



دانشگاه گوارز و منابع گیاهی

نشریه پژوهش‌های تولید گیاهی
جلد بیست و یکم، شماره سوم، ۱۳۹۳
<http://jopp.gau.ac.ir>

شناسایی روابط فیلوژنتیکی گندم زراعی و اجداد آن براساس توالی‌یابی ژن (*HKT*)

زینب سهرابی‌زاده^۱، *آرش فاضلی^۲ و علی اشرف‌مهرابی^۲

^۱ دانشجوی کارشناسی ارشد گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه ایلام، استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه ایلام
تاریخ دریافت: ۹۳/۲/۷؛ تاریخ پذیرش: ۹۳/۴/۲۱

چکیده

شوری یکی از مشکلات مهم در اراضی کشاورزی دنیا می‌باشد، به طوری که سالانه میلیون‌ها تن نمک از طریق آبیاری وارد خاک‌های زراعی می‌شود. گندم اولین و مهم‌ترین گیاه زراعی دنیا است که غذای اصلی بیش از یک سوم مردم جهان را تأمین می‌کند. روش‌های نوین ژنتیکی هم‌چون توالی‌یابی امکان ارزیابی دقیق و سریع مواد ژنتیکی در سطح DNA و RNA را فراهم نموده است. ژن‌های *HKT* گروه مهمی از ژن‌ها در انتقال یون‌های سدیم و پتاسیم می‌باشند، بنابراین به منظور شناسایی تنوع آلی ژن *HKT* از گونه‌های زراعی و وحشی گندم استفاده شد. بذور در گلدان‌های پلاستیکی کشت شدند و در مرحله ۲-۳ برگه، DNA به روش دوپل و همکاران (۱۹۹۰) استخراج گردید. PCR با یک جفت آغازگر اختصاصی تکثیر و محصولات PCR خالص‌سازی و توالی‌یابی شدند. نتایج، تنوع نوکلئوتیدی بین گونه‌های مورد بررسی و گندم نان موجود در NCBI را نشان داد. نتایج توالی‌یابی DNA نشان داد که گونه آرژیلوپس اسپلتوئیدس با ۹۸/۹ درصد، بیش‌ترین شباهت و نمونه‌های گندم وحشی آرژیلوپس کوداتا و آرژیلوپس تریانسالیس با ۹۳/۹ درصد کم‌ترین شباهت را در مقایسه با گندم نان NCBI نشان دادند، در حالی که هوردنوم اسپونتائوم تنها ۳۶/۵ درصد، کم‌ترین شباهت را با توالی NCBI نشان داد. درخت‌های فیلوژنتیکی که براساس توالی DNA با روش UPGMA ترسیم شدند، نتایج بالا را تأیید نمود. همچنین روش‌های فیلوژنتیکی DNA نشان می‌دهد که آرژیلوپس اسپلتوئیدس و گندم نان در یک زیرگروه قرار گرفته‌اند که نشان‌دهنده این است که ژن *HKT* از آرژیلوپس اسپلتوئیدس به واسطه الحاق وارد گندم نان شده است.

واژه‌های کلیدی: شوری، گندم، ژن *HKT*، خویشاوندان وحشی، آنالیز توالی

* مسئول مکاتبه: a.fazeli@ilam.ac.ir

مقدمه

شوری خاک عامل اصلی محدودکننده کشاورزی، به‌خصوص در مناطق خشک و نیمه‌خشک است (جیمز و همکاران، ۲۰۱۱) به‌طوری‌که سالانه میلیون‌ها تن نمک از طریق آب آبیاری وارد خاک‌های زراعی می‌شود (حسیبی و همکاران، ۲۰۱۱). براساس برآوردها، در حدود ۹۰۰-۴۰۰ میلیون هکتار از اراضی دنیا با مشکل شوری مواجه هستند (قوامی و همکاران، ۲۰۰۴) و میزان اراضی شور در ایران ۲۵ میلیون هکتار است که به‌دلیل مدیریت ضعیف آبیاری، این سطح رو به افزایش است (حسیبی و همکاران، ۲۰۱۱). پژوهش‌ها نشان داده است که تنش‌های غیرزنده از جمله تنش شوری عملکرد گیاهان زراعی را ۵۰ درصد و در گندم تا ۸۰ درصد کاهش می‌دهند (رهایبی و همکاران، ۲۰۱۲). تنش شوری در مراحل مختلف رشد روی بخش‌های مختلف گیاه تأثیرات نامطلوبی دارد به‌طوری‌که باعث کاهش کیفیت و کمیت دانه گیاهان زراعی (راوسون و همکاران، ۱۹۸۸)، کاهش تولید ماده خشک، سطح برگ و نسبت ساقه به ریشه (تدین و امام، ۲۰۰۷) می‌گردد. همچنین، تنش شوری شاخص سطح برگ، تولید پنجه، ارتفاع بوته، رشد سنبله و عملکرد گندم نان را کاهش می‌دهد (ماس و پوس، ۱۹۸۹) علاوه‌بر این‌ها، تنش شوری با کاهش تعداد پنجه‌های بارور و کاهش تعداد دانه، پتانسیل عملکرد را کاهش می‌دهد (ال-هنداوی و همکاران، ۲۰۰۵). شوری، به‌دلیل کاهش پتانسیل اسمزی در محیط ریشه و تأثیر بر تعادل آبی گیاه و کاهش فشار آماس، در مراحل مختلف رشدی گندم اثرات مخربی دارد (مونس و همکاران، ۲۰۰۶).

گندم اولین غله و مهم‌ترین گیاه زراعی دنیا است که غذای اصلی بیش از یک سوم مردم جهان است و یک پنجم کالری مورد نیاز بشر را تأمین می‌کند (ارزانی، ۲۰۰۸). گندم به احتمال زیاد یکی از اولین گیاهانی است که به‌وسیله انسان زراعت شده و به همین دلیل مهم‌ترین گیاه زراعی به‌شمار می‌آید (خدابنده، ۲۰۰۷). با توجه به محدودیت منابع تولید و اهمیت بارز گندم در تغذیه انسان که همه ساله تقاضای جهانی برای تولید آن افزایش پیدا می‌کند، شناسایی ارقام متحمل به شوری ضروری است (زادوریان و همکاران، ۲۰۱۱).

تحمل گیاهان به شوری شامل واکنش‌های پیچیده و هماهنگ در سطوح سلولی، سوخت‌وسازی و حتی کل گیاه است که در گونه‌های مختلف گیاهی متفاوت است. خانواده *HKT* (ناقل پتاسیم با کارایی بالا)^۱ گروه مهمی از ژن‌های درگیر در انتقال یون‌های سدیم و پتاسیم می‌باشند (زمانی‌بابگهری و همکاران، ۲۰۱۱). ژن *HKT* در پوست ریشه هر دو یون سدیم و پتاسیم را از محیط ریشه و ساقه

1- High Affinity Potassium Transporter

وارد سلول‌های پاراننشیمی می‌کند، این ژن همچنین در آوند چوبی یون سدیم را به سلول‌های پاراننشیمی انتقال می‌دهد (پاردو، ۲۰۱۰). ژن‌های *HKT* در دو گروه "یک و دو" براساس اولین حلقه اسید آمینه قرار می‌گیرند که گروه اول با داشتن اسید آمینه سرین در انتقال یون‌های سدیم و گروه دوم با اسید آمینه گلیسین به احتمال بیش‌تر در انتقال یون‌های پتاسیم نقش دارند (زمانی‌باگه‌ری و همکاران، ۲۰۱۱). افزایش سدیم داخل سلول، کلسیم سیتوزولی متصل به پروتئین SOS_3 را فعال نموده که SOS_3 فعال شده با SOS_2 یک کمپلکس فعال که باعث فسفریله کردن و در نتیجه فعال‌سازی پروتئین‌هایی از جمله SOS_1 و *HKT* می‌شود را تشکیل می‌دهد (چینوسامی و همکاران، ۲۰۰۵). ژن *HKT1* در اندام‌های هوایی گیاه در بازیافت سدیم از آوند چوبی و انتقال آن به شیره آوند آبکش برای انتقال آن به ریشه و خروج آن از گیاه نقش ایفا می‌کند (مونس و تستر، ۲۰۰۸).

پژوهش‌های زیادی در مورد اثرهای این گروه ژنی در گیاهان مختلف انجام شده است. ماسر و همکاران (۲۰۰۲) با پژوهش روی فرایندهای ملکولی جذب پتاسیم و سدیم در گیاهان نتیجه گرفتند که بیان *TaHKT1* در گندم که حامل مشترک یون سدیم و پتاسیم است، با کمبود یون پتاسیم در گندم و جو القا می‌شود، در حالی که به نظر می‌رسد *AtHKT1* در آرابیدوپسیس تنها حامل یون سدیم است و مستقل از غلظت پتاسیم بیان می‌شود. هوانگ و همکاران (۲۰۰۸) نقشه ژنتیکی ژن‌های *HKT* در گندم، برنج و جو را در تحمل به یون سدیم مقایسه کردند و به این نتیجه رسیدند که ژن‌های *HKT* نقش بالقوه‌ای در انتقال سدیم در گیاهانی مانند برنج، گندم و جو دارند. هوری و همکاران (۲۰۰۸) پژوهشی با عنوان عملکرد حامل *HKT* در انتقال سدیم در ریشه‌ها و محافظت برگ‌ها از تنش شوری انجام داده‌اند و نتیجه گرفتند که، حامل‌های *HKT* در تعادل یون سدیم، مقاومت به شوری و رشد تحت شرایط کمبود یون پتاسیم نقش اساسی ایفا می‌کنند. هایوسر و هوری (۲۰۱۰) نقش ناقل *HKT* از جمله *AtHKT1* و *OsHKT1* را در خروج یون سدیم بررسی نمودند و نشان دادند که انتقال یون سدیم از آوند چوبی باعث حفظ گیاهان و تحمل به شوری در برگ‌های گیاهان دولپه‌ای مثل آرابیدوپسیس و گیاهان زراعی تک‌لپه‌ای مانند برنج و گندم شده است. هوری و همکاران (۲۰۰۱) نشان دادند که سطح رونوشت چندین ژن از حامل‌های کلاس دوم *HKT* به وسیله کمبود پتاسیمی در گندم، برنج و جو افزایش نشان می‌دهد. *HKT* به صورت تک‌ژن و mRNA این ژن دارای سه اگزون و دو اینترون می‌باشد که در پایگاه اطلاعاتی NCBI اگزون اول از کدون ۱۱۷۲-۱، اگزون دوم از کدون ۱۵۲۳-۱۲۹۶ و اگزون سوم از ۱۹۸۱-۱۷۸۰ می‌باشد. با توجه به این که ایران دارای گونه‌های مختلف گندم وحشی و زراعی بوده و تنوع ژنتیکی بسیار بالایی را نشان می‌دهند. بنابراین هدف از این

مطالعه شناسایی روابط فیلوژنتیکی و بررسی تنوع آلی ژن *HKT* در گندم‌های مورد مطالعه بوده تا از این نتایج بتوان در برنامه‌های آینده اصلاح برای تحمل به شوری در گندم استفاده نمود.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در سال ۹۲-۱۳۹۱ در آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی دانشگاه ایلام انجام شد. مواد گیاهی از بانک ژن غلات و حبوبات غرب کشور واقع در دانشکده کشاورزی دانشگاه ایلام تهیه شدند که شامل برخی از گونه‌های زراعی و وحشی گندم و یک گونه وحشی جو می‌باشند که مشخصات آن‌ها در (جدول ۱) بیان شده است.

جدول ۱- گونه‌های گندم زراعی و وحشی مورد استفاده.

ردیف (کد نمونه)	نام علمی	ژنوم	نوع	محل جمع آوری
۱	<i>Aegilops tauschii</i> <i>spp strangulata</i>	DD	وحشی	مازندران - جاده بهشهر نکا- روستای رستم کلا
۲	<i>Aegilops umbellulata</i>	UU	وحشی	کرمانشاه - جاده سرپل ذهاب اسلام‌آباد غرب- روستای سرخه دیزه
۳	<i>Triticum boeoticum</i>	AA	وحشی	کرمانشاه - جاده هرسین نورآباد- روستای چغاسعید
۴	<i>Aegilops crassa</i>	DD MM	وحشی	لرستان - جاده نورآباد به هفت‌چشمه- روستای دهسفيد (پشت تنگ دوستعلی)
۵	<i>Triticum urartu</i>	AA	وحشی	کردستان - جاده قروه سنندج- ۱۵ کیلومتر بعد از دهگلان
۶	<i>Aegilops triuncialis</i>	UU CC	وحشی	کرمانشاه - جاده سرپل ذهاب اسلام‌آباد غرب- روستای سرخه دیزه
۷	<i>Triticum dicocoides</i>	AA BB	وحشی	ایلام - جاده ایلام شباب- دامنه کوه مانشت
۸	<i>Triticum aestivum</i>	AA BB DD	زراعی	رقم سرداری - کلکسیون دانشکده کشاورزی دانشگاه ایلام
۹	<i>Aegilops caudata</i>	CC	وحشی	لرستان - جاده خرم‌آباد اندیمشک - منطقه شوراب
۱۰	<i>Aegilops ovata</i>	UU MM	وحشی	چهارمهال بختیاری - جاده میمند کلواری - ۱۰۵ کیلومتری بروجن
۱۱	<i>Aegilops cylandrica</i>	CC DD	وحشی	کرمانشاه - هرسین - روستای کهریز
۱۲	<i>Aegilops tauschii</i> <i>spp tauschii</i>	DD	وحشی	گیلان - سه کیلومتری جاده آستارا به تالش
۱۳	<i>Aegilops speltoides</i>	BB	وحشی	کرمانشاه - سرپل ذهاب - بین روستای هوار و بزیمیرآباد
۱۴	<i>Triticum turgidum</i> <i>spp durum</i>	AA BB	زراعی	رقم بومی بروجرد - کلکسیون دانشکده کشاورزی دانشگاه ایلام
۱۵	<i>Aegilops neglecta</i>	UU MM	وحشی	ایلام جاده دره شهر ایلام - خروجی دره شهر
۱۶	<i>Hordeum spontaneum</i>	HH	وحشی	ایلام - بانگنجان - مزرعه دانشگاه ایلام

در مرحله نخست بذور ضد عفونی شده و در گلدان‌های کوچک کشت شده و پس از ۲ هفته از برگ‌های جوان نمونه‌ها DNA ژنومی به روش CTAB استخراج گردید. کیفیت و کمیت DNA ژنومی روی ژل آگارز ۰/۸ درصد بررسی و تأیید شد. یک جفت آغازگر اختصاصی با توالی زیر:

Hkt-F 5'TTATTCTTGTCAACTTCTGC3'

Hkt-R 5'CCATGTTCTCATTGTGG3'

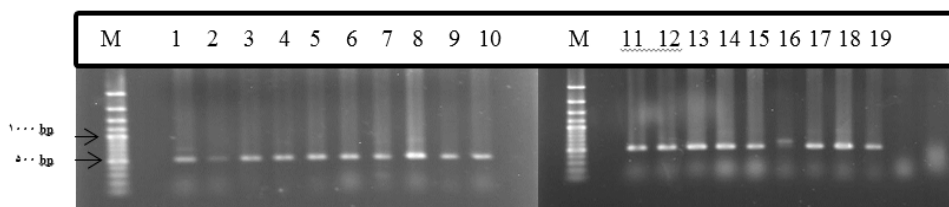
از روی توالی ژن *HKT* گندم نان موجود در پایگاه اطلاعاتی NCBI با کد دسترسی^۱ DQ009003.1، به وسیله نرم‌افزار OLigo برای تکثیر بخشی از ژن *HKT* طراحی شد. حجم نهایی هر واکنش PCR ۲۵ میکرولیتر (μL) بود که شامل بافر 10x PCR به میزان ۲/۵ میکرولیتر، ۲۰MgCl_۲ میلی‌مولار ۲/۵ میکرولیتر، dNTPs ۱ میلی‌مولار به میزان ۲/۵ میکرولیتر، آغازگرهای رفت و برگشت از هر کدام به میزان ۰/۵ میکرولیتر، آنزیم Taq DNA polymerase به میزان ۰/۳ میکرولیتر، آب مقطر استریل به میزان ۱۳/۲ میکرولیتر و ۳ میکرولیتر DNA ژنومی بود. واکنش PCR با یک مرحله واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه آغاز شد و پس از آن ۳۵ چرخه تکثیری شامل سه مرحله متوالی ۹۴ درجه به مدت ۴۵ ثانیه، ۴۶ درجه به مدت ۱ دقیقه و ۷۲ درجه به مدت ۱ دقیقه انجام شد که در ادامه، یک مرحله تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه به مدت ۵ دقیقه در نظر گرفته شد. برای اطمینان از اندازه قطعه مورد نظر، محصولات PCR روی ژل آگارز ۱/۲ درصد برده شدند. محصولات PCR ابتدا توسط شرکت Bionner خالص‌سازی شدند و سپس محصولات PCR توسط دو آغازگر اختصاصی در هر دو جهت توالی‌یابی شدند. این توالی‌ها با توالی‌های ژن *HKT* در پایگاه اطلاعاتی NCBI مقایسه شده و به منظور تجزیه و تحلیل‌های آماری از نرم‌افزارهای BLAST، MegAlign، Clastalw، CLC Sequence Viewer6، MEGA5.2 استفاده شد.

نتایج و بحث

بخشی از ژن *HKT* که در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفت در آگزون اول ژن *HKT* قرار داشت. این بخش از ژن که توسط یک جفت آغازگر اختصاصی در تمامی نمونه‌ها تکثیر شده بود، روی ژل آگارز ۱/۲ درصد برده شدند که نتایج شکل ۱ نشان‌دهنده کیفیت و اختصاصی بودن تکثیر

1- Accession Number

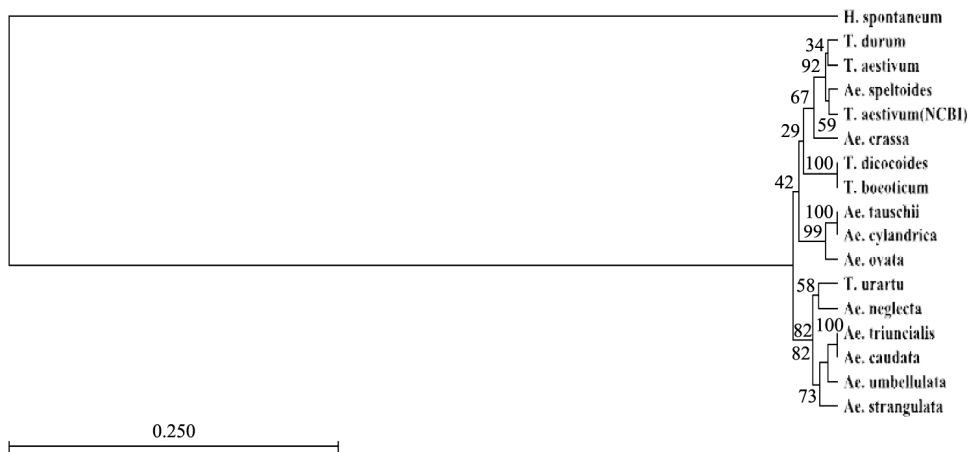
ناحیه هدف می‌باشد به طوری که براساس مطالعات و تجزیه و تحلیل‌های بیوانفورماتیک انتظار می‌رفت که اندازه ناحیه تکثیر شده در حدود ۵۲۰ جفت باز باشد که با نتایج محصولات PCR برای تمامی نمونه‌های گندم زراعی و وحشی مطابقت دارد فقط نمونه شماره ۱۶ که مربوط به جو وحشی بوده اندازه بیش‌تری را نشان داد. اندازه این ژن در جو ۲۰۵۸ جفت باز بود که بیش‌تر از ژن *HKT* در گندم می‌باشد و اندازه قطعه تکثیر شده در جو (شماره ۱۶) نشان‌دهنده همین موضوع است. کیفیت توالی‌یابی برای همه نمونه‌ها بیش‌تر از ۹۵ درصد بود.



شکل ۱- نتایج تکثیر ژن *HKT* از طریق PCR و پرایمر اختصاصی در نمونه‌های مورد بررسی:
 M- نشانگر اندازه مولکولی ۱۰۰۰ bp، شماره ۱ تا ۱۶ شماره نمونه‌های مورد مطالعه براساس جدول ۱
 است که شماره‌های ۱۷، ۱۸ و ۱۹ به ترتیب تکرار نمونه‌های شماره ۱۰، ۱۳ و ۱۵ می‌باشند.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17		
1	█	94.5	94.1	95.6	96.8	95.4	93.9	95.6	98.3	93.9	95.0	94.5	94.5	98.9	98.7	95.0	36.5	1	T.aestivum(ncbi)
2	6.4	█	98.1	94.3	95.2	96.6	97.5	94.3	96.2	97.5	92.4	92.0	92.0	95.2	95.0	96.4	35.7	2	Ae.strangulata
3	6.9	2.1	█	93.9	94.7	96.6	98.7	93.9	95.8	98.7	92.0	91.8	91.8	94.7	94.5	97.5	35.5	3	Ae.umbellulata
4	4.4	5.9	6.4	█	93.7	95.2	93.7	100.0	96.4	93.7	94.3	93.9	93.9	96.2	95.6	94.7	35.0	4	T.boeoticum
5	3.6	5.6	6.1	6.7	█	94.7	94.5	93.7	96.8	94.5	93.5	93.1	93.1	97.1	96.8	94.7	36.3	5	Ae.crassa
6	5.3	3.8	3.8	4.9	6.1	█	96.0	95.2	97.1	96.0	93.5	93.3	93.3	96.0	95.8	97.5	35.5	6	T.urartu
7	7.2	2.9	1.4	6.7	6.4	4.6	█	93.7	95.2	100.0	92.2	92.0	92.0	94.5	93.9	97.3	35.5	7	Ae.triuncialis
8	4.4	5.9	6.4	0.0	6.7	4.9	6.7	█	96.4	93.7	94.3	93.9	93.9	96.2	95.6	94.7	35.0	8	T.dicocoides
9	1.9	4.4	4.8	3.4	3.6	3.3	5.6	3.4	█	95.2	95.8	95.4	95.4	98.5	98.7	96.2	36.3	9	T.aestivum
10	7.2	2.9	1.4	6.7	6.4	4.6	0.0	6.7	5.6	█	92.2	92.0	92.0	94.5	93.9	97.3	35.5	10	Ae.caudata
11	5.9	9.0	9.5	5.9	7.7	7.6	9.3	5.9	4.8	9.3	█	97.9	97.9	95.2	95.6	92.9	35.3	11	Ae.ovata
12	5.4	8.5	8.8	5.4	7.2	6.9	8.5	5.4	4.4	8.5	1.4	█	100.0	94.7	95.2	92.6	36.0	12	Ae.cylindrica
13	5.4	8.5	8.8	5.4	7.2	6.9	8.5	5.4	4.4	8.5	1.4	0.0	█	94.7	95.2	92.6	36.0	13	Ae.tauschii
14	1.2	5.6	6.1	3.6	3.4	4.6	6.4	3.6	1.7	6.4	5.6	5.1	5.1	█	98.5	95.6	36.5	14	Ae.speltoides
15	1.4	5.9	6.4	4.4	3.6	4.8	7.2	4.4	1.4	7.2	5.1	4.6	4.6	1.7	█	95.0	36.5	15	T.durum
16	5.9	4.1	2.9	5.4	6.1	2.9	3.1	5.4	4.4	3.1	8.5	7.7	7.7	5.1	5.9	█	35.0	16	Ae.neglecta
17	117.3	121.5	123.9	124.5	118.1	123.6	123.9	124.5	118.1	123.9	125.9	123.1	123.1	117.3	117.3	126.7	█	17	H.spontaneum
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17		

شکل ۲- ماتریس شباهت‌ها و تفاوت‌های نمونه‌های مورد بررسی در سطح DNA همراه با گندم نان NCBI.



شکل ۳- درخت فیلوژنتیکی در سطح DNA برای نمونه‌های مورد بررسی به همراه گندم نان NCBI.

نتایج تجزیه فیلوژنتیکی در سطح DNA با روش UPGMA (شکل ۳) نشان می‌دهد که نمونه‌ها به سه گروه تقسیم می‌شوند که جو وحشی به تنهایی در گروه اول و دورتر از بقیه قرار گرفته است، گروه دوم که گندم نان NCBI در آن قرار دارد دارای ۶ زیرگروه می‌باشد، در این گونه آزیلوپس اسپلتوئیدس نزدیک‌ترین گونه به گندم نان NCBI می‌باشد که در یک زیر گروه قرار گرفته‌اند و بعد از آن نمونه‌های گندم نان و گندم دوروم بیش‌ترین قرابت را با گندم نان NCBI نشان می‌دهند، همچنین در این گروه گونه آزیلوپس اوواتا دورترین نمونه نسبت به گندم نان NCBI می‌باشد. گروه سوم شامل ۴ زیرگروه می‌باشد، که گونه‌های تریتیکوم اورارتو و آزیلوپس نگلکتا در یک زیرگروه قرار دارند، آزیلوپس تریانسالیس و آزیلوپس کوداتا در زیرگروه دوم این گروه قرار دارند و گونه‌های آزیلوپس آمبولاتا و آزیلوپس استرانگولاتا هر کدام جداگانه و به ترتیب در دو زیرگروه سوم و چهارم قرار گرفته‌اند.

تعیین میزان شباهت نمونه‌های مورد بررسی از نظر ژن *HKT* و تجزیه فیلوژنتیکی: تجزیه و تحلیل تعیین شباهت‌ها و تفاوت‌های گونه‌های مورد بررسی در این پژوهش، در سطح DNA در مقایسه با گندم نان NCBI از نظر ژن *HKT* که به وسیله نرم‌افزار MegAlign انجام شد، نتایج در

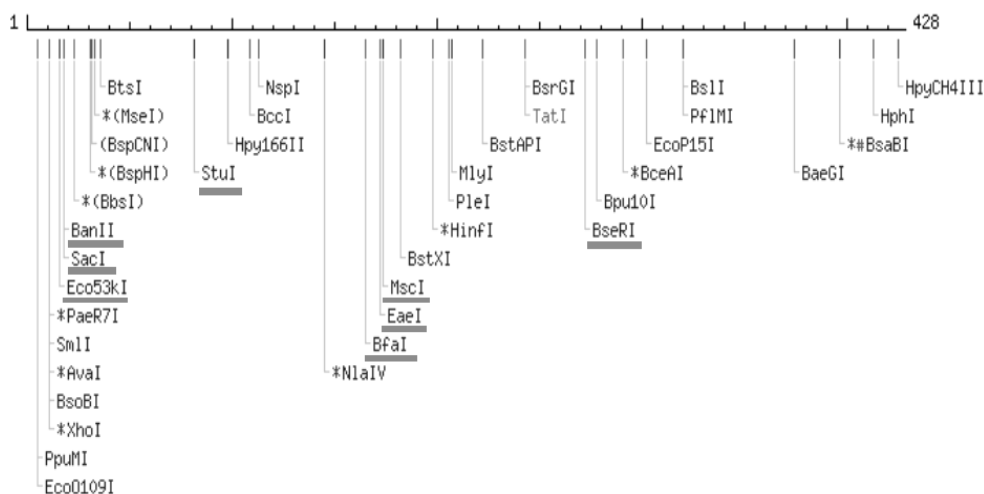
سطح DNA نشان داد که گونه آزیلوپس اسپلتوئیدس با ۹۸/۹ درصد بیش‌ترین شباهت را با گندم نان NCBI دارد در حالی که در نمونه‌های وحشی گندم آزیلوپس کوداتا و آزیلوپس ترانسسیالیس با ۹۳/۹ درصد کم‌ترین شباهت را در مقایسه با گندم نان NCBI دارند در حالی که هوردئوم اسپونتانئوم تنها ۳۶/۵ درصد شباهت و کم‌ترین شباهت را در مقایسه با گندم نان NCBI دارد، همچنین بیش‌ترین تفاوت با گندم نان NCBI مربوط به هوردئوم اسپونتانئوم است که در ناحیه تکثیر شده ۱۱۷ نوکلئوتید تفاوت بین گندم نان NCBI و جو وحشی وجود دارد در صورتی که گونه آزیلوپس اسپلتوئیدس کم‌ترین تفاوت و تنها ۱/۲ درصد تفاوت را نشان می‌دهد و از میان گونه‌های گندم بیش‌ترین تفاوت مربوط به آزیلوپس کوداتا و آزیلوپس ترانسسیالیس است که ۷/۲ درصد تفاوت را نشان می‌دهند (شکل ۵). درخت‌های فیلوژنتیکی که در سطح DNA و پروتئین به وسیله نرم‌افزار CLC Sequence Viewer 6 با روش UPGMA ترسیم شد نیز بیان‌گر همین نتایج می‌باشد (شکل ۴). این دو شکل نشان می‌دهند که آزیلوپس اسپلتوئیدس نزدیک‌ترین گونه به گندم نان NCBI از نظر ژن *HKT* است و با توجه به این که آزیلوپس اسپلتوئیدس شامل ژنوم B می‌باشد بنابراین به احتمال قوی این ژن از ژنوم B به واسطه الحاق^۱ وارد ژنوم گندم نان (AA BB DD) شده است و نشان می‌دهد که به احتمال زیاد ژن *HKT* روی ژنوم B وجود دارد. همچنین نتایج درخت‌های فیلوژنتیکی با نتایج هم‌ردیفی توالی‌ها از طریق نرم‌افزار BLAST هم‌خوانی دارد، به‌عنوان مثال از طریق نرم‌افزار BLAST گونه آزیلوپس اسپلتوئیدس ۹۹ درصد با گندم نان NCBI در سطح نوکلئوتیدی مشابهت نشان می‌دهد که با نتایج نرم‌افزار MegAlign مطابقت دارد.

تجزیه *In silico* نمونه‌های وحشی و زراعی گندم: توالی مورد توافق^۲ از همه نمونه‌ها با استفاده از نرم‌افزار CLC Sequence Viewer 6 به‌دست آمده در سایت Nebcutter (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>) وارد شده تا آنزیم‌های برشی اختصاصی که توانایی تشخیص هاپلوتایپ‌ها را دارند شناسایی شوند که نتایج آن در جدول ۲ آورده شده است. نتایج نشان داد که آنزیم‌های برشی متعددی توانایی برش در ناحیه تکثیر شد را دارند (شکل ۴). نتایج جدول ۲ نشان می‌دهد که با به‌کار بردن ۸ نوع آنزیم برشی می‌توان نمونه‌ها را از هم تفکیک نمود و همچنین با

1- Introgression

2- Consensus Sequence

استفاده از آنزیم برشی *Eco53kI* می توان ناحیه تکثیر شده را در نمونه های مختلف به کمک این آنزیم برش داد به طوری که نمونه هایی که دارای جایگاه '3...GAG ▼ CTC...5' هستند توسط این آنزیم برش خورده و تولید دو باند ۴۱۱bp و ۱۷bp می نماید. با استفاده از این آنزیم می توان *Ae. speltoides*، *Ae. umbellulata*، *T. urartu*، *Ae. triuncialis*، *Ae. caudata*، *T. dicocoides*، *T. boeoticum* و *Ae. Strangulate* و *Ae. neglecta* ناحیه تکثیر شده مورد نظر را برش داد و تولید باندهای چند شکل نمود از طرفی برخی از آنزیم های برشی همانند *StuI* را می توان برای برش تمامی نمونه ها در مقایسه با گندم نان NCBI استفاده نمود که این آنزیم قادر به برش در تمامی نمونه ها در جایگاه '3...AGG ▼ CCT...5' بوده و تولید دو باند ۸۳bp و ۳۴۵bp می نماید.



شکل ۴- جایگاه برشی آنزیم های محدودکننده روی توالی ژن *HKT*

جدول ۲- معرفی آنزیم‌های برشی در توالی مورد مطالعه.

نام آنزیم برشی	تعداد برش	سایت برشی	گونه برش خورده	طول قطعات
<i>Eco53k I</i>	۱	5'...GAG▼CTC...3'	<i>Ae. speltoides</i> , <i>T. boeoticum</i> , <i>T. dicocoides</i> , <i>Ae. caudata</i> , <i>Ae. triuncialis</i> , <i>T. urartu</i> , <i>Ae. umbellulata</i> , <i>Ae. neglecta</i> , <i>Ae. strangulata</i>	۱۷ نوکلئوتیدی و ۴۱۱ نوکلئوتیدی
<i>Sac I</i>	۱	5'...GAGCT▼C...3'	<i>Ae. speltoides</i> , <i>T. boeoticum</i> , <i>T. dicocoides</i> , <i>Ae. caudata</i> , <i>Ae. triuncialis</i> , <i>T. urartu</i> , <i>Ae. umbellulata</i> , <i>Ae. neglecta</i> , <i>Ae. strangulate</i>	۱۹ نوکلئوتیدی و ۴۰۹ نوکلئوتیدی
<i>Ban II</i>	۱	5'...GRGCY▼C...3'	<i>Ae. speltoides</i> , <i>T. boeoticum</i> , <i>T. dicocoides</i> , <i>Ae. caudata</i> , <i>Ae. triuncialis</i> , <i>T. urartu</i> , <i>Ae. umbellulata</i> , <i>Ae. neglecta</i> , <i>Ae. strangulata</i>	۱۹ نوکلئوتیدی و ۴۰۹ نوکلئوتیدی
<i>Stu I</i>	۱	5'...AGG▼CCT...3'	تمام نمونه‌ها به‌جز نمونه گندم نان NCBI را برش می‌دهد	۸۳ نوکلئوتیدی و ۳۴۵ نوکلئوتیدی
<i>Bfa I</i>	۱	5'...C▼TAG...3'	<i>Ae. speltoides</i> , <i>T. aestivum</i> , <i>T. aestivum(ncbi)</i> , <i>Ae. caudata</i> , <i>Ae. triuncialis</i> , <i>Ae. crassa</i> , <i>Ae. umbellulata</i> , <i>Ae. neglecta</i> , <i>Ae. strangulata</i> , <i>T. urartu</i>	۱۶۶ نوکلئوتیدی و ۲۶۲ نوکلئوتیدی
<i>Eae I</i>	۱	5'...Y▼GGCCR...3'	<i>Ae. strangulata</i> , <i>T. urartu</i> , <i>T. aestivum</i> , <i>Ae. neglecta</i>	۱۷۳ نوکلئوتیدی و ۲۵۵ نوکلئوتیدی
<i>Msc I</i>	۱	5'...TGG▼CCA...3'	<i>Ae. strangulata</i> , <i>T. urartu</i> , <i>T. aestivum</i> , <i>Ae. neglecta</i>	۱۷۵ نوکلئوتیدی و ۲۵۳ نوکلئوتیدی
<i>BseR I</i>	۱	5'...GAGGAG(N ₁₀)▼...3'	<i>Ae. speltoides</i> , <i>T. aestivum</i> , <i>T. aestivum(ncbi)</i> , <i>Ae. caudata</i> , <i>Ae. triuncialis</i> , <i>Ae. crassa</i> , <i>Ae. umbellulata</i> , <i>Ae. neglecta</i> , <i>T. urartu</i> , <i>Ae. tauschii</i> , <i>Ae. cylindrica</i> , <i>Ae. ovata</i> , <i>T. durum</i>	۲۷۳ نوکلئوتیدی و ۱۵۵ نوکلئوتیدی

اثرات تنش شوری روی عملکرد و کیفیت گیاهان: ژنوم‌های مختلف در گونه‌های گندم منبع مهمی در تغییرپذیری برای تنش شوری می‌باشند. ژنوم D که در گندم نان هگزاپلوئید (AABBDD) وجود دارد و در گندم دورم تتراپلوئید (AABB) وجود ندارد شامل جایگاه ژنی مهم *HKT1* است که نقش مهمی در تحمل به تنش شوری دارد (بیرت و همکاران، ۲۰۰۷). منبع دیگر *T. monococcum* است که شامل ژنوم A می‌باشد (هوآنگ و همکاران، ۲۰۰۸). نتایج و تجزیه و تحلیل‌های بیوانفورماتیک (شکل ۳) نشان می‌دهد که آرژیلوپس اسپلتوئیدس (ژنوم B) نزدیک‌ترین گونه به گندم نان NCBI می‌باشد که در یک زیر گروه قرار گرفته‌اند، بنابراین به احتمال قوی ژن *HKT* از ژنوم B به گندم نان منتقل شده است. این مطلب با نتایج قبلی گزارش شده هم‌خوانی ندارد، بنابراین باید تجزیه و تحلیل در سطح کل ژن *HKT* صورت پذیرد تا مشخص شود که آیا ژنوم B می‌تواند منبع جدیدی برای ژن *HKT* باشد.

تنوع در ژن *HKT* در خانواده گندمیان با اختلاف در تحمل به تنش شوری مرتبط است که ژن *HKT1* به واسطه تلاقی از *T. monococcum* به گندم نان و دورم منتقل شد است و منجر به تسهیل خروج یون Na^+ از برگ‌های تحت تنش شوری شد (جیمز و همکاران، ۲۰۱۱). گندم دوروم دارای پنج ژن شبیه *HKT1* است که دو تا از ژنوم A و سه تا از ژنوم B دریافت نموده است. بن‌عمار و همکاران (۲۰۱۴) گزارش نمودند که در گندم دورم دو ژن *HKT* ۸۹ درصد از نظر توالی مشابه هستند که این مقدار نشان‌دهنده این است که ناقل‌های سدیم به‌وسیله ژن‌های مختلفی کنترل می‌شوند.

شناسایی اسیدهای آمینه مؤثر در تنش شوری و نقش آن‌ها: اسیدهای آمینه که جز متابولیت‌های گیاهی محسوب می‌شوند پیش‌ساز پروتئین‌ها هستند و در شرایط تنش نقش‌های متفاوتی در گیاه از جمله: تأخیر در پژمردگی، افزایش رنگدانه‌های فتوسنتزی، محدودیت در جذب یون سدیم و افزایش نسبت K^+/Na^+ و جلوگیری از باز شدن روزنه‌ها (هاشمی و همکاران، ۲۰۱۲). تفاوت بسیار زیادی در سطح اسیدهای آمینه در نمونه‌های مورد بررسی در این پژوهش در مقایسه با گندم نان NCBI وجود داشت که در زیر نقش و عمل هر یک از این تغییرات در تنش شوری مورد بررسی قرار خواهد گرفت.

آمینواسیدهای گندم نان NCBI، در نمونه‌های سیلندریکا و تائوشی ۲ مورد به اسید آمینه آسپاراژین تغییر نموده‌اند. افزایش غلظت برخی اسید آمینه‌های خاص از اثرات تنش‌های محیطی محسوب می‌شود (وینگر و همکاران، ۲۰۰۰). از جمله اسیدهای آمینه‌ای که غلظت آن‌ها تحت تنش شوری افزایش می‌یابد می‌توان به آسپاراژین، گلوتامین، پرولین، والین، ایزولوسین، فنیل‌آلانین و گلیسین اشاره نمود. تحت شرایط تنش‌های غیرزنده ژن‌های مرتبط با سنتز پروتئین آسپاراژین سنتتاز افزایش بیان نشان می‌دهد (هاشمی و همکاران، ۲۰۱۲). ژن *ASN* آسپاراژین سنتتاز را رمز می‌کند. قرار گرفتن در شرایط تنش موجب تجمع مواد آمونومی در گیاهان می‌شود که آنزیم آسپاراژین سنتتاز سمیت این مواد را از بین می‌برد (هوآنگ و همکاران، ۲۰۰۸). ویدودو و همکاران (۲۰۰۹)، وانگ و همکاران (۲۰۰۵) و چائو و همکاران (۲۰۰۵) افزایش میزان آسپاراژین را تحت تنش شوری گزارش نمودند.

همچنین، آمینواسیدهای گندم نان NCBI، در نمونه‌های سیلندریکا و تائوشی، ۳ مورد و در نمونه‌های کوداتا، اوواتا، نگلکتا، تریانسالیس، آمبولاتا و گندم ماکارونی یک مورد به آمینواسید پرولین تغییر یافته است. در گیاهان پرولین یک جز مهم پاسخ به تنش شوری محسوب می‌شود (ملکی و همکاران، ۲۰۱۱). افزایش اسیدآمینه پرولین باعث حفظ فشار اسمزی و ادامه رشد سلول می‌شود همچنین پرولین در حفاظت از غشاهای زیستی نقش آنتی‌اکسیدانی دارد (حسیبی و همکاران، ۲۰۱۱). پرولین در تنش شوری در پاک‌سازی رادیکال‌های آزاد اکسیژن، تنظیم پتانسیل اسمزی و پایداری ساختمان پروتئین‌های غشا نقش دارد و در زمان بازیابی گیاه منبع نیتروژن، کربوهیدرات و انرژی است (گماریان و همکاران، ۲۰۰۹). نیکولاس و همکاران (۱۹۹۳) تغییرات غلظت پرولین را به‌عنوان شاخص تنش شوری و آبی معرفی کردند. افزایش پرولین در ریشه باعث تعادل اسمزی و تنظیم اسمزی می‌شود و از ورود نمک از طریق ریشه به گیاه جلوگیری می‌کند (هاشمی و همکاران، ۲۰۱۲). گیاهان به‌طور طبیعی تحت تنش شوری یا خشکی بیش از حد معمول پرولین تولید می‌کنند. زمانی که گیاه سازوکاری برای مقابله با شوری ندارد و دچار تنش می‌شود، سنتز پرولین صورت می‌گیرد (گماریان و همکاران، ۲۰۰۹). کومار و همکاران (۲۰۱۰)، ویدودو و همکاران (۲۰۰۹) و اشرف و فولاد (۲۰۰۷) تجمع آرام پرولین در شرایط تنش‌های غیرزنده را در بسیاری از گیاهان گزارش کردند.

آمینواسیدهای گندم نان NCBI، در کوداتا ۶ مورد، در سیلندریکا، تائوشی و تریانسالیس ۵ مورد، در آمبولاتا، اورارتو، استرانگولاتا و کراسا ۴ مورد، در اوواتا، نگلکتا، دیکوکویدس و بوئوتیکوم ۳ مورد

و در نمونه‌های گندم نان، گندم ماکارونی و اسپلتوئیدس دو مورد به آمینواسیدهای والین و ایزولوسین تغییر یافته‌اند.

تحت تنش والین و ایزولوسین همانند شکل ذخیره‌ای پیروات عمل می‌کنند. پیروات به وسیله شکستن گلوکز انرژی لازم برای حیات سلول فراهم می‌کند و در نتیجه افزایش آمینواسیدهای والین و ایزولوسین در شرایط تنش انرژی لازم برای گیاه را فراهم می‌کند (هاشمی و همکاران، ۲۰۱۱).

آمینواسیدهای گندم نان NCBI، در نمونه‌های سیلندریکا و تائوشی ۳ مورد و در نمونه‌های آمبلولاتا، نگلکتا، استرانگولاتا، تریانسالیس و کوداتا یک مورد به آمینواسید فنیل‌آلانین تغییر یافته است. نیشیاما و همکاران (۲۰۱۰)، جانز و همکاران (۲۰۱۰) و هم و همکاران (۲۰۰۴) گزارش کردند که فنیل‌آلانین مشتقات فنیل پروپانوئید مانند فلاونوئیدها را به وسیله آنزیم فنیل‌آلانین آمونیلایز تولید می‌کند که این ترکیبات در شرایط تنش‌های زنده و غیرزنده از گیاهان محافظت می‌کنند. بنابراین افزایش فنیل‌آلانین تحت تنش‌های غیرزنده احتمال بیان آنزیم فنیل‌آلانین آمونیلایز و بسیاری از ژن‌های درگیر در تولید فلاونوئیدها را افزایش می‌دهد. بنابراین افزایش فنیل‌آلانین در گیاهان تحت تنش برای ایجاد یک زمینه دفاعی ضرورت دارد (هاشمی و همکاران، ۲۰۱۲).

اشرف و همکاران (۲۰۰۷) نشان دادند که در پاسخ به تنش‌های محیطی در بسیاری از گونه‌های گیاهی گلايسين بتائين که پیش‌ساز اسید آمینه گلايسين است تجمع می‌یابد که در بهبود وضعیت گیاه تحت تنش نقش دارد. تغییر در شرایط تولید گلايسين بتائين، تولید گلايسين را تحت تأثیر قرار می‌دهد که می‌توان نتیجه گرفت افزایش آن باعث افزایش سنتز گلايسين می‌شود (هاشمی و همکاران، ۲۰۱۲). در این پژوهش براساس آمینواسیدهای گندم نان NCBI، در نمونه‌های سیلندریکا، تائوشی، کوداتا، نگلکتا، تریانسالیس و آمبلولاتا دو مورد و در کراسا یک مورد به گلايسين بتائين تغییر یافته است. بنابراین با توجه به تغییرات آمینو اسیدی بالایی که در دو گونه آژیلوپس تائوشی و آژیلوپس سیلندریکا مشاهده می‌شود می‌توان نتیجه گرفت که این دو نمونه منبع خوبی برای مطالعات بعدی و آزمایشات گلخانه‌ای و مزرعه‌ای برای ارزیابی در سطوح مختلف تنش شوری می‌باشد تا از این طریق بتوان با تکیه بر نتایج فنوتیپی و ژنوتیپی بهترین منبع گیاهی مقاومت به تنش شوری را شناسایی نموده و از آن‌ها در برنامه‌های اصلاح کلاسیک یا مهندسی ژنتیک استفاده نمود.

منابع

1. Arzani, A. 2008. Breeding Field Crops. Isfahan University of Technology. (In Persian)
2. Ashraf, M., and Foolad, M.R. 2007. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environ. Exp. Bot.* 59: 206-216.
3. Ben Amar, S., Brini, F., Sentenac, H., Masmoudi, K., and Very, A.A. 2014. Functional characterization in *Xenopus* oocytes of Na⁺ transport systems from durum wheat reveals diversity among two *HKT1;4* transporters. *J. Exp. Bot.* 65: 1. 213-222.
4. Byrt, C.S., Platten, J.D., Spielmeyer, W., James, R.A., Lagudah, E.S., Dennis, E.S., Tester, M., and Munns, R. 2007. *HKT1;5*-like cation transporters linked to Na⁺ exclusion loci in wheat, *Nax2* and *Kna1*. *Plant Physiol.* 143: 1918-1928.
5. Chao, D.Y., Luo, Y.H., Shi, M., Luo, D., and Lin, H.X. 2005. Salt-responsive genes in rice revealed by cDNA microarray analysis, *Cell Res.* 15: 796-810.
6. Chinnusamy, V., Jagendorf, A., and Zhu, J. 2005. Understanding and improving salt tolerance in plants, *Crop Sci.* 45: 437-448.
7. El-Hendawy, S.E., Hu, Y., Yakout, G.M., Awad, A.M., Hafiz, S.E., and Schmidhalter, U. 2005. Evaluating salt tolerance of wheat genotypes using multiple parameters. *Europ. J. Agron.* 22: 243-253.
8. Ghavami, F., Malboobi, M.A., Ghannadha, M.R., Yazdi Samadi, B., Mozafari, J., and Jafar Aghaei, M. 2004. An evaluation of salt tolerance in Iranian wheat cultivars at germination and seedling stages. *Iran. J. Agric. Sci.* 35: 2. 453-464. (In Persian)
9. Gomarian, M., Malboobi, M.A., Darvish, F., Mohammadi, S.A., Razavi, K.H., Rahaie, M., and Alizadeh, H. 2009. Evaluation of inducible gene expression under long term salinity stress in two susceptible and tolerant cultivars of wheat. *Modern Gen. J.* 4: 27-40.
10. Hashemi, A., Nematzadeh, G.H., Hosseini Salekdeh, G.H., Hosseini, S.A., and Hajirezaei, M.R. 2012. Physiological and metabolic responses in rice under salt stress. *Crop Biotech.* 1: 2. 1-14.
11. Hasibi, P., Zandieh, L., Ghaeim Maghami, N., Rashidi Rezvan, N., Najafi, H., and Ghaem Maghami, F. 2011. Study of some physiological parameter in two wheat cultivars under NaCl and CaCl salinity. *Crop Physiol. J.* 2: 3-23.
12. Hauser, F., and Horie, T. 2010. A conserved primary salt tolerance mechanism mediated by *HKT* transporters: a mechanism for sodium exclusion and maintenance of high K⁺/Na⁺ ratio in leaves during salinity stress. *Plant, Cell Environ.* 33: 552-565.
13. Hemm, M.R., Rider, S.D., Ogas, J., Murry, D.J., and Chapple, C. 2004. Light induces phenylpropanoid metabolism in Arabidopsis roots. *Plant J.* 38: 765-778.
14. Horie, T., Sugawara, M., Okunou, K., Nakayama, H., Schroeder, J.I., Shinmyo, A., and Yoshida, K. 2008. Functions of *HKT* transporters in sodium transport in

- roots and in protecting leaves from salinity stress. *Plant Biotech.* 25: 233-239.
15. Horie, T., Yoshida, K., Nakayama, H., Yamada, K., Oiki, S., and Shinmyo, A. 2001. Two types of *HKT* transporters with different properties of Na⁺ and K⁺ transport in *Oryza sativa*. *Plant J.* 27: 129-138.
 16. Huang, S., Spielmeier, W., Lagudah, E.S., and Munns, R. 2008. Comparative mapping of *HKT* genes in wheat, barley and rice, key determinants of Na⁺ transport, and salt tolerance. *J. Exp. Bot.* 59: 927-937.
 17. James, R.A., Blake, C., Byrt, C.S., and Munns, R. 2011. Major genes for Na⁺ exclusion, *Nax1* and *Nax2* (wheat *HKT1;4* and *HKT1;5*), decrease Na⁺ accumulation in bread wheat leaves under saline and waterlogged conditions. *J. Exp. Bot.* 62: 2939-2947.
 18. Janz, D., Behnke, K., Schnitzler, J.P., Kanawati, B., Schmitt-Kopplin, P., and Polle, A. 2010. Pathway analysis of the transcriptome and metabolome of salt sensitive and tolerant poplar species reveals evolutionary adaptation of stress tolerance mechanisms. *BMC Plant Biol.* 10: 150.
 19. Khodabandeh, N. 2007. Grain. Tehran University. 537p. (In Persian)
 20. Kumar, V., Shriram, V., Kavi Kishor, P., Jawali, N., and Shitole, M. 2010. Enhanced proline accumulation and salt stress tolerance of transgenic indica rice by overexpressing P5CSF129A gene. *Plant Biotech. Rep.* 4: 37-48.
 21. Maas, E.V., and Poss, J.A. 1989. Salt sensitivity of wheat at different growth stages. *Irrig. Sci.* 10: 29-40.
 22. Maleki, M., Naghavi, M.R., Alizadeh, H., Posstini, K., and Abd Mishani, C. 2011. Effect of salinity on leaf protein patterns in *Aegilops tauschii*. *Modern Gen. J.* 3: 33-40. (In Persian)
 23. Mäser, P., Gierth, M., and Schroeder, J.I. 2002. Molecular mechanisms of potassium and sodium uptake in plants. *Plant Soil.* 247: 43.
 24. Munns, R., James, R.A., and Lauchli, A. 2006. Approaches to increasing the salt tolerance of wheat and other cereals. *J. Exp. Bot.* 57: 1025-1043.
 25. Munns, R., and Tester, M. 2008. Mechanisms of salinity tolerance. *Ann. Rev. Plant Biol.* 59: 651-658.
 26. Nicolas, M.E., Munns, R., Samarakoon, A.B., and Gifford, R.M. 1993. Elevated carbon dioxide improves the growth of wheat under salinity. *Plant Physiol.* 20: 349-360.
 27. Nishiyama, Y., Yun, C.S., Matsuda, F., Sasaki, T., Saito, K., and Tozawa, Y. 2010. Expression of bacterial tyrosineammonia-lyase creates a novel p-coumaric acid pathway in the biosynthesis of phenylpropanoids in *Arabidopsis*. *Planta.* 232: 209-218.
 28. Pardo, J.M. 2010. Biotechnology of water and salinity stress tolerance. *Current Opinion Biotech.* 21: 185-196.
 29. Rahaie, M., Gomarian, M., Alizadeh, H., Malboobi, M.A., and Naghavi, M.R. 2012. The expression analysis of transcription factors under long term salt stress

- in tolerant and susceptible wheat genotypes using reverse northern blot technique. *J. Crop Sci.* 13: 3. 580-595.
30. Rawson, H.M., Richards, R.A., and Munns, R. 1988. An examination of selection criteria for salt tolerance in wheat, barley and triticale. *Austr. J. Agric. Res.* 39: 5. 759-772.
31. Tadayon, M.R., and Emam, Y. 2007. Physiological and morphological response of two barley cultivars to salt stress and correlated it to grain yield. *J. Sci. Technol. Agric. Natur. Sci.* 1: 1. 253-262. (In Persian)
32. Wang, H., Liu, D., Sun, J., and Zhang, A. 2005. Asparagine synthetase gene *TaASN1* from wheat is up-regulated by salt stress, osmotic stress and ABA. *J. Plant Physiol.* 162: 81-89.
33. Widodo, P.J.H., Newbigin, E., Tester, M., Bacic, A., and Roessner, U. 2009. Metabolic responses to salt stress of barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivars, Sahara and Clipper, which differ in salinity tolerance. *J. Exp. Bot.* 60: 4089-4103.
34. Wingler, A., Lea, P.J., Quick, W.P., and Leegood, R.C. 2000. Photorespiration: metabolic pathways and their role in stress protection, *Trans. R. Soc.* 355: 1517-1529.
35. Zadoria, G., Khodarahmi, M., Amini, A., and Mostafavi, Kh. 2011. Effect of NaCl-induced on biomass of bread wheat cultivars in seedling stage. *J. Agron. Plant Breed.* 7: 1. 69-83. (In Persian)
36. Zamani Babgohari, M., Niazi, A., and Ebrahimi, A. 2011. Analysis of chromosomal region and identification of loci surrounding genes involved in Na⁺ and K⁺ in rice, *Arabidopsis* and *Physcomotrella* patent. 7th National Biotechnology Congress of Iran. (In Persian)



Identification of phylogenetic relationship among wheat and its ancestor based on sequencing of *HKT* gene

Z. Sohrabizadeh¹, *A. Fazeli² and A. Ashraf Mehrabi²

¹M.Sc. Student, Dept. Agronomy and Plant Breeding, Ilam University,

²Assistant Prof., Dept. Agronomy and Plant Breeding, Ilam University

Received: 04/27/2014; Accepted: 07/12/2014

Abstract

Salinity is one of the important problems of the farmland in the world, such that million tons of salt enter to arable soils through irrigation every year. Wheat is the first and the most important cereal crops in the world that provides the main food for more than a third of the world's population. Use of modern genetic methods such as sequencing provided the possibility of a more accurate and quick assessment of genetic material at DNA and RNA levels. *HKT* genes are important group to transfer Na and K ions, so cultivated and wild samples of wheat are used for identification of allelic diversity of *HKT* gene. Seeds were planted in plastic pots and DNA was extracted at two-to three-leaf stage by Doyle et al. (1998) method. PCR was amplified by using a pair of specific primers and PCR products were purified and sequenced. Results showed the nucleotide and amino acid variation between the investigated samples and bread wheat in NCBI. Results of DNA sequencing show that *Aegilopss peltoides* with 98.9% and *Ae. caudata* and *Ae. triuncialis* with 93.9% have the most and the least similarity to *Triticum aestivum* in NCBI, respectively, whereas *Hordeum spontaneum* with only 36.5 has the least similarity to *HKT* sequence in NCBI. Phylogenetic tree constructed based on DNA sequence by UPGMA method confirmed above results. DNA phylogenetic methods also showed that *Ae. speltoides* and bread wheat are classified in the same sub-group, that means *HKT* gene was transferred from *Ae. speltoides* to bread wheat via introgression.

Keywords: Salinity, Wheat, *HKT* gene, Wild relatives, Sequence analysis

* Corresponding Author; Email: a.fazeli@ilam.ac.ir

