دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشنامه اصلاح گیاهان زراعی

"مقاله پژوهشی"

بررسی تنوع نوکلئوتئیدی ژن واکسی *B* در برخی گندم‌های زراعی و وحشی

مریم کارونی[۱] و آرش فاضلی[۲]

۱- دانشجوی دکتری اصلاح نباتات، مهندسی ژنتیک، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ایلام، ایران
۲- دانشیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ایلام، ایران، (نویسنده مسوول: a.fazeli@ilam.ac.ir)

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۲/۱۲ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۸/۱۱
صفحه: ۵۳ تا ۶۲

چکیده مبسوط

مقدمه و هدف: ارتقاء کیفیت گندم نان موضوع مهمی است که سالیان سال ذهن محققان زیادی را به خود جلب کرده است که در چند دهه اخیر روش‌های مختلفی برای ارزیابی این هدف توسعه یافته است. یکی از مهمترین اهداف در برنامه‌های اصلاحی گندم، اصلاح برای کیفیت نانوایی گندم می‌باشد. پروتئین‌های واکسی که مسئول بیان آنزیم GBSS در گندم هستند نسبت آمیلوز به آمیلوپکتین را در نشاسته کنترل می‌کنند، این پروتئین‌ها در گندم‌های هگزاپلوئید توسط سه ژن $Wx\text{-}A_1$,$Wx\text{-}B_1$, $Wx\text{-}D_1$ کنترل می‌شوند و نقش کلیدی در کیفیت آرد گندم دارند . هدف از این تحقیق بررسی تنوع نوکلئوتیدی ژن $Wx\text{-}B_1$ در ارقام زراعی و وحشی و نیز بررسی روابط فیلوژنتیکی بین گندم و اجداد آنها بر اساس ژن‌های واکسی می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در مطالعه حاضر روابط فیلوژنتیکی ژن $Wx\text{-}B_1$ در ۳۴ نمونه شامل ۴ گونه آژیلوپس و ۲۸ رقم گندم زراعی و ۲ گونه گندم وحشی در دانشگاه ایلام با استفاده از تکنیک PCR و توالی‌یابی مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج هم‌ردیف‌سازی توالی‌ها برای ژن $Wx\text{-}B\text{-}seq_1$ و $Wx\text{-}B\text{-}seq_2$ نشان داد که نواحی حفاظت شده بسیار بالایی بین گندم‌های زراعی و وحشی وجود دارد، هر چند در برخی نواحی تنوع تک نوکلئوتیدی بین گندم‌های زراعی و وحشی وجود دارد، نتایج ماتریس تشابه ژن $Wx\text{-}B\text{-}seq_1$ نشان داد که بیشترین فاصله مربوط به رقم سرداری و کمترین فاصله مربوط به نمونه Aegilops.umbellulata بود. ماتریس تشابه ژن $Wx\text{-}B\text{-}seq_2$ نشان داد که این ژن در ارقام زراعی بجز شاهی تغییرات چندانی ندارد، در حالی که دو نمونه گندم وحشی T.boeticum و T.dicoccooides فاصله ژنتیکی خیلی زیادی را در مقایسه با ارقام زراعی نشان می‌دهند. نتایج ماتریس جایگزینی برآورد حداکثر درست‌نمایی برای ژن‌های $Wx\text{-}B\text{-}seq_1$ و $Wx\text{-}B\text{-}seq_2$ نشان داد که بیشترین و کمترین سهم جانشینی نوکلئوتیدی به‌ترتیب از نوع پورینی و پیریمیدنی می‌باشد. همچنین، نتایج خوشه‌بندی با روش UPGMA برای ژن‌های $Wx\text{-}B\text{-}seq_1$ و $Wx\text{-}B\text{-}seq_2$ نمونه‌ها را به‌ترتیب به دو گروه و سه گروه اصلی تقسیم نمود.

نتیجه‌گیری: نتایج کلی نشان می‌دهد که تنوع مشاهده شده در نمونه‌های وحشی و اجداد گندم‌های زراعی می‌تواند کاندیدای خوبی جهت بررسی مطالعات بعدی باشد که آیا این تغییرات منجر به محتوای پروتئینی خواهد شد یا خیر؟

واژه‌های کلیدی: آمیلوز، توالی‌یابی، ژن واکسی، کیفیت، گندم

مقدمه

گندم نان (*Triticum aestivum*) مهمترین محصول زراعی در سراسر دنیا می باشد که برای ۲/۵ میلیون نفر از مردم جهان در ۸۹ کشور غذایی اصلی محسوب می‌شود (۹). امروزه با افزایش آگاهی مصرف‌کنندگان، تقاضا برای گندم‌هایی با کیفیت بالا زیاد شده است (۴۲). یکی از مهمترین ترکیبات دانه گندم نشاسته می‌باشد که حدود ۶۵ تا ۷۵ درصد وزن خشک دانه را شامل می‌شود که از دو پلی ساکارید آمیلوز و آمیلوپکتین تشکیل شده است (۴۱). گندم حاوی ۸۰-۷۰٪ آمیلوپکتین و ۳۰٪-۲۰ آمیلوز می‌باشد (۱۴). تفاوت نسبت آمیلوز به آمیلوپکتین، منجر به تفاوت در ساختار گرانولی نشاسته، خصوصیات فیزیکوشیمیایی و کیفیت محصول نهایی خواهد شد (۱۵،۳۳). جهت تشکیل گرانول‌های نشاسته، حضور آمیلوز ضروری نیست و ساختار اولیه گرانول‌ها به دلیل تا خوردن مولکول‌های آمیلوپکتین شکل می‌گیرد. اگر نشاسته در دمای معمولی در محیط آبی قرار گیرد در آب حل نمی شود، اما گرانول‌های آن تا ۵۰٪ وزن خود را آب جذب و متورم می‌شوند. در اثر حرارت، نشاسته در آب حل و گرانول‌های آن تخریب می‌شوند و در این حالت مولکول‌های آمیلوز وارد فضای بین گرانولی شده و با ایجاد شبکه‌ای تار مانند در فضای بین گرانول‌ها باعث حفظ آب و افزایش غلظت محلول می‌شوند که به این پروسه اصطلاحاً ژلاتینی‌شدن نشاسته گفته می‌شود. تشکیل این لایه ژلاتینی در پروسه پختن محصولات نشاسته‌ای حجیم و یا نرم مانند نان و کیک، باعث پراکندگی و حفظ آب در سراسر فراورده شده و تازگی و تردی آن را حفظ می‌کند (۳). در اثر گذشت زمان و سرد شدن نشاسته، پلی‌ساکاریدهای عامل ژلاتینی شدن دوباره به هم پیوسته و حالتی پایدار پیدا می‌کنند، به این فرایند رتروگرسیون(Retrogradation) گفته می‌شود. در این حالت شبکه تار مانند ایجاد شده در فرایند ژلاتینی شدن از بین رفته و قابلیت نگهداری آب در فضای بین گرانول‌ها کم می‌شود. با آزاد شدن آب موجود در بافت فراورده‌ها و انتقال آن به سطح محصول، نرمی و تازگی آن بسیار کاهش می‌یابد که اصطلاحا گفته می‌شود فراورده مانده شده است. در پروسه رتروگرسیون، ابتدا مولکول‌های آمیلوز طی چند ساعت با تشکیل یک مارپیچ دوگانه، ساختارهای کریستالی پایداری بوجود می‌آورند. کریستالی شدن شاخه‌های جانبی آمیلوپکتین بسیار آهسته انجام می‌شود و ممکن است چند روز تا چند هفته نیز طول بکشد (۳،۷) و در واقع ویژگی‌های نشاسته همچون چسبندگی گلاتین و ژلانتینه شدن به نسبت آمیلوز به آمیلوپکتین بستگی دارد. در مجموع لیپیدها و پروتئین‌ها با گرانول‌های متصل به نشاسته ارتباط دارند که مهمترین پروتئین‌های گرانول متصل به نشاسته پروتئین‌های واکسی هستند که یک آنزیم کلیدی برای سنتز آمیلوز در دانه گندم می‌باشند (۲۷). ژن‌های واکسی تولید ایزوفرم‌های مختلف پروتئین‌های واکسی یا GBBS[1] را کنترل می‌کنند (۳۲،۳۵). این پروتئین‌ها از اصلی‌ترین آنزیم‌های موثر در سنتز آمیلوز در آندوسپرم گیاهان می‌باشند و هرگونه جهشی در مکان ژنی آنها باعث عدم تولید یا کاهش فعالیت این پروتئین‌ها می‌شود که بر محتوای آمیلوزی نشاسته

1- Granule bound starch synthase

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-08]

[DOI: 10.52547/jcb.14.42.53]

اثر گذاشته و باعث تولید نشاسته‌هایی با آمیلوز اندک یا بدون آمیلوز می‌گردد (۳۳). لذا می‌توان کیفیت آرد گندم را با تغییر در نسبت پلی ساکاریدهای آمیلوز و آمیلوپکتین ارتقا بخشید که در واقع متأثر از تنوع پروتئین‌های واکسی می‌باشد که نقش اساسی در سنتز آمیلوز ایفا می‌کنند (۲۸). گندم نان معمولی دارای۳ ژن واکسی است که ژن $Wx\text{-}A_1$ بر روی کروموزوم شماره ۷ ژنوم A(7A)، ژن$Wx\text{-}B_1$ بر روی کروموزوم شماره ۴ ژنوم B(4B) و ژن$Wx\text{-}D_1$ برروی کروموزوم شماره ۷ ژنوم D(7D) قرار دارند (۲،۱۵،۱۶،۲۷). عدم وجود هریک از ایزوفرم‌های GBSS به غیرفعال بودن مکان ژنی آن نسبت می‌دهند و آن را اصطلاحاً نول[1] می‌خوانند، واژه واکسی به معنای موم می‌باشد و اصطلاح واکسی بودن نشاسته در رابطه با گیاهانی بکار می‌رود که نشاسته آنها فاقد آمیلوز بوده و یا نسبت آمیلوز به آمیلوپکتین در آنها بسیار پایین است. اصلاح برای کیفیت نانوایی گندم، یکی از مهمترین اهداف در برنامه‌های اصلاحی گندم است که تحت کنترل ژنتیکی این سه ژن می‌باشد (۱۱). اولین گندم تمام واکسی توسط ناکامورا و همکاران (۲۶) با استفاده از تلاقی کلاسیک بین ارقام نیمه واکسی بای هوئو (دارای آلل $Wx\text{-}D_b$) و کانتو ۱۰۷ (دارای آل‌های $Wx\text{-}B_{1b}$و $Wx\text{-}A_{1b}$) تولید شد که هیچ یک از ایزوفرم‌های GBSS در آن وجود نداشت در نتیجه نشاسته آن نیز فاقد آمیلوز بود (۲۶). پاسویی و همکاران (۲۹) نیز با استفاده از جهش‌زایی EMS[2] در مکان ژن$Wx\text{-}D$ رقم کانتر ۱۰۷، موفق به تولید رقم تمام واکسی شدند. ماریانا و همکاران (۲۱) دریافتند که معمولا پلی‌مورفیسم در ژن‌های واکسی از طریق شناسایی SNPها[3] و درج و حذف نوکلوتیدها در اینترون‌ها مشخص می‌شود. وی و همکاران (۳۹) دای و همکاران (۴) در بررسی فیلوژنتیکی ژن Wx-B، دریافتند که گونه دیپلوید آژیلوپس تائوشی از منابع مهم ژنتیکی این ژن می‌باشند. کین و همکاران (۳۱) نشان دادند که نقش ژن‌های واکسی در کاهش محتوای آمیلوز به‌صورت Wx-B>Wx-A>Wx-D می‌باشد و این ژن‌ها اثرات جزیی در بیوسنتز آمیلوپکتین دارند و احتمالاً Wx-B نقش بیشتری را در سنتز آمیلوز نسبت به دو ژن دیگر ایفا می‌کند. دینگ و همکاران (۶) با استفاده از QTL[4] موقعیت ژنهای واکسی را بر روی کروموزم‌های 7A,4B,7D شناسایی کردند. لی و همکاران (۱۸) در بررسی SNPهای ژن Wx-B دریافتند که جایگزینی اسیدآمینه سرین به آسپاراژین مانع تولید پروتئین Wx-B و باعث ایجاد آلل نول می شود. لو و همکاران (۲۰) با استفاده از EMS در گندم در جایگاه G2168A با غیرفعال‌سازی پروتئین‌های ژن Wx-A و در نتیجه کاهش آمیلوز باعث افزایش کیفیت گندم‌های مورد مطالعه شدند. لیو و همکاران (۱۹) با استفاده از SDS-PAGE[5] و توالی‌یابی و شناسایی3SNP در اولین اگزون در Wx-A و 6SNP در Wx-B و یک جهش حذفی در اگزون چهارم که منجر به کدون توقف زودرس شد، آلل‌های نول را در این ژن‌های واکسی شناسایی کردند. عبدی‌پور (۱) در بررسی پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر برای آلل‌های واکسی در ژنوتیپ‌های گندم نان سه ژنوتیپ با آلل جهش یافته $Wx\text{-}A_{1b}$ و هفت ژنوتیپ با آلل جهش‌یافته $Wx\text{-}B_{1b}$ شناسایی کرد. مریمی و همکاران (۲۴) در بررسی ۱۶۰ رقم گندم ایرانی نشان دادند که یک آلل نول $Wx\text{-}D_{1b}$ در ناحیه CWI 67665 و دو آلل نول $Wx\text{-}B_{1x}$ در ناحیه CWI 67747 و CWI 57684 وجود دارد. وانزتی (۳۹) در بررسی تنوع آللی ژن‌های واکسی در ۱۰۳ رقم گندم نان آرژانتینی برای ژن Wx-B سه آلل $Wx\text{-}B_{1a}$، $Wx\text{-}B_{1b}$، $Wx\text{-}B_1$ و برای ژن Wx-D تنها یک آلل $Wx\text{-}D_{1a}$ گزارش دادند. گازمن و همکاران (۱۲) در بررسی ۱۰۳ رقم گندم مکزیکی نشان دادند که آلل نول برای ژن Wx-A تنها به صورت $Wx\text{-}A_{10}$ می‌باشد که شامل حذف قسمتی از اگزون انتهایی ژن بود و برای ژن Wx-B نیز آلل نول $Wx\text{-}B_{1b}$ شناسایی شد که شامل حذف 67kb از ژن بود، همچنین حذف یک سیتوزین در دومین اگزون باعث تغییر چارچوب خواندن (ORF[6]) شده است. بی‌همتا و همکاران (۲) در بررسی۱۰۰ رقم تجاری گندم ایران به‌همراه یک رقم دابل هاپلوئید واکسی نشان دادند که در مکان ژنی $Wx\text{-}B_1$ ۵٪ ژنوتیپ‌ها یعنی ارقام AZ-landrace8، نوید ، کرج ۳، آرتا، شعله، حامل آلل جهش یافته واکسی بودند. در مکان ژنی $Wx\text{-}A_1$ فقط ۲٪ از ژنوتیپ‌ها یعنی ارقام آرتا و AZ-landrace2 حامل آلل واکسی بودند. در مکان $Wx\text{-}D_1$ تمام ارقام حامل آلل طبیعی بوده و هیچ ژنوتیپ واکسی یافت نشد. مریمی و همکاران (۲۲) در بررسی آلل نول در جایگاه $Wx\text{-}B_1$در ۱۷رقم گندم زراعی نشان دادند که ارقام دارای آلل طبیعی ($Wx\text{-}B_{1a}$) قطعه ۷۷۸ جفت باز و تنها ارقام تستر و بهار دارای آلل نول ($Wx\text{-}B_{1b}$) ۶۶۸ جفت باز بودند. شهریاری و همکاران (۳۶) در بررسی چند شکلی ژن‌های $Wx\text{-}B_1$ و$Wx\text{-}A_1$ و اثر جهش‌های آنها بر ساختار آنزیم GBSS در۲۰ نمونه از ارقام تتراپلوئید و هگزاپلوئیدی ایرانی نشان دادند که در مکان ژن $Wx\text{-}B_1$ جهشی ایجاد نشده است، اما برای مکان ژن $Wx\text{-}A_1$ چندین جهش در گونه‌های هاموند و الوند مشخص شد و با کمک توالی‌یابی و بررسی بیوانفورماتیکی اثر جهش‌های شناخته شده این دو رقم به عنوان گزینه‌های اصلی حامل آلل نول برای $Wx\text{-}A_1$ معرفی کردند. شاهسوند (۳۸) حضور یا عدم حضور ژن واکسی را در ارقام گندم با PCR وSDS-PAGE بررسی نمود و نشان داد که ارقام سرداری، سبلان و هیرمند در ژن $Wx\text{-}B_1$ بصورت نول بودند که میزان کیفیت نشاسته در آنها نسبت به سایر ارقام بالاتر بود. پتروا و همکاران(۳۰) در بررسی ۳۸ رقم گندم از نظر حضور آلل واکسی، نشان دادند که تمام ارقام مورد مطالعه حامل آللهای طبیعی در هرسه مکان ژنی مورد نظر بودند. اورتگا و همکاران (۲۸) با بررسی ویژگی‌های ژن واکسی در گونه های آژیلوپس و مقایسه توالی نوکلوتیدی آن با گندم، توانستند ۱۹ آلل جدید را در ژن $Wx\text{-}B_1$ و $Wx\text{-}D_1$ شناسایی کنند. برای شناسایی ارقام واکسی می‌توان بر اساس روش ناکامورا و همکاران (۲۵) آنزیم GBSS را استخراج و با کمک روش SDS -PAGE وضعیت آن آنزیم را مطالعه کرد که در این حالت نول بودن هر یک از آلل‌ها منجر به عدم حضور یا تغییر جایگاه مورد انتظار لکه پروتئینی مربوط به آن

1- Null 2- Ethyl Methane Sulfonate 3- Single nucleotide polymorphism 4- Quantitative trait locus
5- Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis 6- Open reading frame

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-08]
[DOI: 10.52547/jcb.14.42.53]

می‌گردد. همچنین می‌توان از روش های مبتنی بر نورسنجی پرتو قرمز دور جهت طبقه‌بندی گندم‌های دوروم بر اساس وضعیت ژن‌های واکسی آنها، استفاده نمود (۵). تحقیقات مربوط به کیفیت نانوایی گندم از آنجایی اهمیت می‌یابد که بهبود کیفیت نانوایی خود یکی از روش‌های افزایش بهره‌وری در تولید گندم است (۳۷). کیفیت نان از لحاظ اقتصادی، اجتماعی، فرهنگی و سیاسی بسیار مهم می‌باشد، هرچند که دولت‌ها موفق شده اند ثبات عرضه نان را حفظ کند، لیکن در زمینه جلوگیری از ضایعات نان موفقیتی بدست نیاورده‌اند. بنابراین ارتقا کیفیت و ماندگاری نان مسئله‌ای بسیار مهمی است که در چند دهه اخیر از روش‌های مختلفی برای این منظور استفاده شده است. لذا غربالگری منابع ژنتیکی و شناسایی آلل‌های جدید ژن‌های موثر بر محتوای نشاسته از جمله ژن واکسی که بر روی کیفیت آرد تاثیر دارند، ضروری به نظر می‌رسد. لذا هدف از این تحقیق بررسی تنوع نوکلئوتیدی ژن‌های واکسی B در جمعیت‌های مختلف زراعی و وحشی و نیز بررسی روابط فیلوژنتیکی بین گندم و اجداد آنها بر اساس ژن‌های واکسی می‌باشد. به همین منظور علاوه بر ارقام زراعی از نمونه‌های وحشی گندم و گونه‌های آژیلوپس که خزانه مهم ژنی برای گندم و نیز منبع مهمی برای تنوع ژن‌های واکسی جدید با فعالیت آنزیمی متفاوت بوده استفاده شده است تا بتوان از آنها در برنامه‌های اصلاحی به‌منظور بهبود کیفیت آرد استفاده نمود.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشگاه ایلام انجام گرفت، مواد گیاهی مورد بررسی در این پژوهش ژنوتیپ‌های وحشی و ارقام زراعی شامل ۴ گونه آژیلوپس، ۲۸ رقم گندم زراعی و ۲ گونه گندم وحشی (در مجموع ۳۴ نمونه) از بخش تحقیقات غلات موسسه اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج تهیه گردید. لیست این ارقام زراعی و وحشی در جدول ۱ ذکر شده است . ابتدا بذور در گلدان‌های کوچک در شرایط گلخانه‌ای کشت و در مرحله ۴-۳ برگی نمونه‌های برگی جمع‌آوری و برای آنالیزهای بعدی در نیتروژن مایع در دمای ۱۹۶- درجه نگهداری شدند.

استخراج DNA ژنومی

استخراج DNA ژنومی از برگ‌های گیاهچه با استفاده از روش CTAB براساس دستورالعمل دویل و همکاران (۷) با اندکی تغییرات استخراج گردید. کمیت و کیفیت DNA استخراج شده روی ژل آگارز ۰/۸٪ با روش اسپکتروفتومتری و در طول موج‌های ۲۶۰ تا ۲۸۰ نانومتر بررسی و نمونه‌های DNA برای ۱۰۰ نانوگرم در میکرولیتر با استفاده از آب مقطر دوبار تقطیر شده رقیق شدند.

بهینه‌سازی شرایط PCR با آغازگر اختصاصی

ژن واکسی B با کد دسترسی (LC379885) در پایگاه اطلاعات زیست فناوری (NCBI) دارای ۱۱ اگزون و ۱۰ اینترون است که دو جفت پرایمر اختصاصی با استفاده از نرم‌افزار OLigoprimer3 (https://primer۳.ut.ee/) از اگزون‌های ۶ و ۱۱ طراحی شدند تا این ناحیه را بین نمونه‌های مورد بررسی تکثیر نمایند. بطوری که طول پرایمر ۲۲-۱۸ نوکلئوتید، محتوی G+C بین ۴۵ تا ۶۰ درصد، عدم وجود پرایمر دایمر و حداکثر اختلاف دما بین آغازگرهای رفت و برگشت دو درجه در نظر گرفته شد. دو جفت پرایمر اختصاصی (جدول ۲) طراحی و توسط شرکت سینا ژن سنتز شدند. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (جدول۳) 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 پلیمراز (۵ واحد) و در نهایت ۱۳/۹میکرولیتر آب دو بار تقطیر شده، انجام شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در دستگاه ترموسایکلر با برنامه زمانی به شرح جدول (۴) انجام گرفت، قطعات DNA تکثیر شده با استفاده از الکتروفروز روی ژل آگارز ۱/۵٪ در بافر TAE, 1X تفکیک و برای رنگ‌آمیزی ژل از محلول اتیدیوم بروماید استفاده شد. نمونه‌ای از ژن‌های تکثیر شده توسط PCR در شکل (۱) نشان داده شده است. ۵۰ میکرولیتر از محصولات PCR خالص‌سازی شده به همراه ۴۰ میکرولیتر از هر آغازگر به شرکت سیناکلون جهت توالی‌یابی فرستاده شد، کیفیت داده‌های حاصل از توالی‌یابی در پایگاه‌های اطلاعاتی NCBI در مقابل نمونه‌های موجود بررسی و میزان همپوشانی و تشابه توالی‌ها مشخص شد. سپس توالی‌های به دست آمده با استفاده از نرم‌افزارهای BioEdite 7.2.5 جهت هم ردیف‌سازی توالی‌ها، MEGA X 10.0.5 برای محاسبه ماتریس تشابه ژنتیکی و میزان جایگزینی نوکلئوتیدی و ترسیم درخت فیلوژنتیکی استفاده گردید.

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

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

ردیف	نام علمی	نوع	ردیف	نام علمی	نوع	ردیف	نام علمی	نوع
۱	T.aestivum spp Sardari	زراعی	۱۳	T.aestivum spp Sabalan	زراعی	۲۵	T.aestivum spp Rejav	زراعی
۲	T.aestivum spp Pishgam	زراعی	۱۴	T.aestivum spp Bahar	زراعی	۲۶	T.aestivum spp Zareh	زراعی
۳	T.aestivum spp Sirvan	زراعی	۱۵	T.aestivum spp Bezostaya	زراعی	۲۷	T.aestivum spp Khazar	زراعی
۴	T.aestivum spp Einia	زراعی	۱۶	T.aestivum spp Atrak	زراعی	۲۸	T.aestivum spp Toss	زراعی
۵	T.aestivum spp kohdasht	زراعی	۱۷	T.aestivum spp Crasssabalan	زراعی	۲۹	Aegilops.tauschii	وحشی
۶	T.aestivum spp Saji	زراعی	۱۸	T.aestivum spp Parseh	زراعی	۳۰	Triticum.dicoccoides	وحشی
۷	T.aestivum spp Dehdasht	زراعی	۱۹	T.aestivum spp Mehan	زراعی	۳۱	Aegilops.triuncialis	وحشی
۸	T.aestivum spp Shahi	زراعی	۲۰	T.aestivum spp Arya	زراعی	۳۲	Aegilops.umbellulata	وحشی
۹	T.aestivum spp Tajan	زراعی	۲۱	T.aestivum spp Shiraz	زراعی	۳۳	Triticum.baeoticum	وحشی
۱۰	T.aestivum spp Saivan	زراعی	۲۲	T.aestivum spp Dena	زراعی	۳۴	Aegilops.crassa	وحشی
۱۱	T.aestivum spp Behrang	زراعی	۲۳	T.aestivum spp Chamran	زراعی			
۱۲	T.aestivum spp Azadi	زراعی	۲۴	T.aestivum spp Ghabos	زراعی			

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-08]
[DOI: 10.52547/jcb.14.42.53]

جدول ۲- مشخصات آغازگرهای اختصاصی مورد استفاده در این تحقیق

Table 2. Characteristic of specific primers used in this study

نام پرایمر	توالی	دمای اتصال C	اندازه قطعه تکثیری (bp)	تعداد نوکلئوتید
Wx-B-seq$_1$	F_1:5' CGTTCTGCATCCACAACATC 3' R_1:5' CAGCCGCTCAAACTTCTTCT 3'	۶۵	۷۳۸	۲۰
Wx-B-seq$_2$	F_2:5' CACCGGGAAGAAGAAGTTTG 3' R_2:5' ACACCCAGTTCCAAAAGCAC 3'	۶۵	۷۷۰	۲۰

جدول ۳- اجزاء واکنش با آغازگرهای مربوطه PCR

Table 3. PCR with related primers

اجزاء واکنش	غلظت	حجم در25µL
آب مقطر استریل	–	13.9µL
بافر PCR	10X	2.5µL
MgCl2	20mM	1.8µL
مخلوطdNTP	1mM	1.5µL
آغاز گر رفت	P mol/ML100	1µL
آغاز گر برگشت	P mol/ML100	1µL
آنزیم Taq پلیمراز	5U	0.3µL
DNAژنومی	100ng/ µL	3µL
حجم نهایی		25µL

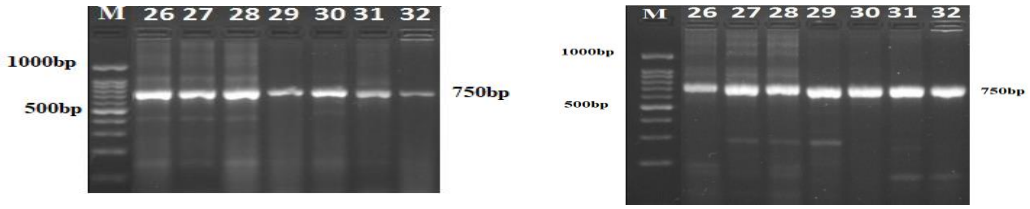
جدول ۴- برنامه PCR جهت تکثیر آغازگرها

Table 4. PCR program for amplification of primers

مرحله	تعدادسیکل	نوع فعالیت	دما C	زمانs (S)
۱	۱	واسرشته سازی اولیه	۹۴	۲۴۰
۲	۵	واسرشت سازی	۹۴	۳۰
		اتصال پرایمر	۵۵	۳۰
		بسط پرایمر	۷۲	۴۵
۳	۲۵	واسرشت سازی	۹۴	۳۰
		اتصال پرایمر	۵۵	۳۰
		بسط پرایمر	۷۲	۶۵
۴	۱	بسط نهایی	۷۲	۶۰۰
۵	۱	مرحله نگهداری	۴	۶۰۰

نتایج و بحث

نتایج حاصل از ژل الکتروفروز آگارز واکنش زنجیره‌ای پلی مراز با استفاده از آغازگرهای مورد استفاده برای ژن‌های Wx-B-seq$_1$ و Wx-B-seq$_2$ نشان‌دهنده کیفیت و اختصاصی بودن تکثیر ناحیه هدف می‌باشد، به طوری که بر اساس مطالعات و تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیک انتظار می‌رفت که اندازه ناحیه تکثیر شده در حدود ۷۵۰ نوکلئوتید باشد که با نتایج محصولات PCR نمونه‌ها (شکل ۱ الف وب) و با مطالعات مریمی و همکاران (۲۴) دای و همکاران(۴) سایتو و همکاران (۳۴) و گازمن و همکاران (۱۱) مطابقت دارد.



شکل ۱- نمونه‌ای از ژن‌های تکثیر شده توسط پی‌سی‌ار با استفاده از آغازگرهای اختصاصی الف- ژن Wx-B-seq$_1$ ب- ژن Wx-B-seq$_2$.
M- سایز مارکر۱۰۰۰bp. شماره ۲۶ تا ۳۲ شماره نمونه‌های مورد مطالعه بر اساس جدول ۱ می‌باشند

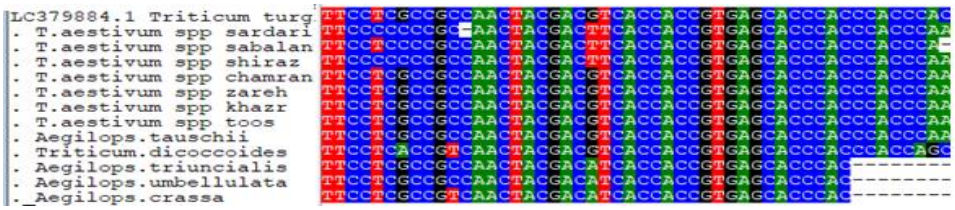
Figure 1. Samples of Genes amplified by PCR using specific primers.**A**) Wx-B-seq$_1$ gene **B**) Wx-B-seq$_2$ gene
M: Marker size 1000bp. No 26 to 32 are the sample numbers studied according to table 1

همردیف‌سازی توالی‌ها

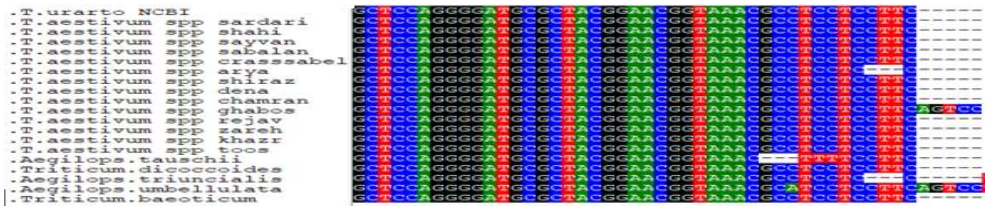
جهت بررسی تنوع بین نمونه ها، همردیف‌سازی توالی‌ها در نرم‌افزار BioEdite Sequence Alignment Editor با روش ClustalW انجام گرفت. (شکل ۲ و ۳) نتایج برای ژن Wx-B-seq$_1$ نشان داد که نواحی حفاظت شده بسیار بالایی بین گندم‌های زراعی و وحشی وجود دارد، هر چند در برخی نواحی، تنوع تک نوکلئوتیدی بین گندم‌های زراعی و وحشی وجود دارد. اما در ناحیه ۳۲۰-۳۱۲ یک حذف ۸ نوکلئوتیدی در نمونه‌های آژیلوپس در مقایسه با نمونه NCBI و گندم‌های زراعی وجود دارد (شکل ۲). همچنین، نتایج حاصل از همردیف‌سازی نمونه‌ها برای ژن Wx-B-seq$_2$ نشان داد که همولوژی بسیار بالایی بین همه توالی‌ها وجود دارد که

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-08]
[DOI: 10.52547/jcb.14.42.53]

فقط در برخی نواحی، تنوع تک نوکلئوتیدی بین برخی نمونه‌ها مشاهده می‌شود. همچنین در ناحیه ۲۶۵ جفت بازی و ۲۹۸ جفت بازی یک ناحیه ۵ و ۶ نوکلئوتیدی به‌ترتیب در گندم قابوس و آژیلوپس تائوشی در مقایسه با سایر نمونه‌ها وجود دارد. توالی‌های حاصل از محصول PCR ژن Wx-B-seq$_1$ در پایگاه اطلاعاتی NCBI با استفاده از روش جستجوی نوکلئوتیدی نشان می‌دهد که درصد بالایی با توالی‌های موجود در این پایگاه اطلاعاتی هم پوشانی دارد که ۹۰٪ با ژن واکسی B$_1$ در *Triticum.turgidum* و ۸۸٪ با نمونه‌های *Ae.speltoeids* برای ژن واکسی تشابه نشان می‌دهد. گازمن و آلویز (۱۳) مریمی و همکاران (۲۳) اورتگا و همکاران (۲۸) نیز نتایج مشابهی بدست آوردند، همچنین توالی‌های حاصل از محصول PCR ژن Wx-B-seq$_2$ در پایگاه اطلاعاتی NCBI با استفاده از روش جستجوی نوکلئوتیدی نشان داد که این توالی‌ها تشابه بسیار بالایی با نمونه گندم *T.urartu* دارند (شکل۳) که با نتایج گازمن وآلویز (۱۳) و وی وهمکاران (۴۰) همخوانی دارد.



شکل ۲- نمونه ای از همردیف سازی توالی ها با استفاده از روش clustalW برای ژن Wx-B-seq$_1$
Figure 2. sample of Sequence alignment using clustalW method of Wx-B-seq$_1$ gene



شکل ۳- نمونه‌ای از همردیف سازی توالی‌ها با استفاده از روش clustalW برای ژن Wx-B-seq$_2$
Figure 3. sample of Sequence alignment using clustalW method of Wx-B-seq$_2$ gene

محاسبه ماتریس فاصله ژنتیکی ژن Wx-B-seq$_1$

به‌منظور درک بهتر میزان تشابه و تفاوت بین توالی‌ها، ماتریس تشابه توالی‌های مورد بررسی، در نرم‌افزار MEGAX برای ژن Wx-B-seq$_1$ محاسبه گردید (جدول ۵). نتایج نشان می‌دهد که فاصله ژنتیکی از ۰/۰۱۹۹۲ تا ۰/۰۷۸۸۱ متغیر بود که بیشترین و کمترین فاصله به‌ترتیب مربوط به رقم سرداری و آژیلوپس آمبولاتا بود. بجز آژیلوپس تائوشی سایر نمونه‌های وحشی (آژیلوپس کراسا، آژیلوپس تریانسیالیس، آمبولاتا) فاصله ژنتیکی کمی در مقایسه با ارقام زراعی داشتند. لذا جهت بررسی بهتر درخت فیلوژنتیکی با ماتریس تشابه‌ها بر اساس مدل Tajima-Nei از نوع جایگزینی با بوتسترپ 1000 و روش UPGM A در نرم‌افزار MEGAX ترسیم گردید.

جدول ۵- ماتریس فاصله ژنتیکی ژن Wx-B-seq$_1$

Table 5. Genetic distance matrix of Wx-B-seq$_1$ gene

Triticum_turgidum_NCBI											
T.aestivum_spp_sardari	0.07881										
T.aestivum_spp_sabalan	0.02759	0.06048									
T.aestivum_spp_shiraz	0.06716	0.03592	0.04074								
T.aestivum_spp_chamran	0.04865	0.07027	0.03615	0.04737							
T.aestivum_spp_zareh	0.04800	0.07182	0.03577	0.04923	0.00792						
T.aestivum_spp_khazr	0.05034	0.07434	0.03813	0.04796	0.01250	0.00668					
T.aestivum_spp_toos	0.05645	0.08364	0.04540	0.06284	0.02175	0.01916	0.01917				
Aegilops.tauschii	0.05070	0.08126	0.03937	0.06053	0.02176	0.01464	0.01464	0.01580			
Triticum.dicoccoides	0.03284	0.09815	0.04635	0.07905	0.05280	0.05271	0.05011	0.04890	0.04280		
Aegilops.triuncialis	0.02215	0.09300	0.03783	0.07256	0.04792	0.04791	0.04667	0.04534	0.04169	0.01281	
Aegilops.umbellulata	0.01992	0.09786	0.03354	0.07586	0.04767	0.04625	0.04483	0.04055	0.03641	0.00926	0.00389
Aegilops.crassa	0.02279	0.09317	0.03768	0.07467	0.04928	0.05056	0.04927	0.04537	0.04160	0.01079	0.00468	0.00260

محاسبه ماتریس فاصله ژنتیکی ژن Wx-B-seq$_2$

نتایج میزان تشابه و فاصله ژنتیکی بین توالی‌های همردیف شده مورد بررسی ژن Wx-B-seq$_2$در نرم‌افزار MEGA X نشان داد که فاصله ژنتیکی از ۰/۰۰۴۹۶ تا ۰/۱۰۲ متغیر بود که بیشترین فاصله مربوط به رقم شاهی و کمترین مربوط به *T.baeoticum* و *T.dicocoeids* بود. همه ارقام زراعی بجز رقم شاهی فاصله ژنتیکی خیلی کمی را از همدیگر نشان می‌دهند که نشان می‌دهد این ژن در ارقام زراعی تغییرات چندانی ندارد در حالی که دو گندم *T.baeoticum* و *T.diccocoids* که از نمونه‌های وحشی جمع‌آوری شده مناطق ایران می‌باشند فاصله ژنتیکی خیلی زیادی را در مقایسه با ارقام زراعی نشان می‌دهند (جدول ۶).

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-08]
[DOI: 10.52547/jcb.14.42.53]

جدول ۶- ماتریس فاصله ژنتیکی ژن $Wx\text{-}B\text{-}seq_2$

Table 6. Genetic distance matrix of $Wx\text{-}B\text{-}seq_2$ gene

T.urarto_NCBI																						
T.aestivum_spp_sardari	0.06004																					
T.aestivum_spp_shahi	0.10228	0.04764																				
T.aestivum_spp_sayvan	0.08185	0.02690	0.05471																			
T.aestivum_spp_sabalan	0.08736	0.03204	0.05652	0.01164																		
T.aestivum_spp_crasssabelan	0.08371	0.02519	0.04939	0.01500	0.01668																	
T.aestivum_spp_arya	0.08922	0.08736	0.10235	0.07264	0.08180	0.07082																
T.aestivum_spp_shiraz	0.06362	0.03375	0.06542	0.03722	0.03897	0.03548	0.05826															
T.aestivum_spp_dena	0.05825	0.03547	0.06907	0.04244	0.04069	0.04069	0.06364	0.00829														
T.aestivum_spp_chamran	0.07264	0.02860	0.06012	0.03204	0.03376	0.03377	0.08182	0.02174	0.02005													
T.aestivum_spp_ghabos	0.03723	0.06926	0.10452	0.08022	0.08027	0.08028	0.09118	0.05492	0.04605	0.05657												
T.aestivum_spp_rejav	0.07811	0.04244	0.08005	0.04594	0.04065	0.04070	0.09480	0.04067	0.03891	0.03370	0.06192											
T.aestivum_spp_zareh	0.09323	0.08955	0.11608	0.09137	0.09322	0.09684	0.11956	0.08564	0.08003	0.07996	0.08939	0.07640										
T.aestivum_spp_khazr	0.07638	0.04602	0.08192	0.05660	0.05837	0.05482	0.09113	0.03903	0.04082	0.04593	0.06760	0.03906	0.07130									
T.aestivum_spp_toos	0.08917	0.03892	0.07459	0.04940	0.04063	0.04066	0.10232	0.04941	0.05473	0.04237	0.07825	0.03028	0.08379	0.04075								
Aegilops.tauschii	0.05123	0.08003	0.11978	0.09668	0.10047	0.10047	0.10991	0.07630	0.07633	0.08918	0.05471	0.07638	0.10276	0.07647	0.07997							
Triticum.dicoccoides	0.00496	0.06182	0.10419	0.08366	0.08919	0.08551	0.09165	0.06540	0.06004	0.07447	0.03900	0.07995	0.09516	0.07825	0.09103	0.04952						
Aegilops.triuncialis	0.06901	0.10245	0.14554	0.11588	0.11793	0.11395	0.11954	0.11018	0.10638	0.11403	0.08933	0.12014	0.11646	0.11263	0.11606	0.09886	0.07083					
Aegilops.umbellulata	0.04067	0.07461	0.11411	0.09115	0.09493	0.09493	0.10619	0.06911	0.06912	0.08373	0.04945	0.08034	0.09747	0.07665	0.08756	0.03726	0.03895	0.08026				
Triticum.baeoticum	0.00497	0.06540	0.10801	0.08734	0.09292	0.08920	0.09478	0.06902	0.06364	0.07814	0.03896	0.08183	0.09717	0.08015	0.09290	0.04773	0.00663	0.07089	0.03544			

برآورد جایگزینی نوکلوتیدی

جهت برآورد جایگزینی نوکلئوتیدی توالی‌های همردیف شده از نرم‌افزار MEGAX جهت انتخاب بهترین مدل جایگزینی نوکلئوتیدی استفاده شد. نتایج نشان داد که مدل JC+G با کمترین مقدار BIC (شاخص اطلاعات بیزی) بهترین مدل در بین ۲۴ نوع مدل برازش داده است. همچنین احتمال جانشینی نوکلئوتیدی با روش Tamura-Nei (۱۹۹۳) در نرم‌افزار MEGAX محاسبه شد که نتایج برای ژن $Wx\text{-}B\text{-}seq_1$ نشان می‌دهد که بیشترین و کمترین سهم جانشینی نوکلئوتیدی از نوع پورینی و پیریمیدنی می‌باشد. به‌طوری که بیشترین جایگزینی پورینی مربوط به آدنین (A) با گوانین (G) به مقدار (۱۴/۲۵) بود در حالی که جایگزینی گوانین با آدنین (۱۰/۷۶) بود. علاوه بر اینها کمترین جانشینی از نوع پیریمدینی سیتوزین به تیمین (۶/۹۳) بود در حالی که جانشینی تیمین با سیتوزین مقدار بیشتری (۱۰/۳۹) را نشان داد (جدول ۷- الف). همچنین نتایج برای ژن $Wx\text{-}B\text{-}seq_2$ نشان داد که بیشترین میزان جانشینی نوکلئوتیدی از نوع پورینی آدنین (A) به گوانین (G) به میزان (۱۴/۸۵) می‌باشد در حالی که کمترین میزان جانشینی از نوع پیریمیدینی (۵,۳۰) از نوع سیتوزین (C) به تیمین (T) مشاهده شد (جدول۷ –ب).

جدول ۷- ماتریس جایگزینی برآورد حداکثر درست‌نمایی. الف- ژن $Wx\text{-}B\text{-}seq_1$ ب- ژن $Wx\text{-}B\text{-}seq_2$

Table 7. Maximum Likelihood Estimate of Substitution Matrix **A)** $Wx\text{-}B\text{-}seq_1$ gene **B)** $Wx\text{-}B\text{-}seq_2$ gene

	A	T/U	C	G
A	-	۵/۴۶	۸/۱۸	**۱۴/۲۵**
T/U	۶/۵۴	-	**۱۰/۳۹**	۸/۶۶
C	۶/۵۴	**٦/۹۳**	-	۸/۶۶
G	**۱۰/۷٦**	۵/۴۶	۸/۱۸	-

جدول ۷ – الف

	A	T/U	C	G
A	–	۷/۴۵	۸/۹۳	**۱٤/۸۵**
T/U	۶/۱۴	–	**٦/۳۵**	۹/۳۵
C	۶/۱۴	**۵/۳۰**	–	۹/۳۵
G	**۹/۷۵**	۷/۴۵	۸/۹۳	–

جدول ۷- ب

درخت فیلوژنتیکی ژن $Wx\text{-}B\text{-}seq_1$

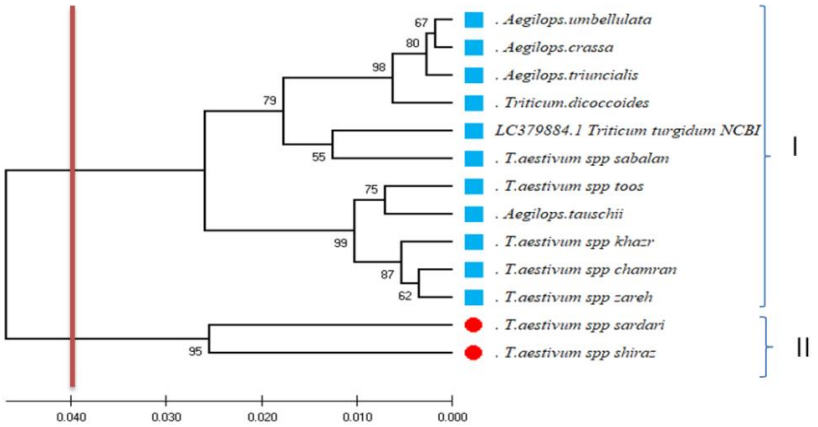
نمودار درختی با استفاده از مدل Tamura و Nei (۱۹۶۸) و روش UPGMA ترسیم شد، نتایج برای ژن $Wx\text{-}B\text{-}seq_1$ (شکل۴) نشان می‌دهد که نمونه‌ها به دو گروه اصلی تقسیم می شوند گازمن و همکاران (۱۱) مریمی و همکاران (۲۳) وی و همکاران (۳۹) نیز نتایج مشابهی بدست آوردند. در این دو گروه اصلی که با فاصله ۹۶ درصد تشابه، نمونه‌ها قرار می‌گیرند گندم‌های زراعی سرداری و شیراز به تنهایی در یک گروه و سایر گندم‌های زراعی و وحشی به همراه نمونه NCBI در گروه دیگر قرار گرفته‌اند. گروه دوم خود به دو زیر گروه اصلی تقسیم می‌شود که ارقام گندم زراعی توس، چمران، زارع، خزر به‌همراه آژیلوپس تائوشی در یک گروه قرار گرفته‌اند. اجداد گندم‌های زراعی یعنی آژیلوپس‌ها و گندم *T.diccocodies* به همراه نمونه NCBI در گروه جداگانه‌ای قرار گرفتند. نتایج کلی درخت فیلوژنتیکی نشان می‌دهد که گندم نان شیراز و آژیلوپس آمبلولاتا، بیشترین فاصله ژنتیکی را از هم دارند.

درخت فیلوژنتیکی ژن $Wx\text{-}B\text{-}seq_2$

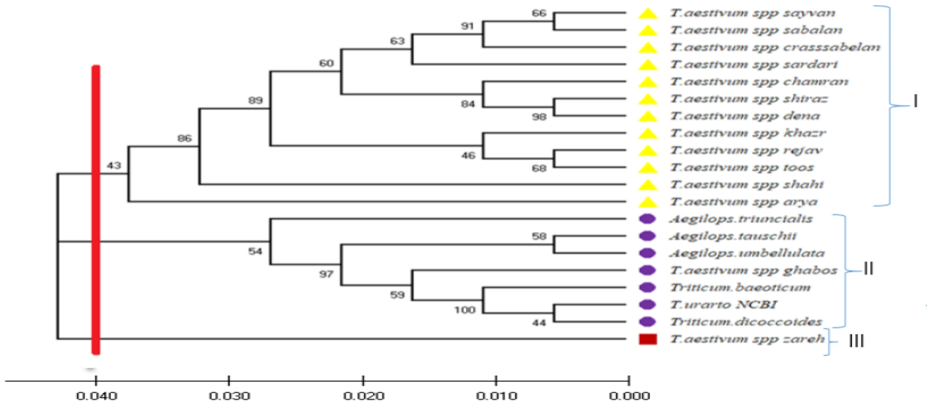
ترسیم نمودار درختی ژن واکسی $Wx\text{-}B\text{-}seq_2$ نشان می‌دهد که در فاصله ۹۶ درصد تشابه ژنتیکی نمونه‌ها به سه گروه اصلی تقسیم می‌شوند که گندم‌های زراعی در یک گروه قرار گرفته‌اند اما در داخل همین گروه سه زیر گروه وجود دارد که گندم‌های (سیوان، سبلان، کراس سبلان، سرداری، چمران، شیراز، دنا، خزر، ریژاو، توس، شاهی و آریا) در یک گروه قرار گرفته‌اند، به طوری که رقم سیوان و آریا بیشترین فاصله ژنتیکی را از هم دارند. گندم‌های وحشی (*T.baeoticum* و *T.dicoccoides*) و اجداد آنها یعنی آژیلوپس (تائوشی، آمبلولاتا، تریانسیالیس) به همراه گندم

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-08]
[DOI: 10.52547/jcb.14.42.53]

زراعی قابوس در گروه دوم قرار گرفتند در حالی که گروه سوم فقط شامل گندم نان زارع بود (شکل ۵).



شکل ۴- درخت فیلوژنتیکی براساس الگوریتم UPGMA حاصل از داده‌های مولکولی ژن Wx-B-seq
Figure 4. Phylogenetic tree based on UPGMA algorithm derived from molecular data in studied Wx-B-seq$_1$ gene



شکل ۵- درخت فیلوژنتیکی براساس الگوریتم UPGMA حاصل از داده های مولکولی ژن Wx-B-seq$_2$
Figure 5. Phylogenetic tree based on UPGMA algorithm derived from molecular data in studied Wx-B-seq$_2$ gene

نتیجه‌گیری کلی

نتایج هم ردیف‌سازی توالی‌ها برای ژن Wx-B-seq$_1$ و Wx-B-seq$_2$ نشان‌دهنده نواحی حفاظت شده بسیار بالایی بین گندم‌های زراعی و وحشی می‌باشد، با این وجود در برخی نواحی تنوع تک نوکلئوتیدی بین گندم‌های زراعی و وحشی وجود دارد، توالی‌های حاصل از محصول PCR ژن Wx-B-seq$_1$ در پایگاه اطلاعاتی NCBI با استفاده از روش جستجوی نوکلئوتیدی نشان می‌دهد که ۸۸٪ با نمونه‌های *Ae.speltoeids* برای ژن واکسی تشابه نشان می‌دهد. لذا از آنجایی که *Ae.speltoeids* با ژنوم S جد محتمل ژن واکسی B می‌باشد با نتایج این تحقیق همخوانی دارد (۱۳،۲۳،۲۸). همچنین نتایج این روش برای ژن Wx-B-seq$_2$ نشان داد که این توالی‌ها تشابه بسیار بالایی با نمونه گندم *T.urartu* دارند و از آنجایی که در مطالعات مختلف *T.urartu* (2n=14,AA) گندم دیپلویید وحشی بخشنده ژنوم A در گونه‌های پلی پلویید گندم گزارش شده است (۸) این فرضیه را که مکان ژنی Wx-B در ابتدا روی کروموزوم B قرار داشته است، اما طی فرایند تکامل گندم، به دلیل یک ترانسلوکاسیون دو طرفه بین کروموزوم‌های B و A جابجا شده است (۱۰) که با وجود حضور این لوکوس بر روی کروموزوم 4A، اما بر اساس جایگاه اولیه، هنوز آن را به نام Wx–B می‌نامند (۱۷) را تقویت می‌کند، مقایسه نتایج ماتریس تشابه ژن Wx-B-seq$_1$ نشان داد که کمترین فاصله مربوط به نمونه *Ae.umbellulata* و بیشترین فاصله مربوط به رقم سرداری بود. ماتریس تشابه ژن Wx-B-seq$_2$ نشان داد که این ژن در ارقام زراعی بجز شاهی تغییرات چندانی ندارد، در حالی که دو نمونه گندم وحشی *T.baeoticum* و *T.diccocoids* فاصله ژنتیکی خیلی زیادی را در مقایسه با ارقام زراعی نشان می‌دهند. نتایج ماتریس جایگزینی برآورد حداکثر درست‌نمایی برای ژن Wx-B-seq$_1$ و Wx-B-seq$_2$ نشان داد که بیشترین و کمترین سهم جانشینی نوکلئوتیدی به‌ترتیب از نوع پورینی و پیریمیدنی می‌باشد. نتایج خوشه‌بندی برای ژن Wx-B-seq$_1$ نمونه‌ها را به دو گروه اصلی و خوشه‌بندی ژن Wx-B-seq$_2$ نمونه‌ها را به سه گروه اصلی تقسیم می‌کند و بطور کلی می‌توان گفت تنوع در سطح نوکلئوتیدی ژن‌های واکسی بین جنس آژیلوپس و تریتیکوم

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-08]
[DOI: 10.52547/jcb.14.42.53]

به‌عنوان ابزار مناسبی جهت آنالیز روابط فیلوژنتیکی می‌تواند استفاده شود. ایران، یکی از غنی‌ترین ژرم پلاسم‌های گندم دنیا را داراست. با توجه به نقش مهمی که در دنیا برای گندم‌های واکسی ذکر شده و این نوع گندم‌ها می‌توانند در افزایش کیفیت نان، ماکارونی و در سایر صنایع غذایی بسیار مهم باشند، ضروری می‌نماید تا گندم‌های تجاری ایران از نظر حضور آلل‌های واکسی مورد جستجو قرار گیرند تا اگر گندم‌هایی با چنین خصوصیاتی یافت شد از نظر کیفیت مورد ارزیابی قرار گرفته و بتوان آنها استفاده نمود. با توجه به اینکه هدف نهایی این تحقیق کمک به تولید گندم‌های نیمه واکسی و تمام واکسی از ارقام بومی می‌باشد پیشنهاد می‌شود که وضعیت آلل‌های واکسی در سایر ارقام تجاری، بومی و وحشی و خویشاوندان گندم که می‌تواند به عنوان والد بخشنده این ژن در برنامه اصلاحی استفاده شود، مورد ارزیابی قرار گیرد. همچنین می‌توان با استفاده از ارقام نیمه واکسی موجود در بانک‌های ژن و یا با استفاده از روش‌های مختلف جهش‌زایی و یا بهره‌گیری از روش‌های مبتنی برخاموشی ژن امکان تولید گندم با محتوای پایین GBSS را بررسی کرد.

منابع

1. Abdipour, M. 2015. Identification and characterization of stored proteins of some native ’siranian bread and durum wheat using protein and DNA based markers. PhD Thesis, Tehran University, Tehran, Iran, 334 pp (In Persian).
2. Bihamta, M.R. and G. Najafian. 2014. Molecular study of some characteristics related to grain quality in hexaploid wheat genotypes (*Triticum.aestivum*). Final Report of Project. Seed and Plant Breeding Research Institute. Tehran. Iran (In Persian).
3. Brown, W.H. and T. Poon. 2016. Introduction to organic chemistry. 6rd.ed. Wiley. New York. USA. 720 pp.
4. Dai, S.F., J.Q. Jiang, Y.N. Jia, X.F. Xue, D.C. Liu, Y.M. Wei, Y.L. Zheng and Z.H. Yan. 2016. Molecular characterization and phylogenetic analysis of Wx genes from three Taeniatherum diploid species. Biologia Plantarum, 60(3): 505-512.
5. Delwiche, S.R. 2006. Single Kernel Near-Infrared Analysis of Tetraploid (Durum) Wheat for Classification of theWaxy Condition. Cereal Chemistry, 83: 287-292.
6. Deng, ZH., W. Fang, X. Guo, X. Zhao, H. Guo, S. Hu and J. Tian. 2018. Genetic dissection of interactions between wheat flour starch and its components in two populations using two QTL mapping method. Mol Breeding, 38: 41 -57.
7. 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.
8. Dvorak, J., P. Diterlizzi, H.B. Zhang and P. Resta. 1993 .The evolution of polyploid wheat: Identification of the A genome donor species. Genome, 36(1): 21-31
9. Food and Agriculture Organization (FAO). 2017. FAOSTAT data-base. [Cited 2017 Jan 14]. Available from: http://faostat.fao.org/beta/en.
10. Graybosch, R.G. 1998.Waxy wheats: origin, properties, and prospects. Journal of Trends in Food Science &Technology, 9: 135-142.
11. Guzman, C., L. Caballero, M. Yamamori and J.B. Alvarez. 2012. Molecular characterization of a new waxy allele with partial expression in spelt wheat. Planta, 235: 1331-1339.
12. Guzman, C., R. Ortega, M. Yamamori, R.J. Pena and J.B. Alvarez .2015 .Molecular characterization of two novel null waxy alleles in Mexican bread wheat landraces. Jornal Cereal Sciences, 62 :8-14.
13. Guzmn, C. and J.B. Alvarez. 2012. Molecular characterization of a novel waxy allele (Wx-Au1a) from (*Triticum.Urartu*) Thum ex Gandil. Genet Resource Crop, 59: 971-979.
14. Habibi.Kaniani, B., M.R. Bihamta, M.E. Hassani, G. Najafian and F.I. Darvish. 2012. Dentification of a null allele at the Wx-B1 locus in some of Iranian bread wheat genotypes. InEnviromental Biology, 6(10): 2586-2589.
15. Hung, P.V., T. Maeda and N. Morita. 2006. Waxy and high amylose wheat starches and flours: characteristics, functionality and application. Trends Food Science Technol, (17): 448-456.
16. Jonnala, R.S., F. MacRitchie, V.W. Smail, B.W. Seabourn, M. Tilley, D. Lafiandra and M. Urbano. 2010. Protein and quality characterization of complete and partial nearisogenic lines of waxy wheat. Cereal Chemistry, 87(6): 538-545.
17. Kim, W., J.W. Johnson, R.A. Graybosch and C.S. Gaines. 2003. The Physicochemical properties and end use quality of wheat starch as a function of waxy protein alleles. Journal Cereal Sciences, 37: 195-204.
18. Li, S., X. Zhong, X. Zhang, M.D. Rahman, J. Lan, H. Tang, P. Qi, J. Ma, J. Wang, G. Chen, X. Lan, M. Deng, Z. Li, W. Harwood, Zh. Lu, Y. Wei, Y. Zheng and Q. Jiang .2020. Production of waxy tetraploid wheat (*Triticum.turgidum durum* L.) by EMS mutagenesis. Genet Resource Crop Evolution, 67: 433-443.
19. Liu, Q., Y. Hu, M. Hu, L. Sun, X. Chen, Q. Li, P. Wang, L. Wang, Y. Zhang and H. Li. 2021. Dentification and molecular characterization of mutant line deficiency in three waxy proteins of common wheat (*Triticumaestivum* L.).Scientific Reports, 144(11): 35-44.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-08]

[DOI: 10.52547/jcb.14.42.53]

20. Luo, M., J. Ding, Y. Li, H. Tang, P. Qi, J. Ma, J. Wang, G. Chen, Z. Pu, W. Li, Z. Li, W. Harwood, X. Lan, M. Deng, Zh. Lu, Y. Wei, Y. Zheng and Q. Jiang. 2019. A single-base change at a splice site in Wx-A1caused incorrect RNA splicing and gene inactivation in a wheat EMS mutant line. Heoretical and Applied Genetics, 132: 2097-2109.
21. Marina, V., L. Klimushina, Y. Pavel, Yu. Kroupin, Y. Mikhail, S. Bazhenov, I. Gennady, I. Karlov and G. Mikhail. 2020. Waxy Gene-Orthologs in Wheat × Thinopyrum Amphidiploids. Agronomy Jornal, 10(7): 963-978.
22. Maryami, Z., M.R. Azimi, C. Guzman, S. Dreisigacker and G. Najafian. 2020. Puroindoline (Pina-D1 and Pinb-D1) and waxy (Wx-1) genes in Iranian bread wheat (*Triticum.aestivum* L.) landraces, Biotechnology & Biotechnological Equipment, 34(1): 1019-1027.
23. Maryami, Z., A. Fazeli and A.A. Mehrabi. 2016a. Evaluation of Phylogenetic Relationships for Waxy Genes in Wild and Cultivated Wheat using Multiplex-PCR. Journal of Crop Breeding, (8): 204 -211 (In Persian).
24. Maryami, Z., A. Fazeli and A.A. Mehrabi. 2016b. Use of incompletely dominant markers to identify null alleles at the position of vaccine B1 waxy gene in Cultivated Wheat, 3rd International Conference on Sustainable Development, Strategies and Challenges focusing on Agriculture, Natural Resources, Environment and Tourism,50-57, Tabriz, Iran (In Persian).
25. Nakamura, T., M. yamamori, H. hirano, S. Hidaka and T. Nagamine. 1995. Production of waxy (amylose-free) wheats. Journal of molecular genetics, 248: 253-259.
26. Nakamura, T., M. Yamamori, H. Hirano and S. Hidaka.1993b. Decrease of waxy (wx) protein in two common wheat cultivars with low amylose content. Journal of plant Breeding, (111): 99-105.
27. Nishio, Z., H. Oikawa, T. Haneda, M. Seki, M. Ito, T. Tabiki, H. Yamauchi and H. Miura. 2009. Influence of amylose content on cookie and sponge cake quality and solvent retention capacities in wheat flour. Cereal Chemistry, 86(3): 313-318.
28. Ortega, R., J.B. Alvarez and C. Guzman. 2014. Characterization of the Wx gene in diploid Aegilops species and its potential use in wheat breeding. Genetics Resources and Crop Evolution, 61: 369-382.
29. Pace, C., B. Shirley, M. Mcnutt and K. Gajiwala. 1996. Forces Contributing to the conformational stability of proteins. Journal of Faseb, 10: 75-83.
30. Petrova, I.V., S.V. Chebotar, A.I. Rybalka and Y. M. Sivolap. 2007. Identification of Wx-genotypes of winter wheat. Cytology and Genetics ,6: 11-17
31. Qin, P., K. Zhiyou and Y. Liu. 2018. Effects of the wxgene on Starch biosynthesis, physicochemical wheat flour properties, and dry noodle quality food. Science and Technology Research, 24(3): 443-453.
32. Sahlstrom, S., A. Baevre and R. Graybosch. 2006. Impact of waxy, partial waxy and wild type wheat starch fraction properties on hearth bread. Characteristics Cereal Chemistry, 83(6): 647-654.
33. 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.
34. Saito, M., P. Vrinten, G. Ishikawa, R. Graybosch and T. Nakamura. 2017. A novel codominant marker for selection of the null Wx-B1 allele in wheat. Breeding Programs.Mol Breeding, 23: 209-217.
35. Seib, P.A. 2000. Reduced-amylose wheats and asian noodles. Cereal Foods World, 45(11): 504-512.
36. Shahriari, F. and M. Fakhrshahi. 2013. Study of polymorphism of Wx-A_1 and Wx-B_1 genes and the effect of their mutations on the structure of GBSS enzyme in some commercial cultivars of Iranian wheat. Iranian Agronomic Research, (10):149-143 (In Persian).
37. Shadadeh, M., M.H Pahlevani, Kh. Zenalinezhad, M. Esmaeilzadeh Moghaddam and S. Bagherikia. 2020. Evaluation of Baking Quality in Iranian Bread Wheat Cultivars using High Molecular Weight Glutenin Subunits. Journal of Crop Breeding, (12):151-160 (In Persian).
38. Shahsvand, M. 2004. Evaluation of waxy gene (Wx) in common hexaploid wheat in the region using PCR and SDS-PAGE techniques .M.ScThesis, Ferdosi University ,Mashhad , Iran, 86 pp (In Persian)
39. 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.
40. Wei, L., A.J. Liu, Y.Z. Sheng, G.Y. Cheng, Z.E Pu and Y.X. Liu. 2013. Molecular characterization of waxy gene in *Aegilops.tauschii*. Asian Journal of Plant Sciences, 12: 34-39.
41. Xurun, Y., Y. Heng, J. Zhang, S. Shao, L. Zhou, F. Xiong and Z. Wang. 2015. Comparison of endosperm starch granule development and physicochemical properties of starchesfrom waxy and non-waxy wheat. International Journal of Food Properties, (18): 2409-2421.
42. Zi, Y., J. Ding, J. Song, G. Humphreys, Y. Peng, C. Li, X. Zhu and W. Guo. 2018. Grain yield, starch content and activities of key enzymes of waxy and non-waxy wheat (*Triticum.aestivum*) Scientific Reports, (8): 45-48.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-08]

[DOI: 10.52547/jcb.14.42.53]

Evaluation of Nucleotide Diversity of Waxy B Gene in some of Wild and Cultivated Wheat

Maryam Karooni[1] and Arash Fazeli[2]

1- PhD Student Plant Breeding- Genetic Engineering, Agronomy and Plant Breeding Department, Faculty of Agriculture, Ilam University, Ilam, Iran
2- Agronomy and Plant Breeding Department, Faculty of Agriculture, Ilam University, Ilam, Iran,
(Corresponding author: a.fazeli@ilam.ac.ir)
Received: 2 May, 2021 Accepted: 2 November 2021

Extended Abstract

Introduction and Objective: Improving the quality of bread wheat is an important issue. It has attracted the attention of many researchers over the years, and in recent decades, various methods have been developed to evaluate this goal. One of the most important goals in wheat breeding programs is to improve the quality of wheat bakery. Waxy proteins that responsible for the expression of GBSS enzyme in wheat that control the ratio of amylose to amylopectin in starch, These proteins in hexaploid wheat are controlled by three genes, Wx-D1, Wx-B1, Wx-A1 and those have a key role in quality of wheat flour. The goal of this study was to investigate the nucleotide diversity of Wx-B1 gene in wild and crop cultivars and also to investigate the phylogenetic relationships between wheat and their ancestors based on waxy genes.

Material and Methods: In the present study, the phylogenetic relationships of the waxy B gene in 34 samples including 4 species of *Aegilops* genus and 28 cultivars of wheat and 2 species of wild wheat were evaluated using PCR and sequencing techniques in Ilam university.

Results: Sequences alignment results of Wx-B-seq1 and Wx-B-seq2 genes showed there are very high conserved regions between crop and wild wheat, although in some regions there is single nucleotide diversity between crop and wild wheat. The results of similarity matrix of Wx-B-seq1 showed the highest distance was related to Sardari cultivar and the lowest distance was related to *Aegilops.umbellulata* sample. The similarity matrix of the Wx-B-seq2 gene showed this gene did not change much in crop cultivars except Shahi cultivar, while the two wild wheat samples *T.boeticum* and *T.dicoccooides* showed a very large genetic distance compared to the crop cultivars. The results of the substitution matrix estimation based on the maximum likelihood method for Wx-B-seq1 and Wx-B-seq2 genes showed the highest and lowest contributions of nucleotide substitution are purine and pyrimidine, respectively. Also, UPGMA clustering results for Wx-B-seq1 and Wx-B-seq2 genes divided the samples into two and three main groups, respectively.

Conclusion: The overall results show that the diversity observed in wild samples and The ancestors of crop wheat can be a good candidate for further studies to determine whether these changes will lead to protein content or not.

Keywords: Amylose, Quality, Sequencing, Waxy gene, Wheat

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-11-08]

[DOI: 10.52547/jcb.14.42.53]