

تحديد درجة القرابة الوراثية بين بعض الطرز المدخلة من العدس (*Lens culinaris Medic*)

## باستخدام تقنية ISSR

عبير سعيد علي<sup>1\*</sup> حسين المحاسنة<sup>2</sup> سلام لاوند<sup>3</sup><sup>1\*</sup> طالب دكتوراه، كلية الزراعة/جامعة دمشق، محاصيل حقلية، [abeer\\_ali\\_saed@hotmail.com](mailto:abeer_ali_saed@hotmail.com).<sup>2</sup> أستاذ، كلية الزراعة/جامعة دمشق، فزيولوجيا المحاصيل الحقلية، [hussain\\_1974h@hotmail.com](mailto:hussain_1974h@hotmail.com).<sup>3</sup> أستاذ مساعد، كلية الزراعة/جامعة دمشق، قسم المحاصيل الحقلية، التقانات الحيوية، [lawand@yahoo.com](mailto:lawand@yahoo.com).[.salam](mailto:salam)

## الملخص:

أجريت الدراسة لتحديد درجة القرابة الوراثية بين طرز العدس المدروسة المزروعة (14 طرازاً من من طرز العدس المدخلة + صنفى أدلب3 وأدلب4) باستعمال تقنية ISSR، حيث استخدم لهذا الغرض 14 بادئة من البادئات، أثبتت فعاليتها في إعطاء تكددية شكلية بين الطرز الوراثية المدروسة، ونجم عن استعمالها 66 حمزة، بلغ متوسط عدد الحزم 4.57 حمزة لكل بادئة. وبلغ متوسط النسبة المئوية للتكددية الشكلية 97.14%. وتراوح متوسط معامل التكددية الشكلية (PIC) بين 0.3432 و 0.4998، وبلغ المتوسط العام لقيمة PIC 0.4650، حيث أثبتت البادئات المستخدمة قدرتها على التمييز بين الطرز الوراثية المدروسة. وقد تبين إن أقل قيمة لمصفوفة التوافق (PAV) هي 0.7176 بين الطرازين X2011s\_226\_6 و ILL8006 ما ما يدل على وجود تباين وراثي كبير بينهما، بينما كانت أعلى قيمة لمصفوفة التوافق PAV نحو 0.8657 هي بين الطرازين X2011s\_242\_230\_3 و X2013\_21\_2، ما يدل على إنهما على درجة كبيرة من القرابة الوراثية.

انفصلت درجة القرابة الوراثية إلى عنقودين رئيسين، ضم العنقود الأول معظم الطرز الوراثية المدروسة بينما ضم العنقود الثاني الطراز الوراثي X2011s\_130\_1.

**الكلمات المفتاحية:** العدس، القرابة الوراثية، التكددية الشكلية، ISSR.

تاريخ الإيداع: 13/7/2023

تاريخ القبول: 2023/9/14



حقوق النشر: جامعة دمشق -

سورية، يحتفظ المؤلفون بحقوق

النشر بموجب الترخيص

CC BY-NC-SA 04

## Determining The Degree of Genetic Kinship Between Some entered Lentil Genotypes (*Lens culinaris Medic*) Using ISSR Technique

Abbeer Saed Ali\*<sup>1</sup> Hussain Almahasneh<sup>2</sup> Salam Lawand<sup>3</sup>

\*1PhD student, Field Crop Science, Faculty of Agriculture Engineering, Damascus University, [abbeer\\_ali\\_saed@hotmail.com](mailto:abbeer_ali_saed@hotmail.com)

<sup>2</sup> Professor, Damascus University, Filed crop physiology, Faculty of Agricultural Engineering, [hussain\\_1974h@hotmail.com](mailto:hussain_1974h@hotmail.com).

<sup>3</sup> Assistant Professor, Damascus University, Faculty of Agricultural Engineering, [salam\\_lawand@yahoo.com](mailto:salam_lawand@yahoo.com).

### Abstract:

In the genetic study that was conducted to determine the degree of genetic kinship between the studied Lentil genotypes (14 entered genotypes + tow variety Idlib3 and Idlib4) using ISSR technique, a total number of 14 primer were used for this purpose which had proved its effectiveness in giving polymorphisms among the studied genotypes, as they resulted 66 bands. the average number of primer was 4.576 band per primer. The average polymorphisms percentage was 97.14%. The polymorphism information content (PIC) ranged from 0.3432 to 0.4998 with an average of 0.4650, as the used primers proved their ability to distinguish between the studied genotypes. It was found the percent agreement values (PAV) is 0.7176 among the two genotypes X2011s\_226\_6 and ILL8006 as the lowest value of PAV, which indicates that there is indicates that they have a large variation of genetic relationship between them, while the highest value of PAV was 0.8657 between the two genotypes, X2011s\_242\_230\_3 and X2013\_21\_2, which indicates that there is a large genetic degree between them.

Genetic kinship tree split into two main branches; the one branch included studied genotypes while the second branche included the genotypes X2011s\_130\_1.

**Key Words:** Lentils, Genetic Kinship, Polymorphism Information, ISSR.

Received:13/7/2023

Accepted:14/9/2023



**Copyright:**Damascus University- Syria, The authors retain the copyright under a CC BY- NC-SA

**:Introduction and literature review** المقدمة والدراسة المرجعية

ينتمي العدس إلى العائلة البقولية (Fabacea/Leguminosea)، والجنس Lens الذي يضم أنواعاً مختلفة، ويعد العدس (*Lens culinaris Medik.*) نبات بقولي ثنائي الصيغة الصبغية ( $2n=2X=14$ ) ذاتي التلقيح (1,2017, *et al, Rodda*). وهو من أقدم النباتات المستأنسة بالعالم، موطنه الأصلي شرق ووسط آسيا، ويُزرع بشكلٍ تقليدي في منطقة حوض المتوسط (354, 2014, *Musco et al*)، وتمثل ما يقارب 27% من إنتاج المحاصيل في العالم (2020, *Coyne et al*). وقد تبين أن الواسمات الجزيئية أداة موثوقة لدراسة التباين الوراثي في المحاصيل (1, 2018, *Pandey et al*). تُعدّ تقنية Inter Simple Sequence Repeats (ISSR) واحدة من التقنيات المهمة حيث طُبقت من قبل (1994, *Ziekiewicz et al*)، وهي تعتمد على تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) (Polymerase Chain Reaction) الذي يضخم منطقة تكرارات المقاطع الداخلية البسيطة، حيث يُستخدم بادئٌ وحيدٌ مؤلفٌ من قطع متكررة ومحاط في بعض الأحيان بـ 2 إلى 4 نيكليوتيدات إما في المنطقة '3' أوفي المنطقة '5'. تُوصف تقنية ISSR بأنها أكثر تكراريةً من تقنية RAPD بسبب طول البادئ المستخدم والذي يعكس درجة حرارة عالية لمرحلة التحام البادئ (319, 2002, *Chowdhury et al*).

استخدم (575, 2015, *Gore et al*) 23 بادئةً من بادئات ISSR ونجم عن استخدامها 368 حزمة، تراوح عدد الحزم الكلية بين 16 حزمة كحد أدنى مع البادئة ISSR-34 و 20 حزمة كحد أعلى مع البادئات ISSR-835. تراوح متوسط معامل التعددية الشكلية PIC بين 0.02 إلى 0.80.

قام (162, 2015, *Baloch et al*) بإجراء دراسة تم فيها التوصيف الجزيئي لـ 50 سلالة مدخلة في تركيا تنتمي إلى 6 أنواع برية ونوع واحد مزروع، استخدم 10 بادئات نتج عنها 151 حزمة منها 150 حزمة ذات تعددية شكلية (99.3%) بمتوسط 15 حزمة لكل بادئة، اكتشفت البادئات 138 حزمة ذات تعددية شكلية بنسبة (100%) وبمتوسط 13 حزمة لكل بادئة، تراوح متوسط معامل التعددية الشكلية PIC بين 0.90 إلى 0.97.

قامت (عباس وزملاؤها، 2012، 201) بدراسة التنوع الوراثي لـ 11 سلالة من العدس مع صنفين محليين إديلب 3، إديلب 5، وذلك باستخدام 20 بادئ، بلغ عدد الحزم الكلية 157 حزمة منها 125 حزمة متباينة شكلياً بمتوسط تعددية شكلية 77%.

تمت دراسة التنوع الوراثي لـ 46 طراز وراثي من العدس في بريطانيا باستخدام ISSR، بلغت التعددية الشكلية 76%، تم الحصول على 69 حزمة باستخدام 9 بادئات من ISSR، 75.3% منها ذات تعددية شكلية. تراوح PIC بين 0.54 و 0.81 (1918, 2023, *Mammadova et al*).

درس (575, 2018, *Babayeva S et al*) وزملاؤه التنوع الوراثي لـ 47 طراز وراثي من العدس باستخدام 7 بادئات، نتج عنها 71 حزمة منها 62 حزمة ذات تعددية شكلية، تراوح معامل التعددية الشكلية بين 0.61-0.95.

يهدف البحث إلى دراسة درجة القرابة الوراثية بين لبعض طرز العدس المدخلة باستخدام تقنية التكرارات الترادفية البسيطة الداخلية (ISSR).

## مواد البحث وطرائقه

### 1- المادة النباتية Plant material:

تمت الدراسة على 14 طرازاً وراثياً من العدس، وصنفين مزروعين من العدس (إدلب3 وإدلب4)، تم الحصول عليها من الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية في الجمهورية العربية السورية.

الجدول 1: طرز العدس المدروسة.

المتشأ	اسم الطراز	التسلسل
ICARDA	X2011s_242_230_3	1
ICARDA	X2013_21_2	2
ICARDA	x2011s_110_23	3
ICARDA	X2011s_130_1	4
ICARDA	X2013_126_54	5
ICARDA	X2011s_59_20	6
ICARDA	X2011s171_13	7
ICARDA	X2011s_139_4	8
ICARDA	x2011s_171_2	9
ICARDA	X2011s_129_13	10
ICARDA	X2011s133_119_15	11
ICARDA	X2011s_226_6	12
ICARDA	ILL2245	13
ICARDA	ILL8006	14
GCSAR	الصنف المعتمد إدلب-3	15
GCSAR	الصنف المعتمد إدلب-4	16

حيث أن:

ICARDA: المركز الدولي للبحوث الزراعية في المناطق الجافة.

GCSAR: الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية في الجمهورية العربية السورية.

### 2- مكان تنفيذ البحث Site of Experiments :

تم تنفيذ التجربة في مخبر التقانات الحيوية التابع لقسم المحاصيل الحقلية، كلية الزراعة، جامعة دمشق.

**3- طريقة العمل:****1-استخلاص الحمض الريبي النووي DNA بطريقة SDS:**

سُحَّح للبادرات بالنمو في أطباق بتري تحوي ماء مقطر وتم استخلاص الحمض النووي DNA من البادرات الفتية بعمر 2 إلى 3 أسابيع بطحن 1غرام من الأوراق الخضراء باستخدام الآزوت السائل حتى الحصول على مسحوق ناعم، نقلت بعدها إلى أنابيب ايندروف سعة 2ml وأضيف لها 1ml من محلول الاستخلاص SDS و المكون من: (0.1M Tris-HCl، PH=8.2، 50mM EDTA، 2% SDS، 0.1M NaCl، 1mg/ml proteinase K.، ثم حضنت العينات لمدة 60 دقيقة مع التحريك المستمر ضمن حمام مائي عند 37 م°. أضيف 10m من مزيج كل من كلوروفورم/أيزواميل كحول بنسبة 1:24. نقل المزيج إلى أنبوب تثقيب سعة 2ml وثقل المزيج (عملية الطرد المركزي) لمدة 10 دقائق بسرعة (10000 rpm) بدرجة حرارة 4 م°. أضيف الإيزوبروبانول Iso-propanol بمعدل 3/2 من حجم الوسط المائي، ثم نقل الحمض النووي (DNA) المترسب إلى أنبوب صغير سعة 2ml وأضيف 0.5ml من محلول الغسيل Washing buffer (كحول إيثيلي 76%) البارد (المحفوظ بدرجة 20 م°) تمّ التثقيب بسرعة (10000 rpm) لمدة 10 دقائق وبدرجة حرارة 4 م°. أنببت عينات الحمض النووي (DNA) في 500µl من المحلول المنظم TE المكون من (10 mM Tris-HCl) 1mM EDTA. وتم التخلص من الحمض النووي RNA بإضافة 2µl من أنزيم RNase (10mg/ml) والتحصين على درجة (37 م°) مدة نصف ساعة. استخدم جهاز المقياس الطيف الضوئي (Power WaweXTM BIO-TEK Instruments) لتقدير كمية الحمض النووي DNA وتحديد نقاوته، حيث يعتمد الجهاز فيعمل على قياس كمية الحمض النووي الموجودة عن طريق تقديره لامتماص الحمض النووي DNA للأشعة فوق البنفسجية بموجات طولها 260 و280 نانومتر. حيث ذكر (Maniatis et al, 1982, 2) أن النسبة بين قراءة الموجة 260 نانومتر والموجة 280 نانومتر تساعد في تقدير نقاوة الحمض النووي إذ يجب أن تتراوح هذه النسبة بين 1.8 و2. وطبقت عملية الرحلان الكهربائي على هلامة الآجاروز بتركيز 0.8% لمعرفة نوعية الحمض النووي DNA المستخدم. ثم مدد تركيز الحمض النووي DNA ليصبح 40 µg/µl.

**2-تطبيق تقنية ISSR:** استخدم في الدراسة 14 بادئةً وأجري تفاعل البلمرة المتسلسل PCR وفقاً ل Williams et al,

1990, 6533 مع بعض التعديلات (جدول 2)

اسم البادئة	التسلسل النكليوتيدي للبادئات 3' → 5'	درجة حرارة الالتحام م°
ISSR16	ACACACACACACACATATAT	54
ISSR19	CACACACACACACACAAC	54
ISSR21	ACACACACACACACACGG	56
ISSR22	CCAGGTGTGTGTGTGTGT	56
ISSR23	CCTCTCTCTGTGTGTGTG	56
ISSR25	ACACACACACACACACGG	56
ISSR26	GGTCACACACACACACAC	56
ISSR27	GAGAGAGAGAGAGAGACTT	56
ISSR28	ACACACACACACACACCTT	56
ISSR32	AGAGAGAGAGAGAGAGT	52
ISSR35	CACACACACACAACAG	52
ISSR37	TGTGTGTGTGTGTGTGG	52
ISSR40	ACACACACACACACACTT	52
ISSR41	ACACACACACACACACGG	56

فكان حجم التفاعل النهائي (25 µl) باستخدام 2x Master mix وتم الحصول عليها من شركة Fermentas-Germany،

ويكون التفاعل 2 µl من البادئ بتركيز (10 mM)، و 12.5 µl من 2x Green master mix، و 8.5 µl ماء مقطراً، و

DNA بتركيز (40µg/µl) ، وتم هذا التفاعل في جهاز التدوير الحراري وفقاً للظروف التالية :

1. الانفصال عند درجة حرارة 94 م° لمدة 5 دقائق.

2. 40 دورة تتضمن كل منها المراحل التالية:

• انفصال عند درجة حرارة 94 م° مدة 30 ثانية.

- التحام حسب درجة حرارة البادئات الموجودة في الجدول 2 وذلك لمدة دقيقة واحدة كما في الجدول (2).
- استطالة عند درجة حرارة 72 م° لمدة دقيقة.

3. اكتمال التفاعل عند درجة حرارة 72 م° مدة عشر دقائق.

ثم حفظت العينات في درجة حرارة 4 م° ، بعد ذلك تم الترحيل على هلامه الأجاروز.

### 3- الرحلان الكهربائي والتلوين والتصوير:

تم الترحيل على هلامه الأجاروز 2% في المحلول المنظم TBE 1X

(10X TBE buffer = (108g Tris borate + 55g Boric acid + 9.2g EDTA)

pH=8 والمضاف إليها 5 µl من صبغة الإيتيديوم برومايد (50 µg/µl) حيث تحمل عينات الحمض النووي DNA على هلامه

الأجاروز بإضافة 5 µl من سائل التحميل الخاص Bromophenol blue 1X loading buffer والمكون من:

(15% Ficoll 400 + 1.03% bromophenol blue + 0.03% Xylene cyanol + 0.4% orange G + 10mM Tris-Hcl + 50mM EDTA).

كما تم حقن مؤشر من الحمض النووي (DNA) 1Kpb من شركة (Germany, Fermentas)، وكذلك لتحديد الحجم والوزن

الجزئي للحزم الناتجة، وتم بعد ذلك الترحيل بمرور حقل كهربائي قدره 100 فولط وذلك لفصل حزم الحمض النووي DNA

الناتجة عن عملية التضخيم. وصورت الهلامه بجهاز تصوير هلامه الأجاروز Image Analyzer.

### التحليل الإحصائي Experimental design:

أُستخدمت البرامج الإحصائية الخاصة بالتقانات الحيوية لتحليل النتائج، فُجِّعت نتائج عملية الرحلان الكهربائي في جداول

مخصصة، اعتمداً على مقارنة وجود أو غياب حزم الحمض النووي DNA بين النباتات، أُعطي الرقم (1) عند وجود

حزمة DNA ذات وزن جزئي محدد عند أي طراز، والرقم (0) عند غيابها، ونُظِّمت الجداول لكل بادئة على حده.

حُدِّت درجة القرابة الوراثية، ورُسمت شجرة القرابة الوراثية Dendrogram بين طرز العدس المدروسة بتطبيق طريقة التحليل

العنقودي Cluster analysis، باستخدام برنامج Popgene الإحصائي يسمح التحليل العنقودي بتقسيم الطرز المدروسة إلى

مجموعات تعكس درجة القرابة الوراثية فيما بينها، فمن الممكن إنَّ تتجمع العينات ضمن مجموعة واحدة بناءً على موطنها الأصلي، أو بناءً على أصلها ونسبها، ولهذا شكَّلت مصفوفة النسب المئوية للتوافق (PAV) Percent Agreement Values، وقد تمَّ إنشاء هذه المصفوفة وفقاً لعدد وحدات التضاعف المشتركة بتطبيق متوسطات المجموعات الزوجية غير المزائجة Sokal و Sneath) Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averaging (UPGMA) حسب (1973)، يدل انخفاض قيم هذه المصفوفة على وجود اختلاف وراثي، وبازديادها يزداد التباين الوراثي بين العينات المدروسة (Nei, 1987, 17). وحُسبت قيم معامل التعددية الشكلية (PIC) PolimorphHism Information Content للبادئات المستخدمة وفق المعادلة:  $PIC = \{\sum 2P_i (1-P_i)\}$ ،  $P_i$  تكرارية الحزم الناتجة عن استخدام البادئ من جميع العينات المدروسة (Pakseresht *et al* , 2013, 563).

### النتائج والمناقشة:

أجريت الدراسة الوراثية لطرز العدس المدروسة باستخدام تقنية ISSR، على مستوى DNA حيث تمَّ تحديد التعددية الشكلية ودرجة القرابة الوراثية و التحليل العنقودي باستخدام تقنية الـ PCR. حيث تمَّ استخلاص الحمض النووي DNA من البادئات الفتية بعمر 2-3 أسابيع، وقيس تركيزه ونقاوته بجهاز المطياف الضوئي.

#### 1-التعددية الشكلية Polymorphism الناتجة عن تطبيق تقنية ISSR في طرز العدس المدروسة:

تم استخلاص الحمض الريبسي النووي منقوص الأوكسجين DNA باستخدام المطياف الضوئي حيث تراوحت نقاوة عينات الحمض النووي المستخلصة بين 1.82 و2، وتراوح تركيز DNA بين 0.263 و1.61  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ، ثم مددت عينات DNA لتصبح 50  $\text{ng}/\mu\text{l}$  لاستخدامها لاحقاً.

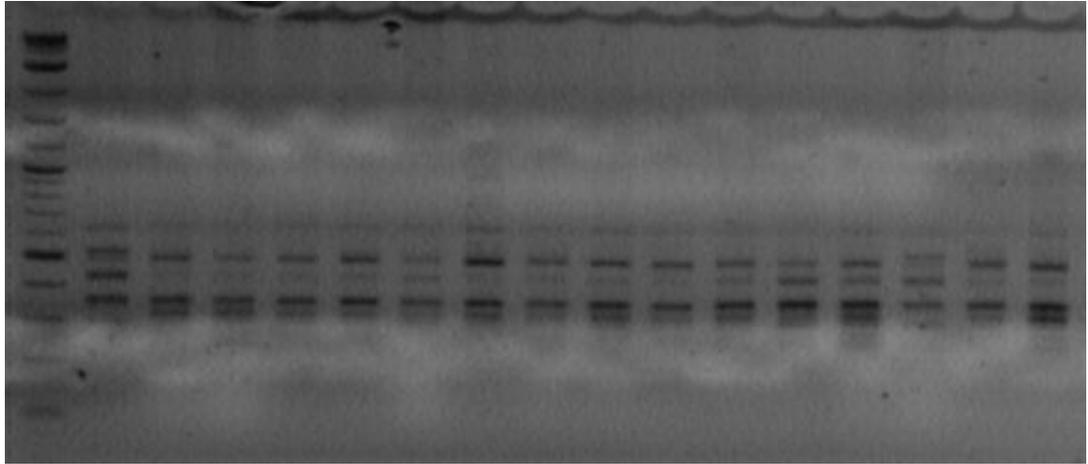
تمَّ تطبيق تقنية التكرارات الترادفية البسيطة الداخلية (ISSR)، حيث تضمَّنت الدراسة اختبار 14 من بادئات تقنية التكرارات الترادفية البسيطة الداخلية ISSR، (الجدول، 3). أظهرت النتائج إنَّ الـ 14 بادئة ISSR أعطت منتجات التضخيم، وأعطت

تعددية شكلية لدى الطرز الوراثية المدروسة، وبلغ عدد الحزم الكلية 66 حزمة، كما بلغ عدد الحزم المتباينة شكلياً 64، وتراوح عدد الحزم الكلية والمتباينة شكلياً بين حزمتين مع البادئة (ISSR-37)، و6 حزم مع البادئات (ISSR25, ISSR28,ISSR32). وبلغت النسبة المئوية للتعددية الشكلية 80% مع البادئات ISSR-41, ISSR-21 و100% مع بقية البادئات المدروسة، وبلغ متوسط النسبة المئوية للتعددية الشكلية 97.14%، وقد تخالفت هذه النتائج مع (شهيناز عباس وزملاؤه، 2022) حيث بلغت النسبة المئوية للتعددية الشكلية 77% وكذلك تخالفت مع (Mammadova Sh.E *et al*، 2023) حيث بلغت النسبة المئوية للتعددية الشكلية 76% بينما توافقت هذه النتائج مع دراسة (Baloch وزملاؤه، 2015) والتي بلغت فيها النسبة المئوية للتعددية الشكلية 99.3%، تراوحت قيم معامل التعددية الشكلية (PIC) من 0.3432 عند البادئات (ISSR-27) كأقل قيمة، إلى 0.4998 عند البادئة (ISSR-21) كأعلى قيمة، وبلغ المتوسط العام لقيمة PIC 0.4650 (الجدول.3، والشكل1)، وقد تخالفت هذه النتائج مع (Mammadova Sh.E *et al*، 2023) والتي تراوح فيها (PIC) بين 0.54 و0.81، وكذلك تخالفت مع

M

(Babayeva S *et al*، 2018) حيث تراوح (PIC) بين 0.61-0.95

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16



الشكل (1): صورة هلامة آجاروز 2% لملاحظة التعددية الشكلية.

:6 ،X2013\_126\_54 :5 ،X2011s\_130\_1 :4 ، X 2011s\_110\_233 ، X2013\_21\_2:2 ، X2011s\_242\_230\_3 :1

،X2011s\_139\_4 :8 ، X2011s171\_13 :7 ،X2011s\_59\_20

،ILL8006 :14 ،ILL2245 :13 ،X2011s\_226\_6 :12 ،X2011s133\_119\_15 :11 ،X2011s\_129\_13 :10 ، X 2011s\_171\_2:9

15: إديلب3، 16: إديلب4

### M معلم جزيئي 1KPB

الجدول (3): رموز البادئات المستخدمة، وعدد الحزم الكلية والمتباينة شكلياً، والنسبة المئوية للتعددية الشكلية، وقيم معامل التعددية الشكلية PIC في الطرز

#### الوراثية من العدس.

اسم البادئة	عدد الحزم الكلية	عدد الحزم المتباينة شكلياً	النسبة المئوية للتعددية الشكلية	معامل التعددية الشكلية PIC
ISSR16	4	4	100	0.3988
ISSR19	4	4	100	000.42
ISSR21	5	4	80	0.4998
ISSR22	4	4	100	000.48
ISSR23	5	5	100	0.4712
ISSR25	6	6	100	0.4712
ISSR26	5	5	100	0.4712
ISSR27	5	5	100	0.3432
ISSR28	6	6	100	0.4872
ISSR32	6	6	100	0.4992
ISSR35	4	4	100	0.4988
ISSR37	2	2	100	0.4800
ISSR40	5	5	100	0.4968
ISSR41	5	4	80	0.4928
المجموع	66	64		
المتوسط	4.71	4.57	97.14	0.4650

## 2- تحديد درجة القرابة الوراثية بين الطرز الوراثية المدروسة: تُمّت دراسة العلاقة الوراثية بين نباتات طرز العدس

المدروسة بتطبيق مصفوفة النسب المئوية للتوافق Percent Agreement Values (PAV)، حيث يدل ارتفاع قيم هذه المصفوفة على وجود قرابة وراثية بين طرازين وراثيين أو أكثر، ويتم إنشاء هذه المصفوفة وفقاً لعدد وحدات التضاعف المشتركة.

يُلاحظ من الجدول (4) إنَّ أعلى قيمة لمصفوفة النسب المئوية للتوافق (PAV) هي 0.8657 بين الطرازين X2011s\_242\_230\_3 و X2013\_21\_2، أي أعلى درجة تشابه، ما يدل على إنَّهما على درجة كبيرة من القرابة الوراثية، تلاهما الطرازين الوراثيين X2013\_126\_54 و X2011s133\_119\_15، بقيمة 0.8611، وكذلك الطرازين X2011s\_139\_4 و إلب3، بينما كانت أقل قيمة نحو 0.7176 بين الطرازين X2011s\_226\_6 و ILL8006، أي أقل درجة تشابه ما يدل على وجود تباين وراثي كبير بينهما، مما تجدر الإشارة إليه بالأهمية الكبيرة لتحديد درجة القرابة الوراثية ضمن الطرز الوراثية المدروسة في برامج تربية النبات لتأمين قاعدة وراثية للاستفادة منها في برامج التهجين والتربية.

الجدول(4): مصفوفة المتوسط العام لنسب للتوافق (PAV) بين طرز العدس المدروسة، الناتجة عن تطبيق متوسطات المجموعات الزوجية غير المزانة UPGMA بتطبيق تقنية ISSR حسب (Nei, 1987).

أدلب ٤	أدلب ٣	ILL8006	ILL2245	X2011s_226_6	X2011s133_119_15	X2011s_129_13	X2011s_171_2	X2011s_139_4	X2011s171_13	X2011s_59_20	X2013_126_54	X2011s_130_1	X2011s_110_23	X2013_21_2	X2011s_242_230_3
0.8148	0.8426	0.8148	0.8426	0.8194	0.8426	0.8102	0.8241	0.8148	0.8426	0.8333	0.8056	0.7917	0.8565	0.8657	****
0.7917	0.8102	0.8009	0.8009	0.7963	0.8194	0.8241	0.7917	0.7546	0.7824	0.8102	0.8380	0.7963	0.8241	****	X2011s_242_230_3
0.8009	0.8287	0.7917	0.8287	0.7963	0.7917	0.7870	0.7824	0.7824	0.8194	0.7917	0.7731	0.7963	****		X2011s_110_23
0.7269	0.8009	0.7269	0.7824	0.8056	0.7824	0.7778	0.7917	0.8009	0.7731	0.7917	0.7731	****			X2011s_130_1
0.7778	0.8148	0.7963	0.7778	0.7731	0.8611	0.8102	0.7963	0.7778	0.7685	0.7870	****				X2013_126_54
0.8056	0.8333	0.7593	0.8056	0.8472	0.8148	0.7917	0.8056	0.7870	0.8426	****					X2011s_59_20
0.8148	0.8241	0.7778	0.8333	0.8009	0.8241	0.7731	0.8056	0.7963	****						X2011s171_13
0.7407	0.8611	0.7593	0.7870	0.7824	0.7778	0.7361	0.7870	****							X2011s_139_4
0.7593	0.7963	0.7593	0.8056	0.7824	0.8148	0.7917	****								X2011s_171_2
0.8009	0.7824	0.8009	0.8102	0.7593	0.8102	****									X2011s_129_13
0.7870	0.8333	0.8241	0.8148	0.7731	****										X2011s133_119_15
0.7731	0.8194	0.7176	0.7731	****											X2011s_226_6
0.8333	0.8426	0.8241	****												
0.8148	0.8333	****													ILL2245
0.8148	****														ILL8006
****															أدلب ٣
															أدلب ٤

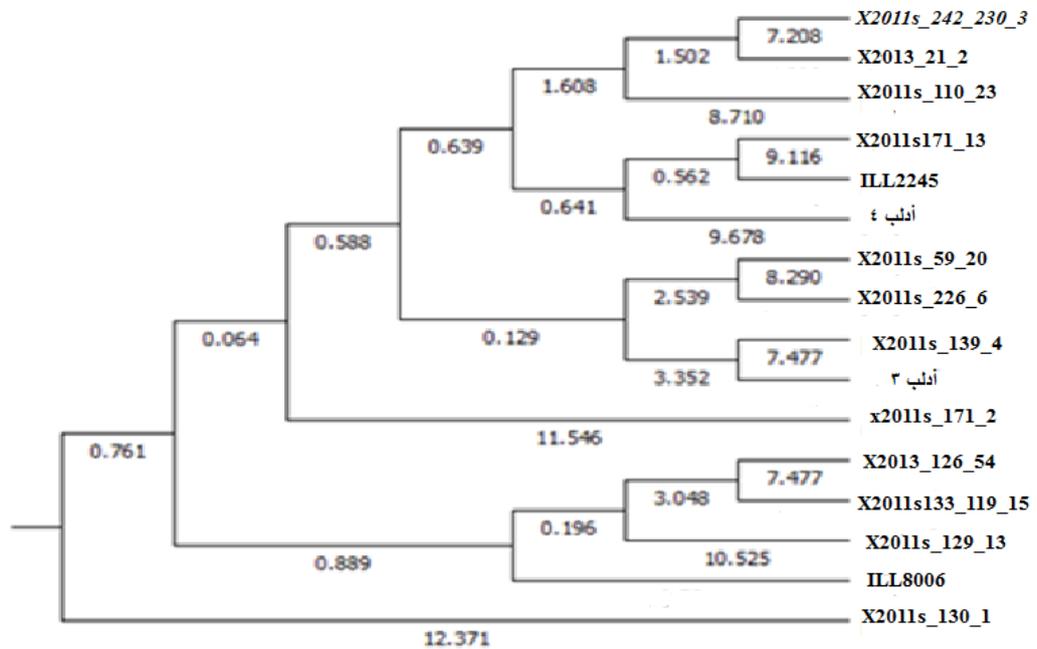
#### 4-4-1-5- التحليل العنقودي Cluster analysis للطرز المدروسة من العدس:

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

أجري التحليل العنقودي للناتج التي تم الحصول عليها وذلك لإنشاء شجرة القرابة الوراثية Dendrogram لتحديد درجة القرابة الوراثية الشكل (2).

توزعت الطرز المدروسة في عنقودين رئيسيين، ضم العنقود الأول Cluster-1 جميع الطرز الوراثية المدروسة عدا الطراز X2011s\_130\_1، حيث كان الطرازين الوراثيين X2011s\_242\_230\_3، X2013\_21\_2 على درجة عالية جداً من القرابة الوراثية، وكذلك الطرازين الوراثيين X2011s171\_13، ILL2245 كانا متقاربين وراثياً بشكل كبير، وأيضاً الطرازين (X2011s\_59\_20، X2011s\_226\_6)، والطرازين (X2011s\_139\_4، أدلب3)، والطرازين (X2013\_126\_54، X2011s133\_119\_15).

ضم العنقود الثاني Cluster-2 الطراز الوراثي X2011s\_130\_1 (الشكل 2) ويمكن من خلال شجرة القرابة الوراثية استخدام الطرز الوراثية المتباعدة وراثياً كأباء ضمن برامج التربية والتحسين الوراثي والتي تؤمن قاعدة وراثية كبيرة.



الشكل (2) شجرة القرابة الوراثية للطرز الوراثية المدروسة من العدس باستخدام تقنية ISSR.

## الاستنتاجات Discussion:

1- أثبتت تقنية ISSR فعاليتها في التمييز بين الطرز الوراثية المدروسة، فتمكنت من إعطاء تعددية شكلية Polymorphic بين طرز العدس الوراثية المدروسة، أعطت منتجات التضخيم قرابة 66 أليلاً، بمتوسط 4.57، وبلغ متوسط النسبة المئوية للتعددية الشكلية نحو 97.14%، وتراوح عدد الأليلات من 2-6 أليلاً، وبلغ المتوسط العام لمعامل التعددية الشكلية (PIC) 0.4650.

2- لوحظ وجود أقل درجة قرابة وراثية بين الطرازين X2011s\_226\_6 و ILL8006 ، بينما كانت أعلى درجة قرابة وراثية بين الطرازين X2011s\_242\_230\_3 و X2013\_21\_2.

## التوصيات Suggestions :

- 1- الاعتماد على تقنية ISSR في القيام بهذه الدراسات على طرز وأنواع أخرى لأنها أظهرت فعاليتها في التباين الوراثي.
- 2- يمكن العمل مستقبلاً على تحديد مواقع المورثات المسؤولة عن الصفات المهمة باستخدام QTLs ، والاستفادة منها في برامج التربية واستخدامها كأباء في عمليات التهجين.

التمويل : هذا البحث ممول من جامعة دمشق وفق رقم التمويل (501100020595).

## المراجع:

1. عباس شهيناز ، القنطار خزامة ، القدسي ينال ، سلوم طوني ، الشعال آلاء، الموسى رحاب (2023). التنوع الوراثي لطرز وراثية من العدس باستخدام تقنية ISSR. مجلة العلوم الحديثة والتراثية: مجلد 10 عدد (3) 2022.
2. Babayeva S., Z. Akparov, L. Amirov, K. Shikhaliyeva, S. Hasanova, K. Rustamov, R. Mirzayev, V. Izzatullayeva, I. Mirzaliyeva, A. Mammadov, M. Abbasov (2018): Genetic relationship among introduced lentil germplasm using agronomic traits and ISSR markers.- Genetika, Vol 50, No.2, 575-590
3. 3-Baloch, F. S., Derya, M., Andeden, E. E., Alsaleh, A., Cömertpay, G., Kilian, B., & Özkan, H. (2015). Inter-primer binding site retrotransposon and inter-simple sequence repeat diversity among wild Lens species. Biochemical Systematics and Ecology, 58, 162-168.
4. 4- Coyne, C. J., Kumar, S., von Wettberg, E. J., Marques, E., Berger, J. D., Redden, R. J., ... & Smýkal, P. (2020). Potential and limits of exploitation of crop wild relatives for pea, lentil, and chickpea improvement. Legume Science, 2(2), e36.

5. 5-Chowdhury. M.A., B. Vandenberg., and T.Warkentin. 2002. Cultivar identification and genetic relationship among selected breeding lines and cultivars in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Euphytica* (127): 317–325.
6. 6-Gore, P. G., Rana, M. K., Tripathi, K., Singh, M., Bisht, I. S., & Bhalla, S. (2015). Genetic diversity in wild *Lens* spp. using inter simple sequence repeat (ISSR) marker. *Legume Research-An International Journal*, 38(5), 575-578
7. 7-Mammadova Sh.E., Kalbiyeva Y.E., Aghayeva S.A., Sevin Teoman Duran., İsmayilova V.M., Mammadov A.M., Hasanova M.Y.(2023). Study of Genetic Polymorphism Using ISSR Markers in the Lentil Collection. *Journal of Survey in Fisheries Sciences*: 10(3S) 1918-1923
8. 8-Maniatis. T, E. F. Fritsch, and J. Sambrook. (1982). *Molecular cloning, a laboratory manual* (Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory).
9. 9-Mohammadi. S.A., and B.M. Prasanna. (2003). Analysis of genetic diversity in crop plants: salient statistical tools and considerations *cropscie*. 43: 1235-1248.
10. 10-Muscolo, A., Sidari, M., Anastasi, U., Santonoceto, C., and Maggio, A. 2014. Effect of PEG-induced drought stress on seed germination of four lentil genotypes. *Journal of Plant Interactions*, 9(1), 354-363.
11. 10-Nei, S.M. 1987. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583-590.
12. Pandey, A. K., Sengar, R. S., Kumar, A., Chand, P., & Yadav, R. (2018). Molecular characterization of Lentil (*Lens culinaris* Medikus) genotypes through Simple sequence repeat (SSR) markers. *Biotech Today: An International Journal of Biological Sciences*, 8(1), 65-72.
13. 11-Pakseresht F, Talebi R, Karami E (2013). Comparative assessment of ISSR, DAMD and SCoT markers for evaluation of genetic diversity and conservation of chickpea (*Cicer arietinum* L.) landraces genotypes collected from north-west of Iran. *Physiol Mol Biol Plant* 19(4):563–574.
14. 12- Rodda, M. S., Davidson, J., Javid, M., Sudheesh, S., Blake, S., Forster, J. W., & Kaur, S. 2017. Molecular breeding for *Ascochyta* blight resistance in lentil: Current progress and future directions. *Frontiers in plant science*, 8, 1136.
15. 13- Sokal, R. R., and P. H. A. Sneath. 1973. *Numerical taxonomy: the principle and practice of numerical classification*. SanFrancisco: Freeman,1973.
16. 14-Pandey, A. K., Sengar, R. S., Kumar, A., Chand, P., & Yadav, R. (2018). Molecular characterization of Lentil (*Lens culinaris* Medikus) genotypes through Simple sequence repeat (SSR) markers. *Biotech Today: An International Journal of Biological Sciences*, 8(1), 65-72
17. 15-Williams, J.G.K., A. R. Kubelik, K.J. Livak, J.A. Rafalski and S.V. Tingey. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18 (22): 6531-6535

18. 16-Ziekiewicz. E., A. Rafalski., and A. Labuda. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* (20):178–183.