

بررسی چندشکلی ژن‌های *Wx-A1* و *Wx-B1* و اثر جهش‌های آنها بر ساختار آنزیم GBSS در برخی ارقام تجاری گندم‌های ایرانی

فرج اله شهریاری^۱ - مسعود فخرشانی^{۲*} - جعفر ذوالعلی^۳

تاریخ دریافت: ۱۳۸۹/۱۱/۶

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۲/۱۸

چکیده

آنزیم GBSS که نتیجه بیان ژن واکسی (*Wx*) است، کنترل کننده نسبت آمیلوز به آمیلوپکتین در نشاسته می‌باشد. عدم بیان آنزیم مذکور و یا غیرفعال بودن آن سبب کاهش مقدار آمیلوز نشاسته و افزایش سهم آمیلوپکتین می‌گردد. گندم نان (*Triticum aestivum L*) دارای سه نسخه ژن واکسی به نام‌های *Wx-A1*، *Wx-B1* و *Wx-D1* است که تولید نشاسته تمام واکسی در آن مستلزم غیرفعال بودن هر سه این ژن‌ها می‌باشد. این پژوهش با هدف بررسی وضعیت چندشکلی مکان ژنی *Wx-A1* و *Wx-B1* به عنوان مقدمه‌ای بر تولید گندمی با نشاسته تمام واکسی انجام شد. قطعات ژنی مربوط به *Wx-A1* و *Wx-B1* در ۲۰ نمونه از ارقام گندم تتراپلوئید و هگزاپلوئید ایرانی در واکنش‌های PCR با آغازگرهای اختصاصی تکثیر و چندشکلی نمونه‌های انتخاب شده با استفاده از تکنیک‌های PCR-RFLP و توالی‌یابی مستقیم بررسی شد. با استفاده از روش‌های فوق، جهشی در بین لوکوس *Wx-B1* مشخص نشد اما با بررسی مکان ژنی *Wx-A1* نمونه‌ها چندین جهش در ارقام هامون و الوند مشخص گردید. بر اساس تعیین توالی نمونه‌های دارای جهش و بررسی بیوانفورماتیکی اثر جهش‌های شناخته‌شده بر ویژگی‌های ساختاری آنزیم GBSS، ارقام الوند و هامون به عنوان گزینه‌های اصلی حامل آلل نول در مکان ژنی *Wx-A1* معرفی می‌گردند.

واژه‌های کلیدی: آلل نول، جهش، ژن واکسی، گندم، PCR-RFLP

مقدمه

به طور معمول از ۲۵ درصد آمیلوز و ۷۵ درصد آمیلوپکتین تشکیل شده است. مولکول‌های نشاسته در گرانول‌هایی نیمه کریستالی نظم می‌گیرند که بسته به گونه گیاهی و اندامی که در آن ذخیره می‌شوند، شکل و اندازه متفاوتی دارند (۴). از جمله مصارف صنعتی نشاسته، تولید کاغذ با کربن اندک، چسب‌های صنعتی، فوم‌هایی با حفرات بسیار ریز، تولید مواد آرایشی، اتانول و پلاستیک‌های قابل تجزیه شدن می‌باشد (۱۲). مصرف صنعتی نشانه گندم در اتحادیه اروپا به $۲/۵ \times ۱۰^۶$ تن در سال می‌رسد. این رقم در کشور انگلیس در حدود $۲/۲ \times ۱۰^۵$ تن است که معادل ۲۵ درصد نشاسته مصرف شده در این کشور می‌باشد (۶). البته سهم مصرف صنعتی نشاسته گندم به سرعت در حال افزایش است زیرا صنایع مختلف به علت کمتر بودن هزینه تولید نشاسته گندم و تنوع موجود در نشاسته آن، استفاده از آن را به نشاسته‌های دیگر ترجیح می‌دهند (۱۲). بیشترین مصرف غیر تغذیه‌ای نشاسته در صنعت تولید کاغذ می‌باشد به طوری که در هر صفحه کاغذ معمولی تا ۸٪ نشاسته وجود دارد. نشاسته هم به صورت مستقیم

از نظر صنایع غذایی، ۵۵ درصد کربوهیدرات مصرف شده در جهان (۱۵) و ۴۰ درصد انرژی مورد نیاز بدن از گندم تامین می‌شود (۳). مصرف سرانه گندم در جهان ۱۰۲ کیلوگرم ولی در ایران به علت رژیم غذایی خاص ۲۲۰ کیلوگرم می‌باشد به طوری که در طبقات کم درآمد گاهی تا حدود ۷۵٪ انرژی و ۸۰٪ پروتئین مورد نیاز بدن از گندم تامین می‌گردد (۱) علاوه بر اهمیت آن از نظر صنایع غذایی، از نظر سیتوژنتیکی نیز به عنوان یک گیاه مدل محسوب می‌شود که مرجع بررسی ژنوم‌های پلی‌پلوئید است (۴). نشاسته آندوسپرم غلات

۱-دانشیار، گروه بیوتکنولوژی و به‌نژادی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه

فردوسی مشهد، مشهد، ایران

۲-دانشجوی دکتری، گروه بیوتکنولوژی و به‌نژادی گیاهی، دانشکده کشاورزی،

دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

(*)- نویسنده مسئول: (Email: fakhreshani.m@gmail.com)

۳- استادیار، گروه بیوتکنولوژی و به‌نژادی گیاهی، دانشگاه باهنر کرمان، کرمان،

ایران

شکسته شدن نشاسته در اثر حرارت مستقیم صورت گیرد، به پلیمرهای حاصل، پیرو دکسترین^۴ و به فرایند منتهی به آن دکسترین‌زایی^۵ گفته می‌شود. پیرو دکسترین‌هایی که حین پخته شدن نان بوجود می‌آیند عامل قهوه‌ای (برشته) شدن و عطر نان تازه است. با توجه به اینکه شکسته شدن پیوندهای α ۱ به ۶ که عامل ایجاد شاخه‌های فرعی موجود در آمیلوپکتین می‌باشند، در اثر حرارت راحت‌تر صورت می‌گیرد؛ در نتیجه هرچه محتوای آمیلوپکتینی نشاسته بالاتر باشد، تولید پیرو دکسترین‌ها در حین پختن نیز بیشتر می‌شود (۵ و ۱۱). ژن‌های واکسی تولید ایزوفرم‌های مختلف پروتئین‌های واکسی یا GBSS را کنترل می‌کنند. این پروتئین‌ها از اصلی‌ترین آنزیم‌های موثر در سنتز آمیلوز در آندوسپرم گیاهان می‌باشند و هرگونه جهشی در مکان ژنی آنها، که باعث عدم تولید یا کاهش فعالیت این پروتئین‌ها شود، بر محتوای آمیلوزی آندوسپرم اثر گذاشته و باعث تولید نشاسته‌هایی با آمیلوز اندک یا بدون آمیلوز (نشاسته‌های واکسی) می‌گردد. در گندم نان سه مکان ژنی به نام‌های $Wx-A_1$ ، $Wx-B_1$ ، $Wx-D_1$ سنتز این پروتئین‌ها را کنترل می‌کنند. ژن $Wx-A_1$ ، در کروموزوم شماره ۷ ژنوم A (۷A)، ژن $Wx-B_1$ در کروموزوم شماره ۴ ژنوم A (۴A) و ژن $Wx-D_1$ در کروموزوم شماره ۷ ژنوم D (۷D) وجود دارد (۱۵ و ۲۴). عدم حضور هر یک از ایزوفرم‌های GBSS را به غیرفعال بودن مکان ژنی آن نسبت می‌دهند و آن را اصطلاحاً نول^۶ می‌خوانند (۱۵). غیرفعال بودن مکان‌های ژنی واکسی را با اضافه کردن حروف کوچک «b» در انتهای نام آن مکان ژنی و به صورت $Wx-A_1b$ ، $Wx-B_1b$ ، $Wx-D_1b$ نشان می‌دهند. واژه «واکسی» به معنای «موم» می‌باشد و اصطلاح واکسی بودن نشاسته در رابطه با گیاهانی به کار برده می‌شود که نشاسته آنها فاقد آمیلوز بوده (۱۷ و ۲۵) یا نسبت آمیلوز به آمیلوپکتین در نشاسته آنها بسیار پایین است (۸). واژه «واکسی» اولین بار در مورد موتانت‌هایی از ذرت به کار برده شد که محتوای آمیلوزی نشاسته آنها بسیار پایین بود و به همین دلیل آندوسپرم خشک شده آنها به حالت مات (مومی) دیده می‌شد در حالی که آندوسپرم دانه‌های غیرموتانت (وحشی) به صورت نیمه شفاف بروز پیدا می‌کرد. بررسی‌های متعدد نشان داده است که موتانت‌های واکسی ذرت، جو و دیگر غلات نیز دارای کمبود آنزیم GBSS و آمیلوز می‌باشند (۱۵).

مواد و روش‌ها

هدف اصلی این پژوهش جداسازی تمام طول ژن‌های $Wx-A_1$

و هم به شکل تغییر یافته در تولید پلاستیک‌های زیستی^۱ کاربرد دارد. در حالت مستقیم گرانول یا ژلاتین نشاسته به عنوان پرکننده‌های فضای یک شبکه تورمانند از رشته‌های پلیمری غیر زیستی استفاده می‌شود. در حالت غیر مستقیم نیز طی فرایندهایی نشاسته به پلی استیک اسید تبدیل می‌شود که می‌توان از آن همانند پلیمرهای شیمیایی جهت تولید لوازم مختلف استفاده کرد (۱۱ و ۱۲). حضور آمیلوز جهت تشکیل گرانول‌های نشاسته ضروری نیست و ساختار اولیه گرانول‌ها به خاطر تا خوردن مولکول‌های آمیلوپکتین در جهت‌های مشخصی شکل می‌گیرد (۲۳). اگر نشاسته در دمای اتاق در محیط آبی قرار گیرد در آب حل نمی‌شود ولی گرانول‌های آن تا ۵۰٪ وزن خود را آب جذب می‌کنند و متورم می‌شوند. در اثر حرارت دادن، نشاسته در آب حل و گرانول‌های آن متورم و تخریب شده و در این حالت مولکول‌های کوچک آمیلوز وارد فضای بین گرانولی می‌شوند. این مولکول‌ها با ایجاد شبکه‌ای تارمانند در فضای بین گرانول‌ها باعث حفظ آب و افزایش غلظت محلول می‌گردد که به این فرایند اصطلاحاً ژلاتینی شدن نشاسته می‌گویند. تشکیل این لایه ژلاتینی در فرایند پختن محصولات نشاسته‌ای نرم و یا حجیم همچون نان و کیک، باعث حفظ و پراکندگی آب در سراسر فرآورده شده و تردی و تازگی آن را حفظ می‌کند (۱ و ۷) پلی‌ساکاریدهای عامل ژلاتینی شدن در اثر گذشت زمان و سرد شدن نشاسته، دوباره به هم پیوسته و حالتی پایدار پیدا می‌کنند. به این فرایند رتروگرسیون گفته می‌شود. در این حالت شبکه تارمانند ایجاد شده در فرایند ژلاتینی شدن از بین می‌رود و قابلیت نگهداری آب در فضای بین گرانول‌ها بسیار پایین می‌آید. با آزاد شدن آب موجود در بافت فرآورده‌ها و انتقال آن به سطح محصول، نرمی و تازگی آن بسیار کاهش می‌یابد که اصطلاحاً گفته می‌شود فرآورده بیات^۲ شده است. در فرایند رتروگرسیون، ابتدا مولکول‌های آمیلوز طی چند ساعت با تشکیل یک مارپیچ دوگانه، ساختارهای کریستالی پایداری بوجود می‌آورند. کریستالی شدن شاخه‌های جانبی آمیلوپکتین بسیار کندتر انجام می‌شود و ممکن است چند روز تا چند هفته نیز به طول انجامد. به همین دلیل استفاده از نشاسته‌هایی با محتوای آمیلوپکتینی بالا در تولید فرآورده‌هایی همچون نان و کیک به دلیل طولانی‌تر بودن فرایند از دست دادن آب و ماندگاری بیشتر محصول، مقبولیت بیشتری دارد (۱ و ۷ و ۱۱). نشاسته تحت تاثیر اسیدها، آنزیم‌های مختلف و حرارت مستقیم به پلی‌ساکاریدهای کوچکتری شکسته می‌شود. محیط اسیدی و آنزیم‌ها نشاسته را هیدرولیز کرده و باعث تولید پلی‌ساکاریدهایی به نام دکسترین^۳ می‌شوند. در صورتی که

4- Pyrodextrin
5- Dextrinization
6- Null

1- Bioplastic
2- Staling
3- Dextrin

نتایج

بررسی چندشکلی وجود چندین جهش را در ارقام هگزابلوئید هامون و الوند در فاصله بین نوکلئوتیدهای ۱ و ۳۵۵ در قطعه دوم ژن واکسی A1 را نشان داد (شکل ۱). بررسی قطعه اول ژن واکسی A1 و هر دو قطعه ژن واکسی B1 با استفاده از تکنیک PCR-RFLP بین ۲۰ رقم مورد مطالعه، تنوعی را نشان نداد. با توجه به اینکه روش PCR-RFLP تنوع و جهش را در محل برش آنزیمی و همچنین حذف و اضافه های چند نوکلئوتیدی در فاصله بین مکان های برشی آنزیمها را مشخص می کند، می توان نتیجه گرفت که این نوع جهشها در فاصله نوکلئوتیدهای ۱۲۰ تا ۱۰۹۱ ژن واکسی A1 و نوکلئوتیدهای ۱۷۵ تا ۱۹۲۷ مکان ژنی واکسی B1 نمونه های مورد مطالعه وجود ندارد.

مقایسه توالی نوکلئوتیدی بخش دوم ژن Wx-A1 رقم الوند با توالی ثبت شده این ژن در پایگاه NCBI (شماره دستیابی AB019622) نشان داد که توالی این قطعه با نوکلئوتیدهای ۱۰۱۱ تا ۲۲۳۵ توالی ثبت شده بیش از ۹۹ درصد انطباق دارد و اختلاف آنها مربوط به وجود سه جهش جایگزینی موازی^۴، چهار جهش جایگزینی متقاطع^۵ و اضافه شدن ۶ نوکلئوتید در توالی ژنی رقم الوند می باشد. باتوجه به اینکه ژن Wx-A1 دارای ۱۳ اینترون و ۱۱ اگزون می باشد و با در نظر گرفتن محل قرارگیری جهش های شناسایی شده در توالی ژنی Wx-A1 رقم الوند، مشخص می گردد که تنها جانشینی A با T در نوکلئوتید ۲۰۵۴ در توالی اگزون ژن فوق بوجود آمده است و بقیه جهشها در توالی های اینترونی می باشند. نتیجه مقایسه توالی نوکلئوتیدی قطعه دوم ژن Wx-A1 رقم هامون با توالی ثبت شده در پایگاه NCBI نیز نشان داد که توالی ژن Wx تنها دارای ۴ جهش جایگزینی موازی و یک جهش جایگزینی متقاطع می باشد. از بین جهش های مشاهده شده در توالی هامون نیز سه جهش در اگزون و ۲ جهش در توالی اینترونها قرار داشت. جایگزینی A با G و دو جانشینی A با T به ترتیب در نوکلئوتیدهای ۲۲۷۱، ۲۲۷۲ و ۲۰۵۴ در بخش اگزون قرار گرفته اند.

بر اساس بررسی های بیوانفورماتیکی، مشخص گردید که جایگزینی نوکلئوتید A با T در اگزون ژن Wx-A1 رقم الوند باعث شده است که ۴۵۳ آمینو بنیان آمینواسید آنزیم GBSS آن نسبت به حالت وحشی از تریتوفان (W) به آرژنین (R) تغییر پیدا کند. با وجود آنکه این تغییر اثر چندانی بر وضعیت آبدوستی/آبگریزی^۶ بنیان های آمینو اسیدی نشان نداد (داده های نشان داده نشده) اما ساختمان سه بعدی پروتئین را تغییر داده است (شکل ۲) جهش های شناسایی شده

و Wx-B1 در گندم های ایرانی و همچنین بررسی چند شکلی آنها بوده است. ارقام کرج ۱، کرج ۲، شیراز، کویر و پیشناز (مرسوم جهت کشت در مناطق معتدل)؛ سیستان، دز، بم، داراب^۲ و هامون (مرسوم جهت کشت در مناطق گرم و خشک)؛ اترک، الوند، روشن و شهریار (مرسوم جهت کشت در مناطق سرد)؛ شیروزی (مرسوم جهت کشت در مناطق مرطوب شمال کشور)؛ لاین های پیشرفته D79، N81-18، A و گندم دوروم (تراپلوئید) رقم آریا و E85 جهت مطالعه انتخاب شدند. DNA نمونه ها با استفاده از کیت^۱ GDP. استخراج گردید. آغازگرهای اختصاصی استفاده شده جهت جداسازی تمام طول ژن های Wx-A1، Wx-B1 با یک روش ابتکاری و بر اساس توالی ژن های واکسی A1 و B1 که به ترتیب با شماره های AB019622 و AB019623 در پایگاه اطلاعاتی NCBI^۲ ثبت شده اند، طراحی گردید. به منظور داشتن تمام طول ژن های واکسی، کل طول هر ژن، بوسیله ۲ جفت آغازگر پوشش داده شد (جدول ۱). دو جفت آغازگر استفاده شده جهت تکثیر Wx-A1 به ترتیب نوکلئوتیدهای ۱۲۰ تا ۱۰۹۱ و ۸۵۰ تا ۲۳۳۵ ژن را پوشش می دادند. با استفاده از جفت آغازگر WxB1 (F,R) نوکلئوتیدهای ۱۷۵ تا ۱۰۱۴، و با استفاده از WxB2 (F,R) نیز نوکلئوتیدهای ۹۷۵ تا ۱۹۲۷ ژن WxB1 تکثیر شدند (جدول ۱).

هضم آنزیمی نمونه ها: پس از تکثیر قطعات ژنی مد نظر، به منظور هضم قطعه اول Wx-A1 و Wx-B1 از آنزیم های SalI و PstI استفاده شد. هضم قطعه دوم Wx-A1 با استفاده از آنزیم PstI و صورت گرفت و جهت هضم قطعه دوم Wx-B1 نیز تنها از آنزیم PstI استفاده گردید؛ سپس محصولات هضم آنزیمی روی ژل پلی اکریل آمید ۷ درصد الکتروفورز شدند. به منظور ایجاد تفکیک بهتر بین نمونه ها در حین انجام الکتروفورز، بجای روش مرسوم استفاده از بافر TBE (۰/۵x)، الکتروفورز در حضور بافر TME (۱x) با pH=۶/۸ که دارای قدرت بافری بالاتری است (۱۸)، صورت گرفت.

تعیین توالی و بررسی جهشها: محصول PCR نمونه هایی که در الکتروفورز چند شکلی نشان دادند، جهت تعیین توالی به کشور کره (شرکت ماکرو ژن) ارسال شدند. با هم خط^۳ کردن نتیجه تعیین توالی ها با توالی های موجود در پایگاه NCBI محل و نوع جهشها بررسی گردید. با استفاده از امکانات پایگاه EXPASY نیز ساختار سه بعدی پروتئین های حاصل از جهش و همچنین نمونه های فاقد جهش تعیین و با استفاده از نرم افزار Rasmol با یکدیگر مقایسه شدند.

4- Transition
5- Transversion
6- Hydrophobicity

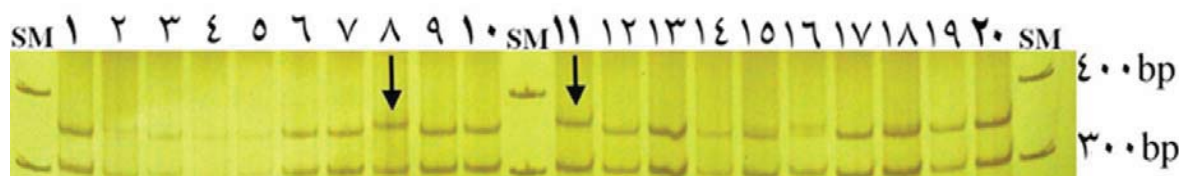
1- Genomic DNA Purification (Fermentas, #K0512)
2- National Center of Biotechnology Information
3- Align

است. بررسی تغییر وضعیت آبدوستی/آبگریزی حاصل از این جانشینی‌ها، نیز تغییرات محسوسی را نشان نداد (داده‌های نشان داده نشده) ولی ساختمان سوم پروتئین به دلیل حذف آمینو اسید پرولین بسیار تغییر کرده است (شکل ۳).

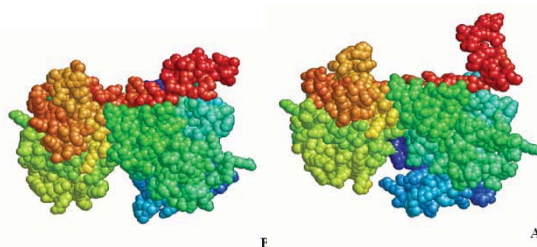
در آگزون‌های رقم هامون نیز باعث تغییر دو بنیان آمینو اسیدی در پروتئین حاصل از آن شده است. تبدیل T به A در نوکلئوتید ۲۰۵۴ باعث تغییر ۴۵۳ آمین بنیان آمینو اسیدی از تریپتوفان (W) به آرژنین (R) و تغییر نوکلئوتیدهای ۲۲۷۱ و ۲۲۷۲ از CG به AA باعث تبدیل پرولین (P) به لیزین (K) در ۴۹۵ آمین بنیان آمینو اسیدی آن شده

جدول ۱- توالی پرایمرهای طراحی شده جهت تکثیر تمام طول ژن‌های Wx-A و Wx-B

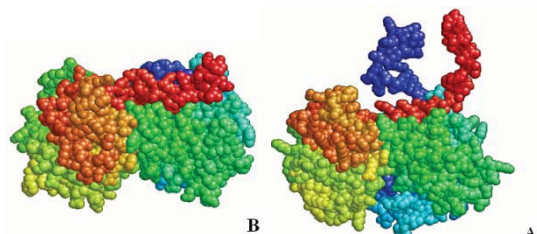
| نام آغازگر | توالی آغازگر (۳.....۵) | دمای اتصال | قطعه تکثیر شده | طول قطعه |
|------------|-----------------------------|------------|----------------|----------|
| WxA1 F | GAA ACC GCA CCG ATT GG | ۶۰ | بخش اول Wx-A1 | ۹۷۱ |
| WxA1 R | GCA CCA AGA TAC AAG GAA GAT | | | |
| WxA2 F | AGC ACT TGA GGT GCC CAG | ۵۸ | بخش دوم Wx-A1 | ۱۴۸۵ |
| WxA2 R | GAG GAT CGA TGA GCA TAC G | | | |
| WxB1 F | CCC CGA AGC AAC AAA GCC | ۵۷ | بخش اول Wx-B1 | ۸۳۸ |
| WxB1 R | GCT GCT GGG TGT TTG | | | |
| WxB2 F | AGA TCA ACA ACA CCC AGC AG | ۵۹ | بخش دوم Wx-B1 | ۹۵۲ |
| WxB2 R | TTG GGG TCG ATG ACG TAC | | | |



شکل ۱ - نتیجه بررسی نیمه دوم ژن Wx-A1 بر اساس تکنیک PCR-RFLP. ارقام مورد بررسی به ترتیب از چاهک شماره ۱ تا ۲۰ عبارتند از ۱- کرج، ۲- مرودشت، ۳- شیراز، ۴- کویر، ۵- پیشتاز، ۶- سیستان، ۷- دز، ۸- هامون، ۹- بیم، ۱۰- داراب، ۱۱- الوند، ۱۲- اترک، ۱۳- روشن، ۱۴- شهریار، ۱۵- شیروزی، ۱۶- آریا و لاین‌های پیشرفته ۱۷-D79، ۱۸-18-N81، ۱۹-A و ۲۰-E85. باندهای دارای چند شکلی ارقام هامون و الوند (چاهک‌های ۸ و ۱۱) با بیکان مشخص شده‌اند.



شکل ۲ - نتیجه شبیه‌سازی ساختمان سوم پروتئین GBSS. A: پروتئین وحشی و B جهش یافته آن در رقم الوند: (پایگاه Expasy و نرم افزار Rasmol)



شکل ۳ - نتیجه شبیه‌سازی ساختمان سوم پروتئین GBSS وحشی و جهش یافته آن در رقم هامون. A: پروتئین وحشی و B: پروتئین جهش یافته (پایگاه Expasy و نرم افزار Rasmol)

بحث

با وجود آنکه اصلاح وضعیت پروتئین‌های ذخیره‌ای نشاسته بر کیفیت نانوائی بسیار موثر می‌باشد اما بهبود نسبت آمیلوز به آمیلوپکتین علاوه بر اهمیت داشتن در افزایش کیفیت فرآورده‌های غذایی مختلف از جمله انواع نان و شیرینی، دارای کاربردهای صنعتی مختلفی نیز می‌باشد (۱۵ و ۲۲). به همین دلیل در بسیاری از برنامه‌های اصلاحی اهمیت و الویت خاصی دارند. برای مثال در برنامه‌های اصلاح کیفیت نانوائی گندم در ژاپن افزایش نسبت آمیلوپکتین آرد مد نظر قرار گرفته است (۲۲). در گذشته از روش‌های نورسنجی مختلفی جهت شناسایی ژن‌های Wx با محتوای آمیلوزی پایین استفاده می‌شد و با وجود آنکه این روش‌ها ساده و نسبتاً کم هزینه بودند اما عدم دقت کافی آنها و در نتیجه پدیدار شدن نتایج نامطلوب از نظر این صفت در طی نسل‌های تفکیک و پیشرفته برنامه‌های بلند مدت اصلاحی، باعث شد که روند استفاده از آن بخصوص در بررسی ارقام نیمه‌واکسی کمرنگ‌تر شود. هرچند روش‌هایی چون تفکیک پروتئین‌های واکسی با استفاده از روش‌های مبتنی بر SDS-PAGE و 2D-PAGE¹ می‌تواند با دقت بسیار بالایی ارقام نیمه‌واکسی را از هم تمیز دهد ولی سختی مراحل خالص سازی نشاسته از آرد و بهینه‌سازی انجام الکتروفورز آن، کاربرد آنها را در برنامه‌های اصلاحی که در آن جمعیت‌های زیادی استفاده می‌شود، بسیار محدود می‌کند (۲۲). روش‌های دیگری همچون آزمون الایزا (۱۳ و ۱۴) و نورسنجی پرتو قرمز دور^۲ (۱۰) نیز که جهت بررسی گندم‌های واکسی و نیمه‌واکسی استفاده شده‌اند، با وجود داشتن دقت مناسب و همچنین امکان انجام مکانیزه برخی از مراحل آنها، به دلیل عدم توانایی در تفکیک موتانت‌های هموزیگوت از هتروزیگوت‌ها محدود به استفاده در موارد خاصی شده‌اند. به علاوه با وجود آنکه شناسایی و مطالعه موتانت‌های واکسی در برخی از گونه‌های گیاهی در قرن نوزدهم میلادی صورت گرفت، اما مطالعه اینگونه موتانت‌ها در گندم هگزاپلوئید به پانزده سال اخیر بر می‌گردد (۲۲) که گاهاً به دلیل پراکندگی بررسی‌ها نیاز به مطالعات بیشتر در این زمینه را دو چندان می‌کند.

در هیچ یک از ارقام مورد بررسی در پژوهش حاضر وجود چندشکلی در مکان ژنی Wx-B1 مشخص نگردید. این نتیجه گیری با نظر ناکامورا و همکاران (۱۹) که مکان جغرافیایی پراکنش آلل‌های Wx-A1b را مربوط به آسیا (ژاپن، کره و ترکیه) و پراکنش اکثر گندم‌های حامل آلل نول Wx-B1 را مربوط به استرالیا می‌دانست انطباق دارد. با وجود آنکه اکثر جهش‌های شناسایی شده در اینترون

ژن‌های مورد بررسی قرار داشتند، اما با توجه به اینکه اثبات شده است که تغییرات در توالی‌های اینترون می‌تواند بر ویرایش یا میزان بیان یک ژن اثر بگذارد (۹ و ۱۶) این نوع جهش‌ها نیز از این جهت دارای اهمیت می‌باشند و نیاز به مطالعه بیشتری دارند.

تغییر ساختار سوم پروتئین GBSS در رقم الوند با توجه به تفاوت نسبی گروه‌های R آمینو اسیدهای جایگزین شده و با توجه به این نکته که بنیان آمینو اسیدهای آگزیر در حین تشکیل ساختمان سوم پروتئین در بخش داخلی قرار گرفته و برهم کنش گروه‌های R آنها با یکدیگر عامل اصلی تشکیل این ساختمان است، قابل توجه می‌باشد (۲۰ و ۲۱). در رابطه با رقم هامون نیز، نظر به استتار بودن ساختار آمینو اسید پرولین در مقایسه با دیگر آمینو اسیدها و همچنین تاثیر آن بر ساختار دوم و سوم پروتئین‌ها و به طبع جایگاه فعال آنها (۲۰ و ۲۱) با قطعیت بیشتری می‌توان نتیجه گرفت که تغییر آمینو اسید پرولین در توالی پلی‌پپتیدی آنزیم GBSS رقم هامون با شدت بیشتری بر فعالیت آن تاثیرگذار باشد. به علاوه با توجه به این نکته که بیش از ۹۵ درصد جهش‌هایی که ساختار پروتئین را تغییر می‌دهند دارای تاثیر منفی بر عملکرد محصول ژن می‌باشند (۲۱)، می‌توان آنزیم GBSS حاصل از ژن Wx-A1 ارقام هامون و الوند را با احتمال بسیار بالاتری به عنوان آلل‌های غیرفعال در نظر گرفت. نتیجه بررسی‌های شاهشوند (۲) بر روی ژن‌های Wx گندم‌های رایج در خراسان فقدان وجود آلل نول در رقم الوند را اثبات کرده بود که با نتایج پژوهش حاضر در تضاد است. این اختلاف در نتیجه گیری می‌تواند ناشی از این باشد که در روش مورد استفاده شاهشوند (۲)، معیار شناسایی آلل نول، عدم تکثیر ژن یا مشاهده حذف و اضافه‌های متعدد در توالی ژن‌های واکسی بوده است در حالی که در پژوهش حاضر این ویژگی بر اساس اثر جهش‌های تک نوکلئوتیدی^۳ بر توالی آمینو اسیدی و ساختمان سوم پروتئین‌ها سنجیده شده است.

در نهایت با توجه به اینکه یکی از اصلی‌ترین علل بالا بودن میزان ضایعات نان در ایران، بیات شدن این فرآورده می‌باشد و همانطور که اشاره شد این ضعف رابطه مستقیمی با نسبت آمیلوز تشکیل دهنده آرد دارد؛ با استفاده از نشاسته‌های واکسی می‌توان آن را به میزان قابل توجهی کاهش داد. به علاوه با توجه به اهمیت نشاسته‌های واکسی به ویژه در کشورهای شرق آسیا، تولید اینگونه آردها و صادرات مستقیم و یا فرآورده‌های حاصل از آنها می‌تواند سهم زیادی در ارز آوری برای کشور داشته باشد. به همین دلیل جهت استمرار این پژوهش و رسیدن به هدف نهایی آن که تولید گندم‌های نیمه‌واکسی و تمام‌واکسی از ارقام بومی می‌باشد، پیشنهاد می‌گردد که وضعیت آلل‌های واکسی A1، B1 و D1 در سایر ارقام بومی،

1- 2 Dimensional Poly Acryl amide Gel Electrophoresis
2- Near Infra-Red Reflectance Spectroscopy

شماره ۱۱۸۳ پ تأمین گردید که بدینوسیله از مساعدت حوزه معاونت پژوهشی دانشکده کشاورزی تشکر و قدردانی می‌گردد. همچنین از آقای دکتر محمد زارع مهرجردی بخاطر راهنمایی‌های ارزنده‌ای که در تحلیل‌های بیوانفورماتیکی داده‌ها ارائه فرمودند، تشکر به عمل می‌آید.

تجاری و ارقام وحشی و خویشاوندان گندم که می‌توانند به عنوان والد بخشنده این ژن در برنامه‌های اصلاحی بکار روند مورد ارزیابی قرار گیرد. همچنین می‌توان با استفاده از روش‌های مختلف جهش‌زایی و یا با استفاده از ارقام نیمه‌واکسی موجود در بانک‌های ژن بین‌المللی و یا با بهره‌گیری از روش‌های مبتنی بر خاموشی ژن امکان تولید گندم‌هایی با محتوای اندک آنزیم GBSS بررسی گردد.

قدردانی

بودجه انجام این طرح از محل پژوهانه دانشگاه فردوسی مشهد به

منابع

- ۱- ابراهیم‌زاده، ش. ۱۳۸۴. بررسی اثر افزودنی‌ها بر خواص رئولوژیکی خمیر، ماندگاری و کیفیت نان بربری حاصل از آردهای تجاری مختلف. پایان نامه دوره کارشناسی ارشد، دانشگاه فردوسی مشهد.
- ۲- شاهشوند، م. ۱۳۸۲. بررسی ژن واکسی (Wx) در گندم‌های هگزاپلوئید رایج در منطقه با استفاده از تکنیک‌های PCR و SDS-PAGE. پایان نامه دوره کارشناسی ارشد، دانشگاه فردوسی مشهد.
- ۳- ولی‌الهی، ا. ۱۳۸۸. جداسازی ژن موثر در تحمل به سرما (Wcor14) از گندم‌های زراعی ایران و بررسی سطح بیان این ژن در تیمارهای سرمایی مختلف. پایان نامه دوره کارشناسی ارشد، دانشگاه شیراز.
- 4- Alejandra, C.M. 1999. Molecular Characterization of Waxy Mutants In Hexaploid Wheat. PhD Thesis. University Of Saskatchewan.
- 5- Alistair, M.S., G.O. Phillips and P.A. Williams. 2006. Food Polysaccharides and Their Applications 2nd Ed. CRC. New York.
- 6- Bachelor, S., E. Booth., G. Entwistle., K. Walker., T. Ap-Rees., A. Hacking., G. Mackay and I. Morrison. 1996. Industrial Marker For UK-Grown Crop Polysaccharids. Home-Grown Cereals Authority Research Rev. 32: 7-14.
- 7- Brown, W.H.; T. Poon. 2005. Introduction To Organic Chemistry. 3rd Ed. Wiley. New York.
- 8- Boyer, C.D., and L.C. Hannah. 1994. Kernel Mutants of Corn. Specialty Corns. 10: 2-28.
- 9- Claustres, M. 2005. Guide to Mutation Detection. 1st Ed. Wiley. New Jersey.
- 10- Delwiche, S.R. 2006. Single Kernel Near-Infrared Analysis of Tetraploid (Durum) Wheat for Classification of the Waxy Condition. Cereal Chemistry. 83: 287-292.
- 11- Eliasson, A.C. 2004. Starch in Food: Structure, Function and Applications. 1st Ed. Woodhead. London.
- 12- Ellis. R.P., M.P. Cochrane., M.F.B. Dale., C.M. Duffus, A. Lynn., I.M., Morrison, R.D.M. Prentice., J.S. Swanston and S.A. Tiller. 1998. Starch Production and Industrial Use. Food Science and Agriculture. 77: 289-311.
- 13- Gale, K.R., M.J. Blundell and A.S. Hill. 2001. Application of a High-Throughput Antibody-Based Assay For Identification of The Granule Bound Starch Synthase Wx-B1b Allele In Australian Wheat Lines. Australian Agriculture. Research. 52: 1417-1423.
- 14- Gale, K.R., M.J. Blundell and A.S. Hill. 2004. Development of a Simple, Antibody-Based Test For Granule Bound Starch Synthase Wx-B1b (Null-4A) Wheat Varieties. Cereal Science. 40: 85-92.
- 15- Graybosch, R.A., K.J. Schemmerhorn., and J.H. Skerritt. 1999. An Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Identification of Wheat Carrying Null Alleles at Genetic Loci Encoding the Granule-Bound Starch Synthase. Cereal Science. 30: 159-163.
- 16- Griffiths, A.J.G., W.M. Gelbart and J.H. Miller. 1999. Modern Genetics Analysis. 7th Ed. Donnelly and Sons. New York.
- 17- Hayakawa, K., K. Tanaka, T. Nakamura., S. Endo and T. Hoshino. 1997. Quality Characteristics of Waxy Hexaploid Wheat (*Triticum Aestivum L.*): Properties of Starch Gelatinization and Retrogradation. Cereal Chemistry. 74: 576-580.
- 18- Kukita, Y., T. Tahira., S.S. Sommer and K. Hayashi. 1997. SSCP Analysis of Long DNA Fragment in Low pH Gel. Human Mutation, 10: 400-407.
- 19- Nakamura, T., M. Yamamori., H. Hirano and S. Hidaka. 1993. Identification of Three Wx Proteins in Wheat. Biochemical Genetics. 31: 75-86.
- 20- Pace, C., B. Shirley., M. McNutt and K. Gajiwala. 1996. Forces Contributing to the Conformational Stability of Proteins. FASEB. 10: 75-83.

- 21- Rose, G., P. Fleming., J. Banavar and A. Maritan. 2006. A Backbone-Based Theory of Protein Folding. Proceedings of Academic National Science. USA. 103: 1623-1633.
- 22- Saito, M., P. Vrinten and T. Nakamura. 2010. DNA Markers for Identifying Waxy Mutations and Improving Noodle Quality in Wheat. Japan International Research Center for Agriculture Science. 44:109-115.
- 23- Smith, A.M., K. Denyer and C. Martin. 1997. The Synthesis of The Starch Granule. Annual Review, Plant Physiology and Plant Molecular. Biology. 48:67-87.
- 24- Yamamori, M., T. Nakamura., T.R. Endo and T. Nagamine. 1994. Waxy Protein Deficiency and Chromosomal Locations of Coding Genes. of Common Wheat. Theoretical and. Applied. Genetics. 89: 179-184.
- 25- Yasui, T., J. Matsuki., T. Sasaki and M. Yamamori. 1996. Amylose and Lipid Contents, Amylopectin Structure, and Gelatinisation Properties of Waxy Wheat (*Triticum Aestivum*) Starch. Cereal Science. 24: 131-137.