دستورالعمل ملی

آزمون‌های

تمایز، یکنواختی و پایداری

در

جو

کمیته فنی ثبت ارقام گیاهی

دکتر سید یعقوب صادقیان مطهر

دکتر جواد مظفری

دکتر محمد رضا جلال کمالی

دکتر یحیی دهقانی شورکی

دکتر محمدرضا احمدی

دکتر داراب حسنی

مهندس سکینه شفاءالدین

مهندس کاوه خاکسار

کارگروه تخصصی جو

مهندس محمدرضا جزائری نوش‌آبادی

دکتر بهزاد سرخی

مهندس احمد یوسفی

مهندس سکینه شفاءالدین

مهندس سعید حاجیلویی

ویراستار

دکترسید یعقوب صادقیان مطهر

فهرست مطالب

عنوان	صفحه
پیش گفتار	۱
موضوع دستورالعمل	٤
مواد گیاهی مورد نیاز	٤
اجرای آزمون	٥
روش‌ها و مشاهدات	٦
گروه‌بندی ارقام	۷
معرفی جدول صفات	۸
جدول صفات	۹
روش اندازه گیری و یادداشت برداری صفات	۲۰
جدول کدهای دهدهی زادکس برای مراحل رشد غلات	۳۳
پرسشنامه فنی ثبت ارقام جو	۳۹
پیوست	٤۳

بسمه تعالی

پیش گفتار

به‌نژادی گیاهی با کشف یا ایجاد تغییرات ژنتیکی جدید در گونه‌های گیاهی شروع می شود. از میان تغییرات ژنتیکی حاصل، گزینش گیاهان با عملکرد بالا، مقاومت به تنشهای زنده و غیرزنده، رنگ مطلوب در گیاهان زینتی و یکنواختی در فرم و شکل درختان میوه و گیاهان زینتی در اولویت پژوهش‌های به نژادی قرار دارند. به‌نژادگر ممکن است فنون مختلف و یا فرمهای گوناگون فن آوری را در ایجاد تغییرات ژنتیکی مورد استفاده قرار دهد. بهرحال ایجاد تغییرات مورد نظر به‌نژادگر در توده‌های گیاهی و گزینش گیاهان مطلوب مهمترین و اولین مرحله گزینش ژنوتیپ‌های برتر می باشد. روش‌های گزینش نیز بر اساس ساختار فیزیولوژی، مورفولوژی و روش تولید مثل گونه‌ها تغییر می‌کند. صفات، حالات، رفتارهای فیزیولوژیکی، عملکرد محصول و کیفیت گیاهان تحت تاثیر عوامل محیطی، ژنتیکی و یا اثرات متقابل ژنوتیپ در محیط می‌باشد.

به‌نژادی یک فرایند بسیار طولانی است و مواد گیاهی در نسلهای مختلف در شرایط مختلف مزرعه، آزمایشگاه و گلخانه مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفته و فنون مختلف برای تشخیص ژنوتیپ‌های برتر در آزمایشگاه و مزرعه به کار گرفته می‌شود. بنابراین نه تنها دانش و فنون پیشرفته بلکه هزینه‌های زیادی برای تهیه یک رقم اصلاح شده در سالهای متمادی صرف می‌شود. در نتیجه حمایت مادی و معنوی از ارقام اصلاح شده، توسط دولت‌ها امری ضروری و اجتناب ناپذیر است.

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

از این رو براساس ماده (۳) قانون ثبت ارقام گیاهی، کنترل و گواهی بذر و نهال مصوب ۱۳۸۲/٤/۲۹ مجلس شورای اسلامی و ماده (۷) آئین نامه اجرای معرفی و ثبت ارقام گیاهی در اسفند ماه ۱۳۸۵ موسسه اقدام به تشکیل کمیته فنی ثبت ارقام گیاهی نمود.

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

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

یکنواختی نوشتارها و رفع غلط های موجود در متن توسط آقای دکتر سید یعقوب صادقیان و تنظیم نهایی دستورالعمل توسط آقای مهندس محمدرضا جزائری انجام گرفت و از طریق اداره روابط عمومی و امور بین‌الملل موسسه به چاپ رسید.

برخود لازم می‌دانم که از همه اعضاء کمیته فنی ثبت که در تدوین و اعضاء کارگروه که در تهیه پیش‌نویس دستورالعمل‌های آزمون تمایز، یکنواختی و پایداری ارقام مختلف زراعی و باغی زحمات زیادی را متقبل شدند، همچنین از سایر عزیزان که در انتشار این مجموعه مشارکت داشتند، تشکر و قدردانی نمایم. از خداوند متعال می‌خواهم که در آینده نزدیک شاهد رویکرد جدیدی در توسعه اقتصاد کشاورزی کشور از طریق ثبت ارقام جدید گیاهی پرمحصول و حمایت از حقوق به‌نژادگر باشیم.

مجید دهقانشعار

رئیس موسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال

۱- موضوع دستورالعمل

این دستورالعمل به منظور ثبت ارقام جو (*Hordeum vulgare* L. sensu lato) مورد استفاده قرار می‌گیرد.

۲- مواد گیاهی مورد نیاز

۲-۱- موسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال در مورد زمان و مکان تحویل، مقدار کمی و کیفی مواد گیاهی ارقام درخواست شده برای ثبت، تصمیم گیری می‌نماید. متقاضیانی که مواد گیاهی مورد ثبت را از خارج کشور وارد می کنند باید مدارک لازم نشان دهنده ورود قانونی و سلامت آن را ارائه نمایند.

متقاضی باید حداقل مقدار ۳ کیلوگرم بذر تحویل نماید.

بذر باید حداقل استانداردهای بذر گواهی شده[1] از نظر قوه نامیه، خلوص فیزیکی و میزان رطوبت را دارا باشد. در مواردی که ضرورت دارد بذر تا زمان کشت در انبار نگهداری شود، بهتر است میزان جوانه‌زنی بذر در زمان تحویل در بالاترین حد ممکن باشد.

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

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

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

۳- اجرای آزمون

۳-۱- مدت زمان آزمون

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

۳-۲- مکان آزمون

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

۳-۳- شرایط اجرای آزمون

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

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

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

۳-٤- برای اهداف خاصی ممکن است آزمایش‌های تکمیلی انجام شود.
برای مثال چنانچه آزمون های انجام شده بر اساس صفات مورفولوژیک (جدول شماره ۱) کافی نبود؛ می‌توان بنا به درخواست متقاضی و با نظر موسسه از صفات مبتنی بر الکتروفورز (جدول شماره ۲) نیز استفاده کرد.

٤- روش‌ها و مشاهدات

٤-۱- تمام مشاهداتی که برای ارزیابی تمایز و پایداری انجام می‌شوند باید بر روی ۲۰ بوته یا قسمت‌هایی از ۲۰ بوته انجام گیرند.

٤-۲- برای ارزیابی یکنواختی صفات در کل یک کرت (مشاهده یک گروه از بوته‌ها یا قسمت‌هایی از آنها به طور کلی) تعداد بوته‌ها یا قسمتهای گیاهی خارج از تیپ نباید بیش از ۵ در ۲۰۰۰ بوته باشد.

٤-۳- برای ارزیابی یکنواختی صفات بوته‌ها یا قسمتهایی از بوته‌ها در سنبله به ردیف‌ها، (مشاهده چند بوته یا قسمت‌هایی از آنها روی سنبله به ردیف‌ها) تعداد بوته‌ها یا قسمت‌های خارج از تیپ آنها در سنبله به ردیف نباید بیش از ۳ در۱۰۰ باشد.

٤-٤- در صورتیکه برای صفات خاصی ارقام شاخص جهت ارزیابی در دسترس نباشد، می‌توان از دستورالعمل توصیف صفات IPGRI[1] استفاده نمود.

۵- گروه‌بندی ارقام

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

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

الف) برگهای پایینی: کرکدار بودن غلاف برگ (صفت شماره ۸)
ب) ریشک‌ها: رنگ آنتوسیانین نوک (صفت شماره ١٦)
ج) سنبله: تعداد ردیف‌ها (صفت شماره ۱۳)
د) دانه: نوع کرک محور اصلی (صفت شماره ۲۲)
ه) دانه: کرکدار بودن شیار شکمی (صفت شماره ٢٦)
د) تیپ رشد (صفت شماره ۲۹)

1- International Plant Genetic Resources Institute (www.bioversityinternational.org)

٦- معرفی جدول صفات

٦-١- برای تشخیص تمایز، یکنواختی و پایداری، باید از صفات و توضیحات آنها که در جدول صفات ارائه شده، استفاده نمود.

٦-٢- به منظور تجزیه و تحلیل داده‌ها و کمی کردن صفات، به هر صفت با توجه به چگونگی بیان آن اعداد ۱ تا ۹ اختصاص داده شده است.

٦-٣- علائم

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

(+) وجود این علامت در ستون علایم جدول صفات نشان دهنده وجود توضیحات تکمیلی در بخش ۸ می‌باشد.

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

M[1]: اندازه‌گیری واقعی

VG[2]: ارزیابی مشاهده ای یک گروه از بوته‌ها یا قسمت‌هایی از آنها به صورت کلی.

VS[3]: ارزیابی مشاهده ای چندین بوته یا قسمت‌هایی از آنها روی سنبله به ردیف‌ها.

1 - Measurement
2 - Visual Group
3 - Visual Single

۷- جدول صفات

(جدول شماره ۱)

خصوصیات مورفولوژیکی

شماره صفت	علائم			صفت	حالت تظاهر	امتیاز
۱	(*) (+)	۲۵-۲۹	VG	بوته: عادت رشد	ایستاده نیمه ایستاده بینابین نیمه خوابیده خوابیده	۱ ۳ ۵ ۷ ۹
۲	(*)	۲۵-۲۹	VS	برگهای پایینی: کرکدار بودن غلاف برگ	ندارد دارد	۱ ۹
۳	(*)	۴۵-۴۹	VG	برگ پرچم: رنگ آنتوسیانین گوشوارک‌ها	ندارد یا خیلی کم کم متوسط زیاد خیلی زیاد	۱ ۳ ۵ ۷ ۹

شماره صفت	علائم			صفت	حالت تظاهر	امتیاز
٤	(*)	٤٥-٤٩	VG	برگ پرچم: شدت رنگ آنتوسیانین گوشوارک‌ها	خیلی کم کم متوسط زیاد خیلی زیاد	۱ ۳ ۵ ۷ ۹
۵	(+)	٤٧-٥١	VG	بوته: فراوانی بوته‌ها با برگ پرچم‌های خمیده	وجود ندارد یا خیلی کم کم متوسط زیاد خیلی زیاد	۱ ۳ ۵ ۷ ۹
٦	—	٥٠-٦٠	VG	برگ پرچم: نقره‌ای بودن غلاف	ندارد یا خیلی کم کم متوسط زیاد خیلی زیاد	۱ ۳ ۵ ۷ ۹

شماره صفت	علائم			صفت	حالت تظاهر	امتیاز
۷	(*)	۵۲-۵۰	VG	زمان ظهور سنبله (اولین سنبلچه در ۵۰٪ سنبله‌ها نمایان شود)	خیلی زود زود متوسط دیر خیلی دیر	۱ ۳ ۵ ۷ ۹
۸	(*)	٦۵-٦۰	VG	ریشک‌ها: رنگ آنتوسیانین نوک	ندارد دارد	۱ ۹
۹	(*)	٦۵-٦۰	VG	ریشک‌ها: شدت رنگ آنتوسیانین نوک	خیلی کم کم متوسط زیاد خیلی زیاد	۱ ۳ ۵ ۷ ۹
۱۰	(*)	۷۵-٦۵	VG	سنبله: نقره‌ای بودن	ندارد یا خیلی کم کم متوسط زیاد خیلی زیاد	۱ ۳ ۵ ۷ ۹

شماره صفت	علائم			صفت	حالت تظاهر	امتیاز
۱۱	(+)	۷۰	VG	سنبله: حالت قرار گرفتن	ایستاده نیمه ایستاده افقی نیمه واژگون واژگون	۱ ۳ ۵ ۷ ۹
۱۲	(*)	۸۰-۹۲	M	بوته: ارتفاع (ساقه، سنبله و ریشک)	خیلی کوتاه کوتاه متوسط بلند خیلی بلند	۱ ۳ ۵ ۷ ۹
۱۳	(*)	۸۰-۹۲	VS	سنبله: تعداد ردیف	دو ردیفه چند ردیفه	۱ ۲
۱٤	(+)	۸۰-۹۲	VS	سنبله: شکل	مخروطی استوانه‌ای دوکی	۳ ۵ ۷

شماره صفت	علائم			صفت	حالت تظاهر	امتیاز
۱۵	(*)	۹۲-۸۰	VS یا M	سنبله: تراکم	خیلی باز باز متوسط متراکم خیلی متراکم	۱ ۳ ۵ ۷ ۹
۱۶	—	۹۲-۸۰	M	سنبله: طول (بدون ریشکها)	خیلی کوتاه کوتاه متوسط بلند خیلی بلند	۱ ۳ ۵ ۷ ۹
۱۷	(*) (+)	۹۲-۸۰	VS یا M	ریشک: طول (در مقایسه با سنبله)	کوتاه متوسط بلند	۳ ۵ ۷
۱۸	—	۹۲	VS	محور سنبله: طول بند اول	کوتاه متوسط بلند	۳ ۵ ۷

شماره صفت	علائم			صفت	حالت تظاهر	امتیاز
١٩	(+)	٩٢	VS	محور سنبله: خمیدگی بند اول	ندارد یا خیلی کم کم متوسط زیاد خیلی زیاد	١ ٣ ٥ ٧ ٩
٢٠	(*) (+)	٩٢	VS	سنبلچه‌های عقیم: وضعیت (در یک سوم میانی سنبله)	موازی موازی تا کمی واگرا واگرا	١ ٢ ٣
٢١	(+)	٩٢	VS	سنبلچه میانی: نسبت طول گلوم و ریشک به طول دانه	کوتاهتر مساوی بلندتر	١ ٢ ٣
٢٢	(*) (+)	٨٠-٩٢	VS	دانه: نوع کرک محور اصلی	کوتاه بلند	١ ٢
٢٣	(*)	٩٢	VS	دانه: پوشینه	ندارد دارد	١ ٩

شماره صفت	علائم			صفت	حالت تظاهر	امتیاز
۲٤	—	۸۵-۸۰	VS	دانه: رنگ آنتوسیانین رگه های لما	ندارد یا خیلی کم کم متوسط زیاد خیلی زیاد	۱ ۳ ۵ ۷ ۹
۲۵	(+)	۹۲	VS	دانه: وجود خار در رگه‌های جانبی پشت لما	ندارد یا خیلی کم کم متوسط زیاد خیلی زیاد	۱ ۳ ۵ ۷ ۹
۲٦	(*) (+)	۹۲	VS	دانه: کرکدار بودن شیار شکمی	ندارد دارد	۱ ۹
۲۷	(+)	۹۲	VS	دانه: وضعیت غشای پایه تخمدان	جلویی جانبی	۱ ۲
۲۸	(+)	۸۷-۸۵ یا ۹۲	VG VS	مغز دانه: رنگ لایه آلرون	مایل به سفید کم رنگ پر رنگ	۱ ۲ ۳
۲۹	(*) (+)	—	VG	تیپ رشد	زمستانه بینابین بهاره	۱ ۲ ۳

(جدول شماره ٢- الف)

جدول صفات مبتنی بر الکتروفورز- روش SDS PAGE

شماره صفت	علائم	صفت	حالت تظاهر	امتیاز
٣٠	(+)	ترکیب هوردئین-D: تظاهرآلل بر روی مکان ژنی Hor-3	باند ٣٤	١
			باند ٣٣	٢
			باند ٣٥	٣
			باند ٣٢/٥	٤
			باند ٣٢	٥
٣١	(+)	ترکیب هوردئین-C: تظاهرآلل بر روی مکان ژنی Hor-1	باندهای ٦٨+٦٥+٦٢	١
			باندهای ٦٨+٦٦+٦٥+٦٢	٢
			باندهای ٧١+٦٦/٥	٣
			باندهای ٧١+٦٦/٥+٦١/٥	٤
			باند ٦٥	٥
			باندهای ٦٨+٦٥+٦٢	٦
			باندهای ٦٨/٥+٦٧/٥+٦٠	٧
			باندهای ٧٣+٦٨+٦٥+٦١	٨
			باندهای ٧٢+٦٩	٩
			باندهای ٦٦/٥+٦٤	١٠
			باندهای ٧١+٦٧	١١
			باندهای ٧٠+٦٩+٦٨+٦٥	١٢
			باندهای ٧١+٦٨+٦١/٥	١٣
			باندهای ٦٧/٥+٦٥	١٤

شماره صفت	علائم	صفت	حالت تظاهر	امتیاز
			باندهای ۱۰۰+۸۸+۸٦+۷۹	۱
			باندهای ۱۰۱+۹۷+۹۵+۹۱+۸۸+۷۹	۲
			باندهای ۱۰۱+۹۷+۹۵+۹۲+۹۱+۷۹	۳
			باندهای ۹۷+۹۱+۸۷+۸۲+۷۵	٤
			باندهای ۱۰۱+۹۷+۸۸+۸٦+۷۹	۵
			باندهای ۱۰۱+۹۵+۸٤+۷۸	٦
			باندهای ۱۰۰+۹٤+۹۱+۹۰+۷۹	۷
			باندهای ۱۰۰+۹۵+۹۱+۸٦+۷۸	۸
			باندهای ۱۰۱+۹۲+۸۸+۹۱+۸۲+۷۹	۹
		ترکیب هوردئین-B:	باندهای ۱۰۰+۸۸+۸٦+۷۹+۷٦	۱۰
۳۲	(+)	تظاهر آلل بر روی مکان ژنی Hor-2	باندهای ۱۰۱+۹۵+۹۲+۸۹+۸٦+۷۹	۱۱
			باندهای ۱۰۱+۹۵+۷۹	۱۲
			باندهای ۱۰۱+۹۲+۸۹+۷۸	۱۳
			باندهای ۱۰۱+۸۹+۸۱+۷۹+۷۸+۷۵	۱٤
			باندهای ۱۰۰+۹۵+۹٤+۸۸+۸٦+۸۳+۸۱+۷۹+۷۸+۷۵	۱۵
			باندهای ۱۰۱+۹۰+۸۸+۸٤+۸۱	۱٦
			باندهای ۸٦+۸۳+۸۱+۷۹+۷۸+۷۵	۱۷
			باندهای ۱۰۰+۸۸+۸۲	۱۸
			باندهای ۱۰۰+۸۱	۱۹
			باندهای ۹۱+۸۹+۸۳+۷۹+۷۵	۲۰
			باندهای ۹۲+۸٤+۷۹	۲۱

(جدول شماره ۲- ب)

جدول صفات مبتنی بر الکتروفورز- روش Acid PAGE

شماره صفت	علائم	صفت	حالت تظاهر	امتیاز
۳۱	(+)	ترکیب هوردئین-C: تظاهرآلل بر روی مکان ژنی Hor-1	باندهای ۲۷+۳۰+۳۲+۳۷+۳۹	۱
			باندهای ۲۷+۳۰+۳۲+۳٤+۳۷+۳۹	۲
			باندهای ۲۷+۳۰+۳۲+۳۷	۳
			باندهای ۳۲+۳۷+٤۱	٤
			باندهای ۲۷+۳۰+۳۲+۳۷+۳۹+٤۱	۵
			باندهای ۳۲+۳۷+۳۸	٦
			باندهای ۳۵+۳۸	۷
			باندهای ۳۲+۳۷+۳۹+٤۱	۸
			باندهای ۳۸+٤۱+٤۲	۹
			باندهای ۳۰+۳۲+۳۷	۱۰
			باندهای ۳٤+۳۷	۱۱
			باندهای ۳٤+۳۹+٤۱+٤۲	۱۲
			باندهای ۳۱+۳٤+۳۷+۳۸+٤۱	۱۳
			باندهای ۳۲+۳۷+٤۱+٤۳	۱٤
۳۲	(+)	ترکیب هوردئین-B: تظاهرآلل بر روی مکان ژنی Hor-2	باندهای ۷۱+۷۹+۸۳+۸٦+۹٤+۱۰۰	۱
			باندهای ۷۱+۸۲+۸۹+۱۰۰	۲
			باندهای ۷٦+۸۲+۸۳+۸٦+۱۰۰	۳
			باندهای ٦٦+۷۱+۷٦+۸٦+۹۳+۱۰۰	٤
			باندهای ۷۱+۷۸+۷۹+۹۰+۹٤	۵
			باندهای ۷٦+۸۱+۹٤	٦
			باندهای ۷۱+۷۲+۷۵+۸۲+۸۵+۸٦+۱۰۰	۷

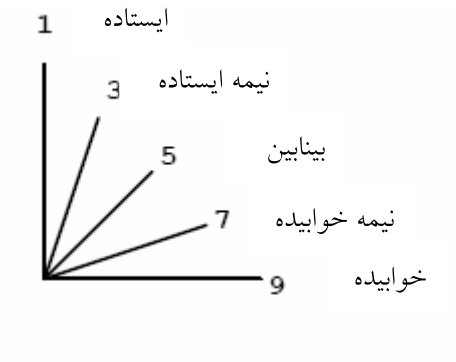
شماره صفت	علائم	صفت	حالت تظاهر	امتیاز
			باندهای ۹٤+۹۰+۷۹+۷٦+۷۲	۸
			باندهای ۸٦+۷۹+۷٦+۷۱	۹
			باندهای ۱۰۰+۹٤+۸٦+۸۳+۷۸+۷۱	۱۰
			باندهای ۹۰+۸٦+۸۳+۷۹+۷۱	۱۱
			باندهای ۷۹+۷٦+۷۱	۱۲
			باندهای ۸۹+۷۱	۱۳
			باندهای ۹۰+۸٦+۸۳+۷۹	۱٤
			باندهای ۹٤+۸۹+۸۵+۷۹+۷۸+۷۲+۷۱+٦۹+٦۷	۱۵
			باندهای ۹٤+۸۸+۸۳+۷۹+۷۱	۱٦
			باندهای ۹۳+۸۳+۷۹+۷٦+٦۹	۱۷
			باندهای ۱۰۰+۹۱+۸٦+۸۵+۷۹+۷۲+۷۱	۱۸
			باندهای ۱۰۰+۷٦+۷۲	۱۹
			باندهای ۸۳+۷۹+۷٦+۷۱+٦۱	۲۰
			باندهای ۱۰۰+۹٤+۸۱+۷٦	۲۱

۸- روش اندازه‌گیری و یادداشت برداری صفات

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

صفت ۱- بوته: عادت رشد

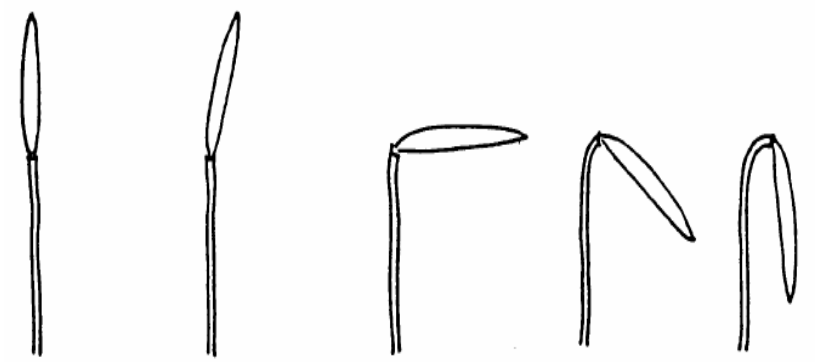
عادت رشد گیاه باید به صورت مشاهده‌ای و از روی حالت برگها و پنجه‌های گیاه تعیین گردد. برای تعیین آن باید از زاویه بین برگها و پنجه‌ها با یک محور عمودی فرضی استفاده شود.



صفت ۵- بوته: فراوانی بوته‌ها با برگ پرچم‌های خمیده

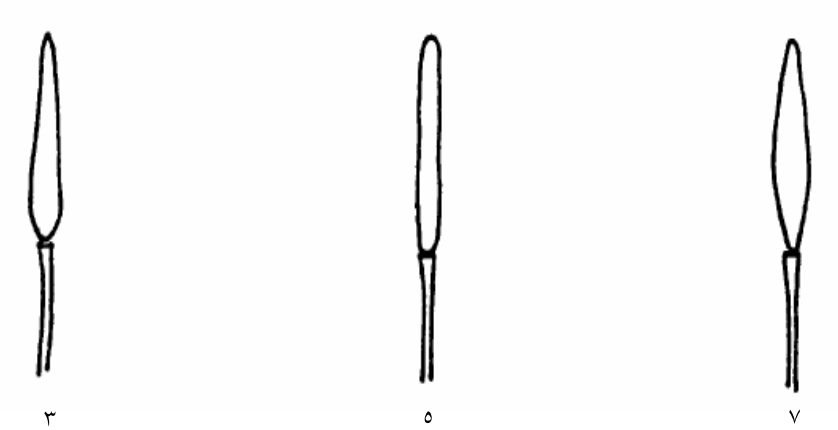
توصیف صفت	امتیاز
تمام برگهای پرچم بدون خمیدگی است	۱
یک چهارم برگهای پرچم خمیده است	۳
یک دوم برگهای پرچم خمیده است	۵
سه چهارم برگهای پرچم خمیده است	۷
تمام برگهای پرچم خمیده است	۹

صفت ۱۱- سنبله: حالت قرار گرفتن



۱ ایستاده ۳ نیمه ایستاده ۵ افقی ۷ نیمه واژگون ۹ واژگون

صفت ١٤- سنبله: شکل



۳	۵	۷
مخروطی	استوانه‌ای	دوکی

صفت ۱۷- ریشک: طول (در مقایسه با سنبله)

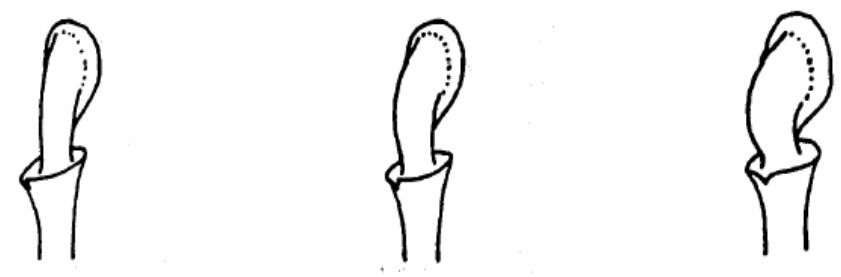
۳ کوتاه

۵ متوسط

۷ بلند

متوسط حالتی است که طول ریشک برابر طول سنبله باشد.

صفت۱۹- محور سنبله: خمیدگی بند اول

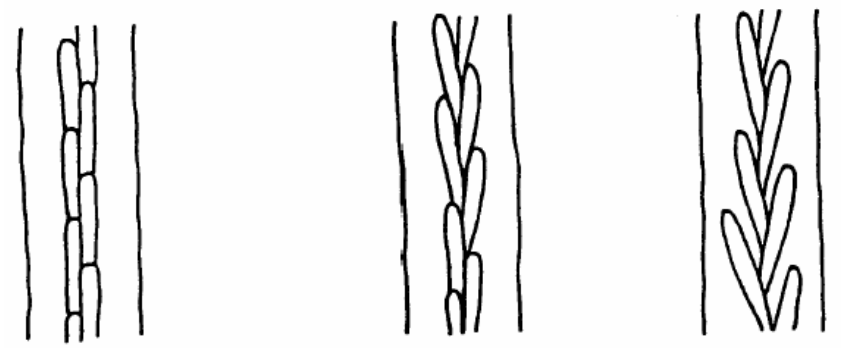


۳
کم

۵
متوسط

۷
زیاد

صفت ۲۰- سنبلچه‌های عقیم: وضعیت (در یک سوم میانی سنبله)

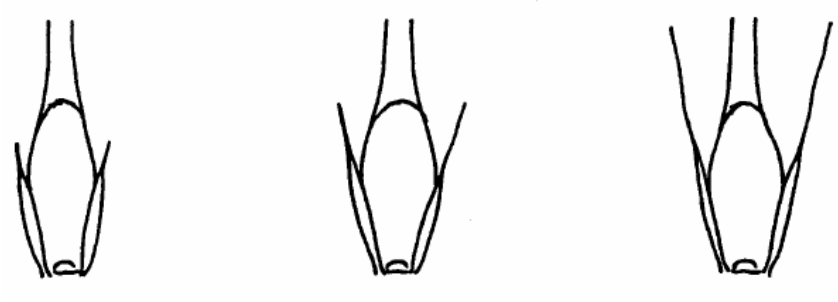


۳
موازی

۵
موازی تا کمی واگرا

۷
واگرا

صفت ۲۱- سنبلچه میانی: نسبت طول گلوم و ریشک به طول دانه



۳
کوتاهتر

۵
بلندتر

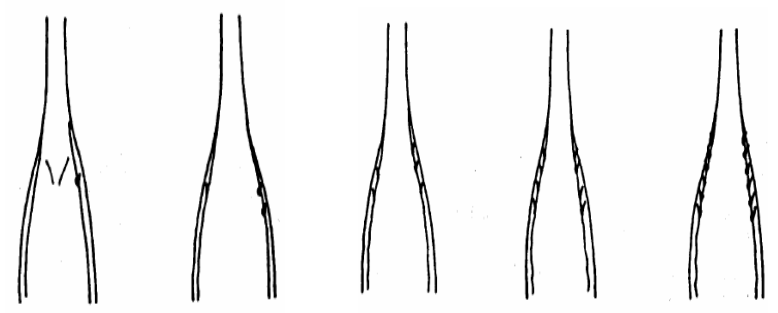
۷
مساوی

صفت ۲۲- دانه: نوع کرک محور اصلی

۱
کوتاه

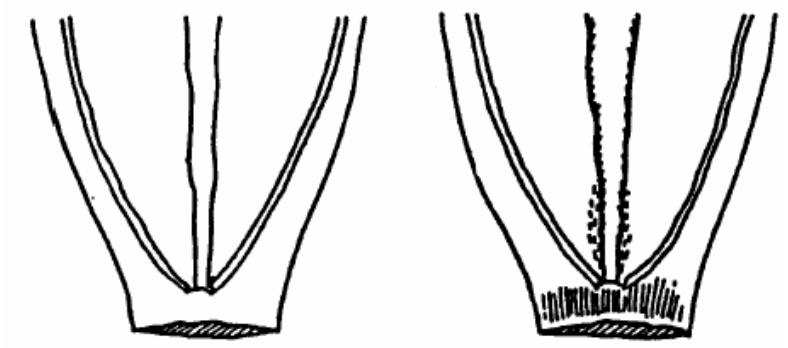
۲
بلند

صفت ۲۵- دانه: وجود خار در رگه‌های جانبی پشت لما



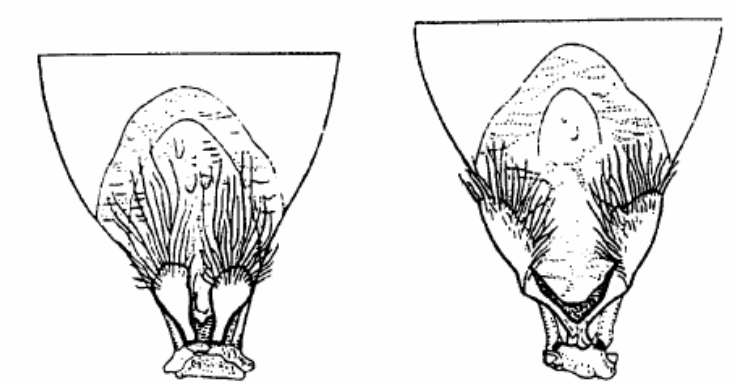
۱ ندارد یا خیلی کم
۳ کم
۵ متوسط
۷ زیاد
۹ خیلی زیاد

صفت ۲۶- دانه: کرکدار بودن شیار شکمی



۱ ندارد
۲ دارد

صفت ۲۷- دانه: وضعیت غشای پایه تخمدان



۱ ۲

جلویی جانبی

صفت ۲۸- مغز دانه: رنگ لایه آلرون

رنگ لایه آلرون پس از خیساندن مغز دانه در آب به مدت ۱۲ ساعت و به صورت مشاهده ای تعیین می‌شود. در صورت لزوم می‌توان از ذره بین نیز استفاده کرد.

صفت ۲۹- تیپ رشد

تیپ رشد باید روی یک یا چندین کرت در فصل بهار ارزیابی گردد. ارقام شاهد بهاره و زمستانه باید همیشه در کرتها باشند. توصیف ارقام مورد مطالعه باید بر طبق رفتار ارقام شاهد باشد. زمانی که آخرین ارقام بهاره کاملا رسیدند (مرحله ۹۲-۹۱ جدول

زادکس) ارقام مورد نظر باید ارزیابی شوند. حالتهای بیان این صفت به صورت زیر تعریف می‌شود:

تیپ زمستانه: بوته‌های این تیپ از نظر مرحله رشدی حداکثر به کد ٤٥ (آماس ساقه) جدول زادکس می‌رسند.

تیپ بینابین: بوته‌های این تیپ از نظر مرحله رشدی از مرحله ٤٥ فراتر می‌روند. به عنوان یک قانون بوته های این تیپ از مرحله ۷۵ فراتر می‌روند و نهایتا تا مرحله ۹۰ می‌رسند.

تیپ بهاره: بوته‌های این تیپ از نظر مرحله رشدی از مرحله ۹۰ هم فراتر می‌روند.

تشخیص آللهای هوردئین

الگوهای باندی ایجاد شده هوردئین‌های B، C و D به صورت شماتیک در جدول نشان داده شده‌اند در این جدول از تفاوت‌های موجود بین شدت باندها صرف نظر شده است.

شناسایی آلل‌های هوردئین‌های C, B و D: نامگذاری باندهای انحصاری و شناسایی آللهای مربوطه (SDS PAGE)

صفت ۳۰: مکان Hor-3

D-Hordeins

Example variety (Atem)	Note				
	1	2	3	4	5
32					--
32.5				--	
33		--			
34	--	--			
35			--		

صفت ۳۱: مکان Hor-1

C-Hordeins

Example variety (Atem)	Note														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
60							--								60
61								--							61
61.5						--							--		61.5
62	--		--	--											62
64										--					64
65	--		--	--	--			--		--			--		65
66				--											66
66.5					--	--				--					66.5
67											--				67
67.5							--							--	67.5
68	--		--	--	--			--				--	--		68
68.5							--								68.5
69									--			--			69
70												--			70
71					--	--					--		--		71
72									--						72
73								--							73

B-Hordeins

صفت ۳۲: مکان Hor-2

Example variety (Atem)	Note																			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
75				--										--	--		--			--	
76										--											
78						--		--					--	--	--		--				
79	--	--	--	--		--		--	--	--	--	--		--	--		--			--	--
81														--	--	--	--		--		
82				--					--									--			
83															--		--			--	
84						--										--					--
86	--	--			--			--		--	--				--		--				
87				--																	
88	--	--	--		--				--	--					--	--		--			
89											--		--	--						--	
90							--									--					
91		--	--	--			--	--	--											--	
92			--						--		--		--								--
94							--								--						
95		--	--			--		--			--	--			--						
97		--	--	--	--																
100	--	--					--	--		--					--			--	--		
101		--	--		--	--			--		--	--	--	--		--					

شناسایی آلل‌های هوردئین‌های B و C: نامگذاری باندهای انحصاری و شناسایی آللهای مربوطه

(Acid PAGE)

C-Hordeins

صفت ۳۱: مکان Hor-1

Example variety (Atem)	Note														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
25															25
27 --	--	--	--		--										27
30 --	--	--	--		--					--					30
31													--		31
32 --	--	--	--	--	--	--		--		--				--	32
34		--									--	--	--		34
35							--								35
37 --	--	--	--	--	--	--		--		--	--		--	--	37
38						--	--		--				--		38
39 --	--	--			--			--				--			39
41				--	--			--	--			--	--	--	41
42									--			--			42
43														--	43
	10	10A	1	11	17	6	19	2	4	5	18	14	8	3	

صفت ۳۲: مکان Hor-2 B-Hordeins

Example variety (Atem)	Note																			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
61																				--	
66				--																	
67															--						
69															--		--				
71	--	--	--		--	--		--		--	--	--	--	--		--	--		--		--	
72								--	--							--			--	--		
75								--														
76				--	--		--		--	--			--					--		--	--	--
78						--					--					--						
79	--	--				--			--	--		--		--		--	--	--	--		--	
81							--															--
82			--	--				--														
83	--	--								--	--			--		--	--				--	
85								--							--				--			
86	--	--		--	--			--		--	--			--					--			
88																	--					
89			--										--		--							
90					--				--			--		--								
91																			--			
93				--														--				
94	--	--			--	--			--		--				--	--						--
100	--	--	--	--	--			--			--								--	--		--
104																						
	3	4	13	14	-	9	1	7	6	-	-	11	16	-	18	-	19	8	15	12	10	

۹- جدول کدهای دهدهی زادکس برای مراحل رشد غلات

کد ۲ رقمی	توضیح عمومی	ملاحظات
۰۰	بذر خشک	
۰۱	شروع جذب آب	
۰۲	-	
۰۳	جذب آب کامل شده	
۰٤	-	
۰۵	پدیدار شدن ریشه از گندمه (کاریوپسیس)	
۰٦	-	
۰۷	پدیدار شدن کلئوپتیل از گندمه (کاریوپسیس)	
۰۸	-	
۰۹	پدیدار شدن برگ در نوک کلئوپتیل	
رشد گیاهچه		
۱۰	خروج اولین برگ از کلئوپتیل	دومین برگ قابل مشاهده است (کمتر از یک سانتیمتر)
۱۱	باز شدن اولین برگ (۱)	
۱۲	باز شدن ۲ برگ	۵۰٪ پهنک باز شده است
۱۳	باز شدن ۳ برگ	
۱٤	باز شدن ٤ برگ	
۱۵	باز شدن ۵ برگ	
۱٦	باز شدن ٦ برگ	
۱۷	باز شدن ۷ برگ	
۱۸	باز شدن ۸ برگ	
۱۹	باز شدن ۹ برگ یا بیشتر	

کد ۲ رقمی	توضیح عمومی	ملاحظات
	پنجه‌دهی	
۲۰	فقط ظهور ساقه اصلی	
۲۱	ظهور ساقه اصلی و یک پنجه	
۲۲	ظهور ساقه اصلی و ۲ پنجه	
۲۳	ظهور ساقه اصلی و ۳ پنجه	
۲٤	ظهور ساقه اصلی و ٤ پنجه	
۲۵	ظهور ساقه اصلی و ۵ پنجه	
۲٦	ظهور ساقه اصلی و ٦ پنجه	
۲۷	ظهور ساقه اصلی و ۷ پنجه	
۲۸	ظهور ساقه اصلی و ۸ پنجه	
۲۹	ظهور ساقه اصلی و ۹ پنجه و بیشتر	
	طویل شدن ساقه	
۳۰	برخاستن ساقه کاذب (۲)	در برنج: تاخیر فاز رویشی
۳۱	اولین گره ساقه قابل شناسایی است	مرحله گره‌بندی
۳۲	دومین گره ساقه قابل شناسایی است	
۳۳	سومین گره ساقه قابل شناسایی است	
۳٤	چهارمین گره ساقه قابل شناسایی است	
۳۵	پنجمین گره ساقه قابل شناسایی است	
۳٦	ششمین گره ساقه قابل شناسایی است	
۳۷	برگ پرچم در حال پدیدار شدن است	
۳۸	-	مرحله پیش آبستنی (در برنج: قرار گرفتن گوشوارک‌ها روبروی هم)
۳۹	زبانک برگ پرچم قابل مشاهده است	
	تورم ساقه	
٤۰	-	مرحله آغازین آبستنی (گل‌آذین کمی توسعه یافته است)
٤۱	توسعه غلاف برگ پرچم	
٤۲	-	

کد ۲ رقمی	توضیح عمومی	ملاحظات
٤٣	انتهای ساقه‌ها در حال متورم شدن هستند	مرحله میان آبستنی
٤٤	-	
٤٥	انتهای ساقه‌ها متورم شده اند	
٤٦	-	
٤٧	باز شدن غلاف برگ پرچم	مرحله اواخر آبستنی
٤٨	-	
٤٩	پدیدار شدن اولین ریشک ها	فقط در ارقام ریشک‌دار
	گلدهی	
٥٠	نمایان شدن اولین سنبلچه گل‌آذین	گیاهان با گلدهی غیر همزمان
٥١		گیاهان با گلدهی همزمان
٥٢	نمایان شدن یک چهارم گل‌آذین	گیاهان با گلدهی غیر همزمان
٥٣		گیاهان با گلدهی همزمان
٥٤	نمایان شدن یک دوم گل‌آذین	گیاهان با گلدهی غیر همزمان
٥٥		گیاهان با گلدهی همزمان
٥٦	نمایان شدن سه چهارم گل‌آذین	گیاهان با گلدهی غیر همزمان
٥٧		گیاهان با گلدهی همزمان
٥٨	نمایان شدن کامل گل‌آذین	گیاهان با گلدهی غیر همزمان
٥٩		گیاهان با گلدهی همزمان
	ظهور گل‌آذین	
٦٠	شروع گلدهی (در جو به آسانی قابل شناسایی نیست و در برنج معمولا بلافاصله بعد از خوشه‌دهی)	گیاهان با گلدهی غیر همزمان
٦١		گیاهان با گلدهی همزمان
٦٢	---	
٦٣	---	

کد ۲ رقمی	توضیح عمومی	ملاحظات
٦٤	اواسط گلدهی	گیاهان با گلدهی غیر همزمان
٦٥		گیاهان با گلدهی همزمان
٦٦	---	
٦٧	---	
٦٨	کامل شدن گلدهی	گیاهان با گلدهی غیر همزمان
٦٩		گیاهان با گلدهی همزمان
	شیری شدن	
۷۰	---	
۷۱	گندمه آبکی	
۷۲	---	
۷۳	اوایل شیری شدن	افزایش مواد جامد در آندوسپرم مایع
۷٤	---	
۷٥	اواسط شیری شدن	
۷٦	---	گندمه بین انگشتان شکسته می‌شود
۷۷	اواخر شیری شدن	
۷۸	---	
۷۹	---	
	خمیری شدن	
۸۰	---	
۸۱	---	
۸۲	---	
۸۳	اوایل خمیری شدن	اثر ناخن باقی می‌ماند
۸٤	---	
۸٥	خمیری نرم	اثر ناخن باقی نمی‌ماند
۸٦	---	
۸۷	خمیری سخت	کلروفیل گل‌آذین از بین می‌رود
۸۸	---	

کد ۲ رقمی	توضیح عمومی	ملاحظات
۸۹	---	
رسیدگی		
۹۰	---	
۹۱	گندمه سخت می‌شود (دو نیمه کردن بذر با ناخن مشکل است) (۳)	در برنج خوشچه‌های انتهایی می‌رسند
۹۲	گندمه سخت می‌شود (نمی‌توان با ناخن روی بذر خراش عمیق ایجاد کرد) (٤)	در برنج ۵۰٪ خوشچه‌ها می‌رسند
۹۳	گندمه‌ها در طول روز می‌ریزند (۵)	در برنج بیش از ۹۰٪ خوشچه‌ها می‌رسند
۹٤	رسیدگی بیش از حد- ساقه ها مرده و متلاشی می‌شوند	خطر ریزش دانه‌ها در اثر تکان
۹۵	خواب بذر	
۹٦	بذور زنده دارای ۵۰٪ قدرت جوانه‌زنی هستند	
۹۷	بذور خواب نیستند	
۹۸	القائ خواب ثانویه	
۹۹	از بین رفتن خواب ثانویه	
نشا کردن و احیا		
T1	از ریشه درآوردن گیاه بذری	
T2	---	
T3	کاشتن (نشاء گیاه در زمین اصلی)	
T4	---	
T5	---	
T6	---	
T7	بازیابی جوانه‌ها	
T8	---	
T9	ادامه رشد رویشی	

زیرنویس جدول کدهای دهدهی برای مراحل رشد غلات

۱- مرحله‌ای که گیاه بذری در گلخانه با زنگ تلقیح می‌شود

۲- فقط در مورد غلات زودرس خوابیده یا نیمه خوابیده استفاده می‌شود

۳- رسیده و مناسب برای دستگاه بسته‌بند (حدود ۱٦٪ رطوبت).گل آذین کلروفیل خود را از دست داده است

٤- رسیده و مناسب برای برداشت با کمباین (کمتر از ۱٦٪ رطوبت)

۵- مناسب‌ترین زمان برداشت

در این قسمت چیزی ننویسید

پرسشنامه فنی ثبت ارقام جو

تاریخ : .....

این پرسشنامه باید به اظهارنامه ثبت رقم پیوست گردد

۱- موضوع

نام علمی: *Hordeum vulgare* L. sensu lato

نام عمومی : جو

۲- مشخصات درخواست کننده :

نام و نام خانوادگی : .....

تابعیت : ..... شغل : .....

نشانی محل کار : .....

تلفن : .....فاکس: .....

نام به‌نژادگر (درصورتیکه متفاوت از درخواست کننده می‌باشد):

.....

۳- نام پیشنهادی رقم یا کد به‌نژادگر:

نام پیشنهادی : .....

کد به‌نژادگر : .....

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

٤-۱- روش اصلاحی : .....

٤-۲- نحوه تکثیر رقم : .....

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

٥-١- تیپ رشد (صفت شماره ٢٩)

زمستانه☐ بینابین☐ بهاره☐

٥-٢- برگهای پایینی: کرکدار بود غلاف برگ (صفت شماره ٢)

ندارد☐ دارد☐

٥-٣- زمان ظهور سنبله (اولین سنبلچه در ٥٠٪ از سنبله‌ها نمایان شود- میانگین زمان سنبله‌دهی با دو رقم شناخته شده مقایسه می‌شود) (صفت شماره ٧)

خیلی زود☐ زود☐ متوسط☐ دیر☐

٥-٤- ریشک‌ها: رنگ آنتوسیانین نوک (صفت شماره ٨)

ندارد ☐ دارد ☐

٥-٥- بوته: ارتفاع (از طوقه تا انتهای ریشک) (صفت شماره ١٢)

خیلی کوتاه☐ کوتاه ☐ متوسط ☐

بلند ☐ خیلی بلند ☐

٥-٦- سنبله: تعداد ردیف (صفت شماره ١٣)

دو ردیفه ☐ چند ردیفه ☐

٥-٧- دانه: نوع کرک محور اصلی (صفت شماره ٢٢)

کوتاه ☐ بلند ☐

٥-٨- دانه: کرکدار بودن شیار شکمی (صفت شماره ٢٦)

ندارد ☐ دارد ☐

٦- ارقام مشابه و تفاوت‌های رقم مورد درخواست با این ارقام :

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

نام رقم مشابه با رقم مورد درخواست	صفت (صفات) متمایز کننده رقم مورد درخواست با رقم مشابه	حالت تظاهر صفت (صفات) در رقم مشابه	حالت تظاهر صفت (صفات) در رقم مورد درخواست

ملاحظات:

۷- اطلاعات تکمیلی جهت آزمون رقم:

۷-۱- خصوصیات زراعی :

.....

۷-۲- مقاومت به آفات و بیماریها :

.....

۷-۳- علاوه بر صفات بندهای ٥ و ٦ ، آیا صفت دیگری که در تشخیص و تمایز رقم مورد درخواست می‌تواند مفید واقع شود، وجود دارد؟

در صورت مثبت بودن جواب جزئیات آن را ذکر نمایید

.....

۷-٤- شرایط ویژه جهت آزمون رقم:

آیا شرایط ویژه‌ای برای رشد یا آزمون رقم مورد درخواست وجود دارد؟

در صورت مثبت بودن جواب جزئیات آن را ذکر نمایید :

.....

۷-۵- اطلاعات تکمیلی دیگر :

.....

۸- مجوز برای معرفی رقم :

(الف) آیا برای معرفی این رقم نیاز به کسب مجوزی از مراجع ذیصلاح می‌باشد؟ بلی ☐ خیر ☐

(ب) آیا چنین مجوزی گرفته شده است؟ بلی ☐ خیر ☐

در صورت مثبت بودن جواب ، یک نسخه از مجوز را پیوست نمایید

۹-اطلاعات ماده گیاهی مورد آزمون :

بذرهای ارائه شده برای آزمون ثبت نباید قبلا توسط قارچ‌کش، آفت‌کش، تاخیردهنده‌های رشد یا غیره تیمار شده باشد، مگر اینکه موسسه درخواست اعمال چنین تیماری را داده باشد. در صورت اعمال تیمار، جزئیات آن را ذکر نمایید.

.....

.....

۱۰- تایید پرسشنامه:

بدینوسیله، صحت اطلاعات تکمیل شده در این پرسشنامه را تایید می‌نمایم.

نام درخواست کننده:

تاریخ و امضاء :

پیوست

در این پیوست شرح روش مورد استفاده برای تجزیه هوردئین‌ها آورده شده است. این صفات تنها به عنوان مکمل صفات مورفولوژیک و فیزیولوژیک بوده و بر اساس درخواست متقاضی ثبت رقم و نظر موسسه استفاده می‌شوند.

برای تجزیه هوردئین‌ها از ژل پلی اکریل‌آمید در حضور سدیم دو دسیل سولفات[1] (SDS PAGE) استفاده می‌شود. هوردئین‌ها توسط سه مکان ژنی مرکب شامل دو مکان ژنی Hor-1 و Hor-2 روی بازوی کوتاه کروموزوم شماره ۵ و مکان ژنی Hor-3 روی بازوی بلند همین کروموزوم کد می‌شوند. در هر مکان ژنی چندین آلل وجود دارد و تجزیه هوردئین‌ها بر مبنای شناسایی این آلل‌ها از طریق ایجاد باندها یا الگوهای باندی ایجاد شده بر روی ژل استوار است. مکانهای ژنی کد کننده گروههای مختلف پروتئین‌های قابل تفکیک الکتروفورزی بر اساس کاهش سرعت حرکت روی ژل به نام‌های هوردئین-B، هوردئین-C و هوردئین-D شناخته می‌شوند. آللهای هر مکان ژنی را می‌توان با حروف یا اعداد یا ترکیبی از آنها نشان داد. همچنین تحرک الکتروفورزی نسبی[2] (REMs) هر یک از باندها را نیز می‌توان تعیین کرد.

اگر فقط الکتروفورز هوردئین‌های C-(Hor-1) و B-(Hor-2) مورد نظر باشد، می‌توان از روش استاندارد (Acid PAGE) انجمن بین‌المللی آزمون بذر (ISTA) استفاده نمود.

1 - Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)
2 - Relative Electrophoretic Mobilities

شرح روش مورد استفاده

ترکیب هوردئین: آلل بیان شده بر روی مکان‌های ژنی Hor-3،Hor-1 و Hor-2

تجزیه هوردئین‌های جو زراعی به روش SDS PAGE

۱- لوازم مورد نیاز

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

۲-مواد شیمیایی

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

اکریل‌آمید (خالص شده مخصوص الکتروفورز)(Acrylamide)

بیس اکریل‌آمید (خالص شده مخصوص الکتروفورز)(Bisacrylamide)

تریس (هیدروکسی متیل) متیل‌آمین TRIS

سدیم دو دسیل سولفات (SDS)

آمونیوم پرسولفات (APS)

۲- مرکاپتواتانول (2-mercaptoethanol)

تترا متیل اتیلن دی آمین(TEMED)

تری کلرواستیک اسید (TCA)

هیدروکلریک اسید (Hydrochloric Acid)

اسید استیک گلاسیال (Glacial Acetic Acid)

گلایسین (Glycine)

n– بوتانول (n-butanol)

پیرونین Y یا G (Pyronin Y or G)

گلیسرول (d =1.256) (Glycerol)

متانول یا اتانول (Methanol or Ethanol)

دی متیل فرمامید (DMF)

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

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

۳- محلولها

۳-۱- محلول استخراج

محلول ذخیره:

٦/۲٥ میلی لیتر بافر یک مولار TRIS HCl با pH=6.8 (بند ۳-۳-۲ را مشاهده کنید)

۱۲/۰٥ میلی لیتر آب مقطر

۲ گرم SDS

۱۰ میلی گرم پایرونین

۱۰ میلی لیتر گلیسرول

این محلول را می‌توان به مدت ۲ ماه در دمای ٤ درجه سانتیگراد نگهداری نمود.

قبل از استفاده محلول استخراج به صورت زیر آماده می‌شود:

۲۸/۳۳ میلی لیتر از محلول ذخیره فوق را به ۷/۹۱ میلی لیتر ۲- مرکاپتواتانول و ۱٥ میلی‌لیتر دی متیل فورمامید (DMF) اضافه نموده و حجم را با آب مقطر به ۱۰۰

میلی‌لیتر می‌رسانید. این محلول باید بلافاصله قبل از استفاده تهیه شود و قابل نگهداری نیست.

۳-۲- بافر الکتروفورز

محلول ذخیره:

۱٤۱/۱ گرم گلایسین

۳۰ گرم تریس

۱۰ گرم SDS

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

۳-۳- محلول تهیه ژل

۳-۳-۱- بافر ذخیره رزولوینگ(Resolving) ژل (یک مولار TRIS HCl با pH=8.8)

۱۲۱/۱٤ گرم تریس + حدود ۲۰ میلی‌لیتر HCl (d=1.19) و حجم محلول با آب مقطر به یک لیتر می‌رسد. این محلول را می‌توان به مدت ۲ ماه در دمای ٤ درجه سانتیگراد نگهداری نمود.

۳-۳-۲- بافر ذخیره استکینگ(Stacking) ژل (یک مولار TRIS HCl با pH=6.8)

۱۲۱/۱٤ گرم تریس + حدود ۷۸ میلی‌لیتر HCL (d=1.19) و حجم محلول با آب مقطر

به یک لیتر می‌رسد. این محلول را می‌توان به مدت ۲ ماه در دمای ٤ درجه سانتیگراد نگهداری نمود.

۳-۳-۳- محلول ۱۰ درصد SDS

۱۰ گرم SDS در در آب مقطر حل نموده تا حجم محلول به ۱۰۰ میلی‌لیتر برسد. این محلول را می‌توان به مدت ۲ ماه در دمای ٤ درجه سانتیگراد نگهداری نمود. قبل از استفاده چنانچه SDS از حالت محلول خارج شده باشد می‌توان با تکان دادن یا حرارت ملایم آن را مجدداً حل نمود.

۳-۳-٤- محلول یک درصد آمونیوم پرسولفات

یک گرم آمونیوم پرسولفات در آب مقطر حل شده و حجم به ۱۰ میلی‌لیتر می‌رسد. این محلول باید بلافاصله قبل از استفاده تهیه شود و قابل نگهداری نیست.

۳-۳-۵- محلول ذخیره اکریل‌آمید

۵۱/۹۸ گرم اکریل‌آمید با آب مقطر به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر می‌رسد.

۳-۳-٦- محلول ذخیره بیس اکریل‌آمید

۰/۳۱۸۵ گرم بیس اکریل‌آمید با آب مقطر به حجم ۱۳۰ میلی‌لیتر می‌رسد.

۳-٤- محلول رنگ آمیزی

۳-٤-۱- ۰/۲۵ گرم کماسی بریلیانت بلو G–250 + ۰/۷۵ گرم کماسی بریلیانت بلو R–250 و حجم محلول با آب مقطر به ۱۰۰ میلی‌لیتر می‌رسد.

۳-٤-۲- ۵۵ گرم تری کلرواستیک اسید با ٦۵ میلی‌لیتر گلایسیل استیک اسید و ۱۸۰ میلی‌لیتر متانول یا اتانول و ۲۵ میلی‌لیتر محلول (۳-٤-۱) مخلوط شده و حجم کل با آب مقطر به یک لیتر می‌رسد.

٤- روش

٤-۱- استخراج پروتئین

چند بذر را در هاون چینی کوچک خرد کنید. آرد حاصل را با نمونه رقیق شده بافر استخراج (۳-۱) درون لوله ۳ میلی‌لیتری پروپیلن همولیز یا لوله درب دار مشابه آن مخلوط کنید. نسبت آرد به بافر باید ۵۰ میلی‌گرم به ۰/۷۵ میلی‌لیتر باشد. نمونه‌ها به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق استخراج می‌شوند. در این مدت چندین بار با دستگاه همزن مخلوط شده و ۱۰ دقیقه هم در حمام آب جوش حرارت می بینند. پس از آن اجازه داده میشود تا سرد شوند. در مرحله آخر لوله‌ها به مدت ۵ دقیقه در۱۸۰۰۰ g سانتریفوژ می‌شوند.

حجم عصاره پروتئین استخراج شده مورد استفاده بسته به ضخامت ژل و عمق چاهک‌ها می‌تواند متفاوت باشد. معمولا بین ۱۰ تا ۲۵ میکرولیتر کافی است.

٤-۲- آماده سازی ژل

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

٤-۲-۱- ژل رزولوینگ (اصلی) (اکریل‌آمید ۱۰٪ با pH=8.8)

برای تهیه دو ورقه ژل به ابعاد ۱۸۰× ۱۶۰×۱/۵ میلیمتر مواد زیر لازم است:

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

۲٦ میلی‌لیتر محلول بیس اکریل‌آمید پایه (۳-۳-٦)

۳۰ میلی‌لیتر محلول ژل پایه (۳-۳-۱)

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

۲ میلی‌لیتر آمونیوم پرسولفات (۳-۳-٤)

۰/۸ میلی‌لیتر SDS (۳-۳-۳)

٤۰ میکرولیتر TEMED (مستقیما از شیشه استفاده شود)

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

قاب ژل نباید کاملا پر شود. لازم است فضایی در حدود ۳ تا ٤ سانتیمتر خالی گذاشته شود. با استفاده از یک سرنگ سطح ژل باید با دقت با n- بوتانول یا آب مقطر پوشانده شود. بعد از اتمام پلمریزاسیون (حدود ۳۰ دقیقه) سطح ژل با دقت با آب مقطر شسته می‌شود و با کاغذ صافی خشک می‌گردد.

٤-۲-۲- ژل فوقانی (stacking) (اکریل‌آمید ۳/۵٪ با pH=6.8)

در ارلن تخلیه ۵۰ میلی‌لیتری مواد زیر مخلوط می‌شوند:

۱/۳۵ میلی‌لیتر محلول ذخیره اکریل‌آمید (۳-۳-۵)

۳/۱۷ میلی‌لیتر محلول ذخیره بیس اکریل‌آمید (۳-۳-٦)

۲/۵ میلی‌لیتر محلول ذخیره ژل (۳-۳-۱)

۱۲/۳۰ میلی‌لیتر آب مقطر

بعد از هواگیری مخلوط فوق مواد زیر به آن اضافه می‌گردد:

۰/۸۷۵ میلی‌لیتر آمونیوم پرسولفات (۳-۳-٤)
۰/۲۳۳ میلی‌لیتر SDS (۳-۳-۳)
۱۷/۵ میکرولیتر TEMED (مستقیما از شیشه استفاده شود)

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

٤-۳- الکتروفورز

تانک الکتروفورز با حجم مناسبی از بافر (۳-۲) که تا دمای ۱۵ درجه سانتیگراد خنک شده است پر می‌شود. پس از آن نمونه‌ها در چاهک‌ها ریخته (لود) می‌شوند و جریان ثابتی معادل ۸ میلی‌آمپر بر سانتیمتر مربع از (سطح مقطع عرضی) ژل برقرار می‌گردد تا پایرونین Y یا G به ژل فوقانی برسد و پس از آن با برقراری جریان ١٦ میلی‌آمپر بر سانتیمتر مربع از ژل (ماکسیمم ولتاژ ۳۰۰ ولت) تا زمانی که نشانگر در پایین ژل است ادامه می‌یابد. دما می‌بایست در ۱۵ درجه سانتیگراد ثابت بماند.

٤-٤- تثبیت و رنگ‌آمیزی ژل

پس از خارج کردن قاب ژل از درون تانک، آن را باز کرده و ژل‌ها به مدت حداقل ۳۰ دقیقه در ۲۵۰ میلی‌لیتر محلول ۱۵٪ TCA تثبیت می‌شود. ژل‌ها در آب مقطر شسته می‌شوند و در ۲۵۰ میلی‌لیتر از محلول رنگ‌آمیزی (۳-٤-۲) در طول شب و در دمای اتاق قرار می‌گیرند. رنگ‌بری معمولا لازم نیست اما ژل‌ها باید قبل از نگهداری در ظروف پلی‌تن با آب مقطر شسته شوند.

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

تجزیه هوردئین‌های B و C جو زراعی به روش Acid Page

اگر تنها تجزیه هوردئین‌های B و C مد نظر باشد از این روش می‌توان استفاده کرد. روش زیر به عنوان روش استاندارد مرجع توسط انجمن بین المللی آزمون بذر (ISTA) پیشنهاد شده است.

۱- لوازم مورد نیاز

برای این کار از انواع سیستم الکتروفورز افقی می‌توان استفاده کرد. منبع تغذیه بایستی توانایی رساندن جریان و ولتاژ ثابت را داشته باشد.

۲- مواد شیمیایی

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

اکریل‌آمید (خالص شده مخصوص الکتروفورز)(Acrylamide)

بیس اکریل‌آمید (خالص شده مخصوص الکتروفورز)(Bisacrylamide)

اوره

اسید استیک گلاسیال (Glacial Acetic Acid)

گلایسین (Glycine)

سولفات آهن (Ferrous sulphate)

اسد اسکوربیک (Ascorbic acid)

پراکسید هیدروژن(Hydrogen peroxide)

مونوتیو گلیسرول(Monothioglycerol)

پیرونین G

تری کلرواستیک اسید (TCA)

متانول (Methanol)

۲- کلرواتانول(2-chloroethanol)

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

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

۳- محلول‌ها

۳-۱- محلول استخراج

پایرونین G (۰/۰۵٪ (w/v) در ۲-کلرواتانول (۲۰٪ (v/v) که شامل اوره (۱۸٪ w/v) و مونوتیوگلیسرول (۱٪ v/v) است ریخته می‌شود. (در جای خنک نگهداری شود و یا به صورت تازه تهیه شود)

۳-۲- محلول بافر مخزن:

٤ میلی لیتر محلول گلایسیال استیک اسید و ۰/٤ گرم گلایسین توسط آب مقطر به حجم یک لیتر رسانده شده و در جای خنک نگهداری شود.

۳-۳-محلول بافر ژل:

۲۰ میلی‌لیتر محلول گلایسیال استیک اسید و ۱ گرم گلایسین توسط آب مقطر به حجم یک لیتر رسانده شده و در جای خنک نگهداری شود.

۳-٤-محلول‌های رنگ‌آمیزی:

۳-٤-۱

۰/۲۵ گرم کماسی بلو ۲۵۰- G و ۰/۷۵ گرم گرم کماسی بلو ۲۵۰- R در ۱۰۰ میلی لیتر آب مخلوط می‌شوند.

۳-٤-۲

۵۵ گرم تری کلرواستیک اسید (TCA) و ۱۸۰ میلی لیتر متانول و ۲۵ میلی لیتر محلول (۳-٤-۱) با آب مقطر به حجم یک لیتر می‌رسند.

٤-روش

٤-۱- استخراج پروتئین

بذر ها خرد شده و و در تیوپ های ۱/۵ میلی لیتری سانتریفوژ ریخته می‌شوند. ۰/۳ میلی‌لیتر از محلول استخراج (۳-۱) به لوله ها اضافه شده و در طول شب در دمای اتاق باقی می‌مانند. در صورت لزوم لوله‌ها در ۱۸۰۰۰gx سانتریفوژ می‌شوند و محلول بالائی برای الکتروفورز استفاده می‌شود.

٤-٢- تهیه ژل

قاب‌های تمیز و خشک ژل، طبق دستورالعمل دستگاه سوار می‌شوند. مالیدن سیلیکون به صفحات شیشه‌ای قبل از سوار کردن دستگاه باعث تسهیل در جدایی ژل می‌گردد. برای تهیه ۱۰۰ میلی لیتر ژل حدود ٦٠ میلی لیتر بافر ژل (۳-۳) با دمای ٤ درجه سانتیگراد را برداشته و مواد زیر را به آن اضافه می شود:

۱۰ گرم اکریل آمید، ۰/٤ گرم بیس اکریل آمید، ٦ گرم اوره، ۰/۱ گرم اسید اسکوربیک و ۰/۰۰۵ گرم سولفات آهن

محلول فوق هم زده شده و با محلول بافر ژل ذخیره (۳-۳) با دمای ٤ درجه سانتیگراد به حجم ۱۰۰ میلی لیتر رسانده می‌شود. به ازای هر ۱۰۰ میلی لیتر ژل ۰/۳۵ میلی لیتر محلول تازه پراکسید هیدروژن ۰/٦ ٪ (v/v) اضافه کرده و با سرعت مخلوط کرده و ژل ریخته می‌شود. سپس با استفاده از شانه چاهک‌ها در ژل ایجاد می‌شود. ژل باید بین ۵ تا ۱۵ دقیقه در دمای اتاق بسته شود در غیر این صورت باید حجم پراکسید هیدروژن اضافه شده تنظیم گردد. برای اطمینان از بسته شدن سطح بالایی ژل باید مخلوط ژل قاب را کاملاً پر کند و یا سطح آن کاملاً با آب پوشانده شود.

٤-۳- الکتروفورز

شانه پلاستیکی از ژل خارج شده و چاهک‌ها با بافر مخزن (۳-۲) شسته می‌شوند. مخزن الکتروفورز با توجه به حجمش از بافر (۳-۲)پر می‌شود. ۱۰ تا ۲۰ میکرولیتر از هرنمونه در یک چاهک ریخته می‌شود و ژل در مخزن قرار گرفته و از اینکه چاهک‌ها کاملاً پر شده‌اند اطمینان حاصل می‌شود. دمای بافر اتاقک پایینی باید ۱۵ درجه سانتیگراد باشد. الکتروفورز با جریان ثابتی که از نباید از٦٠ ولت بر سانتیمتر مربع (سطح مقطع عرضی) ژل (که معادل جریان ۵۰۰ ولتی برای دو ژل با ١٦ سانتیمتر

عرض و ۰/۱۵ سانتیمتر ضخامت است) تجاوز کند شروع شده و تا دو برابر زمانی که نشانگر پایرونین G از ژل خارج می‌شود ادامه می‌یابد. باید یادآوری نمود که در این سیستم قطب مثبت در بالای ژل قرار می‌گیرد.

٤-٥- تثبیت و رنگ آمیزی

پس از خارج کردن قاب ژل از درون تانک، آن را باز کرده و ژل درون یک ظرف پلاستیکی که حاوی ۲۰۰ میلی‌لیتر محلول رنگ آمیزی (۳-٤-۲) است قرار می‌گیرد. . رنگ‌آمیزی در طول شب و در دمای اتاق انجام می‌گیرد. در صورت لزوم به رنگ‌بری، ژل‌ها به مدت ۲ تا ۳ ساعت در آب مقطر و در دمای اتاق قرار می‌گیرند. بعد از آن می‌توان ژل‌ها را خشک ود یا در کیسه‌های پلی‌تنی در بسته در دمای ٤ درجه سانتیگراد نگهداری کرد.

لازم به ذکر است که می‌توان از روش‌های دیگری مانند افزایش دما یا مخلوط تری کلرو استیک اسید (TCA) و کماسی بلو G استفاده کرد. معیار کنترل کیفیت نهایی هم برای تهیه ژل و هم برای رنگ‌آمیزی، تجزیه و تحلیل باندهای ارقام شاهد پیشنهادی در هر دسته از ژل‌هاست. تفکیک باندهای حاصل و تحرک نسبی آنها (وزن مولکولی) باید واضح و مشخص بوده تا تحلیل آنها به درستی انجام گیرد.

در مقایسه دو روش SDS PAGE و Acid PAGE باید متذکر شد که ارقام شاهد و امتیازات داده شده برای چگونگی تظاهر تک تک آنها در هر دو روش دقیقاً یکسان است.

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

in

Barley

This document was created with Win2PDF available at http://www.daneprairie.com.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.