

بررسی تنوع آللی گلوتنین با وزن مولکولی پایین در لاین‌های بومی گندم با استفاده از نشانگرهای اختصاصی DNA

Evaluation of allelic variation for low molecular weight glutenin subunits using DNA specific markers in wheat landraces

ابوالفضل بزرگمهر^۱، جعفر احمدی^{۱*}، فهمیه شاهین‌نیا^۲، خدیجه رضوی^۳، گودرز نجفیان^۴، تهمینه لهراسبی^۳

۱- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد و دانشیار، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره)

۲- استایار، موسسه تحقیقات ژنومیکس گیاهی (ACPFPG)، دانشگاه آدلاید، استرالیا

۳- استادیار، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری تهران، ایران

۴- دانشیار، موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج، ایران

Bozorgmehr A¹, Ahmadi J^{*2}, Shahinnia F³, Razavi KH⁴, Najafian G⁵, Lohrasebi T⁶

1. MSc Student and Associate Professor, Imam Khomeini International university, Iran

2. Assistant Professor, Australian Center for Plant Functional Genomics, University of Adelaide, Australia

3. Assistant Professor, National Institute for Genetic Engineering and Biotechnology, Iran

4. Associate Professor, Seed and Plant Improvement Institute, Iran.

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: njahmadi910@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ۹۲/۵/۶ - تاریخ پذیرش: ۹۲/۹/۲۴)

چکیده

این پژوهش به منظور بررسی تنوع آللی زیر واحدهای گلوتنین با وزن مولکولی پایین (LMW-GS) در ۹۷ لاین بومی گندم نان و دوروم با سه جفت آغازگر اختصاصی برای مکان‌های Glu-D3، Glu-B3 و Glu-A3 انجام شد. نتایج نشان داد که تنوع قابل ملاحظه‌ای در لاین‌های بومی گندم نان و دوروم ایران وجود دارد. به طور کلی بوسیله آغازگر Glu3-D2 پنج الگوی باندی شامل چهار آلل a، b، c و d در بین لاین‌های بومی مورد مطالعه شناسایی شد که به ترتیب دارای فراوانی نسبی ۰/۰۱۳، ۰/۸۵۳، ۰/۰۲۶ و ۰/۰۵۴ بوده و آلل b بیشترین فراوانی را به خود اختصاص داد. بوسیله آغازگر Glu3-3.1 (ژنوم BB و DD) چهار الگوی باندی شامل شش آلل a، b، c، d، e و f شناسایی شد که به ترتیب دارای فراوانی نسبی ۰/۴۷۴، ۰/۵۲۵، ۰/۷۴۲، ۰/۷۴۲ و ۰/۱۶۴ بودند و آلل d و e بیشترین فراوانی را به خود اختصاص دادند. بوسیله آغازگر Glu3-3.2 (ژنوم AA و DD) چهار الگوی باندی شامل ۱۰ آلل a، b، c، d، e، f، g، h، i و j شناسایی شد، که به ترتیب دارای فراوانی نسبی ۰/۰۱۰، ۰/۵۳۶، ۰/۰۱۰، ۰/۰۱۰، ۰/۰۲۰، ۰/۶۵۹، ۰/۵۴۶، ۰/۰۱۰ و ۰/۰۱۰ بودند و آلل g بیشترین فراوانی را به خود اختصاص داد. با استفاده از شاخص نی (H) میزان تنوع ژنتیکی برای آغازگرهای Glu3-D2، Glu3-3.1 و Glu3-3.2 به ترتیب ۰/۳۱۴، ۰/۸۲۹ و ۰/۷۰۹ بدست آمد. این تنوع به عنوان منبع با ارزش تنوع آللی در برنامه‌های اصلاحی و به منظور بهبود کیفیت (با توجه به تعیین تعداد سیستمین و طول نواحی تکراری، دو عامل موثر در تعیین کیفیت پروتئین) محصولات نهایی حاصل از گندم نان و دوروم قابل استفاده است.

واژه‌های کلیدی

تنوع آللی

گلوتنین

گندم

نشانگر

LMW-GS

مقدمه

گلوٲن گندم شامل گلوٲین‌ها و گلیادین‌ها می‌باشد که از مدت‌ها قبل به عنوان عامل تعیین کننده ارزش نانوائی و ارزش محصولات دیگر حاصل از گندم شناخته شده و مطلوبیت آرد برای تهیه نان و صنایع تبدیلی دیگر بستگی به کمیت و کیفیت گلوٲن گندم دارد. این دو گروه مجموعاً ۸۵ درصد از پروٲین ذخیره‌ای در گندم را تشکیل می‌دهند. گلوٲین‌ها از نظر وزن مولکولی به دو گروه با وزن مولکولی بالا (HMW-GS) و وزن مولکولی پایین (LMW-GS) تقسیم می‌شوند (Dovidio et al. 1997, 2004). زیر واحدهای گلوٲین با وزن مولکولی پایین (LMW-GS) توسط ژن‌های *Glu-3* شامل *Glu-A3*، *Glu-B3* و *Glu-D3* که بصورت بلوک ژنی هستند و بر روی بازوی کوتاه کروموزوم‌های 1A، 1B و 1D قرار دارند، کد می‌شوند (Maschi et al. 1998). گلوٲین‌های با وزن مولکولی پایین گروه پیچیده‌ای از پروٲین‌ها هستند که قابلیت تشکیل پیوندهای دی‌سولفیدی بین مولکولی آن‌ها موجب شرکت آن‌ها در پلی‌مر گلوٲن می‌شود. مقایسه داده‌های موجود در سطح ژن و پروٲین این زیرواحدها و توالی‌های در دسترس مرتبط با آلفا، گاما و امگا گلیادین‌ها، عدم یکنواختی آن‌ها را اثبات می‌کند و می‌بایستی به عنوان یک گروه متمایز به نام گلوٲین‌های با وزن مولکولی کم تعریف شوند. ساختار کلی LMW-GS متشکل از ۴ دامنه ساختاری از جمله سیگنال پپتید ۲۰ اسید آمینه، دامنه کوتاه انتهای آمینی (۱۳ اسید آمینه)، دامنه غنی در کدون گلوٲامین و دامنه محافظت شده C ترمینال می‌باشد (Long et al. 2008). مجموعاً ۳۰ تا ۴۰ پلی‌پپتید در ناحیه LMW-GS قابل تشخیص می‌باشد (Redalli et al. 1995). براساس توالی اسید آمینه‌ای انتهای آمینه، LMW را می‌توان در سه گروه خاص طبقه‌بندی کرد. LMW-m که اولین اسید آمینه در توالی پروٲینی آن متیونین می‌باشد، LMW-S که اولین اسید آمینه در توالی پروٲینی آن سرین می‌باشد و LMW-I که اولین اسید آمینه در توالی پروٲینی آن ایزولوسین می‌باشد. زیر واحدهای نوع LMW-S فراوان‌ترین نوع در همه ژنوتیپ‌های بررسی شده می‌باشند (Tao et al. 1989). طول ژن LMW-GS از حدود ۹۰۰ تا ۱۱۵۰ جفت باز متفاوت می‌باشد و تعداد تکرار در دامنه تکراری بین ۱۲ تا ۲۵ بوده و عمدتاً مسئول تنوع در طول ژن می‌باشد. هر چند تنوع

آلی LMW-GS در گندم به طور گسترده‌ای در سطح پروٲین مشخص شده است اما تنوع آلی در سطح DNA برای زیر واحدهای گلوٲین با وزن مولکولی پایین هنوز به طور کامل شناخته نشده است و تنوع طولی ژن‌های کدکننده زیر واحدهای گلوٲین با وزن مولکولی پایین به وسیله نشانگرهای اختصاصی کم‌تر مورد مطالعه قرار گرفته است (D'ovidio et al. 2004; Long et al. 2005). استفاده از نشانگرهای اختصاصی امکان شناسایی آل‌هایی که به دلیل همپوشانی پروٲین‌های گلیادین با زیرواحدهای گلوٲین با وزن مولکولی پایین ناشناخته مانده‌اند را فراهم می‌کند (Gupta et al. 1989, 1994; Wang et al. 2008). برای شناسایی زیر واحدهای گلوٲین با وزن مولکولی پایین با استفاده از روش طبقه‌بندی ژن‌های زیر واحدهای گلوٲین با وزن مولکولی پایین و انتساب آن‌ها به کروموزوم‌ها بوسیله گروه آغازگرهای اختصاصی LMW-GS انجام شد (Long et al. 2008).

مواد و روش‌ها

در این مطالعه ۷۵ لاین بومی گندم نان و ۲۲ لاین بومی گندم دوروم، از بخش تحقیقات غلات موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج تهیه شد. DNA ژنومی از برگ‌های تازه گندم به روش CTAB تغییریافته (Doyle and Doyle 1990) استخراج شد.

تهیه آغازگرها

در این مطالعه از سه جفت آغازگر اختصاصی برای مکان‌های *Glu-D3*، *Glu-B3*، *Glu-A3* که توسط Long et al. (2005) از ژنوم گندم GS طراحی شده بود استفاده شد (جدول ۱).

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز PCR

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) در حجم ۲۰ میکرولیتر، که حاوی ۱ U TaqPlus DNA، دو میکرولیتر بافر (۱۰X) PCR، ۵۰ نانوگرم از DNA ژنومی، ۰/۶ میکرولیتر از $MgCl_2$ (50mM)، ۰/۴ میکرولیتر dNTP (10Mm) و ۰/۲ میکرولیتر از هر آغازگر (10 pmol) انجام شد. برنامه PCR با واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۵°C به مدت ۵ دقیقه آغاز و با ۳۵ چرخه شامل مرحله واسرشت‌سازی در دما ۹۵°C به مدت یک دقیقه، مرحله اتصال

جدول ۱- توالی آغازگرهای اختصاصی برای گلوٲنین‌های با وزن مولکولی پایین

آغازگر	توالی (۵' - ۳')	مکان کروموزوم	دمای اتصال (°C)
Glu3.1	F: ATGGAGACTAGCCACATCCCT R: CACATGGCAACTACTCTGCCA	DD و BB	۶۱
Glu3.D.2	F: ATGGAGACTAGCCGCGTCCCT R: TGACCTAGCAAGACGTTGCGA	DD	۶۹/۵
Glu3.2	F: TGCCATTGCACAGATGCAG R: CTGCAAAAAGGTACCCCTT	DD و AA	۵۰

استفاده از آغازگر Glu3-D2 پنج الگوی باندی شامل چهار آل a، b، c و d با طول‌های بین ۴۰۰ bp و ۶۰۰ bp شناسایی شد، و بدلیل اینکه این خانواده ژنی دارای نواحی تکراری موجود در ساختار ژنی LMW-GS می‌باشد مسئول اصلی تنوع در طول ژن می‌باشد (شکل ۱، جدول ۲). چهار آل a، b، c و d به ترتیب دارای فراوانی نسبی ۰/۰۱۳، ۰/۸۵۳، ۰/۰۲۶ و ۰/۰۵۴ بودند. آل b با طول تقریبی ۵۷۰ bp بیشترین فراوانی را به خود اختصاص داد. آل b فراوان‌ترین باند در میان ۴ آل بوده و در ۳ الگو از ۴ الگوی مشاهده شده در این آغازگر یافت شد، همچنین این آل در ۶۴ لاین مشاهده و شناسایی شد در حالی که آل‌های a، c و d به ترتیب در ۱، ۲ و ۴ لاین مشاهده شدند (جدول ۴). در مطالعه مشابهی هفت آل بوسیله این آغازگر در ژنوتیپ‌های تجاری گندم نان ایران برای این مکان ژنی شناسایی شد (Hosynian et al. 2010). محاسبه تنوع ژنتیکی با استفاده از شاخص نی نشان داد که گندم نان از تنوع ۰/۳۱۴ برخوردار است (جدول ۳). میزان تنوع ژنتیکی محاسبه شده برای این مکان ژنی ($H=0.314$) در این تحقیق کمتر از میزان تنوع ($H=0.737$) بدست آمده در سطح پروتئینی توسط محققین دیگر بود (Izadi et al. 2002; Ikeda et al. 2003; Izadi et al. 2010).

آغازگر Glu3-3.1

این آغازگر برای ژنوم B و D گندم بهاره چینی طراحی شده و دو قطعه ۵۸۰ bp و ۶۲۰ bp را در این رقم تکثیر می‌کند (Long et al. 2005). طول قطعات تکثیر شده بوسیله این آغازگر در بین لاین‌های مورد مطالعه تقریباً بین ۵۸۰-۸۰۰ bp بودند. بوسیله

در دمای 70°C - ۵۰ به مدت یک دقیقه (بسته به دمای اتصال آغازگرها جدول ۱) و مرحله بسط در دمای 72°C به مدت یک دقیقه ادامه یافته و مرحله پایانی با دمای بسط نهایی 72°C به مدت چهار دقیقه بکار گرفته شد. محصول حاصل از PCR بر روی ژل آگاروز دو درصد تفکیک و ارزیابی شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

به منظور محاسبه تنوع ژنتیکی در مکان Glu3 از فرمول نی (Nei 1973) استفاده شد. در این فرمول تنوع ژنتیکی در یک مکان ژنی برابر است با: $H = 1 - \sum P_i^2$. که P_i فراوانی نسبی آل نام در یک مکان ژنی در جمعیت مورد بررسی می‌باشد. تجزیه‌ای خوشه‌ای براساس انواع زیرواحدهای گلوٲنین با وزن مولکولی پایین با استفاده از روش UPGMA و ضریب تشابه جاکارد انجام شد.

نتایج و بحث

آغازگرهای بکار رفته در این پژوهش برای بررسی تنوع طولی گلوٲنین با وزن مولکولی پایین در ژنوم‌های A، B و D بودند که در زیر نتایج بدست آمده با استفاده از آغازگرهای مختلف ارائه می‌شود.

با توجه به اینکه گندم دوروم فاقد ژنوم D می‌باشد، لذا ۲۲ گندم دوروم در مکان ژنی Glu3-D مورد محاسبه قرار نگرفتند. برای مطالعه مکان ژنی Glu3-D از یک جفت آغازگر اختصاصی (Glu3-D.2) که برای ژنوم DD گندم بهاره چینی طراحی شده بود و یک قطعه ۵۴۰ bp را در این رقم تکثیر می‌کند (Long et al. 2005)، استفاده شد. در مجموع ۷۵ لاین بومی گندم نان با

جدول ۲- الگوها و آلل‌ها (باند‌ها) در لاین‌های مورد مطالعه گندم نان با استفاده از آغازگر Glu3-D.2

گونه	شماره لاین	باند				الگو	گونه	شماره لاین	باند				الگو
		a	b	c	d				a	b	c	d	
<i>T. aestivum</i>	۱		+			۱	<i>T. aestivum</i>	۴۵		+			۱
	۶		+			۱		۴۶		+			۱
	۹		+			۱		۴۷		+			۱
	۱۰		+			۱		۴۸		+			۱
	۱۱		+			۱		۴۹		+			۱
	۱۲		+			۱		۵۰		+			۱
	۱۳		+			۱		۵۱		+			۱
	۱۴		+			۱		۵۲		+			۱
	۱۵		+			۱		۵۳		+			۱
	۱۶		+			۱		۵۴		+			۱
	۱۷		+			۱		۵۶		+			۱
	۱۸				+	۲		۵۷		+			۱
	۱۹		+			۱		۵۸					
	۲۰		+			۱		۶۶		+			۱
	۲۱		+			۱		۷۰		+			۱
	۲۲		+			۱		۷۱		+			۱
	۲۳		+			۱		۷۲		+			۱
	۲۴		+			۱		۷۳					
	۲۵		+			۱		۷۴					
	۲۶		+			۱		۷۸					
	۲۷		+			۱		۷۹					
	۲۸		+			۱		۸۰		+			۱
	۲۹		+			۱		۸۲					
	۳۰		+			۱		۸۵					
	۳۱		+			۱		۸۷		+			۱
	۳۲		+			۱		۸۸	+	+	+	+	۴
	۳۳		+			۱		۸۹		+			۱
	۳۴		+			۱		۹۰					
	۳۵		+			۱		۹۲		+			۱
	۳۶		+			۱		۹۳		+			۱
	۳۷		+			۱		۹۴		+			۱
	۳۸		+			۱		۹۵		+			۱
	۳۹		+			۱		۹۶		+	+		۳
	۴۰				+	۲		۹۷		+			۱
	۴۱		+			۱		۹۸		+			۱
	۴۲		+			۱		۹۹		+			۱
	۴۳		+			۱		۱۰۰		+			۱
	۴۴				+	۲		کل	۱	۶۴	۲	۴	

۶۵۰ bp و ۶۰۰ bp بیشترین فراوانی را به خود اختصاص دادند. الگوی یک در گندم دارای بیشترین فراوانی الگوی باندی بود. آلل d و e فراوان‌ترین باند در میان ۶ آلل دیگر بوده و در هر ۴ الگوی مشاهده شده در این آغازگر یافت شد.

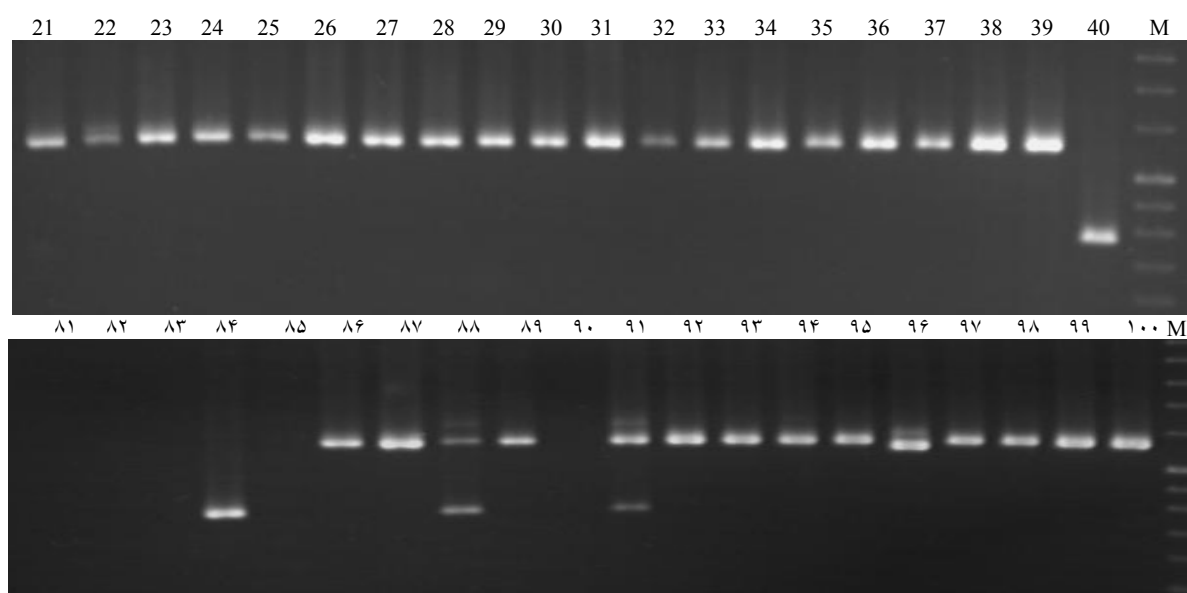
آغازگر Glu3-3.1 چهار الگوی باندی شامل شش آلل a, b, c, d, e و f مربوط به ژنوم B و D شناسایی شد (شکل ۲، جدول ۵)، و به ترتیب دارای فراوانی ۴۷/۴۲۳، ۴۷/۴۲۳، ۵۲/۵۷۸، ۷۴/۲۲۷ و ۷۴/۲۲۷ درصد بودند. آلل‌های d و e با طول تقریبی

جدول ۳- محاسبه فراوانی و ترکیب الگوها در لاین‌های مورد مطالعه گندم نان با استفاده از آغازگر Glu3-D.2

باند	الگو			
	۱	۲	۳	۴
a				+
b	+		+	+
c			+	+
d		+		+
تعداد لاین	۶۲	۳	۱	۱

جدول ۴- محاسبه فراوانی الگوهای باندی با استفاده از شاخص نی (H) در لاین‌های مورد مطالعه با استفاده از آغازگر Glu3-D.2

گونه	فراوانی الگو باندها				میزان تنوع ژنتیکی آغازگر Glu3-D.2
	۱	۲	۳	۴	
<i>T.aestivum</i>	۰/۸۲۷	۰/۰۴	۰/۰۱۳	۰/۰۱۳	۰/۳۱۴



شکل ۱- چند شکلی در ژن LMW-GS که بوسیله آغازگر Glu3-D.2 شناسایی شده است. M، نشانگر اندازه مولکولی (۵۰ bp)؛ شماره‌های ۲۱-۴۰ و ۸۱-۱۰۰ لاین‌های بومی مورد مطالعه.

(Long et al. 2005). طول قطعات تکثیر شده بوسیله این آغازگر در بین لاین‌های مورد مطالعه این تحقیق تقریباً بین ۸۰۰-۵۸۰ bp بودند. با استفاده از جفت آغازگر Glu3-3.2 چهار الگوی باندی شامل ۱۰ آلل a, b, c, d, e, f, g, h, i و j شناسایی شد (شکل ۳، جدول ۸)، که به ترتیب دارای فراوانی ۱/۰۳۰، ۵۳/۶۰۸، ۱/۰۳۰، ۱/۰۳۰، ۱/۰۳۰، ۵۴/۶۳۹، ۶۵/۹۷۹، ۲/۰۶، ۱/۰۳۰، ۱/۰۳۰ درصد بودند. آلل g با طول تقریبی ۹۰۰ bp بیشترین فراوانی را به خود اختصاص داد و آلل‌های g و h فراوان‌ترین آلل در میان ۱۰ آلل بوده و در ۳ الگو از ۴ الگوی باندی مشاهده شدند (جدول ۹).

همچنین هر دو آلل در ۷۲ لاین شناسایی شد. آلل‌های a, b, c و f به ترتیب در ۴۶، ۵۱ و ۱۶ لاین مشاهده شدند (جدول ۶). بر اساس نتایج این تحقیق الگوی سه و دو به ترتیب در گندم دوروم و نان منحصر به فرد بودند. میزان تنوع ژنتیکی در لاین‌های بومی گندم نان (*T. aestivum*) $H = 0.817$ بدست آمد که بیشتر از میزان تنوع بدست آمده ($H = 0.744$) در لاین‌های بومی گندم دوروم (*T. durum*) بود (جدول ۷).

آغازگر Glu3-3.2

این آغازگر برای ژنوم AA و DD گندم بهاره چینی طراحی شده که دو قطعه ۶۸۰ bp و ۷۰۰ bp را در این رقم تکثیر می‌کند

جدول ۵- الگوها و آلل‌ها در لاین‌های مورد مطالعه گندم نان و دوروم با استفاده از آغازگر Glu3-3.1

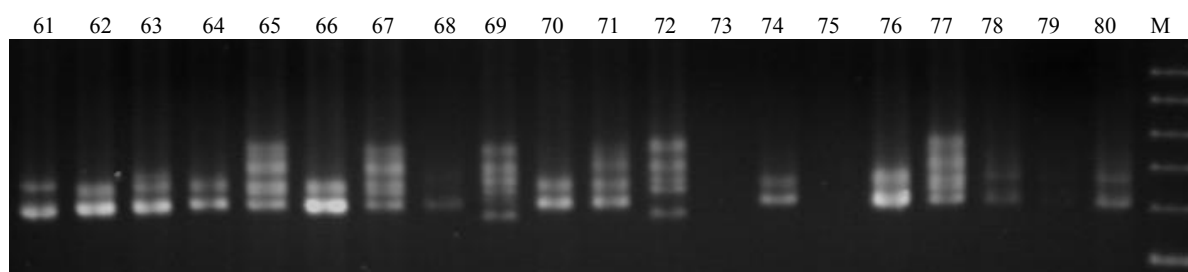
گونه	شماره لاین	باند						الگو	گونه	شماره لاین	باند						الگو
		a	b	c	d	e	f				a	b	c	d	e	f	
<i>T. aestivum</i>	۳				+	+		۱	<i>T. aestivum</i>	۵۸							
	۶	+	+	+	+	+	+	۳		۶۶				+	+		۱
	۹	+	+	+	+	+	+	۳		۷۰				+	+		۱
	۱۰	+	+	+	+	+		۴		۷۱	+	+	+	+	+		۴
	۱۱	+	+	+	+	+		۴		۷۲	+	+	+	+	+	+	۳
	۱۲				+	+		۱		۷۳							
	۱۳	+	+	+	+	+	+	۳		۷۴				+	+		۱
	۱۴									۷۸				+	+		۱
	۱۵	+	+	+	+	+	+	۳		۷۹							
	۱۶	+	+	+	+	+		۴		۸۰				+	+		۱
	۱۷	+	+	+	+	+		۴		۸۲							
	۱۸									۸۵				+	+		۱
	۲۰	+	+	+	+	+	+	۳		۸۷	+	+	+	+	+		۴
	۲۱	+	+	+	+	+	+	۳		۸۸	+	+	+	+	+		۴
	۲۲									۸۹	+	+	+	+	+		۴
	۲۳	+	+	+	+	+		۴		۹۰				+	+		۱
	۲۴									۹۲	+	+	+	+	+		۴
	۲۵									۹۳							
	۲۶	+	+	+	+	+	+	۳		۹۴	+	+	+	+	+		۴
	۲۷	+	+	+	+	+		۴		۹۵			+	+	+		۴
	۲۸	+	+	+	+	+		۴		۹۶	+	+	+	+	+	+	۳
	۲۹	+	+	+	+	+	+	۳		۹۷	+	+	+	+	+		۴
	۳۰	+	+	+	+	+	+	۳		۹۸	+	+	+	+	+		۴
	۳۱	+	+	+	+	+		۴		۹۹	+	+	+	+	+	+	۳
	۳۲									۱۰۰	+	+	+	+	+		۴
	۳۳								<i>T. durum</i>	۱				+	+		۱
	۳۴									۲			+	+	+		۲
	۳۵									۴			+	+	+		۲
	۳۶									۵				+	+		۱
	۳۷									۵۵				+	+		۱
	۳۸	+	+	+	+	+		۴		۵۹			+	+	+		۲
	۳۹	+	+	+	+	+	+	۳		۶۰				+	+		۱
	۴۰	+	+	+	+	+		۴		۶۱				+	+		۱
	۴۱	+	+	+	+	+	+	۳		۶۲				+	+		۱
	۴۲	+	+	+	+	+		۴		۶۳				+	+		۱
	۴۳	+	+	+	+	+		۴		۶۴				+	+		۱
	۴۴			+	+	+		۲		۶۵	+	+	+	+	+		۴
	۴۵	+	+	+	+	+		۴		۶۷	+	+	+	+	+		۴
	۴۶	+	+	+	+	+		۴		۶۸				+	+		۱
	۴۷									۶۹	+	+	+	+	+	+	۳
	۴۸									۷۶				+	+		۱
	۴۹									۷۷	+	+	+	+	+		۴
	۵۰									۸۱							
	۵۱	+	+	+	+	+		۴		۸۳							
	۵۲	+	+	+	+	+		۴		۸۴							
	۵۳	+	+	+	+	+		۴		۸۶							
	۵۴				+	+		۱		۹۱	+	+	+	+	+		۲
	۵۶	+	+	+	+	+	+	۳		کل	۴۶	۴۶	۵۱	۷۲	۷۲	۱۶	
	۵۷				+	+		۱									

جدول ۶- محاسبه فراوانی و ترکیب الگوها در لاین‌های مورد مطالعه گندم نان و دوروم با استفاده از آغازگر Glu3-3.1

باند	الگو			
	۱	۲	۳	۴
a			+	+
b			+	+
c		+	+	+
d	+	+	+	+
e	+	+	+	+
f			+	
تعداد لاین	۲۱	۵	۱۶	۳۰

جدول ۷- محاسبه فراوانی الگوهای باندی با استفاده از شاخص نی (H) در لاین‌های مورد مطالعه با استفاده از آغازگر Glu3-3.1

گونه	فراوانی الگو باندها				میزان تنوع ژنتیکی آغازگر Glu3-3.1
	۱	۲	۳	۴	
<i>T.aestivum</i>	۰/۱۴۷	۰/۰۱۳	۰/۲	۰/۳۴۷	۰/۸۱۷
<i>T. durum</i>	۰/۴۵	۰/۱۳۶	۰/۰۴۵	۰/۱۸	۰/۷۴۴
کل	۰/۲۱۶	۰/۰۴۱	۰/۱۶۴	۰/۳۰۹	۰/۸۲۹



شکل ۲- چند شکلی در ژن LMW-GS که بوسیله آغازگر Glu3-3.1 شناسایی شده است. M، نشانگر اندازه مولکولی (۵۰ bp). شماره‌های ۶۱-۸۰ لاین‌های بومی مورد مطالعه.

تجزیه کلاستر

تجزیه خوشه‌ای با استفاده از آغازگرهای Glu3.1، Glu3.2 و Glu3-D.2 برای زیرواحدهای گلوٲنین با وزن مولکولی پایین برای مکان‌های ژنی AA، BB، DD با استفاده از روش UPGMA (به علت اینکه rcophentic با استفاده از این روش بزرگتر ۰/۸ شد) انجام شد. برای این تجزیه لاین‌های بومی گندم نان و دوروم به صورت جداگانه با یکدیگر مورد تجزیه قرار گرفتند. دندروگرام حاصل از تجزیه‌ای خوشه‌ای ۷۵ لاین بومی گندم نان با استفاده از دو آغازگر Glu3.1، Glu3.2 (شکل ۴) در فاصله ۰/۸۰ در مقیاس تغییر یافته، ۳ گروه تشکیل داد و گروه‌های ۱، ۲ و ۳ به ترتیب ۱۲، ۳۳/۳۴ و ۵۴/۶۷ درصد از لاین‌ها را شامل شدند.

در این مطالعه در لاین‌های بومی گندم نان یک تا چهار آلل شناسایی شد که آلل‌های فوق دارای ۳ الگوی باندی مختلف بودند و در الگوی ۴ هر ۴ آلل قابل مشاهده بود. همچنین در لاین‌های بومی گندم دوروم یک تا نه آلل مشاهده شد که دارای ۳ الگوی باندی متفاوت بودند و در الگوی ۲، هر ۹ آلل را می‌توان مشاهده کرد. در مورد این آغازگر، الگوی یک شایع‌ترین الگو در گندم نان و دوروم مورد مطالعه بودند و الگوی دو و چهار به ترتیب در گندم دوروم و نان منحصر به فرد بودند. با استفاده از آغازگر Glu3-3.2 میزان تنوع ژنتیکی در لاین‌های بومی گندم دوروم (*T. durum*) برابر $H=0.779$ بدست آمد که بیشتر از میزان تنوع حاصل ($H=0.679$) در لاین‌های بومی گندم نان (*T.aestivum*) بود (جدول ۱۰).

جدول ۸- الگوها و آلها در لاینهای مورد مطالعه گندم نان و دوروم با استفاده از آغازگر Glu3-3.2

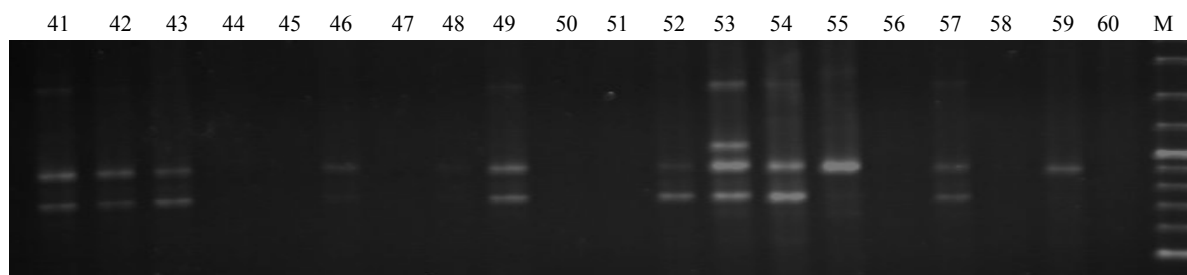
گونه	شماره لاین	باند										الگو	گونه	شماره لاین	باند										شماره لاین	گونه	شماره لاین	گونه																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																													
		a	b	c	d	e	f	g	h	i	j				a	b	c	d	e	f	g	h	i	j																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																	
T. aestivum	۳		+					+	+			۱	T. aestivum	۵۸																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																											

جدول ۹- محاسبه فراوانی و ترکیب الگوها در لاین‌های مورد مطالعه گندم نان و دوروم با استفاده از آغازگر Glu3-3.2

باند	الگو			
	۱	۲	۳	۴
a		+		
b	+			+
c		+		
d		+		
e		+		
f		+	+	+
g	+	+		+
h	+	+		+
i		+		
j		+		
تعداد لاین	۵۱	۱	۱۱	۱

جدول ۱۰- محاسبه فراوانی الگوهای باندی با استفاده از شاخص نی (H) در لاین‌های بومی گندم با استفاده از آغازگر Glu3-3.2

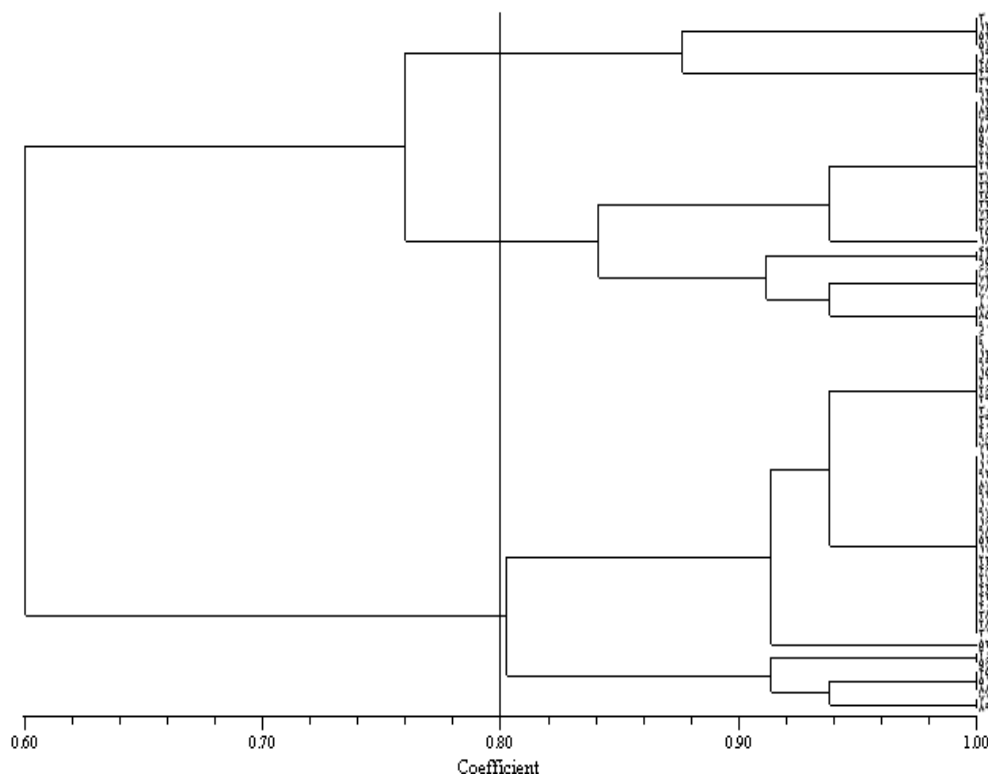
گونه	فراوانی الگو باندها				میزان تنوع ژنتیکی آغازگر Glu3-3.2
	۱	۲	۳	۴	
<i>T.aestivum</i>	۰/۵۶		۰/۰۸	۰/۰۱۳	۰/۶۷۹
<i>T. durum</i>	۰/۴۰۹	۰/۰۴۵	۰/۲۲۷		۰/۷۷۹
کل	۰/۵۲۵	۰/۰۱۰	۰/۱۱۳	۰/۰۱۰	۰/۷۰۹



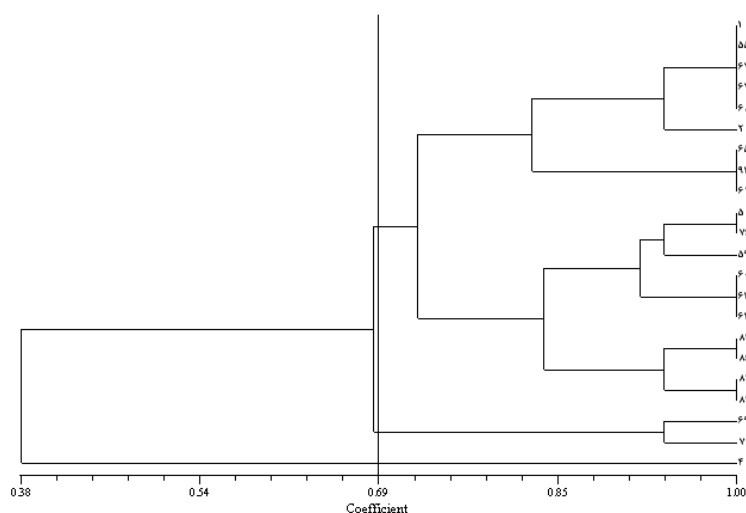
شکل ۳- چند شکلی در ژن LMW-GS که بوسیله آغازگر Glu3-3.2 شناسایی شده است. M، نشانگر اندازه مولکولی (۵۰ bp)؛ شماره‌های ۴۱-۶۰ لاین‌های بومی مورد مطالعه.

حاصل از تجزیه‌ای خوشه‌ای (شکل ۶) با استفاده از زیرواحدهای مکان ژنی Glu-D3 در فاصله ۰/۷۳، سه گروه را تشکیل داد و گروه‌های ۱، ۲ و ۳ به ترتیب ۸۴، ۱۴/۶۷ و ۱/۳۴ درصد از لاین‌ها را شامل شدند. زیرواحدهای گلوٹنین با وزن مولکولی پایین نقش بسیار مهمی در تعیین کیفیت خمیر گندم دارد (Gupta et al. 1993)، اما بدلیل پیچیده بودن این خانواده ژنی، نقش آن‌ها به طور کلی مشخص نشده است. همچنین برخی مطالعات نشان می‌دهد که نواحی تکراری موجود در ساختار ژنی LMW-GS مسئول

سه گروه (کلاستر) مشخص در تجزیه کلاستر تشابه از لحاظ الگوی باندی لاین‌های بومی گندم مورد بررسی را نشان دادند. دندروگرام حاصل از تجزیه‌ای خوشه‌ای ۲۲ لاین بومی گندم دوروم با استفاده از آغازگرهای Glu3.1، Glu3.2 (شکل ۵) در فاصله ۰/۶۹ در مقیاس تغییر یافته، ۳ گروه تشکیل داد و گروه‌های ۱، ۲ و ۳ به ترتیب ۸۶/۳۶، ۹/۰۹ و ۴/۵۴ درصد از لاین‌های گندم دوروم را شامل شدند. بر اساس مکان ژنی Glu-D3 ۷۵ لاین بومی گندم نان با یکدیگر مورد تجزیه قرار گرفتند، دندروگرام



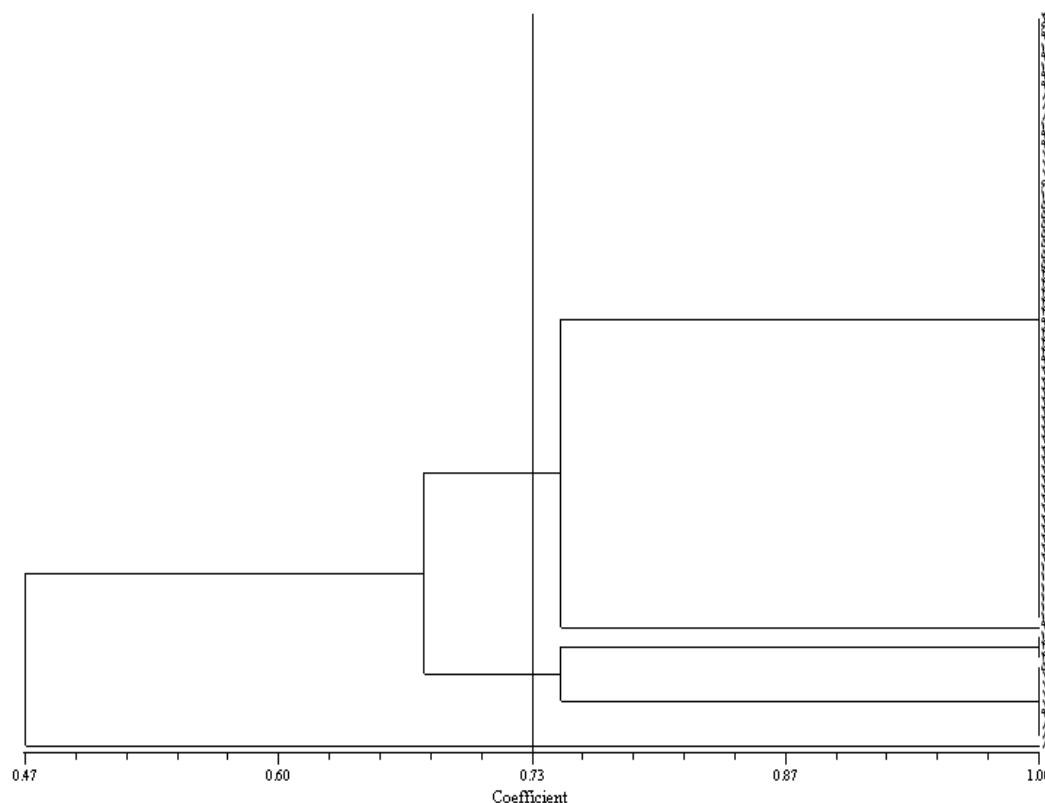
شکل ۴- دندروگرام ۷۵ لاین بومی گندم نان ایران برای زیرواحدهای LMW با استفاده از آغازگرهای Glu3.1 و Glu3.2 بوسیله روش UPGMA



شکل ۵- دندروگرام ۲۲ لاین بومی گندم دوروم ایران برای زیرواحدهای LMW با استفاده از آغازگرهای Glu3.1 و Glu3.2 بوسیله روش UPGMA

ممکن است مربوط به پدیده جابجایی کروموزوم و ترانسپوزونها باشد. از آنجا که لاین‌های مورد مطالعه در این پژوهش مربوط به جمع‌آوری از توده‌های بومی می‌باشند این چنین نتایجی نیز قابل انتظار است. در بین آل‌های شناسایی شده بوسیله آغازگر مکان ژنی Glu-D3 (Glu3-D.2) چند شکلی بسیار متفاوتی در بین لاین‌های بومی مشاهده شد، که در این بین می‌توان به لاین‌های

اصلی تنوع در طول ژن می‌باشد. این تنوع احتمال دارد به علت پدیده حذف (deletion) و یا اضافه (addition) در تعداد نواحی تکراری باشد (D, Ovidio et al. 2004). بنابراین به نظر می‌رسد تفاوت مشاهده شده در طول قطعات بوسیله این سه جفت آغازگر می‌تواند بدلیل پدیده حذف و اضافه در سطح DNA باشد که در نواحی تکراری رخ می‌دهند. البته علاوه بر دلایلی که ذکر شد



گندم نان و دوروم مورد مطالعه در سطح نوکلئوتید وجود دارد و لذا از این تنوع می‌توان به عنوان منبع با ارزش تنوع آلی ژن‌های LMW-GS، در بهبود کیفیت آرد گندم استفاده کرد.

از معاونت پژوهشی پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری تهران به دلیل تامین هزینه طرح و همچنین از بخش غلات موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج به دلیل تامین بذر مورد نیاز قدردانی می‌شود.

۱۸، ۴۰، ۴۴ و ۸۸ اشاره کرد، همچنین این چند شکلی‌ها با استفاده از دو آغازگر دیگر نیز مشاهده شد. با شناسایی چنین آل‌های جدید می‌توان متعاقباً این نوع آل‌ها را توالی‌یابی کرده و با انجام BLAST با توالی‌های موجود در بانک اطلاعات، اطلاعات بیشتری در زمینه تنوع طولی (در حد تک نوکلئوتید) بدست آورد و ساختار آن‌ها را نیز به منظور تعیین تعداد سیستئین و طول نواحی تکراری (دو عامل موثر در تعیین کیفیت پروتئین) مورد مطالعه قرار داد. به طور مثال Xu et al. (2006) یک ژن LMW جدید بنام (Ay263369) LMW-XYGLUD3 از گندم نان رقم Xiaoyan6 همسانه‌سازی کردند.

منابع

- Doyle JJ, Doyle JL (1990) A rapid total DNA preparation procedure for fresh plant tissue. *Focus* 12:13-15.
- D'ovidio R, Simeone M, Masci S, Porceddu E (1997) Molecular characterization of a LMW-GS gene located on chromosome 1B and the development of primers specific for the *Glu-B3* complex locus in durum wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 95: 1119-1126.
- D'ovidio R, Masci S (2004) The low-molecular-weight glutenin subunits of wheat gluten. *Journal of Cereal Science* 39: 321-339.

پروتئین‌های حاصل از این ژن حاوی ۹ اسید آمینه سیستئین بودند در حالی که اکثر ژن‌های شناخته شده تاکنون دارای ۸ اسید آمینه سیستئین هستند. آزمایش‌های تکمیلی آنها نشان داد که این سیستئین اضافی به طور معنی‌داری موجب افزایش خصوصیات کیفی LMW می‌شود. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که تنوع آللی قابل ملاحظه‌ای در مکان ژنی Glu-3 در لاین‌های بومی

Gupta RB, Singh NK, Sheperd KW (1989) The cumulative effects of allelic variation in LMW and HMW glutenin subunits on physical dough properties in the progeny of two bread wheats. *Theoretical and Applied Genetics* 77:57-62.

Gupta R B, Khand K, Macritchie F (1993) Biochemical basis of flour properties in bread wheat. I. Effects of variation in quantity and size distribution of polymeric protein. *Journal of Cereal Science* 18: 23-41.

Gupta RB, Paul JG, Cornish GB, Palmer GA, Bekes F, Rathjen AJ (1994) Allelic variation at glutenin subunit and gliadin loci, Glu-1, Glu-3, and Gli-1, of common wheats. I. Its additive and interaction effects on dough properties. *Journal of Cereal Science* 19:9-17.

Hosynian Khoshro H, Biahmta MR, Hasani MA, omidi M (2010) Evaluation of allelic variation of low molecular weight glutenin subunits (LMW-GS) in genotypes Wheat bread Iran using specific primer (*Triticum aestivum* L.). *Journal Agricultural Science* 41: 345-354. (In Farsi).

Izadi Darbandi A, Yazdi Samadi B, Abdmishani S, Shahnejat Bushehri AA, Shahriari F (2002) variation in low molecular weight glutenin subunits in some wheat (*T. aestivum* L.) varieties using electrophoresis. *Journal Agricultural Science* 33: 37-47. (In Farsi).

Izadi Darbandi A, Yazdi Samadi B, Shahnejat Bushehri AA, Mohammadi M (2010) Allelic variations in Glu-1 and Glu-3 loci of historical and modern Iranian bread wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. *Journal of genetics* 89: 193-199.

Ikeda TM, Nakamichi K, Nagamine T, Yano H, Anagisawa Y (2003) Identification of specific low-molecular-weight glutenin subunit related to gluten quality in bread wheat. *Japan Agricultural Research Quarterly* 37: 99-103.

Long H, Wei YM, Yan ZH, Baun B (2005) Classification of Wheat Low-Molecular-Weight Glutenin Subunit Genes and Its Chromosome Assignment by Developing LMWGS Group-Specific Primers. *Theoretical and Applied Genetics* 111: 1251-1259.

Long H, Huang Z, Wei YM, Yan ZH, Ma ZC, Zheng YL (2008) Length Variation of i-Type Low- Molecular-Weight Glutenin Subunit Genes in Diploid Wheats. *Russian Journal of Genetics* 44: 429-435.

Masci S, D' Ovidio R, Lafiandra D, Kasarda DD (1998) Characterization of a low molecular weight glutenin subunit gene from bread wheat and the corresponding protein that represent a major subunit of the glutenin polymer. *Plant Physiology* 118: 1147-1158.

Nei M (1973) Analysis of Gene Diversity in Subdivided Populations. *Proceedings of National Academy of Science USA* 70: 3321-3323.

Redalli R, Morel MH, Autran JC, Pogna NE (1995) Genetic analysis of low molecular glutenin subunits fractionated by two dimensional electrophoresis (A-PAGE× SDS- PAGE). *Journal of Cereal Science* 21: 5-13.

Tahir M, Lafiandra D (1994) Assessment of genetic variability in hexaploid wheat landraces of Pakistan based on polymorphism for HMW-glutenin subunits. In: *Biochemical Evaluation of Plant Genetic Resources, Final Technical Report, Dept. of Agrobiolgy and Agrobiochemistry. Italy, University of Tuscia Viterbo* 33-44.

Wang L, Zhao X, He Z, Xia X (2008) Characterization of low- molecular- weight glutenin subunit genes at Glu-B3 and Glu-D3 loci and development of functional markers in common wheat. In: *Proceedings of the 11th International Wheat Genetics Symposium. Sydney University Press.*

Xu H, Wang RJ, Shen X, Zhao YL, Sun GL, Zhao HX, Guo AG (2006) Functional properties of a new low-molecular-weight glutenin subunit gene from a bread wheat cultivar. *Theoretical and Applied Genetics* 113: 1295-1303.