

## تحديد درجة القرابة الوراثية لبعض طرز القمح القاسي (*Triticum turgidum var durum*) L. باستخدام تقنية (ISSR) Inter Simple Sequence Repeats

طوني سلوم\* سلام لاوند\*\* شهيناز عباس\*\*\*

(الإيداع: 8 حزيران 2021 ، القبول: 16 آيلول 2021)

المُلخَص:

نفذ البحث في مخابر الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية دمشق/ سورية ومخبر التقانات الحيوية التابع لكلية الزراعة في جامعة دمشق/ سورية للعام 2018-2019. تمت دراسة 19 طرازاً وراثياً من القمح القاسي لتحديد درجة القرابة الوراثية فيما بينها باستعمال تقنية التكرارات المترادفة الداخلية البسيطة (ISSR Inter Simple Sequence Repeats)، واستخدم لهذا الغرض 20 بادئة. أعطت 17 بادئة منها تعددية شكلية polymorphic بين الطرز المدروسة، نجم عن استخدامها ما مجموعه 188 حزمة وبلغت نسبة هذه التعددية 95.55 %، تراوح عدد الحزم لكل بادئة بين 7 حزم كأقل عدد مع البادئة p<sub>20</sub> و 17 حزمة كأعلى عدد مع البادئة p<sub>7</sub>، بمتوسط عام 11.06 حزمة لكل بادئة، وكان متوسط معامل التعددية الشكلية (Polymorphic information content) 0.3204. وتراوحت نسبة البعد الوراثي بين 34 و 69 %، فكانت أدنى قيمة له 34% بين الطرازين ICAMOR و Zagharian2 وبين الطرازين DW13 و DW14، وتدلل هذه القيمة المنخفضة للتباعد الوراثي على درجة كبيرة من القرابة الوراثية، بينما كانت أعلى قيمة للتباعد الوراثي 69 % بين الطرازين D.45414 و Cham-7، ما يدل على وجود تباين وراثي كبير بينهما، ولوحظ أن الشجرة انقسمت إلى عنقودين رئيسيين، انفرد الشاهد (شام 7) بالعنقود الأول، في حين ضم العنقود الثاني الطرز الأخرى منقسمة إلى تحت عنقودين بدرجات متفاوتة من القرابة الوراثية. وتشير نتائجنا إلى إمكانية استخدام تقنية ISSR لدراسة القرابة الوراثية ما بين طرز القمح القاسي.

الكلمات المفتاحية: التباعد الوراثي، طرز قمح قاسي، تقنية ISSR.

\*مهندس زراعي في قسم التقانات الحيوية، الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية، دمشق.

\*\* أستاذ مساعد في قسم المحاصيل الحقلية، كلية الزراعة، جامعة دمشق.

\*\*\* باحث في قسم التقانات الحيوية، الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية، دمشق.

## Determination of genetic affinity of some durum wheat species (*Triticum turgidum* var *durum* L.) using Inter Simple Sequence Repeats (ISSR) Technique.

T. Saloum \* S. Lawand \*\* and S. Abbas \*\*\*

(Received: 8 June 2021, Accepted: 2 August 2021)

### Abstract:

This research was conducted at labs of the General Commission for Scientific Agricultural Research in Damascus/ Syria and the Biotechnology Lab, Faculty of Agriculture–Damascus University/ Syria, during the season 2018/2019. ISSR technique (Inter Simple Sequence Repeats) was used to determine the genetic relationship among Nineteen genotypes of durum wheat. 20 primers were used, 17 of them gave polymorphism, with a total of 188 alleles and a polymorphic percentage of 95.55 %. The number of bands per primer varied from a minimum of 7 bands for the primer p<sub>20</sub> to a maximum of 17 bands for the primer p<sub>7</sub> with an average of 11.06 bands per primer, the average of Polymorphic information content (PIC) was 0.3204. Results showed that the genetic distance ranged between 34 – 69%. The lowest distance (34 %) was recorded between ICAMOR and Zagharian2 and between genotypes DW13 and DW14, this low value of the genetic distance indicates a great degree of genetic relationship. The largest distance 69% was recorded between D.45414 and Cham–7, indicating a far genetic relationship between the two genotypes. It was noted that the tree was divided into two main clusters, the witness (Cham 7) was alone in the first cluster, while the second cluster included the other genotypes that were divided into two clusters with varying degrees of genetic kinship. Our results indicate that the ISSR technique can be used to study genetic kinship among durum wheat genotypes.

**Keywords:** Genetic distance, Durum wheat genotypes, ISSR technique.

---

\* Agronomist, Department of Biotechnology, General Commission for Scientific Agricultural Research, Damascus, Syria.

\*\* Assistant Professor, Agronomy Department, Faculty of Agriculture, Damascus University, Syria.

\*\*\* Researcher, Department of Biotechnology, General Commission for Scientific Agricultural Research, Damascus, Syria.

## 1- المقدمة Introduction

تُعدُّ محاصيل الحبوب النجيلية Cereals الأهمَّ زراعياً على مستوى العالم، حيث تُؤمن 70% من غذاء سكان العالم (Lookhart و Bean، 2000؛ Shao وزملاؤه، 2007؛ Kazemi، 2009)، ويُعدُّ القمح المحصول الغذائي الرئيس في أغلب دول العالم، ويعتمد استقرار أي بلد وأمنه الغذائي على مدى توافر مقومات الاكتفاء الذاتي من هذه المادة زراعاً وإنتاجاً وتخزيناً، وصولاً إلى الاستهلاك الأمثل لها (ديب وسوسي، 2004). وتزداد أهميته نتيجة تزايد معدلات النمو السكاني على مستوى العالم في القرن الحالي (Rosegrant وزملاؤه، 2001). وتُقدَّر المساحة المزروعة بمحصول القمح على مستوى الوطن العربي بنحو 8447.39 ألف هكتاراً (المنظمة العربية للتنمية الزراعية، 2017)، وقد اتجهت الدول العربية لزيادة المساحات المزروعة بالحبوب، حيث ازدادت هذه المساحات بنسبة 32%، في الوقت الذي انخفضت فيه المساحة العالمية بنحو 4% (المنظمة العربية للتنمية الزراعية، 2014)، وتتركز زراعة القمح في الوطن العربي في المغرب، ومصر، وسورية، والجزائر، والعراق، وتونس، (المنظمة العربية للتنمية الزراعية، 2017). وقد تطورت زراعة القمح في سورية تطوراً كبيراً ففي عام 2019 بلغت المساحة المزروعة بالقمح في القطر العربي السوري 1345607 هكتاراً، والإنتاج 3085097 طناً، والإنتاجية 2293 كغ/ هكتار، واحتل القمح القاسي ما يعادل 721165 هكتاراً من المساحة المزروعة، وبلغ الإنتاج 1763802 طناً، والإنتاجية 2446 كغ/ هكتار (المجموعة الإحصائية الزراعية، 2019).

تعتمد تقنيات المعلومات الجزيئية على التفاعل التسلسلي البوليميري Polymerase Chain Reaction حيث يقوم هذا التفاعل بمضاعفة Amplification قطع محددة من DNA وذلك بوجود بادئات عشوائية أو متخصصة مصممة لهذا الهدف، مما يسمح بالحصول على ملايين النسخ المضاعفة من قطعة واحدة من DNA التي تتضاعف أسياً (Weising وزملاؤه، 1995).

لقد أدى تطور التقانات الحيوية إلى ظهور عدد كبير من المعلومات الجزيئية المهمة التي تتباين في نوع ومستوى المعلومات التي تزودنا بها والتي اعتماداً عليها يتم إنشاء خرائط الارتباط الوراثي ومنها تقنية التكرارات الترادفية البسيطة الداخلية (ISSR) Inter Simple Sequence repeats (Zietkiewicz وزملاؤه، 1994)، التي تتميز بأنها غير مكلفة مقارنة مع غيرها من التقنيات سواء من حيث احتياجها لتجهيزات معقدة أو مواد حيوية عالية الثمن، علاوة على ذلك فقد ثبت نجاحها على عدد كبير من الأنواع النباتية، كما تمتاز هذه التقنية بأنها ذات تكرارية وثوقيه عالية ولا تحتاج إلى معلومات مسبقة عن المجين، كما أثبتت الدراسات الأخيرة التي أجريت على هذه التقنية أنها لا تحتاج إلى تراكيز عالية من الحمض النووي الريبي منقوص الاوكسجين DNA للمادة المدروسة (Branchard و Borner، 2001)، إضافة إلى أن نتائجها ثابتة عند تكرارها وهي سريعة، ويمكن أتممتها automation ويمكن نشر البادئات وتبادلها بسهولة بين المخابر بمجرد معرفة التسلسل النيكلوتيدي لها. وتكشف نسب عالية من التعددية الشكلية polymorphism، وتستخدم كمعلم جزيئي في دراسة البنية الوراثية، والتنوع الوراثي، والخصائص التحسينية للنباتات المدروسة (Fu- Rong وزملاؤه، 2007).

تم تقدير التنوع الوراثي لـ 69 طرازاً وراثياً من القمح القاسي باستخدام تقنية ISSR وقد بين Aslan-Parviz وزملاؤه (2020)، أن استخدام 16 بادئة ISSR أعطى 162 حزمة منها 160 حزمة متباينة، بتعددية شكلية 98% بمتوسط 10 حزمة لكل بادئة، أعطت البادئة ISSR14 أكبر عدد للحزم وهو 15 حزمة بينما أعطت البادئة ISSR12 أقل عدد للحزم وهو 7 حزم. وتراوح التعددية الشكلية بين 92% و100%. تراوحت قيم التعددية الشكلية (PIC) بين 0.35 و0.46 بمتوسط 0.42 وتراوحت قيم التباين الوراثي بين 0.06-0.85 بمعدل 0.52 مما يشير إلى كفاءة التمييز بين المجاميع.

وفي بحث أجراه Alshehri وزملاؤه (2020) لدراسة التحليل الوراثي لـ 40 مدخل من القمح أعطى استخدام البادئتين ISSR-14 و ISSR-15 و 8 و 9 حزم على التوالي منها 3 و 6 حزمة متباينة شكلياً على التوالي وكانت قيم معامل التعددية الشكلية (PIC) للبادئتين 0.62 و 0.87 على التوالي.

أظهرت دراسة لـ Etminan وزملاؤه (2017) على 43 سلالة من القمح القاسي منها 25 سلالة محسنة و 18 سلالة برية، باستخدام 15 بادئة من ISSR وجود 155 حزمة، منها 149 حزمة متعددة شكلياً، بمتوسط 10.3 لكل بادئة، وأظهرت النتائج وجود تعددية شكلية كبيرة بين طرز القمح القاسي بمتوسط 96.13%، بلغ متوسط معامل التعددية الشكلية (PIC) 0.41 مما يعكس كفاءة تقنية ISSR في دراسة التنوع الوراثي.

وفي دراسة لـ Saleh وزملاؤه (2017) للتوصيف الجزيئي والمورفولوجي والتشريحي لـ 8 أنواع من القمح القاسي أعطت 7 بادئات ISSR 62 حزمة، 39 منها متباينة شكلياً بنسبة تعددية شكلية 62.9% وتراوحت قيم التشابه الوراثي بين 0.68-0.92.

طبق Heidari وزملاؤه (2017) تقنية ISSR على 17 طراز من القمح القاسي باستخدام 16 بادئة أعطت ما مجموعه 157 حزمة بمتوسط 9.75 حزمة لكل بادئة، وبلغ العدد الكلي للحزم التي أعطت تعددية شكلية 130 حزمة بمتوسط 8.12 حزمة لكل بادئة وأظهرت النتائج وجود تعددية شكلية كبيرة بين طرز القمح القاسي بمتوسط 82.8%، وبلغ متوسط معامل التعددية الشكلية (PIC) 0.35 مما يعكس كفاءة تقنية ISSR في دراسة التنوع الوراثي.

وفي دراسة لـ El-Aref وزملاؤه (2016) لتقييم العلاقات الوراثية بين 8 طرز وراثية من القمح القاسي و 65 طرازاً وراثياً من القمح الطري باستخدام تقنية ISSR تبين أن استخدام 5 بادئات أعطى 63 حزمة بمتوسط 12.6 حزمة بأعلى قيمة 15 حزمة وأقل قيمة 10 حزم، وبلغت نسبة التعددية الشكلية للطرز المدروسة 64.95% مع مع محتوى تعددية شكلية PIC بلغ 0.11، وكان متوسط التشابه الوراثي بين الطرز المدروسة 0.86.

كما درس Zamanianfard وزملاؤه (2015) التنوع الوراثي لـ 25 طراز وراثي من القمح القاسي متضمنة 22 سلالة تربية، 3 سلالات محلية باستعمال تقنية ISSR، أعطت البادئات المستخدمة 83 حزمة، وكانت النسبة المئوية للتعددية الشكلية 77%، بمعدل 7.54 حزمة لكل بادئة، بلغ متوسط معامل التعددية الشكلية (PIC) 0.31 مما يشير إلى كفاءة التمييز بين المجاميع، وأوضح التحليل العنقودي المعتمد على UPGMA انفصال الطرز الوراثية الـ 25 في 4 مجموعات.

وقيم Razmjoo وزملاؤه (2015) التنوع الوراثي بين 25 طرازاً وراثياً من القمح القاسي (22 منها سلالات ناتجة عن برامج تربية، و 2 من الأصناف المحلية، وصنف محسن جديد)، حيث استخدمت 10 بادئات ISSR سجلت ما مجموعه 70 حزمة، بلغ معامل التعددية الشكلية (PIC) 0.41، وقد أظهر التحليل العنقودي انفصال الطرز الوراثية في خمس مجموعات رئيسية، وأظهرت النتائج أن معلمات ISSR يمكن استعمالها بكفاءة مرتفعة لتقييم التباين الوراثي في المادة الوراثية للقمح القاسي.

وأجرى Mehdi وزملاؤه (2015) دراسة لتقييم التنوع الوراثي ضمن مجموعة من 16 سلالة محسنة من القمح القاسي باستخدام 9 بادئات ISSR، سجلت ما مجموعه 73 حزمة متعددة شكلياً، بمتوسط 8.1 حزمة لكل بادئة، وأظهر التحليل العنقودي باستخدام طريقة UPGMA انفصال الطرز الوراثية في 4 مجموعات رئيسية، تراوحت قيم التشابه الوراثي بين 0.34-0.86 بمعدل 0.68، وأظهرت النتائج وجود تعددية شكلية كبيرة بين طرز القمح القاسي، مما يعكس كفاءة تقنية ISSR في دراسة التنوع الوراثي.

## 2- هدف البحث :Research goal

هدف بحثنا هذا إلى تقييم التنوع الوراثي وتحديد درجة القرابة الوراثية بين طرز من القمح القاسي باستخدام تقنية ISSR ومن ثم استثمار ذلك لاحقاً في برامج التحسين الوراثي للقمح القاسي.

## 3- مواد البحث وطرائقه Material and Methods

### 3-1- المادة النباتية Plant material

تمت الدراسة على 19 طرازاً وراثياً من القمح القاسي والتي تم الحصول عليها من الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية- إدارة بحوث المحاصيل الحقلية، والجدول (1) يبين طرز القمح القاسي المدروسة ونسبها. تم تنفيذ العمل في مخابر الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية بدمشق، ومخبر التقانات الحيوية في كلية الزراعة بجامعة دمشق خلال العام 2018-2019.

### الجدول رقم (1): طرز القمح القاسي المدروسة ونسبها

رقم الطراز	رمز الطراز	اسم الطراز	النسب
1	DW1	Cham-7 (كشاهد)	SH/3/Rabi//Gs/Cr
2	DW3	Icambel	ICD06-0279-0AP-2AP-0AP-1AP-0THTD
3	DW4	ICAMOR	ICAMOR- TAO4-63/3/BCr/Gro1//Mgn1
4	DW5	Derazejihan	ICD07-192-BLMSD-0AP-0Tr-2AP-0Tr-3AP-0THT-0AP -0TR
5	DW6	Zagharian2	ICD02-1016-C-6AP-0TR-1AP-0AP-7AP-0AP-3AP-0AP -0TR
6	DW7	Bezajihan	ICD07-094-BLMSD-0AP-6AP-0Tr-1AP-0THT-0AP -0TR
7	DW8	Bezater	ICD06-1428-0AP-0AP-3AP-0AP-3AP-0THTD
8	DW9	Aghramatlas	ICD06-1614-0AP-4AP-0AP-5AP-0THTD -0TR
9	DW10	DW10	Bicrederaa1//Ossl1/Stj5/3/Icajihan14
10	DW11	DW11	Ter1/3/Stj3//Bcr/Lks4/4/Aghrass1/3/Mrf1//Mrb16/Ru
11	DW12	DW12	IcamorTA0463/4/IcamorTA0463/3/CandocrossH25//Msb11/Quarmal-04/82/5/Miki2
12	DW13	DW13	IcamorTA0471//IcamorTA0459/Waha/3/Mgn13/Ainzen1
13	DW14	DW14	IcamorTA041//IcamorTA0469//Icasyr1/3/Beltagy1
14	DW15	DW15	Bcr/Lsk4//Mrf1/Stj2/3/Mrf2/Normal Hamari//Bcr/Lks4
15	DW16	DW16	CM829/CandocrossH25// Icajihan7
16	DW17	DW17	Terbol975/Geruftel2
17	DW18	Terbol975	Bcr/3/Ch1//Gta/Stk/4/Bcr/Lks4
18	DW19	D.45414	HESSIAN-F_2/3/STOT/ /ALTAR 84/ALD
19	DW20	D.51822	ALTAR84/STINT//SILVER_45/3/POHO_1/4/GREEN_14//YAV_10/AUK

### 3-2- استخلاص الحمض الريبي النووي منقوص الأوكسجين DNA Extraction

تم عزل الحمض الريبي النووي منقوص الأوكسجين (Genomic DNA) من الأوراق النباتية الطازجة والتي جمعت من بادرات بعمر 3-4 أسابيع بطريقة CTAB المعدلة (Murray و Thompson، 1980). تم طحن العينات بوجود الآزوت السائل liquid N2 طحناً ناعماً ثم أضيف لكل عينة (800 µl) من محلول الاستخلاص الحاوي على المكونات التالية:

2-mercaptoethanol (v/v)، 1% EDTA (pH8)، 10 mM NaCl، 0.66 M Tris-HCl (pH7.5)، 100 mM CTAB (2% w/v).

ثم حضنت العينات على درجة حرارة 65°م مع التحريك المستمر لمدة 60 دقيقة، ثم وضعت العينات في البراد على درجة حرارة 4°م لمدة 5 دقائق، ثم أضيف للعينات الكلوروفورم/إيزوأميل الكحول chloroform/isoamyl alcohol (24:1)، وحركت الأنابيب برفق مدة عشر دقائق، بعد ذلك ثقلت العينات على سرعة (10000 rpm) لمدة 10 دقائق على درجة حرارة 4°م، ثم نقل الطور العلوي المنفصل بحذر إلى أنابيب جديدة، ثم أضيف 500 ميكرو ليتر من isopropanol المبرد على حرارة -20°م مع التحريك بلطف وذلك من أجل ترسيب الحمض النووي DNA. ثم ثقلت العينات بجهاز الطرد المركزي بسرعة (10000 rpm) ولمدة 10 دقائق، جفف DNA في الهواء للتخلص من آثار الإيثانول وأذيب في 50 ميكرو ليتر من محلول TE المعقم. وحفظت العينات بدرجة حرارة 4°م لمدة 24 ساعة، ثم خزنت على درجة حرارة -20°م لحين الاستخدام.

### 3-3- تقدير كمية الحمض النووي DNA ونوعيته Estimate the quantity and quality of DNA

تم تقدير كمية الحمض النووي DNA ونوعيته في العينات باستخدام جهاز المطياف الضوئي (UV spectrophotometer) الذي يعتمد في عمله تقدير كمية ونوعية الحمض النووي عن طريق امتصاصه للأشعة فوق البنفسجية Ultra Violet بموجات طولها 260 و 280 نانومتر. وتم حساب كمية الحمض النووي DNA من المعادلة التالية (Maniatis وزملاؤه، 1982):

$$\text{DNA Concentration } (\mu\text{g/ml}) = \frac{\text{OD } 260 \times 50(\mu\text{g/ml}) \times (\text{عامل التمديد})}{1000}$$

OD 260: تمثل الكثافة الضوئية لامتصاص الحمض النووي (ميكرو غرام) عند الموجة 260 نانومتر. كما تم تحميل كمية قليلة من الحمض النووي DNA في هلامه من الأغاروز تركيزها 1% لتحديد نوعية الحمض النووي DNA المستخلصة للتأكد من عدم تقطعها، إذ ظهر الحمض النووي DNA على شكل عصابات bands عالية الوزن الجزيئي في هلامه الأغاروز.

### 3-4- تطبيق تقنية التكرارات الترادفية الداخلية البسيطة ISSR

استخدمت تقنية التكرارات الترادفية الداخلية البسيطة (Inter-Simple Sequence Repeats- ISSR) وهي تقنية معلومات جزيئية معتمدة على التفاعل التسلسلي البوليميري PCR. تم استخدام 20 بادئة (ISSR)، تم الحصول عليها من شركة Vivantis، ويظهر الجدول (2) البادئات المستخدمة وتسلسلها النكليوتيدي ودرجة الالتحام لكل منها.

الجدول رقم (2): التسلسل النيكلوتيدي للبادئات المستخدمة في تقنية ISSR ودرجة حرارة الالتحام.

رقم المخبر	البادئ	درجة حرارة الالتحام °C	التسلسل النيكلوتيدي '3 - '5
1	4	48	CAC ACA CAC ACA CAC AAC
2	A830241	44	ACT GAC TGA CTG ACT GAC TG
3	813	49	CTC TCT CTC TCT CTC TT
4	807	51	AGA GAG AGA GAG AGA GT
5	8565	65	GTC ACC ACC ACC ACC ACC ACC AC
6	866	53	CTC CTC CTC CTC CTC CTC
7	W814	45	CTC TCT CTC TCT CTC TTG
8	8	49	CAC ACA CAC ACA CAC AGA C
9	862	53	AGC AGC AGC AGC AGC AGC
10	17899B	46	CAC ACA CAC ACA GG
11	231	51	GAG TCT CTC TCT CTC TCT C
12	8082	51	CTC TCT CTC TCT CTC TCT G
13	NLSSR3	54	CAG CAG CAG CAG CAG
14	17	52	CAG CAC ACA CAC ACA CAC
15	5	48	CAC ACA CAC ACA CAC AGT
16	830	45	TGT GTG TGT GTG TGT GG
17	811	44	GAG AGA GAG AGA GAG AC
18	812	49	GAG AGA GAG AGA GAG AA
19	8564	48	CAC CAC CAC CAC CAC CAC C C
20	16	49	CGT CAC ACA CAC ACA CAC

أجري التفاعل التسلسلي البوليميري (PCR) وفقاً لـ (Williams وزملاؤه، 1990) بحجم تفاعل كلي قدره 25µl وفق الجدول (3).

الجدول رقم (3): مكونات تفاعل PCR

مكونات PCR	الكميات
Master mix من شركة Kappa (الحاوي على Taq polymerase و MgCl <sub>2</sub> و dNTPs)	12.5 µl
Primer (10 µmol)	2 µl
DNA	100 ng
H <sub>2</sub> O	حتى الوصول إلى 25 µl

- استخدم جهاز التدوير الحراري Biometra modell T-1 Thermoblock وفقاً للمراحل التالية:
- 1- دورة واحدة تتضمن فصل سلسلتي DNA (Initial Denaturation): عند درجة حرارة 94 °م لمدة 5 دقيقة.
  - 2- 40 دورة تتضمن كل منها المراحل التالية:
    - فصل سلسلتي DNA (Denaturation): يتم عند حرارة 94 °م لمدة 30 ثانية.
    - تشفع البادئات (Annealing): عند حرارة (44-65 °م) وذلك حسب درجة حرارة البادئات وذلك لمدة دقيقة واحدة.
    - الاستطالة Extension: عند حرارة 72 °م لمدة دقيقة واحدة.
  - 3- اكتمال التفاعل عند حرارة 72 °م مدة خمس دقائق.
  - 4- حفظ العينات في حرارة 4 °م.

ولفصل قطع الحمض النووي DNA الناتجة عن التضخيم تم الترحيل على هلامه الأغاروز 2% في المحلول المنظم TBE 1X  
{(10X TBE buffer = 108 g Tris borate + 55 g Boric acid + 9.2 EDTA, pH 8.0)} والمضاف إليها 5 ميكرو ليتر من صبغة Red gel، حيث حملت عينات الحمض النووي DNA على هلامه الأغاروز كما تم حقن مؤشر من الدنا 1Kpb من شركة (Fermentas, Germany)، وذلك لتحديد أطوال الحزم الناتجة وتتم الترحيل بمرور حقل كهربائي قدره 100 فولت لفصل حزم الدنا الناتجة عن التضخيم، وصورت الهلامه بوجود الأشعة فوق البنفسجية UV-light بجهاز تصوير هلامه الأغاروز (Agle Eye II Staratagene) Image Analyzer (Sameh, 2012).

### 3-5- التحليل الاحصائي statistical analysis

تم تحديد حجم حزم DNA الناتجة عن التضخيم باستخدام برنامج TotalLab (TotalLab 1D version 14.1) ثم تم تقدير عدد الحزم (الكلية، المختلفة، المتشابهة)، وتحويل المعطيات إلى النظام الثنائي (1 للحزمة الموجودة و0 للحزمة الغائبة). ثم تم حساب مصفوفة عدم التوافق الوراثي اعتماداً على معامل Jaccard ثم استخدام هذه المصفوفة لإجراء التحليل العنقودي بطريقة (UPGMA) Unweighted Pair Group Method of Arithmetic Means ورسم شجرة القرابة الوراثية وذلك باستعمال برنامج excel state. وكذلك تم حساب معدل التنوع الوراثي (النسبة المئوية للتعددية الشكلية) وحساب محتوى التعددية الشكلية (PIC) Polymorphism Information Content لكل بادئة من البادئات المستخدمة على مستوى الموقع الواحد وفقاً لـ Weir (1996) حسب العلاقة التالية:

$$PIC = 1 - \sum pi^2$$

حيث  $pi$  هي نسبة تكرار كل قرين على الموقع الوراثي نفسه. ويمثل محتوى التعددية الشكلية (PIC) Polymorphism Information Content لموقع وراثي معين على المادة الوراثية Genome قدرة هذا الموقع على التمييز بين الطرز الوراثية، أي تعبر عن احتمال أن يكون للعينتان المسحوبتان عشوائياً أليلين مختلفين لذات الموقع الوراثي.

### 4- النتائج والمناقشة Results and Discussion

تم تضخيم DNA طرز القمح المدروسة (19 طراز) باستخدام 20 بادئة للتكرارات الترادفية البسيطة الداخلية ISSR الجدول (2)، أعطى 17 بادئة منها نتائج تضاعف بينما لم تعط كل من البادئات P3 و P9 و P19 أي تضاعف وبالتالي لم يتم إدراجها ضمن النتائج. بلغ عدد الحزم الكلية الناتجة عن تضخيم DNA العينات المدروسة 188 حزمة، تباينت منها 180 حزمة بينما تشابهت الحزم الباقية (8 حزم) في جميع العينات، وبذلك بلغ متوسط نسبة التعددية الشكلية Polymorphism 95.55%، الجدول (4).

تراوح عدد الحزم الكلية لكل بادئة بين 7 و 17 حزمة وبمتوسط 11.06 حزمة الجدول (4). أعطى كل من البادئين P7 و P6 أعلى عدد للحزم الكلية (17 و 15 على التوالي). في حين أعطى البادئة P20 أقل عدد من الحزم الكلية (7)



حزمة). أما بالنسبة لعدد الحزم المتباينة فقد تراوح بين 7 و 17 حزمة، بمتوسط 10 حزم لكل بادئ، الجدول (4). وقد أعطى P7 أكبر عدد من الحزم المتباينة (17 حزمة) بتعددية شكلية 100 %، تلاه كل من البادئات P6 و P10 و P18 بعدد حزم متباينة بلغ 14,14,15 حزمة على التوالي وبتعددية شكلية 100 %.

وتتوافق نتائجنا مع (Aslan-Parviz وزملاؤه، 2020؛ Etminan وزملاؤه، 2017؛ Heidari وزملاؤه، 2017) وتتخالف مع (Saleh وزملاؤه، 2017؛ El-Aref وزملاؤه، 2016؛ Zamanianfard وزملاؤه، 2015).

الجدول رقم (4): عدد الحزم (الكلية، المتباينة، المتشابهة)، نسبة التعددية الشكلية (%)، محتوى التعددية الشكلية، التنوع المورثي.

البادئ	عدد الحزم الكلية	عدد الحزم المتباينة	عدد الحزم المتشابهة	نسبة التعددية الشكلية (%)	محتوى التعددية الشكلية PIC
P1	10	10	0	100.00	0.4075
P2	11	11	0	100.00	0.4333
P4	12	12	0	100.00	0.4004
P5	13	13	0	100.00	0.3119
P6	15	15	0	100.00	0.3756
P7	17	17	0	100.00	0.3138
P8	8	8	0	100.00	0.3139
P10	14	14	0	100.00	0.3390
P11	13	10	3	76.92	0.1928
P12	10	8	2	80.00	0.2941
P13	8	7	1	87.50	0.2878
P14	10	10	0	100.00	0.3309
P15	10	8	2	80.00	0.3326
P16	8	8	0	100.00	0.3778
P17	8	8	0	100.00	0.3577
P18	14	14	0	100.00	0.3535
P20	7	7	0	100.00	0.3446
المجموع	188	180	8		
المتوسط	11.06	10.59	0.47	95.55	0.3204

الجدول رقم (5): مصفوفة النسب المتوية لعدم التوافق (PDV) بين المدخلات المدروسة والنتيجة عن تطبيق متوسطات المجموعات الزوجية غير المراتبة UPGMA بتطبيق تقنية ISSR استناداً إلى معامل Jaccard.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
1	0																		
2	0.49	0																	
3	0.49	0.41	0																
4	0.61	0.44	0.45	0															
5	0.52	0.49	<b>0.34</b>	0.40	0														
6	0.56	0.43	0.45	0.36	0.38	0													
7	0.59	0.48	0.49	0.46	0.42	0.36	0												
8	0.63	0.43	0.50	0.52	0.53	0.43	0.49	0											
9	0.62	0.52	0.52	0.39	0.47	0.45	0.52	0.54	0										
10	0.61	0.51	0.52	0.54	0.55	0.49	0.47	0.44	0.60	0									
11	0.60	0.52	0.52	0.47	0.51	0.46	0.46	0.47	0.42	0.44	0								
12	0.54	0.50	0.53	0.50	0.55	0.43	0.49	0.43	0.54	0.44	0.46	0							
13	0.47	0.47	0.53	0.57	0.59	0.49	0.57	0.55	0.55	0.49	0.54	<b>0.34</b>	0						
14	0.58	0.46	0.44	0.49	0.51	0.41	0.53	0.45	0.50	0.35	0.42	0.38	0.37	0					
15	0.53	0.48	0.48	0.53	0.50	0.51	0.53	0.55	0.53	0.48	0.53	0.42	0.44	0.38	0				
16	0.58	0.53	0.53	0.53	0.51	0.48	0.49	0.49	0.55	0.50	0.50	0.43	0.42	0.41	0.42	0			
17	0.62	0.59	0.58	0.56	0.56	0.52	0.47	0.58	0.63	0.44	0.51	0.46	0.50	0.48	0.50	0.36	0		
18	<b>0.69</b>	0.54	0.59	0.63	0.60	0.57	0.60	0.60	0.66	0.53	0.65	0.53	0.55	0.53	0.54	0.47	0.52	0	
19	0.60	0.56	0.51	0.52	0.51	0.52	0.52	0.56	0.59	0.56	0.50	0.48	0.58	0.52	0.53	0.48	0.46	0.51	0

1: Cham-7, 2: Icambel, 3: ICAMOR, 4: Derazejhan, 5: Zagharian2, 6: Bezajihan, 7: Bezater, 8: Aghramatlas, 9: DW10, 10: DW11, 11: DW12, 12: DW13, 13: DW14, 14: DW15, 15: DW16, 16: DW17, 17: Terbol975, 18: D.45414, 19: D.51822.

يمثل محتوى التعددية الشكلية PIC (Polymorphism Information Content) لموقع وراثي معين على الجينوم وبالتالي لواسم جزيئي معين قدرة هذا الواسم على التمييز بين الطرز الوراثية. وقد بلغ متوسط محتوى التعددية الشكلية للبادئات المستخدمة في بحثنا هذا 0.3204، حقق البادئة p2 أعلى قيمة لـ PIC (0.4333) بينما بلغت أقل قيمة لـ PIC (0.1928) كانت للبادئة p11 (الجدول 4). وبينت النتائج أن البادئات P1، P2، P4، P6، P16 كانت الأكثر قدرة على التمييز بين الطرز الوراثية المدروسة إذ أعطت أعلى قيم لمحتوى التعددية الشكلية (PIC): (0.4075، 0.4333، 0.4004، 0.3778، 0.3756 على التوالي). وبما أن أعلى قيمة لـ PIC للمعلومات ذات السيادة التامة مثل الـ ISSR هي 0.5 فإن القيم المتباينة التي حصلنا عليها في هذا البحث لـ PIC تشير إلى التباين الكبير بين الأليلين p و q المختبرة بالمعلومات ISSR.

وتتوافق نتائجنا مع (Aslan-Parviz وزملاؤه، 2020؛ Etminan وزملاؤه، 2017؛ Heidari وزملاؤه، 2017؛ Zamanianfard وزملاؤه، 2015) وتتخالف مع (Alshehri وزملاؤه، 2020؛ El-Aref وزملاؤه، 2016).

#### 4-1 تحديد درجة القرابة الوراثية بين الطرز المدروسة:

يلاحظ من الجدول (5) أن أقل قيمة لمصفوفة النسب المئوية لعدم التوافق (PDV) Percent Disagreement Values هي 0.34 بين الطرازين ICAMOR و Zagharian2 وبين الطرازين DW13 و DW14، وتدل هذه القيمة المنخفضة للتباين الوراثي بين كل طرازين على أنهما على درجة كبيرة من القرابة الوراثية، بينما كانت أعلى قيمة لـ PDV 0.69 بين الطرازين D.45414 و Cham-7 مما يدل على وجود تباين وراثي كبير بينهما، وكان متوسط قيمة PDV هو 0.52 استناداً إلى معامل Jaccard.

وتتوافق نتائجنا مع (Aslan-Parviz وزملاؤه، 2020) وتتخالف مع (Saleh وزملاؤه، 2017؛ El-Aref وزملاؤه، 2016؛ Mehdi وزملاؤه، 2015).

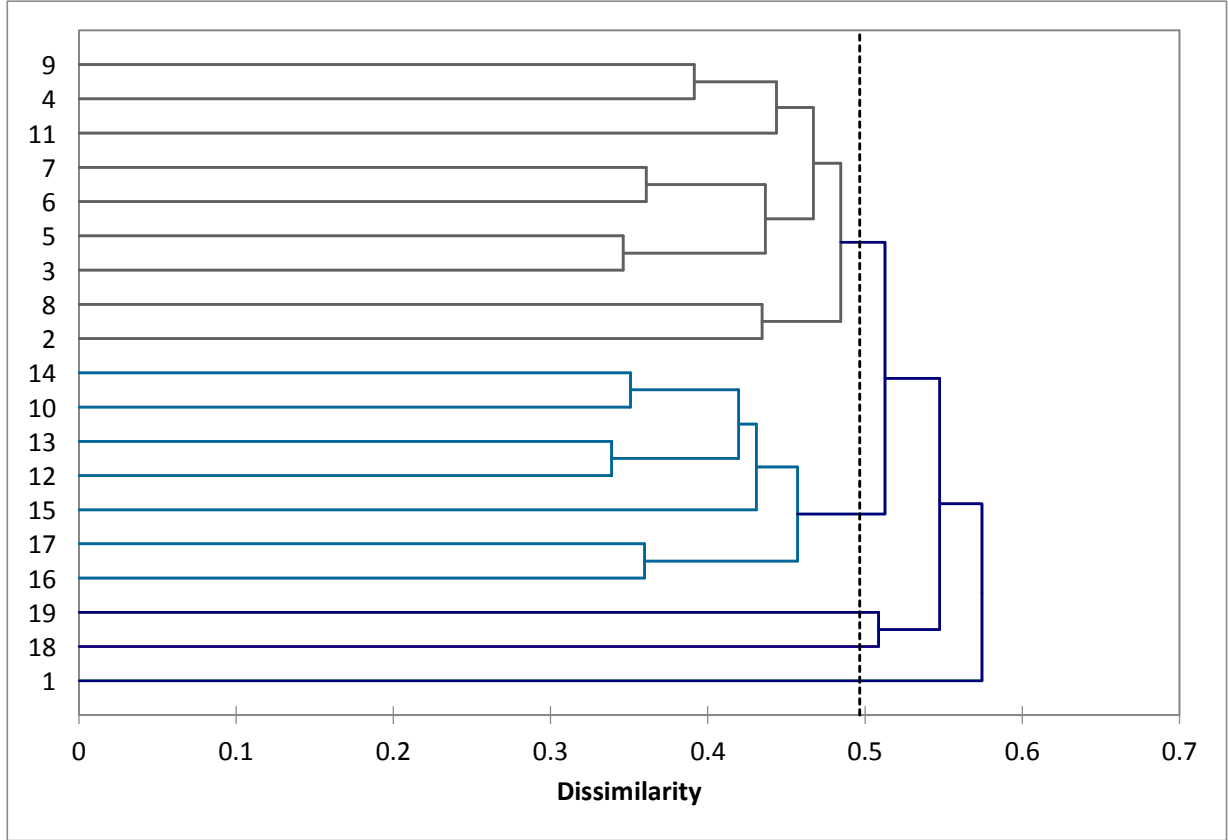
#### 4-2 التحليل العنقودي Cluster analysis (شجرة القرابة):

يعد تحديد درجة القرابة الوراثية ضمن الطرز الوراثية مهماً جداً في برامج تربية النبات لتأمين قاعدة بيانات وراثية واسعة للاستفادة منها في برامج التهجين. وقد تم في هذه الدراسة تحديد درجة القرابة الوراثية ما بين طرز الفصح المدروسة وذلك من خلال حساب مصفوفة التباين الوراثي والتي تظهر قيمة التباين الوراثي بين الطرز الوراثية المدروسة، حيث أن ارتفاع قيمة هذا التباين يدل على ازدياد درجة الاختلاف الوراثي بين الطرز (الجدول 5). كذلك تم إجراء التحليل العنقودي للطرز المدروسة اعتماداً على مصفوفة التباين الوراثي، حيث يسمح التحليل العنقودي برسم شجرة القرابة الوراثية وتقسيم الطرز الوراثية المدروسة إلى مجموعات، وتعكس هذه المجموعات درجة القرابة الوراثية بينها، وقد تتجمع العينات ضمن مجموعة واحدة بناءً على موطنها الأصلي أو بناءً على أصلها ونسبها. وبناءً على التحليل العنقودي للطرز المدروسة في هذا البحث، لوحظ أن الشجرة انقسمت إلى عنقودين رئيسيين. حيث ضم العنقود الأول الشاهد فقط (شام 7)، في حين ضم العنقود الثاني الطرز الأخرى وانقسمت إلى تحت عنقودين (الشكل 1)، ويعود ذلك لأنه لا يوجد آباء مشتركة بين الطراز (شام 7) وبقيّة الطرز.

ضم العنقود الأول الطراز 1 (الشاهد)، وارتبط بباقي الطرز عند أعلى مستوى هرمي بمستوى تباين وراثي قدره 0.574. وقد لوحظ أن الطراز 2 هو الأقرب وراثياً للشاهد بتباين وراثي قدره 0.4919، بينما كان الطراز 18 هو الأبعد وراثياً عنه

بتباين وراثي يصل لـ 0.6875. ضم العنقود الثاني للشجرة تحت عنقودين، ضم تحت العنقود الأول الطرازين 18 و 19 ارتبطوا مع باقي المجموعات عند المستوى 0.547 وكان التباين الوراثي فيما بينهما 0.5086 (تفسير ذلك وجود أب مشترك بينهما ALTAR84)، بينما ضم تحت العنقود الثاني مجموعتين، انقسمت المجموعة الأولى عند مستوى تباين وراثي قدره 0.457، إلى تحت مجموعتين، ضمت تحت المجموعة الأولى الطرازين 16 و 17 وكان التباين الوراثي فيما بينهما 0.3597، أما تحت المجموعة الثانية انقسمت عند مستوى تباين وراثي قدره 0.43، إلى فرعين: ضم الأول الطراز 15 الأقرب وراثياً إلى الطراز 14 (0.3846) والأبعد وراثياً عن الطراز 8 (0.5500)، بينما انقسم الفرع الثاني عند مستوى تباين وراثي 0.419 إلى تحت فرعين، ضم الأول الطرازين 12 و 13 (يشتركان بنسبهما بالأب IcamorTA0471) بتباعد وراثي بينهما 0.338، بينما ضم الثاني الطرازين 10 و 14 (يشتركان بنسبهما بالآباء Mrf1،Lsk4،Bcr) بتباعد وراثي بينهما 0.350 (الشكل 1؛ الجدول 5).

انقسمت المجموعة الثانية عند مستوى تباين وراثي قدره 0.484 إلى تحت مجموعتين ضمت الأولى الطرازين 2 و 8 (يشتركان بنسبهما بالأب ICD06) بتباعد وراثي بينهما 0.434، بينما انقسمت الثانية إلى فرعين عند مستوى تباين وراثي قدره 0.467، انقسم الفرع الأول إلى تحت فرعين عند مستوى تباين وراثي 0.436، ضم تحت الفرع الأول الطرازين 3 و 5 بتباعد وراثي بينهما 0.346، أما تحت الفرع الثاني اندرج تحته الطرازين 6 و 7 بتباعد وراثي بينهما 0.360. انقسم الفرع الثاني عند مستوى تباين وراثي 0.443 إلى تحت فرعين ضم الأول الطراز 11 هو الأبعد وراثياً عن الطراز 1 (الشاهد) بتباعد وراثي قدره 0.5952 والأقرب وراثياً من الطراز 9 بتباعد وراثي قدره 0.4159، بينما اندرج تحت الثاني الطرازان 9 و 4 بتباعد وراثي بينهما 0.547. تشير نتائجنا السابقة إلى إمكانية استخدام تقنية الـ ISSR لدراسة القرابة الوراثية ما بين طرز القمح القاسي.



الشكل رقم(1): شجرة القرابة الوراثية لطرز القمح المدروسة اعتماداً على التحليل العنقودي لبيانات التباين الوراثي فيما بينها حسب معامل Jaccard.

##### 5- الاستنتاجات والتوصيات **Conclusions and Recommendations**:

- 1- أظهرت تقنية ISSR تعددية شكلية بلغت 95.55 %، ناتجة عن استخدام 19 بادئة وبلغ المتوسط العام لمعامل التعددية الشكلية (PIC) 0.3204، ما يشير إلى قدرة البادئات المستخدمة على التمييز بين الطرز الوراثية المدروسة.
- 2- استطاعت البادئات المستخدمة في تقنية ISSR الكشف عن التنوع الوراثي بين الطرز الوراثية المدروسة، فأظهرت وجود 9 حزم موجودة في مختلف الطرز الوراثية المدروسة للقمح القاسي، كما تبين وجود 4 حزمة فريدة (واسمة) ميزت بعض الطرز الوراثية المدروسة.
- 3- انفصلت شجرة القرابة الوراثية إلى عنقودين رئيسيين ضم العنقود الأول الشاهد فقط (شام 7)، في حين ضم العنقود الثاني الطرز الأخرى منقسمة إلى تحت عنقودين بدرجات متفاوتة من القرابة الوراثية. إذ تراوحت نسبة البعد الوراثي بين 34 و 69 %، وكانت أدنى قيمة له 34% بين الطرازين ICAMOR و Zagharian2 وبين الطرازين DW13 و DW14، بينما كانت أعلى قيمة للتباين الوراثي 69 % بين الطرازين D.45414 و Cham-7.
- 4- استثمار النتائج بالعمل مستقبلاً على تحديد مواقع المورثات المسؤولة عن الصفات المهمة وعزلها، والاستفادة منها في برامج التربية واستخدامها كأباء في عمليات التهجين، كما يمكن اختيار الآباء المتباعدة وراثياً وإدخالها في برامج التهجين.

## 6- المراجع References

1. المجموعة الإحصائية الزراعية السنوية. (2019). وزارة الزراعة، الجمهورية العربية السورية.
2. المنظمة العربية للتنمية الزراعية. (2014). الكتاب السنوي للإحصاءات الزراعية العربية، المجلد رقم (31). الصفحة 45.
3. المنظمة العربية للتنمية الزراعية. (2017). الكتاب السنوي للإحصاءات الزراعية العربية، المجلد رقم (35).
4. ديب طارق وسوسي فاتن. (2004). دراسة تطور استهلاك القمح في الجمهورية العربية السورية، مجلة جامعة دمشق للعلوم الزراعية، المجلد (20)، العدد الأول: 191 - 213.
5. Alshehri, M. A., Alzahrani, O., Aziza, A. T., Alasmari, A., Ibrahim, S., Bahattab, O., Osman, G., Alshamari, A. K., and Alduaydi, S. A. (2020). Correlation and genetic analyses of different characteristics in saudi arabian wheat reveal correlation networks and several trait-associated markers. *Journal of Animal and Plant Sciences*, 30(6), 1486-1497. <https://doi.org/10.36899/JAPS.2020.6.0169>
6. Aslan-Parviz, M., Omid, M., Rashidi, V., Etminan, E., and Ahmadzadeh, A. (2020). Evaluation of genetic diversity of durum wheat (*Triticum durum* Desf.) genotypes using Inter-Simple Sequence Repeats (ISSR) and CAAT box-derived polymorphism (CBDP) markers, 52(3), 895-909. <https://doi.org/10.2298/GENSR2003895A>
7. Bornet B., and M. Branchard. (2001). Non-anchored inter-simple sequence repeat (ISSR) markers: reproducible and specific tools for genome fingerprinting. *Plant Molecular Biology Reporter* 22: 427-432.
8. El-Aref, H., Taghian, A., El-Sayed, B. E.-D., El-Rawy, M., and El-Sanousy, S. (2016). Genetic Relationships Among Wheat Varieties Based on Issr Markers. *Research Journal of Applied Biotechnology*, 2(1), 117-126. <https://doi.org/10.21608/rjab.2016.59906>
9. Etminan, A., Pour-Aboughadareh, A., Mohammadi, R., Ahmadi-Rad, A., Moradi, Z., Mahdavian, Z., and Noori, A. (2017). Evaluation of genetic diversity in a mini core collection of Iranian durum wheat germplasms. *Journal of Animal and Plant Sciences*, 27(5), 1582-1587.
10. Fu-Rong G., Jian-Ying G., and Fang-Hao W. (2007). Application of ISSR 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.* V.18 (4) pp: 919-927.
11. Heidari, P., Etminan, A., Azizinezhad, R., and Khosroshahli, M. (2017). Genomic variation studies in durum wheat (*Triticum turgidum* ssp. durum) using CBDP, SCoT and ISSR markers. *Indian Journal of Genetics and Plant Breeding*, 77(3), 379-386. <https://doi.org/10.5958/0975-6906.2017.00051.7>
12. Kazemi Arbat H. (2009). *Especial Farming, Cereals (First Volume)*. Iran University Press. 318.

13. Lookhart G., and S. Bean. (2000). Cereal Proteins: Composition for Their Major Fractions and Methods for Identification. In: Kulp K. and J. G. Ponte Jr(Eds.) Handbook of Cereal Science and Technology (2nd Edition). Marcel Dekkar Inc., New York, USA, Pp: 363–383.
14. Maniatis. T, E. F. Fritsch, and J. Sambrook. (1982). Molecular cloning, a laboratory manual (Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory).
15. Mehdi. S., R. Mohammadi., A.R. Etminan., and L. Shoostari. (2015). Evaluation of genetic diversity in durum wheat advanced lines. Biological Forum– An International Journal. 7(1):236–240.
16. Murray M. G., and Thompson W. F. (1980). Rapid isolation of high molecular weight DNA. Nucleic Acids Res 8: 4321– 4325.
17. Razmjoo, M.; R. Mohammadi and L. Shoostari. (2015). Evaluation of genetic diversity in durum wheat genotypes (*Triticum turgidum* var. durum) using ISSR markers. Journal of Biodiversity and Environmental Sciences, 6(1): 522–529.
18. Rosegrant M., M. Paisner, S. Meijer, and J. Witcover. (2001). Global Food Projections to 2020: Emerging Trends and Alternative Futures. Washington, D.C.: IFPRI. 24.
19. Saleh, O. M., Hamiedeldin, N., Khafaga, A. F., and Shoaib, R. M. (2017). Molecular, Morphological and Anatomical Characterization for Some Egyptian Durum Wheat. Life Sci J;14(2):91–104., <https://doi.org/10.7537/marslsj140217.13.Key>
20. Sameh Magdeldin, ed. (2012). Gel electrophoresis – Principles and Basics. InTech. ISBN 978–953–51–0458–2.
21. Shao H. B., Ch L. Y., Wu G., Zhange J.H., Lu Z. H., and Hu Y. C. (2007). Changes of some anti– oxidative physiological indices under soil water deficits among 10 weat (*Triticum astivum* L. Genotypes at tillering stage. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 54(2): 143–149.
22. Weir, B. S. (1996). Genetic data analysis II 2nd ed Sinauer Associates. Inc. Sunderland, MA.
23. Weising K., Nybom H., Wolff K., and Meyer W. (1995). DNA fingerprinting in plants and fungi, CRC Press, Inc., London.
24. 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.

25. Zamanianfard.Z., A. Etminan., R. Mohammadi., and L. Shooshtari. (2015). Evaluation of molecular diversity of durum wheat genotypes using ISSR markers. Biological Forum– An International Journal. 7(1):214–218.
26. Zietkiewicz E., Rafalski A., and Labuda D. (1994). Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)–anchored polymerase chain reaction amplification. Genomics 20: pp: 176–183.