دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشنامه اصلاح گیاهان زراعی

شناسایی آلل‌های موثر در سختی دانه‌ی ارقام مختلف گندم نان به کمک نشانگرهای مولکولی

ساناز نوروزدخت نوخندان[۱]، علی ایزانلو[۲]، محمد ضابط[۲] و محمدقادر قادری[۲]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشگاه بیرجند، (نویسنده مسوول: sana.noroozi1990@gmail.com)
۲- استادیار، دانشگاه بیرجند

تاریخ دریافت: ۹۴/۴/۱ تاریخ پذیرش ۹۴/۸/۱۰

چکیده

سختی دانه عامل اصلی طبقه‌بندی و استفاده از گندم است. گندم با بافت دانه سخت دارای میزان پروتئین بیشتری بوده و گلوتن فشرده‌تری دارد و تولید نان با کیفیت مطلوب می‌کند. گندم‌های نرم محتوای پروتئین کمتر و گلوتن ضعیف‌تر و سست‌تری دارند و کیفیت نان تولیدی مرغوب نخواهد بود ولی برای تولید کیک و شیرینی مناسب می‌باشند. دو ژن Pina-D1 و Pinb-D1 نقش مهمی در بروز سختی دانه دارند. در این تحقیق شناسایی آلل‌های کنترل کننده سختی دانه ارقام مختلف گندم نان توسط تکثیر با آغازگرهای آلل اختصاصی انجام گرفت. در مکان ژنی Pina-D1، آلل‌های Pina-D1a و Pina-D1b به ترتیب در ٦٤ درصد و ٣٦ درصد از ارقام مشاهده شد. اما، در مکان ژنی Pinb-D1، ۹۰ درصد از ارقام دارای آلل Pinb-D1a و ۱۰ درصد از ارقام دارای آلل Pinb-D1b بودند. سختی ارقام توسط دستگاه اینفراماتیک نیز اندازه‌گیری شد. اعداد کمتر از ۵۰ برای گندم‌های نرم و اعداد بیشتر از ۵۰ برای گندم‌های سخت در نظر گرفته شد. این مطالعه مشخص کرد، ارقامی که از نظر ژنوتیپی سختی و نرمی را نشان دادند، با نتایج حاصل از دستگاه اینفراماتیک مطابقت داشتند. نتایج حاصل از تجزیه همبستگی صفات، همبستگی مثبت و معنی‌داری رابین صفت سختی دانه با درصد پروتئین دانه و عدد زلنی نشان داد. نتایج تجزیه ارتباطی بین صفت و نشانگر نشان داد که آلل Pina-D1b بیشترین اثر را در سختی دانه داشت. در تجزیه رگرسیون گام به گام برای بررسی رابطه صفات و نشانگر، مکان ژنی Pina وارد مدل شد و صفات حجم نان، سختی دانه و جذب آب متغیرهای وابسته به این نشانگر بودند. اطلاعات به دست آمده از این تحقیق می‌تواند به‌نژادگران را در تعیین خصوصیت ارقام مختلف گندم و گزینش کارآمد والدین در برنامه‌های اصلاحی آتی گزینش از طریق نشانگر یاری نماید.

واژه‌های کلیدی: پوروایندولین، سختی دانه، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

مقدمه

سختی دانه یکی از مهم‌ترین پارامترهای مرتبط با کیفیت گندم نان است که بر آرد کردن، پخت و کیفیت فرآورده نهایی تأثیر دارد که بر این اساس گندم‌های هگزاپلوئید را به گروه‌های سخت و نرم تقسیم می‌کنند (۲۰). در آندوسپرم گندم نرم، گرانول‌های نشاسته اتصال ضعیفی با شبکه پروتئینی محاط کننده دارند. دانه به راحتی آسیاب می‌شود و آردی با بافت نرم و نسبت بالای گرانول‌های تخریب نشده نشاسته تولید می‌کند. در عوض در گندم سخت پیوستگی بیشتری بین گرانول‌های نشاسته و شبکه پروتئین وجود دارد و آردی با بافت زبر و نسبت بالاتری از گرانول‌های تخریب شده نشاسته تولید می‌نماید (۲). گندم سخت به خاطر قدرت جذب آب بیشتری که نشاسته تخریب شده دارد، برای پخت نان ترجیح داده می‌شود (۱۷). سختی دانه به وسیله مکان ژنی سختی (Ha) که روی بازوی کوتاه کروموزوم 5D قرار دارد، کنترل می‌شود (۱). این مکان ژنی دربرگیرنده دو ژن کاملاً پیوسته پوروایندولین a (Pina) و پوروایندولین b (Pinb) می‌باشد (۲۰). پوروایندولین‌ها فقط در بذرهای در حال رشد گندم نان بیان می‌شوند و هیچ ژن هومولوگ با آن در گندم دوروم وجود ندارد (۹). ژن‌های پوروایندولین a و b در حالت آلل وحشی (Pina-D1a/Pinb-D1a) منجر به ایجاد بافت دانه نرم می‌شوند و سختی دانه نتیجه جهش در هر یک از این دو ژن است. در گندم دوروم که فاقد هر دو ژن پوروایندولین a و b است، بافت دانه خیلی سخت می‌باشد (۲۰). ژن‌های پوروایندولین a و b کدکننده‌ی دو پلی‌پپتید هستند که با هم بخش عمده ترکیبی به نام فریابیلین را تشکیل می‌دهند (۱۲،۸). مقدار فریابیلین روی نشاسته آبشویی شده گندم نرم زیاد، ولی در گندم سخت ناچیز است و در گندم دوروم وجود ندارد (۱۲). ثابت شده که نرمی دانه با مقدار کمّی این ترکیب همبستگی بالایی دارد و با افزایش مقدار این ترکیب روی سطح نشاسته نرمی دانه افزایش می‌یابد (۱۲). فریابیلین به عنوان یک پروتئین غیر چسبنده بین گرانول نشاسته و شبکه پروتئین اثر می‌کند. بنابراین، دو ترکیب به راحتی از هم جدا می‌شوند و این منجر به نرمی بیشتر می‌شود (۲۶). تعداد زیادی جهش برای Pinb-D1 گزارش شده است که به دو گروه کلی تقسیم می‌شوند. گروه اول شامل جهش‌هایی است که باعث جایگزینی اسیدآمینه‌ای با اسیدآمینه دیگر می‌شود و باعث ایجاد تغییر در ساختمان و عملکرد پروتئین حاصله می‌شود. گروه دوم شامل جهش‌هایی است که یک کدون پایان را در وسط توالی کدکننده جایگزین می‌کند (۵،۶،۲۰،۲۷). تعیین ژنوتیپ ارقام مختلف به لحاظ دارا بودن ژن‌های Pina-D1 و Pinb-D1 با استفاده از تکنیک‌های مختلفی از قبیل روش PCR آلل‌های اختصاصی (۱۰)، چندشکلی در توالی‌های تکثیری جدا شده (CAPS)[۱] (۱۶)، تکثیر گرمادهی توالی‌ها و آرایه (SNP)[۲] (۱۴) و آغازگرهای همبارز STS (۱۵) انجام شده است. اگرچه که این قبیل تعیین ژنوتیپ‌ها در برنامه‌های اصلاحی بخاطر فقدان اطلاعات مفید، گران یا زمان‌بر بودن، منظور نشده‌اند، ولی

1- Cleaved Amplified Polymorphic Sequences
2- Single Nucleotide Polymorphism

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-07-15]
[DOI: 10.29252/jcb.9.21.122]

آگاهی از وضعیت آللی Pinb-D1 و Pina-D1 برای ثبت مشخصات واریته‌ها و لاین‌های اصلاحی در برنامه‌های اصلاحی گندم می‌تواند به توضیح بهتر درباره طبقه‌بندی طبیعی و مختلف سختی دانه کمک کند. هم‌چنین، این گزارشات می‌توانند برای شناخت بهتر ژرم‌پلاسم و استفاده از ارقام با ارزش بالای ژنوتیپی در صفت سختی دانه به عنوان والد بخشنده کمک کند. بنابراین، هدف از این تحقیق شناخت وضعیت آللی ژن‌های Pina و Pinb و ارتباط آنها با صفات کیفی دانه در ارقام مختلف گندم نان بود.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی: در این تحقیق تعداد ۸۳ رقم گندم نان شامل ارقام؛ ارگ، اروند موتانت، استار، اکبری، الموت، الوند، امید، اوحدی، اینیاء، آذر۱، آذر۲، آراتا، آزادی، بزوستایا، بک کراس، بک کراس روشن بهاره، بم، بولانی، بهار (M-79-7)، بیات، پیتیک، پیشتاز، تجن، چمران، داراب۲، دریا، دز، رسول، رصد، روشن، ریژاو، زاگرس، زرین، سایسون، سبلان، سپاهان، سرداری، سرداری۱۰۱، سومالی۳، سیستان، شاهپسند، شاهی، شعله، شهریار، شیراز، شیرودی، طبسی، طوس، قدس، قفقاز، کاسکوژن، کراس البرز، کراس فلات هامون، کرج۲، کرج۳، کرخه، کوهدشت، کویر، گاسپارد، مارون، مرودشت، مغان۱، مغان۲، مغان۳، مهدوی، ناز، نوید، نیک نژاد، وری ناک، هامون، هما، هیرمند، DN-11، اکسکلیبر، گلادیوس، GR، GS، کوکری، MV-17، S-83-3، ویبلی، WS-82-9 مورد بررسی قرار گرفتند.

استخراج DNA و انجام PCR: استخراج DNA ژنومی به روش پالوتا و همکاران (۲۱) با اندکی تغییرات از برگ‌های تازه گیاهان در مرحله دو تا سه برگی انجام شد. بررسی کمّیت و کیفیت DNA استخراج شده با روش‌های اسپکتوفتومتری توسط دستگاه نانودراپ و آگارز ۰/۸ درصد صورت گرفت. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به منظور بررسی تکثیر قطعاتDNA، برای تکثیر جایگاه‌های نشانگر آلل اختصاصی (جدول ۱) در ترموسایکلر اپندورف انجام گردید. سپس بارگذاری محصولات PCR روی ژل آگارز و الکتروفورز انجام شد. رنگ‌آمیزی ژل و سپس تعیین ژنوتیپ نمونه‌های گیاهی و عکس‌برداری با ژل‌داک انجام شد. رتبه‌بندی نشانگرها و تعیین آلل‌های اختصاصی بر اساس وجود یا عدم وجود نوار اختصاصی صورت گرفت. براساس اطلاعات بدست آمده، ترکیب آللی برای ژن‌های پوروایندولین a و b در ژنوتیپ‌های مختلف تعیین شد. غلظت مواد بکار رفته در یک واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در حجم ۲۰ میکرولیتر و با ۰/۲ میکرولیتر Taq DNA پلیمراز، ۰/۸ میکرولیتر $MgCl_2$، ۲ میکرولیتر بافر PCR (10x)، ۱ میکرولیتر از DNA ژنومی (۱۰۰ نانو گرم)، ۰/۴ میکرولیتر dNTP، ۱ میکرولیتر از هر آغازگر و ۱۳/۶ میکرولیتر آب دیونیزه انجام شد.

جدول ۱- مشخصات آغازگرهای اختصاصی با اندازه محصول مورد انتظار و برنامه چرخه دمایی PCR

Table 1. The primer characteristics with the expected size product and the PCR thermo cycling conditions

نام آغازگر	آلل	توالی آغازگر (5'-3')	چرخه دمایی	اندازه نوار مورد انتظار (bp)
Pina-F1c Pina-R1b	Pina-D1a	CACAACCGCACACAGAAATC GATCACGCTGAAATCCGAA	۹۴°C، ۵ دقیقه- ۳۵ چرخه (۹۴°C، ۳۰ ثانیه- ۶۰°C، ۳۰ ثانیه- ۷۲°C، ۹۰ ثانیه)، ۷۲°C، ۱۰ دقیقه	۴۴۷ ۶۲۵
Pina-R2a	Pina-D1b	TCACCCAATGCTGAAGACAC		
Pinb-D1aF Pinb-D1aR	Pinb-D1a	ATGAAGACCTTATTCCTCCTA CTCATGCTCACAGCCGCC	۹۴°C، ۳ دقیقه، ۳۵ چرخه (۹۴°C، ۴۵ ثانیه- ۵۷° C، ۳۵ ثانیه- ۷۲°C، ۴۵ ثانیه)، ۷۲°C، ۱۰ دقیقه	۲۵۰
Pinb-D1aF Pinb-D1bR	Pinb-D1b	ATGAAGACCTTATTCCTCCTA CTCATGCTCACAGCCGCT		۲۵۰

سنجش سختی دانه

ارزش سختی دانه به وسیله دستگاه اینفراماتیک[1] ۸۶۰۰، روی دانه‌های سالم از هر نمونه اندازه‌گیری شد. طبق اعداد استاندارد، اعداد کمتر از ۵۰، برای گندم‌های نرم و اعداد بین ۵۰ تا ۸۰، برای گندم‌های سخت در نظر گرفته شدند.

تجزیه آماری

الگوهای نواری حاصل بر اساس اندازه طول نوار تشکیل شده به سختی دانه یا نرمی دانه ترجمه شدند. تجزیه واریانس صفات اندازه‌گیری شده و مقایسه اثر اصلی آلل‌های نشانگر بر صفات مختلف توسط نرم‌افزار $GenStat_{12.10}$ انجام شد.

صفات ظاهری دانه مانند طول وعرض دانه توسط کولیس دیجیتال با دقت ۰/۱ میلی‌متر اندازه‌گیری شد. صفات کیفی دانه نظیر درصد پروتئین، درصد رطوبت، عدد زلنی، سختی دانه، جذب آب و حجم نان توسط دستگاه اینفراماتیک 8600 NIR در مؤسسه تحقیقات نهال و بذر کرج اندازه‌گیری شدند.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها بر اساس آماره‌های توصیفی شامل بیشینه، کمینه، میانگین، انحراف معیار و دامنه تغییرات مربوط به این صفات محاسبه و ارزیابی شدند. روابط بین صفات با محاسبه همبستگی ساده بررسی شد. رگرسیون گام به گام به‌منظور یافتن آلل‌های موثر بر صفات کیفی دانه با استفاده از نرم‌افزار SPSS انجام گرفت. در تجزیه رگرسیون گام به گام صفات به عنوان متغیر وابسته و آلل‌های نشانگر به عنوان متغیر مستقل در نظر گرفته شدند.

نتایج و بحث

پارامترهای ژنتیکی

آغازگرهای مورد استفاده برای شناسایی آلل‌ها در مکان ژنی Pina (جدول ۱)، قطعه ۴۴۷ جفت بازی را برای شناسایی آلل Pina-D1a و قطعه ۶۲۵ جفت بازی را برای آلل Pina-D1b تکثیر نمودند (شکل ۱). براین اساس، در این

1- NIR PERTEN 8600

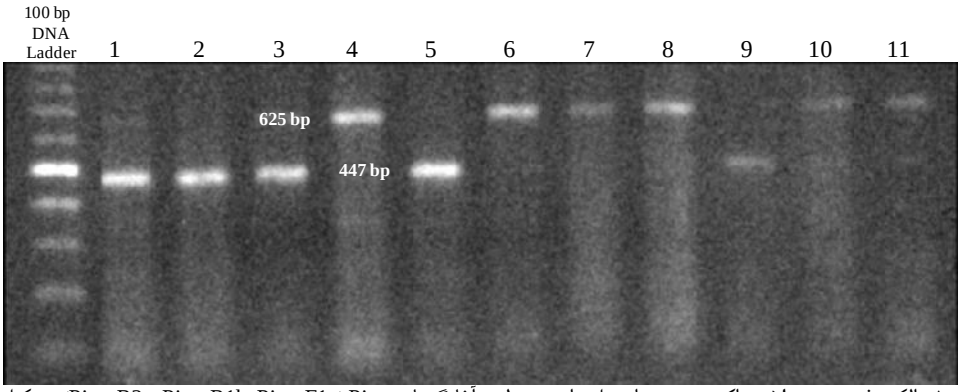
[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-07-15]

[DOI: 10.29252/jcb.9.21.122]

مکان ژنی، بیشترین فراوانی آللی مربوط به آلل Pina-D1a با ۶۴ درصد بود و آلل Pina-D1b نیز در ۳۶ درصد از ارقام مورد مطالعه مشاهده شد. اما آغازگرهای مورد استفاده برای شناسایی آلل‌ها در مکان ژنی Pinb، قطعه مورد انتظار ۲۵۰ جفت بازی را برای آلل‌های Pinb-D1a و Pinb-D1b تکثیر کردند (شکل ۲). در مکان ژنی Pinb-D1، ۹۰ درصد از ارقام دارای آلل Pinb-D1a و ۱۰ درصد از ارقام دارای آلل Pinb-D1b بودند.

ارقامی که در هر دو مکان ژنی، آلل‌های نوع وحشی (Pina-D1a و Pinb-D1a) را داشته باشند جزو ارقام دانه نرم در نظر گرفته می‌شوند ولی ارقامی که حداقل یک آلل نوع جهش یافته (Pinb-D1b/Pina-D1b) در هریک از مکان‌های ژنی را داشته باشند جزو ارقام دانه سخت طبقه بندی می‌شوند. بر اساس نتایج این تحقیق، ۵۵ درصد از ارقام مطالعه شده در هر دو مکان ژنی آلل نوع وحشی را داشتند، یعنی دارای بافت دانه نرم و ۴۵ درصد از ارقام دارای بافت دانه سخت بودند. ارقام دانه سخت خود شامل سه گروه بودند. ارقامی که دارای آلل جهش یافته Pinb-D1b بودند و ۹ درصد از ارقام مورد مطالعه را شامل می‌شدند، ارقامی که دارای آلل جهش یافته Pina-D1b بودند که در ۳۵ درصد از ارقام مشاهده شد و در نهایت ارقامی که دارای آلل جهش یافته در هر دو مکان ژنی بودند (Pinb-D1b/Pina-D1b) که ۱ درصد از ارقام را شامل می‌شدند (جدول ۲). طبق آزمایش صورت گرفته مشخص گردید که انواع گندم‌های سخت بیشتر از نوع جهش یافته Pina-D1b بودند که با گزارشات قبلی مطابقت دارد. لیلمو و همکاران (۱۷) در مطالعه خود روی خزانه ژنی مرکز بین‌المللی اصلاح ذرت و گندم سیمیت جهش آلل نول پوروایندولین a (Pina-D1b) را فراوانترین آلل سختی در این خزانه ژنی معرفی کردند که در ۲۸۳ لاین از ۳۲۸ لاین موجود بوده است. نتایج چن و همکاران (۵ و ۶) نیز حاکی از فراوانی بیشتر آلل جهش یافته Pina-D1b در مقایسه با Pinb-D1b بود. مطالعات آنان روی رقم‌های تاریخی و توده‌های بومی چین فراوانی آلل‌های Pina-D1b و Pinb-D1b و Pinb-D1p در گندم‌های سخت توده بومی به ترتیب ۴۳/۸، ۱۲/۳، ۳۹/۷ درصد نشان داد در حالیکه در گندم‌های سخت تاریخی به ترتیب ۴۸/۵، ۳۶/۸، ۱۴/۷ بود. محمدی و همکاران (۱۹) نیز ترکیب آللی Pina-D1a/Pinb-D1a را با بیشترین فراوانی در ارقام مورد مطالعه مشاهده کردند. آنها همچنین دومین ترکیب آللی از نظر فراوانی را ترکیب Pina-D1b/Pinb-D1a گزارش کردند. ملک زاده و همکاران (۱۸) گزارش کردند که گندم‌های با آلل Pina-D1a مقدار سختی دانه بیشتری را نسبت به گندم‌های دارای آلل Pinb-D1b نشان داند.

اما، کین و همکاران (۴) آلل Pinb-D1b را مهم‌ترین آلل تعیین‌کننده سختی دانه در ژرم پلاسم گندم‌های استرالیای جنوبی گزارش کردند، بطوریکه این آلل در ۸۴ درصدارقام و لاینهای اصلاحی یافت شد. در ارقام گندم سخت آمریکای شمالی و ژرم پلاسم اروپای شمالی (۱۶) نیز آلل Pinb-D1b به عنوان فراوانترین آلل تعیین‌کننده سختی دانه گزارش شد.

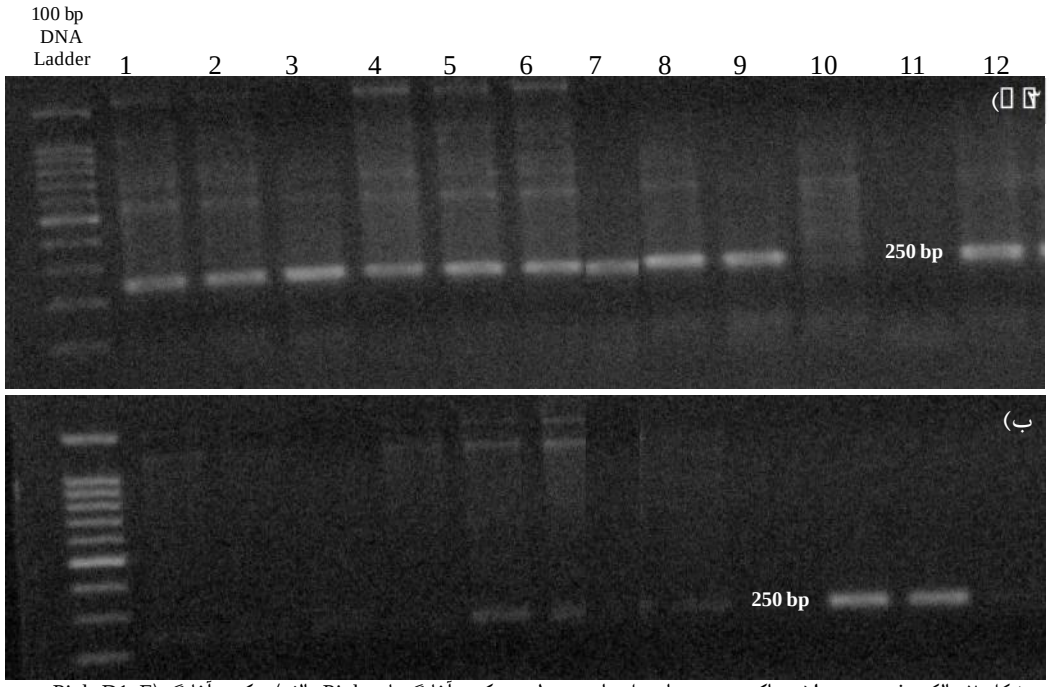


شکل ۱– الکتروفورز محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، مربوط به آغازگرهای Pina (Pina-F1c، Pina-R1b، Pina-R2a). تشکیل نوار ۴۴۷bp نشان‌دهنده آلل Pina-D1a و فنوتیپ دانه نرم و تشکیل نوار ۶۲۵bp نشان‌دهنده آلل Pina-D1b و فنوتیپ دانه سخت می‌باشند. ارقام بکار رفته در شکل به ترتیب عبارتند از: ۱) دریا، ۲) ارگ، ۳) روشنف ۴) دز، ۵) زرین، ۶) تجن، ۷) پیشتاز، ۸) چمران، ۹) کوهدشت، ۱۰) کویر، ۱۱) مارون.

Figure 1. The electrophoresis of PCR products for primers of Pina-F1c ،Pina-R1b ،Pina-R2a. The amplified fragments of 447 bp and 625 bp representing Pina-D1a and Pina-D1b alleles at the puroindoline a locus for grain softness and hardness, respectively. The lanes from 1 to 11 representing cultivars of Darya, Arg, Rooshan, Dez, Zarrin, Tajan. Pishtaz, Chamran, Kohdasht, Kavir and Maroon, respectively.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-07-15]

[DOI: 10.29252/jcb.9.21.122]



شکل ۲- الکتروفورز محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، مربوط به ترکیب آغازگرهای Pinb. الف) ترکیب آغازگر (Pinb-D1aF، Pinb-D1aR) تشکیل‌دهنده نوار ۲۵۰bp برای شناسایی آلل Pinb-D1a و فنوتیپ دانه نرم می‌باشند، ب) ترکیب آغازگر (Pinb-D1aF، Pinb-D1bR) نیز تشکیل‌دهنده نوار ۲۵۰bp جهت تشخیص آلل Pinb-D1b و فنوتیپ دانه سخت می‌باشند. ارقام بکار رفته در شکل به ترتیب از ۱-۱۲ عبارتند از: ارگ، بولانی، تجن، هما، هیرمند، اکبری، سبلان، امید، کویر، گاسکوژن، داراب۲، مهدوی.

Figure 2. Agarose gel electrophoresis of PCR products for the allele specific primers of A) Pinb-D1aF and Pinb-D1aR for identification of Pinb-D1a allele, and B) Pinb-D1aF and Pinb-D1bR for identification of Pinb-D1b allele. M is 100 bp DNA size marker, numbers from left to right (1-12) were cultivars of Arg, Boolani, Tajan, Homa, Hirmand, Akbari, Sabalan, Omid, Kavir, Kaskogen, Darab2, Mahdavi, respectively.

جدول ۲- طبقه‌بندی ارقام براساس ترکیب آللی و شاخص سختی دانه

Table 2. The classification of wheat germplasm based on allelic combination and grain hardness index

ارقام	میانگین سختی دانه± خطای معیار	فنوتیپ	ترکیب آللی (Pina/Pinb)
اترک، ارگ، اروندموتانت، استار، اکبری، الموت، امید، اوحدی، آذر۱، آذر۲، آزادی، بک کراس روشن زمستانه، بک کراس روشن بهاره، بم، بولانی، بیات، پیتیک، دریا، رصد، روشن، زرین، سایسون، سبلان، سرداری، سرداری۱۰۱، سومالی۳، سیستان، شاه پسند، شاهی، شهریار، طبسی، کراس البرز،کراس فلات هامون، کرج۲، کوهدشت، گاسپارد، مغان۲، مهدوی، ناز، نوید، نیک نژاد، هامون، هما، هیرمند، MV17، S-83 3	۴۹/۷۶±۰/۳۹	نرم	Pina-D1a/Pinb-D1a
الوند، آرتا، بهار MV-79-7، پیشتاز، تجن، چمران، دز، رسول، زاگرس، سپاهان، شعله، شیراز، شیرودی، طوس، قدس، کرج۳، کرخه، کویر، مارون، مرودشت، مغان۳، وری ناک، DN11، Excalibur، GR، GS، Kukri، WEEBLE، WS-82-9	۵۱/۳۲±۰/۴۹	سخت	Pina-D1b/ Pinb-D1a
اینیا، بزوستایا، ریژاو، قفقاز، گاسکوژن، مغان۱، Gladious	۵۰/۸۳±۰/۴۸	سخت	Pina-D1a/Pinb-D1b
داراب۲	۵۲/۰۰±۰/۳۹	سخت	Pina-D1b/Pinb-D1b

آمار توصیفی برای صفات کیفی دانه اندازه‌گیری شده در جمعیت گندم مورد مطالعه (جدول ۳) نشان داد که میانگین پروتئین دانه ۱۲/۸۱ درصد با دامنه تغییرات ۱۴-۱۱/۵ و ضریب تغییرات ۵/۳ درصد بود. میانگین سختی دانه ۵۰/۴۱ با ضریب تغییرات ۵.۲ درصد بود. عدد زلنی با میانگین ۳۵/۰۹ و دامنه تغییرات ۴۰-۳۲ و ضریب تغییرات ۵/۲ بدست آمد. صفت جذب آب دانه با کمترین ضریب تغییرات (۱/۲ درصد) و صفت طول دانه با ضریب تغییرات (۸/۶ درصد) و عرض دانه با ضریب تغییرات (۹/۹ درصد) بیشترین ضریب تغییرات را دارا بودند (جدول ۳). ضریب تغییرات به دست آمده برای صفات، میزان تنوع فنوتیپی در جمعیت را نشان می‌دهد.

نتایج حاصل از تجزیه واریانس صفات برای آلل‌های مختلف Pin (جدول ۴) نشان داد که آلل Pina بر صفات جذب آب و سختی دانه و حجم دانه تأثیر گذار بوده و با توجه به میانگین بدست آمده برای آلل‌های مورد نظر در مکان‌های ژنی Pina می‌توان بیان کرد که آلل Pina-D1b بیشترین تأثیر را داشته است و با توجه به اینکه آلل Pina-D1b باعث بافت دانه سخت می‌گردد می‌توان اینگونه نتیجه‌گیری نمود

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-07-15]

[DOI: 10.29252/jcb.9.21.122]

که با افزایش سختی دانه، میزان جذب آب افزایش می‌یابد و همچنین حجم نان نیز افزایش می‌یابد. تجزیه همبستگی فنوتیپی بین صفات مورد مطالعه (جدول ۵) نیز نشان داد که صفت درصد جذب آب همبستگی مثبت معنی‌داری با درصد پروتئین (r=۰/۴۲**) و عدد زلنی (r=۰/۳۸**) و سختی دانه (r=۰/۲۳*) داشت. گندم با بافت دانه سخت دارای میزان پروتئین بیشتر و گلوتن فشرده‌تر و در نهایت کیفیت نانوایی بالاتری نسبت به گندم با بافت دانه نرم است (۲۵،۳). میزان پروتئین و گلوتن و سختی دانه از مهم‌ترین شاخص‌های انتخاب در بهبود کیفی خواص نانوایی گندم هستند (۲۲). درصد بالای پروتئین و گلوتن فشرده به افزایش جذب آب کمک می‌کنند و در نتیجه همبستگی مثبت بین این صفات وجود خواهد داشت. صفت عرض بذر با سختی دانه همبستگی منفی معنی‌داری (r=-۰/۲۳*) را نشان داد. کاهش عرض بذر باعث کاهش مقاومت بذر در برابر شکنندگی و در نهایت کاهش سختی دانه می‌گردد. سختی دانه همبستگی مثبتی با درصد پروتئین (r=۰/۵۹**) و عدد زلنی (r=۰/۵۷**) نشان داد که با گزارشات گروس و همکاران (۱۳) مطابقت دارد و طبق این گزارشات همبستگی مثبت قابل توجهی بین محتوای پروتئین دانه با سختی دانه به دست آمده است. رابطه مثبت معنی‌داری نیز بین عدد زلنی و درصد پروتئین (r=۰/۸۷**) مشاهده گردید که طبق گزارشات شِوری و تاتهام (۲۴) پروتئین دانه صفت عدد زلنی را تحت تاثیر قرار می‌دهد و همبستگی مثبت بین این صفات وجود دارد. صفات حجم نان و درصد رطوبت و طول دانه با هیچ یک از صفات دیگر همبستگی نشان ندادند (جدول ۵).

جدول ۳- میانگین، انحراف معیار و دامنه تغییرات کل برای صفات کیفی در ارقام گندم مورد مطالعه

Table 3. Mean, standard deviation and the variation range for quality traits in the studied wheat cultivars

صفت	میانگین	انحراف معیار	دامنه تغییرات	ضریب تغییرات (٪)
درصد پروتئین	۱۲/۸۱	۰/۶۸	۱۱/۵-۱۴	۵/۳
عدد زلنی	۳۵/۰۹	۱/۸۳	۳۲-۴۰	۵/۲
حجم نان	۴۹۸/۴۱	۲۵/۸۰	۴۵۰-۵۷۰	۵/۱
رطوبت دانه	۹/۴۲	۰/۲۹	۸/۴-۱۰	۳/۰
سختی دانه	۵۰/۴۱	۲/۶۷	۴۴-۵۸	۵/۲
جذب آب دانه	۶۴/۶۵	۰/۸۲	۶۲/۹-۶۶/۲	۱/۲
طول دانه	۶/۲۵	۰/۵۴	۵/۱۵-۷/۷۰	۸/۶
عرض دانه	۳/۰۳	۰/۳۰	۳/۰۳-۳/۸۰	۹/۹

جدول ۴- میانگین مربعات حاصل از تجزیه واریانس صفات کیفی برای آلل‌های مختلف ژن‌های پین در ارقام مختلف گندم

Table 4. Mean squares of quality traits resulted from the analysis of variance for different Pin alleles in the studied wheat cultivars

آلل‌های Pin	Df	طول دانه	عرض دانه	جذب آب†	سختی دانه†	رطوبت‌دانه‡	حجم نان‡	عدد زلنی‡	درصد پروتئین‡
Pina	۱	۰/۰۵۰	۰/۲۰۷	۳/۸۹۶*	۳۹/۵۴۲*	۰/۰۵۲	۴۰۷۵/۰*	۳/۸۴۶	۱/۱۹۹
Pinb	۱	۰/۶۹۰	۰/۰۲۲	۰/۰۶۰	۶/۴۶۴	۰/۱۵۸	۲۸/۰	۰/۲۲۷	۰/۰۰۰
Pina.Pinb	۱	۱/۰۲	۰/۰۳۷	۱/۳۳۳	۰/۱۳۰	۰/۲۸۹	۱۰۹۸/۰	۰/۴۵۴	۱/۲۲۰
خطا	۷۷	۰/۲۸۹	۰/۰۹۵	۰/۶۳۵	۶/۸۳	۰/۰۸۴	۶۱۳/۴	۳/۴۶	۰/۴۴۶
کل	۸۰	۰/۳۰۰	۰/۰۹۴	۰/۶۷۸	۷/۱۵۷	۰/۰۸۸	۶۶۵/۹	۳/۳۶۶	۰/۴۶۳
ضریب تغییرات (٪)		۸/۵۹	۱۰/۱۶	۱/۲۳	۵/۱۸	۳/۰۸	۴/۹۷	۵/۳۰	۵/۲۱

† و ‡ به ترتیب درجه آزادی کل، ۶۴ و ۷۷ بود.

جدول ۵- تجزیه همبستگی فنوتیپی بین صفات کیفی در ژنوتیپ‌های گندم

Table 5. The phenotypic correlation analysis between quality traits in wheat genotypes

صفت	درصد پروتئین	عدد زلینی	حجم دانه	رطوبت دانه	سختی دانه	جذب آب	طول دانه	عرض دانه
درصد پروتئین	۱							
عدد زلنی	۰/۸۶۷**	۱						
حجم نان	-۰/۰۴۱	-۰/۰۰۸	۱					
رطوبت دانه	۰/۰۷۹	۰/۱۵۵	۰/۰۶۳	۱				
سختی دانه	۰/۵۸۹**	۰/۵۶۸**	-۰/۰۴۰	۰/۱۰۱	۱			
جذب آب	۰/۴۲۰**	۰/۳۸۳**	۰/۰۷۹	-۰/۱۲۹	۰/۲۳۴*	۱		
طول دانه	-۰/۰۵۵	۰/۰۰۰	-۰/۲۱۴	۰/۱۱۰	۰/۰۵۰	-۰/۰۴۰	۱	
عرض دانه	-۰/۲۴۵	-۰/۱۶۵	۰/۰۹۶	-۰/۱۲۸	-۰/۲۳۱*	-۰/۰۵۴	۰/۲۱۶	۱

ارتباط بین صفت با نشانگر

نتایج حاصل از تجزیه رگرسیون گام به گام، که صفات اندازه‌گیری شده به عنوان متغیر وابسته و آلل‌های نشانگر به عنوان متغیرهای مستقل بودند (جدول۶)، نشان داد که برای صفات حجم نان، سختی دانه و جذب آب دانه، نشانگر Pina وارد مدل شد و برای صفات طول دانه، عرض دانه، محتوی پروتئین، عدد زلنی و رطوبت دانه هیچ نشانگری وارد مدل نشد. نتایج بدست آمده از رگرسیون گام به گام با نتایج حاصل از تجزیه واریانس مطابقت نشان داد.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-07-15]

[DOI: 10.29252/jcb.9.21.122]

جدول ۶- رگرسیون گام به گام صفات ارقام گندم نان

Table 6. The stepwise regression analysis for traits in bread wheat cultivars

صفت وابسته	مدل	ضرایب غیراستاندارد		ضرایب استاندارد	t	Sig	R^2 تصحیح شده
		B	Std. Error	Beta			
سختی دانه	(Constant)	۴۸/۴۲	۰/۸۷		۵۵/۴۹	۰/۰۰	۰/۰۵
	Pina	۱/۴۶	۰/۶۰	۰/۲۶	۲/۴۲	۰/۰۱	
حجم نان	(Constant)	۵۲۰/۹۵	۹/۲۵		۵۶/۲۹	۰/۰۰	
	Pina	−۱۶/۲۷	۶/۳۰	−۰/۳۰	−۲/۵۸	۰/۰۱	۰/۰۸
جذب آب	(Constant)	۶۴/۰۳	۰/۲۶		۲۳۸/۷۶	۰/۰۰	
	Pina	۰/۴۵	۰/۱۸	۰/۲۷	۲/۴۷	۰/۰۱	۰/۰۶

نتایج بدست آمده نشان داد ارقام مورد مطالعه دارای یکی از دو آلل Pina-D1a یا Pina-D1b برای Pina بودند. به‌طوری‌که، بیشترین فراوانی مربوط به آلل Pina-D1a بود. این آلل بیشترین فراوانی را از ژن پوروایندولین a در میان ارقام گندم در جهان نیز دارند (۲۷،۷). این تحقیق تنوع آللی ژن‌های پوروایندولین را در برخی از ارقام گندم نان مشخص نمود، آللی که بیشترین فراوانی را در میان ارقام سخت گندم نان دارد، Pina-D1b بود که حذف ژن پوروایندولین a سبب بافت سخت دانه گردیده است. اکثر ارقام حامل آلل Pina-D1b ارقام وارداتی می‌باشند که مربوط به پروژه‌های اصلاحی سیمیت هستند. گزارشات بدست آمده حاکی از آن است که خزانه ژنی سیمیت دهنده آلل Pina-D1b به برنامه اصلاحی اکثر مناطق دنیاست (۱۷). ارقام حامل آلل Pinb-D1b نیز از ارقام وارداتی هستند.

نتایج بدست آمده با نتایج حاصل از دستگاه اینفراماتیک مطابقت نشان داد و برای ارقام سخت، درصد سختی دانه آن‌ها عددی بالای ۵۰ و برای ارقام نرم، عددی کمتر از ۵۰ بود. آزمون مکانیکی نوری را می‌توان با دقت کمتری نسبت به آزمون مولکولی، مبنایی برای تعیین سختی بافت دانه قرار داد. فاکتور درصد جذب آب دانه نیز توسط دستگاه بدست آمد که بیان کننده میزان جذب آب بالاتر دانه‌های سخت در مقابل دانه‌های نرم بود که با نتایج (۲۳،۱۱) هماهنگی دارد. استفاده از نشانگرهای STS به منظور ارزیابی ژنوتیپی آلل‌های Pina و Pinb برای تعیین سختی دانه، روشی ساده و قابل اعتماد است که در برنامه‌های اصلاح کیفیت گندم می‌توان بکار گرفت. نتایج بدست آمده از این مطالعه فنوتیپ برخی از ارقام گندم نان را، از نظر میزان سختی دانه، مشخص نمود که می‌توان از این اطلاعات در برنامه‌های اصلاحی گندم استفاده نمود.

منابع

1. Blochet, J.E., C. Chevalier, E. Forest, E. Pebay-Peyroula, M. F. Gautier, P. Joudrier, M. Pezolet and D. Marion. 1993. Complete amino acid sequence of puroindoline, a new basic and cystine-rich protein with a unique tryptophan-rich domain, isolated from wheat endosperm by Triton X-114 phase partitioning. FEBS Letters, 329: 336-340.
2. Brennan, C.S., B.D. Sulaiman, J.D. Schofield and J.G. Vaughan. 1993. The immunolocation of friabilin and its association with endosperm texture. Aspects of Applied Biology, 36: 69-73.
3. Bushuk, W. 1998. Interactions in wheat doughs In: Hamer R.J. and Hoseney R. C. (eds), Interactions: The Keys to Cereal Quality. St. Paul, Minnesota: American Association of Cereal Chemists Inc, pp: 1-16.
4. Cane, K., M. Spackman and H.A. Eagles. 2004. Puroindoline genes and their effects on grain quality traits in southern Australian wheat cultivars. Australian Journal of Agricultural Research, 55: 89-95.
5. Chen, F., F. Zhang, C. Morris, Z. He, X. Xia and D. Cui. 2010. Molecular characterization of the Puroindolinea-D1b allele and development of an STS marker in wheat (*Triticum Aestivum* L.). Journal of Cereal Science, 52: 80-82.
6. Chen, F., Z.H. He, X.C. Xia, L.Q. Xia, X.Y. Zhang, M. Lillemo and C.F. Morris. 2006. Molecular and biochemical characterization of puroindoline a and b alleles in Chinese landraces and historical cultivars. Theoretical and Applied Genetics, 112: 400-409.
7. Chen, F., Z.H. He, X.C. Xia, M. Lillemo and C.F. Morris. 2005. A new puroindoline b mutation presented in Chinese winter wheat cultivar Jingdong 11. Journal of Cereal Science, 42: 267-269.
8. Darlington, H.F., L. Tesic, N. Harris, D. Griggs, I. Cantrell and P.R. Shewry. 2000. Starch granule associated proteins in barley and wheat. Journal of Cereal Science, 32: 21-29.
9. Gautier, M.F., M.E. Aleman, A. Guirao, D. Marion and P. Joudrier. 1994. Triticum aestivum puroindolines, two basic cysteine-rich seed proteins: cDNA sequence analysis and developmental gene expression. Plant Molecular Biology, 25: 43-57.
10. Giroux, M.J. and C.F. Morris. 1997. A glycine to serine change in puroindoline b is associated with wheat grain hardness and low level of starch-surface friabilin. Theoretical and Applied Genetics, 95: 857-864.
11. Glenn, G.M., F.L. Younce and M.J. Pitts. 1991. Fundamental physical properties characterizing the hardness of wheat endosperm. Journal of Cereal Science, 13: 179-194.
12. Greenwell, P. and J.D. Schofield. 1986. A starch granule protein associated with endosperm softness in wheat. Cereal Chemistry, 63: 379-380.
13. Groos, C., E. Bervas and G. Charmet. 2004. Genetic analysis of grain protein content, grain hardness and dough rheology in hard-hard bread wheat progeny. Journal of Cereal Science, 40: 93-100.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-07-15]

[DOI: 10.29252/jcb.9.21.122]

14. Huang, X.Q. and M.S. Roder. 2005. Development of SNP assays for genotyping of the puroindoline b gene for grain hardness in wheat using pyrosequencing. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53: 2070-2075.
15. Huang, X.Q. and A. Brûlé-Babel. 2011. Development of simple and co-dominant PCR markers to genotype puroindoline a and b alleles for grain hardness in bread wheat (*Triticum aestivum* L.), Journal of Cereal Science, 53: 277-284.
16. Lillemo, M. and C.F. Morris. 2000. A leucine to proline mutation in puroindoline b is frequently present in hard wheats from Northern Europe. Theoretical and Applied Genetics, 100: 1100-1107.
17. Lillemo, M., F. Chen, X. Xia, M. William, R.J. Pena, R. Trethowan and Z. He. 2006. Puroindoline grain hardness alleles in CIMMYT bread wheat germplasm. Journal of Cereal Science, 44: 86-92.
18. Malekzadeh, K., F. Shahriari, M. Farsi and E. Mohsenifard. 2008. Allelic variation of hardness genes (puroindoline a and b) in Iranian commercial and landrace wheats. Journal of Water and Soil Science - Isfahan University of Technology, 12: 649-656 (In Persian).
19. Mohammadi, M., E. Mehrazar, A. Izadi-Darbandi and G. Najafian. 2013. Genotype diversity of puroindoline genes (Pina-D1 and Pinb-D1) in bread wheat cultivars developed in Iran and CIMMYT. Journal of Crop Improvement, 27: 361-375.
20. Morris, C.F. 2002. Puroindolines: the molecular genetic basis of wheat grain hardness. Plant Molecular Biology, 48: 633-647.
21. Pallotta, M.A., P. Warner, R.L. Fox, H. Kuchel, S.J. Jefferies and P. Langridge. 2003. Marker assisted wheat breeding in the southern region of Australia. In Proceedings of the Tenth International Wheat Genetics Symposium Paestum, Italy, pp: 789-791.
22. Sadeghi, F. and H. Dehghani. 2016. Study of Correlation Coefficients and Factors Analysis of Bread-making Quality Attributes in Beard Wheat (*Triticum aestivum* L.). Journal of Crop Breeding, 8: 1-8 (In Persian).
23. Salmanowicz, B.P., T. Adamski, M. Surma, Z. Kaczmarek, K. Karolina, A. Kuczynska, Z. Banaszak, B. Lugowska, M. Majcher and W. Obuchowski. 2012. The relationship between grain hardness, dough mixing parameters and bread-making quality in winter wheat. International Journal of Molecular Sciences, 13: 4186-4201.
24. Shewry, P.R. and A.S. Tatham. 2000. Wheat. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, pp: 335-339.
25. Tipples, K.H., R.H. Kilborn and K.R. Preston. 1994. Bread-wheat quality defined. In: Bushuk W. and Rasper V.F. (eds), Wheat: Production, Properties and Quality, Glasgow: Chapman and Hall, pp: 25-35.
26. Turnbull, K.M. and S. Rahman. 2002. Endosperm texture in wheat. Journal of Cereal Science, 36: 327-337.
27. Xia, L., F. Chen, Z. He, X. Chen and C.F. Morris. 2005. Occurrence of puroindoline alleles in Chinese winter wheats. Cereal Chemistry, 82: 38-43.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-07-15]

[DOI: 10.29252/jcb.9.21.122]

Identification of Alleles Affecting the Grain Hardness in Different Bread Wheat Cultivars using Molecular Markers

Sanaz Norouzdokht-Nokhandan[1], Ali Izanloo[2], Mohammad Zabet[2] and Mohammad Ghader Ghaderi[2]

1- MSc. Student, University of Birjand (Corresponding Author: sana.noroozi1990@gmail.com)
2- Assistant professor, University of Biriand
Received: December 22, 2015 Accepted: November 1, 2015

Abstract

Grain hardness is the main factor for classification and end-use quality of wheat. Wheat with the hard grain texture has higher protein content and more intensive gluten that leads to production of higher bread quality. However, soft texture wheat has lower protein content and weaker gluten, which are suitable for cake and candy production. Grain hardness is determined by the Pina and Pinb genes that are located on the short arm of chromosome 5D. In this study, 83 bread wheat cultivars were characterized for the allelic distribution of Pina and Pinb genes using allele specific markers. At the Pina locus, Pina-D1a and Pina-D1b alleles were observed in 64% and 36% of varieties, respectively. However, at the Pinb locus, 90% of varieties showed Pinb-D1a and 10% had Pinb-D1b allele. Based on the grain hardness index which was measured with NIR, varieties whit the value less than 50 was considered as soft while above 50 was considered as hard grain texture. The results of marker-trait association showed that Pina had the significant effect (P= 0.019) on the grain hardness, as cultivars with the Pina-D1a allele were significantly softer (49.85±0.37) that those with the Pina-D1b allele (51.38±0.50). The results of regression analysis showed that for the traits including bread volume, grain hardness and water absorption as dependent variables, Pina was entered to the model. The results of this study can help wheat breeders for effectively selecting parents for the grain hardness in the MAS breeding programs.

Keywords: Polymerase chain reaction, Puroindoline, Seed hardness

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-07-15]

[DOI: 10.29252/jcb.9.21.122]