شناسایی، طبقه بندی و بررسی ارزش نانوایی گندمهای ایران با استفاده از الکتروفورز پروتئینهای ذخیره‌ای اندوسپرم (گلوتنین)[1]

علی مسعودی نژاد، بهمن یزدی صمدی، سیروس عبد میشانی،
محمد نبی سربلوکی و معصومه فیروزی
دانشجوی سابق کارشناسی ارشد ،اساتید دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران و
اساتید مرکز تحقیقات بیوشیمی - بیوفیزیک

تاریخ پذیرش مقاله ۷۶/۶/۲۶

خلاصه

رابطه بین آللهای زیر واحدهای گلوتنین با وزن مولکولی بالا (HMW-GS) و ارزش نانوایی در ۸۱ رقم از گندمهای ایرانی و خارجی با استفاده از روش SDS-PAGE مورد مطالعه قرار گرفت. در مکان ژنی GLU-A1 زیرواحدهای ۱ و *۲ که آللهای خوبی برای کیفیت هستند در ۳۱ درصد ارقام دیده شدند. در مکان ژنی GLU-D1 زیرواحدهای ۱۰ + ۵ که آللهای بسیار مطلوبی برای کیفیت و ارزش نانوایی هستند و زیرواحدهای ۱۲ + ۴، ۱۲ + ۳ و ۱۲ + ۲ که در مقایسه با زیرواحدهای اخیر آللهای نامطلوبی برای کیفیت نانوایی به شمار می‌روند به ترتیب در ۳۰٪ و ۷۰٪ ارقام وجود داشتند. امتیاز ارزش نانوایی ارقام با توجه به زیرواحدهای گلوتنین با وزن مولکولی بالا (HMW-GS) و طبقه بندی پاین[2] مشخص گردید. در این مطالعه ۹٪ ارقام دارای کیفیت خوب (امتیاز ۱۰) و ۵۱٪ ارقام دارای کیفیت نانوایی ضعیف (امتیاز ۷ - ۴) بودند. زیرواحدهای جدیدی نیز در ۳ رقم گندم ایرانی مشاهده گردیدند که با ژنوتیپ *۱۰ + **۲ نامگذاری شدند.

واژه‌های کلیدی: گندم، گلوتنین، پروتئینهای ذخیره‌ای، ارزش نانوایی، الکتروفورز

مقدمه

با توجه به تنوع موجود بین ارقام که خود ناشی از ساختار ژنوتیپی و فنوتیپی می‌باشد، روشهای مختلفی جهت شناسایی و طبقه بندی محصولات زراعی بکار می‌روند (۶). در روشهای سنتی معمولا" ارقام بر اساس خصوصیات مرفولوژیکی و فیزیولوژیکی شناسایی و طبقه بندی می‌گردند (۳۴، ۶ و ۸) که اصطلاحا" روش تاکسونومیکی گفته می‌شود. اگر چه روشهای فوق نقش مهمی در طبقه بندی گیاهان داشته‌اند ولی از آنجایی که خصوصیات مورد بررسی اغلب توسط تعداد زیادی ژن کنترل می‌شوند[3] و از طرفی به شدت تحت تأثیر شرایط محیطی قرار می‌گیرند (۸) بتدریج اهمیت خود را از دست داده و جای خود را به روشهای بیوشیمیایی نظیر الکتروفورز[4] و کروماتوگرافی[5] که ساده، سریع و دقیق‌تر هستند و کمتر تحت تأثیر شرایط محیطی قرار می‌گیرند، داده‌اند.

موفقیت الکتروفورز در شناسایی و تشخیص ارقام به این خاطر است که پروتئینهای تفکیک شده توسط آن اولین محصول فعالیت ژنها هستند (۳۳)، لذا از آنها می‌توان بعنوان نشانگرهایی[6] برای ژنهای ساختمانی[7] که آنها را کد کرده‌اند استفاده نمود. از

1 - Glutenin
2 - Payne
3 - Polygenic characters
4 - Electrophoresis
5 - HPLC
6 - Markers
7 - Structural genes

آنجایی که ژنهای ساختمانی جزئی از سیستم ژنتیکی موجود هستند بنابراین می‌توان از مارکرهای پروتئینی جهت نشاندار کردن[1] این سیستم استفاده نمود که هر چه تعداد نشانگرهای پروتئینی بیشتر باشند می‌توان بخش بیشتری از ژنوم موجود را تحت پوشش قرار داد. معمولا" در شناسایی و مقایسه ارقام توسط الکتروفورز تکیه بر روی ترکیبات پروتئینی و آنزیمی در بذرها و دیگر بافتهای گیاهی است.

پروتئین‌های بذر متنوع می‌باشند ولی در میان آنها پروتئین‌های ذخیره‌ای[2] از اهمیت بیشتری برخوردار هستند زیرا تقریبا" در تمامی جنس‌ها و گونه‌های گیاهی از خود چند شکلی[3] قابل توجهی نشان می‌دهند (۶). همچنین توسط چندین ژن کنترل می‌شوند و مقدارشان در بافت مورد نظر به میزان کافی بوده و استخراج آنها نیز به راحتی صورت می‌پذیرد. در حال حاضر از روش الکتروفورز پروتئین‌های ذخیره‌ای بطور گسترده‌ای در جهت تشخیص و شناسایی ارقام گندم استفاده می‌شود (۳۴، ۲۹، ۱ و ۹). پروتئین‌های گندم بر اساس نظریه آسبورن (۲۴) به چهار دسته زیر تقسیم بندی می‌شوند:

۱ - آلبومین[4] (محلول در آب)

۲ - گلوبولین[5] (محلول در محلول نمک طعام)

۳ - گلیادین[6] (محلول در الکل)

۴ - گلوتنین[7] (محلول در محلول‌های قلیایی یا اسیدی)

دو نوع اخیر که مهمتر از بقیه هستند (۱۰) مجموعا" گلوتن نامیده می‌شوند. گلوتن[8] ترکیب پیچیده‌ای مرکب از پلیمرهای گلوتنین و منومرهای گلیادین می‌باشد (۱۱). گلیادین شامل زنجیره‌های منفرد پلی پپتیدی است ولی گلوتنین پلیمری پیچیده بوده که شامل پلی پپتیدهای با وزن مولکولی بالا[9] و وزن مولکولی پایین[10] بوده که توسط پیوندهای دی سولفیدی جانبی به همدیگر متصل هستند (۱۱ و ۳). گلوتنین مهمترین عامل تعیین کننده ساختمان فیزیکی - شیمیایی خمیر گندم می‌باشد. تنوع بین زیرواحدهای[11] گلوتنین در گندمهای مختلف زیاد بوده و از همین تنوع جهت شناسایی ارقام مختلف استفاده می‌گردد (۱۱).

محققین زیادی رابطه بین تنوع آللی در ژنهای کد کننده زیرواحدهای گلوتنین و کیفیت در گندم را بررسی نموده‌اند (۲۰، ۲۵، ۲۶ و ۲۷). قویترین همبستگی بین ترکیبات پروتئینی جدا شده توسط الکتروفورز و ارزش نانوایی مربوط به زیرواحدهای با وزن مولکولی بالای گلوتنین (HMW - GS) است که مفصل‌ترین مطالعه در این زمینه توسط پاین (۲۵) انجام گرفته که در آن اثرات تک تک زیرواحدهای مزبور بر روی ارزش نانوایی بررسی شده است و بعد از آن محققین دیگری نیز کارهای او را تکرار و نتایج بدست آمده را تأیید کرده‌اند (۴، ۵ و ۲۱).

زیرواحدهای با وزن مولکولی بالای گلوتنین حاصل از تظاهر ژنهای موجود در بازوی بلند کروموزمهای گروه یک هستند که به صورتهای (GluA1, GluB1, GluD1) نشان داده می‌شوند (۲۶). هر مکان ژنی دارای دو ژن به هم چسبیده و بسیار نزدیک است. در گندم نان[12] در مکان ژنی GluA1 دو ژن و یا یکی از آنها غیر فعال می‌باشند (۲۶). بنابراین در یک رقم خالص از گندم در تصویر حاصل از الکتروفورز معمولا" چهار یا پنج باند (زیرواحد) دیده می‌شود. با مطالعات مفصلی که توسط پاین (۲۷) انجام گرفت نامبرده کاتالوگی که در آن ترکیب انواع باندهایی را که به صورتهای مختلف یافت می‌شوند ارائه داد. در الکتروفورز پروتئینهای گندمهای ناشناخته اگر باندهایی دیده شدند که در کاتالوگ مزبور نباشند بصورت اختیاری نامگذاری می‌شوند.

همبستگی و تأثیر هر کدام از باندهای (آلل‌ها) مربوط به ارزش نانوایی توسط محققین بسیاری مطالعه شده و جامع‌تر از همه جدول ۱ است (۲۷). که در آن ارزش معادل هر کدام از آلل‌ها با ارزش نانوایی امتیاز بندی ارائه شده است.

مواد و روشها

مواد آزمایشی: تعدادی از گندمهای ایرانی و خارجی برای مطالعه انتخاب شدند (جدول ۲).

محلولها و مواد شیمیایی: Acrylamide, N, N-Methyenebisacrylamide (BIS), Coomassie Brilliant Blue, R-250 ,Tris, Glycine, 2-Mercaptoethanol, Tri Cholroacetic Acid

1 - Labeling 2 - Storge protein 3 - Polymorphism 4 - Albwmin 5 - Globulin

6 - Gliadin 7 - Glutenin 8 - Gluten 9 - High molecular weight- glutenin subunits

10- Low molecular weight -glutenin subunits 11- subunits 12- Triticum aestivum

(TCA), Sodium Dodecyle Sulfate (SDS), TEMED, Amonium Persulfate (AP). همه مواد از شرکت سیگما (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA) تهیه شدند، از آب مقطر (یکبار تقطیر) استفاده شد.

الکتروفورز پروتئینها: برای الکتروفورز پروتئینها از تکنیک SDS - PAGE[1] به روش لاملی (۱۷) با تغییراتی به شرح زیر استفاده شد.

محلولهای پایه[2]:

الف:محلول اکریلامید: ابتدا مقدار ۳۲ گرم از Acrylamide و ۴۰۷ میلی‌گرم از BIS را وزن کرده داخل یک بشر (در حدود 250 ml) ریخته و مقدار ۱۸۱ میلی‌لیتر آب مقطر روی آن ریخته سپس بشر و محتویات آنرا به همراه یک آهن ربا[3] بر روی یک همزن مغناطیسی[4] گذاشته دستگاه را روشن می‌کنیم تا مایع شفافی به دست آید، سپس محلول حاصل در ظرفی با برچسبی حاوی نام محلول، تاریخ تهیه و نام آزمایشگر می‌ریزیم و در یخچال در درجه حرارت ۴ درجه سانتی گراد نگهداری می‌کنیم. این محلول را می‌توان در حدود یک ماه بدون هیچگونه تأثیری در دقت آزمایش در یخچال نگهداری کرد (بر اساس تجربیات نگارنده نگهداری در حدود ۶ ماه هم تأثیری بر روی دقت آزمایش نگذاشت).

ب: بافر تریس (pH = ۸/۸): بافر تریس با pH = ۸/۸ جهت استفاده در ژل زیرین[5] می‌باشد. جهت درست کردن آن ابتدا ۱۲۱ گرم از تریس Tris را وزن کرده در یک بشر (1000 ml) ریخته و سپس در حدود ۵۰۰ میلی لیتر آب مقطر روی آن ریخته به همراه یک آهن ربا روی همزن مغناطیسی گذاشته تا خوب حل شود سپس در همان حال الکترود pH متر را در داخل محلول گذاشته و pH را می‌خوانیم. حال باید آنقدر اسید کلریدریک (با پیپت پاستور یا با یک قطره چکان) به محلولی که در حال به هم خوردن است اضافه کنیم تا pH آن مساوی ۸/۸ شود. سپس حجم نهایی را با اضافه کردن آب مقطر به ۶۰۰ میلی لیتر می‌رسانیم (در اینجا باید توجه داشت که اگر از اسید با نرمالیته پایین استفاده کنیم ابتدا آب کمتری اضافه کنیم مثلا" ۳۰۰ میلی لیتر و پس از تنظیم PH آن را به حجم نهایی ۶۰۰ میلی لیتر برسانیم). پس از تنظیم pH و رساندن به حجم نهایی، محلول حاصله را صاف کرده و در ظرف حاوی برچسب با مشخصات ذکر شده می‌ریزیم و سپس در یخچال نگهداری می‌کنیم.

ج: بافر تریس (pH = ۶/۸): نحوهٔ تهیه این بافر که جهت استفاده در محلول استخراج پروتئین (3X)[6] ژل بالایی[7] است دقیقا" مثل محلول ب است با این تفاوت که در اینجا pH را به ۶/۸ می‌رسانیم.

د: محلول آمونیوم پرسولفات (AP): مقدار ۰/۵ گرم AP را برداشته در یک لوله آزمایش ریخته ومیزان ۱۰ میلی لیتر آب مقطر روی آن می‌ریزیم و خوب به هم می‌زنیم (این محلول را هر بار که می‌خواهیم آزمایش انجام دهیم تازه تهیه می‌نماییم).

هـ: محلول SDS ۱۰%: مقدار ۱۰ گرم از SDS برداشته و در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر ریخته خوب به هم زده پس از اینکه محلول شفافی به دست آمد آنرا فیلتر کرده و در حرارت اتاق نگهداری می‌کنیم.

و: بافر الکترود (3X): برای درست کردن محلول بافر الکترود ابتدا مقادیر زیر را خوب در آب حل کرده و حجم آن را به ۵ لیتر می‌رسانیم (۷۵/۵g, Tris ۱۵/۷۵g, SDS ۵/۲۵g Glycine) (از بافر الکترود درست شده به این صورت حداکثر می‌توان ۴ بار استفاده نمود).

ز: بافر استخراج پروتئین (3X): بافر استخراج پروتئین که باز هم با غلظت ۳ برابر درست می‌شود به صورت زیر تهیه می‌شود: ۳۷/۵ میلی لیتر از بافر تریس (pH = ۶/۸)، ۱۲ گرم SDS و ۵۰ میلی لیتر کوماسی بلو R - 250 برداشته و به آنها حدود ۷۲ میلی لیتر آب مقطر اضافه کرده خوب به هم می‌زنیم تا محلول شفافی به دست آید سپس به آن ۶۰ میلی لیتر گلیسرول اضافه کرده و در حرارت اتاق نگهداری می‌کنیم (بجای رنگ کوماسی بلو از برموفنوبلو نیز می‌توان استفاده نمود).

ح: محلول رنگ آمیزی: برای درست کردن محلول رنگ آمیزی به طریقه زیر عمل می‌کنیم: ابتدا مقدار ۳ گرم از رنگ کوماسی بلو R - 250 رابرداشته و در یک ارلن ۲/۵ لیتری ریخته (دقت شود ذرات بسیار ریز رنگ به اطراف پراکنده نشود) و سپس

1 - Sodium dodecyl sulfate- poly acrylamide gel electrophoresis
2 - Stock solutions
3 - Magnet
4 - magnetic stirrer
5 - Separating gel
6- extraction buffer
7 - Stacking gel

مقدار ۲ لیتر اتانول روی آن ریخته به همراه یک همزن به مدت ۱۸ - ۱۲ ساعت روی همزن مغناطیسی گذاشته تا خوب حل شود، سپس آن را از کاغذ صافی عبور می‌دهیم (برای جلوگیری از جذب بیش از اندازه رنگ توسط کاغذ صافی ابتدا آن را با آب مقطر خیس می‌نماییم): سپس مقدار ۴۸۰ گرم از TCA را برداشته و در ۱۰۰۰ میلی لیتر آب مقطر خوب حل می‌کنیم (دقت شود ماده TCA بسیار سمی و خورنده بوده و نباید روی پوست بدن یا لباسها بریزد). سپس مقدار ۷۰۰ میلی لیتر از اسید استیک خالص برمی‌داریم. بعد از درست کردن محلول‌های فوق همه آنها (محلول رنگ + محلول TCA + اسید استیک) را در یک ظرف (در حدود ۱۰ لیتر) ریخته و با آب مقطر حجم نهایی را به ۸ لیتر می‌رسانیم (می‌توان با رعایت نسبت‌های فوق مقدار کمتری رنگ درست کرد ولی ترجیحا" رنگ را یکبار و به مقدار زیاد درست می‌کنند).

ط: **محلول رنگ بر:** برای درست کردن محلول رنگ بر مقدار ۶۰۰ گرم TCA را در ۶ لیتر آب مقطر حل می‌نماییم.

استخراج پروتئینها: برای استخراج پروتئینها به مقدار مورد نیاز محلول عصاره‌گیر درست می‌کنیم. برای تهیه محلول عصاره‌گیر محلول‌های زیر را با هم مخلوط می‌کنیم: ۸ میلی لیتر آب مقطر، ۳/۴ میلی لیتر محلول ز، ۰/۶ میلی لیتر ۲ - مرکاپتواتانول (حجم محلول نهایی فوق ۱۲ میلی لیتر است، برای مقادیر بیشتر باید نسبتهای بالا رعایت شود). حال برای استخراج پروتئین ابتدا از هر رقم حدود ۴ بذر را گرفته با اسکالپل یا چاقوی مخصوص جنین‌ها را جدا کرده و دور انداخته و سپس آندوسپرم‌های باقی مانده را با هاون چینی خوب آرد می‌کنیم. سپس مقدار ۳۰ میلی گرم از آرد را وزن کرده و در داخل یک لوله آزمایش کوچک[1] ریخته و سپس مقدار ۳۰۰ میکرو لیتر از عصاره گیر را روی آن می‌ریزیم (۱۰ میلی لیتر بافر استخراج /یک میلی گرم نمونه). حال به مدت یک ساعت به دفعات مکرر محتویات لوله آزمایش را به هم می‌زنیم (با همزن "Vortex" و یا با یک میله باریک آهنی). دقت شود که هر بار که میله آهنی داخل یکی از محلول‌ها می‌شود قبل از وارد کردن آن به داخل محلول دیگر آن را خوب با آب مقطر شسته تا عصاره نمونه‌ها مخلوط نشوند. سپس نمونه‌ها به مدت ۱۲ ساعت به همین صورت در حرارت اتاق گذاشته شده و بعد آنها را در درجه حرارت ۴ درجه سانتی‌گراد و ۱۰۰۰۰ دور سانتریفوژ می‌کنیم (در درجه حرارت اتاق نیز می‌توان سانتریفوژ نمود ولی با دور کمتر در حدود ۳۰۰۰ دور). پس از آن محلول شفاف داخل لوله را با سرنگ کوچک (سرنگ انسولین مناسب است) طوری که محلول به هم نخورد و با رسوب ته لوله مخلوط نشود، برداشته و با حفظ مشخصات داخل لوله‌های تمیز دیگر و یا شیشه‌های کوچک (1ml) می‌ریزیم و تا قبل از انجام آزمایش در یخچال در ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌کنیم. برای استخراج پروتئین از تک بذر ابتدا جنین را جدا کرده، آندوسپرم را لای کاغذ (ترجیحا" کاغذ روغنی) پیچیده با انبردست بخوبی له کرده و داخل لوله ریخته و مثل قبل حدود ۳۰۰ μl عصاره‌گیر می‌ریزیم.

الکتروفورز: از دستگاه PROTEAN II xi SLABGEL (شرکت BIO - RAD) استفاده شد. ابعاد ژل ۱۶۰×۲۰۰×۱/۵ میلی متر غلظت ژل زیرین ۱۰% و غلظت ژل رویی ۴% بود. برای درست کردن ژلها به طریقه زیر عمل شد:

ژل زیرین (۱۰%): مقدار ۳۸ میلی لیتر از محلول الف و ۲۵ میلی لیتر از محلول ب را داخل یک ارلن مایر ریخته در آن را با پوشش پلاستیکی بسته و به مدت ۵ دقیقه هواگیری کرده (برای خارج شدن اکسیژن در محیط چون اکسیژن مانع پلی مریزه شدن ژل می‌گردد). بعد از هواگیری[2] به ترتیب از محلول‌های هـ، د، TEMED به مقدار ۰/۷ و ۱/۶ میلی‌لیتر و ۳۰ میکرولیتر به محلول داخل ارلن اضافه کرده بدون اینکه حبابی ایجاد شود ارلن را کمی چرخانده تا مواد بخوبی مخلوط گردند. سپس مایع داخل ارلن را در یک بشر تمیز ریخته و نصف محلول را به آرامی توسط یک سرنگ یا پیپت در داخل یکی از شیشه‌ها[3] ریخته به طوری که حبابی ایجاد نگردد، نصف دیگر را نیز داخل شیشه دوم ریخته (ارتفاع ۱۲ سانتی‌متر) و سپس سریعا" با سرنگ روی مایع داخل شیشه‌ها کمی ایزوبوتانل اشباع شده با آب می‌ریزیم (این کار برای این است که سطح ژل زیرین صاف باشد) بعد از حدود ۴۵ - ۳۰ دقیقه که ژل بسته شد (سه فاز دیده می‌شود که به ترتیب از بالا به پایین عبارتند از: الکل، آب و ژل) آب و ایزوبوتانل بالای ژل را خارج کرده، چند بار با آب مقطر داخل شیشه را شسته و سپس با کاغذ صافی خشک می‌کنیم (دقت شود که سطح ژل خراب نشود).

ژل رویی (۴%): ابتدا مقدار ۵/۵ میلی لیتر از محلول الف،

1 - ependorf tube
2 - degasing
3- slabs

۲/۶ میلی لیتر از محلول ج باضافه ۱۵ میلی لیتر آب مقطر را دوباره در داخل ارلن مایر ریخته، به مدت سه دقیقه هواگیری و سپس به ترتیب محلول‌های هـ، د، TEMED را به میزان ۰/۲ و ۱/٤ میلی لیتر و ۲۰ میکرو لیتر به آن اضافه کرده و به آرامی هم می‌زنیم و دوباره به آرامی به داخل شیشه‌ها (جای خالی بالای ژل زیرین) ریخته بطوریکه حبابی ایجاد نشود. سپس شانه‌ها را به صورت مورب داخل شیشه‌ها کرده بطوریکه بین انتهای شانه‌ها و محلول حباب ایجاد نشود. پس از مدت ۴۵ - ۳۰ دقیقه که ژل رویی نیز بسته شد شانه‌ها را به آرامی بیرون آورده با یک سرنگ با نوک پلاستیکی باریک با استفاده از بافر الکترود داخل شیارهای ایجاد شده را چند بار شستشو می‌دهیم تا مواد پلی مریزه نشده خارج گردد، و سپس آنها را با همین محلول پر می‌کنیم.

تزریق نمونه‌های پروتئینی[1]: برای تزریق نمونه‌ها با استفاده از سرنگ هامیلتون یا میکروپیپت از عصاره‌های ارقام هر کدام به میزان ۱۰ میکرولیتر گرفته و به ترتیب با ثبت مشخصات داخل شیارها ریختیم (عصاره به صورت نوار باریک و آبی رنگی در ته شیار ته نشین می‌گردد). پس از تزریق تمام نمونه‌ها (به تعداد شیارها) شیشه‌ها را بر روی دستگاه سوار کردیم. در اینجا از واریته‌های آنزا[2] (N, 7+8, 2+12) و یوکورا[3] (1, 17+18, 5+10) بعنوان استاندارد استفاده شد. در روی هر ژل شیارهای اولی و آخری با آنزا و شیار وسطی با یوکورا تزریق شد. سپس تانک بالا و پایین را پر از بافر الکترود نموده (باید توجه نمود بین انتهای شیشه در داخل تانک پایینی حبابی پیدا نشود در غیر اینصورت با چند بار بالا و پایین کردن شیشه‌ها حبابها را خارج می‌کنیم) به دستگاه منبع تغذیه وصل و روی شدت جریان ثابت ۳۰ میلی آمپر برای هر ژل (برای دو ژل ٦۰ میلی آمپر) تنظیم نمودیم. سپس ولتاژ و شدت جریان در لحظه شروع یادداشت گردید، پس از حدود ۸ ساعت که رنگ نشانه به حدود ۰/۵ سانتی‌متری انتهای ژل رسید سه فاکتور فوق را دوباره یادداشت و دستگاه خاموش گردید (در الکتروفورز SDS - PAGE باید توجه نمود که قطب منفی به تانک بالا وصل گردد و قطب مثبت به تانک پایین، چون با افزودن SDS بار تمام پروتئین‌ها منفی می‌گردد و پروتئینها بر اساس تفاوت در وزن مولکولی جدا می‌شوند). سپس ژلها را از داخل شیشه‌ها به آرامی بیرون آورده داخل ظروف شیشه‌ای دارای مقدار کافی رنگ گذاشته شد (معمولا" ۴۰۰ میلی‌لیتر برای دو ژل در یک ظرف). پس از آن ظروف بر روی یک همزن[4] با دور آهسته به مدت دو روز گذاشته شد. بعد از دو روز محلول رنگ را داخل ظروف ریخته، ژلها را چند بار با آب مقطر شسته و بر روی آنها به مقدار کافی محلول رنگبر (۴۰۰ میلی لیتر برای دو ژل داخل یک ظرف، البته بهتر است رنگ آمیزی و رنگبری هر ژل جداگانه داخل یک ظرف همراه با حدود ۲۵۰ میلی‌لیتر محلول قرار داده شود) ریخته دوباره به مدت ۸ ساعت بر روی همزن گذاشته (مدت زمان متغیر است، ژلها آنقدر باید در محلول رنگبر بمانند تا رنگ زمینه حذف و فقط باندها دارای رنگ باشند) و سپس محلول رنگبر را در داخل ظرفی ریخته (از محلول رنگبر می‌توان حداکثر دو بار استفاده کرد) ژلها را چند بار با آب مقطر شسته و برای عکسبرداری آماده نمودیم. برای عکسبرداری ژلها بر روی چراغهای رادیولوژی (شبیه تابلوهای نئون) گذاشته شده به طوری که نور از پایین به آنها برخورد کرده سپس از بالا توسط دوربین‌های لنزدار به کمک لنزهای کلوزآپ[5] عکسبرداری گردید.

نامگذاری باندها و تعیین کیفیت:[6] برای نامگذاری باندها از روش ارائه شده توسط پاین (۲٦ و ۲۷) با مقایسه پروفیلهای نمونه‌ها با ارقام استاندارد (آنزا و یوکورا) و مقایسه با کاتالوگ استفاده شد سپس برای امتیاز بندی کیفیت از جدول ۱ استفاده شد.

نتایج و بحث

اشکال ۱ و ۲ الکتروفورگرام[7] مربوط به بعضی از ارقام مورد مطالعه به همراه نامگذاری باندهای با وزن مولکولی بالای گلوتنین مربوط به مکان ژنی Glu-1 (GluA1, GluB1, GluD1) و امتیاز بندی ارقام برای ارزش نانوایی بر اساس روش پاین (۲٦) را نشان می‌دهد. بعضی باندها در مقایسه با باندهای ارقام استاندارد (Anza, Yecora, Chinese Spring) به راحتی قابل شناسایی هستند ولی بعضی باندها، مخصوصا" آنهایی که دارای وزن مولکولی

1 - Sample loading
2- Anza
3- Yecora rojo
4 - Shaker
5- Close up
6 - Band and Quality Scoring
7 - Electro phore gram

جدول ۱ - تنوعی آللی در مکان ژنی (GLU-1) و امتیاز بندی بر اساس روش پاین (۲۵، ۲۶ و ۲۷)

امتیاز پاین	1D	1B	1A
4	5 + 10		
3		7 + 8, 17 + 18, 13 + 16	1, 2*
2	2 + 12, 3 + 12	7 + 9	
1	4 + 12	7, 6 + 8	Null
2(?)	2 + 10		

نزدیک به هم هستند بخوبی تفکیک نمی‌شوند و تشخیص آنها مشکل است (باندهای 2 ,2*, 5, 9, 10). در بعضی نمونه‌هاباندهای 2 و 2* بخوبی از هم جدا شدند مثل داراب، بیات، کراس بیات، البرز و بلوبوی. در بعضی نمونه‌ها این دو باند بخوبی از هم جدا نشدند مثل "Bew"s و کاوه، ولی در عوض باندهای 2* و 5 در Sara / "Ve"s بخوبی از هم جدا شدند، در اینجور مواقع از لینکاژ بین باندهای 2 و 12 و 5 و 10 استفاده می‌کنیم، بطور مثال اگر در نمونه‌ای در موقعیت باند 2 باندی پهن‌تر از حالت معمولی داریم و باند 12 را نیز داشتیم می‌توانیم با اطمینان بگوییم که در اینجا باندهای 2 و 2* با هم هستند در مورد باند 5 نیز به همین طریق عمل می‌کنیم. وجود باند 10 به همراه باند 5 پهن‌تر از حالت معمولی دلیل بر وجود باند 2* و 5 می‌باشد (۱۸). باندهای 9 و 10 نیز در بعضی نمونه‌ها مثل قفقاز و بلوبوی بخوبی جدا شده و قابل تشخیص هستند و در بعضی نمونه‌ها مانند PR1 و M-70-14 به هم چسبیده بودند. بر اساس تجربیات نگارنده باندهای 2 و 2* در ژلهای ۷ - ۵% و باندهای 9 و 10 در ژلهای ۱۴ - ۱۲% بخوبی از هم جدا می‌شوند (گزارش نشده).

در جدول ۲ ژنوتیپ تمامی ارقام مورد مطالعه همراه با امتیاز پاین آورده شده است و در جدول ۳ فراوانی و درصد آللهای مختلف (HMW - GS) در ارقام مورد مطالعه دیده می‌شود. آللهای 1 و 2* که آللهای مطلوبی به شمار می‌روند (آللهای مربوط به مکان ژنی (GluA) تنها در حدود ۳۷% از گندمها وجود دارند. باندهای 10 + 5 که با ارزش‌ترین آللها از نقطه نظر ارزش نانوایی به شمار می‌روند تنها در حدود ۳۰% از ارقام وجود دارند و در مقابل باندهای 12 + 4 ,12 + 3 و 12 + 2 که نقش منفی در ارزش نانوایی دارند در حدود ۷۰% از ارقام وجود دارند. در جدول ۴ فراوانی و درصد امتیازهای مختلف بر اساس روش پاین (۲۶) دیده می‌شود. همانطور که ملاحظه می‌شود تنها ۹% از ارقام جزء ارقام قوی از نقطه نظر ارزش نانوایی به حساب می‌آیند (دارای امتیاز ۱۰)،در مقابل در حدود ۵۱% از ارقام جزء ارقام ضعیف (امتیاز ۷ - ۴) محسوب می‌شوند. در جدول ۵ گندمهای با تعداد باندهای مختلف از نقطه نظر ارزش نانوایی و فراوانی با هم مقایسه شده‌اند. در گندمهای هگزاپلوئید[1] زیر واحدهای با وزن مولکولی بالای گلوتنین (HMW-GS) توسط جفت ژنهای بسیار به هم نزدیک که بر روی بازوهای بلند کروموزمهای گروه یک (1A, 1B, 1D) قرار دارند کنترل می‌شوند (۳۰). دو ژن موجود بر روی هر یک از کروموزمهای گروه یک به صورت X و Y نشان داده می‌شوند که تفاوتهای اندکی در ساختمان پروتئین‌های کد شده توسط این دو ژن وجود دارد (۲۵ و ۱۳). دو ژن X و Y معمولا" با هم تظاهر پیدا نمی‌کنند. بعنوان مثال از دو ژن X و Y موجود بر روی کروموزوم 1A (مکان ژنی GluA - 1) فقط ژن X است که تظاهر پیدا می‌کند و منجر به ایجاد زیرواحدهای 1 و 2* می‌گردد. ولی ژن Y هیچگاه تظاهر پیدا نمی‌کند. از آنجایی که ژنها در ژنوم موجود وجود دارند، علی رغم اینکه پروتئین راکد کنند یا نه، رقمی راکه فاقد یک زیرواحد خاص باشد برای آن زیرواحد Null گفته می‌شود و با N نشان داده می‌شود. بطور مثال زمانی که ژن X در واریته‌ای به ظهور نرسد این رقم برای مکان ژنی (GluA-1) NULL گفته می‌شود. برخلاف مکان ژنی GluA1 در مکان‌های ژنی GLUB1 وGLUD1 هر دو ژن X و Y تظاهر یافته و دو زیرواحد راکد می‌کنند. مثل زیرواحدهای 10 و 5 مربوط به مکان ژنی GLUD1

1 - Triticum aestivum

جدول ۲ - ارقام مورد آزمایش همراه با امتیاز ارزش نانوایی بر اساس پاین (۱۹۸۴)

HMW - GLUTENIN SUBUNITS

ارقام	1A	1B	1D	امتیاز پاین
پی‌تیک	1	7 + 8	2 + 12	۷
بلوبوی	2*	7 + 9	2 + 12	۸
قفقاز	N	7 + 9	5 + 10	۸
شاهی	N	7 + 8	2 + 12	٦
فارین	1	17 + 18	5 + 10	
لاین ٦٧٠٨	N	17 + 18	2 + 12	٦
لاین ٦٧٠٩	N	17 + 18	2 + 12	٦
لاین ٦٧١٠	N	17 + 18	2 + 12	۵
شعله	N	20	2 + 12	۴
بیستون	N	7 + 8	2 + 12	٦
آذر	N	7 + 8	3 + 12	٦
سفید گندم بافقی	2*	7 + 8	2 + 12	۸
ریحانی	N	7 + 8	2 + 12	٦
عدل قدیم	N	13 + 19	2 + 12	٦
عدل جدید	N	7 + 8	2 + 12	٦
رشید	N	7 + 8	3 + 12	٦
ناز	1	13 + 16	5 + 10	٦
سفیدک	N	7 + 8	2 + 12	٦
دیهیم	1	7 + 8	2 + 12	۸
خلیج	N	7 + 8	2** + 10*	
آکوا	1	7 + 8	2 + 12	۸
فلات	1	7 + 9	5 + 10	۹
گلستان	N	17 + 18	5 + 10	۸
سرخ تخم قرمز	N	7 + 8	2** + 10*	
اروند-۱	N	7 + 8	2 + 12	٦
اروند موتان	1	7 + 8	2 + 12	۸
کراس ازوند	1	7 + 8	5 + 10	۱۰
سبلان	N	13 + 19	5 + 10	۸

ادامه جدول ۲ - ارقام مورد آزمایش همراه با امتیاز ارزش نانوایی بر اساس پاین (۱۹۸۴)

HMW - GLUTENIN SUBUNITS

ارقام	1A	1B	1D	امتیاز پاین
کراس شاهی	N	17 + 18	2 + 12	
آنزا	N	7 + 8	2 + 12	٦
پ آر-۱	1	7 + 9	5 + 10	۸
چناب-۷۰	1	17 + 18	2 + 12	۸
خزر-۱	1	7 + 8	2 + 12	۸
ویری‌اس	1	7 + 9	5 + 10	۱۰
اینیا	1	7 + 8	5 + 10	۱۰
لاین M-70-14	N	7 + 9	5 + 10	۷
گاجما-۷۱	1	17 + 18	5 + 10	۱۰
کراس آزادی	1	7 + 8	5 + 10	۱۰
کاوه	N	17 + 18	5 + 10	۱۰
روشن (٦٥١٧)	N	13 + 16	2 + 12	۷
البرز	2*	17 + 18	2 + 12	۸
نوید	N	7	5 + 10	۸
کراس امید	1	7 + 9	2 + 12	۸
روشن (٦٧٠١)	N	7 + 8	5 + 10	۸
امید	N	7 + 8	2 + 12	٦
کرج-۱	N	7 + 8	5 + 10	۸
کرج-۲	N	7 + 8	5 + 10	۸
کرج-۳	2*	13 + 19	2 + 12	۸
طبسی	N	7 + 8	2 + 12	۵
آزادی	2*	7 + 8	2 + 12	۸
روشن	N	7 + 8	2 + 12	٦
قدس	N	17 + 18	5 + 10	۸
بزوستایا	N	7 + 9	5 + 10	۸
آرژانتین	N	7 + 8	2 + 12	٦
مغان-۱	N	7 + 8	2 + 12	٦

ادامه جدول ۲ - ارقام مورد آزمایش همراه با امتیاز ارزش نانوایی بر اساس پاین (۱۹۸۴)

HMW - GLUTENIN SUBUNITS

ارقام	1A	1B	1D	امتیاز پاین
مغان-۲	N	13 + 16	2 + 12	٦
ویری‌اس/سارا	2*	7 + 9	5 + 10	۱۰
چاینزاسپرینگ	N	7+8	2+12	٦
یامهیل	N	7	2 + 12	۴
تاپ	N	7 + 8	3 + 12	٦
بیو-اس	2*	13 + 16	2 + 12	۸
مضرابی	N	7 + 9	2 + 12	۵
رجگه	N	7 + 8	2 + 12	٦
کوکوزاک-اف+۵	1	17 + 18	5 + 10	۱۰
سوان-۲۲۰	N	7 + 9	2 + 12	۵
نینگ-۸۲	N	17 + 18	5 + 10	۸
فان-۱	2*	7 + 8	2 + 12	۸
بگستا	N	7 + 8	5 + 10	۸
شانگهایی-۳	N	13 + 19	5 + 10	۸
تارو	N	7	2 + 12	۵
اینیا-٦٦	N	13 + 16	5 + 10	۸
توباری-٦٦	N	13 + 16	2 + 12	٦
آپاچی	N	7 + 8	5 + 10	۸
دستجردی	N	7 + 8	2 + 12	٦
شاه‌پسند	N	7 + 8	2 + 12	٦
عطایی	N	7 + 8	2 + 12	٦
قرمزک ورامین	N	7 + 8	2 + 12	٦
لاین ۴۸۲۰	2*	7 + 8	2 + 12	۸
گازرسنگ	N	7 + 8	2 + 12	٦
ماهوتی یزد	N	7 + 8	2 + 12	٦
داراب	2*	17 + 18	2 + 12	۸
بیات	2*	17 + 18	2 + 12	۸
وایکینگ	N	6 + 8	4 + 12	۴
کاتیا	1	7	2 + 12	۸

جدول ۳ - درصد و فراوانی آللهای HMW - GS در گندمهای ایران

درصد	تعداد ارقام	آللها	مکان ژنی
۶۳	۵۷	N	GLUA1
۲۱	۱۹	1	
۱۶	۱۴	2*	
۴	۴	7	GLUB1
۵۱	۴۶	7 + 8	
۱۳	۱۲	7 + 9	
۶	۵	13 + 16	
۶	۵	13 + 19	
۱۸	۱۶	17 + 18	
۱	۱	6 + 8	
۱	۱	20	
۶۳	۵۶	2 + 12	GLUD1
۳	۳	3 + 12	
۱	۱	4 + 12	
۳۰	۲۷	5 + 10	
۳	۳	2** + 10*	

و 8 و 7 مربوط به مکان ژنی GLUB1.ولی گاهی بندرت اتفاق‌می‌افتد که در مکان ژنی GLUB1 نیز یکی از ژنها (معمولا" Y) تظاهر پیدا نمی‌کند که در اینجا نیز ما یک باند داریم (مثل باندهای 7 در شکل ۴ و 20 در شکل ۱) پس در حالت عادی در یک رقم هگزاپلوئید حداقل ۳ و حداکثر ۵ باند دیده می‌شود. رقمی که بیشتر از ۵ زیرواحد (HMW - GS) داشته باشد، مخلوطی از ارقام یا بیوتیپهای[1] یک رقم می‌باشد (شکل ۲). از آنجایی که زیرواحدهای پروتئینی کد شده توسط ژنهای X و Y شامل تعداد زیادی اسید آمینه‌های گلیسین،گلوتامین، پرولین و سیستئین در ساختمان اولیه[2] خود هستند دارای ساختمانی میله‌ای شکل می‌باشند (۳۰). تفاوت زیرواحدهای X و Y بیشتر مربوط به تعداد واحدهای اسید آمینه سیستئین در دو انتهای مولکول می‌باشد(N-Terminus C-terminus) که نوع X دارای سه یا چهار اسید آمینه سیستئین در نزدیکی انتهای N و فقط یک اسید آمینه سیستئین در انتهای C می‌باشد ولی نوع Y دارای پنج اسید آمینه سیستئین در نزدیکی انتهای N و دو اسید آمینه در نزدیکی انتهای C می‌باشد (۱۴ و ۳۰). علاوه بر تفاوتی که بین زیرواحدهای X و Y در یک رقم وجود دارد، این تفاوت نیز ممکن است در داخل زیرواحدهای X یا Y هم وجود داشته باشد، بعنوان مثال دو زیرواحد1AX-1 و *1AX-2 (زیرواحدهای 1 و *2 مربوط به مکان ژنی GLUA1) با هم تفاوتهای اندکی بشرح زیر دارند:

زیرواحد 1AX-1 در هفت اسید آمینه با زیرواحد *1AX-2 فرق دارد. همچنین در آن پپتیدهای شش‌گانه[3] و پپتیدهای سه‌گانه[4] بهم نزدیکتر هستند و نیز به جای اسید آمینه گلوتامین، اسید آمینه آرژنین در نزدیکی سیستئین قرار دارد (۱۵).

با اینکه تفاوت زیرواحدهای X و Y محدود می‌باشد ولی وجود یا عدم وجود هر کدام از آنها تأثیر زیادی بر روی ارزش

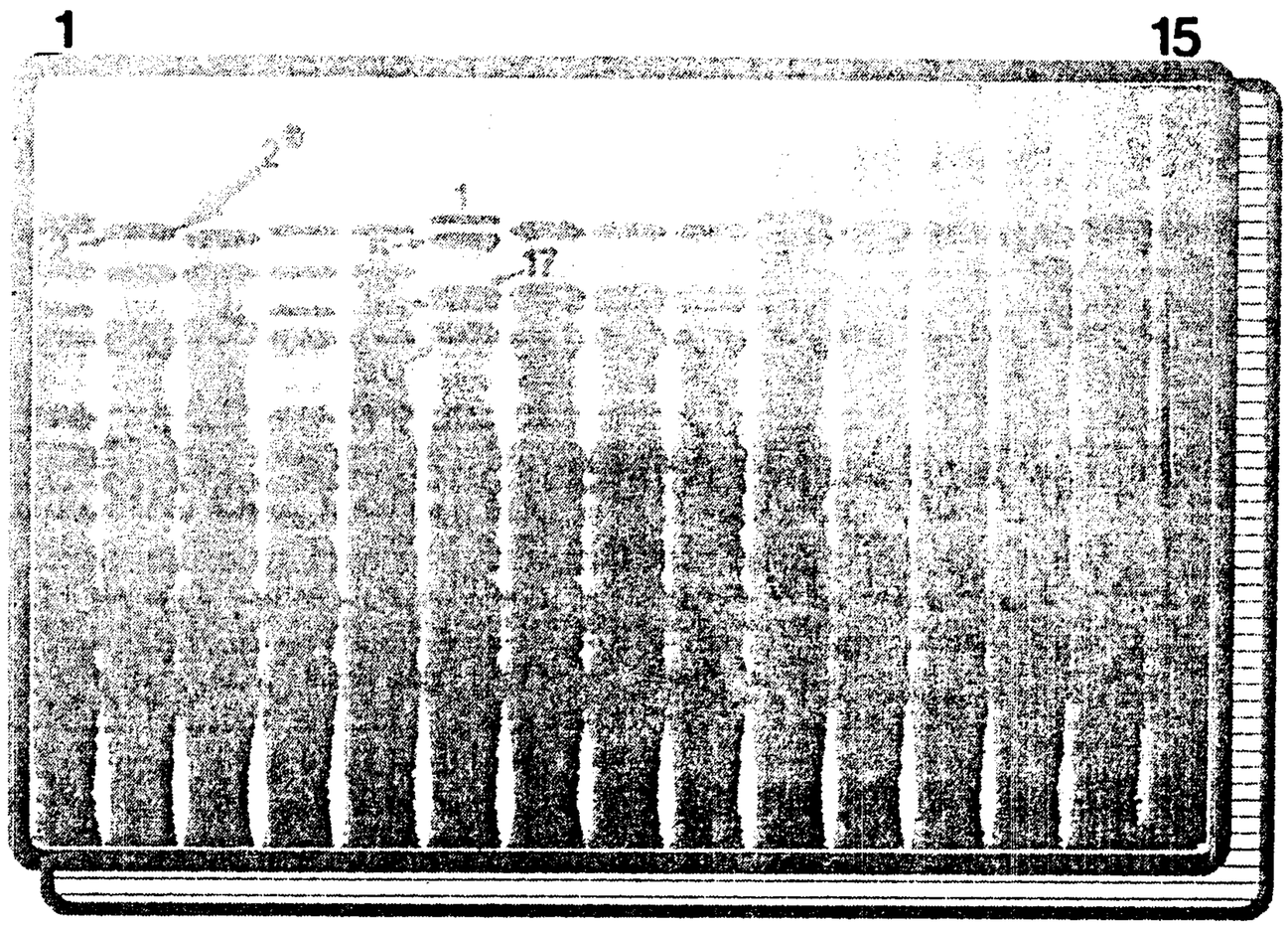
جدول ۴ - فراوانی و درصد امتیازات ارزش نانوایی(Payne)در گندمهای ایرانی

درصد	تعداد ارقام	امتیاز کیفیت Payne
۴	۴	۴
۴	۴	۵
۳۸	۳۳	۶
۶	۵	۷
۳۳	۳۰	۸
۳	۳	۹
۹	۸	۱۰
۳	۳	؟

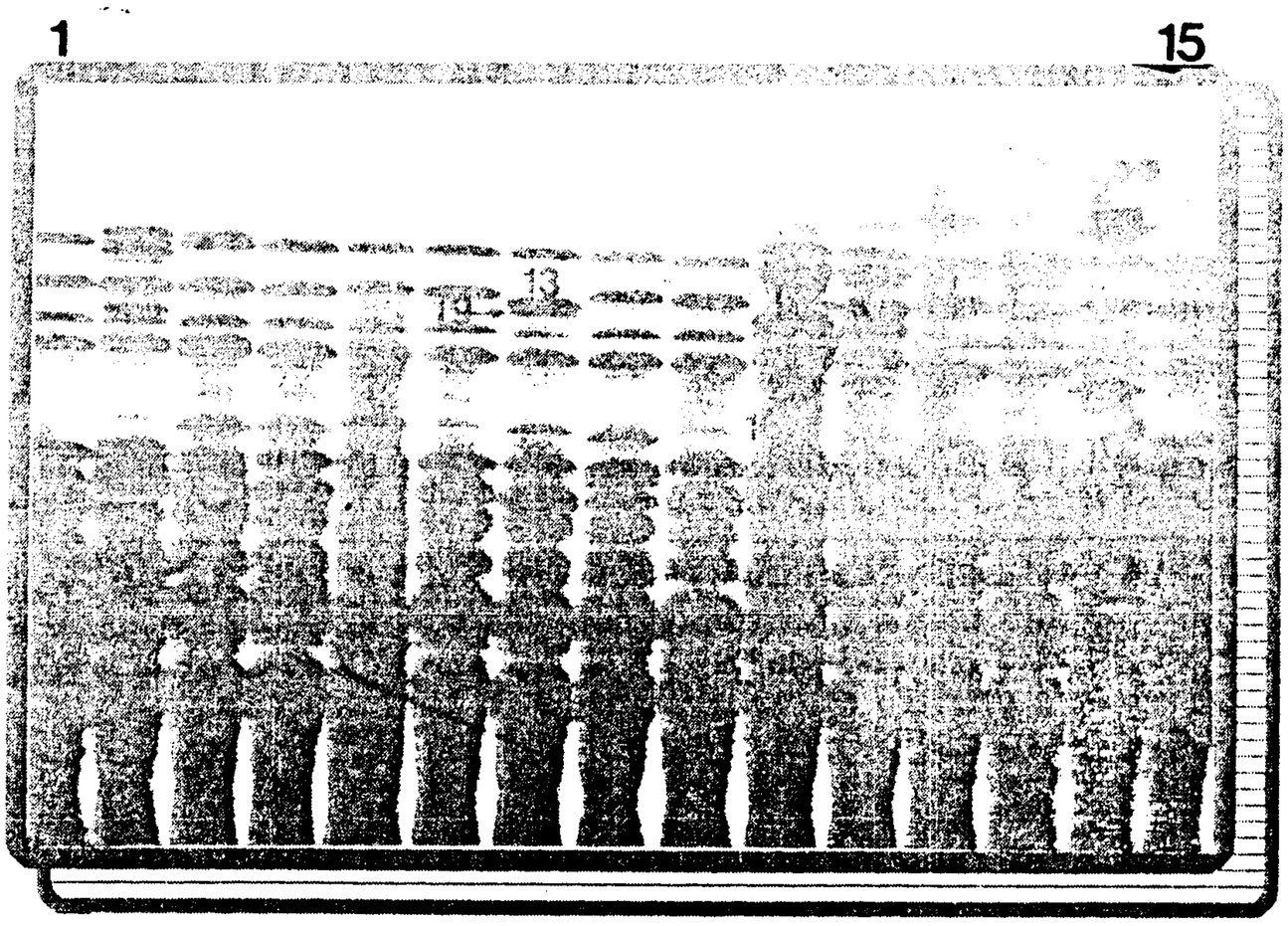
جدول ۵ - درصد و میانگین امتیازات کیفیت در گندمهای با تعداد باندهای مختلف

درصد	میانگین کیفیت	تعدادارقام	تعداد باند
۴	۴/۵	۴	۳
۵۸	۶/۵	۵۲	۴
۳۴	۸/۵	۳۱	۵

1 - Biotype
2 - Primary Structure
3 - Hexapeptide
4 - Tripeptide



شکل ۱ : زیر واحدهای HMW-glutenin در ارقام گندم



شکل ۲ : زیر واحدهای HMW-glutenin در ارقام گندم

نانوایی دارد (۲۳ و ۲۵). بعنوان مثال آللهای 12 + 2 و 10 + 5 به ترتیب دارای ضعیف ترین و قویترین تأثیر بر ارزش نانوایی هستند. البته هنوز مکانیزم دقیق چگونگی تأثیر زیرواحدهای HMW-GS بر روی ارزش نانوایی شناخته نشده است ولی با توجه به کارهای محققینی نظیر (۷، ۲۵ و ۲۶) همبستگی بین انواع این زیرواحدها و ارزش نانوایی غیر قابل چشم پوشی است، از طرفی تعداد زیرواحدهای HMW-GS در یک رقم نیز در ارزش نانوایی مؤثر است (۹ و ۳۱).

همانطور که در جدول شماره ۵ مشاهده می‌شود ارقامی که دارای تعداد بیشتری زیرواحد هستند، مثلا" ارقام دارای ۵ باند، دارای ارزش‌نانوایی‌بیشتری درمقایسه‌باارقام۴و۳باندی هستند البته باید توجه داشت که علاوه بر تعداد، نوع و ساختمان پروتئین نیز مهم است.

نتیجه‌گیری:

در بین ارقام مورد مطالعه در این تحقیق چند شکلی زیادی

مشاهده شد و تقریبا" تمامی ترکیبات مختلف زیرواحدهای با وزن مولکولی بالای گلوتنین (HMW-GS) ارائه شده توسط پاین (۲۶ و ۲۷) بعلاوه ترکیب جدید (*10+**2) مشاهده شد. (نامگذاری باندهای جدید کاملا" اختیاری بوده و این نامگذاری توسط نگارنده انتخاب شده است که توسط پروفسور لوخارت (۱۸) از دانشگاه ایالتی کانزاس نیز تأیید شده است، مکاتبات شخصی). همانطور که از جدول ۳ برمی‌آید حدود ۷۰% ارقام مورد مطالعه دارای باندهای ضعیف هستند و تنها حدود ۹% از ارقام بر اساس امتیاز بندی (۲۷) جزء ارقام بسیار قوی بشمار می‌آیند. در ۷۰% از ارقام باندهای 12 + 4, 12 + 3 و 12 + 2 وجود دارند که از آللهای بسیار ضعیف محسوب می‌شوند و در عوض فقط ۳۰% ارقام دارای باند 10 + 5 هستند. از طرفی بر اساس جدول ۵ حدود ۶۲% از ارقام سه و یا چهار باندی هستند که عدم تظاهر ژن X مربوط به مکان ژنی GLUA1 که منجر به ظهور زیرواحدهای ۱ و *۲ می‌گردد، یک ضعف محسوب می‌شود.

با توجه به نتایج و بحث‌های ذکر شده، راههای زیر جهت اصلاح کیفیت گندمهای ایرانی پیشنهاد می‌گردد:

۱ - ظهور ژنهای X مربوط به مکان ژنی GLUA1 و Y مربوط به مکان ژنی GLUB1 بطوریکه تمامی ارقام پنج باندی شوند (از طریق تلاقی‌های هدفدار و بررسی و سلکسیون نسلهای در حال تفرق).

۲ - جایگزین کردن آلل 10 + 5 بجای 12 + 2 در تمامی ارقام توسط تلاقی‌های برگشتی و سلکسیون تک بذر در بین نسلهای در حال تفرق.

سپاسگزاری

از مسئولین دانشگاه تهران به خاطر تأمین هزینه مالی طرح و مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر به خاطر همکاری در طول تحقیق تشکر می‌گردد. آزمایشات مربوط به این تحقیق در مرکز تحقیقات بین‌المللی بیوشیمی - بیو فیزیک انجام شده که بدینوسیله تشکر و قدردانی می‌گردد.

REFERENCES

مراجع مورد استفاده

۱ - مسعودی نژاد، ع.، یزدی صمدی، ب.، ۱۳۷۲. شناسایی، طبقه بندی و بررسی اثر نانوایی گندمهای ایران با استفاده از الکتروفورز پروتئین‌های ذخیره‌ای اندوسپرم (گلوتنین). مقاله ارائه شده در اولین کنگره زراعت واصلاح نباتات ایران، ۱۸ - ۱۵ شهریور، کرج، ایران.

۲ - مسعودی نژاد، ع.، یزدی صمدی، ب.، ۱۳۷۲. بررسی کمی پروتئین‌های ذخیره‌ای گندم (گلوتنین) با استفاده از الکتروفورز (SDS-PAGE) و لیزراسکانر دنسیتومتری (LSD). مقاله ارائه شده در اولین کنگره زراعت و اصلاح نباتات ایران، ۱۸ - ۱۵ شهریور، کرج، ایران.

3 - Beitz, J.A., Shepherd, W., & Wall, J.S. 1975. Single - kernel analysis of glutenin: use in wheat genetics and breeding. Cereal chem. 52:513-532.

4 - Burnouf, T., & Bouriquet, R. 1980. Glutenin subunits of genetically related European Hexaploid wheat cultivars: their relation to bread - making quality. Theor. appl. Genet. 58:107-111.

5 - Branlard, G., & Dardevet, M. 1985. Diversity of grain proteins and bread wheat quality. 1. Correlation between Gliadin bands and flour quality characteristics. J. Cereal. Sci. 3:329-343.

6 - Cooke, R.J. 1988. Electrophoresis in plant testing and breeding, in; Advances in Electrophorsis Vol. 2 [Chrambatch. A. Dunn. M.J. Radola. B.J. (Eds)] VCH Werlagsgellchaft mbh, D. 6940 Weinheim (F. R. G.), 1988. pp 171 - 261.

7 - Carillo, J.M., Vazauez, J.F., & Orellanna, J. 1990. Relationship between gluten strength and gluten proteins in durum wheat cultivars. Plant Breeding. 104:325-334.

8 - De Weghe, L.V. 1991. Comparative study of electrophoretic methods for cultivar identification of wheat and triticale. Seed Science and Technology. 19:41-50.

9 - Fullington, I.G., E.W. Cole, & Kasarda, D.D. 1983. Quantitative Sodium Dodecyl Sulphate - polyacrylamide gel electrophoresis of total proteins extracted from different wheat cultivars: effect of Protein content. Cereal chemistry. 60(1):65-71.

10 - Gao, L., & Bushuk, W. 1933. Polymeric glutenin of wheat lines with varying number of high molecular weight glutenin subunit HMW - GS. Cereal chem. 70(4):475-480.

11 - Graybosch, R.A. 1992. High molecular weight glutenin subunit composition of cultivars, germplasm, and parents of U. S. Red Winter wheat. Crop science. 32:1151-1158.

12 - Gupta, R.B., Singh, N.K., & Shepherd, K.W. 1989. The cumulative effect of allelic variation in LMW and HMW Glutenin subunits on dough properties in the progeny of two bread wheat. Theor Appl Genet. 77:57-64.

13 - Gallili, G., & Feldman, M. 1985. Structural homology of endosperm heigh molecular weight glutenin subunits of common wheat Triticum aestivum. Theor. Appl. Genet. 70:635-642.

14 - Green, F.C., & Anderson, O.D. 1989. The characterization and comparative analysis of heigh - molecular - weight glutenin genes for genomes A and B of a hexaploid bread wheat. Theor. Appl. Genet. 77:689-700.

15 - Halford, N.G., Field, M.J., Blair, H., Urwin, P., Moore, K., Robert, L., Thompson, R., Flavall, R.B., Tatham, A.S., & Sherwy, P.R. 1992. Analysis of HMW - glutenin subunits encoded by chromosome 1 A. of bread wheat (Triticum aestivum L.) indicates quantitative effects on grain quality. Theor. Appl. Genet. 83:373-378.

16 - Lee, J.W., & Ronalds, J.A. 1967. Effects of environment on wheat gliadin. Nature. 213:844-846.

17 - Laemomli, V.K. 1970. Cleavage of Structural Proteins during the assembly of the head of bactriophage T4. Nature (London). 227:680-685.

18 - Lookhart, G.L., K. Hagman, Kasadra, D.D. 1993. High - molecular - weight glutenin subunits (HMW - GS) of the most commonly grown wheat cultivars in the U. S. in 1984. Plant Breeding. 110:48-62.

19 - Lawrence, G.J., Macritchie, F., & Wrigley, C.W. 1988. Dough and baking quality of wheat lines defficient in glutenin subunits controlled by GluB1, GluD1 loci. J. Cereal. Sci. 7:109-112.

20 - Macritchie, F., Ducros, D.L., & Wrigley, C.W. 1990. Flour polypeptides related to wheat quality. Adv. Cereal. Sci. Technol. 10:79-146.

21 - Moonen, J.H.E., Scheepstra, A., & Graveland, A. 1985. Biochemical properties of some high molecular weight subunits of wheat glutenin. J. Cereal. Sci. 3:17-27.

22 - Marchylo, B.A. 1987. Barley cultivar identification by SDS gradient pace analysis of hordein. Can. J. Plant. Sci. 67:927-944.

23 - NG, P.K., & Bushuk, W. 1988. Statistical relationship between heigh - molecular - weight glutenin subunits and breadmaking quality of Canadian - grown wheats. Cereal Chem. 65:408-413.

24 - Osborne, T.B. 1907. The proteins of the wheat kernel. Publ. 84. Carnegie Institution, Washington, DC.

25 - Payne, P.I., Nightingale, M.A., Krattiger, A.F., & Holt, L.M. 1987. The Relationship between HMW - GS composition and the breadmaking quality of British - grown wheat varieties. J. Sci. Food. Agric. 40:51-65.

26 - Payne, P.I., Corfied, K.C., Holt, L.M., & Blackman, J.A. 1891. Correlation between the inheritance of certain high molecular weight subunits of glutenin and breadmaking quality in progenies of six crosses of bread wheat. J. Sci. Food. Agric. 32:51-60.

27 - Payne, P.I., Holt, L.M., Jackson, E.A., & Law, C.N. 1984. Wheat storage proteins: Their Genetics and potential for manipulation by plant breeding. Philos. Trans. R. Soc. London. B. 304:359-371.

28 - Payne, P.I., Corfield, K.G., Blackman, J.A. 1979. Identification of a high - molecular weight subunits of glutenin whose presence correlates with breadmaking quality in wheats of related pedigree. Theor. Appl. Genet. 55:153-159.

29 - Sherwy, P.R., Faulks, A.J., Prott, H.M., & Miflin, B.J. 1987. The varietal identification of single seeds of wheats by SDS - PAGE Electrophoresis of gliadin. Journal of Sci of Food and Agric. 29:847-849.

30 - Sherwy, P.R., Nalford, N.G., & Tatham, A.S. 1989. HMW - glutenin subunit of wheat, barley and rye: genetics, molecular biology, chemistry, and role in wheat gluten structure and functionality. Oxford Surveys of Plant Molecular Cell Biology. 6:163-219.

31 - Seilmeirer, W., Belitz, H.D., & Wieser, H. 1991. Seperation and quantitative determination of high - molecular - weight glutenin subunits from different wheat varieties and genetic variants of the variety "Sicco". Z. Lebensm. Unters. Forsch. 192:124-129.

32 - Wrigley, C.W. 1970. Protein mapping by combined gel electrofocusing and electrophoresis; application to the study of genotypic variation in wheat gliadins. Biochem. Genet. 4:429-432.

33 - Wrigley, C.W., Autran, J.C., & Bushuk, W. 1982. Identification of cereal varieties by gel electrophoresis of the grain proteins. In: advance in cereal science and technology vol. 5 [pomeranz. Y. (eds)] American Association of Cereal Chemists, St. Paul, Minnesota 1982. pp 211-259.

34 - Wrigley, C.W., Tomlinson, G.D., & Skerrit, G.H. 1987. Improved identification of cereal varieties by SDS - PAGE electrophoresis. International symposium on biochemical identification of vareties, 01 - 08. 09. 1987. Leningrad, USSR, pp. 159.

35 - Wrigley, C.W. 1987. Complementing traditional methods of identifing cereal varieties with novel procedures. Seed Science and Technology. 15:679-688.

36 - Zillman, R.R., & Bushuk, W. 1979. Wheat cultivar identification by gliadin electroforegrams. II. Effects of environmental and experimental factors on the gliadin electrophoregram. Can. J. Plant Sci.

Iranian J. Agric. Sci. Vol. 29 No. 4. 1998

Identification, Classification and Predicting Bread - Making Quality of Iranian Wheats Using Electrophoresis for Seed Storage Protein (Glutenin)

A. MASOUDI-NEJAD, B. YAZDI-SAMADI, C. ABD-MISHANI, M. N. SARBLOUKI AND M. FIROUZI

Respectively, Former Graduate Student, Professors, University of Tehran and Researchers Biochemistry Biophysics, Institute, U. of Tehran, Iran.

Accepted 17 Sep. 1997

SUMMARY

The relations between the high molecular weight glutenin (HMW - GS) and bread - making quality of 81 Iranian wheat cultivars (T. aestivum L.), have been studied using SDS - PAGE technique. At the GluA1 locus the subunits 1 and 2* which are considered as good alleles in relation to quality were present in 31% of the cultivars. At the GluD1 locus the subunits 5 + 10 which are related to very good bread - making quality and the subunits 4 + 12, 3 + 12 and 2 + 12 which show positive correlation with poor bread - making quality were present in 30% and 70% of the cultivars, respectively. The quality score assigned to the alleles of Glu1 loci by Payne method, were determined for the cultivars. In this study, 9% of the cultivars had high bread - making quality (score 10) and 51% had low quality (score 4 - 7). A new GluD1 subunits was observed in 3 Iranian cultivars and named 2**+10* alleles.

Keywords: Wheat, Glutenin, Seed Storage Protein, Bread-Making quality & Electrophoresis