مطالعه تنوع آللی جایگاه ژنی *Glu-B3* در ارقام گندم زراعی ایران با استفاده از نشانگر مولکولی ALP (Amplicon Length Polymorphism)

عباس تنهائیان[۱]، فرج ا۰۰۰ شهریاری، سید حسن مرعشی[۲]، اسماعیل دهقان[۳]

چکیده

پروتئین‌های ذخیره‌ای اندوسپرم دانه گندم از عمده‌ترین عوامل موثر بر کیفیت محصول این گیاه استراتژیک محسوب می‌گردند. کشش پذیری بالا از معیارهای مهم خمیر مطلوب می‌باشد، بنابراین در اصلاح گندم به اجزای گلوتنین با وزن مولکولی پایین (LMW) که نقش بیشتری در کشش پذیری خمیر دارد توجه بیشتری شده است و از آن جهت که گلوتنین‌های گروه B عمده‌ترین جزءتشکیل دهنده LMW بوده و از بیشترین تنوع آللی برخوردارند، در این تحقیق به بررسی تنوع آللی این زیر واحد با نشانگر مولکولی ALP پرداخته شد. پس از به کارگیری پرایمر اختصاصی مکان ژنی *Glu-B3* و انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز باندهایی به طول ۵۵۰– ۴۵۰ جفت باز با ۶ گروه باندی مختلف بر روی ژل الکتروفورز مشاهده شد که حاکی از تنوع آللی در ارقام گندم زراعی ایران بود. در بین ارقام مورد بررسی بیشترین فراوانی آللی مربوط به باند r2 با اندازه تقریبی ۵۰۰ جفت باز و کمترین آن مربوط به باند r3 با اندازه تقریبی۴۷۰ جفت باز بود. ارتباط بین تنوع آللی در *Glu-B3* با پارامترهای موجود مربوط به کیفیت نانوایی نشان داد که ارقام با بافت نرم تماما فاقد باند r3 بودند و در عوض حضور باند r2 با نرمی بافت ارتباط بیشتری داشت. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که نشانگر ALP قادر به بروز تنوع آللی قابل قبول در مکان ژنی *Glu-B3* می‌باشد به نحوی که می‌توان بین حضور الگوی باندی خاص و بعضی صفات مرتبط با کیفیت نانوایی ارتباط برقرار کرد. ازقام مورد مطالعه در تحقیق حاضر از حیث تنوع آللی در مکان ژنی مذکور در ۳ گروه مجزا قرار گرفتند.

واژه های کلیدی: گندم، تنوع آللی، مکان ژنی *Glu-B3*، LMW.

مقدمه

غلات در تغذیه انسان به طور مستقیم و غیر مستقیم از بیشترین اهمیت برخوردارند. در بین غلات گندم مهم‌ترین نقش را ایفا می‌کند (۶). متجاوز از یک سوم غله تولید شده در دنیا را گندم تشکیل می‌دهد که رایج‌ترین قوت غذایی بشر است(۱۹). در میان فرآورده‌های گندم، نان از اهمیت ویژه‌ای برخوردار می‌باشد. کیفیت نان تولید شده عمده‌ترین عامل در تعیین ضایعات آن است و بخش عمده ای از علل ایجاد ضایعات نان به دلیل پایین بودن ارزش نانوایی ارقام مورد استفاده در تهیه نان می‌باشد، لذا سرمایه‌گذاری در پژوهشهای کار بردی این زمینه ضروری به نظر می‌رسد (۲).

پروتئین‌های ذخیره‌ای اندوسپرم دانه گندم از عمده‌ترین عوامل موثر بر کیفیت محصول این گیاه استراتژیک محسوب می‌گردند. گلوتن یکی از مهم‌ترین پروتئین‌های ذخیره‌ای دانه گندم است که باعث کشش پذیری و استحکام خمیر می‌گردد. همچنین عامل حفظ و نگهداری گازهای تولیدی در خمیر محسوب می‌شود. به علاوه اینکه در اثر حرارت منعقد شده و فرم و شکل آن تغییر و آبگیری آن کاهش می‌یابد و در هنگام طبخ، آب خود را به نشاسته داده و در نهایت بافت ویژه نان را بوجود می‌آورد (۱).

پروتئین‌های گلوتنی به دو گروه عمده گلوتنین و گلیادین تقسیم می‌شود که نسبت این دو، معیاری از خصوصیات خمیرپذیری گندم می‌باشد (۲۰).

آنالیز گلوتنین تجزیه‌شده بوسیله ژل الکتروفورز پلی آکریلامید SDS[1] توسط پاین و کورفیلد نشان داد که زیرواحدهای گلوتنین را می‌توان بر اساس تحرکشان به ۳

۱، ۲و۳ به ترتیب کارشناس ارشد ، اعضای هیئت علمی و دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی و به نژادی گیاهی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد

1- Sodium-Dodecyle-Sulfate-PolyAcrylamid Gele Electeroforesis

دسته A، B و C طبقه بندی کرد. دسته A همان اجزای گلوتنین با وزن مولکولی بالا[1](HMW-GS) و دستجات B و C همان اجزای گلوتنین با وزن مولکولی پایین[2](LMW-GS) می‌باشند (۲۳).

خصوصیات خمیرپذیری گندم به دو ویژگی حداکثر مقاومت و کشش‌پذیری مربوط می‌شود. تحقیقات نشان داده است اجزای با وزن مولکولی بالا بر روی پارامتر حداکثر مقاومت خمیر تاثیرگذارتر می‌باشند (۱۰) در حالیکه اجزای با وزن مولکولی پایین، در مقایسه با اجزای با وزن مولکولی بالا، نقش بیشتری را در کشش پذیری خمیر ایفا می‌نمایند (۹).

تمامی فرآورده‌های حاصل از گندم نیازمند خمیری با کشش پذیری بالا می‌باشند؛ لذا در این حالت اکثر اصلاح کنندگان پیشنهاد می‌کنند که ارقام اصلاحی حاوی آلل‌هایی از گلوتنین با وزن مولکولی پائین باشند که تعداد زیرواحد بیشتری را کد می‌نمایند و این به عنوان یک استراتژی عمومی مورد پذیرش واقع‌شده‌است (۲۱).

گروه B عمده‌ترین جزء تشکیل دهنده LMW-GS است (۱۹ و۱۵) که بخش اعظمی از پروتئین‌های ذخیره‌ای اندوسپرم را تشکیل می‌دهد لذا بررسی تنوع آللی در مکان‌های ژنی مربوط به این‌گروه می‌تواند در تشخیص ارقام و برقراری رابطه فیلوژنتیکی سودمند باشد (۱۲). از میان زیرواحدهای گلوتنین با وزن مولکولی پایین، مکان ژنی *Glu-B3* که بیشترین تنوع آللی را نسبت به *Glu-A3* و *Glu-D3* داراست مورد مطالعه و بررسی بیشتر قرار گرفته است (۲۲).

عمده مطالعات در ارتباط میان اجزای گلوتنین با وزن مولکولی پائین و کیفیت نان با استفاده از تکنیک الکتروفورز در سیستم SDS-PAGE انجام گرفته‌است (۲۱) در تکنیک SDS-PAGE استخراج پروتئین‌های LMW دشواری‌های متعددی دارد که به طور مثال می‌توان به آلودگی ناشی از گلیادین در حین استخراج اشاره کرد. هرچند سینگ و همکاران و گوپتا و ماکریتچی جهت حل مشکل روشهایی را پیشنهاد کردند که از جمله می‌توان به استخراج متوالی و استفاده از ژلهای جداکننده اشاره نمود(۱۱و۲۵) ولی در مجموع اجرای این روشها مستلزم صرف وقت و کار زیاد می‌باشد. مضافا اینکه تجزیه و تحلیل باندها به دلیل زیاد بودن تعداد آنها بسیار مشکل و بعضا با اشتباه توام می‌باشد. به کارگیری تکنیک‌های ارائه‌شده عمدتا با تعداد بسیار زیادی باند روبرو خواهد شد که تفسیر آن‌ها را دشوار می‌نماید. از زاویه‌ای دیگر، همه تغییرات ژنتیکی ایجاد شده در سطح DNA مانند تغییرات در اینترون‌ها و توالی‌های مجاور، تغییرات کدون‌های مترادف، تغییر در اسیدهای آمینه‌ای که تغییری در بار خالص الکتریکی پروتئین ایجاد نمی‌کنند، در سطح پروتئین قابل ظهور نیست. بنابراین تکنیک‌هایی که مبتنی بر استخراج پروتئین هستند به اندازه مارکرهای مولکولی قابل اعتماد نمی‌باشند. از طرف دیگر فقط یک دسته از ژن‌های موجودات به صورت پروتئین ترجمه می‌شوند؛ بنابراین پروتئین‌ها نمی‌توانند نماینده کل ژنوم باشند. در مجموع به دلیل محدودیت‌هایی از این دست، مارکرهای مولکولی ترجیح داده می‌شوند (۳).

با توجه به مشخص بودن توالی کدکننده ژن‌های LMW، آغازگر اختصاصی مربوط به آن موجود است. لذا از میان نشانگرهای مولکولی نشانگرALP[3] کاربردی‌ترین، کم هزینه ترین و سریع‌ترین روش به شمار می‌آید و نیازی به مواد پرتوزا یا بیوشیمیایی پیچیده نداشته و در عین‌حال بسیار اختصاصی عمل کرده و از آن جهت که تکرار پذیری بالایی دارد نتایج حاصل از آن بسیار مورد اعتماد می‌باشد (۵). در نتیجه، با به‌کارگیری نشانگرALP در بررسی تنوع آللی در مکان ژنی *Glu-B3* نتایج قابل اعتمادتری بدست خواهد آمد. ضمنا تجزیه وتحلیل داده‌ها آسانتر می‌شود و همچنین مقایسه وارزیابی سایر صفات موثر بر کیفیت نانوایی با تنوع آللی مشاهده‌شده در *Glu-B3* سریعتر ودقیقتر انجام می‌شود. بنا به اظهارات موریس و همکاران تنوعات موجود در سختی دانه نیز یکی از مهم‌ترین عوامل تعیین کننده کیفیت فراورده های نهایی در گندم است. از این رو مطالعه تاثیرات احتمالی مکان‌های ژنی مختلف بر روی این صفت مورد توجه قرار گرفته‌است (۱۷).

با عنایت به مطالب مذکور این تحقیق با هدف بررسی

1- High – Molecular Weight Glutenin Subunit
2- Low - Molecular Weight Glutenin Subunit
3- Amplicon Length Polymorphism

میزان تنوع حاصل از نشانگر مولکولی ALP در مکان ژنی *Glu-B3* ارقام تجاری گندم زراعی ایران و کاربرد احتمالی نتایج حاصله جهت مطالعه رابطه بین یک باند خاص و خصوصیات نانوائی گندم و در نهایت برقراری روابط فیلوژنتیکی صورت پذیرفته است.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق ۶۲ رقم تجاری گندم نان، معرفی شده توسط بخش غلات مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج مورد بررسی قرار گرفت. ابتدا جهت جوانه‌زنی حدود ۱۰ بذر از هر ژنوتیپ به طور مجزا در پتری دیش درون آزمایشگاه کشت گردید. بعد از جوانه زنی بذور و رشد کلئوپتیل، نمونه‌ها در گلدانهای پلاستیکی کشت گردیدند. در مرحله دو برگی نمونه برداری از برگها صورت پذیرفت و برگها جهت استخراج DNA ژنومی به آزمایشگاه منتقل گردیدند. از هر ژنوتیپ دو نمونه مجزا از هم تهیه شد و بعد از قرارگیری در فویل آلومینیومی و انجماد توسط نیتروژن مایع، دریخچال ۲۰°C- نگهداری شدند. استخراج DNA از نمونه‌های برگی با استفاده از روش سقایی معروف و همکاران (۲۴) با اندک تغییرات انجام گرفت و از روش اسپکتروفتومتری برای تعیین کمیت و کیفیت DNA و از روش الکتروفورز ژل آگارز برای تعیین کیفیت DNA استفاده شد. تکثیر DNA ژنومی توسط تکنیکPCR و با استفاده از یک جفت آغازگر اختصاصی برای مکان ژنی *Glu-B3* که توسط لونگ و همکاران پیشنهاد گردیده صورت پذیرفت (۱۲).

توالی آغازگرو برنامه چرخه حرارتی برای ۳۵ سیکل به شرح زیر بود:

آغازگر پیشرو

[1]F.P.: 5’ C CTAGCTTGGAGAAACCATT 3’

[1]R.P.: 5’ CAAGATAGATGGCTGAATAG 3’

آغازگر برگشتی

دمای واسرشت سازی در این واکنش ۹۴°C انتخاب گردید که در چرخه اول به مدت ۲ دقیقه و در سایر چرخه ها به مدت۴۵ ثانیه بود. دمای اتصال آغازگر به صورت Touch Down در چرخه اول از ۵۸°C برای یک دقیقه آغاز شد به نحوی که در هر چرخه این دما به اندازه ۰/۵°C کاهش یافت تا در سیکل دهم به دمای اتصال واقعی آغازگر یعنی ۵۳°C رسید و در سایر چرخه‌ها در همین دما ثابت ماند. دمای بسط آغازگر نیز در تمام چرخه‌ها ۷۲°C برای یک دقیقه در نظر گرفته شد. نهایتا یک چرخه اضافی با دمای ۷۲°C برای ۵ دقیقه جهت اطمینان از سنتز تمام آغازگرهای متصل شده نیز انجام گردید. بعد از تکثیر به وسیله آغازگر اختصاصی *Glu-B3* و انجام الکتروفورز ژل آگارز و رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید و عکسبرداری، از نرم افزار LabWorks جهت تعیین دقیق تر اندازه باندها و موقعیت قرارگیری آنها برروی ژل استفاده گردید و ماتریس صفر و یک (برمبنای حضور یا عدم حضور باندی با طول خاص) در برنامه MS-Excell تهیه و توسط نرم افزار NTsys ماتریس فاصله ژنتیکی بر مبنای ضریبNei محاسبه گردید و در نهایت به صورت نمودار کلاستر نمایش داده شد.

همبستگی بین تنوع آللی در مکان ژنی *Glu-B3* با داده‌های موجود مربوط به سختی دانه در ارقام مختلف گندم‌های زراعی ایران که توسط ملک زاده و همکاران(۴) گزارش گردیده است بوسیلهٔ نرم افزار SigmaStat ver 1.0) در سطح احتمال آماری ۵٪) انجام گرفت.

نتایج و بحث

نتایج حاصل از الکتروفورز محصولات PCR اختصاصی نشان داد که در مکان ژنی *Glu-B3* تنوع زیادی بین ارقام مختلف گندم زراعی کشور وجود دارد. باندهای مشاهده‌شده در ارقام مختلف از حیث اندازه و تعداد با یکدیگر متفاوت می‌باشند؛ به طوری که الگوهای متفاوتی از باندهای r1 با اندازه ۵۵۰ bp، r2 با اندازه تقریبی ۵۰۰ bp، r3 با اندازه تقریبی ۴۷۰ bp و r4 با اندازه تقریبی ۴۵۰ bp را دارا هستند بیشترین فراوانی آللی در ارقام زراعی ایران در مکان ژنی *Glu-B3* مربوط به باند r2 و کمترین آن به باند r3 تعلق داشت (شکل۱). همانطور که در شکل۱ دیده می‌شود الگوی باندها در برخی از ارقام تک باندی، در برخی دو باندی و در نهایت الگوی باندی سه تایی نیز مشاهده می‌شود.

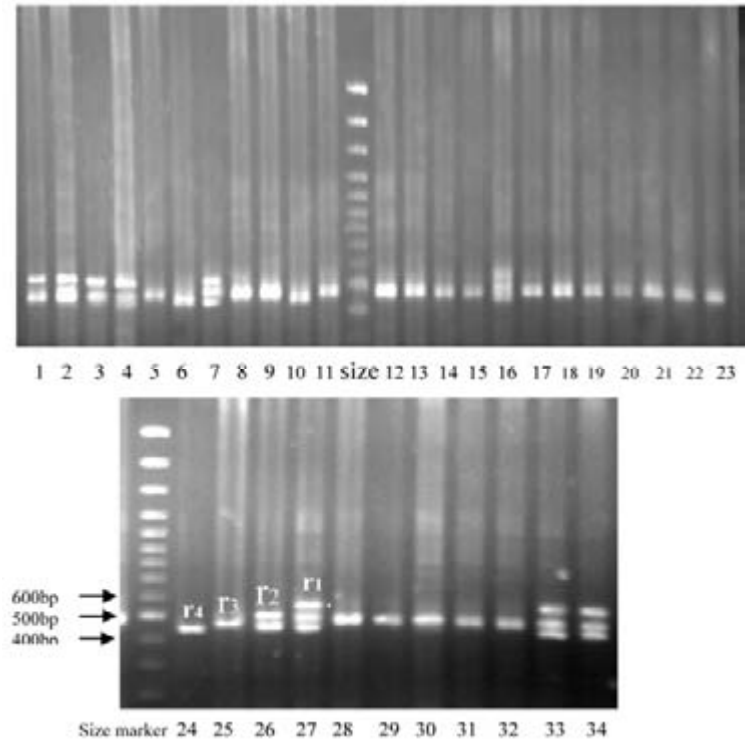
1- Forward primer 2- Reverse primer

البته لازم به ذکر است که در شکل ۱ فقط الگوی باندی ۳۴ رقم به عنوان نمونه جهت نشان دادن فرمهای مختلف اللی موجود آورده شده است. لذا الگوی باندی مربوط به تمام ارقام در جدول ۱ مندرج گردیده است. از این تعداد باند، که محدوده طول آنها بین ۵۵۰-۴۵۰ جفت باز بود، ۶ الگوی باندی متفاوت مترتب گردید که حاکی از تنوع آللی در مکان ژنی *Glu-B3* می‌باشد. معرفی این الگوهای باندی درواقع معرف تنوع آللی در این ارقام می‌باشد. در ارقام اینیا، چناب، البرز، خزر ۱، چمران، کرج ۲، گلستان، سرخ تخم، قدس، امید، بزوستایا، الوند، بک کراس روشن بهاره و بک کراس روشن زمستانه ، تک باندی به طول ۴۵۰ جفت باز مشاهده می‌شود که قبلا نیز باندی به همین اندازه با بکارگیری آغازگری مشابه در ۳ نمونه *Ae. speltoides* و لاین‌های دای تلوسنتریک گندم بهاره چینی گزارش شده بود (۱۳).

در سایر ارقام زراعی ایران الگوهای باندی متفاوتی نسبت به الگوهای گزارش شده توسط لونگ و همکاران ۲۰۰۵ (۱۳) به دست آمد که این امر حاکی از تنوع آللی بیشتر نسبت به لاین‌های دای‌تلوسنتریک گندم بهاره چینی و نمونه‌های *Ae. Speltoides* می‌باشد. دندروگرام حاصله از این تنوعات (دندروگرام۱) نشان داد که ارقام زراعی ایران از حیث تنوع آللی در مکان ژنی *Glu-B3* در۳ گروه مجزا قرار می‌گیرند

گروه ۱ خود به دو زیرگروه تقسیم می‌شود که در زیرگروه ۱-۱، تنها باند r_4 با اندازه تقریبی ۴۵۰ bp وجود دارد و شامل ارقام اینیا، چناب، البرز، خزر ۱، چمران، کرج ۲، گلستان، سرخ تخم، قدس، امید، بزوستایا، الوند، بک کراس روشن بهاره و بک کراس روشن زمستانه می‌باشد. زیرگروه ۲-۱ تنها رقم شیراز را شامل می‌شود که علاوه بر باند r4، باند r2 با اندازه تقریبی ۵۰۰ bp را نیز داراست.

گروه ۲ نیز شامل دو زیرگروه است: زیر گروه ۱-۲ در دو کلاس مجزا طبقه بندی می‌شود: ۱-۱-۲ شامل Stork، عدل، نوید، طبسی، رسول، آذر ۲، اروند، دز، سبلان و آذر که باندهای r_1 (با طول تقریبی ۵۵۰ bp) و r_2 و r_4 را دارد. و



شکل ۱: الگوی باندی ناشی از PCR اختصاصی بر روی تعدادی از نمونه‌های گندم رایج ایران.

۱- فلات، ۲- طوس، ۳- وری ناک ، ۴- آذر، ۵- الموت، ۶- بک کراس روشن زمستانه، ۷- سبلان،۸- کویر، ۹- گاسکوژن،۱۰- بک کراس روشن بهاره، ۱۱- شعله، ۱۲- کاوه، ۱۳- پیشتاز، ۱۴- مهدوی، ۱۵- کرج (۳)، ۱۶- دز، ۱۷- سرداری، ۱۸- گاسپارد،۱۹- هامون، ۲۰- مغان (۲)، ۲۱- شهریار ، ۲۲- الوند،۲۳- بزوستایا ، ۲۴- قدس، ۲۵- مرودشت، ۲۶- شیراز، ۲۷- عدل، ۲۸- شیرودی، ۲۹- کراس البرز، ۳۰- تجن، ۳۱- سایسون، ۳۲- زرین، ۳۳- نوید، ۳۴- اروند.

جدول ۱: نام ارقام به تفکیک الگوی باندی بر اساس حضور(+) و عدم حضور(-) باندی خاص

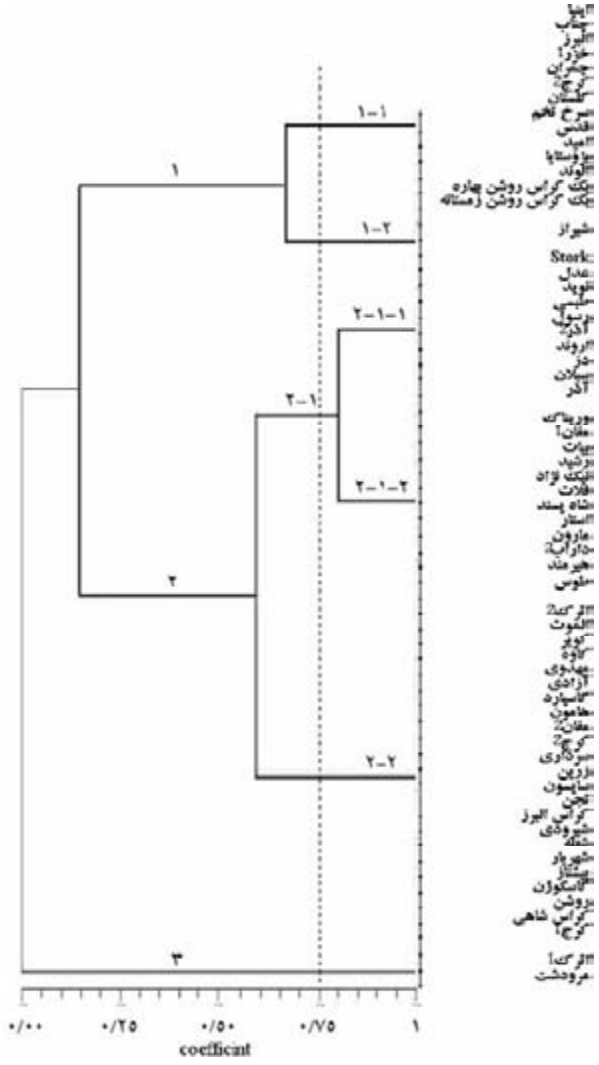
ارقام	باندهای PCR اختصاصی r4 r3 r2 r1	ارقام	باندهای PCR اختصاصی r4 r3 r2 r1	ارقام	باندهای PCR اختصاصی r4 r3 r2 r1	ارقام	باندهای PCR اختصاصی r4 r3 r2 r1
اینیا	- - - +	زرین	- + - -	بک‌کراس روشن زمستانه	- - - +	بک کراس روشن بهاره	- - - +
چناب	- - - +	نوید	+ + - +	الموت	- + - -	سایسون	- + - -
البرز	- - - +	اروند	+ + - +	آذر	+ + - +	طبسی	+ + - +
چمران	- - - +	بزوستایا	- - - +	وری ناک	+ + - +	امید	- - - +
Stork	+ + - +	الوند	- - - +	طوس	+ + - -	کویر	- + - -
اترک نمونه۱-	- + -	شهریار	- + - -	فلات	+ + - -	سیلان	+ + - +
اترک نمونه۲-	+ - -	مغان۲	- + - -	داراب۲	+ + - -	خزر۱	- - - +
سرخ تخم	- - - +	هامون	- + - -	آذر۲	+ + - +	کرج۲	- - - +
کرج۱	- + - -	گاسپارد	- + - -	مارون	+ + - -	هیرمند	+ + - -
کراس شاهی	- + - -	سرداری	- + - -	رسول	+ + - +	عدل	+ + - +
روشن	- + - -	دز	+ + - +	استا	+ + - -	شیرودی	- + - -
قدس	- - - +	کرج۳	- + - -	نیک نژاد	+ + - -	کراس البرز	- + - -
شعله	- + - -	کاوه	- - + -			تجن	- + - -
						شاهپسند	+ + - -

زیر گروه۲-۱-۲ شامل ورناک، مغان ۱، بیات، رشید، نیک نژاد، فلات، شاه پسند، استار، مارون، داراب ۲، هیرمند و طوس که تنها باند r_1 و r_2 را دارا می‌باشند. زیر گروه ۲-۲ تنها باند r_2 را دارد که شامل ارقام اترک ۲، الموت، کویر، کاوه، مهدوی، آزادی، گاسپارد، هامون، مغان ۲، کرج ۳، سرداری، زرین، سایسون، تجن، کراس البرز، شیرودی، شعله، شهریار، پیشتاز، گاسکوژن، روشن، کراس شاهی و کرج۱می‌باشند. به جز اترک ۱ و مرودشت در گروه ۳ که تنها باند r_3 به طول تقریبی ۴۷۰ bp را دارد سایر ارقام در زیر گروه ۲-۲ با تک باندr_2 (با اندازه تقریبی ۵۰۰ bp) قرار می گیرند.

با توجه به اینکه عدم بروز تنوع آللی کافی از معایب نشانگر ALP است (۵) ولی در این مطالعه تنها با وجود کاربرد یک جفت پرایمر اختصاصی جهت تکثیر قطعه ای از ناحیه *Glu-B3* ، تنوع آللی خوبی دیده شد. قره یاضی و همکاران با کاربرد اغازگرهای اختصاصی در جایگاه ژن واکسی ارقام برنج ایرانی هیچ نوع تفاوتی در قطعات قابل تکثیر مشاهده ننمودند به نحوی که نشانگر ALP در جایگاه مربوطه فاقد تنوع آللی بود(۸). در آزمایشی که توسط قره یاضی و همکاران با استفاده از ۱۵ جفت آغازگر اختصاصی برای تکثیر لوکوس های متناظر، جهت طبقه بندی ۳۵ رقم از واریته های زراعی برنجهای ایرانی انجام شد، تنها ۶ جفت از آغازگرها قادر به تشخیص ALP در بین نمونه های برنج مذکور بودند(۷). عدم وجود تنوع آللی کافی در تعدادی از مکان های اختصاصی مختلف در برنج و بر خلاف آن وجود تنوع کافی در جایگاهی اختصاصی در گندم نان حاکی از قدرت بروز تنوع بیشتر نشانگرALP در گندم است. به نحوی که می‌توان از تنوع موجود در طبقه بندی ارقام استفاده نموده و بین حضور یا عدم حضور باند خاص با ویژگی‌های کیفی نان ارتباط برقرار نمود. بنابراین بروز تنوع کافی در گندم نان به عنوان گیاهی آلوهگزا پلوئید و عدم مشاهده چنین تنوعی برای گیاهی دیپلوئید(برنج) می‌تواند حاکی از سودمندی بیشتر کاربرد این نشانگر در گیاهان پلی پلوئید و مخصوصا امیدواری زیاد جهت بهره برداری از مزایای این نشانگر مولکولی در گندم نان باشد.

بررسی همبستگی احتمالی بین سختی دانه و تنوع آللی در مکان ژنی *Glu-B3*

میانگین سختی دانه در ارقامی که دارنده باند r3 بودند به طور چشمگیری از مابقی ارقام بیشتر بود، ولیکن در مورد سایر موارد هیچ گونه ارتباطی مشاهده نگردید. با بررسی ارتباط میان باندهای r4,r3,r2,r1 با بافت بذر مشاهده گردید



شکل۲: دندروگرام مربوط به تجزیه کلاستر در مکان ژنی *Glu-B3*

که ارقام با بافت نرم تماماً فاقد باند r3 بودند و در عوض حضور باند r2 در ارتباط با نرمی بافت، بیشتر چشمگیر می‌باشد. لذا می توان چنین نتیجه گیری کرد که احتمالا عدم حضور باند r3 می تواند به عنوان نشانه‌ای از نرمی دانه تلقی شود. با این حال نیاز است که این موضوع بیشتر مورد بررسی قرار گیرد. تعیین رابطه همبستگی تنوع آللی در *Glu-B3* با داده‌های حاصل از بررسی سختی دانه در ارقام زراعی ایران (۴) که با ضریب همبستگی اسپیرمن محاسبه گردید مشخص شد که بین تنوع آللی در مکان *Glu-B3* با سختی دانه همبستگی معنی دار فقط با آلل r3 مشهود است (r^2= ۰/۳۰۱۰) ولی همبستگی مابین سختی دانه با سایر آلل‌ها و نیز با تعداد کل آلل‌ها در سطح ٪۹۵ معنی دار نبود(جدول۲)

لوئو و همکاران در مطالعات خود برروی ۶ لاین گندم نیوزیلندی به بررسی رابطه تنوع آللی مرتبط با LMW با سختی دانه پرداخته و گزارش کردند که بین سختی دانه و تنوع آللی در مکان ژنی *Glu-B3* همبستگی وجود ندارد (۱۳).

باتوجه به نتایج تحقیق حاضر و همانطور که توسط لی و همکاران اشاره شده می‌توان از تنوع آللی موجود در مکان ژنی Glu-B3 و سایر جایگاه های مربوطه (۹)، بالاخص با افزایش تنوع بدست آمده ازنشانگرALP پس از تبدیل آن به نشانگر PBR(توسط آنزیم های محدود کننده) به خوبی جهت تشخیص ارقام و برقراری رابطه فیلوژنتیکی استفاده نمود. همچنین با پیدا کردن رابطه ای متقن بین حضور اللهای خاص با صفات مختلف متاثر کننده کیفیت نانوایی به گزینش سریع ژرم پلاسم ها بدون نیاز به استفاده از روش‌های بیوشیمیایی دشوار اقدام نمود.

سپاسگزاری

از مدیریت و پرسنل آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد، همچنین از راهنمایی دکتر امین میرشمسی و همکاری مهندس رضا حلمی تشکر و قدردانی می گردد.

جدول ۲: بررسی همبستگی بین تنوع آللی *Glu-B3* با سختی دانه

تنوع آللی در مکان ژنی Glu-B3	فراوانی نسبی★	میانگین سختی دانه	ضریب همبستگی بین دو صفت	میزان معنی دار بودن ضریب محاسبه شده
r_1 = ۵۵۰ bp	۰/۲۳۲	۵۶/۳۰۵	-۰/۲۲۷۰	۰/۰۷۵۹
r_2 = ۵۰۰ bp	۰/۴۸۴	۵۹/۵۶	-۰/۱۶۸	۰/۱۹۱
r_3 = ۴۷۰ bp	۰/۰۲۱	۸۱/۰۰	۰/۳۰۱۰*	۰/۰۱۷۷*
r_4 = ۴۵۰ bp	۰/۲۶۳	۵۸/۹۸	-۰/۱۰۷	۰/۴۰۸
مجموع باندها	-	-	-۰/۲۲۷۴	۰/۰۷۵۴

*: معنی دار در سطح ۵ درصد ★ فراوانی هر آلل از نسبت ارقام دارنده آلل مربوطه به کل تعداد آلل ها بدست آمده است

منابع

۱- رجب زاده، ن. ۱۳۷۵. تکنولوژی آماده سازی و نگهداری غلات. موسسه چاپ و انتشارات آستان قدس رضوی

۲- شهریاری، ف. ۱۳۸۲. مطالعه ژنتیکی کیفیت نانوایی گندمهای آبی و دیم در خراسان. گزارش نهایی پروژه مطالعاتی شورای پژوهش‌های علمی کشور.

۳- عبد میشانی، س. و ا. بوشهری.۱۳۷۷. اصلاح نباتات تکمیلی، جلد دوم. انتشارات دانشگاه تهران.

۴- ملک زاده، خ. ۱۳۸۶. شناسایی مولکولی آلل‌های مهم ژن‌های سختی دانه (puroindoline a, b) در گندم‌های تجاری و بومی ایران. پایان نامه کارشناسی ارشد. گروه بیوتکنولوژی و به نژادی گیاهی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد.

۵- نقوی، م. ر، قره یاضی، ب و حسینی سالکده، ق. ۱۳۸۶. نشانگرهای مولکولی، انتشارات دانشگاه تهران

6-Couvain, S.P. 1998. Technology of Breadmaking. Chapman and Hall, London.

7-Ghareyazie.B, N, Huang, G, Seeond, J, Bennett and G.S., Khus.1994. Aboundance of PCR-based RFLP for marker aided selection in rice. Rice Genet Newsletter 11:140-142.

8-Ghareyazie.B, N, Huang, G, Seeond, J, Bennett and G.S., Khus. 1995. Classification of rice germplasm. I. Analysis using ALP and PCR-based RFLP. Theor. Appl. Genet. 91:218-227.

9-Gupta, R.B. 1989. Low-molecular-weight subunits of Glutenin in wheat and related species: Their characterization, genetics, and relation to bread-making quality. PhD Thesis, University of Adelaide, Australia.

10-Gupta, R.B., Bekes, F, and C.W. Wrigley. 1991. Prediction of physical dough properties from Glutenin subunit composition in bread wheats: Correlation studies. Cereal Chem. 68:328-333.

11-Gupta, R.B. and F. MacRitchie. 1991. A rapid one step one-dimentional SDS-PAGE procedure for analysis of subunit composition of Glutenin in wheat. J. Cereal Sci. 14:105-109.

12-Long, H., Wei, Y.M., Yan, Z-.H., Baum, B., Nevo, E. and Y-.L. Zheng. 2005. Classification of wheat low-molecular-weight glutenin subunit genes and its chromosome assignment by developing LMW-GS group-specific primers. Theor. Appl. Genet. 111:1251–1259.

13-Luo, C., Griffin, W.B., Branlard, G. and D.L. McNeil. 2001. Comparison of low- and high molecular-weight wheat glutenin allele effects on flour quality. Theor Appl Genet:102:1088–1098.

14-Marchylo, B.A, Kruger, J.E., and D.W Hatcher. 1990. Effect of environment on wheat storage proteins as determined by quantitative reversed-phase high-performance liquid chromatography. Cereal Chem. 67:372–376.

15-Masci, S., Egorov, T.A., Ronchi, C., Kuzmicky, D.D., Kasarda, D.D., and D. Lafiandra. 1999. Evidence for the presence of only one cysteine residue in the D-type low molecular weight subunits of wheat subunits of wheat Glutenin. J. Cereal Sci 29:17–25.

16-Miflin, B.J., Field, J.M. and P.R. Shewry. 1983. Cereal storage proteins and their effects on technological properties. In: Daussant, J., Moss, J. and J. Vaughan (Eds.), "Seed Proteins" Academic Press, New York. pp. 255-319.

17-Morris, C.F. 2002. Puroindolines: the molecular genetic basis of wheat grain hardness. Plant Mol. Biol. 48:633–647.

18-Ng, P.K.W., Slominski, E., Johnson, W.J., and W. Bushuk. 1991. Changes in wheat endosperm proteins during grain maturation. In: Bushuk, W., Tkachuk, R. (Eds.), Gluten Proteins, American Association of Cereal Chem., St. Paul, MN, pp. 740–754.

19-Park, W.J., Shelton, D.R. Peterson, C.J., Martin, T.J. Kachman, S.D., and R.L. Wehling. 1997. Variation in polyphenol oxidase activity and quality characteristics among hard white wheat and hard red winter wheat samples. Cereal Chem. 74(1):7-11

20-Payne, P.I. 1987. Genetics of wheat storage protein and the effect of allelic variation on breadmaking quality. Ann. Rev. Plant Physiol. 38:141-153.

21-Payne, P.I., Corfield, K.G. and J.A. Blackman. 1981. Correlation between the inheritance of certain high-molecular-weight subunit of Glutenin and bread-making quality in progenies of six crosses of bread wheat. J. Sci. Food. Agric. 32:51-60.

22-Payne, P.I., Holt, L.M. and C.N. Law. 1984. Genetic linkage between endosperm protein genes on each of the short arm of chromosome 1A and 1B in wheat. Theor. Appl. Genet. 67:235-243.

23-Payne, P.I., Holt, L.M., Hutchinson, J. and M.D. Bennett. 1984. Development and characterization of a line of bread wheat (*Triticum aestivum*) which lacks the short-arm satellite of chromosome 1B and the *Gli-B1* locus. Theor. Appl. Genet. 68:327-334.

24- Saghai - Maroof, M.A., Soliman, K.M., Gorgensen, R.A and R.W. Allard. 1984. DNA spacer length polymorphism in Barley: mendelian inheritance, chromosomal location and population genetics. Proceeding of the national academy of sciences of the USA, 81:8014- 8018.

25-Singh, N.K., Shepherd, K.W. and G.B. Cornish. 1991. A simplified SDS-PAGE procedure for separating LMW subunits of Glutenin. J. Cereal Sci. 14:203-208.

Study of allelic variation at *Glu-b3* locus of the Iranian bread wheat cultivars by using ALP molecular marker

A. Tanhaiyan, F. Shahriari, S.H. Marashi, E. Dehghan[1]

Abstract

Seed storage proteins of wheat grain are the most effective agents in bread making quality. Suitable dough should have high extensibility; therefore it is necessary to pay more attention to low molecular weigh (LMW) due to its role in dough extensibility. Since group B is the most important component of LMW and has the largest allelic variation, the polymorphism of this subunit was studied using ALP molecular marker. On the base of polymerase chain reaction (PCR), six groups of bands varying in length from 450-550bp were detected in using gel electrophoresis, indicating that allele variation in Iranian bread wheat cultivars. Among tested cultivars, the highest allele frequency belonged to r2 with 500bp length and the lowest allelic frequency was belonged to r3 with 470bp length. The results of cluster analysis showed that cultivars are put in three distinct groups. Relationship allelic variation at Glu-B3 and qualitative parameters show that cultivars with soft texture were completely lack of r3 band, whereas the presence of r2 band was quite evident in cultivars with soft texture.

Key words: Wheat**,** allelic polymorphism**,** *GLU-B3* locus, LMW

1- Contribution from College of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad.