التحري عن جينات (GM1 ,GM4,GM11) المقاومة لمرض Gall midge في بعض التراكيب الوراثية للرز (*Oryza sativa* L.) بأستخدام مؤشرات SSR

زينة ثامر عبد الحسين الرفيعي[1] نضال عبد الحسين مسان[2]

مدرس مساعد أستاذ مساعد

drbio444@gmail.com nidhal1976@yahoo.com

[1] كلية العلوم / جامعة كربلاء

[2] كلية التربية للبنات / جامعة الكوفة

المستخلص

ذبابة المرارة *Orseolia oryzae* احد الآفات الخطيرة التي تسبب مرض Gall midge خسارة كبير لمحصول الرز *Oryza sativa* L. استخدم مؤشرات التكرار المتسلسل البسيطة Simple Sequence Repeats المعتمد على تفاعلات البلمرة المتسلسلة لكشف عن جينات المقاومة لمرض إذا تم عزل الدنا من أوراق الرز بعد 25 يوم من الزراعة باستخدام عده استخلاص Genomic DNA plant kit Protocol حصل على كمية دنا جيده تراوحت (125 – 589) نانوغرام /ميكرليتر بنقاوة قدرها 1.8– 1.9 . تم ترحيل العينات على هلام الاكاروز بعد إكمال برنامج PCR أظهرت نتائج ثلاث بادئات مع ستة عشر تركيبا وراثيا تراوحت أحجامها الجزيئية بين(bp1156.84–197.768) بلغت أعلى عدد اليلات 16 اليل سجلها البادئ RM23956 اما اقل عدد الليلات بلغت11 اليلات سجلها البادئ RM28574 ، إما محتوى التعدد الشكلي Polymorphism information content (PIC) الذي يمثل انعكاس للتنوع الاليلي والتكرار الاليلي بين الأصناف تراوحت قيمها بين (0.8807–0.9837).اما قيم التنوع الوراثي تراوحت بين 0.8906– 0.9772 إذا سجل البادئ RM23956 أعلى قيم لتنوع الوراثي إما اقل لتنوع وراثي سجله البادئ RM28574 ، أوضحت النتائج أيضا إن البادئ RM23956 الذي يكشف عن جين GM1موجود في اثنا عشر تركيب وراثي يليه البادئ RM28574 الذي يكشف عن جين GM11 موجود في سبعة تراكيب وراثية إما البادئ RM547 الذي يكشف عن جين GM4 فهو موجود في 5 تراكيب وراثية ، كما أوضحت النتائج ان التركيب الوراثي اباء يحتوى على الجينات الثلاثة.

مفتاح الكلمات : الجينات المقاومة Gall midge ،التنوع الوراثي ،الرز ، مؤشرات التكرار المتسلسل البسيطة

***بحث مستل من اطروحة دكتوراه**

Screening for the gene (GM1, GM4, GM11) disease gall midge resistance genes in Oryza sativa L cultivar using molecular indicators SSR

Z. Th. Abdul- Hussain AL-Refeay[1]
Assistant Lecturer
drbio444@gmail.com

N. Ab.H. Messan Al–Badeiry[2]
Assistant Professor
nidhal1976@yahoo.com

1College of Sciences -University of Karbala
[2]College of Education -University of Kufa

Abstract

Orseolia oryzae one dangerous pests that cause a great loss to the *Oryza sativa L.* crop, used markers Simple Sequence Repeats based polymerization reactions chained to the detection of resistance genes to disease. the DNA isolate of rice leaves after 25 days from sowing .using Genomic DNA plant kit Protocol to extraction , the amount of DNA in good range (125-589) ng / µl purity of 08.01 to 09.01. migrated samples on the gel akaros after completing the PCR program results showed three primers with sixteen cultivar ,The range of molecular size between (1156.84-197.768bp).the primer RM23956 reached to highest number of 16 alleles While the lowest number of 11 alleles recorded RM28574 primers. The Polymorphism information content (PIC) which is a reflection of the diversity of allelic and repetition allelic between varieties ranged value between (0.9837-0.8807). As ranged gene diversity values between 0.9772 -0.8906 . the primers RM23956 which reveals gane GM1 in twelve genotypes followed by the RM28574 which reveals gane GM11 in seven genotypes either the primers RM547 which reveals gane GM4 in five genotypes, as the results showed that the abaa1 cultivars of the contains three genes

Key words : gall midge resistance genes ,genetic diversity, Rice (Oryza sativa L) , microsatellite-markers

المقدمة

حشرة *Orseolia oryzae* هي عبارة عن نوع من الذباب تشبه البعوض، لون الانثى وردي إما الذكر لونه بني ،تضع الأنثى بيوض من 100–150 بيضة على النبات بعد 14 يوم تفقس على شكل ديدان صغيرة تزحف الى غمد الورقة الى ان تصل الى منطقة المرستيم القمي تبداء بالتغذية حيث تعمل على تمزيق الأنسجة وتمتص العصير الخلوي تستمر مدة أسبوعين مما يودي الى فشل الأفرع على تكوين سنابل وتتحول الورقة إلى شكل انبوبي بدل من شكلها الطبيعي (3) كما تعرف هذه الحشرة بان لها طرز بايلوجيه عديدة ، تم تحديدها في بلدان أسيا 14 طراز ،وعشر طرز تم تحديدها في الهند والصين كما تم تحديد طراز واحد في سيريلانكا وتايلنده (11) وهي المسببة لمرض Gall midge .

ان مقاومة النبات المضيف يعتبر أفضل إستراتيجية لمكافحة المرض Gall midge وأفضل اقتصاديا و وبيئيا.اذا ان استعمال المؤشرات الجزيئية أثبتت جودتها في الكشف عن جينات المقاومة لمرض gall midgeفي أصناف الرز ويمكن استخدامه كمنهاج مستمر وفعال لكشف عن الأصناف المقاومة (6) و (22). اذا استطاع (8) من تعين جين Gm11t المقاوم لمرضGall midge على كروموسوم رقم 12 باستخدام تقنية SSR حيث استخدم 471 بادئ حصل على 56 بادئ يعطي تعدد الإشكال وستة بادئات منSSR ترتبط مع جينات المقاومة ،مستقبلا يمكن الاستفادة من هذة الدراسة في كلونة الجين او انتخاب المعتمد على وجود الجين .كما أجرى(17) دراسة عن اهمية جين Gm8 المقاوم لمرض gall midge في أصناف الرز الأسيوية باستخدام مؤشرات SSR توصل الى ان هذا الجين يستطيع مقاومة خمسة طرز بايلوجيه لمرض biotypes(GMB1،GMB2، GMB3، GMB4 وGMB4) ويقع الجين على كرموسوم رقم 8 داخل منطقة 400 كيلو زرج قاعدي وتم تحديد تسعة تراكيب وراثية مقاومة لمرض gall midge تحمل الجين GM8 . اشار(6) الى وجود احد عشر جين مقاوم لمرضgall midge في أصناف الرز ضد سبعة طرز بايلوجية ،في دراسة أخرى استخدم 100 تركيب وراثي وتحت شروط الحقل وكان الطراز البايلوجي لمرض GMB4 و GMB1مع استخدام مؤشرات دنا عالية التخصص لكشف عن وجود جين المقاومة (GM1 ،3 GM، GM4،GM 8،GM11) أظهرت النتائج بعد التحليل المظهري والوراثي انقسام التراكيب الوراثية الى خمسة مجاميع ،المجموعة الأولى تحتوي على سبعة عشر تركيب وراثي مقاوم ولم يحصل اي ضرر اما المجموعة الثانية تحوي على احد وثلاثون تركيب وراثي قدرة نسبة الضرر اقل من 20%. لاحتوائها على جينات المقاومة (GM 3، GM4،GM 8،GM11) اما المجموعة الثالثة تحوي على ثمانية عشر تركيب وراثي كانت عرضة للإصابة الا انها كانت مقاومة طراز البايلوجي GMB4M . اما المجموعة الرابعة تحتوي على ستة تراكيب وراثية كانت مقاومة لإصابة بالطرازالبايولوجي GMB4 اذ قدرت نسبة التلف بـ 50%من النباتات بسبب الطراز البايلوجي GMB1. اما المجموعة الخامسة تحتوي على اثنا وعشرون تركيب وراثي كانت عرضة للمرض ضد جميع الطرز البايلوجية لأنها لأتملك اي جين مقاوم . كما استطاع (18) من تحديد جين المقاومة GM 3 على كرموسوم رقم 4 في أصناف الرز . لذا جاءت هذه الدراسة لتسليط الضوء على التراكيب الوراثية للرز *Oryza sativa* L. التي تحوي على بعض جينات المقاومة لمرض gall midge .

المواد وطرائق العمل Materials and Methods

جمع النماذج النباتية Collection of plant samples

جمعت العينات بالتعاون مع محطة أبحاث الرز في المشخاب / محافظة النجف الأشرف ، لستة عشر تراكيبا وراثيا والتي يجرى إكثارها ذاتيا ضمن خطة وزارة الزراعة في العراق. وكما مبين في جدول (**رقم 1**).

جدول 1: الأصناف والتراكيب الوراثية المدروسة مع مصدرها واصل نشؤها.

ت	اسم التركيب الوراثي	المصدر Source	أصل النشوء Pedigree
1	اباء 1	محطة أبحاث الرز في المشخاب	فيتنام – مركز اباء – تحمل ملوحة
2	عنبر البركة	محطة أبحاث الرز في المشخاب	هندي
3	فرات 1	محطة أبحاث الرز في المشخاب	تايلندي– المعهد ابحاث الرز العالمي (irri) Research International Rice Institute
4	غدير	محطة أبحاث الرز في المشخاب	فيتنام – المعهد ابحاث الرز العالمي (irri) Research International Rice Institute
5	برنامج 4	محطة أبحاث الرز في المشخاب	المعهد ابحاث الرز العالمي (irri) Research International Rice Institute
6	ياسمين	محطة أبحاث الرز في المشخاب	فتنام
7	بحوث 1	محطة أبحاث الرز في المشخاب	تركي
8	عنبر 33	محطة أبحاث الرز في المشخاب	صنف محلي قديم
9	دجلة	محطة أبحاث الرز في المشخاب	صيني
10	مشخاب 2	محطة أبحاث الرز في المشخاب	صنف محلي –ادخل المعهد ابحاث الرز العالمي (irri) Research International Rice Institute هوصنف يتحمل الجفاف تذكر بسيت الاستيراد
11	مشخاب 1	محطة أبحاث الرز في المشخاب	صنف محلي المعهد ابحاث الرز العالمي (irri) Research International Rice Institute
12	**التركيب الوراثي الاول**	محطة أبحاث الرز في المشخاب	فيتنام
13	**التركيب الوراثي الثاني**	محطة أبحاث الرز في المشخاب	فيتنام
14	**التركيب الوراثي الثالث**	محطة أبحاث الرز في المشخاب	فيتنام
15	**التركي الوراثي الرابع**	محطة أبحاث الرز في المشخاب	فيتنام
16	**التركيب الوراثي الخامس**	محطة أبحاث الرز في المشخاب	تايلندي-- المعهد ابحاث الرز العالمي (irri) Research International Rice Institute

الدراسة الجزيئية Molecular study

تم عزل الدنا من الأوراق بعد 25 يوم من الزراعة حسب طريقة (15). طبقا لخطوات العزل المرفقة بعدت الاستخلاص Genomic DNA plant kit Protocol المجهزة من شركة Geneaid ،بعدها استخدم جهاز bio drop لقياس تركيز الدنا اذا تعد خطوة مهمة من ضمن خطوات الاستخلاص الدنا من النبات (19) . ثم أجري الترحيل الكهربائي وفقا ل Sambrook و Russel (2001).

البادئات Primers

جهزت البادئات المعتمدة في هذه الدراسة من قبل شركة Bioneer في شكل مجفد Lyophilized وكان عددها ثلاث بادئ، وتم تحضيرها باستعمال دارئ TE للحصول على التركيز النهائي (المحلول الأصلي) 100 بيكومول/ مايكروليتر، ومن هذا المحلول تم تحضير البادئ الذي يستعمل في تفاعل البلمرة بتركيز 10 بيكومول/ مايكروليتر. جدول رقم4.

جدول 2: أسم البادئ وتسلسل النيوكليوتيدات.

ت	اسم البادئ	Traita ssociate d /QTL	رقم الكرموسوم	Repeat motif	تسلسل النيوكليوتيدات (5'→ 3')	المصدر
1	RM23956	Gm1	9	(AT) 30	Forward :GTCTCTCCCTCTCTCATCTTGTCG Reverse: CCCTATTCATGTGCAATGGAACC	(10)
2	RM547	Gm4	8	(ATT)19	Forward :TAGGTTGGCAGACCTTTTCG Reverse: GTCAAGATCATCCTCGTAGCG	(11)
3	RM28574	Gm11	12	(AG) 29	Forward :TAGTTTGGTGAAGTGGCATTGG Reverse:ATAGTAGGGCAAGGATTCAG AAGAGG	(5)

خليط التفاعل: Reaction Mixture (Master Mix)

جهز خليط التفاعل الرئيسي Master mix من قبل شركة Bioneer في أنابيب خاصة معقمة 3الدليل الحجمي للـ DNA DNA Molecular Size of Markers

جهز الدليل الحجمي المستعمل في هذه الدراسة من قبل شركة Bioneer – USA بتركيز 150 ng/$\mu\ell$. ، وبحجم 250 مايكروليتر ومدى يتراوح من 25 – 2000 زوج قاعدي (17 حزمة)

تفاعل البلمرة المتسلسل Polymerase Chain Reaction

إذ تم تطبيق المؤشر الجزيئي المعتمد في هذه الدراسة SSR من خلال تقنية PCR وفق لبرنامج التالي:

البادئ	المراحل	درجة الحرارة	الوقت
جميع البادءات نفس البرنامج	مسخ الدنا الابتدائية	95C°	5دقيقة
	عدد الدورات 35 دورة		
	مسخ الدنا	95C°	30 دقيقة
	الالتحام	55C°	30 دقيقة
	الاستطالة	72C°	1 دقيقة
	الاستطالة النهائية	72C°	5 دقيقة

بعد انتهاء وقت التفاعل رفعت الأنابيب من جهاز المبلمر الحراري وتم سحب 10 مايكروليتر من الأنابيب وتحميلها بحفر هُلام الآكاروز المحضر مسبقاً بتركيز 1.5%، مع تحميل الدليل الحجمي DNA ladder على أحد الجوانب. ثم رحلت العينات وذلك بتشغيل جهاز الترحيل الكهربائي Electrophoresis لمدة ساعة واحدة. بعدها تعريض الهلام للأشعة فوق البنفسجية على جهاز الـ Gel documentation system للتصوير.

تحليل البيانات Data Analysis

باستخدام uvband تم معرفة عدد الحزم المتضاعفة وأوزانها الجزيئية وبعدها تم تحويل بيانات التوصيف Characterization data يدويا إلى جداول تبين وجود الحزمة عن عدمها لكل عينة من العينات المدروسة وذلك بوضع 1 عن وجود الحزمة و0 عند غيابها. وبالمقارنة مع حجم الاليل المقاوم المحدد على موقع Gramene (7) تم حساب عدد الاليلات الكلية واعلى تكرار لاليل وعدد الاليلات النادرة والتنوع الوراثي ومحتوى التعدد الشكلي الوراثيPolymorphism Information Content (PIC) باستخدام برنامج Power Marker 3.25 (12). اما التحليل التجمعي Cluster لبناء الشجرة الوراثية Dendrograme بطريقة UPGMA يعتمد على معامل البعد الوراثي والتكرار الاليلي بجمع الأفراد المتشابهة جداً في مجموعة واحدة ثم ترتبط المجاميع المتشابهة معاً وهكذا الى ان يتم إدخال كل العينات المدروسة بمجموعة واحدة باستخدام برنامج past3.

النتائج والمناقشة

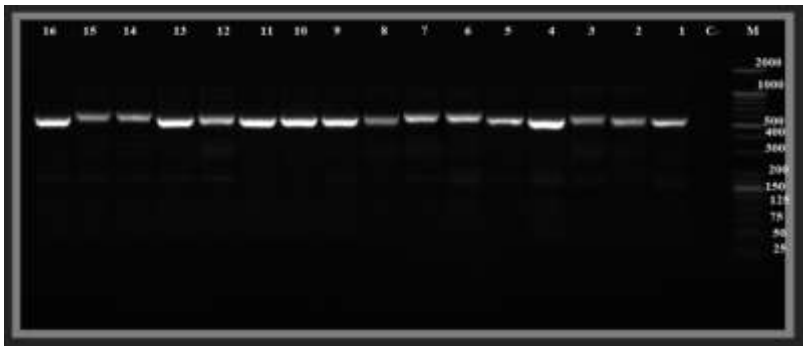
أوضحت النتائج ان الحجم الجزيئي للحزم الناتجة كانت متنوعة لجميع التراكيب الوراثية لرز وقد تراوحت(1156.84–197.768bp) ويعود السبب في اختلاف عدد الحزم الناتجة من استخدام كل بادئ الى الاختلاف في عدد المواقع المكملة لذلك البادئ بين التراكيب الوراثية المستخدمة في الدراسة تتفق هذه مع دراسة (4)، بلغت عدد الاليلات الكلية 63 اليل تم تحديدها في ستة عشر تركيب وراثي بمعدل 3.93 اليل لكل موقع سجل البادئ RM28574 اقل عدد اليلات بلغت 11 اليلات إما أعلى عدد اليلات بلغت 16 اليل سجلها المؤشر RM23956 جدول رقم (3) يعزى هدا الاختلاف الى التغاير بين التراكيب الوراثية المدروسة يتفق مع (10).كما وضحت النتائج عن وجود تباين بين البادئات في محتوى التعدد الشكلي Polymorphism information content (PIC) الذي يمثل انعكاس لتنوع الاليلي والتكرار الاليلي بين الأصناف تتراوح قيمة (0.8807 –0.9837) اذ سجل البادئ RM23956 اعلى قيمة محتوى التعدد الشكلي إما اقل قيمة لمحتوى التعدد الشكلي سجله البادئ RM28574. في جدول (3) تتفق مع (14) اغلب قيم لمحتوى التعدد الشكلي لبادئات في هذه الدراسة سجله قيم عالية مما يدل على كفائة البادئات في إيجاد التنوع الوراثي تتفق هذه الدراسة مع (1)، نلاحظ وجود علاقة طرديه بين محتوى التعدد الشكلي وعدد الاليلات لكل بادئ وعدد الحزم الكلية لكل بادئ جدول رقم (3) ،إما قيم التنوع الوراثي تراوحت بين 0.8906– 0.9772 اذ سجل البادئ

RM23956 أعلى قيم لتنوع الوراثي إما اقل تنوع وراثي سجله البادئ RM28574 جدول رقم (3) وقد يكون سبب هذا الاختلافات هو ادخال زوج من النيوكليوتيدات Insertionsاو استبدلSubstitutions او حذف Deletionsبسبب حدوث طفرة معينة (13). سجل البادئ RM23956 قيم متباينة الزيجة Heterozygot بلغت0.9375. و 22اليل نادر إما البادئ RM547 بلغت الاليلات النادرة 8 إما البادئ RM28574 سجل 7 اليل نادر وان هذا الاليلات النادرة تساعد على تحديد البصمة الوراثية المميزة لكل تركيب وراثي فقد تمكن البادئ الاول من اعطاء بصمة وراثية لجميع التركيب الوراثية قيد الدراسة إما البادئ الثاني والثالث تمكنا من اعطى بصمة وراثية لسبعة تراكيب وراثية فقط.

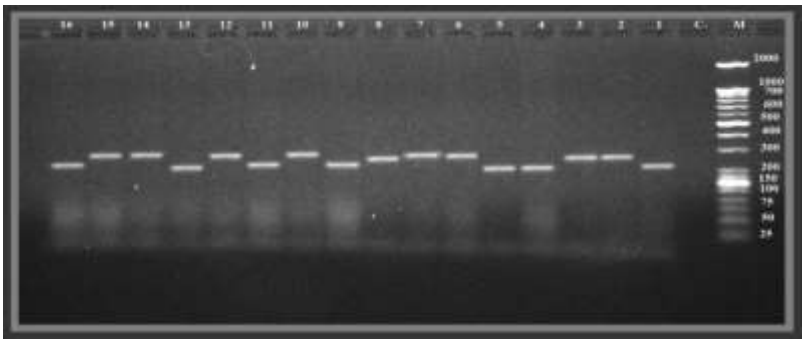
جدول 3: يوضح ملخص نتائج تحليل التنوع الوراثي لستة عشر تركيب وراثي من الرز باستخدام 3 البادئات من نوع SSRيتضمن اسم البادئ،عدد الحزم المتضاعفة ، حجم الحزم المتضاعفة ، عدد الاليلات ،أعلى تكرار لاليل ،متباينة الزيجة ، وقيم التنوع الوراثي heterozygosity و محتوى التعدد الشكلي

ت	marker	No.of alleles	Rare alleles	Size range(bp)	Difference(bp)	No. of amplified bands	Heterozygosity	Major allele(bp)	Major allele frequency	Genic diversity	PIC
1	RM23956	16	22	197.768 -1156.84	959.072	67	0.9375	1114.971	0.375	0.9772	0.9837
2	RM547	12	8	200 - 274.849	74.849	16	0	264.275,267.779 , 271.304	0.1250	0.9063	0.8986
3	RM28574	11	7	508-602	106	16	0	585.57	0.1875	0.8906	0.8807

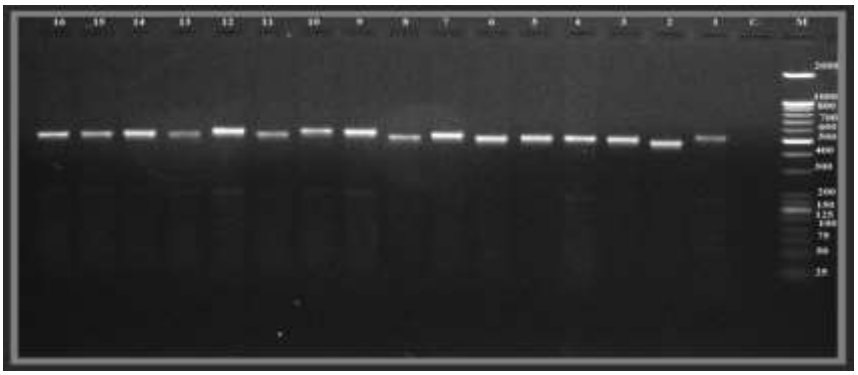
ان استخدام المؤشرات SSR في تحديد الجينات المقاومة في أصناف الرز هي أداة فعالة وقيمة كما تساعد على معرفة الأصناف التي تمتلك المقاومة الأفقية لغرض الاستفادة منها في برامج التربية والانتخاب المعتمد على المؤشرات الوراثية (Marker–assisted selection) لان الإمراض التي تسببها الفطريات والبكتريا والفايروسات والحشرات هي من العوائق الرئيسية لإنتاج الرز و الأكثر خطورة و قساوه (5). كما أوضحت النتائج المعتمدة على الحجم الجزيئي لمنتج PCR ومقارنته مع حجم الجين او الاليل المقاوم المحدد في موقع Gramene (7) ، أن الجينات المقاومة لمرض gall midge resistance genes ومنها الجين المقاوم Gm1 ظهر في صنف اباء1، عبر البركة ، فرات 1، غدير برنامج، عنبر33، دجلة ،مشخاب2،مشخاب1،التركيب الاول ،التركيب الثاني والتركيب الخامس جدول رقم 4 . إما حجم ألجين المقاوم Gm4 ظهر في صنف أباء وصنف دجلة ومشخاب1 والتركيب الوراثي الثاني والخامس جدول رقم 4 . إما ألجين المقاوم Gm11 ظهر في صنف أباء ،عنبر البركة،فرات1،غدير ،برنامج4،ياسمين وعنبر33 جدول رقم 4 تتفق هذه الدراسة مع (18). كما تميز كل من صنف أباء في هذا الدارسة بامتلاكه ثلاثة جينات مقاومة إما صنف عنبر البركة ، فرات1، صنف غدير ، برنامج 4 و صنف عنبر33، دجلة ومشخاب1 والتركيب الوراثي الثاني والخامس باحتوائهم على اثنين من الجينات مقاومة اما ياسمين ومشخاب1وتركيب الوراثي الأول اظهر مقاومة لجين واحد فقط اما صنف بحوث وتركيب الوراثي الثالث والرابع لم تظهر أي جين مقاوم (20). وان زراعة الأصناف التي تحوي جين واحد مقاوم لمرض تسبب انهيار المقاومة بشكل متكرر بسبب ظهور طرز بايلوجيه جديدة لمرض اما اذا كانت الاصناف حاوية على جينين او اكثر قد تولد مقاومة دائمية ضد المرض(6) تتفق هذا الدراسة مع دراسات المعهد الرز الاندنوسي Indonesian Center for Rice(9) . .Research (ICRR)



شكل 1: يوضح نتائج البادئ RM23956 المرحل على هلام الاكاروز بتركيز 1.5%التراكيب الوراثية التالية1–اباء ، 2–عنبرالبركة ، 3– فرات1، 4– غدير ، 5– برنامج4 ،6– ياسمين ،7–بحوث1 ،8– عنبر33، 9– دجلة 10مشخاب2 ،11 –مشخاب1، 12–تركيب وراثي الاول ، 13–تركيب الوراثي الثاني ، 14–التركيب الوراثي الثالث ، 15– التركيب الوراثي الرابع ، 16– التركيب الوراثي الخامس ، M–الدليل الحجمي القياسي bp 25– bp 2000.



شكل 2: تيوضح نتائج البادئ RM547 المرحل على هلام الاكاروز بتركيز 1.5%التراكيب الوراثية التالية1-اباء ، 2-عنبرالبركة ، 3- فرات1، 4-غدير ، 5- برنامج4 ،6- ياسمين ،7-بحوث1 ،8- عنبر33، 9- دجلة 10مشخاب2 ،11 –مشخاب1، 12-تركيب وراثي الاول ، 13-تركيب الوراثي الثاني ، 14- التركيب الوراثي الثالث ، 15- التركيب الوراثي الرابع ، 16- التركيب الوراثي الخامس ، M-الدليل الحجمي القياسي 25 bp- 2000 bp.



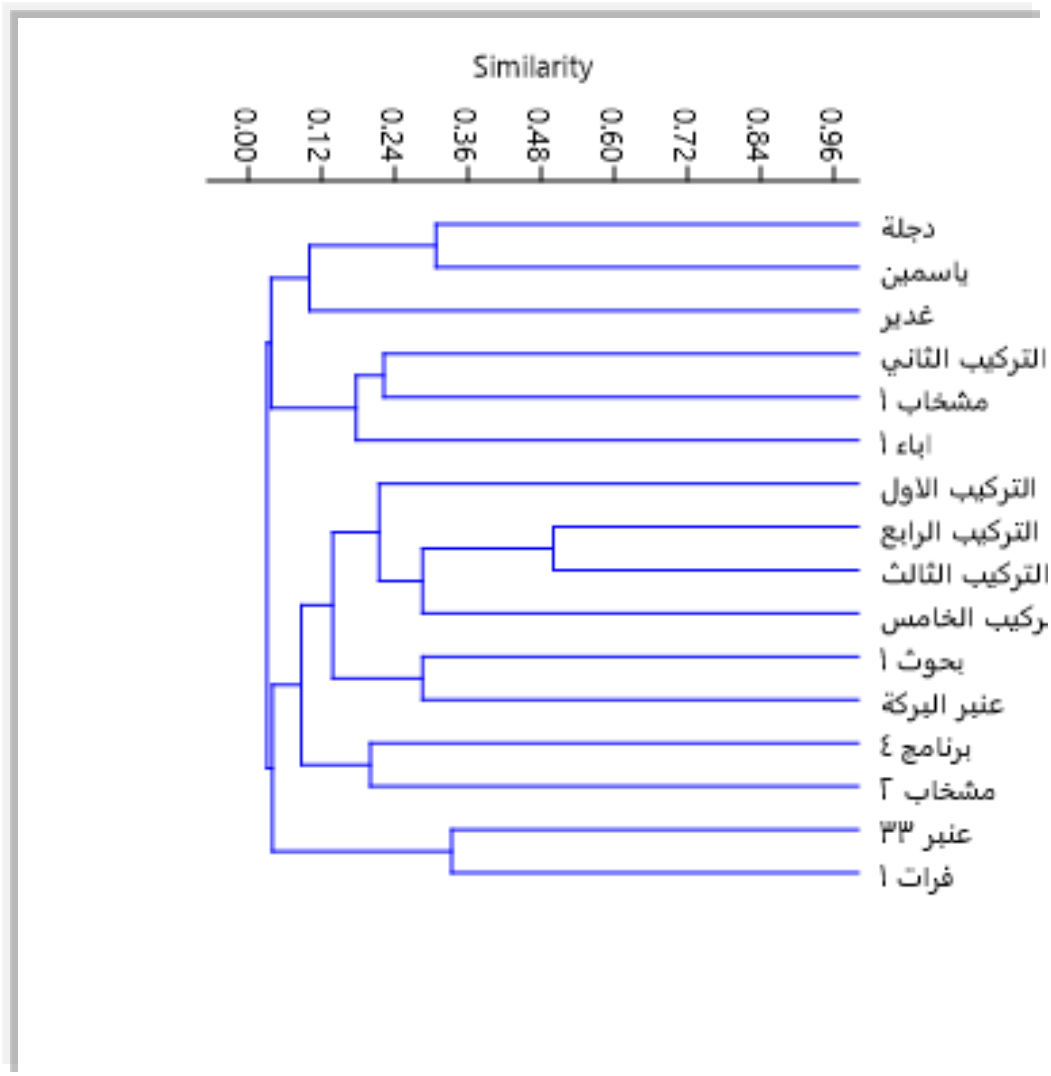
شكل 3: يوضح نتائج البادئ RM28574 المرحل على هلام الاكاروز بتركيز 1.5%التراكيب الوراثية التالية1-اباء ، 2-عنبرالبركة ، 3- فرات1، 4-غدير ، 5- برنامج4 ،6- ياسمين ،7-بحوث1 ،8- عنبر33، 9- دجلة 10مشخاب2 ،11 –مشخاب1، 12-تركيب وراثي الاول ، 13-تركيب الوراثي الثاني ، 14-التركيب الوراثي الثالث ، 15- التركيب الوراثي الرابع ، 16- التركيب الوراثي الخامس ، M-الدليل الحجمي القياسي 25 bp- 2000 bp.

جدول 4: يوضح الجينات المقاومة لمرضgall midge resistance genes الناتج بسبب حشرة Orseolia oryzae (Wood–Mason)

الأصناف والتراكيب الوراثية	RM23956 Gm1	RM547 Gm4	RM28574 Gm11	Numberof postivie
اباء 1	+	+	+	3
عنبر البركة	+	_	+	2
فرات 1	+	_	+	2
غدير	+	_	+	2
برنامج 4	+	_	+	2
ياسمين	_	_	+	1
بحوث 1	_	_	_	0
عنبر 33	+	_	+	2
دجلة	+	+	_	2
مشخاب 2	+	_	_	1
مشخاب 1	+	+	_	2
التركيب الوراثي الاول	+	_	_	1
التركيب الوراثي الثاني	+	+	_	2
التركيب الوراثي الثالث	_	_	_	0
التركيب الوراثي الرابع	_	_	_	0
التركيب الوراثي الخامس	+	+	_	2

(+) الأصناف والتراكيب التي تمتلك جين مقاوم (_) الأصناف والتراكيب التي تمتلك جين حساس

اوضحت نتائج التحليل التجمعي Cluster لبناء الشجرة الوراثية Dendrograme بطريقة UPGM لستة عشر تراكيب وراثية من الرز باستخدام ثلاث بادئات من نوع SSR عن تكون أربعة مجاميع رئيسية (Main Cluster) عند مستوى تشابه مقداره 0.10 . ضمت المجموعة الرئيسية الأولى كل من دجلة ، ياسمين اللذان سجلا أعلا نسبة التشابه بلغت 30% وانضم الصنفان مع الصنف غدير بنسبة تشابه 10% قد تشابهه المادة الوراثية بعض الشئ مما يؤدي الى انعكاسها في عدد الحزم المشتركة بينها، إما المجموعة الرئيسية الثانية ضمت كل من التركيب الوراثي الثاني ومشخاب1 واباء .اما المجموعة الرئيسية الثالثة ضمت مجموعتين ثانوية Sub–Cluster ضمت الأولى التركيب الاول والثالث والرابع والخامس إما المجموعة الثانوية الأخرى ضمت كل من بحوث1، عنبر البركة، برنامج4، مشخاب2 وان وجود التشابه الوراثي بين اصناف من اسلاف مختلفة في الموقع نفسه قد يكون بسبب تكيفت وراثياً مع الظروف البيئية السائدة في ذلك الموقع اما المجموعة الرئيسية الرابعة ضمت عنبر33 وفرات1 وقد يكون لها قاعدة وراثية مشتركة ومن المحتمل قد ينتج بسبب التدفق الجينات بين توزيعا جغرافية مختلفة.تتفق هذا الدراسة مع (16)



شكل 4: يوضح شجرة العلاقة الوراثية بين ستة عشر تراكيبا وراثيا للرز باستعمال 3 بادئ من نوع SSR

المصادر :

1- **Ahasanul H.; Shamsun N.; Begum and Lutful .(2014)**Genetic diversity assessment of rice (*Oryza sativa* L) germplasm using ssr markers. J. Res. Agric.. 1,(1): 37-46.

2- **Arundathi N.; Sangram M.; Rudraksh S.P.; Lambodar B.; Anand P.;Sarat S. (2010)** Flanking microsatellite markers for breeding varieties against Asian rice gall midge. Trop. Plant Biol. 3: 219-226.

3- **Bentur, J. S.; Pasalu, I. C.; Sarma, N. P.; Prasada Rao, U. and Mishra, B. (2003)** Gall midge resistance in Rice: Current Status in India and Future Strategies. DRR Research Paper Series 01/2003.

4- **Berilus S. R.;A. Pattanaya k. and G. Ram. (2013)** Analysis of Genetic Variability in Rice Cultivars of Arunachal Pradesh (India) Using Mi-

crosatellite Marker, African J. Biotechnology,. 12, (8), pp. 798-810.

5- **Das B.;Sengupta S.; Parida S.K.; Roy B.; Ghosh M.; Prasad M. (2013)** Genetic diversity and population structure of rice landraces from Eastern and North Eastern States of India. J. BMC Genet.;14(1):71-76.

6- **Dutta S.; Suvendhu D. D .; Durga R. C. V .; Dayakar R. T.;Visalakshmi V .; Cheralu C.; Ibohal S. K. and Bentur J. S. (2014)**Characterization Of Gall Midge Resistant Rice Genotypes Using Resistance Gene Specific Markers. J. Experimental Biology and Agricultural Science s,; Volume – 2(4):439-446.

7- **Gramene .(2008)** (http://www.gramene.org/.

8- **Himabindu K.; Suneetha K. ; Arun S.; Jagadish B.(2010)**A new rice gall midge resistance gene in the breeding line CR57-MR1523, mapping with flanking markers and development of NILs. J.Euphytica. 174(2):179-187 .

9- **ICRR (Indonesian Center for Rice Research). (2011)** At <http : // bbpadi . litbang . deptan.go.id / >, accessed February 2011.

10- **Israt N.; Mohiuddin A.K.M.; Shahanaz S. and Jannatul F . (2014)** Diversity analysis of indica rice accessions (Oryza sativa L.) using morphological and SSR markers .J.Annals of Biological Research, , 5 (11):20-31.

11- **Katiyar, S. K.; Chandel, G.; Tan, Y.; Huang, B.; Nugaliyadde, L.; Fernando, K.; Bentur, J. S.; Inthavong, S.; Constantino, S. and Bennett, J. (2000)** Biodiversity of Asian rice gall midge (Orseolia oryzae Wood-Mason) from five countries examined by amplified fragment length polymorphisms (AFLP) analysis. Genome 43: 322-333.

12- **Liu K; Muse S.V.; Power Marker: Integrated analysis environment for genetic marker data; Bioinformatics. (2005)** 21: 2128–2129.

13- **Mujaju, C.; Sehic,J. and H. Nybom.(2013)** Assessment of EST-SSR Markers for evaluating genetic diversity in watermelon accessions from Zimbabwe . American J. Plant Sciences. 4: 1448-1456.

14- **Nachimuthu V.V.; Muthurajan R.; Duraialaguraja S.; Sivakami R.; Pandian B.A. (2015)** Analysis of Population Structure and Genetic Diversity in RiceGermplasm Using SSR Markers: An Initiative towards Association Mapping of Agronomic Traits in Oryza sativa. Rice 8: 1-25.

15- **Saghai-Maroof MA.; Soliman K.M.; Jorgensen R.A .and Allard R.W. (1984)** Ribosomal DNA spacer-lengthpolymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. Proceedings of the NationalAcademy of Sciences, 81: 8014-8018.

16- **Sajib A.M.; Hossain M.M.; Mosnaz A.T.M.J.; Hosneara H.; Islam M.M.; Ali M.S.; Prodhan S.H.** 2012.SSR marker-based molecular characterization and genetic diversity analysis of aromatic. . J. BioSci. Biotech, 1(2): 107-116.

17- **Sama, V. S. A. K. ; Himabindu, K .; Bhaskar N. S .; Sundaram, R. M. ; Viraktamath, B. C. ; Bentur, J. S. (2012)** Mapping and marker-assisted breeding of a gene allelic to the major Asian rice gall midge resistance gene Gm8. J. Euphytica, 187 (3). pp. 393-400.

18- **Sama V.; Rawat N.; Sundaram R.M.; Himabindu K.; Naik B.S.; Viratamath B.C.; Bentur J.S. (2014)** A putative candidate for the recessive gall midge resistance gene gm3 in rice identified and validated. Theoretical and Applied Genetics 127: 113 –124.

19- **Sambrook J.; Fritsch, E.F. and Maniatis T. (1989)**Molecular Cloning: a laboratory manual. NY: Cold Spring Harbor.pp:2028**.**

20- **Siva G.; Kumar, K.; Aruna K.; Durga R.Ch. V.; Sundaram R. M. ; Vanisree S.; Jamaloddin Md. and Swathi G..2013. Study of simple sequence repeat (SSR) polymorphism for biotic stress resistance in elite rice variety JGL (1798)** African J. Biotechnology .12,(40),:pp5833-5838.

21- **Sundaram R.M. (2007)** Fine mapping of rice gall midge resistance genes Gm1 and Gm2 and validation of the linked markers. PhD thesis submitted to University of Hyderabad, Hyderabad, pp.181.

22- **Sundaram R.M.; Vishnupriya M.R.;Biradar S.K.; Laha G.S.; Ashok R. G.; Shoba R.N.; Sarma N.P.AND Sonti R.V. (2008)** Marker assisted introgression of bacterial blight resistance in Samba Mahsuri, an elite indica rice variety. J. Euphytica 160: 411-422.