التباينات الأليلية لمورثات الديهيدرين في بعض الطرز الوراثية من القمح المنزرع (القاسي والطري) والبري

Allelic Variations of Dehydrin Genes in some Cultivated (Bread and Durum) and Wild Genotypes of Wheat.

فاطمة الجنعير[2-1] محمود صبوح[1] سلام لاوند[2-1]

F. AL-Ganeer M. Sabboh S. Lawand

(1) قسم المحاصيل الحقلية، كلية الزراعة، جامعة دمشق، سورية.

(2) المركز العربي لدراسات المناطق الجافة والأراضي القاحلة/أكساد، دمشق، سورية.

الملخص

نُفذ البحث في مخبر التقانات الحيوية في كلية الزراعة بجامعة دمشق (سورية) في العام 2016، بهدف تحديد التباينات الأليلية لمورثات الديهيدرين ضمن طرز وراثية مختلفة من القمح الطري والقاسي (حوراني، جوري، شام6، شام8، دوما2، دوما4، شام3، شام9، دوما3)، وبعض الأنواع البرية: (*Aegilops ovata*، *Ae. triuncialis*، *Ae. geneculata*)

أظهرت دراسة تقييم التباين الأليلي لمورثات الديهيدرين المسؤولة عن تحمل الجفاف اختلافاً واضحاً في هذه المورثات بين المعاملات المدروسة، إذ كانت التباينات الشكلية في الوزن الجزيئي بين نظائر الموقع الواحد كبيرةً أحياناً، وكانت على درجة عالية من التماثل في البعض الآخر، وأمكن تمييزها بسهولة على هلامة ميتافور أغاروز 4%. أظهر تفاعل الـPCR بالنسبة لمورثة Dhn12 وجود نمط شكلي واحد (A) ظهر عند كل من الطرز الوراثية شام6، شام8، دوما4، ودوما2 فقط، فيما أعطت مورثة الديهيدرين Dhn6 نمطين شكليين (A،B) ظهرت عند كل من الطرز الوراثية شام8، شام9، دوما4، شام3، وحوراني، و*Ae. ovata*، ومن الملاحظ امتلاك الطرازين الوراثيين جوري، ودوما3، والنوعين البريين *Ae. triuncialis*، *Ae. geneculata* نمطاً شكلياً واحداً فقط، وظهرت ثلاثة أنماط شكلية (A، B، C) لمورثتي الديهيدرين Dhn3، Dhn4 تباينت عند الطرز الوراثية المدروسة، وأربعة أنماط شكلية لمورثة الديهيدرين Dhn7 ظهرت ثلاثة أنماط شكلية منها في الطراز دوما3. كما أظهر تفاعل الـ PCR وجود خمسة أنماط شكلية عند كل من مورثات الديهيدرين Dhn15، Dhn16، Dhn9، وستة أنماط شكلية بالنسبة لمورثتي الديهيدرين Dhn5 و Dhn13.

أظهرت النتائج تفوق المورثة Dhn9 بعدد الأنماط الشكلية التي أعطتها والبالغة 30 نمطاً شكلياً مع الطرز المدروسة كافةً، تلتها المورثة Dhn15 بـ 24 نمطاً شكلياً، في حين أعطت المورثة Dhn12 أقل عدد من الأنماط الشكلية والبالغ أربعة أنماط شكلية مع الطرز الوراثية المدروسة. كما تبين تفوق الطراز الوراثي دوما4 بعدد الأنماط الوراثية التي أعطتها والبالغة 19 نمطاً وراثياً، في حين أعطى الطراز الوراثي دوما3 أقل عدد من الأنماط الشكلية والبالغ عشرة أنماط شكلية. يُستنتج من البحث وجود مورثات من الديهيدرين مسؤولة عن تحمل الجفاف في القمح.

الكلمات المفتاحية: القمح الطري والقاسي، طرز منزرعة، أنواع برية، تباينات أليلية، مورثات الديهيدرين.

©2017 The Arab Center for the Studies of Arid Zones and Dry Lands, All rights reserved.

ISSN:2305 - 5243 ; AIF(NSP)-316

Abstract

This study was conducted at the Biotechnology Lab. - Faculty of Agriculture – Damascus University (Syria) in 2016. The aim of the research was to detect the allelic variations of Dehydrin genes in different durum and bread wheat genotypes: horani, juri, $sham_6$, $sham_8$, $doma_4$. $doma_2$, $sham_3$, $sham_9$, $doma_3$), and three wild types (*Aegilops ovata, Ae. triuncialis, Ae. geneculata*).

Results of Dehydrin gene variation (responsible for drought tolerance) showed significant differences among the studied genotypes. Variation in the molecular weight between loci per gene was very high in some cases, while the similarity in other cases was at a high degree, and it was easily distinguishable by 4% agarose gel. The PCR results of the Dehydrin gene Dhn_{12} showed a monomorphic pattern in the four genotypes: $sham_6$, $sham_8$, $doma_4$, and $doma_2$. While Dhn6 gave two patterns emerged in the 6 genotypes: $sham_8$, $sham_9$, $doma_4$, $sham_3$, horani, and *Ae. ovata*. It is noticeable that both genotypes juri, and $doma_3$, and the wild species Ae. triuncialis, Ae. geneculata had only one monomorphic pattern. There were three patterns (A, B, C) of Dhn_4 and Dhn_3 varied in the studied genotypes, three of four patterns of the Dehedrin gene Dhn7, appeared in $doma_3$. The PCR reaction also showed five patterns for the Dehedrin genes: Dhn_9, Dhn_{16}, Dhn_{15}, and six patterns for two dehedrin genes: Dhn5 and Dhn_{13}.

The results showed that the dehydrine gene Dhn_9 had the largest number of polymorphic patterns, with 30 patterns in all studied genotypes, followed by the gene Dhn15 with 24 patterns, while the gene Dhn_{12} gave the lowest number of patterns (only $_4$) in the studied genotypes. While, the genotype ($doma_4$) was superior in the number of patterns which gave 19 genetic patterns, while $doma_3$ gave the lowest number of patterns (10 patterns).

Key Words: Wheat (durum and bread), Cultivated genotypes, Wild types, Alleles variation, Dehydrin gene.

المقدمة

تُعدُّ محاصيل الحبوب من أهم الأنواع المحصولية إذ تُؤمن 70 % من غذاء سكان العالم، ويشكّل محصولا القمح والأرز ما يعادل 50 % من الإنتاج العالمي (Lookhart وBean، 2000). ويعدُّ محصول القمح الأكثر أهمية (Kazemi، 2009)، إذ يُزرع ويُستهلك كغذاء أساس في العديد من دول العالم، فهو يؤمن نحو 22 % من الطاقة و 19 % من البروتين لبناء جسم الإنسان في الدول النامية (صالح، 2012)، ونحو 40 إلى 60 % من الطاقة اليومية في دول غربي آسيا وشمالي أفريقيا (CIMMYT، 2009).

يُستخدم القمح كمادة أولية في الصناعات الغذائية، بالإضافة إلى استخدامه في العديد من المجالات الصناعية (عبد الحميد وديب، 2003). يُعدُّ القمح في سورية بمثابة العمود الفقري في استراتيجية الأمن الغذائي، إذ يُزرع ضمن الظروف المروية والمطرية، وحقّقت سورية الاكتفاء الذاتي منذ منتصف التسعينات، إذ تُنتج من القمح ما نسبته 60 % قمحاً قاسياً، و 40 % قمحاً طرياً، وتباينت هذه النسبة في السنوات الأخيرة. وانخفض الإنتاج من محصول القمح خلال الفترة الأخيرة بنسبة 60 % بسبب موجات الجفاف التي عصفت بسورية، بالإضافة إلى التدني الحاد في معدل الهطول المطري، ولاسيما في المناطق الرئيسة لزراعة محصول القمح بعلياً (المنطقة الشمالية الشرقية من سورية)، الأمر الذي دفع الحكومة للبحث عن السبل الكفيلة بالمحافظة على المخزون الاحتياطي من غذاء الشعب، والتفكير بشكلٍ جدي في وضع الاستراتيجيات المستقبلية التي تساعد على المحافظة على استقرار الإنتاج الزراعي.

يعمل المربي على استنباط الأصناف المتميزة ذات الإنتاجية العالية والنوعية الجيدة من خلال برامج التهجين بين الأصناف والسلالات التي تؤدي إلى تحسين الغلة الحبية والصفات النوعية. ولعلَّ أولى الخطوات وأهمها هي حسن اختيار الآباء الداخلة في عملية التهجين، ودراسة قدرتها على نقل الصفات المرغوبة إلى السلالات الناتجة عنها، ومتابعة الانتخاب عليها للوصول إلى أصناف جديدة تلبي رغبات المنتج والمصنّع والمستهلك، وبالتالي لابدَّ من إيجاد تباينات وراثية جديدة باستمرار لمتابعة عملية التحسين الوراثي. وتُعدُّ عمليات الإدخال والانتخاب والتهجين الطرائق الأساسية لإحداث هذه التباينات في المحاصيل ذاتية التلقيح (Chahal وGosal، 2002). تُعدُّ دراسة التباينات الوراثية ضمن النوع هدفاً أساسياً للمحافظة عليه من التدهور، وسابقاً كان يتم التمييز بين النباتات بالاعتماد على الصفات الشكلية، ولكن هذه الصفات تتأثر بالظروف البيئية (Arafeh وزملاؤه، 2002)، أمَّا في الوقت الحالي فيتم استخدام تقانات تعتمد على دراسة المورثات بحد ذاتها دون أي تأثير للبيئة فيها (Megdadi، 2001).

تتميَّز الموارد الوراثية النباتية في سورية بوجود درجة عالية من التباين الوراثي ضمن الأنواع النباتية، ويشكل هذا التباين والذي يعد جزءاً

من التنوع الحيوي الكلي مصدراً مهماً للمورثات المفيدة في تحسين إنتاجية الأصناف المزروعة عن طريق استعمال التقانات الحيوية (أوبري وشاهرلي، 1996).

بيَّن Kashif و Khaliq (2003) أن الوصول إلى أصناف جديدة ذات إمكانيات وراثية عالية للغلة الحبية أصبح هدفاً دائماً لجميع برامج التربية، ولتحقيق هذا الهدف لا بدَّ لمربي النبات من معرفة البناء الوراثي، وطبيعة عمل المورثات المتحكمة باستجابة النبات للبيئات المختلفة.

بيَّن Graner وزملاؤه (1991)، و Qi وزملاؤه (1996)، وRamsay وزملاؤه (2000) أنَّ استخدام تقانة المؤشرات الجزيئية، يمكن أن يقلل من تعقيدات إدخال عدد من الصفات المرغوبة في النمط الوراثي الواحد. وقد أدَّى استخدام التقانات الحيوية في دراسة المادة الوراثية DNA إلى تسريع تقييم مكونات الصفات الوراثية وعزل تأثيراتها عن المؤثرات البيئية، وتمَّ التوصل إلى إجراء قياسات دقيقة عن التنوع الوراثي Genetic diversity (Powel وزملاؤه، 1996)، ورسم خرائط الارتباط الوراثية وذلك باستعمال مجموعات انعزالية (Segregation population) للهجن النباتية.

يسبَّب إجهاد الجفاف تغييراً في التركيب الكيميائي والخواص الفيزيائية لجدار الخلية، وتتحكم في هذه التغيرات مورثات معينة (Espartero وزملاؤه، 1994)، كما يؤدي إلى توقف استطالة الخلايا نتيجة الجفاف لفترات طويلة (Nonami وBoyer، 1990)، وتثبيط الأنزيمات اللازمة لتكوين جدار الخلية. وقد أظهرت الدراسات مسؤولية عدة مورثات عن استجابة النبات لإجهادات الجفاف والحرارة المنخفضة (Ingram وBartels، 1996)، فمن بين آليات حماية الخلية لنفسها (حماية فيزيائية) من نقص الماء أو تغيرات الحرارة هي إنتاج بروتينات معينة تسمى بروتينات التطور الجنيني المتأخرة (LEA) (Shinozaki و Yamaguchi-Shinozki، 1997)، فقد أظهرت الدراسات التي أجريت على بذور القطن زيادةً في تعبير المورثات المسؤولة عن إنتاج هذه البروتينات، وذلك خلال المراحل الأخيرة من تطور البذرة (Pages وزملاؤه، 1993؛ Roberts وزملاؤه، 1993)، كما توجد شواهد استنتاجية قوية تُشير إلى ارتباط هذه المورثات مع قدرة النبات على تحمل الجفاف، فتعبيرها مشابه لتعبير عدد من المورثات الموجودة في الأنسجة النباتية خلال مراحل الجفاف، ولوحظ أنَّ تعريض البذور للجفاف يمكن أن يؤدي إلى تعبير مورثي مبكر لهذه المورثات في البادرات.

توجد بروتينات مجموعة LEA في أنماط خلوية متعددة وبتراكيز مختلفة، وأمكن تقسيم بروتينات مجموعة LEA اعتماداً على دراسات تحليلية أجريت على القطن مقارنةً بأنواع نباتية أخرى (Dure وزملاؤه، 1989) إلى: LEA Dhn19 وLEA Dhn11 (مجموعة الديهيدرينات Dehydrins) وLEA Dhn7، وتمَّ لاحقاً إضافة مجموعتين هما LEA Dhn113 نقلاً عن حسون (2013)، وLEA Dhn95 (Galau وزملاؤه، 1993).

من المعروف أنَّ الإجهاد الجفافي القاسي قاتل للخلايا والأنسجة النباتية، لذلك واعتماداً على الخصائص التي تتميز بها بروتينات LEA من حيث اتحادها مع الماء، يمكنها أن تحافظ على الحد الأدنى من الاحتياجات المائية الضرورية لحياة الخلية. وقد وجد Mc-cubbin وKay (1985) أنَّ بروتينات ديهيدرين في القمح (مجموعة Dhn19) هي أكثر اتحاداً بالماء من معظم عديدات الببتيد الأخرى، ويعتمد ذلك على شكل البنية الثالثية لهذه البروتينات، ولذلك يمكن لهذه البروتينات أن تتحد مع كمية كبيرة من الماء (Dure، 1993). إنَّ المشكلة الرئيسة التي تحدث في الخلايا تحت تأثير الجفاف الشديد هي فقد كميات كبيرة من الماء الحر في الخلية، الأمر الذي يؤدي إلى تأذي البنية الخلوية، ويتم التقليل من هذا التأثير بوساطة بروتينات LEA، إذ أن بعض بروتينات LEA تعمل على دعم وظيفة السكريات في محافظتها على تركيب السيتوبلاسم في غياب الماء.

لقد تركزت معظم الدراسات لمورثات LEA بشكل كبير على مجموعة LEA Dhn11، أي المورثات المسؤولة عن إنتاج بروتينات التطور الجنيني المتأخرة التي يطلق عليها مصطلح مورثات الديهدرينات، نظراً لأنَّ الديهدرينات بشكل عام هي البروتينات الأكثر تكراراً ووجوداً في النبات خلال فترات الإجهادات المختلفة من جفاف وحرارة منخفضة وملوحة (Close، 1997).

تمَّ تحديد وجود الديهدرينات كبروتينات في كل من رتبة النباتات الراقية والدنيا على حد سواء، إذ أظهرت الدراسات المرجعية وجود الديهدرينات لدى الطحالب المجففة (Velten وOliver، 2001)، ولدى الفصيلة النجيلية عند كل من القمح والشعير في النباتات البالغة مترافقةً مع إجهاد الحرارة المنخفضة (Galiba وزملاؤه، 1995؛ Danyluk وزملاؤه، 1998)، والجفاف والملوحة والحرارة المرتفعة، أو خلال المعاملة بحمض الأبسيسيك (Robertson، 2003 ؛ Teulat وزملاؤه، 2003).

تمكَّن Dubcovsky وزملاؤه (1995) من تحديد مورثات الديهيدرين في القمح ثنائي الصيغة الصبغية على الصبغيات 4A و 5A و 6A عند النوع *Triticum monococcum*، و5D عند النوع *Triticum tauchii* (Gill وزملاؤه، 1991). كما وجد Limin وزملاؤه (1997) أنَّ عائلة مورثات Wcs 120 عند القمح السداسي (الطري) (*Triticum aestivum*) هي مشابهة للمورثة Dhn5 عند الشعير وتتوضع على الذراع الطويل لكل من صبغيات المجموعة السادسة بالقمح.

وأشار Fraczek ـ Werner و Close (1998) إلى وجود المورثات المسؤولة عن إعطاء بروتينات ديهيدرينية على أذرع الصبغيات 4DS و 5BL و 6AL في نوع القمح (*Triticum aestivum* L.cv *Chinese Springer*) مستخدماً تقانتي Cytogenetic stocks و Western blot (Pan وزملاؤه، 1994).

درس Zhang وزملاؤه (2013) صنفين من القمح الشتوي (*Triticum eastivum*) مختلفين في تحملهما للجفاف، (KTC 86211 وND 7532)، حيث تم تعريضهما للإجهاد المائي خلال أربع مراحل من النمو، وقد بينت النتائج أن البروتينات الخاصة بمورثات الديهيدرين ذات أوزان جزيئية تتراوح بين 37 و45 KD، وتراكمت بشكل معنوي خلال كل المراحل وفي كلا الصنفين، إذ أن البروتين ذو الوزن الجزيئي 38 KD تراكم حصرياً خلال التعريض للجفاف في مرحلة البادرات، بينما تراكمت البروتينات ذات الأوزان 40 و 49 KD في مرحلة امتلاء الحبوب، ولكن تبين أن محتوى الديهيدرين الأكثر ازداد خلال فترة الإجهاد الجفافي، ثم انخفض عند انتهاء الإجهاد واستعادة النمو، وتشير هذه النتائج إلى أن نمط تراكم الديهيدرين خلال إجهاد الجفاف يعتمد على الطراز الوراثي ومرحلة التطور.

درس شيخموس وزملاؤه (2013) التباينات الأليلية لمورثات الديهيدرين في الجيل الطافر الثاني (M2) لبعض الطرز الوراثية من القمح القاسي، وأظهر تفاعل الـ PCR بالنسبة لمورثات الديهيدرين Dhn1 و Dhn6 وDhn10 وDhn3 نمطاً شكلياً واحداً وجد عند أغلب المعاملات المدروسة، وبالنسبة لمورثة الديهيدرين Dhn12 فقد ظهرت فيها نمط شكلي واحد عند معاملة واحدة وهي المعاملة ذات التركيز المتوسط من DES لدى الصنف بحوث9. وبالنسبة لمورثة الديهيدرين Dhn2 فقد ظهر فيها سبعة أنماط شكلية، وظهرت في المورثات Dhn4 وDhn8 وDhn11 خمسة أنماط شكلية، في حين ظهرت أربعة أنماط شكلية في مورثة الديهيدرين Dhn7، وثلاثة أنماط شكلية في مورثة الديهيدرين Dhn9.

تفوقت مورثة Dhn11 على باقي المورثات من حيث عدد الأنماط الشكلية التي أعطتها، إذ بلغ 46 نمطاً شكلياً لدى جميع المعاملات المدروسة، ولم تعط مورثة الديهيدرين Dhn5 أي نمط شكلي في جميع المعاملات المدروسة. وامتلكت معاملة التطفير بالإشعاع (γ25 Kr) في الصنف بحوث9 أكبر عدد من الأنماط الشكلية في جميع مورثات الديهيدرين Dhn المدروسة إذ بلغ عددها 18 نمطاً شكلياً، بينما أظهرت المعاملة (DES 0.05 %) في الصنف دوما1 أقل عدد من الأنماط الشكلية (10 أنماط).

تشكل المناطق الجافة وشبه الجافة (حيث معدل الهطول المطري أقل من 350 ملم/سنة) معظم المساحة المزروعة في سورية (جبور، 2003)، إذ تتميز هذه المناطق بالهطول المطري القليل وغير المنتظم، والحرارة المرتفعة وحدوث الموجات الحرارية المناخية، واتساع المدى الحراري اليومي والسنوي، إضافةً إلى قلة رشح المياه إلى داخل التربة لتغذية المياه الجوفية المستنزفة بشكل كبير، ما يؤدي إلى تعرض النباتات للعجز المائي.

وعادة ما تكون مقدرة الطراز الوراثي على البقاء والإنتاجية تحت ظروف الإجهاد المائي مهمةً، إذ أن تحمل الجفاف مع المحافظة على الكفاءة الإنتاجية أكثر أهميةً عندما تكون درجة الإجهاد متوسطة (Voltas وزملاؤه،1999)، ومن هنا تأتي أهمية التركيز في برامج التربية والتحسين الوراثي على تطوير طرز وراثية قادرة على تحمل الجفاف وإعطاء غلة حبية جيدة (Passioura، 2005). وبمواجهة هذا العامل يمتلك النبات آلية استجابة على المستوى الجزيئي تسمح للنبات عند تعرضه لنقص في كمية الماء المتاح بتحريض مجموعة معينة من المورثات على تشكيل بروتينات مسؤولة عن مقاومة ظروف الجفاف تدعى الديهيدرينات، ويقدر العدد الكلي للمورثات المسؤولة عن تشكيل بروتينات الديهيدرينات في القمح بين 12 إلى 14 مورثة، وتم تحديد مواقع بعضها ووجد أنها موزعة على معظم صبغيات النبات.

هدف البحث إلى تحديد التباينات الأليلية لمورثات الديهيدرين ضمن طرز وراثية مختلفة من القمح الطري والقاسي، إضافةً إلى ثلاثة انواع برية من جنس *Aegilops*

مواد البحث وطرائقه

مكان وزمان تنفيذ البحث:

نُفذت الدراسة في عام 2016 في مخبر التقانات الحيوية، التابع لقسم المحاصيل الحقلية، في كلية الزراعة بجامعة دمشق (سورية).

المادة النباتية:

أجريت الدراسة على عدد من الطرز الوراثية للقمح الطري والقاسي، تم الحصول عليها من الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية السورية وهي على الشكل الآتي (الجدول 1):

- طرز القمح القاسي (الأصناف الرباعية): شام3، دوما3، شام9، حوراني (محلي محسن)، جوري.
- طرز القمح الطري (الأصناف السداسية): دوما2، دوما4،شام6، شام8،
- ثلاثة طرز من الجنس البري *Aegilops* هي (*Aegilops ovata*، *Ae. triuncialis*، *Ae. geneculata*).

الجدول 1. مواصفات الطرز الوراثية المدروسة.

الطرز الوراثية	*Aegilops Ovata*	*Ae. Triuncialis*	*Ae. Geneculata*	جوري	حوراني	دوما4
الصيغة الصبغية	رباعي	رباعي	رباعي	رباعي	رباعي	سداسي
النوع	بري	بري	بري	مزروع	مزروع	مزروع
الارتفاع (سم)	-	-	-	80-75	80	متوسط
الإنتاجية (كغ/هـ)	-	-	-	3000	3000	2230
الطرز الوراثية	شام3	شام8	شام9	شام6	دوما2	دوما3
الصيغة الصبغية	رباعي	سداسي	رباعي	سداسي	سداسي	رباعي
النوع	مزروع	مزروع	مزروع	مزروع	مزروع	مزروع
الارتفاع (سم)	80	85-80	80-70	قصير	متوسط	80
الإنتاجية (كغ/هـ)	3000-2500	3500	4440	3450	2260	2328

استخلاص الحمض النووي الريبي منقوص الأوكسجين (DNA Extraction):

استُخلص الـ DNA من البادرات الفتية بعمر 2 إلى 3 أسابيع بطحن1غرام من الأوراق الخضراء باستخدام الآزوت السائل حتى الحصول على مسحوق ناعم، حسب Dellaporta (1983) مع إجراء بعض التعديلات، نُقل بعدها إلى حوجلة زجاجية سعة 50 مل وأضيف لها 10 مل من محلول الاستخلاص SDS و المكون من:

(0.1 Tris-HCl، PH=8.2، 50mM EDTA، 0.1M NaCl، 2% SDS,1mg/ml proteinase K)

حُضنت العينات لمدة 60 دقيقةً مع التحريك المستمر ضمن حمام مائي عند 37م°. أُضيف 10 مل من مزيج كل من كلوروفورم/أيزواميل كحول بنسبة 1:24. نُقل المزيج إلى أنبوب تثفيل سعة 30 مل وثُفل المزيج (عملية الطرد المركزي) لمدة 10 دقائق بسرعة (10000دورة/دقيقة) بدرجة حرارة 4م°. أضيف الإيزوبروبانول Iso-propanol بمعدل 3/2 من حجم الوسط المائي، ثم نُقل الـ (DNA) المترسب إلى أنبوب صغير سعة 2 مل وأضيف 0.5 مل من محلول الغسيلWashing buffer (كحول إيتيلي 76 %) البارد (المحفوظ بدرجة - 20 م°)، ثمَّ التثفيل بسرعة (10000دورة/دقيقة) لمدة 10 دقائق وبدرجة حرارة 4 م°. أذيبت عينات الـ (DNA) في 500 ميكروليتر من المحلول المنظم TE المكون من (10 ميلي مول Tris ، 1 ميلي مول EDTA). وتمَّ التخلص من الحمض النووي RNA بإضافة 2 ميكروليتر من أنزيم RNaseI (10 مغ/مل) والتحضين على درجة (37م°) مدة نصف ساعة، ومدد تركيز الـ DNA ليصبح 40 نانوغرام/ميكروغرام.

تقدير كمية الحمض النووي DNA و نوعيته بوساطة جهاز المطياف الضوئي:

استخدم جهاز المطياف الضوئي (UV spectrophotometer) لتقدير كمية DNA، إذ يمتص الأشعة فوق البنفسجية Ultra Violet بموجة طولها 260، بينما تمتص البروتينات الأشعة فوق البنفسجية ذات طول موجة 280 نانومتر. تسمح قراءة الامتصاص على طول الموجة 260 نانومتراً بحساب تركيز الحمض النووي في العينة، بحيث أنَّ كل واحد من الكثافة الضوئية Optical Density (OD) يقابل نحو 50 µg/ml لسلاسل الحمض النووي DNA المضاعفة.

إنَّ النسبة بين قراءة الموجة 260 إلى 280 نانومتراً تساعد على تقدير نقاوة الحمض النووي، ويجب أن تتراوح هذه النسبة بين 1.8 و 2.0 للحمض النووي DNA. ويمكن حساب كمية الحمض النووي DNA من المعادلة الآتية وذلك حسب Maniatis وزملائه (1982).

DNA Concentration (µg / ml)= [OD 260 × عامل التمديد × 50]

حيث أنَّ: DNA Concentration (µg / ml) = تركيز الحمض النووي

تمثل OD 260 الكثافة الضوئية لامتصاص الحمض النووي عند الموجة 260 نانومتر.

وحُمِّلت كمية قليلة من الحمض النووي الجينومي DNA Genomic في هلامة من الأغاروز تركيزها من 0.8 إلى 1 % لتحديد نوعية DNA المستخلصة للتأكد من عدم تقطعه، إذ يجب أن يظهر DNA على شكل عصابات (bands) عالية الوزن الجزيئي في هلامة الأغاروز. ثم مُدِّدت عينات DNA للحصول على تركيز 40 ng/µl لتستخدم في التفاعل المتسلسل البوليميرازي.

تضخيم المورثات المدروسة بوساطة تقانة PCR:

تمَّ تضخيم DNA باستخدام 10 أزواج من بادئات متخصصة لمورثات تحمل الجفاف (الجدول 2)، تمَّ الحصول عليها من الهيئة العامة للطاقة الذرية السورية.

الجدول 2. التسلسل النكليوتيدي لمورثات الديهيدرين المسؤولة عن تحمل الجفاف.

مورثة الديهيدرين	(3-5)Reverse Primers بادئ عكسي	(5-3)Forward Primers بادئ أمامي	درجة حرارة الالتحام (سْ)
Dhn15	TCAGTGCTGTCCCGGCAGCTT	ATGGAGTTCCAAGGGCAG	59
Dhn13	GTCCAGGCAGCTTGTCCTT	GCGTCATGGAAAGCATCAC	57
Dhn16	GGGCAGCTTCTCCTTGATCTT	ATGGAGTACCAGGGACAGCAG	60
Dhn3	GCGGAAGTTTTACTGCATCTCCATC	AGGCAACCAAGATCAACACCACCTG	62
Dhn4	CCCCTCCAACAGCCAAGTGAGCTA	CGGCAGCGCAAGATGGAGTACCAG	64
Dhn5	CTCCACCAACGAAAGTGAGCTAGG	AAATGACTGGCATGGGGAGGCATA	67
Dhn6	ACCAGGCCATGTCACAGTACTGC	TGACGTCGTGGCACACACCCTC	64
Dhn7	CGGGTCCATACAAGAAGCCATATT	GTCATTTCCAGCCGACGAGGAAGG	65
Dhn9	AGGCTTCGACGCGTAGCTATGCAA	ATGGAGTTCCAAGGGCAGCAGGAC	68
Dhn12	TCAGCTCGAGCTTGACGACT	GATGATCCAGCAGCAACTCA	58

أجري التفاعل في حجم نهائي قدره 25 µl، فاستخدم 40 ng من DNA و 20 picomol من كلتا البادئتين و12.5 µl من (2 X PCR Master Mix) والذي تمَّ الحصول عليه من شركة Fermentas، Germany الحاوي على المكونات التالية: Taq-Polymerase، dNTPs، $MgCl_2$، وأُضيف الماء المقطر ليصل الحجم النهائي إلى 25 ml، أجريت عملية التضخيم Amplification في جهاز المدور الحراري من شركة APOLLO,USA موديلATC401 وفق البرنامج الحراري التالي:

- وضعت بدرجة حرارة 94 م° لمدة 5 دقائق ثم 40 دورة كل منها مؤلفة من:
- انفصال أو تحطم (Denaturation) شريطي الـ DNA لمدة نصف دقيقة بدرجة حرارة 94 م°.
- التحام (Annealing) البادئة لمدة نصف دقيقة بدرجة حرارة وفق الجدول 2.
- استطالة(Extension) لمدة نصف دقيقة بدرجة حرارة 72 م°.

ثم تُركت العينات لمدة 10 دقائق على حرارة 72 م° لإتمام التفاعل.

وبمجرد الانتهاء من تفاعل PCR أضيف للأنابيب 10 µl من محلول Stop Sequencing والذي يتكون ممَّا يلي:

9.6 µl من 99% Formamide

0.005 غرام Bromophenol Blue

0.005 غرام Xylene Cyanol

384.1 µl ماء مقطر ومعقم

ثم حُفظت العينات في درجة حرارة - 20 م° لتفصل الحزم بعدها بالرحلان الكهربائي على هلامة 4 % ميتافور آغاروز.

الرحلان الكهربائي والتلوين والتصوير:

- تحضير هلامة الميتافور أغاروز: حُضِّرت هلامة الميتافور أغاروز كما يلي: تمَّ إضافة 4 غرام من ميتافور أغاروز لـ 100 ml من المحلول المنظم 1X TBE buffer حيث:

10X TBE buffer (108 g Tris borate + 55 g Boric acid +9.39g EDTA، pH 8.0)

حُضِّرت صفيحة صب الأغاروز بوساطة إغلاقها من الجانبين ووضع مشط مناسب (حسب عدد العينات المراد دراستها) لتشكيل آبار مناسبة لوضع العينات المراد فصلها أو دراسة جودتها.

تمَّ صب المزيج السائل بهدوء في الصفيحة المخصصة لتحضير الهلامة، وعند تماسك الجيل وتصلبه أُزيلت الأمشاط ووضعت هلامة الأغاروز مع الصفيحة في جهاز الرحلان الكهربائي، ثم مُلئ حوض الرحلان بمحلول منظم 1X TBE حتى غطَّى المحلول سطح الهلامة بشكل كامل على ارتفاع 1 إلى 2 مم.

- تلوين هلامة الميتافور أغاروز: تمَّ تلوين الهلامة بوضعها في حوض يحوي 200 مل 1X TBE ممزوجاً بـ 5 µl صبغة الإيثيديوم بروماید (50 mg/ml) وتُركت في الحوض لمدة ساعة ونصف.

ثم شُوهدت حزم الـــ DNA بوجود الأشعة فوق البنفسجية UV-light، وصُوِّرت الهلامة الحاوية على الحزم.

النتائج والمناقشة

أظهرت دراسة تقييم التباين الأليلي لمورثات الديهيدرين المسؤولة عن تحمل الجفاف اختلافاً واضحاً في تعبير هذه المورثات بين الطرز الوراثية المدروسة، إذ كانت التباينات الشكلية في الوزن الجزيئي بين نظائر الموقع الواحد كبيرة أحياناً، بينما كانت على درجة عالية من التماثل في البعض الآخر (الجدول 3).

الجدول 3. الأنماط الشكلية الناتجة عن تفاعل الـ PCR بالنسبة لمورثة Dhn12 في طرزالقمح الوراثية.

مورثة ديهيدرين	*Ae. ovata*	*Ae. triuncialis*	*Ae. geneculata*	شام6	جوري	شام8	شام9	دوما4	دوما3	دوما2	شام3	حوراني
Dhn12	----	----	----	A	----	A	----	A	---	A	---	----

أظهرت مورثة الديهيدرين Dhn6 نمطين شكليين (A،B) لكل من الطرز الوراثية شام8، شام9، دوما4، شام3، وحوراني، و *Ae. ovate* (الجدول 4)، في حين أنها لم تظهر عند الطرزين الوراثيين شام6، ودوما2، ومن الملاحظ أن الطرازين الوراثيين جوري، ودوما3، والنوعين البريين (*Ae. triuncialis* و*Ae. geneculata*) امتلكت نمطاً شكلياً واحداً فقط.

الجدول 4. الأنماط الشكلية الناتجة عن تفاعل الـ PCR بالنسبة لمورثة Dhn6 في طرز القمح الوراثية.

مورثة ديهيدرين	*Ae. ovata*	*Ae. triuncialis*	*Ae. geneculata*	شام6	جوري	شام8	شام9	دوما4	دوما3	دوما2	شام3	حوراني
Dhn6	A	A	A	---	A	A	A	A	A	---	A	A
	B	----	---	---	----	B	B	B	---	----	B	B

أعطت مورثتا الديهيدرين Dhn3، Dhn4 ثلاثة أنماط شكلية (A،B،C) تباينت في الظهور عند الطرز الوراثية المدروسة، فامتلكت كل من الطرز الوراثية شام6، شام8، شام9، وحوراني نمطاً شكلياً واحداً (c)، والطراز الوراثي دوما4 نمطين شكليين (B،A) دون غيره من الطرز.وغابت الأنماط الشكلية لمورثة Dhn4 في الطرز الوراثية شام9، دوما2، شام3، بينما ظهر نمط شكلي واحد في النوع *Ae. geneculata*، وظهرت جميعها لدى النوع *Ae. ovata*، وظهر نمطان شكليان في الطرز الوراثية الأخرى (الجدول 5).

يشير عدد الأنماط الشكلية إلى عدد المواقع الأليلية للمورثة، وزيادتها تعدّ دلالةً على زيادة تحمل الطراز الوراثي للجفاف.

الجدول 5. الأنماط الشكلية الناتجة عن تفاعل الـ PCR لمورثتي Dhn3 و Dhn4في طرز القمح الوراثية .

مورثة ديهيدرين	*Ae. ovata*	*Ae. triuncialis*	*Ae. geneculata*	شام6	جوري	شام8	شام9	دوما4	دوما3	دوما2	شام3	حوراني
Dhn6	----	-----	----	----	----	----	----	A	----	---	----	---
	----	-----	----	----	----	----	----	B	----	----	----	----
	-----	-----	-----	C	-----	C	C	----	----	----	----	C
Dhn4	A	----	----	A	A	A	----	A	----	----	----	A
	B	B	B	----	----	----	----	----	----	----	----	----
	C	C	----	C	C	C	----	C	C	----	----	C

أعطت مورثة الديهيدرين Dhn7 أربعة أنماط شكلية تباينت في الظهور في الطرز الوراثية المدروسة (الجدول6)، وغابت في النوع البري *Ae. triuncialis*، والطراز الوراثي شام6، كما ظهرت ثلاثة أنماط شكلية في الطراز دوما3.

الجدول 6. الأنماط الشكلية الناتجة عن تفاعل الـ PCR بالنسبة لمورثة Dhn7 في طرز القمح الوراثية.

مورثة ديهيدرين	*Ae. ovata*	*Ae. triuncialis*	*Ae. geneculata*	شام6	جوري	شام8	شام9	دوما4	دوما3	دوما2	شام3	حوراني
Dhn7	A	----	---	----	A	----	A	----	A	---	A	A
	----	----	---	----	----	----	----	B	---	B	----	---
	----	----	C	----	-----	C	C	C	C	----	C	----
	----	----	D	----	-----	-----	-----	----	D	----	----	----

أظهر تفاعل الـ PCR وجود خمسة انماط شكلية عند كل من مورثات الديهيدرين Dhn16، Dhn9 وDhn15 (الجداول 7،8،9)، ففي المورثة Dhn9، ظهرت الأنماط الشكلية الخمسة في النوع البري *Ae. geneculata*، فيما ظهرت أربعة أنماط شكلية في النوع البري *Ae. triuncialis*، وفي بقية الطرز الوراثية تباينت الأنماط الشكلية في الظهور. وفيما يتعلق بالمورثتين Dhn16، Dhn15، فقد أعطت نتائج تضخيم الـ DNA أربعة أنماط شكلية لمورثة الديهيدرين Dhn16 في الطراز الوراثي جوري، وغابت جميعها في الطرز شام8، شام9، ودوما3. وغابت الأنماط الشكلية لمورثة Dhn15 في النوع *Ae. ovata*، والطراز دوما3. وتباينت الأنماط في ظهورها في بقية الطرز الوراثية (الجدول 9).

الجدول 7. الأنماط الشكلية الناتجة عن تفاعل الـ PCR بالنسبة لمورثة Dhn9 في طرز القمح الوراثية.

مورثة ديهيدرين	*Ae. ovata*	*Ae. triuncialis*	*Ae. geneculata*	شام6	جوري	شام8	شام9	دوما4	دوما3	دوما2	شام3	حوراني
Dhn9	----	A	A	A	A	A	A	A	---	A	A	A
	B	B	B	----	----	----	----	---	---	---	----	---
	----	C	C	----	-----	-----	-----	----	----	----	-----	----
	D	----	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
	----	E	E	E	----	----	-----	E	----	----	----	-----

الجدول 8. الأنماط الشكلية الناتجة عن تفاعل الـ PCR بالنسبة لمورثة Dhn16 في طرز القمح الوراثية.

مورثة ديهيدرين	*Ae. ovata*	*Ae. triuncialis*	*Ae. geneculata*	شام6	جوري	شام8	شام9	دوما4	دوما3	دوما2	شام3	حوراني
Dhn16	----	---	---	---	A	----	----	---	---	---	---	---
	B	B	---	B	B	----	----	B	---	B	----	B
	----	----	----	----	C	-----	-----	----	----	C	C	----
	----	----	----	D	----	-----	----	D	----	----	----	----
	----	----	----	E	----	----	-----	E	----	----	----	-----

الجدول 9. الأنماط الشكلية الناتجة عن تفاعل الـ PCR بالنسبة لمورثة Dhn15 في طرز القمح الوراثية.

مورثة ديهيدرين	*Ae. ovata*	*Ae. triuncialis*	*Ae. geneculata*	شام6	جوري	شام8	شام9	دوما4	دوما3	دوما2	شام3	حوراني
Dhn15	----	---	---	---	---	A	A	A	---	A	A	A
	----	B	B	B	B	----	B	B	---	---	----	---
	----	C	C	C	C	-----	-----	-----	----	C	-----	C
	----	----	----	----	----	-----	----	----	----	D	----	----
	----	----	E	E	E	E	-----	----	----	E	----	-----

وفيما يتعلق بمورثتي الديهيدرين Dhn5 و Dhn13 كانت التباينات الشكلية الناتجة عن تضخيم قطع الـ DNA بوساطة الـ PCR كبيرةً (الجدولان 10 و11)، إذ ظهر لدى هاتين المورثتين ستة أنماط شكلية، وبالنسبة لمورثة الديهيدرين Dhn5 ظهرت أربعة أنماط منها في النوع البري *Ae. geneculata*، فيما ظهر نمط شكلي واحد في النوع البري *Ae. ovata*، والطراز شام6، وجوري، شام9، دوما4، دوما2، أما بقية الطرز فقد تباين ظهور الأنماط الشكلية للمورثة فيها. وفي مورثة الديهيدرين Dhn13 غابت الأنماط الشكلية الستة في الطراز جوري، فيما ظهر نمط شكلي واحد في كل من الطرز الوراثية شام9، دوما4، دوما3، دوما2، شام3، وحوراني.

الجدول 10. الأنماط الشكلية الناتجة عن تفاعل الـ PCR بالنسبة لمورثة Dhn5 في طرز القمح الوراثية.

مورثة ديهيدرين	*Ae. ovata*	*Ae. triuncialis*	*Ae. geneculata*	شام6	جوري	شام8	شام9	دوما4	دوما3	دوما2	شام3	حوراني
Dhn5	----	---	A	---	---	---	----	----	---	---	---	---
	----	---	B	---	---	----	----	----	B	---	----	---
	----	----	----	----	----	C	----	C	C	C	C	C
	----	----	D	----	----	-----	----	----	----	----	----	----
	E	E	E	----	----	----	-----	----	----	----	----	-----
	----	----	----	F	F	F	F	----	F	----	F	F

الجدول 11. الأنماط الشكلية الناتجة عن تفاعل الـ PCR بالنسبة لمورثة Dhn13 في طرز القمح الوراثية .

مورثة ديهيدرين	*Ae. ovata*	*Ae. triuncialis*	*Ae. geneculata*	شام6	جوري	شام8	شام9	دوما4	دوما3	دوما2	شام3	حوراني
Dhn13	----	---	---	---	---	A	----	----	---	---	---	---
	B	B	---	B	---	----	----	----	---	---	----	---
	----	----	----	C	----	C	----	----	----	----	----	----
	----	----	---	----	----	D	D	D	D	D	D	D
	E	E	E	E	----	----	----	----	----	----	----	----
	----	----	----	----	----	F	----	----	----	----	----	----

أظهرت النتائج من خلال الجدول 12 تفوق المورثة Dhn9 بعدد الأنماط الشكلية التي أعطتها والبالغة 30 نمطاً شكلياً مع الطرز المدروسة كافةً، تلتها المورثة Dhn15 بـ 24 نمطاً شكلياً، والمورثة Dhn5 بـ 21 نمطا شكلياً، ثم المورثتين Dhn16 Dhn13، بـ 18 نمطاً شكلياً، والمورثة Dhn4 بـ 17 نمطاً شكلياً، في حين أعطت المورثة Dhn12 أقل عدد من الأنماط الشكلية والبالغ 4 أنماط شكلية مع الطرز الوراثية المدروسة. وامتلكت الطرز الوراثية للقمح الطري عدداً من الأليلات أكثر من الطرز الوراثية للقمح القاسي مثل الطرز شام8، شام6، دوما4، دوما2، ويعود ذلك لكونها سداسية الصيغة الصبغية، وتتميز عن القمح القاسي بوجود المجموعة الصبغية D مما يجعلها أكثر تحملاً للجفاف (Morris وSears، 1967).

كما أظهرت النتائج أيضاً تفوق الطراز الوراثي دوما4 بعدد الأنماط الوراثية التي أعطتها والبالغة 19 نمطاً وراثياً، تلاه النوع البري *Ae. geneculata* بـ 18 نمطاً وراثياً، في حين أعطى الطراز الوراثي دوما3 أقل عدد من الأنماط الشكلية والبالغ 10 أنماط شكلية.

الجدول 12. الأنماط الشكلية الكلية للمورثات مع الطرز الوراثية المدروسة.

الطرز الوراثية / المورثات الديهيدرينية	*Ae. ovate*	*Ae. triuncialis*	*Ae. geneculata*	شام6	جوري	شام8	شام9	دوما4	دوما3	دوما2	شام3	حوراني	مجموع المواقع الأليلية
Dhn15	0	2	3	3	3	2	2	2	0	4	1	2	24
Dhn13	2	2	1	3	0	4	1	1	1	1	1	1	18
Dhn16	1	1	1	3	5	0	0	3	0	2	1	1	18
Dhn3	0	0	0	1	0	1	1	2	0	0	0	1	6
Dhn4	3	2	1	2	2	2	0	2	1	0	0	2	17
Dhn5	1	2	4	1	1	2	1	1	3	1	2	2	21
Dhn6	2	1	1	0	1	2	2	2	1	0	2	2	16
Dhn7	1	0	2	0	1	1	2	2	3	1	2	1	16
Dhn9	2	4	5	3	2	2	2	3	1	2	2	2	30
Dhn12	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	4
المجموع	12	14	18	17	15	17	11	19	10	12	11	14	170

الاستنتاجات

- تمَّ الكشف عن 10 مورثات من الديهيدرين المسؤولة عن تحمل الجفاف.
- أعطت مورثة الديهيدرين Dhn9 أكبر عدد من الأنماط الشكلية بلغ 30 نمطاً شكلياً، في حين كان أقلها مورثة الديهيدرين Dhn12 والتي أعطت أربعة أنماط شكلية.
- تفوق الطراز الوراثي دوما4 بعدد الأنماط الوراثية والبالغة 19 نمطاً وراثياً.

المقترحات

- متابعة العمل على تحديد التتابع النيكليوتيدي (Sequencing) للأنماط الشكلية لمورثات الديهيدرين.
- دراسة تباينات تعبير مورثات الديهيدرين عند طرز وراثية أخرى متنوعة من القمح وخلال المراحل المتأخرة من النمو لدى النبات وضمن فترات زمنية متعددة ومتقاربة وفي مراحل عمرية مختلفة من حياة النبات.

المراجع

- أوبري خالد وشاهرلي مخلص. 1996. الأصول الوراثية للحبوب واستخدامها في برامج التحسين الوراثي، مجلة المهندس الزراعي العربي، العدد 42: 61 – 64.
- جبور إلياس .2003. الكوارث المناخية ـ الجفاف ـ الجمهورية العربية السورية : 177-208.
- حسون كنانة. 2013. تقييم بعض الصفات الكمية والشكلية لطرز وراثية من الشعير وتحديد المورثات المسؤولة عن تحمل الجفاف تحت طرز الزراعة المطرية. رسالة ماجستير، كلية الزراعة، جامعة دمشق، 98 صفحة.
- 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.

- Arafeh, R.M., Y.Sapir, A. Shmida, N. Iraki, O. Fragman, and P. Coms. 2002. Patterns of genetic and phenotypic variation Iris hayni and *I. atrofusca* (Iris sect. Onocyclus - the royal irises) along an ecogeographical gradient in Palastine and the West Bank, Mol. Ecol.,11: 39 - 53.
- Chahal, C.S., and S .S. Gosal. 2002. Principals and procedures of -plant breeding . Alpha Science International . United Kingdom. 604.
- CIMMYT (International Maize and Wheat Improvement Center). 2009. Drought Tolerance Wheat and Enhanced Quality Project, MTP :66 - 71.
- Close, T.J. 1997. Dehydrins: A commonatity in respons of plants to dehydration and low temperatures physiol. plant 100: 291 - 296.
- 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.
- Dellaporta, SL., J. Wood, J.B. and Hicks. 1983. Aplant DNA minipreparation version Π. Plant Molecular Biology Reporter.1:19 - 12.
- Dubcovsky, J., C. Luo, and J. Dvorak. 1995. Linkaye relationships among stress-induced genes in wheat. Theor Appl Genet.19:795 - 801.
- Dure, L., M. Crouch, J. Harado, D. Ho T.H, and J. Mundy. 1989. Common amino acid sequence domains the LEA proteins of higher plants. Plant Mol. Biol. 12: 475 - 486.
- Dure, L. 1993. Structural motifs in LEA proteins: 91 - 103.
- Espartero, J., J.A. Pintor and J.M. Pardo. 1994. Differential accumulation of S – adenosyl methionine synthetase transcripts in

response to salt stress. plant Mol. Biol. 25: 217 - 227.
- Galau, G.A., H. Y.C. Wang, and D. W. Hughes. 1993. Cotton LEA 5 and LEA 14 encode a typical late embryogenesis – abundant proteins. Plant Physiol. 101: 695 - 696.
- 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.
- Gill, K. S., E. L Lubbers, B. S Gill, W. J Raupp, and T. S Cox. 1991. Agenetic linkage mape of *Triticum Tauschii* (DD) and its relationship to the D genom of bread wheat. Genome . 34: 362 - 374.
- Graner, A., A. Jahoor, J. Schondelmaier, H. Siedler, K. Pillen, G. Fischbeck, G. Wenzel, and R. Herrmann. 1991. Construction of an RFLP map of barley. Theor Appl Genet 83:250 - 256.
- Ingram, J., and D. Bartels. 1996. The molecular Basis of Dehydration Tolerance in plants. Annu. Rev. plant physiol. Plant Mol. Biol. 47:377 - 403.
- Kashif, M., and T. Khaliq. 2003. Determination of general and specific combining ability effect in diallel cross in spring wheat. Pakistan Journal of Biological Sciences. 6(18):1616 - 1620.
- Kazemi, A. H. 2009. Especial Farming, Cereals (First Volume). Iran University Press. 318.
- Limin, A.E., J. Danvluk, L.P. Chauvin, D.B. Fowler, and F. Sarhan. 1997. Chromosome mapping of louc-temperature induced wcs 120 family genes and regulation of cold-tolerance expression in wheat. Mol. Gen. Genet 253:720 - 727.
- 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 : 363 - 383.
- Maniatis, T., E. F. Fritsch, and J. Sambrook. 1982. Molecular cloning, a laboratory manual (Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory).
- Mc – Cubbin, W. D., and C. M. Kay. 1985. Hydrodynamic and optical properties of wheat Em protein. Can. J. Biochem. 63:803 - 810.
- Megdadi, H. M. 2001. Genetic variation in some Aegilops species as revealed by morphological and molecular techniques, phD. Thesis, University of Jordan, Amman, Jordan. 149.
- Morris, R., and E.R. Sears. 1967. The cytogenetics of Wheat and its relatives. In: K.S. Quisenberry (ed). Wheat and Wheat Improvement. Am. Soc. Of Agronomy. Wisconsim.
- Nonami, H., and J. S. Boyer. 1990. Wall extensibility and cell hydraulic conductivity decrease in enlarging stem tissues at low water potentials. Plant physiol. 93:1610 - 1619.
- Pages, M., J. Vilardell, A. B. Jensen, M. M. Alba, M. Torrent, and A. Goday. 1993. Molecular Biological Responses to Drought in Maize in Global Environmental Change. NATO. Adv. Sci. Inst. Ser., Vol. I 16, Interacting Stresses On Plants in Changing Climate, ed. M. B. Jackson, C. R. Blake: 583 - 591.
- Pan, A., P. M.Hayes, F. Chen, T. H. H. Chen, T. Blake, S. Wright, I. Karsai, and Z. Bedo. 1994. Genetic analysis of components of winter hardinessin barley (*Hordeum Volgare* L.) Theor Apple Genet 89: 900 - 910.
- Passioura, J.B.2005. The effect of root geometry on the yield of wheat growing on stored water. Aust. J. Agric. Res. 23:745 - 752.
- 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.
- Qi, X., P. Stam, and P. Lindhout. 1996. Comparison and integration of four barley genetic maps. Genome 39:379 - 394.
- Ramsay, L., M. Macaulay, S. Deglilvanissevich, K. Maclean, L. Carsle, 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.

- Roberts, J. K., N. A. Desimon, W. L. Lingle, and L. Dure. 1993. Cellular concentrations and uniformity of cell- type accumulation of tow LEA proteins in cotton embryos. Plant cell 5: 769 - 780.
- Robertson, M. 2003. Increased dehydrin promoter activity caused by Hv SPY is independent of the ABA response pathway. Plant J. 34(1): 39 - 46
- Shinozaki, K., and K. Yamaguchi – Shinozaki. 1997. Molecular cold stress. Curr. Opin. Biotechnol . 7: 161 - 167.
- 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.
- Velten, J., and M.J. Oliver. 2001. Tr 288, are hydrine with a dehydrin twist. Plant Mol/ Biol.; 45(6): 713 - 722.
- Voltas, J., H. Lopez-Corcoles, and G. Borra.s. 1999. Use of biplot analysis and factorial regression for the investigation of superior genotypes in multi-environment trials. European Journal of Agronomy, 22(3): 309 - 324.
- Werner-Fraczek, J.E., and T.J. close. 1998. Genetic Studies of triticeae dehydrins: assignment of seed protein and a regulatory factor to map positions. Theor. Appl. Genet. 97: 220 - 226.
- 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.

Nº Ref: 738