مجله علوم کشاورزی ایران
جلد ۳۳، شماره ۱، سال ۱۳۸۱(۴۷-۳۷)

بررسی پلی مورفیسم الکتروفورزی ارقام گندم نان از نظر زیر واحدهای گلوتنین با وزن مولکولی پایین (LMW-GS)

علی ایزدی دربندی[1]، بهمن یزدی صمدی[2]، سیروس عبدمیشانی[3]، علی اکبر شاه نجات بوشهری[4] و فرج‌اله شهریاری[5]
۱، ۲، ۳، ٤، دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، استادان و استادیار دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران
۵، استادیار دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد
تاریخ پذیرش مقاله ۸۰/٤/۱۳

خلاصه

در این تحقیق به منظور تعیین الگوی نواری زیرواحدهای گلوتنین دارای وزن مولکولی پایین (LMW-GS) ٦۷ رقم گندم نان مورد استفاده قرار گرفت. با روش استخراج متوالی، گلوتنین و گلایدین هر یک از نمونه‌ها بدون آلودگی به دست آمد. برای تفکیک زیرواحدهای گلوتنین و همچنین گلایدین از روش SDS-1-D.PAGE تک مرحله‌ای با شیب غلظت (۱۲/۵-۸/۱) درصد استفاده شد. در نهایت ۱۷ زیرواحد در سه مکان ژنی Glu-1 و ۱۹ زیرواحد در سه مکان ژنی Glu-3 شناسایی شد. در مکان ژنی Glu-D1 زیرواحد جدید * ۱۰+**۲ در چهار رقم مشاهده شد. در یک رقم جزء 1By و در رقمی دیگر جزء 1Dx بیان نشد، ولی نوارهای (a)۷ و (i) ۱۰ به ترتیب و به تنهایی در دو رقم دیده شدند. در Glu-1 بیشترین فراوانی آللی برای زیرواحدهای (a) ۱۲+۲، (b) ۸+۷ و (c) نول به ترتیب با فراوانی نسبی ۰/۷۱، ۰/٦٤ و ۰/۵٦ بود و در Glu-3 بیشترین فراوانی آللی برای زیرواحدهای Glu-D3b، Glu-B3b و Glu-A3c به ترتیب با فراوانی نسبی ۰/۳۵ ، ۰/۲۵ و ۰/٤۰ مشاهده شد. تنوع هر یک از مکان‌های ژنی در Glu-3 و همچنین میانگین تنوع کل در آن نسبت به Glu-1 بیشتر بود تنوع در مکان ژنی امگاگلایدین از تنوع در مکان‌های ژنی Glu-1 یا Glu-3 بیشتر بود. ولی تنوع حاصل از مطالعه همزمان Glu-1 و Glu-3 بیشتر از تنوع در مکان ژنی امگاگلایدین بود. بیشترین تنوع در مطالعه همزمان مکان‌های ژنی Glu-1 و Glu-3 و مکان ژنی امگاگلایدین دیده شد. تنها دو رقم الموت ۱ و الموت ۲ از نظر همه زیرواحدهای LMW، HMW و امگاگلایدین یکسان بودند. به طور کلی تنوع مشاهده شده در مکان‌های ژنی مورد مطالعه از الگوی زیر پیروی می‌نمود:

ωGli و Glu-3 و Glu-1>Glu-3 و Glu-1>ωGli>Glu-3>Glu-1

واژه‌های کلیدی: زیرواحدهای گلوتنین دارای وزن مولکولی پایین، استخراج متوالی، شیب غلظت، گلایدین.

مقدمه

با توجه به اهمیت گندم در تامین بخش عمده‌ای از نیازهای کالری و پروتئین جهان ضروری است مطالعات کیفی و کمی درباره این محصول استراتژیک در همه جنبه‌ها به عمل آید. در این بین بکارگیری مارکرهای مولکولی در ارزیابی‌های کیفی به جهت صحت، دقت بالا و مقبولیت جهانی آنها اهمیت خاصی پیدا کرده است (۱۴). گلوتن گندم عامل تعیین کننده‌ای در مطالعات کیفی مربوط به ارزش نانوایی است (۳). گلوتن دارای زیرواحدهای گلوتنین با وزن مولکولی بالا و پایین گلایدین[1]هاست (۱۳). در این بین زیرواحدهای گلوتنین با وزن مولکولی پایین[2](LMW-GS) با توجه به اینکه $\frac{1}{3}$ از کل

مکاتبه کننده: علی ایزدی دربندی

1 Gliadins

2 Low Molecular Weight Glutenin Subunits (LMW-GS)

پروتئین دانه و حدود ۶۰ درصد از کل گلوتنین را به خود اختصاص داده است (۲۴) و دارای اثرات بسیار مشهودی روی گسترش [1] (EXT) و حداکثر مقاومت [2] (Rmax) خمیر است، نقش ویژه‌ای در ارزش کیفی آرد و خمیر حاصل از آن دارد (۸).

عدم وجود روش مناسبی برای جداسازی گلوتنین‌های LMW از گلایدین که دارای حلالیت یکسان و نتیجتاً حرکت مشابه در صفحه الکتروفورزی است (۲۶ و ۲۴) و همچنین اثر هم‌پوشانی نوارهای [3] LMW-GS باعث شده است (۲۳)، که بررسی اندکی روی آنهاصورت‌بگیرد و در کشور ما به این موضوع پرداخته نشده است.

الکتروفورز دو بعدی (۲۳)، الکتروفورز تک بعدی دو مرحله‌ای با ژل‌های دارای شیب غلظت (گرادینت [4]) یکنواخت و متغیر به کمک روش‌های خاص استخراج جهت مطالعه LMW-GS به کار رفته‌اند (۵ و ۶). هر یک از روش‌های ذکر شده دارای پیچیدگی خاص، صرف هزینه و زمان بالا است. بدین جهت راه‌اندازی روش جدید استخراج متوالی و متعاقب آن استفاده از سیستم الکتروفورز 1-D.SDS-PAGE تک‌مرحله‌ای با ژل‌های دارای شیب غلظت موفقیت بزرگی در حل مشکلات فوق بود (۲۶، ۲۴ ، ۲۰).

مکان‌های ژنی Glu-1، Glu-3 و Gli-1 به ترتیب کنترل کننده زیرواحدهای گلوتنین با وزن مولکولی بالا [5] (HMW-GS)، زیرواحدهای گلوتنین با وزن مولکولی پایین (LMW-GS) و امگا و گاماگلایدین‌ها هستند (۱۶).

مطالعات ژنتیکی نشان داده است که گلوتنین‌های LMW توسط مکان‌های ژنی Glu-A3، Glu-B3 و Glu-D3 رمز می‌شوند که به ترتیب روی بازوی کوتاه کروموزوم‌های 1A، 1B و 1D قرار دارند. از مطالعه گندم‌های هگزاپلوئید ۲۰ الگوی نواری (بلوک‌های گلوتنین LMW)، ۶ الگو برای مکان ژنی Glu-A3، ۹ الگو برای مکان ژنی Glu-D3 و ۵ الگو برای مکان ژنی Glu-B3 شناسایی شده است. در بین مکان‌های ژنی ذکر شده میزان پلی مورفیسم برای مکان ژنی Glu-B3 بیش از سایر مکان‌هاست (۴، ۲۲).

زیرواحدهای گلوتنین با وزن مولکولی پایین به سه بخش D، B و C تقسیم می‌شوند (۱۸) زیرواحدهای D اسیدی‌ترین بخش LMW است و کمترین تحرک LMW-GS را دارد (۱۹) که شباهت ساختمانی زیادی با امگاگلایدین‌ها دارد و در گروه پرولامین‌های [6] با گوگرد کم قرار می‌گیرد. بخش B دارای بیشترین تعداد زیرواحد است، و زیرواحدهای C به عنوان یک گروه فرعی از LMW-GS در نظر گرفته می‌شوند. زیرواحدهای B و C گلوتنین‌های LMW از لحاظ ترکیب اسیدهای آمینه شباهت‌هایی با گاماگلایدین دارند (۴ ، ۱۳) همه زیرواحدهای B و اکثر زیرواحدهای C مربوط به LMW توسط بازوهای کوتاه کروموزوم‌های گروه یک تولید می‌شوند. تست کراس [7] بذور با لاین واجد جابجایی کروموزومی سه گانه [8] (TrTr) (۱۲) و استفاده از آنها به عنوان والد دوره‌ای در تلاقی برگشتی (۲۴) نشان داد که زیرواحدهای آن به صورت کلاستر به ارث می‌رسند. ژن‌های کنترل کننده آنها (Glu-3) لینکاژ شدیدی با ژن‌های Gli-1 دارند. لذا برخی نوارهای Gli-1 به عنوان نشانگر جهت انتخاب آلل‌های مناسب Glu-3 به کار می‌رود (۱۲، ۱۵) و در تعدادی موارد بیش از یک آلل Glu-3 با یک آلل Gli-1 همراه است (۲۵).

اثر مثبت زیرواحدهای گلوتنین بدلیل قابلیت آنها در تشکیل پیوندهای دی‌سولفیدی بین مولکولی است که نهایتاً اندازه پروتئین نهایی را تحت تاثیر قرار می‌دهند. یک اندازه مولکولی جهت اثر گذاشتن روی خواص فیزیکی (الاستسیته [9] و استحکام) خمیر وجود دارد که اندازه گلایدین منومریک از آن حد پایین‌تر است (۱۱).

بین مکان‌های ژنی Glu-3 اثرات افزایشی وجود دارد (۴) و بین مکان‌های ژنی Glu-1 و Glu-3 اثرات افزایشی و اپیستازی معنی‌داری روی مقاومت خمیر وجود دارد. این اثرات مستقل از تاثیر محیط است که سطوح متفاوت پروتئینی را باعث می‌شود لذا می‌توان استحکام خمیر را بدون افزایش پروتئین غلات که با عملکرد رابطه منفی دارد، افزایش داد (۸).

1 . Extensibility
2 . Maximum Dough Resistance
3 . Bands
4 . Gradiant
5 . High Molecular Weight Glutenin Subunits(HMW-GS)
6 . Prolamins
7 . Test- Cross
8 . Triple Translocation
9 . Elasticity

مجموعاً ۳۰ تا ۴۰ پلی‌پپتید در ناحیه LMW-GS قابل تشخیص‌اند (۲۳). اندازه‌گیری کمی ساترن ۳۰-۲۵ ژن را برای LMW نشان داده است (۱).

دو نوع توالی LMW-s و LMW-m برای اسیدهای آمینه LMW-GS پیدا شده است (۲۷). به کمک TrTr و TN[1] (به ترتیب فاقد همه مکان‌های ژنی Glu-3 و Glu-1) مشخص شده است که HMW-GS و LMW-GS به ترتیب بیشتر روی حداکثر مقاومت خمیر و گسترش خمیر اثر دارند (۱۰)، ولی آلل‌های Glu-3 روش بهتری برای بیان تنوع در Rmax و EXT ایجاد می‌کنند (۶). توالی و جایگاه ریزماهوارک‌های ژن‌های پروتئین‌های ذخیره‌ای مشخص شده است (۱۴) و تکرارپذیری بالایی بین بعضی نوارهای LMW و ژن‌های مقاومت به آفات دیده شده است (۱۷). هدف اصلی از این مطالعه بررسی پلی‌مورفیسم الکتروفورزی ارقام گندم از نظر زیرواحدهای گلوتنین با وزن مولکولی پایین از طریق راه‌اندازی تکنیک جدید 1-D.SDS-PAGE تک مرحله‌ای[2] با ژل‌های دارای شیب غلظت متعاقب روش استخراج متوالی بود، که امکان شناسایی همزمان الگوهای نواری LMW-GS و HMW-GS با همدیگر و الگوی الکتروفورزی امگاگلایدین به طور جداگانه‌ای و نهایتاً تعیین تنوع و روابط حاکم در الگوهای نواربندی[3] فراهم شد.

مواد و روشها

مواد گیاهی

۶۵ رقم از گندم‌های نان موجود در کلکسیون غلات دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران انتخاب گردید. گندم‌های انتخابی جهت تکثیر و احیاء در سال زراعی ۷۸-۷۷ کشت شده بودند رقم‌های گابو[4] و چاینزاسپرینگ[5] به عنوان شاهد به کار رفتند (جدول ۴).

استخراج پروتئین و الکتروفورز

این تحقیق مبتنی بر روش استخراج متوالی[6] ارائه شده توسط مارچیلو و همکاران (۱۹۸۹)که سینگ وهمکاران(۱۹۹۱)، شهریاری و همکاران (۱۹۹۶) آنرا اصلاح کردند و در سیستم الکتروفورزی 1-D.SDS-PAGE تک مرحله‌ای با یکسری تغییرات جدید انجام شد.

استخراج پروتئین

نصف آندوسپرم یک بذر گندم پس از جداسازی جنین توسط تیغ جراحی به وسیله انبردستی خرد شده و در لوله‌های اپندورف[7] ۱/۵ میلی‌لیتری ریخته شد. جهت استخراج پروتئین از چهار محلول پایه استفاده شد که عبارتند از: الف) اتانول ۷۰ درصد (V/V) ب) پروپانول نرمال ۵۰ درصد (V/V) ج) پروپانول نرمال ۵۰ درصد (V/V)، ۰/۰۸M تریس با pH=۸ د) بافر نمونه شامل ۲ درصد SDS(W/V)، ۴۰ درصد (W/V) گلیسرول، ۲ درصد (W/V) برموفنل بلو، ۰/۰۸ M تریس.

در تمام مراحل استخراج متوالی از سانتریفوژ با rpm ۱۳۰۰۰ یا سرعت ۱۰۰۰۰g استفاده شد و تیمارهای دمایی روی نمونه‌ها با حمام آب گرم انجام گرفت. استخراج پرولامین‌های احیاء نشده و گلوتنین‌ها جهت SDS-PAGE تک مرحله‌ای به صورت زیر انجام شد.

استخراج پرولامین‌های احیاء نشده

برای استخراج گلایدین‌ها، ابتدا روی نمونه‌های خرد شده ۲۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۰ درصد (V/V) ریخته و حداقل یک ساعت در ۶۰ °C یا ۳ تا ۱۸ ساعت در دمای اتاق قرار داده شدند، سپس به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شدند. ۱۰۰ میکرولیتر از مایع فوقانی[8] به لوله اپندورف دیگری منتقل و اجازه داده شد حداقل به مدت یک ساعت در دمای ۶۵-۶۰ °C (آون) تبخیر گردد. باقیمانده مجدداً در ۱۰۰ میکرولیتر بافر نمونه حل شد. پس از مختصری ورتکس[9] کردن به مدت ۳۰ دقیقه در ۶۰ °C قرار داده شدند. نمونه‌های گلایدین استخراج شده به این ترتیب آماده وارد کردن به ژل بودند.

---

1 . Triple Null

2 . One Step 1- dimensional – Sodium Dodecyl Sulfat Polyacrylamid Gel Electrophoresis.

3 . Banding Patterns

4 . Gabo

5 . Chinese Spring

6 . Sequential Extraction

7 . Eppendorf Tube

8 . Supernatant

9 . Vortex

استخراج پرولامین‌های احیاء شده

ابتدا باقیمانده مایع فوقانی اولین مرحله استخراج با اتانول ۷۰ درصد (V/V) حذف گردید و سپس جهت از بین بردن آلودگی‌های آلبومین و گلوبولین با پروپانول نرمال ۵۰ درصد (V/V) استخراج متوالی ادامه یافت. در این مرحله سه بار با پروپانول ۵۰ درصد (V/V) عمل استخراج صورت گرفت که دو بار آن به این صورت بود: روی باقیمانده رسوب بالایی (پس از حذف مایع فوقانی) یک میلی‌لیتر پروپانول نرمال ۵۰ درصد (V/V) ریخته شد و نمونه‌ها را در ۶۰ °C به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده و حداقل دوبار ورتکس شدند (یک دفعه قبل از قرار دادن در ۶۰ °C و یک دفعه بعد از برداشتن از تیمار دمایی). می‌توان سوسپانسیون آرد درون لوله اپندروف را به منظور استخراج کامل گلایدین در این مرحله و حذف بهتر سایر آلودگی‌ها در تهیه گلوتنین با اسکالپل خوب به هم زد پس از دو دقیقه سانتریفوژ کردن مایع فوقانی در هر دو بار دور ریخته شد. در سومین بار روی رسوب باقیمانده ۰/۵ میلی‌لیتر از پروپانول ۵۰ درصد (V/V) ریخته و به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شد و سپس همه مایع فوقانی دور ریخته شد.

در ادامه برای استخراج گلوتنین دو محلول زیر به صورت تازه تهیه شد.

محلول (ه): شامل محلول (ج) با یک درصد دی تیوتریتول[1] (DTT).

محلول (و): شامل محلول (ج) با ۴- وینیل پیریدین[2] ۰/۱۴ M (4-VP).

برای استخراج گلوتنین روی هر یک از نمونه‌ها ۱۰۰ میکرولیتر از محلول (ه) ریخته شد و پس از مختصر ورتکس کردن نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در ۶۰ °C قرار داده شدند. گلوتنین احیاء شده (شامل زیرواحدهای گلوتنین با وزن مولکولی بالا و زیرواحدهای گلوتنین با وزن مولکولی پایین که دارای گروه‌های SH هستند) پس از دو دقیقه سانتریفوژ استخراج شد. جهت الکیلاسیون[3] ۱۰۰ میکرولیتر از محلول (و) را روی هر یک از نمونه‌ها ریخته شد. الکیلاسیون با جلوگیری از تشکیل مجدد پیوندهای دی سولفیدی درون مولکولی، باعث افزایش وضوح نوارهای زیرواحدهای گلوتنین با وزن مولکولی پایین (LMW-GS) می‌گردد. الکیلاسیون در وضوح زیرواحدهای گلوتنین با وزن مولکولی بالا (HMW-GS) که تمایلی به تشکیل پیوندهای دی سولفیدی درون مولکولی ندارند، تقریباً بی تاثیر است. جهت انجام مطلوبتر واکنش الکیلاسیون، نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در ۶۰ °C قرار داده می‌شوند. پس از دو دقیقه سانتریفوژ کردن ۱۰۰ میکرولیتر از مایع فوقانی به اپندورف دیگری که دارای ۱۰۰ میکرولیتر بافر نمونه بود، منتقل شد. پس از مختصر ورتکس کردن، نمونه‌ها جهت ترکیب پلی‌پپتیدی‌های گلوتنین احیاء و الکیله شده با SDS به مدت ۱۵ دقیقه در ۶۰ °C قرار داده شدند. بعد از دو دقیقه سانتریفوژ کردن ۱۵-۱۰ میکرولیتر از مایع فوقانی برای جداسازی زیرواحدهای گلوتنین در یک چاهک نمونه ژل SDS-PAGE تزریق شد. پس از انجام کلیه واکنش‌های احیاء شدن، الکیلاسیون و ترکیب با SDS انتظار می‌رود هر زیرواحد حالت خطی‌شکل‌منفردی پیداکند و یک نوار مشخص را به وجود آورد.

تهیه محلول ژل

سیستم ژل مورد نیاز جهت مطالعه این پروتئین‌ها دارای دو لایه بود. لایه با لایی یا ژل متراکم کننده که پروتئین‌ها در آن متراکم شده تشکیل یک منطقه نازک به عنوان مبداء حرکت می‌دهند و لایه پایینی با ژل جدا کننده که تفکیک نوارها در آن صورت می‌گیرد.

لایه ژل جدا کننده شامل بافر (۴۵/۴۱۲ گرم تریس[4] به علاوه یک گرم SDS و ۴۶۰ میلی‌لیتر آب مقطر که با HCl نرمال در pH=۸/۸ تنظیم شد و با آب مقطر به حجم ۵۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد.)، محلول آکریل آمید (۰/۷۵ گرم بیس آکریل آمید به علاوه ۷۵ گرم آکریل آمید که در آب مقطر حل گردیده و به حجم ۲۵۰ میلی‌لیتر رسانده شد)، محلول آمونیوم پرسولفات[5] ۱۰درصد(۰/۲گرم‌آمونیوم پرسولفات در ۱/۹ میلی‌لیتر آب حل شد) و تیمد به عنوان عامل پلیمریزاسیون است.

ژل متراکم کننده شامل بافر (۶/۰۶ گرم تریس به علاوه ۰/۴ گرم SDS و ۱۹۰ میلی‌لیتر آب مقطر که با HCl نرمال در

1 . Dithiothretiol (DTT)

2 . 4- Vinyl Pyridin (4-Vp)

3 . Alkylation

4 . Trizma - Base

5 . Ammonium Persulfate

pH=۶/۸ تنظیم شد و با آب مقطر به حجم ۲۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد)، محلول آکریل آمید (۸۷/۵ گرم آکریل آمید به علاوه ۱/۳۲ گرم بیس آکریل آمید[1] که در آب مقطر حل شده و به حجم ۲۵۰ میلی‌لیتر رسانده شد.)، آمونیوم پرسولفات ۱۰ درصد و تیمد که به این محلول‌ها جهت پلیمریزاسیون اضافه می‌گردد. محلول‌های آکریل آمید از نور محافظت گردیدند. تجربیات نگارنده نشان داد که می‌توان از محلول آمونیوم پرسولفات پس ازچندین ماه نگهداری در فریزر بدون هیچ مشکلی استفاده کرد.

ژل پایین یا ژل جدا کننده

برای تهیه ژل پایین با شیب غلظت (۱۲/۵-۸/۱) درصد از آکریل آمید مطابق جدول ۱ عمل نموده، آنگاه حجم‌های لازم (۲۴ میلی‌لیتر) از هر یک از غلظت‌های محلول ژل درون استوانه‌های ویژه یک گرادینت میکر ۱۰۰ میلی‌لیتری که روی شیکر مغناطیسی قرار گرفته است، ریخته شد، و آنها را به قالب مخصوص ژل هدایت کرده تا به حدود ۱۲ سانتی‌متر برسد، سپس به آرامی یک لایه بوتانول اشباع شده با آب روی آن اضافه گردید. پس از گذشت مدت ۲۰ دقیقه ژل پایین بست. به منظور ارزیابی ژل گرادینت، ژل جدا کننده یکنواخت ۱۰ درصد نیز به صورت جدول ۲ تهیه شد. مدت زمان ۲۵-۲۰ دقیقه جهت بستن این ژل کافی بود.

ژل بالا یا ژل متراکم کننده (۴ درصد)

برای تهیه ژل بالا، غلظت حدوداً ۴ درصد آکریل آمید مناسب است که مطابق جدول ۳ عمل شد. پس از ریختن ژل مدت زمان ۲۰ الی ۳۰ دقیقه برای بستن ژل کافی بود.

جدول ۱- محلول‌های مورد نیاز برای تهیه یک ژل زیرین به صورت گرادینت (۱۲/۵-۸/۱) درصد

محلولها	۸/۱ درصد	۱۲/۵ درصد
بافر دارای pH = ۸/۸	۱۰۲ میلی لیتر	۱۲ میلی لیتر
آکریل آمید ژل جداکننده	۶/۵ میلی لیتر	۱۰ میلی لیتر
آب	۵/۵ میلی لیتر	۲ میلی لیتر
تیمد	۲۰ میکرولیتر	۲۰ میکرولیتر
آمونیوم پرسولفات* ۱۰٪	۴۰ میکرولیتر	۵۰ میکرولیتر

* همیشه قبل از ریختن محلول ژل اضافه می‌شود.

جدول ۲- محلول‌های لازم برای تهیه ژل زیرین به صورت ۱۰ درصد

نوع محلول	آکریل آمید ژل جداکننده	بافر دارای pH = ۸/۸	تیمد	آمونیوم پرسولفات ۱۰٪
حجم	۱۳/۳۳ میلی لیتر	۲۵/۶۷ میلی لیتر	۳۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر

جدول ۳- محلول‌های مورد نیاز برای تهیه ژل بالا (۴ درصد)

نوع محلول	آکریل آمید ژل بالا	بافر دارای pH = ۶/۸	آب	تیمد	آمونیوم پرسولفات ۱۰٪
حجم	۲/۲۸	۲/۴۸	۱۳/۹۴	۱۷ میکرولیتر	۱۳۰ میکرولیتر

تزریق عصاره پروتئین

مقادیر ۱۵ میکرولیتر از عصاره‌های پروتئین گلوتنین (HMW-GS و LMW-GS) یا گلایدین استخراج شده به هر یک از چاهک‌ها تزریق گردید.

الکتروفورز

پس از تهیه الکترود بافر پایه ۱۰X (۳۰/۳۳ گرم تریس، ۱۴۴/۲ گرم گلیسین و ۱۰ گرم SDS در ۸۸۳ میلی‌لیتر آب حل شد و pH آنها با گلیسین در ۸/۳ تنظیم گردید و حجم نهایی به یک لیتر رسانده شد.)، مقدار لازم از الکترود بافر ۱X را در تانک بافر بالایی و پایینی ریخته و با برقراری جریان الکتریسیته نمونه‌ها از قطب منفی به سمت قطب مثبت حرکت کردند.

در حالتی که ژل زیرین یکنواخت (۱۰ درصد) باشد. جریان ثابت ۴۵ میلی‌آمپر برای هر ژل و مدت زمان ۳۰: ۲ ساعت به دستگاه داده شد در حالت ژل گرادینت، جریان ثابت ۳۰ میلی‌آمپر برای هر ژل و مدت زمان ۲۰: ۴ ساعت اختیار شد، در هر دو حالت حد نهایی توان، اختلاف پتانسیل و شدت جریان به ترتیب‌به‌صورت۴۵وات، ۴۰۰ ولت و ۶۰ میلی‌آمپر مشخص گردید.

رنگ‌آمیزی ژل‌ها

ژل‌ها به مدت حداقل سه ساعت در محلول رنگ‌آمیزی شامل یک قسمت از کوماسی برلینت بلو آر[2] با ۴۰ قسمت از تری کلرواستیک اسید[3] ۶ درصد (W/V) در آب: متانول: اسید استیک خالص (۸۰: ۲۰: ۷) قرار گرفتند. در رنگ‌های مصرف شده ژل‌ها به مدت یک شب درون رنگ قرار می‌گیرند.

1 . Bis- Acrylamide

2 . Coomussi Brilliant Blue R

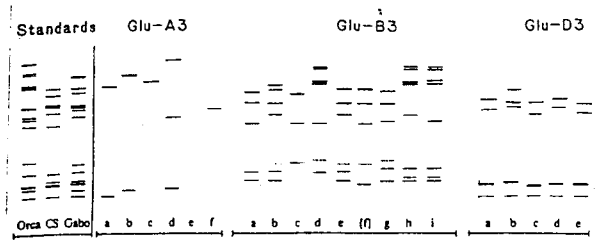
3 . Trichloroacetic Acid

رنگ‌زدایی، عکس‌برداری و نگهداری ژل‌ها

ژل‌ها چندین بار با آب مقطر شستشو داده و بعد از ۲۴ ساعت نوارها کاملاً واضح بودند. عکس‌برداری از ژل‌ها توسط یک رایانه متصل به ترانس ایلومیناتور[1] به کمک نرم‌افزار ژل داکومنتیشن[2] انجام شد. ژل‌ها را درون کیسه‌های سلوفان قرار داده و در دمای C° ۴ نگهداری نمودیم.

نامگذاری نوارها و تعیین کیفیت

نام‌گذاری نوارهای بخش (HMW-GS) و ارزیابی کیفی آنها از طریق مدل پین و همکاران انجام شد (۲ و ۲۴). نامگذاری نوارهای بخش B و C (LMW-GS) و ارزیابی کیفی آنها از طریق مدل گوپتا و همکاران صورت گرفت (۲ و ۷). شکل (۱) راهنمای‌بسیارمناسبی‌جهت‌نامگذاری نوارهای LMW-GS است.



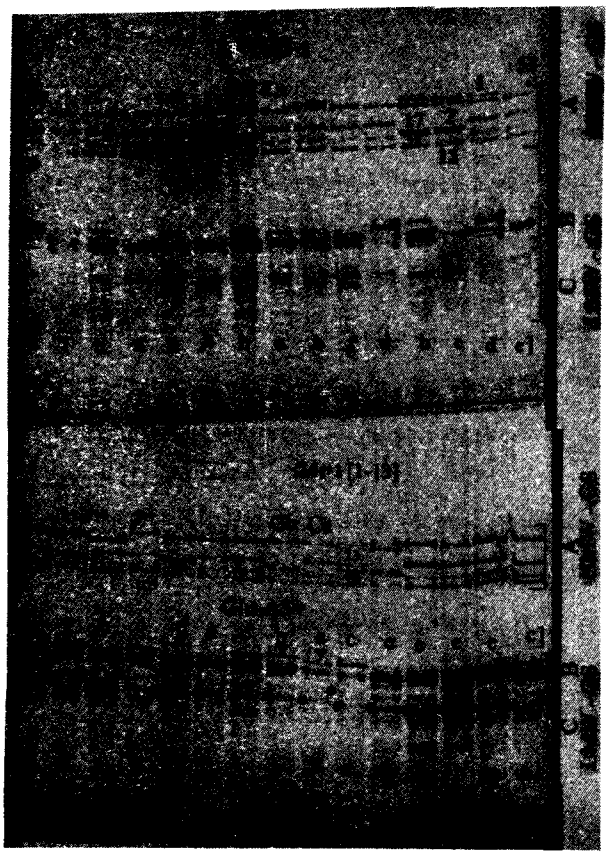
شکل ۱- زیرواحدهای گلوتنین با وزن مولکولی پایین در سه مکان ژنی گندم هگزاپلوئید

روشهای آماری

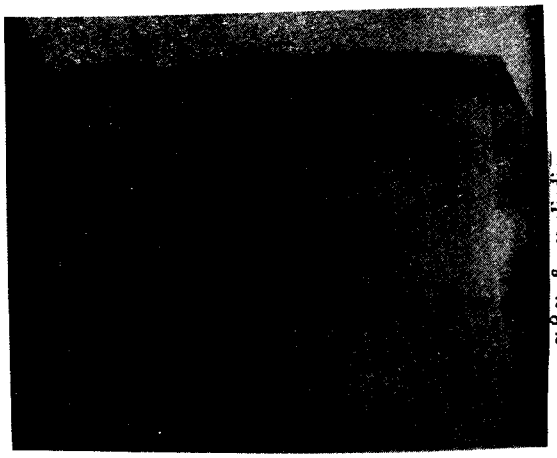
تنوع ژنتیکی در جایگاه‌های ژنی با فرمول پیشنهادی نی محاسبه گردید و با استفاده از ماتریس ضریب تشابه جاکارد[3] و روش UPGMA [4] تجزیه کلاستر[5] به کمک نرم‌افزار SPSS انجام شد.

نتایج و بحث

شکل‌های۲و۳ الکتروفورگرام[6] مربوط به بعضی از ارقام مورد مطالعه‌به‌همراه نامگذاری‌نوارهای‌گلوتنین با وزن مولکولی بالا



شکل‌های ۲ و ۳- الکتروفورگرام ارقام از نظر زیرواحدهای HMWو LMW گلوتنین



شکل ۴- الکتروفورگرام ارقام از نظر زیرواحدهای گلایدین

و پایین را نشان می‌دهند. شکل ۴ مربوط به الگوی الکتروفورزی گلایدین‌هاست که بخش امگاگلایدین‌ها به طور مشخص می‌باشد. ملاحظه می‌شود که در اثر روش استخراج متوالی به راحتی آلودگی‌های پروتئینی از گلوتنین حذف شده‌اند و گلایدین‌ها نیز به نحو مطلوبی استخراج و الکتروفورز شدند. نوارهای HMW-GS به راحتی و بدون هیچ مشکلی تشخیص

1 . Transilluminator
2 . Gel Documentation
3 . Jaccard
4 . Unweighted Paired Group Method using Arithmetic Average.
5 . Cluster Analysis
6 . Electrophoregram

داده شدند. تشخیص آلل‌های Glu-A3 به راحتی صورت می‌گیرد و نوارهای مشخصه مکان ژنی Glu-B3 در بخش B تعیین گردید و آلل‌های مربوطه شناسایی شد.

در مورد مکان ژنی Glu-D3، اولین نوار پر رنگ در بخش C یکی از بهترین شاخص‌ها در تعیین و تشخیص آلل‌ها می‌باشد. در نهایت ۱۷ زیر واحد در سه مکان ژنی Glu-1 و ۱۹ زیرواحد در سه مکان ژنی Glu-3 شناسایی شد.

ژل‌های گرادینت در مقایسه با ژل‌های یکنواخت دارای تفکیک‌پذیری بالاتر و سودمندی بیشتر بودند. با توجه به حذف آلودگی‌های پروتئینی، تفکیک مطلوب زیرواحدهای پروتئین و سرعت بالا در مراحل الکتروفورز و استخراج ضروری است، روش فوق جایگزین سایر روش‌های قدیمی استخراج و الکتروفورز گردد.

آلل‌های مکان‌های ژنی Glu-1 و Glu-3 در روی ژل‌های گرادینت بر اساس مدل‌های موجود و ارقام شاهد تعیین شدند و در جدول ۴ آورده شده است و تنوع ژنتیکی نمونه‌های مورد بررسی از روی زیرواحدهای گلوتنین HMW و LMW در جدول ۵ آورده شده است.

در مکان ژنی Glu-A1 بیشترین فراوانی مربوط به آلل C یا نول گردید که با مطالعات پیشین روی ارقام گندم ایرانی هماهنگی دارد، ولی از مطالعات گوپتا و همکاران دارای انحراف است (۷). فزونی آلل c نوعی ضعف کیفی می‌باشد در مکان ژنی Glu-B1 بیشترین فراوانی مربوط به آلل b (۸+۷) شد و در یک رقم نوار a (۷) به تنهایی دیده شد که فاقد جز 1BY بود. در مکان ژنی Glu-D1 بیشترین فراوانی مربوط به آلل a (۱۲+۲) بود که با نتایج به دست آمده روی ارقام ایرانی مطابقت داشت. در یک رقم نوار ۱۰ به تنهایی دیده شد و فاقد جزء ×1D بود.

در هر یک از مکان‌های ژنی Glu-1، فراوانی یک آلل از سایر آلل‌ها خیلی بیشتر شد. آلل جدید (j) *۱۰+** ۲ در چهار رقم ملاحظه گردید. فقدان برخی زیرواحدها در SDS-PAGE احتمالاً به دلیل حذف یا عدم تظاهر ژن‌های کد کننده آنها می‌باشد. برخی نیز دلیل عدم تظاهر این زیرواحدها را جهش خاموش کننده[1] ذکر نموده‌اند (۲۲).

در مکان‌های ژنی Glu-3 در هر یک از جایگاه‌ها میزان دو یا سه آلل از بقیه آلل‌ها بیشتر شد. در مکان‌های ژنی Glu-A3، Glu-B3 و Glu-D3 به ترتیب بیشترین فراوانی مربوط به آلل‌های c، b و b گردید. توزیع فراوانی آللی در مکان‌های ژنی Glu-3 نسبت به Glu-1 دارای یکنواختی بیشتری است و ارقام ایرانی دارای پتانسیل بالایی از آلل‌های Glu-3 هستند، که میزان و فراوانی نسبی آنها با نتایج گوپتا و همکاران مطابقت دارد (۷). در برخی از ارقام جهت کنترل دقیق‌تر ژنوتیپ آنها از چند بذر تکرارهایی بکار رفت که الگوی نواری آنها یکسان گردید و تفرق درون این ارقام دیده نشد. ترکیبات آللی مربوط به مکان‌های ژنی Glu-3 در این مطالعه با توجه به مدل ارزیابی کیفی (۲) آنها در جدول ۶ آورده شده است. آلل‌های متفاوت حاصل از ۶۷ رقم برای هر مکان ژنی Glu-3 از نظر گسترش خمیر در سه گروه بالا، متوسط و پایین قرار گرفتند.

اکثر ارقام مورد مطالعه در مکان‌های ژنی Glu-A3 و Glu-D3 دارای کیفیت متوسط به بالا هستند و در مکان ژنی Glu-B3 میزان آلل‌های دارای کیفیت بالا کم است. با توجه به الگوی Glu-D3>Glu-B3>Glu-A3 که نشان دهنده اثر مکان‌های ژنی Glu-3 روی میزان پروتئین پلیمریک و گسترش خمیر است (۹) ضروری است ضمن حفظ فراوانی آلل‌های مطلوب در مکان‌های ژنی Glu-D3 و Glu-A3 تلاش جدی در جهت افزایش آلل‌های مطلوب در مکان ژنی Glu-B3 صورت گیرد. میزان تنوع ژنتیکی در جایگاه‌های ژنی Glu-1 و Glu-3 با نتایج مورگانوف و همکاران، گوپتا و همکاران مطابقت داشت (۷، ۲۱). میزان تنوع در هر یک از مکان‌های ژنی Glu-3 بیشتر از تنوع در مکان‌های ژنی Glu-1 بود. همچنین میانگین تنوع کل در Glu-3 بیشتر از Glu-1 بود که بیانگر قابلیت بالاتر و سودمندی بیشتر در مطالعات تنوع ژنتیکی است. از فاصله مهاجرت[2] نوارها در ناحیه امگاگلایدین نیز برای گروه‌بندی و بررسی تنوع ارقام استفاده شد.

در نهایت به منظور گروهبندی ارقام با توجه به آلل‌های مکانهای ژنی Glu-1، Glu-3 و امگاگلایدین تجزیه کلاستر صورت گرفت. تنوع مکانی ژنی امگاگلایدین از تنوع جایگاه‌های ژنی Glu-1 خیلی بیشتر شد و مقدار تنوع در مکان ژنی

1 . Switch off

2 . Migration Distance

جدول ۴- ژنوتیپ نمونه‌های مورد بررسی از نظر زیرواحدهای گلوتنین با وزن مولکولی بالا و پائین

شماره	رقم	Glu-1			Glu-3			امتیاز پین
		A1	B1	D1	A3	B3	D3	
۱	آزادی	b	b	a	c	b	d	۸
۲	خزرا	c	g	a	c	b	d	?
۳	کرج ۱	c	b	d	e	e	a	۸
۴	کرج ۲	c	b	j	c	c	b	?
۵	کرج ۳	b	g	a	d	b	c	?
۶	اروند ۱	c	b	a	a	b	b	۶
۷	مغان ۱	c	b	a	c	b	b	۶
۸	مغان ۲	c	f	a	c	c	e	۶
۹	نوید	b	i	d	e	e	b	۱۰
۱۰	چناب	b	b	a	e	c	a	۸
۱۱	رشید	c	b	b	e	f	b	۶
۱۲	استار	b	b	a	e	b	a	۸
۱۳	قفقاز	c	b	j	c	a	b	?
۱۴	دیهیم	a	b	a	c	e	a	۸
۱۵	الموت۱	c	m	a	e	c	b	?
۱۶	الموت۲	c	m	a	e	c	b	?
۱۷	داراب۱	b	i	a	d	i	b	۸
۱۸	داراب ۲	b	i	d	d	h	b	۱۰
۱۹	عدل جدید	c	e	a	e	c	e	۴
۲۰	عدل قدیم	c	b	a	a	c	b	۶
۲۱	آذر	c	b	a	b	a	c	۶
۲۲	پی تیک	a	b	a	b	b	b	۸
۲۳	پیشتون	c	b	a	e	a	a	۶
۲۴	شاهپسند	c	b	b	e	c	e	۶
۲۵	شاهی	c	b	a	c	b	a	۶

امگاگلایدین از تنوع حاصل از مکان‌های ژنی Glu-3 نیز اندکی بیشتر گردید. در کل الگوی زیر در مکان‌های ژنی مورد مطالعه جهت گروه‌بندی و تنوع ژنتیکی به دست آمد که ملاحظه می‌شود با افزایش مکان‌های ژنی مورد مطالعه نتیجه بهتری در گروهبندی و بیان تنوع حاصل می‌شود.

Glu-1> Glu-3 و ωGli>Glu-3>Glu-1 و Glu-3 و ωGli

در بین ارقام مورد مطالعه در این تحقیق چند شکلی زیادی مشاهده شد و تقریباً تمامی ترکیبات مختلف HMW-GS و LMW-GS به علاوه زیر واحد جدید (j) ۲**+۱۰* در مکان ژنی Glu-D1 مشاهده شد و تنها دو رقم الموت ۱ و الموت ۲ از نظرهمه‌زیرواحدهای LMW،HMWوامگاگلایدین یکسان بودند.

ادامه جدول ۴

شماره	رقم	Glu-1			Glu-3			امتیاز پین
		A1	B1	D1	A3	B3	D3	
۲۶	امید	c	b	a	c	a	d	۶
۲۷	توباری	c	b	a	c	i	d	۶
۲۸	قدس	c	i	d	c	a	a	۸
۲۹	طبسی	c	b	a	e	a	b	۶
۳۰	تجن	a	m	a	c	f	a	?
۳۱	کازرسنگ	c	d	a	c	c	e	۶
۳۲	کلک افغانی	c	d	j	b	e	a	?
۳۳	قرمزک ورامین	c	b	a	c	e	a	۶
۳۴	سرخ تخم	c	b	j	b	d	b	?
۳۵	سبلان	c	g	d	c	c	d	?
۳۶	سفیدک	c	b	a	c	a	c	۶
۳۷	کاوه	b	i	d	c	e	a	۱۰
۳۸	بلو وی	b	b	a	e	g	b	۸
۳۹	البرز	b	i	a	c	e	a	۸
۴۰	زاگرس	c	b	i	e	i	c	?
۴۱	فلات	a	c	d	c	b	b	۹
۴۲	ناز	b	b	a	a	f	e	۸
۴۳	دستجردی	c	b	a	e	a	b	۶
۴۴	ماهوتی یزد	c	b	a	c	a	a	۶
۴۵	عطائی	c	b	a	e	b	b	۶
۴۶	آکوا	a	b	a	a	b	a	۸
۴۷	پنجامو	b	b	a	e	f	b	۸
۴۸	شعله	c	d	a	a	d	b	۴
۴۹	زرین	a	i	a	b	b	c	۸
۵۰	مهدوی	a	i	a	e	c	c	۸
۵۱	مکزیپاک	b	b	a	c	d	e	۸
۵۲	روشن	b	b	a	e	c	b	۶
۵۳	خلیج	b	b	d	c	b	b	۸
۵۴	بیات	b	b	a	c	a	a	۸
۵۵	۴۸۲۰الجزایر	b	b	a	c	a	c	۸
۵۶	ریحانی	c	b	a	e	a	b	۶
۵۷	گلستان	c	i	d	c	b	c	۸
۵۸	اینیا	a	b	d	d	d	d	۱۰
۵۹	آرژانتین	c	a	a	c	e	b	۴
۶۰	کارون	b	i	d	d	d	d	۱۰
۶۱	اترک	b	b	a	e	c	a	۸
۶۲	نیک نژاد	b	c	d	c	b	a	۹
۶۳	سرداری	b	b	a	d	h	d	۸
۶۴	الوند	a	b	a	e	b	a	۸
۶۵	بولانی	c	b	a	e	a	a	۶
۶۶	گابو	b	i	a	b	b	b	۸
۶۷	چاینزاسپرینگ	c	b	a	a	a	a	۶

جدول ۵ - تنوع ژنتیکی نمونه‌های مورد بررسی در مکان‌های ژنی Glu-1 و Glu-3 بر اساس فرمول نی

مکانهای ژنی	مکان ژنی	تنوع ژنتیکی	میانگین تنوع ژنتیکی
Glu-1	$Glu-A_1$	۰/۵۷۶	۰/۵۳۴
	$Glu-B_1$	۰/۵۵۴	
	$Glu-D_1$	۰/۴۵۰	
Glu-3	Glu-A3	۰/۷۰۶	۰/۷۶۷
	Glu-B3	۰/۸۲۴	
	Glu-D3	۰/۷۳۷	

جدول ۶- ارزیابی کیفی آلل‌های ارقام گندم بررسی شده بر اساس مدل گوپتا

EXT	Glu-A3	فراوانی نسبی	Glu-B3	فراوانی نسبی	Glu-D3	فراوانی نسبی
بالا	d و b	۰/۲۶۸	i و h	۰/۰۷۴	e و b	۰/۴۳۲
متوسط	c	۰/۴۰۲	g و b و h	۰/۴۴۷	c و a	۰/۴۴۷
پایین	e	۰/۳۲۸	g و a	۰/۴۷۷	d	۰/۱۱۹

باتوجه‌به‌اثرات‌مشهود Glu-3 روی گسترش خمیر پیشنهادمی‌شود.

۱- لاین TrTr از ارقام تهیه گردد تا بررسی‌های دقیق‌تر روی LMW-GS انجام شود.

۲- از تکنیک PCR و نشانگرهای SSR جهت شناسایی ارقام گندم از نظر ژن‌های کنترل کننده پروتئین‌های ذخیره به ویژه LMW استفاده گردد.

۳- تهیه cDNA از ژن‌های با کیفیت بالا در مکان‌های ژنی Glu-1 و Glu-3 و همسانه‌سازی آنها تا قابل انتقال به ارقام مورد نظر باشد.

۴- مطالعات ژنتیکی جهت تعیین روابط دقیق بین مکان‌های ژنی Glu-3 و Gli-1 انجام شود.

سپاسگزاری

بدینوسیله از بخش تحقیقات غلات موسسه اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج به خاطر در اختیار گذاردن ارقام شاهد و مورد نیاز، تشکر و سپاسگزاری می‌شود.

REFERENCES

1. Cassidy, B. G., J. Dvorak, and O. D. Anderson. 1998. The wheat low-molecular weight glutenin genes: Characterization of six new genes and progress in understanding gene family structure. Theor. Appl. Genet. 96: 743-750.
2. Cornish, G. B. 1994. End-use quality of Australian soft wheat families. In: Paull, J., I. S. Dundas, P. K. W. Shepherd & G. Y. Hollamby, (eds) Proceedings of the seventh assembly wheat Breeding Society of Australia, PP: 273-277.
3. Dilmer, R. Y. 1965. Exploring the structure of protein in wheat gluten. Bakers Dig. 39: 35-38.
4. Dubcovsky, J., M. Echaide, S. Giancola, M. Rousset, M. C. Lou, L. R. Joppa, and J. Durak. 1997. Seed – Storage protein loci in RFLP maps of diploid, tetraploid, and hexaploid wheat. Theor. Appl. Genet. 95: 1165-1189.
5. Gupta, R. B. 1992. An electrophoretic procedure suitable for a routine screeining of LMW and HMW glutening subunits of wheat. J. Cereal Sci. 16: 59-68.
6. Gupta, R. B., F. Bekes and C. W. Wringley. 1991. Prediction of physical dough properties from glutenin subunits composition in bread wheats: Correlation Study Cereal Chem. 68: 328-333.
7. Gupta, R. B., F. Bekes, C. W. Wringley & H. J. Moss. 1991. Prediction of wheat dough quality in breeding on the basis of LMW and HMW glutenin subunit composition. Proc 40th Cereal Chem. Conf. Roy Aust Chem. Inst. Melborne. PP: 217-225.
8. Gupta, R. B., J. G. Paul, G. B. Cornish, G. A. Palmer, F. Bakes & A. J. Rathjen. 1994. Allelic variation at glutenin subunit and gliadin loci, Glu-1, Glu-3 and Gli-1 of Common wheats. I. Its addetive and interaction effects on dough properties J. Cereal Sci. 19: 9-17.
9. Gupta, R. B., Y. Popineau, J. Lefbrre, M. Cornect, G. J. Lawrence & F. Macritchie. 1995. Biochemical basis of flour properties in bread wheat. II. Changes in Polymeric protein formation and dough / gluten

properties associated with the loss of low molecular or High molecular glutenin subunits. J. Cereal. Sci. 21: 103-116.
10. Gupta, R. B. & F. Macritchie. 1991. Rapid communication: A Rapid one – step ond – dimentional SDS-PAGE procedure for analysis of subunit composition of glutenin in wheat. J. Cereal. Sci. 14: 105-109.
11. Gupta, R. B. & F. Macritchie. 1994. Allelic variation at glutenin subunits and gliadin loci, Glu-1, Glu-3 and Gli-1 of common wheat. II. Biochemical basis of allelic effects on dough properties. J. Cereal. Sci. 19: 19-29.
12. Gupta, R. B. & K. W. Shepherd. 1993. Production of multiple wheat-rye 1RS translocation stocks and genetic analysis of LMW subunits of glutenin and gliadins in wheat using this stocks. Theor. Appl. Genet. 85: 719-728.
13. Gupta, R. B., N. K. Singh & K. W. Shepherd. 1989. The cumulative effects of allelic variation of LMW and HMW glutenin subunits on dough properties in the progeny of two bread wheat. Theor. Appl. Genet. 77: 57-64.
14. Henry, R. J. 1997. Practical application of plant molecular biology. Chapman and Hall, London, PP: 268.
15. Jackson, E. A., M. H. Morel, T. Sontag – Storhm, G. Brandlard. E. V. Metakovsky, R. Redaelli. 1996. Proposal for combining classification systems of alleles of Gli-1 and Glu-3 loci in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) J. Genetics and breeding. 50: 321-336.
16. Khelifi, D. & G. Brandland. 1992. The effect of HMW and LMW subunits of glutenin and gliadins on the technological quality of progeny from four crosses between poor making quality and strong wheat cultivars. J. Cereal Sci. 16: 165-200.
17. Labuschange, M. T., and H. Martens 1999. The use of low molecular weight glutenin subunits to distinguish between wheat cultivars with and without resistance to the Russian wheat aphid, *Diuraphis noxia* Plant Breeding 118: 91-92.
18. Margiotta, B., G. Colaprico & D. Lafiandra. 1991. Characterization of low molecular weight glutenin subunit in durum wheat. Cereal Chem. 68: 261-267.
19. Masci, S. M., E. Proceddu, G. Colaprico & D. Lafiandra. 1991. Comparison of band D subunits of glutenin encoded glu-D3 locus in two biotypes of the common wheat cultivar Newton with different technological characteristics. J. Cereal Sci. 14: 35-46.
20. Morel, M. H. 1994. Acid – polyacrylamide gel electrophoresis of wheat glutenins: a new tool for the separation of high and low molecular weight subunits. Cereal Chem. 71(3): 238-242.
21. Morgunov, A. I, R. J. Pena, J. Crossa & R. Agarams 1993. World wild distribution of Glu-1 alleles in bread wheat. J. Genet. And Breed. 47:53-60.
22. Payne, P. I., K. G. Corfield, L. M. Holt & J. A. Blackman. 1981. Correlations between inheritance of certain high molecular weight subunits of glutenin and bread making quality in progenies of six crosses of bread wheat. J. Sci. Food. Agi. 32: 51-60.
23. Redalli, R., M. H. Morel. J. C. Autran & N. E. Pogna. 1995. Genetic analysis of low molecular glutenin subunits fractionated by two dimensional electrophoresis (A-PAGE× SDS-PAGE) J. Cereal. Sci. 21: 5-13.
24. Shahriari, F., T. Radjon, W. Shepherd. 1996. The effect of HMW and LMW of glutenin subunits rheological propertion of bread wheat. Rheo. Ph.D. Thesis Addelid PP: 362.
25. Shewry, P. R., and A. S. Tatham. 1997. Disulphibonds in wheat gluten proteins J. Cereal. Sci. 25: 207-227.
26. Singh, N. K., K. W. Shepherd & G. B. Cornish. 1991. Rapid communication: a simplified SDS-PAGE procedure for separating LMW subunits of glutenin. J. Cereal. Sci. 14: 203-208.
27. Vensel, W. H., G. E. Tarr & D. D. Kasarda. 1995. C. Terminal and internal sequences of a low molecular weight (LMW-s) type of glutenin subunit. Cereal. Chem. 72(4): 356-359.

Variation in Low Molecular Weight Glutenin Subunits in Some Wheat (*T. aestivum.* L.) Varieties Using Electrophoresis

A. IZADI- DARBANDI[1], B. YAZDI – SAMADI[2], S. ABD- MISHANI[3], A. A. SHAHNEJAT BUSHEHRI[4] AND F. SHAHRIARI[5]

1, 2, 3, 4, Former Graduate Student, Professors, and Assistant Professor, Faculty of Agriculture, University of Tehran. 5, Assistant Professor, Faculty of Agriculture, University of Mashhad, Iran.

Accepted. July. 4, 2001

SUMMARY

Variation in LMW- glutenin subunits was studied in 67 bread wheat varieties. The glutenin and gliadin proteins were extracted through sequential extraction procedure. One – step 1- dimensional SDS-PAGE with 8.1-12.5% gradient gel was used for separation of glutenin & gliadin in subunits. Seventeen Glu-1 subunits and 19 Glu-3 subunits were recognized. A new subunit in Glu-1 (2**+10*) was observed in 4 of the varieties, 7(a) and 10(i) subunits were seen independently in 2 varieties, however, 1 By and 1Dx were not expressed. In Glu-1, the 2+12(a), 7+8(b) and null (c) had the highest frequencies of 0.71, 0.64 and 0.56, respectively. Glu-A3c, Glu-B3b and Glu-D3b in Glu-3 constituted the most frequent subunits, with 0.4, 0.25 and 0.35 relative frequencies respectively. Compared to Glu-1, the variation in each locus and also the overall mean variation of Glu-3 were higher. ω- gliadins showed higher variation than total variation Glu-1 or Glu-3 subunits, but lower than total variation Glu-1 and Glu-3. The maximum variation being observed, when the Glu-1, Glu-3 and ω-gliadin were taken into consideration together. Only varieties Alamoot 1 and Alamoot 2 were similar at HMW, LMW and ω-gliadin loci, the results indicated the following order of variation in different loci.

ωGli & Glu-3 & Glu-1> Glu-3 & Glu-1> ωGli>Glu-3>Glu-1.

Key words: LMW-GS, Sequential extraction, Concentration gradient , Gliadin.