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

وسام مالك داود* **أبراهيم أسماعيل المشهداني**** **غفران علي العبيدي*****

* استاذ - قسم علوم الحياة - كلية التربية للعلوم الصرفة -جامعة ديالى - wisam_malik@yahoo.com
** استاذ مساعد - مركز التقنيات الأحيائية - جامعة النهرين.
*** مدرس مساعد- قسم علوم الحياة - كلية التربية للعلوم الصرفة - جامعة ديالى.

المستخلص

نفذت تجربتان خلال الموسم الزراعي 2013-2014 على تراكيب وراثية من الحنطة *Triticum aestivum* L. الأولى لقياس نسبة الأنبات تحت ظروف الملوحة, إذ زرعت بذور التركيبين الوراثيين 2H و N5 و الصنفين الحساسين عراق ولطيفية حسب تصميم القطاعات الكاملة لثلاثة مستويات ملحية 0، 12، 16 ديسي سيمنز.م$^{-1}$ وبثلاثة مكررات زرعت في كل وحدة تجريبية 8 بذور , وبعد 10-15 يوما تم تقدير النسبة المئوية للأنبات , والتجربة الثانية لدراسة التغاير الوراثي بين التركيبين الوراثيين و الصنفين الحساسين ,أذ زرعت بذورها في تربتين تركيزيهما 0 و 20 ديسي سيمنز.م-^{1}، وبعد مرور 20-25 يوما من الأنبات أخذت نماذج من اوراق هذه النباتات لأستخلاص الحامض النووي منقوص الاوكسجين DNA لدراسة التباين الوراثي بطريقة الـ Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD).

أشارت نتائج النسبة المئوية للأنبات الى وجود أختلافات معنوية بين التركيبين الوراثيين والصنفيين الحساسين ,أذ اعطى التركيب الوراثي N5أعلى نسبة للأنبات بلغت 71%و أعطى التركيب الوراثي 2H نسبة أنبات 62% في المستوى الملحي الثالث 16 ديسيسمنز.م-1,بينما أعطى الصنفان عراق ولطيفية أنخفاضاً معنوياً في نسبة أنبات بلغت 25% , 16.5 %في نفس المستوى الملحي على الترتيب، كما أعطى التركيبان الوراثيان 2H و N5 نسبة أنبات 75% و 66%على الترتيب , في حين أعطى الصنفان عراق و لطيفية نسبة أنبات 50% لكليهما في المستوى الملحي الثاني ,يتضح من هذه النتائج أن التركيبين الوراثيان N5و 2Hالمنتخبة 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 (16ديسي سيمنز.م-1).

بينت نتائج تفاعل RAPD-PCR باستعمال 7 بادئات وجود أختلافات بين التركيبين الوراثيين N5 و 2H والصنفيين المحليين عراق ولطيفية ,وأختلفت هذه البادئات من حيث عدد الحزم وموقعها وكان البادئ OPC-12 هو الأفضل بين البادئات ,أذ تمكن من أظهار قوة تمييزية من خلال أنتاجه لحزمة ذات وزن جزيئي 100bp في التركيبين الوراثيين N5 و 2H تحت ظروف الملوحة ولم تظهر هذه الحزمة في الصنفيين المحليين عراق ولطيفية وتحت نفس ظروف الملوحة ,وهذه الحزمة تمثل الجين المتحمل للملوحة والمسؤول عن أظهار الصفة في الأصناف المتحملة للملوحة.

الكلمات المفتاحية : الحنطة ,التباين الوراثي ,التراكيب الوراثية ,RAPD ,البادئات.

المقدمة

تعتبر ملوحة التربة العامل المهم الذي يحدد تطورالزراعة (Hantao واخرون،2004)، من خلال تحديد الأنتاج النباتي وفي جميع ترب العالم المتأثرة بالملوحة (Debez واخرون، 2006) ; 2006

تاريخ تسلم البحث 31 / 3 / 2014 .
تاريخ قبول النشر 25 / 2 / 2015 .
بحث جزء من رسالة الماجستير للباحث الثالث.

http://www.agriculmag.uodiyala.edu.iq/

Koyro, فالاجهاد الملحي يعمل على تثبيط نمو محاصيل الحبوب في العالم إذ تؤثر الملوحة بشكل غير مباشر عن طريق تحكمها في الخواص الكيمياوية والفيزياوية للتربة ممايِنعكس على نمو النبات وأنتاجيته وخاصة زيادة الصوديوم في التربة أي زيادة نسبة أمتصاص تركيز ايون الصوديوم الى تركيز ايون الكالسيوم والمغنيسيوم في محلول التربة،وهي بذلك تؤثر على تماسكها ونفاذيتها والتي بدورها تؤثر على النبات ,فضلاًعن التأثير المباشر للملوحة على النبات عن طريق التأثير الازموزي وعدم التوازن الايوني والتاثير السمي للايونات الملحية (Lessani و 1978,Marschner) ,أشارAhmad (2011) أن الأجهاد الملحي يسبب ثلاثة تأثيرات قاتلة للنبات هي إنخفاض الجهد المائي والسمية الايونية التي تحدث بسبب إمتصاص ايونات الصوديوم والكلورايد التأثير على امتصاص المواد المغذية .كما أن زيادة التركيز الملحي يؤدي الى خفض غلة المحاصيل الى الصفر لان معظم النباتات الحساسة للملوحة بمافي ذلك المحاصيل الحقلية لن تنمو بتراكيز عالية من الملوحة وبالتالي يثبط نموها (Carillo واخرون، 2011) .

أوجد التقدم المتسارع في علوم البايولوجيا الجزيئية العديد من الوسائل والطرائق التي أستخدمت في دراسات وتقييم التباينات والعلاقات بين التراكيب الوراثية ,ومن أهم التقانات الحيوية المستعملة هي تقانة تفاعل البلمرة المتسلسل Polymerase Chain Reaction (PCR) لما تمتاز به من سهولة في الاستعمال , فضلا عن قدرتها على مضاعفة الـ DNA خارج الجسم الحي (In vitro) وبكميات كبيرة جدا ,ظهرت العديد من التقانات الحيوية الحديثة المعتمدة على هذه التقانة ومنها التضاعف العشوائي المتعدد الاشكال لسلسلة الـ RAPD -DNA(حسين ,2011) ,التي تمتاز بعدم أحتياج تطبيقها الى معرفة مسبقة بتسلسل الـ DNA قيد الدراسة وسهولة أجرائها الحسيني وجبرائيل (2013) وسرعتها ,وقد تم تطبيقها في العديد من المجالات كأيجاد التباين الوراثي والبصمة الوراثية والخارطة الوراثية ,ويهدف هذا البحث الى:

- تقييم تحمل الملوحة في التراكيب الوراثية المنتخبة تحت ظروف الملوحة في مرحلة الأنبات بالمقارنة مع الأصناف الحساسة للملوحة.
- تحديد التباين الوراثي لصفة تحمل الملوحة للاصناف المنتخبة لصفة تحمل الملوحة على المستوى الجزيئي بأستعمال طريقة RAPD-PCR.

المواد وطرائق البحث

أستخدم في هذا البحث التركيبان الوراثيان 2H و N5 المستنبطان من برامج التربية والتحسين في حقول منظمة الطاقة الذرية العراقية سابقا ,وقد أستعمل الصنفان الحساسان لطيفية وعراق لغرض المقارنة. نفذ البحث في مركز بحوث التقنيات الأحيائية/قسم التقنيات الأحيائية النباتية/جامعة النهرين 2012-2013. أخذت نماذج من التربة ثم جففت ونعمت وغربلت وتم خلط نسب معينة من الترب الملحية وغير الملحية خلطا متجانسا للوصول الى المستوى الملحي 0,12,16 ديسي سيمنز.م$^{-1}$ للتجربة الأولى ,فضلا عن المستوى الملحي 0 و20 ديسي سيمنز.م $^{-1}$ وضعت الترب في الأصص البلاستيكية المعدة لها وحسب التركيز المطلوب ثم زرعت بذور التركيبين الوراثيين والصنفيين الحساسيين وبواقع 8بذور في الاصيص الواحد بتاريخ 2012/12/21 ، تم قياس نسبة الأنبات للتجربة الأولى بالتراكيز الملحية الثلاثة 0 و12و 16 ديسي سيمنز.م$^{-1}$ وفي التجربة الثانية اخذت أوراق التركيبين الوراثيين والصنفيين الحساسين من المستوى الملحي 0 و 20 ديسي سيمنز.م$^{-1}$ لأستخلاص الحامض النووي الـDNA.

تم أستخلاص الحامض النووي الـ DNA وفقا لطريقة Geneaid @ Genomic DNA Mini Kit Plant مع عدة الاستخلاص , وقدر تركيز الحامض النووي الـ DNA ونقاوته بقراءة مقدار أمتصاص العينة للأشعة فوق البنفسجية بجهاز Spectrophotometer UV الذي يستخدم لقياس كثافة الضوئية (O.D)عند الطوليين الموجبين 260 و 280 نانوميتر ,ثم أستعمل في برنامج الـRAPD-PCRبوجود 7 بادئات موضحة في الجدول (1) ، ثم أجريت عدة تفاعلات لتضخيم الـ DNA وكان البرنامج الموضح في الجدول (2) هو البرنامج الأمثل ,بعد انتهاء التفاعل مررت النواتج في هلام

الاكاروز في جهاز الترحيل الكهربائي لمدة 1:30 ساعة بوجود محلول TBE Buffer بقوة 1X وصبغ الهلام بصبغة بروميد الاثيديوم مدة 30 دقيقة وفحص الهلام بأستخدام جهاز الأشعة فوق البنفسجية U.V لمشاهدة حزمة الـ DNA ومن ثم تقدير تركيزها ونقاوتها,إذ تم تصويره بأستخدام جهاز Polaroid Black–White Film Type 667.

الجدول1. أنواع البادئات المستخدمة في تقنية RAPD-PCR.

Sequence primer 5’- 3’	Name Primer
AAGTCCGTC	OPO-04
GTCCACACGG	GB8
GGGTAACGCC	OPA-09
TGTCATCCCC	OPC-12
CAGCACCCAC	OPA-13
TGTCATCCCC	OPD-20

الجدول 2.برنامج ظروف تفاعل RAPD-PCR.

No.of cycles	Time	Temperature	Step
1	5 min	95°C	Pre - Denaturation
40	1 min	94°C	Denaturation
	1 min	41°C	Annealing
	1 min	72°C	Extension
1	10 min	72°C	Final Extension

النتائج والمناقشة

النسبة المئوية للأنبات

تشير النتائج المبينة في الجدول (3) الى أن الملوحة أدت الى أنخفاض معنوي في نسبة الأنبات في جميع اصناف الحنطة المستخدمة في التجربة ولكن هناك أختلاف كبير في درجة الأنخفاض ,أشارت النتائج الى أن نسبة الانبات كانت عالية جدا في معاملة المقارنة (Control) ووصلت الى نسبة 100% في التركيب الوراثي N5 و 95% في التركيب الوراثي, 2H اما الصنفيين المحليين لطيفية و عراق فكانت نسبة الانبات % 87.5لكلا الصنفيين ,لكن هناك أنخفاض واضح في نسبة الانبات لكلا التركيبين الوراثيين والصنفيين المحليين في المستويين الملحيين 12و 16ديسي سيمنز.م$^{-1}$,أذ كان المستوى 16

ديسي سيمنز.م-1 هو الاكثر تأثيرا في أنخفاض نسبة الانبات بالمقارنة مع المستوى 12 ديسي سيمنز.م-1,أثر المستوى الملحي 12ديسي سيمنز.م-1تأثيرا طفيفا في التركيبين الوراثيين N5 و 2H أذ كانت نسبة الأنبات 75% و 66% على التوالي , أما الصنفان لطيفية وعراق فقد أنخفضت نسبة الانبات فيها بشكل كبير لتصل الى 50%لكلا الصنفيين.

الجدول3. النسبة المئوية للأنبات تحت ظروف الملوحة للتركيبين الوراثيين والصنفين الحساسين.

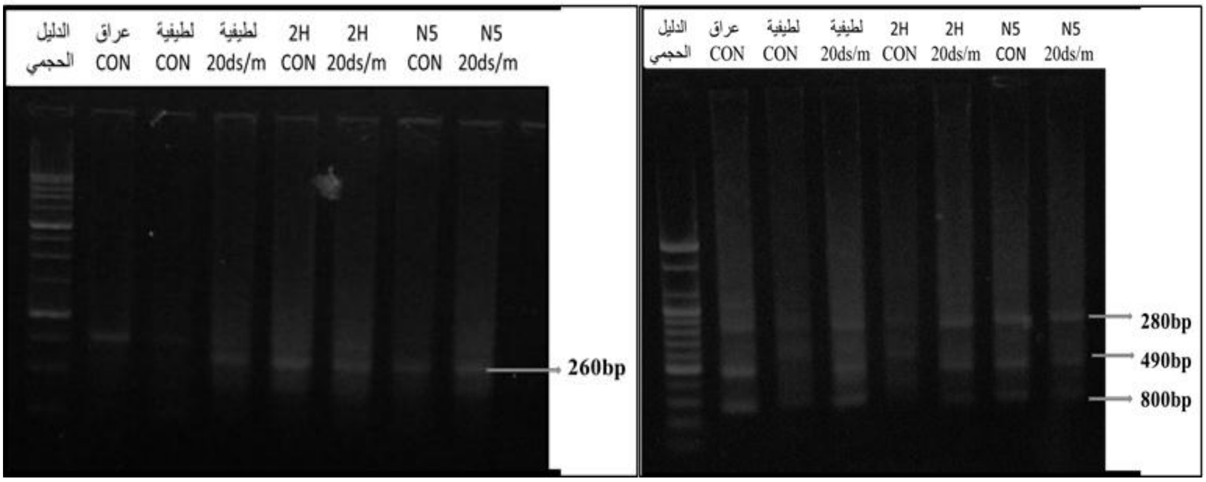
الاصناف	النسبة المئوية للإنبات في مستويات ملحية مختلفة (ds/m)			المتوسط
	O	12	16	
N5	100	75	71	82
2H	95	66	62	74
لطيفية	87.5	50	25	54
عراق	87.5	50	16,5	51
المتوسط	92.5	59.25	44.6	
L.S.D 0,05	الملح =11.49 التراكيب الوراثية = 9.95 الملح *التراكيب الوراثية = 5.75			

أستجابت التراكيب الوراثية الاربعة المستخدمة بشكل متشابه لزيادة تركيز الملوحة أذ كانت جميعها بإتجاه الانخفاض بزيادة التركيز ,أدى أرتفاع الملوحة في المستوى الملحي 16ديسي سيمنز.م-1أدت الى أنخفاض كبير في نسبة الانبات للتركيبين الوراثيين والصنفين المحليين المستخدمة في التجربة ولكن هناك تباين واضح في درجة ألتأثير ,أذ كانت نسبة الأنبات للتركيبين الوراثيين N5هي71% و 2H 62% في حين كانت نسبة ألانبات 25% في صنف لطيفية ,وأنخفضت في ادنى مستوياتها لتصل الى نسبة 16.5% في صنف عراق والذي يعتبر الأكثر تأثرا بالملوحة.أن أرتفاع درجة الملوحة أدت الى أنخفاض في النسبة المئوية للأنبات و لجميع التراكيب الوراثية ,قد يعزى السبب في ذلك الى أنخفاض امتصاص الماء من قبل البذور بسبب أرتفاع الضغط ألازموزي لمحلول التربة (Pearson واخرون، 2003).أوضحت النتائج وجود تباين بين التركيبين الوراثيين والصنفيين المحليين في درجة التحمل للملوحة ,إذ أن التركيب الوراثي N5كان ألاكثر تحملا في حين كان صنف العراق ألاكثر حساسية وخاصة في المستوى الملحي 16 ديسي سيمنز/م-1 شخصت نتائج مشابهة لهذه الاختلافات شخصت من قبل Rauf واخرون (2010) في عدد من أصناف الحنطة ,ومن قبل المشهداني والحديثي (2006) وكذلك من قبل AL-Mishhadani (2012) في بعض التراكيب الوراثية المنتخبة من الحنطة وتعزى هذه ألاختلافات في درجة تحمل الملوحة الى ألاختلافات الوراثية بين ألاصناف والتراكيب الوراثية , وهذه ألاختلافات الوراثية سوف تؤدي الى ظهور أختلافات في اليات تحمل الملوحة المستخدمة من قبل النبات في التقليل من ألتأثير الضار للملوحة (Ali واخرون، 2005) , وأن بعض هذه الاليات وخاصة تنظيم الضغط ألازموزي داخل النبات شخصت من قبل المشهداني واخرون (2001) في بعض التراكيب الوراثية للحنطة المنتخبة لصفة تحمل الملوحة ,كما أشاروا الى أن هذه ألاليات تحت تأثير بعض أزواج الجينات والتي تسمى بجينات تحمل الملوحة والتي تختلف من تركيب وراثي الى أخر حسب درجة تحملها للملوحة و هي المسؤولة عن أظهار هذه ألتغايرات في درجة تحمل الملوحة بين ألاصناف أو التراكيب الوراثية من الحنطة ,وهذا ما أكدته نتائج RAPD الى وجود تغاير وراثي بين التراكيب الوراثية المنتخبة لصفة تحمل الملوحة والأصناف الحساسة للملوحة.

التحري عن التغاير الوراثي بطريقة الـ RAPD

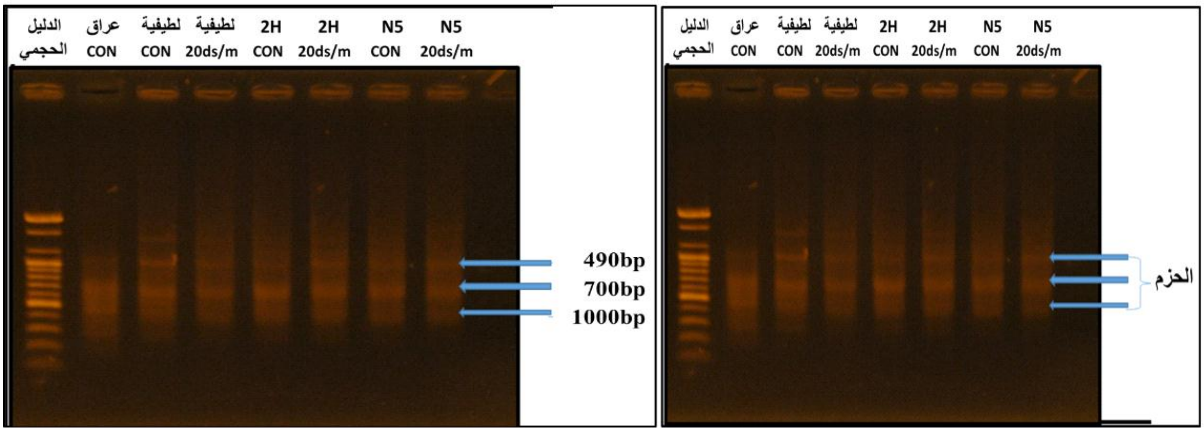
فصلت البادئات الى مجاميع أعتمادا على الكفاءة والقدرة التميزية للبادئ ,إذ فشل البادئ GB8 في أنتاج أي حزم عامة او حزم مميزة لأي صنف من الاصناف المدروسة وتحت عدة تراكيز ملحية رغم

تغيير درجة الحرارة بمستويات مختلفة وتكرار التفاعل لعدة مرات، وقد يعود سبب هذه النتيجة الى غياب المواقع المكملة لتسلسلات تلك البادئات على جينوم الاصناف المدروسة اي عدم وجود مناطق ارتباط بين البادئ وDNA الاصناف قيد الدراسة ,تمكن البادئ OPO-04 من أظهار3حزم عامة ذات حجم 410 و700 و 1000 زوج قاعدي بين الأصناف المدروسة , أما OPA-09 أنتج حزمة واحدة عامة بحجم 260زوج قاعدي و أنتج البادئ OPA-133 حزماً عامة وحجومها 490 و 700 و 1000 زوج قاعدي ,وأعطى البادئ OPD-20 حزمة عامة ذات حجم بلغ 580 زوج قاعدي ,أي أن هذه البادئات أخفقت في أنتاج حزم خاصة تمثل تغايراً وراثياً بين التركيبين الوراثيين والصنفيين الحساسيين ,أظهر البادئ OPC-12 حزمتين عامة ذات حجم 240 و 310 زوج قاعدي ,فضلا عن حزمة متميزة ذات حجم 100 زوج قاعدي في التركيبين الوراثيين 2H و N5 وغيابها في نفس التركيبين الوراثيين في التربة العادية وفي الصنفيين عراق ولطيفية الحساسين للملوحة ، وهذا مؤشر على أن هذه الحزمة قد تشير الى التعبير الجيني للجينات المتحملة للملوحة والتي أختفت في نفس التراكيب الوراثية بالتربة الاعتيادية أي أن هذه الجينات لم تظهر بغياب الملوحة وانما ظهرت بشكل واضح بأرتفاعها.

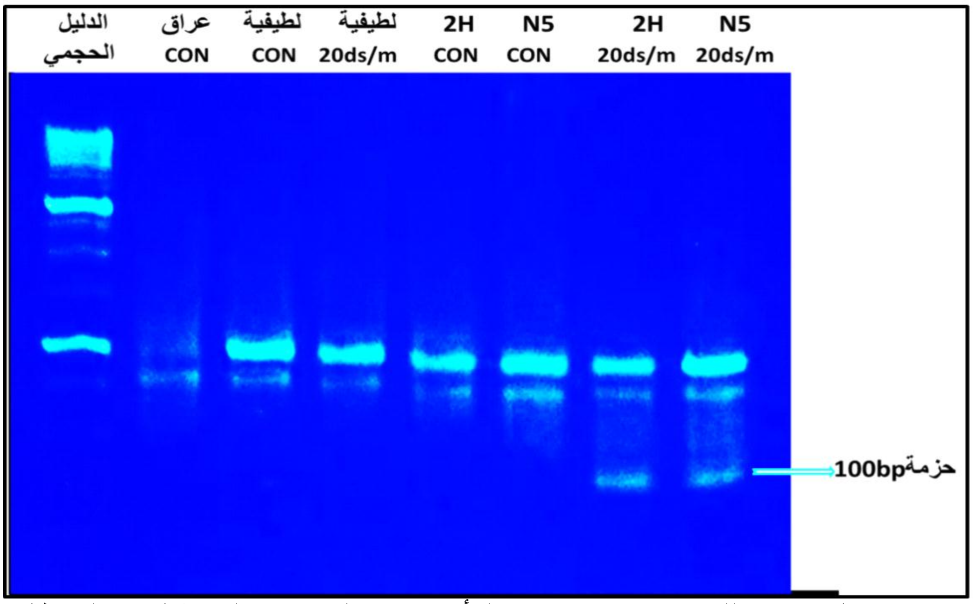


الشكل 1. نواتج تفاعل PCR للبادئ OPO-04 و OPA-09 للأصناف والتراكيب الوراثية من الحنطة على هلام الاكاروز % 0.8 (1.30ساعة، V/cm, 1X TBE) المصورة تحت الأشعة فوق البنفسجية . U.Vبعد التصبيغ بصبغة بروميد الاثيديوم

.



الشكل 2. نواتج تفاعل PCRللبادئ OPA-13 و OPD-20للأصناف والتراكيب الوراثية من الحنطة على هلام الاكاروز % 0.8 (1.30 ساعة، V/cm, 1X TBE) المصورة تحت الأشعة فوق البنفسجية . U.Vبعد التصبيغ بصبغة بروميد الاثيديوم.



الشكل3. نواتج تفاعل PCR للبادئ (OPC-12) للأصناف والتراكيب الوراثية من الحنطة على هلام الاكاروز 0.8 % (1.30 ساعة، V/cm, 1X TBE) المصورة تحت الأشعة فوق البنفسجية U.V . بعد التصبيغ بصبغة بروميد الاثيديوم.

أعتمدت طريقة تحليل نتائج الدراسة على وجود او غياب الحزم التي تنتج من تضاعف قطع معينة من جينوم الأصناف و التراكيب الوراثية المستخدمة ,فضلا عن حجوم تلك الحزم التي تعتمد على العدد والمواقع المكملة لتسلسلات البادئات على شريط DNA القالب والتي تختلف بين بادئ واخر (الجبوري واخرون، 2009) ,أذ تم أهمال الحزم الصغيرة جدا في الحجم ويتفق هذا مع نتائج Swoboda و Bhalla (1997).أن الحزم المتضاعفة التي تم الحصول عليها والتي تختلف بقيمة حجومها وذلك حسب تصميم البادئ مطابقة لما ذكره Dalmasso واخرون (2004) الذي أكد على أن نوع الجين الذي يصمم له البادئ يؤثر على حجم الحزم المتضاعفة .لقد ساهمت هذه البادئات بتحديد التباين الوراثي بين الاصناف من خلال غياب وظهور الحزم و عددها وحجمها.

أن غياب الحزم في البادئ GB8 وظهورها بشكل مسحة يدل على أنها لم تجد مواقع متممة لها على الـ DNA أي عدم وجود المواقع المكملة لتسلسلات تلك البادئات في DNA اصناف الحنطة المستعملة وهذه الحالة شائعة ,وأتفقت مع ما توصل اليه ياسين (2011) من خلال دراسته على نخيل التمر ,إذ لم تتمكن عدة بادئات من أظهار أي نواتج تضاعف و مطابقة لما ذكره زكريا (2011) بفشل البادئ A13في مضاعفة الحامض النووي DNA في جميع التراكيب الوراثية المدروسة لنبات الحنطة .بينت النتائج أن البادئات OPA-09 و OPA-13 و OPO-04 و OPD-20 والتي تمكنت من أظهار عدد من الحزم العامة في جميع الاصناف المدروسة و فشلها في أظهار الحزم المميزة وهذا قد يكون نتيجة الى عدم حدوث طفرة وراثية دالة على تعدد المظاهر الوراثية ,أي ان البادئات لم تعط نتائج كاملة عند أستخدامها .تتطابق هذه النتائج مع نتائج اخرى توصل اليها الجبوري واخرون (2009) ، وبذلك فأن البادئات أرتبطت بالمناطق المتممة من الـ DNA (Conserved Sequence) من الجدير بالذكر أن هذه البادئات لم تظهر أي تباين بين الأنواع المدروسة ,و تدل هذه الحزم العامة على وجود قطعة من الدنا مشتركة بين الاصناف المدروسة .في حين تمكن البادئ OPC-12 من أظهار قدرة تمييزية بين الاصناف المدروسة واعطى نواتج تضاعف واضحة في التركيبين الوراثيين (2H و N5) تحت ظروف الملوحة, أذ اظهر حزمتين عامة ذات حجم 240 و 310 زوج قاعدي في اصناف الحنطة المتحملة والحساسة للملوحة ,في حين ظهرت حزمة واحدة متميزة ذات حجم 100 زوج قاعدي في التراكيب الوراثية من الحنطة المتحملة للملوحة 2H و N5 تحت ظروف الملوحة وفقدت في نفس التركيبين الوراثيين وفي الاصناف المحلية عراق ولطيفية بغياب الملوحة ,أذ يمكن أعتبار هذه الحزمة مؤشر ايجابي قد يكون مسؤول عن التغاير الوراثي لصفة تحمل الملوحة في التراكيب الوراثية المدروسة من الحنطة ,مما يدل

على أن هذه الحزمة لها علاقة بقابلية التحمل لهذين التركيبين الوراثيين , أذ إنَ أظهار هذه الحزمة في التركيبين الوراثيين تحت ظروف الملوحة فقط ربما يؤدي الى تحفيز الجينات المتحملة للملوحة , وبالتالي أظهار التعبير الجيني لهذه الجينات وهذا نتيجة للتداخل بين الوراثة والبيئة (2012 , AL-Mishhadani (G*E)).

من خلال أستعراض النتائج ومناقشتها يمكن القول ان الحاجة الى انتاج اصناف متحملة للملوحة قادرة على النمو والانتاج في ظروف الملوحة العالية ضرورة ملحة نتيجة لزيادة الاراضي الملحية و الاراضي المتأثرة بالملوحة , وهذه الاصناف المتحملة للملوحة تكون قادرة على النمو والانتاج عند ارتفاع نسبة الاملاح في التربة وخاصة ايون الصوديوم, واكدت نتائج الدراسة ان التركيبين الوراثيين 2H,N5 المتحملين للملوحة اظهرا نسبة انبات اعلى من اصناف المقارنة عراق ولطيفية تحت ظروف الشد الملحي.

من خلال هذه الدراسة نستنتج بأنه يمكن إجراء تفاعل الـ PCR لعدد من البادئات وباستخدام مؤشرات الـ RAPD للحصول على حزم مميزة تظهر في نوع معين دون الأنواع الأخرى لإيجاد البصمة الوراثية لذلك النوع (Wang واخرون، 2001), و أن سبب التباين بين اصناف الحنطة والأختلاف في نواتج تضاعف تفاعل PCR قد يعود الى الاختلاف في تسلسل البادئات حيث ان الاختلاف في قاعدة نايتروجينية واحدة يؤدي الى اختلاف في تسلسل البادئات المستخدمة او الى الأختلاف في المناطق المستهدفة في الـ DNA. إن هذا التفاوت في النسبة المئوية للحزم المتباينة قد يعود إلى الاختلاف في ترتيب القواعد النيتروجينية في جينوم التراكيب الوراثية المدروسة او بسبب الاصل الوراثي الذي أنحدرت منه التراكيب الوراثية التي تتأثر بالاصل الوراثي الذي نشأت منه او الاختلاف في تصميم البادئات المستخدمة في تفاعل RAPD-PCR بوصفه شائعاً جدا ضمن الجينوم المستهدف (Ali, 2003), يمكن أعتبار الحزمة 100 زوج قاعدي التي برزت في هذا البادئ OPC-12 مؤشراً جيداً وأيجابياً للتركيبين الوراثيين 2H و N5 المتحملين للملوحة وربما تكون مسؤولة عن صفة تحمل الملوحة لهذين التركيبين الوراثيين ولايمكن أعتبار هذا التغاير مؤشرا قطعيا ,خاصة أن RAPD-PCR يعتمد على تتابع قصير محدد للبادئ بالمقارنة مع جينوم ذي تتابعات كثيرة العدد ,وبذلك يمكن الحصول على نسبةَ أعلى من التغايرات إذا أستعملت بادئات ذات تسلسلات مختلفة عن هذه التسلسلات المدروسة .

وكذلك تبين النتائج أن الاصناف الحساسة للملوحة تشابهت في عدد الحزم ومواقعها وأختلفت مع التراكيب الوراثية 2H و N5 التي أظهرت تبايناً واضحاً في ظروف الملوحة ,أن هذه النتائج مماثلة لشومان واخرون (2001) لتحديد التباين الوراثي في نبات الشعير ,ونتائج اخرى لـ الفقي واخرون (2002).

المصادر

الجبوري , كاظم ديلي حسن ,جنان قاسم حسين ,سامي كريم محمد امين .2009.التغايرات الوراثية للشبوي الناتجة عن الصعق الكهربائي بأستخدام تقانة RAPD مجلة العلوم الزراعية العراقية. المجلد 40 , العدد (5):111-123.

الحسيني , خلود ابراهيم ,جلادت محمد جبرائيل .2013.استخدام المؤشرات المعتمدة على التفاعل التضاعفي العشوائي لسلسلة الـ RAPD)DNA) لأيجاد العلاقة الوراثية بين اصناف البطاطا .مجلة الفرات للعلوم الزراعية. المجلد 5,العدد(20):16-25.

الفقي، زكي أحمد، منى هاشم حسين، إيهاب مصطفى محمد وهاشم أحمد حسين .2002.تحديد البصمات الوراثية لبعض أصناف الفاصوليا المزروعة في مصر بأستخدام البروتينات ومشابهات الانزيمات لـDNA.المجلة العربية للبيوتكنولوجي. المجلد5, العدد(2): 249-.262.

المشهداني , أبراهيم أسماعيل حسن و سيف الدين الحديثي .2006.تقويم صفة تحمل بعض التراكيب الوراثية المنتخبة المستنبطة من الحنطة للملوحة تحت ظروف ملوحة الحقل الطبيعية .

مجلة الأستثمار الزراعي مركز التربة والموارد المائية.وزارة العلوم والتكنلوجية. العدد(4): ص 74_78.

المشهداني ,أبراهيم أسماعيل حسن ,عز الدين مجيد الشماع وحاتم جبار عطية .2001. تقييم تحمل بعض التراكيب الوراثية من الحنطة للملوحة وعلى مراحل نمو مختلفة .مجلة ديالى. العدد : (11)ص _219.230

حسين ,جنان قاسم .2011. البعد الوراثي لأنواع ورد بأستخدام RAPD. مجلة العلوم الزراعية العراقية. المجلد , 42 العدد (2) : 71-79.

زكريا ,بلال فاضل .2011.دراسة بعض التغايرات الفسلجية والوراثية لصفة تحمل الملوحة في بعض التراكيب الوراثية المنتخبة من الحنطة .Triticum spp .رسالة ماجستير. كلية التربية/الرازي.جامعة ديالى.

شومان ,وفاء ,مايكل بوم ,حسن غزال و سها اشتر .2001.التنوع الوراثي في الشعير السوري بأستخدام مؤشرات الـ RAPD.مجلة جامعة الملك سعود.مركز البحوث الزراعية . النشرة البحثية رقم 99.

ياسين ,معن حسن صالح .2011.تحديد التباين الوراثي لعدد من أصناف نخيل التمر في العراق باستخدام مؤشرات RAPD و ISSR. رسالة ماجستير.كلية العلوم .جامعة تكريت.

Ahmad, M. 2011. Evaluation of wheat genotypes for salt tolerance based on conventional and molecular approaches. Ph.D. Arid Agriculture University Rawalpindi . Pakistan.

Ali, B. A. 2003. Detection of DNA alteration in abnormal phenotype of broiler chicken male by random amplified polymorphic DNA (RAPD). *African Journal of Biotechnology* . 2(6): 153-156.

Ali, Z., S. K. Abdus, A. K. Iftikhar, and M. A., Faqir .2005. Heritability (h2b) estimates for NaCl tolerance in Wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Agriculture and Social Sciences* . 2:126–128.

AL. Mishhadani, I. I. H. 2012. Breeding and selection of some lines of bread wheat for salt tolerance. *Journal of Agricultural Science and Technology* .B 2 . 934-939.

Carillo, P., M. G. Annunziata, G. Pontecorvo, A. Fuggi, and P.Woodrow, . 2011. Salinity stress and salt tolerance, abiotic stress in plants -mechanisms and adaptations. Prof. Arun Shanker (Ed.), ISBN. 978- 953-307-394-1, In Tech.

Dalmasso, A., E. Fontanella, P. Piatt, T. Civera, S. Rosat and M.A. Bottero. 2004.Multiplex PCR assay for identification of animal species in feedstuffs. *Mole. Celluler Probes*.. 18 :81-87. Debez, A., D. Saadaoui, B. Ramani, Z. Ouerghi, H.W. Koyro, B.

Huchzermeyer and C. Abdelly. 2006. Leaf H+- ATPase activity and photosynthetic capacity of Cakile maritima under increasing salinity. *Environ.Exp. Bot*.. 57: 285-29.

Hantao, Z., L. Qingtong, P. Wen, G. Yuanyuan, C. Pan, C. Xu and L. Bo. 2004. Transformation of the salt-tolerant gene of *Avicennia marina* in to

tobacco plants and cultivation of salt- tolerant lines. *Chinese Science Bulletin*. 49(5) : 456-461.

Koyro, H. W. 2006. Effect of salinity on growth , photosynthesis , water relations and solute composition of the potential cash crop halophyte Plantago coronopus (L-) . *Environ. Exp. Bot.* 56:136-146.

Lessani, H. and H. Marschner .1978. Relation between salt tolerance and long-distance transport of sodium and chloride in various crop species. *J. Plant Physiol.*. 5: 27-37.

Pearson, K. E., J. Nikos, and W. B. James .2003. The Basics of Salinity and Sodicity Effects on Soil Physical Properties. Department ofLand Resources and Environmental Sciences, Montanta State University-Bozeman.

Rauf, S., M. S. Adil, A. Naveed, and H. Munir .2010. Response of wheat species to the contrasting saline regimes. *Pak. J. Bot.* 42(5): 3039-3045.

Swoboda, I. and P. L. Bhalla. 1997. RAPD analysis of genetic variation in the Australian sunflower scaevola. *Genome* . 40:600-606.

Wang, W., B. Vinocur, O. Shoseyov, and A. Altman .2001. Biotechnology of plant osmotic stress tolerance physiological and molecular consideration. *Acta. Hort*. 560 : 285-92.

USING MOLECULAR BIOLOGY IN IDENTIFICATION OF GENETIC VARIATION WHEAT/GENOTYPES FOR SALT TOLERANCE.

Wisam M. Dawood*　Ibrahem I. AL-Mishhadani **　Ghuffran A. Al-ubaidy***

* Prof. Dr. College of Education for Pure Science- University of Diyala. wisam_malik@yahoo.com

**Dr. Biotechnology Research Center , AL-Nahrain University.

*** College of Education for Pure Science- University of Diyala.

ABSTRACT

Two experiments were carried out during agricultural season 2013-2014 on wheat crop *Triticum aestivum* L. , first for germination percentage under salinity conditions , seeds of genotypes and local varieties were planted in pots at three salt levels (0, 12,16 ds/m) , using randomized complete blook design (RCBD) with three replicates after 10-15 days from the sowing date the percentage of germination was estimated. The second experiment was carried out in the Laboratary to detect selected the genetic variation between genotypes and local cultivar, Seeds were planted in salinized soils at two salt concentrations 0 and 20 ds/m. After 30-35 days from the sowing date, samples of the leaves were taken to extract the DNA to studying genetic variation between selected genotypes and local cultivar using RAPD-PCR technique.

The results revealed that the RAPD-PCR interaction using 7 primer there are differences between genotypes and local varieties , these primers differ in the band number and location and the primer OPC-12 is the best among the primersbeing show the discriminating power through its production bands with a molecular weight 100bp in genotypes N5 and 2H under conditions of salinity but its not appear band in the local varieties Iraq and Latifia and under the same conditions of salinity, these band may represent the salt tolerance gene responsible for the appearance salt tolerance in genotypes.

Key words: Wheat, Genetic Variation, Genetypes, RAPD, Primers.