جمهورية العراق

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة ديالى/كلية التربية للعلوم الصرفة

قسم علوم الحياة

أستعمال التقانة الجزيئية في تشخيص التباين الوراثي في تراكيب وراثية من الحنطة المتحملة للملوحة

رسالة مقدمة الى

مجلس كلية التربية للعلوم الصرفة في جامعة ديالى

وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير علوم الحياة / النبات

من قبل

غفران علي حسين العبيدي

بإشراف

ا.د. وسام مالك داوود

ا.م.د. ابراهيم اسماعيل المشهداني

١٤٣٥هجري

٢٠١٤ميلادي

الفصل الاول:-المقدمة
Introduction

تعد الملوحة مشكلة متزايدة في المناطق الاروائية لاسيما المناطق الجافة وشبه الجافة من العالم (Srivastava و Jana، 1984) ، ويتوقع أن تصبح هذه المشكلة اكبر في العقود القادمة إذ يوجد حوالي 380 مليون هكتار من الأراضي الملحية في جميع أنحاء العالم ، وثلث الأراضي المروية متأثرة بالملوحة العالية (Hantao واخرون، 2004). اشار Martinez و Manzur (2005) الى ان 831 مليون هكتار تتأثر بالملوحة سنويا في العالم ، وتعتبر الأراضي الزراعية العراقية جزء من الأراضي التي تأثرت بأرتفاع نسبة الأملاح في التربة لاسيما المناطق الوسطى والجنوبية ، أذ ان حوالي 75% من الأراضي الزراعية تأثرت بدرجات مختلفة من الملوحة (المشهداني واخرون، 1999) . تعاني منذ القدم مساحات زراعية مروية عديدة من مشاكل الملوحة الخطيرة بسبب تزايد الأملاح خلال القرون الماضية ، فقد تحولت الكثير من الأراضي الزراعية إلى أراضي غير منتجة بسبب أرتفاع نسبة الملوحة فيها. بين Shahid وأخرون (2011) أختلاف أستجابة النباتات للملوحة. واكد Hantao واخرون (2004) أن أغلب المحاصيل في العالم لاتستطيع تحمل الإجهاد الملحي العالي ولايمكن ان تزرع هذه المحاصيل على طول السواحل أو الأراضي المالحة لانها تسبب إنخفاض كبير في الإنبات ، أذ إن الملوحة تؤثر في الإنتاج الزراعي على المستوى العالمي ومن ثم فأنها تزيد الفجوة بين الإنتاج العالمي والإستهلاك ، وهذا سوف يؤدي الى حدوث مشكلة في العالم بسبب نقص الغذاء . تنتشر الملوحة بشكل واسع في العديد من المناطق ، وقد تؤدي إلى تملح أكثر من 50% من الاراضي الصالحة للزراعة (Rodriguez واخرون ، 2005) ، و بالنتيجة فإنها تؤدي دوراً هاماً في الاقتصاد والأمن الغذائي للبلاد (بوشارب ، 2008) . إن مصادر الملوحة في التربة كثيرة منها مادة الاصل أو المركبات الملحية في التربة والماء الأرضي الذي يحتوي على ايونات ملحية والقريب عن سطح التربة ، أذ أن قدرة الماء الارضي على التمليح يعتمد على درجة ملوحته وقربه من سطح التربة.

هنالك جهود تبذل للتغلب على المشكلة من خلال تحسين صفة التحمل في النبات بأستعمال برامج التربية والتحسين لأنتاج اصناف ذات تحمل عال للملوحة وأن نجاح هذه البرامج يعتمد بالدرجة الأساس على وجود الاختلافات الوراثية في صفة التحمل للمادة الوراثية المستعملة وأن

هذه الأختلافات موجودة بين الاصناف المختلفة وهي من أهم متطلبات النجاح لهذه البرامج. أشار المشهداني واخرون (2003) الى أن صفة تحمل الملوحة مسيطر عليها وراثيا وقابله للانتقال عبـــر الأجيـــال، وبذلك تمكنت البحوث السابقة من تطوير صفة التحمل للعديد من المحاصيل ، وزيادة أنتاجيتها في الترب المتأثرة بالملوحة ، أن توفر المعلومات عن هذه الجينات سيمكن الباحثين من أدخال التراكيب الوراثية التي تحوي جينات التحمل مغايرة لأجل تطوير هذه الصفة (حمدالله، 2009).

أن النباتات المستنبطة من هذه البرامج تختلف في درجة تحملها للملوحة نتيجة لأختلاف جيناتها واليات تحملها للملوحة ، شخص المشهداني وآخرون (2001) بعض هذه الآليات في التراكيب الوراثية المنتخبة لصفة تحمل الملوحة من الحنطة. كما أشاروا إلى إن هذه الآليات مسيطر عليها من قبل جينات خاصة تسمى بجينات تحمل الملوحة والتي تختلف من تركيب وراثي لآخر و حسب درجة تحملها للملوحة وهي المسؤولة عن إحداث التغايرات في درجة التحمل بين الأصناف أو التراكيب الوراثية ، و من هذه الاليات إستبعاد ايون الصوديوم Na^+ لأجل التخلص من التراكيز العالية للاملاح في الأوراق (محمد، 2000) ، وتنظيم الضغط الازموزي (Rajendran واخرون، 2009) ، فضلا عن النفاذية الأختيارية لمواصلة أمتصاص العناصر الغذائية المهمة. أن تحسين هذه الصفة في المحاصيل يتطلب الحصول على تنوعات جينية جديدة وتقنيات فعالة لتحديد تحمل الملوحة (Munns و James، 2003).

يرتبط إستبعاد الصوديوم من الأوراق مع زيادة تحمل الملوحة في محاصيل الحبوب بما في ذلك الرز والحنطة والشعير (James واخرون، 2011) ، فاذا تمكن النبات من أستبعاد 98% من الأملاح في التربة فبأمكانه النمو لمدة أطول في الترب الملحية (Munns، 2005) ، أي أن هناك علاقة إيجابية بين كمية ايون الصوديوم المستبعد من الأوراق العلوية وصفة تحمل الملوحة في النبات ، وهذا ما أكده العديد من الباحثين (Cuin واخرون، 2008 ; المشهداني والحديثي، 2006) ، أذ إن تجمع الأملاح في سايتوبلازم خلايا الأوراق يؤدي الى قتل المادة الحية (Munns، 2005) وخفض فعالية الأنزيمات وأيقاف العمليات الوظيفية داخل الورقة.

لقد أوجد التقدم المتسارع في علوم البايولوجيا الجزيئية العديد من الوسائل والطرائق التي أستعملت في دراسات وتقييم التباينات والعلاقات بين التراكيب الوراثية ، ومن أهم التقانات الحيوية المستعملة هي تقانة الـPCR لما تمتاز به من سهولة في الاستعمال ، فضلا عن قدرتها

على مضاعفة الـDNA خارج الجسم الحي (In vitro) وبكميات كبيرة جدا ، وتعد هذه التقانة الأكثر أستعمالا في مختبرات الوارثة الجزيئية في العالم لما تمتاز به من سرعة وسهولة وكفاءة في العمل، فضلا عن تحسسها العالي (الجبوري واخرون، 2009) ، ولهذا فقد ظهرت العديد من التقانات الحيوية الحديثة المعتمدة على الـPCR ، ومن بين هذه التقانات التضاعف العشوائي المتعدد الاشكال لسلسلة الـDNA (RAPD) (حسين، 2011) ، فضلا عن تقانات الـ ISSR AFLP و RFLP وغيرها.

تمتاز تقانة الـ RAPD بعدم أحتياج أستعمالها الى معرفة مسبقة بتسلسل الـDNA قيد الدراسة و سهولة أجرائها (الحسيني وجبرائيل، 2013) وسرعتها ، وقد تم تنفيذها في العديد من المجالات كأيجاد التباين الوراثي والبصمة الوراثية والخارطة الوراثية. أما تقانة الـ ISSR فهي أحدى التقانات التي تعتمد على الـPCR وتمتاز بأنها لا تحتاج إلى معلومات مسبقة عن الجينوم وينجم عنها أنماط ذات تعددية شكلية كبيرة ناجمة عن عدة مواقع وراثية (زيان، 2009) وأكد الاخير أن هذه التقانة هي الأسهل من بين كل الطرائق الجزيئية وعلى الأقل 70 % من البادئات المستعملة تعمل على أي الجين.

ونظرا لأهمية محصول الحنطة كغذاء أساسي لبلدان العالم المختلفة ، ولزيادة أنتاجية هذا المحصول ، ونتيجة لزيادة الملوحة وأنتشارها عالميا أصبح من الواجب أنتاج تراكيب وراثية او اصناف قادرة على التكيف والتعايش مع الملوحة العالية في أنتاجية أقتصادية، و ذلك من خلال برامج التربية والتحسين و التقانات الحيوية الجزيئية التي أثبتت كفاءتها في مجال تشخيص الجينات والتغاير الوراثي في صفة تحمل الملوحة وفي العديد من المجالات الاخرى، لهذا تهدف هذه الدراسة الى:

١- تقييم تحمل الملوحة في التراكيب الوراثية المنتخبة تحت ظروف الملوحة في مرحلة الأنبات بالمقارنة مع الأصناف الحساسة للملوحة.
٢- تحديد التباين الوراثي لصفة تحمل الملوحة للاصناف المنتخبة لهذه الصفة بأستعمال طريقة RAPD-PCR.

الخلاصة

Summary

نفذت الدراسة الحالية في مركز بحوث التقنيات الإحيائية/ جامعة النهرين للموسم 2012-2013 لغرض تحديد التباين الوراثي بأستخدام طريقة RAPD و ISSR بين التركيبين الوراثيين 2H و N5 المتحملة للملوحة و الصنفيين الحساسين للملوحة عراق ولطيفية.

نفذت تجربتان الأولى لقياس نسبة الأنبات تحت ظروف الملوحة ، إذ زرعت بذور التركيبين الوراثيين والصنفيين الحساسين للملوحة بثلاثة مكررات وبثلاثة مستويات ملحية 0 و 12 و 16ديسي سيمنز.م$^{-1}$ ، بواقع 10 بذور في الوحدة التجريبية الواحدة ، وبعد 10-15 يوماً من الزراعة تم تقدير النسبة المئوية للإنبات ، والتجربة الثانية لدراسة التغاير الوراثي بين الأصناف المتحملة والحساسة للملوحة،إذ زرعت بذورها في ترب ملحية بتركيزين ملحيين 0 و 20 ديسي سيمنز.م$^{-1}$ وبعد 20-25 يوم من الأنبات ، أخذت نماذج من أوراق النباتات لأستخلاص الحامض النووي DNA لدراسة التباين الوراثي بأستخدام تقنية RAPD-PCR بين الأصناف المتحملة والحساسة للملوحة.

أشارت نتائج النسبة المئوية للأنبات الى وجود أختلافات كبيرة بين التركيبين الوراثيين المتحمليين للملوحة 2H و N5 و صنفي المقارنة عراق ولطيفية الحساسين للملوحة ، أذ أعطى التركيب الوراثي N5 أعلى نسبة للأنبات بلغت 71% ، و أعطى التركيب الوراثي 2H نسبة أنبات 62% في المستوى الملحي الثالث 16 ديسي سمنز.م-١ ، بينما أعطى صنفا المقارنة عراق ولطيفية أقل نسبة أنبات بلغت 16.5% 25% في المستوى الملحي نفسه على الترتيب ، كما أعطى التركيبين الوراثيين N5 و 2H نسبة أنبات 75% و 66% على الترتيب ، في حين أعطى صنفا المقارنة عراق و لطيفية نسبة أنبات 50% لكلا الصنفين في المستوى الملحي الثاني ، يتضح من هذه النتائج أن التركيبين الوراثيين N5 و 2H المنتخبة من برامج التربية والتحسين هي الأكثر تحملا للملوحة من الصنفيين المحلية عراق و لطيفية الحساسة للملوحة في مرحلة الانبات و التي تعتبر المرحلة الأكثر حساسية للملوحة من مراحل النمو الأخرى وخاصة في المستوى الملحي الثالث (16 ديسي سيمنز.م$^{-1}$).

بينت نتائج تفاعل RAPD-PCR باستعمال 7 بادئات وجود أختلافات بين التركيبين الوراثيين N5 و 2H و الصنفيين المحليين عراق ولطيفية ، وأختلفت هذه البادئات من حيث عدد الحزم

وموقعها وكان البادئ OPC-12 هو الأفضل بين البادئات ، إذ تمكن من أظهار قوة تميزية من خلال إنتاجه لحزمة ذات وزن جزيئي 100bp في التركيبين الوراثيين N5 و2H تحت ظروف الملوحة ولم تظهر هذه الحزمة في الصنفيين المحليين عراق ولطيفية وتحت ظروف الملوحة نفسها، وهذا يشير الى أن هذه الحزمة تمثل مصدر الأختلاف بين التركيبين الوراثيين و الصنفيين المحليين في درجة تحمل الملوحة ، وقد تمثل الجين المتحمل للملوحة والمسؤول عن إظهار الصفة في الأصناف المتحملة للملوحة .

كما أستعمل 15 بادئ لتحديد التباين الوراثي بتقنية ISSR-PCR بين التركيبين الوراثيين N5 و 2H و الصنفيين المحليين عراق ولطيفية الحساسة للملوحة ، ظهر عدد من الحزم العامة ، إلا أن هذه البادئات لم تتمكن من إظهار أي حزم خاصة ، وبذلك فإن هذه البادئات فشلت في إظهار هذا التباين الوراثي بين الأصناف المدروسة.

نستنتج من خلال النتائج إن التركيبين الوراثيين 2H و N5 كانا الأكثر تحملا للملوحة في مرحلة الإنبات واللذان أظهرا حزمة خاصة تحت ظروف الملوحة العالية في حين أن الصنفيين المحليين الحساسين للملوحة لم يظهرا هذه الحزمة تحت الظروف نفسها ، ومن خلال هذا الأختلاف في ظهور هذه الحزمة يمكن أن نستنتج بإن هناك تباين وراثي بين هذيين التركيبين الوراثيين و الصنفيين المحليين في درجة تحملهما للملوحة وقد يعود هذا الى أختلافهما في عدد الحزم ومواقعها والتي قد تمثل الجينات المسؤولة عن التحمل و الحساسية للملوحة.