

بررسی تنوع و ارتباط زیرگونه‌های جو زراعی (*H. vulgare*) با استفاده از ژن استیل کوآنزیم آکربوکسیلاز سیتوسولی و پلاستییدی

مرجان بهزادی راد^{۱*}، محمدرضا نقوی^۲، علیرضا طالعی^۳

۱، ۲ و ۳- دانشجوی کارشناس ارشد و استادان گروه زراعت و اصلاح نباتات، پردیس کشاورزی دانشگاه تهران

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: mbehzadi@ut.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۸۹/۵/۹- تاریخ پذیرش: ۹۰/۹/۸)

چکیده

جو متعلق به خانواده گندمیان است. ژن تک نسخه‌ای پلاستییدی و سیتوسولی استیل کوآنزیم-آکربوکسیلاز، اولین گام کاتالیزی در بیوسنتز اسیدهای چرب، در مطالعه‌ی روابط فیلوژنتیکی، تکاملی و سیستماتیکی گراس‌ها توانایی زیادی دارد زیرا احتمال اینکه ژن‌های تک نسخه و یا کم نسخه دست‌خوش تکامل گروهی شوند کم است. در این تحقیق رابطه فیلوژنتیکی جو زراعی *Hordeum vulgare* و زیرگونه‌های آن (*Hordeum spontaneum* (K. Koch) و *Hordeum distichon* جو زراعی دو ردیفه *Hordeum vulgare* *Hordeum vulgare* *Hordeum vulgare hexastichon* با استفاده از آغازگر اختصاصی ژن استیل کوآنزیم آکربوکسیلاز پلاستییدی (*ACC1*) و سیتوسولی (*ACC2*) بررسی شدند. درخت تکاملی مشترک هر دو ژن با آزمون هم‌جنسی الگوی جایگزینی در اغلب نمونه‌ها منطبق بود بطوری‌که در آزمون هم‌جنسی توالی‌های *H. spontaneum*، *H. distichon* و *H. hexastichon* در هر دو ژن *ACC1* و *ACC2* با الگوی یکسانی تکامل یافته‌اند و در درخت مشترک این دو ژن کنار یکدیگر جای گرفته‌اند. در حالی‌که دو ژن مذکور در *H. vulgare* الگوی تکاملی یکسانی نداشتند که این عدم توافق در درخت فیلوژنتیکی هر دو ژن مشاهده می‌شود.

واژه‌های کلیدی

تکامل مولکولی،
ژن *ACC*
فیلوژنتیک،
Hordeum

مقدمه

جنس *Hordeum* متعلق به طایفه Triticeae از خانواده‌ی Poaceae است. جو زراعی، یکی از گونه‌های مهم اقتصادی در این جنس بوده که در تغذیه‌ی چهارپایان و تهیه مالت استفاده می‌شود و یکی از اولین گیاهانی است که توسط انسان اهلی شده است. عمده‌ترین مناطق تولید جو شامل اروپا، حاشیه مدیترانه‌ای شمال آفریقا، اتیوپی، خاورمیانه، جمهوری‌های شوروی سابق، چین، هندوستان، کانادا، ایالات متحده آمریکا، آمریکای جنوبی و استرالیا است (Blattner 2009). بیشتر بقایای باستان‌شناسی بین سال‌های ۶۰۰۰ تا ۷۰۰۰ قبل از میلاد مربوط به اشکال دو ردیفه جو بوده و اشکال شش ردیفه آن تا قبل از سال ۶۰۰۰ قبل از میلاد مرسوم نبوده‌اند.

دیپلوئید به چهار گروه منورژنیک تقسیم می‌شوند (Wang et al. 1996)، گروه ژنومی I (*H. vulgare*, *H. bulbosom*)، گروه ژنومی Xa (*H. marinum* قبلا X)، گروه ژنومی Xu (*H. murinum*) قبلا Y) و گروه ژنومی H که درون گونه‌های دیپلوئید باقی مانده است (Bothmer et al. 1987; Fan et al. 2009). گیاهان دو فرم ACCase دارند. ایزوفورم‌های سیتوسولی که آنزیمی چند دومینی با منشأ یوکاریوتی است، مالونیل‌کوآ را برای ساخت اسیدهای چرب با زنجیره بلند و متابولیت‌های ثانویه خیلی مهم، و همچنین مالونیل‌اسیون¹ تأمین می‌کند. ایزوفورم دیگری از ACCase که در پلاستید یافت شد، اولین گام در بیوسنتز اسید چرب را عهده‌دار است (Faris et al. 2009).

Komatsuda et al. 1999، با مطالعه‌ی توالی DNA هسته‌ای در جنس جو روابط فیلوژنی را بین چهار ژنوم I، H، Xa، Xu بررسی نمودند. نتایج بدست آمده بر مبنای جایگزینی و نیز رویدادهای حذف و الحاق، نشان داد که ژنوم H و Xa در یک گروه منومورفیک قرار دارند، در حالی که ژنوم Xu و I از هم جدا می‌باشند. Huang et al. 2002، بر اساس توالی دو سیستم ژنی پلاستیدی ACC و PGK روابط تکاملی بین گراس‌ها را بررسی نمودند. نتایج نشان داد که این ژن‌ها در اغلب گونه‌های گراس مطالعه شده تک نسخه هستند. مطابق نظر Huang et al. 2003، روابط فیلوژنتیکی بدست آمده با حقایق شناخته شده از تکامل منطبق بودند. در تحقیقی تنوع ژنتیکی سویچ گراس *Panicum virgatum* که گراس چند ساله‌ی وحشی در آمریکا و کانادا می‌باشد، با استفاده از ژن‌های هسته‌ای که استیل‌کوآنزیم‌آ کربوکسیلاز را کد می‌کنند در شش کولتیوار بررسی شد. Sun et al. 2009، روابط تکاملی جنس *Hordeum* را با ژن *RPB2* بررسی نمودند. نتیجه نشان داد که بر طبق تجزیه‌های فیلوژنتیکی این جنس، ژنوم H و Xa در یک گروه منومورفیک و ژنوم Xu و I جدا از ژنوم‌های نامبرده قرار دارند. ایران به عنوان یکی از مراکز بومی جو مورد توجه است و نظر به اینکه اجداد وحشی جو دارای تنوع ژنتیکی بسیار زیادی هستند، یافتن روابط تکاملی این گیاه بسیار ارزشمند است. در نتیجه در برنامه‌های به نژادی انتقال

جنس *Hordeum* همانند اکثر جنس‌های دیگر در مناطق معتدل، هم در نیمکره‌ی شمالی و هم در نیمکره‌ی جنوبی پراکنش دارد (Zohary 1969). گونه‌های جو دیپلوئید، تتراپلوئید و هگزاپلوئید می‌باشد، که گونه‌های دیپلوئید $2n=14$ شامل گونه‌های زراعی و وحشی هستند. این گیاه بیشترین سازگاری را به شرایط نامساعد محیطی و نظیر سرما، گرمای شدید و خشکی، شوری و قلیایی بودن خاک و کیفیت پایین آب آبیاری دارد (Blattner 2009). این جنس شامل گونه‌های تک اجدادی است و گونه‌های آن به آسانی قابل تشخیص هستند. جو زراعی شباهت زیادی به گروهی از ژنوتیپ‌های علفی و وحشی جو دارد که بطور مرسوم به عنوان *H. spontaneum* طبقه‌بندی می‌شود. *H. spontaneum* تنها جو وحشی است که سازگاری تلاقی و قابلیت باروری کامل با جوهای زراعی را دارد. تلاش زیادی جهت بررسی روابط فیلوژنتیکی در این جنس انجام گرفته است. توالی‌یابی DNA روش مناسب برای تجزیه فیلوژنتیکی مولکولی است. با بررسی وضعیت DNA ارقام و نژادها می‌توان به روابط فیلوژنی آنها با سایر گونه‌ها و در نتیجه به نحوه انتقال ژن از اجداد به نتاج پی برد. بررسی وضعیت خویشاوندی تکاملی بین و درون گونه‌ها، جنس-ها و یا گروه‌های گیاه شناسی مستلزم مطالعه شباهت‌ها و تفاوت-ها می‌باشد. این عمل باعث طبقه‌بندی ارقام تازه کشف شده می‌شود و می‌توان از صفات با ارزشی که در آنها موجود است، جهت انتقال به گیاهان زراعی خویشاوند استفاده نمود (et Jakob 2009; Sun et al. 2009; Blattner 2004; al. 2006). ژن استیل‌کوآنزیم-آ کربوکسیلاز، ژن مناسبی جهت بررسی روابط تکاملی است، زیرا ژنی تک نسخه است و احتمال اینکه ژن‌های تک نسخه و کم نسخه دست‌خوش تکامل گروهی شوند کم است، بنابراین آنها را به ابزار مهمی برای مطالعه‌ی مبدأ و تکامل پلی‌پلوئیدها تبدیل می‌کند (Fan et al. 2009). اولین مرحله تولید اسیدچرب در موجود زنده کربوکسیله شدن مولکول استیل‌کوآنزیم‌آ می‌باشد که این عمل تحت تاثیر استیل‌کوآنزیم‌آ کربوکسیلاز صورت می‌پذیرد. این آنزیم در شروع واکنش سنتز اسیدهای چرب مورد نیاز است، زیرا اسیدهای چرب به عنوان مولکول‌های سوختی و تأمین ساختمان واحدهای غشاهای زیستی ضروری هستند (Safari 2003). اطلاعات سیتوژنتیکی نشان داده است که گونه‌های

¹ Malonylation

شد (جدول ۲) (Huang et al. 2002). واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از دستگاه ترموسایکلر Bio-Rad، با آغازگر ACC1 و ACC2 و آنزیم High-fidelity طبق دستورالعمل شرکت تاکارا، در حجم ۵۰ میکرولیتر، حاوی یک واحد از آنزیم (High-fidelity LA-Tag DNA polymerase (Takara، بافر PCR (۱X) ۱/۵ میلی‌مولار، ۲۰-۵۰ نانوگرم از DNA ژنومی، ۱/۵ میلی‌مولار MgCl₂، ۰/۲ میلی‌مولار از هر dNTP، یک میکرومولار از هر آغازگر انجام شد. برنامه حرارتی برای هر دو آغازگر به صورت گرادینت، شامل ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ چرخه با ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه، ۵۰-۵۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه، ۶۸ درجه سانتی‌گراد به مدت دو دقیقه و بسط نهایی در ۶۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۸ دقیقه بود (Zhang et al. 2009). محصولات تکثیری روی ژل آگارز یک درصد تفکیک و اندازه قطعات با استفاده از نشانگر اندازه مولکولی ۱۰۰-۳۰۰۰، SMO323 شرکت فرمنتاز تعیین و قطعه ۱۵۰۰ bp برای ژن ACC1 و ۱۸۰۰ bp برای ژن ACC2 شناسایی گردیدند. جهت بدست آوردن توالی ژن‌ها، محصولات PCR بصورت مستقیم و یا ریکاوری شده به مرکز توالی‌یابی SEQLAB آلمان فرستاده شد. قطعات تکثیری حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از آغازگرهای Forward و Reverse توالی‌یابی شدند.

ژن بطور مؤثری مورد استفاده قرار می‌گیرد. هدف از این تحقیق پاسخ به سؤالات متفاوت در مورد تکامل *H. vulgare* و زیرگونه‌های آن با استفاده از مقایسه‌ی توالی‌های DNA و پی بردن به وضعیت تکاملی این گیاه با ارزش بصورت ژنتیکی و آماری بود. در این تحقیق آنالیزهایی در مورد مبدأ و تکامل استیل کوآنزیم آ کربوکسیلاز و خانواده ژنی آن در جو صورت گرفته است.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

این تحقیق در آزمایشگاه بیوتکنولوژی گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشگاه تهران در سال ۱۳۸۹ انجام شد. در این مطالعه گونه‌های *H. vulgare* و *H. spontaneum* (جو دوردیفه) *H. distichon* (جو شش ردیفه)، *H. hexastichon* و *H. tworow* بانک ژن ملی ایران تهیه شدند. مشخصات آن‌ها در جدول ۱ آمده است، تعداد ۶-۵ بذر از هر گونه در گلدان کشت و پس از رشد گیاهچه‌ها و ظهور حداقل دو برگ (حدوداً دو تا سه هفته پس از کشت) حدود ۲ گرم از برگ هر گونه، نمونه‌برداری شد. استخراج DNA ژنومی از برگ‌های تازه و به روش CTAB تغییر یافته (Murray and Thompson 1980) انجام گردید. جهت بررسی کمیت و کیفیت نمونه‌های ژل آگارز یک درصد الکتروفورز و نانودراپ استفاده شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از دو جفت آغازگر اختصاصی ACC1 و ACC2 انجام

جدول ۱- نام و مشخصات مواد گیاهی مورد استفاده در این تحقیق.

گونه‌ها	کد گونه‌ها	محل جمع آوری	ژنوم	سطح پلویدی
<i>H. vulgare</i>	TN.02-574	America	H	۲x
<i>H. tworow</i>	KC.70062	Iran	H	۲x
<i>H. spontaneum</i>	TN.02-494	Iran	H	۲x
<i>H. distichon</i>	N-171935 , E-55385	Iran	H	۲x
<i>H. hexastichon</i>	TN.02-102	Turkey	H	۲x

جدول ۲- اسامی آغازگرها برای تکثیر ژن استیل کوآنزیم آ کربوکسیلاز و توالی آن‌ها.

نام آغازگر	توالی رفت (۳'→۵')	توالی برگشت (۳'→۵')
AC	GTTCCTGGCTCCCAATATTTATC	TTCAAGAGATCAACTGTGTAATCA
C1	CCCAATATTTATCATGAGACTTGCA	CAACATTTGAATGAATCTCCACG
AC	GTCCCCGATCGCCTATATTTATT	TTCAAGAGATCCACRGTGTAGTCA
C2	CTATATTTATTTATGAAGGTGGCATC	AGATCCACRGTGTAGTCAACATTA

تجزیه داده‌ها

پس از توالی‌یابی قطعات تکثیر، به منظور تعیین قرابت گونه‌ها و بررسی رابطه فیلوژنتیکی از نرم افزارهای Bioedit, Chromas, DNASTar, Blast, MEGA استفاده شد (Naghavi et al. 2009). از Bioedit و Chromas جهت یافتن نوکلئوتیدهای مشخص نشده‌ی احتمالی، از DNASTar به منظور هم‌ردیف کردن توالی‌ها استفاده گردید. با DNASTar چیدن و سرهم کردن داده‌های توالی-یابی شده، هم‌ردیفی توالی‌ها، تجزیه‌های فیلوژنی و بوسیله Blast یا ابزار جستجوی هم‌ردیفی پای‌ای موضعی، پیدا کردن هم‌ردیفی-های بی فاصله و بالاترین امتیاز (در بین توالی موجود در پایگاه-های اطلاعاتی و توالی تقاضا) انجام شد. در واقع با این نرم افزار مشخص شد که توالی‌های ACC1 و ACC2 گونه‌های *Hordeum* با چه توالی‌های از این ژن‌ها، در گونه‌ی مورد نظر و گونه‌های دیگر شباهت دارد. پس از جستجو و آماده‌سازی و هم‌ردیفی توالی‌ها، از نرم افزار MEGA4 برای تعیین روابط فیلوژنتیکی استفاده شد. در این تحقیق شیوه‌ای که برای رسم درخت فیلوژنتیکی استفاده گردید روش اتصال مجاور^۱ بود که، یکی از روش‌های رایج ساخت درخت تکاملی است. در این تحقیق جهت بررسی صحت درخت‌ها از آزمون Bootstrap با تکرار پذیری ۱۰۰ استفاده شد. از MEGA4 نیز جهت تخمین آزمون هم‌جنسی توالی‌ها و همچنین الگوی جایگزینی نوکلئوتیدی توالی‌ها استفاده شد، که فرمول مورد استفاده توسط این نرم افزار در الگوی جایگزینی به صورت زیر می‌باشد:

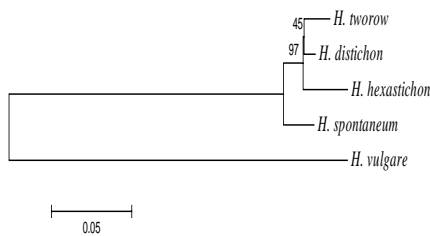
$$R = [A * G * k_1 + T * C * k_2] / [(A + G) * (T + C)]$$

نتایج و بحث

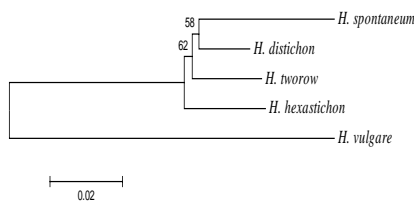
هم‌ردیفی توالی‌ها

پس از هم‌ردیفی توالی‌هایی که با توالی‌هایی از ژن ACC1 و ACC2 در گونه مورد مطالعه در NCBI^۲ شباهت داشتند و نمونه‌هایی که دارای ارزش E^۳ پایین یا صفر بودند انتخاب و از آن‌ها برای ترسیم درخت فیلوژنتیکی استفاده شد. روابط تکاملی *H. vulgare* و زیرگونه‌های آن در شکل ۱ با استفاده از ژن ACC1 و

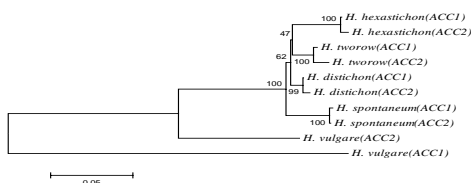
در شکل ۲ با استفاده از ژن ACC2 و در شکل ۳ درخت فیلوژنی با هر دو ژن نشان داده شده است.



شکل ۱- درخت فیلوژنتیکی *H. vulgare* و زیرگونه‌های آن بر اساس ژن ACC1، به روش N.J.



شکل ۲- درخت فیلوژنتیکی *H. vulgare* و زیرگونه‌های آن بر اساس ژن ACC2، به روش N.J.



شکل ۳- درخت فیلوژنتیکی *H. vulgare* و زیرگونه‌های آن بر اساس ژن ACC1 و ACC2، به روش N.J.

در هر سه درخت فیلوژنتیکی *H. vulgare* در جایگاه جد مشترک زیرگونه‌هایش قرار گرفته است و به دلیل تغییرات تکاملی زیاد این گونه در طی سال‌ها، شاخه‌ی این گونه بلندتر از بقیه شاخه-های درخت می‌باشد (شکل ۱، ۲، ۳). در درخت فیلوژنتیکی بر اساس هر دو ژن، توالی‌های ACC1 و ACC1 هر نمونه در کنار یکدیگر قرار گرفتند، که احتمالاً مؤید این مطلب است که ژن‌های سیتوسولی و پلاستییدی استیل کوآنزیم کربوکسیلاز در زیرگونه-های استفاده شده این تحقیق، همزمان تکامل پیدا کرده‌اند.

الگوی جایگزینی نوکلئوتیدی توالی‌ها

از آنجایی که با مطالعه انواع جهش که در معرض انتخاب طبیعی قرار گرفته‌اند می‌توان به روابط تکاملی پی برد، از آزمون آماری

¹ NJ (Neighbor joining)

² National Center for Biotechnology Information

³ E value

تغییرات تکاملی در بین ایندو ژن هر یک از زیرگونه‌ها کنار یکدیگر قرار گرفتند. پس می‌توان گفت که غالب تغییراتی که طی تکامل در توالی این ژن در اثر جهش رخ داده است، از نوع جایگزینی هم‌جنس بوده است.

آزمون هم‌جنسی الگوی جایگزینی توالی‌ها

فرض صفر آزمون هم‌جنسی^۴ این است که توالی‌ها با الگوی جایگزینی یکسانی تکامل یافته‌اند که با استفاده از تفاوت اریبی بین توالی‌های مورد استفاده در آزمایش قضاوت می‌شود. نرم افزار MEGA4 این فرض را با استفاده از آزمون مونت کارلو^۵ با تکرارپذیری هزار جهت برآورد ارزش P انجام می‌دهد. ارزش P کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته می‌شود. در جدول ۴، اعداد زیر قطر اصلی نشان دهنده وجود یا عدم وجود تشابه می‌باشد، اما اعداد بالای قطر میزان عدم توافق^۶ در هر مکان ژنی برای هر جفت توالی است. اعداد ستاره‌دار در جدول نشان می‌دهند که دو توالی با الگوی جایگزینی یکسان تکامل نیافته‌اند و در واقع فرض صفرشان رد شده است.

هم‌جنسی الگوی جایگزینی توالی‌ها استفاده شد تا معنی دار بودن یا نبودن ارتباط گونه‌های مورد مطالعه در درخت‌های رسم شده مشخص گردد. احتمال جایگزینی در بین نوکلئوتیدهای مختلف جو زراعی و زیرگونه‌های آن در جدول ۳ نمایش داده شده است. سرعت‌های متفاوت جایگزینی جفت‌هایی با جایگزینی هم‌جنس^۱ بر روی قطر جدول ۳ به صورت پررنگ و بقیه اعداد جفت‌هایی با جایگزینی ناهم‌جنس^۲ می‌باشند. فراوانی نوکلئوتیدی برای (A) ۰/۲۳۴، (T/U) ۰/۳۵، (C) ۰/۱۷۸ و (G) ۰/۲۳۸ می‌باشد. نسبت سرعت جایگزینی هم‌جنس به ناهم‌جنس (R) با در نظر گرفتن، $KI = 1/841$ (پورین‌ها) و $K2 = 1/942$ (پیریمیدین‌ها)، $0/888$ بدست آمده. با توجه به اینکه از نظر جنبه‌های شیمیایی و ژنتیکی شباهت دو پورین یا دو پیریمیدین بسیار بیشتر از شباهت یک پورین و پیریمیدین است، در نتیجه جهش با جایگزینی ناهم‌جنس دارای تأثیرات بیشتری نسبت به جایگزینی هم‌جنس است. از این رو معمولاً جایگزینی هم‌جنس نسبت به ناهم‌جنس تغییرات کمتری ایجاد می‌کند. که این مسئله را می‌توان به درخت مشترک حاصل از دو ژن نسبت داد که با وجود

⁴ Homogeneity

⁵ Monte Carlo

⁶ disparity

¹ Transitional

² Transversional

³ Transition/Transversion

جدول ۳- بیشترین احتمال جایگزینی نوکلئوتیدی.

	A	T	C	G
A	-	۸/۹۹	۴/۵۸	۱۱/۲۵
T	۶	-	۸/۸۹	۶/۱۱
C	۶	۱۷/۴۶	-	۶/۱۱
G	۱۱/۰۴	۸/۹۹	۴/۵۸	-

جدول ۴- اعداد آزمون هم‌جنسی در زیر قطر اصلی و میزان عدم توافق توالی‌ها بالای قطر اصلی.

گونه	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰
۱.H. hexastichon(ACC1)		۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۹/۰۷	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۱/۰۵	۰/۰۱
۲.H. tworow(ACC1)	۱/۰۰		۰/۰۸	۰/۰۰	۹/۰۸	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۸	۱/۷۷	۰/۰۳
۳.H. spontaneum(ACC1)	۱/۰۰	۰/۰۴*		۰/۱۳	۷/۶۴	۰/۰۰	۰/۰۳	۰/۰۰	۱/۰۰	۰/۱۳
۴.H. distichon(ACC1)	۱/۰۰	۰/۳۸	۰/۰۰**		۱۰/۰۷	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۱۲	۱/۸۰	۰/۰۱
۵.H. vulgare(ACC1)	۰/۰۰**	۰/۰۰**	۰/۰۰**	۰/۰۰**		۸/۸۵	۹/۳۹	۷/۷۰	۳/۷۱	۹/۷۳
۶.H. hexastichon(ACC2)	۱/۰۰	۱/۰۰	۱/۰۰	۰/۳۷	۰/۰۰**		۰/۰۰	۰/۰۰	۱/۴۲	۰/۰۲
۷.H. tworow(ACC2)	۱/۰۰	۱/۰۰	۰/۱۷	۱/۰۰	۰/۰۰**	۱/۰۰		۰/۰۳	۱/۵۱	۰/۰۱
۸.H. spontaneum(ACC2)	۱/۰۰	۰/۰۲*	۱/۰۰	۰/۰۰**	۰/۰۰**	۱/۰۰	۰/۱۵		۱/۰۲	۰/۱۱
۹.H. vulgare(ACC2)	۰/۰۰**	۰/۰۰**	۰/۰۰**	۰/۰۰**	۰/۰۰**	۰/۰۰**	۰/۰۰**	۰/۰۰**	۰/۰۰**	۱/۵۶
۱۰.H. distichon(ACC2)	۰/۲۳	۰/۶۰	۰/۰۰**	۰/۰۰**	۰/۰۰**	۰/۲۴	۰/۲۵	۰/۰۰**	۰/۰۰**	۰/۰۰**

و پلاستیدی در گونه نامبرده و زیرگونه‌هایش احتمالاً سیر تکاملی یکسانی داشته است، زیرا در درخت‌های فیلوژنی رسم شده، می‌توان مشاهده نمود که هر دو توالی ژن‌های ACC1 و ACC2 گونه‌ی *H. vulgare* و زیرگونه‌هایش در کنار یکدیگر قرار گرفتند. درخت تکاملی مشترک هر دو ژن با آزمون هم‌جنسی الگوی جایگزینی در اکثر نمونه‌ها مطابقت داشت. بطوری‌که در آزمون هم‌جنسی توالی‌های *H. spontaneum*، *H. tworow* و *H. hexastichon* در هر دو ژن ACC1 و ACC2 با الگوی یکسانی تکامل یافته‌اند و در درخت مشترک کنار یکدیگر جای گرفته‌اند. در صورتی‌که این دو ژن در *H. vulgare* الگوی تکاملی یکسانی نداشتند که در درخت مشترک این عدم توافق کاملاً مشاهده می‌شود. احتمال این‌که، ژن‌های تک نسخه و کم نسخه دستخوش تکامل گروهی شوند، کم است، بنابراین آن‌ها ابزار مهمی جهت مطالعه‌ی مبدأ و تکامل پلی‌پلوئیدها می‌باشند (Golovnina et al. 2009; Sun et al. 2007) با توجه به اینکه ژن‌های هسته‌ای همانند ACC با تعداد کمی کم اغلب توالی‌های ایترونی متفاوتی دارند، می‌توانند جهت تشخیص روابط تکاملی درون ژنومی بکار رود (Zhang et al. 2009)، لذا این تحقیق با مقایسه توالی‌های DNA توسط دو ژن کلیدی ACC1 و ACC2 با دو منشأ متفاوت پلاستیدی و سیتوسولی، همراه با بررسی آماری الگوی جایگزینی نوکلئوتیدی وضعیت تکاملی و روابط منطقی و معقول تاکسونومی گونه‌ی زراعی و مهم *H. vulgare* و زیرگونه‌هایش را مشخص نمود.

از مقایسه‌ی اعداد آزمون هم‌جنسی و عدم توافق می‌توان پی برد که این مقادیر غالباً از نظر مقدار، عکس یکدیگر هستند، بعنوان مثال از آزمون هم‌جنسی *H. hexastichon* با *H. tworow* در ژن ACC1 استنباط می‌شود که ایندو زیرگونه الگوی جایگزینی تکاملی ماکزیمم مقدار (یک) را داشته‌اند، در حالی‌که شاخص عدم توافق آن‌ها یعنی تفاوت میزان در الگوی جایگزینی ایندو توالی از یکدیگر کمترین مقدار (صفر) می‌باشد. در واقع شاخص عدم توافق مقدار تنوع را در توالی‌هایی که دارای الگوی جایگزینی یکسان یا غیر یکسانی بودند، نشان می‌دهد. نتایج این آزمون نشان می‌دهد، در هر دو ژن ACC1 و ACC2 فرض صفر مبنی بر این‌که *H. vulgare* و زیرگونه‌هایش الگوی جایگزینی تکاملی یکسانی داشته‌اند، رد می‌شود. همچنین در ژن ACC1 الگوی جایگزینی مابین *H. spontaneum* و *H. tworow* و زیرگونه‌های *H. spontaneum* و *H. distichon* متفاوت می‌باشد. این در حالی است که در ژن ACC2 الگوی جایگزینی در بین *H. spontaneum* و *H. tworow* و زیرگونه‌های *H. spontaneum* و *H. distichon* یکسان بوده است. درخت‌های تکاملی ACC1 و ACC2 در بین گونه‌ی *H. vulgare* و زیرگونه‌های آن کاملاً با یکدیگر منطبق هستند. با رسم درخت تکاملی مشترک این دو ژن استنباط می‌شود که ژن ACC2 و ACC1 دارای منشأ ژنی یکسانی هستند و تشابهاتی دارند، زیرا نرم افزار MEGA4 درخت این دو ژن را با هم رسم نمود، این درحالی است که نرم افزار نامبرده، در صورت تفاوت زیاد بین توالی‌ها قادر به رسم درخت نخواهد بود. همچنین می‌توان استنباط کرد که توالی‌های این دو ژن سیتوسولی

منابع

- Blattner F R (2004). Phylogenetic analysis of *Hordeum* (Poaceae) as inferred by nuclear rDNA ITS sequences. *Molecular Phylogeny Evolution*, 33:289-299
- Blattner F R (2009) Progress in phylogenetic analysis and a new infragenetic classification of barley genus *Hordeum* (Poaceae: Triticeae). *Breeding Science* 59: 471-480.
- Bothmer R V and Jacobsen N (1986) Interspecific crosses in *Hordeum* (Poaceae). *Pl. Systematic Evolution*, 153: 49-64
- Bothmer R V, Flink J and Landström T (1987) Meiosis in interspecific *Hordeum* hybrids. Triploid combinations. *Evolution Trends Plants*, 1: 41-50
- Fan X, Sha L, Yang R, Zhang H, Kang H, Ding C, Zhang L, Zheng Y L, Zhou Y H (2009) Phylogeny and

- evolutionary history of *Leymus* (Triticeae; Poaceae) based on a single-copy nuclear gene encoding plastid acetyl-CoA. *BMC Evolutionary Biology*, 9:247 doi:10.1186
- Faris J, Sirikhachornikit A, Hhaselkorn R, Gill B, and Gonicki P (2001) Chromosome mapping and phylogenetic analysis of the cytosolic acetyl-coA carboxylase loci in wheat. *Molecular Biology Evolution*. 18(9): 1720-1733
- Forsrter B P, Ellis R P, Thomas B, Newton A C, Tuberosa R, This D, El- Enein R A, bahri M and Ben Salem M (2000) The development and application of molecular markers for abiotic stress tolerance in barley. *J. Experimental Botany*, Vol. 51, No. 342. pp. 19-27
- Golovnina K A, Glushkov S A, Blinov A G, Adkison L R and Goncharov N P (2007) Molecular phylogeny of the genus *Tritium*. *PL. Evolution*. 264: 195-216

- Huang S, Sirikhachornikit A, Faris J D, Su X, Gill B S, Hhaselkorn R and Gonicki P (2002) Phylogenetic analysis of the acetyl-coA carboxylase and 3-phosphoglycerate kinase loci in wheat and other grasses. *Plant molecular biology*, 48: 805-820
- Huang S, Sirikhachornikit A, Su X, Faris J D, Gill B, Haselkorn R, Gonicki P (2002) Genes encoding plastid acetyl-coA carboxylase and 3-phosphoglycerate kinase of the *Triticum/Aegilops* complex and the evolutionary history of polyploidy wheat, *PNAS* 99: 8133-8138
- Huang S, Xiujuan Su, Haselkorn R, Gornicki P (2003) Evolution of switchgrass (*Panicum virgatum* L.) based on sequences of the nuclear gene encoding plastid acetyl-CoA carboxylase. *Plant Science*, 16
- Jakob S S, Ihlow A and Blattner F R (2006) A chloroplast genealogy of *Hordeum* (Poaceae): long-term persisting haplotypes, incomplete lineage sorting, regional extinction and the consequences for phylogenetic inference. *Molecular Biology Evolution*. 23: 1602-2612
- Komatsuda T, Tann K I, Salomon B, Bryngelsson T and Bothmer R V (1999) Phylogeny in the genus *Hordeum* based on nucleotide sequences closely linked to the *vrs1* locus (row number of spikelets). *Genome* 42: 973-981
- Murray M G and Thompson W F (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*. Vol. 8, No. 19 4321-4326
- Naghavi, M.R., M.A, Malbobi., and S, Rashidi. 2009. *Bioinformatics*. University of Tehran press. PP, 457.(In Farsi).
- Safari, M. 2003. *Principle of Agricultural Biochemistry*. University of Tehran Press. PP, 608.(In Farsi).
- Sun G, Pourkheirandish M and Komatsuda T (2009) Molecular evolution and phylogeny of the *RPB2* gene in the genus *Hordeum*. *Annals of Botany*, 103:975-983
- Wang R, Bothmer R V, Dvorak J, Fedak G, Linde-Laursen I and Muramatsu M (1996) Genome symbols in the *Triticeae*. In *Proceedings of the 2nd International Triticeae Symposium*, Utah State University, Logan, pp.29-34
- Zhang C H, Fan X, Yu H.Q, Zhang H Q, Wang X L and Zhou Y H (2009) Phylogenetic analysis of questionable tetraploid species in *Roegneria* and *Pseudoroegneria* (Poaceae: Triticeae) inferred from a gene encoding plastid acetyl-CoA carboxylase. *Biochemical Systematics and Ecology*, 1-9. 150-163
- Zohary D (1969) the progenitors of wheat and barley in relation to domestication and agricultural dispersal in the old world. In Ucko PJ, Dimbleby GW (eds) *The domestication and exploitation of plants and animals*. General Duckworth and Co. Ltd., London, pp 47-66