

روابط فیلوژنتیکی تعدادی از گونه‌های گندمیان بر اساس توالی

ژن‌های گلوتنین

Phylogenetic relationships of some Triticeae species based on the sequences of glutenin genes

مریم گلدسته^۱، طاهر نژاد ستاری^۱، ایرج مهرگان^{*۱}

۱- دانش‌آموخته دکتری، دانشیاران، گروه زیست‌شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

Goldasteh M¹, Nejdassattari T¹, Mehregan I^{*1}

1- PhD Graduated, Associate Professors, Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: imehregan@srbiau.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۷/۷/۲۴ - تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۲/۱۵)

چکیده

گندم مهم‌ترین گیاه زراعی و منبع اصلی غذا برای بیش از ۴۰ درصد مردم جهان است. این گیاه دارای دامنه سازگاری زیادی بوده و در ناحیه بسیار وسیعی از دنیا کشت و کار می‌شود. اهمیت گندم به دلیل خصوصیات ویژه جذب آب و کشسانی خمیر آن است که ناشی از وجود پروتئین گلوتن در آندوسپرم دانه گندم است. با توجه به اینکه این پروتئین‌ها در سایر گونه‌های خویشاوند گندم هم حضور دارند، تنوع گلوتنین‌های دانه در گندم و هفت گونه خویشاوند نزدیک آن با استفاده از چهار آغازگر اختصاصی برای گلوتنین‌ها مورد بررسی قرار گرفتند. توالی‌های قطعات تکثیر شده با اطلاعات بانک اطلاعاتی NCBI مقایسه شده و توالی‌هایی که بیش از ۹۰ درصد با یک LMW-Gs یا HMW-Gs گندم شباهت داشت برای تجزیه و تحلیل مورد استفاده قرار گرفتند. نتایج بیانگر شباهت زیاد گلوتنین‌ها در میان گندم و سایر گونه‌های خویشاوند آن بود. با اینحال مشاهده شده‌است که در اغلب موارد قطعات مشابه، تکثیر شده در گونه‌های مختلف دارای تفاوت‌هایی با یکدیگر بوده و تنوع برای توالی نوکلئوتیدها در میان این گونه‌ها وجود دارد. بررسی روابط فیلوژنتیکی میان گونه‌ها نشان داد که گونه *T. aestivum* با گونه *T. boeoticum* که دارای ژنوم A است و همچنین با گونه *Ae. tauschii* که والد ژنوم D گندم است، از نظر ساختار ژن‌های کدکننده گلوتنین‌ها دارای شباهت زیادی بوده و در خوشه‌های فیلوژنتیکی نزدیک به هم قرار گرفتند. دو گونه *Ae. juvenalis* و *Ae. vavilovi* اگرچه شباهت زیادی با یکدیگر نشان نمی‌دهند، اما هر دو دارای شباهت زیادی با گونه والدی *Ae. crassa* بوده و معمولاً با این گونه در یک گروه قرار گرفتند. وجود تنوع وسیع برای این پروتئین‌ها در میان خویشاوندان گندم و همچنین روابط فیلوژنتیکی نزدیک و تلاقی‌پذیری این گونه‌ها با گندم نوید بخش استفاده از این تنوع ژنتیکی در برنامه‌های اصلاحی گندم است.

واژه‌های کلیدی

فیلوژنی
گلوتنین
گندم
گونه‌های آزیلوپس

مقدمه

مواد و روش‌ها

تعداد ۶۹ نمونه از گونه‌های *T. durum*, *T. aestivum*, *Ae. crassa*, *Ae. tauschii*, *Ae. cylindrica*, *T. boeoticum*, *Ae. vavilovi*, *Ae. juvenalis* به شرح جدول ۱ که از نقاط مختلف ایران جمع‌آوری شده بودند در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفتند.

جدول ۱- تعداد نمونه و مشخصات ژنوم گونه‌های مورد بررسی

ردیف	گونه	سطح پلوئیدی	ژنوم	تعداد نمونه
۱	<i>T. aestivum</i>	2n=6x	AABBDD	۱۰
۲	<i>T. durum</i>	2n=4x	AABB	۱۰
۳	<i>T. boeoticum</i>	2n=2x	AA	۱۰
۴	<i>Ae. cylindrica</i>	2n=4x	CCDD	۱۰
۵	<i>Ae. tauschii</i>	2n=2x	DD	۱۱
۶	<i>Ae. crassa</i>	2n=4x	DDMM	۸
۷	<i>Ae. juvenalis</i>	2n=6x	DDMMUU	۷
۸	<i>Ae. vavilovi</i>	2n=6x	DDMMSS	۴

DNA ژنومی از برگ‌های جوان گیاهان کشت شده در گلدان و با استفاده از روش CTAB (ستیل تری متیل آمونیوم برومید) استخراج شد. تکثیر PCR در حجم ۲۰ µl حاوی ۱۰ µl مسترمیکس (تهیه شده از شرکت سینا کلون)، آغازگرهای پیش رونده و پس رونده هر کدام ۰/۵ µl، آب مقطر دیونیزه ۸/۵ µl و DNA ژنومی ۰/۵ µl انجام شد. واکنش PCR با چرخه‌های حرارتی شامل واسرشته‌سازی در دمای ۹۵°C به مدت ۱ دقیقه، اتصال بسته به دمای اتصال نشانگرها (جدول ۲) ۴۵ تا ۶۰°C به مدت ۴۵ ثانیه و بسط در دمای ۷۲°C به مدت ۴۵ ثانیه و به تعداد ۳۷ چرخه انجام شد.

محصولات PCR برای هر آغازگر، بر روی ژل آگارز تفکیک شد. از هر گونه یک نمونه انتخاب شده و در حجم ۵۰ میکرولیتر مجدداً PCR انجام شد. توالی‌یابی توسط شرکت فرا پژوه انجام شد. مقایسه تشابه و شکل توالی‌های DNA با استفاده از بانک اطلاعات NCBI صورت گرفت.

بر اساس توالی DNA، درخت فیلوژنتیک ۸ گونه با استفاده از نرم‌افزار MEGA 7 تشکیل شد و در نهایت براساس روابط میان گونه‌ها در درخت‌های فیلوژنتیکی مختلف نتایج جمع‌بندی و روابط میان گونه‌ها تجزیه و تحلیل شد.

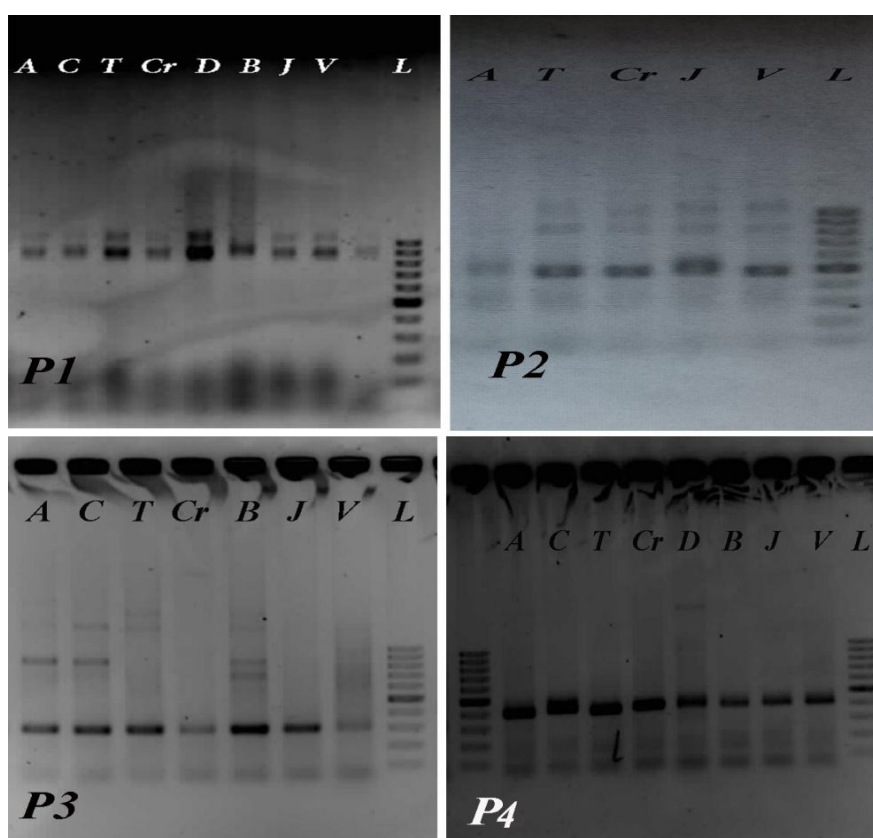
گندم به دلیل ارزش غذایی، ویژگی‌های تکنولوژیکی و طول عمر زیاد دانه آن یکی از مهم‌ترین منابع غذایی بشر است. خصوصیات نهایی محصول آرد گندم به شدت تحت تاثیر پروتئین‌های اندوسپرم دانه قرار دارد (Wall 1979; Weegels et al. 1996). اندوسپرم دانه گندم حاوی ۸ تا ۱۵ درصد پروتئین است که ۸۰ درصد آن را گلوتن تشکیل می‌دهد (van Herpen et al. 2006). پروتئین‌های گلوتن در آرد گندم باعث جذب آب بیش‌تر و خاصیت کشسانی منحصر به فردی می‌شوند که برای پخت نان ضروری است (Shewry et al. 2002). پروتئین‌های گلوتن شامل دو جزء اصلی گلایدین‌های مونومر و گلوتنین‌های پلیمر است (Sapirstein and Fu 1998; Shewry and Tatham 1990; Singh and MacRitchie 2001). گلوتنین شامل مخلوطی از پلیمرهای با وزن مولکولی بالا (HMW-Gs) و وزن مولکولی پائین (LMW-Gs) است که دامنه‌ای از پپتیدهای دیامر تا پلیمرهایی با وزن مولکولی تا چندین میلیون دالتون را تشکیل می‌دهند (Wrigley, 1996). پلیمرها به وسیله باندهای دی‌سولفید که HMW-Gs و LMW-Gs را به‌همدیگر متصل می‌کند تشکیل می‌شوند. این پروتئین‌های پلیمریک مهم‌ترین نقش را در کیفیت نانوائی دارند (Dupont and Altenbach 2003; Field et al. 1983b). به دلیل اندازه بزرگ و ساختمان پیچیده پروتئین‌های پلیمریک برای مطالعه آن‌ها از ساختارهای ساده‌تر HMW-Gs و LMW-Gs استفاده می‌شود (Kuktaitea et al. 2003).

با توجه به شباهت نسبی میان ژنوم گونه‌های مختلف خویشاوند گندم آل‌های نسبتاً مشابهی از گلوتنین‌ها و گلایدین‌ها در جایگاه‌های ژنتیکی مشابهی بر روی ژنوم آن‌ها یافت می‌شود (Ghorbani al. 2013).

در این تحقیق با توجه به نقش مهم ژنوم D در کیفیت گندم نان، تنوع ژنتیکی و روابط تکاملی ژن‌های گلوتنین برای مکان‌های ژنی واقع بر روی ژنوم D در گندم نان (*Triticum aestivum*) و هفت گونه خویشاوند گندم که حامل ژنوم D و A شامل *T. durum*, *Ae. crassa*, *Ae. tauschii*, *Ae. cylindrica*, *T. boeoticum*, *Ae. vavilovi*, *Ae. juvenalis* با استفاده چهار آغازگر اختصاصی گلوتنین مورد بررسی قرار گرفت.

جدول ۲ - توالی، دمای اتصال، محل اتصال و طول قطعه تکثیر شده آغازگرهای به کار برده شده در مطالعه.

آغازگر	جهت	توالی (5'→3')	دمای اتصال (°C)	محل توالی	طول توالی (bp)	مآخذ
P1	F	ATGAAGACCTTCCTCGTCTTTGC'	۶۰	1DS	۹۱۵	Benmoussa et al. (2000)
P2	R	TCAGTAGGCACCAACTCCGGTGC	۵۰	1DS	۵۰۰	Hai Long (2005)
	F	CCTGGCTTGGAGAAACCATC				
	R	CAAGATAGATGGCTGAATAT				
P3	F	GGGACAATACGAGCAGCAAA	۵۵	1DS	۲۹۶	Sixin Liu et al. (2008)
	R	CTTGTTCCGGTTGTTGCCA				
P4	F	CGCAAGACAATATGAGCAAACCT	۵۵	1DS	۴۱۵	Sixin Liu et al. (2008)
	R	TTGCCTTTGTCCTGTGTGC				



شکل ۱- قطعات تکثیر شده برای توالی‌یابی در گونه‌های مورد بررسی. P1- آغازگر شماره ۱، P2- آغازگر شماره ۲، P3- آغازگر شماره ۳، P4- آغازگر شماره ۴. A- گونه *T. aestivum*، C- گونه *Ae. cylindrica*، T- گونه *Ae. tauschii*، Cr- گونه *Ae. crassa*، D- گونه *T. durum*، B- گونه *T. boeoticum*، J- گونه *Ae. juvenalis*، V- گونه *Ae. vavilovi* و L- لدر

جدول ۳- مقایسه شباهت توالی‌های تکثیر شده آغازگر P1 در میان هشت گونه مورد بررسی با توالی‌های مشابه ثبت شده در بانک اطلاعاتی NCBI.

No.	Species	Seq. Size	E-value	BLAST	نمونه مشابه در NCBI
۵	<i>T. aestivum</i>	۴۵۴	2e-98	٪۸۴	<i>T. aestivum</i> cultivar Zheng366 low-molecular-weight glutenin subunit gene, partial cds (gi 817033923)
۶	<i>Ae. cylindrica</i>	۴۸۵	0/13	٪۷۵	<i>Ae. tauschii</i> isolate t086 LMW-GS (glu-3) pseudogene, partial sequence (gi 75219081)
۷	<i>Ae. tauschii</i>	۴۶۶	2e-99	٪۸۴	<i>T. aestivum</i> clone ZH3660-13 low molecular weight glutenin subunit (glu-3) gene, complete cds (gi 508732627)
۸	<i>Ae. crassa</i>	۵۸۱	1e-91	٪۸۶	<i>T. aestivum</i> clone Y34AB-1 low-molecular-weight glutenin subunit (LMW-GS) pseudogene, complete sequence (gi 21930)
۹	<i>T. durum</i>	۸۸۷	0	٪۸۸	<i>T. aestivum</i> low-molecular-weight glutenin subunit (GluA3-5) gene, complete cds (gi7521908)
۱۰	<i>T. boeoticum</i>	۵۸۷	0	٪۹۸	<i>T. aestivum</i> low-molecular-weight glutenin subunit (GluA3-5) gene, complete cds (gi 21930)
۱۱	<i>Ae. juvenalis</i>	۶۸۷	2e-126	٪۷۴	<i>T. aestivum</i> cultivar Longnan'aigan low-molecular-weight glutenin subunit (LMW-3) gene, complet cdc (gi 170730)
۱۲	<i>Ae. vavilovi</i>	۶۰۸	4e-72	٪۷۸	<i>T. aestivum</i> strain Yumai34 glutenin subunit (LMW-m1) gene, complete cds (gi 170730)

نتایج و بحث

(جدول ۳). در یک مطالعه مشابه با استفاده از آغازگر P1، یک

قطعه DNA به طول ۹۱۸ جفت‌باز توالی‌یابی شد که با یک ژن کدکننده LMW-Gs شباهت نشان می‌داد (Nasiri et al. 2013).

در ارزیابی چهار گونه *Ae. crassa*، *Ae. cylindrica*، *Ae. tauschii* و *T. aestivum* با استفاده از آغازگر P1 نشان داده شد که یک توالی ثبت شده از گونه *Ae. tauschii* در NCBI به‌ترتیب ۹۸، ۹۷، ۹۸ و ۹۹ درصد با توالی‌های به‌دست آمده در گونه‌های *Ae. crassa*، *Ae. cylindrica* و *Ae. tauschii* مشابه بودند. آن توالی‌های ژنی، شامل یک فریم خواندنی باز (ORF^۱) کامل بود که با یک کدون متیونین از توالی 5' شروع و تا انتهای توالی ادامه می‌یافت. پروتئین برآورد شده این توالی در گونه‌های *Ae. crassa*، *Ae. cylindrica*، *Ae. tauschii* و *T. aestivum* یک رشته‌ی پروتئینی LMW با هشت سیستمین به‌طول به‌ترتیب ۳۰۵ - ۳۰۴ - ۳۰۶ و ۳۰۵ آمینو اسید را کد می‌کرد (Naghavi et al. 2013).

برای دومین جفت آغازگر (P2) باندی به‌طول ۵۰۰ نوکلئوتید شناسایی شد که در میان گونه‌های مورد بررسی با دو بار خوانش بین ۴۳۴ تا ۴۵۵ نوکلئوتید آن توالی‌یابی شد. توالی‌های به‌دست آمده در گونه‌های *T. aestivum*، *Ae. crassa*، *Ae. tauschii*، *Ae. juvenalis* و *Ae. vavilovi* به‌ترتیب ۸۶، ۹۶، ۹۹، ۹۳ و ۹۶

از میان چهار جفت آغازگر اختصاصی مورد استفاده برای بررسی روابط لوکوس‌های گلوتمین همه آغازگرها برای قطعه مورد بررسی دارای محصولات مونومورفیک بودند. در حالی‌که آغازگر شماره ۱ در هر هشت گونه مورد بررسی تکثیر شد. آغازگر شماره ۲ در گونه‌های *T. durum*، *Ae. cylindrica* و *Ae. crassa* تکثیر نشد و آغازگرهای شماره ۳ و ۴ نیز در گونه *T. durum* تکثیر نشدند. طول قطعات حاصل شده تقریباً با طول قطعات گزارش شده در تحقیقات قبلی (جدول ۲) مشابه بود (شکل ۱). در مجموع از میان ۲۷ توالی شناسایی شده، ۲۱ توالی دارای بیش از ۸۵ درصد پوشش با اولین توالی مشابه برای یک ژن کدکننده LWM-GS در بانک اطلاعاتی NCBI بودند (جداول ۳ تا ۶).

برای اولین جفت آغازگر (P1) باندی به وزن ۹۱۵ نوکلئوتید تکثیر شد که در میان گونه‌های مورد بررسی با دو بار خوانش بین ۴۵۴ تا ۸۷۷ نوکلئوتید آن توالی‌یابی شد. توالی‌های به‌دست آمده در گونه‌های *T. aestivum*، *Ae. crassa*، *Ae. tauschii*، *T. durum*، *T. boeoticum*، *Ae. juvenalis* و *Ae. vavilovi* به‌ترتیب ۸۴، ۸۶، ۸۸، ۹۸، ۷۴ و ۷۸ درصد با توالی مشابه در یک نمونه *T. aestivum* و توالی‌های به‌دست آمده در گونه *Ae. cylindrica* معادل ۷۵ با توالی مشابه در یک نمونه *Ae. tauschii* ثبت شده در بانک اطلاعاتی NCBI شباهت داشت

درصد با توالی مشابه در یک نمونه *T. aestivum* ثبت شده در بانک اطلاعاتی شباهت داشت (جدول ۴). قطعه تکثیر شده در سه گونه *Ae. crassa*، *Ae. juvenalis* و *Ae. vavilovi* دارای شباهت بسیار بالایی با یک ژن کدکننده LMW-Gs جدا شده از رقم Wumangchunmai بودند.

در بررسی انجام شده جهت ارزیابی ژنوتیپ‌های گونه *Ae. tauschii* با استفاده از آغازگر P2 سه آلل مختلف به اندازه‌های ۵۰۰، ۳۲۰ و ۲۹۰ جفت‌باز در میان ژنوتیپ‌های مختلف تکثیر شد. همچنین مشاهده شد که در بین نمونه‌های مختلف این گونه تنوع قابل ملاحظه‌ای برای این آلل‌ها مشاهده می‌شود (Fatahian et al. 2015). در یک مطالعه دیگر به منظور ارزیابی پروتئین‌های دارای وزن مولکولی پائین در میان ۶۲ ژنوتیپ گندم نان، از آغازگر P2 استفاده شد. این آغازگر شش قطعه به طول تقریبی ۴۵۰ تا ۵۰۰ جفت‌باز را در میان نمونه‌های مورد بررسی تکثیر کرد و تنوع قابل ملاحظه‌ای برای این آلل‌ها در میان ژنوتیپ‌های مورد بررسی مشاهده شد. همچنین این محققان گزارش کردند که آلل‌های شناسایی شده توسط آغازگر P2 دارای تاثیر مثبت بر روی کیفیت نان بوده و استفاده از آن‌ها را در برنامه‌های اصلاحی گندم نان قابل توصیه می‌باشد (Hoseinian Khoshru et al. 2010).

برای سومین جفت آغازگر (P3) یک قطعه به طول ۳۰۰ نوکلئوتید شناسایی شد که در میان گونه‌های مختلف به طول متوسط بین ۱۴۸ تا ۳۷۰ نوکلئوتید آن توالی‌یابی شد. توالی‌های به دست آمده در گونه‌های *T. aestivum*، *Ae. cylindrica*، *Ae. crassa* و *T. boeoticum* به ترتیب ۸۸، ۱۰۰، ۶۹ و ۹۵ درصد با توالی مشابه در یک نمونه *T. aestivum* و توالی‌های به دست آمده در گونه‌های *Ae. tauschii*، *Ae. juvenalis* و *Ae. vavilovi* به ترتیب ۸۷، ۷۷ و ۹۴ درصد با توالی مشابه در یک نمونه *Ae. tauschii* ثبت شده در بانک اطلاعاتی NCBI شباهت داشت (جدول ۵). برای چهارمین جفت آغازگر (P4) قطعه‌ای به طول ۴۱۵ نوکلئوتید شناسایی شد که در میان گونه‌های مختلف به طول متوسط بین ۳۶۰ تا ۴۴۸ نوکلئوتید آن توالی‌یابی شد. توالی‌های به دست آمده در گونه‌های *T. aestivum*، *Ae. crassa*، *Ae. tauschii*، *Ae. juvenalis* به ترتیب ۹۹، ۹۶ و ۹۸ درصد با توالی مشابه در یک نمونه *T. aestivum* و توالی‌های به دست آمده در گونه‌های *Ae. boeoticum*، *Ae. juvenalis*، *Ae. cylindrica* و *Ae. vavilovi* به ترتیب ۹۲، ۹۹، ۹۴ و ۹۹ درصد با توالی مشابه در یک نمونه *Ae. tauschii* ثبت شده در بانک اطلاعاتی NCBI شباهت داشت (جدول ۶).

جدول ۴- مقایسه شباهت توالی‌های تکثیر شده آغازگر P2 در میان پنج گونه مورد بررسی با توالی‌های مشابه ثبت شده در بانک اطلاعاتی NCBI.

No.	Species	Seq. Size	E-Value	BLAST	نمونه مشابه در NCBI
۵	<i>T. aestivum</i>	۳۰۰	5e ⁻¹¹³	٪۸۶	<i>T. aestivum</i> isolate KC16829 low molecular weight glutenin subunit t128 (LMW) gene, partial cds (gi 886967)
۱	<i>Ae. tauschii</i>	۳۷۰	0	٪۹۹	<i>T. aestivum</i> cultivar Chinese Spring LMW-D8 (Glu-3) gene, complete cds (gi 886967)
۱	<i>Ae. crassa</i>	۳۰۰	0	٪۹۶	<i>T. aestivum</i> cultivar Wumangchunmai low-molecular-weight glutenin subunit (LMW-GS) pseudogene, LMW-GS-B3-548 allele, partial sequence (gi 886965)
۲	<i>Ae. juvenalis</i>	۳۷۰	2e ⁻¹⁴⁴	٪۹۳	<i>T. aestivum</i> cultivar Wumangchunmai low-molecular-weight glutenin subunit (LMW-GS) pseudogene, LMW-GS-B3-548 allele, partial sequence (gi 886967)
۱	<i>Ae. vavilovi</i>	۳۰۰	0	٪۹۶	<i>T. aestivum</i> cultivar Wumangchunmai low-molecular-weight glutenin subunit (LMW-GS) pseudogene, LMW-GS-B3-548 allele, partial sequence (gi 886965)

جدول ۵- مقایسه شباهت توالی‌های تکثیر شده آغازگر P3 در میان هفت گونه مورد بررسی با توالی‌های مشابه ثبت شده در بانک اطلاعاتی NCBI.

No.	Species	Seq. Size	E-Value	BLAST	نمونه مشابه در NCBI
۱	<i>T. aestivum</i>	۶۸۶	4e-111	%۸۸	<i>T. aestivum</i> Glu-1D-1d gene for high molecular weight glutenin subunit 5 (gi 288860106)
۲	<i>Ae. cylindrica</i>	۳۵۱	7e-08	%۶۹	<i>T. aestivum</i> high molecular weight glutenin subunit (Glu-D1-1) gene, complete cds
۳	<i>Ae. tauschii</i>	۸۶۱	4e-04	%۸۷	<i>Ae. tauschii</i> high molecular weight glutenin subunit 1Dx5*t gene, complete cds
۴	<i>Ae. crassa</i>	۷۴۱	0	%۱۰۰	<i>T. aestivum</i> chromosome 3B, genomic scaffold, cultivar Chinese Spring
۵	<i>T. boeoticum</i>	۳۷۱	E3-98	%۹۵	<i>T. aestivum</i> HMW glutenin 1Mgx gene, complete cds 1D (gi 736319)
۶	<i>Ae. juvenalis</i>	۸۶۱	2e-05	%۷۷	<i>Ae. tauschii</i> clone R2 HMW glutenin subunit Dtx1.5 gene, complete cds
۷	<i>Ae. vavilovi</i>	۵۵۱	e1-113	%۹۴	<i>Ae. tauschii</i> HMW glutenin subunit (Glu) gene, Glu-1Dx5 allele, complete cds (gi 736319)

جدول ۶- مقایسه شباهت توالی‌های تکثیر شده آغازگر P4 در میان هفت گونه مورد بررسی با توالی‌های مشابه ثبت شده در بانک اطلاعاتی NCBI.

No.	Species	Seq. Size	E-Value	BLAST	نمونه مشابه در NCBI
۱	<i>T. aestivum</i>	۲۶۱	5e-169	%۹۹	<i>T. aestivum</i> cultivar Xinong538 high molecular weight glutenin (HMW-G) gene, complete cds (gi 21751)
۲	<i>Ae. cylindrica</i>	۷۴۱	3e-172	%۹۴	<i>Ae. tauschii</i> cultivar IG48561 high molecular weight glutenin subunit 1Dy (Glu-D1-2) gene, complete cds (gi 21779)
۳	<i>Ae. tauschii</i>	۷۴۱	1e-179	%۹۸	<i>T. aestivum</i> cultivar Xinong538 high molecular weight glutenin (HMW-G) gene, complete cds (gi 21751)
۴	<i>Ae. crassa</i>	۸۷۱	3e-141	%۹۶	<i>T. aestivum</i> isolate CN16-Dy high molecular weight glutenin subunit 1Dy protein (Glu-D1-2) gene, complete cds (gi 21779)
۵	<i>T. boeoticum</i>	۸۶۱	9e-122	%۹۲	<i>Ae. tauschii</i> high molecular weight glutenin subunit 1Dy10.5t gene, complete cds (gi 21779)
۶	<i>Ae. juvenalis</i>	۴۸۱	3e-176	%۹۹	<i>Ae. tauschii</i> cultivar IG48561 high molecular weight glutenin subunit 1Dy (Glu-D1-2) gene, complete cds (gi 21779)
۷	<i>Ae. vavilovi</i>	۶۸۱	1e-175	%۹۹	<i>Ae. tauschii</i> cultivar IG48561 high molecular weight glutenin subunit 1Dy (Glu-D1-2) gene, complete cds (gi 21779)

شده توسط آغازگر P3 با بندهای ۲ + ۵ پروتئین‌های HMW-Gs یافت شد. همچنین رابطه نزدیکی میان قطعه تکثیر شده به‌وسیله آغازگر P4 با بندهای ۱۰ + ۱۲ یافت شد. قطعات تکثیر شده توسط آغازگر ۳ و ۴ برای همه ژنوتیپ‌های مورد بررسی در میان ارقام گندم نان مصری تک شکل بودند. همچنین نتایج بررسی کیفی در میان ارقام نشان داد که ارقام گندم حامل بندهای ۱۰+۲ به نسبت از خصوصیات کیفی بالاتری برخوردار بودند (Kadi et al. 2017).

قطعه تکثیر شده در گونه‌های *T. aestivum* و *Ae. tauschii* بیش از ۹۸ درصد با یک ژن کدکننده HMW-Gs جدا شده از رقم زراعی Xinong538 شباهت داشتند. همچنین قطعه تکثیر شده در گونه‌های *Ae. cylindrica*، *Ae. juvenalis* و *Ae. vavilovi* دارای شباهت بسیار بالایی با یک ژن کدکننده HMW-Gs شناسایی شده از رقم زراعی IG48561 بودند. در یک مطالعه جهت بررسی پروتئین‌های ذخیره‌ای دانه در میان ۱۶ ژنوتیپ گندم نان مصری با استفاده از آغازگرهای P3 و P4 رابطه نزدیکی میان قطعه تکثیر

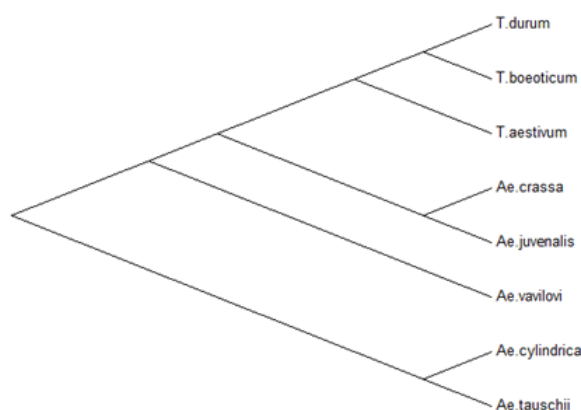
در یک تحقیق دیگر به منظور بررسی کیفیت نانوائی در میان ۲۵ رقم از گندم‌های نان ایرانی و استرالیایی با استفاده از آغازگرهای P3 و P4، آغازگر P3 دو بند با وزن ۲۸۱ و ۲۹۹ جفت‌باز به ترتیب برای زیر واحدهای Dx2 و Dx5 و آغازگر P4 دو بند با وزن ۳۹۷ و ۴۱۵ جفت‌باز به ترتیب برای زیرواحدهای Dy10 و Dy12 را تکثیر کردند (Izanloo et al. 2016).

در یک مطالعه مشابه تعداد ۱۰۶۸ نمونه گندم بومی آسیایی با هدف ارزیابی پروتئین‌های ذخیره‌ای دانه و کیفیت نانوائی مورد بررسی قرار دادند. در این بررسی از شش جفت آغازگر اختصاصی گلوئین گندم از جمله آغازگر ۳ و ۴ استفاده شد. آغازگر شماره ۳ قطعه‌ای به طول ۲۸۱ تا ۲۹۹ جفت‌باز و آغازگر شماره ۴ قطعه‌ای به طول ۳۹۷ تا ۴۱۵ جفت‌باز را تکثیر کرد. بیشترین تنوع در میان گندم‌های مورد بررسی برای آلل‌های Glu-D1 تکثیر شده به وسیله آغازگرهای ۳ و ۴ شناسایی شد. هم‌چنین گزارش شد که نمونه‌های جمع‌آوری شده از غرب آسیا از تنوع بیشتری نسبت به نمونه‌های شرق آسیا برخوردار هستند و با گروه‌بندی نمونه‌های مورد بررسی بر اساس آلل‌های HMW-Gs تکثیر شده توسط این آغازگرها نمونه‌های مورد بررسی را به سه گروه تقسیم کردند. نمونه‌های شرق آسیا و افغانستان در یک گروه و نمونه‌های غرب آسیا و چین در گروه دیگری قرار گرفتند (Lee et al. 2018).

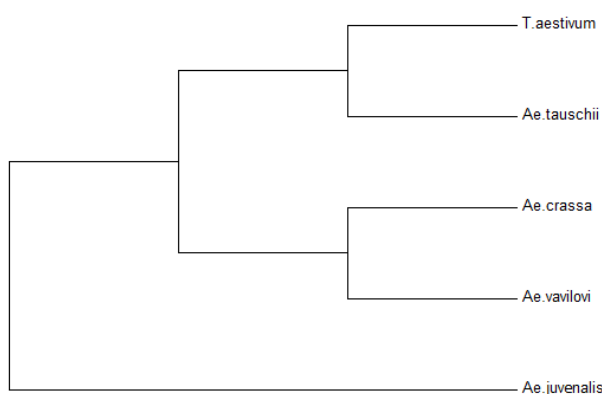
روابط فیلوژنتیکی میان گونه‌ها براساس توالی قطعه DNA تکثیر شده توسط جفت آغازگر شماره ۱ در اولین درخت فیلوژنتیکی نشان داده شده است (شکل ۲) در این درخت فیلوژنتیکی گونه‌های *T. aestivum*، *T. durum*، *T. boeoticum* در یک گروه قرار گرفته‌اند. این سه گونه همگی حاوی ژنوم A می‌باشند. سه گونه *Ae. crassa*، *Ae. juvenalis* و *Ae. vavilovi* که همگی حامل ژنوم M می‌باشند در یک گروه قرار گرفته و گونه‌های *Ae. cylindrica* و *Ae. tauschii* نیز در یک گروه و در فاصله بیشتری از آن‌ها قرار گرفتند.

دومین درخت فیلوژنتیکی براساس توالی قطعه DNA تکثیر شده توسط جفت آغازگر شماره ۲ ترسیم شده است. در دومین درخت فیلوژنتیکی گونه‌های *T. aestivum* و والد دیپلوئید ژنوم D آن گونه *Ae. tauschii* در یک گروه قرار گرفتند و دو گونه

براساس توالی قطعه DNA متعلق به HMW-Gs تکثیر شده توسط جفت آغازگر شماره ۳ سومین درخت فیلوژنتیکی ترسیم شد.



شکل ۲- درخت روابط فیلوژنتیکی میان گونه‌های مورد بررسی بر اساس توالی ژن LMW-Gs تکثیر شده توسط آغازگر شماره ۱

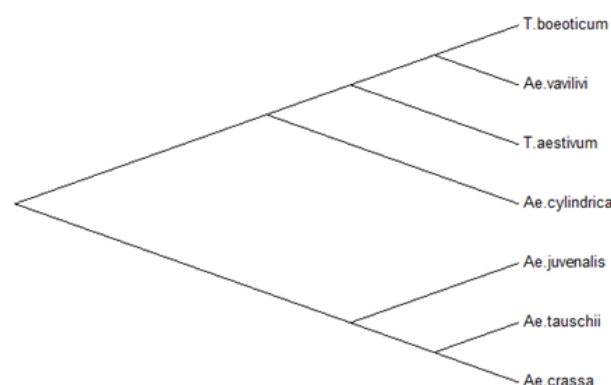


شکل ۳- درخت روابط فیلوژنتیکی گونه‌های مورد بررسی بر اساس توالی ژن LMW-Gs تکثیر شده توسط آغازگر شماره ۲

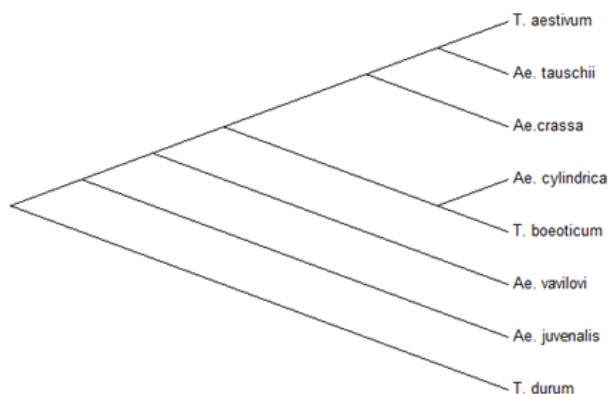
در این درخت فیلوژنتیکی دو شاخه اصلی وجود دارد که در یک شاخه *T. boeoticum*، *Ae. vavilovi*، *T. aestivum* و *Ae. cylindrica* قرار گرفته و در شاخه دیگر سه گونه *Ae. juvenalis*، *Ae. crassa* و *Ae. tauschii* قرار گرفته‌اند. در این درخت نیز وجود گونه‌های *T. boeoticum* و *T. aestivum* که دارای ژنوم A

والد ژنوم D شناخته می‌شود، با فاصله متوسطی از سایر گونه‌ها قرار داشته و تقریباً با همه گونه‌ها شباهت نشان داد. در یک مطالعه با استفاده از تنوع پروتئین‌های HMW-Gs در میان تعدادی از گونه‌های آزیلوپس سه گونه *Ae. tauschii*, *Ae. crassa* و *Ae. cylindrica* در گروه‌های مجزایی قرار داشتند (Ghorbani et al. 2013). در یک مطالعه دیگر به منظور بررسی روابط ژنتیکی میان چهار گونه *T. aestivum*, *Ae. tauschii*, *Ae. crassa* و *Ae. cylindrica* با استفاده از نشانگرهای SSR مبتنی بر ژنوم D دو گونه *Ae. tauschii* و *Ae. cylindrica* در یک گروه نزدیک به یکدیگر و گونه *T. aestivum* در فاصله کمتری از این گروه قرار داشت. در حالی که گونه *Ae. crassa* در فاصله بیش‌تری از سایرین در یک گروه مجزا قرار گرفت (Naghavi et al. 2009). در یک مطالعه مشابه در درخت فیلوژنتیکی ترسیم شده براساس توالی ژن‌های کدکننده LMW-Gs گونه‌های *Ae. crassa*, *Ae. tauschii* و *Ae. cylindrica* نزدیک‌ترین گونه‌ها به *T. aestivum* بودند (Naghavi et al. 2013).

هستند در یک گروه و گونه‌های *Ae. crassa* و *Ae. juvenalis* که دارای ژنوم مشابهی هستند دور از انتظار نبود. گونه *Ae. tauschii* نیز والد ژنوم D در همه این گونه‌ها است و قرار گرفتن آن در کنار گونه‌های حامل این ژنوم مورد انتظار است. با این حال گونه *Ae. vavilovi* اگرچه از نظر دارا بودن ژنوم D به *T. aestivum* شباهت‌هایی دارد اما به لحاظ ژنومی بیش‌تر به گونه *Ae. crassa* شباهت دارد (شکل ۴).



شکل ۴ - درخت روابط فیلوژنتیکی گونه‌های میان مورد بررسی بر اساس توالی ژن HMW-Gs تکثیر شده توسط آغازگر ۳



شکل ۵- درخت فیلوژنتیکی گونه‌های مورد بررسی بر اساس توالی ژن LMW-Gs شناسایی شده توسط آغازگر ۴

نتایج بیانگر آن بود که در میان هشت گونه مورد بررسی پروتئین‌های گلوتنین با وزن مولکولی کم LMW-Gs و گلوتنین‌های با وزن مولکولی زیاد HMW-Gs مشترک بوده و ژن‌های مشابهی با وزن مولکولی مشابه در میان همه گونه‌ها یافت شد. به‌طوری‌که با استفاده از یک آغازگر معین امکان تکثیر ژن‌ها تقریباً در میان همه گونه‌ها مقدور است. در بررسی توالی ژن‌های

براساس توالی قطعه DNA متعلق HMW-Gs تکثیر شده توسط جفت آغازگر شماره ۴ در چهارمین درخت فیلوژنتیکی سه گونه *Ae. tauschii*, *Ae. crassa*, *T. aestivum* و در شاخه دیگر دو گونه *Ae. cylindrica* و *T. boeoticum* و سپس سه گونه *Ae. vavilovi*, *Ae. juvenalis* و *T. durum* به‌ترتیب در شاخه‌های جدا و دورتر از بقیه قرار گرفتند (شکل ۵).

در مجموع گونه *T. aestivum*، با گونه *T. boeoticum* که دارای ژنوم A است و همچنین گونه *Ae. tauschii* که والد ژنوم D گندم است، از نظر ساختار ژن‌های کدکننده گلوتنین‌ها دارای شباهت‌هایی با یکدیگر بوده و در گروه‌های فیلوژنتیکی نزدیک به هم قرار گرفتند. دو گونه *Ae. juvenalis* و *Ae. vavilovi* اگرچه شباهت زیادی با یکدیگر نشان نمی‌دهند، اما دارای شباهت‌هایی با گونه والدی *Ae. crassa* بوده و معمولاً با این گونه در یک گروه قرار گرفتند. در هر حال گونه *Ae. tauschii* که به عنوان

حامل ژنوم D می‌تواند به‌عنوان منبع ارزشمندی برای توسعه کیفیت نان در گونه‌های تجاری گندم نان به‌کار برده شود.

در بررسی ۵ واریته از گندم نان مصری و یک نمونه آرژیلوپس با استفاده از ۲۰ نشانگر SSR از جمله نشانگرهای اختصاصی HMW-Gs نشان داده شد که این نشانگرها با شناسایی باندهای پروتئینی HMW-Gs مرتبط با کیفیت نانویی می‌توانند برای انتخاب ارقام گندم برتر مورد استفاده قرار گیرند (Abdelsalam, 2014).

در یک مطالعه مشابه رابطه میان پروتئین‌های ذخیره‌ای دانه در میان گونه *T. urartu* والد دیپلوئید ژنوم A و گونه *Ae. tauschii* والد دیپلوئید ژنوم D با گندم نان را با استفاده از آغازگرهای اختصاصی HMW-Gs مورد بررسی قرار دادند. مشخص شد که هشت ژن LMW-Gs در گندم دیپلوئید *T. urartu* وجود دارد. بیش‌ترین تنوع در میان گندم‌های جنوب ترکیه یافت شد. بنابراین آن‌ها این ناحیه را به‌عنوان مرکز تنوع این گندم معرفی کردند. تجزیه فیلوژنتیکی نشان داد که احتمالا گونه *T. urartu* والد اصلی ژنوم A در گندم نان است. همچنین دریافتند که گونه دیپلوئید *T. urartu* نسبت به گندم نان از تنوع بسیار بالایی برای ژن‌های LMW-Gs برخوردار بوده و می‌تواند به‌عنوان منبع تنوع ژنتیکی در برنامه‌های به‌نژادی گندم مورد استفاده قرار گیرد (Luo et al., 2015).

در بررسی ژن‌های LMW-Gs در ۲۱۸ نمونه از گونه دیپلوئید *Ae. tauschii* و ۱۳۸ نمونه از گندم نان با استفاده از نشانگرهای مولکولی نمونه‌های *Ae. tauschii* حاوی ۱۱ ژن LMW-Gs بودند که در قالب ۲۵ هاپلوتا‌پ گروه‌بندی شدند. علاوه بر این در میان نمونه‌های گندم نان تنها ۸ ژن LMW-Gs شناسایی شد. نتایج این پژوهش نشان داد که گونه *Ae. tauschii* ssp. *strangulata* که در جنوب دریای خزر در ایران گسترش دارد و می‌تواند والد ژنوم D در گندم نان باشد (Shvn et al., 2018).

بنابراین با توجه به تنوع بالا گونه‌های خویشاوند گندمیان در ایران و روابط فیلوژنتیکی نزدیک ناشی از شباهت ژنومی زیاد این گونه‌ها با گندم نام این تنوع به‌عنوان یک پتانسیل بالقوه می‌تواند برای بهبود کیفیت محصول نان در برنامه‌های اصلاحی گندم نان مورد استفاده قرار گیرد.

مشابه در میان گونه‌های مورد بررسی مشاهده شد که در برخی از گونه‌ها، توالی ژن‌های کدکننده گلوتنین‌ها بسیار شبیه به یکدیگر هستند. از جمله قطعه تکثیر شده توسط آغازگر P2 در سه گونه *Ae. crassa*, *Ae. juvenalis* و *Ae. vavilovi* هر سه دارای شباهت بسیار بالایی با یک ژن کدکننده LMW-Gs جدا شده از رقم Wumangchunmai بودند. همچنین قطعه تکثیر شده توسط آغازگر P3 در گونه‌های *Ae. cylindrica*, *Ae. juvenalis* و *Ae. vavilovi* دارای شباهت بسیار بالایی با یک ژن کدکننده HMW-Gs جدا شده از رقم زراعی IG48561 بودند. با این‌حال مشاهده شد که در اغلب موارد قطعات مشابه تکثیر شده در گونه‌های مختلف دارای تفاوت‌هایی با یکدیگر بوده و تنوع برای توالی نوکلئوتیدها در میان گونه‌ها وجود دارد. در یک مطالعه با استفاده از دو آغازگر اختصاصی که تنوع پروتئین‌های با وزن مولکولی کم را در میان گونه‌های گندمیان مورد بررسی قرار داده بودند ۱۸ آلل مختلف را در میان نمونه‌های *Ae. tauschii* شناسایی کردند بطوریکه در هر نمونه بین یک تا سه قطعه مشاهده شد. این محققان اظهار داشتند که برای پروتئین‌های با وزن مولکولی کم تنوع آلی قابل ملاحظه‌ای در میان گونه‌های جنس *Aegilops* وجود دارد (Khoshro et al., 2010). تنوع موجود برای این ژن‌های اساسی در میان گونه‌های خویشاوند می‌تواند برای درک سیر تکاملی و روابط فیلوژنتیکی میان گونه‌ها به‌کار برده شود. در مجموع مقایسه توالی ژن‌های گلوتنین در میان گونه‌های مورد بررسی بیانگر روابط نزدیک‌تر میان گونه‌های *T. aestivum* با گونه *T. boeoticum* و *Ae. tauschii* از یک طرف و روابط نزدیک میان گونه‌های *Ae. crassa*, *Ae. juvenalis* و *Ae. vavilovi* از طرف دیگر بود.

گزارش شده‌است که پروتئین‌های با وزن مولکولی پائین حدود یک سوم پروتئین ذخیره‌ای و ۶۰ درصد گلوتنین دانه را تشکیل می‌دهند (Bietz and Wall 1973). همچنین در مطالعات متعددی نشان داده شده‌است که تنوع آلی برای لوکوس‌های LMW-GS با تفاوت معنی‌دار در کیفیت خمیر ارقام گندم نان (Gupta et al., 1994) و گندم دوروم مرتبط است (Pogna et al., 1990; Ruiz et al., 1993). بنابراین تنوع فوق‌العاده شناسایی شده در گونه‌های

منابع

- Abdelsalam NR, (2014) Marker assisted-selection of major traits in egyptian bread wheat (*Triticum aestivum* L.) and wild wheat (*Aegilops ventricosa tausch*). Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology 15: 79-86
- Dupont FM, Altenbach SB (2003) Molecular and biochemical impacts of environmental factors on wheat grain development and protein synthesis. Journal of Cereal Science 38: 133-146.
- El-Kadi DA, Darwish DS, Moghaieb REA, I.H.Yacoub IHY, (2017) Variation among some Egyptian wheat Variation among some Egyptian wheat. Bioscience Research 14: 370-379.
- Fatahian S, Aalami1 A, Azizi H (2014) The study of genes coding different glutenin subunits in *Aegilops tauschii* using EST-based markers. 13th Iranian Crop Sciences Congress. Karaj. Iran. (In Farsi)
- Field JM, Shewry PR, Miflin BJ (1983b) Solubilisation and characterisation of wheat gluten proteins: correlations between amount of aggregated proteins and baking quality. Journal of the Science of Food and Agriculture 34: 370-377.
- Ghorbani P, Jaffaraghaei M, Vaezi S, Ebrahimi MA (2013) Evaluation and comparison of seed storage proteins in several Aegilops species from Iran. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research 21:198-208. (In Farsi)
- Gupta RB, MacRitchie F (1994) Allelic variation at glutenin subunit and gliadin loci, *Glu-1*, *Glu-3* and *Gli-1*, of common wheats. II. Biochemical basis of the allelic effects on dough properties. Journal of Cereal Science 19:19-29
- Hoseinian Khoshru H, Bihamta MR, Hasani ME, Omid M (2010) Allelic Diversity of Low-Molecular-Weight Glutenin Subunits in Commercial Genotypes of Iranian Bread Wheat (*Tritium aestivum* L.) using Specific Markers. Iranian Journal of Field Crop Science 41: 345-354. (In Farsi)
- Izanloo A, Parsa S, Ghaderi MG, Pahlavani S (2016) Allelic Variation of High Molecular Weight Glutenin Subunits in Bread Wheat Cultivars Using Allele Specific Markers. Agricultural Biotechnology 7: 105-116. (In Farsi)
- Khoshro HH, Bihamta MR, Hassanii ME, Omid M, Aghaei MJ (2010) Length Polymorphism at the *Glu-A3* and *Glu-D3* in Wild Relatives of Wheat. Cereal Research Communications 38: 375-385
- Kuktaitea R, Larssonb H, Johansson E (2003) Variation in protein composition of wheat flour and its relationship to dough mixing behavior. Journal of Cereal Science 40: 31-39
- Lee S, Choi YM, Lee MC, Hyun DY, Oh S, Jung Y (2018) Geographical comparison of genetic diversity in Asian landrace wheat (*Triticum aestivum* L.) germplasm based on high-molecular-weight glutenin subunits. Genetic Resources and Crop Evolution 65:1591-1602
- Li CX, Xu WG, Guo R, Zhang JZ, Qi XL, Hu L, Zhao MZ (2018) Molecular marker assisted breeding and genome composition analysis of Zhengmai 7698, an elite winter wheat cultivar. Scientific Reports 8:322.
- Luo G, Zhang X, Zhang Y, Yang W, Li Y, Sun J, Zhan K, Zhang A, Liu D (2015) Composition, variation, expression and evolution of low-molecular-weight glutenin subunit genes in *Triticum urartu*. BMC Plant Biology 15:2-14
- Naghavi MR, Ahmadi S, Shanejat-Boushehri SN, Komaei G, Struik PC (2013) Characterization of low-molecular-weight-glutenin subunit genes from the D-genome of *Triticum aestivum*, *Aegilops crassa*, *Ae. cylindrica* and *Ae. tauschii*. Biochemical Systematics and Ecology 50: 23-29
- Naghavi MR, Jaffaraghaei M, Taleei AR, Omid M, Mozafari J, Hassani ME (2009) Genetic diversity of the D genome in *T.aestivum* and *Aegilops tauschii* species using SSR markers. Genetic Resources and Crop Evolution 56:499-506.
- Nasiri J, Naghavi MR, Naseri Rad S, Yolmeh T, Shirazi M, Naderi R, Nasiri M, Ahmadi S (2013) Gene Identification Programs in Bread Wheat: A Comparison Study. Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids 32: 529-554
- Pogna NE, Autran JC, Mellini F, Lafiandra D, Feillet P (1990) Chromosome 1B encoded gliadins and glutenin subunits in durum wheat: Genetics and relationship to gluten strength. Journal of Cereal Science 11: 15-34.
- Ruiz M, Carrillo JM (1993) Linkage relationships between prolamins genes on chromosomes 1A and 1B of durum wheat. Theoretical and Applied Genetics 87: 353-360.
- Sapirstein HD, Fu BX (1998) Intercultivar variation in the quantity of monomeric proteins, soluble and insoluble glutenin, and residue protein in wheat flour and relationships to bread making quality. Cereal Chemistry 75: 500-507.
- Shen L, Luo G, Song Y, Song S, Li Y, Yang W, Xin Li, Sun J, Liu D, Zhang A (2018) Low molecular weight glutenin subunit gene composition at Glu-D3 loci of *Aegilops tauschii* and common wheat and a further view of wheat evolution. Theoretical and Applied Genetics 131: 2745-2763.
- Shewry PR, Halford NG, Belton PS, Tatham AS (2002) The structure and properties of gluten: an elastic protein from wheat grain. Philosophical Transactions of the Royal Society of London-Series B: Biological Sciences 357: 133-142.
- Shewry PR, Tatham AS (1990) The prolamin storage proteins of cereal seeds: structure and evolution. Journal of Biochemistry 267: 1-12.
- Singh H, MacRitchie F (2001) Application of polymer science to properties of gluten. Journal of Cereal Science 33: 231-243.
- van Herpen TM, Goryunova SV, van der Schoot J, Mitreva M, Salentijn E, Vorst O, Schenk MF, van Veelen PA, Koning F, van Soest LJM, Vosman B, Bosch D, Hamer RJ, Gilissen LJ, Smulders MJ (2006) Alpha-gliadin genes from the A, B, and D genomes of wheat contain different sets of celiac disease epitopes. BMC Genomics 7:1-13.

Wall JS (1979) The role of wheat proteins in determining baking quality. In: Laidman DL, Wyn Jones RG (Eds.), Recent advances in the biochemistry of cereals, Academy, London pp. 275-311.

Weegels PL, Hamer RJ, Schofield JD (1996) Functional properties of wheat glutenin. *Journal of Cereal Science* 23: 1-18.

Wrigley CW (1996) Giant proteins with flour power. *Nature* 381: 738-739.