التوصيف الجزيئي لنباتات متوسطة الطول في الشعير باستخدام تقنية SSR

Molecular Characterization of Medium Height Plants in Barley by Using Technique SSR

م. جمال صالح [1] د. مخلص شاهرلي [1] د. سلام لاوند [1]

(1) قسم المحاصيل الحقلية. كلية الزراعة. جامعة دمشق. سورية

الملخص

نفذ هذا البحث في مخبر التقانات الحيوية التابع لكلية الزراعة و جامعة دمشق (سورية) للعام 2011–2012. زُرعت حبوب الصنف فرات 1 متوسطة طول النبات (المعاملة بأشعة غاما جرعة 10 كيلوراد)، وحبوب غير معاملة بالأشعة من أجل تحديد امتلاك هذه النباتات لمواقع وراثية لصفة مقاومة الرقاد وتحديد درجة القرابة الوراثية فيما بينها وذلك باستخدام تقنية SSR (Simple Sequence Repeats). أثبتت البادئات المستخدمة فعاليتها في إعطاء تعددية شكلية(polymorphic) بين النباتات المدروسة، ونجم عن استخدامها ما مجموعه 12 إليلاً (قريناً)، وبلغت نسبة هذه التعددية 94.44 %، تراوح عدد الحزم لكل بادئة بين حزمة واحدة كأقل عدد مع البادئة (Bmac 0209) وثلاثة حزم كأعلى عدد مع البادئتين (Bmag0125, Bmag0225) بمتوسط 2 حزمة لكل بادئة. اظهر التحليل العنقودي وشجرة القرابة الوراثية أن أعلى قيمة لـPDV هي بين الشاهد (الصنف فرات1) والنبات 2 (المعاملة) (81،82) بينما كانت أقل قيمة لها بين النبات 1 و النبات 2 (45.45) مما يدل على وجود تباين وراثي كبير بينها.

الكلمات المفتاحية: الشعير، مقاومة الرقاد، التعددية الشكلية، شجرة القرابة الوراثية.

Abstract

This investigation was carried out at the Laboratory of Biotechnology, Faculty of Agriculture, Damascus University, during the season 2010/ 2011.

Barley variety (fourat 1) treated seeds exposed to Gamma ray with 10 kilorad dose and untreated seeds were sown to identify the presence of genetic loci for lodging resistance and to determine the degree of genetic relationship using the SSR technique (Simple Sequence Repeats). All primers proved their effectiveness in showing polymorphism between studied individuals, and gave a total of 12 alleles with a polymorphic percentage of 94.44%. The number of bands for each primer varied from minimum of 1 band for the primer (Bmac0067) to maximum 3 bands for the primers (Bmag0125, Bmag 0225) in an average of 2 bands for each primer. Cluster analysis and Dendrogram showed the highest PDV (81.82) between untreated plants of Fourat 1 and Gamma treated ones, while it was the lowest (45.45(between treated and untreated plants , which indicates wide genetic diversity among them.

Key words: Barley, Lodging Resistance, Polymorphic, Genetic relationship.

©2014 The Arab Center for the Studies of Arid Zones and Dry Lands, All rights reserved. **ISSN:2305 - 5243**

The Arab Journal for Arid Environments 7 (1 - 2): 18 - 24 المجلة العربية للبيئات الجافة 7 (1 - 2): 18 - 24

المقدمة

يُعد الشعير من المحاصيل النجيلية المهمة في العالم بسبب استخداماته المتعددة في تغذية الإنسان وعلفاً للحيوان وصناعة البيرة، و لقد تحول الشعير خلال آلاف السنين من كونه محصولاً غذائياً إلى محصول علفي إذ يستخدم حوالي 85 % من الإنتاج العالمي حالياً في تغذية الحيوان، بينما تأتي أهميته في الدرجة الثانية عالمياً من حيث الاستخدام في صناعة البيرة، حيث يستخدم عالمياً نحو 18مليون طن سنوياً في هذه الصناعة (Fischbech, 2002) . يتبع الشعير للعائلة Poaceae والجنس Hordeum والقبيلة Hordea، وتحت القبيلة Triticinae. كما ينمو في مدى بيئي واسع وهو أكثر تحملاً للإجهادات من بقية محاصيل الحبوب. ويستخدم إنموذجاً بالنسبة لمحاصيل الحبوب وذلك بسبب توفر المعلومات حول مجموعه الوراثي بشكل واسع (Hayes وزملاؤه، 2000).

تقدر المساحة المزروعة من الشعير في سورية بنحو 1.527 مليون هكتار والإنتاجية قرابة 445.3 كغ/هـ، والإنتاج نحو 679.802 طن، وبما أن الشعير يزرع في مناطق الاستقرار الثالثة في سورية فقد قامت وزارة الزراعة بإدخال الشعير إلى مناطق الاستقرار الأولى والمروية من أجل زيادة الإنتاج وتقليل الاستيراد وذلك من مبدأ الاعتماد على الذات، ولكن من أهم مشاكل زراعة الشعير تحت ظروف الزراعة المروية والتي تحد من زيادة الإنتاجية هي الأمراض وظاهرة الرقاد، وتقدر الخسائر الناتجة عنه بنحو 30 إلى 40 % من الغلة الحبية، وبما أن أصناف الشعير المستنبطة في سورية هي بشكل أساس مخصصة لمناطق الاستقرار الثالثة والمناطق الهامشية، وتتميز بتحملها للجفاف ونقص الرطوبة، فمن هنا تأتي أهمية هذه الدراسة لتحديد الطرز الوراثية الأكثر مقاومة للرقاد، و تحديد درجة القرابة الوراثية بين الطرز المدروسة لاستخدامها في برامج التربية .

إن استخدام تقانات المؤشرات 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 وتقدير التشابه الوراثي(Ramsay وزملاؤه، 2000 ؛ Ivandic وزملاؤه، 2002 ؛ Eleuch وزملاؤه، 2008). طُور التفاعل التسلسلي البوليميرازي (Polymerase Chain Reaction– PCR) من قبل الباحث Saiki وزملائه، (1985) الذي كان له أثر مهم على صعيد الدراسات الوراثية الجزيئية، حيث يعد هذا الإنجاز تطوراً هاماً ساعد في زيادة سرعة وكفاءة غربلة العديد من المجموعات الانعزالية (Tragoonrung وزملاؤه، 1992). ويقوم هذا التفاعل بمضاعفة (Amplification) قطع محددة من الحمض الريبي النووي (DNA) باستخدام بادئات عشوائية أو متخصصة مصممة لهذا الهدف، مما يسمح بالحصول على ملايين النسخ المضاعفة من قطعة واحدة من الحمض الريبي النووي (DNA) التي تتضاعف أسياً، وذلك باستخدام دورات حرارية متعددة (Ayad وزملاؤه، 1997 ؛ سيد، 2001). وقد ساعد تصنيع أجهزة التدوير الحراري(automated thermo cycler) واكتشاف أنزيم البوليميراز (DNA Polymerase) في تطوير هذا التفاعل، وفي ظهور تقانات أخرى تعتمد عليه وتستخدم في إجراء التحاليل الوراثية وإنشاء خرائط الارتباط الوراثية (Rafalski وزملاؤه، 1996).تُعد تقنية التوابع الترادفية البسيطة (Simple Sequence Repeats- SSR) واحدة من التقانات المهمة المعتمدة على التفاعل التسلسلي البوليميرازي (Polymerase Chain Reaction- PCR)، وأطلق عليها Weber و May (1989) مرادفات عدة منها Simple sequence repeats- SSR) و(Simple Tagged Microsatellite site– STMS). كما أنها مثالية ومهمة بسبب وفرتها ووجودها على كل أجزاء المجينات النباتية، وتوزعها بشكل منتظم أو شبه منتظم على كامل المجموع الوراثي، كما أن ارتفاع معدل تطفرها يعكس نسباً عاليةً من التعددية الشكلية polymorphism، ويمكن استخدامها في الكشف عن السيادة المشتركة وفي الكشف عن الأليلات المتعددة multiallelic كما أن نتائجها ثابتة عند تكرارها، وهي تتطلب كمية قليلة من DNA، ويمكن أتمتتها، ويمكن نشر البادئات وتبادلها بسهولة بين المخابر بمجرد معرفة التسلسل النيوكليوتيدي لها، إلا أنه يعاب عليها حاجتها إلى بادئات ذات تسلسل نيوكليوتيدي محدد يحدد مكان التابع البسيط الترادفي SSR (Liu وزملاؤه، 1999؛Yu وزملاؤه، 1996؛ Wang وزملاؤه، 1994 ؛ Sweigart وزملاؤه،1994). وبين Powell وزملاؤه (1996) أن التوابع الترادفية البسيطة هي عبارة عن تسلسلات متكررة تتكون من توليفات مختلفة من أربع وحدات هي القواعد الأساسية DNA وهي الأدينين (A)، السيتوزين (C)، الجوانين (G) والتيامين (T) والمؤلفة من 1إلى 6 أزواج نيوكليوتيدية تتوالى مراراً وتكراراً من طرفيها، ويكون التابع الترادفي البسيط محاطاً بتتال نيوكليوتيدي معين، ثابت ووحيد في تواجده في مورثات النوع الواحد.

يمكن مقاومة ظاهرة الرقاد من خلال الحصول على الطرز ذات السوق القصيرة والصلبة، وذلك بإسهام مورثات التقزم (Rth1، Rth2allele) (Berry وزملاؤه، 2004 ، Brancourt-Hulmel وزملاؤه، 2003). يؤدي إدخال مورثات التقزم في المحاصيل إلى زيادة المقاومة للرقاد و الغلة الحبية (Worland و Snape، 2001). وقد تم تحديد العديد من المورثات المتعلقة بزيادة مقاومة الرقاد في الشعير مثل denso (Hellewell وزملاؤه، 2000)، وEa locus (Laurie وزملاؤه، 1994). بالإضافة لمورثات التقزم التي تعطي نباتات قصيرة جداً مثل Gai وGal (Borner وزملاؤه، 1999). يعد تبن الشعير علفاً مفيداً للمواشي في بعض البلدان مثل تركيا، وبالتالي لا يفضل المزارعون طرز الشعير ذات السوق القصيرة، فضلاً عن أن بعض مورثات مقاومة الرقاد ترتبط في بعض الأحيان سلباً مع الغلة الحبية وتسبب خسائر في الغلة الكامنة، وتشكل هذه العوامل عند تربية الشعير لمقاومة الرقاد تحدياً لمربي النبات. وجد

Hellewell وزملاؤه (2000) ارتباط صفتي قصر الساق وطول السنبلة في الشعير بالاليلين sdw و denso المتوضعين على الموقع نفسه على الصبغي 3H حيث يؤدي الاليل sdw لإنقاص 10 إلى 20 سم من طول الساق.

مما سبق يهدف هذا البحث إلى التوصيف الجزيئي لنباتات متوسطة الطول في الصنف فرات 1 باستخدام تقنية SSR.

مواد البحث و طرائقه

المادة النباتية :

نفذ البحث في مخابر قسم المحاصيل الحقلية و مخبر التقانات الحيوية في كلية الزراعة بجامعة دمشق (سورية) وفي مزرعة أبي جرش للموسم الزراعي 2011 / 2012م. استخدم في البحث صنف محلي من الشعير، فرات1 وهو صنف سداسي الصفوف، انتج محلياً من قبل الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية السورية ، يتميز بإنتاجه الجيد، ولا سيما في المناطق جيدة الهطول و هو متوسط القدرة على الاشطاء و متوسط التحمل للجفاف و متوسط المقاومة للأمراض.

تم في هذا البحث دراسة النباتات المنتخبة الطافرة في الجيل الخامس، وهو استمرار لبرنامج تحسين وراثي على الشعير باستخدام المطفرات الفيزيائية بدأ منذ العام 2006 بالتشعيع بأشعة غاما بالجرعات (5–10–15 كيلوراد) في صنف الشعير فرات1. حيث تمت معاملة البذور في هيئة الطاقة الذرية للصنف فرات 1 ومعدل الجرعة (2174) غراي/سا من منبع كوبالت (60) والنشاط الإشعاعي للمنبع (3.69) كيلوكوري. وزرعت خلال الموسم 2006/2007 وتم انتخاب النباتات الطافرة متوسطة الطول وتحت تأثير الجرعة (10 كيلوراد) في الصنف فرات 1 و مقارنتها بالشاهد.

طريقة الزراعة: أجريت فلاحات متعددة من أجل التخلص من الأعشاب الضارة وأضيفت الأسمدة المعدنية (N.P. K) حسب الكميات الموصى بها من قبل وزارة الزراعة السورية . حيث زرعت البذور في الحقل في أربعة سطور، طول كل سطر 1م، وزرعت البذور على مسافة 5 سم بين البذرة والأخرى ضمن السطر الواحد، والمسافة بين السطر والأخر 20 سم، وعمق الزراعة 3 إلى 5 سم، وتركت مسافات فاصلة بين المكررات بحدود 40 سم وقسمت الأرض إلى مساكب. تمت خلال مراحل النمو والتطور مراقبة النباتات وسجلت القراءات والملاحظات حتى موعد النضج الكامل، وأعطيت النباتات رياً تكميلياً كلما دعت الحاجة. وزرعت بذور النباتات الطافرة والشاهد في ثلاثة مكررات بطريقة القطاعات العشوائية الكاملة (R.C.B.D).

تمت دراسة متوسط صفة طول الساق (سم) على 10 نباتات طافرة أخذت بشكل عشوائي ومن المنتصف في كل قطعة تجريبية.

استخلاص الحمض الريبي النووي DNA بطريقة SDS:

طحن 1غرام من الأوراق الخضراء باستخدام الآزوت السائل حتى الحصول على مسحوق ناعم، نقل بعدها إلى حوجلة زجاجية سعة 50 ml وأضيف لها 10 ml من محلول الاستخلاص (Sodium Dodecyle Sulphat) SDS و المكون من:

(0.1 M Tris-HCl,PH=8.2، 50mM EDTA, o.1M NaCl، 2% SDS, 1 mg /ml proteinase K). حضنت العينات لمدة 60 دقيقة مع التحريك المستمر ضمن حمام مائي على درجة 37 °م. أضيف 10 ml من مزيج كل من كلوروفورم/أيزواميل كحول بنسبة 1:24. نقل المزيج بعدها إلى أنبوب تثفيل سعة 30 مل وثفل المزيج (عملية الطرد المركزي) لمدة 10 دقائق بسرعة (10000 rpm) على درجة حرارة 4 °م. أضيف الإيزوبروبانول (Iso-propanol)بمعدل 3/2 من حجم الوسط المائي، نقل الحمض النووي (DNA) المترسب إلى أنبوب صغير سعة 2 ml وأضيف 0.5 ml من محلول الغسيلWashing buffer (كحول إيتيلي 76 %) البارد (المحفوظ على درجة –20 °م) بالتثفيل بسرعة (10000 rpm) لمدة 10 دقائق وبدرجة حرارة 4 °م. أذيبت عينات الحمض النووي (DNA) في 500 ميكروليتر من المحلول المنظم TE المكون من (10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA). تم التخلص من الحمض النووي RNA بإضافة (2 µl) من أنزيم RNase (10 mg /ml) والتحضين على درجة (37 ° م) مدة نصف ساعة، و أضيف حجم مماثل من الكلوروفورم: ايزوميل الكحول (1:24). وبعد التثفيل ونقل الطور العلوي لأنبوب جديد أضيف له ضعف كمية المزيج من الإيتانول النقي لإعادة ترسيب الحمض النووي DNA، وترك عند الدرجة(4 °م) لمدة ساعة ثم رسب المزيج بالتثفيل بسرعة (10000 rpm) و لمدة 10 دقائق وغسل ثانية بوساطة الإيتانول 70 % و جفف في الهواء للتخلص من آثار الإيتانول،و أذيب الحمض النووي DNA في محلول TE المعقم.

التقدير الكمي والنوعي للحمض النووي DNA بوساطة الأشعة فوق البنفسجية :

استخدم جهاز (.Power WaweXTM (BIO-TEK Instruments, Inc لتقدير كمية الحمض النووي DNA وتحديد نقاوته ، 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 ذكر Maniatis وزملاؤه (1982) أن النسبة بين قراءة الموجة 260 نانومتر والموجة 280 نانومتر (OD 260/ OD 280) تساعد على تقدير نقاوة الحمض النووي إذ يجب أن تتراوح هذه النسبة بين 1.8و2. تم التقدير النوعي على هلامة 0.8 % Agaros ، حيث يظهر الحمض النووي DNA ذو النوعية الجيدة على شكل حزمة Band، بينما يكون الحمض النووي DNA سيء النوعية مبعثراً وغير واضح الحدود ومقطّعاً (Smear).

الجدول 1. التسلسل النكليوتيدي للبادئات المختبرة في تقنية SSR

اسم البادئة	التسلسل النيكليوتيدي للبادئة 3¯ - 5¯	درجة الالتحام
Bmac0209	f- CTAGCAACTTCCCAACCGAC r- ATGCCTGTGTGTGGACCAT	58
Bmac0067	f- AACGTACGAGCTCTTTTTCTA r- ATGCCAACTGCTTGTTTAG	55
Bmag0225	f- AACACACCAAAAATATTACATCA r- CGAGTAGTTCCCATGTGAC	58
Bmag0006	f- TTAAACCCCCCCCCTCTAG r-TGCAGTTACTATCGCTGATTTAGC	58
Bmag0125	f- AATTAGCGAGAACAAAATCAC r- AGATAACGATGCACCACC	55
Bmag0394	f- AATTCATCACAACAAGATAGGA r- AATTGATCTCCCTCTCTCTATG	58

تقنية الـ SSR المطبقة لإجراء الدراسة الجزيئية:

اختبر(6) أزواج من البادئات تم الحصول عليها من الهيئة العامة للطاقة الذرية في سورية بتركيز (10µM)، ويوضح الجدول 1 التسلسل النكليوتيدي للبادئات المستخدمة في الدراسة. أجري تفاعل البلمرة المتسلسل PCR وفقاً لـ Williams وزملائه (1990) مع بعض التعديلات فكان حجم التفاعل النهائي (25 µl) و تم الحصول على مكونات هذا التفاعل من شركة (Fermentas، Germany) كما يلي:

Master mix 12.5 µl (5X) + DNA 2.5 µl + Primer 2 µl ويكمل الحجم إلى 25 µl بالماء المقطر.

الرحلان الكهربائي والتلوين والتصوير:

تم الترحيل على هلامة الميتافور آجاروز 4 % في المحلول المنظم 1X TBE {(10X TBE buffer = 108 g Tris borate+ 55 g Boric acid + 9.2g (EDTA، pH 8.0)} و المضاف اليها 5µl من صبغة الايثيديوم بروماید (10 mg/ml). حملت عينات الحمض النووي DNA على هلامة ميتافور آجاروز بإضافة 5 ميكرولتر من سائل التحميل الخاص (1X Loading buffer Bromophenol blue) و المكون من :

(15% Ficoll 400 + 1.03 % bromophenol Blue + 0.03 % xylene cyanol FF + 0.4 % Orange G + 10 mM Tris-HCl + 50 mM EDTA)

كما تم حقن مؤشر من الحمض النووي (DNA) 1Kpb من شركة Fermentas , Germany وذلك لتحديد الحجم و الوزن الجزيئي للحزم الناتجة ليتم بعد ذلك الترحيل بمرور حقل كهربائي قدره 100 فولط وذلك لفصل حزم الحمض النووي DNA الناتجة عن التضخيم. لتصور الهلامة بجهاز تصوير هلامة ميتافور آجاروز Image Analyzer (Agle Eye II Staratagene).

التحليل الإحصائي

أجري التحليل الإحصائي باستخدام برنامج SPSS 17 باستخدام اختبار T-test، جمعت نتائج عملية التضخيم، ورسمت شجرة القرابة الوراثية Dendrogram بتطبيق متوسطات المجموعات الزوجية غير المزانة UPGMA Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Average باستخدام برنامج Pop gene 1.3 الإحصائي.

النتائج والمناقشة

النباتات الطافرة متوسطة الطول في الصنف فرات 1 في الجرعة 10 كيلوراد:

بينت نتائج التحليل الإحصائي انخفاض متوسط طول الساق وبشكل معنوي عند المعاملة بالمقارنة مع الشاهد وهذا عائد للتأثير المثبط لهذه الجرعة بشكل عام في متوسط طول النبات وبلغ متوسط نسبة الانخفاض في الطول 28.67% وتعد صفة قصر النبات من الصفات المهمة في برامج التربية والتحسين الوراثي لاستنباط الأصناف المقاومة للرقاد (الجدول 2).

الجدول 2. نباتات طافرة متوسطة الطول في الصنف فرات 1.

	الشاهد	المعاملة 10 كيلوراد	المعنوية
طول الساق (سم)	74.88	57.66*	0.005

الدراسة الوراثية على مستوى الحمض النووي DNA:

استخلص الحمض النووي DNA من البادرات الفتية بعمر 2 إلى 3 أسابيع وقيس تركيزه ونقاوته بجهاز المطياف الضوئي ، و تراوحت التراكيز بين 0.56 و1 ميكروغرام /ميكروليتر ونقاوة العينات بين 1.8و2، ومدد تركيز الحمض النووي DNA ليصبح 40 نانوغرام/ميكروليتر، وطبقت عملية الرحلان الكهربائي على الأغاروز بتركيز 0.8 % لمعرفة نوعية الحمض النووي DNA المستخدم .

التعددية الشكلية polymorphism الناتجة عن تطبيق تقنية SSR:

تضمنت الدراسة اختبار النباتات الطافرة و الشاهد، ويبين الجدول 3 أن جميع البادئات المستخدمة أعطت منتجات تضخيم في تفاعل البلمرة المتسلسل، و أثبتت البادئات المستخدمة فعاليتها في إعطاء تعددية شكلية بين الأصناف المدروسة ونجم عن استخدام هذه البادئات ما مجموعه 12 أليلاً (قريناً)، فأعطت 5 بادئات تعددية شكلية polymorphic وبلغت نسبة التعددية 94.44 %، كما تراوح عدد الحزم لكل بادئة بين حزمة واحدة كأقل عدد مع البادئة (Bmac0209) و3 حزم كأعلى عدد مع البادئتين (Bmag0125 و Bmag0225) بمتوسط 2 حزمة لكل بادئة.

ثم طبقت تقنية SSR باستخدام 6 أزواج من البادئات. وقد لوحظت اختلافات كبيرة بين البادئات. فأعطى البادئ (Bmag0125) المرتبط بمقاومة ظاهرة الرقاد حزماً واضحةً في الشاهد و المعاملة. و وجد أن مؤشرات SSR المرتبطة بمقاومة الرقاد تتوضع على الصبغي 3H فقط في الطرز سداسية الصفوف وعلى الصبغي 2H في الطرز ثنائية الصفوف وهذا يتفق مع ما توصل إليه Ahlemeyer وزملاؤه(2003).

الجدول 3. رموز البادئات المستخدمة، وعدد الحزم الكلية والمتباينة،و النسبة المئوية للتعددية الشكلية (%).

اسم البادئ	عدد الحزم الكلية	عدد الحزم المتباينة	النسبة المئوية للتعددية الشكلية %
Bmac0209	1	0	0
Bmac0067	2	2	100
Bmag0225	3	2	66.66
Bmag0006	1	1	100
Bmag0125	3	3	100
Bmag0394	2	2	100
المجموع	12	10	100
المتوسط	**2**	**1.67**	**94.44**

تحديد درجة التباين الوراثي بين الشاهد و النباتات المدروسة:

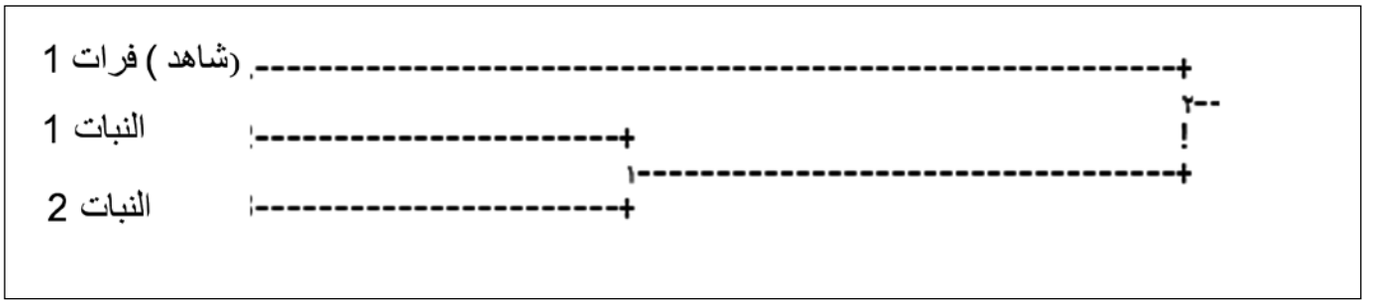
يفيد تحديد درجة التباين الوراثي ضمن الأنواع في برامج تربية النبات، في تأمين قاعدة وراثية كبيرة، للاستفادة منها في برامج التهجين. وتمت دراسة العلاقة الوراثية بين النباتات الشاهدة و المعاملة عند الشعير في الصنف فرات 1 المدروسة بتطبيق مصفوفة النسب المئوية لعدم التوافق Percent Disagreement Values (PDV) حيث يدل ارتفاع قيم هذه المصفوفة على وجود اختلاف وراثي وبازديادها يزداد التباين الوراثي بين النباتين المدروسين ويتم إنشاء هذه المصفوفة وفقاً لعدد وحدات التضاعف المشتركة. ويلاحظ من خلال الجدول 4 أن أعلى قيمة لـ PDV هي بين الشاهد (الصنف فرات1) والنبات2 (المعاملة) (81.82) ، بينما كانت أقل قيمة لها بين النبات 1 و النبات 2 (45.45) مما يدل على وجود تباين وراثي كبير بينها.

الجدول 4. مصفوفة النسب المئوية لعدم التوافق (PDV) بين النباتات المدروسة والناتجة عن تطبيق متوسطات المجموعات الزوجية غير المزانة (UPGMA) بتطبيق تقنية الـ SSR بالاعتماد على Nei (1987).

	الشاهد	نبات 1	نبات 2
الشاهد	0		
نبات 1	72.73	0	
نبات 2	81.82	45.45	0

التحليل العنقودي Cluster analysis للنباتات المدروسة الناتج عن استخدام تقنية SSR:

يسمح التحليل العنقودي بتقسيم النباتات المدروسة إلى مجموعات، وتعكس هذه المجموعات درجة القرابة الوراثية فيما بينها، وقد تتجمع العينات ضمن مجموعة واحدة بناءاً على موطنها الأصلي أو بناءاً على أصلها ونسبها. أجري التحليل العنقودي للنتائج التي تم الحصول عليها وذلك لإنشاء شجرة القرابة الوراثية Dendrogram لتحديد درجة القرابة الوراثية ورسم شجرة القرابة الوراثية بين الأنواع المدروسة. ولوحظ من الشكل 1 أن الأنواع المدروسة انقسمت إلى تحت عنقودين ضم الأول الصنف فرات1 (شاهد). بينما ضم الثاني النباتات المنتخبة متوسطة الطول(1 و 2).



الشكل 1. التحليل العنقودي Cluster Analysis **للأصناف المدروسة، الناتج عن استخدام تقنية** SSR

الاستنتاجات والمقترحات

- أعطت جميع البادئات المستخدمة منتجات تضخيم في تفاعل البلمرة المتسلسل حيث أثبتت البادئات المستخدمة فعاليتها في إعطاء تعددية شكلية بين الأصناف المدروسة ، ونجم عن استخدام هذه البادئات ما مجموعه 12 أليلاً (قريناً) جميعها ذات تعددية شكلية polymorphic.
- يقترح العمل على تحديد التسلسل النيكليوتيدي لهذه الحزم للاستفادة منها في برامج التربية واستخدامها آباءاً في عمليات التهجين.

المراجع

سيد، محمود هيثم.2001. استخدام مؤشرات من الدنا DNA في انتخاب مورثات المقاومة للأمراض في الشعير، أطروحة دكتوراه جامعة دمشق، كلية الزراعة، ، جامعة دمشق .

-Ahlemeyer,J., F. Aykut, W. Kohler, W. Friedt,W and F. Ordon.2003. Genetic gain and genetic diversity in German Winter barley cultivars :43 – 47.

-Ayad, W.G., T. Hodgkin, A. Jaradat, and V.R. Rao.1997. Molecular genetic techniques for plant genetic resources. Report for an IPGRI workshop, IPGRI, Rome, Italy: 11-12.

-Berry P.M., J.H. Sterling, C.J. Spink, R. Baker, S.J. Sylvester-Bradley, A.R. Mooney, A.R. and A.R. Ennos.2004. Understanding and reducing lodging in cereals, Adv. Agron. 84 : 217–271.

-Borner, A.,V. Korzun, S.Malyshev, V. Ivandic and A. Granerr.1999. Molecular mapping of two dwarfing genes differing in their GA response on chromosome 2H of barley. Theor. Appl. Genet., 99: 670- 675.

-Brancourt-Hulmel, M., G. Doussinault, C. Lecomte, P. Bérard, B. Le Buanec and M. Trottet.2003. Genetic improvement of agronomic traits of winter wheat cultivars released in France from 1946 to 1992, Crop Sci. 43: 37–45.

-Eleuch, L., A. Jalil, S. Grando, S. Ceccarelli, M.K. Schmising, A. Tsujimoto, A. Daaloul, A 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.

-Fischbech,G.2002. Contribution of barley to agriculture: A brief overview, in G.A. Food products press, Bingham Pton., USA:1-14.

-Hayes, P.M., A. Castro, A. Corey, L. Marquez-Cedillo, B. Jones, D. Mather, I. Matus, C. Rossi, and K. Sato. 2000. A

summary of published barley QTL reports. NABGMP.
- Hellewell, K.B., D.C. Rasmusson and M.Gallo-Meagher.2000. Enhancing yield of semi-dwarf barley . Crop Sci., 40:352-358.
- Ivandic, V.C., A. Hackett, E. Nevo, R. Keith, W.T.B. Thomas and B.P. Foster.2002. Analysis of simple sequence repeats (SSRs) in wild barley from the Fertile Crescent: associations with ecology geography and flowering time. Plant Mol. Biol. 48:511-527.
- Laurie, D.A., N. Prachett, J.H. Bezant and J.W.Snape.1994. Genetic analysis of a photoperiod response gene on the short arm of chromosome 2(2H) of barley. Heredity, 619: 627.
- Liu, Z. W., R.M. Biyashev, and M.A. Saghai Maroof.1996. Development of Simple Sequence Repeat DNA Markers and their integration into a barley linkage map. Theor. Appl. Genet. 93: 869 – 876.
- Maniatis, T., E.F. Fritsch and J. Sambrook.1982. Molecular cloning: Laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor/ NY.
- Nei, M. 1987. Molecular Evolutionary Genetics. Columbia University Press, New York, NY.
- 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.
- Rafalski, J.A., J.M. Vogel, M. Morgante, W. Powell, C. Andre and S.V. Tingey.1996. Generating and using DNA markers in plants. No mammalian Genomic Analysis: A Practical Guide. 4:75-134.
- 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 Waugh R.2000. A simple sequence repeat- based linkage map of barley. Genetics 156:1997-2005.
- Saiki, R. K., S. Scharf, F. Faloona, K.B. Mullis, G.T. Horn, H.A. Eriich and N. Amheim.1985. Enzymatic amplification of b-globulin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anaemia. Science 230:1350-1354.
- Sweigart, A., K. Karoly, A. Jones, and H.J. Willis.1999. The distribution of individual inbreeding coefficients and pairwise relatedness in population of Mimulus guttalus. Herditiy 83:625-632.
- Tragoonrung, S., V. Kanazin, P.M. Hayes, and T.K.Blake.1992. Sequence tagged site facilitated PCR for barley genome mapping. Theor. Appl. Genet. 84:1002-1008.
- Wang, G.L., D.J. Mackill, M. Bonman, S.R. McCouch, M.C. Champoux, and R.J.Nelson. 1994. RFLP mapping of genes conferring complete and partial resistance to blast in a durably resistant rice cultivar. Genetics 136:1421-1434.
- Weber, J.L. and P.E. May.1989. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. Am. J. Hum. Genet. 44:388-396.
- Williams, J.G.K., A.R.Kubelik, K.J. LivakJ.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.
- Yu, Y.G, M.A. Saghai Maroof, G.R. Buss, P.J. Maughan, and S.A. Tolin. 1994. RFLP and microsatellite mapping of a gene for soybean mosaic virus resistance. Phyto. pathology 84:60-64.
- Worland T., and J.W.Snape . 2001. Genetic Basis of Worldwide Wheat Varietal Improvement, in: A.P. Bonjean, J.F. Angus (Eds.), The World Wheat Book - A History of Wheat Breeding Lavoirsier Publishing Inc., Paris Cedex 08.

Ref : 339 / Accepted 1 -2013