

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

رضا امیری^{*}، عبدالمحیمد 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 ژنتیپ، 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 از زیرواحدهای تجزیه الکتروفورز بود. به علاوه نتایج کمی حاصل از تجزیه RP-HPLC، تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها را آسان نمود. همچنین تجزیه گلیادین‌ها با روش RP-HPLC قابلیت بالای در شناسایی ژن‌های چاودار داشت، به طوری که به سهولت حضور سکالین‌های امگا در ژنوم رقم فلات را معلوم کرد. بنابراین نتیجه‌گیری شده که تجزیه RP-HPLC پروتئین‌های گلیادین می‌تواند کارآمدی روش الکتروفورز را داشته باشد و حتی در مواردی جایگزین آن شود. نتایج تجزیه خوش‌های پلی پیتیدهای گلیادین بیانگر افزایش تدریجی تنوع ژنتیکی از ایزولاین‌ها تا ارقام بومی بود. در مجموع، در بین ارقام بومی، گندمهای علی‌آباد، 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 زیرواحدهای گلوتنین و گلیادین به منظور برآورد کیفیت آرد و شناسایی ژنتیپ‌ها استفاده می‌گردد (۱۱، ۱۲، ۱۳). روش‌های

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

1- Polyacrilamid Gel Electrophoresis

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

از آن جایی که گلیادین‌ها شاخص ژنتیکی 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 آنها استفاده نمود^(۳) و (۲۷). همچنین تجزیه گلیادین‌ها با RP-HPLC، کاربردهای دیگری مثل ارزیابی کیفیت، آزمون خلوص ژنتیکی، طبقه‌بندی گروه‌های گندم و استفاده از پلی پیتیدهای نشانگردارد، به طوری 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 و اصلاح گندم (و سایر غلات) پیدا نموده است، بررسی حاضر بر روی تعدادی ژنتوتیپ گندم نان انجام گرفت. هدف این مطالعه تعیین شرایط مطلوب برای تجزیه RP-HPLC پروتئین‌های ذخیره‌ای گندم و بررسی تنوع ژنتیکی برخی از ایزو لاين‌های بهاره و پاییزه، ارقام زراعی و بومی، از طریق مطالعه چند شکلی پلی پیتیدهای گلیادین بوده است.

مواد و روشها

نمونه‌های 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 چهارمحال و بختیاری، کرج ۱-، روشن، ناز، امید، ارونده، خلیج، فلات، سرداری و شاهینوندی (گندم دوروم) از بانک ژن مؤسسه اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج و ایزو لاين‌های بهاره و پاییزه

جداسازی می‌شوند^(۳).

از کروماتوگرافی غربال مولکولی^۱ (یا کروماتوگرافی غربال ژلی^۲) نیز برای جداسازی پروتئین‌ها و تعیین وزن مولکولی آنها استفاده شده است. کرماتوگرافی تبادل یونی^۳ "اصولاً" بر اساس انواع و مقادیر اسیدهای آمینه باردار استوار است (۵ و ۲۲). کروماتوگرافی بر اساس واکنش (اثر متقابل) آب گریزی^۴، 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^(۵) پایین است. با این حال کروماتوگرافی مایع فاز معکوس با کارایی بالا یا پیشرفته (RP-HPLC)^۵، سودمندترین روش برای جداسازی و مطالعه پروتئین‌های غلات می‌باشد^(۴).

امروزه معرفی ستونهای با تخلخل بالا (A ۳۰۰ یا پیشتر) در RP-HPLC که قادر به جداسازی پروتئین‌های با وزن مولکولی بالا هستند، انقلابی در بسیاری از متداول‌ترین تجزیه‌ای قبلى به وجود 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 بیترز^(۳) برای اولین بار توانست پروتئین‌های گندم را به وسیله RP-HPLC به طرز بهتری، در مقایسه با سایر روش‌های کروماتوگرافی قبلى 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 را به خود جلب نمود.

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

به دست 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 به خوبی آسیاب گردید. سپس ۲۰ میلیگرم از آرد حاصل در لوله‌های پلاستیکی درب دار^{۱۱} 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^{۱۲}، به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اطاق نگهداری شدند. متعاقباً نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۵ هزار دور در دقیقه سانتریفوژ شدند. پس از فیلتر شدن با فیلترهای ۴۵/۰ میکرومتر RP-HPLC میلی پور، از محلول شفاف رویی^{۱۳} برای تزریق به 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 نسبتیهای ۰/۰۶ و ۰/۰۵ درصد TFA به ترتیب در حللهای A و B آزمون گردید، که در این حالت انحراف خط پایه بهبود یافت، اما جداسازی نیز کاهش پیدا کرد. لذا نسبتیهای ۰/۰۸۵ 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 خلاء^{۱۴} فیلتر گردید و سپس در همان شرایط خلا و با استفاده از همزن مغناطیسی به مدت ۳۰ دقیقه هوایگری شد. استونیتریل نیز به مدت ۲۰ دقیقه با استفاده از همزن مغناطیسی و تحت خلاء هوایگری گردید. ستون از نوع Nucleosil C18 300A ۵µm

انزا^۱، پورتولا^۲، سیت سروس^۳، تانوری^۴ ۷۱، پیتیک^۵، همراه بالرقم اینیا^۶ و مارکویس^۷ (شاهد) از گروه زراعت دانشگاه کالیفرنیا در دیویس بود.

وسایل و مواد شیمیایی

حلالهای مورد استفاده شامل تری فلورواستیک اسید(TFA) و اتانل از نوع خالص و آزمایشگاهی کمپانی مرک^۸ بودند. همچنین از استونیتریل و متانول ویژه HPLC استفاده شد. آب مورد استفاده نیز دو بار تقطیر گردید. برای تهیه آن، آب یک بار تقطیر شده(با هدایت الکتریکی حدود ۲/۸ میلی موس بر سانتیمتر) مجدداً با دستگاه آب مقطرگیری^۹ تقطیر گردید. در نتیجه هدایت الکتریکی آب حاصل به ۸ میکرومیکس بر سانتیمتر (۳۵۰ مرتبه کمتر از هدایت الکتریکی آب یک بار تقطیر شده) کاهش یافت. همچنین، فیلترهای استفاده شده برای نمونه‌ها قبل از تزریق به دستگاه از نوع ۴۵/۰ میکرومتر^{۱۰} و فیلترهای بوفر فاز متحرک در موقع هوایگری از نوع F Pyrex ASTM 4-5.5. 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 نسبتیهای 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 گیتز (۲۱) ولوخارت و همکاران (۲۵ و ۲۶). در نتیجه روشهای هابنر و بیتز (۱۷ و ۲۰)، هابنر (۱۴) و بیتز (۳) نتایج خوبی

1- Anza

5- Pitic

9- Buchi 011 RE 121, Switzerland

10- Sporian 30/B or EP 030/20 from Schleicher & Schull, Germany

12- Vortex

2- Portola

6- Inia

13- Supernatant

3- Siete Cerros

7- Marquis

14- Vacumm filtration

4- Tanori 71

8- Merk

11- Eppendorf

کوفتیک^{۱۰} (۲۸) برای تعیین نکوبی 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^{۱۱} و جهت ارزیابی قابلیت روش تجزیه خوش‌های از نرم‌افزار NTSYS^{۱۲} استفاده به عمل آمد. تجزیه مؤلفه‌های اصلی با برنامه SAS^{۱۳} و رسم نمودارها با برنامه کواتروپرو^{۱۴} انجام شد.

نتایج و بحث

اشکال ۱ و ۲ کروماتوگرام‌های گلیادین برخی از ایزو‌لاین‌ها (سیت سروس بهاره یا S و پاییزه یا W، 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 و ۲-Gli) در این دو لاین فعال می‌باشند. البته در برخی از پلی پیتیدها تفاوت‌های کمی کوچکی مشاهده می‌شود که از آن جمله می‌توان به بیشتر بودن مقدار، مساحت یا ارتفاع پیک‌های بازمان ماندگاری^{۱۵} (یا زمان بازداری) و ۱۳/۳۲۲، ۱۲/۹۳۱، ۱۱/۷۷۵، ۱۱/۰۱۸، ۹/۲۰۲ در سیت سروس پاییزه نسبت به بهاره اشاره نمود.

با ابعاد I.D. ۶×۴ mm ۲۵۰ همراه با ستون محافظ^۱ سازگار ۶×۴ mm I.D. ۴۰ HPLC از نوع Shimadzu^۲ بود. دستگاه HPLC از دستگاه اختلاط^۳، محفظه ستون^۴، دتکتور^۵، کنترل کننده سیستم^۶ و کروماتوپک^۷ (رایانه، چاپگر و نرم‌افزار) بود. در برنامه ریزی HPLC برای تفکیک پروتئین‌ها، از شیب غلظت (تجزیه gradient) (gradient ۷۵، ۵۰، ۳۵، ۲۵ و ۱۰ 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 اجرا ۳۱ دقیقه). به علاوه، دمای ستون ۶۰ درجه سانتیگراد و میزان جریان ۱ میلی لیتر در دقیقه بود، که تحت این شرایط فشار سیستم بین ۸۶ تا ۸۰ کیلوگرم نیرو بر سانتی‌متر مربع (معادل Psi ۱۱۷-۱۸۶ 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 متانول ویژه HPLC (۶۷، ۵۰ یا ۱۰ درصد متانول) 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^۹ (متوسط همسایگی) و با استفاده از فاصله اقلیدسی^(۲۳) و محاسبه ضرایب همبستگی

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-L6A

8- Chromatopac C-R4A

9- Unweighted Paired Group Method Using Arithmatic Average

9- Cophenetic correlation coefficient

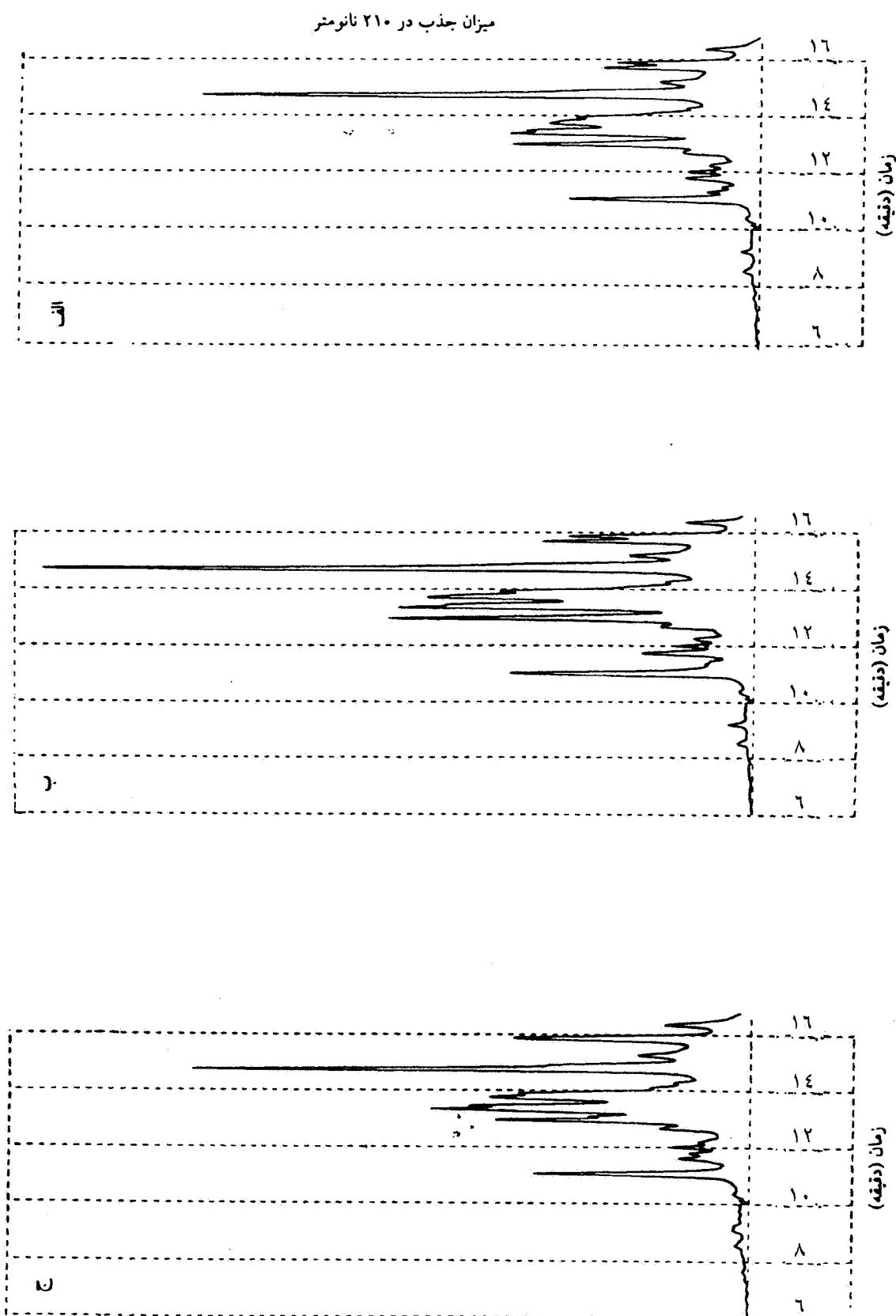
10- Statistical Program for Social Science (SPSS for windows, Ver 6.)

12- Statistical Analysis System(SAS), 1993

11- Numerical Taxonomy System (NTSYS)

13- Quattro pro

۱۵- کلیه زمانهای ماندگاری گزارش شده، عبارت از میانگین زمان ماندگاری در ژنوتیپ‌های واجدان پیک می‌باشند.



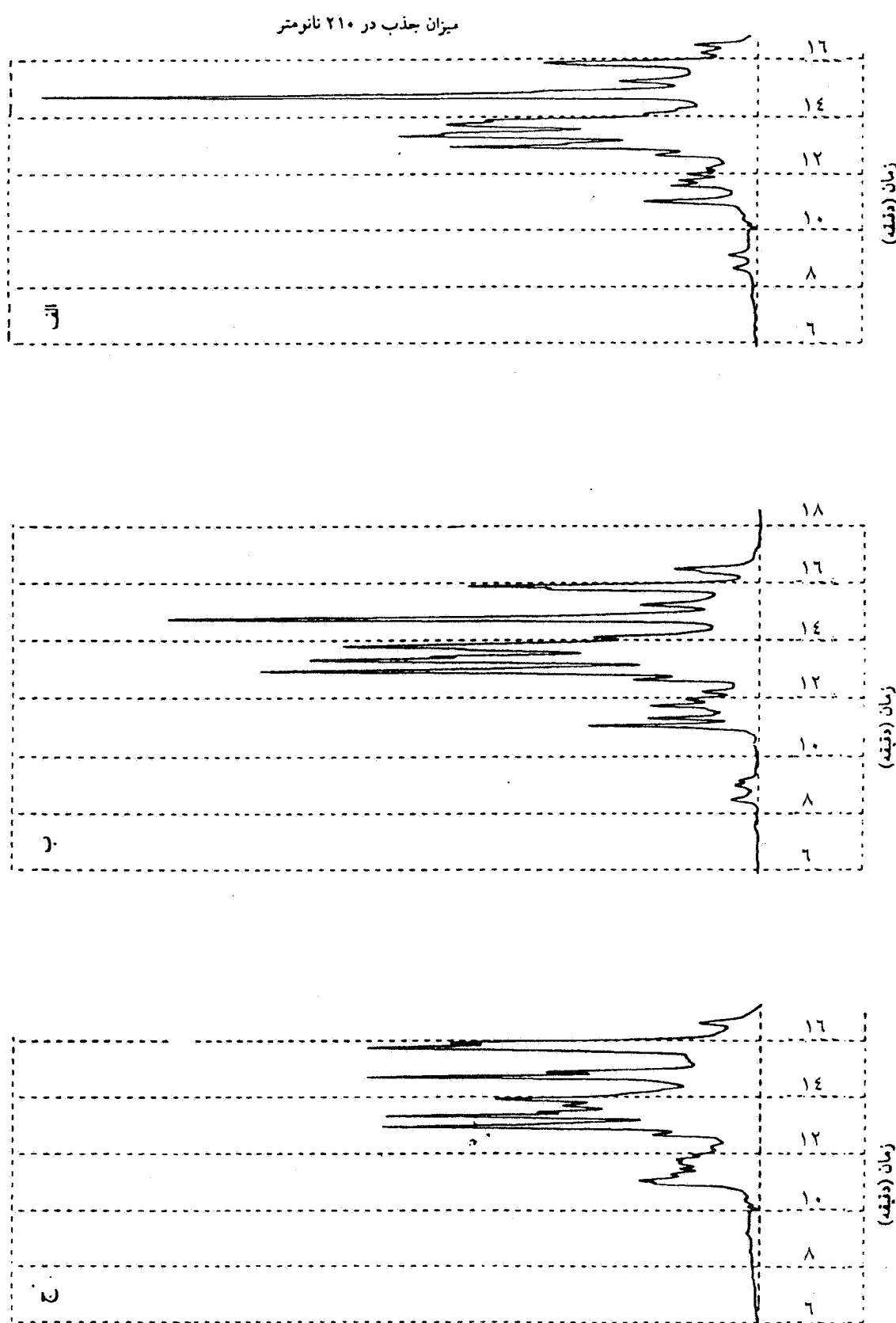
شکل ۱- کروماتوگرام پلی پیتیدهای گلیادین در: الف - لاین سیست سروس بهار، ب - لاین سیست سروس پاییزه و ج - لاین تانوری بهار

شناسایی سکالین‌ها و تفکیک آنها از گلیادین‌های امگا و آلفا، نیاز به تجزیه تعداد زیادی نمونه حاوی بازوی کوتاه کروموزوم ۱ چاودار است. 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-۱۲ مشتق شده است، مطابقت دارد. این خصوصیت در سایر کروماتوگرام‌های این مطالعه وجود نداشت. از این قابلیت RP-HPLC می‌توان با استفاده از لاین‌های آنیوپلوبید، محل کروموزومی پلی پیتیدهای گلیادین و گلوتنین را نیز تعیین نمود (۴، ۵ و ۶).

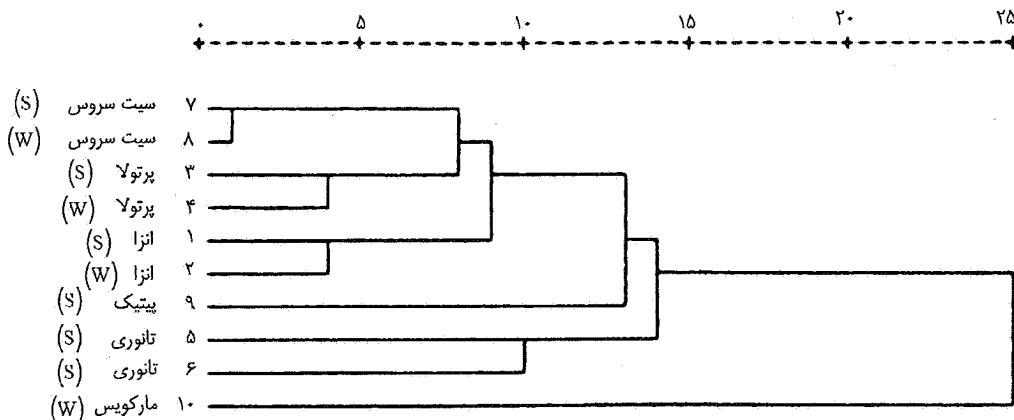
شکل ۳ نمودار خوش‌ای حاصل از تجزیه مقدار نسبی ۲۷ متغیر (پیک) RP-HPLC رادر ایزوولین‌های بهاره و پاییزه همراه با رقم شاهد (مارکویس) نشان می‌دهد. مقدار ضریب همبستگی کوفتیک برای این نمودار برابر ۹۵٪ بود. رولف (۲۸) ضرایب همبستگی کوفتیک بالای ۰٪ را دارای برآش بسیار خوب و ضرایب زیر ۷٪ را دارای برآش بسیار ضعیف می‌داند. رومزبرگ (۲۹) نیز معتقد است که ضرایب همبستگی ۰٪ یا بیشتر از آن، بیانگر انحراف کم ماتریس کوفتیک از ماتریس فاصله بوده و لذا کارایی بالای روش تجزیه خوش‌ای را نشان می‌دهد. بر این اساس قابلیت روش تجزیه خوش‌ای برای ایزوولین‌ها 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 خوش‌ای 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 ایزوولین‌های بهاره و پاییزه در یک گروه واقع شدند و مارکویس نیز در گروه دیگری قرار گرفت. این موضوع نشان می‌دهد که ایزوولین‌های 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

با وجود این، تانوری بهاره و پاییزه تفاوت‌های کیفی نیز دارند، که از جمله وجود پلی پیتیدهای با زمان ماندگاری ۱۵/۴۷ و ۱۰/۱۵ در تانوری بهاره است. همچنین سیت سروس بهاره مقدار بیشتری از پیک‌های با زمان ماندگاری ۱۵/۷۱۳ ۱۵/۸۸۹ و ۱۶/۳۵۵ را نسبت به پاییزه دارا بود. این نتایج همراه با نتایج حاصل از مقایسه سایر کروماتوگرام‌های ایزوولین‌ها (سایر شکل‌ها گزارش نشده‌اند) با فرضیه ارائه شده توسط بیتز (۵)، که مقدار پیک‌های دیر شستشو شونده را در گندمهای بهاره بیشتر می‌داند، 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 و ۲-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 تا ۱۲ دقیقه می‌باشد، که در این ناحیه سطح کروماتوگرام افزایش یافته است. بر اساس گزارش ویزر و همکاران (۳۰) افزایش مقدار نسبی ناحیه انتهایی گلیادین‌های امگا (امگا ۱ و ۲) 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 پیتید نزدیک، بالا باقی بماند. همچنین این موضوع بین گلیادین‌های امگا و آلفا اختلاط ایجاد نموده است. با این وجود، برای



فاصله تشاہ



شکل ۳- نمودار خوشهای حاصل از تجزیه پلی بیتیدهای گلیادین در ایزو لاکن های بهاره و پائیزه

مشاهده شد، از زمینه ژنتیکی محدودی برخوردارند. به علاوه آنود و همکاران (۱۳) و لوحارت و همکاران (۲۵) از ارقام تجاری 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 برخوردار باشد. همچنین این موضوع را می‌توان به موفقیت کم برنامه اصلاحی تولید این ایزو‌لاین‌ها نسبت داد. در مجموع به نظر می‌رسد در صورت انتخاب ارقام تجاری بهاره و پاییزه و با زمینه ژنتیکی نسبتاً متنوع، بتوان گروه بنده مطلوبی از آنها به دست آورد.

نتایج تجزیه مؤلفه‌های اصلی بر روی ۲۷ متغیر مورد نظر (جدول ۱) بیانگر توجیه ۳۴، ۲۲، ۱۷ 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 و -۲ Gli را در ایزولاین‌ها توجیه می‌کنند. بر اساس همبستگی متغیرها با مؤلفه‌ها، مؤلفه اصلی اول پلی پیتیدهای با زمان ماندگاری ۹/۲۰۲، ۱۰/۱۵۰، ۱۱/۹۴۱، ۱۱/۹۷۵ و ۱۶/۴۵۸ را با پلی پیتیدهای با زمان

۱۵، سایر ارقام و ارقام بومی را به گروه‌های زیادی تقسیم می‌کند.
البته این قضاوت بر اساس پلی پیتیدهای ۶ بازوی کروموزومی است، اما از آن جایی که گزارش‌های موجود (۸ و ۱۰) بیانگر حساسیت و دقت فوق العاده این شاخصهای ژنتیکی می‌باشد، چند شکلی آنها را می‌توان نمودی از کل ژنوم دانست. در حقیقت ایزو‌لاین‌های این مطالعه حاصل تلاقی والدین آنها با فنیکس (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 شناختهای این ژنتیک‌ها 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 (۲۵) بسیار متنوع بوده است، اما ژنوتیپ‌های این مطالعه به طوری که

جدول ۱- شاخص تجزیه مؤلفهای اصلی برای پیش‌بینی‌های گلخانه در آینده‌ی زیرهای پنهان و پایینه

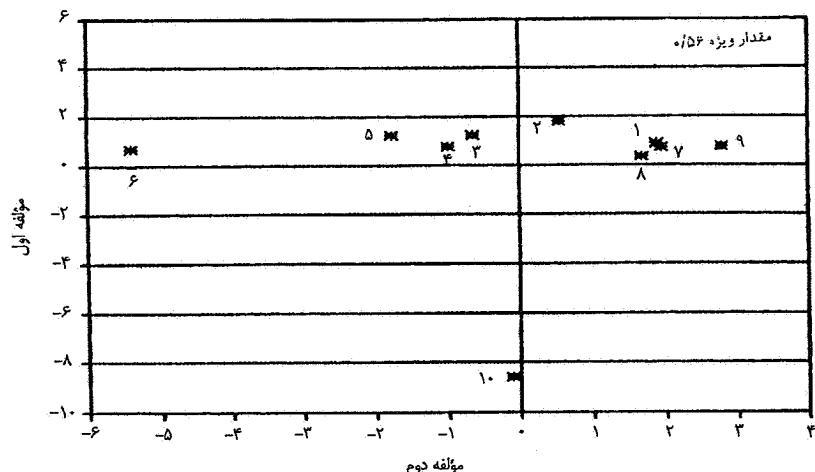
و ۷۷۷ — به ترتیب معنی دار در سطوح احتمال ۵ و ۱ درصد

روی داده‌های مقادیر نسبی پلی پپتیدهایی به دست آمده است که در آنها اثرات کمی در صد پروتئین تقریباً متغیر است (۲۷)، حتی در ژنتوتیپ‌های با درصد پروتئین یکسان احتمال چنین گزینشی دور از انتظار نمی‌باشد. بدین ترتیب پس از شناسایی پلی پپتیدهای مطلوب می‌توان جهت ادغام برخی از آنها در ژنتوتیپی خاص، به تلاقي بین ارقام مختلف اقدام نمود.

باتوجه به جدول ۱، مؤلفه‌های اصلی اول تا چهارم در قالب تقریبی ۱۴ پیک از مکان ژنی -۱ Gli-۱ و ۹ پیک از مکان ژنی Gli-۲، هشتاد و پنج درصد از تغییرات داده‌ها را توجیه می‌کنند. بنابراین احتمالاً سهم مکان ژنی -۱ Gli در تنوع ژنتیکی کل ایزو‌لاین‌ها، نسبت به مکان ژنی -۲ Gli اندکی بیشتر است. همچنین تعداد بیشتر پلی 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 (شکل ۴) در ایزو‌لاین‌های بهاره و پاییزه، بیانگر امکان طبقه‌بندی ژنتوتیپ‌ها با استفاده از روش تجزیه ایزو‌لاین‌ها در یک یخش از نمودار و رقم مشاهده می‌شود کلیه ایزو‌لاین‌ها در یک یخش از نمودار و رقم مارکویس 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 طبقه‌بندی ژنتوتیپ‌ها مطابقت دارد.

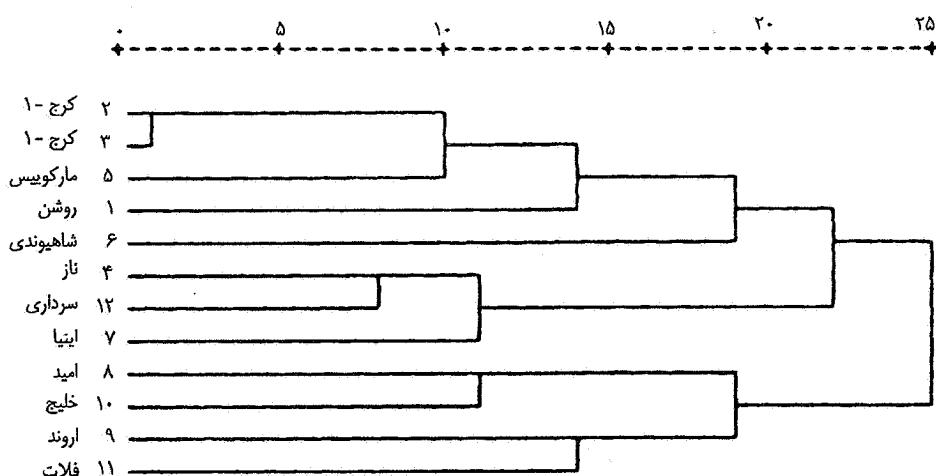
نمودار خوش‌های حاصل از تجزیه مقدار نسبی ۲۴ پیک RP-HPLC در ارقام زراعی ایران همراه با اینیا و رقم شاهد مارکویس (شکل ۵) بیانگر اختلافات ژنتیکی بیشتر این ارقام در مقایسه با ایزو‌لاین‌ها (شکل ۳) می‌باشد. مقدار ضریب همبستگی کوفتیک برای این نمودار برابر $84/0$ بود. بنابراین قابلیت روش UPGMA برای ارقام زراعی خوب می‌باشد. در این شکل فاصله تشابه ۲۵ برابر با فاصله اقلیدسی $22/54$ بود و بر اساس بررسی تغییرات مقادیر D، تعداد مطلوب گروه‌ها برابر با ۵ تشخیص داده شد. بنابراین با انتخاب فاصله تشابه تقریبی $14/8$ تا $5/16$ (معادل فاصله اقلیدسی $13/6$ تا $17/1$) پنج گروه: ۱) کرج -۱، مارکویس و روشن؛ ۲) شاهیوندی؛ ۳) ناز،

ماندگاری $37/3$ ، ۱۰/۰۱۸، $12/646$ ، $11/0۱۸$ ، $12/931$ و $14/702$ و $15/303$ مقایسه می‌نماید. به همین ترتیب مؤلفه اصلی دوم پیک‌های با زمان ماندگاری $7/658$ ، $11/583$ و $16/18$ را با پیک‌های با زمان ماندگاری $12/196$ ، $12/646$ ، $14/071$ و $15/713$ و مؤلفه اصلی سوم پیک‌های با زمان ماندگاری $16/355$ را با پیک‌های با زمان $8/650$ و $11/444$ مقایسه می‌کند. مؤلفه اصلی چهارم نیز میانگینی وزنی از متغیرهای با زمان ماندگاری $9/031$ ، $9/560$ و $13/322$ می‌باشد. به عبارت دیگر متغیرهای با ضریب همبستگی مثبت و منفی در هر مؤلفه با یکدیگر مقایسه می‌شوند، به طوری که افزایش گروه با ضریب همبستگی 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 نشده است)، استنباط می‌شود که صرف نظر از کاهش یا افزایش درصد پروتئین، در برخی از ژنتوتیپ‌ها روند کاهش یا افزایش پلی پپتیدهای مختلف یکسان نیست. بنابراین نوعی تنظیم ظاهر ژنی معکوس در بین ژن‌های سنتز پلی پپتیدهای مختلف گلیادین در ایزو‌لاین‌ها وجود دارد، به نحوی که تغییر ظاهر ژن مربوط به یک پلی پپتید از ژنتوتیپی به ژنتوتیپ دیگر، بر روی ظاهر ژن مربوط به پلی پپتید دیگر به صورت معکوس اثر داشته است. این نتایج بر این موضوع اشاره دارند که همواره در هر ژنتوتیپ 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 به وسیله تجزیه مؤلفه‌های اصلی فراهم شده است. حال اگر این ارتباطات ویژه بین سنتز پلی پپتیدها که تحت کنترل ژنتیکی هستند (به ویژه که بسیاری از آنها شامل تغییرات کیفی هستند که توسط اثرات محیطی تعديل نمی‌گردد)، قابل تعمیم به سایر ژنتوتیپ‌ها باشند، در آن صورت انتخاب ژنتوتیپ‌هایی که حاوی پلی پپتیدهای مطلوب بیشتر و پلی پپتیدهای نامطلوب کمتر (مثلًاً از لحاظ کیفیت پلی پپتیدهای نشانگر و غیره) باشند، امکان پذیر خواهد بود. از آن جایی که این نتایج بر



شکل ۴- نمودار حاصل از رسم مؤلفه اصلی اول و دوم درایزوپلین های بهاره و پاییزه. ژنوتیپ ها 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- مارکویس

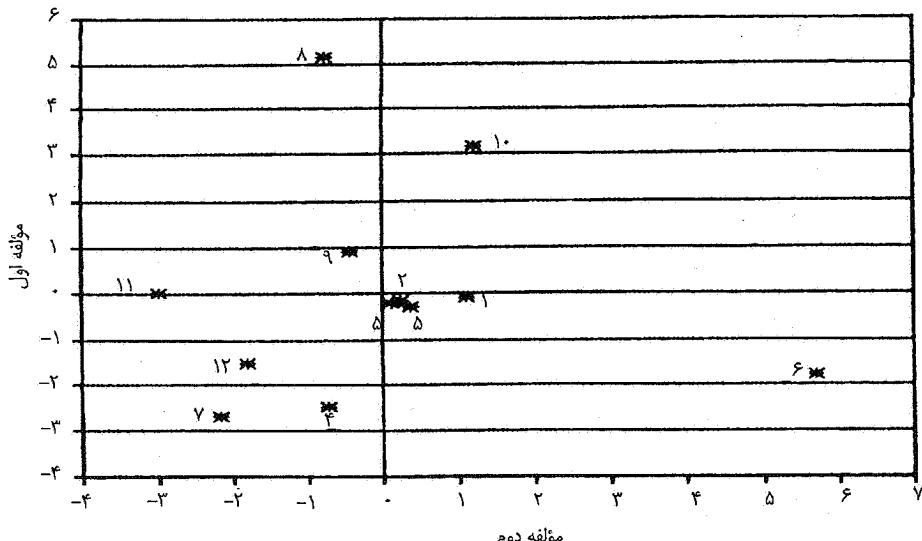
فاصله تشابه



شکل ۵- نمودار خوشهای حاصل از تجزیه پلی پیتیدهای گلیادین در برخی از ارقام زراعی ایران. کرج- ۱ دو مرتبه تکرار شده است.

مریوط باشد. شاهینوندی (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 ژن های مسؤول سنتز اجزای گلیادین ها می باشد. با وجود این، نسبت دادن کلیه ۱۰ پلی پیتید حذف شده به ژنوم D منطقی به نظر نمی رسد، زیرا ممکن است تعدادی از آنها به تفاوت های کیفی معمولی در مکانهای ژنی کروموزوم های A₁, B₁, A₂, B₂ مریوط باشند.

سرداری، و اینیا؛ ۴) امید و خلیج؛ و ۵) ارونده فلات تشکیل می گردد. رقم کرج-۱، که از تلاقی روشن و رقمی خارجی به دست آمده است، با روشن و مارکویس در یک گروه قرار گرفته است. بنابراین شباهتها کرج-۱ و روشن با شجره آنها مطابقت دارد و مارکویس، که گندمی کانادایی است، شباهتها قابل ملاحظه ای با دو رقم ایرانی نشان می دهد. شاید این موضوع به تلاقی اولیه ای که کرج-۱ از آن به دست آمده است



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- تاز، ۵- مارکویس، ۶- شاهیوندی، ۷- آینیا، ۸- امید، ۹- ارونده، ۱۰- خلیج، ۱۱- فلات و ۱۲- سرداری

پلی‌پیتیدهای با ضریب همبستگی مثبت و منفی معنی دار در هر مؤلفه ارائه گردید، در اینجا نیز صادق است. از طرف دیگر بر خلاف جدول ۱، در این ارقام ۷ پلی‌پیتید از مکان ژئی ۱-Gli و ۱۰ پلی‌پیتید از مکان ژئی ۲-Gli هفتاد درصد از تغییرات داده‌ها را توجیه می‌کنند. بدین ترتیب براساس ۷۰ درصد از تغییرات داده‌ها، سهم مکان ژئی ۲-Gli (بازوی کوتاه کروموزوم ۶) در تغییرات داده‌ها کمی بیشتر از مکان ژئی ۱-Gli (بازوی کوتاه کروموزوم ۱) است. نمودار مؤلفه‌های اصلی اول و دوم (شکل ۶) توزیع مناسبی از برآکنش این ارقام را به دست 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 پلی‌پیتید RP-HPLC را در ارقام بومی نشان می‌دهد. در تهیه کروماتوگرام‌های ارقام سفید بافقی، و قرمز بافقی از تجزیه تک بذر و برای بقیه ژنوتیپ‌ها از آرد حاصل از ۵ بذر تصادفی (مشابه سایر تجزیه‌های این مطالعه) استفاده شد. ضریب

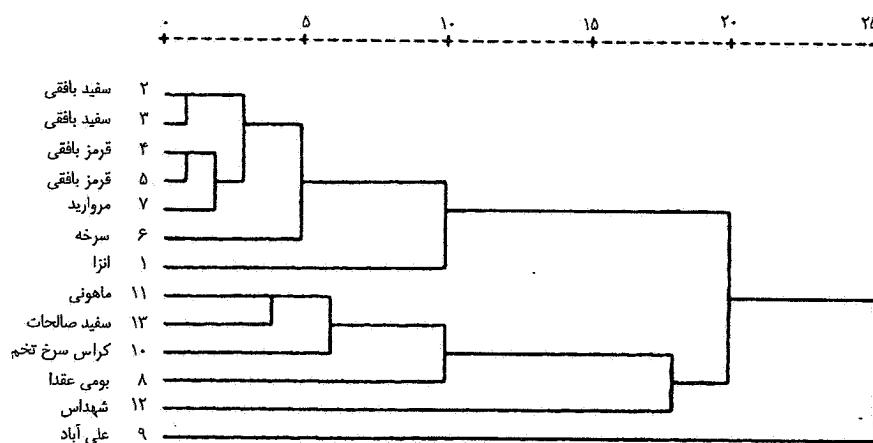
در گروه سوم، ناز و آینیا هر دو گندمهای مکزیکی هستند که در یک گروه قرار گرفته‌اند، که از توده‌های بومی غرب کشور انتخاب شده است، شباهتهای ژنتیکی با این دو رقم (به خصوص ناز) دارد. شباهتهای امید و خلیج، که از توده محلی ساوه و زابل گزینش شده‌اند، با پراکنش جغرافیایی آنها مطابقت ندارد. ارونده از تلاقی گندم روشن و گندمی مکزیکی به دست 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 متغیرشان داد که به ترتیب ۲۱، ۲۰، ۱۷ و ۱۲ درصد از تغییرات مکانهای ۱-Gli-۲-Gli در این ارقام توسط مؤلفه‌های اصلی اول تا چهارم توجیه می‌گردد (جدول ۲). این نتیجه در مقایسه با نتایج تجزیه ایزولاین‌ها (جدول ۱) 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 دیگر با کاهش شباهتها، همبستگی بین پلی‌پیتیدهای گلیادین کاهش یافته و در نتیجه مؤلفه‌ها درصد کمتری از تغییرات کل را توجیه می‌کنند. توجیه قبلی که در مورد ایزولاین‌ها برای

جدول ۲- شرایط تجزیه مؤلفه‌های اصلی برای پلی پیشیده‌های گلیادینز در بخش از قائم زراعی ایران

* و ** - به ترتیب معنی دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد

فاصله تشابه



شکل ۷- نمودار خوشای حاصل از تجزیه پلیپتیدهای

گلیادین در ارقام بومی

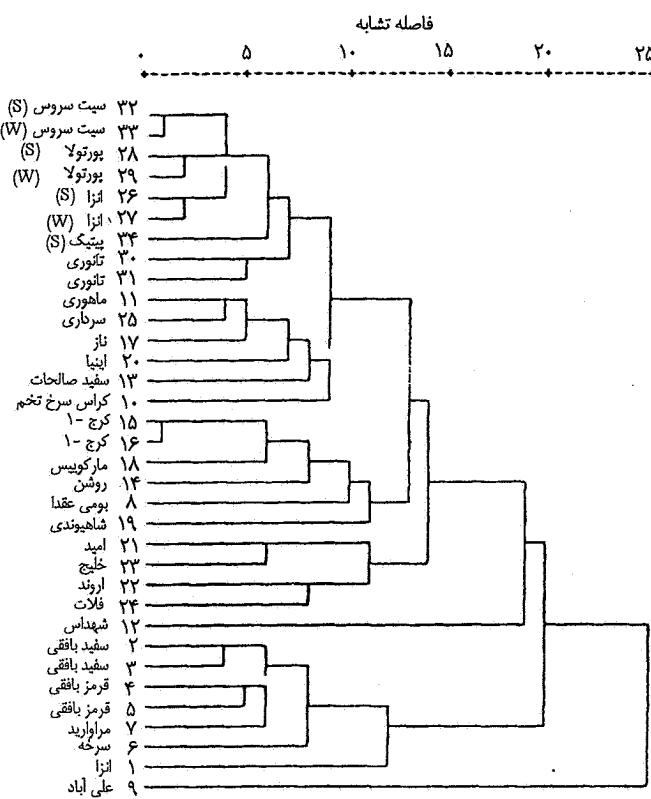
(۵) شهداس و (۶) علی آباد تشکیل گردید. با توجه به این که به غیر از ازرا (رقم شاهد)، شهداس و سفید صالحات بقیه ژنتوتیپ‌ها ارقام بومی استان یزد هستند، نتیجه گیری می‌شود که بین مناطق جغرافیایی با تفاوت‌های ژنتیکی ارقام بومی مطابقت چندانی وجود ندارد. به طوری که تفاوت‌های ژنتیکی ارقام بومی، بیشتر از اختلافات جغرافیایی آنهاست. در این بین رقم علی آباد تفاوت‌های ژنتیکی فوق العاده‌ای باقیه ارقام بومی دارد و در مرحله بعدی گندم عقداً 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)، بیانگر توجیه ۱۱، ۱۳، ۴۰ 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 ایزو لاين‌ها (۸۵ درصد)، مجدداً بیانگر بیشتر بودن تنوع ژنتیکی این مواد است، اما این مقدار اندکی کمتر از نتایج ارقام زراعی (۷۰ درصد) می‌باشد. در تجزیه مؤلفه‌های اصلی و تجزیه خوشای، 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

همبستگی کوفتیک برای این نمودار برابر ۹۵٪ بود. بنابراین قابلیت تجزیه خوشای 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 ازرا بهاره با پاییزه و پورتلای 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، اگرچه 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 ژنتوتیپ‌ها برابر با ۴ تشخیص داده شد. این انتخاب تقریباً معادل فاصله اقلیدسی ۷/۱۹ تا ۶/۱۳ می‌باشد، در حالی که در ارقام زراعی با انتخاب فاصله اقلیدسی ۱۱/۱۷ تا ۶/۱۳ پنج گروه تشکیل گردید. برای مقایسه این دو گروه از ژنتوتیپ‌ها در این جا نیز فاصله اقلیدسی ۱۵ تا ۱۹ (معادل فاصله تشابه ۶ تا ۱۰) انتخاب شد. براین اساس شش گروه شامل (۱) دو نمونه سفید بافقی، دو نمونه قرمز بافقی، مروارید و سرخه احمدآباد؛ (۲) ازرا؛ (۳) ماهونی، سفید صالحات و کراس سرخ تخم؛ (۴) عقدا؛

جدول ۳- تابع تعیین مؤلفه‌های اصلی برای پیش‌بینی‌ها

— به ترتیب معنی دار در مطلع اختصار ۵۰ درصد



شکل ۸- نمودار خوشای حاصل از تجزیه پلی پیتیدهای گلیادین

در کلیه ژنوتیپ‌های مورد مطالعه

حذف) برخی از پلی پیتیدهای متداول‌تر خواهد شد. به عبارت دیگر، انتخاب ژنوتیپی حاوی پلی پیتید جدید، بر روی سایر پلی پیتیدها نیز اثر خواهد داشت، زیرا در هر ژنوتیپ همواره تعداد معینی از مکانهای ژنی فعال هستند. در ارقام بومی نیز مثل ژنوتیپ‌های قبلی، رسم مؤلفه‌های اصلی اول و دوم و اول و سوم با نتایج تجزیه خوشای مطابقت داشت (شکلها گزارش نشده‌اند).

شکل ۸ نمودار خوشای حاصل از تجزیه پلی پیتیدهای گلیادین را در کلیه ژنوتیپ‌ها نشان می‌دهد. این شکل حاصل تجزیه ۴۷ پلی پیتید می‌باشد که از این تعداد ۱۲ پلی پیتید در سه گروه، ۱۰ پلی پیتید در دو گروه و ۲۵ پلی پیتید بقیه فقط در یک گروه از ژنوتیپ‌ها (ایزو لاین‌ها، ارقام زراعی یا بومی) وجود داشتند. در این شکل نیز نمونه‌های تکراری سفید و قرمز بافقی و

بومی برخلاف ژنوتیپ‌های قبلی، سهم مکانهای ژنی ۱- Gli ۱ و ۲- Gli ۲ در تغییرات داده‌ها تقریباً یکسان می‌باشد. در ضمن توجیه‌های قبلی در مورد متغیرهایی که در هر مؤلفه با یکدیگر مقایسه می‌شوند، در اینجا نیز صادق است. مسئله قابل توجه پلی پیتیدهایی هستند که در مؤلفه اصلی اول باهم مقایسه می‌گردند. کلیه پلی پیتیدهایی که با مؤلفه اصلی اول همبستگی مثبت و معنی دار دارند، در ارقام زراعی یا ایزو لاین‌ها (جداول ۱) وجود ندارند (تجزیه پلی پیتید با زمان ماندگاری ۱۰/۹۲۳ در ارقام زراعی نیز وجود دارد). در حالی که از بین پلی پیتیدهایی که با این مؤلفه همبستگی منفی و معنی داردارند، ۶ پلی پیتید در کلیه ژنوتیپ‌های تحت مطالعه حضور دارند. این موضوع نشان می‌دهد که اگر برخی از پلی پیتیدهای جدید از نظر پژوهشگر مفید باشند، انتخاب برای آنها منجر به کاهش (یا

می‌توان جداسازی معادل زمان تجزیه ۵۰ تا ۶۰ دقیقه‌ای را نیز به دست آورد.

تعداد اجزای حاصل از تجزیه گلیادین‌ها در این مطالعه (۲۵-۳۰ پیک بزرگ بدون گسترش مقیاس کروماتوگرام) بیشتر از تجزیه الکتروفورزی می‌باشد. ازان جایی که مطالعه حاضر با زمان تجزیه متوسط انجام شده است، بنابراین امکان افزایش جداسازی نیز وجود دارد. به علاوه نتایج کمی حاصل از تجزیه RP-HPLC، تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها را آسان نمود. بنابراین نتیجه‌گیری می‌شود که تجزیه RP-HPLC پروتئین‌های گلیادین (با هر دلفی 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 بدین وسیله سپاسگزاری می‌گردد. از پروفسور برالرای. بیتز از وزارت کشاورزی امریکا به‌واسطه راهنمایی‌های ارزشمند ایشان در زمینه موضوع تحقیق و ارسال مقالات کاربردی قدردانی می‌شود. همچنین از آفای دکتر زین‌العابدین شبیری صدر عضو هیأت علمی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، پژوهشکده عصر انقلاب تهران و آفایان دکتر انصافی و دکتر قاضی عسگر اعضای هیأت علمی دانشکده شیمی دانشگاه صنعتی اصفهان به خاطر راهنمایی‌های آنها در زمینه HPLC سپاسگزاری می‌گردد.

تزریق مجدد کرج - ۱ (به منظور کنترل)، به طور مجاز از تجزیه آورده شده‌اند. ضریب همبستگی کوفتیک برای این نمودار برابر ۰/۸۲ بود که بیانگر کارایی خوب روش تجزیه خوش‌های می‌باشد. با انتخاب فواصل اقلیدسی ذکر شده در شکل‌های ۴، ۳ 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) ایزو لاین‌ها؛ (۲) ماهوتی، سرداری، ناز، اینیا، سفید صالحات و کراس سرخ تخم؛ (۳) کرج - ۱، مارکویس و روشن؛ (۴) عقد؛ (۵) شاهین‌وندی؛ (۶) امید و خلیج؛ (۷) ارون و فلات؛ (۸) شهداس؛ (۹) سفید بافقی، قرمز بافقی، مروارید و سرخه؛ (۱۰) انزا و (۱۱) علی آباد. در این بین گروه‌های دارند. این نتایج نشان می‌دهد که از فرق العاده‌ای با بقیه گروه‌ها دارند. این نتایج نشان می‌دهد که از ایزو لاین‌ها تا ارقام بومی، تنوع ژنتیکی نیز افزایش می‌یابد و ارقام زراعی مورد بررسی در حد واسطه قرار می‌گیرند. در این بین گندمه‌های علی آباد، شهداس و عقداً 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 بوده است، اگر چه هنوز در برخی موارد توافقی وجود ندارد. البته با توجه به این که زمان تجزیه و میزان جداسازی همبستگی مثبت دارند، با افزایش زمان تجزیه (مثلًا "۶۰-۵۰ دقیقه به جای ۳۰ دقیقه) می‌توان جداسازی را بهبود بخشید. با وجود این، در صورت کاربرد ستونهای با منافذ باریک و زمان تجزیه کمتر (۱۰ دقیقه یا کمتر)،

منابع مورد استفاده

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

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- Campbell, 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. Assessment 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.

- 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.