمینی هستند اما به دلیل شباهت زیاد توالی در دمین WRKY به گروه I، در این گروه قرار گرفته‌اند؛ بنابراین به دلیل قرابت ژنتیکی بالای این دو ژن با دمین کربوکسیلی ژن‌های گروه I می‌توان نتیجه گرفت، این دو ژن در طی دوران تکامل دمین انتهایی آمینی خود را از دست داده‌اند (شکل ۱ و ۲). ژانگ و همکاران نیز در طی تحقیقاتی به ایجاد و تکامل گروه II از گروه I به دلیل از دست رفتن دمین انتهایی آمینی (N) اذعان کرد و نتایج نشان داد که گروه II از تکامل دمین کربوکسیلی (C) گروه I ایجاد شده‌اند (ژانگ و ونگ، 2005). در پروتئین‌های گروه I دمین کربوکسیلی کار اتصال به DNA و دمین آمینی به تخصصی بودن این اتصال کمک می‌کند، بنابراین به دلیل ماهیت یک عامل رونویسی مبنی بر اتصال به DNA، تکامل گروه II از دمین کربوکسیلی منطقی است. در نتایج به‌دست آمده با توجه به شکل ۱ اعضای متعلق به گروه II از نظر فیلوژنتیکی و تکاملی به گروه I-C نزدیک‌ترند که نظریه‌های فوق را تأیید می‌کند (راشتون و همکاران، 2010). با توجه به اینکه گروه‌های II و III تک‌دمینی هستند برای جداسازی و مشخص کردن آن‌ها از یکدیگر تفاوت ساختار انگشت روی آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت، به این صورت که مطابق منابع قبلی ژانگ و ونگ (2005) و راشتون و همکاران (2008) توالی-های دارای ساختار انگشت روی CX7CX23HxC در گروه III و توالی‌هایی که دارای ساختار انگشت روی CX4-5CX22-23HxH نشان داده شده‌اند و دمین انتهایی

شد. شایان‌ذکر است دلیل انتخاب توالی‌های ناقص گزارش شده به‌عنوان اعضای این خانواده، دارا بودن موتیف WRKYGQK و شباهت زیاد ساختاری ($Evalue \leq e^{-5}$) با توالی‌های WRKY و یا ثبت در پایگاه NCBI به‌نام WRKY بوده است.

بررسی فیلوژنتیکی

ژن‌های تنظیم‌کننده‌ی بیان به فراوانی در ژنوم گیاهان و جانوران حضور دارند و تنوع و تکامل یوکاریوت‌ها مربوط به گسترش و تکامل انواع خاص ژن‌های تنظیم‌کننده بیان می‌باشد ریچمن و همکاران (Riechmann et al., 2000). روند تکاملی خانواده WRKY از موجودات تک‌سلولی به سمت موجودات پرسلولی می‌باشد. گیاهان گل‌دار در مقایسه با مخروطیان، سرخس‌ها و خزها دارای بزرگ‌ترین خانواده ژنی WRKY هستند که این عوامل رونویسی نقش تنظیمی بسیار مهمی را در گیاهان گل‌دار بازی می‌کنند. براساس مطالعات صورت گرفته در جلبک کلامیدوموناس رین‌هاردتی به‌عنوان یک گیاه پست که قرابت ژنتیکی فراوانی با اجداد گیاهی دارد فقط یک ژن WRKY وجود دارد که این ژن جزء گروه I می‌باشد (دارای دو دمین WRKY) و نشان‌دهنده‌ی این است که گروه I جد واقعی خانواده‌ی WRKY می‌باشد و دیگر گروه‌های این خانواده از تکامل گروه اول حاصل شده‌اند. جستجو بر مبنای اطلاعات موجود در GeneBank نشان می‌دهد ژن‌های WRKY مشابه گروه I در دو یوکاریوت غیرفتوسنتزکننده یکی در کپک دیکتیوستلیوم دیسکویدوم (شماره‌ی شناسایی: AA052331) و دیگری در یک تک‌یاخته‌ای به نام ژیاردیا لامبلیا (شماره‌ی شناسایی: EAA40901) وجود دارد و به‌طور مهم مؤید این فرضیه می‌باشد که جد واقعی ژن‌های WRKY گروه I می‌باشد و قبل از اینکه ژن‌های WRKY وارد سلسله گیاهی شوند، حدود یک و نیم تا دو میلیارد سال پیش از یوکاریوت‌های اولیه منشأ گرفته‌اند، اما اینکه چگونه به‌طور گسترده‌ای در گیاهان گسترش یافته‌اند و در مخمرها و در سلسله‌ی جانوری وجود ندارند مشخص نیست آلکر و سامسیچ (Ulker and Somssich, 2004). در این مطالعه همانند گروه‌بندی برنج (وو و همکاران، 2005) اعضای که دارای دو دمین WRKY بودند، دمین‌های انتهایی آمینی و کربوکسیلی آن‌ها به‌طور جداگانه هم‌ردیف شدند و سپس درخت فیلوژنتیکی آن‌ها رسم شد (شکل ۱) در این مطالعه طبق منابع علمی ژانگ و ونگ (Zhang and Wang, 2005) همه‌ی اعضا دارای دو دمین WRKY در گروه I قرار گرفتند (۱۶ عضو از کلیه‌ی اعضای گندم). دمین‌های WRKY انتهایی آمینی در این گروه با پسوند N (برای مثال TaWRKY27N) نشان داده شده‌اند و دمین انتهایی

مبنی بر اینکه گروه III در گندم همانند برنج به دلیل سازگاری این گیاه با شرایط و فشارهای محیطی حفاظت شده‌اند.

تجزیه و تحلیل داده‌های بیانی موجود در پایگاه‌های

داده‌ای

کاوشگرهای ریزآرایه از پایگاه‌های اطلاعاتی GENEVESTIGATOR و PLEXdb به دست آمد (جدول ۲). در میان پایگاه‌های اطلاعاتی که برای آنالیز بیان مورد بررسی قرار گرفته بود، پایگاه PLEXdb کامل‌ترین اطلاعات مربوط به آزمایش‌های بیانی بر مبنای داده‌های ریزآرایه را دارا بود. مطلوب‌ترین آزمایش ثبت شده در پایگاه PLEXdb مربوط به آزمایش *کادم* و همکاران (Kadam et al., 2012) بود بدین ترتیب که برای تعیین و بررسی نقشه‌ی لینکاژی مولکولی از ۱۷۳ نشانگر مولکولی که بر روی ۲۱ کروموزوم گندم قرار داشت استفاده شد. در طی دو سال عملکرد محصول و دیگر صفات پاسخ‌دهنده به خشکی و بیان ژن‌های آن‌ها در وارپته‌های متحمل به خشکی (WL711) و حساس (C306) و ترکیب اینبرید لاین‌های (RILs) حاصل از WL711 و C306 در شرایط خشکی و شاهد مورد بررسی قرار گرفت؛ بنابراین باید به دنبال ژن‌هایی بود که در رقم‌های حساس و مقاوم بیان افتراقی داشته‌اند و بتوان آن‌ها را به‌عنوان ژن‌های کاندید درگیر با تنش خشکی انتخاب کرد.

جدول ۳ که بر مبنای آزمایش *کادم* و همکاران از پایگاه PLEXdb به دست آمده است تفاوت بیان را در ۷ عضو این خانواده نشان می‌دهد. در این آزمایش تغییرات بیان ژن‌ها در سطح ۰/۰۱ درصد معنی‌دار می‌باشد.

با توجه به جدول ۳، ژن‌های *TaWRKY45* و *TaWRKY10* هم در وارپته‌ی متحمل (C306) و هم در وارپته‌ی حساس (WL711) افزایش بیان نشان داده‌اند اما نسبت افزایش بیان وارپته متحمل (C306) در شرایط خشکی نسبت به وارپته‌ی حساس (WL711) بیشتر است به طوری که افزایش بیان آن‌ها نسبت به وارپته حساس به ترتیب ۵/۱ و ۱۱ برابر می‌باشد. این مقادیر نشان می‌دهد از میان ۲ ژن مذکور، ژن *TaWRKY45* افزایش بیان شدیدی در وارپته متحمل (C306) نسبت به وارپته‌ی حساس (WL711) در شرایط خشکی دارد به طوری که وارپته‌ی حساس افزایش بیان ۱/۵ برابری داشته در حالی که در وارپته متحمل افزایش بیان ۱۶/۶ برابری مشاهده شده است. در ژن‌های *TaWRKY41*، *TaWRKY8*، *TaWRKY19*، *TaWRKY22* و *TaWRKY15* روند بیان ژن در دو وارپته حساس و متحمل کاملاً برعکس است به این ترتیب که در شرایط تنش خشکی ژن‌های مذکور در وارپته‌ی متحمل

می‌باشند در گروه I و II قرار گرفتند. گروه II نیز در برنج به چهار زیرگروه IIa، IIb، IIc و IId تقسیم‌بندی می‌شوند (وو و همکاران، 2005). توالی‌های گروه II در این مطالعه به زیرگروه‌های IIa، IIb، IIc، IId و IIe تقسیم شدند. در گروه‌بندی زیرگروه‌های گروه II به ترتیب ۶، ۱۳، ۱۱، ۵ و ۲ عضو در زیرگروه‌های IIa، IIb، IIc، IId و IIe قرار گرفتند. توالی‌های *TaWRKY12* و *TaWRKY6* از نظر مناطق کلیدی و حفظ شده تشابه کمی به زیرگروه‌های برنج داشتند بنابراین در گروه جداگانه‌ای به نام IIe قرار گرفتند. می‌توان گفت به دلیل اینکه زیرگروه IIb قرابت ژنتیکی نزدیک‌تری نسبت به گروه I دارد بنابراین احتمالاً اولین ژن‌های تکامل‌یافته گروه II از گروه I زیرگروه IIb باشند. با توجه به شکل ۱ به نظر می‌رسد در میان زیرگروه‌های گروه II، زیرگروه IIa بعد از زیرگروه‌های دیگر گروه II ایجاد شده است.

حدود ۲۰ درصد از ژن‌های خانواده‌ی ژنی *WRKY* در گیاهان عالی مربوط به گروه III می‌باشند در حالی که اعضای این گروه در خزهی فیسکومتراپانتز وجود ندارد و نشان‌دهنده این است که این گروه از ژن‌های *WRKY* در طی دوران تکامل بعد از گروه‌های I و II به وجود آمده‌اند *دنگ* و همکاران؛ *کالد* و همکاران (Dong et al., 2003; Kalde et al., 2003). گروه III فقط در گیاهان عالی وجود دارند بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که این گروه از ژن‌های خانواده *WRKY* در اثر مضاعف ایجاد شده‌اند و به دلیل ایفای نقش در تحمل فشارهای محیطی و تنش‌های وارده بر گیاه انتخاب شده‌اند. ژن‌های گروه III نقش بسیار مهمی را در تک‌لپه‌ای‌ها بازی می‌کنند، این گروه از نظر تکاملی پیشرفته‌ترین گروه خانواده *WRKY* به حساب می‌آید و موجب سازگاری گیاه می‌شود *ژانگ* و *وانگ* (2005). گروه III در برنج نسبت به آرابیدوپسیس از نظر تکاملی بسیار فعال‌تر می‌باشند، زیرا در توالی‌های گروه III برنج مضاعف پی‌درپی دیده می‌شود *یوگلم* و همکاران (2000). گروه III در برنج به دو زیرگروه IIIa و IIIb تقسیم‌بندی می‌شود (وو و همکاران، 2005). در نتایج به دست آمده با توجه به شکل‌های ۱ و ۲، ۲۲ عضو از خانواده‌ی *WRKY* گندم در گروه III قرار گرفتند که ۱۰ عضو در زیرگروه IIIa و ۱۲ عضو در زیرگروه IIIb می‌باشند. با توجه به نتایج به دست آمده در شکل ۱ در گندم گروه III در دوران تکامل بعد از گروه II ایجاد شده‌اند و این گروه نسبت به گروه II قرابت ژنتیکی کمتری نسبت به گروه I به‌عنوان جد خانواده‌ی *WRKY* دارد (فاصله بیشتر این گروه از گروه I در درخت فیلوژنتیکی) و این دستاورد نشان‌دهنده‌ی تأیید مباحث

همکاران؛ کالد و همکاران (2003). براساس داده‌های به‌دست آمده (جدول ۳) از میان ۷ عضو پاسخ‌دهنده به تنش خشکی، ۴ عضو از آن‌ها مربوط به گروه III خانواده‌ی ژنی *WRKY* می‌باشند که نقش گروه III را در تحمل به تنش‌ها تأیید می‌کند. با توجه به گفته‌های قبلی ژن‌های جدول ۲ را می‌توان به‌عنوان ژن‌های کاندید در تحمل به تنش خشکی انتخاب کرد و از آن‌ها در جهت بهبود و اصلاح گندم با استفاده از راهکارهای نوین مهندسی ژنتیک بهره برد.

(C306) افزایش بیان داشته‌اند و در وارپته‌ی حساس (WL711) روند کاهش بیان را طی کرده‌اند. جالب توجه است که روند مشابه بیان ژن‌های *TaWRKY10* و *TaWRKY45* و قرار گرفتن در زیرگروه IIIb نشان‌دهنده‌ی ارتباط تکاملی آن‌ها و احتمالاً نقش مشابه آن‌ها در مسیرها و فرآیندهای بیوشیمیایی می‌باشد. همان‌طور که پیش از این ذکر شد که گروه III بعد از گروه‌های I و II به‌وجود آمده و در نتیجه ایفای نقش در پاسخ به تنش‌ها و سازگاری در طی تکامل حفظ شده‌اند د/نگ و

منابع:

جهت مطالعه منابع به صفحه‌های ۱۱-۱۲ متن انگلیسی مراجعه شود.