مجلة جامعة دمشق للعلوم الزراعية
المجلد 40 العدد 3 (2024): 227–240
Damascus University Journal of Agricultural Sciences
Vo 40 No.3 (2024): 227-240

التوصيف الجزيئي لبعض طرز الذرة البيضاء باستخدام تقنية التكرارات الترادفية البسيطة الداخلية ISSR

فاطمة الجنعير [1]

[1]عضو هيئة فنية– مشرف على الأعمال– قسم المحاصيل الحقلية– كلية الزراعة – جامعة دمشق.

الملخص:

نفذت الدراسة في مخبر التقانات الحيوية التابع لقسم المحاصيل الحقلية في كلية الزراعة–جامعة دمشق خلال الموسم 2021 بهدف التوصيف الجزيئي لـ 9 طرز من الذرة البيضاء وهي (أكلموني، جيزة 15، مصر 9، جازان الأحمر، شلخ6، jioue، شهلا، طابت، عماني محلي) باستخدام تقنية ISSR، حيث استخدم في البحث 25 بادئ ISSR. بينت النتائج التي تم الحصول عليها أن16 بادئة أعطت نتائج تضخيم، بينما 9 بادئات لم تعطِ نتائج تضخيم، ونجم عن استخدام هذه البادئات 81 حزمة، منها 69 حزمة متباينة شكلياً polymorphic، فبلغت نسبة التعددية الشكلية 87.32%، تراوح عدد الحزم لكل بادئة من 2 حزمتين كأقل عدد عند البادئة ISSR 36 إلى 12 حزمة كأعلى عدد عند البادئةISSR 17 بمتوسط 5.1 لكل بادئة، وحُسب معامل التعددية الشكلية PIC لكل بادئة على حده، فبلغ المتوسط العام 0.42. لوحظ أن أقل قيمة لمصفوفة النسب المئوية لعدم التوافق PDV هي 0.092 بين الطرازين الوراثيين مصر 9 وجيزة 15 (من مصر)، مايشير إلى التقارب الوراثي الكبير، وكذلك بين الطرازين الوراثيين طابت وأكلموني (السودان)، بينما كانت أعلى قيمة لـ PDV هي 0.693 بين الطرازين شلخ6 (سورية) وجازان الأحمر(السعودية) مايدل على وجود تباين وراثي كبير بينهما. تلاهما الطراز شلخ 6 وكل من أكلموني وطابت بقيمة لـ PVD بلغت 0.664. انقسمت شجرة القرابة الوراثية Dendrogram للطرز المدروسة، إلى عنقودين رئيسين، ضم العنقود الأول الطراز الوراثي شلخ 6 وهو الأبعد وراثياً (سورية) وقد انفصل بشكل مستقل، في حين ضم العنقود الثاني بقية الطرز الوراثية، والذي انقسم بدوره إلى تحت عنقودين ضم تحت العنقود الأول الطراز الوراثي عماني محلي (عمان)، بينما ضم تحت العنقود الثاني كل من جازان وشهلا وبقية الطرز، وكان الطرازان مصر 9 وجيزة 15 الأقرب وراثياً، وبالتالي نلاحظ أن طرز الذرة البيضاء المدروسة انفصلت وفق توزعها الجغرافي مايشير إلى فعالية تقنية ISSR في سبر التباين الوراثي بين طرز الذرة البيضاء.

الكلمات المفتاحية: ذرة بيضاء، طرز وراثية، تقنية ISSR، شجرة القرابة الوراثية، معامل التعددية الشكلية

تاريخ الايداع:2022/11/20
تاريخ القبول: 2023/1/3

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

ISSN: 2789-7214 (online)
http://journal.damascusuniversity.edu.sy

Molecular characterization of some genotypes of sorghum using inter simple sequence repeats technique ISSR

Fatema AL-Ganeer[1]
[1]Department of Field Crops, Faculty of Agriculture, Damascus University, Damascus, Syria.

Abstract:
This investigation was conducted in the laboratory of biotechnology affiliated to the Department of Field Crops, Faculty of Agriculture, Damascus University, during (2021) season, for Molecular characterization of some genotypes of sorghum (Aklamoni, Giza 15, Misr 9, Jazan Al Ahmar, Shalakh 6, jioue, Shahla, Tabit, Omani local) using Inter Simple Sequence Repeats technique ISSR.Twenty five ISSR primers were used for this purpose, The results showed that 16 primers were effective in showing polymorphism between the examined sorghum genotypes. The primers gave 81 bands 69 of them were polymorphic, with a polymorphism percentage of **87.32** %. the number of bands for each primer ranged from **2** bands for the primer ISSR36 to **12** bands for the primer ISSR17with an average of **5.1** bands. The PIC was calculated for each primer separately, and the average was 0.42. It was observed that the lowest value of PDV was 0.092 between the two genotypes Misr9 and Giza15 (which are from Egypt), as well as between the two genotypes Tabit and Aklamoni (both from Sudan), while the highest value of PDV was 0.693 between the two genotypes, Shalakh6 (Syria) and Jazan Al-Ahmar (Saudi Arabia), which indicates a large genetic variation between them. They were followed by the genotypes Shalekh 6, Tabit and Aklamoni with a PVD value of 0.664. Cluster analysis divided the nine genotypes into two main clusters, the first cluster included Shalekh 6 which is the farthest, and the second cluster included the others,Which was divided into two sub clusters, the first one included local Omani while the second included Jazan and Shahla, and the two genotypes Egypt 9 and Giza15 were the closest genetically. So, the studied genotypes were separated according to their geographical distribution, which indicates the effectiveness of the ISSR technique in probing the genetic variation between sorghum genotypes.

Key Words: Sorghum, Genotypes, Polymorphism, Dendrogram, ISSR, PIC

Received: 20/11/2022
Accepted: 3/1/2023

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

المقدمة Introduction:

يتبع محصول الذرة البيضاء *sorghum bicolor* L. إلى الفصيلة النجيلية *Poaceae*، و الجنس *sorghum*، و النوع *bicolor* (Snowden، 1955، 191)، ويعد من المحاصيل المتعددة الاستخدام فهو محصول غذائي لحوالي 750 مليون شخصاً في المناطق الجافة من العالم، حيث تُستعمل حبوبه في صناعة الخبز وبعض الأطعمة، وكعلف مركز في عليقة الدواجن ويمكن أن تُستعمل النباتات الخضراء كعلف أخضر وفي تصنيع السيلاج، وتدخل حبوبه في العديد من الصناعات كصناعة النشاء، والكحول وسكر الغلوكوز والوقود الحيوي (Mathur وزملاؤه، 2017، 146). تصنف الذرة البيضاء كخامس المحاصيل الحبية بعد محصول القمح wheat والرز Rice والذرة الصفراء Maiz والشعير Barley من حيث المساحة والإنتاج حيث بلغت المساحة المزروعة عالمياً 4.067 مليون هكتاراً والإنتاج 513.59 مليون طناً (FAO، 2019).

مبررات البحث Justifications:

إنّ الموارد الوراثية التي يتم جمعها يمكن أن تسهم في برامج التربية والتحسين الوراثي، لذلك فإنّ عملية توصيف وتقييم هذه الموارد أمراً لا بدّ منه للكشف عن القيمة الكامنة فيها، وسيكون من المهم جداً من أجل المستقبل ليس فقط الحفاظ على الموارد الوراثية، وإنّما أيضاً توصيفها لاكتشاف خصائصها التي يمكن أن تساهم في تحسين وتطوير أداء الأنواع النباتية المختلفة مع ضمان استدامة الإنتاج الزراعي، فعملية تقييم وإدخال الطرز الوراثية المتباينة من أهم طرائق التربية والتحسين الوراثي السريعة التي تقدم لمربي النبات معلوماتٍ واضحةٍ ودقيقة عن أداء هذه الطرز الوراثية في منطقة الزراعة المستهدفة، وتحديد الطرز الوراثية المتفوقة من خلال دراسة سلوكها وصفاتها الكمية والنوعية، وبالتالي يتوافر لدى مربي النبات قاعدة وراثية عريضة تتيح له انتخاب الطرز المتفوقة ذات الصفات المرغوبة، والاستفادة منها في برامج التربية والتحسين الوراثي.

إنّ استعمال التقانات الحيوية على المستوى الجزيئي للمادة الوراثية DNA أدّى إلى تسريع وتحسين برامج تربية المحاصيل. إذْ تُعدّ المؤشرات الجزيئية Molecular markers ذات أهمية قصوى على صعيد مجال تربية النبات، إضافة إلى أنها تعد مؤشرات مساعدة في إسراع عمليات الانتخاب والتربية، وهي بذلك تختصر الزمن الذي تستغرقه عمليات التربية.

هدف البحث Objective :

تقييم التنوع الوراثي وتحديد درجة القرابة الوراثية لـ 9 طرز وراثية من الذرة البيضاء Sorghum مختلفة المصادر الجغرافية باستخدام إحدى المؤشرات الجزيئية وهي تقنية التكرارات الترادفية البسيطة الداخلية ISSR.

الدراسة المرجعية Literature Review:

تعرف المصادر الوراثية بأنها التباين الوراثي الممكن الاستفادة منه زراعياً، وتتميز بتنوعها الوراثي الكبير وقدرتها على تحمل الإجهادات الإحيائية واللاإحيائية والباكورية بالنضج (شاهرلي والأوبري، 2004)، وتشكل هذه الموارد المادة الخام الأهم لمربي النبات ومورد أساسي للمزارعين كما أنها ذخيرة وراثية للوقاية من التغيرات البيئية والاقتصادية الضارة المحتملة (Lane،2007، 19). أكد Diederichsen وزملاؤه (2007، 15) أن الموارد الوراثية تساهم في برامج التربية، لذلك فإن عملية توصيف وتقييم هذه المادة الوراثية أمر ضروري للكشف عن القيمة الكامنة فيها، وقد استخدمت الدراسات المورفولوجية على نطاق واسع مع نبات الذرة البيضاء لدراسة العلاقات الوراثية بينها وإعطاء معلومات مفيدة لمربي النبات (Brandeland، 2007، 49). وقد بين Degani

وزملاؤه (1998، 247) أن الاعتماد على الصفات الشكلية لدراسة التنوع النباتي غير كافٍ، وبشكل خاص عند وجود تقارب كبير بين النباتات المدروسة، كما أن هذه الصفات شديدة التأثر بالظروف البيئية المحيطة بالنبات، تعد التباينات الشكلية من المعايير الأولى التي استخدمت في عملية التوصيف والتصنيف ودراسة التباينات بين الأنواع المختلفة وداخل النوع الواحد، إلا أنه في الآونة الأخيرة وفي ظل التطوّر المتسارع في علم التقانات الحيوية، اكتشفت معايير ومؤشرات أكثر دقّة يمكنها تحقيق هذا الهدف وتطويره، أهمها دراسة التنوع الوراثي باستخدام المؤشرات الجزيئية التي تستند على معلومات مأخوذة من جزيئة الحمض النووي الريبي منقوص الأوكسجين DNA، والتي تسمح بالتمييز بين فردين محددين.

تعد المؤشرات الجزيئية Molecular Markers ذات أهمية كبرى في مجال تربية النبات، فهي توفر مؤشرات مساعدة في إسراع عمليات الانتخاب والتربية وهي بذلك تختصر الزمن الذي تستغرقه عمليات التربية إضافة لخفضها التكاليف المادية (سيد، 2001)، وقد أدى تطور التقانات الحيوية إلى ظهور عدد كبير من المعلمات الجزيئية المهمة التي تتباين في نوع ومستوى المعلومات التي تزودنا بها والتي بالاعتماد عليها يتم إنشاء خرائط الارتباط الوراثي وتحليل التباين والتشابه الوراثي (Powell وزملاؤه، 1996، 230). تستخدم تقنية التكرارات الترادفية البسيطة الداخلية Inter Simple Sequence Repeat ISSR كمعلم جزيئي في دراسة البنية الوراثية والتنوع الوراثي، وتعد كواحدة من التقنيات المهمة المعتمدة على التفاعل التسلسلي البوليميرازي التي طبقت من قبل Ziekiewicz وزملاؤه (1994، 180)، وتوصف بأنها أكثر تكرارية من تقنية RAPD بسبب طول البادئات المستخدمة والتي تعكس درجة عالية من الحرارة لمرحلة تشفع البادئات (Chowdhury وزملاؤه، 2002، 320). إن الميزة الرئيسة لتقنية ISSR أنها لا تتطلب وقتاً طويلاً لبناء المكتبة الوراثية، وعلى الرغم من حقيقة كونها تورث كمعلمات سائدة وأحياناً غير سائدة إلا أنها معلمات ذات طبيعة عشوائية فهي مناسبة بشكل خاص لدراسات علم الوراثة وتقييم التنوع الوراثي وتحديد هوية الأصناف (Nagaraju وزملاؤه، 2002، 5837). ولكون معلمات ISSR غزيرة فإنها تعطي عدداً كبيراً من الحزم ومستوى عال إلى متوسط من التعددية الشكلية، القدرة على التضخيم عالية إلى متوسطة، والتكاليف منخفضة كما أن جهد تنفيذها منخفض (Van der Nest وزملاؤه،2000، 435).

قام Bashandy (2016، 265) بدراسة التنوع الوراثي باستخدام تقنية ISSR بين أربعة طرز وراثية(سلالات برية) من الذرة البيضاء جمعت من ثلاث مناطق مختلفة من محافظة الوادي الجديد في مصر بالإضافة للصنف المحلي التجاري جيزة 15 كشاهد ، بينت النتائج أن نسبة التعددية الشكلية بلغت 87.8%، وكانت أعلى درجة تشابه 0.69 وجدت بين السلالتين SL4 و SL2 بينما أظهر الصنف جيزة15 والسلالة SL1 أدنى درجة تشابه وراثي (0.48)، كما انفصلت شجرة القرابة الوراثية في عنقودين رئيسين ضم العنقود الأول الصنف جيزة 15 بينما ضم العنقود الثاني السلالات الأربعة الأخرى، حيث انفصل الأخير إلى تحت عنقودين ضم الأول السلالة SL1 بشكل منفرد بينما ضم تحت العنقود الآخر كلاً من SL4 و SL2 اللتين جمعتا من نفس المنطقة مع بعضهما، والسلالة SL1 بشكل منفصل، مما يدل إلى أن شجرة القرابة الوراثية انفصلت حسب التوزع الجغرافي.

درس Taher وزملاؤه (2015، 355) التنوع الوراثي لـ 10 طرز وراثية من الذرة البيضاء باستخدام تقنية ISSR، بينت النتائج أن البادئات أعطت 95 حزمة ،93 منها كانت متعددة شكلياً حيث بلغت نسبة التعددية الشكلية 96.51%، وبلغت قيمة معامل PIC 0.41، أظهر التحليل العنقودي لشجرة القرابة الوراثية انفصال الطرز المدروسة في عنقودين رئيسين ضم العنقود الأول الطرز السورية والأفريقية، بينما ضم العنقود الآخر الطرز الآسيوية مما يدل إلى أن شجرة القرابة الوراثية انفصلت حسب التوزع الجغرافي للطرز الوراثية المدروسة.

مواد البحث وطرائقه:

1. المادة النباتية Plant Material:

أجريت الدراسة على 9 طرز من الذرة البيضاء تم الحصول على البذار من قسم المحاصيل الحقلية في كلية الزراعة – جامعة دمشق، والجدول (1) يوضح مصدر وبعض مواصفات هذه الطرز.

الجدول (1): مصدر وبعض مواصفات طرز الذرة البيضاء المستخدمة في الدراسة.

الطراز	المصدر	إزهار/يوم	نضج/ يوم	العثكول			ارتفاع النبات (سم)
				لون	شكل	الطول سم	
أكلموني	السودان	67	93	كريمي	مندمج	16.9	198.7
جيزة15	مصر	80	128	كريمي	مندمج	16.4	106.6
مصر9	مصر	64	95	كريمي	مندمج	30.30	160.9
جازان الأحمر	السعودية	81	122	أبيض	نصف مندمج	19	260
شلخ 6	سوريا	62	120	كريمي	نصف مندمج	14.2	84.9
Jioue	موريتانيا	75	120	أحمر	مندمج	0.01	100.3
شهلا	السعودية	81	122	أبيض	نصف مندمج	13.2	201.1
طابت	السودان	61	111	أبيض	نصف مندمج	18	130
عماني محلي	عمان	53	108	كريمي	مندمج	14.2	84.9

المصدر: كلية الزراعة – قسم المحاصيل الحقلية

1- موقع تنفيذ التجربة Research Site:

نُفذ البحث في مخبر التقانات الحيوية التابع لقسم المحاصيل الحقلية في كلية الزراعة– جامعة دمشق، خلال العام 2021.

2- استخلاص الحمض الريبي النووي DNA:

استُخلص الـ DNA من البادرات الفتية بعمر 2–3 أسابيع، بطحن 1 غرام من الأوراق الخضراء، باستخدام الآزوت السائل حتى الحصول على مسحوق ناعم، حسب Dellaporta وزملاؤه (1983، 20)، ثم نُقل المسحوق إلى حوجلة زجاجية سعة 50 مل وأضيف 10 مل من محلول الاستخلاص SDS و المكون من: 0.1 Tris-HCl, PH=8.2, 50mM EDTA, 0.1M NaCl, 2% (SDS,1mg/ml) proteinase K). حُضنت العينات لمدة 60 دقيقةً ضمن حمام مائي عند 37°م. أُضيف 10 مل من مزيج كلوروفورم/أيزواميل كحول بنسبة 24:1. نُقل المزيج إلى أنبوب سعة 30 مل وثُفل لمدة 10 دقائق بسرعة (10000دورة/دقيقة) بدرجة حرارة 4°م. أُضيف الإيزوبروبانول Iso-propanol بمعدل 3/2 من حجم الوسط المائي، ثم نُقل الـ (DNA) المترسب إلى أنبوب صغير سعة 2 مل، وأُضيف 0.5 مل من محلول الغسيل (Washing buffer) (كحول إيتيلي 70%) البارد والمحفوظ بدرجة –20مْ، ثمَّ التثفيل بسرعة (10000دورة/دقيقة) لمدة 10 دقائق وبدرجة حرارة 4 مْ. أُذيبت عينات الـ (DNA) في 500ميكروليتر من المحلول المنظم TE المكون من 10 ميلي مول Tris، 1ميلي مول EDTA. وتمَّ التخلص من الحمض النووي RNA بإضافة 2 ميكروليتر من أنزيمRNaseI (10 مغ/مل) والتحضين على درجة (37°م) مدة نصف ساعة، ومدد تركيز الـ DNA ليصبح 40 نانوغرام/ميكروغرام.

3- التقدير الكمي والنوعي للحمض الريبي النووي DNA

استخدم جهاز الطيف الضوئي (UV. Spectrophotometer) لتقدير كمية الحمض النووي المستخلص وتحديد درجة نقاوته، ويعتمد الجهاز في عمله على قياس كمية الـ DNA عن طريق تقديره لامتصاص الـ DNA للأشعة فوق البنفسجية بطولي موجتين 260 و280 نانومتر ثم تحسب النسبة بينهما(Prabhakar و Mark، 2002). وقد ذكر Maniatis وزملاؤه (1982) أنّ النسبة بين قراءة الموجة 260 نانومتر والموجة 280 نانومتر OD 260/ OD 280 تُساعد في تقدير نقاوة الحمض النووي، إذْ يجب أن تتراوح هذه النسبة بين 1.8–2، كما أوضح الباحث نفسه أنّ قراءة الامتصاص على طول الموجة 260 نانومتر تسمح بحساب تركيز (DNA) في العينة المُقاسة، إذْ أنّ كل وحدة من الكثافة الضوئية (Optical density, OD) تقابل نحو µg/ml 50 من (DNA) (ذات السلاسل المضاعفة)، وبذلك حُسب تركيز (DNA) من المعادلة الرياضية الآتية (Maniatis وزملاؤه، 1982):

$$\textbf{DNA con. } (\mu g/\mu l) = \{OD_{260} \times 100 \text{ (Dilution Factor)} \times 50\ \mu g/ml\}/1000$$

إذْ تمثل OD260 الكثافة الضوئية لامتصاص الحمض النووي (µg) عند الموجة 260 نانومتر، ثمّ مُددت عينات DNA للحصول على تركيز (40ng/µl)، كما تمّ التقدير النوعي على هلامة Agaros، إذْ يظهر الحمض النووي (DNA) ذي النوعية الجيدة على شكل حزمة Band، بينما يكون الحمض النووي (DNA) سيء النوعية ممشحاً وغير واضح الحدود Smear.

4- تطبيق تقنية التكرارات الترادفية البسيطة الداخليةISSR

استُخدم في الدراسة 25 بادئةً، ويوضح الجدول (2) التسلسل النيكليوتيدي ودرجة حرارة الالتحام للبادئات المستخدمة. أُجري تفاعل البلمرة المتسلسل PCR وفقاً لـ Williams وزملائه (1990، 6533)، فكان حجم التفاعل النهائي (25 ميكروليتر) باستخدام 2x Master mix تمَّ الحصول عليها من شركة Fermentas-Germany، حيث يتكون التفاعل من 2 ميكروليتر من البادئ بتركيز (10 ميلي مول)، 12.5 ميكروليتر من master mix 8.5 ميكروليتر ماء مقطر، و2 ميكرو ليتر من الـ DNA، تم هذا التفاعل في جهاز التدوير الحراري الآلي وفقاً للظروف الآتية:

94 مْ مدة 5 دقائق، ومن ثم 40 دورة تتضمن كل منها المراحل التالية:

- الانفصال عند درجة حرارة 94 مْ، مدة 30 ثانية.
- الالتحام حسب درجة حرارة البادئات الموجودة في الجدول (2) لمدة دقيقة واحدة.
- الاستطالة عند درجة حرارة 72 مْ، لمدة دقيقة.
- اكتمال التفاعل عند درجة حرارة 72 مْ، لمدة عشر دقائق.

ثم حفظت العينات في درجة حرارة 4 مْ، وتم ترحيلها على هلامة الآجاروز 2%.

5- الرحلان الكهربائي والتلوين والتصوير:

تم الترحيل على هلامة الآجاروز 2% في المحلول المنظم TBE 1X

(10X TBE buffer = 108g Tris borate +g55 Boric acid + 9.2 EDTA) ,PH=8 والمضاف إليها 5 ميكروليتر من صبغة الإيتيديوم برومايد (10 ميكروغرام/ميكروليتر)، حملت عينات الـ DNA على هلامة الآجاروز بإضافة 5 ميكروليتر من سائل التحميل الخاص 1X loading buffer Bromophenol blue والمكون من (15%Ficoll 400 + 1.03% bromophenol blue + 0.03%Xglene cyanolff + 0.4% orange G + 10mM Tris-Hcl + 50mM EDTA)، ثم حقن مؤشر من الحمض النووي

(DNA) 1Kpbمن شركة (Fermentas, Germany)، لتحديد الحجم والوزن الجزيئي للحزم الناتجة، ليتم بعد ذلك الترحيل بمرور حقل كهربائي قدره 100 فولط لفصل حزم الـ DNA الناتجة عن عملية التضخيم. ثم صورت الهلامة بجهاز تصوير هلامة الآجاروز Image Analyzer (Gi Box-Sengene)) (Serwer، 1983، 375).

الجدول (2): التسلسل النيكليوتيدي للبادئات المختبرة في تقنية ISSR ودرجة حرارة الالتحام.

البادئ	التسلسل النيكليوتيدي '3 – '5	درجة حرارة الالتحام
ISSR-1	CACACACACACACACAA	50
ISSR-2	GAGAGAGAGAGAGAGAC	52
ISSR-3	GGAGAGGAGAGGAGA	48
ISSR-4	CACACACACACACACAG	52
ISSR-5	ACACACACACACACACT	56
ISSR-6	GAGAGAGAGAGAGAGACG	56
ISSR-7	TCTCTCTCTCTCTCTCGA	54
ISSR-8	TCTCTCTCTCTCTCTCAG	54
ISSR-9	ACACACACACACACACGG	56
ISSR-13	CCAGGTGTGTGTGTGTGT	56
ISSR-14	GTGTGTGTGAGAGAGAGA	54
ISSR-15	ACACACACACACACATATAT	54
ISSR-16	CCTCTCTCTGTGTGTGTG	56
ISSR-18	CCTCTCTCTGTGTGTGTG	56
ISSR-20	CACACACACACACACACACACA	56
ISSR-23	GAGAGAGAGAGAGAGAGAGA	54
ISSR-25	AGGAGGAGGAGGAGGAGG	54
ISSR-32	CTCTCTCTCTCTCTCTT	52
ISSR-33	CACACACACACAACAG	52
ISSR-35	GAGAGAGAGAGAGAGAT	52
ISSR-36	AGAGAGAGAGAGAGAGT	52
ISSR-37	TGTGTGTGTGTGTGTGG	52
8ISSR-3	TCTCTCTCTCTCTCTCC	52
ISSR-40	ACACACACACACACACTT	52
ISSR-43	TGTGTGTGTGTGTGTGAA	52

6- التحليل الإحصائي:

أُستخدم في هذه الدراسة الوراثية البرامج الإحصائية الخاصة بالتقانات الحيوية لتحليل النتائج، فجُمعت نتائج عملية الرحلان الكهربائي في جداول مخصصة، اعتماداً على مقارنة وجود أو غياب حزم الحمض النووي DNA بين طرز الذرة البيضاء المدروسة، حيث أُعطي الرقم (1) عند وجود حزمة DNA ذات وزن جزيئي محدد وعند أي طراز، والرقم (0) عند غيابها، ونُظِّمت الجداول لكل بادئة على حده (Zhong وزملاؤه، 2009، 8؛ Adonina وزملاؤه، 2005، 962). حُدِّدت درجة القرابة الوراثية، ورُسمت شجرة القرابة الوراثية Dendrogram بين طرز الذرة البيضاء المدروسة بتطبيق طريقة التحليل العنقودي Cluster analysis، باستخدام برنامج Popgene1.31 الإحصائي حيث يسمح التحليل العنقودي بتقسيم الطرز المدروسة إلى مجموعات تعبر عن درجة القرابة الوراثية فيما بينها، وبالتالي يمكن أن تتجمع العينات ضمن مجموعة واحدة بناءً على موطنها الأصلي، أو

بناءً على أصلها ونسبها، ولهذا شُكِّلت مصفوفة النسب المئوية لعدم التوافق Percent Disagreement Values (PDV)، تمَّ إنشاء هذه المصفوفة وفقاً لعدد وحدات التضاعف المشتركة بتطبيق متوسطات المجموعات الزوجية غير المزانة Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averaging (UPGMA) حسب (Sneath و Sokal، 1973)، يدل ارتفاع قيم هذه المصفوفة على وجود اختلاف وراثي، وبازديادها يزداد التباين الوراثي بين العينات المدروسة(Nei، 1972). كما حُسبت قيم معامل التعددية الشكلية Polimorphism Information Content (PIC) للبادئات المستخدمة كل بادئة على حدا وفق المعادلة: PIC= 1- $\sum_{i=1}^{n} Pi^2$ حيث Pi تكرارية الحزم i^{th} الناتجة عن استخدام البادئ مع جميع العينات المدروسة (Botstein وزملاؤه، 1980، 317؛ Mohammadi و Prasanna، 2003، 1236)، وهو يعد كمعيار يدل على مقدرة تسلسل الموقع المدروس باستخدام البادئة الخاصة على إظهار التباينات الوراثية وتمييزها بين الطرز المختلفة، حيث يؤخذ بالحسبان عند حساب معامل PIC عدد الحزم الظاهرة ونسبة تكرارها في مجموعة العينات المدروسة، وكلما اقتربت قيمة PIC من (1) كانت المقدرة على تمييز التباينات الوراثية وإظهارها أكبر، ويمكن أن يعطي PIC قيمة (0) عندما تظهر البادئة حزمة وحيدة ثابتة عند العينات كلها، لذلك يمكن عد هذه البادئة ليست ذات أهمية في تمييز الطرز الوراثية عن بعضها، حيث أنها لم تظهر أي تعددية شكلية (Mohammadi و Prasanna، 2003، 1236).

النتائج والمناقشة:

استخلص الحمض النووي DNA من البادرات بعمر 2–3 أسابيع، وقيس تركيزه ونقاوته بجهاز الطيف الضوئي، ومدد تركيزه ليصبح 40 ng/µl وطبقت عملية الرحلان الكهربائي على هلامة الأغاروز بتركيز 0.8% لمعرفة نوعية الحمض النووي DNA المستخلص حيث يبدو على شكل حزم مضيئة، وتتميز العينات الجيدة باحتوائها على جزيئات DNA ذات وزن جزيئي مرتفع بأعلى الهلامة، مما يدل على نوعية جيدة. أظهر حساب النسبة بين قراءات تركيز عينات الـ DNA المُستخلص من طرز الذرة البيضاء الوراثية المدروسة عند موجات ضوئية بطول 280/260 نانومتر وباستخدام المطياف الضوئي قيماً تتراوح بين1.811 و 1.972 وهي تُشير إلى نقاوة جيدة من الـ DNA، كما قُدِّرت تراكيز عينات الـ DNA ما بين(0.29 – 0.43 µg/µl) في المحلول المنظم الذي خزنت فيه هذه العينات، ويوضح الجدول (3) نتائج تقدير تراكيز الـ DNA المستخلص من العينات المدروسة.

الجدول (3): قراءات المطياف الضوئي عند أطوال موجات 260 و280 نانومتر وتحديد تركيز ونقاوة عينات الحمض النووي DNA المستخلصة مقدراً بالميكروغرام/ميكروليتر.

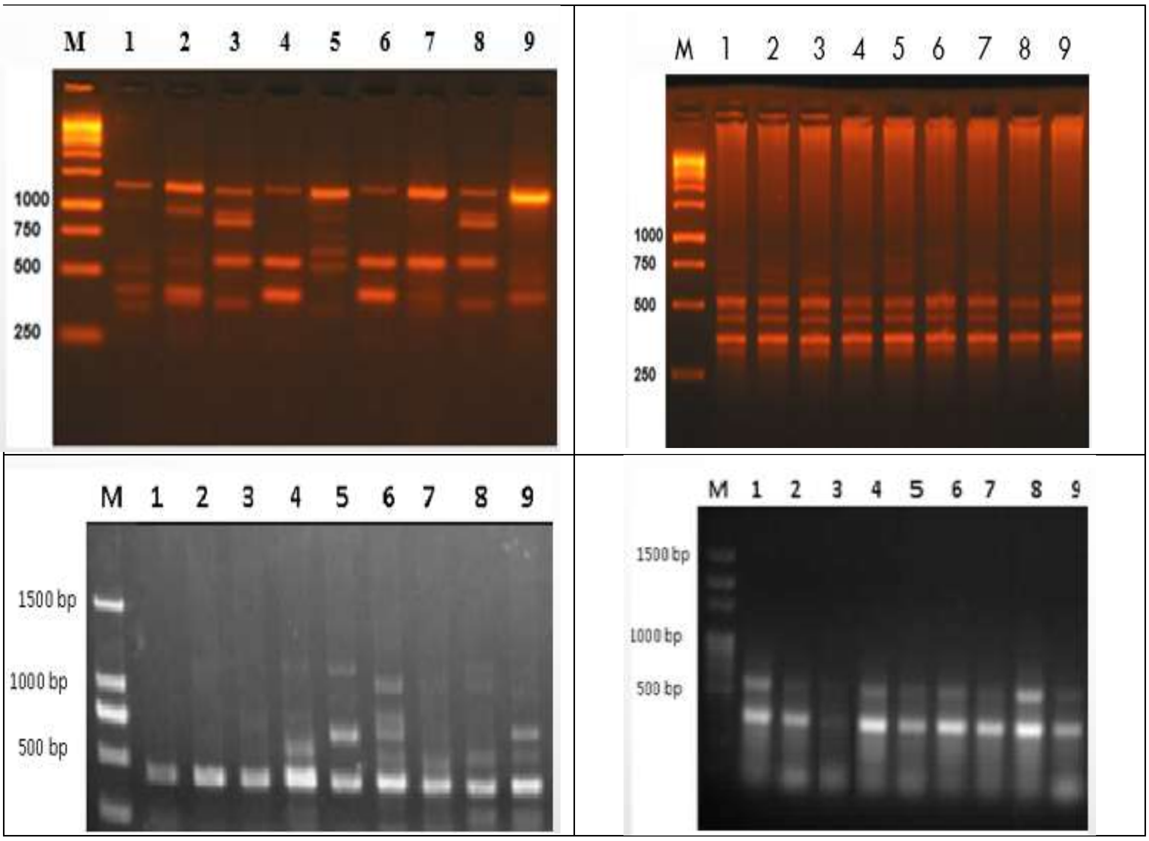
التسلسل	الطرز الوراثية	OD 280/ OD 260	تركيز الـ DNA µg/µl
1	أكلموني	1.857	0.29
2	جيزة15	1.862	0.31
3	مصر9	1.920	0.39
4	جازان الأحمر	1.811	0.33
5	شلخ 6	1.935	0.35
6	Jioue	1.972	0.41
7	شهلا	1.880	0.43
8	طابت	1.820	0.40
9	عماني محلي	1.927	0.33

التعددية الشكلية polymorphism الناتجة عن تطبيق تقنية ISSR:

تضمنت الدراسة 25 بادئة، ويبين الجدول (4) أن 16 بادئة أعطت نتائج تضخيم في تفاعل البلمرة المتسلسل PCR، بينما 9 بادئات لم تعطِ أي نتائج تضخيم، وقد أثبتت البادئات المستخدمة فعاليتها في إعطاء تعددية شكلية بين طرز الذرة البيضاء المدروسة، ونجم عن استخدام هذه البادئات 81 حزمة ، منها 69 حزمة متباينة شكلياً **polymorphic** ،حيث بلغت نسبة التعددية الشكلية 87.32%، تراوح عدد الحزم لكل بادئة من 2 حزمتين كأقل عدد عند البادئة ISSR 36 إلى 12 حزمة كأعلى عدد عند البادئة ISSR 17 بمتوسط 5.1 لكل بادئة، كما حُسب معامل التعددية الشكلية PIC لكل بادئة على حده، وتراوحت القيم من 0.32 عند البادئتين (ISSR 4، ISSR-35) كأقل قيمة، إلى 0.49 عند البادئتين (ISSR-18، ISSR-15) كأعلى قيمة، وبلغ المتوسط العام **0.42**، مايشير إلى قدرة البادئات المستخدمة على التمييز بين الطرز الوراثية المدروسة الجدول(4)، تتوافق هذه النتائج مع ما توصل إليه Bashandy (2016) فبلغت نسبة التعددية الشكلية 87.8% للطرز الوراثية المدروسة، وتقترب من النتائج التي وصل إليها Taher وزملاؤه (2015) حيث بلغت قيمة معامل PIC 0.41.

الجدول (4): عدد الحزم الكلية والمتباينة شكلياً والنسبة المئوية للتعددية الشكلية(%) وقيم معامل الـ PIC

البادئة	عدد الحزم الكلية	عدد الحزم المتباينة شكلياً	النسبة المؤية للتعددية الشكلية %	PIC
$ISSR_2$	7	6	%85.70	0.48
$ISSR_4$	5	5	%100	0.32
$ISSR_6$	5	3	%60	0.45
$ISSR_7$	3	3	%100	0.37
$ISSR_8$	4	4	%100	0.47
$ISSR_{14}$	6	6	%100	0.40
$ISSR_{15}$	4	2	%50	0.49
$ISSR_{16}$	4	4	%100	0.48
$ISSR_{17}$	12	10	%83.30	0.39
$ISSR_{18}$	3	3	%100	0.49
$ISSR_{32}$	7	5	%71.43	0.39
$ISSR_{33}$	4	4	%100	0.35
$ISSR_{34}$	4	4	%100	0.44
$ISSR_{35}$	6	4	%66.70	0.32
$ISSR_{36}$	2	2	%100	0.42
$ISSR_{37}$	5	4	%80	0.48
المجموع	**81**	**69**	--	
المتوسط	**5.1**	**4.3**	**%87.32**	**0.42**



الشكل (1): صور هلامة الأغاروز 2% تبين التعددية الشكلية الناتجة عن استخدام بادئات ISSR

M المؤشر الجزيئي 1: أكلموني، 2: جيزة 15، 3: مصر 9، 4: جازان الأحمر، 5: شلخ 6، 6: jioue ، 7: شهلا، 8: طابت، 9: عماني محلي.

تحديد درجة القرابة الوراثية بين الطرز الوراثية المدروسة من الذرة البيضاء:

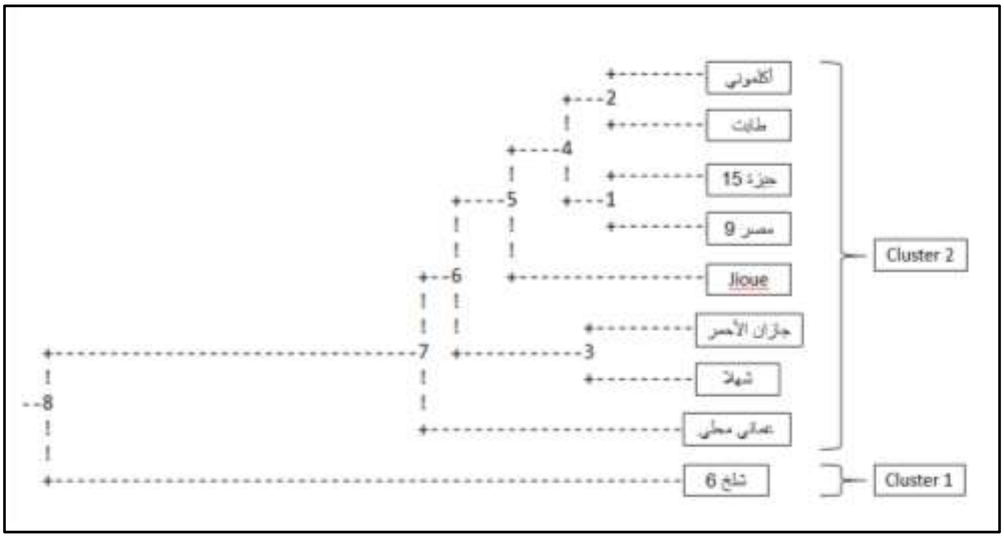
يفيد تحديد درجة القرابة الوراثية ضمن الأنواع في تأمين قاعدة وراثية كبيرة، وتقديمها كسلة وراثية غنية لمربي النبات للاستفادة منها في برامج التهجين. وقد تمت دراسة العلاقة الوراثية بين طرز الذرة البيضاء المدروسة بتطبيق مصفوفة النسب المئوية لعدم التوافق Percent Disagreement Values (PDV). نلاحظ أن أقل قيمة لمصفوفة النسب المئوية لعدم التوافق PDV هي 0.092 بين الطرازين الوراثيين مصر 9 وجيزة 15 (وهما من مصر)، مايشير إلى التقارب الوراثي الكبير بينهما، وكذلك بين الطرازين الوراثيين طابت وأكلموني (وهما من السودان)، تلاهما الطرازان شهلا وجازان الأحمر بقيمة تباعد وراثي 0.108 = PDV (وهما من السعودية)، بينما كانت أعلى قيمة لـ PDV هي 0.693 بين الطرازين شلخ6 (سورية) و جازان الأحمر (السعودية) ما يدل على وجود تباين وراثي كبير بينهما. تلاهما الطراز شلخ 6 وكل من أكلموني وطابت بقيمة لـ PVD بلغت 0.664 ، كما نلاحظ أن قيمة PVD بلغت 0.609 بين الطراز الوراثي شلخ6 وكل من الطراز عماني محلي والطراز jioue ، مايشير إلى البعد الوراثي للطراز شلخ 6 عن الطرز (جازان الأحمر، أكلموني، طابت، عماني محلي، jioue) الجدول (5).

الجدول (5): مصفوفة المتوسط العام للنسب المئوية لعدم التوافق PDV الناتجة عن تطبيق متوسطات المجموعات الزوجية غير المزانة UPGMA بتطبيق تقنية ISSR حسب (Nei، 1987).

الطرز الوراثية	أكلموني	جيزة15	مصر9	جازان الأحمر	شلخ 6	Jioue	شهلا	طابت	عماني محلي
أكلموني	*****								
جيزة15	0.125	*****							
مصر9	0.125	0.092	*****						
جازان الأحمر	0.249	0.327	0.287	*****					
شلخ 6	0.664	0.556	0.556	0.693	*****				
jioue	0.125	0.230	0.194	0.287	0.609	*****			
شهلا	0.194	0.194	0.159	0.108	0.506	0.194	*****		
طابت	0.092	0.125	0.159	0.287	0.664	0.194	0.194	*****	
عماني محلي	0.268	0.194	0.230	0.327	0.609	0.230	0.230	0.268	*****

التحليل العنقودي Cluster analysis لطرز الذرة البيضاء المدروسة:

أُجري التحليل العنقودي للنتائج التي تمّ الحصول عليها لإنشاء شجرة القرابة الوراثية Dendrogram للطرز الوراثية المدروسة، والتي انقسمت إلى عنقودين رئيسين، ضم العنقود الأول الطراز الوراثي شلخ 6 وهو الأبعد وراثياً (من سورية) وقد انفصل بشكل مستقل، في حين ضم العنقود الثاني بقية الطرز الوراثية، والذي انقسم بدوره إلى تحت عنقودين ضم تحت العنقود الأول الطراز الوراثي عماني محلي (من عمان)، بينما ضم تحت العنقود الثاني كل من جازان وشهلا (من السعودية) تجمعت في عنقود، وأكلموني وطابت (السودان) تجمعت في عنقود، وجيزة ومصر9 (من مصر) تجمعت في عنقود، والطراز jioue (من موريتانيا)، وكان الطرازان مصر 9 وجيزة 15 هما الأقرب وراثياً وكذلك الطرازان أكلموني وطابت، ويعود ذلك لكون هذه الطرز من منطقة حوض النيل وربما يكون لهم أب مشترك، وبالتالي نلاحظ من طريقة انفصال الطرز في شجرة القرابة الوراثية، وكذلك بالعودة إلى جدول مصدرها الجدول (1) أن طرز الذرة البيضاء المدروسة قد انفصلت وفق توزعها الجغرافي.



الشكل (1): التحليل العنقودي للطرز الوراثية المدروسة من الذرة البيضاء باستخدام تقنية ISSR

الاستنتاجات Conclusions:

1. تم تقييم التنوع الوراثي لطرز الذرة البيضاء المدروسة بتطبيق تقنية ISSR والتي أظهرت فعالية في التمييز بين هذه الطرز بالاعتماد على نتائج 18 بادئة فكانت نسبة التعددية الشكلية 87.32%.
2. أعطت18 بادئة من أصل 25 من البادئات منتجات تضخيم في تفاعل البلمرة المتسلسل حيث أثبتت البادئات المستخدمة قدرتها على التمييز بين الطرز المدروسة فبلغ متوسط معامل التعددية الشكلية PIC 0.42
3. أظهر المتوسط العام لمصفوفة النسب المئوية لعدم التوافق PDV وكذلك التحليل العنقودي لشجرة القرابة الوراثية أن الطرازين مصر 9 وجيزة 15 (مصر) وطابت وأكلموني (السودان) هي الأقرب وراثياً فيما بينها، بينما كان الطراز شلخ 6 هو الأبعد وراثياً
4. انفصلت شجرة القرابة الوراثية حسب توزع المناطق الجغرافية للطرز الوراثية المدروسة من الذرة البيضاء.

التوصيات والمقترحات:

1. تطبيق تقنية ISSR على طرز وراثية أخرى من نبات الذرة البيضاء والأنواع القريبة منه كونها أثبتت فعالية جيدة في تقييم التنوع الوراثي لهذا النبات.
2. استخدام تقنية التكرارات الترادفية البسيطة SSR لتحديد مواقع المورثات المسؤولة عن الصفات المهمة الإنتاجية (طول العثكول وشكله ، وزن الحبوب في العثكول، نسبة البروتين) لتسريع وتيرة التحسين الوراثي ضمن برامج تربية الذرة البيضاء.
3. إدخال الطرز الوراثية شلخ6، أكلموني، جازان الأحمر، مصر6، jioue في برامج التربية والتحسين الوراثي واستخدامها كآباء في عمليات التهجين، والاستفادة من صفاتها للحصول على هجن ذات قوة هجين عالية نظراً لبعدها الوراثي.

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

References:

1. سيد، محمود هيثم (2001). استخدام مؤشرات من الدناDNA في انتخاب مورثات المقاومة للأمراض في الشعير، جامعة دمشق، كلية الزراعة، أطروحة دكتوراه.
2. شاهرلي، مخلص والأوبري، خالد.(2004). حفظ المصادر الوراثية للأنواع النباتية في سورية، مشروع الحفظ والاستخدام المستدام للتنوع الحيوي الزراعي في المناطق الجافة GEF، الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية، وزارة الزراعة والإصلاح الزراعي.
3. Adonina, I. G; E.A.Salina; E.G.Pestova and M.S.Röder 2005. Transferability of Wheat Microsatellites to Diploid Aegilops Species and Determination of Chromosomal Localizations of Microsatellites in the S Genome. Journal Home. 48(6):959-970.
4. Bashandy, T. (2016). Assessment of genetic diversity among Egyptain Sorghum Landraces for grain yield variability using ISSR Markers analysis. J.Agrie.Chem. and Biotechn.Mansoura Univ. Vol.7(10):263-267.
5. Botstein, D. R. L., White, M. Skolinck, and R.W. Davis. 1980. Constraction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. Am. J. Hum. Genet., 32: 314-331.
6. Brandeland, M. 2007. Gene flow, Publication about Agricultural Biodiversity, Bioversity International, p:49
7. Chowdhury. M.A.; Vandenberg، B.; Warkentin. T. 2002. Cultivar identification and genetic relationship among selected breeding lines and cultivars in chickpea (Cicer arietinum L.). Euphytica (127):p.317–325.
8. Degani, C.; Rowland, L. g.; Levi, A.; Hortynski, and Galletta, G. J. 1998. DNA fingerprinting of strawberry (*Fragaria* x *ananassa*) cµltivars using randomly amplified polymorphicDNA (RAPD) markers, Euphytica, 1025, pp. 247-253.
9. Dellaporta, SL., J.Wood., and J.B. Hicks. 1983. Aplant DNA minipreparation version Π. Plant Molecular Biology Reporter.1:19-12.
10. Diederichsen, A.; L. R. Boguslavskij.; M. Halan and W. K.Richards. 2007. Collecting plant genetic resources in the eastern Carpathian mountains within the territory of Ukraine in 2005, Plant Genetic Newsletter, Bioversity International and FAO. n 151, p:14-21.
11. FAO STAT. 2019. Htt: //apps. Fog.org/faosts/default accessed 2007.
12. Lane, A. 2007. An introduction to crop wild relatives, Geneflow, Publication about Agricultural Biodiversity, Bioversity International, p: 19.
13. Maniatis. T, E. F. Fritsch, and J. Sambrook. 1982. Molecular cloning, a laboratory manual (Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory).
14. Mathur, S.; Umakanth, A.V.; Tonapi, V.A.; Sharma, R. and Sharma, M.K. 2017. Sweet sorghum as biofuel feedstock: recent advances and available resources. Biotechnol Biofuels 10:146.
15. Mohammadi. S.A., and B.M. Prasanna. 2003. Analysis of genetic diversity in crop plants: salient statistical tools and considerations cropscie. 43: 1235-1248.
16. Nagaraju, J., Kathirvel, M., Ramesh Kumar, 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
17. Nei, S. M.1972. Interspecific gene differences and evolutionary time estimated from electrophoretic data on.
18. Powell, W.; Morgante, M.; Andre, C.; Hanafey, M.; Vogel, J.; Tingey, S. and Rafalski, A. 1996. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite), markers for germplasm analysis. Molecular Breeding 2: pp. 225-238.
19. Prabhakar, M., and D. Mark. 2002. Ultraviolet Spectroscopy and UV Lasers. New York: Marcel Dekker. ISBN 0-8247-0668-4.
20. Serwer, Ph. 1983. "Agarose gels: Properties and use for electrophoresis". Electrophoresis 4 (6): 375–382. doi: 10.1002/elps .1150040602
21. Sneath, P. and R. Sokal. 1973. Numerical Taxonomy. San Francisco: W. H. Freeman.

22. Snowden, J. D. 1955. The Wild fodder sorghums of the genus Eusoghum, j. Linn. Soc. Lond. P: 55-191.
23. Taher D., Sabbouh M. and Lawand S. 2015. Genetic diversity analysis of Sorghum (Sorghum bicolor L. Moench) accessions using ISSR markers. Int. J. Chem. Tech. Res.,v. 8(11): 350-357.
24. Van der Nest, M.A., Steenkamp, E.T., Wigfield, B.D. and Wingfield, M.J. 2000. Development of simple sequence repeat (SSR) markers in Eucalyptus from amplified inter-simple sequence repeats (ISSR). Plant Breed. 119. 433-436.
25. 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.
26. 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.
27. Zietkiewicz, E.; Rafalski, A.; Labuda, D. 1994 Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. Genomics 20: pp. 176-183.