ISSN: 2676-7309

Plant Genetic Researches

Volume 10, Issue 2 (2024)

Lorestan University

Research Article

http://dx.doi.org/10.22034/PGR.10.2.7

Investigating Variation of Subunits of Gliadin Protein in Recombinant Inbred Lines Derived from Cross Between Zagros and Norstar Cultivars and Some Commercial Wheats

Nasrin Akbari[1], Seyed Siamak Alavi Kia[2,*] and Mostafa Valizadeh[3]

1- Ph.D., Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Iran

2- Associate Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Iran

3- Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Iran

[*]***Corresponding author*** ✉: *ss.alavikia@tabrizu.ac.ir*

Citation: Akbari, N., Alavi Kia, S.S. and Valizadeh, M. (2024). Investigating variation of subunits of gliadin protein in recombinant inbred lines derived from cross between Zagros and Norstar cultivars and some commercial wheats. *Plant Genetic Researches*, **10(2):** 91-102. http://dx.doi.org/10.22034/PGR.10.2.7

(Received: February 12, 2024; Final Revised: December 16, 2023; Accepted: December 26, 2023; Published online: March 17, 2024)

Extended abstract

Introduction

Due to world population incline and the increasing wheat consumption as human main staple food, as well as high amount of waste of bread which is mainly due to its low quality, the wheat breeding programs to improve bread quality are of great importance. Therefore, in line with wheat breeding programs aimed at enhancing wheat yield, attempts should be made to introduce wheat cultivars characterized by not only high yield but also superior bread-making quality. Hence, qualitative analysis of grains and exploring the genetic variation associated with bread-making quality characteristics in wheat breeding lines are of paramount importance. Banding pattern of grain storage proteins is a reliable tool for investigating genetic variability, and because of its repeatability, close relationship with bread-making quality and less susceptibility to environment, is especially noticeable for wheat breeders. Wheat gluten contains two types of proteins, gliadins and glutenins that constitute the main part of storage proteins of wheat grain. These two protein groups play a pivotal role, fundamentally contributing to the characteristics of wheat flour dough, thereby significantly influencing the bread-making quality of wheat flour. Alleles of gliadin subunits are used as reliable and capable markers in genetic studies. Considering uniqueness, relatively high polymorphism, repeatability of electropherogram and independence from environmental changes, gliadin proteins are appropriate tools for studying wheat germplasm and selection of high-quality wheats in terms of bread-making characteristics.

Materials and methods

The gliadin protein banding pattern of 28 RILs, their parents (Zagros and Norstar cultivars) and 10 other commercial cultivars (Omid, Bezostaya, Roshan, Zarrin, Sabalan, Sardari, Gascogene, Navid, Inia, and Hirmand) were examined via A-PAGE method. For calculating relative distance of each band from the origin, the 50th gliadin band of Marquis wheat was employed as the control. The analysis of molecular variance (AMOVA) was accomplished via GenAlEx 6.4. using scoring data derived from the gliadins banding patterns of the studied genotypes. Considering the cultivars and lines as separate groups, the amount of within and between group variances, and polymorphic information content (PIC) were estimated. Principal coordinate analysis (PCoA) was

©2023 The author(s). This is an open access article distributed under Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC BY 4.0), which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source.

done for separating of the genotypes in terms of structure of gliadin patterns. The MEGA 5 software was employed for cluster analysis. Cluster analysis using banding pattern of gliadin proteins was accomplished via Nie genetic distances and based on ward´s method. The Excel software was employed for drawing the pie charts and determining of frequency percent of ω, α, β and γ gliadins.

Results and discussion

The results of this study revealed high variation for gliadins coding loci with total mean of 73.96%. The percentage of polymorphism was estimated to be 91.67 and 56.25 for lines and commercial cultivars, respectively. The minimum and maximum number of gliadin bands were 12 and 25 bands, respectively. Also, based on PhiPT statistics, the significant difference was observed ($P<0.05$) between commercial cultivars and recombinant inbred lines in terms of gliadin banding patterns. Cluster analysis and PCoA via banding pattern of gliadins led to formation of three and four distinct groups, respectively. The highest variation was observed in ω-gliadins, suggesting that they may have a role in observed variation among genotypes and their bread making-quality traits.

Conclusion

The ω-gliadins performed a greater role in observed variation among studied genotypes and their bread-making quality. The obtained variation explained the ability of banding pattern of gliadins in terms of separating of genotypes and assist to selection of superior genotypes in terms of bread-making quality from progenies and lines derived from wheat crosses.

Keywords: Grain reserve protein, Gliadin, Bread wheat, Molecular markers, A-PAGE

پژوهش‌های ژنتیک گیاهی

جلد ۱۰، شماره ۲، ۱۴۰۲

شاپا الکترونیکی: ۷۳۰۹-۲۶۷۶

دانشگاه لرستان

مقاله پژوهشی

http://dx.doi.org/10.22034/PGR.10.2.7

بررسی تنوع زیرواحدهای پروتئین گلیادین در لاین‌های اینبرد نوترکیب حاصل از تلاقی ارقام زاگرس و نوراستار و برخی گندم‌های تجاری

نسرین اکبری[۱]، سید سیامک علوی‌کیا[۲،*] و مصطفی ولی‌زاده[۳]

۱- دکتری تخصصی، گروه به‌نژادی و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

۲- دانشیار، گروه به‌نژادی و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

۳- استاد، گروه به‌نژادی و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۷/۲۳؛ تاریخ آخرین ویرایش: ۱۴۰۲/۰۹/۲۵؛ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۰/۰۵؛ تاریخ انتشار برخط: ۱۴۰۲/۱۲/۲۸)

چکیده

با توجه به افزایش جمعیت جهان و مصرف بالای گندم نان در جوامع بشری و همچنین بالا بودن ضایعات نان که بخش عمده آن ناشی از پایین بودن کیفیت آن است، برنامه‌های به‌نژادی کیفیت گندم نان از اهمیت بالایی برخوردار هستند. از این‌رو، ارزیابی کیفی دانه‌ها و بررسی تنوع ژنتیکی معیارهای کیفیت نانوایی در لاین‌های حاصل از تلاقی‌ها حائز اهمیت است. به این منظور، الگوی نواری پروتئین‌های گلیادین در ۲۸ لاین اینبرد نوترکیب به‌همراه والدین و ۱۰ رقم تجاری، به روش A-PAGE مورد بررسی قرار گرفت. میزان تنوع بین و درون لاین‌ها و ارقام بر اساس الگوی نواری پروتئین‌های گلیادین با استفاده از روش AMOVA تعیین شد. تجزیه خوشه‌ای نیز برای ارقام و لاین‌های اینبرد نوترکیب صورت گرفت. نتایج حاکی از وجود تنوع بالا در مکان‌های ژنی کنترل‌کننده گلیادین با میانگین کل ۷۳/۹۶ درصد بود که درصد چندشکلی در لاین‌ها و ارقام تجاری به‌ترتیب ۹۱/۶۷ و ۵۶/۲۵ درصد برآورد شد. کمترین و بیشترین تعداد نوار گلیادین در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه، به‌ترتیب ۱۲ و ۲۵ نوار بود. همچنین بر اساس آماره PhiPT، اختلاف معنی‌داری از لحاظ الگوی پروتئین گلیادین بین ارقام تجاری و لاین‌های اینبرد نوترکیب در سطح احتمال ۵ درصد مشاهده شد. تجزیه خوشه‌ای و آزمون تجزیه به مختصات اصلی با استفاده از الگوی نواری پروتئین‌های گلیادین به‌ترتیب منجر به تشکیل چهار و سه گروه متمایز شد و تا حدودی لاین‌ها را از ارقام مورد مطالعه تفکیک کردند. بیشترین تنوع در زیرواحد ω -گلیادین‌ها مشاهده شد. به‌طور کلی با توجه به نتایج مطالعه حاضر چنین می‌توان گفت که ω-گلیادین‌ها نقش بیشتری در تنوع مورد مشاهده در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه و کیفیت نانوایی آن‌ها داشتند.

واژگان کلیدی: پروتئین ذخیره‌ای دانه، گلیادین، گندم نان، نشانگرهای مولکولی، A-PAGE

* نویسنده مسئول، آدرس پست الکترونیکی: ss.alavikia@tabrizu.ac.ir

مقدمه

نان مهم‌ترین و پرمصرف‌ترین محصول غذایی تهیه شده از آرد گندم است و پروتئین دانه آن در تعیین کیفیت نانوایی از اهمیت بالایی برخوردار است، به‌طوری‌که برخی از پروتئین‌های ذخیره‌ای دانه بر کیفیت نان، تأثیر بسزایی نشان داده‌اند. در این میان، کیفیت دانه و آرد گندم به‌شدت به ساختار گلوتن بستگی دارد که مخلوط پیچیده‌ای از پروتئین‌ها است. گلوتن معمولاً به دو گروه اصلی گلیادین‌ها و گلوتنین‌ها طبقه‌بندی می‌شود. گلیادین‌ها بر ماهیت چسبناکی خمیر تأثیر می‌گذارند، در حالی‌که گلوتنین‌ها در کشسانی و استحکام خمیر نقش دارند (Utebayev *et al*., 2019; Abedi and Pourmohammadi, 2020ab; Gholami Farahabadi *et al*., 2021).

گلیادین‌ها بخش هتروژن پروتئین‌های ذخیره‌ای دانه (Bietz and Wall, 1973; Zilic, 2013; Wang *et al*., 2020) و ۳۰ تا ٤۰ درصد از پروتئین کل آرد را تشکیل می‌دهند (Metakovsky *et al*., 1984). همچنین گلیادین‌ها، حدود ۵۰ درصد از پروتئین گلوتن گندم را تشکیل می‌دهند و سبب ایجاد انعطاف (plasticity) در ساختار گلوتن و خاصیت روان‌روی (viscosity) در خمیر می‌شوند (Metakovsky *et al*., 1984; Wang *et al*., 2020). گلیادین‌ها یک مخلوط ناهمگن از پروتئین‌های محلول در الکل هستند و شامل چهار زیرواحد α، β، γ و ω می‌باشند (Lakhneko *et al*., 2020). با استفاده از روش SDS-PAGE، محدوده وزن مولکولی گلیادین‌ها ۳۰ تا ۸۰ کیلودالتون تعیین شده است. وزن مولکولی زیرواحدهای ω-گلیادین در محدوده ٤٦ تا ٧٤ کیلودالتون است که البته در مطالعات دیگر این محدوده ۵۵ تا ۷۵ کیلودالتون گزارش شده است (Kasarda *et al.,* 1983; Békés *et al*., 2017; Metakovsky *et al*., 2018). زیرواحدهای α، β و γ گلیادین دارای وزن مولکولی کمتری نسبت به زیرواحد ω-گلیادین هستند (Kasarda *et al.,* 1983)، به‌طوری که α-گلیادین‌ها ۲۵ تا ۳۵ کیلودالتون، β-گلیادین‌ها، ۳۰ تا ۳۵ کیلودالتون و γ گلیادین‌ها ۳۵ تا٤۰ کیلودالتون وزن دارند (Békés *et al*., 2017; Metakovsky *et al*., 2018; Zang *et al*., 2022).

گلیادین‌ها توسط ۲ جایگاه ژنی *GLI-1* و *GLI-2* بر روی بازوی کوتاه گروه کروموزومی همیولوگ ۱ و ٦ در هر سه دسته کروموزومی (ABD) رمزگذاری می‌شوند (Tarekegn and Labuschagne, 2005; Pourmohammadi *et al*., 2023). مکان ژنی *GLI-2* که بر روی بازوی کوتاه کروموزوم ٦ در هر سه دسته کروموزومی قرار دارد، گلیادین‌های نوع α را در گندم هگزاپلوئید (*Triticum aestivum*) رمزگردانی می‌کند (Pourmohammadi *et al*., 2023). سطح قابل‌توجهی از چند-شکلی آللی موجود در جایگاه‌های رمزکننده گلیادین‌ها در گندم، مربوط به وقوع تکرارهای متوالی و واگرایی، کراسینگ‌آورهای نابرابر (Shewry *et al*., 1995) و جهش‌های خود به خودی می‌باشد (Metakovsky, 1987; Novoselskaya *et al.,* 1990; Upelniek *et al*., 1995).

آلل‌های زیرواحدهای پروتئین گلیادین، به‌عنوان نشانگرهای ژنتیکی کارآمد و قابل‌اعتماد در مطالعات ژنتیکی گندم مورد استفاده قرار می‌گیرند (Payne, 1987; Metakovsky *et al*., 1990; Branlard *et al.,* 2001; Menkovska *et al.,* 2002; Jakubauskiene and Juodeikine, 2005; Utebayev *et al*., 2019). با توجه به اینکه هر ژنوتیپ گندم تقریباً الگوی الکتروفورز منحصر به فردی از گلیادین‌ها را نشان می‌دهد (Wrigley *et al.,* 1982; Sozinov and Poperelya, 1979)، از چندشکلی ژنتیکی مکان‌های ژنی رمزگردان گلیادین‌ها می‌توان برای انتخاب ژنوتیپ‌های برتر گندم با کیفیت دانه بالا استفاده کرد (Utebayev *et al*., 2019). الگوی نواری گلیادین‌ها بسته به عوامل محیطی یا رشد تغییر نمی‌کند و قابل تکرار است؛ بنابراین برای هر ژنوتیپ انحصاری می‌باشد (Melnikova *et al*., 2012) و همانند نشانگرهای DNA، برای مطالعه ژرم‌پلاسم گندم مفید است (Melnikova *et al*., 2012; Utebayev *et al*., 2019). با توجه به میزان چندشکلی پروتئین‌های گلیادین، از آن‌ها به‌طور گسترده برای شناسایی ارقام هگزاپلوئید و تتراپلوئید گندم استفاده می‌شود (Benmoussa, 2000). همچنین مطالعه ژنتیکی الکتروفوروگرام گلیادین‌ها و شناسایی آلل‌های گلیادین روشی مناسب برای ارزیابی و شناسایی تفاوت ژنتیکی ارقام گندم می‌باشد (Bushuk and Zillman 1978; Kneževic

et al., 2007). استفاده از الگوی الکتروفورزی پروتئین دانه گندم در مطالعات متعددی مانند ارزیابی تنوع ژنتیکی به‌واسطه آلل‌های گلیادین (Utebayev *et al*., 2019)، بررسی اثرات گلیادین و گلوتنین بر خصوصیات فنّاورانه محصولات تولیدی از گندم (Pourmohammadi *et al*., 2023)، ارزیابی الگوی پروتئینی ارقام سنتی و مدرن گندم جهت تعیین اثرات بالینی آن‌ها (Zilic *et al*., 2013) و همچنین استفاده از الکتروفورز پروتئین جهت شناسایی غلات مورد توجه بوده است (Wrigley *et al*., 1982; Afkar *et al*., 2021).

با توجه به اهمیت پروتئین گلیادین، هدف از این مطالعه بررسی تنوع بین و درون ژنوتیپ‌ها بر اساس الگوی نواری پروتئین گلیادین است.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه که طی سال ۱۳۹٤ در دانشگاه تبریز انجام شد، ۲۸ لاین اینبرد نوترکیب (F_6) حاصل از تلاقی ارقام گندم زاگرس و نورستار به‌همراه والدین و ۱۰ رقم تجاری گندم (امید، بزوستایا، روشن، زرین، سبلان، سرداری، گاسکوژن، نوید، اینیا و هیرمند) از نظر تنوع الگوی پروتئین گلیادین بررسی شدند. الگوی نواری رقم گندم استاندارد مارکوئیس به‌عنوان شاهد و معیار حرکت نسبی نوارها مورد استفاده قرار گرفت.

جهت بررسی الگوی نواری پروتئین ذخیره‌ای گلیادین از الکتروفورز ژل آکریل‌آمید حاوی اسیدلاکتیک با pH = ۳/۱ بر اساس روش لافیاندرا و کاساردا (Lafiandra and Kasarda,1985) استفاده گردید (مواد شیمیایی مورد استفاده در تهیه و استخراج پروتئین متعلق به شرکت مرک بودند). به‌منظور تهیه و استخراج پروتئین‌های گلیادین از هر نمونه گندم، ٤ تا ۵ بذر به‌طور تصادفی انتخاب و با استفاده از هاون چینی کوبیده و سپس با استفاده از غربال ۰/۵ میلی‌متری الک شدند و ۱۰ میلی‌گرم از آرد هر نمونه توزین و در میکروتیوب ریخته شد. سپس روی هر نمونه، ۱۰۰ میکرولیتر محلول بافر استخراج شامل ۳/۹ میلی‌لیتر دی متیل فرمآمید (Dimethylformamide: DMF)، ۲/۵ گرم ساکاروز و ۳ میلی‌گرم متیل ویوله که با آب مقطر به حجم ۱۲/۵ میلی‌لیتر رسانده شده بود، اضافه شد. در این مرحله، نمونه‌ها به‌مدت یک ساعت در دمای اتاق نگهداری و هر ۱۵ دقیقه یک‌بار توسط ورتکس همگن شدند. سپس نمونه‌ها در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۵ دقیقه با شدت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. در نهایت مایع شفاف بالایی حاصل که حاوی پروتئین گلیادین بود به‌دقت با استفاده از سمپلر به میکروتیوب دیگر انتقال و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد در فریز نگهداری شد.

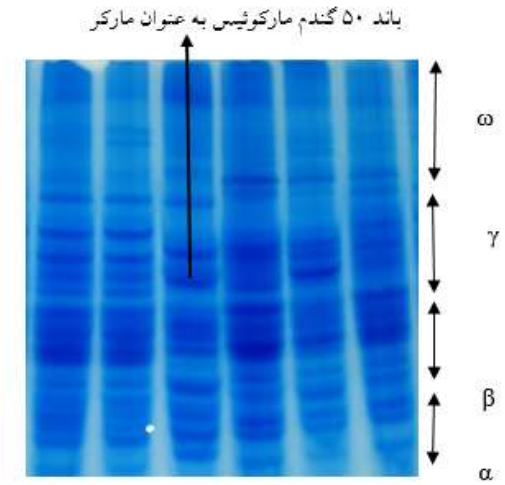
جهت انجام الکتروفورز (A-PAGE)، ۱۲ میکرولیتر از عصاره پروتئینی استخراجی در چاهک‌های ژل تزریق و تانک ژل به دستگاه مولد نیروی برق با شدت‌جریان ثابت ۳۰ میلی‌آمپر وصل شد. به‌منظور رنگ‌آمیزی نوارهای پروتئینی از ترکیب دو محلول "الف" (حاوی ۰/۵ گرم آبی‌کوماسی در ۱۲۵ میلی‌لیتر اتانول ۹۵ درصد) و محلول "ب" (شامل، ۱۵ گرم TCA در ۱۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر) استفاده شد. محلول رنگ‌آمیزی شامل ۱۵ میلی‌لیتر از محلول "الف"+ کل محلول "ب" بود. این مرحله ۱۲ ساعت به طول انجامید. در نهایت جهت رنگ‌بری و مشاهده بهتر نوارهای پروتئینی، ژل در آب مقطر به‌مدت ٦ ساعت رنگ‌بری شد.

فرمول گلیادینی لاین‌ها و ارقام تجاری مورد مطالعه به روش بوشاک و زلمن (Bushuk. and. Zillman,1978) مشخص شد. برای این منظور با استفاده از نوار ۵۰ گلیادین گندم مارکوئیس به‌عنوان شاهد (شکل ۱)، فاصله نسبی هر نوار از مبدأ محاسبه گردید. سپس بر اساس حضور و عدم‌حضور نوار پروتئینی فوق، به‌ترتیب اعداد یک و صفر برای نمره‌دهی الگوی گلیادین هر ژنوتیپ مورد استفاده قرار گرفتند. جهت تعیین فاصله نسبی هر نوار پروتئینی از مبدأ از فرمول زیر استفاده شد:

$$\text{حرکت نسبی نوار پروتئینی} = \frac{\text{فاصله مطلق نوار از مبدأ (میلی‌متر)}}{\text{فاصله مطلق نوار مرجع از مبدأ (میلی‌متر)}} \times ۵۰$$

سپس به‌وسیله نرم‌افزار GenAlEx 6.4 بر روی فایل نمره‌دهی حاصل از الگوی نواری گلیادین ژنوتیپ‌ها تجزیه

واریانس مولکولی (AMOVA) انجام شد و با معرفی ارقام و لاین‌ها به‌عنوان گروه‌های مجزا، مقادیر واریانس‌های درون‌گروهی و بین گروهی، محتوای چندشکلی (Polymorphic Information Content: PIC) محاسبه شد. تجزیه به مختصات اصلی نیز برای تفکیک ژنوتیپ‌ها از لحاظ ساختار الگوی گلیادین با استفاده از نرم‌افزار مذکور انجام شد. جهت تجزیه‌وتحلیل خوشه‌ای از نرم‌افزار MEGA5 استفاده شد. به این منظور، ماتریس ارائه شده بر اساس فاصله ژنتیکی Nie توسط نرم‌افزار GenAlEx 6.4 به نرم‌افزار MEGA5 معرفی و سپس دندروگرام ترسیم شد. به‌منظور رسم نمودار دایره‌ای و تعیین در صد فراوانی نوارهای پروتئینی بخش‌های ω، γ، α و β گلیادین‌ها از نرم‌افزار Excel استفاده شد.



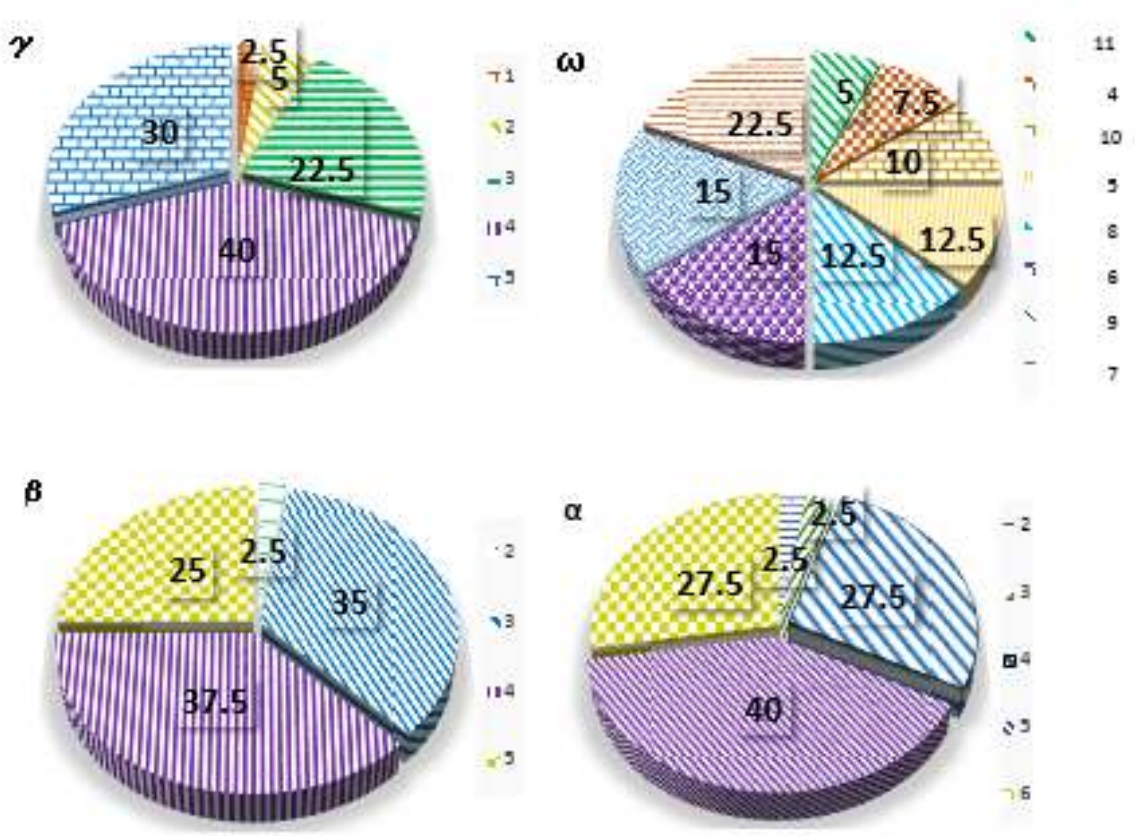
شکل ۱- الگوی نواری پروتئین گلیادین در گندم‌های مورد مطالعه

Figure 1. Banding pattern of gliadin proteins in the studied wheats

نتایج و بحث

بر اساس نتایج، تعداد نوار پروتئینی گلیادین مشاهده شده، در ارقام تجاری مورد مطالعه بین ۱۲ تا ۲۵ و در لاین‌ها بین ۱۶ تا ۲۴ نوار بود. ارقام دارای ۲۰ و ۲۵ نوار پروتئینی (۱۶/۶ درصد) و لاین‌های اینبرد نوترکیب دارای ۲۳ نوار پروتئینی (۲۱/۴۲ درصد)، بیشترین فراوانی را به خود اختصاص دادند. در مجموع، ژنوتیپ‌های دارای ۲۳ نوار پروتئینی در بخش گلیادین با ۱۷/۵ درصد دارای بیشترین فراوانی بودند (جدول ۱). با توجه به الگوی کلی نوارهای گلیادین که به چهار بخش α، β، γ و ω تفکیک شده بود، تنوع بالایی بین ژنوتیپ‌ها مشاهده شد به‌طوری که بیشترین تنوع مربوط به بخش ω بود (شکل ۱ و جدول ۲). تنوع بالا در بخش ω-گلیادین در الگوی نواری گلیادین گندم‌های مطالعه شده در الجزیره نیز گزارش شده است (Medouri *et al.*, 2015). در پژوهش دشاوا و همکاران (Desheva *et al.*, 2021) که در آن به بررسی الگوی پروتئین گلیادین ۲۲ ژنوتیپ گندم پرداخته شده بود نتایج نشان تنوع ژنتیکی بالایی بر اساس گلیادین محلول در الکل برای ژنوتیپ‌های مورد بررسی نشان داد. همچنین در مطالعه مذکور بخش گلیادین γ و به‌دنبال آن α بیشترین تنوع ژنتیکی را دارا بودند و کمترین تغییرات مربوط به بخش ω بود (Desheva *et al.*, 2021). در مطالعه حاضر بر اساس درصد فراوانی نوارها در چهار بخش گلیادین، ژنوتیپ‌های دارای ۷ نوار پروتئینی در بخش ω-گلیادین، ٤ نوار پروتئینی در بخش‌های γ و β-گلیادین و ۵ نوار پروتئینی در بخش α-گلیادین، بیشترین فراوانی را داشتند (شکل ۲).

تجزیه واریانس مولکولی الگوی نواری گلیادین مقادیر واریانس بین و درون‌گروهی را به‌ترتیب ۳/۳٤۱ و ۱۱/۸۲۹ برآورد کرد که بیانگر بالا بودن تنوع درون دو گروه لاین‌های اینبرد نوترکیب و ارقام تجاری بود (جدول ۳). این یافته‌ها با نتایج اکبری و همکاران (Akbari *et al.*, 2017) که تنوع لاین‌های اینبرد فوق را بر اساس الگوی گلوتنین ارزیابی کرده بودند، مطابقت داشت. شاید بتوان این امر را به تأثیرگذاری بیشتر نوارهای ω که بیشترین تعداد نوار را در بین چهار گروه دارا بود و همچنین به ارتباط ω-گلیادین‌ها با γ گلیادین‌ها (Payne, 1987; Gao *et al.*, 2007) نسبت داد. البته مقدار آماره PhipT برابر با ۰/۲۲۰ به‌دست آمد که در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار بود و نشان داد که بین دو گروه لاین‌های اینبرد نوترکیب و ارقام تجاری نیز اختلاف معنی‌دار از نظر الگوی نواری گلیادین وجود دارد (جدول ۳).



شکل ۲- در صد فراوانی نوارهای پروتئینی بخش‌های ω، γ، α و β گلیادین‌ها. گندم‌های مورد مطالعه در بخش ω بین ٤ تا ١١ نوار پروتئینی نشان دادند. همچنین در بخش γ ۱ تا ۵ نوار، در بخش β، ۲ تا ۵ و در نهایت در بخش α، ۲ تا ٦ نوار پروتئین گلیادین مشاهده شده که فراوانی مشاهده شده در هر بخش در نمودار دایره‌ای ارائه شده است.

Figure 2. The frequency of protein bands of the ω, γ, α and β gliadins. The wheat genotypes showed between 4 and 11 protein bands in the ω gliadin. Also, 1 to 5 bands of gliadin proteins were observed in the γ gliadin, 2 to 5 bands in the β gliadin, and finally, 2 to 6 bands of gliadin protein were observed in the α gliadin.

جدول ۱- درصد گلیادین‌ها در لاین‌های اینبرد نوترکیب و ارقام تجاری مورد مطالعه

Table 1. Percentage of gliadins in recombinant inbred lines and commercial cultivars

تعداد نوار Band number	فراوانی Frequency	درصد Percentage	ارقام Cultivars		لاین‌ها Lines	
			فراوانی Frequency	درصد Percentage	فراوانی Frequency	درصد Percentage
12	1	2.5	1	8.3	0	0
13	1	2.5	1	8.3	0	0
16	3	7.5	1	8.3	2	7.1
17	3	7.5	1	8.3	2	7.1
18	4	10	1	8.3	3	10.7
19	4	10	1	8.3	3	10.7
20	6	15	2	16.6	4	14.2
21	5	12.5	1	8.3	4	14.2
22	2	5	0	0	2	7.1
23	7	17.5	1	8.3	6	21.42
24	2	5	0	0	2	7.1
25	2	5	2	16.6	0	0

جدول ۲- تعداد نوارهای انواع گلیادین در ارقام تجاری و لاین‌های اینبرد نوترکیب

Table 2. Number of different gliadins' bands of commercial cultivars and RILs

نوع Type	نام ژنوتیپ Genotype name	تعداد کل نوار Total band number	ω	γ	β	α
ارقام تجاری Commercial cultivars	گاسکوژن (Gascojen)	16	7	2	3	4
	هیرمند (Hirmand)	18	7	3	3	5
	زرین (Zarin)	13	5	1	3	4
	اینیا (Inia)	25	11	5	4	5
	نوید (Navid)	20	7	5	3	5
	امید (Omid)	12	4	3	3	2
	سرداری (Sardari)	21	9	3	4	5
	سبلان (Sabalan)	25	10	4	5	6
	روشن (Roshan)	20	7	4	4	5
	بزوستایا (Bezostaya)	23	7	5	5	6
	زاگرس (Zagros)	17	6	4	3	4
	نورستار (Norestar)	19	8	3	3	5
لاین‌های اینبرد نوترکیب RILs	11	16	5	4	3	4
	17	20	6	3	5	6
	44	24	10	5	3	6
	49	18	6	4	4	4
	50	17	8	2	3	4
	51	19	7	3	5	4
	55	23	9	5	3	6
	60	21	7	5	4	5
	83	22	9	4	3	6
	89	16	4	3	4	5
	97	23	8	5	4	6
	99	21	8	4	5	4
	114	21	6	3	5	4
	139	18	4	4	5	5
	140	19	6	4	3	6
	141	20	5	5	4	6
	142	22	9	4	3	6
	155	23	11	5	2	5
	156	24	10	5	4	5
	205	23	9	4	4	6
	218	19	7	4	4	4
	220	23	9	5	4	5
	231	18	5	4	5	4
	262	21	7	4	5	5
	267	17	6	4	4	3
	271	20	8	3	4	5
	277	23	10	4	4	5
	287	20	5	5	5	5

جدول ۳- تجزیه واریانس مولکولی نواری‌های گلیادین

Table 4. Analysis of the molecular variance of gliadin bands

منابع تغییر Source of variations	میانگین مربعات Mean of squares	برآورد واریانس Variance estimation	درصد واریانس Percent of variance	PhiPT	P-value
بین گروه‌ها Among groups	67.950	3.341	22%	0.22	0.01
درون گروه‌ها Within groups	11.829	11.829	78%		
کل Total	517.450	15.169			

همچنین نتایج حاکی از بالا بودن تنوع ژنتیکی درون‌گروهی در لاین‌های نوترکیب نسبت به ارقام تجاری بود. به‌طوری‌که تنوع درون‌گروهی لاین‌های اینبرد نوترکیب از نظر الگوی پروتئین گلیادین حدود ۱/۵ برابر ارقام تجاری مورد مطالعه بود که این می‌تواند به‌دلیل نوترکیبی و تفکیک‌متجاوز حاصل از تلاقی والدین باشد؛ زیرا الگوی نواری پروتئین گلیادین دو والد لاین‌های اینبرد نوترکیب با هم اختلاف داشتند. به‌طوری که زاگرس ۱۷ و نورستار ۱۹ نوار پروتئینی گلیادین داشتند و در سه بخش ω، γ و α نیز تعداد نوارها در والدین متفاوت بود. با این توضیح که ارقام زاگرس و نوراستار در بخش ω، به‌ترتیب ٦ و ۸، در بخش γ، ٤ و ۳ و در بخش α ٤ و ۵ نوار پروتئینی داشتند. علاوه‌بر اختلاف نوارهای پروتئینی، چندشکلی بالای گزارش شده در مورد مکان‌های ژنی کنترل‌کننده گلیادین (Metakovsky, 1987; Shewry *et al.,* 1995; Waga and Skoczowski, 2014) نیز امکان بالا بودن واریانس درون‌گروهی در لاین‌های نوترکیب را تأیید می‌کند. درصد چندشکلی نوارهای گلیادین در لاین‌های اینبرد نوترکیب بیشتر از ارقام تجاری مورد مطالعه بود؛ به‌طوری که درصد چندشکلی در لاین‌های اینبرد نوترکیب ۹۱/٦۷ درصد و در ارقام تجاری مورد مطالعه ۵٦/۲۵ درصد به‌دست آمد و در کل نشان از تنوع درون‌گروهی بیشتر در بین لاین‌های اینبرد نوترکیب داشت (جدول ٤). بالا بودن درصد چندشکلی همان‌طور که ذکر شد خصوصیتی مطلوب و مثبت در برنامه‌های اصلاحی برای شناسایی ارقام هگزاپلوئید و تتراپلوئید گندم محسوب می‌شود (Benmoussa *et at.*, 2000).

چندشکلی بالا در تجزیه‌وتحلیل پروتئین‌های ذخیره‌ای گلیادین در گندم‌های نان ایرانی پیش‌تر گزارش شده بود و الگوهای پروتئینی خاصی از گلیادین‌ها برای مناطق مختلف مورد شناسایی و معرفی قرار گرفته است (Shahnejat Bushehri *et al.*, 2011). در مطالعه مشابه دیگری، با بررسی ۲۰ الگوی نواری گلیادین، در مجموع ۵۱ نوار چندشکل و ۲ نوار تک‌شکل توسط روش A-PAGE شناسایی شد (Desheva *et al.*, 2021).

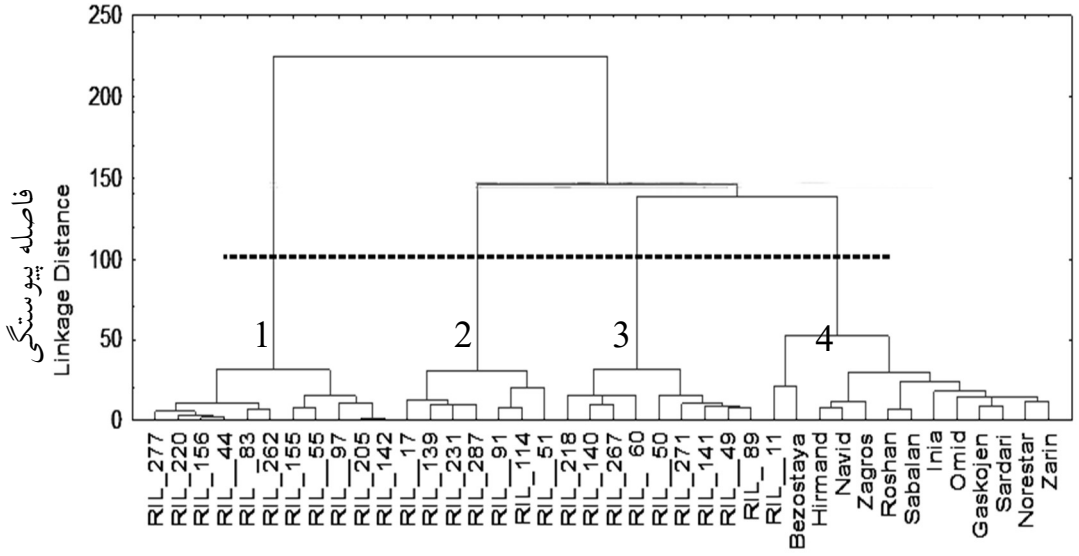
تجزیه خوشه‌ای با استفاده از الگوی نواری پروتئین‌های گلیادین و بر اساس فاصله ژنتیکی Nie بین ژنوتیپ‌ها با الگوریتم وارد (Ward) منجر به تشکیل چهار گروه متمایز شد. در گروه یک، لاین‌های نوترکیب ۲۷۷، ۲۲۰، ۱۵٦، ٤٤، ۸۳، ۲٦۲، ۲٦۲، ۱۵۵، ۵۵، ۹۷، ۲۰۵ و ۱٤۲؛ در گروه شماره دو، لاین‌های نوترکیب ۱۷، ۱۳۹، ۲۳۱، ۲۸۷، ۹۱، ۱۱٤ و ۵۱ قرار داشتند. گروه سوم، شامل لاین‌های اینبرد نوترکیب ۲۱۸، ۱٤۰، ۲٦۷، ٦۰،۵۰، ۲۷۱، ۱٤۱ و ۸۹ بود. در گروه چهارم لاین اینبرد نوترکیب ۱۱ و ارقام تجاری اینیا، روشن، سبلان، هیرمند، نوید، گاسکوژن، سرداری، زاگرس، نورستار، امید و زرین قرار گرفتند (شکل ۳).

بر اساس نتایج تجزیه به مختصات اصلی، ارقام و ژنوتیپ‌ها در سه گروه قرار گرفتند (شکل ٤). در این تجزیه، سه بردار اول، ۸۱/٤۵ درصد از تغییرات کل را توجیه نمودند. بردار اول، ۳۵/۰۹ درصد؛ بردار دوم، ۲۲/۷۷ درصد و بردار سوم، ۲۰/۵۹ درصد از تغییرات را توجیه نمودند؛ ولی در حالت کلی به‌دلیل بالا بودن تنوع ژنتیکی درون‌گروهی و در نتیجه پایین بودن واریانس بین‌گروهی، فاصله ژنتیکی Nie بین ژنوتیپ‌ها نیز پایین و حدود ۰/۰۵۰ برآورد شد (شکل ٤). تجزیه خوشه‌ای به‌غیر از لاین اینبرد نوترکیب شماره ۱۱ موفق شد ارقام تجاری را از لاین‌های اینبرد متمایز کند ولی این کار به‌وسیله روش تجزیه به مختصات اصلی با موفقیت انجام نشد. چنانچه در شکل ٤ ملاحظه می‌شود، بای‌پلات توسط مختصات اول و دوم (٦۰/۸٦ درصد از تغییرات کل) رسم شده است و ارقام تجاری و سایر لاین‌های اینبرد نوترکیب گروه‌های سه و چهار حاصل از تجزیه خوشه‌ای در فاصله بسیار نزدیک به هم قرار گرفته‌اند. هرچند این احتمال وجود دارد که اگر مختصات سوم نیز در گروه‌بندی استفاده می‌شد (عدم امکان در نرم‌افزار GenAlEx 6.4)، آنگاه گروه‌های سه و چهار متشکل در تجزیه خوشه‌ای نیز از یکدیگر تفکیک می‌شدند.

جدول ٤- مجموع و میانگین مربعات درون‌گروهی نوارهای پروتئینی گلیادین و درصد چندشکلی آن‌ها

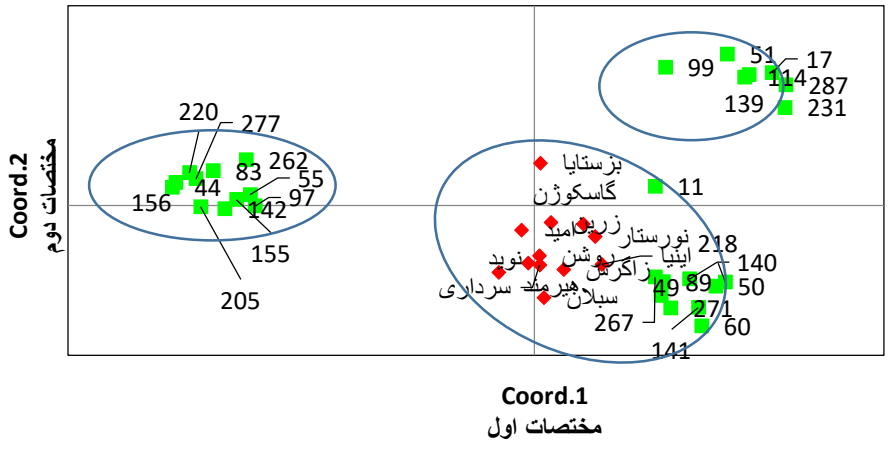
Table 4. Within group sum and mean of squares of gliadin protein bands and their polymorphism percentage

نوع Type	فراوانی Frequency	مجموع مربعات درون‌گروهی Within group sum of squares	میانگین مربعات درون‌گروهی Within group mean of squares	درصد چندشکلی polymorphism percentage
لاین‌ها Lines	28	354.25	13.12	91.67%
ارقام Cultivar	12	95.40	8.659	56.25%



شکل ۳- تجزیه خوشه‌ای بر اساس الگوی نواری گلیادین‌ها

Figure 3. Cluster analysis based on banding pattern of gliadins



شکل ٤- تجزیه به مختصات اصلی بر اساس الگوی نواری گلیادین‌ها

Figure 4. Principal Coordinate Analysis (PCoA) based on banding pattern of gliadins

تحقیق حاضر به تبعیت از مطالعات قبلی تنوع بالایی را در رابطه با الگوی نواری پروتئین‌های گلیادین به‌ویژه در بخش ω-گلیادین‌ها نشان داد. تنوع به‌دست آمده حاکی از قابلیت الگوی نواری گلیادین برای تفکیک ژنوتیپ‌ها از یکدیگر و

کمک به انتخاب ژنوتیپ‌های برتر از لحاظ کیفیت نانوایی در نتاج و لاین‌های حاصل از تلاقی‌های گندم است. به‌طور کلی نتایج مطالعه حاضر نشان داد که استفاده از الگوهای نواری گلیادین به‌همراه به‌کارگیری روش‌های مناسب آماری، می‌تواند با اعتبار بالایی گروه‌های مختلف ژنوتیپ‌ها، ارقام و لاین‌های اینبرد نوترکیب را از یکدیگر تفکیک نمایند؛ بنابراین حتی به کمک الگوهای نواری گلیادین می‌توان ارقام دور و البته مناسب را برای ایجاد نسل‌های در حال تفرق، جهت اصلاح کیفیت نانوایی در گندم نان را به‌صورت مطلوب‌تری انتخاب کرد.

References

Abedi, E. and Pourmohammadi, K. (2020a). Chemical modifications and their effects on gluten protein: an extensive review. *Food Chemistry*, **343:** 128398.

Abedi, E. and Pourmohammadi, K. (2020b). The effect of redox agents on conformation and structure characterization of gluten protein: an extensive review. *Food Science & Nutrition*. **12:** 6301-6319.

Afkar, S., Hadi, F. and Jafari, A.A. (2021). Investigation of intera- and interspecies variation of festuca using seed protein electrophoresis. *Plant Genetic Researches*, **8:** 45-56 (In Persian).

Akbari, N., Alavi Kia, S.S., Majid Norozi, M. and Valizadeh, M. (2017). Relationship between HMW-GS bands and bread making quality traits in recombinant inbred lines derived from a cross between Zagros and Norstar wheat varieties. *Cereal Research*, **7(2):** 185-194 (In Persian).

Benmoussa, M., Vezina, L.P., Pag, M., Yello, S. and Laberge, S. (2000). Genetic polymorphism in low-molecular-weight glutenin genes from *Triticum aestivum*, variety Chinesespring. *Juornal Theoretical and Applied Genetics*, **100:** 789-793.

Békés, F., Schoenlechner, R. and Tomoskozi, S. (2017). Ancient wheats and pseudocereals for possible use in cereal-grain dietary intolerances. *Elsevier*, Amsterdam, DA.

Bietz, J.A. and Wall, J.S. (1973). Isolation and characterization of gliadin-like subunits from glutenins. *Cereal Chemistry*, **50:** 537-543.

Branlard, G., Dardevet, M., Saccomano, R., Lagoutte, F. and Gourdone, F. (2001). Genetic diversity of wheat storage proteins and bread wheat quality. *Euphytica*, **119:** 59-67.

Bushuk, W. and. Zillman, R.R. (1978). Wheat cultivar identification by gliadin electropherograms. I. Apparatus, method and nomenclature. *Canadian Journal of Plant Science*, **58:** 505-515.

Desheva, G., Kyosev, B., Sabeva, M. and Anol Deshev, M. (2021). Genetic variation of gliadins and some quality characteristics in spelt wheat. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, **27(3):** 541-554.

Jakubauskiene, L. and Juodeikine, G. (2005). The relationship between Protein fractions of wheat gluten and quality of ring-shaped rolls evaluated by echolocation method. *Food Technology and Biotechnology*, **43:** 247-253.

Gao, S., Gu, Y.Q., Wu, J., Coleman-Derr, D., Huo, N., Crossman, C., Jia, J., Zuo, Q., Ren, Z., Anderson, O.D. and Kong, X. (2007). Rapid evolution and complex structural organization in genomics regions harboring multiple prolamin genes in the polyploidy wheat genome. *Plant Molecular Biology*, **65:** 189-203.

Gholami Farahabadi, M., Ranjbar, Gh., Dehestani Kalagar, A. and Bagheri, N. (2021). Investigation of qualitative traits and genes expression involved in bakery quality for some of the bread's wheat doubled haploid lines. *Plant Genetic Researches*, **8:** 151-158 (In Persian).

Kasarda, D.D., Autran, J.C., Lew, E.J.L., Nimmo, C.C. and Shewry, P.R. (1983). N-terminal amino acid sequences of ω-gliadins and ω-secalins: Implications for the evolution of prolamin genes. *Biochimica et Biophysica Acta*, **747:** 138-150.

Kneževic, D., yurievna-Dragovich, Y.A., Zecevic, N. and djukic, V. (2007). Polymorphism of *Gli-A1* alleles in winter wheat cultivars (*Triticum aestivum* L). *Kragujevac Journal of Sciences*, **29:** 139-147.

Lafindra, D. and Kasarda, D.D. (1985). One and two-dimensional. (two-ph) polyacrylamide gel electrophoresis in single gel: Separation of wheat proteins. *Cereal Chemistry*, **62:** 314-319.

Lakhneko, O., Danchenko, M., Morgun, B., Kováč, A., Majerová, P. and Škultéty, Ľ. (2020). Comprehensive comparison of clinically relevant grain proteins in modern and traditional bread wheat cultivars. *International Journal of Molecular* Sciences, **10:** 3445.

Metakovsky, E.V., Wrigley, C.V., Bekes, F. and Gupta, R.B. (1990). Gluten polypeptides as useful genetic markers of dough quality in Australian wheats. *Australian Journal Agriculture Research*, **41:** 289-306.

Menkovska, M., Kneževic, D. and Ivanoski, M. (2002). Protein allelic composition, dough rheology, and baking characteristics of flour mill streams from wheat cultivars with known and varied baking qualities. *Cereal Chemistry*, **79(5):** 720-725.

Melnikova, N.V., Kudryavtseva, A.V. and Kudryavtsev, A.M. (2012). Catalogue of alleles of gliadin-coding loci in durum wheat (*Triticum durum* Desf.). *Biochimie*, **94:** 551-557.

Metakovsky, E.V., Novoselskaya, A.Y., Kopus, M.M., Sobko, T.A. and Sozinov, A.A. (1984). Blocks of gliadin components in winter wheat detected by one- dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Theoretical and Applied Genetics*, **67:** 559-568.

Metakovsky, E.V. (1987). Organization, Variability and Stability of the Family of the Gliadin-Coding Genes in Wheat: Genetic Data. Proc. *3rd. Intern. Workshop on Glut. Prot. Budapest*, Hungary.

Metakovsky, E., Melnik, V., Rodriguez-Quijano, M., Upelniek, V. and Carrillo, J.M., (2018). A catalog of gliadin alleles: polymorphism of 20th-century common wheat germplasm. *The Crop Journal,* **6:** 628-641.

Medouri, A., Bellil, I. and Douadi Khelif, D. (2015). The genetic diversity of gliadins in *Aegilops geniculata* from Algeria. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding,* **51(1):** 9-15.

Novoselskaya, A.Y., Metakovsky, E.V., Sutka, J. and Galiba, G. (1990). Spontaneous and induced genetic variability in gluten proteins in bread wheat. *4th Intern. Workshop on Glut. Prot. Winnipeg, MB*, Canada.

Payne, P.I. (1987). Genetics of wheat storage proteins and the effect of allelic variations on bread making quality. *Annual Review of Plant Physiology*, **38:** 141-153.

Pourmohammadi, K., Abedi, E. and Bagher Hashemi, S.M. (2023). Gliadin and glutenin genomes and their effects on the technological aspect of wheat-based products. *Current Research in Food Science,* **7:** 100622.

Shewry, P.R., Napier, J.A. and Tatham, A.S. (1995). Seed storage proteins: structures and biosynthesis. *Plant Cell*, **7:** 945-956.

Shahnejat Bushehri, A.A., Salavati, A., Yazdi Samadi, B., Hassani, M.E. and Shahnejat Bushehri, S. (2011). Analyses of monomeric storage proteins "gliadins" in Iranian bread wheats. *Cereal Research Communications,* **39(1):** 100-108.

Sozinov, A.A. and Poperelya, F.A. (1979). Prolamin polymorphism and plant breeding. *Building Agriculture Science*, **10:** 21-34.

Tarekegne, A. and Labuschagne, M.T. (2005). Relationship between high molecular weight glutenin subunit composition and gluten quality in Ethiopian-grown bread durum wheat cultivars and lines. *Journal. Agronomy and Crop Science*, **191:** 300-307.

Upelniek, V.P., Novoselskaya, A.Y., Sutka, J., Galiba, G. and Metakovsky, E.V. (1995). Genetic variation at storage protein-coding loci of common wheat (cv 'ChineseSpring') induced by nitrosoethyl urea and by the cultivation of immature embryos in vitro. *Theoretical and Applied Genetics*, **90:** 372-379.

Utebayev, M., Dashkevich, S., Bome, N., Bulatova, K. and Shavrukov, Y. (2019). Genetic diversity of gliadin-coding alleles in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) from Northern Kazakhstan. *PeerJ*, **7:** e7082.

Wang, D., Li, F., Cao, S. and Zhang, K. (2020). Genomic and functional genomics analyses of gluten proteins and prospect for simultaneous improvement of end-use and health-related traits in wheat. *Theoretical and Applied Genetics,* **5:** 1521-1539.

Waga, J. and Skoczowski, A. (2014). Development and characteristics of x-gliadin-free wheat genotypes Development and characteristics of x-gliadin-free wheat genotypes. *Euphytica*, **195:** 105-116.

Wrigley, C.W., Autran, J.C. and Bushuk, W. (1982). Identification of cereal varieties by gel electrophoresis of the grain proteins. *Cereal Science and Technology*, **5:** 211-259.

Zang, P., Gao, Y., Chen, P., Lv, C., Zhao, G. (2022). Recent advances in the study of wheat protein and other food components affecting the gluten network and the properties of noodles. *Foods*, **11:** 3824.

Zilic, S. (2013). *Wheat Gluten: Composition and Health Effects. Gluten.* Nova Science Publishers, New York, USA.