

تحديد درجة القرابة الوراثية لسلاسل وأصناف من القمح القاسي السوري (*Triticum turgidum var durum L.*) باستخدام تقنية (ISSR)

آلاء الشعال¹ وخزامة القنطار¹ ورحاب الموسى^{1*} وشهيناز عباس¹



1 إدارة المخابر والجودة، قسم التقانات الحيوية، الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية، سورية.

(*للمراسلة: د. رحاب الموسى، bebo_moussa13@yahoo.com).

تاريخ القبول: 2025 / 12/14

تاريخ الاستلام: 2025 / 04 / 27

الملخص

نفذ هذا البحث في مخابر الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية دمشق/ سورية، حيث تمت دراسة 81 طرازاً وراثياً من القمح القاسي (13 صنفاً معتمداً و68 سلالة) بهدف تحديد درجة القرابة الوراثية فيما بينها، وذلك باستعمال 12 بادئة من بادئات التكرارات المترادفة البسيطة الداخلية ISSR، أعطت جميعها تعددية شكلية بين الأصناف والسلاسل المدروسة. نجم عن استخدامها ما مجموعه 96 حزمة بمتوسط 8 حزمة/بادئة وبلغ متوسط النسبة المئوية للتعددية الشكلية 96.26%. تراوح عدد الحزم الناتجة لكل بادئة من 4 حزم كأقل عدد مع البادئتين ISSR14 و ISSR6 إلى 18 حزمة كأعلى عدد مع البادئة ISSR7، بمتوسط عام 7.7 حزمة لكل بادئة. كما بلغ متوسط معامل التعددية الشكلية 0.337 PIC . سجلت أدنى قيمة لـ PDV (0.1111) بين السلالتين $Dw71$ و $DW77$ ، وتدل هذه القيمة المنخفضة للتباين الوراثي على درجة كبيرة من القرابة الوراثية، بينما كانت أعلى قيمة لـ PDV 0.9722 بين السلالة $DW74$ والصنف $Bouhoth7$ و 0.9688 بين السلالة $DW1$ وكل من الصنفين $Cham7$ و $Bouhoth5$ ، ما يدل على وجود تباين وراثي كبير بينها. بينت شجرة القرابة الوراثية تفرد السلالة $DW81$ في مجموعة لوحدها بينما تدرجت باقي الأصناف والسلاسل المدروسة في المجموعة الثانية بدرجات متفاوتة من القرابة. وتشير نتائجنا إلى إمكانية استخدام تقنية ISSR كأدوات مهمة لتوصيف الطرز الوراثية من القمح كما توفر معلومات مهمة تساعد المربين على اختيار الأنواع المناسبة في برامج تربية النبات.

الكلمات المفتاحية: أصناف معتمدة وسلاسل مبشرة، القمح القاسي، القرابة الوراثية، تقنية ISSR.

المقدمة:

تُعدُّ محاصيل الحبوب النجيلية Cereals الأهمّ زراعياً على مستوى العالم، وتؤمن 70% من غذاء سكان العالم، ويحتل القمح Wheat المرتبة الأولى بين تلك المحاصيل من حيث الأهمية (Lookhart and Bean, 2000; Kazemi, 2009) إذ يُزرع ويُستهلك كغذاءٍ أساسي في العديد من دول العالم، ويؤمن هذا المحصول ما يُعادل 22% من الطاقة و19% من البروتين اللازم لبناء جسم الإنسان في الدول النامية، ونحو 40 - 60% من الطاقة اليومية في دول غرب آسيا وشمال أفريقيا (CIMMYT, 2009؛ صالح، 2012).

يحتل القمح من حيث الإنتاج العالمي المرتبة الثانية في قائمة محاصيل الحبوب بعد الذرة الصفراء (Zea mays L). وتتصدر الصين قائمة الدول المنتجة عالمياً للقمح بالرغم من أنها تمتلك 15% من أصل المساحة المزروعة، إلا أنها تنتج ما يُقارب 20% من الإنتاج العالمي، حيث يصل إنتاجها إلى نحو 125 مليون طنناً سنوياً (International Grain Council, 2020).

يُعد القمح المحصول الأهم في سورية من حيث القيمة الاقتصادية والمساحة المزروعة، حيث تنتشر زراعة القمح في كل المحافظات السورية، وتتركز زراعته في المناطق الشرقية والشمالية الشرقية، حيث تحتل محافظة الحسكة المرتبة الأولى من حيث المساحة المزروعة، تليها محافظة الرقة. (المجموعة الإحصائية الزراعية، 2019).

في عام 2020 بلغت المساحة المزروعة بمحصول القمح (القاسي والطرقي) في القطر العربي السوري قرابة 1350538 هكتار، والإنتاج 2848472 طنناً، والإنتاجية 2019 كغ. هكتار⁻¹. احتل القمح القاسي من المساحة المزروعة ما يعادل 744123 هكتاراً، وبلغ الإنتاج 1672849 طنناً، والإنتاجية 2248 كغ. هكتار⁻¹ (المجموعة الإحصائية الزراعية، 2021)

تباطأت في الآونة الأخيرة وتيرة التحسين الوراثي في غلّة محصول القمح الحبية بشكلٍ ملحوظ بسبب غياب المادة الوراثية المناسبة وطرائق التربية السليمة (Jia et al., 2013). ومن المعروف أنّ صفة الغلّة الحبية هي صفة كمية معقدة Complex quantitative trait يتحكم بها عدد كبير من المورثات، وذات قابلية توريث منخفضة Low heritability، وتتأثر بشكلٍ معنوي بالعوامل البيئية، الأمر الذي يجعل مسألة التحسين من القضايا الصعبة جداً في برامج التربية التقليدية (Deng et al., 2000; Koebner and Snape, 1999)، ورغم أهمية الصفات الشكلية والخصائص الفيزيولوجية، إلا أنّ الحاجة للمؤشرات الجزيئية أصبحت أكثر أهمية وإلحاحاً، إذ ساهم استخدام التقانات الحيوية والهندسة الوراثية في رسم الخرائط الوراثية، وتحديد مواقع المورثات المسؤولة عن بعض الصفات المهمة من خلال تطبيق تقنيات AFLP، RT-PCR، ISSR، SSR، SRAP، SCAR، RADP (Karlik and Tombuloglu, 2016)

تعد تقنية التكرارات المترادفة البسيطة الداخلية (ISSR) والتي طبقت من قبل (Zietkiewicz et al., 1994) واحدة من التقنيات المهمة المعتمدة على تفاعل البلمرة المتسلسل إذ أنها تضخم منطقة التكرارات المترادفة البسيطة وتستخدم بادئة وحيدة مؤلفة من نكليوتيدات متكررة ومحاطة في بعض الأحيان بـ 2-4 نكليوتيدات إما في النهاية '3' أو '5'، كما توصف تقنية ISSR بأنها أكثر تكرارية من تقنية RAPD بسبب طول البادئ المستخدمة والذي يعكس درجة حرارة عالية لمرحلة تشفع البادئات (Bornet and Branchard, 2001; Chowdhury et al., 2002)، وإمكانية الكشف عن التتاليات النكليوتيدية ذات السيادة في التوريث، بالإضافة لوفرتها وتواجدها في مجينات حقيقيات النوى النباتية ولا تحتاج إلى معلومات عن التسلسل المجهني المدروس (Tautz and Renz, 1984; Kijas et al., 1995)، كما أن نتائجها ثابتة عند تكرارها وهي سريعة كما أنها تتطلب كمية قليلة من DNA،

ويمكن أتمتها automation ويمكن نشر البادئات وتبادلها بسهولة بين المخابر بمجرد معرفة التسلسل النيكلوتيدي لها. وتكشف نسب عالية من التعددية الشكلية polymorphism وبِنفس مقدرة تقنية SSR (Zietkiewicz et al., 1994). وفي دراسة لتحليل التنوع الوراثي بين 49 نوعاً من القمح في سورية (37 نوعاً من القمح القاسي و 12 نوعاً من القمح الطري) باستخدام 32 بادئ SSR تمثل 34 موقعاً وراثياً تغطي تقريباً كامل جينوم القمح. بلغ متوسط التعددية الشكلية 0.57 للقمح القاسي و 0.65 للقمح الطري. وكان الارتباط بين PIC وعدد الاليلات أكبر في القمح الرباعي (0.8) منه في القمح السداسي (0.5). قسم التحليل العنقودي الأنواع المدروسة إلى مجموعتين منفصلتين تعكسان اختلافات التنوع الوراثي داخل كل مجموعة (Achter et al., 2010).

كما قام (جيرودية وزملاؤه، 2015) بإجراء دراسة جزيئية لبعض الأصناف السورية من القمح الطري باستخدام 9 بادئات RAPD حيث أعطت البادئات 259 حزمة بمتوسط 28.8 حزمة/بادئ. وتم تحديد 89 حزمة فريدة موجبة و 5 حزم فريدة سالبة من 5 بادئات ميزت 3 أصناف هي بلدية حمراء وشام4 وبريجي، وكان الصنف بلدية حمراء أكثر الأصناف تحديداً بالحزم الموجبة (18 حزمة) تلاه الصنف فلورنس أورو(15 حزمة) بينما كان الصنف شام 4 أكثر الأصناف تحديداً بالحزم السالبة (3 حزم). وأظهر التحليل العنقودي توزيع الأصناف في فرعين حسب توزيعها البيئي.

درس (Zamanianfard et al., 2015) التنوع الوراثي لـ 25 طراز وراثي من القمح القاسي متضمنة 22 سلالة تربية، 3 سلالات محلية باستعمال تقنية ISSR، أعطت البادئات المستخدمة 83 حزمة، وكانت النسبة المئوية للتعددية الشكلية 77%، بمعدل 7.54 لكل بادئ، بلغ متوسط معامل التعددية الشكلية (PIC) 0.31 مما يشير إلى كفاءة التمييز بين المجاميع، أوضح التحليل العنقودي المعتمد على UPGMA انفصال الطرز الـ 25 في 4 مجموعات.

قيّم (Razmjoo et al., 2015) التنوع الوراثي بين 25 طرازاً وراثياً من القمح القاسي (22 منها سلالات ناتج برامج تربية، و2 من الأصناف المحلية، وصنف محسن جديد) ، حيث استخدمت 10 بادئات ISSR سجلت مامجموعه 70 حزمة، بلغ معامل التعددية الشكلية (PIC) 0.41، وقد أظهر التحليل العنقودي انفصال الطرز المدروسة في خمس مجموعات رئيسية، وأظهرت النتائج أن معاملات ISSR يمكن استعمالها بكفاءة مرتفعة لتقييم التباين الوراثي في المادة الوراثية للقمح القاسي.

أظهرت دراسة لـ (Etminan et al., 2017) على 43 سلالة من القمح القاسي منها 25 سلالة مزروعة و 18 سلالة برية، باستخدام 15 بادئة من ISSR، وجود 155 حزمة، و 149 حزمة منها متعددة شكلياً، بمتوسط 10.3 حزمة لكل بادئة، وأظهرت النتائج وجود تعددية شكلية كبيرة بين طرز القمح القاسي بمتوسط 96.13%، بينما بلغ متوسط معامل التعددية الشكلية (PIC) 0.41.

وفي بحث أجراه (Alshehri et al., 2020) لدراسة التحليل الوراثي لـ 40 مدخل من القمح استخدم بادئتين ISSR و 5 بادئات SSR و 12 بادئة SCoT، أعطت البادئة ISSR-14 8 حزم منها 3 متباينة شكلياً وبمعامل تعددية شكلية PIC قدره 0.621، في حين أن البادئة ISSR-15 أعطت 9 حزم منها 6 حزم متباينة شكلياً وبمعامل تعددية شكلية (PIC) قدره 0.87.

كما درس (Kumar et al., 2020) التنوع الوراثي لـ 20 طراز وراثي من القمح القاسي باستعمال تقنية ISSR، أعطت البادئات الـ 25 المستخدمة 89 حزمة، بلغ متوسط معامل التعددية الشكلية (PIC) 0.357 مما يشير إلى كفاءة التمييز بين المجاميع، أوضح التحليل العنقودي المعتمد على UPGMA انفصال الأصناف الـ 20 في مجموعتين.

ولتقدير التنوع الوراثي لـ 69 طرازاً وراثياً من القمح القاسي باستخدام تقانة الـ ISSR بين (Aslan-Parviz et al., 2020)، أن استخدام 16 بادئ ISSR، أعطى 162 حزمة منها 160 حزمة متباينة بتعددية شكلية 98% بمتوسط 10 حزمة لكل بادئ، وأعطى

البادئ ISSR14 أكبر عدد للحزم وهو 15 حزمة بينما أعطى البادئ ISSR12 أقل عدد للحزم وهو 7 حزم. وتراوحت التعددية الشكلية بين 92% و100%. تراوحت قيم معامل التعددية الشكلية (PIC) بين 0.35 و0.46 بمتوسط 0.42 مما يشير إلى كفاءة التمييز بين المجاميع.

في دراسة أجريت لتوصيف 12 صنف من القمح الطري المصري باستخدام 9 بادئات ISSR، تراوحت نسبة التعددية الشكلية من 20-100% بمتوسط 75.12%. تم إنتاج 10 حزم فريدة باستخدام 4 بادئات هي HB, HB08, HB10, 812 حيث كانت هذه البادئات الأعلى والأكثر نجاحاً في إثبات هوية الطرز الجينية حيث أنتجت (3 و 2 و 3 و 2 حزمة فريدة على التوالي) يمكن استخدامها كواسمات للتمييز بين الأصناف. أظهرت شجرة القرابة الوراثية أن بادئات ISSR أداة فعالة في التمييز بين الأصناف المدروسة (Fouad et al., 2024).

إن تكوين قاعدة بيانات للمادة النباتية (من القمح) المتوفرة لدى الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية تتيح لنا تحديد درجة القرابة الوراثية بين السلالات والأصناف المدروسة وبالتالي تساهم في تحديد الخيارات الأمثل لعمليات التهجين بين تلك السلالات والأصناف للحصول على هجن تحمل الصفات المرغوبة مما يسرع من عملية التحسين الوراثي، لذلك هدف هذا البحث إلى تحديد درجة القرابة الوراثية بين سلالات وأصناف من القمح القاسي باستخدام تقنية ISSR.

مواد البحث وطرقه :

مكان تنفيذ البحث:

نُفذ هذا البحث في مخبر التقانات الحيوية-الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية، خلال الفترة 2021/2023.

المادة النباتية:

أجريت الدراسة على 81 طراز وراثي من القمح القاسي تتضمن 13 صنف معتمد (Bouhoth9, Bouhoth7, Bouhoth5, Bouhoth11, Douma1, Douma3, Cham1, Cham3, Cham5, Cham7, Cham9, ACSAD65, Hourani) و 68 سلالة من القمح القاسي (Durum Wheat (DW) (DW1.....48, DW55, DW62.....71, DW73.....81) تم الحصول عليها من إدارة بحوث المحاصيل/الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية.

استخلاص الحمض النووي:

تم عزل الحمض النووي (DNA) من الأوراق النباتية الفتية الطازجة بطريقة CTAB وفقاً لما أشار إليه (Murray and Thompson, 1980)، بعد طحنها بوجود الأزوت السائل طحناً ناعماً. واستخدم محلول الاستخلاص الحاوي على المكونات التالية: 2-1% (w/v) CTAB, 50mM Tris-HCl (pH8), 1.4M NaCl, 10 mM EDTA (pH8), وحمض ثنائي-ميركابتوإيثانول (mercaptoethanol (v/v))، وحفظت العينات على درجة حرارة -20°م لحين الاستخدام.

استخلاص الحمض النووي DNA وتقدير كميته ونوعيته :

استخلص الحمض النووي DNA من الأوراق الفتية وقيس تركيزه ونقاوته بجهاز المطياف الضوئي. وتراوحت التراكيز بين 0.263 و0.450 µg / µl وكانت نقاوة العينات بين 1.85-1.96، ومدد تركيز الحمض النووي DNA ليصبح 40 ng/µl، وطبقت عملية الرحلان الكهربائي على هلام الأغاروز بتركيز 0.8% لمعرفة نوعية الحمض النووي DNA المستخدم إذ يظهر الحمض النووي DNA ذو النوعية الجيدة على شكل حزمة Band من أجل استخدامها في تقنية ISSR.

تطبيق تقنية التكررات المترادفة الداخلية البسيطة ISSR

أجري اختبار 12 بادئة من بادئات ISSR تم الحصول عليها من شركة Genomics eurofins.

كما استخدم 2 X PCR Master Mix والذي تم الحصول عليه من شركة (eurofins Genomics) الحاوي على المكونات التالية: Taq-Polymerase, dNTPs, MgCl₂, Buffer. ويوضح الجدول رقم (1) التسلسل النيكلوتيدي للبادئات المستخدمة في الدراسة.

الجدول (1): التسلسل النيكلوتيدي للبادئات المستخدمة في تقنية ISSR ودرجة حرارة الالتحام.

رقم المخبر	البادئة	التسلسل النيكلوتيدي '3-'5'	درجة حرارة الالتحام °C
ISSR1	4	CACACACACACACAAC	48
ISSR2	A830241	ACTGACTGACTGACTG	42-46
ISSR3	813	CTCTCTCTCTCTCTT	49-51
ISSR4	807	AGAGAGAGAGAGAGT	50-52
ISSR5	8565	GTCACCACCACCACCACCAC	64-66
ISSR6	866	CTCCTCCTCCTCCTC	53
ISSR7	W814	CTCTCTCTCTCTCTTG	44-46
ISSR9	862	AGCAGCAGCAGCAGCAGC	53
ISSR10	17899B	CACACACACACAGG	44-47
ISSR11	231	GAGTCTCTCTCTCTCTC	51
ISSR12	8082	CTCTCTCTCTCTCTCTG	50-52
ISSR14	17	CAGCACACACACACACAC	51-53

أجري تفاعل PCR وفقاً لـ (Williams *et al.*, 1990) وكان حجم التفاعل النهائي (25 µl) ، ويظهر الجدول رقم (2) مكونات هذا التفاعل:

الجدول (2): مكونات تفاعل الـ PCR

مكونات الـ PCR	الكميات
2X master Mix	12.5
DNA(40 ng/µl)	2 µl
Primer (10pmol/µl)	2 µl
H2O	حتى الوصول إلى 25 µl

وتم هذا التفاعل في جهاز التدوير الحراري من شركة (Technet- 512, UK) موديل ATC401 وفقاً للظروف التالية:

- ❖ الانفصال: عند درجة حرارة 94°م لمدة دقيقة واحدة ليتم انفصال سلسلتي الـ DNA.
- ❖ 40 دورة تتضمن كل منها المراحل التالية:
 1. الانفصال: يتم عند حرارة 94°م لمدة 30 ثانية.
 2. التلاحم حسب درجة حرارة البادئات الموجودة في الجدول (1) وذلك لمدة دقيقة واحدة.
 3. الاستطالة: عند حرارة 72°م لمدة دقيقة واحدة.
- ❖ اكتمال التفاعل: عند حرارة 72°م مدة عشر دقائق.
- ❖ ثم حفظت العينات في درجة حرارة 4°م لتفصل الحزم بعدها بالرحلان الكهربائي على هلام الأجاروز

الرحلان الكهربائي والتلوين والتصوير:

لفصل قطع الحمض النووي DNA الناتجة عن التضخيم تم تحميل نواتج PCR على هلام الأجاروز 2%، والمضاف إليها 5 ميكرو ليتر من صبغة Red gel.

كما تم حقن مؤشر من الدنا Kpb1 من شركة (Fermentas, Germany)، وذلك لتحديد أطوال الحزم الناتجة وتم الترحيل بمرور حقل كهربائي قدره 100 فولط لفصل حزم الدنا الناتجة عن التضخيم، وصورت الهلامية بوجود الأشعة فوق البنفسجية UV-light بجهاز تصوير هلامية الأغاروز (Image Analyzer (Agle Eye II Stratagene) (Sameh, 2012).

التحليل الإحصائي:

تم تحديد حجم حزم DNA الناتجة عن التضخيم باستخدام برنامج (TotalLab 1D version 14.1) ثم تم تقدير عدد الحزم (الكلية، المتباينة، المتشابهة)، وتحويل المعطيات إلى النظام الثنائي (1 للحزمة الموجودة و0 للحزمة الغائبة). وتم حساب مصفوفة عدم التوافق الوراثي اعتماداً على معامل Jaccard واستخدمت هذه المصفوفة لإجراء التحليل العنقودي بطريقة Unweighted Pair Group Method of Arithmetic Means (UPGMA) ورسمت شجرة القرابة الوراثية باستعمال برنامج XLSTAT. كما تم حساب النسبة المئوية للتعددية الشكلية، وحُسبت قيم معامل التعددية الشكلية Polymorphism Information Content (PIC) للبادئات المستعملة وفق المعادلة:

$$PIC = 1 - \sum (P_{ij})^2$$

حيث P_{ij} تكرارية i^{th} الناتجة عن استخدام البادئة j^{th} من جميع العينات المدروسة (Botstein *et al.*, 1980);

النتائج والمناقشة:

التعددية الشكلية polymorphism الناتجة عن تطبيق تقنية ISSR.

طبقت تقنية ISSR للتمييز بين الأصناف والسلالات المدروسة حيث استخدمت 12 بادئة من بادئات ISSR أعطت جميعها نواتج تضخيم (الجدول، 3)، ونجم عن استخدام هذه البادئات ما مجموعه 96 حزمة بمعدل 8 حزم/بادئة. وأعطت البادئة (ISSR7) أعلى عدد من الحزم (18 حزمة) ما يدل على أن هذه البادئة ذات دلالة أكبر للتنوع الوراثي مقارنة مع البادئتين ISSR6 و ISSR14 اللتان أعطتا أقل عدد من الحزم (4 حزم).

بلغ عدد الحزم ذات التعددية الشكلية Polymorphic 92 حزمة بمتوسط 7.7 حزمة متباينة شكلياً/بادئة، حيث سجل أعلى عدد للحزم المتباينة شكلياً (17 حزمة) مع البادئة ISSR7 في حين أعطت البادئة ISSR14 أقل عدد من الحزم المتباينة شكلياً (3 حزم).

بلغ متوسط النسبة المئوية للتعددية الشكلية 96.26%، مما يدل على فعالية تقنية ISSR في كشف التباينات الشكلية بين الأصناف والسلالات المدروسة. حيث أعطت 9 بادئات (ISSR1، ISSR2، ISSR3، ISSR4، ISSR5، ISSR6، ISSR9، ISSR11، ISSR12) النسبة المئوية الأعلى للتعددية الشكلية والتي بلغت 100% في حين بلغت النسبة المئوية الأقل للتعددية الشكلية 75% مع البادئة (ISSR14). وقد توافقت النتائج التي تم الحصول عليها مع نتائج كل من (Aslan-Parviz *et al.*, 2020; Etminan *et al.*, 2017) الذين حصلوا على نسبة تعددية شكلية عالية (98 و 96.13% على التوالي)، بينما تخالفت مع (Saleh *et al.*, 2016; El-Aref *et al.*, 2017) الذين حصلوا على نسبة تعددية شكلية متوسطة (64.95 و 62.9% على التوالي).

كما يلاحظ من الجدول (3) أن كل من البادئات ISSR7، ISSR10، ISSR14 تمكنت من تضخيم حزمة فريدة في السلالات DW81، DW3، DW66 على التوالي، مما يشير لإمكانية استخدام هذه الاليلات كواسمات لتمييز السلالات المذكورة. إضافة لإمكانية الاستفادة من هذه الحزم الفريدة وتحديد الصفات المرتبطة بها واستثمار ذلك في برامج التربية كونها حزم مميزة للسلالة.

يظهر الجدول رقم (3) أن قيمة معامل التعددية الشكلية PIC وفقاً لـ (Botstein *et al.*, 1980) تراوحت بين 0.130 مع البادئة ISSR14 و 0.481 مع البادئة ISSR3 بمتوسط قدره 0.337. تزودنا قيمة معامل التعددية الشكلية PIC لموقع وراثي ما على الجينوم بقدرته على التمييز بين العينات المدروسة وبمعنى آخر تعبر قيمة PIC عن احتمال أن تمتلك العينتان المحسوبتان عشوائياً موقعين مختلفين لذات الموقع الوراثي (Botstein *et al.*, 1980).

توافقت النتائج التي تم الحصول عليها مع (Heidari *et al.*, 2017; Zamanianfard *et al.*, 2015) حيث بلغ متوسط معامل التعددية الشكلية 0.31 و 0.35 على التوالي، في حين تخالفت مع (Alshehri *et al.*, 2020; El-Aref *et al.*, 2016) حيث بلغ متوسط معامل التعددية الشكلية 0.75 و 0.11 على التوالي .

الجدول (3): البادئات المستخدمة، عدد الحزم الكلية والفريدة والمتباينة شكلياً، النسبة المئوية للتعددية الشكلية ومعامل التعددية الشكلية في تقنية ISSR.

البادئات	عدد الحزم الكلية	عدد الحزم الفريدة	عدد الحزم المتباينة شكلياً	النسبة المئوية للتعددية الشكلية	معامل التعددية الشكلية pic
ISSR1	5	0	5	100	0.461
ISSR2	11	0	11	100	0.472
ISSR3	6	0	6	100	0.481
ISSR4	12	0	12	100	0.360
ISSR5	6	0	6	100	0.302
ISSR6	4	0	4	100	0.279
ISSR7	18	1	17	94.44	0.249
ISSR9	6	0	6	100	0.418
ISSR10	14	1	12	85.71	0.329
ISSR11	5	0	5	100	0.310
ISSR12	5	0	5	100	0.257
ISSR14	4	1	3	75	0.130
المجموع	96	3	92		
المتوسط	8.0	0.3	7.7	96.26	0.337

تحديد درجة القرابة الوراثية بين الطرز الوراثية المدروسة

يُفيد تحديد درجة القرابة الوراثية بين الأصناف في برامج تربية النبات، في تأمين قاعدة وراثية كبيرة. وتمت دراسة العلاقة الوراثية بين الأصناف والسلالات المدروسة بتطبيق مصفوفة النسب المئوية لعدم التوافق Percent Disagreement Values (PDV) ويدل ارتفاع قيم هذه المصفوفة على وجود اختلاف وراثي وبازديادها يزداد التباين الوراثي بين الأصناف المدروسة ويتم إنشاء هذه المصفوفة وفقاً لعدد وحدات التضاعف المشتركة.

بينت النتائج أن أقل قيمة لـ PDV هي 0.111 بين السلالتين DW71 و DW77 و 0.119 بين السلالتين DW3 و DW5 بينما كانت أعلى قيمة لها 0.9722 بين السلالة DW74 والصنف Bouhoth7 و 0.9688 بين السلالة DW1 وكل من الصنفين Cham7 و Bouhoth5 مما يدل على وجود تباين وراثي كبير بينها. في حين أشار (Zamanianfard *et al.*, 2015) إلى أن

مستوى التشابه الوراثي بين الأنماط المدروسة من القمح تراوح بين 0.4-0.92 مظهراً مستويات عالية نسبياً من التعددية بين الأنماط المدروسة.

التحليل العنقودي (Cluster Analysis) للطرز المدروسة الناتج عن استخدام تقنية ISSR:

يسمح التحليل العنقودي بتقسيم الطرز المدروسة إلى مجموعات وتعكس هذه المجموعات درجة القرابة الوراثية فيما بينها. أجري التحليل العنقودي للنتائج التي تم الحصول عليها وذلك لإنشاء شجرة القرابة الوراثية Dendrogram وتحديد درجة القرابة الوراثية بين الأصناف والسلالات المدروسة من القمح القاسي من أجل الحصول على قاعدة وراثية كبيرة.

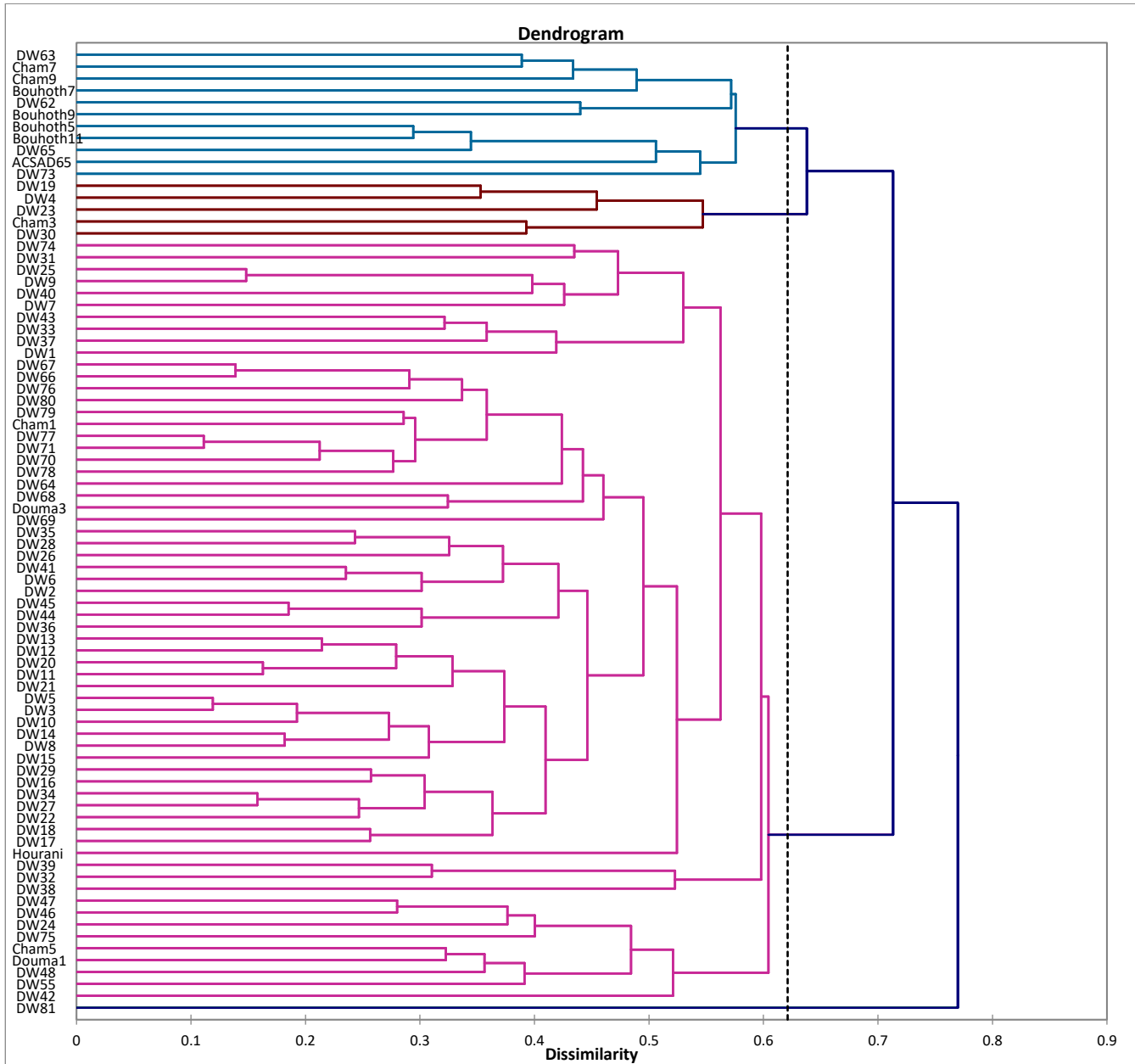
تظهر شجرة القرابة الوراثية لفرقة السلالة DW81 في مجموعة لوحدها عند تباعد قدره 0.769 ، بينما انقسمت المجموعة الثانية إلى تحت مجموعتين عند تباعد قدره 0.713؛ حيث انقسمت تحت المجموعة الأولى بدورها لتحت تحت مجموعتين عند تباعد قدره 0.637، ضمت تحت تحت المجموعة الأولى السلالات (DW62, Dw63, Dw65, Dw73) والأصناف (Cham7, Cham9,)، بينما ضمت تحت تحت المجموعة الثانية السلالات (Bouhoth5, Bouhoth7, Bouhoth9, Bouhoth11, ACSAD65) ، أما تحت المجموعة الثانية فقد ضمت باقي السلالات والأصناف Cham3 والصنف (DW4, DW19, Dw23, DW30). حيث تشير هذه النتائج لفاعلية تقنية ISSR في التمييز بين السلالات والأصناف المدروسة، حيث قدمت معلومات أكثر تفصيلاً وتنوعاً حول التباين الوراثي للأنماط الجينية للقمح السوري.

وهذا ما يتشابه مع دراسات أخرى سابقة حيث أشار (Fouad et al., 2024) إلى أن شجرة القرابة الوراثية كشفت بأن بادئات ISSR كانت أداة ناجحة في التمييز بين 12 نمطاً وراثياً لقمح الخبز نظراً لخلقيتها الوراثية. وقد نجحت بادئات ISSR في تمييز الأصناف المدروسة تبعاً لمستوى الصيغة الصبغية وموقعها حيث اجتمعت الأصناف رباعية الصيغة الصبغية في مجموعة والسادسية في مجموعة (El-Aref et al., 2016). كما درس (Carvalho et al., 2008) 48 صنف من القمح البرتغالي القديم وأشار إلى أن الأصناف المتماثلة بالمستوى الجيني شاركت نفس العنقود الأساسي.

الاستنتاجات والتوصيات:

- أظهرت تقنية ISSR تعددية شكلية Polymorphic في تفاعل التسلسل البوليميرازي بلغت نسبتها 96.26%، واستطاعت البادئات المستعملة التمييز بين السلالات والأصناف المدروسة.
- استطاعت كل من البادئات ISSR7، ISSR10، ISSR14 تضخيم حزم فريدة وبالتالي ينصح باستخدامها في الدراسات الجزيئية على نبات القمح. إضافةً لإمكانية الاستفادة من هذه الحزم الفريدة وتحديد الصفات المرتبطة بها واستثمار ذلك في برامج التربية كونها حزم مميزة للسلالة.
- استطاعت البادئة ISSR2 تضخيم 11 حزمة بتعددية شكلية 100% وبقيمة معامل تعددية شكلية 0.472 وبالتالي ينصح باستخدامه عند التوصيف الجزيئي لسلالات وأصناف القمح المختلفة.
- سجل أعلى بعد وراثي بين السلالة DW74 والصنف Bouhoth7 وبين السلالة DW1 وكل من الصنفين Cham7 و Bouhoth5 وبالتالي ينصح التهجين فيما بينها لتوسيع القاعدة الوراثية للهجن الناتجة.
- أظهر التحليل العنقودي وشجرة القرابة الوراثية أنّ السلالة DW81 تفردت في مجموعة لوحدها بينما توزعت باقي السلالات والأصناف في المجموعة الثانية بدرجات متفاوتة من القرابة.
- يمكن استخدام بادئات ISSR كأدوات مهمة لتوصيف الطرز الوراثية من القمح كما توفر معلومات مهمة تساعد المربين على اختيار الأنواع المناسبة في برامج تربية النبات.

- يمكن العمل مستقبلاً على تحديد مواقع المورثات المسؤولة عن الصفات المهمة باستخدام QTLs وعزلها.



الشكل (1): شجرة القرابة الوراثية بين الأصناف المدروسة باستخدام تقنية ISSR بحسب طريقة UPGMA.

المراجع:

- المجموعة الإحصائية الزراعية. (2021). منشورات وزارة الزراعة والإصلاح الزراعي، سورية.
- المجموعة الإحصائية الزراعية. (2019). منشورات وزارة الزراعة والإصلاح الزراعي، سورية.
- جبرودية نضال، وجهاني يوسف، الموسى فخري، رضا وفاء، مهرة أسامة. (2015). دراسة جزيئية لبعض الأصناف السورية المحلية من القمح الطري باستخدام تقنية RAPD، المجلة السورية للبحوث الزراعية، 2(1): 32-40.
- صالح، ميسون. (2012). التأقلم البيئي لبعض الأصول الوراثية من القمح المبدئي والمزروع تحت ظروف الزراعة المطرية. رسالة دكتوراه، كلية الزراعة، جامعة دمشق، 224 صفحة.

Achtar, S.; M.Y. Moualla; A. Kalhout; M.S. Roder; and N. MirAli (2010). Assessment of genetic diversity among syrian durum (*Triticum ssp. durum*) and bread wheat (*Triticum aestivum* L.) using SSR markers. Russian Journal of Genetics, 46: 1320-1326.

- Alshehri, M.A.; O. Alzahrani; A.T. Aziza; A. Alasmari; S. Ibrahim; and O. Bahattab (2020). Correlation and genetic analyses of different characteristics in Saudi Arabian wheat reveal correlation networks and several trait-associated markers. *J Anim. Plant Sci.*, 30(6): 1486–1497.
- Aslan-Parviz, M.; M. Omid; V. Rashidi; E. Etminan and A. Ahmadzadeh (2020). Evaluation of genetic diversity of durum wheat (*Triticum durum Desf.*) genotypes using Inter-Simple Sequence Repeats (ISSR) and CAAT box-derived polymorphism (CBDP) markers. *Genetika*, 52(3): 895-909.
- Bornet, B. And M. Branchard (2001). Non-anchored inter-simple sequence repeat (ISSR) markers: reproducible and specific tools for genome fingerprinting. *Plant Mol Biol Rep.*, 19:209–215.
- Botstein, D.; R.L. White; M. Skolnick; and R.W. Davis (1980). Construction of a genetic Linkage map in man using restriction fragment polymorphisms. *Am J Hum Genet.*, 32 (3) : 314- 331.
- Carvalho, A.; J. L. Brito; B. Macas; and H. G. Pinto (2008). Genetic variability analysis of a collection of Old Portuguese bread wheat using ISSRs., *Options Mediterraneennes. Ser. A, Sem. Medit.*, 81: 35-38.
- Chowdhury, M.A.; B. Vandenberg and Warkentin (2002). Cultivar identification and genetic relationship among selected breeding lines and cultivars in chickpea (*Cicer arietinum L.*). *Euphytica*, 127:317–325.
- CIMMYT International Maize and Wheat Improvement Center (2009). Drought Tolerance Wheat and Enhanced Quality Project. MTP. 66-71.
- Deng, X.P.; L. Shan; Y. Ma; and S. Inanga (2000). Diurnal oscillation in the intercellular CO₂ concentration of spring Wheat under the Semiarid Condition. *Photosynthetic*, 38: 178-192.
- El-Aref, H.; A. Taghian; B.E.D. El-Sayed; M. El-Rawy; and S. El-Sanousy (2016). Genetic Relationships Among Wheat Varieties Based on Issr Markers. *Res J App Biotech.*, 2(1): 117–126.
- Etminan, A.; A. Pour-Aboughadareh; R. Mohammadi; A. Ahmadi-Rad; Z. Moradi; Z. Mahdavian; and A. Noori (2017). Evaluation of genetic diversity in a mini core collection of Iranian durum wheat germplasms. *J Anim Plant Scie.*, 27(5): 1582–1587.
- Fouad, H.M.; H. Bakry; and H.A. Soltan (2024). Morphological and molecular characterization of some bread wheat (*Triticum aestivum L.*) genotypes. *International Journal of Agricultural Sciences*, 6(3): 155-171.
- Heidari, P.; A. Etminan; R. Azizinezhad; and M. Khosroshahli (2017). Genomic variation studies in durum wheat (*Triticum turgidum ssp. durum*) using CBDP, SCoT and ISSR markers. *Indian J. Genet.*, 77(3): 379-386.
- International Grains Council, Council Grain Market Report GMR No. (2020).
- Jia, B.F.; I. Khalil; E.G. Krenzer; and C.T. Mackown (2013). Breeding winter wheat for a dual-purpose management system. *Euphytica*, 119: 231–234.
- Karlik, E.; and H. Tombuloglu (2016). Molecular Markers and Their Applications. In (*Plant Omics: Trends and Applications*), p: 137-157.
- Kazemi Arbat H. (2009). *Especial farming, cereals (First Volume)*. Iran University Press. 318 Pages.
- Kijas, J.M.H.; J.C.S. Fowler; and M.R. Thomas (1995). An evaluation of sequence tagged microsatellite site markers for genetic analysis within Citrus and related species. *Genome*, 38:349–355.
- Koebner, R.M.D.; and J.W. Snape (1999). Wheat ecology, physiology of yield determination. In: Satorre EH, Slafer GA (Eds). *Food Products Press, New York.*, 441-460.

- Kumar, P.; V. Sharma; R. Sanger; P. Kumar; and M.K. Yadav (2020). Analysis of molecular variation among diverse background wheat (*Triticum aestivum L*) genotypes with the help of ISSR markers. International Journal of Chemical Studies, 8(3), 271–276.
- Lookhart, G.; and S. Bean (2000). Cereal Proteins: Composition for Their Major Fractions and Methods for Identification. In: Kulp K. and J. G. Ponte Jr(Eds.) Handbook of Cereal Science and Technology(2nd Edition). Marcel Dekkar Inc., New York, USA, Pp:363-383.
- Murray, M.G.; and W.F. Thompson (1980). Rapid isolation of high molecular weight DNA. Nucleic Acids Res., 8: 4321- 4325.
- Razmjoo, M.; Mohammadi and L. Shooshtari (2015). Evaluation of genetic diversity in durum wheat genotypes (*Triticum turgidum var. durum*) using ISSR markers. J Biodiv Environ Scie., 6(1): 522-529.
- Saleh, O.M.; N. Hamiedeldin; A.F. Khafaga; and R.M. Shoaib (2017). Molecular, Morphological and Anatomical Characterization for Some Egyptian Durum Wheat. Life Sci J., 14(2):91-104.,
- Sameh M., ed. Gel electrophoresis – Principles and Basics (2012). InTech 2012. Pp:366. / ISBN 978-953-51-0458-2/.
- Tautz, D.; and M. Renz (1984). Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. Nucleic Acids Research, 12:4127–4138.
- 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.
- Zamanianfard, Z.; A. Etminan; R. Mohammadi; and L. Shooshtari (2015). Evaluation of molecular diversity of durum wheat genotypes using ISSR markers. Biological Forum- An International Journal, 7(1):214-218.
- Zietkiewicz, E.; A. Rafalski; and D. Labuda (1994). Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. Genomics. 15;20(2):176-83.

Genetic Relationship among Syrian Lines and Varieties of durum wheat (*Triticum turgidum var durum* L.) using Inter Simple Sequence Repeats (ISSR) Technique

Alaa Alshaal¹, Khozama Kountar¹, Rehab Almoussa^{2*}, and Shahinaz Abbas

¹ Biotechnology Department, Laboratory and Quality Management General Commission for Agricultural Scientific Research, Syria.



(*Corresponding author: Rehab Almoussa, Email: bebo_moussa13@yahoo.com, Mobile: +963938163029)

Received: 27/04 / 2025

Accepted: 14/12/ 2025

Abstract

This research was conducted in the laboratories of the General Commission for Scientific Agricultural Research in Damascus/ Syria. Inter Simple Sequence Repeats (ISSR) technique was used to determine the genetic relationship among 81 genotypes (13 varieties and 68 lines) of durum wheat. All the 12 primers produced a total of 96 amplification bands and a polymorphic percentage of 96.26 %. The number of bands per primer varied from a minimum of 4 bands for the primers ISSR14, ISSR6 to a maximum of 18 bands for the primer ISSR7 with an average of 7.7 bands per primer. The average of polymorphic information content (PIC) was 0.337. The lowest distance (0.1111) was recorded between lines DW71 and DW77, this low value of the genetic distance indicates a great degree of genetic relationship. The largest distance (0.9722) was recorded between line DW74 and Bouhoth7, (0.9688) was recorded between line DW1 and the varieties Bouhoth5 and Cham7, indicating a far genetic relationship between them. It was noted from the genetic relationship tree that line DW81 was in a cluster by itself, while the other studied lines and varieties were fallen under the second cluster with varying degrees of genetic relationship. Our results indicate that the ISSR technique can be used as an important tool for characterization wheat genotypes, providing valuable information that helps breeders to select the most suitable varieties in plant breeding programs.

Keywords: Certificated Varieties and promising Lines, Durum wheat, Genetic relationship, ISSR technique.