تقويم تحمل الملوحة لأصناف مختلفة من الرز

شذى عايد يوسف* ابراهيم شعبان السعداوي**
حفصة روناك*** عادل يوسف نصر الله****

الملخص

تم تقويم تحمل الملوحة باستخدام تقنية الغربلة السريعة 14 تركيباً وراثياً عراقياً من الرز وهي عنبر 33،عنبر بغداد، عنبر فرات، عراق5، عراق7، عراق8، عراق11، مناذرة، عنبر هجين، طفرة 2، طفرة 10، طفرة 16، اباء 1 واباء 2، كما استخدمت تقنية التضاعف العشوائي ذي الاشكال المتعددة لسلسلة الدنا (RAPD) في محاولة لايجاد عدد من البواديء يمكن الاعتماد عليها كدالات لتحمل الملوحة، اذ تم اختبار 80 بادئاً ذوات عشر قواعد نيوكليوتيدية mer oligomer -10 نوع UBC.

اظهرت النتائج ان جميع التراكيب الوراثية المختبرة كانت حساسة للملوحة باستثناء الصنف عنبر فرات الذي كان متوسط التحمل للملوحة. كما اشارت النتائج الى امكانية استخدام تقنية التضاعف العشوائي المتعدد الاشكال لسلسلة الدنا لتمييز الاصناف الحساسة والمتحملة للملوحة لوجود ارتباط بين صفة تحمل الملوحة والبواديء UBC102، UBC161 و UB400.

المقدمة

يعد الرز من المحاصيل ذات الحساسية المتوسطة للملوحة، اذ تبلغ عتبة التثبيط له 3 ديسي سيمنز/م (26). واشارت العديد من البحوث الى امكانية اجراء عملية الغربلة والانتخاب لصفة تحمل الملوحة لنبات الرز في مرحلة البادرة لكونها المرحلة الحساسة للملوحة، الا ان العملية تكون صعبة تحت ظروف الحقل بسبب تداخلها مع شدود مختلفة ذات صلة بالتربة وأخرى بيئية مثل الحرارة والرطوبة النسبية واشعة الشمس، لذا فان تداخل تلك العوامل البيئية مع الملوحة يؤدي الى صعوبة الاعتماد على عمليتي الغربلة والانتخاب لاصناف الرز تحت ظروف الحقل (10، 17). لذا فان تقنية الغربلة السريعة لتحمل الملوحة بالاعتماد على الاضرار المرئية على الأوراق عند استخدام مدرج التقويم المقترح من قبل Gregorio وSenadhira (18) يكون مهماً جداً ويمكن بوساطته اختبار 300 تركيبا وراثيا من الرز لتحملها للملوحة خلال شهر وبمعدل ساعتي عمل/يوم.

تستعمل في الدراسات الحديثة تقنية فحص الاشكال المظهرية polymorohism للحامض النووي دنا DNA كدالة او مؤشر marker للمساعدة في برامج التربية، ولقد عززت تقنية التفاعل التضاعفي لسلسلة الدنا Polymerase Chain Reaction (PCR) من تطور نظام الفحص الجزيئي والذي من احد استخداماته تقنية التضاعف العشوائي المتعدد الاشكال لسلسلة الدنا (RAPD) Random Amplified Polymorfic DNA. وتكمن اهمية هذه التقنية في امكانية استخدامها لتحليل التغايرات الوراثية في المحاصيل المختلفة (15) والاختلافات بين اصناف النوع الواحد، كما انها تعد طريقة كفوءة لتحديد درجة العلاقة او القرابة بين الاصناف المختلفة (23)، فضلا عن ذلك تستخدم هذه التقنية كدالة في برامج التربية والتحليل الوراثي (19، 20) لتشخيص وتمييز الاصناف التي لها صلة بالصفة المدروسة (32، 39).

* وزارة العلوم والتكنولوجيا- بغداد، العراق.
** كلية العلوم، جامعة بغداد- بغداد- العراق.
*** مختبر تربية النبات- الوكالة الدولية للطاقة الذرية، النمسا.
**** كلية الزراعة، جامعة بغداد- بغداد-العراق.

نفذ في دائرة البحوث الزراعية –وزارة العلوم والتكنولوجيا برنامج لتربية محصول الرز بهدف الحصول على تراكيب وراثية تتحمل الملوحة باستخدام طرائق التربية التقليدية والتشعيع وزراعة الانسجة، ونظرا الى حاجة العراق الى قاعدة معلومات عن تحمل الاصناف المحلية من الرز للملوحة من جهة والحاجة الملحة لمنظومة ذات كفاءة عالية في تقويم التغايرات الناتجة من البرنامج فقد استهدف البحث الحالي تقييم بعض التراكيب الوراثية المستحدثة في العراق لتحمل الملوحة. فضلاً عن استخدام تقنية التضاعف العشوائي لقطع الدنا في محاولة لايجاد عدد من البواديء يمكن الاعتماد عليها كدالات لتحمل الملوحة.

المواد وطرائق البحث

الغربلة السريعة لاختبار تحمل الملوحة في تراكيب وراثية من نبات الرز

نفذ البحث في مختبرات الوكالة الدولية للطاقة الذرية في النمسا. اتبعت طريقة الغربلة المستحدثة من قبل Gregorio وجماعته (17)، اذ استعملت حاويات بلاستيكية بابعاد 45×30×12 سم ثبتت عليها شبكة بلاستيكية ذات فتحات متقاربة لوضع البذور النابتة عليها ومنع سقوطها في المحلول وفي الوقت نفسه تسمح للجذور بان تكون على تماس مع المحلول المغذي وتنمو فيه بحرية. وقد وضع فوق الشبكة اطار بلاستيكي مقسم طوليا وعرضيا يحوي 10 خطوط وكل خط يحوي 10 فتحات دائرية لوضع بادرة واحدة فيه. زرعت البادرات الصغيرة للتراكيب الوراثية عنبر 33، عنبر بغداد، عنبر فرات، عنبر هجين، عراق 5، عراق 7، عراق 8، عراق 11، مناذرة، طفرة 2، طفرة 10، طفرة 16، اباء 1 واباء 2 في الحاويات وبواقع 30 بادرة ولكل تركيب وراثي، واستخدم الصنفان المتحملان للملوحة Nona Bokra و Pokkali والصنفان الحساسان للملوحة IR28 وIR29 كفواحص لاغراض المقارنة. تمت زراعة 6 تراكيب وراثية في كل حاوية اضافة الى الصنفين المتحملين والحساسين للملوحة لغرض المقارنة. تركت البادرات الصغيرة لتنمو في الماء المقطر لمدة 3 ايام لغرض السماح للبادرات بتعديل الاضرار التي تحدث للجذير في اثناء الزراعة ثم استبدل الماء المقطر بالمحلول المغذي يوشيدا (37) المملح بكلوريد الصوديوم للحصول على درجة توصيل كهربائي مقدارها 6 ديسي سيمنز/م لغرض الاقلمة، وبعد ثلاثة ايام استبدل المحلول بمحلول اخر ذي توصيل كهربائي مقداره 10 ديسي سيمنز/م، وخلال مدة التجربة تم تعديل الاس الهيدروجيني للمحلول يوميا الى 5 باضافة HCl او NaOH. نفذت التجربة في البيت الزجاجي وتحت ظروف مسيطر عليها، اذ كانت درجة الحرارة 29 / 20 م نهار/ ليل ورطوبة نسبية 70%. تم تبديل المحلول كل اسبوع وجرى تقويم البادرات بعد اسبوعين من بداية التعرض للشد الملحي واعطيت البادرات درجات بحسب المظهر الخارجي وعلى اساس مدرج التقويم المقترح من قبل Gregorio وSenadhira (18) (جدول 1).

جدول 1: مدرج التقويم لتحمل الملوحة والمقترح من قبل Gregorio و Senadhira (18)

درجة التحمل	المشاهدات	درجة التحمل للملوحة
1	النمو طبيعي – لا توجد اضرار على الورقة	عالي التحمل
3	نمو قريب من الطبيعي – تحرق في قمم الأوراق والتفافها	متحمل
5	اعاقة شديدة لنمو البادرة، معظم الاوراق ملتفة	معتدل التحمل
7	توقف نهائي لنمو البادرة، جفاف معظم الاوراق	حساس
9	موت معظم الاوراق	حساس جدا

تأثير الملوحة في نمو تراكيب وراثية من نبات الرز

ولغرض التاكد من وجود ارتباط بين نتائج تقنية الغربلة السريعة ونمو النباتات تحت الظروف الملحية الاعتيادية تم اختبار تاثير الملوحة في الاصناف عنبر 33، عنبر بغداد، عنبر فرات، Nona Bokra، Pokkali وIR29 وكما يأتي:

تم تثقيب اصص بحجم ¼ كغم تربة من جميع الجهات وضع قماش قطني في داخلها لغرض الحفاظ على التربة بداخلها. عبئت الاصص بتربة ذات درجة توصيل كهربائي مقدارها 3 ديسي سيمنز/م ثم وضعت الاصص في حاويات كبيرة تحتوي على المحلول المغذي يوشيدا وذا درجة توصيل كهربائي مقداره 3 ديسي سيمنز/م ثم وضعت الحاويات في البيت الزجاجي (التابع لدائرة البحوث الزراعة– العراق) وللظروف السابقة نفسها. زرعت البادرات بعمر 2 اسبوع في الاصص وبواقع 3 بادرات/اصيص، وبعد اسبوعين من الزراعة تم تمليح محلول يوشيدا لمعاملة الملوحة بملح كلوريد الصوديوم للحصول على شد ملحي مقداره 4 ديسي سينمز/م وبعد يومين رفع الشد الملحي الى 6 ثم الى 10 ديسي سيمنز/م. تم تفريغ المحلول المغذي من الحاويات لكل من معاملة المقارنة (3 ديسي سيمنز/م) ومعاملة الملوحة (10 ديسي سيمنز/م) كل اسبوع، ثم تركت الاصص بدون محلول لمدة 48 ساعة لغرض التهوية ومنع الظروف الاختزالية (5)، اعيدت اضافة محاليل مغذية جديدة وبالشدين الملحيين ذاتيهما. وبعد ثلاثة اشهر من الزراعة تم انهاء التجربة بعد موت معظم نباتات الاصناف عنبر 33، عنبر بغداد وIR29 واكثر من نصف نباتات الصنف عنبر فرات في معاملة الملوحة. تم اخذ قياسات طول المجموع الخضري والجذري والوزن الجاف للمجموع الخضري والجذري للنبات بعد 50 يوما من تاريخ الزراعة.

نفذت هذه التجربة العاملية باستخدام تصميم القطاعات العشوائية الكاملة وبعاملين هما الاصناف والملوحة (3 و10 ديسي سيمنز/م) وبواقع 5 مكررات، ثم حللت البيانات إحصائياً واستخرج اقل فرق معنوي LSD على مستوى 0.05 للمقارنة بين متوسطات المعاملات (3).

طريقة التضاعف العشوائي المتعدد الاشكال لسلسلة الدنا RAPD

بعد ان تم اختبار حساسية التراكيب الوراثية لتحمل الملوحة استخدمت طريقة RAPD في محاولة لايجاد عدد من البواديء يمكن الاعتماد عليها كدالات markers لتحمل الملوحة فضلا عن تسليط الضوء على جانب التنوع الوراثي لاصناف الرز في العراق وحسابه ضمن اولويات التنمية الزراعية التي تضم مشاريع التربية والتحسين، ويبرز هنا دور مؤشرات الدنا DNA Markers في تحديد هوية الصنف لحفظ حقوق مربي النبات عند اكتشافه لصنف جديد ولتقدير القرب او البعد الوراثي بين الاصناف لما لذلك من اهمية في برامج التربية من خلال الاختيار الانسب للآباء التي تحمل الصفات المرغوبة.

استخلاص الدنا

اعتمدت طريقة Xie وجماعته (35) في استخلاص الدنا من اوراق بادرات 11 صنفا من نبات الرز وهي الاصناف الحساسة للملوحة عنبر 33، عنبر بغداد، عراق 5، عراق 7، عراق 8، عراق 11، IR28 وIR29 والصنف المتوسط الحساسية للملوحة عنبر فرات والصنفين المتحملين للملوحة Pokkali و NonaBokra (وحسب النتائج التي تم التوصل اليها في تقنية الغربلة السريعة).

التفاعل التضاعفي لسلسلة الدنا Polymerase Chain Reaction (PCR)

استعمل 80 بادئا ذوي 10 نيوكليوتيدات (10 – mer oligonucletide primer) نوع UBC (University of British Columbia, Vancouver Canada) (جدول 2). اذ ان كل تفاعل يحوي 15

نانوغرام من الدنا المستخلص (قالب الدنا) و1.25 وحدة من Taq DNA polymerase و0.2 ملي مول من البادىء primer و0.17 ملي مول من القواعد النيتروجينية dNTP (dATP، dGTP، dCTP وdTTP) و1.7 ملي مول من كلوريد المغنيسيوم اضافة الى المحلول الداريء PCR buffer (60 ملي مول من Tris – HCl ذي اس هيدروجيني 8.4 و150 ملي مول من كلوريد البوتاسيوم KCl و1.5 ملي مول من كلوريد المغنيسيوم $MgCl_2$)، أكمل الحجم الى 30 ميكروليتر بالماء المقطر المعقم ثم وضعت في انابيب eppendorf خاصة بجهاز PCR (eppendorf thermomixer 5436).

جدول 2: عدد وتركيب البواديء المستخدمة في تجربة التضاعف العشوائي لقطع الدنا

البادىء	تتابع البادئ 3← 5	البادىء	تتابع البادئ 3← 5	البادىء	تتابع البادئ 3 ← 5
UBC1	CCTGGGCTTC	UBC117	TTAGCGGTCT	UBC248	GAGTAAGCGG
UBC8	CCTGGCGGTA	UBC118	CCCGTTTTGT	UBC249	GCATCTACCG
UBC9	CCTGCGCTTA	UBC120	GAATTTCCCC	UBC250	CGACAGTCCC
UBC11	CCCCCCTTTA	UBC122	GTAGACGAGC	UBC251	CTTGACGGGG
UBC12	CCTGGGTCCA	UBC123	GTCTTTCAGG	UBC255	TTCCTCCGGA
UBC13	CCTGGGTGGA	UBC127	ATCTGGCAGC	UBC259	GGTACGTACT
UBC15	CCTGGGTTTG	UBC132	AGGGATCTCC	UBC264	TCCACCGAGC
UBC17	CCTGGGCCTC	UBC133	GGAAACCTCT	UBC266	CCACTCTGTG
UBC23	CCCGCCTTCC	UBC139	CCCAATCTTC	UBC267	CCCATCTGTG
UBC31	CCGGCCTTCC	UBC144	AGAGGGTTCT	UBC278	GGTTCCAGCT
UBC35	CCGGGGTTAA	UBC145	TGTCGGTTGC	UBC320	CCGGCATAGA
UBC45	TTAACCCCGG	UBC149	AGCAGCGTGG	UBC321	ATCTAGGGAC
UBC59	TTCCGGGTGC	UBC153	GAGTCACGAG	UBC330	GGTGGTTTCC
UBC64	GAGGGCGGGA	UBC160	CGATTCAGAG	UBC331	GCCTAGTCAC
UBC73	GGGCACGCGA	UBC161	CGTTATCTCG	UBC340	GAGAGGCACC
UBC76	GAGCACCAGT	UBC176	CAAGGGAGGT	UBC341	CTGGGGCCGT
UBC77	GAGCACCAGG	UBC178	CCGTCATTGG	UBC350	TGACGCGCTC
UBC82	GGGCCCGAGG	UBC185	GTGTCTTCAC	UBC351	CTCCCGGTGG
UBC84	GGGCGCGAGT	UBC209	TGCACTGGAG	UBC360	CTCTCCAGGC
UBC85	GTGCTCGTGC	UBC217	ACAGGTAGAC	UBC370	TCAGCCAGCG
UBC87	GGGGGGAAGC	UBC223	GATCCATTGC	UBC374	GGTCAACCCT
UBC97	ATCTGCGAGC	UBC224	TCTCCGGTAT	UBC380	AGGAGTGAGA
UBC101	GCGGCTGGAG	UBC241	GCCCGACGCG	UBC390	TCACTCAGAG
UBC102	GGTGGGGACT	UBC242	CACTCTTTGC	UBC400	GCCCTGATAT
UBC104	GGGCAATGAT	UBC243	GGGTGAACCG	–	–
UBC105	CTCGGGTGGG	UBC245	CGCCTGCCAG	–	–
UBC114	TGACCGAGAC	UBC246	TATGGTCGCG	–	–
UBC115	TTCCGCGGGC	UBC247	TACCGACGGA	–	–

ولغرض اظهار الحزم bands استخدمت تقنية الهجرة الكهربائية electrophoresis باستخدام هلام الاكروز مع صبغة الاثيديوم بروميد، تم فحص الحزم باستخدام جهاز Ultraviolet Radiation – Obligatory eye Protetion باستخدام الاشعة ما فوق البنفسجية UV illumination، تم طبع صور

الحـــزم باستـــخدام جهاز **Mitsubish Videocopy Processor P67E** علما انه الى جانب ترحيل العينـــات يرحل معها الدنا القياسي نوع **X** ذو الوزن الجزيئـــي **70** الى **12500** زوج قاعدي (**bp**) لغـــرض تحديـــد المواقـــع الفيزيائية للحزم.

ومن النقاط الاساسية التي يتعين اعتمادها لتطبيق مؤشرات **RAPD** على مجين أي نوع من النباتات ومنـــها الرز هي الحصول على النتائج نفسها عند اعادة التجربة (**12**، **27**). وفي هذه الدراسة وبعد ضـــبط التركيـــز لكـــل مكونات التفاعل واستخدام الجهاز نفسه والدرجات الحرارية تم الحصول على النتائج نفسها عند اعادة استخدام بعـــض البادئات وقد لاحظ الشئ ذاته **Ronning** وجماعته (**29**) مما يدل الى ان مؤشرات **RAPD** تستند على اختلافـــات حقيقية وثابتة.

تم تحديد الحزم مرئياً للاصناف المدروسة ولكل باديء، بعد ذلك تم ادخال البيانات في الحاسبة على اساس وجود (**1**) او عدم وجود (**0**) الحزمة وفي كل موقع فيزيائي لكل باديء (**23**)، ولغرض ايجاد العلاقة الوراثية بين اصناف الرز المستخدمة في هذه الدراسة تم تحليل البيانات بادخال القيم في نظام: **Sequential Algomerative Heirachical and Nested Clustering (SAHN)** (**30**) الذي يعتمد على حساب المعدلات الحسابية ضمن **Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Average (UPGMA)** وكل ذلك ضمن البرنامج الاحصائي **Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System (NTSYS)** (**28**). ثم تم رسم مخطط التحليل التجميعي او ما يسمى بشجرة العلاقة الوراثية **Dendrogram** للاصناف المدروسة.

النتائج والمناقشة

أشارت النتائج إلى وجود تأثير واضح للملوحة في أوراق التراكيب الوراثية المختبرة (شـــكل **1**)، إذ حـــدث التفاف للورقة الأولى بعد **4** ايام من التعرض للملوحة ثم جفافها، وبعد أسبوعين من تعرض النباتات للملوحـــة لـــوحظ التفاف معظم أوراق البادرة وتحولها الى اللون الأبيض ثم موت معظم بادرات الصنفين الحساسين والتراكيـــب الوراثيـــة المدروسة، باستثناء الصنف عنبر فرات، اذ كانت درجة التقويم للأصناف المختبرة بين **7.2** و **8.6** في حين كانت درجة التقويم للصنف عنبر فرات **6.7** (جدول **3**)، وهذا يشير إلى ان جميع التراكيب الوراثية كانـــت حـــساسة للملوحـــة باستثناء الصنف عنبر فرات والذي عدّ من الأصناف المتوسطة التحمل للملوحة استنادا إلى مدرج التقـــويم المعتمـــد في الدراسات السابقة (**17**، **18**، **38**)، إذ وجد ان الأصناف المتحملة للملوحة تتخذ درجة تقـــويم تكـــون بـــين **1-5** والمتوسطة التحمل للملوحة بين **5-7** والحساسة للملوحة **7-9** والحساسة جدا للملوحة تتخذ درجة **9**، وان اختلاف الصنف عنبر فرات عن بقية التراكيب الوراثية في درجة تحمل الملوحة لا يمكن عزوه الاّ للتغايرات الوراثية لصفة تحمـــل الملوحة لان ظروف التجربة كانت متماثلة الى حد كبير، اما بالنسبة للفواحص **Nona Bokra**، **Pokkali**، **IR28** و**IR29** فكانت درجة تقويمها مشابهة للبحوث السابقة والمنفذة من قبل محمـــد (**6**)، **Gregorio** وجماعتـــه (**17**)، **Gregorio** و**Senadhira** (**18**)، **Zapata** وجماعته (**38**) إذ كـــان الـــصنفان **Nona Bokra** و **Pokkali** اقل تأثرا بالملوحة وبلغت درجة التقويم لهما **4.5** و **5** على التوالي، فعلى الرغم من ان الملوحة أدت إلى التفاف الورقتين الأولى والثانية الا انه ظهرت أوراق جديدة ولم يتوقف النمو، في حـــين بلغـــت درجـــة التقـــويم **9** للـــصنفين **IR28** و**IR29**. ولقد اختبر تاثير الشد الملحي في نمو الاصناف عنبر **33**، عنبر بغـــداد، عنـــبر فـــرات، **Nona Bokra**، **Pokkali** و**IR29** ووجد انه بعد **50** يوما من الزراعة في معاملة الملوحة (**10** ديسي سيمنز/م) مـــات عـــدد مـــن نباتات الاصناف عنبر **33**، عنبر بغداد و**IR29** وبعد اسبوعين من ذلك التاريخ ماتـــت معظم نباتات تلك الاصنـــاف

من اليمين الى اليسار IR29، IR28 ، عنبر 33، عنبر بغداد، عراق 5، عراق 7، عراق 8، عنبر فرات، Nona Bokra و Pokkali

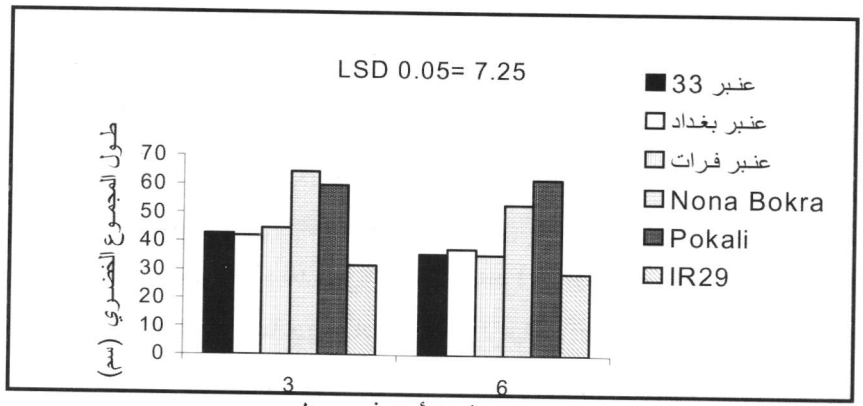
شكل 1: تاثير الملوحة في اوراق التراكيب الوراثية.

جدول 3: درجة التقويم ودرجة التحمل للملوحة في التراكيب الوراثية تحت ظروف الشد الملحي **10** ديسي سيمنز/م في المحاليل المغذية

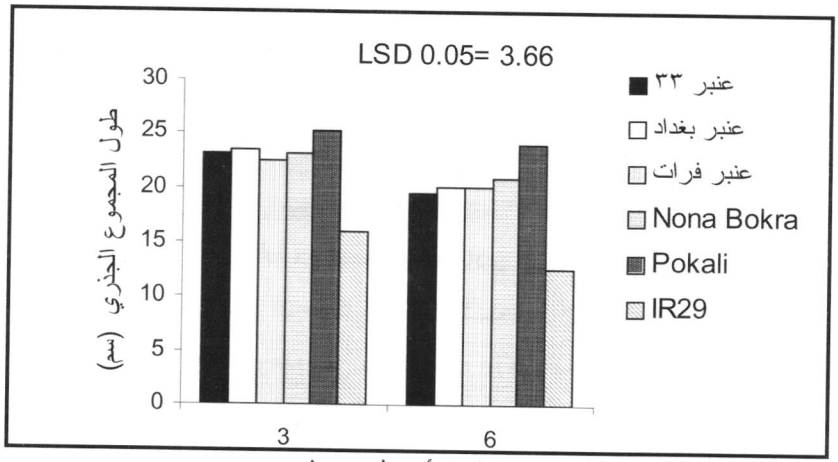
التركيب الوراثي	درجة التقويم	درجة التحمل للملوحة	التركيب الوراثي	درجة التقويم	درجة التحمل للملوحة
عنبر33	8.0	حساس	طفرة2	8.4	حساس
عنبر بغداد	8.6	حساس	طفرة10	8.6	حساس
عنبر فرات	6.7	متوسط التحمل	طفرة16	8.4	حساس
عراق5	7.4	حساس	اباء 1	7.6	حساس
عراق7	8.2	حساس	اباء 2	8.0	حساس
عراق8	7.6	حساس	IR28	9.0	حساس جدا
عراق11	7.8	حساس	IR29	9.0	حساس جدا
مناذرة	8.0	حساس	Nona Bokra	4.5	متحمل
عنبر هجين	7.2	حساس	Pokali	5.0	متحمل

وعدد من نباتات الصنف عنبر فرات (الصنف المتوسط التحمل للملوحة) في حين حدث بعد ثلاثة اشهر من تاريخ الزراعة موت عدد من نباتات الصنف Nona Bokra واكثر من نصف عدد نباتات الصنف عنبر فرات، اما في معاملة المقارنة فكانت جميع نباتات الاصناف المختبرة حية ولغاية انهاء التجربة. ولم تتطرق الدراسة الى معرفة السبب وراء موت البادرات، الاّ ان الدراسات أشارت إلى التأثيرات السلبية للملوحة في معظم أو جميع العمليات الفسلجية في النبات وخاصة إذا كان مستوى الملوحة أعلى من عتبة التثبيط للمحصول المدروس، فالملوحة تقلل من امتصاص الماء والعناصر الغذائية كما انها تثبط عملية البناء الضوئي والتنفس والفعاليات الحيوية الأخرى التي تؤدي إلى النمو والحاصل، فهي إما ان تسبب انخفاضا في فعالية تلك العمليات او تسبب موت النبات (14)، كما لاحظ Lutts وجماعته (25) ان ملح كلوريد الصوديوم يعجل في حدوث الشيخوخة في أوراق الرز ويزيد من نفاذية الاغشية والتسريع في العمليات الضارة مما يؤثر في نمو جميع اوراق الأصناف الحساسة للملوحة. وعند دراسة تاثير الملوحة على طول المجموع الخضري والجذري والوزن الجاف لهما وجد انها اثرت معنويا في طول المجموع الخضري للصنفين عنبر فرات وNona Bokra (شكل 2) في حين ان الملوحة قد اثرت معنويا في طول الجذر للاصناف عنبر 33، عنبر بغداد وIR29 (شكل 3). اما بالنسبة للوزن الجاف للمجموعين الخضري والجذري (شكل 4) فانها اثرت معنويا في الوزن الجاف للمجموعين الخضري والجذري للاصناف عنبر 33، عنبر فرات، Pokkali وIR29. يلاحظ من نتائج تجربة تاثير الملوحة في نمو النباتات، ان تحمل الملوحة للاصناف يتوافق مع بقاء النباتات حية تحت الظروف الملحية ومع طول المجموع الجذري للصنف وهذا يتفق مع Akbar (9)، Akbar وPonnamperuma (10)، William

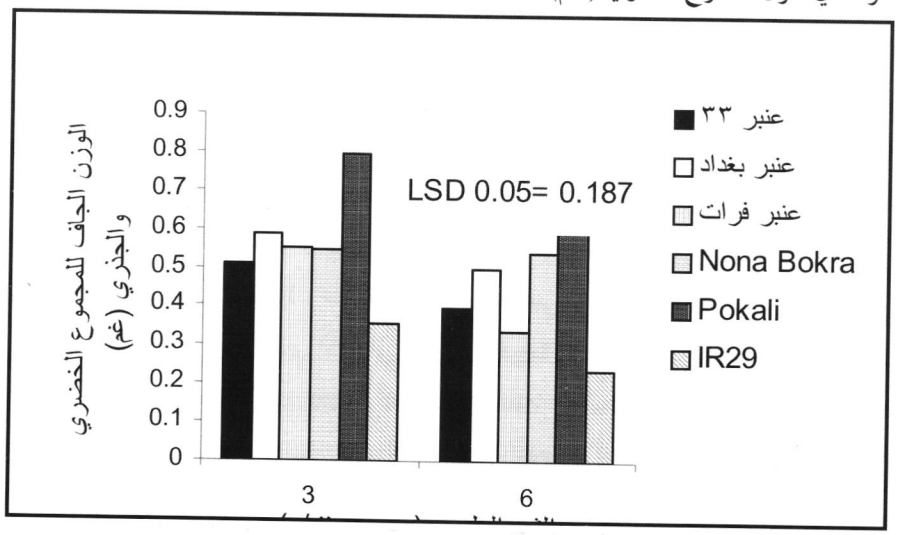
وجماعته (33) وبهذا الصدد اشار نصر الله ويوسف (7) الى ان طول الجذر لنبات الرز يعد من المؤشرات المعتمدة كمعيار لانتخاب النباتات المتحملة للملوحة.



شكل 2: تاثير الملوحة في طول المجموع الخضري (سم) لستة أصناف من الرز.



شكل 3: تاثير الملوحة في طول المجموع الجذري (سم) لستة أصناف من الرز.



شكل 4: تاثير الملوحة في الوزن الجاف للمجموع الخضري والجذري (سم) لستة أصناف من الرز.

ويلاحظ من نتائج تجربة تاثير الملوحة في نمو النباتات للتراكيب الوراثية المدروسة تطابقها مع نتائج تقنية الغربلة السريعة وعليه فبالامكان الاعتماد على تقنية الغربلة السريعة لتحديد درجة التحمل لعدد كبير من التراكيب الوراثية للرز وخلال 2 الى 3 اسابيع وهذا ايضا ما اكده **Gregorio** وجماعته (17) من ان هناك ارتباط بين نتائج

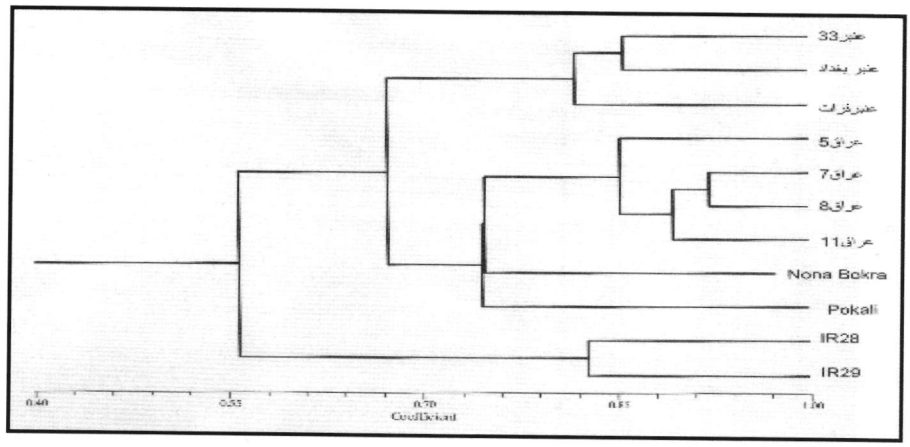
تقنية الغربلة السريعة وحاصل الحبوب ونسبة انخفاض الحاصل تحت ظروف الشد الملحي عند اختبار بعض الأصناف والمقيمة عن طريق الغربلة السريعة في الحقل وتحت الظروف الملحية والاعتيادية.

وجد في هذه الدراسة ايضا ان بعض البواديء اظهرت حزماً احادية المظهر **monomorphic** في جميع الأصناف وهي **UBC12**، **UBC97**، **UBC243** و**UBC374** وهذا ما لاحظه ايضا الباحث **Ko** وجماعته (**21**)، اذ اظهر الباديء **OPW-9** حزماً متشابهة في جميع الأصناف المدروسة، كما لوحظ من التجربة ان **9** بواديء لم تظهر اية حزمة وهي **UBC45**، **UBC117**، **UBC118**، **UBC139**، **UBC224**، **UBC255**، **UBC369**، **UBC380** و**UBC390** وهذا يعود الى احتمال عدم وجود تطابق كاف بين الباديء وقالب الدنا (**21**)، في حين عزا **Xie** وجماعته (**35**) سبب عدم ظهور حزم لعدد من البواديء المختبرة إلى ان التتابع الجينومي للرز **rice genomic sequence** يمكن ان يكون مختلفا عن التتابع في الباديء، او الى نوعية الباديء، اذ ان تركيب قاعدة الباديء يؤثر في قوة ووضوح الاكثار (**34**)، كما لوحظ ان مجموع **G+C** له علاقة قوية بقابلية قوة التضاعف **strength of amplification** (**16**). الا انه من ناحية اخرى لوحظ ان بقية البواديء المختبرة كانت على قدر كبير من الاهمية اذ عند فحص الاشكال المظهرية للحزم لوحظ وجود أشكال مظهرية متعددة **polymorphism** نتيجة الاختلافات في عدد الحزم ومواقعها بين الأصناف مما امكن تشخيص جميع اصناف الرز المستخدمة في هذه الدراسة وذلك بايجاد بصمة وراثية مميزة لتلك الاصناف والناتجة من ايجاد نسق وراثي مميز وهذا أيضا ما لاحظه **Farooq** وجماعته (**13**)، **Ko** وجماعته (**21**، **22**) إذ أشاروا إلى إمكانية استخدام تقنية التضاعف العشوائي لقطع الدنا للتمييز بين اصناف الرز، ويعود السبب في اختلاف عدد الحزم الناتجة من استخدام كل بادئ الى الاختلاف في عدد المواقع المكملة لذلك البادئ بين الاصناف المستخدمة في هذه الدراسة. ان معظم البواديء المستخدمة في التجربة انتجت حزما كان موقعها الفيزيائي بين **517** و**3054** زوجاً قاعدياً (**bp**)، وهذا يتفق مع ما وجده **Xie** وجماعته (**35**) عند اختبارهم اربعة اصناف من الرز وهي **Pokkali**، **NonaBokra**، **IR29** و**IR28**، اذ اشاروا الى ان مواقع الحزم للبواديء المختبرة كانت بين **500** و**3000** زوج قاعدي.

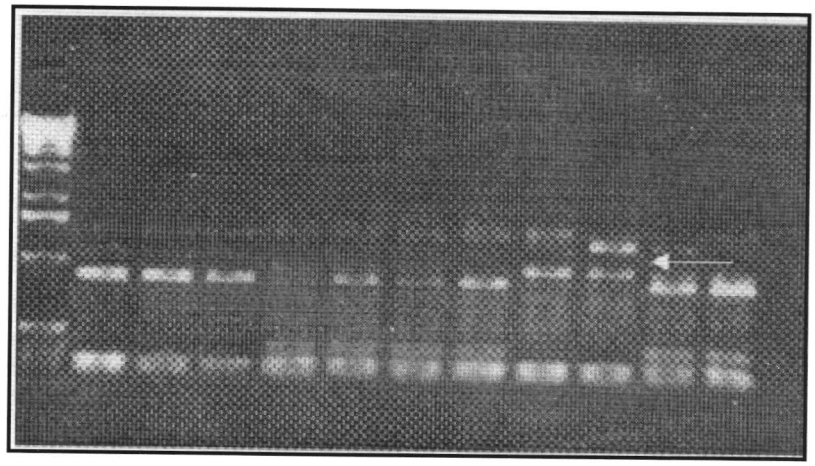
ومن نتائج التحليل التجميعي الذي يوضح العلاقة الوراثية بين الاصناف (شكل **5**) يتضح ان هناك اربع مجموعات رئيسة **main cluster** توزعت عليها الاصناف. ضمت المجموعة الاولى الاصناف عنبر **33** وعنبر بغداد وعنبر فرات وبالرجوع الى اسلافهم يتضح ان الصنف عنبر **33** وعنبر فرات وعنبر بغداد مستنبط من تشعيع حبوب الصنف عنبر **33** باشعة كاما (**1**، **2**). مما ادى الى انتمائهم الى مجموعة واحدة. اما المجموعة الثانية فضمت التراكيب الوراثية عراق **5**، عراق **7**، عراق **8** وعراق **11** وهذا يعود الى ان تلك التراكيب الوراثية قد استحدثت من تشعيع الهجين عنبر **2** والناتج من تهجين **IR22** وعنبر **33** (اتصال شخصي مع د.اسكندر فرنسيس ابراهيم/ دائرة تكنلوجيا البذور) وهذا يتفق مع العاصي (**4**) الذي اشار الى ان وجود درجة تشابه عالية بين الاصناف التي تشترك بالسلف نفسها (الاب) يعود الى ان المادة الوراثية انتقلت من الاب الى تلك الاصناف أي ان الاصناف تشترك بنفس الاليلات التي انحدرت اليها من سلف مشترك وعلى هذا الاساس تبنى العلاقة الوراثية (**11**). اما المجموعة الثالثة فضمت الصنفين المتحملين للملوحة **Nona Bokra** و **Pokkali** في حين تضمنت المجموعة الرابعة الصنفين الحساسين للملوحة **IR28** و**IR29**. وتبرز اهمية ايجاد التشابه الوراثي بين الاصناف المدروسة في مساعدة مربيّ النبات في اتخاذ القرار المناسب باختيار الآباء الملائمة لتكوين توافقات وراثية جديدة وخاصة عند تطوير النباتات من ناحية زيادة مقاومتها للمسببات المرضية والظروف البيئية غير الملائمة (**31**).

وعند دراسة امكانية الاعتماد على البواديء في تشخيص الاصناف المتحملة والحساسة للملوحة وجد امكانية الاعتماد على البواديء كمؤشرات لتحمل الملوحة، اذ ظهرت حزمة خاصة في الموقع **1000** و**1200** زوج قاعدي في

البادىء UBC102 (شكل6) وUBC166 (شكل 7) على التوالي في الصنفين المتحملين للملوحة Pokkali وNonaBokra في حين ظهرت حزمة خاصة في الموقع 700 زوج قاعدي للبادىء UBC400 (شكل 8) في الصنف عنبر فرات (المتوسط التحمل للملوحة)، ويلاحظ من الدراسة عدم وجود بادىء يمكن ان يعد كمؤشر لتحمل الملوحة بين الاصناف المتحملة والمتوسطة التحمل للملوحة وان سبب ذلك قد يعود الى ان الجينات المسؤولة عن تحمل الملوحة تختلف بين الاصناف المتحملة والمتوسطة التحمل للملوحة، اذ من المعروف ان صفة تحمل الملوحة صفة كمية (24) وان صفة تحمل الملوحة في الرز يسيطر عليها عدد من الجينات او المجموعات الجينية وان هذه الجينات تتوافق مع الصفات الفسيولوجية والتي تعزى اليها تحمل الملوحة (36)، كما ذكروا ان الصفات الفسيولوجية والتي يمتلكها الصنفان المتحملان للملوحة Pokkali و NonaBokra هي عامل النمو (النمو السريع للنبات حيث يتم فيه تخفيف تركيز الاملاح في النسيج النباتي) وانخفاض تركيز الصوديوم في المجموع الخضري، اما في الصنف عنبر فرات فقد وجد انه يراكم البرولين والكربوهيدرات في خلاياه (8) مما انعكس ذلك على زيادة الجهد المائي للخلية وبالتالي زيادة تحملها للملوحة. وعلى كل حال، لابد من الاشارة الى وجوب اجراء دراسات موسعة تضم اصنافاً اخرى من الرز لغرض التأكد من امكانية الاعتماد على البواديء UBC102، UBC161 وUBC400 على انها مؤشرات لتحمل الملوحة.

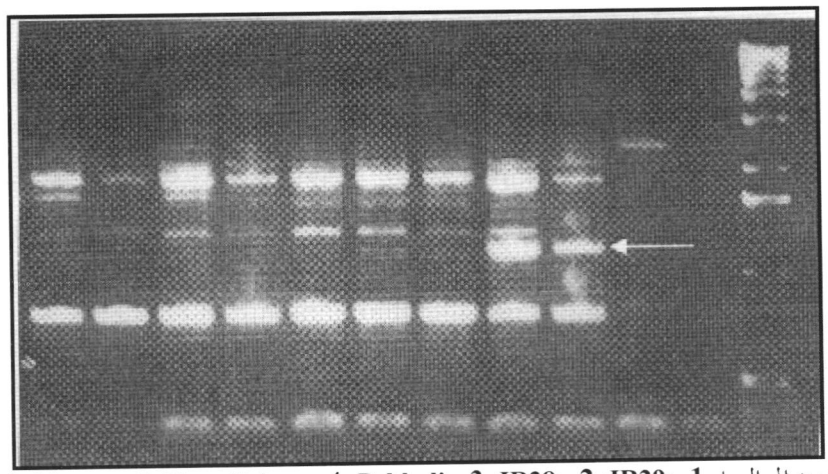


شكل 5: يمثل شجرة العلاقة الوراثية بين أصناف الرز المدروسة.



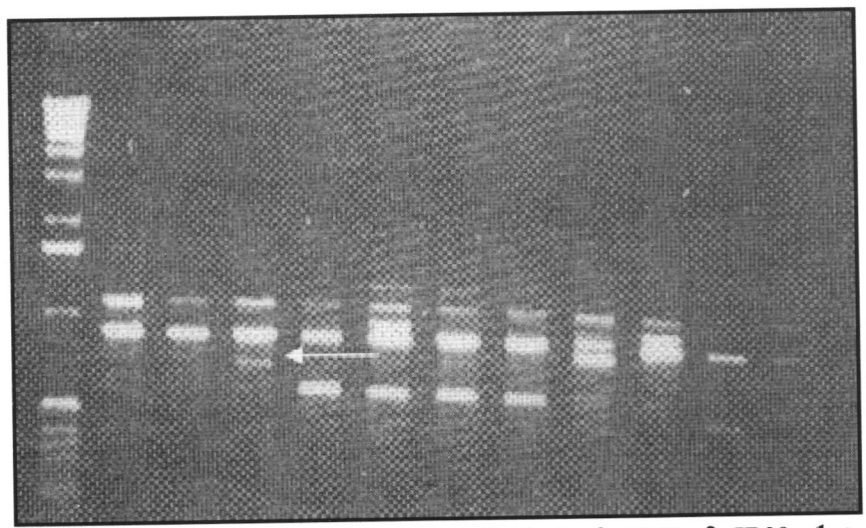
من اليمين الى اليسار 1-(IR29) 2-(IR28) 3-(Pokkali) 4-(Nona Bokra) 5-(عراق 11) 6- (عراق 8) 7-(عراق 7) 8-(عراق 5) 9-(عنبر فرات) 10-(عنبر بغداد) 11-(عنبر 33) 12-(الدنا القياس نوع X).

شكل 6: ظهور الحزمة بالموقع 1000 كيلو قاعدة في الصنفين NonaBokra وPokkali فقط عند تفاعل البادئ UBC102 مع الدنا المستخلص من تراكيب وراثية مختلفة من الرز.



من اليمين الى اليسار 1-(IR29) 2-(IR28) 3-(Pokkali) 4-(Nona Bokra) 5-(عراق 11) 6- (عراق 8) 7-(عراق 7) 8-(عراق 5) 9-(عنبر فرات) 10-(عنبر يغداد) 11-(عنبر 33) 12-(الدنا القياس نوع X).

شكل 7: ظهور الحزمة بالموقع 1200 كيلو قاعدة في الصنفين NonaBokra وPokkali فقط عند تفاعل البادئ UBC161 مع الدنا المستخلص من تراكيب وراثية مختلفة من الرز.



من اليمين الى اليسار 1-(IR29) 2-(IR28) 3-(Pokkali) 4-(Nona Bokra) 5-(عراق 11) 6- (عراق 8) 7-(عراق 7) 8-(عراق 5) 9-(عنبر فرات) 10-(عنبر يغداد) 11-(عنبر 33) 12-(الدنا القياس نوع X).

شكل 8: ظهور الحزمة بالموقع 700 كيلو قاعدة في الصنف عنبر فرات فقط عند تفاعل البادئ UBC400 مع الدنا المستخلص من تراكيب وراثية مختلفة من الرز.

يستنتج من الدراسة الاتي:

1- امكانية اعتماد تقنية الغربلة السريعة لتحديد درجة تحمل الملوحة في اصناف الرز.

2- ان ايجاد العلاقة الوراثية بين اصناف الرز يفتح افاقا واسعة لاجراء دراسات جديدة تتضمن تطبيق مؤشرات الدنا في مجال التربية والانتخاب المعتمد على المؤشرات الوراثية marker assisted selection للبحث عن جين او جينات تشفر لصفة تحمل الملوحة.

المصادر

1- ابراهيم، اسكندر فرنسيس؛ هيثم عبد الوهاب الجدوع؛ عبد الكريم حايف كاظم؛ عماد محمود المعروف وشاهر فدعوس نويهي (2001). استنباط صنف جديد من الرز "عنبر فرات" باستخدام الاشعاع. المجلة العلمية لمنظمة الطاقة الذرية العراقية. 3: 51-56.

2- ابراهيم، اسكندر فرنسيس؛ هيثم عبد الوهاب الجدوع؛ عبد الكريم حايف كاظم وعماد محمود المعروف (2001). استنباط صنف جديد من الرز "عنبر بغداد" باستخدام اشعة كاما. دراسات العلوم الزراعية. 28 (2): 272-280.

3- الساهوكي، مدحت وكريمة محمد وهيب (1990). تطبيقات في تصميم وتحليل التجارب. وزارة التعليم العالي والبحث العلمي، جامعة بغداد، مطبعة دار الحكمة للطباعة والنشر، الموصل، العراق.

4- العاصي، عقيل حسين (2002). استخدام مؤشرات الدنا لتحليل التنوع الوراثي للشعير المزروع في العراق. اطروحة دكتوراه – كلية التربية ابن الهيثم – جامعة بغداد، العراق.

5- القريشي، حسين كاظم (1988). تاثير فترات الغمر والسماد الفوسفاتي على جاهزية بعض العناصر الغذائية وعلى انتاج الرز *Oryza sativa* L. صنف عنبر 33. رسالة ماجستير– كلية الزراعة جامعة بغداد. بغداد– العراق.

6- محمد، لبيد شريف (2000). غربلة وتقويم عدد من تراكيب الرز الوراثية لتحمل الملوحة. اطروحة دكتوراه – كلية الزراعة– جامعة بغداد، العراق.

7- نصر الله، عادل يوسف وشذى عايد يوسف (2001). تأثير مستويات من الملوحة في تراكيب وراثية من نبات الرز. مجلة جامعة تكريت للعلوم الزراعية. 1 (4):190-199.

8- يوسف، شذى عايد؛ ابراهيم شعبان السعداوي وعادل يوسف نصر الله (2003). تاثير الملوحة والتشعيع في بعض الصفات الفسيولوجية في كالس صنفي الرز عنبر بغداد وعنبر فرات. مجلة الزراعة العراقية. 8 (4): 71-79.

9- Akbar, M. (1986). Breeding for salinity tolerance in rice p: 37-55. Proceeding of US. Pakistan Biosaline Research Work shop, Karachi, Pakistan.

10- Akbar, M. and F. Ponnamperuma (1982). Saline soils of south and southeast Asia as potential rice lands. In Rice Research Strategies for the Future. p: 265-281. IRRI, Philippines.

11- Boonparkob, U. and D.H. Byrne (2001). Genetic relationships among cultivated diploid plums and their progenitors as determined by RAPD markers. J. Amer. Soc. Hort. Sci., 126 (4): 451-461.

12- Edwards, K.J. (1998). Randomly Amplified Polymorphic DNAs(RAPDs) In: Karp, A.; Isaac, P.G.; Ingram, D.S. (eds): Molecular tools for screening biodiversity. Chapman and Hall Cambridge, 1: 171-175.

13- Farooq, S.; T. Shah; M. Asghar; E. Askari; M. Arif and N. Iqbal (1994). Rapid identification of rice genotypes through RAPDs. Rice Biotechnology Quarterly, 19:14-15.

Flowers, T. (1987). Salinity resistance in rice. p: 9-11. ODA and IRRI. Rice Research Collabiration Seminar. London, July.

15- Fofana, B.; X. Vekemans; P. Du Jardin and J. Baudoin (1997). Genetic diversity in lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) as revealed by RAPD markers. Euphytica, 95: 157-165.

16- Fritsh, P.; M. Manson; C. Spore; P. Pack and L. Peiseberg (1993). Constancy of RAPD primer amplification strength among distantly related taxa of flowering plants. Plant Molecular Biology, 11: 10-20.

17- Gregorio, G.; D. Senadhira and R. Mendoza (1997). Screening rice for salinity tolerance IRRI, Philippines.

18- Gregorio, G. and D. Senadhira (1996). Rapid screening for salinity tolerance in rice. Plant Breeding Genetics and Biochemistry Division, IRRI, Philippines.

19- Henry, R.; H. Ko, and S. Weiing (1997). Identification of Cereal Food World, 42 (1): 26-29.

20- Hu, J. and C. Quiros (1991). Identification of broccoli and cauliflower with the RAPD marker. Plant Cell Rep., 10: 505-511.

21- Ko, H.; D. Cowan; R. Henry; G. Graham; A. Blakeney and L. Lewin (1994). Random amplified polymorphic DNA analysis of Australian rice (*Oryza sativa* L.) varieties. Euphytica, 80: 179-189.
22- Ko, H.; R. Henry; G. Graham; G. Fox; D. Chadbone and I. Heak (1994). Identification of cereals using the polymerase chain reaction. J. Cereal Sci., 19: 101.
23- Kumar, P.; C. Janice and J. Chong (1998). Genetic analyses of Heliconia species and cultivars with randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. J. Amer. Soc. Hort. Sci., 123: 91-97.
24- Lee, K.; Senadhira, D. and Gregorio, G. 1996. Genetic analysis of salinity tolerance in Japonica rice. SABRAO J., 28 (2): 7-13.
25- Lutts, S.; J. Kinet and J. Bouharmont (1996). Ethylene production by leaves of rice (*Oryza sativa* L.) in relation to salinity tolerance and oxogenous putrescine application. Plant Sci., 166: 15-25.
26- Mass, E. and G. Hoffman (1977). Crop salt tolerance– current assessment. ASCE J. Irrig. And Drainage Div., 103: 115-134.
27- Penner, G.A.; J. Chong; C.P. Whight; S.J. Molnar and G. Fedak (1993). Identification of a RAPD marker for the Crown rust resistance gene *PC* 68 in Oats. Genome, 36: 818-820.
28- Rohlf, F.J. (1993). NTSYS-PC numerical taxonomy and multivariate analysis system. Version 1.8 Exeter Publications. Setauket, NY.
29- Ronning, C. M.; R.J. Schnell and S. Grazit (1995). Using Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) markers to identify *Annoma* cultivars. J. Amer. Soc. Hort. Sci., 120: 726-729.
30- Sneath, P.H. and R. R. Soakal (1973). Numerical taxonomy: The principles and practice of numerical classification. W.H. Freeman Co. San Francisco. California.
31- Weeden, N. F.; G. M. Timmerman; M. Hemmat; B. K. Kneen and B. A. Lodhi (1992). Inheritance and reliability of RAPD markers, application of RAPD technology to plant breeding, p: 12-17, Crop Sci. Soc. Amer., Madison, Wis.
32- Weng, Y. and D. Chen (2002). Molecular markers and its clone for salt tolerance in wheat. Yi Chuan Xue Bao., 29 (4): 343-349
33- William, K.; M. Meads and D. Sauerbrey (1998). Yhe roles of seedling salt tolerance and sprouting in forest zonation on west coast.
34- Williams, J.; A. Kubelik; K. Livak; J. Rafalski and S. Tingey (1990). DNA polymorphisms amplified by abitratry primers are useful as genetic markers. Nucl. Acid. Res., 18: 6531-6535
35- Xie,J.; A. Zapata; M. Shen and R. Afza (1998). Salinity tolerant performance and genetic diversity of four rice varieties. Plant Breeding Unit FAO/IAEA Programme Agriculture and Biotechnology Laboratory.
36- Yeo, A.; M. Yeo; S. Flowers and T. Flowers (1990). Screening of rice (*Oryza sativa* L.) genotypes for physiological characters contributing to salinity resistance, and their relationship to overall performance. Theor. Appl. Genet., 79: 377-384.
37- Yoshida, S.; D. Forno; S. Cock and K. Gomez (1976). Laboratory manual for physiological studies in rice, p: 83. IRRI. Phlippines.
38- Zapata, F.; R. Afza; I. Rodrigues; Sh. Mei; J. Xie; N. Van Cuong and X. Rakotonjanahary (1997). Establishment of rice lines. Plant Breeding Unit FAO/IAEA Programme Agriculture and Biotechnology Laboratory.
39- Zhang, Q.; H. Wang and Z. Hu (1999). RAPD markers associated with salt tolerance in wild soybean populations. Soybean Genetics Newsletter 26 (on line Journal) 23 April.

SALT TOLERANCE FOR DIFFERENT RICE VARIETIES

S. A. Yousif*
I. S. Al-saadawi**
H. Ronak***
A. Y. Naser Allah****

ABSTRACT

Evaluation score of visual salt injury at seedling (fast screening) of 14 selected Iraqi varieties were used (Amber 33, Amber Furat, Amber Baghdad, Iraq 5, Iraq 7, Iraq 8 and Iraq 11, Munathera, Amber Hybrid, Mutation 2, Mutation 10, Mutation 16, Ibaa 1 and Ibaa 2) was used. Genetic analyses based on RAPD technique were carried out. Eighty 10-mer-oligomer primers from University of British Columbia, Vancouver, Canada, were randomly selected for amplification to detect the genetic marker for salt tolerance.

Result indicated that all tested genotypes were found to be sensitive to salinity except Amber Furat, which revealed moderately salt tolerance. The results showed that RAPD technique can be used as a marker for salt tolerance, because there was a linkage between salt performance and the primers UBC102, UBC161 and UBC400.

* Ministry of Sci. and Tech.- Baghdad, Iraq.
** Science Collage- Baghdad Univ.- Baghdad, Iraq
*** Plant Breeding Unit FAO-IAEA Program Agric. and Biotech. Laboratory, Austria.
**** Agric. Collage- Baghdad Univ.- Baghdad, Iraq.