مجله بیوتکنولوژی کشاورزی

علمی-پژوهشی و ISC

بررسی تنوع آللی و کیفیت پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر در گندم‌های دوروم

معصومه رجبی هشجین[1]، محمدحسین فتوکیان*[1]، مصطفی آقائی سریرزه[2]، محسن محمدی[2]

[1] دانشکده کشاورزی دانشگاه شاهد، تهران، ایران

[2] موسسه تحقیقات، اصلاح و تهیه نهال و بذر، کرج، ایران

تاریخ دریافت: 1391/10/29، تاریخ پذیرش: 1392/01/21

چکیده

وجود تنوع ژنتیکی بین ژنوتیپ‌ها یک عامل خوب در جهت کاهش آسیب‌پذیری ژنتیکی و تولید پایدار است. پروتئین‌های آندوسپرم دانه در گندم شامل گلوتامین و پرولین هستند که در مجموع پرولین نامیده می‌شوند. زیرواحدهای سنگین گلوتنین عامل عمده کشش پذیری گلوتنین هستند. نحوه توارث زیرواحدهای گلوتنین از قانون توارث مندلی با آلل‌های چندگانه در هر مکان ژنی پیروی می‌کند. شناسایی زیرواحدهای گلوتنین برای غربال ژرم پلاسم گندم با کیفیت بالا مفید است. به منظور بررسی تنوع آللی زیرواحدهای گلوتنین، 116 لاین گندم دوروم متعلق به ایران و شش کشور ایتالیا، یوگسلاوی، پرتغال، افغانستان، بلغارستان و عراق مورد مطالعه قرار گرفتند. گلوتنین‌های استخراج شده از بذر با روش SDS-PAGE الکتروفورز شدند و باندها امتیازدهی و شناسایی شدند. 16 ترکیب آللی شناسایی شد. در مکان ژنی GluA1 68/8% لاین‌ها فاقد آلل (نول) بودند. در 21/6% لاین‌ها آلل 1 و در 12/5% لاین‌ها آلل 2* مشاهده شد. در مکان ژنی GluB1، هشت نوع آلل شناسایی شد. بیشترین فراوانی شامل آلل 20 بود که 42 تا از ژنوتیپ‌ها دارای این آلل بودند. 20 تا از لاین‌ها دارای آلل 17+18 بودند. آل‌های 7+8، 6+8 و 7 به ترتیب در 21 ، 12 و 7 ژنوتیپ مشاهده شدند. هم‌چنین آلل 22 و 7+9 هر کدام یک بار در لاین‌ها مشاهده شدند. در یکی از لاین‌های بومی کشور پرتغال در مکان ژنی GluB1 یک آلل منحصر به فرد مشاهده شد که با مدل امتیازدهی مرسوم مطابقت نداشت. تجزیه کلاستر لاین‌ها را به 9 گروه تقسیم کرد. تنوع ژنتیکی مکان ژنی GluA1 برابر 0/42 و در مکان ژنی Glu-B1 برابر با 0/81 شد. هم‌چنین تنوع ژنتیکی متوسط مکان‌های ژنی 0/05 برآورد شد. میانگین امتیاز ژنومی HMW-GS بین 6-2 بود.

کلمات کلیدی: *تنوع ژنتیکی، گلوتنین، دوروم، SDS-PAGE, HMW-GS*

* نویسنده مسئول: محمدحسین فتوکیان تلفن: 09124238603 Email: fotokian@yahoo.com

مقدمه

مصرف سرانه و خوراکی گندم در ایران به طور متوسط برای جوامع شهری و روستائی 170 کیلوگرم است. اهمیت اقتصادی گندم ایجاب می-کند تا هر گونه راهکاری برای بهینه کردن تولید و مصرف این محصول در کشور مورد ارزیابی و کاربرد قرار گیرد. پس از ابداع نشانگرهای مولکولی و توسعه و تکامل آنها در دهه‌های اخیر انتخاب در بین لاین‌ها یا نتاج حاصل از تلاقی‌ها با استفاده از نشانگرهای مولکولی در برنامه‌های به‌نژادی فراگیر شده است. در این بین استفاده از نشانگرهای پروتئینی برای بررسی تنوع ژنتیکی گندم به دلیل ارزان بودن و در دسترس بودن تمامی امکانات مورد نیاز آن بسیار رواج دارد. بررسی پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر گندم به دلیل اینکه کمتر تحت تاثیر محیط است می‌تواند اطلاعات درست و قابل اعتمادی از تنوع ژنتیکی ژنوم گندم در اختیار ما قرار دهد. گلوتنین‌ها بر اساس وزن مولکولی که در محدوده 300-1000 کیلودالتون است (Liu *et al.*, 1996) به دو گروه گلوتنین‌های با وزن مولکولی بالا (HMW-GS) و گلوتنین‌های با وزن مولکولی پایین (LMW-GS) تقسیم می‌شوند. تحقیقات نشان داده که HMW-GS بر روی حداکثر مقاومت خمیر و LMW-GS روی کشش پذیری خمیر تاثیر دارند (Gupta, 1989). بیشتر زیر واحدها (60 تا 80 درصد گلوتنین) LMW-GS های با وزن 30 الی 50 هزار دالتون هستند. اینها بر اساس وزن مولکولی و نقاط ایزوالکتریک، به دو زیر واحد B و C تقسیم بندی می‌شوند. زیر واحدهای سبک گلوتنین بوسیله ژن‌های قرار گرفته بر روی لوکوس‌های Glu-A3، Glu-B3 و Glu-B2 کروموزوم شماره یک، کد می‌شوند. دیگر زیرواحدها، زیرواحدهای HMW-GS هستند که با وزن مولکولی 80 تا 120 هزار دالتون، بوسیله ژن‌های واقع در لوکوس Glu-1 کروموزوم شماره یک کد می‌شوند. چهار ژن HMW-GS در گندم دوروم وجود دارند، اما به سبب خاموشی ژن، اغلب ژنوتیپ‌ها تنها حاوی یک تا سه زیر واحد هستند (Payne *et al.*, 1981). تنوع در زیرواحدهای HMW-GS در ارقام مختلف گندم تاثیرات متفاوتی بر کیفیت گلوتن در گندم هگزاپلوئید گذاشته است. در مکان ژنی GluA1 پلی‌مورفیسم کمتری نسبت به مکان ژنی GluB1 مشاهده شده است و با سه آلل اصلی a، b وc نشان داده می‌شود (Payne and Lawrence, 1983). این آلل‌ها به ترتیب با نام‌های زیر شناخته می‌شوند:1، 2* و نول (Thompson *et al.*, 1983). مطالعات مولکولی نشان داد که در هر مکان ژنی Glu-B1 دو نوع آلل وجود دارد (Payne, 1987). یکی با وزن مولکولی بالاتر به نام گروه x و دیگری با وزن مولکولی پایین‌تر به نام گروه y (Harberd *et al.*, 1986). با توجه به رابطه بین Glu-B1x با کیفیت پخت نان، شواهد نشان داد که B1x7+B1y8, B1x7+B1y9 و B1x17+B1y18 با کیفیت مطلوب پخت نان در ارتباطند، در حالی

که زیر واحدهای B1x20 و B1x6+B1y8 اثرات نامطلوبی بر کیفیت آرد دارند (Yang *et al.*, 1991). زیر واحد 1Bx14+1By15 تاثیر مثبتی بر کیفیت نهایی ارقام گندم‌های چینی داشت (Zhu *et al.*, 2005). اگر چه شواهد مولکولی نشان داد که B1x14 بسیار مشابه با B1x20 داشت (Liu and Shepherd, 1996). در غیاب ژنوم D در گندم دوروم، نسبت به گندم نان برای سیستم امتیاز دهی کمتر مناسبند (Igrejas *et al.*, 1999). آزمایش رسوب SDS و مقدار پروتئین در گندم دوروم، نشان داد که B1x7+B1y8 بهترین و بعد از آن به ترتیب، B1x23+B1y18، B1x13+B1y16 و در نهایت، B1x6+B1y8 کمترین مطلوبیت را دارند (Tarekegne and Labuschagne, 2005). هدف از این تحقیق بررسی تنوع آللی و ارزیابی کیفیت زیرواحدهای گلوتنین در ژنوتیپ‌های گندم دوروم است.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق 116 لاین بومی گندم دوروم متعلق به ایران و شش کشور ایتالیا، عراق، افغانستان، بلغارستان، یوگسلاوی و پرتغال که در بانک ژن گیاهی ملی ایران موجود بودند مورد ارزیابی قرار گرفتند. بذور انتخابی پس از جدا کردن جنین به خوبی کوبیده شدند. برای استخراج گلوتنین‌ها از روش گام به گام Singh *et al.* (1991) استفاده شد. ابتدا به هر نمونه200 میکرولیتر الکل 70% اضافه شد و به مدت یک ساعت در حمام آب گرم 60 درجه سانتیگراد قرار داده و پس از ورتکس به مدت پنج دقیقه سانتریفیوژ شدند. مایع رویی دور ریخته شد و یک میلی‌لیتر پروپانول 50% اضافه شده، نمونه‌ها به مدت نیم ساعت در دمای 60 درجه سانتیگراد قرار داده شدند و پس از ورتکس، سانتریفیوژ شده و مایع فوقانی دور ریخته شد. این مرحله دو بار تکرار شد. به نمونه نیم میلی‌لیتر پروپانول 50% اضافه شده و پس از پنج دقیقه سانتریفیوژ مایع فوقانی دور ریخته شد. در ادامه یک میلی‌لیتر DTT[1] یک درصد همراه با بافر استخراج شامل Tris Hcl pH=8 و پروپانول اضافه شده و نمونه‌ها به مدت نیم ساعت در دمای 60 درجه سانتیگراد قرار داده شده و سپس دو دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس یک میلی‌لیتر بافر استخراج اضافه شده و نمونه‌ها به مدت 15 دقیقه در دمای 60 درجه سانتیگراد قرار داده شدند. پس از دو دقیقه سانتریفیوژ مایع رویی به یک تیوپ دیگر منتقل شد. نمونه‌ها بر روی ژل 10% بر اساس روش Payne *et al.* (1987) الکتروفورز شدند. نام‌گذاری زیر واحدها طبق روش Payne and Lawrence (1983) انجام شد.

1- Dithiotheriol

از ارقام استاندارد فلات و الوند برای امتیازدهی دقیق استفاده شد. هم‌چنین امتیاز کیفیت آرد بر اساس روش امتیازبندی Payne *et al.* (1987) تعیین گردید. برای بررسی تنوع ژنتیکی از فراوانی نسبی آلل‌ها در هر مکان ژنی و شاخص Nei (1987) استفاده شد. در این فرمول اگر pi فرارانی نسبی آللiام در یک مکان ژنی در لاین‌های مورد بررسی باشد، تنوع ژنتیکی (ξ) در این مکان ژنی از طریق فرمول زیر محاسبه شد:

$$\xi=1-\Sigma pi^2$$

هم‌چنین برای بررسی تنوع ژنتیکی (H) متوسط از فرمول Nei (1987) استفاده شد.

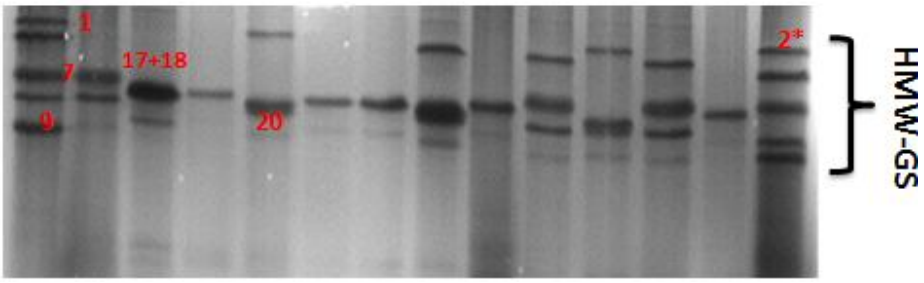
$$H=\frac{N}{N-1}\times\frac{\sum_j\left(1-\sum_i p_{ij}^2\right)}{N_j}$$

در این فرمول N تعداد لاین، p_{ij}^2 فراوانی نسبی آلل iام از مکان ژنی J ام و N_j تعداد مکان-های ژنی است. برای تجزیه و تحلیل دادهها از نرم-افزار spss استفاده شد.

نتایج و بحث

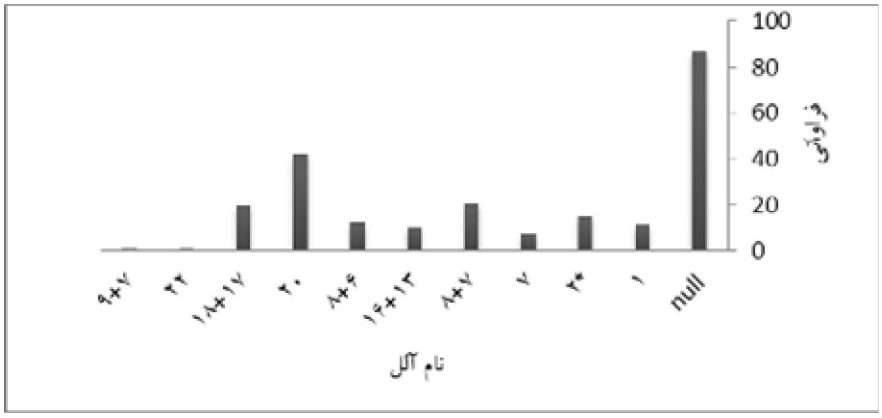
الگوی الکتروفورزی تعدادی از لاین‌های گندم مورد ارزیابی در شکل یک نشان داده شده است. همانگونه که مشاهده می شود، سه آلل در مکان ژنی GluA1 و هشت آلل در مکان ژنی GluB1 شناسایی شدند و در این لاین‌ها 16 ترکیب آللی مشاهده شد. در مکان ژنی GluA1، آلل نول دارای بیشترین فراوانی بود. سپس آلل یک بیشترین فراوانی را داشت. فراوانی آلل‌های نول، 1 و *2، به ترتیب، 68/8%، 21/6% و 12/5% بود. در یک بررسی روی 40 توده گندم بومی کشور رومانی عنوان شد که آلل نول دارای بیشترین فراوانی است (Popa *et al.*, 2003). در مکان ژنی GluB1، آلل 20 دارای بیشترین فراوانی بود و 42 تا از ژنوتیپ‌ها دارای این آلل بودند. سپس آلل 17+18 بیشترین فراوانی را به خود اختصاص داده بود و 20 تا از لاین‌ها واجد این آلل بودند. این آلل، یک آلل پر کیفیت محسوب می‌شود. بعد از آن، آلل 7+8، با داشتن 16 لاین، در رتبه سوم فراوانی قرار داشت. سپس آلل 6+8، 12 بار در لاین‌ها تکرار شده بود. آلل 13+ 16، در10 لاین مشاهده شد. تعداد هفت لاین دارای آلل 7 بودند. آلل‌های 22 و 7+9 هر کدام فقط یک بار در لاین‌ها دیده شدند. شکل دو نشان‌دهنده فراوانی زیرواحدهای گلوتنین است. در بررسی 43 لاین امید بخش گندم نان با استفاده از روش SDS-PAGE، 14 نوع آلل و21 ترکیب آللی مشاهده شد (Bahraie, 1992). در بررسی 86 لاین و رقم گندم نان موجود در برنامه‌های به‌نژادی کشور 14 نوع آلل و 31 ترکیب آللی شناسایی شد (Bahraie, 1992). در بررسی 183 لاین و رقم گندم مشاهده شد که 60% آلل‌ها دارای امتیاز بالای کیفی بودند (Najaphian *et al.*, 1986). طی تحقیقی که روی 153 رقم اسپانیایی انجام شده بود سه آلل در مکان ژنی GluA1 و هشت آلل در مکان

ژنی GluB1 گزارش شد (Ruiz and Carrillo, 1993). بهتر است در برنامه‌های اصلاحی، از لاین-هایی که واجد آلل 2^* و 1 در مکان ژنی GluA1 و آلل‌های 17+18 و 7+8 در مکان ژنی GluB1 هستند استفاده شود. در این بررسی، در مکان ژنی GluA1، 68/8% لاین‌ها دارای آلل نول بودند. در حالیکه در بررسی که در 86 لاین و رقم گندم نان انجام شده بود فقط 36% ارقام و لاین‌ها دارای آلل نول بودند (Bahraie, 1992). هم چنین در بررسی که بر روی 400 ژنوتیپ گندم نان انجام شده بود فراوانی آلل نول فقط 9% بود (Popa *et al.*, 2003). در یک بررسی که بر روی 40 رقم انجام شده بود، 50% شامل آلل نول و 42/5% دارای آلل 2^* بودند و فراوانی آلل 1، فقط 7/5% بود (Bellil *et al.*, 2012). در مطالعه‌ای که بر روی 96 نمونه گندم بومی دوروم انجام شده بود مشخص شد که در مکان ژنی GluA1 بیشترین فراوانی مربوط به آلل نول بود (Rashidi *et al.*, 1997 Monfared). این نتیجه در مطالعات قبلی که روی گندم دوروم انجام شده بود نیز مشاهده شد (Raciti *et al.*, 2003; Ram, 2003). در این تحقیق در مکان ژنی GluB1 آلل 20 دارای بیشترین فراوانی بود. در یک تحقیق روی 96 نمونه گندم در این مکان ژنی بیشترین فراوانی به آلل‌های 7 و 20 تعلق داشت (Rashidi Monfared *et al.*, 1997). طی یک مطالعه مشخص شد که آلل 20 تاثیر منفی روی ور آمدن و استحکام گلوتن دارد (Carrillo *et al.*, 1990). در این بررسی در مکان ژنی GluB1 13/8% لاین‌ها دارای آلل 7+8 بودند. هم‌چنین آلل 17+18 در 17/3% لاین‌ها مشاهده شد. در حالی که در بررسی Bellil *et al.* (2012)، آلل‌های 7+8 و 17+18 در 2/5% ارقام دیده شدند.



شکل1- الگوی الکتروفورزی برخی از لاین‌های گندم دوروم.

Figure1- Electrophoretic pattern of durum wheat lines.



شکل 2- فراوانی آلل‌های مختلف زیرواحدهای گلوتنین در ژنوتیپ‌های گندم دوروم مطالعه شده.

Figure 2- Frequency of Glutenin subunits of different alleles in Studied genotypes of durum wheat .

به هر یک از لاین‌ها بر اساس وجود یا عدم وجود هر آلل، امتیاز صفر و یک داده شد و تجزیه کلاستر با استفاده از نرم‌افزار SPSS و به روش WARD انجام شد که نتیجه آن تقسیم بندی لاین‌ها به نه گروه بود. نتایج حاصل از این تجزیه در جدول دو آمده است. به منظور انتخاب لاین‌های برتر از نظر زیرواحدهای گلوتنین، میانگین امتیاز ژنومی هر گروه به طور جداگانه محاسبه گردید که نتیجه آن در جدول 3 آمده است.

با توجه به گروه بندی ژنوتیپ‌ها، اغلب ژنوتیپ-های دارای آلل پر کیفیت در گروه چهار، پنج و هشت قرار دارند. در این بررسی تنوع ژنتیکی مکان ژنی GluA1 برابر 0/42 و در مکان ژنی GluB1 برابر با 0/81 شد. هم‌چنین تنوع ژنتیکی متوسط 0/05 به دست آمد. در تحقیقی که روی 856 لاین گندم دوروم انجام شده بود برای مکان ژنی GluA1 تنوع ژنتیکی 0/04 و برای مکان ژنی GluB1 عدد 0/57 را به دست آمد (Hamdi *et al.*, 2010). هم-چنین در بررسی که روی 30 توده بومی زنجان انجام شده بود میزان تنوع ژنتیکی در مکان ژنی Glu-A1، Glu-B1،Glu-D1 و تنوع ژنتیکی متوسط را به ترتیب 0/27، 0/8، 0/586 و 0/87 به دست آمد (Mohammadi *et al.*, 1997). نتایج نشان می-دهد که ژنوتیپ‌های بررسی شده تنوع ژنتیکی بالایی دارند و مشابه با نتایج به دست آمده از مطالعه گندم‌های وحشی اسپانیایی (Pflüger *et al.*, 2001; Alvarez *et al.*, 2007) و ارقام گندم دورم ایتالیایی و ترکیه‌ای بودند (Turchetta *et al.*, 1995) هم‌چنین تنوع موجود در این لاین‌ها از ارقام گندم دورومی که Carrillo *et al.* (1990) و Lerner *et al.* (2004) بررسی کرده بودند بیشتر بود.

جدول1- نوع آلل در مکان‌های ژنی Glu-A1 و Glu-B1 و امتیاز کیفی لاین‌های بومی دوروم.

Table 1- Glu-A1 and Glu-B1 alleles and rated quality of native durum wheat.

شماره Number	کد ژنوتیپ Genotype code	منشا Origin	GLUA1	GLUB1	امتیاز اللی Allelic score	امتیاز ژنومی Genomic score
1	Wc-3122	خراسان Khorasan	2*	17+18	3+3	6
2	Wc-4012	خراسان Khorasan	Null	13+16	3+1	4
3	Wc-4279	خراسان Khorasan	1	20	1+3	4
4	Wc-4303	خراسان Khorasan	Null	20	1+1	2
5	Wc-4303	خراسان Khorasan	Null	20	1+1	2
6	Wc-4303	خراسان Khorasan	Null	20	1+1	2
7	Wc-45704	خراسان Khorasan	Null	20	1+1	2
8	Wc-45648	یوگوسلاوی Yugoslavia	Null	21	1+1	2
9	Wc-45648	یوگوسلاوی Yugoslavia	Null	6+8	1+1	2
10	Wc-45620	افغانستان Afghanistan	Null	20	1+1	2
11	Wc-45620	افغانستان Afghanistan	Null	20	1+1	2
12	Wc-45620	افغانستان Afghanistan	Null	20	1+1	2
13	Wc-45619	افغانستان Afghanistan	Null	6+8	1+1	2
14	Wc-45425	افغانستان Afghanistan	Null	20	1+1	2

	New		Null	پرتغال Portuguese	Wc-45501	**15**
2	1+1	13+16	Null	افغانستان Afghanistan	Wc-45501	**16**
2	1+1	20	Null	پرتغال Portuguese	Wc-45505	**17**
2	1+1	6+8	Null	پرتغال Portuguese	Wc-45566	**18**
2	1+1	7	Null	بلغارستان Bulgaria	Wc-47208	**19**
2	1+1	20	Null	بلغارستان Bulgaria	Wc-47191	**20**
2	1+1	7	Null	بلغارستان Bulgaria	Wc-47191	**21**
6	3+3	17+18	1	بلغارستان Bulgaria	Kc- 525	**22**
6	3+3	17+18	1	بلغارستان Bulgaria	Kc- 525	**23**
4	3+1	17+18	Null	لرستان Lorestan	Kc- 642	**25**
2	1+1	20	Null	لرستان Lorestan	Kc- 643	**26**
2	1+1	20	Null	لرستان Lorestan	Kc- 643	**27**
2	1+1	7	Null	لرستان Lorestan	Kc- 643	**28**
6	3+3	17+18	2*	لرستان Lorestan	Kc-655	**29**
4	3+1	7+8	Null	لرستان Lorestan	Kc- 656	**30**
4	3+1	7+8	Null	لرستان Lorestan	Kc- 659	**31**
4	1+3	20	2*	لرستان Lorestan	Kc-660	**32**
2	1+1	13+16	Null	لرستان Lorestan	Kc- 678	**33**

2	1+1	20	Null	لرستان Lorestan	Kc- 874	**34**
2	1+1	20	Null	کرمانشاه Kermanshah	Kc- 874	**35**
6	3+3	17+18	2*	کرمانشاه Kermanshah	Kc- 911	**36**
4	3+1	17+18	Null	کرمانشاه Kermanshah	Kc- 951	**37**
4	1+3	20	2*	کرمانشاه Kermanshah	Kc- 962	**38**
2	1+1	13+16	Null	کرمانشاه Kermanshah	Kc- 963	**39**
4	3+1	17+18	Null	عراق Iraq	Kc- 963	**40**
4	3+1	7+8	Null	عراق Iraq	Kc-1429	**41**
4	3+1	7+8	Null	عراق Iraq	Kc-1430	**42**
4	3+1	7+8	Null	خوزستان Khuzestan	Kc-1431	**43**
2	1+1	13+16	Null	خوزستان Khuzestan	Kc-1477	**44**
2	1+1	20	Null	خوزستان Khuzestan	Kc-1477	**45**
2	1+1	22	Null	خوزستان Khuzestan	Kc-1477	**46**
4	1+3	20	2*	خوزستان Khuzestan	Kc-1548	**47**
2	1+1	20	Null	اصفهان Isfahan	Kc-1901	**48**
4	3+1	17+18	Null	اصفهان Isfahan	Kc-1915	**49**
2	1+1	20	Null	اصفهان Isfahan	Kc-1915	**50**
4	3+1	7+8	Null	خراسان Khorasan	Kc-3075	**51**

4	3+1	7+8	Null	خراسان Khorasan	Kc-3081	**52**
6	3+3	17+18	2*	خراسان Khorasan	Kc-3082	**53**
2	1+1	20	Null	خراسان Khorasan	Kc-3366	**54**
2	1+1	20	Null	خراسان Khorasan	Kc-3366	**55**
2	1+1	20	Null	خراسان Khorasan	Kc-3366	**56**
4	1+3	20	1	خراسان Khorasan	Kc-3417	**57**
2	1+1	20	Null	خراسان Khorasan	Kc-3431	**58**
2	1+1	13+16	Null	خراسان Khorasan	Kc-3431	**59**
2	1+1	6+8	Null	خراسان Khorasan	Kc-3570	**60**
4	1+3	20	2*	خراسان Khorasan	Kc-3634	**61**
6	3+3	7+8	1	خراسان Khorasan	Kc-3637	**62**
6	3+3	17+18	1	خراسان Khorasan	Kc-3638	**63**
4	3+1	17+18	Null	خراسان Khorasan	Kc-3642	**64**
6	3+3	17+18	2*	کرمانشاه Kermanshah	Kc-3642	**65**
2	1+1	20	Null	کرمانشاه Kermanshah	Kc-3653	**66**
6	3+3	7+8	2*	کرمانشاه Kermanshah	Kc-3653	**67**
2	1+1	20	Null	کرمانشاه Kermanshah	Kc-3654	**68**
6	3+3	7+8	1	کرمانشاه Kermanshah	Kc-3654	**69**

4	3+1	7+8	Null	کرمانشاه Kermanshah	Kc-3659	**70**
4	3+1	7+8	Null	کرمانشاه Kermanshah	Kc-3659	**71**
4	3+1	7+8	Null	کرمانشاه Kermanshah	Kc-3661	**72**
2	1+1	20	Null	کرمانشاه Kermanshah	Kc-4128	**73**
2	1+1	20	Null	کرمانشاه Kermanshah	Kc-4128	**74**
4	3+1	17+18	Null	کرمانشاه Kermanshah	TN-12501	**75**
4	3+1	17+18	Null	اردبیل Ardebil	TN-12501	**76**
2	1+1	7	Null	اردبیل Ardebil	TN-12567	**77**
4	3+1	7+8	Null	اردبیل Ardebil	TN-12567	**78**
2	1+1	20	Null	اردبیل Ardebil	TN-12571	**79**
4	3+1	17+18	Null	کرمانشاه Kermanshah	TN-12590	**80**
2	1+1	7	Null	کرمانشاه Kermanshah	TN-12595	**81**
4	3+1	7+8	Null	کرمانشاه Kermanshah	TN-12595	**82**
2	1+1	20	Null	کرمانشاه Kermanshah	TN-12607	**83**
6	3+3	7+8	2*	همدان Hamadan	TN-12631	**84**
6	3+3	13+16	2*	همدان Hamadan	TN-12635	**85**
6	3+3	17+18	1	همدان Hamadan	TN-12635	**86**
4	3+1	7+8	Null	همدان Hamadan	TN-12667	**87**

4	3+1	17+18	Null	همدان Hamadan	TN-12668	**88**
2	1+1	6+8	Null	خوزستان Khuzestan	TN-12673	**89**
4	3+1	7+8	Null	خوزستان Khuzestan	TN-12707	**90**
2	1+1	20	Null	خوزستان Khuzestan	TN-12715	**91**
2	1+1	20	Null	خوزستان Khuzestan	TN-12715	**92**
2	1+1	20	Null	خوزستان Khuzestan	TN-12716	**93**
2	1+1	20	Null	اردبیل Ardebil	TN-12716	**94**
2	1+1	20	Null	اردبیل Ardebil	TN-12721	**95**
2	1+1	20	Null	اردبیل Ardebil	TN-12721	**96**
2	1+1	7	Null	اردبیل Ardebil	TN-12737	**97**
2	1+1	20	Null	لرستان Lorestan	TN-12761	**98**
4	3+1	17+18	Null	لرستان Lorestan	TN-12763	**99**
2	1+1	20	Null	لرستان Lorestan	TN-12763	**100**
2	1+1	20	1	لرستان Lorestan	TN-12808	**101**
4	3+1	7+8	Null	لرستان Lorestan	TN-12820	**102**
2	1+1	6+8	Null	لرستان Lorestan	P.S.No3	**103**
2	1+1	6+8	Null	لرستان Lorestan	P.S.No3	**104**
4	1+3	20	2*	ایتالیا Italy	P.S.No17	**105**

4	1+3	20	2*	ایتالیا Italy	P.S.No18	**106**
4	3+1	13+16	Null	ایتالیا Italy	P.S.No18	**107**
2	1+1	6+8	Null	ایتالیا Italy	P.S.No19	**108**
2	1+1	6+8	Null	ایتالیا Italy	P.S.No19	**109**
6	3+3	17+18	1	ایتالیا Italy	P.S.No19	**110**
2	1+1	6+8	Null	ایتالیا Italy	P.S.No21	**111**
2	1+1	6+8	Null	ایتالیا Italy	P.S.No21	**112**
2	1+1	7	1	ایتالیا Italy	P.S.No27	**113**
2	1+1	7	Null	ایتالیا Italy	P.S.No29	**114**
4	3+1	7+8	Null	ایتالیا Italy	P.S.No29	**115**
4	3+1	13+16	Null	ایتالیا Italy	P.S.No29	**116**

جدول 2- گروه بندی حاصل از تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌های گندم دوروم مطالعه شده.

Table 2- Grouping of studied durum wheat genotypes based on cluster analysis result.

نام گروه Group name	شماره ژنوتیپ Genotype number
1	45-59-8-15-58-43-2-115-84
2	27-20-80-76-18-112-96
3	102-13-88-17-107-103-9-111-108
4	41-40-50-42-66-51-70-68-77-71-83-81-30-114-89
5	24-22-35-28-48-39-64-52-75-74-87-79-21-109-98
6	110-113-101-57-3-86-69-23-63-62
7	53-47-67-65
8	106-61-29-38-32-1-85-36
9	4-5-6-7-11-10-12-14-16-19-25-26-31-33-34-37-44-46-49-54-55-56-60-72-73-78-82-90-91-92-93-94-95-97-99-100-104-105

جدول3- میانگین امتیاز ژنومی گزوه‌های حاصل از تجزیه کلاستر گندم‌های دوروم مطالعه شده.

Table 3- Average rating studied durum wheats and their genomic groups based on cluster analysis.

شماره گروه Group number	**میانگین امتیاز ژنومی** Average of genomic score	**شماره گروه** Group number	**میانگین امتیاز ژنومی** Average of genomic score
1	2.6	6	3.6
2	2	7	2
3	2	8	4.2
4	4.4	9	2.4
5	4.9	-	

جدول3) فراوانی نسبی آلل‌ها و تنوع ژنتیکی نمونه‌های مورد بررسی بر اساس شاخص نئی.

Table 3- The relative frequency of alleles and genetic diversity of samples according to the Nei index.

مکان ژنی Gene locuse	آلل Allele	فراوانی نسبی relative frequency	تنوع ژنتیکی genetic diversity	تنوع ژنتیکی متوسط Average genetic diversity
	Null	0.75		
GluA1	1	0.09	0.42	
	2*	0.14		
	20	0.36		
	7+8	0.13		0.05
	7+9	0.008		
GluB1	13+16	0.08	0.81	
	7	0.06		
	17+18	0.36		
	22	0.008		
	6+8	0.1		

با توجه به نتایج به دست آمده از این تحقیق مشاهده شد که گندم‌های دوروم مطالعه شده در مکان ژنی Glu-A1 بیشتر واجد آلل نول هستند. این مسئله شاید به این دلیل باشد که تحت تاثیر گزینش طبیعی قرار گرفته‌اند. مطالعات مختلف بر روی تاثیر پرولامین‌ها بر روی کیفیت گندم دوروم که با روش‌های حجم رسوب SDS، میکسوگراف و اندازه گیری مقدار پروتئین انجام شده بود (Brites and Carrillo, 2001; Martinez *et al.*, 2005) نشان داد که در مکان ژنی GluA1 آلل‌های 2* و 1 و در مکان ژنی GluB1 آلل‌های 7+8، 17+18، تاثیر مثبتی روی کیفیت نانوایی دارند. با توجه به این مسئله که نان حاصل از گندم دوروم در افراد مبتلا به بیماری سلیاک (نوعی بیماری ژنتیکی که افراد قادر به هضم گلوتن نان نیستند)، مسمومیت کمتری ایجاد می‌کند که این امر دلیل خوبی برای تولید نان از گندم دوروم است (Troncone and Auricchio, 1991). بنابراین بهتر است در برنامه‌های اصلاحی در جهت افزایش کیفیت نانوایی گندم‌های دوروم از لاین‌هایی که واجد آلل 2* و 1 در مکان ژنی Glu-A1 و آلل‌های 17+18 و 7+8 در مکان ژنی Glu-B1 هستند

استفاده شود. در این بررسی 13 لاین دارای این آلل‌های پر کیفیت در هر دو مکان ژنی بودند که 12 تای آنها بومی ایران هستند. با توجه به این مسئله که این دو مکان ژنی دارای اثرات افزایشی هستند انتخاب ژنوتیپ‌هایی که در هر دو مکان ژنی دارای آلل‌های پر کیفیت هستند کیفیت نهایی را بیشتر افزایش خواهد داد. هدف نهایی از بررسی پتانسیل ژنتیکی نمونه‌هایی که در بانک‌های ژرم پلاسم ذخیره شده‌اند ولی کمتر مورد توجه قرار گرفته‌اند این است که بتوان با یک تصمیم آگاهانه از فرسایش ژنتیکی آنها که بالاتر از حد انتظار است جلوگیری کرد (Virchow 1999; Hammer 2003). **هم‌چنین** مطالعات متعدد نشان داده اند که نگهداری و حفظ ژرم پلاسم بانک‌های ژن نیازمند این است که اطلاعات دقیق و کاملی در مورد پتانسیل ژنتیکی نمونه‌های موجود در آنها به دست آورد (Steiner *et al.* 1997; Bo¨rner *et al.* 2000). با توجه اطلاعات به دست آمده از این تحقیق که بر روی 116 لاین خالص گندم دوروم انجام شده بود و قبل از این تحقیق نیز هیچ بررسی بر روی پتانسیل ژنتیکی این ژنوتیپ‌ها انجام نشده بود، این نتایج می‌تواند کمک شایانی در جهت تکمیل اطلاعات در مورد پتانسیل ژنتیکی و تصمیم گیری صحیح در جهت حفظ تنوع ژنتیکی بالای این ژنوتیپ‌ها به بانک ژن ملی گیاهی ایران نماید.

سپاسگزاری

نویسندگان از بخش غلات موسسه تحقیقات، اصلاح وتهیه نهال و بذر به دلیل حمایت و در اختیار گذاشتن امکانات برای انجام این تحقیق سپاسگزاری می‌نمایند.

منابع

Avarez J, Martin A, Martn LM (2001). Variation in the high-molecular-weight glutenin subunits coded at the Glu-H 1 locus in *Hordeum chilense*. Theoretical and Applied Genetics 102: 134-137.

Bahraie S (2002). Iranian bread wheat quality evaluation on heavy subunits of glutenin. Iranian Journal of Agricultural Science 5: 215-204.

Bellil I, Chekara Bouziani M, Khelifi D (2012). Genetic Diversity of High and Low Molecular Weight Glutenin Subunits in Saharan Bread and Durum Wheats from Algerian Oases. Czech Journal of Plant Breading 48: 23-32.

Bo¨rner A, Chebotar S, Korzun V (2000). Molecular characterization of the integrity of wheat (*Triticum aestivum* L.) germplasm after long-term maintenance. Theoretical and Applied Genetics 100: 494-497.

Boggini C and Pogna NE (1989). The bread making quality and storage protein composition of Italian durum wheat. Cereal Science 9:131-138.

Branlard J, Autran J, Monneveux P (1989). High molecular weight subunit in durum wheat (*T. durum*). Theoretical and Applied Genetics 18:353-358.

Brites C, Carrillo JM (2001). Influence of High molecular weight (HMW) and Low molecular weight (LMW) glutenin subunits controlled by Glu-1 and Glu-3 loci on durum wheat quality. Cereal Chemistry 78: 59–63.

Carrillo JM, Vazquez JF, Orkellana J (1990). Relationship Between Gluten Strength and Glutenin Proteins in Durum Wheat Cultivars. Plant Breeding 104: 325–333.

Gupta RB, and Shepherd KW (1990). Two-step one-dimensional SDS-PAGE analysis of LMW subunits of glutenin. 1. Variation and genetic control of the subunits in hexaploid wheats. Theoretical and Applied Genetics 80: 65–74.

Hamdi W, Bellil I, Branlard G, Khelifi D (2010). Genetic variation and geographical diversity for seed storage proteins of seventeen durum wheat populations collected in Algeria. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca 38: 22–32.

Hammer K (2003). A paradigm shift in the discipline of plant genetic resources. Genetic resources and crop evolution 50: 3–10.

Harberd NP, Bartels D, Thompson RD (1986). DNA restriction fragment variation in the gene family encoding high-molecularweight (HMW) glutenin subunits of wheat. Biochemical Genetics 24:579–592.

Hosseinian Khoshru H, Bihamta M, Hasani A, Omidi M (2009). Low-molecular-weight glutenin subunits allelic variation on bread wheat genotypes business (*Triticum aestivum*) using specific markers. Crop Science 42: 354-345.

Igrejas G, Guedes-Pinto, H., Carnide, V (1999). Seed storage protein diversity in triticale varieties commonly grown in Portugal. - Plant Breeding 118: 303-306.

Izadi Darbandi A, Yazdi Samadi B, Abde Mishani A, Shahriari F (2001). Polymorphism electrophoresis of wheat cultivars with low molecular weight glutenin subunits. Journal of Agricultural Science 33: 37-41.

Lerner SE, Ponzio NR, Seghezzo ML (2004) Genetic variation for grain proteincomponents and industrial quality of durumwheat cultivars sown in Argentina. Cereal Science 40: 161-166.

Liu CY, Shepherd KW (1996).Variation of B sub units of Glutenin in durum, wild and less-widely cultivated tetraploid wheats. Plant Breeding 15:172-178.

Martinez AT, Speranza M, Ruiz-Dueoas FJ, Ferreira P,Camarero S, Guillén F (2005) Biodegradation oflignocellulosics: microbiological, chemical and enzymaticaspects of fungal attack to lignin. International Microbiology 8: 195–204.

Mohammadi A, Valizadeh M, Mogaddam M, Arshad I, Javadian N, Mohebbalipure N (2007). Assessment of genetic diversity of wheat glutenin aggregate number of indigenous North. Knowledge of modern agriculture 11: 61-70.

Najaphian G, Abdemishani S, Yazdi Samadi (1960). The effect of high molecular weight glutenin subunits allelic variation in the value of the bread wheat breeding lines. Journal of Agricultural Science 28: 1-12.

Nei M (1973). Analysis of gene diversity in subdivided populations. Proceedings of National Academy of Science USA 70: 3321–332.

Oak MD, Dexter JE (2006). Chemistry, genetics and prediction of dough strength and end-use quality in durum wheat in: Gliadin and Glutenin. *AACC* International, St Paul, Minnesota 281-305.

Payne PI (1987). The genetical basis of breadmaking quality in wheat. Aspects of Applied Biology 15: 79–90.

Payne PI, Holt LW, Law CN (1981). Structural and genetic studies on the high molecular weight subunit of wheat Glutenin. I- allelic variation in subunits among varieties of wheat (*Triticum aestivum*), Theoretical and Applied Genetics 60:229-236.

Payne PI, Jackson EI, Holt LW (1984). The association between gliadins 45 and gluten strength in durum wheat varieties. A direct causal effect on the result of genetic linkage. Cereal Science 2: 73-81.

Payne PI, Lawrence CJ (1983). Catalogue of alleles for the complex gene loci. Glu-A1, Glu-B1, and Glu-D1 which code for high molecular weight subunits of Glutenin in hexaploid wheat. Cereal Research Communications 11(1):29-35.

Pflüger LA, Martin LM, Alvarez JB (2001). Variation in the HMW and LMW Glutenin subunits from spanish accessions of emmer wheat (*T. turgidum* ssp. Dicoccum schrank).Theoretical and Applied Genetics 102:767–772.

Popa M, Gregova E, Kraic J (2003). Romanian wheat (*Triticum aestivum* L.) landraces characterized by seed storage proteins electrophoresis. Plant Genetic News letter 135:53-58.

Rabinovich SV, Panchenko IA, Parchomenko RG, Bondarenko VN (1998). High-molecular weight glutenin subunit composition of spring bread wheats grown in the Ukraine and the Russian Federation between 1995-97 and its connection with pedigrees. Annual Wheat Newsletter 44: 236-251.

Raciti CN, Doust MA, Lombardo GM, Boggini G, Pecetti L (2003). Characterization of durum wheat Mediterranean germplasm for high and low molecular weight glutenin subunits in relation with quality. European Journal of Agronomy 19: 373-382.

Ram S (2003). High molecular weight glutenin subunit composition of Indian wheats and their relationships with dough strength. Plant Biochemistry and Biotechnology 12: 151-155.

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 of Journal Biology 21: 393-399.

Ruiz M, Carrillo JM (1993). Linkage relationship between prolamin genes on chromosomes 1A and 1B of durum wheat. Theoretical and Applied Genetics 87: 353-360.

Shewry PR, Halford NG (2002). Cereal seed storage proteins: Structures, properties and role in grain utilization. Journal of Experimental Botany 53: 947-958.

Singh NK, Shepherd KW, Comish GB (1991). Rapid communication: a simplified SDS-PAGE. Procedure for separating LMW subunits of Glutenin. Journal of cereal Science 14:203-208.

Steiner AM, Ruckenbauer P, Goecke E (1997). Maintenance in genebanks, a case study: contaminations observed in the Nurnberg oats of 1831. Genetic resources and crop evolution 44: 533–538.

Tarekegne A, Labuschagne MT (2005). Relationship between high molecular weight glutenin subunit composition and gluten quality in Ethiopian bread and durum wheat cultivars and lines. Journal of Agronomy and Crop Science 191: 300-307.

Thompson RD, Bartels D, Harberd NP, Flavell RB (1983). Characterization of the multigene family coding for HMW glutenin subunits in wheat using cDNA clones. Theoretical and Applied Genetics 67:87–96.

Troncone R, Auricchio S (1991). Gluten-sensitive enter- opathy (celiac disease). Food Reciew International 7:205-231

Turchetta T, Ciaffi M, Porceddu E, Lafiandra D (1995). Relationship between electrophoretic pattern of storage proteins and gluten strength in durum wheat landraces from Turkey. Plant Breeding 114: 406-412.

Virchow, D (1999). Genetic resources: Status, development, losses and conservation management. In: Conservation of Genetic Resources - Costs and Implications for Sustainable Utilization of Plant Genetic Resources for Food and Agriculture. Springer.Pp 11-44.

Yang, R.C., Jana, S. and Clarke, J.M. (1991) Phenotypic diversity and associations of some potentially drought-responsive characters in durum-wheat. Crop Science 31: 1484–1491.

Zhu YF, Li YW, Chen Y, Li H, Liang H, Yue S J, Zhang AM, Zhang XQ, Wang DW, Jia X (2005). Generation and characterization of a high molecular weight glutenin1Bx14-deficient mutant in common wheat. Plant Breeding 124 : 421-427.

Evaluation of allelic variation and assessment of quality of seed storage proteins in durum wheats

Rajabi H.M.[1], Fotokian M.H.[*1], Agahee S.M.[2], Mohammadi M.[2]

[1]Agricultural College, Shahed University, Tehran, Iran
[2]Research Institute of Seed and Plant Breeding, Karaj, Iran

Abstract

The existence of genetic variation of genotypes is very interesting in reducing genetic vulnerability and lead to stable control of production. Proline and glutamine-rich wheat seed endosperm proteins are collectively referred to as prolamins. HMW-GS are major determinants of gluten elasticity. The inheritance of glutenin subunits follows Mendelian genetics with multiple alleles in each locus. Identification of the banding patterns of glutenin subunits could be used as an estimate for screening high quality wheat germplasm. In this study 116 genotypes of Triticum turgidum originating from different geographical areas of Iran and six countries, Portuguese, Italy, Yugoslavia, Bulgaria, Iraq and Afghanistan, were evaluated for variation in high molecular weight glutenin subunit. Glutenin extracted from seeds using SDS-PAGE electrophoresis and scoring bands were determined. 16 allele combinations were identified. In pure lines of durum wheat, the Null allele was observed more frequently than the 1 and 2* alleles. In% 21/6% of genotypes 1allele and 12.5%, 2* allele was observed. The locus GluB1, 7 type alleles was detected. The locus GluB1 20 allele had the highest frequency and was observed in 42 genotype. 20 genotypes were having 17+18 allele. The 7+8, 6+8 and 7 alleles were observed in 21, 12 and 7 genotypes respectively. Each of the 22 and 7+9 alleles also was observed in one genotype. In the one line of native country of Portugal, observed unique allele at the GluB1 locus, which conventional scoring models did not match. The tested genotypes were classified in nine groups according to the linkage distance analysis. The genetic variability in Glu-A1and Glu-B1 locus Were respectively, 0.42 and 0.81. HMW glutenin Glu-1 quality scores are in the range between 2 and 6.

Keyword: *SDS-PAGE, Glutenin, Genetic diversity, Durum, HMW-GS*

[*] Corresponding Author: Fotokian M.H. Tel: 09124238603 Email: fotokian@yahoo.com