ژنتیک نوین
دوره نهم، شماره ۱، بهار ۱۳۹۳
صفحه ۱۰۶- ۹۵

ارزیابی نشانگرهای SSR و ISSR جایگاه ژنومی 1D، مرتبط با کیفیت مطلوب نانوایی در لاین های موتانت گندم نان

Evaluation of SSR and ISSR markers on 1D locus of bread wheat mutant lines associated with desirable bread-making quality

مرضیه وارسته‌شمس*[۱]، محمود سلوکی[۱]، محمدرضا بی‌همتا[۲]، بهنام ناصریان خیابانی [۳]، محمدطاهر حلاجیان[۳]

۱- به ترتیب دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد و استادیار، دانشگاه زابل
۲- استاد پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران
۳- استادیاران، پژوهشکده تحقیقات کشاورزی، پزشکی و صنعتی سازمان انرژی اتمی

Varasteh Shams M*[1], Soluki M[1] , Bihamta MR[2] , Naserian Khiabani B[3] , Hallajian MT[3]

1. Graduate MSc Student, Assistant Professor, University of Zabol
2. Professor, College of Agriculture, University of Tehran, Karaj, Iran.
3. Assistant Professors, Agricultural, Medical and Industerial Research School ,Karaj. Iran.

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: shams_2424@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ۹۱/۴/۳- تاریخ پذیرش: ۹۱/۱۲/۲۰)

چکیده

در این پژوهش چهل ژنوتیپ گندم نان از جمعیت F_2 حاصل از دو تلاقی بین ژنوتیپ والد با کیفیت مطلوب نانوایی (رقم تجن) و دو لاین موتانت از رقم طبسی با عملکرد بالا و کیفیت پایین نانوایی (T-66-58-9 و T-66-58-12)، جهت بررسی نشانگرهای ریزماهواره و توالی تکراری ساده درونی مرتبط با کیفیت نانوایی بالا مورد استفاده قرار گرفتند. هدف از این تحقیق، معرفی و بررسی آغازگرهای طراحی شده مرتبط با جایگاه ژنومی *Glu-1D* جهت ارزیابی و شناسایی لاین‌های موتانت گندم نان از نظر ژن‌های کیفیت و دستیابی به سودمندی نشانگرهای ریزماهواره و توالی تکراری ساده درونی طراحی شده است. والدین با دو جفت آغازگر SSR و شش آغازگر ISSR تجزیه و تحلیل شدند. از بین هشت آغازگر، دو آغازگر (۲۵ درصد) بین دو ژنوتیپ والد در هر تلاقی، چندشکلی بالایی ایجاد کردند. نتایج حاصل از الکتروفورز ژل‌های مربوط به جمعیت F_2، با استفاده از این آغازگرهای چندشکل مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند و ضرایب تشابه بین افراد و میانگین ضرایب برای هر نتاج در هر تلاقی محاسبه شد. دو نشانگر مولکولی S_2 و S_{13} بالاترین درصد چندشکلی و بیشترین قدرت تفکیک را نشان دادند. این نشانگرها می‌توانند به منظور تشخیص ژنوتیپ‌ها و مطالعات تنوع ژنتیکی در برنامه‌های آتی اصلاح کیفیت نانوایی ارقام و لاین‌های گندم نان مورد استفاده قرار گیرند.

واژه‌های کلیدی

ضریب تشابه
کیفیت نانوایی
گندم نان
ISSR
SSR

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

[DOR: 20.1001.1.20084439.1393.9.1.12.1]

مقدمه

کیفیت نانوایی گندم نان (*Triticum aestivum* L.) با نوع ترکیب و کمیت پروتئین‌های ذخیره‌ای گلوتن بخصوص با زیرواحدهای گلوتنین با وزن مولکولی بالا (HMW-GS)[1] همبستگی دارد. این گروه از پروتئین‌ها در طول ۳۰ سال گذشته شناسایی شده‌اند (Payne et al. 1981,1987; Macritchi et al. 1997; 2002 Uthayakumaran et al.). تنوع در HMW-GS در گندم هگزاپلوئید توسط مکان‌های ژنی *Glu-1* که بر روی بازوی بلند کروموزوم‌های همیولوگ گروه یک (*Glu-1A, Glu-1B,Glu-1D*) قرار دارند، کنترل می‌شود (Payne et al. 1981; Shewry et al. 1992). ژنوتیپ‌های مختلف گندم نان ۵-۳ زیرواحد گلوتنین با وزن مولکولی بالا دارند که یک یا هیچ زیرواحد در جایگاه *Glu-1A*، یک یا دو زیرواحد در جایگاه *Glu-1B* و دو زیرواحد در جایگاه *Glu-1D* کد می‌شوند. نشانگر پروتئینی اساسی برای کیفیت خوب گندم، ترکیب آللی Dx5+Dy10 در جایگاه *Glu-1D*است، در حالی‌که ترکیب آللی Dx2+Dy12 با کیفیت ضعیف نانوایی مرتبط است (Payne et al.1981,1987; Hamer et al.1992; D' Ovidio et al.1994; Horvat et al.2002). ترکیب زیرواحدهای HMW گلوتنین در دانه گندم از طریق SDS-PAGE[2] و RP-HPLC[3] و HPCE[4] قابل شناسایی است (Margiotta et al. 1993; Sutton et al. 1997). روش‌های معمول برای شناسایی و ارزیابی تنوع ژنتیکی در گندم بر اساس الکتروفورز یا کروماتوگرافی پروتئین دانه به دلیل این‌که چندشکلی و تفاوت‌های قابل ثبت در پروتئین خیلی بالا نیست، تاثیر محدودی دارد (Pasqualone et al. 1998). عمده مطالعات در ارتباط بین اجزای گلوتنین و کیفیت نان با استفاده از تکنیک الکتروفورز در سیستم SDS-PAGE انجام گرفته است (Payne et al. 1981). در مجموع اجرای این روش مستلزم صرف وقت و کار زیاد می‌باشد و قابلیت تحرک زیرواحدها در این سیستم همیشه با اندازه مولکولی آن‌ها مطابقت ندارد که منجر به بروز مشکلاتی در شناسایی ترکیبات آللی لاین‌های والدی در برنامه‌های اصلاحی می‌شود.

همچنین تجزیه و تحلیل باندها به دلیل زیاد بودن تعداد آن‌ها بسیار مشکل و گاهی با اشتباه توام می‌باشد. از زاویه‌ای دیگر، همه تغییرات ژنتیکی ایجاد شده در سطح DNA مانند تغییرات در اینترون‌ها و توالی‌های مجاور، تغییرات کدون‌های مترادف، تغییر در اسیدهای آمینه‌ای که تغییری در بار خالص الکتریکی پروتئین ایجاد نمی‌کنند در سطح پروتئین قابل ظهور نمی‌باشد. بنابراین تکنیک‌هایی که مبتنی بر استخراج پروتئین هستند به اندازه نشانگرهای مولکولی قابل اعتماد نیستند. از طرف دیگر فقط یک دسته از ژن‌های موجودات به صورت پروتئین ترجمه می‌شوند، بنابراین پروتئین‌ها نمی‌توانند نماینده کل ژنوم باشند. در مجموع به دلیل محدودیت‌هایی از این دست، نشانگرهای مولکولی ترجیح داده می‌شوند (Abdmishani and Shahnejat Boushehri 1377). تکنیک واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)[5] شکل دیگری از تجزیه و تحلیل بر اساس توالی ژنی گندم است که نشانگرهای مبتنی بر این تکنیک درجه بالایی از چندشکلی را در مقایسه با نشانگرهای مورفولوژیکی و پروتئینی نشان می‌دهند (D' Ovidio et al.1994; Varghese et al.1996; Lafiandra et al.1997). کاربرد نشانگرهای AS-PCR[6] جهت شناسایی ژنوتیپ‌های گندم حاوی ترکیبات آللی گلوتنین توسط Ahmad (2000) و Debustos et al. (2001) گزارش شده است که در مطالعات آن‌ها قطعات ژنی متعلق به زیرواحدهای مختلف HMW به طور انتخابی از طریق واکنش‌های PCR با استفاده از آغازگرهای جفتی تکثیر شدند. نشانگرهای توالی تکراری ساده (SSR)[7] توالی‌های نوکلئوتیدی تکرار شونده‌ای هستند که به دلیل سطوح بالای چندشکلی، موقعیت ژنومی شناخته شده، حضور و تکرارپذیری بالا در سراسر ژنوم و وراثت هم بارزی آن‌ها سیستم نشانگری ایده آلی برای انگشت نگاری DNA در سطوح بالا می‌باشند (Roder et al. 1995). توالی تکراری ساده درونی (ISSR)[8] نوع جدیدی از نشانگر مولکولی مبتنی بر PCR (SSR تغییریافته) است که در آن از یک آغازگر منفرد با طول ۱۸-۱۶ جفت باز که مرکب از ردیف‌های تکرارشونده و غیر تکرارشونده (به صورت قلاب شده

[1] High molecular weight glutenin subunit
[2] Sodium dodecyl sulfate poly acryl amide gel electrophoresis
[3] Reversed-phase high performance liquid chromatography
[4] High performance capillary electrophoresis
[5] Polymerase chain reaction
[6] Allel-specific polymerase chain reaction
[7] Simple sequence repeat
[8] Inter simple sequence Repeat

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1393.9.1.12.1]

در انتهای ′۳ یا ′۵ با ۴-۲ نوکلئوتید) است، برای تکثیر قطعات DNA الگو استفاده می‌شود (Zietkiewicz et al.1994). نشانگرهای SSR در ژرم پلاسم مختلف گندم نان (Huang et al.2002; Hai L et al.2007) و نشانگرهای ISSR در گندم دوروم (Pasqualone et al.1998) به طور موفقیت آمیزی به منظور ارزیابی تنوع ژنتیکی و مطالعات فیلوژنتیکی و بررسی ارقام مورد استفاده قرار گرفته‌اند.

گندم نان در ایران در مقایسه با هدف افزایش عملکرد به منظور خودکفایی، از نظر خاصیت نانوایی که با ارزش تغذیه‌ای آن ارتباط دارد به اندازه کافی مورد توجه قرار نگرفته است و تحقیقات انجام شده نیز کمتر متوجه شناسایی ژن‌های موثر در افزایش خاصیت نانوایی ارقام گندم مصرفی بوده است (Behnia 1373). هم اکنون تحقیقات زیادی برای شناخت خصوصیات گلوتن و اساس مولکولی آن در حال انجام است و همچنین از جهش القا شده در گندم به طور وسیعی جهت تغییر تعدادی از زیرواحدهای پروتئینی مرتبط با کیفیت دانه استفاده شده است. بهترین ارقام گندم نان از نظر میزان عملکرد، بهترین ارقام از لحاظ کیفیت نانوایی نیستند. در سال‌های اخیر ارزیابی لاین‌های موتانت اصلاحی برتر و ارقام والد آن‌ها به همراه سایر ارقام تجاری استاندارد، از نظر ویژگی‌های کمی و مورفولوژیکی تحت شرایط محیطی مختلف صورت گرفته است (Naserian Khiabani et al. 2007). تحقیقاتی نیز در زمینه اثرات تنش شوری و خشکی بر روی برخی ویژگی‌های کیفی و محتوای پروتئینی دانه در این ارقام و لاین‌های موتانت انجام شده است (Asadi et al. 2007). همچنین آغازگرهای اختصاصی زیرواحدهای گلوتنین با وزن مولکولی بالا جهت تکثیر آلل‌های Dx5+Dy10 وDx2+Dy12 با کاربرد روش نقاط نشانمند از ردیف[1] (STS) برای تعیین کیفیت نانوایی در این ارقام و لاین‌های موتانت مورد استفاده قرار گرفته است (Zamani 1385). هدف این تحقیق معرفی آغازگرهای طراحی شده مرتبط با جایگاه ژنومی *Glu-1D* و بررسی سودمندی ریزماهواره و توالی تکراری ساده درونی جهت ارزیابی و شناسایی لاین‌های موتانت گندم نان از نظر ژن‌های کیفیت است.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

سه ژنوتیپ گندم نان که از لحاظ کیفیت نانوایی اختلاف معنی-داری داشتند (Zamani 1385)، به نام‌های رقم تجن با کیفیت مطلوب نانوایی و دارای زیرواحدهای Dx5+Dy10 با امتیاز ۱۰ (Payne et al.1983) و لاین‌های موتانت T-66-58-9 و T-66-58-12 از رقم طبسی با کیفیت پایین نانوایی و عملکرد بالا و دارای زیرواحدهای Dx2+Dy12 امتیاز ۶ (Payne et al. 1983) به عنوان والدین دو تلاقی متفاوت در نظر گرفته شدند به طوری که رقم تجن در هر دو تلاقی مشترک بود. همچنین دو جمعیت جداگانه با تعداد ۲۰ فرد از ژنوتیپ‌های F_2 حاصل از هر تلاقی، جهت بررسی به کار برده شدند. لاین‌های موتانت مورد استفاده، متعلق به پژوهشکده تحقیقات کشاورزی، پزشکی و صنعتی سازمان انرژی اتمی ایران بود که طی سال های ۶۸-۱۳۶۵ توسط مجد معرفی شدند.

استخراج DNA

استخراج DNA از بافت برگ با استفاده از روش CTAB تغییر یافته (Doyle and Doyle 1990) انجام شد. کیفیت DNA از طریق الکتروفورز روی ژل آگارز یک درصد تخمین زده شد و غلظت آن توسط دستگاه اسپکتروفتومتر CECIL مدل 2021 محاسبه و DNA استخراج شده تا غلظت ۱۰۰ نانوگرم در میکرولیتر با بافر TE رقیق شد. از DNA رقیق شده جهت تکثیر از طریق PCR استفاده شد.

تکثیر DNA

در این مطالعه از شش آغازگر ISSR طراحی‌شده (Hallajian et al. 2009) و دو آغازگر SSR (Roder et al. 1998) استفاده شد (جدول۱). توالی‌های اسیدآمینه‌ای زیر واحدهای نوع x (شامل x5، x2.2، x2.2* و x2.1 با شماره‌های اکسشن AY517724، X12928، AJ893508 و AY159367) و زیر واحدهای نوع y (شامل y10 و y12 با شماره‌های اکسشن AY486484 و X12929) مرتبط با جایگاه ژنومی 1D از سایت NCBI جستجو شد. براساس شباهت‌ها و تفاوت‌ها در موتیف‌های تکراری زیر واحدهای نوع X تحت‌عنوان کلی مرتبط با زیرواحد Dx2 ذکر شد (جدول۱). همچنین با استفاده از نرم‌افزار GeneDoc به

[1] Sequence tagged site

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1393.9.1.12.1]

جدول۱- اسامی آغازگرهای مورد استفاده، توالی، دمای اتصال، تعداد آلل و اندازه قطعات تکثیر شده

آغازگر	توالی (۳′⟶۵′)	دمای اتصال (°C)	آلل	اندازه قطعات (bp)
S_1	CCA GGA CAA GGG CAA CAA GGR TAC	۵۶	Dx5, Dx2, Dy10	۴۶۰-۹۱۴
S_2	CCA GGA CAA GGG CAA CAR* CCA GGA	۴۸	Dx5, Dx2	۷۶۲-۱۷۴۸
S_3	GGK* CAG CAG CCA GGA CAA GGG	۴۸	Dx5, Dx2	۶۴۳-۱۸۸۴
S_7	CAA GGG CAA CAA GGK CAG CAG	۵۸	Dx5, Dx2	۵۰۸-۹۹۰
S_{13}	TAC CCA ACT TCT CTA CAR CAG	۵۲	Dy10, Dy12	۵۷۱-۱۴۹۲
S_{14}	TAT CCA ACT TCT CCR CAG CAG	۴۸	Dx5, Dx2, Dy10, Dy12	۴۷۰-۱۹۹۰
S_9 S_{10}	(L) : TGT CAA CAT CGT TTT GAA AAG G (R) : ACA CTG TCA ACC TGG CAA AAG TG	۵۶	Xgwm-135-1A	۱۰۷-۶۷۵
$S_{11}S_{12}$	(L) : AAT GGC AAT TTG AAG ACA TAG C (R) : TTC GCA ATG ACC TTG ATT AAG TGG	۵۶	Xgwm-458-1D	۱۵۰-۱۷۰۰

* در توالی‌های فوق حرف R توکلئوتید A یا G و K نوکلئوتید G و T می‌باشد.

صورت جداگانه این توالی‌ها بررسی و با یکدیگر مقایسه شدند. توالی‌های نوکلئوتیدی نواحی مشابه شناسایی و چندین آغازگر ISSR بر اساس شباهت‌ها و تفاوت‌ها در موتیف‌های تکراری زیرواحدهای نوع x و نوع y طراحی شد. از این آغازگرها، شش آغازگر برای بررسی چند شکلی در موتیف‌های تکراری زیر واحدهای گلوتنینی انتخاب شدند (Hallajian et al. 2009). آغازگرهای ISSR نیز همانند روش RAPD در واکنش‌های تکثیر به صورت تک آغازگر مورد استفاده قرار می‌گیرند. واکنش‌های تکثیر در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۲/۵ میکرولیتر بافر واکنش (۱۰X)، ۰/۵ میکرولیتر dNTPs (۱۰ میلی‌مولار)، دو میکرولیتر $MgCl_2$ (۵۰ میلی مولار)، ۲/۵ میکرولیتر DNA ژنومی (۱۰۰ نانوگرم در میکرولیتر)، ۰/۵ میکرولیتر DNA پلیمراز (5U recombinant Taq) ، دو میکرولیتر از هر آغازگر (۵ میکرو مولار) و به ترتیب در آغازگرهای ISSR و SSR ۱۵ و ۱۳ میکرولیتر آب دو بار تقطیر انجام شد. واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر T Gradiant Biometra مدل 232 RS انجام شد. واکنش مربوط به آغازگرهای S_1، S_7، S_{13}، S_{14} (ISSR) و S_9 S_{10}، S_{11} S_{12} (SSR) با چرخه‌های دمایی زیر انجام شد: مرحله یک؛ در دمای ۹۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه. مرحله دو؛ طی ۲۹ چرخه، جهت واسرشت سازی در دمای ۹۶ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه، اتصال آغازگر در دمای بهینه (جدول۱) به مدت یک دقیقه، بسط آغازگر در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت دو دقیقه، بسط نهایی آغازگر در دمای ۷۲ درجه سانتی-گراد به مدت ۵ دقیقه. به منظور کاهش تکثیرهای غیراختصاصی، در مورد آغازگرهای S_2 و S_3 از برنامه واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به روش کاهش مرحله‌ای دما (Touchdown PCR) استفاده شد. در این روش، واکنش ابتدا با دماهای بالاتر از دمای نقطه ذوب آغازگر آغاز می‌شود و در طی چرخه‌های ابتدایی واکنش، دمای اتصال به‌تدریج تا پایین‌تر از نقطه ذوب آغازگرها کاهش داده می-شود. اتصال اختصاصی آغازگر به هدف، قبل از هر اتصال غیر اختصاصی صورت می‌گیرد. این عمل تا حدودی از ایجاد باندهای شبه ریزماهواره که در چرخه‌های عادی PCR باعث بروز مشکلاتی در امتیازبندی می‌شوند، می‌کاهد (ICARDA 2002 Annual Report). واکنش فوق با چرخه‌های دمایی زیر انجام شد: مرحله یک؛ در دمای ۹۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه. مرحله دو؛ طی ۷ چرخه ابتدایی، در دمای ۹۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، در دمای ۶۲ درجه سانتی‌گراد با دو درجه کاهش در هر چرخه به مدت یک دقیقه و سپس طی ۲۵ چرخه انتهایی، در دمای ۹۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، در دمای ۴۸ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه، در دمای ۷۲ درجه سانتی-گراد به مدت یک دقیقه. مرحله سه؛ بسط نهایی آغازگر در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه. محصولات تکثیر PCR بر روی ژل ۶ درصد پلی‌آکریل‌آمید واسرشت ساز با ضخامت ۰/۴

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

[DOR: 20.1001.1.20084439.1393.9.1.12.1]

جدول ۲- تعداد قطعات تکثیری چندشکل و در صد چندشکلی و قدرت تفکیک در جمعیت مورد مطالعه

آغازگر	درصد چندشکلی		قدرت تفکیک
	والد	F_2	
S_1	۲۹	۴۲	۰/۸۸
S_2	۶۷	۶۷	۰/۹۸
S_3	۲۵	۵۰	۰/۹۲
S_7	۲۰	۳۰	۰/۹۰
S_{13}	۱۰۰	۷۸	۰/۹۹
S_{14}	۲۵	۷/۱	۰/۹۰
S_9 S_{10}	۴۰	۴۶	۰/۸۹
$S_{11}S_{12}$	۲۵	۶۷	۰/۹۱
	متوسط		
	۳۷/۱	۴۵/۲	-

میلی‌متر و ابعاد ۳۳×۴۲ سانتی‌متر و حاوی اوره ۷ مولار بارگذاری شد و ژل با توان ۶۵ وات به مدت یک ساعت در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد در دستگاه Biometra مدل S2 الکتروفورز شد. رنگ-آمیزی ژل با استفاده از نیترات نقره بر اساس روش (Bassam et al. 1983) با اندکی تغییر انجام شد. اندازه قطعات حاصل از تکثیر با نشانگر اندازه ۱۰۰ bp DNA (Fermentase) تخمین زده شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

یافته‌های حاصل از ژل‌های آکریل‌آمید دو جمعیت F_2 حاصل از تلاقی تجن با T-66-58-9 و تجن با T-66-58-12 و والدین آنها به صورت صفر و یک در تشکیل ماتریس تشابه مورد استفاده قرار گرفت. تجزیه و تحلیل‌یافته‌ها با استفاده از نرم‌افزار NTSYSpc v2.02 (۲۱) صورت پذیرفت. ضرایب تشابه بین افراد بر اساس ضریب دایس (۱۷) طبق معادله (۱) محاسبه شد:

$$Sij = 2a/(2a+b+c) \quad \text{(معادله ۱)}$$

در این رابطه، Sij) تشابه بین دو نتاج مورد مقایسه، a) تعداد باندهای مشترک، b) تعداد باندهایی که در نتاج i وجود دارد ولی در j وجود ندارد و c) تعداد باندهایی که در نتاج i وجود ندارد ولی در j وجود دارد.

نمودار درختی با استفاده از ضرایب تشابه حاصل، بر اساس الگوریتم UPGMA[1] تشکیل شد و بر این اساس نتاج حاصل از دو تلاقی مختلف در زیرگروه‌های جداگانه دسته‌بندی شدند. مقادیر احتمال همسانی (PI)[2] هر آغازگر طبق معادله (۲) محاسبه شد:

$$PI = \sum_{i=1}^{n} pi^4 + \sum_{i=1}^{n-1}\sum_{j=i+1}^{n}(2pipj)^2 \quad \text{(معادله ۲)}$$

در این رابطه، p_i= فراوانی آلل i ام و p_j= فراوانی آلل j ام است. سپس قدرت تفکیک (PD)[3] هر آغازگر که احتمال شناسایی ارقام توسط یک آغازگر را نشان می‌دهد از رابطه PI-۱ محاسبه شد (Caetano-Anolles et al. 1997).

نتایج و بحث

به منظور ارزیابی سودمندی نشانگرهای مورد استفاده جهت شناسایی تنوع در ارقام والد و جمعیت‌های F_2 مورد مطالعه، شش آغازگر ISSR و دو آغازگر SSR مورد بررسی قرار گرفت. طول آغازگرها ۲۵-۲۱ جفت باز و نماینده همه آلل‌های مرتبط با کیفیت نانوایی در مکان ژنی *Glu-1D* بودند (جدول۱). با استفاده از هشت آغازگر مورد استفاده در این تحقیق در ارقام والد، در کل ۲۹ قطعه تکثیری چندشکل (۳۷/۱ درصد) با میانگین ۲/۸۸ قطعه تکثیری چندشکل در هر آغازگر ثبت شد (جدول۲). تعداد قطعات تکثیری در مکان ژنی مورد مطالعه، بین پنج تا ۱۲ قطعه

[1] Unweighted pair-group methods using artimetric average

[2] Probability identity
[3] Power of discrimination

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1393.9.1.12.1]

متفاوت بود و میانگین تعداد قطعات در هر آغازگر ۷/۷۵ قطعه محاسبه شد. در جمعیت F_2 نیز در کل ۳۸ قطعه تکثیری چند-شکل (۴۵/۲ درصد) با میانگین ۴/۷۵ قطعه تعیین شد. تعداد قطعات تکثیری در مکان ژنی مورد مطالعه، بین شش تا ۱۴ قطعه متفاوت بود و میانگین تعداد قطعات در هر آغازگر ۱۰/۵ قطعه محاسبه شد. فراوانی قطعات تکثیر شده در جایگاه‌های مختلف بین ۰/۱۳ تا ۰/۹۵ بود. Mohammadi et al. (2009) با استفاده از ۷۳ آغازگر ریزماهواره بر روی ۷۰ لاین و رقم مورد استفاده در برنامه‌های اصلاح و معرفی ارقام گندم نان در ایران و مرکز سیمیت در کل ۵۹۲ آلل با میانگین ۸/۵۳ آلل در هر مکان ژنی و فراوانی آلل ۰/۱۳ تا ۰/۸۹ با میانگین ۰/۳۸ گزارش دادند که نتایج ایشان با نتایج بررسی حاضر از نظر میانگین تعداد آلل و فراوانی آلل تا حد زیادی مطابقت داشت. Prasad et al. (2000) با استفاده از ۲۰ آغازگر ریزماهواره، ۵۵ آلل را از بین ۵۵ ژنوتیپ گندم شناسایی کردند و تعداد آلل کمتری (۲/۷۵) را در هر مکان ژنی گزارش کردند. Struss and Plieske (1998) ۱۳۰ آلل چندشکل را با استفاده از ۱۵ آغازگر ریزماهواره با میانگین ۸/۶ آلل در هر مکان ژنی از بین ۱۶۲ ژنوتیپ جو گزارش کردند. Bolouri-Moghadam et al. (2011) با استفاده از ۱۰ نشانگر ریزماهواره بر روی جمعیت‌های ۷ رقم جو زراعی در کل ۶۵ آلل با میانگین ۹/۲ و تعداد آلل ۷ تا ۱۳ با میانگین ۹/۲۸ گزارش کردند که با نتایج حاصل از این بررسی تطابق داشت. اختلاف در نتایج گزارش شده در مطالعات مختلف می‌تواند به دلیل اختلاف در تعداد ژنوتیپ‌های مورد مطالعه و زمینه ژنتیکی آن‌ها، تعداد نشانگرهای مورد استفاده و تکنیک به کار رفته در تعیین چند-شکلی باشد (Mohammadi et al. 2009). بیشترین درصد چندشکلی و بالاترین قدرت تفکیک در ارقام والد و جمعیت F_2 مربوط به آغازگر S_{13} و S_2 بود (جدول۲).

فراوانی ضرایب تشابه دو به دو با استفاده از نشانگرهای SSR و ISSR در والدین و جمعیت‌های F_2 مورد بررسی در شکل ۱و۲ نشان داده شده است. دامنه ضرایب تشابه بین ۰/۵۸ تا ۰/۹۵ با میانگین ۰/۷۵ بود. فراوان‌ترین دامنه ضرایب تشابه در نتاج حاصل از Tajan×T-66-58-9 بین ۰/۷ تا ۰/۷۹ (۴۳/۱۱ درصد) و در نتاج حاصل از Tajan×T-66-58-12 بین ۰/۸ تا ۰/۸۹ (۵۵/۵۶ درصد) بود. ضرایب بالای تشابه در بررسی حاضر به این دلیل است که ژنوتیپ‌های مورد مطالعه، اعضای خزانه ژرم پلاسم بسیار محدودتری در مقایسه با حالت نمونه‌برداری تصادفی ارقام از نواحی جغرافیایی متنوع می‌باشند. همچنین اختلافات ژنتیکی پایین در این مطالعه ممکن است به این دلیل باشد که تنها نواحی ژنومی مرتبط با کیفیت نانوایی مشارکت داشته‌اند، در حالی‌که آغازگرهای مورد استفاده، بین دو والد متفاوت از لحاظ کیفیت نانوایی چندشکلی قابل قبولی ایجاد کردند.

از بین آغازگرهای مورد استفاده دو آغازگر S_2 و S_{13} الگوی باندی بسیار متفاوتی را در والدین هر دو تلاقی نشان دادند (شکل ۵) و همچنین بالاترین قدرت تفکیک و درصد چندشکلی را در والدین و نتاج حاصل ایجاد کردند (جدول۲). چندشکلی DNA بین هر دو ژنوتیپ والدینی که از طریق تکثیر نشانگرهای ریزماهواره حاصل می‌شود، ابزار مفیدی جهت تخمین تنوع ژنتیکی و چندشکلی نتاج حاصل می‌باشد (Long et al. 2001) .

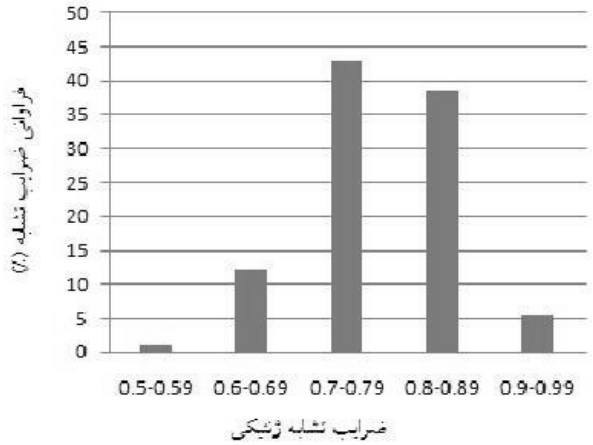
ضرایب تشابه بین والد تجن با لاین‌های T-66-58-9 و T-66-58-12 تنها با استفاده از آغازگرهای چندشکل در جدول۳ نشان داده شده است. با استفاده از داده‌های حاصل از این دو آغازگر با چند-شکلی بالا بین والدین (جدول۲)، ضرایب تشابه دایس بر اساس ارتباط بین ژنوتیپ‌ها در تشکیل نمودار درختی با روش UPGMA به کار برده شد (شکل ۳ و ۴).

در جمعیت F_2 تلاقی Tajan×T-66-58-9 (جمعیت ۱) میانگین ضریب تشابه نتاج به T-66-58-9 و Tajan به ترتیب ۰/۶ و ۰/۴۸ و در جمعیت F_2 تلاقی Tajan×T-66-58-12 (جمعیت دو) میانگین ضریب تشابه نتاج به T-66-58-12 و Tajan به ترتیب ۰/۵۴ و ۰/۵۲ بود که تجزیه خوشه‌ای جمعیت‌های مورد مطالعه نیز نتایج مشابهی را نشان داد و مشاهده شد که تشابه ژنتیکی نتاج حاصل از هر دو تلاقی به والد موتانت مربوطه بیشتر از شباهت آن‌ها به والد تجن می‌باشد.

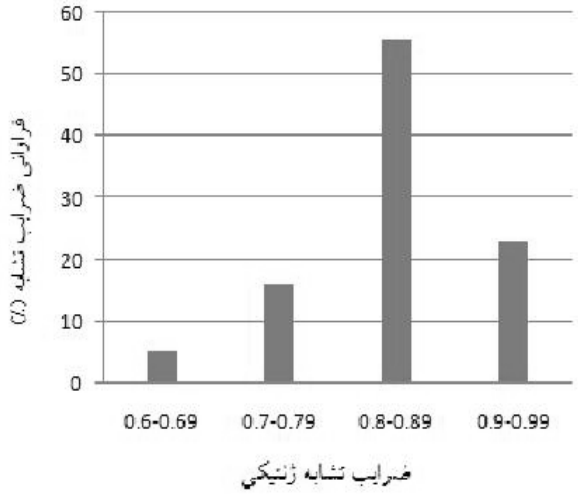
نتایج تجزیه خوشه‌ای نشان داد که آغازگرهای مورد استفاده در جمعیت یک و دو به ترتیب در ضریب تشابه ۰/۴۷ و ۰/۵۳ اعضای هر جمعیت را به دو گروه تقسیم کردند و بر این اساس

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

[DOR: 20.1001.1.20084439.1393.9.1.12.1]



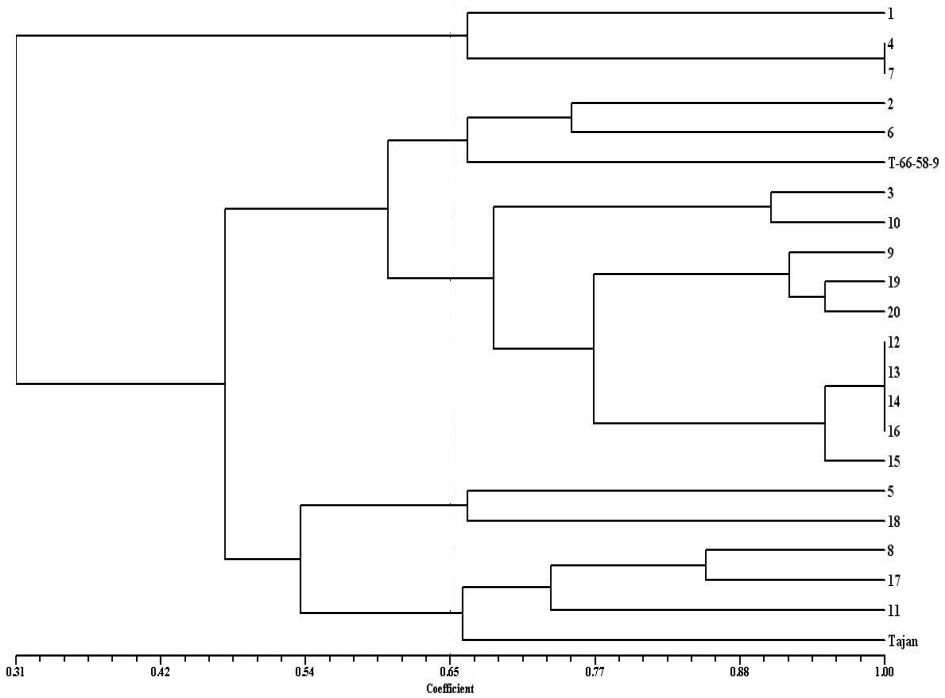
شکل۱- توزیع فراوانی Tajan×T-66-58-9 با استفاده از ۸ آغازگر



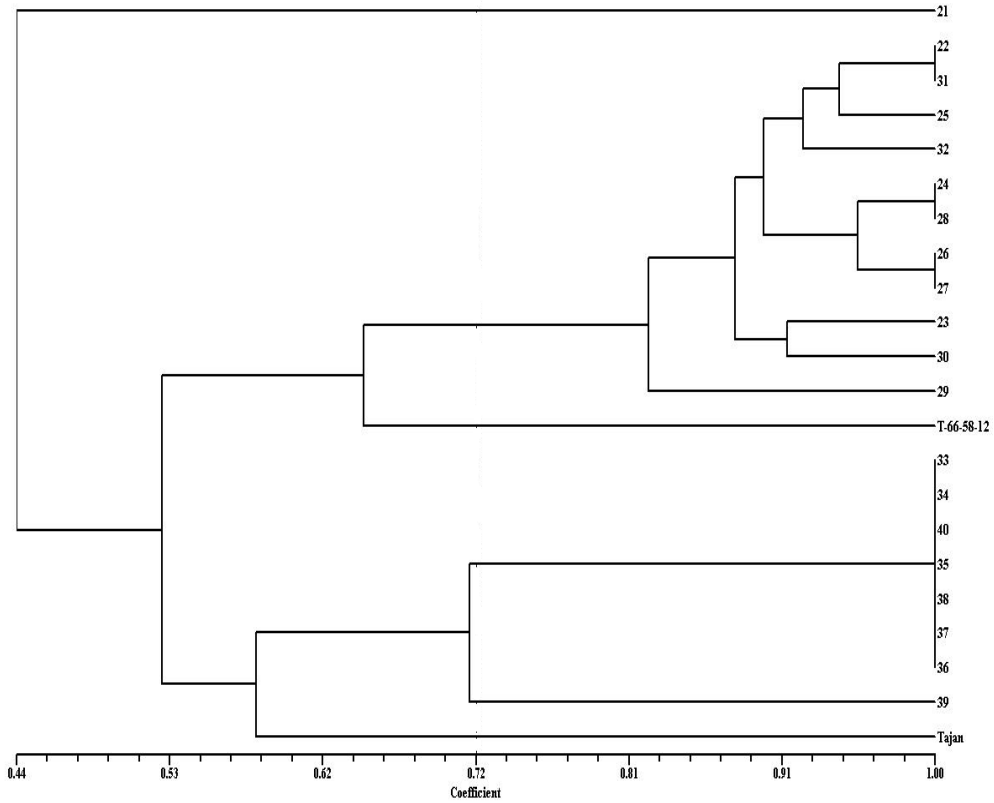
شکل۲- توزیع فراوانی ضرایب Tajan×T-66-58-12 با استفاده از ۸ آغازگر

در هر گروه یکی از والدین با تعدادی از نتاج مربوطه قرار گرفت (شکل ۳و۴). همچنین نتایج نشان داد که ترکیب این آغازگرها به راحتی می‌توانند ژنوتیپ‌های جمعیت یک و دو را به ترتیب در ضرایب تشابه ۰/۳۱ و ۰/۴۴ تفکیک کنند. با توجه به مقایسه الگوی باندی حاصل از هشت آغازگر به کار رفته در این مطالعه بر روی والدین هر تلاقی و با توجه به نتایج درصد چندشکلی و قدرت تفکیک این آغازگرها و بررسی تفکیک جمعیت‌های F_2 توسط آغازگرهای با چندشکلی بالا در والدین، مشخص شد که دو آغازگر S_2 و S_{13} به خوبی می‌توانند به منظور تشخیص ژنوتیپ‌ها و مطالعات تنوع ژنتیکی در برنامه‌های اصلاح کیفیت نانوایی ارقام و لاین‌های گندم نان مورد استفاده قرار گیرند. چندشکلی بالای DNA با استفاده از نشانگرهای ISSR در چندین گیاه زراعی دیگر نیز گزارش شده است (Kantety et al.1995; Blair et al. 1999; Hou et al. 2005; Sofalian et al. 2008) با وجود لاین‌های متنوع در برنامه‌های اصلاحی گندم نان، با استفاده از تلاقی‌های هدفمند و برنامه ریزی شده تغییراتی در ترکیبات آللی ایجاد می‌شود که بهترین شانس برای ظهور تفکیک متجاوز است و می‌تواند به منظور استخراج لاین‌ها با عملکرد بالا و

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1393.9.1.12.1]



شکل ۳- نمودار درختی والدین و نتاج F_2 تلاقی T-66-58-9×Tajan بر اساس تنوع آللی در آغازگرهای چندشکل

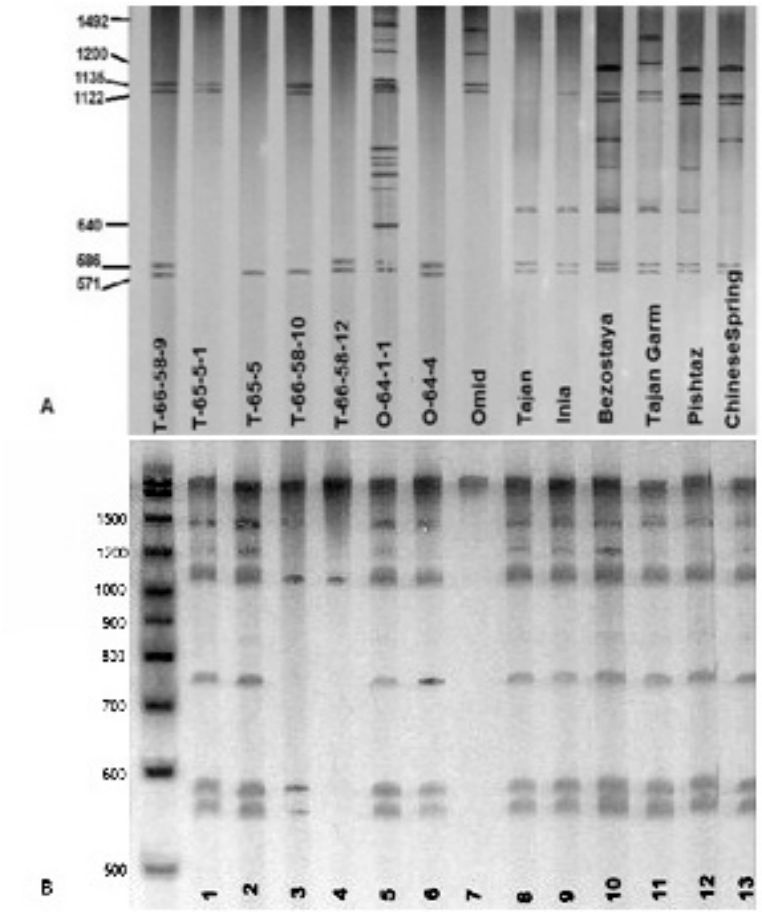


شکل ۴- نمودار درختی والدین و نتاج F_2 تلاقی T-66-58-12×Tajan بر اساس تنوع آللی در آغازگرهای چندشکل

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1393.9.1.12.1]

جدول ۳- ضرایب تشابه بین والدین با استفاده از تنوع آللی درآغازگرهای چندشکل

	Tajan	T -66-58-9	T-66-58-12
Tajan	۱		
T -66-58-9	۰/۴۳	۱	
T-66-58-12	۰/۲۸	۰/۴	۱



شکل۵- الگوی باندی آغازگر S_{13} درارقام و لاین‌های موتانت (A) و ۱۳ نتاج جمعیت F_2 حاصل از تلاقی Tajan×T-66-58-12 (B)

ترکیبی از صفات مطلوب، مورد انتخاب قرار گیرند. بر این اساس با استفاده از آغازگرهای معرفی شده در بررسی مواد ژنتیکی ناشناخته از نظر ترکیبات آللی، میزان تنوع و تشابه و اختلاف آن‌ها با مواد شناخته شده محاسبه می‌شود و از بین مواد مشابه با ارقام و لاین‌های مطلوب، مطالعات اختصاصی از لحاظ ترکیبات آللی صورت می‌گیرد. این موضوع از لحاظ وجود تعداد زیاد لاین‌های موتانت و ارقام استاندارد و امکان ایجاد تلاقی‌های بسیار زیاد بین ارقام و لاین‌های با کیفیت مطلوب و ارقام و لاین‌های با کمیت مطلوب و سرانجام دسترسی به ارقامی که از هر دو جنبه مطلوب باشند ارزشمند است، همچنین در کاهش حجم کاری و افزایش سرعت برنامه‌های آتی اصلاح کیفیت گندم نان اهمیت دارد. Bolouri-moghadam et al. (2011) نشان دادند که نشانگرهای SSR نیز از توانایی بالایی در آشکار کردن بیشترین اطلاعات در یک مکان ژنی منفرد برخوردار هستند و به خوبی

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1393.9.1.12.1]

می‌توانند با هدف تجزیه و تحلیل ژنتیکی در سطح مولکولی، تعیین تشابه ژنتیکی و گروه‌بندی ارقام جو مورد استفاده قرار گیرند. Fatehi et al. (2011) نیز در بررسی اکسشن‌های نژادهای گندم ایرانی گزارش کردند که نشانگرهای ISSR می‌توانند شاخص خوبی جهت تعیین ارتباطات ژنتیکی بین گونه‌ای در واریته‌های مختلف گندم باشند و تجزیه و تحلیل بر اساس این نشانگر مولکولی اطلاعات معتبر و مهمی را برای مطالعه تنوع و اختلاف بین اکسشن‌های گندم در بهبود ژنتیکی آن فراهم می‌کند. به نظر می‌رسد که نشانگر ISSR در شناسایی ارقام و تشخیص هیبریدهای حاصل از تلاقی ارقام مختلف پیش از بروز صفات در گیاه بالغ نیز از قابلیت بالایی برخوردار است و بنابراین باعث صرفه‌جویی زمان در برنامه‌های اصلاحی می‌شود (Pasqualon et al. 1998). با توجه به این‌که نشانگرهای SSR و ISSR مورد استفاده در این بررسی به مکان ژنی *Glu-1D* تعلق دارند می‌توان با استفاده از آغازگرهای مورد تایید در این بررسی، لاین‌های موتانت برتر و ارقام والد لاین‌ها و سایر ارقام تجاری استاندارد را مورد ارزیابی قرار داد و اقدام به انتخاب بهترین ارقام و لاین‌ها کرد و در برنامه‌های آتی اصلاح کیفیت نانوایی گندم نان، با تلاقی والدین انتخابی که از نظر ژنتیکی به حد کافی متفاوت باشند، جمعیت‌های مختلفی را برای تهیه نقشه‌های ژنتیک و مکان‌یابی ژنی ایجاد کرد. به نظر می‌رسد که جمعیت‌های F_2 از جنبه عملی از سایر جمعیت‌ها (جمعیت‌های حاصل از تلاقی برگشتی، لاین‌های اینبرد خویش آمیخته، هاپلوییدهای مضاعف) کاربردی‌تر باشند، زیرا بیشترین میزان تنوع و تفرق صفات را نشان می‌دهند و در مدت نسبتا کمتری قابل تهیه هستند. وقتی برای تجزیه جمعیت‌های تفرق یافته از نشانگرهای غالب و هم‌بارز استفاده می‌شود و مشاهده می‌شود که نسبت تفرق برای هر مکان ژنی (نشانگر) از مقدار مورد انتظار انحراف ندارد، می‌توان نقشه‌های پیوستگی نشانگرها را طراحی کرد. با نمره‌دهی اجزای جمعیت تفرق برای صفت مورد نظر و سپس تعیین ژنوتیپ مولکولی هر یک از اجزای جمعیت در حال تفرق با استفاده از نشانگرهای مولکولی (تهیه نقشه‌های ژنتیکی) می‌توان ارتباط هر یک از نشانگرها را با صفت مورد نظر تعیین کرد (Naghavi et al. 1384) و از این رو، شناسایی نشانگرهایی که بیشترین چندشکلی و توانایی تشخیص و قدرت تفکیک را در بین والدین تلاقی‌ها دارا باشند از مراحل مهم برنامه‌های اصلاح کیفی گندم نان می‌باشد.

دستیابی به نشانگرهای چندشکل یک انتخاب مناسب به منظور استفاده در اهداف مختلف اصلاحی گیاهان است. میزان بالای تنوع ژنتیکی که بین ژنوتیپ‌های گندم وجود دارد، توسط نشانگرهای چندشکل موجود تعیین می‌شود و می‌تواند به صورت کارآمد در برچسب دار کردن ژن‌ها و نقشه‌یابی ژنوم والدین و نتایج حاصل از تلاقی‌ها برای وارد کردن صفات مطلوب از جمله عملکرد و کیفیت بالا به ژنوتیپ‌های مطلوب مورد استفاده قرار گیرند.

سپاسگزاری

بدینوسیله از گروه پژوهشی کشاورزی پژوهشکده تحقیقات کشاورزی، پزشکی و صنعتی سازمان انرژی اتمی که هزینه‌های اجرایی این پژوهش را تأمین و در اجرای پروژه یاری کردند، صمیمانه تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

Abdmishani S, Shahnejat boushehri AA (1377) Advanced Plant Breeding. Tehran University Puplications, Tehran, Iran. (In Farsi).

Ahmad M (2000) Molecular marker-assisted selection of HMW glutenin allels related to wheat bread quality by PCR-generated DNA markers. Theoretical and Applied Genetics 101: 892-896.

Asadi AA, Naserian Khiabani B, Mirkhani R, Vedadi S (2007) Investigation of salinity and drought effects on some quality traits in wheat. Inter Journal of Agricultural Biology 4: 125-134.

Bassam BJ, Caetano-Anoelles G, Gresshoff PM (1983) Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide geles. Annual Biochemistry 196: 80-83.

Behnia M (1373) Pertaining cereal. Tehran University Press, Tehran, Iran. (In Farsi).

Blair MW, Panaud O, Mc Couch SR (1999) Inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification for analysis of microsatellite motif frequency and fingerprinting in rice (*Oryza sativa* L.). Theoretical and Applied Genetics 98:780-792.

Bolouri-moghadam MR, Safarnezhad A, Kazemitabar K (2011) Genetic Diversity Assessment in Several Barley (*Hordeum vulgare* L.) Cultivars Using Microsatellite Markers. Notulae Scientia Biologicae 3: 140-144.

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

[DOR: 20.1001.1.20084439.1393.9.1.12.1]

Caetano-Anolles G, Callahan LM, Gresshoff PM (1997) The origin of bermudagrass *(cynodon)* off-types inferred by DNA amplification fingerprinting. Crop Science 37: 81-87.
Debustos A, Rubio P, Jouve N (2000) Molecular characterization of the inactive allel of the gene *Glu-A1* and the development of a set of AS-PCR markers for HMW glutenin of wheat. Theoretical Applied Genetics 100: 1085-1094.
Debustos A, Rubio P, Soler C, Garcia P, Jouve N (2001) Markers-assisted selection to improv HMW-glutenins in wheat. Euphytica 119:69-73.
D' Ovidio R, Porceddu E, Lafiandra D (1994) PCR analysis of genes encoding allelic variants of high-molecular-wheight glutenin subunits at the *Glu-D1* locus. Theoretical Applied Genetics 88: 175-180.
Doyle JJ, Doyle JL (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12: 13-15.
Hai L, Wagner C, Friedt W (2007) Quantitative structure analysis of genetic diversity among spring bread wheat *(Triticum aestivum* L.*)* from different geographical regions. Genetica 130: 213-225.
Hallajian MT, Varasteh shams M, Naserian khiabani B, Majdabadi A, Pirvali biranvand N (2009) Designing polymorphic ISSR primers in order to study x and y types of glutenin subunits in 1D locus controlling favorable baking quality of bread wheat. Genetics and Molecular Biology 1: 075-079.
Hamer RJ, Weegels WP, Marseille JP (1992) Prediction of bread-making quality of wheat: the use of HMW glutenin A subunit based quality scoring systems. Cereal science 15: 91-102.
Horvat D, Jurkovic Z, Sudar R, Pavlinic D, Simic G (2002) The relative amounts of HMW glutenin subunits of OS wheat cultivars in relation to bread-making quality. Cereal Research Communication 30:415-422.
Hou YC, Yan ZH, Wei YM, Zheng YI (2005) Genetic diversity of barley from west china based on RAPD and ISSR analysis. Barley Genetic Newsletter 35: 9-12.
Huang XQ, Borner A, Roder MS, Ganal MW (2002) Assessing genetic diversity of wheat *(Triticum aestivum* L.*)* germplasm using microsatellite markers. Theoretical Applied Genetics 105: 699-707.
ICARDA Annual Report (2002).
Kantety RV, Zeng X, Bennetzen J, Zehr BE (1995) Assessment of genetic diversity in dent and popcorn (*Zea maize* L.) inbred lines using inter-simples sequence repeat (ISSR) amplification. Molecular Breeding 1: 365-373.
Lafiandra D, Tucci GF, Pavoni A, Turchetta T, Margiotta B (1997) PCR analysis of x- and y-type genes present at the complex *Glu-A1* locus in durum and bread wheat. Theoretical Applied Genetics 94: 235-240.
Lang NT, Yanagihara S, Buu BC (2001) A microsatellite marker for a gene confering salt tolerance on rice at the vegetative and reproductive stages. SABRAO. Breeding Genetics 33:1-10.
Macritchi F, Lafiandra D (1997) Structure-function relationships of wheat proteins. In: Food Protein and Their Applications (Damodaran S, Paraf A. eds.): 293-324.
Margiotta B, Colaprico G, D' Ovidio R, Lafiandra D (1993) Characterization of high M_r subunits of glutenin by combined chromatographic (RP-HPLC) AND electrophoretic separations and restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis of their encoding genes. Cereal Science 17: 221-226.
Mohammadi SA, Khodarahmi M, Jamalirad S, Jalal Kamali MR (2009) Genetic diversity in a collection of old and new bread wheat cultivars from Iran as revealed by simple sequence repeat-based analysis. Annual Applied Biology 154: 67-76.
Naserian Khiabani B, Asadi AA, Rahimi M, Ardekani MR (2007) Evaluation of wheat cultivars and mutants for morphological and yield traits and comparing of yield components under irrigated and rainfed conditions. Asian Journal of plant Science 6: 214-224.
Naghavi MR, Ghareyazie B, Hosseini Salekdeh Gh (1384) Molecular Markers. University of Tehran Press, Tehran, Iran (In Farsi).
Nei M, Li WH (1979) Mathematical model for studying genetic variation in terms of genetic polymorphism. United States Patent Application 08/326456.
Payne PI, Holt LM, Law CN (1981) Structural and genetical studies on the high molecular weight subunits of wheat glutenin. Inter Allelic variation in subunits among at varieties of wheat. Theoretical Applied Genetics 60: 229-236.
Payne PI, Lawrence GJ (1983) Catalogue of alleles for the complex gene loci, *Glu-A1*, *Glu-B1*, and *Glu-D1* which code for high-molecular weight subunits of glutenin in hexaploid wheat. Cereal Research communications 11: 29-35.
Payne PI, Nightingale MA, Kratigger AF, Holt LM (1987) The relation between HMW glutenin subunit composition and the bread making quality of British grown wheat varieties. Science, Food Agriculture 40: 51-65.
Pasqualone A, Lotti C, Blanco A, Trocoli A, De Vita P, Di Fonzo N (1998) Use of ISSR markers for cultivar identification in durum wheat. In: Proceedings of 6th International Meeting on Durum Wheat. Italy, Foggia 225-240.
Prasad M, Varsheny RK, Roy JK, Balyan SH, Gupta PK (2000) The use of microsatellite for diversity in wheat. Theoretical Applied Genetics 100: 584-592.
Raholf FJ (1992) NTSYS-PC Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, Version 2.0. State University of New York, Stont Brook, New York.
Roder MS, Plaschke J, Konig SU, Borner A, Sorrells ME, Tanksley SD, Ganal MW (1995) Abundance, variability and chromosomal location of microsatellites in wheat. Molecular and General Genetics 246: 327-333.
Roder MS, Korzun V, Wendehake K, Plaschke J, Tixier MH, Leroy P, Ganal PW (1998) A microsatellie map of wheat. Genetics 149: 2007-2023.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1393.9.1.12.1]

Shewry PR, Halford NG, Tatham AS (1992) High molecular weight subunits of wheat glutenin. Cereal Science 15: 115-119.
Sofalian M, Chaparzadeh N, Javanmard A, Hejazi MS (2008) Study the genetic diversity of wheat landraces from northwest of Iran based on ISSR molecular marker. International Journal of Agriculture and Biology 10: 466-473.
Struss D, Plieske J (1998) The use of microsatellite markers for detection of genetic diversity in barley populations. Theoretical Applied Genetics 97: 308-315.
Sutton KH, Bietz JA (1997) Variation among high molecular weight subunits of glutenin detected by capillary electrophoresis. Cereal Science 25: 9-16.
Uthayakumaran S, Beasley HL, Stoddard FL, Keentok M, Phan-thien N, Tanner RI, Bekesley HL (2002) Synergistic and additive effects of three HMW glutenin subunit loci. Cereal Chemistry 79: 294-300.
Zamani MJ (1385) The selection of mutant wheat genotypes with HMW glutenin alleles related to bread-making quality by using PCR. Azad Islamic University, Karaj, Iran. (In Farsi).
Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D (1994) Genome fingerprinting by simple sequence repeats (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. Genomics 20: 176-183.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1393.9.1.12.1]