به‌نژادی گیاهان زراعی و باغی
دوره ۱ ■ شماره ۲ ■ پاییز و زمستان ۱۳۹۲
صفحه‌های ۱۰۱ - ۱۱۰

به‌گزینی ژنوتیپ‌های گندم نان برای ارزش نانوایی با استفاده از نشانگرهای STS-PCR

الهام مهرآذر[۱]، علی ایزدی دربندی*[۲]، محسن محمدی[۳]، گودرز نجفیان[۴]

۱. کارشناس‌ارشد رشتهٔ اصلاح نباتات، پردیس ابوریحان دانشگاه تهران، تهران، ایران
۲. دانشیار گروه علوم زراعی و اصلاح نباتات، پردیس ابوریحان دانشگاه تهران، تهران، ایران (نویسنده مسئول مکاتبات *)
۳. استادیار مؤسسهٔ اصلاح و تهیهٔ نهال و بذر، کرج، ایران
۴. دانشیار مؤسسهٔ اصلاح و تهیه نهال و بذر، کرج، ایران

تاریخ وصول مقاله: ۹۱/۱۰/۱ تاریخ پذیرش مقاله: ۹۲/۱۰/۷

چکیده

ارزش نانوایی در گندم‌های هگزاپلوییید، صفت بسیار پیچیده‌ای در برنامهٔ اصلاحی گندم است. زیرواحدهای گلوتنین با وزن مولکولی بالا نقش مؤثری در استحکام گلوتن و کشش‌پذیری خمیر دارند. مکان ژنی *Glu-1* رمزکننده این زیرواحدهاست که بر بازوی بلند کروموزوم‌های گروه یک قراردارند. در این تحقیق از نشانگرهای DNA مبتنی بر PCR در به‌گزینی کیفی ارقام گندم استفاده شد. دو زوج آلل *Glu-D1* یعنی 1Dx5-1Dy10 و 1Dx2-1Dy12 به ترتیب همبستگی شدیدی با قوت و ضعف ارزش نانوایی دارند و زیرواحد 1Bx7 در مکان ژنی *Glu-B1* که معمولاً با یکی از آلل‌های 1By8 یا 1By9 پیوسته است با افزایش الاستیسیتهٔ خمیر، دارای ارزش نانوایی متوسط تا خوب است. نشانگرهای اختصاصی DNA به طول ۴۵۰، ۵۷۶، ۶۱۲، ۲۳۷۳، ۵۲۷، ۶۶۹ جفت بازی به ترتیب برای آلل‌های پروتئینی 1Dx5، 1Dy10، 1Dy12، 1Bx7،1By8 و 1Dy9 تأیید شدند. در این تحقیق پتانسیل استفاده از نشانگرهای DNA جهت غربال ژنوتیپ‌های گندم از نظر ارزش نانوایی در مرحلهٔ گیاهچه‌ای معرفی شد.

کلیدواژه‌ها: کیفیت نانوایی، گلوتنین، گندم، نشانگرهای مولکولی، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز.

* نویسنده مسئول
Email: aizady@ut.ac.ir

مقدمه

خواص رئولوژیک[1] خمیر گندم مربوط به مادهٔ چسبنده و قابل کشش گلوتن است. خاصیت ارتجاعی گلوتن وابسته به حضور دو نوع پروتئین ذخیره‌ای دانهٔ گندم به‌نام‌های گلوتنین و گلیادین است که این پروتئین‌ها سبب تنوع پروتئینی از طریق کمّیت، کیفیت و ترکیبات مختلف خود در ارقام مختلف گندم شده‌اند (۵). با توجه به اینکه در کشور ما بیشتر از نان‌های پهن استفاده می‌شود و پروتئین‌های گندم به‌ویژه گلوتن و گلیادین نقش زیادی در افزایش کیفیت این قبیل نان‌ها دارند، پایداری، دوام و کیفیت نان پهن در مصرف و کاهش ضایعات آن از اهمیت بسزایی برخوردار است (۲۷). ویژگی‌های نهایی خمیر، مربوط به اجزای گلوتن و شبکهٔ پروتئینی حاصل و تأثیر متقابل آن‌ها با همدیگر و نشاستهٔ موجود در آرد است (۱۱، ۲۸ و ۳۱). میزان زیاد اسیدآمینهٔ گلوتامین موجود در گلوتنین با وزن مولکولی بالا با پیوندهای هیدروژنی بین و درون‌رشته‌ای بر خاصیت کشش خمیر مؤثر است (۹). پژوهش های زیادی بر روی پروتئین‌های گلوتنین با استفاده از سیستم الکتروفورزی SDS-PAGE انجام شده است و همبستگی آلل‌های موجود با زیرواحدهای گلوتنین دارای وزن مولکولی بالا و کیفیت نانوایی حالت مثبتی را نشان داده است (۱۳ و ۲۸). گلوتنین‌ها براساس میزان تحرک آن‌ها بر روی ژل اکریل‌آمید به دو بخش دارای وزن مولکولی بالا و پایین تقسیم شده و به‌ترتیب براساس مدل‌های پین و گوپتا نامگذاری می‌شوند (۱۳). ژن‌های کنترل‌کنندهٔ این خصوصیات روی بازوی بلند کروموزوم‌های A۱، B۱ و D۱ قرار دارند. چهار ویژگی ساختاری پروتئین شامل محتوای گلوتنین با وزن مولکولی بالا و پایین و گلیادین و نوع ترکیبات آللی آن‌ها سبب تعیین ارزش کیفی، پایداری و دوام نان می‌شوند (٦). زیرواحدهای با وزن مولکولی بالا توسط مکان‌های ژنی *Glu-1* در سه جایگاه *Glu-D1*، *Glu-B1* و *Glu-A1* که بر روی بازوی بلند کروموزوم‌های D۱، B۱ و A۱ قرار دارند رمز می‌شوند و هر یک از این مکان‌های ژنی شامل دو ژن خیلی نزدیک به‌هم به نام‌های *Glu-1-1* و *Glu-1-2* هستند که به‌ترتیب زیرواحدهای تیپ x و y را برحسب وزن مولکولی رمز می‌کنند. تا کنون ۸ آلل برای مکان ژنی *Glu-A1*، ۱۱ آلل برای *Glu-B1* و ۹ آلل برای *Glu-D1* شناسایی شده است. ژن تیپ y موجود در مکان ژنی *Glu-A1* معمولاً تظاهر نیافته و خاموش است و گاهی هر دو ژن تیپ x و y مکان ژنی *Glu-A1* تظاهر نیافته که در این حالت آلل نول را خواهیم داشت. در *Glu-B1* و *Glu-D1* به‌طور معمول هر دو ژن بیان می‌شوند، بنابراین، در گندم هگزاپلوئید، ۳ـ ۵ جزء (نوار) در قسمت گلوتنین‌های HMW[2] دیده می‌شود (۱۱ و ۱۷). تنوع آللی در هر یک از مکان‌های ژنی HMW گلوتنین وجود دارد که ناشی از تفاوت‌ها در اجزای زیرواحدهای گلوتنین با وزن مولکولی بالا در بین ارقام است (۲٤). مطالعات متعدد نشان داده است که ترکیب اجزای سازندهٔ گلوتنین اثرات معناداری بر خواص خمیر دارند. زیرواحدهای گلوتنین با وزن مولکولی بالا 1Dx5-1Dy10 با استحکام بالای خمیر و کیفیت خوب نانوایی پیوسته هستند و زیرواحدهای 1Dx2-1Dy12 با خواص نانوایی ضعیف مرتبط هستند (٤، ۱۲ و ۱۸). از بین زیرواحدهای گلوتنین با وزن مولکولی بالا در جایگاه *Glu-B1*، جزء 1Bx7 عمومی‌ترین زیرواحدهاست که در تعداد زیادی از واریته‌های گندم نان و دوروم دیده می‌شود (۲٤ و ۳۱). زیرواحد 1Bx7 معمولاً با یکی از زیرواحدهای 1By به‌نام‌های 1By8 یا 1By9 پیوستگی دارد. اگرچه تعیین اثر

1. Rheological properties

2. High Molecular Weight Glutenin Subunit

اختصاصی 1Bx7 از دو زیرواحد توأم با آن ساده نیست اما هر یک از این جفت آلل یعنی ۸+۷ یا ۹+۷ از نظر ارزش کیفی در گروه متوسط تا خوب قرار دارند (۱). اگرچه بسیاری از فعالیت‌های مربوط به شناسایی زیرواحدهای گلوتنین با جرم مولکولی بالا و پایین در سطح پروتئین انجام شده است و به‌منظور تجاری‌سازی محصولات نهایی اصلاح نباتات متداول است، به‌نژادگری نوین ابزاری طلب می‌کند که به به‌نژادگر قدرت تشخیص محتوای ژنتیکی مؤثر در کیفیت نهایی دانه را در خلال کار اصلاحی و در جوامع در حال تفکیک فراهم کند. توالی جفت‌ژن‌های رمزکنندهٔ زیرواحدهای (1Dx2 و 1Dx5)، (1Dy10 و 1Dy12) و 1Bx7 با سایر ژن‌های رمزکنندهٔ 1Bx بسیار شبیه است ولی از روی تفاوت‌های جزئی موجود در توالی ناحیهٔ رمزکنندهٔ این ژن‌ها، آغازگرهای اختصاصی برای بررسی‌های PCR طراحی می‌شود. بر این اساس، آغازگرهای اختصاصی برای تکثیر بخش‌های رمزکننده و نواحی تکراری درون‌ژنی زیرواحدهای گلوتنین طراحی شده‌اند (۵، ۲۱، ۲۹ و ۳۰). نشانگرهای مبتنی برنقاط نشانمند از ردیف (STS)[1]، ازجمله نشانگرهای مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلیمراز است و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی (معمولاً بیش از ۲۰ نوکلئوتید) ایجاد می‌شود که یک نقطهٔ نشانمند از ردیف نامیده می‌شود، زیرا پیش از طراحی آغازگر قطعه، در یک مرحله عمل ردیف‌یابی انجام شده است. درواقع STS یک ردیف کوتاه منحصربه‌فرد است که می‌توان آن را توسط PCR تکثیر کرد. مزیت نشانگر STS هم‌بارز بودن آن است، بدین معنی که قادر به تفکیک هموزیگوس‌ها از هتروزیگوس‌ها است و قابلیت تکرارپذیری بیشتری دارند (۷، ۱۹ و ۲۳). در این پژوهش با تعیین نشانگرهای DNA مبتنی بر PCR برای جایگاه‌های ژنی *Glu-D1* و *Glu-B1* در ارقام زراعی گندم نان در حال کشت ایران، یک روش تشخیصی کارآمد، جایگزین، دقیق و قابل اعتماد جهت گروه‌بندی کیفی به‌منظور مصرف نهایی و استفاده در برنامه‌های اصلاحی ارائه می‌شود.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

در این پژوهش براساس الگوی باندی پروتئین‌های گلوتنین در ٦٥ رقم گندم نان بررسی‌شده (۱۰)، تعداد ۲۰ رقم که ترکیبات آللی 1Dx5، 1Dy10، 1Dy12، 1Bx7، 1By8 و 1By9 داشتند به‌عنوان آلل‌های مورد نظر جهت تعیین نشانگرهای DNA مرتبط با آن‌ها انتخاب شدند (جدول۲). علت انتخاب این ارقام این بود که با دانستن نوع آلل در سطح پروتئین می‌توان نشانگرهای DNA آن را براساس آغازگرهای اختصاصی ردیابی و معرفی کرد. آزمون فیزیکی تعیین ارتفاع رسوب SDS (۲۰) نیز برای ارقام منتخب انجام شد. در این آزمایش از دو محلول دودسیل سولفات و اسیدلاکتیک برای معلق‌کردن ذرات آرد استفاده شد که بعد از مخلوط‌شدن گلوتن آن ته‌نشین می‌شود. زیرواحدهای گلوتنین از تک‌بذرها استخراج و به‌وسیلهٔ سیستم الکتروفورزی SDS-PAGE تجزیه و تحلیل شدند. از روش استخراج متوالی[2] (۲۵) با رعایت آخرین تغییرات اعمال‌شده (۱۰) با استفاده از ژل‌های با شیب غلظت (۸/۱ـ ۱۲/۵) درصد پلی‌اکریل‌آمید به‌منظور بررسی الگوی الکتروفورزی زیرواحدهای گلوتنین استفاده شد. زیرواحدهای HMW-GS از طریق مدل جهانی پین نامگذاری شدند (۱۸). ارقام گابو[3] و چاینز اسپرینگ[4] نیز به‌منزلهٔ شاهدهای جهانی با الگوی باندی شناخته‌شده برای

1. Sequence Tagged Site

2. Sequential Extraction
3. Gabo
4. Chinese Spring

نامگذاری ترکیبات آللی استفاده شدند. استخراج DNA از ۰/۱ گرم برگ گیاهچه‌ها در مرحلهٔ دو تا سه برگی با استفاده از روش CTAB انجام شد (۱۵).

آغازگرهای اختصاصی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

آغازگرهای توصیف‌شده توسط اندرسون و همکاران (۳) برای آزمون ژنتیکی حضور آلل‌های 1Dx5 و 1Dx2 استفاده شد. آغازگرهای توصیف‌شده توسط اسمیت و همکاران (۲۶) برای آزمون ژنتیکی حضور آلل‌های Dx10 و Dx12 در مکان ژنی *Glu-D1* به‌کار رفتند. در این پژوهش به‌منظور تشخیص زیرواحد Bx7 از آغازگر ارائه‌شده توسط اندرسون و گرین (۳) و برای شناسایی زیرواحدهای By8 و By9 از آغازگرهای توصیف‌شده توسط لی و همکاران (۱۳) استفاده شد. در این آزمایش واکنش‌های PCR با آغازگرهای اختصاصی[1] (جدول۱) با دو دستگاه ترموسایکلر BioRad و Eppendorf در چرخه‌های دمایی به‌صورت یک مرحله واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۴ °C به‌مدت یک دقیقه، سپس ۳۸ چرخه شامل، واسرشت‌سازی در ۹۴ °C به مدت یک دقیقه، اتصال آغازگرها در دامنه‌دمایی ۵۹ تا ٦٤ °C به‌مدت ٤٥ ثانیه، بسط آغازگرها در ۷۲ °C به‌مدت یک دقیقه و ۳۰ ثانیه انجام شد. در آخر بسط نهایی در ۷۲ °C به‌مدت ۱۰ دقیقه انجام گرفت. غلظت مواد به‌کاررفته در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در حجم ۲۵ میکرولیتر حاوی ۱ واحد Taq DNA پلیمراز، ۱/۱٤ میلی‌مولار از $MgCl_2$ ۵۰ میلی‌مولار، ۱× از بافر (10×) PCR، ۱/۵ میلی‌مولار از هر dNTP ۵۰ میلی‌مولار، ۲۵۰ نانوگرم از هر آغازگر که این مواد از شرکت تکاپوزیست تهیه شدند و ۵۰ نانوگرم از DNA ژنومی که در این واکنش استفاده شد. فرآورده‌های PCR روی ژل‌های آگارز ۱/۵درصد الکتروفورز شدند و در محلول اتیدیوم بروماید ۰/۵ µg/ml به‌مدت یک ساعت رنگ‌آمیزی و سپس با نور UV قابل رؤیت شدند.

جدول۱. مشخصات آغازگرهای اختصاصی و فرآورده‌های مکان‌های ژنی گلوتنین

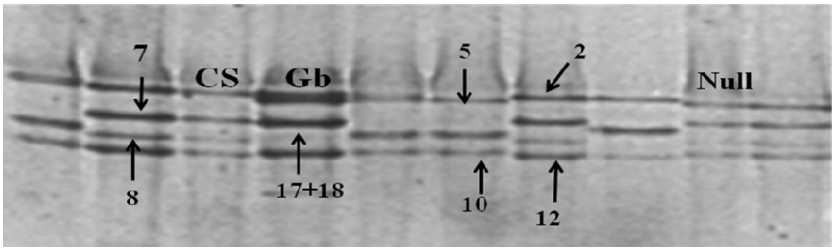
آغازگر	توالی (′۳-′۵)	آلل	دمای اتصال (°C)	اندازهٔ محصول (bp)
P۱	GCCTAGCAACCTTCACAATC	Dx۲ or Dx۳	۶۰	Null
P۲	GAAACCTGCTGCGGACAAG	Dx۵		۴۵۰bp
P۳	GTTGGCCGGTCGGCTGCCATG	Dy۱۲	۶۳	۶۱۲bp
P۴	TGGAGAAGTTGGATAGTACC	Dy۱۰		۵۷۶bp
P۵	ATGGCTAAGCGCCTGGTCCT	BxV	۶۰	۲۳۷۳ bp
P۶	TGCCTGGTCGACAATGCGTCGCTG	No-ByV		Null
PV	TTAGCGCTAAGTGCCGTCT	By۸	۶۴	۵۲۷ bp
P۸	TTGTCCTATTTGCTGCCCTT	No-By۸		Null
P۹	TTCTCTGCATCAGTCAGGA	By۹	۵۹	۶۶۹ bp
P۱۰	AGAGAAGCTGTGTAATGCC	No-By۹		۷۰۷ bp

1. Specific primers

نتایج و بحث

در این پژوهش دو جفت آغازگر اختصاصی شناساگر زیرواحدهای (1Dx5 یا 1Dx2 و 1Dx3) و (1Dy10 یا 1Dy12)، در مکان ژنی *Glu-D1* و سه جفت آغازگر اختصاصی شناساگر زیرواحدهای 1Bx7، 1By8، 1By9 در مکان ژنی *Glu-B1* با رتبهٔ کیفی بالا، متوسط و پایین مؤثر در کیفیت نانوایی در ۲۰ ژنوتیپ گندم نان به‌کار گرفته شدند (جدول۲).

هر یک از نشانگرهای اختصاصی STS از طریق مطابقت با آلل‌های پروتئینی در سیستم SDS-PAGE به تأیید رسید (شکل۱).

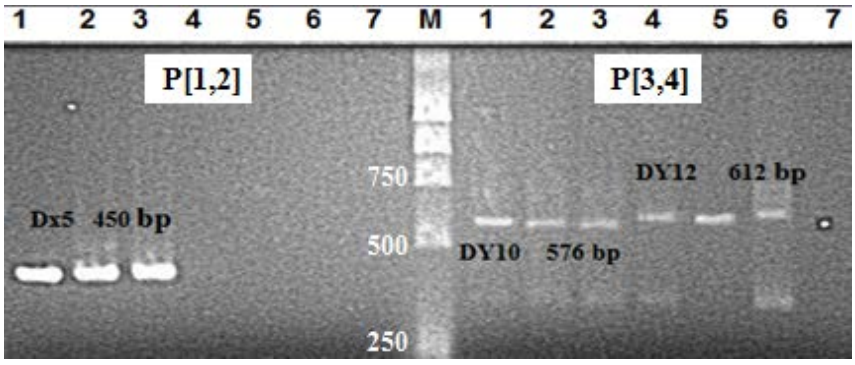


شکل۱. الگوی الکتروفورزی برخی از ارقام نان گندم مطالعه‌شده برای زیرواحدهای گلوتنین با وزن مولکولی بالا

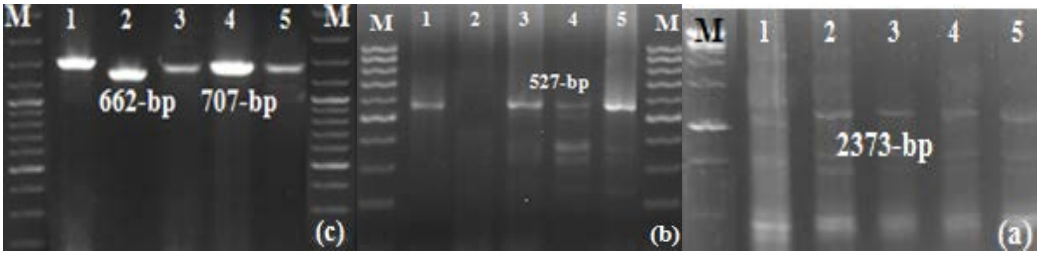
جدول۲. ارقام گندم نان بررسی‌شده، زیرواحدهای گلوتنین، امتیاز کیفی پین و ارتفاع آزمون رسوب SDS

شماره	رقم	زیرواحدهای گلوتنین با وزن مولکولی بالا HMW-GS					رتبهٔ کیفی	آزمون ارتفاع رسوب SDS (cm)
		۱Ax	۱Bx	۱By	۱Dx	۱Dy		
۱	چینی بهاره	نول	۷	۸	۲	۱۲	۶	۵۵
۲	گابو	۲*	۱۷	۱۸	۲	۱۲	۸	۶۵
۳	کرج۲	نول	۷	۸	۵	۱۰	۸	۵۳
۴	کرج۳	۲*	۱۳	۱۹	۲	۱۲	–	۷۰
۵	فلات	۱	۷	۹	۵	۱۰	۱۰	۵۰
۶	نوید	۲*	۱۷	۱۸	۵	۱۰	۱۰	۴۶
۷	قدس	نول	۱۷	۱۸	۵	۱۰	۸	۴۹
۸	استار	۲*	۷	۸	۲	۱۲	۸	۵۷
۹	گلستان	نول	۱۷	۱۸	۵	۱۰	۸	۶۵
۱۰	بزوستایا	۲*	۷	۹	۵	۱۰	۱۰	۶۰
۱۱	اینیا	۱	۷	۸	۵	۱۰	۱۰	۶۳
۱۲	شاه‌پسند	نول	۷	۸	۳	۱۲	۶	۶۵
۱۳	روشن	۲*	۷	۸	۲	۱۲	۶	۵۲
۱۴	اترک	۲*	۷	۸	۲	۱۲	۸	۶۵
۱۵	چناب	۲*	۷	۸	۲	۱۲	۸	۶۸
۱۶	تجن	۱	۷	۱۱	۲	۱۲	–	۶۵
۱۷	اروند	نول	۷	۸	۲	۱۲	۶	۴۱
۱۸	نیک‌نژاد	۲*	۷	۹	۵	۱۰	۹	۶۴
۱۹	طبسی	نول	۷	۸	۲	۱۲	۶	۶۵
۲۰	الوند	۱	۷	۸	۲	۱۲	۸	۴۸

جفت آغازگر P_1 و P_2 برای شناسایی زیرواحد 1Dx5 و 1Dx2 یا 1Dx3 به‌کار رفتند. ارقام دارای زیرواحد 1Dx5 یک فرآوردهٔ اختصاصی ٤٥٠ جفت‌بازی را تولید می‌کنند و ارقام فاقد این زیرواحد و دارای زیرواحدهای 1Dx2 یا 1Dx3 هیچ فرآورده‌ای تولید نمی‌کنند (شکل۲). با استفاده از جفت آغازگرهای P_3 و P_4 ارقام دارای 1Dy10 فرآورده ٥٧٦ جفت‌بازی را تولید کردند ولی ارقام فاقد آن و دارای زیرواحد 1Dy12 یک باند ٦١٢ جفت‌بازی را تولید کردند (شکل۲). ملاحظه می‌شود سه رقم اول که زیرواحدهای پروتئینی 1Dx5+1Dy10 دارند، فرآوردهای ٤٥٠ و ٥٧٦ جفت‌بازی به ترتیب اختصاص به زیرواحد 1Dx5 و 1Dy10 دارند. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای سه رقم بعدی که فاقد 1Dx5 و دارای آلل‌های 1Dx2 یا 1Dx3 هستند هیچ فرآورده‌ای با آغازگرهای P_1 و P_2 تولید نکرد، اما به دلیل حضور آلل 1Dy12 در این ارقام با آغازگرهای P_3 و P_4 نشانگر اختصاصی آن با ٦١٢ جفت‌بازی تکثیر شد. بنابراین، می‌توان از هر یک از این‌ها به‌منزلهٔ نشانگرهای مناسب برای ردیابی ارقام دارای آلل‌های غنی یا ضعیف از نظر ارزش نانوایی استفاده کرد. در این پژوهش آغازگرهای اختصاصی (P_5 و P_6)، (P_7 و P_8)، (P_9 و P_{10}) شناساگر زیرواحدهای Bx7، By8 و By9 در مکان ژنی *Glu-B1* با رتبهٔ کیفی متوسط و مؤثر در افزایش کیفیت نانوایی در ارقام گندم نان به‌کار گرفته شدند که شکل۳ به ترتیب الکتروفورز اختصاصی محصولات PCR را در مکان ژنی *Glu-B1* نشان می‌دهد. با توجه به شکل۳ ژنوتیپ چناب، اروند، طبسی و الوند آلل ۷+۸ دارند و رقم فلات آلل ۹+۷ را نشان می‌دهد. نتایج و ارتباط بین زیرواحدهای گلوتنین و نشانگرهای DNA آن‌ها برای ارقام گندم استفاده‌شده در ایران در این مطالعه با نتایج مطالعات مقبول احمد بر روی ارقام کشور نیوزیلند، دوویدئو و همکارانش و اندرسون و همکاران روی ژنوتیپ‌های اروپا در تعیین نشانگرهای DNA مرتبط با زیرواحدهای پروتیین‌های ذخیره‌ای گندم مطابقت و شباهت دارد (۱، ٥ و٢٦) در مطالعه‌ای مشابه که در این زمینه انجام گرفته است تنوع آللی ١٠٦ ژنوتیپ گندم نان در سطح پروتئین بررسی‌شده قرار گرفت و ٢٢ آلل برای بلوک ژنی شناسایی شد (١٤). همچنین در پژوهشی دیگر که بر روی ارقام تجاری گندم نان ایران انجام شد تعدادی از آلل‌های مکان ژنی *Glu-1* در سطح پروتئین و DNA شناسایی شد (۹ و ۱۰). در این مطالعه با یافتن آلل‌هایی که همبستگی بالایی با صفات مرتبط با کیفیت محصول نهایی گندم دارند می‌توان ژنوتیپ‌های با کیفیت بالا را در مراحل اولیهٔ رشد گیاه انتخاب کرد.



شکل۲. الکتروفورز اختصاصی محصولات PCR مربوط به آغازگرهای[P1, P2] [و P3, P4] ، برای زیرواحدهای 1Dx5 ، 1Dy10 و 1Dy12 در مکان ژنی *Glu-D1* را در شکل نشان می‌دهد. ارقام به‌کاررفته عبارت‌اند از: (۱) نوید، (۲) قدس، (۳) فلات، (٤) کرج۳، (٥) چینی بهاره، (٦) گابو، (۷) شاه‌پسند، M : نشانگر اندازه DNA (kb ۱)



شکل۳. الکتروفورز اختصاصی محصولات PCR مربوط به آغازگرهای [P_6, P_5] و [P_8, P_7] و [P_{10}, P_9]، برای زیرواحدهای Bx7، By8 و By9 در مکان ژنی *Glu-B1* با استفاده از آغازگر اختصاصی به‌ترتیب در شکل (a)، (b) و (c) نشان می‌دهد. ارقام به‌کاررفته عبارت‌اند از: (۱) چناب، (۲) فلات، (۳) اروند، (٤) طبسی، (٥) الوند، M: نشانگر اندازهٔ DNA در شکل(a)، (b) و (c) به‌ترتیب ۱ kb، ۱۰۰bp و ۵۰ bp را نشان می‌دهد.

براساس مطالعات انجام‌شده در این پژوهش در سطح DNA و پروتئین بر روی ارقام نام‌برده می‌توان براساس جدول امتیازدهی پین (۱۸)، رتبه‌بندی کیفی ارقام را براساس بهترین و بدترین رقم از نظر کیفیت نانوایی تعیین کرد (جدول۲). براساس جدول امتیازدهی پین ارقام دارای امتیاز بین هشت تا ۱۰ کیفیت بالا، ارقام دارای امتیاز پنج تا هفت دارای کیفیت متوسط و ارقام دارای امتیازسه تا چهار دارای کیفیت پایین نانوایی هستند. نتایج براساس جدول امتیازبندی نشان داد که ارقام مطالعه شده رتبهٔ کیفی بالا و متوسط دارند. آزمون رسوب SDS[1] نیز به‌منزلهٔ یکی دیگر از روش‌های تعیین کیفیت پروتئین استفاده شد. ارتفاع رسوب SDS حاصل، معرف کیفیت گلوتن است و عدد رسوب SDS هرچه بیشتر باشد کیفیت گلوتن مطلوب است و می‌توان بدون توجه به عملکرد دانه، در پیش‌بینی بهبود کیفیت نانوایی از آن‌ها استفاده کرد (۲۰ و ١٦). به‌طورکلی، باندهای*۲ از مکان ژنی *Glu-A1*، ۱۰+۵ از مکان ژنی *Glu-D1* و ۱۸+۱۷ از مکان ژنی *Glu-B1* روی ارتفاع رسوب بیشترین تأثیر را دارند و وجود این زیرواحد در گندم سبب افزایش ارتفاع رسوب SDS می‌شود و این نتیجه با بخشی از نتایج صادق زاده و همکاران (۲۲) مطابقت دارد. نتایج حاضر در جدول۲ نشان‌دهندهٔ این است که بالا یا پایین بودن ارتفاع رسوب SDS نمی‌تواند دلیل قطعی بر این نظر باشد که این نشان می‌دهد کیفیت نانوایی علاوه بر زیرواحدهای گلوتنین با وزن مولکولی بالا، تحت‌تأثیر زیرواحدهای گلوتنین با وزن مولکولی پایین، نسبت گلوتنین به گلیادین، توزیع وزن مولکولی و محتوای پروتئین کل است (۸). گزینش به کمک نشانگر، پیوستگی بسیار بالایی در بین هر یک از جفت زیرواحدهای ۱۰+۵ و ۱۲+۲ و فرآورده‌های PCR آن‌ها نشان داده است و در این پژوهش این موضوع در تکرارهای مجزا تأیید شد، بنابراین، تعیین قوت و ضعف ارقام گندم از نظر ارزش نانوایی در مکان‌های ژنی *Glu-D1* با استفاده از آغازگرهای اختصاصی آن‌ها در کوتاه‌ترین زمان فراهم می‌شود. حضور فرآودهٔ اختصاصی مکان ژنی 1Bx7 در محصول PCR امکان شناسایی ارقام با پتانسیل متوسط تا خوب را در این جایگاه فراهم می‌کند. عمدهٔ مطالعات بر روی زیرواحدهای گلوتنین با وزن مولکولی بالا و پایین و کیفیت نان در تشخیص ترکیبات آللی برای رتبه‌بندی کیفی ارقام گندم با استفاده از الکتروفورز در سیستم SDS-PAGE انجام گرفته است که دشواری‌های متعددی دارد و درمجموع مستلزم صرف وقت و کار زیاد و تفسیر آن‌ها دشوار است و استفاده از نشانگرهای DNA

1. Sodium Dodecyl Sulfate

به‌دلیل محدودیت‌های ذکرشده ترجیح داده می‌شوند. نتایج این پژوهش می‌تواند ضمن رفع خطاهای ممکن در نامگذاری الگوی باندی پروتئینی سیستم SDS-PAGE، موجب تشخیص بسیارسریع پتانسیل کیفی ارقام از نظر ارزش نانوایی برای جایگاه‌های *Glu-D1* و *Glu-B1* در برنامه‌های اصلاحی می‌شود. نشانگرهای DNA تأییدشده برای ارزش نانوایی را می‌توان در مرحلهٔ گیاهچه‌ای به‌دست آورد و دیگر نیازی نیست گیاهان بذرگیری و ترکیبات پروتئینی آن‌ها مشخص شوند و این گزینش سریع موجب پرهیز از اتلاف وقت و تسریع در پژوهش های هم‌زمان کمّی و کیفی ارقام در نسل‌های حاصل از تلاقی‌ها می‌شود. بنابراین، از نشانگرهای اختصاصی به روش STS-PCR می‌توان جهت شناخت ژنوتیپ‌هایی با هدف خاص و ارزیابی کیفی ارقام گندم استفاده کرد. گزینش ارقام ضعیف و قوی از نظر ارزش نانوایی در مکان ژنی *Glu-D1* و *Glu-B1* به‌راحتی ممکن می‌شود و شناخت ارقام دارای جزء 1Bx7 با کیفیت متوسط تا خوب نیز به‌سهولت امکان‌پذیر است. همچنین با توجه به نتایج می‌توان بیان کرد که آزمون ارتفاع رسوب SDS شاهد مناسبی برای تأیید درجهٔ کیفیت ارقام، با توجه به نتایج حاصل از PCR و SDS-PAGE است.

منابع

1. Ahmad M (2000) Molecular marker-assisted selection of HMW glutenin alleles related to wheat bread quality by PCR-generated DNA markers. Theoretical and Applied Genetics. 101: 892-896 .
2. Anderson DD and Greene FC (1989) The characterization and comparative analysis of high-molecular-weight glutenin genes from genomes A and B of a hexaploid bread-wheat. Theoretical and Applied Genetics. 77: 689-700 .
3. Anderson DD, Greene FC, Yip RE, Halford NG, Shewry PR and Malpica-Romero JM (1989) Nucleotides sequences of the two high-molecular-weight glutenin genes from the D-genome of hexaploid bread wheat , *Triticum aestivum* L. cv Cheyenne. Nucleic Acids Research. 17: 461-462 .
4. De-Bustos A, Rubio P, Soler C, García P and Jouve N (2001) Marker assisted selection to improve HMW glutenins in wheat. Euphytica. 119: 69-73 .
5. Dovidio R, Porceddu E and Lafiandra D (1994) PCR analysis of genes encoding allelic variants of high-molecular-weight glutenin subunits at the Glu-D1 locus. Theoretical and Applied Genetics. 88: 175-180 .
6. Gianibelli MC, Larroque OR, MacRitchie F and Wrigley CW (2001) Biochemical, genetic and molecular characterization of wheat glutenin and its component subunits. Cereal Chemistry. 78: 635-646 .
7. Guo PG, Bai GH and Shaner GE (2003) AFLP and STS tagging of a major QTL for Fusarium head blight resistance in wheat. Theoretical and Applied Genetics. 106: 1011-1017.
8. Gupta RB, Batey IL and Ritchie FM (1992) Relationships between protein composition and functional properties of wheat flour. Cereal Chemistry. 69: 125-131 .
9. Izadi Darbandi A and Yazdi samadi B (2012) Marker-assisted selection of high molecular weight glutenin alleles related to bread-making quality in Iranian common wheat (*Triticum aestivum* L.). Genetics. 91: 193-198 .

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

11. Johal J, Gianibelli MC, Rahman S, Morell MK and Gale KR (2004) Characterization of low-molecular-weight glutenin genes in *Aegilops tauschii*. Theoretical and Applied Genetics. 109:1028–1040 .

12. Kuchel H, Fox R , Reinheimer J, Mosionek L, Willey N, Bariana H and Jefferies S (2007) The successful application of a marker- assisted wheat breeding strategy. Molecular Breeding (In Press) .

13. Lei ZS, Gale KR, He ZH, Gianibeli C, Larroque O, Xia XC, Butow BJ and Ma W (2006) Y-type gene specific markers for enhanced discrimination of high-molecular weight glutenin alleles at the Glu-B1 locus in hexaploeid wheat. Cereal Science. 43: 94-101 .

14. Liu L, He ZH, Ma WJ, Liu JJ, Xia XC and Pena RJ (2009) Allelic variation at the Glu-D3 locus in Chinese bread wheat and effects on dough properties, pan bread and noodle qualities. Cereal Research Communications. 37: 57-64 .

15. Murray M and Thompson WF (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Research. 8: 4321-4325 .

16. Najafian G, Bahraie S, Baghaie N, Mortezagholi M and Babaie-Goli E (2008 (Bread making quality attributes of Iranian commericial cultivars of wheat and their HMW glutenin subunits composition. Proceedings the 11th International Wheat Genetics Symposium. 24-29 Aug., Brisbane, Australia. 241p.

17. Park WJ, Shelton DR, Peterson CJ, Martin TJ, Kachman SD and Wehling RL (1997) Variation in polyphenol oxidase activity and quality characteristics among hard white wheat and hard red winter wheat samples. Cereal Chemistry. 74: 7-11 .

18. Payne PI, Nightengale MA, Krattiger AF and Holt LM (1987) The relationship between HMW glutenin subunit composition and breadmaking quality of British grown wheat varieties. Science Food Agriculture. 40: 51-65 .

19. Prins R, Groenewald JZ, Marais GF, Snap JW and Koebner RMD (2001) AFLP and STS tagging of Lr19, a gene conferring resistance to leaf rust in wheat. Theoretical and Applied Genetics. 103: 618-624.

20. Quick JS and Donnelly BI (1980) A rapid test for estimation of durum wheat gluten quality. Crop Science. 20: 816-818 .

21. Radovanovic N and Cloutier S (2003) Gene-assisted selection for high molecular weight glutenin subunits in wheat doubled haploid breeding programs. Molecular Breeding. 12: 51-59 .

22. Sadeghzadeh B, Ghannadha M R, Ahmadian Tehrani P, Abdmishani S and Seied Tabatabaei BE (2002) Determination of relationship between HMW-GS and wheat baking quality through Electrophoresis. Iranian Journal of Agriculture Science. 33: 535-542. (In Farsi (

23. Semgan K, Bjornstad A and Ndjionjop MN (2006) An overview of molecular marker methods for plants. African Journal of Biotechnology. 5(25): 2540-2568.

24. Shewry PR, Halford NG, Tatham AS, Popineau Y, Laciandra D and B elton PS (2003) The high molecular weight subunits of wheat glutenin and their role in determining wheat processing properties. Advance Food Nutrient Research. 45: 221-302 .

25. Singh NK, Sheperd KW and Cornish GB (1991) A simplified SDS-PAGE procedure for separating LMW subunits of gl utenin. Cereal Science. 14: 203-208 .

26. Smith RL, Schweder ME and Barnett RD (1994) Identification of glutenin alleles in wheat and triticale using PCR-generated DNA markers. Crop Science. 34: 1373-1378 .

27. Tanhaiyan A, Shahriari F, Marashi SH and Dehghan E (2009) St udy of al lelic variation at *Glu-b3* locus of the Iranian bread wheat cultivars by using ALP m olecular marker. Iranian Journal of researches agriculture. 7: 367-374. (In Farsi)

28. Uthayakumaran S, B atey IL and Wrigley CW (2004) On-the-spot identification of grain variety and wheat-quality type by Lab-on-chip capillary electrophoresis. Cereal Science. 41: 371-374 .

29. Uthayakumaran S, Li stiohadi Y, Baratta M, Batey IL and W rigley CW (2006) Rapid identification and quantitation of high–molecular-weight glutenin subunits. Cereal Science. 44: 34-39 .

30. Van-Compenhout S, St appen JV, Sagi L and Volckaert G (1995) Locus-speci fic primers for LMW glutenin genes on each of the group 1 chromosomes of hexapl oeid wheat. Theoretical and Applied Genetics. 91: 313-319 .

31. Xu Q, Xu J, Li u CL, Chang C, Wang CP, You MS, Li BY and Li u GT (2008) PC R-based markers for identification of HMW-GS at *Glu-B1x* loci in common wheat. Cereal Science. 47: 394-398 .