اولین همایش یافته‌های نوین در محیط زیست و اکوسیستم‌های کشاورزی
برگزارکننده: دانشگاه تهران، پژوهشکده انرژی‌های نو و محیط زیست
پایگاه اینترنتی همایش: AgroCongress.ir

مکان‌یابی QTLهای مرتبط با محتوای گلوتنین و گلیادین دانه گندم نان با استفاده از نشانگر ریزماهواره

محدثه ایزدی فرد[۱]، علاءالدین کردنائیج[۲]، علیرضا رضازاده[۳]

۱-دانشجوی کارشناسی ارشد دانشگاه شاهد، تهران

۲-عضو هیأت علمی گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشگاه شاهد، تهران

۲-عضو هیأت علمی گروه گیاهپزشکی دانشگاه شاهد، تهران

پست الکترونیکی:a_kordenaeej@yahoo.com , izadifardmohaddese@yahoo.com

چکید

ویژگی‌های رئولوژیک آرد گندم به عنوان پر مصرف‌ترین و شناخته شده‌ترین نوع آرد، به زیرواحدهای گلیادین و گلوتنین شبکه گلوتنی آن وابسته است(۱). علاوه بر مکان‌های ژنی شناخته شده کنترل کننده این زیرواحدها با نام‌های Glu-A1، Glu-A3، Glu-B1، Glu-B3، Glu-D1، Glu-D3، Gli-A1، Gli-A2، Gli-B1، Gli-B2، Gli-D1 و Gli-D2، ماهیت کمی و پلی‌ژنیک آن‌ها امکان شناسایی مکان‌های ژنی کمی (QTL) کنترل کننده تنوعات ژنتیکی مرتبط با این زیرواحدها را به روش نقشه‌یابی QTL فراهم کرده‌است. در مطالعه حاضر که بر روی یک جمعیت متشکل از ۱۱۸ لاین خویش‌آمیخته نوترکیب(F2:8) انجام شده‌است، یکQTL برای صفت محتوای گلوتنین به روش نقشه‌یابی فاصله‌ای مرکب و یازده QTL به‌روش آنالیز تک نشانگری به‌دست آمده است. هم‌چنین برای صفت محتوای گلیادین، دو QTL به‌روش نقشه‌یابی فاصله‌ای مرکب و دوازده QTL به روش آنالیز تک نشانگری شناسایی شده است. نتایج این بررسی را در صورت تایید QTLهای شناسایی شده در آزمایش‌های بعدی، می‌توان در برنامه‌های گزینش به‌کمک نشانگر مورد استفاده قرار داد.

کلید واژگان:گلیادین، گلوتنین،QTL

مقدمه:

فرآورده‌های گندم در الگوی غذایی مردم ایران از اهمیت زیادی برخوردار است به طوریکه ٤٠ تا ٤٥ درصد کالری و حدود ٥٠ درصد پروتئین مورد نیاز روزانه هر فرد را تامین می نماید(٥) ارزش نانوایی ارقام مختلف گندم به مقدار گلوتن موجود در دانه آن‌ها وابسته می‌باشند پروتئین‌های گلوتنی شامل گلیادین‌ها و گلوتنین‌ها است و نزدیک به ٨٠درصد پروتئین دانه گندم را این دو جزتشکیل می‌دهند(٥)گلوتنین‌ها نقش مهم‌تری را در کیفیت نانوایی و اختلاف میان ارقام داشته (٦) و(٣) این پروتئین‌ها نقش اصلی در ایجاد خواص رئولوژیکی و کیفیت آرد و پخت نان دارند. در واقع پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر مسئول خواص منحصر به فرد چسبندگی و قابلیت ارتجاع در خمیر گندم هستند (٤) . محتوی گلوتنین و گلیادین گندم عمدتا به وسیله پیشینه ژنتیکی آن تعیین می‌شود و نمی‌تواند به وسیله تغییرات در شرایط محیط یا با استفاده از کودها تغییر یابد. با توجه به این که محتوی گلوتنین و گلیادین صفات کمی هستند. بنابراین، می‌توان مکان‌های ژنی کنترل کننده این صفات (QTL) را با استفاده از روش نقشه‌یابی QTL(QTL mapping) بر روی کروموزوم‌های گندم شناسایی کرد.

مواد و روش‌ها:

مواد گیاهی مورد مطالعه

مطالعه حاضر با هدف اندازه‌گیری محتوای گلوتنین و گلیادین دانه گندم نان و نیز مکان یابی QTLهای کنترل‌کننده این صفات در یک جمعیت نقشه‌یابی متشکل از١١٨ لاین اینبرد نوترکیب (recombinant inbred lines: RILs)انجام می‌شود. این لاین‌ها از تلاقی دو والد ایرانی طبسی و اروپایی تایفون و به روش نتاج تک بذر از نسل F2 در سال ٢٠٠٧ توسط کردنائیج حاصل شدند.

ارزیابی فنوتیپی جمعیت نقشه‌یابی برای محتوی گلوتنین و گلیادین دانه گندم

بذور ١١٨ لاین اینبرد نوترکیب همراه با والدینشان ابتدا توسط آسیاب والسی آرد شد سپس اندازه‌گیری مقدار، گلوتن مرطوب و گلوتنین و گلیادین طبق متد شماره 37-12.02 سازمان استاندارد آمریکا انجام خواهد گرفت. بدین صورت که برای تعیین مقدار گلوتن مرطوب از دستگاه گلوتن-شوی گلوتامیک، مطابق با روش ارائه شده توسط ICC به شماره ١٣٧ استفاده شد. ابتدا ١٠ گرم آرد کامل توسط آسیاب چکشی تهیه شد با ٨/٤ میلی‌لیتر محلول نمک طعام ٢٪، سدیم فسفات و پتاسیم فسفات مخلوط شد، سپس ماده حاصله در مش مخصوص دستگاه گلوتن شور دوقلوی اتوماتیک گذاشته شد و دستگاه به مدت ٢ دقیقه روشن خواهد شد تا نشاسته‌ی ماده شسته شد. سپس ماده باقیمانده در مش مخصوص گذاشته شدو به مدت ٣ دقیقه دستگاه روشن خواهد شد تا سبوس نیز شسته شد. و برای اندازه‌گیری گلوتنین و گلیادین از دستگاه سانتریفیوژ استفاده می-شود گلوتن حاصله در روی توری مخصوص گذاشته شد و در شتاب ٦٠٠ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. عمل سانتریفیوژ سبب خواهد شد که مقداری از گلوتن از روی توری به زیر توری برود. سپس به وسیله کاردک مخصوص، گلوتن روی توری و زیر توری تراشیده و به تفکیک وزن خواهد شد .

نقشه پیوستگی نشانگرهای SSR

نقشه پیوستگی نشانگرهای ریزماهواره (SSR) که قبلا توسط کردناییج و للی (۲۰۰۸) تهیه شده بود در دسترس می‌باشد و برای آنالیز QTL مورد استفاده قرار می‌گیرد. این نقشه متشکل از ۲۰۸ مکان آللی نشانگر ریز ماهواره بوده و تمام ۲۱ کروموزوم ژنوم گندم را پوشش می‌دهد.(۷)

تهیه نقشه QTLهای کنترل محتوای گلوتنین و گلیادین

شناسایی QTL به روش نقشه‌یابی فاصله‌ای مرکب روش آنالیز تک نشانگر انجام شد. در روش تک نشانگر از تکنیک رگرسیون برای آنالیز رابطه میان فنوتیپ و نشانگر استفاده شد و رابطه-ی بین یک نشانگر با یک QTL ارزیابی گردید. در روش نقشه-یابی فاصله-ای مرکب داده‌های فنوتیپی حاصل از اندازه‌گیری محتوای گلوتنین و گلیادین در لاین‌های اینبرد نوترکیب با داده‌های ژنوتیپی نقشه پیوستگی نشانگرهای ریز ماهواره تلفیق شده و برای هر QTL اندازه اثرات افزایشی و سهم آن در واریانس تنوعات فنوتیپی مربوط به هر صفت تعیین گردید.

نتایج و بحث:

QTLهای بدست آمده برای محتوای گلوتنین دانه

۱-شناسایی QTL به‌روش آنالیز تک نشانگر

با استفاده از آنالیز تک نشانگر برای محتوای گلیادین دانه، دوازده QTL روی کروموزوم‌های

2A-2,3A,3A,3A,3A,4B,5B,5B,7A,7B,7D,7D به دست آمدندکه میانگین ارزش فنوتیپی آنها 3.61 بوده است این – QTL-ها به ترتیب با نشانگرهای

Xgwm312,Xgwm3044,Xgwm1159,Xgwm1110,Xgwm192a,Xgwm4019,Xgwm1108,Xgwm3064

,Xbarc184,Xgwm1055 ,Xgwm745, تفرق پیدا کرده‌اند.(جدول شماره ۲)

۲-شناسایی QTL به روش نقشه‌یابی فاصله‌ای مرکب

برای محتوای گلوتنین دانه، یک QTL بزرگ اثر بر روی کروموزوم 6D-2 با مقدار LOD معادل ۲,۲۳ و ارزش فنوتیپی 25.58٪ به دست آمد. این QTL با نشانگر *Xgwm815b* تفرق پیدا کرده است. .(جدول شماره ۱)

QTLهای به‌دست آمده برای محتوای گلیادین دانه

۱- شناسایی QTL به روش آنالیز تک نشانگر

با استفاده از آنالیز تک نشانگر برای محتوای گلیادین دانه، یازده QTL به ترتیب بر روی کروموزوم‌های

1D,3A,3A,3A,4B,5A-2,7A,7B,7B,7D,7Dبه دست آمدند که میانگین ارزش فنوتیپی آنها ۳,۹۱ بوده است این QTLبه

ترتیب با نشانگرهای
Xgwm4867,Xgwm1159,Xgwm1042,Xgwm674,Xgwm192a,Xgwm1342,Xgwm3064,Xgwm333
Xgwm745,Xbarc184,Xgwm1055,تفرق پیدا کرده‌اند .(جدول شماره ٤)

۲-شناسایی QTL به روش نقشه‌یابی فاصله‌ای مرکب

برای محتوای گلیادین دانه دو QTL بزرگ اثر بر روی کروموزوم‌های 7A و 7B به ترتیب با LODهای ۲,۱۵ و ۲,۳۱ و میانگین ارزش فنوتیپی ۲۰,۵ به دست آمد. این QTLها با نشانگرهای *Xgwm3064* و *Xgwm333* تفرق پیدا کرده‌اند (جدول شماره ۳).با توجه به نتایج حاصل از این مطالعه و مطالعات پیشین از جمله Zhang و همکاران (۲۰۰۹) در مطالعه‌ی که برای تعیین مقدار, HMW-GS,LMW-GS و پروتئین گلوتن و خواص میکسوگراف خمیر انجام دادند به این نتیجه رسیدند که مکان ژنی HMW-GS در ۲۵/۳٪ واریته‌ها با ویژگی‌های میکسوگراف خمیر وابسته هستند و همچنین مقدار پروتئین گلوتن مخصوصا مقدار HMW-GS و GLU-B3 با بیشتر پارامترهای مربوط به کیفیت نان رابطه‌ی معناداری دارند(١٤). Catherine و همکاران (۲۰۰۵) اظهار کردند همان طور که در مطالعات قبلی بر روی گندم ۲ ژن GLU-B1-1 و Spa- B به عنوان ژن‌های کاندید برای شناسایی QTLهای زیر واحد گلوتنین با وزن مولکولی بالا شناسایی شده بودند. آن‌ها در مطالعه‌ی خود به این نتیجه رسیدند که ژن GLU-B1-1 بهترین ژن کاندید برای شناسایی QTLهای مربوط به زیر واحد-های گلوتنین با وزن مولکوکی بالا هستند (١٦) .Kuchel و همکاران (۲۰۰٦) در مطالعه‌ای که بر روی یک جمعیت دابل هاپلوئید برای شناسایی QTLهای مربوط به صفات آردسازی شامل خواص رئولوژیک خمیر و کیفیت پخت انجام دادند به این نتیجه رسیدند که QTLهای مربوط به گلوتنین HMW-LMW بر روی کروموزوم 1A و 1B و QTLهای مربوط به قدرت خمیر و حجم قرص نان بر روی کروموزوم 3A و QTLهای مربوط به محتوی پروتئین آرد و آردسازی بر روی کروموزوم 6A و QTLهای مرتبط با رنگ آرد بر روی کروموزوم 7B قرار دارند(۸). در نهایت با توجه به این که انتخاب به کمک نشانگرهای مولکولی ابزاری کارآمد برای متخصصان اصلاح نباتات می‌باشد از این طریق می‌توان براساس حضور نشانگر پیوسته با ژن، به وجود ژن پی برد.اگرچه انتخاب به کمک نشانگرها دیدگاه جدیدی نیست، اما استفاده عملی از آن چندان گزارش نشده است. شاید یکی از مهم‌ترین دلایل این بوده است که نشانگرهای مورد مطالعه فاصله زیادی از ژن مطلوب داشته‌اند که موجب عدم دقت و کاهش کارایی آن‌ها شده است. بنابراین برای توفیق در انتخاب به کمک نشانگرها وجود یک دستورالعمل جا افتاده که قابل استفاده، ارزان، مؤثر و مکمل روش‌های به‌نژادی موجود باشد، جدی است. یکی از مراحلی که برای توفیق در انتخاب به کمک نشانگرها پیشنهاد می‌شود، یافتن نشانگرهایی است که فاصله آن‌ها از ناحیه ژنی موردنظر کمتر از ۵ سانتی‌مورگان باشد. در این زمینه Zhang و همکاران (۱۹۹۵) به صورت تجربی نشان دادند با یافتن نشانگرهایی که فاصله آن‌ها از ناحیه ژنی موردنظر کمتر از ۵ سانتی مورگان باشد، دقت انتخاب ۹۹/۷۵٪ خواهد بود(۱۳). داشتن نقشه‌های ژنتیک اشباع که به طور متوسط دست کم یک نشانگر به ازای کمتر از ۱۰ سانتی مورگان فاصله روی کروموزوم‌ها داشته باشند، از موارد ضروری است (۲) .در نهایت ضمن شناسایی و معرفی برخی از QTLهای کنترل کننده‌ی محتوی گلوتنین و گلیادین در گندم و تایید ماهیت کمی این صفات، اهمیت چنین مطالعاتی را در زمینه بهبودکیفیت نانوایی گندم در برنامه‌های به‌نژادی روشن می‌کند.

جدول ۱- مشخصات QTLهای شناسایی شده با استفاده از روش نقشه‌یابی فاصله‌ای مرکب برای محتوای گلوتنین دانه در جمعیت لاین‌های اینبرد نوترکیب گندم

کرموزوم	نشانگر پیوسته	موقعیت نسبت به نشانگر	LOD	اثر افزایشی	ارزش فنوتیپی(R^2)	آلل والدینی
6D-2	Xgwm815b	14.0000	2.2341	-0.7212	0.2558	Tab

جدول ۲- مشخصات QTLهای شناسایی شده با استفاده از روش آنالیز تک نشانگر برای محتوای گلوتنین دانه در جمعیت لاین‌های اینبرد نوترکیب گندم

کرموزوم	نشانگر پیوسته	b0	b1	LR	pr(F)	R2
2A-2	*Xgwm312*	3.682	-0.161	4.839	0.029	* 0.043
3A	*Xgwm3044*	3.683	-0.155	4.883	0.029	* 0.039
3A	*Xgwm1159*	3.684	-0.185	6.746	0.01	* 0.059
3A	*Xgwm1110*	3.691	-0.147	4.209	0.042	* 0.035
3A	*Xgwm1042*	3.687	-0.147	4.165	0.043	* 0.035
4B	*Xgwm192a*	3.705	0.183	6.539	0.011	* 0.047
5B	*Xgwm4019*	3.705	0.143	3.943	0.049	* 0.025
5B	*Xgwm1108*	3.712	0.188	7.066	0.008	** 0.051
7A	*Xgwm3064*	3.693	0.147	3.993	0.048	* 0.034
7B	*Xgwm745*	3.64	0.182	5.97	0.016	* 0.043
7D	*Xbarc184*	3.653	-0.162	5.059	0.026	* 0.042
7D	*Xgwm1055*	3.665	-0.156	4.838	0.029	* 0.040

جدول ۳- مشخصات QTLهای شناسایی شده با استفاده از روش نقشه‌یابی فاصله‌ای مرکب برای محتوای گلیادین دانه در جمعیت لاین‌های اینبرد نوترکیب گندم

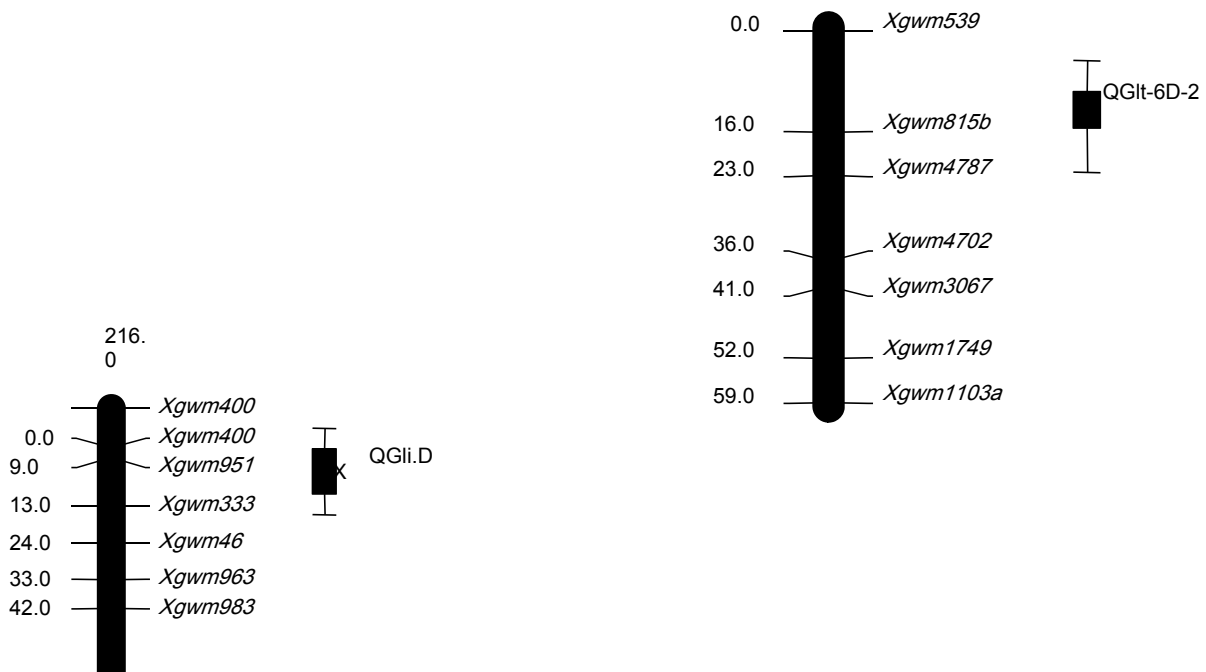
کرموزوم	نشانگر پیوسته	موقعیت نسبت به نشانگر	LOD	اثر افزایشی	ارزش فنوتیپی(R^2)	آلل والدینی
7A	*Xgwm3064*	17.0000	2.1584	-0.6063	0.3326	Tai
7B	*Xgwm333*	14.0000	2.3143	0.3261	0.0860	Tab

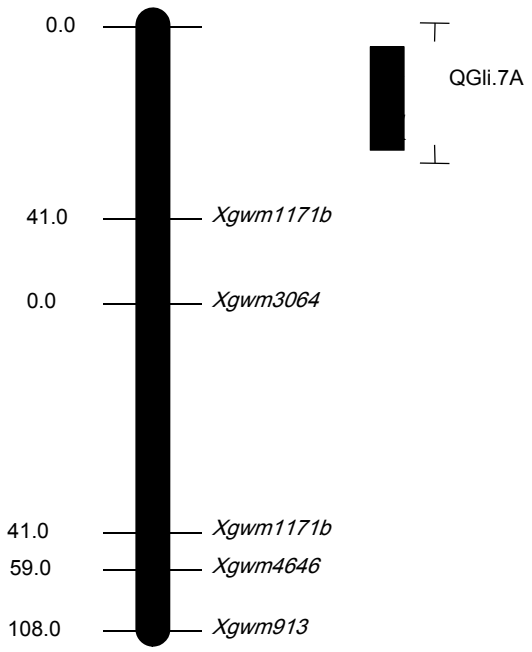
جدول ٤- مشخصات QTLهای شناسایی شده با استفاده از روش آنالیز تک نشانگر برای صفت محتوای گلیادین دانه در جمعیت لاین‌های اینبرد نوترکیب گندم

کرموزوم	نشانگر پیوسته	b0	b1	LR	F(1,n-2)	pr(F)	R2
1D	*Xgwm4867*	1.626	0.198	4.187	4.19	0.042	* 0.035
3A	*Xgwm1159*	1.616	0.197	4.044	4.045	0.046	* 0.036

3A	*Xgwm1042*	1.612	0.24	6.101	6.156	0.014	* 0.050
3A	*Xgwm674*	1.631	0.213	4.784	4.8	0.03	* 0.039
4B	*Xgwm192a*	1.593	-0.198	4.063	4.064	0.046	* 0.029
5A-2	*Xgwm1342*	1.63	0.197	4.196	4.199	0.042	* 0.034
7A	*Xgwm3064*	1.604	-0.208	4.341	4.347	0.039	* 0.036
7B	*Xgwm333*	1.658	0.287	8.849	9.033	0.003	** 0.061
7B	*Xgwm745*	1.666	-0.206	4.1	4.102	0.045	* 0.031
7D	*Xbarc184*	1.656	0.203	4.257	4.261	0.041	* 0.035
7D	*Xgwm1055*	1.646	0.231	5.775	5.818	0.017	* 0.047

شکل ۱- نقشه مکان های کروموزومی QTL های مرتبط با محتوای گلوتنین و گلیادین دانه گندم





منابع:

۱. مهدویان، س.، شیخ الاسلامی، ز. الهامی راد، ا.، و ق.، عبداله زاده، ۱۳۹۰، بررسی اثر ترکیب‌های گلوتن و نشاسته بر خصوصیات رئولوژیکی خمیر، همایش ملی صنایع غذایی(فن آوری‌های نوین، کنترل کیفیت و بسته‌بندی مواد غذایی).

۲. نقوی، م.، قره‌یاضی، ب.، و ق.، سالکده، ۱۳۸٤، نشانگرهای مولکولی. انتشارات دانشگاه تهران.

۳.وزیری، م.، محمدی نژاد، ق.، و ا.، باقی زاده، ۱۳۹۲، ارزیابی تنوع ژنتیکی برای خصوصیات مرتبط با کیفیت نانوایی در لاین‌های مختلف گندم نان، بیست و یکمین کنگره ملی علوم و صنایع غذایی ایران.

۴.Branlard, G., M., Dardevetet al., 2001, Genetic diversity of wheat storage proteins and bread wheat quality. Euphytica, 119: 59-67

۵.Iran-Nejad, H., Shahbaziyan, N., 2005, Cereal cultivation, wheat. Karenoo Publications, . (Vol. I) Tehran,Iran, 272 P. (In Persian).

6.Khatkar, B. S., Bell A. E., Schofield, J. D., 1995, The dynamic rheological properties of glutens and gluten sub-fractions from wheats of good and poor bread making quality. J. Cereal Sci. 22:29-44.

7.Kordenaeej, A., and T., Lelley, 2008, Mapping QTLs related to yield and_yieldcomponents under drought in bread wheat, Sydney University Press.

8.Kuchel, H., Langridge, P., et al. 2006, The genetic control of milling yield, dough rheology and baking quality of wheat. Theoretical and Applied Genetics 112: 1487-1495.

16.Ravel, C., Sebastien, P., Alain, M., Laurent, L., Mireille, D., Francois, B., Philippe, D., Dominique, B., Gilles, Ch., 2005.Identification of Glu-B1-1 as a candidate gene for the quantity of high-molecular-weight glutenin in bread wheat(Triticum aestivum L) by means of an association study. Theoretical and applied genetics,112:738-743

10. Voorrips, R.E.,2002, MapChart: software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs. Heredity, 93:77-78

11.Wang, S., Basten, C.J., Zeng, Z.B., 2012, Windows QTL Carthographer, new version, Statistical Genetics. North Carolina State University.

12.Woychick, C. G., Fillion, R.A., 2009, Method of making demountable interconnect structure, EP Patent, 2:107-601

13. Zhang, Q., Gao, Y. J., Maroof, M. S., Yang, S. H., & Li, J. X., ۱۹۹۵, Molecular divergence and hybrid performance in rice. Molecular breeding. ۱: ۱۳۳-۱٤۲.

14.Zhang, Y., Tang, J., let al. 2009, The gluten protein and interactions between components determine mixograph properties in an F2:6 recombinant inbred linepopulation in bread wheat. Journal of Cereal Science, 50: 219-226

Mapping QTLs related to the Gliadin and Glutenin contents in bread wheat grain using microsatellite marker

Abstract

Rheological properties of wheat flour as the well-known and the most widely used flour, depend on it’s gliadin and glutenin subunits of gluten network. In addition to the known loci controlling these

subunits so called *Glu-A1*, *Glu-A3*, *Glu-B1*, *Glu-B3*, *Glu-D1*, *Glu-D3*, *Gli-A1*, *Gli-A2*, *Gli-B1*, *Gli-B2*, *Gli-D1*, and *Gli-D2*, their quantitative and polygenic nature, made it possible to identify the quantitative trait loci (QTL) controlling the genetic variations associated with these subunits by QTL mapping technique. In the present study, based on a population of 118 recombinant inbred lines (F2: 8), one and eleven QTLs were detected for the glutenin content by the composite interval mapping(CIM) and the single marker analysis method respectively. Also two and twelve QTLs were identified for gliadin content by the same methods. The results of this study can be used in the marker-assisted selection programs if the subsequent tests confirm these QTLs.

Keywords: Gliadin, glutenin, QTL, RILs