

بررسی مولکولی زیرواحدهای سنگین گلوتنین در توده‌های گندم تتراپلوئید و هگزاپلوئید بومی ایران

Molecular study of high molecular weight glutenin subunits in tetraploid and hexaploid Iranian wheat landraces

گیتا میرنیام^۱، محسن ابراهیمی^{۱*}، علی ایزدی دربندی^۱، حسین رامشینی^۱، مسلم عبدی پور^۲

۱- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشیاران، استادیار، دانشگاه تهران، پردیس ابوریحان

۲- استادیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه یاسوج

Mirniyam G¹, Ebrahimi M^{*1}, Izadi Darbandi A¹, Ramshini H¹, Abdipour M²

1- Msc Student, Associate Professors, Assistant Professor, College of Aburairhan,
University of Tehran, Iran

2-Assistant Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, University of
Yasouj, Yasouj, Iran

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

(تاریخ دریافت: ۹۴/۷/۲۷ - تاریخ پذیرش: ۹۵/۳/۱۱)

چکیده

به منظور بررسی تنوع زیرواحدهای سنگین گلوتنین (HMW-GS) در مکان ژنی *Glu-1* در ۸ توده تتراپلوئید و ۳۲ توده هگزاپلوئید گندم‌های بومی ایران، از روش استخراج متوالی پروتئین-های ذخیره‌ای و الکتروفورز SDS-PAGE دو مرحله‌ای با غلظت ۱۵ درصد اکریل آمید استفاده شد، هفت زیرواحد در مکان ژنی *Glu-1* در گندم‌های تتراپلوئید و ۱۵ زیرواحد در گندم‌های هگزاپلوئید شناسایی شد. در جایگاه ژنی *Glu-1*، بیش‌ترین فراوانی آللی در گندم‌های تتراپلوئید برای زیرواحدهای نول و ۷+۸ و ۲+۱۲ به ترتیب ۰/۷۳، ۰/۴۵ و ۰/۴۷ بود. در مجموع شش ترکیب آللی در گندم‌های تتراپلوئید و ۲۱ ترکیب آللی در گندم‌های هگزاپلوئید بررسی شد. میانگین کلی امتیاز کیفی براساس زیرواحدهای گلوتنین با وزن مولکولی بالا در دامنه‌ای بین سه تا شش در گندم‌های تتراپلوئید و ۴ تا ۱۰ در گندم‌های هگزاپلوئید بود. دستاوردهای این تحقیق می‌تواند در برنامه‌های اصلاحی و انتخاب جهت بهبود کیفیت گندم‌های بومی مفید باشد.

واژه‌های کلیدی

گلوتنین با وزن مولکولی بالا

گندم تتراپلوئید

گندم هگزاپلوئید

SDS-PAGE

مقدمه

مطالعه بر روی تنوع ژنتیکی مسیری مهم جهت موفقیت در برنامه‌های اصلاحی می‌باشد که اطلاعات ارزشمندی را در ارتباط با کمیت و اگرایی ژنتیکی فراهم آورده و می‌تواند به عنوان خط مشی برنامه‌های هدفمند اصلاح نباتات مورد استفاده قرار گیرد. از سوی دیگر به شناسایی ترکیبات والدینی که بیشترین پتانسیل ژنتیکی را همراه دارند منجر می‌شود. گندم نان (*Triticum aestivum* L. یکی از مهم‌ترین محصولات غذایی بوده که ۱۷ درصد محصول جهانی، نزدیک به نیمی از تغذیه مردم جهان و ۲۰ درصد پروتئین و کالری کل غذای انسان را شامل می‌شود. عمده‌ترین بخش مصرف گندم مربوط به تولید نان است (Ghasemi et al. 2013). با توجه به میزان ضایعات نان، نیاز مبرم به اصلاح کیفیت دانه گندم احساس می‌شود و لازم است با استفاده از روش‌های مطلوب برای ارزیابی لاین‌های به‌نژادی گندم در جهت بهبود کیفیت این محصول اقدام شود (Haghparast et al. 2009). گندم دوروم (*Triticum turgidum* L. var. durum) با فراهم آوردن ماده اولیه ماکارونی و اسپاگتی طی سال‌های اخیر به‌عنوان بخشی از رژیم غذایی مردم ایران رایج شده‌است. ارزش بیولوژیکی محصولات به‌دست آمده از سمولینای گندم دوروم به کمیت و کیفیت پروتئین و اسیدهای آمینه آن بستگی دارد (Eslami and Mirmohammadi 2004). تنوع در نوع و میزان پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر مسئول تفاوت‌های موجود در ارقام مختلف گندم‌های تجاری از نظر کیفیت و خواص غذایی آرد است، بنابراین در برنامه‌های به‌نژادی کیفیت گندم، از پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر به‌عنوان یک شاخص کلیدی و ارزشمند استفاده می‌شود (Najafian and Baghai 2011). اهمیت این موضوع در تولید پاستا بدین سبب است که نوع پروتئین‌های موجود در دانه بر شرایط فرآوری تأثیر می‌گذارد. کشش گلوتن برای توضیح توانایی پروتئین‌ها برای تشکیل شبکه‌ای مطمئن که کیفیت مطلوب پخت را القاء می‌کند، استفاده می‌شود. پیوستگی و کشش ماتریس پروتئینی تشکیل شده در طی اتصال و انفصال خمیر، در تعیین خصوصیات ساختاری پاستا مهم هستند (Dexter and Matsuo 1980). پروتئین‌های گلوتن شامل گلیادین و گلوتنین می‌باشند که پروتئین‌های ذخیره‌ای اصلی گندم بوده و نقش عمده‌ای را در

تعیین خواص تکنولوژی و خواص نانوائی آرد ایفا می‌کنند (Xu et al. 2008). گلوتنین‌ها پلیمری متشکل از زیر واحدهای سنگین و سبک بوده و نقش به سزایی در فرآیند پخت نان و پاستا دارند (Shewry et al. 1989). حجم مولکولی گلوتنین می‌تواند با جذب آب تا ۱۰۰ میلیون دالتون برسد و وقتی این حجم کاهش یابد به دو زیرواحد با وزن مولکولی متفاوت تقسیم می‌شود (Shewry et al. 2002). در واقع آنچه پس از آبشویی خمیر توسط محلول نمک باقی می‌ماند، گلوتن است که گلیادین آن توسط الکال ۷۰ درصد خارج شده و باقیمانده گلوتنین است. وزن مولکولی گلوتنین به میلیون‌ها دالتون می‌رسد که متوسط آن‌ها ۳۰۰،۰۰۰ دالتون می‌باشد. گلوتنین پس از کاهش (احیاء شدن) آلکیلایون توسط الکتروفورز ژل^۱ SDS-PAGE به سه بخش تقسیم شده که به ترتیب A، B و C خوانده می‌شود. بخش A شامل HMW-GS^۲ (۶۰ تا ۸۰ درصد گلوتنین) که با وزن مولکولی ۸۰ تا ۱۲۰ هزار دالتون، به‌وسیله ژن‌های واقع در جایگاه *Glu-1* کروموزوم شماره یک، رمزدهی می‌شوند. این ژن‌ها بر روی بازوی بلند کروموزوم-های 1A، 1B و 1D قرار دارند (Johal et al. 2004; Izadi et al. 2012). این مکان‌های ژنی به‌صورت *Glu-1* نشان داده شده و به-ترتیب *Glu-A1*، *Glu-B1* و *Glu-D1* نامیده می‌شوند. هر مکان ژنی شامل دو ژن بهم پیوسته *Glu-1-1* و *Glu-1-2* است که به-ترتیب زیرواحدهای سنگین‌تر (تیپ x) و سبک‌تر (تیپ y) را بر حسب وزن مولکولی‌شان رمزدهی می‌کنند، به همین لحاظ تعیین نقش مجزای هر کدام از آل‌ها و همچنین نقش تجمعی آن‌ها در کیفیت مشکل خواهد شد که در این جا اهمیت مطالعه لاین‌های ایزوژنیک مشخص می‌شود (Shewry et al. 2009; Yan et al. 2008). بخش B و C شامل LMW-GS^۳‌هاست که به‌وسیله ژن-های قرار گرفته بر روی جایگاه‌های *Glu-A3*، *Glu-B3* و *Glu-D3* کروموزوم شماره یک، رمزدهی می‌شوند (Ook and Dexter 2006). به‌دلیل احتمال عدم تظاهر دو زیرواحد x و y در *Glu-A1* و زیرواحد y در *Glu-B1* تنها سه ژن از پنج ژن HMW-GS در گندم‌های هگزاپلوئید به کمک SDS-PAGE قابل شناسایی و

¹ Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

² High Molecular Weight Glutenin Subunit

³ Low Molecular Weight Glutenin Subunit

(2010) استخراج شده و در سیستم الکتروفورزی ژل‌های پلی اکریل آمید سدیم دی دسیل سولفات یک بعدی دو مرحله‌ای (Two-step 1-dimensional SDS-PAGE) با غلظت ۱۵ درصد اکریل‌آمید، بررسی شدند. برای استخراج پروتئین‌ها ابتدا نصف آندوسپرم یک بذر گندم از جنین جدا شده و در هاون خرد شد. بعد از خروج پرولامین‌های احیا نشده یا گلیادین‌ها بر روی رسوب باقی‌مانده یک میلی لیتر پروپانول ۵۰ درصد (V/V) ریخته و نمونه‌ها مختصری ورتکس و به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم قرار داده شد. سپس دو دقیقه سانتریفوژ شده و مایع فوقانی خارج و مرحله قبل به‌طور کامل یک‌بار دیگر تکرار شد. به رسوب باقیمانده ۰/۵ میلی‌لیتر پروپانول اضافه و به مدت پنج دقیقه با ۱۳۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفوژ انجام شد و مایع فوقانی دور ریخته شد. به نمونه‌ها ۱۰۰ میکرولیتر محلول پروپانول ۵۰ درصد (V/V) و Tris-HCl ۰/۰۸ مولار با pH=۸ و DTT^۱ یک درصد اضافه شد. بعد از سانتریفوژ، نمونه‌ها با ۳۳/۶ میکرولیتر 4-VP^۲ و ۲/۴ میلی‌لیتر پروپانول ۵۰ درصد (V/V) و Tris-HCl ۰/۰۸ مولار با pH=۸ (برای هر ۲۴ نمونه) ترکیب شدند. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از مایع فوقانی هر نمونه برداشته و به لوله‌های اپندروف دیگری که دارای ۱۰۰ میکرولیتر بافر نمونه (SDS دو درصد (W/V)، گلیسرول ۴۰ درصد (W/V)، برموفنول بلو (W/V) و تریس ۰/۰۵ مولار) انتقال و سپس ورتکس شد. نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در حمام آب گرم با دمای ۶۰ درجه سانتی-گراد قرار گرفتند و سپس به مدت دو دقیقه با ۱۳۰۰۰ xg سانتریفوژ و در نهایت ۱۵ میلی‌لیتر از هر نمونه بر روی ژل SDS-PAGE بارگذاری شد. زیرواحدهای سنگین پروتئین (HMW-GS) بر اساس سیستم شماره‌گذاری (Payne et al. 1983) معین شد. برای محاسبه تنوع ژنتیکی متوسط (H) تمام مکان‌های ژنی از فرمول پیشنهادی (Nei 1987) استفاده شد:

$$H = \frac{N}{N-1} \times \frac{\sum_j (1 - \sum_i P_{ij}^2)}{N_j} \quad (1)$$

در این فرمول N تعداد واریته‌ها و P_{ij}^2 فراوانی آلل نام از مکان ژنی نام و N تعداد مکان‌های ژنی می‌باشد.

بررسی است (Shewry et al. 2002). چهار ژن HMW-GS نیز در گندم تتراپلوئید وجود دارد، اما به سبب خاموشی ژن، عمده ژنوتیپ‌ها تنها حاوی یک تا سه زیر واحد هستند (Dexter 2006). در این گندم‌ها جایگاه ژنی *Glu-A1* فقط یک زیر واحد و جایگاه ژنی *Glu-B1* معمولاً یک یا دو زیر واحد را رمزدهی می‌کند. بنابراین گندم‌های تتراپلوئید تنها ۱-۳ زیر واحد در ناحیه گلوتنین‌های سنگین داراست (Payne et al. 1983). Hernandez et al. (2012) بیان کردند که HMW-GS‌ها مهم‌ترین تاثیر را روی خواص رئولوژیکی خمیر و کیفیت نانوائی دارند. آلل‌های ۱ و ۲* از مکان ژنی *Glu-A1* تاثیر بهتری را روی کیفیت پخت نان در مقایسه با آلل نول دارند (He et al. 2005) و آلل ۱۰+۵ از مکان ژنی *Glu-D1* همبستگی بالاتری را با مقاومت خمیر دارد، در حالی‌که آلل ۱۲+۲ با کیفیت پایین نانوائی در ارتباط است (Gianibelli et al. 2001) هدف از این تحقیق، مطالعه تنوع ژنتیکی نمونه‌های بومی گندم نان و گندم ماکارونی به کمک پروتئین‌های ذخیره‌ای بوده تا اطلاعات حاصل از این بررسی بتواند در غنی‌سازی ژرم‌پلاسما گندم‌های بومی به کار گرفته شود.

مواد و روش‌ها

۴۰ توده تتراپلوئید و هگزاپلوئید گندم از کلکسیون غلات بانک ژن گیاهی ملی ایران به‌صورت تصادفی انتخاب شد (جدول ۱). گندم‌های انتخابی جهت تکثیر در سال ۱۳۹۱-۱۳۹۲ در مزرعه پژوهشی پردیس ابوریحان کشت شدند. رقم‌های چاینیز اسپرینگ (۱۲+۲، ۷+۸، N)، گابو (۱۲+۲، ۱۷+۱۸، ۲*)، سری M82 (۱۰+۵، ۹+۷، ۱)، هیلو (۱۰+۵، ۱۷+۱۸، ۲*)، هالبرد (۱۰+۵، ۱۴+۱، ۱) و ارنست (۱۲+۳، ۹+۷، N) به‌عنوان رقم شاهد در شناسایی زیر-واحدهای گلوتنین استفاده شدند.

در این تحقیق، به‌منظور بررسی تنوع ژنتیکی در توده‌های تتراپلوئید و هگزاپلوئید گندم، از هر توده چهار بذر انتخاب و سپس آرد شد. در مواردی که درون توده‌ها هتروژنی مشاهده شد تعداد بذور تا ۱۰ بذر افزایش یافت. پروتئین‌ها با روش استخراج متوالی (Singh et al. 1991) تغییر یافته توسط Izadi et al.

¹ Dithiotheriol

² 4-Vinylpyridine

جدول ۱- نام توده‌های تٲراپلوئید و هگزاپلوئید مورد آزمایش به‌همراه مکان جمع‌آوری

نام توده	سطح پلوئیدی	محل جمع‌آوری	نام توده	سطح پلوئیدی	محل جمع‌آوری
kc17342	Durum	باختران	kc752	Hexaploid	آذربایجان غربی
kc17449	Durum	خوزستان	kc523	Hexaploid	خوزستان
kc2028	Durum	مازندران	kc880	Hexaploid	همدان
kc17553	Durum	لرستان	kc867	Hexaploid	گلستان
kc17787	Durum	گیلان	kc881	Hexaploid	همدان
kc17333	Durum	باختران	kc753	Hexaploid	آذربایجان غربی
kc548	Durum	باختران	kc866	Hexaploid	گلستان
kc17493	Durum	لرستان	kc746	Hexaploid	آذربایجان شرقی
kc17460	Hexaploid	اردبیل	kc717	Hexaploid	اصفهان
kc528	Hexaploid	لرستان	kc882	Hexaploid	همدان
kc17495	Hexaploid	لرستان	kc855	Hexaploid	گلستان
kc4128	Hexaploid	خوزستان	kc745	Hexaploid	آذربایجان شرقی
kc9255	Hexaploid	خراسان رضوی	kc754	Hexaploid	آذربایجان غربی
kc17307	Hexaploid	کهگیلویه و بویراحمر	kc519	Hexaploid	خوزستان
kc17450	Hexaploid	خوزستان	kc539	Hexaploid	باختران
kc3573	Hexaploid	لرستان	kc716	Hexaploid	اصفهان
kc9257	Hexaploid	خراسان رضوی	kc762	Hexaploid	آذربایجان غربی
kc4147	Hexaploid	کهگیلویه و بویراحمر	kc527	Hexaploid	لرستان
kc17540	Hexaploid	آذربایجان شرقی	kc540	Hexaploid	باختران
kc17557	Hexaploid	لرستان	kc17227	Hexaploid	آذربایجان غربی

نتایج و بحث

نتایج حاصل از الکتروفورز پروتئین‌های ذخیره‌ای آندوسپرم گندم در مطالعه زیرواحدهای گلوٲین با وزن مولکولی بالا در ژنوتیپ-های هگزاپلوئید و تٲراپلوئید نشان داد که در مکان ژنی *Glu-A1* زیرواحدهای ۱* و Null به ترتیب با فراوانی نسبی ۰/۱۶، ۰/۰۹ و ۰/۷۵ در ژنوتیپ‌های دوروم و با فراوانی نسبی ۰/۰۶، ۰/۲۰ و ۰/۷۳ در ژنوتیپ‌های هگزاپلوئید وجود دارند. همان‌طور که مشاهده می‌شود آل Null بیش‌ترین فراوانی نسبی را در این مکان ژنی داشت. در واقع چون توده‌های بومی تحت گزینش طبیعی تکامل یافته‌اند و هیچ‌گونه گزینش مصنوعی برای انتخاب آن‌ها انجام نشده‌است فراوانی بالایی در آل‌های نامطلوب دارند ولی در ارقام اصلاح شده به‌علت فشار گزینش مصنوعی، آل‌های با ارزش مانند آل ۱* و ۲* فراوانی بیش‌تری دارند (Mohammadi et al. 2008). در بررسی تنوع ژنتیکی ارقام و لاین‌های گندم والدینی اقلیم‌های معتدل و سرد کشور برای مکان ژنی *Glu-A1* آل‌های

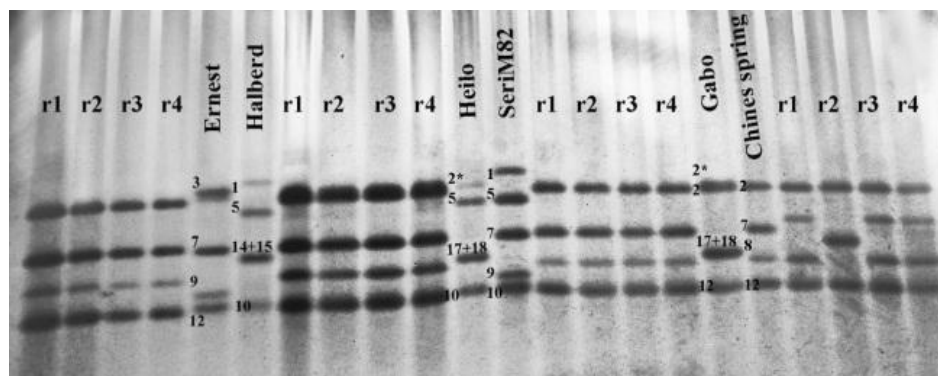
Null، ۲* و ۱ به‌ترتیب با فراوانی ۳۹/۶، ۴۲ و ۱۸/۳ شناسایی شدند. بالا بودن فراوانی آل Null که ارزش کیفی کمتری دارد یک ضعف برای مواد ژنتیکی محسوب شده و بهتر است در دو رگ‌گیری‌ها به این موضوع توجه شود (Najafian et al. 2011). برتری آل‌های ۱ و ۲* نسبت به آل Null در گزارشات زیادی آمده‌است (Payne et al. 1984; Najafian et al. 1997; Nikoseresht et al. 2009; Haghparsat et al. 2009; Izadi et al. 2010). در بررسی دیگری بر روی ۴۰ رقم گندم هگزاپلوئید الجزایری، آل Null با فراوانی ۵۰ درصد، آل ۲* با فراوانی ۴۲/۵ درصد و آل ۱ با فراوانی ۷/۵ درصد مشاهده شد (Bellil et al. 2012). در ژنوتیپ‌های چینی نیز، فراوانی بالای آل Null گزارش شده‌است (Li et al. 2009) در حالی که این آل در گندم‌های اروپایی فراوانی کمی را داراست (An et al. 2005). در مطالعه دیگری بر روی ۹۶ گندم دوروم بومی، بیش‌ترین فراوانی آلی برای آل Null گزارش شد (Rashidi Monfared et al. 2007). نقض این نتایج یعنی فراوانی بالای آل ۲* و ۱ در گندم‌های

برزیلی گزارش شد (Csta et al. 2012). در ارتباط با این موضوع بهتر است ژنوتیپ‌هایی به‌عنوان والد در نظر گرفته شوند که در این مکان ژنی یکی از آل‌های ۱ و ۲* را داشته باشند. در مکان ژنی *Glu-B1* ژنوتیپ‌های تتراپلوئید و هگزاپلوئید به‌ترتیب چهار و شش آل شناسایی شد که زیرواحد ۱۵+۱۴ در ژنوتیپ‌های تتراپلوئید و زیرواحد ۸+۷ در ژنوتیپ‌های هگزاپلوئید به‌ترتیب با فراوانی نسبی ۰/۵۰ و ۰/۴۵ دارای بیش‌ترین فراوانی بودند. در توده‌های پاکستانی فراوانی زیرواحدهای ۱۸+۱۷ و ۹+۷ گزارش شده‌است (Masood et al. 2004; Sultana et al. 2007). در بررسی دیگری، زیرواحدهای ۱۸+۱۷ و ۹+۷ با فراوانی حدوداً ۷۱ درصد در لاین‌های پیشرفته گندم مشاهده شدند (Rasheed et al. 2012). برتری ترکیبات ۱۸+۱۷، ۱۶+۱۳ و ۸+۷ در گزارش‌های قبلی مورد تاکید قرار گرفته و بهتر است در انتخاب والدین برای یک برنامه تلاقی ژنوتیپ‌هایی در نظر گرفته شوند که این ترکیبات را در ژنوم B خود داشته باشند (Payne et al. 1984; Najafian et al. 1997; Haghparast et al. 2009). ارتباط زیر-واحدهای مکان ژنی *Glu-B1* با کیفیت نهایی نان در گزارش‌های زیادی بیان شده‌است (Lage 2006; Tang et al. 2001; Hsam et al. 2008; al. 2008). در مکان ژنی *Glu-D1* شش آل در ژنوتیپ‌های هگزاپلوئید شناسایی شد که زیرواحد ۱۲+۲ با فراوانی نسبی ۰/۴۷ بیش‌ترین فراوانی را داشت. فقدان برخی از زیرواحدها در SDS-PAGE احتمالاً به‌دلیل حذف و یا عدم تظاهر ژن‌های کنترل‌کننده آن‌ها می‌باشد. برخی نیز عدم تظاهر این زیرواحدها را جهش ژن خاموش‌کننده ذکر کرده‌اند. زیرواحدهای کمیاب ۱۲+۵ و ۱۲+۵* با وجود کمیاب بودن در دنیا در نمونه‌های گندم بومی ایران مشاهده شد. تاکنون یک بررسی دقیق علمی برای تعیین کیفیت این زیرواحدها و مقایسه آن‌ها با سایر زیرواحدهای ژنوم D انجام نشده‌است. با توجه به وجود این زیرواحدها در ایران و کمیاب بودن آن‌ها در سایر کشورها بررسی در این زمینه اهمیت زیادی خواهد داشت. نتایج حاصل از این پژوهش در مکان ژنی *Glu-D1* نشان داد که فراوانی آل ۱۰+۵ (با ارزش‌ترین زیرواحد در بین HMW-GS) در توده‌های هگزاپلوئید ۰/۱۳ است که این حدود قبلاً نیز در مطالعه رقم‌های گندم‌های ایرانی گزارش شده و در خصوص برتری ترکیب آلی ۱۰+۵ نسبت به ۱۲+۲ مطالعات

زیادی وجود دارد. متأسفانه فراوانی آل ۱۲+۲ (کاهش دهنده کیفیت) (Payne et al. 1987; Najafian et al. 2008) بسیار بیش-تر از ترکیب ۱۰+۵ است و با در نظر گرفتن نقش بیش‌تر و مشخص‌تر این ژنوم در کیفیت نانویی بایستی در انتخاب لاین-های والدینی برای ایجاد جوامع اصلاحی دقت کرد و در صورت امکان ژنوتیپ‌هایی که دارای ترکیب ۱۰+۵ هستند را برگزید. نقش مهم زیرواحد ۱۰+۵ در خصوصیات آرد و کشسانی خمیر در کولتوارهای کانادایی، آلمانی، سوریایی، آمریکایی و نیوزلندی نیز به اثبات رسیده است (Rasheed et al. 2012) به طوری که در کانادا کلیه لاین‌های به‌نژادی براساس حضور جفت زیرواحد ۱۰+۵ انتخاب شده‌اند (Bushuk. 1997). در گزارش‌ها آمده‌است که زیرواحد ۱۲+۲ از جایگاه ژنی *Glu-D1* بیشترین تاثیر منفی را بر کیفیت پروتئین داشته و منجر به گلوتن ضعیف و ضریب رسوب پایین می‌شود (Ulhen 1990). براساس نظر بعضی از دانشمندان روسی واریته‌های مناطق خشک بیشتر حاوی زیر-واحدهای ۱۲+۲ و مناطق مرطوب اساساً حاوی زیرواحدهای ۱۰+۵ هستند (Rabinovich 1998). در تحقیق حاضر توده‌های استان‌های لرستان، آذربایجان غربی و آذربایجان شرقی (KC528، KC762، KC17540) که همگی دارای آب و هوای نسبتاً مرطوب هستند، دارای زیرواحد ۱۰+۵ بودند. میزان تنوع ژنتیکی برای مکان‌های *Glu-A1*، *Glu-B1* و *Glu-D1* به‌ترتیب برابر ۰/۴۳، ۰/۶۹ و ۰/۷۳ در ژنوتیپ‌های هگزاپلوئید و ۰/۴ و ۰/۶۵ در ژنوتیپ‌های تتراپلوئید بوده و میانگین تنوع ژنتیکی (H) برای مکان‌های ژنی *Glu-1* در ژنوتیپ‌های هگزاپلوئید و تتراپلوئید برابر با ۰/۶۱ و ۰/۵۲ بود (جدول ۲ و ۳). تنوع ژنتیکی در ژنوتیپ‌های هگزاپلوئید بیش‌تر از ژنوتیپ‌های تتراپلوئید و در مکان ژنی *Glu-D1* این مقدار ۰/۷۳ است که با مطالعات دیگر در این زمینه مبنی بر وجود تنوع ژنتیکی بالا در جایگاه *Glu-B1* مغایرت دارد (An et al. 2009; Li et al. 2006; Moragues et al. 2005). در گندم‌های هگزاپلوئید ترکیب آلی (۱۲+۲، ۸+۷، Null) با فراوانی ۱۵ درصد رایج‌ترین ترکیب بود. این ترکیب در بررسی (Fatehi et al. 2008) نیز با فراوانی هشت درصد جز فراوان‌ترین ترکیبات بود. سایر ترکیبات آلی مانند (۱۰+۲، ۸+۷، Null)، (۱۲+۲، ۱۵+۱۴، Null) و (۱۰+۲، ۱۵+۱۴، Null) به‌ترتیب بیش‌ترین فراوانی را داشتند.

جدول ۲- فراوانی آلی و تنوع ژنتیکی در گندم‌های تتراپلوئید مورد بررسی

مکان ژنی	آل	فراوانی	فراوانی نسبی	تنوع ژنتیکی	میانگین تنوع ژنتیکی
<i>Glu-A1</i>	۱	۵	۰/۱۶	۰/۴	۰/۵۲
	۲°	۳	۰/۰۹		
	Null	۲۴	۰/۷۵		
<i>Glu-B1</i>	۷+۸	۴	۰/۱۲	۰/۶۵	
	۱۷+۱۸	۸	۰/۲۵		
	۱۴+۱۵	۱۶	۰/۵		
	۷+۹	۴	۰/۱۲		



شکل ۱- وضعیت باندهای گلوٲنین سنگین در توده‌های هگزاپلوئید مورد آزمایش در چهار تکرار که به ترتیب از چپ به راست در توده KC539، رقم شاهد ارنست، رقم شاهد هالبرد، توده KC519، رقم شاهد هیلو، رقم شاهد سری M82، توده KC754، رقم شاهد گابو، رقم شاهد چاینیز اسپرینگ و توده KC745 مشاهده شدند.

جدول ۳- فراوانی آلی و تنوع ژنتیکی در گندم‌های هگزاپلوئید مورد بررسی

مکان ژنی	آل	فراوانی	فراوانی نسبی	تنوع ژنتیکی	میانگین تنوع ژنتیکی
<i>Glu-A1</i>	۱	۸	۰/۰۶	۰/۴۳	
	۲°	۲۶	۰/۲		
	Null	۹۴	۰/۷۳		
<i>Glu-B1</i>	۷	۳	۰/۰۲	۰/۶۹	۰/۶۱
	۷+۸	۵۸	۰/۴۵		
	۷+۹	۷	۰/۰۵		
	۶+۸	۶	۰/۰۴		
	۱۷+۱۸	۱۲	۰/۱۱		
	۱۴+۱۵	۴۲	۰/۳۳		
<i>Glu-D1</i>	۲+۱۰	۳۱	۰/۲۴	۰/۷۳	
	۵+۱۰	۱۷	۰/۱۳		
	۵+۱۲	۸	۰/۰۶		
	۵+۱۰°	۶	۰/۰۵		
	۵°+۱۲	۶	۰/۰۵		
	۲+۱۲	۶۰	۰/۴۷		

گرفتند. در مجموع ۲۱ ترکیب آلی در گندم‌های هگزاپلوئید مشاهده شد که ۴۶ نمونه، زیرواحد ۲+۱۲ را در جایگاه ژنی *Glu-D1* خود داشته و تنها در چهار نمونه این زیرواحد با آل‌های موثر در کیفیت نانوائی (۱ یا ۲*) همراه بود. این امر نشان می‌دهد

ترکیب‌هایی با زیرواحد ۱ یا ۲* در جایگاه ژنی *Glu-A1* نمره کیفی بالاتری را نسبت به ترکیبات شامل آل Null در این جایگاه ژنی داشتند. همراهی آل ۵+۱۰ با آل‌های ۱ یا ۲* تنها در چهار نمونه مشاهده شد که جز بهترین ژنوتیپ‌های این مجموعه قرار

جدول ۴- بررسی ترکیبات آللی زیرواحدهای سنگین گلوتنین در گندم‌های هگزاپلوئید و نمره کیفی آن‌ها

نمره کیفی	تعداد هر ترکیب آللی	ترکیبات آللی	شماره ترکیب
۷	۹	N, ۱۴+۱۵, ۵+۱۰	۱
۵	۱۰	N, ۱۴+۱۵, ۲+۱۲	۲
۰°	۱۳	N, ۱۴+۱۵, ۲+۱۰	۳
-	۵	N, ۷, ۲+۱۰	۴
۴	۷	N, ۷, ۲+۱۲	۵
۸	۵	N, ۷+۸, ۵+۱۰	۶
۶	۲۰	N, ۷+۸, ۲+۱۲	۷
-	۱۹	N, ۷+۸, ۲+۱۰	۸
-	۶	N, ۷+۸, ۵+۱۰°	۹
۷	۱	N, ۷+۹, ۵+۱۰	۱۰
-	۷	N, ۱۷+۱۸, ۵+۱۲	۱۱
-	۱	N, ۱۷+۱۸, ۲+۱۰	۱۲
-	۳	N, ۱۷+۱۸, ۵°+۱۲	۱۳
۴	۵	N, ۶+۸, ۲+۱۲	۱۴
-	۵	N, ۶+۸, ۲+۱۰	۱۵
۱۰	۱	۱, ۷+۸, ۵+۱۰	۱۶
۸	۴	۲°, ۷+۸, ۲+۱۲	۱۷
۱۰	۱	۲°, ۷+۸, ۵+۱۰	۱۸
۱۰	۱	۲°, ۱۷+۱۸, ۵+۱۰	۱۹
۸	۱	۲°, ۷, ۵+۱۰	۲۰
-	۹	۲°, ۱۴+۱۵, ۲+۱۰	۲۱
۷	۱۰	N, ۱۴+۱۵, ۵+۱۰	۲۲
۵	۱۳	N, ۱۴+۱۵, ۲+۱۲	۲۳
۰°	۴	N, ۱۴+۱۵, ۲+۱۰	۲۴

*نمره کیفی ترکیب مورد نظر ناشناخته است.

جدول ۵- بررسی ترکیبات آللی زیرواحدهای سنگین گلوتنین در گندم‌های تتراپلوئید و نمره کیفی آن‌ها

نمره کیفی	تعداد هر ترکیب آللی	ترکیبات آللی	شماره ترکیب
۳	۱۵	N, ۱۴+۱۵	۱
۶	۲	۲°, ۱۷+۱۸	۲
۴	۵	N, ۱۷+۱۸	۳
۴	۲	N, ۷+۸	۴
۶	۴	۱, ۱۷+۱۸	۵
۵	۴	۱, ۷+۹	۶

که تاثیرات منفی زیرواحد ۲+۱۲ با وجود آلل‌های مفید قابل چشم‌پوشی است. همراهی آلل Null از جایگاه ژنی *Glu-A1* و زیرواحد ۲+۱۲ از جایگاه ژنی *Glu-D1* در ۳۲ درصد نمونه‌ها مشاهده شد که ۱۵ درصد از نمونه‌ها با داشتن آلل‌های مفید از جایگاه ژنی *Glu-B1* مانند آلل ۷+۸، اثرات منفی زیرواحد ۲+۱۲ را جبران کردند. امتیاز کیفی نمونه‌ها بر اساس زیرواحدهای گلوتنین با وزن مولکولی بالا در دامنه‌ای بین ۴ تا ۱۰ با میانگین هفت در گندم‌های هگزاپلوئید بود. نمره‌ی کیفی ۶۳ نمونه با وجود آلل‌های نادر هنوز شناخته نشده است. در گندم‌های تتراپلوئید ۴۶ درصد از نمونه‌ها ترکیب (۱۵+۱۴ و Null) را داشتند. سایر ترکیبات مانند (۱۷+۱۸ و ۲°) در دو نمونه، (۱۷+۱۸ و Null) در پنج نمونه، (۷+۸ و Null) در دو نمونه، (۱۷+۱۸ و ۱) در چهار نمونه و ترکیب (۷+۹ و ۱) نیز در چهار نمونه مشاهده شدند. امتیاز کیفی توده‌های تتراپلوئید در دامنه‌ای بین ۳ تا ۶ بود. از ۳۲ توده هگزاپلوئید مورد بررسی، ۲۵ توده هتروژن بوده و بین دو تا چهار ترکیب آللی مختلف نشان دادند. وجود بیوتیپ‌های پروتئینی درون نمونه‌های گندم امری طبیعی است که در ارقام گندم کشورهای مختلف نیز گزارش شده است (Appleyard et al. 2003; Bahraie 2003; Metakovsky 1990). همگن یا غیرهمگن بودن نسبی توده‌ها به میزان خودگشتی آن‌ها در محل جمع‌آوری قبل از نگهداری توده‌ها در بانک ژن بستگی دارد. از هشت توده تتراپلوئید نیز، چهار توده ترکیبات آللی مختلف داشتند. در شکل ۱ هتروژن بودن توده هگزاپلوئید KC745 به وضوح مشهود است. نتایج نشان داد که با مطالعه پروتئین‌های ذخیره‌ای دانه گندم احتمال تمایز سطوح پلوئیدی مختلف وجود دارد. در برنامه‌های به‌نژادی گندم ایران، زیرواحدهای سنگین گلوتنین در سال‌های اخیر به عنوان شاخص کیفیت مورد توجه قرار گرفته است و یکی از دلایل مهم فراوانی بالای آلل‌های نامطلوب مانند نول و ۲+۱۲ گندم ایرانی در مقایسه با سایر کشورها عدم توجه به پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر به عنوان معیار انتخاب در برنامه‌های به‌نژادی کیفیت گندم بوده است.

سپاسگزاری

از بخش تحقیقات ژنتیک و بانک ژن گیاهی ملی ایران برای در اختیار قرار دادن نمونه‌های این تحقیق و از دانشگاه تهران به جهت حمایت مالی تحقیق تشکر و قدردانی می‌شود.

علاوه بر کیفیت پروتئین‌های ذخیره‌ای صفات دیگری نیز در خواص خمیر و کیفیت نانوائی موثر هستند که انجام بررسی‌های ملکولی به همراه آزمایش‌های سنجش صفات مرتبط با کیفیت نانوائی می‌تواند در گزینش ژنوتیپ‌های برتر کمک کند تا این ژنوتیپ‌ها به عنوان والدین برنامه‌های اصلاحی انتخاب شده و در غنی‌سازی ژرم پلاسما گندم به کار گرفته شوند.

منابع

- An X, Qiaoyun L, Yueming Y, Yinghua X, Hsam SLK, Zeller FJ (2005) Genetic diversity of European spelt wheat (*Triticum aestivum* ssp. *Spelta* L. em. Thell.) revealed by glutenin subunit variations at the *Glu-1* and *Glu-3* loci. *Euphytica* 146:193-201.
- Appleyard DB, McCausland J, Wrigley CW (1979) Checking the identity and origin of off-types in propagation of pedigree wheat seed. *Seed Science and Technology* 7:459-466.
- Bahraie S (2003) Bread wheat quality evaluation based on the high molecular weight glutenin subunits. *Iranian Journal of Crop Sciences* 5:204-216. (In Farsi).
- Bellil I, Chekara Bouziani M, Khelifi D (2012) Genetic diversity of high and low molecular weight glutenin subunits in saharan bread and durum wheat from Algerian Oases. *Czech Journal of Plant Breeding* 48: 23-32.
- Bushuk W (1997) Wheat breeding for end product use. In: *Wheat: Prospects for global improvements. Developments in Plant Breeding*. The Netherland: Kluwer Academic Publishers. 6: 203-211.
- Costa MS, Scholz MBS, Franco CML (2013) Effect of high and low molecular weight glutenin subunits, and subunits of gliadin on physicochemical parameters of different wheat genotypes. *Journal of Food Science and Technology* (Suppl. 1): 163-170.
- Dexter JE, Matsuo RR (1980) Relationship between durum wheat protein properties and pasta dough rheology and spaghetti cooking quality. *Agricultural and Food Chemistry* 26:899-905.
- Eslami M, Mir Mohammadi Meybodi AM, Arzani A (2004) Evaluating grain quality traits and their heritabilities in durum wheat. *Science and Technology of Agriculture and Natural* 9: 121-128.
- Fatehi F, Maleki M, Salavati A, Bihamta MR, Zali AA, Hossein Zadeh AH (2008) The relationship between glutenin subunit of high molecular weight and baking quality of wheat bread. *Iranian journal of Agriculture Science* 39: 43-52. (In Farsi).
- Ghasemi M (2013) Investigation of genetic variety and evaluation of breadmaking quality in some of cultivars and lines of dry farming wheat in Northern khorasan with use of biochemical markers. M Sc Thesis, University of Sabzevar, Iran.
- Gianibelli MC, Larroque OR, MacRitchie F, Wrigley CW (2001) Biochemical, Genetic and Molecular characterization of wheat endosperm proteins. Minnesota USA, American Association of Cereal Chemists Press, 1-20.
- Haghparsat R, Rajabi R, Najafian G, Rashmeh Karim K, Aghaee Sarbarzeh M (2009) Evaluation of indices related to grain quality in advanced bread wheat genotypes under rainfed conditions. *Seed and Plant Improvement Journal* 25: 315-328. (In Farsi).
- He ZH, Liu L, Xia XC, Liu JJ, Pena RJ (2005) Composition of HMW and LMW glutenin subunits and their effects on dough properties, pan bread, and noodle quality of Chinese bread wheats. *Cereal Chemistry* 82:345-350.
- Hernandez ZJE, Figueroa JDC, Rayas-Duarte P, Martinez-Flores HE, Arambula GV, Luna GB, Pena RJ (2012). Influence of high and low molecular weight glutenins on stress relaxation of wheat kernels and the relation to sedimentation and rheological properties. *Journal of Cereal Science* 55: 344-350.
- Hsam SLK, Kieffer R, Zeller FJ (2001) Significance of *Aegilops tauschii* glutenin genes on bread-making properties of wheat. *Cereal Chemistry* 78: 521-525.
- Izadi Darbandi A, Yazdi Samadi B (2012) Marker-assisted selection of high molecular weight glutenin alleles related to bread-making quality in Iranian common wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Genetics* 91: 193-198.
- Izadi Darbandi A, Yazdi Samadi B, Shanejat Boushehri 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.
- Johal J, Gianibelli MC, Rahman S, Morell MK, Galem K (2004) Characterization of low molecular-weight glutenin genes in *Aegilops tauschii*. *Theoretical and Applied Genetics* 109:1028-1040.
- Lage J, Skovmand B, Pena RJ, Anderson SB (2006) Grain quality of emmer wheat derived synthetic hexaploid wheats. *Genetic Resources and Crop Evolution* 53: 955-962.
- Li Y, Chengyan H, Xinxia S, Qingqi F, Genying L, Xiusheng C (2009) Genetic variation of wheat glutenin subunits between landraces and varieties and their contributions to wheat quality improvement in China. *Euphytica* 169: 159-168.
- Masood MS, Asghar M, Anwar R (2004) Genetic diversity in wheat land races from Pakistan based on polymorphism

- for high molecular weight glutenin subunits (HMW-GS). Pakistan Journal of Botany 36: 835-843.
- Metakovsky EV (1990) The value of gliadin biotypes in commercial cultivars of wheat, In: W. Bushuk and R. Mohammadi A, Valizadeh M, Moghaddam M, Arshad U, Javadian N, Mohebalipour N (2008) Study of genetic diversity of high and low molecular weight glutenins in wheat landraces of Zanjan region, Iran. Agroecology Journal 11:61-70.
- Moragues MJ, Zarco Hernandez M, Moralejo A, Royo C (2006) Genetic diversity of glutenin protein subunits composition in durum wheat landraces (*Triticum turgidum* L. var. durum) from the Mediterranean basin. Genetic Resources and Crop Evolution 53:993-1002.
- Najafian G, Abde-Mishani C, Yazdi-Samadi B (1997) Effect of allelic variation for high molecular weight glutenin subunits on bread-making quality of breeding lines of wheat. Iranian Journal of Agricultural Sciences 28: 1-13. (In Farsi).
- Najafian G, Baghaie N (2011) Genetic variation in high molecular weight glutenin subunits in parental lines and cultivars of wheat used in breeding programs of cold and temperate agro climatic zones of Iran. Seed and Plant Improvement Journal 27: 305-322. (In Farsi).
- Najafian G, Bahraie S, Baghaie N, Mortezaigholi M, Babaie-Goli E (2008) Bread making quality attributes of Iranian commercial cultivars of wheat and their HMW glutenin subunits composition. In: Proceedings of the 11th International Wheat Genetics Symposium. 24-29 Aug, Brisbane, Australia, p 241.
- Nei M (1987) Estimation of the average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. Genetics 89:583-590.
- Nikooseresht R, Najafian G, Mirfakhrai R GH, Dehghani H (2009) Evaluation of bread making quality of wheat using SDS sedimentation volume and high molecular weight glutenin subunits. Seed and Plant Improvement Journal 25: 373-383. (In Farsi).
- Oak MD, Dexter JE (2006). Chemistry, genetics and prediction of dough strength and end-use quality in durum wheat. Gliadin and Glutenin the Unique Balance of Wheat Quality, AACCC, Inc, St Paul, USA, pp 281-305.
- Payne PI, Holt LM, Jackson EA, Law CN (1984) Wheat storage proteins: Their genetics and their potential for manipulation by plant breeding. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences 304: 356-371.
- Payne PI, Lawrence GJ (1983) *Glu-A1*, *Glu-D1* which code for HMW subunits of glutenin hexaploid wheat. Catalogue of alleles for the complex loci. Cereal Research Communications 11: 29-35.
- Payne PI, Nightingale MA, Krattiger AF, Holt LM (1987) The relationship between HMW glutenin subunit composition and the bread-making quality of British-grown wheat varieties. Journal of the Science of Food and Agriculture 40: 51-56.
- Rabinovich SV (1998) Composition of high molecular weight glutenin subunits connected with good quality in spring wheats and its distribution in different countries of world In: A. E. Slinkard (ed.), Proc. 9th Intl. Wheat Genetics Symp. Proc. 9th Intl. 4: 254-256.
- Rasheed A, Mahmood T, Kazi AG, Ghafoor A, Mujeeb-Kazi A (2012) Allelic variation and composition of HMW-GS in advanced lines derived from D-genome synthetic hexaploid / bread wheat (*Triticum aestivum* L.). Journal of Crop Science and Biotechnology 15: 1-7.
- Rashidi Monfared S, Nagavi MR, Husseinzade A, Mardi M (2007) Genetic diversity and heavy subunits of glutenin detected native genotypes and cultivars of durum wheat using protein markers. Iranian Journal of Biology 21: 393-399.
- Shewry PR (2009) Wheat. Journal of Experimental Botany 60:1537-1553.
- Shewry PR, Halford NG (2002) Cereal seed storage proteins: structure, properties and role in grain utilization. Journal of Experimental Botany 53: 947-958.
- Shewry PR, Halford NG, Tatham AS (1989) The high molecular weight subunits of wheat, barley and rye. In: Mifflin BJ, (Ed.), Genetics, molecular biology, chemistry and role in wheat Gluten structure and functionality, Oxford Survey Plant Molecular and Cellular Biology, University Press, New York, 6: 163-219.
- Singh NK, Sheperd KW, Cornish GB (1991) A simplified SDS-PAGE procedure for separating LMW subunits of glutenin. Journal of Cereal Science 14: 203-208.
- Sultana T, Ghafoor A, Ashraf M (2007) Genetic variability in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) of Pakistan based on polymorphism for high molecular weight glutenin subunits. Genetic Resources and Crop Evolution 54: 1159-1165.
- Tang Y, Yang W, Tian J, Li J, Chen F (2008) Effect of HMW-GS 6+8 and 1.5+10 from synthetic hexaploid wheat on wheat quality traits. Agricultural Sciences in China 7: 1161-1171.
- Uhlen AN (1990) The composition of high molecular weight glutenin subunits in Norwegian wheats and their relation to bread-making quality. Norwegian Journal of Agricultural Sciences 4: 1-17.
- Xu Q, Xu J, Liu CL, Chang C, Wang CP, You MS, Li BY, Liu GT (2008) PCR based markers for identification of HMW-GS at *Glu-B1x* loci in common wheat. Journal of Cereal Science 47:394-398.
- Yan R, Wang T, Xu AB, Yang ZJ, Ren ZL (2008) Molecular characterization of a novel HMW-GS 1Dx5 associated with good bread making quality (*Triticum aestivum* L.) and the study of its unique inheritance. Genetic Resources and Crop Evolution 55:585-592.