ژنتیک نوین
دوره سیزدهم، شماره ٤، زمستان ۱۳۹۷
صفحه ۵۳۵ - ۵۲۵

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 M[1], Nejadsattari T[1], 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: ۹۷/۷/۲٤ - تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۲/۱۵)

چکیده

گندم مهم‌ترین گیاه زراعی و منبع اصلی غذا برای بیش از٤٠ 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 و 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 نوکلوئوتیدها 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 معمولا 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
گونه های آژیلوپس

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.4.7.0]

مقدمه

گندم به‌دلیل ارزش غذایی، ویژگی‌های تکنولوژیکی و طول عمر زیاد دانه آن یکی از مهم‌ترین منابع غذایی بشر است. خصوصیات نهایی محصول آرد گندم به‌شدت 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 به‌وسیله باندهای دی‌سولفید که HMW-Gs و LMW-Gs را به‌همدیگر متصل می‌کند تشکیل می‌شوند. این پروتئین‌های پلیمریک مهم‌ترین نقش را در کیفیت نانوایی دارند (Dupont and Altenbach 2003; Field et al. 1983b). به‌دلیل 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 آلل‌های نسبتا مشابهی از گلوتنین‌ها و گلیادین‌ها در جایگاه‌های ژنتیکی مشابهی بر روی ژنوم آن‌ها یافت می‌شود (Ghorbani et 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*، *T. boeoticum*، *Ae. cylindrica*، *Ae. tauschii*، *Ae. crassa*، *Ae. juvenalis*، *Ae. vavilovi* با استفاده چهار آغازگر اختصاصی گلوتنین مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

تعداد ۶۹ نمونه از گونه‌های *T. aestivum*، *T. durum*، *T. boeoticum*، *Ae. cylindrica*، *Ae. tauschii*، *Ae. crassa*، *Ae. juvenalis*، *Ae. vavilovi* 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	*T. aestivum*	2n=6x	AABBDD	۱۰
۲	*T. durum*	2n=4x	AABB	۱۰
۳	*T. boeoticum*	2n=2x	AA	۱۰
۴	*Ae. cylindrica*	2n=4x	CCDD	۱۰
۵	*Ae. tauschii*	2n=2x	DD	۱۱
۶	*Ae. crassa*	2n=4x	DDMM	۸
۷	*Ae. juvenalis*	2n=6x	DDMMUU	۷
۸	*Ae. vavilovi*	2n=6x	DDMMSS	۴

DNA ژنومی از برگ‌های جوان گیاهان کشت شده در گلدان و با استفاده از روش CTAB (ستیل تری متیل آمونیوم بروماید) 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، آب‌مقطر 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 ۱دقیقه، 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 مجددا PCR انجام شد. توالی‌یابی توسط شرکت فزا پژوه انجام شد. مقایسه تشابه و شکل توالی‌های DNA با استفاده از بانک اطلاعات NCBI صورت گرفت.

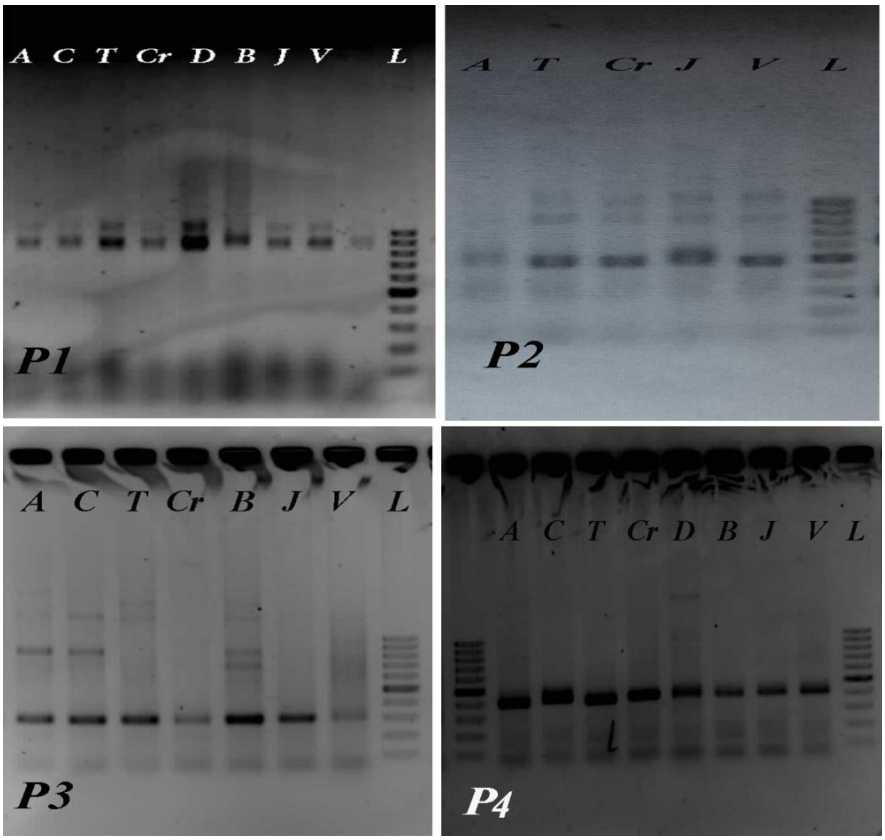
بر اساس توالی DNA، درخت فیلوژنتیک ۸ گونه با استفاده از نرم‌افزار MEGA 7 تشکیل شد و در نهایت براساس روابط میان گونه‌ها در درخت‌های فیلوژنتیکی مختلف نتایج جمع‌بندی و روابط میان گونه‌ها تجزیه و تحلیل شد.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.4.7.0]

جدول۲ – توالی، دمای اتصال، محل اتصال و طول قطعه تکثیر شده آغازگرهای به‌کار برده شده در مطالعه.

آغازگر	جهت	توالی ('5→'3)	دمای اتصال (°C)	محل توالی	طول توالی (bp)	مآخذ
P1	F	ATGAAGACCTTCCTCGTCTTTGC'	٦٠	1DS	٩١٥	Benmoussa et al. (2000)
	R	TCAGTAGGCACCAACTCCGGTGC				
P2	F	CCTGGCTTGGAGAAACCATC	٥٠	1DS	٥٠٠	Hai Long (2005)
	R	CAAGATAGATGGCTGAATAT				
P3	F	GGGACAATACGAGCAGCAAA	٥٥	1DS	٢٩٦	Sixin Liu et al. (2008)
	R	CTTGTTCCGGTTGTTGCCA				
P4	F	CGCAAGACAATATGAGCAAACT	٥٥	1DS	٤١٥	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 ٤. 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

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-04-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.4.7.0]

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	*T. aestivum*	۶۵۴	2e-98	٪۸۴	*T. aestivum* cultivar Zheng366 low-molecular-weight glutenin subunit gene, partial cds (gi 817033923)
۱۰۴	*Ae. cylindrica*	۶۸۵	0/13	٪۷۵	*Ae. tauschii* isolate t086 LMW-GS (glu-3) pseudogene, partial sequence (gi 75219081)
۶۸	*Ae. tauschii*	۰۶۶	2e-99	٪۸۴	*T. aestivum* clone ZH3660-13 low molecular weight glutenin subunit (glu-3) gene, complete cds (gi 508732627)
۱۰۱	*Ae. crassa*	۵۱۸	1e-91	٪۸۶	*T. aestivum* clone Y34AB-1 low-molecular-weight glutenin subunit (LMW-GS) pseudogene, complete sequence (gi 21930)
۵۹	*T. durum*	۸۸۷	0	٪۸۸	*T. aestivum* low-molecular-weight glutenin subunit (GluA3-5) gene, complete cds (gi7521908)
۸۵	*T. boeoticum*	۵۸۷	0	٪۹۸	*T. aestivum* low-molecular-weight glutenin subunit (GluA3-5) gene, complete cds (gi 21930)
۹۶	*Ae. juvenalis*	۱۵۸۷	2e-126	٪۷۴	*T. aestivum* cultivar Longnan'aigan low-molecular-weight glutenin subunit (LMW-3) gene, complet cdc (gi 170730)
۸۶	*Ae. vavilovi*	۱۰۸	4e-72	٪۷۸	*T. aestivum* strain Yumai34 glutenin subunit (LMW-m1) gene, complete cds (gi 170730)

نتایج و بحث

از میان چهار جفت آغازگر اختصاصی مورد استفاده برای بررسی روابط لوکوس‌های گلوتنین 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 ٤ نیز در گونه *T. durum* تکثیر نشدند. طول قطعات حاصل شده تقریبا با طول قطعات گزارش شده در تحقیقات قبلی (جدول۲) 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 کدکنند LWM-GS در بانک اطلاعاتی NCBI بودند (جداول ۳ تا ٦).

برای اولین جفت آغازگر (P1) باندی به وزن ۹۱۵ نوکلئوتید تکثیر شد که در میان گونه‌های مورد بررسی با دو بار خوانش بین ٤٥٤ 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 ٨٤، ٨٦، ٨٤، ٨٨، ٩٨، ٧٤ و ٧٨ 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 (جدول ۳). در یک مطالعه مشابه با استفاده از آغازگر P1، یک قطعه DNA به طول ۹۱۸ جفت‌باز توالی‌یابی شد که با یک ژن کدکنند 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*، *T.aestivum* مشابه بودند. آن توالی‌های ژنی، شامل یک فریم خواندنی باز(ORF[1]) 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 سیستئین به‌طول به‌ترتیب ۳۰۵ - ۳۰٤ - ۳۰٦ 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 ٤٣٤ تا ٤٥٥ نوکلئوتید آن توالی‌یابی شد. توالی‌های به‌دست آمده در گونه‌های *T. aestivum*، *Ae. crassa*، *Ae. tauschii*، *Ae. juvenalis* و *Ae. vavilovi* به‌ترتیب ٨٦، ٩٦، ٩٩، ٩٣ و ٩٦

[1] - Oper Reading Frame

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.4.7.0]

درصد با توالی مشابه در یک نمونه *T. aestivum* ثبت شده در بانک اطلاعاتی شباهت داشت (جدول ٤). 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 الل 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 به‌منظور ارزیابی پروتئین‌های دارای وزن مولکولی پائین در میان ٦٢ ژنوتیپ گندم نان، از آغازگر P2 استفاده شد. این آغازگر شش قطعه به‌طول تقریبی ٤٥٠ تا ٥٠٠ 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 به‌طول ۳۰۰ نوکلئوتید شناسایی شد که در میان گونه‌های مختلف به‌طول متوسط بین ١٤٨ تا ٣٧٠ نوکلئوتید آن توالی‌یابی شد. توالی‌های به‌دست آمده در گونه‌های *T. aestivum*، *Ae. cylindrica*، *Ae. crassa* و *T. boeoticum* به‌ترتیب ۸۸، ۱۰۰، ٦٩ و ۹۵ درصد با توالی مشابه در یک نمونه *T. aestivum* و توالی‌های به‌دست آمده در گونه‌های *Ae. tauschii*، *Ae. Juvenalis* و *Ae. vavilovi* به‌ترتیب ۸۷، ۷۷ و ۹٤ درصد با توالی مشابه در یک نمونه *Ae. tauschii* ثبت شده در بانک اطلاعاتی NCBI شباهت داشت (جدول ٥). برای چهارمین جفت آغازگر (P4) قطعه‌ای به‌طول ٤١٥ نوکلئوتید شناسایی شد که در میان گونه‌های مختلف به‌طول متوسط بین ٣٦٠ تا ٤٤٨ نوکلئوتید آن توالی‌یابی شد. توالی‌های به‌دست آمده در گونه‌های *T. aestivum*، *Ae. crassa*، *Ae. tauschii*، *Ae. juvenalis* به‌ترتیب ۹۹، ۹٦ و ۹۸ درصد با توالی مشابه در یک نمونه *T. aestivum* و توالی‌های به‌دست آمده در گونه‌های *T. boeoticum*، *Ae. juvenalis*، *Ae. cylindrica* و *Ae. vavilovi* به‌ترتیب ۹۲، ۹۹، ۹٤ و ۹۹ درصد با توالی مشابه در یک نمونه *Ae. tauschii* ثبت شده در بانک اطلاعاتی NCBI شباهت داشت (جدول ٦).

جدول ٤- 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
٥	*T. aestivum*	۳۴۴	$5e^{-113}$	٪۸۶	*T. aestivum* isolate KC16829 low molecular weight glutenin subunit t128 (LMW) gene, partial cds (gi 886967)
١٨	*Ae. tauschii*	۵۴۴	0	٪۹۹	*T. aestivum* cultivar Chinese Spring LMW-D8 (Glu-3) gene, complete cds (gi 886967)
٣٤	*Ae. crassa*	۲۱۱	0	٪۹۶	*T. aestivum* cultivar Wumangchunmai low-molecular-weight glutenin subunit (LMW-GS) pseudogene, LMW-GS-B3-548 allele, partial sequence (gi 886965)
٢٦	*Ae. juvenalis*	۵۰۴	$2e^{-144}$	٪۹۳	*T. aestivum* cultivar Wumangchunmai low-molecular-weight glutenin subunit (LMW-GS) pseudogene, LMW-GS-B3-548 allele, partial sequence (gi 886967)
٢٨	*Ae. vavilovi*	۴۴۴	0	٪۹۶	*T. aestivum* cultivar Wumangchunmai low-molecular-weight glutenin subunit (LMW-GS) pseudogene, LMW-GS-B3-548 allele, partial sequence (gi 886965)

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-04-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.4.7.0]

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
۴	*T. aestivum*	۶۸۹	4e-111	٪۸۸	*T. aestivum* Glu-1D-1d gene for high molecular weight glutenin subunit 5 (gi 288860106)
۱۶	*Ae. cylindrica*	۴۷۱	7e-08	٪۶۹	*T. aestivum* high molecular weight glutenin subunit (Glu-D1-1) gene, complete cds
۱۸	*Ae. tauschii*	۸۹۱	4e-04	٪۸۷	*Ae. tauschii* high molecular weight glutenin subunit 1Dx5*t gene, complete cds
۱۸	*Ae. crassa*	۷۹۱	0	٪۱۰۰	*T. aestivum* chromosome 3B, genomic scaffold, cultivar Chinese Spring
۶۵	*T. boeoticum*	۴۷۱	E3-98	٪۹۵	*T. aestivum* HMW glutenin 1Mgx gene, complete cds 1D (gi 736319)
۶۶	*Ae. juvenalis*	۸۶۱	2e-05	٪۷۷	*Ae. tauschii* clone R2 HMW glutenin subunit Dtx1.5 gene, complete cds
۸۸	*Ae. vavilovi*	۶۴۱	e1-113	٪۹۴	*Ae. tauschii* HMW glutenin subunit (Glu) gene, Glu-1Dx5 allele, complete cds (gi 736319)

جدول ٦- 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	*T. aestivum*	۶۰۱	5e-169	٪۹۹	*T. aestivum* cultivar Xinong538 high molecular weight glutenin (HMW-G) gene, complete cds (gi 21751)
۱۰	*Ae. cylindrica*	۲۶۱	3e-172	٪۹۴	*Ae. tauschii* cultivar IG48561 high molecular weight glutenin subunit 1Dy (Glu-D1-2) gene, complete cds (gi 21779)
۱۲	*Ae. tauschii*	۲۶۱	1e-179	٪۹۸	*T. aestivum* cultivar Xinong538 high molecular weight glutenin (HMW-G) gene, complete cds (gi 21751)
۱۳	*Ae. crassa*	۸۷۱	3e-141	٪۹۶	*T. aestivum* isolate CN16-Dy high molecular weight glutenin subunit 1Dy protein (Glu-D1-2) gene, complete cds (gi 21779)
۲۵	*T. boeoticum*	۸۶۱	9e-122	٪۹۲	*Ae. tauschii* high molecular weight glutenin subunit 1Dy10.5t gene, complete cds (gi 21779)
۲۶	*Ae. juvenalis*	۴۸۱	3e-176	٪۹۹	*Ae. tauschii* cultivar IG48561 high molecular weight glutenin subunit 1Dy (Glu-D1-2) gene, complete cds (gi 21779)
۲۸	*Ae. vavilovi*	۶۸۱	1e-175	٪۹۹	*Ae. tauschii* cultivar IG48561 high molecular weight glutenin subunit 1Dy (Glu-D1-2) gene, complete cds (gi 21779)

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 ١٦ ژنوتیپ گندم نان مصری با استفاده از آغازگرهای P3 و P4 رابطه نزدیکی میان قطعه تکثیر 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 ٤ 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 ۲+۱۰ به نسبت از خصوصیات کیفی بالاتری برخوردار بودند (Kadi et al. 2017).

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.4.7.0]

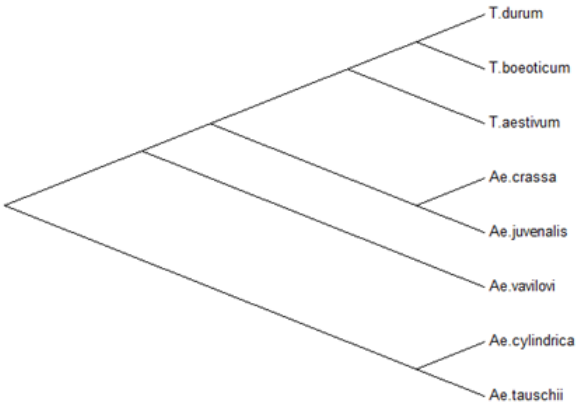
در یک تحقیق دیگر به‌منظور بررسی کیفیت نانوایی در میان ۲۵ رقم از گندم‌های نان ایرانی و استرالیایی با استفاده از آغازگرهای P3و P4، آغازگر P3 دو بند با وزن ۲۸۱ و ۲۹۹ جفت‌باز به‌ترتیب برای زیر واحدهای Dx5 و Dx2 و آغازگر P4 دو بند با وزن ۳۹۷ و ٤١٥ جفت‌باز به‌ترتیب برای زیرواحدهای Dy10 و Dy12 را تکثیر کردند (Izanloo et al. 2016).

در یک مطالعه مشابه تعداد ١٠٦٨ نمونه گندم بومی آسیایی با هدف ارزیابی پروتئین‌های ذخیره‌ای دانه و کیفیت نانوایی مورد بررسی قرار دادند. در این بررسی از شش جفت آغازگر اختصاصی گلوتنین گندم از جمله آغازگر ۳ و ٤ استفاده شد. آغازگر شماره ۳ قطعه‌ای به طول ۲۸۱ تا ۲۹۹ جفت‌باز و آغازگر شماره ٤ قطعه‌ای به‌طول ۳۹۷ تا ٤١٥ جفت‌باز را تکثیر کرد. بیشترین تنوع در میان گندم‌های مورد بررسی برای آلل‌های Glu-D1 تکثیر شده به‌وسیله آغازگرهای ۳ و ٤ 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).

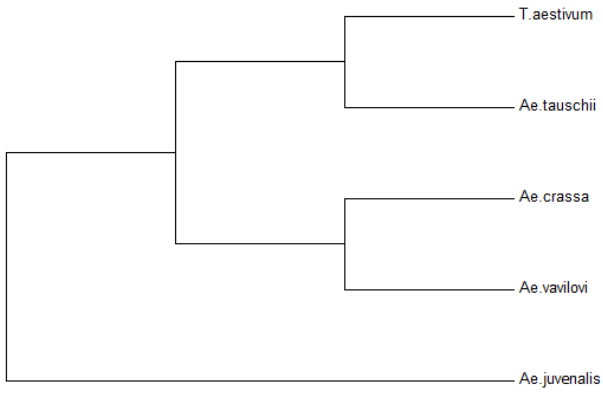
روابط فیلوژنتیکی میان گونه‌ها براساس توالی قطعه DNA تکثیر شده توسط جفت آغازگر شماره ۱ در اولین درخت فیلوژنتیکی نشان داده شده‌است (شکل ۲) در این درخت فیلوژنتیکی گونه‌های *T. boeoticum*، *T. durum* و *T. aestivum* در یک گروه قرار گرفته‌اند. این سه گونه همگی حاوی ژنوم A می‌باشند. سه گونه *Ae. crassa*، *Ae. 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 شده‌است. در دومین درخت فیلوژنتیکی گونه‌های *T. aestivum* و والد دیپلوئید ژنوم D آن گونه *Ae. tauschii* در یک گروه قرار گرفتند و دو گونه *Ae. crassa* و *Ae. vavilovi* که هر دو حامل ژنوم M هستند همانند درخت فیلوژنتیکی حاصل از آغازگر ۱ در یک گروه قرار گرفتند با این حال گونه *Ae. juvenalis* در یک گروه جداگانه از سایر گونه‌ها متمایز شد (شکل۳).

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

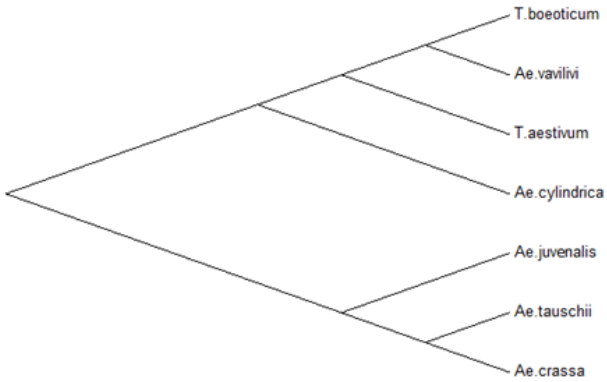


شکل ۳- درخت روابط فیلوژنتیکی گونه‌های مورد بررسی بر اساس توالی ژن LMW-Gs تکثیر شده توسط آغازگر شماره ۲

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

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-04-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.4.7.0]

هستند در یک گروه و گونه‌های *Ae. juvenalis* و *Ae. crassa* 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 ٤).

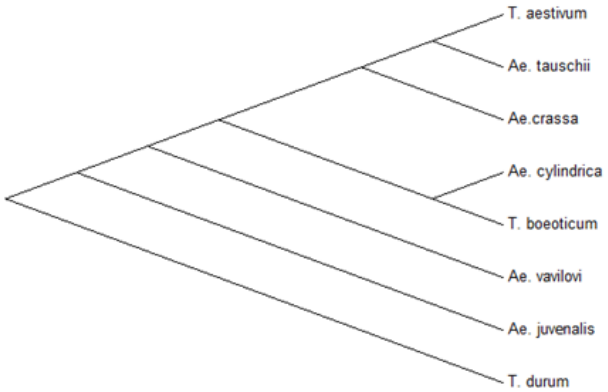


شکل ٤ – درخت روابط فیلوژنتیکی گونه‌های میان مورد بررسی بر اساس توالی ژن HMW-Gs تکثیر شده توسط آغازگر ۳

براساس توالی قطعه DNA متعلق HMW-Gs تکثیر شده توسط جفت آغازگر شماره ٤ در چهارمین درخت فیلوژنتیکی سه گونه *Ae. tauschii*, *Ae. crassa*, *T. aestivum* در یک گروه قرار گرفته‌اند 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 (شکل۵).

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 به‌هم 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 معمولا با این گونه در یک گروه قرار گرفتند. در هر حال گونه *Ae. tauschii* که به عنوان والد ژنوم D شناخته می‌شود، با فاصله متوسطی از سایر گونه‌ها قرار داشته و تقریبا با همه گونه‌ها شباهت نشان داد.

در یک مطالعه با استفاده از تنوع پروتئین‌های HMW-Gs در میان تعدادی از گونه‌های آژیلوپس سه گونه *Ae. tauschii*, *Ae. cylindrica* و *Ae. crassa* در گروه‌های مجزایی قرار داشتند (Ghorbani et al. 2013). در یک مطالعه دیگر به‌منظور بررسی روابط ژنتیکی میان چهار گونه *T. aestivum*, *Ae. tauschii*, *Ae. cylindrica* و *Ae. crassa* 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 حالی‌که 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 کدکنند LMW-Gs گونه‌های *Ae. cylindrica*، *Ae. tauschii* و *Ae. crassa* نزدیک‌ترین گونه‌ها به *T. aestivum* بودند (Naghavi et al. 2013).



شکل ۵– درخت فیلوژنتیکی گونه‌های مورد بررسی بر اساس توالی ژن LMW-Gs شناسایی شده توسط آغازگر ٤

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 تقریبا در میان همه گونه‌ها مقدور است. در بررسی توالی ژن‌های

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-04-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.4.7.0]

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 نوکلوئوتیدها در میان گونه‌ها وجود دارد. در یک مطالعه با استفاده از دو آغازگر اختصاصی که تنوع پروتئین های 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 آللی 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 ٦٠ درصد گلوتنین دانه را تشکیل می‌دهند (Bietz and Wall 1973). همچنین در مطالعات متعددی نشان داده شده‌است که تنوع آللی 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 حامل ژنوم D می‌تواند به‌عنوان منبع ارزشمندی برای توسعه کیفیت نان درگونه‌های تجاری گندم نان به‌کار برده شود.

در بررسی ۵ واریته از گندم نان مصری و یک نمونه آژیلوپس با استفاده از ۲۰ نشانگر SSR از جمله نشانگرهای اختصاصی HMW-Gs نشان داده شد که این نشاگرها با شناسایی باندهای پروتئینی HMW-Gs مرتبط با کیفیت نانوایی 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. taustchi* و ۱۳۸ نمونه از گندم نان با استفاده از نشاگرهای مولکولی نمونه‌های *Ae. taustchii* حاوی ۱۱ ژن LMW-Gs بودند که در قالب ۲۵ هاپلوتایپ 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. taustchii* 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.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-04-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.4.7.0]

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, Omidi 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, Omidi 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, Omidi 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.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.4.7.0]

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.

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.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.4.7.0]