دراسة التباين الوراثي بين بعض أصناف القمح (*Triticum Spp.*) السورية باستخدام مؤشرات تكرارات المقاطع البسيطة الداخلية الـ ISSR

فهد البيسكي* رمزي مرشد* نور القباني ***

وسيم محسن بسام العاطالله** خزامة القنطار****

الملخص

درس في هذا البحث التباين الوراثي ما بين ثمانية أصناف من القمح المزروعة في سورية بهدف الإستفادة منها في تطوير برامج التربية والتحسين الوراثي الفعالة للقمح. استخدم 19 بادئة ISSR، وأعطت جميعها حزم من الـ DNA في الأصناف المدروسة كافة، بلغ عدد الحزم الكلية الناتجة 238 حزمة، بمتوسط 12.53 حزمة لكل بادئة، وبلغ مجموع الحزم المتباينة 236 حزمة بمتوسط 12.42 حزمة لكل بادئة، بينما كان مجموع الحزم المتشابهة 2 حزمة فقط، بلغ متوسط النسبة المئوية للتعددية الشكلية للبادئات المستخدمة 99.25 %. كان

*باحث في الهيئة العامة للتقانة الحيوية، وزارة التعليم العالي – دمشق.

**باحث في الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية.

***أستاذ مساعد في قسم علوم البستنة – كلية الزراعة – جامعة دمشق.

الصنفان شام 3 وبحوث 11 هما الأقرب وراثياً ببعد وراثي قدره 0.690، بينما الأبعد وراثياً فهما الصنفان شام 3 وشام 10 ببعد وراثي قدره 0.844. أدى التحليل العنقودي اعتماداً على معطيات الـ ISSR إلى تقسيم الأصناف المدروسة إلى خمس مجموعات، حيث ضمت المجموعة الأولى الصنف جولان 2، وضمت المجموعة الثانية الصنف دوما 1، وضمت المجموعة الثالثة ثلاثة أصناف هي دوما 4، بحوث 7 وبحوث 8، وضمت المجموعة الرابعة الصنفان بحوث 11 وشام 3، أما المجموعة الخامسة فضمت الصنف شام 10. تشير هذه النتائج إلى كفاءة مؤشرات الـ ISSR في تحديد درجة التباين الوراثي ما بين أصناف القمح المختلفة، كما تشير درجة التباين الوراثي المرتفعة ما بين الأصناف المدروسة إلى إمكانية استخدام هذه الأصناف في برامج التحسين الوراثي للقمح.

الكلمات المفتاحية: القمح *Triticum Spp.*، التباين الوراثي، تكرارات المقاطع البسيطة الداخلية ISSR.

Genetic diversity of some Syrian wheat varieties (*Triticum Spp.*) using ISSR technique

Fahed Albiski[*] Ramzi Murshed[***]
Nour Al Qabbani[*] Wasim Mohsen[**]
Bassam Al Atalah[**] Khouzama Al Kountar[**]

Abstract

Genetic diversity between eight Syria wheat varieties was studied in order to use them in breeding programs. 19 ISSR primers were used in the analysis of wheat varieties DNA, all used primers produced DNA fragments in all studied varieties. The total number of bands amplified was 238 bands, with an average of 12.53 bands/primer. The total number of polymorphic bands was 236 with an average of 12.42 bands/primer. Only 2 monomorphic bands were detected. The average of polymorphism percentages for the used primers was 99.25 %. The most genetically closer varieties were Cham 3 and Bouhoth 11 with a genetic distance value of 0.690, while the most distant varieties were Cham 3 and Cham 10 with genetic distance of 0.844. The cluster analysis divided the eight varieties into 5 groups. The first group included Goulan 2 only, the second group included Doma 1, the third group included three varieties: Doma4, Bouhoth 7

[*] National Commission for Biotechnology (NCBT), Damascus
[**] General Commission of Scientific Agriculture Research, Ministry of Agriculture
[***] Associat. Prof., Faculty of Agriculture, Damascus Univ

and Bouhoth 8, the fourth group included Bouhoth 11 and Cham 3, and the fifth group included Cham 10. These results indicate that the ISSR is an effective tool to determine the genetic diversity between the different wheat varieties, and the high genetic diversity between the analysed varieties indicate also the possibility of using them in the wheat genetic improvement programs.

Key words: Wheat *Triticum* Spp, genetic diversity, ISSR marker.

مقدمة:

يعد محصول القمح من أكثر المحاصيل أهمية وانتشاراً في العالم، ويُشكل الغذاء الأساسي لمعظم سكان العالم، ويغطي هذا المحصول قرابة 19% من مجمل المساحة المزروعة بالحبوب في العالم (2013,FAO). يُعدّ القمح الطري *Triticum aestivum*، والقمح القاسي *Triticum durum* من أكثر أنواع القمح أهميةً من الناحية الزراعية والاقتصادية. بلغ إجمالي المساحة المزروعة بمحصول القمح عالمياً نحو 220.1 مليون هكتار والإنتاج 749.5 مليون طن، بإنتاجية بلغت نحو 3405 كغ.هكتار$^{-1}$ (FAO، 2016). تحتل سورية المرتبة الثالثة على مستوى الوطن العربي بعد المغرب والجزائر من حيث المساحة المزروعة والإنتاج، حيث بلغت المساحة المزروعة قرابة 1.21 مليون هكتاراً، وبلغ الإنتاج قرابة 2.50 مليون طناً، ومتوسط الإنتاجية 2274 كغ.هكتار$^{-1}$ (المنظمة العربية للتنمية الزراعية. 2015).

تتميز المصادر الوراثية النباتية في سورية بتنوعها ويشكل التباين الذي يعد جزءا من التنوع الحيوي الكلي مصدراً هاماً للمورثات المفيدة في تحسين إنتاجية الأصناف المزروعة، وبين Khaliq وKashif (2003) أن الوصول الى أصناف جديدة ذات امكانيات وراثية عالية للغلة الحبية أصبح هدفاً دائماً لجميع برامج التربية، ولتحقيق هذا الهدف لابد لمربي النبات من معرفة التركيب الوراثي ووظيفة المورثات المتحكمة باستجابة النبات للبيئات المختلفة. يتوقف نجاح برامج التربية لتحسين صفة تحمل الإجهاد بشكل عام على وجود التباين الوراثي في الطرز الوراثية، وتحديد أهم الصفات الوراثية ومنها تلك المرتبطة بتحمل الإجهاد والقابلة للتوريث، بالإضافة إلى إمكانية توظيف هذا التباين الوراثي لعزل الطرز المتحملة للإجهاد واستبعاد الطرز الحساسة (Epestin وزملاؤه، 1980). إن معرفة التباين الوراثي للأصناف المحلية والمعتمدة لمحصول القمح على المستوى الجزيئي (DNA) ومعرفة درجة القرابة بين تلك الأصناف سيساعد مربي النبات في الاختيار الصحيح للأصناف الأكثر تنوعاً إحيائياً وتباعداً وراثياً

مما سيسمح بتوسيع القاعدة الوراثية الإنتخابية لمربي النبات في الأجيال الانعزالية وذلك عند التهجين بين تلك الأصناف.

تُعد المؤشرات الجزيئية Molecular markers ذات أهمية قصوى في تربية النبات، بفعل عدة عوامل منها: إمكانية تحديد موقع وراثي مطلوب لطراز وراثي معين مباشرةً، وعدم وجود أية علاقة بين المراحل التطورية للنبات والمؤشرات الجزيئية، وعدم تأثّر هذه المؤشرات بالعوامل البيئية، والحصول على عدد كبير من المؤشرات بزمنٍ قصيرٍ نسبياً، إضافةً إلى أنّها تُعد مساعدة في تسريع عمليات الانتخاب والتربية (سيد، 2001). ويُقلّل استعمال تقانات المؤشرات الجزيئية في برامج التربية من تعقيدات إدخال عدد من الصفات المرغوبة في النمط الوراثي (Qi وزملاؤه، 1996).

استخدمت مؤشرات تكرارات المقاطع البسيطة البينية Inter Simple Sequence ISSR Repeats، التي تعطي مستوياتٍ مرتفعة من التباينات للحمض النووي DNA ما بين الأفراد (Fu–Rong وزملاؤه، 2007) من خلال تضخيم المواقع بين التوابع الدقيقة المتقاربة والمتوضعة بشكلٍ متعاكس (Zietkiewicz وزملاؤه، 1994)، وذلك باستعمال بادئات مفردة ذات نيكليوتيدات متكررة بطول يصل إلى 16-18 bp (Bornet وزملاؤه، 2002؛ Nagaraju وزملاؤه، 2002). ولكون مؤشرات الـ ISSR غزيرة فإنّها تعطي عدداً كبيراً من الحزم، ومستوى متوسط إلى مرتفع من التباينات Polymorphism (Gui وزملاؤه، 2008)، وقد استخدمت في الدراسات الوراثية للعديد من الأنواع النباتية لكونها فعّالة في كشف المستويات المنخفضة جداً من التباينات الوراثية Genetic variability (Klliker وزملاؤه، 2003)، وطبقت بنجاح في دراسات التنوع الوراثي في عددٍ كبير من الأنواع النباتية (Bornet وزملاؤه، 2002)، وفي تقييم الهجن الجسمية الناتجة عن دمج بروتوبلاست الأصناف التجارية من البطاطا (Ellouza وزملاؤه، 2006)، وقد درس Kondo وKanbar (2011) التباين الوراثي بين 20 صنفاً مزروعاً من الشعير جمعت من سورية واليابان باستخدام ISSR وRAPD في تحليل التباين الوراثي. ودرس

Medraoui وزملاؤه (2007) التنوع الوراثي بين عدد من السلالات المحلية من الذرة البيضاء Sorghum جمعت من 4 مواقع متباينة جغرافياً في المغرب، وذلك باستعمال مؤشرات RAPD وISSR. وقيم Zamanianfard وزملاؤه (2015) التنوع الوراثي ل 25 طرازاً وراثياً من القمح القاسي، حيث تمّ استعمال مؤشرات الـ ISSR، فكانت عدد الحزم الكلية 83 حزمة، و بلغت النسبة المئوية للتباينات ما يقارب 77%، وبلغت قيم معامل التعددية الشكلية (PIC) لجميع البادئات بمعدّل 0.31، وأظهر التحليل العنقودي توزع هذه الطرز في 4 مجموعات، حيث كانت المجموعة الرابعة منفصلة عن بقية الطرز، ويعود ذلك إلى كون 24 صنفاً من القمح القاسي Durum wheat الرباعي الصيغة الصبغية Tetraploid wheat. كما وجد Malik وزملاؤه (2013) من خلال دراسة التباين الوراثي بين أصناف القمح الهندية (الأقماح الطرية)، باستخدام مؤشرات ISSR، SSR، أن مؤشرات ISSR أعطت191 حزمة منها 146 حزمة ذات تعددية شكلية، وقد بيّن التحليل العنقودي انقسام الأصناف حسب موطنها الأصلي. درس Vosough وزملاؤه (2013) التنوع الوراثي لنحو 20 سلالة محلية إيرانية من القمح القاسي باستعمال مؤشرات الـ ISSR، وقد تمّ اختبار 15 بادئة ISSR، أنتجت 178 حزمة من الـ DNA، منها 138 حزمة متعددة شكلياً بمتوسط 9.7 لكل بادئة، وبلغت النسبة المئوية للتباينات 77%، وبلغت قيم معامل التعددية الشكلية (PIC) لجميع البادئات بالمتوسط قرابة 0.32. كما درس Abou-Deif وزملاؤه (2013) التباين والتنوع الوراثي ودرجة القرابة الوراثية لـ 20 طرازاً وراثياً من القمح بنوعيه القاسي والطري تحوي أصنافاً ثنائية ورباعية وسداسية الصيغة الصبغية باستعمال مؤشرات ISSR، وقد لاحظ أنّ ثمانية بادئات أعطت 112 حزمة من الـ DNA وتزواح حجم الحزم ما بين 127-1857 pb، منها 17 حزمة وحيدة التكرار بنسبة 15.2%، و95 حزمة ذات تباين بنسبة 84.8% بمعدل 11.87% لكل بادئة. وأظهرت شجرة القرابة الوراثية أنّ مؤشرات الـ ISSR نجحت في تمييز هوية 20 طرازاً وراثياً بحسب توزعها الجغرافي، حيث انفصلت حسب صيغتها الصبغية ثنائية

ورباعية وسداسية. ونظراً لأهمية معرفة التباين الوراثي لطرز القمح ومعرفة درجة القرابة بين تلك الطرز، والدور الهام الذي يلعبه تحديد مدى التباين الوراثي في تطوير برامج تربية سريعة وفعالة ودقيقة، واستخدامها في برامج التحسين الوراثي الهادفة للوصول إلى طرز متحملة للإجهادات البيئية مع المحافظة على الطاقة الإنتاجية للمحصول. فقد هدف البحث لدراسة التباين الوراثي ما بين طرز القمح باستخدام مؤشرات الـ ISSR.

مواد البحث وطرائقه :

زمان ومكان تنفيذ البحث:

نُفذ البحث في مخبر التقانات الحيوية النباتية في الهيئة العامة للتقانة الحيوية بدمشق، خلال عامي 2017 – 2018.

المادة النباتية:

نفذ البحث على أربعة أصناف من القمح القاسي (شام 3، دوما 1، بحوث 11، بحوث 7)، والقمح الطري (بحوث 8، شام 10، دوما 4، جولان 2)، والتي تمَّ الحصول عليها من الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية.

غُسلت البذور بالماء الجاري ثم غمرت بالكحول الايتيلي (تركيز 70%) مدة دقيقة واحدة مع التحريك، ثمٌّ عُوملت بمحلول هيبوكلوريت الصوديوم (NaOCl) (تركيز 3%) مدٌّة 20 دقيقة مع إضافة محلول TWEEN 20 لزيادة فعّالية عملية التطهير من خلال تخفيف التوتر السطحي، ثم غُسلت البذور بالماء المقطر المعقم ثلاث مرات متتالية، وذلك بمعدٌّل 5 دقائق لكل مرة. زُرعت العينات النباتية في وسط Murashige and Skoog (MS) (1962)، المضاف له 30 غ.ل$^{-1}$ سكروز و 7 غ.ل$^{-1}$ آجار بدرجة حموضة (pH) 5.8، وذلك ضمن أنابيب اختبار بحجم 2.5× 20 سم، تحوي 12.5 مل من الوسط المغذي المعقمة على درجة حرارة 121 م° وضغط 1.04 كغ.سم^{2} مدّة 20 دقيقة. حُضنت الأنابيب المزروعة بغرفة النمو على درجة حرارة 22±2 م° وإضاءة 16 ساعة/8 ظلام وشدة ضوئية 3000 لوكس.

استخلاص الـ DNA واختباره:

عزل الـ DNA من 0.2 غ من الأوراق المأخوذة من نباتات بعمر 3 أسابيع وفق طريقة CTAB المعدلة (Murray وThompson، 1980)، حيث طحنت الأوراق، ثم نقل المسحوق إلى أنابيب معقمة سعة 2 مل، ثم أضيف لكل عينة 750 µl من محلول الاستخلاص CTAB المحتوي على المكونات التالية: 100 ,CTAB (w/v) 3% mM Tris-HCl (pH 8), 1.4 M NaCl, 20 mM) EDTA (pH 8), 0.2 % 2-mercaptoethanol (v/v)). ثم حضنت العيّنات في الحمام المائي على درجة حرارة 65 م° مع التحريك المستمر لمدة 60 دقيقة، ثم وضعت في الثلج لمدة 5 دقائق، ثم أضيف لها 750 µl من مادة chloroform/ isoamylalchohol (1: 24)، ومُزجت برفق لمدة 10 دقائق ثم وضعت في جهاز الطرد المركزي على سرعة 10000 دورة/د لمدة 10 دقائق على درجة حرارة 4 م°، نقل بعدها الطور الطافي (المحتوي على DNA) إلى أنابيب جديدة سعة 1.5 مل، وأعيدت تنقيته مرة أخرى بكمية مماثلة من مادة chloroform/ isoamylalchohol (1: 24). أضيف 500 µl من الايزوبروبانول المبرد على حرارة -20 م°مع التحريك بلطف، وتركت العينات بعدهاعلى درجة حرارة -20 م° من أجل ترسيب DNA. في اليوم التالي أعيد التثقيل بسرعة 10000 دورة / د لمدة 10 دقائق، ثم تم التخلص من الرشاحة وغسل الراسب (DNA) بإضافة 200 µl من محلول إيتانول 70%. ثقلت الأنابيب بعد ذلك على سرعة 10000 دورة/ د لمدة 10 دقائق، واستبعد الجزء الطافي وجفف راسب DNA على حرارة 37 م° لمدة 20 دقيقة، ثم أذيب DNA في 50 µl من الماء المقطر المعقم. تم التخلص من الـ RNA بإضافة 2 µl من أنزيم RNase (10 مغ/مل) والتحضين على درجة 37 م° مدة نصف ساعة، وخزنت العينات على درجة حررة -20 م° لحين الاستخدام.

استخدم جهاز المطياف الضوئي (Spectrophotometer UV)، لتقدير كمية الحمض النووي DNA وتحديد نقاوته عن طريق قياس امتصاص الحمض النووي

DNA للأشعة بموجات طولها 260 و280 نانومتر. حُمل 6 µl من DNA في هلامة من الأغاروز تركيزها 1% والحاوية على 2 µl من الإيثيديوم بروميد بتركيز 10 mg/ml ضمن محلول TBE (1X) لتحديد نوعية DNA المستخلصة للتأكد من عدم تقطعها. ثم مُددت عينات DNA للحصول على تركيز 25 نانوغرام/ميكرولتر لتستخدم في تفاعل الـ PCR.

التفاعل التسلسلي المتعدد (PCR) :

تمّ تضخيم الـ DNA باستعمال 19 بادئة للتكرارات التتابعية البسيطة الداخلية ISSR (الجدول1)، والتي تم الحصول عليها من شركة euro fins الأوروبية.

الجدول (1): بادئات الـ ISSR المستخدمة في تحليل DNA أصناف القمح المدروسة ودرجة حرارة التحامها.

رقم البادئة	تسلسل القواعد النتروجينية	درجة حرارة الإلتحام (C°)
ISSR1	CACACACACACACACAG	52.8
ISSR2	GAGAGAGAGAGAGAGAC	52.8
ISSR3	AGAGAGAGAGAGAGAGC	52.8
ISSR4	GACAGACAGACAGACA	49.2
ISSR5	GAGAGAGAGAGAGAGAT	50.4
ISSR6	GACGACGACGACG	44.0
ISSR7	TCTCTCTCTCTCTCTCC	52.8
ISSR8	CGTCGTCGTCGT	40.0
ISSR9	GTGGTGGTGGC	38.0
ISSR10	TTGTTGTTGTTGTTGC	44.0
ISSR11	ACACACACACACACACYG	54.8
ISSR12	AGAGAGAGAGAGAGAGT	50.4
ISSR13	ACTCACTCGC	32.0
ISSR14	GTGTGTGTGTGTGTGTYG	54.8
ISSR15	ATCATCATCCG	32.0
ISSR16	GACAGACAGACAGACA	49.2
ISSR17	AGAGAGAGAGAGAGAC	49.2
ISSR18	AGAGAGAGAGAGAGAGG	52.8
ISSR19	AGCGGGGGG	34.0

أجري تفاعل الـ PCR باستخدام KAPA PCR KIT بحسب تعليمات الشركة المصنعة في حجم نهائي قدره 25 µl. وذلك وفق البرنامج الحراري التالي:

- المرحلة الأولى (مرحلة الفصل الأولي): وتتم لمرة واحدة على درجة حرارة 95 م° لمدة 3 دقائق.
- المرحلة الثانية: وتتكرر 40 مرة وتضم الخطوات التالية:

1. مرحلة الفصل: وتتم على درجة حرارة 95 م° لمدة 15 ثانية.
2. مرحلة الالتحام: تتم على درجة الحرارة المناسبة لكل بادئة من بادئات المستخدمة لمدة دقيقة واحدة.
3. الاستطالة: تتم على درجة حرارة 72 م° لمدّة دقيقة واحدة.

- المرحلة الثالثة (الاستطالة النهائية): تتم لمرة واحدة على درجة حرارة 72 م° لمدّة 5 دقائق.

الرحلان الكهربائي والتلوين والتصوير لنواتج الـ PCR:

رحلت نواتج تفاعل الـ PCR على هلامة الآجاروز 2% في المحلول المنظم 1X TBE والمكون من: { (10X TBE buffer = 108 g Tris borate + 55 g Boric acid + 9.2 EDTA, pH 8.0)} والمضاف إليها 5µl من صبغة الايثيديوم برومايد (10 mg/ml)، حيث تحمل عينات الحمض النووي DNA على هلامة الآجاروز بإضافة 5 ميكرولتر من سائل التحميل الخاص (1X Loading buffer Bromophenol blue) والمكون من: (15% Ficoll 400 + 1.03 % Bromophenol blue + 0.03 % xylene cyanol FF + 0.4 % Orange G + 10 mMTris-HCl + 50 mM EDTA)، كما تم حقن مؤشر من الحمض النووي (DNA) 100 pb من شركة (KAPA, USA)، ثم تم الترحيل لمدة ساعتين ونصف بمرور تيار كهربائي شدته 100 فولط، صورت الهلامة بعد ذلك بوجود الأشعة فوق البنفسجية بجهاز تصوير هلامة الآجاروز Image analyzer.

التحليل الإحصائي:

حدد طول حزم الـ DNA الناتجة عن المكاثرة باستخدام برنامج Total Lab، وحولت المعطيات إلى النظام الثنائي (1 للحزمة الموجودة و 0 للحزمة الغائبة). ثم تم حساب مصفوفة عدم التوافق الوراثي اعتماداً على معامل Jaccard، ثم استخدمت هذه المصفوفة لإجراء التحليل العنقودي بطريقة Unweighted Pair Group Method of Arithmetic Means (UPGMA) ورسم شجرة القرابة الوراثية وذلك باستعمال برنامج Power Marker. تم كذلك حساب محتوى التعددية الشكلية Polymorphism Information Content (PIC) لكل بادئة من البادئات المستخدمة على مستوى الموقع الواحد وفقاً لـ Weir (1996) حسب العلاقة التالية:

$$PIC=\sum pi2$$

حيث Pi: هي نسبة تكرار كل قرين على الموقع الوراثي نفسه.

ويمثل محتوى التعددية الشكلية Polymorphism Information Content (PIC) لموقع وراثي معين على المادة الوراثية Genome قدرة هذا الموقع على هذا الموقع على التمييز مابين الطرز الوراثية، أي تعبر عن احتمال أن يكون للعينتان المسحوتان عشوائياً حزمتين مختلفتين للموقع الوراثي ذاته.

تم حساب التنوع المورثي Gen Diversity (GD) لكل بادئة من البادئات المستخدمة ضمن مجموعة الطرز الوراثية المدروسة وفقاً لـ Nei (1987) تبعاً للعلاقة التالية :

$$GD=n(1-\sum pi2)/(n-1)$$

حيث تمثل nعدد المدخلات و Pi هي نسبة تكرار كل قرين على الموقع الوراثي نفسه. ويعبر التنوع المورثيGen Diversity عن الإختلاف في تكرار مورث ما فيما ما بين الطرز الوراثية (1973,Nei).

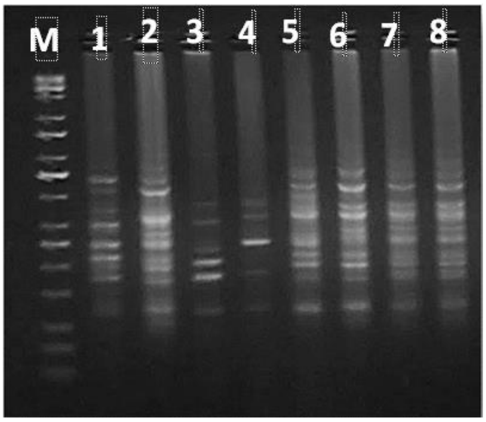
النتائج والمناقشة:

تمكنت بادئات الـ ISSR المستخدمة من الالتحام في مناطق متعددة من جينوم أصناف القمح الستة المدروسة، بلغ عدد الحزم الكلية الناتجة 238 حزمة، تشابهت منها حزمتان فقط في جميع العينات، في حين تباينت الحزم الباقية وعددها 236 حزمة، وبالتالي بلغ متوسط نسبة التباينات Polymorphism % 99.25 (الجدول 2).

الجدول (2): عدد الحزم (الكلية، المتشابهة والمتباينة) ونسبة التعددية الشكلية ومحتوى التعددية الشكلية (PIC) والتنوع المورثي (GD) للبادئات المستخدمة في الدراسة.

البادئة	عدد الحزم الكلية	عدد الحزم المتشابهة	عدد الحزم المتباينة	نسبة التعددية الشكلية (%)	محتوى التعددية الشكلية (PIC)	التنوع المورثي (GD)
P1	30	0	30	100	0.86	0.88
P2	17	0	17	100	0.82	0.85
P3	21	0	21	100	0.86	0.88
P4	16	0	16	100	0.86	0.88
P5	17	1	16	94.12	0.86	0.88
P6	7	0	7	100	0.71	0.76
P7	2	0	2	100	0.51	0.60
P8	7	0	7	100	0.82	0.85
P9	7	0	7	100	0.79	0.82
P10	6	0	6	100	0.75	0.79
P11	19	0	19	100	0.86	0.88
P12	12	1	11	91.66	0.82	0.85
P13	6	0	6	100	0.82	0.85
P14	15	0	15	100	0.86	0.88
P15	12	0	12	100	0.82	0.85
P16	4	0	4	100	0.61	0.66
P17	19	0	19	100	0.86	0.88
P18	6	0	6	100	0.75	0.78
P19	15	0	15	100	0.86	0.88
المجموع	238	2	236	-	-	-
المتوسط	12.53	0.105	12.42	99.25	0.795	0.83

أعطى البادئة p1 أعلى عدد من الحزم الكلية وصل إلى 30 حزمة بتعددية شكلية 100% (الشكل1)، في حين أعطى البادئة p7 حزمتان فقط وبتعددية شكلية 100% (الجدول2). تنتج بادئات الـ ISSR عدد مختلف من حزم الـ DNA بحسب تسلسل التكرارات البسيطة التي تحويها، ومن بين التسعة عشر بادئة ISSR المستخدمة في هذا البحث أعطى 17 بادئة نسبة تعددية شكلية 100% (الجدول 2)، وتدل هذه النتائج على إمكانية استعمال هذه البادئات بشكل فعال في الدراسة الجزيئية للتمييز بين أصناف القمح المدروسة. تراوحت قيمة محتوى التعددية الشكلية (PIC) من 0.51 للبادئة P7 وحتى 0.86 للبادئات P1 وP3 وP4 وP5 وP11 وP14 وP17 وبلغ المتوسط 0.795. كما تراوحت قيمة التنوع المورثي (GD) ما بين 0.60 للبادئة P7 و0.88 للبادئات P1 وP3 وP4 وP5 و P11 وP14 وP17 وبلغ المتوسط 0.83 (الجدول 2).



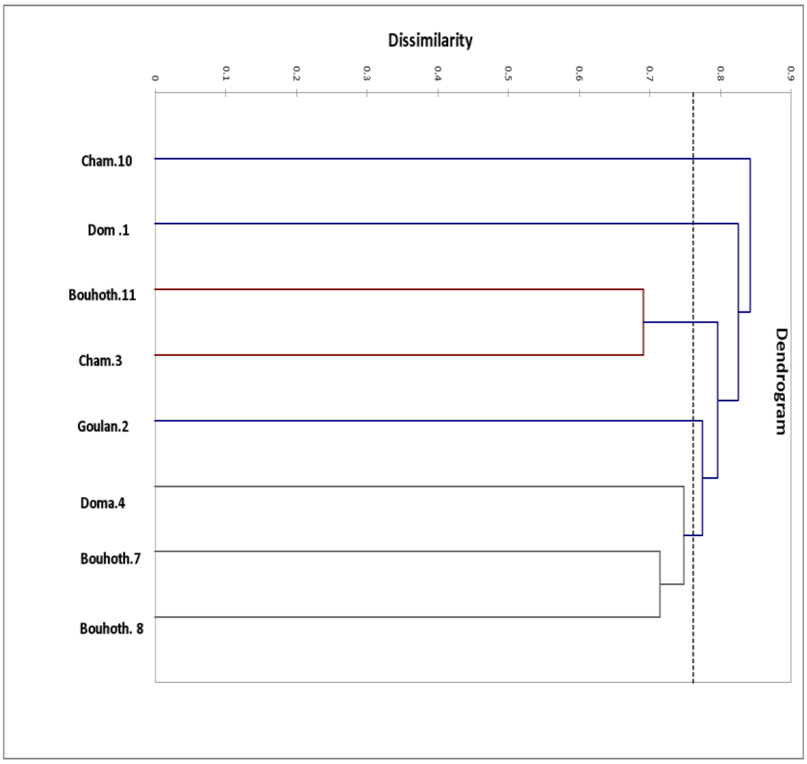
الشكل (1): صورة لنواتج تضخيم الـ DNA للأصناف المدروسة باستخدام البادئة P1 وبوجود معلم جزيئي ذو وزن جزيئي 100 pb (1: جولان 2، 2: دوما 1، 3: دوما 4، 4: بحوث 7، 5: بحوث 8، 6: بحوث 11، 7: شام 3، 8: شام 10.

تمت دراسة العلاقة الوراثية بين الأصناف المدروسة من خلال حساب مصفوفة عدم التوافق الوراثي (PDV) اعتماداً على معامل Jaccard لتحديد درجة التباين الوراثي فيما بينها، والذي يفيد في تأمين قاعدة وراثية كبيرة للاستفادة منها في برامج التحسين الوراثي. حيث كان الصنفان شام 3 وبحوث 11 هما الأقرب وراثياً بتباين وراثي قدره 0.690، بينما الأبعد وراثياً فهما الصنفان شام 3 وشام 10 بتباين وراثي قدره 0.844 يليها الصنفان دوما 4 ودوما 1 بتباين وراثي قدره 0.819 (الجدول3).

الجدول (3): مصفوفة عدم التوافق الوراثي (PDV) بين أصناف القمح المدروسة استناداً إلى معامل Jaccard.

	Goulan2	Doma.1	Doma.4	Bouhoth.7	Bouhoth.8	Bouhoth.11	Cham.3	Cham.10
Goulan2	0							
Doma.1	0.8034	0						
Doma.4	0.7778	0.8198	0					
Bouhoth.7	0.7586	0.8000	0.7615	0				
Bouhoth.8	0.7881	0.7982	0.7358	0.7143	0			
Bouhoth.11	0.8374	0.8198	0.7818	0.7615	0.7358	0		
Cham.3	0.8376	0.9123	0.8131	0.8148	0.7905	0.6907	0	
Cham.10	0.8264	0.8393	0.8917	0.8926	0.8125	0.7909	0.8440	0

تم إجراء التحليل العنقودي للأصناف المدروسة اعتماداً على معطيات الـ ISSR، وأدى التحليل العنقودي إلى تقسيم الأصناف المدروسة إلى خمس مجموعات مختلفة. ضمت المجموعة الأولى الصنف جولان 2، وضمت المجموعة الثانية الصنف دوما 1، وضمت المجموعة الثالثة ثلاثة أصناف هي دوما 4، بحوث 7 وبحوث 8، وضمت المجموعة الرابعة الصنفان بحوث 11 وشام 3 وهما الأقرب وراثياً، أما المجموعة الخامسة فضمت الصنف شام 10 (الشكل2).



الشكل(2): مخطط شجرة القرابة الوراثية لأصناف القمح المدروسة اعتماداً على التحليل العنقودي لبيانات التباين الوراثي.

وبالنتيجة، تثبت نتائجنا أن مؤشرات الـ ISSR، وبشكل خاص البادئات المستخدمة في هذا البحث، هي أداة سريعة وفعالة لتحديد درجة التباين الوراثي ما بين أصناف القمح المختلفة، وبالتالي يمكن أن تساعد هذه المؤشرات في اختيار الأصناف المناسبة لإدخالها في برامج التربية. كما تدل درجة التباين الوراثي المرتفعة ما بين الأصناف المدروسة على إمكانية استخدام هذه الأصناف في برامج التحسين الوراثي للقمح مما سيسمح بتوسيع القاعدة الوراثية الإنتخابية لمربي النبات. في الاختيار الصحيح للأصناف الأكثر تنوعاً أحيائياً وتباعدا وراثيا .

المراجع:

- **المنظمة العربية للتنمية الزراعية. 2015**. الكتاب السنوي للإحصائيات الزراعية السنوية.
- **سيد، محمود هيثم . 2001**. استخدام مؤشرات من الدنا في انتخاب مورثات المقاومة للأمراض في الشعير، جامعة دمشق، كلية الزراعة، أطروحة دكتوراه.

References:

- **Aboudief M. H., Rasheed, M. A., Salaam, M. A. A, Mosta F.a, E. A. H., Ramadan, W.A. 2013** .Characterization of twenty wheat varieties by ISSR markers. Middle-East J. sci. Res. 15: 16 175.
- **Bornet B., Goraguer, F., Joy, G.and Branchard, M. 2002**. Genetic diversity in European and Argentinian cultivated potatoes (Solanum tuberosum subsp. tuberosum) detected by inter-simple sequence repeats (ISSRs). Genome 45:481-484.
- **Nouri-Ellouz O., Gargouri-Bouzid, R., Sihachakr, D., Triki, MA., Ducreux, G., Drira, N., Lakhoua, L. 2006**. Production of potato intraspecific somatic hybrids with improved tolerance to PVY and Pythium aphanidermatum. Journal of Plant Physiology. 163: 1321-1332.
- **Epestin E., Norlynn, J. J. Rush, G. W. Kingsbury, R. W. Kelly, D. W. Cunning ham, G. A. and Wrona, A. F. 1980**. Saline culture of crops: A genetic approach. Sci. 210:399-404.
- **Faostat Food and agriculture organization of the United Nations. 2016.** http://faostat.fao.org/.
- **Fu- Rong G., Jian- Ying, G. and Fang- Hao, W. 2007**. Application of ISR Molecular marker in invasive plant species study. State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests Institute of Plant Protection, Yunnan Agricultural University, Kunming Chin.J. Appl. Ecol., 18(4): 919-927.
- **Gui F.R., Wan, F. H. and Guo, J.Y. 2008**. Population genetics of Ageratina denophora using inter simple sequence repeat (ISSR) molecular markers in China. Plant Biosystems, 142 (2):255-263.
- **Kanbar A. and K. Kondo. 2011.** Efficiency of ISSR and RAPD Dominant Markers in Assessing Genetic Diversity among Japanese and Syrian Cultivars of Barley (H. Vulgare L.). Research journal of agriculture and biological, 7(1): 4-10.

- **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.
- **Klliker R., D. Herrmann, B. Boller and F. Widmer. 2003**. Swiss Mattenklee landraces, a distinct and diverse genetic resource of red clover (Trifolium pratense L.). Theoretical and Applied Genetics, 107:306-315.
- **Lawyer F.; S. Stoffel, R. Saiki, S. Chang, P. Landre, R. Abramson, and D. Gelfand. 1993.** High-level expression, purification, and enzymatic characterization of full-length Thermus aquaticus DNA polymerase and a truncated form deficient in 5' to 3' exonuclease activity. PCR methods and applications, 2 (4): 275–287.
- **Malik R, Sharma H, Verma A, Kundu S, Sharma I, Chatrath R .2013.** Hierarchical clustering of Indian wheat varieties using morphological diversity assessment. Indian J Agric Res. 47(2): 116-123.
- **Maniatis T., E. F. Fritsch and J. Sambrook. 1982.** Molecular cloning:Laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor/ NY.
- Medraoui L., Ater, M., Benlhabib, O., Msikine, D. and Filali-Maltouf, A. 2007. Evaluation of genetic variability of sorghum (Sorghum bicolor L. Moench) in north western Morocco by ISSR and RAPD markers. C R Biol. 330(11):789-797.
- **Murashige T. and Skoog, F. 1962**. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant., 15: 473-497.
- **Murray M.G. and W. F.Thompson.1980**. Rapid Isolation of high molecular weight DNA.Nucleic Acid Res.8(19):4321-4325.
- **Nagaraju J., Kathirvel, M., Kumar, R.R., Siddiq, E.A. and Hasnain, S.E. 2002.** Genetic analysis of traditional and evolved Basmati and non-Basmati rice varieties by using fluorescence-based ISSR-PCR and SSR markers. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 99: 5836-5841.
- **Nei M. 1973.** Analysis of gen diversity in subdivided populations. Proceedings of the Nation Academy of Science of the USA.70:3321-3323.
- **Nei M. 1987**.Molecular Evolutionary Genetics. Columbia university Press, New York, NY.
- **Vosough M., F. Schultheiss, M. Agmell and J.E. Stahl. 2013**. A method for identification of geometrical tool changes during machining of titanium alloy Ti6Al4V. Int J Adv Manuf Technol, Vol. 67, pp. 339–348
- **Weir B.S.1996**.Genetic data analysis II 2nd ed Sinauer Associates. Inc. Sunderland, MA. Zamanianfard, Z., Etminan, A., Mohammadi, R and Shooshtari, L. 2015 Evaluation of Molecular Diversity of durum wheat

genotypes using ISSR markers. Biological Forum – An International Journal 7(1): 214-218 .

- **Zietkiewicz E., Rafalski, A. and Labuda, D. 1994**. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)- anchored polymerase chain reaction amplification. Genomics, 20: 176–183.