Archive of SID

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

رودابه راوش*[1]، بهروز شیران[2]، اسماعیل ابراهیمی[3]، سعدالله هوشمند[2]

[1]دانشجوی دکتری ژنتیک مولکولی و بیوانفورماتیک، بخش اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد

[2]دانشیار بخش اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد

[3]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 تنش‌های زیستی و غیر زیستی در گیاهان می‌باشد. در این مطالعه با بررسی کتابخانه‌های EST در ژنوم گندم و خویشاوندان وحشی آن که در شرایط تنش خشکی و شرایط نرمال ایجاد شده‌اند، ژن‌ها و فاکتورهای رونویسی دخیل در مقاومت به خشکی بررسی شدند. یکی از این ژن‌ها که تفاوت بیان زیادی در تنش خشکی نشان داد، S-lik RNase می‌باشد 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 می‌باشد. نتایج PCR در زمان واقعی نشان داد که بیان این ژن در بساک ارقام مقاوم افزایش زیادی داشته است. RNaseها در فرایندهای متنوع سلولی همچون همانندسازی DNA، رونویسی، پیرایش (اسپلایسینگ) و کنترل ترجمه نقش مهمی بازی می‌کنند بطوریکه RNaseهای فامیل T2 در فرایندهای تغذیه، انتقال مجدد فسفات، خودناسازگاری، پیری و دفاع در برابر پاتوژن‌ها درگیرند. اثرات بالقوه یافت شده برای RNaseها در القای مقاومت به خشکی، می‌تواند ناشی از برهمکنش چندین خاصیت متمایز آنها باشد. در این تحقیق افزایش بیان چشمگیر S-lik 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 ژن‌های موثر در ایجاد مقاومت به تنش ها در بین خویشاوندان وحشی گیاهان تاکید می‌نماید.

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

*نویسنده مسئول: رودابه رواش تلفن: 09133163018 Email: R.Ravash@gmail.com

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

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 می شود 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 آللی 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 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[1] که به "EST[2]" 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 ژن-های 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 می-باشد. 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

[1] Expressed Sequence Tags

www.SID.ir

Archive of SID

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 روش ها

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 1026 EST و کتابخانه حالت کنترل با شماره 5467 (مربوط به بافت شاخساره) شامل 2445 EST از سایت دانشگاه هاروارد با آدرس اینترنتی (http://combio.dfci.harvard.edu/) با فرمت FASTA جمع آوری و ذخیره شدند.

ESTها در پایگاه اطلاعاتی EGassembler (http://egassembler.hgc.jp/) به صورت آنلاین، 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 آنلاین 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 واریته های 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

www.SID.ir

Archive of SID

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^{TM} – 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 Qiagene انجام گرفت.

بر اساس نتایج بدست آمده از آنالیز EST و انتخاب ژن های کاندید، بر اساس توالی ژن پرایمر مربوط به آن با استفاده از نرم افزار NTI advance 11.5.1 vector طراحی گردید. انجام PCR در زمان واقعی[1] با استفاده از دستگاه Rotor gene-Q از شرکت Qiagene 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 جهت تشخیص اختصاصی بودن واکنش انجام گردید. برای هر نمونه سه تکرار تکنیکی و دو تکرار بیولوژیکی وجود داشت که عموما تفاوت آنها کمتر از 0/5 بود. تجزیه و تحلیل داده‌ها با روش مقایسات کمی[2] انجام گرفت و نمونه های تنش هر رقم در مقابل کنترل آن که همزمان با آنها گرفته شده بود، سنجیده شدند.

همسانه‌سازی و توالی یابی

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 فرمنتاز، ژن کلون گردید. سپس پلاسمید حاوی قطعه ژن توسط کیت استخراج پلاسمید شرکت فرمنتاز استخراج شده و برای توالی یابی به شرکت ماکروژن کره ارسال گردید.

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

برای شناسایی نقش دقیق تر ژن انتخابی در گیاهان مختلف و آزمایش هایی که با اهداف متفاوت در گیاهان مختلف انجام گرفته اند، یکی از بهترین مسیر ها، بررسی نتایج بیان ژن مورد آزمایش در آزمایشات میکرواری می‌باشد. به این منظور از طریق پایگاه Plexdb با آدرس اینترنتی

[1] Real Time – PCR

[2] Comparative quantitation

www.SID.ir

Archive of SID

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 می‌توان دید جامع تری در رابطه با نقش این ژن در گیاه داشته باشیم.

نتایج و بحث

نتایج آنالیز EST

پس از بلاست کانتیگ‌ها در NCBI که با کمک نرم افزار CLC bio صورت گرفت، یکی از ژن‌هایی 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 معنی‌داری نشان می‌داد. این ژن در واکنش به برخی از تنش‌ها و بیماریها گزارش شده است (Deshpande & Shankar, 2002; MacIntosh *et al.*, 2010)، ولی هیچگونه گزارشی در مورد افزایش بیان آن در تنش خشکی در گندم داده نشده است. ریبونوکلئازها[1] (RNase) اجزاء موجود در سلول‌ها هستند که علاوه بر از بین بردن RNA سلولی نقش‌های 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 گرده حاوی آلل S مشابه جلوگیری می‌کند (Clarke & Newbigin, 1993). تظاهر ژن S-RNase در مادگی گیاهان خود ناسازگار برای رد کردن گرده 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 می‌شود. این دسته از پروتئین‌ها زیر مجموعه‌ای از فامیل fungal RNase T2 هستند. S-like RNase ها در تمام گونه‌های گیاهی وجود دارند و اغلب در گل‌ها بیان می‌شوند (MacIntosh *et al.*, 2010). عملکرد S-like RNase در دو مسیر فیزیولوژیکی گزارش شده است؛ اولا" در تغذیه به واسطه چرخش مجدد فسفات معدنی در طی کمبود فسفات، ثانیا" در طی پیری و مراحلی شامل مرگ سلولی و دفاع در برابر پاتوژن ها، دخیل می‌باشد (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 می‌باشند (Hillwig *et al.*, 2010).

نتایج آنالیز PCR در زمان واقعی

آغازگر رفت 5' ATTCGCTTGAACGCAACTCA 3' و آغازگر برگشت 5' TGTCCTACGCCGAAGCATTC 3' 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

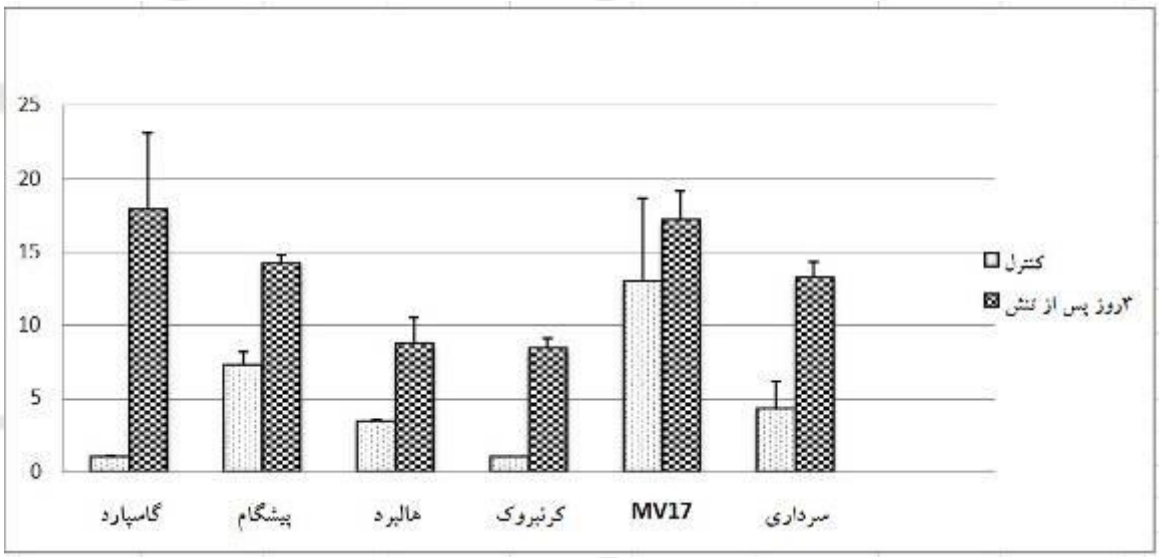
[1] Ribonuclease (RNase)

www.SID.ir

Archive of SID

کنترل داخلی اکتین در رشته پیشرو 5'CCTGTGTTGCTGACTGAGGCCCC3' و در رشته پیرو 5'CCAAACGAAGGATAGCATGAGGA AGCG3' 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 توجیه پذیری نبود. میزان افزایش بیان این ژن در بافت بساک چشمگیر بود 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 توجیه است (شکل‌های 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).



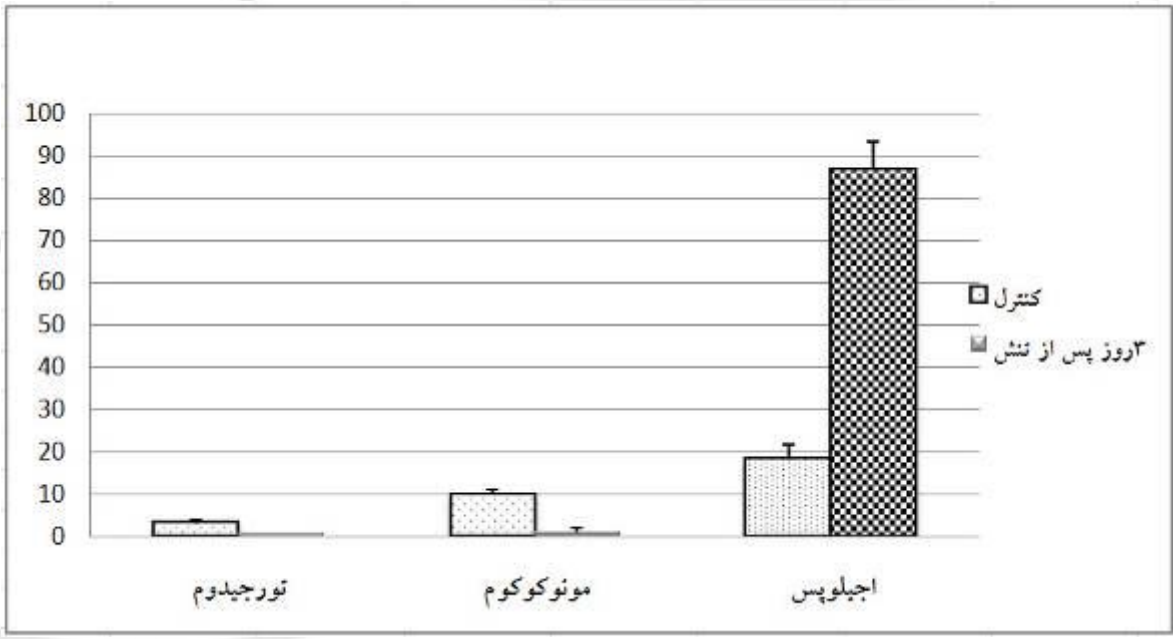
شکل 1- بیان نسبی ژن S-like RNase در حالت تنش خشکی در بساک ارقام مختلف گندم مدرن.

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

همانطور که در شکل 1 مشخص می‌باشد، 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 کمتری داشت. همچنین، در ریشه و برگ نیز بیان ژن S-like RNase به اندازه بساک بالا نمی‌باشد و این به دلیل نقش مهم این ژن در بساک می-باشد.

www.SID.ir

Archive of SID



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.

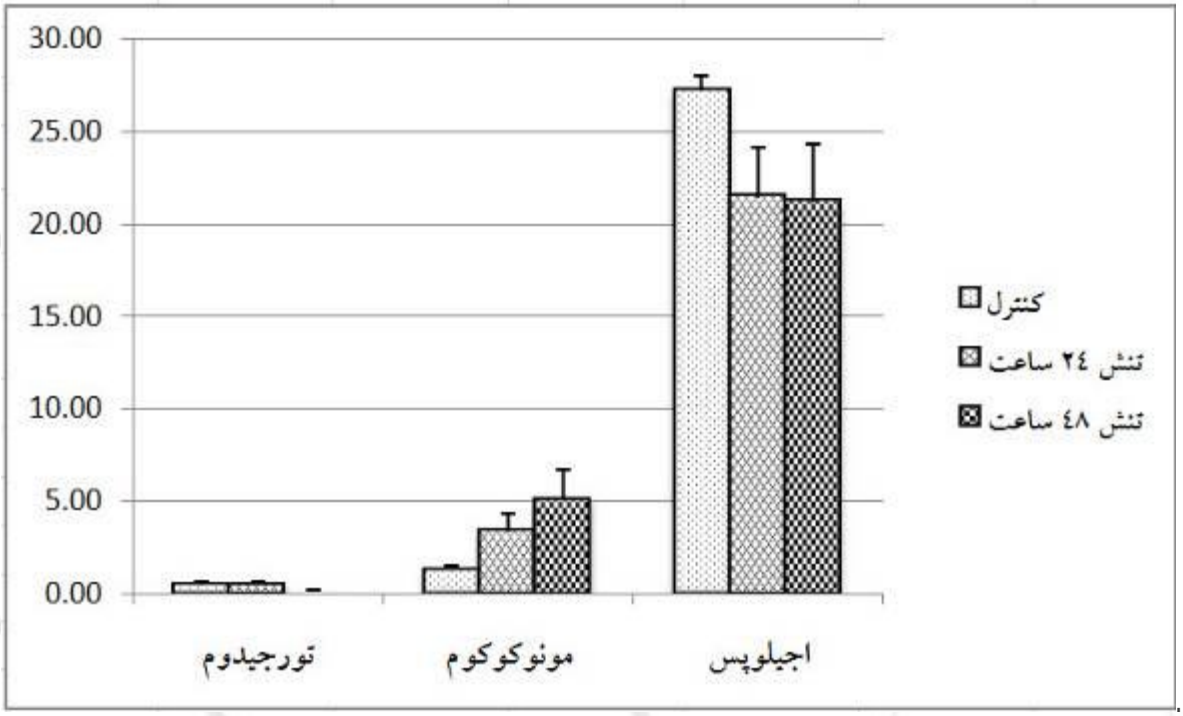
بیان ژن S-like RNase در بافت بساک و در پاسخ به تنش خشکی، فقط در یکی از خویشاوندان وحشی گندم یعنی اجیلوپس بطور معنی داری افزایش نشان داد (شکل2). بر اساس نتایج این مطالعه بیان این ژن که در حالت کنترل نیز در اجیلوپس بالاست، در اثر تنش خشکی، بسیار بیشتر می‌شود. در دو خویشاوند دیگر گندم یعنی مونوکوکوم و تورجیدوم در اثر تنش خشکی بیان این ژن کاهش یافت. از آنجاییکه اجیلوپس منشا ژنوم D در گندم مدرن می‌باشد، می‌توان 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 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 می‌باشد. 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 می‌باشد و ارزش حفظ و بهره-برداری از خویشاوندان وحشی گیاهان را روشن می‌سازد.

www.SID.ir

Archive of SID



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.

کلونینگ و توالی‌یابی

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

> S-like Rnase _pJET1 1257
TGTCCTACGCCGAAGCATTCGAGAT
GGCCGGCGCCGCCATGGGATACTGA
GCTGCAGCTGCAGATCGGTAGCCGG
TCGGGCCCTTGACCGGTCTCGTCTTG
TGAGTTGCGTTCAAGCGAAT

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

www.SID.ir

Archive of SID

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 دراثر 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 میکرواری 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 *Lycospersicum esculentum* دیده شده است. همچنین در اثر محدودیت فسفات، ژن مذکور در *A. thaliana, L. esculentum,* و *Nicotiana alata* بروز کرده است (Lers *et al.*, 1998). در طی زایلوجنسیس[1] 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 ریسه 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[2] 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-

[1] xylogenesis
[2] splicing

www.SID.ir

Archive of SID

توانـد رهنمـودی هدفمنـد بـرای سـازوکارهای اصلاحی تلقی گـردد. همچنـین نظـر بـه اهمیـت گندم در تغذیه بشر و نیز با توجه به اینکه ایران از مهمتـرین خواسـتگاه‌هـای خویـشاوندان وحـشی گندم محسوب مـی‌گـردد، تمرکـز بـر مطالعـات ژنتیکی و برنامه های اصلاحی روی خویشاوندان وحشی می‌توانـد راهکـار مناسـبی جهـت یـافتن ژنهای جدید موثر در مقاومت به تنش ها باشد.

سپاسگزاری

بدینوسیله از موسسه نهال و بذر کـرج کـه بذر خویشاوندان وحـشی و چنـدین رقـم گنـدم مدرن را برای اجرای این پژوهش فراهم نمودنـد، قـدردانی مـی‌شـود. همچنـین نویـسندگان مقالـه، مراتـب سـپاس خـود را از پژوهـشکده زیـست فنـاوری شـهرکرد بـه خـاطر در اختیـار گذاشـتن دستگاه PCR در زمان واقعـی، ابـراز مـی‌دارنـد. شایان ذکر است که بودجه مالی تحقیق انجام شده توسط دانشگاه شهرکرد و مرکـز همکـاری هـای علمی و بین المللی وزارت علوم تامین گردید که بدینوسیله از این نهادها کمال تـشکر و قـدردانی خود را اعلام می‌کنیم.

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 Biophisical research Communications 376: 578-583.

www.SID.ir

Archive of SID

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.

www.SID.ir

Archive of SID

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

Ravash R.[*1], Shiran B.[2], Ebrahimie E.[3], Houshmand S.A.[2]

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*

www.SID.ir