Damascus University Journal of Agricultural Sciences
Vo 40 No.4 (2025): 336-350

مجلة جامعة دمشق للعلوم الزراعية
المجلد ٤٠ العدد ٤ (٢٠٢٥): ٣٣٦-٣٥٠

التوصيف الجزيئي لبعض طرز الشعير البري والمزروع (Hordeum vulgare) باستخدام تقنية ISSR

فاطمة كمال هزي*[1] **سلام لاوند[2]** **يوسف نمر[3]**

[1]* طالبة دكتوراه ومعيدة، جامعة دمشق/ كلية الزراعة/ قسم المحاصيل الحقلية، الأصول الوراثية
fatima2.haze@damascusuniversity.edu.sy
[2] أستاذ مساعد في قسم المحاصيل الحقلية، جامعة دمشق، التقانات الحيوية، البريد الالكتروني
Salam.lawand@damascusuniversity.edu.sy
[3] أستاذ مساعد في قسم المحاصيل الحقلية، جامعة دمشق، إنتاج المحاصيل الحقلية

تاريخ الايداع:٢٠٢٣/٦/٦
تاريخ القبول: ٢٠٢٣/٧/١٧

حقوق النشر: جامعة دمشق –سورية،
يحتفظ المؤلفون بحقوق النشر بموجب
الترخيص **CC BY-NC-SA 04**

الملخص:

نفذ هذا البحث في مخبر التقانات الحيوية التابع لكلية الزراعة في جامعة دمشق/ سورية للعام ٢٠٢١-٢٠٢٢، حيث تم إنبات حبوب ١٢ طرازاً وراثياً من الشعير تمّ جمعها من أربع محافظات مختلفة بيئيّاً (نوعين من الشعير البري وصنف مزروع أو معتمد من كل محافظة)، لتحديد درجة القرابة الوراثية فيما بينها، باستعمال تقنية التكرارات الترادفية البسيطة الداخلية ISSR (Inter Simple Sequence Repeats)، واستخدم لهذا الغرض ١٤ بادئة. أظهرت نتائج التحليل أن ١٣ بادئة من أصل ١٤ بادئة أثبتت فعاليتها في إعطاء تعددية شكلية Polymorphic بين الطرز المدروسة، نجم عن استخدامها ما مجموعه ٦١ حزمة وبلغت نسبتها ٩١.٦٦٪، تراوحت قيم معامل التعددية الشكلية (PIC) من 0.181 كأقل قيمة عند البادئة ISSR35، و0.352 عند البادئة ISSR32 كأعلى قيمة، وبلغ المتوسط العام 0.262، كما انقسمت شجرة القرابة الوراثية إلى عنقودين رئيسيين، ضمّ العنقود الأوّل الطرز المزروعة وجميع الطرز البريّة من نوع H.spontaneum بدرجات متفاوتة من القرابة الوراثية حيث كان الصنفين عربي أبيض وعربي أسود الأقرب وراثيّاً بين كافة الطرز المدروسة وبمسافة ١.٥٣٩، وضم العنقود الثاني جميع الطرز البريّة من نوع H.marinum حيث كان الطرازين H.marinum (درعا) و H.marinum (السويداء) الأقرب وراثيّاً بمسافة ٣.١٢٦ .

الكلمات المفتاحية: الشعير، تقنية ISSR، طرز برية، معامل التعددية الشكلية.

Molecular Characterization of Some Wiled and Cultivated Barley types by Using ISSR- Technique

Fatema Haze*[1] Salam Lawand[2] Youssef Nemer[3]

[1*] PhD student, Damascus University, Genetic Origins, fatima2.haze@damascusuniversity.edu.sy
[2] Assistant Professor, Damascus University, Faculty of Agricultural Engineering Salam.lawand@damascusuniversity.edu.sy
[3] Assistant Professor, Damascus University, Filed crop Production.

Received: 6/6/2023
Accepted: 17/7/2023

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

Abstract:

The research was conducted at Biotechnology Lab, Faculty of Agriculture – Damascus University/ Syria, during the season2021 /2022. Seeds of 12 genotypes were germinated after collecting from ecologically dissimilar syrian provinces, (two wild barley types and cultivated or proved type from each province) to determine the genetic relationship by using ISSR technique (Inter Simple Sequence Repeats) with 14 primers. The analysis results revealed that 13 primers showed polymorphism among the evaluated genotypes, primers gave a total of 61 pigments with a polymorphic percentage of %91.66, the average of Polymorphic information content (PIC) ranged between 0.181 as a lowest value and 0.352 as a highest value . Varieties dendrogram separated into two major clusters, the first cluster included the cultivated and all wild genotypes of a type *H.spontaneum* with different degrees of genetic relationship, as Arabi Abiad and Ararbi Aswad were genetically the closest with a gentic distance 1.539. While the second cluster contained all wild genotype belonging to *H.marinum*, as the models *H.marinum*(Daraa) and *H.marinum* (AL-swidaa) were genetically the closest with a gentic distance 3.126.

Keywords: Barely, Issr , Polymorphic Information Content, Wild Genotypes.

المقدمة:

يُعد الشّعير Barley (*Hordeum vulgare* L.) من المحاصيل الحبّية المهمة، فهو يدخل ضمن النظام الغذائي البشري في العديد من المناطق في العالم، إضافةً إلى أهميته كمحصول علفي وبخاصةٍ مع تزايد الاهتمام بالإنتاج الحيواني (٢٩، ٢٠٠٣، Fischbeck).

ينتمي الشّعير للعائلة النجيليّة *Poaceae* (*Gramineae*) والقبيلة *Hordea* وتحت القبيلة *Triticinae* والجنس *Hordeum*، ويأتي في المرتبة الرابعة ضمن لائحة المحاصيل الحبّية في العالم، بعد القمح Wheat (*Ttiticum spp*) والرز Rice (*Oryza sativa* L.) والذّرة الصفراء Corn (*Zea mays* L.)، و يضم جنس *Hordeum* أكثر من ٣٥٠ نوعاً ثنائية الصيغة الصبغية ومتعددة الصيغ الصبغية و معمرة و حولية، والتي تنتشر في جميع أنحاء العالم(Von Bothmer and Barkworth, ٢٠٠٩, 30). إذ يتكيف الشعير مع مجموعة واسعة من البيئات الزراعية، لذا ينمو بنجاح في مناطق متباينة مناخياً كهضبة التبت، وهضاب جبال الهيمالايا، ودول الأنديز، والسهول الاستوائية في الهند وجبال إثيوبيا. ويتميز أيضاً بأنه حولي، هش، ثنائي الصف، ثنائي الصيغة الصبغية، يتحمل مستويات مرتفعة من ملوحة التربة والجفاف والصقيع، وفي الغالب ذاتي الإلقاح. كما تشترك أنواع الشعير المزروع والبرية في مجين مشترك (2n=14)، وتتسم بالخصوبة الكاملة (Forster *et al*, 2000, 19)

يتوفر في القطر العربي السوري عدد كبير من الأصول الوراثية للجنس *Hordeum* ولا يعرف الكثير عن توزعها الجغرافي أو ارتباطها بظروف بيئية معينة، أو مدى تكرارها، ولقد أدى سوء استغلال المراعي الطبيعية والرعي الجائر والاحتطاب وتدهور التربة والحرائق إلى تدهور الغطاء النباتي وضياع الكثير من الأصول الوراثية البرية، ويعد نقص المعلومات حول المصادر الوراثية النباتية من العوائق الرئيسة للاستفادة من هذه المصادر في الأبحاث و التطبيقات المختلفة (بركودة و درويش، ١٩٩٩، ١).

إنّ استعمال التقانات الحيوية على المستوى الجزيئي للمادة الوراثية DNA أدّى إلى تسريع وتحسين برامج تربية المحاصيل (Powell *et al*,1996, 1)، إذْ تُعد المؤشرات الجزيئية Molecular markers مهمة على صعيد مجال تربية النبات، إضافة إلى إنَّها تُعد مؤشرات مساعدة في إسراع عمليات الإنْتخاب والتربية، وهي بذلك تختصر الزمن الذي تستغرقه عمليات التربية إضافةً إلى توفير في الوقت والجهد (سيد، 2001). كما وإنّ استعمال تقانات المؤشرات الجزيئية، يمكن أنَّ يقلل من تعقيدات إدخال عدد من الصفات المرغوبة في النمط الوراثي الواحد، كذلك يمكن استعمال المؤشرات الجزيئية بشكل فعّال في تحاليل التنوع الوراثي وتقدير التشابه الوراثي (Ramsay *et al,*2000,156).

بدأت وزارة الزراعة في السنوات الأخيرة بالتوسّع بإدخال الشّعير إلى مناطق الاستقرار الأولى والمروية من أجل زيادة الإنتاج وتقليل الاستيراد وذلك من مبدأ الاعتماد على الذّات. إن غنى التنوع الوراثي في الشعير البري ووجوده في مجموعة واسعة من المناطق، بما في ذلك العديد من الظروف غير المواتية للغاية مثل الإجهادات الأحيائية وغير اللأحيائية في المنطقة تشير إلى أنه يمكن استغلال الشعير البري من الشرق الأدنى القريب من الهلال الخصيب من أجل تحسين زراعة الشعير(١٣١ ،٢٠١٠، Shakhatreh *et al*). وهناك عدة طرق لتقييم التنوع الوراثي ومن ضمنها التقييم الشكلي (المورفولوجي)، وعلى الرغم من أنّ المواصفات الشكليّة تتأثر بشكل كبير بالبيئة، وتتحكم بها مُورّثات ذات تأثير مختلف إلا أنّ ذلك لم يمنع استخدامها بشكلٍ واسعٍ في دراسات تقييم التنوّع الوراثيّ وتحسين الأصناف (Van Beuningen and Bruch, 1997, 981). فقد اسُتخدمت هذه الطريقة إمّا بشكل مُستقل لتقييم الأصول الوراثيّة (التمو، ٢٠٠٧، ١)، أو مُترافقة مع مؤشرات أخرى كالبيوكيميائية والجزيئية (أشتر، ٢٠٠٩،

٢٠٤)، حيث يُعدّ الشّعير البرّيّ من أهم المصادر الوراثيّة، لذلك لا بد من حصر وجمع وتوصيف المادة الوراثيّة المتاحة لهذا النوع في مناطق انتشاره المحلية توصيفاً مورفولوجياً ووراثياً لإرساء قاعدة انطلاق للدراسات المستقبلية التي تهدف لحماية الغطاء النباتي من المتغيرات التي تطرأ على الحياة البرّيّة، وزيادة إنتاجية الشّعير المزروع، وفي إطار ذلك فقد شهدت السنوات العشر الأخيرة تقدماً كبيراً في مجال التقنيات الحيويّة التي تهتم بدراسة التنوّع الوراثيّ للنباتات في العالم و أهم هذه التقنيات: RAPD، ISSR، AFLP، SSR التي تعتمد على تفاعل البلمرة المتسلسل PCR .

بين Caldwell وآخرون (٢٠٠٥) أن أصناف الشعير الحديثة تميل إلى أن يكون لها أساس وراثي ضيق مقارنة بأسلافها البرية بسبب الانجراف الوراثي وارتفاع مستويات التهجينات المتقاربة (Inbreeding) في التكاثر (١٧٢).

وجد Ellis وآخرون(٢٠٠٠) أن الشعير البري والنباتات البرية المتواجدة بمنطقة حوض البحر المتوسط، هي بالفعل مصدر مورثات مفيدة لتحسين المحاصيل المزروعة(٦٥-83).

إنَّ الحاجة للمؤشرات الجزيئية Molecular traits أصبحت أكثر أهمية وإلحاحاً، لإنّها توفر نتائج مبكرة، ما يُساعد في تسريع عمليات الإنتخاب والتربية، فتختصر الزمن الذي تستغرقه برامج التربية التقليدية. كما لا توجد علاقة بين المراحل التطورية للنبات والمؤشرات الجزيئية، وبالتالي يمكن استخلاص المادة الوراثية من الحمض الريبي النووي (DNA) خلال المراحل المبكرة من دورة حياة المحصول، وسهولة تحديد موقع وراثي مطلوب لطراز وراثي معين مباشرةً، وعدم تأثر المؤشرات الجزيئية بالشكل الظاهري للنباتات، والعوامل البيئية، ويمكن الحصول على عددٍ كبير من المؤشرات خلال فترةٍ زمنية قصيرة نسبياً (Canci *et al*, 2003, 1671).

لقد تطورت التقانَات الحيوية الجزيئية خلال الفترة الماضية تطوراً كبيراً مع تطور التفاعل السلسلي البوليميرازي polymerase chain reaction (PCR) بشكلٍ خاص، وقد استخدمت هذه التقانات من أجل الكشف والتوصيف وتقييم التنوع الوراثي الموجود في مجتَّمعات نباتية، كما تنوعت هذه التقانات بطريقة مكنتها من كشف الاختلافات الوراثية وحتى أصغرها. يمكن كشف الاختلافات على مستوى الـ DNA من خلال استخدام الأنزيمات الخلوية والتي يتَّم تطبيقها على جزيئات الـ DNA بطرائق عديدة (Eleuch *et al*, 2008, 1005).

درست Al Hadeithi (2015) التباين الوراثي لـ 9 أصناف من الشّعير العراقي باستخدام 9 بادئات ISSR، حيث بيّنت نتائج دراستها ظهور 41 حزمة للأصناف المدروسة منها 28 حزمة متباينة شكليّاً و 13 حزمة متماثلة. و تراوحت نسبة التعددية الشكلية بين 25–100%، وبمتوسط 4.5 حزمة لكل بادئة. بينما تراوحت قيم معامل التعددية الشكلية PIC بين(0.0854– 0.9897) (١٦٨٢-1688).

تمتّ دراسة التنوع الوراثي لـ 16 صنفاً من الشّعير الإيراني مع 26 صنف من الشّعير الأوروبي وذلك باستخدام 20 بادئة ISSR. حيث أعطت البادئات 77 حزمة وبمتوسط 12.83 حزمة لكل بادئة، وتراوحت النسبة المئوية للتعددية الشكلية بين (50–78.94)%. بينما تراوحت قيمة معامل التعددية الشكلية (PIC) بين (0.26– 0.46) (Shiva *et al*, 2017,295) .

درس Velicevici وآخرون (2018) التنوع الوراثي لأربعة أصناف من الشّعير مع هجن F1 باستخدام ثلاث بادئات ISSR، حيث أثبتت هذه البادئات فعاليتها في إعطاء تعددية شكلية بين الأصناف المدروسة وتراوحت النسبة المئوية للتعددية الشكلية بين 55.55% مع البادئة HB15 و 75% مع البادئة HB12. بينما سجلت قيمة معامل التعددية الشكلية Pic أعلى قيمة (0.3840) مع البادئة HB14 وأدنى قيمة 0.2267 مع البادئة HB12(١٩-25).

قام Akbulut وآخرون (2018) بتقييم التباين الوراثي بين 68 طراز وراثي من الشّعير التي تمَّ الحصول عليها من تركيا وأذربيجان باستخدام تقنيتي ISSR و RAPD، تمّ استخدام 10 بادئات ISSR ، أثبتت 9 بادئات منها فعاليتها، وأعطت 52 حزمة متعددة شكلياً بمتوسط 5.2 حزمة لكل بادئة، وقد بلغت النسبة المئوية للتعددية الشكلية 80.7% (٣).

تمّت دراسة 15 صنف من الشّعير المصري جزيئيّاً باستخدام تقنية ISSR لتقييم التباين الوراثي بين الأصناف المدروسة، حيث نتج عن استخدام 10 بادئات ما مجموعه 66 حزمة وبمتوسط 6.6 حزمة لكل بادئة، كما تراوحت النسبة المئوية للتعددية الشكلية بين 33.3% و87.5%.(Samah *et al,* 2018, 408).

قام Mariey وآخرون(٢٠١٨) بتقييم ١٩ صنفًا مصريًا من الشعير، لتحديد استجابتها لظروف الإجهاد المائي. باستعمال تقنية Sequence Related Amplified Polymorphism (SRAP) لتحديد التنوع الوراثي والعلاقات بين الأصناف لتحمّل الجفاف، تَّم تضخيم تسع مجموعات من أزواج البادئات المتخصصة، وأعطت ما مجموعة ٧١ أليلاً، حيث أعطت البادئات (me5 + em1) أعلى تُعددية شكلية بنسبة ١٠٠ % وبلغ معامل التُعددية الشكلية (PIC) ٠.٩٧ وتَّم رسم شجرة القرابة الوراثية وإنقسمت الأصناف في أربع مجموعات وفقاً لاستجابتها للاجهاد المائي (21-٣٧).

كما درس Shayan وآخرون (٢٠١٩) التباين الوراثي بين ٢٨ طرازاً وراثياً، حيث أظهرت النتائج أنه من بين ١٤ بادئة ISSR تم استخدامها، أعطت ١١ بادئة منها ٥٥٩ حزم متباينة شكلياً .وتراوحت قيم معامل التعددية الشكلية (PIC) بين ٠.١١٦ و ٠.٢٥٢ بمتوسط ٠.١٨٧ (١).

درس Djshwar وآخرون (2021) التنوع الوراثي لـ ٥٩ طرازاً وراثياً من الشّعير العراقي باستخدام تقنية ISSR مستخدماً ٤٥ بادئة، حيث أعطت البادئات ٢٥٥ حزمة وبمتوسط ٠.٧٧ حزمة لكل بادئة، أما نسبة التعددية الشكلية فقد بلغت 80.7% (١).

أهداف البحث Research Objectives

تحديد درجة القرابة الوراثية لـ ١٢ طرازاً من الطرز الوراثية البرية والمزروعة من الشعير باستخدام تقنية ISSR.

مواد البحث وطرائقه Materials and methods

1-المادة النباتية المدروسة Plant material: تمَّ تقييم 12 طرازاً من الشّعير البري والمزروع التي تمّ جمعها من المناطق الجنوبية في الجمهورية العربية السورية (تمّ الحصول على الأصناف المزروعة من حقول المزارعين، الصنف الأكثر انتشاراً بالمنطقة، أمّا الصنف فرات٣ أُخذ من قسم المحاصيل الحقلية، كلية الهندسة الزراعية، جامعة دمشق) جدول (١)، تمّ القيام بالعديد من الجولات الحقليّة شملت أربع محافظات (دمشق، ريف دمشق، السويداء، درعا)، وتمّ تتبع المراحل الفينولوجيّة للنبات حتى وصول النباتات لمرحلة النضج التامّ.

الجدول (١): الطرز الوراثية المدروسة من الشعير البري والمزروع، ومصدرها

منطقة الجمع	الطراز		الارتفاع عن سطح البحر(م)	خط الطول	خط العرض
السويداء (شهبا)	مزروع	صنف بلدي	1137	36.63.33	32.85.00
	بري	*H.spontaneum*	1137	36.63.33	32.85.00
		H.marinum	1137	36.63.33	32.85.00
درعا (مزيريب)	مزروع	عربي أبيض	400	33.36.10	32.75.00
	بري	*H.spontaneum*	400	33.36.10	32.75.00
		H.marinum	400	33.36.10	32.75.00
دمشق(كلية الزراعة / جامعة دمشق)	مزروع	فرات3	743	36.18.00	33.21.00
	بري	*H.spontaneum*	743	36.18.00	33.21.00
		H.marinum	743	36.18.00	33.21.00
يبرود (ريف دمشق)	مزروع	عربي أسود	1400	36.39.45	33.79.00
	بري	*H.spontaneum*	1400	36.39.45	33.79.00
		H.marinum	1400	36.39.45	33.79.00

٢-موقع تنفيذ البحث Experimental site:

نُفّذ البحث في مخبر التقانات الحيوية في كلية الزراعة بجامعة دمشق/ سورية، خلال العام ٢٠٢١-٢٠٢٢.

٣- طريقة العمل:

٣-١- تعقيم البذور وزراعتها:

عُقّمت البذور بنقعها في مادة الإيتانول تركيز 70% لمدة 30 ثانية، ثم نقلت على التوالي إلى ثلاثة أوعية يحوي كل منها ماءً مقطراً معقماً، وتركت في كل وعاء لمدة 5 دقائق، ثم وضعت في وعاء يحوي مادة كلوروكس ٥٪ لمدة 5 دقائق، ثم نُقلت مرة أخرى لتنقع في الماء المقطر ثلاث مرات كل منها 5 دقائق، بعدها زُرعت البذور في أصص خاصة و تمّ أخذ الأوراق الطازجة بعمر ٢-٣ أسابيع من أجل استخلاص الـDNA للدراسة الوراثية.

٣-٢- استخلاص الـ DNA بطريقة SDS:

استُخلص الحمض النووي DNA من البادرات الفتية بعمر 2-3 أسابيع بطحن 1غرام من الأوراق الخضراء باستخدام الآزوت السائل حتى الحصول على مسحوق ناعم، نُقل بعدها إلى حوجلة زجاجية سعة 50µl وأضيف لها 110µl من محلول الاستخلاص والمكون من:(0.1M Tris-HCl,pH=8.2, 50mM EDTA, 0.1M NaCl, 2% SDS,1mg/ml proteinase K) SDS (Stein *et al*, 2001)، ثمَّ حضنت العينات مدَّة 60 دقيقة مع التحريك المستمر ضمن حمام مائي عند37°م، أضيف 110µl من مزيج كل من كلوروفورم/ كحول أيزواميل بنسبة 1:24، ونُقل المزيج إلى أنبوب تثفيل سعة 130µl وثفل المزيج (عملية الطرد المركزي) مدَّة

10دقائق بسرعة (10000 rpm) بدرجة حرارة 4°م، ثمَّ نُقل الوسط المائي (الطبقة العلوية) الحاوي على الحمض النووي(DNA) إلى أنبوب جديد، وأضيف الإيزوبروبانول Iso-propanol بمعدّل 3/2 من حجم الوسط المائي، ثمَّ نقل الحمض النووي(DNA) المترسب إلى أنبوب صــغير ســعة l2µ وأضــيف إليه l0.5µ من محلول الغســيل Washing buffer(كحول إيتيلي 76%) البارد (المحفوظ بدرجة –20ْ م لحين الإســـتخدام) ثمَّ تمَّ التثقيل بســـرعة(10000rpm) مدَّة 10 دقائق وبدرجة حرارة 4 م، أُذيبت عيناتDNA في 50µl من المحلول المنظم TE المكون من (10 mMTris-HCl, 1mM EDTA)، وتمَّ التخلص من الحمض النووي RNA بإضافة 2µl من أنزيم RNase (10 mg/ml) والتحضين على درجة حرارة (37ْم) مدَّة نصف ساعة، ثمَّ مُدد تركيز الحمض النووي DNA ليصبح (40ng/µl).

٣-٣- التقدير الكمي والنوعي للحمض النووي DNA بواسطة الأشعة فوق البنفسجية:

اســـتُخدم جهاز المطياف الضـــوئي (UV spectrophotometer) نوع HITACH لتقدير كمية الحمض النووي DNA وتحديد نقاوته، حيث يعتمد الجهاز في عمله على قياس كمية الحمض النووي الموجودة في العينات عن طريق امتصــاصــه للأشــعة فوق البنفسجية Ultra Violet بموجات طولها 260 و 280 نانومتر.

٤-٣- تطبيق تقنية ISSR :

استُخدم في الدراسة 14 بادئة تم الحصول عليها من شركة (INTRON (Biotechnology Inc الكوريّة جدول (٢).

الجدول(٢): التسلسل النيكليوتيدي للبادئات المختبرة باستخدام تقنية ISSR ودرجة حرارة التحامها.

اسم البادئة	التسلسل النكليوتيدي للبادئات ٥َ ← ٣َ	درجة حرارة الالتحام مْ
ISSR3	AGAGAGAGAGAGAGAGT	50
ISSR5	CGTCACACACACACACAC	56
ISSR19	CACACACACACACACAAC	54
ISSR20	GAGAGAGAGAGAGAGACG	56
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

تمّ اجراء تفاعل البلمرة المتسلسل PCR في جهاز التدوير الحراري وفقاً للظروف الآتية:

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

2- 40 دورة تتضمن كل منها المراحل الآتية:

- التحطم: يتم عند حرارة 94ْ م مدَّة 30 ثانية.

– الالتحام: حسب درجة حرارة الالتحام لكلَ بادئة مدَّة دقيقة واحدة، الجدول (٢).

– الاستطالة: عند حرارة 72 ْم مدَّة دقيقة.

3– اكتمال التفاعل عند حرارة 72 ْم مدَّة عشـر دقائق، ثمَّ حُفظت العينات في درجة حرارة 4 ْم لتفصـل الحزم بعدها بالترحيل على هلامة ميتافورآغاروز 4%.

٥–٣–الرحلان الكهربائي والتلوين والتصوير:

تمَّ الترحيل على هلامة الآغاروز 2% ، [(10X TBE buffer= 108 g Tris borate + 55 g Boric acid + 9.2g EDTA,pH=8)] والمضـــاف إليها 5µl/100ml من صـــبغة الايثيديوم بروماید (10 µg/µl)، وحُملت عينات الحمض النووي DNA على هلامة الآغاروز 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 حُقن مؤشـر من الحمض النووي(DNA) 1Kpb من شـركة Intron وذلك لتحديد الحجم والوزن الجزيئي للحزم الناتجة ليتم بعد ذلك الترحيل بمرور حقل كهربائي قدره 100 فولط وذلك لفصل حزم الـــحمض النووي DNA الناتجة عن التضخيم لتصور الهلامة بجهاز تصوير هلامة الآغاروز Image Analyzer (Agle Eye II Staratagene)، (Sameh Magdeldin , 2012,1).

٦ –٣– التحليل الإحصائي:

جُمعت نتائج عملية التضـخيم في جداول اعتماداً على مقارنة وجود أو غياب حزم الحمض النووي DNA بين العينات المدروسـة، وأُشير إلى وجود الحزمة بالرقم (1) ولعدم وجودها بالرقم (0)، حيث تمَّ تقييم التنوع الوراثي وفق معامل Nei (1987، ١). ونُظِّمت الجداول لكلَ بادئة على حده (Zhong *et al*, 2009, 6)

تمّ تحديد درجة القرابة الوراثية، وتمّ رسم شجرة القرابة الوراثية Dendrogram بين الطرز المدروسة بتطبيق طريقة التحليل العنقودي Cluster analysis، حيث يسمح التحليل العنقودي بتقسيم الطرز المدروسة إلى مجموعات تعكس درجة القرابة الوراثية فيما بينها، فمن الممكن أن تتجمع العينات ضمن مجموعة واحدة بناءً على موطنها الأصلي، أو بناءً على أصلها ونسبها، ,قد تمَّ إنشاء هذه مصفوفة النسب المئويّة لعدم التوافق(Percent Disagreement Values) وفقاً لعدد وحدات التضاعف المشتركة بتطبيق متوسطات المجموعات الزوجية غير المزانة Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averaging (UPGMA) حســـب (Yeh *et al*, 1999, 1)، يدل ارتفاع قيم هذه المصـــفوفة على وجود تقارب وراثي، وبازديادها يزداد التقارب الوراثي بين العينات المدروســة. وحُســبت قيم معامل التعددية الشــكلية Polimorphism Information Content (PIC) للبادئات المســتعملة وفق المعادلة.:

$$PIC = 1/n \sum_{j=1}^{n} PICi$$

حيث $PICi= 1-\{f^2+(1-f^2)\}$

F تكرارية الحزم الموجودة، (1-f) تكرارية الحزم الغائبة (De Riek *et al*, 2001,1).

النتائج والمناقشة Results and Discussion

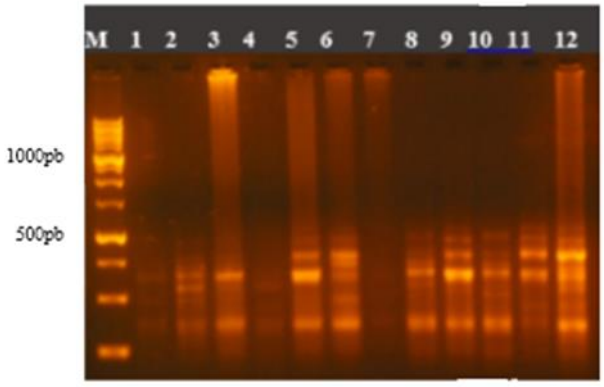
1-تقدير تركيز الـ DNA باستخدام المطياف الضوئي Spectrophotometer:

أظهر حساب النسبة بين قراءات تركيز عينات الـــ DNA المُستخلص من الطرز المدروسة عند موجات ضوئية بطول 280/260 نانومتر وباستخدام المطياف الضوئي قيماً تتراوح بين 1.80 و 2 وهي تُشير إلى نقاوة جيدة من الــــــ DNA، كما قُدِّرت تراكيز عينات الـ DNA ما بين (0.450 µg/µl -0.263) في المحلول المنظم الذي خزنت فيه هذه العينات.

٢-التعددية الشكلية الناتجة عن تطبيق تقنية ISSR في الطرز المدروسة:

تضـــمنت الدراســـة اختبار 14 بادئة، ويبين الجدول (٣) أنّ ١٣ بادئة منها أثبتت فعاليتها في إعطاء تعددية شـــكلية بين الطرز المدروســـة، في حين أنّ بادئة واحدة لم تعطِ أيّ نتائج تضـــخيم (ISSR19)، ونجم عن اســـتخدام هذه البادئات ٦١ حزمة، وبلغ المتوسط العام للتعددية الشكليّة ٩١.٦٦٪ حيث تراوحت النسبة المئوية بين ٧٥٪ مع البادئة ISSR19 و١٠٠٪ مع باقي البادئات، كما تراوح عدد الحزم لكل بادئة من حزمة واحدة كأقل عدد مع البادئة (ISSR19) و٧ مع البادئة (ISSR5)، بمتوسط 4.06 حزمة لكل بادئة. لم تتوافق هذه النتائج مع النتائج التي توصـل إليها Al-Hadeithi (2015) في دراسـته على محصـول الشّـعير، حيث تراوحت النسبة المئوية للتعددية الشكلية بين ٢٥٪ مع البادئة ISSR19 و100% مع بقية البادئات.

تراوحت قيم معامل التعددية الشـــكلية (PIC) من0.181 عند البادئة ISSR35 كأقل قيمة، و0.352 عند البادئة ISSR32 كأعلى قيمة، وبلغ المتوســط العام 0.262، مما يشـير إلى قدرة البادئات المسـتعملة على التمييز بين الطرز المدروســة. وهذا يتوافق مع ماتوصّــل له Gougerdchi وآخرون(٢٠١٤) الذي أشار إلى قدرة البادئات المستعملة في دراسته على الشعير في رومانيا على تمييز التباينات الوراثية بين الطرز المدروسة وإظهارها (١). وتكمن أهمية التنوع الوراثي (قيمة الـــــPIC) أنها تزودنا بقوة تمييز موقع ما على المجين من خلال الأخذ بالحسبان ليس فقط عدد النظائر في الموقع الواحد بل أيضاً التكرار النسبي لتلك النظائر ضمن أفراد الصنف المدروس، بمعنى آخر تعبر قيمة الـPIC عن احتمال أن تمتلك العينات المسحوبة عشوائياً حزماً مختلفة لذات الموقع الوراثي.



الشكل(١): صورة هلامة الآغاروز 2% لملاحظة التعددية الشكلية الناتجة عن استخدام البادئة (ISSR10) في جميع الطرز المدروسة، M يمثل المؤشر الجزيئي لتحديد أطوال حزم الحمض النووي DNA.

(١):صنف بلدي سويداء، (٢): *H.spontaneum* (سويداء)،(٣): *H.marinum* (سويداء)، (٤): عربي أبيض (درعا)، (٥): *H.spontaneum*(درعا)، (٦): *H.marinum* (درعا)، (٧): فرات٣ (دمشـــق)، (٨):): *H.spontaneum*(دمشـــق)، (٩): *H.marinum* (دمشق)، (١٠): عربي أسود (يبرود)، (١١): *H.spontaneum* (يبرود)، (١٢): *H.marinum* (يبرود).

الجدول (٣): رموز البادئات المستعملة وعدد الحزم الكلّية والمتباينة شكلياً، النسبة المئوية للتعددية الشكلية%، وقيم معامل التعددية الشكلية PIC في الطرز المدروسة.

اسم البادئة	عدد الحزم الكلية	عدد الحزم المتباينة شكلياً	النسبة المئوية للتعددية الشكلية %	PIC
ISSR3	4	٤	١٠٠	٠.٢٤٠
ISSR5	7	٧	١٠٠	٠.٢٥١
ISSR19	1	1	75	0.291
ISSR20	5	5	100	0.341
ISSR21	4	4	100	0.214
ISSR22	4	3	100	0.331
ISSR23	4	4	100	0.321
ISSR25	4	4	100	0.221
ISSR26	3	3	100	0.335
ISSR27	6	6	100	0.249
ISSR28	5	5	100	0.332
ISSR32	4	٤	١٠٠	٠.٣٥٢
ISSR35	6	٦	١٠٠	٠.١٨١
ISSR37	4	٤	١٠٠	٠.٢٨٢
المجموع	**61**	**60**	**1375**	**3.941**
المتوسط	**4.06**	**4**	**91.66**	**0.262**

٣-تحديد درجة القرابة الوراثية بين الطرز المدروسة من الشّعير باستخدام تقنيةISSR:

يُفيد تحديد درجة القرابة الوراثية بين الطرز المدروسة في برامج تربية النبات، في تأمين قاعدة وراثية عريضة، للاستفادة منها في برامج التهجين. تمَت دراسة العلاقة الوراثية بين طرز الشّعير المدروسة بتطبيق مصفوفة النسب المئوية لعدم التوافق (PDV) Percent Disgreement Values، حيث أن ارتفاع قيم هذه المصفوفة يدل على وجود اختلاف وراثي وبازديادها يزداد التباين الوراثي بين الطرازين المدروسين ويتم إنشاء هذه المصفوفة وفقاً لعدد وحدات التضاعف المشتركة بينها.

يُلاحظ من الجدول(٤) أنّ أعلى قيمة لمصفوفة النسب المئوية لعدم التوافق PDV هي **0.5008** بين الطراز *H.spontaneum* (دمشق) *H.marinum* (يبرود) وهذا يدل على أنهما على درجة كبيرة من التباين الوراثي ، بينما كانت أقل قيمة لـ PDV هي**0.0308** بين الصنف عربي أبيض (درعا) والصنف عربي أسود (يبرود).

تباينت هذه النتائج مع ما توصلت إليه Al-Hadeithi (2015،١) فقد تراوحت درجة القرابة الوراثية بين 9 طرز وراثية من الشّعير من (0.6897) إلى (0.0854).

الجدول(٤): مصفوفة النسب المئوية لعدم التوافق (PDV) بين الطرز المدروسة والناتجة عن تطبيق متوسطات المجموعات الزوجية غير المزانة UPGMA بتطبيق تقنية الـ ISSR، حسب (Nei، 1987).

	عربي أسود	*H.sp.* دمشق	*H.ma.* درعا	*H.ma.* يبرود	*H.ma.* سويداء	*H.sp.* يبرود	*H.ma.* دمشق	*H.sp.* سويداء	فرات ٣	بلدي سويداء	عربي أبيض	*H.sp.* درعا
عربي أسود	***											
H.sp. دمشق	0.2384	***										
H.ma. درعا	0.3185	0.3610	***									
H.ma. يبرود	0.4520	**0.5008**	0.1846	***								
H.ma. سويداء	0.3185	0.3610	0.0614	0.0954	***							
H.sp. يبرود	0.2007	0.1643	0.2355	0.3621	0.2369	***						
H.ma. دمشق	0.3185	0.2276	0.1254	0.1645	0.0645	0.1634	***					
H.sp. سويداء	0.2776	0.4053	0.2312	0.3633	0.2356	0.2776	0.2385	***				
فرات ٣	0.0625	0.3185	0.3121	0.4214	0.3122	0.2776	0.3168	0.2775	***			
بلدي سويداء	0.1292	0.2834	0.3154	0.3674	0.2354	0.2007	0.2385	0.2607	0.1292	***		
عربي أبيض	**0.0308**	0.2271	0.3612	0.4123	0.2745	0.2387	0.2763	0.2367	0.0953	0.0932	***	
H.sp. درعا	0.2776	0.1643	0.3185	0.3675	0.2314	0.0771	0.2389	0.2796	0.3610	0.2007	0.2325	***

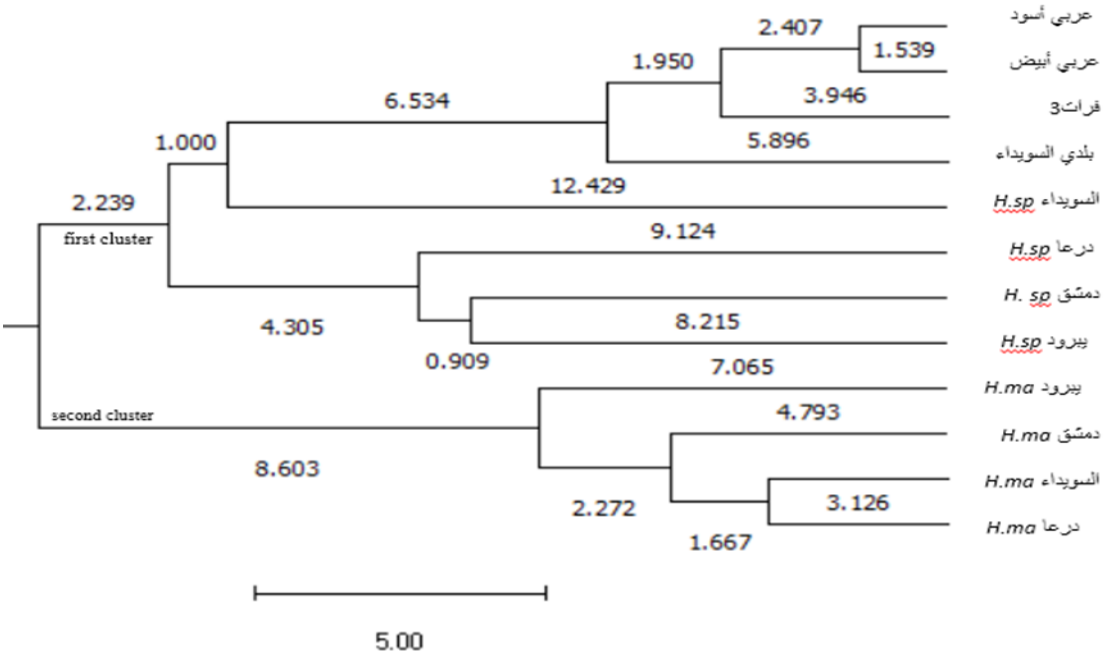
H.sp. : اختصار ***Hordeum spontaneum*** ***H.ma.*** اختصار ***Hordeum marinum***.

٤ – التحليل العنقودي (Cluster analysis) للطرز المدروسة من الشّعير:

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

أُجري التحليل العنقودي للنتائج التي تمّ الحصول عليها، وذلك لإنشاء شجرة القرابة الوراثية Dendrogram، ويُلاحظ من الشكل(2) أنّ شجرة القرابة الوراثية انفصلت إلى عنقودين رئيسين (clusters)، انقسم العنقود الأول إلى تحت عنقودين رئيسين، ضمّ تحت العنقود الأوّل الطرز المزروعة بالإضافة إلى الطراز *H.spontaneum* (السويداء) الذي انفصل بتحت عنقود مستقل وبمسفة وراثيّة ١٢.٤٢٩، وكان الطرازين عربي أبيض وعربي أسود الأقرب وراثيّاً بمسافة١.٥٣٩، في حين أنّ تحت العنقود الثاني ضمّ الطرز البريّة *H.spontaneum* (درعا)، *H.spontaneum*(دمشق)، *H.spontaneum*(يبرود)، مما يُشير إلى أنّ العنقود الأول انفصل حسب المنشأ (الموطن الأصلي)، وهذا يتوافق مع Badr وآخرون (٢٠٠٠) حيث بيّن أن الشعير (*Hordeum vulgare L.*) تمّ استئناسه من سلالة (*Hordeum vulgare subsp. spontaneum*) (155-١٦٥)، أمّا العنقود الثاني فقد ضم الطرز البريّة من نوع *H.marinum* التي جُمعت من يبرود، دمشق، السويداء، درعا، وكان الطرازين *H.marinum* (درعا) و *H.marinum* (السويداء) الأقرب وراثيّاً بمسافة وراثيّة ٣.١٢٦، مما يُشير إلى أنّ هذه الطرز انفصلت حسب التوزع الجغرافي لها.

وبذلك نجد أنّ شجرة القرابة الوراثيّة انفصلت حسب المنشأ (الموطن الأصلي) والتوزع الجغرافي وحسب الأنواع للطرز المدروسة وبالتالي يُمكن استخدام الطرز البريّة كآباء ضمن برامج التربية والتحسين الوراثي نظراً لبعدها الوراثي عن الطرز المزروعة.



الشكل (٢): التحليل العنقودي للطرز المدروسة، الناتج عن استخدام تقنية ISSR

H.sp.*: اختصار *Hordeum spontaneum ***H.ma*. اختصار *Hordeum marinum*.**

الاستنتاجات Conclusions:

١. أظهرت تقنية ISSR تعددية شكلية بلغت ٩١.٦٦ %، الناتجة عن استخدام ١٤ بادئة ما يشير إلى فعالية التقنية في التمييز بين الطرز الوراثية المدروسة.

٢. تبيّن أنّ أعلى قيمة لمصفوفة النسب المئوية لعدم التوافق PDV هي 0. 5008 بين الطراز *H.spontaneum*(دمشق) و الطراز *H.marinum* (يبرود) وهذا يدل على البعد الوراثي بينهما، بينما كانت أقل قيمة لـ PDV هي ٠.٠٣٠٨ بين الصنفين عربي أبيض وعربي أسود مما يدل على وجود قرابة وراثية بينهما.

٣. انقسمت شجرة القرابة الوراثية إلى تحت عناقيد حسب المنشأ والأنواع.

التوصيات Suggestions :

١. الاعتماد على تقنية ISSR في القيام بهذه الدراسات على طرز وأنواع أخرى لأنها أظهرت فعاليتها في التباين الوراثي.

٢. يمكن العمل مستقبلاً على تحديد مواقع المورثات المسؤولة عن الصفات المهمة باستخدام QTLs ، والاستفادة منها في برامج التربية واستخدامها كآباء في عمليات التهجين.

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

References:

١. أشتر، سها (2009). *تقييم بعض الطرز الوراثية من الأقماح السورية (السداسية والرباعية) باستخدام معلمات بيوكيميائية وجزيئية مختلفة*. رسالة دكتوراه، كلية الزراعة، جامعة تشرين، الجمهورية العربية السورية. عدد الصفحات 204.

٢. التمو، منور. (2007). *دراسة خصائص بعض التراكيب الوراثية من الشّعير (Hordeum spontaneum) وتقويم أهميتها كمصادر وراثية لتحمل الجفاف*. رسالة ماجستير، قسم المحاصيل الحقلية، كلية الزراعة، جامعة دمشق، الجمهورية العربية السورية.

٣. بركودة، يوسف وأكرم درويش. (١٩٩٩). *التقرير الوطني للتنوع الحيوي (البيولوجي) في الجمهورية العربية السورية*– وزارة الدولة لشؤون البيئة.

٤. سيد، محمود هيثم(2001). *استخدام مؤشرات من الدنا DNA في انتخاب مورثات المقاومة للأمراض في الشّعير*، أطروحة دكتوراه، قسم المحاصيل الحقليّة، كلية الزراعة، جامعة دمشق، الجمهورية العربية السورية.

5. Akbulut, M., Ocal, N., Ceylan, A., Gurcan, K. and Aliyev., R.T.(2018). *Estimation of Genetic Diversity and Population Structur among Turkish and Azerbaijani Barley Accessions based on ISSR and RAPD Markers*. The J. Anim. Plant Sci. 28(3).
6. Al_ Hadeithi, Z. S. M. (2015). *Using ISSR markers to build a phylogenetic of Barley Genotypes*. Iraqi Journal of Science,56(2) PP: 1682-1688.
7. Badr A, Müller K, Schäfer-Pregl R, El Rabey H, Effgen S, Ibrahim HH, Pozzi C, Rohde W, Salamini F (2000) *On the origin and domestication history of barley (Hordeum vulgare)*. Molecular Biology and Evolution 11: 155-165.
8. Barkworth ME, von Bothmer R Scientific names in the Triticeae. In: Muehlbauer GJ, Feuillet C (eds) (2009) *Genetics and genomics of Triticeae. Springer*, New York, pp 3–30.
9. Caldwell K, Russell J, Langridge P, Powell W (2005) *Extreme population-dependent linkage disequilibrium detected in an inbreeding plant species, Hordeum vulgare Genetics*172:557567.
10. Canci, P., L.M. Nduulu, R. Dill-Macky, G. Muehlbauer, D. and Smith, p. (2003). *Genetic relationship between kernel discoloration and grain protein concentration in barley.* Crop Science, 43(5), pp: 1671-1679.
11. De Riek, J; Calsyn, E.; Everaet,L; Van, Bockstaele, E.; De Loose, M. AFLP.(2001). *AFLP based alternatives for the assessment of distinctness, uniformity and stability of sugar beet varieties*. Theortical and Applied Genetics 103: 1254-1265.doi.10.1007//s001220100710.
12. Djshwar Lateef, Kamil Mahmud Mostfa, Nawroz Tahir, (2021). *Genomic* v*anation and genetic stracture profile of Iraqi barley accessions using ISSR and arbitrary functional gene-based molecular markers*. Article fromUniversity Sulaimani, Augast, 17th, http//doi.org//0.2103/rs.3.rs-787338/v1.
13. Eleuch. L, A. Jalil, S. Grando, S. Ceccarelli, M. Schmising, H. Tsujimoto, A. Hajer, A. Daaloul and M. Baum.(2008). *Genetic Diversity and association analysis for salinity tolerance, heading date and plant height of wheat gemoplasm using simple sequence repeat markers*. J. Integr. Plant Biolo. 50(8):1005-1015.
14. Ellis, R.P. (2000). *Wildbarley as asource of genes for crop Improvement, in G.A. Slafer, J.L. Molina-Cano, R. Savin, J.L. Araus, and I. Romagosa (eds)* , *Barley Science. Recent advanges from molecular biology to agronomy of yield and quality*, Food Products Press, Binghampton, USA, pp 65-83.
15. Fischbeck, G. (2003). "Contribution of barley to agriculture: *A brief overview", in G.A Slafer, J.L. Molina-Cano,R. Savin, J.L. Araus, and I. Romagosa(eds.), Barley Science, Recent advantages from molecular biology to agronomy of yield and quality.* Food Production Press, Binghampton, USA,pp. 1-14.

16. Forster BP, Ellis RP, Thomas WTB, Newton AC, Tuberosa R, This D, El-Enein RA, Bahri MH, Salem MB (2000) *The development and application of molecular markers for abiotic stress tolerance in barley*. J Exp Bot 51:19–27.
17. Gougerdchi. A., Dezhsetan. S., Ebrahimi. M.A., Sadeghzadeh. B., Savari. S.(2014) *Using SSR Markers for Assessment Genetic Diversity and Detection Drought Escape Candidate Genes in Barley Lines (Hordeum vulgare L.).* DOI: 10.1515/plass-2015-0009
18. Mariey.A.S, Mona A.M. El-Mansoury and Maha A. El-Bialy.(2018). *Genetic Diversity Study of Egyptian Barley Cultivars Using Sequence-Related Amplified Polymorphism (SRAP) Analysis for Water Stress Tolerance*. Sus. Agric .Sci. Vol.44, No.1,pp. 21 – 37.
19. Nei, M. (1987). *Molecular Evolutionary Genetics. Columbia University Press, New York,* NY.
20. Powell,W., Morgante, M., Doyle,J.J., Mcnical,J., Tingey,S.V., and Rafalski.(1996). *Genepool Variation in Genus Glycine Subgenus Soja Revealed by polymorphic Nuclear and chloroplast*.
21. Ramsay, L.; Macaulay, M.; DegliIvanissevich, 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.
22. Samah, A. M., Mona, A., F. and Karima, A., R.(2018). *Morphological and Molecular Characterization of Some Egyption Barley Cultivars under Calcareous Soil conditions.* Middle *East Journal of Agriculture Research*. 7(2) pp: 408-420.
23. Sameh Magdeldin, ed. (2012). *Gel electrophoresis – Principles and Basics. InTech.*
24. Shakhatreh Y, Haddad N, Alrababah M, Grando S, Ceccarelli S (2010) Phenotypic diversity in wild barley (Hordeum vulgare L. ssp. spontaneum (C. Koch) Thell.) accessions collected in Jordan. Genet Resour Crop Evol 57:131–146.
25. Shayan, S., Moghaddam Vahed, M., Mohammadi, S. A., Ghassemi Golezani, K., Sadeghpour, F., & Youssefi, A. J. J. o. P. P. (2019). *Genetic diversity of winter barley genotypes for root traits and ISSR markers and interrelationship of these characters*.
26. Shiva, I.,Kianoosh, C. and Danial, K.(2017). *Anther culture response and genetic relationships between Iranian and European barley (Hordeum vulgare L.) cultivars. Journal of Biotechnology*, 98(4), pp: 295-304.
27. Stein, N., Herren, G. and Keller, B. (2001). *A new DNA extraction method for high-throughput marker analysis in a large genome species such as Triticum aestivum*. *Plant Breeding*. 120: 354-356.
28. Van Beuningen, L.T. and Busch R.H. (1997).*Genetic diversity among North American spring wheat cultivars: III. Cluster analysis based on quantitative morphological traits. Crop Sci.*37: 981-988.
29. Velicevici G., Madosa, E., ciulca S.,Camen, D.,ciulcaA., Petolescu. C Malaescu. M., Nistor. E and Beinsan. C. (2018). *Analysis of genetic diversity in barley cultivars using ISSR markers.* Journal of Horticulture, Forestry and Biotechnology, 22 (2),pp:19-25.
30. Yeh, F.C., R.C. Yang and T. Boyle.(1999). POPGENE 32- version 1.31.Population Genetics Software.
31. Zhong, J.; X.Lv; R.Liu and H.Chen. (2009). *Genetic Relationship of Sweet Cherry (Prunus avium L.) Based on SSR Markers*. Plant Sciences Research. 2(1): 6-10 .