

شناسایی پروتئین‌های دارای جرم مولکولی بالا در *Aegilops crassa* بومی ایران

مهسا بام نشین^۱، محمدرضا نقوی^{۲*}، علیرضا طالعی^۳، محمدجعفر آقایی^۴ و محمداسماعیل حسینی^۵
۱، ۲، ۳. دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و استادان پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران
۴. استادیار مؤسسه تحقیقات نهال و بذر، بخش ژنتیک، ۵. استادیار دانشکده کشاورزی، غذا و منابع طبیعی،
پارک تکنولوژی استرالیا، دانشگاه سیدنی
(تاریخ دریافت: ۸۸/۷/۶ - تاریخ تصویب: ۸۸/۱۲/۱۲)

چکیده

در این تحقیق تعداد ۱۲۰ نمونه *Aegilops crassa* (با ژنوم MMDD) بومی ایران از نظر پروتئین‌های گلوئین با وزن مولکولی بالا مورد بررسی قرار گرفتند. پس از ارزیابی نوارهای بانندی از بین متنوع‌ترین نوارها، ۱۷ الگوی بانندی انتخاب و جهت تعیین نوع پروتئین آنها از روش اسپکترومتری جرمی استفاده گردید. از بین ۱۷ باند تنها ۶ باند با احتمال بالا شناسایی گردیدند. از باندهای شناسایی شده ۲ باند با باندهای موجود در *Aegilops ventricosa* و دو باند دیگر با باندهای موجود در *Triticum aestivum* از نظر وزن مولکولی بالا تطابق داشتند. همچنین ۲ باند دیگر با بتا آمیلاز در *Hordeum vulgare* تطابق نشان دادند. برای ۱۱ باند دیگر هیچ اطلاعاتی از روش اسپکترومتری جرمی به دست نیامد. نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که نمونه‌های *Ae. crassa* بومی ایران به عنوان یک منبع پروتئینی مناسب می‌توانند در اصلاح گندم برای بهبود خصوصیات پروتئینی مورد استفاده قرار گیرند.

واژه‌های کلیدی: اسپکترومتری جرمی، پروتئین‌های با وزن مولکولی بالا، ژنوم MMDD.

مقدمه

تتراپلوئید *Ae. crassa* و *Ae. tauschii* حاصل گردیده است. اما در حال حاضر منشأ سیتوتیپ تتراپلوئید *Ae. crassa* را نمی‌توان با دقت تعیین کرد (Kihara et al., 1965).

گونه *Ae. crassa* که در ترکیه، فلسطین، سوریه، اردن، ایران، عراق، لبنان، افغانستان، ترکمنستان و پامیر و کوه‌های آلتای پراکنده است، در ایران دارای دامنه پراکنش بسیار وسیعی بوده و از دامنه‌های البرز در شرق کشور تا شمال غرب در آذربایجان غربی و بر روی دامنه‌های رشته کوه زاگرس تا سواحل جنوبی در ارتفاعات استان بوشهر و هرمزگان می‌روید. اگرچه دامنه

آژیلوپس دارای پتانسیل بالایی در اصلاح گونه‌های گندم در مقابل تنش‌های زنده و غیر زنده می‌باشد. این جنس از گندم وحشی دارای ۲۱ گونه بوده که از جمله آنها می‌توان به گونه *Aegilops crassa* اشاره نمود که دارای دو سیتوتیپ تتراپلوئید و هگزاپلوئید با ژنوم ($2n=6x=42$ ، و $2n=4x=28$ ، $M^{cr}M^{cr}D^{cr1}D^{cr1}$) است (Eig, 1929). تجزیه جفت شدن کروموزوم‌های میوزی در هیبریدهای بین سیتوتیپ‌های تتراپلوئید و هگزاپلوئید *Ae. crassa* بیانگر آن است که فرم هگزاپلوئید از هیبریداسیون بین فرم

بالاتر) و زیرواحدهای تیپ Y (زیرواحدهای دارای وزن مولکولی پایین‌تر) را کد می‌کنند قرار دارند (William et al., 1993; Payne et al., 1983)

اگرچه مطالعات مختلفی در مورد *Ae. crassa* صورت گرفته است ولی مطالعه خاصی در مورد شناسایی پروتئینهای آن صورت نگرفته است. Mohammadi et al. (1999) تنوع HMW گلوتهین‌ها را در ۱۱۶ نمونه *Ae. tauschii* که از کشورهای ایران، آذربایجان، افغانستان، تاجیکستان، ترکمنستان، ارمنستان، شوروی سابق و ترکیه جمع‌آوری شده بودند بررسی کرده و ۱۴ ترکیب مختلف از زیرواحدهای *Glu-D1* را مشاهده نمودند که برخی از آنها قبلاً گزارش نشده بودند. Bahraei et al. (2004) تنوع زیرواحدهای گلوتهین‌های سنگین را در ۴۳ لاین و رقم از گندم‌های نان تحت کشت ایران را با استفاده از روش SDS-PAGE مورد بررسی قرار دادند. مجموعاً ۱۴ نوع آلل و ۲۱ ترکیب آللی در گندم‌های نان مورد مطالعه مشاهده شد. Murai & Tsunewaki (1993) با مشاهده نرعیمی سیتوپلاسمی در هیبرید بین برخی جمعیت‌های *Ae. crassa* و گندم هگزاپلوئید استفاده از سیتوپلاسم این گونه را در تولید بذر هیبرید گندم پیشنهاد کرد. Valkoun (2001) گونه *Ae. crassa* را به عنوان یکی از گونه‌های مقاوم به خشکی شناخته و اهمیت مطالعه این گونه را سهولت در انتقال ژن‌های مقاوم به خشکی به گندم نان بیان کرد (Pena et al., 1995). همچنین در مطالعه دیگری تنوع مولکولی نمونه‌هایی از *Ae. crassa* بومی ایران را با استفاده از نشانگرهای SSR مورد ارزیابی قرار گرفت و تنوع بالایی از تنوع ژنتیکی در نمونه‌ها به دست آمد (Naghavi et al., 2009).

از آنجا که پیش شرط استفاده از منابع ژنتیکی وحشی اطلاع از انواع و میزان پروتئین‌های آنهاست با عنایت به اینکه کشور ما از مراکز مهم تنوع این گونه به شمار می‌رود و با توجه به محاسن بررسی الکتروفورز و اسپکترومتری جرمی و دستیابی به توالی پروتئین‌ها در مدت زمان کوتاه و شناسایی پروتئین‌ها و در نتیجه امکان دستیابی به آلل‌های جدید و در نهایت امکان تقویت ژرم‌پلاسم گندم نان با استفاده از ژرم‌پلاسم خارجی هدف از انجام این آزمایش بوده است.

پراکنش و سازگاری این گونه نسبت به گونه *Ae. tauschii* کمتر است، اما این احتمال نیز وجود دارد که ژنوم D موجود در این گونه حامل ژن‌های سازگاری متفاوتی بوده و با انتقال آن به ژنوم گندم‌های نان ارقامی با پایه ژنتیکی وسیع‌تر و دامنه سازگاری مطلوب‌تر تولید گردد (Rejesus et al., 1996; Ciaffi et al., 1993).

پروتئین‌های ذخیره‌ای دانه در گندم‌های زراعی و وحشی شامل گلوتهین‌ها و گلایدین‌ها می‌باشند. اهمیت این پروتئین‌ها در آنست که پس از جذب آب با یکدیگر ترکیب شده و ماده‌ای بنام گلوتهن می‌سازند که به آرد قابلیت تبدیل به نان، ماکارونی و سایر فرآورده‌ها را می‌دهد (Ciaffi et al., 1993). ویژگی پروتئین‌ها آن است که محصول مستقیم ژن‌ها بوده و تحت تأثیر شرایط محیطی قرار نمی‌گیرند. از دیگر محاسن این پروتئین‌ها می‌توان به کنترل ژنتیکی ساده و هم بارز بودن آلل‌های مختلف اشاره نمود. این عوامل به علاوه سهولت تکنیک الکتروفورز باعث شده است تا پروتئین‌های ذخیره‌ای در دامنه وسیعی از مطالعات از جمله بررسی تنوع ژنتیکی (Pena et al., 1995; Rashidi et al., 2009; Payne et al., 1983) مورد استفاده قرار گیرند.

گلوتهین خودترکیب ناهمگنی از زیرواحدهای دارای وزن مولکولی بالا (HMW-GS) و زیرواحدهای دارای وزن مولکولی پایین (LMW) می‌باشند. LMWها در حدود ۳۰ درصد از کل پروتئین‌های ذخیره‌ای دانه را تشکیل می‌دهند (Payne et al., 1983). این زیرواحدها توسط مکان ژنی *Glu-3* که بر روی بازوی کوتاه کروموزوم‌های همیولوگ گروه یک (۱A، ۱B و ۱D) قرار دارند، کد می‌شوند. نقش برخی از این زیرواحدها در کیفیت ماکارونی شناخته شده است (Nevo et al., 1982). (HMW-GS) با وجود اینکه تنها ۱۰ درصد پروتئین‌های ذخیره‌ای دانه را تشکیل می‌دهند تأثیر بسیار زیادی روی کیفیت نانویی دارند (Payne et al., 1980). این زیرواحدها به وسیله ژن‌هایی که لینکاژ شدیدی در مکان ژنی *Glu-1* با هم دارند و بر روی بازوی بلند کروموزوم‌های گروه یک قرار دارند کد می‌شوند. در هر مکان دو ژن کاملاً به هم پیوسته که زیرواحدهای تیپ X (زیرواحدهای دارای وزن مولکولی

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

مواد مورد استفاده در این تحقیق شامل ۱۲۰ نمونه *Ae. crassa* می‌باشد که از بانک ژن مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر تهیه گردید. همچنین به منظور شناسایی باندهای پروتئینی از ۳ ژنوتیپ استرالیایی Grebe, Sunvale, Sunbri که باندهای شناخته شده دارند به همراه Chinese spring استفاده گردید.

استخراج پروتئین به روش لایملی (1970) که توسط فولینگتن و همکاران اصلاح گردیده است، انجام شد. به هر یک از نمونه‌ها حاوی ۴۰ میلی‌گرم آرد، ۱ سی‌سی بافر استخراج (۳۷/۵ میلی‌لیتر بافر با pH: ۶/۸ + ۱۲ گرم سدیم دودسیل سولفات + ۵۰ میلی‌گرم کوماسی بریلیانت بلو + ۷۲/۳ میلی‌لیتر آب مقطر + ۶۰ میلی‌لیتر گلیسرول) اضافه شد. در طول ۱ ساعت نمونه‌ها ۴ بار و هر بار به مدت ۲ دقیقه ورتکس شده و قبل از آخرین ورتکس نمونه‌ها در داخل آب گرم ۷۵ درجه سانتی‌گراد حدود ۱۰ دقیقه قرار داده شدند و پس از گذشت حداقل ۲۴ ساعت نمونه‌ها روی ژل لود گردیدند.

ژل اکرلامید SDS-PAGE تک بعدی شامل ژل تحتانی ۱۰٪ و ژل فوقانی ۴٪ می‌باشد که پس از گذشت حد اکثر ۵/۵ ساعت ژل می‌بندد. در این حالت شانه به آرامی خارج و درون چاهک‌ها به آرامی با بافر رانینگ شستشو داده شد و میزان ۱۰ میکرولیتر از هر نمونه داخل هر چاهک لود گردید. سپس قاب ژل از روی پایه باز شده و درون تانک الکتروفورز که حاوی تقریباً ۳/۵ لیتر بافر رانینگ می‌باشد قرار گرفت. روی حوضچه بالای قاب نیز از بافر پر شد و الکترودها به دستگاه جریان ثابت ۲۵ میلی‌آمپر به مدت حداقل ۷ ساعت متصل گردید و پس از خارج کردن ژل از دستگاه رنگ‌آمیزی بامحلول کوماسی بلو به مدت ۴۰ الی ۶۰ ساعت (روی شیکر) و بعد از آن رنگ بری با محلول TCA به مدت ۹ ساعت انجام پذیرد.

ارزیابی الگوهای بانندی و آنالیز داده‌ها

باندهایی که دارای الگوی متمایز در نمونه‌های *Ae. crassa* بودند به کمک اسکارپل استریل جدا گردیدند. باید دقت شود که باندها از آلودگی‌های

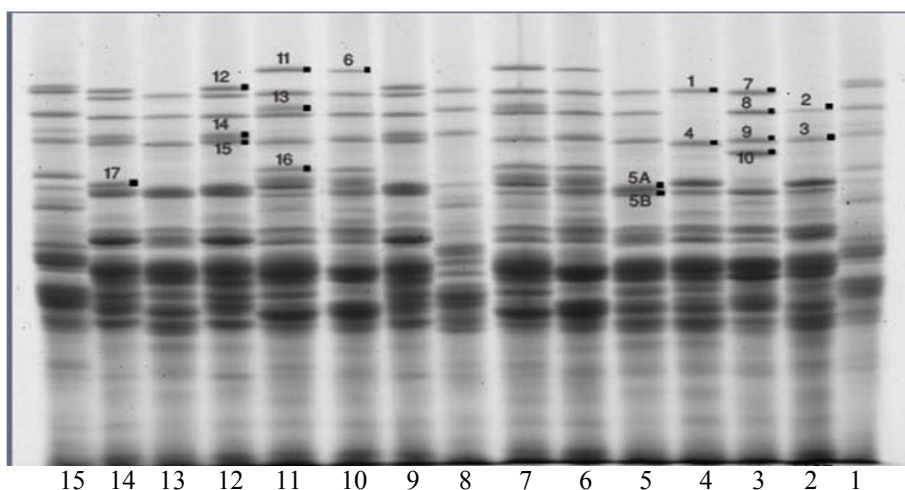
بیولوژیک مثل مو و ناخن حفظ شوند. هر باند به طور جداگانه با کمی آب مقطر درون تیوب ۱/۵ نگهداری و نمونه‌ها تا زمان ارسال درون یخچال قرار داده شدند. وزن مولکولی هر باند توسط ساینز مارکر شرکت Fermentaz محاسبه گردید.

شناسایی پروتئین و جستجوی در بانک‌های اطلاعاتی

تعداد ۱۷ باند جدا شده به وسیله آنالیزور پروتئومیکس زیست‌کاربردی ۴۷۰۰ در مرکز پروتئین و پروتئومیکس دانشگاه ملی سنگاپور آنالیز شدند. روش کار در این مرکز به این صورت است که نمونه را با مقدار زیادی ماتریکس (Sinapinic acid) و یا 4-cyano- α -hydroxy cinamic) مخلوط و مخلوط حاصل را روی صفحه فلزی (Target plate) ریخته و اجازه می‌دهند به طور کامل خشک شده و کریستاله شود. نقش ماتریکس جذب نور لیزر در طول موج ۳۳۷ نانومتر (لیزر نیتروژن) و کمک به پایداری نمونه است. تاباندن پالس‌هایی از نور لیزر (در حد نانو ثانیه) منجر به جذب نور لیزر و گرم شدن سریع و تصعید مولکول‌های ماتریکس به همراه نمونه می‌شود. هنگامی که ماتریکس به همراه نمونه وارد فاز گازی می‌شود مقداری از انرژی مولکول‌های برانگیخته شده ماتریکس به مولکول‌های نمونه منتقل شده و سبب یونیزاسیون نمونه می‌شود. البته علت اصلی یونیزاسیون مولکول‌های نمونه هنوز به طور دقیق مشخص نیست. یونیزاسیون پپتیدها بیشتر به صورت مثبت و با جذب پروتون از مولکول‌های ماتریکس صورت می‌گیرد. تفسیر داده‌ها توسط نرم‌افزار Gps انجام و جستجوی اطلاعات به صورت خودکار توسط برنامه Mascot انجام می‌گردد. برای به دست آوردن اطلاعات در مورد کاربرد پروتئین‌ها و ... از Expasy و Nebi و Wikipedia و ... استفاده گردید.

نتایج

نتایج حاصل از تفکیک پروتئین‌ها به روش الکتروفورز یک بعدی، تنوع آلی قابل ملاحظه‌ای را آشکار نموده که پس از ارزیابی و مقایسه با کنترل‌های *grebe tauschii*, *sunvale*, *sunbri*, *Chinese spring* تعداد ۱۷ باند (شکل ۱) مورد توجه و جهت ارزیابی بعدی (اسپکترومتری جرمی) انتخاب گردیدند.



شکل ۱- الگوی پروتئین‌های با وزن مولکولی بالا در برخی از نمونه‌های *Ae. crassa*

(چاهک‌های شماره ۱، ۸ و ۱۵ ژنوتیپ‌های Grebe, Sunvale و Sunbri با منشا استرالیا می‌باشند که باندهای شناخته شده دارند)

بانک‌های اطلاعاتی موجود نبود. این باند پروتئینی با توجه به اطلاعات ارائه شده در شکل ۱ شامل موارد زیر می‌باشد (جدول‌های ۱ و ۲):

(5B=18) Chain A, Sevenfold Mutant of Barley Beta-Amylase

(5A=5) beta-amylase 1 [*Hordeum vulgare*]

(3) y-type high molecular weight glutenin subunit [*Aegilops ventricosa*]

(4) y-type high molecular weight glutenin subunit [*Aegilops ventricosa*]

(9) glutenin high molecular weight subunit [*Triticum aestivum*]

(14) glutenin high molecular weight subunit [*Triticum aestivum*]

این باند توسط MALDI TOF-TOF MS/MS (جدول‌های ۱ و ۲). نتایج این آنالیز شناسایی فقط ۶ باند بود و در مورد ۱۱ باند دیگر، اطلاعاتی در

۱۸ که در ناحیه پایین‌تر از باندهای پروتئینی با وزن مولکولی بالا قرار گرفته‌اند؛ در اکثر نمونه‌های *Ae. crassa* مشاهده گردیدند و فراوانی برابر ۹۱/۶۶ را در بین نمونه‌ها داشتند. هر دو باند براساس نتایج اسپکترومتری جرمی به عنوان بتا آمیلاز (1,4-alpha-D-glucan maltohydrolase) شناخته شدند. از بین تمامی گیاهان بررسی شده این ۲ باند حداکثر شباهت را با بتا آمیلاز در جو داشتند. بتا آمیلاز متعلق به خانواده ۱۴ گلیکوزیل هیدرولاز می‌باشد که پیوند گلیکوزیدی را بین ۲ یا چند کربوهیدرات هیدرولیز می‌کند. بتا آمیلاز گیاهان آزادسازی مالتوز را از ۱ و ۴-آلفا-D-گلوکانها کاتالیز می‌کند. منابع ژنتیکی بتا آمیلاز ۲ نوع جو *Hordeum vulgare* و *Hordeum spontaneum* بوده و رفتار بتا آمیلاز (کیفیت مالت‌سازی) ابتدا در *H. spontaneum* فلسطین اشغالی شناسایی شده و از طریق تلاقی برگشتی به جوهای مدرن منتقل گردیده است.

بر اساس اطلاعات موجود در بانک‌های اطلاعاتی، ۴ باند شماره ۳ و ۴ و ۹ و ۱۴ با فراوانی به ترتیب ۳۰ و ۵۸/۳ و ۱۳/۳۳ در بین نمونه‌ها همگی به عنوان گلوٹینین با وزن مولکولی بالا (HMW - گلوٹینین) از نوع y-type شناسایی شدند. این شباهت در انواع گندم بررسی شد، بیشترین میزان شباهت مربوط به گلوٹینین با وزن مولکولی بالا ۳ گندم *Ae. tauschii* و *Ae. ventricosa* و بالاترین میزان شباهت را به *Triticum aestivum* بودند. به طوری که باند ۳ بالاترین میزان شباهت را به پروتئین‌های ذخیره دانه *Ae. ventricosa* و *T. aestivum* داشت. باند ۴ بالاترین میزان شباهت را به *Ae. ventricosa* و *T. aestivum* داشت. باند ۹ بالاترین میزان شباهت را به *Ae. tauschii* و *T. aestivum* داشت و بالاخره باند ۱۴ بالاترین میزان شباهت را به پروتئین‌های ذخیره دانه *T. aestivum* و *A. tauschii* داشت.

همچنین ۲ باند 5A و 5B به ترتیب با نام‌های ۵ و

جدول ۱- اطلاعات به دست آمده از آنالیز MALDI TOF-TOF MS و جستجو در Mascot

Spot no.	Exp. Mass	Delta	Ion	Peptide	Exp. Mv	The. Mv	Identified protein (access.no.)/Scor
18	1002.4578	0.0131	35	K.AYDWSAYK.Q	71890	56505	Chain A, Sevenfold Mutant Of Barley Beta-Amylase 6729696 /143
	1002.4578	0.0131	---	K.AYDWSAYK.Q			
	1015.5668	0.0177	36	K.LFGFTYLR.L			
	1015.5668	0.0177	---	K.LFGFTYLR.L			
	1325.6806	0.0191	50	R.YDPTAYNTILR.N			
	1325.6806	0.0191	---	R.YDPTAYNTILR.N			
2020.9740	0.0501	---	R.DVGTRDPDIFYTDGHGTR.N				
5	1015.5493	0.0002	43	K.LFGFTYLR.L	68330	59634	beta-amylase [Hordeum vulgare] 10953875 /117
	1015.5493	0.0002	---	K.LFGFTYLR.L			
	1188.6201	0.00121	---	K.ISGIHWWYK.V			
	1188.6201	0.0121	---	K.ISGIHWWYK.V			
	1325.6614	-0.0001	46	R.YDPTAYNTILR.N			
	1325.6614	-0.0001	---	R.YDPTAYNTILR.N			
3	915.5120	-0.0018	19	R.SVAVSQVAR.Q	48400	19968	y-type high molecular weight glutenin subunit [Aegilops ventricosa] 7188718 /75
	915.5120	-0.0018	---	R.SVAVSQVAR.Q			
	1112.5840	-0.0098	---	R.QVVDQQLAGR.L			
	1187.6038	-0.0083	25	R.LPWSTGLQMR.C			
	1187.6038	-0.0083	---	R.LPWSTGLQMR.C			
	1203.5962	-0.0108	14	R.LPWSTGLQMR.C + Oxidation (M)			
	1203.5962	-0.0108	---	R.LPWSTGLQMR.C + Oxidation (M)			
	1320.5930	-0.0049	---	R.ELQESSLEACR.Q			
4	915.5268	0.013	33	R.SVAVSQVAR.Q	51250	19968	y-type high molecular weight glutenin subunit [Aegilops ventricosa] 7188718 /86
	915.5268	0.013	---	R.SVAVSQVAR.Q			
	1112.6082	0.0144	---	R.QVVDQQLAGR.L			
	1187.6341	0.022	13	R.LPWSTGLQMR.C			
	1187.6341	0.022	---	R.QYEQTVPK.G			
	1203.6258	0.0188	8	R.LPWSTGLQMR.C + Oxidation (M)			
	1203.6258	0.0188	---	R.LPWSTGLQMR.C + Oxidation (M)			
	1320.6266	0.0287	---	R.ELQESSLEACR.Q			
9	915.5169	0.0031	31	R.SVAVSQVAR.Q	48400	20193	glutenin high molecular weight subunit [Triticum aestivum] 24474926 /155
	915.5169	0.0031	---	R.SVAVSQVAR.Q			
	1112.5819	-0.0119	60	R.QVVDQQLAGR.L			
	1112.5819	-0.0119	---	R.QVVDQQLAGR.L			
	1187.6020	-0.0001	33	R.LPWSTGLQMR.C			
	1187.6020	-0.0001	---	R.LPWSTGLQMR.C			
	1203.5963	-0.0107	10	R.LPWSTGLQMR.C + Oxidation (M)			
1203.5963	-0.0107	---	R.LPWSTGLQMR.C + Oxidation (M)				
1320.5944	-0.0035	---	R.ELQESSLEACR.Q				
14	915.5198	0.006	39	R.SVAVSQVAR.Q	44840	20193	glutenin high molecular weight subunit [Triticum aestivum] 24474926 /147
	915.5198	0.006	---	R.SVAVSQVAR.Q			
	1112.5883	-0.0055	61	R.SVAVSQVAR.Q			
	1112.5883	-0.0055	---	R.QVVDQQLAGR.L			
	1187.6065	-0.0056	16	R.LPWSTGLQMR.C			
	1187.6065	-0.0056	---	R.LPWSTGLQMR.C			
	1203.5989	-0.0081	13	R.LPWSTGLQMR.C + Oxidation (M)			
	1203.5989	-0.0081	---	R.LPWSTGLQMR.C + Oxidation (M)			
	1231.6039	-0.0416	---	K.CRSVAVSQVAR.Q			

از ۱۷ باند ارسالی برای اسپکترومتری جرمی شناسایی گردیدند که از آن بین، ۲ باند به عنوان بتا آمیلاز جو و ۴ باند دیگر به عنوان گلوٹنین با وزن مولکولی بالا شناسایی شدند که مربوط به دو گونه *Ae. ventricosa* and *T. aestivum* بودند. دارای ژنوم AABDD و *T. aestivum* دارای ژنوم NNDD می‌باشند که تشابه ژنومی آنها با *Ae. crassa* در ژنوم DD می‌باشد (Dosba et al., 1980; Yen & Kimber, 1992). با توجه به فراوانی بالای ۲ باند ۵ و ۱۸ (حدود ۹۱/۶۶) که به عنوان بتا آمیلاز شناسایی شدند، می‌توان

بحث

نتایج به دست آمده در این تحقیق خود دلیلی است مبنی بر اینکه اسپکترومتری جرمی روش مفیدی برای وسعت دادن اطلاعات ما در زمینه شناسایی پروتئین‌ها می‌باشد. در نتیجه استفاده از این روش در آینده برای شناسایی سایر باندهای جالبی که در این مطالعه دیده شدند می‌تواند اطلاعات جدیدی را درباره پروتئین‌های ساختاری موجود در کراسا برای ما آشکار سازد. پروتئین‌های شناسایی شده در این مطالعه برای اولین بار است که در گیاه *Ae. crassa* گزارش می‌شوند. شش باند

جدیدی برای مالتوز معرفی کرد و یا حداقل در طبقه‌بندی میزان مالت جایگاه مناسبی را به آن اختصاص داد. همچنین با توجه به وفور باندهای مربوط به بتا آمیلاز در نمونه‌ها و با توجه به تنوع بالای انواع *Ae. crassa* و از آنجا که تا کنون بررسی روی نمونه‌های بومی ایران صورت نگرفته است. شاید با بررسی‌های بیشتر بتوان آلل جدیدی را با قدرت مالت‌سازی بالا در یکی از انواع ایرانی شناسایی کرد.

حضور بتا آمیلاز را در بین تقریباً تمامی *Ae. crassa* ایران نتیجه‌گیری کرد. با توجه به تنوع بالایی که در بین *Ae. crassa* بومی ایران دیده شده و از آنجایی که باند مربوط به بتا آمیلاز در اکثر این انواع دیده شده (فراوانی ۹۶٪)، پیشنهاد می‌شود که میزان مالتوز انواع گوناگون *Ae. crassa* بومی ایران اندازه‌گیری شده و با میزان مالت سایر انواع جو بخصوص *H. vulgare* و *H. spontaneum* مقایسه شود. امید است بتوان این گونه را نیز به عنوان منبع ژنتیکی

جدول ۲- پروتئین‌های شناسایی شده برای هر باند با نمره های مختلف

pos	Identified protein	(access.no./Scor
18	1 Chain A, Sevenfold Mutant Of Barley Beta-Amylase beta-amylase [Hordeum vulgare]	6729696 /143
	2 protein group	10953875 /142
	Beta-amylase (1,4-alpha-D-glucan maltohydrolase)	113786 /142
	Beta-amylase precursor (1,4-alpha-D-glucan maltohydrolase) (Beta-Amy1)	75107132 /142
	beta-amylase 1 [Hordeum vulgare]	38349539 /142
	beta-amylase [Hordeum vulgare subsp. vulgare]	464145 /142
	beta-amylase [Hordeum vulgare]	3779258 /142
	endosperm-specific beta-amylase 1 [Hordeum vulgare subsp. vulgare]	29134857 /142
	3 protein group	29134855 /134
	beta-amylase [Hordeum vulgare]	11322499 /134
beta-amylase [Hordeum vulgare]	10953877 /134	
5	1 protein group	10953875 /117
	Beta-amylase (1,4-alpha-D-glucan maltohydrolase)	113786 /117
	Beta-amylase precursor (1,4-alpha-D-glucan maltohydrolase) (Beta-Amy1)	75107132 /117
	beta-amylase 1 [Hordeum vulgare]	38349539 /117
	beta-amylase [Hordeum vulgare subsp. vulgare]	464145 /117
	beta-amylase [Hordeum vulgare]	10953877 /117
	beta-amylase [Hordeum vulgare]	11322499 /117
	beta-amylase [Hordeum vulgare]	3779258 /117
	endosperm-specific beta-amylase 1 [Hordeum vulgare subsp. vulgare]	29134855 /117
	endosperm-specific beta-amylase 1 [Hordeum vulgare subsp. vulgare]	29134857 /117
2	Beta-amylase (1,4-alpha-D-glucan maltohydrolase)	231540 /111
3	Chain A, Sevenfold Mutant Of Barley Beta-Amylase	6729696 /105
3	1 y-type high molecular weight glutenin subunit [Aegilops ventricosa]	7188718 /75
	2 glutenin high molecular weight subunit [Triticum aestivum]	24474926 /75
	3 glutenin high molecular weight subunit [Triticum aestivum]	24474920 /74
4	1 y-type high molecular weight glutenin subunit [Aegilops ventricosa]	7188718 /86
	2 glutenin high molecular weight subunit [Triticum aestivum]	24474926 /86
	3 glutenin high molecular weight subunit [Triticum aestivum]	24474920 /84
9	1 protein group	24474926 /155
	y-type high molecular weight glutenin subunit [Aegilops ventricosa]	7188718 /155
	2 glutenin high molecular weight subunit [Triticum aestivum]	24474920 /154
	3 HMW glutenin subunit Dty10 [Aegilops tauschii]	46981764 /150
14	1 protein group	24474926 /147
	- y type high molecular weight glutenin subunit [Aegilops ventricosa]	7188718 /147
	2 glutenin high molecular weight subunit [Triticum aestivum]	24474920 /146
	3 HMW glutenin subunit Dty10 [Aegilops tauschii]	46981764 /142

نتیجه‌گیری کلی

نتایج این تحقیق بیانگر وجود تنوع آلی وسیع در نمونه‌های *Ae. crassa* بومی ایران می‌باشد. از ۱۷ باند تجزیه شده با اسپکترومتری جرمی ۹ باند با توجه به نمره پایین (کمتر از ۷۵) قابل تشخیص نبودند که با توجه به موقعیت مکانی آنها در مقایسه با نمونه‌های شاهد مورد استفاده می‌تواند به عنوان زیرواحدهای جدید پروتئین‌های ذخیره با وزن مولکولی بالا مطرح باشند. البته با توالی‌یابی این باندها و بررسی آنها در بانک‌های اطلاعاتی دقیق‌تر این موضوع مورد بررسی

خواهد بود. در حقیقت با شناسایی دقیق‌تر آل‌های مناسب و با انتقال آنها از طریق روش‌های کلاسیک (تلاقی) و یا روش‌های نوین (مهندسی ژنتیک) به ارقام زراعی می‌توان کیفیت پروتئین این ارقام را بهبود داد.

سپاسگزاری

از بانک ژن مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر به واسطه در اختیار قرار دادن نمونه‌ها تشکر و قدردانی می‌گردد.

REFERENCES

- Bahraei, S., Saidi, A. & Alizadeh, D. (2004). High molecular weight glutenin subunits of current bread wheats grown in Iran. *Euphytica*, 137, 173-179.
- Ciaffi, M., Lanfiandra, D., Porceddu, E. & Benedettelli, S. (1993). Storage protein variation in wild emmer (*Triticum turgidum* SSP. *Dicoccoides*) from Jordan and Turkey. 2. Patterns of allele distribution. *Theor. Appl. Genet.* 86, 518-5250.
- Dosba, F., Tanguy, A. M. & Douaire, G. (1980). Study of the characteristics linked to an Mv chromosome of *Aegilops ventricosa* in an addition line wheat × *Aegilops*. *Cereal Res. Commun.* 8, 501-507.
- Eig, A. V. (1929). Monographisch-kritische Übersicht der Gattung *Aegilops*. Verlag des Repertoriums, Dahlem bei: Berlin.
- Kihara, H., Yamashita, K. & Tanaka, M. (1965). Morphological, physiological, geographical and cytological studies in *Aegilops* and *Triticum* collected in Pakistan, Afghanistan and, Iran. In: Yamashita, K. (Eds), *Cultivated plants and their relatives*, pp. 1-118.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of resistance to disease. *Annual Review of Phytopathology*, 14, 211-245
- Lafiandra, D., Ciaffi, M. & Benedettelli, S. (1993). Seed storage proteins of wild wheat progenitors, In: Damania, A. B., Jhon Wiley & Sons ed. *Biodiversity and wheat Improvement*. ICARDA.
- Mohammadi, V., Ahmadian, P., Ghannadha, M. R. & Mishani, S. (1999). Variation of high molecular weight glutenin sununits in *Triticum tauschii*. *Iranian J Agric Sci*, 30, 55-65.
- Murai, K. & Tsunewaki, K. (1993). Photoperiod-sensitive cytoplasmic male sterility in wheat with *Ae. crassa* cytoplasm. *Euphytica*, 67, 41-48.
- Naghavi, M. R., Ranjbar, M., Zali, A., Aghaei, M. J., Mardi, M. & Pirseyedi, S. M. (2009). Genetic diversity of *Aegilops crassa* and its relationship with *Aegilops tauschii* and the D genome of wheat. *Cereal Research Communications*, 37(2), 159-167.
- Nevo, E., Golenberg, E. & Beiles, A. (1982). Genetic diversity and environmental associations of wild wheat, *Tritium dicoccoides*, in Israel. *Theor. Appl. Genet.* 62, 241-254.
- Payne, P. I., Law, C. N. & Mudd, E. E. (1980). Control by homoeologous group 1 chromosomes of the high- molecular- weight subunits of glutenin, a major protein of wheat endosperm. *Theor. Appl. Genet.* 58, 113-120.
- Payne, P. I., Holt, L. M., Thomposn, R. D., Bartels, D., Harberd, N. P., Harris, P. A. & Law, C. N. (1983). The high molecular weight subunits of glutenin: classical genetics, molecular genetics and relationship to bread- making quality. In: Proceedings of 6th *Int. wheat Genet. Symp.* Kyoto, Japan, PP. 827-834.
- Pena, R. J., Zarco-Hernandez, J. & Mujeeb-Kazi, A. (1995). Glutenin subunit compositons and bread-making quality characteristics of synthetic hexaploid wheats derived from *Triticum turgidum* X *Triticum tauschii* (coss). Crosses. *J Cereal Sci*, 21, 15-23.
- Rashidi, S., Naghavi, M. R., Mardi, M. & Hosseinzadeh, A. (2009). Evaluation of morphological and high molecular proteins in durum wheat germplasm. *J Agric Sci Techno.* (In press).
- Rejesus, M., Van Ginkel, M. & Smale, M. (1996). *Wheat breeder perspectives of genetic diversity and germplasm use*. Wheat special report 4. Mexico D. F. CIMMYT.

17. Valkoun, J. J. (2001). Wheat pre-breeding using wild progenitors. *Euphytica*, 119, 17-23.
18. William, M. D. H. M., Pena, R. J. & Mujeeb-Kazi, A. (1993). Seed storage protein and isozyme variations in *Triticum tauschii* (*Aegilops squarrosa*). *Theor. Appl. Genet*, 87, 257-263.
19. Yen, Y. & Kimber, G. (1992). Genomic relationships of N genome *Triticum* species. *Genome*, 35, 962-966.