# الكشف عن وجود قابلية تحمل الملوحة في بعض تراكيب البنجر السكري باستخدام تقانة PCR

ماجد شايع حمدالله

أستاذ مساعد

قسم علوم المحاصيل الحقلية – كلية الزراعة – جامعة بغداد

majidzoini@yahoo.com

**المستخلص**

أُستخلص DNA من بادرات ثمانية اصناف من البنجر السكري (*Beta vulgaris*)، ستة منها تُزرع في ولاية مشيغن (EL-AO 13698 و EL-AO 21483 و EL-AO 22799 و EL-AO 22438 و EL-AO 15037 و EL-AO 15028) وصنف مستورد (Swiss) وتركيب بري (Wild) بأستخدام خمسة بادئات لخمسة مواقع جينية تتصف بأنها جينات متحملة للملوحة تم انتاجها من شركة Integrated DNA Technology Company (IDT) في مختبرات كلية علوم النبات والتربة/ جامعة مشيغن الاميركية في العام 2011. كان الهدف من تطبيق التجربة تشخيص وجود بعض جينات تحمل الملوحة وتقدير درجة البعد الوراثي للتراكيب الوراثية بأستخدام تقانة PCR. تم حساب درجة التباعد الوراثي ثم انشىء الشكل العنقودي (cluster) بالأعتماد على طريقة agglomerative لتبسيط البيانات عن طريق تجميع التراكيب الوراثية في مجاميع للصفات المدروسة حسب تشابه نمط الأستجابة. ادى استخدام البادئات الى تكوين 27 حزمة كانت جميعها من نوع polymorphic. اختلف عدد الحزم المنتجة من 4-7 حسب البادئ وانتج البادئان BVU07582-m وBVU07582-U اعلى عدد من الحزم. توزعت التراكيب الوراثية المدروسة الى ثلاث مجاميع عند تطبيق التحليل العنقودي حسب تشابه واختلاف مواقعها الاليلية، اذ ضمت المجموعة الأولى (A) ثلاثة تراكيب هي EL-AO 22799 و EL-AO 22438 والمجموعة الثانية (B) اربعة تراكيب وراثية هي EL-AO 13698 وSWiss و EL-AO 15037 و EL-AO 15028 و EL-AO 21483 والثالثة (C) تركيب وراثي واحد هو Wild. كان التركيب Wild الأبعد وراثيا عن جميع التراكيب المدروسة. كانت نسبة البعد الوراثي منخفضة ومتساوية بين تراكيب المجموعة A واعطت حزما لجميع البادئات وهذا يعكس استجابة هذه التراكيب بشكل متماثل لجميع البادئات المستخدمة في حين لم تتكون اي حزمة للتركيب Wild بأستثناء حزمة واحدة نتجت من البادئ F100-p49296-L. يمكن استخدام التراكيب EL-AO 22799 و EL-AO 22438 و EL-AO 15028 في برامج التربية لنقل صفة الملوحة الى تراكيب اخرى لامتلاكها جميع تتابعات البادئات المستخدمة لتشخيص جينات الملوحة.

كلمات مفتاحية: البنجر السكري، جينات تحمل الملوحة، PCR.

The Iraqi Journal of Agricultural Sciences – 44(2): 194-199, 2013 Hamdalla

# DETECTION OF SALINITY TOLERANCE CAPABILITY IN SOME GENOTYPES OF SUGAR BEET BASED ON PCR TECHNIQUE

**Majid Sh. Hamdalla**

**Assistant Professor**

**Dept. of Field Crop Sci..- Coll. of Agriculture - Univ. of Baghdad**

majidzoini@yahoo.com

## ABSTRACT

**DNA was extracted from eight cultivars of Sugar beet (*Beta vulgars)*, six of them are grown in Michigan state(EL-AO 13698, EL-AO 21483, EL-AO 22799, EL-AO 22438, EL-AO 15037, EL-AO 15028) one is wild and the last is introduced with five primers for five loci of salinity tolerance which are imported from Integrated DNA Technology company at the laboratories of the College of Plant and Soil Science/Michigan State University. The objective was to identify some salinity tolerance genes and estimate the genetic diversity based on PCR technique for the tested genotypes. Genetic diversity was estimated and cluster analysis was applied based on agglomerative method which accumulated the tested genotypes into groups according to resemblance of their responses. Twenty seven polymorphic bands were produced. The rate of bands was 4-7 for each genotype and maximum bands were produced by primer BVU07582-m and BVU07582-U. The tested genotypes grouped in three sets according to their alleles, the group A includes the genotypes EL-AO 22799, EL-AO 22438,and EL-AO 15028, group B includes the genotypes EL-AO 13698, EL-AO 21483, EL-AO 15037, and Swiss, while group C contain the genotype Wild. The genotype Wild was the most diversity, while the genetic diversity for group A was equal and faint and gave bands for all used primers. This may explain the responses similarity of genotypes of A group for the used primers, while no bands were formed for genotype Wild except primer F100-p49296-L. The genotypes EL-AO 22799, EL-AO 22438, and EL-AO 15028 have all the sequences of primers which code for salinity genes.**

**Key words: Sugar beet, Salinity tolerance genes, PCR.**

**المقدمة**

يسهم البنجر السكري بأكثر من 25% من انتاج السكر العالمي (4) وهو من المحاصيل الصناعية المهمة التي تعد احد مصادر الايثانول الحيوي (9 و21). يبلغ الانتاج في وحدة المساحة 16-24 طن/هكتار (1 و11). ان التعرف على طبيعة الجينوم للبنجر السكري وتحديد درجة التباعد الوراثي بين تراكيبه سيسهل عمليات تربيته (10)، اذ ان التغايرات الوراثية للصفات المدروسة يعد من اهم متطلبات النجاح لأي برنامج تربية (15)، لذلك يحاول مربوا النبات تقدير التغايرات الوراثية (6 و13 و20) أو ايجادها عن طريق التهجين مع التراكيب المتباعدة وراثياً او احداث الطفرات او ادخال الجينات بأستخدام التقانات الجزيئية. يعد استخدام المعلمات الوراثية من السبل الحديثة لدراسة التباعد الوراثي بين المحاصيل كونها تعكس المستوى الحقيقي للتغاير الوراثي الموجود بين التراكيب الوراثية على مستوى DNA وبالتالي فأنها تقدم معلومات اكثر دقة من التعبير المظهري ومن معلومات الأصل الوراثي(5 و17). اجريت العديد من الدراسات حول الحاصل والنوعية والخرائط الوراثية للبنجر السكري باستخدام المعلمات الوراثية (8 و16 و19 و22) ان مشكلة الملوحة تبرز كأكبر التحديات التي تواجه الباحثين في القرن الواحد والعشرين، اذ تؤثر الملوحة على معظم الصفات المظهرية والفسلجية للنبات مما ينعكس سلباً على صفات الحاصل الاقتصادي. ان المعالجات المطبقة من ناحية ادارة التربة والمحصول تعتبر قاصرة في مواجهة هذه المشكلة بحاجة الى المعالجات الوراثية وذلك بأدخال تراكيب متحملة للملوحة ونقل صفاتها الى التراكيب المحلية او ادخال جينات تحمل الملوحة بأستخدام التقانات الجزيئية ولكن قبل ذلك يجب تحديد طبيعة الجينوم للتراكيب المحلية ومدى امتلاكه لهذه الجينات من اجل استقدام التراكيب المتباعدة وراثيا او ادخال الجينات غير الموجودة في جينوم التراكيب المحلية. يمكن ان تُشخص التراكيب المتحملة للملوحة ودرجة التباعد الوراثي بينها عن طريق الاداء المظهري والمعلمات الوراثية، الا ان الاعتماد على الاداء المظهري يمتاز بعدم دقته نتيجة لتأثره بالظروف البيئية ومراحل النمو (2 و3)، بينما تمتاز المعلمات الوراثية التي تعتمد على تباين تتابع حزم DNA بأنها مستقلة عن تأثير الظروف البيئية. أظهرت التقانات الجزيئية وخاصة تلك التي تعتمد على تقانة PCR كفاءة في تقدير درجة التباعد الوراثي بين المجتمعات النباتية للبنجر السكري (12). كان الهدف من البحث المنجز هو التحقق من وجود بعض جينات تحمل الملوحة في بعض اصناف البنجر السكري المنزرعة في اميركا بأستخدام تقانة PCR وتقدير درجة التباعد الوراثي بينها.

**المواد والطرائق**

طبق هذ البحث في مختبرات كلية علوم النبات والتربة/ جامعة مشيغن الاميركية عام 2011 واستخدمت ثمانية تراكيب وراثية من البنجر السكري (*Beta vulgaris*)، ستة منها تُزرع في ولاية مشيغن (EL-AO 13698 و EL-AO 21483 و EL-AO 22799 و EL-AO 22438 و EL-AO 15037 و EL-AO 15028) وصنف مستورد (Swiss) وتركيب بري (Wild). تضمن البحث تشخيص بعض جينات تحمل الملوحة في التراكيب المدروسة. أستخدمت خمسة بادئات لخمسة مواقع جينية تتصف بأنها جينات متحملة للملوحة من شركة Integrated DNA Technology. تراوحت اطوال البادئات بين 17- 24 bp والجدول 1 يبين تتابعات البادئات المستخدمة في هذه الدراسة. تم تعقيم 50 بذرة لكل تركيب ووضعت في دورق وغمرت بمحلول Bleach بتركيز 10% ووضعت في shaker لمدة 10 دقائق ثم غُسلت البذور بالماء المقطر ووضعت في الماء المقطر لمدة اسبوع حتى الانبات. أخذت اجزاء من وريقات البادرات ووضعت في مشبك وغسلت بالماء المقطر ثم نُقلت الى انابيب ependorfs ووضعت في النتروجين السائل لعدة دقائق ثم خُزنت في درجة 80- درجة مئوية لحين الاستعمال. أُستخرجت العينات لأستخلاص الـ DNA ووضعت في اناء يحتوي كمية من النتروجين السائل وطُحنت ثم أُستخلص DNA باستخدام ال kit. تم تقدير كمية ال DNA (ul/ng) للعينات المدروسة باستخدام جهاز spectrophotometer بوجود الأشعة فوق البنفسجية عند الطول الموجي 260 n.m. وقرأت النتائج بأستخدام برنامج ND-800. استخدم 50 ng من DNA لكل عينة لتفاعل التضاعف (PCR) وبلغ حجم التفاعل الكلي 40 uL. تم تمرير نواتج التضاعف عبر هلام الاكاروز بتركيز 2% في جهاز الترحيل الكهربائي لمدة ساعة واحدة بوجود

المحلول 1XTBE واستخدمت صبغة بروميد الاثيديوم بتركيز 1% ثم قُرأت النتائج بالأشعة فوق البنفسجية باستخدام كاميرا رقمية. تم تكوين مصفوفة رقمية (جدول 2) اعتمادا على وجود او غياب حزم ال DNA للعينات المختلفة، اذ أُعطي الرقم 1 في حالة وجود الحزمة و 0 في حالة غيابها. تم انشاء الشكل العنقودي بالأعتماد على طريقة agglomerative لتبسيط البيانات عن طريق تجميع التراكيب الوراثية في مجاميع للصفات (18 و23). يتكون تحليل cluster من عدد من الخطوات تبدأ بتكوين مصفوفة لدرجة التشابه بين التراكيب المدروسة تدعى proximities matrix ثم يتم تكوين dendogram بالاعتماد على طريقة UPGMA (18) باستخدام برنامج SPSS الإصدار 17 كذلك تم حساب درجة التباعد الوراثي حسب معادلة Nei و Li (14 ) وكما في ادناه:

$$I = 1 - (2nxy/(nx+ny)) \cdot 100$$

حيث ان:

DI: درجة التباعد الوراثي، nx: عدد الحزم الكلية للتركيب الوراثي x، ny: عدد الحزم الكلية للتركيب الوراثي y، Nxy: عدد الحزم المشتركة بين التركيبين الوراثيين x و y.

**جدول 1. التسلسل النيكلوتيدي للبادئات المستخدمة المدروسة حسب تشابه نمط الأستجابة**

| ت | البادىء | التسلسل النيكلوتيدي |
|---|---|---|
| 1 | BVU07582-L r | 5¯-TGCGGTTGCTGCTACTCTCATTC-3¯ |
| | BVU07582-L f | 5¯-GTTGCTTCGCCTTCATCCCACTA-3¯ |
| 2 | F100-p49296-L r | 5¯-TTCAGTCCCCACATCAA-3¯ |
| | F100-p49296-L f | 5¯-CTCTTCTTCGCGCAACAATACCAC-3¯ |
| 3 | F100-p49296-M r | 5¯-GTGGTATGTTGCGCGAAGAAGA-3¯ |
| | F100-p49296-M f | 5¯-AGGTCGATTTGAAGCAGAGGTAGC-3¯ |
| 4 | BVU07582-M r | 5¯-GGCTTTCGCTCCCCATACC-3¯ |
| | BVU07582-M f | 5¯-GGCCTAGCAATCACCACAGTTC-3¯ |
| 5 | BVU07582-U r | 5¯-CTGCCATGGGAAAAGGGGTTACT-3¯ |
| | BVU07582 f | 5¯-CAACACGAAACCAAACACGAATCA-3¯ |

- 5¯ ← 3¯ يشير الى اتجاه تصنيع DNA لأنزيم DNA Polymerase

**النتائج والمناقشة**

ان عدم توفر معلومات وراثية او مكتبة جينومية للمحاصيل المتكيفة للظروف المحلية قد يقود الى ضياع هذه التراكيب نتيجة لعوامل مختلفة كالخلط الوراثي او الميكانيكي وحدوث الطفرات وغيرها، بالتالي فأن التعرف على طبيعة الجينوم للتراكيب الوراثية ضروري في برامج التربية. ان توفر المعلومات عن الجينات المتحملة للملوحة سيمكن الباحثين من ادخال التراكيب الوراثية التي تحمل جينات تحمل ملوحة مغايرة لأجل تطوير هذه الصفة. ان تحليل ثمانية تراكيب من البنجر السكري باستخدام خمسة بادئات ادى الى تشخيص 27 حزمة (68%) كانت جميعها من نوع polymorphic. (جدول 2 وشكل 1) اختلف عدد الحزم المنتجة من 7-4 حسب البادىء. انتج البادئان 4 و5 اعلى عدد من الحزم بينما اعطت التراكيب 3 و4 و6 حزما لجميع البادئات وهذا يشير الى وجود تتابع القواعد لجميع البادئات المستخدمة في جينوم هذه التراكيب في حين لم تتكون اي حزمة للتركيب 8

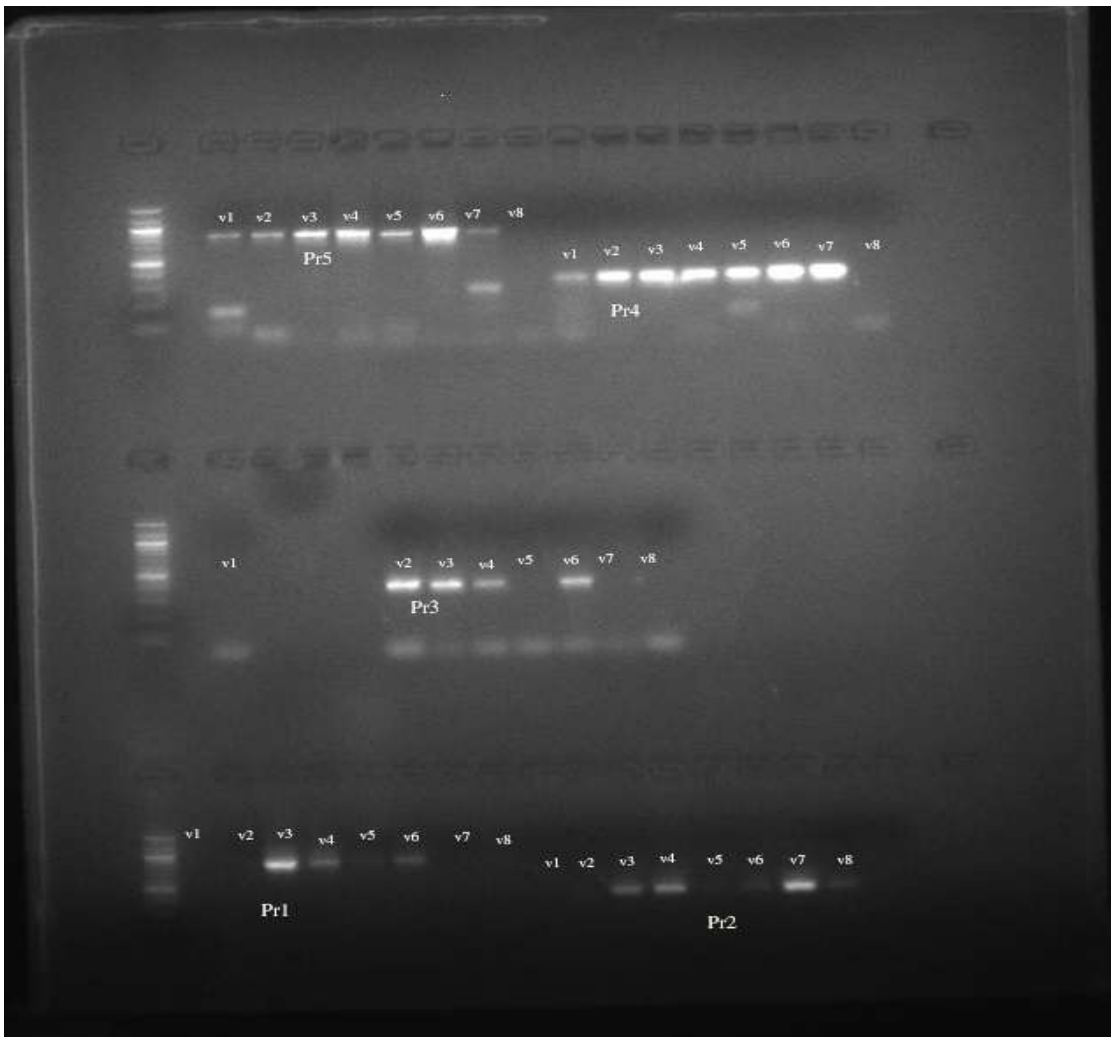
باستثناء حزمة واحدة نتجت من البادئ 2 وهذا يشير الى ان هذا التركيب قد يكون ذو اصل وراثي مختلف عن بقية التراكيب الوراثية المدروسة. بينما لم يفلح البادئان pr4 و pr5 في التمييز بين التراكيب المتحملة للملوحة وهذا ناتج عن الاستجابة المتماثلة لهاذين البادئين، حيث ظهرت حزم DNA لهاذين البادئين في جميع التراكيب الوراثية باستثناء التركيب V8 الذي لم يحتوي على هذا التتابع. توزعت التراكيب الوراثية المدروسة الى ثلاث مجاميع عند تطبيق التحليل العنقودي (cluster analysis) حسب تشابه واختلاف مواقعها الاليلية، اذ ضمت المجموعة الأولى (A) ثلاثة تراكيب هي V3 و V4 و V6 والمجموعة الثانية (B) اربعة تراكيب وراثية هي V1 وV7 وV5 وV2 والثالثة (C) تركيب وراثي واحد هو V8 (شكل 2). اعتمد تقدير نسبة البعد الوراثي بين كل تركيبين وراثيين على وجود الحزم المشتركة بينهما (14 ). تشير نتائج جدول 3 للبعد الوراثي الى وجود اختلافات وراثية متباينة بين التراكيب المدروسة من البنجر السكري اعتمادا على تشابه واختلاف المواقع الأليلية بينهما. كان التركيب V8 الأبعد وراثيا عن جميع التراكيب المدروسة وهذا يتضح من قيمة البعد الوراثي لهذا التركيب، اذ كانت نسة البعد الوراثي 100% مع التراكيب V1 وV2 و V3وV5 ، في حين لم تنخفض نسبة البعد الوراثي مع بقية التراكيب عن 50%. أن سبب البعد الوراثي لهذا التركيب انه من التراكيب المدخلة. كانت نسبة البعد الوراثي منخفضة ومتساوية بين تراكيب المجموعة A وبلغت 0 وهذا يعكس استجابة هذه التراكيب بشكل متماثل لجميع البادئات المستخدمة وبالتالي لم تفلح هذه البادئات في تمييز الاختلافات بينهم. اما المجموعة الثانية فقد امتلك التركيب V1 اقل نسبة بعد وراثي بين تراكيب مجموعته، اذ بلغت اقل قيمة للبعد الوراثي 20%وكانت بين التراكيب V1 وV2 وكذلك بين V1 وV5 وبين V1 وV7. ان التهجين بين التراكيب المختلفة المتحملة للملوحة والتي اثبتت تباعدا وراثيا نتيجة امتلاكها تسلسل قواعد متباين للبادئات المختلفة قيد الدراسة يمكن ان يؤدي الى تجميع جينات تحمل الملوحة في تركيب واحد وهذا سيزيد من الجهد الجيني للتركيب الناتج من التهجين. على هذا الاساس فمن المعقول التضريب بين تراكيب المجموعة A مع B وتجنب التضريب بين تراكيب المجموعة الواحدة لامتلاكها جينات متماثلة لتحمل الملوحة (7).

**جدول 2. المصفوفة الرقمية لوجود(1) او غياب (0) الحزم**

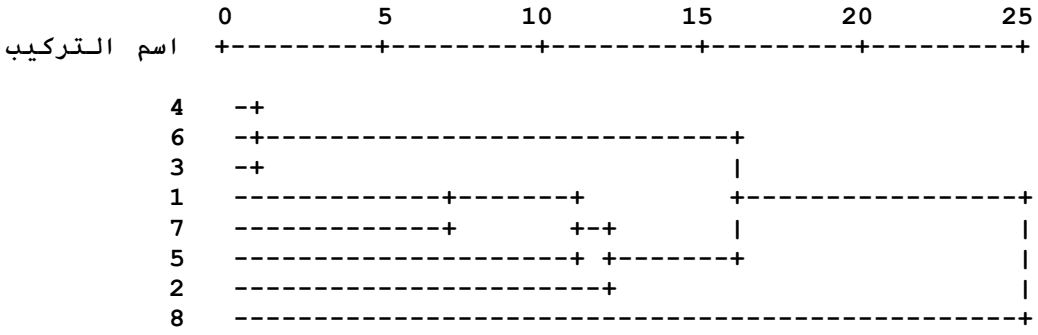
| | التراكيب الوراثية | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | V8 | V7 | V6 | V5 | V4 | V3 | V2 | V1 | |
| البادئات | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | Pr1 |
| | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | Pr2 |
| | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | Pr3 |
| | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | Pr4 |
| | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | Pr5 |

**جدول 3. التباعد الوراثي (ID) للتراكيب المدروسة حسب Nei**

| | التركيب الوراثي | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | V8 | V7 | V6 | V5 | V4 | V3 | V2 | V1 | |
| التركيب الوراثي | 1.0 | 0.2 | 0.43 | 0.2 | 0.43 | 0.43 | 0.2 | 0 | V1 |
| | 1.0 | 0 34 | 0.25 | 0.34 | 0.25 | 0.25 | 0 | | V2 |
| | 1.0 | 0.25 | 0 | 0.25 | 0 | 0 | | | V3 |
| | 0.66 | 0.25 | 0 | 0.25 | 0 | | | | V4 |
| | 1.0 | 0.34 | 0.25 | 0 | | | | | V5 |
| | 0.67 | 0.25 | 0 | | | | | | V6 |
| | 0.5 | 0 | | | | | | | V7 |
| | 0 | | | | | | | | V8 |




**شكل 1. الترحيل الكهربائي لحزم DNA المتضاعفة بتقانة PCR للتراكيب المدروسة ( V1-V8) من البنجر السكري لخمسة بادئات (Pr1-Pr5)**




**شكل 2. التحليل العنقودي لتراكيب البنجر السكري (المحور العمودي) ومسافات euclidean اعتماداً على تغاير حزم DNA المتضاعفة او المرحلة كهربائيا**

## REFERENCES

1- Barlog , P.,W. Grzebisz ,M .Fec , R. Lukowiak , and W . Szczepaniak. 2010. Row method of sugar beet fertilization with multicomponent fertilizer based on urea - ammonium nitrate solution as a way to increase nitrogen efficiency. Cent-al European of Agriculture. J. 11(2) : 225-234.

2- Chaudhary, L., A. Sindhu, M. Kumar, and M. Saini. 2010. Estimation of genetic divergence among some cotton varieties by RAPD analysis. J. of Plant Breeding and Crop Sci. 2(3): 39-43.

3- Domyati, F., A. Rania, S. Edris, A. Mansour, G. Sabir, and A. Bahieldin. 2011. Molecular markers associated with genetic

diversity of some medicinal plants in Sinai. Academic J. http/ www.academic J.org /JMPR.

4- Draycott, A.P. 2006. Sugar Beet, 1st ed. Black Well, Oxford. pp. 443.

5-Erlich,A., D. Gelfand, and J. Sminsky. 1999. Recent advances in polymerase chain reaction. Sci. J. 252: 1643.

6- Fernie,A. R., Y. Tadmor, and D. Zamir. 2006. Natural genetic variation for improving crop quality. Curr. Opin. Plant Biol. 9:196-202.

7- Friebe, B., J. Jiang, W. Raupp, R. Mclntosh, and B .Gill. 1996. Characterization of wheat alien translocations conferring resistance to disease and pests. Euphtyica. 91: 59-87.

8- Hallden, C., A. Hjerdin, I. M. Rading, T. Sall, B. Fridlundh, G. Johannisdottir, S. Tuesso, C. Akesson, and N. Nilsoon. 1996. A high density RFLP linkage map of sugar beet. Genome. 39:634-645.

9- Henke S., Bubnik Z., Hinkova A., and V.Pour. 2005.Model of sugar factory with bi-oethanol production in program sugars TM , Journal of Food Engineering.77: 416-420.

10- Holland,J.B.2007. Genetic architecture of complex traits in plants.Curr.Opin.Plant Biol.10:156-162

11- Ketner, Ch., C. M. Hoffmann, and B. Märländer. 2006. Effects of weather variables on sugar beet yield development (*Beta vulgaris*). Europe. J. Agronomy. 24:62-69.

12- Madani, M., T. Kyndt, N. Colparet, S. Subbotin, G. Gheysen, and M. Moens. 2007. Polymorphism among sugar beet cyst nematode Heteroderaschachtii populations as inferred from AFLP and its rDNA gene analyses. Russian J. of Nematology. 15: 117-128.

13-Mariac, C., V. Luong, I. Kapran , A. Mamadou, F. Sagnard, M. Deu, J. Ndjeunga, G. Bezancon, J. Pham, and Y.Vigouroux. 2006. Diversity of wild and cultivated pearl millet accessions in Niger assessed by microsatellite markers. Theor. Appl. Genet. 114: 49-58.

14- Nei, M., and W. H. Li. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proc. Nat. Acad. Sci. USA., 74: 5269-5273.

15- Ober,E. S. and M. C. Luterbacher. 2002. Genotypic variation for drought tolerance in *Beta vulgaris*. Ann Bot. 89: 917-924.

16- Schneider, K., R. Schafer-Pregl, D. C. Borchardt, and F. Salamini. 2002. Mapping QTLs for sucrose content, yield and quality in a sugar beet population finger printed by EST-related markers. Theor. Appl. Genet. 104: 1107-1113.

17- Smith, O. S., and J. S. Smith. 1992. Measurement of genetic diversity among maize hybrids: a comparison of isozymic, RFLP pedigree, and heterosis data. Maydica. 37: 53-80.

18- Sneath, P. H. and R. R. Sokai .1973. Numerical Taxonomy: The Principal and Practice of Numerical Classification, In: C. J. Williamson, and R. J. Killick. 1978.Heredity 41: 215-225.

19- Stich, B., A. E. Melchinger, M. Heckenberger, J. Mohring, A. Schechher, and H. Pieph. 2008. Multi trait association mapping in sugar beet. Theor. Appl. Genet. 117: 947-954.

20- Tani, N., H.Yoshimaru, T. Kawahara, Y. Hoshi, F. Nobushima, and T. Yasui. 2006. Determination of the genetic structure of remnant Morus Koidz .Trees to establish a conservation program on the Bonin Island, Japan. BMC Ecol 6:14.

21- Tzilivakas, J., K. Jaggard, K .Lewis, S. May, and D. Warner. 2005. Environmental impact and economic assessment for UK sugar beet production systems. Agriculture Ecosystems and Environment. 107: 341-358.

22- Weber, W. E., D. C. Borchardt, and G. Koch. 2000. Marker analysis for quantitative traits in sugar beet. Plant Breeding. 119: 97-106.

23- Williams, W. T. 1976. Pattern Analysis in Agricultural Sciences. Elsevier, Amsterdam. CSIRO. pp. 95.