جامعة البعث

كلية الزراعة

قسم المحاصيل الحقلية

Al-Baath University

Faculty of Agriculture

Crops Department

أثر الإجهاد الجفافي في بعض طرز القمح باستخدام المؤشرات البيوكيميائية والجزيئية

The Effect Of Drought Stress On Some Wheat Genotypes Using Biochemical And Molecular Indicators

خطة بحث أعدت للتسجيل بدرجة الماجستير في الهندسة الزراعية

قسم المحاصيل الحقلية

إعداد

أمينة طنبري

الإشراف

د. لينا النداف (مشرفاً)

تقنيات حيوية وبيولوجيا جزيئية

مدرس في قسم المحاصيل الحقلية

جامعة البعث

د. سلام لاوند (مشرفاً مشاركاً)

بيولوجيا جزيئية نباتية

أستاذ مساعد في قسم المحاصيل الحقلية

جامعة دمشق

المقدمة:

تُعدُّ محاصيل الحبوب الأهمّ زراعياً على مستوى العالم، حيث تُؤمن 70% من غذاء سكان العالم، ويشكّل محصولا القمح Wheat والأرز Rice ما يعادل 50 % من الإنتاج العالمي (Lookhart and Bean, 2000)، حيث يعدُّ محصول القمح من أهم محاصيل الحبوب (Kazemi, 2009)، إذ يُزرع ويُستهلك كغذاء أساسي في العديد من دول العالم، وبخاصةٍ في المناطق التي تُعاني من مشكلة الجفاف، ويؤمن هذا المحصول ما يُعادل 22 % من الطاقة و 19 % من البروتين اللازم لبناء جسم الإنسان في الدول النامية (صالح، 2012).

تحتوي حبوب القمح *Triticum aestivum* L. على البروتين الغروي (الغلوتين)، ما يسمح بالحصول على الخبز المنتفخ والناضج بشكل متجانس. ويُعد القمح محصولاً نشوياً لكنه في الوقت نفسه يحتوي على البروتين والأملاح والفيتامينات كمواد ذات قيمة غذائية مرتفعة جداً، وكمية من الأحماض الأمينية. ويُستخدم كمادة أولية في العديد من الصناعات الغذائية، مثل الخبز، بالإضافة إلى استخدامه في المجالات الصناعية، كصناعة النشاء (عبد الحميد وديب، 2003).

يحتل القمح من حيث الإنتاج العالمي المرتبة الثانية في قائمة محاصيل الحبوب بعد محصول الذرة الصفراء ، حيث أنتج 736 مليون طناً من القمح للموسم الزراعي 2015–2016، ويشكل إنتاج الصين، الهند، روسيا والولايات المتحدة أكثر من ربع الإنتاج العالمي (International Grain Council, 2016).

يُعدّ الوطن العربي أكبر تجمع سكاني مستهلك للقمح، حيث بلغ الاستهلاك 42 مليون طناً عام 2013، فيما كان الإنتاج24.7 مليون طناً، وتم الاعتماد على الاستيراد لسد العجز ما بين الإنتاج والاستهلاك، وكانت كل من مصر، والجزائر، المغرب، العراق، واليمن من أكبر الدول العربية المستوردة للقمح (المنظمة العربية للتنمية الزراعية، 2014). تقدر المساحة المزروعة بمحصول القمح على مستوى الوطن العربي بنحو 10709,88 ألف هكتاراً (المنظمة العربية للتنمية الزراعية، 2014). اتجهت الدول العربية لزيادة المساحات المزروعة بالحبوب، حيث ازدادت هذه المساحات بنسبة 32%، في الوقت الذي انخفضت به المساحة العالمية بنحو 4% (المنظمة العربية للتنمية الزراعية، 2014)، تتركز زراعة القمح في الوطن العربي في المغرب، والعراق، والجزائر، وسورية، وتونس، (المنظمة العربية للتنمية الزراعية،2015).

بلغت المساحة المزروعة بالقمح في القطر العربي السوري 1287885 هكتاراً، والإنتاج 2024332 طناً، والإنتاجية 1572 كغ.هكتار$^{-1}$، احتل القمح القاسي من المساحة المزروعة ما يعادل 577634 هكتاراً، وبلغ

الإنتاج 952964 طناً، والإنتاجية 1650 كغ.هكتار$^{-1}$، في حين بلغت المساحة المزروعة بالقمح الطري 7102551 هكتاراً، والإنتاج 1071369 طناً، والإنتاجية 1508 كغ.هكتار$^{-1}$. تتركز زراعة القمح القاسي والطري في سورية في المناطق الشرقية والشمالية الشرقية، حيث تحتل محافظة الحسكة المرتبة الأولى من حيث المساحة المزروعة، تليها محافظة الرقة، (المجموعة الإحصائية الزراعية، 2014).

تشير الإحصائيات إلى تراجع المساحة المزروعة بهذا المحصول، رغم الزيادة الملحوظة في الإنتاج والإنتاجية (FAO, 2010)، ويُعزى هذا التراجع في المساحة المزروعة بمحصول القمح في الزراعات المروية إلى تملح التربة Soil Salinization، وخروج جزء كبير منها من قطاع الاستثمار الزراعي، في حين يعزى تراجع وتردي غلة المحصول في الزراعات المطرية رغم ازدياد المساحة المزروعة التي تشكل 55% من إجمالي المساحة الكلية المزروعة (1599108) هكتاراً، إلى تدني معدلات الهطول المطري، وعدم انتظام توزع الأمطار خلال موسم النمو بما يتناسب مع تلبية احتياجات نباتات المحصول المائية (Rhoades *et al.,* 1992)، لذلك كان لابد من العمل على تحسين تحمله تحت ظروف الإجهاد الجفافي، إما عن طريق التوسع الأفقي من خلال زيادة المساحة المزروعة، وهذا غير ممكن بسبب تراجع مساحة الأراضي الصالحة للزراعة نتيجة لتملح الموارد المائية العذبة وندرتها، أو زيادة الإنتاج بشكل رأسي، وذلك من خلال زيادة الإنتاج في وحدة المساحة المزروعة، ويمكن تحقيق ذلك من خلال انتخاب الطرز الوراثية ذات الطاقة الإنتاجية المرتفعة تحت ظروف الزراعة المطرية، وتحديد حزمة التقانات الزراعية المناسبة التي تظهر الطاقة الإنتاجية الوراثية الكامنة Potential yield لهذه الطرز (Chahal and Gosal, 2002).

الدراسة المرجعية:

يعرف **الإجهاد الجفافي** Drought stress بأنه فترة من ندرة المياه تواجه المحصول خلال مراحل نموه وتؤدي إلى الحد من إنتاجية النبات في الطبيعة أو في النظام الزراعي، وعادةً ما تترافق ظروف الجفاف مع العديد من الإجهادات البيئية الأخرى مثل الإجهاد الحراري والضوئي وإجهاد التغذية (Nayer and Heidari, 2008).

يشكل حوالي 26% من مجموع الإجهادات (Tas and Tas ,2007) وبالتالي يعّد أحد أهم العوامل المؤثرة على نمو النباتات وتطورها (Rampino *et al*., 2006).

هناك نوعين من الجفاف:

- جفاف التربة: الذي يبرز بعد استنفاذ المخزون المائي من التربة، خاصة من الطبقة التي تنتشر بها الجذور فينجم عنه عدم قدرة النبات على امتصاص ماء التربة (Richards and Passioura, 1981).
- جفاف الجو: الذي ينتج عن هبوب رياح جافة وساخنة تؤدي إلى نقص الرطوبة الجوية (Baldy, 1974).

يلجأ النبات في ظروف الإجهاد الجفافي، إما للتهرب هو وسيلة يتبعها النبات لإلغاء أو التقليل من تأثيرات الإجهاد الجفافي، خلال مراحل تطوره خاصة الأصناف الحساسة لنقص المياه، ويكون ذلك بالتبكير في الإزهار والنضج خارج فترات الإجهاد المائي (Yekhlef, 2001) أو للتأقلم والذي يعرف بأنه قدرة النبات على النمو وإعطاء مردود في المناطق التي تعاني من نقص المياه (Turner, 1979). ولعل من أهم آليات التأقلم التنظيم الأسموزي الذي يعد إجراء بيولوجي يحمي العضو من تأثير نقص المياه، وذلك بتخفيض الضغط المائي والإبقاء على الضغط الانتباجي بتراكم مختلف المركبات ذات دور المنظم الأسموزي (Turner, 1986). ومن هذه المركبات السكريات الذوابة والأحماض العضوية وبعض الشوارد كالصوديوم والبوتاسيوم وغيرها (Farooq *et al.*, 2009).

وجد أن الحمض الأميني برولين يلعب دوراً هاماً في حماية النباتات التي تتعرض للإجهادات غير الحيوية، حيث يخفف من سمية بعض المركبات ويتفاعل مع بقايا بعض البروتينات (Nanjo *et al.,* 1999; Yang and Jorgensen, 2011). وقد وجد Farshadfar وزملاؤه (2008). زيادة تركيز البرولين في الظروف المجهدة مقارنةً بالظروف غير المجهدة. في هذا الصدد وجد Abdalla and El-Khoshiban (2007) زيادة في نسبة الصوديوم في المجموعين الخضري والجذري، في الطرز الحساسة والمتحملة من القمح. كما وجد (Nejad *et al.,* 2010) أيضاً زيادة نسبة الصوديوم في جذور الذرة مع زيادة مستوى الإجهاد الجفافي، وبالتالي فالصوديوم يمكن أن يقوم بجزء من دور البوتاسيوم في تعديل الجهد الحلولي تحت ظروف الجفاف. هذا الأمر قد يكون مختلفاً في محاصيل أخرى، فقد وجد AlJbawi and Abbas (2013) أن طرز الشوندر السكري المتحملة للجفاف تزيد فيها نسبة البوتاسيوم ويتراجع محتوى الصوديوم في جذورها.

درس Al-Maskari وزملاءه (2016) تأثير الجفاف على نمو ومحتوى الأوراق من الكلوروفيل في نبات القمح، حيث وضعت فيها أربعة أنظمة للجفاف، 100٪ و 80٪ و 60٪ و 40٪ . أظهرت النتائج وجود فروق ضئيلة في بعض الصفات النباتية مع معاملات الإجهاد.

يعتمد تأثير الجفاف في النبات على شدة الإجهاد وعلى وقت حدوثه وعلى طول مدة تعرض النبات له، وأيضاً حسب مرحلة نمو النبات (Kramer and Boyer, 1995; Saab and Sharp,2004)

لعل أولى علامات الجفاف هو انخفاض في نمو النبات وتقلص في حجم الأوراق (Kramer and Boyer, 1995; Saab and Sharp,2004. كما يؤثر الإجهاد الجفافي على مختلف تفاعلات عملية التركيب الضوئي وتخريب الأغشية السيتوبلاسمية ما يؤدي إلى زيادة نفاذيتها، وفقدان خاصيتها الاصطفائية، ومن ثم تسرب الذائبات المعدنية والعضوية المفيدة لحياة الخلية النباتية ما يؤدي إلى موتها، لذلك ترتبط حياة الخلية النباتية ومن ثم قدرتها على استعادة النمو بكفاءة الطرز/النوع الوراثي في المحافظة على سلامة الأغشية السيتوبلاسمية، وبالتالي فإن عملية تطوير طرز وراثية تمتاز بالقدرة على المحافظة على إستقرار وثباتية الأغشية الحيوية تحت ظروف الإجهاد هي من أهم السبل لتحسين تحمل تلك الطرز(Oosterhuis and Walker, 1987).

تعد مرحلة إنبات البذور والبادرة من المراحل الحرجة، لا سيما في المناطق التي تتعرض للجفاف (Pratap and Sharma, 2010)، وذلك يؤثر سلباً في تراجع إنتاجية المحصول (Thomoson, et al., 2005).حيث يؤدي تراجع الجهد المائي حول البذور إلى تراجع نسبة الإنبات وطول الجذور (Kaydam and yagnur, 2008)، وتبدي البادرات تبايناً وراثياً خلال المراحل الأولية من النمو، نتيجة ظروف الإجهاد (Jajarmi, 2009)، مما ينعكس على أطوالها، وتراكم المادة الجافة فيها (Moud and Maghsoudi, 2008)، وقد يعزى الأُثر المثبط لزيادة الإجهاد للوسط، على معدل امتصاص الماء المستخدم من قبل البذور مما يؤدي إلى تراجع نسبة الإنبات (Strogonov, 1964)، وبالتالي تعد مرحلة الإنبات مرحلة هامة في تطور النبات، يعتمد عليها تأسيس عدد كبير من البادرات تفيد في تحديد الغلة الحبية (Mound and Maghsoudi, 2008). يؤثر الإجهاد الجفافي سلباً في كفاءة البادرات في منافسة الأعشاب الضارة، ويسبب أيضاً تراجعاً في معدل استطالة أجزاء النبات الهوائية نتيجة تراجع جهد الامتلاء داخل الخلايا النباتية الضروري لاستطالتها، ويمكن أن يتوقف النمو بشكل كلي عند ازدياد شدة الإجهاد المائي أو طول فترة التعرض له، وتعد استطالة الخلايا النباتية من أكثر العمليات الفيزيولوجية حساسية لظروف شح المياه (Bressan *et al.,* 1990).

لجأ مربي النبات، إلى استخدام بعض المركبات الكيميائية التي تحث على الجفاف ضمن ظروف المخبر، وذلك لما يعترضهم من مشاكل في التحسين الوراثي لصفة الغلة الحبية تحت ظروف الجفاف، ومن هذه المركبات، مركبات البولي إيتيلين غليكول PEG6000 التي تستخدم بكثرة من أجل غربلة أصناف القمح لتحمل

الجفاف عند المراحل المبكرة للنمو، كونها مركبات غير متشردة، ولا تدخل عبر غلاف البذرة وتبقي جهد الوسط ثابت طيلة فترة التجربة (Valifard *et al.*, 2012).

أشار الباحثون إلى أن تعريض بادرات القمح بنسبة 20% من مركب PEG6000 أدت إلى تراجع طول السويقة، ووزنها الرطب والجاف (Pereyra *et al.*, 2006). وفي دراسة أخرى تراجعت أطوال الجذور والبادرات، وأوزانها الرطبة والجافة مع زيادة تركيز PEG6000 ، وتم تحديد المؤشرات التي ارتبطت بالتحمل مثل مؤشر التحمل بدليل طول الجذور، والوزن الجاف للبادرة كمؤشرات واقعية في غربلة الطرز للجفاف (Ahmad *et al.,* 2009).

درس العودة وزملاءه (2005). استجابة بعض الطرز الوراثية من القمح للإجهاد الجفافي في طور البادرة، حيث وجد فروق معنوية في استجابة طرز القمح للإجهاد ، فقد أبدت الطرز المتحملة للإجهاد الجفافي تراجعاً أقل في معدل النمو، وقدرة أكبر على استعادة النمو في نهاية فترة استعادة النمو بالمقارنة مع الطرز الحساسة.

لوحظ وجود تباين وراثي في كفاءة الطرز الوراثية في المحافظة على محتوى الماء النسبي في خلايا الأوراق، يمكن أن يعزى هذا التباين الوراثي إلى القدرة على التعديل أو التباين في درجة انغلاق المسامات استجابة للإجهاد الجفافي (Nye & Tinker, 1977). لذلك فقد أكد علماء الفيزيولوجيا وتربية النبات ضرورة إيجاد الطرز النباتية التي تتمتع بصفات مورفولوجية تساعد النبات على تحمل الجفاف ومقاومته سواءً كانت هذه الصفات خاصة بالمجموع الخضري أو المجموع الجذري (Bazzaz *et al.*, 2002).

تتحمل نباتات القمح الطرية الإجهاد الجفافي بشكل أفضل من الأصناف القاسية، بسبب كبر حجم مجموعها الجذري وتفرعه وتعمقه في التربة مقارنة مع القمح القاسي. غير أن الأقماح القاسية تتحمل الجفاف الهوائي أكثر من الطرية بسبب احتواء الأولى على السفا الطويل الذي يقلل من أثر الرياح الحارة (حياص ومهنا، 2007).

أجريت دراسة لمعرفة أثر الإجهاد المفروض صناعيًا، في مجموعة من المؤشرات الفيزيولوجية المرتبطة بتحمل الجفاف، عند مرحلتي النمو الأولي (الإنبات والبادرة). استخدمت فيها تراكيز مختلفة من محلول بولي إيتيلين غليكول (PEG6000) وجد تباين وراثي بين الطرز في استجابتها لتغيرات الإجهاد ، فقد حققت الطرز (حوراني، بحوث7، دوما1، دوما41282، دوما45367، دوما4، جولان 2، 8150-h) أقل معدلات تراجع في مؤشر التحمل النسبي للجفاف، بينما أظهرت الطرز (شام3، بحوث11، دوما41149) حساسية مفرطة للإجهاد المتزامن مع مرحلة الإنبات. وأبدت الطرز (دوما1، حوراني، بحوث7، دوما 41282، بحوث8، جولان2) تفوقاً

ملحوظاً مع زيادة تراكم المادة الجافة في بادراتها المنماة في الأوساط عالية التركيز، مقارنة مع الشاهد. وبذلك صنّفت من أكثر الطرز تحملاً للإجهاد. (اللحام وآخرون، 2016).

توصل غنيم وزملاءه (2011) في تجربة لاختبار مدى تحمل طرز من القمح للإجهاد الجفافي المحدث باستخدام بولي إيثيلين غليكول (PEG6000) خلال مرحلة الإنبات إلى وجود تباين وراثي بين الطرز المدروسة، فقد تراجعت نسبة الإنبات وحققت الأصناف شام10، دوما4، دوما2، شام3، أعلى معدلات في نسبة الإنبات عند جميع الإجهادات المفروضة، وكذلك في سرعة الإنبات مقارنة مع الطرز الأخرى.

بينت نتائج دراسة تأثير الإجهاد الناجم عن إضافة البولي إيتيلين غليكول (PEG) إلى المحلول المغذي في استجابة صنفين من القمح أحدهما متحمل للجفاف، والآخر حساس إلى حدوث تراجع في الوزن الجاف للمجموع الخضري والجذري، ومحتوى الماء النسبي، وكان التراجع في هذه المؤشرات أكبر في الطراز الحساس بالمقارنة مع الطراز المتحمل، إضافة إلى تراكم كمية أكبر من البرولين في الطرز المتحملة للإجهاد (Kastori *et al.*, 1999).

يُعدُّ التباين الوراثي في كمية البرولين المُتراكمة بين النباتات صفةٍ فيزيولوجيةٍ مهمةٍ في التعديل الحلولي، ويُقترح إمكانية اعتماده كمؤشر إنتخاب في برامج التربية، وقد أُوصي بذلك بالنسبة لمحاصيل الحبوب المزروعة في بيئة حوض المتوسط (Nanjo *et al.,* 1999).

المؤشرات الجزيئية

اتسم القرن الماضي باكتشافات مميزة على مستوى علم البيولوجيا، ولا سيما البيولوجيا الجزيئية. حيث كان هناك تقدم جوهري في استخدام الطرق الجزيئية في مجال تربية النبات، في الوقت الذي كان فيه التوصيف المورفولوجي هو الطريقة الوحيدة المستخدمة منذ اعتمادهم من قبل العالم النمساوي جورج ماندل. ويعد فهم ودراسة التركيب الوراثي للقمح اللبنة الأساسية لنجاح برامج تربية النبات التي ازداد اعتمادها على طرائق جديدة أسرع وأكثر فعالية لتطوير وإنتاج أصناف محسنة، ولزيادة الغلة (ICARDA,2003). وقد تم نشر العديد من الأبحاث في العقد الأخير تدعم استخدام الدلائل الجزيئية في تحديد النقاء الوراثي Genetic purity في اختيار الحبة (Jain *et al.*, 1999; Huang and Sun,2000).

تعد المؤشرات الجزيئية ذات أهمية قصوى على صعيد تربية النبات بفعل عدة عوامل منها: إمكانية تحديد موقع وراثي مطلوب لطراز وراثي معين مباشرة، وعدم تأثر هذه المؤشرات بالشكل الظاهري للنبات أو الطور الفينولوجي والمؤثرات البيئية كما هو الحال في المؤشرات المورفولوجية، والحصول على عدد كبير من المؤشرات بزمن قصير نسبياً، كما أنها تعد مؤشرات مساعدة في إسراع عمليات الانتخاب والتربية (سيد، 2001). كما أن استخدام تقانات المؤشرات الجزيئية، التي طورت بالشكل الكافي لاستخدامها في برامج التربية، يمكن أن يقلل من تعقيدات إدخال عدد من الصفات المرغوب فيها في النمط الوراثي الواحد. (Graner *et al.*, 1991; Qi *et al.*, 1996; Ramsay *et al.,* 2000). ولعل من أهمها التقانات المعتمدة على تفاعل البوليميراز التسلسلي Polymerase Chain Reaction (PCR) التي تعد من أكثر التقانات المستخدمة في دراسة التباين الوراثي مثل تقنية التعددية الشكلية للـ DNA المضخم عشوائياً Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) وتقنية التعددية الشكلية لقطع الـDNA المهضومة بأنزيمات التقييد Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) وتقنية التسلسلات البسيطة المتكررة Simple Sequence Repeats (SSR) (Staub *et al.*, 1996; Gupta and Varshney, 2000).

يقوم تفاعل ال (PCR) بمضاعفة Amplification قطع محددة من الحمض النووي الريبي منقوص الاوكسجين DNA وذلك بوجود بادئات عشوائية أو متخصصة مصممة لهذا الهدف، مما يسمح بالحصول على ملايين النسخ المضاعفة من قطعة واحدة من الحمض الريبي النووي منقوص الاوكسجين DNA التي تتضاعف أسياً (Weising *et al.*, 1995)، ويتم هذا التفاعل بوجود مكونات أساسية هي كلوريد المغنزيوم MgCl2، النكليوتيدات ثلاثية الفوسفات(Deoxynucleoside Triphosphates (dNTPs وأنزيم Taq–Polymerase عبر عدد من الدورات يصل لـــ40 دورة (Newton and Graham., 1994). ومن المؤشرات الجزيئية المهمة جداً والواسعة الانتشار حالياً مؤشرات التسلسلات البسيطة المتكررة (SSR). تتكون هذه المؤشرات من مقاطع صغيرة متكررة، تسمى وحدات متكررة، تتكون من توليفات مختلفة من أربع وحدات هي قواعد الحمض النووي DNAالأدنيين(A)، والسيتوزين(C)، الجوانين(G)، والتيامين(T)، وهي تتواجد بكثرة في مجينات حقيقات النوى وتتوزع على جميع الصبغيات سواء في المناطق المشفرة(الإكسونات) أو غير المشفرة(الإنترونات) Powell *et al.,* 1996).

تعد ال SSR من التقنيات المهمة التي تتميز بموثوقيتها العالية ومثاليتها، وذلك لارتفاع معدل تطفرها بحيث تكشف عن الأليلات المتعددة وبالتالي تسهم في كشف التباينات الوراثية بدقة عالية (Rafalski and Tingey,

(1993; Sweigart *et al.*, 1999 ووفرتها وتوزعها ضمن الجينوم وكذلك لتطلبها كميات قليلة من المادة الوراثية DNA (Wang *et al.*,2014)، بالإضافة إلى إمكانية الكشف عن التتاليات النيكليوتيدية ذات السيادة المشتركة Codominant في التوريث (Rafallski *et al.,* 1993)، إمكانية أتمتتها Rafallski, et. al., automation (1993) وحيث انه يمكن نشر البادئات Primers وتبادلها بسهولة بين المخابر بمجرد معرفة التسلسل النكليوتيدي لها (Yu, *et. al ,* 1994).

استخدمت هذه التقنية على العديد من الأنواع والأجناس في محاصيل الحبوب كالقمح والرز (Roder *et al.*, 1995; Zhao and Kochert, 1992).

استخدم Sofalian وزملاؤه (2009) معلمات SSR لدراسة التنوع الوراثي لـ 18 سلالة محلية من إيران، باستعمال 15 زوج من بادئات SSR، والتي أعطت نتائج تضخيم، وبلغت نسبة التعددية الشكلية 97.22%. قام Eleuch وزملاؤه (2008) بتقييم التنوع الوراثي لمدخلات من القمح، فدرس 48 طرازاً وراثياً من القمح، واستخدم 22 مؤشراً جزيئياً من مؤشرات SSR، تمكَّنت أربعة من مؤشرات SSR من التمييز بين طرز القمح، حيث بلغت النسبة المئوية للتعددية الشكلية 97.2%، وفصلت هذه التقنية بين الطرز المدروسة بحسب البلد الذي جمعت منه ، وتباين ارتباط المؤشرات الجزيئية بالصفات الحقلية بحسب البلد أيضاً.

درست اشتر (2009) التنوع الوراثي لـ 49 طرازاً وراثياً من القمح القاسي والطري، باستعمال 32 مؤشراً من مؤشرات SSR ، بلغ عدد الحزم النهائي 255 أليلاً بمتوسط 7.97 أليلاً للموقع الواحد، وتراوح عدد الأليلات من أليلين كحد أدنى إلى 18 أليلاً كحد أقصى، وكان متوسط قيمة التنوع الوراثي 0.65 للقمح الطري، و0.47 للقمح القاسي. وقد توصل Chenyang وزملاؤه (2006) في دراسة لصنف محسنا من القمح باستعمال مؤشرات SSR، إلى أن قيمة التنوع الوراثي 0.45.

تمَّ تحديد وجود الديهيدرينات كبروتينات في كل من النباتات الراقية والدنيا على حد سواء، فقد أظهرت الدراسات المرجعية وجود الديهيدرينات لدى الطحالب المجففة، ولدى الفصيلة النجيلية عند كل من القمح والشعير في النباتات البالغة مترافقة مع إجهاد الحرارة المنخفضة (Galiba *et al.,* 1955; Danyluk *et al., 1998*).

أثبتت العديد من الدراسات والبحوث تراكم بروتينات الديهيدرين، وازدياد تعبير المورثات المسؤولة عن إنتاجها في الشعير مترافقة مع تعرض النباتات لإجهادات الحرارة المنخفضة، والجفاف، والملوحة،(Teulat *et al.,* 2003; Robertson *et al.,* 2003; Close *et al.,* 1995; Close *et al.*, 1989).

درس Zhang وزملاؤه (2013) صنفين من القمح الشتوي (*Triticum aestivum*) مختلفين في درجة تحملهما للجفاف (KTC 86211, ND 7532)، حيث تمّ تعريضهما للإجهاد الجفافي في التربة، ثمّ استعادة النمو في أربع مراحل من النمو، وقد بّينت النتائج أنّ بروتينات الديهيدرين مع أوزانها الجزيئية 37–45 KD، تراكمت بشكلٍ معنوي خلال كل المراحل وفي كلا الصنفين، حيث وجد أنّ بروتين الديهيدرين (28 KD) تراكم حصرياً في مرحلة البادرات، وكذلك البروتين (40, 45 KD) تراكم في مرحلة امتلاء الحبوب، ولكن تبين أنّ محتوى الديهيدرين الأكثر زاد مع تراجع محتوى رطوبة التربة، ثمّ انخفض خلال مرحلة استعادة النمو، تشير هذه النتائج إلى أنّ نمط تراكم الديهيدرين خلال إجهاد الجفاف اعتمد على الطراز الوراثي ومرحلة التطور.

قام Zhang وزملاؤه (2015) بتوصيف مورثة الديهيدرين، واستجابتها للإجهادات كالجفاف والملوحة المرتفعة والبرودة والحرارة المرتفعة، وكذلك دراسة الوظائف البيولوجية لمورثة الديهيدرين خلال التعرض لإجهاد الجفاف، والتي زودت مربي النبات بمعلومات مهمة لتطبيق هذه المورثات في برامج التربية الجزيئية، التي تركز على تحسين تحمل القمح للإجهاد، وقد أظهرت النتائج أنّ طول مورثة الديهيدرين TaDHN-1 bp487، وهي ترمز 112 حمض أميني، ومن المتوقع أنّ وزنها الجزيئي 11.5 KD، كما كشف التعبير الوراثي لهذه المورثة أنها حُرّضت بتأثير حمض الأبسيسك والناتج عن إجهادي الجفاف والملوحة، في حين أنّه لم يحدث التعبير المورثي تحت ظروف إجهاد الحرارة، ومن المثير للاهتمام أنّ مستوى تعبير مورثة الديهيدرين TaDHN-1 قد انخفض تدريجياً مع تطور حبوب القمح، وكان التعبير ضعيفاً جداً في مرحلة لاحقة من نضج الحبوب التي أشارت إلى أنّ مورثة الديهيدرين لم تشارك في الحماية من الجفاف في هذه المرحلة من حياة النبات.

أظهر الصنف sids وهو الصنف الأكثر تحملاً للجفاف وزنين رطب وجاف مرتفعين بالمقارنة مع الصنف الحسّاس Gmiza تحت ظروف الإجهاد المائي، عند تعريض صنفين من القمح الطري (Sids,Gmiza) إلى انخفاض تدريجي في المياه بدءاً من اليوم 17 حتى 32 بعد الزراعة ، كما امتلك الصنف Sids معامل نفاذية للأغشية مرتفع، ونشاطاً مرتفعاً من الأنزيمات المضادة للأكسدة بالمقارنة مع Gmiza، ومن جهة أخرى فإن أنماطاً مختلفةً من التعبير الوراثي لمورثات الديهيدرين لوحظت بسبب شدة الإجهاد المائي، متوافقة مع مدى تحمل الأصناف للجفاف، وقد أظهر تسلسل الـ DNA لمورثة Dhn وجود درجة مرتفعة من التشابه 80–92% مع النباتات الأخرى القريبة من هذه الأصناف، والملفت للنظر هو ظهور مستوى عالٍ للتعبير الوراثي لمورثات الديهيدرين في أنسجة الأوراق في الطراز المتحمل Sids تحت ظروف الجفاف القاسية (Hassgan *et al.,* 2015).

درس شيخموس وزملاؤه (2013) التباينات الأليلية لمورثات الديهيدرين في الجيل الطافر الثاني M2 لبعض الطرز الوراثية من القمح القاسي، هدفت الدراسة الجزيئية إلى تحديد التباينات في مورثات الجفاف المشكلة لبروتينات الديهيدرين (مورثات الديهيدرين)، حيث تمَّت مضاعفة DNA معاملات القمح المختلفة مع 12 زوجاً من البادئات المتخصصة بمواقع مورثات الديهيدرين بواسطة ال PCR. أظهرت نتائج هذا التفاعل قطع DNA مختلفة (تباينات شكلية مختلفة) لكل بادئة وضمن المعاملات المدروسة، عكست هذه التباينات وجود نظائر مختلفة لكل موقع مورثي ديهيدريني ضمن هذه المعاملات. حيث كانت التباينات الشكلية في الوزن الجزيئي بين نظائر الموقع الواحد كبيرة في بعض الأحيان، وفي البعض الآخر كانت على درجة مرتفعة من التماثل، وأمكن تميزها بسهولة على هلامة ميتافور الأغاروز 4.

أهمية البحث ومبرراته:

يحدث في النبات عدد كبير من التفاعلات للتغلب على الآثار الضارة الناجمة عن مجموعة واسعة من الإجهادات الحيوية وغير الحيوية بما في ذلك الضوء، الجفاف، الملوحة وارتفاع درجات الحرارة، ويعد الإجهاد الجفافي واحد من أهم الضغوط البيئية التي يتعرض لها النبات والتي تؤثر سلباً على إنتاجيته.

ولما كان القمح من أهم المحاصيل التي تزرع في الوطن العربي عامةً، وسوريا خاصةً، ونظراً لموجات الجفاف التي يتعرض لها العالم وتذبذب كمية الأمطار وعدم انتظامها، فإنه من الأهمية بمكان فهم الاستجابات البيوكيميائية والجزيئية للجفاف من قبل النبات وذلك لإدراك شامل لآلية مقاومة النبات لظروف ندرة المياه، فالأصل في عملية تكيف النبات مع البيئة هو الجينات وما يصاحبها من عناصر منظمة تجعل النبات أفضل نمواً، لذلك فإن هذه الدراسة التي تعتبر حديثة وغير مطروحة يمكن اعتبارها خطوة رئيسة أولية يستفاد منها لاحقاً في دراسات التربية والانتخاب ومن هنا تأتي أهمية البحث.

هدف البحث:

1–تحديد بعض المؤشرات البيوكيميائية المميزة للطرز المدروسة المرتبطة بتحمل الإجهاد الجفافي.

2–تحديد بعض المؤشرات الجزيئية المرتبطة بتحمل الإجهاد الجفافي للطرز المدروسة.

مواد وطرائق البحث:

الطرز المختبرة: القمح القاسي (حوراني ، شام 3 ، شام 5 ، بحوث 9 ، اكساد 65**).**

القمح الطري(شام 10 ، بحوث 10 ، دوما 2 ، دوما 6 ، جولان 2**).**

وفيما يلي أهم مواصفات الطرز المدروسة:

طرز القمح القاسي:

حوراني: إنتاجيته حوالي 1,71 طن/هـ، السنبلة هرمية الشكل مقاومة للانفراط طولها 4-6 سم، لونها كريمي، الحبوب كروية لونها عنبري، طول النبات 68 سم، عدد الأيام للنضج التام 181 يوم.

شام3: إنتاجيته حوالي 1,95 طن/هـ، السنبلة هرمية الشكل مقاومة للانفراط، طولها 7-8 سم، لونها كريمي، الحبوب بيضوية لونها عنبري، طول النبات 61 سم، عدد الأيام للنضج التام 164 يوم.

شام5: إنتاجيته حولي 1,85 طن/هـ، السنبلة هرمية الشكل مقاومة للانفراط، طولها 6-8 سم، لونها كريمي، الحبوب بيضوية لونها عنبري، طول النبات 56 سم، عدد الأيام للنضج التام 181 يوم.

بحوث9: إنتاجيته في الزراعة المروية 6,91 طن/هـ، ، السنبلة هرمية الشكل مقاومة للانفراط، طولها 7-8 سم، لونها كريمي غامق، الحبوب بيضوية نصف متطاولة لونها عنبري، طول النبات 89 سم، عدد الأيام للنضج التام 163 يوم.

أكساد 65: إنتاجيته تصل 3,17 طن/هـ، ، السنبلة هرمية الشكل مقاومة للانفراط، طولها4-6 سم، لونها كريمي غامق، الحبوب نصف متطاولة لونها عنبري، طول النبات 89 سم، عدد الأيام للنضج التام 165 يوم.

طرز القمح الطري:

شام 10: إنتاجيته في الزراعة المروية حوالي 8 طن/هـ، ، السنبلة هرمية الشكل مقاومة للانفراط لونها كريمي غامق، الحبوب بيضوية لونها عنبري، طول النبات 87 سم، عدد الأيام للنضج التام 159 يوم.

بحوث 10:

دوما 2: إنتاجيته حوالي 2,26 طن/هـ، ، السنبلة هرمية الشكل مقاومة للانفراط لونها كريمي، الحبوب بيضوية لونها عنبري، طول النبات 67 سم، عدد الأيام للنضج التام 159 يوم.

دوما6:

جولان 2: إنتاجيته حوالي 4,58 طن/هـ، ، السنبلة متوازية الشكل مقاومة للانفراط لونها كريمي، الحبوب كروية لونها عنبري، طول النبات 82 سم، عدد الأيام للنضج التام 164 يوم.

مكان تنفيذ التجربة: مخابر التقانات الحيوية في جامعة دمشق.

معاملات التجربة والمادة النباتية:

سيتم تعريض البادرة بمرحلة 3 أوراق حقيقية إلى الإجهاد الجفافي باستخدام تراكيز مختلفة من البولي إيتيلين غليكول PEG6000 (−3 ، −6 ، −9 ، −12 ، 0) بار. ترطب أوراق الترشيح بهذه المحاليل بمعدل 5 ميلليتر لكل طبق، بالإضافة إلى أطباق تحتوي على ماء مقطر فقط، تعد كشاهد، تغطى الأطباق منعاً لفقد الماء بالتبخر، ويتم تحضين الأطباق على درجة حرارة 20 ± 2 مْ. ويقاس طول الجذير (ملم) وطول السويقة الجنينية (م) ثم تقدير كل من (المحتوى المائي النسبي، السكريات الذوابة، البرولين، المالون داي ألدهيد، الكلوروفيل) في العينات المختبرة للجذير والسويقة معاً وذلك بعد (24 ، 48 ، 72) ساعة من التعريض للإجهاد. ستصمم هذه التجربة بالتصميم العشوائي الكامل وبثلاثة مكررات.
المخطط التالي يوضح توزيع المعاملات بالنسبة لأصناف القمح القاسي بنفس الطريقة سيتم توزيع المعاملات لأصناف القمح الطري.

A5B5	A5B4	A2B2
A1B1	A1B2	A5B5
A5B1	A1B5	A1B4
A4B1	A5B5	A5B4
A1B2	A2B1	A5B2
A3B2	A5B1	A1B1
A5B4	A3B5	A4B4
A2B2	A4B3	A2B4
A1B3	A2B3	A3B3
A4B4	A4B1	A1B2
A1B5	A1B1	A4B2
A4B2	A1B4	A3B1
A5B3	A2B4	A4B5
A2B5	A3B2	A1B3
A4B3	A2B2	A3B4
A2B3	A1B3	A2B5
A2B1	A4B4	A1B5
A5B2	A3B3	A4B3
A3B5	A3B1	A3B2
A3B4	A4B2	A2B3
A2B4	A2B5	A5B3
A1B4	A4B5	A5B1
A4B5	A5B3	A3B5
A3B3	A5B2	A4B1
A3B1	A3B4	A2B1

A	الصنف القاسي
B	تركيز PEG

1A	حوراني
2A	شام3
3A	شام 5
4A	بحوث 9
5A	أكساد 65

1B	0
2B	3-
3B	6-
4B	9-
5B	12-

المحتوى المائي النسبي للسويقة والجذير:

يبين المحتوى المائي الفعلي والمحتوى المائي عند التشبع (الإمتلاء التام للخلايا) ويقاس المحتوى المائي عند التشبع حسب طريقة (Hul *et al.,* 2015). بحفظ النبات في ماء مقطر لمده كافية (24 ساعة) في ظروف تمنع العمليات الأيضية (ظلام ودرجة حرارة منخفضة) حتى تتشبع الخلايا بالماء، ويحسب المحتوى المائي عند التشبع بتجفيف النبات وإيجاد وزنه الجاف ووزنه عند التشبع، ويحسب المحتوى المائي الفعلي كنسبة مئوية للمحتوى المائي عند التشبع:

$$\text{المحتوى المائي النسبي} = \frac{\text{المحتوى المائي الفعلي}}{\text{المحتوى المائي عند التشبع}} \times 100$$

تركيز بعض المواد الذوابة في السيتوبلاسم:

يعتمد الجهد الأسموزي للخلية على محصلة الجزيئات أو الأيونات الموجودة حتى لو كانت لمركبات مختلفة، لذلك تلجأ النباتات أثناء الإجهاد إلى مراكمة أنواع مختلفة من المذابات المتوائمة في السيتوبلاسم، وتعمل هذه المذابات المتوائمة إما لخفض الجهد الأسموزي أي تجعله اكثر سالبية خاصة عند ارتفاع تراكيزها أو لحماية البروتينات والأغشية الخلوية، وقد تؤدي الوظيفتين معاً ومنها:

تركيز السكريات الذوابة (ميكروغرام.غ$^{-1}$وزنرطب)::

أخذ 1 غ من الأوراق الفتية، ويضاف لها 50 مل ماء مقطر مغلي وبعدها توضع في حمام مائي بدرجة 80 درجة مئوية لمدة نصف ساعة بعد ذلك تم ترشيح العينة ويكمل الراشح الى 50 مل ماء مقطر، ثم يؤخذ 1مل من الراشح ويضاف له 1 مل من كاشف الفينول 5% ويمزج جيداً ثم يضاف له 5 مل حمض الكبريت المركز، ويضاف له 10 مل ماء مقطر ويتم تقدير نسبة السكريات الذوابة بقياس الشدة اللونيه بجهاز المطياف الضوئي عند طول موجة 488 نانومتر (Hul *et al.,* 2015).

-تركيز الحمض الأميني البرولين (ميكروغرام.غ$^{-1}$وزنرطب):

سيحلل البرولين حسب طريقة (Hul *et al.,* 2015). ، حيث سيتم أخذ وزن معين من العينة حوالي 0.5 غ ستطحن، ثم تمزج مع 10 مل من محلول حمض السلفوسالسيلك 3% وتوضع في جهاز الطرد المركزي 2000 دورة/ دقيقة ثم يرشح المخلوط، ويؤخذ 2مل من الرشاحة ويوضع عليه 2 مل من حمض الخل و 2مل من نينهدرين، وتوضع لمدة ساعة في حمام مائي درجة حرارته 100 درجة مئوية، وبعد التبريد مباشرة في حمام ثلجي لوقف التفاعل يضاف للمزيج 4مل من التولوين، ويمزج بشكل جيد لمده عشرين ثانية،

وتترك في درجة حرارة الغرفة سوف تنفصل طبقة من التولوين وماتحمله من البرولين فوق المخلوط، تؤخذ من هذه الطبقة 1 مل ثم يقاس البرولين بواسطة جهاز مقياس الطيف الضوئي بطول موجه 520 نانومتر وتقارن مع منحنى قياسي للبرولين النقي.

-محتوى السويقة والجذير من المالون داي ألدهيد (MDA) (ميكرومول.غ$^{-1}$):

تستخدم عادة درجة أكسدة اللبيدات لتقدير مدى تضرر الأغشية الحلوية بإجهاد الأكسدة لذلك سيتم تقدير تركيز(MDA) وهو الناتج النهائي لأكسدة لبيدات الأغشية الخلوية وذلك بحسب طريقة (Hul *et al.,* 2015).حيث سيتم إضافة 1مل من حمض الخليك ثلاثي الكلور بتركيز 0.1% وزن/ حجم الى 0.25 غ من العينة، ثم اخذ 0.5 مل من الرشاحة الناتجة بعد التثفيل ويضاف اليها 1مل من (TBA thiobarbituric acid بتركيز 0.5%، ثم قراءة امتصاص العينة للأشعة على طول موجة 532 نانومتر بواسطة جهاز قياس الطيف الضوئي.

تركيز الكلوروفيل في أوراق البادرات (ملغ.غ$^{-1}$وزن طري):

للكلوروفيل أنواع A,B,C,D,F وهو من الصبغات المرتبطة باقتناص الطاقة الضوئية اللازمة للبناء الضوئي ويقدر الكلوروفيل في الأوراق بحسب طريقة (Hul *et al.,* 2015). ستوضع الأوراق النباتية في أكياس خاصة لحين نقلها إلى المختبر، ثم مباشرة سيؤخذ 200 ملغ من كل ورقة ثم تسحق الأوراق الرطبة باستخدام هاون خزفي مع (20) مل من الأسيتون بتركيز(80 %) وفصل الراشح عن الراسب المتبقي بوساطة جهاز الطرد المركزي ومن ثم قراءة الامتصاصية للراشح على الأطوال الموجية (663 – 645) نانوميتر بوساطة جهاز المطياف الضوئي من نوع (Spectrophotometer/cam) ثم ستحسب كمية الكلوروفيل من النوع.(A , B) باستخدام معادلات خاصة.

المؤشرات الجزيئية

- استخلاص الحمض النووي الريبي منقوص الاوكسجين DNA Extraction:

يعزل الحمض النووي الريبي منقوص الاوكسجين (DNA) من الأوراق الفتية بطريقة .CTAB المعدلة وفقاً لما أشار إليه (Murray and Thompson, 1980) وفق الخطوات التالية:

1- يوزن 0.8 غ من الأوراق الفتية لكل عينة، تطحن ضمن هاون بوجود الأزوت السائل (-196°م) Liquid N2 إلى بودرة ناعمة حيث توضع المادة النباتية ضمن أنابيب أبندورف Eppendorf Tube معقمة سعة(2 ml).

2- يضاف لكل أنبوب(عينة نباتية) 800µl من محلول الاستخلاص الحاوي على المكونات التالية:

(120mM Tris-HCl (PH 8.0)، 80mM، EDTA (PH 8.0)، 4%β-mercaptoethanol (v/v) ،3% (w/v) CTAP ، 2% PVP (w/v) ، 1.4 M NaCl).

بعد المجانسة توضع على حمام مائي درجة حرارته(65 °م) لمدة ساعة واحدة مع مراعاة المجانسة مرة ثانية بمنتصف فترة التحضين، ثم توضع العينات في البراد على درجة حرارة 4°م لمدة 5 دقائق.

3- يضاف لكل عينة من العينات النباتية حجم مماثل لحجم محلول الاستخلاص من مادة الكلوروفورم أيزو أميل الكحولChloroform / Isoamyl alchohol (24:1)، تحرك الأنابيب بلطف مدة 10 دقائق، ثم تترك على الرجاج لمدة عشرين دقيقة.

4- توضع الأنابيب بعد ذلك في جهاز الطرد المركزي(Centrifuge) (Univeral 32R, Germany) على سرعة (10000 rpm) ولمدة 10 دقائق على درجة حرارة 4°م، حيث يتم في هذه المرحلة فصل المزيج إلى طورين، ينقل بعدها الطور العلوي المنفصل بحذر إلى أنابيب Eppendorf جديدة سعة (1.5 ml).

5- تكرر مرة ثانية خطوة المعاملة الكلوروفورم أيزو أميل الكحولChloroform / Isoamyl alchohol (24:1) والمجانسة والتثفيل كما في الخطوات السابقة.

6- يضاف لكل أنبوب 600 ميكروليتر من Isopropanol المبرد على حرارة (- 20°م) إلى الحجم الكلي مع التحريك بلطف وتترك العينات بعدها على درجة حرارة (- 20°م) لليوم التالي وذلك من أجل ترسيب الحمض النووي DNA.

7- في اليوم التالي توضع الأنابيب بعد ذلك في جهاز الطرد المركزي(Centrifuge) على سرعة (10000 rpm) ولمدة 10 دقائق على درجة حرارة 4°م.

8- يتم التخلص من الرشاحة بإضافة (200 µl) من محلول الإيتانول 70% لراسب الحمض النووي . DNA، تثفل الأنابيب بعد ذلك في جهاز الطرد المركزي(Centrifuge) على سرعة (10000 rpm) ولمدة 10 دقائق، ويجفف راسب الحمض النووي DNA عند حرارة (37°م) مدة (10) دقائق.

9- يذاب الحمض النووي DNA في(50 µl) من محلول TE المكون من كلا من (10mM Tris, 1mM EDTA, pH(8.0)).

10- يتم التخلص من الحمض النووي RNA بإضافة (2µl) من أنزيم (10mg/ml) RNase والتحضين على درجة حرارة(37°م) مدة نصف ساعة، ثم يضاف حجم مماثل من الكلوروفورم أيزو أميل الكحول / Chloroform Isoamyl alchohol (24:1).

11- بعد التثفيل ونقل الطور العلوي لأنبوب جديد، يضاف لكل عينة ضعف كمية المزيج من الإيتانول ethanol النقي لإعادة ترسيب الحمض النووي DNA، ويترك المزيج على درجة حرارة 4°م لمدة ساعة.

12- يرسب المزيج بواسطة جهاز الطرد المركزي(Centrifuge) على سرعة (10000 rpm) ولمدة 10 دقائق، ثم يغسل الراسب من جديد بواسطة الإيتانول 70% ويجفف في الهواء للتخلص من آثار الإيتانول، ثم يذاب الحمض النووي DNA في 100 ميكروليتر من محلول TE المعقم.

13- بعد ذلك تحفظ العينات بدرجة حرارة 4°م لمدة 24 ساعة، ثم تخزن على درجة حرارة (- 20°م) لحين الاستخدام.

- تقدير كمية الحمض النووي الريبي منقوص الأوكسجين الـDNA ونوعيته بواسطة جهاز المطياف الضوئي UV:

تقدر كمية الحمض النووي الريبي منقوص الأوكسجين DNA في العينات باستخدام جهاز المطياف الضوئي(spectrophotometer- UV)الذي يعتمد في عمله على قياس كمية الحمض النووي الموجودة عن طريق امتصاصه للأشعة فوق البنفسجية Ultra Violet بموجات طولها 260 و 280 نانومتر.

تقدر نوعية الحمض النووي DNA بالاعتماد على طريقة الرحلان الكهربائي باستخدام هلامة أغاروز(agarose gel) تركيز2% مضافاً لها مادة Ethidium bromide، التي ترتبط مع الحمض النووي DNA مشكلاً معقداً يتوهج إثر تعرضه للأشعة فوق البنفسجية، حيث أن جزيئات الحمض النووي DNA تهاجر على هلامة الآغاروز كحزم أو بقع، وتكون عينات الحمض النووي DNA ذات جودة جيدة عند عدم وجود تقطعات فيها، ثم تمدد عينات الحمض النووي DNA للحصول على تركيز 50 نانوغرام/ ميكروليتر لتستخدم في التفاعل التسلسلي البوليميري.

- تطبيق تقنية SSR:

سيستخدم في الدراسة أزواج من البادئات المتخصصة سيتم الحصول عليها من الهيئة العامة للطاقة الذرية في سورية، وسيجرى تفاعل البلمرة المتسلسل PCR وفقاً لـ (Williams *et al, 1990*).

عملية التضخيم Amplification ستتم في جهاز التدوير الحراري من شركة (Technetc – 512, UK) ، وفق البرنامج الحراري التالي:

– دورة واحدة بدرجة حرارة (94) درجة مئوية ولمدة خمس دقائق ليتم انفصال سلسلتي الحمض النووي DNA تبعت بـ (40) دورة كل دورة تضمنت:

– التحطم حراري لسلسلة DNA المزدوجة (Denaturation) على حرارة (94°) درجة مئوية ولمدة نصف دقيقة.

– الالتحام (Annealing) على حرارة بين (48 – 50°) درجة مئوية ولمدة دقيقة واحدة.

– استطالة (Extension) على حرارة (72°) درجة مئوية ولمدة دقيقة واحدة.

واستطالة نهائية ولدورة واحدة عند حرارة (72°) درجة مئوية ولمدة عشرة دقائق.

ثم تحفظ العينات في درجة حرارة 4°م لتفصل الحزم بعدها بالترحيل على هلامة الآغاروز

الرحلان الكهربائي والتلوين والتصوير:

سيتم الترحيل على هلامة الميتافورآجاروز4% في المحلول المنظم 1X TBEوالمكون من:
{(10X TBE buffer = 108 g Tris borate + 55 g Boric acid + 9.2 EDTA, pH 8.0)}والمضاف إليها 5µl من صبغة الايثيديومبرومايد (10 mg/ml)، حيث تحمل عينات الحمض النووي DNA على هلامة الميتافور آجاروز بإضافة 5 ميكرولتر من سائل التحميل الخاص (1X Loading buffer Bromophenol blue) و المكون من:
(15% Ficoll 400 + 1.03 % Bromophenol blue + 0.03 % xylene cyanol FF + 0.4 % Orange G + 10 mM Tris–HCl + 50 mM EDTA)

سيتم حقن مؤشر من الحمض النووي (DNA) 1Kpb من شركة (Fermentas, Germany)، وذلك لتحديد الحجم و الوزن الجزيئي للحزم الناتجة ليتم بعد ذلك الترحيل بمرور حقل كهربائي قدره 100 فولط وذلك لفصل

حزم الحمض النووي DNA الناتجة عن التضخيم، لتصور الهلامة بعد ذلك بجهاز تصوير هلامة الآجاروز Image Analyzer.

التحليل الإحصائي:

بالنسبة للدراسة البيوكيميائية:

سيتم تحليل البيانات إحصائياً باستخدام برامج احصائية لتحديد معامل الاختلاف وتحديد معنوية القيم المدروسة، واستخدام اختبار LSD(Least Significant Difference) لمقارنة المتوسطات وتحديد معنوية الفروق فيما بينها.

بالنسبة للدراسة الجزيئية:

ستجمع نتائج عملية الرحلان الكهربائي الناتجة عن تطبيق تقنية SSR وتنظم في جداول لكل بادئة على حده اعتماداً على وجود أو غياب حزم الحمض النووي DNA في العينات المدروسة، حيث يدل الرقم 1 على وجود حزمة الحمض النووي الواضحة فقط والرقم 0 يدل على غياب الحزمة بحسب (Nei, 1987)، وسيجرى التحليل الإحصائي باستخدام البرنامج POPGENE V1.31(Yeh, 1999)، وتتم دراسة العلاقة الوراثية بين الطرز الوراثية المدروسة بتطبيق مصفوفة النسب المئوية للتوافقPercent Agreement Values (PAV) ويتم إنشاء هذه المصفوفة وفقاً لعدد وحدات التضاعف المشتركة بينها وفقاً لـ (Nei, 1972). ويجرى التحليل العنقودي اعتماداً على نتائج المسافة الوراثية بين الطرز المدروسة وفقاً لمعادلة (Nei, 1987)، وترسم شجرة القرابة الوراثية (Dendrogram) بتطبيق متوسطات المجموعات الزوجية غير المتزنة UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averaging) بحسب (Sneath and Sokal, 1973).

-يمكن إجراء تعديل جزئي على خطة البحث بحيث لا يؤثر على أهدافها.

المراجع:

المراجع العربية:

اشتر، سها .2009. تقييم بعض الطرز الوراثية من الأقماح السورية (السداسية والرباعية) باستخدام معلمات بيوكيميائية و جزيئية مختلفة، رسالة دكتوراه- جامعة تشرين- كلية الزراعة-207 ص.

حياص، بشار؛ مهنا، أحمد، 2007- إنتاج محاصيل الحبوب والبقول، الجزء النظري، منشورات جامعة البعث، كلية الزراعة.

سيد، محمود هيثم، 2001. استخدام مؤشرات من ال DNA في انتخاب مورثات المقاومة للأمراض في الشعير، جامعة دمشق، كلية الزراعة، أطروحة دكتوراه.

شيخموس أحمد، شاهرلي مخلص، لاوند سلام. 2013. التحسين الوراثي لبعض الطرز الوراثية للقمح القاسي (*Triticum durum*) باستخدام المطفرات الفيزيائية والكيميائية. رسالة دكتوراة ، كلية الزراعة، جامعة دمشق، 175 صفحة.

صالح، ميسون. 2012. التأقلم البيئي لبعض الأصول الوراثية من القمح المبدئي والمزروع تحت ظروف الزراعة المطرية. رسالة دكتوراه، كلية الزراعة، جامعة دمشق، 224 صفحة.

عبد الحميد عماد، وديب طارق. 2003. إنتاج محاصيل الحبوب وتكنولوجيتها، منشورات جامعة تشرين، 51 - 54.

علي، أحمد عمر؛ العودة، أيمن الشحادة؛ صبوح، محمود، 2008- تأثير الإجهاد المائي في بعض صفات القمح الكمية ومحتوى الحبوب من البروتين، مجلة جامعة دمشق للعلوم الزراعية، 24(1): 219-236.

العودة، أيمن الشحادة؛ صبوح، محمود؛ جودة، محمد عادل، 2005– تقويم استجابة بعض الطرز الوراثية من القمح (*Triticum spp.*) للإجهاد المائي في طور البادرة، مجلة جامعة دمشق للعلوم الزراعية. 21(1):15–36.

غنيم، فاديا؛ خيتي، مأمون ؛اللحام ،غسان، 2011– اختبار مدى تحمل طرز من القمح للإجهاد الجفافي المحدث باستخدام بولي إيثيلين غليكول (PEG–6000) خلال مرحلة الإنبات، ملخصات أبحاث المؤتمر العلمي التاسع لهيئة البحوث العلمية الزراعية 2011.

اللحام، غسان؛ تدبير، زينب؛ المنصور، ريم؛ النجار، ورزان؛ بليش،رياض؛ علي،محمد؛ شهاب، سعود؛ الحنيش، ثامر، 2016– تقييم بعض المعايير المورفو– فيزيولوجية في تحمل طرز من القمح للإجهاد الحلولي باستخدام بولي إيثيلين غليكول (PEG6000). المجلة السورية للبحوث الزراعية. 3(2):133–143.

المجموعة الإحصائية الزراعية السنوية. 2014. منشورات وزارة الزراعة والإصلاح الزراعي، سورية.

المنظمة العربية للتنمية الزراعية. 2014. الكتاب السنوي للإحصاءات الزراعية العربية_ المجلد رقم (34).

المنظمة العربية للتنمية الزراعية. 2015. الكتاب السنوي للإحصاءات الزراعية العربية_ المجلد رقم (35).

المراجع الأجنبية:

Abdalla, 1 M.M and N.H. El-Khoshiban 2007. The Influence of Water Stress on Growth, Relative Water Content, Photosynthetic Pigments, Some Metabolic and Hormonal Contents of two *Triticium aestivum* cultivars.Journal of Applied Sciences Research, 3(12): 2062-2074.

Ahmad, S.; R. Ahmad; and M.Y. Ashraf 2009. Sunflower (*Helianthus annuus L.*) response to drought stress at germination and seedling growth stages. Pak. J. Bot., 41(2): 647-654.

AlJbawi,E. and F.Abbas 2013. The Effect of Length during Drought Stress on Sugar Beet (Beta vulgarisL.) Yield and Quality. Persian Gulf Crop Protection. 2(1): 35-43..

Al-Mascari. A.; Al-Busaidi, W.; Al-Nadabi, H.; Al-Fahdi, A.; khan, M.M. 2016. Effects of Drought Stress on Wheat (*Triticum aestivum L.*) cv. Coolly, International Conference on Agricultural, Food, Biological and Health Sciences (AFBHS-16), 128-130.

Baldy, G. 1974. Contribution à l'étude fréquentielle des conditions climatiques et de leurs influences sur la production des principales zones céréalières. Document du Projet céréale, 170p.

Bazzaz, F. A.; D. D. Ackerly and E. G. Reekie 2002. Reproductive allocation in plant .In Seeds, the ecology and regeneration of plant communities.

Bressan, R. A., D. E. Nelson, N. M. Iraki, P. C. Larson, N. K. Singh, P. M. Hasegawa and N. C. Carpita 1990. Reduced cell expansion in cell walls of plant cells adapted NaCl, environmental injury to plantes CF. Katter maned. J, Academic Press, San Diego, P. 137.

Chahal. C.S. and S .S. Gosal. 2002. Principals and procedures of -plant breeding . Alpha Science International . United Kingdom. 604.

Chenyang, H., W. Lafen., Z. Xueyong., Y. Guangxia., D. Yushen., J. Jizeng., L. Xu., S. Xunwu., L. Sancai., and C. Yongsheng. 2006. Genetic diversity in Chinese modern wheat varieties revealedby microsatellite markers. Science in China: series C Life Sciences. 49: 218-226.

Close. T.J, A.A. korll, and P.M. chandler. 1989. A cDNA - based comparison of dehydration – induced proteins (dehydrins) in barely and corn. Plant Mol Biol . ; 13 (1) : 95 – 108.

Close. T.J, N.C. Meyer, and J. Rdik. 1995. Nucleotide sequence of a gene encoding a585 kilodalton barley dehydrin that lacks of serine tract. Plant physiol. ; 107 (1): 289-290.

Danyluk. J, A. Perron , M. Houde, A. Limin, B. fowler, N. Benhamou, and f. Sarhan. 1998. Accumulation of an acidic dehydrin in the vicinity of the plasma membrane during cold acclimation of wheat. Planet cell; 10: 623 – 638.

Eleuch. L, A. Jalil, S. Grando, S. Ceccarelli, M. Schmising, H. Tsujimoto, A. Hajer, A. Daaloul and M. Baum. 2008. Genetic Diversity and association analysis for salinity tolerance, heading date and plant height of wheat gemoplasm using simple sequence repeat markers. J. Integr. Plant Biolo. 50(8):1005-1015.

FAO (Food and Agricultural Organization of The United Nation). 2010. Food Outlook. June 2010

Farooq,M.; A.Wahid; N.Kobayashi; D.Fujita and S.M.A.Basra 2009. Plant drought stress: effects, mechanisms and management, Agron. Sustain. Dev. 29:185–212.

Farshadfar, H., H. Ghasempour., H. Vaezi. (2008). Molecular Aspects of drought tolerance in bread wheat (*T.aestivum*). Pakistan journal of Biological Sciences. 11(1): 118-122.

Farshadfar,H.; H. Ghasempour; H. Vaezi 2008. Molecular Aspects of drought tolerance in bread wheat (*T.aestivum*). Pakistan journal of Biological Sciences. 11(1): 118-122.

Galiba. G, A. Quarris., J. Sutka., A. Morgounov., and J. W. snap. 1995. RFLP mapping of the vernalization (Vrn1) and frost resistance (Fr1) genes on chromosome 5A of Wheat. Theor apple Genet, 90: 1174-1179.

Graner,A.; A.Jahoor; J.Schondelmaier; H.Siedler; K. Pillen; G.Fischbeck; G.Wenzel; and R.G. Herrmann, 1991. Construction of an RFLP map of barley. Theor Appl Genet 83,250–256.

Gupta,P.K.; R.K.Varshney, 2000. The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis on bread weat. Euphytica 113: 163- 185.

Hassgan, M.N., M.Z. EL-Bastawisy., A. EL-Sayed.K., T.H. Ebeed., M.M. Nemat Alla.2015. Roles of dehydrin genes in wheat tolerance to drought stress. Journal of Advanced Rescerch .No(6):179-188.

Huang,J. and M.Sun, 2000. Genetic diversity and relationships of sweet potato and its wild relatives in Ipomoea series Batatas (Convolvulaceae) as revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) and restriction analysis of chloroplast DNA. Theor. Appl. Genet., 100: 1050-1060. • **Jain,A.C. and P.L.Bhalla, 1999.** Evaluation of genetic diversity and genome fingerprinting of Pandorea (Bignoniaceae) by (RAPD) and inter- SSR PCR. Genome, 42: 714-719.

Hul,L.; MARF.Muhammad; L.Xlang; Z.Jin; Y.Fel and X.Z.Hul, 2015. Physiological and Comparative Proteomic Analysis Reveals Different Drought Responsesin Roots and Leaves of Drought Tolerant Wild Wheat (Triticum boeoticum). .PLoS ONE.10 (4).

ICARDA. 2003. Durum wheat germplasm improvement for increased productivity, yield stability, and grain quality in West Asia and North Africa. Annual Report. 18-20 International Triticeae Mapping Initiative (ITMI) Wheat mapping workshop (1994). Proc. of the 4th public workshop, McGuire PE and Qualset CO (eds), San Diego CA USA.

International Grains Council .2016. Grain Market Report GMR 469 – 25 August.

Jajarmi, V. 2009. Effect of water stress on germination indices in seven wheat cultivar. World Acad. Sci. Eng. Tech., 49: 105-106.

Kastori, R. R.; Dencic, S. S.; and Pletrovic M.J. 1999. Effect of water stress on two wheat cultivars with different levels of drought resistance. Natural Science, No. 96, P.61-71.

.

Kaydam, D.; and M. Yagnur 2008. Germination, seedling growth and relative water content of shoot in different seed sizes of triticale under osmotic stress of water and NaCl. African J. of Biotec., 7(16): 2862-2868.

Kazemi Arbat, H. 2009. Especial farming, cereals (First Volume). Iran University Press. 318 Pages.

Kramer, P.J., Boyer, J.S. 1995. Water relations of plants and soils. Academic Press, California**; Lavergne, J.; and J.M. Briantais 1996.** Photosystem-II heterogeneity. In: Ort DR and Yocum CF (eds). Oxygenic photosynthesis: The light reactions, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 265-287.

Lookhart, G and S. Bean 2000. Cereal Proteins: Composition for their major fractions and methods for identification. In: Kulp K. and J. G. Ponte Jr(Eds.) Handbook of Cereal Science and Technology(2nd Edition). Marcel Dekkar Inc., New York, USA, Pp: 363-383.

Maniatis. T, E. F. Fritsch, and J. Sambrook. 1982. Molecular cloning, a laboratory manual (Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory).

Moud, A. M. and K.Maghsoudi 2008. Salt stress effects on respiration and growth of germinated seeds of different wheat (*Triticum aestivum L*.) cultivars. World Journal of Agricultural Sciences. 4 (3): 351-358.

Nanjo,T.; M.Kobayashi; Y.Yoshiba; Y.Kakubari; K.Yamaguchi-Shinozaki and k.Shinozaki 1999. Antisense suppression of praline degradation improves tolerance to freezing and salinity in Arabidopsis thaliana. FEBS Lett. 461:205-210.

Nayer, M. and R. Heidari. 2008. Water stress induced by polyethylene glycol 6000 and sodium chloride in two maize cultivars. Pakistan journal of Biological Sciences. 11(1):92-97.

Nei, S. M.1972. Interspecific gene differences and evolutionary time estimated from electrophoretic data on.

Nei, S.M. 1987. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. Genetics 89: 583-590.

Nejad,T.S.; A.Bakhshande and A. jazayeri (2010). Calculated linear regression equations of motion K+ and Na+ ions and compare moving process these elements in corn roots. Report and Opinion. 2(3): 15-22.

Nye, A. H. and P.B. H. Tinker 1977. Solutes movement in the Soil–root system. Black Well; **Fenner, M. Ed. 2002.** 2nd Ed .Wallingford, CAB International. 1-29.

Oosterhuis, D.M.; S.Walker 1987. Stomata resistance measurment as indicator of water deficit stress in wheat and soybeans. South Africa journal of plant and soil, 4(3): 113-126.

Pereyra,M.A.; C.A.Zalazar; and C.A.Barassia 2006. Phospholipids in Azospirillum- inoculated wheat seedlings exposed to water stress. Plant Physiol. Biotec., 44: 873-879.

Powell W., M. Morgante, J.J. Doyle, J. Mcnical, S.V. Tingey, and A.J. Rafalski. (1996). Genepool Variation in Genus Glycine Subgenus Soja Revealed by polymorphic Nuclear and chloroplast microsatellites, Genetics 144:793-803.

Pratap,V.; Y.K.Sharma 2010. Impact of osmotic stress on seed germination and seedling growth in black gram (*Phaseolus mungo*). J. Env. Biol., 31(5) 721-726.

Qi,X.; P. Stam; P. Lindhout. 1996. Comparison and integration of four barley genetic maps. Genome 39,379–394.

Rafalski. J.A. and S.V. Tingey. 1993. Genetic diagnostics in plant breeding: RAPDs, microsatellites and machines. Trends Genetics. 9(8), 275-280.

Rampino,P.; S.Pataleo; C.Gerardi; G.Mita; and C.Perrotta 2006. Drought stress response in wheat: physiological and molecular analysis of resistant and sensitive genotypes. Plant Cell Environ., 29: 2143-2152.

Ramsay,L.; M. Macaulay; S. Degli Ivanissevich; K. Maclean; L. Carsdle; J. Fuller; K.j. Edwards; S. Tuvesson; M. Morgante; A. Massari; E. Maestri; N. Marmiroli; T. Sjakste; M. Ganal; W. Powell and R. Waugh. 2000. A simple sequence repeat- based linkage map of barley. Genetics 156, 1997- 2005.

Rhoades, J. D., G. C. Topp., W. D. Reynolds., and R. E. Green. 1992. Instrumentel field methods of salinity appraisal. Eds., SSSA Special Publication. No. 30. Madison, pp: 231-248.

Richards, R.A.; J.B. Passioura 1981- Seminal root morphology and water use of **.**wheat I. Environmental effects. Crop Sci, 21(2): 249-252

Robertson. M. 2003. Increased dehydrin promoter activity caused by Hv SPY is independent of the ABA response pathway. Plant J. 34(1): 39-46.

Roder, M.S.; J. Plaschke; S.U. Konig; A. Borner; M.E. Sorrells; S.D. Tanksley; and M.W. Ganal 1995. Abundance ‹variability and chromosomal location of microsatellites in wheat. Mol. Gen. Genet., 246: 327-333.

Saab, I.N., Sharp. R.E. 2004. Non-hydraulic signals from maize roots in drying soil: inhibition of leaf elongation but not stomatal conductance. Planta, 179: 466-474.

Sneath, P. and R. Sokal. 1973. Numerical Taxonomy. San Francisco: W. H. Freeman

Sofalian, O., N. Chaparzadeh and M. Dolati, 2009. Genetic diversity in spring wheat landraces from northwest of Iran assessed by SSR markers. Notul. Bot. Hort. Agric., Cluj-Napoca, 37: 252-256.

Staub,J.E; F.C.Serquen and M.Gupta, 1996. Genetic markers, map construction, and their application in planet breeding. Hort Science, 31(5): 729-739.

Strogonov,B.P. 1964. Physiological basis of salt tolerance of plants. Translatedfrom Russian by A. Poljakoff-Mayber and A. M. Mayber, Program for Scientific Translations Ltd., 279 p.

Sweigart. A, K. Karoly, A. Jones, and H.J. Willis. 1999. The distribution of individual inbreeding coefficients and pairwise relatedness in population of Mimulusguttalus. Herditiy 83:625 - 632.

Tas,S.; B.Tas 2007. Some physiological responses of drought stress in wheat genotypes with different ploidy in Turkey. World. J. Agric. Sci., 3: 178-183.

Teulat. B, N. Zoumarou - Wallis, B. Rotter, M. Ben Salem, H. Bahri, and D. This. 2003. QTL for relative water content in field- grown barley and their stability across Mediterranean environments. Theor Apple Genet. 108 (1): 181 – 188.

Thomson,A.M.; R.A.Brown; M.J.Rosenberg; R.C.Izaurralde; and V. Benson 2005. Climate change impacts for the conterminous USA: Anintegrated assessment. Part 3. Dry land production of grain and forage crops. Clim. Change, 69: 43-65.

Turner,N.C. 1979. Drought resistance and adaptation to water deficits in crops plants. Dans, Stress Physiology in Crop Plants, Mussell, H. et Staples, R.C. (éds). Wiley Intersciences, New York, pp. 303- 37

Turner,N.C. 1986. Adaptation to water deficit.A changing.

Valifard,M.; A.Moradshahi; and B.Kholdebarin 2012. Biochemical and physiological responses of two wheat (*Triticum aestivum L.*) cultivars to drought stress applied at seedling stage. J. Agr. Sci. Tech., 14: 1567-1578.

Wang.YZ. HB. XU., HL. Zhu., Y. Tao., GX. Zhang., LX. Zhang., CQ. Zhang., ZZ. Zhang., ZQ. Ma.2014. Classifiaction and expression diversification of wheat dehydrin genes. Plant Science. Vol(214):113-120.

Williams, J.G.K., A. R. Kubelik, K.J. Livak, J.A. Rafalski and S.V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Research 18 (22): 6531-6535.

Yang F, A. D. and H.Li.Jorgensen 2011. Implications of hightemperature events and water deficits on protein profiles in wheat (*Triticum aestivum* L. cv. Vinjett) grain, *Proteomics*, vol. 11, no. 9, pp. 1684–1695, 2011.

Yekhlef,N. 2001. Photosynthèse activité photo chimique et tolérance au déficit hydrique chez le blé dur (Triticum durum Desf.).Thèse d'état, Fac des science.DSN.Universite Constantine,146 pages.

Yu. Y.G, M.A. Saghai Maroof, G.R. Buss, P.J. Maughan, and S.A. Tolin. 1994. RFLP and microsatellite mapping of a gene for soybean mosaic virus resistance. Phytopathology 84: 60-64.

Zhang. H.M., L.S. Zhang., L. Liu., W.N. Zhu., and W.B. Yang. 2013. Changes of dehydrin profiles induced by drought in winter wheat at different developmental stages. BIOLOGICAL PLANTARUM. 57(4):797-800.

Zhang.N., M.Sh.Sun. LU. Liu., F.R. Meng., J.P. Ren., J. Yin., and Ch. LIY.2015. Charactarization of Dehydrin gene TaDHN-1and its response to abiotic stress in wheat.China Agriculture Science. Vol(46):849-858.

Zhao, X.; and G. Kochert 1992. Characterization and genetic mapping of a short, highly repeated, interspersed DNA sequence from rice (Oryza sativa L.). Mol. Gen. Genet., 23(1): 353-359.