

بررسی روابط فیلوژنتیکی ژن‌های واکسی در گندم‌های وحشی و زراعی با استفاده از PCR چندگانه

زهرا مریمی^۱، آرش فاضلی^۲ و علی اشرف مهرابی^۳

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد و استادیار، دانشگاه ایلام
۲- استادیار، دانشگاه ایلام (نویسنده مسوول: a.fazeli@ilam.ac.ir)
تاریخ دریافت: ۹۳/۱۰/۸ تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۲/۱۰

چکیده

پروتئین‌های واکسی مسئول سنتز آمیلوز در دانه‌های گندم می‌باشند که در گندم‌های هگزاپلوئید به وسیله سه ژن واکسی $Wx-D1$ و $Wx-B1$ ، $Wx-A1$ رمزگذاری می‌شوند که نقش مهمی در کیفیت آرد گندم دارند. هدف این مطالعه بررسی روابط فیلوژنتیکی ژن‌های واکسی در گندم‌های وحشی و زراعی با استفاده از PCR چندگانه می‌باشد. برای این منظور ۷۱ جمعیت از ۸ گونه جنس آزیلوپس و ۴ گونه گندم وحشی با استفاده از تکنیک PCR چندگانه مورد مطالعه قرار گرفتند. نتایج حاصل از خوشه‌بندی نشان داد که نمونه‌ها به دو گروه اصلی تقسیم شدند. نمونه‌های دیپلوئید با ژنوم (A, B, D) در یک گروه و گندم‌های تتراپلوئید و هگزاپلوئید در گروه دیگر قرار گرفتند. همچنین، نتایج بای پلات نشان داد که ژنوم‌های A و D بیشترین قرابت ژنتیکی از لحاظ ژن‌های واکسی را با هم داشتند. تکنیک PCR چندگانه به شناسایی هم‌زمان هر سه ژن واکسی در جمعیت‌های مختلف گندم قادر بوده و باعث صرفه‌جویی در زمان و هزینه می‌شود. هم‌چنین از نتایج آن می‌توان در برنامه‌های اصلاحی انتخاب به کمک مارکر استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: آمیلوز، ژن‌های واکسی، روابط فیلوژنتیکی، PCR چندگانه

مقدمه

نشاسته یکی از ترکیبات مهم آندوسپرم دانه گندم است که ۶۵-۷۰ درصد از وزن خشک دانه را شامل می‌شود و از دو پلی ساکارید، آمیلوز خطی (۳۶-۲۳ درصد) و آمیلوپکتین منشعب (۷۵-۶۸ درصد) تشکیل شده است (۱۴). نسبت آمیلوز به آمیلوپکتین به تفاوت در ساختار گرانولی نشاسته، خصوصیات فیزیکوشیمیایی و کیفیت آرد گندم منجر می‌شود (۴۲). با کاهش نسبت پلی ساکارید آمیلوز به آمیلوپکتین کیفیت آرد گندم بهبود می‌یابد که این نسبت متأثر از تنوع پروتئین‌های واکسی^۱ است که نقش کلیدی در سنتز آمیلوز ایفا می‌کنند (۱۴). سه نوع پروتئین واکسی در گندم‌های هگزاپلوئید که توسط سه ژن واکسی $Wx-A1$ ، $Wx-B1$ و $Wx-D1$ که روی کروموزم‌های گروه هفت قرار داشته‌اند می‌گردند و اهمیت به‌سزایی در تعیین کیفیت آرد گندم دارند (۳۵ و ۱۰۳). حضور نداشتن هریک از این ژن‌ها را به غیرفعال بودن مکان ژنی آن ژن نسبت می‌دهند که اصطلاحاً آن را آلل خنثی^۲ می‌نامند (۱۲). غیر فعال بودن مکان‌های ژن واکسی را با حروف کوچک "b" در انتهای نام آن مکان ژنی و به صورت $Wx-D1b$ و $Wx-A1b$ ، $Wx-B1b$ نشان می‌دهند. یاماموری (۳۶) و یاماموری و یاماتو (۳۷) لاین‌های گندمی با محتوی آمیلوز ۲۰-۲۵ درصد شناسایی کردند که حامل دو آلل واکسی نول و یک آلل با بیان کم بودند. تولید گندم‌های واکسی و نیمه واکسی با استفاده از پروتئین‌های واکسی می‌تواند در برنامه‌های اصلاحی جهت افزایش کیفیت گندم مورد توجه قرار گیرد (۱۵، ۲۴). مطالعات زیادی از سوی یاماموری و همکاران (۳۸)، گازمن و همکاران (۱۰) و گازمن و الواریز (۱۱) برای بررسی تنوع پروتئین‌های واکسی در اجداد

گندم صورت گرفته است و چند شکلی بالایی در آن‌ها مشاهده شده است. با این وجود، مطالعات چند شکلی این پروتئین‌ها در گونه‌های جنس آزیلوپس، که از خویشاوندان مهم گندم است، خیلی کم انجام شده است (۴۰، ۲). جنس آزیلوپس نقش مهمی در تکامل ارقام گندم ایفا می‌کند. دو ژنوم از سه ژنوم گندم نان مربوط به این جنس می‌باشند. ژنوم D گندم نان از گونه‌ی $Aejilops$ ($2n=2x=14, DD$) $tauschii$ منشأ گرفته است (۵).

گرچه منشأ ژنوم B هنوز دقیقاً مشخص نیست ولی همه گونه‌های $Sitopsis$ مخصوصاً گونه $Ae. speltoides$ ($2n=2x=14, SS$) یک کاندیدای محتمل برای این ژنوم پیشنهاد شده است (۳۱، ۷). آزیلوپس‌ها دارای ۲۳ گونه دیپلوئید، تتراپلوئید و هگزاپلوئید بوده و دومین خزانه ژنی برای گندم می‌باشند (۳۰). گونه‌های آزیلوپس منبع مهمی برای تنوع ژن‌های واکسی جدید با فعالیت آنزیمی متفاوت بوده و با مطالعه توالی‌های ژن واکسی می‌توان زادگاه و رابطه فیلوژنتیکی بین گندم و جنس آزیلوپس را مشخص نمود (۴۱، ۴۰، ۲۲، ۲۱، ۱۳، ۱۲، ۸). تکنیک پی سی آر چندگانه^۳ با ارزیابی سه ژن واکسی به‌طور هم‌زمان، در زمان و هزینه صرفه‌جویی نموده که از نتایج آن می‌توان در برنامه‌های اصلاحی انتخاب به کمک مارکر استفاده نمود. لانگدو و همکاران (۱۸) با شناسایی مولکولی ژن‌های واکسی در گندم با استفاده از پی سی آر چندگانه توانستند در مدت زمان کوتاهی هر سه ژن واکسی را در گندم نان مشخص نمایند. هدف این تحقیق شناسایی ژن‌های واکسی و نیمه واکسی موجود در جمعیت‌های گندم زراعی و وحشی، بررسی روابط فیلوژنتیکی بین گندم و اجداد آن‌ها بر اساس ژن‌های واکسی،

شناسایی آلل‌های خنثی در جمعیت‌های مختلف گندم زراعی و وحشی است که از آن‌ها بتوان در بهبود منابع ژنتیکی و اصلاح کیفیت آرد نان در برنامه‌های اصلاحی استفاده نمود.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

در این تحقیق بذور ۷۱ جمعیت از گونه‌های زراعی و وحشی گندم که از مناطق شمال، غرب، شمال غرب ایران و بانک ژن غلات و حبوبات غرب کشور واقع در دانشکده کشاورزی دانشگاه ایلام جمع‌آوری شده بود، استفاده گردید که مشخصات و محل جمع‌آوری نمونه‌ها در جدول ۱ مشخص شده است. بذور در گلدان‌های کوچک در شرایط گلخانه‌ای کشت گردید و در مرحله ۳-۴ برگ‌ی نمونه‌های برگ‌ی برای آنالیزهای بعدی از تمام نمونه‌ها جمع‌آوری و سریعاً در نیتروژن مایع در دمای ۱۹۶- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

استخراج DNA ژنومی

DNA ژنومی به صورت بالک از بافت برگ گیاهچه‌های سه تا چهار برگ‌ی رشد یافته در گلدان‌ها (۵ گیاهچه از هر جمعیت) با استفاده از روش CTAB بر اساس دستورالعمل دوئل و همکاران (۴) با اندکی تغییرات استخراج گردید. کمیت و کیفیت DNA استخراج شده روی ژل آگارز ۰/۸ درصد و نیز روش اسپکتروفتومتری در طول موج‌های ۲۶۰ تا ۲۸۰ نانومتر بررسی گردید. سپس با استفاده از آب مقطر دوبار تقطیر، نمونه‌های DNA برای ۱۰۰ نانوگرم در میکرولیتر رقیق شدند.

مراحل واکنش زنجیره ای پلیمرز

از دو جفت آغازگر که از سوی شریف‌لو و همکاران (۳۰) و ۲۹ برای تکثیر نواحی ژن‌های واکسی طراحی شده بودند، استفاده گردید (جدول ۲). واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۳ میکرولیتر DNA الگو، ۲/۵ میکرولیتر بافر 10X، ۱/۸ میکرولیتر کلرید منیزیم ۲۰ میلی‌مولار، ۱/۵ میکرولیتر dNTPs یک میلی‌مولار، یک میکرولیتر از هر کدام از جفت آغازگرهای مربوطه (غلظت ۱۰ پیکومول)، ۰/۳ میکرولیتر آنزیم Taq پلیمرز (۵ واحد) و در نهایت ۱۳/۹ میکرولیتر آب دو بار تقطیر شده، انجام شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در دستگاه ترموسایکلر (Bio Rad) با برنامه زمانی ۴ دقیقه واسرشته سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، سپس ۱۰ چرخه اولیه به صورت Touch Down و در پی آن ۲۵ چرخه معمولی انجام گرفت. در ده چرخه Touch Down،

در چرخه اول دمای اتصال آغازگر به رشته الگو ۵ درجه سانتی‌گراد بالاتر از دمای واقعی در نظر گرفته شد و در هر چرخه ۰/۵ درجه از دمای اتصال کاسته شد تا در نهایت در چرخه دهم به دمای اتصال واقعی رسید. در ۲۵ چرخه بعدی دمای اتصال ثابت (بسته به دمای اتصال آغازگر) و با زمان ۳۰ ثانیه انجام شد. در همه چرخه‌ها واسرشته سازی در دمای ۹۴ درجه به مدت ۳۰ ثانیه و نیز بسط تکثیر در دمای ۷۲ درجه به مدت دو دقیقه و چهل و پنج ثانیه انجام گرفت. همچنین بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه صورت گرفت. قطعات DNA تکثیر شده با استفاده از الکتروفورز روی ژل آگارز ۱/۵ درصد در بافر TAE، 1X تفکیک و برای رنگ‌آمیزی ژل از محلول اتیدیوم برمایید استفاده شد. نمره‌دهی بر اساس حضور (۱) و نبودن حضور باند (۰) انجام گرفت و دندروگرام مربوطه با روش UPGMA ترسیم گردید. همچنین با استفاده از روش تجزیه به مختصات اصلی (PCoA) گروه‌بندی نمونه‌ها در یک بای پلات نمایش داده شد.

نتایج و بحث

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز چندگانه (پی سی آر چندگانه) با استفاده از آغازگرهای مورد استفاده توانایی شناسایی و تشخیص آلل‌های خنثی و طبیعی در هر سه جایگاه اختصاصی برای ژن‌های واکسی در اجداد وحشی و زراعی گندم را نشان داد که نتایج حاصل از ژل الکتروفورز آغازز تنوع آلی بالایی را در این ژن‌ها در جمعیت‌های مختلف مورد مطالعه نشان داد. به طوری که در گندم‌های هگزاپلوئید سه آلل، گندم‌های تتراپلوئید دو آلل و اجداد وحشی گندم یک تا دو آلل مشاهده گردید (شکل ۱). نتایج مشاهده شده با نتایج محققین دیگر همچون وانزتی و همکاران (۳۳)، شریف‌لو و همکاران (۳۰) و ناکامارا و همکاران (۲۴) مطابقت داشت که نتایج حاصل از تنوع آلی مشاهده شده در گونه‌های مختلف به همراه آلل‌های تکثیر شده در جدول ۳ نشان داده شده است. جدول ۳ نشان می‌دهد که آغازگر اختصاصی MAG267 در تمامی گونه‌هایی که دارای ژنوم B بوده‌اند تکثیر شده است درحالی که آغازگر اختصاصی SSR تنوع بالایی را حتی در بین گندم‌های هگزاپلوئید نشان می‌دهد که بیان گر تنوع آلی بالای موجود بین قطعات تکثیر شده تکثیر شده از طریق این آغازگر در نمونه‌های مختلف می‌باشد و این آغازگر قابلیت شناسایی آلل‌های جدید را در لوکوس‌های A و D برای غربال‌گری ژرم‌پلاسماهای گیاهی به منظور شناسایی آلل‌های جدید را دارد.

جدول ۱- جمعیت‌های گندم وحشی و زراعی مورد استفاده در این تحقیق

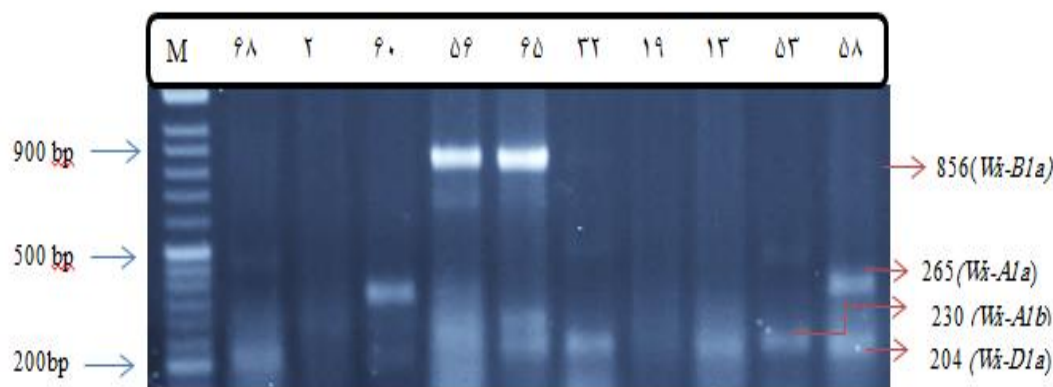
Table 1. Populations of wild and cultivated plants used in this study

ردیف	کد	نام علمی	محل جمع‌آوری	ردیف	کد	نام علمی	محل جمع‌آوری
۱	AT ₁	<i>Ae. tauschii</i>	گرگان	۳۷	AS ₃₇	<i>Ae. speltoides</i>	ایلام- دره شهر- موسی خوش قدم
۲	AT ₂	<i>Ae. tauschii</i>	لنگرود	۳۸	IUGB-00963	<i>Ae. speltoides</i>	ایلام- دره شهر- گل‌دار
۳	AT ₃	<i>Ae. tauschii</i>	املش	۳۹	IUGB-0025	<i>Ae. speltoides</i>	کرمانشاه- قصر شیرین
۴	AT ₄	<i>Ae. tauschii</i>	بابلسر	۴۰	AS ₄₀	<i>Ae. speltoides</i>	ایلام- دره شهر- نرسیده به تنگه
۵	AT ₅	<i>Ae. tauschii</i>	لنگرود	۴۱	IUGB-00416	<i>Ae. speltoides</i>	ایران (محل جمع‌آوری ناشناخته)
۶	AT ₆	<i>Ae. tauschii</i>	رشت	۴۲	IUGB-1747	<i>Ae. speltoides</i>	ایلام- آبدانان
۷	AT ₇	<i>Ae. tauschii</i>	لاهیجان	۴۳	AS ₄₃	<i>Ae. speltoides</i>	ایلام- تختخان
۸	AT ₈	<i>Ae. tauschii</i>	رشت - روستای میان‌گراب	۴۴	IUGB-0083	<i>Ae. speltoides</i>	کرمانشاه سربل ذهاب
۹	AT ₉	<i>Ae. triuncialis</i>	ایلام- دره شهر- زید	۴۵	TS ₄₅	<i>Ae. speltoides</i>	ایران (محل جمع‌آوری ناشناخته)
۱۰	AT ₁₀	<i>Ae. triuncialis</i>	ایلام- چغا سبز	۴۶	TS ₄₆	<i>Ae. speltoides</i>	ایران (محل جمع‌آوری ناشناخته)
۱۱	AT ₁₁	<i>Ae. triuncialis</i>	ایلام- سه راهی ملک‌شاهی	۴۷	TB ₄₇	<i>T. boeoticum</i>	ایلام- آبدانان- کبیر کوه
۱۲	AT ₁₂	<i>Ae. triuncialis</i>	ایلام - دره شهر - تنگه چوبین	۴۸	TB ₄₈	<i>T. boeoticum</i>	ایلام- آبدانان
۱۳	AT ₁₃	<i>Ae. triuncialis</i>	ایلام - سرابله	۴۹	TU ₄₉	<i>T. urartu</i>	ایلام
۱۴	AT ₁₄	<i>Ae. triuncialis</i>	ایلام - سراب دره شهر	۵۰	AN ₅₀	<i>Ae. neglecta</i>	ایران (محل جمع‌آوری ناشناخته)
۱۵	AT ₁₅	<i>Ae. triuncialis</i>	ایلام- نرسیده به سرابله	۵۱	AC ₅₁	<i>Ae. caudate</i>	ایران (محل جمع‌آوری ناشناخته)
۱۶	AT ₁₆	<i>Ae. triuncialis</i>	همدان - ملایر	۵۲	IUGB-00340	<i>T. dicocoides</i>	کرمانشاه- بیستون
۱۷	AT ₁₇	<i>Ae. triuncialis</i>	همدان - ملایر	۵۳	IUGB-00106	<i>T. dicocoides</i>	ایلام- مانشت
۱۸	AT ₁₈	<i>Ae. triuncialis</i>	همدان - ملایر	۵۴	IUGB-0029	<i>T. dicocoides</i>	ایران (محل جمع‌آوری ناشناخته)
۱۹	AT ₁₉	<i>Ae. triuncialis</i>	همدان - تویسرکان	۵۵	SAJI	<i>T. durum</i>	ایران - رقم زراعی
۲۰	AU ₂₀	<i>Ae. umbellulata</i>	ایلام - سه راهی کلم	۵۶	Wc-3791	<i>T. durum</i>	ایران (محل جمع‌آوری ناشناخته)
۲۱	AU ₂₁	<i>Ae. umbellulata</i>	ایلام - تخت خان	۵۷	DENA	<i>T. durum</i>	ایران - رقم زراعی
۲۲	AU ₂₂	<i>Ae. umbellulata</i>	ایلام - بدره	۵۸	Wc-47194	<i>T. durum</i>	بلغارستان
۲۳	AU ₂₃	<i>Ae. umbellulata</i>	ایلام - دره شهر	۵۹	Wc-5728	<i>T. durum</i>	ایران (دریافتی از سیمیت)
۲۴	AU ₂₄	<i>Ae. umbellulata</i>	ایلام - چغاسبز	۶۰	Kc-464	<i>T. durum</i>	لرستان- خرم آباد
۲۵	AU ₂₅	<i>Ae. umbellulata</i>	ایلام - سراب دره شهر	۶۱	Kc1477	<i>T. durum</i>	خوزستان- شوشتر
۲۶	AU ₂₆	<i>Ae. umbellulata</i>	ایران (محل جمع‌آوری ناشناخته)	۶۲	Kc-1545	<i>T. durum</i>	کرمانشاه
۲۷	AU ₂₇	<i>Ae. umbellulata</i>	ایران (محل جمع‌آوری ناشناخته)	۶۳	Wc-4303	<i>T. durum</i>	خراسان - مشهد
۲۸	AU ₂₈	<i>Ae. umbellulata</i>	ایلام سه راهی ملک‌شاهی - دره	۶۴	ZARDAK	<i>T. durum</i>	ایران- رقم زراعی
۲۹	AO ₂₉	<i>Ae. ovate</i>	ایران	۶۵	CRAS	<i>T. aestivum</i>	ایران- رقم زراعی
۳۰	AO ₃₀	<i>Ae. ovate</i>	ایلام - بدره	۶۶	NORA	<i>T. aestivum</i>	ایران - رقم زراعی
۳۱	AO ₃₁	<i>Ae. ovate</i>	ایلام- نرسیده به بدره	۶۷	SARDARI	<i>T. aestivum</i>	ایران- رقم زراعی
۳۲	TA ₃₂	<i>T. aestivum</i>	ایران- رقم زراعی	۶۸	PESHTAZ	<i>T. aestivum</i>	ایران- رقم زراعی
۳۳	TA ₃₃	<i>T. aestivum</i>	ایران- رقم زراعی	۶۹	NOSTOR	<i>T. aestivum</i>	ایران- رقم زراعی
۳۴	AC ₃₄	<i>Ae. crasse</i>	ایلام- بدره	۷۰	BAHAR	<i>T. aestivum</i>	ایران - رقم زراعی
۳۵	AC ₃₅	<i>Ae. crasse</i>	ایران (محل جمع‌آوری ناشناخته)	۷۱	TA ₇₁	<i>T. aestivum</i>	ایران- رقم زراعی
۳۶	AS ₃₆	<i>Ae. speltoides</i>	ایلام- آبدانان				

جدول ۲- مشخصات آغازگرهای اختصاصی مورد استفاده در این تحقیق

Table 2. Characteristic of specific primers used in this study

ردیف	آغازگر	۵' / ۳'	توالی	دمای اتصال (C°)	اندازه قطعات تکثیر (bp)	لوکوس / ژن
۱	SSR- F		CGCTCCCTGAAGAGAGAAAGAA	۵۲	۲۳۰ - ۲۶۵	Wx-A1a/b
	SSR- R		ATAGGCACAACCCCTAAC		۲۰۴	Wx-D1a/b
۲	MAG267- F		TCTTTTCGTCGTCACACATTC	۵۱	۸۵۴	Wx-B1a/b
	MAG267-R		AACTTGTCTTGGCGGG			



شکل ۱- ژن های تکثیر شده توسط پی سی آر چندگانه با استفاده از آغازگرهای SSR و MAG267
M- سایز مارکر، ۶۸- تریتیکوم آنسیتیوم، ۲- آزیلوپس تائوشی زیر گونه استرانگولاتا، ۶۰- تریتیکوم دوروم، ۵۶- تریتیکوم دوروم، ۶۵- تریتیکوم آنسیتیوم، ۳۲- تریتیکوم آنسیتیوم، ۱۹- آزیلوپس تریانسالیس، ۱۳- آزیلوپس تریانسالیس، ۵۳- تریتیکوم دیکوکودیس، ۵۸- تریتیکوم دوروم

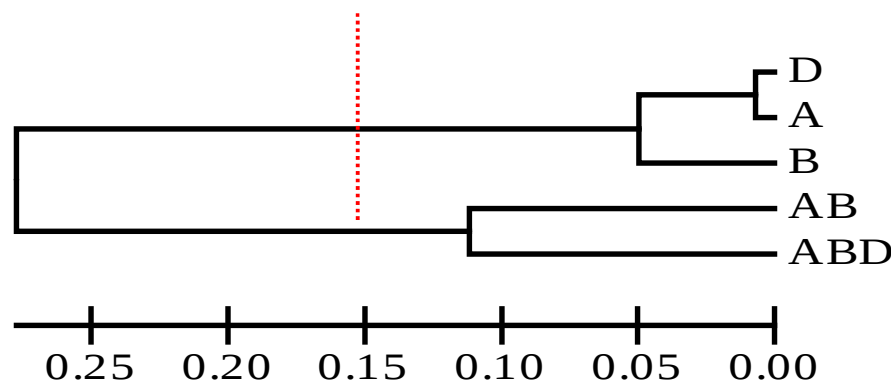
Figure 1. Genes amplified by multiple PCR using SSR and MAG267 primers M- Size Marker, 68- *Triticum aestivum*, 2- *Aegilops tauschii sub strangulate*, 60- *Triticum durum*, 56- *Triticum durum*, 65- *Triticum aestivum*, 32- *Triticum aestivum*, 19- *Aegilops triuncialis*, 13- *Aegilops triuncialis*, 53- *Triticum dicoccoides*, 58- *Triticum durum*

جدول ۳- مشخصات ژن های واکسی تکثیر شده با کمک پی سی آر چندگانه
Table 3. Specification of waxy genes amplify by multiple PCR

ژنوتیپ	باند های تکثیر شده توسط SSR (جفت باز)	باند های تکثیر شده توسط MAG267 (جفت باز)	باند های تکثیر شده توسط پی سی آر چندگانه (جفت باز)	نوع واکسی ایجاد شده
A.B.D.	۲۶۵، ۲۰۴، ۲۳۰/۲۶۵	۸۵۴	۲۳۰/۲۶۵، ۲۰۴، ۸۵۴	-
aaB.D.	۲۰۴، ۲۳۰	۸۵۴	۲۳۰، ۸۵۴، ۲۰۴	Wx-A
A.bbD.	۲۰۴، ۲۶۵، ۲۳۰/۲۶۵	-	۲۰۴، ۲۶۵، ۲۳۰/۲۶۵	Wx-B
AaB.dd	۲۳۰/۲۶۵، ۲۶۵	۸۵۴	۲۶۵، ۸۵۴، ۲۳۰/۲۶۵	Wx-D
Aabbdd	۲۶۵، ۲۳۰/۲۶۵	-	۲۶۵، ۲۳۰/۲۶۵	Wx-B, Wx-D
aaB.dd	۲۳۰	۸۵۴	۸۵۴	Wx-A, Wx-D
aabbD.	۲۰۴، ۲۳۰	-	-	Wx-A, Wx-B
aabbdd	۲۳۰	-	۲۳۰	Wx-A, Wx-B, Wx-D

ژن های واکسی A و D قرابت ژنتیکی بیشتری را با هم از لحاظ ژن های واکسی در مقایسه با ژنوم B دارند (شکل ۲). نتایج تجزیه به مولفه های اصلی (PCoA) نشان می دهد که صد درصد تغییرات توسط دو مولفه توجیه شد که مولفه اول ۷۴/۹۵ درصد تغییرات و مولفه دوم ۲۵/۰۵ درصد از تغییرات کل را توجیه نمود. نتایج بای پلات نیز بیان کننده این است که نمونه های دیپلوئید که دارای یک ژن واکسی هستند در یک طرف و نمونه های تتراپلوئید و هگزاپلوئید در طرف دیگر قرار گرفته اند به طوری که ژنوم A و D قرابت ژنتیکی بیشتری را از لحاظ ژن های واکسی با هم نشان دادند (شکل ۳).

دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه ای براساس روش UPGMA، نمونه های مختلف را بر اساس نوع ژن واکسی به دو گروه تقسیم نمود. در گروه اول نمونه های وحشی دارای ژنوم A، B و D که به ترتیب دارای ژن های واکسی A، B و D هستند، قرار گرفتند که همه این نمونه ها دیپلوئید هستند. گروه دوم شامل گندم های تتراپلوئید و هگزاپلوئید است که حداقل دارای دو یا سه ژن واکسی هستند که گندم های تتراپلوئید با ژنوم AB دارای دو ژن واکسی و گندم های نان هگزاپلوئید با ژنوم ABD دارای سه ژن واکسی A، B و D هستند (شکل ۲). همچنین نتایج خوشه بندی نشان داد که



شکل ۲- دندروگرام حاصل از آلل‌های تکثیر شده در ۵ گروه مختلف ژن
Figure 2. Dendrogram of amplified alleles in different populations



شکل ۳- نمودار دو بعدی پراکنش گروه‌های مختلف ژن‌های واکسی بر روی دو محور مختصات اصلی اول و دوم
Figure 3. Two dimensional plot distribution of different group based on waxy genes

تربیانسیالیس) استفاده شد که نتایج حاکی از تکثیر قطعه ۲۰۴ جفت بازی در ژنوم‌های M، C و U بود. این ژنوم‌ها نسبت به هم خویشاوند بوده و احتمالاً از اجداد آزیلوپس تائوشی دارای ژنوم D می‌باشند که از سوی دوراک و زنگ (۶) و وانگ و همکاران (۳۴) شناسایی شدند. مریمی و همکاران (۱۹) و اورتگا و همکاران (۲۶) نیز قبلاً نتایج مشابهی را گزارش کرده‌اند. لی و همکاران (۱۷) با شناسایی مولکولی ژن واکسی D1 در آزیلوپس تائوشی با استفاده از روش توالی‌یابی نشان دادند که توالی ژن واکسی D1 تمام جمعیت‌های گونه آزیلوپس در یک گروه و توالی ژن واکسی از گوجه و برنج در گروه دوم و توالی مربوطه در آراییدوبسیس و نخود در گروه سوم قرار گرفتند. آن‌ها هم چنین نشان دادند که توالی ژن واکسی جو شباهت زیادی به توالی ژن واکسی در گندم و گونه‌های آزیلوپس دارد. در مطالعات مختلف، گندم دیپلوئید وحشی تربیتیکوم اورارتو ($2n=2x=14$ AA) گونه بخشنده ژنوم A به شمار می‌رود که به گونه‌های هگزاپلوئید معرفی شده است (۲۳، ۱۵). در تحقیق حاضر بررسی ژن واکسی A1 در جمعیت‌هایی با ژنوم A نشان داد که آلل‌های ۲۳۰ و ۲۶۵ جفت بازی در گونه‌های تربیتیکوم بوئوتربیکوم تکثیر شدند که مبین این نکته است که ژن واکسی A از اینگونه به گندم‌های زراعی منتقل شده است و این نتایج با نتایج گازمن و همکاران (۱۱) و مریمی و همکاران (۲۰) مطابقت نداشت. همچنین به منظور شناسایی جد ژن واکسی B، جمعیت‌های آزیلوپس

کیفیت گندم نان یکی از فاکتورهای اصلی در برنامه‌های اصلاحی است که تحت کنترل ژنتیکی می‌باشد. پروتئین‌های واکسی (Wx-D1 و Wx-A1، Wx-B1) مسوول سنتز آمیلوز در دانه گندم‌های هگزاپلوئید بوده که یک فاکتور اصلی در کیفیت گندم به‌شمار می‌رود. امروزه روش‌های مختلفی هم چون توالی‌یابی، الکتروفورز یک بعدی و دو بعدی جهت شناسایی تنوع آلی ژن‌های واکسی مورد استفاده قرار می‌گیرد (۳۲). یاماموری و همکاران (۳۸، ۳۷) با استفاده از روش الکتروفورز یک بعدی چند شکلی بالایی را برای پروتئین‌های واکسی نشان دادند. گازمن و همکاران (۱۲) نیز در بررسی ژن‌های واکسی با استفاده از روش توالی‌یابی تنوع آلی بالایی را از این ژن‌ها گزارش نمودند که هرکدام از این روش‌ها نیازمند هزینه و صرف زمان طولانی می‌باشد. لذا، "پی سی ار" چندانکه با صرف کمترین هزینه و زمان قابلیت شناسایی آلل‌های مختلف را در تمامی نمونه‌ها دارد. همچنین با استفاده از لوکوس‌های این سه ژن می‌توان روابط فیلوژنتیکی در گونه‌ها و جمعیت‌های مختلف گندم را مطالعه نمود. تنوع در سطح نوکلئوتیدی ژن‌های واکسی بین جنس آزیلوپس و تربیتیکوم که ابزار مناسبی است، برای آنالیز روابط فیلوژنتیکی استفاده شده است و این نتایج با خاستگاه ژنوم B، A و D مطابقت داشته است (۲۳، ۲۲، ۹). در تحقیق حاضر، به منظور شناسایی ژن Wx-D1 از تعدادی گونه آزیلوپس دارای ژنوم U (آزیلوپس آملولاتا)، M (آزیلوپس کراسا) و CU (آزیلوپس

و به علت عواملی از جمله مهاجرت، گزینش، جهش و نوترکیبی دچار تغییر خواص ژنتیکی جمعیت شده‌اند. پیشنهاد می‌گردد که وضعیت آل‌های B1, A1 و D1 در سایر ارقام بومی، وحشی و تجاری که می‌توانند والد بخشنده این ژن محسوب شده و در برنامه‌های اصلاحی به کار رود، مورد ارزیابی قرار گیرد. همچنین با کمک جهش‌زایی و روش‌های مبتنی بر خاموشی ژن امکان تولید گندم‌هایی با محتوی اندک پروتئین واکسی بررسی گردد. کاربرد این تحقیق در واقع شناسایی گندم‌های واکسی و نیمه واکسی و نیز بررسی روابط فیلوژنتیکی بین گندم و اجداد آن‌ها بر اساس ژن‌های واکسی و استفاده از آن‌ها در برنامه‌های اصلاح کیفیت گندم می‌باشد.

دارای ژنوم S مورد مطالعه قرار گرفتند و نتایج بیان‌کننده رابطه بین ژن واکسی B1 با گونه‌هایی با ژنوم S بودند و نشان داد که احتمالاً آژیلوپس اسپلتوتیدس با ژنوم S از اجداد وحشی ژنوم B می‌باشد. اورتگا و همکاران (۲۶)، گازمن و همکاران (۱۱) نیز نتایج مشابهی در این رابطه گزارش نمودند. در بررسی پراکنش گروه‌های مختلف ژن‌های واکسی، ژن واکسی A با ژن واکسی D بیشترین شباهت را نشان داد که احتمالاً به دلیل روابط فیلوژنتیکی نزدیک بین جنس تربیتیکوم با جنس آژیلوپس باشد. پیترسون و همکاران (۲۷) نیز در بررسی روابط فیلوژنتیکی جنس آژیلوپس و تربیتیکوم شباهت نزدیک ژنوم A با ژنوم D را گزارش نمودند و اظهار داشتند که احتمال می‌رود این دو گونه اجداد مشترکی داشته‌اند

منابع

1. Ainsworth, C., J. Clark and J. Balsdon. 1993. Expression, organization and structure of the genes encoding the waxy protein (granule-bound starch synthase) in wheat. *Plant Molecular Biology*, 22: 67-82.
2. Caballero, L., E. Bancel, C. Debiton and G. Branlard. 2008. Granulebound starch synthase (GBSS) diversity of ancient wheat and related species. *Plant Breeding*, 127: 548-553.
3. Chao, S., P.J. Sharp, A.J. Worland, E.J. Warham, R.M.D. Koebner and M.D. Gale. 1989. RFLP-based genetic maps of wheat homologous group 7 chromosomes. *Theoretical and Applied Genetics*, 78: 495-504.
4. Doyle, J.J. and J.L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19: 11-15.
5. Dvorák, J., M.C. Luo and Z.L. Yang. 1998b. Restriction fragment length polymorphism and divergence in the genomic regions of high and low recombination in self-fertilizing and cross-fertilizing *Aegilops* species. *Genetics*, 148: 423-434.
6. Dvorák, J. and H.B. Zhang. 1992. Reconstruction of the phylogeny of the genus *Triticum* from variation in repeated nucleotide sequences. *Theoretical and Applied Genetics*, 84: 419-429.
7. Feldman, M. 2001. The origin of cultivated wheat. In: Bonjean AP, Angus WJ (eds) *The world wheat book. A history of wheat breeding*. Lavoisier Tech and Doc, Paris, pp: 3-56.
8. Fortune, P.M., K.A. Schierenbeck, A.K. Ainouche, J. Jacquemin, J.F. Wendel and M.L. Ainouche. 2007. Evolutionary dynamics of waxy and the origin of hexaploid *Spartina* species (*Poaceae*). *Molecular and Phylogenetic Evolution*, 43: 1040-1055.
9. Graybosch, R.A., K.J. Schemmerhorn and J.H. Skerritt. 1999. An Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Identification of Wheat Carrying Null Alleles at Genetic Loci Encoding the Granule-Bound Starch Synthase. *Cereal Science*, 30: 159-163.
10. Guzmán, C., L. Caballero and J.B. Alvarez. 2009. Variation in Spanish cultivated einkorn wheat (*Triticum monococcum* L. ssp. *monococcum*) as determined by morphological traits and waxy proteins. *Genetics Resources and Crop Evolution*, 56: 601-604.
11. Guzmán, C. and J.B. Alvarez. 2012. Molecular characterization of a novel waxy allele (*Wx-Au1a*) from *Triticum urartu* Thun. *exGandil*. *Genetics Resources and Crop Evolution*, 59: 971-979.
12. Guzmán, C., L. Caballero, M. Yamamori and J.B. Alvarez. 2012b. Molecular characterization of a new waxy allele with partial expression in spelt wheat. *Planta*, 235: 1331-1339.
13. Ingram, A.L. and J.J. Doyle. 2003. The origin and evolution of *Eragrostis* (*Poaceae*) and related polyploids: evidence from nuclear waxy and plastid rps16. *American Journal of Botany*, 90: 116-122.
14. James, M.G., K. Denyer and A.M. Myers. 2003. Starch synthesis in the cereal endosperm. *Current Opinion in Plant Biology*, 6: 215-222.
15. Johnson, B. 1975. Identification of the apparent B-genome donor of wheat. *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, 17: 21-39.
16. Kiribuchi-Otobe, C., T. Nagamine, T. Yanagisawa, M. Phnishi and I. Yamaguchi. 1997. Production of hexaploid wheats with waxy endosperm character. *Cereal Chemistry journal*, 74: 72-74.
17. Li, W., Z. Gao, W. Xiao, Y.M. Wei, Y.X. Liu, G.Y. Chen, Z.E. Pu, H.P. Chen and Y.L. Zheng. 2012. Molecular diversity of restriction enzyme sites, Indels and upstream open reading frames (uORFs) of 50 untranslated regions (UTRs) of Waxy genes in *Triticum* L. and *Aegilops* L. species. *Genetics Resources and Crop Evolution*, 59: 1625-1647.
18. Long-Dou, L., H. Cai-Ling, C. Long, Y. Gui-Hong, D. Chuan-Liang, G. Wu-Jun1, Y. Xu-Qin and T. Guang-Xuan. 2009. Molecular identification on Waxy genes in wheat using multiple-PCR. *Hereditas* (Beijing), 31: 844-848.
19. Maryami, Z., A. Fazeli and A.A. Mehrabi. 2014a. Identification of Variation for Wx- D Genome in Wheat and Its Ancestor. *Advances in Environmental Biology*, 8: 2012-2016.
20. Maryami, Z., A. Fazeli and A.A. Mehrabi. 2014b. Investigation of diversity of Waxy- A1 gene using amplification in different species in A genome wheat's. *Advances in Environmental Biology*, 8: 2004-2007.

21. Mason-Gamer, R.J., C.F. Weil and E.A. Kellogg. 1998. Granule-bound starch synthase: structure, function, and phylogenetic utility. *Molecular biology and evolution*, 15: 1658-1673.
22. Mason-Gamer, R.J. 2001. Origin of North American *Elymus* (*Poaceae: Triticeae*) allotetra ploid based on granule bound starch synthase gene sequences. *Systematic Botany*, 26: 757-768.
23. Miller, T.E. 1987. Systematic and evolution. In: Lupton FGH (ed) *Wheat breeding: its scientific basis*. Chapman and Hall, London, pp: 1-30.
24. Nakamura, T., P. Vrinten, M. Saito and M. Konda. 2002. Rapid classification of partial waxy wheats using PCR-based markers. *Genome*, pp: 1150-1156.
25. Nakamura, T., M. Yamamori, H. Hirano and S. Hidaka. 1995. Production of waxy (amylose-free) wheats. *Molecular and General Genetics*, 248: 253-259.
26. Ortega, R., J.B. Alvarez and C. Guzman. 2013. Characterization of the *Wx-* gene in diploid *Aegilops* species and its potential use in wheat breeding. *Genetics Resources and Crop Evolution*, pp: 369-382.
27. Petersen, G., S. Ole, Y. Merete and B. Kasper. 2006. Phylogenetic relationships of *Triticum* and *Aegilops* and evidence for the origin of the A, B and D genomes of common wheat (*Triticum aestivum*). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 39: 70-82.
28. Saito, M., P. Vrinten and T. Nakamura. 2010. DNA Markers for Identifying Waxy Mutations and Improving Noodle Quality in Wheat. *Japan International Research Center for Agriculture Science*, 44:109-115.
29. Shariflou, M.R. and P.J. Sharp. 1999. A polymorphic microsatellite in the 3' end of 'waxy' genes of wheat, *Triticum aestivum*. *Plant Breeding*, 118: 275-277.
30. Shariflou, M.R., M.E. Hassani, G. Good and P.J. Sharp. 2003. Tightly linked DNA markers for the waxy loci in bread wheat. *Tenth International Wheat Genetics Symposium*, 2: 831-834.
31. Van Slageren, M.W. 1994. Wild wheats: a monograph of *Aegilops* L and *Amblyopyrum* (Jaub and Spach) Eig.(*poaceae*), Agricultural University Wageningen: the Netherland.ICARDA: Aleppo, Syria, pp: 7-512.
32. Tsunewaki, K. and Y. Ogiwara. 1983. The Molecular basis of genetic diversity among cytoplasm of *Triticum* and *Aegilops* species. 11. On the origin of polyploidy wheat cytoplasm's as suggested by chloroplast DNA restriction fragment patterns. *Genetics*, 104: 155-171.
33. Vanzetti, L.S., L.A. Pfluger, M. Rodriguez-Quijano, J.M. Carrillo and M. Helguera. 2009. Genetic variability for waxy genes in Argentinean bread wheat germplasm. *Electronic Journal of Biotechnology*, 12: 1-9.
34. Wang, S., X. Li, K. Wang, X. Wang, S. Li, Y. Zhang, G. Guo, F.J. Zeller, S.L.K. Hsam, Y. Yan and P. Gustafson. 2011. Phylogenetic analysis of C, M, N, and U genomes and their relationships with *Triticum* and other related genomes as revealed by LMW-GS genes at Glu-3 loci. *Genome*, 54: 273-284.
35. Yamamori, M., T. Nakamura, T.R. Endo and T. Nagamine. 1994. Waxy protein deficiency and chromosomal location of coding genes in common wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 89: 179-184.
36. Yamamori, M. 2009. Amylose content and starch properties generated by five variant *Wx* alleles for granule-bound starch synthase in common wheat (*Triticum aestivum* L.). *Euphytica*, 165: 607-614.
37. Yamamori, M. and K. Yamamoto. 2011. Effects of two novel *Wx-A1* alleles of common wheat (*Triticum aestivum* L.) on amylose and starch properties. *Journal of Cereal Science*, 54: 229-235.
38. Yamamori, M., T. Nakamura and T. Nagamine. 1995. Poly morphism of two waxy proteins in the emmer group of tetraploid wheat, *Triticum dicoccoides*, *T. dicoccum*, and *T. durum*. *Plant Breeding*, 114: 215-218.
39. Yamamori, M., T. Nakamura, T.R. Endo and T. Nagamine. 1994. Waxy protein deficiency and chromosomal location of coding genes in common wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 89: 179-184.
40. Yan, L., M. Bhave, R. Fairclough, C. Konik, S. Rahman and R. Appels. 2000. The genes encoding granule-bound starch synthases at the waxy loci of the A, B and D progenitors of common wheat. *Genome*, 43: 264-272.
41. Yan, L. and M. Bhave. 2001. Characterization of waxy proteins and waxy genes of *Triticum timopheevii* and *T. zhukovskyi* and implications for evolution of wheat. *Genome*, 44: 582-588.
42. Zeng, M., C.F. Morris, I.L. Batey and C.W. Wrigley. 1997. Sources of variation for starch gelatinization, pasting and gelation properties in wheat. *Cereal Chemical*, 74: 63-71.

Evaluation of Phylogenetic Relationships for Waxy Genes in Wild and Cultivated Wheat using Multiplex-PCR

Zahra Maryami¹, Arash Fazeli² and Ali Ashraf Mehrabi³

1 and 3- Gradated M.Sc. and Assistant Professor, Ilam University

2- Assistant Professor, Ilam University (Corresponding author: a.fazeli@ilam.ac.ir)

Received: December 29, 2014

Accepted: March 1, 2015

Abstract

Waxy proteins are responsible for amylase synthesis in wheat seeds, being encoded by three waxy genes (*Wx-A1*, *Wx-B1* and *Wx-D1*) in hexaploid wheat which have an important role in starch quality. The purpose of this study was to investigate phylogenetic relationship between waxy genes in wild and cultivated wheat using Multiplex-PCR. To this end, 71 populations from 8 *Aegilops* and 4 wheat wild spices 'were studied. Clustering results showed that the samples were divided in two main groups. Diploid samples with A, B and D genomes located in the same group but tetra and hexaploid wheat located in the other group. Also, Biplot results showed that *Aegilops* with A and D genomes had the greatest genetic affinity for waxy genes. Multiplex-PCR technique is able to identify three waxy genes simultaneously in different populations of wheat which contributed substantially to breeder in cost and time.

Keywords: Amylose, Multiplex-PCR, Phylogenetic relationships, Waxy Genes