نشریه علوم گیاهان زراعی ایران
دوره ۴۵، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۳ (ص۳۰۵-۲۹۹)

بررسی مولکولی زیرواحدهای سنگین گلوتنین در *Tritcium boeoticum* و *Aegilops tauschii* ایران و کشورهای همسایه

تینا کیهانی[۱]، علی‌اکبر شاه‌نجات بوشهری[۲*] و محمدرضا نقوی[۲]
۱. کارشناس ارشد اصلاح نباتات، دانشکدهٔ علوم و مهندسی کشاورزی، دانشگاه تهران.
۲. استادان، دانشکدهٔ علوم و مهندسی کشاورزی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران
(تاریخ دریافت: ۹۲/۹/۲۷ - تاریخ تصویب:۹۳/۲/۱۴)

چکیده

تنوع زیرواحدهای گلوتنین سنگین (HMW-GS) در مکان‌های ژنی *Glu-1* در ۱۹ ژنوتیپ گندم دیپلوئید وحشی تریتیکوم بوئتیکوم و ۳۶ ژنوتیپ گندم دیپلوئید وحشی آژیلوپس تائوشی موجود در بانک ژن دانشکدهٔ کشاورزی کرج دانشگاه تهران با استفاده از روش SDS-PAGE بررسی شد. کلیهٔ ژنوتیپ‌ها دیپلوئید وحشی تریتیکوم بوئتیکوم بررسی‌شده در این تحقیق زیرواحد *۲ را در مکان ژنی *GluA1* خود نشان دادند. در بررسی ژنوتیپ‌های آژیلوپس تائوشی ایرانی و خارجی که از ۷ کشور مختلف آسیایی جمع‌آوری شده بودند تنوع آللی خوبی مشاهده شد، به‌طوری‌که ۶ آلل در مکان ژنی *GluD-1* ژنوتیپ‌های آژیلوپس تائوشی ایرانی و ۴ آلل در مکان ژنی *GluD-1* ژنوتیپ‌های آژیلوپس تائوشی خارجی ملاحظه شد. زیرواحدهای ۱۲+۱/۵ و $2+T_2$ از جمله زیرواحدهای کمیابی بودند که در ژنوتیپ‌های خارجی بررسی‌شده در این تحقیق گزارش شدند. با توجه به نقش مهم زیرواحدهای گلوتنین سنگین به‌عنوان نشانگر ژنتیکی کیفیت آرد و پخت نان، نتایج تحقیق حاضر، برآوردی ژنتیکی از کیفیت گندم وحشی موجود در ایران است.

واژه‌های کلیدی: **تنوع ژنتیکی، کیفیت پخت نان،گلوتنین با وزن مولکولی زیاد، SDS-PAGE.**

مقدمه

تنوع ژنتیکی اساس موفقیت در بهبود خواص غذایی غلات است و می‌توان با روش‌های گوناگونی همچون بررسی مورفولوژیکی صفات و نشانگرهای مولکولی به‌سادگی آن را شناسایی کرد (Fufa *et al.*, 2005 ; Metakovsky,1991). گلوتنین‌ها گروه بزرگی از پروتئین‌های ذخیره در گندم‌اند که پلی‌مری متشکل از زیرواحدهای سنگین و سبک به‌شمار می‌روند. این گروه از پروتئین‌ها در فرایند پخت نان و پاستای حاصل از گندم اهمیت زیادی دارند(Shewry *et al.*, 1989).گلوتنین‌های با وزن مولکولی زیاد، مسئول خاصیت کشسانی و استحکام خمیرند (Afshan *et al.*, 2010; Kozub *et al.*, 2009). زیرواحدهای پروتئینی با وزن مولکولی زیاد، توسط مکان *GLU1* واقع بر بازوی بلند کروموزوم‌های گروه ۱ کد می‌شوند که هر مکان شامل دو ژن نزدیک به هم و کدکننده برای زیرواحد X و زیرواحد نوعY است. به‌دلیل احتمال تظاهر نیافتن دو زیرواحد X و Y در مکان ژنی *GLUA1* و زیرواحد Y در مکان ژنی *GLuB1*، تنها سه آلل از پنج آلل HMW-GS در گندم‌های هگزاپلوئید با کمک روش SDS-PAGE قابل شناسایی و بررسی است (Shewry *et al.*, 2002 ; Lawrence *et al.*, 1981).

زیرواحدهای گلوتنین با وزن مولکولی زیاد در مکان ژنی*Glu-D1* اصلی‌ترین عامل در کیفیت پخت نان به‌شمار می‌روند. در حدود ۳۰ آلل برای مکان ژنی ۱ *Glu-D*در گندم نان و دیگر گونه‌های گندم شناسایی شده است (McIntosh *et al.*, 2008). به‌دلیل نقش مهم این ژنوم در کیفیت گندم تا کنون مطالعات گسترده‌ای دربارهٔ خویشاوندان وحشی گندم از جمله تریتیکوم تورجیدوم، تریتیکوم منوکوکوم (Li *et al*., 2008 ; An *et*

تلفن: ۰۹۱۲۳۶۴۰۰۳
E-mail: ashah@ut.ac.ir

(Jiang *et al.*, 2006)، تریتیکوم دیکوکوتیدس (Lu *et al.*, 2005; 2008) و آژیلوپس تائوشی).

به‌منظور (Naghavi *et al.*, 2013 ; Xu *et al.*, 2010) استفاده از ژنوم‌های مشابه این گونه‌های وحشی با گندم انجام گرفته است تا برای بهبود و تقویت ژن‌های واریته‌های زراعی گندم، به‌کار گرفته شوند.

گونهٔ *Aegilops tauschii* بدون شک به‌عنوان دهندهٔ ژنوم D در گندم پذیرفته شده است (Lee *et al.*, 1999). تلاقی گونهٔ *Ae. Tuaschii* (DD) با گندم تتراپلوئید *Triticum turgidum* (AABB) در حدود ۸۰۰ تا ۱۲۰۰ سال پیش در جنوب شرقی آسیا صورت گرفت و گندم هگزاپلوئید (AABBDD) را به‌وجود آورد (Dvorak *et al.*, 1998 ; Giles *et al.*, 2006). تحقیقات نشان می‌دهد که این پلی‌پلوئیدی شدن از هیبریداسیون طبیعی بیوتیپ‌های اجدادی که هیچ کدام به‌صورت تجاری کشت نمی‌شوند به‌وجود آمده است (Allaby *et al.*, 1999 ; Caldwell *et al.*, 2004 ; Gu *et al.*, 2004 ; Huang *et al.*, 2002 ; Lelley *et al.*, 2000). به‌علاوه آژیلوپس تائوشی دارای تنوع آللی وسیعی در پروتئین‌های ذخیره‌ای دانه است (Yan *et al.*, 2003(a,b); Lagudah *et al.*, 1989) که می‌تواند اطلاعات ارزشمندی دربارهٔ بسط و تکامل گندم‌های هگزاپلوئید فراهم کند، اما تنها تعداد کمی از آلل‌های مکان *Glu-D1* در آژیلوپس تائوشی شناسایی شده است (Wan *et al.*, 2005). این در حالی است که ژنوم D آژیلوپس تائوشی ارتباط نزدیکی با خصوصیات مربوط به پخت نان در گندم‌های معمولی دارد (Dong *et al.*, 1991). همچنین آلل *۲ از ژنوم A نیز تأثیرات مهمی بر خصوصیات نانوایی گندم نان دارد. ازآنجا که تریتیکوم بوئتیکوم به‌عنوان یک ذخیرهٔ باارزش از ژن‌های مطلوب از جمله کیفیت پروتئین و ژن‌های مقاومت گزارش شده است، مطالعه و کشف سطح بالایی از تنوع بین ارقام تریتیکوم بوئتیکوم و مقایسهٔ آنها با گونه‌های گندم وحشی دیگر ضروری است. گندم‌های وحشی همچون آژیلوپس تائوشی و تریتیکوم بوئتیکوم حاوی ژن‌هایی هستند که برای بهبود گندم زراعی می‌توانند ارزشمند باشند. ازاین‌رو آگاهی از وضعیت زیرواحدهای گلوتنین با وزن مولکولی زیاد در والدین و انتخاب والدین واجد زیرواحدهای مورد نظر برای برنامه‌های به‌نژادی گندم و نیز انتخاب نتاج در نسل‌های در حال تفکیک براساس زیرواحدهای یادشده، به‌عنوان مارکرهای بیوشیمیایی که از نظر کیفیت نانوایی مطلوب باشند، برای به‌دست آوردن نتاج با کیفیت نانوایی مطلوب کمک‌کننده خواهند بود. هدف از این تحقیق و تحقیقات مشابه (Naghavi, 2013; Shahnejat *et al.*, 2006,2011) بیان تنوع آللی در پروتئین‌های ذخیره‌ای دانه در خویشاوندان وحشی گندم است.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

۱۹ ژنوتیپ گندم دیپلوئید وحشی تریتیکوم بوئتیکوم (*Tritcium boeoticum*) (جدول۲) و ۳۶ ژنوتیپ گندم دیپلوئید وحشی آژیلوپس تائوشی (*Aegilops tauschii*) از ایران و هفت کشور همسایهٔ ایران (جدول۱)، در این تحقیق بررسی شد. بذور از مؤسسهٔ تحقیقات نهال بذر و بانک ژن دانشکدهٔ کشاورزی کرج دانشگاه تهران به‌دست آمد. پروتئین کل شش تک‌دانه از هر نمونه برای بررسی استخراج شد. واریته‌های: ناز (۱۰+۵و۱۶+۱۳و۱)، بزوستایا-۱ (۱۰+۵و۹+۷و*۲)، چاینیز اسپرینگ (null, 7 + 8, 2 + 12)، مورات(۱۲+۲و۹+۷و*۲) ، گرب (۱۲+۲و۸+۷و*۲)، گابو (12 + 2, 18 + 17, *2) و کوک (۱۰+۵ و۸+۷و*۲) به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شدند (Payne *et al.*, 1983).

تفکیک پروتئین‌های الکتروفورز و روش‌های آماری

بذور بعد از جدا شدن جنین (شش تک‌بذر از هر نمونه) خرد شده و با ۶۲٫۵mM بافر استخراج شامل ۱۲ درصد گلیسرول، ۲ درصد سدیم دو دسیل سولفات، ۰/۰۳ درصد برموفنول بلو و ۵ درصد از ۲-مرکاپتو اتانول مخلوط شدند. سپس نمونه‌ها پنج دقیقه در دمای ۶۰ درجهٔ سانتی‌گراد در بن‌ماری قرار داده شدند و سپس ۵ دقیقه با ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. در نهایت ۱۵ میکرولیتر از هر یک از نمونه‌ها بر روی ژل SDS-PAGE براساس روش لاملی(Laemmli *et al.*, 1970) همراه با اندک تغییرات لود شدند. زیرواحدهای سنگین پروتئین (HMW-GS) براساس سیستم

شماره‌گذاری پین (Payne *et al.*, 1983) معین شد و تنوع ژنتیکی هر یک از مکان‌های ژنی بر پایهٔ فرمول نی (Nei 1973) $H = 1-\sum Pi^2$ محاسبه شد (جدول‌های ۳ و ۴)، که در این فرمول H عبارت است از تنوع ژنتیکی و Pi بیانگر فراوانی آلل خاص در مکان‌های ژنی است.

جدول۱ .اطلاعات مربوط به ۳۶ نمونهٔ گندم *Aegilops tauschii*

شمارهٔ نام نمونه در بانک ژن	محل جمع‌آوری نمونه
۱	ایران
۲	ایران
۳	ایران
۴	ایران
۵	ایران
۶	ایران
۷	آذربایجان
۱۰	ایران
۱۵	ترکیه
۱۷	تاجیکستان
۱۸	ایران
۱۹	تاجیکستان
۲۱	ایران
۲۳	ایران
۲۴	ایران
۲۵	ایران
۲۶	ایران
۲۷	ایران
۲۸	ایران
۳۲	ایران
۳۳	افغانستان
۳۴	تاجیکستان
۳۶	ترکیه
۳۷	ایران
۳۸	ترکیه
۳۹	ایران
۴۰	ایران
۴۲	ترکیه
۴۴	تاجیکستان
۴۵	ژاپن
۴۹	ارمنستان
۵۱	ایران
۵۴	آذربایجان
۵۹	تاجیکستان
۶۰	ترکمنستان
۶۶	افغانستان
۶۸	آذربایجان
۷۳	آذربایجان

جدول۲. اطلاعات مربوط به ۱۹ نمونهٔ گندم *Tritcium boeoticum*

منطقهٔ جمع آوری	تام نمونه در بانک ژن
کاغذ کنان	۲۶
جادهٔ اردبیل به خلخال	۲۷
هشت‌چین کرج	۲۸
فیروزآباد	۲۹
هشت‌چین کرج	۳۱
هشت‌چین کرج	۳۲
الشتر(لرستان)	۵۸
جادهٔ جوانرود-گوذران(کرمانشاه)	۵۹
روانسر(کرمانشاه)	۶۰
کردستان	۶۲
بین جوانرود و گوذران(کرمانشاه)	۶۳
نزدیک قشلاق کردستان	۶۴
کامیاران	۶۶
سقز	۶۷
مریوان	۶۸
نا مشخص	۶۹
جادهٔ فیروزآباد-خرم‌آباد	۷۰
نامشخص	۷۱
بین چغلونه و خرم‌آباد	۷۲

نتایج و بحث

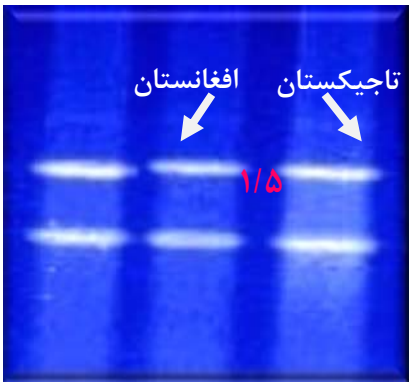
نمونه‌های *Aegilops tauschii* تنوع زیادی برای گلوتنین‌ها با وزن مولکولی زیاد نشان دادند، به‌طوری‌که ۸ ترکیب آللی در مکان ژنی *GLU-D^{t}1* مشاهده شد (جدول‌های ۳ و ۴).

در بررسی ژنوتیپ‌های آژیلوپس تائوشی ایرانی و خارجی که از ۷ کشور مختلف آسیایی جمع‌آوری شده بودند، مشاهده شد که ژنوتیپ‌های به‌دست‌آمده از ترکیه و ژاپن با داشتن زیرواحد ۱۰+۵ در مکان ژنی *GLu-D1* امتیاز بیشتری از نظر تأثیر در بهبود کیفیت خمیر نان داشتند. ژنوتیپ‌های به‌دست‌آمده از افغانستان و تاجیکستان زیرواحد جدید ۱۲+۱/۵ را در مکان ژنی*GLu-D1* نشان دادند که در هیچ یک از نمونه‌های ایرانی مشاهد نشده بود (شکل۱). همچنین یکی از

ژنوتیپ‌های آذربایجانی بررسی‌شده هم زیرواحد جدید T_2

جدول۳. نتیجهٔ الکتروفورز ژنوتیپ‌های *Aegilops tauschii* ارقام ایرانی

تنوع ژنتیکی	فراوانی نسبی	فراوانی	آلل	شمارهٔ آلل	مکان ژنی
۰/۵۱	۰/۷	۱۴	a(۲+۱۲)	۱	*GLU-D1*
	۰/۰۵	۱	d(۵+۱۰)	۲	
	۰/۰۵	۱	i(۱۰)	۳	
	۰/۱	۲	n(۲+۱۰)	۴	
	۰/۰۵	۱	m(۲+۱۱)	۵	
	۰/۰۵	۱	s(۱۱)	۶	



شکل۱. ژل مربوط به آژیلوپس تائوشی افغانستان و تاجیکستان با زیرواحد۱/۵

کلیهٔ واریانت‌های آللی در *Aegilops tauschii* خارجی بررسی‌شده، ترکیبی از یک جفت زیرواحد بودند و حالت نادر عدم بروز یکی از زیرواحدهای X و Y که در گندم‌های هگزاپلوئید دیده می‌شود، تنها در نمونه‌های ایرانی مشاهد شد.

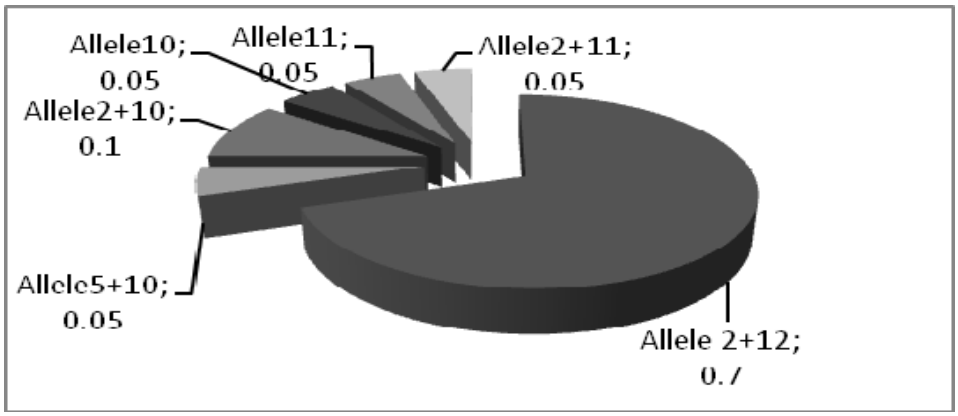
+۲ را در مکان ژنی *GLu-D1* نشان داد (شکل۲).

جدول۴. نتیجهٔ الکتروفورز ژنوتیپ‌های *Aegilops tauschii* ارقام خارجی

تنوع ژنتیکی	فراوانی نسبی	فراوانی	آلل	شمارهٔ آلل	مکان ژنی
۰/۵۳	۰/۶۶	۱۲	a(۲+۱۲)	۱	*GLU-D1*
	۰/۱۶	۲	d(۵+۱۰)	۲	
	۰/۱۱	۳	n (۱/۵+۱۲)	۳	
	۰/۰۵۵	۱	m (۲+T_2)	۴	

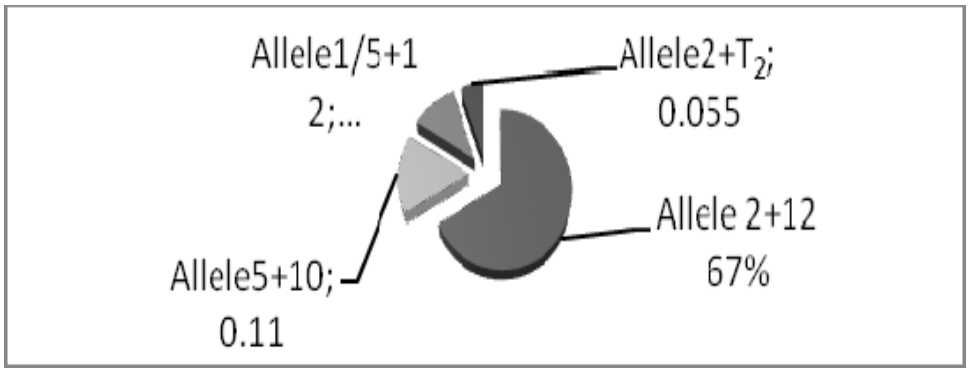
شکل۲. ژل مربوط به آژیلوپس تائوشی آذربایجان با زیرواحدT_2+۲

در مکان ژنی *GLU-D1* ژنوتیپ‌های ایرانی *Aegilops tauschii* زیرواحدهای ۲+۱۲ و ۲+۱۰ با فراوانی نسبی ۰/۷ و ۰/۱، بیشترین؛ و زیرواحدهای ۵+۱۰، ۲+۱۱، ۱۰ و ۱۱ با فراوانی نسبی ۰/۰۵، کمترین فراوانی را داشتند (شکل ۳).



شکل۳. فراوانی آللی *GLU-D1* در *Aegilops tauschii* ارقام ایرانی

در نمونه‌های خارجی بررسی‌شده، در برخی از ژنوتیپ‌ها، نواری با تحرک کمتر از 2X ظاهر شد که ۱/۵ نامگذاری شد. لاگواده و هالورن براساس مقاله‌ای برای *Aegilops tauschii* نوار منحصربه‌فردی به‌نام T_2 گزارش کرده‌اند که خارج از محدودهٔ HMW گلوتنین‌ها قرار می‌گیرد و تحرک آن از سریع‌ترین زیرواحد گندم یعنی نوار ۱۲ نیز بیشتر است (William *et al.*, 1993). مکان ژنی *GLU-D1* در ژنوتیپ‌های خارجی *Aegilops tauschii* دو ترکیب ۱۲+۱/۵ و T_2+ ۲ را به‌ترتیب با فراوانی نسبی ۰/۱۱ و ۰/۰۵۵ نشان داد، درحالی‌که زیرواحد ۱۲+۲ و ۱۰+۵ در این ارقام به‌ترتیب فراوانی نسبی ۰/۶۶ و ۰/۱۶ را نشان می‌دهند (شکل ۴). نتایج این پژوهش در مکان ژنی *GLU-D^{t}1* نشان داد که فراوانی آلل ۱۰+۵ که با ارزش‌ترین زیرواحد در بین HMW-GS است، در همهٔ ژنوتیپ‌ها کمتر دیده شده است.



شکل ۴. فراوانی آللی *GLU-D1* در *Aegilops tauschi*i ارقام خارجی

به‌طور کلی ۸ آلل مختلف در مکان ژنی *GLu-D^{t}1* در داخل و خارج از کشور شناسایی شد. دلیل مشاهدهٔ ترکیبات جدید در این بررسی آن است که با وجود طبیعت آللی زیرواحدها، بین دو مکان ژنی به‌هم‌پیوسته *GLu-D1* کراسینگ اورهای نادری به وقوع می‌پیوندد. به‌طور کلی تفاوت‌هایی که در نوع و تعداد واریانت‌های آللی مکان ژنی *GLu-D1* گندم هگزاپلوئید و *Aegilops tauschii* دیده می‌شود بدان علت است که تنوع ژنتیکی در آنها به‌طور موازی رخ نداده است (Lagudah *et al.*, 1989). این در حالی است که همهٔ نمونه‌های *T.boeoticum* که از رویشگاه طبیعی‌شان در غرب و شمال غرب ایران جمع‌آوری شدند به‌صورت ۱۰۰ درصد دارای زیرواحد ۲* برای مکان ژنی *GLU-A1^{bt}* بودند. به‌علاوه زیرواحدهای دیگری در ژل SDS-PAGE مربوط به نمونه‌های *T.boeoticum* مشاهده شد. حالت معمول در مکان ژنی *GLu-A1*^{bt} حضور یک زیرواحد گلوتنین است، اما برخلاف گندم‌های نان و دوروم، بیش از یک زیرواحد در ارقام دیپلوئید وحشی دارای ژنوم A مانند آنچه در این تحقیق مشهود است، تولید می‌شوند. فرایندهای ژنتیکی نظیر دیپلوئیدی شدن و جبرانی دز ژنی که در کاهش تعداد یا فعالیت ژن‌های مازاد دخالت می‌کنند ممکن است در فرایند تکامل گندم‌های پلی‌پلوئید هم توده‌های وحشی و هم ارقام زراعی شرکت کرده باشند. بنابر نظر برخی از محققان، فرایندهای دیپلوئیدی شدن ممکن است به‌طور غیرتصادفی ژن‌های گلوتنین با وزن مولکولی زیاد واقع بر ژنوم A را تحت تأثیر قرار داده باشند (Lee *et al.*, 1999a,b). به‌علاوه در گندم‌های دیپلوئید وحشی برخلاف ارقام هگزاپلوئید فرصت بیان زیرواحد Y مکان ژنی *GLu-A1* همانند زیرواحد X وجود دارد، که این خود می‌تواند دلیلی بر افزایش تعداد الگوهای باندی یافت‌شده در این تحقیق باشد. گلوتنین‌ها مانند دیگر پروتئین‌های دانهٔ گندم، عامل مهمی در فراوری غذاهایی همچون نان، بیسکویت، غلات صبحانه‌ای و محصولات پاستا به‌شمار می‌روند. یک راه بهبود کیفیت ارقام گندم برای پخت نان، بهره‌گیری از ژن‌هایی از توده‌های بومی کشاورزی اولیه و

خویشاوندان وحشی گندم نان است. دامنهٔ تنوع آللی در مکان ژنی *GLU-A1* و *GLU-D1* بررسی‌شدهٔ *T.boeoticum* و *Aegilops tauschii* در این تحقیق، گسترده است و توسط اصلاحگران می‌تواند به گندم نان انتقال داده شود. در گونه‌های بیگانه، احتمال دارد آلل‌های جدیدی یافت شود که ممکن است به بهبود کیفیت و دیگر صفات گندم‌های زراعی کمک کنند. با توجه به این نکته که آلل *۲ از ژنوم A دارای تأثیرات مهمی بر خصوصیات نانوایی گندم نان است، و با دانستن این نکته که همهٔ ارقام *T.boeoticum* بررسی‌شده در این تحقیق دارای این آلل بودند، می‌توان پیشنهاد کرد که با وارد کردن ژن‌هایی خاص از *T.boeoticum* به درون گندم‌های هگزاپلوئید می‌توان منبع ارزشمندی از ژن‌های جدید فراهم کرد که به‌منظور تغییر خصوصیات عمل‌آوری آرد گندم کاربرد خواهند داشت. همچنین غربالگری کلکسیون‌های وحشی گندم نان برای یافتن ارقام گندم نان براساس امتیاز زیرواحدهای آن و انتقال آنها به ژنوتیپ‌های معمولی گندم و دیگر افراد خانوادهٔ گندم از طریق روش‌های مهندسی ژنتیک یا با کمک تلاقی‌های مناسب زراعی با انتخاب ژنوتیپ‌هایی با تنوع مناسب و مفید، باید یکی از اهداف اصلی برنامه‌های به‌نژادی در زمینهٔ بهبود کیفیت پروتئین گندمیان باشد.

با توجه به ضایعات زیاد نان‌های مسطح در ایران، باید روش‌های پخت مکانیزه و یافتن راهکارهایی برای افزایش تولید را ضروری بدانیم. اصلاحگران ایرانی از این پس باید به ترکیبات جدیدی از HMW-GS به‌منظور بهبود کیفیت پخت در انتخاب والدین توجه کنند. اصلاح‌کنندگان سایر کشورها که به آگاهی در مورد ژرم پلاسم گندم‌های نان ایران تمایل دارند، نیز می‌توانند از اطلاعات این تحقیق استفاده کنند.

REFERENCES

1. Afshan, S. & Naqavi, F. N. (2010). Allelic variation in high molecular weight glutenin subunits in Pakistani bread wheat genotypes. *Cereal Research Communications*, 39, 109–119.
2. Allaby, R. G., Banerjee, M. & Brown, T. A. (1999). Evolution of the high molecular weight glutenin loci of the A, B, D and G genomes of wheat. *Genome*, 42, 296–307.
3. An, X., Zhang, Q., Yan, Y., Li, Q., zhang, Y., Wang, A., Pei, Y., Tian, J., Hsam, S. L. K., Zeller, F. J. (2006). Cloning and molecular characterization of three novel LMW-i glutenin subunit genes from cultivated einkorn (*Triticum monococcum* L.). *Theor. Apple. Genet*, 113, 383-395.
4. Caldwell, K. S., Dvorak, J., Lagudah, E. S., Akhunov, E., Luo, M. C. (2004). Sequence polymorphism in polyploidy wheat and their D-genome ancestor. Genetics, 167, 941–947.
5. Dong, H., Cox, TS., Sears, RC. & Lookhart, GL. (1991). High molecular weight glutenin genes: effect on quality in wheat. *Crop Science*, 31, 974–979.
6. Dvorak, J., Luo, M. C., Yang, Z. L. & Zhang, H. B. (1998). The structure of the *Aegilops tauschii* genepool and the evolution of hexaploid wheat. *Theor Appl Genet*, 97, 657–670.
7. Fufa, H., Baenziger, P. S., Beecher, I., Dweikat, V., Graybosch, R. A. & Eskridge, K. M. (2005). Comparison of phenotypic and molecular marker-based classifications of hard red winter wheat cultivars. *Euphytica*, 145,133–146.
8. Giles, R. J. & Brown, T. A. (2006). GluDy allele variations in Aegilops tauchii and Triticum aestivum: implications for the origins of hexaploid wheat. Theor. *Appl. Genet*, 112, 1563–1572.
9. Gu, Y. Q., Devin, C. D., Kong, X. Y., Anderson, O. D. (2004). Rapid genome evolution revealed by comparative sequence analysis of orthologous regions from four Triticeae genomes. *Plant Physiol*, 135, 459–470.
10. Huang, S., Sirikhachornkit, A., Su, X. J., Faris, J. & Gill, B. (2002). Genes encoding plastid acetyl-CoaA carboxylase and 3-phosphoglycerate kinase of the Triticum/Aegilops complex and evolutionary history of polyploid wheat. *Proc. Natl. Acad. Sci*, USA 99: 8133–8138.
11. Jiang, C., Pei, Y., Zhang, Y., Li, X., Yao, D., Yan, Y., Ma, W., Hsam, S. L. K. & Zeller, F. J. (2008). Molecular cloning and characterization of four navel LMW glutenin subunit genes from Aegilops longissima, Triticum Dicocoides and T. zhukovskyi. *Hersitas*, 145, 92-98.
12. Kozub, N. A., Sozinov, I. A., Sobko, T. A., Kolyuchii, V. T., Kuptsov, S. V. & Sozinov, A. A. (2009). Variation at storage protein loci in winter common wheat cultivars of the central forest-steppe of Ukraine. *Cytol. Genet*, 43, 55–62.
13. Laemmli, VK. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.

14. Lagudah, E. S. & Halloran, G. M. (1989). Phylogenetic relationship of Triticum tauschii D genome aonor to hexaploid wheat.3. variation in, and the genetics of seed esterase(EST-5). *Theor. Appl. Genet*, 77, 851-856.
15. Lawrence, G. J. & Shepherd, K. W. (1981). Chromosomal location of genes controlling seed protein in species related to wheat, *Theor. Appl. Genet*, 59, 25–31.
16. Lee, Y. K., Bekes, F., Gupta, R., Appels, R., morel, M. K. (1999a) The low-molecular-weight glutenin subunit proteins pf primitive wheats.I. Variation in A-genome species. Theor. *Appl. Genet*. 89, 119-125
17. Lee,Y.K., Ciaffi, M., Appels, R., Morell, M. K. (1999b). The low-molecular-weight glutenin subunit proteins of primitive wheats.II. The genes from A-genome species. Theor. *Appl. Genet*, 98, 126-134**.**
18. Lelley, T., Stachel, M., Grausgruber, H. & Vollmann, J. (2000). Analysis of relationships between Ae. tauschii and the D genome of wheat utilizing microsatellite. *Genome*, 43, 661–668
19. Li, X., Wang, A., Xiao, Y., Yan, Y., He, Z., Appels, R., Ma, W., Hsam, S. L. K. & Zeller, F. J. (2008). Cloning and chractrization of a novel low molecular weight glutenin subunit gene at the Glu-A3 locus from wild emmer wheat. *Euphytica*, 159, 181-190.
20. Lu, CM., Yang, W.Y., Zhang, W. J. & Lu, B. R. (2005). Identification of SNPs and development of allelic specific PCR markers for high molecular weight glutenin subunit $D^tX1.5$ from Aegilops tauschii through sequence characterization. *J. Cereal Sci*, 41, 13-18.
21. McIntosh, R. A., Yamazaki, Y., Dubcovsky, J., Rogers, J., Morris, C., Somers, D. J., Appels, R. & Devos, K. M. (2008). *Catalogue of Gene Symbols for Wheat*. MacGene. From http://www.shigen.nig.ac.jp/wheat/komugi/genes/download. jsp (accessed26.01.2010).
22. Metakovsky, EV. (1991), Gliadin allele identification in common wheat. II. Catalogue of gliadin alleles in common wheat. *Journal of Genetics and Breeding*, 45, 325–344.
23. Naghavi, M. (2013). Characterization of low-molecular-weight-glutenin subunit genes from the D-geniome of Triticum aestivum. Aegilops crassa, *Ae. cylindrical and Ae. tauschii*, *Biochemical Systematics and Ecology*, 50 (2013) 23-29.
24. Nei, M. (1973). Analysis of gene diversity in subdivided population. *Proceedings of the National Academy of Sciences* of the USA 70, 3321–3323. doi, 10.1073/pnas.70.12.3321
25. Payne, PI. & Lawrence, GJ. (1983). Catalogue of alleles for the complex gene loci, Glu-A1, Glu-B1 and Glu-D1 which code for high molecular weight subunits of glutenin in hexaploid wheat. *Cereal Research Communications*, 11, 29–35.
26. Shahnejat Bushehri, A. A, Gomarian, M. & Yazdi-Samadi, B. (2006). The high molecular weight glutenin subunit composition in old and modern bread wheats cultivated in Iran. *Aust. J. Agricult. Res*, 57, 1109–1114.
27. Shahnejat Bushehri, A. A., Salavati, A., Yazdi Samadi, B., Hassani, M. E. & Shahnejat Bushehri, S. (2011). Analysis of monomeric storage proteins “Gliadins” in Iranian bread wheats. *Cereal Research Communications*, 39, 100–108
28. Shewry, P. R., Halford, N.G. & Tatham, A. S. (1989). The high-molecular-weight subunits of wheat, barley and rye: genetics, molecular biology, chemistry and role in wheat gluten structure and functionality. Oxford *Surveys Plant Mol. Cell Biol*, 6,163–219.
29. Shewry, P. R & Halford, N. G. (2002). Cereal seed storage proteins: structures, properties and role in grain utilization. *J. Exp. Bot*, 53, 947–958.
30. Wan, Y., Yan, Z., Liu, K., Zheng,Y. & D’Ovidio, R. (2005). Comparative analysis of Dgenome-encoded high-molecular weight subunits of glutenin. *Theor. Appl. Genet*, 111, 1183–1190.
31. William, M. D. H., PENA, R. J. & Mujeeb- Kazi, A. (1993). Seed storage protein and isozymw variations in *Triticum tauschii* (*aegilops squarrosa*). *Theor. Appl. Genet*, 87,257-263.
32. Yan, Y., Hsam, S. L. K., Yu, J. Z., Jiang, Y. & Zeller, F. J. (2003a). Allelic variation of the HMW glutenin subunits in *Aegilops tauschii* accessions detected by sodium dodecyl sulphate (SDS-PAGE), acid polyacrylamide gel (A-PAGE) and capillary electrophoresis. *Euphytica*, 130, 377–385.
33. Xu, S. S., Khan, K., Klindworth, D. L. & Nygard, G. (2010). Evaluation and characterization of high-molecular weight 1D glutenin subunits from *Aegilops tauschii* in synthetic hexaploid wheats. *Cereal Sci*, 52, 333-336.
34. Yan, Y., Hsam, S. L. K., Yu, J. Z., Jiang, Y. & Ohtsuka, I. (2003b). HMW and LMW glutenin alleles among putative tetraploid and hexaploid *T. spelta* progenitors. *Theor. Appl. Genet*, 107, 1321–1330.