تحديد درجة القرابة الوراثية لبعض أصناف العدس باستخدام تقنية ISSR

Identification of the Genetic relationship Among Some Lentil *(Lens culinaris medic)* varieties by Using ISSR technique

كرم ناخة[1] سلام لاوند[2]

Karam Nakha[1] Salam Lawand[2]

(1) طالبة ماجستير، قسم المحاصيل الحقلية، كلية الزراعة، جامعة دمشق.

(1) MA student- department of Field Crops Department, Faculty of Agriculture, Damascus University.

(2) مدرس، قسم المحاصيل الزراعية، كلية الزراعة، جامعة دمشق.

(2) Teacher - department of Field Crops Department, Faculty of Agriculture, Damascus University.

المُلَخَّص

زرعت أربعة أصناف من العدس (حوراني، كردي، إدلب3، إدلب4) في أصص خلال الموسم الزراعي 2013/2012 في مخبر التقانات الحيوية في كلية الزراعة (جامعة دمشق/سورية) لتحديد درجة القرابة الوراثية فيما بينها وذلك باستخدام تقنية تكرارات المقاطع الداخلية البسيطة ISSR (Inter Simple Sequence Repeats)، واستخدم لهذا الغرض 21 بادئةً. أثبتت 17 بادئة فعاليتها في إعطاء تعددية شكلية (Polymorphic) بين الأصناف المدروسة ونجم عن استخدامها ما مجموعه 122 حزمة، كان عدد الحزم المتباينة شكلياً 114 بحيث بلغت نسبة التعددية 93.4%، تراوح عدد الحزم لكل بادئة بين ثلاث حزم كأقل عدد مع البادئتين (ISSR-36،وISSR-40) و14 حزمةً كأعلى عدد مع البادئة (ISSR-18) بمتوسط 7.2 حزمة لكل بادئة. كما وجد أن أكبر قيم معامل التعددية الشكلية كانت 0.3752 مع البادئة ISSR-18 في حين كانت أقل قيم معامل التعددية الشكلية 0.2833 مع البادئة (ISSR-15) وبمتوسط قدره 0.3646. بينت دراسة التشابه الوراثي(Similarity) أن درجة القرابة الوراثية تراوحت بين 64 و37% حيث بلغت أعلى درجة قرابة وراثية (64%) بين الصنفين ادلب3 و كردي تلاها (62%) بين كل من الصنفين (حوراني و ادلب 3) و(حوراني و كردي)، في حين كانت أقل درجة قرابة وراثية و(37%) بين الصنفين ادلب 4وادلب 3 تلاها (38%) بين الصنفين ادلب4 وحوارني. ويمكن الاستفادة من الصنف إدلب4 وكردي لاستخدامهما كآباء في برامج التربية والتحسين الوراثي. وأظهرت الدراسة تنوعاً وراثياً كبيراً بين الأصناف المدروسة ضمن الجنس Lens، حيث يمكن الاستفادة من هذه النتائج ببرامج التربية وتصميم برامج تهدف إلى الحصول على تراكيب وراثية ذات محصول عالي.

الكلمات المفتاحية: عدس، قرابة وراثية، ISSR، معامل التعددية الشكلية (Pic).

Abstract

The genetic diversity study was conducted on Four cultivated lentil (lens culinaris medic) genotypes which was potted at the Biotechnology Laboratory, Faculty of Agriculture during the season 2012-2013 to evaluate the genetic diversity and to determine the degree of genetic

©2022 The Arab Center for the Studies of Arid Zones and Dry Lands, All rights reserved. **ISSN: 2305-5243; AIF-23 (p: 164 - 175)**

similarity using ISSR technique (Inter Simple Sequence Repeats).In the present study, 21 primers were used, whereas 17 primers gave amplification by a total of 122 bands with a polymorphic percentage of 93.4%. The number of bands for each primer varied from 3 bands for the two primers (ISSR-40 and ISSR-36) to 14 bands for the primer (ISSR-18) with an average of 7.2 bands for each primer. The two primers ISSR-19 and ISSR-15 recorded the greatest genetic diversity (0.3752) and the lowest genetic diversity 0.2833, respectively with an average of (0.3646). Genetic similarity percentages ranged from 73 to 64%, the two genotypes (3-4) followed by (2-3) and (2-4) recorded the highest percentages (64%) and (62%) respectively. While the lowest percentages recorded between the two genotype (1-3) (37%) and (1-2) (38%).

Keywords: Genetic Diversity, Lentil، ISSR, Polymorphic information content (pic).

المقدمة

يُعد العدس محصولاً غذائياً مهماً، ولاسيما في الدول الفقيرة لاحتوائه على كمية وفيرة من البروتين قد تصل إلى 25%، ونسبة عالية من الكربوهيدرات (46%)، إضافة إلى محتواه الجيد من الألياف. كما يلعب دورا مهما في تحقيق التوازن في الدورات الزراعية بسبب كفاءته العالية في تثبيت الآزوت الجوي (Duran وزملاؤه، 2004).

ينتمي العدس إلى العائلة البقولية (Leguminosea (Fabaceae والجنس *Lens* الذي يضم أنواعاً مختلفة، ويضم العدس كذلك النوع البري L. ervoides وموطنه الأصلي سورية وفلسطين والأنواع البرية *L. nigricans* و *L. orientalis* و *L. odemensis*. ويعدّ النوع *Lens culinaris esculenta* من أهم هذه الأنواع، الذي يقسم إلى مجموعتين تختلفان عن بعضهما نباتياً وإنتاجياً (1979, Ladizinsky) .

يعد العدس نباتاً بقولياً حولي ذاتي التلقيح ثنائي الصيغة الصبغية (2n=2x=14) (Sharma وزملاؤه، 1995)، ويُعدّ التنوع الوراثي ضمن الأنواع النباتية جزءاً مهماً من التنوع الحيوي، حيث تتميز الموارد الوراثية النباتية المحلية بتنوعها الوراثي الكبير وبقدرتها على تحمل الإجهادات الإحيائية ولاإحيائية كما تتميز بالباكورية في النضج (شاهرلي وزملاؤه، 1995). تشمل هذه الموارد الوراثية الأصناف المزروعة المحلية القديمة إضافةً لأقاربها البرية حيث تشكل هذه الموارد المادة الخام الأهم لمربي النبات، وتعد ذخيرة التحسين الوراثي لإدخال صفات تحمّل للإجهادات البيئية (Lane، 2007).

على الرغم من أهمية الصفات الشكلية والخصائص الفيزيولوجية المظهرية الزراعية إلا أن الحاجة للدراسة الجزيئية أصبحت أكثر أهميةً وإلحاحاً (Powell وزملاؤه، 1996).

حيث تتميز المؤشرات الجزيئية (Molecular Markers) بأنها أكثر دقةً وثباتاً كونها تعتمد على دراسة جزيئة الـDNA التي تحمل المعلومات الوراثية مباشرةً (معلا وزملاؤه، 2009)، وبالتالي يمكن استخلاص المادة الوراثية من الحمض الريبي النووي (DNA) في المراحل الأولى من عمر النبات، كذلك سهولة تحديد موقع مورثة معينة مسؤولة عن صفة ما بشكل مباشر،وعدم تأثر الدراسة الجزيئية بالشكل الظاهري للنباتات وبالعوامل البيئية كما في برامج التربية التقليدية، وأيضا تمتلك المؤشرات الجزيئية أهمية قصوى على صعيد تربية النبات إضافةً إلى أنها تعد مؤشرات مساعدة في إسراع عمليات الانتخاب والتربية، وهي بذلك تختصر الزمن الذي تستغرقه برامج التربية إضافةً إلى خفضها للتكاليف المادية (سيد،محمود، هيثم،2001)، كما أوضح Ramsay وزملاؤه (2000) إن استخدام التقانات الجزيئية، يمكن أن يقلل من تعقيدات إدخال عدد من الصفات المرغوبة في النمط الوراثي الواحد، كذلك يمكن استخدام المؤشرات الجزيئية بشكل فعال في تحاليل التنوع الوراثي وتقديرالتشابه الوراثي (Eleuch و زملاؤه، 2008).

تُعدّ تقنية ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) واحدةً من التقانات المهمة حيث طُبقت من قبل Ziekiewicz و زملاؤه (1994)، وهي تعتمد على تفاعل البلمرة المتسلسل (Polymerase Chain Reaction)(PCR) الذي يضخم منطقة تكرارات المقاطع الداخلية البسيطة حيث يُستخدم بادئٌ وحيدٌ مؤلفٌ من قطع متكررة ومحاط في بعض الأحيان بـ 2 إلى 4 نيكليوتيدات إما في المنطقة '3 أوفي المنطقة '5 .تُوصف تقنية ISSR بأنها أكثر تكراريةً من تقنية RAPD بسبب طول البادئ المستخدم والذي يعكس درجة حرارة عالية لمرحلة التحام البادئ (Chowdhury وزملاؤه، 2002)، كما

استُخدمت هذه التقنية لدراسة التنوع الوراثي في القمح (Nagaoka و Ogihara، 1997)، والرز (Joshi وزملاؤه، 2000) ، والبطاطا (Bornet وزملاؤه، 2002) ، والشعير (Fernández وزملاؤه، 2002).

قام Gupta وزملاؤه (2012) بمقارنة تقنيات RAPD و SSR و ISSR حيث استخدم 235 معلماً جزيئياً 34 (SSR) و9 (ISSR) و192 (RAPD) من أجل رسم الخارطة الوراثية للعدس، وتم اكتشاف 11 معلماً جزيئياً جديداً من معلمات SSRلرسم الخارطة الوراثية.

استخدم Duran وزملاؤه (2004) 14 بادئة من بادئات ISSR فأعطت 166 حزمةً، وكان عدد الحزم المتعددة شكلياً 164 حزمة ، وبلغت نسبة التعددية الشكلية 98.8%، كما تم تقييم التنوع الوراثي لـ 70 صنف من العدس الإثيوبي باستخدام تقنية ISSRحيث أعطت ما مجموعه 47 حزمة منها 28 حزمة ذات تعددية شكلية (Fikiru وزملاؤه، 2007)، وفي دراسة أجراها Tanyolac وزملاؤه (2009) وباستخدام 18 بادئاً من بادئات ISSR أعطت 23 حزمة متعددة شكليا، في حين كان متوسط نسبة التعددية الشكلية لكل بادئة من بادئات ISSRهي 1.27.

بينما درست علاقة القرابة الوراثية لـ 31 طرازاً وراثياً من العدس باستخدام 10 بادئات من بادئات ISSR فأعطت 43 حزمة ذات تعددية شكلية (Seyedimoradi و Talebi 2014).

أجرى Toklu وزملاؤه (2008) دراسة باستخدام 65 بادئاً من بادئات ISSR أعطت 14 بادئة نتائج تضخيم ما مجموعه 125 حزمة بينها 105 حزمة متعددة شكلياً، وكانت أكبر قيم معامل التعددية الشكلية هي 0.823 مع البادئة { UBC835 {(AG)8 YCفي حين كانت أقل قيم معامل التعددية الشكلية هي 0.495 مع البادئة {(TC)8 RT } UBC853 وبمتوسط قدره 0.677.

هدف هذا البحث إلى: تحديد درجة القرابة الوراثية لبعض أصناف من العدس باستخدام تقنية ISSR .

مواد البحث وطرائقه

1- المادة النباتية ومكان وزمان تنفيذ البحث:

تتألف المادة النباتية من 4 أصناف من العدس المزروع هي:(إدلب3، و إدلب4 ،و حوراني ،وكردي) والتي تتميز بتأقلم بيئي جيد وذات إنتاجية عالية وتزرع في مساحات واسعة في سورية، تم الحصول عليها من الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية (سورية)، نفذ البحث في مخبر التقانات الحيوية في كلية الزراعة بجامعة دمشق (سورية) خلال الموسم الزراعي 2013/2012 ويبين الجدول1 نسب الأصناف المدروسة.

الجدول 1. نسب الأصناف المدروسة.

اسم الصنف	النسب
كردي	صنف محلي
حوراني	صنف محلي
إدلب 3 (ايكاردا)	(ILL99) Morocan (landrace) × (ILL5588) Jordanian (landrace)
إدلب 4 (ايكاردا)	(ILL5879) {(ILL39 Syria) × (ILL479 Lebanon)} × (ILL5714) { (ILL500 Mexico) × (ILL1719 Ethiopia)}

2- طرائق العمل:

- **تعقيم البذور وزراعتها:**

عُقمت البذور بنقعها في مادة الإيتانول تركيز 70% لمدة 30 ثانيةً، بعد ذلك نُقلت على التوالي إلى أربعة أوعية يحوي كل منها ماءً مقطراً معقماً، تُركت في كل وعاء لمدة 5 دقائق، ونُقلت هذه البذور ووضعت في وعاء يحوي مادة هيبو كلوريد الصوديوم 5% لمدة 5 دقائق، ثم نُقلت مرةً أخرى لتُنقع في الماء المقطر ثلاث مرات مدة كل منها 5 دقائق، ثم زُرعت في

أصص خاصة، وبعمر 2 إلى 3 أسابيع أُخذت الأوراق الطازجة من أجل استخلاص الحمض النووي DNA للدراسة الوراثية.

- **استخلاص الحمض الريبي النووي DNA بطريقة SDS:**

استُخلص الحمض النووي DNA من البادرات الفتية بعمر 2 إلى 3 أسابيع بطحن 1غرام من الأوراق الخضراء باستخدام الآزوت السائل حتى الحصول على مسحوق ناعم، نُقل بعدها إلى حوجلة زجاجية سعة 50ml وأضيف لها 10ml من محلول الاستخلاص SDS و المكون من:

(0.1M Tris-HCl،PH=8.2، 50mM EDTA، 0.1M NaCl، 2% SDS،1mg/ml proteinase K).

(Stein و وزملاؤه،2001) ، ثم حُضنت العينات لمدة 60 دقيقةً مع التحريك المستمر ضمن حمام مائي عند 37 مº. أُضيف 10ml من مزيج كل من كلوروفورم/أيزواميل كحول بنسبة 1:24. نُقل المزيج إلى أنبوب تثفيل سعة 30ml وثُفل المزيج (عملية الطرد المركزي) لمدة 10 دقائق بسرعة (10000 rpm) بدرجة حرارة 4 مº. أُضيف الإيزوبروبانول Iso-propanol بمعدل 3/2 من حجم الوسط المائي، ثم نُقل الحمض النووي (DNA) المترسب إلى أنبوب صغير سعة 2ml وأُضيف 0.5ml من محلول الغسيل Washing buffer (كحول إيتيلي 76%) البارد (المحفوظ بدرجة 20 مº) تمَّ التثفيل بسرعة (10000 rpm) لمدة 10 دقائق وبدرجة حرارة4 مº. أُذيبت عينات الحمض النووي (DNA) في 500µl من المحلول المنظم TE المكون من (10 mM Tris-HCl)،(1mM EDTA). وتمَّ التخلص من الحمض النووي RNA بإضافة 2µl من أنزيم RNase (10mg/ml) والتحضين على درجة (37 مº) مدة نصف ساعة. استخدم جهاز المقياس الطيف الضوئي(Power WaweXTM BIO-TEK Instruments) لتقدير كمية الحمض النووي DNA وتحديد نقاوته، حيث يعتمد الجهاز في عمله على قياس كمية الحمض النووي الموجودة عن طريق تقديره لامتصاص الحمض النووي DNA للأشعة فوق البنفسجية بموجات طولها 260 و280 نانومتر. حيث ذكرManiatis وزملاؤه، (1982) أن النسبة بين قراءة الموجة 260 نانومتر والموجة 280 نانومتر تساعد في تقدير نقاوة الحمض النووي إذ يجب أن تتراوح هذه النسبة بين 1.8 و2. وطُبقت عملية الرحلان الكهربائي على هلامة الآجاروز بتركيز 0.8% لمعرفة نوعية الحمض النووي DNA المستخدم. ثم مدد تركيز الحمض النووي DNA ليصبح 40 µg/µl.

3- تطبيق تقنية ISSR :

استُخدم في الدراسة 21 بادئةً ويوضح الجدول 2 التسلسل النيكليوتيدي ودرجة حرارة الالتحام للبادئات المستخدمة في الدراسة. أُجري تفاعل البلمرة المتسلسل PCR وفقاً لـ Lawyer وزملاؤه، (1993) مع بعض التعديلات، فكان حجم التفاعل النهائي (25 µl) باستخدام 2x Master mix تمَّ الحصول عليها من شركة Fermentas-Germany، وتكون التفاعل 2µl من البادئ بتركيز (10 mM) ، و 12.5 µlمن 2x Green master mix، و 8.5 µl ماءً مقطراً، و DNA بتركيز (40 µg/µl) ، وتم هذا التفاعل في جهاز التدوير الحراري وفقا للظروف التالية :

1. الانفصال عند درجة حرارة 94 مº لمدة 5 دقائق.
2. 40 دورة تتضمن كل منها المراحل التالية:
   - انفصال عند درجة حرارة 94 مº مدة 30 ثانية.
   - التحام حسب درجة حرارة البادئات الموجودة في الجدول 2 وذلك لمدة دقيقة واحدة.
   - استطالة عند درجة حرارة 72 مº لمدة دقيقة.
3. اكتمال التفاعل عند درجة حرارة 72 مº لمدة عشر دقائق.

ثم تحفظ العينات في درجة حرارة 4 مº ، بعد ذلك تم الترحيل على هلامة الآجاروز.

4- الرحلان الكهربائي والتلوين والتصوير :

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

(10X TBE buffer =(108g Tris borate+55g Boric acid + 9.2g EDTA، pH=8 والمضاف إليها 5µl من صبغة الإيتيديوم بروماید (50 µg/µl) حيث حملت عينات الحمض النووي DNAعلى هلامة الآجاروز بإضافة 5 µl 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).

كما تم حقن مؤشر من الحمض النووي (DNA) 1Kpbمن شركة (Fermentas، Germany) Kوكذلك لتحديد الحجم والوزن الجزيئي للحزم الناتجة، وتم بعد ذلك الترحيل بمرور حقل كهربائي قدره 100 فولط وذلك لفصل حزم الحمض النووي DNA الناتجة عن عملية التضخيم. وصورت الهلامة بجهاز تصوير هلامة الآجاروز Image Analyzer.

الجدول 2 . التسلسل النيكليوتيدي للبادئات المستخدمة في تقنية ISSR ودرجة حرارة الالتحام م°.

درجة حرارة الالتحام م°	التسلسل النيكليوتيدي 3' - 5'	البادئة
52	GAGAGAGAGAGAGAGAC	ISSR-2
52	CACACACACACACACAG	ISSR-4
56	GAGAGAGAGAGAGAGACG	ISSR-6
54	TCTCTCTCTCTCTCTCGA	ISSR-7
54	TCTCTCTCTCTCTCTCAG	ISSR-8
56	ACACACACACACACACGG	ISSR-9
56	CCAGGTGTGTGTGTGTGT	ISSR-14
54	GTGTGTGTGAGAGAGAGA	ISSR-15
54	ACACACACACACACATATAT	ISSR-16
56	CCTCTCTCTGTGTGTGTG	ISSR-18
56	CACACACACACACACACACACA	ISSR-20
54	GAGAGAGAGAGAGAGAGAGA	ISSR-22
54	AGGAGGAGGAGGAGGAGG	ISSR-25
52	AGAGAGAGAGAGAGAGT	ISSR-32
52	GAGAGAGAGAGAGAGAT	ISSR-33
52	CTCTCTCTCTCTCTCTT	ISSR-34
52	CACACACACACAACAG	ISSR-35
52	TCTCTCTCTCTCTCTCC	ISSR-36
52	TGTGTGTGTGTGTGTGG	ISSR-37
52	ACACACACACACACACTT	ISSR-40
52	TGTGTGTGTGTGTGTGAA	ISSR-43

4- التحليل الإحصائي:

جُمعت نتائج عملية التضخيم الناتجة عن تطبيق تقنية ISSR في جداول ولكل بادئة على حده، اعتماداً على وجود أو غياب حزم DNA في العينات المدروسة، حيث يدل الرقم 1 على وجود حزمة الحمض النووي الواضحة فقط ، والرقم 0 يدل على غياب الحزمة حسب Nei (1987)، و أُجري التحليل الإحصائي باستخدام البرنامج POPGENE V1.31 (Yeh وزملاؤه، 1999). وتمت دراسة العلاقة الوراثية بين الطرز الوراثية المدروسة بتطبيق مصفوفة النسب المئوية لعدم التوافق (Percent Agreement Values) (PAV)، ويتم إنشاء هذه المصفوفة وفقاً لعدد وحدات التضاعف المشتركة بينها وفقاً لـ Nei (1972). حيث أن ارتفاع قيم هذه المصفوفة يدل على وجود اختلاف وراثي، وبازديادها يزداد التباين الوراثي بين الطرازين المدروسين.

يسمح التحليل العنقودي بتقسيم الطرز الوراثية المدروسة إلى مجموعات، وتعكس هذه المجموعات درجة القرابة الوراثية فيما بينها. أجري التحليل العنقودي للنتائج التي تمّ الحصول عليها وذلك لإنشاء شجرة القرابة الوراثية (Dendrogram) بتطبيق متوسطات المجموعات الزوجية غير المزانة (UPGMA) (Sneath و Sokal، 1973)، اعتماداً على نتائج المسافة الوراثية بين الطرز المدروسة وفقاً لمعادلة Nei (1978).

حسبت قيم معامل التعددية الشكلية للبادئات المستخدمة وفق المعادلة:

$$PIC = [\Sigma 2(PI(1- PI)^2]$$

حيث Pi تكرارية الحزم **I** الناتجة عن استخدام البادئ في جميع العينات المدروسة (Mohammadi و Prasanna، 2003).

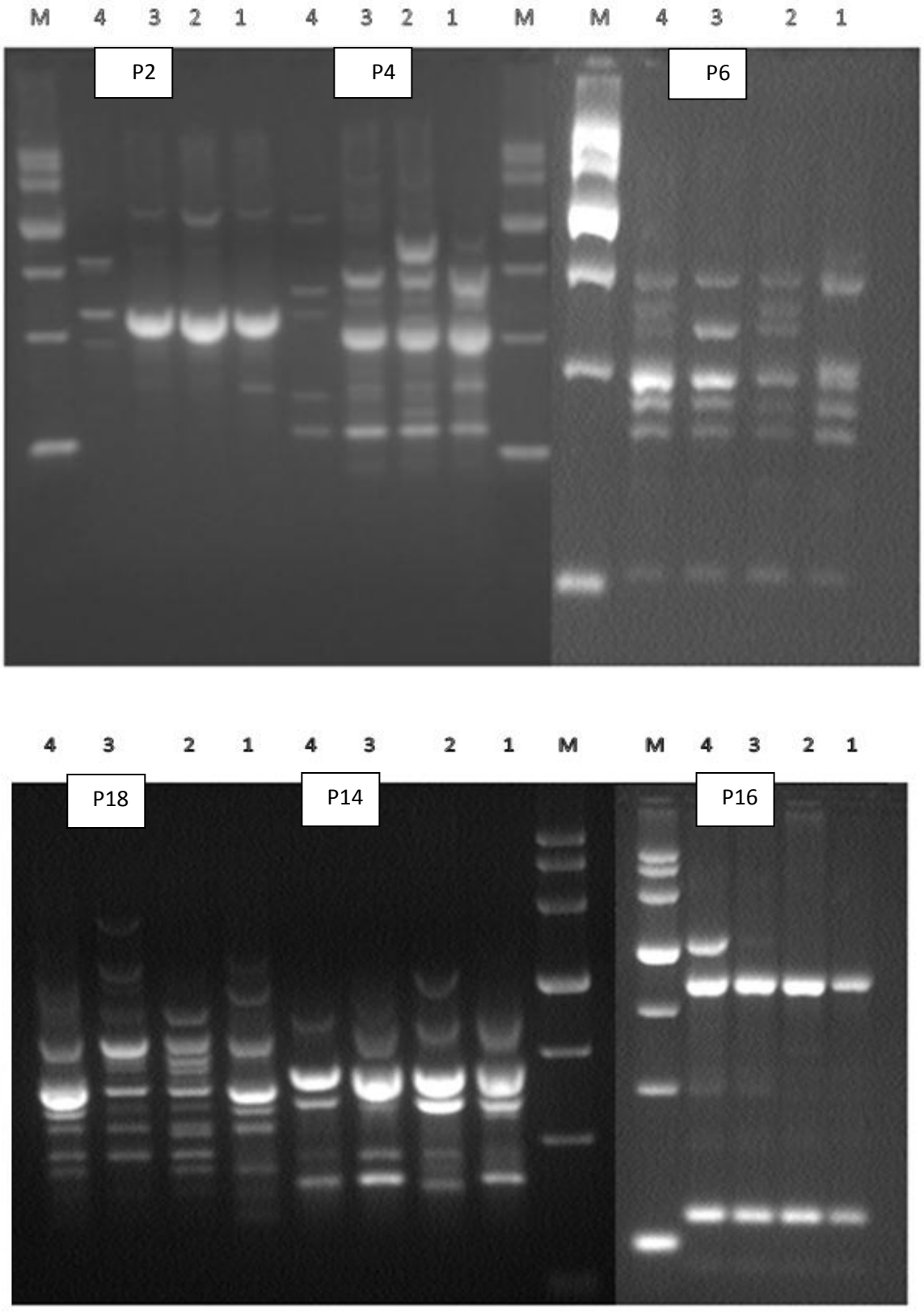
النتائج والمناقشة

1- التعددية الشكلية:

تم استخلاص الحمض النووي DNA وقيس تركيزه وتراوح بين 0.26 و1.45 ونقاوته بين 1.8 و 2 لكل الأصناف وطبقت تقنية ISSR فتم اختبار 21 بادئة تم الحصول عليها من الهيئة العامة للطاقة الذرية في سورية. حيث أثبتت 17 بادئة فعاليتها في إعطاء تعددية شكلية بين الأصناف المدروسة في حين لم تعط 4 بادئات أي نتائج تضخيم في تفاعل البلمرة المتسلسل (الشكل 1) .

يبين الجدول 3 أن 17 بادئة أعطت منتجات تضخيم ونجم عن استخدام هذه البادئات ما مجموعه 122 حزمةً، حيث أعطت هذه البادئات تعدديةً شكليةً (Polymorphic) وبلغت النسبة المئوية للتعددية 93.4%، وتراوح عدد الحزم لكل بادئة بين ثلاث حزم كأقل عدد مع البادئتين (ISSR-40، ISSR-36) و14 حزمةً كأعلى عدد مع البادئة (ISSR-19) بمتوسط 7.2 حزمة لكل بادئة. وكانت النسبة المئوية للتعددية الشكلية الأقل مع البادئة (ISSR6) بمقدار50%، والأكبر مع البادئات (ISSR2-ISSR4-ISSR40-ISSR43-ISSR15-ISSR22-ISSR25-ISSR33-ISSR34-ISSR35-ISSR36-ISSR37) بمقدار100%. وتتفق هذه النتائج مع نتائج Duran وزملائه(2004) حيث كانت نسبة التعددية الشكلية 98.8 %.

كما تباينت البادئات التي استخدمت في هذه الدراسة بقيم معامل التعددية الشكلية (PIC) التي وجدت بين الأصناف، حيث كانت أعلى قيمة لمعامل التعددية الشكلية هي 0.3752 باستخدام البادئة ISSR-18، وكانت أقل قيمة لمعامل التعددية الشكلية هي 0.2833 باستخدام البادئة ISSR-15 وبمتوسط قدره 0.3646 (الجدول 3).



الشكل 1. صور هلامة الآجاروز 2% لملاحظة التعددية الشكلية الناتجة عن استخدام البادئات ISSR2 -ISSR4 -ISSR6- ISSR18 - ISSR14 - ISSR16 في جميع الأصناف المدروسة، (M) يمثل المؤشر الجزيئي حيث 1 (إدلب4)، 2 (حوراني)، 3 (إدلب3)، 4 (كردي).

الجدول 3. رموز البادئات المستخدمة، وعدد الحزم الكلية والمتباينة شكلياً، والنسبة المئوية للتعددية الشكلية ومعامل التعددية الشكلية (PIC).

اسم البادئ	عدد الحزم الكلية	عدد الحزم المتباينة شكليا	النسبة المئوية للتعددية الشكلية(%)	معامل التعددية الشكلية PIC
ISSR-2	5	5	100	0.3751
ISSR-4	11	11	100	0.3749
ISSR-6	8	4	50	0.3729
ISSR-14	9	8	88.9	0.3750
ISSR-15	4	4	100	0.2833
ISSR-16	5	4	80	0.3746
ISSR-18	14	13	92.8	0.3752
ISSR-22	4	4	100	0.3750
ISSR-25	8	8	100	0.3648
ISSR-32	8	7	87.5	0.3710
ISSR-33	13	13	100	0.3740
ISSR-34	5	5	100	0.3741
ISSR-35	9	9	100	0.3735
ISSR-36	3	3	100	0.3648
ISSR-37	6	6	100	0.3549
ISSR-40	3	3	100	0.3456
ISSR-43	7	7	100	0.3697
المجموع	122	114	93.4	
المتوسط	7.2	6.7		0.3646

يلاحظ من الجدول 4 وجود 72 حزمة فريدة (موجودة و غائبة) وواسمة للأصناف المدروسة، موجودة في جميع الأصناف. حيث لوحظ وجود أكبر عدد من الحزم الفريدة (39 حزمة في الصنف إدلب4) ، في حين كان أقل عدد من الحزم الفريدة موجود في الصنف كردي (7 حزم) ، ويلاحظ أن جميع البادئات المستخدمة امتلكت القدرة على تمييز الأصناف المدروسة. أعطت البادئة ISSR4 أكبر عدد من الحزم الفريدة (10 حزم) في حين أعطت البادئة ISSR6 أقل عدد من الحزم الفريدة حزمة واحدة فقط .

الجدول 4. عدد الحزم الفريدة الموجودة في الأصناف المدروسة.

البادئة	ادلب4	حوراني	ادلب3	كردي	المجموع
ISSR-2	4	-	-	1	5
ISSR-4	8	-	2	-	10
ISSR-6	-	-	-	1	1
ISSR-14	1	-	2	-	3
ISSR-15	1	2	-	-	3
ISSR-16	1	-	1	-	2
ISSR-19	-	3	4	1	8
ISSR-22	1	-	1	-	2
ISSR-25	2	1	1	-	4
ISSR-32	4	-	-	-	4
ISSR-33	4	1	-	-	5
ISSR-34	1	1	-	-	2
ISSR-35	-	2	1	3	6
ISSR-36	2	-	-	-	2
ISSR-37	5	1	-	-	6
ISSR-40	1	2	-	-	3
ISSR-43	4	1	-	1	6
المجموع	39	14	12	7	72

2- تحديد درجة القرابة الوراثية بين السلالات المدروسة:

يفيد تحديد درجة القرابة الوراثية ضمن الأصناف في برامج تربية النبات، لتأمين قاعدة وراثية كبيرة، للاستفادة منها في برامج التربية والتحسين الوراثي، وتمت دراسة العلاقة الوراثية بين أنواع العدس المدروسة بتطبيق مصفوفة النسب المئوية للتوافقPercent Agreement Values (PAV) حسب Nie و Li (1979).

يلاحظ من خلال الجدول5 أن أكبر قيمة لـ PAV هي 0.64 بين الصنفين (إدلب3 و كردي) ويدل هذا على أنهما على درجة كبيرة من القرابة الوراثية، تلاهما الأصناف (حوراني و إدلب3)، (حوراني و كردي)، ومن ثم الصنفين (إدلب4 و كردي) بقيمة 0.51، بينما كانت أقل قيمة لها 0.37 بين الصنفين (إدلب4 وإدلب3) تلاهما الصنفين (إدلب4 و حوراني) بقيمة 0.38 مما يدل على وجود تباين وراثي كبير بينها.

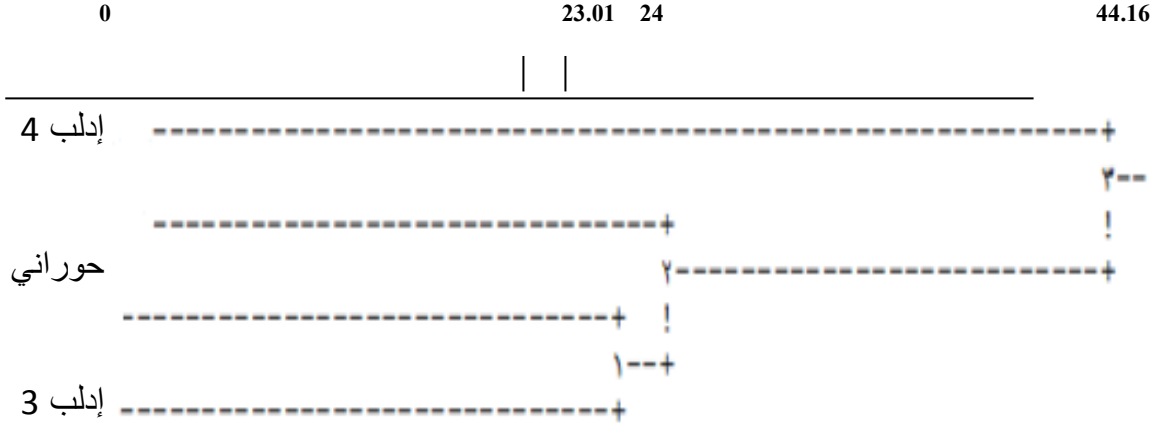
الجدول 5. مصفوفة النسب المئوية للتوافق (PAV) بين الأصناف المدروسة بتطبيق تقنية ISSR حسبNei (1987).

الصنف	إدلب 4	حوراني	إدلب 3	كردي
إدلب 4	1			
حوراني	0.38	1		
إدلب 3	**0.37**	0.62	1	
كردي	0.51	0.62	**0.64**	1

3- التحليل العنقودي(Cluster analysis) للأصناف المدروسة الناتج عن استخدام تقنية ISSR:

أظهر هذا التحليل عنقودين رئيسيين ضم الأول الصنف إدلب4 بمسافة (44.16) أما العنقود الثاني فقد انقسم إلى تحت عنقودين انفرد الصنف حوراني بتحت عنقود وبمسافة (24) أما تحت العنقود الثاني فضم الصنفين إدلب3 وكردي بمسافة قدرها (23.01).

يمكن أن يعزى بعد الصنف إدلب4 عن بقية الأصناف من خلال مقارنة نسبه مع الأصناف الأخرى بالإضافة لامتلاكه عدداً أكبر من الحزم الفريدة والتي بلغت 39حزمة، في حين كان عدد الحزم الفريدة لبقية الأصناف هي (14 و 12 و 7) حزم لكل من حوراني وإدلب3 و كردي على التوالي، لذلك انفصلت في تحت عنقود ثان وهذه النتائج توافقت مع النتائج التي حصل عليها MeenaKshi وزملاؤه (2013) بأنه تم التمييز بين الأصناف المدروسة من خلال الحزم الفريدة، وبذلك استطاعت تقنية ISSR التمييز بين الأصناف المدروسة وتوافق هذا مع نتائج Sonante و Pignone (2001) على العدس، و Závodná وزملائه 2000 .



الشكل 2. التحليل العنقودي للأصناف المدروسة والناتجة عن استخدام تقنية ISSR.

الاستنتاجات والمقترحات

1- أظهرت تقنية ISSR تعدديةً شكليةً بلغت 93.4 % ناتجة عن استخدام 17 بادئة فعالية في التمييز بين الأصناف المدروسة.
2- انقسمت شجرة القرابة الوراثية إلى تحت عنقودين ضم الأول الصنف إدلب4 في حين ضم العنقود الثاني الأصناف حوراني و إدلب3 و كردي .
3- يمكن العمل مستقبلاً على تحديد مواقع المورثات المسؤولة عن الصفات المهمة باستخدام QTLs، وعزلها للاستفادة منها في برامج التربية واستخدامها كآباء في عمليات التهجين.

المراجع

- **سيد، محمود هيثم.** 2001.استخدام مؤشرات من الدنا (DNA) في انتخاب مورثات المقاومة للأمراض في الشعير، جامعة دمشق، كلية الزراعة، أطروحة دكتوراه .
- **شاهرلي، مخلص؛ الأوبري، خالد؛ نابلسي، غسان؛ مولوي، بسام. 1995.** أولويات حفظ المصادر الوراثية البرية في سورية، دمشق، سورية.
- **معلا، محمد؛ شومان، وفاء؛ الواوي، هايل.** 2009. دراسة بعض الخواص الإنتاجية والمظهرية لسلالات منتخبة من الحمص المزروع (*Cicer arietinum* L). مجلة جامعة تشرين للبحوث والدراسات العلمية- سلسلة العلوم البيلوجية المجلد (31) العدد (1): 81-99.

- **Bornet. B., F. Goraguer., G. Joly., and M.Branchard.** 2002**.** Genetic diversity in European and Argentinean cultivated potatoes (Solanum *tuberosum subsp. tuberosum*) detected by inter-simple sequence repeats (ISSRs). Genome (45): 481-484.
- **Chowdhury. M.A., B. Vandenberg., and T.Warkentin.** 2002**.** Cultivar identification and genetic relationship among selected breeding lines and cultivars in chickpea (*Cicer arietinum L.).* Euphytica (127): 317–325.
- **Durán. Y and M. Pérez de la Vega.** 2004**.** Assessment of genetic variation and species relationships in a collection of *Lens culinaris Medikus* using RAPD and ISSR Spanish Journal of Agricultural Research 2(4): 538-544.
- **Eleuch. L., A. Jalil., S. Grando., S. Ceccarelli., M.K. 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 barley gemoplasm using simple sequence repeat markers. J. Integr. Plant Biolo. 50(8):1005-1015.
- **Fernández. M.E., A.M. Figueiras., and C. Benito.** 2002**.** The use of ISSR and RAPD markers for detecting DNA polymorphism، genotype identification and genetic diversity among barley cultivars with known origin. Theoretical and Applied Genetics (104):845–851.
- **Fikiru.E., K. Tesfaye., and E. Bekele.** 2007**.** Genetic diversity and population structure of Ethiopian lentil (*Lens culinaris Medikus*) landraces as revealed by ISSR marker African Journal of Biotechnology Vol. 6 (12): 1460-1468.Genet. (91): 647-654.
- **Gupta. M., B. Verma., N. Kumar., R.K. Chahota., R. Rathour., S.K. Sharma., S. Bhatia., and T.R. Sharma.** 2012**.** Construction of intersubspecific molecular genetic map of lentil based on ISSR، RAPD and SSR markers. J. Genet. (91)، 12/2012; 91(3):279-87. DOI: 10.1007/s12041-012-0180-4

- **Joshi. S.P., V.S. Gupta., R.K. Aggarwal., P.K. Ranjekar., and D.S. Brar.** 2000**.** Genetic diversity and phylogenetic relationship as revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) polymorphism in the genus Oryza. Theoretical and Applied Genetics (100):1311–1320.
- **Ladizinsky. G.** 1979**.** The origin of lentil and its wild genepool. Euphytica 28(1979): 179-187.
- **Lane. A.** 2007**.** An introduction to crop wild relatives، Geneflow، Publication about Agricultural Biodiversity، Bioversity International، p.19.
- **Lawyer. F.S., R. Stoffel., S. Saiki., P. Chang., R. Landre., Abramso., and D. Gelfand.** 1993**.** High-level expression، purification، and enzymatic characterization of full-length Thermus aquaticus DNA polymerase and a truncated form deficient in 5' to 3' exonuclease activity. *PCR methods and applications*، 2 (4): 275–287.
- **Maniatis.T., N. Proudfoot., and A. Gil.** 1982**.**The structure of the human zeta-globin gene and a closely linked, nearly identical pseudogene. Cell press,Volume 31, Issue 3, Part 2, December 1982, 553–563.
- **Meenakshi J.S.K., J.P. Verma., Singh and Anupam Barh.** 2013**.** Genetic diversity assessment in lentil *(lens culinaris medikus*) genotype through issr marker.The Bioscan8 (4): 1529-1532.
- **Mohammadi. S.A., and B.M. Prasanna.** 2003**.** Analysis of genetic diversity in crop plants: salient statistical tools and considerations cropscie. 43:1235-1248.
- **Nagaoka. T., and Y. Ogihara.** 1997**.** Applicability of inter-simple sequence repeat polymorphisms in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers. Theoretical and Applied Genetics (94): 597–602.
- **Nei. M.** 1987**.** Molecular Evolutionary Genetics. Columbia University Press، New York، NY.
- **Nei. M., and W.H. Li.** 1979**.** Mathematical model for polymorphism and genetic diversity among Indianstudying genetic variations in terms of restriction bread wheat cultivars. Prog. Agric.، (12): p.82-89. endonucleases. Proc. Nat. Acad. Sci.، (76): 5269-5273.
- **Nei.M.** 1978**.** Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. Genetic (89): 583- 590.
- **Nei.M.** 1972**.** Genetic distance between populations. American Naturalist (106): 283- 292.
- **Powell.W., M. Morgante., J.J. Doyle., J. Mcnical., S.V. Tingey., and A.J. Rafalski.** 1996**.** Genepool Variation in Genus Glycine Subgenus Soja Revealed by polymorphic Nuclear and chloroplast microsatellites، Genetics (144):793-803. p.573.
- **Ramsay.L., M. Macaulay., S. Degli Ivanissevich., K. Maclean., L. Carsle., J. Fuller., K.J. Edwards., S. Tuvesson., M. Morgante., A. Massari., E. Maestri., N. Marmiroli., T. Sjakste., M. Ganal., W. Powell., and R. Waugh.** 2000**.** A simple sequence repeat-based linkage map of barley. Genetics (156):1997-2005.
- **Seyedimoradi.H., and R. Talebi.** 2014 Detecting DNA polymorphism and genetic diversity in Lentil(*Lens culinaris Medik*.) germplasm: comparison of ISSR and DAMD marker.، Physiology and Molecular Biology of Plants. 20(1):125-132. DOI: 10.1007/s12298-013-0214-2.
- **Sharma. SK., IK. Dawson., and R. Waugh.** 1995. Relationships among cultivated and wild lentils revealed by RAPD analysis. Theor Appl Genet. 1995 Sep;91(4):647-54.

- **Sokal. R R., and P. H. A. Sneath. 1973.** Numerical taxonomy: the principle and practice of numerical classification. SanFrancisco: Freeman،1973.
- **Sonante. G., and D. Pignone.** 2001**.** Assessment of genetic variation in a collection of lentil using molecular tools. Euphytica (120):301-307.
- **Stein. N., G. Herren., and Keller. B.** 2001**.** A new DNA extraction method forhigh-throughput marker analysis in alarge genome species such as Triticum aestivum. Plant Breeding. 120: 354-356.
- **Tanyolac.B., S. Ozatay., A. Kahraman., and F. Muehlbauer.** 2009**.** Linkage mapping of Lentil (*Lens culinaris L*.) genome using recombinant inbred lines revealed by AFLP, ISSR, RAPD and some morphologic markers. Journal of Applied Biological Sciences 3(2):179-185.
- **Toklu. F., Y. T. Karako., E. Hakl., T. Bicer., A. Brandolini., B. Kilian., and H. O. Zkan.** 2008**.** Genetic variation among lentil (Lens culinaris Medik) landraces from Southeast Turkey Plant Breeding doi: 10.1111/j.1439-0523.2008.01548.
- **Yeh. F.C., R.C. Yang., and T. Boyle.** 1999**.** POPGENE 32- version 1.31. Population Genetics Software.
- **Závodná.M., J. Kraic., G. Paglia., E. Gregová., and M. Morgante.** 2000**.** Differentiation between closely related lentil *(Lens culinaris Medik*.) cultivars using DNA markers. Seed Sci Technol (28): p. 217-219.
- **Ziekiewicz. E., A. Rafalski., and A. Labuda.** 1994**.** Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) anchored polymerase chain reaction amplification. Genomics (20):178–183.

N° Ref: 574