مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی- مولکولی
دوره سوم، شماره نهم، زمستان ۱۳۹۱

NCMBJ
Research Article
مقاله تحقیقی

مطالعه مولکولی و آنالیز توالی ژن Wdhn13 (LEA) در گندم های زراعی نان، دوروم و گونه های دهنده ژنومی آن ها

مهران فلک ناز[۱]، علی اشرف مهرابی[۲]، دانیال کهریزی*[۳] ، علی اصغر نصراله نژاد[۴]،خیراله یاری [۵]

[۱]دانشجوی کارشناسی ارشد اصلاح نباتات دانشگاه ایلام، ایلام، ایران
[۲]استادیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشگاه ایلام، ایلام، ایران
[۳]دانشیار، گروه زراعت واصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی دانشگاه رازی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران
[۴]استادیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
۵ مربی، مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، ایران

چکیده

سابقه و هدف: پروتئین‌های LEA اولین بار در گندم و پنبه به عنوان پروتئین‌های تجمعی در اواخر دوره جنینی شناسایی و مطرح شدند. بیشتر دسته بندی‌های عمومی ژن‌های LEA به وسیله استنباط از ساختار دمین های پروتئینی یا ویژگی های شیمیایی بدست می‌آید. روش‌های بیو انفورماتیکی روش‌های مفیدی برای مطالعه ژنوم در شرایط خارج آزمایشگاهی می‌باشند.

مواد و روش ها: در این تحقیق جهت مطالعه ژن Wdhn13 پروتئین های LEA درگونه های مختلف گندم از ۸ گندم زراعی و وحشی (شامل سرداری، نان گنبد، دوروم شوش، دوروم بروجرد، اورارتو، دیکوکوئیدز، تائوشی و اسپلتوئیدز) استفاده شد و توالی بدست آمده از آن ها با تنها توالی ژن Wdhn13 مربوط به گندم نان در پایگاه اطلاعاتی NCBI از طریق نرم افزار های بلاست، CLC و داروین مقایسه شد.

یافته ها: نتایج آنالیز نشان داد که توالی ژن Wdhn13 در گندم سرداری با توالی ژن Wdhn13 مربوط به گندم نان موجود در NCBI بیشترین شباهت و توالی ژن Wdhn13 در گندم اورارتو کمترین شباهت را با توالی ژن Wdhn13 مربوط به گندم نان موجود در NCBI دارد. علت این تفاوت هم تغییرات در اسید های آمینه بر اساس تغییرات در توالی DNA نمونه ها می باشد. همردیفی از طریق نرم افزار BLAST و درخت فیلوژنتیکی رسم شده بر اساس الگوریتم UPGMA نیز موید این نتیجه بودند. همچنین درخت فیلوژنتیکی رسم شده سیر تکاملی منطقی را در ارتباط با این ژن برای اشتقاق گونه های دیپلوئید، تتراپلوئید و هگزاپلوئید از یکدیگر نشان داد. جدول فاصله توالی ها نیز موید این بود که نتایج BLAST و درخت فیلوژنتیک بر هم منطبق می باشند.

نتیجه گیری: نتایج این تحقیق نشان داد که با توجه به تکثیر ژن مورد نظر بر روی ژنوم های دیپلوئید اورارتو (AA) و گونه های تتراپلوئید و هگزاپلوئید شامل ژنوم AA و عدم تکثیر بر روی گونه های اسپلتوئیدز (BB) و تائوشی (DD) می توان نتیجه گرفت که ژن Wdhn13 بر روی ژنوم AA گندم قرار دارد.

کلمات کلیدی: گندم، ژنWdhn13، پروتئین LEA

مقدمه

پروتئین های LEA (Late embryogenesis abundant) اولین بار در گندم و پنبه به عنوان پروتئین های تجمعی در اواخر دوره جنینی شناسایی و مطرح شدند (۴،۵). آنالیزهای اولیه نشان داد که پروتئین های LEA در دو دسته جداگانه LEA و زیر گروه‌های LEA-A قرار دارند. ژن های LEA-A در زمان تنش شوری و در ابتدای توسعه بذر و قبل از ژن های LEA بیان می شوند. بیشتر دسته بندی های عمومی ژن های LEA به وسیله استنباط از ساختار دمین های پروتئینی یا ویژگی های

آدرس نویسنده مسئول: گروه زراعت واصلاح نباتات دانشکده کشاورزی دانشگاه رازی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران
Email:dkahrizi@yahoo.com
تاریخ دریافت مقاله: ۹۱/۰۳/۰۱
تاریخ پذیرش: ۱۰/ ۱۳۹۱/۰۸

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-09-15]
[DOR: 20.1001.1.22285458.1391.3.9.2.6]

شیمیایی بدست می آید که این معیار های عمومی به وسیله Dure *et al* در سال ۱۹۸۹ ارائه شد (۵). ژن های LEA بسیار حساس به ABA هستند زیرا ABREs (تنظیم کننده عناصر در ناحیه پروموتور) که حاوی توالی ACGT می باشد و به نام جعبه G معروف است، بسیار حساس به ABA بوده و وابسته به حضور عناصر MYC با توالی CACCTG و عناصر MYB با توالی TAACTG می باشد، ABREs می تواند با فاکتور های رونویسی bZIP اثر متقابل داشته باشد (۱۲). موتیف های ABRE همچنین در ناحیه پروموتر ژن های تنظیم کننده مقاومت به خشکی که در بیان مقاومت به تنش هایی که توسط خانواده های چند ژنی صورت می گیرد، در گیر هستند (۶). پروتئین های مختلف LEA برای تجمع در مقابله با تنش های محیطی در گیاه شناخته شده اند، بنابراین پروتئین های LEA باید در مکانیسم های مقاومت از طریق تجمع در بافت مورد نظر در اوایل ظهور تنش دخالت داشته باشند. در بافت های مختلف گیاهی پروتئین های LEA می توانند باعث جلوگیری ازغیر فعال شدن چرخه های منجمد سازی وغیر منجمد شدن لاکتات دی هیدروژناز می باشد (۱۴) بیرینی و همکاران در سال ۲۰۰۷ تحقیقی با عنوان، بیان بیش از اندازه ژن DHN-5 گندم در گیاه آرابیدوپسیس جهت مقاومت به تنش محیطی را انجام دادند. آن ها به این نتیجه رسیدند که ژن های پروتئین LEA در اکثر گیاهان وجود داشته و در زمان تنش باعث ایجاد مقاومت و پایداری شده و حتی بیان بیش از حد آن باعث مقاومت بیشتر گیاه می شود (۳). بارتلت و همکاران در سال ۲۰۰۷ تحقیقی با عنوان، بیان ژن، مسیر و تنظیم بیان ژن های مختلف را انجام داده و نتیجه گرفتند که، پروتئین های LEA در پاسخ به تنش های محیطی بیان شده و باعث پایداری گیاه در برابر خشکی، محافظت ساختار سیتوسولیک، جلوگیری از تجزیه یون ها و پایداری دیواره سلولی می شوند و این پروتئین ها در اواخر دوره جنینی در بذور تجمع پیدا کرده و باعث مقاومت در برابر تمامی تنش های محیطی می شود (۱،۱۱). کوبایاشی و همکاران در سال ۲۰۰۸ تحقیقی با عنوان رونویسی فعال ژن های Cor/Lea و افزایش مقاومت به تنش زیستی از طریق بیان همولوگ DREB2 گندم در توتون ترانسژنیک را انجام داده و به این نتیجه دست یافتند که DREB2 به عنوان فاکتور رونویسی عمل کرده و در جهت مثبت، ژن های dhn13,Wrab17,Wrab18,Wrab19 را در توسعه مقاومت به تنش های غیرزنده در گندم تنظیم می کند، که این تحقیق باعث شناسایی ژن wdhn13 درگندم نان گردید (۷). شنگ و همکاران در سال ۲۰۰۹ مطالعه ای تحت عنوان تغییر ساختار و بالا بردن مقاومت به خشکی در برنج با کاهش میزان ایندول-۳- استیک اسید به وسیله فعالیت TLD1/OsGH3.13 را انجام داده و در نهایت نتیجه گرفتند که کاهش میزان IAA به تجمع mRNA پروتئین های LEA کمک کرده و باعث شروع مقاومت تنش در برنج می شود (۹). لیو و همکاران در سال ۲۰۰۹ مطالعه‌ای بر روی پروتئین های گروه ۴ LEA استخراج شده از گیاه *Boea hygrometrica* انجام دادند و در نهایت به این نتیجه دست یافتند که گیاه *Boea hygrometrica* می تواند در زمان کم شدن میزان آب و تنش خشکی زنده مانده و به عنوان یک سیستم مدل در تحمل به خشکی مورد استفاده قرار گیرد، همچنین مطالعات کتابخانه ای cDNA برگ های خشک شده با استفاده از تکنیک میکرو آرایه ها نشان داد که پاسخ به تنش در اثر گروه ژنی است که باعث تولید ۴ گروه پروتئینی LEA در گیاه تنباکو می شود (۱۳). باهارندروف و همکاران در سال ۲۰۰۹ در مطالعه ای با عنوان آنالیز بیوانفورماتیکی و بیان پروتئین های LEA در پاسخ به تنش خشکی Collembola به بررسی بیان پروتئین های مشخص LEA مانند پروتئین شوک گرمایی HSP70 در طول تنش دمایی در خاک Collembola پرداختند. آنالیز های Insilco چهار EST از دو گونه Collembola نشان داد که پروتئین های گروه ۳ LEA در *Megaphorura arctica* حضور دارد (۱۰). ژن Wdhn13 از ژن های کد کننده پروتئین های گروه دوم LEA با وزن ملکولی ۱۲/۸ کیلودالتون به عنوان کوچکترین عضو گروه دی هیدرین ها در گیاهان با سه قطعه غنی از لایسین می باشد. ژن Wdhn13 برخلاف سایر DHN ها(دیهیدرین ها) که بر روی همولوگ های گروه ۶ گندم قرار دارند بروی کروموزوم های گروه ۷ قرار دارند.(۸) DHN ها ژن هایی تجمعی هستند که در پاسخ به تنش های کم آبی، سرمایی، پسابیدگی و شوری بیان می شوند و پروتئین های LEA را برای مقاومت بیان می کنند. پروتئین های LEA در بذور خشک و بالغ تجمع یافته و به وسیله ABA تنظیم

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-09-15]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1391.3.9.2.6]

می شوند. ژن های LEA بسیار حساس به ABA هستند زیرا ABREs یا تنظیم کننده عناصر در ناحیه پرموتورکه حاوی توالی ACGT می باشد و به نام جعبه G معروف است، بسیار حساس به ABA می باشد و وابسته به حضور عناصر MYC با توالی CACCTG و عناصر MYB با توالی TAACTG می باشد (۱۲). خشکی در واقع یک رویداد هوا شناختی است که با عدم وقوع بارندگی در یک دوره زمانی همراه می‌باشد، دوره ای که به اندازه کافی بلند است تا باعث تخلیه رطوبتی خاک و تنش کمبود آب همراه با کاهش پتانسیل آب در بافت‌های گیاهی گردد. اما از دیدگاه کشاورزی، خشکی عبارت است از ناکافی بودن مقدار و توزیع آب قابل استفاده در طی دوره رشد گیاه که این امر موجب کاهش بروز توان کامل ژنتیکی گیاه می‌گردد. خشکی عامل اصلی محدود کننده تولیدات کشاورزی است که گیاه را از رسیدن به حداکثر توان محصول دهی باز می‌دارد (۱). مقاومت به خشکی صفت پیچیده ای است که بروز آن بستگی به عمل و عکس‌العمل میان صفات مختلف مورفولوژیکی (زودرسی، کاهش سطح برگ، لوله ای شدن برگ، میزان موم، سیستم ریشه ای کارآمد، ریشک دار بودن، پایداری عملکرد و کاهش پنجه زنی)، فیزیولوژیکی (کاهش تعرق، افزایش راندمان مصرف آب، بسته شدن روزنه‌ها و تنظیم اسمزی)، و بیوشیمیایی (تجمع پرولین، پلی آمین، ترهالوز و غیره، افزایش فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز و افزایش ذخیره سازی کربوهیدرات‌ها) دارد. مکانیزم‌های ژنتیکی کنترل کننده این صفات چندان شناخته شده نیستند (۱،۲). هدف این بررسی شناسایی آلل های جدید از ژن Wdhn13 در گونه های دیگر گندم و مقایسه آن ها با یکدیگر در سطوح نوکلئوتیدی و آمینواسیدی می باشد.

مواد و روش ها

این تحقیق در سال ۱۳۹۰ در آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشگاه ایلام انجام شد. مواد گیاهی این تحقیق عبارتند از گندم های وحشی دارای ژنوم AA,BB,DD,AABB و همچنین گندم های زراعی دارای ژنوم AABB,AABBDD جمع آوری شده از مناطق مختلف استان ایلام، که مشخصات آن ها در جدول ۱ آمده است.

نام	ژنوم	کد نمونه در PCR	نام	ژنوم	کد نمونه در PCR
دروم بروجرد	AABB	A	دیکوکویدز	AA BB	5
سرداری	AABBDD	B	اورارتو	AA	6
نان گنبد	AABBDD	2	تائوشی	DD	8
دروم شوش	AABB	4	اسپلتوئیدز	BB	12

جدول ۱- معرفی گونه های گندم مورد استفاده در این تحقیق.

در مرحله اول بذور ضد عفونی شده و در گلدان کشت شدند پس از گذشت یک هفته از برگ های تازه از طریق روش بافر CTAB، DNA ژنومی نمونه ها استخراج شدند، پس از استخراج DNA ژنومی کیفیت DNA ژنومی بر روی ژل آگارز ۰/۸ درصد مشاهده شد سپس از روی تنها توالی مربوط به ژن Wdhn13 مربوط به گندم نان موجود در پایگاه اطلاعاتی NCBI به وسیله نرم افزار Oligo5 آغازگر اختصاصی طراحی شد. در هر واکنش PCR ۲۵ µL، بافر 10X PCR به میزان ۲/۵ µL، $MgCl_2$ ۲۰ میلی مولار به میزان ۱/۳ µL، dNTPs ۱ میلی مولار به میزان ۲/۵ µL، آغازگر های رفت و برگشت از هرکدام به میزان ۰/۳ µL،آنزیم *pfu* پلیمراز به میزان ۱ واحد آنزیمی، آب دوبار یونیزه شده به مقدار ۱۵/۸ µl و الگوی DNA به میزان ۱/۳ µL مورد استفاده قرار گرفت. واکنش PCR با یک مرحله آغازین واسرشت در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد و مدت ۴ دقیقه شروع شد. پس از آن ۳۵ چرخه تکثیری شامل سه مرحله متوالی ۹۴ درجه به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۵درجه سانتی گراد به مدت ۶۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۹۰ ثانیه انجام شد. در مرحله آخر یک مرحله ۱۰ دقیقه ای در دمای ۷۲ درجه برای امتداد و اتمام همانند سازی کل رشته ها در نظر گرفته شد، به منظور اطمینان از تکثیر صحیح قطعه مورد نظر، محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز شد. در مرحله بعد باند های مورد نظر از روی ژل آگارز به وسیله کیت خالص سازی توسط شرکت Bionner جداسازی شده تحت PCR قرار گرفته و محصولات حاصل از آن پس از الکتروفورز توالی یابی گردیدند جهت دقت بالاتر از دو آغازگر رفت و برگشت جهت توالی یابی استفاده شد جهت شناسایی توالی ژن ابتدا توالی آغازگر

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-09-15]

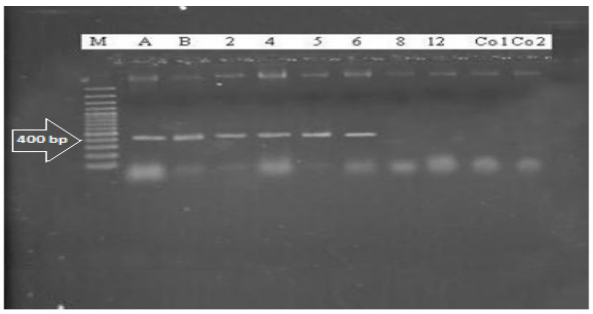
[DOR: 20.1001.1.22285458.1391.3.9.2.6]

رفت در توالی ها شناسایی و سپس به وسیله نرم افزار آنلاین BLAST با توالی موجود در پایگاه اطلاعاتی مقایسه شد. نواحی مربوط به ژن مورد نظر شناسایی و با توالی مربوط به گندم نان مقایسه شدند و برای شناسایی نواحی اختلاف و مشخص شدن آن ها توالی ها توسط نرم افزار CLC Sequence Viewer با یکدیگر مقایسه شده، به توالی پروتئینی تبدیل و در نهایت بررسی شدند. برای مقایسات لازم از نرم افزارهای Blast، Edit Seq و CLC main Workbench استفاده شد.

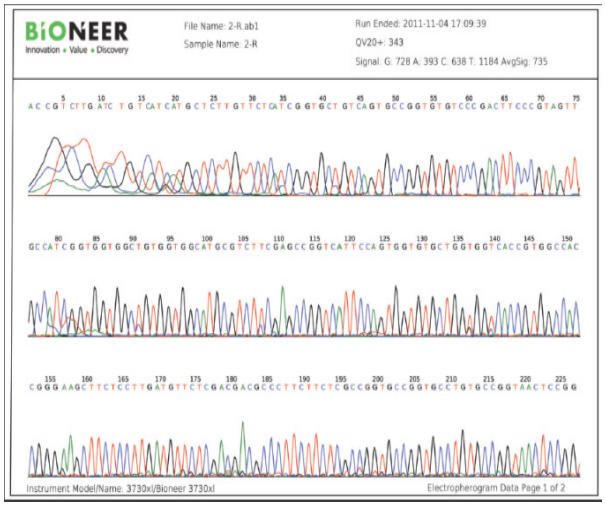
یافته ها

ابتدا DNA های استخراج شده با پرایمرهای تخصصی تحت PCR قرار گرفتند (شکل ۱). در مرحله بعد نتایج PCR توالی یابی شدند. بخشی از تعیین توالی ژن تکثیر یافته Wdhn13 در شکل ۲ نشان داده شده است. کیفیت گراف ها نشان دهنده میزان دقت در تعیین توالی می باشد. همانطور که در شکل ۱ نشان داده شده است نمونه گندم وحشی اورارتو با ژنوم دیپلوئید AA (نمونه با کد ۶) و نمونه های گندم زراعی دوروم بروجرد، دوروم شوش و گندم وحشی دیکوکوئیدز با ژنوم تتراپلوئید AABB (نمونه های با کد A، ۴ و ۵) و نمونه های گندم زراعی سرداری و نان گنبد با ژنوم هگزاپلوئید AABBDD (نمونه های با کد B و ۲) ژن مورد نظر را تکثیر کردند. نمونه های گندم وحشی تائوشی با ژنوم DD (نمونه شماره ۸) و اسپلتوئیدز با ژنوم BB (نمونه با کد ۱۲) ژن مورد نظر را تکثیر نکردند. در این مرحله با توجه به تکثیر ژن مذکور بر روی ژنوم های دیپلوئید اورارتو (AA) و گونه های تتراپلوئید و هگزاپلوئید شامل ژنوم AA و عدم تکثیر بر روی گونه های اسپلتوئیدز (BB) و تائوشی(DD) می توان نتیجه گرفت که ژن مورد نظر بر روی ژنوم AA گندم وجود دارد. که این نتیجه به عنوان نتیجه اولیه این تحقیق بسیار حائز اهمیت است.

در مرحله بعد جهت آنالیز های بیوانفورماتیکی از نتایج حاصل از توالی نمونه ها استفاده شد. نتایج در مرحله اول توسط نرم افزار آنلاین BLAST با تنها توالی موجود در پایگاه اطلاعاتی NCBI (توالی مربوط به گندم نان) مورد مقایسه قرار گرفت. یافته‌ها نشان داد ژن Wdhn13 به صورت یک تکه و بدون اینترون در داخل ژن می باشد و قسمت رمزگردان آن در داخل



شکل ۱- تکثیر ژن Wdhn13 با آغازگر های تخصصی در گندم های مورد مطالعه
از چپ به راست M: سایز مارکر(لدر)، A:دوروم بروجرد، B:سرداری، 2:نان گنبد، 4:دوروم شوش، 5:دیکوکوئیدز، 6:اورارتو، 8:تائوشی، 12:اسپلتوئیدز،Co1:کنترل ۱(واکنشPCR بدون DNA)، Co2: کنترل ۲(واکنشPCR بدون پرایمر)



شکل ۲- نتایج توالی یابی محصولات PCR

پایگاه اطلاعاتی NCBI نیز از کدون شماره ۱۷۶۲ شروع و تا کدون شماره ۲۱۳۶ ادامه دارد. نواحی قبل از کدون شماره ۱۷۶۲ به عنوان 3́-UTR و نواحی بعد از کدون پایان شماره ۲۱۳۶ به عنوان 5́-UTR خطاب می‌شوند.

نتیجه مقایسه درگندم اورارتو نشان داد که توالی ژن Wdhn13 با توالی گندم نان موجود در پایگاه اطلاعاتی ۸۵ درصد شباهت دارند و این اختلاف ۱۵ درصدی باعث تغییر در توالی سی و پنج اسیدآمینه شده است. که این تغییرات به شرح زیر بوده است:

H6R, G7A, E10D, K11Q, K12G, G13R, V14A, M15E, E16A, P23G, R24G, G27D, T33G, G35D, T36R, Y37A, G38A, H42R, T43D, H73P, G78P, M79A, S80H, G81R, S82R, K83A, T84S, H85Y, Y95H, G96W, K97N, S98D,

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-09-15]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1391.3.9.2.6]

G99R, H100L, T101E

همچنین در گندم دیکوکوئیدز نتایج مقایسه نشان داد که توالی ژن Wdhn13 با توالی گندم نان موجود در پایگاه اطلاعاتی ۹۲ درصد شباهت دارند و این اختلاف ۸ درصدی باعث تغییر در توالی هجده اسیدآمینه شده است. که این تغییرات به شرح زیر بوده است:

V14I, M15V, G69S, H70Y, G71E, D72N, H73I, Q74K, H75E, G81V, S82V, K83E, H85Q, A86R, A89G, T90M, G107D, -114T

درگندم دوروم بروجرد نتایج نشان داد که توالی ژن Wdhn13 ۹۷ درصد با توالی گندم نان موجود در پایگاه اطلاعاتی شباهت دارند، و این اختلاف ۳ درصدی باعث تغییر در توالی پنج اسیدآمینه شده است که این تغییرات به شرح زیر بوده است:

H5R, M15V, R24G, Y37C, H73P

مقایسات در درگندم دوروم شوش با توالی گندم نان موجود در پایگاه اطلاعاتی NCBI نشان داد که این توالی ها ۹۲ درصد شباهت دارند و این اختلاف ۸ درصدی باعث تغییر در توالی هجده اسیدآمینه شده است. که این تغییرات به شرح زیر بوده است:

H5R, G6A, E10D, G13V, M15V, S17I, I18M, T19K, K21M, P23G, R24G, G27D, D28H, T33G, G35S, H73P, M112I, -114T, D115-

نتیجه مقایسه درگندم نان گنبد با توالی گندم نان موجود در پایگاه اطلاعاتی نشان داد که توالی ژن Wdhn13 در گندم نان گنبد با توالی موجود در NCBI ۹۶ درصد شباهت دارند این اختلاف ۴ درصدی باعث تغییر در توالی هفت اسیدآمینه شده است که این تغییرات به شرح زیر بوده است:,V14I, R24G G107D, -114T, K116Q, I117D, K118G

و در نهایت نتیجه این مقایسه بین توالی ژن Wdhn13 در گندم سرداری و توالی موجود در NCBI نشان دهنده این بود که توالی ژن Wdhn13 درگندم سرداری با توالی گندم نان موجود در پایگاه اطلاعاتی ۹۸ درصد شباهت دارند (شکل ۳) و این اختلاف ۲ درصدی باعث تغییر در توالی چهار اسیدآمینه شده است که این تغییرات به شرح زیر بوده است:

V14I, M15V, R24G, G107D

توضیح اینکه در این نشانه ها حرف اول نشانه اسید آمینه مربوط به ژن گزارش شده در NCBI، عدد نشان دهنده جایگاه اسید آمینه در پروتئین مورد نظر و حرف دوم نشانه اسید آمینه در ژن مورد تحقیق می باشد. به طور مثال H6R بدین معنی است که در جایگاه شماره ۶ به جای اسید آمینه H (هیستدین) در NCBI در نمونه اورارتو اسید آمینه R قرار گرفته است و همچنین خط فاصله نشان از عدم وجود آن اسید آمینه می باشد. به طور مثال T-114 بدین معنی است که در جایگاه شماره ۱۱۴ نمونه NCBI فاقد اسید آمینه می باشد و این جایگاه در گندم مورد بررسی (دیکوکوئیدز) دارای اسید آمینه T می باشد. تغییرات اسید آمینه ای در این نمونه عمدتاً به دلیل تغییر در نوکلئوتید اول کدون های رمز گردان بوده است به طوری که در برخی نقاط تغییر در کدون های سوم هیچگونه تغییری در اسید آمینه رمز شده نداشته است.

تعیین میزان شباهت نمونه ها

گندم نان رقم سرداری شباهت بیشتری از نظر ترادف اسید آمینه مربوط به ژن Wdhn13با گندم نان گزارش شده در NCBI دارد. نتایج مقایسه توالی های بدست آمده از این نمونه ها توسط نرم افزار CLC Sequence Viewer در شکل۴ و ۵ نشان داده شده و در نهایت توالی مورد توافق در ارتباط با این ژن در بخش های مورد توافق آمده است.

آنالیز های فیلوژنتیکی

آنالیز فیلوژنتیکی بر اساس توالی DNA

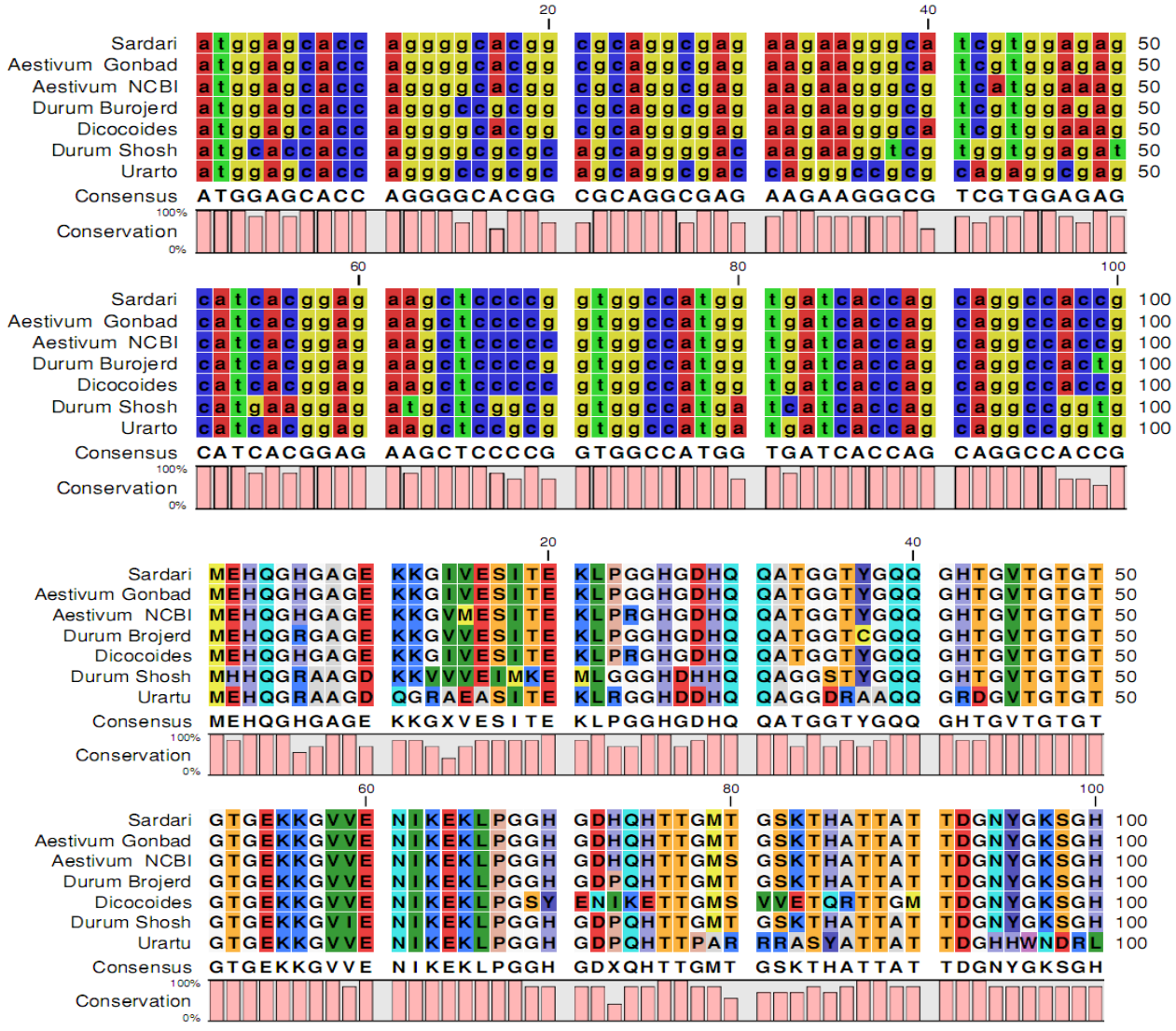
نتایج حاصل از درخت فیلوژنتیکی توالی ژن Wdhn13 که بر اساس الگوریتم UPGMA توسط نرم افزار Sequence CLC viewer براساس توالی نوکلئوتیدی رسم شد، در نمونه های مورد بررسی تایید کننده نتایج حاصل از همردیفی توالی ها از طریق نرم افزار آنلاینBLAST بود (شکل ۶) گندم سرداری در مورد ژن Wdhn13 بیشترین شباهت را با نمونه موجود در NCBI دارد .همچنین گندم اورارتو دارای کمترین شباهت می باشد. ماتریس شباهت ها (شکل ۷) نیز که بر اساس الگوریتم UPGMA بدست آمده بود نیز موید این موضوع بود که نتایج BLAST و آنالیزهای فیلوژنتیکی بر هم منطبق می باشند.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-09-15]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1391.3.9.2.6]

```
>dbj|AB297677.1| G Triticum aestivum Wdhn13 gene for group2 late embryogenesis a
protein, complete cds
Length=2408

 GENE ID: 542792 Wdhn13 | LEA D-11 dehydrin [Triticum aestivum]

 Score =  654 bits (354),  Expect = 0.0
 Identities = 368/375 (98%), Gaps = 0/375 (0%)
 Strand=Plus/Plus

Query  1     ATGGAGCACCAGGGGCACGGCGCAGGCGAGAAGAAGGGCATCGTGGAGAGCATCACGGAG  60
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| || |||| ||||||||||||
Sbjct  1762  ATGGAGCACCAGGGGCACGGCGCAGGCGAGAAGAAGGGCGTCATGGAAAGCATCACGGAG  1821

Query  61    AAGCTCCCCGGTGGCCATGGTGATCACCAGCAGGCCACCGGTGGCACGTACGGGCAGCAA  120
             ||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1822  AAGCTCCCCCGTGGCCATGGTGATCACCAGCAGGCCACCGGTGGCACGTACGGGCAGCAA  1881

Query  121   GGACACACCGGAGTTACCGGCACAGGCACCGGCACCGGCGAGAAGAAGGGCGTCGTCGAG  180
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1882  GGACACACCGGAGTTACCGGCACAGGCACCGGCACCGGCGAGAAGAAGGGCGTCGTCGAG  1941

Query  181   AACATCAAGGAGAAGCTTCCCGGTGGCCACGGTGACCACCAGCACACCACTGGAATGACC  240
             ||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||| |
Sbjct  1942  AACATCAAGGAGAAGCTTCCCGGTGGGCACGGTGACCACCAGCACACCACTGGAATGAGC  2001

Query  241   GGCTCGAAGACGCATGCCACCACAGCCACCACCGATGGCAACTACGGGAAGTCGGGACAC  300
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  2002  GGCTCGAAGACGCATGCCACCACAGCCACCACCGATGGCAACTACGGGAAGTCGGGACAC  2061

Query  301   ACCGGCACTGACAGCACCGATGAGAACAAGAGCATGATGGACAAGATCAAGGACAAGCTG  360
             ||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  2062  ACCGGCACTGACAGCACCGGTGAGAACAAGAGCATGATGGACAAGATCAAGGACAAGCTG  2121

Query  361   CCTGGACAGCACTAA  375
             |||||||||||||||
Sbjct  2122  CCTGGACAGCACTAA  2136
```

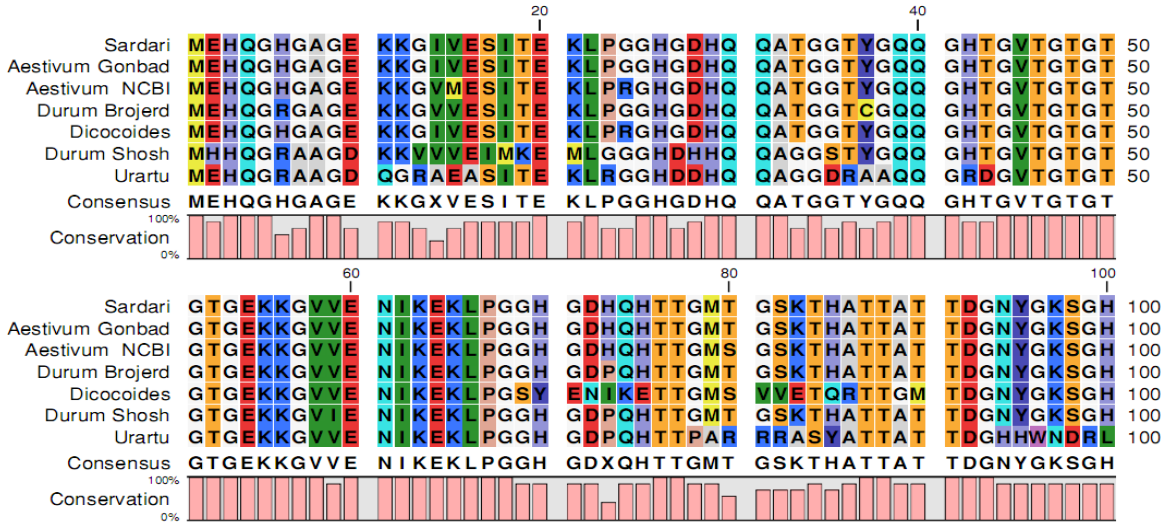
شکل۳- نمونه ای از همردیف سازی توالی بدست آمده با توالی موجود در NCBI بوسیله نرم افزار آنلاین BLAST.



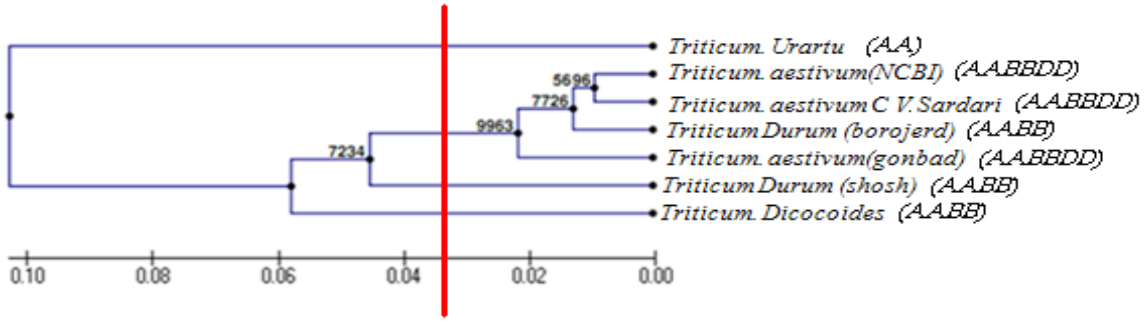
شکل٤- نمونه ای از همردیفی توالی ها در سطح نوکلئوتید برای ژن Wdhn13 در گندم های مورد مطالعه

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-09-15]

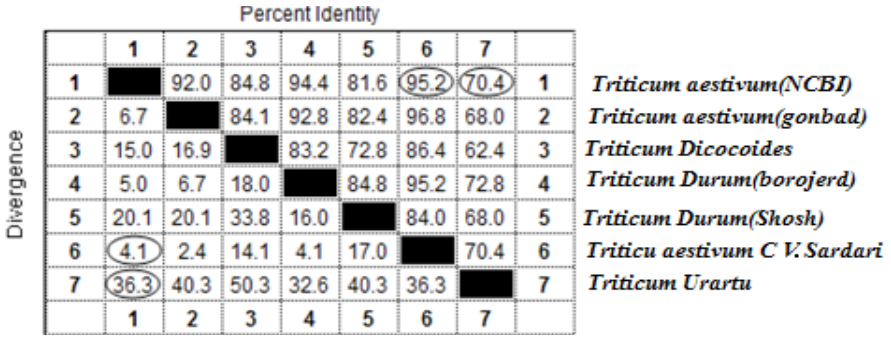
[DOR: 20.1001.1.22285458.1391.3.9.2.6]



شکل۵- نمونه ای از همردیفی توالی ها در سطح پروتئین برای ژن Wdhn13 در گندم های مورد مطالعه



شکل ٦- درخت فیلوژنتیکی بر اساس الگوریتم UPGMA حاصل از داده های مولکولی ژن Wdhn13 در نمونه های گندم مورد مطالعه DNA.



شکل ۷- ماتریس شباهت ها و تفاوت ها برای ژن Wdhn13 در نمونه های گندم مورد مطالعه.

آنالیز فیلوژنتیکی بر اساس توالی پروتئین

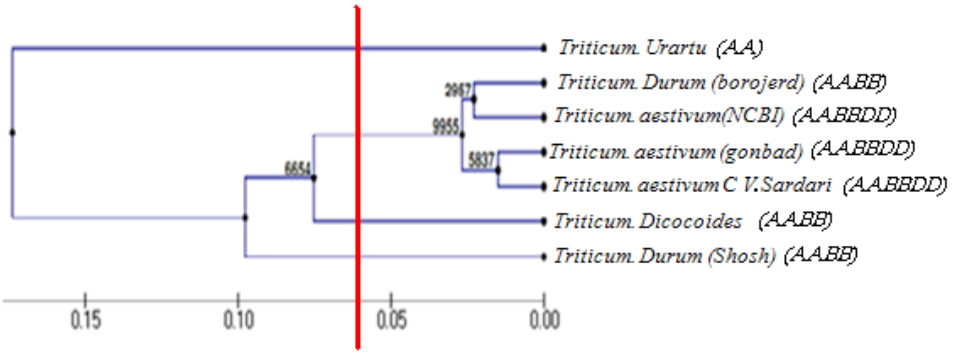
نتایج حاصل از درخت فیلوژنتیکی توالی ژن Wdhn13 که بر اساس الگوریتم UPGMA توسط نرم افزار CLC Sequence viewer براساس توالی پروتئینی رسم شد، در نمونه های مورد بررسی تایید کننده نتایج حاصل از همردیفی توالی ها از طریق نرم افزار آنلاین BLAST بود. به طوری که در درخت فیلوژنتیکی (شکل ۸) مشاهده می شود گندم سرداری در مورد ژن Wdhn13 بر اساس توالی پروتئینی بیشترین شباهت را با نمونه موجود در NCBI داشته و گندم اورارتو دارای کمترین شباهت می باشد. ماتریس شباهت (شکل ۹) بدست آمده نیز بر اساس الگوریتم UPGMA نیز موید این موضوع می باشد.

بحث

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که توالی DNA و پروتئین مربوط به گندم نان موجود در پایگاه اطلاعاتی NCBI بیشترین شباهت را در سطح نوکلئوتیدی با نمونه سرداری و کمترین

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-09-15]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1391.3.9.2.6]



شکل ۸- درخت فیلوژنتیکی بر اساس الگوریتم UPGMA حاصل از داده های مولکولی ژن Wdhn۱۳ در نمونه های گندم مورد مطالعهDNA.

Percent Identity

Divergence

	1	2	3	4	5	6	7	
1		93.7	86.5	95.2	82.5	96.0	71.4	1
2	6.6		85.0	93.7	82.5	97.6	69.0	2
3	14.9	16.7		84.1	73.0	87.3	63.5	3
4	4.9	6.6	17.9		85.7	96.0	73.8	4
5	19.9	19.9	33.5	15.9		84.9	69.0	5
6	4.1	2.4	14.0	4.1	16.9		71.4	6
7	36.0	39.9	49.7	32.2	39.9	36.0		7
	1	2	3	4	5	6	7	

1 *Triticum aestivum(NCBI)*
2 *Triticum aestivum(gonbad)*
3 *Triticum Dicocoides*
4 *Triticum Durum(borojerd)*
5 *Triticum Durum(Shosh)*
6 *Triticum aestivum C V. Sardari*
7 *Triticum Urartu*

شکل ۹- ماتریس شباهت ها و تفاوت ها برای ژن Wdhn۱۳ در نمونه های گندم مورد مطالعه.

شباهت را با نمونه اورارتو دارد. جداول فاصله که بر اساس توالی نوکلئوتیدی و پروتئینی توسط نرم افزار Meg Align بدست آمد و همچنین درخت های فیلوژنتیکی که بر اساس الگوریتم UPGMA توسط نرم افزار CLC Sequence viewer رسم شد نیز موید نتایج حاصل از نرم افزار BLAST بودند که نتایج آن ها نیز حاکی از میزان شباهت بالای توالی ژن Wdhn13 درگندم سرداری با توالی ژن Wdhn13 موجود در NCBI و شباهت کمتر توالی ژن Wdhn13 در اورارتو با توالی ژن Wdhn13 در NCBI بود. همچنین نتایج حاصل از درخت های فیلوژنتیکی نشان از جدا شدن منطقی گونه ها از یکدیگر داشتند، به طوری که ابتدا گونه های دیپلوئید، سپس تتراپلوئید و بعد از آن گونه های هگزاپلوئید از یکدیگر مشتق شدند. مهم ترین نتیجه این تحقیق بدین شرح بود که با توجه به تکثیر در گونه های دیپلوئید، تتراپلوئید و هگزاپلوئید شامل ژنوم A (گندم اورارتو، گندم دوروم بروجرد و گنبد، گندم دیکوکوئیدز، گندم سرداری و گندم نان شوش) و همچنین عدم تکثیر در گونه های دیپلوئید ژنوم های BB (گندم اسپلتوئیدز) وDD (گندم تائوشی) می توان نتیجه گرفت که ژن Wdhn13 بر روی ژنوم AA گندم قرار دارد.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از حمایت های مالی دانشگاه ایلام و حمایت های فنی مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه به ویژه آقای دکتر خیراله یاری تشکر می شود.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-09-15]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1391.3.9.2.6]

منابع

(1) Bartels D, Phillips J, Chandler J. Desiccation tolerance: gene expression, pathways, and regulation of gene expression. Plant Desiccation Tolerance, 2007; 35:115-137.

(2) Basra AS, Basra RK. Mechanisms of environmental stress resistance in plants. Harwood Academic, Amsterdam, the Netherlands, 1997; 21:1-43.

(3) Brini F, Hanin M, Lumbreras V, Amara I, Khoudi H, Hassairi A, Pages M, Masmoudi K. Overexpression of wheat dehydrin DHN-5 enhances tolerance to salt and osmotic stress in Arabidopsis thaliana. Plant Cell Rep, 2007; 26:2017-2026.

(4) Cuming AC, Lane BG. Protein synthesis in imbibing wheat embryos. European Journal of Biochemistry, 1979; 99: 217–224.

(5) Dure L, Crouch M, Harada J, Mundy J, Quatrano RS, Thomas T, Sung ZR. Common amino acid sequence domains among the LEA proteins of higher plants. Plant Molecular Biology, 1989; 12: 475–486.

(6) Ewa M, Kalemba A, Stanisawa P. Possible roles of LEA proteins and sHSPs in seed protection. Biological leet, 2007; 44(1): 3-16.

(7) Kobayashi F, Ishibashi M, Takumi S. Transcriptional activation of Cor/Lea genes and increase in abiotic stress tolerance through expression of a wheat DREB2 homolog in transgenic tobacco. Transgenic Res, 2008; 17(5):755-67.

(8) Ohno R, Takumi S, Nakamura C. Kinetics of transcript and protein accumulation of a low-molecular weight wheat LEA D-11 dehydrin in response to low temperature, Plant Physiology, 2003; 169:193-200.

(9) Sheng W, Chen H, Jia C, Yong-Cun Z, Su-Qiao Z, Yu-Feng X, Da-Ye S, Ying S. Altered Architecture and Enhanced Drought Tolerance inRice via the Down-Regulation of Indole-3-Acetic Acid byTLD1/OsGH3.13 Activation1[C][W]. Plant Physiology, 2009; 151:1889–1901.

(10) Simon B, Alan T, Michael J, Brian M, Martin H, Volker L. Bioinformatics and protein expression analyses implicate LEA proteins in the drought response of Collembola. Insect Physiology, 2009; 55: 210–217.

(11) Sivamani E, Bahieldin A, Wraith JM, Al-Niemi T, Dyer WE, Ho T-HD QuR. Improved biomass productivity and water use efficiency under water deficit conditions in transgenic wheat constitutively expressing the barley HVA1 gene. Plant Sci, 2000; 15: 5-19.

(12) Stockinger EJ, Gilmour SJ, Thomashow MF. Arabidopsis thaliana CBF1 encodes an AP2 domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeat/DRE, a cis-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit. Proc Natl Acad1997; 94: 1035-1040.

(13) Xia Liu, Zhi Wang, Lili Wang, Renhua Wu, Jonathan Phillips, Xin Deng. LEA 4 group genes from the resurrection plant Boea hygrometrica confer dehydration tolerance in transgenic tobacco, Plant Sci. 2009; 176: 90–98.

(14) Yue-ie C hsing. Late Embryogenesis Abundant Proteins-Advances in Botanical Research. Plant Pathology, 2008; 48: 4-7.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-09-15]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1391.3.9.2.6]