مجلة العلوم الحديثة والتراثية ، 2021 ، 10 (1) : 1 – 9 .
Journal of Modern and Heritage Science
http://www.j-msh.com
Online ISSN: 2001-6611
Print ISSN: 2001-662X

توصيف بعض أصناف الحمص وتحديد درجة القرابة الوراثية بينها باستخدام تقنية ISSR

محمد ديب[1] و جورج غندور[1] و ينال القدسي[2]* و شهيناز عباس[2]
[1] سورية / كلية العلوم / جامعة البعث و [2] سورية/ الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية/ قسم التقانات الحيوية
استلام البحث : 01 / 10 / 2021 وقبول النشر : 15 / 11 / 2021

الخلاصة
نفذ البحث في مخابر الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية بدمشق قسم التقانات الحيوية خلال عامي 2020-2021، لدراسة التباين الوراثي بين ستة أصناف من الحمص (غاب3، غاب4، غاب5، Filip03-118، Filip 67-95، G11-08). وتحديد درجة القرابة الوراثية بينها باستعمال تقنية ISSR، استخدم في الدراسة 7 بادئات إلا أن ستة بادئات منها فقط أعطت منتجات تضخيم في تفاعل البلمرة المتسلسل PCR. أثبتت هذه البادئات فعاليتها في إعطاء تعددية شكلية بين الأصناف المدروسة، ونجم عن استعمال هذه البادئات ما مجموعه (48) حزمة، بمتوسط (8) حزم، وبلغ عدد الحزم المتعددة شكلياً (46) حزمة بمتوسط (7.66) حزمة، وبلغت النسبة المئوية للتعددية الشكلية (96.28%) وكانت الأقل مع البادئة (ISSR17) بمقدار (77.7%)، أما باقي البادئات التي أعطت منتجات تضخيم في تفاعل PCR فقد أعطت نسبة مئوية للتعددية الشكلية بلغت (100%)،، وبلغ متوسط قيم معامل التعددية الشكلية PIC (0.299) ما يُشير إلى قدرة البادئات المستخدمة على التمييز بين الأصناف المدروسة. وقد تبين أن معظم البادئات المدروسة امتلكت القدرة على التمييز بين الأصناف المدروسة بوجود وغياب الحزم الفريدة. وميزت هذه الحزم الفريدة بعض الأصناف المدروسة حيث امتلك الصنفان (Filip03-18, Filip67-95) أكبر عدد من الحزم الفريدة وهذا يدل على التنوع الوراثي بين الأصناف المدروسة، والذي استطاعت البادئات المدروسة الكشف عنه. كما بلغت أقل قيمة لمصفوفة عدم التوافق PDV هي (0.3778) بين الصنفين (Filip 67-95, Filip03-118) مما يدل على أنهما على درجة عالية من القرابة الوراثية، بينما كانت أعلى قيمة لـ PDV (0.7692) بين الصنفين (غاب3، G11-08) مما يدل على ووجود تباين وراثي كبير بينها. وأظهرت نتائج التحليل العنقودي وشجرة القرابة الوراثية انفصال الأصناف إلى عنقودين رئيسيين، وانفصل العنقود الأول إلى تحت عنقودين، ضم تحت العنقود الأول الصنفين (Filip03-118, Filip67-95) بمسافة وراثية قدرها 0.3778 وكانا الأقرب وراثياً إلى بعضهما البعض. وضم تحت العنقود الثاني الصنف (G11-08) لوحده، بينما انفصل العنقود الثاني إلى تحت عنقودين، ضم تحت العنقود الأول كل من (غاب3، غاب4) وبمسافة وراثية قدرها 0.4118 بينما ضم تحت العنقود الثاني الصنف غاب 5 لوحده، وكان الصنفان (غاب3، G11-08) الأبعد وراثياً بمسافة وراثية قدرها 0.7692 ويفيد ذلك في اختيار الآباء المتباعدة وراثياً لإدخالها في برامج التربية والتحسين الوراثي.
الكلمات المفتاحية: الحمص، التقانات الحيوية، تقنية ISSR، البادئات، القرابة الوراثية.

Characterization of some chickpea verities and determining the degree of genetic relationship between them using ISSR technique

Mohammad Deeb[1], George Ghandour[2], Yanal Al-Kuddsi[3] and Shahinaz Abbas[4]
[1, 2] Faculty of Science, Al-Baath University, Homs, Syria
[3, 4] Department of Biotechnology, General Commission for Scientific Agricultural Research, Damascus, Syria.
Received: 01 / 10 / 2021; Accepted: 15 / 11 / 2021

Abstract
The research was carried out in the laboratories of the General Commission for Scientific Agricultural Research in Damascus, Department of Biotechnology, during the years 2020-2021, to study the genetic variation between six varieties of chickpea (Gab3, Gab4, Gap5, Filip03-118, Filip 67-95, G11-08). The degree of genetic relationship between them was determined using the ISSR technique. Seven primers were used in the study, but only six of them gave amplification products in the PCR polymerase chain reaction. These primers proved their effectiveness in giving a polymorphism among the studied items, and the use of these primers resulted in a total of (48) bands, with an average of (8) bands, and the number of polymorphism bands was (46) bands with an average of (7.66) bands, and the percentage of polymorphism was (96.28) and was the lowest with the (ISSR17) primer by (77.7%), while the rest of the primers that gave amplification products

مجلة العلوم الحديثة والتراثية ، 2021 ، 10 (1) : 1 – 9 .
Journal of Modern and Heritage Science
http://www.j-msh.com
Online ISSN: 2001-6611
Print ISSN: 2001-662X

in the PCR reaction gave a percentage of polymorphism that reached (100%), and the average values of the polymorphism coefficient PIC (0.299)) which indicates the ability of the primers used to distinguish between the studied varieties. It was found that most of the studied primers had the ability to distinguish between the studied varieties with the presence and absence of unique packages.These unique bands distinguished some of the studied cultivars, as the two cultivars (Filip03-18, Filip67-95) possessed the largest number of unique bands, and this indicates the genetic diversity among the studied cultivars, which the studied initiators were able to detect. The lowest value of the PDV incompatibility matrix was (0.3778) between the two cultivars (Filip 67-95, Filip03-118), which indicates that they have a high degree of genetic relationship, while the highest value of PDV was (0.7692) between the two cultivars (Gab3، G11-08) which indicates the existence of a large genetic variance between them. The results of cluster analysis and genetic relationship tree showed the separation of varieties into two main clusters, and the first cluster separated into two sub-clusters, and under the first cluster the two cultivars (Filip03-118, Filip67-95) with a genetic distance of 0.3778 And they were genetically closest to each other. Under the second cluster contained the variety (G11-08) alone, while the second cluster separated into two sub-clusters, under the first cluster included each of (Gab3, Ghab4) with a genetic distance of 0.4118, while under the second cluster included the type Ghab 5. Alone, the two cultivars (Gab3, G11-08) were the most distant genetically with a genetic distance of 0.7692 and this is useful for selecting genetically divergent parents to be included in the genetic improvement and breeding programs.

Keywords: Chickpea, Biotechnologies, ISSR technology, Primers, Genetic relationship.

المقدمة

ينتمي الحمص المزروع (*Cicer arietinum*.L) إلى الجنس *Cicer* من رتبة البقوليات *Leguminosales* (أحمد، 2012). وهو نبات بقولي قديم جداً وجد منذ العصور الحجرية (Abbo and Kumar, 2001)، وهو من أهم المحاصيل في مجموعة محاصيل غرب أسيا، حيث تعد منطقة الشرق الأوسط موطنه الأصلي إلى جانب العديد من المحاصيل، ويعتقد أنه قد تم استئناس محصول الحمص في شرق الأناضول من سلفه البري (C. reticulatum) ومن ثم انتشر على نطاق واسع (Abbo *et al.*, 2005).

بلغ عدد الأصول الوراثية المجموعة من جنس الحمص في العالم (86499) مدخلاً، معظمها من الأصناف والسلالات المحلية إضافة لسلالات التربية والأنواع والأقارب البرية، وهي موزعة في 36 بنكاً وراثياً عالمياً، ويوجد في ايكاردا في سورية والمعهد الدولي لبحوث المحاصيل في المناطق المدارية شبه الجافة الاستوائية (ICRISAT) في الهند كمركزين دوليين رئيسين حوالي 37% من مجموع مدخلات الحمص هذه. (Upadhyaya and Laxmipathi, 2009); (Taubert, 2008).

وقدرت منظمة الزراعة والغذاء العالمي FAO أنه منذ بداية القرن العشرين ضاع حوالي 75% من التنوع الحيوي الوراثي تماما عن طريق التعرية الوراثية Genetic Erosion (إحلال أصناف جديدة محسّنة محل الأصول الوراثية التقليدية التي يستعملها المزارعون مما أدى إلى تقليص قاعدتها الوراثية مقارنةً مع الطرز الوراثية المدخلة) وهذا ما يؤدي إلى فقد التنوع الوراثي بين المجاميع النباتية وضمنها، حيث اختفت العديد من الأصناف وانقرضت، ويعود سبب ذلك بشكل رئيسي إلى الاعتماد كلّياً على الأصناف المحسّنة (Brandeland, 2007).

ولذلك يجب مراعاة إدخال مصادر وراثية خارجية بحيث يبقى المجتمع النباتي كاملاً يضم غالبية التراكيب المحلية والمزروعة والمستوردة للنوع نفسه، حيث تتميز المصادر الوراثية النباتية بتنوعها الوراثي الكبير وبقدرتها على تحمل الاجهادات الإحيائية واللإحيائية، وتشمل هذه المصادر مجموعة متنوعة من الموارد الوراثية بأنواعها التقليدية والأصناف المزروعة حديثاً بالإضافة إلى الأقارب البرية (Lane, 2007).

وترتبط عملية تحسين أي نبات بمدى اتساع المخزون الوراثي لأفراد النوع الذي ينتمي إليه أو للأنواع البرية القريبة منه والتابعة لنفس الجنس، ومن المعروف أن الأنواع البرية تتميز بمخزون عال من المورثات المسؤولة عن المقاومة للكائنات الممرضة الموجودة في المنطقة وكذلك تلك المسؤولة عن التكيف مع الظروف البيئية السائدة، والتي عادة تحتل المرتبة الثانية من الأهمية من حيث تأثيرها على الغلة البذرية بعد الأمراض، لذلك فإنه من الأهمية بمكان البحث عن المورثات المسؤولة عن مثل هذه الصفات في مصادرها الوراثية المختلفة ومحاولة نقلها إلى الأصناف المرغوبة باعتبار أن علاقة القرابة الموجودة بين الآباء البرية للمحاصيل تعد مادة ممتازة لدراسة التأقلم النباتي الواسع (Reddy *et al.*, 2004)، ويعد النوع *C. pinnatifidum* القريب البري للحمص المزروع أكثر تحملاً للإجهادات اللإحيائية المختلفة (Bhattarai and Fettig, 2005).

مجلة العلوم الحديثة والتراثية ، 2021 ، 10 (1) : 1 – 9 .
Journal of Modern and Heritage Science
http://www.j-msh.com
Online ISSN: 2001-6611
Print ISSN: 2001-662X

أكد (Frison *et al.*, 2002) على ضرورة تقييم وتوصيف الموارد الوراثية لتعزيز استخدامها في برامج التربية بعد تحديد الخصائص المرغوبة منها لتحسين الأصناف التي تمتلك قاعدة وراثية ضيقة نسبياً.

ولأن توصيف الأنواع النباتية وتصنيفها اعتماداً على المؤشرات الشكلية والإنتاجية تعتبر من الطرائق القديمة، التي تتأثر غالباً بالظروف البيئية السائدة وتعطي نتائج متقاربة ومتشابهة ويصعب الاعتماد عليها في تمييز الاختلافات ولأنها تتطلب وقتاً وجهداً كبيرين (Wjhani, 2004)، كان لابد من دعم هذه الدراسات بطرائق التقانات الحيوية الحديثة باستخدام المؤشرات الجزيئية لتوصيف المصادر الوراثية إذ أنها تتميز بكثرة عددها وثبات نتائجها وعدم تأثرها بالظروف البيئية (Ricciardi *et al.*, 2002)، كما أن استخدام التقانات الحيوية على المستوى الجزيئي للمادة الوراثية يؤدي إلى تسريع وتيرة تحسين المحاصيل (Powell *et al.*, 1996) إذ إنّها تساعد على عمليات الانتخاب والتربية مختصرة بذلك الزمن الذي تستغرقه عمليات التربية التقليدية (سيد، 2001)، لأسباب عديدة منها عدم وجود أي علاقة بين الأطوار الفينولوجية للنبات والواسمات الجزيئية، ويمكن استخلاص المادة الوراثية من الحمض الريبي النووي منقوص الأوكسجين (DNA) من المراحل الأولى للنبات، وسهولة تحديد موقع مورثة معينة مسؤولة عن صفة ما مباشرة وعدم تأثر الدراسة الجزيئية بالشكل الظاهري للنباتات وبالعوامل البيئية كما هو الحال في برامج التربية التقليدية.

أن استخدام التقانات الجزيئية، يقلل من تعقيدات إدخال عدد من الصفات المرغوب فيها في النمط الوراثي الواحد (Ramsay *et al.*, 2000)، ويسمح بدراسة التنوع الوراثي Genetic diversity وتقدير التشابه الوراثي (Eleuch, 2008). إضافة إلى تسريع تقيم مكونات الصفات الوراثية وعزل تأثيراتها عن المؤثرات البيئية، ورسم خرائط الارتباط الوراثية Linkage mapping (Powell *et al.*, 1996). إضافة إلى استخدام البصمة الوراثية لمعرفة التباينات الوراثية الموجودة داخل المجتمعات النباتية وتحديد درجة نقاوتها وامكانية استثمارها في تحسين الأجناس النباتية الشبيهة والقريبة.

وتعتبر تقنية التكرارات الترادفية البسيطة الداخلية Inter Simple Sequence Repeats (ISSR) واحدة من التقانات المهمة التي تعتمد على تفاعل البلمرة المتسلسل Polymerase Chain Reaction (PCR)، والتي وجدت عام 1994 كتقنية جديدة للمعلمات الجزيئية، وتتميز بأنها غير مكلفة مقارنة مع غيرها من التقنيات سواء من حيث احتياجاتها لتجهيزات معقدة أو مواد حيوية غالية الثمن، علاوة على ذلك فقد ثبت نجاحها على عدد كبير من الأنواع النباتية، وتمتاز هذه التقنية بأنها ذات تكرارية ووثوقيه عالية ولا تحتاج إلى معلومات مسبقة عن المجين، كما أثبتت الدراسات الأخيرة التي اجريت على هذه التقنية أنها لا تحتاج إلى تراكيز عالية من الحمض النووي الريبي منقوص الأوكسيجين DNA للمادة المدروسة (Branchard and Bornet, 2001).

أهمية البحث وأهدافه

إن عملية تقييم وتوصيف الطرز الوراثية ومن ثم إدخال الطرز التي أثبتت تفوقها في إنتاج الغلة، وتحملها للإجهادات المختلفة من أهم الطرق التي تساعد في إيجاد تباينات وراثية جديدة لاستثمارها في عمليات التهجين، مما يساعد في تطوير وتحسين برامج التربية، وبالتالي التوصل إلى سلالات وأصناف جديدة ذات مواصفات جيدة، وتتميز بإنتاجية عالية، ومتحملة للإجهادات الأحيائية واللاإحيائية، ولكن بسبب بطء هذه البرامج، وعدم الاستقرار الوراثي لفترات زمنية طويلة، وتدهور الصفات المرغوبة نتيجة التبدلات البيئية المستمرة تم اللجوء إلى الطرائق الأخرى لتحسين خواص وصفات وانتاجية النباتات، ومن هذه الطرائق استخدام المعلمات الجزيئية، التي يمكن من خلالها تحديد درجة القرابة الوراثية بين الطرز، وبالتالي استخدام الطرز الوراثية المتباعدة وراثياً كآباء في برامج التهجين، للوصول إلى طرز وراثية متفوقة في صفاتها الإنتاجية، وأكثر تأقلماً مع ظروف الوسط المحيط. وقد هدف بحثنا إلى دراسة التباين الوراثي بين ستة أصناف من الحمص. وتحديد درجة القرابة الوراثية بينها باستعمال تقنية ISSR.

المواد وطرائق العمل

مكان إجراء البحث:

أجري البحث في مخابر قسم التقانات الحيوية، الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية بدمشق وذلك خلال العام 2020-2021.

المادة النباتية:

استخدمت في هذه الدراسة ستة أصناف من نوع الحمص المزروع (*Cicer arietinum*.L) هي (غاب3، غاب4، غاب5، Filip03-118، Filip 67-95، G11-08). تم الحصول عليها من إدارة بحوث المحاصيل الحقلية، الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية.

استخلاص الحمض النووي الريبي منقوص الأوكسجين DNA Extraction:

تم عزل الحمض النووي الريبي منقوص الأوكسجين من الأوراق النباتية الطازجة المجموعة من بادرات بعمر 2-3 أسابيع بطريقة CTAB المعدلة وفقا لما أشار إليه (Murray and Thompson, 1980). وقد استخدم جهاز المطياف الضوئي (Bio metra GenRay UV-photomter) لتقدير كمية الحمض النووي DNA في العينات، والذي يعتمد في عمله على قياس كمية الحمض النووي الموجودة عن طريق امتصاصه للأشعة فوق البنفسجية Ultra Violet بموجات طولها 260 و 280 نانومتر. تسمح قراءة الامتصاص على طول الموجة 260 نانومتر بحساب تركيز الحمض النووي nucleic acid في العينة بحيث أن كل واحد من الكثافة الضوئية Optical Density (OD) تقابل حوالي 50 ميكروغرام/مل لسلاسل الحمض النووي DNA المضاعفة.

مجلة العلوم الحديثة والتراثية ، 2021 ، 10 (1) : 1 – 9 .
Journal of Modern and Heritage Science
http://www.j-msh.com
Online ISSN: 2001-6611
Print ISSN: 2001-662X

وتم حساب كمية الحمض النووي DNA من المعادلة التالية (Maniatis,1982)

DNA con. (µg/µl) = {OD260 x 100 (Dilution Factor) x 50 µg/ml}/1000

كما أن النسبة بين قراءة الموجة 260 نانومتر/ إلى 280 نانومتر تساعد في تقدير نقاوة الحمض النووي وخلوه من البروتين ويجب أن تتراوح هذه النسبة بين (2، 1.8).

تطبيق تقنية ISSR:

استخدم في الدراسة 7 بادئات تم الحصول عليها من شركة Vivantis إلّا أن ستة بادئات فقط أعطت منتجات تضخيم في تفاعل البلمرة المتسلسل PCR وبالتالي اعتمدت في دراستنا ويوضح الجدول (1) التسلسل النيكليوتيدي ودرجة حرارة الالتحام للبادئات الستة المستخدمة.

جدول (1)، التسلسل النيكليوتيدي ودرجة حرارة الالتحام للبادئات الستة المستخدمة.

البادئات		التسلسل النكليوتيدي	درجة الالتحام
ISSR7	W814	CTC TCT CTC TCT CTC TTG	**44-46**
ISSR16	830	TGT GTG TGT GTG TGT GG	**45**
ISSR17	811	GAG AGA GAG AGA GAG AC	**44**
ISSR18	812	GAG AGA GAG AGA GAG AA	**49**
ISSR19	8564	CAC CAC CAC CAC CAC CAC CAC C	**47-48**
ISSR20	16	CGT CAC ACA CAC ACA CAC	**49**

وأجري تفاعل البلمرة المتسلسل Polymerase Chain Reaction (PCR) وفقاً لـ (Williams *et al*., 1990) مع بعض التعديلات. وكان حجم التفاعل النهائي 25 µl باستخدام Master mix من شركة Kappa الحاوي على (, Taq polymerase MgCl2, dNTPs) ويبين الجدول (2) مكونات تفاعل PCR.

جدول (2)، مكونات تفاعل PCR.

مكونات PCR	الكميات والتراكيز
Master mix2X PCR	12.5 µl
DNA	2 µl
Primer	2 µl
H2O	8.5 µl

وقد تم هذا التفاعل في جهاز التدوير الحراري (Life Eco- Bioer) وفقاً للتالي:

الانفصال المبدئي: عند درجة حرارة 94º: لمدة 5 دقائق ليتم انفصال سلسلتي DNA.

40 دورة تتضمن كل منها المراحل التالية:

الانفصال: يتم عند حرارة 94º لمدة 30 ثانية.

الالتحام: حسب درجة حرارة الالتحام لكل بادئ من الجدول وذلك لمدة 30 ثانية.

الاستطالة: عند حرارة 72º لمدة دقيقة.

اكتمال التفاعل: عند درجة حرارة 72º مدة عشر دقائق.

ثم تم تحميل نواتج التفاعل على هلامة آغاروز بتركيز 1.5% واستخدام مؤشر من الحمض النووي Kpb DNA من شركة (FermentasGermany) وذلك لتحديد الحجم و الوزن الجزيئي للحزم الناتجة. وتم ترحيل النواتج بمرور حقل كهربائي قدره 100 فولت لفصل حزم الحمض النووي DNA الناتجة عن التضخيم. ثم تم تصوير الهلامة بجهاز تصوير هلامة الآغاروز (Cleaver Scientific- Clear view).

التحليل الإحصائي Statistical Analysis:

جُمعت النتائج في جداول اعتمادا على مقارنة وجود أو غياب قطع DNA بين الأصناف، حيث أعطي الرقم (1) عند وجود حزمة DNA والرقم (0) لعدم وجود الحزمة، وذلك باستخدام برنامج Totallab 1D، ثم تم حساب مصفوفة عدم التوافق الوراثي اعتماداً

مجلة العلوم الحديثة والتراثية ، 2021 ، 10 (1) : 1 – 9 .
Journal of Modern and Heritage Science
http://www.j-msh.com
Online ISSN: 2001-6611
Print ISSN: 2001-662X

على معامل Jaccard واستخدمت هذه المصفوفة لإجراء التحليل العنقودي بطريقة (UPGMA) Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averaging ورسمت شجرة القرابة الوراثية Dendrogram باستخدام برنامج Xlstat الإحصائي.

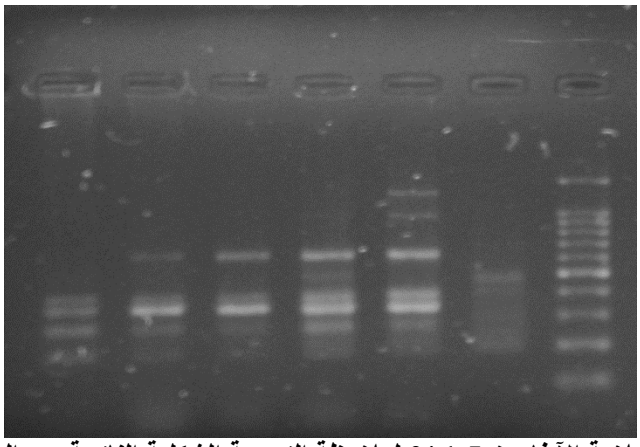
النتائج والمناقشة

قيس تركيز DNA ونقاوته باستخدام جهاز المطياف الضوئي، حيث تراوحت التراكيز بين (650 و1050) ميكروغرام/ ميكرولتر وطبقت عملية الرحلان الكهربائي على هلامه الآغاروز بتركيز0.8 % للتأكد من نوعية DNA ، وظهرت DNA على شكل حزم أو عصابات مضيئة ذات وزن جزيئي مرتفع وخالية من التقطعات والتكسر، ما يدل على أن DNA ذو نوعيةٍ جيدة.

التعددية الشكلية الناتجة عن تطبيق تقانة ISSR :

تم اعتماد البادئات الستة التي اعطت منتجات تضخيم في تفاعل البلمرة المتسلسل PCR. وقد أثبتت هذه البادئات فعاليتها في إعطاء تعددية شكلية بين الأصناف المدروسة، ونجم عن استعمال هذه البادئات ما مجموعه (48) حزمة، بمتوسط (8) حزم، وتراوح عدد الحزم الكلية لكل بادئ بين (6) حزم كأقل عدد مع البادئ (ISSR7) و(9) حزم كأعلى عدد مع البادئ (ISSR16, ISSR17, ISSR18) بمتوسط (8) حزم، كما هو مبين في الجدول (3)، وتتفق هذه النتائج مع ما توصل إليه (Pakseresht, *et al.*, 2013); (Aggarwal, *et al.*, 2015).

وقد بلغ عدد الحزم المتعددة شكلياً (46) حزمة بمتوسط (7.66) حزمة، وتراوح عدد الحزم المتباينة شكلياً لكل بادئ بين (6) حزم كأقل عدد مع البادئ (ISSR7) و (9) حزم كأعلى عدد مع البادئين (ISSR16, ISSR17)، ويبين الشكل (1) صورة هلامة الآغاروز 1.5% لملاحظة التعددية الشكلية الناتجة عن البادئة (ISSR17). وقد بلغت النسبة المئوية للتعددية الشكلية (96.28%) وكانت الأقل مع البادئة (ISSR17) بمقدار (77.7%)، أما باقي البادئات فقد أعطت نسبة مئوية للتعددية الشكلية بلغت (100%)، وحُسب معامل التعددية الشكلية PIC لكل بادئ على حده، وهو يُعد معيار يدل على الإمكانية والمقدرة الخاصة لتسلسل الموقع المدروس باستخدام البادئ الخاص به في تمييز التباينات الوراثية واظهارها بين الأصناف المختلفة، وتراوحت قيم معامل التعددية الشكلية PIC بين (0.247) كأقل قيمة مع البادئ (ISSR16) و (0.419) كأعلى قيمة مع البادئ (ISSR20) بمتوسط عام بلغ (0.299)، ما يُشير إلى قدرة البادئات المستخدمة على التمييز بين الأصناف المدروسة، جدول (3)، وتتفق هذه النتائج مع ما توصل إليه(Amirmoradi, *et al.*, 2013); (Choudhary, *et al.*, 2013);(Singh, *et al.*, 2014) .



شكل (1)، صورة هلامة الآغاروز 1.5% لملاحظة التعددية الشكلية الناتجة عن البادئة (ISSR17).

جدول(3)، البادئات المستخدمة، وعدد الحزم الكلية والمتباينة، والنسبة المئوية للتعددية الشكلية %، ومعامل التعددية الشكلية في الأصناف المدروسة.

البادئات	عدد الحزم الكلية	عدد الحزم المتباينة شكليا	النسبة المئوية للتعددية الشكلية	معامل التعددية الشكلية Pic
ISSR7	6	6	100	0.248
ISSR16	9	9	100	0.247
ISSR17	9	7	77.7	0.248
ISSR18	9	9	100	0.306
ISSR19	8	8	100	0.324
ISSR20	7	7	100	0.419

مجلة العلوم الحديثة والتراثية ، 2021 ، 10 (1) : 1 – 9 .
Journal of Modern and Heritage Science
http://www.j-msh.com
Online ISSN: 2001-6611
Print ISSN: 2001-662X

المجموع	48	46	-	-
المتوسط	8	7.66	%96.28	0.299

ويلاحظ من الجدول (4) أن معظم البادئات المدروسة امتلكت القدرة على التمييز بين الأصناف المدروسة بوجود وغياب الحزم الفريدة، حيث أن البادئة (ISSR20) لم تعطِ أية حزمة فريدة، في حين أعطى البادئ (ISSR16) أكبر عدد من الحزم الفريدة (5 حزم)، بينما أعطت البادئة (ISSR19) أقل عدد من الحزم الفريدة (حزمة واحدة فقط).

جدول (4)، عدد الحزم الفريدة مع البادئات المدروسة.

البادئات	عدد الحزم الفريدة
ISSR7	3
ISSR16	5
ISSR17	3
ISSR18	3
ISSR19	1
ISSR20	0

يتبين من الجدول (5) وجود 20 حزمة فريدة (واسمة) لأصناف الحمص المدروسة منها 15 حزمة (موجودة) و 5 حزم (غائبة) وميزت هذه الحزم الفريدة بعض الأصناف المدروسة حيث امتلك الصنفان (Filip03-18, Filip67-95) أكبر عدد من الحزم الفريدة بمقدار 6 حزم فريدة، في حين كان أقل عدد من الحزم الفريدة لدى الأصناف (G11-08) بمقدار 3 حزم وهذا يدل على التنوع الوراثي بين الأصناف المدروسة، والذي استطاعت البادئات المدروسة الكشف عنه.

جدول (5)، عدد الحزم الفريدة الموجبة والسالبة للأصناف المدروسة.

الصنف	عدد الحزم الموجبة	عدد الحزم السالبة	مجموع الحزم الفريدة
غاب3	0	2	2
غاب4	0	0	0
غاب5	0	2	2
Filip03-118	6	0	6
Filip 67-95	6	0	6
G11-08	3	1	4
المجموع	15	5	20

بينت النتائج قدرة تقنية ISSR على تمييز معظم الأصناف المدروسة بحزمة وحيدة من DNA وجدت في صنف معين وغابت في الأصناف الأخرى، مما يمكن من معرفة هذا الصنف قبل قدوم موسم الإنتاج، وبالتالي يمكن الاستفادة منها في علميات التصنيف النباتي والتحسين الوراثي لأصناف الحمص المدروسة، وبشكل داعم للدراسات الحقلية، مما يشير إلى الدور الكبير الذي تؤديه المؤشرات الجزيئية في تربية النبات وتحديد الطرز والأصناف المختلفة.

تحديد درجة القرابة الوراثية بين الطرز المدروسة:

يفيد تحديد درجة القرابة الوراثية ضمن الأنواع في برامج تربية النبات، لتأمين قاعدة وراثية كبيرة، للاستفادة منها في برامج التهجين. تمت دراسة العلاقة الوراثية بين الأصناف الوراثية المدروسة بتطبيق مصفوفة النسب المئوية لعدم التوافق (PDV) Percent Disagreement Values حسب (Nei, 1987)، حيث أن ارتفاع قيم هذه المصفوفة يدل على وجود اختلاف وراثي وبازديادها يزداد التباين الوراثي بين الصنفين المدروسين ويتم إنشاء هذه المصفوفة وفقاً لعدد وحدات التضاعف المشتركة. نلاحظ من خلال الجدول (6) أن أقل قيمة لمصفوفة النسب المئوية لعدم التوافق PDV هي (0.3778) بين الصنفين (Filip 67-95, Filip03-118) وأنهما على درجة عالية من القرابة الوراثية، يليهما الصنفان (غاب3، غاب4) بمقدار(0.4118) والصنفان (غاب4، Filip03-118) بمقدار(0.5405) والصنفان (غاب4، غاب5) بمقدار(0.550) بينما كانت أعلى قيمة لها (0.7692) بين الصنفين (غاب3، G11-08) مما يدل على وجود تباين وراثي كبير بينها.

مجلة العلوم الحديثة والتراثية ، 2021 ، 10 (1) : 1 – 9 .
Journal of Modern and Heritage Science
http://www.j-msh.com
Online ISSN: 2001-6611
Print ISSN: 2001-662X

جدول(6)، مصفوفة النسب المئوية لعدم التوافق(PDV) بين أصناف الحمص المدروسة والناتجة عن تطبيق تقنية ISSR.

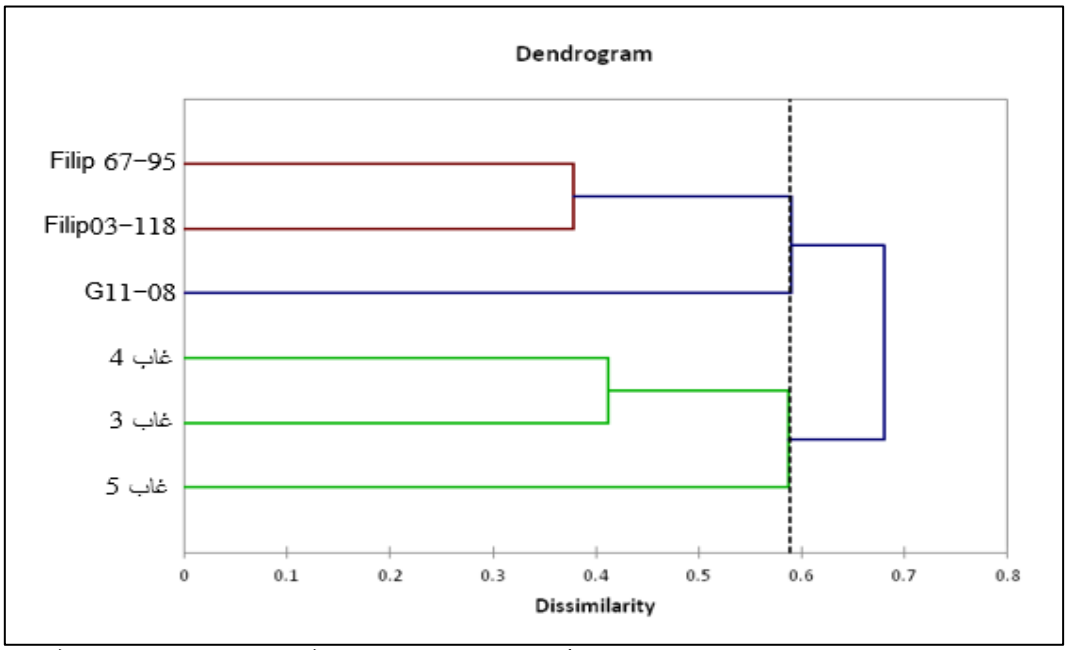
	غاب3	غاب4	غاب5	Filip03-118	Filip 67-95	G11-08
غاب3	0					
غاب4	0.4118	0				
غاب5	0.6250	0.5500	0			
Filip03-118	0.7297	0.5405	0.6757	0		
Filip 67-95	0.7568	0.5676	0.7027	0.3778	0	
G11-08	0.7692	0.7419	0.6400	0.5952	0.5854	0

التحليل العنقودي (Cluster analysis) وشجرة القرابة:

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

أجري التحليل العنقودي للنتائج التي تم الحصول عليها وذلك لإنشاء شجرة القرابة الوراثية لتحديد ورسم شجرة القرابة الوراثية Dendrogram بين الأصناف المدروسة.

ويلاحظ من الشكل (2) أن شجرة القرابة الوراثية انفصلت إلى عنقودين رئيسيين، وانفصل العنقود الأول إلى تحت عنقودين، ضم تحت العنقود الأول الصنفين (Filip03-118, Filip67-95) بمسافة وراثية قدرها 0.3778 وضم تحت العنقود الثاني الصنف (G11-08) لوحده، بينما انفصل العنقود الثاني إلى تحت عنقودين، ضم تحت العنقود الأول كل من غاب3، غاب4 وكانا الأقرب وراثياً إلى بعضهما البعض وبمسافة وراثية قدرها 0.4118 بينما ضم تحت العنقود الثاني الصنف غاب 5 لوحده، وكان الصنفان (غاب3، G11-08) الأبعد وراثياً بمسافة وراثية قدرها 0.7692 ويفيد ذلك في اختيار الآباء المتباعدة وراثياً لإدخالها في برامج التربية والتحسين الوراثي.



شكل (2)، التحليل العنقودي Cluster analysis لأصناف الحمص المدروسة الناتج عن استخدام تقنية ISSR

الاستنتاجات

- تم التوصيف جزيئياً بتقنية ISSR واستخدام لذلك سبعة بادئات أعطت ستة بادئات منها فقط منتجات تضخيم في تفاعل البلمرة المتسلسل وبلغت النسبة المئوية للتعددية الشكلية (96.28%).
- أثبتت تقنية ISSR فعالية كبيرة في تقييم التنوع الوراثي لأصناف الحمص المدروسة، واستُخدم لذلك 6 بادئات أعطت ما مجموعه 48 حزمة، منها 46 حزمة ذات تعددية شكلية وتراوحت قيم معامل التعددية الشكلية PIC بين (0.247 - 0.419) بمتوسط عام بلغ (0.299)، ما يُشير إلى قدرة البادئات المستخدمة على التمييز بين الأصناف المدروسة.

- بينت نتائج الدراسة الجزيئية أن هناك تنوعاً وراثياً كبيراً بين الأصناف المدروسة، حيث انفصلت شجرة القرابة الوراثية بين الأصناف المدروسة حسب تقنية ISSR إلى عنقودين رئيسيين، وذلك تبعاً لدرجة القرابة الوراثية بينها، وكانت أعلى درجة قرابة وراثية بين الصنفين (Filip03-118, Filip67-95) وكانت أعلى درجة تباعد وراثي بين الصنفين (غاب3، G11-08).

التوصيات

- نوصي بتطبيق تقنية ISSR في الدراسات الوراثية المتعلقة بمحصول الحمص كونها أثبتت فعالية، جيدة في تقييم التنوع الوراثي للحمص.
- إدخال الأصناف الوراثية الأبعد وراثياً (غاب3، G11-08) في برامج التربية والتحسين الوراثي لتأمين قاعدة وراثية كبيرة، للاستفادة منها في برامج التهجين.

المصادر

أحمد عبد المنعم حسن. (2012). أساسيات إنتاج الخضر وتكنولوجيا الزراعات المكشوفة المحمية (الصوبات)، كلية الزراعة، جامعة لقاهرة.

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

Abbo, S.; Molina, C.; Jungmann, R.; Grusak, M.A.; Berkovitch, Z.; Reifen, R.; Kahl,G.; Wiater, P. And Reifen, R. (2005). QTL govering caro tenoid concentration and weight in seeds of Chickpea (Cicer arietinum L). theor. Appl. Genet. 111: 185-195.

Abbo, S and Kumar, J,.(2001). Genetics of flowering time in chickpea and its bearing on productivity in semiarid environments. Adv. Agron. 72:107–138.

Aggarwal, H., Rao, A., Kumar, A., Singh, J ., Rana, J.S., Naik, P.K and Chhokar, V. 2015. Assessment of genetic diversity among 125 cultivars of chickpea (Cicer arietinum L.) of Indian origin using ISSR markers. Turk .J. Bot (2015) 39: 218-226

Amirmoradi, B., Talebi, R., Karami, E and Shirvani, H. 2013. Evaluation of Genetic Diversity Within and Between Cicer Species Using ISSR Molecular Markers. International Journal of Agriculture and Crop Sciences. (2013)5-22: 2683-2688.

Bhattarai, T and Fettig, S.(2005). Characterization of a Dehydrin Gene from Cicer pinnatifidum, a drought-resistant wild relative of chickpea. Physiologia Plantarum Vol (123), Issue 4, pages: 452–458.

Branchard, M Bornet, B. and.(2001). Non-anchored inter-simple sequence repeat (ISSR) markers: reproducible and specific tools for genome fingerprinting. Plant Molecular Biology Reporter 22:427–432.

Brandeland, M.(2007). Gene flow, Publication about Agricultural Biodiversity, Bioversity International, p:49.

Choudhary, P., Khanna, S.M., Jain, P.K., Bharadwaj, C., Kumar, J., Lakhera, P.C and Srinivasan, R. 2013. Molecular Characterization of Primary Gene Pool of Chickpea Based on ISSR Markers. Biochem Genet. DOI 10.1007/s10528-012-9564-7.

Eleuch, L.; Jalil, A.; Grando, S.; Ceccarelli, S.; Schmising, M.K.; Tsujimoto, H.; Hajer, A.; Daaloul, A and Baum, M.(2008). Genetic Diversity and association analysis for salinity tolerance, heading date and plant height of barley germoplasm using simple sequence repeat markers. J. Integr. Plant Biolo. 50(8):1005-1015.

Frison, A. E. ; Mitteau, M and Sharrock, S.(2002).Sharing responsibilities for ex situ germplasm management. Plant Genetic Resources Newsletter, 2002, No.131:7-15.

Lane, A.(2007). An introduction to crop wild relatives, Geneflow, Publication about Agricultural Biodiversity, Bioversity International, p:19.

Maniatis, T., Fritsch, E.F and Sambrook, J.(1982). Molecular cloning:Laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, ColdSpringHarbor/ NY.

Murray, H.G. and Thompson, W.F. (1980) Rapid Isolation of High Molecular Weight DNA. Nucleic Acids Research, 8, 4321-4325.

Online ISSN: 2001-6611
Print ISSN: 2001-662X

Nei, M.(1987). Molecular Evolutionary Genetics. Columbia University Press, New York, NY.

Pakseresht, F., Talebi, R and Karami E. 2013. Comparative assessment of ISSR, DAMD and SCoT markers for evaluation of genetic diversity and conservation of landrace chickpea (Cicer arietinum L.) genotypes collected from north-west of Iran. (2013), 19(4): 563-574.

Powell W.; Morgante, M.; Doyle, J.J.; Mcnical, J.; Tingey, S.V and Rafalski, A.J.(1996). Gene pool Variation in Genus Glycine Subgenus Soja Revealed by polymorphic Nuclear and chloroplast microsatellites, Genetics 144:793-803.

Ramsay, L.; Macaulay, M.; Degli Ivanissevich, S.; Maclean, K.; Carsle, L.; Fuller, J.; Edwards, K.J.; Tuvesson, S.; Morgante, M.; Massari, A.; Maestri, E.; Marmiroli, N.; Sjakste, T.; Ganal, M.; Powell, W and Waugh, R.(2000). A simple sequence repeat-based linkage map of barley. Genetics, 156:1997-2005.

Reddy A. R., Chaitanya K. L., Vivekanandan, M.(2004). Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. J. Plant Physiol., 161: 1189–1202.

Ricciardi, L.; V.Giorgio.; C. De Giovanni.; C. Lotti.; A. Gallotta. and G. Fanizza,. (2002). The genetic of apulian apricot genotypes (Prunus armeniaca L.) assessed using AFLP markers. Cellular and Molecular Biology Letters.(7):431-436.

Singh, P.K., Sharma, H., Srivastava, N and Bhagyawant S.S. 2014. Analysis of Genetic Diversity among Wild and Cultivated Chickpea Genotypes Employing ISSR and RAPD Markers. American Journal of Plant Sciences, (2014) 5: 676-682.

Taubert, P. H. W.(2008). Global Strategy for the Ex Situ Conservation of Chickpea (Cicer L). Leguminosae. In Engelmann (ed): Naturliche Pflanzenfamilien. Vol. 3.

Upadhyaya, H. D and Laxmipathi, C. L. G.(2009). Managing and Enhancing the Use of Germplasm- Strategies and Methodologies. Technical Manual, N. 10. Patancheru 502 324, Andhra Pradesh, India: International Crops Research Institute for the semi-Arid Tropic. Pp. 236.

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.

Wjhani, Y. (2004). Genetic studies on the biodiversity of local and wild Syrian wheat using modern biotechnological techniques. Thesis submitted in partial fulfillment for the requirements of the degree of doctor of philosophy in agriculture science (genetics), Department of genetics, Cairo university, Faculty of agriculture, 119 p.