

جمهورية العراق

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة ديالى / كلية التربية - الرازي

قسم علوم الحياة

دراسة بعض التغيرات الفسلجية والوراثية لصفة تحمل الملوحة في بعض التراكيب الوراثية المنتخبة من الحنطة

(*Triticum spp.*)

رسالة

مقدمه إلى مجلس كلية التربية الرازي - جامعة ديالى

وهي جزء من متطلبات نيل درجة ماجستير علوم

الحياة / نبات

من قِبَل

بلال فاضل زكريا

بإشراف

أ.م.د. إبراهيم إسماعيل حسن

أ.د. وسام مالك داود

ذي الحجة-1432هـ

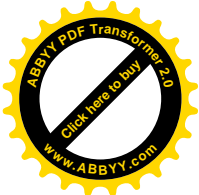
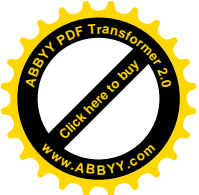
تشرين الثاني-2011م

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

(هَذَا خَلَقُ اللَّهِ فَأَمْرُونِي مَاذَا خَلَقَ الَّذِينَ مِنْ
دُونِهِ بَلِ الظَّالِمُونَ فِي ضَلَالٍ مُّبِينٍ)

للديب العظيمة
صدق العظيمة

(سورة لقمان الآية 11)



بسم الله الرحمن الرحيم

إقرار المشرفين

نشهد بأن إعداد الرسالة الموسومة بـ (دراسة بعض التغيرات الفسلجية والوراثية لصفة تحمل الملوحة في بعض التراكيب الوراثية المنتخبة من الحنطة. *Triticum spp*) قد تم تحت إشرافنا في كلية التربية الرازي / جامعة ديالى ، وهي جزء من متطلبات نيل شهادة الماجستير/ في علوم الحياة / نبات .

التوقيع:

التوقيع :

المشرف : د. إبراهيم إسماعيل حسن

المشرف : د. وسام مالك داود

المرتبة العلمية : أستاذ مساعد

المرتبة العلمية : أستاذ

التاريخ : / / 2011

التاريخ : / / 2011

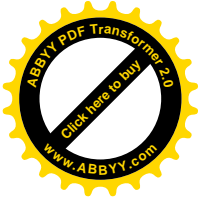
بناء على التوصيات التي تقدم بها المشرفان والمقوم اللغوي أرشح هذه الرسالة للمناقشة.

التوقيع :

الاسم : د. نجم عبد الله جمعة

المرتبة العلمية : أستاذ مساعد

التاريخ: / / 2011



بسم الله الرحمن الرحيم

إقرار المقوم اللغوي

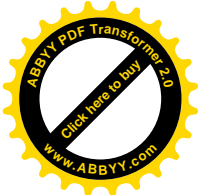
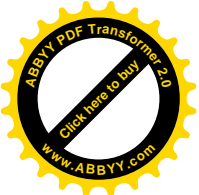
أشهد بأن هذه الرسالة الموسومة بـ (دراسة بعض التغيرات الفسلجية والوراثية لصفة تحمل الملوحة في بعض التراكيب الوراثية المنتخبة من الحنطة *Triticum spp.*) تمت مراجعتها من الناحية اللغوية وتصحيح ما ورد فيها من أخطاء لغوية وتعبيرية وبذلك أصبحت مؤهلة للمناقشة .

التوقيع :

الاسم : د. باسم محمد إبراهيم

المرتبة العلمية : أستاذ مساعد

التاريخ: / / 2011



بسم الله الرحمن الرحيم

نشهد نحن أعضاء لجنة المناقشة بأننا أطلعنا على هذه الرسالة الموسومة بـ (دراسة بعض التغيرات الفسلجية والوراثية لصفة تحمل الملوحة في بعض التراكيب الوراثية المنتخبة من الحنطة. *Triticum ssp.*) وقد ناقشنا الطالب (بلال فاضل زكريا) في محتوياتها ، وفيما له علاقة بها وجدنا أنها جديرة بنيل درجة الماجستير، في علوم الحياة / نبات بدرجة (امتياز).

(رئيس اللجنة)

التوقيع:

الاسم : أ.د. كاظم محمد إبراهيم

التاريخ: / / 2011

(عضو اللجنة)

التوقيع:

الاسم : أ.م.د. عماد خلف عزيز

التاريخ: / / 2011

(عضو اللجنة)

التوقيع:

الاسم : أ.م.د. نجم عبد الله جمعة

التاريخ: / / 2011

(عضو اللجنة المشرف)

التوقيع:

الاسم : أ.م.د. إبراهيم إسماعيل حسن

التاريخ: / / 2011

(عضو اللجنة المشرف)

التوقيع:

الاسم : أ.د. وسام مالك داود

التاريخ: / / 2011

صادق مجلس كلية التربية الرازي / جامعة ديالى على قرار لجنة المناقشة .

التوقيع:

عميد كلية التربية - الرازي

الاسم : أ.د. عباس عبود فرحان

التاريخ: / / 2011

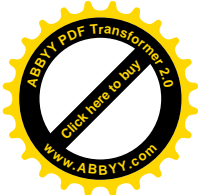
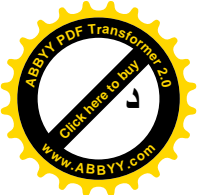
قائمة المحتويات

الموضوع	
شكر وتقدير	أ
الخلاصة	ب- ث
المحتويات	ج- د - هـ - و
قائمة الأشكال	ز- ح
قائمة الجداول	ط
قائمة الملاحق	ي
قائمة المختصرات	ك- ل

التسلسل	رقم الصفحة
المقدمة	1.....

الفصل الأول : استعراض المراجع

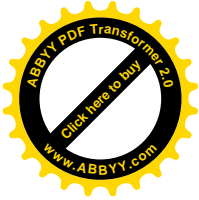
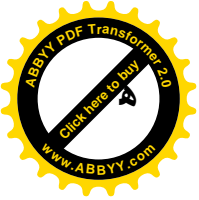
1. مراجعة المصادر	4.....
1.1 تأثير الملوحة في نمو النبات	4.....
2.1 صفة تحمل الملوحة في النبات	7.....
3.1 الآليات الفسلجية لتحمل النبات للملوحة	8.....
4.1 وراثية صفة تحمل الملوحة	11.....
5.1 تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR)	13.....
1.5.1 1 مرحلة المسخ	17.....
1.5.1 2 مرحلة الالتحام	17.....
1.5.1 3 مرحلة الاستطالة	18.....



- 19..... 2.5.1 انزيم البلمرة
- 20..... 3.5.1 البادئ
- 21..... 4.5.1 المحلول المنظم للتفاعل
- 22..... 6.1 تقنية RAPD
- 24..... 7.1 تقنية Bulk segregate – analysis

الفصل الثاني : المواد وطرائق العمل

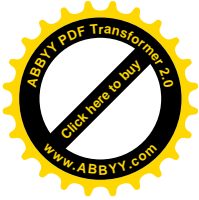
رقم الصفحة	التسلسل
26.....	2. المواد وطرائق العمل
26.....	1.2 تقييم صفة تحمل الملوحة
26.....	1.1.2 التراكيب الوراثية المستخدمة
26.....	2.1.2 تنفيذ التجربة
28.....	3.1.2 التصميم التجريبي
28.....	4.1.2 الصفات المدروسة
29.....	5.1.2 الدراسات الفسيولوجية لصفة تحمل الملوحة
30.....	2.2 تجارب الدراسات الوراثية لصفة تحمل الملوحة
30.....	1.2.2 التراكيب الوراثية
31.....	2.2.2 الأجهزة
32.....	3.2.2 المحاليل و المواد الكيميائية
33.....	4.2.2 استخلاص DNA
33.....	A1.4.2.2 محاليل الاستخلاص
33.....	A2.4.2.2 طريقة العمل
34.....	5.2.2 تقدير نوعية DNA المعزول
34.....	A1.5.2.2 المحاليل المستخدمة



36.....	6.2.2 الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز
36.....	7.2.2 قياس نقاوة DNA
37.....	3.2 تفاعلات PCR-RAPD
38.....	1.3.2 الأجهزة
39.....	2.3.2 طريقة العمل
41.....	3.3.2 عملية الترحيل الكهربائي لخيط تفاعل PCR
42.....	4.2 تحضير تفاعلات Bulk segregate
42.....	1.4.2 تحضير خليط التفاعل الأساسي
44.....	2.4.2 الترحيل الكهربائي لخيط تفاعل BSA
45.....	5.2 تحليل البيانات

الفصل الثالث: النتائج والمناقشة

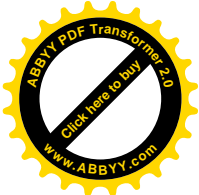
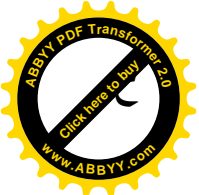
رقم الصفحة	التسلسل
46.....	3. النتائج والمناقشة
46.....	1.3 تقييم التراكيب الوراثية المنتخبة لتحمل للملوحة
46.....	1.1.3 تأثير الملوحة في الوزن الطري
52.....	2.1.3 تأثير الملوحة في الوزن الجاف
57.....	3.1.3 تركيز أيونات العناصر في الأوراق العليا من النبات
63.....	2.3 نتائج عزل DNA
64.....	1.2.3 نتائج البادئات التي أظهرت حزم متباينة
65.....	A.1.2.3 البادئ OPO-04
67.....	B.1.2.3 البادئ OPI-01
69.....	C.1.2.3 البادئ OPC-08



71.....	OPN-16 البادئ D.1.2.3
73.....	OPA-07 البادئ E.1.2.3
75.....	OPG-B8 البادئ F.1.2.3
77.....	OPB-10 البادئ G.1.2.3
84.....	Bulk segregate نتائج تجارب مؤشرات 3.3
84.....	OPN-16 البادئ A.3.3
86.....	OPO-04 البادئ B.3.3
88.....	OPC-08 البادئ C.3.3
93.....	الاستنتاجات
94.....	التوصيات
111-95.....	المصادر
115-112	الملاحق
b – a	الخلاصة الانكليزية

قائمة الأشكال

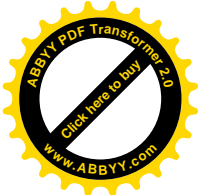
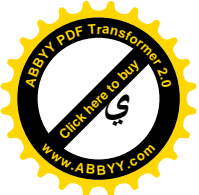
التسلسل	رقم الصفحة
1.1	عملية التضاعف لقطع DNA بواسطة PCR 16.....
1.2	أساس بناء مؤشرات Bulk segregate analysis 43.....
1.3	تأثير مستويات مختلفة من الملوحة في الوزن الرطب للمجموع الخضري.....47
a.1.3	تأثير مستويات مختلفة من الملوحة في نمو التراكيب الوراثية.....48
b.1.3	الاختلاف في صفة تحمل الملوحة بين التراكيب الوراثية.....50
2.3	تأثير مستويات مختلفة من الملوحة في الوزن الرطب للمجموع الجذري.....47
3.3	تأثير مستويات مختلفة من الملوحة في الوزن الجاف للمجموع الخضري.....53
4.3	تأثير مستويات مختلفة من الملوحة في الوزن الجاف للمجموع الجذري.....53
a.4.3	تأثير مستويات مختلفة من الملوحة في نمو جذور التراكيب الوراثية.....56
5.3	محتوى الأوراق العليا من عنصر الصوديوم Na^+60
6.3	محتوى الأوراق العليا من عنصر البوتاسيوم K^+60
7.3	نسبة K^+/Na^+ من الأوراق العليا تحت ظروف ثلاث تراكيز ملحية.....62
8.3	محتوى الأوراق العليا من عنصر الكالسيوم Cl في تراكيز مختلفة من الملوحة. 63
9.3	نواتج DNA المعزول من الحنطة لكافة النماذج المدروسة64
10.3	نواتج تفاعل RAPD-PCR للبادئ OPO-04.....66
11.3	نواتج تفاعل RAPD-PCR للبادئ OPI-01.....68
12.3	نواتج تفاعل RAPD-PCR للبادئ OPC-08.....70
13.3	نواتج تفاعل RAPD-PCR للبادئ OPN-16.....72
14.3	نواتج تفاعل RAPD-PCR للبادئ OPA-07.....74
15.3	نواتج تفاعل RAPD-PCR للبادئ OPG-B8.....76



- 78.....OPB-10 RAPD-PCR للبادئ 16.3 نواتج تفاعل
- 85.....OPN-16 BSA-PCR للبادئ 17.3 نواتج تفاعل
- 87.....OPO-04 BSA-PCR للبادئ 18.3 نواتج تفاعل
- 89.....OPC-08 BSA-PCR للبادئ 19.3 نواتج تفاعل

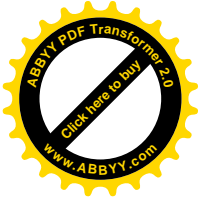
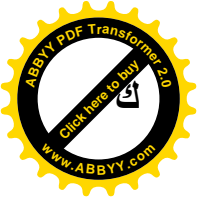
قائمة الجداول

التسلسل	رقم الصفحة
1.2	الخواص الفيزيائية والكيميائية للتربة المستخدمة في التجربة.....27
2.2	النماذج المدروسة مع مصادر نشوئها وتجهيزها.....30
3.2	الأجهزة المستخدمة في البحث.....31
4.2	المحاليل المستخدمة في البحث.....32
5.2	البادئات العشوائية المجهزة من شركة PROMEGA.....37
6.2	الأجهزة المستخدمة في تفاعل PCR.....38
7.2	تراكيذ مكونات خليط تفاعل RAPD-PCR.....39
8.2	ظروف تفاعل RAPD-PCR للبادئات المستخدمة.....40
9.2	تراكيذ مكونات خليط التفاعل Bulk segregate.....42
10.2	توالي القواعد النيروجينية للبادئات المستخدمة في تقنية BSA.....44
1.3	الحزم المتباينة للبادئ OPO-04 مع أوزانها الجزيئية.....67
2.3	الحزم المتباينة للبادئ OPI-01 مع أوزانها الجزيئية.....69
3.3	الحزم المتباينة للبادئ OPC-08 مع أوزانها الجزيئية.....71
4.3	الحزم المتباينة للبادئ OPN-16 مع أوزانها الجزيئية.....73
5.3	الحزم المتباينة للبادئ OPA-07 مع أوزانها الجزيئية.....75
6.3	الحزم المتباينة للبادئ OPG-B8 مع أوزانها الجزيئية.....77
7.3	الحزم المتباينة للبادئ OPB-10 مع أوزانها الجزيئية.....79
8.3	نواتج البادئات من الحزم مع نسبة كفاءتها وقدرتها التمييزية.....81
9.3	البادئات التي ميزت الأصناف والخطوط الوراثية المدروسة.....83
10.3	الحزم المعزولة مع أوزانها الجزيئية للبادئ OPN-16.....86
11.3	الحزم المعزولة مع أوزانها الجزيئية للبادئ OPO-04.....88
12.3	الحزم المعزولة مع أوزانها الجزيئية للبادئ OP- C08.....90
13.3	الحزم المعزولة التي ميزت الأصناف والخطوط الوراثية المدروسة.....92



قائمة الملاحق

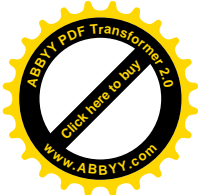
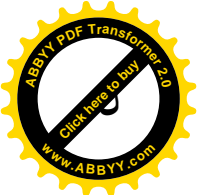
رقم الصفحة	التسلسل
112.....	1 تأثير مستويات مختلفة من الملوحة في الوزن الرطب للمجموع الخضري.....
112.....	2 تأثير مستويات مختلفة من الملوحة في الوزن الرطب للمجموع الجذري.....
113.....	3 تأثير مستويات مختلفة من الملوحة في الوزن الجاف للمجموع الخضري.....
113.....	4 تأثير مستويات مختلفة من الملوحة في الوزن الجاف للمجموع الجذري.....
114.....	5 تأثير الملوحة على تركيز أيون الصوديوم في الأوراق العليا.....
114.....	6 تأثير الملوحة على تركيز أيون البوتاسيوم في الأوراق العليا.....
115.....	7 تأثير نسبة عنصر البوتاسيوم الى الصوديوم في الأوراق العليا.....
115.....	8 تأثير الملوحة على تركيز أيون الكالسيوم في الأوراق العليا.....



قائمة المصطلحات والمختصرات

Terminology and Abbreviations

AFLP...	Amplified fragment length polymorphism.....	تضاعف أطوال القطع المتعددة الأشكال
bp.....	Base pair.....	زوج القاعدة
BSA.....	Bulk Segregate Analysis.....	تحليل المجاميع المعزولة
CTAB..	Cetyltrimethyl Ammonium Bromide.....	ستيل ثلاثي ميثيل امونيوم بروميد
dATP.....	Deoxy adenine triphosphate.....	ادنين منقوص الأوكسجين ثلاثي الفوسفات
dCTP.....	Deoxy Cytosine triphosphate.....	سايتوسين منقوص الأوكسجين ثلاثي الفوسفات
dGTP....	Deoxy Guanine triphosphate.....	كوانين منقوص الأوكسجين ثلاثي الفوسفات
DNA....	Deoxyribonucleic Acid.....	الحامض النووي منقوص الأوكسجين
DNA Fingerprinting.....		بصمة الدنا
dTTP....	Deoxy Thymine Triphosphate.....	ثايمين منقوص الاوكسجين ثلاثي الفوسفات
D.W.....	Distilled Water.....	ماء مقطر
RAPD..	Random Amplified Polymorphic DNA..	التضاعف العشوائي لقطع الدنا المتباينة
RFLP..	Restriction fragment length polymorphism.	تقييد أطوال مقاطع الدنا المتعددة الأشكال
RCBD..	Randomized Complete Blocked Des.....	تصميم القطاعات العشوائية الكاملة
M.....	marker	مؤشر الدنا
MW.....	Molecular Weight.....	الوزن الجزيئي
NPK.....	Nitrogen Phosphor Potassium.....	نايتروجين، فسفور، بوتاسيوم
O.D.....	Optical Density	الكثافة الضوئية
Oligonucleotides.....		نيوكليوتيدات متعددة
PCR	Polymerase Chain Reaction.....	تفاعل البلمرة المتسلسل الدنا
Taq DNA polymerase.....		انزيم بلمرة الدنا
Thermocycler.....		المبلمر الحراري



T_m.....Melting Temperature.....درجة حرارة التفكك
TE.....Tris-EDTA ... ethylene diamintetra acetateاثيلين داي امين تيترا استيل اسيد
U.V.....Ultra violet ray.....الأشعة فوق البنفسجية
SSR.....Simple sequence repeatsالتتابعات البسيطة المتكررة
DWT....Dry weight.....الوزن الجاف

الخلاصة

نفذت الدراسة على مرحلتين في مركز البحوث والتقنيات الإحيائية 2010 / 2011 لغرض تقويم تحمل الملوحة في بعض التراكيب الوراثية المنتخبة من الحنطة بالمقارنة مع الصنفين تموز 2 ودور 85، تضمنت المرحلة الأولى زراعة بذور التركيبين الوراثيين N3 و 2H المتحملين للملوحة إلى جانب صنف المقارنة تموز 2 الحساس للملوحة في أصص ضمن ثلاث مستويات مختلفة من الملوحة هي (2 ، 8 أو 15 ديسي سيمنز. م⁻¹). وزعت العينات وفق تصميم القطاعات العشوائية الكاملة (RCBD) بثلاثة مكررات لدى بلوغ النباتات مرحلة التفرعات تم قياس الوزن الرطب والجاف للمجموع الخضري والجذري، كما تم قياس تراكيز ايونات الصوديوم ، البوتاسيوم ، الكالسيوم في الأوراق العليا للنباتات، أما المرحلة الثانية : فتتعلق بدراسة التباين الوراثي لصفة تحمل الملوحة بين التراكيب المدروسة باستخدام مؤشرات Random amplified polymorphic DNA (RAPD) و Bulk (BSA) segregate analysis المعتمدة على تقنية PCR (Polymerase Chain Reaction).

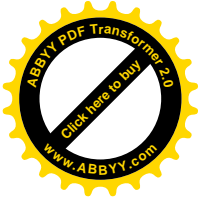
بيّنت النتائج أن زيادة مستوى الملوحة أدى إلى انخفاضاً معنوياً في جميع الصفات المدروسة لاسيما في المستوى الملحي الثالث كما أوضحت الدراسة وجود تباين بين التركيبين الوراثيين والصنف المحلي في تحملها للملوحة ، إذ اتضح أن التركيبين الوراثيين كانا الأكثر تحملاً للملوحة مقارنة بالصنف تموز 2 الذي أظهر حساسية عالية للملوحة. كما بينت النتائج إلى أن تحسناً كبيراً حصل في التركيبين الوراثيين لصفة تحمل الملوحة من خلال برنامج التربية والتحسين الذي نفذه الباحث الدكتور إبراهيم إسماعيل حسن.

ولدى التحري عن آليات التحمل للملوحة أظهرت النتائج أن صفة تحمل الملوحة للتركيبين الوراثيين N3 و 2H كانت مرتبطة مع انخفاض في تركيز ايون الصوديوم (2H 4.95 و N3 4.09 ملغم.غم⁻¹ على التوالي) وارتفاع في تركيز ايون البوتاسيوم (2H 7.29 و N3 8.26 ملغم.غم⁻¹ على التوالي) وارتفاع في نسبة عنصر البوتاسيوم إلى الصوديوم (2H 1.64 و N3 2.23 على التوالي) في أوراقهما العليا بالمقارنة مع الصنف تموز 2 الحساس للملوحة. كما أظهرت النتائج إن هذين التركيبين الوراثيين قد حافظاً على مستوى متوازن من أيون الكالسيوم مع زيادة الملوحة في حين لم تلاحظ هذه الخصائص في الصنف تموز 2 مما يجعله أكثر حساسية للملوحة.

وفي تفاعلات RAPD-PCR من بين الـ 8 بادئات المستخدمة أنتجت 7 منها 82 حزمة ضمن التركيبين الوراثيين 2H و N3 والصنفين تموز 2 ودور 85 ، منها 38 حزمة (46.3%) Monomorphic Bands، بينما بلغ عدد الحزم المتباينة Polymorphic 44 حزمة (53.7%)، وهي النتائج التي اعتمدت في تحليل التنوع الوراثي للتراكيب الوراثية N3 و 2H مع الصنفين تموز 2 ودور 85، واكبر عدد من الحزم المتباينة كانت في البادئ OPI-01 وهي 10 حزم، بينما كان اصغر عدد من الحزم المتباينة هو (2)، و التي أنتجت من البادئ OPN-16. وقد تراوحت حجوم الحزم المتضاعفة بين (585-1823) bp للبادئ OPI-01 و البادئ OPN-16 (1500-1716). كما أظهرت هذه النتائج أن اقل بعد وراثي كان بين التركيبين الوراثيين 2H و N3 واكبر بعد وراثي كان بين التركيب الوراثي 2H والصنف دور 85 في البادئ OPI-01 مقارنة مع البادئات الأخرى .

تم تحديد البصمة الوراثية للتراكيب الوراثية المدروسة ، وكان الصنف دور 85 اكثر تميزاً ، وذلك من خلال ظهور الحزم الفريدة Unique Bands في البادئ OPG-B (1440 bp) و (590 bp) ، والبادئ OPB-10 (446 bp) ، والبادئ OPC-08 (603 bp) أما الصنف تموز 2 فقد تميز في البادئ OPO-04 (2042 bp) و (1774 bp) ، إذ يمكن اعتبار هذه الحزم كمؤشرات وراثية خاصة بالأصناف (Cultivar specific marker)

اجري تحليل BSA بمساعدة ثلاث بادئات (OPN-16 و OPC-08 و OPO-04). بينت النتائج أن البادئات المستخدمة كانت كفوءة في التمييز بين مجموعتي التراكيب الوراثية المدروسة (المتحملة والحساسة للملوحة). أنتج البادئان OPN-16 و OPC-08 اثنتان من القطع المضاعفة الفريدة في التراكيب المتحملة (N3 و 2H) بلغ وزنهما الجزيئي 402bp و 386bp وبنفس التتابع . أما البادئ OPO-04 فقد أنتج اثنتان من القطع الفريدة في الأصناف الغير متحمل عند الوزن الجزيئي 1710bp و 893bp، ويمكن اعتبار تلك القطع كبصمة أصبع للتراكيب الوراثية التي ظهرت فيها.



شكر وتقدير

بعد الحمد لله الذي تتم بنعمته الصالحات والصلاة والسلام على خير الأنبياء سيدنا محمد وعلى آله وأصحابه الطيبين الطاهرين ومن اتبعهم إلى يوم الدين. ربما تقف الكلمات عاجزة عن التعبير عما يدور في صدر الإنسان من خوالج لرد الجميل والامتنان لكل من بذل جهداً لأجل تسهيل مهمتي ولا يسعني إلا أن أدعو له فالدعاء له أجدى من كل كلمات الشكر زاده الله تمكيناً وأسبغ عليه من أفضل العفو والعافية وجزاه الله عني الجزاء الأوفى ومتعته بنعمه يوم الجزاء العظيم.

فمن دواعي سروري أن أشكر كل من الأستاذ الدكتور وسام مالك داود ، والأستاذ المساعد الدكتور إبراهيم إسماعيل حسن المشهداني لمساعدتهم والدكتور نجم عبد الله جمعة والدكتور عماد خلف عزيز والدكتور كاظم محمد ابراهيم ، ومن اللطف والوفاء أن أتقدم بالشكر إلى الدكتور بلال كامل سليمان والدكتور رباح نجاح جبار والأستاذ ستار عبد الله شلاهي والأستاذ غيث لطفي عارف ومنتسبي مختبر زراعة الأنسجة لانجاز متطلبات البحث / مركز التقانة الإحيائية / جامعة النهريين والدكتور أيوب عبيد محمد كلية الزراعة / جامعة الانبار لما قدموه من تسهيلات ومساعدة في إتمام الفحوصات الوراثية.

وأسمى آيات الاحترام وأطيب المشاعر لأسرتي ، إذ تعجز الكلمات في التعبير عن أروع مواقف التضحية والحنان ، أسأل الله العلي القدير أن يجزيهم عني خير الجزاء وحسن الثواب في الدنيا والآخرة.

وفي النهاية أود أن أشكر كل من مد يد العون و فانتني ذكره سهواً لا جحوداً أو نكراناً وجل من لا يسهو، راجياً المولى تعالى أن يوفقتني إلى كل ما يحبه ويرضاه وأن يوفق الجميع للخير و خدمة العلم أنه نعم المولى ونعم النصير.

المقدمة

Introduction

تشهد الثورة العلمية في عصرنا الحاضر وتيرة متسارعة لم يعرف لها نظير في تاريخ البشرية ، وقد فتحت أبواباً عديدة لحل الكثير من المشكلات المختلفة ، وأولها تلك المتعلقة بالأغذية والدواء . في الوقت الذي يتزايد فيه أعداد سكان الكرة الأرضية وتزداد حاجاتهم للغذاء والدواء والكساء وغيره، إن الموارد الطبيعية النباتية والحيوانية تنحسر يوماً بعد آخر نتيجة للتدهور والتلوث الناجم عن الاستغلال المفرط لهذه الموارد (الحداد واللوزي، 2003) ، وتعد ملوحة التربة من المشاكل الرئيسية التي تحدد الإنتاج الزراعي في المناطق المختلفة الجافة منها وشبه الجافة من العالم (Caesar و Rusitzka ، 1982) . إذ تؤدي ملوحة التربة إلى انخفاض في نمو النبات عن طريق التأثير الازموزي (الشد المائي) وعدم التوازن الأيوني والتأثير السمي للأيونات الملحية (Lessani و Marschner ، 1987) . واتفق العلماء على أن التأثير الضار أو المميت للنبات يرجع إلى عوامل الإجهاد Stress وتأثيرها المباشر وغير المباشر على سلسلة نقل العناصر (Abdul Qados ، 2011) . لذلك أوضح Epstein و آخرون (1980) إن تحسين صفة تحمل الملوحة في النباتات كفاء في حل مشكلة الملوحة إذ لوحظ أيضاً من خلال الدراسات والبحوث الجارية أن الأنواع النباتية تختلف في درجة تحملها للملوحة وقد يكون هذا التباين موجود ضمن أصناف النوع الواحد ، وكما هو معلوم في برامج التربية والتحسين ، وان هناك شروطاً يجب توافرها من أجل نجاح مثل هذا البرنامج وهي :-

- 1- وجود اختلافات في صفة تحمل الملوحة في المادة الوراثية المستخدمة .
- 2- اختيار الطريقة الفعالة في تشخيص وانتخاب النباتات المتحملة للملوحة .
- 3- تحديد مرحلة النمو الأكثر حساسية للملوحة (Ralph وآخرون ، 1984) .

إذ أن صفة تحمل الملوحة مسيطر عليها وراثيا وقابلة للانتقال عبر الأجيال (المشهداني وآخرون ، 2003) .

وان توريث هذه الصفة في نبات الجت كانت عالية (Nobele وآخرون ، 1984) .
وان تحديد هذه المورثات في مختلف أنواع المحاصيل باستخدام أدوات التكنولوجيا الحيوية الجديدة ومنها العلامات المعتمدة على الحامض النووي (DNA) وهي واحدة من هذه التقنيات الفعالة جداً وأداة مهمة يمكن الوثوق بها لقياس التنوع الوراثي في المحاصيل التي كانت هدفاً رئيساً في التطور البيولوجي ، خلافاً لصفات الشكل الظاهري (المورفولوجية) والكيميائية الحياتية (البايوكيميائية) ، التي ربما تتأثر بالعوامل البيئية وعمليات النمو التي تستغرق وقتاً طويلاً جداً ، لأن علامات الحامض النووي تكون تصوراً سريعاً عن تسلسل الجينوم ، وبالتالي تمكنا من الكشف عن الاختلافات الوراثية التي تحملها الأفراد المختلفة (Rabbani وآخرون ، 2008) . تركزت الدراسات الوراثية على الحنطة بوصفها من المحاصيل الإستراتيجية (عبد القادر ، 2003) . وفي ظل التطور السريع والمستمر في استخدام مؤشر DNA في السنوات الأخيرة ساعد في الكشف على أنواع حديثة وعديدة من تلك المؤشرات التي تعتمد على واحد من الانجازات البارزة التي تحققت قبل نهاية الألفية الثانية ألا وهي ابتكار تقانة تضاعف سلسلة DNA والتي تعرف بـ (تفاعل البلمرة المتسلسل PCR) " polymerase chain reaction " من قبل (Mullis وآخرون ، 1986) التي أحدثت ثورة هائلة في التقانة الإحيائية وجعلت التنبؤ قائماً باستحداث طرائق أخرى في هذا المجال ، إذ تستند هذه التقانة على مضاعفة جزء DNA خارج الجسم الحي *In vitro* (Mohan ، 1991) . وان معرفة المكونات الموروثة وغير الموروثة للصفات الكمية ضروري لأتباع برنامج مناسب للارتقاء بتلك الصفات ، لا تتطلب تقنية PCR-RAPD أي معلومات مسبقة عن تسلسل جينوم الكائن الحي لأخذ البصمات من جينوم الكائن واستخدمت هذه التقنية على نطاق واسع لتقدير تغيرات الوراثة الجزيئية على مستوى العائلة وبين الأنواع وثيقة الصلة في التشخيص (Rabbani وآخرون ، 2008 ; Shaptadvipa و Sarma ، 2009) .

فضلا عن استخدام تقنية Bulk segregate analysis المعتمدة على تقنية PCR لعزل وتحليل التباين الوراثي بين التراكيب الوراثية التي تم تطويرها سابقاً في منظمة الطاقة الذرية العراقية لتتحمل مستويات محدودة من الملوحة من خلال عمليات التعريض والغرلة والانتخاب طيلة فترة البرامج و تم عزل عدد من التراكيب الوراثية المحتملة للملوحة وكان الهدف من الدراسة الحالية استكمال تلك البرامج وتحقيق الأهداف الآتية :-

- 1- معرفة مدى تحمل التراكيب الوراثية قيد الدراسة لملوحة التربة مقارنة مع الصنف المحلي المعتمد .
- 2- تحديد الدراسات الفسيولوجية لتحمل هذه التراكيب الوراثية للملوحة .
- 3- إيجاد الأنماط الوراثية للنماذج المدروسة باستخدام طريقة RAPD – PCR .
- 4- تحديد التقارب الوراثي والعلاقة الوراثية بين التراكيب الوراثية المحتملة للملوحة مقارنة مع الصنفين الحساسين للملوحة .

الفصل الأول 1. استعراض المراجع

LITERATURE REVIEW

1.1 تأثير الملوحة في نمو النبات

تعد الملوحة من العوامل الرئيسية المعرقلة لنمو النبات في مختلف أنحاء العالم وذلك للتأثيرات السلبية على بعض الخصائص المورفولوجية أو الفسيولوجية للنبات وهذه التأثيرات أما تكون مباشرة وتشمل السمية الأيونية (Ion toxicity) فعند زيادة تركيز أيوني Na^+ و Cl^- في الخلايا النباتية ينجم عنها عدم التوازن في المغذيات التي يمتصها النبات ، وهذا التأثير نوعي أو سمي على النبات وهكذا باقي الأيونات الملحية والتأثير الأزموزي (Osmotic effect) نتيجة زيادة الملح، إذ أن الملوحة تؤثر مباشرة في قابلية النبات على امتصاص الماء من التربة . وكذلك عدم التوازن الأيوني (Ion imbalance) (Salman وآخرون، 2003) . إذ ذكر الربيعي (2002) أن الملوحة أدت إلى زيادة نسبة الصوديوم وانخفاض محتوى البوتاسيوم في نبات الشعير بسبب الإخلال في التوازن الأيوني (Ion imbalance) . أو بشكل غير مباشر عن طريق تأثيرها على الخصائص الفيزيائية والكيميائية والحيوية للتربة بحيث تجعلها غير صالحة لنمو النبات وكذلك تأثيرها في الجذور ويمكن أن تكون مميتة للنباتات (Hasnain و Berge، 2006) . إذ أن زيادة الأيونات الملحية في التربة ينتج عنه خلل في عملية التبادل الأيوني بين التربة والنبات وكذلك تتأثر التربة نفسها من خلال التأثير على خصوبتها أو احد مكوناتها (الكاتيونات أو الأنيونات) إذ أن أملاح الصوديوم المتبادل تؤثر على الصفات الفيزيائية والكيميائية للتربة كرفع درجة التفاعل (pH) باتجاه القلوية وبالتالي عدم جاهزية اغلب العناصر الغذائية للنبات . التي تكون جاهزة عادةً في الوسط الحامضي ، وضعف البناء وصلادة التربة وتنفخ أو تتشنت مما يؤثر

على نفاذية وحركة الماء فيها وهذه التأثيرات ستتعاكس على صفات التربة وبالتالي على نمو النبات بشكل سلبي (Pearson وآخرون ، 2003) كما أن زيادة نسبة ملوحة التربة يمكن أن تؤثر على تحلل المواد العضوية في التربة (Walpolo و Arunakumara، 2010).

أدت الملوحة عند المستويين 320 ، 230 مليمول . لتر⁻¹ إلى انخفاض كبير في الوزن الرطب والجاف لأصناف من الحنطة نتيجة تأثيرها على العديد من العمليات الحيوية التي يقوم بها النبات مثل تراكم الحوامض الأمينية ، وتصنيع البروتينات ، كما أن تراكم الأملاح داخل النبات يقلل من سرعة التفاعلات الأيضية بدرجات مختلفة اعتماداً على جزء النبات (Tammam وآخرون ، 2008) . فقد أوضح السعدي (2008) من خلال الدراسة التي قام بها على صنف الحنطة (الفتح والنور) في وحدة المزارع المائية والتي تحتوي على تراكيز متزايدة من ملح كلوريد الصوديوم وهي (25 ، 50 ، 75 ، 100 ، 150 مليمول . لتر⁻¹) انخفاض تدريجي في متوسط النمو المطلق والنسبي للجذور وقطرها ونسبة البروتين فيها وأعزى هذا إلى انخفاض معدل الانقسام الخلوي لخلايا الجذور وحصول تنافس بين أيونات الصوديوم والكالسيوم المرتبطة بالغشاء البلازمي وزيادة نفاذيته . وذكر Al-Hendawy وآخرون (2005) من خلال زراعة نبات الحنطة في مستويات مختلفة من الملوحة أن المستوى الملحي الثالث 15 ديسي سيمنز م⁻¹ أدى إلى انخفاض معنوي في عدد الأوراق والتفرعات والوزن الرطب والجاف للمجموعتين الخضري والجذري . ويعزى السبب إلى أن الملوحة أدت إلى انخفاض مقدرة النباتات على امتصاص المياه ، وهذا يؤدي إلى خفض معدل النمو مع مجموعة من التغييرات الأيضية مماثلة لتلك الناجمة من الإجهاد المائي . كذلك تسبب الأملاح دخول وتراكم كميات كبيرة من الأيونات الملحية وارتفاع نسبتها إلى مستويات سامة في العصير الخلوي للأوراق ، وتسبب الشيخوخة المبكرة ، وخفض التمثيل الضوئي في الأوراق ، كذلك تؤثر الملوحة من خلال تراكم هذه الأملاح في الأوراق واختلاف الضغط التناضحي مما يؤدي إلى الإجهاد المائي (Munns ، 2002) . وتوصل AL-Uqaili وآخرون (2002) عند دراستهم لتأثير ماء البزل بمستويات ملحية مختلفة هي

2 و 3 و 4 و 6 و 8 و 10 دي سي سيمنز . م¹⁻ في نمو نبات الحنطة صنف المكسيك إلى أن عدد التفرعات قد انخفض معنوياً نتيجة زيادة ملوحة ماء الري مقارنة بماء النهر . وتوصل Francois وآخرون (1986) إلى نتائج مماثلة في دراستهم لأصناف عدة مختلفة من الحنطة بزيادة التركيز الملحي لماء الري من 10.8 إلى 20.5 دي سي سيمنز . م¹⁻ .

كما وجد الحلاق (2003) أن الملوحة سببت اختزلاً معنوياً في عدد التفرعات وارتفاع النباتات كما سببت حالة من الاضطراب التغذوي من خلال الزيادة الواضحة في تراكيز بعض العناصر ونقص في البعض الآخر، إذ يتم تثبيط نمو النبات ويأتي هذا الانخفاض نتيجة استهلاك النبات للطاقة ATP عند أخذ العناصر الغذائية الضرورية من وسط النمو المتأثر بالملوحة، لأن هذه الطاقة كانت ستصرف على العمليات الحيوية للنبات (Cuin وآخرون، 2011).

وقد وجد (عطية وآخرون، 2001) في دراسة أجريت على تركيبين وراثيين منتخبين من الحنطة هما (3H و 4H) إلى جانب صنف المكسيك للمقارنة أدت الملوحة إلى خفض الوزن الجاف للجزء الخضري والجذري.

ووجد Ali وآخرون (2005) أن إضافة $MgCl_2$ ، $CaCl_2$ ، Na_2SO_4 ، و $NaCl$ بنسبة 10 : 5 ، 1 : 4 وبتراكيز 2 ، 5 ، 10 ، 15 ، 20 ، 25 دي سي سيمنز . م¹⁻ في وسط نمو نبات الحنطة أدى إلى خفض الوزن الجاف للسيقان وقد عُزي ذلك إلى تأثير عملية البناء الضوئي Photosynthesis مما ينعكس على تراكم وتصنيع المواد الكربوهيدراتية، أما Ahmad وآخرون (2001) فقد وجدوا في دراستهم التي تضمنت سبعة تراكيب وراثية من الحنطة وثلاثة مستويات ملحية 50 ، 100 أو 150 مليمول . لتر¹⁻ من كلوريد الصوديوم تحت ظروف الزراعة المائية Hydroponic Culture أن الملوحة قللت من النمو الخضري للمحاصيل أكثر من النمو الجذري ، كما وجدوا أن زيادة الملوحة أدت إلى إسراع النبات في إكمال دورة حياته.

وفي دراسة قام بها Pervaiz وآخرون (2002) لاحظوا انخفاضاً في الوزن الجاف للمجموع الخضري والجذري لثلاثة أصناف من الحنطة عند زيادة التركيز الملحي من 0-200 ملي مولر كلوريد الصوديوم وهذا سببه سمية ايونات الصوديوم والكلوريد في خلايا الساق. وكذلك بينت نتائج الدراسات التي قام بها Gorham وآخرون (1985) على الحنطة والشعير إن هذه المحاصيل كانت أكثر حساسية للملوحة خلال المراحل المبكرة من النمو الخضري وأقل حساسية للملوحة خلال مراحل التزهير، إذ أشار Maas (1986) أن تحمل الملوحة يتغير تبعاً لمراحل النمو. وهذا ما أكدته المشهداني والحديثي (2006) من خلال دراسة بعض التراكيب الوراثية المحتملة للملوحة.

كما لاحظ Mahmoodabad وآخرون (2011) من خلال الدراسة التي أجروها على نبات القمح أن زيادة الملوحة أدت إلى خفض الوزن الرطب والجاف في جميع أجزاء النبات.

2.1 صفة تحمل الملوحة في النبات

أثبتت الدراسات والبحوث وجود اختلاف واضح بين النباتات في درجة تحملها للملوحة وهذه الاختلافات بين الأنواع وحتى بين أصناف النوع الواحد . وان قابلية النبات على تحمل الملوحة مرتبطة بالعمليات الآتية :-

- 1- تجميع الأيونات الملحية داخل فجوات خلايا الأوراق العليا.
 - 2- إعادة امتصاص العناصر المهمة في العمليات الحيوية (Flowers، 2004).
 - 3- حركة المركبات العضوية اللازمة لتنظيم الضغط الأزموزي داخل خلايا الأوراق (Munns و Tester ، 2008).
- فقد أوضح Lauchli (1984) أن هناك اختلافات بين أنواع العائلة البقولية في درجة تحمل الملوحة ، وقد تبين أن الجت والبرسيم أكثر تحملاً من الحمص.
- أما بالنسبة للاختلاف بين أصناف الحنطة في درجات تحمل الملوحة ، فقد ذكر المشهداني والحديثي (2006) إن هناك اختلافات في درجة تحمل الملوحة بين بعض التراكيب

الوراثية من الحنطة وان هذه الاختلافات موجودة في كل مراحل نمو النبات، وفي الدراسات التي قام بها العودة (2007) على أنواع من الحنطة تبين أن هناك اختلافات واضحة بين الأصناف في درجة الاستجابة إلى الملوحة فقد كانت سلالة أكساد من القمح الطري أكثر تحملاً للملوحة، كما أشارت الحلاق (2003) وجود تباين بين التركيب الوراثية في تحملها للملوحة ، إذ اتضح أن التركيب الوراثي L2 ، وصنف النخوة كانا الأكثر تحملاً للملوحة مقارنة بالتركيب الوراثي العز الذي أظهر حساسية عالية للملوحة .

3.1 الآليات الفسلجية لتحمل النبات للملوحة

تشير الكثير من الدراسات الى ان بعض النباتات تمتلك قابلية لتحمل الملوحة من خلال القيام بفعاليات حيوية مختلفة ، فبعض النباتات الملحية Halophytes تحتوي على غدد ملحية في أوراقها تجعلها تتأقلم مع التركيز الملحية العالية مثل نبات *Atriplex hastata* وان آلية التحمل تكمن خلال امتصاصها كميات كبيرة من ايونات الأملاح و تخزينها في تلك الغدد ، كما أن النباتات الملحية تميل إلى زيادة حجم الفجوات في خلايا أوراقها التي تشغل 95% من حجم الأوراق الناضجة وتعمل على تنظيم الضغط الأزموزي من خلال تجمع الايونات وتراكمها في هذه الفجوات للحفاظ على التوازن الأيوني في سايتوبلازم الخلية (الخليفة و الخليفة، 2009).

أما النباتات غير الملحية (Glycophytes) التي تنتمي إليها اغلب المحاصيل الزراعية فإن آلية التحمل تتم عن طريق تحمل الملوحة أو استخدام ميكانيكية تحمل خاصة، إذ يعمل النبات خلال وجود الشد الملحي في وسط النمو إلى إجراء بعض التحورات والتكيفات للتقليل من حدة الشد مثل تأخير الإنبات وتقشير دورة الحياة والإسراع في أكمال دورة حياته عند توافر الظروف المناسبة (Moshe ، 1984). وهناك نباتات يبدو أنه ليس لها فوائد إنتاجية بعد ، لكن دراسة آلية التحمل ومعرفتها قد جذب العديد من الباحثين لإجراء البحوث العلمية لما لها من فائدة يمكن استغلالها بطرق وراثية للحصول على نباتات تتحمل الملوحة (Colmer ، 2006). لذا تعد الآليات

الفسلجية لتحمل الملوحة من قبل النبات جزءا مكملًا لرد فعل النبات وراثيا وكيميائيا كي يستطيع القيام بفعالياته الحيوية ومن هذه الآليات :-

أ- الاستبعاد Exclusion :- إذ يقوم النبات بطرد الأملاح من السائتوبلازم إلى الفجوات عبر غشاء الفجوة لتقليل تركيزها ، أو استبعاد ايون الصوديوم عن طريق حجزه في المنطقة السفلية من النبات (Pitman وآخرون ، 1981) .

ب- تحمل الأزموزية Osmotic tolerance :- هنا تتميز النباتات المتحملة للإجهاد الملحي بالقدرة على تنظيم النفاذية للحفاظ على نمو النبات من خلال جينات معينة (Munns و Tester ، 2008) . لذلك يقوم النبات بموازنة الأملاح من خلال هذه الآلية المتميزة واستبعاد كلوريد الصوديوم من بعض الأنسجة والأوراق عن طريق النتح لجعل النباتات أكثر تحملاً للملوحة (Munns وآخرون ، 2006) .

إذ أشار الباحث Greenway (1973) أن النباتات تستجيب إلى الملوحة بوساطة الية استبعاد الايونات وان أوراق هذه النباتات لها القابلية على طرد الايونات الملحية الزائدة ومنها الصوديوم والكلوريد إلى الجزء الأسفل من النبات .

وأوضح Lauchli (1984) أن تحمل النبات للملوحة مرتبط بقدرته على التخلص من التراكيز العالية للأملاح المتراكمة وهذا يتم بطرق عدة ومنها :-
أولاً: التخفيف بواسطة النمو السريع مع زيادة محتوى الماء للخلية .

ثانياً:- التنظيم الأزموزي من خلال استبعاد ايون الصوديوم من الأوراق العليا إلى أسفل النبات ثم طرحه إلى الخارج عن طريق الجذور، أو حجزه في المنطقة السفلية الجذرية للنبات . فقد وجد (Cuin وآخرون ، 2011) إن أصناف من حنطة الخبز استطاعت تحمل الملوحة عن طريق استبعاد أيون الصوديوم من العصير الخلوي الى الفجوات الموجودة في خلايا الجذور كوسيلة فسلجية لتحمل الملوحة . وفي دراسة قام بها Schach و Munns (1992) لاحظا وجود آليتين لتحمل الملوحة في نباتات الحنطة ، الأولى : تراكم معدل قليل من ايونات الصوديوم في الجذور الذي يعد أحيانا منظم لبعض عمليات النمو ، والآلية الثانية : هي حجز الأيونات في الأوراق القديمة ، مما يؤدي إلى زيادة القدرة على تحمل التراكيز العالية لايونات الصوديوم في النبات . كما

أجرى (Roy و Tester ، 2009) بحث حول تحمل الحنطة للملوحة وتم فيها التركيز على آلية استبعاد النبات لأيون الصوديوم من الأنسجة وزيادة نفاذيتها للماء فوجد أن هناك تباين في آلية التحمل بين الخطوط والتراكيب الوراثية المستخدمة. ومن آليات تحمل الملوحة في النباتات الحساسة للملوحة تحمل الأزموزية ويتم من خلال إعادة تنظيم الضغط الأزموزي (Osmo regulation) ، إذ يحافظ هذا التنظيم على حجم الخلية من خلال زيادة تركيز العصير الخلوي داخلها بدرجة تكفي لمقاومة الشد الخارجي أي إبقاء الجهد المائي عال إلى درجة تسمح له بمعادلة الجهد المائي لوسط النمو أو التفوق عليه لأستمرار العيش ، إذ ذكر (Tester و Munns ، 2008) إلى مقدرة نباتات الحنطة تحمل الملوحة من خلال آلية تنظيم الضغط التناضحي واستبعاد ايون الصوديوم من أنسجة النبات وهناك جينات مسؤولة عن هذه الصفة ، لان زيادة الضغط التناضحي تؤدي إلى نمو الأوراق الفتية ، وإبطاء مرحلة الشيخوخة عن طريق التبادل الأيوني .

وأظهرت دراسة الربيعي (1984) أن صنف الحنطة (أبو غريب) كان أكثر تحملا للملوحة من الصنف (مكسيباك) وهذا يرجع إلى وجود جهد أزموزي عال . للسنف (أبو غريب) في كل مستويات الملوحة المدروسة . أما الكيار (1998) فقد وجد في دراسة للتحري عن آلية تحمل الملوحة لتركيبين وراثيين من الحنطة 3H و 4H مقارنة بصنف المكسيباك أن صفة تحمل الملوحة تزامنت مع انخفاض تركيز ايون الصوديوم وزيادة تركيز البوتاسيوم مسببا زيادة ايون البوتاسيوم إلى ايون الصوديوم في أوراقها العليا مقارنة بالصنف (المكسيباك) الذي اظهر زيادة في تركيز ايون الصوديوم وانخفاضا في تركيز ايون البوتاسيوم مما أدى إلى انخفاض نسبة ايون البوتاسيوم إلى ايون الصوديوم في أوراقه العليا.

كما أشارت النتائج إلى أن هذين التركيبين الوراثيين حافظا على مستوى متوازن من ايون الكالسيوم والمنغنيسيوم وزيادة الضغط الأزموزي لخلايا الأوراق العليا بزيادة الملوحة في حين كانت النتائج معكوسة في صنف المكسيباك.

وقد توصل المشهداني وآخرون (2001) إلى نتائج مماثلة لتراكيب وراثية أخرى من الحنطة ، إذ وجدوا أن صفة تحمل الملوحة للتركيبين الوراثيين 1H و 6H كانت ناجمة عن انخفاض تركيز ايون الصوديوم وارتفاع تركيز ايون البوتاسيوم وارتفاع نسبة عنصر البوتاسيوم إلى عنصر الصوديوم في أوراقهما العليا مع زيادة الملوحة في حين لم تلاحظ هذه الخصائص في صنف النداء مما يجعله اقل تحملا للملوحة.

كذلك أظهرت الأبحاث الفسيولوجية على تحمل النبات للملوحة ان هناك عدة جوانب يقوم بها النبات، بما في ذلك، إنتاج osmolyte، والاستجابات للإنبات، والتكيف التناضحي، والنقل وانتقائية امتصاص الايونات، والاستجابات الأنزيمية، إفراز الملح والتحكم الجيني في قدرة خلايا النباتات للحفاظ على انخفاض تركيزات الصوديوم في العصير الخلوي وهي عملية أساسية ترتبط بقدرة النباتات على النمو في تراكيز عالية من الملح (Kant وآخرون ، 2006). كذلك أشار (Sannazzaro وآخرون، 2007) على قيام الجذر بزيادة أو تنظيم نسبة الألبومين لفك الضغط الأزموزي الذي يسببه الإجهاد الملحي التي تعد من آليات تحمل النبات للملوحة.

4.1 وراثية صفة تحمل الملوحة

بسبب قلة المعلومات المتوافرة عن القاعدة الوراثية (Genetic base) لصفة تحمل الملوحة لذا من الضروري جمع المزيد من المعلومات وإجراء المزيد من الأبحاث والدراسات حولها . إذ أكد (Jones و Gorham ، 1992) ومن سبقه من العاملين في هذا المجال بان صفة تحمل الملوحة ليس بظاهرة بسيطة لأنها تعني ارتباط مجموعة واسعة من الصفات الفسيولوجية والوراثية المختلفة وهذه يمكن أن تحدد بأكثر من جين .

كما يلاحظ وجود تباين وراثي معنوي لتحمل الملوحة بين سلالات الحنطة التي تفوقت فيها سلالات (أكساد) على جميع الأنواع المحلية (شام 6 و شام 3) (العودة ، 2007) . وهذا ما أكده (Ghaloo وآخرون ، 2011) من خلال فحص المورثات في أصناف من الحنطة تحت مستويات مختلفة من كلوريد الصوديوم إذ وجد اختلاف بين

الأنماط الجينية في استجابتها للملوحة وكان التركيب الوراثي *moomal* الأكثر تحملا للملوحة .

وأوضح (Furr و Ream ، 1969) أن صفة تحمل الملوحة مورثة ومسيطر عليها وراثيا من قبل عدد من الجينات قابلة للانتقال عبر الأجيال. وهي (متعددة الصفات – متعددة الجينات) (Multi traitl – Multi gene). وهذا ما أكده المشهداني وآخرون (2003) في أن توريث هذه الصفة بالمعنى الواسع والضيق لجميع صفات الحاصل ومكوناته والنمو انخفض مع زيادة الملوحة ولهذا فان هذه الصفة تتأثر كثيرا بالبيئة مما يدعو إلى الاعتقاد أنها صفة كمية يحكمها أكثر من جين. كما استنتج الباحثون من خلال دراستهم أن صفة تحمل الملوحة هي صفة وراثية قابلة للانتقال عبر الأجيال وان تقدماً أو تحسناً وراثياً لهذه الصفة متوقع من خلال دورات الانتخاب وذلك للتأثير المعنوي لفعل الجين الإضافي في توريث هذه الصفة وخاصة في مستوى الملوحة العالي. ولهذه الجينات عمليات أساسية ترتبط بقدرة النباتات على النمو في تراكيز عالية من الملح (Ruisheng وآخرون ، 2004).

فقد استنتج (Abel ، 1969) أن انتقال ايون الكلوريد (Cl-) من الجذر إلى المنطقة العليا لأصناف فول الصويا يقع تحت السيطرة الوراثية وان استبعاد ايون الكلوريد (Cl-) في صنف Lee يقع تحت سيطرة زوج من الجينات الفردية السائدة (Dominant Single Gene Pair) ، بينما تراكم الأيون في أوراق صنف Jackson ينظم بواسطة زوج من الجينات . وأشار (Moshe ، 1984) إلى أن اكتشاف السيطرة للجين الرئيس على نشاط مركب الـ ATP ذات أهمية كبرى في دراسة الطاقة اللازمة لامتصاص العناصر والايونات لتحمل الملوحة.

كما أن التقدم في تطبيق التحليل الوراثي الجزيئي ، وعلم الجينات تمكن من تحديد الجينات الوراثية المسؤولة عن تحمل الملوحة (Xiong و Jian ، 2002). إذ استطاع UL-Hak (2009) تقييم التنوع الوراثي الجزيئي وتحديد المورثات المسؤولة عن هذه الصفة في نباتات البامية من خلال استخدام تقنية RAPD-PCR. ومن جانب

آخر دراست علاقة بعض العناصر الأساسية لنمو النبات. والتعبير الجيني الذي يلعب دوراً هاماً في تنظيم واستجابة تحمل الإجهاد تحت ظروف النمو الطبيعي.

وذكر (Maddur ، 1976) أن صفة تحمل الشعير للملوحة في مرحلة الإنبات تنتقل بوساطة جينات ذات سيادة جزئية ، أما انتقال تلك الصفة في مرحلة البادرات فتتم عن طريق جينات ذات تغلب جزئي وتام . وظهرت رؤى جديدة لمحاولة الوصول إلى الآليات التي من خلالها يمكن تحديد الجينات التي تلعب دوراً حاسماً في تحمل النبات للملوحة (Roy و Tester ، 2009).

لذا فإن الدراسات الجزيئية ولدت مجموعة كبيرة من الأدوات لتسليط الضوء على المستجيبات لتحمل الملوحة (Jian و Xiong ، 2002). إذ استطاع Munns (2002) الكشف عن أصناف من الحنطة تمتلك صفة تحمل الملوحة من خلال إجراء دراسة جزيئية وفلسجية عليها .

وقد حصل الباحثان Sghar و Farooq (1995) على أصناف من الحنطة ذات تحمل عالي للملوحة نتيجة لنقل الجينات المسؤولة عن التحمل من الأنواع البرية المستخدمة في التهجين إلى الحنطة المنزرعة . وكذلك وجود تباين في الآليات لصفة تحمل الملوحة بسبب التغيرات في تعبير الجينات المسؤولة عن هذا التحمل (Kant وآخرون ، 2006) . فقد ذكر (Flowers ، 2004) إلى وجود تباين في تحمل الأنواع النباتية وأصناف النوع الواحد من المحاصيل وان هذا التحمل يرجع سببه إلى امتلاك هذه الأنواع أو الأصناف لتعديلات وراثية مختلفة.

5.1 تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل " Polymerase Chain Reaction" (PCR)

تقوم الخلية بمضاعفة كمية الحامض النووي في الخلية بشكل تلقائي وسريع مع وجود نظام تصحيح للأخطاء خلال النسخ، و تبلغ سرعة النسخ والمضاعفة داخل الخلية الحية إلى 1000 قاعدة نيتروجينية بالثانية (داخل النظام الحيوي)، ويحدث هذا التضاعف في الخلية في وقت التكاثر والانقسام فقط.

استدعى التطور الحاصل في مجال التكنولوجيا الحيوية والذي يقوم على التعامل مع الحامض النووي DNA بشكل أساسي على أن يبحث العلماء عن طريقة أو تقنية تقوم على مضاعفة كمية الحامض النووي DNA بشكل كبير خارج الجسم الحي (Molle و McPherson ، 2001).

فكان هناك محاولات عدة لتنشيط الخلية لزيادة قابليتها على الانقسام المستمر بإضافة عوامل النمو growth factors إلى أن توصل Mullis و faloona في عام (1987) إلى اكتشاف تقنية PCR فكانت هذه التقنية بوابة لكثير من التطورات المتسارعة في مجال التقنية الحيوية، ومن أهم الأسباب التي ساعدت هذه التقنية على الانتشار عدم اعتمادها على النظام الحيوي (أي الخلية) والتحكم بكمية DNA وسرعة في الإنتاج.

وهي تقنية مخبرية تقوم بإكثار نسخ الحامض النووي DNA خارج النظام الحيوي أي أنها طريقة لنسخ الحامض النووي في المختبر و لذلك فهي تقنية حيوية لاستنساخ قطعة محددة من الحمض النووي و مضاعفة إنتاجها للقيام بالتجارب والفحوصات المختلفة (James و Peter ، 2000).

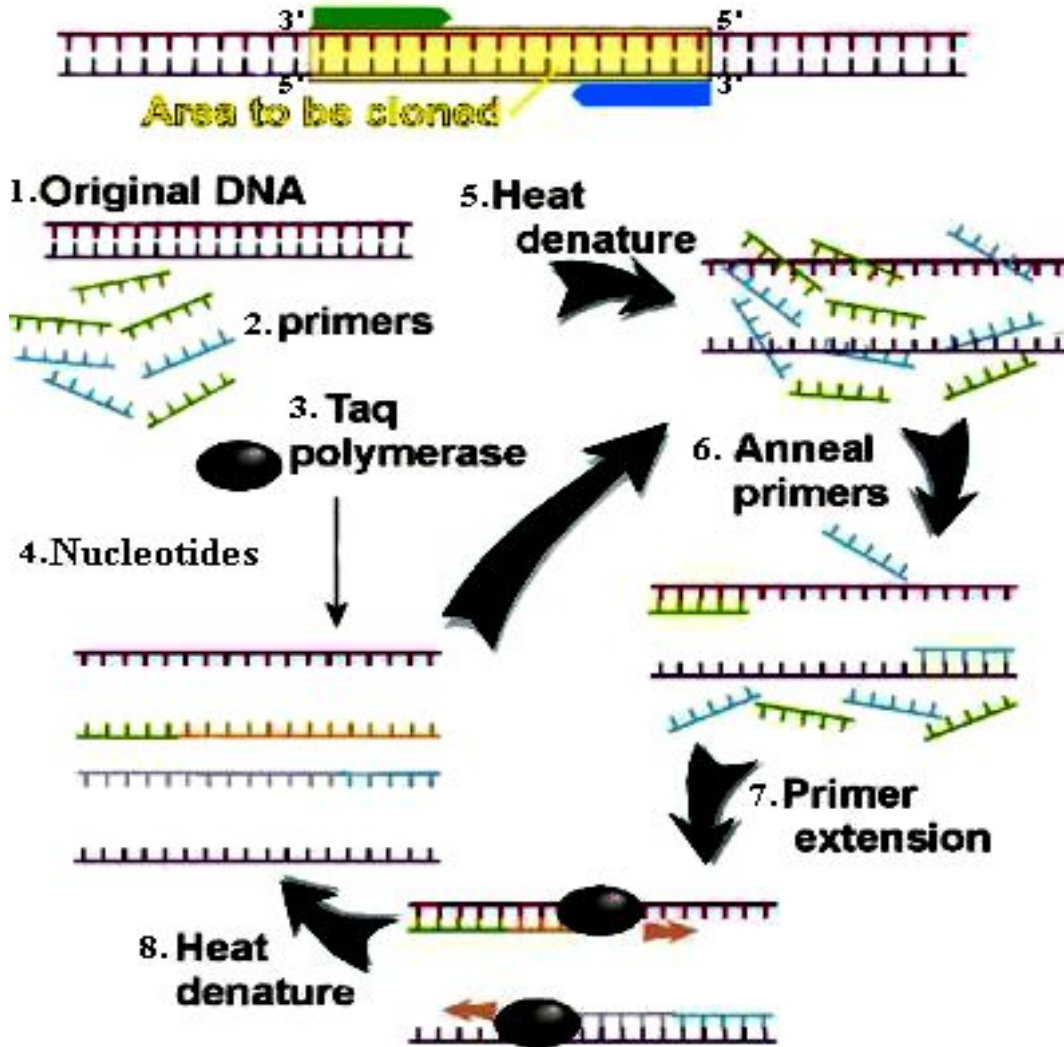
كانت تقنية PCR تستخدم في تسعينيات القرن الماضي بوصفها اختبارات استقصائية متممة، ولكن في نهاية القرن العشرين بدأت هذه التقنية تحل محل تقنيات كثيرة أخرى لأنها أثبتت فعالية كبيرة ودقة ممتازة. وفي مطلع القرن الواحد والعشرين وبعد إتمام سلسلة الجينوم البشري أصبح ينظر إلى كامل هذا القرن بأنه قرن الجينومات Genomics، إذ كان لتقنية PCR دوراً أساسياً في هذه الثورة العلمية الكبرى (Zewail ، 2002).

وكثيراً ما يقتضى الأمر دراسة جزء معين من DNA (المادة الوراثية) ولكن صعوبة التعامل مع عدد محدود من جزيئات هذا الحامض تحول دون ذلك ، لذا يستلزم الأمر مضاعفة هذا الجزء المطلوب دراسته مرات عدة خارج الجسم حتى يسهل استخدامه بعد ذلك في الدراسة المطلوبة، وتسمى هذه العملية باسم (تضاعف الحامض النووي المنقوص الأوكسجين DNA amplification) ولإجراء عملية التضاعف يلزم فك

جزئي الشريط عن بعضهما البعض ، ثم تكوين شريط جديد أمام كل شريط قديم باستخدام أنزيم البلمرة polymerase إذ يرتبط كل شريط جديد مع الشريط القديم وبذلك يصبح لدينا جزيئات من الحامض بدلاً من جزء واحد وبتكرار هذا الإجراء عدة مرات يتكون لدينا بمتواليه هندسية عدد كبير من جزيئات الحامض تشبه كلها الجزء الأصلي الذي بدأنا به (Mourad وآخرون ، 2010).

لذا فإن هذه التقنية تعتمد كثيرا على أنزيم بلمرة *Taq polymerase* في إجراء عمليات المضاعفة في أنبوبة *amplification in vitro* . وقد تعاونت شركة Cetus مع شركة Perkin- Elmer في أمريكا لإنتاج جهاز ذاتي التشغيل يقوم بمضاعفة جزيئات حامض DNA ويطلق على الجهاز اسم Automated thermal cycler وهو يستخدم الآن على نطاق واسع في مختبرات البحوث وفي هذا الجهاز ترتفع درجة الحرارة ألياً لإتمام عملية فك الشريطين ثم تنخفض ألياً لإتمام عملية بناء الشريط الجديد مرتبطاً مع الشريط القديم ، وهكذا فإذا بدأنا بمائة جزء مثلا فإن عدد الجزيئات يرتفع إلى 200 ثم 400 ثم 800 ثم 1600 ثم 3200 ثم 6400 وهكذا وقد قدر أنه في مدى 30 دورة يتم التضاعف بمقدار مليون وتتميز هذه الطريقة بسرعة الإنجاز شكل (1-1) (الصالح ، 2007) .

The PCR Process



الشكل (1-1) عملية التضاعف لقطع DNA بواسطة PCR .

<http://www.dna art online uese primer>

وتقسم عملية البلمرة إلى ثلاث مراحل متتابعة ومكررة ضمن برنامج الجهاز وهي :-

1.1.5.1 مرحلة المسخ Denaturation

تحدث هذه المرحلة في الخلايا الحية أثناء الطور التمهيدي من الانقسام الخلوي وذلك بفعل إنزيمات معينة تلتصق باللولب الحلزوني وتسيطر على دوراته من خلال 1- قطع أو لحم شريط اللولب باستمرار 2- وتقوم إنزيمات أخرى بإبعاد شريط اللولب عن بعضها لمسافة قصيرة 3- وإدخال بروتينات معينة بين السلسلتين لإبقائهما منفصلتين.

أما في تفاعل PCR تمسخ سلسلتي DNA للعيونة الهدف المضخمة (Denaturation at 94°C). تتم هذه المرحلة عند درجة حرارة 94 م°، لتمسخ الشريط المضاعف DNA الهدف. يتعطل في هذه المرحلة عمل جميع الإنزيمات في الوسط ويتوقف على سبيل المثال عمل إنزيم النسخ (كبهوار ، 2007). فتعد هذه المرحلة من أولى المراحل والأساسية في تحضير DNA القالب للعمليات اللاحقة، إذ يتم إعداد DNA القالب المزدوج السلسلة Double Strand للتفاعل عن طريق فتح الشريط المزدوج بتكسير الأواصر الهيدروجينية التي تربط بين السلسلتين وذلك بتعريضه إلى درجة حرارة تتراوح بين 94-97 م° بوقت يتراوح بين 2-5 دقائق للحصول على دنا مفرد السلسلة لتعمل كل سلسلة منه بوصفه قالباً لبناء القطعة المكملة لها.

وتعتمد عملية المسخ على عدد من العوامل كنوعية ومصدر DNA القالب وإنزيم البلمرة وظروف التفاعل (Cha و Thilly ، 1993 ، Fincham ، 1983).

1.1.5.1 2 مرحلة التحام البادئ Primer annealing

يتم في هذه المرحلة ارتباط البادئ بالسلسلة الهدف في تفاعل تحديد التسلسل النيوكليوتيدي وبالتالي يجري تضخيم نسخ لكلا السلسلتين معاً. يرتبط البادئ بتتابع محدد من سلسلة DNA المقابلة لها من حيث القواعد النيتروجينية الملائمة للبادئ ، ويتم ذلك الارتباط عبر روابط الفسفور ما بين نيوكليوتيدات البادئ ونيوكليوتيدات السلسلة الهدف.

تجري هذه المرحلة عند درجة حرارة 50 م° (كبهوار ، 2007). تعتمد درجة الحرارة وطول الفترة الزمنية اللازمة لهذه المرحلة على العديد من العوامل التي تحدد من كفاءتها ومنها تركيز وطول البادئ ونسبة احتوائه من قواعد G+C، ويتم احتساب درجة الحرارة اللازمة للالتحام من خلال إحدى المعادلات الحسابية الملائمة لطول البادئ لاستخراج الدرجة الحرارية الحقيقية لتفكك 50% منه (Tm) Temperature Melting والتي يمكن حسابها حسب المعادلة التالية:

(عدد القواعد T+A) x 2 + (عدد القواعد G+C) x 4 ، إلا أن هذه المعادلة ملائمة للبادئات ذات التتابعات القصيرة دون 20 نيوكليوتيدة . وكثير من المختبرات تعتمد على طرح 3-5 درجات حرارية من الناتج لبداية تفاعلات PCR وصولاً إلى درجة الحرارة المثلى (Wu وآخرون ، 1991) .

3.1.5.1 مرحلة الأستطالة Extension

وتُجرى عند درجة حرارة مناسبة لعمل إنزيم البلمرة وغالبا ما تكون 72 م° وتعد هذه الدرجة مثالية لعمل إنزيم polymerase بعد ارتباط البادئ Primer في المرحلة السابقة ، يتم في هذه المرحلة ارتباط النوكليوتيدات (dNTP's أو ddNTP's) إلى السلسلة الهدف وتركيب السلسلة المكتملة ابتداءً من الطرف 3' باتجاه الطرف 5'، بإضافة كلا النوعين من النيوكليوتيدات خلال تركيب السلسلة المكتملة (كبهوار ، 2007) . إن هذه المرحلة يتم إعدادها بدقة وتغذيتها إلى جهاز PCR وبعده دورات مناسبة لتكون ملائمة للهدف المدروس ، إذ يعتمد عدد الدورات على كثير من الشروط مثل تركيز DNA المستهدف وطول البادئ والزمن الذي تستغرقه كل دورة ويؤكد الكثير من الباحثين أن زيادة عدد الدورات أكثر من 40 دورة يؤدي إلى أخطاء كثيرة أهمها كمية الاتحادات غير المتخصصة للنيوكليوتيدات ضمن ناتج التفاعل ، وبالطبع فإن العدد المنخفض من الدورات يعطي كميات قليلة من الناتج المطلوب ، كون إن ناتج كل دوره من التضاعف يصبح كدنا قالب للدورة اللاحقة وعلى هذا الأساس يزداد عدد النسخ الناتجة

بشكل متضاعف مع عدد الدورات المنتخبة لتصل إلى أكثر من مليون قطعة بعد 30 دورة فقط (Saiki وآخرون ، 1988 ؛ Gelfand و Innis ، 1990) .

2.5.1 أنزيم البلمرة PCR Enzyme

تستلزم عملية فك شريطي DNA المزدوج double strand عن بعضهما درجة حرارة تصل إلى 90 م° ، وكان إنزيم البلمرة Klenow fragment المستخدم سابقا يتعرض للتلف مع كل دورة تضاعف ولا شك أن ذلك كان يشكل عبئاً على من يقوم بالعمل . وكان حل هذه المشكلة في عام 1988 عندما قام ثمانية من العلماء بقيادة (ساكي) Saiki ، باستنباط نوع جديد هو Taq polymerase الثابت حرارياً والمعزول من بكتيريا محبة للحرارة تعرف باسم *Thermos aquaticus* تعيش في الينابيع الحارة (الصالح ، 2007) . أما في الوقت الحالي فقد تمكنت كل من شركة Roche و Promega بإنتاج أنزيم بلمرة متسلسل وهو Taq Polymerase إذ أن لهذا الإنزيم القدرة على العمل في درجة حرارة عالية ومنذ ذلك الحين أمكن للباحثين إكثار حامض DNA في أنابيب خارج الجسم الحي دون أن يصاب الإنزيم بالتلف رغم تعرضه إلى درجة حرارة تصل إلى أكثر من 90° في كل دورة تضاعف (Mourad وآخرون ، 2010) .

وتتألف جزيئة الإنزيم Taq Polymerase من سلسلة مفردة من الببتايد المتعدد وذي وزن جزيئي يقارب 95 كيلو دالتون ، وتعرف الوحدة الإنزيمية الواحدة منه على انها كمية الإنزيم اللازم لبناء 10 نانوغرام من التركيز الكلي للنوكليوتيدات المفسفرة deoxyribo nucleoside triphosphate في خليط التفاعل وتحويلها إلى حامض DNA القابل للترسيب خلال 30 دقيقة وبدرجة 75 م° وتحت ظروف التفاعل ، ويمتاز Taq Polymerase أيضاً بفعاليتيه كإنزيم خارجي النشاط exonuclease activity فضلا عن قدرته على ربط القواعد النيتروجينية dNTPs المحورة الموجودة ضمن محلول التفاعل (Innis وآخرون ، 1988 ؛ Roche ،

(1999) ويقوم أنزيم البلمرة بتصحيح أخطاء الأستنساخ إذا تم إضافة نيوكليوتيدة سليمة يقوم الأنزيم من خلال أخذود يحمل شحنة موجبة من ربط النيوكليوتيدات السليمة ويتقدم إلى الأمام أما إذا كانت النيوكليوتيدة خاطئة فإنها لن تتمكن من الاتحاد مع النيوكليوتيدة المقابلة في السلسلة (ال قالب) وعلية فإنها سوف تعيق تقدم الأنزيم إلى الأمام فيتراجع الأنزيم إلى الخلف إلى المنطقة التي تؤهله لقطع النيوكليوتيدة الخاطئة حتى تأتي النيوكليوتيدة السليمة ويبدأ السير في البناء الصحيح (وهي بذلك تشبه الكماشة الجزء الأمامي منها للاتحام والجزء الخلفي منها يعمل كمصنف للقطع) (عبد الفتاح ، 2009) .

3.5.1 البادئ The Primer

وهو عبارة عن تسلسل من نيوكليوتيدات قليلة Oligonucleotides مكون من القواعد النيتروجينية القادرة على الارتباط مع القواعد النيتروجينية المكاملة للحامض النووي المراد تضخيمه . يتم تصميم البادئات الكفوءة على أساس عدم تكامل تتابعاتها فيما بينها او مع تتابع بادئ آخر وذلك لتفادي حدوث التضاعف المتخصص specific amplification أو حدوث إشكال من primer-dimer ، ويراعى كذلك أن تكون البادئات ذات محتوى مناسب من القاعدتين الكوانين والساييتوسين G+C ratio والتي تتراوح عادة بين 60-70% لتمنح القوة والثبات لمناطق الارتباط ويعتبر primers قطع من DNA فقط وليس من RNA مصنعة وليست طبيعية (Mourad وآخرون ، 2010) . ويتكون من قطعة واحدة في حال البادئات العشوائية Randomly ويعمل على كافة أنواع Universal Primers DNA ، وفي حال البادئات المتخصصة أنواع معين من الجينات يكون لكل شريط من شريطي DNA المنفصلين قطعة ، إحداهما تسمى forward primer بادئ أمامي ، والأخرى reverse primer بادئ عكسي (الصالح ، 2007) .

أهمية البادئات ليس من خلال تحديدها لمناطق بناء السلاسل الجديدة فحسب بل لتحديدها لدرجات الحرارة اللازمة لتثبيتها خلال مرحلة التحامها وفقا لمحتواها من

القواعد كما مرة ذكره ، (Rafalski وآخرون ، 1994 ، Roche ، 1999) . ولهذا فعلينا أن نعرف تتابع القواعد النيروجينية في المنطقة المجاورة للجزء المطلوب مضاعفته حتى نختر له (البادئ) المناسب كذلك فإن الطرف أو النهاية الأخرى للجزء المراد مضاعفته تحتاج إلى بادئ آخر وبذلك يتركز التضاعف في المنطقة من جزئي DNA الواقعة بين (البادئين) . ومن هنا فإن تفاعل PCR كما ذكرنا سابقاً يضاعف جزء من DNA يقع بين منطقتين معروف فيهما تتابع القواعد النيروجينية حتى نختر لكل منهما (البادئ المناسب) ومن الجدير بالذكر أن نمو تكوين شريط DNA جديد يتم بالنسبة له من الاتجاه (3') إلى الاتجاه (5') وهو عكس اتجاه الشريط القديم الذي يتكون وفقاً له ومن المفترض أننا نوفر في الأنبوبة التي تجرى فيها عملية التضاعف كل من النيوكليوتيدات الأربعة التي ستبنى منها الأشرطة الجديدة وهي :

(Deoxy	thymidine	triphosphate)	(dTTP)
(Deoxy	cytidine	triphosphate)	(dCTP)
(Deoxy	adenosine	triphosphate)	(dATP)
(Deoxy	guanosine	triphosphate)	(dGTP)

(كبهوار ، 2007) .

4.5.1 المحلول المنظم للتفاعل PCR buffer : -

وهو محلول مركب يقوم بعملية تنظيم عمل تفاعل PCR وذلك بتأثيره على إنزيم البلمرة والمحافظة على نشاطه ، لذا أصبح هناك العديد منها وفقاً لنوع الإنزيم المستخدم في التفاعل . تختلف هذه المحاليل المنظمة من حيث تركيز مكوناتها إذ يعتمد إنزيم الحامض النووي Taq polymerase على تركيز القياسي والأمثل للمحلول المنظم PCR buffer ، وتركيز الملح وكذلك pH . لذا فإن المكونات القياسية للمحلول المنظم تتكون من KCl او MgCl₂ بتركيز 50 ملي مولر 10 ملي مولر Tris-Hcl و pH = 8.3 ، في درجة حرارة الغرفة . يوفر المحلول المنظم الأيونات اللازمة أثناء عملية

التفاعل . من المهم أن نلاحظ أن تركيز الملح يؤثر على قابلية التحام البادئ primer بـ DNA القالب ، وكذلك درجة حرارة تفكك DNA (Chen و Janes ، 2002 ؛ Roux ، 2009) . وعدد الدورات الحرارية المستخدمة ، وطول الدورة (Samboork و Russell ، 2001) .

6.1 تقنية التضاعف العشوائي متعدد الأشكال (RAPD) Random Amplified Polymorphic DNA

هي تقنية بحثية بدأ العمل بها مطلع التسعينات من القرن المنصرم تسمح بمسح كامل جينوم الكائن عشوائياً للكشف عن بعض التغيرات الوراثية في مادته الوراثية . يُستعمل في هذه التقنية بادئ مصنع (وليس طبيعي) مفرد single (وليس مزدوج) مؤلف من عشرة قواعد (ذات تتابعات عشوائية لكن غالباً ما تحتوي على GC بنسبة 50% على الأقل) ولا يقتصر استخدام هذه التقنية على بادئ واحد معين إنما يُستعمل فيها عدة مئات من البوادئ يرمز لكل منها بأحد الأحرف الإنكليزية الستة والعشرين وعن يمينه رقم، ومجال هذا الرقم هو من (10←20) (Peter و James ، 2000) . ولدى تطبيق تقنية (RAPD) يتم إضافة أحد البوادئ إلى وسط التفاعل (بادئ واحد فقط).

يمكن استخدام هذه البادئات لكافة الكائنات الحية وتمتاز هذه المؤشرات بالسرعة لاعتمادها على تقانة PCR وعدم حاجتها إلى كمية كبيرة أو نقاوة عالية من DNA الهدف ولا إلى معرفة مسبقة بالتتابعات النيوكليوتيدية Nucleotide Sequences ، بالإضافة إلى دقة نتائجها وكلفتها المناسبة ، ومن مميزاتها أيضاً السهولة في كافة مراحل إعدادها وخصوصاً عند الكشف عن نواتجها إذ يتم ذلك مباشرة بترحيل ناتج PCR كهربائياً على هلام الاكاروز وتصبيغها بالايثيديوم برومايد، أي دون اللجوء إلى استخدام وصمة سوزن أو استخدام مواد التعليم المختلفة (Labelled) لبادئاتها المستخدمة في بعض طرق تأثير DNA (Williams وآخرون ، 1990 ؛ Reiter وآخرون ، 1992).

طبقت هذه التقنية في اغلب بحوث تحليل التنوع الوراثي Genetic diversity على الكائنات الحية المجهرية منها في تشخيص الأمراض الوراثية والأمراض الطفيلية. أما في نباتات المحاصيل فقد تم تقييم التنوع الوراثي في مجموعة محورية من الشعير السوري باستخدام مؤشرات التضاعف العشوائية لقطع DNA المتباينة (RAPD) وأجريت الدراسة على ثلاثة وعشرين مدخلاً تمثل مناطق زراعة الشعير الرئيسة في سوريا وتم تحليل عشر نباتات من كل مدخل باستخدام ست بادئات عشوائية بعد إجراء عملية التضاعف ، تم الحصول على ثلاث وعشرين حزمة مختلفة من DNA سمحت بالتمييز فيما بينها ، وقدرت التباينات الوراثية في المجموعة المركزية بنسبة 100% (Choumane وآخرون ، 2001) .

تم الكشف عن الاختلاف الوراثي لثلاثين تركيب وراثي من الحنطة باستخدام تقنية RAPD وكانت النتائج أكثر دقة وترتيب من الطرائق الأخرى في تحديد الاختلاف الوراثي بين هذه التراكيب الوراثية (Rashed وآخرون ، 2008) .

وجد Muhammad وآخرون (2005) إن هذه التقنية كذلك مهمة في تحديد المورثات التي تساعد مربي نبات الحنطة في استنباط أنواع ذات جودة عالية بأقل فترة زمنية تساعد في تحسين الإنتاج في البلاد . إذ استطاع Naghavi وآخرون (2004) من تمييز أنواع من الحنطة الأكثر تحملاً للظروف البيئية باستخدام تقنية RAPD-PCR . وتمكن (Awaad وآخرون ، 2010) من خلال دراسة أجريت على بعض التراكيب الوراثية من الحنطة المتحملة للملوحة من إيجاد التشابه والاختلاف الوراثي فيما بينها باستخدام عشر بادئات . كما أجرى (Shaddad و Hamdia ، 2010) بحثاً حول صفة تحمل الملوحة في بعض التراكيب الوراثية للحنطة التي تم من خلالها تقييم التنوع الوراثي الجزيئي وتحديد المورثات المسؤولة عن آلية استبعاد أيون الصوديوم باستخدام تقنية RAPD-PCR .

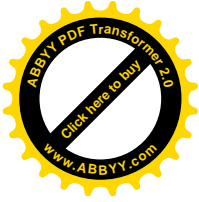
Bulk segregate -Technique 7.1

إن التطور الحاصل في مجال البيولوجي الجزيئي خلال العقدين الأخيرين تمخض عن انبثاق أنواع جديدة من المؤشرات الوراثية التي تمتاز بقدرتها على إظهار التباين ضمن التتابعات المتمثلة للدنا بين الأفراد وهذا التباين يعود سببه إلى حدوث طفرات (Mutations) تؤدي إلى تغيير الأزواج القاعدية .

وعلم الوراثة معني كثيرا في تحديد هذه التباينات وعزلها بشكل أكثر دقة ، لذا كثيرا ما يتم تحديد هذه العلاقات عن طريق إجراء تحليل يسمى بالمجاميع المعزولة Bulk segregate وهي طريقة كفوء وسريعة (Amin ، 2008) جوهر هذا الإجراء هو خلق عينة متضاعفة من DNA وتحليلها عن طريق تجميع الحزم المتمثلة بين الأفراد مثل إيجاد موقع الارتباط الجزيئي لصفة مقاومة الأمراض ، إذ يتم إنشاء عينات من الحامض النووي DNA بكميات كبيرة واحدة تحتوي على حزم Bands أو خطوط تمثل مقاومة هذا المرض ، والمجموع الثانية من الحزم هي متحسسة لهذا المرض . كل هذه العينات من الحامض النووي DNA هي عشوائية من جميع أماكن الجينوم باستخدام تقنية BSA وتم تطوير جزء كبير من هذه التقنية وهذا الأسلوب فعال وقد اكتسب قبولاً واسعاً في السنوات القليلة الماضية منذ وضعت لأول

مرة <http://www.ndsu.edu/pubweb/~mcclean>

وأشارت الدراسات إلى أن تقنية BSA قد استثمرت في تحديد وعزل المؤشرات الجزيئية المرتبطة بمقاومة مرض الصدا الذي يصيب أوراق النباتات وكذلك البعد الوراثي وذلك بمضاعفة قطع DNA بشكل عشوائي (Tabor وآخرون ، 2000) . كما استخدمت هذه التقنية BSA للربط بين المؤشرات الجزيئية وصفة تحمل الملوحة في بعض التراكيب الوراثية للقطن وتم التوصل إلى أنه يمكن استخدام كل من البادئ Z15 والبادئ Z07 للمساعدة في التمييز بين التراكيب الوراثية المحتملة والحساسة للملوحة، وكان الصنف جيزة 83 الأكثر تحملا للملوحة بسبب ظهور وانعزال بعض المؤشرات الجزيئية في هذا الصنف في حين لم تظهر في التراكيب الأخرى (AL-Kadi وآخرون ،



(2005) . أما بالنسبة للحنطة فقد تمكن Amin (2008) من تحديد وعزل مواقع الجينات المحتملة للملوحة داخل المادة الوراثية لـ 154 تركيب وراثي من حنطة الخبز باستخدام تقنية BSA وعلى أساسها قسمت هذه التراكيب الوراثية إلى المجموعة الأولى والتي تضم 20 تركيب وراثي الأكثر تحملا للملوحة والمجموعة الثانية تضم بقية التراكيب الوراثية الأكثر حساسية للملوحة .

الفصل الثاني

2. المواد وطرائق العمل

Materials and Methods

1.2 تقييم صفة تحمل الملوحة

1.1.2 التراكيب الوراثية

إنّ التراكيب الوراثية المستخدمة في هذه الدراسة هي 2H و N3 ناتجة من برنامج التربية والانتخاب التقليدي (Arnon و Hoagland، 1950) لأباء في جيلها الثاني والمستلمة من مركز Commercial wheat breeding program في الولايات المتحدة الأمريكية والصنف المحلي تموز 2 ، وقد ادخل هذا الصنف لغرض المقارنة ومعرفة مقدار التحسين الحاصل في صفة التحمل للتركيبين الوراثيين 2H و N3 .

2.1.2 تنفيذ التجربة

نفذت هذه التجربة في مركز بحوث التقنيات الإحيائية / جامعة النهرين في بغداد 2011/2010 واستخدمت فيها تربة تم الحصول عليها من حقول منظمة الطاقة الذرية في التويثة جنوب بغداد . أخذت نماذج من هذه التربة بعمق 30-40 سم ثم جففت تحت الظروف الطبيعية ونعمت وغرّبت بغربال قطر فتحاته 2 ملم ثم خلطت نسب معينة فيها من التربة الملحية مع تربة غير ملحية للحصول على المستويات (2 ، 8 أو 15 ديسي سيمنز . م⁻¹) ثم أخذت ثلاث عينات بوزن 100 غم ووضعت بصورة منفردة بثلاث قناني زجاجية سعة 250 مل . أضيف لكل قنينة 100 مل من الماء المقطر لتصبح النسبة 1:1 ، وأغلقت فوهات القناني بإحكام ووضعت في Magnetic stirrer لخلطها بشكل جيد لمدة ساعة ، بعد ذلك تم ترشيح محتويات كل قنينة باستخدام ورق الترشيح من

نوع (Whatman#42) موضوعة داخل قمع زجاجي وبعد إكمال عملية الترشيح أخذ الراشح وقيس التوصيل الكهربائي (Ec) بواسطة جهاز Ec meter للحصول على المستويات المطلوبة من الملوحة. كما تم قياس درجة الحموضة (pH) باستخدام جهاز pH Meter كذلك قدر تركيز أيونات الصوديوم ، الكالسيوم ، البوتاسيوم، لكل مستوى ملحي باستخدام مطياف الأمتصاص الذري Atomic absorption spectrophotometer المذكورة في طريقة Richards (1954). وتم تقدير أيون الكلور باستخدام جهاز Microprocessor ionalyzer بواسطة قطب الكلوريد . تم تحديد الصفات الفيزيائية والكيميائية للتربة المدروسة وتحديد نسجة التربة باستخدام طريقة الهايدروميتر وحسب الطريقة المذكورة في Bouyoucos (1936) الجدول (1-2) .

الجدول 1-2 : الخواص الفيزيائية والكيميائية للتربة المستخدمة في التجربة.

التوصيل الكهربائي (EC)			الصفات
15	8	2	
7.8	8.4	8.13	الرقم الهيدروجيني (pH)
			الأيونات الذائبة السالبة والموجبة (ppm)
52	39	14.8	K ⁺
6072	820	61.3	Na ⁺
624	300.9	20.8	Mg ⁺⁺
1343	600	82.2	Ca ⁺⁺
950	660	100	Cl ⁻
238	153	106	SO ₄ ⁼
522	401	488	HCO ₃ ⁼
-	-	مزيجية	نسجة التربة
-	-	%27	الطين
-	-	%41	الرمل
-	-	%32	الغرين

وضعت التربة بالمستويات المطلوبة في أصص بلاستيكية غير مثقبة سعة الواحدة منها 3 كغم ، وزعت بذور التراكيب الوراثية والصنف المحلي تموز 2 في الاصص المعدة لها بواقع (7) بذور في الأصيص بتاريخ 2010/11/22 ، وأضيف لها السماد المركب NPK (27/27/0) على أساس 50 كغم / دونم وبواقع 0.5 غم/الأصيص عند الزراعة كما أضيف سماد اليوريا (46N%) بنفس الكمية ولكن على شكل دفعتين بواقع 0.250 غم/الأصيص لكل مرة كانت الدفعة الأولى أثناء الزراعة والثانية في مرحلة التفرعات بحسب مقياس Zadoks وآخرون (1974). أجريت التجربة داخل البيت البلاستيكي لمنع ماء المطر من تخفيف التراكيز الملحية .

3.1.2 التصميم التجريبي

استخدم تصميم القطاعات العشوائية الكاملة (RCBD) بثلاثة مكرارات واشتمل المكرر الواحد على ثلاثة مستويات ملحية (2 ، 8 ، 15 ديسي سيمنز. م⁻¹) وثلاثة تراكيب وراثية .

4.1.2 الصفات المدروسة

في نهاية مرحلة التفرعات تم حساب الوزن الطري للمجموع الخضري والجذري ضمن المستوى الواحد باستخدام ميزان حساس Sensitive balance . أما الوزن الجاف فقد تم قياسه لكل تركيب وراثي من كل أصيص بعد تجفيف المجموع الخضري والجذري في فرن حراري Oven على درجة حرارة 50 م° لمدة 48 ساعة . حلت البيانات إحصائياً وفقاً للتصميم المستخدم وللمقارنة بين متوسطات المعاملات استخدم اختبار اقل فرق معنوي (L . S . D) بمستوى احتمال 0.05 حسب طريقة (Steel و Torrie ، 1960) .

5.1.2 الدراسات الفسيولوجية لصفة تحمل الملوحة

قدرت تراكيز العناصر في الأوراق العليا للنبات ولجميع التراكيب الوراثية النامية في المستويات الملحية (2، 8 او 15 ديسي سيمنز. م⁻¹) في مرحلة التفرعات . ثم قطعت الأوراق إلى قطع صغيرة لكل معاملة على انفراد وجففت في فرن درجة حرارته 50م° لمدة 48 ساعة ، ثم طحنت بواسطة هاون خزفي وأخذت منها عينة مقدارها 25 ملغم. وضعت كل عينة في ورق زجاجي سعته 50 مل ، وهضم المسحوق النباتي بإضافة 10سم³ من مزيج حامض النتريك HNO₃ وحامض البيروكلوريك HClO₄ وحامض الكبريتيك H₂SO₄ المركز بنسبة 1:2:5 على التوالي. ثم تركت النماذج لمدة يوم واحد بعد تغطيتها بالبارافين ثم وضعت الدوارق على حمام رملي درجة حرارته 80 م° لمدة 6 ساعات على الأقل لحين تحول لون المادة المهضومة من الأصفر إلى الأبيض الشفاف لضمان التخلص من أكاسيد النتريك (Pratt و Chapman ، 1961) . بعدها ذوبت المادة المهضومة في كل ورق بحجم 20مل من الماء الخالي من الأيونات deionized water ثم قدرت فيها تراكيز أيونات البوتاسيوم ، الصوديوم ، الكالسيوم ، المغنيسيوم باستخدام مطياف الامتصاص الذري Spectrophotometer atomic absorption . وحللت النتائج بحسب وفقاً للتصميم واستخدام اقل فرق معنوي (L . S . D) للمقارنة بين متوسطات المعاملات بمستوى احتمال 0.05 حسب طريقة (Torrie و Steel ، 1960) .

2.2 تجارب الدراسات الوراثية لصفة تحمل الملوحة

1.2.2 التراكيب الوراثية

استخدمت لهذه الدراسة التراكيب الوراثية المنتخبة لصفة تحمل الملوحة 2H , N3 والصنفين المحليين تموز 2 ودور 85 وهذه الأصناف ناتجة من تضريب أباء معرضة للتشيع ، تم الحصول عليها من منظمة الطاقة الذرية سابقا ووزارة العلوم والتكنولوجيا حالياً الأبحاث الزراعية في بغداد صيف عام (2010) لغرض المقارنة ، ويبين الجدول (2-2) مصدر النماذج المدروسة ونشوتها .

جدول (2-2) النماذج المدروسة مع مصادر نشوتها وتجهيزها :

ت	التركيب الوراثي Genotypes	مصدرها origin	أصل النشوء Pedigree
1	تموز 2	منظمة الطاقة الذرية	Local صنف محلي
2	دور 85	منظمة الطاقة الذرية	Local صنف محلي
3	2H	المربي د. إبراهيم المشهداني	Breeding Programme /USA
4	N3	المربي د. إبراهيم المشهداني	Breeding Programme /USA

نفذت هذه التجربة وزرعت بذور التراكيب الوراثية الثلاثة في مختبرات زراعة الأنسجة النباتية / للدراسات العليا لمعرفة قوة الإنبات . في حين نفذت الاختبارات الوراثية في مختبرات قسم التقنيات الإحيائية الطبية والجزئية في مركز بحوث التقنيات الإحيائية / جامعة النهرين ، للمدة من تشرين الأول 2010 – اذار 2011 . بهدف دراسة التنوع الوراثي لصفة تحمل الملوحة وإيجاد البعد الوراثي الذي يفصل بين ثلاثة تراكيب وراثية من الحنطة (*Triticum aestivum*).

2.2.2 الأجهزة Apparatus

الجدول (2-3) الأجهزة المستخدمة في البحث

الشركة المصنعة والمنشأ Company and Origin	أسم الجهاز Apparatus Name		ت
Express -Japan	Autoclave	موعدة	1
Eppendorf-Germany	Cold microfuge	منبذ صغير	2
Sanyo-Japan	Deep freeze	مجدة	3
Controls-England	Distiller	جهاز تقطير	4
Consort-Belgium	Electrophoresis unit	وحدة الترحيل الكهربائي	5
Iraq	Laminar air flow cabinate	منعدة انسياب الهواء الطبي	7
Germany	mortar	هاون خزفي	8
England	Incubator	حاضنة	9
Hoffman-USA	Germination Cabinet	كابينة إنبات	10
Eppendorf- Germany	Microcentrifuge	جهاز طرد مركزي	11
LG -Korea	Microwave Oven	فرن الموجات الدقيقة	12
Bio Red – Italy	pH-Meter	جهاز قياس pH	13
Consort- German	Power supply	مجهز للطاقة	14
Ishtar-Iraq	Refrigerator	ثلاجة	15
Sortorius-Germany	Sensitive electronic Balance	ميزان كهربائي حساس	16
Shimadzu- Japan	Spectrophotometer	مقياس الكثافة الضوئية	17
Stuart Scientific-UK	Vortex	مازج دوار	18
Memmert- Germany	Water bath	حمام مائي	19
USA	U.V. Cabinet	كابينة الأشعة فوق البنفسجية	20

3.2.2 المحاليل والمواد الكيميائية Chemicals and Solutions

الجدول (2-4) المحاليل المستخدمة في البحث .

الأصل والمنشأ <i>Company and origin</i>	المواد الكيميائية والبايولوجية <i>Chemicals and Biological Materials</i>
BDH-England	Absolute ethyl alcohol
Promega-USA	Agarose
Promega-USA	Nuclei Lysis
Promega-USA	Bench top PCR markers (50-1000bp)
Fluka – Switzerland	Boric acid
Sigma-USA	Bromophenol Blue
BDH-England	Chloroform
Riedel-de Haën country	CTAB(cetyltrimethyl ammonium bromide)
Hazard-UK	Ethanol Alcohol
Promega-USA	Ethidium bromide
BDH-England	EDTA(ethylene diamintetra acetate)
Promega-USA	Go Taq®Green master mix
Fluka – Switzerland	Glycerol
Promega-USA	Ethanol
Promega-USA	RNase
Thomas Bakar-India	Isoamyl Alcohol
BDH-England	Isopropanol
Promega-USA	(1) Kb DNA Ladder (250-10000)bp
Riedel-de Haën	Na ₂ EDTA
Promega-USA	Protein Precipitation
Promega-USA	Isopropanol
Thomas Bakar-India	Tris-Base
Promega-USA	TBE-buffer (10x)
Promega-USA	DNA Rehydration

4.2.2 استخلاص DNA :- تمت عمليات عزل DNA وفقا لطريقة (Wizard® Genomic DNA Purification Kit).

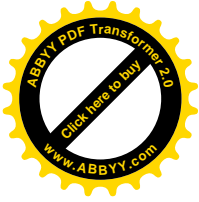
A1.4.2.2 محاليل الاستخلاص *Solution used for DNA Extraction*

حضرت وفقا للأحجام الآتية :

600	مايكروليتر	Nuclei Lysis
3	مايكروليتر	RNase
200	مايكروليتر	Protein Precipitation
600	مايكروليتر	Isopropanol
600	مايكروليتر	Ethanol
100	مايكروليتر	DNA Rehydration

A2.4.2.2 طريقة العمل

- 1- وزن 0.072 غم من مسحوق البذور لكل عينة في أنبوبة نبذ مركزي حجم 2 مللتر .
- 2- أضيف لكل عينة 600 مايكروليتر من محلول Nuclei Lysis ثم وضعت الأنابيب في جهاز المازج الدوار vortex لفترة 1-3 ثانية.
- 3- حضنت في حمام مائي على درجة 65 م° لمدة 15 دقيقة مع التحريك لمرة أو مرتين بعدها رفعت الأنابيب من الحمام المائي وتركت لمدة 5 دقائق بدرجة حرارة الغرفة ثم أضيف إلى كل أنبوب 3 مايكروليتر من أنزيم RNase ووضعت على المازج الدوار vortex لمدة 2-5 دقيقة.
- 4- وضعت الأنابيب في الحاضنة Incubator على درجة حرارة 37 م° لفترة 15 دقيقة ثم رفعت الأنابيب وأضيف لها 200 مايكروليتر من محلول ترسيب البروتين Protein Precipitation إلى كل أنبوبة ووضعت على المازج الدوار لمدة تصل إلى 20 ثانية.



- 5- اجري نبذ بجهاز الطرد المركزي بسرعة 13000-16000 دورة / دقيقة لمدة 3 دقائق لترسيب البروتينات.
- 6- رفعت الطبقة المائية العليا بحرص شديد لتجنب تكسر شريط DNA إلى أنبوبة جديدة لكل عينة ثم أضيف 600 مايكروليتر من محلول Isopropanol لكل عينة ومزجت جيدا بالتقليب . تتكون حينئذ كتلة بيضاء تمثل DNA.
- 7- وضعت العينات بجهاز الطرد المركزي بسرعة 13000-16000 دورة / دقيقة لمدة دقيقة واحدة ، وتم التخلص من الطبقة المائية بحرص شديد.
- 8- أضيف لكل عينة 600 مابكروليتر من محلول الايثانول ونبذ بجهاز الطرد المركزي بنفس السرعة لمدة دقيقة واحدة لترسيب DNA.
- 9- تم التخلص من طبقة الايثانول ثم تركت العينات الى ان جفت بدرجة حرارة الغرفة .
- 10- أضيف 100 مايكروليتر من محلول الترطيب DNA Rehydration إلى كل أنبوبة وحضنت في حمام مائي Water Bath لمدة 60 دقيقة وبدرجة حرارة 65°م ثم تركت لتصل إلى درجة حرارة الغرفة لإتمام الإذابة .

5.2.2 تقدير نوعية DNA المعزولة DNA Quality determination

تم تقدير نوعية DNA من خلال ترحيل عينة من كل نموذج على هلام الاكاروز Agarose وفقا لما جاء في (Maniatis وآخرون ، 1982) :-

A1.5.2.2 المحاليل المستخدمة: Chemicals and Solutions

- 1- محلول TBE : - (20) 0.88 M Boric acid ; 0.89M Tris – borate ; (Mm EDTA ,pH 8

تم تحضير محلول TBE بقوة 10X منه وفق التركيز الآتي:-

108 gm	Tris – base •
55 gm	Boric acid •
pH 8	EDTA •
0.5 gm	

وإكمال الحجم إلى 1 لتر بإضافة الماء المقطر والمعقم بالموصدة ثم يحفظ في درجة حرارة الغرفة (Sambrook وآخرون ، 1989).

2- محلول التحميل Loading Solution بقوة 10x:- تم تحضيره من المواد والتراكيز التالية :-

- بروموفينول الأزرق Bromophenol Blue Dye 0.25 gm في 50 ml ماء مقطر
 - كليسرول Glycerol 30 ml
- وإكمال الحجم إلى 100 ml بإضافة الماء المقطر المعقم (Sambrook وآخرون ، 1989).

3- صبغة بروميد الايثيديوم Ethidium bromide Dye

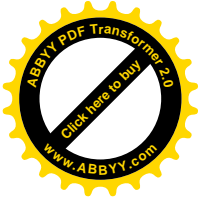
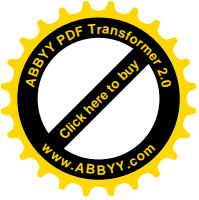
حضرت هذه الصبغة بإضافة 1 ملغم من بروميد الايثيديوم في 100ml ماء مقطر في قنينة معتمة على درجة حرارة 4 م° (المادة مسرطنة يجب ارتداء القفازات والحذر في التعامل معها) (Maniatis وآخرون ، 1982).

6.2.2 الترحيل الكهربائي على هلام الأكاروز Gelelectrophoresis

- 1- حضر الهلام بإضافة 0.32 غم من الأكاروز إلى 40 مل من TBE بقوة 1X ثم وضع في بيكر داخل جهاز Microwave oven إلى حين اكتمال الإذابة وترك ليبرد إلى درجة حرارة 50-55 م° .
- 2- حضر الحوض المعد وسكب الهلام السائل برفق وبشكل مستمر داخل الحوض لمنع حدوث الفقاعات وترك حتى يتصلب .
- 3- غمر الحوض الذي يحتوي على الهلام في محلول TBE بقوة 1X ورفع المشط .
- 4- وضع 2 مايكروليتر من صبغة التحميل على ورق البرافين لكل عينة ثم مزجت مع 5 مايكروليتر من DNA لكل عينة .
- 5- حملت العينات في الحفر وبراغى عدم خروج العينة من سطح الحفرة .
- 6- وصلت أقطاب التيار الكهربائي وجهاز بقدره من 50-60 فولت .
- 7- أوقف الترحيل عند وصول الصبغة الزرقاء إلى حافة نهاية الهلام .
- 8- تم رفع الجل ووضعها في حوض يحتوي على صبغة بروميد الاينثيديوم في مكان مظلم لمدة 30-60 دقيقة .
- 9- فحص الهلام باستخدام جهاز الأشعة فوق البنفسجية U.V لرؤية حزم DNA وتقدير حجمه باستخدام كاميرا من نوع Polaroid Black – White Film Type 667 (الصالح ، 2007) .

7.2.2 قياس تركيز DNA ونقاوته

تم قياس تركيز DNA من خلال تخفيف العينة بإضافة 495 مايكروليتر من الماء المقطر إلى 5 مايكروليتر من العينة وقراءة مقدار امتصاص العينة للأشعة فوق البنفسجية بجهاز Spectrophotometer الذي يستخدم لقياس الكثافة الضوئية (O.D) عند الطولين الموجبين 260 ، 280 نانوميتر وتطبيق القانون الاتي :-



تركيز DNA (mg/ml) = مقدار الامتصاصية عند الطول الموجي 260 لمل واحد من العينة المخففة x مقلوب التخفيف x 50 .
أما النقاوة = الامتصاصية عند الطول الموجي 260 / الامتصاصية عند الطول الموجي 280 هذه النسبة إحدى المؤشرات الدالة على كفاءة عملية الاستخلاص ومدى تلوث الحامض النووي المستخلص بالبروتين (Maniatis وآخرون ، 1982).

3.2 تفاعلات RAPD - PCR .

❖ تم تطبيق هذه التقنية بإتباع الخطوات التالية :-

1- استخدام سبع بادئات تقوم بترتيب القواعد النيروجينية بتسلسل محدد يحضر بتركيز 10pmol/ml .

❖ الجدول (2-5) البادئات العشوائية المصنعة من قبل شركة PROMEGA مع التتابعات Sequences.

No.	Primer name	5" - 3" primer sequence
1	OPO-04	AAGTCCGCTC
2	OPA-07	GAAAACGGTG
3	OPN-16	CAAGGTGGGT
4	OPC-08	TGGACCGGTG
5	OPG-B8	GTCCACACGG
6	OPB-10	CTGCTGGGAC
7	OPI-01	ACCTGGACAC
8	OPA-13	CAGCACCCAC

2- المحاليل والمواد اللازمة لإجراء التفاعلات والمجهزة من شركة – Promega
التي يتألف من :-

المحلول المنظم 10 X PCR buffer
25 mM MgCl₂
10 mM dNTPs
5 ml Taq DNA Polymerase

1.3.2 الأجهزة المستخدمة Apparatus

الجدول (2-6) الأجهزة المستخدمة في تفاعل PCR .

الشركة المصنعة والمنشأ Company and origin	اسم الجهاز Apparatus Name		ت
Labnet - USA	Thermocycler	جهاز بلمرة حراري	-1
Eppendorf - Germany	Microcentrifuge	جهاز نبد مركزي صغير	-2
Consort - Belgum	Electrophoresis	جهاز الترحيل الكهربائي	-3
Consort - Germany	U.V. Cabinet	مصدر الأشعة فوق البنفسجية	-4
Techne - UK	Laminar air flow hood	كابينة انسياب الهواء الطيفي	-5

2.3.2 طريقة العمل :-

1- تم تحضير خليط التفاعل الرئيس. Master mix وذلك بإضافة المكونات التالية إلى أنبوبة معقمة كما في الجدول (2- 7) .

الجدول (7-2) تراكيز مكونات خليط تفاعل RAPD-PCR .

<i>Final concentration</i>	<i>Volume for (1) tube</i>	<i>Materials concentration and manufacturer</i>
-----	8.5µl	D.W
1X	12.5µl	Taq ®Green Master Mix
10 pmol	2µl	Primer(10 pmol)
23µl	Total reaction volume	

مزجت هذه المكونات في أنبوبة باستخدام الماصة الدقيقة Micro pipette وذلك بسحبها ثم توضع في جهاز النبد لعدة ثوانٍ short spin .

2- حضرت 5 أنابيب معقمة حجم 0.5 مل ومعلمة حسب العينات المراد دراستها وأضيف 23 مايكروليتر من الخليط لكل أنبوبة .

3- أضيف 2- 3 مايكروليتر من DNA كل عينة في الأنبوبة المخصصة لها مع ترك الأنبوبة الخامسة لـ Negative DNA ، أن توزيع Master mix على الأنابيب يجب أن يكون قبل نقل DNA لتجنب التلوث .

4- أستخدم جهاز الطرد المركزي لثوانٍ عدة short spin لجمع القطرات الملتصقة بجدار أنبوبة الطرد المركزي وإنزالها إلى أسفل الأنبوبة للحفاظ على الحجم النهائي لخليط التفاعل البالغ 25 مايكروليتر.

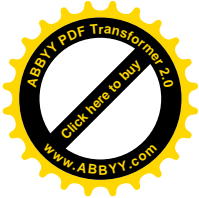
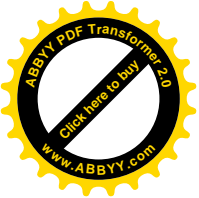
وضعت العينات في جهاز البلمرة الحراري Thermocycler ، ويتم تنفيذ البرنامج الموضح في الجدول (2-7) .

الجدول (2-8) ظروف تفاعل RAPD-PCR للبيانات المستخدمة .

Step	Temperature	Time									
Initial denaturation	Temp.: 95°C	Time: 5 min									
<table border="1" style="margin: auto;"> <tbody> <tr> <td>Denaturation</td> <td>Temp.: 94°C</td> <td>Time: 20-30 s</td> </tr> <tr> <td>Primer Annealing</td> <td>Temp.: 36°C</td> <td>Time: 1 min</td> </tr> <tr> <td>Primer Extension</td> <td>Temp.: 72°C</td> <td>Time: 2 min</td> </tr> </tbody> </table>			Denaturation	Temp.: 94°C	Time: 20-30 s	Primer Annealing	Temp.: 36°C	Time: 1 min	Primer Extension	Temp.: 72°C	Time: 2 min
Denaturation	Temp.: 94°C	Time: 20-30 s									
Primer Annealing	Temp.: 36°C	Time: 1 min									
Primer Extension	Temp.: 72°C	Time: 2 min									
No. of cycles	45 cycles (10DNA molecules detectable level using ethidium bromide)										
Final extension	Temp.: 72°C	Time: 10-15 min									

(Rabbanie وآخرون ، 2008) .

5- رفعت الأنابيب بعد 4 ساعات ووضعت في الثلجة لحين الترحيل.
 تم تحضير المؤشر (Marker) وذلك بإضافة 5 مايكروليتر من DNA 1Kb ladder (250-10,000)bp إلى الصبغة بحجم 1x Loading buffer.



3.3.2 الترحيل الكهربائي Gel electrophoresis لخيطة تفاعل PCR .

Gel agarose 1.2% (2 hr, 5 V/cm, 0.5 X Tris - borate buffer)

- 1- حضر الهلام بإضافة 1.125 غم من الأكاروز إلى 75 مل من TBE بقوة 1X ثم وضع في بيكر داخل جهاز Microwave إلى حين اكتمال الإذابة ثم ترك ليبرد إلى درجة حرارة تصل 50-55 م° .
- 2- تم تهيئة الحوض وذلك بإحاطة أبعاده بلاصق قوي وضع المشط بداخله .
- 3- سكب الهلام السائل برفق وبشكل مستمر داخل اللوح لمنع حدوث الفقاعات وترك حتى يتصلب ثم أزيل اللاصق .
- 4- غمر الحوض الذي يحتوي على الهلام في محلول TBE بقوة 1X ورفع المشط .
- 5- ثم وضع الماركر DNA Marker بحجم 6 مايكروليتر في الحفرة الأولى للمقارنة ، ثم حملت العينات الأخرى حسب التسلسل المعلم عليها .
- 6- تم توصيل أقطاب التيار الكهربائي وجهاز بقدره من 70-80 فولت لمدة 5 ساعات (الصالح ، 2007) بعد اكتمال عملية الترحيل تم تصبغ الهلام بصبغة بروميد الايثيديوم وتحت الأشعة فوق البنفسجية تم تصوير عملية الترحيل باستخدام كاميرا من نوع Polaroid Black – White Film Type 667 (Hashemi وآخرون ، 2009) .

4.2 تحضير تفاعلات Bulk segregate

حضرت تراكيز خليط التفاعل ومكوناته PCR كما مبين في الجدول (2-8) باستخدام ثلاث بادئات لكشف وعزل الحزم المميزة وإظهار التباين الوراثي بين التراكيب الوراثية المدروسة .

الجدول (2-9) تراكيز مكونات خليط التفاعل Bulk segregate .

<i>Final concentration</i>	<i>Volume for (1) tube</i>	<i>Materials concentration and manufacturer</i>
-----	8.5µl	D.W
1X	12.5µl	Taq ®Green Master Mix
10 pmol	2µl	Primer(10 pmol)
200 ng	2µl	خليط التفاعل (10+ 10) DNA
25µl	Total reaction volume	

1.4.2 تحضير خليط التفاعل الأساسي Master Mix Preparation

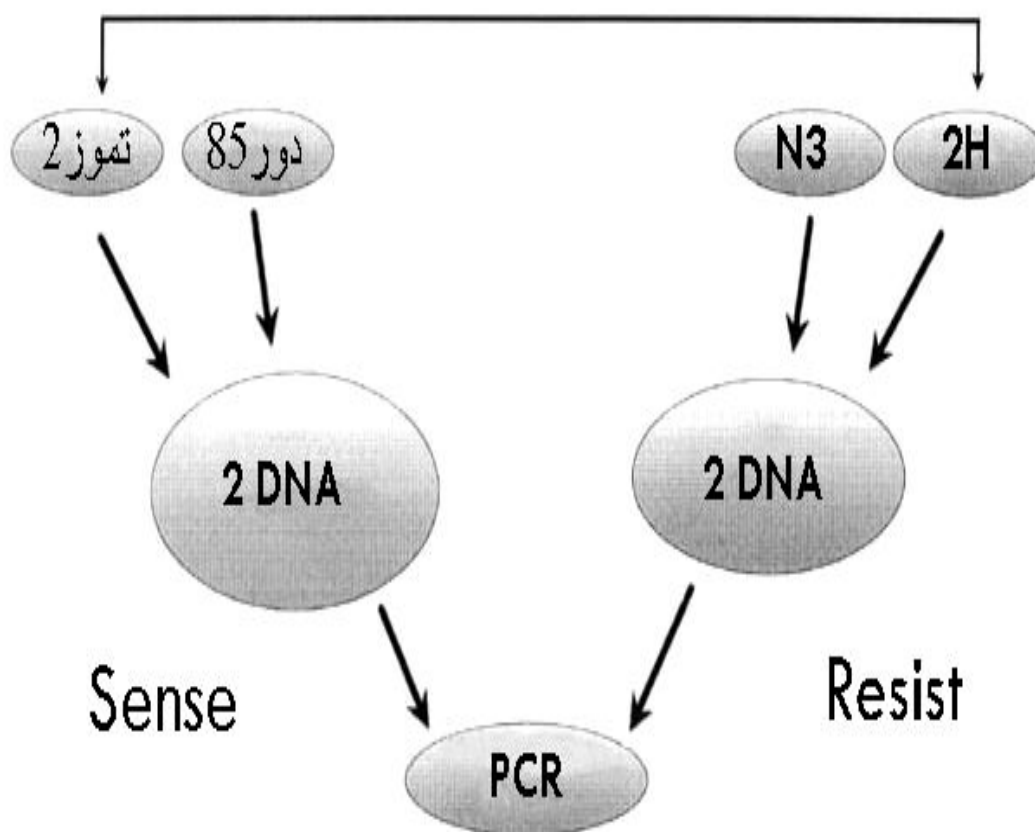
حضر خليط تفاعل حجمه النهائي 25 مايكرو لتر من الخليط الأساسي للتفاعل

Master Mix

- 1-أضيف 12.5 مايكرو لتر من خليط عدة Go Taq®Green Master Mix ، لكل عينة وفق تعليمات الشركة المصنعة الى أنبوبة PCR حجم 500 مايكرو لتر معقمة.
- 2-أضيف بادئ تركيزه 10 بيكومول/ مايكرو لتر ، حجم الإضافة يعتمد على نوع البادئ المضاف.
- 3-أضيف ماء مقطر معقم وخالٍ من الايونات إلى أنبوبة PCR التي يتم تحضير مزيج التفاعل فيها إذ يكمل الحجم الى 23 مايكرو لتر للعينة .

4-مزج 10 مايكروليتر لكل من الترايب الوراثية المتحملة على حدة في أنبوبة معقمة حجمها 500 مايكروليتر ، ثم مزج نفس الحجم أعلاه للأصناف الحساسة في أنبوبة أخرى معقمة شكل (1-2).

Bulk segregant analysis



الشكل (1-2) أساس بناء مؤشرات Bulk segregate analysis .

5- بعد توزيع خليط التفاعل أضيف 2 مايكروليتر من DNA تركيزه 200 نانوغرام /مايكروليتر إلى أنبوبة PCR حجمها 200 مايكروليتر معقمة.

جدول (2-10) توالي القواعد النيروجينية للبادئات المستخدمة في تقنية BSA.

No.	Name primer	5" - 3" sequence primer
1	OPO-04	AAGTCCGCTC
2	OPC-08	TGGACCGGTG
3	OPN-16	CAAGGTGGGT

وضع العينات في جهاز البلمرة الحراري الحلقي Thermocycler ، ونفذ البرنامج نفسه.

2.4.2 الترحيل الكهربائي Gel electrophoresis لخليط تفاعل BSA :

تم الترحيل الكهربائي لتمييز قطع DNA بعد إجراء تفاعل PCR-BSA باستخدام هلام الأكاروز حسب الغرض من الترحيل ، حيث حضر 1.125 غم من الأكاروز وأضيف إلى 75 مل من TBE بقوة 1X ، ان خليط تفاعل PCR نوع Green Master Mix Reaction ولا يحتاج عند الترحيل الكهربائي إلى المزج مع دارئ صبغة التحميل لاحتوائه على صبغتين صفراء و زرقاء والتي تعمل على زيادة كثافة DNA مما يؤدي إلى أستقرار ناتج التفاعل في حفر هلام الأكاروز(الصالح ، 2007).

5.2 تحليل البيانات Data Analysis.

1- تم حساب الوزن الجزيئي M.W بإستعمال برامج الحاسوب Photo capt. وهو برنامج كشف، صور الحزم الناتجة من تفاعل PCR ومقارنتها بالحجم المعروف لحزم المؤشر DNA Ladder (الذي يشمل 14 حزمة من 250 إلى 10,000 bp).

2- تقدير النسبة المئوية للتباين الوراثي Polymorphism % .
حللت البيانات التي أدت إلى كشف أجزاء polymorphic . إذ يتم النظر إلى كل الحزم المتضاعفة بشكل جانبي لكل بادئ ومقارنتها مع بعضها البعض ويرمز لكل حزمة ظهرت رقم "1" وعند غياب نفس الحزمة المشابه بالحجم في المجموعة الأخرى يرمز لها "0".
الحزم الرئيسية التي تضاعفت فقط تحسب والحزم الضعيفة لا تحتسب لكل بادئ وفقا (Ali ، 2003) .

$$\text{Polymorphsim} = \frac{\text{عدد الحزم المتباينة في البادئ}}{\text{العدد الكلي لحزم البادئ}} \times 100$$

ثم حساب النسبة المئوية لكفاءة كل البادئات المستخدمة Primer efficiency والقدرة التمييزية لكل بادئ .

أما حساب الكفاءة لكل بادئ فنتم من خلال المعادلة الآتية :

العدد الكلي لحزم البادئ / العدد الكلي لحزم كل البادئات $\times 100$.
ثم استخراج النسبة المئوية للمقدرة التمييزية لكل بادئ من خلال المعادلة :
عدد الحزم المتباينة للبادئ / عدد الحزم المتباينة لكل البادئات $\times 100$.

(Grudman وآخرون ، 1995) .

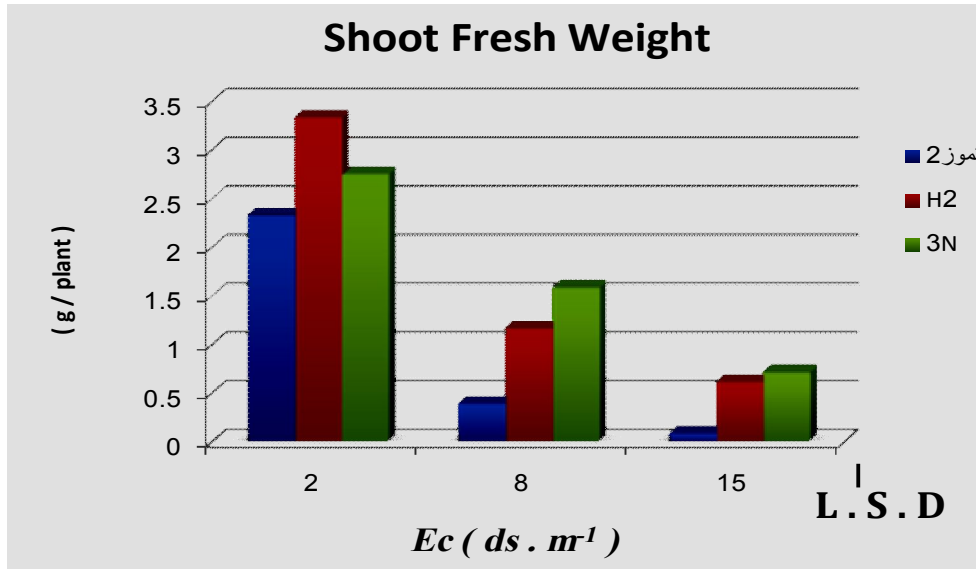
3. النتائج والمناقشة

Results and Discussion

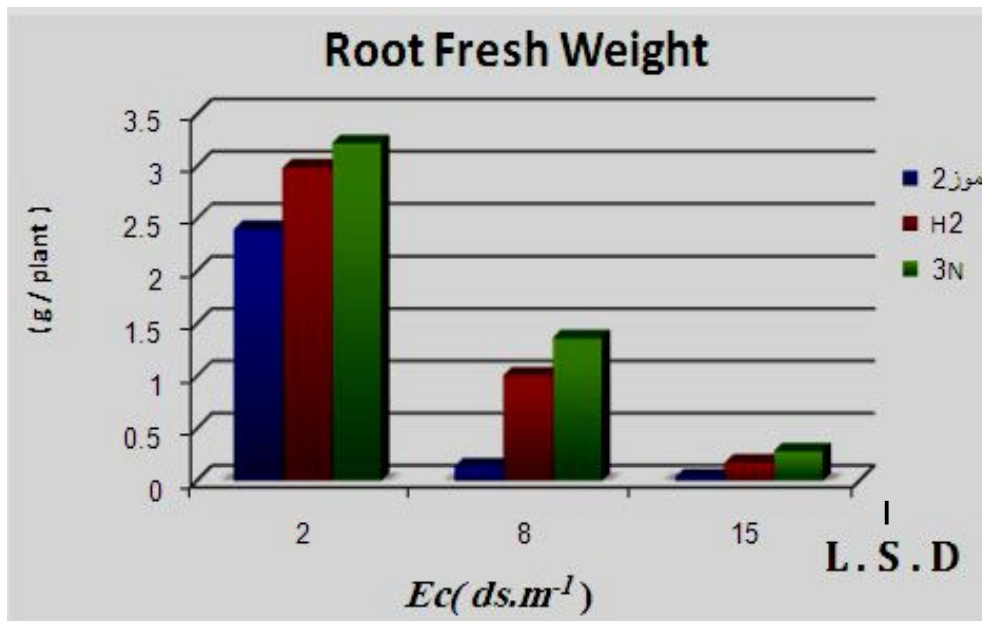
1.3 تقييم التراكيب الوراثية المنتخبة لتحمل للملوحة

1.1.3 تأثير الملوحة في الوزن الطري للنبات

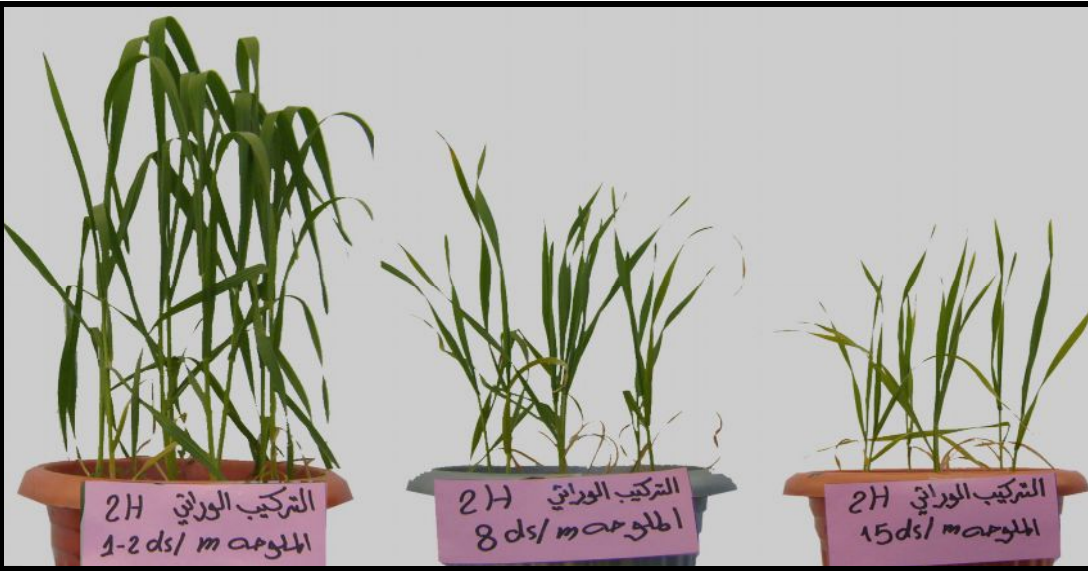
تشير النتائج المبينة في الشكلين (1-3) و (2-3) إن الزيادة في مستويات الملوحة أدت إلى انخفاض معنوي في الوزن الرطب للمجموع الخضري والجذري ، وان هذا الانخفاض كان كبيراً في المستوى الملحي الثاني (8 دي سي سيمنز. م¹⁻) والثالث (15 دي سي سيمنز . م¹⁻) وقد كان المستوى الملحي الثالث أكثر انخفاضاً بالنسبة للمجموع الخضري بمعدل (0.47 غم) بالمقارنة مع المستوى الأول الذي سجل (2.81 غم) وهذا الانخفاض قد يعزى سببه إلى تأثير الملوحة في الإخلال في التوازن الأيوني (Ion imbalance) أو تأثير الضغط الازموزي أو إلى التأثير السمي للأيونات الملحية من خلال دخول كميات كبيرة من الأملاح وبلوغها مستويات سامة ، بالتالي حدوث شيخوخة في الأوراق وموتها ، وانخفاض عمليات البناء الضوئي الى المستوى الذي لا يمكن للنبات الحفاظ على مستوى النمو (Munns ، 2002) ، وهذا يعود إلى نقص محتوى صبغات البناء الضوئي ومجموعة من السكريات والبروتينات (القحطاني ، 2004) ، وهذا الانخفاض في الوزن الطري للمجموع الخضري يعود إلى انخفاض ارتفاع طول النبات ، عدد التفرعات ، عدد أوراق النبات لوحة (a1-3) . وهذا يتفق مع ما أشار إليه Mahmoodabad وآخرون (2011) أن زيادة الملوحة أدت إلى انخفاض الوزن الرطب في خمسة تراكيب وراثية من محصول الحنطة . كذلك لاحظ Aisha وآخرون (2005) أن الملوحة أسهمت في انخفاض الوزن الرطب وطول نبات الرز خاصة تحت الظروف الملحية العالية .



الشكل (1-3) : تأثير مستويات مختلفة من الملوحة في الوزن الرطب للمجموع الخضري للتراكيب الوراثية المدروسة .

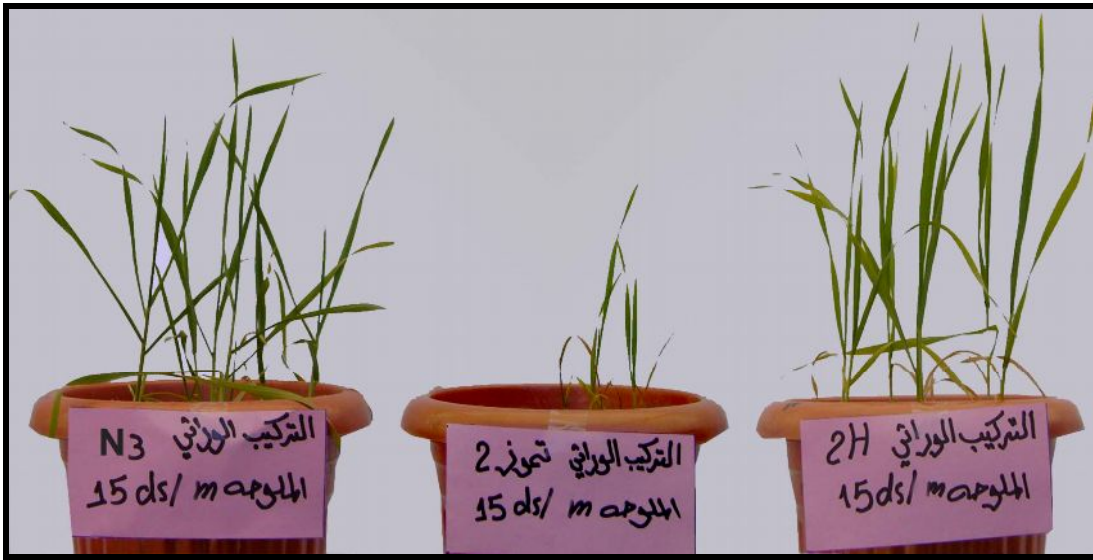
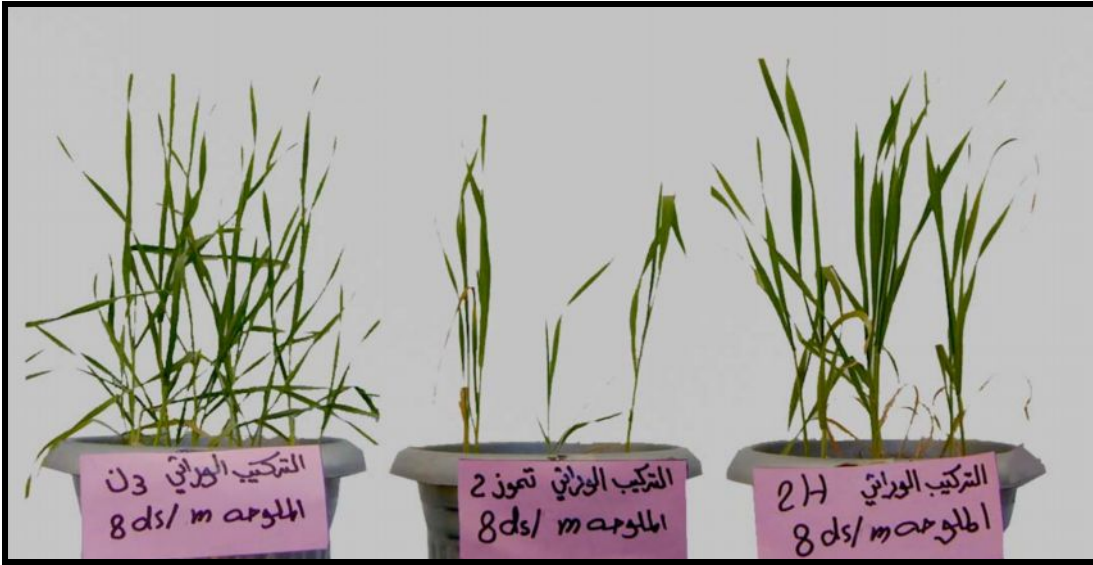


الشكل (2-3) : تأثير مستويات مختلفة من الملوحة في الوزن الرطب للمجموع الجذري للتراكيب الوراثية المدروسة .



لوحة (a1-3) : تأثير مستويات مختلفة من الملوحة في نمو التراكيب الوراثية.

كما يلاحظ من الشكل (1-3) إن مقدار انخفاض الوزن الرطب للمجموع الخضري في الصنف تموز2 بتأثير الملوحة كان اكبر إذ انخفض من (2.33 غم) في المستوى الأول إلى (0.09 غم) في المستوى الملحي الثالث بينما كان الانخفاض في التركيب الوراثي 2H من (3.34 غم) في المستوى الملحي الأول إلى (0.62 غم) في المستوى الملحي الثالث وللتركيب الوراثي N3 من (2.76 غم) إلى (0.72 غم) ، وهذا يعطي تفسيراً على أن التركيبين الوراثيين 2H و N3 قد سجلا أعلى قيمة في الوزن الرطب للمجموع الخضري في المستويين الثاني والثالث بسبب الزيادة الحاصلة في عدد التفرعات والأوراق وطول النبات ويعزى ذلك إلى قدرة هذه التراكيب على استخدام آلية فسلاجية استطاعت من خلالها تحمل الملوحة وهذا يأتي أما عن طريق استبعاد ايون الصوديوم من العصير الخلوي إلى الفجوات الموجودة في خلايا الجذور كوسيلة فسلاجية لتحمل الملوحة (Cuin وآخرون ، 2011) . أو من خلال آلية تنظيم الضغط التناضحي واستبعاد ايون الصوديوم من أنسجة النبات وهناك جينات مسؤولة عن هذه الصفة وهي استبعاد ايونات الصوديوم من الأوراق والحفاظ على امتصاص العناصر الغذائية المهمة Rajendran (وآخرون ، 2009) لغرض استمرار العمليات الفسيولوجية الحيوية في النبات . أما الصنف تموز2 فقد أعطى اقل قيمة في الوزن الرطب للمجموع الخضري بسبب التأثير السلبي للملوحة على فعالية الخلايا والإخلال في نشاط بعض الإنزيمات وبسبب التأثير على قابلية النبات على امتصاص العناصر الغذائية المهمة مما يسبب تثبيط النشاط المرستيمي وتقرزم النبات وتيبس الأوراق (الفقي ، 2010) . كذلك تؤثر الأملاح على رفع الضغط الأزموزي لمحلول التربة وعدم قدرة النبات على بناء ضغط أزموزي عالي في خلاياه للتغلب على الضغط الأزموزي للتربة لغرض امتصاص الماء والعناصر الغذائية المهمة للعمليات الفسيولوجية في النبات (Pearson وآخرون ، 2003 ; Salman وآخرون ، 2003) .



لوحة (b1-3):الاختلاف في صفة تحمل الملوحة بين التراكيب الوراثية المدروسة.

كما توضح النتائج في الشكل (2-3) انخفاض متوسط الوزن الرطب للمجموع الجذري للصنف تموز 2 مع زيادة مستوى الملوحة من (2.40 غم) في المستوى الأول إلى (0.030 غم) في المستوى الملحي الثالث ويعزى هذا الانخفاض إلى تأثير الملوحة في معدل الانقسام الخلوي لخلايا الجذور وحصول تبادل بين أيونات الصوديوم وأيونات الكالسيوم المرتبطة بالغشاء البلازمي ، مما يسبب تسريب الأغشية الخلوية لأيونات المهمة خارج الخلية (Cramer وآخرون ، 1985) . في حين تفوق التركيبين الوراثيين في متوسط الوزن الرطب للمجموع الجذري وهذا يعود إلى عدم تأثير الملوحة سلبيا على نمو وانقسام خلايا الجذر لوحة (a4-3) . وهذا يعزز قدرة النبات في

امتصاص أيون الكالسيوم الذي يلعب دوراً مهماً في زيادة تكامل الأغشية الخلوية والسيطرة على دخول وخروج العناصر الغذائية المهمة لنمو النبات (Aslam وآخرون ، 2001) .

يشير التداخل بين الملوحة والتراكيب الوراثية في الشكلين (1-3) و (2-3) إلى أن هناك انخفاضاً معنوياً في المستويين الملحيين الثاني والثالث في صفتي الوزن الرطب للمجموع الخضري والجذري لجميع التراكيب الوراثية .

وقد سجل الصنف تموز2 اقل القيم بالنسبة للوزن الرطب للمجموع الخضري والجذري في هذين المستويين ، بينما سجل التركيبتين الوراثةيين 2H و N3 أعلى القيم لنفس الصفتين . ويعزى سبب هذا الانخفاض في الوزن الرطب للمجموع الخضري والجذري للصنف تموز2 إلى تأثير الملوحة في جميع مراحل نمو النبات فتؤدي إلى خفض ارتفاع النبات وعدد الأوراق وعدد التفرعات (Al-Hendawy وآخرون ، 2005) لوحة (b1-3) .

كذلك بينت النتائج في الشكلين (1-3) و (2-3) إلى وجود علاقة ايجابية بين الوزن الرطب للمجموع الخضري والمجموع الجذري ، إذ إن زيادة نمو المجموع الجذري تؤدي إلى زيادة نمو المجموع الخضري من خلال زيادة البراعم العرضية في منطقة التاج وزيادة امتصاص الماء والعناصر الغذائية اللازمة للعمليات الفسيولوجية الحيوية من الجزء الخضري وهذا سوف يؤدي الى زيادة عدد التفرعات وعدد الاوراق وارتفاع النبات .

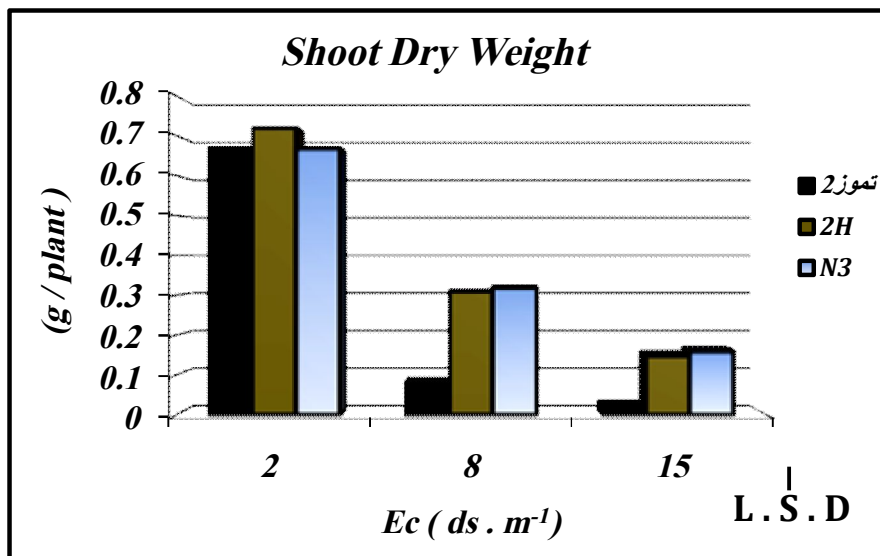
وهذا ما أكده المشهداني وآخرون (2001) تحت ظروف الملوحة فان زيادة المجموع الجذري يشجع النمو الخضري . كما تبين النتائج أن هناك تبايناً واضحاً بين التراكيب الوراثية المنتخبة في مقدار التحمل للملوحة الذي اختلف من تركيب وراثي لآخر إذ سجل التركيب الوراثي N3 أعلى القيم في معدل الوزن الرطب بالنسبة للمجموع الخضري والجذري ، وهذا يعزى إلى الاختلافات الوراثية في استجابة التراكيب الوراثية المنتخبة للملوحة نتيجة للاختلافات في آليات تحمل الملوحة المستخدمة في تجنب التأثير السلبي

للأملاح (Ali وآخرون ، 2005) . وشخصت اختلافات مماثلة في الاستجابة للملوحة بين أربع تراكيب وراثية من الحنطة (المشهداني والحديثي ، 2006) وهذا يتفق مع ما أشار إليه الحلاق (2003) إلى وجود تباين بين التراكيب الوراثية في تحملها للملوحة ، إذ اتضح أن التركيب الوراثي L2 كان الأكثر تحملاً للملوحة مقارنة بالتركيب الوراثي العز. كما لاحظ Mahmoodabad وآخرون (2011) ان زيادة المستوى الملحي أدى إلى حدوث تغيرات في معدل انخفاض الوزن الرطب في المجموع الخضري والجذري للأصناف المستخدمة في التجربة .

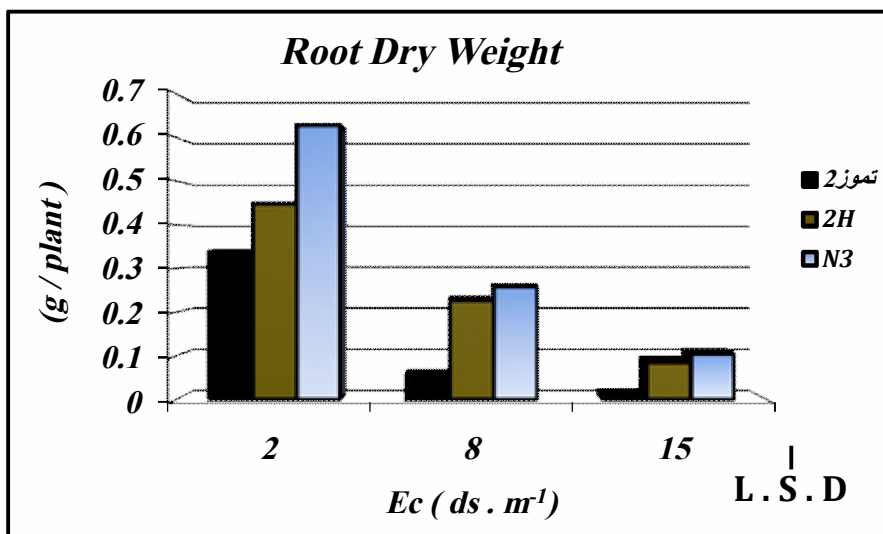
2.1.3 تأثير الملوحة في الوزن الجاف للنبات .

أوضحت النتائج الواردة في الشكلين (3-3) و (4-3) إلى أن ارتفاع الملوحة أدت إلى انخفاض الوزن الجاف للمجموع الخضري والجذري ، وكان الانخفاض معنوياً في المستوى الملحي الثاني والثالث ، إذ انخفض الوزن الجاف للمجموع الخضري إلى (0.11 غم) والمجموع الجذري إلى (0.106 غم) عند المستوى الثالث (15 ديسي سيمنز . م⁻¹) مقارنة بمعاملة المقارنة (0.69 غم) للمجموع الخضري و (0.47 غم) للمجموع الجذري وهذا الانخفاض يعزى سببه إلى تأثير الملوحة في خفض ارتفاع النبات وعدد التفرعات وعدد أوراق النبات بسبب الاضطراب الأيوني الناتج من تأثير الملوحة في مرحلة النمو الخضري والجذري للنبات (التميمي ، 2007) كذلك تؤثر الملوحة على انقسام ونمو خلايا الأجزاء الخضرية والجذرية للنبات . وهذا يتفق مع ما أشار إليه (Hassan ، 1989 ، Abd Al Wahab و Abdul Qados ، 2008) من أن النمو الخضري والجذري لنبات الحنطة ينخفض بزيادة تراكيز الأملاح مثل الكلوريدات وكاربونات الصوديوم ، إذ تعمل الملوحة على تثبيط العمليات الكيموحيوية والتي من أهمها عملية البناء الضوئي ويمكن ملاحظة ذلك من خلال تأثيرها على صبغات البناء الضوئي .

إذ أشارت نتائج الدراسة التي أجراها (Abd Al Qados ، 2011) إلى نقص محتوى الكلوروفيل الكلي وكلوروفيل a ، b والكاروتينات بزيادة تركيز الملوحة باستخدام ملح كلوريد الصوديوم .



الشكل (3-3): تأثير مستويات مختلفة من الملوحة على الوزن الجاف للمجموع الخضري للتراكيب الوراثية المدروسة.



الشكل (3-4): تأثير مستويات مختلفة من الملوحة على الوزن الجاف للمجموع الجذري للتراكيب الوراثية المدروسة.

أما عن التداخل بين نسب الملوحة المختلفة والتراكيب الوراثية فقد أوضحت النتائج وجود انخفاض معنوي في صفة الوزن الجاف للجزء الخضري والجذري ولجميع التراكيب الوراثية مع زيادة مستوى الملوحة .

وقد سجل الصنف تموز2 اقل القيم بينما سجل التركيبيين الوراثيين 2H و N3 أعلى القيم في الوزن الجاف للمجموعين الخضري والجذري (الشكلين 3 - 3 و 3 - 4) ، هذا يعني إن الصنف تموز2 كان اقل من التركيبيين الوراثيين بمعدل ارتفاع النبات وعدد التفرعات والأوراق بسبب تأثير الشد الملحي لوحدة (a1-3) و (a4-3) . نتائج مماثلة حصل عليها السعدي (2008) والكيار (1998) إذ كان هناك انخفاض في الأوزان الجافة للمجموع الخضري والمجموع الجذري لنبات الحنطة عند مستويات الملوحة العالية . إذ يلاحظ في الشكل (3-3) أن مقدار انخفاض الوزن الجاف للمجموع الخضري كان اكبر في الصنف تموز2 إذ انخفض من (0.67 غم) في المستوى الأول إلى (0.02 غم) في المستوى الملحي الثالث ، بينما كان الانخفاض في التركيب الوراثي 2H من (0.72 غم) في المستوى الأول إلى (0.15 غم) في المستوى الملحي الثالث وللتركيب الوراثي N3 من (0.67 غم) إلى (0.16 غم) (الملحق 3)، ويعزى السبب في هذا التفوق إلى قدرة هذه التراكيب في استبعاد ايونات الصوديوم من الأوراق والحفاظ على امتصاص العناصر الغذائية الأخرى (Ahmad وآخرون ، 2005) ، أو امتلاك التراكيب الوراثية آلية تحمل أخرى للملوحة (Shaddad و Hamdia ، 2010) .

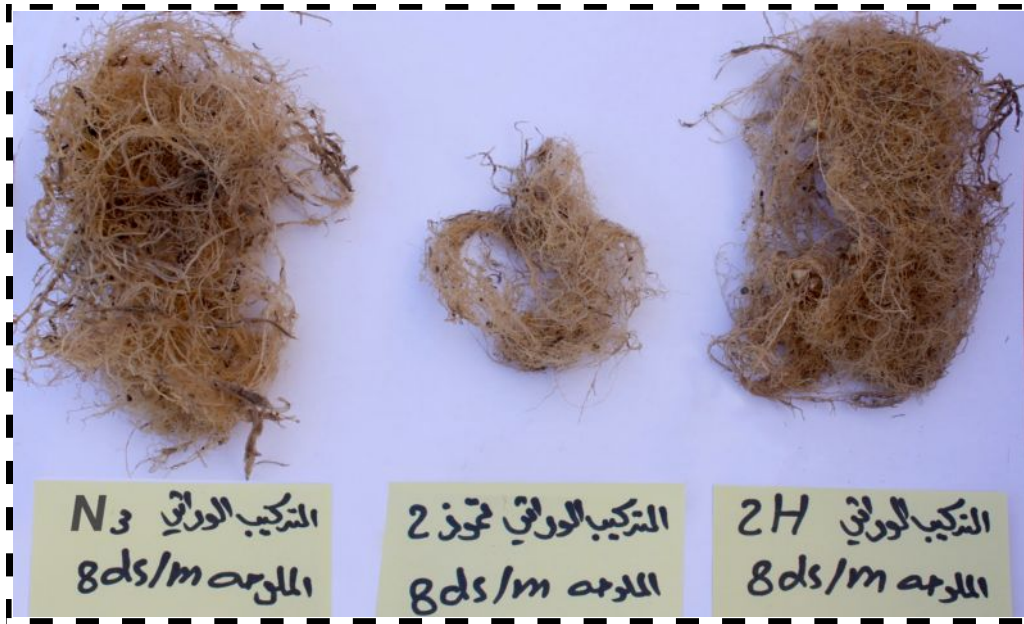
وكذلك للمحافظة على نشاط بعض الإنزيمات وعمل الأغشية الخلوية والعضيات في الخلايا . فقد أشار (Ralph وآخرون ، 1984) إلى أن الملوحة تؤدي إلى اضطراب في العمليات الأيضية المختلفة في النبات كما تؤدي الملوحة الى تثبيط بناء الكثير من التراكيب الخلوية مثل الكلوروفيل والمايتوكوندريا وغيرها التي تعيق نمو النبات (Levitt ، 1980) . كما توضح النتائج في الشكل (4-3) انخفاض متوسط الوزن الجاف للمجموع الجذري للصنف تموز2 مع زيادة المستوى الملحي من (0.34 غم) إلى (0.010 غم) وهذا يعود إلى ضعف نمو خلايا الجذور تحت الظروف الملحية والذي سوف يؤدي إلى انخفاض إنتاج بعض الهرمونات النباتية مثل السايٹوكاينين أو تأثير الملوحة المباشر في

خفض ايض السايوتوكاينينات (الرجبو، 1992) . وهذا ما أكده السعدي (2008) في أن زيادة تراكيز ملح كلوريد الصوديوم قد أدى إلى اختزال في الوزن الجاف للجذور . في حين تفوق التركيبين الوراثيين 2H و N3 في متوسط الوزن الجاف للمجموع الجذري لوحة (a4-3) ، وهذا قد يعزى إلى تمكن جذور هذه التراكيب الوراثية من استبعاد ايون الصوديوم واستبداله بايون عنصر آخر مثل الكالسيوم أو البوتاسيوم ، وهذا ما أشار إليه Cramer وآخرين (1985) من إن جذور نبات القطن استطاعت استبدال ايون الكالسيوم مكان ايون الصوديوم على مواقع الغشاء الخلوي للشعيرات الجذرية مع زيادة ملح كلوريد الصوديوم في بيئة النمو، وهذا سوف يؤدي إلى تحسين نمو الجذور وبالتالي إلى زيادة الوزن الجاف للمجموع الخضري و تحسين الإنتاجية ، وذلك لوجود علاقة طردية بين نمو الجذور والجزء الخضري والإنتاجية (Hassan و Mohammed 1999،)

تشير النتائج أن مقدار التحمل قد اختلف بين التراكيب الوراثية ، إذ كان التركيبان الوراثيان 2H و N3 أكثر تحملاً للملوحة من صنف المقارنة تموز2 ، وذلك لامتلاكهما أعلى القيم من معدل الوزن الجاف للمجموعين الخضري والجذري ، وهذا يعود إلى أن التركيبين الوراثيين 2H و N3 كانا أكثر كفاءة في استبعاد ايون الصوديوم وإعادة امتصاص العناصر المهمة لنمو النبات ، وهذا ما اشار اليه السعدي (2008) بأن صنف الفتح أبدى قدرة تحمل جيدة للتركيز العالي من ملح كلوريد الصوديوم مقارنة بالصنف النور . وكذلك توصل المشهداني وآخرون (2001) إلى نفس النتائج في تراكيب وراثية أخرى من الحنطة ، إذ وجدوا اختلاف في صفة تحمل الملوحة بين التركيبين الوراثيين 1H و 6H ، من خلال استعراض نتائج هذا الجزء من هذه الدراسة يمكن ان نستنتج :-

1- أن هناك تحسناً كبيراً قد حصل في صفة تحمل الملوحة في التركيبين الوراثيين المنتخبين من خلال برنامج التربية والانتخاب .

2- وإن التركيب الوراثي N3 كان الأكثر تحملاً للملوحة من التركيب الوراثي 2H والصنف المحلي تموز2 ، وذلك لتفوقه في وزن المجموع الخضري والجذري .



اللوحة (3-4 a) تأثير مستويات مختلفة من الملوحة في نمو جذور التراكيب الوراثية .

3.1.3 تركيز أيونات العناصر في الأوراق العليا من النبات

تشير النتائج في الشكلين (3-5) و (3-6) إلى أن زيادة مستويات الملوحة أدت إلى زيادة معنوية في تركيز ايون الصوديوم وانخفاض معنوي في تركيز ايون البوتاسيوم في الأوراق العليا ولجميع التراكيب الوراثية المدروسة ، فقد ازداد معنوياً تركيز ايون الصوديوم في المستويين الملحيين الثاني والثالث إلى (5.4 ، 6.40 ملغم/غم) عن المستوى الأول . وقد انخفض معنوياً تركيز ايون البوتاسيوم للتراكيب الوراثية في نفس المستويين الملحيين الثاني والثالث إلى (5.79 ، 4.89 ملغم/غم) عن المستوى الأول . إن أهم ما لوحظ في دراسة تركيز العناصر هو ارتفاع تركيز ايون الصوديوم وانخفاض تركيز ايون البوتاسيوم مع زيادة الملوحة وهذا يتفق مع ما جاء به المشهداني وآخرون (2001) والحلاق (2003) . ويعزى مثل هذا الانخفاض إلى العلاقة العكسية بين تركيز ايون الصوديوم وايون البوتاسيوم في الأوراق (Devitt وآخرون ، 1981) . إذ تقلل زيادة تركيز ايون الصوديوم من تركيز ايون البوتاسيوم في الأوراق العليا من خلال إحلال ايون الصوديوم محل ايون البوتاسيوم في خلايا النبات (Marschner ، 1971) .

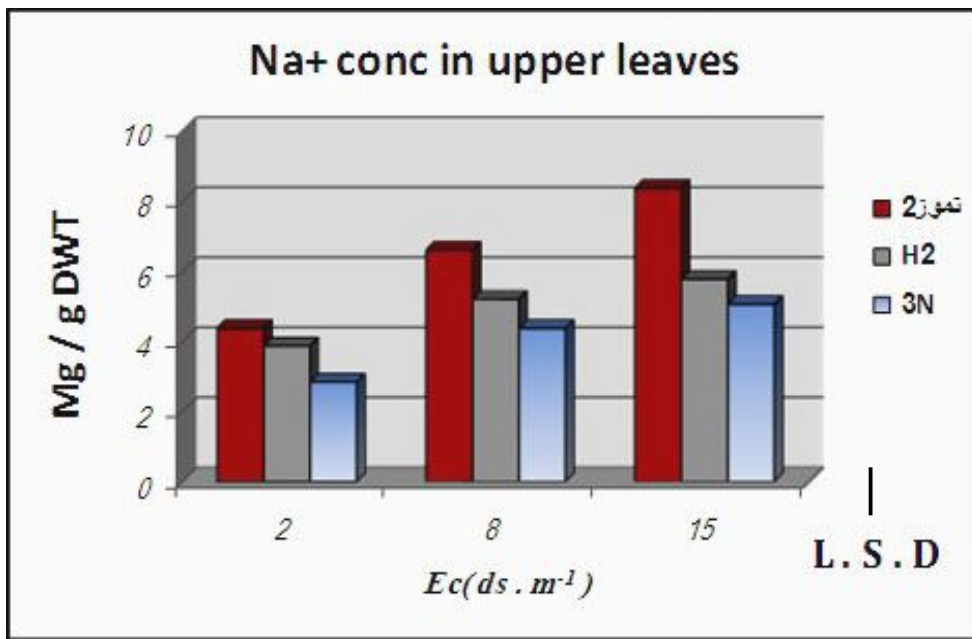
من خلال التداخل بين التراكيب الوراثية والملوحة في الشكلين (3-5) و (3-6) نجد مع مقدار الزيادة الحاصلة في تركيز ايون الصوديوم بزيادة الملوحة خاصة في المستويين الملحيين الثاني والثالث (8 و 15 ديسي سيمنز م⁻¹) استطاع التركيبين الوراثيين 2H و N3 تقليل تركيز ايون الصوديوم ورفع تركيز ايون البوتاسيوم في الأوراق العليا ، بينما كانت الزيادة معنوية لتركيز ايون الصوديوم في صنف المقارنة تموز 2 . وهذا يعزى إلى أن هذين التركيبين الوراثيين تمكنا من استبعاد ايون الصوديوم والحد من تراكمه المنقول من الجذر إلى الجزء الخضري ومنها إلى الأوراق بواسطة الأغشية الخلوية حيث أنها تؤدي دور مهم في خفض التراكيز السامة للأيونات الملحية عن طريق إما حجزه داخل فجوات خاصة في خلايا الأوراق أو طرحه خارج الأوراق (Cuin وآخرون ، 2002) مما يؤدي إلى زيادة تركيز أيون البوتاسيوم في الأوراق العليا وهذا نتيجة لزيادة امتصاص

ايون البوتاسيوم من التربة عن طريق الجذور وإعادة امتصاص K^+ من الجزء الأسفل من النبات إلى الأوراق العليا. إذ إن هذه العناصر تلعب دور مهم في انقسام وتوسع الخلايا وتمدد جدرانها من خلال زيادة معدل انتقال المواد الغذائية من التربة إلى النبات وخاصة ايون البوتاسيوم وهو الأكثر أهمية بسبب المهام الواسعة التي يقوم بها من الحفاظ على تدرج الجهد الأزموزي عبر أغشية الخلايا إلى تفعيل عمل العديد من الإنزيمات (Dev و Kronzucker ، 2008) . وهذا يتفق مع نتائج الدراسة الحالية حيث سجل التركيبين الوراثيين 2H و N3 استبعاد نسبي لايون الصوديوم من أوراقهما العليا وزيادة تركيز ايون البوتاسيوم بالمقارنة مع الصنف تموز2 الذي لم يتمكن من استبعاد ايون الصوديوم من أوراقه العليا مما زاد من تركيزه وأدى إلى تثبيط نمو وانقسام الخلايا والتأثير على جميع العمليات الفسيولوجية الحيوية في الخلايا . وهذا ما أشار إليه Hassan (1989) . أن آلية استبعاد ايون الصوديوم يمكن أن تتم من الأوراق العليا عن طريق تنظيم تركيز ايون الصوديوم المنقول من الجذر إلى الساق ومنها إلى الأوراق بواسطة الأغشية الخلوية ، والحفاظ على امتصاص العناصر الغذائية الأخرى (Rajendran وآخرون، 2009).

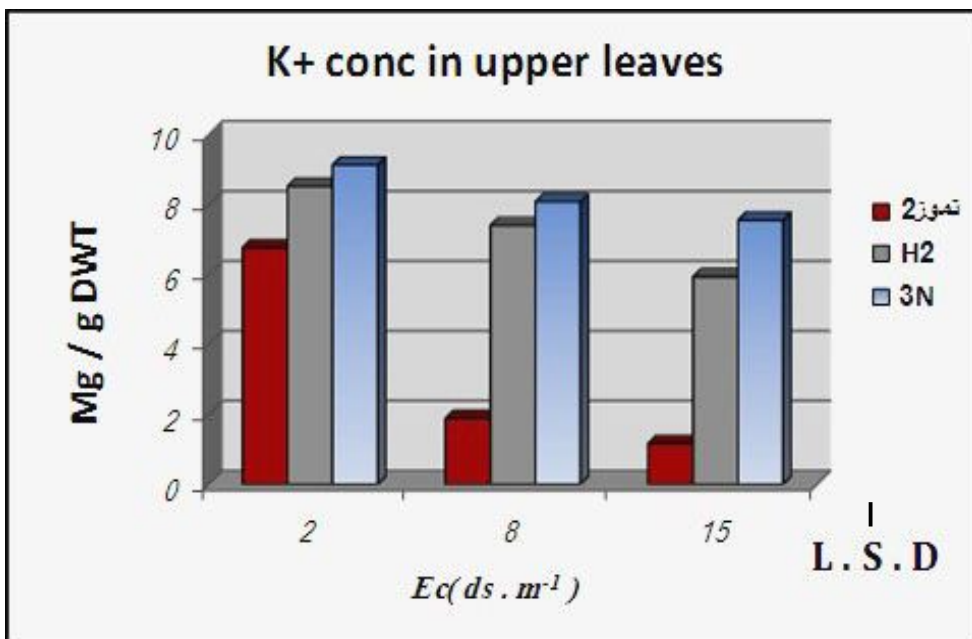
إن هذا التفسير تدعمه نتائج هذه الدراسة إذ إن التركيب الوراثي الذي امتاز بإبعاد كمية اكبر من ايون الصوديوم من أوراقه العليا الشكل (3-5) حقق أعلى تحملا للملوحة بالمقارنة مع التركيب الوراثي 2H الذي حقق اقل تحملا للملوحة نتيجة لإبعاد اقل كمية من ايون الصوديوم . بينما لم يتمكن الصنف تموز2 الحساس للملوحة من استبعاد ايون الصوديوم من أوراقه العليا. فعند النظر إلى نتائج تراكم الأيونات في التراكيب الوراثية المتحملة للملوحة وصنف المقارنة تموز2 الحساس للملوحة يتضح أن هناك اختلافات معنوية فيما بينها بالنسبة لمتوسط تراكيز أيونات العناصر المدروسة في الأوراق العليا . فقد لوحظ أن متوسط تركيز أيون البوتاسيوم قد كان اكبر في التركيبين الوراثيين 2H و N3 المتحملين للملوحة مقارنة بالصنف تموز2 الذي سجل اقل تركيز لايون البوتاسيوم في المستوى الملحي الثالث (15 ديسي سيمنز. م⁻¹) ، وان أعلى تركيز سجله بالنسبة لايون البوتاسيوم التركيب الوراثي (N3) وذلك لخفض تركيز ايون Na^+ في خلايا الأوراق العليا بسبب وجود المنافسة بين ايوني البوتاسيوم والصوديوم على حامل ايون

مشترك بينهما (Ball وآخرون ، 1987) ، أما بالنسبة لأيون الصوديوم فقد سجل التركيب الوراثي (N3) أقل تركيز له بالمقارنة مع الصنف تموز2 الذي سجل أعلى تركيز له في مستوى الملوحة (15 ديسي سيمنز. م⁻¹) ، ومن هذه النتائج نستدل على ان سلوك التراكيب الوراثية في عملية الاستبعاد تختلف بصورة واضحة تبعاً لاستجابة التركيب الوراثي لمستويات الملوحة المختلفة كما تشير الكثير من البحوث إلى وجود علاقة ايجابية بين كمية ايون الصوديوم المستبعدة وصفة تحمل الملوحة (Shannon وآخرون ، 1994 ؛ المشهداني والحديثي ، 2006) .

يتضح من الشكلين (3-5) و (3-6) إلى ان ارتفاع مستوى الملوحة (المستوى الملحي الثاني والثالث) أدى إلى انخفاض معنوي في تركيز ايون البوتاسيوم في الأوراق العليا للصنف تموز2 . بينما التركيبين الوراثيين 2H و N3 حافظا على تركيز عالي من ايون K⁺ في أوراقهما العليا. وارتبط التركيز العالي لهذا الايون في الأوراق العليا لهذين التركيبين الوراثيين مع انخفاض تركيز ايون الصوديوم فيها بسبب حدوث حالة التنافس بين الأيونات (الفقي ، 2010) . وهذا ما أكدته المشهداني وآخرون (2001) ويتضح ان ارتفاع ايون البوتاسيوم في الأوراق العليا للتركيبين الوراثيين 2H و N3 إحدى متطلبات تحمل الملوحة في النبات ، بينما الصنف تموز2 امتاز بأقل محتوى من ايون البوتاسيوم في أوراقه العليا وأكثر حساسية للملوحة الشكل (3-6) يلاحظ وجود ارتباط قوي بين تحمل التراكيب الوراثية للملوحة وتركيز ايون البوتاسيوم في أوراقهما العليا Shannon وآخرون (1994) .



الشكل (3-5) : محتوى الأوراق العليا من عنصر الصوديوم Na⁺ تحت تراكيز مختلفة من الملوحة.

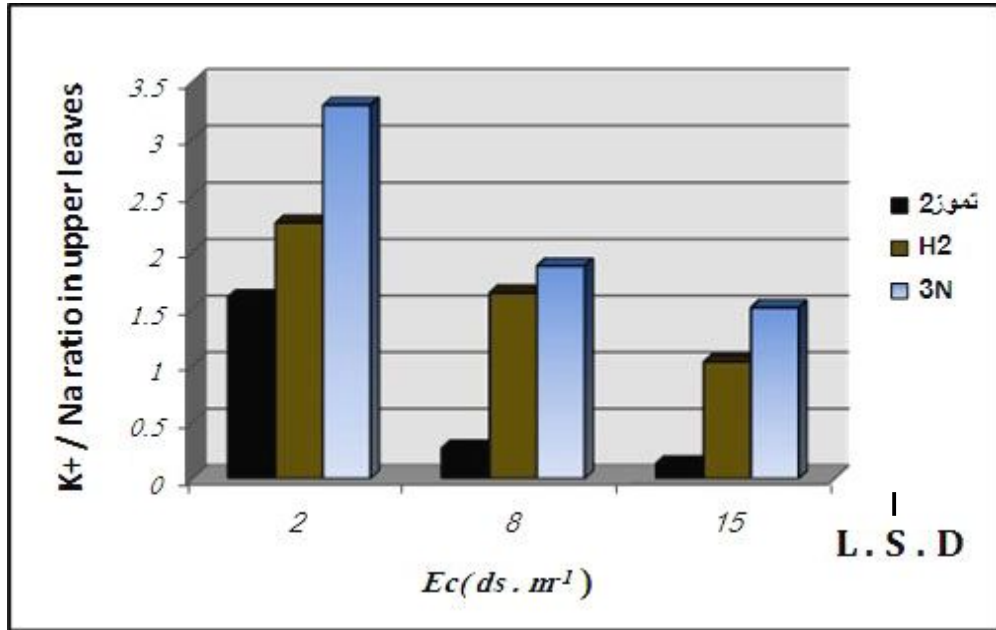


الشكل (3-6) : محتوى الأوراق العليا من عنصر البوتاسيوم K⁺ تحت تراكيز مختلفة من الملوحة.

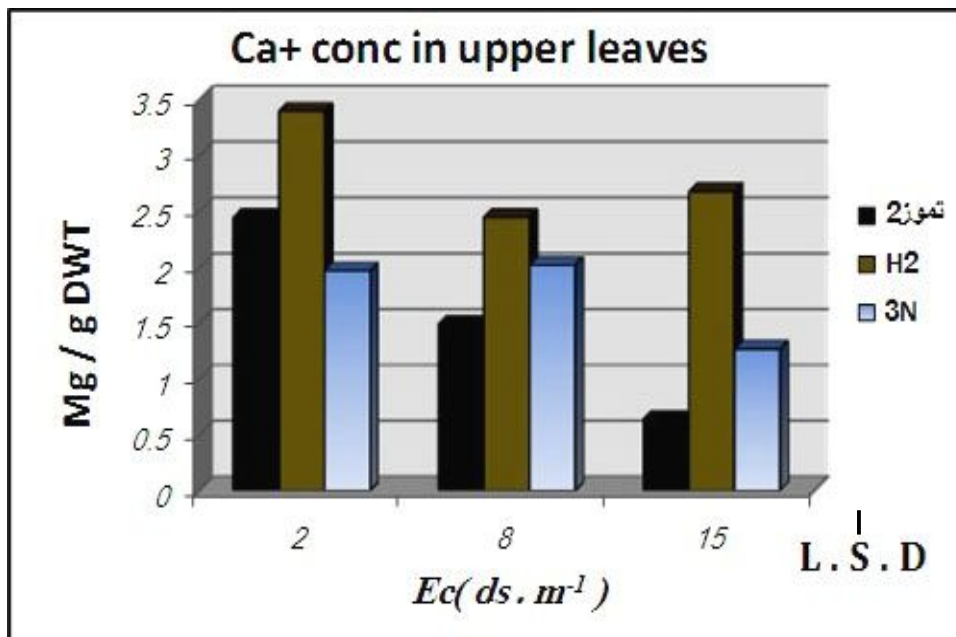
وتشير النتائج في الشكل (3-7) إلى استمرار انخفاض نسبة ايون البوتاسيوم إلى ايون الصوديوم بشكل حاد مع زيادة الملوحة بالنسبة للصنف تموز 2 ، بينما ارتفعت النسبة معنوياً في المستوى الملحي الثالث بالنسبة للتركيبين الوراثيين 2H و N3 كما يلاحظ في هذا المستوى الملحي تفوق التركيبين الوراثيين 2H و N3 معنوياً في نسبة ايون البوتاسيوم إلى ايون الصوديوم على الصنف المحلي تموز 2 حيث ان التركيبين الوراثيين المتحملين للملوحة N3 ، 2H قد حققا نسبة K^+/Na^+ وصلت إلى (1.51 ، 1.03) على التوالي ، وهي أعلى من النسبة التي حققها صنف تموز 2 الحساس للملوحة وبالباغة 0.13 في المستوى الملحي 15 ديسي سيمنز. م⁻¹ ، وكذلك بالنسبة للمستوى الملحي الثاني (8 ديسي سيمنز. م⁻¹) ، إذ كانت نسبة K^+/Na^+ في التركيبين الوراثيين المتحملين 2H و N3 (1.88 ، 1.64) على التوالي ، أما صنف تموز 2 فقد حقق نسبة أقل إذ وصلت إلى 0.27 ، إذ ارتبطت زيادة نسبة البوتاسيوم إلى الصوديوم في الأوراق العليا للتركيب الوراثية مع زيادة درجة تحمل للملوحة وهذا الاستنتاج تدعمه نتائج عدد من الباحثين . فقد وجد الكيار (1998) إن صفة تحمل الملوحة كانت متزامنة مع انخفاض تركيز أيون الصوديوم وزيادة تركيز البوتاسيوم أي زيادة نسبة K^+/Na^+ في الأوراق العليا لنبات الحنطة ، ولاحظ ذلك أيضاً المشهداني وآخرون (2001) و الحلاق (2003) وجود علاقة قوية بين قلة تراكم عنصر الصوديوم في الأوراق و صفة التحمل للملوحة في بعض الأصناف ، فقد وجد أن تركيز الصوديوم في الأوراق العليا كان أقل في التركيب الوراثية المتحملة للملوحة مقارنة بالحساسه للملوحة وان التركيب الوراثية المتحملة للملوحة من الحنطة سجلت نسبة K^+/Na^+ عالية في أوراقها العليا . أما بالنسبة إلى تركيز الكالسيوم فإن ارتفاع الملوحة أدى إلى انخفاض معنوي في تركيز ايون الكالسيوم في الأوراق العليا للصنف تموز 2 بينما حافظ التركيبين الوراثيين 2H و N3 على مستوى ايون الكالسيوم الشكل (3-8) والسبب يتعلق بقابلية التركيب الوراثية في مواصلة امتصاص الايونات المهمة للنبات والدور المهم الذي يؤديه هذا الايون في تنظيم وظائف الخلية وجدارها الخلوي وفي التقليل من فقدان ايون البوتاسيوم من الخلايا نتيجة لزيادة تركيز الايونات الملحية (Gramer وآخرون ، 1985) وهذا ما أكده المشهداني

وآخرون (2001) من خلال دراسة مشابهة على بعض التراكيب الوراثية . من استعراض نتائج هذه الدراسة نستنتج أن صفة تحمل الملوحة المتمثلة في التركيبين الوراثيين 2H و3N يمكن ان تلخص في القدرة على :-

- 1- خفض تركيز ايون الصوديوم في الأوراق العليا نتيجة لامتلاكهما آلية الاستبعاد.
- 2- زيادة تركيز ايون البوتاسيوم في خلايا أوراقهما العليا من خلال استبدال ايون الصوديوم المستبعد بايون البوتاسيوم وإعادة انتقاله من الأوراق السفلى إلى العليا وإحلاله محل ايون الصوديوم المستبعد.
- 3- الحفاظ على مستوى معتدل من تركيز ايون الكالسيوم في الأوراق العليا .



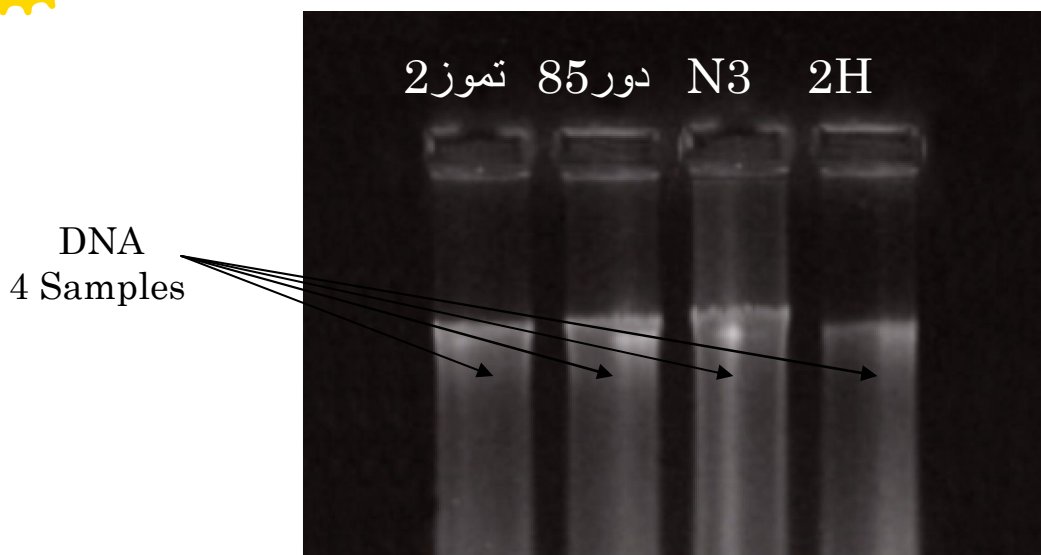
الشكل (7.3) : نسبة K^+/Na^+ من الأوراق العليا تحت ظروف ثلاث تراكيز ملحية.



الشكل (3-8) : محتوى الأوراق العليا من عنصر الكالسيوم Ca^{+} تحت تراكيز مختلفة من الملوحة.

2.3 نتائج عزل DNA

امتازت مختبرات الهندسة الوراثية Genetic Engineering بإمكانية عزل DNA من مختلف الكائنات الحية ولاسيما النباتات والطريقة التي استخدمت في هذه الدراسة تتضمن استخدام طقم الاستخلاص Wizard® Genomic DNA Purification Kit) طريقة مثلى لانجاز هذه الخطوة لما تمتاز به من إمكانية عالية في عزل DNA وبمواصفات عالية نسبياً. إذ تراوحت نقاوة وكمية DNA المستخلص بين 2- 3.5 مايكروغرام لكل 0.072-0.080 غرام من مسحوق البذور اعتماداً على قراءة الامتصاص لطيف الأشعة فوق البنفسجية، وبنوعية جيدة من خلال ترحيل 5 مايكروليتر من DNA على هلام الاكاروز الناتج من إذابة 0.32 غم من الاكاروز في محلول TBE (شكل 3-9).



شكل 3-9: نواتج DNA المعزول من الحنطة لكافة النماذج المدروسة على هلام الاكاروز بتركيز 0.8% (5V/cm , 0.5XTris , borate buffer 2hr -) المصورة تحت الأشعة فوق البنفسجية U.V بعد التصبغ بصبغة برومايد الاثديوم.

وقد تم إعداد التوليفة التي أشير إليها في الفصل الثاني لتطبيق برنامج PCR واختبار البادئات للكشف عن التباين الوراثي بين التراكيب الوراثية 2H و N3 والصنفين المحليين تموز 2 ودور 85 . فأظهرت مؤشرات RAPD نتائج مختلفة وفقاً للبادئات المستخدمة وتم استبعاد البادئ (A13) لعدم مقدرته على إظهار الاختلاف بين التراكيب الوراثية .

1.2.3 نتائج البادئات التي أظهرت حزمًا متباينة العدد والمواقع بين النماذج

Polymorphic bands

تضمنت النتائج سبع بادئات عشوائية حدد من خلالها التباين الوراثي بين عدد من تراكيب الحنطة الوراثية .

وكان لهذه البادئات عدد كلي من الحزم بلغ 82 حزمة، كما اختلفت هذه البادئات في إظهار الحزم المتباينة Polymorphic ومواقعها وكذلك تباينت أوزانها الجزيئية الناتجة على هلام الاكاروز التي عددها 44 لذا شكلت نسبة الاختلاف الوراثي بنسبة (53.7%) من خلال ظهور الحزم المنفردة Unique bands في بعض التراكيب الوراثية

وغيابها في البعض الآخر وبالتالي تحديد البصمة الوراثية لكل تركيب وراثي . أما نسب التشابه الوراثي فقد بلغت (46.3 %) . حصل (Tahir ، 2008) على نتائج مماثلة من خلال دراسة التنوع الوراثي بين أصناف من الحنطة .

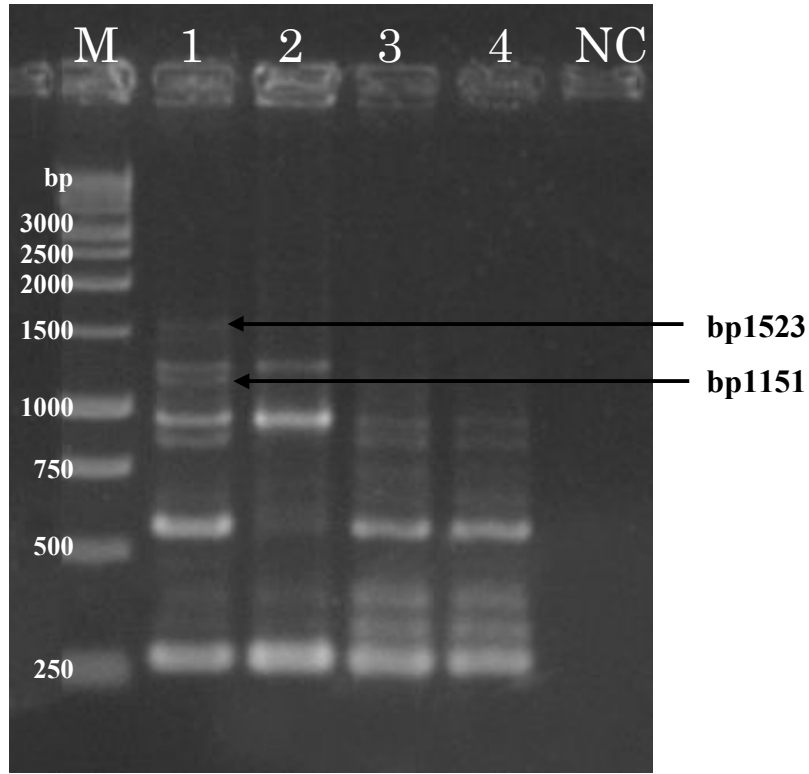
وفي أدناه استعراض لنتائج ومناقشة التغيرات الوراثي في هذه الدراسة :-

A.1.2.3 البادئ OPO-04 :

تراوح عدد الحزم الناتجة عن استخدام هذا البادئ بين 3- 7 لكافة التراكيب الوراثية ، وكان العدد الكلي لحزم هذا البادئ (24) حزمة . تراوح وزنها الجزيئي بين 2042- bp 526 مع حزمة رئيسة واحدة ظهرت في جميع النماذج المدروسة (الشكل 3-10) لذا كانت كفاءته Primer efficiency (8.5%) .

أما الحزم المتباينة فقد بلغت 8 حزم . اظهر الصنف دور85 ثلاث حزم فقط وهي اقل عدد بين البادئات بينما اظهر الصنف تموز2 والتريبيين الوراثيين 2H و N3 سبع حزم تراوحت أوزانها الجزيئية بين 254 – 1523 bp وكان الصنف تموز2 أكثر تباينا بالنسبة للتراكيب الوراثية الأخرى ، إذ ظهرت حزمتين متباينة الأولى بوزن جزيئي 1523 وهي اكبر حزمة لهذا البادئ، في حين بلغ وزن الحزمة الثانية 1151 bp ، كما ميز هذا البادئ الصنف دور85 بغياب عدد من الحزم كان أبرزها حزمة رئيسة ذات وزن جزيئي 784 bp كانت بمثابة مؤشر للتركيب.

أما التريبيين الوراثيين N3 و 2H فقد تميزا بظهور ثلاث حزم بوزن 402 و 332 و 855 bp على التوالي بينما افتقر اليها الصنفان المحليان تموز2 ودور85 . بلغت القوة التمييزية لهذا البادئ (18.2%) (جدول 3-1). يشير ظهور قطع مضاعفة بأوزان جزيئية معينة في تراكيب دون أخرى إلى احتواء جينوم تلك التراكيب على مواقع ارتباط مكمل لنتابع البادئ المستخدم، والعكس صحيح بالنسبة للتراكيب التي تفتقر إلى تلك القطع. وبذا فان وجود تتابعات في جينوم معين وغيابها في آخر هو معيار للتباعد الوراثي بين الجينومين (Kernodle وآخرون ، 1993) .



الشكل (3-10) نواتج تفاعل RAPD-PCR للبادئ OPO-04 لأربعة تراكيب وراثية من الحنطة على هلام الاكاروز Agarose gel electrophoresis بتركيز 1.2% (, 5V/cm , 2hr , U.V بعد التصبيغ borate buffer 0.5XTris -) المصورة تحت الأشعة فوق البنفسجية .
بصبغة بروميد الايثيديوم .

M: الدليل الحجمي 1 Kb ladder . NC : negative control
(1- تموز) (2- دور 85) (3- N3) (4- 2H) .

جدول 3-1: الحزم المتباينة للبادئ OPO-04 مع أوزانها الجزئية .

ت	الوزن الجزئي (زوج قاعدة)	التركيب الوراثية			
		تموز2	دور85	N3	2H
1	1523	1	0	0	0
2	1229	1	1	0	0
3	1151	1	0	0	0
4	943	1	1	1	1
5	849	1	0	1	1
6	855	0	0	1	1
7	553	1	0	1	1
8	402	0	0	1	1
9	332	0	0	1	1
10	254	1	1	1	1

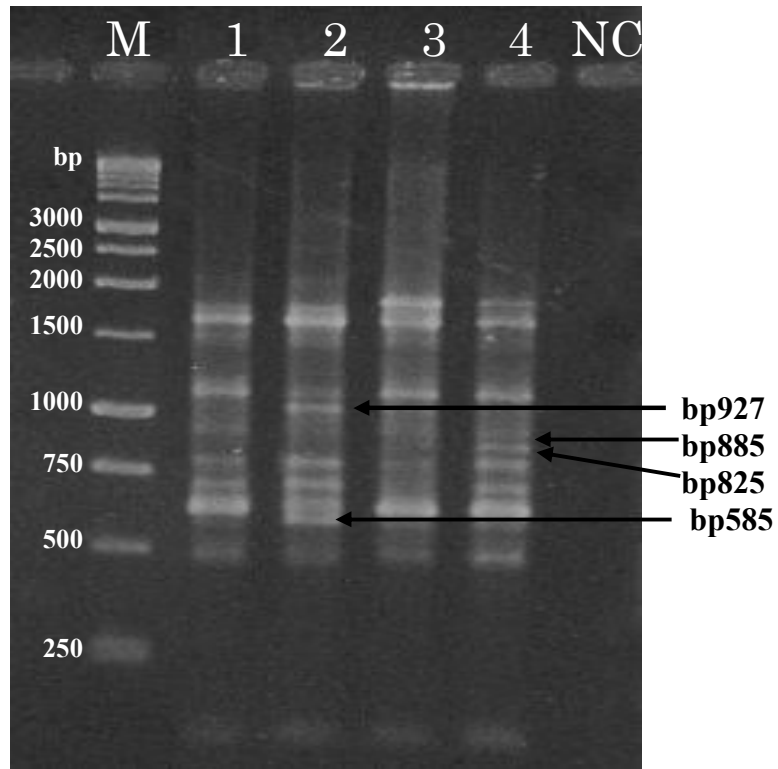
0: الحزم الغائبة absent of band 1: الحزم الموجودة presence of band

Unique bands : الحزم الفريدة (خضراء) Main bands : الحزم الرئيسية (أزرق)

B.1.2.3 البادئ OPI-01:

كان أداء هذا البادئ متميزاً في جميع النماذج المدروسة، إذ أظهر عدداً من الحزم تراوح بين 9 - 12، وبلغ العدد الإجمالي للحزم المتضاعفة 43 (شكل 3-11)، لذا فقد سجل كفاءة عالية نسبياً (14.6%). أما عدد الحزم المتباينة التي لوحظت في هذا البادئ فكانت 10 حزم. بلغ أداها وزنا bp585 في حين بلغ أعلاها bp 1823 كما هو موضح في الجدول (3-2).

أنتج البادئ المذكور حزمة مفردة عند الوزن الجزئي 585 bp كانت بمثابة بصمة أصبع للتركيب الوراثي دور85. كما تميز التركيب الوراثي 2H بحزمتين فريدتين بلغ وزنها الجزئي 825 - 885 bp على التوالي، فيما انفرد تموز2 بحزمة واحدة وزنها الجزئي 927 bp. لوحظ غياب عدد من الحزم الرئيسية إحداها في التركيب الوراثي N3 عند الوزن الجزئي 690 bp والأخرى في التركيب الوراثي 2H وبوزن 484 bp، لذا كانت له مقدرة تمييزية عالية (22.7%).



الشكل (3-11) نواتج تفاعل RAPD-PCR للبادئ OP-I01 لأربعة تراكيب وراثية من الحنطة على هلام الاكاروز Agarose gel electrophoresis بتركيز 1.2% (, 5V/cm , 2hr) المصورة تحت الأشعة فوق البنفسجية U.V بعد التصبيغ بصبغة بوميد الايثيديوم .

M: الدليل الحجمي 1 Kb ladder . NC : negative control
(1-تموز 2) (2-دور 85) (3- N3) (4- 2H) .

الجدول (2-3) الحزم المتباينة للبادئ OPI-01 مع أوزانها الجزئية .

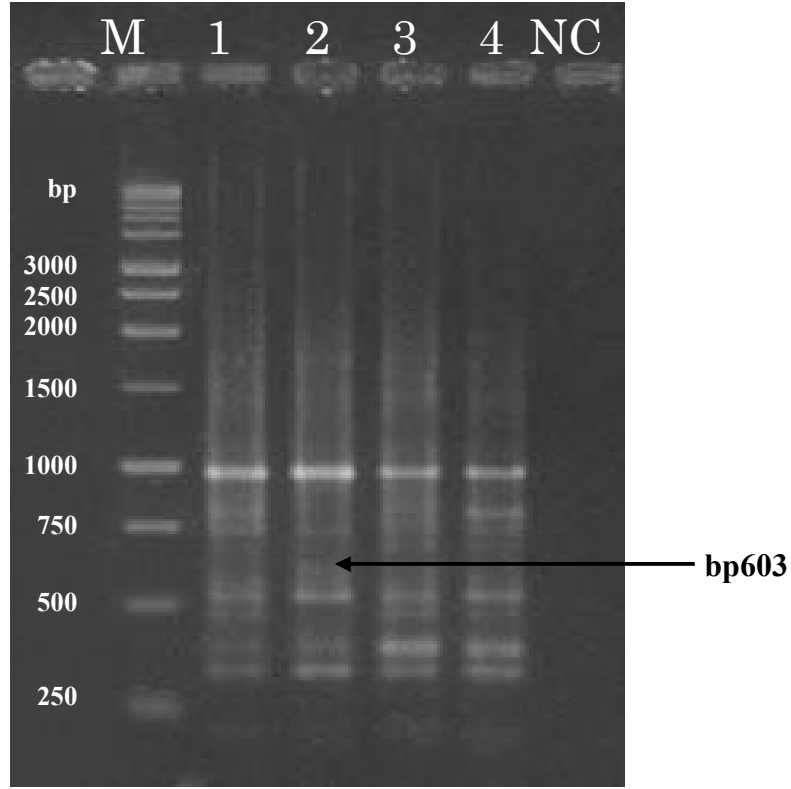
ت	الوزن الجزئي (زوج قاعدة)	التراكيب الوراثية			
		تموز2	دور85	N3	2H
1	1823	0	0	1	1
2	1774	1	1	0	1
3	1608	1	1	1	1
4	1484	1	1	1	0
5	1132	1	1	1	1
6	1090	1	1	0	0
7	1012	0	1	1	0
8	927	1	0	0	0
9	885	0	0	0	1
10	825	0	0	0	1
11	768	1	1	1	1
12	698	1	1	0	1
13	621	1	1	1	1
14	585	0	1	0	0
15	475	1	1	1	1
16	450	1	1	1	1

0: الحزم الغائبة absent of band :1 الحزم الموجودة presence of band

Unique bands الحزم الفريدة Main bands الحزم الرئيسية

C.1.2.3 البادئ OPC-08:

بعد مضاعفة دنا نماذج الحنطة المدروسة باستخدام هذا البادئ ضمن تفاعلات PCR ، أظهرت النتائج وجود عدد من الحزم تراوحت بين 6- 8 حزم، بلغ عددها الكلي 29 حزمة، تراوحت أوزانها الجزئية بين 327- 967 bp (شكل 3-12)، لذا بلغت كفاءته (9.8%) . تباينت أربع حزم في الظهور بين الأصناف والتراكيب الوراثية الأولى كانت بوزن جزئي 603 bp انفرد بها الصنف دور85 وأصبحت له بمثابة مؤشر، وفي الوقت نفسه كان البادئ المذكور فعالاً في تمييز غياب موقعي ارتباط معه نتج عنه غياب حزمتين بوزن جزئي 809 و 479 bp (جدول 3-3). كما اظهر البادئ عدداً من الحزم الرئيسية ، أما مقدرته التمييزية فقد بلغت (9.1%).



الشكل (3-12) نواتج تفاعل RAPD-PCR للبادئ OP-C08 لأربعة تراكيب وراثية من الحنطة على هلام الاكاروز Agarose gel electrophoresis بتركيز 1.2% (, 5V/cm , 2hr , بصبغة بروميد الايثيديوم .
المصورة تحت الاشعة فوق البنفسجية U.V بعد التصبيغ (- borate buffer 0.5XTris

M: الدليل الحجمي 1 Kb ladder . NC : negative control

(1- تموز 2) (2- دور 85) (3- N3) (4- 2H) .

جدول (3-3) الحزم المتباينة للبادئ OPC-08 مع أوزانها الجزئية .

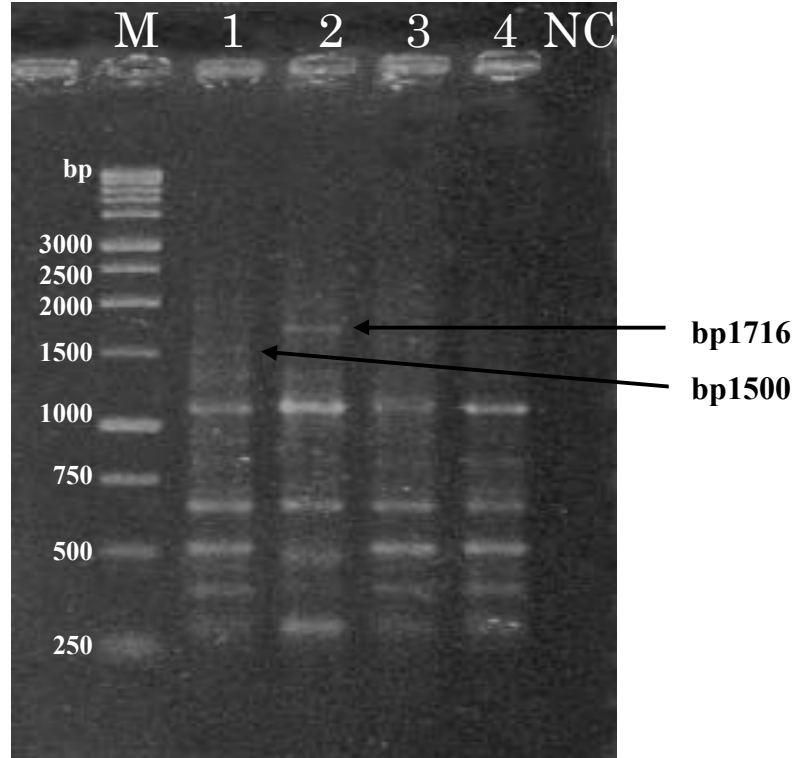
ت	الوزن الجزئي (زوج قاعدة)	التراكيب الوراثية			
		تموز2	دور85	N3	2H
1	967	1	1	1	1
2	809	1	0	1	1
3	750	1	1	1	1
4	677	0	0	1	1
5	603	0	1	0	0
6	521	1	1	1	1
7	479	1	0	1	1
8	382	1	1	1	1
9	327	1	1	1	1

0: الحزم الغائبة absent of band 1: الحزم الموجودة presence of band

Main bands الحزم الرئيسية  Unique bands الحزم الفريدة 

D.1.2.3 البادئ OPN-16 :

تراوح عدد الحزم الناتجة عن استخدام هذا البادئ بين 8- 9 حزمة (شكل 3-13) لذا بلغت كفاءته (12.2%) ، إلا أن التباين بين هذه الحزم قد تمثل بحزمة فريدة بوزن جزئي بلغ 1716 bp ظهرت مع الصنف دور85 مثلت بصمة لهذا الصنف أكدت الاختلاف الحقيقي في البنية الوراثية لهذا الصنف مقارنة مع التراكيب الأخرى. كذلك ميز هذا البادئ الصنف تموز2 بحزمة وزنها الجزئي 1500 bp وبناءً على العدد الكلي للحزم التي أنتجها البادئ المذكور (34 حزمة) بلغت مقدرته التمييزية (4.5%). تميز هذا البادئ بإظهاره 8 مواقع ارتباط رئيسة في التراكيب الوراثية المدروسة جميعها تراوح وزنها الجزئي بين 1114- 296 bp ، وهذا التمييز يمكن ملاحظته في الجدول (3-4)




الشكل (3-13) نواتج تفاعل RAPD-PCR للبادئ OPN-16 لأربعة تراكيب وراثية من الحنطة على هلام الاكاروز Agarose gel electrophoresis بتركيز 1.2% (, 5V/cm , 2hr) مصورة تحت الأشعة فوق البنفسجية U.V بعد التصيغ بصبغة بروميد الايثيديوم .

M: الدليل الحجمي 1 Kb ladder . NC : negative control
(1- تموز 2) (2- دور 85) (3- N3) (4- 2H) .

الجدول (3-4) الحزم المتباينة للبادئ OPN-16 مع أوزانها الجزئية .

ت	الوزن الجزئي (زوج قاعدة)	التراكيب الوراثية			
		تموز2	دور85	N3	2H
1	1716	0	1	0	0
2	1500	1	0	0	0
3	1114	1	1	1	1
4	802	1	1	1	1
5	703	1	1	1	1
6	653	1	1	1	1
7	519	1	1	1	1
8	479	1	1	1	1
9	389	1	1	1	1
10	296	1	1	1	1

0 : الحزم الغائبة absent of band :1 الحزم الموجودة presence of band

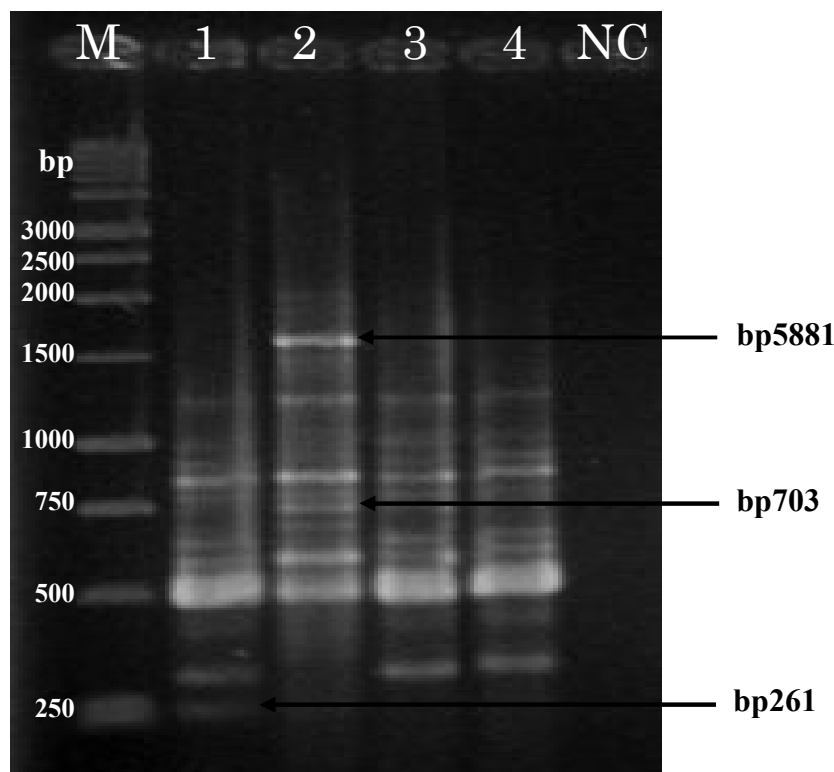
Unique bands الحزم الفريدة  Main bands الحزم الرئيسية 

E.1.2.3 البادئ OPA-07 :

اظهر هذا البادئ عدداً كبيراً نسبياً من الحزم في التراكيب الوراثية جميعها تتراوح بين 9- 12 حزمة ، فيما بلغ العدد الكلي للحزم (38) حزمة. تفاوتت القطع المضاعفة في وزنها الجزئي الذي بلغت أعلى قيمه 1588 bp، فيما بلغت أدنى قيمه 261 bp (شكل 3-14) .

كان من بين الحزم الناتجة ست حزم عامة، لذا بلغت الكفاءة المقدرة للبادئ (14.6%). اظهر البادئ المذكور نمطا مميزا من الحزم المضاعفة في الصنف دور85، إذ انفرد الأخير بحزمتين افتقرت لهما بقية النماذج المدروسة، الأولى بوزن جزئي 1588 bp كانت بمثابة بصمة أصبع مميزة له، والثانية بوزن جزئي 703 bp. كما افتقر الصنف المذكور إلى موقع ارتباط مهم مع البادئ المستخدم أدى إلى غياب حزمة رئيسة عند الوزن الجزئي 337 bp. تميز الصنف تموز2 بحزمة ذات وزن جزئي 261 bp افتقرت لها بقية الأصناف الأخرى وعدت مؤشرا له، أما

المقدرة التمييزية لهذا البادئ فقد بلغت (20.5%) . يبين الجدول (3-5) نتائج تحليل RAPD الخاصة بالبادئ OPA-07 في هذه الدراسة.



الشكل (3-14) نواتج تفاعل RAPD-PCR للبادئ OPA-07 لأربعة تراكيب وراثية من الحنطة على هلام الاكاروز Agarose gel electrophoresis بتركيز 1.2% (, 5V/cm , 2hr , borate buffer 0.5XTris -) وتصور تحت الاشعة فوق البنفسجية U.V بعد التصبغ بصبغة بروميد الايثيديوم .

M: الدليل الحجمي 1 Kb ladder . NC : negative control

(1-تموز) (2- دور 85) (3- N3) (4- 2H) .

الجدول (3- 5) الحزم المتباينة للبادئ OPA-07 مع أوزانها الجزئية .

ت	الوزن الجزئي (زوج قاعدة)	التراكيب الوراثية			
		تموز2	دور85	N3	2H
1	1588	0	1	0	0
2	1250	1	1	1	1
3	1118	0	1	0	0
4	1000	1	1	1	1
5	909	1	1	1	1
6	854	1	1	1	1
7	811	0	1	1	0
8	760	0	1	1	1
9	703	0	0	1	0
10	659	0	0	1	1
11	634	1	0	1	1
12	579	1	1	1	1
13	514	1	1	1	1
14	325	1	0	1	1
15	261	1	0	0	0

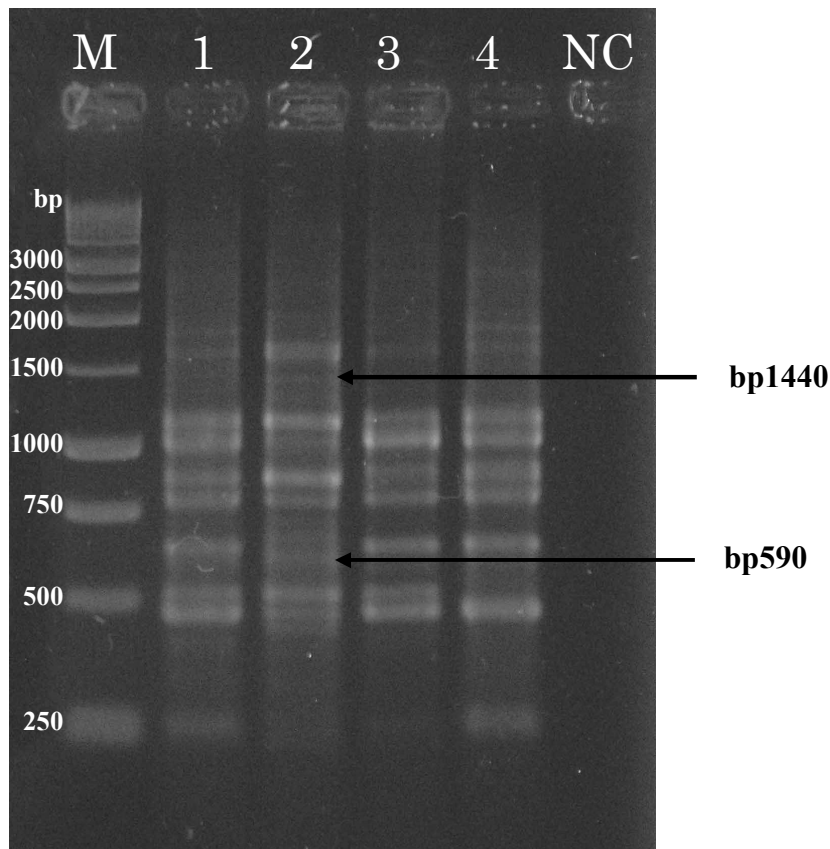
0: الحزم الغائبة absent of band 1: الحزم الموجودة presence of band

Unique bands الحزم الفريدة  Main bands الحزم الرئيسية 

F.1.2.3 البادئ OPG-B8 :

امتلاك البادئ OP-GB كفاءة عالية في التمييز بين التراكيب الوراثية قيد الدراسة. فقد نتج عن استخدام البادئ المذكور ما مجموعه 36 قطعة مضاعفة على هلام الاكروز، كما تراوح عدد القطع المضاعفة في التراكيب الوراثية المدروسة بين 8-10 قطعة (الشكل 3-15) . بلغ أعلى قيمة للوزن الجزئي للقطع المضاعفة 1835 بينما مثلت bp250 اقل لوزن الجزئي للقطع نفسها . لذا بلغت كفاءة البادئ المقدره (12.2%) . نتج عن استخدام البادئ أنماطا مختلفة من الحزم المضاعفة كانت مميزة لبعض التراكيب الوراثية دون الأخرى ، كما موضح في الجدول (3-6) . تميز الصنف دور85 بوجود حزمتين الأولى بوزن جزئي 1440 bp التي كانت بمثابة مؤشر لهذا الصنف، أما الثانية فقد كانت بوزن 590 bp . إن غياب الحزم الرئيسية ذات الـ الوزن الجزئي 1032 bp و 509 bp في الصنف دور85 والتراكيب الوراثي N3 هو ناتج

عن افتقار جينوم تلك التراكيب لمواقع الارتباط مع البادئ المستخدم، وهذا مؤشر لاختلاف تتابع النكليوتيدات في تلك الجينومات. لذا توصف مثل تلك التراكيب بأنها متباينة وراثيا Genetically varied، وإذا ما زادت شدة التباين وصفت بأنها متباينة وراثيا Genetically diverse وهذه العملية ضرورية في تحديد الصلات الوراثية بين التراكيب الوراثية ومكانها في برامج إنتاج الهجن المتفوقة. بلغت المقدرة التمييزية لهذا البادئ (15.9%).



الشكل (3-15) نواتج تفاعل RAPD-PCR للبادئ OPG-B8 لأربعة تراكيب وراثية من الحنطة على هلام الاكاروز Agarose gel electrophoresis بتركيز 1.2% (2hr , 5V/cm ,) U.V بعد التصبيغ (- borate buffer 0.5XTris المصورة تحت الأشعة فوق البنفسجية) بصبغة بروميد الايثيديوم .

M: الدليل الحجمي 1 Kb ladder . NC : negative control

(1- تموز 2) (2- دور 85) (3- N3) (4- 2H) .

الجدول (3-6) الحزم المتباينة للبادئ OPG-B8 مع أوزانها الجزئية .

ت	الوزن الجزئي (زوج قاعدة)	التراكيب الوراثية			
		تموز2	دور85	N3	2H
1	1835	1	0	0	1
2	1700	1	1	1	1
3	1440	0	1	0	0
4	1189	1	1	1	1
5	1032	1	0	1	1
6	904	1	1	1	1
7	787	1	1	1	1
8	639	1	0	1	1
9	590	0	1	0	0
10	509	1	1	1	0
11	475	1	1	1	1
12	250	1	0	0	1

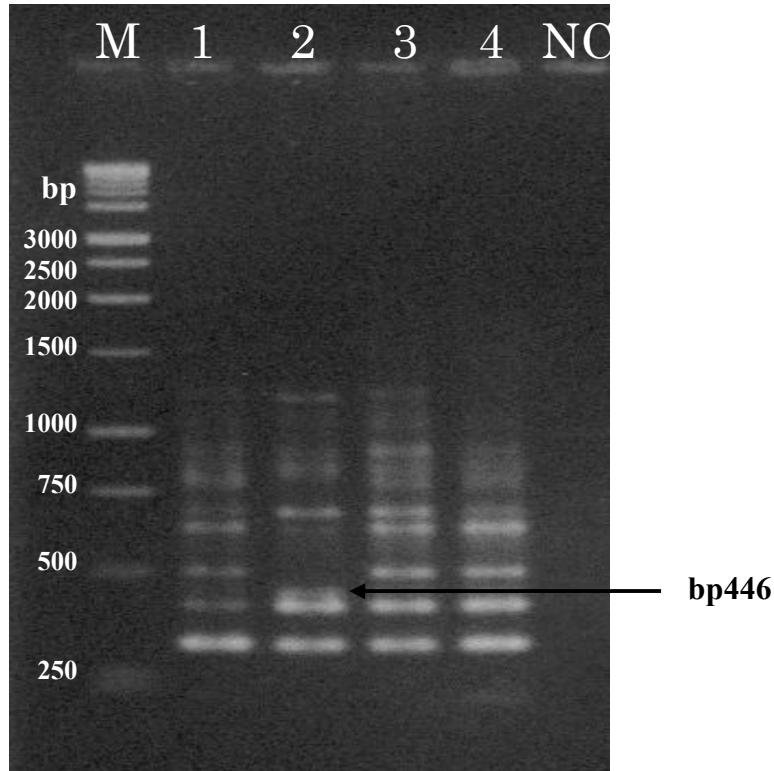
الحزم الغائبة absent of band : 0 الحزم الموجودة presence of band

الحزم الرئيسية Main bands  الحزم الفريدة Unique bands 

G.1.2.3 البادئ OPB-10 :

أعطى البادئ من خلال تفاعل PCR نتائج متباينة فيما بين التراكيب الوراثية . إذ تراوح عدد القطع المضاعفة بين 8-9 حزمة (جدول 3-7) ، وبلغ العدد الكلي للقطع المضاعفة في جينومات التراكيب الوراثية المدروسة 34 قطعة. تراوح الوزن الجزئي لتلك القطع بين 311 - bp1194 مسجلا كفاءة بلغت (10.1%) (شكل 3-16). ميز البادئ الصنف دور85 بحزم فريدة عند الوزن الجزئي 446 bp فيما افتقرت لها بقية التراكيب الوراثية ، كما إن غياب الحزمتين 505 و 791 bp في الصنف المذكور اثبت حجم التباعد الوراثي الذي ظهر به هذا الصنف مقارنة ببقية التراكيب. كان البادئ مميزاً أيضاً للتركيب الوراثي N3 من خلال غياب حزمة عند الوزن الجزئي 1194 bp لتكون مؤشراً له، وبذا فإن المقدرة التمييزية لهذا البادئ قد بلغت (9.1%) . إن اختلاف التراكيب الوراثية في النمط الذي تتوزع به القطع المتضاعفة ربما يعود إلى اختلاف القاعدة الوراثية التي انحدرت منها تلك التراكيب أو أنها

انحدرت من مجتمعات بعد تعرضها لضغط انتخابي شديد، هذا إذا استبعدنا الطفرات الوراثية التلقائية لانخفاض تكرار حدوثها.



الشكل (3-16) نواتج تفاعل RAPD-PCR للبادئ OPB-10 لأربعة تراكيب وراثية من الحنطة على هلام الاكاروز Agarose gel electrophoresis بتركيز 1.2% (, 5V/cm , 2hr) المصورة تحت الاشعة فوق البنفسجية U.V بعد التصيغ بصبغة بروميد الايثيديوم .

M: الدليل الحجمي 1 Kb ladder . NC : negative control

(1-تموز 2) (2- دور 85) (3- N3) (4- 2H) .

الجدول (3-7) الحزم المتباينة للبادئ OPB-10 مع أوزانها الجزيئية .

ت	الوزن الجزيئي (زوج قاعدة)	التراكيب الوراثية			
		تموز2	دور85	N3	2H
1	1194	1	1	1	0
2	915	1	1	1	1
3	841	1	1	1	1
4	791	1	0	1	1
5	664	1	1	1	1
6	630	1	1	1	1
7	505	1	0	1	1
8	446	0	1	0	0
9	424	1	1	1	1
10	311	1	1	1	1

0: الحزم الغائبة absent of band :1 الحزم الموجودة presence of band

الحزم الرئيسية Main bands  الحزم الفريدة Unique bands 

لذا من بين ثمانية بادئات تم استبعاد البادئ (A13) الذي لم فشل في مضاعفة الحامض النووي DNA في جميع التراكيب الوراثية المدروسة ، بسبب عدم وجود منطقة ارتباط مكملة لتتابع القواعد النيروجينية لهذا البادئ ضمن جينوم التراكيب الوراثية المدروسة (Devos و Gale ، 1992) . أما البادئات الأخرى فقد تفاوتت كثيرا في مقدرتها على الكشف عن حجم التغيرات الوراثي الموجود بين النماذج المدروسة ، إذ أنتجت بعض البادئات عدد كبير من الحزم ، في حين أنتج البعض الآخر عددا اقل .

تبين من خلال تفاعل RAPD-PCR إن البادئات السبعة قد أنتجت ما مجموعه (82) حزمة مضاعفة عبر النماذج الأربعة المختلفة من DNA (جدول 3-8). كان من بين الحزم الناتجة 38 حزمة صنفت على إنها رئيسية لدى ظهورها في جميع التراكيب الوراثية المدروسة وبنسبة مئوية بلغت 46.3% . أما الحزم المتباينة Polymorphic التي يعول عليها كثيرا في تحديد الصلة الوراثية بين التراكيب المدروسة فقد بلغ عددها (44) وكانت النسبة المئوية لها 53.7% وهي أعلى نسبة مقارنة مع بقية المجاميع .

تراوح عدد الحزم المتباينة بين الأنواع الوراثية بين 2-10 وهذه النسبة من الاختلاف الوراثي بين التراكيب الوراثية كانت مشابهة للنتائج التي حصل عليها Awaad وآخرون (2010) من خلال الدراسة التي أجراها على بعض التراكيب الوراثية المحتملة للملوحة من الحنطة . وقد أعطى البادئ OP-I01 العدد الأكبر من الحزم المتباينة بنسبة 22.7%، فيما أعطى البادئ OP-N16 اقل عدد من الحزم المتباينة. وبلغ المعدل العام للحزم المتباينة 6.3 حزمة لكل هذا المعدل من التباين نتائج مماثلة لما حصل عليها Rashed وآخرون (2008) بان الاختلاف الوراثي بين عشرة تراكيب وراثية من الحنطة المحتملة للملوحة.

إن هذا التفاوت في النسبة المئوية للحزم المتباينة قد يعود إلى اختلاف ترتيب القواعد النيتروجينية في جينوم التراكيب الوراثية التي تتأثر بالأصل الوراثي (منطقة النشوء) الذي انحدرت منه التراكيب الوراثية المدروسة أو السبب الثاني الذي يعود إلى الاختلاف في تصميم البادئات المستخدمة في تفاعل RAPD-PCR بوصفه شائعاً جداً ضمن الجينوم المستهدف أم لا (Ali ، 2003) وان هذا التباين الوراثي لا يمكن عده مؤشراً قطعياً ، خاصة لدى استخدام مؤشرات RAPD التي تعتمد على تتابعات عشوائية قصيرة (البادئ) ضمن جينوم هائل الحجم ، وبذا يمكن ان يكون التباين الوراثي اكبر بين التراكيب الوراثية المدروسة ضمن تتابعات أخرى من غير تلك التي تستهدفها البادئات (الجدول 3-8).

الجدول (8-3) نواتج البادئات من الحزم مع نسبة كفاءتها وقدرتها التمييزية .

المقدرة التمييزية	الكفاءة efficiency	Polymorphsim %	Polymorphic	معدل الحزم	البادئ
18.2	8.5	80	8	10	OPO-04
20.5	14.6	60	9	15	OPA-07
4.5	12.2	20	2	10	OPN-16
9.1	9.8	44	4	9	OPC-08
15.9	12.2	58	7	12	OPGB-8
9.1	10.1	40	4	10	OPB-10
22.7	14.6	63	10	16	OPI-01
_____			43	82	المجموع

كذلك تباينت نتائج Polymorphsim لكل بادئ وتراوحت النسبة المئوية بين 20-80% (الجدول 8-3) وكانت أعلى نسبة مئوية من Polymorphism أنتجها البادئ O4 الذي يمتلك 24 حزمة مقارنةً بالبادئ N16 الذي أنتج اقل نسبة مئوية بسبب وجود مواقع ارتباط مختلفة لهذا البادئ OPO-04 أكثر من البادئ OPN-16 ضمن جينوم التراكيب الوراثية (Rahman وآخرون 2004 ؛ Kernodle وآخرون ، 1993) ، وهذا يعني امتلاك بعض البادئات مقدرة عالية على الكشف عن التغيرات فيما بين التراكيب الوراثية ، في حين افتقر بعضها الآخر لتلك المقدرة .

كما أن الأوزان الجزيئية للحزم المتضاعفة الناتجة عن استخدام البادئات المختلفة ، تباينت في الحجم بين 45 bp - 2042 bp والعدد في جميع التراكيب الوراثية . اعتمد التمييز بين التراكيب الوراثية إما على غياب الحزم العامة أو ظهور الحزم المميزة . تبين

من خلال نتائج تفاعل PCR إن الصنف دور85 قد اظهر نمطا مميزا من الحزم المتضاعفة في البادئات OPG8-8 (bp 1440) و (bp 590) ومن اهم الحزم التي تمثل بصمة وراثية لهذا الصنف هي (bp 446) OPB-10 و (bp 603) OPC-08 ، كما كان سلوك الصنف تموز2 مماثلا ولكن في بادئات أخرى، مثل OPO-04 (bp 2042) و (bp 1774) وان ظهور مثل هذه الحزم في الأصناف الحساسة للملوحة تعد مؤشرات سلبية لصفة التحمل أما الحزم التي ظهرت في كل من التركيب الوراثي 2H وهي (bp 885) و (bp 825) على التوالي في البادئ OPI-01 والتركيب N3 (bp 703) باستخدام البادئ OPA-07 بمثابة مؤشرات ايجابية قد تكون مسؤولة عن تكيف النبات لصفة تحمل الملوحة وهذه البادئات مهمة لمعرفة بصمة DNA لهذه التراكيب الوراثية (Afiah وآخرون ، 2007)،(جدول 3-9).

أكد الفحص البصري لجل الاكاروز أن هناك تقاربًا ملحوظًا بين التراكيب الوراثية الحساسة مع وجود اختلاف كبير بينها وبين الأصناف المتحملة بسبب احتواء الأصناف على عدد كبير من الحزم المتشابهة في موقعها على جينوم النواة أما التباين الوراثي بين التراكيب الوراثية 2H و N3 كان سببه اختلاف عدد ومواقع الحزم التي ظهرت ضمن جينوم التراكيب الوراثية المدروسة (Plaschke وآخرون ، 1995) . إن وجود التقارب الوراثي فيه إشارة إلى انحدار تلك الأصناف من أصل وراثي واحد، كما يشير إلى فعالية برنامج التربية في إحداث تغاير ملحوظ على مستوى DNA في النباتات المتحملة للملوحة، الذي انعكس بدوره على الفعاليات الفسيولوجية وبالتالي الأداء العام لتلك النباتات (Awaad وآخرون ، 2010) . وان تحديد هذه الصلات الوراثية عن طريق المعلمات الوراثية اكسبها أهمية كبيرة في تحديد درجة التشابه والتباين الوراثي بين التراكيب الوراثية المختلفة نتيجة للكشف عن جزء من جينومها باستخدام تقنية جزيئية واخذ البصمات الوراثية لهذه التراكيب الوراثية (Plaschke و Roder ، 1995) ، والذي من شأنه المساعدة في وضع برنامج التربية الملائم لتطوير المقدر الإنتاجية لتلك التراكيب وبالالاتجاه المرغوب. لذا فان معلمات RAPD فعالة في التحديد السريع والمبكر

للأفراد الأكثر تباينا في محتواها الوراثي الموجودة ضمن مجتمعات كبيرة ، وبذا فإنها تساهم في تحديد موقعها في برامج التربية (James و Peter ، 2000) .

الجدول (3-9) البادئات التي ميزت الأصناف والخطوط الوراثية المدروسة مع الوزن الجزيئي.

الوزن الجزيئي للحزم المميزة Molecular weight of unique bands		البادئ Primer	اسم النوع Variety name
الغائبة	الظاهرة		
	1523	OPO-04	تموز2
	1151	OPO-04	
1224		OPO-04	
	261	OPA-07	
	1500	OPN-16	
	927	OPI-01	
	585	OPI-01	دور85
	603	OPC-08	
	1716	OPN-16	
	1588	OPA-07	
325		OPA-07	
	1440	OPG-B8	
	590	OPG-B8	
	446	OPB-10	
505		OPB-10	
	703	OPA-07	N3
	885	OPI-01	2H
	825	OPI-01	
509		OPG-B8	

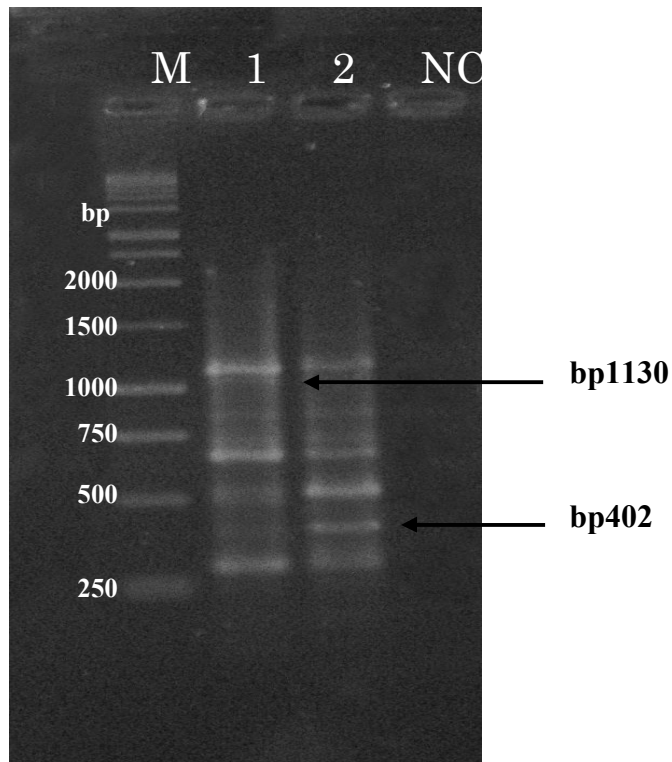
3.3 نتائج تجارب مؤشرات Bulk segregate analysis

يهدف هذا الاختبار إلى محاولة عزل المؤشرات الجزيئية والربط بينها وبين صفة تحمل الملوحة في بعض التراكيب الوراثية من الحنطة ، ولهذا استخدمت في هذه الدراسة ثلاث بادئات وهي OPC-08 , OPO-04 , OPN-16 وقد كانت كفاءة في التعرف على التغيرات الوراثي ضمن جينوم النواة للتراكيب الوراثية 2H و N3 والأصناف المحلية تموز2 ودور85 من خلال تقسيم النباتات إلى مجموعتين الأولى تضم التراكيب الوراثية المنتخبة لصفة تحمل للملوحة (2H و N3) ، والمجموعة الثانية تضم الأصناف الحساسة للملوحة (تموز2 ودور85) ، نتيجة ظهور وانعزال بعض المؤشرات في جينوم التراكيب الوراثية وغيابه في البعض الآخر ، وهذه المؤشرات الجزيئية قد تكون مرتبطة بجينات تحمل الملوحة في التراكيب الوراثية (El-Kadi وآخرون ، 2005) . لاحظ ذلك أيضا Rahman وآخرون (2004) وجود تباين وراثي بين التراكيب الوراثية المنتخبة لصفة تحمل الملوحة والأصناف الحساسة للملوحة بسبب انعزال بعض المؤشرات الجزيئية باستخدام تقنية BSA-PCR . وقد تم تحليل المجاميع المعزولة وتقدير التباين الوراثي بين التراكيب الوراثية 2H و N3 و الأصناف المحلية الحساسة للملوحة لكل بادئ كما يلي :-

A.3.3 البادئ OPN-16 :

اظهر هذا البادئ 16 حزمة معزولة سبع منها متشابهة Monomorphic في كلا المجموعتين (شكل 3-17) وبمعدل 8 حزم لكل مجموعة (جدول 3-10). تراوح الوزن الجزيئي للحزم المعزولة باستخدام البادئ المذكور بين 304-1150 bp . كانت الحزمة ذات الوزن الجزيئي 1130 bp مميزة للأصناف المحلية تموز2 ودور85 وهي بمثابة مؤشر سلبي لهما بسبب غيابها في التراكيب الوراثية ، كما يلاحظ انعزال حزمة عند الوزن الجزيئي 402 bp يمكن تمييزها بسهولة في التركيبين الوراثيين 2H و N3 وهذه الحزمة مؤشر جزيئي ايجابي ومهم قد تكون مسؤولة عن تطور آلية تحمل الملوحة

في هذه التراكيب الوراثية. أما وجود الحزم الرئيسية Monomorphic بهذا العدد يدل على وجود تقارب وراثي كبير. نتائج مماثلة حصل عليه الباحث Afiah وآخرون (2007) في دراسة أجراها على بعض التراكيب الوراثية المنتخبة لصفة تحمل الملوحة في نبات الحنطة .



الشكل (3-17) نواتج تفاعل BSA-PCR للبادئ OPN-16 لكافة النماذج المدروسة على هلام الاكاروز Agarose gel electrophoresis بتركيز 1.2% (, 5V/cm , 2hr)
U.V بعد التصبيغ (- borate buffer 0.5XTris) الصورة تحت الاشعة فوق البنفسجية
بصبغة بروميد الايثيديوم .

M: الدليل الحجمي 1 Kb ladder . NC : negative control
(حساسة للملوحة - تموز 2 - دور 85) (متحملة للملوحة - N3 - 2H) .

الجدول (3-10) الحزم المعزولة مع أوزانها الجزيئية للبادئ OPN-16

ت	الوزن الجزيئي (زوج قاعدة)	التراكيب الوراثية	
		حساسة	متحملة
1	1150	1	1
2	1130	1	0
3	1045	1	1
4	840	1	1
5	712	1	1
6	654	1	1
7	522	1	1
8	402	0	1
9	304	1	1

0: الحزم الغائبة absent of band 1: الحزم الموجودة presence of bands

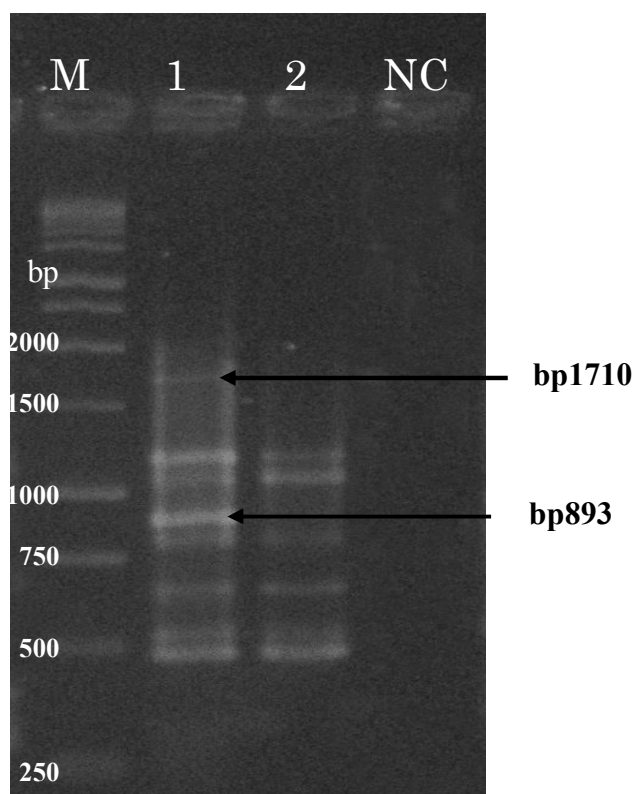
الحزم الرئيسية Main bands الحزم الفريدة Unique bands

B.3.3 البادئ OPO-04 :

أظهرت نتائج هذا البادئ تبايناً واضحاً في عدد ومواقع الحزم المضاعفة والمعزولة بين النماذج المدروسة، إذ بلغ عدد الحزم (14) حزمة ، ثمان حزم للتراكيب الوراثية المتحملة وست للتراكيب الوراثية الحساسة (شكل 3-18).

وقد لوحظ انعزال حزمتين مختلفتين في الوزن الجزيئي (bp 893 و bp1710) والموقع ضمن الجينوم للمجموعة التي تضم الأصناف الحساسة للملوحة وغيابها في المجموعة التي تضم التراكيب الوراثية المتحملة للملوحة ، مما يدل على وجود تشابه وراثي كبير بين التراكيب الوراثية بسبب غيابها في نفس مستوى الجينوم وهذا ينعكس على قدرة التحمل للملوحة التي ظهرت شبه متساوية في الدراسة الفسيولوجية وبذا أصبحت مؤشرا في لتلك التراكيب (Afiah وآخرون ، 2007). أما الحزم الرئيسية Monomorphic فقد بلغ عددها ست مجاميع في التراكيب الوراثية (الجدول 3-11) اما التباين الوراثي بين المجموعتين ناتج من التهجين وإكساب هذه التراكيب الوراثية 2H و N3 صفة تحمل الملوحة من خلال برنامج التربية والانتخاب وهو تطور ايجابي

حققه هذا البرنامج . هذا يتفق مع ما أشار إليه Amin (2008) إلى جود تباين وراثي ضمن جينوم بعض التراكيب الوراثية المنتخبة من الحنطة من خلال الكشف والتعرف على عدد ومواقع هذا التباين باستخدام تقنية BSA-PCR ، وان هذا التباين يمكن أن يكون سبب لتحسن صفة تحمل الملوحة وهذا يمكن مربي نبات الحنطة من الاسترشاد بهذه التقنية لتقليل مدة البرامج الأخرى بدقة و اقل كلفة .



الشكل (3-18) نواتج تفاعل BSA-PCR للبادئ OPO-04 لكافة النماذج المدروسة على هلام الاكاروز Agarose gel electrophoresis بتركيز 1.2% (, 5V/cm , 2hr) مصورة تحت الأشعة فوق البنفسجية U.V بعد التصبيغ بصبغة بروميد الايثيديوم .



M: الدليل الحجمي 1 Kb ladder . NC : negative control

(حساسة للملوحة - تموز 2 - دور 85) (متحملة للملوحة - N3 - 2H) .

الجدول (3-11) الحزم المعزولة مع أوزانها الجزيئية للبادئ OPO-04

ت	الوزن الجزيئي (زوج قاعدة)	التراكيب الوراثية	
		حساسة	متحملة
1	1710	1	0
2	1152	1	1
3	1057	1	1
4	893	1	0
5	830	1	1
6	684	1	1
7	531	1	1
8	485	1	1

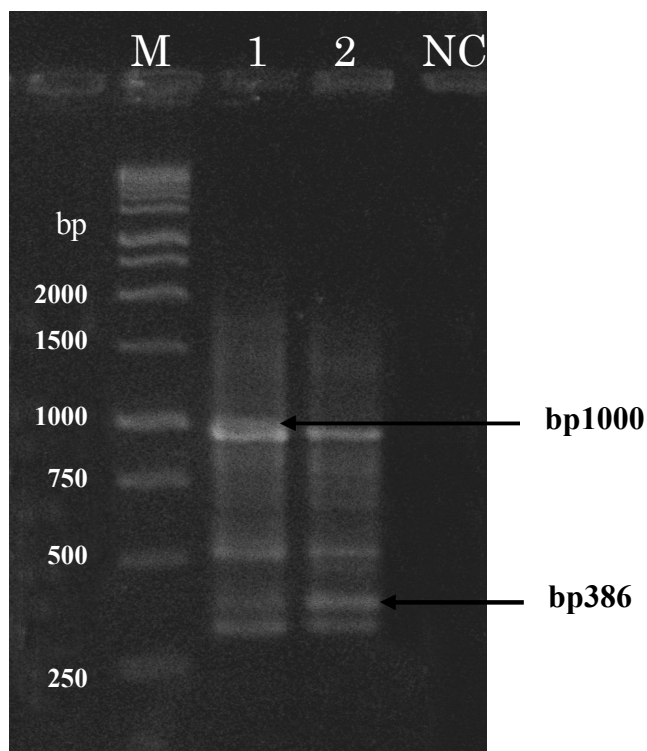
0 : الحزم الغائبة absent of band :1 الحزم الموجودة presence of band

الحزم الرئيسية Main bands  الحزم الفريدة Unique bands 

C.3.3 البادئ OPC-08:

أعطى هذا البادئ اقل عدد من المؤشرات المعزولة مقارنة بالبادئ الآخرين (جدول 3-12)، وتراوح الوزن الجزيئي للقطع المضاعفة بين 334-1000 bp وبواقع خمس حزم لكل مجموعة. تميز هذا البادئ بإظهار حزمة فريدة في التراكيب الوراثية الحساسة بوزن جزيئي 1000bp، فيما لوحظ غيابها في بقية التراكيب الوراثية، وفي الوقت نفسه امتلك البادئ المذكور مقدرة جيدة على التمييز بين النماذج المدروسة من خلال الكشف وعزل حزمة مميزة عند الوزن الجزيئي 386 bp (شكل 3-19)، إن وجود مثل هذه المؤشرات التي تعبر عن جزء من جينوم نواة التراكيب الوراثية مهمة جدا قد تعبر عن صفة تحمل الملوحة في التراكيب الوراثية تم اكتسابها عن طريق التضريب والانتخاب، وهذا ما أكدته نتائج الدراسة الفسيولوجية ومعدل الوزن الجاف والطري للمجموع الخضري والجذري إلى وجود زيادة في قابلية تحمل الملوحة في التراكيب الوراثية 2H و N3. ويرى بعض الباحثين أن هناك جينات مسؤولة عن هذا التغير الفسلجي الذي ساعد النبات على تحمل الملوحة والنمو في الظروف الملحية تنتقل من الآباء عن طريق

التضريب والانتخاب وهي مرتبطة بإعادة تنظيم امتصاص أيون K^+ ومنع تراكم الأيونات الضارة للنبات الذي يشجع النمو الخضري (Maas وآخرون ، 1996).



الشكل (3-18) نواتج تفاعل BSA-PCR للبادئ OPC-08 لكافة النماذج المدروسة على هلام الاكاروز Agarose gel electrophoresis بتركيز 1.2% (, 5V/cm , 2hr) المصورة تحت الأشعة فوق البنفسجية U.V بعد التصبيغ بصبغة بروميد الايثيديوم .

M: الدليل الحجمي 1 Kb ladder . NC : negative control

(حساسة للملوحة - تموز 2 - دور 85) (متحملة للملوحة - 2H - N3) .

الجدول (3-12) الحزم المتباينة الظهور مع أوزانها الجزيئية للبادئ OPC-08

ت	الوزن الجزيئي (زوج قاعدة)	التراكيب الوراثية	
		حساسة	متحملة
1	1000	1	0
2	926	1	1
3	548	1	1
4	515	1	1
5	386	0	1
6	334	1	1

0 : الحزم الغائبة absent of band 1 : الحزم الموجودة presence of band

الحزم الرئيسية Main bands  الحزم الفريدة Unique bands 

إن مما لا شك فيه أن هناك حاجة متنامية إلى إنتاج أصناف من المحاصيل يمكنها النمو وإعطاء محصول جيد في ترب ذات مستويات ملحية عالية ، خصوصاً في المناطق التي تعاني من تدهور في صفات الحقول المعدة للزراعة ، والأخيرة تشكل نسبة كبيرة من أراضي المناطق الجافة وشبه الجافة التي تنتمي إليها حقولنا .

لذا تطلب الأمر البحث عن مصادر وراثية جديدة تمتلك صفة التحمل للملوحة ، والعمل على نقل الجينات المسؤولة عن إظهار صفة التحمل إلى المحاصيل الاقتصادية باستخدام طرائق التربية التقليدية وهذه النتائج تبين مدى نجاح تحسين هذه الصفة في التراكيب الوراثية 2H و N3 المنتخبة بالنسبة لمعدل النمو وكذلك ظهور مؤشرات جزيئية جديدة ضمن الجينوم لهذه التراكيب الوراثية تفتقر إليها الأصناف المحلية الحساسة للملوحة (Munns وآخرون ، 2002) . تم الكشف عنها باستخدام طريقة BSA-RAPD لاختبار صفة تحمل الملوحة في التراكيب وراثية.

وقد أنتجت البادئات المستخدمة (OPC-08 , OPO-04 , OPN-16) ، 9 و 8 و 6 حزم على التوالي، وبلغت نسبة التشابه الوراثي المقدر 73.9 % ، وبذا فإن باقي النسبة البالغ 26.1 % يمثل التباين الوراثي (Rashed وآخرون ، 2008) . وكان البادئ OPO-04 أكثرها كفاءة في الكشف عن التباين بين التراكيب الوراثية المتحملة والحساسة للملوحة من خلال انعزال الحزم التي قد تكون جزء من الجينات المسؤولة عن

صفة التحمل ، إذ ظهرت حزمتين بوزن جزيئي bp1710 و bp893 في الأصناف المحلية في حين غابت في التراكيب الوراثية المحتملة ، قد يعود عدم ظهور هذه المؤشرات في التراكيب الوراثية إلى عدم تطور هذه الأصناف أو حدوث طفرات غير ايجابية بسبب التشعيع مما يجعلها حساسة للملوحة (Afiah ، 2007) . وفي الوقت نفسه فإن المؤشرات الجزيئية التي ظهرت في الخطوط الوراثية ولم تظهر في الأصناف يمكن أن تكون مرتبطة بالجينات المسؤولة عن تحمل الملوحة انتقلت عن طريق التضريب إلى التراكيب الوراثية . إذ استطاع Ding وآخرون (2000) من تحديد الجين المسؤول عن تحمل الملوحة في نبات الرز وكانت المسافة الجينية له تبعد حوالي cM16.4.

كما نلاحظ من النتائج أن الحزم الجزيئية المعزولة التي ظهرت في الجينوم قد تكون السبب في تكيف التراكيب الوراثية 2H و N3 لتحمل الملوحة من خلال اكتساب آلية تحمل للملوحة تحد من معدل امتصاص الأملاح من التربة ونقلها إلى جميع أنسجة النبات ، وضبط التوازن الأيوني في الجذور والبراعم ، والأوراق (Munns وآخرون ، 2005) . حيث لاحظ Amin (2008) إن تقنية BSA-PCR ساعدت في الكشف عن جينات تحمل الملوحة والإجهاد من خلال دراسة أجزائها على عدد من التراكيب الوراثية المنتخبة لصفة تحمل الملوحة في الحنطة ، وهذا الاختلاف في DNA سببه تضريب المحاصيل وإدخالها في برامج التربية وتحسين تكيفها لتحمل الملوحة وكذلك الطفرات الناتجة من التشعيع بطرق مختلفة (Rashed ، 1998 ، Microfiche وآخرون ، 2008) . كما نلاحظ إن الحزم المتباينة التي ظهرت في الأصناف الحساسة للملوحة كانت أوزانها الجزيئية أكبر ومتباينة الموقع أكثر من تلك التي ظهرت في التركيبين الوراثيين 2H و N3 ، وهذا التباين الوراثي قد تتبعه الخطوط الوراثية لكي تستطيع التكيف مع مستوى الملوحة العالي من خلال إحدى آليات تحمل الملوحة (Ehab وآخرون ، 2011) ، وهي الاستبعاد حيث يقوم النبات بحجز أيون الصوديوم داخل فجوات الخلايا وبخاصة في الجذور لكي يقلل من دخول بعض الأيونات مثل Na^+ أو تقليل تركيزه في الأوراق العليا من خلال حجزه في بعض فجوات الخلية وبذلك يبدي

النبات تحمل لمثل هذه الأيونات ، أو تحمل الأزموزية Osmotic tolerance وهنا تتميز النباتات المتحملة للإجهاد الملحي بالقدرة على تنظيم النفاذية للحفاظ على نمو النبات (Munns و Tester ، 2008) . إن أهم ما قدمته هذه التقنية هو الكشف عن التغيرات الوراثي بين المجاميع المدروسة بشكل أوضح من خلال انعزال المؤشرات الجزيئية المتباينة ضمن جينوم التراكيب الوراثية في مستوٍ واحد مما يدل على مدى التقارب الوراثي فيما بينها وكذلك البعد الوراثي بينهما وبين الأصناف الحساسة للملوحة ، هذا ما اكده Amin وآخرون (2008) من خلال تعيين التباين الوراثي بين الحنطة الناعمة والحنطة الخشنة لصفة تحمل الملوحة من خلال تقسيمها إلى مجموعتين باستخدام تقنية . BSA-PCR

جدول 3-13: الحزم المعزولة التي ميزت الأصناف والخطوط الوراثية المدروسة مع الوزن الجزيئي لكل حزمة مميزة .

Bulk segregate Molecular weight	التركيب الوراثي	البادئ
1130	Sensitive	OPN-16
402	Tolerant	
1710	Sensitive	OPO-04
893	Sensitive	
1000	Sensitive	OPC-08
386	Tolerant	

الاستنتاجات

أشارت نتائج الدراسات الوراثية والفسولوجية لصفة تحمل الملوحة الى :

- 1- وجدت فروقات فسلجية ووراثية في صفة تحمل الملوحة بين التراكيب الوراثية المدروسة .
- 2- إن التركيبين الوراثيين 2H و N3 اظهرا تفوقاً كبير في تحمل الملوحة بالمقارنة مع الصنف المحلي .
- 3- خفض تركيز أيون الصوديوم في الأوراق العليا للتركيبين الوراثيين 2H و N3 نتيجة لامتلاكهما آلية تثبيط حيوية لانتقال هذا الأيون إلى الأعلى .
- 4- زيادة تركيز أيون البوتاسيوم والحفاظ على مستوى معتدل من تركيز أيون الكالسيوم في خلايا الأوراق العليا لهذين التركيبين .
- 5- إن صفة تحمل الملوحة هي صفة وراثية قابلة للتوريث عبر الأجيال تتأثر كثيراً بالبيئة لأنها صفة كمية يحكمها أكثر من جين .
- 6- تميزت مؤشرات RAPD بإمكانية الكشف عن الاختلاف الوراثي بين التركيبين الوراثيين 2H و N3 والأصناف المحلية تموز 2 ودور 85 .
- 7- كان هناك اختلاف واضح بين التركيبين الوراثيين وصنفي المقارنة وذلك في ظهور الحزم المميزة وكان الصنفين الحساسين للملوحة أكثر قرابة من بعضهما .

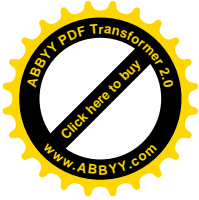
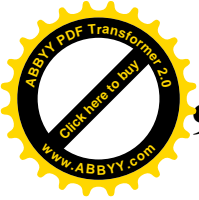
التوصيات

- 1- إجراء عملية التربية والانتخاب لصفة تحمل الملوحة من الأجيال المتقدمة لأنها طريقة كفوءة وفعالة للحصول على تراكيب وراثية متحملة للملوحة .
- 2- إدخال مثل هذه التراكيب الوراثية في برامج التربية والتحسين لنقل صفة تحمل الملوحة إلى الأصناف المحلية الحساسة للملوحة .
- 3- زيادة عدد البادئات لإيجاد التنوع الوراثي ضمن DNA للتراكيب الوراثية لإعطاء صورة أوسع عن حجم التغيرات الموجود وبالتالي تحديد مكان تلك التراكيب في برامج التربية .
- 4- تطبيق التقنيات الجزيئية الأخرى مثل AFLP، RFLP وعلامات SSR لتوسيع قاعدة المعلومات حول المورثات المسؤولة عن تحمل الملوحة في هذين التركيبين الوراثيين .
- 5- اعتماد الخط الوراثي N3 بوصفه صنفاً لتمييزه عن التركيب الوراثي 2H والصنف المحلي تموز2 في صفة تحمل الملوحة .
- 6- اعتماد طرائق الوراثة الجزيئية في برامج التربية لإنتاج أصناف جديدة من الحنطة ، لأنها توفر الوقت والمال والجهد ، فضلاً عن دقتها العالية .

المصادر العربية

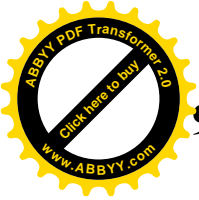
- التميمي ، صلاح عباس زيدان . 2007 . التداخل بين الملوحة والكالسيوم واثره في نمو وتطور نبات الحنطة *Triticum aestivum* L . باستخدام المزارع المائية . رسالة ماجستير ، كلية التربية - جامعة ديالى .
- الحلاق ، عبير محمد يوسف . 2003 . تقويم تحمل الملوحة لتراكيب وراثية من الحنطة باستخدام طريقة الاعمدة . رسالة ماجستير ، كلية العلوم ، جامعة بغداد .
- الحداد ، محمد الحبيب ، سالم اللوزي . 2003 . المؤتمر العربي للزراعة العضوية من اجل نظافة البيئة وتدعيم الاقتصاد . إنعقد بتونس خلال الفترة 27-28-7.
- الخليفة ، دانة حمزة امام ، سماح حمزة امام الخليفة . 2009 . انتاج نباتات مقاومة للملوحة باستخدام تقنية زراعة الانسجة النباتية . بحث مقدم الى ادارة البحوث الزراعية والمائية ، وزارة البلدية والتخطيط العمراني ، الدوحة قطر.
- الربيعي ، فاضل عليوي عطية . 2002 . تأثير نقع البذور بمحاليل املاح الكالسيوم في تحمل نبات الشعير (*Hordeum vulgare* L.) للملوحة . رسالة ماجستير ، كلية التربية ابن الهيثم ، جامعة بغداد .
- الربيعي، عبد الكريم حسن . 1984 . العلاقات بين ملوحة التربة والضغط الازموزي للعصير النباتي لأجزاء النبات . رسالة ماجستير ، كلية الزراعة - جامعة بغداد .
- الرجوب ، عبد الستار اسمير . 1992 . دراسات عن تحمل الملوحة لاربع تراكيب وراثية من الحنطة (*Triticum aestivum* L.) . اطروحة دكتوراه ، كلية العلوم ، جامعة بغداد .
- السعدي ، حسن عبد الرزاق علي . 2008 . نمو جذور نبات القمح (*Triticum aestivum* L.) النامي في المزارع المائية تحت أجهاد ملح كلوريد الصوديوم. مجلة علوم المستنصرية . المجلد 19 ، العدد 7 ، ص 14-20 .
- الصالح ، عبد العزيز عبد الرحمن . 2007 . البصمة الوراثية . سلسلة الكتب العلمية الثقافية ، مركز بحوث كلية العلوم .
- العودة ، أيمن الشحادة . 2007 . تقويم أهمية التحريض وطبيعته في تحسين تحمل بعض سلالات أكساد من القمح القاسي والطري للإجهاد الملحي . مجلة جامعة دمشق للعلوم المجلد (23) العدد 2 الصفحات: 15-36 .
- الفقي ، علاء الدين حسن محمد . 2010 . تأثير الملوحة على النباتات. قسم الحقائق النباتية معهد بحوث البساتين . محاضرة عرض تقديمي . <http://happytree flash.com/.ppt.html>

- القحطاني ، رمزية سعد . 2004 . تأثير حمض الجبريلليك وملوحة كلوريد الصوديوم على إنبات البذور والنمو والأبيض في نبات السنّا *Senna occidentalis* . رسالة ماجستير ، كلية العلوم قسم النبات والاحياء المجهرية ، جامعة الملك سعود .
- الكيار ، عادل سليم هادي . (1998) . الأوجه الفسيولوجية لتحمل الملوحة لبعض التراكيب الوراثية لحنطة الخبز (*Triticum aestivum* L.) رسالة ماجستير ، كلية الزراعة - جامعة بغداد .
- المشهداني ، ابراهيم اسماعيل وسيف الدين عبد الرزاق الحديثي . 2006 . تقويم صفة تحمل بعض التراكيب الوراثية المستنبطة من الحنطة للملوحة تحت ظروف ملوحة الحقل الطبيعية . مجلة الاستثمار الزراعي مركز التربة والموارد المائية ، وزارة العلوم والتكنولوجيا - العدد 4 . ص74-78 .
- المشهداني ، ابراهيم اسماعيل حسن ، عز الدين الشماع ، حاتم جبار عطية ، كريم حامد عبد الله ، عادل سليم هادي . 2001 . الية تحمل الملوحة في بعض التراكيب الوراثية المنتخبة من الحنطة . مجلة اباء للابحاث الزراعية - المجلد 11 ، العدد 1 . ص56-74 .
- المشهداني ، ابراهيم اسماعيل حسن ، عز الدين مجيد الشماع ، حاتم جبار عطية . 2003 . بعض الدراسات الوراثية لصفة تحمل الملوحة للحاصل ومكوناته لبعض التراكيب الوراثية المنتخبة من الحنطة ، مجلة العلوم الزراعية العراقية . 34-(2):111-118 .
- عبد الفتاح ، عمرو صالح . 2009 . أساسيات الوراثة والقضايا المتضمنة : الكروموسوم - العبور - الارتباط - الخرائط الوراثية الكروموسوم - تناسخ الكروموسوم . مجلة الهندسة الوراثية . كتاب المستحدثات البيولوجية وتطبيقاتها .
- عبد القادر ، احمد . 2003 . تطور برامج أبحاث التكنولوجيا التقانات الحيوية الزراعية في الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية . دمشق - ص.ب.3515 .
- عطية ، حاتم جبار ، عادل سليم الكيار ، ابراهيم اسماعيل المشهداني . 2001 . استجابة أصناف جديدة من حنطة الخبز لملوحة التربة . مجلة الزراعة العراقية . مجلد 6 ، عدد 2 : 55-63 .
- كيهوار ، محمد كامل . 2007 . مبدأ تحديد تسلسل الـ DNA . مجلة التشخيص المخبري المجلد 4 ، العدد 5 . ص 1-6 .

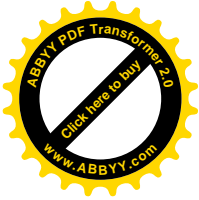
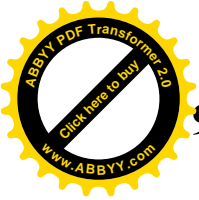


References

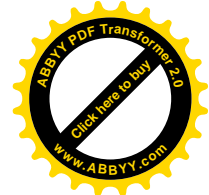
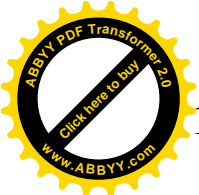
- **Abd Al Wahab, F. K. and Abdul Qados ,A M. S., . 2008 .** Effect of Salt Strees on Plant Growth and Pigments of Two Varieties of Barley (*Hordeum vulgare* L.). Saudi Journal of Biological Sciences 15 (3) 127-137.
- **Abdul Qados, M.S. A. (2011) .** Effect of salt stress on plant growth and metabolism of bean plant *Vicia faba* (L.) Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences . 10: 7–15.
- **Abel, G.H. 1969.** Inheritance of the capacity for chlorides inclusion and chloride exclusion by soybeans.Crop Science.9: 697-698.
- **Afiah , S.A., Ahmed ,K. A. , and Soliman, . 2007 .** Somaclonal variation in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) RAPD, Finger printing of elite genotypes under Siwa Oasis conditions . African Crop Science Conference Proceedings Vol. 8: 2039-2045 .
- **Ahmad,M. B. H., Niazi, B. Z., and Athar, M. 2005 .** Varietals differences in agronomic performance of six wheat varieties grown under saline field environment. Int. J. Environ. Sci. Tech .Vol. 2 : (1) 49-57, Spring .
- **Ahmed, Z. I., Hassan, Ul., F. and Mahmood, N., . 2001 .** Root and shoot response of salt stressed wheat genotypes. University of Arid Agriculture, Rawalpindi. J Aps, 11(4): 155-158.
- **Aisha, S., Mumtaz, S., Raza,S., Khan, M.A. and Solangi, S., . 2005 .** Salinity effects on seedling growth and yield components of different inbred rice lines . Pak. J. Bot., 37(1): 131-139.
- **AL-Hendawy, S. E., Yuncai Hu, G. M., Yakout, A. M., Awaad, S. E. and Schmidhalter ,H. U., . 2005 .** Evaluating salt tolerance of wheat genotypes using multiple parameters. Europ. J. Agronomy 22 . 243–253.
- **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.



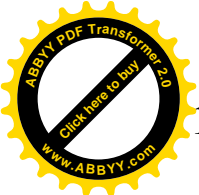
- **Ali, Z., Abdus, S. K., Iftikhar A. K., and Faqir, M. A., . 2005 .** Heritability (h^2_b) Estimates for NaCl Tolerance in Wheat (*Triticum aestivum* L.) . Journal of Agriculture & Social Sciences. 2:126–128.
- **Ali,y.;Aslam , Z .; Sarwar,G & Hussain , F . 2005 .** Genotypic and environmental interaction in advanced lines of wheat under salt – effected soils environment of Punjab.Int . J .Environ. science .Tech ., 2(3):223-228.
- **Al-Kadi, D.A., Afiah.S.A., M.A. Aly and A.E. Badran . 2005 .** Bulked segregant analysis to develop molecular markers for salt tolerance in Egyptian cotton . Arab J. Biotech., Vol. 9 (1) Jan: 129-142.
- **Al-Uqaili, J.K., Jarallah, A.K.A., Al-Ame,B.H.A. and Kerd, F. 2002 .** Effect of saline drainage water on wheat growth and on soil salinity. Iraq, J. Agric. (special issue)., 7(2).
- **Amin. A. Y., . 2008 .** A rapid method for identifying markers associated with salinity tolerance genes in hexaploid wheat (*Triticum aestivum*). Arab J. Biotech., Vol. 13 (1) January :63-72.
- **Aslam, M., I.H., Mahmood, R.H., Qureshi, S., Nawaz, J., Akhtar and Ahmad ,Z., . 2001 .** Nutritional Role of Calcium in Improving Rice Growth and Yield under Adverse Conditions . International Journal of agriculture & Biology. 3:292–297.
- **Awaad, H. A., Youssef, M. A. H., Moustafa, E. S. A., . 2010 .** Identification of Genetic Variation among Bread Wheat Genotypes for Lead Tolerance Using Morpho – Physiological and Molecular Markers. Journal of American Science ;6(10):1142-1153]. (ISSN: 1545-1003).
- **Ball , M . C ., Chow , W .S., and Anddersun,J . M., . 1987 .** Sanlinity- Induced potassium deficiency causes loss of functional photosystem II in Leves of the grey mangrove . Avicennia marina , through depletion of the atrazine-binding polypeptide . Aus . J. Plant physiology . 14,351-361.
- **Bouyoucos, G., . 1936 .** Direction for mechanical analysis of soil by hydrometer methods . Soil science . 4 .229-255.



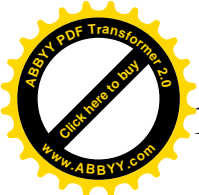
- **Caesar, K. and Rusitska, G., . 1982 .** Tolerance to salinity. 332-339. In faba bean improvement (Ed, Hawtin, G. and C. Webb) ICARDA. Vol. 6. ISBN, Printed in the Nether- Land.
- **Cha,R,S., and Thilly , W.G., . 1993 .** Specificity , efficiency , and fidelity of PCR . PCR methods Appl. 3:118-29.
- **Chapman, H.D., . and Pratt, P.F., . 1961 .** Methods of analysis for soil plant and water. Univ. of California. Division of Agric. Science.
- **Chen, B.Y., and Janes, H.W., . 2002 .** PCR Cloning Protocols. In: "Methods in Molecular Biology", Vol. 192, 2nd ed. **Humana Press Inc., Totowa, NJ. Pp:423.**
- **Choumane . W. H., Ghazal, . S., and Ashtar, . M. B., . 2001 .** Genetic diversity in the Syrian barley by using Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) markers. Res. Bult., No. (99), Res. Cent. Coll. of Agri., King Saud Univ., pp. (5-33)
- **Colmer, T. D., Flowers, T. J., and Munns ,R., . 2006 .** Use of wild relatives to improve salt tolerance in wheat. Journal of Experimental Botany, Vol. 57(5). 1059–1078.
- **Cramer , G.R., Lauchli , A ., and Polito , V.S. 1985 .** Displacement of Ca^{+} by Na^{+} from the plasmalemma of root cells . Plant Physiol . 75.207-210.
- **Cuin, T. A., Anthony J. M., Sophie A. L., and Roger A. L., . 2002 .** Potassium activities in cell compartments of salt-grown barley leaves. Journal of Experimental Botany, Vol. 54: 657-661.
- **Cuin, T. A., Bose, J., Giovanni, S., Deepa, J., Tester, M., Mancuso ,S., and Shabala ,S., . 2011 .** Assessing the role of root plasma membrane and tonoplast Na^{+}/H^{+} exchangers in salinity tolerance in wheat: in planta quantification methods. doi: 10:j.1365-3040.



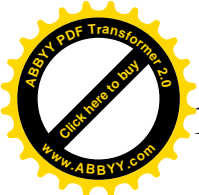
- **Dev, T. B., and Kronzucker ,H. J., . 2008 .** Cellular mechanisms of potassium transport in plants. Copyright. *Physiologia Plantarum*, ISSN 0031-9317.
- **Devitt , D.A., Jarrell ,W.M., and Stevens, K.L., . 1981 .** Sodium-Potassium ratios in soil solution and response under saline condition . *Soil Sci .J.*45.80-86.
- **Devos, K.M. and Gale, M.D. 1992.** The use of random amplified polymorphic DNA markers in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 84: 567-572.
- **Ding, H., G., Zhang ,Y., Guo, S. Chen, S., and Chen . 2000 .** RAPD Tagging of A salt tolerance geng in rice. Plant Biotechnology Laboratory, Institute of Genetics, Academia Sinica, Beijing, China .
- **Ehab. M.R., Metwali, M., Eid, H., and Bayoumi ,T. Y., . 2011.** Agronomical Traits and Biochemical Genetics Markers Associated with Salt Tolerance in Wheat Cultivars (*Triticum aestivum* L). *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 5(5): 174-183.
- **Epstein,E., Norlyn,J.D., Rush,D.W., Kingsbury,R.W., Kelley, D.B., Cunningham ,G.A., and Wrona,A.F. 1980 .** Saline culture of crop:A genetic approach. *Science.* 210. 399-404.
- **Farooq . S., and Sghar M.A., 1995 .** Production of salt tolerance wheat germplasm through crossing culindrica . field evaluation of salt tolerant germoplasm . nuclear institute for agriculture and bio.
- **Fincham , J.R.S., .1983.** Cells, DNA and Chromosome . In : Wright, P.S.G (ed) *Genetics*, Cold Spring Harbor Labrotary . New York , p:2-48 .
- **Francois,L.E.,Maas,E.V.,Donovan, T.T., and Youngs,V.L. 1986 .** Effect of salinity on grain yield and quality, vegetative growth and germination of semi-dwarf and durum wheat . *Agronomy J.* 79 . 1053-1058.
- **Furr,J.R.and Ream,C.I. 1969 .** Breeding citrus root – stocks for salt tolerance.inl.citrus symposium.1.373-381.



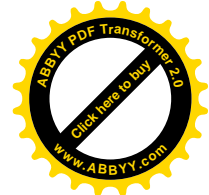
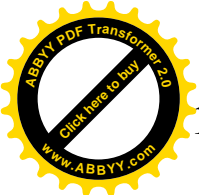
- **Flowers, T. J. 2004** . Improving crop salt tolerance. Journal of Experimental Botany, Vol. 55, (396). 307-319.
- **Ghaloo , S.H., soomro, Z.A., N.U., khan, Z., bibi, I.U. k. , M.S. kakar , S.A. t., and rajper ,A.A., . 2011** . Response of wheat genotypes to salinity at early growth stages. Pak. J. Bot ., 43(1): 617-623, 2011.
- **Gorham,J.,Wyn-Jones,R.G., and Mcdonnell,E. 1985** . Some mechanisms of salt tolerance in crop plants . plants and soil . 89. 15-18.
- **Gorham R. and Jones ,W., . 1992** . Utilization of triticaceae for improving salt tolerance in wheat .wheat genetic resources : meeting diverse need edited by J.P.Srivastava and A.B.Damania.ICARDA.
- **Greenway , H . 1973** . Salinity . growth,and metabolism.J.Aust. Inst .Agric.Sci.39.24-34.
- **Grudman , H., Schneider , C., Hartung, D., Daschner, F. D. and Pith, T. L. 1995.** Discriminatory power of three DNA typing techniques for *P. aeruginosn* . J .clin . microbial. 3:528-532.
- **Hoagland,D.R. and Aranon,D.I. 1950.** The water culture methods for growing plants without soil circulation California Agricultural. Experiment station No.347
- **Hamdia, M. A ., and Shaddad, M. A. K. 2010** . Salt Tolerance of crop plants . Journal of Stress Physiology & Biochemistry, Vol. 6 (3) : 64-90 .
- **Hashemi, S.H.; Mirmohammadi-Maibody, S.A.M.; Nematzadeh, G.A. and Arzani, A. 2009** . Identification of rice hybrids using microsatellite and RAPD markers. African journal of Biotechnology. 8(10): 2094-2101.
- **Hasnain, M. A., and Berge,O . 2006** . Effect of exo-polysaccharides producing bacterial inoculation on growth of roots of wheat (*Triticum aestivum* L.) plants grown in a salt-affected soil. Int. J. Environ. Sci. Tech. of exo-polysaccharides.© Supplement Winter 2006, Vol. 3 (1). 43-51.
- **Hassan , I.I., 1989** . Aspects of salt tolerance in wheat . M.Sc.thesis . Dept . of Environmental and evolutionary Biology . University of Liverpool.



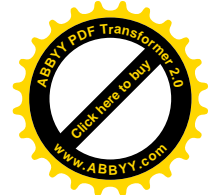
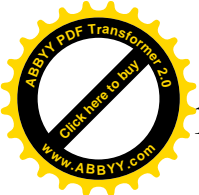
- **Hassan, I . I., and Mohammad, L. S., .1999 .** Yield components comparison and correlation in nine genotypes of wheat under salina conditions . IBN Al- Haitham Sci ., 10 (2), 10 .
- **Innis , M.N ., Myambo , K.B, Gelfand , D.H. and Brow , M.A.D. 1988 .** DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction –amplified DNA. Proc . Natl. Acad . Science . USA 85:9436-9440.
- **Innis.M.A. and Gelfand, D.H. 1990 .** Optimization of PCR Basic methodology. Part one.In: PCR Protocols, Innis, M.A.:Gelfand ,D.H., Sninsky, J.J. and white, T.J. (eds)Academic Press, Inc . London.
- **Kant, S., Pragma K., Eran, R., and Simon, B., . 2006 .** Evidence that differential gene expression between the halophyte, *Thellungiella halophila*, and *Arabidopsis thaliana* is responsible for higher levels of the compatible osmolyte proline and tight control of Na⁺uptake in *T. halophila*. Plant, Cell and Environment. 29, 1220–1234.
- **Kernodle, S.P.; Cannon, R.E. and Scandalios, J.G. 1993.** Concentration of primer and template qualitatively affects product in RAPD-PCR. *Biotechniques*. 1: 362-364.
- **Lauchli,A. 1984 .** Salt eclusion; An adaptation of legumes for crops and pastures under saline condition.Edited by C.S. Rischard and H.T.Cary.71-187.
- **Lessani,H . and Marschner,H. 1978 .** Relation between salt tolerance and long-distansport of sodium and chloride in various crop species . Aust J. plant physiol . 5.27-37.
- **Levitt , J . 1980 .** Reactions of plants to environmental stresses . V.Z.Academic Press . New York (Book).



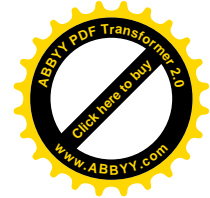
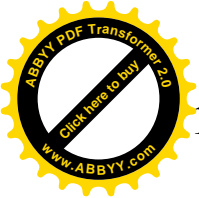
- **Maas, E.V., Lesch, S.M., Francois, L.E. and Grieve, C.M. 1996 .** Contribution of individual culms to yield of salt-stressed wheat. *Crop Sci.* 36:142-149 .
- **Maas,E.V. (1986) .** Salt tolerance of plant . *Applied Agricultural Research .* 1(1).12-20.
- **Maddar,A.M . (1976) .** The inheritance of salt tolerance in barley (*Hordeum vulgare L.*).Ph.D.dissertation, Michigan state University.
- **Mahmoodabad, R. Z. E., Shahzad J. S., Khayatnezhad, M., and Gholamin, R., . 2011 .** The Study of Effect Salinity Stress on Germination and Seedling Growth in Five Different Genotypes of Wheat. *Advances in Environmental Biology*, 5(1): 177-179.
- **Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J. 1982 .** *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, N.Y.
- **Marschner, H. 1971 .** Why can sodium replace potassium in plant s. potash biochem.physiol . *College . in potash Inst .* 8:50-63.
- **McPherson, M.J. and MØller, S.G. 2001 .** *PCR The basic background to bench.* Cornwell Press, Trowbridge, UK.
- **Microfiche ,. 1998 .** Application of DNA based marker mutations for improvement of cereals and other sexually reproduced crop plants. *Proceedings of a final Research Co-ordination Meeting organized by the Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture .*
- **Mohan, M., 1991 .** RFLP in plant breeding *Workshop handbook.* International center of genetic engineering and biotechnology, New Delhi .
- **Moshe, T., .1984.** *Physiological genetics of salt resistance in higher plants.* Studies on the level of the whole plant and isolated organs , *Tissues and cells.* *Salinity tolerance in plants .* Edited by C.S Richards and H.T. Gray . 301-320.



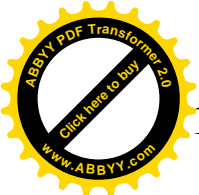
- **Mourad , s . N., Ghina al-Eter. A., and Raghid, A., . 2010 .** Basic recombinant techniques for working with DNA . Institute for Genetic Engineering, Ecology and Health (IGEEH) Karlsruhe, Germany Postal Address: Verein fur Gentechnik, Okologie und Gesundheit (VGOG) e.V., Haid-und-Neu-Str.7, 76131 Karlsruhe, Germany First edition August .
- **Mullis, K. B. and Faloona, F. A. 1987 .** Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase chain reaction. *Methods Enzymol.* 155: 335-350.
- **Mullis,K.B.,Faloona,F., Scharf, S.,Saiki,R.K.,Horn, G., and Erlich, H.A. 1986 .** Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro* : The polymerase chain reaction. *Cold spring Harbor symp. Quant. Biol.*51:263-273.
- **Muhammad , A., Mehboob-ur-R., and Zafar ,Y., . 2005 .** DNA Fingerprinting studies of some wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes using random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *Pak. J. Bot .*, 37(2): 271-277.
- **Munns,R . 2002 .** Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, Cell and Environment* .25,239–250.
- **Munns, R., Richard. A. J., and Lauchli ,A., . 2006 .** Approaches to increasing the salt tolerance of wheat and other cereals. *Plants and Salinity Special Issue. Journal of Experimental Botany*, Vol. 57(5). 1025–1043.
- **Munns, R., Husain, S., Rivelli, A. R., Richard A. and James, A.G. (Tony) Condon,Megan P. Lindsay, Evans S. Lagudah1, Danie P. Schachtman & Ray A. Hare . 2002 .** Avenues for increasing salt tolerance of crops, and the role of physiologically based selection traits. *Plant and Soil* 247: 93–105.
- **Munns, R. and Tester ,M., . 2008 .** Mechanisms of Salinity Tolerance. *Annu. Rev. Plant Biol.* 2008. 59:651–81.
- **Naghavi , M. R ., Mardi ,M. , Ramshini ,H. A. , and Fazelinasab, B., . 2004 .** Comparative analyses of the genetic diversity among bread wheat



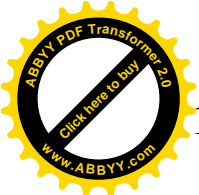
- genotypes based on RAPD and SSR markers . Iranian Journal of Biotechnology, Vol. 2, No. 3.
- **Nobele,C.L., Halloran,G.M., and West,D.W. 1984** . Identification and selection for salt tolerance in Lucerne (*Medicago sativa* L.). Aust. J. of Agri. Research.35.239-252.
 - **Pearson, K. E., Nikos, J., Krista, W., Pearson, E., and James W. B., 2003** . The Basics of Salinity and Sodicyty Effects on Soil Physical Properties.
 - **Pervaiz, Z.; Afzal,M.; Xi , S.; Xiaoe, y. & Ancheng,L . 2002** . Physiological parameters of salt tolerance in wheat. Asi . J . plant Sciences ., 1 (4):478-481.
 - **Peter,C., M., and James ,H .B., . 2000** . Cereal biotechnology. Published by Woodhead Publishing Limited Abington Hall, Abington Cambridge CB1- 6AH England.
 - **Pitman,M.G.,Lauchli,A.,and Stelzer,R. 1981.** Ion distribution in roots of barley seedling measured by electron probe x-ray microanalysis. Plant Physiol.68.673-679.
 - **Plaschke, J., Canal, M.W. and Roder ,M.S. 1995** . Detection of genetic of diversity in closely related bread wheat using microsatellite markers . Theor .Appl. Gent . 91:1001-1007.
 - **Rabbani, M.A.; Pervaiz, Z.H. and Masood, M.S. 2008** . Genetic diversity analysis of traditional and improved cultivars of Pakistani rice (*Oryza sativa* L.) using RAPD markers. E. J. Biotech. 11(3): fulltext-3.
 - **Rafalski , J.A., Hanafey, M.K., Tingey, S.V. and Williams,J.G.K. 1994** . technology for molecular breeding :RAPD markers , microsatellites and machines , In : plant Genome Analysis , (ed) Gresshoff, P.M.PP. 14-27.Boca.Raton , FL:CRC Press.
 - **Rahnan .M . U .Malik .T . A. Chowdhary ,M . S .Iqbol , M. J and Zafar . 2004** . Applicatios of random amplified polymorphic DNA (RAPD)



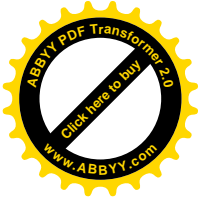
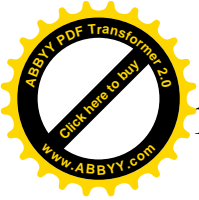
- technique for the identification of markers linked to salinity tolerance in wheat . (*Triticum aestivum* L.) . Pak. J. Bot., 36(3): 595-602 .
- **Rajendran , K., Tester ,M., and Roy ,S. J., . 2009 .** Quantifying the three main components of salinity tolerance in cereals . Plant, Cell and Environment .32, 237–249.
 - **Ralph , W.,K. Emanuel , and W.P. Robert . 1984 .** Physiological to salinity in selected of wheat . plant physiol . 74:417-423.
 - **Rashed, M.A., Abou-Deif, M.H., Sallam ,M.A.A. and Ramadan ,W. A., . 2008.** Estimation of Genetic Diversity among Thirty Bread Wheat Varieties by RAPD Analysis . Journal os Applied Sciences Research, 4(12): 1898-1905 .
 - **Reiter , R.S., Williams , J.G.K.,Feldmann, K.A., Rafalski, J.A., Tingey ,S.V. and Scolnik, P.A. 1992 .** Global and Local genomic mapping in *Arabidopsis thaliana* by using recombinant inbred lines and RAPDs . Proceedings National Academy of sciences of the united states of America 89,1477-1481.
 - **Richards , L.A. 1954 .** Origin and nature of saline and alkali soils . In diagnosis and improvement of saline and soils . Agric . Hand Book No .60:1-10.
 - **Roche . Molecular . Biochemicals company . 1999 .** Taq DNA Polymerase from *Thermus aquatcus* BM.Germany.
 - **Roux, K.H. 2009 .** Optimization and Troubleshooting in PCR. Spring Harb. Protoc. doi:10.1101/pdb.ip66.
 - **Ruisheng, Sandra Fonseca, Laszlo, G. Puskas, Laszlo Hackler, JR., Ágnes Zvara, Denes DudITits and Maria S. Paisi . 2004 .** Transcript identification and profiling during salt stress and recovery of *Populus euphratica*. Tree Physiology 24, 265–276.
 - **Saiki, R . k .; Gelfand , G . H .; Stoffel , S .; Scharf , S . J .; Higuchi , R .; Horn,G.T.; Mullis , K . B . and Erlich , H . A . 1988 .** Primer directed



- enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase .
Science 239:487-791.
- **Salman, Gulzar, M. Ajmal Khan, Irwin A. Ungar . 2003 .** Effects of Salinity on Growth, Ionic Content, and Plant–Water Status of *Aeluropus lagopoides* .Marcel Dekker, INC Madision Avenue New York, NY10016. 1657–1668.
 - **Sambrook, J.; Fritsch, E.F. and Maniatis, T. 1989 .** Molecular Cloning : A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
 - **Sambrook, J. and Russell, D.W. 2001 .** Molecular Cloning. In: "A Laboratory Manual". Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.
 - **Sannazzaro, A.I. , Edgardo ,M. E., Alberto , O., Oscar A. R., and Mene´ndez ,A., . 2007 .** Modulation of polyamine balance in *Lotus glaber* by salinity and arbuscular mycorrhiza. *Plant Physiology and Biochemistry* .45 . 39-46.
 - **Schach, T. D.P., and Munns, R. 1992 .** Sodium accumulation in leaves of *Triticum* species that differ in salt tolerance (wheat). *Australian. J. of Plant Physiol.* (Australia). 19(3): 331-340.
 - **Shannon , M.C.; C.M. Grieve , and Francois, L.E. . 1994 .** Whole plant response to salinity . *plant –environment interaction* . Ed.By E. Robert and M.D.Wilkinson.Inc New York.
 - **Shaptadvipa, B. and Sarma, R.N. 2009 .** Assessment of nature and magnitude of genetic diversity based on DNA polymorphism with RAPD technique in traditional glutinous rice of Assam. *Asian Journal of Plant Sciences*. 8(3): 218-223.
 - **Steel,R.G.D. and Torrie,J.H. 1960.** Principles and procdedures of statistics with special refernce to the biological sciences . McGraw-Hill Book company, Inc.New York, Toronto,London.



- **Tabor, G. M., Kubisiak, T. L., Klopfenstein, N. B., Hall, R. B., and McNabb, H. S. J., . 2000 .** Bulked Segregant Analysis Identifies Molecular Markers Linked to *Melampsora medusae* Resistance in *Populus deltoids*. Publication no. P-2000-071 3-01 R.
- **Tahir , N . A . 2008 .** Assessment of Genetic Diversity Among Wheat Varieties in Sulaimanyah using Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Analysis . Jordan Journal of Biological Sciences .V1(4). 159 – 164.
- **Tammam, A. A., Mona, F. A., and Mabrouka, M. H., . 2008 .** Study of salt tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivar Banysoif 1. Australian Journal of Crop Science 1(3):115-125 . ISSN: 1835-2707.
- **Tester, K. M. R., and Roy ,S. J., . 2009 .** Quantifying the three main components of salinity tolerance in cereals. Plant, Cell and Environment . 32, 237–249.
- **UL-Hak ,I., . 2009 .** Genetic basis of variation for salinity tolerance in okra (*Abelmoschus esculentus* L.). A thesis submitted in partial fulfilment of the requirements for the degree of doctor of philosophy.
- **Walpol, B. C. and Arunakumara, K. K. I. U., . 2010 .** Effect of salt stress on decomposition of organic matter and nitrogen mineralization in animal manure amended soils. The Journal of Agricultural Sciences, 2010, vol. 5, no 1.
- **Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J. A. and Tingey, S. V. 1990 .** DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acid Research.18(22): 6531-6535.
- **Wizard® Genomic DNA Purification Kit . Promega Corporation · 2800** Woods Hollow Road · Madison, WI 53711-5399 USA Toll Free in USA 800-356-9526 .
- **Wu, D.Y., Ugozzoli , Pal , B.K.Qian , J . and Wallace , R. B . 1991 .** In. Newton, G.R. and Graham,G.A.(ed) PCR.2ed Eynsham,Oxon.,UK.Pp.24.



- **Xiong, L., and Jian, K. Z., . 2002 .** Salt Tolerance. The Arabidopsis Book, American Society of Plant Biologists.
- **Yang, Y. G., Kim, J. Y., Soh ,M.S., and Kim ,D.S., . 2007 .** A Simple and Rapid Gene Amplification from Arabidopsis Leaves Using AnyDirect System. Journal of Biochemistry and Molecular Biology, Vol. 40 (3). 444-447.
- **Zadoks , C.,T.T. Chang , and C.F.Konak . 1974 .** Zadoks Decimal Code for the Growth Stage of Cereal Weed . Research . 14:415-421.
- **Zewail , A . 2002 .** Science and Technologyin the Twenty-First Century . I. Science and technology in twenty-first century 21. Series .509.05.

Internet References

<http://www.dna art online uese primer>

<http://www.ndsu.edu/pubweb/~mcclean>

الجدول 1 : تأثير مستويات مختلفة من الملوحة على الوزن الرطب للمجموع الخضري.

		2011 / 2010			Genotype التراكيب الوراثية	
Total	مستويات الملوحة ديبي سيمنز/م					
المعدل	15	8	2-1			
b 0.94	g 0.09	fg 0.40	c 2.33	تموز 2	1	
a 1.71	f 0.62	e 1.17	a 3.34	2H	2	
a 1.69	f 0.72	d 1.59	b 2.76	N3	3	
	c 0.47	b 1.05	a 2.81	المعدل	4	

0.23	التراكيب الوراثية	LSD 0.05
0.23	الملوحة	
0.39	التراكيب الوراثي x الملوحة	

الجدول 2 : تأثير مستويات مختلفة من الملوحة على الوزن الرطب للمجموع الجذري .

		2011 / 2010			Genotype التراكيب الوراثية	
Total	مستويات الملوحة ديبي سيمنز/م					
المعدل	15	8	2-1			
c 0.860	e 0.030	e 0.134	b 2.40	تموز 2	1	
a 1.390	e 0.170	d 1.001	a 2.99	2H	2	
b 1.620	e 0.28	c 1.36	a 3.22	N3	3	
	c 0.160	b 0.832	a 2.87	المعدل	4	

0.19	التراكيب الوراثية	LSD 0.05
0.19	الملوحة	
0.33	التراكيب الوراثي x الملوحة	

الجدول 3 : تأثير مستويات مختلفة من الملوحة على الوزن الجاف للمجموع الخضري .

		2011 / 2010			Genotype التراكيب الوراثية	
Total	مستويات الملوحة ديبي سيمنز/م					
المعدل	15	8	2-1			
c 0.26	g 0.02	f 0.08	b 0.67	تموز 2	1	
b 0.40	f 0.15	d 0.31	a 0.72	2H	2	
a 0.39	e 0.16	c 0.32	b 0.67	N3	3	
	c 0.11	b 0.24	a 0.69	المعدل	4	

0.042	التراكيب الوراثية	LSD 0.05
0.042	الملوحة	
0.072	التراكيب الوراثي x الملوحة	

الجدول 4 : تأثير مستويات مختلفة من الملوحة على الوزن الجاف للمجموع الجذري .

		2011 / 2010			Genotype التراكيب الوراثية	
Total	مستويات الملوحة ديبي سيمنز/م					
المعدل	15	8	2-1			
c 0.135	g 0.010	f 0.056	c 0.34	تموز 2	1	
b 0.256	f 0.087	e 0.230	b 0.45	2H	2	
a 0.332	f 0.106	d 0.260	a 0.63	N3	3	
	c 0.068	b 0.182	a 0.473	المعدل	4	

0.029	التراكيب الوراثية	LSD 0.05
0.029	الملوحة	
0.050	التراكيب الوراثي x الملوحة	

الجدول 5 : تأثير الملوحة على تركيز ايون الصوديوم في الأوراق العلوية .

		2011 / 2010			Genotype التراكيب الوراثية	
Total	مستويات الملوحة ديبي سيمنز/م					
المعدل	15	8	2-1			
a 6.45	a 8.38	b 6.61	e 4.38	تموز 2	1	
b 4.95	c 5.78	d 5.21	e 3.88	2H	2	
c 4.09	d 5.06	e 4.38	f 2.85	N3	3	
	a 6.40	b 5.4	c 3.70	المعدل	4	

0.560	التراكيب الوراثية	LSD 0.05
0.560	الملوحة	
0.97	التراكيب الوراثي x الملوحة	

الجدول 6 : تأثير الملوحة على تركيز ايون البوتاسيوم في الأوراق العلوية .

		2011 / 2010			Genotype التراكيب الوراثية	
Total	مستويات الملوحة ديبي سيمنز/م					
المعدل	15	8	2-1			
b 3.27	c 1.17	c 1.88	b 6.77	تموز 2	1	
a 7.29	b 5.94	b 7.41	ab 8.53	2H	2	
a 8.26	b 7.56	b 8.09	a 9.14	N3	3	
	b 4.89	b 5.79	a 8.14	المعدل	4	

0.97	التراكيب الوراثية	LSD 0.05
0.97	الملوحة	
1.67	التراكيب الوراثي x الملوحة	

الجدول 7 : تأثير نسبة عنصر البوتاسيوم الى الصوديوم في الأوراق العلوية .

		2011 / 2010			Genotype التراكيب الوراثية	
Total	مستويات الملوحة ديبي سيمنز/م					
المعدل	15	8	2-1			
c 0.66	e 0.13	e 0.27	c 1.6	تموز 2	1	
b 1.64	d 1.03	c 1.64	b 2.26	2H	2	
a 2.23	c 1.51	bc 1.88	a 3.3	N3	3	
	b 0.89	b 1.26	a 2.38	المعدل	4	

0.23	التراكيب الوراثية	LSD 0.05
0.23	الملوحة	
0.41	التراكيب الوراثي x الملوحة	

الجدول 8 : تأثير الملوحة على تركيز ايون الكالسيوم في الأوراق العلوية.

		2011 / 2010			Genotype التراكيب الوراثية	
Total	مستويات الملوحة ديبي سيمنز/م					
المعدل	15	8	2-1			
b 1.52	e 0.64	d 1.49	bc 2.45	تموز 2	1	
a 2.84	b 2.68	bc 2.45	a 3.4	2H	2	
b 1.90	c 1.72	c 2.02	d 1.97	N3	3	
	b 1.68	b 1.98	a 2.60	المعدل	4	

0.42	التراكيب الوراثية	LSD 0.05
0.42	الملوحة	
0.51	التراكيب الوراثي x الملوحة	

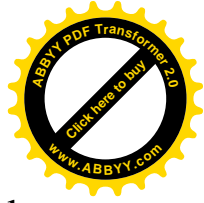


A study was conducted to investigate salt tolerance in wheat genotypes (N3 and 2H) compared with the sensitive genotypes Tammooz 2 . which was the sensitive variety . The first stage was conducted in pots using three salinity levels (2 , 8 and 15 ds . m⁻¹) . Treatments were distributed in Randomized Complete Block Design (RCBD) with three replicates. As plants reached the tillering stage, fresh and dry weight of shoot and root was recorded. Also, the concentration of sodium, potassium and calcium ions were estimated in the upper leaves of the studied genotypes.

The second stage involved the study of genetic variability of salinity tolerance trait among the studied genotypes the using PCR techniguse with the aid of RAPD- and BSA-DNA markers.

results showed that there was a significant reduction in the means of all studied traits with increasing of salinity level, especially in the third one . There were differences among the selected genotypes in their salt tolerant . However , the genotypes (N3 and 2H) were more tolerance than Tammooz 2. The results also indicated that a progress in salt was successfully achieved in all selected genotypes through breeding program .

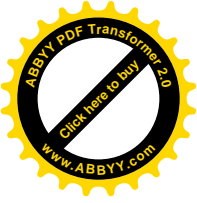
The investigation of salinity tolerance mechanisms revealed that it was correlated with a reduction of sodium Na⁺ concentration in the upper leaves (4.95 and 4.09 mg / g) , the same increase in potassium ions K⁺ (7.29 and 8.26 mg / g , respectively) N3 and 2H in the upper leaves, and increase potassium:sodium ratio which recorded higher values (1.64 and 2.23mg/g). As compared with the sensitive variety (Tammooz 2) , the



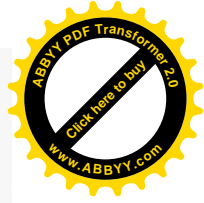
results showed that the calcium level in the tolerant plants was more stable than the control variety.

Eight RAPD primers were used in this study, seven of them produced 82 bands in four genotypes. Thirty eight of these bands found to be monomorphic (46.3%), meanwhile 44 band (53.7%) found to be polymorphic. The highest number of polymorphic (10 bands) was produced by OPI-01 primer, while the lowest (2 bands) was produced by OPN-16 primer. The molecular size of the amplified bands by using RAPD primers ranged from 250bp to 1523bp . The results of molecular analysis showed that Dour 85 variety was genetically diverged from the rest of genotypes. This variety can be distinguished with its unique banding pattern across the used primers. The molecular size of these unique bands were 1440bp and 590bp , 446bp and 603bp using OPG-B , OPB-10 and C-08 primers, respectively. Two other unique bands discriminate Tammooz2 variety with the molecular size of 2024bp and 1774bp by using OPO-04 primer.

The (BSA) analysis was implemented with the aid of three primers (N16, C-08 and O-04). The results indicated that these primers were efficiently distinguished between the two bands segregant sets of genotypes (tolerant and sensitive). The N16 and C-08 primers resulted in two unique bands in tolerant genotypes (N3 and 2H) with the molecular size of 402bp and 386bp, respectively. Meanwhile, O-04 primer produced two unique bands in the sensitive varieties at the molecular size of 1710bp and 893bp. Theses unique bands found to be fingerprints for these genotypes.



Republic of Iraq
Ministry of Higher Education
And Scientific Research
University of Diyala
Al Razi College of Education
Biology Department



*Study Some Physiologic and Genetical Variations of Salinity Tolerance in some Selected Genotypes Wheat (*Triticum ssp.*)*

*A thesis
Submitted to Razi College of Education
University of Diyala
in partial fulfillment of the Requirements for the Degree of
Master of Science in Biology.
In Botany*

By

Bilal Fadil . Zakariya

Supervised By

Dr. Wisam Malik, Dawood

Dr. Abraham Ismail, Hassan

November-2011 A.C.

Zu Al hija-1432H