

بررسی تنوع ژنتیکی و تعیین رابطه زیر واحدهای گلو تین با وزن مولکولی بالا با کیفیت نانوائی در توده‌های بومی گندم ایران

حمید رضا بابایی، بهمن یزدی صمدی و سیروس عبدالمیشانی

به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و استادان گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران

تاریخ پذیرش مقاله ۷۹/۵/۵

خلاصه

به منظور بررسی تنوع ژنتیکی زیر واحدهای گلو تین با وزن مولکولی بالا و تعیین رابطه آنها با کیفیت نانوائی، تعداد ۷۸ مرفوتیپ گندم نان استان خوزستان متعلق به کلکسیون غلات دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران از نظر زیر واحدهای گلو تین با وزن مولکولی بالا (HMW-GS) با استفاده از روش SDS-PAGE مورد بررسی قرار گرفتند. در این بررسی برای مکان ژنی GLU-B1 چهار واریانت شامل: *۷، *۷، *۸ و برای مکان ژنی GLU-D1 دو واریانت *۲ و ۱۲ مشاهده گردید. نتایج این بررسی نشان داد که مکان ژنی GLU-D1 بیش از سایر مکانهای ژنی در کیفیت نانوائی موثر است. عدم ظهور زیر واحد ۱DX۲ باعث افت قابل ملاحظه‌ای در کیفیت نانوائی گردید. تأثیر واریانت های مکان ژنی GLU-B1 نیز در کیفیت نانوائی نا مشخص و مبهم بود. همچنین برای گروه بندی شهرهای مبدأ مرفوتیپ‌ها از حیث زیر واحدهای گلو تین از تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA استفاده و مشخص گردید رابطه دقیقی بین تنوع ژنتیکی و پراکنش جغرافیایی وجود ندارد.

واژه‌های کلیدی: گندم نان، کیفیت نانوائی، تنوع ژنتیکی، زیر واحدهای گلو تین با وزن مولکولی بالا، واریانت.

مقدمه

تجزیه الکتروفورزی توده‌های بومی گندم برای اجزای گلو تین با وزن مولکولی بالا (HMW-GS) تاکنون به دو منظور زیر صورت گرفته است:

- ۱- بررسی پولی مورفیسم و پراکنندگی جهانی آللهای GLU-1
- ۲- بررسی رابطه بین اجزای گلو تین با وزن مولکولی بالا با کیفیت نانوائی (۱).

در سالهای اخیر الکتروفورز ژل پلی اکریل آمید (PAGE) پروتئینهای ذخیره‌ای غلات روش معتبری برای ارزیابی تنوع شیمیایی در ارقام و در بعضی از جوامع بومی گندم بوده است. این روش ممکن است به منظور جمع آوری ژرم پلاسما در

جاهایی که تنوع ژنتیکی قابل ملاحظه‌ای دارند یا در مناطقی که تنوع پذیری زیادی در آنجا انتظار می‌رود مورد استفاده قرار می‌گیرد. دومینی سی و گروتانلی (۲) در مرکز تحقیقات ایکاردا تنوع الکتروفورزی گندمهای بومی اتیوپی را بررسی و نتیجه گرفتند بعضی از توده‌های گندم دوروم با گندمهای هگزابلوئید این کشور مخلوط شده‌اند. آنها در گزارش خود با اشاره به نتایج کار محققین دیگر اظهار نموده اند که اتیوپی منبع ژنی مناسبی برای ژرم پلاسما گندمهای با کیفیت بالا است. مورگانوف و پینا (۴) انتشار آللهای GLU-1 گندم نان را در سطح جهانی بررسی و از تجزیه خوشه‌ای به منظور شناسایی شباهتها در پراکنندگی آلل های GLU-1 استفاده کردند تجزیه خوشه‌ای نشان داد که آلل های GLU-1 با پارامترهای

جغرافیایی در سطح جهانی مرتبط نمی‌باشد و اجزای گلو تین در ارقام کشورهای با اقلیم مختلف همچون فنلاند، یوگسلاوی، ایتالیا و چین مشابه هستند. آنها نتیجه گیری نمودند که در این کشورها ارزیابی کیفیت نانوائی با روشهای مشابهی انجام می‌شود و تزیین مصنوعی در جهت کیفیت مطلوب در یک دوره زمانی نسبتاً طولانی بر روی فراوانی آللهای GLU-1 تأثیر زیادی گذاشته که نهایتاً منجر به کاهش تنوع مکان ژنی GLU-1 شده است.

مارچی لو و همکاران (۳) با روش SDS-PAGE شیب‌دار بعضی از گندمهای کانادا را مورد تجزیه الکتروفورزی قرار دادند. آنها واریاتی از نوار ۷ مشاهده کردند که از نظر تحرک نسبی کمی پایین‌تر از نوار ۷ قرار می‌گرفت و آنرا* ۷ نامیدند. در بعضی ارقام همچنین واریاتی از نوار ۸ به نام* ۸ مشاهده شد که از نظر تحرک نسبی کمی پایین‌تر از نوار ۸ ظاهر می‌شد.

راجرز و پاین (۵) در دانشگاه کمبریج لاینهای ایزوژنی ایجاد کردند که یک زیر واحد از GLU-B1 یا GLU-D1 را داشتند و برای زیر واحد X-Type یا Y-Type ناقص بودند. آنها لاینهای ایزوژن ناقص را با لاینهای ایزوژن شاهد مقایسه و تأثیر هر زیر واحد را بر روی کیفیت تعیین نمودند. نتایج این آزمایش نشان داد که آللهای GLU-D1 تأثیر بیشتری نسبت به GLU-B1 بر روی کیفیت دارند. همچنین IDX اثر کمتری نسبت به IDY بر کیفیت میگذارد. در حالی که برخی از بررسیها تأثیر IDX را بر روی کیفیت معادل IDY گزارش نموده اند.

مواد و روشها

تعداد ۷۸ مرفوتیپ گندم نان از توده‌های بومی استان خوزستان متعلق به کلکسیون غلات دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران در سال ۱۳۷۳ به منظور بررسی کیفیت نانوائی و الکتروفورزی در مزرعه کشت و تکثیر گردید.

پس از برداشت محصول با در نظر گرفتن فراوانی مرفوتیپها در توده بومی جهت بررسی الکتروفورزی نمونه برداری انجام گردید. الکتروفورز با استفاده از SDS و ژل اکریل آمید (۱۰% و ۷%) با SDS-PAGE موسوم به روش الکتروفورز "لایمی" (۱۹۷۰) انجام شد. برای اینکار پس از تهیه محلولهای مورد نیاز، ابتدا یک دانه گندم مربوط به هر نمونه را با انبر دستی خرد نموده در تیوپ

پلاستیکی ریخته و بافر استخراج پروتئین به آن اضافه شد. پس از استخراج پروتئین‌ها، محلول ژل تحتانی را آماده و در قالب مخصوص آن ریختیم پس از پلیمریزه شدن ژل، محلول ژل فوقانی را آماده روی ژل تحتانی ریخته و بلافاصله شانه مخصوص چاهک‌ها را روی ژل فوقانی قرار دادیم، پس از پلیمریزه شدن ژل، شانه را از ژل خارج نموده، نمونه عصاره پروتئین را در محل چاهکها تزریق نمودیم. در هر ژل دو نمونه استاندارد شاهد از ارقام امید و آزادی برای کمک به تشخیص زیر واحدهای گلو تین استفاده شد. قالب ژل را روی سیستم سردکننده دستگاه الکتروفورز سوار نموده و پس از تنظیم ولتاژ و شدت جریان دستگاه را روشن نمودیم تا عمل الکتروفورز انجام شود. بعد از حدود ۷ ساعت دستگاه را خاموش نموده، قالب‌های ژل را خارج نموده و ژل را از قالب مخصوص آن جدا نموده در محلول رنگ قرار دادیم تا ژل و نوارهای پروتئین آن رنگ آمیزی شود. پس از پایان رنگ آمیزی (حدود ۴۰-۶۰ ساعت) ژل را در محلول رنگ بر قرار دادیم تا رنگهای اضافی از ژل خارج و تشخیص نوارهای پروتئین امکان پذیر باشد. در این تحقیق ابتدا از ژل پلی‌اکریل آمید ۱۰ درصد برای شناسایی نوارهای پروتئینی استفاده شد اما برای اطمینان در تشخیص زیر واحدهای ۲ و* ۲ که به وفور در نمونه‌ها وجود داشت از ژل رقیق‌تر ۷/۵ درصد نیز استفاده شد (۱).

برای بررسی کیفیت نانوائی مقدار یک گرم آرد از هر مرفوتیپ تهیه نموده و آزمایش رسوب SDS را مشابه روش ارائه شده "کوئیک و دانلی" با تغییرات جزئی برای نمونه‌ها انجام دادیم. میزان پروتئین نمونه‌ها نیز با استفاده از دستگاه NIR اندازه گیری شد و برای اطمینان با روش کلدال کنترل گردید (۱).

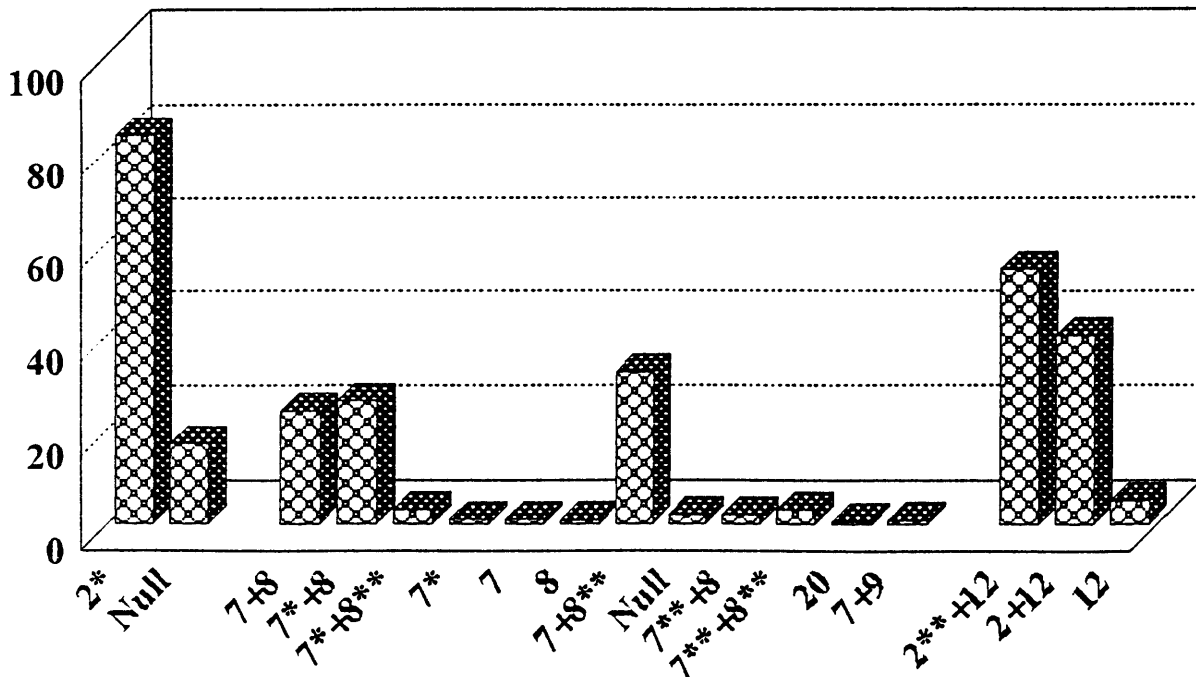
پس از جمع‌آوری داده‌ها تجزیه واریانس اثر مکانهای ژنی سه‌گانه GLU-1 برای ارتفاع رسوب SDS در دو نوع گروه‌بندی پروتئین شامل: الف) دو سطح پروتئینی: کمتر از ۱۵% و بیشتر از ۱۵% (ب) سه سطح پروتئین: (۱) ۱۴/۵-۱۲/۴ (درصد ۲) ۱۶/۶-۱۴/۵ (درصد ۳) ۱۸/۷-۱۶/۶ و مقایسه میانگین زیر واحدها برای ارتفاع رسوب SDS با آزمون دانکن در سطح ۵% با استفاده از برنامه GLM نرم افزار آماری SAS انجام شد. از تجزیه رگرسیونی قدم به قدم نیز برای تعیین نقش مکانهای ژنی در ارتفاع رسوب SDS با استفاده از برنامه PROG-REG، گزینه رگرسیون

میزان پروتئین در ارتفاع رسوب SDS برای دو نوع گروهبندی پروتئین در جدول ۱ و مقایسه میانگین زیر واحدهای GLU-1 برای هر دو نوع گروه بندی در جدول ۲ آمده است. با مراجعه به جدول ۱ ملاحظه می‌گردد که تاثیر مکان ژنی GLU-A1 در ارتفاع رسوب SDS در دو نوع گروهبندی پروتئین معنی‌دار است. میانگین ارتفاع رسوب SDS برای آلل ۲ نسبت به آلل نول بیشتر و در سطح ۱٪ معنی‌دار بود. تأثیر مکان ژنی GLU-B1 برای ارتفاع رسوب SDS غیر معنی‌دار بود. زیر واحدهای این مکان ژنی از نظر ارتفاع رسوب SDS با سه سطح پروتئینی در دو گروه قرار می‌گیرند. زیر واحد ۹ و زیر واحد ۷+۹ در یک گروه مجزا و سایر زیر واحدها در گروه دیگر قرار می‌گیرند. برای دو سطح پروتئینی هم نتایج مشابه بود با این تفاوت که زیر واحد ۷+۸ تفاوت معنی‌داری با دو گروه نشان نداد. پایین بودن ارتفاع رسوب SDS برای زیر واحد ۷+۹ می‌تواند بدلیل همبستگی مثبت و بالای (۰/۳۹) این زیر واحد با زیر واحد ۱۲ از مکان ژنی GLU-D1 باشد که با ارتفاع پایین رسوب SDS همراه است. علاوه بر این نتایج بسیاری از محققین نشان می‌دهد که زیر واحد ۹ نسبت به زیر واحد ۸ از امتیاز کیفی پایین‌تری برخوردار است (۶).

قدم به قدم نرم‌افزار SAS استفاده شد. برای تعیین تنوع ژنتیکی شهرهای مبدأ مرفوتیها از حیث زیر واحدهای مکان ژنی GLU-1 تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA با استفاده از گزینه CLUSTER نرم‌افزار آماری SPSS انجام گردید.

نتایج و بحث

نوع و فراوانی زیر واحدهای گلوتهین با وزن مولکولی بالا در مرفوتیپ‌های مورد بررسی در نمودار ۱ آمده است. با مراجعه به این نمودار ملاحظه می‌گردد که برای مکان ژنی GLU-A1 دو زیر واحد* ۲ و نول و برای مکان ژنی GLU-B1، زیر واحد ۷+۸، دو و واریانت از ۷ به نامهای* ۷ و** ۷، واریانت** ۸، زیر واحد ۸ (بدون زیر واحد ۷) ترکیبی از واریانتهای ۷ و ۸ و نول (عدم ظهور هر نوع زیر واحد) مشاهده گردید برای مکان ژنی GLU-D1 نیز زیر واحد ۱۲+۲ زیر واحد ۱۲ همراه با واریانتهای از زیر واحد ۲ به نام* ۲ (مشابه زیر واحد ۲/۱ که قبلاً توسط لاگودا گزارش شده است) و زیر واحد ۱۲ بدون زیر واحد ۲ (1DX=null) مشاهده گردید (شکل ۱). نتایج تجزیه واریانس برای تاثیر مکانهای ژنی سه گانه و



نمودار ۱ - فراوانی زیر واحدهای گلوتهین با وزن مولکولی بالا در مرفوتیپهای مورد بررسی

جدول ۱ - تجزیه واریانس خصوصیات کیفی گندم نان

منابع تغییر		دوسطح پروتئین		سه سطح پروتئین	
df	درصد پروتئین	df	ارتفاع رسوب SDS	درصد پروتئین	ارتفاع رسوب SDS
۱	۳۹/۹۸**	۲	۱۸/۳۱	۲۷/۷۱**	۱۳/۵۹
۱	۰/۳۹	۱	۳۴۶۲/۲۴**	۰/۷۸	۳۶۵۰/۲۹**
۱۱	۱/۴۴*	۱۰	۴۳۸/۲۷	۱/۷۰**	۴۴۷/۳۰
۲	۲/۳۲*	۲	۳۴۸۱/۰۸**	۰/۹۰	۴۲۵۴/۹۳**
۱	۰/۳۶	۲	۲۰۹/۲۰	۰/۰۱	۲۸۴/۰۸
۴	۱/۶۸*	۷	۲۰۷/۳۹	۲/۴۹**	۸۱۴/۹۱**
۲	۱/۹	۳	۲۰۱/۳۱	۲/۳۹**	۴۲۶/۰۳
۴	۱/۵۲	۴	۱۹۰/۶۳	۱/۴۱*	۲۳۶/۰۵
۱	۳/۵۲*	۱	۰/۴۸	۴/۳۸**	۱۹/۰۹
۴	۱/۷۸*	۴	۴۳۸/۵۶	۴/۵۶**	۲۵۶/۵۶
	۰/۶۷		۰/۴۶	۰/۷۵	۰/۵۲
					R ^۲

** و * به ترتیب معنی دار در سطوح ۱٪ و ۵٪

معنی دار شدن تفاوت در میزان پروتئین بین زیر واحدهای این مکان ژنی باشد (جدول ۱).

معنی دار نشدن اثر متقابل مکانهای GLU-A1, GLU-D1 در میزان پروتئین را می توان به تنوع کم زیر واحدها در نمونه های مورد بررسی مربوط دانست. به عبارت دیگر تعداد زیر واحدها در حدی نیست که بتوان برآورد صحیحی از اثر متقابل بدست آورد.

نتایج تجزیه واریانس همچنین نشان داد که ارتفاع رسوب SDS بستگی به میزان پروتئین ندارد و با تغییر آن ارتفاع رسوب SDS تغییر معنی داری پیدا نمی کند. بنابراین آزمایش رسوب SDS بدون تأثیر پذیری از مقدار پروتئین روش دقیقی برای برآورد کیفیت نانویی محسوب می گردد.

تجزیه رگرسیون

برای برآورد نقش هر مکان ژنی در ارتفاع رسوب SDS از

تجزیه رگرسیونی به روش گام به گام استفاده شد:

۱- معادله رگرسیونی برای مکان ژنی GLU-A1:

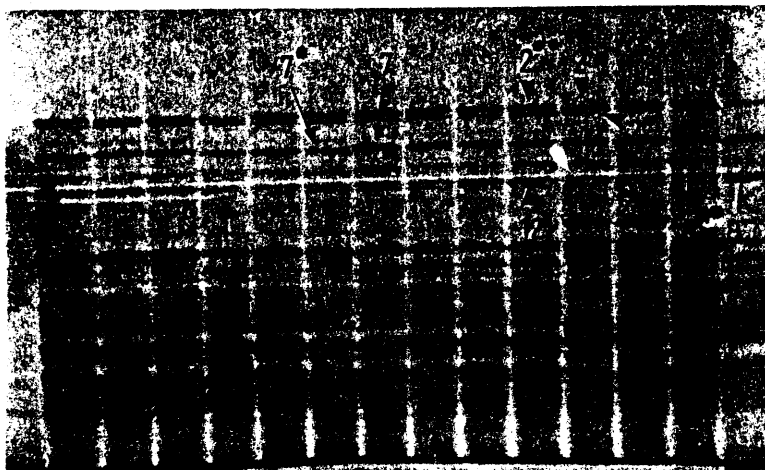
$$Y = 35/86 + 12/49X$$

$$Y = \text{SDS} \quad X = 2^* \quad (R^2 = 0/05, P = 5\%)$$

پایین بودن ارتفاع رسوب SDS برای زیر واحد ۸ ممکن است به دلیل کاهش تعداد زیر واحدها که منجر به کاهش مقدار کلی پروتئین می شود، یا به دلیل تعداد تکرار کم برای این زیر واحد (۳ نمونه) که قضاوت صحیح درباره آنرا دشوار می سازد، و نهایتاً اینکه امتیاز کیفی زیر واحد ۸ نسبت به زیر واحد ۷ کمتر است (۶) باشد.

نتایج تجزیه واریانس در دو نوع گروه بندی پروتئین نقش مثبت و معنی دار مکانی ژنی GLU-D1 را نشان می دهد. زیر واحدهای این مکان ژنی از نظر ارتفاع رسوب SDS از سه گروه مجزا شامل زیر واحد ۱۲ + ۲ بایشتین میانگین، پس از آن زیر واحد ۱۲ + ۲** و بالاخره زیر واحد ۱۲ با کمترین میانگین ارتفاع رسوب SDS قرار می گیرند. این نتیجه بیانگر ارزش بالای زیر واحد DX=2 است که عدم ظهور یا تغییر در ساختمان این زیر واحد باعث افت ارتفاع رسوب SDS شد.

از بین اثر متقابل ها فقط اثر متقابل مکان ژنی GLU-B1 در میزان پروتئین با سه گروه پروتئین برای ارتفاع رسوب SDS معنی دار شد. چون اثر مکان ژنی GLU-B1 برای ارتفاع رسوب SDS معنی دار نشده است، معنی دار شدن اثر متقابل می تواند به دلیل



شکل ۱ - موقعیت نوارهای ۷، ۷*، بندهای ۸، ۸** مکان ژنی GLU-B1 در ژل ۷/۵ درصد.

۲ - معادله رگرسیونی برای مکان ژنی GLU = B1:

$$(R^2 = 0.07, P = 5\%)$$

$$Y = 39/67 + 8/3 X_1 + 11/82 X_2 + 21/0.7 X_3$$

$$Y = \text{SDS}, X_1 = 7+8, X_2 = 7+8^*, X_3 = 7^*+8^*$$

۳ - معادله رگرسیونی برای مکان ژنی GLU-D1

$$(R^2 = 0.21, P = 5\%)$$

$$Y = 13/0.8 + 30/24 X_1 + 41/57 X_2$$

$$Y = \text{SDS}, X_1 = 2^*+12, X_2 = 2+12$$

۴ - معادله رگرسیونی وقتی که هر سه مکان ژنی برای مدل

رگرسیونی در نظر گرفته شدند:

$$+ 17/15 X_1 - 30/24 X_2 + 29/39 X_3 + 43/42 X_4$$

$$Y = 1/12$$

$$(R^2 = 0.31, P = 5\%)$$

$$X_1 = 2^* X_2 = 8 X_3 = 2^{**} + 12 X_4 = 2 + 12$$

$$Y = \text{SDS}$$

مقادیر R^2 معادلات رگرسیونی نشان میدهد که مکان

ژنی GLU-D1 به تنهایی بیش از دو سوم کل تغییرات را

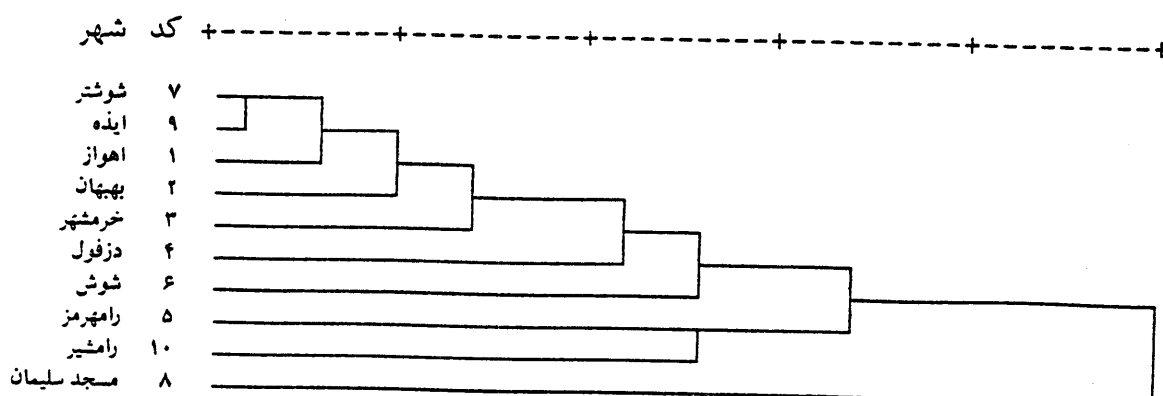
توجیه می‌کند. این نتیجه با نتایج جدول تجزیه واریانس نیز مطابقت

دارد.

جدول ۲ - مقایسه میانگین زیر واحدهای مکان ژنی GLU-1 برای هر دو نوع گروه بندی پروتئینی⁺.

مکان ژنی	زیر واحد	ارتفاع رسوب SDS
Glu-A1	۲*	۴۸/۳۶ a
	نول	۳۵/۸۷ b
Glu-B1	۷**+۸**	۶۰/۷۵ a
	۷+۸**	۵۱/۷۴ a
	۷+۸	۴۷/۹۸ a
	نول	۴۶/۵۰ a
	۷**+۸	۴۳/۲۵ a
	۷*	۴۳ a
	۷	۴۳ a
	۷**+۸**	۴۱/۳۳ a
Glu-D1	۷**+۸	۳۹/۶۱ a
	۸	۱۵ b
	۷+۹	۱۴ b
	۲+۱۲	۵۴/۶۶ a
	۲**+۱۲	۴۳/۳۳ b
	۱۲	۱۳/۰۸ c

⁺ مقایسه میانگین با سه سطح پروتئین جز برای زیر واحد ۷+۸** که رتبه ab گرفت برای سایر زیر واحد ها مشابه بود



نمودار ۲ - دندروگرام تعیین فاصله بین شهرها بر اساس آلل های مکان ژنی GLU-1

۲- دندروگرام تعیین فاصله بین شهرها را بر اساس زیر واحدهای مکان ژنی GLU-1 نشان می دهد. با مشاهده نمودار ملاحظه می گردد که رابطه منطقی مشخصی بین تنوع ژنتیکی و تنوع جغرافیایی وجود ندارد. احتمالاً این موضوع به دلیل امکان تبادل بذر بین شهرهای مجاور که در یک منطقه (به وسعت استان خوزستان) واقع شده اند و یابه دلیل تعداد کم نمونه در شهرهای مبدأ مرفوتیب هاست.

بررسی تنوع ژنتیکی برای زیر واحدهای گلوٹنین با وزن مولکولی بالا (HMW-GS):

به منظور بررسی تنوع ژنتیکی زیر واحدهای گلوٹنین با وزن مولکولی بالا پس از انجام الکتروفورز و تهیه الگوی نواربندی نمونه ها، آللهای موجود شناسایی و فراوانی نسبی آللهای برای شهرهای مبدأ مرفوتیب ها بدست آمد. حضور و عدم حضور هر آلل به ترتیب با اعداد یک و صفر برای هر نمونه مشخص شد و برای تعیین فاصله ژنتیکی از تجزیه خوشه ای به روش UPGMA استفاده شد. نمودار

REFERENCES

مراجع مورد استفاده

۱. بابایی، ح. ۱۳۷۵. بررسی تنوع ژنتیکی گندمهای بومی ایران با استفاده از الکتروفورز پروتئینهای ذخیره ایی آندوسپرم. پایان نامه فوق لیسانس، دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران.
2. Dominici, L.A., & C. Grottanelli. 1984. ElectroPhoretic Variability In landraces Of durum Wheat from Ethiopia. *J. Of Rachis*. 7:34-35.
3. Marchylo, B.A.; O.M. Lukow, & J.E. Eruger. 1992. Quantitative Variation in high molecular Weight glutenin subunit 7 in some Canadian Wheats, *J. of cereal sci.* 15(1):29-37.
4. Morganov, A. L.; & R.J. Pena. 1993. World wide distribution of Glu-1 alleles in bread wheat. *J. of Genetics and plant Breeding* 47(1) 53-60
5. Rogers, W. J.; & P.I. Payne. 1991. Effect on bread making quality of X-Type and Y-Type high molecular weight subunits of glutenin. *J. of cereal sci.* 14 (3) 209-221.
6. Shewry, P.R.; N.G. Halford, & A. Statham. 1991. High molecular weight subunits of wheat glutenin. *J. of cereal sci.* 15:105-120.

Studies on Genetic Diversity and Relationships Between Subunits of High Molecular weight Glutenin (HMW-GS) and Bread - Making Quality of Bread wheat Landraces.

H. R. BABAEE, B. YAZDI-SAMADI AND C. ABD-MISHANI

Former Graduate Student and Professor Faculty of Agriculture University of Tehran Karaj, Iran.

Accepted June, 25, 2000

SUMMARY

In order to investigate the genetic diversity of high molecular weight glutenin subunits and relationships between the subunits and bread making quality of wheat, seventy eight morphotypes of bread wheat of khuzestan province from cereal collections of Tehran Agricultural College were studied, using SDS-PAGE technique. The results showed four variants in GLU-B1 locus including: 7*, 7**, 8**, subunit 8 and null (1BY=null, 1BX=null) and two variants in GLU-D1 locus including: 2** and subunit 12. It was found that GLU-D1 locus has significant and more favorable effects on bread quality, compared to other loci, and the absence of subunit 2 considerably reduces the bread-making quality. The effects of subunits of GLU-B1 locus on bread-making quality is not well understood. Cluster analysis was performed to group locations (cities), and the results showed no relations between genetic and geographical diversity, concerning high molecular weight glutenin subunits.

Key words: bread-making quality, genetic diversity, high molecular weight glutenin subunits, variants.