شناسایی و طبقه بندی گندمهای ایران با استفاده از الکتروفورز گلیادین[1]

علی مسعودی نژاد، بهمن یزدی صمدی، سیروس عبدمیشانی و محمدنبی سربلوکی

بترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد ،استادان دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران و استاد مرکز تحقیقات بیوشیمی - بیوفیزیک ایران

تاریخ پذیرش مقاله ۷۶/۳/۲۸

خلاصه

گلیادین یکی از پروتئینهای ذخیره‌ای اندوسپرم گندم می باشد که دارای پلی مورفیسم فراوان است و توسط گروهی از ژنها که بر روی بازوهای کوتاه کروموزومهای همولوگ گروه یک و شش قرار دارند کنترل می شود. در این آزمایش حدود ۵۰ رقم از گندمهای ایرانی و خارجی انتخاب شدند از روش الکتروفورز A-PAGE بر اساس روش لافیاندرا استفاده شد. واریته مارکوئیس بعنوان واریته استاندارد بود ، چند شکلی زیادی بویژه در ناحیه امگا و گاما در بین ارقام مشاهده گردید . شدت رنگ پذیری باندها متغیر بود. بیشترین شدت در ناحیه بین ۴۰ تا ۶۰ واحد حرکت نسبی و کمترین شدت در ناحیه بالاتر از ۷۰ واحد حرکت نسبی مشاهده گردید. گروهبندی ارقام با استفاده از روش تجزیه خوشه ای انجام گرفت و ارقام به ۹ دسته تقسیم شدند . ارقامی که دارای ریخته ارثی نزدیک به هم بودند مثل اروند و اروند موتان در یک کلاستر قرار گرفتند که نشان دهنده قدرت تجزیه آماری انجام شده جهت تفکیک ارقام از همدیگر است ، ارقامی نیز مثل بزوستاویا و قفقاز که منشاء جغرافیایی یکسانی داشتند نیز در یک دسته قرار گرفتند .

واژه های کلیدی : الکتروفورز ، پروتئینهای ذخیره ای ،گندم ، پلی مورفیسم ،گلیادین

مقدمه

اکثر پروتئینهای گندم و غلات از نوع ذخیره‌ای[2] می‌باشند . این پروتئینها که در زمان رسیدن دانه در آن تجمع می‌یابند ، در فرآیند جوانه زنی تحت تأثیر آنزیمهای مختلف شکسته شده و به منبع نیتروژن برای رشد جنین تبدیل می‌شوند (۱۳). گلیادین یکی از این پروتئینهای ذخیره‌ای است که در آب و نمکها نامحلول بوده ولی در الکل ۷۰٪ محلول می‌باشد. گلیادین غنی از اسیدهای آمینه اسیدی مثل گلوتامین و پرولین می‌باشد ولی دارای مقدار کمی از اسیدهای آمینه بازی مخصوصاً لیزین است(۱۱).

سنتز گلیادین که پروتئینی دارای پلی‌مورفیسم فراوان است در گندمهای نان (*Triticum aestivum* L.) توسط گروهی از ژنها که بر روی بازوی کوتاه کروموزومهای همولوگ گروه یک و شش قرار دارند کنترل می شود (۴، ۱۸، ۲۱، ۲۳، ۱۲)

مولکولهای گلیادین کوچک بوده و دارای وزن مولکولی در حدود ۳۵۰۰۰ دالتون می‌باشند. این پروتئینها فاقد باند دی سولفیدی جانبی بوده وبصورت منومرهای جداگانه‌ای می‌باشند(۲۱). هنگامی که این پروتئینها در pH آسیدی (pH=3.1) الکتروفورز می‌گردند به چهار گروه متمایز (α-Gliadin , β-Gliadin , γ-Gliadin , ω-Gliadin) تقسیم می‌شوند (۱۵، ۲۲). تعداد باندهای تفکیک شده گلیادین

1 - Gliadin

2- Storage proteins

توسط الکتروفورز یک بعدی[1] متغیر و بین ۱۵تا۲۰ زیر واحد می‌باشند(۲۳، ۱۳، ۱۶، ۱۸)

هر کدام از کروموزمها ژنهایی را حمل می‌کنند که کد کننده تعداد زیادی زیر واحد[2] هستند . مکانهای ژنی کنترل کننده این زیر واحدها را بصورت زیر نشان می‌دهند :

بر روی کروموزمهای گروه یک Gli - 1 شامل مکانهای ژنی GliA1 , GliB1 , GliD1 و بر روی کروموزمهای گروه شش Gli-2 شامل مکانهای ژنی GliA2 , GliB2 , GliD2 (Payne et al. 1984).

بر اساس مطالعات انجام شده ، باندهای گلیادین بصورت گروهها و بلوکهای متصل به هم توارث می‌یابند(۵، ۷، ۳، ۱۹، ۸)

هر مکان ژنی کد کننده گلیادین[3] شامل چند ژن بسیار نزدیک به هم است که حاصل پدیده‌هایی نظیر دوبرابر شدن قطعات کروموزمی[4] ، موتاسیون ، تکامل و غیره می‌باشد. باندهای گلیادین از نقطه نظر نسبت حرکت[5] و شدت رنگ پذیری[6] تولید الگوهایی می‌نمایند که برای تشخیص و تمایز ارقام مناسب هستند و می‌تواند بعنوان نشانگرهایی[7] در این زمینه بکار روند (۹).

مواد و روشها

مواد شیمیایی

Acrylamid, Bis , Tris , Amonium Persulfate , Ascorbic Acid و Temed , Ferrous Sulfate که از سیگما خریداری شد .

Potassium Hydroxid , Lactic Acid , Silver nitrate Hydrogen Peroxide از شرکت مرک و Aluminium Lactate از شرکت فلوکا خریداری شدند .

مواد مورد آزمایش :

گندمهای مورد آزمایش حدود ۵۰ رقم از ارقام داخلی و خارجی بر طبق جدول شماره ۱ بودند. از واریته مارکوئیس[8] بعنوان استاندارد استفاده شد.

الکتروفورز :

جدول ۱ - گندمهای ایرانی مطالعه شده برای گلیادین

ارقام	ردیف	ارقام	ردیف	ارقام	ردیف
قدس	۳۷	رشید	۱۹	عطایی	۱
روشن	۳۸	قرمزک ورامین	۲۰	زرندی	۲
ناز	۳۹	دستجردی	۲۱	گازرسنگ	۳
گلستان	۴۰	پیر-۱	۲۲	دیهیم	۴
فلات	۴۱	چناب-۷۰	۲۳	سفیدک	۵
البرز	۴۲	خزر-۱	۲۴	آکوا	۶
اروند-۱	۴۳	کراس شاهی	۲۵	پی‌تیک	۷
اروندموتان	۴۴	شاهی	۲۶	خلیج	۸
کراس‌اروند	۴۵	داراب	۲۷	شعله	۹
سبلان	۴۶	اینیا۶۶	۲۸	بولانی	۱۰
بیات	۴۷	قفقاز	۲۹	بلوبوی	۱۱
کراس بیات	۴۸	کرج-۱	۳۰	بیستون	۱۲
ویری اس	۴۹	کرج-۲	۳۱	مکزیپاک	۱۳
سفیدگندم‌بافقی	۵۰	کرج-۳	۳۲	عدل‌قدیم	۱۴
قرمزگندم‌بافقی	۵۱	امید	۳۳	عدل جدید	۱۵
لاین M-70-14	۵۲	کراس‌امید	۳۴	روشن(۶۷۰۱)	۱۶
کراس آزادی	۵۳	مغان-۱	۳۵	روشن(۶۵۱۷)	۱۷
آزادی	۵۴	بزوستایا	۳۶	ریحانی	۱۸

الکتروفورز بر اساس روش لافیاندرا (۱۲) با تغییراتی بشرح زیر انجام گرفت:

استخراج پروتئین

برای استخراج پروتئین، یک تک بذر (حدود ۱۰۰ mg

1 - One -Dimentional Electrophoresis
2- Subunits
3 - Block
4- Duplication
5 - Mobility
6 - Intensity
7- Markers
8- Marquis

بین چند لایه کاغذ پیچیده شده و توسط انبردست خوب له و پودر حاصله در یک لوله پلاستیکی در دار[1] 1.5 ml ریخته شده و حدود ۸۰۰ میکرولیتر از بافر استخراج (جدول ۲) به آن اضافه و طی مدت یکساعت بطور متناوب بخوبی بهم زده (شیکر لوله بهتر است) سپس نمونه ها رابه مدت ۱۲ ساعت (معمولاً یک شب) در حرارت معمولی اتاق قرار داده شده،بعد از آن نمونه ها به مدت ۲۰ دقیقه در یک سانتریفوژ معمولی با حدود ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شدند (با سانتریفوژهای یخچال دار ۴ درجه سانتیگراد و ۱۰۰۰۰ دور بهتر است). برای الکتروفورز از ۱۲ میکرو لیتر عصاره شفاف استفاده شد .

ساختن ژل :

ژل زیرین (۷%)

برای ساختن ژل زیرین (جداکننده) به ارتفاع ۱۲/۵ سانتی متر، محلولهای زیر را با همدیگر بصورت زیر مخلوط می‌کنیم :

۲۰ میلی لیتر از محلول A (جدول ۲) , 1.6 میلی لیتر از محلول B و تمام محلولهای D و E (این دو محلول را هر بار بصورت تازه درست می‌کنیم) را در یک استوانه مدرج ۱۰۰ میلی لیتری ریخته با آب مقطر حجم را به ۸۰ میلی لیتر می‌رسانیم سپس محلول حاصل را در یک ارلن مایر ریخته در آنرا با سرپوش پلاستیکی بسته و به مدت سه دقیقه بوسیله پمپ خلاء و یا شیرآب هواگیری می‌کنیم. سپس محلول هواگیری شده را بدون اینکه حبابی در آن تشکیل شود به آرامی در یک بشر تمیز ریخته جهت ریختن محلول به داخل شیشه های قالب ژل ، از سیلندر یک سرنگ بعنوان یک قیف استفاده کرده و به آرامی محلول را بداخل شیشه‌ها ریخته (تا ارتفاع ۱۲/۵ سانتی متر) و سریعاً با یک پیپت حدود ۴ میلی لیتر از ایزوبوتانول اشباع شده توسط آب (برای درست کردن این محلول در یک ظرف شیشه‌ای (۲۵۰ ml) حدود ۵۰ میلی لیتر آب مقطر ریخته و بقیه حجم را ایزوبوتانل اضافه کرده ،محلول دارای دو فاز می‌باشد که فاز بالایی ایزوبوتانل می باشد) ریخته می‌شود . مدت ۴۵-۳۰ دقیقه صبر کرده تا ژل کاملاً بسته شود (تشکیل سه فاز در داخل شیشه) .

بافر الکترود (KOH)

۱۰۰ میلی لیتر از محلول B با آب مقطر به حجم ۵۰۰۰ میلی لیتر رسانده شد. pH معمولاً ۳/۱ می‌باشد در غیر اینصورت pH بااضافه کردن اسید لاکتیک به ۳/۱ رسانده می شود. بعد از بسته شدن ژل محلولهای بالای (آب وایزوبوتانل) آنرا ریخته و چند بار با آب مقطر تمیز شسته ، واژگون کرده و با کاغذ ژوزف و یا کاغذ صافی بدون اینکه صدمه‌ای به سطح ژل وارد شود، قطرات آب داخل شیشه خشک می‌شود. سپس دستگاه رابه مدت یک ساعت قبل از عملیات روشن می‌کنیم[2] (شدت جریان : ۴۵ میلی آمپر برای هر ژل) . توجه : در اینجا برخلاف الکتروفورز گلوتنین قطب مثبت به تانک بالا و قطب منفی به تانک پائین وصل می‌شود چون در این روش پروتئین‌های دارای بار مثبت می‌باشند .

بعد از این مرحله دستگاه را خاموش کرده ، بافر تانک بالا را دور ریخته ، شیشه‌ها را بطور عمودی قرار داده تا محلول ژل بالائی[3] درست شده و داخل آن ریخته شود.

ژل بالایی :(۴ %)

۱۰ میلی لیتر از محلول G راکه قبلاً درست کرده و در فریزر نگه داشته بودیم ، برداشته ذوب کرده داخل یک بشر تمیز ریخته سپس مقدار ۱۵ میکرو لیتر از محلول F (که قبلاً بخوبی هواگیری شده باشد) را به آن اضافه کرده چند بار و به آرامی باگردش دورانی بهم زده و فوراً بداخل شیشه‌ها می‌ریزیم (در اینجا بهتر است محلول توسط سرنگ و به آرامی طوری که حبابی ایجاد نشود بداخل شیشه‌ها تزریق گردد) سپس سریعاً شانه ها[4] را می‌گذاریم (باید دقت شود در سطح دندانه‌های شانه و محلول حبابی ایجاد نشود) . مدت ۳۰ دقیقه صبر کرده سپس شانه‌ها را به آرامی و طوریکه‌ژل خراب نشودبیرون می‌آوریم وسپس سریعاً به کمک یک سرنگ وبامحلول‌بافرالکترود آلومینیوم لاکتات (pH = ۳/۱) شیارها را می‌شوئیم تا ذرات پلی مریزه نشده خارج شود (برای درست کردن این محلول ۲۰ میلی لیتر از محلول C را برداشته حجم را با آب مقطر به یک لیتر می‌رسانیم) .

حال از هر نمونه به ترتیب و بر اساس نقشه تزریق نمونه[5] مقدار ۱۲ میکرو لیتر داخل هر چاهک می‌ریزیم (در هر ژل ۱۵ تایی بهتر است دو نمونه عصاره استاندارد مثل مارکوئیس در چاهکهای ۵ و ۱۰ ریخته شود تا بعداً در امتیازبندی[6] مشکلی پیش

1 - Ependorf tube
2- Prerun
3- Stacking Gel
4 - Comb
5 - Loading Samples
6- Scoring

جدول ۲- محلولهای پایه برای الکتروفورز گلیادین

نام	مواد شیمیایی	مقدار	ملاحظات
(A)	ACRYLAMIDE	۲۸ گرم	فیلتر کرده در
	BIS	۱/۲ میلی گرم	یخچال نگهداری شود
	WATER	۱۰۰ میلی لیتر	
(B)	KOH	۱۱ گرم	فیلتر کرده در
	ACID LACTIC	۷۵ میلی لیتر	یخچال نگهداری شود
	WATER	۳۰۰ میلی لیتر	
(C)	ALUMINIUM LACTATE	۶/۵۰ گرم	فیلتر کرده در
	ACID LACTIC	۱۰ میلی لیتر	یخچال نگهداری شود
	WATER	۱۰۰ میلی لیتر	
(D)	SILVER NITRATE	۱۷ میلی گرم	هر بار تازه
	WATER	۱۰ میلی لیتر	تهیه شود
(E)	AMMONIUM PERSULFATE	۳۵ میلی گرم	هر بار تازه
	WATER	۱۰ میلی لیتر	تهیه شود
(F)	HYDROGENE PEROXIDE	۱ میلی لیتر	هر بار تازه
	WATER	۲۹ میلی لیتر	تهیه شود
(G)	SOLUTION (A)	۱۷ میلی لیتر	
	SOLUTION (B)	۲ میلی لیتر	به ده قسمت
	ASCORBIC ACID	۲۰ میلی گرم	۱۰ میلی‌لیتری تقسیم
	FERROUS SULFATE	۳ میلی گرم	و فریز شود(۲۰-)
	WATER	۱۰۰ میلی لیتر	
*بافر استخراج	DMF	۳/۹	میلی لیتر
	WATER	۲۵	میلی لیتر
	SUCROSE	۵	گرم
	METHYL VIOLET	۱۷	میلی گرم

*(۸۰۰ میکرولیتر عصاره بازای ۱۰۰ میلی گرم نمونه)

نیاید). بعد از اتمام تزریق نمونه‌ها دستگاه را سوار کرده ، تانک بالا را از بافر الکترود آلومینیوم لاکتات پر کرده (در تانک پائینی همان بافر الکترود قبلی KOH می‌باشد) و دوباره قطب مثبت را به تانک بالا و قطب منفی را به تانک پائین وصل کرده دستگاه را روشن می‌کنیم (۴۵ میلی آمپر برای هر ژل) . بهتر است

در شروع و خاتمه کار دستگاه سه پارامتر شدت جریان ، ولتاژ و توان یادداشت گردند . برای اطمینان از درستی کار چند دقیقه منتظر می‌مانیم تا رنگ نشانه عصاره‌ها بداخل ژل نفوذ کند . پس از اتمام الکتروفورز (در اینجا روش کار با سیستم قبلی برای الکتروفورز گلوتنین فرق می‌کند ، اگر در عصاره از Methyl Violet بعنوان

رنگ نشانه استفاده می کنیم ، بفرض اگر دو ساعت طول می‌کشد تا رنگ نشانه به انتها برسد . زمان عمل [1] باید ۴ ساعت باشد ، یعنی دو ساعت بعد از خارج شدن رنگ نشانه نیز صبر می‌کنیم ولی اگر از Pyronin G بعنوان رنگ نشانه استفاده می‌کنیم وقتی که رنگ به ۰/۵ سانتی متری انتهای ژل رسید دستگاه را خاموش می‌کنیم) دستگاه را خاموش و ژلها را به آرامی از بین شیشه‌ها خارج کرده و داخل محلول رنگ‌آمیزی [2] می‌اندازیم (در صورتیکه دستگاه‌هم زن موجود باشد می‌توان چند ژل را با هم داخل یک ظرف قرار داد ولی در صورتیکه این دستگاه موجود نیست هر ژل همراه با ۲۵۰ میلی لیتر محلول رنگ آمیزی داخل یک ظرف قرار می‌گیرد) . مدت رنگ آمیزی برای گلیادین ۱۲ ساعت کافی است.

محلول رنگ آمیزی

محلول اول : یک گرم رنگ کوماسی بلو [3] را در یک ارلن ۲۵۰ میلی لیتری ریخته (بایستی اینکار با دقت انجام شود تا ذرات رنگ به محیط آزمایشگاه وارد نشود) سپس ۲۵۰ میلی لیتر اتانل خالص به آن اضافه کرده به همراه یک همزن مغناطیسی به مدت ۱۲ ساعت به هم می زنیم . سپس محلول حاصله را فیلتر کرده و در ظرف سر بسته می‌ریزیم .

محلول دوم : حدود ۵۰۰ گرم تری کلرو استیک اسید [4] را در یک ظرف یک لیتری ریخته حدود ۱۰۰۰ میلی لیتر آب مقطر به آن اضافه کرده و خوب به هم می‌زنیم تا کاملاً حل شود .

محلول مورد استفاده: ۲۵ میلی‌لیتر از محلول اول و ۱۰۰ میلی لیتر از محلول دوم را برداشته در یک ظرف ریخته و حجم نهایی را به ۵۰۰ میلی لیتر می‌رسانیم که برای رنگ آمیزی دو ژل کافی است.

محلول رنگبری [5]

بعد از رنگ آمیزی جهت شفاف شدن زمینه ژل و نمایان شدن باندها ژلها را از محلول رنگ آمیزی خارج کرده سه بار با آب مقطر شسته و درون ظرفی قرار داده ، د رحدود ۵۰۰ میلی لیتر از محلول رنگبر روی آنها ریخته آنقدر صبر می‌کنیم تا زمینه شفاف شده و باندها کاملاً مشخص شوند (معمولاً در مورد گلیادین ۵ ساعت کافی می‌باشد) .

عکسبرداری از ژلها و محاسبه حرکت نسبی [6] (RM)

بعد از رنگبری ، ژلها سه بار با آب مقطر شسته شده و سپس با استفاده از یک چراغ رادیولوژی [7] و دوربین عکاسی Cannon ، 135 میلی متری همراه با لنزکلوزآپ [8] از آنها عکسبرداری شد . برای محاسبه RM از عکس ژلها استفاده شده ابتدا باند 50 در واریته مارکوئیس شناسایی و فاصله آن از ابتدای ژل با خط کش محاسبه شد و سپس برای محاسبه RM مربوط به باندهااز رابطه زیر استفاده شد .

فاصله باند γ-50 از ابتدای ژل / (۵۰ × (mm)

فاصله باند مربوطه از ابتدای ژل) = RM باند

برنامه‌های کامپیوتری :

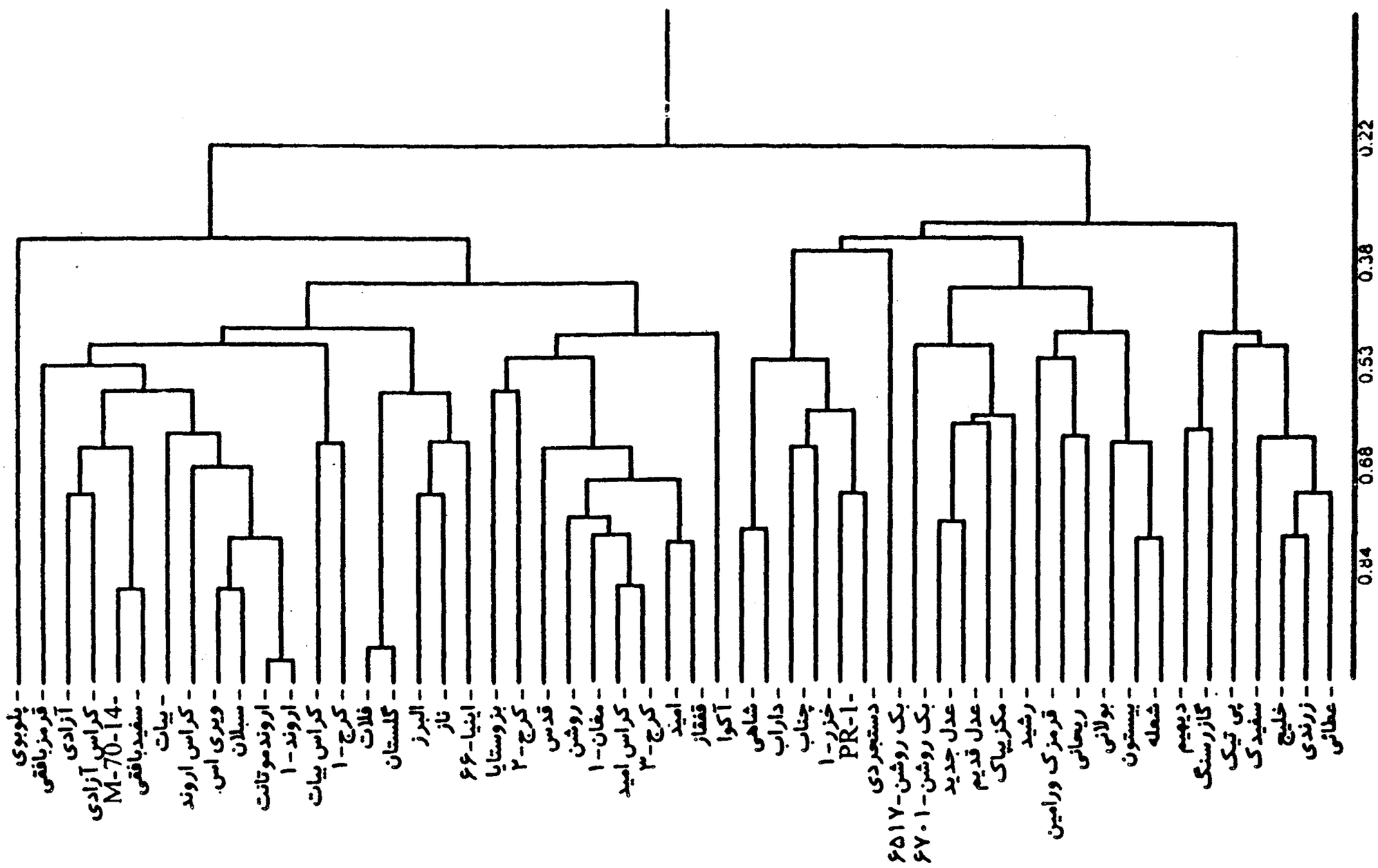
جهت تهیه فرمول الکتروفورزی گلیادین برنامه Glistar.BAS در زبان Quick Basic نوشته شد که اطلاعات مربوط به RM باند های هر رقم را بصورت علائم + در زیر اعداد مربوطه در زیر مقیاسی از (mm) 5-90 نشان می د هد(جدول ۳).

جهت محاسبات آماری و انجام تجزیه خوشه‌ای [9] برنامه Glisim.BAS نوشته شد که درصد تشابه بین ارقام را بر اساس فرمول قبلی (۱) محاسبه کرده و نتیجه را بصورت ماتریس تشابه در فایل ذخیره می‌کند که بعداً برای رسم دندروگرام مورد استفاده قرار گرفت ، تجزیه خوشه‌ای بروش UPGMA و بر اساس روش قبل مسعودی نژاد و یزدی صمدی (۱ و ۲) انجام شد.

نتایج و بحث

فرمول الکتروفورتیکی ارقام مورد آزمایش در شکل ۱ مشاهده می‌گردد . فرمول الکتروفورتیکی باند ها و مقدار حرکت نسبی RM آنها بر حسب باند ۵۰- γ در واریته مارکوئیس محاسبه و ارقام از همدیگر متمایز شدند . به استثنای رقم رشید ، تمامی ارقام مورد مطالعه دارای باندهای مشترک ۱۰ و ۱۳ می‌باشند . برخلاف گلوتنین ، در گلیادین‌امتیازبندی [10] باندها و تفکیک و شناسایی باندهای مختلف در ارقام همراه با مشکلاتی می‌باشد . بعنوان مثال در بعضی موارد که نمونه‌های یکسانی در ژلهای متفاوت تجزیه

1 - Runing time
2- Stain solution
3- Comassie Brilliant Blue R-250
4 - TCA
5 - Destain solution
6- Relative Mobility
7- Illuminatior
8 - Close up
9- Gluster Analysis
10- Scoring



شکل ۲ - فنوگرام حاصل از تجزیه خوشه ای (UPGMA) ارقام از نقطه نظر باندهای گلیادین

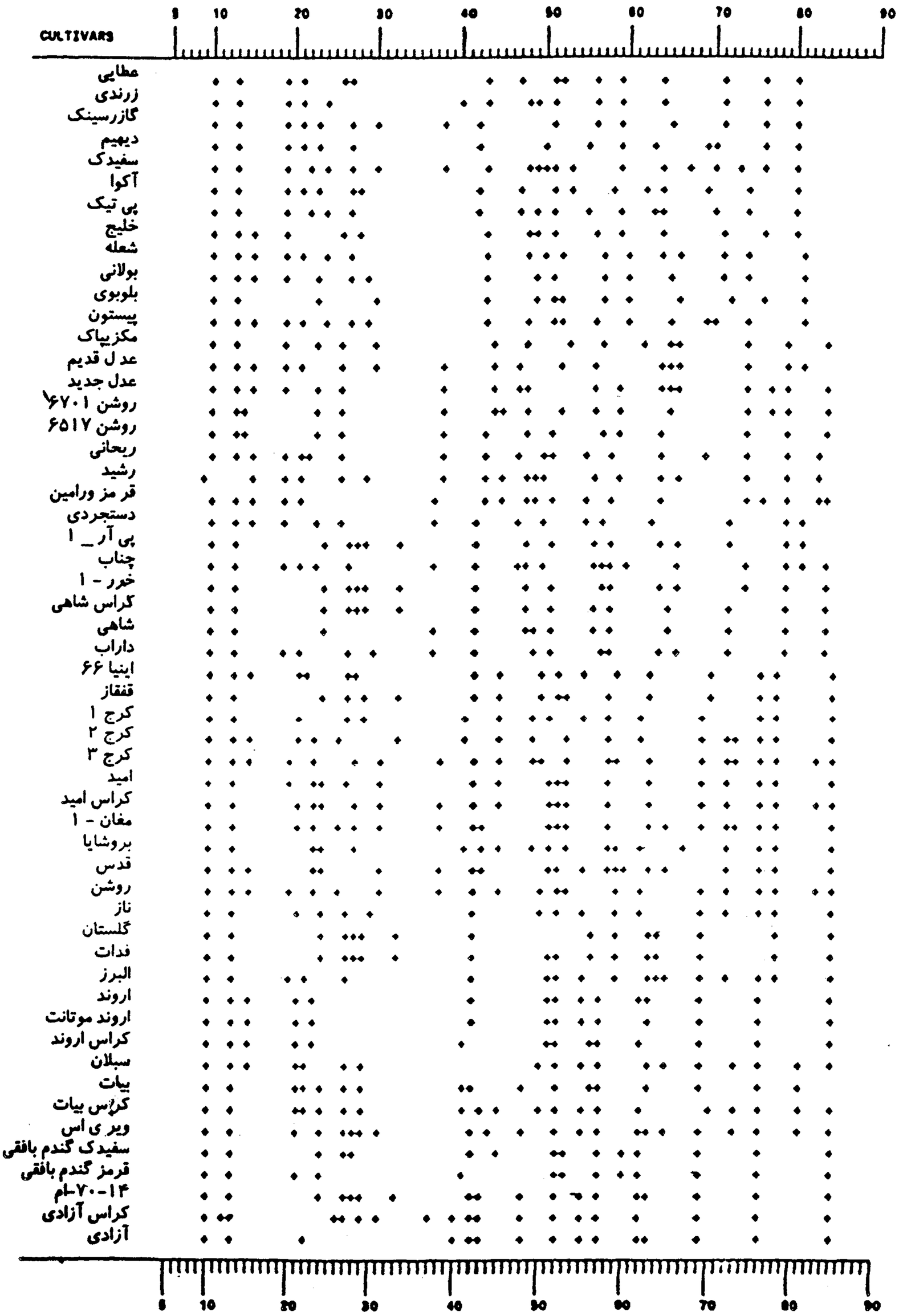
می‌گردند برای هر نمونه نیز تفاوتهایی در کاتولوگ الکتروفورزی مشاهده می‌شود مخصوصاً در شدت رنگ‌پذیری[1] باندها ، ظهور باندهای جدید ضعیف و یا ناپدید شدن بعضی از باندها . همچنین از ژلی به ژل دیگر تفاوتهایی در حرکت نسبی (RM) باندها در مناطق مختلف (آلفا ، بتا ، گاما ، امگا) دیده می‌شود . بعنوان مثال ممکن است در ژلی اولین باند ناحیه امگا (ω) در یک نمونه دارای RM = 13 باشد و در ژلی دیگر همین باند دارای RM = 11 باشد ، (در مقایسه RM مربوط به دیگر نواحی مخصوصا" ناحیه گاما (نتیجه ای برعکس مشاهده گردید). عوامل مختلفی را می توان مسئول این موضوع دانست مخصوصا ، خصوصیات فیزیکی ژل ، تفاوت درجه حرارت ، زمان الکتروفورز ، نحوه استخراج پروتئین ، درجه خلوص آلومینیوم لاکتات و غیره (۱۱). در آزمایش بعمل آمده بیشترین شدت رنگ در ناحیه بین ۴۰ تا ۶۰ واحد RM(جدول ۳) وکمترین شدت رنگ در ناحیه بالاتر از ۷۰ واحد مشاهده شد.

با توجه به ماتریس تشابه بین ارقام ملاحظه می‌گردد که پلی مورفیسم زیادی بین ارقام وجود دارد ، بالاترین تشابه 0.97 می‌باشد که متعلق به دو واریته اروند ـ یک و اروند ـ موتان می‌باشد . دو واریته گلستان و فلات نیز دارای درصد تشابه 0.94 می‌باشند . به عبارتی دیگر بین واریته‌های مورد مطالعه ارقام یکسان از نقطه نظر باندهای گلیادین مشاهده نمی‌گردد .

گلیادین از پروتئینهایی است که بسیار هتروژن بوده و دارای تنوع داخل گونه‌ای زیادی می‌باشد و بر اساس همین موضوع نیز از آن بطور وسیعی در شناسایی و طبقه بندی و همچنین بررسی روند تکاملی در گندم و گونه‌های وابسته استفاده می‌کنند (۲۱، ۱۱، ۹، ۸)

فنوگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA در شکل ۲ دیده می‌شوند . محور درصد تشابه در نقاط مختلف بریده شد و تعداد کلاسترها به همراه دامنه تشابه در (جدول ۳) آمده است . بهترین برش در نقطه S = 0.50 می‌باشد که ۹ کلاستر بشرح زیر بدست می دهد :

1 - Intensity



جدول ۳ - فرمول الکتروفورتیکی ارقام برای باندهای گلیادین

کلاستر اول : عطائی ، زرندی ، خلیج ، سفیدک ، پی‌تیک ، گازرسنگ ، دیهیم

کلاستر دوم : شعله ، بیستون ، بولانی ، ریحانی ، قرمزک ورامین ، رشید

کلاستر سوم : مکزیپاک ، عدل قدیم ، عدل جدید ، بک کراس روشن 6701، بک کراس روشن 6517

کلاستر چهارم : دستجردی

کلاستر پنجم : PR-1، خزر-۱ ، چناب-70 ، داراب ، کراس شاهی ، شاهی

کلاستر ششم : آکوا

کلاستر هفتم : قفقاز ، امید ، کرج-۳ ، کراس امید ، مغان-۱ ، روشن ، قدس ، کرج-۲ ، بزوستایا

کلاستر هشتم : اینیا ، ناز ، البرز ، گلستان ، فلات ، کرج-۱ ، کراس بیات ، اروند-۱ ، اروند-موتان ، سبلان ، ویری‌اس

کراس اروند ، بیات ، سفید گندم بافقی ، لاین M-70-14، کراس آزادی ، آزادی

کلاستر نهم : بلوبوی

جدول ۳ - دامنه تشابه و تعداد کلاستر ها

دامنه تشابه (S)	تعداد کلاستر
S = 0.80	44
S = o.70	33
S = 0.60	20
S = 0.50	9
S = 0.40	4
S = 0.38	2

همانطور که از طبقه بندی ارقام توسط تجزیه خوشه‌ای مشاهده می‌گردد ، پروفیل‌های الکتروفورزی پتانسیل قابل توجهی برای طبقه بندی و شناسایی دارند (۱، ۲) الکتروفورز پروتئینهای محلول در الکل (گلیادین) به همراه تجزیه خوشه‌ای بر اساس درصد تشابه بخوبی قادر به گروهبندی و تفکیک ارقام مختلف از یکدیگر می‌باشند و از آنها میتوان جهت بررسی رابطه خویشاوندی ، تکاملی و تنوع ژنتیکی و جغرافیایی استفاده نمود . بعنوان مثال در کلاستر سوم به ترتیب ارقام عدل قدیم و عدل جدید و لاینهای حاصل از تلاقی برگشتی روشن را داریم که ژنومهای با منشاء یکسان با هم، در یک کلاستر قرار گرفته‌اند .

در کلاسترهای پنجم و هفتم و هشتم نیز به ترتیب ارقام با منشاء مشابه مثل شاهی و کراس شاهی ، امید و کراس امید ، اروند-۱ ، اروند-موتان و کراس اروند را داریم که نشان دهنده قدرت تجزیه خوشه‌ای و نتایج الکتروفورزی در بررسی خویشاوندی و تکامل بین ارقام است. در کلاستر هفتم ارقام قفقاز و بزوستایا با هم قرار گرفته‌اند که هر دو منشاء جغرافیایی یکسان دارند .

نتیجه گیری

گلیادین به دلایل زیر می‌تواند بعنوان یکی از مارکرهای بسیار مناسب جهت بررسی ساختار ژنتیکی در گندم مورد استفاده قرار گیرد (۶).

- تحت تأثیر شرایط محیطی قرار نمی‌گیرد .
- ژنهای کد کننده پلی پپتیدها توارث هم بارز دارند لذاافراد ناخالص خودشان را نشان می‌دهند .
- در پی سالهای تکامل این باندها مورد سلکسیون قرار نگرفته‌اند لذا انواع موتان را می‌توان یافت .
- هر ژنوتیپ حدود ۳۰-۲۰ باند دارد لذا وسیله بسیار مناسبی برای شناسایی و تشخیص ارقام است .

تکنیک A-PAGE به همراه روشهای آماری چند متغیره ، مثل تجزیه خوشه‌ای می‌تواند بخوبی جهت بررسی مسائل مختلف ژنتیکی ، تاکسونومیکی و تکاملی در گندم مورد استفاده قرار گیرد . تلاش در جهت فهم بهتر و بیشتر سیستم کنترل ژنتیکی باندهای گلیادین و بررسی همبستگی باندها با صفات کیفی در گندم می‌تواند از اهداف مهم در آینده باشد .

سپاسگزاری

از دانشگاه تهران به خاطر تأمین هزینه طرح تشکر می گردد. آزمایشات مربوط به این تحقیق نیز در مرکز تحقیقات بین المللی بیوشیمی-بیوفیزیک انجام شده که بدینوسیله تشکر و قدردانی می گردد.

مراجع مورد استفاده REFERENCES

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

۲ - مسعودی نژاد،ع . یزدی صمدی ،ب، b ۱۳۷۲ . بررسی کمی پروتئینهای ذخیره ای 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

1- Baker . R. j , W. Bushuk . 1978 . Inheritance of Differences of Gliadin Electrophoregram in the Progeny of Neepawa and Pitic 62 Wheats . Can. j. Plant . Sci. 58 : 325 - 329

2- Brown . j. W. S , R. B. Flavell . 1981 . Fractionation of Wheat Gliadin and Glutenin Subunits by Two Dimention Electrophoresis and Role of Group 6 and Group 2 Chromosomes in Gliadin synthesis. Theor Appl Genet . 59: 349 - 359

3- Branlard , G . 1982 . Correlation Between Gliadin Bands . Theor App Genet . 64 : 163 - 168

4- Cooper . D. B , R. G. Sears , G. L. Lookhart , B. L. jones . 1985 . Heritable Somaclonal Variation in Gliadin Proteins of Wheat Plants Derived From Immature Embryo Callus Culture . Theor App Genet . 71 : 784 - 790

5- Doekes. G. j. 1973 . Inheritance of Gliadin Composition in Bread Wheat , (Triticum aestivum . L.). Euphytica . 22: 28 - 34

6- E. V. Metakovsky , A. yu. Novoselskaya , M. M. Kopus , T. A. Sobko , A. A. sozinov . 1983 . Blocks of Gliadin Components in Winter Wheat Detected by One - Dimentional Polyacrylamide Gel Electrophoresis . Theor App Genet . 67 : 559 - 568

7- Elton. G. A. H , j. A. D. Ewart . 1962 . Starch - Gel Electrophoresis of Cereal Proteins . J. Sci. Food . Agric . 13 : 62 - 69

8- Garcia - Olmedo . F , P. Carbonero , B. L. Jones . 1982 . Chromosomal Locations of Gene That Control Wheat Endosperm Proteins . In : Pomeranz. Y. (Eds) . Adv. Cereal . Sci. Tech. Vol. 5. Am Assoc Cereal Chemists . Inc. St. Paul. Min. PP. 2 - 47

9- Jones . B. L , G. L. Lookhart , S. B. Hall , K. F. Finney . 1982 . Identification of wheat Cultivars by Gliadin Electrophoresis : Electrophoregrams of the 88 Wheat Cultivars Most Commonly Grown in the United States in 1979 . Cereal . Chem . 59 : 181 - 188

10- Lafiandra . D , D. D. Kasarda . 1985 . One - and Two - Dimentional (Two - pH Polyacrylamide Gel Electrophoresis in a Single Gel: Seperation of Proteins . Cereal Chem . 62(5) : 314 - 319

11- Lookhart . G. L , B. L. Jones , S. B. Hall , K. F. Finney . 1982. An Improued Method for Standardizing Polyacrylamid Gel Electrophiresis of Wheat Gliadin Proteins . Cereal Chem . 59: 179-181

12- Mecham . D. K , D.D. Kasarda , C.O. Qualset . 1978 . Genetic Aspects of Wheat gliadin proteins . Biochemical Genetics . 16: 831 - 853

13- Mosleth,E,A,K,Uklen. 1987, Influence of HMW Subunits of Glutenin and Gliadins on Baking Quality in Wheat . 2 . The use of partial least squars (PLS) Regression for Evaluation of Proteins

Quality and Prediction of Baking Quality From the Electrophoretic Pattern . PP . 548 - 552 In : Proc. 3rd . Int. Workshop on Gluten Proteins . R. Lasztity and F. Bekes (Eds). World Scientific pub. Co. Singapore .

14- Novosclskaya . Ayu , E. V. Metakovsky , A. A. Sozinov . 1983. The Study of Gliadin Polymorphism of Some Wheat Varieties by Means of One - and Two - Dimentional Electrophoresis . Cytol Genet . 17 : 45 - 49

15- Rybalka . A. L. 1975 . Hybridization and Monosomic Analysis of Gliadin . Dis VSGl Obessa

16- Shewry . P. R , A. j. Faulks , H. M. Pratt , B. j. Miflin. 1978 . The Varietal Identification of Single Seed of Wheat by SDS - PAGE of Gliadin . J. Sci. Food . Agric . 29: 847 - 849

17- Shewry . P. R , A. j. Faulks , H. M. Pratt , B. j. Miflin. 1978 . The Varietal Identification of Single Seed of Wheat by SDS - PAGE of Gliadin . J. Sci. Food . Agric . 29: 847 - 849

18- Wrigley. C. W , K. W. Shephered. 1973 . Electrofocusing of Grain Proteins frome Wheat Genoty Pes . Ann NY Acad Sci. 209: 154 - 162

19- Wall. j. S. 1979 . The Role of Wheat Proteins in Determining Baking Quality . PP. 275 - 311 . In : D. L. Laidman and R.G. Wyn jones . (Eds) Recent Advances in the Biochmistry of Cereals . Academic Press , London . New York

20- Woychik . j. H , j. A. Boundy . 1961. Electrophoresis of Wheat Gluten Proteins With Concentrated Urea . Arch . Biochem . Biophys . 94: 477 - 481

21 - Wrigley . C. W , j. C. Autran , W. Bushuk . 1982 . Identification of Cereal Variety by Gel Electrophoresis of the Grain Proteins . In: Pomeranz . Y(Ed) . Adv Cereal Sci Technol . Vol. 5. Am Soc Cereal Chem Inc. St. Paul. Min. PP 211 - 259

Identification and Classification of Iranian Wheat Cultivars by GLiadin Polymorphism Using Electrophoresis Technique

A.MASSOUDI NEJAD, B.YAZDI SAMADI , C.ABD MISHANI AND M.N. SAR BLOUKI

Respectively former Graduate Student , Professors , College of Agriculture ,University of Tehran , and Professor of Institute of Biochemistry - Biophysis

Accepted 18 June. 1997

SUMMARY

Gliadin is one of the storage protein in wheat endosperm which shows high polymorphism .It is controled by a group of genes located on the short arms of homologous chromosomes of group 1 and 6 About 50 Iranian and exotic wheat cultivars were studied for their Gliadian polymorphism .Using A-PAGE electrophoresis , Marquis was used as check variety. A high degree of polymorphism was found in cultivars under study , especially in gama and omega zones protein subunits . The degree of stainbility of banding were different . The highest density was observed in area between 40 to 60 relative mobility (RM) units. Cultivar grouping was done by UPGMA cluster analysis , and nine cluster were identified . Cultivar such as Arvand , Arvand -1 and Arvand -Mutant , with similar permplasm were located in same cluster also cultivars like Benzostaya and Ghafghaz with the same Geographical origin were also gouped in same cluster.