ژنتیک نوین
دوره پانزدهم ، شماره ٤، زمستان ۱۳۹۹
صفحه ۳۷۰ - ۳٦۱

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- به‌ترتیب دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، دانشیار، استاد، دانشیار، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، ایران

Yosefzaei S[1] , Mahdinezhad N[*1], Fakheri B[1], Ganjali S[1]

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: ۹۹/۰٦/۰۲)

چکیده

پروتئین‌های LEA اولین بار در گندم و پنبه به‌عنوان 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 دیپلویید وحشی (*Aegilops speltoides*، *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 به‌واسطه 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 توالی یابی نشان داد که جهش جانشینی انتقالی بیشتر از جانشینی تقاطعی است و نسبت d_N/d_S برابر ۱/۱۳ به‌دست 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 به‌توالی ژن دهیدرین گندم به‌همراه 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، به‌دلیل سازگاری به شرایط تنش خشکی، توالی این ژن به‌واسطه جهش‌های فراوان دچار تغییر زیاد شده که باعث می‌شود در بررسی‌های فیلوژنتیکی از سایر گندم‌های موردمطالعه جدا شود. با توجه به نتایج به‌دست‌آمده 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

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1399.15.4.5.2]

مقدمه

مجموعه گندم دیپلوئید با تعداد کروموزوم (۱٤ =۲x= ۲n) از سه گونه *T.urarta*، *T.boeoticum* و*T.moncoccum* تشکیل‌شده است. گروه گندم‌های تتراپلوئید با تعداد کروموزوم (۲۸=٤x= ۲n) از ۱۰ گونه تشکیل‌شده 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 ٤٨=٦x= ۲n دارای ژنوم ABD است که هر یک از ژنوم A، B و D از گونه‌های مختلفی گرفته‌شده 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 به‌عنوان منابع ژنی مورداستفاده پژوهشگران قرار می‌گیرند و تنوع ژنتیکی موردنیاز 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[1] نقش دارند (Allagulova et al. 2003; Umezawa et al. 2006). اولین بار در گندم و پنبه پروتئین‌های LEA جهت مقابله با تنش‌های محیطی به‌عنوان 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 آبسیزیک 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 فرآیندهای 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 به‌صورت سازه‌های پروتئینی متشکل از مارپیچ آلفا[2] 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[3] 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 گرفته‌شده 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

[1] dehydration

[2] α- helix

[3] overexpression

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1399.15.4.5.2]

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 *dhn*5 در گیاه آرابیدوپسیس 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 به‌عنوان 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 آرابیدوپسیس 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 درمجموع در ساختار این ژن ۹ موتیف و یک دمین حفاظت‌شده و ٤ 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 موردبررسی ازلحاظ این ژن در ۳ گروه قرار دارند. که گروه اول شامل ٤ 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[1] بودند. نتایج این تحقیق نمایانگر ارتباط ویژه و 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.

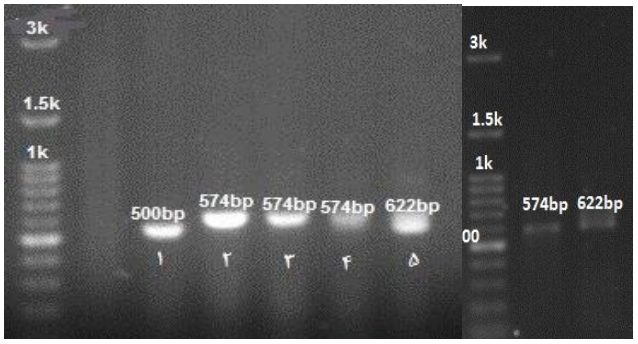
مواد و روش‌ها

بذور سه سطح ژنوتیپی گندم‌های وحشی دیپلوئید (*A. Tauschii*،*speltoides* A. و *A. urartu*)، 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 تـازه بـرگ استفاده شد. استخراج DNA از نمونه‌های گیاهی به روش دستی و از روش (Dellaporta et al. 1993) باکمی تغییر صورت گرفت. کمیت و کیفیت نمونه‌های DNA با استفاده از روش اسپکتروفتومتری در طول‌موج ۲٦۰ و ۲۸۰ نانومتر و الکتروفورز ژل آگارز با غلظت ۰/۸ درصد تعیین شد. نشانگر اختصاصی مورداستفاده 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: AACAAACAAAAACCCTCGAC) شد. واکنش PCR با حجم ۲۰ میکرولیتر، شامل دو میکرولیتر بافر واکنش PCR، یک میکرولیتر $MgCl_2$، یک میکرولیتر مخلوط dNTP 1x، 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.

[1] *T.dicoccoides*

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1399.15.4.5.2]

پس از انجام واکنش PCR، به‌منظور 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 ٦۰ دقیقه الکتروفورز شد. عکس‌برداری از ژل با دستگاه ژل داک انجام شد. در مرحله بعد قطعات به‌دست آمده با طول مورد نظر از روی ژل آگارز به‌وسیله کیت خالص‌سازی جداسازی شد و محصولات تکثیری جهت توالی‌یابی به شرکت Bionner کره ارسال شد.



شکل ۱- الکتروفورز ژن *DHN5* در ۱-*A.speltoides* ۲-*T.urartu* ۳-شبرنگ ٤- بهرنگ ٥-سیستان ٦-*A.taushii* ۷-بولانی

توالی‌یابی بر اساس هر دو قطعه تکثیری رفت‌وبرگشت انجام گرفت. استخراج توالی از کروماتوگرام‌های دریافتی از شرکت با استفاده از نرم‌افزار Chromas ver. 2 صورت گرفت. پس از دریافت توالی‌ها، با به‌کارگیری نرم‌افزار Blast در بانک ژنی، اختصاصی بودن قطعه موردنظر به گونه گرامینه تائید شد. توالی‌های دریافتی با توالی‌های ژن *DHN* در پایگاه اطلاعاتی NCBI مقایسه و با استفاده از برنامه ClustalW هم‌ردیف سازی (Alignment) شدند. سپس با استفاده از نرم‌افزارهای MEGA 5، DNA SP و پایگاه داده HIV Databases شاخص‌های ژنتیکی مورد بررسی قرار گرفتند. برای تعیین توالی پروتئین کد شده حاصل از توالی‌های 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 به‌صورت بیوانفورماتیکی تعیین شد. برای ترسیم ساختار سه‌بعدی مورد بررسی در هریک از ارقام مورد مطالعه از پایگاه اطلاعاتی Phyre 2 استفاده شد.

نتایج و بحث

وجود تنها یک باند 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 ٦۰۰-۵۰۰ جفت‌باز با کمی تغییر در هر گونه گندم به‌خوبی تکثیر شده است. این مطلب نشان‌دهنده طراحی و عملکرد صحیح آغازگرها و برنامه PCR مناسب (به‌خصوص دمای اتصال) می‌باشد. در مرحله بعد نتایج PCR توالی‌یابی شدند. کیفیت گراف‌ها نشان‌دهنده میزان دقت در تعیین توالی می‌باشد. سپس جهت آنالیزهای بیوانفورماتیکی از نتایج حاصل از توالی نمونه‌ها استفاده شد. نتایج توسط نرم‌افزارهای MEGA, Blast DNA SP و پایگاه داده HIV Databases شاخص‌های ژنتیکی مورد بررسی قرار گرفتند. برای تعیین توالی پروتئین کد شده حاصل از توالی‌های ژنومی مورد مطالعه از ابزار تعیین توالی پروتئین موجود در پایگاه ExPasy استفاده شد. نتایج تجزیه و تحلیل توالی‌های نوکلئوتیدی ژن *DHN5* در خانواده گرامینه نشان داد که بیشترین فراوانی متعلق به باز گوانین (۳۰/٦۷) و کمترین فراوانی مربوط به باز آدنین (۱۳/۳) می‌باشد (جدول ۱). در برآورد جایگزینی نوکلئوتیدی در خانواده گرامینه، مقادیر بالای جایگزینی پیریمیدینی بود به‌طوری‌که این مقدار برای تبدیل تیمین به سیتوزین ۲۹/۹۵ درصد و برای تبدیل سیتوزین به تیمین ۸/٤۹ درصد به‌دست آمده است. این مقادیر برای بازهای پورینی کمتر و به‌ترتیب برای تبدیل آدنین به گوانین و گوانین به آدنین ۱۲/۲۲ درصد و ۱۰/٤۷ درصد بود (جدول ۲). نتایج این بررسی با نتایج سایر محققین که بیشتر جانشینی را جانشینی پیریمیدینی گزارش کرده‌اند، مطابقت دارد. علت این تغییرات احتمالاً می‌توان به متیله شدن سیتوزین نسبت داد (Picoult et al. 1999). در بررسی شاخص‌های ژنتیکی ژن *DHN5* در خانواده گرامینه، تعداد کل جهش، ۱۸۸ جهش شناسایی شد. توزیع آن‌ها 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	۲٦/٦	۱۳/۳	۲۹/٤۳	۳۰/٦۷

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1399.15.4.5.2]

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

From/To	A	T	C	G
A	–	۱/۷۸	٦/۲۷	۱۲/۲۲
T	٥/۲٦	–	۲۹/۹٥	٦/۱٤
C	٥/۲٦	۸/٤۹	–	٦/۱٤
G	۱۰/٤۷	۱/۷۸	٦/۲۷	–

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

جدول ۳- جایگاه پلی مورفیسم ژن *DHN5* در خانواده گرامینه

جمعیت	S	H	Hd	Pi	Eta	K
گرامینه	۱٥۸	۱٤	۰/۷٦٦	۰/۱۱۷۰۸	۱۸۸	۳۳/۱۳٤

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

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 تائید 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 ۰/٥٦ و مینیمم طول حفاظت ۷۵ باز و حفاظت توالی ۰/٤٦۳ مشاهده شد (جدول ٤). 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 ٥) به‌دست 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 (d_N) نسبت به تغییرهای نوکلئوتیدی که تأثیری در اسیدآمینه حاصله نداشته‌اند (d_s)، 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 از تبدیل نواحی غیر کدکننده ژنی به نواحی کدکننده ژنی است. نتایج مطالعه نشان داد که مقادیر D منفی بود (جدول ٦). 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 ۳٤ واریته مورد بررسی و دو توالی از خانواده *solanum* و *populus* به‌عنوان خارج گروه برای تعیین روند تکاملی خانواده گرامینه، از NJ استفاده شد.

جدول ٤- مناطق حفاظت‌شده DNA ژن *DHN5* در خانواده گرامینه

جمعیت	C	MWL	CT
گرامینه	۰/٤٦۳	۷٥	۰/٥٦

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

جدول ٥- تعیین روند انتخاب طبیعی در ژن *DHN5* در خانواده گرامینه

پارامتر	مقدار عددی
Ds	۱/۷٦۷۳
Dn	۱/۹۹٤۲
dn/ds*	۱/۱۳

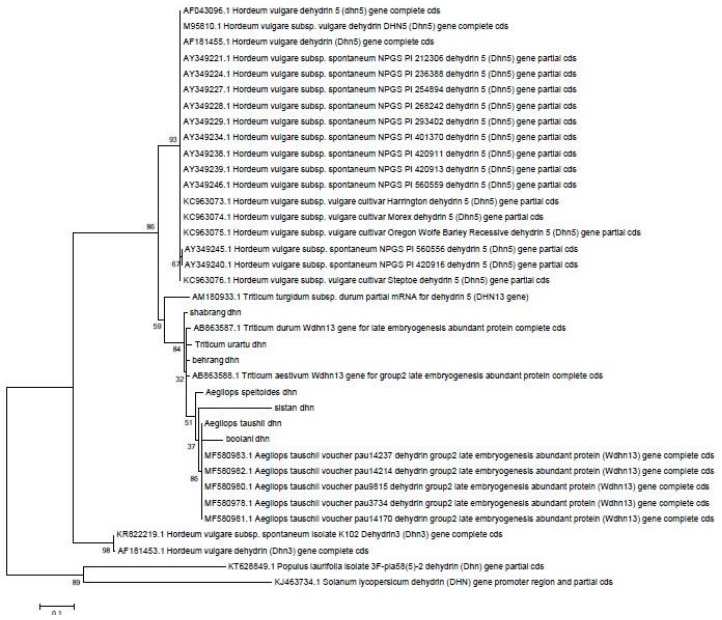
*مقدار عددی dn/ds نشان‌دهنده روند انتخاب طبیعی

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1399.15.4.5.2]

جدول ٦- بررسی تست Neutrality

M	S	Ps	θ	Π	D
٣٤	١٥٨	٠/٥٥٨٣٠٤	٠/١٣٦٥٤٥	٠/١١٧٠٨٠	-٠/٥٣٩٥١٢

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 ٢- درخت فیلوژنی توالی‌های مربوط به ژن *DHN5* بر اساس روش NJ در ارقام موردمطالعه با سایر گونه‌های هم‌خانواده در NCBI

مقادیر Bootstrapping به‌وسیله ١٠٠٠ بار نمونه‌گیری مجدد به‌دست آمدند. مقادیر Bootstrapping بالا در محل انشعاب شاخه‌های درخت نشان می‌دهد که درخت فیلوژنی نوکلئوتیدهای موردنظر از درجه اعتماد بالایی برخوردار است.همان‌طور که در شکل (١) مشاهده می‌شود از گونه *Populus* و *Solanum* به‌عنوان Outgroup استفاده شده است و در یک شاخه مجزا نسبت به بقیه قرارگرفته است و درخت فیلوژنی را ریشه‌دار نموده است. نتایج بررسی فیلوژنی نشان داد که واریته‌های *H. Vulgare subs* (KR822219.1) و *H. vulgare* (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 فیزیکوشیمیایی ژن *DHN5* در خانواده دهیدرین و نمونه‌های مورد مطالعه نشان داد که بیشترین مقدار آمینواسید را گلیسین (٢٣/١) در رقم شبرنگ و ترئونین (١٤/٥) در گونه *A.speltoides* است (جدول ٧). در بسیاری از گونه‌های گیاهی گلیسین 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 گلیسین بتائین تولید گلیسین را تحت تاثیر قرار داده که می‌توان نتیجه گرفت افزایش آن باعث افزایش سنتز گلیسین می‌شود (Ashraf and Foolad 2007). بنابراین با توجه به این‌که مقدار آمینواسید گلیسین 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 به‌عنوان یک عامل مهم به‌منظور برآورد مقاومت پروتئین‌ها در برابر حرارت می‌باشد در توالی ژن *DHN5* رقم سیستانی بیشتر بود که دلیل آن فراوانی بیشتر اسیدآمینه‌های آلانین ایزولوسین لوسین و والین که همگی جزء اسید آمینه‌های الیفاتیک می‌باشند

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1399.15.4.5.2]

که در این رقم بیشتر بود. در شرایط تحت تنش والین و ایزولوسین همانند شکل ذخیره‌ای پیروات عمل کرده که افزایش این آمینواسیدها در شرایط تنش انرژی لازم برای گیاه را فراهم می‌کند. ازنظر 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 DHNها چه در خصوص ویژگی‌های مولکولی و چه در مورد ارتباط بین تغییرات بیان ژن خانواده 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.

جدول ۷- درصد آمینواسیدها در گونه‌های گندم مورد بررسی

	A.taushii	*A.speltoides*	*T.urartu*	Shabrang	Behrang	Sistan	Bolani
Ala	3/4	٤	٥/٣	٣/٨	٣/٩	٤/٨	٦
Arg	٢/٩	١/٦	٩/٣	٠	٠/٨	٢/٩	٥
Asn	٢/٩	٢/٤	٢/٧	٢/٣	٣/١	٢/٩	٤
Asp	٤/٣	٤/٨	٤/٧	٤/٦	٦/٣	٣/٨	٤
Cys	٠	٠	٠/٧	٠	٠	١	٠/٥
Gln	٨/٦	٦/٥	٧/٣	٦/٢	٥/٥	٧/٦	٨/٥
Glu	٧/٢	٧/٣	٣/٣	٦/٩	٤/٧	٤/٨	٦
Gly	١٨/٠	٢٢/٦	١١/٣	٢٣/١	٢٢	١٩	١٢/٩
His	٦/٥	٧/٣	١١/٣	٨/٥	٧/٩	٧/٥	٥
Ile	٢/٩	٤	٢	٢/٣	٣/١	١/٩	٣/٥
Leu	٣/٦	٢/٤	٢/٧	٢/٣	٣/١	٧/٦	٤/٥
Lys	٨/٦	٩/٧	٧/٣	١٠/٨	٩/٤	٤/٨	٧/٥
Met	٢/٢	٢/٤	٢/٧	٣/٨	٣/١	٢/٩	١/٥
Phe	٠/٧	٠	١/٣	٠	٠	١	٣/٥
Pro	٥	٢/٤	٥/٣	٢/٣	٢/٤	٨/٦	٦
Ser	٤/٣	٣/٢	٨	٣/٨	٣/٩	٤/٨	٧
Thr	١٢/٢	١٤/٥	١٠	١٣/٨	١٤/٢	٨/٦	٩/٥
Trp	٠	٠	٠/٧	٠	٠	٠	٠
Tye	١/٤	١/٦	١/٣	١/٥	١/٦	١/٩	١/٥
Val	٤/٣	٣/٢	٢/٧	٣/٨	٤/٧	٥/٧	٤

جدول ۸- اطلاعات پروتئینی در گندم‌های مورد بررسی

	A.taushii	*A.speltoides*	*T.urartu*	Shabrang	behrang	sistan	bolani
تعداد آمینواسید	١٣٩	١٢٤	١٥٠	١٣٠	١٢٧	١٠٥	٢٠١
وزن مولکولی	١٤٦٤٤/٩٧	١٢٤٥٦/٨١	١٦٧٦٣/٤٤	١٣٣١١/٤٥	١٢٩٨٣/١١	١٠٨٣٦/٠٤	٢١٦٩٦/٩٤
ایزوالکتریکpH	٧/٦٢	٦/٨٣	١٠/٦٢	٦/٩٠	٦/٨٥	٦/٦٤	٩/٣٦
شاخص الیفاتیک	٤٢/٠٩	٣٨/٥٥	٣١/٢٧	٣٣/٠٠	٤٢/٢٠	٥٨/٤٨	٤٨/٥٦
پایداری پروتئین	پایدار	پایدار	ناپایدار	پایدار	پایدار	ناپایدار	پایدار

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1399.15.4.5.2]

تعداد کل جهش‌هایی که در طی تکامل این جایگاه ژنی رخ داده است برابر با ۱۸۸ و همچنین تعداد جایگاه‌های چند شکل نیز محاسبه شد که روند انتخاب مثبت در این ژن را توجیه می‌کند و این امر نقش عمده‌ای در شناخت بیولوژیکی این ژن خواهد داشت که سبب به‌وجود آمدن پروتئین‌های جدید و همچنین عملکردهای جدید می‌شود. نتایج نشان داد بیشترین نوکلئوتید مربوط به باز گوانین است و بیشترین میزان جانشینی بازها مربوط به بازهای پیریمیدینی بود که در تمامی قسمت‌های ژن پراکنده‌اند. همچنین نتایج حاصل از درخت فیلوژنتیکی نشان از جدا شدن منطقی گونه‌ها از یکدیگر داشتند، به‌طوری‌که ابتدا گونه‌های دیپلوئید و سپس تتراپلوئید و بعد از آن گونه‌های هگزاپلوئید از یکدیگر مشتق شدند. بررسی ارقام مورد مطالعه با سایر گونه‌های مربوط به خانواده گرامینه نشان داد که تقریباً هرگونه در شاخه مربوط به خود قرارگرفته و ژن *DHN* این قابلیت را دارد که گونه‌های مختلف را به‌توان به‌وسیله آن تفکیک کرد. لذا می‌توان نتیجه گرفت ژن *DHN5* ابزاری مناسب برای ارزیابی روابط فیلوژنتیکی باشد.

از نظر فیزیکوشیمیایی *DHN*ها با حضور فراوان اسید آمینه Gly و اسیدهای آمینه قطبی اما بدون Cys و Trp مشخص می‌شوند (Liu et al. 2012; Close 1996). طی مطالعه‌ای که توسط Liu و همکاران در مورد شناسایی ده ژن کد کننده‌ی یازده پلی پپتید فرضی از DHN در Populus انجام گرفت، مشخص شده که ترکیبات اسید آمینه تمام پروتئین‌های DHN آن‌ها دارای خصایص مشترکی می‌باشند؛ به‌عنوان مثال در PtrDHN-7 (K_3) از زیرگروه Kn، باقی‌مانده‌های Gly، Gln، Lys، Glu و Asp ۶۰٪ از کل اسیدهای آمینه موجود در توالی را تشکیل می‌دادند در حالی‌که فاقد اسیدهای آمینه Cys و Trp بود. تنها نمونه استثنایی این مطالعه PtrDHN-10 (817405) بود که دارای محتوای نسبتا بالایی از اسیدآمینه سیستئین (٤/٦ درصد) بود (Liu et al. 2012). مقدار نقطه ایزوالکتریک (PI)، خصوصیات بیوشیمیایی مهمی را برای زیربخش‌های DHNهای گیاهان مطرح می‌کند، زیرا ویژگی‌های مختلف اسیدی یا بازی DHNها در یک زیر گروه مشابه ممکن است به‌عوامل محیطی مختلفی پاسخ دهد (Liu et al. 2012; Allagulova et al. 2003). نتیجه به‌دست آمده از این مطالعه با نتایج PIهای به‌دست آمده از سایر DHNهای گیاهی سازگار می‌باشد (Yang et al. 2012; Liu et al. 2012; Kosová et al. 2007).

دهیدرین‌ها دارای وزن‌های مولکولی بسیار متفاوتی هستند به نحوی‌که کوچک‌ترین دهیدرین شناسایی شده تا کنون دارای وزن مولکولی 9.6 KDa (Graether and Boddington 2014; Labhilili et al. 1995) و بزرگ‌ترین آن دارای MW برابر با 70 کیلو دالتون می‌باشد (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 می‌باشد که این مقدار بسیار بیشتر از وزن مولکولی شیمیایی آن است. پیشنهاد شده که این اختلاف ناشی از ساختارهای نامنظم Dehydrinsهای بسیار بزرگ در حال ران[1] شدن بر روی ژل SDS-PAGE می‌باشد (Graether and Boddington 2014; Receveur-Bréchot 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 زنجیره‌های آلیفاتیک آلانین، والین، لوسین و ایزولوسین اشغال شده‌اند و به‌عنوان یک فاکتور مثبت در افزایش ثبات حرارتی پروتئین‌های گلوبولار محسوب می‌شود؛ به‌همین دلیل در موجودات مقاوم به گرما پروتئین‌ها دارای شاخص آلیفاتیک بالایی می‌باشند (Ikai 1980).

از آنجایی‌که دهیدرین یک مولتی–فامیلی از پروتئین‌های موجود در گیاهان است که در پاسخ به تنش سرما و خشکی تولید می‌شود (Puhakainen et al. 2004). از جمله پروتئین‌های 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 پروتئین‌ها می‌توان به‌عوامل دیگری غیر از شاخص آلیفاتیک نسبت داده شود.

[1] run

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1399.15.4.5.2]

منابع

Ahmadabadi M, Ahmadi Tehrani P, Omidi 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, Jlaiel 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 minipreparation: 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, RossK (1986) Expression of Tolerance of Na+, K+, Mg2+, Cl− and SO2− 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'x'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 dehydrine5 during the development of frost tolerance in barley (*Hordeum vulgar*). 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).

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1399.15.4.5.2]

Receveur-Bréchot 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.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1399.15.4.5.2]