ژنتیک نوین
دوره هفتم، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۱
صفحه ۱۲۷- ۱۲۱

بررسی تنوع و ارتباط زیرگونه‌های جو زراعی (*H. vulgare*) با استفاده از ژن استیل کوآنزیم‌آکربوکسیلاز سیتوسولی و پلاستیدی

مرجان بهزادی راد[1*]، محمدرضا نقوی[2]، علیرضا طالعی[3]

۱، ۲ و ۳- دانشجوی کارشناس ارشد و استادان گروه زراعت و اصلاح نباتات، پردیس کشاورزی دانشگاه تهران

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: mbehzadi@ut.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۸۹/۵/۹- تاریخ پذیرش: ۹۰/۹/۸)

چکیده

جو متعلق به خانواده گندمیان است. ژن تک نسخه‌ای پلاستیدی و سیتوسولی استیل کوآنزیم-آکربوکسیلاز، اولین گام کاتالیزی در بیوسنتز اسیدهای چرب، در مطالعه‌ی روابط فیلوژنتیکی، تکاملی و سیستماتیکی گراس‌ها توانایی زیادی دارد زیرا احتمال اینکه ژن‌های تک نسخه و یا کم نسخه دست‌خوش تکامل گروهی شوند کم است. در این تحقیق رابطه فیلوژنتیکی جو زراعی *Hordeum vulgare* و زیرگونه‌های آن (*K. Koch*) *Hordeum spontaneum*، *Hordeum distichon*، جو زراعی دو ردیفه *Hordeum vulgare tworow*، جو زراعی شش ردیفه *Hordeum vulgare hexastichon* با استفاده از آغازگر اختصاصی ژن استیل کوآنزیم آکربوکسیلاز پلاستیدی (*ACC1*) و سیتوسولی (*ACC2*) بررسی شدند. درخت تکاملی مشترک هر دو ژن با آزمون هم‌جنسی الگوی جایگزینی در اغلب نمونه‌ها منطبق بود بطوری‌که در آزمون هم‌جنسی توالی‌های *H. spontaneum*، *H. tworow* و *H. hexastichon* در هر دو ژن *ACC1* و *ACC2* با الگوی یکسانی تکامل یافته‌اند و در درخت مشترک این دو ژن کنار یکدیگر جای گرفته‌اند. در حالی‌که دو ژن مذکور در *H. vulgare* الگوی تکاملی یکسانی نداشتند که این عدم توافق در درخت فیلوژنتیکی هر دو ژن مشاهده می‌شود.

واژه‌های کلیدی

تکامل مولکولی، ژن *ACC*، فیلوژنتیک، *Hordeum*

مقدمه

جنس Hordeum متعلق به طایفه Triticeae از خانواده‌ی Poaceae است. جو زراعی، یکی از گونه‌های مهم اقتصادی در این جنس بوده که در تغذیه‌ی چهارپایان و تهیه مالت استفاده می-شود و یکی از اولین گیاهانی است که توسط انسان اهلی شده است. عمده‌ترین مناطق تولید جو شامل اروپا، حاشیه مدیترانه‌ای شمال آفریقا، اتیوپی، خاورمیانه، جمهوری‌های شوروی سابق، چین، هندوستان، کانادا، ایالات متحده آمریکا، آمریکای جنوبی و استرالیا است (Blattner 2009). بیشتر بقایای باستان شناسی بین سال‌های ۶۰۰۰ تا ۷۰۰۰ قبل از میلاد مربوط به اشکال دو ردیفهٔ جو بوده و اشکال شش ردیفه آن تا قبل از سال ۶۰۰۰ قبل از میلاد مرسوم نبوده اند.

Archive of SID

جنس Hordeum همانند اکثر جنس‌های دیگر در مناطق معتدل، هم در نیمکره‌ی شمالی و هم در نیمکره‌ی جنوبی پراکنش دارد(Zohary 1969). گونه‌های جو دیپلوئید، تتراپلوئید و هگزاپلوئید می‌باشد، که گونه‌های دیپلوئید ۲n=۱۴ شامل گونه‌های زراعی و وحشی هستند. این گیاه بیشترین سازگاری را به شرایط نامساعد محیطی و نظیر سرما، گرمای شدید و خشکی، شوری و قلیایی بودن خاک و کیفیت پایین آب آبیاری دارد (Blattner 2009). این جنس شامل گونه‌های تک اجدادی است و گونه‌های آن به آسانی قابل تشخیص هستند. جو زراعی شباهت زیادی به گروهی از ژنوتیپ‌های علفی و وحشی جو دارد که بطور مرسوم به عنوان *H. spontaneum* طبقه‌بندی می‌شود. *H. spontaneum* تنها جو وحشی است که سازگاری تلاقی و قابلیت باروری کامل با جوهای زراعی را دارد. تلاش زیادی جهت بررسی روابط فیلوژنتیکی در این جنس انجام گرفته است. توالی‌یابی DNA روش مناسب برای تجزیه فیلوژنتیکی مولکولی است. با بررسی وضعیت DNA ارقام و نژادها می‌توان به روابط فیلوژنی آن‌ها با سایر گونه‌ها و درنتیجه به نحوه انتقال ژن از اجداد به نتاج پی برد. بررسی وضعیت خویشاوندی تکاملی بین و درون گونه‌ها، جنس-ها و یا گروه‌های گیاه شناسی مستلزم مطالعه شباهت‌ها و تفاوت-ها می باشد. این عمل باعث طبقه‌بندی ارقام تازه کشف شده می-شود و می‌توان از صفات با ارزشی که در آن‌ها موجود است، جهت انتقال به گیاهان زراعی خویشاوند استفاده نمود (Jakob et al. 2006; Blattner 2004; Sun et al. 2009). ژن استیل‌کوآنزیم-آکربوکسیلاز، ژن مناسبی جهت بررسی روابط تکاملی است، زیرا ژنی تک نسخه است و احتمال اینکه ژن‌های تک نسخه و کم نسخه دست‌خوش تکامل گروهی شوند کم است، بنابراین آن‌ها را به ابزار مهمی برای مطالعه‌ی مبدأ و تکامل پلی پلوییدها تبدیل می‌کند (Fan et al. 2009). اولین مرحله تولید اسیدچرب در موجود زنده کربوکسیله شدن مولکول استیل کوآنزیمآ می باشد که این عمل تحت تاثیر استیل کوآنزیمآ کربوکسیلاز صورت می-پذیرد. این آنزیم در شروع واکنش سنتز اسیدهای چرب مورد نیاز است، زیرا اسیدهای چرب به عنوان مولکول‌های سوختی و تأمین ساختمان واحدهای غشاهای زیستی ضروری هستند (Safari 2003). اطلاعات سیتوژنتیکی نشان داده است که گونه‌های دیپلوییید به چهار گروه منوژنیک تقسیم می‌شوند (Wang et al. 1996)، گروه ژنومی I (*H.vulgare, H. bulbosom*)، گروه ژنومی Xa (*H. marinum* قبلا X)، گروه ژنومی Xu (*H. murinum* قبلا Y) و گروه ژنومی H که درون گونه‌های دیپلوییید باقی مانده است (Bothmer et al. 1987; Fan et al. 2009). گیاهان دو فرم ACCase دارند. ایزوفورم‌های سیتوسولی که آنزیمی چند دومینی با منشأ یوکاریوتی است، مالونیل‌کوآ را برای ساخت اسیدهای چرب با زنجیره بلند و متابولیت‌های ثانویه‌ی خیلی مهم، و همچنین مالونیلاسیون[1] تأمین می‌کند. ایزوفورم دیگری از ACCase که در پلاستید یافت شد، اولین گام در بیوسنتز اسید چرب را عهده‌دار است (Faris et al. 2009).

Komatsuda et al. 1999، با مطالعه‌ی توالی DNA هسته‌ای در جنس جو روابط فیلوژنی را بین چهار ژنوم H، I، Xa، Xu بررسی نمودند. نتایج بدست آمده برمبنای جایگزینی و نیز رویدادهای حذف و الحاق، نشان داد که ژنوم H و Xa دریک گروه منومورفیک قرار دارند، در حالی‌که ژنوم Xu و I از هم جدا می-باشند.Huang et al. 2002، بر اساس توالی دو سیستم ژنی پلاستیدی ACC و PGK روابط تکاملی بین گراس‌ها را بررسی نمودند. نتایج نشان داد که این ژن‌ها در اغلب گونه‌های گراس مطالعه شده تک نسخه هستند. مطابق نظر Huang et al. 2003، روابط فیلوژنتیکی بدست آمده با حقایق شناخته شده از تکامل منطبق بودند. در تحقیقی تنوع ژنتیکی سوییچ گراس Panicum virgatum که گراس چند ساله‌ی وحشی در آمریکا و کانادا می-باشد، با استفاده از ژن‌های هسته‌ای که استیل کوآنزیمآ کربوکسیلاز را کد می‌کنند در شش کولتیوار بررسی شد. Sun et al. 2009، روابط تکاملی جنس Hordeum را با ژن *RPB2* بررسی نمودند. نتیجه نشان داد که بر طبق تجزیه‌های فیلوژنتیکی این جنس، ژنوم H و Xa در یک گروه منومورفیک و ژنوم Xu و I جدا از ژنوم‌های نامبرده قرار دارند. ایران به عنوان یکی از مراکز بومی جو مورد توجه است و نظر به اینکه اجداد وحشی جو دارای تنوع ژنتیکی بسیار زیادی هستند، یافتن روابط تکاملی این گیاه بسیار ارزشمند است. در نتیجه در برنامه‌های به نژادی انتقال

[1] Malonylation

Archive of SID
www.SID.ir

ژن بطور مؤثری مورد استفاده قرار می‌گیرد. هدف از این تحقیق پاسخ به سؤالات متفاوت در مورد تکامل H. vulgare و زیرگونه-های آن با استفاده از مقایسه‌ی توالی‌های DNA و پی بردن به وضعیت تکاملی این گیاه با ارزش بصورت ژنتیکی و آماری بود. در این تحقیق آنالیزهایی در مورد مبدأ و تکامل استیل کوآنزیمآ کربوکسیلاز و خانواده ژنی آن در جو صورت گرفته است.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

این تحقیق در آزمایشگاه بیوتکنولوژی گروه زراعت و اصلاح نباتات *دانشگاه تهران* در سال ۱۳۸۹ انجام شد. در این مطالعه گونه‌های *H. vulgare* و *H. spontaneum*، (جو دوردیفه) *H.tworow*، *H. hexastichon* (جو شش ردیفه)، H. distichon از بانک ژن ملی ایران تهیه شدند. مشخصات آن‌ها در جدول ۱ آمده است، تعداد ۶-۵ بذر از هر گونه در گلدان کشت و پس از رشد گیاهچه‌ها و ظهور حداقل دو برگ (حدوداً دو تا سه هفته پس ازکشت) حدود ۲ گرم از برگ هر گونه، نمونه‌برداری شد. استخراج DNA ژنومی از برگ‌های تازه و به روش CTAB تغییر یافته (Murray and Thompson 1980) انجام گردید. جهت بررسی کمیت و کیفیت نمونه‌های ژل آگارز یک درصد الکتروفورز و نانودراپ استفاده شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از دو جفت آغازگر اختصاصی ACC1 و ACC2 انجام شد(جدول ۲) (Huang et al. 2002). واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از دستگاه ترموسایکلر Bio-Rad، با آغازگرACC1 و ACC2 و آنزیم High-fidelity طبق دستورالعمل شرکت تاکارا، در حجم ۵۰ میکرولیتر، حاوی یک واحد از آنزیم (High-fidelity LA-Tag DNA polymerase (Takara، بافر PCR (1X) ۱/۵ میلی‌مولار، ۵۰-۲۰ نانوگرم از DNA ژنومی، ۱/۵ میلی‌مولار MgCl2، ۰/۲ میلی‌مولار از هر dNTP، یک میکرومولار از هر آغازگر انجام شد. برنامه حرارتی برای هر دو آغازگر به صورت گرادیانت، شامل ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ چرخه با ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه، ۵۰-۵۶ درجه سانتی-گراد به مدت ۴۰ ثانیه، ۶۸ درجه سانتی‌گراد به مدت دو دقیقه و بسط نهایی در ۶۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۸ دقیقه بود (Zhang et al. 2009). محصولات تکثیری روی ژل آگارز یک درصد تفکیک و اندازه قطعات با استفاده از نشانگر اندازه مولکولی bp ۱۰۰-۳۰۰۰، SMO323 شرکت فرمنتاز تعیین و قطعه bp ۱۵۰۰ برای ژن *ACC1* و bp ۱۸۰۰ برای ژن *ACC2* شناسایی گردیدند. جهت بدست آوردن توالی ژن‌ها، محصولات PCR بصورت مستقیم و یا ریکاوری شده به مرکز توالی‌یابی SEQLAB آلمان فرستاده شد. قطعات تکثیری حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از آغازگرهای Forward و Reverse توالی‌یابی شدند.

جدول ۱- نام و مشخصات مواد گیاهی مورد استفاده در این تحقیق.

گونه‌ها	کد گونه‌ها	محل جمع آوری	ژنوم	سطح پلوییدی
H. vulgare	TN.02-574	America	H	۲x
H. tworow	KC.70062	Iran	H	۲x
H. spontaneum	TN.02-494	Iran	H	۲x
H. distichon	N-171935 , E-55385	Iran	H	۲x
H. hexastichon	TN.02-102	Turkey	H	۲x

جدول ۲- اسامی آغازگرها برای تکثیر ژن استیل کوآنزیمآ کربوکسیلاز و توالی آن‌ها.

نام آغازگر	توالی رفت(′۳→′۵)	توالی برگشت(′۳→′۵)
AC	GTTCCTGGCTCCCCAATATTTATC	TTCAAGAGATCAACTGTGTAATCA
C1	CCCAATATTTATCATGAGACTTGCA	CAACATTTGAATGAATCTCCACG
AC	GTCCCCGGATCGCCTATATTTATT	TTCAAGAGATCCACRGTGTAGTCA
C2	CTATATTTATTATGAAGGTGGCATC	AGATCCACRGTGTAGTCAACATTA

Archive of SID
www.SID.ir

تجزیه داده‌ها

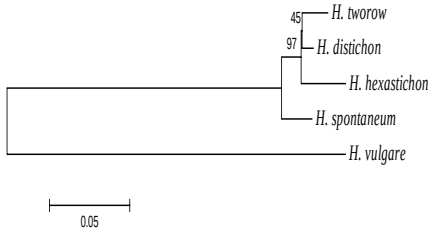
پس از توالی‌یابی قطعات تکثیری، به منظور تعیین قرابت گونه‌ها و بررسی رابطه فیلوژنتیکی از نرم افزارهای Chromas، Bioedit، DNAstar، Blast، MEGA استفاده شد (Naghavi et al. 2009). ازChromas و Bioedit جهت یافتن نوکلئوتیدهای مشخص نشده‌ی احتمالی، از DNAstar به منظور همردیف کردن توالی‌ها استفاده گردید. باDNAstar چیدن و سرهم کردن داده‌های توالی-یابی شده، همردیفی توالی‌ها، تجزیه‌های فیلوژنی و بوسیله Blast یا ابزار جستجوی همردیفی پایه‌ای موضعی، پیدا کردن همردیفی-های بی فاصله و بالاترین امتیاز (در بین توالی موجود در پایگاه-های اطلاعاتی و توالی تقاضا) انجام شد. در واقع با این نرم افزار مشخص شد که توالی‌های ACC2 و ACC1 گونه‌های Hordeum با چه توالی‌های از این ژن‌ها، در گونه‌ی مورد نظر و گونه‌های دیگر شباهت دارد. پس از جستجو و آماده‌سازی و هم‌ردیفی توالی‌ها، از نرم افزار MEGA4 برای تعیین روابط فیلوژنتیکی استفاده شد. در این تحقیق شیوه‌ای که برای رسم درخت فیلوژنتیکی استفاده کردیم روش اتصال مجاور[1] بود که، یکی از روش‌های رایج ساخت درخت تکاملی است. در این تحقیق جهت بررسی صحت درخت‌ها از آزمون Bootstrap با تکرار پذیری ۱۰۰ استفاده شد. از MEGA4 نیز جهت تخمین آزمون هم جنسی توالی‌ها و همچنین الگوی جایگزینی نوکلئوتیدی توالی‌ها استفاده شد، که فرمول مورد استفاده توسط این نرم افزار در الگوی جایگزینی به صورت زیر می‌باشد:

$$R = [A*G*k_1 + T*C*k_2]/[(A+G)*(T+C)]$$

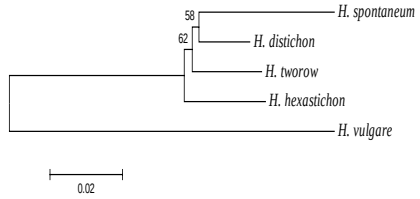
نتایج و بحث

همردیفی توالی‌ها

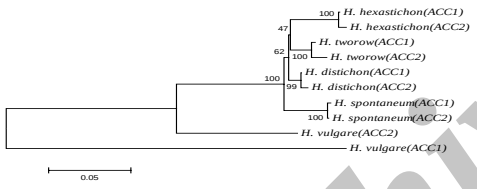
پس از هم‌ردیفی توالی‌هایی که با توالی‌هایی از ژن *ACC1* و *ACC2* در گونه مورد مطالعه در NCBI[2] شباهت داشتند و نمونه-هایی که دارای ارزش E[3] پایین یا صفر بودند انتخاب و از آن‌ها برای ترسیم درخت فیلوژنتیکی استفاده شد. روابط تکاملی H. vulgare و زیرگونه‌های آن در شکل ۱ با استفاده از ژن *ACC1* و در شکل ۲ با استفاده از ژن *ACC2* و در شکل ۳ درخت فیلوژنی با هر دو ژن نشان داده شده است.



شکل۱- درخت فیلوژنتیکی H. vulgare و زیرگونه‌های آن بر اساس ژن ACC1، به روش N.J.



شکل۲- درخت فیلوژنتیکی H. vulgare و زیرگونه‌های آن بر اساس ژن ACC2، به روش N.J.



شکل۳- درخت فیلوژنتیکی H.vulgare و زیرگونه‌های آن بر اساس ژن *ACC2* و *ACC1*، به روش N.J.

در هر سه درخت فیلوژنتیکی H. vulgare در جایگاه جد مشترک زیرگونه‌هایش قرار گرفته است و به دلیل تغییرات تکاملی زیاد این گونه در طی سال‌ها، شاخه‌ی این گونه بلندتر از بقیه شاخه-های درخت می‌باشد (شکل۳،۲،۱). در درخت فیلوژنتیکی بر اساس هر دو ژن، توالی‌های ACC1 و ACC1 هر نمونه در کنار یکدیگر قرار گرفتند، که احتمالا مؤید این مطلب است که ژن‌های سیتوسولی و پلاستیدی استیل کوآنزیمآ کربوکسیلاز در زیرگونه-های استفاده شده این تحقیق، همزمان تکامل پیدا کرده اند.

الگوی جایگزینی نوکلئوتیدی توالی‌ها

از آنجایی‌که با مطالعه انواع جهش که در معرض انتخاب طبیعی قرار گرفته‌اند می‌توان به روابط تکاملی پی برد، از آزمون آماری

[1] NJ(Neighbor joining)
[2] National Center for Biotechnology Information
[3] E value

Archive of SID
www.SID.ir

هم‌جنسی الگوی جایگزینی توالی‌ها استفاده شد تا معنی دار بودن یا نبودن ارتباط گونه‌های مورد مطالعه در درخت‌های رسم شده مشخص گردد. احتمال جایگزینی در بین نوکلئوتیدهای مختلف جو زراعی و زیرگونه‌های آن در جدول ۳ نمایش داده شده است. سرعت‌های متفاوت جایگزینی جفت‌هایی با جایگزینی همجنس[1] بر روی قطر جدول ۳ به صورت پررنگ و بقیه اعداد جفت‌هایی با جایگزینی ناهمجنس[2] می‌باشند. فراوانی نوکلئوتیدی برای (A)۰/۲۳۴، (T/U) ۰/۳۵، (C) ۰/۱۷۸ و (G) ۰/۲۳۸ می‌باشد. نسبت سرعت جایگزینی همجنس به ناهمجنس (R)[3] با در نظر گرفتن، $K1$ =۱/۸۴۱ (پورین‌ها) و $K2$= ۱/۹۴۲ (پیریمیدین‌ها)، ۰/۸۸۸ بدست آمده. با توجه به اینکه از نظر جنبه‌های شیمیایی و ژنتیکی شباهت دو پورین یا دو پیریمیدین بسیار بیشتر از شباهت یک پورین و پیریمیدین است، در نتیجه جهش با جایگزینی ناهمجنس دارای تأثیرات بیشتری نسبت به جایگزینی هم‌جنس می باشد. از این رو معمولا جایگزینی هم‌جنس نسبت به ناهمجنس تغییرات کمتری ایجاد می‌کند. که این مسئله را می توان به درخت مشترک حاصل از دو ژن نسبت داد که با وجود تغییرات تکاملی در بین ایندو ژن هر یک از زیرگونه‌ها کنار یکدیگر قرار گرفتند. پس می‌توان گفت که غالب تغییراتی که طی تکامل در توالی این ژن در اثر جهش رخ داده است، از نوع جایگزینی هم‌جنس بوده است.

آزمون هم‌جنسی الگوی جایگزینی توالی‌ها

فرض صفر آزمون هم جنسی[4] این است که توالی‌ها با الگوی جایگزینی یکسانی تکامل یافته‌اند که با استفاده از تفاوت اریبی بین توالی‌های مورد استفاده در آزمایش قضاوت می‌شود. نرم افزار MEGA4 این فرض را با استفاده از آزمون مونت کارلو[5] با تکرارپذیری هزار جهت برآورد ارزش P انجام می‌دهد. ارزش P کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار درنظر گرفته می شود. در جدول ۴، اعداد زیر قطر اصلی نشان دهنده وجود یا عدم وجود تشابه می‌باشد، اما اعداد بالای قطر میزان عدم توافق[6] در هر مکان ژنی برای هر جفت توالی است. اعداد ستاره‌دار در جدول نشان می‌دهند که دو توالی با الگوی جایگزینی یکسان تکامل نیافته‌اند و در واقع فرض صفرشان رد شده است.

[1] Transitional
[2] Transvertional
[3] Transition/Transversion

[4] Homogenity
[5] Monte Carlo
[6] disparity

جدول۳- بیشترین احتمال جایگزینی نوکلئوتیدی.

	A	*T*	*C*	*G*
A	-	۸/۹۹	۴/۵۸	۱۱/۲۵
T	۶	-	۸/۸۹	۶/۱۱
C	۶	۱۷/۴۶	-	۶/۱۱
G	۱۱/۰۴	۸/۹۹	۴/۵۸	-

جدول۴- اعداد آزمون هم‌جنسی در زیر قطر اصلی و میزان عدم توافق توالی‌ها بالای قطر اصلی.

گونه	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰
۱.*H. hexastichon(ACC1)*		۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۹/۰۷	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۱/۰۵	۰/۰۱
۲.*H. tworow(ACC1)*	۱/۰۰		۰/۰۸	۰/۰۰	۹/۰۸	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۸	۱/۷۷	۰/۰۳
۳.*H. spontaneum(ACC1)*	۱/۰۰	۰/۰۴ *		۰/۱۳	۷/۶۴	۰/۰۰	۰/۰۳	۰/۰۰	۱/۰۰	۰/۱۳
۴.*H. distichon(ACC1)*	۱/۰۰	۰/۳۸	۰/۰۰ **		۱۰/۰۷	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۱۲	۱/۸۰	۰/۰۱
۵.*H. vulgare(ACC1)*	۰/۰۰ **	۰/۰۰ **	۰/۰۰ **	۰/۰۰ **		۸/۸۵	۹/۲۹	۷/۷۰	۳/۷۱	۹/۷۳
۶.*H. hexastichon(ACC2)*	۱/۰۰	۱/۰۰	۱/۰۰	۰/۳۷	۰/۰۰ **		۰/۰۰	۰/۰۰	۱/۴۲	۰/۰۲
۷.*H. tworow(ACC2)*	۱/۰۰	۱/۰۰	۰/۱۷	۱/۰۰	۰/۰۰ **	۱/۰۰		۰/۰۳	۱/۵۱	۰/۰۱
۸.*H. spontaneum(ACC2)*	۱/۰۰	۰/۰۲ *	۱/۰۰	۰/۰۰ **	۰/۰۰ **	۱/۰۰	۰/۱۵		۱/۰۲	۰/۱۱
۹.*H. vulgare(ACC2)*	۰/۰۰ **	۰/۰۰ **	۰/۰۰ **	۰/۰۰ **	۰/۰۰ **	۰/۰۰ **	۰/۰۰ **	۰/۰۰ **		۱/۵۶
۱۰.*H. distichon(ACC2)*	۰/۲۳	۰/۶۰	۰/۰۰ **	۰/۰۰ **	۰/۰۰ **	۰/۲۴	۰/۲۵	۰/۰۰ **	۰/۰۰ **	

Archive of SID
www.SID.ir

از مقایسه‌ی اعداد آزمون هم‌جنسی و عدم توافق می‌توان پی برد که این مقادیر غالبا از نظر مقدار، عکس یکدیگر هستند، بعنوان مثال از آزمون هم‌جنسی *H. hexastichon* با *H. tworow* در ژن *ACC1* استنباط می‌شود که ایندو زیرگونه الگوی جایگزینی تکاملی ماکزیمم مقدار (یک) را داشته‌اند، در حالی‌که شاخص عدم توافق آن‌ها یعنی تفاوت میزان در الگوی جایگزینی ایندو توالی از یکدیگر کمترین مقدار (صفر) می‌باشد. در واقع شاخص عدم توافق مقدار تنوع را در توالی‌هایی که دارای الگوی جایگزینی یکسان یا غیر یکسانی بودند، نشان می‌دهد. نتایج این آزمون نشان می‌دهد، در هر دو ژن *ACC1* و *ACC2* فرض صفر مبنی بر این‌که *H. vulgare* و زیرگونه‌هایش الگوی جایگزینی تکاملی یکسانی داشته‌اند، رد می‌شود. همچنین در ژن *ACC1* الگوی جایگزینی مابین *H.spontaneum* و *H.tworow* و زیرگونه‌هایH.spontaneum و H. Distichon متفاوت می‌باشد. این در حالی است که در ژن ACC2 الگوی جایگزینی در بین *H.spontaneum* و *H. Tworow* و زیرگونه‌های *H. spontaneum* و *H. distichon* یکسان بوده است. درخت‌های تکاملی ACC1 و ACC2 در بین گونه‌ی *H. vulgare* و زیرگونه‌های آن کاملاً با یکدیگر منطبق هستند. با رسم درخت تکاملی مشترک این دو ژن استنباط می‌شود که ژن *ACC2* و *ACC1* دارای منشأ ژنی یکسانی هستند و تشابهاتی دارند، زیرا نرم افزار MEGA4 درخت این دو ژن را با هم رسم نمود، این درحالی است که نرم افزار نامبرده، در صورت تفاوت زیاد بین توالی‌ها قادر به رسم درخت نخواهد بود. همچنین می‌توان استنباط کرد که توالی‌های این دو ژن سیتوسولی و پلاستیدی در گونه نامبرده و زیرگونه‌هایش احتمالا سیر تکاملی یکسانی داشته است، زیرا در درخت‌های فیلوژنی رسم شده، می توان مشاهده نمود که هر دو توالی ژن‌های ACC1 و ACC2 گونه‌ی *H. vulgare* و زیرگونه‌هایش در کنار یکدیگر قرار گرفتند. درخت تکاملی مشترک هر دو ژن با آزمون هم‌جنسی الگوی جایگزینی در اکثر نمونه‌ها مطابقت داشت. بطوری‌که در آزمون هم‌جنسی توالی‌های *H. spontaneum*، *H. tworow* و *H. hexastichon* در هر دو ژن ACC1 و ACC2 با الگوی یکسانی تکامل یافته‌اند و در درخت مشترک کنار یکدیگر جای گرفته‌اند. در صورتی‌که این دو ژن در *H. vulgare* الگوی تکاملی یکسانی نداشتند که در درخت مشترک این عدم توافق کاملا مشاهده می‌شود. احتمال این‌که، ژن‌های تک نسخه و کم نسخه دستخوش تکامل گروهی شوند، کم است، بنابراین آن‌ها ابزار مهمی جهت مطالعه‌ی مبدأ و تکامل پلی پلوییدها می‌باشند (Golovnina et al. 2007; Sun et al. 2009) با توجه به اینکه ژن‌های هسته‌ای همانند *ACC* با تعداد کپی کم اغلب توالی‌های اینترونی متفاوتی دارند، می‌توانند جهت تشخیص روابط تکاملی درون ژنومی بکار رود (Zhang et al. 2009)، لذا این تحقیق با مقایسه توالی‌های DNA توسط دو ژن کلیدی *ACC1* و *ACC2* با دو منشأ متفاوت پلاستیدی و سیتوسولی، همراه با بررسی آماری الگوی جایگزینی نوکلئوتیدی وضعیت تکاملی و روابط منطقی و معقول تاکسونومی گونه‌ی زراعی و مهم *H. vulgare* و زیرگونه هایش را مشخص نمود.

منابع

Blattner F R (2004). Phylogenetic analysis of Hordeum (Poaceae) as inferred by nuclear rDNA ITS sequences. Molecular Phylogeny Evolution, 33:289-299

Blattner F R (2009) Progress in phylogenetic analysis and a new infragenetic classification of barley genus Hordeum (Poaceae: Triticeae). Breeding Science 59: 471–480.

Bothmer R V and Jacobsen N (1986) Interspecific crosses in Hordeum (Poaceae). Pl. Systematic Evolution, 153: 49–64

Bothmer R V, Flink J and Landström T (1987) Meiosis in interspecific Hordeum hybrids. Triploid combinations. Evolution Trends Plants ,1: 41–50

Fan X, Sha L, Yang R, Zhang H, Kang H, Ding C, Zhang L, Zheng Y L, Zhou Y H (2009) Phylogeny and evolutionary history of Leymus (Triticeae; Poaceae) based on a single-copy nuclear gene encoding plastid acetyl-CoA. BMC Evolutionary Biology, 9:247 doi:10.1186

Faris J, Sirikhachornikit A, Hhaselkorn R, Gill B, and Gonicki P (2001) Chromosome mapping and phylogenetic analysis of the cytosolic acetyl-coA carboxylase loci in wheat. Molecular Biology Evolution. 18(9) :1720 -1733

Forsrter B P, Ellis R P, Thomas B, Newton A C, Tuberosa R, This D, El- Enein R A, bahri M and Ben Salem M (2000) The development and application of molecular markers for abiotic stress tolerance in barley. J. Experimental Botany, Vol. 51, No. 342. pp. 19-27

Golovnina K A, Glushkov S A, Blinov A G, Adkison L R and Goncharov N P (2007) Molecular phylogeny of the genus Tritium .PL. Evolution . 264: 195-216

Archive of SID
www.SID.ir

Huang S, Sirikhachornikit A, Faris J D, Su X, Gill B S, Hhaselkorn R and Gonicki P (2002) Phylogenetic analysis of the acetyl-coA carboxylase and 3-phosphoglycerate kinase loci in wheat and other grasses. Plant molecular biology, 48: 805-820

Huang S, Sirikhachornikit A, Su X, Faris J D, Gill B, Haselkorn R, Gonicki P (2002) Genes encoding plastid acetyl-coA carboxylase and 3-phosphoglycerate kinase of the *Triticum/Aegilops* complex and the evolutionary history of polyploidy wheat, PNAS 99: 8133-8138

Huang S, Xiujuan Su, Haselkorn R, Gornicki P (2003) Evolution of switchgrass (Panicum virgatum L.) based on sequences of the nuclear gene encoding plastid acetyl-CoA carboxylase. Plant Science, 16

Jakob S S, Ihlow A and Blattner F R (2006) A chloroplast genealogy of Hordeum (Poaceae): long-term persisting haplotypes, incomplete lineage sorting, regional extinction and the consequences for phylogenetic inference. Molecular Biology Evolution. 23: 1602-2612

Komatsuda T, Tann K I, Salomon B, Bryngelsson T and Bothmer R V (1999) Phylogeny in the genus Hordeum based on nucleotide sequences closely linked to the vrs1 locus (row number of spikelets). Genome 42: 973-981

Murray M G and Thompson W F (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Research. Vol. 8, No. 19 4321-4326

Naghavi, M.R., M.A, Malbobi., and S, Rashidi. 2009. Bioinformatics. University of Tehran press. PP, 457.(In Farsi).

Safari, M. 2003. Principle of Agricultural Biochemistry. University of Tehran Press. PP, 608.(In Farsi).

Sun G, Pourkheirandish M and Komatsuda T (2009) Molecular evolution and phylogeny of the *RPB2* gene in the genus Hordeum. Annals of Botany, 103:975–983

Wang R, Bothmer R V, Dvorak J, Fedak G, Linde-Laursen I and Muramatsu M (1996) Genome symbols in the *Triticeae*. In Proceedings of the 2nd International *Triticeae* Symposium, Utah State University, Logan, pp.29–34

Zhang C H, Fan X, Yu H.Q, Zhang H Q, Wang X L and Zhou Y H (2009) Phylogenetic analysis of questionable tetraploid species in Roegneria and Pseudoroegneria (Poaceae: Triticeae) inferred from a gene encoding plastid acetyl-CoA carboxylase. Biochemical Systematics and Ecology, 1–9. 150–163

Zohary D (1969) the progenitors of wheat and barley in relation to domestication and agricultural dispersal in the old world. In Ucko PJ, Dimbleby GW (eds) The domestication and exploitation of plants and animals. General Duckworth and Co. Ltd., London, pp 47-66

Archive of SID

www.SID.ir