

التوصيف الجزيئي لطفرات من الحمص المعزولة من المعاملة بالمطفرين أشعة غاما وEMS

عبير جبيلي⁽¹⁾ و فهد البيسكي⁽²⁾

(1). مركز بحوث اللاذقية، الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية، اللاذقية، سورية.

(2). الهيئة العامة للتقانة الحيوية، دمشق، سورية.

(*) للمراسلة: د.عبير جبيلي، البريد الإلكتروني: abeerjubily.e@gmail.com.

تاريخ القبول: 2024/11/25

تاريخ الاستلام: 2024/09/2

الملخص

أجريت هذه التجربة في مركز البحوث العلمية الزراعية في اللاذقية- الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية، سورية خلال المواسم 2017-2022. استُخدم كل من المطفرين أشعة غاما وإيثيل ميتيل السلفونات EMS لإحداث التباين الوراثي في الحمص الصنف Gab.5. إذ تم تضخيم الـ DNA باستخدام عشرة بادئات (RAPD) 171 عائلة طافرة مباشرة من الصنف غاب (5) مُنتخبة بناءً على المواصفات الشكلية والإنتاجية مقارنةً مع الشاهد. أشارت هذه التقنية إلى وجود اختلاف وراثي لدى 7 عائلات من الصنف غاب (5) مقارنةً مع الشاهد. نتج عن استخدام البادئات 81 حزمة، بتعددية شكلية بلغ متوسط نسبتها % 22.82. كما أدى التحليل العنقودي اعتماداً على نتائج الـ RAPD إلى تقسيم الصنف Gab.5 والعائلات المنتخبة إلى سبع مجموعات مختلفة. إنَّ توفر الطفرات المرغوبة الناتجة يعطي فرصة جيدة لتطوير أصناف محسنة من الحمص إلى جانب توليد التباين الوراثي مما يُثري المصادر الوراثية للحمص.

الكلمات المفتاحية: *Cicer arietinum* L.، التباين الوراثي، تقنية RAPD، شجرة القرابة الوراثية.

المقدمة:

يُعد الحمص (*Cicer arietinum* L.) من البقوليات الهامة ذاتية التلقيح، ويزرع الحمص في أكثر من 40 بلداً في العالم (Upadhyaya et al., 2006)، ويحتل المرتبة الثانية من حيث المساحة المزروعة في سورية (55159 هكتار) بين المحاصيل البقولية بعد العدس (المجموعة الإحصائية السنوية الزراعية، 2022) ويُعد مصدراً هاماً للبروتين والألياف والفيتامينات. يعتمد نجاح أي برنامج تربية على توافر التباين الوراثي الملائم، وبالتالي يجب أن يعتمد أي برنامج تربية على قاعدة وراثية عريضة ليكون قادراً على النجاح في الاستجابة للتغيرات البيئية والأمراض (Simmonds, 1962). لقد أشار العديد من الباحثين إلى أن العامل الرئيسي المسؤول عن النجاح المحدود في زيادة الغلة البذرية في الحمص يعود إلى القاعدة الوراثية الضيقة للمادة المتاحة (Haq, 1994; Wani and Anis, 2001) إن التباين الطبيعي هو نتاج تطفير تلقائي في الحقل عن طريق إعادة التركيب والانتخاب الطبيعي، ويمكن لأي طفرة حدثت بشكل طبيعي أن تُستحدث، وربما الكثير منها لم تحدث من تلقاء نفسها أو حدثت وفُقدت من العشائر أو التجمعات الطبيعية، لكن معدل الطفرات التلقائية منخفض جداً 10^{-6} أو واحد بالمليون للمورث الفردي، ومعظمها غير مفيد اقتصادياً لذلك لا بد من استحداثها

صناعياً. تُعرف الطفرات بأنها تبدلات مفاجئة تطرأ على المادة الوراثية، فتغير من خصائصها وخصائص الكائن الحي، وهي قابلة للتوريث إلى النسل الناتج (العودة وآخرون، 2004).

أشار العديد من الباحثين إلى أن استخدام أشعة غاما والمطفرات الكيميائية يُعد من الطرائق الهامة في إحداث التغيرات الوراثية في النباتات، فقد تناولت أبحاثهم التأثيرات الإيجابية التي تحدثها هذه المطفرات في النمو الخضري والمؤشرات الإنتاجية، إضافة إلى الشذوذ في النمو (تقزم النباتات، نقص الكلوروفيل، موت النباتات) والذي يظهر نتيجة لاستخدام بعض الجرعات أو التراكيز غير الملائمة (Mahla et al., 1990; Khan and Goyal, 2009; Majeed et al., 2010).

هناك عدة معايير يمكن من خلالها تقويم التنوع الوراثي أكثرها قدماً المعايير الشكلية ومن ثم الوراثية سواء عن طريق تحليل البروتينات أو الأحماض النووية منقوصة الأوكسجين، وتعرف الأخيرة بالمؤشرات الجزيئية التي هي جزء من علوم التقانات الحيوية Biotechnology.

تتميز المؤشرات الجزيئية بقدرتها وكفاءتها في كشف نسبة عالية من التباينات الوراثية لكونها تعتمد على دراسة جزيئية الـ DNA مباشرة وتغطي كامل مجين الفرد، كما تتصف بعدم تأثرها بالظروف المحيطة بها (Stuber et al., 1982; Hoey et al., 1996). تختلف التقانات المعتمدة على دراسة DNA (المؤشرات الجزيئية) عن بعضها البعض بنوع التباينات الوراثية التي تكشفها، ومن بينها تقانة التضاعف العشوائي المتعدد الأشكال لسلسلة DNA (Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD التي تعتمد على التفاعل التسلسلي للبوليميريز (polymerase Chain Reaction (PCR المكتشف من قبل Mullis في عام 1983، ويقوم هذا التفاعل بمضاعفة قطع محددة من الـ DNA باستخدام بادئات عشوائية أو متخصصة مصممة لهذا الهدف مما يسمح بالحصول على ملايين النسخ المضاعفة من قطعة واحدة من الـ DNA التي تتضاعف أسياً باستخدام دورات حرارية متعددة (Mullis et al., 1986)، يتمتع تحليل RAPD بمزايا كبيرة أهمها بأنه سريع، وأقل كلفة وقابل للتطبيق على أي نبات بدون معلومات مسبقة عن تسلسل النكليوتيدات، وفي الكشف المحتمل عن ضرر DNA من خلال التطهير (Ahloowalia and Maluszynski, 2001).

يتم استخدام وجود أو غياب الحزم في تقنية RAPD لتقدير التنوع الوراثي وقياس التشابه، حيث أظهر تحليل التباين الوراثي باستخدام تقنية RAPD لـ 12 صنفاً من الحمص باستخدام 41 بادئاً 22 منها لم تعطِ نتائجاً مرضية، أعطت هذه البادئات 73 حزمة تراوح طول الحزمة بين 100-3000 Pb، تراوح عدد الحزم المنتجة للبادئ الواحد من 3-9 وبمتوسط قدره 3.84 حزمة للطراز الوراثي، بلغ عدد الحزم الكلية ذات التعددية الشكلية في 19 بادئ التي تم اختيارها للبصمة الوراثية 57، وبالتالي فإن الحزم متعددة الشكل الناتجة هي 3 بالمتوسط للبادئ وبلغ متوسط التعددية الشكلية 71% (Singh et al., 2014)، كما وجد Rawashdeh (2006) and Haddad في الأردن أن تقنية RAPD كانت قادرة على اكتشاف وتأكيد التباين الوراثي الموجود بين طفرات الحمص وآبائها والناجم عن أشعة غاما (40KR) وذلك باستعمال ثلاث بادئات هي: OPA07، OPA20، OPZ20 بإظهارها حزم فريدة بإجمالي 6 حزم، 13 حزمة، 17 حزمة، على التوالي، كذلك لاحظ Hegazi and Hamideldin (2010) تغيرات في حزم DNA، تم توصيف التغيرات في وجود أو اختفاء حزم مختلفة مع التباين في شدتها. كانت هذه التأثيرات ناتجة عن إعادة التركيب الهيكلي في الحمض النووي (DNA) الناجم عن تضرر الحمض النووي من خلال المعاملة الطفرية. هذا وتُعتبر تقنية RAPD مؤشراً ممتازاً لتمييز الطفرات عن آباءها لتقييم تباينها الوراثي، حيث يبين نتائج RAPD باستخدام عشر بادئات لطفرات الحمص المعزولة من تطهير الصنف CO-4 بأشعة غاما (KR 60-20) و EMS (10-50 mM) عن إجمالي 129 حزمة، اتصفت 92 منها بتعددية

شكلية بمتوسط 70.99 %، أظهرت أربع بادئات (OPA-04، OPA-06، OPA-07 و OPA-09) أعلى تعددية شكلية بلغت 88.89، 77.78، 75.00 % على الترتيب (Umavathi and Mullainathan, 2019)، وفي تقييم التباين الوراثي بين 94 سلالة طافرة من الحمص (صنف Bivaniz) المُنتجة بالمطر الكيمائي EMS أنتجت 8 بادئات RAPD من أصل 12 بادئة مستخدمة 57 حزمة، وُجد أن 24 منها متعددة الأشكال بنسبة تعددية شكلية 42.25 % (Rostami-Ahmadvandi et al., 2016).

تهدف الدراسة الحالية إلى عزل الطفرات المرغوبة من الصنف الشتوي غاب(5) الناتجة عن التطهير الفيزيائي والكيميائي والتوصيف الجزيئي لها باستخدام مؤشرات تقنية RAPD، كذلك تحديد درجة القرابة الوراثية بتطبيق مصفوفة النسب المئوية للتوافق (PDV Percent Disagreement Values) اعتماداً على معامل Jaccard لتحديد درجة التباين الوراثي فيما بينها، والذي يفيد في تأمين قاعدة وراثية كبيرة للاستفادة منها في برامج التحسين الوراثي.

مواد البحث وطرقه:

المادة النباتية: أُجريت الدراسة على 17 عائلة طافرة مباشرة من الصنف غاب(5) مُنتجة بناءً على الموصفات الشكلية والإنتاجية مقارنةً مع الشاهد من ثلاثة أجيال طافرة متتالية كما يأتي:

تم اختيار صنف الحمص الشتوي غاب(5) من قسم البقوليات - إدارة المحاصيل في الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية، متوسط وزن 100 بذرة (31 غ)، متوسط نسبة البروتين (19.6 %) وإنتاجية (2150 كغ.هـ⁻¹).

معاملات التطهير: عُمِلت البذور بأشعة غاما وإيثيلين ميثيل سلفات EMS. تضمنت كل معاملة تطهير 300 بذرة، بالجرعات المختارة (15-20-25) كيلو راد (KR) من أشعة غاما والتراكيز (0.1-0.2-0.4 %) من المطفر الكيمائي EMS إضافة إلى الشاهد دون معاملة.

الأجيال الطافرة: زُرعت البذور المعاملة في الحقل على سطور في الموسم 2017-2018، وتم حساب معدل الانبات ونسبة الحياة، وتم حصاد الجيل الأول M1، وفي الموسم 2018-2019 زرع الجيل الثاني M2 بطريقة السطور، وتمت مراقبة التغيرات المورفولوجية، وتعليم النباتات ذات الغلة العالية والصفات الاقتصادية الأخرى، وحصدت بشكل فردي منفصل، وفي نهاية هذا الموسم تم انتخاب 17 سلالة من أنسال الصنف غاب(5) الطافرة بناءً على الموصفات الشكلية والغلة البذرية ومكونات الغلة، وهي: 6 طفرات ناتجة عن المعاملة 15KR تحمل الأرقام: 2-4، 2-6، 2-10، 8-18، 5-45، 4-48، و 6 طفرات ناتجة عن المعاملة 20KR ذات الأرقام: 1-9، 7-10، 2-11، 9-16، 1-19، و طفرتين ناتجتين عن المعاملة 25KR هي: 2-21 و 3-1، و 3 طفرات ناتجة عن المعاملة EMS 0.1 % هي: 5-10، 8-13، 8-16 الجدول (1).

الجدول (1): العائلات المباشرة المنتجة من أنسال الصنف غاب(5) في الجيل الطافر الثاني.

اسم السلالة الطافرة	الجرعة / التركيز	اسم السلالة الطافرة	الجرعة / التركيز
2-4	15 KR	9-1	20 KR
2-6		9-10	
2-10		10-7	
18-8		11-2	
45-5		16-9	
48-4		19-1	
2-21	25 KR	10-5	0.1% EMS
3-1		13-8	
		16-8	

زُرعت بذور هذه الطفرات المنتخبة كعائلات في الجيل الثالث M3 بتصميم القطاعات العشوائية الكاملة وبثلاثة مكررات في موسم 2019-2020 وتم تقييم طفرات الجيل M3 مقارنة مع الشاهد غير المعامل باستخدام العديد من المؤشرات الإنتاجية والنوعية.

التوصيف الجزيئي باستخدام تقنية RAPD: نفذ التوصيف الجزيئي لـ 17 سلالة طافرة منتخبة من الجيل الطافر الثالث في العام 2021-2022، باستخدام تقنية RAPD في مخابر شعبة التقانات الحيوية في مركز البحوث العلمية الزراعية باللاذقية.

تم استخلاص الحمض النووي الريبي منقوص الأوكسجين بطريقة CTAB (Cety Trimethyl Ammonium Bromide) حسب Doyle and Doyel (1990) والمعدلة من قبل Kahl (2001). تم التقدير النوعي للحمض النووي DNA بواسطة الرحلان الكهربائي الأفقي، وتم ترحيل العينات لمدة ساعتين على شدة تيار 90 فولت، وتمت مراقبة العينات باستخدام جهاز الأشعة فوق البنفسجية، حيث ظهرت حزم الحمض النووي DNA نتيجة اتحاد بروم الإيثيديوم مع DNA وتشكيله معقداً يتوهج عند تعريضه للأشعة فوق البنفسجية، وتم انتقاء العينات الأفضل ذات النوعية الجيدة التي ظهرت على شكل حزم واضحة Bands متوهجة قريبة من جيوب التحميل، مُدّت عينات DNA بعدها بالماء المقطر المعقم للوصول إلى التركيز 100 ng/μl.

استُخدمت تقنية التضخيم العشوائي متعدد الأشكال (RAPD)، حيث تم تضخيم DNA باستخدام 10 بادئات عشوائية، الجدول (2). أُجريت مكاثرة الـ DNA ضمن جهاز التدوير الحراري PCR (Polymerase Chain Reaction) من شركة Filexigene بحجم تفاعل كلي مناسب 25 μl الحاوي على المكونات التالية: 2.5 μl محلول منظم بقوة 10×، 0.75mM (50mM) كلوريد المغنيزيوم (MgCl2)، 0.5 μl (10mM) من القواعد الآزوتية (dNTPs)، 2.5 μl للبادئ (10pg/μl)، 0.2 وحدة من أنزيم بلمرة DNA (Taq- Polymerase) بالتركيز (5U/μl)، 2.5 ميكرو لتر من الحمض النووي DNA القالب بالتركيز (10ng/ μl)، تم أكمل الحجم بالماء المقطر المعقم.

تم ترحيل نواتج تفاعل PCR في هلامة أجاروز بتركيز 1.5% في جهاز الرحلان الأفقي تحت جهد كهربائي 85 فولت لمدة ساعتين ونصف بوجود سائل الرحلان 1XTBE وتلوين الهلامة بمحلول بروم الإيثيديوم 0.5 μg/ml، ثم صُوّرت الحزم الظاهرة بوجود الأشعة فوق البنفسجية باستخدام جهاز Gel documentation وبوجود المؤشر الجزيئي بطول (3000 bp) لتظهير نواتج التفاعل، تم بعدها حساب عدد الحزم الناتجة مع أطوالها باستخدام كل بادئة.

الجدول (2): التسلسل النكليوتيدي لبادئات RAPD المستخدمة في تضخيم DNA أصناف وعائلات الحمص المدروسة ودرجة حرارة الالتحام لكل منها.

اسم البادئة	تسلسل القواعد النتروجينية '3-5'	درجة حرارة الالتحام (°C)
OPA- 19	CAA ACGTCG G	32
OPA- 20	GTT GCG ATC C	32
OPD- 19	CTG GGG ACT T	32
OPE- 09	CTT CAC CCG A	32
OPM-17	TCA- GTC- CGG G	34
OPP- 18	GGG AAG GAC A	32
OPV- 12	ACC CCC CAC T	34
OPX- 16	CTC TGT TCG G	32
OPAJ- 11	GAA CGC TGC C	34
OPAN- 09	GGGGGAGATG	34

التحليل الإحصائي:

تم تحديد حجم حزم الـ DNA الناتجة عن التضخيم ونُظمت الجداول لكل بادئة على حدى اعتماداً على غياب أو وجود حزم الحمض النووي الـ DNA في العينات المدروسة، وتم تحويل المعطيات إلى النظام الثنائي (1 للحزمة الموجودة و 0 للحزمة الغائبة). حُسبت مصفوفة عدم التوافق الوراثي اعتماداً على معامل Jaccard، ثم أستخدمت هذه المصفوفة لإجراء التحليل العنقودي بطريقة برنامج PopGene 1.31 الإحصائي. وحُسبت قيم محتوى التعددية الشكلية (PIC) Polymorphism Information Content باستخدام كل حزمة وفقاً لـ De Riek وآخرين (2001) حسب العلاقة التالية:

$$Pic = 1 - [f^2 + (1 - f)^2]$$

حيث f : تكرارية الحزم الموجودة و $(1 - f)$: تكرارية الحزم الغائبة، ثم حسب محتوى التعددية الشكلية لكل بادئة من البادئات المستخدمة على مستوى الموقع الواحد. ويمثل محتوى التعددية الشكلية (PIC) Polymorphism Information Content لموقع وراثي معين على المادة الوراثية Genome قدرة هذا الموقع على التمييز بين الطرز الوراثية؛ أي تُعبّر عن احتمال أن يكون للعينتين المسحوبتين عشوائياً أليلان مختلفان لذات الموقع الوراثي.

النتائج والمناقشة:

يفيد تحديد درجة القرابة الوراثية ضمن الأنواع في برامج تربية النبات في تأمين قاعدة وراثية كبيرة، للاستفادة منها في برامج التهجين، وتمت دراسة العلاقة الوراثية بين الأصناف المدروسة والعائلات المنتخبة بتطبيق مصفوفة النسب المئوية للتوافق (PDV) Percent Disagreement Values، إذ يتم إنشاء هذه المصفوفة وفقاً لعدد وحدات التضاعف المشتركة بينها. ويسمح التحليل العنقودي بتقسيم الأصناف والعائلات المنتخبة 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.

1- التوصيف الجزيئي للصنف غاب (5) والعائلات المنتخبة من الجيل الثالث M3:

تضمنت الدراسة اختبار الصنف المدروس غاب5 والعائلات المنتخبة من الجيل الثالث M3 حيث تم تضخيم DNA باستخدام عشر بادئات (RAPD)، أعطت جميع البادئات المستخدمة منتجات تضخيم في تفاعل البلمرة المتسلسل حيث أثبتت هذه البادئات فعاليتها في إعطاء تعددية شكلية بين الصنف المدروس والعائلات المنتخبة من الجيل الثالث M3 ونجم عن استخدام هذه البادئات ما مجموعه 81 حزمة، حيث أعطت هذه البادئات البادئات تعددية شكلية Polymorphism بلغ متوسط نسبتها 22.82%. كما تراوح عدد الحزم لكل بادئة بين 6 حزم كأقل عدد مع البادئات OPA-20، OPP-18، OPV-12، OPAN-09 و 14 حزمة كأعلى عدد مع البادئة OPE-09.

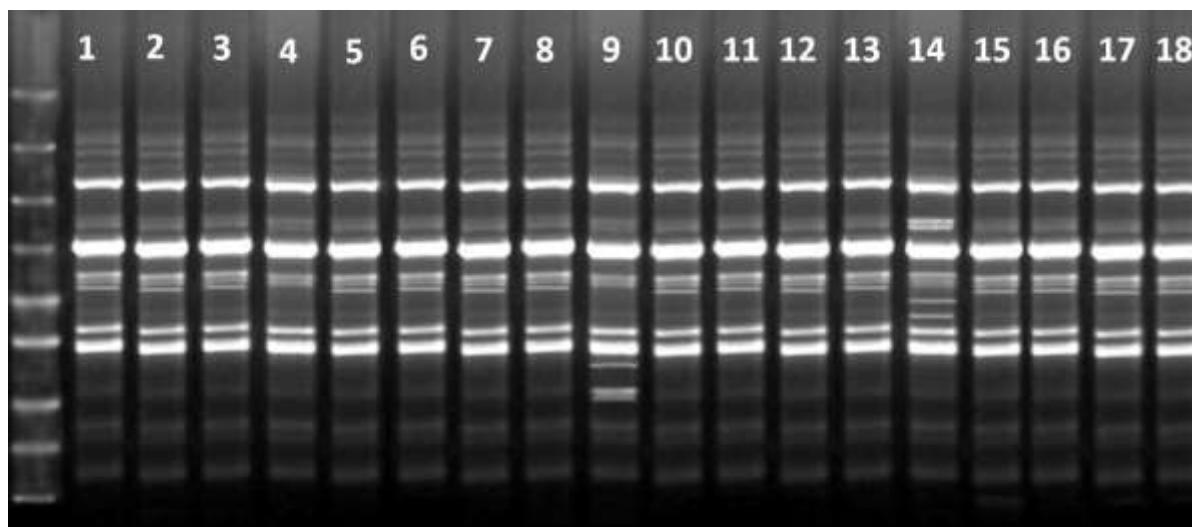
أعطى البادئ OPE-09 أعلى نسبة تعددية شكلية 64.29% مما يدل على إمكانية استعمال هذا البادئ بشكل فعال في الدراسة الجزيئية لأصناف الحمص المدروسة والعائلات المنتخبة من الجيل الثالث M3، بينما أعطى البادئ OPD-19 أقل تعددية شكلية 16.67% في حين أن البادئات OPM-17، OPA-20- OPP-18، OPV-12، OPAN-09 لم تعطي أي حزمة متباينة شكلية بين العينات المدروسة. (الجدول 3، والشكل 1).

يُمثل محتوى التعددية الشكلية (PIC) Polymorphism Information Content لموقع وراثي معين على المجين وبالتالي لواسم جزيئي معين قدرة هذا الواسم على التمييز بين الطرز الوراثية. وقد بلغ متوسط محتوى التعددية الشكلية للبادئات المستخدمة نحو 0.33، حققت البادئة OPX-16 أعلى قيمة لـ PIC (0.095)، وبالتالي كانت الأكثر قدرة على التمييز بين الطرز، بينما بلغت أقل قيمة لـ

PIC (0.035) في البادئة OPAJ-11 (الجدول 3). كما يتبين من الجدول (3) وجود 17 حزمة فريدة، وقد ميزت هذه الحزم بعض العائلات المنتخبة المدروسة، حيث امتلكت الطراز العائلة المنتخبة mfa.21-2 أكبر عدد من الحزم الفريدة بمعدل 7 حزم، وهذا يدل على التنوع الوراثي الكبير بين العائلات المنتخبة المدروسة الذي استطاعت البادئات الكشف عنه، فكلما ازداد عدد الحزم الفريدة دل ذلك على وجود تنوع وراثي كبير.

توافقت نتائجنا مع (Mullainathan *et al.*, 2014) الذين أكدوا بأن تحليل RAPD لنباتات الجيل الثالث M3 المعرضة للمعاملات الطفرية تنتج تباينات واضحة بين الطفرات والشاهد غير المعامل في طفرات الفليفلة *Capsicum annum*، ونتائج (Nilahayati *et al.*, 2022) حيث لاحظوا باستخدام تقنية RAPD وجود تباين وراثي بين الآباء و 4 سلالات طافرة مختبرة من فول الصويا. (الجدول 3): عدد الحزم (الكلية، المتباينة والمتشابهة والحزم الفريدة) ونسبة ومحتوى التعددية الشكلية (%) لدى الصنف غاب (5) وعائلاته المنتخبة.

البادئ	عدد الحزم الكلية	عدد العزيم المتباينة	عدد الحزم المتشابهة	نسبة التعددية الشكلية	عدد الحزم	الحزم الفريدة للعائلات المنتخبة					محتوى التعددية الشكلية (PIC)
						mfa. 3-1	mfa.2 1-2	mfa.1 9-1	mfa. 9-10	mfa.1 8-8	
OPA-19	12	7	5	58.33	7	1	2	-	3	1	0.061
OPA-20	6	0	6	0	0	-	-	-	-	-	0.00
OPD-19	6	1	5	16.67	0	-	-	-	-	-	0.058
OPE-09	14	9	5	64.29	6	-	3	-	3	-	0.080
OPM-17	7	0	7	0	0	-	-	-	-	-	0.00
OPP-18	6	0	6	0	0	-	-	-	-	-	0.00
OPV-12	6	0	6	0	0	-	-	-	-	-	0.00
OPX-16	9	5	4	55.56	2	-	1	1	-	-	0.095
OPA J-11	9	3	6	33.33	2	-	2	-	-	-	0.035
OPA N-09	6	0	6	0	0	-	-	-	-	-	0.00
المجموع	81	25	56	228.18	17	1	7	1	6	1	0.330
المتوسط	8.1	2.5	5.6	22.82	1.7	0.10	0.70	0.10	0.60	0.10	0.033



الشكل (1): نواتج تضخيم الـ DNA بتقنية PCR-RAPD على هلامية الأجاروز 1.5% للصنف Gab.5 والعائلات المنتخبة من الجيل الثالث M3 باستخدام البادئة OPE-09 بوجود المعلم الجزيئي M بطول (3000 pb).

2- تحديد درجة القرابة الوراثية بين الصنف غاب (5) والعائلات المنتخبة من الجيل الثالث M3:

تمت دراسة العلاقة الوراثية بين صنف الحمص Gab.5 والعائلات المنتخبة الجيل الثالث M3 بتطبيق مصفوفة النسب المئوية للتوافق Percent Disagreement Values (PDV) اعتماداً على معامل Jaccard لتحديد درجة التباين الوراثي فيما بينها، والذي يفيد في تأمين قاعدة وراثية كبيرة للاستفادة منها في برامج التحسين الوراثي. ويدل ارتفاع قيم هذه المصفوفة على وجود تباين وراثي، وبازديادها يزداد التباين الوراثي بينها. ويجري إنشاء هذه المصفوفة وفقاً لعدد وحدات التضاعف المشتركة. نلاحظ من الجدول رقم (4) وبمقارنة الصنف Gab.5 مع العائلات المنتخبة منه أن أعلى قيمة لمصفوفة النسب المئوية لعدم التوافق هي 0.240 بين العائلة المنتخبة fa.9-10 وبين العائلة المنتخبة fa.21-2، ما يدل على وجود تباين وراثي بينهما، في حين كانت أدنى قيمة لمصفوفة النسب المئوية لعدم التوافق هي (0.0317) بين الصنف Gab.5 والعائلة المنتخبة fa.13-8 و fa.18-8، وتدل هذه القيمة المنخفضة للتباين الوراثي بينهما على أنهما على درجة كبيرة من القرابة الوراثية.

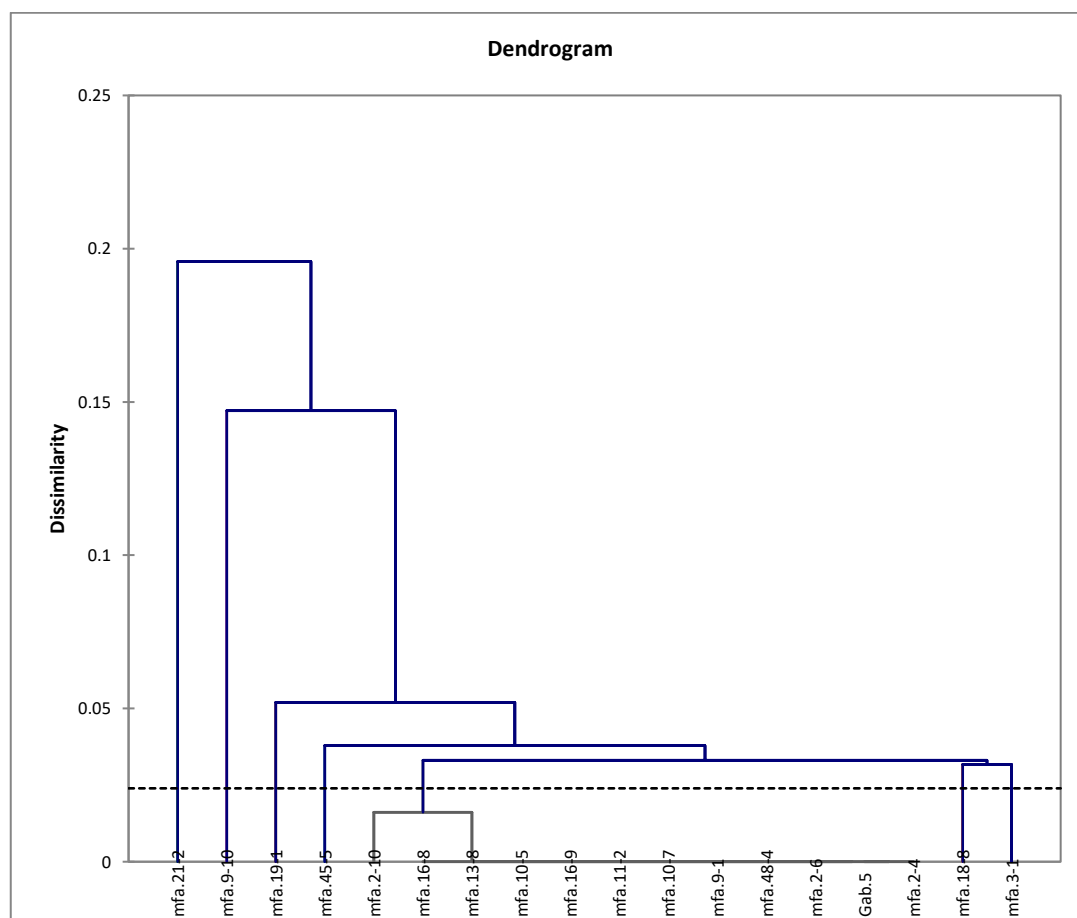
الجدول (4): مصفوفة عدم التوافق الوراثي (PDV) بين صنف الحمص Gab.5 والعائلات المنتخبة من الجيل الثالث M3 المدروسة استناداً إلى معامل Jaccard.

	Gab.5	fa.2-4	fa.2-6	fa.2-10	fa.18-8	fa.45-5	fa.48-4	fa.9-1	fa.9-10	fa.10-7	fa.11-2	fa.16-9	fa.19-1	fa.21-2	fa.3-1	fa.10-5	fa.13-8	fa.16-8
Gab.5	0																	
fa.2-4	0.0000	0																
fa.2-6	0.0000	0.0000	0															
fa.2-10	0.0161	0.0161	0.0161	0														
fa.18-8	0.0317	0.0317	0.0317	0.0476	0													
fa.45-5	0.0323	0.0323	0.0323	0.0484	0.0635	0												
fa.48-4	0.0000	0.0000	0.0000	0.0161	0.0317	0.0323	0											
fa.9-1	0.0000	0.0000	0.0000	0.0161	0.0317	0.0323	0.0000	0										
fa.9-10	0.1471	0.1471	0.1471	0.1343	0.1471	0.1489	0.1471	0.1471	0									
fa.10-7	0.0000	0.0000	0.0000	0.0161	0.0317	0.0323	0.0000	0.0000	0.1471	0								
fa.11-2	0.0000	0.0000	0.0000	0.0161	0.0317	0.0323	0.0000	0.0000	0.1471	0.0000	0							
fa.16-9	0.0000	0.0000	0.0000	0.0161	0.0317	0.0323	0.0000	0.0000	0.1471	0.0000	0.0000	0						
fa.19-1	0.0469	0.0469	0.0469	0.0625	0.0769	0.0476	0.0469	0.0469	0.1594	0.0469	0.0469	0.0469	0					
fa.21-2	0.1944	0.1944	0.1944	0.1831	0.1944	0.1972	0.1944	0.1944	0.2400	0.1944	0.1944	0.1944	0.1806	0				
fa.3-1	0.0317	0.0317	0.0317	0.0476	0.0317	0.0635	0.0317	0.0317	0.1471	0.0317	0.0317	0.0317	0.0769	0.1944	0			
fa.10-5	0.0000	0.0000	0.0000	0.0161	0.0317	0.0323	0.0000	0.0000	0.1471	0.0000	0.0000	0.0000	0.0469	0.1944	0.0317	0		
fa.13-8	0.0000	0.0000	0.0000	0.0161	0.0317	0.0323	0.0000	0.0000	0.1471	0.0000	0.0000	0.0000	0.0469	0.1944	0.0317	0.0000	0	
fa.16-8	0.0000	0.0000	0.0000	0.0161	0.0317	0.0323	0.0000	0.0000	0.1471	0.0000	0.0000	0.0000	0.0469	0.1944	0.0317	0.0000	0.0000	0

3- التحليل العنقودي Cluster analysis (شجرة القرابة الوراثية) للصنف Gab.5 والعائلات المنتخبة من الجيل الثالث M3:

يبحث التحليل العنقودي في تحديد المجاميع المتشابهة من الأصناف بصفات محددة بالاعتماد على تشابه استجابتها للظروف البيئية المحيطة وتصنيف التراكيب الوراثية حسب تقاربها أو تباعدها الوراثي (Stuckburger, 2011). ويُعد من الأدوات الجيدة لمربي النبات لتقييم التباين الوراثي وتحديد مواقع الصفات الكمية (QTL) والمحافظة على الأصول الوراثية (Yan and Ortiz, 1994).

أجري التحليل العنقودي لنتائج الصنف Gab.5 والعائلات المنتخبة المدروسة التي تم الحصول عليها وذلك لإنشاء شجرة القرابة الوراثية Dendrogram لتحديد درجة القرابة الوراثية اعتماداً على معطيات الـ RAPD، حيث يسمح التحليل العنقودي بتقسيم الصنف Gab.5 والعائلات المنتخبة إلى مجموعات تعكس درجة القرابة الوراثية فيما بينها، وأدى التحليل العنقودي اعتماداً على معطيات الـ RAPD إلى تقسيم الصنف Gab.5 والعائلات المنتخبة إلى سبع مجموعات مختلفة، الشكل رقم (2). ضمت المجموعة الأولى الصنف Gab.5 والعائلات المنتخبة mFa.2-4، mFa.2-6، mFa.2-10، mFa.48-4، mFa.9-1، mFa.10-7، mFa.11-، mFa.16-9، mFa.16-8، mFa.13-8، mFa.10-5، mFa.18-8، وضمت المجموعة الثانية العائلة المنتخبة mFa.18-8، وضمت المجموعة الثالثة العائلة mFa.45-5، وضمت المجموعة الرابعة العائلة mFa.9-10، وضمت المجموعة الخامسة العائلة mFa.19-1، وضمت المجموعة السادسة العائلة mFa.21-2، وضمت المجموعة السابعة العائلة mFa.3-1. وهذا ما يشير إلى إمكانية العائلات المنتخبة mFa.18-8، mFa.45-5، mFa.9-10، mFa.19-1، mFa.21-2، mFa.3-1 هي عائلات جديدة متباينة عن الصنف Gab.5.



الشكل رقم (2): مخطط شجرة القرابة الوراثية للصنف Gab.5 والعائلات المنتخبة من الجيل الثالث M3 اعتماداً على التحليل العنقودي لبيانات التباين الوراثي فيما بينها.

في الخلاصة، وجد من بين 17 عائلة طافرة مبشرة من الصنف غاب (5) نتجت 7 عائلات طافرة مختلفة وراثياً عن آبائها بناءً على استخدام تقنية الـ PCR RAPD (جميعها ناتجة عن المعاملة بأشعة غاما)، وقد أبدت جميع هذه العائلات السبعة باستثناء العائلة 21-2 وزن 100 بذرة أعلى من الشاهد تراوح من 32.23 (8-18) إلى 39.27 (1-3)، كما تميزت جميع هذه العائلات بمحتوى بروتيني أعلى من الشاهد باستثناء العائلتين 5-45 و 1-19، وتوقفت جميع العائلات على الشاهد في صفة الغلة البذرية على النبات بنسبة زيادة في الغلة البذرية تراوحت من 2% (2-21) إلى 52% (8-18) كما هو مبين في الجدول (5). وهذه النتائج تتماشى مع الحاجة إلى تقييم حتى الأجيال M6، M7 على الأقل لمراقبة ثباتية الطفرات لصفة الغلة البذرية والصفات المرتبطة بها.

الجدول (5): الهوية المظهرية و الإنتاجية للعائلات الطافرة من الصنف Gab.5 في الجيل الثالث M3

العائلات الطافرة	الصنف	الجرعة/التركيز المطفر	طبيعة النمو	وزن 100 بذرة (غ)	المحتوى البروتيني في البذور %	الغلة البذرية/النبات	نسبة الزيادة في الغلة البذرية مقارنة بالشاهد %	صفات البذور
الشاهد غاب 5		00 KR	قائم	30.94	22.44	28.78	-	طبيعية
2-10	غاب 5	15 KR	نصف قائم	33.77	23.91	43.08	50	طبيعية
18-8	غاب 5	15 KR	قائم	32.23	24.26	43.11	52	طبيعية
45-5	غاب 5	15 KR	نصف قائم	35.16	21.55	33.76	17	طبيعية
9-10	غاب 5	20 KR	قائم	34.20	22.94	31.39	9	طبيعية
19-1	غاب 5	20 KR	قائم	32.47	21.78	41.40	44	طبيعية
21-2	غاب 5	25 KR	نصف قائم	29.14	24.95	29.27	2	صغيرة
3-1	غاب 5	25 KR	نصف قائم	39.27	23.79	35.61	24	كبيرة

الاستنتاجات:

أثبتت النتائج أن تقنية الـ RAPD، وبشكل خاص البادئات المستخدمة في هذا البحث، أنها تقنية سريعة وفعالة في كشف التباينات الوراثية ما بين صنف الحمص Gab.5 والعائلات المنتخبة، كما تدل درجة التباين الوراثي ما بين الصنف المدروس والعائلات المنتخبة بضرورة إدخالها في برامج التحسين الوراثي للحمص.

المقترحات:

يُوصى باستخدام أشعة غاما كإحدى وسائل تربية الحمص المهمة في إحداث تباينات وراثية مما يؤدي إلى زيادة قاعدته الوراثية وتكوين بنية ملائمة لعملية الانتخاب، وخاصة الجرعتين 15 و 20 KR، وكذلك التركيز 0.1% من المطفر EMS لتحسين أغلب الصفات المرغوبة في الحمص.

المراجع:

العودة، أيمن؛ كيال، حامد؛ خيتي، مأمون. تأثير التحريض الإشعاعي في الصفات الشكلية ومكونات الغلة في صنفين (حوراني، شام3) من القمح القاسي (*Triticum durum* L.) (2004). مجلة جامعة دمشق للعلوم الزراعية. المجلد (20)، العدد (1)، الصفحات: 127-142.

المجموعة الإحصائية السنوية الزراعية. (2022). وزارة الزراعة والإصلاح الزراعي، دمشق، سورية.

- Ahloowalia, B.S. and M. Maluszynski. (2001). Induced mutation, a new paradigm in plant breeding. *Euphytica*, 118(2), 167-173.
- De Riek, J.; Calsyn, E.; Everaert, I.; Van, Bockstaele, E.; De Loose, M. AFLP. (2001). AFLP based alternatives for the assessment of distinctness, uniformity and stability of sugar beet varieties. *Theoretical and Applied Genetics*. 103: 1254-1265. doi: 10.1007/s001220100710.
- Doyle, J. J. and J. L. Doyle (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*. 12, 13-15.
- Erdem, G and S. Oldacay (2004). Employment of RAPD technique to assess the genetic stability of *helianthus annuus* treated with different mutagenic agents. *J. Appl. Sci.*, 4, 277-281.
- Gupta, N. and S. S. Bhagyawant. (2021). RAPD analysis in kabuli chickpea seed accessions. *Journal of Agri. Sci*, Vol 9, Issue 4, 6-9.
- Hegazi, A.Z. and N. Hamideldin (2010). The effect of gamma irradiation on enhancement of growth and seed yield of okra (*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench) and associated molecular changes. *J. Horti & Forestry*. 2(3): 038-051.
- Hoey, B. K.; Crowe, K. R.; Jones, V. M. and N. O Polans (1996). phylogenetic analysis of *pisum* based on morphological characters, and allozyme and RAPD markers. *TheorApplGenet*. N°. PP: 92-100.
- Kahl, G (2001). The dictionary of gene technology. Wiley-VCH, Weinheim. Germany.
- Khan, S. and Goyal, S (2009). Mutation genetic studies in mungbeaniv. selection of early maturing mutants. *The Journal of Agricultural Science*. 42(2), 109-113.
- Khawale, R. N; V. Yerramilli and S. K. Singh (2007). Molecular marker assisted of *in Vitro* chemical mutagen induced grapevine mutants. *Curr. Sci.*, 92, 1056-1060.
- Mahla, S. V. S; Mor, B. R. and Yadava, J. S (1990). Effect of mutagens on yield and its component characters in mustard. *Haryana Agric. Univ. J. Res.*, 8(2), 173-178.
- Majeed, A. A; Khan, R; Ahmad, H. and Z. Muhammad (2010). Gamma irradiation effects on some growth parameters of *Lepidium sativum* L. *ARPJ journal of agricultural and biological science*. 5(1), 39-42.
- Mullis, K.; S. Faloona; S. Scharf; R. Saiki; G. Horn; and H. Erlich (1986). Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: The polymerase chain reaction. *Cold spring Harbor Symp. Quant. Biol.* Vol (51), 263-273.
- Mullainathan, L. and S. Umavathi (2014). Induced mutagenesis in *Cicer arietinum*. *International letters of natural sciences*. Vol (12), pp 1-4.
- Nilahayati, R. and J. Syahputra (2022). RAPD analysis for genetic variability of soybean mutant resulting from gamma rays irradiation in m6 generation. *Agricultural Science Digest*, 1(6), 1-6.
- Rawashdeh, I. M. and Nasri I. Haddad (2006). Detecting genetic diversity among wild species, landraces, mutants, and cultivated chickpea using RAPD analysis. *Dirasat. Agricultural Sciences*. Volume 33, No. 2, 2006, 114-123.
- Rostami-Ahmadvandi, H.; D. Kahrizi; K. Cheghamirza; I. Nosratti and J. Zargooshi (2016). Molecular and agro-morphological genetic diversity of chickpea mutants induced via ethyl methane sulfonate. *Cell and Molecular Biology*. 62(11): 8-12.
- Simmonds, N. W (1962). Variability in crop plants, its USE and conservation. *Biological Reviews*. 37: 422-426.
- Singh, P. K.; H. Sharma; N. Srivastava and S. S. Bhagyawant (2014). Analysis of genetic diversity among wild and cultivated chickpea genotypes employing ISSR and RAPD markers. *American Journal of Plant Sciences*. 5, 676-682.

- Stuber, C. W.; N. M. Goodman and R. H (1982). Improvement of yield and ear number resulting from selection at allozyme loci in a maize population. Crop Sciences. Vol. 22, pp: 737-740.
- Stuckburger, D. W. (2011). Multivariate Statistics: concepts, models and applications. www.psychstat. mission.
- Umavathi, S. and L. Mullainathan (2019). Molecular profiling chickpea mutants isolated from EMS and gamma rays treatments. RatarPovrt. 56(3), 88-96.
- Upadhyaya, H. D; C. J. Coyne; S. Singh; C. L. L. Gowda; N. Lalitha and F. J. Muehlbauer (2006). Identification of large-seeded high-yielding diverse kabuli accessions in newly assembled chickpea germplasm. Int. Chickpea Pigeonpea news. 13, 2-5.
- Wani, A. A. and Anis, M (2001). Gamma rays induced bold seeded high yielding mutant in chickpea. Mutation breeding newsletter. 45: 20-21.
- Yan. S. K. and G. Ortiz (1994). Regression and analysis of elite wheat lines grown in rain fed environment. J. of Genetics and Breeding. 48:183-190

Molecular Characterization of Chickpea Mutants Isolated From EMS and Gamma Ray Treatments

Abeer jubily⁽¹⁾ and Fahed Albiski⁽²⁾

(1). General Commission for scientific and agriculture research, Lattakia, Syria.

(2). National commission for biotechnology, Damascus, Syria.

(*corresponding author: Dr. Abeer Jubily. E-Mail; abeerjubily.e@gmail.com).

Received: 18/06/2024

Accepted: 2/09/2024

Abstract

This experiment was carried out at the Agricultural Science Research Center in Lattakia- General Commission for Scientific Agricultural Research, Syria during seasons 2017-2022. The mutagens gamma rays and ethyl methanesulfonate (EMS) were used to induce genetic variation in chickpea cultivar Gab.5. DNA was amplified using ten primers (RAPD) of 17 promising mutant families of Gab (5) selected based on morphological and productive characteristics compared to the control. The results showed genetic differences between 7 mutant families derived from Ghab5 compared to the control. The primers resulted in a total of 81 bands, with an average polymorphism of 22.82%. Cluster analysis based on the RAPD results divided the cultivar Gab.5 and the selected families into seven different groups. The availability of the desired mutations gives a good opportunity to develop improved chickpea cultivars in addition to generating genetic variation, which enriches the genetic resources of chickpea.

Key words: *Cicer arietinum* L., genetic variation, RAPD technique, dendrogram.