بررسی الگوی الکتروفورزی، فعالیت آنزیمهای ریبونوکلئازی و مطالعه ژن ریبونوکلئاز S در خامه‌های خود و دگرتلقیح رقمهای زراعی 'Bravo cool water mix' و 'Bravo purple star' گیاه اطلسی

حکیمه علومی[۱ و ۲،*]، فرخنده رضانژاد[۲] و حسین علی ساسان[۲]

[۱] کرمان، پردیس دانش ماهان، مرکز بین‌المللی علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، پژوهشکده علوم محیطی، گروه اکولوژی

[۲] کرمان، دانشگاه شهید باهنر، دانشکده علوم، بخش زیست شناسی

تاریخ دریافت: ۸۸/۹/۲۹ تاریخ پذیرش: ۸۹/۱۱/۲۴

چکیده

درگیاه اطلسی، خودناسازگاری توسط گلیکوپروتئینهای خامه‌ای کنترل می‌شود. این گلیکوپروتئینها دارای فعالیت ریبونوکلئازی می‌باشند. در این مطالعه، پس از گرده‌افشانی مادگی رقم زراعی خودناسازگار Bravo purple star و رقم زراعی خودسازگار Bravo cool water mix اطلسی با گرده‌های خودی و غیرخودی، فعالیت ریبونوکلئازهای خامه به روش اسپکتروفتومتری و ایزوآنزیمهای ریبونوکلئازهای خامه به روش PAGE مورد بررسی قرار گرفت. همچنین میزان بیان ژن ریبونوکلئاز S در خامه خود و دگرتلقیح این رقمها بررسی شد. به دلیل اهمیت نوع آلل S در بروز برهمکنشهای ناسازگار، آلل S هر رقم نیز مورد شناسایی قرار گرفت. فعالیت ریبونوکلئازهای کل در خامه خودتلقیح رقم Bravo purple star در مقایسه با سایر نمونه‌ها بیشتر بود. الگوی الکتروفورزی ریبونوکلئازها در خامه‌های دو رقم مورد مطالعه تفاوت نشان داد. فعالیت باند ریبونوکلئاز RNase 3، تنها در خامه خودتلقیح و با شدت کمتر در خامه دگرتلقیح رقم Bravo purple star، مشاهده شد. نتایج نشان داد که ژن S-RNase، در خامه‌های خود و دگرتلقیح هر دو رقم زراعی خودناسازگار و خودسازگار و با شدت بیشتر در خامه خودتلقیح رقم خودناسازگار بیان می‌شود. مقایسه توالی به دست آمده با سایر توالی‌های موجود، نشان دهنده ۱۰۰ درصد شباهت بین قطعه تکثیر شده در رقم Bravo purple star با آلل S_3-RNase گیاه *Petunia hybrida* زیرگونه inflata بود. همچنین، بین توالی بازهای قطعه تکثیر شده رقم Bravo cool water mix با آلل S_1-RNase گیاه *Petunia hybrida* ۱۰۰درصد شباهت وجود داشت.

واژه های کلیدی: اطلسی، بیان ژن، خودتلقیحی، خودناسازگاری، دگرتلقیحی، ریبونوکلئاز S.

* نویسنده مسئول، تلفن : ۰۳۴۲-۶۲۲۶۶۱۱ پست الکترونیکی:oloumi.ha@gmail.com

مقدمه

در گیاهان شیوه‌های زیادی برای ممانعت از خودباروری وجود دارد. یکی از این روشها، خودناسازگاری می‌باشد. امروزه خودناسازگاری به صورت مهم‌ترین و گسترده‌ترین مکانیسم برای تشویق برون‌زادی (Out-breeding) در گیاهان گل‌دار تعریف می‌شود. خودناسازگاری یک سیستم بازشناسی گرده–مادگی، براساس ژنتیک می‌باشد که خود و دگرباروری را بین افراد با تیپ ناسازگاری مشابه ممانعت می‌کند (۱۰).

در خودناسازگاری گامتوفیتی خامه‌ای (GSI) که در تیره‌های سیب زمینی، نخود، رز و میمون دیده شده، اگر هاپلوتیپ گرده با یکی از هاپلوتیپ‌های مادگی جور شود، گرده به عنوان گرده خودی شناخته شده و رشد لوله آن در خامه متوقف می‌شود. گرده‌ای که هاپلوتیپ متفاوت از

Archive of SID
www.SID.ir

هاپلوتیپ مادگی را داشته باشد به عنوان گرده غیرخودی شناخته شده و لوله آن اجازه رشد درون مادگی را پیدا می‌کند. مطالعات مولکولی متعددی برای جواب به این سوالات که چطور گرده غیرخودی و خودی توسط مادگی تشخیص داده می‌شود و بازشناسی گرده خودی چگونه منجر به مهار رشد لوله گرده می‌شود، انجام گرفته است (۱۱). مطالعات نشان داده است که محصول خامه‌ای لوکوس خودناسازگاری (لوکوس S) در سیستم GSI خامه‌ای، ریبونوکلئازهای ویژه S هستند. محصول آللهای S، گلیکوپروتئین با ویژگی ریبونوکلئازی بوده و تجزیه RNA گرده مرتبط با آلل S، پس از گرده‌افشانی ناسازگار رخ می‌دهد. مشخص شده که پروتئینهای S، برای رد گرده خودی در خامه ضروری و کافی می‌باشند (۱۲).

مطالعات نشان داده است که این گلیکوپروتئین در بخش خامه‌ای یعنی جایی‌که مهار رشد لوله گرده انجام می‌گیرد، با غلظتهای بالاتر بیان می‌شود. مقایسه cDNA کدکننده آللهای S در *Nicotiana alata* نشان‌دهنده تنها ۶۵ درصد شباهت آمینواسیدها در بین بخشهای مختلف آلل بود (۱۸). توالی پروتئینهای S در هاپلوتیپ‌های متفاوت گیاهان خودناسازگار، به طور غیرمعمولی متنوع بوده و شباهت آمینواسیدها بین پروتئینهای S بین ۳۸ درصد تا ۹۸ درصد متغیر می‌باشد (۲۳). این گلیکوپروتئین با وزن مولکولی حدود ۳۲ کیلودالتون، دارای حداقل دو بخش اصلی شامل ناحیه حفاظت شده (C: Conserved region) و نواحی بسیار متغیر (HV: Hyper variable region) است. هرگونه برهمکنش بین این پروتئین و گرده یا لوله گرده به احتمال با دخالت سطح پروتئین می‌باشد (۱۸ و ۲۵).

تنوع بین آللها در کل توالی گلیکوپروتئین مشاهده می‌شود اما این تنوع در نواحی بسیار متغیر (HV) که بین پنج توالی حفاظت شده (C1-C5) قرارگرفته‌اند، تمرکز بیشتری نشان می‌دهد. به نظر می‌رسد که دو ناحیه HVa و HVb که تنوع آللی بالایی دارند و آبدوست می‌باشند، در سطح مولکول قرار گرفته و به طور مستقیم در بازشناسی ریبونوکلئاز S با بخش اختصاصی گرده درگیر باشند (۱۷).

فعالیت ریبونوکلئازی مرتبط با گلیکوپروتئینهای S در *N. alata*، حدود ۸۰ درصد فعالیت ریبونوکلئازی عصاره‌های خامه را نشان می‌دهد (۲۰). همچنین مشخص شده است که تجزیه RNA گرده وابسته به آلل S، پس از ورود ریبونوکلئاز به لوله گرده و بازشناسی آن در شرایط "در زیوه"، رخ می‌دهد. ریبونوکلئاز تنها زمانی فعال است که جزء اختصاصی آن با دانه گرده جفت شود (۲۵). ریبونوکلئاز S در سویه‌های خودسازگار (SC: Self-compatible) نیز بیان می‌شود. دیده شده است گونه *Licopersicum peruvianym* دارای افراد خودسازگار و خودناسازگار می‌باشد. نتایج نشان داده است که پروتئین مرتبط با آلل S، در افراد خودسازگار وجود دارد. این پروتئین یک ریبونوکلئاز S غیرفعال بوده که باقیمانده هیستیدینی را در جایگزینی آن با آرژنین، در محل فعال از دست داده است، اما احتمال دارد که تغییراتی غیر از جایگزینی هیستیدین مسئول نقص عملکرد SI می‌باشند (۱۶).

رقمهای متعددی از *P. hybrida* برای اهداف تحقیقاتی و تجاری به وجود آمده است. از تلقیح رقمهای سازگار با رقمهای ناسازگار برای مطالعه اساس ژنتیکی خودناسازگاری استفاده می‌شود. مانند سایر گونه‌های تیره بادمجان که تاکنون مطالعه شده‌اند، خودناسازگاری در گیاه *P. hybrida* گامتوفیتی با یک لوکوس S چندآللی می‌باشد (۴ و ۲۶). درطول نمو جوانه گل، گلیکوپروتئینهای S در نیمه بالایی خامه تجمع می‌یابند و به مقادیر بسیار کم در تخمدان وجود دارند. (۸ و ۲۴).

توالی کامل ژن ریبونوکلئاز S در گیاه *Petunia x hybrida* دارای ۳۲۲۱ جفت باز بوده که ۱۹۰۵ جفت باز در توالی Flanking انتهای '5 و ۵۰۴ جفت باز در توالی حاشیه‌ای انتهای '3 می‌باشد. یک اینترون ۱۱۸ جفت بازی نیز بین

Archive of SID
www.SID.ir

بازهای ۲۱۶۸ و ۲۲۸۵ توالی DNA ریبونوکلئاز S قرار گرفته است (۴). مقایسه توالی cDNA ریبونوکلئاز S بین گیاه اطلسی و توتون، نشان داده است که این پروتئین با حدود ۱۲۲ آمینواسید و وزن مولکولی بین ۲۷ تا ۳۳ کیلودالتون دارای یک توالی نشانه (Signal peptide) و یک توالی حفاظت شده با ۱۵ آمینواسید در ناحیه انتهایی N (N terminus) می‌باشد. پروتئین ریبونوکلئاز S درگیاه اطلسی دارای ۴ توالی حفاظت شده دیگر بوده که به طور تقریبی در ۱۶ درصد کل آمینواسیدها با گیاه توتون مشابه هستند. شباهت توالی پروتئینهای S در محل هشت باقیمانده سیستئینی و ۵ توالی حفاظت شده می‌باشد (۲۰). پروتئین ریبونوکلئاز S دارای دو ناحیه متغیر بوده که در واکنش بازشناسی گرده دخالت دارند که این نواحی متغیر HVa و HVb بین توالیهای حفاظت شده C2 و C3 قرار گرفته‌اند. در تمام گونه‌های این تیره یک محل گلیکوزیله شدن ثابت در پروتئین ریبونوکلئاز S وجود دارد (۵). تعداد کل آللهای S شناخته شده در *P. hybrida* در حدود ۱۰ آلل می‌باشد، در حالی‌که ممکن است آللهای جدیدی نیز در حال تشکیل باشد (۲۴).

در این مطالعه میزان فعالیت ریبونوکلئازهای خامه در رقم خودناسازگار Bravo purple star و رقم خودسازگار Bravo cool water mix گیاه اطلسی (*P. hybrida*) که در ایران کشت می‌شوند پس از خودتلقیحی و دگرتلقیحی در خامه‌ها مقایسه شد. همچنین بیان ژن ریبونوکلئاز S در این خامه مطالعه و آلل S در این رقمها مورد شناسایی قرار گرفت.

مواد و روشها

دانهٔ رقم زراعی خودناسازگار Bravo purple star و رقم زراعی خودسازگار Bravo cool water mix گیاه *P. hybrida* از شرکت Syngenta seeds B.V تهیه و در شرایط مزرعه‌ای کشت داده شدند. پس از گلدهی، گلها مورد مطالعه قرارگرفتند.

شرایط گرده‌افشانی: پس از انجام آزمون زیست پذیری دانه‌های گرده (۱) کلالهٔ ۳۰ گل از هر رقم زراعی با گردهٔ بساکهای تازه شکفته همان گل گرده‌افشانی شدند. همچنین در هر رقم ۳۰ گل نیز با استفاده از گردهٔ پایه‌های سایر رقمها مورد گرده‌افشانی قرارگرفتند. برای جلوگیری از گرده‌افشانی طبیعی در گلهایی که به طور مصنوعی گرده‌افشانی شده بودند، بخش انتهایی گلبرگها با نخ بسته شد.

مطالعه فعالیت ریبونوکلئازها در خامه: استخراج آنزیم: مقدار ۱۰۰ میلی گرم از نمونه‌ها (شامل خامه، گلبرگ و کاسبرگ از رقمهای زراعی خودسازگار و خودناسازگار خودتلقیح و دگرتلقیح) پس از پودر شدن در ازت مایع، در ۱۰۰ میکرولیتر بافر استخراج حل شدند. این بافر شامل سیتریک اسید ۱۵۰ میلی مولار و PMSF ۰/۱ میلی مولار (pH=۳) می‌باشد (۲). این بافر نوارهای بیشتری از RNase را نسبت به بافرهای با pH خنثی نشان می‌دهد (۲۹). پس از سانتریفیوژ به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد، عصاره تا زمان استفاده در دمای ۷۰- درجه سانتی گراد نگهداری گردید (۲۹).

از روش اسپکتروفتومتری برای تعیین فعالیت ریبونوکلئازی استفاده شد. مقدار ۲۰ میکرولیتر از آنزیم استخراج شده به ۲۰۰ میکرولیتر بافر هضم شامل K_3PO_4 ۰/۱ مولار با pH= ۷، و KCl ۰/۰۵ مولار که حاوی ۴ میلی گرم در لیتر RNA مخمر *Torulopsis utilis* (torula yeast RNA, Sigma, USA) بود، اضافه شد. در لوله آزمایش کنترل که به عنوان نمونه مرجع استفاده می‌شود، واکنش بی‌درنگ با اضافه کردن ۵۵µL تری کلرواستیک اسید ۲۰ درصد سرد شده در یخ، متوقف شد و سپس نمونه در یخ قرار گرفت. سایر نمونه‌ها برای انجام واکنش به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرارگرفتند. سپس به منظور متوقف ساختن واکنش، نمونه‌ها همراه با نمونه کنترل به مدت ۱۰ دقیقه در یخ قرارگرفتند و بعد در ۱۳۰۰۰ دور

Archive of SID
www.SID.ir

برای ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شدند. تفاضل جذب نمونه‌ها نسبت به نمونه کنترل (که واکنش آن بی‌درنگ پس از اضافه نمودن عصاره، با اضافه نمودن TCA سرد وگذاشتن در یخ متوقف شده بود) در ۲۶۰nm محاسبه شد. فعالیت ریبونوکلئاز به صورت افزایش در جذب در ۲۶۰nm نمونه‌ها نسبت به کنترل، پس از یک دقیقه انجام واکنش به ازای میلی‌گرم پروتئین موجود در بافر موجود در ۲۰۰ میکرولیتر عصاره محاسبه و به صورت واحد آنزیم در میلی‌گرم پروتئین بیان شد (۱۹).

مطالعه الگوی ایزوآنزیمهای ریبونوکلئاز به روش PAGE (۶): از ژل تفکیک کننده ۱۲/۵ درصد (حاوی۲/۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر RNA مخمر *Torulosis utilis*، pH=۹) و ژل متراکم کننده ۳/۷۵ درصد (pH=۶/۸) در دستگاه الکتروفورز عمودی (Universal, USA، از شرکت BioRad) و محلول پایه بافر الکترود (۱/۹۲M Glycin، ۰/۲۵M Tris، pH=۸/۳) حاوی RNA۰/۳ mg/ml مخمر ، جهت جداسازی پروتئینها ومطالعه الگوی ایزوآنزیمهای ریبونوکلئاز استفاده شد. برای برقراری جریان الکتریسیته از منبع تغذیه (BioRad, PowerPac^{TM} Universal, USA) و شدت جریان ۸۰ میلی آمپر استفاده گردید.

معادل حجم نمونه (۲۰ میکرولیتر)، بافر نمونه (گلیسرول ۱۰ درصد و برموفنل بلو ۰/۰۲۵ درصد در بافر Tris-HCl با pH=۶/۸) به هر عصاره پروتئینی قبل از انجام الکتروفورز اضافه گردید. پس از تزریق ۴۰ میکرولیتر پروتئین به درون چاهک، جریان الکتریکی به مخزن پرشده از بافر الکترود وصل شد و سپس جریان الکتریکی برقرار شد. بعد از اتمام الکتروفورز، ژلها در محلول Tris-HCl ۰/۱ مولار به مدت ۵۰ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفته و پس از آن در Tris-HCl ۰/۰۱ مولار به مدت ۱۰ دقیقه شسته شدند. سپس با آبی تولوئیدن O ۰/۲ درصد (w/v) در Tris-HCl ۰/۰۱ مولار به مدت ۱۰ دقیقه قرارگرفتند. ژلها با دو بار شستشو در Tris-HCl ۰/۰۱ مولار به مدت ۱۰ و ۲۰ دقیقه رنگبری شدند. بعد از شستشوی نهایی در گلیسرول ۱۰ درصد (v/v) در Tris-HCl ۰/۰۱ مولار، نوارهای آنزیمی قابل ظاهر شدند (۳).

استخراج RNA کل: خامه‌های گرده‌افشانی شده با گرده خودی و غیرخودی رقمهای Bravo cool water mix و Bravo purple star، ۴۸ ساعت پس از گرده‌افشانی از گل جدا شدند. RNA کل بافت خامه با استفاده از کیت استخراج RNA (QIAGEN, RNeasy Plant Mini Kit, Korea) و طبق روش ذکرشده درکیت، استخراج گردید.

ساخت DNA مکمل و انجام واکنشهای زنجیره‌ای پلیمراز (PCR): برای ساختن DNA مکمل از ۲ میکروگرم RNA به دست آمده از هر نمونه و آغازگر oligo-dt، بر اساس روش Kato و Mukai (۲۰۰۴) (۱۴) در طی واکنشهای زنجیره‌ای پلیمراز استفاده شد. تکثیر cDNA و واکنش PCR، با استفاده از ۲ میکرولیتر آغازگرهای Forward و Reverse (به ترتیب طراحی شده از توالی حفاظت شده شماره ۱ و ۳ پروتئین S-RNase که توالی آنها در زیر آمده است)، ۵ میکرولیتر cDNA و کیت PCR (PCR Premix, BioNEER, Korea) انجام شد شدت باند به دست آمده روی ژل آگارز (آگارز ۱ درصد در بافر TBE، pH=8) با استفاده از نرم‌افزار TotalLab (v 1.10) مورد مقایسه قرار گرفت.

pC1 5'-CAACTCGTGTTAACATGGCCA-3'
pC3 5'-ACAACACGTGCCATGCTT-3'

تعیین توالی: قطعه تکثیر شده ژن ریبونوکلئاز S در واکنشهای PCR، به منظور انجام واکنشهای تخلیص و تعیین توالی، به شرکت MilleGen (Labége, France) ارسال گردید. تعیین توالی توسط دستگاه تعیین توالی Applied Biosystems مدل 3730XL و با استفاده از روش دی‌داکسی (Termination chain dedoxy) انجام شد. سپس به منظور تشخیص آلل S-RNase، ردیف بازهای به

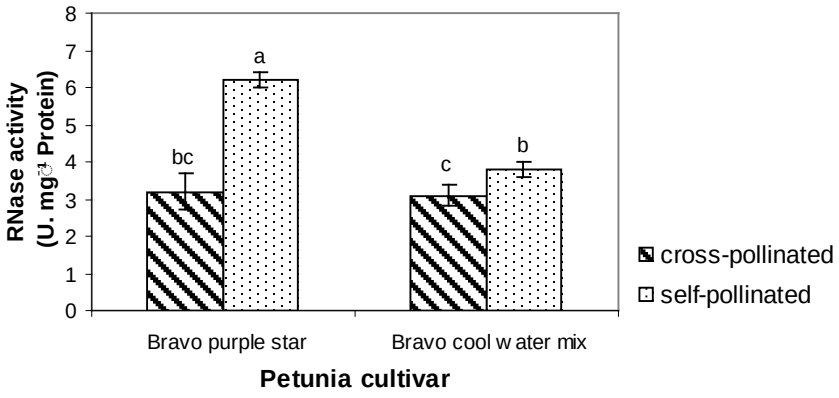
Archive of SID
www.SID.ir

دست آمده در بانک ژنی GeneBank توسط نرم‌افزار Blast مورد مطالعه قرار گرفت.

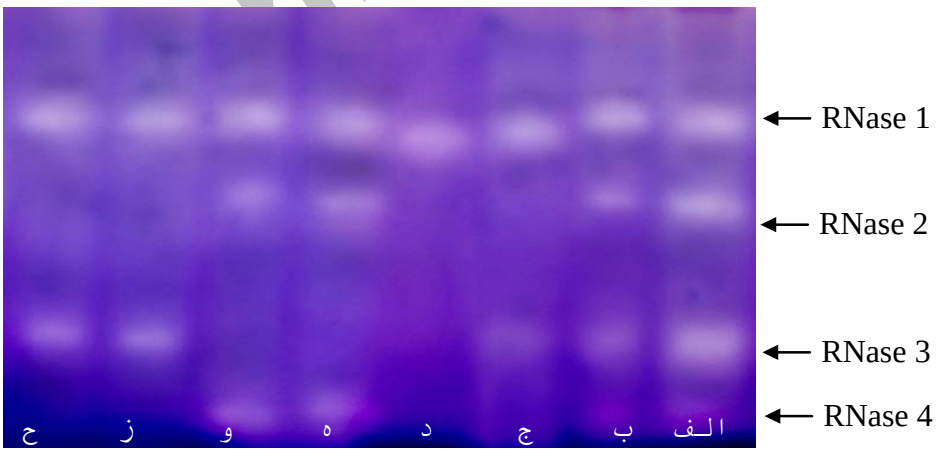
بررسیهای آماری: داده‌های مربوط به شدت بیان ریبونوکلئاز S (به دست آمده از نرم‌افزار TotalLab, v1.10) برای مقایسه شدت نوار DNA از واکنشهای PCR، توسط آزمون T و در سطح معنی‌داری ۹۵ درصد مورد مقایسه قرار گرفت. نمودارها با استفاده از نرم افزار Excel 2003 رسم شد.

نتایج

فعالیت ریبونوکلئازها: نوع گرده‌افشانی بر فعالیت ریبونوکلئازهای خامه مؤثر بود. فعالیت این آنزیم در خامه خودتلقیح هر دو رقم در مقایسه با خامه دگرتلقیح این رقمهای زراعی بیشتر بود. آنزیم RNase در خامه خودتلقیح رقم زراعی Bravo purple star فعالیت بیشتری نسبت به رقم زراعی Bravo cool water mix نشان داد (شکل ۱).



شکل ۱- فعالیت ریبونوکلئاز($U.\ mg^{-1}Protein$) در خامه خودتلقیح و دگرتلقیح رقمهای زراعی Bravo purple star و Bravo cool water mix گیاه اطلسی. داده‌ها شامل میانگین± خطای استاندارد از ۳ تکرار می‌باشند.



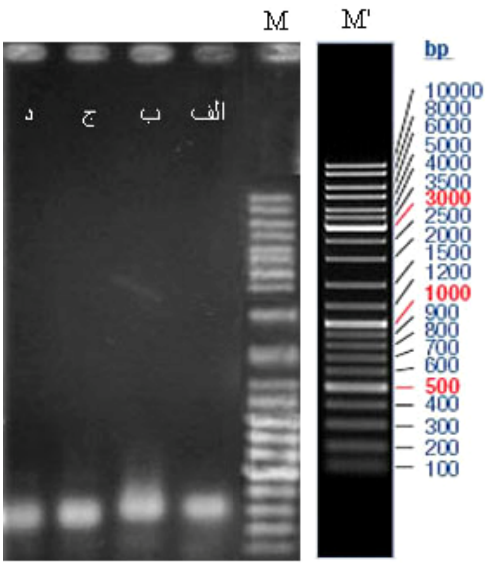
شکل ۲- الگوی ایزوآنزیمی فعالیت ریبونوکلئاز در خامه خودتلقیح و دگرتلقیح، گلبرگ و کاسبرگ (به ترتیب الف، ب، ج و د) رقم زراعی Bravo purple star و خامه خود و دگرتلقیح (به ترتیب ه، و، ز و ح) رقم زراعی Bravo cool water mix. فعالیت بالای باند ریبونوکلئازی RNase 2 و RNase 3 در خامه خودتلقیح رقم Bravo purple star مشاهده شد. ریبونوکلئاز RNase 4 نیز در خامه خود و دگرتلقیح رقم Bravo cool water mix دارای باند قوی‌تری بود.

www.SID.ir

مطالعه فعالیت ریبونوکئازی در ژل، نشان دهنده فعالیت بالای باندهای ریبونوکلئازی RNase2 و RNase3 در خامه خودتلقیح رقم Bravo purple star بود. فعالیت این باندهای ریبونوکلئازی در خامه خود و دگرتلقیح رقم Bravo cool water mix مشاهده نشد. با توجه به الگوی الکتروفورزی پروتئین و استاندارد آن، نوار ریبونوکلئازی S با گستردگی بالا (RNase3) در محدوده وزن مولکولی حدود ۲۷ تا ۳۰ کیلودالتون واقع شده است. ریبونوکلئاز فعال دیگری (RNase4) نیز در خامه خود و دگرتلقیح رقم Bravo cool water mix دارای باند قوی‌تری بود (شکل ۲).

بیان ریبونوکلئاز S: RNA کل از خامه رقمهای خود و دگرتلقیح با استفاده از کیت استخراج Qiagen RNA استخراج شد. مقدار ۲ میکروگرم بر میکرولیتر RNA به منظور انجام واکنشهای ساخت DNA مکمل و PCR استفاده شد. با استفاده از آغازگر PC1 Forward و آغازگر PC3 Reverse، قطعه‌ای با حدود ۳۰۰ جفت باز تکثیر شد. بیان S-RNase در خامه‌های خودتلقیح و دگرتلقیح در هر دو رقم مشاهده شد، بنابراین ژن مسئول در واکنشهای خوداناسازگاری، در رقم خودسازگار Bravo cool water mix نیز بیان می‌شود (شکل ۳).

توالی ریبونوکلئاز S: قطعه تکثیر شده حاصل از انجام واکنشهای PCR، توسط شرکت Millegen فرانسه با استفاده از دستگاه DNA sequencer مدل ABI، تعیین توالی شد. به منظور تشخیص آلل S، توالی به دست آمده در بانک ژنی توسط نرم افزار Blast مورد مطالعه قرار گرفت.



شکل ۳- تکثیر DNA مکمل در واکنش PCR. الف وب: به ترتیب خامه دگرتلقیح و خودتلقیح رقم زراعی Bravo purple star ج و د: به ترتیب خامه دگرتلقیح و خودتلقیح رقم زراعی Bravo cool water mix. M مارکر وزن مولکولی RNA در ژل و 'M طرح مارکر RNA از شرکت Fermentas می‌باشد.

مقایسه توالی با سایر توالیهای موجود، نشان دهنده ۱۰۰ درصد شباهت بین قطعه تکثیر شده در رقم Bravo purple star با آلل S_3-RNase گیاه *Petunia hybrida* زیرگونه inflata بود. بین توالی بازهای قطعه تکثیر شده رقم Bravo cool water mix با آلل S_1-RNase گیاه *Petunia hybrida* ۱۰۰ درصد شباهت وجود داشت.

بحث و نتیجه‌گیری

میزان فعالیت ریبونوکلئاز: نتایج نشان داده است که فعالیت S-RNase تا ۸۰ درصد فعالیت ریبونوکلئازهای خامه را شامل می‌شود. بنابراین می‌توان با اندازه‌گیری میزان فعالیت کل ریبونوکلئازها، میزان فعالیت S-RNase را تخمین زد (۲۹). در این پژوهش، فعالیت ریبونوکلئازها در خامه گرده‌افشانی شده هر دو رقم زراعی مورد مطالعه مشاهده شد. فعالیت ریبونوکئاز در خامه خودتلقیح هردو رقم در مقایسه با خامه دگرتلقیح، بیشتر بود. اما در رقم خوداناسازگار Bravo purple star، خودتلقیحی منجر به افزایش فعالیت ریبونوکلئاز به میزان بیشتری در مقایسه با انواع خودتلقیح رقم خودسازگار Bravo cool water mix گردید. نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر، گزارش سایر محققین درباره فعالیت ریبونوکلئاز S در مادگی گیاهان *Prunis salicina* (۳۱)، *P. avium* (۲۸)، *Solanum*

Archive of SID
www.SID.ir

chacoense (۲۲) و *Witheringia solanacea* (۲۹) را تأیید می‌کند. این نتایج نشان می‌دهد که ریبونوکلئاز S در خامه گیاهان خودسازگار و خوداسازگار وجود داشته اما فعالیت آن در گونه‌های خوداسازگار پس از خودتلقیحی بسیار بیشتر از گونه‌های خودسازگار می‌باشد.

محققین دریافتند که سویه‌های خوداسازگار گونه‌های *Nicotiana alata* و *Licopersicum peruvianum* فعالیت ریبونوکلئازی بیشتری در مقایسه با سویه‌های خودسازگار دارند. پیشنهاد شده است که فعالیت ریبونوکلئاز مادگی در رقمهای خوداسازگار منجر به مهار رویش لوله‌های گرده ناسازگار در آنها می‌شود (۱۶). در این مطالعه باند ایزوآنزیمی متفاوتی بین دو رقم مشاهده شد. خامه دگرتلقیح رقم زراعی خوداسازگار Bravo purple star دارای باند آنزیمی RNase 3 بود که این باند آنزیمی در خامه رقم زراعی Bravo cool water mix مشاهده نشد. Yen و Green (۱۹۹۱) گزارش کردند که فعالیت ریبونوکلئازها در اندامهای مختلف، متفاوت بوده و در خامه بیشترین باند فعالیت ریبونوکلئاز متعلق به S-RNase می‌باشد (۳۲). بنابراین به نظر می‌رسد که باند RNase3 مشاهده شده در خامه رقم زراعی Bravo purple star در مطالعه فعالیت ریبونوکلئاز در سیستم PAGE، متعلق به ریبونوکلئاز S باشد. Singh و همکاران (۱۹۹۱) دریافتند که غیر از ریبونوکلئاز S، ریبونوکلئازهای دیگری در مادگی گیاهان خوداسازگار *Petunia inflate* وجود داشته که محدوده وزن پروتئینی آنها (در مطالعه با الگوی الکتروفورزی پروتئین) با مادگی گیاهان خودسازگار تفاوت دارد و بنابراین، به احتمال فعالیت ریبونوکلئازی قوی (RNase4) که در خامه‌های خودسازگار مشاهده می‌شود، ریبونوکلئاز S نمی‌باشد (۲۷). با توجه به نتایج سایر محققین، به نظر می‌رسد باند RNase 4 متعلق به ریبونوکلئازهای غیر از لوکوس S می‌باشد که تنها در خامه رقم خودسازگار Bravo cool water mix فعال بود. Kondo و همکاران (۲۰۰۲) در مطالعه سویه‌های خودسازگار و خوداسازگار *L. esculentum*، علاوه بر باند ریبونوکلئاز فعال در محدوده ۳۰ کیلودالتون در سویه خوداسازگار، باند ریبونوکلئازی فعالی را در محدوده ۲۲ کیلودالتون در سویه خودسازگار تشخیص دادند. این محققین بیان کردند که باند آنزیمی ۲۲KDa متعلق به ریبونوکلئازهای غیر S (Non-S RNase) و متعلق به ریبونوکلئازهای LE و LX می‌باشد (۱۶).

Kao و Tsukamoto (۲۰۰۴) بیان می‌کنند فعالیت ریبونوکلئازی موجود در خامه سویه‌های خودسازگار به دلیل فعالیت ریبونوکلئازهای یادگار (Relic ribonucleases) یا شبه S بوده که دارای تنوع آللی نیستند. پیشنهاد شده است این ریبونوکلئازها نقشی در برهمکنشهای خوداسازگاری ندارند، اما اهمیت فیزیولوژیکی آنها در خامه هنوز مشخص نشده است (۱۳). مطالعات دیگری نشان داده است که فعالیت ریبونوکلئازی در خامه خودسازگار گونه *Petunia inflata* ، قابل مقایسه با خامه‌های خوداسازگار بوده ولی در رقم خوداسازگار، باندی با فعالیت آنزیمی قوی‌تری مشاهده می‌شود (۲۷). پیشنهاد شده است که در تلقیح سازگار (غیرخودی) رقم خوداسازگار، مولکول ریبونوکلئاز ممکن است غیرفعال شده و یا اینکه طوری تغییر کند که فعالیت بازدارندگی خود روی رشد لوله گرده را از دست بدهد (۱۵). بنابراین کاهش فعالیت ریبونوکلئاز S در خامه دگرتلقیح رقم خوداسازگار Bravo purple star در نتیجه غیرفعال شدن آن بوده است که در الگوی الکتروفورزی آن نیز شدت فعالیت کمتری در باند آنزیمی RNase3 مشاهده می‌شود.

Tomimoto و همکاران (۱۹۹۶) بیان کردند که احتمالاً، نقص در یکی از فرآورده‌های آلل S در رقمهای سازگار *Prunus communis*، منجر به عدم فعالیت طبیعی ریبونوکلئاز S و در نتیجه خودسازگار بودن این رقمها شده است (۳۰). بسیاری از مطالعات نیز بیان می‌کند که به دلیل جهش در ژنوم ریبونوکلئاز S در رقمهای خودسازگار،

Archive of SID

www.SID.ir

فعالیت آن در لوله گرده مهار شده است (۸، ۱۵ و ۲۴). مکانیسم احتمالی غیرفعال شدن ریبونوکلئاز S در رقمهای خودناسازگار پس از تلقیح با گرده غیرخودی، شامل تجزیه S-RNase از طریق مسیر وابسته به یوبی‌کوتینی شدن می‌باشد، اما در گرده‌افشانی ناسازگار، ریبونوکلئاز S یوبی‌کوتینی نمی‌شود و در نتیجه فعال بوده و منجر به مهار رشد لوله گرده می‌شود (۲۱). ریبونوکلئاز فعال می‌تواند منجر به تجزیه RNA لوله گرده خودی شده، در حالی که در لوله‌های گرده غیرخودی این واکنش به میزان بسیار کمتری مشاهده می‌شود. بنابراین، S-RNaseها به عنوان سلول‌کشهای قوی عمل کرده، مرگ لوله گرده را باعث می‌شوند. S-RNaseها می‌توانند موجب تجزیه rRNA و یا mRNA آنزیمهای ضروری برای ادامه رشد لوله گرده شوند. نتایج نشان داده است که تأثیر ریبونوکلئاز S از طریق تجزیه rRNA و mRNA می‌باشد (۹).

بیان S-RNase: S-RNase در خامه‌های خود و دگر تلقیح در هر دو رقم بیان شد، بنابراین ژن مسئول در واکنشهای خودناسازگاری، در رقم زراعی خودسازگار Bravo cool water mix نیز بیان می‌شود. با توجه به بیان این ژن در خامه خودتلقیح رقم زراعی خودسازگار Bravo cool water mix، به نظر می‌رسد این فرضیه که در رقم خودسازگار ریبونوکلئاز S بیان نمی‌شود، نادرست باشد. بنابراین، این احتمال وجود دارد که از ترجمه این ژن در رقم خودسازگار Bravo cool water mix در خامه ممانعت شده است، یا اینکه فعالیت پروتئین آن در خامه تلقیح شده (همان طور که در الگوی الکتروفورزی فعالیت آنزیم نیز مشاهده می‌شود)، مهار شده است. تصور می‌شود مهار آنزیم به احتمال از طریق غیرفعال شدن آن (به عنوان مثال از طریق یوبی‌کوتینی‌شدن) و یا به دلیل تغییر در ساختار ژنتیکی آن باشد. در مطالعات قبلی نیز گزارش شده است که ریبونوکلئاز S در گونه‌های خودسازگار و خودناسازگار تیره‌های Solanaceae، Rosaceae و Scrophulariceae بیان می‌شود (۱۲). Kao و Tsukamoto (۲۰۰۴) دریافتند که گونه خودسازگار *L. peruvianum* دارای یک S-RNase با محل کاتالیتیک غیرفعال بوده که باقیمانده هیستیدنی در یکی از محلهای فعال آن با آرژنین جایگزین شده است (۱۲، ۱۳). این جایگزینی منجر به غیرفعال شدن ریبونوکلئاز S می‌شود. از آنجایی که فعالیت این ریبونوکلئاز برای رد گرده ناسازگار ضروری است (۱۲)، بنابراین فرآیند تجزیه RNA لوله گرده و در نتیجه فرآیند رد گرده در خامه سازگار انجام نمی‌گیرد (۱۳).

Katoh و همکاران (۲۰۰۲) نیز در مطالعه گیاه *Malus domestica* و *Pyrus pyrifolia*، وجود ریبونوکلئازهای S با جرمهای مولکولی متفاوت را در خامه رقمهای خودسازگار وخودناسازگار این گیاه گزارش کردند. آنها بیان کردند که ریبونوکلئاز S در رقم خودسازگار، یک ریبونوکلئاز غیرفعال بوده که غیرفعال بودن آن به احتمال به دلیل وجود زنجیره‌های گلیکانی متفاوت درمقایسه با ریبونوکلئاز S رقم خودناسازگار و یا در اثر ایجاد جهش در ژنوم ریبونوکلئاز می‌باشد (۱۵). گزارشاتی وجود دارد که بیان می‌کند میزان بیان ریبونوکلئاز S در خامه‌های گیاهان خودسازگار کمتر از مقدار آن در خامه گیاهان خودناسازگار است (۱۵). Qin و همکاران (۲۰۰۶) گزارش کردند که رشد لوله گرده خودی در سویه خودسازگار گونه *Solanum chacoense* به دلیل جهش در اجزاء آلل S (شامل محصولات گرده یا خامه) بوده و نه به دلیل تغییر در میزان بیان ژن (۲۲). پیشنهاد شده است که جهش در اجزاء آلل S گرده (ژنوم F-box)، منجر به رشد لوله گرده خودی در گونه‌های خودسازگار و حتی خودسازگار پراکنده (Sporadic self-incompatible species) می‌شود. بنابراین پروتئینهای اجزاء آلل S گرده جهش یافته، ریبونوکلئازهای S خودی را مشابه ریبونوکلئاز غیرخودی تشخیص داده، آن را غیرفعال می‌کنند و بنابراین رشد لوله گرده خودی به طور کامل انجام می‌گیرد (۲۸).

آلل ریبونوکلئاز S رقمهای زراعی Bravo cool water mix و Bravo purple star: نواحی بسیار متغیر پروتئین

Archive of SID

www.SID.ir

ریبونوکلئاز S بین نواحی دوم و سوم حفاظت شده قرار گرفته که دارای اجزای ضروری برای بازشناسی گرده می‌باشد، بنابراین استفاده از این بخش از توالی ریبونوکلئاز، به شناسایی آلل آن کمک می‌کند (۲۲). Dodds و همکاران (۱۹۹۳) اندازه توالی بین آغازگرهای PC1 و PC3 را حدود ۳۴۰ نوکلئوتید روی cDNA، گزارش کردند (۷). در مطالعات قبلی نیز تعیین توالی غیرکامل(جزئی) (Partial sequencing) به منظور تشخیص نوع آلل ریبونوکلئاز S، با استفاده از توالی حفاظت شده پروتئین ریبونوکلئاز در گیاهان *Nicotiana alata* (۷)، *Solanum chacoense* (۲۲)، *Prunus lannesiana* (۱۴) و *Prunus avium* (۲۸) انجام گرفته است.

بخشی از توالی DNA مکمل S-RNase شامل قطعه تکثیر شده بین آغازگرهای توالی حفاظت شده ۱و ۳ پروتئین S-RNase، به منظور تشخیص آلل ریبونوکلئاز مورد تعیین توالی قرار گرفتند. نتایج تعیین توالی نشان داد که ریبونوکلئاز S رقم Bravo purple star به طور ۱۰۰ درصد با آلل S_3-RNase گیاه *Petunia hybrida* شباهت دارد. تعیین توالی ناکامل (جزئی) ریبونوکلئاز S در رقم Bravo cool water mix، نیز با آلل S_1 گیاه *Petunia hybrida* ۱۰۰ درصد شباهت داشت. با استفاده از این اطلاعات می‌توان از پرایمرهای اختصاصی این آللها برای شناسایی توالی کامل ریبونوکلئاز S در این گیاهان، مطالعه توالی بازهای ژن ریبونوکلئاز S و مقایسه با آلل ریبونوکلئاز S در سایر رقمهای این گونه یا گونه‌های دیگر استفاده نمود. Clarke و همکاران (۱۹۹۵) توالی کامل ژن ریبونوکلئاز S را در گیاه *Petunia x hybrida* شناسایی کرده و بیان کردند که این ژن دارای ۳۲۲۱ جفت باز بوده که ۱۹۰۵ جفت باز در توالی مجاور (پیرامون) انتهای '5 و ۵۰۴ جفت باز در توالی مجاور انتهای '3 می‌باشد. یک اینترون ۱۱۸ جفت بازی نیز بین بازهای ۲۱۶۸ و ۲۲۸۵ توالی DNA ریبونوکلئاز S قرار گرفته است. پروتئین S_1-RNase دارای پپتید نشانه (Signal peptide) با ۲۲ آمینواسید بوده که خروج پروتئین به فضای خارج سلولی بافت گذر خامه را باعث می‌شود (۴).

منابع

۲- ایزدی خالق آبادی، مریم، رضانژاد، فرخنده، منوچهری کلانتری، خسرو، ۱۳۸۷. اثر برخی فاکتورهای شیمیایی و محیطی بر رویش و رشد لوله گرده در گل اطلسی Juss *Petunia hybrida*) . ۲۱(۴): ۶۶۷-۶۷۵

2- Abel, S, Glund, K, (1987) Ribonuclease in plant vacoules, purification and molecular properties of the enzyme from cultured tomato cells. Planta 172: 71-78

3- Blank, A, Sugiyama, RH, Dekker, CA, (2009) Activity staining of nucleotic enzymes after sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis: use of aqueouse isopropanol to remove detergent from gels. Analytical Biochemistry 120: 267-275

4- Clark, KR, Okuley, JJ, Sims, TL, (1995) Complete nucleotide-sequence of the S_1-RNase gene of *Petunia hybrida*. Plant Physiology 107: 307-308

5- Cruz-Garcia, F, Hancock, CN, McClure, B, (2003) S-RNase complexes and pollen rejection. Journal of Experimental Botany 54: 123-130

6- Davis, BJ, (1964) Polyacrylamide gel electrophoresis. Ann N Y Academic Science Journal 121: 404-427.

7- Dodds, PN, Bonig, I, Du, H, Rodin, J, Anderson, MA, Newbigin, E, Clarke, AE, (1993) S-RNase gene of *Nicotiana alata* is expressed in developing pollen. Plant Cell 5: 1771-1782

8- Dowd, PE, McCubbin, AG, Wang, X, Verica, JA, Tsukamoto, T, Ando, T, Kao, TH, (2000) Use of *Petunia inflata* as a model for the study of solanaceous type self-incompatibility. Annals of Botany 85: 87-93

9- Hiratsuka, S, Hirano, A, Zhang, SL, (2007) Comparison of S-RNase, RNase T-1, T-2, and A effects on growth inhibition and RNA degradation of in vitro-cultured pear pollen. Scientia Horticulturae 114: 159-163

10- Hiscock, SJ, Tabah, DA, (2003) The different mechanisms of sporophytic self-incompatibility. Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences 358: 1037-1045

Archive of SID
www.SID.ir

11- Hua, ZH, Fields, A, Kao, TH, (2008) Biochemical models for S-RNase-based self-incompatibility. Molecular Plant 1: 575-585
12- Huang, S, Lee, HS, Karunanandaa, B, Kao, TH, (1994) Ribonuclease activity of *Petunia inflata* S-proteins is essential for rejection of self-pollen. Plant Cell 6: 1021-1028
13- Kao, TH, Tsukamoto, T, (2004) The molecular and genetic bases of S-RNase-based self-incompatibility. Plant Cell 16: S72-S83
14- Kato, S, Mukai, Y, (2004) Allelic diversity of S-RNase at the self-incompatibility locus in natural flowering cherry populations (*Prunus lannesiana* var. speciosa). Heredity 92: 249-256
15- Katoh, N, Goto, K, Asano, J, Fukushima, K, Yamada, K, Kasai, A, Li, TZ, Takanoha, M, Miyairi, K, Okuno, T, (2002) S-RNases from self-incompatible and -compatible apple cultivars: Purification, cloning, enzymic properties, and pollen tube growth inhibitory activity. Bioscience Biotechnology and Biochemistry 66: 1185-1195
16- Kondo, K, Yamamoto, M, Matton, DP, Sato, T, Hirai ,M, Norioka, S, Hattori, T, Kowyama, Y, (2002) Cultivated tomato has defects in both S-RNase and HT genes required for stylar function of self-incompatibility. Plant Journal 29: 627-636
17- Matsuura T, Sakai H, Unno M, Ida K, Sato M, Sakiyama F, Norioka S (2001) Crystal structure at 1.5-angstrom resolution of *Pyrus pyrifolia* pistil ribonuclease responsible for gametophytic self-incompatibility. Journal of Biological Chemistry 276: 45261-45269
18- McClure, B, (2009) Darwin's foundation for investigating self-incompatibility and the progress toward a physiological model for S-RNase-based SI. Journal of Experimental Botany 60: 1069-1081
19- McClure, BA, Haring, V, Ebert, PR, Anderson, MA, Simpson, RJ, Sakiyama, F, Clarke, AE, (1989) Style self-incompatibility gene-products of *Nicotiana alata* are ribonucleases. Nature 342: 955-957
20- Newbigin, E, Anderson, MA, Clarke, AE, (1993) Gametophytic self-incompatibility systems. Plant Cell 5: 1315-1324
21- Qiao, H, Wang, HY, Zhao, L, Zhou, JL, Huang, J, Zhang, YS, Xue, YB, (2004) The F-box protein AhSLF-S-2 physically interacts with S-RNases that may be inhibited by the ubiquitin/26S proteasome pathway of protein degradation during compatible pollination in *Antirrhinum*. Plant Cell 16: 582-595
22- Qin, XK, Liu, BL, Soulard, J, Morse, D, Cappadocia, M, (2006) Style-by-style analysis of two sporadic self-compatible *Solanum chacoense* lines supports a primary role for S-RNases in determining pollen rejection thresholds. Journal of Experimental Botany 57: 2001-2013
23- Roalson, EH, McCubbin, AG, (2003) S-RNases and sexual incompatibility: structure, functions, and evolutionary perspectives. Molecular Phylogenetics and Evolution 29: 490-506
24- Robbins, TP, Harbord, RM, Sonneveld, T, Clarke, K, (2000) The molecular genetics of self-incompatibility in *Petunia hybrida*. Annals of Botany 85: 105-112
25- Silva, NF, Goring, DR, (2001) Mechanisms of self-incompatibility in flowering plants. Cellular and Molecular Life Sciences 58: 1988-2007
26- Sims, TL, Ordanic, M, (2001) Identification of a S-ribonuclease-binding protein in *Petunia hybrida*. Plant Molecular Biology 47: 771-783
27- Singh, A, Ai, Y, Kao, TH, (1991) Characterization of ribonuclease-activity of 3 S-allele-associated proteins of *Petunia inflata*. Plant Physiology 96: 61-68
28- Sonneveld, T, Tobutt, KR, Vaughan, SP, Robbins, TP, (2005) Loss of pollen-S function in two self-compatible selections of *Prunus avium* is associated with deletion/mutation of an S haplotype-specific F-box gene. Plant Cell 17: 37-51
29- Stone, JL, Sasuclark, MA, Blomberg, CP, (2006) Variation in the self-incompatibility response within and among populations of the tropical shrub *Witheringia solanacea* (Solanaceae). American Journal of Botany 93: 592-598
30- Tomimoto, Y, Nakazaki, T, Ikehashi, H, Ueno, H, Hayashi, R, (1996) Analysis of self-incompatibility-related ribonucleases (S-RNases) in two species of pears, *Pyrus communis* and *Pyrus ussuriensis*. Scientia Horticulturae 66: 159-167
31- Yamane, H, Tao, R, Sugiura, A, (1999) Identification and cDNA cloning for S-RNases in self-incompatible Japanease pulm (*Prunus salicina* Lindi. cv. Sordum). Plant Biotechnology 16: 389-396
32- Yen, Y, Green, PJ, (1991) Identification and properties of the major ribonucleases of *Arabidopsis thaliana*. Plant Physiology 97: 1487-1493

Archive of SID

www.SID.ir

The study of electrophoresis pattern, ribonuclease enzymes activity and investigation of S-RNase gene in self- and cross-pollinated styles of cultivars *Petunia hybrida* 'Bravo cool water mix' and *P. hybrida* 'Bravo purple star'

Oloumi H.[1, 2], Rezanejad F.[2] and Sasan H.A.[2]

[1] Ecology Dept., Environmental Sciences Institute, International Center for Science, High Technology and Environmental Sciences, Mahan, Kerman, I.R. of IRAN

[2] Biology Dept., Shahid Bahounar University, Kerman, I.R. of IRAN

Abstract

In *Petunia hybrida*, Self-incompatibility is controlled by stylar glycoproteins. These glycoproteins could be able to recognize and reject self-pollen. These proteins have ribonuclease activity. In this study, the activity and isoenzyme pattern of S-RNases in self and cross-pollinated styles of Bravo purple star (self-incompatible) and Bravo cool water mix (self-compatible) were investigated (spectrophotometically and PAGE electrophoresis, respectively). The expression intensity of S-RNase was also studied in self- and cross-pollinated styles. Because of the importance of S allele in self-incompatibility interactions, the S-allele was identified in both cultivars. Self-pollinated styles of Bravo purple star showed the highest activity of RNases. Different isoenzyme pattern of S-RNases was found in the styles of two cultivars. The results showed that S-RNase is expressed in both self- and cross-pollinated styles of both cultivars. But, the highest expression was observed in self-pollinated styles of Bravo purple star (self-incompatible). By the comparison of DNA sequencing of S-RNase in Bravo purple star to other identified S-RNases, it was found 100% identity of this cultivar S allele to S_3-RNase in *Petunia hybrida* sub species inflate,. There was 100% identity between nucleotide sequence of S-RNase in Bravo cool water mix and allele S_1-RNase in *Petunia hybrida*.

Keywords: cross-pollination, gene expression, *Petunia hybrida*, self-pollination, S-RNase, self-incompatibility

Archive of SID

www.SID.ir