

## التنوع الوراثي لبعض الطرز الوراثية من القمح القاسي *Triticum durum* باستخدام

### تقانة SSR

رهام أبو الكنج\*<sup>(1)</sup> وغنوة لباييدي<sup>(1)</sup> ونعيم الحسين<sup>(2)</sup>

(1). قسم التقانات الحيوية، كلية الهندسة التقنية، جامعة حلب، حلب، سورية.

(2). مركز بحوث حلب، الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية، دمشق، سورية.

(\*للمراسلة: رهام أبو الكنج. البريد الإلكتروني: رهام أبو الكنج. البريد الإلكتروني: perfume-1990@hotmail.com).

تاريخ القبول: 2018/10/01

تاريخ الاستلام: 2018/05/02

### الملخص

يعدّ فهم التركيب الوراثي للقمح *Triticum sp.* اللبنة الأساس لنجاح أي برنامج لتربية النبات، وقد أضحى استخدام المؤشرات الجزيئية في دراسات تقييم التنوع الوراثي، وفي برامج تربية النبات أمراً بالغ الأهمية. لذلك هدف البحث إلى دراسة التنوع الوراثي لطرز وراثية من القمح القاسي *Triticum durum*. نُفذ البحث في مخبر التقانات الحيوية التابع لمركز بحوث حلب خلال الفترة الممتدة ما بين 2016-2017، إذ استخلص DNA من جميع الطرز المدروسة بطريقة CTAB وقدر تركيزه ونقاوته ونوعيته، طبقت تقانة التكرار التسلسلي البسيط SSR في دراسة التنوع الوراثي باستخدام ثلاثة عشر زوجاً من البادئات، ورسمت شجرة القرابة بطريقة UPGMA وفقاً لمعامل Jaccard. أظهرت النتائج الحصول على 160 أليلاً اختلفت بأحجام القطع الناتجة وتراوحت أوزانها ما بين 100-2000 زوج من القواعد، وتراوحت قيمة قوة المؤشر الجزيئي (Polymorphic Information Content, PIC) ما بين 0.14-0.37، وأعطت البادئات wms408، wms642، wms666، wms70 أفضل النتائج، وأظهر التحليل العنقودي توزع الطرز المدروسة في عنقودين رئيسيين، وتراوحت نسبة التشابه ما بين 0.21-0.9. وهذا يؤكد كفاءة مؤشرات SSR في الكشف عن مستوى واسع من التباين الوراثي وقدرتها على تحديد هوية الطرز الوراثية.

الكلمات المفتاحية: القمح القاسي، التنوع الوراثي، المؤشرات الجزيئية، SSR.

### المقدمة:

يحتل القمح المرتبة الأولى في العالم من حيث المساحة المزروعة إذ وصلت المساحة المزروعة بالقمح عام 2016 إلى 220 مليون هكتار (FAO, 2017)، ويعدّ أحد أهم المحاصيل الغذائية عالمياً (Gupta et al., 2008)، ونتيجة للتغيرات المناخية التي تؤثر سلباً في إنتاج القمح، والزيادة في عدد السكان، وقد يصل إلى 9 مليار نسمة عام 2050 (Tilman et al., 2002)، فإن مراكز البحث العلمي تسعى لتحسين مردود وحدة المساحة وزيادة فرص الحصول على الغذاء، باستنباط أصناف جديدة ذات مواصفات نوعية عالية وغلة مرتفعة.

يعد القمح المحصول الاستراتيجي الأول في سورية لأنه يشكل العمود الفقري في الأمن الغذائي، لذلك تتواصل الجهود لتطويره وتحسين نوعيته وإنتاجيته من خلال التحسين الوراثي وهذا يتطلب استخدام مادة وراثية متنوعة ومتكيفة مع البيئة، وتعدّ الحاجة المتزايدة لهذا المحصول من أهم الدوافع لتبني طرائق جديدة تمتاز بالسرعة والفاعلية والموثوقية لتطوير وإنتاج أصناف محسنة، كاستخدام المؤشرات الجزيئية في دراسات التنوع الوراثي (Kameswara, 2004)، التي تعد أداة مفيدة لتقييم التنوع الوراثي كونها لا تتأثر بالتغيرات البيئية (Drikvand *et al.*, 2015).

تختلف المؤشرات الجزيئية تبعاً لعدة مفاتيح أساسية، مثل غزارتها في الجينوم، ومستوى التعدد الشكلي الذي تكشف عنه، وخصوصية الموقع الوراثي، وقابليتها للتكرار، وطبيعة توريثها، والمتطلبات الفنية والتقنية اللازمة لتنفيذها. (Drikvand *et al.*, 2015). تتميز التكرارات التسلسلية البسيطة /Simple Sequence Repeat /SSR بوفرتها وانتظامها في الجينوم وسيادتها المشتركة Codominant، كما تتصف بتعدديتها الشكلية وسهولة فحصها عن طريق PCR (Prasad *et al.*, 2017)، ونظراً لكفاءة مؤشرات الـ SSR في الكشف عن مستوى عالٍ من التباينات الوراثية فقد استخدمت كثيراً في تحليل التنوع الوراثي (Prasad *et al.*, 2000)، وقد تمكن Röder ورفاقه (2002) باستخدام 19 مؤشراً من مؤشرات SSR من الفصل ما بين 500 صنف قمح أوروبي. كما قيم Salem ورفاقه (2008) التنوع الوراثي لسبعة أصناف من القمح الطري في مصر باستخدام 15 مؤشراً لـ SSR، ودرس Drikvand ورفاقه (2015) التنوع الوراثي في إيران لبعض طرز القمح القاسي والطري باستخدام 30 مؤشراً لـ SSR. وحلل Wei ورفاقه (2005) التنوع الوراثي لـ 24 طرازاً من القمح الطري في الصين باستخدام 40 مؤشراً لـ SSR. وفي كرواتيا أجري توصيف لـ 30 طرازاً وراثياً من القمح بواسطة 24 مؤشراً لـ SSR من قبل Spanic ورفاقه (2012). أما في المغرب فقد قام Henkrar ورفاقه (2016) بتقييم التنوع الوراثي لأصناف من القمح القاسي بواسطة 13 مؤشراً لـ SSR، في حين درس Yildirim ورفاقه (2011) التنوع الوراثي لسلاسل تركية من القمح القاسي باستخدام تقانة الـ SSR، واستخدم Prasad ورفاقه (2000) 20 مؤشراً من مؤشرات SSR لكشف التعدد الشكلي لـ 55 طرازاً من القمح في الهند، وأشار Maccaferri ورفاقه (2003) إلى وجود التباين الوراثي بين طرز إبطالية من القمح القاسي بواسطة SSR.

ونظراً لضرورة البحث عن مصادر وراثية متباينة لإدخالها في برامج التربية، فقد هدفت هذه الدراسة إلى دراسة التنوع الوراثي لـ 44 طرازاً مبشراً من القمح القاسي باستخدام تقانة SSR بغية الاستفادة منها في البرامج المحلية لتحسين القمح.

مواد البحث وطرائقه:

المادة النباتية:

أجريت الدراسة على 44 طرازاً وراثياً من القمح القاسي (الجدول 1) مثلت بعض أصناف القمح القاسي المعتمدة في سورية والعديد من الطرز الوراثية المبشرة، تم الحصول عليها من الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية في سورية/GCSAR وبرنامج تحسين القمح القاسي في المركز الدولي للبحوث الزراعية في المناطق الجافة/ICARDA. ونُفذت في مخبر التقانات الحيوية التابع للهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية/ مركز بحوث حلب وذلك خلال الفترة الممتدة ما بين 2016-2017.

الجدول 1. يبين أصناف القمح المعتمدة في سورية والطرز الوراثية المبشرة المستخدمة في الدراسة

الطرز الوراثي	الرقم التسلسلي
IcamorTA041/4/Aghrass1/3/HFN94N8/Mrb5//Zna1/5/Malmuk1/Serrator1	1
Bcr/Lks4//Mrf1/Stj2/3/Mrf2/Normal Hamari//Bcr/Lks4	2
Mrf1/Stj2/3/1718/BT24//Karim	3
ICAMOR-TA04-68/6/21563/AA//Fg/3/D68-10-2A-2A1A/4/Vitron/5/Bcr	4
Azeghar-1/4/ICAMOR-TA04-62/3/Maamouri 3//Vitron/Bidra1/5/Mgnl3/Ainzen-1	5
Mgnl3/Ainzen-1/3/ICAMOR-TA04-63// H.mouline/Sbl2/4/Mgnl3/Ainzen-1	6
Mrf1/Stj2//Bcrch1/4/ICAMOR-TA04-62/3/Ammar 8//Vitron/Bidra1/5/Stj3//Bcr/Lks4/3/Ter-3	7
Mgnl3/Ainzen-1//Mgnl3/Ainzen-1	8
Mgnl3/Ainzen-1/3/Bcr/Gro1//Mgnl1	9
Mgnl3/Ainzen-1//Mgnl3/Aghrass2	10
Terbol97-5/Geruftel-2	11
Oss1/Stj5/5/Bicredera1/4/BEZAIZ-SHF//SD-19539/Waha/3/Stj/Mrb3/6/Stj3//Bcr/Lks4/3/Ter-3	12
Mgnl3/Ainzen-1/3/Ter-1//Mrf1/Stj2	13
Ouasloukos-1/5/Azn1/4/BEZAIZ-SHF//SD-19539/Waha/3/Gdr2	14
Ouasloukos-1/5/Azn1/4/BEZAIZ-SHF//SD-19539/Waha/3/Gdr2	15
Oss1/Stj5/5/Bicredera1/4/BezaizSHF//SD19539/Waha/3/Stj/Mrb3/6/Icajihan1	16
IcamorTA042/4/Bcr/Lks4/3/Altar84/Stn//Lahn/5/Beltagy2/6/Oss1/Stj5/5/Bicredera1/4/BezaizSHF//SD19539/Waha/3/Stj/Mrb3	17
IcamorTA042/4/Bcr/Lks4/3/Altar84/Stn//Lahn/5/Beltagy2/6/Oss1/Stj5/5/Bicredera1/4/BezaizSHF//SD19539/Waha/3/Stj/Mrb3	18
Oss1/Stj5/5/Bidra1/4/BezaizSHF//SD19539/Waha/3/Stj/Mrb3/6/Icajihan1	19
Ter1/3/Stj3//Bcr/Lks4/4/Icajihan18	20
Ter1/3/Stj3//Bcr/Lks4/4/Icajihan18	21
Ter1//Mrf1/Stj2/3/Icajihan22	22
Bicredera1/Azeghar2//Icajihan25	23
Bicredera1/Azeghar2//Icajihan25	24
Azeghar1/6/Zna1/5/Awl1/4/Ruff//Jo/Cr/3/F9.3/7/Azeghar1//Msb11/Quarmal	25
Azeghar1/4/IcamorTA0462/3/Maamouri3//Vitron/Bidra1/5/Mgnl3/Ainzen1	26
Mgnl3/Ainzen1/3/IcamorTA0462//Terbol975/Icamor"s"/4/Beltagy2	27
Ter1/3/Stj3//Bcr/Lks4/4/IcamorTA0462/3/Arislahn7//CI115/Bcrch1/5/Beltagy2	28
Maamouri1/5/IcamorTA0462/4/Stj3//Bcr/Lks4/3/Icamor"s"/6/Mgnl3/Ainzen1	29
Mgnl3/Ainzen1/3/Bcr/Gro1//Mgnl1	30
Mgnl3/Ainzen1/3/Bcr/Gro1//Mgnl1	31
Ouasloukos1/5/Azn1/4/BEZAIZSHF//SD19539/Waha/3/Gdr2	32
Ouasloukos1/5/Azn1/4/BEZAIZSHF//SD19539/Waha/3/Gdr2	33
CM829/CandocrossH25//Icajihan10	34
Maamouri1/5/IcamorTA0462/4/Stj3//Bcr/Lks4/3/Icamor"s"/6/Mgnl3/Ainzen1	35
Cham 1 (PLC/RUFF//GTA/RLT)	36
Cham 3 (DURUM-DWARF-S15/CRANE//GEIER-DW)	37

Cham 5 (JORI 69/HOURANI)	38
Cham 7 (OUASSEL_1/4/MRB-SH/3/RABI//GS/CR)	39
Cham 9 (STJ3//BCR/LKS_4)	40
Douma 1 (BELIKH//GEDIZ/BIT)	41
Douma 3 (ACSAD1073/OMRUF-2)	42
Bohouth 7 (CHEN/ALTAR 84)	43
Bohouth 11 (SULA//CORM/RUFO/3/SITO/4/ROK/FGO//STI)	44

#### استخلاص المادة الوراثية DNA:

عُزل الحمض النووي الريبي منقوص الأكسجين DNA لكامل جينوم القمح من الأنسجة الورقية الفتية لجميع الطرز المدروسة بطريقة Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide (CTAB) وفق الخطوات المقترحة من قبل Saghai-Marouf ورفاقه (1984) مع إجراء بعض التعديلات الملائمة لظروف العمل في المختبر.

تم قياس تركيز الـ DNA المستخلص من جميع العينات باستخدام جهاز المطياف الضوئي Spectrophotometer من نوع Eppendorf AG Biophotometer 22331 Hamburg، كما حُددت نقاوة الـ DNA المستخلص بقياس الامتصاصية (OD) عند طولي الموجة 260 و 280 نانومتر وحسبت النسبة (OD<sub>280</sub>/OD<sub>260</sub>). تُعد نوعية الـ DNA جيدة إذا تراوحت هذه النسبة في العينات النقية ما بين 1.8-2.0 (Sambrook *et al.*, 2001). حُضرت العينات للقياس بأخذ 10 ميكرو ليتر من الـ DNA المستخلص وإكمال الحجم إلى 200 ميكرو ليتر من المحلول TE. كما اختبرت نوعية الـ DNA وجودته من خلال الرحلان الكهربائي electrophoresis في هلامه أغاروز تركيز 1%، إذ حُمِلت كمية 2 ميكرو ليتر من الـ DNA، أُضيف لها 2 ميكرو ليتر محلول تحميل 10x loading dye، و6 ميكرو ليتر من الماء المقطر والمعقم. تمت عملية الرحلان عند فرق كمون 100 فولت لمدة 45 دقيقة، ثم لونت الهلام في محلول بروميد الايثيديوم تركيز 0.5 ميكروغرام/مل، وظُهرت تحت الأشعة فوق البنفسجية UV في جهاز توثيق الهلام Gel documentation، ومن ثم أخذت صورة رقمية للهلام لتحليل النتائج، (الشكل 1).

#### 1.1 تقييم التنوع الوراثي للطرز الوراثية المدروسة

استخدمت تقانة التكرارات التسلسلية البسيطة SSR التي تعتمد على التفاعل التسلسلي للبوليميراز Polymerase Chain Reaction (PCR)، إذ استخدم 14 زوجاً من بادئات SSR في تفاعلات منفصلة للكشف عن 14 موقعاً وراثياً في جينوم نبات القمح الجدول (2).

الجدول 2. يبين بادئات التكرارات التسلسلية البسيطة SSR المستخدمة وتسلسلها النكليوتيدي (Röder *et al.*, 1998)

درجات الالتحام Tm	البادئة	التكرار (الموتيف motif)	البادئة
50°	F: CTGCAAGCCTGTGATCAACT	(CA)18	Wms2
	R: CATTCTCAAATGATCGAACA		
55°	F: CGTATCACCTCCTAGCTAAACTAG	(GA)40	Wms6
	R: AGCCTTATCATGACCCTACCTT		
50°	F: TGGCGCCATGATTGCATTATCTTC	(CA)17GA(TA)4	Wms18
	R: GGTTGCTGAAGAACCCTATTAGG		
60°	F: ATCTTAGCATAGAAGGGAGTGGG	(AT)19(GT)15	Wms30
	R: TTCTGCACCCTGGGTGAT		
60°	F: GCACGTGAATGGATTGGAC	(GA)2GC(GA)33	Wms46

	R: TGACCCAATAGTGGTGGTCA		
60°	F: AGTGGCTGGGAGAGTGTTCAT	(GT)7GC(GT)11	Wms70
	R: GCCCATTACCGAGGACAC		
60°	F: TGCAGTGGTCAGATGTTTCC	(GA)20	Wms165
	R: CTTTTCTTTCAGATTGCGCC		
55°	F: TATGGTCAAAGTTGGACCTCG	(GA)18	Wms357
	R: AGGCTGCAGCTCTTCTTCAG		
60°	F: ATCATGTGCGATCTCCTTGACG	(CT)14(GT)16	Wms389
	R: TGCCATGCACATTAGCAGAT		
55°	F: TCGATTTATTTGGGCCACTG	(CA)>22(TA)(CA)7(TA)9	Wms408
	R: GTATAATTCGTTACAGCACGC		
60°	F: AAGGCGAATCAAACGGAATA	(CT)18(CA)20	Wms533
	R: GTTGCTTTAGGGGAAAAGCC		
55°	F: ATGGCATAATTTGGTGAAATTG	(CA)14(TA)6	Wms577
	R: TGTTTCAAGCCCAACTTCTATT		
60°	F: ACGGCGAGAAGGTGCTC	(GT)14	Wms642
	R: CATGAAAGGCAAGTTCGTCA		
60°	F: GCACCCACATCTTCGACC	(CA)13	Wms666
	R: TGCTGCTGGTCTCTGTGC		

خُضِر مزيج تفاعل PCR باستخدام بادئات SSR بحجم نهائي 10 ميكروليتر بحيث يحتوي على 2 ميكرو ليتر DNA (50 نانوغرام/ميكرو ليتر)، و1 ميكرو ليتر من المحلول المنظم (10x PCR buffer) الحاوي على كلوريد المغنيزيوم (15mM)، و0.4 ميكرو ليتر من كل بادئة أمامية/ Forward أو عكسية/ Reverse (التركيز الأساسي لكل منها 10 بيكومولر/ ميكروليتر)، و1 ميكرو ليتر من مزيج النيكليوتيدات الأربع dNTP's (تركيز 2 ميلي مولر mM)، و0.2 ميكرو ليتر من أنزيم البلمرة الثابت حرارياً Taq polymerase من شركة Euro clone (تركيز 5 وحدة أنزيمية/ ميكرو ليتر) وأكمل الحجم إلى 10 ميكرو ليتر بإضافة الماء منزوع الشوارد المعقم.

تمت عملية التدوير الحراري في جهاز من نوع (Eppendorf Mastercycler Germany) وذلك وفق الخطوات التالية: فصل أولي عند 94 °م لمدة 3 دقائق ولدورة واحدة، ومن ثم 45 دورة كل دورة تتضمن المراحل التالية: مرحلة فصل سلسلاتي DNA (Denaturation) عند درجة الحرارة 94 °م لمدة دقيقة واحدة، ومرحلة التزاوج أو الالتحام (Annealing) عند درجات الحرارة 50 و55 و60 °م تبعاً للبادئة لمدة دقيقة واحدة، ومرحلة الامتداد أو الاستطالة (Extension) عند درجة حرارة 72 °م لمدة دقيقتين، ثم الدورة النهائية عند الدرجة 72 °م لمدة 10 دقائق.

بعد انتهاء تفاعل PCR، أُضيف لكل عينة كمية 1 ميكروليتر من محلول التحميل 10x loading dye، ثم فصلت نواتج التفاعل على هلامة أغاروز تركيز 3% خُضِرَت باستخدام محلول TAE (1 X Tris-acetate buffer). تمت عملية الترحيل باستخدام نفس المحلول السابق لمدة ساعتين، عند جهد كهربائي 25 فولط خلال الـ 15 دقيقة الأولى و50 فولط حتى نهاية عملية الرحلان. بعد انتهاء عملية الفصل الكهربائي صُبِغَت الهلامة باستخدام محلول بروميد الايثيديوم Ethidium Bromide تركيز 0.5 ميكرو غرام/ مل لمدة

30 دقيقة مع التحريك، ثم غُسلت الهلامة بالماء المقطر للتخلص من بقايا مادة الصبغ. أُخذت صورة رقمية للهلامة باستخدام جهاز توثيق الهلام من نوع Wise Doc المزود بمصدر للأشعة فوق البنفسجية UV لتحليل النتائج.

تمت مقارنة أحجام القطع الناتجة مع مؤشر قياس للوزن الجزيئي 100 bp (Molecular weight marker 100 bp). وتمت قراءة النتائج وفق النظام الثنائي، حيث أُعطي الرقم 1 في حال وجود الأليل و0 في حال غيابه. حللت النتائج باستخدام برنامج التحليل (Unweighted Paier Group Method with UPGMA DARwin Version 5.0.158 ورسمت شجرة القرابة باستخدام طريقة (Genetic Similarity) بين الطرز الوراثية باستخدام معامل Jaccard /Jaccard Average) ودرست نسبة التشابه الوراثي (Jaccard, 1908). coefficient.

وحسبت قوة المؤشر الجزيئي (PIC) Polymorphic information content في الكشف عن التعدد الشكلي من العلاقة (Botstein *et al.*, 1980):

$$PIC = 1 - \sum p^2 / n - 1$$

حيث أن: n: عدد الأفراد، و P2: مربع تردد الحزم الموجودة present والغائبة absent.

وحسب التنوع الوراثي من العلاقة (Botstein *et al.*, 1980):

$$H = 1 - \sum P^2$$

كما حسبت النسبة المئوية للتعدد الشكلي للحزم الناتجة من العلاقة:

$$\% \text{ للتعدد الشكلي للحزم} = (\text{عدد الحزم المتعددة شكلياً} / \text{العدد الكلي للحزم}) \times 100$$

دُرس تركيب مجتمع طرز القمح القاسي المدروسة من خلال Structure 2.3.4 (جامعة ستانفورد، ستانفورد، كاليفورنيا، الولايات المتحدة الأمريكية)، وفقاً لخوارزمية العنقدة المعتمدة على نموذج Bayesian. (Pritchard *et al.*, 2000; Falush *et al.*, 2003, Hubisz *et al.*, 2009).

وضعت مدة التشغيل عند القيمة 5000، كما وضعت فترة ما بعد التشغيل / MCMC 5000، دُرس عدد المجتمعات K بين 2-9 لاستنتاج العدد الأمثل للمجتمعات (العناقيد). ثم أدخلت النتائج إلى Structure Harvester لتحديد القيمة المثلى لعدد المجتمعات (العناقيد) (Earl and Vonholdt, 2012).

**النتائج والمناقشة:**

**تركيز ونوعية DNA:**

تراوح تركيز DNA المستخلص من العينات المدروسة ما بين (1048.2-133.9) نانوغرام/ ميكرو ليتر، وكانت نوعيته جيدة إذ تراوحت النسبة OD<sub>280</sub>/OD<sub>260</sub> بين 1.75 و2.09 مما يشير إلى نقاوة عينات الـ DNA وخلوها من البروتين (Volk *et al.*, 2014).

كما بينت نتائج الرحلان الكهربائي على هلامة الأغاروز أن طريقة الاستخلاص أعطت DNA بنوعية جيدة ذات وزن جزيئي عالي في جميع العينات (شكل 1)، إذ ظهر الـ DNA على شكل حزمة واحدة في أعلى المسارات في الهلامة، ولم يظهر وجود الـ RNA في العينات نظراً لهضمه باستخدام أنزيم RNase أثناء عملية الاستخلاص.



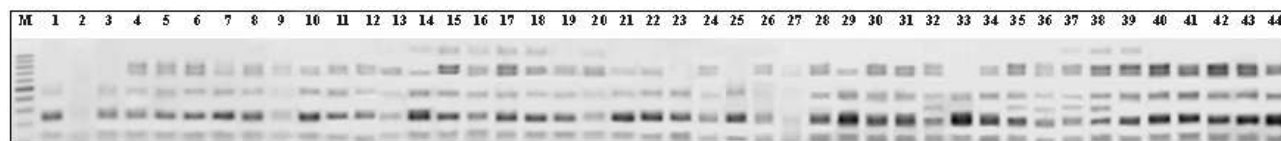
الشكل 1. اختبار نوعية الـ DNA بالرحلان الكهربائي على هلامة أغاروز تركيز 1% (M: مؤشر قياسي لامدا (50 نانوغرام)، المسارات 1-44: طرز القمح المدروسة)

#### التعدد الشكلي:

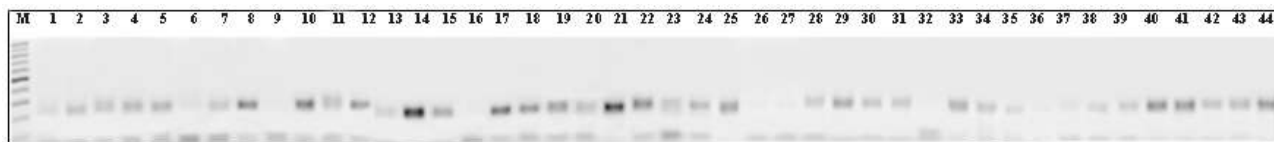
استطاع 13 زوجاً من البادئات المستخدمة الكشف عن التعدد الشكلي في الطرز المختبرة، إذ أعطت 160 أليلاً بمتوسط قدره 12.3 أليلاً لكل زوج من البادئات، وكان أفضل البادئات، والبادئة wms70 إذ أعطت 22 أليلاً، تلتها البادئة wms666 والتي أعطت 20 أليلاً، في حين أعطت البادئات wms18، وwms165، وwms389 أقل عدد من الأليالات إذ أعطت ثلاثة أليالات فقط. اختلف حجم القطع الناتجة، وتراوح ما بين 100-2000 bp، وكان هناك 126 أليلاً مشتركاً بين فردين على الأقل، بينما كان هناك 25 أليلاً نو تعدد شكلي Polymorphic bands لكنه فريد Unique band، و9 أليالات أحادية الشكل Monomorphic bands.

ومن الجدير بالذكر أن العدد المتوسط للأليالات الناتجة والبالغ 12.3 أليلاً لكل زوج من البادئات، كان مرتفعاً مقارنة بدراسات أخرى حديثة، إذ بلغ العدد الإجمالي للأليالات 48 أليلاً بمتوسط 3.2 أليل لكل زوج من البادئات وذلك عند تقييم التنوع الوراثي لسبعة أصناف من القمح الطري باستخدام 15 مؤشر SSR في مصر (Salem *et al.*, 2008)، أما في الدراسة التي أجريت في إيران فقد تم تمييز 71 أليلاً بمتوسط 2.36 عند دراسة التنوع الوراثي لـ 40 طراز وراثي من القمح القاسي والطري باستخدام 30 مؤشر SSR (Drikvand *et al.*, 2015). وفي الصين، بلغ عدد الأليالات الكلي 276 أليلاً إذ تراوحت بين 1-16 أليلاً لكل زوج من البادئات بمتوسط 6.9 أليالات عند دراسة التنوع الوراثي لأربع وعشرين طرازاً من القمح الطري باستخدام 40 مؤشراً لـ SSR (Wei *et al.*, 2005)، وفي المغرب تم الحصول على 44 أليلاً لدى تقييم التنوع الوراثي لأصناف من القمح القاسي بواسطة 13 مؤشر SSR وكان عدد الأليالات يتراوح من 2 إلى 6 أليالات بمتوسط 3.38 أليلاً لكل زوج من البادئات (Henkrar *et al.*, 2016). وهذا يشير إلى وجود قاعدة وراثية واسعة بين طرز القمح القاسي المدروسة مقارنة مع مثيلاتها في بلدان أخرى.

تراوحت النسبة المئوية للتعدد الشكلي % polymorphic ما بين 33.3 - 100%، أما قيمة قوة المؤشر الجزيئي PIC فتراوحت ما بين 0.14-0.37 مع العلم أن القيمة العظمى لهذا المؤشر هي 1، وبالتالي يمكن القول بأن البادئات wms642، wms666، wms70، wms408 قد أعطت أفضل النتائج بين البادئات المستخدمة استناداً إلى عدد الحزم الناتجة وقيمة PIC والنتائج موضحة في الشكل (2) والجدول (3). وتجدر الإشارة إلى انخفاض قيمة قوة المؤشر الجزيئي PIC في هذه الدراسة إذ كان المتوسط العام لهذا المؤشر 0.24 بالمقارنة مع دراسات أخرى (Drikvand *et al.*, 2015)، و(Salem *et al.*, 2008)، و(Moragues *et al.*, 2007) إذ كانت قيمته 0.45 و0.54 و0.7 على التوالي، وقد يعود هذا التباين في قيم الـ PIC المتوسطة لبادئات الـ SSR المستخدمة في الكشف عن مستوى التعددية الشكلية في الـ DNA واختلاف الطرز المدروسة وكذلك عددها.



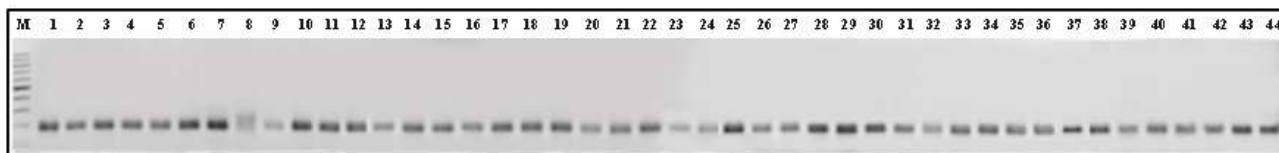
(نواتج تفاعل مكاثرة البادئة wms2)



(نواتج تفاعل مكاثرة البادئة wms6)



(نواتج تفاعل مكاثرة البادئة wms30)



(نواتج تفاعل مكاثرة البادئة wms46)



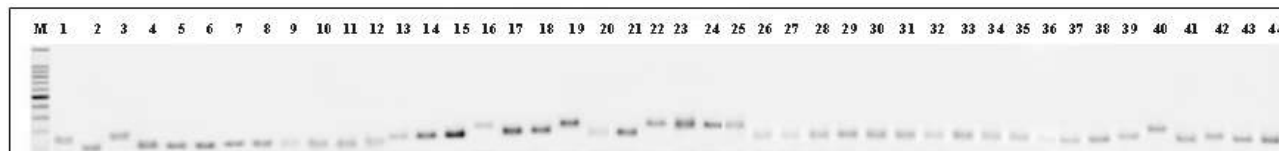
(نواتج تفاعل مكاثرة البادئة wms70)



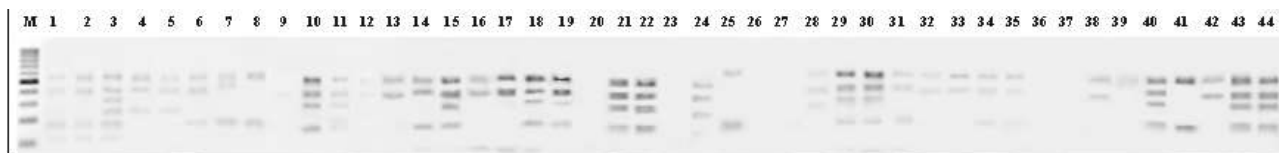
(نواتج تفاعل مكاثرة البادئة wms408)



(نواتج تفاعل مكاثرة البادئة wms533)



(نواتج تفاعل مكاثرة البادئة wms577)





## (نواتج تفاعل مكاثرة البادئة wms642)



## (نواتج تفاعل مكاثرة البادئة wms666)

الشكل 2. الرحلان الكهربائي على هلامة أغاروز 2.5 % لنواتج تفاعل PCR باستخدام بادئات SSR، M: مؤشر قياسي للوزن الجزيئي 100 bp، المسارات 1-44: طرز القمح المدروسة.

الجدول 3. يبين التعدد الشكلي الناتج عن استخدام بادئات SSR على طرز القمح القاسي

قيمة التنوع الوراثي H	قوة المؤشر PIC	التعدد الشكلي % Polymorphic %	العدد الكلي للأليلات Total bands	أليلات أحادية الشكل Monomorphic bands	التعدد الشكلي للأليلات Polymorphic bands			حجم القطع الناتجة (زوج نكليوتيدي (bp)	البادئة Primer
					الكلي Total	الوحيدة Unique	مشتركة Share		
0.22	0.23	85.7	14	2	12	2	10	150-1200	Wms2
0.13	0.14	80	10	2	8	4	4	100-550	Wms6
0.28	0.28	66.7	3	1	2	0	2	150-1500	Wms18
0.18	0.18	100	18	0	18	5	13	150-1500	Wms30
0.24	0.24	88.9	18	2	16	1	15	150-1500	Wms46
0.22	0.23	100	22	0	22	5	17	100-2000	Wms70
0.14	0.15	33.3	3	2	1	0	1	150-250	Wms165
0.25	0.25	100	3	0	3	0	3	150-900	Wms389
0.34	0.35	100	19	0	19	0	19	150-2000	Wms408
0.23	0.23	100	14	0	14	2	12	100-1100	Wms533
0.28	0.29	100	7	0	7	1	6	100-550	Wms577
0.36	0.37	100	9	0	9	0	9	150-550	Wms642
0.18	0.19	100	20	0	20	5	15	150-1500	Wms666
—	—	—	160	9	151	25	126	—	المجموع
0.23	0.24	93.8	12.3	0.69	11.61	1.92	9.69	—	المتوسط

PIC: Polymorphic information content,

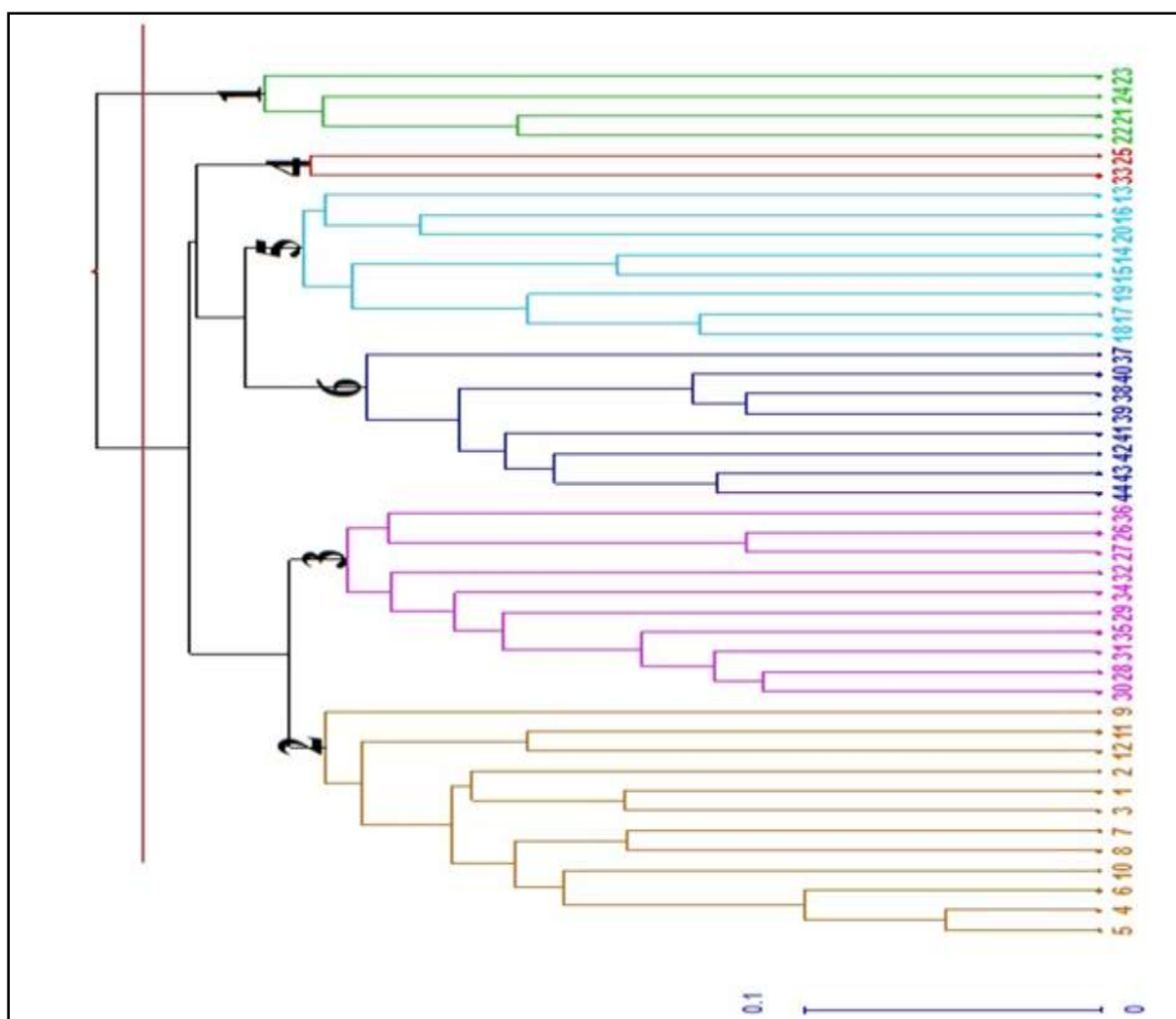
## نسب التشابه:

تراوحت نسبة التشابه بين الطرز المدروسة وفقاً لمعامل Jaccard واستناداً لبيانات مصفوفة التشابه Similarity matrix ما بين 0.21 إلى 0.9. بمتوسط قدره 0.42، وهذا يشير إلى التباين الوراثي الكبير بين الطرز المدروسة، ووصلت نسبة التشابه في أعلى قيمة لها 0.9 بين الطرازين (4) و(5) وذلك نتيجة وجود آباء مشتركة (ICAMOR، Vitron) داخلية في نسب كل منهما، في حين كانت أدنى قيمة للتشابه 0.21 بين الطرازين (6) و(23) ويمكن تفسير ذلك بعدم وجود آباء مشتركة بين هذين الطرازين (الجدول 4).

تتوافق هذه النتائج مع نتائج دراسات أخرى (Maccaferri et al., 2003) إذ بلغت القيمة المتوسطة لمعامل التشابه لطرز القمح القاسي 0.44، وتختلف مع دراسة (Prasad et al., 2000) والذي حصل على متوسط نسبة تشابه 0.23.



- تحت العنقود الأول: اقتصر على طرازين وراثيين فقط (25-33).
- تحت العنقود الثاني: تفرع تحت العنقود الفرعي الثاني إلى مجموعتين:
- المجموعة الأولى: احتوت على الطرز الوراثية ذات الرقم 13-20.
- المجموعة الثانية: شملت الأصناف السورية المعتمدة جميعها ذات الرقم 37-44 باستثناء الطراز ذو الرقم 36 (شام 1) الذي انفصل وانضم إلى تحت العنقود الثاني للعنقود الفرعي الأول كما ذكر سابقاً. بالعودة إلى نسب الأصناف المعتمدة نجد أنها تشترك مع بعض الطرز المدرجة ضمن تحت العناقيد التابعة لنفس العنقود ببعض الآباء كـ ALTAR 84 ، CR ، STJ3//BCR/LKS.



الشكل 3. شجرة القرابة Dendrogram بين طرز القمح المدروسة وفق معامل Jaccard

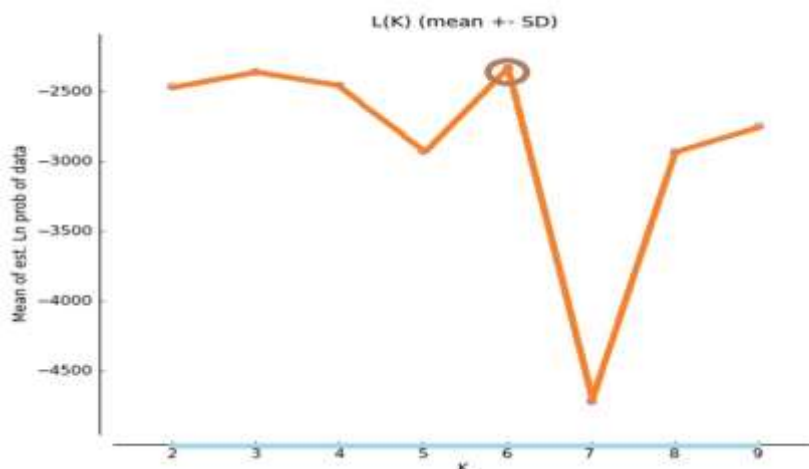
لقد أظهر مخطط التحليل العنقودي عملية الفصل المبنية على أساس التشابه الوراثي بين الطرز المدروسة، وأدى لإدراجها في عناقيد تبعاً لأصلها الوراثي، مع وجود بعض الاستثناءات لبعضها الآخر. فمثلاً يلاحظ أن الأصناف المعتمدة في سورية قد أدرجت في تحت

عنقود ضمن مجموعة واحدة عدا الصنف شام 1 ويعود إلى ضيق القاعدة الوراثية فيما بينها وانحدارها من آباء مشتركة قريبة من بعضها من الناحية الوراثية، وجاءت من برامج تربية ذات أهداف واحدة، كما وأنها متكيفة مع البيئات الجافة، أما الصنف شام 1 فهو من أوائل الأصناف المعتمدة في سورية، ولم يتم تحسينه بسبب اعتماد العديد من الأصناف الأخرى، كما لوحظت الظاهرة نفسها مع الطرازين (25-33) اللذين اجتمعا ضمن تحت عنقود واحد مستقل عن العناقيد الأخرى، يمكن تفسير ذلك باستخدام بعض البادئات المرتبطة بصفات كمية كالبادئات (wms533، wms18، wms6، wms577)، وبالتالي أدرجت تحت عنقود واحد بالاعتماد على صفات شكلية مثل ارتفاع النبات، أو صفة النكرزة الطرفية الورقية أو صفة الرقاد وغيرها من الصفات الشكلية. <https://graingenes.org/cgi-bin/GG3/report.cgi?class=marker&name=WMS18>.

وهذا يؤكد كفاءة وقدرة تقانة SSR في الكشف عن مستوى واسع من التباين الوراثي، والقدرة على تحديد هوية طرز وراثية ذات نسب مختلفة من التشابه الوراثي، إذ تمكنت المؤشرات المستخدمة من الفصل بين الطرازين (4 و5) واللذين بلغت نسبة التشابه الوراثي بينهما 90%. مما يدل على أن استخدام عدد قليل نسبياً من بادئات SSR كان كافياً لتقييم الطرز المدروسة.

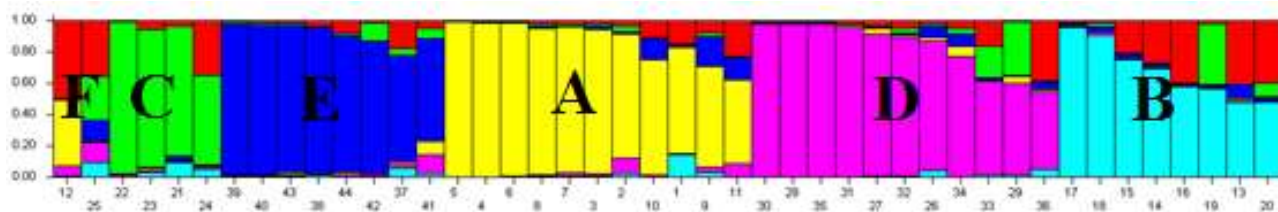
### 1.2. تحليل البنية أو التركيب الوراثي للطرز المدروسة بواسطة الـ Structure:

وفقاً لقيمة K فقد أمكن تقسيم الطرز المدروسة إلى ستة مجتمعات (شكل 4)، أعطي لكل واحد منها لوناً مختلفاً عن الآخر (A، B، وC، D، E، وF)، حيث ضم المجتمع A 11 طرازاً هي التي تحمل الأرقام 1-11 وملونة باللون الأصفر، والمجتمع B ضم سبعة طرز وراثية أعطت الأرقام 13-20 ولونتها باللون السماوي، وضم المجتمع C أربعة طرز لونتها باللون الأخضر وتحمل الأرقام 21-24، بينما ضم المجتمع D 11 طرازاً وراثياً لونها باللون الزهري وذات الأرقام 26-36، وضم المجتمع E، الأصناف المعتمدة من القمح في سورية وأخذت الأرقام 37-44 طرازاً، ولونتها باللون الأزرق. بينما ضم المجتمع F طرازين اثنين فقط أعطيا الأرقام 12-25 ولونتها باللون الأحمر (الشكل 5).



الشكل 4. تقدير عدد المجتمعات ضمن 44 طراز وراثي من القمح القاسي باستعمال  $\Delta K$  وقيم K المتراوححة من 2 إلى 9 في 44 طراز من القمح بواسطة الطريقة المقترحة من قبل (Evanno et al. (2005).

وكان التباين الوراثي بين المجتمعات 58%، وهذا ما يؤكد القاعدة الوراثية العريضة للطرز المدروسة، مما يجعلها مرشحة لإدخالها في برامج التربية المحلية، من ناحية أخرى، أكدت النتائج التي تم الحصول عليها من خلال تحليل الـ structure إلى حد كبير نتائج تحليل العنقدة بطريقة UPGMA والتي بينت توزع الطرز الوراثية ضمن ستة عناقيد وهذا يؤكد كفاءة البادئات المستخدمة في كشف التباين الوراثي بين الطرز المدروسة.



الشكل 5. البنية الوراثية لـ 44 طراز وراثي من القمح القاسي التي قدرت بواسطة بيانات المؤشر SSR، قيمة  $\Delta K$  حسب عند  $K=6$ . وقد بينت النتائج أن 77.27% من الطرز المدروسة (34 طرازاً من أصل 44 طراز شملته الدراسة) كان لها أصلاً مشتركاً ( $\alpha=0.065$ )، وهذا ما أشارت إليه العديد من الدراسات التي نفذت على القمح أو محاصيل أخرى، (Zeng *et al.*, 2009; Tyagi *et al.*, 2014; Iqbal and Rahman, 2017) والتي أشارت إلى أن تبادل المصادر الوراثية بين مراكز الأبحاث المحلية والدولية هي أحد أهم الأسباب للأصول المشتركة (Van Esbroeck and Bowman, 1998). تم تأكيد الاختلاف بين المجتمعات (العناقيد) بحساب قيمة  $F_{st}$  الذي تراوحت قيمته بين (0.075-0.61)، ويتوافق ذلك مع العديد من الدراسات التي أجريت في محاصيل مختلفة فقد تراوحت قيمته في دراسة تناولت القطن (0.29-0.42) (Tyagi *et al.*, 2014)، وفي الرز (0.20-0.46) (Courtois *et al.*, 2012)، والذرة (0.06-0.31) (Liu *et al.*, 2003).

#### المراجع:

- Botstein, D.; R.L. White; M. Skolnick; and R.W. Davis (1980). Construction of a genetic-linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* 32, 314–331.
- Courtois, B.; J. Frouin; R. Greco; G. Bruschi; G. Droc; C. Hamelin; M. Ruiz; G. Clement; J.C. Evrard; S. van Copenole; D. Katsantonis; M. Oliveira; S. Negrao; C. Matos; S. Cavigiolo; E. Lupotto; P. Piffanelli; and N. Ahmadi (2012). Genetic diversity and population structure in a European collection of rice. *Crop Sci.* 52: 1663–1675. doi: 10.2135/cropsci2011.11.0588.
- Drikvand, R.; G. Najafian; Elham and A. Salahvarzi (2015). Investigation of genetic diversity of some durum and bread wheat genotypes using SSR markers. *J. Bio. & Env. Sci.* 6(3): 24- 32.
- Earl, D.A.; and B.M. Vonholdt (2012). STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conserv. Genet. Resour.* 4: 359–361. doi: 10.1007/s12686-011-9548-7.
- Evanno, G.; S. Regnaut; and J. Goudet (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol. Ecol.* 14: 2611–2620. doi: 10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x
- Falush, D.; M. Stephens; and J.K. Pritchard (2003). Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics* 164: 1567–1587.
- FAO (2017). Annual Agriculture Statistical Food and Agriculture Organization of United Nations FAO, Roma. Italy. ([Http://apps://apps: fao.org/cgi-bin/nphdb.pl=agriculture](http://apps://apps: fao.org/cgi-bin/nphdb.pl=agriculture)).

- Gupta, P.K.; R.R. Mir; A. Mohan; and J. Kumar (2008). Wheat Genomics: present status and future prospects. Internat J Plant Genomics. Special issue on genomics of Major Crops and Model Plant Species, Hindawi Pub Corp, USA (In press), 5: 73.
- Henkrar, F.; J. El-Haddoury; H. Ouabbou; N. Nsarellah; D Iraqi; N. Bendaou; and S.M. Udupa (2016). Genetic diversity reduction in improved durum wheat cultivars of Morocco as revealed by microsatellite markers. Sci. Agric. 73(2): 134-141.
- <https://graingenes.org/cgi-bin/GG3/report.cgi?class=marker&name=WMS18>.
- Hubisz, M.J.; D. Falush; M. Stephens; J.K. Pritchard (2009). Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. Mol Ecol Res. 9:1322–1332.
- Iqbal, M.A.; and M. Rahman (2017). Identification of Marker-Trait Associations for Lint Traits in Cotton. Front. Plant Sci. 8:86. doi: 10.3389/fpls.2017.00086.
- Jaccard, P. (1908). Nouvelles recherches sur ladistribution florale. Bull. Soc. Vaud. Sci.Nat. 44: 223-270.
- Kameswara, R.N. (2004). Plant genetic resources: Advancing conservation and use through biotechnology. African Journal of Biotechnology. 3(2):136-145.
- Liu, K.J.; M. Goodman; S. Muse; J.S. Smith; E. Buckler; and J. Doebley (2003). Genetic structure and diversity among maize inbred lines as inferred from DNA microsatellites. Genetics. 165: 2117–2128.
- Maccaferri, M.; M.C. Sanguineti; P. Donini; and R. Tuberosa (2003). Microsatellite analysis reveals a progressive widening of the genetic basis in the elite durum wheat germplasm. Theoretical and Applied Genetics. 107: 783-797.
- Moragues, M.; M.A. Moralejo; M.E. Sorrells; and C. Royo (2007). Dispersal of durum wheat landraces across the Mediterranean basin assessed by AFLPs and microsatellites. Genet Resour Crop Evol 54: 1133–1144.
- Prasad, M.; R.K. Varshney; J.K. Roy; H.S. Balyan; P.K. Gupta (2000). The use of microsatellites for detecting DNA polymorphism, genotype identification and genetic diversity in wheat. Theoretical and Applied Genetics. 100: 584–592.
- Prasad, P.; S.C. Bhardwaj; O.P. Gangwar; S. Kuma; H. Khan; S. Kumar; H.C. Rawal; and T.R. Sharma (2017). Population differentiation of wheat leaf rust fungus *Puccinia triticina* in South Asia. Current science. 112 (10), 2073-2084.
- Pritchard, J.K.; M. Stephens; N.A. Rosenberg; and P. Donnelly (2000). Association mapping in structured populations. Am. J. Hum. Genet. 67: 170–181. doi: 10.1086/302959
- Röder, M.S.; V. Korzun; K. Wendehake; J. Plaschke; N.H. Tixier; P. Leroy; and M.W. Ganal (1998). A microsatellite map of wheat. Genetics. 149: 2007-2023.
- Röder, M.S.; K. Wendehake; V. Korzun; G. Bredemeijer; D. Laborite; L. Bertrand; P. Isaac; S. Rendell; J. Jackson; R.J. Cooke; B. Vosman; and M.W. Ganal (2002). Construction and analysis of amicrosatellite-based database of European wheat varieties. Theor. Appl. Genet. 106: 67-73.
- Saghai-Marouf, M.A.; R.M. Biyashev; G.P. Yang; Q. Zhang; and R.W. Allard (1984). Extraordinary polymorphic microsatellite DNA in barley: species diversity, chromosomal locations and population dynamics. Proceedings of the National Academy of Sciences (USA). 91: 5466-5470.

- Salem, K.F.M.; A.M. El-Zanaty; and R.M. Esmail (2008). Assessing wheat (*Triticum aestivum* L.) Genetic diversity using morphological characters and microsatellite markers. *World Journal of Agricultural Sciences*. 4:538-544.
- Sambrook, J.; and D. Russel 2001- *Molecular Cloning: A laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 3rd ED, New York, USA.
- Spanic, V.; H. Buerstmayr; and G. Derezner (2012). Assessment of genetic diversity of wheat genotypes using microsatellite markers. *Periodicum Biologorum*. 114: 37–42.
- Tilman, D.; K. Cassman; P. Matson; R. Naylor; and S. Polasky (2002). Agricultural sustainability and intensive production practices. *Nature*, 418:671-677.
- Tyagi, P.; M.A. Gore; D.T. Bowman; B.T. Campbell; J.A. Udall; and V. Kuraparthi (2014). Genetic diversity and population structure in the US Upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Theor. Appl. Genet.* 127: 283–295. doi: 10.1007/s00122-013-2217-3.
- Van Esbroeck, G.; and D.T. Bowman (1998). Cotton germplasm diversity and its importance to cultivar development. *J. Cotton Sci.* 2: 121–129.
- Volk H., Piskernik S., KurinČIČ M., Klančnik A., Toplak N., Jeršek B., 2014- Evaluation of different methods for DNA extraction from milk, *Journal of food and nutrition research*, 53(2), 97-104.
- Wei, Y.; Y. Hou; Z. Yan; W. Wu; Z. Zhang; D. Liu; and Y. Zheng (2005). Microsatellite DNA polymorphism divergence in Chinese wheat (*Triticum aestivum* L.) landraces highly resistant to *Fusarium* head blight. *J. Appl. Genet.* 46(1): 3-9.
- Yildirim, A.; O.A. Sonmezoglu; S. Gokhen; N. Kandemir; and N. Aydin (2011). Determination of genetic diversity among Turkish durum wheat landraces by microsatellites. *African Journal of Biotechnology*. 10: 3915-3920.
- Zeng, L.H.; W.R. Meredith; O.A. Gutierrez; and D.L. Boykin (2009). Identification of associations between SSR markers and fiber traits in an exotic germplasm derived from multiple crosses among *Gossypium tetraploid* species. *Theor. Appl. Genet.* 119: 93–103. doi: 10.1007/s00122-009-1020-7.

## Genetic Diversity of Some Wheat (*Triticum durum*) Genotypes Using SSR Technique

Reham Abo Al-Kanj<sup>\*(1)</sup> Ghinwa Lababidi<sup>(1)</sup> and Naim Al-Husien<sup>(2)</sup>

(1). Department of Biotechnology, Faculty of Technical Engineering, University of Aleppo, Aleppo, Syria.

(2). Aleppo Research Center, General Commission of Scientific Agricultural Research Center (GCSAR), Damascus, Syria.

(\*Corresponding author: Reham Abo Al-Kang. E-Mail: perfume-1990@hotmail.com).

Received: 02/05/2018

Accepted: 01/10/2018

### Abstract

The understanding of wheat genetic variation is considered the basis for successful plant breeding programs. The use of molecular markers in genetic diversity assessment studies and in plant breeding programs has become critical. Therefore, the research aimed to studying the genetic diversity of durum wheat genotypes, it was carried out at the Biotechnology Laboratory of the Aleppo Research Center during 2016 – 2017. The DNA was extracted from all genotypes by using CTAB method, and determined its quality, purity, and quantity. SSR technology is used to study the genetic diversity with 13 primers and the dendrogram was drawn using UPGMA method according to Jaccard coefficient. The results showed there were 160 bands ranged between 100-2000 bp. PIC value was between 0.14-0.37, So the wms70, wms666, wms642, wms408 primers showed the best results. Cluster analysis showed that genotypes distributed in two main clusters. The similarity ranging from 0.21 - 0.9. This confirms the efficacy of SSR markers in detecting a wide range of genetic variation and its ability to identify genotypes.

**Keywords:** Durum wheat, Genetic diversity, Molecular markers, SSR.