Bull. Fac.Agric.,Cairo Univ., 63:144-151 (2012)

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF SOME BARLEY GENOTYPES *Hordeum vulgare*

(Received:5.2.2012)

By
K . Hassoun , M . Shaherly and S . Lawand

Department of Agronomy, Faculty of Agriculture, Damascus University, Syria

ABSTRACT

The present research was conducted in biotechnology laboratory at the faculty of Agriculture-Damascus University during the year 2010-2011. Six barley genotypes were grown in addition to two varieties white Arabi and black Arabi which have been utilized as a control in the research. To study the genetic diversity and to determine the degree of genetic relationship among these genotypes using inter simple sequence repeats (ISSR) technique have been used. The used primers proved its efficiency in showing polymorphism among the studied genotypes and the local varieties which resulted in a seventy one alleles. The percentage of this polymorphism reached 86.40%. The number of bands for each primer accounted to a minimum of two bands for the primer (ISSR-34) and a maximum of seven bands with the primers (ISSR, 9-4-43) with an average of five bands for each primer. Both cluster analysis and dendogram showed that the highest degree of genetic relationship was between white Arabi and black Arabi varieties with a genetic distance of (8.41), followed by the two genotypes Acsad 1632 and Acsad 1670 with a genetic distance of (10.11). These results indicated the genetic diversity of the studied genotypes.

Key words: *barley, cluster analysis, genetic diversity , molecular characterization, polymorphic, dendogram.*

التوصيف الجزيئي لطرز وراثية من الشعير (*Hordeum vulgare*)

كنانه حسون - مخلص شاهرلي - سلام لاوند

قسم المحاصيل الحقلية - كلية الزراعة - جامعة دمشق - سوريا

ملخص

نفذ البحث في مخبر التقانات الحيوية التابع لكلية الزراعة - جامعة دمشق للعام 2010-2011. زرعت ستة طرز وراثية من الشعير بالإضافة إلى الصنفين عربي أبيض وعربي أسود والتي استخدمت كشواهد في البحث من أجل دراسة التنوع الوراثي لهذه الأنواع وتحديد درجة القرابة الوراثية فيما بينها وذلك باستخدام تقنية ISSR (Inter simple Sequence repeats) واستخدم لهذا الغرض 14 بادئة. أثبتت البادئات المستخدمة فعاليتها في إعطاء تعددية شكلية polymorphic بين الطرز الوراثية المدروسة والشواهد ونجم عن استخدامها مجموعه 71 أليل (قرين)، وبلغت نسبة هذه التعددية 86,40 %، تراوحت عدد الحزم لكل بادئة بين 2 حزمة كأقل عدد مع البادئة (ISSR-34) و7 حزم كأعلى عدد مع البادئات (ISSR- 9-4-43) بمتوسط 5 حزم لكل بادئة. أظهر كلاً من التحليل العنقودي وشجرة القرابة الوراثية أن أعلى درجة قرابة وراثية كانت بين الصنفين عربي أبيض وعربي أسود وذلك ببعد وراثي قدره (8,41)، ثم الطرازين الوراثيين أكساد 1632 و1670 وذلك ببعد وراثي قدره (10,11) حيث دلت النتائج على التنوع الوراثي للطرز الوراثية المدروسة.

1. مقدمة

تمتاز دولة سورية بتباينات جغرافية ومناخية وبيئية تنعكس على الغطاء النباتي من حيث التنوع على مستويات الأنظمة البيئية والأنواع وحتى على المستوى الوراثي من حيث تحت الأنواع والسلالات ضمن النوع الواحد وقد شمل هذا التنوع موارد وراثية متباينة، حيث تعد المحاصيل النجيلية مجموعة هامة تتواجد في سورية العديد مـــن

أجناسها الغذائية والعلفية مما يجعلها من أهم مراكز نشوء هذه الأجناس في هذه المنطقة.

يعد التنوع الوراثي الموجود ضمن الأنواع النباتية جزءاً هاماً من التنوع الحيوي، حيث تتميز المصادر الوراثية النباتية بتنوعها الوراثي الكبير وبقدرتها على تحمل الإجهادات الإحيائية واللاإحيائية والباكورية في النضج (شاهرلي و أخرون 1995). تشمل هذه المصادر طائفة متنوعة من الموارد الوراثية والأصناف المزروعة حديثاً بالإضافة إلى الأقارب البرية وغيرها من أجناس النبات ات البرية المستخدمة كغذاء . تشكل هذه الموارد المادة الخام الأهم لمربي النبات ومورد أساسي للمزارعين كما أنها ذخيرة للتطويع الوراثي للوقاية من التغيرات البيئية والاقتصادية الضارة المحتملة(Lane, 2007).

وفيما يتعلق بالطرز الوراثية من الشعير موضوع الدراسة (*Hordeum vulgare*) فإنها تشكل ذخيرة وراثية ذات أهمية وطنية وعالمية، تُجَمّع وتُصَنّف وتُخَزّن في بنوك للأصول الوراثية لكي يتسنى للمختصين القيام بدراسات وبحوث عليها بهدف انتخاب وتربية الأنواع والأصناف الملائمة للظروف المحلية، و كذلك تحسين الأنواع المزروعة لمنعها من الانقراض وإنتاج السلالات والهجن والأصناف الملائمة للظروف البيئية والزراعية والإنتاجية المختلفة، هذا وبالإضافة إلى أنها تستخدم كعلف للحيوانات حيث يدخل بنسبة 75% في تركيبة الخلائط العلفية المركزة، إضافة إلى استخدامه في إعداد فرشات الحيوانات، ويستخدم في تغذية الإنسان حيث يعد محصولاً غذائياً في المناطق الجبلية ويستخدم في عمل البسكويت والخبز وإنتاج النشاء والكثير من الصناعات الكيماوية والغذائية، ويدخل في صناعة البيرة والمشروبات الكحولية. وعادة ما يكون الشعير المحصول الحبي الوحيد الذي ينجح في البيئات الجافة لأن له مقدرة على التأقلم مع نطاق واسع من المناخات بالإضافة إلى أنها تتحمل الجفاف وارتفاع درجات الحرارة.

رغم أهمية الصفات الشكلية والخصائص الفسيولوجية وكذلك الخصائص الشكلية المظهرية الزراعية إلا أن الحاجة للمؤشرات الجزيئية أصبحت أكثر أهمية وإلحاحاً ويرجع ذلك للأسباب التالية:

1- توفر المؤشرات الجزيئية نتائج مبكرة مما يساعد في الإسراع بعمليات الانتخاب والتربية وبذلك تختصر الزمن الذي تستغرقه إضافة إلى خفض كلفة المادة التي تحتاجها الدراسات المورفولوجية.
2- عدم وجود أي علاقة بين الأطوار الفينولوجية للنبات والمؤشرات الجزيئية وبالتالي يمكن استخلاص المادة الوراثية من الدنا (الحمض الديوكسي ريبوزي النووي) (DNA) من المراحل الأولى للنبات.
3- سهولة تحديد موقع وراثي مطلوب لطراز وراثي معين مباشرة.
4- عدم تأثر المؤشرات الوراثية الجزيئية بالشكل الظاهري للنباتات والمؤشرات البيئية كما في برامج التربية التقليدية.
5- الحصول على عدد كبير من المؤشرات بزمن قصير نسبياً.
6- إن جوهر العمل البحثي يكمن في زراعة الصنف المتفوق أو الطراز الوراثي المفضل في البيئة حيث تسمح له بالتعبير عن إمكاناته الإنتاجية الكامنة (Boyer, 1982) وبما أن تطوير هذا الطراز يعتمد على نقل المورثات المتحكمة بالصفة المطلوبة للوصول إلى أصناف جديدة أفضل وبالتالي فإن معرفة مواقع هذه المورثات في النبات المانح ضرورية لتسريع برنامج العمل البحثي.

وقد ذكر (Powell *et al*., 1996) أن استخدام التقانات الحيوية على المستوى الجزيئي للمادة الوراثية أدى إلى تسريع وتحسين تربية المحاصيل. إذ تعد المؤشرات الجزيئية Molecular markers ذات أهمية قصوى على صعيد تربية النبات إضافة إلى أنها تعد مؤشرات مساعدة في إسراع عمليات الانتخاب والتربية وهي بذلك تختصر الزمن الذي تستغرقه عمليات التربية التقليدية إضافة إلى خفضها للتكاليف المادية (سيد، 2001).

كما أوضح كل من (Graner *et al*., 1991; Qi and Lindhout, 1996; Ramsay *et al*., 2000) أن استخدام تقانات المؤشرات الجزيئية يمكن أن يقلل من تعقيدات إدخال عدد من الصفات المرغوبة في النمط الوراثي الواحد. كذلك يمكن استخدام المؤشرات الجزيئية بشكل فعال في تحاليل التنوع الوراثي وتقدير التشابه الوراثي (Powell *et al*., 1996).

وقد طُور التفاعل التسلسلي البوليميرزي (البيسرة) (Polymerase Chain Reaction- PCR) من قبل الباحث (Saiki *et al*.,1985) الذي كان له أثراً مهماً على صعيد الدراسات الوراثية الجزيئية، حيث اعتبر هذا الإنجاز تطوراً هاماً ساعد في سرعة وكفاءة غربلة العديد من المجموعات الانعزالية (Siaki *et al*., 1985and 1988 Mullis *et al*.,1986; Tragoonrung *et al*., 1992). ويقوم هذا التفاعل بمضاعفة Amplification قطع محددة من حمض الدنا (DNA) باستخدام بادئات عشوائية أو متخصصة مصممة لهذا الهدف، مما يسمح بالحصول على ملايين النسخ المضاعفة من قطعة واحدة من الحمض النووي DNA التي تتضاعف أسياً، وذلك باستخدام دورات حرارية متعددة(Karp *et al*., 1997; Ayad *et al*., 1997 و سيد 2001).

وقد ساعد تصنيع أجهزة التدوير الحراري automated thermo cycler واكتشاف إنزيم البوليميراز DNA Polymerase في تطوير هذا التفاعل وفي ظهور تقانات أخرى تعتمد عليه وتستخدم في إجراء التحاليل الوراثية وإنشاء خرائط الارتباط الوراثية (Saiki *et al*., 1988; Rafalski *et al*.,1996).

تعد تقنية التوابع الترادفية البسيطة الداخلية (Inter Simple Sequence Repeats- ISSR) واحدة من التقانات الهامة المعتمدة على تفاعل البيسرة (Polymerase Chain

Reaction- PCR) وقد طبقت من قبل Ziekiewicz (*et al*.،1994) و تعتبر مؤشرات جزيئية مثالية للأسباب التالية:

تضخم منطقة التوابع الترادفية البسيطة ويستخدم بادئ وحيد ومؤلف من قطع متكررة ومحاط في بعض الأحيان بـ 2-4 نيكليوتيدات في المنطقة ' 3 أو 5' . وتوصف تقنية ISSR بأنها أكثر تكرارية من تقنية RAPD بسبب طول البادئ المستخدم والذي يعكس درجة حرارة عالية لمرحلة تشفع البادئات.

إمكانية الكشف عن التتاليات النيكليوتيدية ذات السيادة في التوريث. (Borent and Branchard, 2001., Chowdhury *et al*., 2002) وفرتها وتواجدها في مجينات حقيقيات النوى النباتية ولا تحتاج إلى معلومات عن التسلسل المجيني المدروس.

نتائجها ثابتة عند تكرارها وسريعة كما أنها تتطلب كمية قليلة من الحمض النووي DNA، ويمكن أتمتتها automation وحيث أنه يمكن نشر البادئات وتبادلها بسهولة بين المخابر بمجرد معرفة التسلسل النيكليوتيدي لها.

تكشف نسب عالية من التعددية الشكلية polymorphism وبنفس مقدرة تقنية SSR، وكذلك استخدمت لدراسة التنوع الوراثي في البطاطا (Bornet *et al*, 2002) ، الشعير (Fernandez *et al*., 2002) وا لأرز (Joshi *et al* ., 2000) والقمح (Nagaoka and Ogihara., 1997).

2. المواد وطرق العمل

2. 1. المواد المستخدمة

2. 1. 1. المادة النباتية

تم الحصول على الطرز الوراثية المدروسة من المركز العربي لدراسات المناطق الجافة والأراضي القاحلة (أكساد) بالإضافة إلى صنفين محليين كما في الجدول (1):

2.2 طرق العمل

2. 2. 1 . استخلاص الحمض النووي بطريقة SDS:

تم استخلاص الدنا وفق الخطوات التالية:

1 -طحن 1غرام من الأوراق الخضراء "غير المجففة" في هاون بورسلان وباستخدام الآزوت السائل حتى الحصول على مسحوق ناعم ، نقل بعدها إلى حوجلة زجاجية سعة 50 ميليمتر وأضيف لها 10 ميليمتر من سائل الاستخلاص SDS Sodium Dodecyle Sulphat (Tris 0.1M, pH=8.2, EDTA 50 mM, NaCl 0.1M, SDS 2%, (proteinase-K 1mg/ml، ثم مزجت جيداً.

2- تحضين العينات لمدة 60 دقيقة مع التحريك المستمر ضمن حمام مائي عند 37°م، ثم نقلت الحوجلة إلى الثلج ووضعت فيه لمدة 5-10 دقائق.

2 - أضيف بعد ذلك 10 مليمترات من مزيج كل مـن كلوروفورم/أيزواميل/ كحول بنسبة 1:24 ثم مزج الخليط لمدة 15 دقيقة باستخدام هزاز آلي في درجة حرارة المخبر.

4- نقل المزيج إلى أنبوب تثفيل سعة 30 مل وثفل المزيج (عملية الطرد المركزي) لمدة 10 دقائق بسرعة (10000 rpm).

5- تم أخذ الطبقة العليا (المتشكلة عن عملية التثفيل، والتي تمثل الوسط المائي الذي يحوي الأحماض النووية) بوساطة ماصة ونقلت إلى أنابيب تثفيل جديدة.

6- أُضيف الكحول الإيزوبروبانولي Iso-propanol بمعدل 3/2 من حجم الوسط المائي ومزج بهدوء بقلب الأنبوب رأساً على عقب عدة مرات (تم في هذه المرحلة ترسيب الأحماض النووية على شكل كتلة خيطية هلامية أو بيضاء).

7- نقل الحمض النووي DNA المترسب بوساطة ماصة دقيقة إلى أنبوب صغير سعة 2 مل وأضيف 1.5 مل من محلول الغسيل Washing buffer (كحول إيثيلي 76% البارد المحفوظ بدرجة –20°م) وتركه لمدة 20 دقيقة في الثلج حيث جمع الحمض النووي DNA بالطرد المركزي بسرعة (10000 rpm) لمدة 10 دقائق وبدرجة حرارة 4°م .

8- استبعد سائل الغسيل وحفظ الحمض النووي المتجمع في قاع الأنبوب وجففت العينات باستخدام التجفيف مع التفريغ الحراري في مجفدة vacuum dryer لمدة 10-20 دقيقة.

9- أذيبت عينات الحمض النووي الدنا في 500 ميكروليتر من المحلول المنظم TE المكون من (10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA) وعند درجة حرارة4° م.

10- خلال أية عملية استخلاص للحمض النووي الدنا فإنه لابد من وجود كمية من الحمض النووي الرنا الناتجة عن عملية الاستخلاص(تختلف كمية الحمض النووي RNA باختلاف طريقة الاستخلاص وباختلاف النسيج النباتي وعمره) وعليه فإنه لابد من استبعاد هذه الحمض النووي RNA وفق مايلي:

تم التخلص من الحمض النووي RNA بإضافة 2 µl من أنزيم RNase (10 mg /ml) والتحضين على درجة 37- م ° لمدة نصف ساعة، و أضيف حجم مماثل من الكلوروفورم: ايزوميل الكحول (1:24). وبعد ال طرد المركزي ونقل الطور العلوي لأنبوب جديد أضيف له ضعف كمية المزيج من الإي ثنول ethanol النقي لإعادة ترسيب الحمض النووي DNA، وترك عند الدرجة(4- م°) لمدة ساعة ثم رسب المزيج با لطرد المركزي بسرعة (10000 rpm) و لمدة 10 دقائق وغسل ثانية بواسطة الإيثانول 70 % و جفف في الهواء للتخلص من آثار

جدول رقم (1): الطرز الوراثية والأصناف المحلية المدروسة حيث اعتمد رمز محدد لكل سلالة.

الصنف	الرمز	المواصفات
الصنف أكساد 176	1	معتمد في سورية، سداسي الصفوف، لون السنبلة والحبوب أبيض.
السلالة أكساد 1420	2	ثنائية الصف، لون السنبلة أبيض، لون الحبوب أبيض.
السلالة أكساد 1614	3	ثنائية الصف، لون السنبلة أبيض، لون الحبوب أبيض.
السلالة أكساد 1630	4	سداسية الصفوف، لون السنبلة أبيض، لون الحبوب أبيض.
السلالة أكساد 1632	5	سداسية الصفوف، لون السنبلة أبيض، لون الحبوب أبيض.
السلالة أكساد 1670	6	سداسية الصفوف.
الصنف عربي أبيض	7	محلي قديم، ثنائي الصف، من أكثر الأصناف انتشارا في القطر.
الصنف عربي أسود	8	صنف محلي قديم، ثنائي الصف، يأتي في المركز الثاني.

الإيثانول ضمن جهاز المجفف بالتفريغ و الحرارة dry block Heater نوع Lab-tech ثم أذيب الحمض النووي DNA في محلول TE المعقم.

2 .2 .2.التقدير الكمي والنوعي للحمض النووي DNA بواسطة الأشعة فوق البنفسجية

أستخدم جهاز (BIO-TEK Power WaweXTM Instruments, Inc.) لتقدير كمية الحمض النووي DNA وتحديد نقاوته حيث يعتمد الجهاز في عمله على قياس كمية الحمض النووي الموجودة عن طريق تقديره لامتصاص الحمض النووي DNA للأشعة فوق البنفسجية بموجات طولها 260 و 280 نانومتر. حيث ذكر Maniatis وأخرون عام 1982 أن النسبة بين قراءة الموجة 260 نانومتر والموجة 280 نانومتر OD 260/ OD 280 تساعد في تقدير نقاوة الحمض النووي إذ يجب أن تتراوح هذه النسبة بين 1,8-2.

ثم مددت عينات الدنا للحصول على تركيز 40 نانوغرام /ميكرولتر كما تم التقدير النوعي على هلامة Agarose بتركيز 0,8%، إذ يظهر الحمض النووي DNA ذو النوعية الجيدة على شكل حزمة Band، بينما يكون الحمض النووي DNA سيء النوعية مبعثراً وغير واضح الحدود Smear.

2.2 . 3. تقنية الـ ISSR المطبقة لإجراء الدراسة الجزيئية

تضمنت هذه الدراسة تطبيق تقنية ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) (جدول 2) والتي تعتمد بشكل أساسي على تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) Polymerase Chain Reaction وتتميز هذه التقنية عن التقنيات الأخرى بسهولتها وسرعتها فهي لا تتطلب وقت طويل(Williams *et al*., 1990) بالإضافة إلى ما تملكه هذه التقنية من وثوقية وتخصصية عالية كونها تحتاج لبادئات ذات عدد أسس كبير ويتم بهذه التقانة تضخيم الحمض النووي DNA حيث يتم خلال تفاعل البلمرة إكثار قطعة من الحمض النووي DNA والحصول على عدد كبير من السلاسل الجديدة.

أجري تفاعل البيسرة PCR وفقاً لـ (Williams *et al*., 1990) مع اضافة بعض التعديلات فكان حجم التفاعل النهائي (25 ul) ، حيث يتضمن (12.5 µl) Green Master mix، وبادئة بتركيز (10 µM) (Fermentas) وDNA بتركيز (40 mg) ويكمل الحجم إلى (25 µl) بالماء المقطر المعقم ، ويتم هذا التفاعل في جهاز التدوير الحراري من شركة (APOLLO, USA) موديل ATC401 وفقاً للظروف التالية :

جدول رقم (2) : التسلسل النكليوتيدي للبادئات المختبرة في تقانة ISSR

البادئة	التسلسل النكليوتيدي	درجة الالتحام
ISSR-2	(GA)8C	52
ISSR-3	(CA)8A	50
ISSR-4	(CA)8C	52
ISSR-5	(AC)8T	50
ISSR-6	(GA)8CG	56
ISSR-9	(AC)8GG	56
ISSR-14	CCAG(GT)7	56
ISSR-18	C(CT)4(GT)4G	56
ISSR-32	(GT)8G	52
ISSR-33	(GT)8 A	50
ISSR-34	(CT)8G	50
ISSR-36	(CA)8CC	56
ISSR-40	(AC)8TT	50
ISSR-43	(AG)9	54

1- الانفصال : عند درجة حرارة 94 ْم لمدة 5 دقائق ليتم انفصال سلسلتي الحمض النووي DNA.

2- 35 دورة تتضمن كل منها المراحل التالية :

التحطم : يتم عند حرارة 94 ْم لمدة 30 ثانية .

الالتحام : عند حرارة 51 ْم لمدة دقيقة واحدة .

الاستطالة : عند حرارة 72 ْم لمدة دقيقة .

3- اكتمال التفاعل عند حرارة 72 ْم مدة عشر دقائق .

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

2. 2 .4 .التفريد الكهربائي والتلوين والتصوير

تم الترحيل على هلامة الآغاروز 2% بمرور حقل كهربائي قدره 100 فولط ولمدة ساعتين ونصف وذلك لفصل حزم الحمض النووي DNA الناتجة عن التضخيم وفق ما يلي:

- تم إضافة 2 g من الآغاروز لـ 100 ml من المحلول المنظم buffer TBE 1X (200 ml 5X TBE ،(EDTA buffer-Tris-acetate) buffer +1800 ml distilled water)

5X TBE buffer (54 g Tris borate + 27.2 g Boric acid + 20 ml 0.5 EDTA,pH 8.0)

ثم إضافة 5µl من صبغة الايثيديوم بروماید (50 mg/ml) كما يتم حقن عينة من مؤشر الحمض النووي (DNA) 100-bpمن شركة (Fermentas, Germany) وذلك لتحديد الحجم الجزيئي للحزم الناتجة ليتم بعد ذلك الترحيل.

2 .3. التحليل الإحصائي Statistical analysis :

جمعت نتائج عملية التضخيم في جداول اعتماداً على مقارنة وجود أو غياب حزم الحمض النووي DNA بين الطرز الوراثية المدروسة، حيث أعطي الرقم (1) عند وجود حزمة الحمض النووي DNA والرقم (0) لعدم وجود الحزمة، ذلك يتضمن الحزم الواضحة فقط وقد نظمت الجداول لكل بادئة على حداً، ورسمت شجرة القرابة الوراثية Dendrogram بتطبيق متوسطات المجموعات الزوجية غير المزانة UPGMA Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averaging باستخدام برنامج Pop gene 1.31 الإحصائي.

3.النتائج والمناقشة:

3. 1. ا لدراسة الوراثية على مستوى الحمض النووي DNA

تم استخلاص الحمض النووي DNA من البادرات الفتية بعمر 2-3 أسابيع وقيس تركيزه ونقاوته بجهاز المطياف الضوئي حيث تراوحت التراكيز بين 0.56 و 1 ميكروغرام /ميكروليتر ونقاوة العينات بين 1.8-2، ومدد تركيزالحمض النووي DNA ليصبح 40نانوغرام/ميكروليتر نانوغرام/ميكروليتر، وطبقت عمية الرحلان الكهربائي على هلامة الآغاروز بتركيز 0.8 % لمعرفة نوعية الحمض النووي DNA المستخدم (شكل 1).

ثم طبقت تقنية ISSR فتم اختبار 14 بادئات. فأعطت هذه البادئات حزم واضحة وذات تعددية شكلية كما يبين الشكل(2) هذه الحزم . (1) الصنف 176، (2) الصنف 1420، (3) الصنف 1614، (4) الصنف 1630، (5) االصنف 1632 (6) الصنف 1670، (7) الصنف عربي أبيض، (8) الصنف عربي أسود.

3. 2.التعددية الشكلية polymorphism الناتجة عن تطبيق تقنية ISSR

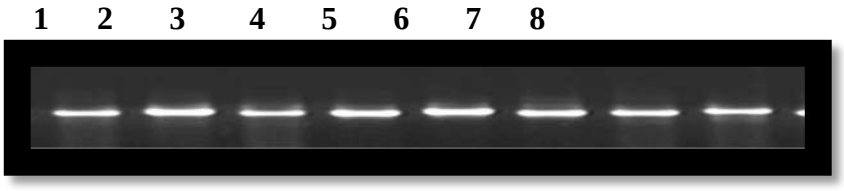
تضمنت الدراسة (جدول 3) اختبار ستة طرز وراثية من الشعير إضافة إلى الصنفين عربي أبيض وعربي أسود التي استخدمت كشواهد. كما أن جميع البادئات المستخدمة أعطت منتجات تضخيم في تفاعل البلمرة المتسلسل حيث أثبتت البادئات المستخدمة فعاليتها في إعطاء تعددية شكلية بين الأصناف المدروسة والشاهد و قد نجم عن استخدام هذه البادئات ما مجموعه 71 أليل (قرين)، حيث أعطت جميع هذه البادئات تعددية شكلية polymorphic و نسبة التعددية 86,40 % ، تراوح عدد الحزم لكل بادئة بين 2 حزمة كأقل عدد مع البادئة (ISSR-34) و7 حزم كأعلى عدد مع البادئات (ISSR- 9-4-43) بمتوسط 5 حزم لكل بادئة. وكانت النسبة المئوية للتعددية الشكلية قد تراوحت بين 66,6 و 100%

جدول (3): رموز البادئات المستخدمة، عدد الحزم الكلية والمتباينة، النسبة المئوية للتعددية الشكلية % وحجم الحزم في الأنواع المدروسة.

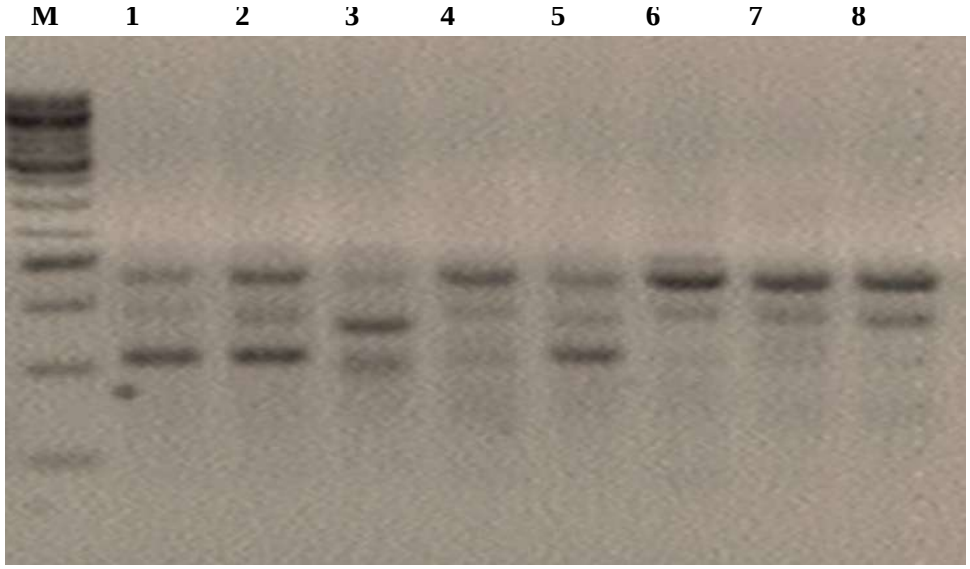
	عدد الحزم الكلي	عدد الحزم ذات التعددية الشكلية	النسبة المئوية% للتعددية الشكلية
ISSR-9	7	7	100
ISSR-32	4	3	75
ISSR-33	4	4	100
ISSR-34	2	1	50
ISSR-4	7	5	71.42
ISSR-2	6	5	83.33
ISSR-3	6	6	100
ISSR-5	5	4	80
ISSR-6	6	6	100
ISSR-14	3	2	66.66
ISSR-18	4	4	100
ISSR-36	4	4	100
ISSR-41	6	5	83.33
ISSR-43	7	7	100
المجموع	71	63	86.40

3.3. تحديد درجة القرابة الوراثية بين الأنواع المدروسة:

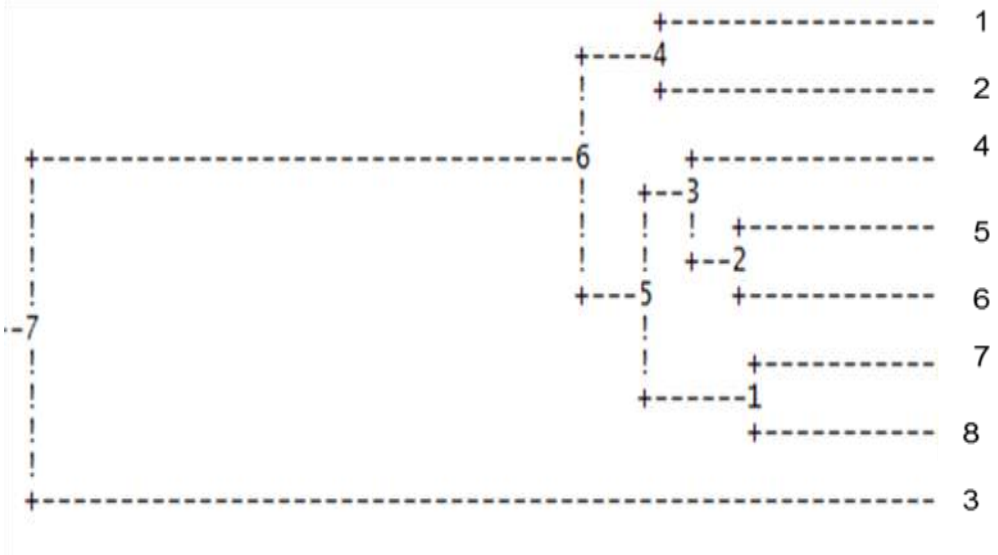
يفيد تحديد درجة القرابة الوراثية ضمن الأنواع في برامج تربية النبات، لتأمين قاعدة وراثية كبيرة، للاستفادة منها في برامج التهجين. وتمت دراسة العلاقة الوراثية بين الطرز الوراثية المدروسة بتطبيق مصفوفة النسب المئوية لعدم التوافق Percent Disagreement Values (PDV) حيث أن ارتفاع قيم هذه المصفوفة يدل على وجود اختلاف وراثي وبازديادها يزداد التباين الوراثي بين النباتين المدروسين ويتم إنشاء هذه المصفوفة وفقاً لعدد وحدات التضاعف المشتركة.



الشكل(1):هلامة الآغاروز بتركيز 0.8% لتحديد نوعية الحمض النووى.D.N.A



الشكل (2): صورة هلامة الآغاروز 2% لملاحظة التعددية الشكلية الناتجة عن استخدام البادئة(ISSR-32-33) في جميع الطرز المدروسة والشاهد، M يمثل المؤشر الجزيئي لتحديد أوزان وأحجام حزم الحمض النووي DNA .



الشكل (3) : التحليل العنقودي Cluster Analysis للأنواع المدروسة والشاهد، الناتج عن استخدام تقنيةISSR.
حيث أن: 1)- الطراز 176، 2)- الطراز 1420، 3)- الطراز 1614، 4)- الطراز 1630،
5)- الطراز 1632، 6)- الطراز 1670، 7)- عربي أبيض، 8)- عربي أسود.

جدول (4) : مصفوفة النسب المئوية لعدم التوافق (PDV) بين الأصناف المدروسة والشاهد والناتجــة عن تطبيق متوسطات المجموعات الزوجية غير المزانة UPGMA بتطبيق تقانة الـ ISSR.

	1	2	3	4	5	6	7	8
1	****							
2	0.2553	****						
3	0.7363	**0.8615**	****					
4	0.2737	0.3915	0.8287	****				
5	0.2553	0.3309	0.7363	0.2373	****			
6	0.3507	0.4340	0.8287	0.2196	0.2022	****		
7	0.2373	0.3114	0.7662	0.2196	0.2737	0.2553	****	
8	0.2924	0.3709	**0.8615**	0.2737	0.3309	0.2737	**0.1683**	****

حيث أن:

1)- الطراز 176، 2)- الطراز 1420، 3)- الطراز 1614، 4)- الطراز 1630، 5)- الطراز 1632، 6)- الطراز 1670، 7)- عربي أبيض، 8)- عربي أسود.

نلاحظ من خلال الجدول (4) أن أقل قيمة لـ PDV هي 0,16 بين الصنف 7 والصنف 8، بينما كانت أعلى قيمة لها هي 0,86 بين الصنف 3 والصنفين2 ، 8 مما يدل على وجود تباين وراثي كبير بينها.

4.3.التحليل العنقودي Cluster analysis للأنواع المدروسة والشاهد الناتج عن استخدام تقنية ISSR:

يسمح التحليل العنقودي بتقسيم الأنواع المدروسة إلى مجموعات، وتعكس هذه المجموعات درجة القرابة الوراثية فيما بينها، وقد تتجمع العينات ضمن مجموعة واحدة بناءاً على موطنها الأصلي أو بناءاً على أصلها ونسبها.

أجري التحليل العنقودي للنتائج التي تم الحصول عليها وذلك لإنشاء شجرة القرابة الوراثية Dendrogram لتحديد درجة القرابة الوراثية ورسم شجرة القرابة الوراثية بين الأصناف المدروسة والشواهد. ولوحظ من الشكل (3) أن شجرة القرابة الوراثية انفصلت إلى عنقودين، ضم العنقود الأول الطراز الوراثي 3، في حين ضم العنقود الثاني الطرز الوراثية 1، 2، 4، 5، 6، 7 و8. كما انفصل العنقود الثاني إلى تحت عنقودين، ضم تحت العنقود الأول الطرز الوراثية 1و 2، في حين ضم تحت العنقود الثاني الطرز الوراثية 6، 5، 4 والصنفان 7 و8.

كان الصنفان 7 و8 الأقرب إلى بعضهما البعض ببعد وراثي (8,41)، ثم الطرازين 5 و 6 ببعد وراثي(10,11)

- أظهرت تقنية ISSR تعددية شكلية Polymorphism في إظهار التباينات الوراثية بين الطرز الوراثية حيث بلغت نسبة التعددية الشكلية 86,40 %.
- انفصل الطراز الوراثي 1614 عن بقية الطرز والأصناف في شجرة القرابة الوراثية.
- كان الصنفان عربي أبيض وعربي اسود هما الأقرب وراثياً، حيث أنها أصناف معتمدة وتستنبط منها الأصناف والطرز الأخرى.

التوصيات

1 - تحديد المورثات المسؤولة عن تحمل الإجهاد الجفافي وذلك باستخدام RT- PCR.

2 - عزل البروتينات المسؤولة عن تحمل الصدمة.

4. المراجع

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

شاهرلي، مخلص؛ الأوبري، خالد؛ نابلسي، غسان ومولوي، بسام.(1995). أولويات حفظ المصادر الوراثية البرية في سوريا، دمشق، سوريا.

REFERENCES

Ayad W.G., Hodgkin T., Jaradat A. and Rao V.R.(1997). Molecular genetic techniques for plant genetic resources. Report for an IPGRI workshop, IPGRI, Rome, Italy, P.p. 11-12.

Bornet B. and Branchard M.(2001). Non-anchored inter-simple sequence repeat (ISSR) markers: reproducible and specific tools for genome fingerprinting. Plant Molecular Biology Reporter 22:427–432.

Bornet B. Goraguer F., Joly G. and Branchard M. (2002). Genetic diversity in European and Argentinean cultivated potatoes (*Solanum tuberosum* subsp. tuberosum) detected by inter-simple sequence repeats (ISSRs). Genome 45: 481-484.

Boyer J.S.(1982). Plant productivity and environment . Science 218,443-448 .

Chowdhury M.A., Vandenberg B. and Warkentin T. (2002). Cultivar identification and genetic relationship among selected breeding lines and cultivars in chickpea (*Cicer arietinum* L.). Euphytica 127:317–325.

Fernandez M.E., Figueiras A.M. and Benito C. (2002). The use of ISSR and RAPD markers for detecting DNA polymorphism, genotype identification and genetic diversity among barley cultivars with known origin. Theoretical and Applied Genetics 104: 845–851.

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

Joshi S.P., Gupta V.S., Aggarwal R.K., Ranjekar P.K. and Brar D.S. (2000). Genetic diversity and phylogenetic relationship as revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) polymorphism in the genus *Oryza*. Theoretical and Applied Genetics 100:1311–1320.

Karp A., Kresovich S., Bhat, Ayad W. G. and Hodgkin T. (1997). Molecular tools in plant genetic resources conservation: a guide to the technologies. 1st ed. IPGRI Technical Bulletin NO. 2. IPGRI, Rome, Italy, Pp. 9-21.

Lane A. (2007). An introduction to crop wild relatives, Geneflow, Publication about Agricultural Biodiversity, Bioversity International, p:19.

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

Mullis K. S. Faloona, Scharf S., Saiki R., Horn G., and Erlich H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: The polymerase chain reaction. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 51:263-273.

Nagaoka T. and Ogihara Y. (1997). Applicability of inter-simple sequence repeat polymorphisms in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers. Theoretical and Applied Genetics 94: 597–602.

Powell W., Morgante M., Doyle J.J., Mcnical J., Tingey S.V. and Rafalski A.J. (1996). Genepool variation in genus *Glycine subgenus Soja* Revealed by polymorphic nuclear and chloroplast microsatellites, Genetics 144:793-803.

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

Rafalski J.A., Vogel, Morgante M., Powell W., Andre C. and S.V. Tingey (1996). Generating and using DNA markers in plants. No mammalian Genomic Analysis: A Practical Guide. 4:75-134.

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

Saiki R. K., Scharf S., Faloona F., Mullis K. B., Horn G. T., Eriich H. A. and Amheim N. (1985). Enzymatic amplification of b-globulin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anaemia. Science 230:1350-1354.

Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.T., Mullisand K.B. and Eriich H.A. (1988). Prime-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase Science 239:487-491.

Tragoonrung S., Kanazin V., Hayes P.M. and Blake T.K. (1992). Sequence tagged site facilitated PCR for barley genome mapping. Theor. Appl. Genet. 84:1002-1008.

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

Ziekiewicz E., Rafalski A. and Labuda A. (1994). Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) anchored polymerase chain reaction amplification. Genomics 20:178–183.