

واسنجی ترکیبات آلی ژنهای پیورواپندولین (*Pinb-D1/Pina-D1*) و آزمون مکانیکی سختی بذر در گندم نان

الهام مهرآذر^{۱*}، علی ایزدی دربندی^۲ و محسن محمدی^۳
۱، دانشجوی کارشناسی ارشد اصلاح نباتات، ۲، استادیار گروه علوم زراعی و اصلاح نباتات پردیس ابوریحان
دانشگاه تهران، ۳، استادیار موسسه اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج
(تاریخ دریافت: ۹۱/۷/۲ - تاریخ تصویب: ۹۲/۳/۱)

چکیده

سختی دانه یکی از مهم‌ترین ویژگی‌های کیفی گندم نان است که نقش اساسی در قدرت جذب آب توسط آرد و اندازه ذرات آن دارد. سختی دانه گندم تحت کنترل مکان ژنی (*Ha*) روی کروموزوم 5D می‌باشد. در این تحقیق با آزمون مکانیکی بوسیله دستگاه کشش و فشار (CT) و آزمون مکانیکی نوری (NIR) بوسیله دستگاه اینفراماتیک سختی ارقام با منشاهای متفاوت مورد بررسی قرار گرفت و تنوع آلی ژنهای پیورواپندولین، آل‌های *Pina-D1a*، *D1b*، *Pinb-D1a*، *Pinb-D1c*، *Pinb-D1b* و *Pinb-D1d* با آغازگرهای اختصاصی STS و SNPs با روش دمای سوئیچ در ارقام بررسی شدند. نتایج نشان داد که بیش از نیمی از ارقام مورد مطالعه دارای جهش در ژنهای کنترل کننده پیورواپندولین‌ها بودند. سایر ارقام دارای آل طبیعی (*Pina-D1a/Pinb-D1a*) بوده و فنوتیپ دانه نرم را نشان می‌دهند. بیشترین فراوانی آلی سختی مربوط به *Pina-D1b* و *Pinb-D1b* و به تعداد کمتری *Pinb-D1d* بوده و آل *Pinb-D1c* در هیچ رقمی دیده نشد. با توجه به نتایج، ارقام سخت حاصل از تحقیق بیشتر مربوط به دو اقلیم گرم و مرطوب و یا گرم و خشک می‌باشند. ضریب همبستگی بین نتایج سختی حاصل از دو آزمون کشش و فشار (CT) با آزمون (NIR)، نتایج مولکولی با آزمون (NIR) و نتایج مولکولی با آزمون کشش و فشار بترتیب برابر ۰/۷۴، ۰/۸۷ و ۰/۷۹ بود که در سطح ($\alpha < 0.0001$) معنی‌دار شدند. مطالعات ما در زمینه اساس ژنتیکی و مکانیکی سختی دانه می‌تواند اطلاعات مفیدی را در زمینه اصلاح این صفت در برنامه‌های به‌نژادی گندم ایران در اختیار به‌نژادگران قرار دهد.

واژه‌های کلیدی: آزمون کشش و فشار (CT)، آزمون مکانیکی نوری (NIR)، تکنیک واکنش با دمای سوئیچ، گندم نان

مقدمه

Cadiz et al., 2008). بر همین اساس به عنوان یک صفت کیفی نقش کلیدی در طبقه‌بندی تجاری گندم نان در سراسر جهان دارد (Chen et al., 2007). دانه‌های گندم با بافت سخت دارای آرد زبر و گرانول نشاسته آسیب دیده بیشتری می‌باشند در مقایسه با آن‌ها دانه‌ها با آندوسپرم نرم دارای گرانول نشاسته آسیب دیده کمتر

گندم (*Triticum aestivum* L.) مهم‌ترین گیاه زراعی دنیا است و در میان صفات کیفی گندم سختی دانه بر اساس بافت آندوسپرم به دو گروه نرم و سخت دسته بندی می‌شوند که نقش اساسی در عملکرد آردسازی، اندازه ذرات آرد، قدرت جذب آب آرد دارد (senMatus-)

زنجیره‌ای پلیمرز با آغازگرهای اختصاصی (Giroux & Morris, 1997)، استفاده از CAPS^۱ مارکرها به همراه آنزیم برشی خاص برای تکثیر قطعه‌ای از ژن‌های مختلف پیورواپندولین (Lillemo & Morris, 2000; Li et al., 2008) و استفاده از توالی‌یابی^۲ ژن (Giroux & Morris, 1997; Gazza et al., 2005). در این تحقیق بدلیل پرمهزینه و زمان‌بر بودن روش‌های ذکر شده استفاده از یک روش جدید برای توسعه واکنش آل‌های اختصاصی و نشانگرهای SNPs با استفاده از دمای سوئیچ گزارش شده است که یک سیستم واکنش زنجیره‌ای پلیمرز سه پرایمری می‌باشند که اجازه تکثیر مکان ژنی هدف را با آغازگرهای اختصاصی مکان ژنی در فاز اول و آشکار سازی آل SNP با آغازگرهای آل اختصاصی در فاز دوم چرخه دمایی PCR می‌دهند (Huang & Brule, 2011). به غیر از روش‌های مولکولی نامبرده برای مطالعه سختی دانه استفاده از ویژگی‌های فیزیکی و مکانیکی، بویژه در محصولات دانه‌ای، جهت تشخیص کیفیت دانه و طبقه‌بندی آن می‌تواند بسیار مفید باشد. چهار روش NIR، WHI، PSI و SKCS برای تعیین سختی دانه طبق استانداردهای بین‌المللی بکار می‌رود (Famera et al., 2004). در این تحقیق از روش PCR با ارزیابی ترکیبات آلی ژن‌های *Pina* و *Pinb* در ارقام تجاری گندم نان و بررسی سختی دانه با روش‌های مکانیکی و مکانیکی نوری به منظور تأیید بر نتایج بدست آمده از بخش مولکولی می‌باشد. تعیین ترکیبات آلی مربوط به سختی دانه می‌تواند دستاورد مهمی در بهره‌برداری‌های تجاری ارقام در صنایع نانوائی و برنامه به‌نژادی گندم باشد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

در این تحقیق از ۵۰ رقم تجاری گندم نان با منشاهای متفاوت که در پژوهش‌های مستمر بخش تحقیقات غلات موسسه اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج بکار

می‌باشند (senMatus-Cadiz et al., 2008). دانه سخت با محتوای پروتئین و الاستیسیته بالا دارای کیفیت بالای نانوائی می‌باشند در حالی که دانه‌های نرم با محتوای پروتئین کمتر برای تهیه انواع کیک و بیسکوئیت کیفیت بالایی دارند (Morris & Rose, 1996). سختی دانه گندم تحت تاثیر عوامل ژنتیکی است اما اثر عوامل و فاکتورهای محیطی روی آن بی‌تاثیر نیست (Turnbull & Rahman, 2002). پروتئین فریابیلین با وزن مولکولی ۱۵ کیلو دالتون پیوستگی معنی‌داری با سختی دانه دارد و یکی از اجزای پروتئین‌های PINA، PINB و GSP-1 است (Bihan et al., 1996). اساس مولکولی سختی دانه از ژن‌های پیورواپندولین که در مکان ژنی (*Ha*) در روی بازوی کوچک کروموزوم 5D قرار دارد نتیجه می‌شود که شامل پیورواپندولین a (*Pina-D1*) و پیورواپندولین b (*Pinb*-*D1*) می‌باشند (Morris & Bhave, 2008; Morris, 2008). تنوع در آل‌های پیورواپندولین با تفاوت در کیفیت دانه گندم پیوستگی دارد (Chen et al., 2007). اخیراً ژن جدید پیورواپندولین (*Pinb-2*) موثر در بافت دانه تحت بررسی است که توسط Geng et al. (2012) شناسایی شده است. احتمالاً تفاوت ناچیزی بین داده‌های ژنوتیپی و فنوتیپی در تنوع آلی در ژن *Pinb*-2 مشاهده شده است و هیچ اثر برجسته‌ای در روی بافت دانه ندارد. جهش‌های متفاوت در *Pina* و *Pinb* می‌تواند سطوح مختلفی از بافت دانه را نتیجه شود (Bhave & Morris, 2008; Morris, 2008). ژن‌های پیورواپندولین a و b در حالت آل طبیعی (*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 پیورواپندولین a و b است، بافت دانه خیلی سخت می‌باشد (Chen et al., 2007). آل‌های *Pina-D1b* و *Pinb-D1b* شایع‌ترین آل‌های پیورواپندولین در ارقام گندم نان سراسر جهان می‌باشند (Lillemo & Morris, 2000; Morris et al., 2001). سه روش شناسایی تنوع آلی در مکان ژنی پیورواپندولین b عبارتند از: تکثیر به کمک واکنش

1. Cleaved Amplified Polymorphic Sequences (CAPS)
2. Sequencing

استفاده از روش CTAB با اندکی تغییر انجام شد (Murray & Thompson, 1980).

می‌روند، استفاده گردید (جدول ۱). این ارقام انتخابی از اقلیم‌های مختلف می‌باشند و استخراج DNA آن‌ها با

جدول ۱- مشخصات ارقام گندم نان مورد بررسی

شماره No.	رقم (Genotype)	منشا (Origin)	اقلیم (Zone)	شماره No.	رقم (Genotype)	منشا (Origin)	اقلیم (Zone)
1	Adl	Iran	معتدل	26	Khazar-1	Iran	گرم و مرطوب
2	Azadi	Iran	معتدل	27	Moqan2	India	گرم و مرطوب
3	Darya	Iran	گرم و مرطوب	28	Pishgam	Iran	سرد
4	Karaj1	Iran	معتدل	29	Vee/nac	CIMMYT	گرم و خشک
5	Shahriar	Iran	سرد	30	Zagross	CIMMYT	سرد
6	Shiraz	Iran	معتدل	31	Barekat	Iran	گرم و مرطوب
7	Tam-200	USA	معتدل	32	Moqan1	CIMMYT	گرم و مرطوب
8	Rashid	Iran	سرد	33	Ac-Vista	Canada	گرم و خشک
9	Azar	Iran	سرد	34	Celtic	Canada	گرم و خشک
10	Ghods	Iran	معتدل	35	Glenlea	Canada	گرم و خشک
11	Naz	CIMMYT	گرم و مرطوب	36	Neepawa	Canada	گرم و خشک
12	Bistoon	Iran	معتدل	37	Ac-Foremost	Canada	گرم و خشک
13	Niknejad	Iran	معتدل	38	Ac-Taber	Canada	گرم و خشک
14	Omid	Iran	سرد	39	Hope	USA	گرم و مرطوب
15	Parsi	Iran	معتدل	40	Marquis	Canada	گرم و مرطوب
16	Sabalan	Iran	سرد	41	Anza	USA	گرم و خشک
17	Roshan	Iran	معتدل	42	Selkirk	Canada	گرم و خشک
18	Sefid	Iran	سرد	43	Katepwa	Canada	گرم و خشک
19	Khalij	Iran	گرم و خشک	44	Ac-Cadillac	Canada	گرم و خشک
20	Maroon	Iran	گرم و خشک	45	Laura	Canada	گرم و خشک
21	Darab2	CIMMYT	گرم و خشک	46	Pasqua	Canada	گرم و خشک
22	Golestan	CIMMYT	گرم و مرطوب	47	Ac-Eatonia	Canada	گرم و خشک
23	Atrak	CIMMYT	گرم و خشک	48	CDC-Bounty	Canada	گرم و خشک
24	Chenab	Pakistan	گرم و خشک	49	Harvest	Canada	گرم و خشک
25	Kaveh	CIMMYT	گرم و خشک	50	Ac-Abbey	Canada	گرم و مرطوب

سنجش سختی بذر به روش مکانیکی با دستگاه کشش و فشار^۱

در این روش عکس‌العمل دانه نسبت به نیروی اعمال شده بر روی دانه دست نخورده آزمون می‌شود که می‌توان با کمک یک دستگاه اندازه‌گیری مناسب، منحنی نیرو-تغییر شکل و منحنی نیرو-زمان را از آن بدست آورد (Curtis, 2002). آزمایش با دستگاه بارگذاری کشش و فشار با ۱۰ تکرار انجام گرفت و میانگین ۱۰ تکرار برای هر رقم در جدول ۳ آمده است. داده‌های بدست آمده از آزمون، با کمک برنامه EXCEL دسته‌بندی شده و سپس نتایج مورد نظر از هر منحنی بطور مجزا استخراج گردیدند. در این مطالعات یکی از عوامل موثر بر خواص مکانیکی دانه اندازه دانه می‌باشد، با انتخاب دانه‌های با

سنجش سختی بذر به روش مکانیکی نوری با NIR

این دستگاه با تابش امواج نزدیک مادون قرمز NIR به مواد آلی گندم و ثبت انرژی جذب شده، میزان و کیفیت آن‌ها را مشخص می‌نماید (Gautier et al., 1994). اندازه ذرات بر انعکاس اشعه مادون قرمز تاثیر گذار است، به طوری که هر چه اندازه ذرات افزایش یابد، دانه سختی بیشتری خواهد داشت. درصد سختی دانه با استفاده از دستگاه اینفراماتیک (NIR) مدل ۸۶۰۰ بر اساس استاندارد جهانی AACC طبق روش ۷۰/۰۲-۳۰ اندازه‌گیری شده و طبق اعداد استاندارد، اعداد کمتر از ۵۰، برای گندم‌های نرم و اعداد بین ۵۰ تا ۸۰، برای گندم‌های سخت در نظر گرفته می‌شوند که در جدول ۳ آمده است (Faměra et al., 2004; Hrušková & Svec, 2009).

Pina-D1a و *Pina-D1b* ژن پیورواپندولین a و آل‌های *Pinb-D1a* و *Pinb-D1d*، *Pinb-D1c*، *Pinb-D1b* ژن پیورواپندولین b استفاده شد. واکنش‌های PCR با آغازگرهای اختصاصی و برنامه چرخه دمایی برای تعیین تنوع آل‌های *Pina* و *Pinb* با استفاده از آغازگر نام برده بر طبق جدول ۲ می‌باشد. همچنین غلظت مواد بکار رفته در یک واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در حجم ۲۵ میکرولیتر حاوی ۱ واحد Taq DNA پلیمرز، ۱/۵ میلی مولار از هر $MgCl_2$ ، 1x (۲/۵ میکرولیتر) بافر از هر بافر PCR (10x)، ۵۰ نانوگرم (۱ میکرولیتر) از DNA ژنومی، ۰/۲ میلی مولار از هر dNTP و ۰/۴ پیکو مول از هر آغازگر استفاده شد. فرآورده‌های PCR روی ژل‌های آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز گردیدند.

قطر بزرگتر از ۲/۸ میلی‌متر این فاکتور تا حدی تحت کنترل قرار گرفت (Ohm et al., 1998). کلیه نمونه‌ها در جهت شکمی (پایدارترین حالت) مورد آزمایش قرار گرفتند و با سرعت معادل ۷ میلی‌متر بر دقیقه بر طبق (Afkari & Minaei., 2004; ASAE, 2008) آزمون شدند که اعدادی با نیرویی کمتر از ۱۵۰ نیوتون اعمال شده بر روی دانه، برای گندم‌های نرم و اعداد با نیرویی بیش از ۱۵۰ نیوتون اعمال شده بر روی دانه، برای گندم‌های سخت در نظر گرفته می‌شوند.

آغازگرهای اختصاصی واکنش زنجیره‌ای پلیمرز از آغازگرهای توصیف شده توسط Huang & Brule- Babel (2011) برای تکثیر و شناسایی مهم‌ترین آل‌های موثر در سختی دانه از جمله آل‌های

جدول ۲ - مشخصات و برنامه چرخه دمایی آغازگرهای اختصاصی

توالی آغازگر (۵' - ۳')	چرخه دمایی واکنش زنجیره‌ای پلیمرز	آل	اندازه محصول
ACTGGACGAAAAAGCAGTGG GATCACGCTGAAATCCGAAG GTTTGTGCGCGAGGTAGAAG	چرخه ۱ (94) C 5min چرخه ۳۵ (94) C 30s - 72 °C 30s - 60 چرخه ۱ (72) C 10min	<i>Pina-D1b</i> <i>Pina-D1a</i>	1033-bp 744-bp
TCCTCCTAGCTCTCCTTGCTC AGCCACTAGGGAAGTTCGAG ATATGCTCACAGCCGCT	چرخه ۹۵ (95) C 30s - 72 °C 40s - 6015 چرخه ۹۵ (95) C 30s - 72 °C 40s - 455 چرخه ۹۵ (95) C 30s - 72 °C 40s - 5315	<i>Pinb-D1b</i> <i>Pinb-D1a</i>	226-bp 423-bp
TCCTCCTAGCTCTCCTTGCTC AGCCACTAGGGAAGTTCGAG CAGTGCTATCTGGCTCG	چرخه ۹۵ (95) C 30s - 72 °C 40s - 6115 چرخه ۹۵ (95) C 30s - 72 °C 40s - 485 چرخه ۹۵ (95) C 30s - 72 °C 40s - 5315	<i>Pinb-D1c</i> <i>Pinb-D1a</i>	269-bp 423-bp
TCCTCCTAGCTCTCCTTGCTC AGCCACTAGGGAAGTTCGAG ATAGGCCACAAAAATGGA	چرخه ۹۵ (95) C 30s - 72 °C 40s - 6015 چرخه ۹۵ (95) C 30s - 72 °C 40s - 455 چرخه ۹۵ (95) C 30s - 72 °C 40s - 5315	<i>Pinb-D1d</i> <i>Pinb-D1a</i>	237-bp 423-bp

بکار رفت و همچنین این آغازگرها طوری طراحی شدند که عدم حضور سه آل *Pinb-D1c*، *Pinb-D1b* و *Pinb-D1d* در ارقام مورد مطالعه مبنی بر حضور آل طبیعی (*Pinb-D1a*) در مکان ژنی *Pinb* می‌باشد که در شکل ۱ نشان می‌دهد.

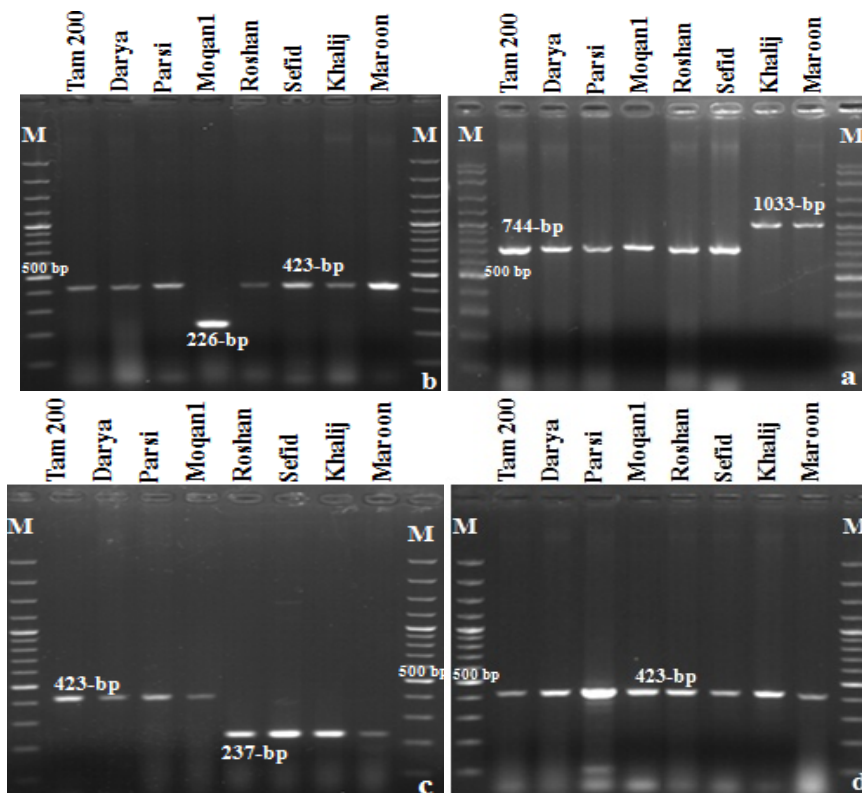
در میان ۵۰ رقم مورد مطالعه فقط ۳۴ رقم از نظر فنوتیپ سختی را نشان دادند (جدول ۳)، ۱۶ رقم باقیمانده هیچ یک از آل‌های *Pina-D1b*، *Pinb-D1b*، *Pinb-D1c* و *Pinb-D1d* را نشان ندادند و دارای آل طبیعی (*Pina-D1a/Pinb-D1a*) بوده و فنوتیپ نرم را نشان می‌دهند. همچنین مطالعات نشان داد که از میان این ۳۴ رقم تجاری که دارای فنوتیپ سختی می‌باشند

نتایج و بحث

در این تحقیق به منظور تعیین تنوع آل‌های ارقام مورد مطالعه از آغازگرهای معرفی شده توسط Huang & Brule-Babel (2011) برای ژن *Pina* و *Pinb* استفاده شد که نتایج بدست آمده از ارزیابی آلی سختی بافت دانه در ۵۰ رقم تجاری گندم نان در جدول ۳ آمده است. آغازگر *Pina* حضور آل جهش یافته از نوع حذفی (*Pina-D1b*) و عدم حضور این آل جهش یافته و حضور آل طبیعی (*Pina-D1a*) را مشخص می‌کند و در مجموع ۳ آغازگر اختصاصی SNP تنها با یک نوکلئوتید تفاوت در انتهای ۳' آغازگر برای شناسایی سه آل جهش یافته از نوع *Pinb-D1c*، *Pinb-D1b* و *Pinb-D1d*

که دو رقم خلیج و مارون علاوه بر آلل *Pinb-D1d* دارای آلل *Pina-D1b* هم می‌باشند.

۱۴ رقم دارای آلل *Pina-D1b* (A+) از نظر ژن *Pina* بوده، ۱۶ رقم دارای آلل *Pinb-D1b* (B+) بوده و ۴ رقم از میان این ارقام آلل *Pinb-D1d* (D+) را نشان می‌دهند



شکل ۱- الکتروفورز محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، شکل a، b، c و d: بترتیب الکتروفورز محصولات PCR با آغازگرهای اختصاصی *Pina-D1a* و *Pina-D1b*، *Pinb-D1b*، *Pinb-D1d* و *Pinb-D1c* برای هشت رقم مشترک گندم. M: سایز مارکر (100 bp)

جدول ۳- تنوع آلی در ارقام مورد مطالعه به همراه سنجش ارزش سختی بذر به دو روش آزمون کشش و فشار و NIR

رقم Genotype	Pina	Pinb	شاخص سختی NIR%	میانگین ارزش سختی با Compression test (N)	فنوتیپ Phenotype
Roshan	A-	B- C- D+	۵۱	۱۵۰/۱۶	سخت
Sefid	A-	B- C- D+	۴۶	۱۵۲/۱۶	سخت
Khalij	A+	B- C- D+	۴۷	۱۴۹/۳۶	سخت
Maroon	A+	B- C- D+	۵۲	۱۵۵/۲۵	سخت
Darab2	A+	B- C- D-	۵۴	۱۵۹/۶۶	سخت
Golestan	A+	B- C- D-	۵۰	۱۱۰/۴۴	سخت
Atrak	A+	B- C- D-	۵۴	۱۸۱/۸۹	سخت
Chenab	A+	B- C- D-	۵۲	۱۹۶/۹۷	سخت
Kaveh	A+	B- C- D-	۵۱	۱۵۵/۴۳	سخت
Khazar1	A+	B- C- D-	۵۴	۱۳۸/۹۵	سخت
Moqan2	A+	B- C- D-	۵۱	۲۰۴/۳۳	سخت
Pishgam	A+	B- C- D-	۵۴	۱۹۰/۲۵	سخت
Vee/nac	A+	B- C- D-	۵۵	۲۱۸/۸۶	سخت
Zagross	A+	B- C- D-	۵۲	۲۰۰/۱۷	سخت
Barekat	A+	B- C- D-	۵۱	۱۴۰/۱۴	سخت
Ac-Vista	A+	B- C- D-	۵۴	۱۸۹/۲۹	سخت
Celtic	A+	B- C- D-	۵۲	۱۹۶/۵۶	سخت
Glenlea	A+	B- C- D-	۵۱	۲۰۱/۳۷	سخت

ادامه جدول ۳- تنوع آلی در ارقام مورد مطالعه به همراه سنجش ارزش سختی بذر به دو روش آزمون کشش و فشار و NIR

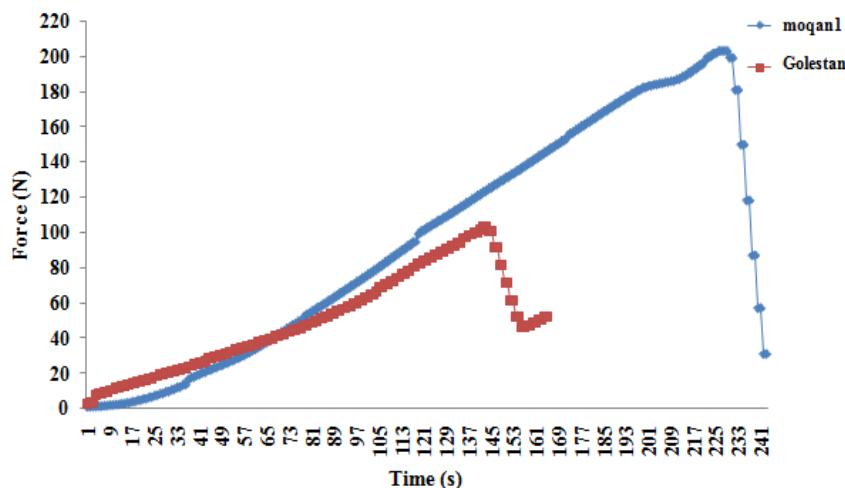
Neepawa	A-	B+ C- D-	۵۴	۱۹۶/۹۸	سخت
Ac-Foremost	A-	B+ C- D-	۵۴	۱۸۷/۶۳	سخت
Ac-Taber	A-	B+ C- D-	۵۲	۱۹۰/۲۹	سخت
Moqan1	A-	B+ C- D-	۵۴	۱۹۳/۳۸	سخت
Hope	A-	B+ C- D-	۵۴	۱۷۵/۱۴	سخت
Marquis	A-	B+ C- D-	۵۵	۱۸۸/۱۶	سخت
Anza	A-	B+ C- D-	۵۲	۱۶۰/۲۹	سخت
Selkirk	A-	B+ C- D-	۵۶	۱۹۵/۲۰	سخت
Katepwa	A-	B+ C- D-	۵۲	۱۵۰/۱۴	سخت
Ac-Cadillac	A-	B+ C- D-	۵۴	۱۸۶/۱۸	سخت
Laura	A-	B+ C- D-	۵۲	۱۵۹/۹۵	سخت
Pasqua	A-	B+ C- D-	۵۵	۱۷۸/۲۳	سخت
Ac-Eatonia	A-	B+ C- D-	۵۴	۱۸۱/۱۹	سخت
CDC-Bounty	A-	B+ C- D-	۵۱	۱۴۹/۱۲	سخت
Harvest	A-	B+ C- D-	۵۲	۱۶۸/۴۲	سخت
Ac-Abbey	A-	B+ C- D-	۵۴	۱۷۶/۵۸	سخت
Adl	A-	B- C- D-	۴۹	۱۱۷/۱۱	نرم
Azadi	A-	B- C- D-	۵۰	۱۲۵/۶۶	نرم
Darya	A-	B- C- D-	۵۰	۱۲۷/۳۹	نرم
Karaj1	A-	B- C- D-	۴۵	۱۰۰/۱	نرم
Shahriar	A-	B- C- D-	۴۷	۱۳۴/۱	نرم
Shiraz	A-	B- C- D-	۴۸	۱۱۶/۳۷	نرم
Tam-200	A-	B- C- D-	۵۰	۱۲۹/۳۷	نرم
Rashid	A-	B- C- D-	۵۰	۱۲۷/۲۷	نرم
Azar	A-	B- C- D-	۴۸	۱۱۲/۹۵	نرم
Ghods	A-	B- C- D-	۵۱	۱۱۴/۲۶	نرم
Naz	A-	B- C- D-	۵۰	۱۲۹/۳۸	نرم
Bistoon	A-	B- C- D-	۵۰	۱۳۰/۲۱	نرم
Niknejad	A-	B- C- D-	۴۳	۱۱۹/۶۶	نرم
Omid	A-	B- C- D-	۴۹	۱۴۵/۴۴	نرم
Parsi	A-	B- C- D-	۵۲	۱۹۱/۵۹	نرم
Sabalan	A-	B- C- D-	۴۶	۱۱۹/۱۲	نرم

A+ و A-: بترتیب حضور آلل Pina-D1a و Pina-D1b. B+ و B-: بترتیب حضور و عدم حضور آلل Pinb-D1b
C+ و C-: بترتیب حضور و عدم حضور آلل Pinb-D1c. D+ و D-: بترتیب حضور و عدم حضور آلل Pinb-D1d

جهان و در میان سایر آللهای تعیین کننده سختی به خود اختصاص می‌دهند، از این جهت در این تحقیق مورد بررسی قرار گرفتند این آللهای از نظر نوع جهش متفاوت بوده و آلل *Pina-D1b* دارای جهش حذفی می‌باشد و آلل *Pinb-D1b* دارای جهش جایگزینی اسید آمینه گلیسین (Gly-46) به سرین (Ser-46)، آلل *Pinb-D1c* دارای جهش جایگزینی اسید آمینه لوسین (Leu-60) به پرولین (Pro-60) و آلل *Pinb-D1d* جهش جایگزینی اسید آمینه تریپتوفان (Trp-44) به آرژنین (Arg-44) می‌باشند (Lillemo et al., 2006; Morris & Bhava, 2008; Huang & Brule-Babel, 2011). توجه به درصد سختی دانه بدست آمده توسط دستگاه اینفراماتیک (NIR) و میانگین سختی بدست آمده با

این ارقام به ترتیب در بر دارنده آلل سختی یا جهش در یکی از ژن‌ها می‌باشند و ژن دیگر دارنده سایر آللهای آن ژن یا آلل طبیعی می‌باشد که بافت دانه سخت را ناشی می‌شود (Giroux & Morris, 1998; Lillemo & Morris, 2000; Morris et al., 2001). توجه به جدول ۳، آلل *Pina-D1b* و *Pinb-D1b* بیشترین فراوانی را در میان آللهای پیورواپندولین ارقام سخت به خود اختصاص می‌دهد همچنین در میان ارقام ایرانی مورد مطالعه آلل *Pinb-D1c* یافت نشد که با نتایجی از مطالعات شهریاری و همکاران (Shahriari et al., 2008) بر روی ارقام ایرانی مطابقت دارد. از آنجایی که آللهای سختی *Pina-D1b*، *Pinb-D1b*، *Pinb-D1c* و *Pinb-D1d* بیشترین فراوانی و اهمیت را در سراسر

قرار داد شکل ۲ گراف حاصل از دستگاه کشش و فشار را برای دو رقم با سختی بالا و پایین نشان می‌دهد که تفاوت نیروی وارده به هر بذر برای شکست آن بذر کاملاً مشهود است و نشان می‌دهد که هرچه نیروی وارده بیشتر باشد یعنی بذر ما سخت‌تر است و انرژی بیشتری برای شکست نیاز دارد و بالعکس.



شکل ۲- منحنی نیرو-زمان دانه گندم رقم مغان ۱ و گلستان که نیروی وارده به دو رقم تا مرحله شکست کاملاً مشهود است.

Wanjugi et al. (2007) از نظر نوع اقلیم مربوط به ارقام سخت هم‌خوانی دارد. اکثر ارقام تجاری حامل آلل *Pina-D1b* ارقام وارداتی و مربوط به پروژه‌های اصلاحی سیمیت (CIMMYT) می‌باشند و گزارشات بدست آمده حاکی از آن است که خزانه ژنی سیمیت بخشنده آلل *Pina-D1b* به برنامه اصلاحی اکثر دنیاست (Lillemo et al., 2006). ارقام تجاری حامل آلل *Pinb-D1b* نیز از ارقام وارداتی هستند که بیشتر از بخش‌هایی از آمریکا و کانادا به خزانه ژنی کشور وارد شدند. نتایج مطالعات مشابه در این زمینه نشان داد که ارقام تجاری حامل آلل *Pinb-D1b* در میان ارقام روسیه، اوکراین، چین، آمریکا و کانادا غالبیت دارد (Lillemo et al., 2006; senMatus-). با توجه به این موضوع استفاده از ارقام این نواحی را برای غنی کردن ژرم‌پلاسم ایرانی که از نظر این آلل فقیر می‌باشند می‌توان در برنامه‌های به‌نژادی به منظور اصلاح و افزایش کیفیت در الویت کاری به‌نژادگران قرار داد. در این تحقیق از نتایج حاصل از تعیین ترکیبات آلی سختی

دستگاه کشش و فشار (CT) مشخص شد که این نتایج در همه ارقامی که از نظر ژنوتیپی سختی را نشان دادند مطابقت دارد. در مورد ارقام که ژنوتیپ و فنوتیپ آن‌ها قابل تشخیص نمی‌باشد می‌توان آزمون مکانیکی نوری و آزمون مکانیکی را در شرایطی که دستیابی به اطلاعات مولکولی مشکل باشد مبنایی بر تعیین نوع سختی ارقام

در این تحقیق به منظور بررسی ارتباط بین دو آزمون CT و NIR بین نتایج حاصل از این دو آزمون همبستگی پیرسون با استفاده از نرم افزار SAS ver 0.9 انجام شد و همبستگی بین نتایج بدست آمده از دو آزمون مکانیکی و مکانیکی نوری ۰/۷۴ بود که در سطح ۰/۰۱ معنی‌دار گردید و این نتایج حاکی از آن است که نتایج حاصل از این دو روش هم‌پوشانی خوبی را با هم نشان می‌دهد. همچنین بین نتایج حاصل از آزمون مکانیکی با نتایج مولکولی و نتایج حاصل از آزمون مکانیکی نوری با نتایج مولکولی ضریب همبستگی محاسبه گردید که بترتیب ۰/۷۹ و ۰/۸۷ بودند که در سطح ۰/۰۱ معنی‌دار گردیدند و نشان دادند که نتایج مولکولی حاصل با نتایج هر دو آزمون مکانیکی در تطابق می‌باشد. نتایج بدست آمده حاکی از آن است که عمده ارقامی که فنوتیپ سختی را نشان می‌دهند مربوط به دو اقلیم گرم و مرطوب شمال (Zone I) و اقلیم گرم و خشک جنوب (Zone II) می‌باشند. نتایج حاصل از این تحقیق با نتایج حاصل از آزمایشات Xia et al. (2005) و

دانه در ارقام تجاری گندم نان می‌توان به منظور بهبود کیفیت در برنامه‌های اصلاحی گندم همراه سایر خصوصیات اقدام نمود.

REFERENCE

1. Afkari Sayyah, A. H. & Minaei, S. (2004). Behavior of wheat kernels under quasi-static loading and its relation to grain hardness. *Journal of Agriculture Science Technology*, 6, 11-19. (In Farsi).
2. Bhawe, M. & Morris, C. F. (2008). Molecular genetics of puroindolines and related genes: allelic diversity in wheat and other grasses. *Plant Molecular Biology*, 66, 205-219.
3. Bihan, T. L., Blochet, J. E., Desormeaux, A., Marion, D. & Pezolet, M. (1996). Determination of the secondary structure and conformation of puroindolines by infrared and Raman spectroscopy. *Biochemistry*, 35, 12712-12722.
4. Chen, F., Yu, Y. X., Xia, X. C. & He, Z. H. (2007). Prevalence of a novel puroindoline b allele in Yunnan endemic wheats (*Triticum aestivum* ssp *yunnanense* King). *Euphytica*, 156, 39-46.
5. Chen, F., Zhang, F. Y., Xia, X. C., Dong, Z. D. & Cui, D. Q. (2012). Distribution of puroindoline alleles in bread wheat cultivars of the Yellow and Huai valley of China and discovery of a novel puroindoline a allele without PINA protein. *Molecular Breeding*, 29, 371-378.
6. Compression Test of Food Materials of Convex Shape, Reviewed by the ASAE Physical Properties of Agricultural Products Committee, ASAE, S368.4 DEC2000 (R2008).
7. Curtis, B. C. (2002). *Wheat in the World*. Published online at: [Http://www.fao.org/docrep/006/y4011e/y4011e04.htm\(1\)](http://www.fao.org/docrep/006/y4011e/y4011e04.htm(1))
8. Faměra, O., Hrušková, M. & Novotná, D. (2004). Evaluation of methods for wheat grain hardness determination. *Plant Soil and Environment*, 50, 489-493.
9. Gautier, M. F., Aleman, M. E., Guirao, A., Marion, D. & Joudrier, P. (1994). Triticum aestivum puroindolines, two basic cysteine-rich seed proteins: cDNA sequence analysis and developmental gene expression. *Plant Molecular Biology*, 25, 43-57.
10. Gazza, L., Nocente, F., Ng, P. K. W. & Pogna, N. E. (2005). Genetic and biochemical analysis of common wheat cultivars lacking puroindoline a. *Theoretical and Applied Genetics*, 110, 470-478.
11. Geng, H., Beecher, B. S., He, Z., Kiszonas, A. M. & Morris, C. F. (2012). Prevalence of Puroindoline D1 and Puroindoline b-2 variants in U.S. Pacific Northwest wheat breeding germplasm pools, and their association with kernel texture. *Theoretical and Applied Genetics*, 124, 1259-1269.
12. Giroux, M. J. & Morris, C.F. (1997). A glycine to serine change in puroindoline b is associated with wheat grain hardness and low levels of starch-surface friabilin. *Theoretical and Applied Genetics*, 95, 857-864.
13. Hayden, M. J., Tabone, T. & Mather, D. E. (2009). Development and assessment of simple PCR markers for SNP genotyping in barley. *Theoretical and Applied Genetics*, 119, 939-951.
14. Hrušková, M. & Švec, I. (2009). Wheat hardness in relation to other quality factors. *Czech Journal of Food Science*, 27, 240-248.
15. Huang, X. Q. & Brule-Babel, A. (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*, xxx, 1-8.
16. Li, G. Y., He, Z. H., Lillemo, M., Sun, Q. X. & Xia, X. C. (2008). Molecular characterization of allelic variations at Pina and Pinb loci in Shandong wheat landraces, historical and current cultivars. *Journal of Cereal Science*, 47, 510-517.
17. Lillemo, M. & Morris, C. F. (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.
18. Lillemo, M., Chen, F., Xia, X., William, M., Pena, R. J., Trethowan, R. & He, Z. (2006). Puroindoline grain hardness alleles in CIMMYT bread wheat germplasm. *Journal of Cereal Science*, 44, 86-92.
19. Morris, C. F. & Bhawe, M. (2008). Reconciliation of D-genome puroindoline allele designations with current DNA sequence data. *Journal of Cereal Science*, doi:10.1016/j.jcs.2007.09.012
20. Morris, C. F. & Rose, S. P. (1996). Wheat. Pages 3-54 in: *Cereal Grain Quality*. Henry, R. J. & Kettlewell, P. S. eds. Chapman and Hall: New York.
21. Murray, M. & Thompson, W. F. (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*, 8, 4321-4325.
22. Ohm, J. B., Chung, O. K. & Deyoe, C. W. (1998). Single -kernel characteristics of hard winter wheat in relation to milling and baking quality. *Cereal Chemistry*, 75, 156 - 161.

23. senMatus-Cadiz, M. A., Pozniak, C. J. & Hucl, P. J. (2008). Puroindoline allele diversity in Canadian and northern US hard spring wheat varieties differing in kernel hardness. *Canadian Journal of Plant Science*, 88, 873-883.
24. Shahriari, F., Malekzadeh, Kh. & Morris, C. F. (2008). Molecular characterization of puroindoline a and b allele in Iranian commercial and landrace wheat cultivar. In: proceeding ISB2008, May 4th-8th, Sfax-Tunisia, Session3, PC65S3.
25. Turnbull, K. M & Rahman, S. (2002). Endosperm texture in wheat. *Journal of Cereal Science*, 36, 327-337.
26. Wanjugi, H. W., Hogg, A. C., Martin, J. M. & Giroux, M. J. (2007). The role of puroindoline A and B individually and in combination on grain hardness and starch association. *Crop Science*, 47,67-76.
27. Xia, L., Chen, F., He, Z., Chen, X. & Morris, C. F. (2005). Occurrence of puroindoline alleles in Chinese winter wheats. *Cereal Chemistry*, 82, 38-43.