



ارتباط بین ارتقاء کیفیت نانوایی با کاهش بیان ژن‌های Dx2 و Dy12 در گندم موتابت

حسین احمدی اوچ تپه^۱, حسن سلطانلو^۲, سیده ساناز رمضانپور^۳, احمد یامجی^۴ و وحید شریعتی^۵

^۱- دانشجوی دکتری، دانشیار، استادیار گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

^۲- استادیار، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، (نویسنده مسؤول): soltanlooh@gau.ac.ir

^۳- استادیار، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، گروه زیست فناوری مولکولی گیاهی، کرج

^۴- استادیار، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، گروه زیست فناوری مولکولی گیاهی، کرج

^۵- استادیار، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، گروه زیست فناوری مولکولی گیاهی، کرج

تاریخ دریافت: ۹۶/۲/۲۴ تاریخ پذیرش: ۹۶/۶/۱۹

صفحه: ۱۳۲ تا ۱۳۷

چکیده

در تحقیق حاضر سطح بیان ژن‌های Dx2 و Dy12 واقع در جایگاه Glu-D1 که رمزکننده زیرواحدهای سنتگین گلوتنین با تأثیر منفی بر کیفیت نانوایی می‌باشد، در ژنوتیپ چهش یافته گندم نان بنام RO-3 با کیفیت نانوایی بالا به همراه رقم روشن (رقم والدی آن) با کیفیت نانوایی پایین مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور نمونه‌برداری از بذور در فواصل زمانی ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۳۰ روز بعد از گلدهی صورت گرفت. نتایج الگوی بیان ژن Dx2 در یکشترین کاهش بیان را در ۵ روز بعد از گلدهی نسبت به ژنوتیپ والدی دارد و برای ژن Dx2 بیشترین کاهش بیان در ۱۰ روز بعد از گلدهی نسبت به ژنوتیپ والدی مشاهده شد. به طور کلی در طی مرحله توسعه دانه هر دو ژن مورد مطالعه در ژنوتیپ موتابت نسبت به والد کاهش بیان نشان داد. بیشترین نسبت تجمع وزن خشک دانه در ژنوتیپ چهش یافته در ۱۰ تا ۱۵ روز بعد از گلدهی اتفاق افتاد. بنابراین مراحل ابتدایی توسعه دانه از مراحل بحرانی برای کاهش بیان این دو ژن و تجمع وزن خشک دانه در ژنوتیپ چهش یافته می‌باشد. سرعت پر شدن دانه و حداکثر وزن دانه در ژنوتیپ چهش یافته بیشتر از ژنوتیپ والدی بود. بنابراین اصلاح ارقام با سرعت پر شدن دانه بالاتر و همچنین انتخاب ارقام با بیان پایین ژن‌های Dx2 و Dy12 می‌تواند نقش مهمی در انتخاب ارقام با عملکرد و کیفیت نانوایی بالا داشته باشد.

واژه‌های کلیدی: بیان ژن، توسعه دانه، زیرواحد سنتگین گلوتنین، کیفیت نانوایی، گندم، qRT-PCR

موتابت RO-3 حاصل از پرتوتابی رقم روشن (با رتبه B) به وسیله اشعه گاما، درصد پروتئین بالاتری نسبت به رقم والدی دارد، بنابراین به علت داشتن درصد بالای پروتئین در رتبه A قرار گرفت. اینزدی دریندی و همکاران (۱۱) در تحقیقی به بررسی تنوع الگوی در مکان‌های Glu-1 و Glu-3 ارقام ایرانی قدیم و جدید گندم نان پرداختند. نتایج آنها نیز نشان داد که رقم روشن از لحاظ کیفیت نانوایی در رتبه پایین قرار دارد. نجفیان و بقایی (۱۹) تنوع ژنتیکی زیر واحدهای گلوتنین با وزن مولکولی بالا در ارقام و لاین‌های گندم بررسی کردند. نتایج تحقیقات آنها نشان داد که رقم روشن از نظر امتیاز زیر واحدهای گلوتنین دارای وزن مولکولی بالا در رتبه آللی ۶ (پایین) قرار دارد و این رقم دارای آلل‌های N در جایگاه Glu-B1 و Glu-B8 در جایگاه Dx2+Dy12 و Dx2+Dy12+By8 در جایگاه A1، A1+AxNull در Bx7+By8 و Bx6+By8 با کیفیت پخت ضعیف نان در ارتباط هستند (۲۰). عوامل موثر بر کیفیت دانه گندم به طور کلی به ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی تقسیم‌بندی می‌شوند. ویژگی‌های فیزیکی شامل فرم مخزن دانه، سختی دانه، وزن دانه، اندازه و شکل دانه و ویژگی‌های شیمیایی شامل محتوی پروتئین، کیفیت پروتئین و تست رسوب می‌باشد (۱۷). حق پرست و همکاران (۱۰) نشان دادند که در ژنوتیپ ۱۴-GBM گندم نان، بین وزن دانه و شاخن گلوتن همبستگی مثبت و معنی‌داری وجود دارد. بدین صورت که در این ژنوتیپ وزن دانه نسبت به ژنوتیپ‌های دیگر بالا و در نتیجه درصد پروتئین بالا بود. درک فرآیند پر شدن دانه ممکن است در برنامه‌های اصلاحی گندم برای افزایش عملکرد دانه و تولید ارقام با کیفیت بالا سودمند باشد (۱۸). پر

مقدمه گندم اصلی‌ترین محصول غله‌ای است که برای تولید نان استفاده می‌شود و خاصیت پخت آن به علت حضور پروتئین گلوتن است. نوع و مقدار پروتئین‌های گلوتن در تخمین خاصیت پخت نان آرد گندم مهم است (۴). کیفیت گندم تا حدود زیادی به وسیله پروتئین‌های ذخیره‌ای موجود در آندوسپرم دانه تعیین می‌شود. پروتئین‌های ذخیره‌ای گندم از دسته پرولامین‌ها بوده که به دو دسته گلوتنی و غیرگلوتنی تقسیم می‌شوند (۱۶). گلوتن که در خاصیت کشسانی و چسبندگی خمیر شرکت دارد، با حدود ۸۰ درصد بیشترین مقدار پروتئین ذخیره‌ای گندم را شامل می‌شود. پروتئین‌های گلوتنی گندم به دو دسته گلیادین‌ها و گلوتنین‌ها تقسیم می‌شوند. گلوتنین از مهم‌ترین پروتئین‌های ذخیره‌ای گندم و از زیر واحد با وزن مولکولی بالا و زیر واحد با وزن مولکولی پایین^۱ تشکیل شده است (۲۳). رونوشت گلیادین‌ها، زیر واحدهای سنتگین گلوتنین و زیر واحدهای سبک گلوتنین زود تجمع می‌یابند و ناپدید می‌شوند (۳) و مقدار نسبی گلیادین، سنتگین گلوتنین می‌توانند به صورت مونومرهای آزاد در مراحل اولیه پر شدن دانه حضور داشته باشند (۹). زیر واحدهای سنتگین گلوتنین توسط ژن‌های x و y رمز می‌شوند که جایگاه آنها بر روی بازوی بلند کروموزوم‌های 1A (-1A1، A1B)، 1B (-1B1)، 1D (-1D1) قرار دارند (۱۶). در مکان ژنی Glu-D1 جفت آلل‌های Dx5+Dy10 (با تأثیر مثبت در کیفیت نانوایی) قرار دارند که قدرت خمیر بالاتر نسبت به جفت آلل‌های Dx2+Dy12 (با تأثیر منفی در کیفیت نانوایی) دارند و در کیفیت بالای نان نقش دارند (۱۵، ۳۹). زمانی و همکاران (۳۹) در تحقیقی نشان دادند که

آگارز ۱ درصد استفاده شد. برای بررسی کمی میزان RNA استخراج شده از دستگاه نانوفوتومتر مدل p300 (شرکت IPMILEN) استفاده شد. در مرحله بعد بر اساس روش پیشنهادی شرکت فرمنتاز با تیمار دئوکسی ریبونوکلئازی توسط آنزیم DNA، DNaseI RNA ژنومی از RNA استخراج شده حذف گردید. برای این منظور ۲ میکروگرم از محلول RNA کل، یک میکرولیتر بافر (10x)، یک واحد (U) DNaseI آنزیم DNaseI به درون یک تیوب ۲/۰ میلیلیتری اضافه شد و بهوسیله آب DEPS به حجم ۱۰ میکرولیتر رسانده شد. سپس تیوب حاوی مواد به مدت ۳۰ دقیقه در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. بعد از حذف DNA مقدار یک میکرولیتر EDTA با غلظت ۲۵ میلی‌مolar به تیوب‌ها اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند.

ساخت cDNA بر طبق پروتکل پیشنهادی شرکت فرمنتاز انجام گرفت (۱۳). برای این منظور مقدار پنج میکرولیتر از RNA مرحله قبل و یک میکرولیتر آغازگر Oligo dT18 (با غلظت ۰/۵ میکرو گرم) به درون یک تیوب ۰/۲ میلی‌لیتری اضافه شد سپس به وسیله آب DEPS به حجم ۱۱ میکرولیتر رسانده شد. سپس تیوب حاوی مواد به مدت ۵ دقیقه در انکوباتور با دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. مخلوط واکنش لازم برای مرحله رونویسی معکوس به صورت ترکیب (۴ میکرولیتر بافر واکنش ۵x، ۲ میکرولیتر Ribolok RNase ۱۰ میکرومولا)، ۰/۵ میکرولیتر dNTP (۰/۱۰ میکرومولا)، یک میکرولیتر آنزیم رونوشتبردار معکوس) به تیوب حاوی ۱۱ میکرولیتر مواد اضافه شد و حجم آن به ۲۰ میکرولیتر رسانده شد. تیوب حاوی مواد به مدت ۶۰ دقیقه در انکوباتور با دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و در نهایت به منظور توقف واکنش به مدت ۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس cDNAهای سنتز شده ۲۰ برابر رفیق شدنده و در دمای -۸۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند.

طراحی آغازگر و واکنش کمی چرخه‌ای پلی‌مراز در زمان واقعی (qRT-PCR)
بهمنظور طراحی آغازگرها ابتدا توالی ژن‌های Dx2 و ژن خاندار اکتین (AB181991.1) از بانک اطلاعاتی NCBI گرفته شد و سپس با استفاده از نرم‌افزار پرایمر ۳ (v. 0.4.0) آغازگرهای موردنظر با در نظر گرفتن ویژگی‌های مطلوب برای استفاده در روش واکنش چرخه‌ای پلی‌مراز کمی در زمان واقعی طراحی شدند (جدول ۱). در تحقیق حاضر برای بررسی بیان ژن‌ها از دستگاه Q5 iQ (شرکت Bio-Rad، آمریکا) و تکنولوژی رنگ SYBR Green (کیت سایبر بیوپارس، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان) استفاده گردید. میزان افزایش یا کاهش بیان ژن ژنوتیپ‌های موتانت نسبت به والد به صورت نسبی با استفاده از روش پفافل $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (۲۱) و نرم‌افزار REST (۲۲) انجام شد. نمودارهای مربوط به داده‌های qRT-PCR در محیط Excel رسم شدند.

شدن دانه (رشد دانه بعد از گردahaشانی) به دو عامل سرعت و طول دوره‌ی پر شدن دانه از مواد پرورده که نتیجه آن افزایش وزن خشک دانه است بستگی دارد (۵). اصلاح موتاسیونی روش سریعی برای بهبود محصولات است. صدها موتانت مفید برای صفات مختلف در محصولات مختلف نظیر گندم از طریق القاء جهش‌زایی فیزیکی و شیمیایی ایجاد شده‌اند (۲۵). اصلاح از طریق القای جهش می‌تواند یک یا تعداد بیشتری از این صفات را در گیاهان تغییر دهد، بنابراین می‌توان نقش مهمی در ایجاد صفات مورد نظر برای اصلاح گیاه ایفا کند (۱۲). امروزه استفاده از پرتوهای رادیواکتیو از جمله پرتو گاما در تحقیقات کشاورزی، استفاده وسیعی یافته و می‌توان به عنوان یک منبع ایجاد تنوع ژنتیکی از آن استفاده کرد (۲۸). براساس آنچه اشاره شد این مطالعه به منظور بررسی الگوی بیان دو ژن Dx2 و Dy12 (با تأثیر منفی در کیفیت نانوایی) در ژنوتیپ گندم موتانت و رقم والدی آن در پنج مرحله مختلف توسعه دانه (۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۳۰ روز بعد از گلدهی) انجام شد. در بخش دوم این تحقیق پارامترهای مربوط به پر شدن دانه (از جمله سرعت پر شدن دانه، دوره موثر پر شدن دانه، طول دوره پر شدن دانه و حداقل وزن دانه) محاسبه شد و در نهایت بررسی روابط بین الگوی بیان ژن‌ها و پارامترهای مربوط به پر شدن دانه بررسی شده است.

مواد و روش‌ها

به منظور ارزیابی بیان دو ژن درگیر در کیفیت نانوایی و همچنین اندازه‌گیری صفات فیزیولوژیکی سرعت و دوره پر شدن دانه، آزمایشی با یک لاین جهش‌یافته RO-3 (با کیفیت نانوایی بالا) حاصل از برنامه اصلاح موتاسیونی سازمان ارژی اتمی ایران با هدف اولیه افزایش کیفیت نانوایی (با استفاده از پرتوتایی گاما با منشأ کالت ۶۰) به همراه رقم گندم روشن (با کیفیت نانوایی پایین) به عنوان رقم والدی در مزرعه تحقیقاتی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان به صورت طرح بلوک‌های کامل تصادفی در سه تکرار اجرا شد. برای این منظور بر روی یک خط ۲ متری (یک تکرار) تعداد ۴۰ عدد از بذر هر ژنوتیپ کشت شدند که فاصله خلط از هم ۳۰ سانتی‌متر بود. نمونه‌برداری بذر از ۵ روز بعد از گلدهی^۱ در فواصل زمانی ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۳۰ روز یک بار برای اندازه‌گیری صفات فیزیولوژیکی و ارزیابی بیان ژن انجام شد. تجزیه و تحلیل پارامترهای مربوط به پر شدن دانه با استفاده از یک مدل رگرسیون خطی (دو تکه‌ای) (۲۷) بر اساس روش DUD و دستورالعمل Proc Nlin نرم‌افزار SAS 9.00 انجام گرفت.

استخراج RNA و سنتز cDNA

به منظور بررسی بیان ژن، RNA کل از بذر همسان و سالم هر یک از ژنوتیپ‌ها در پنج مرحله مورد مطالعه، استخراج گردید. استخراج RNA با استفاده از بافر پی‌بایوزول (p-Biozol Buffer) و بر اساس دستورالعمل شرکت بیوفلاکس (BioFlux, Japan) انجام شد (۱۳). به منظور ارزیابی کمیت و کیفیت RNA استخراجی از دو روش اسپکتروفوتومتری در طول موج ۲۶۰ نانومتر و الکتروفورز ژل

Table 1. Characteristic of target and reference gene primers

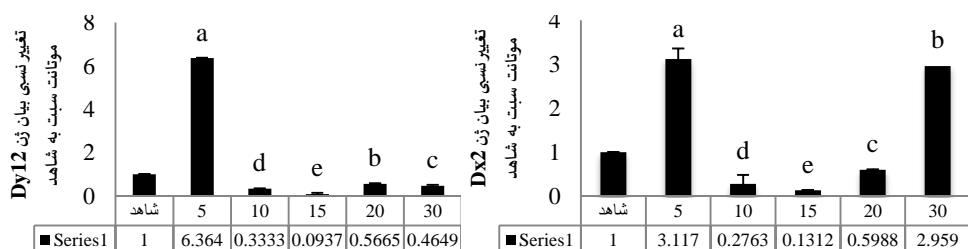
جدول ۱- مشخصات ژن‌های آغازگرها هدف و مرجع

	طول قطعه تکثیر (bp)	TM (°Cd)	توالی آغازگر	شماره دسترسی	ژن	آغازگر
۱۸۲	۶۰/۰۱	۵۹/۴۵	۵'-GGCACTACCCAGCTCTCTG-3'	پیش رو	BK006459.1	Dy12
	۶۰/۹۹	۵'-GTACCCCTGTTGCCCTGTC-3'	پس رو	TaDy12		
۱۰۹	۶۰/۰۲	۵'-CCGCAGGAGTCAGGACAA-3'	پیش رو	BK006460.1	Dx2	Ta.Dx2
	۶۰/۱۸	۵'-GCTGCAACCGAGAACGGTAGG-3'	پس رو			
۱۹۱	۵۸/۸۳	۵'-AAGAGTCGGTGAAGGGGACT-3'	پیش رو	AB181991.1	Actin	Ta. Actin
	۵۸/۸۳	۵'-TTCATACAGCAGGCAAGCAC-3'	پس رو			

داد. در این ژنوتیپ بیشترین میزان کاهش بیان ژن (۱۱/۰۰۴) برابر کاهش بیان نسبت به روش (روز بعد از گلدھی مشاهده شده است (شکل ۱-الف). الگوی تظاهر ژن Dy12 در ژنوتیپ RO-3 نسبت به رقم روش در تمام مراحل مورد مطالعه (به غیر از مرحله ۱۵ روز بعد از گلدھی) کاهش بیان نشان داد؛ به طوریکه بیشترین میزان کاهش بیان ژن (۲/۱۷۳) نشان داد؛ به طوریکه بیشترین میزان کاهش بیان ژن (۲/۱۷۳) برابر کاهش بیان نسبت به رقم روش (روز) در ۵ روز بعد از گلدھی مشاهده گردید (شکل ۱-ب).

نتایج و بحث

مقایسه الگوی بیان ژن‌های Dy12 و Dx2 موتانت نسبت به والد در بازه‌های زمانی یکسان در شکل ۱ نشان داده شده است. بر اساس این نتایج، روند بیان این ژن‌ها در بازه‌های زمانی مختلف توسعه دانه، در ژنوتیپ موتانت نسبت به والد متفاوت بود (شکل ۱). نتایج الگوی بیان ژن Dx2 در ژنوتیپ RO-3 نسبت به ژنوتیپ والدی (رقم روش) در طی مراحل ۱۵ و ۳۰ روز بعد از گلدھی افزایش بیان ژن و برای مراحل ۱۰ و ۲۰ روز بعد از گلدھی کاهش بیان ژن را نشان



شکل ۱- مقایسه میزان بیان ژن‌های Dx2 (راست) و Dy12 (چپ) ژنوتیپ موتانت RO-3 نسبت به روش (والد، شاهد).
Figure 1. Comparison of genes expression for Dx2 (a) and Dy12 (b) RO-3 mutant genotype than Roshan (parent, control)

برای ژنوتیپ‌های مورد مطالعه در بازه زمانی ۲۰ تا ۳۰ روز بعد از گلدھی حاصل شد (شکل ۲).

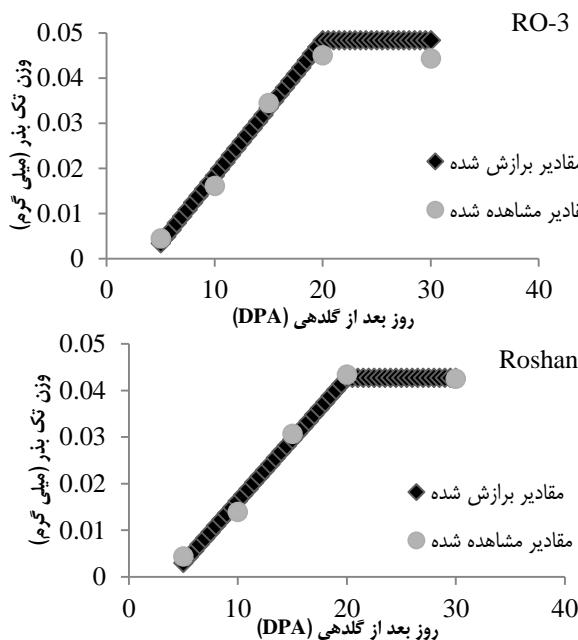
بیشترین نسبت تجمع وزن خشک دانه (میلی گرم بر روز) برای هر دو ژنوتیپ در فاصله زمانی ۱۰ تا ۱۵ روز بعد از گلدھی مشاهده شد. همچنین کمترین تجمع وزن خشک دانه



شکل ۲- وزن خشک دانه (راست) و مراحل توسعه مورفولوژیکی دانه (چپ) در ژنوتیپ والدی و موتانت در فواصل زمانی ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۳۰ روز بعد از گلدھی.
Figure 2. Seed dry weight (right) and morphological stages of seed development (left) in parent and mutant genotype at intervals of 5, 10, 15, 20 and 30 days post-anthesis (DPA)

بدین ترتیب که ابتدا وزن دانه به صورت خطی افزایش یافت و به حدکثر خود رسید (رسیدگی وزنی)، پس از این مرحله، وزن دانه از تغییرات چندانی برخوردار نبود و به صورت یک خط افقی در آمد.

روند تغییرات سرعت و طول دوره پر شدن دانه بهوسیله مدل رگرسیون خطی بدست آمد و با استفاده از داده‌های مشاهده شده و داده‌های برآش شده نمودارهای مربوطه ترسیم شد (شکل ۳). بررسی روند تغییرات سرعت پر شدن دانه نشان داد که الگوی نمو بذر در هر دو ژنتیپ مشابه بود.



شکل ۳- روند تغییرات سرعت و طول دوره پر شدن دانه در ژنتیپ والدی و موتانت
Figure 3. Grain filling rate and duration of grain filling in parent and mutant genotypes

که بین دو ژنتیپ از نظر سرعت پر شدن دانه، دوره مؤثر پر شدن دانه، حدکثر وزن دانه تفاوت‌های وجود دارد. به عبارتی نتایج مؤید این است که شیب خط برآش شده برای دو ژنتیپ یکسان نیست (جدول ۲).

دوره مؤثر پر شدن دانه از طریق تقسیم حدکثر وزن دانه به سرعت پر شدن دانه محاسبه شد (۸،۲۷). صفات طول دوره پر شدن دانه و دوره مؤثر پر شدن دانه در رقم روشن بیشتر از ژنتیپ RO-3 بود. همچنین صفات سرعت پر شدن دانه و حدکثر وزن دانه در ژنتیپ جهش یافته نسبت به ژنتیپ والدی بیشتر بود. بر اساس نتایج بدست آمده مشخص گردید

جدول ۲- سرعت پر شدن دانه، دوره مؤثر پر شدن دانه، طول دوره پر شدن دانه و حدکثر وزن دانه در ژنتیپ والدی و موتانت
Table 2. Grain filling rate, effective grain filling period, during grain filling period and the maximum weight of seed parent and mutant genotypes

ژنتیپ	سرعت پر شدن دانه (گرم در روز)	دوره مؤثر پر شدن دانه (روز)	طول دوره پر شدن دانه (روز)	حدکثر وزن دانه (گرم)	معادله برآش شده
روشن	۰/۰۴۶۱۵۱	۱۶	۲۴/۹۸۸	۰/۰۴۳۶۲	$Y = -0.01023 + 0.00265X$
RO-3	۰/۰۴۵۰۶	۱۵	۲۳/۸۰۸	۰/۰۴۵۱۵	$Y = -0.0116 + 0.002997X$

گلدھی کاهش نشان داد. برای ژن Dy12 بیشترین کاهش بیان در ۵ روز بعد از گلدھی مشاهده شد و برای ژن Dx2 بیشترین کاهش بیان در ۱۰ روز بعد از گلدھی مشاهده شد. از طرفی در این ژنتیپ بیشترین نسبت تجمع وزن خشک دانه در فاصله زمانی ۱۰ تا ۱۵ روز بعد از گلدھی مشاهده شد. بنابراین برای ژنتیپ RO-3 مراحل اولیه توسعه دانه (۵ تا ۱۰ روز بعد از گلدھی) برای کاهش بیان ژن بحرانی تر

کاهش بیان ژن‌های Dx2 و Dy12 سبب افزایش قابل توجهی در قدرت خمیر و بالطبع کیفیت نان می‌شود (۱۵). نتایج این مطالعه نیز نشان می‌دهد که ژنتیپ موتانت با کاهش بیان ژن‌های Dx2 و Dy12 سعی در افزایش کیفیت نانوایی دارد بنابراین نسبت به رقم والدی خود ارجحیت دارد. در ژنتیپ RO-3 میزان بیان هر دو ژن Dx2 و Dy12 نسبت به والد (روشن) در زمان‌های ۱۰، ۱۵ و ۲۰ روز بعد از

Dx2 و Dy12 می‌توانند نقش مهمی در انتخاب ارقام با عملکرد بالا و کیفیت نانوایی بالا داشته باشد. همچنین داشتن آگاهی از وضعیت زیر واحدهای گلوتینین با وزن مولکولی بالا در ارقام موتانت حاصل از پرتوتابی و انتخاب ژنوتیپ‌های موتانت واحد زیرواحدهای موردنظر جهت برنامه‌های بهترزآمدی گندم، اصلاح گران را جهت بدست آوردن ارقام با کیفیت نانوایی بالا و زیر کشت بردن آن‌ها به جای ارقام والدی کمک می‌کند.

بر اساس تحقیقات گسترده دانشمندان نقش زیر واحدهای سنگین گلوتینین مشخص شده است. در این میان زیر واحدهای Dx2 و Dy12 تأثیر منفی بر کیفیت نانوایی دارند. به طور کلی با توجه به نتایج بدست آمده در این تحقیق و سایر تحقیقات انجام شده اصلاح ارقام برای عدم داشتن زیر واحدهای Dx2 و Dy12 در بهبود کیفیت آرد و نان گندم مفید می‌باشد.

می‌باشد. به طور کلی در طی پنج مرحله توسعه دانه، ژن Dx2 در رقم موتانت نسبت به روشن به مقدار ۷/۱۵۹ کاهاش بیان نشان داد؛ همچنین ژن Dy12 در رقم موتانت نسبت به والد به مقدار ۵/۹۳۱ برابر کاهاش بیان نشان داد. اثر منفی Dx2+Dy12 بر کیفیت نان توسط سایر محققین گزارش شده است (۱،۲۴۶) که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد. کوماری و والا رماسی (۱۴) در مطالعه‌ای نشان دادند که دانه‌های با وزن بالاتر، از سرعت پر شدن بالاتری نسبت به دانه‌های با وزن کمتر برخوردار می‌باشند. در تحقیق حاضر نیز مشاهده شد که حداکثر وزن دانه ژنوتیپ RO-3 بیشتر از رقم والدی بود؛ بنابراین ژنوتیپ جهش یافته سرعت پر شدن دانه بالاتری نسبت به رقم والدی داشت. برای ژنوتیپ RO-3 سرعت پر شدن دانه ۰/۰۰۳۴۷ گرم (درصد) در روز ۱۱/۵۸ (به عنوان یک فاکتور فرار از تنش حرارتی آخر فصل) و همچنین انتخاب ارقام با بیان پایین ژن‌های

منابع

- Ahmad, M. 2000. Molecular marker-assisted selection of HMW glutenin alleles related to wheat bread quality by PCR-generated DNA markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 101: 892-896.
- Altenbach, S.B and K.M. Kothari. 2004. Transcript profiles of genes expressed in endosperm tissue are altered by high temperature during wheat grain development. *Journal of Cereal Science*, 40: 115-126.
- Altenbach, S.B., K.M. Kothari and D. Lieu. 2002. Environmental conditions during wheat grain development alter temporal regulation of major gluten protein genes. *Cereal Chemistry*, 79: 279-285.
- Barak, S., D. Mudgil and B.S. Khattar. 2013. Relationship of gliadin and glutenin proteins with dough rheology, flour pasting and bread making performance of wheat varieties. *LWT - Food Science and Technology*, 51: 211-217.
- Brdar, M.D., M.K.B. Marija and D. Borislav. 2008. The parameters of grain filling and yield components in common wheat (*Triticum aestivum* L.) and durum wheat (*Triticum turgidum* L. Var.*Durum*) *Central European Journal of Biology*, 3(1): 75-82.
- Campos, H., J. Zuniga, P. Rathgeb and C. Jobet. 2004. Selection of Chilean wheat genotypes carriers of the HMW glutenin allele Glu-D1 x5 through polymerase chain reaction. *Agricultura Técnica*, 64: 223-228.
- Dupont, F.M., W.J. Hurkman, W.H. Vensel, C. Tanaka, K.M. Kothari, O.K. Chung and S.B. Altenbach. 2006. Protein accumulation and composition in wheat grains: effects of mineral nutrients and high temperature. *European Journal of Agronomy*, 25: 96-107.
- Ellis, R.H and C. Pieta-Filho. 1992. The development of seed quality in spring and winter cultivars of barley and wheat. *Seed Science Research*, 2: 19-25.
- Ferreira, M.S.L., J. Bonicel, N.N. Rosa, M.F. Samson and M.H. Morel. 2009. How is gluten polymers assembled during grain filling in durum wheat? *Proceedings of the 10th International Gluten workshop*, 29-33.
- Hghparast, R., R. Rajabi, G. Najafiyani, K. Rashmekarim and M. Aghayi Sarbarzeh. 2009. Evaluation of Indices Related to Grain Quality in Advanced Bread Wheat Genotypes under Rainfed Conditions. *Seed and Plant Improvement Journal*, 25(2): 315-328 (In Persian).
- Izadi-Darbandi, A., B. Yazdi-Samadi, A.A. Shanejat-Boushehri and M. Mohammadi. 2010. Allelic variations in Glu-1 and Glu-3 loci of historical and modern Iranian bread wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. *Journal of Genetics*, 89(2): 193-199.
- Karataş, D.D., B. Kunter, G. Coppola and R. Velasco. 2010. Analysis of polymorphism based on SSCP markers in gamma-irradiated (Co60) grape (*Vitis vinifera*) varieties. *Genetics and Molecular Research*, 9(4): 2357-2363.
- Kiani, D., H. Soltanloo, S.S. Ramezanpour, A.A. Nasrolahnezhad Qumi, A. Yamchi, K. Zaynali Nezhad and E. Tavakol. 2017. A barley mutant with improved salt tolerance through ion homeostasis and ROS scavenging under salt stress. *Acta Physiol Plant*, 39(90): 1-14.
- Kumari, S.L and G. Valarmathi. 1998. Relationship between grain yield grain filling rate and duration of grain filling in rice. *Madras Agricultural Journal*, 85: 210-211.
- Lei, Z.S., K.R. Gale, Z.H. He, C. Gianibelli, O. Larroque, X.C. Xia, B.J. Butow and W. Ma. 2006. Y-type gene specific markers for enhanced discrimination of high-molecular weight glutenin alleles at the Glu-B1 locus in hexaploid wheat. *The Journal of Cereal Science*, 43: 94-101.
- Liu, S., X. Gao and G. Xia. 2009. Characterizing HMW-GS alleles of decaploid *Agropyron elongatum* in relation to evolution and wheat breeding. *Theoretical and Applied Genetics*, 116: 325-334.

17. Md Zaidul, I.S., A. Abd Karim, D.M.A. Manan, A. Ariffin, N.A. Nik Norulaini and A.K. Mohd Omar. 2004. farinograph study on the viscoelastic properties of sago/wheat flour dough systems. Journal of the Science of Food and Agriculture, 84: 616-622.
18. Moradi, M., and M. Motamed. 2010. Speed and duration of grain filling in some wheat cultivars. Quarterly Journal of Plant Production Science (Journal of Agricultural), 4: 37-43 (In Persian).
19. Najafiyan, G., and N. Baghayi. 2011. Genetic Variation in High Molecular Weight Glutenin Subunits in Parental Lines and Cultivars of Wheat Used in Breeding Programs of Cold and Temperate Agro - Climatic Zones of Iran. Seed and Plant Improvement Journal, 27(3): 305-322 (In Persian).
20. Payne P.I., M.A. Nigtingale, A.F. Krattiger and L.M. Holt. 1987. The relationship between HMW glutenin subunit composition and the bread-making quality of British-grown wheat varieties. Journal of the Science of Food and Agriculture, 40: 51-65.
21. Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Research, 29: 2002-2007.
22. Pfaffl, M.W., G.W. Horgan and L. Dempfle. 2002. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real time PCR. Nucleic Acids Research, 30: 36-46.
23. Sarkar, S., A.M. Singh, A.K. Ahlawat, M. Chakraborti and S.K. Singh. 2015. Genetic diversity of bread wheat genotypes based on High Molecular Weight Glutenin Subunit profiling and its relation to bread making quality. Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology, 24(2): 218-224.
24. Shewry P.R., N.G. Halford and A.S. Tatham. 1992. High-molecular weight subunits of wheat glutenin subunits of wheat glutenin. Journal of Cereal Science, 5: 105-120.
25. Singh, N.K. and H.S. Balyan. 2009. Induced mutations in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) CV. 'Kharchia 65' for reduced plant height and improves grain quality traits. Advances in Biological Research, 3(5-6): 215-221.
26. Tabiki T., S. Ikeguschi and T.M. Ikeda. 2006. Effects of High-molecular-weight and Low-molecular-weight glutenin subunit alleles on common wheat flour quality. Breeding Science, 56: 131-136.
27. Van Sanford, D.A. 1985. Variation in kernel growth characters among soft red winter wheat. Crop Science, 25: 625-630.
28. Zamani, M.J., M.R. Bihamta, B. Naseriyan Khiyabani and M.T. Halajian. 2007. Selection of bread wheat mutant genotypes carrying HMW glutenin alleles related to baking quality through sequence tagged site. Journal of Agronomy and Plant Breeding, 1(3): 63-71 (In Persian).
29. Zamani, M.J., M.R. Bihamta, B. Naserian Khiabani, Z. Tahernezhad, M.T. Hallajian and M. Varasteh Shamsi. 2014. Marker-Assisted Selection for Recognizing Wheat Mutant Genotypes Carrying HMW Glutenin Alleles Related to Baking Quality. The Scientific World Journal, Article ID 387912, 5 pp.

Relationship between Improvement of the Baking Quality and Down-Regulation of Dx2 and Dy12 Genes in Mutant Bread Wheat

Hossein Ahmadi-Ochtapeh¹, Hassan Soltanloo², Sayedeh Sanaz Ramezanpour³,
Ahad Yamchi⁴ and Vahid Shariati⁵

1, 3 and 4- Ph.D. Student, Associate Professor, Assistant Professor Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources (GUASNR), Iran

2- Associate Professor, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources (GUASNR), Iran,
(Corresponding Author: soltanlooh@gau.ac.ir)

5. Assistant Professor in National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, department of plant molecular biotechnology, Karaj

Received: June 14, 2017

Accepted: September 10, 2017

Abstract

In current research, the expression level of Dx2 and Dy12 genes on Glu-D1 locus that encoding the high-molecular-weight glutenin subunits (HMW-GSs), with negative impact on quality of bakery in genotype mutant bread wheat called RO-3 with high quality of bakery and its parent (Roshan) with low quality of bakery was investigated. For this purpose, sampling was performed grains at intervals of 5, 10, 15, 20 and 30 days post-anthesis (DPA). The gene expression results showed that RO-3 genotype had the highest gene expression decreasing for Dy12 genes at 5 DPA compared to parental genotype, and for Dx2 gene the highest gene expression decreasing was 10 DPA compared to parental genotype. Generally, during seed development both genes in mutant genotype had gene expression decreasing than the parental genotype. The most dry weight accumulation rates occurred in 10 to 15 DPA in mutant genotype. So, the early stages of seed development for reducing the expression of these genes and rates dry weight accumulation is critical in mutant genotype. The grain-filling rate and the maximum grain weight were higher in mutant genotype than the parental genotype. Therefore breeding the cultivars with higher grain filling rate and also selection of varieties with low expression for Dx2 and Dy12 genes play important role in the selection of varieties with high yield and quality of bakery.

Keywords: Gene expression, Glutenin heavy subunit, QRT-PCR, Quality of bakery, Seed development, Wheat