استفاده از کروماتوگرافی مایع فاز معکوس با کارایی بالا (RP-HPLC) در بررسی تنوع ژنتیکی گندم نان

رضا امیری*، عبدالمجید رضایی*، محمد شاهدی** و شهرام دخانی**

چکیده

این مطالعه به منظور ارزیابی قابلیت روش کروماتوگرافی مایع فاز معکوس با کارایی بالا (RP-HPLC) در بررسی پروتئین‌های ذخیره‌ای و تنوع ژنتیکی آن در ایزولاین‌های بهاره و پاییزه، ارقام زراعی و بومی گندم نان اجرا گردید. پروتئین‌های گلیادین حاصل از آرد ۵ بذر تصادفی از هر ژنوتیپ، با روش RP-HPLC تجزیه شدند. در این روش از ستون Nucleosil C18 300A و یک ستون محافظ و حلال متحرک استونیتریل حاوی TFA استفاده شد.

کلیه شرایط انتخاب شده برای تجزیه پروتئین‌های ذخیره‌ای، اهداف این مطالعه را با منظور نمودن سرعت و بازده جداسازی مناسب تأمین نمود. تحت این شرایط تعداد اجزای حاصل از تجزیه گلیادین‌ها بیشتر اززیرواحدهای تجزیه الکتروفورز بود. به علاوه نتایج کمّی حاصل از تجزیه RP-HPLC، تجزیه و تحلیل آماری داده ها را آسان نمود. همچنین تجزیه گلیادین‌ها با روش RP-HPLC قابلیت بالایی در شناسایی ژن‌های چاودار داشت، به طوری که به سهولت حضور سکالین‌های امگا در ژنوم رقم فلات را معلوم کرد. بنابراین نتیجه‌گیری شد که تجزیه RP-HPLC پروتئین‌های گلیادین می‌تواند کارآیی روش الکتروفورز را داشته باشد و حتی در مواردی جایگزین آن شود. نتایج تجزیه خوشه‌ای پلی پپتیدهای گلیادین بیانگر افزایش تدریجی تنوع ژنتیکی از ایزولاین‌ها تا ارقام بومی بود. در مجموع، در بین ارقام بومی، گندمهای علی آباد، عقدا، سفید بافقی، قرمز بافقی، شهداس و سرخه از تنوع ژنتیکی بیشتری برخوردار بودند.

واژه‌های کلیدی - *ارقام بومی، ایزولاین، تجزیه خوشه‌ای، زیرواحدهای پروتئین، گلیادین، مؤلفه‌های اصلی*

مقدمه

سالهای زیادی است که از روش الکتروفورز برای مطالعه پروتئین‌های ذخیره‌ای گندم و سایر غلات، جداسازی زیر واحدهای گلوتنین و گلیادین به منظور برآورد کیفیت آرد و شناسایی ژنوتیپ‌ها استفاده می‌گردد (۱،۲،۱۱ و ۱۲). روشهای گوناگون الکتروفورز با ژل نشاسته یا پلی‌اکریل آمید (PAGE)[1]، با استفاده از بافر اسیدی با قدرتهای یونی پایین، به طور گسترده مورد استفاده قرار گرفته‌است. در این روشها، پروتئین‌ها به طور عمده بر اساس بار الکتریکی و اندازه

*- به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و استاد اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان

**- دانشیار صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان

1- Polyacrilamid Gel Electrophoresis

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-09-21]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1378.3.3.3.8]

جداسازی می‌شوند(۳).

از کروماتوگرافی غربال مولکولی[1] (یا کروماتوگرافی غربال ژلی[2]) نیز برای جداسازی پروتئین‌ها و تعیین وزن مولکولی آنها استفاده شده است. کرماتوگرافی تبادل یونی[3] اصولاً بر اساس انواع و مقادیر اسیدهای آمینه باردار استوار است (۵ و ۲۲). کروماتوگرافی بر اساس واکنش (اثر متقابل) آب گریزی[4]، پروتئین‌ها را طبق اثر متقابل چربی دوستی با فاز جامد آب گریز جداسازی می‌نماید. این روش، پروتئین‌ها را با مکانیسمی متفاوت از دو روش قبلی جدا می‌کند، اما قدرت جداسازی آن کاملاً پایین است (۵). با این حال کروماتوگرافی مایع فاز معکوس باکارایی بالا یا پیشرفته (RP-HPLC)[5]، سودمندترین روش برای جداسازی و مطالعه پروتئین‌های غلات می‌باشد(۴).

امروزه معرفی ستونهای با تخلخل بالا (A ۳۰۰ یا بیشتر) در RP-HPLC که قادر به جداسازی پروتئین‌های با وزن مولکولی بالا هستند، انقلابی در بسیاری از متدولوژی‌های تجزیه‌ای قبلی به‌وجود آورده است. روش RP-HPLC مثل کروماتوگرافی واکنش آب گریزی بر روی ژل‌های آگاروزکه با گروه‌های فنیل واکتیل در تماس است، پروتئین‌ها را بر اساس اختلاف در سطح آب گریزی جداسازی می‌نماید، با این تفاوت که قدرت جداسازی آن بسیار بالاتر است(۹).

در سال ۱۹۸۳ بیتز(۳) برای اولین بار توانست پروتئین‌های گندم را به‌وسیله RP-HPLC به طرز بهتری، در مقایسه با سایر روشهای کروماتوگرافی قبلی یا روشهای الکتروفورز، جداسازی نماید. برای مثال، گلیادین‌ها به ۳۶ پیک (بزرگ و پهن)، در مقایسه با ۴۰ تا ۴۵ جزء حاصل از الکتروفورز دو بعدی، جداسازی شدند. قدرت جداسازی بالای این روش که در اولین مطالعه مشاهده شد، توجه متخصصین این رشته رابه خود جلب نمود.

از آن جایی که گلیادین‌ها شاخص ژنوتیپی مناسبی برای تمایز ارقام گندم بوده و قدرت جداسازی آنها در روش RP-HPLC بیشتر از الکتروفورز یک بعدی است، به آسانی می‌توان از RP-HPLC برای جداسازی آنهااستفاده نمود(۳، ۷ و ۲۷). همچنین تجزیه گلیادین‌ها باRP-HPLC، کاربردهای دیگری مثل ارزیابی کیفیت،آزمون خلوص ژنتیکی، طبقه بندی گروه‌های گندم و استفاده از پلی پپتیدهای نشانگردارد،به‌طوری که می‌توان از این روش به عنوان مکمل ارزشمندی در برنامه‌های اصلاح گندم و مطالعات ژنتیکی استفاده نمود(۹).

با توجه به این‌که در چند سال اخیر روش RP-HPLC اهمیت فراوانی در مطالعات ژنتیک واصلاح گندم (و سایر غلات) پیدا نموده است، بررسی حاضر بر روی تعدادی ژنوتیپ گندم نان انجام گرفت. هدف این مطالعه تعیین شرایط مطلوب برای تجزیه RP-HPLC پروتئین‌های ذخیره‌ای گندم و بررسی تنوع ژنتیکی برخی از ایزولاین‌های بهاره و پاییزه، ارقام زراعی و بومی، از طریق مطالعه چند شکلی پلی پپتیدهای گلیادین بوده است.

موادوروشها

نمونه های گیاهی

این آزمایش بر روی نمونه‌های گندم نان در آزمایشگاه‌های علوم و صنایع غذایی و اصلاح نباتات دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی اصفهان انجام شد. مواد مورد بررسی شامل ۱۰ رقم بومی، مشتمل بر سفید بافقی، قرمز بافقی، سرخه احمدآباد، مروارید، بومی عقدا، بومی علی آباد، کراس سرخ تخم و ماهونی از استان یزد، شهداس و سفید صالحات از استان چهار محال و بختیاری، کرج -۱، روشن، ناز، امید، اروند، خلیج، فلات، سرداری و شاهیوندی (گندم دوروم) از بانک ژن مؤسسه اصلاح وتهیه نهال و بذر کرج و ایزولاین‌های بهاره و پاییزه

1- Size Exclusion Chromatography(SEC)
2- Gel Permeation Chromatography
3- Ion Exchange Chromatography(IEC)
4- Hydrophobic Interaction Chromatography (HIC)
5- Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-09-21]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1378.3.3.3.8]

انزا[1]، پورتولا[2]، سیت سروس[3]، تانوری ۷۱[4]، پیتیک[5]، همراه باارقام اینیا[6] و مارکوییس[7] (شاهد) از گروه زراعت دانشگاه کالیفرنیا در دیویس بود.

وسایل و مواد شیمیایی

حلالهای مورد استفاده شامل‌تری فلورواستیک اسید(TFA) و اتانل از نوع خالص و آزمایشگاهی کمپانی مرک[8] بودند. همچنین از استونیتریل و متانل ویژه HPLC استفاده شد. آب مورد استفاده نیز دو بار تقطیر گردید. برای تهیه آن، آب یک‌بار تقطیر شده(با هدایت الکتریکی حدود ۲/۸ میلی موس بر سانتیمتر) مجددا" با دستگاه آب مقطرگیری[9] تقطیر گردید. در نتیجه هدایت الکتریکی آب حاصل به ۸ میکروموس بر سانتیمتر (۳۵۰ مرتبه کمتر از هدایت الکتریکی آب یک‌بار تقطیر شده) کاهش یافت. همچنین، فیلترهای استفاده شده برای نمونه‌ها قبل از تزریق به دستگاه‌از نوع ۰/۴۵ میکرومتر[10] وفیلترهای بوفنر فاز متحرک در موقع هواگیری از نوع Pyrex ASTM 4-5.5. F بودند.

استخراج گلیادین

با توجه به گزارش هابنر و بیتز (۲۴) و سایر مطالعات (۳، ۹ و ۱۸)، ابتدا پروتئین‌های گلیادین گندم انزا با استفاده از اتانل ۷۰ درصد(V/V) و مدت زمان ۳۰ دقیقه، تحت نسبتهای مختلف حلال به آرد و دورهای مختلف سانتریفوژ استخراج و تجزیه گردید. روشهای آزمون شده عبارت بودند از: هابنر و بیتز(۱۵، ۱۷ و ۲۰)، هابنر (۱۴)، بیتز (۳)،هابنر و گینز (۲۱) ولوخارت و همکاران (۲۵ و ۲۶). در نتیجه روشهای هابنر وبیتز (۱۷ و ۲۰)، هابنر (۱۴) و بیتز (۳) نتایج خوبی به‌دست دادند، که با توجه به نیاز به آرد کمتر و ارتفاع پیک‌ها، از روش هابنر و بیتز (۱۵) با تغییر جزئی به شرح زیر استفاده گردید.

پس از جداسازی نیمه جنین ۵ بذر تصادفی، بخش آندوسپرم آنها به‌خوبی آسیاب گردید. سپس ۲۰ میلیگرم از آرد حاصل در لوله‌های پلاستیکی درب دار[11] ۲ میلی لیتری ریخته شد. آنگاه ۱/۲ میلی لیتر اتانل ۷۰ درصد(V/V) به هر لوله اضافه گردید و نمونه‌ها پس از چند ثانیه به هم زدن با شیکر لوله[12]، به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اطاق نگهداری شدند. متعاقبا" نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۵ هزار دور در دقیقه سانتریفوژ شدند. پس از فیلتر شدن با فیلترهای ۰/۴۵ میکرومتر میلی پور، از محلول شفاف رویی[13] برای تزریق به RP-HPLC استفاده گردید. نمونه‌های استخراج شده در یخچال (دمای ۲ درجه سانتیگراد) نگهداری و در کمتر از ۱۰ تا ۱۵ روز پس از استخراج تجزیه شدند. البته به پیشنهاد هابنر و بیتز (۱۶) ابتدا نسبتهای ۰/۰۶ و ۰/۰۵ درصد TFA به ترتیب در حلالهای A وB آزمون گردید، که در این حالت انحراف خط پایه بهبود یافت، اما جداسازی نیز کاهش پیدا کرد. لذا نسبتهای ۰/۱ و۰/۸۵ درصد انتخاب شد.

شرایط تجزیه و دستگاه HPLC

فاز متحرک شامل آب دو بار تقطیر شده حاوی TFA (۰/۱ درصد) به عنوان حلال A و استونیتریل حاوی TFA (۰/۰۸۵ درصد) به عنوان حلال B بود(۱۶). آب قبل از استفاده تحت خلأ[14] فیلتر گردید و سپس در همان شرایط خلأ و با استفاده از همزن مغناطیسی به مدت ۳۰ دقیقه هواگیری شد. استونیتریل نیز به مدت ۲۰ دقیقه با استفاده از همزن مغناطیسی و تحت خلأ هواگیری گردید. ستون از نوع Nucleosil C18 300A 5μm،

1- Anza 2- Portola 3- Siete Cerros 4- Tanori 71
5- Pitic 6- Inia 7- Marquis 8- Merk
9- Buchi 011 RE 121, Switzerland
10- Sporian 30/B or EP 030/20 from Schleicher & Schull, Germany 11- Eppendorf
12- Vortex 13- Supernatant 14- Vaccum filteration

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-09-21]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1378.3.3.3.8]

با ابعاد .I.D mm ۲۵۰×۴/۶ همراه با ستون محافظ[1] سازگار .I.D mm ۴۰×۴/۶ بود. دستگاهHPLC از نوع‌شیماتزو[2] و شامل سه پمپ[3] B,A و C، محفظه اختلاط[4]، محفظه ستون[5]، دتکتور[6]، کنترل کننده سیستم[7] و کروماتوپک[8](رایانه، چاپگر و نرم‌افزار) بود. در برنامه ریزی HPLC برای تفکیک پروتئین‌ها، از شیب غلظت (تجزیه gradient) ۲۵،۳۵،۵۰ و ۷۵ درصد حلال B، به ترتیب در دقایق صفر، ۵، ۱۰ و ۱۸ استفاده شد. غلظت حلال B پس از ۲۱ دقیقه به ۲۵ درصد برگردانده شد. همچنین ۱۰ دقیقه برای تعادل مجدد ستون در نظر گرفته شد(کل زمان اجرا۳۱ دقیقه). به علاوه، دمای ستون ۶۰ درجه سانتیگراد و میزان جریان ۱ میلی لیتر در دقیقه بود، که تحت این شرایط فشار سیستم بین ۶۸ تا ۸۰ کیلوگرم نیرو بر سانتیمترمربع (معادل Psi ۱۸۶-۱۱۷ یا کمی بیشتر) تغییر می‌نمود. حجم تزریق ۱۰ میکرولیتر بود و پروتئین‌ها در ۲۱۰ نانومتر شناسایی گردیدند. همچنین نتایج تجزیه، جهت تجزیه و تحلیل و مقایسات بعدی به صورت همزمان بر روی دیسکت‌های مغناطیسی در کروماتوپک ذخیره گردید. اکثر نمونه‌ها دو بار تجزیه شدند و در طول مطالعه، ستون چندین بار با متانل ویژه HPLC (۵۰،۶۷ یا ۱۰۰ درصد متانل) شستشو گردید. همچنین قبل از آغاز هر تجزیه، یک برنامه شیب غلظت بدون نمونه اجراشد. از کلیه کروماتوگرام‌ها خط پایه ذخیره کم گردید.

روشهای آماری

تجزیه خوشه‌ای با روش UPGMA[9] (متوسط همسایگی) و با استفاده از فاصله اقلیدسی(۲۳) و محاسبه ضرایب همبستگی کوفنتیک[10] (۲۸) برای تعیین نکویی برازش آنها و تجزیه مؤلفه‌های اصلی بر روی ماتریس ضرایب همبستگی انجام شد. در هر مورد از مساحت نسبی پیک‌های RP-HPLC جهت تجزیه و تحلیل آماری استفاده گردید. برای انجام تجزیه خوشه‌ای از نرم‌افزار آماری SPSS[11] و جهت ارزیابی قابلیت روش تجزیه خوشه‌ای از نرم افزار NTSYS[12] استفاده به عمل آمد. تجزیه مؤلفه‌های اصلی با برنامه SAS[13] و رسم نمودارها با برنامه کواتروپرو[14] انجام شد.

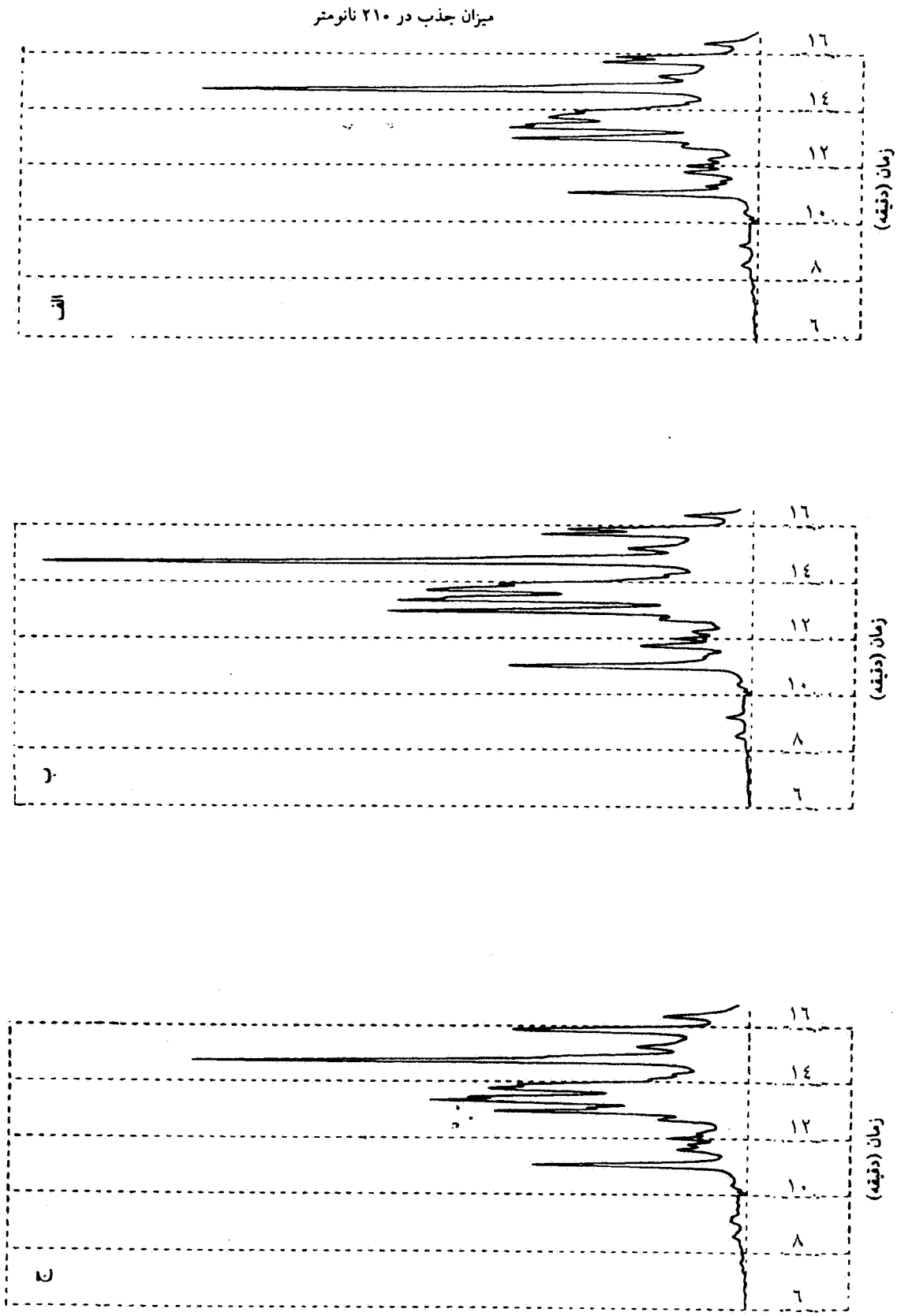
نتایج و بحث

اشکال ۱ و ۲ کروماتوگرام‌های گلیادین برخی از ایزولاین‌ها(سیت سروس بهاره یا S و پاییزه یاW، تانوری بهاره و پاییزه) و ارقام (سرداری و فلات) را نشان می‌دهد. همان‌طوری که مشاهده می‌شود، در چهار کروماتوگرام ایزولاین‌ها تفاوتهای کمی و کیفی وجود دارد، اما به طور دقیق نمی‌توان میزان تفاوتها را تعیین نمود. با وجود این، شباهتهای کروماتوگرام‌های مذکور بیشتر از تفاوتهای آنهاست. برای مثال سیت سروس بهاره و پاییزه (شکلهای ۱- الف و ۱- ب) از لحاظ کیفی هیچ تفاوتی ندارند و کلیه اجزای گلیادین در آنها یکسان است. این موضوع نشان می‌دهد که مکانهای ژنی یکسانی (مکان ژنی ۱- Gli و۲- Gli) در این دو لاین فعال می‌باشند. البته در برخی از پلی پپتیدها تفاوتهای کمّی کوچکی مشاهده می‌شود که از آن جمله می‌توان به بیشتر بودن مقدار، مساحت یا ارتفاع پیک‌های بازمان ماندگاری[15] (یا زمان‌بازداری) ۹/۲۰۲، ۱۱/۰۱۸، ۱۱/۴۴۴، ۱۱/۷۷۵، ۱۲/۹۳۱، ۱۳/۳۲۲ و ۱۳/۷۷۵ در سیت سروس پاییزه نسبت به بهاره اشاره نمود.

1- VDS optiab chromatographic tecknik CmbH, Berlin, Germany
2- Shimadzu LC-6A
3- LC-6A
4- Mix chamber
5- Column oven CTO-6A
6- Spectrophotometric Detector UV-VIS
7- System Controller SCL-6A
8- Chromatopac C-R4A
9- Unweighted Paired Group Method Using Arithmatic Average
9- Cophenetic correlation coefficient
10- Statistical Program for Social Science (SPSS for windows, Ver 6.)
11- Numerical Taxonomy System (NTSYS)
12- Statistical Analysis System(SAS), 1993
13- Quatro pro
۱۵- کلیه زمانهای ماندگاری گزارش شده، عبارت از میانگین زمان ماندگاری درژنوتیپ‌های واجدآن پیک می‌باشند.

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-09-21]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1378.3.3.3.8]



شکل ۱ - کروماتوگرام پلی‌پپتیدهای گلیادین در: الف - لاین سیت سروس بهاره، ب - لاین سیت سروس پاییزه و ج - لاین تانوری بهاره

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-09-21]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1378.3.3.3.8]

با وجود این، تانوری بهاره و پاییزه تفاوتهای کیفی نیز دارند، که از جمله وجود پلی پپتیدهای با زمان ماندگاری ۸/۴۷ و۱۰/۱۵ در تانوری بهاره است. همچنین سیت سروس بهاره مقدار بیشتری از پیک‌های با زمان ماندگاری ۱۵/۷۱۳، ۱۵/۸۸۹ و۱۶/۳۵۵ را نسبت به پاییزه دارا بود. این نتایج همراه با نتایج حاصل از مقایسه سایر کروماتوگرام‌های ایزولاین‌ها (سایر شکلها گزارش نشده‌اند) با فرضیه ارائه شده توسط بیتز (۵)، که مقدار پیک‌های دیر شستشو شونده را در گندمهای بهاره بیشتر می داند، مطابقت دارد، اما روند کاملاً روشنی در این رابطه مشاهده نشد. در مجموع، مقایسه ظاهری کروماتوگرام‌ها به عنوان نتیجه‌ای مقدماتی، بیانگر شباهتهای ژنتیکی این ژنوتیپ‌ها می‌باشد. اما پیچیدگی زیاد داده‌های RP-HPLC، همان طوری که هابنر و بیتز (۱۹) نیز بر آن تاکید نموده‌اند، مانع از قضاوت قطعی در باره تفاوتهای ژنوتیپ‌ها می‌گردد. به همین دلیل تجزیه آماری داده‌های RP-HPLC این کار را آسان‌تر می‌سازد.

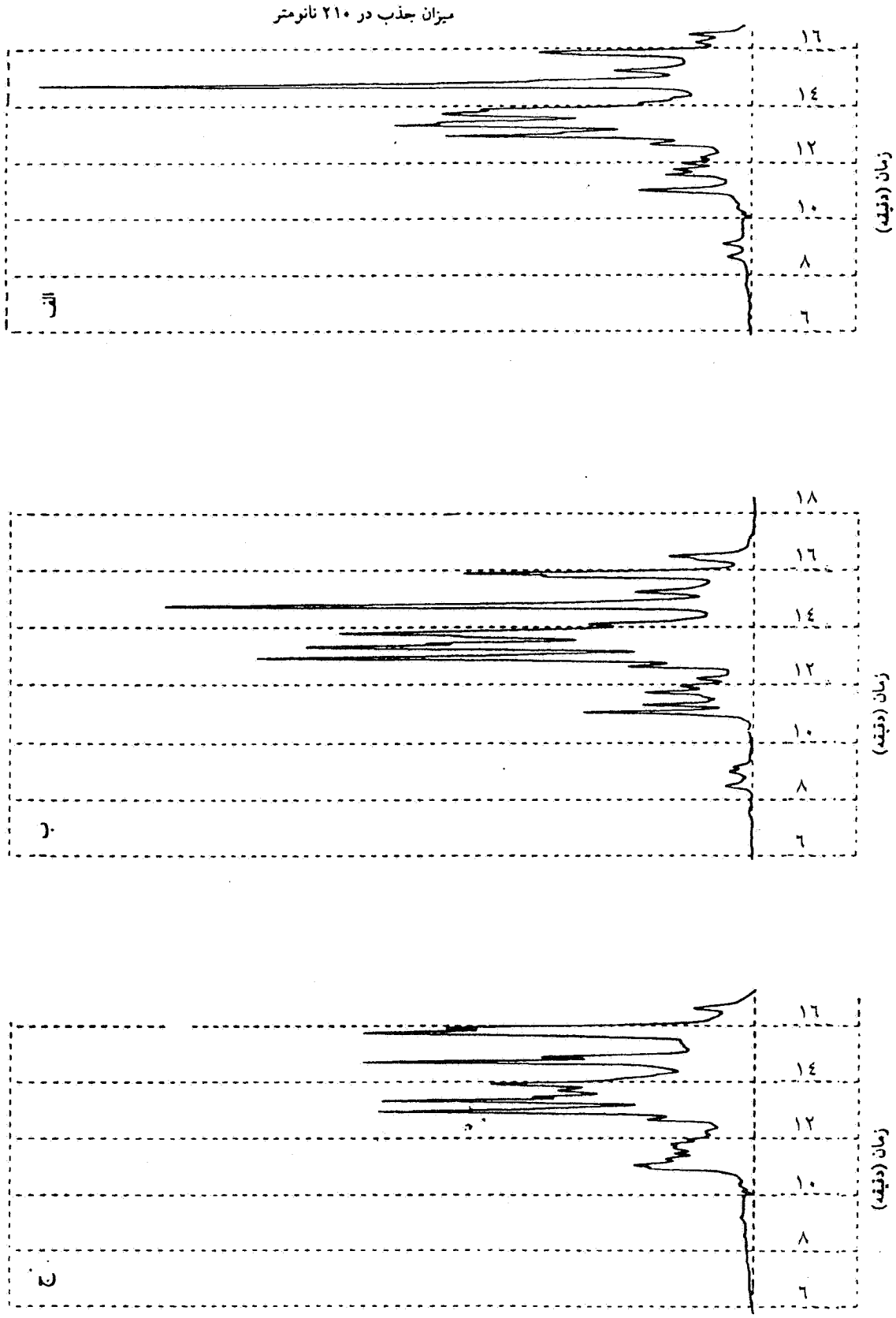
مشابه توضیحات فوق، در کروماتوگرام‌های ارقام سرداری و فلات (شکلهای ۲- ب و۲- ج) و سایر کروماتوگرام‌ها (گزارش نشده‌اند) نیز تفاوتهای کیفی و کمی قابل تشخیص بود، اما چنانچه ذکر شد، برای دقت و سهولت بیشتر از روشهای آماری استفاده گردید. با این حال با مقایسه کروماتوگرام‌ها می‌توان به مطالعات ژنتیکی نیز دست زد. در این رابطه، نکته قابل توجه، حالت غیر عادی کروماتوگرام فلات در ناحیه با زمان ماندگاری ۱۱ تا۱۲ دقیقه می‌باشد، که در این ناحیه سطح کروماتوگرام افزایش یافته است. بر اساس گزارش ویزر و همکاران (۳۰) افزایش مقدارنسبی ناحیه انتهایی گلیادین‌های امگا (امگا ۱و۲) ناشی از حضور سکالین‌های امگا می‌باشد. در حقیقت آب گریزی نزدیک برخی از سکالین‌ها و گلیادین‌های امگا باعث شده است که سطح کروماتوگرام در اثر حضور چند پلی پپتید نزدیک، بالا باقی بماند. همچنین این موضوع بین گلیادین‌های امگا و آلفا اختلاط ایجاد نموده است. با این وجود، برای شناسایی سکالین‌ها و تفکیک آنها از گلیادین‌های امگا و آلفا، نیاز به تجزیه تعداد زیادی نمونه حاوی بازوی کوتاه کروموزوم ۱ چاوداراست. بنابراین نتیجه‌گیری می‌شود که ژنوم رقم فلات دارای جابجایی بازوی کروموزوم ۱ چاودار(1RS) می‌باشد. این نتیجه باشجره رقم فلات که از لاین مکزیکی ویری-۲[1] مشتق شده است، مطابقت دارد. این خصوصیت در سایر کروماتوگرام‌های این مطالعه وجود نداشت. از این قابلیت RP-HPLC می‌توان با استفاده از لاین‌های آنیوپلوییید، محل کروموزومی پلی پپتیدهای گلیادین و گلوتنین را نیز تعیین نمود (۴، ۵و ۶).

شکل ۳ نمودار خوشه‌ای حاصل از تجزیه مقدار نسبی ۲۷ متغیر (پیک) RP-HPLC رادر ایزولاین‌های بهاره و پاییزه همراه با رقم شاهد(مارکوییس) نشان می‌دهد. مقدار ضریب همبستگی کوفنتیک برای این نمودار برابر ۰/۹۵ بود. رولف (۲۸) ضرایب همبستگی کوفنتیک بالای ۰/۹ را دارای برازش بسیار خوب و ضرایب زیر ۰/۷ را دارای برازش بسیار ضعیف می‌داند. رومزبرگ (۲۹) نیز معتقد است که ضرایب همبستگی ۰/۸ یا بیشتر از آن، بیانگر انحراف کم ماتریس کوفنتیگ از ماتریس فاصله بوده و لذاکارایی بالای روش تجزیه خوشه‌ای را نشان می‌دهد. بر این اساس قابلیت روش تجزیه خوشه‌ای برای ایزولاین‌ها بسیار خوب می‌باشد. در این شکل فاصله تشابه ۲۵ (کل مقیاس نمودار) برابر فاصله اقلیدسی ۱۹/۷۸ بود. بر مبنای مقایسه مقادیر D (فاصله اقلیدسی که در آن یک گروه تشکیل می‌گردد) در هر مرحله تجزیه خوشه‌ای نسبت به مرحله قبلی، مشخص شد که مقدار تغییرات D در مرحله ۹ معادل ۸/۴۹ برابر مرحله ۸ می‌باشد. بنابراین تعداد مطلوب گروه‌ها برابر با دو (معادل فاصله اقلیدسی ۱۱/۸) شناخته شد. بدین ترتیب کلیه ایزولاین‌های بهاره و پاییزه در یک گروه واقع شدند و مارکوییس نیز در گروه دیگری قرار گرفت. این موضوع نشان می‌دهد که ایزولاین‌های تحت مطالعه از لحاظ مکان ژنی Gli-۱ و Gli -۲ تفاوتهای زیادی ندارند، در حالی که در بخشهای بعدی نشان داده می‌شود که حتی انتخاب فاصله تشابه

1- Veery -2

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-09-21]

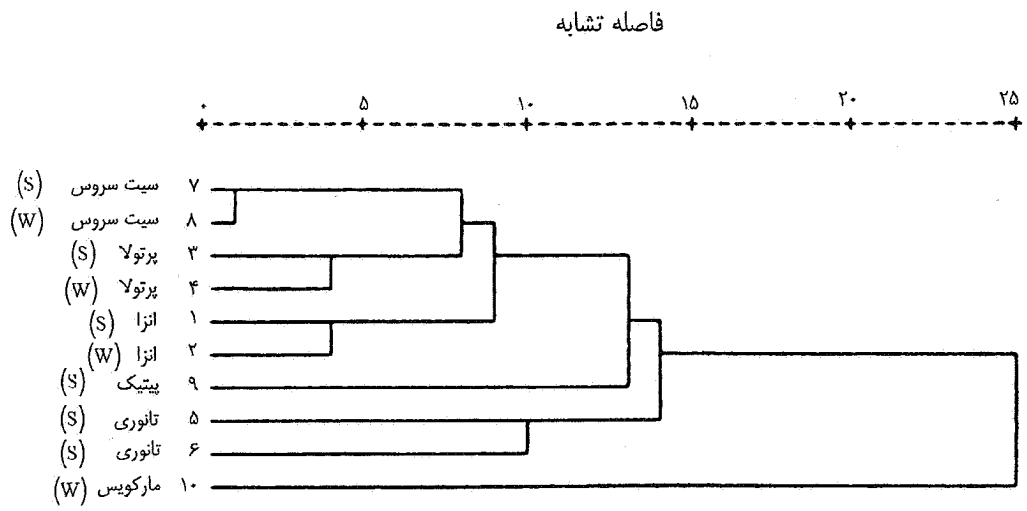
[DOR: 20.1001.1.22518517.1378.3.3.3.8]



شکل ۲ - کروماتوگرام پلی‌پپتیدهای گلیادین در: الف - لاین تانوری پاییزه، ب - رقم سرداری و ج - رقم فلات

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-09-21]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1378.3.3.3.8]



شکل ۳- نمودار خوشه‌ای حاصل از تجزیه پلی‌پپتیدهای گلیادین در ایزولاین‌های بهاره و پاییزه

۱۵، سایرارقام و ارقام بومی را به گروه‌های زیادی تقسیم می‌کند. البته این قضاوت بر اساس پلی پپتیدهای ۶ بازوی کروموزومی است، اما از آن جایی که گزارشهای موجود (۸ و ۱۰) بیانگر حساسیت و دقت فوق‌العاده این شاخصهای ژنتیکی می‌باشند، چند شکلی آنها را می‌توان نمودی از کل ژنوم دانست. در حقیقت ایزولاین‌های این مطالعه حاصل تلاقی والدین آنها بافنیکس (والد غیر دوره‌ای) و انجام دو تلاقی برگشتی با والد خود هستند. سپس در نسلهای در حال تفکیک برای خصوصیات بهاره و پاییزه انتخاب صورت گرفته است. این موضوع می‌تواند دلیلی بر شباهتهای این ژنوتیپ‌ها باشد.

شکل ۳ جداسازی مطلوبی را بین ژنوتیپ‌های بهاره و پاییزه ارائه نمی‌دهد، که این موضوع بر خلاف نتایج انود و همکاران (۱۳) و لوخارت و همکاران (۲۵) می‌باشد. هابنر و بیتز(۱۹) معتقدند که ارتباطات مشاهده شده توسط انود و همکاران (۱۳) ممکن است استثنایی باشد. با وجود این، عدم امکان تفکیک ژنوتیپ‌های بهاره و پاییزه در این مطالعه، در حالی که تفاوتهایی در برخی از اجزای دیر شستشو شونده آنها مشاهده گردید، می‌تواند دلایل دیگری نیز داشته باشد. اول این‌که زمینه ژنتیکی ارقام مورد مطالعه این پژوهشگران (۱۳و۲۵) بسیار متنوع بوده است، اما ژنوتیپ‌های این مطالعه به طوری که مشاهده شد، از زمینه ژنتیکی محدودی برخوردارند. به علاوه انود و همکاران (۱۳) و لوخارت و همکاران (۲۵) از ارقام تجارتی تولید شده در بهار و پاییز استفاده نموده‌اند، اما بذور ایزولاین‌های این مطالعه همگی حاصل کشت پاییزه هستند. از آن جایی که صرف نظر از زمینه ژنتیکی، شرایط محیطی نیز بر ترکیب پروتئین (به صورت کمی) مؤثر است (۱۹)، این نکته در تمایز ارقام بهاره و پاییزه می‌تواند از اهمیت قابل توجهی برخوردارباشد. همچنین این موضوع را می توان به موفقیت کم برنامه اصلاحی تولید این ایزولاین‌ها نسبت داد. در مجموع به نظر می‌رسد در صورت انتخاب ارقام تجارتی بهاره و پاییزه و با زمینه ژنتیکی نسبتاً متنوع، بتوان گروه بندی مطلوبی از آنها به‌دست آورد.

نتایج تجزیه مؤلفه‌های اصلی بر روی ۲۷ متغیر مورد نظر (جدول ۱) بیانگر توجیه ۱۷،۲۲،۳۴ و ۱۲ درصد از تغییرات داده‌های گلیادین، به ترتیب توسط مؤلفه‌های اصلی اول تا چهارم می‌باشد. بنابراین سه مؤلفه اصلی اول، ۷۳ درصد از تغییرات مکان ژنی ۱- Gli و۲- Gli را در ایزولاین‌ها توجیه می‌کنند. بر اساس همبستگی متغیرها با مؤلفه‌ها، مؤلفه اصلی اول پلی پپتیدهای با زمان ماندگاری ۹/۲۰۲، ۱۰/۱۵۰، ۱۱/۷۷۵، ۱۱/۹۴۱ و ۱۶/۴۵۸ را با پلی پپتیدهای با زمان

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-09-21]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1378.3.3.3.8]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1378.3.3.3.8]
[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-09-21]

جدول ۱- نتایج تجزیه مؤلفه‌های اصلی برای پلی‌پپتیدهای گلیادین در ایزولاین‌های بهاره و پاییزه

میانگین زمان ماندگاری (دقیقه)	نوع پلی‌پپتید	بردارهای ویژه				ضرایب همبستگی متغیرها با مؤلفه‌ها			
		مؤلفه اصلی اول	مؤلفه اصلی دوم	مؤلفه اصلی سوم	مؤلفه اصلی چهارم	مؤلفه اصلی اول	مؤلفه اصلی دوم	مؤلفه اصلی سوم	مؤلفه اصلی چهارم
۷/۶۵۸	امگا	۰/۱۱	-۰/۳۶	-۰/۰۴	۰/۱۲	۰/۳۳	-۰/۸۷**	-۰/۰۹	۰/۲۲
۸/۴۷۰	امگا	۰/۱۳	۰/۱۸	-۰/۲۸	۰/۱۳	۰/۳۹	۰/۴۳	-۰/۶۱	۰/۲۲
۸/۶۵۰	امگا	-۰/۱۱	-۰/۰۷	۰/۳۷	۰/۲۴	-۰/۳۳	-۰/۱۸	۰/۸۱**	۰/۴۳
۹/۰۳۱	امگا	۰/۱۲	-۰/۱۶	۰/۲۰	۰/۳۶	۰/۳۷	-۰/۳۸	۰/۴۴	-۰/۶۴*
۹/۲۰۲	امگا	-۰/۳۰	۰/۱۱	-۰/۰۶	-۰/۰۴	-۰/۹۱**	۰/۲۷	-۰/۱۳	-۰/۰۶
۹/۵۶۰	امگا	۰/۰۹	۰/۰۴	-۰/۰۴	۰/۴۴	۰/۲۷	۰/۱۰	-۰/۱۰	۰/۷۷**
۱۰/۱۵۰	امگا	-۰/۲۴	-۰/۰۰۴	۰/۰۱	۰/۰۹	-۰/۷۴*	-۰/۰۱	۰/۰۳	۰/۱۶
۱۰/۳۷۳	امگا	۰/۲۹	۰/۰۲	۰/۱۵	۰/۱۱	۰/۸۷**	۰/۰۵	۰/۳۲	۰/۱۹
۱۱/۰۱۸	امگا	۰/۲۸	۰/۰۷	۰/۱۸	-۰/۰۰۴	۰/۸۴**	۰/۱۶	۰/۳۸	-۰/۰۰۸
۱۱/۳۴۷	امگا یا آلفا	۰/۰۹	۰/۲۱	-۰/۲۴	۰/۲۵	۰/۲۶	۰/۵۰	-۰/۵۲	۰/۴۴
۱۱/۴۴۴	آلفا	۰/۰۸	۰/۰۵	۰/۴۱	-۰/۰۷	۰/۲۳	۰/۱۲	۰/۸۹**	-۰/۱۳
۱۱/۵۸۳	آلفا	۰/۰۶	-۰/۳۵	-۰/۱۲	-۰/۱۲	۰/۱۹	-۰/۸۵**	-۰/۲۶	-۰/۲۰
۱۱/۷۷۵	آلفا یا بتا	-۰/۲۲	۰/۰۹	-۰/۱۵	-۰/۱۵	-۰/۶۶*	۰/۲۲	-۰/۳۳	-۰/۲۶
۱۱/۹۴۱	آلفا یا بتا	-۰/۲۹	-۰/۱۲	-۰/۰۲	-۰/۰۳	-۰/۸۸**	-۰/۳۰	-۰/۰۴	-۰/۰۶
۱۲/۱۹۶	آلفا یا بتا	-۰/۰۹	۰/۲۹	۰/۱۹	۰/۱۴	-۰/۲۶	۰/۷۰*	۰/۴۱	۰/۲۵
۱۲/۶۴۶	آلفا یا بتا	۰/۲۱	۰/۲۸	۰/۰۱	۰/۰۹	۰/۶۴*	۰/۶۷*	۰/۰۲	۰/۱۵
۱۲/۹۳۱	بتا	۰/۲۸	-۰/۰۹	-۰/۰۳	۰/۰۶	۰/۸۶**	-۰/۲۱	-۰/۰۷	۰/۱۱
۱۳/۳۲۲	بتا	۰/۰۲	-۰/۰۹	-۰/۲۴	۰/۴۱	۰/۰۷	-۰/۲۱	-۰/۵۳	۰/۷۳*
۱۳/۷۷۵	بتا یا گاما	۰/۱۸	-۰/۲۳	-۰/۰۲	-۰/۲۰	۰/۵۴	-۰/۵۵	-۰/۰۵	-۰/۳۵
۱۴/۰۷۱	بتا یا گاما	۰/۰۸	۰/۲۷	۰/۰۰۹	-۰/۳۱	۰/۲۳	۰/۶۵*	۰/۰۲	-۰/۵۶
۱۴/۷۰۲	بتا یا گاما	۰/۲۵	۰/۰۹	۰/۰۳	-۰/۲۷	۰/۷۵*	۰/۲۲	۰/۰۶	-۰/۴۸
۱۵/۳۰۳	گاما	۰/۳۱	۰/۰۰۷	۰/۰۸	-۰/۱۳	۰/۹۳**	۰/۰۲	۰/۱۸	-۰/۲۳
۱۵/۷۱۳	گاما	۰/۰۳	۰/۳۰	۰/۲۸	۰/۰۷	۰/۰۸	۰/۷۳*	۰/۶۰	۰/۱۳
۱۵/۸۸۹	گاما	۰/۱۷	۰/۲۵	-۰/۲۵	-۰/۰۶	۰/۵۱	-۰/۵۹	-۰/۵۳	-۰/۱۱
۱۶/۱۸۰	گاما	۰/۰۷	-۰/۲۸	۰/۲۷	۰/۰۴	۰/۲۱	-۰/۶۸	۰/۵۹	۰/۰۶
۱۶/۳۵۵	گاما	۰/۱۴	۰/۲۱	-۰/۳۰	۰/۱۱	۰/۴۵	۰/۵۱	-۰/۶۶*	۰/۱۹
۱۶/۴۵۸	گاما	-۰/۳۱	۰/۰۸	۰/۰۹	۰/۰۹	-۰/۹۴**	-۰/۲۰	۰/۱۹	۰/۱۶
مقدار ویژه		۹/۲۲	۵/۷۹	۴/۷۰	۳/۱۳				
مقدار ویژه تجمعی (٪)		۳۴	۵۶	۷۳	۸۵				

* و ** - به ترتیب معنی‌دار در سطوح احتمال ۵ و ۱ درصد

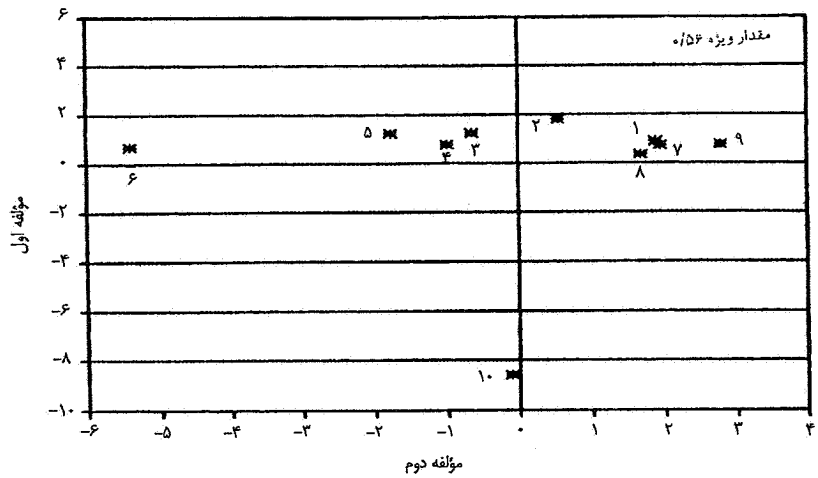
ماندگاری ۱۰/۳۷۳، ۱۱/۰۱۸، ۱۲/۶۴۶، ۱۲/۹۳۱، ۱۴/۷۰۲ و ۱۵/۳۰۳ مقایسه می‌نماید. به همین ترتیب مؤلفه اصلی دوم پیک‌های با زمان ماندگاری ۷/۶۵۸، ۱۱/۵۸۳ و ۱۶/۱۸ را با پیک‌های با زمان ماندگاری ۱۲/۱۹۶، ۱۲/۶۴۶، ۱۴/۰۷۱ و۱۵/۷۱۳ و مؤلفه اصلی سوم پیک‌های با زمان ماندگاری ۱۶/۳۵۵ را با پیک‌های با زمان ۸/۶۵۰ و ۱۱/۴۴۴ مقایسه می‌کند. مؤلفه اصلی چهارم نیز میانگینی وزنی از متغیرهای با زمان ماندگاری ۹/۰۳۱، ۹/۵۶۰ و۱۳/۳۲۲ می‌باشد. به عبارت دیگر متغیرهای با ضریب همبستگی مثبت و منفی در هر مؤلفه با یکدیگر مقایسه می‌شوند، به‌طوری که افزایش گروه باضریب همبستگی مثبت، همراه با کاهش گروه با ضریب همبستگی منفی بوده است و بر عکس. از آن جایی که همبستگی مقدار نسبی اکثر پلی پپتیدها با درصد پروتئین معنی دار نمی‌باشد (نتایج گزارش نشده‌است)، استنباط می‌شود که صرف نظر از کاهش یا افزایش درصد پروتئین، در برخی از ژنوتیپ‌ها روند کاهش یا افزایش پلی پپتیدهای مختلف یکسان نیست. بنابراین نوعی تنظیم تظاهر ژنی معکوس در بین ژن‌های سنتز پلی پپتیدهای مختلف گلیادین در ایزولاین‌ها وجود دارد، به نحوی که تغییر تظاهر ژن مربوط به یک پلی پپتید از ژنوتیپی به ژنوتیپ دیگر، بر روی تظاهر ژن مربوط به پلی پپتید دیگر به صورت معکوس اثر داشته است. این نتایج بر این موضوع اشاره دارند که همواره در هر ژنوتیپ تعداد معینی از ژن‌ها فعال هستند. اما نکته مهم، جستجوی پلی پپتیدهایی است که در زمینه‌های ژنتیکی مختلف همراه با یکدیگر وجود دارند، که این امکان به‌وسیله تجزیه مؤلفه‌های اصلی فراهم شده است. حال اگر این ارتباطات ویژه بین سنتز پلی پپتیدها که تحت کنترل ژنتیکی هستند(به‌ویژه که بسیاری از آنها شامل تغییرات کیفی هستند که توسط اثرات محیطی تعدیل نمی‌گردد)، قابل تعمیم به سایر ژنوتیپ‌ها باشند، در آن صورت انتخاب ژنوتیپ‌هایی که حاوی پلی پپتیدهای مطلوب بیشتر و پلی پپتیدهای نامطلوب کمتر(مثلا" از لحاظ کیفیت پلی پپتیدهای نشانگر و غیره) باشند، امکان‌پذیر خواهد بود. از آن جایی که این نتایج بر روی داده‌های مقادیر نسبی پلی پپتیدهایی به‌دست آمده‌است که در آنها اثرات کمی درصد پروتئین تقریبا" منتفی است(۲۷)، حتی در ژنوتیپ‌های با درصد پروتئین یکسان احتمال چنین گزینشی دور از انتظار نمی باشد. بدین ترتیب پس از شناسایی پلی پپتیدهای مطلوب می‌توان جهت ادغام برخی از آنها در ژنوتیپی خاص، به تلاقی بین ارقام مختلف اقدام نمود.

باتوجه به جدول ۱، مؤلفه‌های اصلی اول تا چهارم در قالب تقریبی ۱۴ پیک از مکان ژنی ۱- Gli و ۹ پیک از مکان ژنی ۲-Gli، هشتاد و پنج درصد از تغییرات داده‌ها را توجیه می‌کنند. بنابراین احتمالا" سهم مکان ژنی ۱- Gli در تنوع ژنتیکی کل ایزولاین‌ها، نسبت به مکان ژنی ۲- Gli اندکی بیشتر است. همچنین تعداد بیشترپلی پپتیدهای مربوط به مکان ژنی ۱- Gli (گلیادین‌های امگا و گاما) دلیل دیگری بر این ادعاست. نمودار حاصل از رسم مؤلفه‌های اصلی اول و دوم (شکل۴) در ایزولاین‌های بهاره و پاییزه، بیانگرامکان طبقه‌بندی ژنوتیپ‌ها با استفاده از روش تجزیه مؤلفه‌های اصلی است. همان طوری که مشاهده می‌شود کلیه ایزولاین‌ها در یک بخش از نمودار و رقم مارکوییس در ناحیه‌ای دیگر قرار گرفته‌اند. این نتیجه با تعداد مطلوب گروه در روش تجزیه خوشه‌ای (شکل ۳) و گزارش لوخارت و همکاران (۲۵) برای کاربرد روش تجزیه مؤلفه‌های اصلی در طبقه بندی ژنوتیپ ها مطابقت دارد.

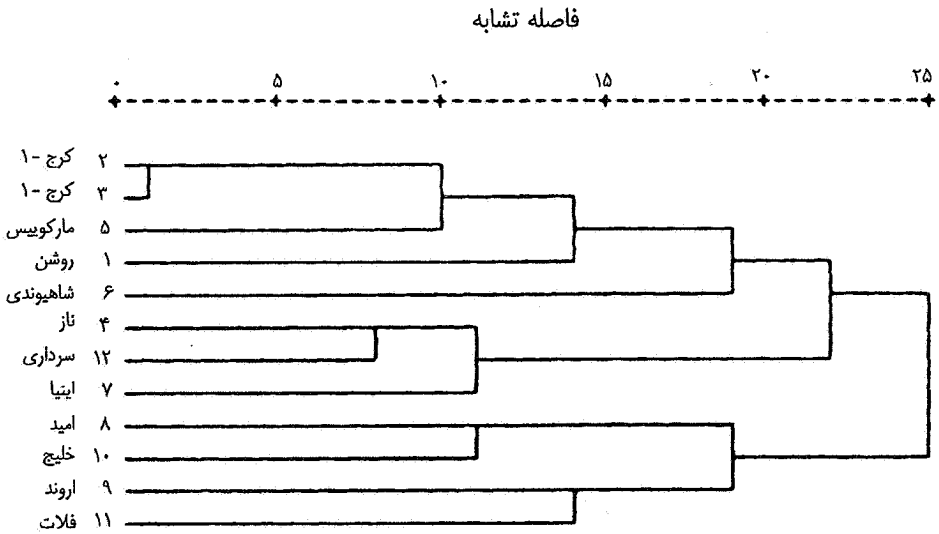
نمودار خوشه‌ای حاصل از تجزیه مقدار نسبی ۲۴ پیک RP-HPLC در ارقام زراعی ایران همراه با اینیا و رقم شاهد مارکوییس (شکل ۵) بیانگر اختلافات ژنتیکی بیشتر این ارقام در مقایسه با ایزولاین‌ها (شکل ۳) می‌باشد. مقدار ضریب همبستگی کوفنتیک برای این نمودار برابر ۰/۸۴ بود. بنابراین قابلیت روش UPGMA برای ارقام زراعی خوب می‌باشد. دراین شکل فاصله تشابه ۲۵ برابر با فاصله اقلیدسی ۲۲/۵۴ بود و بر اساس بررسی تغییرات مقادیرD، تعداد مطلوب گروه‌ها برابر با ۵ تشخیص داده شد. بنابراین با انتخاب فاصله تشابه تقریبی ۱۴/۸ تا۱۶/۵ (معادل فاصله اقلیدسی ۱۳/۶ تا۱۷/۱) پنج گروه: ۱)کرج -۱، مارکوییس و روشن؛ ۲) شاهیوندی؛ ۳) ناز،

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-09-21]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1378.3.3.3.8]



شکل ۴- نمودار حاصل از رسم مؤلفه اصلی اول و دوم درایزولاین‌های بهاره و پاییزه. ژنوتیپ‌ها عبارتند از: ۱- انزای بهاره، ۲- انزای پاییزه، ۳- پورتولای بهاره، ۴- پورتولای پاییزه، ۵- تانوری بهاره، ۶- تانوری پاییزه، ۷- سیت سروس بهاره، ۸- سیت سروس پاییزه، ۹- پیتیک بهاره و ۱۰- مارکوییس

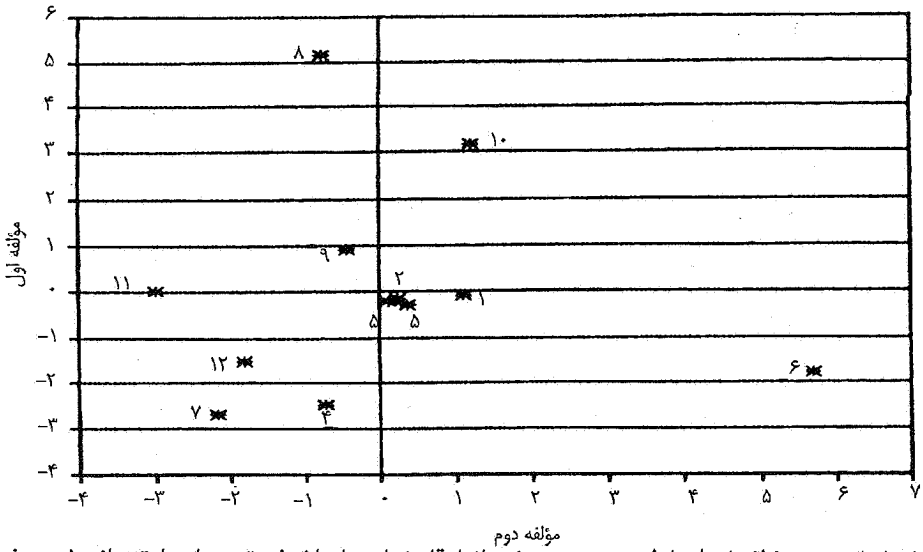


شکل ۵- نمودار خوشه‌ای حاصل از تجزیه پلی‌پپتیدهای گلیادین در برخی از ارقام زراعی ایران. کرج -۱ دو مرتبه تکرار شده‌است.

سرداری، و اینیا؛ ۴) امید و خلیج؛ و۵) اروندوفلات تشکیل می‌گردد. رقم کرج-۱، که از تلاقی روشن و رقمی خارجی به‌دست آمده است، با روشن ومارکوییس دریک گروه قرارگرفتند. بنابراین شباهتهای کرج -۱ و روشن با شجره آنها مطابقت دارد و مارکوییس، که گندمی کانادایی است، شباهتهای قابل ملاحظه‌ای با دو رقم ایرانی نشان می‌دهد. شاید این موضوع به تلاقی اولیه‌ای که کرج-۱ از آن به‌دست آمده است مربوط باشد. شاهیوندی (گندم دوروم) فقط دارای ۱۴ پیک از ۲۴ پیک بود که این موضوع به علت فقدان ژنوم D در این ژنوتیپ و به عبارت دیگر از دست رفتن یک سوم ژن‌های مسؤول سنتز اجزای گلیادین‌ها می‌باشد. با وجود این، نسبت دادن کلیه ۱۰ پلی پپتید حذف شده به ژنوم D منطقی به نظر نمی‌رسد، زیراممکن است تعدادی از آنها به تفاوتهای کیفی معمولی در مکانهای ژنی کروموزوم‌های ۱A،۱B،۶Aو۶B مربوط باشند.

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-09-21]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1378.3.3.3.8]



شکل ۶- نمودار حاصل از رسم مؤلفه اصلی اول و دوم در برخی از ارقام زراعی ایران. ژنوتیپ‌ها عبارتند از: ۱- روشن، ۲-کرج - ۱، ۳-کرج - ۱، ۴- ناز، ۵- مارکوییس، ۶- شاهیوندی، ۷- اینیا، ۸- امید، ۹- اروند، ۱۰- خلیج، ۱۱- فلات و ۱۲- سرداری

در گروه سوم، ناز و اینیا هر دو گندمهای مکزیکی هستند که در یک گروه قرار گرفتند و سرداری، که از توده‌های بومی غرب کشور انتخاب شده است، شباهتهای ژنتیکی با این دو رقم (به‌خصوص ناز) دارد. شباهتهای امید و خلیج، که از توده محلی ساوه و زابل گزینش شده‌اند، با پراکنش جغرافیایی آنها مطابقت ندارد. اروند از تلاقی گندم روشن و گندمی مکزیکی به‌دست آمده است و فلات نیز یکی از مشتقات رقم مکزیکی ویری-۲ می‌باشد. بنابراین شباهتهای این دو رقم احتمالاً با شجره آنها در ارتباط است.

نتایج مؤلفه‌های اصلی بر روی ۲۴ متغیرنشان داد که به ترتیب ۲۱، ۲۰، ۱۷ و۱۲ درصد از تغییرات مکانهای ۱- Gli و ۲-Gli در این ارقام توسط مؤلفه‌های اصلی اول تا چهارم توجیه می‌گردد (جدول ۲). این نتیجه در مقایسه با نتایج تجزیه ایزولاین‌ها (جدول۱) و گزارش لوخارت و همکاران (۲۵)، ضمن تایید نتایج تجزیه خوشه‌ای، بیانگر تنوع ژنتیکی بیشتر بین ارقام زراعی نسبت به ایزولاین‌های مورد بررسی می‌باشد. به عبارت دیگرباکاهش شباهتها، همبستگی بین پلی پپتیدهای گلیادین کاهش یافته ودرنتیجه مؤلفه‌ها درصدکمتری از تغییرات کل را توجیه می‌کنند. توجیه قبلی که در مورد ایزولاین‌ها برای پلی‌پپتیدهای با ضریب همبستگی مثبت ومنفی معنی دار در هر مؤلفه ارائه گردید، در این‌جا نیز صادق است. ازطرف دیگر بر خلاف جدول ۱، در این ارقام ۷ پلی پپتید از مکان ژنی ۱ - Gli و ۱۰ پلی پپتیدازمکان ژنی ۲- Gli هفتاد درصد از تغییرات داده‌ها را توجیه می‌کنند. بدین ترتیب براساس ۷۰ درصد از تغییرات داده‌ها، سهم مکان ژنی ۲- Gli (بازوی کوتاه کروموزوم ۶) در تغییرات داده‌ها کمی بیشتر از مکان ژنی ۱- Gli (بازوی کوتاه کروموزوم ۱) است. نمودار مؤلفه‌های اصلی اول و دوم (شکل ۶) توزیع مناسبی از پراکنش این ارقام را به‌دست می‌دهد، که با نتایج تجزیه خوشه‌ای مطابقت دارد. با وجود این، از آن جایی که مؤلفه‌های اول و دوم فقط ۴۱ درصد از تغییرات کل داده‌ها را توجیه می‌کنند، گروه‌بندی نسبتاً دقیق حاصل از نمودار آنها، بیانگر کارایی بالای روش تجزیه مؤلفه‌های اصلی و قابلیت آن در تفکیک ژنوتیپ‌ها می‌باشد.

شکل ۷ نمودار خوشه‌ای حاصل از تجزیه ۳۰ پلی‌پپتید RP-HPLC را در ارقام بومی نشان می‌دهد. در تهیه کروماتوگرام‌های ارقام سفید بافقی، و قرمز بافقی از تجزیه تک بذر و برای بقیه ژنوتیپ ها از آرد حاصل از ۵ بذر تصادفی (مشابه سایر تجزیه‌های این مطالعه) استفاده شد. ضریب

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-09-21]

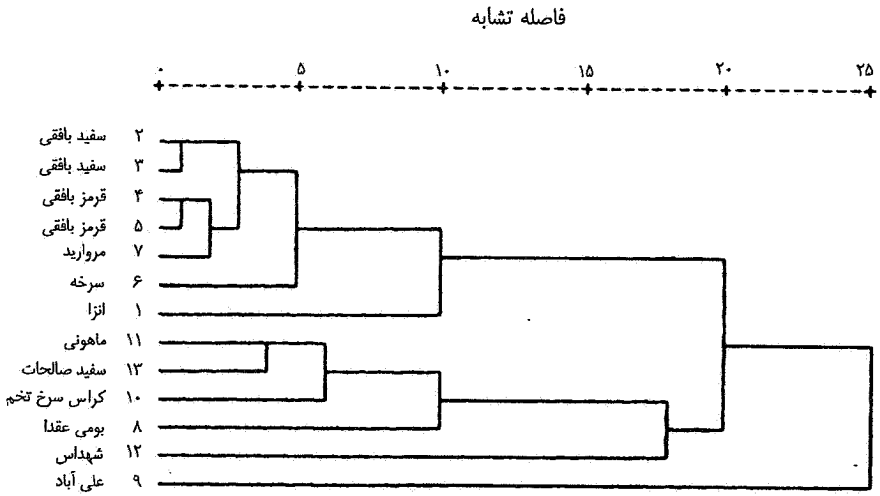
[DOR: 20.1001.1.22518517.1378.3.3.3.8]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1378.3.3.3.8] [Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-09-21]

جدول ۲- نتایج تجزیه مؤلفه‌های اصلی برای پلی‌پپتیدهای گلیادین در برخی از ارقام زراعی ایران

میانگین زمان ماندگاری (دقیقه)	نوع پلی‌پپتید	بردارهای ویژه				ضرایب همبستگی متغیرها با مؤلفه‌ها			
		مؤلفه اصلی اول	مؤلفه اصلی دوم	مؤلفه اصلی سوم	مؤلفه اصلی چهارم	مؤلفه اصلی اول	مؤلفه اصلی دوم	مؤلفه اصلی سوم	مؤلفه اصلی چهارم
۸/۴۷۰	امگا	۰/۱۸	-۰/۰۸	۰/۲۵	۰/۱۰	۰/۴۰	-۰/۱۷	۰/۵۰	۰/۱۶
۹/۰۳۱	امگا	-۰/۱۳	۰/۰۳	۰/۱۴	۰/۲۴	-۰/۲۹	۰/۰۶	۰/۲۸	۰/۴۱
۹/۲۰۲	امگا	۰/۳۴	۰/۱۲	۰/۰۰۸	۰/۱۳	۰/۷۹**	۰/۲۶	۰/۰۲	۰/۲۳
۱۰/۳۷۳	امگا	۰/۱۹	۰/۲۳	-۰/۱۴	۰/۲۰	۰/۴۳	۰/۵۱	۰/۲۷	۰/۳۴
۱۰/۹۲۳	امگا	۰/۳۲	۰/۰۴	۰/۱۸	-۰/۲۳	۰/۷۱**	۰/۱۰	۰/۳۶	-۰/۴۰
۱۱/۰۱۸	امگا	-۰/۱۸	-۰/۱۴	-۰/۳۱	۰/۲۲	-۰/۴۱	-۰/۳۰	-۰/۶۳*	۰/۳۸
۱۱/۲۵۲	امگا یا آلفا	-۰/۰۸	-۰/۱۷	۰/۲۷	۰/۳۶	-۰/۱۸	-۰/۳۸	۰/۵۵	۰/۶۲*
۱۱/۴۴۴	آلفا	-۰/۰۳	۰/۳۷	-۰/۰۷	-۰/۱۳	-۰/۰۷	۰/۸۲**	-۰/۱۳	-۰/۲۲
۱۱/۶۷۹	آلفا یا بتا	-۰/۲۱	-۰/۱۵	-۰/۲۳	-۰/۱۷	-۰/۴۸	-۰/۳۴	-۰/۴۶	-۰/۳۰
۱۱/۹۴۱	آلفا یا بتا	-۰/۰۲	۰/۲۹	-۰/۱۵	۰/۲۹	-۰/۰۴	۰/۶۴**	۰/۳۰	۰/۵۰
۱۲/۱۹۶	آلفا یا بتا	-۰/۰۱	۰/۳۳	-۰/۱۲	-۰/۰۵	-۰/۰۲	۰/۷۲**	-۰/۲۴	-۰/۰۸
۱۲/۴۲۰	آلفا یا بتا	-۰/۱۳	-۰/۰۳	۰/۲۵	-۰/۰۰۹	-۰/۲۹	-۰/۰۶	-۰/۵۱	-۰/۰۲
۱۲/۶۴۶	آلفا یا بتا	۰/۱۱	-۰/۳۴	۰/۱۷	۰/۰۵	۰/۲۵	-۰/۷۴**	۰/۳۴	۰/۰۸
۱۲/۹۳۱	بتا	-۰/۱۶	۰/۰۲	-۰/۲۱	-۰/۲۴	-۰/۳۶	۰/۰۴	-۰/۴۲	-۰/۴۲
۱۳/۳۲۲	بتا	-۰/۱۶	-۰/۳۱	۰/۰۴	-۰/۲۲	-۰/۳۷	-۰/۷۰*	۰/۰۸	۰/۳۸
۱۳/۶۷۹	بتا یا گاما	۰/۳۹	-۰/۰۵	-۰/۱۱	۰/۱۹	۰/۸۹**	-۰/۱۰	-۰/۲۲	۰/۳۳
۱۳/۷۷۵	بتا یا گاما	-۰/۳۲	۰/۱۴	۰/۱۵	۰/۱۴	-۰/۷۲**	-۰/۳۰	۰/۳۰	۰/۲۴
۱۳/۹۰۷	بتا یا گاما	۰/۲۹	-۰/۱۵	-۰/۳۲	۰/۱۱	۰/۶۵*	-۰/۳۳	-۰/۶۳*	۰/۱۹
۱۴/۰۷۱	بتا یا گاما	-۰/۱۶	-۰/۰۶	۰/۳۶	-۰/۲۵	-۰/۳۷	-۰/۱۴	۰/۷۲**	-۰/۴۳
۱۴/۷۰۲	بتا یا گاما	-۰/۱۷	-۰/۲۰	-۰/۰۱	۰/۲۵	-۰/۳۹	-۰/۴۴	-۰/۰۳	۰/۴۳
۱۴/۹۰۹	گاما	۰/۲۳	۰/۰۵	۰/۱۹	-۰/۳۸	۰/۵۳	۰/۱۱	۰/۳۹	-۰/۶۶*
۱۵/۲۰۷	گاما	-۰/۱۳	۰/۲۸	۰/۲۸	۰/۱۸	-۰/۲۹	۰/۶۲*	۰/۵۶	۰/۳۲
۱۵/۸۸۹	گاما	۰/۲۵	-۰/۱۹	۰/۲۹	-۰/۰۰۸	۰/۵۷	-۰/۴۲	۰/۵۸*	-۰/۰۱
۱۶/۲۵۲	گاما	-۰/۰۶	۰/۳۲	۰/۰۶	-۰/۱۶	-۰/۱۴	۰/۷۰*	۰/۱۲	-۰/۲۷
مقدار ویژه		۵/۱۳	۴/۸۶	۴/۰۵	۲/۹۶				
مقدار ویژه تجمعی (%)		۲۱	۴۱	۵۸	۷۰				

* و ** - به ترتیب معنی‌دار در سطوح احتمال ۵ و ۱ درصد



شکل ۷- نمودار خوشه‌ای حاصل از تجزیه پلی‌پپتیدهای گلیادین در ارقام بومی

همبستگی کوفنتیک برای این نمودار برابر ۰/۹۵ بود. بنابراین قابلیت تجزیه خوشه‌ای بسیار خوب بوده است. با توجه به مقیاس فاصله تشابه کل (۳۷/۳)، بذور اول و دوم گندم سفید بافقی در فاصله اقلیدسی ۸/۱۱ و بذور اول و دوم گندم قرمز بافقی در فاصله اقلیدسی ۸/۷۵ در یک گروه قرار گرفتند. این فاصله تقریباً ۴ برابر فاصله سیت سروس بهاره با پاییزه و ۲ برابر فاصله انزای بهاره با پاییزه و پورتولای بهاره با پاییزه در شکل ۳ و تقریباً برابر فاصله ارقام ناز و سرداری در شکل ۴ می‌باشد. بنابراین، نتایج مقدماتی اخیر حداقل بیانگر احتمال وجود تنوع در داخل گندمهای سفید و قرمز بافقی می‌باشد، اگر چه برای مطالعه تنوع درون ارقام، حداقل باید ۱۰ تا ۲۰ بذر را تجزیه نمود.

بر اساس بررسی مقادیر D، تعداد مطلوب گروه‌ها برای این دسته از ژنوتیپ‌ها برابر با ۴ تشخیص داده شد. این انتخاب تقریباً معادل فاصله اقلیدسی ۱۹/۷ تا۲۹ می‌باشد، درحالی‌که در ارقام زراعی با انتخاب فاصله اقلیدسی ۱۳/۶ تا ۱۷/۱ پنج گروه تشکیل گردید. برای مقایسه این دوگروه از ژنوتیپ‌ها در این‌جا نیز فاصله اقلیدسی ۱۵ تا۱۹ (معادل فاصله تشابه ۶ تا ۱۰) انتخاب شد. براین اساس شش گروه شامل:۱) دو نمونهٔ سفید بافقی، دو نمونه قرمز بافقی، مروارید و سرخه احمدآباد؛ ۲) انزا؛ ۳) ماهونی، سفیدصالحات وکراس سرخ تخم؛ ۴) عقدا؛ ۵) شهداس و ۶) علی آباد تشکیل گردید. باتوجه به این‌که به غیر از انزا(رقم شاهد)، شهداس و سفید صالحات بقیه ژنوتیپ ها ارقام بومی استان یزد هستند، نتیجه‌گیری می‌شود که بین مناطق جغرافیایی با تفاوتهای ژنتیکی ارقام بومی مطابقت چندانی وجود ندارد. به‌طوری که تفاوتهای ژنتیکی ارقام بومی، بیشترازاختلافات جغرافیایی آنهاست. دراین بین رقم علی آباد تفاوتهای ژنتیکی فوق العاده‌ای بابقیه ارقام بومی دارد و در مرحله بعدی گندم عقدا قرار می‌گیرد. در مجموع، نتایج بیانگر وجود تنوع ژنتیکی در ارقام بومی می‌باشد.

نتایج تجزیه مؤلفه‌های اصلی بر روی داده‌های گلیادین در ارقام بومی (۳۰ پیک)، بیانگرتوجیه ۴۰،۱۳،۱۱ و ۹ درصد از تغییرات داده‌ها، به ترتیب توسط مؤلفه‌های اصلی اول تا چهارم می‌باشد(جدول ۳). بنابراین چهار مؤلفه اصلی ۷۳ درصد از تغییرات داده‌ها را توجیه می‌کنند. این مقدار در مقایسه با ایزولاین‌ها(۸۵ درصد)، مجدداً بیانگر بیشتر بودن تنوع ژنتیکی این مواد است، اما این مقدار اندکی کمتر از نتایج ارقام زراعی (۷۰ درصد) می‌باشد. درتجزیه مؤلفه‌های اصلی و تجزیه خوشه‌ای، نمونه‌های حاصل از تجزیه تک بذر (سفید بافقی و قرمز بافقی) دخالت داده شده‌اند، که احتمالاً یکی از دلایل افزایش توجیه مؤلفه اصلی اول، همین مسأله است. در ارقام

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-09-21]

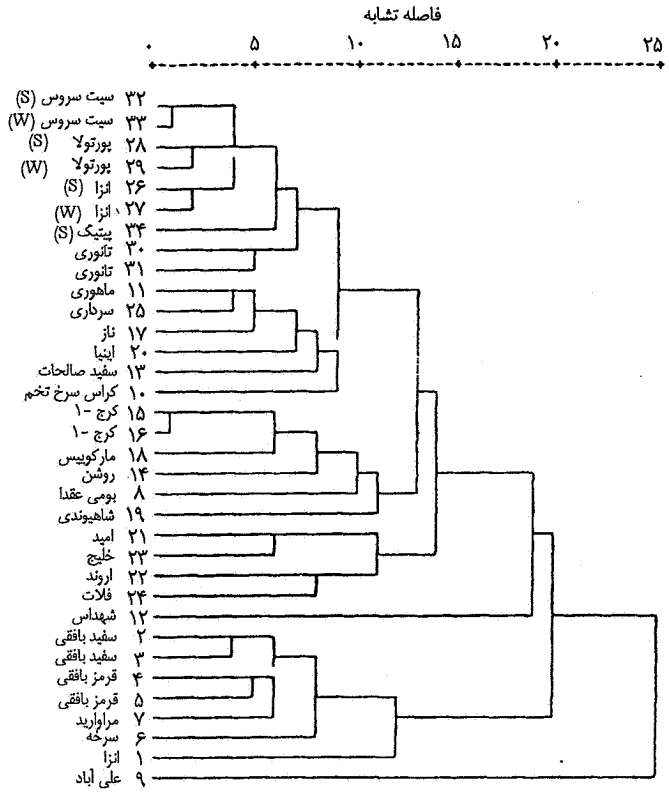
[DOR: 20.1001.1.22518517.1378.3.3.3.8]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1378.3.3.3.8]
[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-09-21]

جدول ۳- نتایج تجزیه مؤلفه‌های اصلی برای پلی‌پپتیدهای گلیادین در ارقام بومی

میانگین زمان ماندگاری (دقیقه)	نوع پلی‌پپتید	بردارهای ویژه				ضرایب همبستگی متغیرها با مؤلفه‌ها			
		مؤلفه اصلی اول	مؤلفه اصلی دوم	مؤلفه اصلی سوم	مؤلفه اصلی چهارم	مؤلفه اصلی اول	مؤلفه اصلی دوم	مؤلفه اصلی سوم	مؤلفه اصلی چهارم
۸/۴۷	امگا	۰/۱۱	۰/۱۵	۰/۲۲	۰/۴۰	۰/۳۹	۰/۳۰	۰/۴۰	۰/۶۴*
۸/۸۵۲	امگا	۰/۱۲	۰/۰۵	۰/۱۶	۰/۴۵	۰/۴۲	۰/۱۱	۰/۳۰	۰/۷۳**
۹/۰۳۱	امگا	-۰/۰۳	۰/۳۴	-۰/۱۰	۰/۱۲	-۰/۱۰	۰/۶۷*	-۰/۱۷	۰/۲۰
۱۰/۷۲۹	امگا	۰/۲۵	۰/۱۵	۰/۱۲	۰/۰۳	۰/۸۷**	۰/۳۰	۰/۲۲	۰/۰۵
۱۰/۸۴۷	امگا	-۰/۲۶	-۰/۰۳	-۰/۰۲	-۰/۰۴	-۰/۸۹**	-۰/۰۶	-۰/۰۵	-۰/۰۶
۱۰/۹۲۳	امگا	۰/۱۷	۰/۰۵	۰/۰۵	-۰/۴۲	۰/۶۱*	۰/۱۰	۰/۱۰	-۰/۶۹**
۱۱/۰۱۸	امگا	-۰/۱۶	-۰/۲۲	۰/۱۰	۰/۳۳	-۰/۵۵	-۰/۴۳	۰/۱۸	۰/۵۴
۱۱/۲۵۲	امگا یا آلفا	-۰/۱۷	-۰/۲۷	۰/۲۲	-۰/۰۱	-۰/۵۸*	-۰/۵۳	۰/۴۱	-۰/۰۲
۱۱/۳۴۷	آلفا	۰/۱۳	-۰/۰۴	-۰/۱۵	-۰/۱۷	۰/۴۷	-۰/۰۷	-۰/۳۰	-۰/۲۷
۱۱/۶۷۹	آلفا یا بتا	-۰/۰۳	-۰/۱۰	۰/۱۷	-۳۴	-۰/۱۰	-۰/۱۹	۰/۳۱	-۰/۵۵
۱۱/۸۶۱	آلفا یا بتا	۰/۰۹	-۰/۲۳	-۰/۱۸	۰/۱۵	۰/۳۲	-۰/۴۵	-۰/۳۳	۰/۲۵
۱۱/۹۴۱	آلفا یا بتا	-۰/۲۰	۰/۰۲	۰/۲۰	-۰/۰۵	-۰/۶۹**	۰/۰۳	۰/۳۷	-۰/۰۸
۱۲/۰۵۲	آلفا یا بتا	۰/۲۳	-۰/۱۸	-۰/۰۸	۰/۱۷	-۰/۸۱**	-۰/۳۵	-۰/۱۴	۰/۲۷
۱۲/۱۹۶	آلفا یا بتا	-۰/۲۶	۰/۱۱	۰/۰۸	-۰/۰۰۷	-۰/۹۲**	۰/۲۱	۰/۱۵	-۰/۰۱
۱۲/۶۴۶	آلفا یا بتا	-۰/۱۸	-۰/۲۱	۰/۲۲	۰/۰۳	-۰/۶۳*	-۰/۴۰	۰/۳۹	۰/۰۵
۱۲/۸۲۰	بتا	۰/۲۴	-۰/۲۱	-۰/۱۲	-۰/۰۹	۰/۸۵**	-۰/۴۱	-۰/۲۳	-۰/۱۵
۱۲/۹۳۱	بتا	-۰/۲۷	۰/۱۴	-۰/۰۱	-۰/۰۳	-۰/۹۴**	۰/۲۸	-۰/۰۲	-۰/۰۵
۱۳/۱۹۶	بتا	۰/۲۲	-۰/۱۱	-۰/۱۶	-۰/۰۰۹	۰/۷۷**	-۰/۲۱	-۰/۳۰	-۰/۰۱
۱۳/۳۲۲	بتا	-۰/۲۲	-۰/۰۲	۰/۱۲	-۰/۰۸	-۰/۷۵**	-۰/۰۴	۰/۲۲	-۰/۱۳
۱۳/۳۹۱	بتا یا گاما	۰/۲۲	۰/۰۵	۰/۰۴	۰/۰۰۸	۰/۷۶**	۰/۱۰	۰/۰۷	۰/۰۱
۱۳/۵۶۰	بتا یا گاما	۰/۲۲	۰/۱۵	۰/۲۰	۰/۰۵	۰/۷۸**	۰/۳۰	۰/۳۷	۰/۰۸
۱۳/۷۷۵	بتا یا گاما	-۰/۰۳	۰/۰۴	۰/۴۴	-۰/۱۳	-۰/۱۲	۰/۰۷	۰/۸۰**	-۰/۲۱
۱۴/۰۷۱	بتا یا گاما	۰/۰۳	-۰/۴۵	-۰/۱۱	۰/۱۱	۰/۰۹	-۰/۸۷*	-۰/۱۹	۰/۱۶
۱۴/۷۰۲	بتا یا گاما	۰/۰۸	۰/۰۵	۰/۳۳	-۰/۱۰	۰/۲۹	۰/۱۰	۰/۶۰*	-۰/۱۷
۱۵/۰۹۶	گاما	۰/۲۷	۰/۰۸	۰/۰۶	-۰/۱۶	۰/۹۳**	۰/۱۶	۰/۱۱	-۰/۲۶
۱۵/۲۰۷	گاما	-۰/۲۲	۰/۲۳	-۰/۱۵	۰/۰۴	-۰/۷۸**	۰/۴۴	-۰/۲۸	۰/۰۷
۱۵/۷۹۱	گاما	۰/۱۸	۰/۱۱	۰/۳۲	۰/۰۶	۰/۶۳*	۰/۲۱	۰/۵۷	۰/۱۰
۱۵/۸۸۹	گاما	-۰/۱۸	-۰/۱۹	-۰/۰۲	۰/۰۱	-۰/۶۳*	-۰/۳۷	-۰/۰۳	۰/۰۲
۱۶/۲۵۲	گاما	-۰/۱۰	۰/۲۹	-۰/۳۰	-۰/۰۹	-۰/۳۴	۰/۵۷*	-۰/۵۵	-۰/۲۶
۱۶/۴۵۸	گاما	-۰/۰۶	۰/۲۴	-۰/۱۴	۰/۲۰	-۰/۲۱	۰/۴۶	-۰/۱۵	۰/۳۳
مقدار ویژه		۱۲/۱۷	۳/۸۰	۳/۳۱	۲/۶۵				
مقدار ویژه تجمعی (%)		۴۰	۵۳	۶۴	۷۳				

* و ** - به ترتیب معنی‌دار در سطوح احتمال ۵ و ۱ درصد



شکل ۸- نمودار خوشه‌ای حاصل از تجزیه پلی‌پپتیدهای گلیادین در کلیه ژنوتیپ‌های مورد مطالعه

بومی برخلاف ژنوتیپ‌های قبلی، سهم مکانهای ژنی ۱- Gli و ۲- Gli درتغییرات داده‌ها تقریبا" یکسان می‌باشد. در ضمن توجیه‌های قبلی در مورد متغیرهایی که در هر مؤلفه با یکدیگر مقایسه می‌شوند، در این‌جا نیز صادق است. مسأله قابل توجه پلی پپتیدهایی هستندکه درمؤلفه اصلی اول باهم مقایسه می‌گردند. کلیه پلی پپتیدهایی که با مؤلفه اصلی اول همبستگی مثبت و معنی دار دارند، در ارقام زراعی یا ایزولاین‌ها (جداول ۲و۱) وجود ندارند (تجزیه پلی پپتید با زمان ماندگاری ۱۰/۹۲۳ در ارقام زراعی نیز وجود دارد). درحالی‌که از بین پلی پپتیدهایی که با این مؤلفه همبستگی منفی ومعنی داردارند، ۶ پلی پپتید در کلیه ژنوتیپ‌های تحت مطالعه حضور دارند. این موضوع نشان می‌دهد که اگر برخی از پلی پپتیدهای جدیدازنظر پژوهشگر مفید باشند، انتخاب برای آنها منجر به کاهش (یا حذف) برخی از پلی پپتیدهای متداول‌تر خواهد شد. به‌عبارت دیگر، انتخاب ژنوتیپی حاوی پلی پپتید جدید، بر روی سایر پلی پپتیدها نیز اثر خواهد داشت، زیرا در هر ژنوتیپ همواره تعداد معینی از مکانهای ژنی فعال هستند. در ارقام بومی نیزمثل ژنوتیپ‌های قبلی، رسم مؤلفه‌های اصلی اول و دوم و اول و سوم با نتایج تجزیه خوشه‌ای مطابقت داشت (شکلها گزارش نشده‌اند).

شکل ۸ نمودارخوشه‌ای حاصل ازتجزیه پلی پپتیدهای گلیادین را در کلیه ژنوتیپ ها نشان می‌دهد. این شکل حاصل تجزیه ۴۷ پلی پپتید می‌باشد که از این تعداد۱۲ پلی پپتید در سه گروه، ۱۰ پلی پپتیددردوگروه و۲۵ پلی پپتیدبقیه فقط در یک گروه از ژنوتیپ‌ها(ایزو لاین‌ها، ارقام زراعی یا بومی) وجود داشتند. دراین شکل نیز نمونه‌های تکراری سفید و قرمز بافقی و

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-09-21]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1378.3.3.3.8]

تزریق مجدد کرج -۱ (به منظور کنترل)، به طور مجزادرتجزیه آورده شده‌اند. ضریب همبستگی کوفنتیک برای این نمودار برابر ۰/۸۲ بود که بیانگر کارایی خوب روش تجزیه خوشه‌ای می‌باشد. با انتخاب فواصل اقلیدسی ذکر شده در شکلهای ۳،۴ و ۷ و توجه به مقیاس واقعی نمودار (فاصله اقلیدسی ۳۹/۷۵)، همان گروه‌های قبلی تشکیل گردیدند. در مجموع با انتخاب فاصله اقلیدسی ۱۵، تعداد ۱۱ گروه به شرح زیر تشکیل شد: ۱) ایزولاین‌ها؛۲) ماهونی، سرداری، ناز، اینیا، سفید صالحات و کراس سرخ تخم؛ ۳) کرج -۱، مارکوییس و روشن؛ ۴) عقدا؛ ۵) شاهیوندی؛ ۶) امیدوخلیج؛ ۷) اروند و فلات؛ ۸) شهداس؛ ۹) سفید بافقی، قرمز بافقی، مروارید و سرخه؛ ۱۰) انزا و ۱۱) علی آباد. در این بین گروه‌های ۸،۹،۱۰ و ۱۱ تفاوتهای ژنتیکی فوق‌العاده‌ای با بقیه گروه‌ها دارند. این نتایج نشان می‌دهد که از ایزولاین‌ها تا ارقام بومی، تنوع ژنتیکی نیز افزایش می‌یابد و ارقام زراعی مورد بررسی در حد واسط قرار می‌گیرند. در این بین گندمهای علی آباد، شهداس و عقدا تنوع قابل ملاحظه‌ای از خود نشان می‌دهند.

با توجه به نتایج این مطالعه و گزارشهای هابنر و بیتز(۱۸ و ۱۹) کلیه شرایط تجزیه در این مطالعه (ترکیب فاز متحرک، غلظت TFA، زمان تجزیه، درجه حرارت ستون، میزان جریان، حجم تزریق و نحوه شناسایی) مناسب بوده‌است، اگر چه هنوز در برخی موارد توافقی وجود ندارد. البته با توجه به این‌که زمان تجزیه و میزان جداسازی همبستگی مثبت دارند، با افزایش زمان تجزیه (مثلاً ۶۰-۵۰ دقیقه به‌جای ۳۰ دقیقه) می‌توان جداسازی رابهبود بخشید. با وجود این، در صورت کاربرد ستونهای با منافذ باریک و زمان تجزیه کمتر(۱۰ دقیقه یاکمتر)، می‌توان جداسازی معادل زمان تجزیه ۵۰ تا ۶۰ دقیقه‌ای را نیز به‌دست آورد.

تعداد اجزای حاصل ازتجزیه گلیادین‌ها در این مطالعه (۳۰-۲۵ پیک بزرگ بدون گسترش مقیاس کروماتوگرام) بیشترازتجزیه الکتروفورزی می‌باشد. ازآن جایی که مطالعه حاضر با زمان تجزیه متوسط انجام شده است، بنابراین امکان افزایش جداسازی نیز وجود دارد. به علاوه نتایج کمّی حاصل ازتجزیه RP-HPLC، تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها را آسان نمود. بنابراین نتیجه‌گیری می‌شود که تجزیه RP-HPLC پروتئین‌های گلیادین (باهرهدفی که انجام گیرد) حداقل دارای قابلیتهای روش الکتروفورز می‌باشد.

سپاسگزاری

هزینه‌های انجام این مطالعه توسط دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی اصفهان و سازمان تات تأمین شده است که بدین‌وسیله سپاسگزاری می‌گردد. از پروفسور برالر.ای.بیتز از وزارت کشاورزی امریکا به‌واسطه راهنماییهای ارزشمند ایشان در زمینه موضوع تحقیق و ارسال مقالات کاربردی قدردانی می‌شود. همچنین از آقای دکتر زین‌العابدین شبیری صدر عضو هیأت علمی سازمان پژوهشهای علمی و صنعتی ایران، پژوهشکده عصر انقلاب تهران و آقایان دکتر انصافی و دکتر قاضی عسگر اعضای هیأت علمی دانشکده شیمی دانشگاه صنعتی اصفهان به خاطر راهنماییهای آنها در زمینه HPLC، سپاسگزاری می‌گردد.

منابع مورد استفاده

۱- رضایی، ع.م. ۱۳۷۵. رابطه بین کیفیت آرد و زیر واحدهای گلوتنین با وزن مولکولی بالا در گندم. مجلهٔ علوم کشاورزی ایران، جلد ۲۶، شماره ۲، صفحه ۲۱-۱۱.

۲- رضایی، ع.م. ۱۳۷۶. رابطه بین زیر واحدهای گلوتنین با وزن مولکولی بالا با خصوصیات کیفی آرد. مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی، جلد ۱، شماره ۱، صفحه ۲۸-۱۹.

3- Bietz, J.A. 1983. Separation of cereal proteins by reversed-phase high-performance liquid chromatography.

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-09-21]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1378.3.3.3.8]

J. Chromatogr. 255:219-238.

4- Bietz, J.A. 1986. High-performance liquid chromatography of cereal proteins. pp:105-170. *In*: Pomeranz, Y. (Ed.). Advance in Cereal Science and Technology. Vol 8. AACC, INC. St. Paul, MN., USA.

5- Bietz, J.A. 1988. Reversed-phase high-performance liquid chromatography of cereal proteins: methods and applications. pp. 109-141. *In:* Cherry, J.P. and R.A. Barford (Eds.). Methods for Protein Analysis. Am. Oil Chem. Soc., Champaign, Illinois.

6- Bietz, J.A. and T. Burnouf. 1985. Chromosomal control of wheat gliadin: analysis by reversed-phase high-performance liquid chromatography. Theor. Appl. Genet. 70:599-609.

7- Bietz, J.A. and L.A. Cobb. 1985. Improved procedures for rapid wheat varietal identification by reversed-phase high-performance liquid chromatography of gliadin. Cereal Chem. 62(5): 332-339.

8- Bietz, J.A., T. Burnouf, L.A. Cobb and J.S. Wall. 1984. Gliadin analysis by reversed-phase high-performance liquid chromatography: Optimization of extraction conditions. Cereal Chem. 61(2):124-129.

9- Bietz, J.A., T. Burnouf, L.A. Cobb and J.S. Wall. 1984. Wheat varietal identification and genetic analysis by reversed-phase high-performance liquid chromatography. Cereal Chem. 61(2):129-135.

10- Burnouf, T. and J.A. Bietz. 1987. Identification of wheat cultivars and prediction of quality by reversed-phase high-performance liquid chromatographic analysis of endosperm storage proteins. Seed Sci. and Technol. 15:79-99.

11- Campbel, W.P., C.W. Wrigley, P.J. Cressey and C.R. Slack. 1987. Statistical correlations between quality attributes and grain-protein composition for 71 hexaploid wheats used as breeding parents. Cereal Chem. 64(4):293-299.

12- Cressey, P.J., W.P. Campbell, C.W. Wrigley and W.B. Griffin. 1987. Statistical correlations between quality attributes and grain-protein composition for 60 advanced lines of crossbred wheat. Cereal Chem. 64(4):299-301.

13- Enod, S., K. Okada, S. Nagao and B.L. D'Appolonia. 1990. Quality characteristics of hard red spring and winter wheats. II. Statistical evaluations of reversed-phase high-performance liquid chromatography and milling data. Cereal Chem. 67(5):486-489.

14- Huebner, F.R. 1989. Assesment of potential breadmaking quality of hard spring wheats by high -performance liquid chromatography of gliadins. Cereal Chem. 66(4):333-337.

15- Huebner, F.R. and J.A. Bietz. 1984. Separation of wheat gliadins by preparative reversed-phase high -performance liquid chromatography. Cereal Chem. 61(6):544-549.

16- Huebner, F.R. and J.A. Bietz. 1987. Improvements in wheat protein analysis and quality prediction by reversed-phase high-performance liquid chromatography. Cereal Chem. 64(1):15-20.

17- Huebner, F.R. and J.A. Bietz. 1988. Quantitative variation among gliadins of wheats grown in different environments. Cereal Chem. 65(4):362-366.

18- Huebner, F.R. and J.A. Bietz. 1994. RP-HPLC for varietal identification in cereal and legumes: Wheat. pp. 97-120. *In*: Kruger, J.E. and J.A. Bietz (Eds.). High-Performance Liquid Chromatography of Cereal and Legume Proteins. AACC, INC. St. Paul, MN., USA.

19- Huebner, F.R. and J.A. Bietz. 1994. RP-HPLC for assessment of quality in cereals and legumes: Breadmaking quality (wheat). pp. 206-234. *In*: Kruger, J.E. and J.A. Bietz (Eds.). High-Performance Liquid Chromatography of Cereal and Legume Proteins. AACC, INC. St. Paul, MN., USA.

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-09-21]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1378.3.3.3.8]

20- Huebner, F.R. and J.A. Bietz. 1995. Rapid and sensitive wheat protein fractionation and varietal identification by narrow-bore reversed-phase high-performance liquid chromatography. Cereal Chem. 72(5):504-507.

21- Huebner, F.R. and C.S. Gaines. 1992. Relation between wheat kernel hardness, environment, and gliadin composition. Cereal Chem. 69(2):148-151.

22- Huebner, F.R., J.A. Rothfus and J.S. Wall. 1967. Isolation and chemical comparison of different gamma-gliadins from hard red winter wheat flour. Cereal Chem. 44:221-229.

23- Jobson, J.D. 1992. Applied Multivariate Data Analysis, Vol. II: Categorical and Multivariate Methods. Springer-Verlag Inc., Berlin.

24- Lookhart, G.L. and J.A. Bietz. 1994. Protein extraction and sample handling techniques. pp.51-65. *In*: Kruger, J.E. and J.A. Bietz. (Eds.). High-Performance Liquid Chromatography of Cereal and Legumes Proteins. AACC, INC. St. Paul, MN., USA.

25- Lookhart, G.L., T.S. Cox and O.K. Chung. 1993. Statistical analyses of gliadin reversed-phase high -performance liquid chromatography patterns of hard red spring and hard red winter wheat cultivars grown in a common environment: classification indices. Cereal Chem. 70(4):430-434.

26- Lookhart, G.L., R. Graybosch, J. Peterson and A. Lukaszewski. 1991. Identification of wheat lines containing the 1BL/1RS translocation by high-performance liquid chromatography. Cereal Chem. 68(3):312-316.

27- Marchylo, B.A., D.W. Hatcher and J.E. Kruger. 1988. Identification of wheat cultivars by reversed-phase high-performance liquid chromatography of storage proteins. Cereal Chem. 65(1):28-40.

28- Rohlf, F.J. 1987. Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System for the IBMPC Microcomputer. Applied Biostatistics Inc.

29- Romesburg, H.C. 1990. Cluster Analysis for Researchers. Robert E. Krieger Pub., Malabar, Florida.

30- Wieser, H., W. Seilmeier and H.D. Belitz. 1994. Quantitative determination of gliadin subgroups from different wheat cultivars. J. Cereal Sci. 19:149-155.

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-09-21]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1378.3.3.3.8]