ژنتیک نوین
دوره هشتم، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۲
صفحه ۳۹۶- ۳۸۷

تنوع آللی ژن‌های *Puroindoline* موثر در سختی دانه در ارقام گندم نان ایران

Allelic variations of *puroindoline* genes affecting grain hardness in Iranian bread Wheat cultivars

الهام مهرآذر*[۱]، علی ایزدی‌دربندی[۱]، محسن محمدی[۲]، گودرز نجفیان[۲]

۱- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد و استادیار گروه علوم زراعی پردیس ابوریحان دانشگاه تهران
۲- به ترتیب استادیار و دانشیار موسسه اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج

Mehrazar E*[1], Izadi-Darbandi A[1], Mohammadi M[2], Najafian G[2]

1. Msc Student and Assistant Professor, University of Tehran, College of Abouraihan
2. Assistant Professor and Associate Professor Seed and Plant Improvement Institute, Karaj, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: elhammehrazar@ut.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۱/۶/۲۰ - تاریخ پذیرش: ۹۱/۱۰/۲۴)

چکیده

سختی دانه یک صفت مهم در گروه‌بندی تجاری گندم نان (*Triticum aestivum L.*) است. سختی دانه تحت کنترل مکان ژنی سختی (*Ha*) شامل سه ژن به هم پیوسته پروتئین نرمی دانه (*Gsp-1*)، پیوروایندولین a (*Pina*) و پیوروایندولین b (*Pinb*) می‌باشد. یک حذف بزرگ در ژن پیوروایندولین a (*Pina*) یا چندشکلی‌های تک نوکلئوتیدی (SNPs) در ژن پیوروایندولین b (*Pinb*) که منجر به تغییر در اسید آمینه می‌شوند باعث تغییردر میزان سختی بافت دانه گندم می‌شوند. آلل‌های نوع طبیعی این دو ژن موجب فنوتیپ طبیعی دانه نرم می‌شوند و بروز جهش در هریک از این دو مکان ژنی باعث سخت شدن بافت دانه می‌شود. تعدادی از ارقام تجاری گندم نان برای تعیین تنوع آللی ژن‌های پیوروایندولین a و b مورد مطالعه قرار گرفتند. تعیین تنوع آلل‌های کنترل کننده سختی دانه توسط تکثیر با آغازگرهای اختصاصی STS و همچنین نشانگرهای همبارز SNP انجام گرفت. نتایج حاکی از آن است که حدود نیمی از ارقام مورد مطالعه دارای جهش در ژن‌های کنترل کننده پیوروایندولین‌ها بودند. همچنین آلل‌های جهش یافته *Pina-D1b* و *Pinb-D1b* شناسایی شدند و ارقام معرفی شده جدید نظیر گنبد، سیروان ، اروم، بهار، افلاک و مغان۳ دارای ژنوتیپ *Pina-D1b* بوده و رقم زارع ژنوتیپ *Pinb-D1b* را نشان دادند. در بین آلل‌های تعیین کننده سختی دانه آلل *Pina-D1b* بیشترین فراوانی را داشت. در این مطالعه مشخص شد، ارقامی که از نظر ژنوتیپی سختی را نشان می‌دهند با نتایج حاصل از دستگاه اینفراماتیک از نظر سختی مطابقت می‌کند. همبستگی بین درصد شاخص سختی و جذب آب حاصل از دستگاه اینفراماتیک ۰/۷۴ بود که در سطح ($P<0/0001$) معنی‌دار شد. یافته‌های حاصل درباره ژنتیک سختی دانه و تایید نشانگرهای اختصاصی آن می‌تواند کمک موثری در برنامه‌های به‌نژادی گندم کند.

واژه‌های کلیدی

آزمون مکانیکی نوری
سختی دانه
گندم
واکنش زنجیره‌ای پلیمراز
puroindoline

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

گندم یکی از محصولات غذایی مهم در جهان محسوب می‌شود و سختی دانه یکی از عوامل تعیین کننده کلاس تجاری و کیفیت گندم در مصارف گوناگون به شمار می‌رود (Wanjugi 2007; Ayala et al. 2012; Guzman et al. 2012). میزان سختی بافت دانه یکی از ویژگی‌های اساسی در طبقه بندی تجاری گندم می‌باشد. دانه‌های نرم‌تر، آرد نرم‌تر تولید می‌کنند که مناسب برای تهیه کیک و انواع بیسکوئیت هستند در حالی که دانه‌های سخت‌تر آرد نسبتا شکننده‌تر و تردتر تولید می‌کنند که قدرت جذب آب بالاتری داشته و برای تهیه نان مناسب می‌باشند (Glenn et al.1991). به همین جهت گندم‌های هگزاپلوئید را بر اساس میزان سختی بافت آندوسپرم به گروه‌های سخت و نرم تقسیم می‌کنند (Wanjugi 2007; Chen et al.2010). سختی دانه گندم تحت تاثیر عوامل ژنتیکی است اما عوامل محیطی نیز تاثیر گذار هستند (Turnbull and Rahman 2002). سختی دانه بوسیله مکان ژنی سختی (*Ha*) که بر روی بازوی کوتاه کروموزوم 5D قرار دارد کنترل می‌شود این مکان ژنی شامل سه ژن بهم پیوسته *Gsp-1*، *Pina* و *Pinb* می‌باشد که به ترتیب مربوط به پروتئین نرمی دانه، پیوروایندولین a و پیوروایندولین b می‌باشد (Lillemo et al. 2006; Morris and Bhave 2008; Chen et al. 2012). اگر نشاسته گندم را آبشویی کنیم، میزان پروتئین فریابیلین[1] آن در گندم سخت نسبت به گندم نرم کمتر است و گندم دوروم فاقد این پروتئین است. پروتئین فریابیلین دارای وزن مولکولی ۱۵ کیلو دالتون بوده و شامل دو جز عمده پروتئینی پیوروایندولین a (PINA) و پیوروایندولین b (PINB) است. این پروتئین، پروتئین‌های گیاهی منحصر به فرد با مناطق غنی از تریپتوفان است و میل ترکیبی زیادی با چربی‌ها دارد (Morris et al. 2002; Mikulikova 2007; Li et al. 2008; Ayala et al. 2012) این ارتباط از طریق دامنه‌های غنی از تریپتوفان بصورت منحصر به فرد و مکان فعال برای اتصال فسفولیپیدها در سطحی از گرانول‌های نشاسته پیدا می‌شود (Gautier et al. 1994; Li et al. 2008). تنوع آللی در ژن‌های پیوروایندولین با میزان سختی بافت دانه پیوستگی دارد (Martin et al. 2006 ; Ma et al. 2009). در گندم دوروم، بدلیل اینکه ژن‌های رمز کننده وجود ندارند، پروتئین فریابیلین نیز تولید نمی‌شود و ارتباط موثر با فسفولیپیدهای سطحی گرانول‌های نشاسته منتفی بوده و لذا بافت دانه سخت می‌باشد. تا کنون ۹ آلل برای پیوروایندولین a (*Pina*) و ۱۷ آلل برای پیوروایندولین b (*Pinb*) در گندم نان شناسایی شده است (Bhave and Morris 2008; Morris and Bhave 2008). ژنوتیپ حاصل از آلل‌های طبیعی (*pina-D1a/pinb-D1a*) منجر به فنوتیپ دانه با بافت آندوسپرم نرم می‌شود و چنانچه جهشی در هر یک از این دو ژن ایجاد شود منجر به دانه با بافت آندوسپرم سخت می‌شود (Chen et al. 2007; Bhave and Morris 2008; Chen et al. 2010; Ayala et al. 2012). آلل‌های *pina-D1b* و *pinb-D1b* رایج‌ترین آلل‌های منجر به سختی دانه در سراسر دنیا می‌باشند (Lillemo et al. 2006; Morris and Bhave 2008; Huang and Brule-Babel 2011). آلل‌های *pinb-D1c*، *pinb-D1d*، *Pinb-D1b* و *Pina-D1b* ژن *Pinb* و *Pina* شناسایی شده در ارقام گندم سخت در گندم‌های آمریکای شمالی و اروپا می‌باشند که این آلل‌ها از نظر نوع جهش متفاوت بوده و آلل *Pina-D1b* دارای جهش حذفی می‌باشد و آلل *Pinb-D1b* دارای جهش جایگزینی اسید آمینه گلایسین (Gly-46) به سرین (Ser-46)، آلل *Pinb-D1c* دارای جهش جایگزینی اسید آمینه لوسین (Leu-60) به پرولین (Pro-60) و آلل *Pinb-D1d* جهش جایگزینی اسید آمینه تریپتوفان (Trp-44) به آرژنین (Arg-44) می‌باشند (Huang and Roder 2005; Lillemo et al. 2006; Morris and Bhave 2008; Huang and Brule-Babel 2011). روش‌های زیادی از جمله دو نشانگر مبتنی بر DNA شامل جایگاه نشانمند از توالی[2] و تفاوت ردیف تکثیری برش خورده[3] برای ارزیابی ژنوتیپی آلل‌های مختلف *Pinb-D1* استفاده شده است (Giroux and Morris 1997; Lillemo and Morris 2000; Huang and Roder 2005). اما به دلیل گران بودن نشانگرهای نامبرده به ترتیب کمتر مورد استفاده قرار می‌گیرند ولی نشانگرهای جایگاه‌های نشانمند از توالی و نشانگرهای همبارز SNP به عنوان یک روش موثر در ارزیابی ژنوتیپی آلل‌های مختلف *Pinb-D1* گزارش شده

[1] Friabilin

[2] Sequence-Tagged Sites (STS)

[3] Cleaved Amplified Polymorphic Sequences (CAPS)

Archive of SID
www.SID.ir

است. به منظور مطالعه سختی دانه به غیر از روش‌های مولکولی نامبرده، استفاده از ویژگی‌های فیزیکی و بطور ویژه مکانیکی در محصولات دانه‌ای، جهت تشخیص کیفیت دانه و طبقه‌بندی آن بسیار مفید است. کاربرد روش‌های فیزیکی، در مقایسه با دیگر روش‌های تعیین کیفیت محصول خام (همچون روش‌های شیمیایی) هرچند از دقت کمتری برخوردار است، اما قابلیت‌های مهم آن از جمله ساده، سریع، مقرون به صرفه و کارامد بودن آن، به عنوان یک روش ابزاری سبب شده که امروزه بیش از قبل به آن توجه شود (Salmanowicz et al. 2012). در این رابطه، امروزه به استفاده همزمان از دو روش مکانیکی و نوری (NIR[1]) توجه خاصی شده است. اندازه ذرات دانه‌ها در سختی آن‌ها تاثیرگذار است به طوری که هر چه دانه‌ها سخت‌تر باشند به اندازه درشت‌تر خرد می‌شوند. اندازه ذرات نیز بر انعکاس اشعه مادون قرمز تاثیرگذار است، به طوری که هر چه اندازه ذرات افزایش یابد و دانه سختی بیشتری داشته باشد، جذب NIR و میزان درصد جذب آب افزایش می‌یابد و بالعکس (Gautier et al. 1994; Salmanowicz et al. 2012).

نظر به توسعه برنامه‌های به‌نژادی کشور به خصوص در مورد افزایش کیفیت نانوایی و عوامل موثر بر آن، این تحقیق به منظور تعیین تنوع آلل‌های *Pina* و *Pinb* در ارقام تجاری گندم نان ایران انجام گرفت. بافت دانه با محتوای پروتئین و کیفیت پیوسته است (He et al. 2004) بنابراین بهبود سختی دانه می‌تواند به همراه بهبود کیفیت و پروتئین در برنامه‌های اصلاحی دنبال شود. هدف این تحقیق تعیین ژنوتیپ ژن‌های دخیل در سختی دانه در تعدادی از لاین‌های اصلاحی و ارقام گندم نان می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق از ۳۸ رقم تجاری گندم نان که محصول پژوهش‌های بخش تحقیقات غلات موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج می‌باشند، استفاده شد (جدول۱). این ارقام انتخابی از ۴ اقلیم کشور شامل اقلیم گرم و مرطوب شمال (Zone I)، اقلیم گرم و خشک جنوب (Zone II)، اقلیم معتدل (Zone III) و اقلیم سرد (Zone IV) می‌باشند (Saidi et al. 2005). همچنین ارقام بهار، اروم، زارع، افلاک، مغان۳، آرتا، بم، ارگ، گنبد، سیروان، میهن، سیستان و سپاهان که اخیرا معرفی شده‌اند نیز در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفت.

استخراج DNA

استخراج DNA از گیاهچه‌ها در مرحله دو تا سه برگی با استفاده از روش CTAB با اندکی تغییر انجام شد (Murray and Thompson 1980).

سنجش سختی بذر به روش مکانیکی نوری

درصد سختی دانه و درصد جذب آب با استفاده از دستگاه اینفراماتیک (NIR) مدل ۸۶۰۰ بر اساس استاندارد جهانی AACC طبق روش ۳۰-۷۰/۰۲ اندازه‌گیری شد. معمولا طبق اعداد استاندارد، اعداد کمتر از ۵۰، برای گندم‌های نرم و اعداد بین ۵۰ تا ۸۰، برای گندم‌های سخت در نظر گرفته می‌شوند (جدول۲). نتایج حاصل از این روش می‌تواند تاییدی بر نتایج مولکولی و همچنین روشی برای تعیین فنوتیپ بافت دانه بخصوص در ارقامی که از نظر مولکولی فنوتیپ و ژنوتیپ نامشخص دارند، باشد

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

در مطالعه حاضر از آغازگرهای توصیف شده توسط Gautier et al. (1994) برای تشخیص جهش حذف ژنی *Pina* معروف به آلل *Pina-D1b* استفاده شد. از آغازگرهای ارائه شده توسط (Giroux and Morris 1997) برای شناسایی جهش جایگزینی نوکلئوتید G به A در موقعیت نوکلئوتید ۲۲۳ استفاده شد. این جهش منجر به تغییر آمینواسید گلایسین به سرین شده، با شناسایی این نوع جهش آلل *Pinb-D1b* شناسایی می‌شود. واکنش‌های PCR با آغازگرهای اختصاصی و برنامه چرخه دمایی برای تعیین تنوع آلل‌های *Pina* و *Pinb* با استفاده از آغازگر نام برده بر طبق جدول۲ انجام شد. غلظت مواد بکار رفته در یک واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در حجم ۲۵ میکرولیتر و با یک واحد *Taq* DNA پلیمراز، ۱/۱۴ میلی‌مولار از هر $MgCl_2$، ۱/۵ میکرولیتر بافر PCR (10x)، ۵۰ نانوگرم از DNA ژنومی، ۱/۵ میلی مولار از هر dNTP و ۲۵۰ نانوگرم از هر آغازگر انجام شد. فراورده‌های PCR روی ژل‌های آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز شدند.

[1] Near Infrared Reflectant (NIR)

Archive of SID
www.SID.ir

جدول۱- تنوع آللی شناسایی شده در ارقام تجاری ایران

رقم	اقلیم	سال معرفی	شجره	شاخص سختی (NIR)	درصد جذب آب	*Pina*	*Pinb*	فنوتیپ مورد انتظار
Arg	معتدل	۱۳۸۸	1-66-22 / Inia	۵۲	۶۴	*No pina-D1b*	*No Pinb-D1b*	عدم تشخیص**
Bam	معتدل	۱۳۸۵	Vee "s"/Nac //1-66-22	۵۰	۶۴/۵	*No pina-D1b*	*No Pinb-D1b*	عدم تشخیص
MV17	سرد	۱۳۷۲	رقم وارداتی	۴۷	۶۳/۷	*No pina-D1b*	*No Pinb-D1b*	عدم تشخیص
Navid	سرد	۱۳۴۷	Minhardi-Odin No. 1-39-1606	۴۴	۶۳/۲	*No pina-D1b*	*No Pinb-D1b*	عدم تشخیص
Mihan	سرد	*	*	۵۳	۶۴/۲	*No pina-D1b*	*No Pinb-D1b*	عدم تشخیص
Alamoot	سرد	۱۳۷۴	Kavz/Ti71/3/Maya"s"//Bb/Inia/4/Kj2/5/Anza/3/Pi/Ndr//Hys	۴۸	۶۳/۶	*No pina-D1b*	*No Pinb-D1b*	عدم تشخیص
Sepahan	معتدل	۱۳۸۵	Azd/5/L2453/1347/4/Kal//Bb/Kal/3/Au//Y50E/3*Kal	۵۳	۶۴/۵	*No pina-D1b*	*No Pinb-D1b*	عدم تشخیص
Mahdavi	معتدل	۱۳۷۴	Ti/Pch/5/Mt48/3/Wt*//Nar59/Tota63/4/Mus	۵۰	۶۳/۸	*No pina-D1b*	*No Pinb-D1b*	عدم تشخیص
Kouhdasht	گرم و مرطوب	*	*	۵۲	۶۳/۶	*No pina-D1b*	*No Pinb-D1b*	عدم تشخیص
Dehdasht	معتدل	*	*	۵۲	۶۴/۱	*No pina-D1b*	*No Pinb-D1b*	عدم تشخیص
Gaspard	گرم و مرطوب	۱۹۹۲	ARMINDA/FD-71036[1790];	۴۸	۶۴/۱	*No pina-D1b*	*No Pinb-D1b*	عدم تشخیص
Hamoon	گرم و خشک	۱۳۸۱	Falat/Roshan	۵۰	۶۴	*No pina-D1b*	*No Pinb-D1b*	عدم تشخیص
Rasad	سرد	*	*	۵۳	۶۴/۵	*No pina-D1b*	*No Pinb-D1b*	عدم تشخیص
Baaz	گرم و خشک	*	*	۵۲	۶۴	*No pina-D1b*	*No Pinb-D1b*	عدم تشخیص
Homa	سرد	*	*	۵۲	۶۴/۱	*No pina-D1b*	*No Pinb-D1b*	عدم تشخیص
Hirmand	گرم و خشک	۱۳۷۰	"Byt/4/Jar//Cfn/Sr70/3/Jup"s	۴۹	۶۳	*No pina-D1b*	*No Pinb-D1b*	عدم تشخیص
Sistan	گرم مرطوب	۱۳۷۰	Bank"s"/Vee"s"	۴۸	۶۳/۷	*No pina-D1b*	*No Pinb-D1b*	عدم تشخیص
Arta	گرم و مرطوب	۱۳۷۲	HD2206/Hork//Bul/6/CMH80A.253/2/M2A/ CML//Ald/3/Ald*4/5/BH1146/H56.71//BH1146/3/ CMH78.390/4/Seri/7/Hel/3*Cno79//2*Seri 82	۵۵	۶۴/۲	*No pina-D1b*	*No Pinb-D1b*	عدم تشخیص
Ac-Andrew	گرم و خشک	۲۰۰۱	DIRKWIN/SC-8021- V2// TREASURE/ BLANCA[2965][3105];	۵۴	۶۴/۵	*No pina-D1b*	*No Pinb-D1b*	عدم تشخیص
Darab	گرم و خشک	۱۳۵۹	Rsh*Irni49(60-61)*C271-Pk868	۵۱	۶۴	*pina-D1b*	*No Pinb-D1b*	سخت
Arvand	گرم و خشک	۱۳۵۲	Rsh(Mt-Ky*My48)	۴۷	۶۳/۲	*No pina-D1b*	*Pinb-D1b*	سخت

Archive of SID
www.SID.ir

ادامه جدول ۱

Deyhim	معتدل	۱۳۴۷	Diadem*Italiai	۵۱	۶۳/۸	*pina-D1b*	*No Pinb-D1b*	سخت
Oroom	سرد	۱۳۸۴	Alvand//NS732/Her	۴۶	۶۲/۳	*pina-D1b*	*No Pinb-D1b*	سخت
Zaree	سرد	۱۳۸۹	130L1.11//F35.70/Mo73/4/Ymh/Tob//Mcd/3/Lira CIT925080-0SE-0YC-7YC-0YC-1YC-0YC-3YC-0YC	۵۲	۶۳/۸	*No pina-D1b*	*Pinb-D1b*	سخت
Sirvan	گرم و خشک	۱۳۹۰	PRL/2*PASTOR	۵۰	۶۳/۲	*pina-D1b*	*No Pinb-D1b*	سخت
Moqan3	گرم و مرطوب	۱۳۸۵	Luan/3/V763.23/V879.c8//Pvn/4/Picus /5/opata	۵۴	۶۳/۸	*pina-D1b*	*No Pinb-D1b*	سخت
Alvand	سرد	۱۳۷۴	CF1770/1-27-6275	۵۳	۶۴/۴	*pina-D1b*	*No Pinb-D1b*	سخت
Aflak	گرم و خشک	۱۳۷۶	HD160/5/Tob/ Cno / 23854 /3/ Nai60//Tit/ Son64 /4/LR/ Son64	۵۴	۶۴/۵	*pina-D1b*	*No Pinb-D1b*	سخت
DN11	معتدل	*	Attila * 2 / PBW65	۵۱	۶۴	*pina-D1b*	*No Pinb-D1b*	سخت
Norstar	گرم و خشک	۱۹۷۷	WINALTA/ALABASSKAYA[155][851][1202][1322];	۵۴	۶۴/۲	*No pina-D1b*	*Pinb-D1b*	سخت
Pato	معتدل	*	*	۵۲	۶۴	*No pina-D1b*	*Pinb-D1b*	سخت
Ac-Barrie	گرم و خشک	۱۹۹۴	NEEPAWA/COLUMBUS//BW-90[1323][1577][1792];	۵۴	۶۴/۸	*No pina-D1b*	*Pinb-D1b*	سخت
Ac-Crystal	گرم و خشک	۱۹۹۶	HY-377/L-8474-D-1[1879];	۵۳	۶۴/۵	*No pina-D1b*	*Pinb-D1b*	سخت
Gonbad	گرم و مرطوب	*	*	۵۳	۶۴	*pina-D1b*	*No Pinb-D1b*	سخت
Bahar	معتدل	۱۳۸۶	ICW84-0008-013AP-300L-3AP-300L-0APBloyka	۵۲	۶۴	*pina-D1b*	*No Pinb-D1b*	سخت
Gascogen	سرد	۱۳۷۳	*	۵۳	۶۴/۲	*No pina-D1b*	*Pinb-D1b*	سخت
Inia	گرم و مرطوب	۱۳۴۷	LR64/SN64	۵۱	۶۴	*No pina-D1b*	*Pinb-D1b*	سخت
Shahpasand	سرد	۱۳۲۱	Landrace	۵۵	۶۴/۷	*No pina-D1b*	*Pinb-D1b*	سخت

** فاقد آلل‌های جهش یافته مورد مطالعه می‌باشند ولی ممکن است دارای سایر آلل‌های جهش یافته باشند.

* اطلاعات این رقم در دسترس نمی‌باشد.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول۲- مشخصات آغازگرهای اختصاصی و برنامه چرخه دمایی آغازگرها

آلل	توالی آغازگر (′۳ – ′۵)	چرخه دمایی واکنش	اندازه محصول (bp)
Pina-D1b No Pina-D1b	CCCTGTAGAGACAAAGCTAA TCACCAGTAATAGCCAATAGTG	۱ چرخه (۹۴ ̊C، ۳ دقیقه) ۳۵ چرخه (۹۴ ̊C، ۱ دقیقه – ۵۵ ̊C، ۱ دقیقه– ۷۲ ̊C، ۲ دقیقه) ۱ چرخه (۷۲ ̊C، ۱۰ دقیقه)	Null ۳۳۰
No Pinb-D1b	ATGAAGACCTTATTCCTCCTA CTCATGCTCACAGCCGCC*	۱ چرخه (۹۴ ̊C، ۳ دقیقه) ۳۰ چرخه (۹۴ ̊C، ۱ دقیقه – ۵۷ ̊C، ۱:۳۰ دقیقه– ۷۲ ̊C، ۲۰ ثانیه) ۱ چرخه (۷۲ ̊C، ۵ دقیقه)	۲۵۰
Pinb-D1b	ATGAAGACCTTATTCCTCCTA CTCATGCTCACAGCCGCT*		۲۵۰

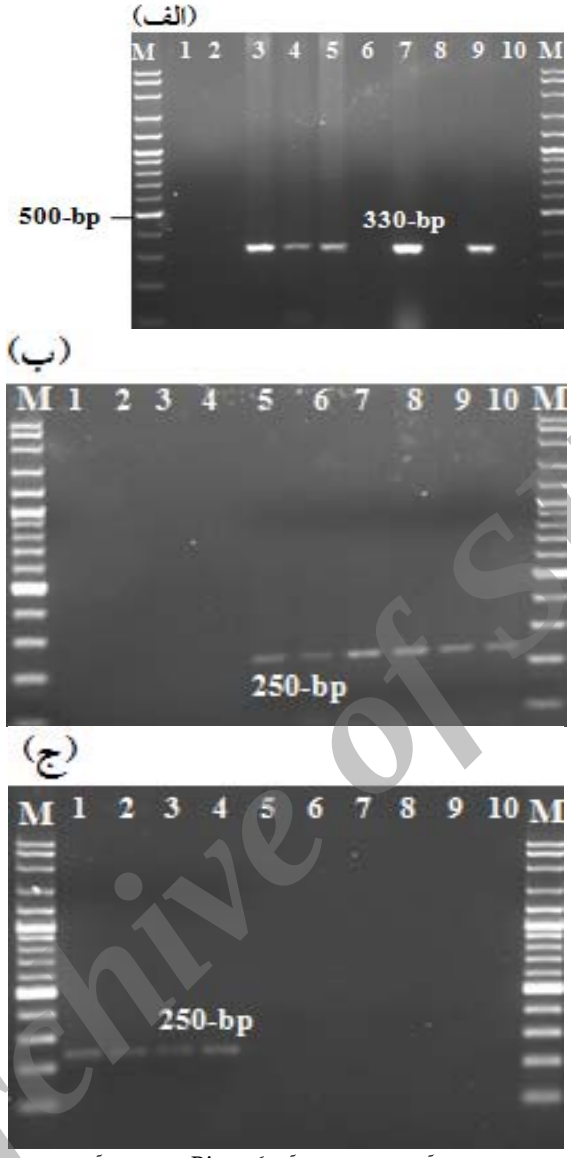
* آغازگرهای SNP با تفاوت یک نوکلئوتید در انتهای ′۳

نتایج و بحث

در این مطالعه به منظور تعیین تنوع آللی ژن‌های پیوروایندولین در ارقام مورد مطالعه از آغازگرهای معرفی شده توسط Gautier et al. (1994) برای ژن *Pina* و آغازگرهای معرفی شده توسط Giroux and Morris (1997) برای ژن *Pinb* استفاده شد. نتایج بدست آمده از ارزیابی آللی سختی بافت دانه در ۳۸ رقم تجاری گندم نان ایران در جدول۲ آمده است. آغازگر *Pina* به صورت اختصاصی قطعه ۳۳۰ جفت بازی را تکثیر می‌کند که آزمون اختصاصی آغازگر *Pina* را در ۱۰ رقم تجاری گندم نان شامل اینیا، شاهپسند، اروند، زارع، میهن، سیروان، الموت، اروم، ارگ و نوید نشان می‌دهد. تکثیر قطعه ۳۳۰ جفت بازی نشان دهنده عدم حضور آلل جهش‌یافته از نوع حذفی (*Pina-D1b*) و حضور سایر آلل‌های سختی مربوط به جایگاه ژنی *Pina* و یا آلل طبیعی *Pina-D1a* می‌باشد (شکل۱– الف). دو جفت آغازگر اختصاصی که فقط دارای یک نوکلئوتید متفاوت در انتهای ′۳ آغازگرها می‌باشند، برای شناسایی یک آلل جهش یافته از نوع *Pinb-D1b* و عدم حضور این آلل جهش یافته در جایگاه ژنی *pinb* بکار رفتند. حضور و عدم حضور آلل *Pinb-D1b* به ترتیب باعث تولید یا عدم تولید فراورده ۲۵۰ جفت بازی در واکنش PCR شد. تولید محصول ۲۵۰ جفت بازی در ۶ رقم نشان دهنده عدم حضور آلل جهش یافته *Pinb-D1b* است که می توانند دارای دیگر آلل‌های جهش یافته *Pinb* یا آلل طبیعی (*Pinb-D1a*) باشند و عدم تولید این فراورده نشان دهنده حضور آلل مورد نظر است(شکل۱– ب). تولید محصول ۲۵۰ جفت بازی با استفاده از زوج آغازگر دیگر، حضور آلل *Pinb-D1b* را در چهار رقم تجاری گندم نان مورد آزمایش نشان می‌دهد (شکل۱– ج). در شکل مشخص است که چهار رقم ابتدای ژل دارای آلل جهش یافته*Pinb-D1b* هستند و سایر ارقام فاقد این آلل می باشند.

آغازگرهای مورد استفاده فقط شناسایی آلل‌های *Pina-D1b* و *Pinb-D1b* را انجام می‌دهند و برای تعیین تنوع سایر آلل‌ها باید از آغازگرهای اختصاصی آن‌ها و یا تعیین توالی استفاده کرد بنابراین نمی‌توان برای بخشی از ارقام مورد مطالعه بر اساس آلل‌های مورد مطالعه در این تحقیق در سطح ژنوتیپی تعیین ویژگی سختی یا نرمی نمود و از نظر ژنوتیپی نامشخص هستند. برای ارقام نامشخص از نظر ژنوتیپ احتمال دارد که آن‌ها واجد آلل‌های دیگر جهش یافته باشند که موجب سختی آن ارقام شد. همچنین مطالعات نشان داد که ۹ رقم از ارقام تجاری دارای ژنوتیپ *No Pina-D1b/Pinb-D1b* و ۱۰ رقم از آن‌ها ژنوتیپ *Pina-D1b/No Pinb-D1b* هستند. این ژنوتیپ‌ها به ترتیب در بر دارنده آلل سختی یا جهش در یکی از ژن‌ها می‌باشند و ژن دیگر دارنده سایر آلل‌های آن ژن یا آلل طبیعی می‌باشد، حضور یک آلل جهش یافته نیز موجب ایجاد بافت سختی دانه می‌شود (Giroux and Morris 1998; Lillemo and Morris 2000; Morris et al. 2001). دو آلل *Pina-D1a* و *Pina-D1b* بیشترین فراوانی آلل‌ها را از ژن پیوروایندولین a در میان ارقام گندم در جهان دارند (Xia et al. 2005; Chen et al. 2010). نام ارقام و نوع آلل سختی مشاهده شده در آن‌ها در جدول۲ مشخص شده است. این تحقیق تنوع آللی ژن‌های پیوروایندولین را در برخی از گندم‌های تجاری بخصوص ارقام جدیدی چون بهار، اروم، زارع، افلاک، مغان۳،

Archive of SID
www.SID.ir



شکل۱- الکتروفورز محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، الف) آزمون اختصاصی آغازگر *Pina*، حضور فرآورده ۳۳۰ جفت بازی عدم وجود آلل *Pina-D1b* و نبود این فرآورده وجود آلل *Pina-D1b* را نشان می‌دهد. ب) آزمون اختصاصی آغازگر No *Pinb-D1b*، ارقامی که دارای محصول ۲۵۰ جفت بازی می‌باشند فاقد آلل *Pinb-D1b* هستند. ج) آزمون اختصاصی آغازگر *Pinb-D1b*.، تکثیر محصول ۲۵۰ جفت بازی در شکل نشان دهنده حضور آلل *Pinb-D1b* می‌باشد. ارقام بکار رفته در شکل بترتیب عبارتند از: ۱) اینیا؛ ۲) شاهپسند؛ ۳) اروند؛ ۴) زارع؛ ۵) میهن؛ ۶) سیروان؛ ۷) الموت؛ ۸) اروم؛ ۹) ارگ و ۱۰) نوید. M) نشانگر اندازه DNA (bp ۱۰۰)

آرتا، بم، ارگ، گنبد، سیروان، میهن، سیستان و سپاهان مشخص نمود و نتایج نشان داد، آللی که بیشترین فراوانی را در میان ارقام سخت گندم‌های تجاری دارد *Pina-D1b* است که بدلیل حذف ژن پیوروایندولین a واجد دانه سخت می‌باشند. اکثر ارقام تجاری حامل آلل *Pina-D1b* ارقام وارداتی و مربوط به پروژه‌های اصلاحی سیمیت[1] می‌باشند و گزارشات بدست آمده حاکی از آن است که خزانه ژنی سیمیت‌دهنده آلل *Pina-D1b* به برنامه اصلاحی اکثر مناطق دنیاست (Lillemo et al. 2006). ارقام تجاری حامل آلل *Pinb-D1b* نیز از ارقام وارداتی هستند که به خزانه ژنی وارد شدند. با توجه به نتایج ارقام بکار رفته در این

[1] CIMMYT

Archive of SID
www.SID.ir

مطالعه که فنوتیپ آن‌ها غیر قابل تشخیص بود هیچ یک دارای آلل‌های *Pina-D1b* و *Pinb-D1b* نبودند. زیرا آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق فقط شناسایی آلل‌های *Pina-D1b* و *Pinb-D1b* را انجام می‌دهند در نتیجه ارقام مورد مطالعه ممکن است سایر آلل‌های تعیین کننده سختی از دو ژن *Pina* و *Pinb* و یا آلل‌های طبیعی (*Pina-D1a/ Pinb-D1a*) با فنوتیپ نرمی را دارا باشند در نتیجه برای تعیین تنوع سایر آلل‌ها باید از آغازگرهای شناساگر آن‌ها یا تعیین توالی استفاده کرد. همچنین با توجه به نتایج مولکولی حاصل نیمی دیگر از ارقام یکی از آلل‌های سختی مورد بررسی را نشان دادند که واجد فنوتیپ سخت می‌باشند. با توجه به نتایج حاصل از آزمون مکانیکی نوری و دو فاکتور درصد سختی دانه و درصد جذب آب بدست آمده توسط دستگاه اینفراماتیک مشخص شد که این نتایج در همه ارقامی که از نظر ژنوتیپی سختی را نشان دادند به جز رقم اروند و اروم مطابقت دارد و درصد سختی دانه آن‌ها عددی بالای ۵۰ را نشان می‌دهد. در مورد سایر ارقام که ژنوتیپ و فنوتیپ آن‌ها از نظر مولکولی نا مشخص می‌باشد می‌توان اندازه‌گیری مکانیکی نوری را با دقت کمتری نسبت به آزمون مولکولی، مبنایی بر تعیین سختی ارقام قرار داد. با توجه به نتایج آزمون فیزیکی ۱۳ رقم از ارقام با فنوتیپ و ژنوتیپ نامشخص از نظر مولکولی، درصد شاخص سختی و جذب آب بالایی را به خود اختصاص داده و احتمالا دارای فنوتیپ بافت سخت می‌باشند و ۶ رقم دیگر آن ارقام با درصد شاخص سختی و جذب آب پایینی که به خود اختصاص داده‌اند دارای فنوتیپ بافت نرم از نظر فیزیکی می‌باشند (جدول۱). همچنین با توجه به اینکه دانه‌های سخت در مقایسه با دانه‌های نرم آب بیشتری را جذب می‌کنند نشان داد که نتایج بدست آمده با نتایج (Glenn et al. 1991; Salmanowicz et al. 2012) هماهنگی دارد. همبستگی بین دو شاخص فیزیکی اندازه گیری شده در این تحقیق یعنی، شاخص سختی (NIR) و درصد جذب آب ۰/۷۴ بود که در سطح یک درصد معنی‌دار شد. و این دو شاخص تاییدکننده همدیگر بودند و همپوشانی خوبی را با هم نشان می‌دهند. نکته قابل ذکر با توجه منابع این است که سختی دانه تنها تحت تاثیر ژن‌های نامبرده نمی‌باشد و فاکتورهای محیطی موثر در سختی دانه عبارتند از: محل رشد (نوع خاک، ارتفاع، نوع کاشت، آبیاری، کود و عملیات کشت)، فصل رشد (بارش و میزان رطوبت و دما در دوران بلوغ)، شرایط ذخیره سازی، محتوای پروتئین، رطوبت، اندازه دانه نیز در آن تاثیر دارند (Pomeranz and Williams 1990).

بنابراین تعیین تنوع آللی سختی دانه در برنامه‌های اصلاحی گندم از ضروری‌ترین موضوع هاست که می‌تواند در به‌گزینی لاین‌ها و ارقام تجای بسیار مفید باشد. استفاده از نشانگرهای STS و ارزیابی ژنوتیپی SNP در ترکیب با الکتروفورز ژل آگارز به عنوان یک روش ساده، مقرون به صرفه، کارامد و قابل اعتماد برای ارزیابی ژنوتیپی پر بازده‌ای از آلل‌های *pina* و *pinb* برای انتخاب سختی دانه در برنامه‌های اصلاح کیفیت گندم است (Gautier et al.1994; Giroux and Morris 1997) و برای تعیین تنوع سایر آلل‌ها باید از آغازگرهای اختصاصی شناساگر آن‌ها یا تعیین توالی استفاده کرد. در مطالعه حاضر بررسی آلل‌هایی از ژن‌های پیوروایندولین انجام شد که بیشترین حضور در میان ارقام گندم جهان و بیشترین تاثیر را در سختی بافت دانه گندم دارند و ژنوتیپ بخشی از ارقام موجود در کلکسیون بذر کشور از لحاظ سختی مشخص شد. آلل *Pina-D1b* در خزانه ژنی اکثر کشورها مانند چین، استرالیا، آمریکا و شمال اروپا (Lillemo et al. 2000; Lillemo et al. 2006 ; Chen et al. 2007) فراوانی بالایی دارد که در ۱۰ رقم داراب، دیهیم، اروم، سیروان، مغان۳، الوند، افلاک، DN11، گنبد و بهار از ارقام مورد مطالعه دیده شد. مطالعات مشابهی در این زمینه بر روی گندم‌های آمریکایی (Morris et al. 2001)، استرالیایی (Pickering and Bhave 2007)، کانادایی (Matus-Cadiz et al. 2008) و گندم‌های اروپایی (Lillemo and Morris 2000) انجام شده است. در این مطالعات و تحقیق حاضر، حضور آلل‌های جهش یافته مربوط به سختی دانه در مکان‌های ژنی بررسی شده با نتایج آزمون‌های فیزیکی تعیین سختی مطابقت داشت نشانگرهای معرفی شده در این تحقیق با ویژگی‌های نشانگرهای معرفی شده قبلی برای تشخیص آلل‌های مختلف ژن *Pina-D1b* و *Pinb-D1b* مطابقت داشت (Gautier et al. 1994; Giroux and Morris 1997) که آن‌ها را می‌توان برای انتخاب

Archive of SID
www.SID.ir

لاین‌های والدینی و نتاج در نسل‌های در حال تفرق به منظور انتخاب به کمک نشانگر بکار برد. لذا استفاده از نشانگرهای اختصاصی گزارش شده که تایید فنوتیپی آزمون فیزیکی را نیز دارند توصیه می‌شود.

سپاسگزاری

بدینوسیله از بخش غلات موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج به دلیل حمایت‌های لازم در اجرای این تحقیق تشکر و سپاسگزاری می‌شود.

منابع

AACC (2002) Approved methods of the AACC, Methods 30-70 and 02. St. Paul, Minn.: American Association of Cereal Chemists.

Ayala M, Guzman C, Alvarez JB, Pena RJ (2012) Characterization of genetic diversity of puroindoline genes in Mexican wheat landraces. Euphytica, Published online:18 August 2012, doi: 10.1007/s10681-012-0773-2.

Beecher B, Bettge A, Smidansky E, Giroux MJ (2002) Expression of wild-type PinB sequence in transgenic wheat complements hard phenotype. Theoretical and Applied Genetics 105:870-877.

Bhave M, Morris CF (2008) Molecular genetics of puroindolines and related genes: allelic diversity in wheat and other grasses. Plant Molecular Biology 66: 205-219.

Chen F, Yu YX, Xia XC, He ZH (2007) Prevalence of a novel puroindoline b allele in Yunnan endemic wheats (*Triticum aestivum* ssp *yunnanense* King). Euphytica 156:39-46.

Chen F, Zhang F, Morris C, He Z, Xia X, Cui D (2010) Molecular characterizationofthe Puroindolinea-D1b allele anddevelopment of anST Smarkerin wheat (Triticumaestivum L.). Journal of Cereal Science 52:80-82.

Chen F, Zhang FY, Xia XC, Dong ZD, Cui DQ (2012) Distribution of puroindoline alleles in bread wheat cultivars of the Yellow and Huai valley of China and discovery of a novel puroindoline a allele without PINA protein. Molecular Breeding 29:371-378.

Eagles HA, Cane K, Eastwood RF, Hollamby GJ, Uchel HK, Martin PJ, Cornish GB (2006) Contributions of glutenin and puroindoline genes to grain quality traits in southern Australian wheat breeding programs. Australian Journal of Agricultural Research 57:179-186.

Gautier MF, Aleman ME, Guirao A, Marion D, Joudrier P (1994) Triticum aestivum puroindolines, twe basic cysteine- rich seed proteins: cDNA sequence analysis and developmental gene expression. Plant Molecular Biology 25:43-57.

Giroux MJ, Morris CF (1997) A glycine to serine change in puroindoline b is associated with wheat grain hardness and low levels of starch-surface friabilin. Theoretical and Applied Genetics 95: 857-864.

Glenn GM, Younce FL, Pitts MJ (1991) Fundamental physical properties characterizing the hardness of wheat endosperm. Journal of Cereal Science 13: 179-194.

Guzman C, Caballero L, Martin MA, Alvares JB (2012) Molecular characterization and diversity of the Pina and Pinb genes in cultivated and wild diploid wheat. Molecular Breeding 30:69-78.

He ZH, Yang J, Zhang Y, Quail KJ, Pena RJ (2004) Pan bread and dry white Chinese noodle quality in Chinese winter wheats. Euphytica 139: 257-267.

Huang XQ, Brule-Babel A (2011) Development of simple and co-dominant PCR markers to genotype puroindoline a and b alleles for grain hardness in bread wheat (Triticum aestivum L.). Journal of Cereal Science xxx (2011) 53: 1-8.

Huang XQ, Röder MS (2005) Development of SNP assays for genotyping of the puroindoline b gene for grain hardness in wheat using Pyrosequencing. Journal of Agricultural and Food Chemistry 53: 2070-2075.

Ikeda TM, Ohnishi N, Nagamine T, Oda S, Hisatomi T, Yano H (2005) IdentiWcation of new puroindoline genotypes and their relationship to Xour texture among wheat cultivars. Journal of Cereal Science 41:1-6.

Li Geneying, He Zhongghu, Lillemo Morten, Sun Qixin, Xia Xianchun (2008) Molecular characterization of allelic variations at Pina and Pinb loci in Shandong wheat landraces, historical and current cultivars. Journal of Cereal Science 47 : 510-517.

Lillemo M, Chen F, Xia X, William M, Pena RJ, Trethowan R, He Z (2006) Puroindoline grain hardness alleles in CIMMYT bread wheat germplasm. Journal of Cereal Science 44:86-92.

Lillemo M, Morris CF (2000) A leucine to proline mutation in puroindoline b is frequently present in hard wheats from Northern Europe. Theoretical and Applied Genetics 100:1100-1107.

Ma D, Zhang Y, Xia X, Morris CF, He Z (2009) Milling and Chinese raw white noodle qualities of common wheat near-isogenic lines differing in puroindoline b alleles. Journal of Cereal Science 50: 126-130.

Martin JM, Meyer FD, Smidansky ED, Wanjugi H, Blechl AE, Giroux MJ (2006) Complementation of the pina (null) allele with the wild type Pina sequence restores a soft phenotype in transgenic wheat. Theoretical and Applied Genetics 113:1563-1570.

Mikulikova D (2007) The effect of Friabilin on wheat grain hardness. Czech Journal of Genetics and Plant Breeding 43:35-43.

Archive of SID
www.SID.ir

Morris CF (2002) Puroindolines: the molecular basis of wheat grain hardness. Plant Molecular Biology 48: 633-647.
Morris CF, Bhave M (2008) Reconciliation of D-genome puroindoline allele designations with current DNA sequence data. Journal of Cereal Science 48:277-287, doi:10.1016/j.jcs.2007.09.012
Murray M, Thompson WF (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Research 8: 4321-4325.
Pomeranz Y, Williams PC (1990) Wheat hardness: Its genetic, structural and biochemical background, measurement, and signifi-cance. in: Advances in Cereal Science and Technology,Vol. X. Y. Pomeran, ed. AACC International: St. Paul, MN 471-548.
Saidi A, Akbari Haghighi A, Bakhtiar F, Mehrvar MR, Nategh Z (2005) Characteristics of Improved Bread Wheat, Durum Wheat, Barley, Triticale and Rye Cultivars Released during 1930-2003. Ministry of Jihad-e-Agriculture, Agricultural Research and Education Organization Seed and Plant Improvement Institute, Cereal Research Department, Karaj, Iran. (In Farsi).
Salmanowicz BP, Adamski T, Surma M, Kaczmarek Z, Karolina K, Kuczynska A, Banaszak Z, Lugowska B, Majcher M, Obuchowski W (2012) The Relationship Between Grain Hardness, Dough Mixing Parameters and Bread-Making Quality in Winter Wheat. International Journal of Molecular Sciences 13:4186-4201.
Turnbull KM, Rahman S (2002) Endosperm texture in wheat. Journal of Cereal Science 36:327-337.
Wanjugi HW, Hogg AC, Martin JM, Giroux MJ (2007) The role of puroindoline A and B individually and in combination on grain hardness and starch association. Crop Science 47:67-76.
Xia L, Chen F, He Z, Chen X, Morris CF (2005) Occurrence of puroindoline alleles in Chinese winter wheats. Cereal Chemistry Journal 82:38-43.

Archive of SID

www.SID.ir