مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی
سال دوازدهم ـ ویژه‌نامه زراعت و اصلاح نباتات ـ ۱۳۸٤
www.magiran.com/jasnr

Archive of SID

الگوهای تفکیک ژن‌های اصلی شناخته شده گلوتنین‌های دارای وزن ملکولی بالا و پایین با استفاده از هاپلوئید مضاعف حاصل از تلاقی بین گونه‌ای گندم و ذرت

غلامعلی رنجبر[1]، گیلبرت جان هولامبی[2] و کنت ویلیامز شفرد[2]
[1]عضو هیأت علمی دانشگاه مازندران، [2]اعضاء هیأت علمی دانشگاه آدلاید، استرالیا

تاریخ دریافت: ۸۱/۱۰/۱ ؛ تاریخ پذیرش: ۸۳/۵/۲۵

چکیده

برای استفاده از هاپلوئیدهای مضاعف[1] (DH) در اصلاح نباتات اطمینان از اینکه آنها نمونه‌های تصادفی گامت‌های والدینی باشند امکان پیشگویی نتاج را فراهم می‌سازد. در مطالعهٔ حاضر از ۲۵٦ لاین هاپلوئید مضاعف که از تلاقی بین جنسی گندم و ذرت با بکارگیری هیبریدهای نسل اول بین ارقام تراید‌نت و مولینکس تولید شدند، استفاده شده است. در هر کدام از لاین‌های هاپلوئید مضاعف نسبت به استخراج گلایدین و گلوتنین براساس روش سینگ و همکاران (۱۹۹۱) اقدام و برای تفکیک زیر واحدهای گلوتنین، برروی ژل الکتروفرز عمودی قرار داده شدند. پس از مقایسهٔ باندها هیچگونه انحراف از نسبت‌های مندلی ناشی از تفکیک ناجور آلل‌ها برای لوکوس‌های مربوط به زیر واحدهای گلوتنین که در نتاج DH پلی‌مورفیسم نشان می‌دهند، مشاهده نشد. این مسئله نشان می‌دهد که می‌توان از نتاج DH این مطالعه در برنامه‌های اصلاحی برای اصلاح صفات کیفیت نانوایی گندم استفاده نمود و به نفع ارقام با کیفیت بالا انتخاب انجام داد.

واژه‌های کلیدی: هاپلوئید مضاعف، گلوتنین، گلایدین، گندم، تلاقی بین گونه‌ای

مقدمه

چنانچه جوامع هاپلوئیدهای مضاعف قسمت قابل توجهی از مواد اصلاح نباتات را در آینده تشکیل دهند، و یا اینکه به‌صورت عمومی از آنها در تهیهٔ نقشه‌های ژنتیکی استفاده گردد، معین کردن اینکه ژنوتیپ هر گامت گندم استعداد تولید یک گیاه هاپلوئید را دارد بسیار مهم است. اگر نسبت‌های مندلی توسط پروتکل هاپلوئید مضاعف بهم نخورد، آنگاه حداقل تعداد نتاج هاپلوئید مضاعف موردنیاز برای بازیافت ترکیبات ژنی مشخص در یک برنامهٔ اصلاحی را می‌توان پیش‌گویی نمود (رنجبر و همکاران، ۱۹۹٦؛ رنجبر، ۱۹۹۷). به‌علاوه، برای مطالعات نقشه ژنتیکی ارائه انتخاب تصادفی گامت‌های F_1 توسط جامعه هاپلوئید مضاعف تولید شده بسیار مطلوب است (رنجبر، ۱۹۹۷).

وجود تفکیک ناجور توسط تامپسون و همکاران (۱۹۹۱) برای گیاهان جو حاصل از کشت میکروسپور گزارش شد که ٤ تا ۱۰ لوکوس مورد بررسی تفکیک ناجور نشان دادند. همچنین تفکیک ناجور در لینه‌های هاپلوئید مضاعف حاصل از کشت بساک در برنج (گایدردونی و همکاران، ۱۹۸۹) و در هاپلوئیدهای مضاعف جو حاصل از روش تلاقی بین گونه‌ای با *Hordeum bulbosum* دیده شد ولی شدت آن به‌مراتب

1- Doubled Haploids

www.SID.ir

Archive of SID

از آنچه در لینه‌های حاصل از کشت میکروسپور دیده شد کمتر بوده است (پیکرینگ، ۱۹۸۳).

هیبریدهای F_1 حاصل از تلاقی دو واریته از گندم ترایدنت[1] و مولینکس[2] حداقل برای ۸ صفت مختلف که توسط ژن‌های عمده شناخته شده کنترل می‌گردند و همچنین برای چندین صفت دیگر که وضعیت ژنتیکی آنها هنوز بخوبی شناخته شده نیست، چند شکلی[3] نشان می‌دهند.

یکی از این تفاوت‌ها در مورد ترکیبات پروتئینی است که برای تولید نان با کیفیت مناسب در گندم حائز اهمیت می‌باشد. واریته‌های ترایدنت و مولینکس در سه لوکوس کنترل‌کنندهٔ زیر واحدهای گلوتنین با وزن‌های ملکولی کم (LMW)[4] و زیاد (HMW)[5] بنام لوکوس‌های *Glu-B1*، *Glu-A3* و *Glu-B3* (کورنیش و همکاران، ۱۹۹۳) چند شکلی نشان می‌دهند.

پاین و کورفیلد (۱۹۷۹) پروتئین‌های گندم را توسط ژل‌های سفارز[6] تفکیک نمودند. گلوتنین‌های با وزن‌های ملکولی متفاوت سپس توسط الکتروفرزهای ژل‌پلی اکریلامید[7] در حضور SDS-PAGE برای توصیف ترکیبات پلی‌پپتیدی آنها تفکیک شدند. پایـــن و همکاران (۱۹۸۱) این سیستم ژل را برای توصیف تنوع ژنتیکی زیرواحدهای HMW در تعداد زیادی از انتخاب‌های حاصل از ارقام گندم هگزاپلوئید بکار بردند. روش لاملی (۱۹۷۰) توسط پاین و همکاران (۱۹۸۰) تصحیح شده و نیز پروتئین‌های اندوسپرم گندم با استفاده الکتروفرز ژل پلی اکریلامیـــد تک بعدی ۱۰ درصد تفکیک گردید (پاین و همکاران، ۱۹۸۱). سینگ و همکاران (۱۹۹۱) روش ساده‌تری را برای تفکیک همزمان و در یک مرحله SDS-PAGE تک بعدی هم در مورد زیر واحدهای گلوتنین HMW و هم LMW ایجاد نمودند.

پروتئین گلایدین گندم به طور مشخصی توسط لوکوس‌های *Gli-A1*، *Gli-B1* و *Gli-D1* تعیین می‌گردند که بشدت با لوکوس‌های *Glu-A3*، *Glu-B3* و *Glu-D3* مربوط به زیر واحدهای گلوتنین LMW که بترتیب برروی بازوی کروموزوم‌های 1AS، 1BS و 1DS هستند لینکاژ دارند. بنابراین تعیین الگوی تفکیک گلایدین در والدین و لاین‌های دیپلوئیدهای مضاعف می‌تواند در تشخیص باندهای بسیار پیچیده LMW کمک نماید (سینگ و همکاران، ۱۹۹۱).

هدف از این مطالعه تعیین وضعیت توارث الگوهای باندهای پروتئینی در نتاج هاپلوئیدهای مضاعف حاصل از تلاقی F_1های ترایدنت/ مولینکس با ذرت است.

مواد و روش‌ها

دویست و پنجاه و پنج لینهٔ هاپلوئید مضاعف توسط گرده‌افشانی نمودن گلچه‌های F_1 حاصل از تلاقی ترایدنت/ مولینکس با ذرت در سال ۱۹۷۵ در آزمایشگاه سیتوژنتیک غلات[8] به‌دست آمد. مقدار بذر حاصل از هر هاپلوئید مضاعف به طور قابل ملاحظه‌ای متفاوت بود، و برخی از لینه‌ها تولید بذر بسیار چروکیده و سختی نمودند که برای انتخاب و غربال نمودن تمام صفات مورد بحث این مطالعه مناسب نبودند (جدول ۱). در آزمایش حاضر با کمی تغییرات از روش سینگ و همکاران (۱۹۹۱) استفاده شده است. ضمناً والدین در باندهای گلوتنین HMW و LMW کاملاً متفاوت بودند.

1-Trident
2-Molineux
3-Polymorphism
4-Low Molecular Weight
5-High molecular weight
6-Sepharose
7-Polyacrilamide gel electrophoresis

۸- مجتمع کشاورزی و منابع طبیعی ویت، دانشگاه آدلاید ـ استرالیای جنوبی

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱- صفات کنترل شده توسط ژن‌های اصلی شناخته شدهٔ پروتئین که چند شکلی نشان داده‌اند.

صفت	حضور آلل در رقم		محل ژن روی	منابع
	ترایدنت	مولینکس	کروموزوم	
گلوتنین با وزن ملکولی بالا *(Glu-B1)*	۷+۸	۷+۹	1BL	پاین و همکاران (۱۹۸۰)
گلوتنین با وزن ملکولی پایین *(Glu-A3)*	e	c	3AS	کورنیش (۱۹۹٤)
گلوتنین با وزن ملکولی پایین *(Glu-B3)*	h	c	3BS	کورنیش (۱۹۹٤)

۱-تجزیهٔ گلایدین[1]: اندوسپرم نیمی از یک بذر از لینه‌های هاپلوئید مضاعف با استفاده از فشار یک چکش روی یک صفحهٔ فلزی تمیز بخوبی پودر شد. پودر حاصل را در داخل یک لولهٔ اپیندورف[2] ۱/۵ میلی‌متری قرار داده و مخلوط در ۳۰۰µl از اتانول ۷۰ درصد با بهم‌زدن توسط یک سیم فلزی قبل از ورتکس کردن به‌حالت تعلیق در آمد. سپس به‌مدت ۳۰ دقیقه با ورتکس مجدد به فاصلهٔ هر ده دقیقه در آون ٦۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. به دنبال آخرین ورتکس مخلوط به مدت دو دقیقه در ۵۰۰۰rpm سانتریفوژ گردید. قسمت مایع (۱۰۰µl) به داخل یک لولهٔ اپیندورف جدید منتقل و اتانول آن با استفاده از حمام تبخیر در زیر ٦۰ درجه سانتی‌گراد تبخیر گردید به‌طوری‌که در پایان حدود ۲۰ الی ۳۰µl از مایع در لوله باقی ماند. آنگاه ۱۰۰µl از بافر نمونهٔ SDS ۲× (80 mM Tris-Hcl, 40% Glycerol w/v, 0.02% Bromophenol blue) اضافه شد. پس از افزودن یک قطره گلایسین و مخلوط مجدد آن، نمونه سانتریفوژ شده و به مقدار ۱٤µl از مایع در هر چاهک ژل SDS-PAGE قرار داده شد.

۲- تجزیهٔ گلوتنین[3]: قسمت جامد باقیمانده از عصاره‌گیری گلایدین چندین بار با به حالت تعلیق در آوردن در یک میلی‌لیتر از ان- پروپانل-۱[4] ۵۰ درصد v/v شسته شد و پس از سانتریفوژ با استفاده از یک سر سرنگ بسیار ظریف متصل به سیستم پمپ مکش شیر آب، قسمت مایع در هر بار حذف گردید.

گلوتنین از بقایای پودر دانه عاری از گلایدین در ۱۰۰µl از یک محلول ترکیبی ان- پروپانل- ۵۰۱ درصد و ۸۰mM تریس- اسید کلریدریک[5] (pH=۸) عصاره‌گیری گردید که درست قبل از بکار بردن آن دی تیو تریتول[6] ۱ درصد (v/v) اضافه شده بود. پس از ورتکس مختصر عصاره در آون ٦۰ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ دقیقه جهت نرم شدن توده‌های گلوتنین قرار داده شد. سپس ۳ دقیقه سانتریفوژ (۵۰۰۰ rpm) انجام و عصاره‌گیری را با استفاده از ۱۰۰µl از محلول مشابه به علاوه وینیل پریدین- ٤[7] ۱/٤٪ (کاملاً تازه) تکمیل نموده و برای ۳۰ دقیقه دیگر در آون ٦۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. نمونه سپس به مدت ۲ دقیقه سانتریفوژ (۵۰۰۰ rpm) و ۵۰µl از مایع به یک لولهٔ اپیندورف جدید حاوی ۱۰۰µl بافر نمونه منتقل شد، و مخلوط پس از یک ورتکس مختصر بار دیگر به مدت ۱۵ دقیقه در همان آون جهت تشکیل مجموعهٔ SDS با پلی پپتیدهای گلوتنین قرار داده شد. پس از ۲ دقیقه سانتریفوژ (۵۰۰۰ rpm)، ۱٤µl از مایع در چاهک ژل SDS-PAGE برای تفکیک زیر واحدهای گلوتنین قرار داده شد.

۳- آماده‌سازی SDS-PAGE و الکتروفورز: روش الکتروفرز ژل پلی اکریلامید (PAGE) شامل یک سیستم ژل برای تفکیک ملکول‌های پروتئین است که حاوی بافر ژل جداساز (pH=۸/۸۸)، اکریلامید به‌علاوهٔ ۱ درصد

1- Gliadin Analysis
2- Eppendorf tube
3- Glutenin Analysis
4- N-Propanol-1

5- Tris-Hcl
6- Dithiothreitol 1%
7- Vinil Pyridine-4

www.SID.ir

Archive of SID

اتصال‌ساز متقاطع (اکریلامید/بیس)[1]، تترا متیل اتیلن دی آمین (TEMED)[2] و کاتالیزور آمونیم پرسولفات (APS)[3] می‌باشد. فرمول ترکیبات شیمیایی هر قسمت در جدول ۲ ارائه شده است. فاصلهٔ بین دو صفحهٔ شیشه‌ای که توسط یک فاصله‌انداز پلاستیکی، ژلی به قطر یک میلی‌متر ایجاد می‌نماید، توسط محلول ژل جداساز[4] پر شده و پس از بستن ژل، ژل استک[5] برای ایجاد چاهک‌هایی جهت ریختن نمونه‌ها در آن با استفاده از فرمول ارائه شده در جدول ۲ روی ژل جداساز ریخته شد. پس از بسته شدن این ژل شانه‌های مخصوص (۲۸ چاهکی) را به آرامی از روی آن حذف و چاهک‌ها توسط بافر الکترود پر گردیدند. نمونه‌ها در داخل این چاهک‌ها قرار داده شده و با استفاده از جریان ثابت ۹۰mA و ولتاژ ۴۰۰ به مدت ۲ الی ۳ ساعت جداسازی انجام گردید. در موقع قرار دادن نمونه‌ها در چاهک باید نسبت به حذف حباب‌های هوا دقت نمود.

رنگ‌آمیزی و خشک نمودن ژل: محلول رنگ‌آمیزی با ۰/۲۵ گرم آبی کوماسی بریلیان R[6] (در ۲۵ میلی‌لیتر آب)، ۵۷/۸ گرم تری کلرو استیک اسید[7] که در ۷۲۰ میلی‌لیتر آب به‌علاوه ۱۸۰ میلی‌لیتر متانول و ۶۳ میلی‌لیتر اسیداستیک خالص حل شده جهت رنگ‌آمیزی باندها با استفاده از تکان دادن توسط یک دستگاه شیکر مسطح به‌مدت ۲ الی ۳ ساعت بکار رفت. برای خشک نمودن ژل رنگ‌آمیزی شده، ابتدا توسط یک محلول تثبیت‌کننده حاوی ۴۰ درصد متانول، ۱۰ درصد اسیداستیک و ۳ درصد گلیسرول حجمی که توسط آب به حجم یک لیتر رسانده شد به مدت یک ساعت با تکان دادن توسط شیکر مسطح تثبیت گردید و سپس ژل بین دو لایه غشاء سلوفان قرار داده شد و به مدت چند روز در حرارت اتاق خشک گردید.

تشخیص و معیاربندی باندها: باندها براساس روش کورنیش و همکاران (۱۹۹۳) تشخیص و معیاربندی گردید. هیچ مشکلی در تشخیص باندهای HMW وجود نداشت، لیکن تشخیص باندهای LMW بسیار مشکل بود. برای تشخیص این باندها از لینکاژ موجود بین این باندها و الگوهای مربوط به گلایدین کمک گرفته شد.

نتایج و بحث

شکل‌های ۱ و ۲ ژل الکتروفرز را به‌ترتیب برای زیرواحدهای گلوتنین HMW، LMW و گلایدین نشان می‌دهند. جداول ۳ و ٤ نتاج هاپلوئیدهای مضاعف که در داخل هرکدام از هشت ژنوتیپ ممکن از تفکیک همزمان سه لوکوس *Glu-B1*، *Glu-A3* و *Glu-B3* طبقه‌بندی شده‌اند را نشان می‌دهند. همانطور که انتظار می‌رود هیچ تنوعی در سایر لوکوس‌های HMW و LMW مشاهده نشد زیرا احتمالاً هر دو والد آلل‌های مشابهی را در سایر لوکوس‌ها حمل می‌نمایند.

در لوکوس *Glu-B1* تعداد ۹۶ نتاج هاپلوئید مضاعف حامل آلل کنترل‌کنندهٔ زیر واحدهای گلوتنین HMW 7+10 بودند و ۸٤ نتاج آلل کنترل‌کنندهٔ 8+7 را دارا بودند. این اختلاف معنی‌داری را از نسبت مورد انتظار ۱:۱ نشان نمی‌دهد (χ^2=۰/۸، P =۰/۷۵). تفکیک در سایر لوکوس‌ها مشابه بوده و وقتی که سه لوکوس با هم به‌صورت پیوسته با یک بلوک بررسی شدند نیز هیچگونه انحراف معنی‌داری از ۸ ژنوتیپ از نسبت‌های مندلی مشاهده نگردید (χ^2=۱/۰۲، P=۰/۲۵). بنابراین هیچ مدرکی برای هرگونه تفکیک ناجور جهت فنوتیپ‌های پروتئین مورد مطالعه با استفاده از نتاج هاپلوئید مضاعف به‌دست نیامد.

1-Acrylamid/BIS
2-Tetramethyl Ethylendiamine
3-Ammonium Persulphate
4-Isolating Gel
5-Stacking Gel
6-Comassie Brilliant Blue R
7-Trichloroacetic acid

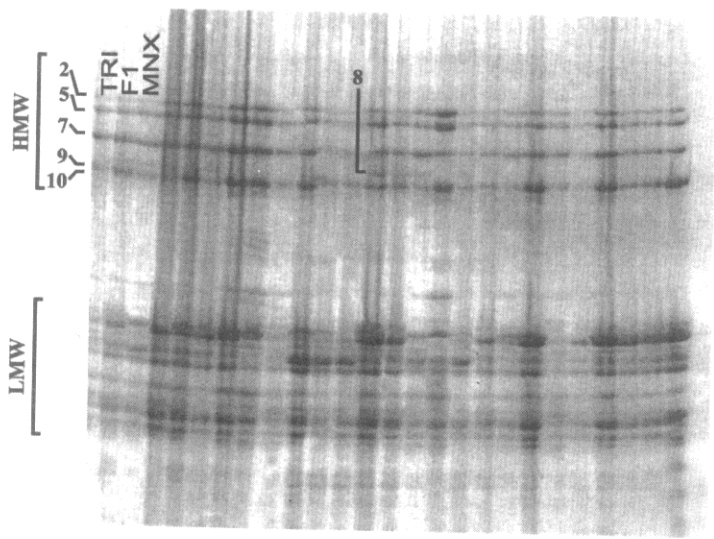
www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲- ترکیب ژل SDS-PAGE برای تفکیک زیر واحدهای HMW و LMW گلوتنین در لاین‌های DH گندم.

محلول آماده	اسیدیته	مقدار بکار رفته در ژل	ترکیبات شیمیایی	غلظت
بافر جداساز ژل (×2)	۸/۸۸	۱۳ml	تریس	٤٥/٤١٢ گرم
			اس دی اس	۱/۰۰۰ گرم
			آب	در ٤٦٠سی‌سی
محلول اکریلامید برای ژل جداساز†		۸/۷ ml	اکریلامید	۷۵ گرم
			بیس	۰/۷۵ گرم
آب مقطر		٤/۳ ml	آب	تا حجم ۲۵۰سی‌سی
حجم نهایی		۲٦ ml		
تیمید		٦۲ µl		
آپی اس		۷٤ µl		
بافر ژل ذخیره (×2)	٦/۸	۵ ml	تریس	٦/۰٦ گرم
			اس دی اس	۰/٤ گرم
			آب	در ۲۵۰سی‌سی
محلول ژل استک اکریلامید برای استک کردن ژل‡		۱/۳ ml	اکریلامید	۸۷/۵ گرم
			بیس	۱/۳۲ گرم
آب مقطر		۳/۷ ml	آب	تا حجم ۲۵۰سی‌سی
حجم نهایی		۱۰ ml		
تیمید		۲۰ µl		
آپی اس		۵۰ µl		

†حاوی ۳۰ درصد اکریلامید و ۱ درصد اتصال ساز متقاطع ‡حاوی ۳۵ درصد اکریلامید و ۱/۵ درصد اتصال ساز متقاطع



شکل ۱ـ الگوهای باند گلوتنین ترایدنت، مولینکس، نتاج F_1 آنها و لاین‌های DH حاصل از تلاقی بین گونه‌ای نتاج F_1 آنها با ذرت. زیر واحدهای با وزن ملکولی بالا برای لوکوس Glu-B1 در ترایدنت و مولینکس و نتاج هاپلوئید مضاعف آنها تنوع نشان داد و زیر واحدهای با وزن ملکولی پایین برای لوکوس‌های Glu-A3 و Glu-B3 تنوع نشان داده است.

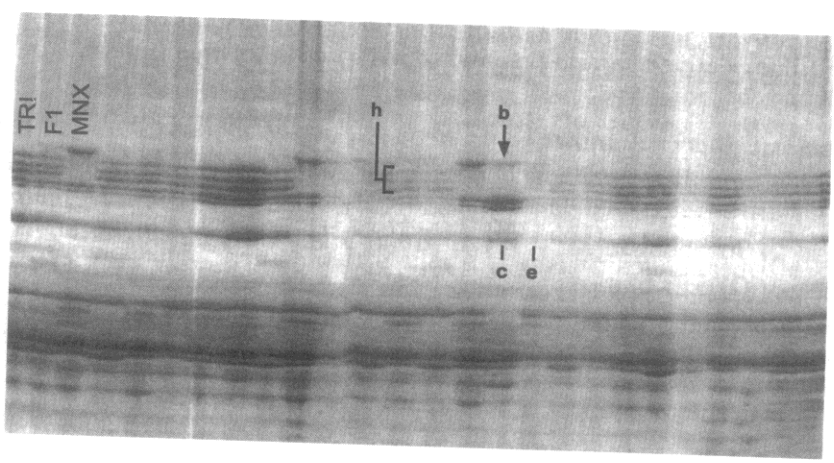
www.SID.ir

Archive of SID

برای استفاده در مطالعات ژنتیکی، به‌ویژه در تهیه نقشه‌ژنی، تولید هاپلوئیدهای مضاعف از تلاقی‌هایی که نمونه‌های تصادفی از گامت‌ها را نشان دهند، بسیار حائز اهمیت است. برای اصلاح نباتات به‌دست آوردن یک نمونه تصادفی بسیار مطلوب و مفید است زیرا در آن صورت محاسبه حداقل تعداد هاپلوئیدهای مضاعفی که باید تولید شود تا غالب ترکیبات ژنی مطلوب را شامل گردند امکان‌پذیر می‌گردد (رنجبر، ۱۹۹۷). اگر تعدادی از گامت‌ها بخاطر نوع ژنوتیپ‌شان برای ایجاد هاپلوئید مضاعف از پتانسیل کمتر یا بیشتری از سایرین برخوردار باشند، آنگاه نتایج حاصل از روش اصلاحی هاپلوئیدهای مضاعف غیرقابل پیش‌بینی و بی‌فایده خواهد شد.

در بررسی حاضر بر خلاف نتایج تامپسون و همکاران (۱۹۹۱) در جو حاصل از کشت میکروسپور، و لاین‌های هاپلوئید حاصل از کشت بساک در برنج گایدردونی و همکاران (۱۹۸۹)، برای لوکوس‌های مربوط به زیر واحدهای گلوتنین هیچ موردی برای تفکیک ناجور مشاهده نگردید. این نشان می‌دهدکه تفکیک ژن‌ها در این لوکوس‌ها به‌هیچ وجه انحرافی از نسبت‌های مورد انتظار مندلی را از خود نشان نمی‌دهند. تعدادی از ژنوتیپ‌های گامت ممکن است به‌صورت بسیار واضح و بدون ابهام قابل تعیین باشند، همانند آلل‌های پروتئین مورد بحث این مطالعه، ولی این نوع آزمایش در صورت استفاده از جوامع هاپلوئیدهای مضاعف برای تهیهٔ نقشه ژنتیکی بسیار ضروری و مفید است (رنجبر، ۱۹۹۷).

با توجه به نتایج این آزمایش در مورد لوکوس‌های کنترل‌کنندهٔ کیفیت نانوایی گندم که در دو والد ترایدنت و مولینکس متمایز بودند، اثبات عدم وجود تفکیک ناجور در نتاج حاصل از هاپلوئیدهای مضاعف این روش را برای استفاده در اصلاح گندم برای صفت مزبور بسیار کارآ و مؤثر خواهد نمود. لذا با توجه به سرعت بسیار بالای دستیابی به یکنواختی ژنتیکی کامل در طی فقط یک نسل می توان نسبت به انتخاب لینه‌های با کیفیت مناسب یا بالا در بین نتاج حاصل با استفاده از این روش و تشخیص وجود باندهای با کیفیت خوب نانوایی در لوکوس‌های مربوطه به سرعت اقدام نمود و در روند اصلاح گندم برای این صفت بسیار مهم اقتصادی تسریع به‌عمل آورد. در واقع یکی از مزایای اقتصادی این روش در تشخیص سریع و ذخیره‌سازی زمان و کاهش هزینه در آزادسازی ارقام با کیفیت بالا یا ایجاد بهبود و رفع معایب ارقام قبلی می‌باشد.



شکل ۲ـ الگوهای باند گلایدین ترایدنت، مولینکس» نتاج F_1 آنها و لاین‌های DH حاصل از تلاقی بین گونه‌ای نتاج F_1 آنها با ذرت. الگوهای باند گلایدین برای خواندن زیر واحدهای با وزن ملکولی پایین گلوتنین بخاطر پیوستگی شدید این دو با یکدیگر بسیار مفید می‌باشند. زیر واحد b دارای یک باند در بالا و زیر واحد h دارای ۳ باند در زیر b برای لوکوس Gli-B3 هستند. در لوکوس Gli-A3، جایی که باند وجود دارد از نوع c بوده و جایی که باند وجود ندارد از نوع e می‌باشد. ترایدنت در لوکوس‌های Gli-A3 و Gli-B3 به‌ترتیب دارای باند e و فاقد باند c بوده ولی دارای باند h می‌باشد و مولینکس در لوکوس‌های فوق به‌ترتیب دارای باند c و فاقد باند h ولی دارای باند e می‌باشد.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۳- تفکیک زیرواحدهای گلوتنین **HMW** و **LMW** کنترل شده توسط سه لوکوس.

تعداد لاین‌های DH مشاهده شده	ژنوتیپ		
	Glu-B3	Glu-A3	Glu-B1
۲۸	b	c	۷+۸
۱۳	h	c	۷+۸
۲٤	b	e	۷+۸
۱۹	h	e	۷+۸
۲۰	b	c	۷+۸
۳۰	h	c	۷+۸
۲۱	b	e	۷+۸
۲۵	h	e	۷+۸

جدول ٤ ـ تفکیک فنوتیپ‌های پروتئین دانه لاین‌های **DH** حاصل از تراید‌نت × مولینکس.

لوکوس	فراوانی فنوتیپ‌ها در لاین‌های DH		نسبت مورد انتظار	χ^2	P
	تیپ تراید‌نت	تیپ مولینکس			
	(۷+۸)	(۷+۹)			
وزن ملکولی بالا (*Glu-B1*)	۸٤	۹٦	۱:۱	۰/۸۰^{ns}	۰/٤۰
وزن ملکولی پایین	(e)	(c)			
(*Glu-A3*)	۹۱	۸۹	۱:۱	۰/۰۲^{ns}	۰/۸۹
	(h)	(b)			
(*Glu-B3*)	۹۳	۸۷	۱:۱	۰/۲۰^{ns}	۰/٦۷

ns: غیرمعنی‌دار از نظر آماری

منابع

1.Cornish, G.B., Burridge, P.M., Palmer, G.A., and Wrigley, C.W. 1993. Mapping the origins of some HMW and LMW glutenin subunit alleles in Australian germplasm. In: Wrigley, C.W. (ed.), Proc. 43th Aust. Cereal Chemistry Conference, Sept. 12-16, Coogee Beach, Sydney, NSW, Australia, pp 255-260.

2.Cornish, G.B. 1994. "Excalibur Magic" an eight-edged sword. In: Paull, J., Dundas, I.S., Shepherd, K.J., and Hollamby, G.J. (Eds), Proc. the 7th wheat breeding society of Australia. Sept. 25-30. Adelaide, South Australia. pp 51-55.

3.Guiderdoni, E., Glaszmann, J.C., and Coutois, B. 1989. Segregation of 12 isozyme genes among doubled haploid lines derived from a japonica × indica cross of rice (Oryza sativa L.). Euphytica 42:45-53.

4.Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685.

5.Payne, P.I., and Corfield, K.G. 1979. Subunit comparison of wheat glutenin proteins, isolation by gel filteration in a dissociation medium. Planta 145:83-88.

6.Payne, P.I., Holt, L.M., and Law, C.N. 1981. Structural and genetical studies on the high-molecular-weight subunits of wheat glutenin. Part 1: Allelic variation in subunits amongst varieties of wheat (*Triticum aestivum*) Theor. Appl. Genet. 60:229-236.

7.Payne, P.I., Law, C.N., and Mudd, E.E. 1980. Control by homoelogous group 1 chromosomes of the high-molecular-weight subunits of glutenin, a major protein of wheat endosperm. Theor. Appl. Genet. 58: 113-120.

8.Pickering, R.A. 1983. The assessment of variation in two populations of *Hordeum bulbosum* L. for improving success rates in a doubled haploid barley program. Euphytica 32:903-910.

9.Ranjbar, G.A. 1997. Production and utilization of doubled haploid lines in wheat breeding programs. Ph. D. Thesis. The University of Adelaide.

10.Ranjbar, G.A., Hollamby, G.J., Islam, A.M.K.R., and Shepherd, K.W. 1996. A consideration for flour quality of wheat doubled haploid lines using protein banding method. In: Proc. the 10th international cereal and bread congress, Porto Carras (Chalkidiki). Greece. p 115.

11.Singh, N.K., Shepherd, K.W., and Cornish, G.B. 1991. A simplified SDS-PAGE procedure for separating LMW subunits of glutenin. J. Cereal Sci. 14:203-208.

12.Thompson, D.M., Chalmers, K., Waugh, R., Forster, B.P., Thomas, W.T.B., and Calihari, P.D.S. 1991. The inheritance of genetic markers in microspore-derived plants of barley (*Hordeum vulgare* L.) Theor. Appl. Genet. 81:487-492.

www.SID.ir

Archive of SID

J. Agric. Sci. Natur. Resour., Vol. 12(5), Jan - Feb 2006
www.magiran.com/jasnr

Segregation patterns of known major genes in the doubled haploid population derived from (Trident × Molineux) wheat F_1 × maize crosses I. determination of endosperm protein phenotypes

G.A. Ranjbar[1], G.J. Hollamby[2] and K.W. Shepherd[2]
[1]Assistant Professor of Mazandaran University, Iran, [2]Faculty Members of the Adelaide University, Australia.

Abstract

To utilize doubled haploid (DH) lines for plant breeding purposes, it is desirable that a random sample of parental gametes is obtained because it is possible to predict progenies. In current study 256 DH lines derived from intervener hybridization have been undertaken between wheat and maize using F_1 hybrids of wheat cultivars. Trident and Molineux have been used as parental cultivars of wheat F_1 hybrids in 1997 at Waite Campus. Gliadin and Glutenin were extracted from each DH lines according to a method developed by Sing et al. (1991) and to separate glutenin subunit bands, a Hoefer gel electrophoretic apparatus has also been used. The current study of glutenin subunits related loci gave no case of distorted segregation patterns showing departure from expected Mendelian ratios. This case shows that DH progeny of present work can be used in breeding programs for improving bread quality characteristics of wheat and doing selection for the benefiting of high quality cultivars.

Keywords: Doubled haploids; Glutenin subunits; Gliadin subunits; Wheat; Intergeneric Hybridization

www.SID.ir