المسح الجزيئي لبعض أصناف الحنطة المزروعة في عموم العراق للكشف عن بعض جينات المقاومة لأمراض الأصداء

حرب عادل عبد محمد مهل عامر عبد الودود

الملخص

نُفذ مسح جزيئي لـ 17 صنفاً من الحنطة المزروعة في عموم العراق وذلك للكشف عن وجود 12 جيناً من جينات المقاومة لمرض صدأ الحنطة التي يسببها الفطر***Puccinia spp.*** ،باستخدام 10مؤشرات مرتبطة بهذه الجينات من نوع SSR, STS التي تكون مسؤولة عن إظهار صفة المقاومة الثابتة لأنواع الصدأ، وأظهرت النتائج ان الصنف تموز2 قد امتلك أعلى عدد من الجينات التي بلغت 11،يليها الاصناف العراق، نور،الرشيد، رزكاري واباء وقد امتلكت 9 جينات، بينما الصنف مستورد استرالي قد امتلك 5 جينات وهي الاقل عدداً. ويمكن ان نلاحظ ايضا ان الجينات Sr24\ Lr24, Sr36 كانت الاكثر ظهوراً في الاصناف المدروسة إذ انها وجدت في الاصناف جميعها ، يليها الجين Lr 34 ،إذ ظهر فيها 15 صنفاً وتراوحت بقية الجينات في الظهور بين ذلك.

المقدمة

يعد القمح ***(Triticum aestivum L.)*** 2N= 6X= 42, AABBDD من أهم محاصيل الحبوب في العالم والعراق،إن من أهم الأمراض التي تهدد إنتاجية هذا المحصول هي أمراض الأصداء التي يسببها ***Puccinia spp.***، إذ ان تسبب هذه الامراض خسارة في حاصل الحنطة من خلال تقليل عدد السنيبلات في السنبلة الواحدة، خفض الوزن التجريبي وخفض جودة السنيبلات. تعتمد نسبة الخسارة في الإنتاج التي تسببها الأصداء على حساسية النبات وظروف المناخ إضافة إلى وقت الإصابة وشدة المرض نسبة الى مرحلة نمو النبات وان اشد خسارة في الحاصل تكون عند حدوث الإصابة قبل مرحلة تكوين السنابل. وعليه فان التشخيص المبكر والمناسب للمرض ضروري لإدارة المرض في أثناء الموسم الواحد ولاختيار الأصناف المناسبة مستقبلا، وان الأصناف الحساسة في حالة الإصابة الشديدة تصل نسبة الخسارة فيها إلى 40% (12). وعلى الرغم من إن استخدام مبيدات الفطريات المنتظم قد يوفر سيطرة على الفطر إلى حد معين، إلا إنها تضيف كلفة إضافية إلى العمل وهي غير صديقة للبيئة، لذلك فان الطريقة الأنسب اقتصاديا والأكثر فاعلية هي بتنمية و زراعة وتطوير أصناف أو ضروب مقاومة للصدأ أذ إنها أكثر أمناً للبيئة واستراتيجية مناسبة للسيطرة على الأصداء (13، 19). ان استخدام مؤشرات الدنا المرتبطة بجينات المقاومة لأصداء الحنطة للكشف عن وجود هذه الجينات يسهل من عملية الانتخاب كثيرا ،إذ ان مؤشرات الدنا تتخطى محددات الاختيار او الانتخاب حسب الصفات المظهرية، وعموماً ان التسهيلات التي توفرها مؤشرات الدنا تعد طريقة غير مباشرة لانتخاب الصفات صعبة التميز مظهرياً و لعملية مراكمة الجينات، وإدامة الاليلات المتنحية في برامج التضريب العكسي وأيضاً لاختبار الاباء في برامج التربية (4، 5) ان برامج الوراثة التقليدية في نقل الجينات ومراكمتها في الانواع تستنزف الوقت وتكون مملة ومعقدة لأنها تستلزم اختبارات اصابة ألنبات وتحتاج الى سلالات مناسبة لذلك (7). ان الهدف من هذه الدراسة هو تشخيص مواقع الجين المرتبطة بصفات المقاومة الثابتة لأصداء الحنطة من خلال المسح الجزيئي للكشف عن وجود جينات المقاومة التي يرتبط وجودها باستجابة النبات البالغ وإظهار صفة المقاومة ضد المرض.

دائرة وقاية المزروعات ، وزارة الزراعة، بغداد ،العراق.

المواد وطرائق البحث

النماذج النباتية

تم الحصول على عينات بذور نبات الحنطة من مصادر عديدة وحسب جدول (1)، إذ زرعت في اصص بلاستيكية قطر 15 سم ، لحين بلوغ النبات عمر ثلاث اوراق في الاقل، ثم تم تحضيرها لعزل الدنا المجيني منها.

عزل الدنا المجيني تم عزل الدنا حسب طريقة **Weigand** وجماعته (22) المعتمدة على طريقة (20).

جدول 1: مصادر الأصناف المستخدمة في البحث

الصنف	المصدر
العز	دائرة فحص وتصديق البذور/وزارة الزراعة
العراق	
تموز 2	
انتصار	
ربيعة	
نور	
تموز 3	
الرشيد	
مستورد استرالي	صنف غير مسجل من المزارعين
رشيد 2	دائرة فحص وتصديق البذور/وزارة الزراعة
رزگاري	البحوث الزراعية / إقليم كردستان
سميتو	
آراس	
اورانتو **Oranto**	
تلعفر	مديرية الزراعة في محافظة نينوى/وزارة الزراعة
اباء 99	دائرة فحص وتصديق البذور/وزارة الزراعة
شام 6	جامعة تكريت/وزارة التعليم العالي

الكشف عن المؤشرات الجزيئية

ان مؤشرات الدنا المستخدمة في هذه الدراسة اختيرت حسب اهميتها المذكورة في الادبيات العلمية، إذ يوضح جدول (2) المؤشرات والجينات المرتبطة بها وتسلسل القواعد النيتروجينية ووزن الحزمة الهدف اضافة الى درجة حرارة الارتباط لكل بادئ ،علما انها عشرة مؤشرات مرتبطة بأثنتي عشرة جيناً. أذ تم اعداد تفاعلات هذه المؤشرات بالاعتماد على كل من **Weising** و**Gardner** (23) وحسب توصيات شركة **Bioneer** المجهزة لخليط التفاعل الاساس **master mix** والبادئات المستخدمة، إذ يتكون خليط التفاعل من التراكيز النهائية التالية وبحجم **20** مايكروليتر لكل عينة (انزيم بلمرة الدنا **TOP DNA polymerase**وحدة انزيمية واحدة، **dNTPs** **250** مايكرومولر/ لكل قاعدة، ترس حامضي **10** ملي مولر، **KCl 30** ملي مولر، كلوريد الزئبق **1.5** ملي مولر، اضافة الى صبغة ملونة ومنظمة، ويضاف عند التحضير: **10** بيكومول لكل باديء، الدنا القالب **50** نانوغرام/ مايكروليتر، يكمل الحجم بالماء المقطر المعقم).وضعت العينات في جهاز المبلمر الحراري الحلقي ويبرمج الجهاز لينفذ برنامج التضاعف **95** مْ لمدة خمس دقائق ولمرة واحدة، ثم ثلاثين دورة، **92**مْ لمدة دقيقتين، **72** مْ لمدة دقيقة واحدة، تليها دورة واحدة ،**72** مْ لمدة خمس دقائق) وتتراوح درجة حرارة الارتباط بين **55–65** مْ حسب البادئ كما

موضح في جدول (2)، ترفع العينات بعد انتهاء البرنامج وتحفظ في درجة حرارة 4 مْ، او تحضر مباشرة لتحميلها على هلام الاكاروز بتركيز 1.5%.

جدول 2: مؤشرات الدنا المستخدمة والجينات المرتبطة بها وتتابع النيوكليوتيدات ودرجة حرارة الارتباط ووزن الحزمة الهدف

الجين	التتابع	المؤشر	درجة حرارة الارتباط م°	وزن الحزمةالمتضاعفة bp
Lr24\Sr24 F R	TCGTCCAGATCAGAATGTG CTCGTCGATTAGCAGTGAG	Sr24#12	55	500
Sr2 F R	AAGGCGAATCAAACGGAATA GTTGCTCTAGGGGAAAAGCC	Gmw533	60	120
Sr22 F R	GACGAGCTAACTGCAGACCC CTCAATCCTGATGCGGAGAT	Cfa2019	60	234
Sr25/Lr19 F R	CATCCTTGGGGACCTC CCAGCTCGCATACATCCA	Gb	65	230
Sr26 F R	AATCGTCCACATTGGCTTCT CGCAACAAAATCATGCACTA	Sr26#43	56	245
Sr36 F R	CGTCGAAAACCGTACACTCTCC GCGAAACAGAATAGCCCTGATG	Wmc477	61	190
Sr39-Lr35 F R	AGAGAGAGTAGAAGAGCTGC AGAGAGAGAGCACCCACC	Sr39	60	900
Sr46 F R	TCGGTTCCATAATGTAGTGCC ATGGTCATAGGAGGATTCGAG	csSC46	62	600
Lr34/Yr18 F R	GTTGGTTAAGACTGGTGATGG TGCTTGTATTGCTGAATAGT	csLv34	58	229
Sr31/Lr26/Yr9 F R	CTCTGTGGATAGTTACTTGATCGA CCTAGAACATGCATGGCTGTTACA	Iag95	55	1200
Sr38/Lr37/Yr17 F R	AGGGGCTACTGACCAAGGCT TGCAGCTACAGCAGTATGTACACAAA A	cslVrgal3 F	60	382

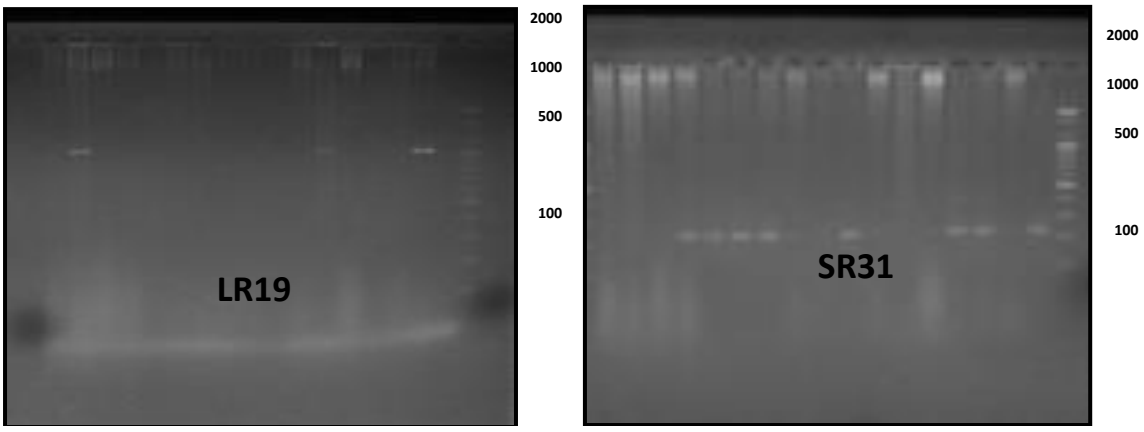
النتائج والمناقشة

جدول 3: نتائج ظهور الجينات في الأصناف المدروسة

المؤشر / الصنف	Sr2	Sr22	r24/ Lr24	Lr19/ Sr25	Sr26	Sr36	Sr46	Sr 31	Lr34	Sr39	عدد الجينات
1	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	8
2	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	9
3	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	10
4	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	8
5	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	6
6	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	9
7	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	8
8	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	9
9	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-	5
10	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	6
11	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	9
12	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	7
13	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	6
14	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	6
15	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	8
16	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	9
17	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+	6

إن تحليل ودراسة نتائج تضاعف المؤشرات المرتبطة بجينات المقاومة أظهرت مدى واسع من التباين ووجود عدد كبير من هذه الجينات في الأصناف قيد الدراسة، كما موضح (جدول 3).

وكما يوضح شكل (1) نتائج تضاعف مؤشرات مقاومة صدأ الساق للجين SR31 وصدأ الأوراق LR19 المرحلة على هلام الاكاروز بتركيز 1.5 % مع الدليل الحجمي 100 bp DNA ladder.



شكل 1: نتائج تضاعف مؤشرات مقاومة صدأ الساق للجين SR31 وصدأ الاوراق LR19 المرحلة على هلام الاكاروز بتركيز 1.5 % ،إذ (M) الدليل الحجمي 100 bp DNA ladder، 1 العز، 2 العراق، 3 تموز2 ، 4 انتصار،5 بيعة، 6 نور، 7 تموز3، 8 الرشيد، 9 مستورد استرالي، 10 رشيد2، 11 رزگاري، 12 سميتو، 13 اراس، 14 ارانتو، 15 تلعفر، 16 اباء99، 17 شام6.

ويلاحظ من دراسة الجدول المذكورة أنفاً إن الصنف (3) تموز 2 قد امتلك اعلى عدداً من الجينات التي بلغت 10، يليها الأصناف (16،11،8،6،2) وهي العراق، نور،الرشيد، رزگاري، IPA99 وقد بلغت 9 ، بينما كان الصنف (9) مستورد استرالي قد امتلك خمسة جينات وهي الأقل عدداً. ويمكن أن نلاحظ أيضا إن الجينات \Sr24 Lr24, Sr36 كانت الأكثر ظهوراً في الأصناف المدروسة ،إذ إنها موجودة في الأصناف جميعها، وتشير اغلب المصادر إلى ارتفاع نسبة ظهور هذه الجينات في مختلف الأصناف والضروب الوراثية، (15،17)، ويذكر كل منJin و Singh (9) ان المقاومة بالدرجة الاولى في 450 خطاً وراثياً من القمح عزيت الى جين Sr24 وبالدرجة الثانية الى جين Sr36 ، يليها الجين Lr 34 حيث ظهر في 15 صنفاً وتراوحت بقية الجينات في الظهور بين ذلك. ونلاحظ في الدراسة الحالية ان ظهور الجين Sr31 اقتصر على 3 أصناف فقط هي العراق ، نور واباء 99 وهذا ما يؤكده كل من Pretorius وجماعته (17) و urnhauser وBóna (18) عن انخفاض نسبة ظهور هذا الجين في الاصناف والضروب الوراثية المدروسة من قبلهم.ومن هذه النتائج تتكون لدينا فكرة واضحة بما يمكن ان ننصح به المزارعين، بعد مراجعة تاريخ ظهور الأصداء في المناطق المختلفة من العراق عن الأصناف التي يفضل زراعتها في منطقة معينة حسب وجود جينات المقاومة فيها، إذ تذكر المصادر ان الضروب الوراثية التي تحمل الجين Sr2 تظهر مستويات مقاومة عالية تصل الى 80% لصدأ الساق من غيرها التي لاتحمل هذا الجين (1). كذلك من المعروف ان وجود الجين Sr 31 في تركيب وراثي معين يوفر حماية ويظهر صفة المقاومة لصدا الساق خاصة للسلالة Ug99 من الفطر والسلالات المنحدرة منها (3). الا ان التهديد الأكثر خطورة لمحصول القمح، هو ظهور السلالات الطارئة شديدة الضراوة من صدأ الساق التي تكون ذات ضراوة لعدد من الجينات منها Sr31, Sr36 وهي السلالات من نسل Ug99 (24).لهذا تذكر المصادر ان عملية مراكمة الجينات مثل Sr46, Sr2, Sr22 Sr24\Lr24

Sr25\Lr19, Sr26, Sr36, في تراكيب وراثية معينة يوفر حماية طويلة الامد ضد السلالات الطارئة وإستراتيجية مهمة لتطوير ضروب حنطة ذات مقاومة متينة وثابتة لصدأ الساق والاوراق (2، 3، 9، 11، 15، 17، 18، 21) خاصة لسلالة Ug99 والسلالات المنحدرة منها. كذلك جينات المقاومة لصدا الاوراق مثل Lr19, Lr24,Lr34 وغيرها من الجينات، كما يذكر كل من Park (16) و Pretorius (17) على اهمية تكوين مقاومة معقدة للصدأ من خلال مراكمة هذه الجينات وغيرها لتوفير قاعدة وراثية متينة لمواجهة الصدأ، لحين اكتشاف جينات جديدة، الذي يجب ان يكون من اولويات البحث لتطوير محصول القمح. ويعمل علماء التربية في العالم على إيجاد جينات المقاومة في الأنواع القريبة من الحنطة، مثل الجينات العنقودية ومنها Sr38\Lr37\Yr17; Lr34\ Yr18 التي توفر حماية ضد صدأ الساق والأوراق والمخطط او الاصفر (1, 5, 14). ومن هنا تبرز أهمية الكشف عن وجود هذه الجينات في الأصناف المزروعة، إذ يذكر Bariana (1) ان تشخيص الطراز الوراثي الذي يحمل مستويات عالية من المقاومة عن طريق مؤشرات الدنا، يشير الى ان هذه الصفات تتجمع هرمياً او تتراكم في تركيب وراثي معين مما يسبب مستويات اعلى من المقاومة للمرض، وان المقاومة الوراثية هي الطريقة المفضلة لتقليل الخسائر في محصول الحنطة التي تسببها الاصداء (3، 7، 10، 19، 21).

المصادر

1-Bariana, H.; N.Willey; B. Venkata; A. Lehnensiekand; G.Standen (2004). Breeding methodology to achieve durability for rust resistance in wheat. In:Proceeding of the 54th Australian cereal chemistry conference and 11th wheat breeders assembly, 21-24 September, Canbera, ACT, Australia,2-8.

2-Bariana, H.; H. Miah; G. Brown; N. Willey; and A. Lehmensiek, (2007). Molecular Mapping of durable rust resistance in wheat and its implication in breeding. In: Buck, H., Nisi, J. and Salomón, N. (eds.). wheat production in stressed environments. Proceedings of the 7th International Wheat Conference, 27 November – 2 December (2005). Mar del Plata, Argentina.

3–Bernardo, A.; R. Bowdenm; M. Rouse; M. Newcomb; D. Marshall and Bai, G.(2013). Validation of molecular markers for new stem rust résistance genes in U. S. hard winter wheat, Crop Sci.,53:755-64.

4–Blaszcyk, L.; I. Kramer; F. Ordon; J. Chelkowski; M. Tyrka; G. Vida; and I. Karsai, (2008).Validity of selection DNA markers for breeding. Cereal Res. Communic. 36(2):201-213.

5–Bolton, M.; J. Kolmer; and D. Garvin (2008). Wheat leaf rust caused by Puccinia triticina. Molecular Plant Pathology, 9(5):563-75.

6–Francia, E.; G. Tacconi; C. Grosatti; D. Barabaschi; D. Bulgarelli; Dall'Aglio E. and G. Valè (2005). Marker assisted selection in crop plants. Plant Cell,Tissue and Organ Culture, 82: 317-42.

7-Gupta, P.; R. Varshney; P. Sharma and B. Ramesh (1999). Molecular markers and their applications in wheat breeding. Plant Breeding, 118:369-90.

8–Helguera, M.; I. Khan; J. Kolmer; L. Lijavetzky; L. Zhong-qi and J. Dubcovsky (2003). PCR assays for the Lr37-Yr17- Sr38 cluster of rust resistance genes and their use to develop isogenic hard red spring wheat lines. Crop Sci., 43:1839-47.

9–Jin, Y. and R. Singh (2006). Resistancee in U.S. Wheat to recent Eastern Aafrican Isolates of Puccinia graminis f. sp.Tritici with virulence to Resistance gene SR31. Plant Disease, 90(4):476-80.

10-Kokhmetova, A. and M. Atishova (2012). Identification of sources of resistance to wheat stem rust using molecular markers. Russian J. Genetics, 2(6):486-93. (Abstract).

11-Liu, S.; L. Yu; R. Singh; Y. Jin; M. Sorrells, and J. Anderson (2010). Diagnostic and co-dominant PCR markers for wheat stem rust resistance genes Sr25 and Sr26. Theor. Appl. Genet., 120:691-97.

12-Marasas, C.N.; M. Smale and R.P. Singh (2004). The economic impact in developing countries of leaf rust resistance breeding in CIMMYT-related spring bread wheat. Int. Maize and Wheat Improvement Center, Mexico, D.F.

13-McIntosh, R.A.; C.R. Wellings and R.F. Park (1995). Wheat rusts: An atlas of resistance genes. Kluwer Academic, Boston, MA.

14-Mumtaz, S.; I. Khan; S. Ali; B. Zeb; A. Iqbal; Z. Shah, and Swati, Z.(2009).Development of RAPD based markers for wheat rustresistance gene cluster (Lr37-Sr38-Yr17) derived from Triticum ventricosum L.8(7):1188-92.

15-Olson, E.; G. Brown-Guedira; D. marshall; Y. Jin; M. Mergoum; I. Lowe, and J. Dubcovsky (2010). Genotyping of U. S. wheat germplasm for presence of stem rust resistance genes Sr24, Sr36 and Sr1RS^{amigo}. Crop Sci., 50:668-75.

16-Park, R. (2008). Breeding cereals for rust resistance in Australia. Plant Pathol., 57:591-602.

17-Pretorius, Z.; Y. Jin; C. Bender; L. Herselman and R. Prins (2012). Seedling resistance to stem rust race Ug99 and marker analysis for Sr2, Sr24 and Sr31 in South African wheat cultivars and lines. Euphytica, 186:15-23.

18-Purnhauser, L. and L. Bóna (2009). Detection of Sr31 and stem rust resistance genes by molecular markers in wheat cultivars registered in Hungary. Res. J. Agric. Sci., 41(2): 319-22.

19-Saharan, M.; R. Tiwari; S. Krattinger; B. Keller; Priyamvada and B. Mishra (2008). Genetic and phenotypic mapping for leaf rust resistance Lr34 in Indian bread wheat population. Directorate of Wheat Res., India, Institute of Plant Biology, Switzerland.

20-Saghai- Maroof, M. A.; K. M. Soliman; R. A. Jorgensen and R. W. Allard, (1984). Ribosomal DNA spacer length polymorphisms in barley:Mendelian inheritance, chromosomal location and population dynamics Proc. Natl. Acad. Sci., USA. 81: 8014-8018.

21-Sumíková, T. and A. Hanzalová (2010). Multiple PCR assay to detect rust Resistanc genes Lr26 and Lr37 in Wheat. Czech J. Genet. Plant Breed., 46(2):85-89.

22-Weigand, F.; M. Baum and S. Udupa, (1993). DNA molecular marker techniques,technical manual. No.20. International Center for Agric. Res. in the Dry Areas. Aleppo, Syria.

23-Weising, K. and R.C. Gardner (1999). A set of conserved PCR primers for simple sequence repeat polymorphsim in chloroplast genomes of dicotyledonous angiosperms. Genome 42: 9-19.

24–Zheng, Q.; D. Klindworh; T. Friesen; A. Liu; Z. Li; S. Zhong; Y. Jin and S. Xu (2014). Characterization of Thinopyrum species for wheat stem rust resistance and ploidy level. Crop Sci., 54: 1-10.

MOLECULAR SCREENING FOR SOME WHEAT CULTIVARS CULTIVATED IN IRAQ TO DETECT SOME WHEAT RUST GENES TO DISCASE

H. A. A. Mohammed **M. A. A. Alwadood**

ABSTRACT

Molecular screening was carried out on 17 varieties of wheat cultivated in Iraq to investigate 10 DNA markers (SSR and STS) associated with 12 rust resistance genes, caused by fungus *Puccinia spp*. The results showed that variety 3 Tamooz2 possessed the highest number of resistance genes (10), followed by (Iraq, Noor, AL-Rasheed, Rizgaree and IPA99) 9 genes, while variety 9 Australian had the lowest number of genes (5). It was also noted that the genes Sr24\ Lr24, Sr36 were the most dominant of studied genes, as it was presented in all of the wheat varieties, followed by Lr34 gene which was present in 15 of the tested varieties, while others tested genes were in between.

Plant Protection Office, Ministry of Agric.,Bagdad,Iraq.