

بِسْمِ تَعَالَى

وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات و آموزش کشاورزی
مؤسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال

نشریه فنی

راهنمای اجرای آزمون های تمایز، یکنواختی و پایداری
ارقام گندم نان

(*Triticum aestivum* L. emend. Fiori et Paol.)
ژنو ، سال 1994

تابستان 1386

وزارت جهاد كشاورزی
سازمان تحقیقات و آموزش كشاورزی
مؤسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال

نشریه فنی

راهنمای اجرای آزمون های تمایز، یکنواختی و پایداری
ارقام گندم نان

(*Triticum aestivum* L. emend. Fiori et Paol.)
ژنو ، سال 1994

ترجمه و تنظیم :

سعید حاجیلویی

عضو هیئت علمی مؤسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال

تابستان 1386

فرم ثبت انتشارات وزارت جهاد کشاورزی
در مرکز اطلاعات و مدارك علمی و تحقیقاتی کشاورزی

عنوان : راهنمای اجرای آزمون های تمایز، یکنواختی و پایداری
ارقام گندم نان

نویسنده :
مترجم : مهندس سعید حاجیلویی

در صورتی که اثر ترجمه باشد لطفاً عنوان و مشخصات
کامل مآخذ اصلی را مرقوم فرمائید

International Union for the Protection of New Varieties of Plants. These Test
Guidelines apply to all varieties of *Triticum aestivum* L. emend. Fiori et Paol.
TG/3/11 + Corr. Date : 1994-11-04 + 1996-10-18 Geneva . UPOV

این راهنما باید همراه با مقاله شماره UPOV/TG/1/2، مورد
مطالعه قرار گیرد ، مقاله مذکور حاوی توضیحات مربوط به
اصول عمومی مرتبط با راهنمای آزمایشات می باشد.
تمام یا قسمتی از این مقاله بدون اخذ موافقت از اتحادیه
بین المللی برای حفاظت از حق مالکیت معنوی ارقام جدید گیاهی
می تواند تکثیر، ترجمه و چاپ شود، مشروط بر اینکه منبع در
آنها ذکر گردد.

ترجمه و تنظیم: مهندس سعید حاجیلویی
ناظر:

ویراستاران: دکتر جواد شاطریان و دکتر آیدین حمیدی
چاپ: اول

در صورت تجدید چاپ لطفاً تاریخ انتشار چاپ های
قبلی را مرقوم فرمائید

ویرایش: اول

محل نشر: کرج

نام ناشر: مؤسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال

تاریخ انتشار: تابستان 1386

تعداد صفحات: 45 صفحه

تیراژ: 30 نسخه

زبان متن: فارسی

زبان اصلی: انگلیسی

لطفاً موضوع کتاب یا نشریه خود را در حدود 50
کلمه مرقوم فرمائید

یکی از راههای حمایت از حقوق اصلاحگران نباتات زراعی، ثبت ارقام اصلاح شده است. ثبت رقم با بررسی صفات ظاهری و مولکولی انجام می‌گیرد. این نشریه به توضیح اینگونه صفات پرداخته و نحوه یادداشت برداری از آنها را شرح می‌دهد. اینگونه صفات چنانچه کمتر تحت تأثیر شرایط محیطی قرار گیرند و به اندازه کافی متمایز، یکنواخت و پایدار باشند، ملاک ثبت و تهیه کاتالوگ رقم جدید قرار خواهند گرفت.

نوع :

اداری □

نشریه ■

کتاب □

نام نشریه: راهنمای اجرای آزمون های تمایز، یکنواختی و پایداری ارقام گندم نان

نگارش: مهندس سعید حاجیلویی

ویراستاران: دکتر جواد شاطریان و دکتر آیدین حمیدی

ناشر: مؤسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال

تاریخ انتشار ترجمه: تابستان 1386

تعداد صفحات: 45 صفحه

تیراژ: 30 نسخه

این نشریه به تأیید شورای انتشارات مؤسسه ثبت و گواهی بذر
و نهال رسیده و به شماره تاریخ در مرکز
اطلاعات و مدارك علمی و تحقیقاتی به ثبت رسیده است.

فهرست مندرجات :

بخش اول:	7.....
موضوع این راهنما:	7.....
مواد مورد نیاز:	7.....
اجرای آزمون‌ها:	8.....
روش‌ها و مشاهده‌ها:	8.....
گروه بندی ارقام :	9.....
صفات و علائم:	9.....
جدول صفات:	11.....
بخش دوم:	19.....
توضیح برخی از صفات ارائه شده در جدول:	19.....
کولئوپتیل: رنگ آنتوسیانین.	19.....
روش اندازه گیری رنگ آنتوسیانین:	19.....
گیاه: عادت رشد.	20.....
گیاه: فراوانی گیاهان دارای برگ پرچمهای خمیده:	20.....
برگ پرچم: مومی بودن غلاف.	20.....
ساقه: مغز در برش عرضی(در فاصله میان پایه سنبله و گره ساقه زیر آن).	21.....
سنبله: شکل نیمرخ.	21.....
سنبله: تراکم.	21.....
ریشک‌ها یا اسکورها:	22.....
بالاترین بند محور سنبله: میزان کرکی بودن سطح برجسته.	22.....
پوشه پایینی: عرض شانه(در سنبلچه واقع در یک سوم میانی سنبله).	23.....
پوشه پایینی: شکل شانه(در سنبلچه واقع در یک سوم میانی سنبله).	23.....
پوشه پایینی: شکل نوک(در سنبلچه واقع در یک سوم میانی سنبله).	24.....
پوشه پایینی: مقدار کرک سطح داخلی(در سنبلچه واقع در یک سوم میانی سنبله).	24.....
پوشینک پشتی(لما): شکل نوک(در سنبلچه واقع در یک سوم میانی سنبله).	24.....
بذر: رنگ پذیری با فنل.	26.....
روش تعیین عکس العمل به فنل:	26.....
تیپ فصلی:	27.....
بخش سوم:	28.....
جدول کدهای دهی زادکس برای تعیین مراحل رشد غلات.	28.....
بخش چهارم:	32.....
پرسش نامه فنی.	32.....

- بخش پنجم : 35.....
- 35..... توضیحات اضافی :
- 35..... قسمت اول :
- 35..... مقدمه :
- 36..... قسمت دوم :
- 36..... جدول صفات حاصل از الکتروفورز پروتئینهای ذخیره ای :
- 37..... قسمت سوم :
- 37..... توضیح روش مورد استفاده جهت تعیین ترکیب گلوکزین :
- 37..... 1- ابزار و ادوات :
- 37..... 2- مواد شیمیایی :
- 38..... 3- محلولها :
- 40..... 4- روش :
- 46..... منابع مورد استفاده :

بسمه تعالی
(راهنمای اجرای آزمون های تمایز، یکنواختی و
یابرداری)

بخش اول:

الف: موضوع این راهنما:

این راهنمای آزمون بر روی تمام ارقام گندم نان ***Triticum aestivum*** **L. emend. Fiori et Paol.** استفاده می شود.

ب: مواد مورد نیاز:

1. مراجع ذیصلاح در خصوص زمان، مکان، کمیت و کیفیت مواد گیاهی مورد نیاز آزمون رقم در دست معرفی، تصمیم می گیرند.
2. متقاضیانی که مواد گیاهی را از خارج از کشور محل اجرای آزمون وارد می نمایند، لازم است از پیوست بودن کلیه موافقت نامه های گمرکی آن مواد، اطمینان حاصل نمایند.
3. متقاضی، لازم است حداقل سه کیلوگرم بذر از هر رقم (در یک یا چند نمونه) را ارائه نماید.
4. کیفیت بذر ارائه شده نباید از حداقل استانداردهای گواهی بذور تجارتي کشور بررسی کننده رقم در زمینه ظرفیت جوانه زنی، درصد رطوبت و خلوص بذر پایینتر باشد.
5. در صورت درخواست مراجع ذیصلاح، متقاضی موظف است حداقل 150 خوشه سنبله (برای ارقام زمستانه) و 100 خوشه سنبله (برای ارقام بهاره) از رقم مورد نظر را ارائه نماید. خوشه سنبله ها لازم است کاملاً رسیده عاری از اثر خسارت آفات و بیماریهای گیاهی بوده و حاوی تعداد کافی بذر زنده جهت ایجاد یک ردیف گیاه بالغ و سالم باشند.
6. بر روی مواد گیاهی نباید هیچگونه تیماری (ضد عفونی، غربال و) صورت پذیرد، مگر اینکه اجرای آن تیمار به درخواست افراد ذیصلاح انجام شده باشد. در صورتی که تیماری بر روی مواد گیاهی اجرا شده باشد جزئیات کامل آن باید ارائه شود.

ج: اجرای آزمون‌ها:

1. حداقل دوره اجرای آزمون‌ها معمولاً دو دوره رشد مشابه می باشد.
2. معمولاً آزمون‌ها باید در یک مکان اجرا شوند. چنانچه صفت مهمی از رقم در مکان مورد نظر مشاهده نشود، ممکن است آن رقم را در مکان دیگری نیز مورد آزمون قرار داد.
3. آزمون‌های مزرعه ای باید در شرایطی انجام پذیرد که از رشد طبیعی رقم اطمینان حاصل شود.
4. اندازه کرتها باید به اندازه ای در نظر گرفته شود که برداشت گیاهان یا بخش هایی از آنها به منظور اندازه گیری یا شمارش، بر روی مشاهدات انتهای دوره رشد، اثر سوء بر جا نگذارد.
5. در هر آزمون، از هر رقم حداقل باید 2000 گیاه در دو یا چند تکرار مورد کشت قرار گیرد. اگر آزمون‌ها به روش خوشه سنبله در ردیف کشت شوند، از هر رقم 100 خوشه سنبله مورد نیاز می باشد.
6. تنها در صورتی می توان برای مشاهده و اندازه گیری از کرت‌های مجزا استفاده نمود که اینگونه کرتها از شرایط محیطی مشابهی برخوردار باشند.
7. ممکن است، آزمون‌های اضافی دیگری به منظور دستیابی به مقاصد خاصی طراحی و اجرا شود.

د: روش‌ها و مشاهده‌ها:

1. تمام مشاهده‌ها برای تشخیص تمایز و پایداری باید از روی 20 گیاه یا قسمتی از 20 گیاه جمع آوری گردد.
2. برای تشخیص یکنواختی صفات در کل یک کرت (ارزیابی چشمی با انجام یک مشاهده بر روی گروهی از گیاهان یا قسمت‌هایی از گیاهان) نباید تعداد گیاه یا قسمت‌های گیاهی غیریکنواخت از نظر خصوصیات مورد نظر، بیش از 5 در 2000 باشد.
3. برای تشخیص یکنواختی صفات بر روی تک خوشه سنبله در ردیف‌ها، گیاهان یا قسمت‌هایی از گیاهان (تشخیص چشمی با انجام مشاهده‌هایی بر روی تک خوشه سنبله در ردیف‌ها، گیاهان یا قسمت‌هایی از گیاهان) تعداد خوشه سنبله در ردیف‌ها، گیاهان یا قسمت‌هایی از گیاهان غیر یکنواخت، نباید بیش از 3 در 100 باشد

ه: گروه بندی ارقام :

1- باید مجموعه ارقام مورد کشت را برای سهولت در تشخیص تمایز، به چند گروه تقسیم نمود. صفاتی که برای گروه بندی ارقام مناسب می باشند، آنهایی هستند که تجربه نشان داده است که آن صفات در داخل یک رقم یا ثابت است و یا اینکه به مقدار کمی تغییر می نماید. همچنین لازم است وضعیت های مختلف بیان اینگونه صفات در مجموعه ارقام به خوبی توزیع شده باشد (صفت در مجموعه ارقام دارای توزیع نرمال باشد).

2- پیشنهاد می شود که افراد ذیصلاح، صفات مشروحه ذیل را در گروه بندی ارقام مورد استفاده قرار دهند.

I. ساقه: کرکدار بودن بالاترین گره (صفت شماره 6).

II. بذر اولیه: مومی بودن پوشینک (صفت شماره 13).

III. بذر: رنگ پوشینک (صفت شماره 20).

و: صفات و علائم:

1- برای تشخیص تمایز، یکنواختی و پایداری، باید از صفات و توضیحات صفات درج شده در جدول صفات ارائه شده توسط اتحادیه بین المللی برای حفاظت از ارقام جدید گیاهی (UPOV)، استفاده نمود.

2- امتیازهای 1 تا 9 به منظور تجزیه و تحلیل الکترونیکی داده ها است و هر صفتی بسته به شدت و ضعف ظهور آن در ارقام مختلف می تواند امتیاز عددی از 1 تا 9 را دریافت نماید.

3- برای برخی صفات دو رقم الگوی متفاوت که با یک علامت سمیکلون (;) از یکدیگر جدا شده اند برای ارقام زمستانه و بهاره یولاف ارائه رقم اول به عنوان الگوی ارقام زمستانه و رقم دوم به عنوان الگوی ارقام بهاره در نظر گرفته می شود.

4- علائم:

(*) وجود این علامت در ستون علائم (جدول صفات) در برابر برخی از صفات، بیانگر وجود الزام در اندازه گیری آن صفات در تمام ارقام و در تمام دوره های رشد است. اینگونه صفات همواره در شناسنامه ارقام درج می شوند، مگر اینکه تحت شرایط محیطی بخصوصی، صفت مورد نظر بیان نشود و یا اینکه امکان یادداشت برداری از حالت های مختلف آن صفت، بر روی ارقام مورد بررسی وجود نداشته باشد.

(+) وجود این علامت در ستون علائم (جدول صفات) نشان دهنده این است که می توان توضیحات اضافی در خصوص آن صفت را در بخش دوم ملاحظه نمود.

5- در ستون مربوط به مرحله رشدی مناسب یادداشت برداری از صفت، عددی ثبت شده است که بیانگر بهترین مرحله یادداشت برداری از صفت مورد نظر است.

6- مراحل مختلف رشد و نمو گیاه شماره گذاری شده و در بخش سوم ارائه گردیده است.

7- حروف انگلیسی ارائه شده در ستون نحوه یادداشت برداری از صفت، روش یادداشت برداری از صفت مورد نظر را به شرح زیر بیان می نماید.

M : اندازه گیری واقعی.

VG : تشخیص چشمی با انجام یک مشاهده بر روی گروهی از گیاهان یا بخش هایی از گیاهان.

VS : تشخیص چشمی با انجام چند مشاهده بر روی تعدادی سنبله در ردیفها، گیاهان یا بخش هایی از گیاهان.

ز: جدول صفات:

ارقام الگو	ام	توصیف صفت	روش یادداشت برداری	مرحله مناسب یادداشت	علائم (شرح / اهمیت)	صفت	ردیف
Herzog ; Delos	1	نیست یا خیلی ضعیف	VS	9-11	(+) (+)	کلئوپتیل: رنگ آنتوسیانین	1
Niklas ; Baldus	3	ضعیف					
Andros ; Planet	5	متوسط					
Obelisk ; Briscard	7	قوی					
Albatros ; ---	9	خیلی قوی					
Castan ; ---	1	عمودی	VG	25-29	(*) و (+)	گیاه: عادت رشد	2
Frandoc ; Remus	3	نیمه عمودی					
Obelisk ; Troll	5	بینابین					
Boss ; ---	7	نیمه خوابیده					
Beaver ; ---	9	خوابیده					
Soissons ; Prinqual	1	نیست یا خیلی ضعیف	VG	49-51	---	برگ پرچم: رنگ آنتوسیانین گوشوارگها	3
Niklas ; Troll	3	ضعیف					
Cargidoc ; ---	5	متوسط					
Cargo ; Sunnan	7	قوی					
Recital ; Dollar	9	خیلی قوی					

ادامه جدول صفات:

ارقام الگو	ام	توصیف صفت	روش یادداشت برداری	مرحله مناسب یادداشت	علائم (شرح / اهمیت)	صفت	ردیف
Apollo ; ---	1	نیست یا خیلی کم	VG	47-51	(+)	گیاه : فراوانی گیاهان دارای برگ پرچمهای خمیده	4
Recital ; Axona	3	کم					
Obelisk ; Prinqual	5	متوسط					
Frاندو ; Prinqual	7	زیاد					
Capitole ; ---	9	خیلی زیاد					
Britta ; Florence	1	خیلی زود	VG	50-52	(*)	زمان ظهور سنبله (اولین سنبله در 50% سنبله‌ها نمایان شود)	5
Recital ; Remus	3	زود					
Astron ; Paros	5	متوسط					
Moulin ; Vitus	7	دیر					
Beaver ; ---	9	خیلی دیر					
Cargo ; Adonis	1	نیست یا خیلی ضعیف	VG	60-65	(*) و (+)	برگ پرچم : مومی بودن غلاف	6
Heiduck ; Ventura	3	ضعیف					
Agent ; Hanno	5	متوسط					
Orestis ; Prinqual	7	قوی					
Haven ; Wim	9	خیلی قوی					

ادامه جدول صفات:

ارقام الگو	ام تید از	توصیف صفت	روش یادداشت برداری	مرحله مناسب یادداشت برداری	علائم (شرح / اهمیت)	صفت	ردیف
Soissons ; Adonis	1	نیست یا خیلی ضعیف	VG	60-69	(*)	سنبله : مومی بودن	7
Garant ; Ventura	3	ضعیف					
Contra ; Paros	5	متوسط					
Niklas ; Combi	7	قوی					
Boxer ; Wim	9	خیلی قوی					
Goelent ; Adonis	1	نیست یا خیلی ضعیف	VG	60-69	---	ساقه : مومی بودن گردن	8
Soissons ; Ventura	3	ضعیف					
Haven ; Attis	5	متوسط					
Herzog ; Nandu	7	قوی					
Quotador ; Wim	9	خیلی قوی					
Courtot ; Briscard	1	خیلی کوتاه	M	75-92	(*)	گیاه : طول (ساقه + سنیله + ریشه ها)	9
Konsul ; Remus	3	کوتاه					
Sideral ; Ventura	5	متوسط					
Boxer ; Adonis	7	بلند					
Aladin ; Vitus	9	خیلی بلند					

ادامه جدول صفات:

ارقام الگو	ام تید از	توصیف صفت	روش برداشت برداری	مرحله مناسب برداشت برداری	علائم (شرح / اهمیت)	صفت	ردیف
Orestis ; Remus	3	نازک	VS	80-92	(*) و (+)	ساقه: مغز در برش عرضی (در فاصله میان پایه سنبله و گره ساقه زیر آن)	10
Herzog ; Nandu	5	متوسط					
Forby ; Furio	7	ضخیم					
Slejpner ; Filou	1	نیزه ای	VS	92	(*) و (+)	سنبله: شکل نیمرخ	11
--- ; ---	2	استوانه ای					
Pane 247 ; ---	3	نیمه چماقی					
Beauchamp ; Prinqual	4	چماقی					
Declic ; Nandu	5	دوکی					
Demar 4 ; ---	1	خیلی سست	VS or M	80-92	(*)	سنبله: تراکم	1 2
Castan ; Ventura	3	سست					
Soissons ; Hanno	5	متوسط					
Forby ; Combi	7	متراکم					
--- ; ---	9	خیلی متراکم					
--- ; ---	1	خیلی کوتاه					
Carat ; ---	3	کوتاه	M	80-92	---	سنبله: طول (شامل ریشکها و اسکورها)	13
Ritmo ; Arkas	5	متوسط					
Forby ; Prinqual	7	بلند					
Amifort ; ---	9	خیلی بلند					

ادامه جدول صفات:

ارقام الگو	امتد	توصیف صفت	روش یادداشت برداری	مرحله مناسب یادداشت	علائم (شرح / اهمیت)	صفت	ردیف
Futur ; Axona	1	هر دو نیستند	VG	80-92	(*) و (+)	ریشکها یا اسکورها:	14
Festival ; Furio	2	اسکورها هستند					
Soissons ; Ventura	3	ریشکها هستند					
Herzog ; ---	1	خیلی کوتاه	VG	80-92	(*)	ریشکها و اسکورها طول (از انتهای سنبله)	15
Andros ; Combi	3	کوتاه					
Pagode ; Hanno	5	متوسط					
Fidel ; ---	7	بلند					
Gaicho ; ---	9	خیلی بلند					
Herzog ; Furio	1	سفید	VG	90-92	(*)	سنبله: رنگ	16
Gallo ; Prinqual	2	رنگی					
Soissons ; ---	1	نیست یا خیلی ضعیف	VS	80-92	(+)و	محور سنبله: بالاترین بند (میزان کرکی بودن سطح برجسته)	17
Slejpner ; Furio	3	ضعیف					
Beaver ; Rock	5	متوسط					
Apollo ; Axona	7	قوی					
Carat ; ---	9	خیلی قوی					

ادامه جدول صفات:

ارقام الگو	ام تید از	توصیف صفت	روش یادداشت برداری	مرحله مناسب یادداشت برداری	علائم (شرح / اهمیت)	صفت	ردیف
Courtot ; ---	1	نیست یا خیلی باریک	VS	80-92	(+)	پوشه پایینی: عرض شانه (در سنبلچه واقع در یک سوم میانی سنبله)	18
Soissons ; Wim	3	باریک					
Sideral ; Furio	5	متوسط					
Castan ; Filou	7	پهن					
Abo ; ---	9	خیلی پهن					
Courtot ; ---	1	شیب دار	VS	80-92	(+)	پوشه پایینی: شکل شانه (در سنبلچه واقع در یک سوم میانی سنبله)	19
Forby ; Ventura	3	کمی شیب دار					
Herzog ; Priqual	5	مسطح					
Beaver ; Adonis	7	برجسته					
Farnese ; ---	9	خیلی برجسته یا دو برآمدگی آشکار					
Aladin ; Sunnan	1	خیلی کوتاه	VS	80-92	---	پوشه پایینی: طول نوک (در سنبلچه واقع در یک سوم میانی سنبله)	20
Sideral ; Axona	3	کوتاه					
Recital ; Furio	5	متوسط					
Soissons ; Tejo	7	بلند					
Courtot ; Prinqual	9	خیلی بلند					

ادامه جدول صفات:

ارقام الگو	ام تید از	توصیف صفت	روش یادداشت برداری	مرحله مناسب یادداشت برداری	علائم (شرح / اهمیت)	صفت	ردیف
Festival ; Lobo	1	مستقیم	VS	80-92	(+)	پوشه پایینی: شکل نوک (در سنبلچه واقع در یک سوم میانی سنبله)	21
Slejpner ; Furio	3	کمی خمیده					
Courtot ; Rock	5	خمیدگی متوسط					
Arum ; ---	7	خمیدگی زیاد					
--- ; ---	9	خمیدگی خیلی زیاد					
Slejpner ; Prinqual	3	ضعیف	VS	80-92	(+)	پوشه پایینی: مقدار کرک سطح داخلی در (سنبلچه واقع در یک سوم میانی سنبله)	2 2
Sideral ; Furio	5	متوسط					
Declic ; Tejo	7	قوی					
Soissons ; Prinqual	1	مستقیم	VS	80-92	(+)	پوشش پشتی (لما) : شکل نوک (در سنبلچه واقع در یک سوم میانی سنبله)	23
Slejpner ; Briscard	3	کمی خمیده					
Sideral ; Wim	5	خمیدگی متوسط					
Parade ; Axona	7	خمیدگی زیاد					
Tara ; ---	9	خمیدگی خیلی زیاد					

ادامه جدول صفات:

ارقام الگو	امتیاز	توصیف صفت	روش ییادداشت برداری	مرحله مناسب ییادداشت	علائم (شرح / اهمیت)	صفت	ردیف
Recital ; Florence	1	سفید	VG	92	(*)	بذر: رنگ	24
Soissons ; Ventura	2	قرمز					
--- ; ---	1	هیچ یا خیلی روشن	VS	92	(+)	بذر: رنگ پذیری با فنل	25
Soissons ; ---	3	روشن					
Orestis ; Prinqual	5	متوسط					
Slejpner ; Rock	7	تیره					
Sideral ; Ventura	9	خیلی تیره					
Slejpner ; ---	1	تیپ زمستانه	VG	---	(*) و (+)	تیپ فصلی	26
Fidel ; ---	2	تیپ بینابین					
--- ; Nandu	3	تیپ بهاره					

بخش دوم :

ح: توضیح برخی از صفات ارائه شده در جدول:
(1) - کولئوپتیل: رنگ آنتوسیانین.

روش اندازه گیری رنگ آنتوسیانین:

الف) تعداد بذور مورد نیاز در هر آزمون:

برای تشخیص تمایز ارقام تعداد 20 بذر و برای تشخیص یکنواختی ارقام تعداد 100 بذر از هر رقم مورد نیاز است.

ب) آماده سازی بذور:

بذور آماده جوانه زنی (بدون خواب) روی کاغذ مرطوب در درون ظروف پتری قرار میگیرند و درب ظروف در طول مدت جوانه زنی بسته می شود.

ج) مکان:

آزمایشگاه یا گلخانه.

د) نور:

بعد از اینکه طول کلئوپتیلها در تاریکی به حدود 1 سانتیمتر رسید، آنها در شرایط نور مصنوعی (مشابه نور طبیعی) در شدت 15000 لوکس به صورت مداوم و به مدت 3 الی 4 روز قرار می گیرند.

ه) دما:

15 الی 20 درجه سانتیگراد.

و) زمان یادداشت برداری:

زمانی است که کلئوپتیل کاملاً رشد کرده (حدود یک هفته) و گیاه از نظر مراحل دهی رشد زادکس¹ در مرحله 9 الی 11 قرار دارد.

ز) شاخص یادداشت برداری:

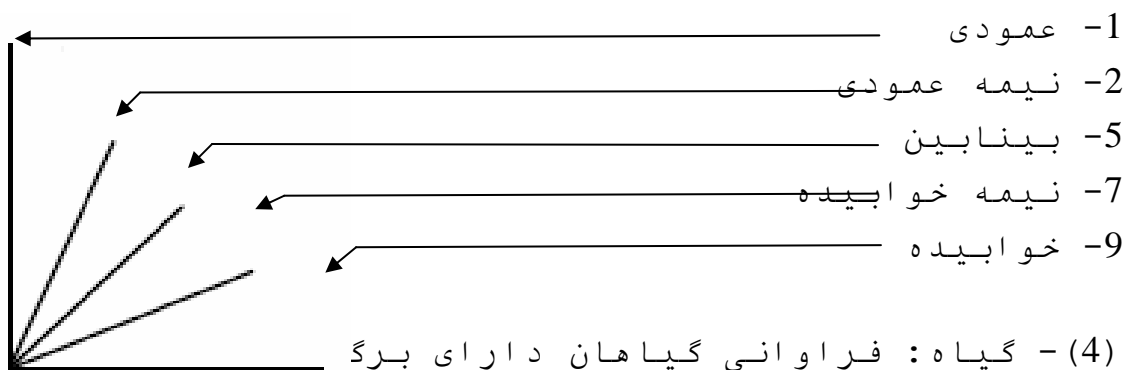
یادداشت برداری مشاهده ای است و از تک تک بذور یادداشت برداری انجام می شود و امتیاز دهی از 1 الی 9 صورت می گیرد.

توجه:

برای آزمون تمایز حداقل دو رقم الگو به عنوان شاهد باید در نظر گرفته شود.

¹ ZADOKS

(2) گیاه: عادت رشد. عادت رشد گیاه از روی وضعیت برگها و پنجه های گیاه و به صورت مشاهده ای مشخص می شود. برای اینکار باید از زاویه ایجاد شده فی مابین برگهای خارجی و پنجه ها با یک محور افقی فرضی استفاده شود.

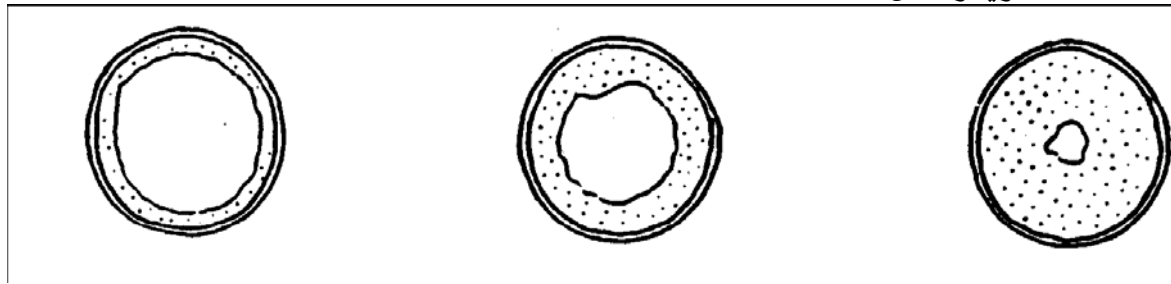


(4) - گیاه: فراوانی گیاهان دارای برگ تمام برگ پرچمها بدون خمیدگی (راست و مسقیم) اسد عددیک،

- یک چهارم برگ پرچمها خمیدگی دارد، عدد سه ،
- یک دوم برگ پرچمها خمیدگی دارد عدد پنج،
- سه چهارم برگ پرچمها خمیدگی دارد عدد هفت،
- تمام برگ پرچمها خمیده است. عدد نه .

(6) - برگ پرچم: مومی بودن غلاف. شدیدترین حالت مومی بودن غلاف باید ملاک عمل قرار گیرد.

(10) ساقه: مغز در برش عرضی (در فاصله میان پایه سنبله و گره ساقه زیر آن).

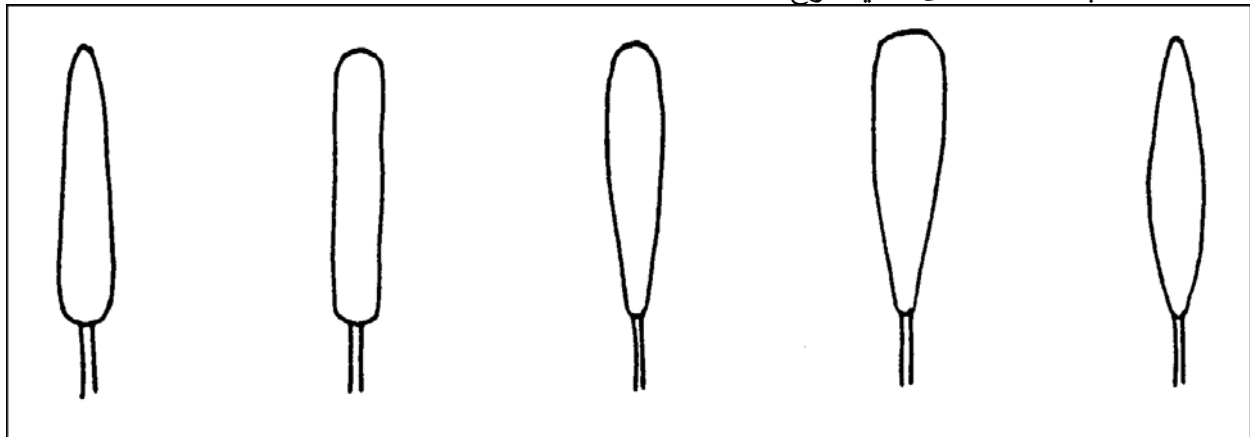


متوسط (5)

ضخیم (7)

نازک (3)

(11) سنبله: شکل نیمرخ.



چماقی (3)

نیمه چماقی (4)

دوکی (5)

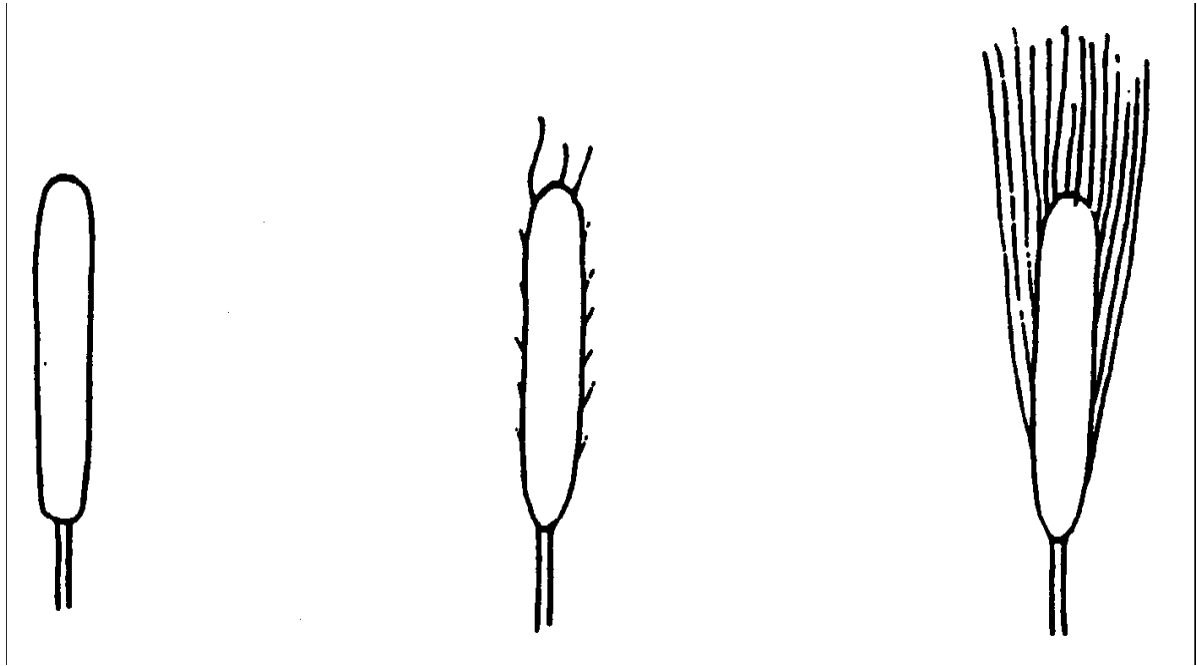
نیزه ای (1)

استوانه ای (2)

(12) سنبله: تراکم.

تراکم سنبله را می توان یا به صورت مشاهده ای و یا از روی محاسبه نسبت تعداد سنبلچه ها به طول سنبله بدست آورد.

(14) ریشکها یا اسکورها:



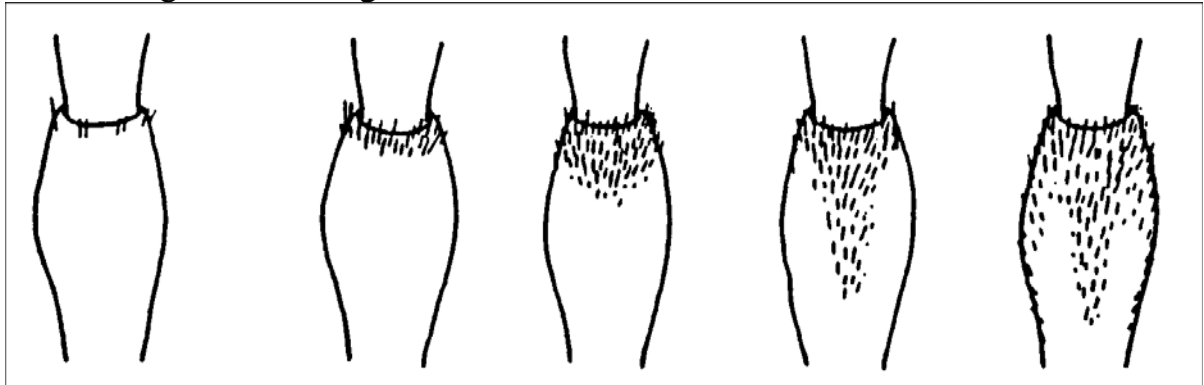
اسکورها

هر دو نیستند (1)

ریشکها هستند (3)

هستند (2)

(17) بالاترین بند محور سنبله: میزان کرکی بودن سطح برجسته.



متوسط (5)

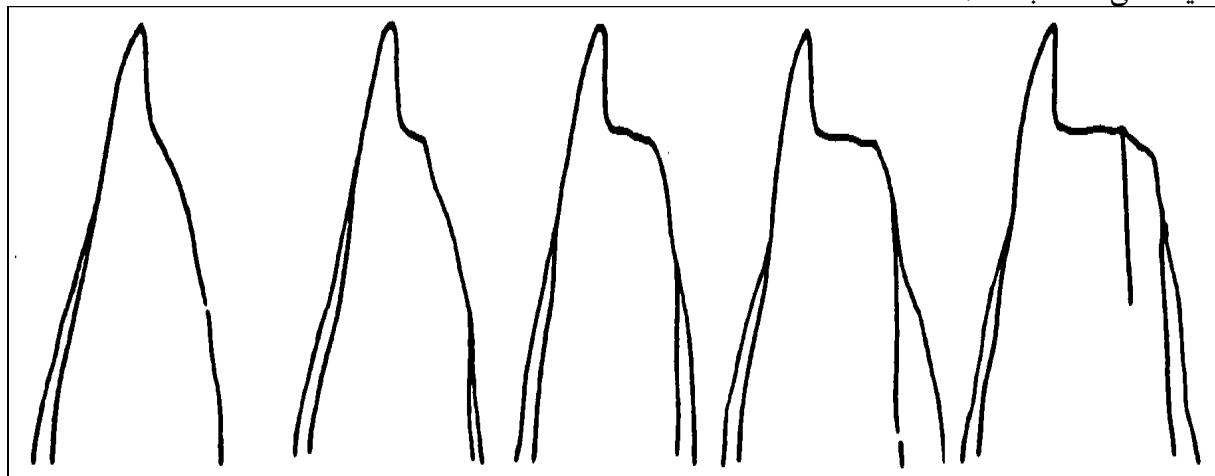
قوی (7)

خیلی قوی (9)

نیست یا خیلی ضعیف (1)

ضعیف (3)

(18) پوشه پایینی: عرض شانه (در سنبلچه واقع در یک سوم میانی سنبله).



متوسط (5)

پهن (7)

خیلی پهن (9)

نیست یا خیلی باریک (1)

باریک (3)

(19) پوشه پایینی: شکل شانه (در سنبلچه واقع در یک سوم میانی سنبله).



برجسته (7)

برجسته (9)

خیلی

شیبدار (1)

کمی شیبدار (3)

مسطح (5)

(21) پوشه پایینی: شکل نوک (در سنبلچه واقع در یک سوم میانی سنبله).



خمیدگی خیلی زیاد (9) خمیدگی زیاد (7) خمیدگی متوسط (5)
 کمی خمیده (3) مستقیم (1)

(22) پوشه پایینی: مقدار کرک سطح داخلی (در سنبلچه واقع در یک سوم میانی سنبله).



کم (3)

زیاد (9)

متوسط (5)

(23) پوشینک پشتی (11): شکل نوک (در سنبلچه واقع در یک سوم میانی سنبله).



خمیدگی

خمیدگی زیاد (7)
ایستاده (1)

خمیدگی خیلی زیاد (9)
متوسط (5)
کمى خمیده (3)

(25) بذر: رنگ پذیری با فنل.

روش تعیین عکس العمل به فنل:

الف) تعداد بذور مورد نیاز در هر آزمون:

برای تشخیص تمایز 20 بذر و برای تشخیص یکنواختی 100 بذر لازم است. بذور نبایستی با مواد شیمیایی تیمار شده باشند.

ب) آماده سازی بذور:

16 الی 20 ساعت در آب خیسانده می شوند، بعد از حذف آب سطحی و خشک شدن، بذور درون ظروف پتری بر روی شیار شکمی قرار گرفته و درب ظروف بسته می شود.

ج) غلظت محلول:

محلول فنل 1% (تازه تهیه و مصرف شود).

د) مقدار محلول:

به اندازه ای که سه چهارم بذور توسط محلول پوشیده شود.

ه) مکان:

آزمایشگاه.

و) نور:

نور طبیعی- بدور از تشعشع مستقیم خورشید.

ز) دما:

18 الی 20 درجه سانتیگراد.

ح) زمان یادداشت برداری:

4 ساعت (پس از افزودن محلول).

ط) شاخص یادداشت برداری:

یادداشت برداری مشاهده ای است و از تک تک بذور یادداشت برداری انجام می شود و امتیاز دهی از 1 الی 9 صورت می گیرد.

توجه:

برای آزمون تمایز، حداقل لازم است دو رقم الگو به عنوان شاهد در نظر گرفته شود.

(26) تیپ فصلی:

این خصوصیت لازم است در فصل بهار و از یک یا چند کرت برآورد شود. ارقام شاهد نیز لازم است در کرتها کشت شوند. این خصوصیت با مشاهده عکس العمل ارقام الگو و مقایسه آن با ارقام مورد بررسی تعیین می شود. یادداشت برداری زمانی انجام می شود که آخرین ارقام با تیپ فصلی بهاره به مرحله رسیدگی کامل (مراحل دهمی رشد زادکس) رسیده باشند. حالت‌های مختلف این خصوصیت به شرح زیر تعریف می شود.

تیپ زمستانه:

گیاهانی که از این تیپ باشند، از نظر مراحل رشدی دهمی (ابداعی توسط زادکس) حداکثر می توانند تا مرحله شماره 45 رشد نمایند.

تیپ بینابین:

گیاهانی که از این تیپ باشند، از نظر مراحل رشدی دهمی (ابداعی توسط زادکس) می توانند از مرحله رشدی شماره 45 عبور نمایند. اینگونه ارقام عموماً از نظر مرحله رشدی می توانند بین مرحله شماره 75 الی 90 به رشد خود ادامه دهند.

تیپ بهاره:

گیاهانی که از این تیپ رشد باشند، از نظر مراحل رشدی دهمی (ابداعی توسط زادکس) می توانند بیش از مرحله رشدی شماره 90 به رشد خود ادامه دهند.

بخش سوم :

جدول کدهای دهدهی

زادکس برای تعیین مراحل رشد غلات
(گندم، جو، یولاف، چاودار و برنج)

کد	توضیح عمومی	توضیح اضافی
	جوانه زنی	
00	بذر خشک	
01	شروع جذب آب	
02	---	
03	جذب آب کامل	
04	---	
05	خروج ریشه چه	
06	---	
07	خروج کلنوپتیل	
08	---	
09	قرار گرفتن برگ در انتهای کلنوپتیل	
	رشد گیاهچه	
10	قرار گرفتن اولین برگ درون کلنوپتیل	
11	باز شدن اولین برگ ⁽¹⁾	دومین برگ قابل مشاهده است.
12	باز شدن دو برگ	
13	باز شدن سه برگ	50% پهنک باز شود
14	باز شدن چهار برگ	
15	باز شدن پنج برگ	
16	باز شدن شش برگ	
17	باز شدن هفت برگ	
18	باز شدن هشت برگ	
19	باز شدن نه برگ و بیشتر	
	پنجه دهی	
20	فقط ساقه اصلی	
21	ساقه اصلی و یک پنجه	
22	ساقه اصلی و دو پنجه	
23	ساقه اصلی و سه پنجه	
24	ساقه اصلی و چهار پنجه	
25	ساقه اصلی و پنج پنجه	
26	ساقه اصلی و شش پنجه	
27	ساقه اصلی و هفت پنجه	
28	ساقه اصلی و هشت پنجه	
29	ساقه اصلی و نه پنجه و بیشتر	

ادامه جدول کدهای ددهی زادکس برای تعیین مراحل
رشد غلات

(گندم، جو، یولاف، چاودار و برنج)

کد	توضیح عمومی	توضیح اضافی
	طویل شدن ساقه	
30	برافراشته شدن ساقه کاذب ⁽²⁾	
31	قابل شناسایی بودن اولین گره ساقه	گره های بالای یقه
32	قابل شناسایی بودن دومین گره ساقه	
33	قابل شناسایی بودن سومین گره ساقه	
34	قابل شناسایی بودن چهارمین گره ساقه	
35	قابل شناسایی بودن پنجمین گره ساقه	
36	قابل شناسایی بودن ششمین گره ساقه	
37	قابل مشاهده بودن برگ پرچم	
38	---	
39	قابل مشاهده بودن زبانک برگ پرچم	مرحله قبل از آماس انتهای ساقه
	آماس ساقه	
40	---	مرحله ابتدایی آماس ساقه (رشد کم گل آذین)
41	توسعه برگ پرچم	
42	---	
43	مشاهده اندکی آماس در انتهای ساقه ها	
44	---	مرحله میانی آماس ساقه
45	آماس ساقه ها	
46	---	مرحله بایانی آماس ساقه مربوط به ارقام دارای ریشک
47	باز شدن پهنک برگ پرچم	
48	---	
49	مشاهده اولین ریشکها	
	گلدهی	
50	نمایان شدن اولین سنبلچه گل آذین	مربوط به آنهایی که گل دهی غیر همزمان دارند مربوط به آنهایی که گل دهی همزمان دارند مربوط به آنهایی که گل دهی غیر همزمان دارند مربوط به آنهایی که گل دهی همزمان دارند مربوط به آنهایی که گل دهی غیر همزمان دارند مربوط به آنهایی که گل دهی همزمان دارند مربوط به آنهایی که گل دهی غیر همزمان دارند مربوط به آنهایی که گل دهی همزمان دارند
51		
52	نمایان شدن یک چهارم گل آذین	
53		
54	نمایان شدن یک دوم گل آذین	
55		
56	نمایان شدن سه چهارم گل آذین	
57		
58	نمایان شدن گل آذین کامل	
59		

ادامه جدول کدهای ددهی زادکس برای تعیین مراحل
رشد غلات

(گندم، جو، یولاف، چاودار و برنج)

توضیح عمومی	کد	توضیح اضافی
گرده افشانی		در جو این مرحله قابل شناسایی نیست. در برنج
شروع گرده افشانی	60	مربوط به آنهایی که گل دهی غیر همزمان دارند
	61	
---	62	مربوط به آنهایی که گل دهی غیر همزمان دارند
---	63	
اواسط گرده افشانی	64	مربوط به آنهایی که گل دهی غیر همزمان دارند
	65	
---	66	مربوط به آنهایی که گل دهی غیر همزمان دارند
---	67	مربوط به آنهایی که گل دهی غیر همزمان دارند
خاتمه گرده افشانی	68	
	69	
شیری شدن		
---	70	
بذر پر آب	71	
---	72	
شروع شیری شدن	73	
---	74	
اواسط شیری شدن	75	افزایش مواد جامد در اندوسپرم مایع، در این مرحله بذور با فشار انگشتان له می شوند.
---	76	
اواخر شیری شدن	77	
---	78	
---	79	
خمیری شدن		
---	80	
---	81	
---	82	
شروع خمیری شدن	83	
---	84	اثر ناخن باقی نمی ماند.
خمیری نرم	85	اثر ناخن باقی می ماند.
---	86	مقدار کلروفیل گل آذین کاهش می یابد.
خمیری سخت	87	
---	88	
---	89	

ادامه جدول کدهای ددهی زادکس برای تعیین مراحل
رشد غلات

(گندم، جو، یولاف، چاودار و برنج)

توضیح اضافی	توضیح عمومی	کد
	رسیدن	
	---	90
در برنج خوشهچه انتهایی می رسد.	بذور سخت (دو نیمه کردن بذور با ناخن مشکل	91
در برنج 50% خوشهچه ها می رسند.	بذور سخت (نمی توان خیلی با ناخن روی بذور	92
در برنج بیش از 90% خوشهچه ها می رسند.	بذور در طول روز ریزش می کنند ⁽⁵⁾	93
ریسکه ریزش بذور در اثر تکان وجود دارد.	رسیدگی بیش از حد- مرگ و متلاشی شدن ساقه ها	94
	خواب بذر	95
	بذور زنده 50% قدرت جوانه زنی دارند.	96
	بذور در خواب نیستند.	97
	القاء دومین مرحله خواب بذور.	98
	از بین رفتن دومین مرحله خواب بذور	99

پانویسهای ستون توضیح عمومی جداول کدهای ددهی زادکس برای تعیین
مراحل رشد غلات (گندم، جو، یولاف، چاودار و برنج):

- (1) مرحله ای است که در آن تحت شرایط کنترل شده (گلخانه) آلودگی مصنوعی با زنگ انجام می پذیرد.
- (2) تنها در خصوص غلات زودرسی که دارای عادت رشدی خوابیده یا نیمه خوابیده دارند بکار می رود.
- (3) دارای الیاف رسیده و مناسب برای بافندگی (با 16% رطوبت). گل آذین در این مرحله بخش اعظم کلروفیل خود را از دست داده است.
- (4) دارای بذور رسیده و مناسب جهت برداشت با دروگر غلات (با کمتر از 16% رطوبت).
- (5) مناسب ترین زمان برداشت غلات.

بخش چهارم :

پرسش نامه فنی

محل درج شماره

(توسط متقاضی پر نشود).

این پرسشنامه در ارتباط با تقاضای حقوق بھنژادگر گیاهی تکمیل شود.

1	گونه: <i>Triticum aestivum</i> L. emend Fiori et Paol.
2	نام، نام خانوادگی و آدرس متقاضی:
3	نام رقم یا کد بھنژادی پیشنهادی:
4	اطلاعاتی در زمینه منشاء، نحوه نگهداری و تکثیر رقم:

ادامه پرسشنامه

5- جدول خصوصیات رقم (لطفاً امتیاز مرتبط با هر صفت، بر اساس امتیاز ارائه شده در راهنمای آزمون ارائه شود).

ارقام الگو	امتیاز رقم برای	امتیاز راهنمای	توصیف	صفت	ردی
Slejpner ; ---		1	زمستانه	تیپ فصلی	5/1
Fidel ; ---		2	بینابین		
--- ; Nandu		3	بهاره		
Britta ; Florence		1	خیلی زود	زمان ظهور سنبله (اولین سنبله در 50% ساقه ها نمایان شود) زمان ظهور سنبله با دو رقم شناخته شده مقایسه می شود.	5/2
Recital ; Remus		3	زود		
Astron ; Paros		5	متوسط		
Moulin ; Vitus		7	دیر		
Beaver ; ---		9	خیلی دیر		
Courtot ; Briscard		1	خیلی کوتاه	گیاه : طول (ساقه+سنبله+ریشکها) طول گیاه با دو رقم شناخته شده مقایسه می شود.	5/3
Konsul ; Remus		3	کوتاه		
Sideral ; Ventura		5	متوسط		
Boxer ; Adonis		7	بلند		
Aladin ; Vitus		9	خیلی بلند		
Orestis ; Remus		3	نازک	ساقه : مغز در برش عرضی (در فاصله میان پایه سنبله و گره ساقه زیر آن)	5/4
Herzog ; Nandu		5	متوسط		
Forby ; Furio		7	ضخیم		
Herzog ; Furio		1	سفید	رنگ سنبله	5/5
Gallo ; Prinqual		2	رنگی		
Futur ; Axona		1	هر دو نیستند	ریشکها یا اسکورها :	5/6
Festival ; Furio		2	اسکورها هستند		
Soissons ; Ventura		3	ریشکها هستند		

6- وضعیت ارقام مشابه و اختلافات آنها با رقم در دست معرفی:

وضعیت ظهور صفت در رقم در دست	وضعیت ظهور صفت در رقم مشابه	صفتی که در رقم تفاوت نشان می	نام رقم

(1): لطفاً به منظور شناسایی وضعیت ارقام نسبت به یکدیگر اندازه تفاوت را بیان نمایید.

7- اطلاعات اضافی که ممکن است به تمایز رقم کمک نماید.

مقاومت به آفات و بیماریهای رقم:	7/1
شرایط خاص برای بررسی رقم:	7/2
سایر اطلاعات در خصوص رقم:	7/3

بخش پنجم :

توضیحات اضافی:
قسمت اول:

مقدمه:

در ادامه این ضمیمه لیستی از صفاتی که بر مبنای الکتروفورز پروتئین های ذخیره ای ایجاد شده و توضیح روش مورد استفاده آمده است. اتحادیه بین المللی برای حفاظت از ارقام جدید گیاهی تصمیم گرفته است که این صفات را به صورت ضمیمه در دفترچه آزمون درج نماید. بدین ترتیب طبقه خاصی از صفات ایجاد شد. با این حال اکثریت اعضای اتحادیه بر این باورند که تکیه بر صفات حاصل از الکتروفورز پروتئینهای ذخیره ای به تنهایی برای تشخیص تمایز ارقام، کافی نیست. بنابر این، اینگونه صفات تنها می توانند به عنوان مکمل اختلافات موجود در صفات مرفولوژیکی و فیزیولوژیکی مطرح باشند. آن اتحادیه ضمن تأیید مجدد مفید بودن اینگونه صفات، آنها را به تنهایی برای متمایز نمودن ارقام از یکدیگر کافی نمیداند. اینگونه صفات به عنوان صفات متداول، مورد اندازه گیری قرار نمی گیرند، مگر اینکه متقاضی ثبت رقم، درخواست یا قراردادی را برای اندازه گیری آنها روی رقم مورد نظر ارائه نماید.

برای تجزیه گلوپتینهای دارای وزن ملکولی بالا (HMW) ژل پلی اکریل آمید در حضور سدیم دودسیل سولفات (SDS PAGE) استفاده می شود. گلوپتینها توسط چند مکان ژنی بر روی بازوی بلند کروموزومهای گروه یک شامل Glu-A1، Glu-B1 و Glu-D کد می شوند (پاین، 1987). برای هر مکان ژنی چندین آلل وجود دارد و تجزیه گلوپتینهای دارای وزن ملکولی بالا (HMW) بر مبنای شناسایی این آللها از طریق باندها و الگوهای باندهای ظاهر شده بر روی ژل استوار است. آللها بر اساس تعاریف ارائه شده توسط پاین و لورنس در سال 1983 (به بخش 4 مراجعه شود)، توسط شماره باندهای ایجاد شده مشخص می شوند.

جدول صفات حاصل از الکتروفورز پروتئینهای نخیره‌ای:

ردیف	صفت	علائم (شرح) /	توصیف صفت	امتیاز	ارقام الگو
27	ترکیب گلوتهین: آلدهای بیان شده بر روی مکان ژنی Glu- A1	(+) /	باند 1	1	Kadett
			باند * 2	2	Courtot
			بدون باند	3	Talent
28	ترکیب گلوتهین: آلدهای بیان شده بر روی مکان ژنی Glu- B1	(+) /	باندهای 6+8	1	Norman
			باندهای 7+8	2	Courtot
			باندهای 7+9	3	Kadett
			باند 7 (یا باندهای 7+9 در حضور باندهای 5+10)	4	Okapi
			باندهای 13+16	5	Carala
			باندهای 14+15	6	Troll
			باندهای 17+18	7	Moulin
			باند 20	8	Figaro
			باندهای 6/1+22	9	Schwbenkom
29	ترکیب گلوتهین: آلدهای بیان شده بر روی مکان ژنی Glu-	(+) /	باندهای 2+12	1	Courtot
			باندهای 3+12	2	Norman
			باندهای 4+12	3	Talent
			باندهای 10+5	4	Kadett

DI

توضیح روش مورد استفاده جهت تعیین ترکیب گلوئین:

(تعیین آل‌های بیان شده بر روی مکان‌های ژنی Glu-B1، Glu-A1 و Glu-D)

روش الکتروفورز SDS PAGE برای تجزیه گلوئین‌های با وزن ملکولی بالا (HMW) در گندم

1- ابزار و ادوات:

هر نوع دستگاه الکتروفورز افقی که بتواند دمای ژل را ثابت نگهدارد قابل استفاده است. ضخامت ژل نبایستی بیشتر از 1/5 میلیمتر باشد. منبع تغذیه مورد استفاده نبایستی توانایی برقرار نمودن جریان و ولتاژ برق ثابت را داشته باشد.

2- مواد شیمیایی:

(کلیه مواد شیمیایی مورد استفاده نبایستی دارای درجه خلوص بالا باشند).

- ♣ - اکریل‌آمید (خصوصاً اکریل‌آمید خالص شده برای الکتروفورز).
- ♣ - بیس اکریل‌آمید (خصوصاً بیس اکریل‌آمید خالص شده برای الکتروفورز).
- ♣ - تریس (هیدروکس متیل آمین).
- ♣ - سدیم دودسیل سولفات (SDS).
- ♣ - آمونیوم پر سولفات (APS).
- ♣ - 2-مرکاپتواتانول.
- ♣ - TEMED (تترامتیل اتیل دی آمین).
- ♣ - تری کلرواستیک اسید (TCA).
- ♣ - هیدروکلرواسید.
- ♣ - گلاسیل استیک اسید.
- ♣ - گلاسیلین.
- ♣ - آن-بوتانول.
- ♣ - پایرونین Y یا G.
- ♣ - گلیسرول (d=1/256).
- ♣ - متانول یا اتانول.
- ♣ - کماسی بلو R-250 یا معادل آن.
- ♣ - کماسی بلو G-250 یا معادل آن.

3- محلول‌ها :

3-1- محلول استخراج

3-1-1- فقط محلول استخراج گلوتن‌ن:

3-1-1-1- محلول ذخیره استخراج گلوتن‌ن:

- ▲ 6/25 میلی‌لیتر بافر تریس در اسیدکلریدریک 1
نرمال با PH=6/8.
 - ▲ 12/05 میلی لیتر آب مقطر.
 - ▲ 2- گرم سدیم دودسیل سولفات (SDS).
 - ▲ 10- میلی گرم پایرونین Y یا G.
 - ▲ 10- میلی لیتر گلیسرول.
- محلول فوق به مدت 2 ماه در دمای 4 درجه سانتیگراد قابل نگهداری است.
در زمان استفاده، محلول استخراج، محلول ذخیره فوق به شرح زیر تهیه می شود.

3-1-1-2- محلول استخراج گلوتن‌ن:

- ▲ 4/25 میلی لیتر از محلول ذخیره.
 - ▲ 0/75 میلی لیتر مرکاپتواتانول.
- سپس مخلوط فوق توسط آب مقطر به حجم 10 میلی لیتر می رسد.
محلول حاصل قابل نگهداری نیست و بایستی بعد از تهیه فوراً مورد استفاده قرار گیرد.

3-1-2- محلول های استخراج گلوتن‌ن‌ها به همراه گلی‌آدین‌ها:

3-1-2-1- محلول A:

- ▲ 25- میلی لیتر کلرواتانول.
 - ▲ 50- میلی گرم پایرونی Y یا G.
- سپس مخلوط فوق توسط آب مقطر به حجم 100 میلی لیتر می رسد.

3-1-2-2- محلول B:

- ▲ 27 گرم اوره.
 - ▲ 3 میلی لیتر 2-مرکاپتواتانول
 - ▲ 10 گرم سدیم دودسیل سولفات (SDS).
- سپس مخلوط فوق توسط آب مقطر به حجم 100 میلی لیتر می رسد.

3-2- بافر الکتروفورز:

محلول ذخیره:

♣ 141/1 گرم گلیسین.

♣ 30 گرم تریس.

♣ 10 گرم SDS.

سپس مخلوط فوق توسط آب مقطر به حجم 11 میلی لیتر می رسد. این محلول قبل از استفاده توسط آب مقطر به نسبت 1 به 10 رقیق می شود. محلول رقیق شده بافر را بیشتر از یک هفته نمی توان نگهداری کرد. محلول ذخیره بافر هم در دمای اطاق به مدت 2 ماه قابل نگهداری است. PH محلول بافر بایستی نزدیک 8/3 باشد.

3-3- تهیه محلول ژل:

3-3-1- محلول بافر ژل (1 مول تریس اسیدکلریدریک، PH=8/8):

♣ 121/14 گرم تریس

♣ -حدود 20 میلی لیتر (اسیدکلریدریک، $d=1/19$).

سپس مخلوط فوق توسط آب مقطر به حجم 1 لیتر می رسد. این بافر در دمای 4 درجه سانتیگراد به مدت 2 ماه قابل نگهداری است.

3-3-3- محلول 10 درصد SDS:

♣ 10- گرم SDS حل شده در آب مقطر به حجم 100

میلی لیتر می رسد. این محلول در دمای 4 درجه سانتیگراد به مدت 2 ماه قابل نگهداری است. قبل از استفاده چنانچه SDS رسوب نماید می توان با تکان دادن و حرارت ملایم آن را مجدداً محلول نمود.

3-3-4- محلول 1% آمونیوم پرسولفات:

♣ 1- گرم آمونیوم پرسولفات (APS) در آب مقطر حل و

حجم محلول با آب مقطر به 100 میلی لیتر می رسد. محلول حاصل قابل نگهداری نیست و بایستی بعد از تهیه مصرف شود.

3-3-5- محلول ذخیره اکریل آمید:

♣ 40/02- گرم اکریل آمید در 100 میلی لیتر آب مقطر حل شود.

3-3-5- محلول ذخیره بیس اکریل آمید:

♣ 0/5198- گرم بیس اکریل آمید در 130 میلی لیتر آب مقطر حل شود.

3-4- محلول رنگ آمیزی:

3-4-1:

▲ 0/25- گرم کماسی بلو G-250.
▲ 0/75 گرم کماسی بلو R-250.
سپس مخلوط فوق توسط آب مقطر به حجم 100 میلی لیتر می
رسد.

2-4-3:

▲ 55- گرم تری کلرواستیک اسید.
▲ 65- میلی لیتر گلاسیال استیک اسید.
▲ 180- میلی لیتر متانول یا اتانول.
▲ 25 میلی لیتر محلول (1-4-3).
سپس مخلوط فوق توسط آب مقطر به حجم 1 لیتر می رسد.

4-روش:

1-4- فقط گلوکزین:

از بذر توسط یک وسیله کوبنده آرد تهیه شود. 50 میلی
گرم از آرد بذر به همراه 0/75 میلی لیتر بافر استخراج درون
لوله درب دار 3 میلی لیتری ریخته شود. عصاره گیری به مدت 2
ساعت در دمای اطاق انجام شود. طی این مدت مخلوط درون لوله،
چندین بار توسط دستگاه همزن به هم زده و به مدت 10 دقیقه
هم در داخل حمام آب جوش قرار گرفته و سپس سرد شود. لوله
های حاوی عصاره به مدت 5 دقیقه با سرعت 18000g سانتریفوژ
شوند.

2-4- گلوکزین به همراه گلیادین:

در صورت تمایل گلوکزین و گلیادین ها را می توان در یک
بذر توأم مورد بررسی قرار داد. برای اینکار ابتدا
گلیادین ها با افزودن 0/25 میلی لیتر محلول A (2-1-3) بر روی
یک بذر له شده (یا یک نیمه از بذر) در درون یک لوله درب
دار ریخته و در دمای اطاق به مدت یک شب نگهداری کرد، سپس
گلوکزین ها با افزودن 0/5 میلی لیتر محلول B (2-1-3) بر روی
یک بذر له شده در درون یک لوله درب دار ریخته و در دمای
اطاق به مدت یک شب نگهداری کرد.
بسته به ضخامت ژل و اندازه چاهکها مقدار استفاده از محلول
استخراج متفاوت می باشد. این مقدار معمولاً می تواند بین 10
تا 25 میکرولیتر باشد.

3-4- آماده نمودن ژل:

دیواره های شیشه ای تمیز و خشک به منظور تهیه کاست ژل بر
اساس دستورالعمل های دستگاه مورد استفاده فراهم گردد. در
صورتی که از نوار چسب برای آب بندی کاست ژل استفاده می
شود، پیشنهاد می شود کاست یک روز پس از تهیه، مورد استفاده
قرار گیرد تا طی این مدت چسبندگی نوار چسب بهتر و بیشتر
شود.

1-3-4-تهیه محلول اصلی (10% اکریل آمید، PH=8/8):

برای تهیه دو ورقه ژل در ابعاد $180 \times 160 \times 1/5$ میلیمتر، مواد زیر مورد نیاز است.

- ▲ 20- میلی لیتر محلول ذخیره اکریل آمید (3-3-5).
 - ▲ 26- میلی لیتر محلول ذخیره بیس اکریل آمید (3-6-3).
 - ▲ 30- میلی لیتر محلول ذخیره بافر (3-3-1).
- این کار در دمای اطاق انجام می شود. از مخلوط فوق به مدت 2 الی 3 دقیقه در فلاکس باچنر هواگیری شده سپس به این مخلوط مواد زیر اضافه می شود.
- ▲ 2- میلی لیتر آمونیوم پر سولفات (APS).
 - ▲ 0/8- میلی لیتر سدیم دودسیل سولفات (SDS).
 - ▲ 40- میکرو لیتر TEMED (مستقیماً از داخل بطری استفاده شود).

سپس ژل به دقت درون کاست ریخته می شود. به طوری که از تشکیل حباب درون ژل جلوگیری شود. پلیمریزاسیون در دمای اطاق انجام می شود.

کاست ژل نبایستی بطور کامل پر شود. لازم است فضایی در حدود 3 الی 4 سانتیمتر در بالای ژل برای ژل فوقانی باقی گذاشته شود. سطح بالایی ژل را بایستی توسط سرنگ با محلول آن بوتانول (یا آب مقطر) پوشاند. بعد از حدود 30 دقیقه که پلیمریزاسیون کامل شد، سطح بالایی ژل توسط آب مقطر شستشو شده و توسط کاغذ صافی خشک می شود.

2-3-4- محلول ژل اصلی (7% اکریل آمید، PH=8/8):

برای مشاهده زیر واحدهای 2 و 2* غلظت ژل 7% اکریل آمید استفاده می شود. برای تهیه دو ورقه ژل در ابعاد $180 \times 160 \times 1/5$ میلی لیتر مواد زیر مورد نیاز است.

- ▲ 14- میلی لیتر محلول ذخیره ای اکریل آمید (3-3-5).
 - ▲ 6- میلی لیتر آب مقطر
 - ▲ 26- میلی لیتر محلول ذخیره بیس اکریل آمید (3-6-3).
 - ▲ 30- میلی لیتر محلول بافر ژل (3-3-1).
- این کار در دمای اطاق انجام می شود. از مخلوط فوق به مدت 2 الی 3 دقیقه در فلاکس باچنر هواگیری می شود. به این مخلوط مواد زیر اضافه می شود.
- ▲ 2- میلی لیتر آمونیوم پرسولفات (3-3-4).
 - ▲ 0/8- میلی لیتر سدیم دودسیل سولفات (3-3-3).
 - ▲ 40- میکرو لیتر TEMED (مستقیماً از داخل بطری برداشت شود).

سپس ژل به دقت درون کاست ریخته می شود. بطوریکه از تشکیل حباب درون ژل جلوگیری و پلیمریزاسیون در دمای اطاق انجام شود.

کاست ژل را نبایستی بطور کامل پر کرد. لازم است فضایی در حدود 3 الی 4 سانتیمتر در بالای ژل برای ژل فوقانی باقی گذاشت. سطح بالایی ژل بایستی توسط سرنگ با محلول آن

3-3-4- ژل فوقانی (3% اکریل آمید، PH=6/8) :

در یک فلاکس باچنر 50 میلی لیتری، مواد زیر با یکدیگر مخلوط می شوند.

▲ 1/5 میلی لیتر محلول ذخیره اکریل آمید (3-3-5).

▲ 2/15 میلی لیتر محلول بیس اکریل آمید (3-3-6).

▲ 2/5 میلی لیتر محلول ذخیره بافر ژل (3-3-2).

▲ 13/15 میلی لیتر آب مقطر.

بعد از برطرف نمودن گاز (هواگیری) به مخلوط فوق مواد زیر اضافه می شود.

▲ 0/75 میلی لیتر آمونیوم پر سولفات (3-3-4).

▲ 0/2 میلی لیتر سدیم دودسیل سولفات (3-3-3).

▲ 15 میکرولیتر TEMED (مستقیماً از داخل بطری برداشته شود).

مواد را به دقت مخلوط نموده، سریعاً ژل فوقانی در فضای بالای کاست ژل ریخته می شود. شانه مخصوص ایجاد چاهک در ژل به طوری در بالای کاست قرار می گیرد که زیر آن حباب هوا تشکیل نشود. ژل فوقانی در دمای اطاق طی مدت 2 ساعت پلیمریزه می شود، سپس شانه مخصوص به دقت از بالای کاست ژل خارج شده و چاهک‌های ایجاد شده توسط محلول آبکی بافر الکتروفورز شستشو می شود (2-3).

4-4- الکتروفورز:

مخزن دستگاه با مقدار مناسبی از بافر الکتروفورز (2-3) که تا دمای 15 درجه سانتیگراد سرد شده است پر می شود. پس از قرار دادن نمونه‌ای از عصاره استخراج شده (لود کردن نمونه‌ها بر روی ژل)، الکتروفورز با برقراری جریان برق به شدت 8 میلی آمپر بر سانتیمتر مربع (سطح مقطع ژل) تا حرکت پایرونیپین G یا Y از ژل فوقانی شروع و سپس با شدت جریان 16 میلی آمپر بر سانتیمتر مربع (سطح مقطع ژل) یا ماگزیم ولتاژ 300 ولت تا خروج نشانگر از پایین ژل ادامه پیدا می کند. دمای محیط واکنش بایستی در سطح 15 درجه سانتیگراد حفظ شود.

4-5- تثبیت و رنگ آمیزی:

کاست حاوی ژل را از مخزن دستگاه جدا کرده و سپس دیواره‌های کاست را از یکدیگر باز کرده و ژل جهت تثبیت به مدت حداقل 30 دقیقه در مجاورت 250 میلی لیتر محلول 15 درصد تری کلرواستیک اسید (TCA) قرار می گیرد. سپس ژل تثبیت شده بعد از شستشو با آب مقطر به مدت یک شب در دمای اطاق در مجاورت 250 میلی لیتر محلول رنگ آمیزی (2-4-3) قرار می گیرد.

سایر روشهای رنگ آمیزی، نظیر رنگ آمیزی با کماسی بلو را می توان با موفقیت اجرا نمود. به منظور کنترل کیفی نهایی، فرآیند تهیه ژل، رنگ آمیزی و تحلیل الگوهای باندهای بر روی ژل، از ارقام الگو استفاده می شود. تفکیک باندهای الکتروفورزی و حرکت نسبی آنها (بر اساس وزن ملکولی) بایستی به وضوح انجام شود تا امکان قضاوت مناسب امکان پذیر گردد.

6-4-شناسایی آللهای گلوتنین:

جداول صفحه بعد به منظور توضیح آللهای گلوتنین و کمک به شناسایی باندهای مختلف طراحی گردیده است. این جداول مکان و وزن ملکولی تمامی باندهای گلوتنین را برای هر مکان ژنی تعیین کرده است. همچنین این جداول ضمن مقایسه باندهای ایجاد شده توسط آللهای مکانهای ژنی مختلف با الگوی باندهای ایجاد شده توسط یک رقم الگو به نام **Courtot**، شماره باند تعریف شده توسط پاین و حروف تعریف شده توسط پاین و لورنس (1983) را برای هر آلل ارائه می نمایند.

4-7- زیر واحدهای گلوکزین با وزن ملکولی بالا (HMW): نامگذاری باندها و تشخیص آل‌های مربوطه:

4-7-1- جدول زیر واحدهای Glu-A1 و نامگذاری باندها و تشخیص آل‌های مربوطه

(' f)öfız, ù©	È+œ/ < üt	Courtot Ÿ.ù.ÈöfızÈ. " v	Note		
			1 (a)	2 (b)	3 (c)
1	(113)---		1---		
2/2*	(108)---	2/2*---		2*---	n (no band)
3	(107)---				
4	(106)---				
5	(105)---				
6	(100)---				
6.1	(99)---				
7	(98)---	7 ---			
13/14/ 20	(94)---				
15	(91)---				
16/	(90)---				
17/18	89.5)				
22	(87)---				
8	(86)---	8 ---			
9/10	(83)---				
12	(80)---	12 ---			

4-7-2- جدول زیر واحدهای Glu-B1 و نامگذاری باندها و تشخیص آل‌های مربوطه

(' f)öfız, ù©	È+œ/ < üt	Courtot Ÿ.ù.ÈöfızÈ. " v	Note								
			2 (b)	3 (c)	4 (a)	5 (f)	6 (h)	7 (i)	8 (e)	9	
1	(113)---										
2/2*	(108)---	2/2*---									
3	(107)---										
4	(106)---										
5	(105)---										
6	(100)---		6---								
6.1	(99)---									6.1---	
7	(98)---	7 ---		7---	7---	7---					
13/14/ 20	(94)---						13---14---			20---	
15	(91)---						15---				
16/	(90)---					16---					
17/18	89.5)							17/18---			
22	(87)---									22---	
8	(86)---	8 ---	8---	8---							
9/10	(83)---				9---						
12	(80)---	12 ---									

3-7-4- جدول زیر واحدهای Glu-D1 و نامگذاری باندها و تشخیص آلدهای مربوطه

		Note				
(' j)ofz,ú©	È+oè<ü†	Courtot Yü.ÈofzÈ." v	1 (a)	2 (b)	3 (c)	4 (d)
1	(113)---					
2/2*	(108)---	2/2*---	2---			
3	(107)---			3---		
4	(106)---				4---	
5	(105)---					5---
6	(100)---					
6.1	(99)---					
7	(98)---	7 ---				
13/14/ 20	(94)---					
15	(91)---					
16/	(90)---					
17/18	89.5)					
22	(87)---					
8	(86)---	8 ---				
9/10	(83)---					10---
12	(80)---	12 ---	12---	12---	12---	

توجه:

باندهای خاصی (مانند باندهای شماره 9 و 10) دارای وزن ملکولی یکسانی هستند. لذا در حضور باند 5+10 از مکان ژنی Glu-D1 نمی توان حضور دو باند 7 و 7+9 از مکان ژنی Glu-B1 را از یکدیگر متمایز نمود. سایر باندهای هموزن به دلیل اینکه همواره با باندهای دیگری ظاهر می شوند قابل تفکیک و شناسایی از یکدیگر می باشند. برای مثال در مکان ژنی Glu-B1 باند شماره 13 همواره به همراه باند شماره 16 و باند شماره 14 همراه باند شماره 15 ظاهر می شود. در حالیکه باند شماره 20 از این مکان ژنی به تنهایی ظاهر می شود

- BEZAR, H.J., HADFIELD, P.D., 1982: "Identification of New Zealand Wheat Cultivars." Crop Research Division, D.S.I.R., Christchurch, NZ, 39 pp.
- BRIGGLE, L.W., REITZ, L.P., 1963: "Classification of Triticum Species and of Wheat Varieties Grown in the United States." United States Department of Agriculture, Technical Bulletin, No. 1278, US, 125 pp.
- BUSTARRET, J., 1944: "Variétés et variations." Annales agronomiques, 14ème année, 336, 365, FR
- DE BACKER, A., 1983: "L'homogénéité des variétés de Blé." Mémoire de fin d'études, 122e, promotion Beauvais, 108 pp, FR
- DHORNE, D., 1985: "Les cultivars de blé (triticum Spp) et leur identification." Mémoire pour l'obtention du titre d'Ingénieur D.P.E., Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Toulouse, 124 pp, FR
- FEINS, G.K. et al, 1975: "Australian Wheat Varieties." CSIR Wheat Research Unit, North Rye, New South Wales, AU
- HERVEY-MURRAY, C.G., 1980: "The Identification of Cereal Varieties." Cambridge University, Press, 187 pp, GB
- JONARD, P., 1951: "Les blés tendres (triticum vulgare vill) cultivés en France." Paris, Institut National de la Recherche Agronomique, 491 pp, FR
- MILATZ, R., 1970: "Kriterien der Getreidearten einschliesslich Mais und ihre Bewertung zur, Sortenidentifizierung." Bonn, Verband Deutscher Pflanzenzüchter, 236 pp, DE
- PAYNE, P.I., LAWRENCE, G.J., 1983: "Catalogue of Alleles For the Complex Gene Loci, Glu-A1, Glu-B1, Glu-D1, Which Code For High Molecular Weight Subunits of Glutenin in Hexaploid Wheat Cereal Research Communications 11, p. 29-35.
- PAYNE, P.I., 1987: "Genetics of Wheat Storage Proteins and the Effect of Allelic Variation on Bread-Making Quality. Annual Review of Plant Physiology 38, p. 141-153.
- PERCIVAL, J., 1921: "The Wheat Plant," monograph, London, Duckworth and Co., 463