مجله علوم گیاهان زراعی ایران
دوره ۴۱، شماره ۲، ۱۳۸۹ (۳۵۴-۳۴۵)

بررسی تنوع آللی زیر واحدهای گلوتنین با وزن مولکولی پایین در ژنوتیپ‌های تجاری گندم نان (*Triticum aestivum* L.) ایران با استفاده از نشانگرهای اختصاصی

حمید حسینیان خوشرو[۱]*، محمدرضا بی‌همتا[۲]، محمد اسماعیل حسنی[۳] و منصور امیدی[۴]
۱، ۲، ۳، ۴، دانشجوی کارشناسی ارشد، استاد، استادیار و استاد پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران
(تاریخ دریافت: ۸۸/۲/۹ - تاریخ تصویب: ۸۸/۱۰/۱۵)

چکیده

جهت بررسی تنوع آللی در بلوک‌های ژنی کدکننده پروتئین‌های ذخیره‌ای گندم زیر واحدهای گلوتنین با وزن مولکولی پایین (LMW-GS) بین ۶۲ ژنوتیپ از گندم‌های نان، نه جفت آغازگر اختصاصی برای مکان‌های ژنی (*Glu-A3, Glu-B3, Glu-D3*) بکار گرفته شد. برای تفکیک محصولات واکنش PCR از ژل آگاروز ۲ درصد استفاده شد. نتایج نشان داد که تنوع قابل ملاحظه‌ایی بین ژنوتیپ‌های گندم نان ایران وجود دارد. بطوری که برای بلوک ژنی *Glu-A3* بوسیله دو جفت آغازگر (*Glu-A3*.1,2) در مجموع هشت آلل شناسایی گردید که در بین آنها آلل c با فراوانی نسبی ۰/۳۱۱ بیشترین فراوانی را به خود اختصاص داد. برای بلوک ژنی *Glu-B3* در مجموع ۱۷ آلل، بوسیله سه جفت آغازگر اختصاصی (*Glu-B3*.1, 2, 3)، شناسایی شد که آلل f با فراوانی نسبی ۰/۱۴۵ بیشترین فراوانی را داشت. برای بلوک ژنی *Glu-D3*، در مجموع ۲۲ آلل، بوسیله چهار آغازگر اختصاصی (*Glu-D3*.1, 2, 3, 4) شناسایی شد که آللh با فراوانی نسبی ۰/۱۷۴ بیشترین فراوانی را در بین آلل‌های شناسایی شده به خود اختصاص داد. با استفاده از شاخص نی میزان تنوع ژنتیکی به ترتیب برای بلوک ژنی *Glu-A3* برابر ۰/۸۱۸، برای بلوک ژنی *Glu-B3*، ۰/۹۱۴ و برای بلوک ژنی *Glu-D3*، ۰/۹۱۵ بدست آمد. میانگین تنوع ژنتیکی (H) برای بلوک‌های ژنی *Glu-3* در بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه برابر با ۰/۸۹۴ بدست آمد. میزان تنوع ژنتیکی برای هر آغازگر نشان داد که آغازگر *Glu-D3*.3 قادر به شناسایی آلل‌های چند شکلی بیشتری نسبت به آغازگرهای دیگر است. تجزیه ارتباطی داده‌های کیفی و مولکولی با استفاده از روش رگرسیون گام به گام نشان داد که ده آلل دارای بیشترین R^2 برای صفات درصد گلوتن مرطوب و خشک می‌باشد. تنوع شناسایی شده در این پژوهش می‌تواند به عنوان منبع با ارزش تنوع آللی در برنامه‌های اصلاحی به منظور بهبود کیفیت محصولات نهایی حاصل از گندم بهره برد.

واژه‌های کلیدی: گندم نان (*Triticum aestivum* L.)، زیر واحد گلوتنین با وزن مولکولی پایین (LMW-GS)، تنوع آللی، آغازگرهای اختصاصی.

مقدمه

گندم (*Triticum aestivum* L.) به عنوان مهمترین گیاه زراعی دنیا و به منزله عامل حیات و زندگی برای مردم است. ایجاد تنوع در تولیدات صنایع غذایی تبدیلی

*نویسنده مسئول: حمید حسینیان خوشرو تلفن: ۰۹۳۷-۹۳۳۹۵۱ E-mail: hoseinikh@ut.ac.ir

Archive of SID
www.SID.ir

از قبیل نان، شیرینی، ماکارونی، و نودول‌ها و همچنین بخاطر ارزان بودن تهیه منبع تقریباً غنی از پروتیین‌های گیاهی موجب شده است که اکثر ملل و ملت‌ها گندم را در سبد غذایی خود قرار دهند.

پروتئین‌های ذخیره‌ای گندم از دسته پرولامین‌ها بوده که اهداکننده شرایط الاستیتیکی، کشسانی و چسبندگی خاصی به خمیر در حال توسعه می‌باشد این پروتئین‌ها به دو دسته گلوتن و غیر گلوتن تقسیم می‌شوند. مطلوبیت آرد برای تهیه نان بستگی به کمیت و کیفیت گلوتن گندم دارد. پروتئین‌های گلوتنی گندم به دو دسته گلیادین‌ها (یک زنجیره‌ای) و گلوتنین‌ها (چند زنجیره‌ای) تقسیم می‌شوند. که از مدت‌ها قبل به عنوان عوامل تعیین کننده، ارزش نانوایی و ارزش محصولات دیگر حاصل از گندم شناخته شده است (D`Ovidio et al. 1997). این دو گروه مواد مجموعاً ۸۵ درصد از کل پروتئین ذخیره‌ای در گندم را تشکیل می‌دهند (D`ovidio et al., 2004). در ادامه گلوتنین گندم به لحاظ وزن مولکولی به دو گروه، زیر واحدهای گلوتنین با وزن مولکولی بالا (HMW-GS) و زیر واحدهای گلوتنین با وزن مولکولی پایین (LMW-GS) تقسیم می‌شوند. پروتئین‌های گلوتنین در خمیر در حال توسعه بوسیله باندهای کووالانسی که بین اسید آمینه‌های سیستئین موجود در زیر واحدهای گلوتنین با وزن مولکولی بالا و پایین تشکیل می‌شوند، خواص کیفی خمیر جهت تولید محصولات نهایی آرد را سبب می‌شوند. (HMW-GS) ها توسط ژن‌های *Glu-1* با مکان‌های *Glu-D1* , *Glu-B1* , *Glu-A1* که بر روی بازوی بلند کروموزوم‌های 1A, 1B, 1D قرار دارند کد می‌شوند. زیر واحدهای گلوتنین با وزن مولکولی پایین (LMW-GS) توسط ژن‌های *Glu-3* شامل (*Glu-A3*, *Glu-B3*, *Glu-D3*) که به صورت بلوک ژنی هستند و بر روی بازوی کوتاه کروموزوم‌های 1A, 1B, 1D قرار دارند، کد می‌شوند (Masci et al., 1998; Johal et al., 2004). LMW-GS در مقایسه با HMW-GS تنوع آللی بسیار بیشتری دارند اما بدلیل همپوشانی آنها با گلیادین‌ها در ژل SDS-PAGE امکان شناسایی آلل‌های بیشتر را با مشکل مواجه کرده است (Wang et al., 2005). به دلیل رابطه نزدیک و معنی‌دار تنوع آللی LMW-GS با کیفیت خمیر در گندم نان و دروم، در سال‌های اخیر مطالعات گسترده‌ای در سطح پروتئین در گندم نان و خویشاوندان نزدیک آن صورت گرفته است. اما تنوع ژنتیکی در سطح DNA برای LMW-GS هنوز به طور کامل شناخته نشده است. و تنوع طولی[1] ژن‌های کدکننده LMW-GS بوسیله نشانگرهای اختصاصی کمتر مورد مطالعه قرار گرفته است. اغلب ژن‌های کدکننده LMW-GS، یک انتهای آمینه کوتاه (۱۳ اسید آمینه‌ای) و بسیار حفاظت شده و یک انتهای کربوکسیل که دو سوم طول پپتید را شامل می‌شود و نسبت به انتهای آمینه ناپایدارتر است، را دارا می‌باشند. در بین این دو ناحیه، ناحیه تکراری، از تعداد واحدهای تکراری تشکیل شده که مسئول اصلی تنوع در طول ژن‌ها می‌باشد (Long et al., 2005; D`ovidio et al., 2004). تنوع در طول ژن‌ها و تعداد سیستئین دو عامل موثر در کیفیت پروتئین شناخته شده است (Long et al., 2008).

تا کنون چندین آغازگر اختصاصی بر مبنای انتهای کربوکسیل و انتهای آمینه که نواحی حفاظت شده‌اند، برای گروهی از ژن‌های موجود در بلوک ژنی *Glu-3* طراحی شده است. با استفاده از نشانگرهای اختصاصی امکان شناسایی آلل‌های که بدلیل همپوشانی پروتیین‌های گلیادین با زیر واحدهای LMW-GS ناشناخته مانده‌اند، فراهم می‌شود (Wang et al., 2008). و همچنین بوسیله این نشانگرها امکان انتخاب ژنوتیپ‌های حاوی آلل‌های پر کیفیت در مرحله اوایل رشد، بدست آوردن اطلاعاتی در زمینه تنوع آللی، تکامل خانواده ژنی LMW-GS و مطالعه ایجاد ژن‌های دروغی در ژنوم گندم، فراهم می‌شود (Huang et al., 2005; Chardot et al., 2002). بررسی تنوع طولی ژن‌های کدکننده LMW-GS توسط آغازگرهای اختصاصی در گندم نان با توجه به پتانسیل‌شان ممکن است اطلاعات بسیار با ارزشی را برای فرآیندهای اصلاحی فراهم آورد. هدف از این تحقیق بررسی تنوع آللی در بلوک‌های ژنی کدکننده LMW-GS و مطالعه همبستگی آنها با صفات کیفی مهم در بین ارقام گندم نان می‌باشد.

1. Length variation

Archive of SID

www.SID.ir

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و استخراج DNA

در این آزمایش از ۶۲ رقم گندم نان (*Triticum aestivum* L.) موجود در کلکسیون بانک ژن دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران (جدول۱) به منظور بررسی تنوع آللی، چهار رقم گندم تتراپلوئید (*T. turgidum*, durum) و ۲۰ نمونه گندم وحشی دیپلوئید موجود در بانک ژن مؤسسه تحقیقات اصلاح و نهال و بذر کرج به منظور کنترل فعالیت آغازگرها بکار گرفته شده است. DNA ژنومی از برگ‌های تازه گندم به روش تغییر یافته CTAB (Murray & Thampson, 1980) استخراج گردید.

جدول ۱- اسامی، صفات کیفی مهم** و آلل‌های شناسایی شده** در سطح پروتئین برای بلوک ژنی *Glu-3* در ارقام گندم نان مورد مطالعه

سال معرفی	*Glu-D3*	*Glu-B3*	*Glu-A3*	حجم رسوب SDS	شاخص گلوتن	عدد فالینگ	درصد پروتئین	وزن هکتولیتر kg	رقم
*	b	b	b	۶۶/۳۳	۴۰/۷۳	۸۰۸/۸	۱۲/۴۷	۷۶/۴۶	پی‌تک
۱۳۳۵	c	a	b	۶۱	۴۸/۹۷	۸۴۲/۴	۱۱/۱	۷۹/۸۲	آذر
۱۳۷۴	a	c	e	۵۱	۳۲	۷۸۲/۸	۱۱/۷۷	۸۸/۲۲	اترک
۱۳۵۳	b	b	c	۶۰/۳۳	۴۶/۷۸	۹۹۴/۱	۱۱/۹۷	۸۲/۴۷	مغان
۱۳۷۴	b	h	d	۷۴/۶۷	۴۱/۹۱	۶۰۹/۲	۱۲/۲۷	۷۹/۸۲	داراب۲
۱۳۷۴	c	b	b	۶۱	۴۸/۹۷	۸۴۲/۴	۱۱/۶۳	۸۰/۲۹	زرین
قدیمی	d	h	d	۵۱/۳۳	۴۱/۴۶	۱۰۱۰	۱۲/۳	۷۷/۸۷	سرداری
۱۳۴۷	b	f	e	۴۰/۳۳	۳۰/۶۸	۵۸۴/۹	۱۱/۸	۸۲/۳۷	پنجامو
*	c	i	e	۶۶/۳۳	۴۰/۷۳	۸۰۸/۸	۱۲/۴۷	۷۶/۴۶	زاگرس
۱۳۲۱	b	a	e	۵۳/۳۳	۳۱/۸۲	۴۹۳/۱	۱۲/۰۳	۷۹/۶۸	ریحانی
*	z	g	e	۵۶/۶۷	۲۷/۹۹	۸۹۱/۵	۱۱/۵	۷۹/۶۸	بولبوی
*	b	e	c	۵۶/۶۷	۲۷/۹۹	۸۹۱/۵	۱۱/۵	۷۹/۶۸	آرژانتین
۱۳۴۷	d	d	d	۶۳/۳۳	۴۱/۲۵	۹۱۵/۲	۱۲/۳۳	۷۹/۱۶	اینیاء
*	*	*	*	۲۹/۶۷	۲۰/۹۶	۸۰۵/۵	۱۰/۸۷	۸۱/۷۲	ک. آزادی
*	b	c	e	۳۱/۳۳	۲۳/۰۵	۵۵۹/۱	۱۲/۳۳	۷۷/۸	الموت۱
۱۳۵۸	d	b	c	۴۶/۳۳	۴۰/۰۱	۶۳۸/۶	۱۱/۰۷	۸۰/۳۹	آزادی
۱۳۷۸	*	*	*	۵۶/۶۷	۲۹/۹۹	۸۹۱/۵	۱۱/۵	۷۹/۶۸	آذر۲
۱۳۴۷	a	e	c	۵۶/۶۷	۲۷/۹۹	۸۹۱/۵	۱۱/۵	۷۹/۶۸	دیهیم
۱۳۶۸	a	e	c	۶۶/۳۳	۴۰/۷۳	۸۰۸/۸	۱۲/۴۷	۷۶/۴۶	قدس
۱۳۶۵	a	a	c	۵۳/۳۳	۳۱/۸۲	۴۹۳/۱	۱۲/۰۳	۷۹/۶۸	بیات
قدیمی	a	a	c	۵۶/۶۷	۲۷/۹۹	۸۹۱/۵	۱۱/۵	۷۹/۶۸	سرخ تخم
*	b	d	b	۵۶/۶۷	۲۷/۹۹	۸۹۱/۵	۱۱/۵	۷۹/۶۸	ک. بیات
۱۳۵۹	*	*	*	۵۳/۶۷	۲۸/۷۴	۶۶۶/۲	۹/۱	۷۶/۴۶	بیستون
۱۳۳۵	a	a	e	۳۹/۶۷	۳۸/۳۶	۶۹۴/۳	۱۱/۴	۷۷/۴۱	امید
۱۳۵۷	d	a	c	۵۶/۳۳	۴۶/۳۸	۷۶۰/۷	۱۱/۸۷	۸۰/۴۱	البرز
۱۳۵۹	a	e	c	۵۳/۶۷	۲۸/۷۴	۶۶۶/۲	۱۳/۱	۷۹/۳۶	شعله
۱۳۷۴	b	d	a	۴۰/۳۳	۳۰/۶۸	۵۸۴/۹	۱۱/۸	۸۲/۳۷	تجن
۱۳۳۹	a	f	c	۴۴	۳۳/۴۱	۵۰۴/۲	۱۱/۰۷	۷۸/۱۲	دستجردی
قدیمی	b	a	e	۳۸/۳۳	۲۲/۰۳	۶۹۰	۱۱/۹	۸۰/۱۵	عطایی
قدیمی	b	b	e	۶۲	۳۷/۶۵	۷۲۱/۶	۱۱/۰۳	۷۹/۴	گازرسنگ
۱۳۷۶	e	c	c	۴۵/۶۷	۱۹/۲۶	۵۱۳/۳	۱۰/۵۷	۸۱/۴۱	چمران
۱۳۷۱	*	*	*	۵۵/۳۳	۳۴/۷	۵۸۹/۳	۱۲/۱۳	۸۱/۷	چمران
۱۳۷۱	*	*	*	۶۲	۳۷/۶۵	۷۲۱/۶	۱۱/۰۳	۷۹/۴	رسول
*	*	*	*	۶۶/۶۷	۴۰/۰۲	۷۷۳/۲	۱۲/۵۳	۷۸/۴	زرندی
۱۳۵۹	a	e	c	۵۶/۶۷	۲۷/۹۹	۸۹۱/۵	۱۱/۵	۷۹/۶۸	کاوه
*	a	e	c	۲۹/۶۷	۲۰/۹۶	۸۰۵/۵	۱۰/۸۷	۸۱/۷۲	ق. ورامین
۱۳۵۲	d	b	c	۳۱/۳۳	۲۳/۰۵	۵۵۹/۱	۱۲/۳۳	۷۷/۸	خزر ۱
۱۳۳۰	b	a	e	۵۶/۶۷	۲۷/۹۹	۸۹۱/۵	۹/۱	۷۹/۴	طبسی
۱۳۵۹	b	i	d	۴۶/۳۳	۲۹/۹۸	۹۹۳/۶	۱۲/۵۷	۷۶/۸۷	داراب۱
*	*	*	*	۶۲/۶۷	۴۶/۶۶	۸۳۵/۳	۱۱/۶۷	۸۲/۰۹	ک.البرز
*	*	*	*	۳۷	۳۳	۴۸۵/۶	۱۲/۱	۷۴/۴۸	ک.اروند
۱۳۵۵	e	c	e	۳۷	۳۳	۴۸۵/۶	۱۲/۱	۷۴/۴۸	ع. جدید
۱۳۵۲	b	c	c	۴۶/۳۳	۲۹/۹۸	۹۹۳/۶	۱۲/۵۷	۷۶/۸۷	کرج۲
۱۳۴۸	d	i	c	۳۰	۲۵/۶۹	۸۰۰/۷	۱۲/۷	۷۸/۱۶	توباری
۱۳۴۱	b	c	a	۳۷	۳۳	۴۸۵/۶	۱۲/۱	۷۴/۴۸	ع.قدیم

Archive of SID

www.SID.ir

ادامه جدول ۱

سال معرفی	*Glu-D3*	*Glu-B3*	*Glu-A3*	حجم رسوب SDS	شاخص گلوتن	عدد فالینگ	درصد پروتئین	وزن هکتولیتر kg	رقم
*	b	c	e	۴۶/۳۳	۲۹/۹۸	۹۹۳/۶	۱۲/۹	۷۳/۸	الموت۲
۱۳۳۷	a	b	a	۴۵/۳۳	۲۴/۶۳	۵۰۰/۹	۱۱/۷	۸۱/۰۱	آکوا
۱۳۶۹	b	b	c	۴۳/۶۷	۲۶/۹۶	۸۵۹/۵	۱۱/۳۷	۷۸/۳۷	فلات
۱۳۷۴	*	*	*	۵۱	۳۲	۷۸۲/۸	۱۱/۷۷	۸۰/۲۲	الموت
*	*	*	*	۶۰/۳۳	۴۶/۷۸	۹۹۴/۱	۱۱/۹۷	۸۲/۴۷	M-72-7
*	*	*	*	۳۰	۳۴/۶۴	۶۱۷/۷	۱۱/۹	۷۶/۷	ک. امید
۱۳۵۲	*	*	*	۴۶/۳۳	۲۹/۹۸	۹۹۳/۶	۱۲/۵۷	۷۶/۸۷	اروند
۱۳۶۵	c	b	c	۶۲/۶۷	۴۶/۶۶	۸۳۵/۳	۱۱/۶۷	۸۲/۰۹	گلستان
۱۳۴۸	*	*	*	۶۴/۳۳	۵۰/۰۱	۷۴۱/۴	۱۲/۱	۷۹/۹	بزوستایا
*	a	c	e	۵۶	۲۹/۹۲	۵۹۶/۴	۱۲/۵	۷۵/۱۷	چناب
۱۳۵۲	a	e	e	۶۲	۳۷/۶۵	۷۲۱/۶	۱۱/۰۳	۷۹/۴	کرج۱
*	*	*	*	۵۱	۳۲	۷۸۲/۸	۱۱/۷۷	۸۰/۲۲	M-73-18
قدیمی	a	a	e	۶۰/۳۳	۴۶/۷۸	۹۹۴/۱	۱۱/۹۷	۸۲/۴۷	بولانی
۱۳۷۴	a	b	e	۳۰/۶۷	۳۷/۷۲	۶۲۰/۱	۱۲/۱۷	۷۶/۵	الوند
۱۳۵۲	b	b	c	۵۰/۳۳	۳۶/۰۱	۱۰۰۸	۱۱/۴۳	۷۹/۰۶	مغان۱
*	d	d	d	۶۲	۳۷/۶۵	۷۲۱/۶	۱۱/۰۳	۷۹/۴	کارون

* داده‌ها در دسترس نیست. ** داده‌های کیفی از منبع (Akbari. 2008) و داده‌های آللی از منبع (Eizadi. 2000) اقتباس شده است.

تهیه آغازگرها

در این آزمایش نه جفت آغازگر اختصاصی برای مکان‌های ژنی *Glu-A3, Glu-B3, Glu-D3* به کار رفته که همه آنها توسط Long et al. (2005) از روی ژنوم گندم CS طراحی گردیده‌اند (جدول ۲). از این نه جفت آغازگر به ترتیب دو جفت آغازگر تهیه شده از ژنوم A، سه جفت آغازگر تهیه شده از ژنوم B و چهار جفت آغازگر تهیه شده از ژنوم D می‌باشند. شایان ذکر است هر یک از این آغازگرها تنها گروهی خاصی از ژن‌های بلوک ژنی *Glu-3* را تکثیر می‌کنند.

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز PCR

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) در حجم ۱۵ میکرولیتر، که حاوی 1U Taq DNA پلیمراز، ۱/۵ میکرولیتر بافر PCR (10X)، ۵۰ نانوگرم از DNA ژنومی، ۱/۲ میکرولیتر از $MgCl_2$ (100 mM)، ۱ میکرولیتر از هر dNTP (100 mM) و ۱/۵ میکرولیتر از هر آغازگر (10 pmol) انجام شد. برنامه PCR به ترتیب $95^{\circ}C$ به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ سیکل شامل $95^{\circ}C$ به مدت ۴۵ ثانیه، $70^{\circ}C - 50$ به مدت ۴۵ ثانیه (بسته به دمای اتصال پرایمرها جدول ۲)، $72^{\circ}C$ به مدت ۴۵ ثانیه و دمای بسط نهایی $72^{\circ}C$ به مدت ۷ دقیقه بکار گرفته شده است. محصول حاصل از PCR بر روی ژل آگاروز ۲ درصد تفکیک و ارزیابی شدند.

محاسبه تنوع ژنتیکی

بمنظور محاسبه تنوع ژنتیکی در مکان ژنی *Glu-3* از شاخص Nei (1973) استفاده گردید. در این فرمول اگر Pi فراوانی نسبی آلل iام در یک مکان ژنی در جمعیت مورد بررسی باشد در این صورت تنوع ژنتیکی در این مکان ژنی برابر است با:

$$\xi = 1 - \sum Pi^2$$

برای محاسبه تنوع ژنتیکی متوسط (H) به صورت میانگین ξها در تمام مکان‌های ژنی از فرمول پیشنهادی Nei (1973) به صورت زیر استفاده می‌شود:

$$H = \frac{N}{N-1} \times \frac{\sum_j (1 - \sum_i P_{ij}^2)}{N_J}$$

در این فرمول N تعداد واریته، P_{ij}^2 فراوانی نسبی آلل i ام از مکان ژنی j ام و Nj تعداد مکان‌های ژنی می‌باشد.

شناسایی آلل‌ها

آلل‌ها بوسیله الگو باندی پیشنهادی Long et al. (2008) شناسایی گردیدند. بر طبق این الگو باندهایی که متفاوت از باند تولید شده در رقم CS[1] بودند به عنوان یک آلل در نظر گرفته می‌شوند.

1. Chinese Spring

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۲- مشخصات آغازگرهای اختصاصی

آغازگر	توالی (۳´–۵´)	طول قطعه تکثیری (bp)	دمای اتصال (°C)
Glu-A3.1	F: AGTGCCATTGCGCAGATGAAT R: AACGGATGGTTGAACAATAGA	350	۶۰
Glu-A3.2	F:ATGGAGACTAGCTGCATCC R:CTGCAAAAAGGTACCCTTTT	680	۶۰
Glu-B3.1	F: GCACAAATGGAGAATAGCCAC R: AACAAATGGTATTTGTTGTTG	500	۵۹
Glu-B3.2	F: CCTAGCTTGGAGAAACCATT R: CAAGATAGATGGCTGAATAG	450	۵۰
Glu-B3.3	F: ATGGAGACTAGCCACATCCCT R: CACATGGCAACTACTCTGCCA	620, 580	۶۱
Glu-D3.1	F: CCTGGCTTGGAGAAACCATC R: CAAGATAGATGGCTGAATAT	500	۵۰
Glu-D3.2	F: ATGGAGACTAGCCGCGTCCCT R: ATGGAGACTAGCCGCGTCCCT	540	۶۴
Glu-D3.3	F: ATGGAGACTAGATGCATCCCT R: AGATTGGATGGAACCCTGAAC	600	۶۰
Glu-D3.4	F: ATGGAGACTAGCTGCATCT R: CTGCAAAAAGGTACCCTGTA	700	۵۲

نتایج و بحث

آزمون اختصاصی بودن آغازگرها

تمام آغازگرها بکار رفته در این پژوهش از نظر اختصاصی بودن توسط طراحان این آغازگرها، بوسیله لاین‌های دی‌تلوسومیک[1] رقم CS مورد آزمون قرار گرفته و اختصاصیت آنها مورد تأیید قرار گرفته بود (Long et al., 2005)، جهت اطمینان از فعالیت اختصاصی این آغازگرها، آغازگرها بر روی DNA استخراج شده از نمونه‌های دیپلوئید، تتراپلوئید و هگزاپلوئید مورد آزمون قرار گرفته و اختصاصی بودن آنها مورد تایید قرار گرفت (شکل ۱).

بلوک ژنی *Glu-A3*

در مجموع بوسیله دو جفت آغازگر اختصاصی (*Glu-A3*.1,2) که برای بلوک ژنی *Glu-A3* بکار گرفته شده بود و به ترتیب قطعه bp ۳۵۰ و ۶۸۰ را در رقم CS تکثیر می‌کردند، هشت آلل شناسایی گردید. بوسیله آغازگر *Glu-A3*.1 چهار آلل (a, b, c, d) با طول‌های تقریباً bp ۳۰۰ -۴۰۰ در بین ارقام مورد بررسی شناسایی گردید (شکل۲). آلل c با فراوانی نسبی ۰/۳۱۱ بیشترین و آلل a با فراوانی نسبی ۰/۰۱۳ کمترین فراوانی را به خود اختصاص داد. بوسیله آغازگر *Glu-A3*.2 چهار آلل e, f, g, h با طول تقریبی بین bp ۵۰۰ تا ۶۰۰ شناسایی شد که آلل g با فراوانی نسبی ۰/۱۶۵ و آلل h با فراوانی نسبی ۰/۰۵۲ به ترتیب بیشترین و کمترین فراوانی را در بین آلل‌های شناسایی شده به خود اختصاص دادند (جدول۳). در یک پژوهشی که برای بررسی تنوع طولی ژن‌های کدکننده LMW-GS نوع i در نمونه‌های *T. boeoticum* و *T. monococcum* بوسیله آغازگرهای اختصاصی انجام شد ۱۱ الگوی باندی پیشنهاد و هشت آلل شناسایی گردید (Lnog et al., 2008). در چند پژوهش دیگر که در سطح پروتئین انجام شد تعداد آلل‌های گزارش شده برای این بلوک ژنی به ترتیب ۵، ۸ و ۶ آلل بود (Dubcovsky et al., 1997; Ezadi et al., 2000; Ikeda et al., 2003)، میزان تنوع ژنتیکی محاسبه شده برای این بلوک ژنی H=۰/۸۱۸ بدست آمد که با نتایج (H=۰/۸۰۶) پژوهش (Lnog et al., 2008) همخوانی و از نتایج پژوهش دیگر که میزان تنوع برابر H=۰/۷۰۱ بدست آمده بود، بیشتر بود (Ezadi et al., 2000).

بلوک ژنی *Glu-B3*

در مجموع سه جفت آغازگر اختصاصی (*Glu-B3*.1,2,3) که از روی DNA گندم نان رقم CS برای بلوک ژنی *Glu-B3* طراحی شده بودند و به ترتیب قطعات bp ۵۰۰، ۴۵۰ و ۶۲۰ را در رقم CS تکثیر می‌کردند بکار گرفته شدند. بطور کلی به وسیله این سه آغازگر اختصاصی ۱۷ آلل برای این بلوک ژنی شناسایی

1. Ditelosomic lines

Archive of SID

www.SID.ir

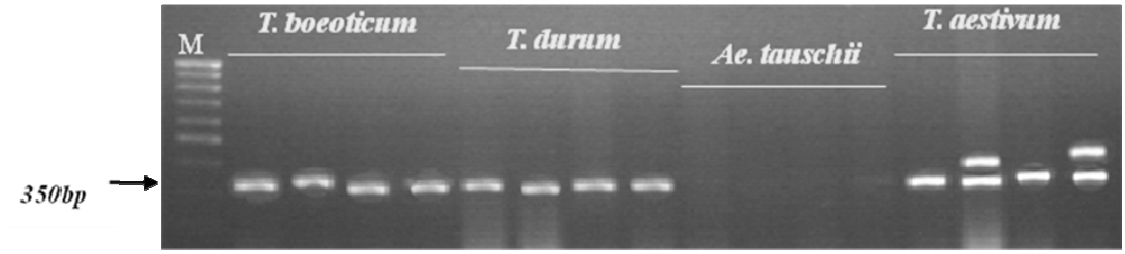
شد که چهار آلل a, b, c, d با طول تقریبی بین ۴۵۰-۵۵۰bp بوسیله آغازگر *Glu-B3*.1، شش آلل e, f, g, h, i. j با طول تقریبی ۴۰۰-۵۰۰ bp بوسیله آغازگر *Glu-B3*.2 و هفت آلل k, l, m, n, o, p, q با طول تقریبی ۵۵۰-۶۵۰bp بوسیله آغازگر *Glu-B3*.3 شناسایی شد (جدول۳) در بین این آلل‌ها، آلل f با فراوانی نسبی ۰/۱۴۵ بیشترین فراوانی را به خود اختصاص داد. در یک پژوهش ۱۲ آلل بوسیله ده نشانگر اختصاصی، برای این بلوک ژنی شناسایی گردید (Wang et al., 2008). در مطالعه دیگر تنوع آللی ۱۰۶ ژنوتیپ گندم نان در سطح پروتئین مورد بررسی قرار گرفت و ۲۲ آلل برای این بلوک ژنی شناسایی گردید (Lu et al., 2009).

جدول ۳- نوع، فراوانی آللهای LMW-GS و تنوع ژنتیکی در نمونه‌های مورد بررسی بر اساس فرمول نی

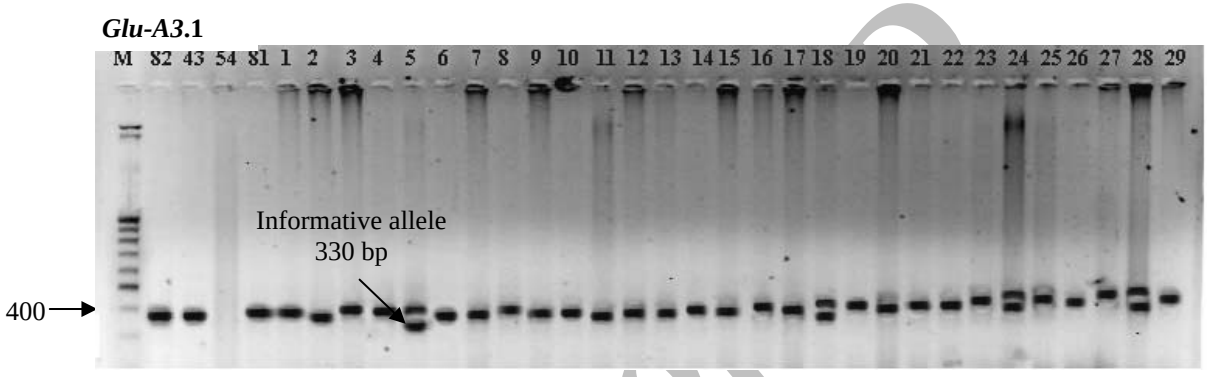
بلوک ژنی	آغازگر	آلل	فراوانی نسبی	میزان تنوع برای هر آغازگر	میزان تنوع ژنتیکی در هر بلوک ژنی	میانگین تنوع ژنتیکی (H) در جمعیت
Glu-A3	*Glu-A3*.1	a	0.013	0.872	0.818	0.894
		b	0.105			
		c	0.311			
		d	0.139			
	Glu-A3.2	e	0.079	0.946		
		f	0.132			
		g	0.165			
		h	0.052			
Glu-B3	*Glu-B3*.1	a	0.038	0.97	0.914	
		b	0.121			
		c	0.106			
		d	0.048			
	Glu-B3.2	e	0.058	0.968		
		f	0.145			
		g	0.063			
		h	0.043			
		i	0.033			
		j	0.0048			
	Glu-B3.3	k	0.004	0.977		
		l	0.048			
		m	0.087			
		n	0.101			
		o	0.038			
		p	0.019			
		q	0.033			
Glu-D3	*Glu-D3*.1	a	0.021	0.964	0.910	
		b	0.071			
		c	0.142			
		d	0.060			
		e	0.027			
		f	0.071			
	Glu-D3.2	g	0.092	0.961		
		h	0.174			
		i	0.005			
		j	0.005			
	Glu-D3.3	k	0.005	0.994		
		l	0.021			
		m	0.010			
		n	0.005			
		o	0.054			
		p	0.016			
		q	0.043			
	Glu-D3.4	f	0.060	0.99		
		s	0.071			
		t	0.010			
		u	0.021			
		v	0.005			

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۱- آزمون فعالیت *Glu-A3*.1، در این شکل M: سایز مارکر، چهار نمونه اول (2n=2x=14=AA) *T. boeoticum*، چهار نمونه دوم (2n = 4x=28=AABB) *T. turgidum, durum* (به ترتیب دنا، یاواروس، آریا و کرخه)، چهار نمونه سوم (2n=2x=14=DD) *Ae. tauschii* که فاقد ژنوم AA می‌باشد، و چهار نمونه آخر ژنوتیپ‌های هگزاپلوئید (به ترتیب CS، دستجردی، اترک، شعله).



شکل ۲- چند شکلی در ژن‌های LMW-GS که بوسیله آغازگر *Glu-A3*.1 شناسایی شده است. M: سایز مارکر (100 bp)، 81: CS, 82: *T. boeoticum*, 43: *T. turgidum*, durum; 54: *Ae. tauschii*; 1-29: *T. aestivumm*

شناسایی آلل a به عنوان نشانگر آگاهی بخش

همچنین در یک پژوهش دیگر که بر روی ارقام تجاری گندم نان ایران صورت گرفت تعداد نه آلل برای این بلوک ژنی در سطح پروتئین شناسایی شد (Ezadi et al., 2000). میزان تنوع ژنتیکی برای این بلوک ژنی H = ۰/۹۱۴ بدست آمد که بیشتر از میزان تنوع (H=۰/۸۲۴) بدست آمده در سطح پروتئینی بود (Ezadi et al., 2000; Ikeda et al., 2003).

بلوک ژنی *Glu-D3*

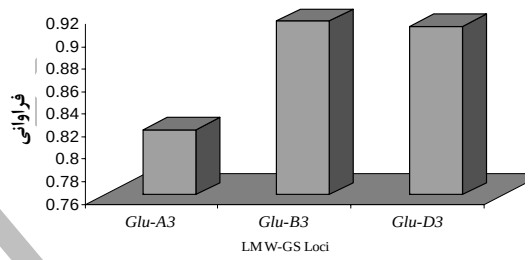
در مجموع بوسیله چهار جفت آغازگر اختصاصی (*Glu-D3*.1,2,3,4) که به ترتیب قطعات bp ۵۰۰، ۵۴۰، ۶۰۰ و ۷۰۰ را در رقم CS تکثیر می‌کردند ۲۲ آلل شناسایی گردید. شش آلل a, b, c, d, e, f با طول تقریبی bp ۵۵۰-۴۵۰ بوسیله آغازگر *Glu-D3*.1، چهار آلل g, h, i, j با طول تقریبی bp ۵۵۰-۳۵۰ بوسیله آغازگر *Glu-D3*.2، هفت آلل k, j, m, n, o, p, q با طول تقریبی bp ۶۵۰-۵۵۰ بوسیله آغازگر *Glu-D3*.3 و پنج آلل r, s, t, u, v با طول تقریبی bp ۷۵۰-۶۵۰ بوسیله آغازگر *Glu-D3*.4 شناسایی گردیدند (جدول ۳). در بین آلل‌های شناسایی شده، آلل h با فراوانی نسبی ۰/۱۷۴ بیشترین فراوانی را داشت. در یک پژوهش ۱۲ آلل بوسیله هفت نشانگر اختصاصی، برای این بلوک ژنی شناسایی گردید (Wang et al., 2008). تعداد آلل شناسایی شده برای این بلوک ژنی بیشتر از تعداد آلل‌های شناسایی شده در سطح پروتئین، نه آلل (Ikeda et al., 2008)، پنج آلل (Ezadi et al., 2000) و پنج آلل (Dubcovsky et al. 1997) بود. میزان تنوع ژنتیکی برای این بلوک ژنی H=۰/۹۱۰ بدست آمد که بیشتر از میزان تنوع (H=۰/۷۳۷) بدست آمده در سطح پروتئینی بود (Ezadi et al., 2000; Ikeda et al., 2003).

میزان تنوع ژنتیکی بر اساس شاخص Nei (1973) برای مکان‌های ژنی *Glu-D3, Glu-B3, Glu-A3* به ترتیب ۰/۸۱۸، ۰/۹۱۴ و ۰/۹۱۰ بود (شکل۳) و میانگین تنوع ژنتیکی (H) برای بلوک‌های ژنی *Glu-3* برابر ۰/۸۹۴ محاسبه گردید. در یک پژوهشی که تنوع آللی ارقام تجاری گندم نان ایران مورد بررسی قرار گرفت میزان تنوع ژنتیکی برای مکان‌های *Glu-D3, Glu-B3, Glu-A3* به ترتیب ۰/۷۰۶، ۰/۸۲۴، ۰/۷۳۷ و میانگین

Archive of SID

www.SID.ir

تنوع ژنتیکی (H) ۰/۷۶۷ گزارش شد (Ezadi et al., 2000). همانطور که ملاحظه می‌شود الگوی تنوع ژنتیکی در مکان‌های ژنی *Glu-3* به صورت *Glu-B3*> *Glu-D3*> *Glu-A3* هم در سطح پروتئین و هم در سطح نوکلئوتید برقرار است. همچنین میزان تنوع ژنتیکی در بلوک ژنی *Glu-A3* از دو بلوک دیگر کمتر است که با نتایج مطالعات دیگر همخوانی دارد (Gupta et al., 1993; Dubcovsky et al., 1997). همانطور که ملاحظه می‌شود میزان تنوع شناسایی شده در سطح نوکلئوتید بیشتر از سطح پروتئین می‌باشد.



شکل ۳- میزان تنوع ژنتیکی در مکان‌های ژنی *Glu-3*

جدول ۴ تجزیه ارتباطی داده‌های ۱۲ صفت کیفی و مولکولی را با استفاده از روش رگرسیون گام به گام نشان می‌دهد. بیشترین تعداد نشانگر (آلل) برای صفات درصد گلوتن مرطوب و خشک (۱۰ آلل) و کمترین مربوط به صفات رسوب زلنی، حجم نان، درصد جذب آب، عدد فالینگ و حجم رسوب SDS (یک آلل) می‌باشد و همچنین بیشترین R^2 کل مربوط به درصد گلوتن مرطوب (۹۷٪) است.

جدول ۴- تجزیه ارتباطی داده های ۱۲ صفت کیفی و مولکولی گندم نان با استفاده از رگرسیون گیری گام به گام

صفت	تعداد نشانگر (T)	R^2 Max	R^2 T
وزن هزار دانه	۲	۰/۱۰۶	۰/۱۷۵
درصد پروتئین	۹	۰/۲۷۵	۰/۷۷۱
رسوب زلنی	۱	۰/۰۷۵	۰/۰۷۵
حجم نان	۱	۰/۰۹	۰/۰۹
سختی دانه	۲	۰/۰۸۸	۰/۱۹۸
جذب آب	۱	۰/۰۸۴	۰/۰۸۴
عدد فالینگ	۱	۰/۰۹۴	۰/۰۹۴
درصد گلوتن مرطوب	۱۰	۰/۰۹۵	۰/۹۷۱
درصد گلوتن خشک	۱۰	۰/۰۸۹	۰/۷۰۶
شاخص گلوتن	۲	۰/۱۵۹	۰/۲۵۰
حجم رسوب (SDS)	۱	۰/۱	۰/۱
وزن هکتولیتر	۷	۰/۰۸۵	۰/۵۸۵

R^2adjusted T: مجموع کل R^2 تعدیل شده نشانگرها آگاهی بخش برای صفات کیفی
R^2adjusted max: بیشترین R^2 تعدیل شده مربوط به یک نشانگر برای صفات کیفی

با توجه به نتایج تجزیه رگرسیون مشخص گردید که آلل b از آغازگر *Glu-B3*.1 دارای بیشترین R^2 (۰/۰۹۵ و ۰/۰۸۹) برای صفات گلوتن مرطوب و خشک با طول ۵۰۰bp، آلل f از آغازگر *Glu-B3*.2 دارای بیشترین R^2 (۰/۰۹، ۰/۰۷۵ و ۰/۲۷۵) برای صفات حجم نان، رسوب زلنی و درصد پروتئین با طول ۴۵۰ bp، آلل d از آغازگر *Glu-B3*.1 دارای بیشترین R^2 (۰/۱۵۹ و ۰/۰۸۵) برای صفات شاخص گلوتن و وزن هکتولیتر با طول ۵۲۰ bp، آلل r از آغازگر *Glu-D3*.4 دارای بیشترین R^2 (۰/۰۸۸) برای صفت سختی دانه با طول ۷۱۰bp، آلل a از آغازگر *Glu-A3*.1 دارای بیشترین R^2 (۰/۱) برای صفت حجم رسوب با طول ۳۳۰bp، آلل e از آغازگر *Glu-A3*.2 دارای بیشترین R^2 (۰/۱۰۶) برای صفت وزن هزار دانه و آلل a از آغازگر *Glu-B3*.1 دارای بیشترین R^2 (۰/۰۸۴) برای صفت درصد جذب آب با طول ۴۹۰bp بود. در یک پژوهش تجزیه ارتباطی بین ۱۱ صفت زراعی و ۵۱۹ نشانگر SSR (۲۲۱ نشانگر) در گندم نان انجام شد، در نشانگرهای SSR بیشترین میزان R^2 برای شاخص برداشت با ۲۸٪ و طول ۲۹۱bp در آغازگر Xwmc44 مشخص شد (Roy et al., 2006).

میزان تنوع ژنتیکی (H) محاسبه شده برای هر آغازگر نشان داد که آغازگر *Glu-D3*.3 بالاترین میزان تنوع ژنتیکی (H=۰/۹۹۴) را دارا است (جدول ۳). این آغازگر قادر به شناسایی چند شکلی بالایی می‌باشد که می‌تواند اطلاعات مفیدی را در زمینه مطالعات تنوع آللی ژن‌های LMW-GS فراهم آورد.

زیرواحد گلوتنین با وزن مولکولی پایین(LMW-GS) نقش مهمی در تعیین کیفیت خمیر نان دارد (Gupta et al., 1993). اما بدلیل پیچیده بودن خانواده ژنی کدکننده LMW-GS، نقش همه آنها بخوبی مشخص نشده است. گزارش شده که تنوع آللی در هر یک از مکان‌های ژنی *Glu-3* اثر زیادی بر کیفیت محصول نهایی حاصل از آرد گندم دارد(Appelbee et al., 2007). همچنین گزارش شده با شناسایی دقیق تنوع آللی امکان بهبود کیفت گندم بوسیله انتخاب آلل‌هایی با اثر مطلوب و ترکیبات آللی درگیر در اثر اپیستازی مطلوب فراهم، می‌شود (Eagles et al., 2002). برخی مطالعات نشان می‌دهد که ناحیه تکراری موجود در ساختار ژنی

Archive of SID

www.SID.ir

LMW-GS از تعداد واحدهای تکراری تشکیل یافته که مسئول اصلی تنوع در طول ژن‌ها می‌باشد. این تنوع ممکن است به دلیل پدیده حذف و یا اضافه در تعداد واحدهای تکراری (D`Ovidio et al., 2004) که به احتمال زیاد بوسیله یک کراسینگ‌آور نابرابر و یا سرخوردن در طول همانندسازی[1] (Shewry et al., 1989; Lnog et al., 2005) ایجاد می‌شوند. با توجه به اینکه آغازگرهای بکار رفته بر مبنای انتهای آمینه و انتهای کربوکسیل طراحی گردیده‌اند در نتیجه این آغازگرها ناحیه تکراری را تکثیر می‌کنند (Lnog et al., 2005). پس می‌توان گفت تفاوت مشاهده شده در طول قطعات مربوط به پدیده کمبود و اضافه در سطح DNA است که در ناحیه تکراری رخ می‌دهد. اما دلیل اینکه برخی از ژنوتیپ‌ها (مثلاً دستجردی و شعله) دارای دو قطعه از قطعه مورد نظر می‌باشند احتمالاً، علاوه بر دلایلی که در فوق ذکر گردید ممکن است از یک ژن دو کپی در یک بلوک ژنی وجود داشته باشد، و همچنین از آنجایی که ژنوتیپ‌های مورد مطالعه در این پژوهش مربوطه به جمع‌آوری از توده‌های بومی از تلاقی برخی از ارقام داخلی با همدیگر و یا با ارقام خارجی است لذا چنین نتایجی قابل انتظار است (Ezadi et al., 2000). در مطالعه‌ای که به منظور ارزیابی آلل‌های متفاوت برای هر مکان ژنی *Glu-3* از نظر صفت گسترش خمیر[2] صورت گرفته نشان داده شده که فراوانی نسبی آلل‌های با کیفیت بالا در *Glu-D3* که بیشترین اثر را روی این صفت دارند، از فراوانی آلل‌های با کیفیت بالا *Glu-B3* و *Glu-A3* زیادتر بود (Gupta et al., 1993; Dubcovsky et al., 1997; Ezadi et al., 2000). پس می‌توان گفت که تنوع بالای موجود در مکان ژن *Glu-D3*، باعث بوجود آمدن ترکیبات آللی بهتری نسبت به دو مکان ژنی دیگر شده است.

1. Slippage during replication
2. Extension

نتیجه گیری کلی

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که تنوع آللی قابل ملاحظه‌ای در بلوک‌های ژنی *Glu-3* در ارقام گندم نان مورد مطالعه در سطح نوکلئوتید وجود دارد. که از این تنوع می‌توان به عنوان منبع با ارزش تنوع آللی، ژن‌های LMW-GS، در بهبود کیفیت آرد گندم استفاده کرد. مطالعه در سطح DNA می تواند اطلاعات بیشتری نسبت به سطح پروتئین در زمینه مطالعات ژنتیکی، شامل تنوع ژنتیکی، تنوع آللی، مطالعات در روند تکامل ژن و ژنوم فراهم کند. با شناسایی آلل‌هایی که چند شکلی بالایی از خود نشان دادند (مانند آلل i که توسط آغازگر *Glu-D3*.2 شناسایی شد) می‌توان متعاقباً این آلل‌ها را توالی‌یابی کرده و ساختار آنها را به منظور تعیین تعداد سیستئین و طول ناحیه تکراری (دو عامل موثر در کیفیت پروتئین) مورد مطالعه قرار داد. با یافتن آلل‌های که دارای همبستگی بالایی با صفات مرتبط با کیفیت محصول نهایی گندم دارند می‌توان ژنوتیپ‌های با کیفیت بالا را در مراحل اولیه رشد گیاه انتخاب کرد. بنابراین از ژنوتیپ‌های گندم نان و خویشاوندان آنها که حاوی آلل‌های جدید مرتبط با کیفیت بالا برای LMW-GS هستند را می‌توان به عنوان منبع با ارزش تنوع ژنی در برنامه‌های اصلاحی با هدف بهبود کیفیت محصولات حاصل از گندم بکار گرفت.

سپاسگزاری

از معاونت پژوهشی دانشکده علوم و مهندسی کشاورزی دانشگاه تهران بخاطر تأمین هزینه طرح و همچنین از سازمان تحقیقات کشاورزی و بخش غلات موسسه تحقیقات اصلاح و نهال بذر کرج به خاطر در اختیار گذاردن بذر مورد نیاز قدردانی می‌گردد.

REFERENCES

1. Akbari Rad, M. (2008). *Evaluation of genetic diversity in some of the commercial variety and promising lines bread wheat for different traits related to quality of bakery*. M. Sc. thesis. Azad University of Karaj. (In Farsi).
2. Appelbee, M. (2007). *Quality potential of gluten protein in hexaploid and related wheat species*. Ph. D. dissertation, University of Adelaide.
3. Chardot, T., Do, T., Perret, L. & Lauriere, M. (2002). *Heterogeneity of genes encoding the low molecular weight glutenin subunits of bread wheat*. In: Renard D, Delle Valle G, Popineau Y (eds) Plant

Archive of SID
www.SID.ir

biopolymer science: food and non-food applications. Royal Society of Chemistry, Cambridge, pp 24–30.
4. 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.
5. D`ovidio, R. & Masci, S. (2004). The low-molecular-weight glutenin subunits of wheat gluten. *J Cereal Sci*, 39, 321-339.
6. D'Ovidio, R., Marchitelli, C., Cardelli, L. E. & Porceddu, E. (1999). Sequence similarity between allelic Glu-B3 genes related to quality properties of durum wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 98, 455–461.
7. Dubcovsy, J., Echaide, M., Giancola, S., Rousset, M., Lou, M. C., Joppa, L. R. & Durak, J. (1997). Seed-storage-protein loci in RFLP maps of diploid, tetraploid, and hexaploid wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 95, 1169-1189.
8. Eagles, H. A., Hollamby, G. J., Gororo, N. N. & Eastwood, R. F. (2002). Estimation and utilization of glutenin gene effects from the analysis of unbalanced data from wheat breeding program. *Australin Journal of Agricultural Research*, 53, 367-377.
9. Eizadi Darbandi, A. (2000). *Evaluation of electrophoreses polymorphism of LMW-GS in bread wheat*. M. Sc. thesis. University of Tehran. (In Farsi).
10. 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. *J Cereal Sci*, 18, 23-41.
11. Huang, Z., Long, H., Yan, Z. H., Wei, Y. M. & Zheng, Y. L. (2005). Sequence analysis of LMW-GS genes from *Aegilops tauschii* containing HMW glutenin subunits 5+12 with good quality. *High Technol Lett*, 15(7), 67–72.
12. Ikeda, T. M., Branlard, G., Pena, R. J., Takata, K., Liu, L., Lerner, S. E. & Kolman, M. A. (2008). International collaboration for unifying Glu-3 nomenclature system in common wheats. In: Proceedings of *the 11th International Wheat Genetics Symposium*. Sydney University Press.
13. Ikeda, T. M., Nakamichi, K., Nagamine, T., Yano, H. & Anagisawa, Y. (2003). Identification of specific low-molecular-weight glutenin subunit related to gluten quality in bread wheat. *JARQ*, 37, 99-103.
14. Johal, J., Gianibelli, M. C., Rahman, S., Morell, M. K. & Galem, K. R. (2004). Characterization of low-molecular-weight glutenin genes in *Aegilops tauschii*. *Theoretical and Applied Genetics*, 109, 1028–1040.
15. Liu, L., He, Z. H., Ma, W. J., Liu, J. J., Xia, X. C. & Pena, R. J. (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.
16. Long, H., Huang, Z., Wei, Y. M., Yan, Z. H., Ma, Z. C. & Zheng, Y. L. (2008). Length Variation of i-Type Low-Molecular-Weight Glutenin Subunit Genes in Diploid Wheats. *Russian Journal of Genetics*, 44(4), 429–435.
17. Long, H., Wei, Y. M., Yan, Z. H. & Baun, B. (2005). Classification of wheat low molecular weight glutenin subunit genes and its chromosome assignment by development LMW-GS group-specific primers. *Theoretical and Applied Genetics*, 111, 1251-1259.
18. Masci, S., D'Ovidio, R., Lafiandra, D. & Kasarda, D. D. (1998). Characterization of a low-molecular-weight glutenin subunit gene from bread wheat and the corresponding protein that represents a major subunit of the glutenin polymer. *Plant Physio*, 118, 1147–1158
19. Murray, M. & Thompson, W. F. (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res*, 8, 4321–4325.
20. Nei, M. (1973). Analysis of gene diversity in subdivided populations. In: Proceedings of *National Academy of Science USA*, 70, 3321–3323.
21. Roy, J. K., Bandopadhyay, R., Rustgil, S., Balyanl, H. S. & Guptal, P. K. (2006). Association analysis of agronomically important traits using SSR, SAMPL and AFLP markers in bread wheat. *Curent science*, 90, 5-10.
22. Shewry, P. R., Halford, N. G. & Tatham, A. S. (1989). The high molecular weight subunits of wheat, barley and rye. In: Miflin, B.J., (Ed.), *Genetics, molecular biology, chemistry and role in wheat Gluten structure and functionality*, Oxford Survey Plant Molecular and Cellular Biology, vol. 6. University Press, New York, pp. 163–219.
23. 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.
24. Wang, ZQ., Long, H., Zheng, Y. L., Yan, Z. H., Wei, Y. M. & Lan, X. J. (2005). Cloning and analysis of LMW-GS Genes from *Triticum aestevum* ssp. *Tibetanum Shao*. *Acta Genetica Sinica*, 32, 86–93.

Archive of SID

www.SID.ir