

بررسی ارتباط فیلوژنتیکی نواحی اینترونی و اگزونی ژن ACC در گونه‌های مختلف جو بومی ایران

مرجان بهزادی‌راد^{۱*}، محمدرضا نقوی^۲، علیرضا طالعی^۳ و علیرضا عباسی^۴
۱، ۲، ۳، ۴، دانشجوی کارشناسی ارشد، استادان و استادیار پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران
(تاریخ دریافت: ۸۹/۷/۲۱ - تاریخ تصویب: ۹۰/۳/۱۸)

چکیده

جنس جو متعلق به طایفه *Triticeae* از خانواده گندمیان تک‌لپه، است. ژن تک کپی پلاستییدی استیل کوآنزیم‌آ کربوکسیلاز، آنزیمی اساسی در سنتز اسیدهای چرب در پروکاریوت‌ها و یوکاریوت‌ها می‌سازد و اهمیت این آنزیم در شروع واکنش سنتز اسیدهای چرب می‌باشد. این ژن از توانایی بالایی، جهت تجزیه‌های فیلوژنتیکی، تکاملی و سیستماتیکی گراس‌ها برخوردار می‌باشد. در این آزمایش، برای اولین بار، رابطه فیلوژنتیکی هشت گونه و زیرگونه جوهای بومی ایران شامل *H. marinum*، *H. bulbosom*، *H. murinum*، *H. vulgare ssp. distichon*، *H. vulgare ssp. spontaneum*، *H. brevisubulatum*، *H. vulgare ssp. hexastichon*، *H. vulgare ssp. tworow* جو دو رديفه، با استفاده از آغازگر اختصاصی ژن استیل کوآنزیم‌آ کربوکسیلاز *ACCI*، بررسی شدند. در این تحقیق با استفاده از نرم‌افزارهای مختلف بیوانفورماتیکی، تعداد اگزون و اینترون گونه‌ها محاسبه و همچنین توالی‌های آنها بررسی گردید. درخت تکاملی گونه‌ها و زیرگونه‌ها بر اساس نواحی اینترون و اگزون به تنهایی و همچنین کل توالی ژن *ACC* ترسیم گردید. درخت تکاملی بر اساس کل توالی ژن *ACC*، گونه‌های جو بومی ایران را به دو گروه کلی تقسیم نمود. گونه‌های *H. hexastichon*، *H. tworow*، *H. distichon*، *H. spontaneum* در هر سه درخت در کنار یکدیگر قرار گرفتند. همچنین *H. bulbosom*، *H. brevisubulatum* و *H. murinum* در کنار یکدیگر و جدا از بقیه گونه‌ها و زیرگونه‌ها جای گرفتند. درخت تکاملی بر اساس کل ژن مشابهت بسیار زیادی با درخت حاصل از توالی اگزون‌ها داشت. نتایج نشان می‌دهد گونه‌هایی که تعداد اگزون مشابه بیشتری دارند، در درخت فیلوژنی در شاخه‌های نزدیک‌تری نسبت به یکدیگر قرار می‌گیرند. با توجه به اینکه ژن *ACCI* در بررسی‌های فیلوژنتیکی گراس‌ها منبع ارزشمندی می‌باشد، لذا روابط تکاملی و همچنین روابط منطقی و معقول تاکسونومی گونه‌های مهم و بومی جو ایران در برنامه‌های اصلاحی می‌تواند مفید باشد.

واژه‌های کلیدی: فیلوژنتیک مولکولی، *Hordeum*، ژن *ACC*، اگزون، اینترون.

مقدمه

نظر اهمیت غذایی و سطح زیر کشت در میان غلات، پس از گندم، ذرت و برنج مقام چهارم را دارد. اما با توجه به اینکه در شرایط متنوع آب و هوایی قابل کشت است، از نظر دامنه گسترش کشت مقام اول را داراست

جنس *Hordeum* متعلق به طایفه *Triticeae* از خانواده *Poaceae* گندمیان، است. جو یکی از اولین گیاهانی است که توسط انسان اهلی گردیده است. جو از

و تجزیه تحلیل‌های عملکردهای مولکولی است. تجزیه توالی‌های مولکولی شامل هم‌ردیفی توالی‌ها، جست و جو در پایگاه‌های اطلاعاتی، شناسایی نگاره‌ها، پیدا کردن آغازگرها و ژن‌ها، ترسیم روابط تکاملی و مقایسه ژنومی هستند که تجزیه‌های ساختاری شامل تجزیه ساختار اسیدهای نوکلئیک و پروتئین و نیز مقایسه آنها، تقسیم بندی و پیش‌بینی‌های لازم در ارتباط با این توالی‌ها هستند (Naghavi et al., 2009).

Huang et al. (2002)، از دو سیستم ژنی برمبنای توالی‌های ژن‌های هسته‌ای کدکننده استیل کوآنزیم‌آ (ACCase) و ۳- فسفوگلیسرات کیناز (PGK) در مطالعه تکامل گندم وسایرگراس‌ها استفاده نمودند. آنالیزهای فیلوژنتیکی با هم‌ردیفی توالی‌ها توسط Clusta X انجام شد. از هم‌ردیفی توالی‌های اینترون و اگزون جداگانه برای ایجاد درخت فیلوژنتیکی و سرعت جایگزینی نوکلئوتیدی استفاده شد. آنالیز آنها نشان داد اغلب گونه‌های گراس مطالعه شده تک کپی می‌باشند. روابط ارتولوگوسی ACC با فاکتورهای شناخته شده از تکامل منطبق بود. از مقایسه توالی نوکلئوتیدی ژن‌های استیل کوآنزیم‌آ و ۳- فسفوگلیسرات کیناز که با یکدیگر سازگارند، روابط فیلوژنتیکی مهمی در بین گراس‌ها به‌دست آمده است. Zhang et al. (2009)، رابطه فیلوژنتیکی را در گونه *Roegneria* و *Pseudoroegneria* توسط ژن ACC بررسی کردند و روابط تکاملی را بر اساس اینترون و اگزون به‌دست آوردند. مشخصات داده‌های جفت شده از توالی‌های اینترون و اگزون محاسبه و درخت فیلوژنی آنها را نیز رسم نمودند. Komatsuda et al. (1999)، با مطالعه توالی DNA هسته‌ای در جنس جو روابط فیلوژنی را بین چهار ژنوم *H*، *Xa* و *Xu* بررسی نمودند. نتایج به‌دست آمده بر مبنای جایگزینی و رویدادهای حذف و الحاق، نشان داد که ژنوم *H* و *Xa* در یک گروه منومورفیک و ژنوم *Xu* و *I* در یک گروه دیگر قرار می‌گیرند.

با توجه به اینکه ایران به عنوان یکی از مراکز بومی جو مورد توجه است و اجداد وحشی جو دارای تنوع ژنتیکی بسیار زیادی هستند، یافتن روابط تکاملی این گیاه بسیار ارزشمند است و هدف از آنالیزهای فیلوژنتیکی کشف ترتیبی از شاخه‌ها به صورت

(Hayes, 1992). جو یک گیاه زراعی باستانی است که حدود ۱۰۰۰۰ سال پیش از اجداد وحشی در بین‌النهرین اهلی شده است. عمده‌ترین مناطق تولید جو شامل اروپا، حاشیه مدیترانه‌ای شمال آفریقا، اتیوپی، خاورمیانه، جمهوری‌های شوروی سابق، چین، هندوستان، کانادا، ایالات متحده آمریکا، امریکای جنوبی و استرالیا است (Forsrter et al., 2000). جنس *Hordeum* همانند اکثر جنس‌های دیگر در مناطق معتدل، هم در نیمکره شمالی و هم در نیمکره جنوبی پراکنش دارد (Von Bothmer et al., 1991). تعداد کروموزوم‌های پایه جو $n=7$ می‌باشد که گونه‌های دیپلوئید و تتراپلوئید و هگزاپلوئید آن به ترتیب ۱۴، ۲۸، ۴۲ کروموزوم خواهند داشت (Blattner, 2010). گونه‌ها معمولاً در زادگاه‌های طبیعی هستند (Nishikata et al., 2002, Petersen & Seberg, 2003). تلاش زیادی جهت بررسی روابط فیلوژنتیکی در این جنس انجام گرفته است، زیرا جو یکی از محصولات مهم جهانی است و خانواده‌های وحشی آن منابع ژنتیکی غنی را جهت بهبود محصولات دارند. جهت مطالعه سریع آنالیزهای فیلوژنتیکی مولکولی در روی این جنس، در دهه اخیر از توالی‌های DNA استفاده شده است (Blattner, 2004; Jakob et al., 2006; Sun et al., 2009). چربی‌ها یکی از مهمترین ترکیبات ذخیره‌ای انرژی در گیاهان، بویژه بذور گیاهی به حساب می‌آیند. استیل کوآنزیم‌آ کربوکسیلاز، آنزیمی اساسی در سنتز اسیدهای چرب در پروکاریوت‌ها و یوکاریوت‌ها است و اهمیت این آنزیم در شروع واکنش سنتز اسیدهای چرب می‌باشد، زیرا اسیدهای چرب به عنوان مولکول‌های سوختی و تأمین ساختمان واحدهای غشاهای زیستی ضروری هستند (Safari, 2003). به این ترتیب که استیل کوآنزیم‌آ کربوکسیلاز، یک دی اکسید کربن را تثبیت و تولید مالونیل کوآ می‌کند که واسطه کلیدی در بیوسنتز اسیدهای چرب و متابولیت‌های ثانویه گوناگون است. ایزوفرم‌های متفاوت ژن ACC در اولین گام کاتالیزی بیوسنتز اسیدهای چرب یافته شده‌اند. قطعات ژن مورد نظر ۱.۵-۱.۸ kb هستند (Hung et al., 2002). حوزه عمل علم بیوانفورماتیک بطور عمده شامل سه حوزه تجزیه و تحلیل توالی‌های مولکولی، ساختارهای مولکولی

تعداد ۵-۶ بذر از هر گونه در گلدان کشت و پس از رشد گیاهچه‌ها و ظهور حداقل دو برگ (حدوداً دو تا سه هفته پس از کشت) از آنها جهت استخراج DNA نمونه‌برداری شد.

استخراج DNA, PCR و توالی‌یابی

با استفاده از روش CTAB تغییر یافته، استخراج DNA ژنومی از برگ‌های تازه انجام گردید (Murray & Thompson, 1980). جهت بررسی کمیت نمونه‌های DNA استخراج شده از دستگاه نانودراپ و جهت بررسی کیفیت آن، از ژل آگارز ۱ درصد استفاده شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از آغازگر ACCI (Huang et al., 2002)، در دستگاه ترموسایکلر صورت گرفت. در حجم ۲۵ میکرولیتر، که حاوی یک واحد آنزیم (High-fidelity LA-Tag DNA polymerase (Takara، ۱ mM، ۲۰-۵۰ نانوگرم از DNA ژنومی، ۱/۵ mM از MgCl₂، ۰/۲ mM از هر dNTP، ۱ Mμ از هر آغازگر انجام شد. برنامه PCR به ترتیب ۹۴°C به مدت ۵ دقیقه، ۵۶°C به مدت ۴۰ ثانیه، ۶۸°C به مدت ۲ دقیقه و دمای بسط نهایی ۶۸°C به مدت ۸ دقیقه به کار گرفته شده است. محصول حاصل از PCR بر روی ژل آگارز یک درصد تفکیک و ارزیابی شدند (Zhang et al., 2009). محصولات به‌دست آمده از PCR جهت توالی‌یابی به مرکز توالی‌یابی SEQLAB آلمان فرستاده شد. قطعات تکثیری حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از آغازگرهای Forward و Reverse توالی‌یابی شد.

تجزیه داده‌ها

پس از توالی‌یابی قطعات تکثیری به منظور تعیین قرابت گونه‌ها و بررسی روابط فیلوژنتیکی از نرم‌افزارهای

درخت‌هایی است که نشان‌دهنده بهترین رابطه تکاملی بین توالی‌ها باشد (Naghavi et al., 2009). بررسی‌های فیلوژنتیکی به منظور توصیف تاریخ تکاملی گیاهان به کار میرود. با دانستن روابط ژنتیکی بین گیاهان، از اطلاعات رده‌بندی می‌توان به عنوان راهنمایی با بهره‌گیری از منابع ژنتیکی در استفاده از آنها در تلاقی‌ها و جداسازی ژن‌های مفید استفاده کرد. با بررسی رابطه فیلوژنی مولکولی می‌توان اطلاعاتی درباره گونه‌ها و نسل‌های اجدادی منقرض شده و حتی برآورد شروع زمان انشعاب و طبقه‌بندی دقیق گیاه مورد نظر را به‌دست آورد. هم‌چنین هنگامی که وضعیت فیلوژنی ارقام زراعی مهم دنیا مورد بررسی قرارگیرد روابط خویشاوندی بسیاری از گیاهان در سراسر دنیا مشخص می‌شود. به طوری که این ارقام می‌توانند پایه و اساس بسیاری از برنامه‌های به‌نژادی باشند. در نتیجه در برنامه‌های به‌نژادی انتقال ژن به طور مؤثری مورد استفاده قرار می‌گیرد (Xion, 2006). هدف از این تحقیق تعیین ارتباط فیلوژنتیکی گونه‌های مختلف جوهای بومی ایران بر اساس توالی نواحی اگزونی و اینترونی ژن ACC می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

از بانک ژن ملی ایران و کشور استرالیا هشت گونه و زیرگونه جو بومی ایران تهیه شد (جدول ۱)، جهت بررسی روابط فیلوژنتیکی در این تحقیق از آغازگر اختصاصی ACCI، استفاده گردید که پرایمر اختصاصی بر مبنای توالی کد شونده ACC از گندم و ذرت می‌باشد (Huang et al., 2002). این آزمایش در آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشگاه تهران در سال ۱۳۸۸ انجام شد.

جدول ۱- نام و مشخصات گونه‌های جو مورد استفاده در این تحقیق

گونه‌ها	کد گونه‌ها	محل جمع‌آوری
<i>H. marinum</i>	TN.02-904	Sari
<i>H. murinum</i>	TN.02-1085	Lorestan
<i>H. brevisubulatum</i>	406383, 13VM91	Iran
<i>H. bulbosum</i>	406400, 25VM91	Iran
<i>H. vulgare ssp. spontaneum</i>	TN.02-494	Saveh
<i>H. vulgare ssp. tworow</i>	KC.70062	Khoram abad
<i>H. vulgare ssp. hexastichon</i>	TN.02-102	Turkey
<i>H. vulgare ssp. distichon</i>	N-171935 E-553851	Varamin

H. murinum، چهار، *H. hexastichon*، دو، *H. bulbosom* سه، *H. tworow* شش عدد تخمین زده شد. به این منظور تعداد آگزون‌های مشابه و متفاوت در هر یک از گونه‌ها در جدول ۱ ارایه شده است. که در این جدول اعداد روی قطر اصلی آگزون‌های مشابه و اعداد زیر قطر اصلی آگزون‌های متفاوت هستند.

بیشترین تعداد آگزون‌های مشابه بین گونه‌های *H. tworow* و *H. marinum* می‌باشد گونه‌های *H. marinum* و *H. tworow*، *H. distichon* و *H. spontaneum* هر یک دارای چهار آگزون مشترک می‌باشند. *H. spontaneum*، *H. marinum*، *H. tworow* هر یک تنها دارای یک آگزون مشابه با *H. hexastichon* می‌باشند، در صورتی که *H. distichon* دو ناحیه آگزونی مشابه با *H. hexastichon* دارد. کمترین تعداد آگزون‌های یکسان در *H. brevisubulatum* می‌باشد که با هیچ یک از گونه‌ها آگزون مشابهی نداشت و همچنین *H. bulbosom* که تنها یکی از این نواحی متشابه را با *H. murinum* دارد. پس از به‌دست آوردن توالی آگزون‌ها و اینترون‌ها در گونه‌های مختلف جو، با استفاده از نرم‌افزار Mega 4 اطلاعات زیادی از بررسی آنها حاصل شد. این یافته‌ها که در جدول ۲ آورده شده‌اند که شامل مکان‌های ژنی متفاوت^۱، مکان‌های ژنی حفاظت شده^۲،

Softberry، Genescan، Mega، BLAST، DNASTar استفاده شد. از DNASTar به منظور هم‌ردیف کردن توالی‌ها استفاده گردید و توسط نرم‌افزار BLAST مشخص شد که توالی‌های *ACCI* گونه‌های جو بومی ایران با چه توالی‌های از این ژن، در گونه مورد نظر و گونه‌های دیگر شباهت دارد. درخت فیلوژنتیکی با استفاده از Mega در بین گونه‌های مورد نظر رسم گردید. Genescan و Softberry تعداد اینترون و آگزون‌های هر یک از توالی‌ها را مشخص نمودند. Genescan یکی از معروفترین برنامه‌های پیش‌بینی ژن در یوکاریوت‌هاست. بوسیله این برنامه تراکم ژن، تعداد آگزون در هر ژن و توزیع اندازه آگزون مشخص می‌شود. این برنامه دارای آگزون پیش‌بینی شده، طول آن، چارچوب قرائت باز، چندین ستون امتیازدهی و یک سطح احتمال می‌باشد.

نتایج و بحث

تجزیه توالی‌ها

تعداد آگزون‌های هر یک از توالی‌ها به‌دست آمد و از نظر تعداد و ترتیب نوکلئوتیدها با آگزون‌های توالی سایر گونه‌ها مقایسه شد. ابتدا آگزون مورد نظر در هر توالی مشخص و سپس توالی سایر گونه‌های جو برای داشتن آن آگزون بررسی می‌شدند. تعداد آگزون گونه‌های *H. distichon* هفت، *H. marinum* شش، *H. spontaneum* پنج، *H. brevisubulatum* دو،

1. Variable sites
2. Conserved sites

جدول ۱- مقایسه تعداد آگزون مشابه و متفاوت در گونه‌های جو مورد بررسی

گونه‌های جو	<i>H. distichon</i>	<i>H. marinum</i>	<i>H. spontaneum</i>	<i>H. brevisubulatum</i>	<i>H. bulbosom</i>	<i>H. hexastichon</i>	<i>H. murinum</i>	<i>H. tworow</i>
<i>H. distichon</i>	-	۴	۴	۰	۰	۲	۰	۴
<i>H. marinum</i>	۱	-	۴	۰	۰	۱	۰	۵
<i>H. spontaneum</i>	۲	۲	-	۰	۰	۱	۰	۴
<i>H. brevisubulatum</i>	۱۱	۸	۷	-	۰	۰	۰	۰
<i>H. bulbosom</i>	۹	۸	۷	۴	-	۰	۱	۰
<i>H. hexastichon</i>	۹	۸	۷	۶	۶	-	۰	۱
<i>H. murinum</i>	۱۰	۹	۸	۵	۳	۷	-	۰
<i>H. tworow</i>	۹	۵	۳	۸	۸	۸	۹	-

جدول ۲- مشخصات داده‌های جفت شده از توالی‌های اینترون و اگزون در گونه‌های جو

نسبت جایگزینی	جفت‌های جایگزینی ناهمجنس	جفت‌های جایگزینی همجنس	جفت‌های همسان	مکان‌های یگانه	مکان‌های حفاظت شده	مکان‌های متفاوت
۰/۷	۱۹۵	۱۴۰	۴۸۴	۶۰۴	۲۱۹	۱۰۵۴
۰/۷	۵۰	۳۷	۱۴۶	۲۲۹	۲۷۴	۳۴۰

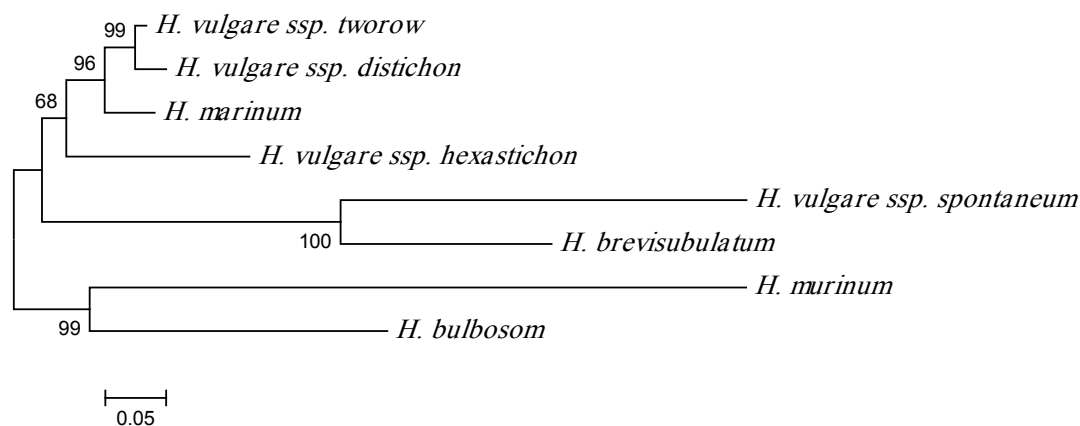
جهش با آرایش مجدد تعیین می‌شود که در معرض انتخاب طبیعی قرار می‌گیرد (Golovnina et al., 2007). روابط تکاملی بین توالی‌ها با استفاده از نمودارهایی به نام درخت فیلوژنتیکی نشان داده می‌شوند. هدف از آنالیزهای فیلوژنتیکی کشف ترتیبی از شاخه‌ها به صورت درخت‌هایی است که نشان‌دهنده بهترین روابط توالی‌ها باشد. برای این کار، توالی‌های اگزون و اینترون و همچنین با نرم‌افزار Mega 4 هم‌ردیف شده و در نهایت رابطه تکامل گونه‌ها در قالب درخت فیلوژنی به روش Neighbor-Joining (NJ) نشان داده شده است (Kumar et al., 2004). همچنین Bootstrap نیز یک آزمون آماری درخت‌های فیلوژنی با استفاده از روش نمونه‌برداری‌های متعدد از داده‌های اولیه است و برای آزمون درخت‌های ترسیم شده با روش‌های فاصله‌ای و درست‌نمایی به کار گرفته می‌شود. نتایج حاصل از این آزمون به صورت عدد در کنار درخت نمایان می‌گردد و در واقع درصد دفعاتی است که هر شاخه مشخص در نمونه‌برداری مختلف توسط این آزمون و درخت‌های حاصل از آن تشکیل می‌شود (Naghavi et al., 2009). درخت اینترون‌ها به سه گروه مجزا تقسیم شدند. گروه اول شامل *H. tworow*، *H. marinum*، *H. distichon* و

مکان‌های ژنی یگانه^۱ می‌باشند. همچنین قسمت دوم جدول نامبرده شامل، جفت‌های همسان (ii)، جفت‌هایی با جایگزینی همجنس (si) که در آنها یک پریمیدین توسط یک پریمیدین دیگر یا یک پورین با یک پورین دیگر جایگزین می‌شود، جفت‌هایی با جایگزینی ناهمجنس (sv) که در آنها یک پریمیدین توسط یک پورین یا برعکس جایگزین می‌گردد و نهایتاً نسبت جایگزینی هم جنس به جایگزینی غیر هم جنس (R) بیان شده‌اند (Zhang et al., 2009).

مکان‌های ژنی متفاوت که در آن حداقل تعداد دو نوکلئوتید متفاوت وجود دارد، در نواحی اینترونی نسبت این مکان‌ها به مکان ژنی کل ۱۰۵۴ به ۱۴۳۰ در صورتی که در اگزون‌ها ۳۴۰ به ۶۸۹ می‌باشد. مکان‌های ژنی حفاظت شده که در آن یک نوع نوکلئوتید در همه توالی‌ها وجود دارد در اگزون‌ها بیش از اینترون‌هاست.

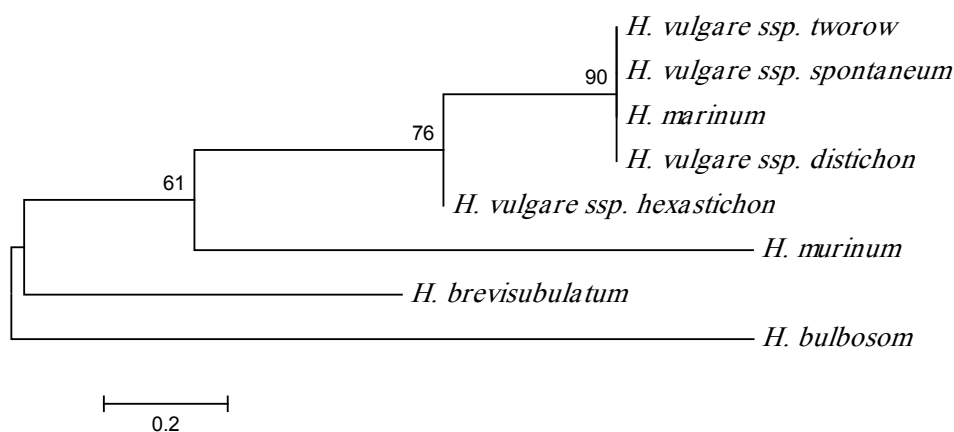
تجزیه فیلوژنتیکی

تجزیه و تحلیل‌های فیلوژنتیکی تخمینی هستند از اینکه چگونه اعضاء یک خانواده می‌توانند در طی علم تکامل از هم اشتقاق پیدا کرده باشند. این روابط به وسیله مطالعه جهش‌های جایگزینی، حذف، ازدیاد و

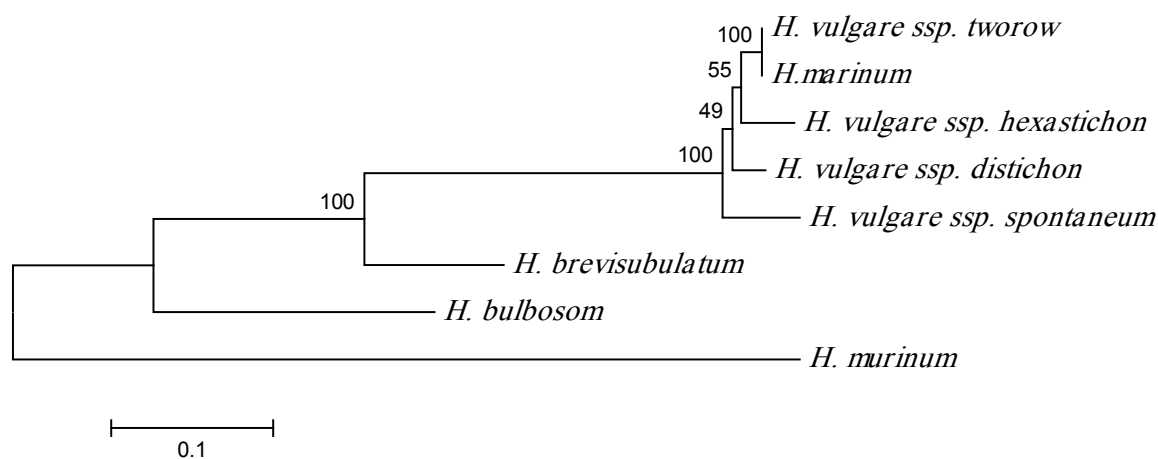


شکل ۱- درخت فیلوژنتیکی بر اساس نواحی اینترون گونه‌های جو

1. Singleton sites



شکل ۲- درخت فیلوژنتیکی بر اساس نواحی آگزون گونه‌های جو



شکل ۳- درخت فیلوژنتیکی بر اساس کل نواحی ژن (شامل اینترون و آگزون) گونه‌های جو

H. bulbosom، *H. brevisubulatum* و *H. murinum* که در درخت اینترون آگزونی، جد مشترک است. از نظر مورفولوژی *H. bulbosom* و *H. murinum* در درخت مشابهند (Von Bothmer et al., 1991). در درخت تکاملی جنس جو، گونه‌های *H. murinum*، *H. bulbosom* و *H. brevisubulatum* در نزدیکی یکدیگر جای گرفته‌اند (Blattner, 2009; Peterson & Seberg, 2003). این قرابت در هر سه درخت رسم شده در این مقاله نیز دیده می‌شود.

نتیجه گیری کلی

ژن استیل کوآنزیم A جهت مطالعه فیلوژنتیکی، تکاملی و سیستماتیک گراس‌ها توانایی زیادی دارد (Sun et al., 2009; Huang et al., 2002; Gornicki et al., 2007; Fan et al., 2007; Golvnia et al., 2007) و توسعه تکنولوژی مولکولی، روش‌های توالی‌یابی و

H. hexastichon و گروه دوم *H. spontaneum* و نهایتاً در گروه سوم *H. murinum* و *H. bulbosom* جای گرفته‌اند. طول شاخه، در شاخه‌های گروه دوم و سوم بیشتر است که این نشان می‌دهد، میزان تغییراتی که در یک شاخه روی می‌دهد (Naghavi et al., 2009)، در این شاخه‌ها بیشتر است. درخت آگزون‌ها به دو گروه تقسیم می‌شود. گروه اول *H. distichon*، *H. murinum*، *H. brevisubulatum* و همچنین *H. bulbosom* جد مشترک سایر گونه‌ها در آگزون‌ها گردید. درخت فیلوژنتیکی بر اساس کل ژن نیز، همانند آگزون‌ها دو گروه شد، گروه اول آگزون‌ها متشکل از *H. distichon*، *H. murinum*، *H. tworow* و گروه دوم *H. hexastichon*، *H. spontaneum*

H. Bulbosom در کنار یکدیگر و یا در شاخه‌های نزدیک‌تری نسبت به هم قرار گیرند زیرا هر دو گونه دارای ژنوم یکسانی می‌باشند. در مطالعات قبلی روابط تکاملی دو گونه نامبرده در درخت فیلوژنتیکی در کنار یکدیگر جای گرفته‌اند (Blattner, 2009; Sun et al., 2009). درخت فیلوژنتیکی اگزونی و کل ژن ACC، بسیار به یکدیگر شبیه‌اند، این مطلب نشان می‌دهد که بیشترین تغییرات در اینترون‌ها صورت گرفته است. همین‌طور از مطابقت جدول ۱ با درخت فیلوژنی نتیجه می‌شود که هر چه تعداد اگزون‌های مشابه بین گونه‌ها بیشتر باشد، آن گونه‌ها در شاخه‌های نزدیک‌تری از درخت نسبت به یکدیگر قرار می‌گیرند. در واقع چون اگزون‌ها در ژن بیان شده باقی می‌مانند و اینترون‌ها حذف می‌شوند در نتیجه انتظار می‌رود کمترین تغییرات در اگزون‌ها صورت گیرد تا عمل نهایی ژن دستخوش تغییرات نشود.

سپاسگزاری

از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه تهران برای تأمین اعتبار مالی این طرح تشکر و قدردانی می‌گردد.

آنالیزهای مقایسه‌ای DNA ابزار مهمی جهت مطالعات تکامل و درک روابط فیلوژنتیکی گونه‌های گیاهی شده است (Liu et al., 2006; Golovnina et al., 2007; Che et al., 2007).

قطعات مختلف DNA (همانند اگزون و اینترون) می‌توانند جهت تعیین روابط ژنتیکی گونه‌های متفاوت به کار برده شوند. برقراری روابط ارتولوگوسی مابین ژن‌ها یکی از کلیدهای قابل دسترس است. گونه‌های جنس *Hordeum* که در این تحقیق استفاده شدند، جوهای بومی ایران هستند که برای اولین بار در دنیا، توالی ژن ACC در آنها جهت تعیین رابطه فیلوژنتیکی بررسی شده است. از مشاهده سه درخت حاصل، نتیجه می‌شود که گونه‌های *H. marinum*، *H. distichon*، *H. murinum* و *H. bulbosom* در هر سه درخت با درصد تشابه بالایی با طول شاخه کم که نشان‌دهنده میزان انشعاب کم است، در کنار یکدیگر و در یک گروه قرار می‌گیرند. گونه‌های *H. bulbosom* و *H. murinum*، *H. brevisubulatum* طول شاخه بلندی دارند که بیان‌کننده میزان زیاد تغییرات ژنتیکی بر روی این گونه‌هاست. از طرفی انتظار می‌رفت که زیرگونه‌های *H. vulgare* و گونه

REFERENCES

- Blattner, F. R. (2004). Phylogenetic analysis of *Hordeum* (Poaceae) as inferred by nuclear rDNA ITS sequences. *Mol Phylogenet Evol*, 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.
- Che, J., Pang, J. F., Zhao, H., Wu, G. F., Zhao, E. M. & Zhang, Y. P. (2007). Molecular phylogeny of the Chinese ranids inferred from nuclear and mitochondrial DNA sequences. *Biochem Syst Ecol*, 35, 29-39.
- Fan, X., Zhang, H.Q., Sha, L. N., Zhang, L., Yang, R. W., Ding, C. B. & Zhou, Y. H. (2007). Phylogenetic analysis among *Hystrix*, *Leymus* and its affinitive genera (Poaceae: Triticeae) based on the sequences of gene encoding plastid acetyl- CoA carboxylase. *Plant Sci*, 174, 701-707.
- Faris, J., Sirikhachornikit, A., Haselkorn, R., Gill, B. & Gonicki, P. (2001). Chromosome mapping and phylogenetic analysis of the cytosolic acetyl-coA carboxylase loci in wheat. *Mol Biol Evol*, 18, 1720-1733.
- Forsrter, B. P., Ellis, R. P., Thomas, W. T. B., Newton, A. C., Tuberosa, R., This, D., El-Enein, R. A., Bahri, M. H. & Ben Salem, M. (2000). The development and application of molecular markers for abiotic stress tolerance in barley. *J Experimental Botany*.
- Golovnina, K. A., Glushkov, S. A., Blinov, A. G., Adkison, L. R. & Goncharov, N. P. (2007). Molecular phylogeny of the genus *Tritium*. *Evol*, 264, 195-216.
- Hayes, P. M., Blake, T. K., Chen, T. H. H., Tragoonrung, S., Chen, F., Pan, A. & Liu, B. (1993). Quantitative trait loci on barley (*Hordeum vulgare* L.) chromosome 7 associated with components of winter hardiness. *Genome*, 36, 66-72.
- Hou, W. R., Sun, G. L., Chen, Y., Wu, X., Peng, Z. S. & Zhou, C. Q. (2008). Molecular cloning of ribosomal protein L26 (RPL26) cDNA from *Ailuropodamel anoleuca* and its potential value in phylogenetic study. *Biochem Syst Ecol*.
- Huang, S., Sirikhachornikit, A., Su, X., Faris, J. D., Gill, B., Hhaselkorn, 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.
11. Huang, S., Sirikhachornikit, A., Faris, J. D., Su, X., Gill, B. S., Hhaselkorn, R. & 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.
 12. Jakob, S. S., Ihlow, A. & Blattner, F. R. (2006). Achloroplast genealogy of *Hordeum* (*Poaceae*): long-term persisting haplotypes, incomplete linkage sorting, regional extinction, and the consequences for phylogenetic inference. *Mol Biol Evol*, 23, 1602-2612.
 13. Komatsuda, T., Tann, K. I., Salomon, B., Bryngelsson, T. & 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.
 14. Kumar, S., Tamura, K. & Nei, M. (2004). *MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment*. Brief Bioinform.
 15. Liu, Q. L., Ge, S., Tang, H. B., Zhang, X. L., Zhu, G. F. & Lu, B. R. (2006). Phylogenetic relationships in *Elymus* (*Poaceae*: *Triticeae*) based on the nuclear ribosomal internal transcribed spacer and chloroplast *trnL-F* sequences. *New Phytol*, 170, 411-420.
 16. Mangelsen, E., Kilian, J., Berendzen, K. W., Kolukisaoglu, Ü. H., Harter, K., Jansson, Ch. & Wanke, D. (2008). Phylogenetic and comparative gene expression analysis of barley (*Hordeum vulgare*) WRKY transcription factor family reveals putatively retained functions between monocots and dicots. *BMC Genomics*, 9, 194.
 17. Naghavi, M. R., Malbobi, M. A. & Rashidi, S. (2009). *Bioinformatics*. University of Tehran press. PP, 457.
 18. Naghavi, M. R., Ebrahimi, A., Sabokdast, M. & Mardi, M. (2011). Assessment of genetic diversity in wild and landraces (*H. vulgare*) of barley from Iran. *Cereal Research Communication*, 39, 487-496.
 19. Nishikata, T., Salomon, B., Komatsuda, T., Bothmer, R. V. & Kadowaki, K. (2002). Molecular phylogeny of genus *Hordeum* using three chloroplast DNA sequences. *Genom*, 45, 1157-1166.
 20. Petersen, G., Seberg, O., Yde, M. & Berthelsen, K. (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.
 21. Petersen, G. & Seberg, O. (2003). Phylogenetic analyses of the diploid species of *Hordeum* (*Poaceae*) and a revised classification of the genus. *Systematic Botany*, 28, 293-306.
 22. Safari, M. (2003). *Principle of agricultural biochemistry*. University of Tehran Press. PP, 608.
 23. Small, R., Ryburn, J. A., Cronn, R. C., Seelanan, T. & Wendel, J. F. (1998). The tortoise and the hare: choosing between noncoding plastome and nuclear sequences for phylogeny reconstruction in a recently diverged plant group. *Am J Bot*, 85, 1301-1315.
 24. Sun, G. L. & Daley, T. (2007). Molecular evolution and genome divergence at *RPB2* gene of the Stand H genome in *Elymus* species. *Plant Molecular Biology*, 64, 645-665.
 25. Sun, G., Pourkheirandish, M. & Komatsuda, T. (2009). Molecular evolution and phylogeny of the *RPB2* gene in the genus *Hordeum*. *Annals of Botany*, 103, 975-983.
 26. Von Bothmer, R., Banden, C., Jorgense, R. B. & Linde Laursen, I. B. (1991). *An ecogeographical study of the genus Hordeum*. International Board for Plant Genetic.
 27. Von Bothmer, R., Van Hintum, T. L., Knupffer, H. & Sato, K. (2003). *Diversity in Barley (Hordeum vulgare)*. Elsevier Science, Amsterdam. The Netherlands.
 28. Xion, J. (2006). *Essential bioinformatics*. Cambridge University Press, Newyork: 127-169.
 29. Zhang, C. H., Fan, X., Yu, H. Q., Zhang, H. Q., Wang, X. L. & 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.