

شناسایی ژن *DHN5* و بررسی روابط تکاملی آن در گندم زراعی و اجداد آن

Identification of *DHN5* gene and investigation of its evolutionary relationships in wheat and its ancestors

سمیه یوسف زایی^۱، نفیسه مهدی نژاد^{۱*}، براتعلی فاخری^۱، صالحه گنجعلی^۱

۱- به ترتیب دانش آموخته کارشناسی ارشد، دانشیار، استاد، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، ایران

Yosefzaei S¹, Mahdinezhad N^{*1}, Fakheri B¹, Ganjali S¹

1- MSc Student, Associate Professor, Professor, Assistant Professor, Departement of Plant Breeding and Biotechnology, University of Zabol, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: nmahdinezhad@uoz.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۸/۰۷/۱۷ - تاریخ پذیرش: ۹۹/۰۶/۰۲)

چکیده

پروتئین‌های LEA اولین بار در گندم و پنبه به عنوان پروتئین‌های تجمعی در اواخر دوره جنینی جهت مقابله با تنش‌های محیطی شناسایی و مطرح شدند. پروتئین‌های دهیدرین گروه دوم از مجموعه پروتئین‌های بسیار آب‌دوست خانواده LEA می‌باشند که در برابر خشکی مقاوم‌اند. با توجه به اهمیت دهیدرین‌ها، ژن *DHN5* از سه گونه گندم دیپلوئید وحشی (*Aegilops speltoides* و *Aegilops tauschii* و *Triticum urartu*)، دو رقم گندم دوروم تتراپلوئید زراعی (بهرنگ و شبرنگ) و دو رقم گندم هگزاپلوئید زراعی (بولانی و سیستان) جهت شناسایی و ارزیابی روند تکامل مولکولی جداسازی و توالی‌یابی شد و برای اولین بار این ژن در گندم به واسطه این پژوهش شناسایی و نتایج حاصل از توالی‌یابی ژن در ارقام گندم زراعی و اجداد وحشی آن در پایگاه جهانی داده NCBI ثبت شد. نتایج توالی‌یابی نشان داد که جهش جانشینی انتقالی بیشتر از جانشینی تقاطعی است و نسبت d_N/d_S برابر ۱/۱۳ به دست آمد که روند انتخاب مثبت ژن *DHN5* در بین ارقام زراعی و وحشی گندم را در طی تکامل نشان می‌دهد. نواحی حفاظت‌شده بخش اندکی از توالی ژن *DHN5* را تشکیل می‌دهد که این امر نشان‌دهنده مستعد بودن آن به تغییرهای نوکلئوتیدی و جهش است. درخت فیلوژنتیک مربوط به توالی ژن دهیدرین گندم به همراه ۲۸ واریته گیاهی دیگر به روش Neighbor-joining رسم شد که نشان‌دهنده مسیرهای تکاملی مختلف ژن *DHN5* برای اشتقاق گونه‌های دیپلوئید، تتراپلوئید و هگزاپلوئید از یکدیگر است. تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی نشان داد در رقم سیستان، به دلیل سازگاری به شرایط تنش خشکی، توالی این ژن به واسطه جهش‌های فراوان دچار تغییر زیاد شده که باعث می‌شود در بررسی‌های فیلوژنتیکی از سایر گندم‌های مورد مطالعه جدا شود. با توجه به نتایج به دست آمده در تمام ارقام مورد مطالعه می‌توان نتیجه گرفت که این ژن احتمالاً بر روی هر سه ژنوم A، B و D گندم قرار دارد.

واژه‌های کلیدی

پروتئین دهیدرین
تکامل
رابطه فیلوژنی
گندم
dhn

مقدمه

مجموعه گندم دیپلوئید با تعداد کروموزوم ($2n=2x=14$) از سه گونه *T. urarta*، *T. boeoticum* و *T. monococcum* تشکیل شده است. گروه گندم‌های تتراپلوئید با تعداد کروموزوم ($2n=4x=28$) از ۱۰ گونه تشکیل شده است که حاوی ژنوم‌های AB و AD بوده و نسبت به گونه‌های دیپلوئید در گستره‌ی محیطی وسیع‌تری رشد می‌نمایند. از آن جمله گندم امر وحشی *T. dicoccum* و گندم *T. durum* که همگی دارای فرمول ژنومی AABB هستند. گندم هگزاپلوئید دارای گونه‌های بسیار زیادی شامل *T. aestivum*، *T. spelta* و *T. petropa vlovskyi* است. گندم نان با تعداد کروموزوم $2n=6x=42$ دارای ژنوم ABD است که هر یک از ژنوم A، B و D از گونه‌های مختلفی گرفته شده است (Sishen et al. 2007). گونه‌های وحشی گیاهان زراعی بخش مهمی از نمونه‌های گیاهی ارزنده فلور هر کشور را تشکیل می‌دهند که حاوی ژن‌های بسیار مفید و با ارزش برای بهبود مقاومت به برخی تنش‌های زیستی و غیر زیستی از قبیل خشکی، شوری، سرما، گرما، مقاومت به آفات و امراض مهم هستند و معمولاً به عنوان منابع ژنی مورد استفاده پژوهشگران قرار می‌گیرند و تنوع ژنتیکی مورد نیاز اصلاح‌گران را تأمین می‌کند (Vojdani 1996; Ahmadabadi 2005; Wang 2010; Dvořák and Ross 1986; Bommineni et al. 1997).

امروزه از طریق رویکردهای مولکولی مطالعات بسیاری برای شناسایی مکانیسم‌های تحمل به خشکی در گیاهان در حال انجام است و برخی ژن‌های پاسخ‌دهنده به تنش خشکی در سطح رونویسی گزارش شده‌اند (Du et al. 2011). برخی از این محصولات ژنی در محافظت از گیاهان در برابر اثرات تنش از طریق دریافت تنش، سیگنال‌های انتقال، شبکه تنظیم‌کننده رونویسی و نیز در تحمل در برابر آب‌زدایی^۱ نقش دارند (Allagulova et al. 2003; Umezawa et al. 2006). اولین بار در گندم و پنبه پروتئین‌های LEA جهت مقابله با تنش‌های محیطی به عنوان پروتئین‌های تجمعی در اواخر دوره جنینی شناسایی و مطرح شدند (Dure et al. 1989). حضور پروتئین‌های LEA در گیاهان مختلف، بیانگر توزیع گسترده این پروتئین‌ها در سلسله

گیاهی است (Allagulova et al. 2003). این پروتئین‌ها در اندام‌های رویشی تحت تأثیر تنش آبی، دمای پایین، شوری و آبسازیک اسید (ABA) انباشته می‌شوند که بیانگر نقش حفاظتی این گروه از پروتئین‌ها در شرایط محدودیت محیطی است (Wise and Tunnacliffe 2004). مهم‌ترین جایگاه تولید این پروتئین‌ها در درون‌هسته و سیتوپلاسم است (Hu 2008). این پروتئین‌ها دارای نقش تنظیمی در سلول هستند و در مسیر بیوشیمیایی و فرایندهای سلولی مانند همانندسازی و تنفس سلولی نقش دارند و پس از بروز تنش محیطی مقدار این پروتئین‌ها در سلول افزایش و باعث حفظ تعادل سلول در ارتباط با محیط خارج می‌گردند. (Pogodin and Baulin 2011).

پروتئین‌های LEA در شرایط دهیدراتاسیون به صورت سازه‌های پروتئینی متشکل از مارپیچ آلفا^۲ شروع به نفوذ در ساختمان غشاء سلولی می‌نمایند. پس از ورود این پروتئین‌ها در ساختمان غشاء وضعیت ترمودینامیکی غشاء در اثر کنار هم قرار گرفتن ساختارهای آب‌گریز غشاء که ناشی از برهم‌کنش‌های گروه‌های آب‌دوست و آب‌گریز غشاء می‌باشد، تغییر می‌نماید. این بدان معنی است که ساختار مارپیچ آلفای پروتئین LEA در تعامل با لایه‌های فسفولیپیدی قرار می‌گیرد و ضخامت غشاء سلولی را افزایش می‌دهد و باعث مقاومت سلول به تنش خشکی و پدیده دهیدراتاسیون می‌شود (Pogodin et al. 2012).

در مطالعه‌ای تحت عنوان بیش بیان^۳ ژن کدکننده پروتئین LEA در اصلاح مقاومت به خشکی در برنج که تحت شرایط مزرعه، انجام دادند به این نتیجه رسیدند که برنج‌های تراریخت که دارای ژن‌های کدکننده پروتئین LEA بودند، در شرایط تنش متحمل بودند. لذا این پژوهشگران نتیجه گرفتند که مقاومت به تنش در گیاه برنج همبستگی مثبتی با میزان بیان ژن‌های کدکننده پروتئین LEA دارد (Zung et al. 2007). تحقیقی با عنوان ژن‌های LEA گرفته شده از *Tamarix androssowii* برای انتقال به توتون جهت مقاومت به خشکی را انجام شده، نتایج این تحقیق نشان داد لاین‌های تراریخت توتون مقاومت بسیار خوبی در برابر تنش نسبت به لاین‌های شاهد (غیر تراریخت) مقاوم‌تر بودند و ژن‌های

^۲ α -helix^۳ overexpression^۱ dehydration

نزدیکی بعضی گونه‌های مورد مطالعه بود (Falak naz et al. 2012).

هدف از این مطالعه شناسایی ژن DHN5 و بررسی روابط فیلوژنتیکی آن از طریق روش‌های آزمایشگاهی و تائید مطالعات بیوانفورماتیکی در گندم‌های مورد مطالعه بوده تا از این نتایج در برنامه‌های آینده اصلاح برای تحمل به خشکی در گندم استفاده شود.

مواد و روش‌ها

بذور سه سطح ژنوتیپی گندم‌های وحشی دیپلوئید (A. *urartu* و A. *Tauschii.speltooides*، گندم‌های تتراپلوئید (گندم‌های دوروم بهرنگ و شبرنگ) و گندم‌های هگزاپلوئید (گندم نان منطقه سیستان شامل ۲ رقم سیستان و بولانی) جهت کشت و استخراج DNA از مرکز تحقیقات کشاورزی شهرستان زابل و موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر تهیه شدند. کشت بذرها در گلدان‌های یک کیلویی حاوی مخلوطی متشکل از کوکوپیت و پرلیت (۱:۱) در عمق یک سانتی‌متری انجام شد. برای مطالعات مولکولی از بافت‌های تازه برگ استفاده شد. استخراج DNA از نمونه‌های گیاهی به روش دستی و از روش (Dellaporta et al. 1993) با کمی تغییر صورت گرفت. کمیت و کیفیت نمونه‌های DNA با استفاده از روش اسپکتروفتومتری در طول موج ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر و الکتروفورز ژل آگارز با غلظت ۰/۸ درصد تعیین شد. نشانگر اختصاصی مورد استفاده در این تحقیق بر اساس توالی مربوط به ژن دهیدرین موجود در بانک ژن و با استفاده از نرم‌افزار Oligo طراحی (Forward: CACCTTCCTCACACAACC و Reverse: AACAAACAAAAACCTCGAC) شد. واکنش PCR با حجم ۲۰ میکرولیتر، شامل دو میکرولیتر بافر واکنش PCR، یک میکرولیتر $MgCl_2$ ، یک میکرولیتر مخلوط 1x dNTP، ۰/۲۵ میکرولیتر از هر آغازگر رفت و برگشت، یک واحد آنزیم Taq، یک میکرولیتر DNA الگو و حجم واکنش با آب استریل دیونیزه به ۲۰ میکرولیتر رسید.

LEA گرفته‌شده از *Tamarix androssowii* جهت اعمال مقاومت به خشکی بسیار مناسب بوده و پتانسیل بالایی برای توسعه مقاومت به خشکی در گیاهان را دارا می‌باشند (Wang et al. 2007). در بررسی میزان بیش بیان ژن *dhn5* در گیاه آراییدوپسیس جهت مقاومت به تنش محیطی محققان به این نتیجه رسیدند که ژن‌های پروتئین LEA در اکثر گیاهان وجود داشته و در زمان تنش باعث ایجاد مقاومت و پایداری شده و افزایش بیان آن باعث مقاومت بیشتر گیاه می‌شود (Brini et al. 2007). تحقیقی با عنوان رونویسی فعال ژن‌های *COR/LEA* و افزایش مقاومت به تنش زیستی از طریق بیان همولوگ *DREB2* گندم در توتون ترانسژنیک صورت گرفت که پژوهشگران به این نتیجه دست یافتند که *DREB2* به عنوان فاکتور رونویسی عمل کرده و در جهت مثبت، ژن‌های *dhn13/wrab17/wrab18/wrab19* را در توسعه مقاومت به تنش‌های غیرزنده در گندم تنظیم می‌کند که این تحقیق باعث شناسایی DHN13 در گندم نان شد (Kobayashi et al. 2008). بیان بالای DHN5 گندم در آراییدوپسیس دارای اثر پلی تروپی است یعنی علاوه بر تحریک بیان سایر ژن‌های مقاومت به تنش‌های غیرزنده، منجر به تحریک بیان ژن‌های تدافعی مانند مقاومت در برابر پاتوژن‌ها نیز می‌شود (Brini et al. 2011). با استفاده از آنالیزهای بیوانفورماتیکی ژن کدکننده پروتئین LEA را از لحاظ وجود دمین‌های حفاظت‌شده و ساختارهای موتیف مانند مورد بررسی قرار گرفت و به این نتیجه رسیدند که در مجموع در ساختار این ژن ۹ موتیف و یک دمین حفاظت‌شده و ۴ توالی حفاظت‌شده وجود دارد (Rasouli et al. 2013). در بررسی دیگری تحت عنوان مطالعه بیوانفورماتیکی و تنوع ژنتیکی ژن DHN13 در گونه‌های دیپلوئید، تتراپلوئید و هگزاپلوئید گندم نتایج حاصل از آنالیزهای فیلوژنتیکی بر اساس الگوریتم UPGMA نشان‌دهنده این موضوع بود که گندم‌های مورد بررسی از لحاظ این ژن در ۳ گروه قرار دارند. که گروه اول شامل ۴ رقم گندم نان (توالی موجود در NCBI)، گندم سرداری، گندم دوروم شوش و گندم دوروم بروجرد، گروه دوم شامل ۱ رقم وحشی اورارتو و گروه سوم شامل ۲ رقم نان گنبد و دیکوکوئیدز^۱ بودند. نتایج این تحقیق نمایانگر ارتباط ویژه و

¹ *T.dicoccoides*

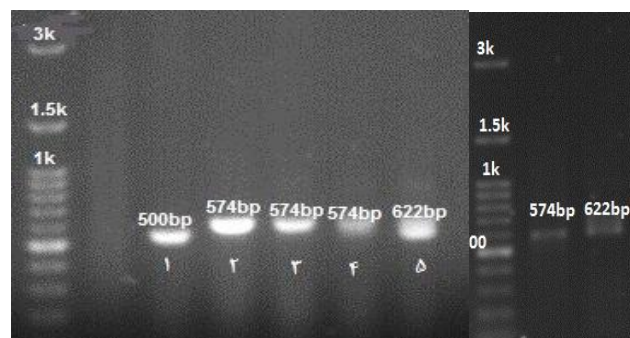
نتایج و بحث

وجود تنها یک بانده در نیم رخ الکتروفورزی، دلیلی بر کیفیت مطلوب DNA استخراج شده است. الکتروفورز محصول PCR نشان داد که قطعات اختصاصی ژن DHN5 به طول تقریبی بین ۶۰۰-۵۰۰ جفت باز با کمی تغییر در هر گونه گندم به خوبی تکثیر شده است. این مطلب نشان دهنده طراحی و عملکرد صحیح آغازگرها و برنامه PCR مناسب (به خصوص دمای اتصال) می باشد. در مرحله بعد نتایج PCR توالی یابی شدند. کیفیت گراف ها نشان دهنده میزان دقت در تعیین توالی می باشد. سپس جهت آنالیزهای بیوانفورماتیکی از نتایج حاصل از توالی نمونه ها استفاده شد. نتایج توسط نرم افزارهای MEGA, Blast DNA SP و پایگاه داده HIV Databases شاخص های ژنتیکی مورد بررسی قرار گرفتند. برای تعیین توالی پروتئین کد شده حاصل از توالی های ژنومی مورد مطالعه از ابزار تعیین توالی پروتئین موجود در پایگاه ExPasy استفاده شد. نتایج تجزیه و تحلیل توالی های نوکلئوتیدی ژن DHN5 در خانواده گرامینه نشان داد که بیشترین فراوانی متعلق به باز گوانین (۳۰/۶۷) و کمترین فراوانی مربوط به باز آدنین (۱۳/۳) می باشد (جدول ۱). در برآورد جایگزینی نوکلئوتیدی در خانواده گرامینه، مقادیر بالای جایگزینی پیریمیدینی بود به طوری که این مقدار برای تبدیل تیمین به سیتوزین ۲۹/۹۵ درصد و برای تبدیل سیتوزین به تیمین ۸/۴۹ درصد به دست آمده است. این مقادیر برای بازهای پورینی کمتر و به ترتیب برای تبدیل آدنین به گوانین و گوانین به آدنین ۱۲/۲۲ درصد و ۱۰/۴۷ درصد بود (جدول ۲). نتایج این بررسی با نتایج سایر محققین که بیشتر جانشینی را جانشینی پیریمیدینی گزارش کرده اند، مطابقت دارد. علت این تغییرات احتمالاً می توان به متیله شدن سیتوزین نسبت داد (Picoult et al. 1999). در بررسی شاخص های ژنتیکی ژن DHN5 در خانواده گرامینه، تعداد کل جهش، ۱۸۸ جهش شناسایی شد. توزیع آن ها در طول ژنوم متفاوت بود.

جدول ۱- فراوانی نوکلئوتیدهای حاصل از توالی نوکلئوتیدی ژن DHN5 در

خانواده گرامینه				
نوکلئوتید	A	T/U	C	G
فراوانی	۲۶/۶	۱۳/۳	۲۹/۴۳	۳۰/۶۷

پس از انجام واکنش PCR، به منظور اطمینان از تکثیر صحیح قطعه مورد نظر و تعیین اندازه باند محصول PCR، ۵ میکرولیتر از هر محصول روی ژل آگارز یک درصد در بافر 0.5x TBE با ولتاژ ۸۰ به مدت ۶۰ دقیقه الکتروفورز شد. عکس برداری از ژل با دستگاه ژل داگ انجام شد. در مرحله بعد قطعات به دست آمده با طول مورد نظر از روی ژل آگارز به وسیله کیت خالص سازی جداسازی شد و محصولات تکثیری جهت توالی یابی به شرکت Bionner کره ارسال شد.



شکل ۱- الکتروفورز ژن DHN5 در ۱- *A.speltoides*، ۲- *T.urartu*، ۳- شیرنگ ۴- بهرنگ ۵- سیستان ۶- *A.taushii*، ۷- بولانی

توالی یابی بر اساس هر دو قطعه تکثیری رفت و برگشت انجام گرفت. استخراج توالی از کروماتوگرام های دریافتی از شرکت با استفاده از نرم افزار Chromas ver. 2 صورت گرفت. پس از دریافت توالی ها، با به کارگیری نرم افزار Blast در بانک ژنی، اختصاصی بودن قطعه مورد نظر به گونه گرامینه تأیید شد. توالی های دریافتی با توالی های ژن DHN در پایگاه اطلاعاتی NCBI مقایسه و با استفاده از برنامه ClustalW هم ردیف سازی (Alignment) شدند. سپس با استفاده از نرم افزارهای MEGA 5، DNA SP و پایگاه داده HIV Databases شاخص های ژنتیکی مورد بررسی قرار گرفتند. برای تعیین توالی پروتئین کد شده حاصل از توالی های ژنومی مورد مطالعه از ابزار تعیین توالی پروتئین موجود در پایگاه ExPasy استفاده شد. پس از اعمال توالی DNA به این پایگاه برای هریک از ارقام مورد مطالعه توالی پروتئین به صورت بیوانفورماتیکی تعیین شد. برای ترسیم ساختار سه بعدی مورد بررسی در هریک از ارقام مورد مطالعه از پایگاه اطلاعاتی Phyre 2 استفاده شد.

جدول ۲- ماتریس برآورد الگوی جایگزینی نوکلئوتیدی ژن DHN5 در خانواده گرامینه

From/To	A	T	C	G
A	-	۱/۷۸	۶/۲۷	۱۲/۲۲
T	۵/۲۶	-	۲۹/۹۵	۶/۱۴
C	۵/۲۶	۸/۴۹	-	۶/۱۴
G	۱۰/۴۷	۱/۷۸	۶/۲۷	-

*احتمال جایگزینی هر ورودی از یک پایه (ردیف) به پایه دیگر (ستون) است. در این جدول درصد جهش‌های انتقالی (جایگزینی پورین به پورین دیگر و یا پیریمیدین به پیریمیدین دیگر) به صورت ضخیم و جهش تقاطعی (جایگزینی پورین به پیریمیدین و برعکس) به صورت ساده نشان داده شده‌اند.

جدول ۳- جایگاه پلی مورفیسم ژن DHN5 در خانواده گرامینه

K	Eta	Pi	Hd	H	S	جمعیت
۳۳/۱۳۴	۱۸۸	۰/۱۱۷۰۸	۰/۷۶۶	۱۴	۱۵۸	گرامینه

*S: تعداد جایگاه چندشکلی، H: تعداد هاپلوتایپ‌ها، Hd: تنوع هاپلوتیدی، Pi: تنوع نوکلئوتیدی، Eta: تعداد کل جهش، K: تعداد تفاوت نوکلئوتیدها بین جمعیت یا گونه‌ها (واگرایی نوکلئوتیدی).

از تبدیل نواحی غیر کدکننده ژنی به نواحی کدکننده ژنی است. نتایج مطالعه نشان داد که مقادیر D منفی بود (جدول ۶). منفی بودن نتایج نشان‌دهنده تفاوت فاحش میان فراوانی چندشکلی‌ها و مثبت بودن نشان‌دهنده تفاوت نازل میان فراوانی چندشکلی‌ها است که نتایج این تحقیق نشان داد که تفاوت فاحشی بین فراوانی چندشکلی‌ها وجود دارد. نتایج تست Neutrality نشان‌دهنده اثر گسترش اخیر جمعیت گرامینه در جهان و یا اثر انتخاب جهت‌دار بر روی این ژن در طول تکامل است. در این پژوهش، برای رسم درخت فیلوژنتیکی توالی نوکلئوتیدی در ۳۴ واریته مورد بررسی و دو توالی از خانواده *solanum* و *populus* به عنوان خارج گروه برای تعیین روند تکاملی خانواده گرامینه، از NJ استفاده شد.

جدول ۴- مناطق حفاظت‌شده DNA ژن DHN5 در خانواده گرامینه

CT	MWL	C	جمعیت
۰/۵۶	۷۵	۰/۴۶۳	گرامینه

C: حفاظت توالی، MWL: مینیمم طول حفاظت، CT: حد آستانه حفاظت

جدول ۵- تعیین روند انتخاب طبیعی در ژن DHN5 در خانواده گرامینه

پارامتر	مقدار عددی
Ds	۱/۷۶۷۳
Dn	۱/۹۹۴۲
dn/ds°	۱/۱۳

*مقدار عددی dn/ds نشان‌دهنده روند انتخاب طبیعی

تعداد جایگاه‌های چندشکلی نیز ۱۵۸ جایگاه مشاهده شد؛ که روند انتخاب مثبت این ژن را نشان می‌دهد (جدول ۳). علت پایین بودن تنوع نوکلئوتیدی احتمالاً ناشی از کاهش شدید جمعیت مؤثر واریته‌های این خانواده و تأیید بر در معرض خطر بودن و انقراض این واریته‌ها است.

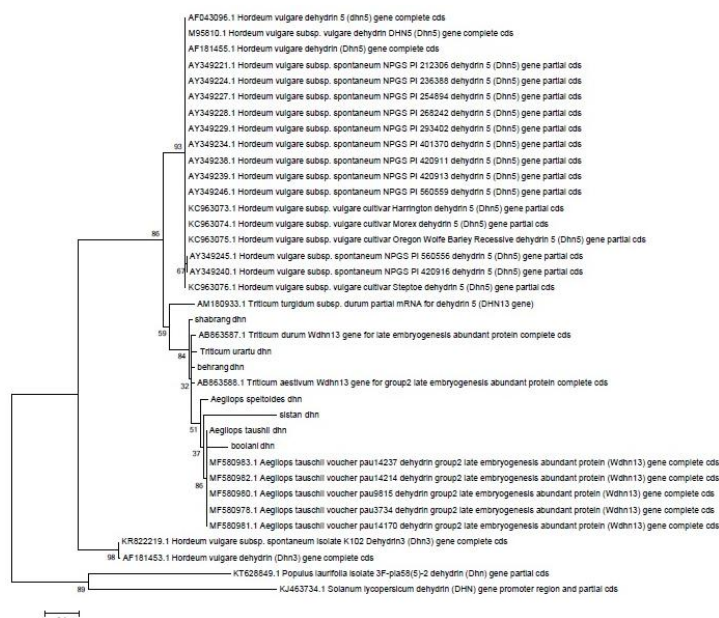
در نتایج حاصل از نواحی حفاظت‌شده ژن DHN5 در خانواده گرامینه، ناحیه حد آستانه حفاظت ۰/۵۶ و مینیمم طول حفاظت ۷۵ باز و حفاظت توالی ۰/۴۶۳ مشاهده شد (جدول ۴). این نواحی حفاظت‌شده بخش کوچکی از توالی ژن مذکور را شامل می‌شود که این امر نشان‌دهنده تمایز متفاوت این جایگاه و همچنین مستعد بودن آن به تغییرات نوکلئوتیدی و جهش در بین واریته‌های مختلف، باعث تنوع در بین واریته‌ها می‌شود.

مقدار عددی نسبت dN/dS خانواده گرامینه ۱/۱۱ (جدول ۵) به دست آمد که روند انتخاب مثبت ژن DHN5 در بین واریته‌های گرامینه را در طی تکامل نشان می‌دهد. بررسی تغییرهای نوکلئوتیدی که باعث تغییر اسیدهای آمینه شده‌اند (dN) نسبت به تغییرهای نوکلئوتیدی که تأثیری در اسیدآمینه حاصله نداشته‌اند (dS)، یک روش مفید و بسیار کارآمد جهت تشخیص روند انتخاب طبیعی در طول تکامل برای ژن‌ها می‌باشد (Papiz et al. 1986). این نوع انتخاب سبب به وجود آمدن واریته‌های جدید و از طرفی سبب تثبیت عملکرد آن‌ها در طی روند تکامل و پیشرفت در جهت خالص‌سازی عملکرد آن‌ها شده است که ناشی

جدول ۶- بررسی تست Neutrality

M	S	Ps	θ	Π	D
۳۴	۱۵۸	۰/۵۵۸۳۰۴	۰/۱۳۶۵۴۵	۰/۱۱۷۰۸۰	-۰/۵۳۹۵۱۲

M: تعداد توالی، S: تعداد نواحی جداشده، Ps: S/m ، θ : $Ps/a1$ ، π : تنوع نوکلئوتیدی، D: تست Neutrality با استفاده از روش Tajima.



شکل ۲- درخت فیلوژنی توالی‌های مربوط به ژن *DHN5* بر اساس روش NJ در ارقام مورد مطالعه با سایر گونه‌های هم‌خانواده در NCBI

گونه‌های گیاهی گل‌سین بتائین که پیش ساز اسید آمینه گل‌سین است در پاسخ به تنش‌های محیطی تجمع می‌یابد که در بهبود وضعیت گیاه تحت تنش نقش دارد. تغییر در شرایط تولید گل‌سین بتائین تولید گل‌سین را تحت تاثیر قرار داده که می‌توان نتیجه گرفت افزایش آن باعث افزایش سنتز گل‌سین می‌شود (Ashraf and Foolad 2007). بنابراین با توجه به این که مقدار آمینواسید گل‌سین در رقم شبرنگ بیشترین مقدار است می‌توان از این نمونه در برنامه‌های مهندسی ژنتیک و اصلاحی استفاده نمود. همچنین نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل ژن *DHN5* در نمونه‌های مورد مطالعه نشان داد که بیشترین تعداد آمینواسید و بیشترین میزان وزن مولکولی مربوط به رقم بولانی است. شاخص الیفاتیک که به عنوان یک عامل مهم به منظور برآورد مقاومت پروتئین‌ها در برابر حرارت می‌باشد در توالی ژن *DHN5* رقم سیستانی بیشتر بود که دلیل آن فراوانی بیشتر اسید آمینه‌های آلانین ایزولوسین لوسین و والین که همگی جزء اسید آمینه‌های الیفاتیک می‌باشند

مقادیر Bootstrapping به وسیله ۱۰۰۰ بار نمونه‌گیری مجدد به دست آمدند. مقادیر Bootstrapping بالا در محل انشعاب شاخه‌های درخت نشان می‌دهد که درخت فیلوژنی نوکلئوتیدهای مورد نظر از درجه اعتماد بالایی برخوردار است. همان‌طور که در شکل (۱) مشاهده می‌شود از گونه *Populus* و *Solanum* به عنوان Outgroup استفاده شده است و در یک شاخه مجزا نسبت به بقیه قرار گرفته است و درخت فیلوژنی را ریشه‌دار نموده است. نتایج بررسی فیلوژنی نشان داد که واریته‌های *H. (KR822219.1)* و *Vulgare subs* (*AF181453.1*) قدمت بیشتری نسبت به سایر واریته‌های خانواده گرامینه دارند. بیشترین فاصله ژنتیکی بین رقم سیستان و واریته *H. vulgare (AF181453.1)* می‌باشد. نتایج حاصل از ترکیبات فیزیوشیمیایی ژن *DHN5* در خانواده دهیدرین و نمونه‌های مورد مطالعه نشان داد که بیشترین مقدار آمینواسید را گل‌سین (۲۳/۱) در رقم شبرنگ و ترئونین (۱۴/۵) در گونه *A.speltoides* است (جدول ۷). در بسیاری از

دهیدرین و مقاومت به تنش‌های غیرزنده از گندم و جو حاصل شده است (Zhu et al. 2000; Kosova et al. 2008; Holkovan et al. 2010; Hanin et al. 2011).

بر اساس نتایج این تحقیق، بررسی روند انتخاب طبیعی در خانواده گرامینه با استفاده از ژن DHN5 در بین گونه‌های گندم در طی تکامل مثبت نشان داده شد. همچنین، نواحی حفاظت‌شده بخش اندکی از توالی ژن DHN5 را تشکیل می‌دهد که این امر نشان‌دهنده چندشکلی بالای این ژن و همچنین مستعد بودن آن به تغییرهای نوکلئوتیدی و جهش می‌باشد.

که در این رقم بیشتر بود. در شرایط تحت تنش والین و ایزولوسین همانند شکل ذخیره‌ای پیرووات عمل کرده که افزایش این آمینواسیدها در شرایط تنش انرژی لازم برای گیاه را فراهم می‌کند. از نظر میانگین شاخص پایداری پروتئینی، گونه *T.urartu* و سیستان ناپایدار و در سایر نمونه‌های مورد مطالعه پایداری پروتئین مشاهده شد (جدول ۷ و ۸).

نتیجه‌گیری کلی

بیشترین اطلاعات ژنتیکی DHN5 ها چه در خصوص ویژگی‌های مولکولی و چه در مورد ارتباط بین تغییرات بیان ژن خانواده

جدول ۷- درصد آمینواسیدها در گونه‌های گندم مورد بررسی

	<i>A.taushii</i>	<i>A.speltoides</i>	<i>T.urartu</i>	Shabrang	Behrang	Sistan	Bolani
Ala	3/4	۴	۵/۳	۳/۸	۳/۹	۴/۸	۶
Arg	۲/۹	۱/۶	۹/۳	۰	۰/۸	۲/۹	۵
Asn	۲/۹	۲/۴	۲/۷	۲/۳	۳/۱	۲/۹	۴
Asp	۴/۳	۴/۸	۴/۷	۴/۶	۶/۳	۳/۸	۴
Cys	۰	۰	۰/۷	۰	۰	۱	۰/۵
Gln	۸/۶	۶/۵	۷/۳	۶/۲	۵/۵	۷/۶	۸/۵
Glu	۷/۲	۷/۳	۳/۳	۶/۹	۴/۷	۴/۸	۶
Gly	۱۸/۰	۲۲/۶	۱۱/۳	۲۳/۱	۲۲	۱۹	۱۲/۹
His	۶/۵	۷/۳	۱۱/۳	۸/۵	۷/۹	۷/۵	۵
Ile	۲/۹	۴	۲	۲/۳	۳/۱	۱/۹	۳/۵
Leu	۳/۶	۲/۴	۲/۷	۲/۳	۳/۱	۷/۶	۴/۵
Lys	۸/۶	۹/۷	۷/۳	۱۰/۸	۹/۴	۴/۸	۷/۵
Met	۲/۲	۲/۴	۲/۷	۳/۸	۳/۱	۲/۹	۱/۵
Phe	۰/۷	۰	۱/۳	۰	۰	۱	۳/۵
Pro	۵	۲/۴	۵/۳	۲/۳	۲/۴	۸/۶	۶
Ser	۴/۳	۳/۲	۸	۳/۸	۳/۹	۴/۸	۷
Thr	۱۲/۲	۱۴/۵	۱۰	۱۳/۸	۱۴/۲	۸/۶	۹/۵
Trp	۰	۰	۰/۷	۰	۰	۰	۰
Tye	۱/۴	۱/۶	۱/۳	۱/۵	۱/۶	۱/۹	۱/۵
Val	۴/۳	۳/۲	۲/۷	۳/۸	۴/۷	۵/۷	۴

جدول ۸- اطلاعات پروتئینی در گندم‌های مورد بررسی

	<i>A.taushii</i>	<i>A.speltoides</i>	<i>T.urartu</i>	Shabrang	behrang	sistan	bolani
تعداد آمینواسید	۱۳۹	۱۲۴	۱۵۰	۱۳۰	۱۲۷	۱۰۵	۲۰۱
وزن مولکولی	۱۴۶۴۴/۹۷	۱۲۴۵۶/۸۱	۱۶۷۶۳/۴۴	۱۳۳۱۱/۴۵	۱۲۹۸۳/۱۱	۱۰۸۳۷/۰۴	۲۱۶۹۶/۹۴
ایزوالکتریک pH	۷/۶۲	۶/۸۳	۱۰/۶۲	۶/۹۰	۶/۸۵	۶/۶۴	۹/۳۶
شاخص الیفاتیک	۴۲/۰۹	۳۸/۵۵	۳۱/۲۷	۳۳/۰۰	۴۲/۲۰	۵۸/۴۸	۴۸/۵۶
پایداری پروتئین	پایدار	پایدار	ناپایدار	پایدار	پایدار	ناپایدار	پایدار

(Allagulova et al. 2003). نتیجه به دست آمده از این مطالعه با نتایج PI های به دست آمده از سایر DHN های گیاهی سازگار می باشد (Yang et al. 2012; Liu et al. 2012; Kosová et al. 2007).

دهیدرین ها دارای وزن های مولکولی بسیار متفاوتی هستند به نحوی که کوچک ترین دهیدرین شناسایی شده تا کنون دارای وزن مولکولی 9.6 KDa (Graether and Boddington 2014; Labhili et al. 1995) و بزرگ ترین آن دارای MW برابر با 70 کیلو دالتون می باشد (Graether and Boddington 2014; Kim et al. 2012). از طرفی دیگر بالاترین وزن مولکولی که برای دهیدرین توسط الکتروفورز دو بعدی تعیین شده ۲۰۰ کیلو دالتون می باشد که این مقدار بسیار بیشتر از وزن مولکولی شیمیایی آن است. پیشنهاد شده که این اختلاف ناشی از ساختارهای نامنظم Dehydrins های بسیار بزرگ در حال ران^۱ شدن بر روی ژل SDS-PAGE می باشد (Graether and Boddington 2014; Receveur-Bréchet et al. 2006).

شاخص آلیفاتیک (Aliphatic index)، شاخص دیگری بود که در این مطالعه مورد ارزیابی قرار گرفت. این شاخص در واقع عبارت است از حجم نسبی پروتئین که با زنجیره های آلیفاتیک آلانین، والین، لوسین و ایزولوسین اشغال شده اند و به عنوان یک فاکتور مثبت در افزایش ثبات حرارتی پروتئین های گلوبولار محسوب می شود؛ به همین دلیل در موجودات مقاوم به گرما پروتئین ها دارای شاخص آلیفاتیک بالایی می باشند (Ikai 1980).

از آنجایی که دهیدرین یک مولتی-فامیلی از پروتئین های موجود در گیاهان است که در پاسخ به تنش سرما و خشکی تولید می شود (Puhakainen et al. 2004). از جمله پروتئین های هیدروفیلیک و قابل اطمینان مقاوم در برابر تنش حرارتی همراه با تعداد زیادی از اسیدهای آمینه باردار هستند (Yang et al. 2012) بنابراین پایداری حرارتی (thermostability) این پروتئین ها می توان به عوامل دیگری غیر از شاخص آلیفاتیک نسبت داده شود.

تعداد کل جهش هایی که در طی تکامل این جایگاه ژنی رخ داده است برابر با ۱۸۸ و همچنین تعداد جایگاه های چند شکل نیز محاسبه شد که روند انتخاب مثبت در این ژن را توجیه می کند و این امر نقش عمده ای در شناخت بیولوژیکی این ژن خواهد داشت که سبب به وجود آمدن پروتئین های جدید و همچنین عملکردهای جدید می شود. نتایج نشان داد بیشترین نوکلئوتید مربوط به باز گوانین است و بیشترین میزان جاننشینی بازها مربوط به بازهای پیریمیدینی بود که در تمامی قسمت های ژن پراکنده اند. همچنین نتایج حاصل از درخت فیلوژنتیکی نشان از جدا شدن منطقی گونه ها از یکدیگر داشتند، به طوری که ابتدا گونه های دیپلوئید و سپس تتراپلوئید و بعد از آن گونه های هگزاپلوئید از یکدیگر مشتق شدند. بررسی ارقام مورد مطالعه با سایر گونه های مربوط به خانواده گرامینه نشان داد که تقریباً هرگونه در شاخه مربوط به خود قرار گرفته و ژن DHN این قابلیت را دارد که گونه های مختلف را به توان به وسیله آن تفکیک کرد. لذا می توان نتیجه گرفت ژن DHN5 ابزاری مناسب برای ارزیابی روابط فیلوژنتیکی باشد.

از نظر فیزیوشیمیایی DHN ها با حضور فراوان اسید آمینه Gly و اسیدهای آمینه قطبی اما بدون Cys و Trp مشخص می شوند (Liu et al. 2012; Close 1996). طی مطالعه ای که توسط Liu و همکاران در مورد شناسایی ده ژن کد کننده یازده پلی پپتید فرضی از DHN در Populus انجام گرفت، مشخص شده که ترکیبات اسید آمینه تمام پروتئین های DHN آن ها دارای خصایص مشترکی می باشند؛ به عنوان مثال در PtrDHN-7 (K₃) از زیرگروه Kn، باقی مانده های Gly، Gln، Lys، Glu و Asp ۶۰٪ از کل اسیدهای آمینه موجود در توالی را تشکیل می دادند در حالی که فاقد اسیدهای آمینه Cys و Trp بود. تنها نمونه استثنایی این مطالعه PtrDHN-10 (817405) بود که دارای محتوای نسبتاً بالایی از اسید آمینه سیستئین (۴/۶ درصد) بود (Liu et al. 2012). مقدار نقطه ایزوالکتریک (PI)، خصوصیات بیوشیمیایی مهمی را برای زیربخش های DHN گیاهان مطرح می کند، زیرا ویژگی های مختلف اسیدی یا بازی DHN ها در یک زیر گروه مشابه ممکن است به عوامل محیطی مختلفی پاسخ دهد (Liu et al. 2012).

¹ run

منابع

- Ahmadabadi M, Ahmadi Tehrani P, Omid M, Davoodi (D2005) Studies on interspecific caryotypic diversity in *aegilops triuncialis* in north-western Iran. Journal of Agricultural Science and Technology 36:969-977 (In Farsi).
- Allagulova C.R, Gimalov F, Shakirova F, Vakhitov V (2003) The plant dehydrins: structure and putative functions. Biochemistry (Moscow) 68:945-951.
- Ashraf M, Foolad M.R (2007) Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. Environment Expression Botany 58:206-216.
- Bommineni V, Jauhar P, Peterson T, Chibbar R, Almouslem A (1997) Analysis of hybrids of durum wheat with *Thinopyrum junceiforme* using RAPD markers. Theoretical and applied genetics 95:757-763.
- Brini F, Hanin, M, Lumbreras V, Amara I, Khoudi H, Hassairi A, Pages M, Masmoudi K (2007) Overexpression of wheat dehydrin DHN-5 enhances tolerance to salt and osmotic stress in *Arabidopsis thaliana*. Plant cell reports 26: 2017-2026.
- Brini F, Yamamoto A, Jlaiei L, Takeda S, Hobo T., Dinh H.Q, Hattori T, Masmoudi K, Hanin, M (2011) Pleiotropic effects of the wheat dehydrin DHN-5 on stress responses in *Arabidopsis*. Plant and cell physiology 52:676-688.
- Campbell SA, Close TJ (1997) Dehydrins: genes, proteins, and associations with phenotypic traits. The New Phytologist 137: 61-74.
- Close TJ (1996) Dehydrins: emergence of a biochemical role of a family of plant dehydration proteins. Physiologia Plantarum 97: 795-803.
- Dellaporta SL, Wood J, Hicks JB (1983) A plant DNA miniprep: version II. Plant molecular biology reporter 1: 19-21.
- Du H, Wang N, Cui F, Li X, Xiao J, Xiong L (2010) Characterization of the β -carotene hydroxylase gene DSM2 conferring drought and oxidative stress resistance by increasing xanthophylls and abscisic acid synthesis in rice. Plant Physiology 154: 1304-1318.
- Dure L, Crouch M, Harada J, Ho T.-H.D, Mundy J, Quatrano R, Thomas T, Sung Z (1989) Common amino acid sequence domains among the LEA proteins of higher plants. Plant molecular biology 12:475-486.
- Dvořák J, Ross K (1986) Expression of Tolerance of Na⁺, K⁺, Mg²⁺, Cl⁻ and SO₄²⁻ 4 Ions and Sea Water in the Amphiploid of *Triticum aestivum* × *Elytrigia elongata* 1. Crop Science 26: 658-660.
- Falak naz MH, Merabi D, Kharizi D, Nasrollahe neghad H (2012) Molecular study and sequencing of Wdhn13 gene (LEA) in bread wheat, durum wheat and their genomic species. Journal of Cellular-Molecular Biotechnology 3: 19-27 (In Farsi).
- Graether SP and Boddington KF (2014) Disorder and function: a review of the dehydrin protein family. Frontiers in plant science 5: 576.
- Hanin M, Brini F, Ebel C, Toda Y, Takeda S, Masmoudi K (2011) Plant dehydrins and stress tolerance: versatile proteins for complex mechanisms. Plant signaling and behavior 6: 1503-1509.
- Holkova L, Mikulkova P, Hrstkova P, Prasil I. T, Bradocova M, Prasilova P, Chloupek O (2010) Allelic variation at Dhn4 and Dhn7 are associated with frost tolerance in barley. Plant Breeding 46: 149-158.
- Hu T.Z (2008) OsLEA3, a late embryogenesis abundant protein gene from rice, confers tolerance to water deficit and salt stress to transgenic rice. Journal of Plant Physiology 55: 530-537.
- Ikai A (1980) Thermostability and aliphatic index of globular proteins. The Journal of Biochemistry 88: 1895-1898.
- Kim EC, Lee HS and Choi DW (2012) Sequence variability and expression pattern of the dehydrin gene family in '*Populus tremula*' × '*Populus alba* var. *glandulosa*'. Plant Omics 5: 122.
- Kobayashi F, Ishibashi M, Takumi S (2008). Transcriptional activation of Cor/Lea genes and increase in abiotic stress tolerance through expression of a wheat DREB2 homolog in transgenic tobacco. Transgenic Research 17:755-767.
- Kosova K, Halkova L, Prasil I.T, Prasilova P, Bradacova M, Vitamvas P, Capkova V (2008) The expression of dehydrin5 during the development of frost tolerance in barley (*Hordeum vulgare*). Plant Physiology 165: 1142-1151.
- Kosová K, Vítámvás P and Prášil I (2007) The role of dehydrins in plant response to cold. Biologia Plantarum 51: 601-617.
- Labhilili M, Joudrier P, Gautier MF (1995) Characterization of cDNAs encoding *Triticum durum* dehydrins and their expression patterns in cultivars that differ in drought tolerance. Plant Science 112: 219-230.
- Liu C.C, Li C.M, Liu B.G, Ge S.J, Dong X.M, Li W, Zhu HY, Wang BC and Yang CP, (2012) Genome-wide identification and characterization of a dehydrin gene family in poplar (*Populus trichocarpa*). Plant Molecular Biology Reporter 30: 848-859.
- Papiz M, Sawyer L, Eliopoulos E, North A, Findlay J Sivaprasadarao R, Jones T, Newcomer M, Kraulis P.J.N (1986) The structure of β -lactoglobulin and its similarity to plasma retinol-binding protein. 324: 383.
- Picoult-Newberg L, Ideker T.E, Pohl M.G, Taylor S.L, Donaldson M.A, Nickerson D.A, Boyce-Jacino M (1999) Mining SNPs from EST databases. Genome research 9: 167-174.
- Pogodin S, Slater NK, Baulin VA (2012) Biomolecule surface patterning may enhance membrane association. ACS nano 6: 1308-1313.
- Puhakainen T, Hess MW, Mäkelä P, Svensson J, Heino P and Palva ET (2004) Overexpression of multiple dehydrin genes enhances tolerance to freezing stress in *Arabidopsis*. Plant molecular biology 54: 743-753.
- Rasouli H, Falakna, M, Kahrizi D, Mehrabi A, Yari Kh, Gaderinia P (2013) Functional assessment of LEA, a group 2 late embryogenesis abundant protein in different cultivar of bread wheat via computational analysis. Advances in Environmental Biology (In Farsi).

Receveur-Bréchet V, Bourhis JM, Uversky VN, Canard B and Longhi S (2006) Assessing protein disorder and induced folding. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 62: 24-45.

Sishen L, Xianyun Wei JJ, Linzhi Li XZh, Chen H, Fan Y, Sun H, Zhao X, Yunfong Xu T, Jiang F, Wang H, Lihui L (2007) A intervarietal genetic map and QTL analysis for yield traits in wheat. *Molecular Breeding* 20: 167-178.

Vojdani P (1996) mportance of protection methods in natural origin and that's role in protect and use from plant resources. *Proceedings of 4th Iranian Crop Sciences Congress Esfahan University*. 554-573 (In Farsi).

Wang M, Zhang Y, Lin Z, Ye X, Yuan Y, Ma W, Xin Z (2010) Development of EST-PCR markers for *Thinopyrum intermedium* chromosome 2Ai# 2 and their application in characterization of novel wheat-grass recombinants. *Theoretical and applied genetics* 121: 1369-1380.

Wang Y, Jiang J, Zhao X, Liu G, Yang C, and Zhan L, (2006) A novel LEA gene from *Tamarix androssowii* confers drought tolerance in transgenic tobacco. *Plant Science* 171: 655-662.

Wise MJ, Tunnacliffe A (2004) POPP the question: what do LEA proteins do? *Trends in plant science* 9: 13-17.

Yang Y, He M, Zhu Z, Li S, Xu Y, Zhang C, Singe, SD and Wang Y (2012) Identification of the dehydrin gene family from grapevine species and analysis of their responsiveness to various forms of abiotic and biotic stress. *BMC Plant Biology* 12: 140.

Zhu B, Choi DW Fenton R, Close TJ (2000) Expression of the barley dehydrin multigene family and the development of freezing tolerance. *Molecular Genetics and Genomics* 264: 145-153.