مجله علوم کشاورزی ایران
جلد ۳۱، شماره ۴، سال ۱۳۷۹(۷۹۸-۷۸۵)

بررسی کیفیت نانوایی لاینهای دابلدهاپلویید گندم بااستفاده از روش الکتروفورز پروتئین های ذخیره‌ای بذر

فرشاد بختیار و رضا بزرگی پور
اعضاء هیأت علمی بخش تحقیقات غلات و بخش تحقیقات ژنتیک و ذخائر توارثی
موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر
تاریخ پذیرش مقاله ۷۹/۵/۵

خلاصه

این تحقیق به منظور بررسی کیفیت نانوایی در لاین‌های دابلدهاپلوئید گندم تولید شده با استفاده از روش حذف کروموزومی تلاقی گندم و ذرت انجام شد. مواد گیاهی مورد استفاده در این تحقیق شامل بذور F1 گندم حاصل از تلاقی‌های بزوستایا × نوید (NB) و کرج ۱ × ایرنیا (IK) به همراه چهار ژنوتیپ ذرت H1=KSC 108, H7=SC 704, H3=KSC 103 و سینکا ۶۰ بود. در این تحقیق تعداد ۴۷ لاین دابلدهاپلوئید گندم به همراه والدین، نتاج F1 و ارقام شاهد چاینیز اسپرینگ و مارکوئیس به منظور بررسی کیفیت پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر مورد مطالعهٔ الکتروفورزی قرار گرفتند. برای تفکیک زیر واحدهای گلوتنین از روش SDS-PAGE (ژل ۱۰٪) استفاده شد و در مجموع تعداد ۱۱ زیر واحد در سه مکان ژنی مشاهده گردید. زیر واحد نول با ۵۷/۴ درصد و زیر واحد ۶،۸ با ۴/۳ درصد بیشترین و کمترین فراوانی را دارا بودند. در لاین‌های مورد بررسی چند مکان ژنی دور از انتظار نیز مشاهده شد. در نهایت لاین‌های مورد مطالعه از نظر درجه‌بندی کلی کیفی اجزاء گلوتن رتبه‌بندی گردیدند که تعدادی از لاین‌های دابلدهاپلوئید دارای درجه کیفی بالاتری نسبت به والدین و نتاج F1 حاصل از آنها بودند.

واژه های کلیدی : کیفیت نانوایی، دابلدهاپلویید، الکتروفورز، حذف کروموزومی

مقدمه

بشر از بدو خلقت با هدف امرار معاش روزانه و ذخیرهٔ مواد غذایی بذور علف‌های خانوادهٔ گندمیان را جمع‌آوری کرد. این امر که همراه با هدف انتخاب بذوری با مقدار آرد بیشتر و کیفیت بهتر محصول بود در نهایت منجر به برگزیده شدن گونه‌های غلات امروزی گردید (۵). در دنیای امروز، گندم به عنوان یکی از عمده‌ترین محصولات غذایی به شمار می‌رود. در سال ۱۹۹۷ از مجموع زمینهای زیر کشت جهان ۱۶ درصد آن یعنی حدود ۲۲۸ میلیون هکتار به کشت گندم اختصاص داشته است. تولید و مصرف نان از زمانهای گذشته تا به حال دستخوش تغییرات عمده‌ای گردیده است به نحوی که در ابتدا مصرف نان چاودار در آلمان، اروپای شرقی، دانمارک، سوئد و نروژ معمول بود ولی از حدود ۲۰۰ سال پیش در فرانسه مصرف نان گندم جایگزین آن گردید و به طور کلی مصرف نان چاودار در جهان کاهش یافت (۵). در کشور ما، مصرف نان جو از زمانهای قدیم معمول بوده اما با توجه به خواص ویژه نان گندم از قبیل سازگاری و لذیذ بودن آن، اشتهاآور بودن و عدم ایجاد

حالت تنفر از مصرف زیاد و همچنین وجود مواد غذایی فراوان و ویتامینهای مختلف از جمله ویتامینهای گروه B و E مصرف این نان بتدریج جایگزین مصرف نان جو گردیده است. عمده‌ترین بخش مصرف گندم مربوط به تولید نان است که هر ساله بیش از ۹۰ درصد عرضه گندم را به خود اختصاص می‌دهد، اهمیت مصرف نان در کشور به حدی است که ۴۴/۳ درصد از کالری مصرفی روزانه یک نفر شهری و ۵۱/۵ درصد از کالری مصرفی روزانه یک نفر روستایی از مصرف نان تأمین می‌شود (۵ و ۴).

گندم معمولی نان نوعی آلوهگزاپلویید (2n=6x=42) است که از سه ژنوم A، B و D (هر ژنوم متشکل از ۷ جفت کروموزوم) تشکیل شده و هر ژنوم از یک گونهٔ دیپلویید اجدادی مشتق شده است. این سه گونهٔ دیپلویید به نوبه خود از دیپلویید واحدی ناشی شده‌اند. این اشتراک در اصل سبب گردیده تا هر ژنوم دارای ژنهای تقریباً مشابه با ژنومهای دیگر باشد و لذا ضمن فراهم آوردن زمینهٔ مناسب برای تحقیقات ژنتیکی در رابطه با تعیین محل ژنهای کنترل کننده اجزاء گلوتنین، در نتایج حاصله نیز روند هماهنگی مشاهده گردد. با استفاده از سری لاینهای نولیزومیک[1]، ترازومیک[2]، نولی-ترازومیک[3] و دی‌تلوسنتریک[4] معلوم شده است که مکانهای ژنی کنترل کنندهٔ گلوتنین‌های بزرگ بر روی بازوی بلند کروموزوم‌های 1A، 1B، 1D و نزدیک به سانترومر (ضریب نوترکیبی ۹٪ = R) قرار دارند (۱۶). این مکانها را مشترکاً Glu-1 و هر یک را بسته به کروموزوم مربوطه Glu-A1 و Glu-B1 و Glu-D1 می‌نامند. برای مکان ژنی Glu-A1 تاکنون سه آلل یافت شده که بصورت نوار ۱،نوار *۲ و نول (فاقد هر یک از دو نوار یاد شده) از آنها نام برده می‌شود. این اجزاء گلوتنین در بالاترین ناحیه گلوتنین‌های بزرگ یا بالاترین قسمت ژل قرار دارند برای مکان ژنی Glu-B1 تاکنون ۱۱ آلل مشاهده گردیده است به طوری که ملاحظه می‌شود برخی از آلل‌ها حاوی دو جزء (مثلاً ۷ و ۸) می‌باشند که جزء بالاتر در ژل را X وجزء پایین تر را Y مینامند. به عنوان مثال Glu-B1 7+8 دارای دو جزء 1By8 و 1Bx7 است. بررسی‌های جدید نشان داده که هر مکان ژنی شامل دو ژن بسیار نزدیک به هم (R=0.01%) برای دو جزء X و Y می باشد و هر یک از دو ژن خود جداگانه دستخوش جهش‌های مکرر قرار گرفته‌اند (۲۱). برای مکان ژنی Glu-D1 تاکنون ۶ آلل گزارش گردیده و هر آلل شامل دو جزء است که یکی بالاتر و دیگری پایین‌تر از آلل‌های Glu-B1 قرار می‌گیرند. به عنوان نمونه نوار ۵ بالاتر و نوار ۱۰ پایین‌تر ازنوارهای ۷+۸ هستند . باتوجه به اینکه مکان ژنی Glu-1A دارای هیچ و یا یک جزء، مکان ژنی Glu-1B دارای یک یا دو جزء و مکان ژنی Glu-1D دارای دو جزء می‌باشند لذا در هر رقم گندم هگزاپلویید ۳ تا ۵ جزء (اصطلاحاً نوار)درقسمت گلوتنین‌های بزرگ (H.M.W) دیده می‌شود (۲۱).

در برنامه‌های اصلاح کیفیت، اجزاء گلوتنین سنگین با کیفیت مطلوب که توسط مکانهای ژنی مختلف کنترل می‌شوند، با تلاقی والدین و جمع کردن آنها در نتاج و گزینش نتاج با استفاده از رسوبگذاری SDS و الکتروفورز باSDS-PAGE انجام می‌شود. بدین صورت پیشرفت اصلاحی کلی در کیفیت پروتئین بدست آمده است (۱۳).

درگونه‌های خودگشن به‌نژادگران عموماً با توجه به اهداف اصلاحی مورد نظر از روشهای معرفی[5]، شجره‌ای[6]، توده‌ای[7] و تلاقی‌برگشتی[8] استفاده می‌کنند. از نظر اصلاحی در گیاهان خودگشن سیستم دابلدهاپلوییدی می‌تواند مستقیماً جهت تولید ارقام جدید مورد استفاده‌قرار گیرد زیرا هر لاین دابلدهاپلویید تولید شده پتانسیل تبدیل شدن به یک رقم جدید را دارد، بطور کلی مزایای اصلی سیتسم دابلدهاپلوییدی در مقایسه با روشهای کلاسیک اصلاحی عبارت از سرعت بخشیدن به برنامه های اصلاحی و افزایش کارآیی سلکسیون در طول برنامه میباشد.(۲)

روشهای متداول اصلاح نباتات در دهه های اخیر نقش بسیار مهمی در پیش‌برد کشاورزی و تأمین نیازهای غذایی بشر داشته‌اند، در حال حاضر استفاده از روشهای نوین بیوتکنولوژی گیاهی که در واقع تکمیل کننده روشهای متداول اصلاح نباتات می‌باشند می‌تواند راه‌گشایی در جهت حل سریع‌تر مسایل و مشکلات کشاورزی گردد. با این امید در این تحقیق سعی گردیده است که با تلفیق دو تکنیک نسبتاً جدید بیوتکنولوژی گیاهی یعنی هاپلوییدی و الکتروفورز گامی هر چند کوتاه در جهت بهبود کیفیت نانوایی ارقام گندم برداشته شود.

1. Nullisomic 2. Tetrasomic 3. Nulli-tetrasomic 4. Ditelocentic
5. Introduction 6. Pedigree 7. Bulk 8. Back cross

مواد و روشها

مواد گیاهی مورد استفاده دراین تحقیق شامل بذور F1 گندم حاصل از تلاقیهای (بزوستایا × نوید) و (کرج ۱ ×اینیا) به همراه چهار ژنوتیپ ذرت H7=SC 704,H3=KSC 103,H1=KSC 108 و سنیکا ۶۰ بود . دراین تحقیق به منظور مقایسه صفات مورد مطالعه در تلاقیهای انجام شده بین بذور F1 گندم و ژنوتیپهای ذرت از آزمون مربع کای استفاده شد.به منظور همزمان نمودن مرحله گرده‌دهی گیاهان ذرت با مرحله گل‌دهی گیاهان گندم بذور ذرت ۴۵ روز زودتر از بذور گندم کشت گردید. (در هر تاریخ کاشت با فاصله زمانی ۱۵ روز تعداد ۵ عدد بذر از هر رقم در ظرف پتری کاشته شد و در فیتوترون با دمای ۲۵°C و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری گردید). پس از جوانه زنی بذور،گیاهچه‌هابه گلدانهای پلاستیکی با قطر ۲۲cm که حاوی مخلوطی ازخاک‌برگ ، ماسه و خاک مزرعه به نسبت ۱-۱-۱ بود منتقل شدند. گیاهچه‌های حاصل در گلخانه تحت شرایط دمایی ۲۵°C و دوره‌نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی تا مرحله تولید گل آذین‌نر و گرده‌دهی نگهداری گردیدند. به منظور رشدونمو بهتر گیاهان ذرت پس از مرحله ۵-۶ برگی هر ۱۵ روز یک بار مقدار کمی کود اوره به گلدانها اضافه گردید. جهت‌کشت بذورگندم در هر تاریخ کاشت بافاصله زمانی ۲۰ روز تعداد ۲۵ عدد بذر گندم پس ازضدعفونی درظرف پتری کشت گردید.به منظور شکسته شدن خواب بذور و یکنواخت شدن جوانه‌زنی، یک روز بعد از کاشت پتریها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۴+ °C قرار گرفتند و سپس به فیتوترون بادمای ۲۰°C ودوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی منتقل گردیدند. پس از جوانه زنی گیاهچه‌های حاصل به گلدانهای پلاستیکی با قطر ۸ cm که حاوی مخلوطی از ماسه،خاک برگ و خاک مزرعه به نسبت ۱-۱-۱ بود منتقل گردیدند و در گلخانه با شرایط دمایی ۲۰ °C و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند. ۴۵ روز بعد گیاهچه‌های گندم به منظور طی دوره ورنالیزاسیون به مدت ۶-۸ هفته به سردخانه منتقل و در شرایط دمایی ۴+ °C و نور کم نگهداری شدند. پس از طی دوره ورنالیزاسیون گیاهچه‌های گندم به گلخانه (با شرایط فوق‌الذکر) انتقال یافتند. ۱۵ روز بعد گیاهچه‌هابه گلدانهای پلاستیکی با قطر ۱۴ cm منتقل شدند و تا مرحله تولید خوشه و انجام سایرمراحل آزمایش نگهداری گردیدند. پس ازخروج $\frac{2}{3}$ خوشه گندم از غلاف برگ پرچم خوشه های گندم عقیم شدند.۲۴ ساعت بعد دانه‌های تازه گرده ذرت برروی یک تکه فویل آلومینیومی جمع‌آوری گردید و با استفاده از یک قلم‌مو برروی کلاله گندم انتقال یافت. ۲۴ ساعت بعد ازگرده‌افشانی نسبت به تزریق هورمون 2.4,D باغلظت ۱۰۰ mg/l اقدام گردید (برای این منظور هورمون هم درداخل‌ساقه وهم درون گلچه های گرده افشانی شده تزریق شد). ۱۴ الی ۱۸ روز بعد از گرده‌افشانی‌بااستفاده از تکنیک نجات جنین،جنین‌های هاپلوییید به محیط کشت MS انتقال داده شدند و در شرایط تاریکی بادمای ۲۰°C نگهداری‌گردیدند. یک الی دو هفته پس از جوانه زنی جنین‌های هاپلوییید، زمانی که طول ساقه‌چه به حدود ۱ الی ۱/۵ cm رسید، گیاهچه‌ها به فیتوترون با دمای ۲۰°c و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی منتقل شدند تا با جذب نور و انجام فعالیتهای فتوسنتزی شروع به رشدو نمو نمایند. با گذشت حدود یک ماه زمانی که گیاهچه‌ها حداقل دارای سه برگ و سیستم ریشه‌ای کامل و قوی شدند، نسبت به انتقال آنها از محیط درون شیشه‌ای به خاک اقدام گردید.به منظور دو برابر نمودن تعداد کروموزمهای گیاهان هاپلوییدتولید شده در مرحله پنجه‌دهی، از محلول ۰/۰۵% کلشیسین به مدت ۵/۵ - ۶ ساعت استفاده شد. سپس گیاهچه‌ها به گلدان انتقال یافتند و تامرحله بذرگیری در گلخانه نگهداری شدند.

به منظور استخراج پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر (گلوتنین و گلایدین)، ابتدا بذر مورد نظر با استفاده از تیغ اسکالپل به دو قسمت تقسیم شد. به نحوی که یک نیمهٔ آن دارای جنین و نیمهٔ دیگر آن فاقد جنین بود. نیم بذر حاوی جنین نگهداری گردید و قسمت دیگر آن توسط یک هاون کوچک کاملاً پودر شد. آرد حاصل به درون یک لولهٔ اپندورف ریخته شد و سپس به مقدار پنج برابر وزن نیم‌بذر اولیه (برحسب μl) از محلول ۱/۵ مولار دی متیل فرم امید به لولهٔ اپندورف اضافه شد و با سوزن تشریح مخلوط گردید. به منظور اختلاط بیشتر از ورتکس استفاده شد(حداکثر یک دقیقه).سپس لوله‌های اپندورف حاوی مواد فوق به مدت یک ساعت در آزمایشگاه نگهداری شدند وبعد سانتریفوژ گردیدند (۱۰ دقیقه و ۱۵۰۰۰ دور در هر دقیقه). بدین ترتیب گلایدین استخراج شده در محلول رویی قابل تفکیک بود. به منظور استخراج گلوتنین ابتدا

پالتهای باقیمانده در ته لوله اپندورف به منظور جداسازی سایر پروتئین‌هاتوسط ۱/۵ml ۱-محلول(Tris-HCl:pH=6.8 0.125M) شستشو داده شد . سپس لوله‌های اپندورف سانتریفوژ گردید و محلول رویی دورریخته شد(۱۰ دقیقه و ۱۵/۰۰۰ دور درهردقیقه). آنگاه محلولی متشکل از ۳۰ میلی‌گرم DTT، ۱/۵ml سمپل بافر و ۱/۵ml آب تهیه گردید و به نسبت پنج برابر وزن نیم بذر اولیه به لوله های اپندورف اضافه شد. آنگاه لوله های اپندورف به مدت یک ساعت در بن ماری با دمای ۶۰°C قرارگرفتند و بعد سانتریفوژ گردیدند(به مدت ۱۰ دقیقه و ۱۵۰۰۰ دور درهر دقیقه).در نهایت محلول رویی حاوی گلوتن استخراج شده بود. پس از استخراج پروتئین های ذخیره ای بذر(گلوتنین) با استفاده از دستگاه الکتروفورز،ژلهای مربوطه ران گردیدند که نتایج آن در زیر ارائه گردیده است.

نتایج وبحث

در این تحقیق به منظور بررسی الکترو فورگرام زیر واحدهای گلوتنین با وزن مولکولی بالا (H.M.W) درلاین‌های دابلدهاپلوئید، والدین اولیه (شامل ارقام گندم نوید، بزوستایا، اینیا و کرج ۱) به همراه نتاج F1 حاصل از تلاقی‌های (بزوستایا × نوید) و (کرج ۱ × اینیا) و همچنین ارقام شاهد چاینیز اسپرینگ و مارکویس مورد بررسی قرار گرفتند که زیر واحدهای مربوطه در جدول شماره ۱ ارائه گردیده است.

از تعداد ۶۰ لاین دابلدهاپلوئید گندم تولید شده در این تحقیق ۴۷ لاین از نظر الکتروفورگرام زیر واحدهای گلوتنین با وزن مولکولی بالا H.M.W مورد بررسی قرار گرفتند که نتایج آن در جدول شماره۲ ارائه گردیده است. باتوجه به جداول شمارهٔ ۱ و ۲ از نظر درجه‌بندی کلی کیفی اجزاء گلوتنین برخی از لاین‌های دابلدهاپلوئید حاصل از تلاقی ارقام نوید و بزوستایا دارای درجهٔ کیفی گلوتنین برابر ۱۰ می‌باشند که این درجه از درجهٔ والدین و همچنین هیبرید F1 حاصل از آنها بیشتر است. حداکثر درجهٔ بندی کلی کیفی اجزاء گلوتنین در لاین‌های دابلدهاپلوئید حاصل از تلاقی اینیا و کرج ۱ می‌باشد،که این درجه با درجهٔ بذور F1حاصل از دو رقم فوق مطابقت دارد. همانطور که در جدول شمارهٔ ۲ مشاهده می‌شود در برخی از لاین‌های دابلدهاپلوئید مورد مطالعه نوارهای غیرمنتظره‌ای مشاهده می‌گردد که این پدیده در مطالعات فلیکس و همکاران نیز مشاهده گردیده است. بطوری که آنها نیز پس از تلاقی ارقام چاینیز اسپرینگ و کارتوت در لاین های دابلدهاپلوئید تولید شده از نتاج F1 ۹ نوار غیرمنتظره مشاهده کردند (۷). بدو و همکاران با مطالعه کیفیت نانوایی لاین‌های دابلدهاپلوئید حاصل از کشت پرچم نتاج F1 تلاقی ارقام گندم MV17 و MV16 مشاهده کردند که مقدار پروتئین، میزان گلوتن و خاصیت ارتجاعی خمیر در لاین‌های دابلدهاپلویید نسبت به والدین برتر بوده و دارای اختلاف معنی‌داری می‌باشد. آنها همچنین گزارش کردند که در لاین‌های دابلدهاپلوئید مورد مطالعه صفات مربوط به کیفیت نانوایی نسبت به میزان محصول

جدول ۱-زیر واحدهای H.M.W در والدین، بذور F1 و شاهدهای چاینیزاسپرینگ و مارکویس

درجه‌بندی کلی	مکان ژنی			رقم یا
کیفی‌اجزاء گلوتنین	GLU-D1	GLU-B1	GLU-A1	ژنوتیپ
8	5+10	7	2*	نوید
9	5+10	7+9	2*	بزوستایا
9	5+10	7+9	2*	بزوستایا×نوید
-	5+10	13+16	1	اینیا
7	5+10	7+9	NULL	کرج I
10	5+10	7+8	1	کرج I× اینیا
6	2+12	7+8	NULL	چاینیزاسپرینگ

جدول ۲- شمارهٔ لاین‌های دابلدهاپلوئید، مکان‌های ژنی مربوطه و درجه‌بندی کیفی اجزاء گلوتنین

ردیف	شماره‌لاین	مکان ژنی GLU-A1	GLU-B1	GLU-D1	درجه‌بندی کلی کیفی‌اجزاء گلوتنین
1	DH-1-IK	NUL	17+18	2+12	6
2	DH-2-IK	NUL	17+18	2+12	6
3	DH-3-IK	NUL	7+9	2+12	5
4	DH-5-IK	NUL	17+18	2+12	6
5	DH-6-IK	2*	7	2+12	6
6	DH-7-IK	1	17+18	5+10	10
7	DH-8-IK	1	17+18	5+12	-
8	DH-9-IK	1	17+18	5+12	-
9	DH-10-NB	2*	7+9	5+12	-
10	DH-11-NB	2*	7+8	5+10	10
11	DH-12-IK	NUL	7+9	2+12	5
12	DH-13-IK	NUL	17+18	5+10	8
13	DH-14-IK	1	7+9	5+10	9
14	DH-15-NB	2*	7+9	5+10	9
15	DH-17-IK	NUL	7+8	5+10	8
16	DH-20-IK	NUL	7+8	5+10	8
17	DH-24-IK	NUL	7	2+12	5
18	DH-26-IK	NUL	7	2+12	5
19	DH-27-NB	NUL	7+9	5+10	8
20	DH-28-NB	NUL	7+9	5+10	8
21	DH-30-NB	1	7+9	5+10	9
22	DH-31-IK	NUL	7+8	5+10	8
23	DH-32-IK	NUL	7+8	2+12	6
24	DH-33-NB	1	17+18	5+10	10
25	DH-35-IK	NUL	7+8	2+12	6
26	DH-36-IK	NUL	7+8	2+12	6
27	DH-37-NB	1	17+18	5+10	10
28	DH-38-IK	NUL	7+8	2+12	8
29	DH-39-NB	1	7+8	5+10	10
30	DH-40-IK	NUL	17+18	2+12	6
31	DH-41-NB	NUL	7+8	5+10	8
32	DH-24-IK	NUL	7+8	2+12	6
33	DH-43-NB	1	17+18	5+10	10
34	DH-44-NB	1	17+18	5+10	10
35	DH-46-IK	NUL	7+8	2+12	6
36	DH-47-IK	NUL	7+9	2+12	5
37	DH-48-IK	NUL	17+18	2+12	6
38	DH-49-IK	NUL	17+18	2+12	6
39	DH-50-IK	NUL	7+9	2+12	5
40	DH-51-NB	1	7+9	5+10	9
41	DH-52-NB	2*	7+9	5+10	9
42	DH-53-IK	NUL	7+9	2+12	5
43	DH-54-IK	NUL	7+9	2+12	5
44	DH-55-NB	2*	7+9	5+10	9
45	DH-56-IK	1	6+8	2+12	6
46	DH-57-IK	1	6+8	2+12	6
47	DH-58-NB	2*	17+18	5+10	10

جدول ۳ - درصد فراوانی زیر واحدهای گلوتنین با وزن مولکولی بالا در لاین‌های دابلدهاپلوئید.

مکان ژنی	زیر واحد	تعداد	فراوانی٪
Glu-A1	NUL	27	57.4
	1	13	27.7
	2*	7	14.9
Glu-B1	7	3	6.4
	7+8	12	25.5
	7+9	15	31.9
	17+18	15	31.9
	6+8	2	4.3
Glu-D1	2+12	23	48.9
	5+12	3	6.4
	5+10	21	44.7

دانه دارای تغییرات بیشتری می‌باشد(۶).

باتوجه به جدول شماره ۳ در مکان ژنی Gul-A1 زیر واحد نول با فراوانی ۵۷/۴ درصد نسبت به زیر واحدهای ۱ با فراوانی ۲۷/۷ درصد و *۲ با فراوانی ۱۴/۹ درصد دارای بیشترین فراوانی بود. با توجه به اینکه این نوارها در گندم دارای تاثیر مثبت بر روی کیفیت هستند حضور آنها در لاین‌های مورد بررسی دارای ارزش بالایی است (۱۹).

در مکان ژنی Glu-B1 پنج زیر واحد مختلف مشاهده شد. این زیر واحدها عموماً با زیر واحدهای گزارش شده توسط پاین و همکاران مشابه می‌باشد (۱۷).

بیشترین فراوانی زیر واحدها در این مکان ژنی مربوط به زیر واحدهای ۱۸+۱۷ (۳۱/۹٪)، ۹+۷ (۳۱/۹٪) و ۸+۷ (۲۵/۵٪) می‌باشد. مورگانو و همکاران در بررسی ۱۳۸۰ لاین گندم نان از ۲۱ کشور جهان نشان دادند که ۹۲/۷٪ لاین‌های مرکز تحقیقات سیمیت دارای زیر واحدهای ۸+۷، ۹+۷ و ۱۸+۱۷ هستند که با توجه به منشأ واندین لاین‌های مورد آزمایش نتایج بدست آمده با گزارشات مورگانو و همکاران مطابقت می‌کند(۱۴). با توجه به نتایج بدست آمده از تحقیقات پاین و همکاران(۱۸) لاورنس و همکاران (۱۰ و ۱۱)، راجرز و همکاران(۲۰) و منصور و همکاران (۱۲) نقش ژنوم B بر روی کیفیت عموماً نامشخص و کم‌تأثیر گزارش شده است.

در مکان ژنی Glu-D1 سه زیر واحد یافت شد. زیر واحد ۱۰+۵ که با ارزش‌ترین زیر واحد از نقطه نظر ارزش نانوایی به شمار می‌رود دارای فراوانی ۴۴/۷ درصد بود، گرین و همکاران (۸) ثابت کرده‌اند که مطلوب بودن زیر واحد ۱۰+۵ نسبت به زیر واحد ۱۲+۲ به علت وجود اسید آمینه سیستئین اضافی موجود در زیر واحد ۵ نسبت به زیر واحد ۲ می‌باشد و همین عامل باعث ایجاد واکنش‌های روبروئی زنجیرهای پپتیدی و افزایش استحکام خمیر می‌شود.

تحقیقات پاین و همکاران (۱۸) نشان داده است که زیر واحد ۱۰+۵ در مکان ژنی Glu-D1 با قدرت خمیر بیشتر همبستگی دارد در حالیکه آلل دیگر این مکان ژنی یعنی ۱۲+۲ با قدرت خمیر ضعیف مرتبط است. مسلت و اهلن(۱۵) در تحقیقات خود دریافتند که زیر واحد ۱۰+۵ با حجم رسوب زلنی بالاتری نسبت به زیر واحد ۱۲+۲ همبستگی دارد.

راجرز و همکاران (۲۰) در بررسی ۵۷ رقم تجارتی گندم کشت شده در آلمان دریافتند که تنوع آللی مربوط به مکان ژنی Glu-D1 (برتری زیر واحد ۱۰+۵ نسبت به ۱۲+۲) درصد بیشتری از تغییرات کیفی را نشان می‌دهد و سهم کمتری از این تغییرات مربوط به مکان ژنی Glu-A1 و Glu-B1 است.

بمنظورتجزیه خوشه‌ای(گروه‌بندی لاینهابراساس ماتریس فاصله) داده‌های مربوط به۴۷ لاین‌دابلدهاپلوئیدبااستفاده از برنامه نرم‌افزاری SPSS و از روش وارد[1] مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند که نتایج آن به صورت کلادوگرام[2] در شکل شماره۱ مشاهده می‌شود.

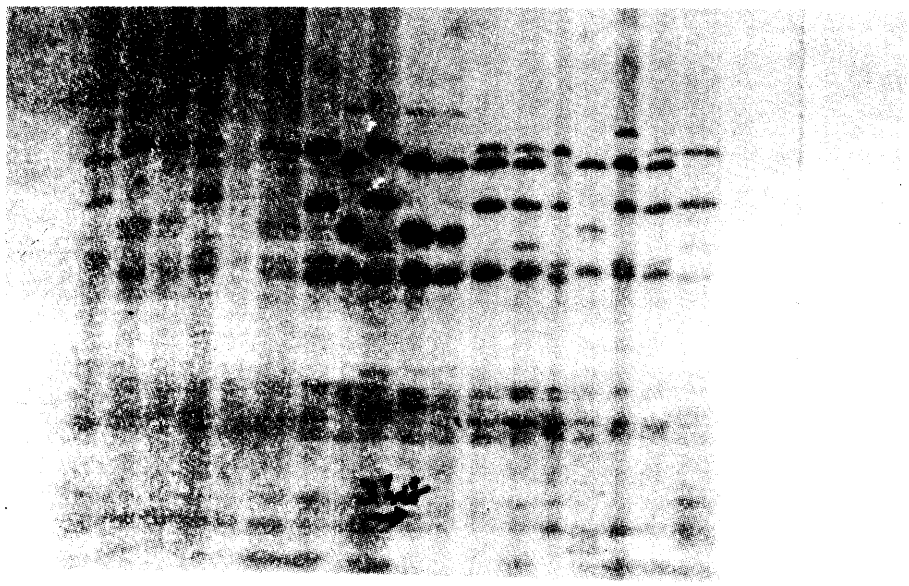
با رسم خط برش[3] از مقیاس فاصلهٔ ۵+ کلادوگرام نمودار فوق به هفت دسته تقسیم می‌شود که عبارتند از:

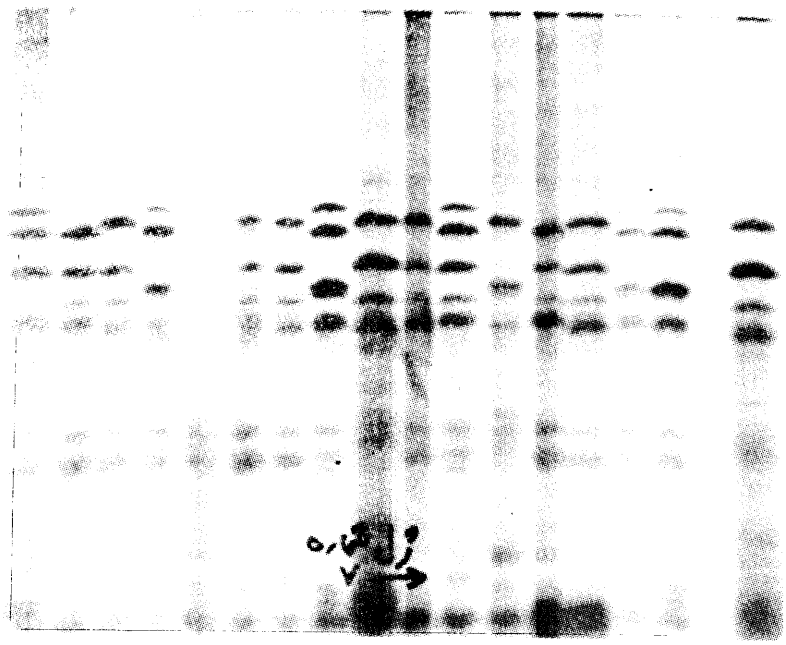
- دستهٔ اول شامل مجموعهٔ لاین‌های شمارهٔ ۶، ۵۶، ۵۷، ۲۴، ۲۶ و ۶ می باشد. لاینهای دابلد هاپلوید موجود در این دسته همگی از والدین اولیه مشترک (اینیا و کرج۱)تولید شده اند.مجموعه لاینهای دابلدهاپلوید موجود در این دسته همگی درمکان ژنی Glu-D1 با زیر واحد ۱۲+۲ مشترک می باشند. درجه کلی کیفی اجزاء گلوتنین

1. Ward 2. Cladigram 3. cut of line

در عکسهای زیر nb =(نوید ×بزوستای)، ik =(اینیا ×کرج ۱)، ma =مارکویس، ch =چاینیزاسپرینگ میباشند.

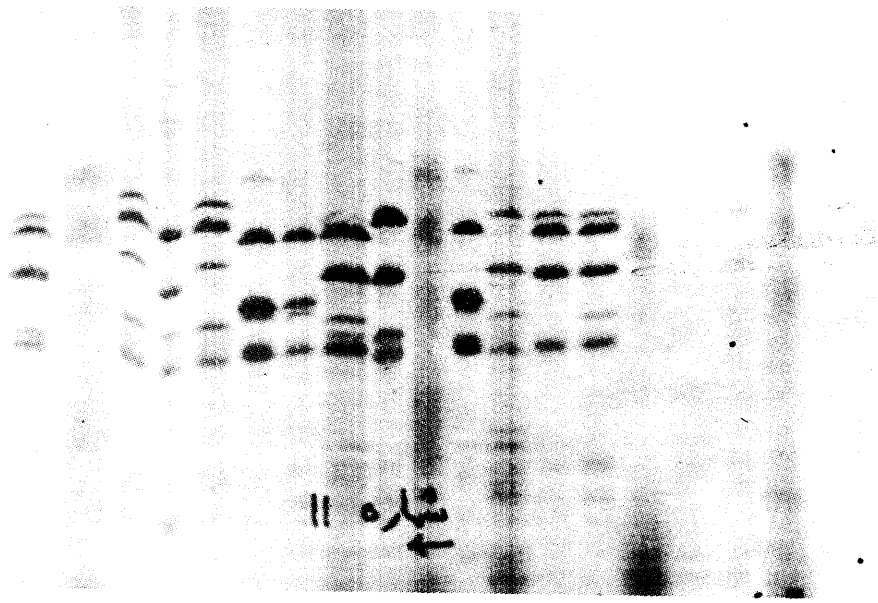
شماره لاین ۶۲ ۱۵ ۱۴ ۱۳ ۱۲ ۱۱ ۱۰ ۹ ۸ ۶۲ ۷ ۶ ۵ ۴ ۳ ۲ ۱ ۶۱





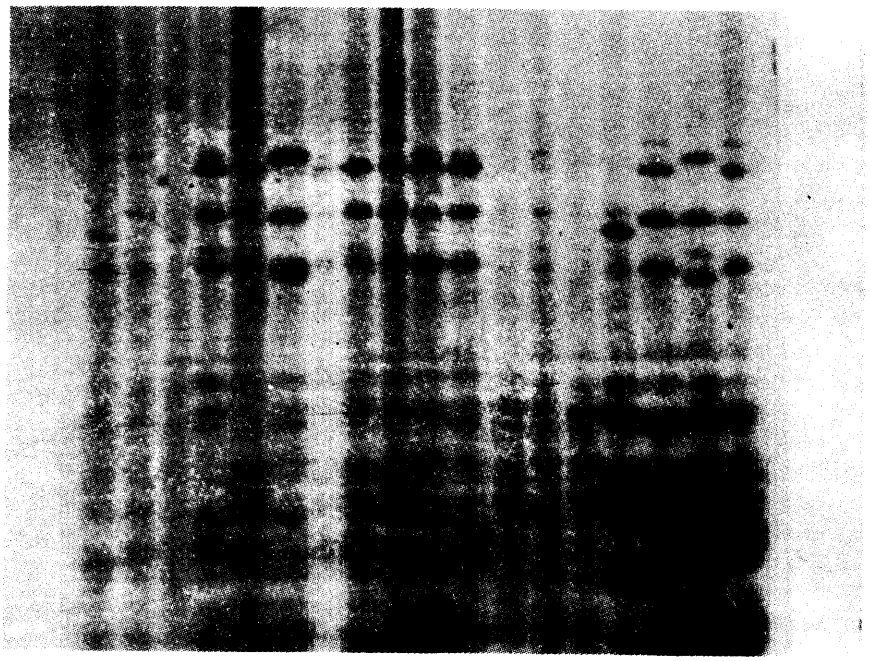
ma ik -- ik ik nb ch ik nb ik nb ik nb nb -- -- ch

شماره لاین ۶۱ ۶۲ ۷۳ ۶۹ ۹۰ ۹۱ ۹۲ ۶۵ ۶۴ ۶۶ ۶۳ ۶۷ ۶ ۶۸ ۱۱ ۹۳ ۹۴ ۹۵



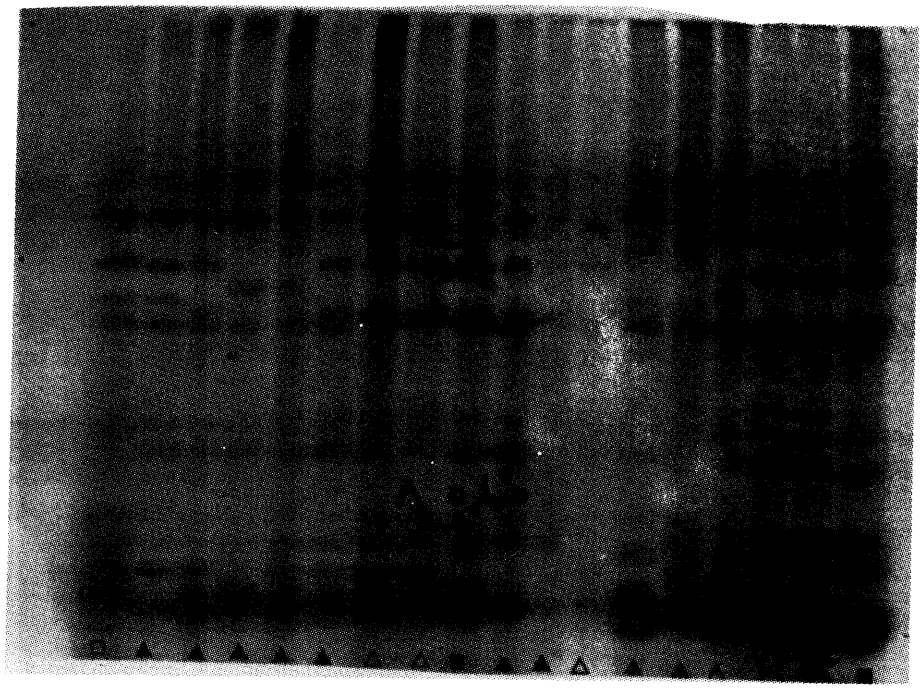
- - - nb - ik - - - - - - - - - ch ma

شماره لاین ۶۱ ۹۱ ۹۲ ۹۸ ۱۱ ۱۰ ۷۲ ۹ ۶۲ ۶ ۷۰ ۲۹ ۷ ۱۶ ۲۲ ۲۳ ۶۲ ۵۹



- ch - - - ik - - ik ch ik - nb nb - - - ma

شماره لاین ۶۱ ۶۸ ۶۷ ۵۸ ۵۷ ۵۶ ۵۵ ۵۴ ۵۳ ۶۱ ۵۲ ۵۱ ۵۰ ۴۹ ۴۸ ۴۷ ۴۶

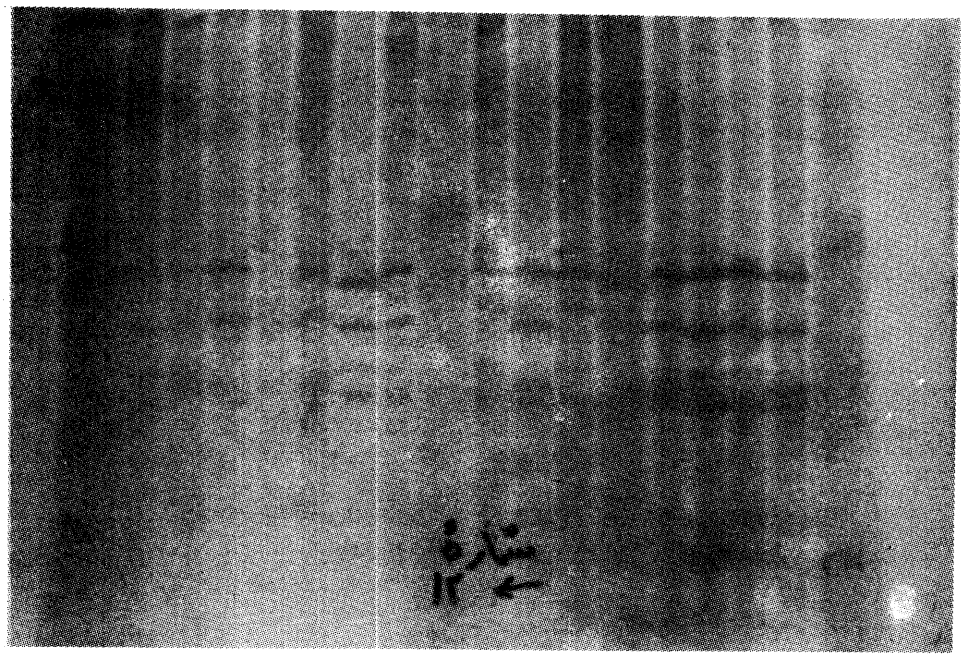


ch ik ik ik ik ik nb nb ma ik ik nb ik ik nb - - ma

شماره لاین ۶۲ ۱۵ ۱۴ ۱۳ ۱۲ ۱۱ ۱۰ ۹ ۸ ۶۲ ۷ ۶ ۵ ۴ ۳ ۲ ۱ ۶۱

ma ik ik ik -- ik ik ik ch ik nb nb ik ik ik nb ch

شماره لاین ۶۲ ۹۱ ۹۲ ۱۷ ۴ ۷۱ ۳۰ ۲۵ ۶۱ ۲۴ ۲۰ ۲۶ ۱۹ ۲۱ ۲۸ ۲۷ ۵۳ ۶۱



ma ik nb nb - - ik ik ik ma - nb - - ik - - ch

درلاینهای دابلدهاپلوییدِ این دسته از درجه کیفی والد کرج۱ (برابر۷)وهمچنین هیبرید F1 حاصل از تلاقی کرج۱ × اینیا (برابر۱۰) کمتر است.با توجه به زیر واحدهای موجود در مکانهای ژنی Glu-A1، GluB1و Glu-D1 لاینهای دابلد هاپلوییدِ این دسته و همچنین زیر واحد های موجود در والدین و نتاج F1 حاصل از آنها (جداول شماره۱و۲) مشاهده می شود که در لاینهای دابلدهاپلوییداین دسته زیر واحد های دور از انتظاری درهر سه مکان ژنی وجود دارد.

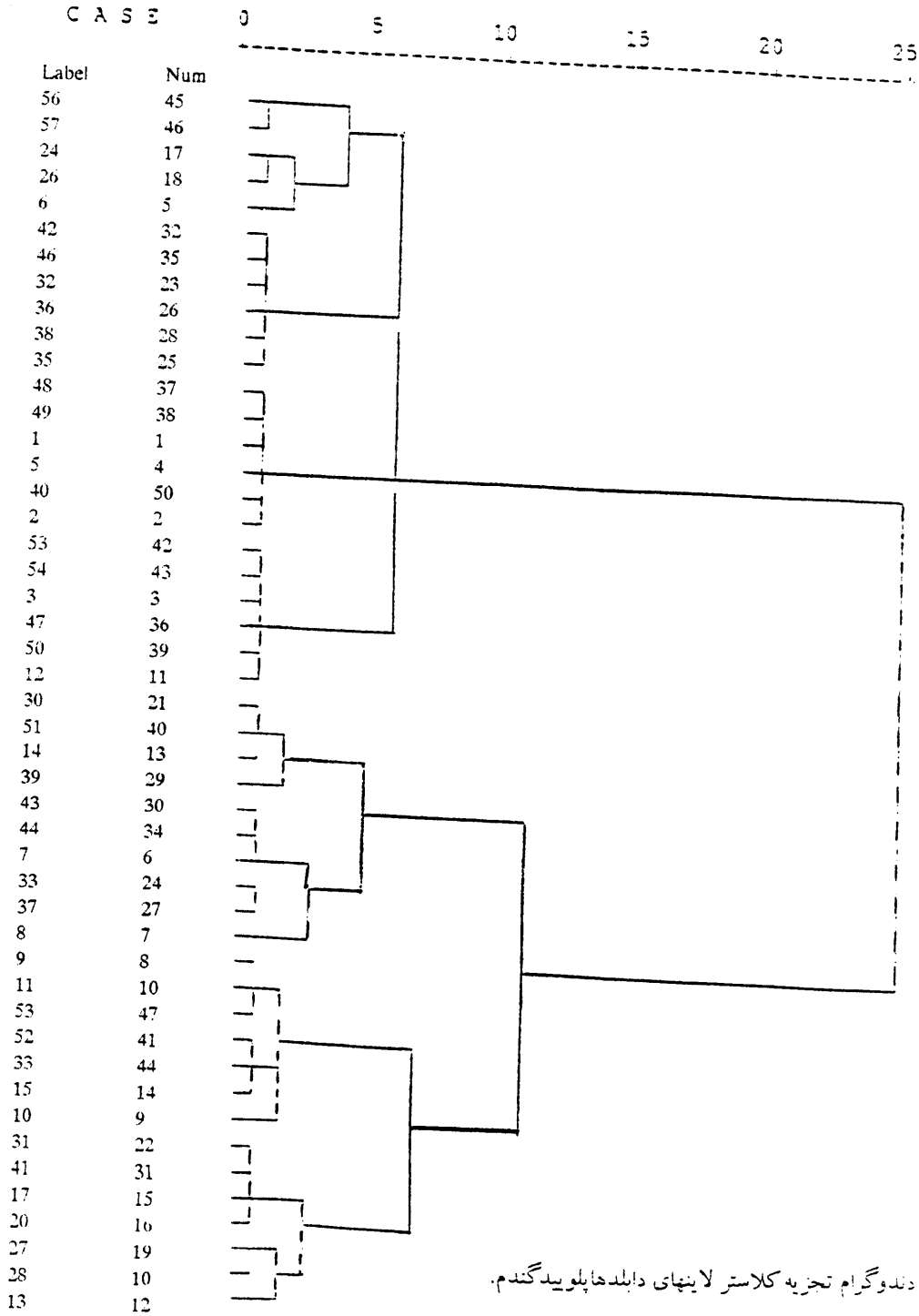
- دستهٔ دوم شامل مجموعهٔ لاین‌های شمارهٔ ۴۲، ۴۶، ۳۲، ۳۶، ۳۸ و ۳۵ می باشد. لاینهای دابلد هاپلوییدِ موجود در این دسته همگی از والدین اولیه مشترک (اینیا و کرج۱)تولید شده اند.لاینهای دابلد هاپلوییدِ موجود در این دسته درمکان ژنی Glu-A1 دارای زیر واحد NUL ، درمکان ژنی Glu-B1 دارای زیر واحد ۸+۷ ودرمکان ژنی Glu-D1 دارای زیر واحد ۱۲+۲ بادرجه کلی کیفی اجزاء گلوتنین برابر ۶ می باشند که این درجه‌از درجه کیفی والد کرج۱ (برابر۷) و همچنین هیبرید F1 حاصل از تلاقی کرج۱ × اینیا (برابر۱۰) کمتر است. در مکانهای ژنی Glu-B1 و Glu-D1 لاینهای دابلدهاپلوییدِ این دسته نیز زیر واحد های دور از انتظاری درهر دو مکان ژنی مشاهده می شود (جداول ۱و۲).

- دستهٔ سوم شامل مجموعهٔ لاین‌های شمارهٔ ۴۸، ۴۹، ۱، ۵، ۴۰ و ۲ می باشد. لاینهای دابلد هاپلوییدِ موجود در این دسته همگی از والدین اولیه مشترک (اینیا و کرج۱)تولید شده اند.لاینهای دابلد هاپلوییدِ موجود در این دسته درمکان ژنی Glu-A1 دارای زیر واحد NUL و درمکان ژنی Glu-B1 دارای زیر واحد ۱۸+۱۷ ودرمکان ژنی Glu-D1 دارای زیر واحد ۱۲+۲ بادرجه کلی کیفی اجزاء گلوتنین برابر ۶ می باشند که این درجه‌از درجه کیفی والد کرج۱ (برابر۷) و همچنین هیبرید F1 حاصل از تلاقی کرج۱ × اینیا (برابر۱۰) کمتر است. در مکانهای ژنی Glu-B1 و Glu-D1 لاینهای دابلدهاپلوییدِ این دسته نیز زیر واحد های دور از انتظاری درهر دو مکان ژنی مشاهده می شود (جداول ۱و۲).

- دستهٔ چهارم شامل مجموعهٔ لاین‌های شمارهٔ ۵۳ ، ۵۴ ، ۳، ۴۷، ۵۰ و ۱۲ می باشد. لاینهای دابلدهاپلوییدِ موجود در این دسته همگی

والدین اولیه مشترک (اینیا و کرج۱)تولید شده اند.لاینهای بلدهاپلوئید موجود در این دسته درمکان ژنی Glu-A1 دارای زیر احد NUL و درمکان ژنی Glu-B1 دارای زیر واحد ۹+۷ درمکان ژنی Glu-D1 دارای زیر واحد ۱۲+۲ بادرجه کلی کیفی جزاء گلوتنین برابر ۵ می باشند که این درجه‌از درجه کیفی والد کرج ۱ (برابر۷) و همچنین هیبرید F1 حاصل از تلاقی کرج ۱ × اینیا (برابر ۱۰) کمتر است. در مکان ژنی Glu-D1 لاینهای دابلدهاپلوئیداین دسته نیز زیر واحد دور از انتظاری مشاهده می‌شود (جدولهای ۱و۲).

- دستهٔ پنجم شامل مجموعهٔ لاین‌های شمارهٔ ۳۰، ۵۱، ۱۴، ۳۹، ۴۳، ۴۴، ۷، ۳۳، ۳۷، ۸ و ۹ می باشد . والدین اولیه لاینهای دابلدهاپلوئید موجود در این دسته یکسان نمی باشند بطوری که



شکل شماره ۱- دندوگرام تجزیه کلاستر لاینهای دابلدهاپلوئیدگندم.

لاینهای شماره ۳۰ ، ۵۱ ، ۳۹ ، ۴۴ ، ۳۳ و ۳۷ حاصل تلاقی ارقام‌نوید و بزوستایا و لاینهای شماره ۱۴ ، ۴۳ ، ۷ ، ۸ و ۹ حاصل تلاقی ارقام اینیا و کرج ۱ می باشند .بطور کلی لاین‌های دابلد هاپلویید موجود در این دسته به جز لاین شمارهٔ ۴۳ درمکانهای ژنی Glu-A1 با زیر واحد ۱ و Glu-D1با زیر واحد ۱۰+۵ مشترک می باشند .در مکانهای ژنی Glu-B1,Glu-A1 وGlu-D1 لاینهای دابلدهاپلویید این دسته نیز زیر واحد های دور از انتظاری درهر سه مکان ژنی مشاهده می شود (جداول ۱و۲).

- دستهٔ ششم شامل مجموعهٔ لاین‌های شمارهٔ ۱۱ ، ۵۸ ، ۵۸ ، ۵۲ ، ۵۵ و ۱۰ می باشد . لاینهای دابلدهاپلویید موجود در این دسته همگی از والدین اولیه مشترک (نوید وبزوستایا)تولید شده اند. لاینهای دابلد هاپلویید موجود در این دسته همگی در مکان ژنی Glu-A1 با زیر واحد *۲ مشترک می باشند .در مکانهای ژنی Glu-B1 وGlu-D1 لاینهای دابلدهاپلویید این دسته نیز زیر واحد های دور از انتظاری درهر دو مکان ژنی مشاهده می شود (جداول ۱و۲). برخی از لاینهای دابلد هاپلویید موجود در این دسته دارای درجه کیفی کلی اجزاء گلوتنین برابر ۱۰ می باشند که از درجه کیفی کلی اجزاءگلوتنین رقم نوید (برابر۸) و رقم بزستایا (برابر ۹) وهمچنین هیبرد F1 حاصل از تلاقی بزستایا×نوید (برابر ۹) بیشتر می‌باشد.

- دستهٔ هفتم شامل مجموعهٔ لاین‌های شمارهٔ ۳۱ ، ۴۱ ، ۱۷ ، ۲۰ ، ۲۷ ، ۲۸ و ۱۳ می‌باشد. والدین اولیه لاینهای دابلدهاپلویید موجود در این دسته یکسان نمی‌باشند بطوری که لاینهای شماره ۴۱ ، ۲۷ و ۲۸ حاصل تلاقی ارقام نوید و بزوستایاو لاینهای شماره ۳۱ ، ۱۷ ، ۲۰ و ۱۳ حاصل تلاقی ارقام اینیاو کرج ۱ می باشند .لاینهای دابلد هاپلویید موجود در این مجموعه همگی درمکان ژنی Glu-A1 با زیر واحد NUL و در مکان ژنی Glu-D1 با زیر واحد ۱۰+۵ مشترک می باشند. درجه کلی کیفی اجزاء گلوتنین در این دسته در تمام لاینهایکسان و برابر ۸ می‌باشد.

با توجه به شکل شماره ۱ مشاهده می‌شود که لاین‌های دابلدهاپلویید ابتدا به دو دستهٔ کلی تقسیم‌بندی می‌شوند. که دستهٔ اول شامل نتایج حاصل از تلاقی (کرج ۱ × اینیا) و دستهٔ دوم شامل نتاج حاصل از تلاقی(بزوستایا × نوید) می‌باشند. همان‌گونه که در شکل ۱ مشاهده می‌شود میزان تنوع در بین لاین‌های حاصل از تلاقی (بزوستایا × نوید) بیشتراز لاین‌های حاصل از تلاقی (کرج ۱×اینیا) می‌باشد.با توجه به وجود تفاوت بالا بین دسته‌های اول و هفتم، چنانچه تلاقی‌های بین دو دستهٔ فوق صورت گیرد احتمال مشاهدهٔ تنوع بین نتاج حاصله وجود خواهد داشت که می‌توان از آن بهره‌برداری کرد.همان‌گونه که در شکل (۱) مشاهده می‌شود با وجود اینکه برخی از لاین‌های دابلدهاپلویید مورد مطالعه مثلا" لاین‌های شمارهٔ ۷، ۸، ۹، ۱۳، ۱۴، ۱۷، ۲۰ و ۳۰ از نتاج F1 تلاقی (کرج 1 × اینیا) منشاء گرفته‌اند ولی ازنظر دسته بندی در دستهٔ تلاقی‌های (بزوستایا×نوید) قرار دارند. احتمال دارد این مورد به علت وجود نوترکیبی در ژن‌های کدکنندهٔ مکان‌های ژنی مربوطه باشد.

بطور کلی با توجه به نتایج بدست آمده در این تحقیق وسایر تحقیقات انجام شده در زمینه تولید و ارزیابی لاینهای دابلدهاپلویید گندم میتوان نتیجه گرفت که تلفیق تکنیک هاپلوییدی با روشهای اولیه ارزیابی آزمایشگاهی می‌تواند موجب کاهش هرچه بیشتر زمان وافزایش دقت درامر تولید ومعرفی ارقام زراعی گندم گردد.

سپاسگزاری

بدینوسیله از زحمات آقایان دکتر محمد رضا قنادها، دکتر محمد صادق نجفی ،دکتر سیروس عبدمیشانی،مهندس قنبر توحیدفر ،مهندس بابک بهنام، خانم نادیا بقایی وکلیه عزیزانی که در انجام این تحقیق مارا یاری نموده اند صمیمانه تشکر وقدردانی می نمائیم .

مراجع مورد استفاده

REFERENCES

۱. بختیار، ف. ر. بزرگی پور، و ک. نظری. ۱۳۷۷. استفاده ازروش به نژادی هاپلوئیدی درگندم به منظور ایجادارقام پرمحصول ومقاوم به زنگ زرد.پنجمین کنگره زراعت واصلاح نباتات ایران .کرج مؤسسه تحقیقات‌اصلاح وتهیه نهال و بذر.۱۳- ۹ شهریور(۱۳۷۷).

۲. بزرگی پور، ر. ۱۳۷۳. استفاده از روش هاپلوئیدی درغلات سومین کنگره علوم زراعت واصلاح نباتات ایران.

۳. عبدمیشانی ، س. و ع. شاه نجات بوشهری. ۱۳۷۰. اصلاح نباتات تکمیلی جلددوم.مرکز نشردانشگاهی تهران.

۴. غلات درآینه آمار ۱۳۷۶. اداره کل آماروااطلاعات. تهران ـ وزارت کشاورزی ، معاونت برنامه ریزی وبودجه .
۵. کریمی ،ه. ۱۳۷۱. گندم. مرکزنشر دانشگاهی تهران.
6.Bedo, Z.,I.Karsai,G.Vida,L.Lang,1992.Bread making quality of doubeld haploid lines derived from wheat anther culture . Jornal of Genetic and Breeding .46:3,263-267:9ref.
7.Felix, I. J.,P. Martinant, M. Bernard, S. Bernard, G. Branlard, 1996. Genetic Chracterization of storage proteins in set of F1-derived haploid lines in bread wheat. Theoretical and Applied Genetics.92:3-4,340-346:50 ref.
8. Greene, F. C., Anderson, O. D, Yip, R. D, Halford, N. G, Malpica romero, J. M and Shewry, P. R , 1988. In:proceedings of the 7th international wheat genetic symposium.IPSR.Cambridge PP735-740.
9. Jain, S. M., S. K. Sopory and R. E. Veilleux(eds),In vitro Haploid Production In Higher Plants,Vol.1,11-33.
10. Lawrance, G. J., H. J. Moss, K. W. Shepherd and C. W. Wrigley, 1987. Dough quality of biotypes of eleven australian wheat cultivars that differ in high molecular weight glutenin subunit composition.J.of Cereal Sci.6:99-101.
11. Lawrance, G. J., F. Macritchie and C. W. Wrigley, 1988. Dough and baking quality of wheat lines deficient in glutenin subunits cotrolled by the Glu-A1,Glu-B1,Glu-D1 loci.J.of Cereal Sci,7:109-112.
12. Mansur, L. M., C. O. Qalset, D. D. Kasarda and R.Morris, 1990. Effect of cheynne chromosomes on milling and baking quality of chines spring wheat in relation to gliadin and glutenin storage proteins.Crop Sci.30:593-602.
13. Miller, T. E, 1987. Systematic and Evaluation in wheat Breeding its scientific Basis,ed.Lupton F.G.H .
14. Morgonov, A. I., R. J. Pena, A. J. Cross and Ragarams , 1993. World wide distribution of Glu-1 alleles inbread wheat.J.Genet and Breed 47:53-60.
15. Mosleth, E., and A. K. Uhlen,1990. Associations between the composition of gliadins and HMW glutenin subunits and the gluten quality in wheat.PP 112-127 In:Gluten protein.W.Bushuk and R .Tkachuk ,(eds) .1991 .AACC .St .Paul .MN .USA.
16. Payne, P. I.,1984. Philos.Trans.R.soc.London,ser.B 304:359-371.
17. Payne, P. I., and G. J. Lawrance,1983. Catalogue of alleles for the complex gen loci.Glu-B1 and Glu-D1 which code for hight molecular weight subunits of hexaploid wheat.Cereal research communication.11(1):29-35.
18. Payne, P. I., K. J. Corfield, and J. A. Blackman, 1979. Identification a high molecular weight subunit of glutenin whose presence correlation with bread making quality in wheats of related pedigree.TAG.55:153-157.
19. Pogna, N., D. Lafiandra, P. Fellet, J. C. Autran ,1988. Evidence for a direct causual effect of low molecular weight subunits of glutenin on viscoelasticity in durum wheat.J.Cereal Sci.7:211-214.
20. Rogers, W. J., P. I. Payne, and K. Harinder,1989. The HMW glutenin subunit and gliadin composition of German-grown wheat varieties and their relationship with bread making quality.Plant breeding.103:89-100.
21. Shewry, P. R., N. G. Halford, and A. S. Tatham,1992. High molecular weight subunits of wheat glutnin.Critical Review Article.J.cereal Sic.15:105-120.

Investigation of Bread Making Quality in Doubled Haploid Lines of Wheat by the use of Electrophoresis Method of Seed Storage Proteins

F. BAKHTIAR AND R. BOZORGIPOUR

Cereal Department and Genetic Department of seed and plant Improvement Institute, Karaj, Iran.

Accepted July, 26 2000

SUMMARY

In this study,in order to develop doubled haploid lines of wheat, a chromosome elimination method involving crosses between wheat and maize was employed. The plant materials used were F1 seeds of wheat from crosses between Navid×Bezostaya (NB) and Inia×Karaj1 (IK) along with four Maize genotypes; H1=SKC 108, H3=KSC 301, H7=CS 704 and sinika 60. Finally 60 lines of wheat doubled haploid were obtained . In order to investigate the quality of seed storage proteins, 47 doubled haploid lines of wheat , parents, F1 seed's and chinese spring and Markuis varieties were studied using electrophoretic analysis. In order to seperate the glutenin subunit's SDS-PAGE method with 10% gel(W/V) was used. The total of 11 subunits in three gene locations were observed .Null subunit with 75.4 present and 6+8 subunit with 4.3 present had the highest and the lowest frequencies respectively. In the lines studied, several unespected gene locations were also observed.Finaly lines under investigation were graded for glutenin quality fractions . A number of doubled haploid lines had better quality grades compared to the parents and F1 seeds.

Key words: Bread making quality, Double haploid, Electro phoresis, Chromosome elimination