ژنتیک نوین
دوره نهم، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۳
صفحه ۴۵۰- ۴۳۹

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

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

ابوالفضل بزرگمهر[۱]، جعفر احمدی*[۱]، فهمیه شاهین‌نیا[۲]، خدیجه رضوی[۳]، گودرز نجفیان[۴]، تهمینه لهراسبی[۳]

۱- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد و دانشیار، دانشگاه بین المللی امام خمینی (ره)
۲- استایار، موسسه تحقیقات ژنومیکس گیاهی (ACPFG)، دانشگاه آدلاید، استرالیا
۳- استادیار، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری تهران، ایران
۴- دانشیار، موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج، ایران

Bozorgmehr A[1], Ahmadi J[*2], Shahinnia F[3], Razavi KH[4], Najafian G[5], Lohrasebi T[6]

1. MSc Student and Associate Professor, Imam Khomeini International university, Iran
2. Assistant Professor, Australian Center for Plant Functional Genomics, University of Adelaide, Australia
3. Assistant Professor, National Institute for Genetic Engineering and Biotechnology, Iran
4. Associate Professor, Seed and Plant Improvement Institute, Iran.

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

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

چکیده

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

واژه‌های کلیدی

تنوع آللی
گلوتنین
گندم
نشانگر
LMW-GS

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-09-01]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1393.9.4.6.1]

مقدمه

گلوتن گندم شامل گلوتنین‌ها و گلیادین‌ها می‌باشد که از مدتها قبل به عنوان عامل تعیین کننده ارزش نانوایی و ارزش محصولات دیگر حاصل از گندم شناخته شده و مطلوبیت آرد برای تهیه نان و صنایع تبدیلی دیگر بستگی به کمیت و کیفیت گلوتن گندم دارد. این دو گروه مجموعا ۸۵ درصد از پروتئین ذخیره‌ای در گندم را تشکیل می‌دهند. گلوتنین‌ها از نظر وزن مولکولی به دو گروه با وزن مولکولی بالا (HMW-GS) و وزن مولکولی پایین (LMW-GS) تقسیم می‌شوند (Dovidio et al. 1997, 2004). زیر واحدهای گلوتنین با وزن مولکولی پایین (LMW-GS) توسط ژن‌های *Glu-3* شامل (*Glu-A3*، *Glu-B3* و *Glu-D3*) که بصورت بلوک ژنی هستند و بر روی بازوی کوتاه کروموزوم‌های 1A، 1B و 1D قرار دارند، کد می‌شوند (Masci et al. 1998). گلوتنین‌های با وزن مولکولی پایین گروه پیچیده‌ای از پروتئین‌ها هستند که قابلیت تشکیل پیوندهای دی‌سولفیدی بین مولکولی آن‌ها موجب شرکت آن‌ها در پلی‌مر گلوتن می‌شود. مقایسه داده‌های موجود در سطح ژن و پروتئین این زیرواحدها و توالی‌های در دسترس مرتبط با آلفا، گاما و امگا گلیادین‌ها، عدم یکنواختی آن‌ها را اثبات می‌کند و می‌بایستی به‌عنوان یک گروه متمایز به نام گلوتنین‌های با وزن مولکولی کم تعریف شوند. ساختار کلی LMW-GS متشکل از ۴ دامنه ساختاری از جمله سیگنال پپتید ۲۰ اسید آمینه، دامنه کوتاه انتهای آمینی (۱۳ اسید آمینه)، دامنه غنی در کدون گلوتامین و دامنه محافظت شده C ترمینال می‌باشد (Long et al. 2008). مجموعا ۳۰ تا ۴۰ پلی‌پپتید در ناحیه LMW-GS قابل تشخیص می‌باشد (Redalli et al. 1995). براساس توالی اسید آمینه‌ای انتهای آمینه، LMW را می‌توان در سه گروه خاص طبقه-بندی کرد. LMW-m که اولین اسید آمینه در توالی پروتئینی آن متیونین می‌باشد، LMW-S که اولین اسید آمینه در توالی پروتئینی آن سرین می‌باشد و LMW-I که اولین اسید آمینه در توالی پروتئینی آن ایزولوسین می‌باشد. زیر واحدهای نوع LMW-S فراوان‌ترین نوع در همه ژنوتیپ‌های بررسی شده می‌باشند (Tao et al.1989). طول ژن LMW-GS از حدود ۹۰۰ تا ۱۱۵۰ جفت باز متفاوت می‌باشد و تعداد تکرار در دامنه تکراری بین ۱۲ تا ۲۵ بوده و عمدتا مسئول تنوع در طول ژن می‌باشد. هر چند تنوع آللی LMW-GS در گندم به طور گسترده‌ای در سطح پروتئین مشخص شده است اما تنوع آللی در سطح DNA برای زیر واحدهای گلوتنین با وزن مولکولی پایین هنوز به طور کامل شناخته نشده است و تنوع طولی ژن‌های کدکننده زیر واحدهای گلوتنین با وزن مولکولی پایین به وسیله نشانگرهای اختصاصی کم‌تر مورد مطالعه قرار گرفته است (D`ovidio et al. 2004; Long et al. 2005). استفاده از نشانگرهای اختصاصی امکان شناسایی آلل هایی که به دلیل همپوشانی پروتئین‌های گلیادین با زیرواحدهای گلوتنین با وزن مولکولی پایین ناشناخته مانده‌اند را فراهم می‌کند (Gupta et al. 1989, 1994; Wang et al. 2008). برای شناسایی زیر واحدهای گلوتنین با وزن مولکولی پایین با استفاده از روش طبقه‌بندی ژن‌های زیر واحدهای گلوتنین با وزن مولکولی پایین و انتساب آنها به کروموزوم‌ها بوسیله گروه آغازگرهای اختصاصی LMW-GS انجام شد (Long et al. 2008).

مواد و روش‌ها

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

تهیه آغازگرها

در این مطالعه از سه جفت آغازگر اختصاصی برای مکان‌های Glu-D3, Glu-B3, Glu-A3 که توسط Long et al. (2005) از ژنوم گندم GS طراحی شده بود استفاده شد (جدول۱).

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز PCR

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) در حجم ۲۰ میکرولیتر، که حاوی 1 U TaqPlus DNA، دو میکرولیتر بافر (۱۰X) PCR، ۵۰ نانوگرم از DNA ژنومی، ۰/۶ میکرولیتر از ($MgCL_2$ (50mM، ۰/۴ میکرولیتر dNTP (10Mm) و ۰/۲ میکرولیتر از هر آغازگر (10 pmol) انجام شد. برنامه PCR با واسرشت‌سازی اولیه در دمای $95^{\circ}C$ به مدت ۵ دقیقه آغاز و با ۳۵ چرخه شامل مرحله واسرشت سازی در دما $95^{\circ}C$ به مدت یک دقیقه، مرحله اتصال

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-09-01]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1393.9.4.6.1]

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

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

در دمای ۷۰°C –۵۰ به مدت یک دقیقه (بسته به دمای اتصال آغازگرها جدول۱) و مرحله بسط در دمای ۷۲°C به مدت یک دقیقه ادامه یافته و مرحله پایانی با دمای بسط نهایی ۷۲ °C به مدت چهار دقیقه بکار گرفته شد. محصول حاصل از PCR بر روی ژل آگاروز دو درصد تفکیک و ارزیابی شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

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

نتایج و بحث

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

با توجه به اینکه گندم دوروم فاقد ژنوم D می‌باشد، لذا ۲۲ گندم دوروم در مکان ژنی Glu3-D مورد محاسبه قرار نگرفتند. برای مطالعه مکان ژنی Glu3-D از یک جفت آغازگر اختصاصی (Glu3-D.2) که برای ژنوم DD گندم بهاره چینی طراحی شده بود و یک قطعه ۵۴۰ bp را در این رقم تکثیر می‌کند (Long et al. 2005)، استفاده شد. در مجموع ۷۵ لاین بومی گندم نان با استفاده از آغازگر Glu3-D2 پنج الگوی باندی شامل چهار آلل a، b، c و d با طول‌های بین ۴۰۰ bp و ۶۰۰ bp شناسایی شد، و بدلیل اینکه این خانواده ژنی دارای نواحی تکراری موجود در ساختار ژنی LMW-GS می‌باشد مسئول اصلی تنوع در طول ژن می‌باشد (شکل۱، جدول۲). چهار آلل a، b، c و d به ترتیب دارای فراوانی نسبی ۰/۰۱۳، ۰/۸۵۳، ۰/۰۲۶ و ۰/۰۵۴ بودند. آلل b با طول تقریبی ۵۷۰ bp بیشترین فراوانی را به خود اختصاص داد. آلل b فراوان‌ترین باند در میان ۴ آلل بوده و در ۳ الگو از ۴ الگوی مشاهده شده در این آغازگر یافت شد، همچنین این آلل در ۶۴ لاین مشاهده و شناسایی شد در حالی که آلل‌های a، c و d به ترتیب در ۱، ۲ و ۴ لاین مشاهده شدند (جدول۴). در مطالعه مشابهی هفت آلل بوسیله این آغازگر در ژنوتیپ‌های تجاری گندم نان ایران برای این مکان ژنی شناسایی شد (Hosynian et al. 2010). محاسبه تنوع ژنتیکی با استفاده از شاخص نی نشان داد که گندم نان از تنوع ۰/۳۱۴ برخوردار است (جدول۳). میزان تنوع ژنتیکی محاسبه شده برای این مکان ژنی (H=۰/۳۱۴) در این تحقیق کمتر از میزان تنوع (H= ۰/۷۳۷) بدست آمده در سطح پروتئینی توسط محققین دیگر بود (Izadi et al. 2002; Ikeda et al. 2003; Izadi et al. 2010).

آغازگر Glu3-3.1

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

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-09-01]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1393.9.4.6.1]

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

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

آغازگر Glu3-3.1 چهار الگوی باندی شامل شش آلل a، b، c، d، e و f مربوط به ژنوم B و D شناسایی شد (شکل۲، جدول۵)، و به ترتیب دارای فراوانی ۴۷/۴۲۳، ۴۷/۴۲۳، ۵۲/۵۷۸، ۷۴/۲۲۷، ۷۴/۲۲۷ و ۱۶/۴۹۴ درصد بودند. آلل‌های d و e با طول تقریبی ۶۵۰ bp و ۶۰۰ bp بیشترین فراوانی را به خود اختصاص دادند. الگوی یک در گندم دارای بیشترین فراوانی الگوی باندی بود. آلل d و e فراوان‌ترین باند در میان ۶ آلل دیگر بوده و در هر ۴ الگوی مشاهده شده در این آغازگر یافت شد.

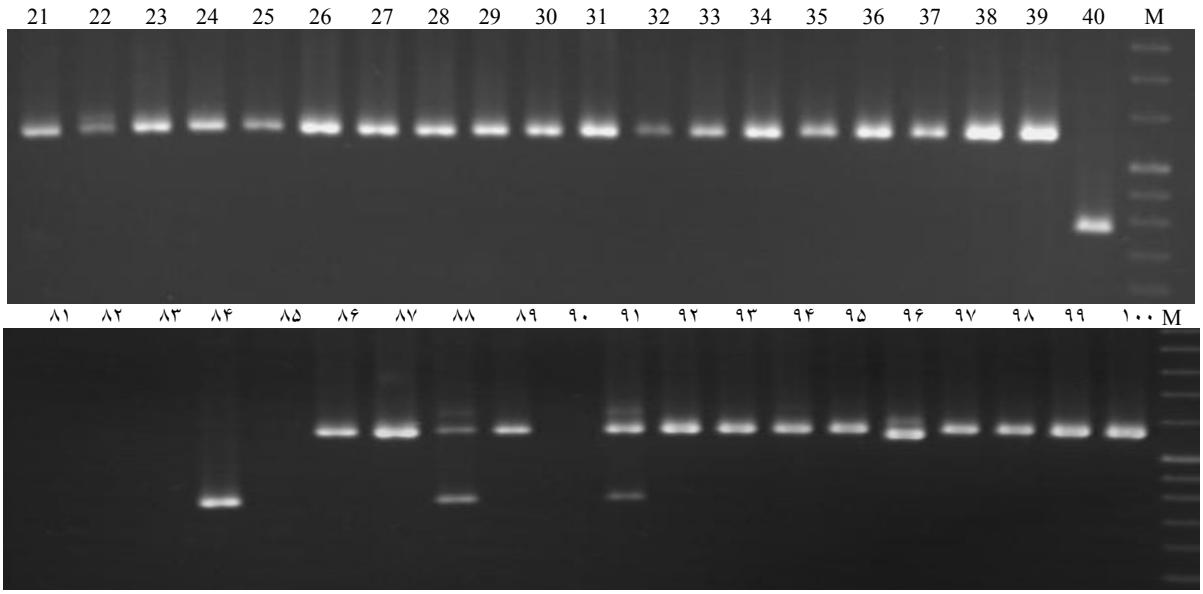
[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-09-01]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1393.9.4.6.1]

جدول۳- محاسبه فراوانی و ترکیب الگوها در لاین‌های مورد مطالعه گندم نان با استفاده از آغازگر Glu3-D.2

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

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

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



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

همچنین هر دو آلل در ۷۲ لاین شناسایی شد. آلل‌های a، b، c و f به ترتیب در ۴۶، ۴۶، ۵۱ و ۱۶ لاین مشاهده شدند (جدول۶). بر اساس نتایج این تحقیق الگوی سه و دو به ترتیب در گندم دوروم و نان منحصر به فرد بودند. میزان تنوع ژنتیکی در لاین‌های بومی گندم نان (*T. aestivum*) H= ۰/۸۱۷ بدست آمد که بیشتر از میزان تنوع بدست آمده (H= ۰/۷۴۴) در لاین‌های بومی گندم دوروم (*T. durum*) بود (جدول۷).

آغازگر Glu3-3.2

این آغازگر برای ژنوم AA و DD گندم بهاره چینی طراحی شده که دو قطعه ۶۸۰ bp و ۷۰۰ bp را در این رقم تکثیر می‌کند (Long et al. 2005). طول قطعات تکثیر شده بوسیله این آغازگر در بین لاین‌های مورد مطالعه این تحقیق تقریبا بین ۸۰۰ bp–۵۸۰ بودند. با استفاده از جفت آغازگر Glu3-3.2 چهار الگوی باندی شامل ۱۰ آلل a، b، c، d، e، f، g، h، i و j شناسایی شد (شکل۳، جدول۸)، که به ترتیب دارای فراوانی ۱/۰۳۰، ۵۳/۶۰۸، ۱/۰۳۰، ۱/۰۳۰، ۱/۰۳۰، ۲/۰۶، ۶۵/۹۷۹، ۵۴/۶۳۹، ۱/۰۳۰ و ۱/۰۳۰ درصد بودند. آلل g با طول تقریبی ۹۰۰ bp بیشترین فراوانی را به خود اختصاص داد و آلل‌های g و h فراوان‌ترین آلل در میان ۱۰ آلل بوده و در ۳ الگو از ۴ الگوی باندی مشاهده شدند (جدول۹).

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-09-01]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1393.9.4.6.1]

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

الگو	باند						شماره لاین	گونه	الگو	باند						شماره لاین	گونه
	f	e	d	c	b	a				f	e	d	c	b	a		
							۵۸		۱		+	+				۳	
۱		+	+				۶۶		۳	+	+	+	+	+	+	۶	
۱		+	+				۷۰		۳	+	+	+	+	+	+	۹	
٤		+	+	+	+	+	۷۱		۴		+	+	+	+	+	۱۰	
۳	+	+	+	+	+	+	۷۲		۴		+	+	+	+	+	۱۱	
							۷۳		۱		+	+				۱۲	
۱		+	+				۷۴		۳	+	+	+	+	+	+	۱۳	
۱		+	+				۷۸									۱۴	
							۷۹		۳	+	+	+	+	+	+	۱۵	
۱		+	+				۸۰		۴		+	+	+	+	+	۱۶	
							۸۲		٤		+	+	+	+	+	۱۷	
۱		+	+				۸۵									۱۸	
٤		+	+	+	+	+	۸۷	*T. aestivum*	۳	+	+	+	+	+	+	۲۰	
٤		+	+	+	+	+	۸۸		۳	+	+	+	+	+	+	۲۱	
٤		+	+	+	+	+	۸۹									۲۲	
۱		+	+				۹۰		۴		+	+	+	+	+	۲۳	
٤		+	+	+	+	+	۹۲									۲۴	
							۹۳									۲۵	
٤		+	+	+	+	+	۹۴		۳	+	+	+	+	+	+	۲۶	
٤		+	+	+			۹۵		۴		+	+	+	+	+	۲۷	
۳	+	+	+	+	+	+	۹۶		۴		+	+	+	+	+	۲۸	
٤		+	+	+	+	+	۹۷		۳	+	+	+	+	+	+	۲۹	
٤		+	+	+	+	+	۹۸		۳	+	+	+	+	+	+	۳۰	
۳	+	+	+	+	+	+	۹۹		۴		+	+	+	+	+	۳۱	
٤		+	+	+	+	+	۱۰۰									۳۲	*T. aestivum*
۱		+	+				۱	*T. durum*								۳۳	
۲		+	+	+			۲									۳۴	
۲		+	+	+			۴									۳۵	
۱		+	+				۵									۳۶	
۱		+	+				۵۵									۳۷	
۲		+	+	+			۵۹		۴		+	+	+	+	+	۳۸	
۱		+	+				۶۰		۳	+	+	+	+	+	+	۳۹	
۱		+	+				۶۱		۴		+	+	+	+	+	۴۰	
۱		+	+				۶۲		۳	+	+	+	+	+	+	۴۱	
۱		+	+				۶۳		۴		+	+	+	+	+	۴۲	
۱		+	+				۶۴		۴		+	+	+	+	+	۴۳	
٤		+	+	+	+	+	۶۵		۲		+	+	+			۴۴	
٤		+	+	+	+	+	۶۷		۴		+	+	+	+	+	۴۵	
۱		+	+				۶۸		۴		+	+	+	+	+	۴۶	
۳	+	+	+	+	+	+	۶۹									۴۷	
۱		+	+				۷۶									۴۸	
۴		+	+	+	+	+	۷۷									۴۹	
							۸۱									۵۰	
							۸۳		٤		+	+	+	+	+	۵۱	
							۸۴		۴		+	+	+	+	+	۵۲	
							۸۶		۴		+	+	+	+	+	۵۳	
۴		+	+	+	+	+	۹۱		۱		+	+				۵۴	
	۱۶	۷۲	۷۲	۵۱	۴۶	۴۶	کل		۳	+	+	+	+	+	+	۵۶	
									۱		+	+				۵۷	

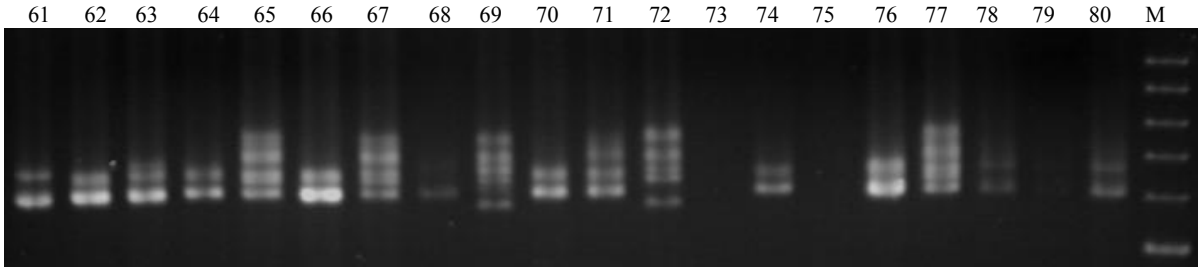
[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-09-01]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1393.9.4.6.1]

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

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

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

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



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

در این مطالعه در لاین‌های بومی گندم نان یک تا چهار آلل شناسایی شد که آلل‌های فوق دارای ۳ الگوی باندی مختلف بودند و در الگوی ۴ هر ۴ آلل قابل مشاهده بود. همچنین در لاین‌های بومی گندم دوروم یک تا نه آلل مشاهده شد که دارای ۳ الگوی باندی متفاوت بودند و در الگوی ۲، هر ۹ آلل را می‌توان مشاهده کرد. در مورد این آغازگر، الگوی یک شایع‌ترین الگو در گندم نان و دوروم مورد مطالعه بودند و الگوی دو و چهار به ترتیب در گندم دوروم و نان منحصر به فرد بودند. با استفاده از آغازگر Glu3-3.2 میزان تنوع ژنتیکی در لاین‌های بومی گندم دوروم (*T. durum*) برابر H= ۰/۷۷۹ بدست آمد که بیشتر از میزان تنوع حاصل (H=۰/۶۷۹) در لاین‌های بومی گندم نان (*T.aestivum*) بود (جدول۱۰).

تجزیه کلاستر

تجزیه خوشه‌ای با استفاده از آغازگرهای Glu3.1، Glu3.2 و Glu3-D.2 برای زیرواحدهای گلوتنین با وزن مولکولی پایین برای مکان‌های ژنی AA، BB، DD با استفاده از روش UPGMA (به علت اینکه rcophentic با استفاده از این روش بزرگتر ۰/۸ شد) انجام شد. برای این تجزیه لاین‌های بومی گندم نان و دوروم به صورت جداگانه با یکدیگر مورد تجزیه قرار گرفتند. دندروگرام حاصل از تجزیه‌ای خوشه‌ای ۷۵ لاین بومی گندم نان با استفاده از دو آغازگر Glu3.1، Glu3.2 (شکل۴) در فاصله ۰/۸۰ در مقیاس تغییریافته، ۳ گروه تشکیل داد و گروه‌های ۱، ۲ و ۳ به ترتیب ۱۲، ۳۳/۳۴ و ۵۴/۶۷ درصد از لاین‌ها را شامل شدند.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-09-01]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1393.9.4.6.1]

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

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

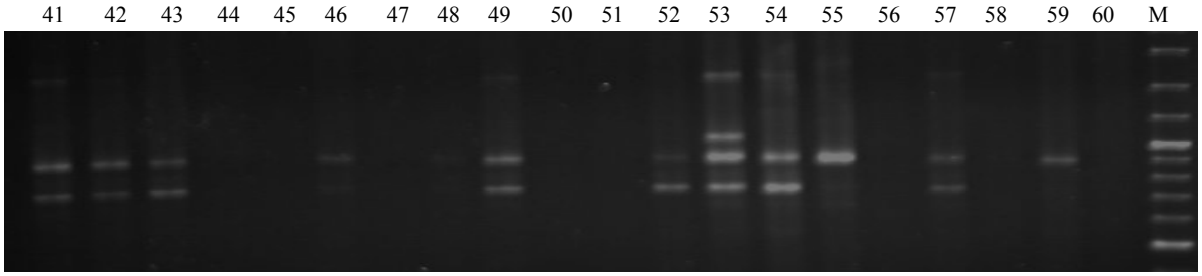
[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-09-01]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1393.9.4.6.1]

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

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

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

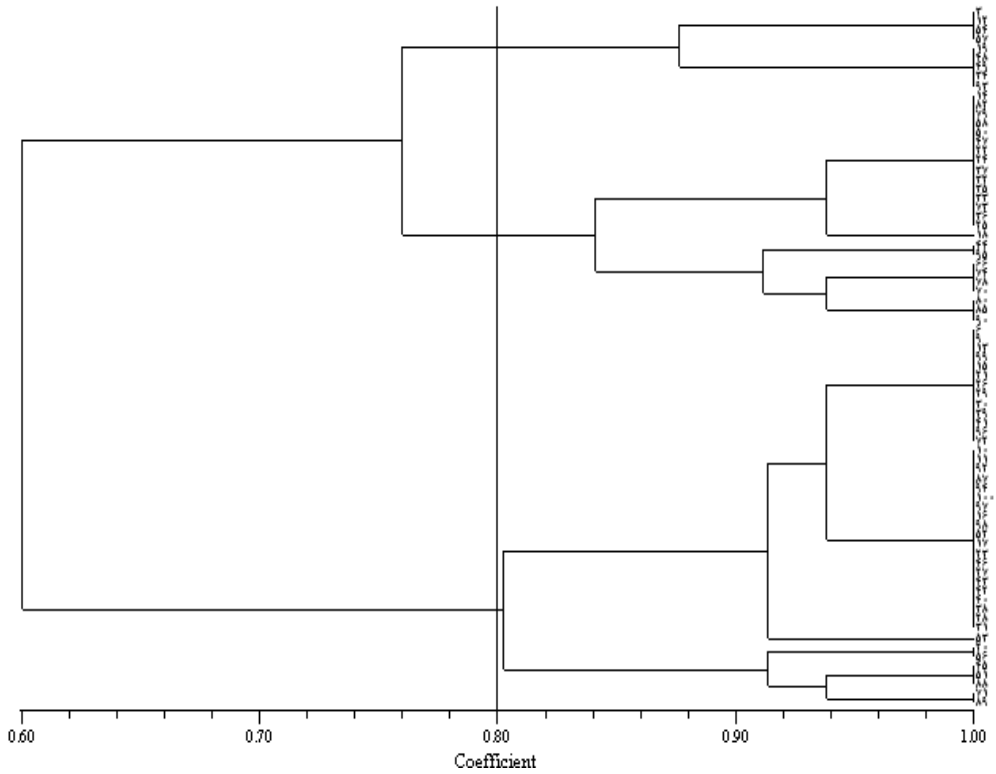
گونه	فراوانی الگو باندها				میزان تنوع ژنتیکی آغازگر Glu3-3.2
	۱	۲	۳	۴	
T.aestivum	۰/۵۶		۰/۰۸	۰/۰۱۳	۰/۶۷۹
T. durum	۰/۴۰۹	۰/۰۴۵	۰/۲۲۷		۰/۷۷۹
کل	۰/۵۲۵	۰/۰۱۰	۰/۱۱۳	۰/۰۱۰	۰/۷۰۹



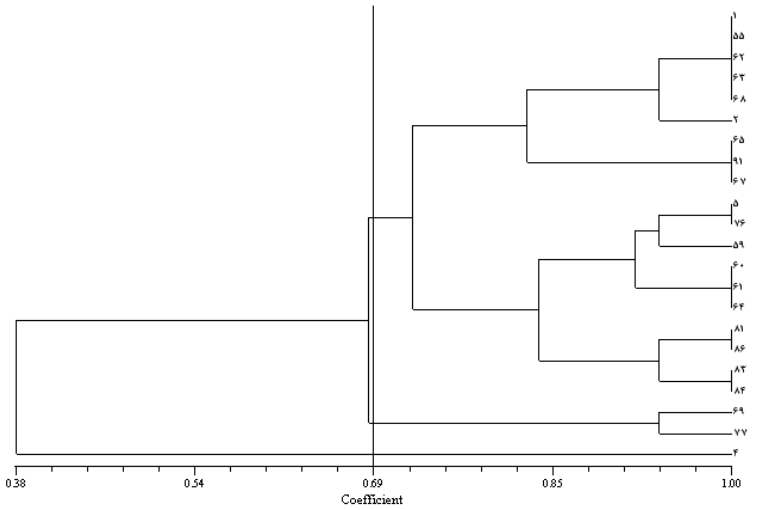
شکل۳- چند شکلی در ژن LMW-GS که بوسیله آغازگر Glu-3.2 شناسایی شده‌است. M، نشانگر اندازه مولکولی (bp ۵۰)؛ شماره‌های ۶۰-۴۱ لاین‌های بومی مورد مطالعه.

سه گروه (کلاستر) مشخص در تجزیه کلاستر تشابه از لحاظ الگوی باندی لاین‌های بومی گندم مورد بررسی را نشان دادند. دندروگرام حاصل از تجزیه‌ای خوشه‌ای ۲۲ لاین بومی گندم دوروم با استفاده از آغازگرهای Glu3.1 ، Glu3.2 (شکل۵) در فاصله ۰/۶۹ در مقیاس تغییریافته، ۳ گروه تشکیل داد و گروه‌های ۱، ۲ و ۳ به ترتیب ۸۶/۳۶، ۹/۰۹ و ۴/۵۴ درصد از لاین‌های گندم دوروم را شامل شدند. بر اساس مکان ژنی Glu-D3 ۷۵ لاین بومی گندم نان با یکدیگر مورد تجزیه قرار گرفتند، دندروگرام حاصل از تجزیه‌ای خوشه‌ای (شکل۶) با استفاده از زیرواحدهای مکان ژنی Glu-D3 در فاصله ۰/۷۳، سه گروه را تشکیل داد و گروه‌های ۱، ۲ و ۳ به ترتیب ۸۴، ۱۴/۶۷ و ۱/۳۴ درصد از لاین‌ها را شامل شدند. زیرواحدهای گلوتنین با وزن مولکولی پایین نقش بسیار مهمی در تعیین کیفیت خمیر گندم دارد (Gupta et al. 1993)، اما بدلیل پیچیده بودن این خانواده ژنی، نقش آن‌ها به طور کلی مشخص نشده‌است. همچنین برخی مطالعات نشان می‌دهد که نواحی تکراری موجود در ساختار ژنی LMW-GS مسئول

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-09-01]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1393.9.4.6.1]



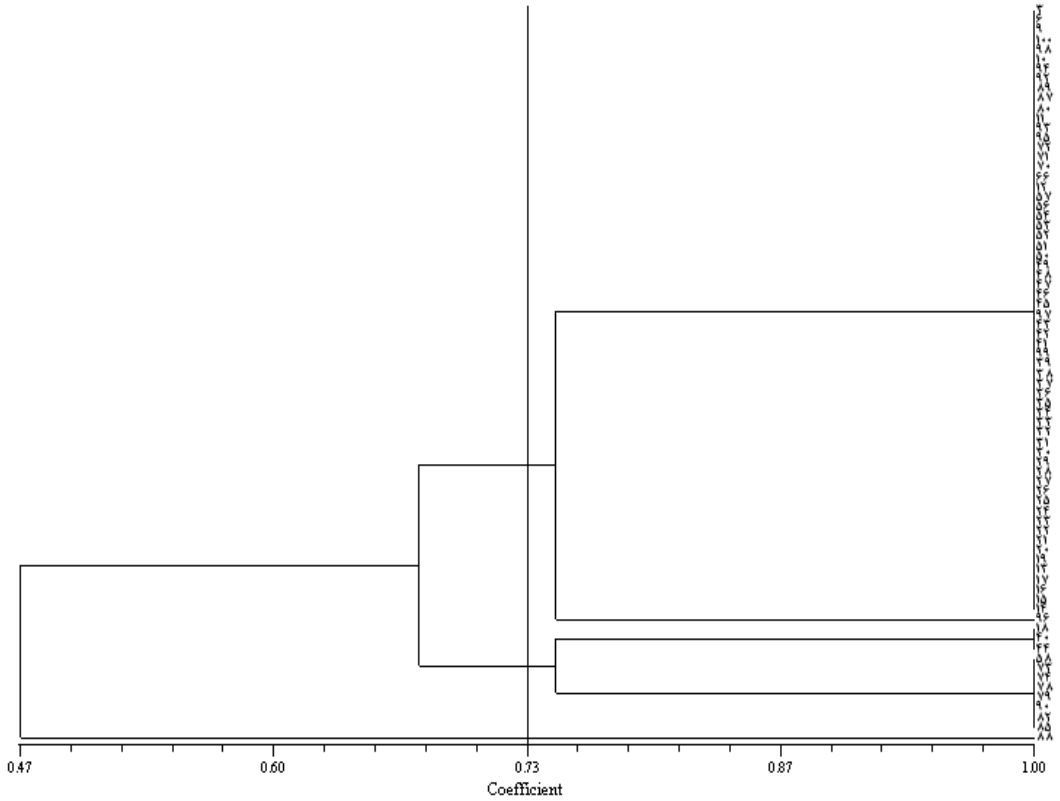
شکل ۴- دندروگرام ۷۵ لاین بومی گندم نان ایران برای زیرواحدهای LMW با استفاده از آغازگرهای Glu3.1 و Glu3.2 بوسیله روش UPGMA



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

اصلی تنوع در طول ژن می‌باشد. این تنوع احتمال دارد به علت پدیده حذف (deletion) و یا اضافه (addition) در تعداد نواحی تکراری باشد (D, Ovidio et al. 2004). بنابراین به نظر می‌رسد تفاوت مشاهده شده در طول قطعات بوسیله این سه جفت آغازگر می‌تواند بدلیل پدیده حذف و اضافه در سطح DNA باشد که در نواحی تکراری رخ می‌دهند. البته علاوه بر دلایلی که ذکر شد ممکن است مربوط به پدیده جابجایی کروموزوم و ترانسپوزون‌ها باشد. از آنجا که لاین‌های مورد مطالعه در این پژوهش مربوط به جمع‌آوری از توده‌های بومی می‌باشند این چنین نتایجی نیز قابل انتظار است. در بین آلل‌های شناسایی شده بوسیله آغازگر مکان ژنی Glu-D3 (Glu3-D.2) چند شکلی بسیار متفاوتی در بین لاین‌های بومی مشاهده شد، که در این بین می‌توان به لاین‌های

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-09-01]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1393.9.4.6.1]



شکل ۶- دندروگرام ۷۵ لاین بومی گندم نان ایران برای زیرواحدهای LMW با استفاده از آغازگر Glu3-D.2 بوسیله روش UPGMA

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

پروتئین‌های حاصل از این ژن حاوی ۹ اسید آمینه سیستئین بودند در حالی‌که اکثر ژن‌های شناخته شده تاکنون دارای ۸ اسید آمینه سیستئین هستند. آزمایش‌های تکمیلی آنها نشان داد که این سیستئین اضافی به طور معنی‌داری موجب افزایش خصوصیات کیفی LMW می‌شود. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که تنوع آللی قابل ملاحظه‌ای در مکان ژنی Glu-3 در لاین‌های بومی گندم نان و دوروم مورد مطالعه در سطح نوکلئوتید وجود دارد و لذا از این تنوع می‌توان به عنوان منبع با ارزش تنوع آللی ژن‌های LMW-GS، در بهبود کیفیت آرد گندم استفاده کرد.

سپاسگزاری

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

منابع

Doyle JJ, Doyle JL (1990) A rapid total DNA preparation procedure for fresh plant tissue. Focus 12:13-15.

D`ovidio R, Simeone M, Masci S, Porceddu E (1997) Molecular characterization of a LMW-GS gene located on chromosome 1B an the development of primers specific for the *Glu-B3* complex locus in durum wheat. Theoretical and Applied Genetics 95: 1119-1126.

D`ovidio R, Masci S (2004) The low-molecular-weight glutenin subunits of wheat gluten. Journal of Cereal Science 39: 321-339.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-09-01]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1393.9.4.6.1]

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Wang L, Zhao X, He Z, Xia X (2008) Characterization of low- molecular- weight glutenin subunit genes at Glu-B3 and GluD3 loci and development of functional markers in common wheat. In: Proceedings of the 11th International Wheat Genetics Symposium. Sydney University Press.

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

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-09-01]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1393.9.4.6.1]