

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 ایزولان‌های بهاره و پاییزه، ارقام زراعی و بومی گندم نان اجرا گردید. پروتئین‌های گلیادین حاصل از آرد ۵ بذریه 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 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 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 کارایی روش الکتروفورز را داشته باشد و حتی در مواردی جایگزین آن شود. نتایج تجزیه خوشه‌ای پلی پپتیدهای گلیادین بیانگر افزایش تدریجی تنوع ژنتیکی از ایزولان‌ها 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، ایزولان، 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

گونگون الکتروفورز با ژل نشاسته یا پلی‌اکریل آمید (PAGE)^۱، 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

جداسازی می‌شوند (۳).

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 آنها استفاده نمود (۳، ۷ و ۲۷). همچنین تجزیه گلیادین‌ها با RP-HPLC، کاربردهای دیگری مثل ارزیابی کیفیت، آزمون خلوص ژنتیکی، طبقه بندی گروه‌های گندم و استفاده از پلی پپتیدهای نشانگر دارد، 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 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.

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 چهار محال و بختیاری، کرج - ۱، روشن، ناز، امید، اروند، خلیج، فلات، سرداری و شاهپوندی (گندم دوروم) از بانک ژن مؤسسه اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج و ایزولاین‌های بهاره و پاییزه

از کروماتوگرافی غربال مولکولی^۱ (یا کروماتوگرافی غربال ژلی^۲) نیز برای جداسازی پروتئین‌ها و تعیین وزن مولکولی آنها استفاده شده است. کروماتوگرافی 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 پایین است (۵). 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 بیشتر) در RP-HPLC که قادر به جداسازی پروتئین‌های با وزن مولکولی بالا هستند، انقلابی در بسیاری از متدولوژی‌های تجزیه‌ای قبلی به وجود آورده است. روش RP-HPLC مثل کروماتوگرافی واکنش آب گریزی بر روی ژل‌های آگاروز که با گروه‌های فنیل و اکتیل 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 به وسیله 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 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} 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^{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 ۰/۴۵ میکرومتر میلی پور، از محلول شفاف رویی^{۱۳} 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 و B آزمون گردید، که در این حالت انحراف خط پایه بهبود یافت، اما جداسازی نیز کاهش پیدا کرد. لذا نسبتهای ۰/۱ و ۰/۸۵ 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^{۱۴} 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 5 μ m،

انزا^۱، پورتولا^۲، سیت سروس^۳، تانوری^۴، پیتیک^۵، همراه بارقام اینیا^۶ و مارکوویس^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 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) مجدداً با دستگاه آب مقطرگیری^۹ 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 دستگاه از نوع ۰/۴۵ میکرومتر^{۱۰} و فیلترهای 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 دوره‌های 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) و لوخارت و همکاران (۲۵ و ۲۶). در نتیجه روشهای هابنر و بیتز (۱۷ و ۲۰)، هابنر (۱۴) و بیتز (۳) نتایج خوبی

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 filtration	

کوفتیک^{۱۰} (۲۸) برای تعیین نکویی برآزش 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 کوآتروپرو^{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 پپتیدها تفاوت‌های کمی کوچکی مشاهده می‌شود که از آن جمله می‌توان به بیشتر بودن مقدار، مساحت یا ارتفاع پیک‌های بازمان ماندگاری^{۱۵} (یا زمان‌بازداری) ۱۳/۷۷۵، ۹/۲۰۲، ۱۱/۰۱۸، ۱۱/۴۴۴، ۱۱/۷۷۵، ۱۲/۹۳۱، ۱۳/۳۲۲ و ۱۳/۷۷۵ در سیت سروس پاییزه نسبت به بهاره اشاره نمود.

با ابعاد ۲۵۰×۴/۶ mm I.D. همراه با ستون محافظ^۱ سازگار ۴۰×۴/۶ mm I.D. بود. دستگاه HPLC از نوع شیماتزو^۲ و شامل سه پمپ^۳ B، A و C، محفظه اختلاط^۴، محفظه ستون^۵، دکتور^۶، کنترل کننده سیستم^۷ و کروماتوپیک^۸ (رایانه، چاپگر و نرم‌افزار) بود. در برنامه ریزی HPLC برای تفکیک پروتئین‌ها، از شیب غلظت (تجزیه gradient) ۵۰، ۳۵، ۲۵ 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 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 ۶۸ تا ۸۰ کیلوگرم نیرو بر سانتیمتر مربع (معادل ۱۸۶-۱۱۷ Psi 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 کروماتوپیک ذخیره گردید. اکثر نمونه‌ها دو بار تجزیه شدند و در طول مطالعه، ستون چندین بار با متانل ویژه HPLC (۶۷، ۵۰ یا ۱۰۰ درصد متانل) شستشو گردید. همچنین قبل از آغاز هر تجزیه، یک برنامه شیب غلظت بدون نمونه اجرا شد. 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 technik 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 Arithmetic Average

9- Cophenetic correlation coefficient

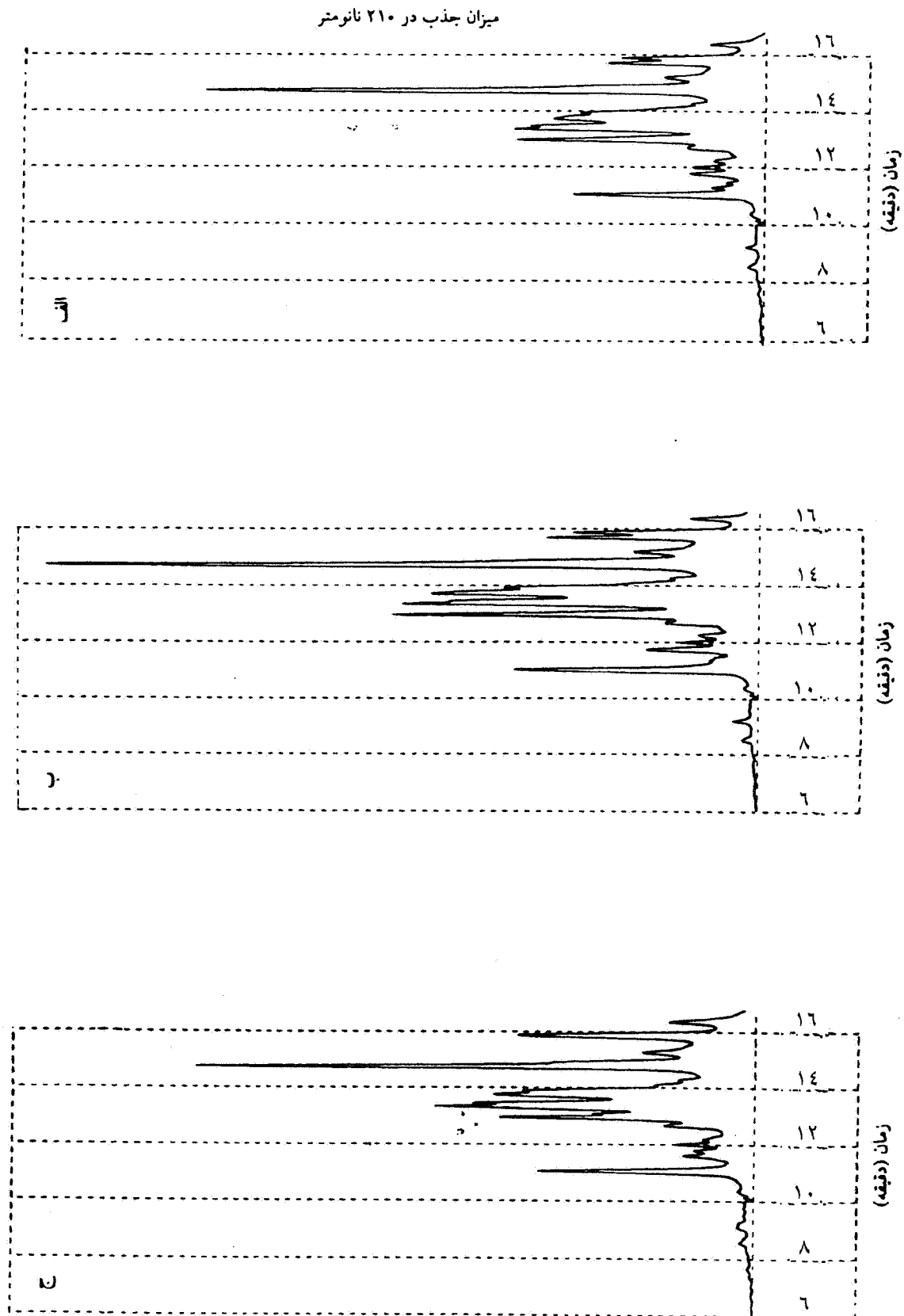
10- Statistical Program for Social Science (SPSS for windows, Ver 6.)

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 واجدان پیک می‌باشند.



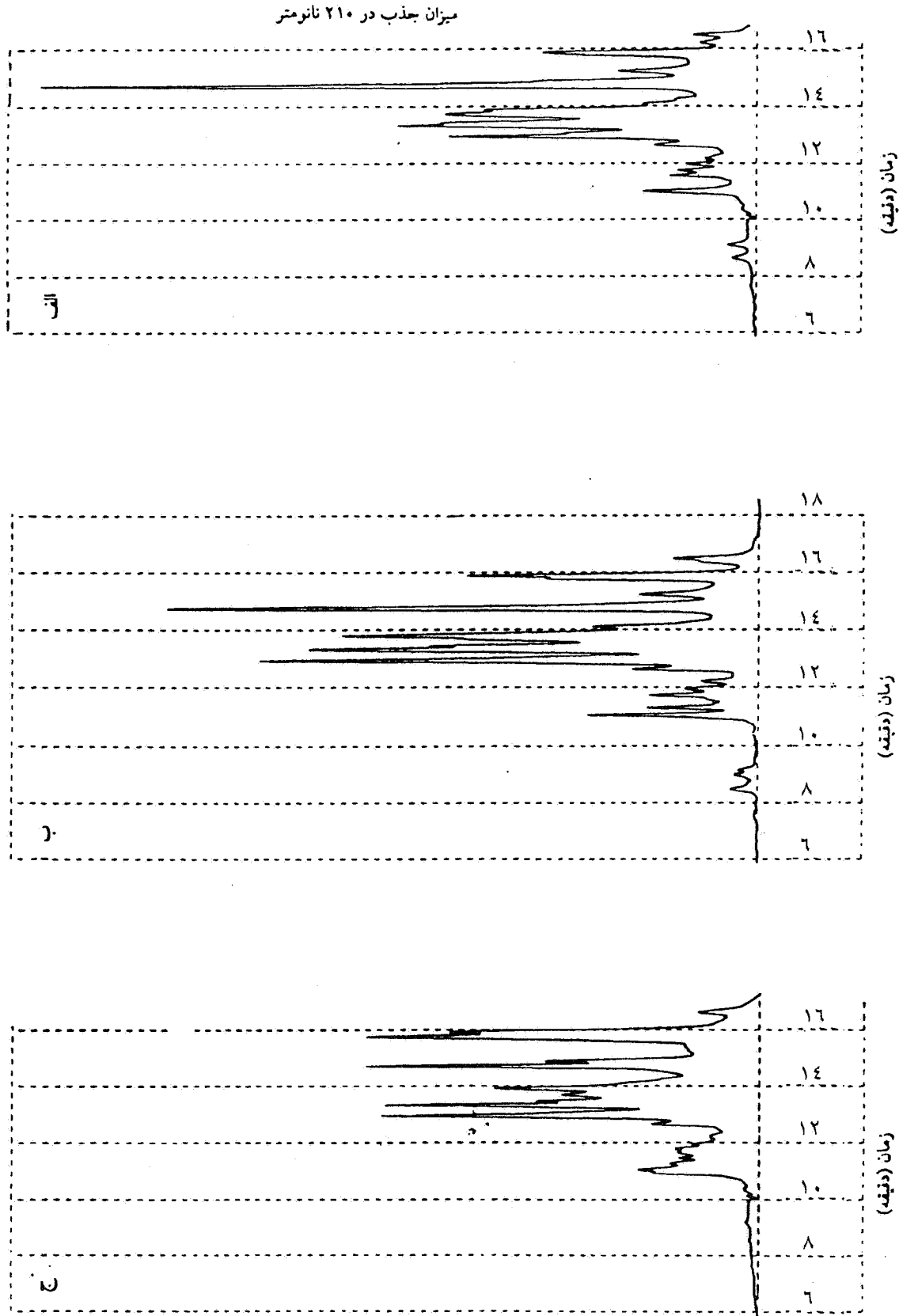
شکل ۱- کروماتوگرام پلی پیتیدهای گلیادین در: الف - لاین سیت سروس بهاره، ب - لاین سیت سروس پائیزه و ج - لاین تانوری بهاره

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 (IRS) می‌باشد. این نتیجه باشجره رقم فلات که از لاین مکزیکی ویری-۲ مشتق شده است، مطابقت دارد. این خصوصیت در سایر کروماتوگرام‌های این مطالعه وجود نداشت. از این قابلیت RP-HPLC می‌توان با استفاده از لاین‌های آنیوپلویید، محل کروموزومی پلی پپتیدهای گلیادین و گلو تنین را نیز تعیین نمود (۴، ۵ و ۶).

شکل ۳ نمودار خوشه‌ای حاصل از تجزیه مقدار نسبی ۲۷ متغیر (پیک) RP-HPLC رادر ایزولاین‌های بهاره و پاییزه همراه با رقم شاهد (مارکوئیس) نشان می‌دهد. مقدار ضریب همبستگی کوفتیک برای این نمودار برابر ۰/۹۵ بود. رولف (۲۸) ضرایب همبستگی کوفتیک 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 کوفتیک از ماتریس فاصله بوده و لذا کارایی 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 مارکوئیس 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

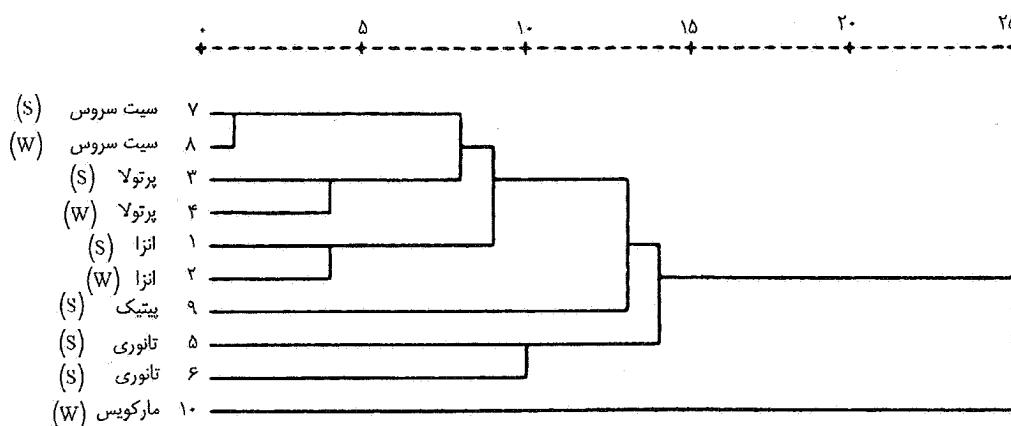
با وجود این، تانوری بهاره و پاییزه تفاوت‌های کیفی نیز دارند، که از جمله وجود پلی پپتیدهای با زمان ماندگاری ۸/۴۷ و ۱۰/۱۵ در تانوری بهاره است. همچنین سیت سروس بهاره مقدار بیشتری از پیک‌های با زمان ماندگاری ۱۵/۷۱۳، ۱۵/۸۸۹ و ۱۶/۳۵۵ را نسبت به پاییزه دارا بود. این نتایج همراه با نتایج حاصل از مقایسه سایر کروماتوگرام‌های ایزولاین‌ها (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 پپتید نزدیک، بالا باقی بماند. همچنین این موضوع بین گلیادین‌های امگا و آلفا اختلاط ایجاد نموده است. با این وجود، برای



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

فاصله تشابه



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

مشاهده شد، از زمینه ژنتیکی محدودی برخوردارند. به علاوه انود و همکاران (۱۳) و لوخارت و همکاران (۲۵) از ارقام تجارتي 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 تجارتي بهاره و پاییزه و با زمینه ژنتیکی نسبتاً متنوع، بتوان گروه بندی مطلوبی از آنها به دست آورد.

نتایج تجزیه مؤلفه‌های اصلی بر روی ۲۷ متغیر مورد نظر (جدول ۱) بیانگر توجه ۱۷،۲۲،۳۴ و ۱۲ درصد از تغییرات داده‌های گلپدین، به ترتیب توسط مؤلفه‌های اصلی اول تا چهارم می‌باشد. بنابراین سه مؤلفه اصلی اول، ۷۳ درصد از تغییرات مکان ژنی $Gli-1$ و $Gli-2$ را در ایزولاین‌ها توجه می‌کنند. بر اساس همبستگی متغیرها با مؤلفه‌ها، مؤلفه اصلی اول پلی‌پپتیدهای با زمان ماندگاری ۹/۲۰۲، ۱۰/۱۵۰، ۱۱/۷۷۵ و ۱۱/۹۴۱ و ۱۶/۴۵۸ را با پلی‌پپتیدهای با زمان

۱۵، سایر ارقام و ارقام بومی را به گروه‌های زیادی تقسیم می‌کند. البته این قضاوت بر اساس پلی‌پپتیدهای 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 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 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 این که زمینه ژنتیکی ارقام مورد مطالعه این پژوهشگران (۱۳ و ۲۵) بسیار متنوع بوده است، اما ژنوتیپ‌های این مطالعه به طوری که

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

میانگین زمان ماندگاری (دقیقه)	نوع پلی‌پیتید	بردارهای ویژه					
		مؤلفه اصلی اول	مؤلفه اصلی دوم	مؤلفه اصلی سوم	مؤلفه اصلی چهارم	مؤلفه اصلی اول	مؤلفه اصلی دوم
۷/۶۵۸	امگا	۰/۱۱	۰/۳۶	۰/۰۴	۰/۱۲	۰/۳۳	۰/۸۷**
۸/۴۷۰	امگا	۰/۱۳	۰/۱۸	۰/۲۸	۰/۱۳	۰/۳۹	۰/۴۳
۸/۶۵۰	امگا	۰/۱۱	۰/۰۷	۰/۳۷	۰/۲۴	۰/۱۸	۰/۱۸
۹/۰۳۱	امگا	۰/۱۲	۰/۱۶	۰/۲۰	۰/۳۶	۰/۳۷	۰/۳۸
۹/۲۰۲	امگا	۰/۳۰	۰/۱۱	۰/۰۶	۰/۰۴	۰/۲۷	۰/۱۳
۹/۵۶۰	امگا	۰/۰۹	۰/۰۴	۰/۰۴	۰/۴۴	۰/۱۰	۰/۱۰
۱۰/۱۵۰	امگا	۰/۲۴	۰/۰۴	۰/۰۱	۰/۰۹	۰/۱۷	۰/۰۳
۱۰/۳۳۳	امگا	۰/۰۹	۰/۰۲	۰/۱۵	۰/۱۱	۰/۱۷	۰/۰۵
۱۱/۰۱۸	امگا	۰/۲۸	۰/۰۷	۰/۱۸	۰/۰۴	۰/۱۶	۰/۳۲
۱۱/۳۳۷	امگا یا آلفا	۰/۰۹	۰/۲۱	۰/۲۴	۰/۲۵	۰/۲۶	۰/۳۸
۱۱/۴۴۴	آلفا	۰/۰۸	۰/۰۵	۰/۴۱	۰/۰۷	۰/۲۳	۰/۵۰
۱۱/۵۸۲	آلفا	۰/۰۶	۰/۳۵	۰/۱۲	۰/۱۲	۰/۱۹	۰/۱۲
۱۱/۷۷۵	آلفا یا بتا	۰/۲۲	۰/۰۹	۰/۱۵	۰/۱۵	۰/۶۶*	۰/۲۲
۱۱/۹۴۱	آلفا یا بتا	۰/۴۹	۰/۱۲	۰/۰۲	۰/۰۳	۰/۸۸**	۰/۳۰
۱۲/۱۹۶	آلفا یا بتا	۰/۰۹	۰/۲۹	۰/۱۹	۰/۱۴	۰/۲۶	۰/۷۰*
۱۲/۴۴۶	آلفا یا بتا	۰/۲۱	۰/۲۸	۰/۰۱	۰/۰۹	۰/۶۳*	۰/۴۱
۱۲/۹۳۱	بتا	۰/۲۸	۰/۰۹	۰/۰۲	۰/۰۶	۰/۲۱	۰/۰۷
۱۳/۳۲۲	بتا	۰/۰۲	۰/۰۹	۰/۲۴	۰/۴۱	۰/۲۱	۰/۲۱
۱۳/۷۷۵	بتا یا گاما	۰/۱۸	۰/۲۳	۰/۰۲	۰/۲۰	۰/۵۴	۰/۵۵*
۱۴/۰۷۱	بتا یا گاما	۰/۰۸	۰/۲۷	۰/۰۹	۰/۳۱	۰/۲۳	۰/۶۵*
۱۴/۷۰۲	بتا یا گاما	۰/۲۵	۰/۰۹	۰/۰۳	۰/۲۷	۰/۷۵**	۰/۲۲
۱۵/۳۰۳	گاما	۰/۳۱	۰/۰۷	۰/۰۸	۰/۱۳	۰/۹۳**	۰/۲۲
۱۵/۷۱۲	گاما	۰/۰۳	۰/۳۰	۰/۲۸	۰/۰۷	۰/۰۸	۰/۷۳*
۱۵/۸۸۹	گاما	۰/۱۷	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۰۶	۰/۵۱	۰/۵۹
۱۶/۱۸۰	گاما	۰/۰۷	۰/۲۸	۰/۲۷	۰/۰۴	۰/۲۱	۰/۶۸
۱۶/۳۵۵	گاما	۰/۱۴	۰/۲۱	۰/۳۰	۰/۱۱	۰/۲۵	۰/۵۱
۱۶/۴۵۸	گاما	۰/۳۱	۰/۰۸	۰/۰۹	۰/۰۹	۰/۹۴**	۰/۲۰
مقدار ویژه		۹/۲۲	۵/۷۹	۴/۷۰	۳/۱۳	۳/۱۳	۳/۱۳
مقدار ویژه نسبی (%)		۳۳	۵۶	۷۳	۸۵	۸۵	۸۵

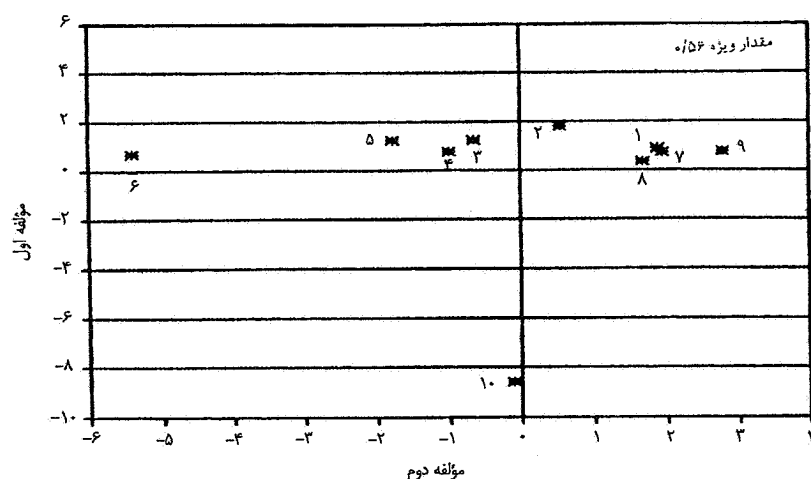
* و ** - به ترتیب معنی‌دار در سطوح احتمال ۵ و ۱ درصد

روی داده‌های مقادیر نسبی پلی پپتیدهایی به دست آمده است که در آنها اثرات کمی درصد پروتئین تقریباً "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 می توان جهت ادغام برخی از آنها در ژنوتیپی خاص، به تلاقی بین ارقام مختلف اقدام نمود.

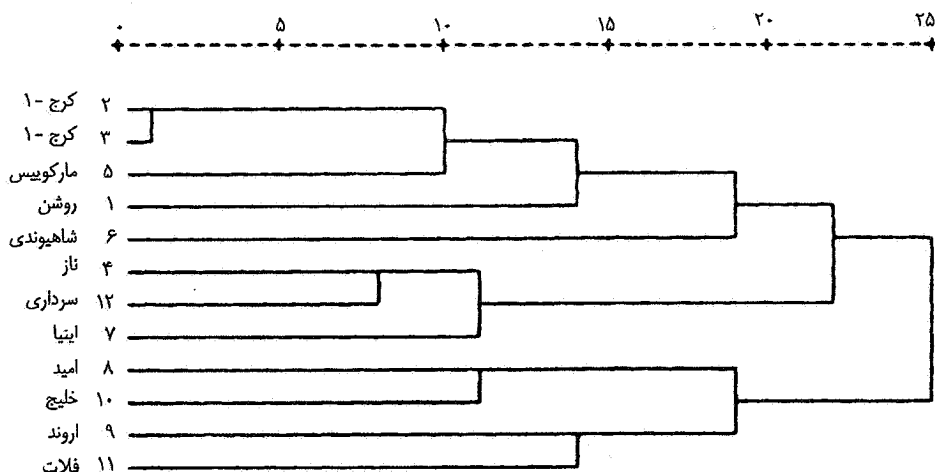
باتوجه به جدول ۱، مؤلفه‌های اصلی اول تا چهارم در قالب تقریبی ۱۴ پیک از مکان ژنی ۱ - Gli و ۹ پیک از مکان ژنی ۲ - Gli، هشتاد و پنج درصد از تغییرات داده‌ها را توجیه می کنند. بنابراین احتمالاً " سهم مکان ژنی ۱ - Gli در تنوع ژنتیکی کل ایزولاین‌ها، نسبت به مکان ژنی ۲ - Gli اندکی بیشتر است. همچنین تعداد بیشتر 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 بهار و پاییزه، بیانگر امکان طبقه بندی ژنوتیپ‌ها با استفاده از روش تجزیه مؤلفه‌های اصلی است. همان طوری که مشاهده می شود کلیه ایزولاین‌ها در یک بخش از نمودار و رقم مارکوویس در ناحیه‌ای دیگر قرار گرفته اند. 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 ژنوتیپ‌ها مطابقت دارد.

نمودار خوشه‌ای حاصل از تجزیه مقدار نسبی ۲۴ پیک RP-HPLC در ارقام زراعی ایران همراه با اینیا و رقم شاهد مارکوویس (شکل ۵) بیانگر اختلافات ژنتیکی بیشتر این ارقام در مقایسه با ایزولاین‌ها (شکل ۳) می باشد. مقدار ضریب همبستگی کوفنتیک برای این نمودار برابر ۰/۸۴ بود. بنابراین قابلیت روش UPGMA برای ارقام زراعی خوب می باشد. در این شکل فاصله تشابه ۲۵ برابر با فاصله اقلیدسی ۲۲/۵۴ بود و بر اساس بررسی تغییرات مقادیر D، تعداد مطلوب گروه‌ها برابر با ۵ تشخیص داده شد. بنابراین با انتخاب فاصله تشابه تقریبی ۱۴/۸ تا ۱۶/۵ (معادل فاصله اقلیدسی ۱۳/۶ تا ۱۷/۱) پنج گروه (۱) کرج - ۱، مارکوویس و روشن؛ (۲) شاهوندی؛ (۳) ناز،

ماندگاری ۱۰/۳۷۳، ۱۱/۰۱۸، ۱۲/۶۴۶، ۱۲/۹۳۱، ۱۴/۷۰۲ و ۱۵/۳۰۳ مقایسه می نماید. 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 و ۱۵/۷۱۳ و مؤلفه اصلی سوم پیک‌های با زمان ماندگاری ۱۶/۳۵۵ را با پیک‌های با زمان ۸/۶۵۰ و ۱۱/۴۴۴ مقایسه می کند. مؤلفه اصلی چهارم نیز میانگینی وزنی از متغیرهای با زمان ماندگاری ۹/۰۳۱، ۹/۵۶۰ و ۱۳/۳۲۲ می باشد. به عبارت دیگر متغیرهای با ضریب همبستگی مثبت و منفی در هر مؤلفه با یکدیگر مقایسه می شوند، به طوری که افزایش گروه با ضریب 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 نمی باشد (نتایج گزارش نشده است)، استنباط می شود 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 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 تعدیل نمی گردد)، قابل تعمیم به سایر ژنوتیپ‌ها باشند، در آن صورت انتخاب ژنوتیپ‌هایی که حاوی پلی پپتیدهای مطلوب بیشتر و پلی پپتیدهای نامطلوب کمتر (مثلاً) از لحاظ کیفیت پلی پپتیدهای نشانگر و غیره) باشند، امکان پذیر خواهد بود. از آن جایی که این نتایج بر



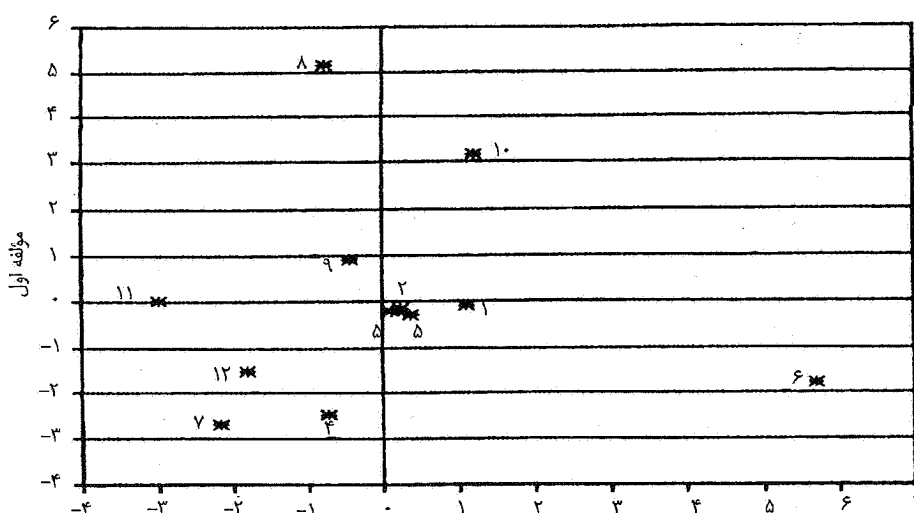
شکل ۴- نمودار حاصل از رسم مؤلفه اصلی اول و دوم در ایزولاین‌های بهاره و پاییزه. ژنوتیپ‌ها عبارتند از: ۱- انزای بهاره، ۲- انزای پاییزه، ۳- پورتولای بهاره، ۴- پورتولای پاییزه، ۵- تانوری بهاره، ۶- تانوری پاییزه، ۷- سیت سروس بهاره، ۸- سیت سروس پاییزه، ۹- پیستیک بهاره و ۱۰- مارکوئیس فاصله تشابه



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

مربوط باشد. شاهپوندی (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 مسؤل سنتز اجزای گلیادین‌ها می‌باشد. با وجود این، نسبت دادن کلیه ۱۰ پلی‌پیتید حذف شده به ژنوم D منطقی به نظر نمی‌رسد، زیرا ممکن است تعدادی از آنها به تفاوت‌های کیفی معمولی در مکانهای ژنی کروموزوم‌های ۱A، ۱B، ۱A، ۱B و ۶B مربوط باشند.

سرداری، و اینیا؛ ۴) امید و خلیج؛ و ۵) ارونند و فلات تشکیل می‌گردد. رقم کرج-۱، که از تلاقی روشن و رقمی خارجی به‌دست آمده است، با روشن و مارکوئیس در یک گروه قرار گرفتند. بنابراین شباهت‌های کرج-۱ و روشن با شجره آنها مطابقت دارد و مارکوئیس، 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



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- مارکوئیس، ۶- شاهینودی، ۷- اینیا، ۸- امید، ۹- اروند، ۱۰- خلیج، ۱۱- فلات و ۱۲- سرداری

پلی پپتیدهای با ضریب همبستگی مثبت و منفی معنی دار در هر مؤلفه ارائه گردید، در این جا نیز صادق است. از طرف دیگر بر خلاف جدول ۱، در این ارقام ۷ پلی پپتید از مکان ژنی Gli-۱ و ۱۰ پلی پپتید از مکان ژنی Gli-۲ هفتاد درصد از تغییرات داده‌ها را توجیه می‌کنند. بدین ترتیب براساس ۷۰ درصد از تغییرات داده‌ها، سهم مکان ژنی Gli-۲ (بازوی کوتاه کروموزوم ۶) در تغییرات داده‌ها کمی بیشتر از مکان ژنی Gli-۱ (بازوی کوتاه کروموزوم ۱) است. نمودار مؤلفه‌های اصلی اول و دوم (شکل ۶) توزیع مناسبی از پراکنش 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 پلی پپتید 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 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 (به خصوص 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 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.

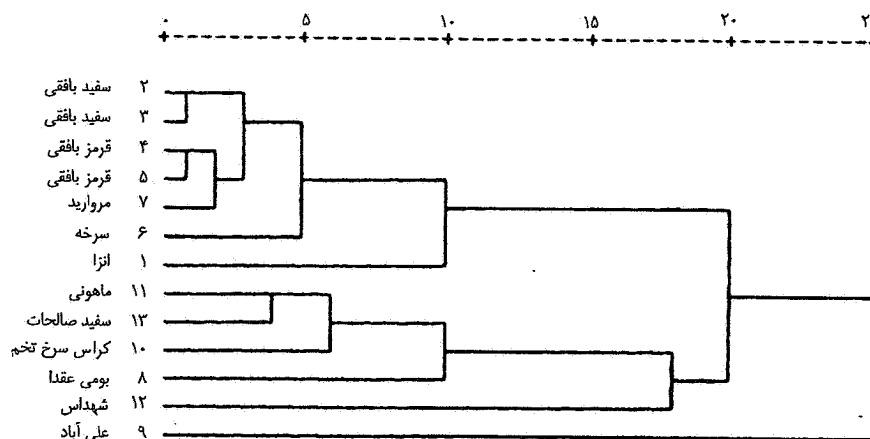
نتایج مؤلفه‌های اصلی بر روی ۲۴ متغیر نشان داد که به ترتیب ۲۱، ۲۰، ۱۷ و ۱۲ درصد از تغییرات مکانهای Gli-۱ و Gli-۲ در این ارقام توسط مؤلفه‌های اصلی اول تا چهارم توجیه می‌گردد (جدول ۲). این نتیجه در مقایسه با نتایج تجزیه ایزولاین‌ها (جدول ۱) و گزارش لوخارت و همکاران (۲۵)، ضمن تایید نتایج تجزیه خوشه‌ای، بیانگر تنوع ژنتیکی بیشتر بین ارقام زراعی نسبت به ایزولاین‌های مورد بررسی می‌باشد. به عبارت دیگر با کاهش شباهتها، همبستگی بین پلی پپتیدهای گلیادین کاهش یافته و در نتیجه مؤلفه‌ها درصد کمتری از تغییرات کل را توجیه می‌کنند. توجیه قبلی که در مورد ایزولاین‌ها برای

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

میلنگین زمان ماندگاری (دقیقه)	نوع پلی‌پیتید	مقدارهای ویژه					
		مؤلفه اصلی اول	مؤلفه اصلی دوم	مؤلفه اصلی سوم	مؤلفه اصلی چهارم	مؤلفه اصلی اول	مؤلفه اصلی دوم
۸/۴۷۰	امگا	۰/۱۸	۰/۰۸	۰/۲۵	۰/۱۰	۰/۴۰	۰/۱۷
۹/۳۳۱	امگا	۰/۱۳	۰/۰۳	۰/۱۴	۰/۳۴	۰/۲۹	۰/۰۶
۹/۶۰۲	امگا	۰/۳۴	۰/۱۲	۰/۰۰۸	۰/۱۳	۰/۷۹**	۰/۲۶
۱۰/۳۷۳	امگا	۰/۱۹	۰/۳۳	۰/۱۴	۰/۲۰	۰/۴۳**	۰/۵۱
۱۰/۹۳۳	امگا	۰/۳۲	۰/۰۴	۰/۱۸	۰/۳۳	۰/۷۱**	۰/۱۰
۱۱/۰۱۸	امگا یا آلفا	۰/۱۸	۰/۱۴	۰/۳۱	۰/۲۲	۰/۴۱	۰/۳۰
۱۱/۲۵۲	آلفا	۰/۰۸	۰/۱۷	۰/۲۷	۰/۳۶	۰/۱۸	۰/۳۸**
۱۱/۴۴۴	آلفا یا بتا	۰/۰۳	۰/۳۷	۰/۰۷	۰/۱۳	۰/۰۷	۰/۸۲**
۱۱/۶۷۹	آلفا یا بتا	۰/۲۱	۰/۱۵	۰/۲۳	۰/۱۷	۰/۴۸	۰/۳۴**
۱۱/۹۴۱	آلفا یا بتا	۰/۰۲	۰/۲۹	۰/۱۵	۰/۲۹	۰/۰۴	۰/۶۴**
۱۲/۱۹۶	آلفا یا بتا	۰/۰۱	۰/۳۳	۰/۱۲	۰/۰۵	۰/۰۲	۰/۷۲**
۱۲/۴۲۰	آلفا یا بتا	۰/۱۳	۰/۰۳	۰/۲۵	۰/۰۵	۰/۲۹	۰/۰۶
۱۲/۶۲۶	آلفا یا بتا	۰/۱۱	۰/۳۴	۰/۱۷	۰/۰۵	۰/۲۶	۰/۷۴**
۱۲/۹۳۱	بتا	۰/۱۶	۰/۰۲	۰/۲۱	۰/۲۴	۰/۳۶	۰/۰۴
۱۲/۳۲۲	بتا	۰/۱۶	۰/۳۱	۰/۰۴	۰/۲۲	۰/۳۷**	۰/۷۰*
۱۳/۶۷۹	بتا یا گاما	۰/۳۹	۰/۰۵	۰/۱۱	۰/۱۹	۰/۸۹**	۰/۱۰
۱۳/۷۷۵	بتا یا گاما	۰/۳۲	۰/۱۴	۰/۱۵	۰/۱۴	۰/۷۲**	۰/۳۰
۱۳/۹۰۷	بتا یا گاما	۰/۲۹	۰/۱۵	۰/۳۲	۰/۱۱	۰/۶۵*	۰/۳۳
۱۴/۰۷۱	بتا یا گاما	۰/۱۶	۰/۰۶	۰/۳۶	۰/۲۵	۰/۳۷	۰/۱۴
۱۴/۷۰۲	بتا یا گاما	۰/۱۷	۰/۲۰	۰/۰۱	۰/۲۵	۰/۳۹	۰/۴۴
۱۴/۹۰۹	گاما	۰/۲۳	۰/۰۵	۰/۱۹	۰/۳۸	۰/۵۳	۰/۱۱
۱۵/۲۰۷	گاما	۰/۱۳	۰/۲۸	۰/۲۸	۰/۱۸	۰/۴۹	۰/۶۲*
۱۵/۸۸۹	گاما	۰/۲۵	۰/۱۹	۰/۲۹	۰/۰۰۸	۰/۵۷	۰/۴۲*
۱۶/۲۵۲	گاما	۰/۰۶	۰/۳۲	۰/۰۶	۰/۱۶	۰/۱۴	۰/۷۰*
مقدار ویژه		۵/۱۳	۴/۸۶	۴/۰۵	۷/۹۶	۰/۴۰	۰/۵۰
مقدار ویژه تجمی (%)		۲۱	۴۱	۵۸	۷۰		

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

فاصله تشابه



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

(۵) شهداس و (۶) علی آباد تشکیل گردید. با توجه به این‌که به غیر از انزا (رقم شاهد)، شهداس و سفید صالحات بقیه ژنوتیپ‌ها ارقام بومی استان یزد هستند، نتیجه‌گیری 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 با بقیه 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)، بیانگر توجیه 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. در تجزیه مؤلفه‌های اصلی و تجزیه خوشه‌ای، نمونه‌های حاصل از تجزیه تک بذر (سفید بافتی و قرمز بافتی) دخالت داده شده‌اند، که احتمالاً یکی از دلایل افزایش توجیه مؤلفه اصلی اول، همین مسأله است. در ارقام

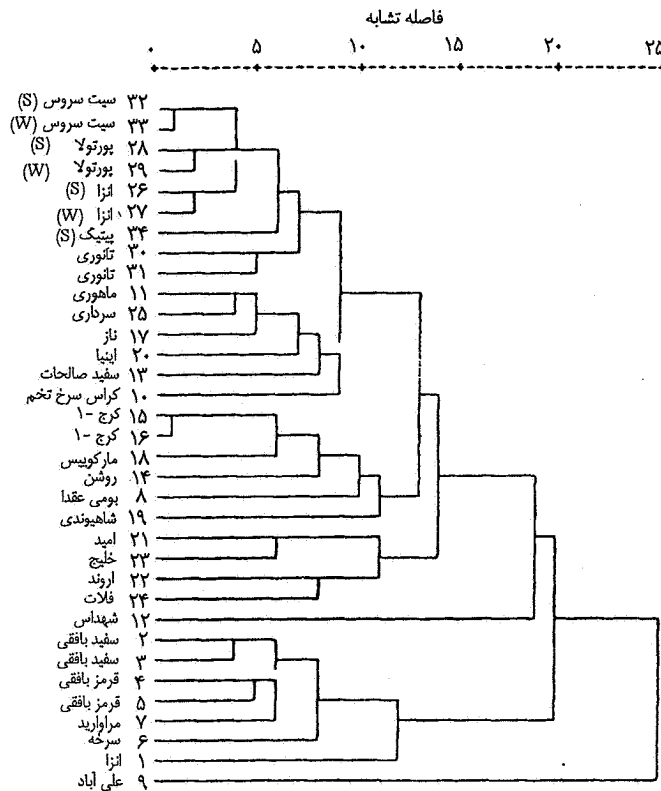
همبستگی کوفنتیک برای این نمودار برابر ۰/۹۵ بود. بنابراین قابلیت تجزیه خوشه‌ای بسیار خوب بوده است. با توجه به مقیاس فاصله تشابه کل (۳۷/۳)، بذور اول و دوم گندم سفید بافتی در فاصله اقلیدسی ۸/۱۱ و بذور اول و دوم گندم قرمز بافتی در فاصله اقلیدسی ۸/۷۵ در یک گروه قرار گرفتند. این فاصله تقریباً ۴ برابر فاصله 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 بافتی 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 تا ۲۹ می‌باشد، در حالی که در ارقام زراعی با انتخاب فاصله اقلیدسی ۱۳/۶ تا ۱۷/۱ پنج گروه تشکیل گردید. برای مقایسه این دو گروه از ژنوتیپ‌ها در این جا نیز فاصله اقلیدسی ۱۵ تا ۱۹ (معادل فاصله تشابه ۶ تا ۱۰) انتخاب شد. بر این اساس شش گروه شامل (۱: دو نمونه سفید بافتی، دو نمونه قرمز بافتی، مروارید و سرخه احمدآباد؛ ۲) انزا؛ (۳) ماهونی، سفید صالحات و کراس سرخ تخم؛ (۴) عقدا؛

جدول ۳- نتایج تجزیه مؤلفه‌های اصلی برای پلی‌پیتیدهای گیادین در ارقام بومی

میانگین زمان ماندگاری (دقیقه)	نوع پلی‌پپتید	بردارهای ویژه					
		مؤلفه اصلی اول	مؤلفه اصلی دوم	مؤلفه اصلی سوم	مؤلفه اصلی چهارم	مؤلفه اصلی اول	مؤلفه اصلی دوم
۸/۴۷	امگا	۰/۱۱	۰/۱۵	۰/۲۲	۰/۴۰	۰/۳۹	۰/۳۰
۸/۸۵۲	امگا	۰/۱۲	۰/۰۵	۰/۱۶	۰/۴۵	۰/۴۲	۰/۱۱
۹/۰۳۱	امگا	-۰/۰۳	۰/۳۴	-۰/۱۰	۰/۱۲	-۰/۱۰	۰/۶۷*
۱۰/۷۲۹	امگا	۰/۲۵	۰/۱۵	۰/۱۲	۰/۰۳	۰/۸۷**	۰/۳۰
۱۰/۸۴۷	امگا	-۰/۲۶	-۰/۰۳	-۰/۰۲	-۰/۰۴	-۰/۸۹*	-۰/۰۶
۱۰/۹۲۳	امگا	۰/۱۷	۰/۰۵	۰/۰۵	-۰/۴۲	۰/۶۱*	۰/۱۰
۱۱/۰۱۸	امگا	-۰/۱۶	-۰/۲۲	۰/۱۰	۰/۳۳	-۰/۵۵*	۰/۱۸
۱۱/۲۵۲	امگا یا آلفا	-۰/۱۷	-۰/۲۷	۰/۲۲	-۰/۰۱	-۰/۵۸*	۰/۴۱
۱۱/۳۴۷	آلفا	۰/۱۳	۰/۰۴	-۰/۱۵	-۰/۱۷	۰/۴۷	-۰/۳۰
۱۱/۶۷۹	آلفا یا بتا	-۰/۰۳	۰/۱۰	۰/۱۷	-۳۴	-۰/۱۰	-۰/۱۹
۱۱/۸۶۱	آلفا یا بتا	۰/۰۹	-۰/۲۳	-۰/۱۸	۰/۱۵	۰/۳۲	-۰/۴۵
۱۱/۹۴۱	آلفا یا بتا	-۰/۰۶	۰/۰۲	۰/۲۰	-۰/۰۵	-۰/۶۹**	۰/۰۳
۱۲/۰۵۲	آلفا یا بتا	۰/۲۳	-۰/۱۸	-۰/۰۸	۰/۱۷	-۰/۸۱**	-۰/۳۵
۱۲/۱۹۶	آلفا یا بتا	-۰/۲۶	۰/۱۱	۰/۰۸	-۰/۰۵۷	-۰/۹۲**	۰/۲۱
۱۲/۶۴۶	آلفا یا بتا	-۰/۱۸	-۰/۲۱	۰/۲۲	۰/۰۳	-۰/۶۳*	۰/۰۴
۱۲/۸۲۰	بتا	۰/۲۴	-۰/۱۴	-۰/۱۲	-۰/۰۹	-۰/۸۵**	-۰/۲۱
۱۲/۹۳۱	بتا	۰/۲۷	-۰/۱۱	-۰/۱۶	-۰/۰۹	۰/۷۷**	-۰/۲۸
۱۳/۱۹۶	بتا	۰/۲۲	-۰/۰۲	۰/۱۲	-۰/۰۵۹	-۰/۷۵**	-۰/۰۴
۱۳/۳۲۲	بتا یا گاما	۰/۲۲	۰/۰۵	۰/۰۴	۰/۰۵۸	۰/۷۶**	۰/۱۰
۱۳/۳۹۱	بتا یا گاما	۰/۲۲	۰/۱۵	۰/۲۰	۰/۰۵	۰/۷۸*	۰/۳۰
۱۳/۵۶۰	بتا یا گاما	-۰/۰۳	۰/۰۴	۰/۴۴	-۰/۱۳	-۰/۱۲	۰/۰۷
۱۳/۷۷۵	بتا یا گاما	۰/۰۳	-۰/۴۵	-۰/۱۱	۰/۱۱	-۰/۱۲	۰/۰۷*
۱۴/۰۷۱	بتا یا گاما	۰/۰۸	۰/۰۵	۰/۳۲	-۰/۱۰	۰/۲۹	-۰/۸۷*
۱۴/۷۰۲	گاما	۰/۲۷	۰/۰۸	۰/۰۶	-۰/۱۶	۰/۱۰	۰/۱۰
۱۵/۰۹۶	گاما	-۰/۲۲	۰/۲۳	-۰/۱۵	۰/۰۴	۰/۹۳**	۰/۱۶
۱۵/۲۰۷	گاما	۰/۱۸	۰/۱۱	۰/۳۲	۰/۰۶	-۰/۷۸**	۰/۴۴
۱۵/۸۸۹	گاما	-۰/۱۸	-۰/۲۹	-۰/۰۲	۰/۰۱	۰/۶۳*	۰/۲۱
۱۶/۲۵۲	گاما	-۰/۱۰	۰/۲۹	-۰/۳۰	-۰/۰۹	-۰/۳۷*	-۰/۳۷*
۱۶/۴۵۸	گاما	-۰/۰۶	۰/۲۴	-۰/۱۴	۰/۲۰	-۰/۳۴	۰/۵۷*
مقدار ویژه		۱۲/۱۷	۳/۸۰	۳/۳۱	۷/۶۵	۷/۶۵	۰/۴۶
مقدار ویژه تجمعی (%)		۴۰	۵۳	۶۴	۷۳	۷۳	-۰/۱۵

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



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

حذف) برخی از پلی‌پپتیدهای متداول تر خواهد شد. به عبارت دیگر، انتخاب ژنوتیپی حاوی پلی‌پپتید جدید، بر روی سایر پلی‌پپتیدها 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 خوشه‌ای مطابقت داشت (شکلها گزارش نشده‌اند).

شکل ۸ نمودار خوشه‌ای حاصل از تجزیه پلی‌پپتیدهای گلیادین را در کلیه ژنوتیپ‌ها نشان می‌دهد. این شکل حاصل تجزیه ۴۷ پلی‌پپتید می‌باشد که از این تعداد ۱۲ پلی‌پپتید در سه گروه، ۱۰ پلی‌پپتید در دو گروه و ۲۵ پلی‌پپتید 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 و ۲ - Gli در تغییرات داده‌ها تقریباً یکسان می‌باشد. در ضمن توجه‌های قبلی در مورد متغیرهایی که در هر مؤلفه با یکدیگر مقایسه می‌شوند، در این‌جا نیز صادق است. مسأله قابل توجه پلی‌پپتیدهایی هستند که در مؤلفه اصلی اول باهم مقایسه می‌گردند. کلیه پلی‌پپتیدهایی که با مؤلفه اصلی اول همبستگی مثبت و معنی دار دارند، در ارقام زراعی یا ایزولاین‌ها (جداول ۱ و ۲) وجود ندارند (تجزیه پلی‌پپتید با زمان ماندگاری ۱۰/۹۲۳ در ارقام زراعی نیز وجود دارد). در حالی که از بین پلی‌پپتیدهایی که با این مؤلفه همبستگی منفی و معنی دار دارند، ۶ پلی‌پپتید در کلیه ژنوتیپ‌های تحت مطالعه حضور دارند. این موضوع نشان می‌دهد که اگر برخی از پلی‌پپتیدهای جدید از نظر پژوهشگر مفید باشند، انتخاب برای آنها منجر به کاهش (یا

می توان جداسازی معادل زمان تجزیه ۵۰ تا ۶۰ دقیقه ای را نیز به دست آورد.

تعداد اجزای حاصل از تجزیه گلیادین ها در این مطالعه (۳۰-۲۵ پیک بزرگ بدون گسترش مقیاس کروماتوگرام) بیشتر از تجزیه الکتروفورزی می باشد. از آن 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 داده ها را آسان نمود. بنابراین نتیجه گیری می شود که تجزیه RP-HPLC پروتئین های گلیادین (باهره دفی که انجام گیرد) حداقل دارای قابلیت های روش الکتروفورزی می باشد.

سپاسگزاری

هزینه های انجام این مطالعه توسط دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی اصفهان و سازمان تات تأمین شده است که بدین وسیله سپاسگزاری می گردد. از پروفسور برالر ای. بیتز از وزارت کشاورزی امریکا به واسطه راهنمایی های ارزشمند ایشان در زمینه موضوع تحقیق و ارسال مقالات کاربردی قدردانی می شود. همچنین از آقای دکتر زین العابدین شبیری صدر عضو هیأت علمی سازمان پژوهش های 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 راهنمایی های آنها در زمینه HPLC، سپاسگزاری می گردد.

تزیق مجدد کرج - ۱ (به منظور کنترل)، به طور مجزاد تجزیه آورده شده اند. ضریب همبستگی کوفتیک برای این نمودار برابر ۰/۸۲ بود که بیانگر کارایی خوب روش تجزیه خوشه ای می باشد. با انتخاب فواصل اقلیدسی ذکر شده در شکل های ۳، ۴ و ۷ و توجه به مقیاس واقعی نمودار (فاصله اقلیدسی ۳۹/۷۵)، همان گروه های قبلی تشکیل گردیدند. در مجموع با انتخاب فاصله اقلیدسی ۱۵، تعداد ۱۱ گروه به شرح زیر تشکیل شد: (۱) ایزولاین ها؛ (۲) ماهونی، سرداری، ناز، اینیا، سفید صالحات و کراس سرخ تخم؛ (۳) کرج - ۱، مارکو بیس و روشن؛ (۴) عقدا؛ (۵) شاهبندی؛ (۶) امید و خلیج؛ (۷) اروند و فلات؛ (۸) شهداس؛ (۹) سفید بافقی، قرمز بافقی، مروارید و سرخه؛ (۱۰) انزا و (۱۱) علی آباد. در این بین گروه های ۱۰، ۹، ۸ و ۱۱ تفاوت های ژنتیکی فوق العاده ای با بقیه گروه ها دارند. این نتایج نشان می دهد که از ایزولاین ها تا ارقام بومی، تنوع ژنتیکی نیز افزایش می یابد و ارقام زراعی مورد بررسی در حد واسط قرار می گیرند. در این بین گندم های علی آباد، شهداس و عقدا تنوع قابل ملاحظه ای از خود نشان می دهند.

با توجه به نتایج این مطالعه و گزارش های هابنز و بیتز (۱۸) و (۱۹) کلیه شرایط تجزیه در این مطالعه (ترکیب فاز متحرک، غلظت TFA، زمان تجزیه، درجه حرارت ستون، میزان جریان، حجم تزیق 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 (مثلاً ۶۰-۵۰ دقیقه به جای ۳۰ دقیقه) می توان جداسازی را بهبود بخشید. با وجود این، در صورت کاربرد ستون های 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 گلو تنین با وزن مولکولی بالا در گندم. مجله علوم کشاورزی ایران، جلد ۲۶، شماره ۲، صفحه ۲۱-۱۱.
- ۲- رضایی، ع.م. ۱۳۷۶. رابطه بین زیر واحدهای گلو تنین 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- 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.

- 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.* AACCC, 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.