التنوع الوراثي لأصناف الشعير المزروعة في العراق والمختلفة في تحملها لاجهاد الجفاف بطريقة RAPD

نضال نعمه حسين
زينب رعد جاسم
قسم علوم الحياة/كليه التربية للعلوم الصرفة(ابن الهيثم)/جامعة بغداد
حرب عادل
دائرة وقاية المزروعات/ وزارة الزراعة

استلم البحث في:16/تشرين الثاني/2014،قبل البحث في:18/كانون الاول/2015

الخلاصة

تم دراسة التباين الوراثي لستة عشر صنفا من الشعير *Hordeum vulgar L.* المزروعة في العراق والمختلفة في قابليتها لتحمل إجهاد الجفاف باستعمال طريقة RAPD .قيمت أصناف الشعير لإجهاد الجفاف من خلال تعريض النبات في مرحلة الإنبات إلى تراكيز مختلفة من مادة البولي اثلين كلايكول 6000 (6000 PEG).اعتمادا على نسبه الإنبات تبين بان الصنف براق واريفات أكثر الأصناف تحملا للجفاف إما بوادي،أمل، نور القادسية، نومار،عدت متوسطه التحمل للجفاف, أما الأصناف الخير ،ألوركاء ،إباء99 ،شعاع ،رافدين ،سمير،ريحانه3، فرات9، جزيرة1،أباء7 فعدت أصناف حساسة لتحمل الجفاف .

انتجت بادئات RAPD عددا من الحزم بلغ عددها (203) حزمه توزعت على 16صنفا من الشعير، (10.39%) منها كانت Monomorphic أحاديه الشكل ،أما (89.60%) الباقية فكانت Polymorphic متعددة الاشكال أو متباينة،وكان معدل النسبة المئوية للتباين Polymorphism (88.70%) تراوحت مابين 71.4% للبادئ OP-B11 و100% للبادئ OP-C16 . أنتجت بعض البادئات حزما مميزه لبعض أصناف الشعير المدروسة ،كالبادئ OP-N13 الذي تميز بالحزمة ذات الوزن الجزيئي 450bp وظهرت في الأصناف فرات 9 ،جزيرة 1،إباء 7 وهى أصناف جميعها حساسة للجفاف ولم تظهر مع الأصناف الاخرى، والبادئp27 تميز بالحزمة ذات الوزن الجزيئي 2000bp التي ظهرت في الصنف براق المتحمل للجفاف ولم تظهر في الأصناف الحساسة لذلك يمكن إن تكون هذه الحزمة مرتبطة بصفة التحمل للجفاف. أظهرت شجرة القرابة الوراثية المعتمدة على طريقة RAPD باستعمال مقياس Jaccard للتشابه الوراثي انعزال عينات الشعير المدروسة في ثلاث مجاميع رئيسيه عند درجة تشابه % 75 ضمت تحت المجموعة الأولى والثانية التابعة للمجموعة الأولى الأصناف المتحملة والمتوسطة التحمل للجفاف ماعدا الصنفين الخير والوركاء اللذين انعزلا حسب أصلهم الوراثي مع احد الإباء (أريفات)، أما المجموعة الثانية والثالثة وتحت المجموعة الثالثة التابعة للمجموعة الأولى فضمت الأصناف الحساسة للجفاف. دلت نتائج مؤشرات RAPD على وجود نسبه عاليه من التباين الوراثي بين أصناف الشعير المدروسة والمزروعة في العراق وأمكن الفصل بين العينات المختلفة في تحملها لاجهاد الجفاف باستعمال عدد قليل من المواقع الوراثية.

الكلمات المفتاحيه :الشعير ، الجفاف , RAPD ، البولي اثلين كلايكول PEG.

المقدمه

يعد الشعير *Hordeum vulgare L.* رابع أهم المحاصيل النجيلية بعد القمح والرز والذرة الصفراء ويتميز بقدرة تكيفية عالية High Adaptability ، إذ ينمو ضمن مدى واسع من الظروف البيئية .بلغت المساحة المزروعة بالشعير عالميا قرابة 55698 الف هكتار، ووصل الإنتاج إلى 35915 الف طن والانتاجية 2440 كغم.هـ$^{-1}$(1).يحتل الشعير المرتبة الثانية بعد القمح من الناحية الاقتصادية إذ يستعمل بالدرجة الأساس كعلف للحيوانات ويستعمل في صناعة المولت والبيرة واحد مكونات الأغذية الصحية حيث يستعمل خبزا لشعير لمرضى السكري كما يستعمل في تحضير الحساء ويستعمل خبز الشعير لمختلف الثقافات (2) .يعد الشعير من أهم محاصيل الحبوب وأقدمها في العراق إذ يعد من المحاصيل الاساسيه المستعملة كعلف للحيوانات(3) ويزرع الشعير في محافظات العراق مثل نينوى والقادسية وذي قار وكركوك وديالى والانبار وبغداد وصلاح الدين والنجف والبصرة وميسان .قدر انتاج الشعير في العراق بـ(1003.2) إلف طن للموسم الشتوي لسنة 2013 بزيادة بلغت نسبتها 20.6 % عن انتاج السنة الماضية إذ كان (832.0) إلف طن إذ احتلت محافظة نينوى المركز الأول من حيث الإنتاج والذي قدر بـ(486.9)إلف طن بنسبة 48.5% من مجموع انتاج العراق تلتها محافظة القادسية الذي قدر إنتاجها (125.0) ألف طن بنسبة (12.5%) من مجموع انتاج العراق تلتها محافظة ذي قار إذ قدر إنتاجها (108.6) إلف طن بنسبة (10.8) من مجموع أنتاج العراق فيما شكلت بقيه المحافظات نسبة مقدارها (28.2%) من مجموع إنتاج العراق ماعدا إقليم كردستان (4).

نظرا" لأهمية المياه في حياة النباتات وقلتها وعدم توفرها بشكل كاف لنموها بات من الضروري الاهتمام بأليه الشد المائي وأثره في نمو النبات بغية الحصول على أنماط وراثية ذات قابلية في تحمل إجهاد الجفاف ولاسيما في المراحل الأولى من حياة النبات والتي تعد مراحل أساسية في بدء وتحديد إنتاجيته، إذ أجريت دراسات عديدة في هذا المجال وذلك بتعريض النبات إلى مواد ذي فعل اوزموزى كمادة البولى اثلين كلايكول التي استعملت من قبل العديد من الباحثين فاستعملت من قبل(5) في نبات اللوبيا Cowpea وكذلك على نبات قصب السكر (6) وعلى نبات الطماطم (7) وفى نبات الشعير (8).

يتميز الشعير البرى *Hordeum vulgare* ssp. *Spontaneum* بامتلاكه مجموعة من المورثات المفيدة في التحمل للعديد من الاجهادات الحيوية، لذا من الممكن استعماله في تربيه الشعير للحصول على أصناف مقاومه لتلك الاجهادات (9). بالرغم من إن إجراء التهجين بين الشعير البرى والشعير المزروع ممكن ويعطى نسلا خصبا إلا إن إدخال المورثات من الشعير البرى إلى الشعير المنزرع يعد عمليه صعبة وطويلة وذلك لامتلاك الشعير البرى على عدد من الصفات غير المرغوب فيها كصفة انفراط البذور والسفا القاسي (10).

إن استعمال المؤشرات الجزيئية للـ DNA أدى إلى تسريع تقويم المكونات الوراثية وعزل تأثيراتها عن المؤثرات البيئية ، وتعد المؤشرات الوراثية ذا أهميه قصوى على صعيد تربيه النبات بفعل عدة عوامل منها عدم تأثر هذه المؤشرات بالشكل المظهري للنبات والمؤثرات البيئية ، والحصول على عدد كبير من المؤشرات بزمن قصير نسبيا ، فضلا عن أنها تعد مؤشرات مساعدة في عمليه الانتخاب والتربية (11) . تعد طريقة RAPD من مؤشرات الـ DNA المعتمدة على تقنيه التضاعف المتسلسل للـDNA Polymerase chain reaction (PCR) وتعرف على أنها مضاعفه مواقع معينه من ألدنا المحيني باستعمال بادئ واحد عشوائي وبوجود إنزيم بلمره الـ DNA Polymerase DNA ودرجه حرارة مناسبة بحيث تنتج حزما متضاعفة متعددة مختلفة الأوزان الجزيئية (12). وأثبتت هذه التقانة فعاليتها في دراسة التباين الوراثي لمختلف أنواع الكائنات الحية فقد استعملت لدراسة التنوع الوراثي في الأحياء الدقيقة وفي الإنسان(13) وكانت تقنيه الـRAPD فعاله وسريعة في الكشف عن التنوع الوراثي في النباتات المختلفة فقد استعملت في دراسة التنوع الوراثي بين أصناف عديدة (12) (14) (15) (16).

المواد وطرائق العمل

المادة النباتية

تم الحصول على ستة عشر صنفا من الشعير *(Hordeym vulgare L.)* في إجراء هذه الدراسة من مركز تكنولوجيا البذور التابع لوزارة العلوم والتكنولوجيا ومن هيأة فحص وتصديق البذور التابع لوزارة الزراعة .وهى : براق ،بوادى ،أريفات،أمل ،ألوركاء ،الخير،نور القادسية ،نومار ،اباء99،شعاع،رافدين ،سمير،ريحانة 3 ،فرات 9،جزيرة1واباء7.

تحمل أصناف الشعير لإجهاد الجفاف

تم إنبات البذور بعد تعقيمها في محلول الهايبوكلورايت (5%) ثم بمحلول كلوريد الزئبق بتركيز 2% فى حاضنة وبدرجة حرارة 25 مْ في إطباق بتري معقمة. وضعت ورقتا ترشيح في كل طبق ورطبت بمحاليل البولى اثلين غلايكول6000 وبتراكيز مختلفة للوصول إلى الجهود المائية (9- ,6- ,3-) بار،فضلا عن معاملة السيطرة بدون إضافة البولى اثلين كلايكول .وضعت 10 بذور في كل طبق وبواقع ثلاثه مكررات لكل معاملة .أضيف 6 مل من محلول البولى اثلين كلايكول وبالتركيز المناسب في كل طبق وتركت لمدة 10 أيام في الحاضنة .تم إضافة كميات متساوية من محاليل البولى اثلين كلايكول لسد النقص الحاصل بسبب التبخر. وبعد 10 أيام تم حساب نسبة الإنبات وحسب المعادلة الأتيه (17):

نسبة الإنبات = عدد البذور النابتة/عدد البذور الكلية)X 100

استخلاص الأحماض النوويةDNA extraction

تمت عمليات عزل مجين ألدنا (Genomic DNA) من العينات النباتية للأوراق الفتيه التي أخذت من بادرات أصناف الشعير بعمر 10 أيام وبالاعتماد على طريقة الاستخلاص المعتمدة على استعمال ماده(CTAB) وذلك وفقاً لطريقة (18) المعتمدة على (19). تم تقدير كمية الـDNA المستخلصة بوساطة مقياس الطيف الضوئي Spectrophotometer واختبرت نوعية الـDNA على هلامة ذات تركيز 1% من الأكاروز ومن خلال عملية الترحيل الكهربائي الأفقي بحسب طريقة(20).

أعداد تفاعلات التضاعف العشوائي المتعدد الأشكال لسلسلة الـ DNA (RAPD)

استعمل أحد عشر بادئا عشوائيا من بادئات RAPD موضحة في جدول رقم (1). أجري التفاعل في حجم نهائي قدره 25مايكروليتر .استعمل 50 نانوغراما من الـDNA و250 ميكرومول من كل من النيوكليوتيدات الأربعة (dTTP/dATP/dCTP/dGTP) و10بيكومول من كل بادئ ووحدة واحدة من أنزيم البلمرةTaq DNA polymerase أجريت عمليةالتضخيم Amplification في جهاز المبلمرالحراري Techne(5000)Tc وفق البرنامج الحراري الاتي، دورة واحدة بدرجة حرارة94°م لمدة 2 دقائق (المسخ الأولي) ثم40 دورة تتكون كلٌ منها من المراحل التالية92°م لمدة 30ثانية (المسخ)، 36°م لمدة15 ثانية(الالتحام)72 م °لمدة15 ثانية (الاستطالة) ثم تركت العينات لمدة10دقائق على حرارة 72°م (الاستطالة ألنهائيه).

الترحيل الكهربائي وتحليل الهلام Electrophoresis and gel analysis

حمّلت العينات على هلام الاكاروز بتركيز 1% وبفولتية 3-1 فولت / سم مع مؤشر الدليل ألحجمي ولمدة 4 –5 ساعات . ثم صبغ بصبغة بروميد الاثيديوم ويفحص تحت الأشعة فوق البنفسجية UV light ويتم تصويره بواسطة كاميرا نوع Canon . تم حللت صور الهلامات وتحديد الوزن الجزيئي لقطع الـDNA المتضخم مع البادئات المختلفة. جمعت نتائج كل البادئات والبيانات الخاصة بها في جداول خاصة لاستعمالها لاحقاً في التحليل.

تحليل البيانات

صممت تجربه تحمل أصناف الشعير لاجهـــاد الجفـــاف وفـــق التصميـم العشوائي الكـــامل (Completely randomized design) وأخضعت البيانات إلى تحليل التباين في مستوى 5% وحللت النتائج باستعمال برنامج التحاليل الاحصائية SAS (21) .

اجري التحليل الاحصائي لتحليل درجه التشابه الوراثي بين العينات المدروسة بقراءة حزم الحامض النووي DNA الظاهرة في الهلام ورمز لوجود ألحزمه برقم 1 ولعدم وجودها بالرمز 0 واستعمل برنامج PAST ver. 1.91 في حساب معامل التشابه الوراثي. تم وضع مخطط التحليل العنقودي Cluster ورسمت شجره القرابة الوراثية التي توضح التشابه الوراثي بين الأصناف المدروسة بطريقه UPGMA (Un weighted pair- group method using an arithmetic average). اعتمدت هذه الطريقة لكونها الأكثر استعمالا وباستعمال برنامج PAST وبنسخته المعدلة (Version.1.91) وباستعمال مقياس Jacard للتشابه الوراثي (22). حسبت النسبة المئوية لكفاءة البادئات المستعملة Primer efficiency لمؤشرات الـRAPD من خلال المعادلة:-

كفاءة البادئ % = العدد الكلي لحزم البادئ / العدد الكلي لحزم كل البادئات x 100

ثم تم استخراج النسبة المئوية للقدرة التمييزية لكل بادئ من خلال المعادلة الاتيه:-

النسبة المئوية للقدرة التميزية %=عدد الحزم المتباينة للبادئ / عدد الحزم المتباينة لكل البادئات x 100 (23).

النتائج والمناقشة

تم تعريض بذور أصناف مختلفة من الشعير المزروع في العراق إلى جهود مائية مختلفة (-3، -6 ، -9) بار لفحص مدى تحمل الأصناف المختلفة لاجهاد الجفاف .

الجدول(2) يوضح تأثير الجهد المائي في نسبة انبات أصناف مختلفة من الشعير والمعرضة لجهـــود مائية مختلفة (-3,-6,-9) بار.أشارت النتائج الى وجود تأثير معنوي لاجهاد الجفاف عند المستويين (-6,-9) بار في خفض نسبة إنبات البذور ولم يظهر المستوى (-3) بار تأثيرا معنويا في نسبه انبات اغلب الأصناف المدروسة. لوحظ انخفاض في نسب الأنبات كلما زاد الجهد المائي فعند الجهد المائي -3بار انخفضت نسبة الأنبات إلى 69,12% مقارنة بمعاملة السيطرة حيث كانت نسبة الإنبات 73,42%إي بنسبة انخفاض تعادل 5%،إما عند تعريض البذور إلى جهد مائي -6 بار انخفضت نسبة الأنبات إلى 43,37%إي بنسبة انخفاض تعادل40% وعند تعريض النبات إلى الجهد المائي -9 بار فأصبحت نسبة الإنبات 33,31%إي بنسبة انخفاض تعادل 54%. يعزى انخفاض نسبة الأنبات عند التركيز العالي من كلايكول متعدد الاثلين إلى انخفاض معدل امتصاص الماء من البذور الضروري لتحول المواد الغذائية المخزونة الداخلية في البذور تحت تأثير النشـاط الإنزيمي من الشـكل المعقـد إلى البسـيط ومن ثـــم بـــدء الإنبات(24)،فضـــلا عن ذلك تأثير الجفـــاف في نشـــاط الإنزيمات نفسهـــا مباشره داخـــل البـــذور إذ لوحظ نشـــاط إنزيمي بيتـــا اميليز والفـــا اميليز اللذين يثبطان

بفعل الجفـاف(26,25). تماثلت هذه النتائج مع ما حصـــــل عليــه كل من(27)و(28) في نباتات العدس وزهرة الشمس. أما عدم تأثر نسبة الإنبات أو ارتفاعها في بعض الأصناف عند التراكيز المنخفضة من كلايكول متعدد الاثلين(3-بار)فيعود إلى انخفاض الجهد المائي لهذا المحلول الذي لم يكن كافيا لمنع تشرب الكميه المطلوبة من الماء لحدوث الإنبات إذ استطاعت البذور بفعل قوى التشرب الداخلي إن تحصل على كميه الماء اللازمة لبدء الإنبات وهذا لوحظ من خلال نسبة الإنبات المرتفعة عند الأصناف بوادي ،الوركاء،الخير،نومار حققت نسبة إنبات 100% عند التركيز 3- بار وهذا يدل على إن بذور هذه الأصناف تمتاز بقوى تشرب داخلية عالية أدت إلى الحصول على كميه الماء اللازمة لحدوث الإنبات بالرغم من وجود جهد مائي منخفض في منطقه النمو.

الجدول (2) يبين كذلك إن نسبه الانبات للصنف براق واريفات لم تتأثر معنويا بأعلى جهد مائي 9- بار فكانت 88 عند معامله السيطرة لكلا الصنفين وأصبحت 83،77% عند الجهد المائي 9- بار وعلى التوالي لذا عد هذين الصنفين اعتمادا على نسبه الإنبات من الأصناف المتحملة للجفاف أما الأصناف بوادي،أمل، نور القادسية، نومار فقد تأثرت نسبه الإنبات فيهم معنويا عند الجهد 9- بار نسبه إلى معامله السيطرة ولم تتأثر معنويا بالجهد المائي 6- بار فكانت نسبه إنباتهم 88%, 61%, 88%, 100%على التوالي عند معامله السيطرة وأصبحت 38%, 44%, 61% ,77% عند الجهد المائي 9- بار على التوالي لذا يمكن عدهم اصنافا متوسطه التحمل للجفاف ،أما بقية الأصناف الخير، الوركاء، أباء 99،شعاع ،رافدين ،سمير،ريحانه3، فرات9، جزيرة1،إباء7 تأثرت نسبه إنباتهم معنويا بالجهد المائي 6- بار و 3- بار لبعض الأصناف لذا أمكن اعتبارهم أصناف حساسة للجفاف.

استعمل إحد عشر بادئا عشوائيا لدراسة ستة عشر صنفا من الشعير المزروعة فى العراق والمتحملة لدرجات مختلفة من إجهاد الجفاف، أنتجت هذه البادئات عددا من الحزم بلغ (202) حزمه توزعت على 16 صنفا من الشعير،21حزمه أي (10.39%) كانت Monomorphic أحاديه الشكل ،أما 181 حزمه الباقية إي (89.60%) فكانت Polymorphic متعددة الإشكال أو متباينة ، تراوحت أعدادها بين (23-10) حزمه للبادئ الواحد.البادئ P27 أعطى أعلى عدد من الحزم متعددة الأشكال 23 حزمه بينما البادئ OP-B11 أنتج أوطئ عدد من الحزم المتباينة 10 حزم، وبلغ معدل الحزم المتباينة (16.45%) حزمه لكل بادئ بين 16 صنفا ،أما معدل النسبة المئوية للتباين Polymorphism فبلغت (88.70%) تراوحت مابين 71.4 % للبادئ OP-B11 و100% للبادئ OP-C16 .إما كفاءه البادئات قد تراوحت مابين (12.37_5.94) حيث كان البادئP27 أكفأ البادئات المستعمله إما اقلها كفاءه فكان البادئ OP-C16،إما بالنسبة للقدرة التمييزية للبادئات المستعملة فكانت تتراوح بين (5.52 _12.70)فكانت أعلى قدره تميزيه للبادئP27 إما اقل قدره تميزيه فكانت للبادئ OP-B11 .جدول (3). اتفقت نتائج هذه الدراسة مع دراسة أجراها (29) إذ قاموا بدراســة التنــوع الوراثي لـ 23تركيبا وراثيا من الشعير المزوع في سوريا باستعمال ست بادئات أظهرت 23 حزمة متباينة سمحت بالتميز بين التراكيب الوراثية.

أعطت بادئات RAPD (11) حزمة مميزة لعينات الشعير المدروسة كما في الجدول (4) والشكل (1) ، فمثلا البادئ OP-N13 أعطى الحزمة 450bميزت كل من فرات 9 ،جزيرة 1،إباء 7 وهى أصناف جميعها حساسة للجفاف ،وفقدت هذه الحزمة في الأصناف المتحملة والمتوسطة التحمل .وأعطى الحزمة 1500 bp التي ميزت الصنف شعاع ،والحزمة 1400 ميزت الصنف رافدين وكذلك البادئ OP-C16 الذي تميز أيضا بالحزمة ذات الوزن الجزيئي 1500 bp إذ ظهرت هذه ألحزمه في براق،بوادي،اريفات،أمل، الخير، الوركاء، نور القادسية،نومار،اباء99 وإما البادئ OP-P27 فقد تميز بالحزمة ذات الوزن الجزيئي 2000 bp التي ظهرت في الصنف براق المتحمل للجفاف فقط ولم تظهر في الأصناف الحساسة للجفاف لذا يمكن إن تكون هذه الحزمة مرتبطة بصفة التحمل للجفاف . اتفقت هذه النتيجة مع نتيجة الباحث(30) الذي استعمال نفس هذا البادئ على أصناف بريه من الشعير الإيراني وقد ظهرت له حزمه مميزه لصفه التحمل للجفاف كانت ذات وزن جزيئي 600 bp فقد ظهرت هذه ألحزمه في الأصناف المتحملة ولم تظهر في الأصناف الحساسة. تعد الحزمة 2000 bp التابعة للبادئ P27 من الحزم المهمة جدا والتي يمكن استعمالها على نطاق واسع للتميز بين أصناف الشعير المتحملة والحساسة للجفاف من خلال تحويل هذه الحزم إلى (SCAR) Sequence-characterize amplified region وهى بادئات ذو ثبوتيه عالية ومشتقة من بادئات (RAPD) (31)(32)، لقد تم تطوير بادئات ال SCAR استعملت لتميز أصناف الحنطة المتحملة والحساسة للجفاف (33) والمتحملة والحساسة للملوحة(34) ابتداء من بادئات RAPD.

استثمرت نتائج بادئات الـ RAPD كافة في تقدير البعد الوراثي بين الأصناف المدروسة لنبات الشعير *H.vulgare* من خلال البرنامج الإحصائي Past وباستعمال معامل Jaccard للتشابه الوراثي ، وتمثلت النتيجة بالجدول (5) .أظهرت النتائج إن اقل قيمه للتشابه الوراثي كانت بين (سميروفرات9) حيث بلغت (0.69048) أما اكبر قيمه للتشابه كانت بين (إباء 99وبراق) حيث بلغت (0.97674) وتراوحت بقية العينات بقيمها بين ذلك.

يبين الشكل (2) شجرة علاقات القرابة الوراثية لأصناف الشعير استنادا على تحليل بيانات RAPD باستعمال UPGMA.وترجع أهمية تحديد القرابة الوراثية إلى إمكانية تنظيم الأصول الوراثية واختيار الإباء الداخلة في برامج التربية والتنبؤ بأحسن الهجن ومعرفة اقل عدد من التراكيب الوراثية التي تحتوى على اكبر قدر ممكن من الصفات الجيدة في برامج التربية (35) وبناء على درجة التشابه Similarity index قسمت أصناف الشعير الستة عشر إلى ثلاث مجاميع عند درجة تشابه 75% ضمت المجموعة الأولى ثلاثة تحت مجموعة وبنسبه تشابه 81% ضمت تحت المجموعة الأولى والثانية جميع الأصناف المتحملة للجفاف والمتوسطة التحمل ماعدا الصنفين الوركاء والخير الحساسين للجفاف التي ظهر

بأن صنف الخير ناتج من تضريب صنف اريفات مع صنف الأسود المحلي(36) لذا قد يكون وجودهم مع أريفات تحت المجموعة نفسها اعتمادا على الأصل الوراثي، إما المجموعة الثانية والثالثة وتحت المجموعة الثالثة التابعة للمجموعة الأولى فقد ضمت الأصناف الحساسة للجفاف، وبالتالي تشير النتائج إلى إن تقنيه RAPD قد ميزت وبكفاءة التراكيب الوراثية المتحملة للجفاف عن تلك الحساسة عن بعضها وهذا يتفق مع نتائج كل من (30)و(37)و(38).

دلت النتائج أيضا على وجود نسبه عاليه من التباين الوراثي بين العينات المدروسة مما يشير إلى إمكانية التحسين الوراثي لأصناف الشعير اعتمادا على هذه النتائج وباستعمال هذه المجموعة من التراكيب الوراثية .

المصادر

1-FAO (2002) Statistical yearbook production .

2- Fischbeck,G.(2002).Contribution of barley to agriculture,Abrief over view . in:G.A. , :1-4.

3- العذاري ، حسن محمد . (2000) . انتخاب واختيار سلالات من الشعير للمناطق محدودة الأمطار . مجلة زراعة الرافدين ، 5(8)31-40.العراق.

4-مديريه الاحصاء الزراعي.(2013). وزاره الزراعة .العراق.

5- Badiane,F.A.;Diouf,D.;Sané1,D.;Diouf,O.; Goudiaby,V. and Diallo,N.(2004). Screening cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] varieties by inducing water deficit and RAPD analyses. African J. Biotech .3 (3): 174-178.

6- Patade,V.Y.;Saprasanna,P.;Bapat,V.A. and Kulkami,U.G.(2006).Selection for abiotic (salinity and drought) stress tolerance and molecular characterization of tolerant lines in sugarcane .Sugar.Tech.8(1):63-68.

7- Abdel-Raheem, A.T.; Ragab, A. R.; Kasem, Z.A.; Omer, F. D. and Samera, A.M. *In vitro* selection for tomato plants for drought tolerance via callus culture under polyethylene glycol (PEG) and mannitol treatments (2001). African Crop Science Conference Proceedings, 8:2027-2032.

8- أيمن ,الشحاذة العودة; رفيق ,صالح و رؤى الشيخ علي.(2006).تقيم استجابة بعض اصناف الشعير لتحمل الإجهاد الحلولى فى مرحلة النمو الأولى. مجلة جامعة دمشق للعلوم الزراعية . 22(1) :33-15.سوريا.

9- Jaleel,C.A. ;Manivannan,P. ;Wahid,A. ;Farooq,M. ;Al-Jubury,H.J. ; Somasundaran, R. and Panneerselvem, R.(2006). Drought stress in plant: areview on morphological characteristic and pigments composition. Int. J.Agric. Biol.,11(1):100-105.

10- Baum,M. ;Grando,S. ;Backes,G. ;Jahoor,A. ;Sabbagh,A. and Ceccarelli,S. (2003). QTLs for agronomic traits in mediterranean environment identified in recombinant in bread lines of the cross 'Arta'x *H.spantaneum* 41-1. Theor.Appl.Genet.,107:1215-1225.

11- سيد ، محمود هيثم . (2001) . استخدام مؤشرات من الدنا DNA في انتخاب مورثات المقاومة للامراض في الشعير . أطروحة دكتوراه ، جامعة دمشق ، كلية الزراعة ، سوريا.

12-Williams, J.G.K.; Kublaik , A.R.; Livak, K.J.;Rafalski, J.A. and Tingey, S.V. (1990) . DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are Usedul as genetic markers . Nucl. Acids . Res., 18:6531-6535.

13- Welsh.J. and McClelland, M.(1990).Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers,Nucleic Acid,Res,18:7213-7218.

14- Vierling,R. and Nguyen, H.T. (1992). Use of RAPD markers to determine the genetic relationship of diploid wheat genotypes ,Theor .Appl .Genet.,84 :835-838.

15-Askari,E. ;Al-Khalifa, N.S. ;Ohmura,T. ;Al-Hafedh,Y.S. ;Khan,F.A. ;Al-Hindi,A. and Okawara,R. (2003). Molecular phytogeny of seven data palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultivars.7(1):223-228

16-Awasthi,A.K.;Nagaraja,G.M.;Naik,G.V.;Kanginakudru,S.;Thangavelu,K. and Nagaraju,J. (2004). Genetic diversity and relationships in mulberry (*Morus*) as revealed by RAPD and ISSR marker assays.BMC Genetic,5(1) :1471-1486.

17-Hamidi , H. and Safarnejad ,A. (2010) . Effect of Drought Stress on Alfalfa caltivars (*Medicago Sativa* L.) in Germination stage . American – Eurasian . Agric. Environ . Sci., 8(6):705-709.

18- Weigand , F.; Baum, M. and Udupa, S.(1993) . DNA Molecular marker techniques , technical manual . No. 20. Int. center Agric. Res. In the Dry Acas .15:117-125.

19- Saghai – maroof, M. A.; Soliman, K. M.; Jorgensen, R. A. and Allard, R. W. (1984) . Ribosomal DNA Spacer length polymorphisms in barley : Mendelain inheritance , Chromosomal location and population dynamics proc. Natl. Acad sci., USA. 81 : 8014-8018.

20- Sambrook, J.; Fritch, E.F. and Maniatis , J. (1989) . Molecular Cloning alaboratory manual . 2nd edation . coldspring Harbor laboratory press , New York.

21-SAS.(2012).Statistical Analysis System,User's Guide.Statistical.Version 9.1th ed. SAS .Inst. Inc. Cary.N.C.USA.

22- Hammer,D.;Harper,A. and Ryan,P.(2001).PAST:Palacontologi cal statistics.

23- Grudman.H.;Schneider,C.;Hartung,D.;Daschner,F. and Pith,T.(1995). Discriminatory power of three DNA typing techniques for *P.aeruginosa*. Clin.Microbiol.,3:528-532.

24-Rubio,M.C. ;Gonzalez,E.M. ;Minchin,F.R. ;Webb,K.J. ;Arrese-Igor ,C.; Ramos, J. and Becana ,M. (2002). Effects of water stress on antioxidant enzymes of leaves and nodules of transgenic alfalfa over expressing superoxide dismutases.Physiol. Plant ,115:531-540.

25- Todaka,D.;Matsushima,H. and Morohashi,Y.(2000).Water stress enhances .B-amylase activity in cucumber cotyledons. J. Exper. Bot.,345 (51):739-745.

26- Yan ,P.; Wu,L.J. and Yu,Z.L.(2006). Effect of salt and drought stress on antioxidant enzymes activities and SOD isoenzymes of liquorice(*Glycyrrhiza uralensis* Fisch). Plant Growth Regulation, 49 (2-3): 157-165.

27- Singh,N.K.;Handa,A.K.;Hasegawa,P.M. and Bressan,R.A. (1985). Protein associated with adaptation of cultured tobacco cells to NaCl. Plant Physiol., 79:122-126.

28- Mohammed,salehi.(2012). The study of drought tolerance of lentil (*Lens culinaris* Medik) in seedling growth stages. Int. J. Agron. Plant Prod.3(1):38-41.

29- شومان ،وفاء ; غزال ، حسن ; اشتر ، سها وباوم ، مايكل.(2001). التنوع الوراثي في الشعير السوري بأستخدام مؤشرات RAPD. مركز بحوث كليه الزراعة، جامعه الملك سعود،99 :5-33.

30- Nazari,L. and Pakinyat, H.(2008). Genetic diversity of wild and cultivated barley genotype under drought stress using RAPD marker. Biotechnology ,7(4) :745-750.

31- Li , S.F. ; Tang , S.J. and ail , W.Q (2010) .RAPD – SCAR marker for genetically improved NEW GIFT Nile Tilapia (*Oreochrmis niloticas niloticas* L.) and their application in strain identification .Res.,31 :147-153.

32-Rajesh , M.K.; Jerard , B,A, ; Prethi , P. ; Thomas, R.J. ; Fayeis , T.P. , and Rachana , K.E. (2013). Development of RAPD - derised SCAR marker associated with tall – type palm trait in coco nut . Sci. Hortic ., 150: 312-316.

33- Pakniyat,H. and Tavakol,E. (2007). RAPD markers associated with drought tolerance in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). Pak.J.Biol.Sci., 10(18): 3237-3239.

34- Pakniyat,H.;Namayandeh,A. and Forster,B.P. (2004). Identification of RAPD markers linked to salt tolerance in cultivated and wild barley. Int. barley Genet. 191-194.

35- Dwivedi, S.L.S. ; Gurtn , ; Chandra , W. ; Yuejin N. and Nigam , N. (2001) Assessment of Genetic diversity among selected ground nut germplasm I : RAPD analysis plant Breeding 120: 345 – 349.

36- العاصي ، عقيل حسين علي . (2002) . استخدام مؤشرات الدنا في تحليل التنوع الوراثي للشعير *Hordum vulgar* L. المزروع في العراق . أطروحة دكتواره ، كلية التربية ابن الهيثم ، جامعة بغداد ، العراق.

37-Reena,D.;Nawab,S.T.;Niraj,T. and Sharad,T. (2012). Identification of RAPD and ISSR markers for drought tolerance in Wheat (*Triticum aestivum* L.) .Physiol.Mol.Biol.Plant, 18(11): 101-104.

38- Mohammed,salehi.(2012). The study of drought tolerance of lentil (*Lens culinaris* Medik) in seedling growth stages. Int. J. Agro. Plant Prod.3(1):38-41.

الجدول (1): يوضح البادئات العشوائية المستعملة مع تتابعاتها

ت	اسم البادئ	تتابع البادئ 5 ـــــــ 3//
1	OP-BO1	GTTTCGCTCC
2	OP-B11	GTAGACCCGT
3	OP-C16	CACACTCCAG
4	OP-D20	ACCCGGTCAC
5	OP-EO2	GGTGCGGGAA
6	OP-N13	AGCGTCACTC
7	OP-N16	AAGCGACCTG
8	OP-P04	GTGTCTAAGG
9	OP-T04	CACAGAGGGA
10	P 27	CCGTGCAGTA
11	P 7	CTGCATCGTG

الجدول (2): تأثير الجهد المائي في نسبة الإنبات (%) لأصناف الشعير المدروسة

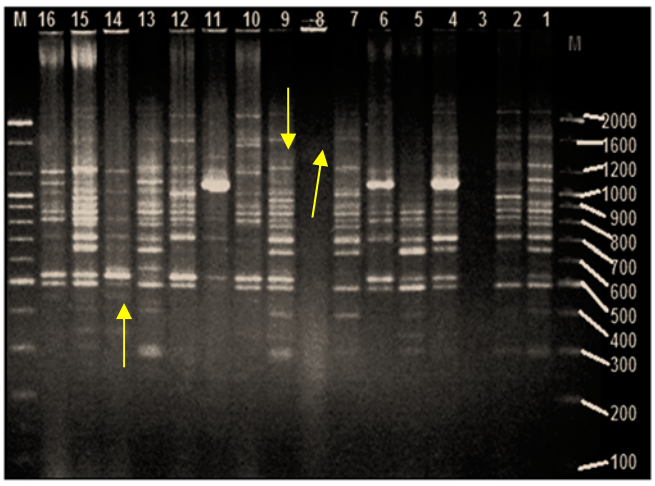
الصنف	الجهد المائي (بار)				المعدل%
	Control	3-	6-	9-	
براق	88	94	94	83	89.75
بوادي	100	100	88	77	91.25
اريفات	88	94	83	77	85.50
أمل	88	94	83	61	81.50
الوركاء	88	100	61	50	74.75
الخير	88.8	100	61	44	73.45
نور القادسية	61	55	50	44	52.50
نومار	88	100	88	38	78.50
أباء 99	66	61	27	27	45.25
شعاع	66	44	27	16	38.25
رافدين	44	38	22	11	28.75
سمير	27	22	5	5	14.75
ريحانة 3	100	83	5	0	47.00
فرات 9	66	66	0	0	33.00
جزيرة 1	83	33	0	0	29.00
أباء 7	33	22	0	0	13.75
المعدل	73.42	69.12	43.37	33.31	---
: للصنف: 14.768 * ، للجهد المائي: 12.281 * ، التداخل: 21.053 *LSDقيمة					
) *P<0.05.(					

جدول(3):يوضح البادئات المستعمله والحزمه الناتجه ونسبه التباين وكفائتها والقدره التمميزيه لها

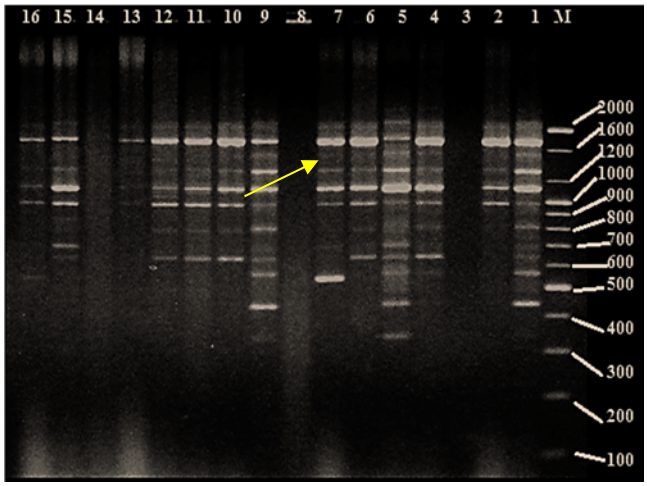
ت	البادئ	الحزم الرئيسيه	الحزم المتباينه	نسبه التباين%	كفاءه البادئ	القدره التميزيه للبادئ
1	OP-E02	16	14	87.5	7.92	7.73
2	OP-N13	22	19	86.36	10.89	10.49
3	OP-T04	23	22	95.65	11.38	12.15
4	OP-P04	19	18	94.73	9.40	9.94
5	OP-D20	21	20	95.23	10.39	11.04
6	OP-B01	13	11	84.61	6.43	6.07
7	OP-B11	14	10	71.41	6.93	5.52
8	OP-C16	12	12	100	5.94	6.62
9	OP-N16	18	15	83.3	8.91	8.28
10	P27	25	23	92	12.37	12.70
11	P7	20	17	85	9.90	9.39

جدول(4): يوضح الحزم المميزه الناتجه للبادئات المستعمله والاصناف التي ظهرت فيها هذه الحزم

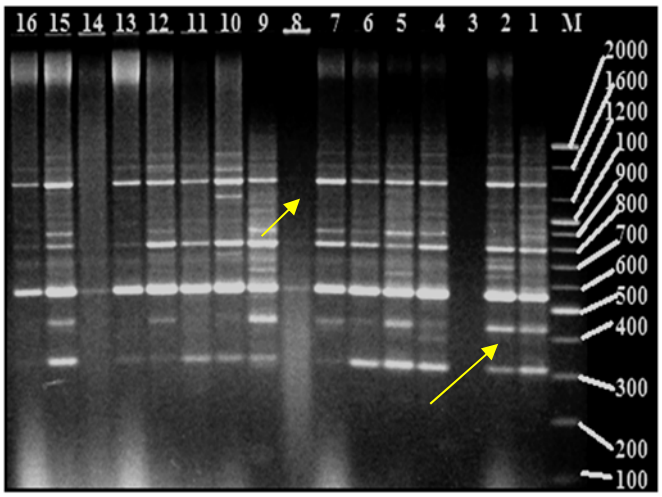
ت	البادىء	الحزم مميزه (وزنها الجزيئيbp)	الصنف المتميز
1	OP-N13	450 1500 1400	فرات 9 ، جزيرة 1 ، اباء 7 شعاع رافدين
2	OP- C16	1500	براق ، بوادي ، اريفات ، امل ، الخير ، الوركاء ، نور القادسية ، نومار ، اباء 99
3	OP- BO1	800 1400	بوادي امل
4	OP- EO2	1200 400	شعاع امل
5	P27	2000 300	براق براق،بوادي،اريفات،امل،الوركاء،نومار،اباء99 ، شعاع ،رافدين ، فرات 9



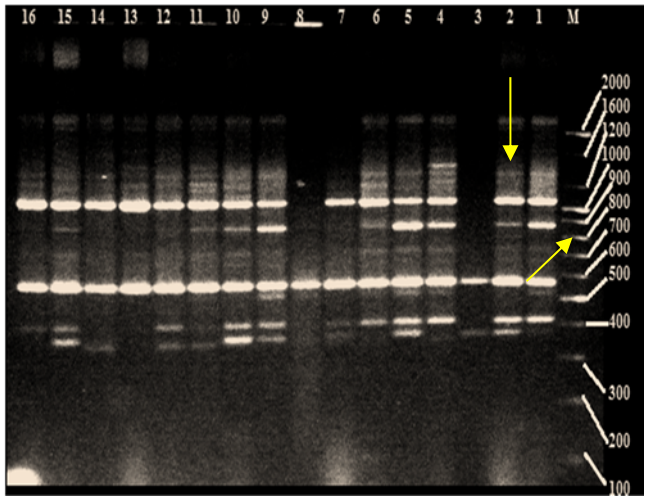
OP- N13 (B)



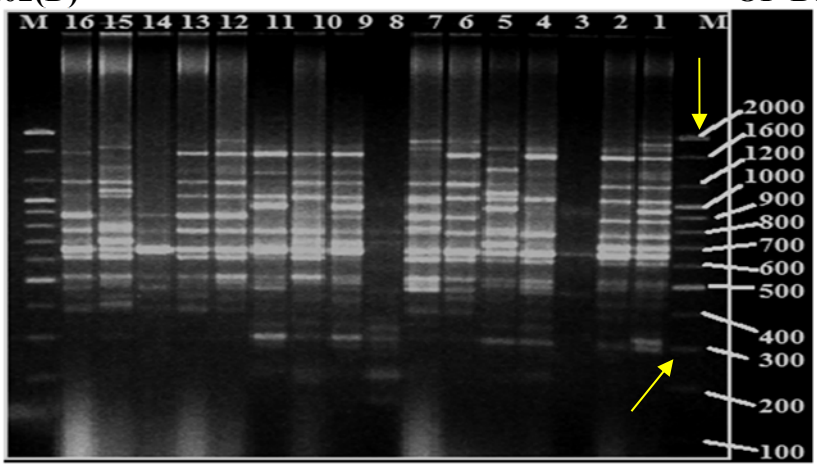
OP- C16 (A)



OP-E02(D)



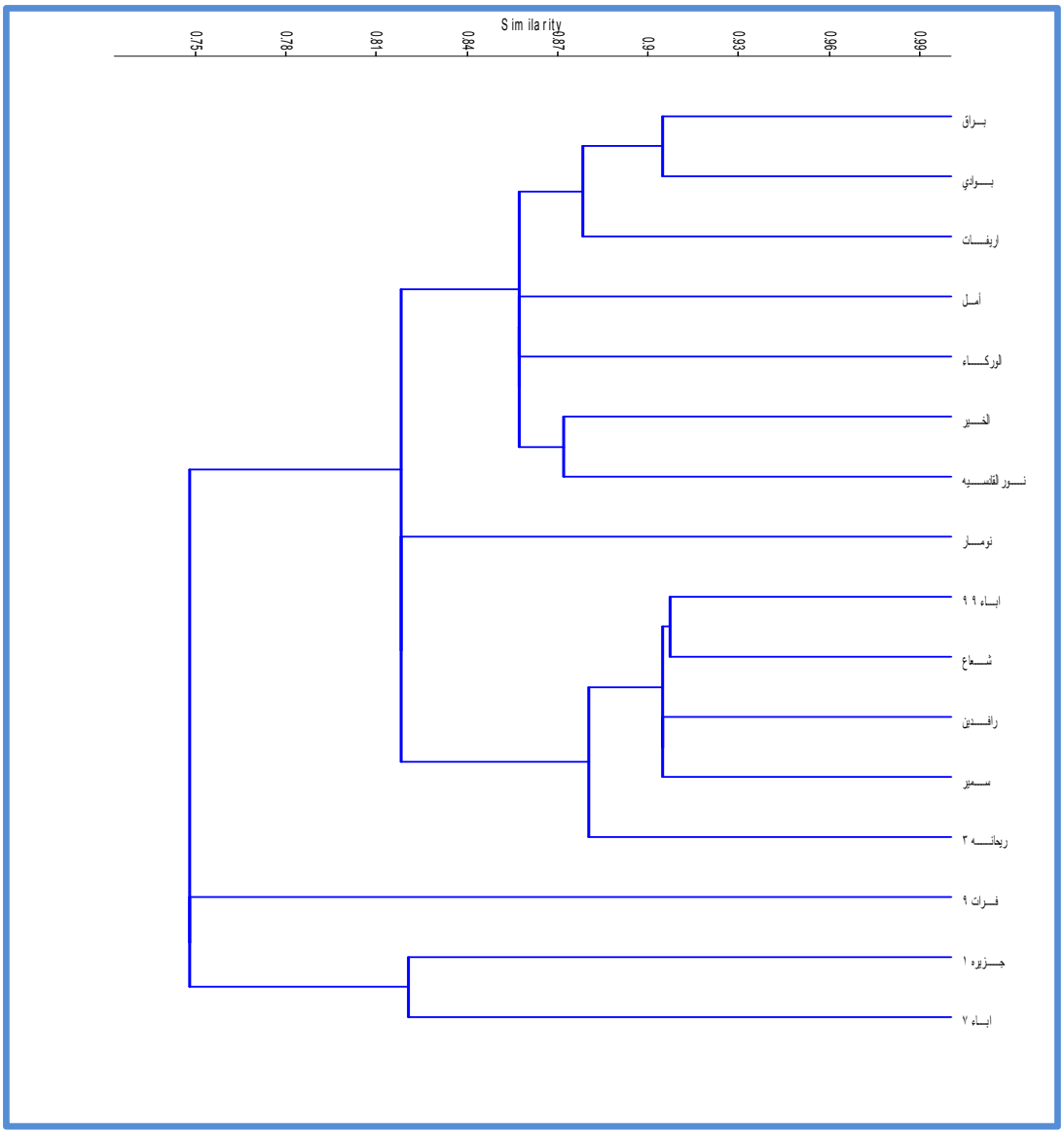
OP-B01 (C)



P27 (E)

شكل (1): يوضح نواتج تضاعف البادئات المتميزه المرحله على هلام الاكاروز 1 % مع الدليل الحجمي Ladder

M- الدليل الحجمي ،1- براق ،2-بوادي ،3-اريفات ،4-أمل ، 5- الوركاء ، 6- الخير، 7-نور القادسيه ،8- نومار، 9- أباء 10،99-شعاع ،11- رافدين ،12- سمير ، 13- ريحانه3 ، 14- فرات9 ، 15-جزيرة1 ، 16-أباء7.



الشكل (2): يوضح مخطط التحليل العنقودي (شجره القرابه) اعتمادا على مؤشرات الـRAPD

جدول (5): يوضح قيم معامل التشابه الوراثي لأصناف الشعير المدروسة اعتمادا على البيانات الناتجة من استخدام تقنيه الـRAPD

	براق	بوادي	أريفات	أمل	الوركاء	الخير	نور القادسية	نومار	اباء 99	شعاع	رافدين	سمير	ريحانه3	فرات 9	جزيرة1	اباء 7
براق	1															
بوادي	0.904	1														
أريفات	0.880	0.875	1													
أمل	0.880	0.973	0.85	1												
الوركاء	0.976	0.880	0.857	0.857	1											
الخير	0.833	0.871	0.8	0.846	0.853	1										
نور القادسية	0.904	0.9	0.829	0.857	0.880	0.871	1									
نومار	0.813	0.761	0.871	0.738	0.790	0.731	0.804	1								
اباء 99	0.976	0.883	0.860	0.860	0.953	0.813	0.883	0.837	1							
شعاع	0.928	0.833	0.853	0.809	0.951	0.85	0.878	0.829	0.906	1						
رافدين	0.883	0.878	0.809	0.853	0.860	0.85	0.878	0.829	0.906	0.857	1					
سمير	0.976	0.880	0.857	0.857	0.952	0.853	0.926	0.833	0.853	0.951	0.904	1				
ريحانه3	0.906	0.853	0.829	0.829	0.926	0.825	0.809	0.761	0.883	0.878	0.878	0.880	1			
فرات 9	0.714	0.789	0.763	0.763	0.731	0.756	0.743	0.692	0.697	0.725	0.725	0.690	0.789	1		
جزيرة 1	0.928	0.878	0.853	0.853	0.951	0.897	0.878	0.829	0.906	0.95	0.902	0.951	0.925	0.725	1	
اباء 7	0.761	0.75	0.769	0.725	0.780	0.717	0.75	0.789	0.744	0.820	0.731	0.780	0.794	0.771	0.820	1

اقل قيمه للتشابه الوراثي

اعلى قيمه للتشابه الوراثي

Genetic Diversity of Iraqi Barley Species Differing in Their Tolerance to Drought by RAPD Analysis

Nidhal N. Hussain
Zainab R. jassem
Dept. of Biology / College of Education for Pure Science (Ibn AL-Haithem) /University of Baghdad
Harb Adeel
Dept. of plant protection/ Ministary of Agriculture
Received in:16/November/2014,Accepted in:18/January/2015

Abstract

The genetic diversity was studied in sixteen barley *Hordeum vulgar* L. species cultivated in Iraq , which are differ in their ability to drought stress tolerance by using random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD - PCR) .Barley species was evaluated to drought stress after treatment the plant seedling at germination stages to different concentration of polyethylene glycol (PEDG6000) . The results showed that the Broaq and Arefat species have the highest tolerance to drought stress in contrast the rest of Barly species like Alkhair, Alwarkaa, Ebaa99, Shoaa, Alrafidain,Sameer Rehana 3 , forat9 , jazeral ,and ebaa7 revealed sensitivity to drought stress .

The primes which used RAPD technique for all the studied species were produced 203 bands . The percentage of monomorphic bands is 10.39 % , while the polymorphic bands scored 89.70% raning from 71.4 % for OP-B11 primer to 100% for OP-C16 primer .Some primers produced specific or distinguished bands for some Barley species , such as primer OP-N13 which produced band with 450 bp molecular weight. and this band was appeared in sensitive drought stress species only like Forat 9 ,Jazera 1 and Ebaa7. Primer P27 produced band with 2000 bp molecular weight and this band was appeared in highest tolerance Boraq Barley species .This band maybe associated with drought tolerant. Cluster analyses by using jaccard scale for genetic similarity revealed a dendogram with three major groups with 75% similarity degree .The first and second sub group of group one included the tolerant and moderately tolerant species excluding Alkhair and Alwarkaa species which they are separated according to their genetic origin with one of the parents (Arefat) . The second and the third groups with the third sub group of group one included the sensitive species. The results of RAPD markers indicated the presence of high percentage of genetic diversity within the studies Barley species cultivated in Iraq .Moreover .these result enable the researches to separate the samples which differ in their ability to drought stress tolerance by using few numbers of genetic sites.

.

Key Words: *Hordeum vulgar* , drought and RAPD