

دستورالعمل ملی
آزمون‌های
تمایز، یکنواختی و پایداری
در

گندم نان

کمیته فنی ثبت ارقام گیاهی

دکتر سید یعقوب صادقیان مطهر

دکتر جواد مظفری

دکتر محمد رضا جلال کمالی

دکتر یحیی دهقانی شورکی

دکتر محمدرضا احمدی

دکتر داراب حسنی

مهندس سکینه شفاءالدین

مهندس کاوه خاکسار

کارگروه تخصصی گندم نان

مهندس محمدرضا جزایری

دکتر گودرز نجفیان

دکتر محسن اسماعیل زاده مقدم

ویراستار

مهندس صمد مبصر

طرح روی جلد

مهندس اسماعیل نصرالهی

فهرست مطالب

صفحه	عنوان
۱	پیش گفتار
۴	موضوع دستورالعمل
۴	مواد گیاهی مورد نیاز
۵	اجرای آزمون
۶	روش ها و مشاهدات
۷	گروه بندی ارقام
۸	معرفی جدول صفات
۹	جدول صفات
۱۹	روش اندازه گیری و یادداشت برداری صفات
۳۰	جدول کدهای دهنده زادکس برای مراحل رشد غلات
۳۶	پرسشنامه فنی ثبت ارقام گندم
۴۰	پیوست

بسمه تعالی

پیش گفتار

به نژادی گیاهی با کشف یا ایجاد تغییرات ژنتیکی جدید در گونه های گیاهی شروع می شود. از میان تغییرات ژنتیکی حاصل، گزینش گیاهان با عملکرد بالا، مقاومت به تنش های زنده و غیرزنده، رنگ مطلوب در گیاهان زینتی و یکنواختی در فرم و شکل درختان میوه و گیاهان زینتی در اولویت پژوهش های به نژادی قرار دارند. به نژادگر ممکن است فنون مختلف و یا فرم های گوناگون فن آوری را در ایجاد تغییرات ژنتیکی مورد استفاده قرار دهد. بهر حال ایجاد تغییرات مورد نظر به نژادگر در توده های گیاهی و گزینش گیاهان مطلوب مهمترین و اولین مرحله گزینش ژنوتیپ های برتر می باشد. روش های گزینش نیز بر اساس ساختار فیزیولوژی، مورفولوژی و روش تولید مثل گونه ها تغییر می کند. صفات، حالات، رفتارهای فیزیولوژیکی، عملکرد محصول و کیفیت گیاهان تحت تاثیر عوامل محیطی، ژنتیکی و یا اثرات متقابل ژنوتیپ در محیط می باشد.

به نژادی یک فرایند بسیار طولانی است و مواد گیاهی در نسل های مختلف در شرایط مختلف مزرعه، آزمایشگاه و گلخانه مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفته و فنون مختلف برای تشخیص ژنوتیپ های برتر در آزمایشگاه و مزرعه به کار گرفته می شود. بنابراین نه تنها دانش و فنون پیشرفته بلکه هزینه های زیادی برای تهیه یک رقم اصلاح شده در سال های متمادی صرف می شود. در نتیجه حمایت مادی و معنوی از ارقام اصلاح شده، توسط دولت ها امری ضروری و اجتناب ناپذیر است.

همان طور که بیان شد تهیه ارقام برتر زراعی، باغی (مثمر و غیرمثمر) با پتانسیل عملکرد بالا و کیفیت بهتر و مقاوم به تنش های محیطی و غیرمحیطی از اهداف به نژادی است. جمعیت جهان در حال افزایش بوده و زمین های زراعی و سایر منابع محیطی روز به روز محدودتر می شوند. بنابراین تهیه ارقام اصلاح شده پرمحصول و مقاوم به بیماریها و تنش های محیطی اثرات مثبت اقتصادی و زیست محیطی دارد. شکی نیست که در قرن بیست و یکم، ارقام جدید زراعی و باغی که دارای ارزش های اقتصادی و بازاریابی ممتازی هستند در بازارهای جهانی عرضه خواهند شد.

از این رو براساس ماده (۳) قانون ثبت ارقام گیاهی، کنترل و گواهی بذر و نهال مصوب ۱۳۸۲/۴/۲۹ مجلس شورای اسلامی و ماده (۷) آئین نامه اجرای معرفی و ثبت ارقام گیاهی در اسفند ماه ۱۳۸۵ موسسه اقدام به تشکیل کمیته فنی ثبت ارقام گیاهی نمود.

تهیه و تدوین دستورالعمل های تمایز، یکنواختی و پایداری ارقام جدید از جمله وظایفی بود که برعهده کمیته فنی ثبت ارقام گیاهی گذاشته شد. این کمیته نیز کارگروه تخصصی را برای تهیه پیش نویس دستورالعمل هر محصول تعیین نمود. لذا تدوین پیش نویس دستورالعمل ها براساس دستورالعمل اتحادیه بین المللی حمایت از ارقام گیاهی (UPOV) و با در نظر گرفتن صفات مهم مورفولوژی، فیزیولوژی و زراعی و مقاومت به تنش های زنده و غیرزنده که در تمایز ارقام گیاهی در شرایط آب و هوایی کشور ایران نقش موثری دارند، انجام گرفت.

پیش نویس هر دستور العمل پس از بحث و تبادل نظر در کمیته فنی تصحیح و به تصویب رسید.

یکنواختی نوشتارها و رفع غلط های موجود در متن توسط آقای مهندس صمد مبصر و تنظیم نهایی دستورالعمل توسط آقای مهندس سید حسین جمالی انجام گرفت و از طریق اداره روابط عمومی و امور بین الملل موسسه به چاپ رسید.

برخود لازم می دانم که از همه اعضای کمیته فنی ثبت که در تدوین و اعضای کارگروه که در تهیه پیش نویس دستورالعمل های آزمون تمایز، یکنواختی و پایداری ارقام مختلف زراعی و باغی زحمات زیادی را متقبل شدند، همچنین از سایر عزیزان که در انتشار این مجموعه مشارکت داشتند، تشکر و قدردانی نمایم. از خداوند متعال می خواهم که در آینده نزدیک شاهد رویکرد جدیدی در توسعه اقتصاد کشاورزی کشور از طریق ثبت ارقام جدید گیاهی پرمحصول و حمایت از حقوق به نژادگر باشیم.

مجید دهقان شعار

رئیس موسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال

۱- موضوع دستورالعمل

این دستورالعمل به منظور ثبت ارقام گندم نان (*Triticum aestivum* L. emend. Fiori et Paol) مورد استفاده قرار می گیرد.

۲- مواد گیاهی مورد نیاز

۱-۲- موسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال در مورد زمان و مکان تحویل، مقدار کمی و کیفی مواد گیاهی ارقام درخواست شده برای ثبت، تصمیم گیری می نماید. متقاضیانی که مواد گیاهی مورد ثبت را از خارج کشور وارد می کنند باید مدارک لازم نشان دهنده ورود قانونی و سلامت آن را ارائه نمایند. متقاضی باید حداقل مقدار ۳ کیلوگرم بذر تحویل نماید. بذر باید حداقل استانداردهای بذر گواهی شده^۱ از نظر قوه نامیه، خلوص فیزیکی و میزان رطوبت را دارا باشد. در مواردی که ضرورت دارد بذر تا زمان کشت در انبار نگهداری شود، بهتر است میزان جوانه زنی بذر در زمان تحویل در بالاترین حد ممکن باشد.

۲-۲- در صورت تقاضای موسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال متقاضی باید حداقل ۱۵۰ سنبله از ارقام زمستانه و ۱۰۰ سنبله از ارقام بهاره را تحویل نماید. سنبله ها باید کاملاً رسیده بوده و به هیچ آفت یا بیماری آلوده نباشند و دارای مقدار بذر زنده کافی برای کشت حداقل یک ردیف مشاهده ای باشند.

۱. دستورالعمل کنترل و گواهی بذر گندم- موسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال-۱۳۸۵

۳-۲- مواد گیاهی نباید با هیچ ماده‌ای که روی بروز صفات رقم موثراند تیمار شده باشد، مگر اینکه موسسه اجازه و یا درخواست اعمال چنین تیماری را داده باشد. در صورتی که ماده گیاهی تیمار شده باشد جزئیات کامل آن باید توسط متقاضی توضیح داده شود.

۳- اجرای آزمون

۳-۱- مدت زمان آزمون

حداقل مدت زمان لازم برای انجام آزمون دو فصل رشد مشابه است.

۳-۲- مکان آزمون

آزمونها معمولاً در یک مکان انجام می شود. چنانچه صفت مهمی از رقم که مربوط به بررسی تمایز، یکنواختی و پایداری است در آن محل تظاهر پیدا نکند می توان آزمون را در یک محل مناسب دیگر نیز انجام داد.

۳-۳- شرایط اجرای آزمون

آزمون‌ها باید در شرایطی انجام شود که رشد طبیعی گیاه برای بروز صفات مربوط به رقم فراهم گردد. اندازه کرت‌های آزمون باید طوری باشد که حذف بوته‌ها یا قسمت‌هایی از آن، برای اندازه‌گیری و یا شمارش، موجب اختلال در انجام مشاهدات تا آخر فصل رشد نگردد.

هر آزمون باید دارای حدود ۲۰۰۰ گیاه باشد که در بین دو یا تعداد بیشتری تکرار تقسیم می‌شوند.

در صورتیکه آزمون‌ها روی سنبله صورت می‌گیرند حداقل ۱۰۰ سنبله مشاهده شوند. استفاده از کرتهای مجزا برای مشاهده و اندازه‌گیری صفات فقط در شرایط محیطی مشابه مجاز می‌باشد.

۳-۴- برای اهداف خاصی ممکن است آزمایش‌های تکمیلی انجام شود. برای مثال چنانچه آزمون‌های انجام شده بر اساس صفات مورفولوژیک (جدول شماره ۱) کافی نبود؛ می‌توان بنا به درخواست متقاضی و با نظر موسسه از صفات مبتنی بر الکتروفورز (جدول شماره ۲) نیز استفاده کرد.

۴- روش‌ها و مشاهدات

۴-۱- تمام مشاهداتی که برای ارزیابی تمایز و پایداری انجام می‌شوند باید بر روی ۲۰ بوته یا قسمت‌هایی از ۲۰ بوته انجام گیرند.

۴-۲- برای ارزیابی یکنواختی صفات در کل یک کرت (مشاهده یک گروه از بوته‌ها یا قسمت‌هایی از آنها به صورت کلی) تعداد بوته‌ها یا قسمت‌های گیاهی خارج از تیپ نباید بیش از ۵ در ۲۰۰۰ بوته باشد.

۴-۳- برای ارزیابی یکنواختی صفات بوته‌ها یا قسمت‌هایی از بوته‌ها در سنبله به ردیف‌ها، (مشاهده چند بوته یا قسمت‌هایی از آنها روی سنبله به ردیف‌ها) تعداد بوته‌ها یا قسمت‌های خارج از تیپ آنها در سنبله به ردیف نباید بیش از ۳ در ۱۰۰ باشد.

۴-۴- در صورتیکه برای صفات خاصی ارقام شاخص جهت ارزیابی در دسترس نباشد، می توان از دستورالعمل توصیف صفات ¹IPGRI استفاده نمود.

۵- گروه بندی ارقام

۵-۱- برای سهولت در ارزیابی تمایز، مجموعه ارقام مورد کشت باید به چند گروه تقسیم شوند. تجربه نشان داده، صفاتی در گروه بندی ارقام مناسب می باشند که در داخل یک رقم ثابت بوده و یا تغییرات کمی داشته باشند. همچنین حالتهای بیان این صفات باید در مجموعه ارقام به خوبی توزیع شده باشد.

۵-۲- صفات گروه بندی کننده مفید شامل موارد زیر می باشد:

الف) ساقه: ضخامت مقطع عرضی دیواره ساقه (صفت شماره ۱۰)

ب) سنبله: رنگ (صفت شماره ۱۶)

ج) وجود ریشک یا تیغک روی سنبله (صفت شماره ۱۴)

د) تیپ رشد (صفت شماره ۲۶)

۶- معرفی جدول صفات

۶-۱- برای تشخیص تمایز، یکنواختی و پایداری، باید از صفات و توضیحات آنها که در جدول صفات ارائه شده، استفاده نمود.

۶-۲- به منظور تجزیه و تحلیل داده ها و کمی کردن صفات، به هر صفت با توجه به چگونگی بیان آن اعداد ۱ تا ۹ اختصاص داده شده است.

۶-۳- علائم

(*) صفاتی که در هر دوره رشد برای آزمون تمام ارقام باید مورد استفاده قرار گرفته و همیشه در شناسنامه رقم لحاظ می گردند، جز در شرایطی که تظاهر یک صفت قبلی یا شرایط محیطی مانع بروز صفت شود.

(+) وجود این علامت در ستون علایم جدول صفات نشان دهنده وجود توضیحات تکمیلی در بخش هشت می باشد.

اعداد ذکر شده در ستون سوم جدول نشان دهنده بهترین مرحله یادداشت برداری از صفات مورد نظر است. توصیف مراحل رشد ونمو گیاه که با شماره مشخص شده اند در جدول کدهای دهندهی زادکس برای مراحل رشد غلات (بخش ۹) ارائه گردیده است.

M¹: اندازه گیری واقعی

VG²: ارزیابی مشاهده ای یک گروه از بوته ها یا قسمت هایی از آنها به صورت کلی.

VS³: ارزیابی مشاهده ای چندین بوته یا قسمت هایی از آنها روی سنبله به ردیف ها.

1-Measurement

2-Visual Group

3-Visual Single

۷- جدول صفات

(جدول شماره ۱)

خصوصیات مورفولوژیکی

امتیاز	حالت تظاهر	صفت	علائم			شماره صفت
۱ ۳ ۵ ۷	ندارد یا خیلی کم کم متوسط زیاد	کلئوپتیل: رنگ آنتوسیانین	VS	۹-۱۱	(+)	۱
۱ ۳ ۵ ۷ ۹	عمودی نیمه عمودی بینابین نیمه خوابیده خوابیده	گیاه: رفتار رشد اولیه	VG	۲۵-۲۹	(*) (+)	۲
۱ ۳ ۵ ۷ ۹	ندارد یا خیلی کم کم متوسط زیاد خیلی زیاد	برگ پرچم: رنگ آنتوسیانین گوشوارک ها	VG	۴۹-۵۱	—	۳

شماره صفت	علائم	صفت	حالت تظاهر	امتیاز
۴	VG	گیاه: فراوانی بوته های با برگ پرچم های خمیده	وجود ندارد یا خیلی کم	۱
			کم	۳
			متوسط	۵
			زیاد	۷
			خیلی زیاد	۹
۵	VG	زمان ظهور سنبله (اولین سنبلچه در ۵۰٪ سنبله ها نمایان شود)	خیلی زود	۱
			زود	۳
			متوسط	۵
			دیر	۷
			خیلی دیر	۹
۶	VG	برگ پرچم: شدت نقره ای رنگ بودن غلاف	نقره ای نیست یا خیلی کم	۱
			کم	۳
			متوسط	۵
			زیاد	۷
			خیلی زیاد	۹

شماره صفت	علائم	صفت	حالت تظاهر	امتیاز
۷	VG	سنبله: شدت نقره‌ای رنگ بودن	نقره‌ای نیست یا خیلی کم	۱
			کم	۳
			متوسط	۵
			زیاد	۷
			خیلی زیاد	۹
۸	VG	ساقه: شدت نقره‌ای رنگ بودن گردن پدانکل (میانگره انتهایی)	نقره‌ای نیست یا خیلی کم	۱
			کم	۳
			متوسط	۵
			زیاد	۷
			خیلی زیاد	۹
۹	M	گیاه: ارتفاع از طوقه تا انتهای ریشک	خیلی کوتاه	۱
			کوتاه	۳
			متوسط	۵
			بلند	۷
			خیلی بلند	۹

شماره صفت	علائم	صفت	حالت تظاهر	امتیاز
۱۰	(*) (+)	۸۰-۹۲	VS	ساقه: ضخامت مقطع عرضی دیواره ساقه (در فاصله وسط بین قاعده سنبله و گره ساقه زیر آن)
۱۱	(*) (+)	۹۲	VS	سنبله: شکل نیمرخ
۱۲	(*)	۸۰-۹۲	M VS	خیلی سست سست متوسط متراکم خیلی متراکم

شماره صفت	علائم	صفت	حالت نظاهر	امتیاز
۱۳	—	M	سنبله:	۱
			طول	۳
			(از قاعده سنبله	۵
			تا	۷
			نوک ریشک‌ها)	۹
۱۴	۸۰-۹۲	VG	وجود ریشک یا	۱
			تیغک روی سنبله	۲
			ریشک دار	۳
۱۵	۸۰-۹۲	VG	طول ریشک یا	۱
			تیغک	۳
			در نوک سنبله	۵
			بلند	۷
			خیلی بلند	۹
۱۶	۹۰-۹۲	VG	سنبله:	۱
			رنگ	۲

شماره صفت	علائم	صفت	حالت تظاهر	امتیاز
۱۷	VS	گره های محور اصلی سنبله: کرک دار بودن سطح محدب قاعده	ندارد یا خیلی کم	۱
			کم	۲
			متوسط	۳
			زیاد	۴
			خیلی زیاد	۵
۱۸	VS	پوشینه پایینی: عرض شانه (سنبلچه های یک سوم میانی سنبله)	بدون شانه یا خیلی باریک	۱
			باریک	۳
			متوسط	۵
			پهن	۷
			خیلی پهن	۹
۱۹	VS	پوشینه پایینی: شکل شانه (سنبلچه های یک سوم میانی سنبله)	شیب دار	۱
			کمی شیب دار	۳
			مسطح	۵
			برجسته	۷
			خیلی برجسته	۹

شماره صفت	علائم	صفت	حالت تظاهر	امتیاز
۲۰	VS	پوشینه پایینی: طول زائده منقاری (سنبلچه های یک سوم میانی سنبله)	خیلی کوتاه	۱
			کوتاه	۳
			متوسط	۵
			بلند	۷
			خیلی بلند	۹
۲۱	VS	پوشینه پایینی: شکل زائده منقاری (سنبلچه های یک سوم میانی سنبله)	راست	۱
			کمی خمیده	۳
			خمیدگی متوسط	۵
			خمیدگی زیاد	۷
			خمیدگی خیلی زیاد	۹
۲۲	VS	پوشینه پایینی: مقدار کرک سطح داخلی (سنبلچه های یک سوم میانی سنبله)	کم	۳
			متوسط	۵
			زیاد	۷

امتیاز	حالت نظاهر	صفت	علائم			شماره صفت
۱ ۳ ۵ ۷ ۹	راست کمی خمیده خمیدگی متوسط خمیدگی زیاد خمیدگی خیلی زیاد	لمای زیرین: شکل نوک داخلی (سنبلچه های یک سوم میانی سنبله)	VS	۸۰-۹۲	(+)	۲۳
۱ ۲	سفید قرمز	بذر: رنگ	VG	۹۲	(*)	۲۴
۱ ۳ ۵ ۷ ۹	بی رنگ یا خیلی روشن روشن متوسط تیره خیلی تیره	بذر: رنگ پذیری با فنل	VS	۹۲	(+)	۲۵
۱ ۲ ۳	زمستانه بینابین بهاره	تیپ رشد	VG	—	(*) (+)	۲۶

(جدول شماره ۲)

جدول صفات مبتنی بر الکتروفورز

شماره صفت	علائم	صفت	حالت تظاهر	امتیاز
۲۷	(+)	ترکیب گلوتنین: آلل بیان شده بر روی مکان ژنی Glu-A1	باند ۱	۱
			باند ۲	۲
			بدون باند	۳
۲۸	(+)	ترکیب گلوتنین: آلل بیان شده بر روی مکان ژنی Glu-B1	باندهای ۶+۸	۱
			باندهای ۷+۸	۲
			باندهای ۷+۹	۳
			باند ۷ (یا باندهای ۷+۹ در حضور باندهای ۵+۱۰ صفت ۲۹)	۴
			باندهای ۱۳+۱۶	۵
			باندهای ۱۴+۱۵	۶
			باندهای ۱۷+۱۸	۷
			باند ۲۰	۸
			باندهای ۲۲+۶/۱	۹

شماره صفت	علائم	صفت	حالت تظاهر	امتیاز
۲۹	(+)	ترکیب گلوتنین: آلل بیان شده بر روی مکان ژنی Glu-D1	باندهای ۲+۱۲	۱
			باندهای ۳+۱۲	۲
			باندهای ۴+۱۲	۳
			باندهای ۵+۱۰	۴

۸- روش اندازه گیری و یادداشت برداری صفات

توضیحات زیر تنها شامل صفاتی می شود که در ستون علائم جدول صفات با علامت (+) مشخص گردیده است.

صفت ۱ (جدول شماره ۱) - کلئوپتیل: رنگ آنتوسیانین

روش تعیین رنگ آنتوسیانین: تعداد بذر مورد نیاز در هر آزمون: برای ارزیابی تمایز و یکنواختی به ترتیب ۲۰ و ۱۰۰ بذر نیاز است.

آماده سازی بذرها: بذر بدون خواب روی کاغذ صافی مرطوب درون پتری دیش قرار می گیرند و در پتری در طول مدت جوانه زنی بسته می ماند.

مکان آزمون: آزمایشگاه یا گلخانه

نور: پس از اینکه طول کلئوپتیل ها در تاریکی به حدود یک سانتیمتر رسید بذرها در شریط نور مصنوعی (معادل نور خورشید) به شدت ۱۵۰۰۰ لوکس به صورت مداوم و به مدت ۳ تا ۴ روز قرار می گیرند.

دما: ۱۵ الی ۲۰ درجه سانتیگراد

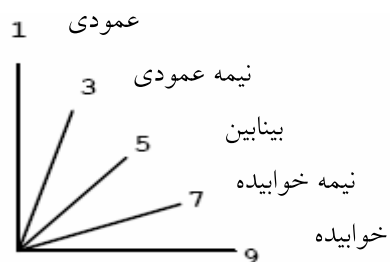
زمان یادداشت برداری: زمانی که کلئوپتیل کاملاً رشد کرده (حدود یک هفته) و در مرحله رشدی ۹ الی ۱۱ قرار دارد.

مقیاس یادداشت برداری: مطابق جدول صفات.

توجه: برای ارزیابی تمایز ارقام حداقل دو رقم شاهد لازم است.

صفت ۲ (جدول شماره ۱) - گیاه: رفتار رشد اولیه

عادت رشد گیاه باید به صورت مشاهده‌ای و از روی حالت برگها و پنجه های گیاه تعیین گردد. برای تعیین آن باید از زاویه بین برگها و پنجه‌ها با یک محور عمودی فرضی استفاده شود.

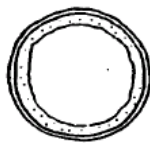


صفت ۴ (جدول شماره ۱) - گیاه: فراوانی بوته‌های با برگ پرچم‌های خمیده

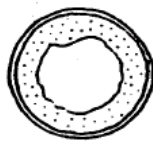
امتیاز	توصیف صفت
۱	تمام برگهای پرچم بدون خمیدگی است
۳	یک چهارم برگهای پرچم خمیده است
۵	یک دوم برگهای پرچم خمیده است
۷	سه چهارم برگهای پرچم خمیده است
۹	تمام برگهای پرچم خمیده است

صفت ۶ (جدول شماره ۱) - برگ پرچم: شدت نقره‌ای رنگ بودن غلاف
شدیدترین حالت نقره‌ای رنگ بودن غلاف باید مبنا قرار گیرد.

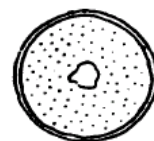
صفت ۱۰ (جدول شماره ۱) - ساقه: ضخامت مقطع عرضی دیواره ساقه (در فاصله وسط
بین قاعده سنبله و گره ساقه زیر آن)



۳
نازک



۵
متوسط



۷
قطور

صفت ۱۱ (جدول شماره ۱) - سنبله: شکل نیمرخ



۱
نیزه‌ای



۲
استوانه‌ای



۳
نیمه چماقی



۴
چماقی

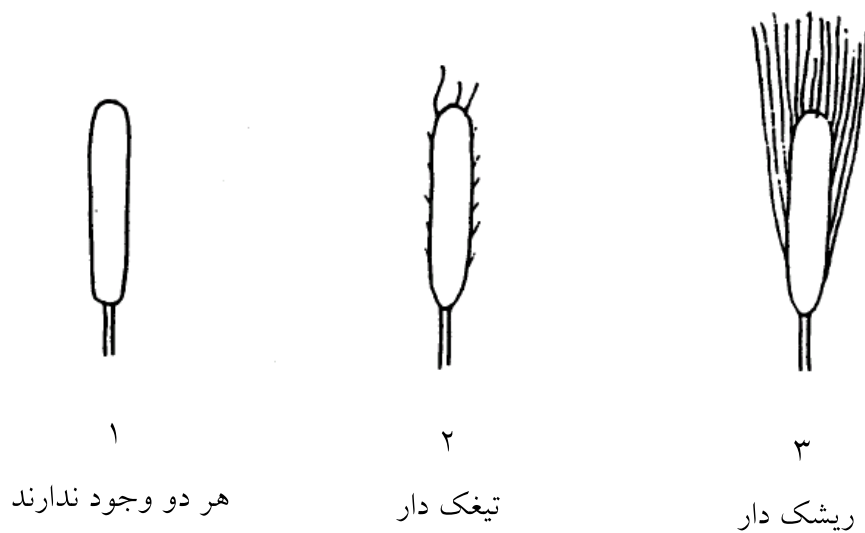


۵
دوکی

صفت ۱۲ (جدول شماره ۱) - سنبله: تراکم

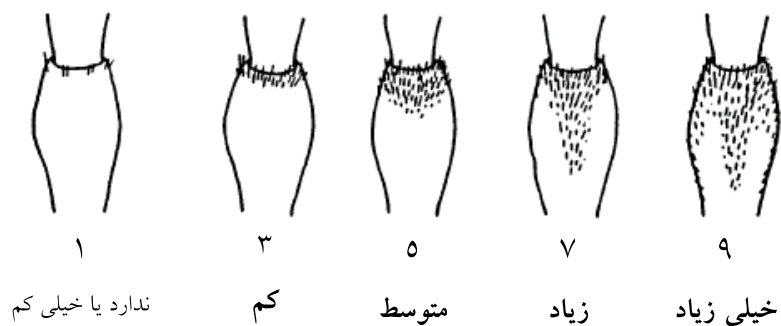
تراکم سنبله را هم می توان از طریق مشاهده و هم با محاسبه نسبت تعداد سنبلچه ها در سنبله ارزیابی نمود.

صفت ۱۴ (جدول شماره ۱) - وجود ریشک یا تیغک روی سنبله



صفت ۱۷ (جدول شماره ۱) - گره های محور اصلی سنبله: کرک دار بودن سطح محدب

قاعده



صفت ۱۸ (جدول شماره ۱) - پوشینه پایینی: عرض شانه (سنبلچه های یک سوم میانی

سنبله)



۱

۳

۵

۷

۹

بدون شانه یا

باریک

متوسط

پهن

خیلی پهن

خیلی باریک

صفت ۱۹ (جدول شماره ۱) - پوشینه پایینی: شکل شانه (سنبلچه های یک سوم میانی

سنبله)



۱

۳

۵

۷

۹

شیبدار

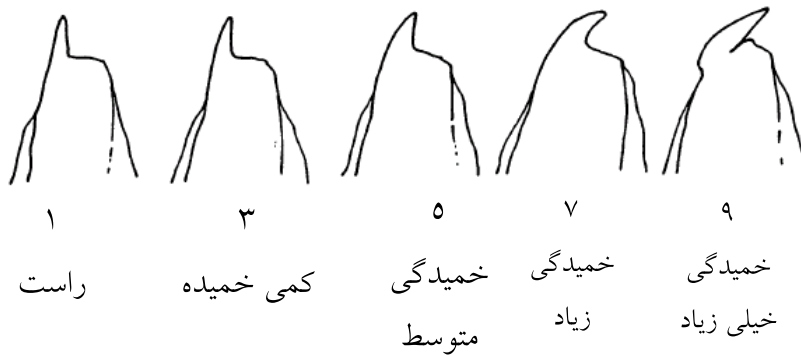
کمی شیبدار

مسطح

برجسته

خیلی برجسته

صفت ۲۱ (جدول شماره ۱) - پوشینه پایینی: شکل زائده متقاری (سنبلچه های یک سوم میانی سنبله)

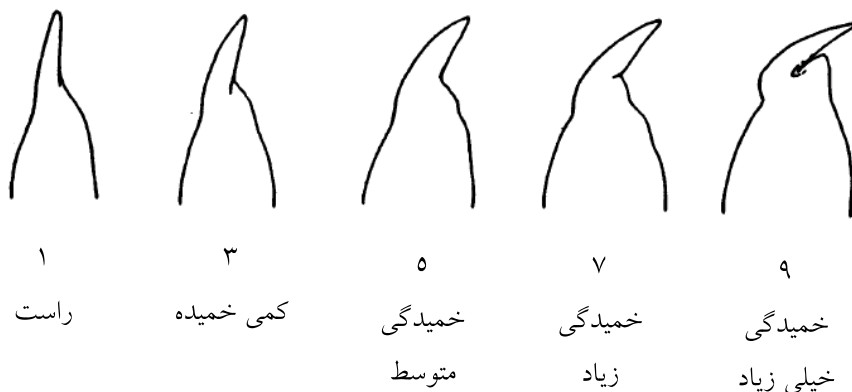


صفت ۲۲ (جدول شماره ۱) - پوشینه پایینی: مقدار کرک سطح داخلی (سنبلچه های یک سوم میانی سنبله)



صفت ۲۳ (جدول شماره ۱) - لمای زیرین: شکل نوک داخلی (سنبلچه های یک سوم

میانی سنبله)



صفت ۲۵ (جدول شماره ۱) - بذر: رنگ پذیری با فنل

روش تعیین واکنش به فنل

تعداد بذرهای مورد نیاز در هر آزمون: برای ارزیابی تمایز و یکنواختی به ترتیب ۲۰ و ۱۰۰ بذر لازم است. بذرها نباید با مواد شیمیایی تیمار شده باشند.

آماده سازی بذرها: بذرها به مدت ۱۶ تا ۲۰ ساعت در آب خیس می خورند و پس از خشک کردن و حذف آب سطحی، از طرف شیار در پتری دیش درب دار قرار می گیرند.

غلظت محلول: محلول فنل ۱ درصد (محلول تازه باشد)

مقدار محلول: سه چهارم بذر با محلول پوشیده شود.

مکان: آزمایشگاه

نور: با استفاده از روشنی روز و بدور از تابش مستقیم آفتاب.

دما: ۱۸ الی ۲۰ درجه سانتیگراد.

زمان یادداشت برداری: ۴ ساعت بعد از اضافه کردن محلول.

مقیاس یادداشت برداری: مطابق جدول صفات.

نکته: هنگام ارزیابی حداقل دو رقم شاهد لازم است.

صفت ۲۶ (جدول شماره ۱) - تیپ رشد

تیپ رشد باید روی یک یا چندین کرت در فصل بهار ارزیابی گردد. ارقام شاهد بهاره و زمستانه باید همیشه در کرتها باشند. توصیف ارقام مورد مطالعه باید بر طبق رفتار ارقام شاهد باشد. زمانی که آخرین ارقام بهاره کاملاً رسیدند (مرحله ۹۱-۹۲ جدول زادکس) ارقام مورد نظر باید ارزیابی شوند. حالتهای تظاهر این صفت به صورت زیر تعریف می شود:

تیپ زمستانه: بوته های این تیپ از نظر مرحله رشدی حداکثر به کد ۴۵ (آماس ساقه) جدول زادکس می رسند.

تیپ بینابین: بوته های این تیپ از نظر مرحله رشدی از مرحله ۴۵ فراتر می روند. به عنوان یک قانون این تیپ از مرحله ۷۵ فراتر می روند و نهایتاً تا مرحله ۹۰ می رسند. تیپ بهاره: بوته های این تیپ از نظر مرحله رشدی از مرحله ۹۰ هم فراتر می روند.

تشخیص آللهای گلوتنین

الگوهای زیر به منظور نشان دادن آللهای توضیح داده شده در جدول شماره دو طراحی شده اند که همچنین در تشخیص باندهای مختلف کمک می نمایند. در این الگوها موقعیت و وزن مولکولی تمام باندهای گلوتنین برای هر مکان ژنی تعیین شده و با باندهای رقم شاهد (courtot) مقایسه گردیده اند. همچنین شماره باندهای نام گذاری شده توسط Payne و حروفی که به هر آلل توسط Payne و Lawrence داده شده، آمده است.

زیر واحدهای گلوتنین با وزن مولکولی بالا : نامگذاری باندها و تشخیص آللهای مربوطه:

صفت ۲۷ (جدول شماره ۲): مکان Glu-A1

Example variety (Courtot)		Note		
		1 (a)	2 (b)	3 (c)
1	(113)---	1---		
2/2*	(108)---	2/2*---	2*---	n (no band)
3	(107)---			
4	(106)---			
5	(105)---			
6	(100)---			
6.1	(99)---			
7	(98)---	7 ---		
13/14/ 20	(94)---			
15	(91)---			
16/ 17/18	(90/ 89.5)---			
22	(87)---			
8	(86)---	8 ---		
9/10	(83)---			
12	(80)---	12 ---		

صفت ۲۸ (جدول شماره ۲): مکان Glu-B1

Example variety (Courtot)		Note								
		1 (d)	2 (b)	3 (c)	4 (a)	5 (f)	6 (h)	7 (i)	8 (e)	9
1	(113)---									
2/2*	(108)---	2/2*---								
3	(107)---									
4	(106)---									
5	(105)---									
6	(100)---		6---							
6.1	(99)---									6.1---
7	(98)---	7 ---	7---	7---	7---					
13/14/ 20	(94)---					13---14---			20---	
15	(91)---						15---			
16/ 17/18	(90/ 89.5)---					16---		17/18---		
22	(87)---									22---
8	(86)---									
9/10	(83)---	8 ---	8---	8---	9---					
12	(80)---	12 ---								

صفت ۲۹ (جدول شماره ۲): مکان Glu-D1

Example variety (Courtot)		Note			
		1 (a)	2 (b)	3 (c)	4 (d)
1 (113)---					
2/2* (108)---	2/2*---	2---			
3 (107)---			3---		
4 (106)---				4---	
5 (105)---					5---
6 (100)---					
6.1 (99)---					
7 (98)---	7 ---				
13/14/ (94)---					
20					
15 (91)---					
16/ (90)---					
17/18 (89.5)					
22 (87)---					
8 (86)---	8 ---				
9/10 (83)---					10---
12 (80)---	12 ---	12---	12---	12---	

توجه: باندهای مشخصی مثل ۹ و ۱۰ دارای وزن مولکولی یکسانی هستند. این امر باعث می شود که وقتی باندهای ۵+۱۰ (صفت ۲۹) حضور داشته باشند نتوان تفاوتی بین وجود باندهای ۷ و ۷+۹ (صفت ۲۸) گذاشت. بنابراین در حضور باندهای ۵+۱۰ (صفت ۲۹) امتیاز ۴ به یکی از دو باند ۷ و ۷+۹ (صفت ۲۸) داده می شود. دیگر باندهای با وزن مولکولی یکسان را می توان از روی پیوستگی با دیگر باندها تشخیص داد. مثلاً برای صفت ۲۸، همیشه باند ۱۳ با ۱۶ و باند ۱۴ با ۱۵ پیوسته است و با هم حضور می یابند در حالی که باند ۲۰ به تنهایی بیان می شود.

شرح روش مورد استفاده برای تجزیه گلوتمین های با وزن مولکولی بالا در پیوست آورده شده است.

۹- جدول کدهای ددهی زادکس برای مراحل رشد غلات

کد ۲ رقمی	توضیح عمومی	ملاحظات
۰۰	بذر خشک	
۰۱	شروع جذب آب	
۰۲	-	
۰۳	جذب آب کامل شده	
۰۴	-	
۰۵	پدیدار شدن ریشه از گندمه (کاریوپسیس)	
۰۶	-	
۰۷	پدیدار شدن کلئوپتیل از گندمه (کاریوپسیس)	
۰۸	-	
۰۹	پدیدار شدن برگ در نوک کلئوپتیل	
رشد گیاهچه		
۱۰	خروج اولین برگ از کلئوپتیل	دومین برگ قابل مشاهده است (کمتر از یک سانتیمتر) ۵۰٪ پهنک باز شده است
۱۱	باز شدن اولین برگ (۱)	
۱۲	باز شدن ۲ برگ	
۱۳	باز شدن ۳ برگ	
۱۴	باز شدن ۴ برگ	
۱۵	باز شدن ۵ برگ	
۱۶	باز شدن ۶ برگ	
۱۷	باز شدن ۷ برگ	
۱۸	باز شدن ۸ برگ	
۱۹	باز شدن ۹ برگ یا بیشتر	

کد رقمی	توضیح عمومی	ملاحظات
پنجه‌دهی		
۲۰	فقط ظهور ساقه اصلی	
۲۱	ظهور ساقه اصلی و یک پنجه	
۲۲	ظهور ساقه اصلی و ۲ پنجه	
۲۳	ظهور ساقه اصلی و ۳ پنجه	
۲۴	ظهور ساقه اصلی و ۴ پنجه	
۲۵	ظهور ساقه اصلی و ۵ پنجه	
۲۶	ظهور ساقه اصلی و ۶ پنجه	
۲۷	ظهور ساقه اصلی و ۷ پنجه	
۲۸	ظهور ساقه اصلی و ۸ پنجه	
۲۹	ظهور ساقه اصلی و ۹ پنجه و بیشتر	
طویل شدن ساقه		
۳۰	برخاستن ساقه کاذب (۲)	در برنج: تاخیر فاز رویشی مرحله گره‌بندی
۳۱	اولین گره ساقه قابل شناسایی است	
۳۲	دومین گره ساقه قابل شناسایی است	
۳۳	سومین گره ساقه قابل شناسایی است	
۳۴	چهارمین گره ساقه قابل شناسایی است	
۳۵	پنجمین گره ساقه قابل شناسایی است	
۳۶	ششمین گره ساقه قابل شناسایی است	
۳۷	برگ پرچم در حال پدیدار شدن است	
۳۸	-	مرحله پیش آبستنی (در برنج: قرار گرفتن گوشوارک‌ها
۳۹	زبانک برگ پرچم قابل مشاهده است	روبروی هم)
تورم ساقه		
۴۰	-	مرحله آغازین آبستنی (گل‌آذین کمی توسعه یافته است)
۴۱	توسعه غلاف برگ پرچم	
۴۲	-	

کد ۲ رقمی	توضیح عمومی	ملاحظات
۴۳	انتهای ساقه‌ها در حال متورم شدن هستند	مرحله میان آبستنی
۴۴	—	
۴۵	انتهای ساقه‌ها متورم شده اند	
۴۶	—	
۴۷	باز شدن غلاف برگ پرچم	مرحله اواخر آبستنی
۴۸	—	
۴۹	پدیدار شدن اولین ریشک‌ها	فقط در ارقام ریشک‌دار
گلدهی		
۵۰	نمایان شدن اولین سنبلچه گل‌آذین	گیاهان با گلدهی غیر همزمان
۵۱		گیاهان با گلدهی همزمان
۵۲	نمایان شدن یک چهارم گل‌آذین	گیاهان با گلدهی غیر همزمان
۵۳		گیاهان با گلدهی همزمان
۵۴	نمایان شدن یک دوم گل‌آذین	گیاهان با گلدهی غیر همزمان
۵۵		گیاهان با گلدهی همزمان
۵۶	نمایان شدن سه چهارم گل‌آذین	گیاهان با گلدهی غیر همزمان
۵۷		گیاهان با گلدهی همزمان
۵۸	نمایان شدن کامل گل‌آذین	گیاهان با گلدهی غیر همزمان
۵۹		گیاهان با گلدهی همزمان
ظهور گل‌آذین		
۶۰	شروع گلدهی (در جو به آسانی قابل شناسایی نیست و در برنج معمولاً بلافاصله بعد از خوشه‌دهی)	گیاهان با گلدهی غیر همزمان
۶۱		گیاهان با گلدهی همزمان
۶۲		---
۶۳		---

کد ۲ رقمی	توضیح عمومی	ملاحظات
۶۴	اواسط گلدهی	گیاهان با گلدهی غیر همزمان
۶۵		گیاهان با گلدهی همزمان
۶۶	---	
۶۷	---	
۶۸	کامل شدن گلدهی	گیاهان با گلدهی غیر همزمان
۶۹		گیاهان با گلدهی همزمان
شیری شدن		
۷۰	---	افزایش مواد جامد در آندوسپرم مایع گندمه بین انگشتان شکسته می شود
۷۱	گندمه آبکی	
۷۲	---	
۷۳	اوایل شیری شدن	
۷۴	---	
۷۵	اواسط شیری شدن	
۷۶	---	
۷۷	اواخر شیری شدن	
۷۸	---	
۷۹	---	
خمیری شدن		
۸۰	---	اثر ناخن باقی می ماند اثر ناخن باقی نمی ماند کلروفیل گل آذین از بین می رود
۸۱	---	
۸۲	---	
۸۳	اوایل خمیری شدن	
۸۴	---	
۸۵	خمیری نرم	
۸۶	---	
۸۷	خمیری سخت	
۸۸	---	

کد ۲ رقمی	توضیح عمومی	ملاحظات
۸۹	---	
رسیدگی		
۹۰	---	
۹۱	گندمه سخت می شود (دو نیمه کردن بذر با ناخن مشکل است) (۳)	در برنج خوشچه های انتهایی می رسند
۹۲	گندمه سخت می شود (نمی توان با ناخن روی بذر خراش عمیق ایجاد کرد) (۴)	در برنج ۵۰٪ خوشچه ها می رسند
۹۳	گندمه ها در طول روز می ریزند (۵)	در برنج بیش از ۹۰٪ خوشچه ها می رسند
۹۴	رسیدگی بیش از حد- ساقه ها مرده و متلاشی می شوند	خطر ریزش دانه ها در اثر تکان
۹۵	خواب بذر	
۹۶	بذور زنده دارای ۵۰٪ قدرت جوانه زنی هستند	
۹۷	بذور خواب نیستند	
۹۸	الفای خواب ثانویه	
۹۹	از بین رفتن خواب ثانویه	
نشا کردن و احیا		
T1	از ریشه درآوردن گیاه بذری	
T2	---	
T3	کاشتن (نشاء گیاه در زمین اصلی)	
T4	---	
T5	---	
T6	---	
T7	بازیابی جوانه ها	
T8	---	
T9	ادامه رشد رویشی	

زیرنویس جدول کدهای دهمی برای مراحل رشد غلات

- ۱- مرحله ای که گیاه بذری در گلخانه با زنگ تلقیح می شود
- ۲- فقط در مورد غلات زودرس خوابیده یا نیمه خوابیده استفاده می شود
- ۳- رسیده و مناسب برای دستگاه بسته بند (حدود ۱۶٪ رطوبت). گل آذین کلروفیل خود را از دست داده است
- ۴- رسیده و مناسب برای برداشت با کمباین (کمتر از ۱۶٪ رطوبت)
- ۵- مناسب ترین زمان برداشت

در این قسمت چیزی ننویسید	پرسشنامه فنی ثبت ارقام گندم تاریخ : این پرسشنامه باید به اظهارنامه ثبت رقم پیوست گردد
۱- موضوع نام علمی: <i>Triticum aestivum</i> L. emend Fiori et Paol نام عمومی: گندم	
۲- مشخصات درخواست کننده: نام و نام خانوادگی : تابعیت : شغل : نشانی محل کار : تلفن : فاکس: نام به‌نژادگر (در صورتیکه متفاوت از درخواست کننده می‌باشد):	
۳- نام پیشنهادی رقم یا کد به‌نژادگر: نام پیشنهادی : کد به‌نژادگر :	

۴- اطلاعاتی در مورد منشاء، روش اصلاحی، نگهداری و تکثیر رقم :

۴-۱- روش اصلاحی :

۴-۲- نحوه تکثیر رقم :

۵- صفاتی از رقم که لازم است به آنها اشاره گردد :

۵-۱- تیپ رشد (صفت شماره ۲۶)

زمستانه ☐ بینابین ☐ بهاره ☐

۵-۲- زمان ظهور سنبله (اولین سنبلچه در ۵۰٪ از سنبله ها نمایان شود) (صفت شماره ۵)

خیلی زود ☐ زود ☐ متوسط ☐ دیر ☐ خیلی دیر ☐

۵-۳- گیاه: ارتفاع (از طوقه تا انتهای ریشک) (صفت شماره ۹)

خیلی کوتاه ☐ کوتاه ☐ متوسط ☐ بلند ☐ خیلی بلند ☐

۵-۴- ساقه: ضخامت مقطع عرضی دیواره ساقه (در فاصله وسط بین قاعده سنبله و گره

ساقه زیر آن) (صفت شماره ۱۰)

نازک ☐ متوسط ☐ ضخیم ☐

۵-۵- سنبله: رنگ (صفت شماره ۱۶)

سفید ☐ رنگی ☐

۵-۶- وجود ریشک یا تیغک روی سنبله (صفت شماره ۱۴)

هر دو وجود ندارند ☐ تیغک دار ☐ ریشک دار ☐

۶- ارقام مشابه و تفاوت های رقم مورد درخواست با این ارقام :

لطفا جدول زیر را تکمیل نمایید. اطلاعات این جدول مشخص می کند که رقم مورد درخواست از چه لحاظ با رقم یا ارقام دیگر متفاوت است یا با کدام رقم رایج بیشترین شباهت را دارد. این اطلاعات می تواند به انجام آزمون تمایز کمک نماید.

نام رقم مشابه با رقم مورد درخواست	صفت (صفات) متمایز کننده رقم مورد درخواست با رقم مشابه	حالت تظاهر صفت (صفات) در رقم مشابه	حالت تظاهر صفت (صفات) در رقم مورد درخواست
ملاحظات:			
۷- اطلاعات تکمیلی جهت آزمون رقم: ۷-۱- خصوصیات زراعی : ۷-۲- مقاومت به آفات و بیماریها : ۷-۳- علاوه بر صفات بندهای ۵ و ۶ ، آیا صفت دیگری که در تشخیص و تمایز رقم مورد درخواست می تواند مفید واقع شود، وجود دارد؟ در صورت مثبت بودن جواب جزئیات آن را ذکر نمایید 			

۷-۴- شرایط ویژه جهت آزمون رقم: آیا شرایط ویژه‌ای برای رشد یا آزمون رقم مورد درخواست وجود دارد؟ در صورت مثبت بودن جواب جزئیات آن را ذکر نمایید : ۷-۵- اطلاعات تکمیلی دیگر :
۸- مجوز برای معرفی رقم : (الف) آیا برای معرفی این رقم نیاز به کسب مجوزی از مراجع ذیصلاح می‌باشد؟ بلی ☐ خیر ☐ (ب) آیا چنین مجوزی گرفته شده است؟ بلی ☐ خیر ☐ در صورت مثبت بودن جواب ، یک نسخه از مجوز را پیوست نمایید
۹-اطلاعات ماده گیاهی مورد آزمون : بذرهای ارائه شده برای آزمون ثبت نباید قبلاً توسط قارچ‌کش، آفت‌کش، تاخیردهنده‌های رشد یا غیره تیمار شده باشد، مگر اینکه موسسه درخواست اعمال چنین تیماری را داده باشد. در صورت اعمال تیمار، جزئیات آن را ذکر نمایید.
۱۰- تایید پرسشنامه: بدینوسیله، صحت اطلاعات تکمیل شده در این پرسشنامه را تایید می‌نمایم. نام درخواست کننده: تاریخ و امضاء :

پیوست

در این پیوست شرح روش مورد استفاده برای تجزیه گلوٲین های با وزن مولکولی بالا آورده شده است. این صفات تنها به عنوان مکمل صفات مورفولوژیک و فیزیولوژیک بوده و بر اساس درخواست متقاضی ثبت رقم و نظر موسسه استفاده می شوند. برای تجزیه گلوٲین های با وزن مولکولی بالا از الکتروفورز ژل پلی اکریل آمید در حضور سدیم دودسیل سولفات^۱ استفاده می شود. گلوٲین ها توسط سه مکان ژنی به نامهای Glu-A1، Glu-B1 و Glu-D کد می شوند (Payne, 1987). در هر مکان ژنی چندین آلل وجود دارد و تجزیه گلوٲین های با وزن مولکولی بالا بر مبنای شناسایی این آلل ها که به صورت یک سری باندها یا الگوهای باندهای شناخته شده در ژل ظهور می یابند، انجام می گیرد. آللها بر اساس تعریف ارائه شده توسط Payne و Lawrence، توسط شماره باندهای مربوطه مشخص می شوند. حروف مربوطه و وزن مولکولی دقیق آنها در قسمت شرح روش مورد استفاده، آمده است.

1- Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)

شرح روش مورد استفاده

(ترکیب گلوٲنین: آلل بیان شده توسط مکان ژنی Glu-A1, Glu-B1 و Glu-D)
روش SDS PAGE برای تجزیه گلوٲنین های با وزن مولکولی بالا از گندم نان

۱- ابزار و ادوات

از هر سیستم الکتروفورز افقی که بتواند دمای ژل را ثابت نگهدارد می توان استفاده نمود. توصیه می شود که ضخامت ژل بیشتر از ۱/۵ میلیمتر نباشد. منبع تغذیه باید توانایی تامین جریان و ولتاژ ثابت را داشته باشد.

۲- مواد شیمیایی

(همه مواد شیمیایی باید درجه Analytical Reagent یا بالاتر داشته باشند)

اکریل آمید (با خلوص مخصوص الکتروفورز) (Acrylamide)

بیس اکریل آمید (با خلوص مخصوص الکتروفورز) (Bisacrylamide)

تریس (هیدروکسی متیل) متیل آمین (TRIS)

سدیم دو دسیل سولفات (SDS)

آمونیم پرسولفات (APS)

۲- مرکاپتواتانول (2-mercaptoethanol)

تترا متیل اتیلن دی آمین (TEMED)

تری کلرواستیک اسید (TCA)

هیدروکلریک اسید (Hydrochloric Acid)

استیک اسید گلاسیل (Glacial Acetic Acid)

گلیسین (Glycine)

بوتانول (n-butanol)

پیرونین Y یا G (Pyronin Y or G)

گلیسرول (d=1.256) (Glycerol)

متانول یا اتانول (Methanol or Ethanol)

کماسی بریلیانت بلو R-250 (Coomassie Brilliant Blue R-250)

کماسی بریلیانت بلو G-250 (Coomassie Brilliant Blue R-250)

۳- محلولها

۳-۱- محلول استخراج

۳-۱-۱- فقط محلول استخراج گلوآنتین

محلول ذخیره:

۶/۲۵ میلی لیتر بافر یک مولار HCl TRIS با pH=6.8 (بند ۳-۳-۲ را مشاهده کنید)

۱۲/۰۵ میلی لیتر آب مقطر

۲ گرم SDS

۱۰ میلی گرم پایرونین Y یا G

۱۰ میلی لیتر گلیسرول

این محلول را می توان به مدت ۲ ماه در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری نمود.

قبل از استفاده محلول استخراج به صورت زیر آماده می شود:

۴/۲۵ میلی لیتر از محلول ذخیره فوق به ۰/۷۵ میلی لیتر ۲- مرکاپتواتانول اضافه نموده و حجم را با آب مقطر به ۱۰ میلی لیتر می رسانید. این محلول باید بلافاصله قبل از استفاده تهیه شود و قابل نگهداری نیست.

۳-۱-۲- محلول استخراج گلوترین های همراه گلیادین ها
محلول A: ۲۵ میلی لیتر ۲- مرکاپتواتانول + ۵۰ میلی گرم پایرونین Y یا G و حجم کل با آب مقطر به ۱۰۰ میلی لیتر می رسد.
محلول B: ۲۷ گرم اوره، ۳ میلی لیتر ۲- مرکاپتواتانول + ۱۰ گرم SDS و حجم کل با آب مقطر به ۱۰۰ میلی لیتر می رسد.

۳-۲- بافر الکتروفورز

محلول ذخیره:

۱۴۱/۱ گرم گلیسین

۳۰ گرم تریس

۱۰ گرم SDS

حجم کل با آب مقطر به یک لیتر می رسد. محلول ذخیره باید بلافاصله قبل از استفاده به نسبت ۱ به ۱۰ با آب مقطر رقیق شود. محلول ذخیره در دمای اتاق به مدت ۲ ماه قابل نگهداری است ولی محلول رقیق شده را نباید بیش از یک هفته نگهداشت. pH بافر باید نزدیک ۸/۳ باشد.

۳-۳- محلول تهیه ژل

۳-۳-۱- بافر ذخیره رزولوینگ (Resolving) ژل

۱۲۱/۱۴ گرم تریس + حدود ۲۰ میلی لیتر HCl ($d=1.19$) و حجم محلول با آب مقطر به یک لیتر می رسد. این محلول را می توان به مدت ۲ ماه در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری نمود.

۳-۳-۲- بافر ذخیره استکینگ (Stacking) ژل (یک مولار TRIS HCl با $pH=6.8$)
۱۲۱/۱۴ گرم تریس + حدود ۷۸ میلی لیتر HCL ($d=1.19$) و حجم محلول با آب مقطر به یک لیتر می رسد. این محلول را می توان به مدت ۲ ماه در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری نمود.

۳-۳-۳- محلول ۱۰ درصد SDS
۱۰ گرم SDS در این محلول را می توان به مدت ۲ ماه در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری نمود. قبل از استفاده چنانچه SDS از حالت محلول خارج شده باشد می توان با تکان دادن یا حرارت ملایم آن را مجدداً حل نمود.

۳-۳-۴- محلول یک درصد آمونیوم پرسولفات
یک گرم آمونیوم پرسولفات در آب مقطر حل شده و حجم به ۱۰۰ میلی لیتر می رسد. این محلول باید بلافاصله قبل از استفاده تهیه شود و قابل نگهداری نیست.

۳-۳-۵- محلول ذخیره اکریل آمید
۴۰/۰۲ گرم اکریل آمید با آب مقطر به حجم ۱۰۰ میلی لیتر می رسد.

۳-۳-۶- محلول ذخیره بیس اکریل آمید
۰/۵۱۹۸ گرم بیس اکریل آمید با آب مقطر به حجم ۱۳۰ میلی لیتر می رسد.

۳-۴- محلول رنگ آمیزی

۳-۴-۱

۰/۲۵ گرم کماسی بریلیانت بلو G-250 + ۰/۷۵ گرم کماسی بریلیانت بلو R-250 و حجم محلول با آب مقطر به ۱۰۰ میلی لیتر می رسد.

۳-۴-۲

۵۵ گرم تری کلرواستیک اسید با ۶۵ میلی لیتر گلاسیل استیک اسید و ۱۸۰ میلی لیتر متانول یا اتانول و ۲۵ میلی لیتر محلول (۳-۴-۱) مخلوط شده و حجم کل با آب مقطر به یک لیتر می رسد.

۴- روش

۴-۱- استخراج پروتئین

۴-۱-۱- فقط گلوٹنین ها

چند بذر را در هاون چینی کوچک خرد کنید. آرد حاصل را با نمونه رقیق شده بافر استخراج (۳-۱-۱) درون تیوب ۳ میلی لیتری درب دار مشابه آن مخلوط کنید. نسبت آرد به بافر باید ۵۰ میلی گرم به ۰/۷۵ میلی لیتر باشد. نمونه ها به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق استخراج می شوند. در این مدت چندین بار با دستگاه همزن مخلوط شده و ۱۰ دقیقه هم در حمام آب جوش حرارت می بینند. پس از آن اجازه داده میشود تا سرد شوند. در مرحله آخر لوله ها به مدت ۵ دقیقه در ۱۸۰۰۰ g سانتریفوژ می شوند.

۴-۱-۲- گلوٹنین های همراه گلیادین

در صورت تمایل می توان گلوٹنین ها و گلیادین ها را از یک بذر تجزیه کرد. ابتدا با اضافه کردن ۰/۲۵ میلی لیتر محلول A (۳-۱-۲) به یک یا نصف دانه خرد شده داخل یک میکروتیوب و نگهداری در دمای اتاق در طول شب گلیادین ها استخراج می شوند. پس

از آن گلوٲنین‌ها با اضافه کرن ۰/۵ میلی‌لیتر محلول B (۲-۱-۳) به دانه خرد شده و نگهداری در دمای اتاق در طول شب استخراج می‌شوند.
حجم محلول استخراج با توجه به ضخامت ژل و اندازه چاهک‌ها متغیر است. معمولاً بین ۱۰ تا ۲۵ میکرولیتر کافی است.

۲-۴- آماده سازی ژل

قاب‌های تمیز و خشک ژل، طبق دستورالعمل دستگاه سوار می‌شوند. اگر برای محکم کردن قابها از چسب استفاده می‌شود توصیه می‌شود یک روز قبل از استفاده چسبانده شود تا نوار چسبها بهتر بچسبند.

۲-۴-۱- رزولونینگ (اصلی) ژل (اکریل‌آمید ۱۰٪ با pH=8.8)

برای تهیه دو عدد ژل به ابعاد $180 \times 160 \times 1/5$ میلیمتر مواد زیر لازم است:

۲۰ میلی‌لیتر محلول اکریل‌آمید پایه (۳-۳-۵)

۲۶ میلی‌لیتر محلول بیس اکریل‌آمید پایه (۳-۳-۶)

۳۰ میلی‌لیتر محلول ژل پایه (۳-۳-۱)

این کار در دمای اتاق انجام می‌شود. مخلوط در یک ارلن تخلیه ۱۰۰ میلی‌لیتری به مدت ۲ تا ۳ دقیقه هواگیری شده و مواد زیر به آن اضافه می‌گردد:

۲ میلی‌لیتر آمونیوم پرسولفات (۳-۳-۴)

۰/۸ میلی‌لیتر SDS (۳-۳-۳)

۴۰ میکرولیتر TEMED (مستقیماً از شیشه استفاده شود)

سپس ژل به دقت درون قاب ریخته می‌شود به طوریکه حباب هوا درون آن تشکیل نگردد. پلیمریزاسیون در دمای اتاق صورت گیرد.

قاب ژل نباید کاملاً پر شود. لازم است فضایی در حدود ۳ تا ۴ سانتیمتر خالی گذاشته شود. با استفاده از یک سرنگ سطح ژل باید با دقت با n - بوتانول یا آب مقطر پوشانده شود. بعد از اتمام پلیمریزاسیون (حدود ۳۰ دقیقه) سطح ژل با دقت با آب مقطر شسته می‌شود و با کاغذ صافی خشک می‌گردد.

۴-۲-۲- ژل رزولوینگ (اصلی) (اکریل آمید ۷٪ با $pH=8.8$)

برای تعیین زیر واحدهای ۲ و ۲* لازم است از ژل اصلی کنسانتره اکریل آمید ۷٪ استفاده شود.

برای تهیه دو عدد ژل به ابعاد $180 \times 160 \times 1/5$ میلیمتر مواد زیر لازم است:

۱۴ میلی لیتر محلول اکریل آمید پایه (۳-۳-۵)

۶ میلی لیتر آب مقطر

۲۶ میلی لیتر محلول بیس اکریل آمید پایه (۳-۳-۶)

۳۰ میلی لیتر محلول ژل پایه (۳-۳-۱)

این کار در دمای اتاق انجام می‌شود. مخلوط در یک ارلن تخلیه ۱۰۰ میلی لیتری به مدت ۲ تا ۳ دقیقه هواگیری شده و مواد زیر به آن اضافه می‌گردد:

۲ میلی لیتر آمونیوم پرسولفات (۳-۳-۴)

۰/۸ میلی لیتر SDS (۳-۳-۳)

۴۰ میکرولیتر TEMED (مستقیماً از شیشه استفاده شود)

سپس ژل به دقت درون قاب ریخته می‌شود به طوریکه حباب هوا درون آن تشکیل نگردد. پلیمریزاسیون در دمای اتاق صورت گیرد.

قاب ژل نباید کاملاً پر شود. لازم است فضایی در حدود ۳ تا ۴ سانتیمتر خالی گذاشته شود. با استفاده از یک سرنگ سطح ژل باید با دقت با n - بوتانول یا آب مقطر پوشانده

شود. بعد از اتمام پلمریزاسیون (حدود ۳۰ دقیقه) سطح پل با دقت با آب مقطر شسته می شود و با کاغذ صافی خشک می گردد.

۴-۲-۳- ژل فوقانی (Stacking) (اکریل آمید ۳٪ با pH=6.8)

در ارلن تخلیه ۵۰ میلی لیتری مواد زیر مخلوط می شوند:

۱/۵ میلی لیتر محلول اکریل آمید پایه (۳-۳-۵)

۲/۱۵ میلی لیتر محلول بیس اکریل آمید پایه (۳-۳-۶)

۲/۵ میلی لیتر بافر ژل پایه (۳-۳-۲)

۱۳/۱۵ آب مقطر

بعد از هواگیری مواد زیر اضافه می گردد:

۰/۷۵ میلی لیتر آمونیوم پرسولفات (۳-۳-۴)

۰/۲ میلی لیتر SDS (۳-۳-۳)

۱۵ میکرولیتر TEMED (مستقیماً از شیشه استفاده شود)

مواد را با دقت مخلوط نموده و بلافاصله ژل فوقانی را در بالای قاب بریزید. شانه ایجاد چاهک را در ژل فرو کنید به طوری که حباب هوا تشکیل نگردد. اجازه دهید تا ژل در دمای اتاق به مدت ۲ ساعت بسته شود. سپس شانه را به دقت خارج کنید و چاهک ها را با بافر رقیق شده الکتروفورز (۳-۲) شستشو دهید.

۴-۳- الکتروفورز

تانک الکتروفورز با حجم مناسبی از بافر (۳-۲) که تا دمای ۱۵ درجه سانتیگراد خنک شده است پر می شود. پس از آن نمونه ها در چاهک ها ریخته (لود) می شوند و جریان ثابتی معادل ۸ میلی آمپر بر سانتیمتر مربع از (سطح مقطع عرضی) ژل برقرار می گردد

تا پایرونین Y یا G به ژل فوقانی برسد و پس از آن با برقراری جریان ۱۶ میلی‌آمپر بر سانتیمتر مربع از ژل (ماکسیمم ولتاژ ۳۰۰ ولت) تا زمانی که نشانگر در پایین ژل است ادامه می‌یابد. دما می‌بایست در ۱۵ درجه سانتیگراد ثابت بماند.

۴-۴- تثبیت و رنگ‌آمیزی ژل

پس از خارج کردن قاب ژل از درون تانک، آن را باز کرده و ژل‌ها به مدت حداقل ۳۰ دقیقه در ۲۵۰ میلی‌لیتر محلول ۱۵٪ TCA تثبیت می‌شود. ژل‌ها در آب مقطر شسته می‌شوند و در ۲۵۰ میلی‌لیتر از محلول رنگ‌آمیزی (۳-۴-۲) در طول شب و در دمای اتاق قرار می‌گیرند. رنگ‌بری معمولاً لازم نیست اما ژل‌ها باید قبل از نگهداری در ظروف پلی‌تن با آب مقطر شسته شوند.

می‌توان از دیگر روش‌های رنگ‌آمیزی نیز مثل کماسی بلو G یا به تنهایی تری کلرو استیک اسید (TCA) استفاده کرد. تفکیک باندهای حاصل و تحرک نسبی آنها (وزن مولکولی) باید واضح و مشخص بوده تا تحلیل آنها به درستی انجام گیرد.

National Guidelines
for the Conduct of Tests for
Distinctness, Uniformity and Stability

in

Wheat