

## بررسی بیان ژن S-like RNase در گندم و خویشاوندان وحشی آن تحت تنش خشکی

رودابه راوش<sup>1\*</sup>، بهروز شیران<sup>2</sup>، اسماعیل ابراهیمی<sup>3</sup>، سعدالله هوشمند<sup>2</sup>

<sup>1</sup> دانشجوی دکتری ژنتیک مولکولی و بیوانفورماتیک، بخش اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد

<sup>2</sup> دانشیار بخش اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد

<sup>3</sup> استادیار بخش اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز

تاریخ دریافت: 1390/12/18. تاریخ پذیرش: 1391/3/22

### چکیده

ژنومیکس کارکردی راهکار جدیدی برای پی بردن به جنبه های اساسی تنش های زیستی و غیر زیستی در گیاهان می باشد. در این مطالعه با بررسی کتابخانه های EST در ژنوم گندم و خویشاوندان وحشی آن که در شرایط تنش خشکی و شرایط نرمال ایجاد شده اند، ژن ها و فاکتورهای رونویسی دخیل در مقاومت به خشکی بررسی شدند. یکی از این ژن ها که تفاوت بیان زیادی در تنش خشکی نشان داد، S-like RNase می باشد که تا کنون نقش آن در مقاومت به خشکی در گندم بررسی نشده است. آنالیز Expressed Sequence Tag (EST) مشخص کرد که ژن S-Like RNase دارای افزایش بیان معنی داری در شرایط تنش خشکی می باشد. نتایج PCR در زمان واقعی نشان داد که بیان این ژن در بساک ارقام مقاوم افزایش زیادی داشته است. RNase ها در فرایندهای متنوع سلولی همچون همانندسازی DNA، رونویسی، پیرایش (اسپلایسینگ) و کنترل ترجمه نقش مهمی بازی می کنند بطوریکه RNase های فامیل T2 در فرایندهای تغذیه، انتقال مجدد فسفات، خودناسازگاری، پیری و دفاع در برابر پاتوژن ها درگیرند. اثرات بالقوه یافت شده برای RNase ها در القای مقاومت به خشکی، می تواند ناشی از برهمکنش چندین خاصیت متمایز آنها باشد. در این تحقیق افزایش بیان چشمگیر S-like RNase در گندم و خویشاوند وحشی گندم (*Aegilops tauschii*) در پاسخ به تنش خشکی، برای اولین بار گزارش گردید و این بر اهمیت پیدا کردن ژن های موثر در ایجاد مقاومت به تنش ها در بین خویشاوندان وحشی گیاهان تاکید می نماید.

کلمات کلیدی: تنش خشکی، *RNase S-like protein*، آنالیز EST، PCR در زمان واقعی

و ذخیره شده در بانک‌های اطلاعاتی صورت می‌گیرد و این همان حوزه بیوانفورماتیک گیاهی است (Neerincx *et al.*, 2005). کتابخانه‌های مربوط به توالی‌های بروز یافته ژنوم<sup>1</sup> که به "EST"<sup>2</sup> معروف اند، دسته مهمی از داده‌های زیستی می‌باشند که برای طیف وسیعی از آزمایشات انجام شده بر روی گونه‌های مختلف گیاهی و جانوری تهیه شده و در پایگاه‌های اطلاعاتی مهم مانند NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) و Harvard University (<http://compbio.dfci.harvard.edu>) (در دسترس عموم قرار گرفته اند. توالی EST-های تولید شده، در سطح کلان برای تعیین ژن‌های جدید در مسیرهای متابولیکی خاص بسیار با ارزش هستند. در حال حاضر پروژه‌های EST در مقیاس بزرگ، به عنوان چشم انداز جدیدی برای فهم اصول مولکولی صفات مهم در گیاهان زراعی تلقی می‌گردد. تعداد زیاد ESTهای ذخیره شده در پایگاه‌های عمومی، منابع بالقوه و با ارزشی برای مقایسه سطوح بیان ژن‌ها در بین گونه‌های مختلف، بافت‌ها و مراحل نموی می‌باشد. کاربرد اولیه ESTها کشف ژن است، اما از کاربردهای پیچیده تر آنها می‌توان به شناسایی خانواده‌های ژنی حفاظت شده بین گونه‌های مورد بررسی، کشف گوناگونی‌های ویرایش رونوشت ژن (اسپلایسینگ‌ها) و تعیین ساختار ژن از طریق صف بندی و انطباق ویرایش‌ها، بررسی بیان ژن و تفسیر ژنوم اشاره کرد (Dong *et al.*, 2005). با

گندم یکی از گیاهان حیاتی برای بشر به حساب می‌آید و بخش عمده‌ای از غذای او از این غله تامین می‌گردد. بنابراین مطالعه بر روی جنبه‌های مختلف به‌نژادی گندم، هدف با ارزشی می‌باشد. در کشور ما خشکی از جمله تنش‌های مهم غیرزیستی است که عملکرد نهایی گندم را بطور چشمگیری کاهش می‌دهد. اهمیت این مساله زمانی بیشتر می‌شود که بدانیم بیشتر نواحی کشت گندم کشور، در اقلیم خشک واقع شده اند. انتخاب برای ارقام متحمل به خشکی و پیدا کردن ژن‌های مقاومت به خشکی از جمله اهداف مهم برنامه‌های اصلاحی کشور می‌باشد.

ژنومیکس مطالعه ی ژنوم یک جاندار است، که شامل تعیین همه ی ژن‌ها و عناصر تنظیمی آنها و در واقع تلاش متمرکز برای تعیین توالی همه ترکیبات DNA ماده‌ی ژنتیکی و تعیین نقشه ژنتیکی موجودات است. با بالا رفتن تعداد ژنوم‌های تعیین شده، آنالیزهای مقایسه ای هم ارزشمند می‌شود.

امروزه در اصلاح گندم از ژنومیکس، به عنوان ابزاری برای شناسایی مکان‌های کنترل کننده تحمل به تنش و نیز وسیله‌ای برای غربال کردن تغییرات آلی در گندم وحشی، استفاده شده است. دامنه و قدرت تفکیک ژنومیکس فهم ژنتیکی وسیع و در عین حال همراه با جزئیات بیشتر از عملکرد کلی گیاه را برای محققان فراهم می‌آورد. این آنالیزها با نرم افزارهای مخصوص روی مقادیر بسیار زیادی از داده‌های زیستی تولید

<sup>1</sup> Expressed Sequence Tags

ESTها در پایگاه اطلاعاتی EGassembler (<http://egassembler.hgc.jp/>) به صورت آنلین، بر اساس میزان شباهت توالی‌هایشان دسته بندی شدند. این پایگاه، جفت توالی‌هایی که از نظر آماری به شکل معنی داری به هم شبیه هستند را در یک دسته قرار می‌دهد که آنها را کانتیگ می‌نامند. در مرحله بعد، به منظور تعیین پروتئین مرتبط با هر توالی آنالیز BlastX بر روی تمام توالی‌های کانتیگ انجام شد. این کار با استفاده از نرم افزار CLC Bio به صورت آنلین صورت گرفت. برای تعیین معنی دار بودن نتایج از لحاظ آماری از نرم افزار IDEG6 با آدرس اینترنتی <http://telethon.bio.unipd.it/bioinfo/IDEG6> استفاده شد.

#### ایجاد تنش خشکی و آزمون میزان بیان ژن با PCR در زمان واقعی

در این مطالعه، واریته‌های گندم مقاوم به خشکی (هالبرد، سرداری و پیشگام) و واریته‌های گندم حساس به خشکی (کرنبروک، گاسپارد و MV17) و خویشاوندان وحشی گندم شامل *Triticum monococcum* (دارنده ژنوم AA)، *Aegilops tauschii* (دارنده ژنوم DD) و *Triticum turgidom* (دارنده ژنوم AABB)، مورد آزمایش قرار گرفتند.

بذور گیاهان در گلدان‌های سفالی با قطر دهانه 15 سانتی متر که با نسبت مساوی از خاک مزرعه، شن شسته شده و خاک برگ پر شده

کمک کتابخانه EST ذرت، ژن‌های موثری که در طی تنش خشکی در ریشه این گیاه القا می‌شدند، شناسایی گردیدند (Hui-yong *et al.*, 2009). برای شناسایی ژن‌های القایی در تنش خشکی در نخود، در تحقیقی یک کتابخانه cDNA نرمال شده از برگ‌های نخود که توسط تیمار PEG تنش دیده بودند و یک کتابخانه از برگ‌های نرمال، ایجاد گردید که در بین آنها 194 ژن جدید یافت شد (Gao *et al.*, 2008).

با توجه به نقش پر اهمیت مطالعه بر روی کتابخانه‌های EST در دستیابی به ژن‌های جدید، در این مطالعه سعی گردید با بررسی ESTهای موجود برای شرایط کنترل و تنش خشکی در ژنوم گندم و خویشاوندان وحشی آن که منابع بالقوه ای در مطالعات ژنتیکی بشمار می‌آیند، به بررسی یکی از ژن‌های جدید دخیل در مقاومت به خشکی پرداخته شود.

#### مواد و روش‌ها

##### جمع آوری اطلاعات EST

برای انجام آنالیز EST و یافتن ژن‌های جدید موثر در تنش خشکی، کتابخانه تنش خشکی گندم، با شماره 5596 (از بافت برگ) شامل EST 1026 و کتابخانه حالت کنترل با شماره 5467 (مربوط به بافت شاخساره) شامل EST 2445 از سایت دانشگاه هاروارد با آدرس اینترنتی (<http://combio.dfci.harvard.edu/>) با فرمت FASTA جمع آوری و ذخیره شدند.

جهت تشخیص اختصاصی بودن واکنش انجام گردید. برای هر نمونه سه تکرار تکنیکی و دو تکرار بیولوژیکی وجود داشت که عموماً تفاوت آنها کمتر از 0/5 بود. تجزیه و تحلیل داده‌ها با روش مقایسات کمی<sup>2</sup> انجام گرفت و نمونه‌های تنش هر رقم در مقابل کنترل آن که همزمان با آنها گرفته شده بود، سنجیده شدند.

### همسانه‌سازی و توالی‌یابی

جهت اطمینان از صحت قطعه تکثیر شده، قطعه ژن مورد نظر پس از تکثیر با PCR معمولی بر روی ژل آگاروز بارگذاری شد و پس از اطمینان از اندازه قطعه، از ژل جداسازی و خالص سازی شد. قطعه تکثیری، با استفاده از کیت همسانه‌سازی شرکت فرمتاز، ژن کلون گردید. سپس پلاسمید حاوی قطعه ژن توسط کیت استخراج پلاسمید شرکت فرمتاز استخراج شده و برای توالی‌یابی به شرکت ماکروژن کره ارسال گردید.

### بررسی جنبه‌های مختلف عملکرد ژن مورد نظر

#### در سایر آزمایشات میکروآرای

برای شناسایی نقش دقیق تر ژن انتخابی در گیاهان مختلف و آزمایش‌هایی که با اهداف متفاوت در گیاهان مختلف انجام گرفته‌اند، یکی از بهترین مسیرها، بررسی نتایج بیان ژن مورد آزمایش در آزمایشات میکروآرای می‌باشد. به این منظور از طریق پایگاه Plexdb با آدرس اینترنتی

بودند، کشت شدند. جهت ایجاد تنش، در مرحله 5 تا 6 برگی آبیاری قطع گردید و نمونه‌برداری از اندام‌های برگ و ریشه در زمان‌های: یک روز پس از شروع تنش و دو روز پس از شروع تنش انجام شد و همزمان، از تیمار کنترل نیز نمونه برداری گردید. میزان RWC اندازگیری شده در زمان تنش زیر 70 درصد بود. جهت مطالعه تاثیر تنش خشکی بر روی الگوی بیان ژن در اندام زایشی، از بافت بساک در حالت کنترل و سه روز پس از شروع تنش نمونه برداری صورت گرفت. استخراج RNA با استفاده از کیت - RNx™ plus شرکت سیناژن انجام شد. کمیت و کیفیت RNA استخراجی، با استفاده از اسپکتروفتومتر و ژل مخصوص RNA تعیین گردید. سنتز رشته cDNA با استفاده از کیت ساخت cDNA شرکت Qiagen انجام گرفت.

بر اساس نتایج بدست آمده از آنالیز EST و انتخاب ژن‌های کاندید، بر اساس توالی ژن پرایمر مربوط به آن با استفاده از نرم افزار 11.5.1 NTI advance طراحی گردید. انجام PCR در زمان واقعی<sup>1</sup> با استفاده از دستگاه Rotor gene-Q از شرکت Qiagen صورت گرفت. واکنش PCR با حجم نهایی 10 میکرولیتر انجام شد. برنامه واکنش شامل: 95 درجه به مدت 1 دقیقه و سپس طی 40 سیکل با 95 درجه برای 20 ثانیه، 59 درجه برای 20 ثانیه و 72 درجه 20 ثانیه، بود. الگویابی منحنی ذوب از 60 تا 95 درجه در پایان واکنش برای هر PCR

<sup>2</sup> Comparative quantitation

<sup>1</sup> Real Time - PCR

مادگی گیاهان خود ناسازگار برای رد کردن کرده با آلل مشابه (S-allele) ضروری است و این کشف باعث شد تا تعداد زیادی از RNase های گیاهی مشابه در گیاهان خودناسازگار یافت شوند که به آنها S-like RNase گفته می شود. این دسته از پروتئین ها زیر مجموعه ای از فامیل fungal RNase T2 هستند. S-like RNase ها در تمام گونه های گیاهی وجود دارند و اغلب در گل ها بیان می شوند (MacIntosh *et al.*, 2010). عملکرد S-like RNase در دو مسیر فیزیولوژیکی گزارش شده است؛ اولاً در تغذیه به واسطه چرخش مجدد فسفات معدنی در طی کمبود فسفات، ثانیاً در طی پیری و مراحل شامل مرگ سلولی و دفاع در برابر پاتوژن ها، دخیل می باشد (Bariola & Green, 1997; Deshpande & Shankar, 2002). S- and S-like RNase مربوط به گیاهان، شامل پنج ناحیه بسیار محافظت شده هستند که از C1 تا C5 می باشند (Hillwig *et al.*, 2010).

#### نتایج آنالیز PCR در زمان واقعی

آغازگر رفت 5'  
3' ATTCGCTTGAACGCAACTCA و  
آغازگر برگشت 5'  
3' TGTCCTACGCCGAAGCATTC از  
روی توالی EST موجود و توالی دومین پروتئین طراحی شد و با آغازگر مقالات دیگر نیز مطابقت داده شد (Adhikari *et al.*, 2007). آغازگر ژن

<http://www.plexdb.org> بیان این ژن در شرایط مختلف در گیاهان جو، برنج و گندم بررسی شد. با بررسی میزان بروز این ژن در این آزمایشات می توان دید جامع تری در رابطه با نقش این ژن در گیاه داشته باشیم.

#### نتایج و بحث

##### نتایج آنالیز EST

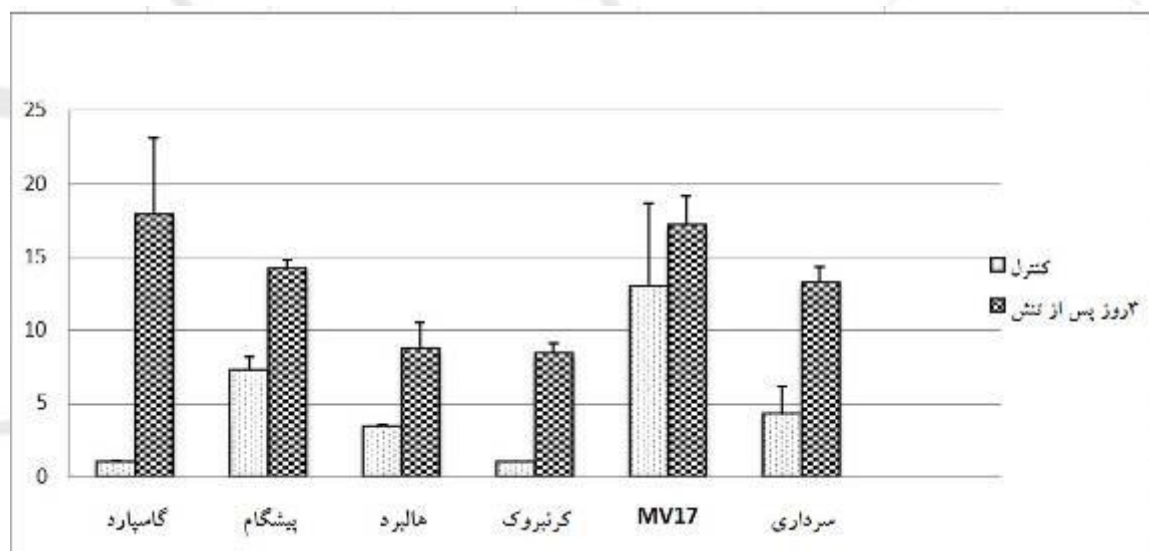
پس از بلاست کانتینگ ها در NCBI که با کمک نرم افزار CLC bio صورت گرفت، یکی از ژن هایی که در این مرحله کاندید شد، S-RNase like protein precursor [*Hordeum vulgare* subsp. *vulgare*] (Accession No. Q8L827) بود، که تعداد EST های آن در حالت تنش نسبت به حالت کنترل افزایش معنی داری نشان می داد. این ژن در واکنش به برخی از تنش ها و بیماریها گزارش شده است (Deshpande & Shankar, 2010; MacIntosh *et al.*, 2002)، ولی هیچگونه گزارشی در مورد افزایش بیان آن در تنش خشکی در گندم داده نشده است. ریونوکلازها<sup>1</sup> (RNase) اجزاء موجود در سلول ها هستند که علاوه بر از بین بردن RNA سلولی نقش های دیگری نیز برای آنها یافت شده است. S-RNases در فرآیند خودناسازگاری گامتوفیتی در حداقل سه فامیل گیاهی دخالت دارند (Hua *et al.*, 2008). تراوش آنها در خامه از رشد دانه کرده حاوی آلل S مشابه جلوگیری می کند (Clarke & Newbigin, 1993). تظاهر ژن S-RNase در

<sup>1</sup> Ribonuclease (RNase)

بطوریکه در شرایط تنش، میزان بروز آن در بساک تمامی ارقام گندم مدرن مورد مطالعه، نسبت به شرایط کنترل افزایش چشمگیر و معنی داری نشان داد، که این افزایش بیان باتوجه به نقش مهم ژن S-like RNase در اندام های زایشی، قابل توجه است (شکل های 1 و 2)، همچنین بیان این ژن در برگ برخی از ارقام افزایش نشان داد و بیشترین شدت بیان در برگ اجیلوپس دیده شد (شکل 3).

کنترل داخلی اکتین در رشته پیشرو 5'CCTGTGTTGCTGACTGAGGCCCC3' و در رشته پیوسته 5'CCAAACGAAGGATAGCATGAGGAAGCG3' بود. تغییرات بیان این ژن در بین ارقام گندم و خویشاوندان وحشی آن در سه بافت برگ و ریشه و بساک در زمان کنترل و تنش خشکی اندازه گیری گردید.

تغییرات بیان این ژن در بافت ریشه دارای الگوی مشخص و توجه پذیری نبود. میزان افزایش بیان این ژن در بافت بساک چشمگیر بود

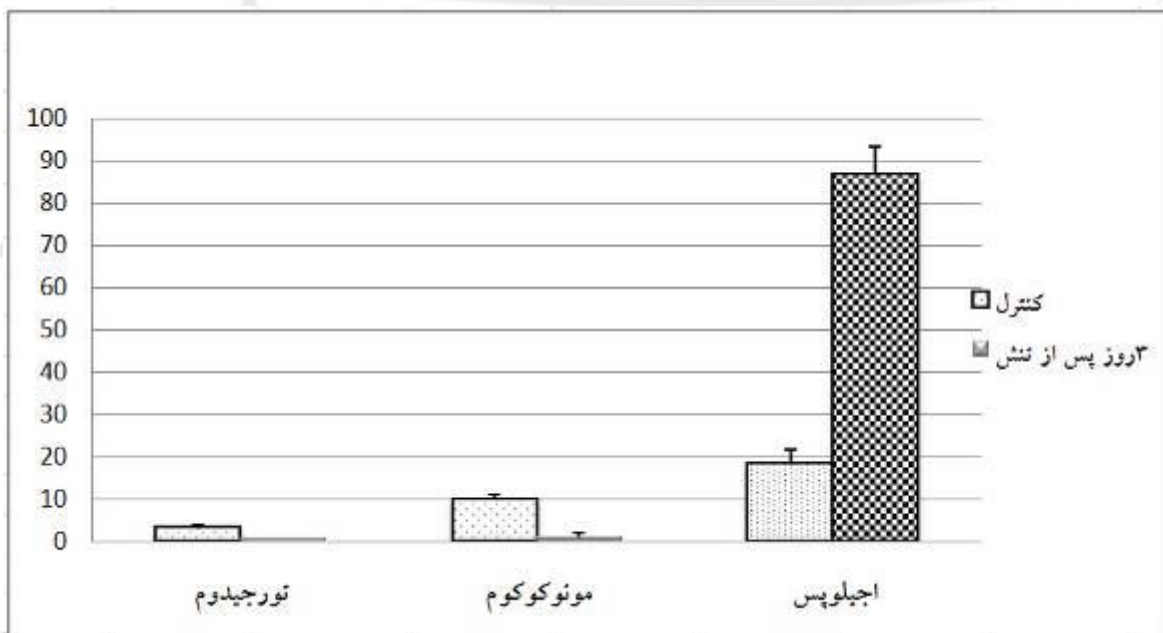


شکل 1- بیان نسبی ژن S-like RNase در حالت تنش خشکی در بساک ارقام مختلف گندم مدرن.

Figure 1- Relative expression of S-Like RNase at drought stress in anther tissue of modern wheat varieties.

کمتری داشت. همچنین، در ریشه و برگ نیز بیان ژن S-like RNase به اندازه بساک بالا نمی باشد و این به دلیل نقش مهم این ژن در بساک می باشد.

همانطور که در شکل 1 مشخص می باشد، بیان در شرایط تنش خشکی نسبت به حالت کنترل در بساک تمام ارقام مختلف گندم مدرن افزایش چشمگیری دارد، البته در رقم MV17 که حساس به خشکی محسوب می شود، این ژن افزایش بیان



شکل 2- بیان نسبی ژن S-like RNase در حالت تنش خشکی در بساک خویشاوندان وحشی گندم.

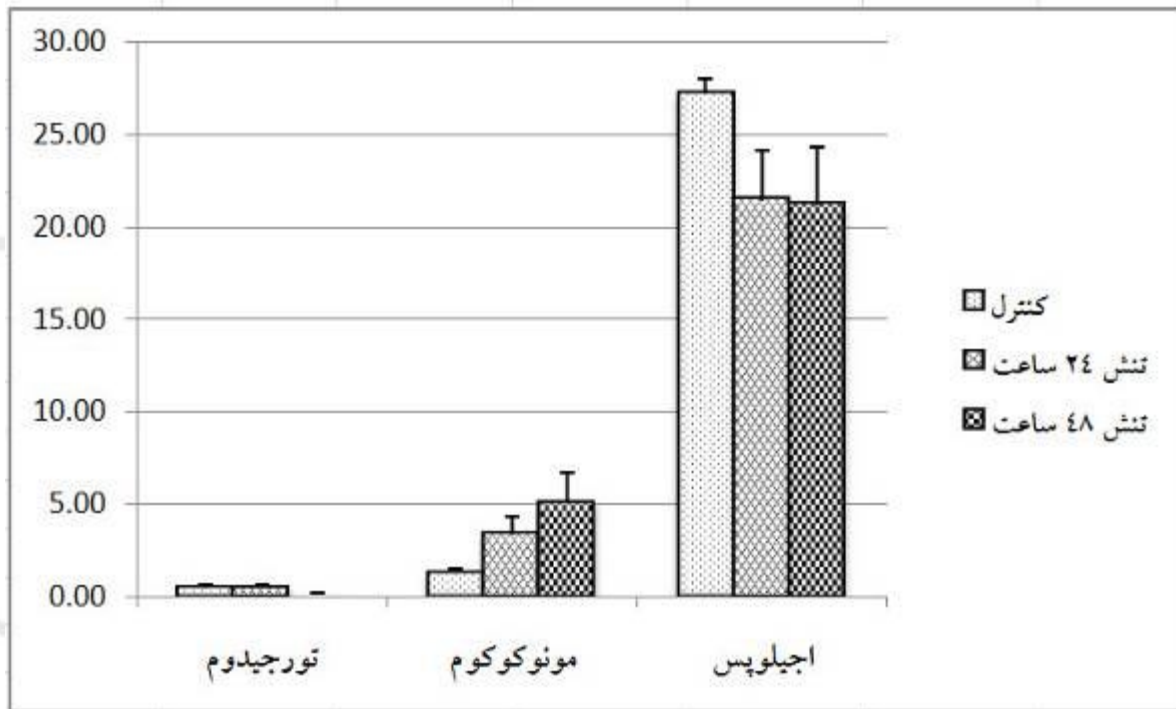
Figure 2- Relative expression of S-Like RNase at drought stress in Hui-yong anther tissue of wheat wild relatives.

نشان داد (شکل 3) و الگوی بیانی آن با بساک نیز متفاوت بود.

الگوی بیان متفاوت و بالای ژن S-like RNase در بساک نسبت به ساقه و ریشه در ارقام مختلف گندم مدرن و گندم وحشی اجیلوپس، نشان دهنده نقش مهم این ژن در پاسخ اندام های زایشی به تنش می باشد. همچنین بیان منحصر بفرد این ژن در گندم وحشی اجیلوپس نشان دهنده اهمیت خویشاوندان وحشی بعنوان منابع بالقوه ژنهای مقاومت به تنش ها برای گونه های مدرن زراعی می باشد و ارزش حفظ و بهره برداری از خویشاوندان وحشی گیاهان را روشن می سازد.

بیان ژن S-like RNase در بافت بساک و در پاسخ به تنش خشکی، فقط در یکی از خویشاوندان وحشی گندم یعنی اجیلوپس بطور معنی داری افزایش نشان داد (شکل 2). بر اساس نتایج این مطالعه بیان این ژن که در حالت کنترل نیز در اجیلوپس بالاست، در اثر تنش خشکی، بسیار بیشتر می شود. در دو خویشاوند دیگر گندم یعنی مونوکوکوم و تورجیدوم در اثر تنش خشکی بیان این ژن کاهش یافت. از آنجاییکه اجیلوپس منشا ژنوم D در گندم مدرن می باشد، می توان پیشبینی کرد که ژن S-like RNase در گندم مدرن از ژنوم D نشأت گرفته باشد.

ژن S-like RNase در برگ اجیلوس نیز به نسبت دو خویشاوند دیگر بیان بسیار بالاتری



شکل 3- بیان نسبی ژن S-like RNase در حالت تنش خشکی در برگ خویشاوندان وحشی گندم.

Figure 3- Relative expression of S-Like RNase at drought stress in leaf tissue of wheat wild relatives.

توالی ژن S-like RNase (*rsh1*) در جو، جفت می‌گردد.

بررسی جنبه های مختلف عملکرد ژن مورد نظر در سایر آزمایشات میکرواری

بر اساس نتایج میکرواری در آزمایشات گوناگون، می‌توان جنبه های مختلف عملکردی ژن را بررسی کرد. در آزمایشی که در گیاه جو بر روی سنجش میزان بیان ژنها در سنبلیچه جو در بافتهای لَمّا، پالنا، ریشک و بذر صورت گرفته است، مشخص شده که در مرحله پر شدن دانه، بیشترین میزان بیان S-Like RNase در بافت بذر می‌باشد. همچنین در اثر تنش خشکی در مرحله پر شدن دانه بیان این ژن در دانه جو افزایش یافته ولی میزان بیان در ریشک در اثر تنش

#### کلونینگ و توالی‌یابی

قطعه ژن مورد نظر، توسط آغازگرهای این ژن با PCR تکثیر و جداسازی شد. پس از کلونینگ، قطعه تکثیر شده، توالی‌یابی شد. نتایج حاصل از توالی‌یابی این قطعه در زیر آورده شده است:

```
> S-like Rnase_pJET1 1257
TGTCCTACGCCGAAGCATTCGAGAT
GGCCGGCGCCGCATGGGATACTGA
GCTGCAGCTGCAGATCGGTAGCCGG
TCGGGCCCTTGACCGGTCTCGTCTTG
TGAGTTGCGTTCAAGCGAAT
```

نتایج آنالیز بلاست توالی بدست آمده در سایت NCBI نشان داد که این توالی با اطمینان بالا ( $e\text{-value} = 2e^{-22}$ ) و شباهت 98 درصد با



طی زایلوجنسیس<sup>1</sup> در *Zinnia elegans* نیز بیان آن زیاد شده است (Ye and Droste, 1996). بنابر مشاهداتی که از فعالیت آنزیمی این پروتئین در دست می‌باشد، نقش آن در سیستم دفاعی موجودات پیشنهاد شده است. در مورد نقش ضد میکروبی RNase در برابر آفات گیاهی تحقیقاتی شده است که نشان داده اند RNase از بلند شدن ریشه قارچ جلوگیری می‌کند. نتایج این دسته از مطالعات نشان می‌دهد که فعالیت آنزیمی در غلظت و شرایط خاص انجام می‌گیرد و RNA قارچی پس از انتقال این پروتئین به دستگاه گلژی، تجزیه می‌شود (Hugot et al., 2002). RNase ها در رونویسی، پیرایش<sup>2</sup> و کنترل ترجمه با تعیین محصول RNA نقش بارزی ایفا می‌کنند، همچنین برخی از انواع آنها در فرآیندهای تغذیه، انتقال مجدد فسفات، خودناسازگاری، پیری و دفاع در برابر پاتوژن ها درگیر هستند (Hillwig et al., 2010). اثرات آنها در القای مقاومت به خشکی می‌تواند ناشی از برهمکنش چندین خاصیت آنها باشد و در نتیجه نقش آنها در القای مقاومت به خشکی در گیاهان می‌تواند بسیار حائز اهمیت باشد.

مطالعات مربوط به ژنومیکس کارکردی از طریق بررسی های بیوانفورماتیکی کتابخانه های EST، راهکاری سریع و قابل قبول برای پی بردن به عملکرد سلولها در شرایط تنش می‌باشد و می-

خشکی کاهش یافته است (Abebe et al., 2009). در تحقیقی که بر روی بروز ژنها در دو رقم برنج حساس و مقاوم به شوری صورت گرفت، بیان S-Like RNase در ناحیه خوشه برنج در اثر تیمار شوری در رقم حساس افزایش زیادی داشته است و در رقم مقاوم به شوری، افزایش بیان به میزان کمتری مشاهده شده است (Walia et al., 2005). در آزمایش دیگری بیان این ژن در ریشه و ساقه برنج در اثر تیمار آهن و فسفر در شاخساره برنج افزایش زیادی داشته است ولی در ریشه میزان بیان آن بالا نرفته است (Zheng et al., 2009). در مطالعه ای متفاوت که بر روی الگوی بیان ژنها در مرحله زایشی برنج انجام شد، به این نتیجه رسیدند که بیشترین بیان S-Like RNase در بافت کلاله در حال گرده افشانی بود (Fujita et al., 2010). در آزمایش میکروآری در گندم نیز بروز ژنها در بافتهای مختلف در طی مراحل رشدی گندم مورد بررسی قرار گرفت و بیشترین بیان برای ژن مورد نظر در این مطالعه، در بافت اندوسپرم دانه بوده است (Schreiber et al., 2009).

تظاهر ژن S-like RNase در طی فرایند پیری در *Arabidopsis thaliana* و *Lycopersicon esculentum* دیده شده است. همچنین در اثر محدودیت فسفات، ژن مذکور در *Nicotiana glauca*، *A. thaliana*، *L. esculentum*، در *alata* بروز کرده است (Lers et al., 1998).

<sup>1</sup> xylogenesis

<sup>2</sup> splicing

### سپاسگزاری

بدینوسیله از موسسه نهال و بذر کرج که بذر خویشاوندان وحشی و چندین رقم گندم مدرن را برای اجرای این پژوهش فراهم نمودند، قدردانی می‌شود. همچنین نویسندگان مقاله، مراتب سپاس خود را از پژوهشکده زیست فناوری شهرکرد به خاطر در اختیار گذاشتن دستگاه PCR در زمان واقعی، ابراز می‌دارند. شایان ذکر است که بودجه مالی تحقیق انجام شده توسط دانشگاه شهرکرد و مرکز همکاری‌های علمی و بین‌المللی وزارت علوم تامین گردید که بدینوسیله از این نهادها کمال تشکر و قدردانی خود را اعلام می‌کنیم.

تواند رهنمودی هدفمند برای سازوکارهای اصلاحی تلقی گردد. همچنین نظر به اهمیت گندم در تغذیه بشر و نیز با توجه به اینکه ایران از مهمترین خواستگاه‌های خویشاوندان وحشی گندم محسوب می‌گردد، تمرکز بر مطالعات ژنتیکی و برنامه‌های اصلاحی روی خویشاوندان وحشی می‌تواند راهکار مناسبی جهت یافتن ژنهای جدید موثر در مقاومت به تنش‌ها باشد.

### منابع

- Abebe T, Wise R, and Skadsen R (2009). Comparative Transcriptional Profiling Established the Awn as the Major Photosynthetic Organ of the Barley Spike While the Lemma and the Palea Primarily Protect the Seed. *Plant Genome* 2: 247-259.
- Adhikari TB, Balaji B, Breeden J, Goodwin SB (2007). Resistance of wheat to *Mycosphaerella graminicola* involves early and late peaks of gene expression. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 71: 55-68
- Bariola P, Green P (1997). Plant ribonucleases. In: D'Alessio G, Riordan J, eds. *Ribonucleases: structures and functions*. New York: Academic Press 163-190.
- Clarke AE, Newbigin E (1993). Molecular aspects of self incompatibility in flowering plants. *Annual Review of Genetics* 27: 257-279
- Deshpande RA, Shankar V (2002). Ribonucleases from T2 family. *Critical Reviews in Microbiology* 28: 79-122.
- Dong Q, Kroiss L, Oakley FD, Wang B, Brendel V (2005). Comparative EST analysis in plant systems. *Methods in enzymology* 395: 400-416.
- Fujita M, Horiuchi Y, Ueda Y, Mizuta Y, Kubo T, Yano K, Yamaki S, Tsuda K, Nagata T, Niihama M, Kato H, Kikuchi S, Hamada K, Mochizuki T, Ishimizu T, Iwai H, Tsutsumi N, Kurata N (2010). Rice expression atlas in reproductive development. *Plant Cell Physiol* 51:2060-2081.
- Gao WR, Wang XS, Liu QY, Peng H, Chen Ch, Li JG, Zhang JS, Hu SN, Ma H (2008). Comparative analysis of ESTs in response to drought stress in chickpea (*C. arietinum* L.). *Biochemical and Biophysical research Communications* 376: 578-583.

- Hillwig MS, Liu X, Liu G, Robert W, Thornburg RW, Gustavo C, MacIntosh GC (2010). *Petunia* nectar proteins have ribonuclease activity. *Journal of Experimental Botany* 61: 2951–2965.
- Hua ZH, Fields A, Kao Th (2008). Biochemical models for SRNase-based self-incompatibility. *Molecular 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. *Molecular Plant–Microbe Interactions* 15: 243–250.
- Hui-yong L, Shu-hua H, Yun-su S, Yan-chun S, Zhong-bao Z, Guo-Ying W, Tian-yu W, Yu L (2009). Isolation and analysis of drought -induced genes in maize roots. *Agricultural Science in China* 8: 129-136.
- Lers A, Khalchitski A, Lomaniec E, Burd S, Green PJ (1998). Senescence-induced RNases in tomato. *Plant Molecular Biology* 36:439-449.
- MacIntosh G, Hillwig M, Meyer A, Flagel L (2010). RNase T2 genes from rice and the evolution of secretory ribonucleases in plants. *Molecular Genetics and Genomics* 283: 381–396.
- Neerincx PBT, Leunissen JAM (2005). Evolution of web services in bioinformatics. *Brief Bioinform* 6: 178-188.
- Schreiber A, Sutton T, Caldo R, Kalashyan E, Lovell B, Mayo G, Muehlbauer G, Druka A, Waugh R, Wise R, Langridge P, Baumann U (2009). Comparative transcriptomics in the Triticeae. *BMC Genomics* 10:285-302
- Walia H, Wilson C, Condamine P, Liu X, Ismail A, Zeng L, Wanamaker I, Mandal J, Cui X, Xu J, Close J (2005). Comparative transcriptional profiling of two contrasting rice (*Oryza sativa* L.) genotypes under salinity stress during vegetative growth stage. *Plant Physiology* 139: 822-835.
- Ye ZH, and Droste DL (1996). Isolation and characterization of cDNAs encoding xylogenesis-associated and wounding-induced ribonucleases in *Zinnia elegans*. *Plant Molecular Biology* 30:697-709.
- Zheng L, Huang F, Narsai R, Wu J, Giraud E, He F, Cheng L, Wang F, Wu P, Whelan J, Shou H (2009). Physiological and transcriptome analysis of iron and phosphorus interaction in rice seedlings. *Plant Physiology* 151:262-274.

## Study of S-Like RNase expression in wheat and its wild relatives under drought stress

Ravash R.<sup>\*1</sup>, Shiran B.<sup>2</sup>, Ebrahimie E.<sup>3</sup>, Houshmand S.A.<sup>2</sup>

- 1- PhD Student of molecular genetics and bioinformatics, Department of plant breeding, College of Agriculture, University of Shahrekord
- 2- Associate Professor, Department of plant breeding and biotechnology, College of Agriculture, University of Shahrekord
- 3- Assistant Professor, Department of plant breeding, College of Agriculture, University of Shiraz

### Abstract

Functional genomics has provided new opportunities to understand the fundamental aspects of biotic and abiotic stresses in plants. In this study, a comparative analysis on EST libraries of wheat and its wild relatives conducted to discover novel genes and transcriptional factors involved in drought tolerance. EST analysis revealed a significant increase in expression level of S-lik RNase in drought condition. Further analysis by qPCR indicated over-expression of this gene in anther of tolerant cultivars. RNases participate in vital cellular functions such as DNA replication, transcription, splicing, and control of translation. T2 family RNases have been implicated in nutrition, phosphate remobilization, self-incompatibility, senescence, and defense against pathogens. This is the first report on the effect of S-lik RNase at drought stress response in wheat and significant up regulation of this gene in wheat wild relative (*Aegilops tauschii*) and that emphasize on finding new effective genes from wild relative plants for stress tolerance.

**Key words:** *Real time- PCR, EST Analysis, RNase S-like protein, Drought stress*