التوصيف الجزيئي لبعض أنواع جنس الرغل *Atriplex* المنتشرة في سورية

باسم السمان[1] و عبد الله أبوزخم[2]
و عبد الله الطاهر[3]

الملخص

نُفِّذَ البحث في مخبر التقانات الحيوية التابع للهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية خلال الموسم 2010-2011. وقد هدف إلى دراسة التنوع الوراثي لعشرين مدخلاً نباتياً تتبع لسبعة أنواع من الرغل تنتشر في سورية وتحديد درجة القرابة الوراثية فيما بينها؛ وذلك باستخدام تقنية مابين تكراريات التسلسلات البسيطة ISSR (Inter Simple Sequence Repeats)، واستخدم لهذا الغرض 10 مرئسات. أثبتت المرئسات المستخدمة فعاليتها في إعطاء تعددية شكلية polymorphic بين الأنواع المدروسة ونجم عن استخدامها ما مجموعه 195 أليلاً (قريناً)، وبلغت نسبة هذه التعددية 100%، راوح عدد الحزم لكل مرئس بين 12 حزمة كأقل عدد مع المرئس (ISSR-4) و27 حزمة كأعلى عدد مع المرئس (ISSR-862) بمتوسط 19.5 حزمة لكل مرئس. أظهر كلٌّ من التحليل العنقودي وشجرة القرابة الوراثية أن أعلى درجة قرابة وراثية كانت بين المدخلين *A.leucoclada*1 و*A.leucoclada*2 (0.64)، في حين كانت أقل درجة قرابة وراثية بين النوعين *A.leucoclada*3 و*A.glauca*2 (0.10). دلت النتائج على التنوع الوراثي الكبير للأنواع التابعة لجنس الرغل *Atriplex* في سورية.

الكلمات المفتاحية: التوصيف الجزيئي، ISSR، الرغل، سورية.

[1] قسم الأصول الوراثية، [3] قسم التقانات الحيوية، الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية، سورية.
[2] قسم الحراج والبيئة، كلية الزراعة، جامعة دمشق، سورية.

Molecular characterization of some *Atriplex* species in Syria

B. Al-samman[(1)]; A. Abo-zakham[(2)] and A. Al-taher[(3)]

ABSTRACT

This investigation was carried out at the Laboratory of Biotechnology at General Commission for Scientific Agricultural Research (GCSAR), during the season 2010-2011. The aim of this research was to study the genetic diversity among twenty individual plants of seven species and to determine the degree of genetic similarity using the technique ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) and 10 primers were used for this purpose. All primers proved their effectiveness in showing polymorphism between the studied species, primers gave a total 195 allele with a polymorphic percentage 100%. The number of bands for each primer varied from a minimum of 12 bands for the primer (ISSR-4) to a maximum of 27 bands for the primer (ISSR-862) in an average of 19.5 bands for each primer, cluster analysis and Dendrogram showed the highest degree of genetic similarity between accession *A.leucoclada*1 and *A.leucoclada*2 (0.64), while it was low between species *A.leucoclada*3 and *A.glauca*2 (0.10). Results showed vast genetic diversity among the studied species.

Key words: Molecular characterization, ISSR, *Atriplex*, Syria.

(1)Department of Genetic Resources, (3) Department of Biotechnology, General Commission for Scientific Agricultural Research, Syria.
(2) Renewable Natural Recourses and Ecology Department, Faculty of Agriculture, Damascus University, Syria.

المقدمة

تعدُّ منطقة حوض المتوسط من أهم مراكز نشوء التنوع الحيوي (Vavelove, 1992)، وسورية غنية بالموارد الوراثية النباتية إذ تعدُّ أحد المواطن الرئيسة لكثير من الأنواع والطرز البيئية التي تأقلمت عبر القرون الماضية ضمن مختلف الظروف البيئية، ونشأت عندها صفات المقاومة أو التحمل للإجهادات الإحيائية واللاإحيائية (الشوربجي، 1988).

أدى الاستغلال المكثف والعشوائي لهذه المصادر إلى تدهور في هذه الموارد، فقد أسهم الرعي الجائر والاحتطاب للأشجار والشجيرات وفلاحة الأراضي الهامشية إلى تغيّر كبير في الغطاء النباتي (الخطة الوطنية لمكافحة التصحر، 2002)، كما لوحظ حدوث تراجع تدريجي في الأنواع الرعوية المستساغة Palatable species إلى حد الانقراض (Ghazanfar *et al.*,1995). لذا كانت الحاجة ملحة لاتخاذ الإجراءات اللازمة للحفاظ على هذه المصادر وتوصيفها وتصنيفها وإكثارها، ومن ثم البحث وتقييم التباينات الوراثية ضمنها للاستفادة منها لاحقاً في برامج التحسين الوراثي.

يُعدُّ جنس الرغل أوالقطف *Atriplex* L. أحد أهم المصادر الوراثية الرعوية في سورية، وهو من أكثر أجناس الفصيلة السرمقية *Chenopodiceae* تنوعاً، إذْ يضم ما يزيد على 250 نوعاً تنتشر في مختلف أرجاء العالم، وخاصةً المناطق الجافة وشبه الجافة (سنكري، 1983)، وإنّ معظم أنواع هذا الجنس معمرة وشجيرية ومستديمة الخضرة، ويطلق عليها اسم شجيرات الملح Salt Bushes. الأزهار غالباً منفصلة الجنس، توجد الأزهار الذكرية والأنثوية على النبات نفسه أو تنمو الأزهار الذكرية على نبات والأزهار الأنثوية على نبات آخر، الثمرة غشائية توجد داخل الغلاف الزهري الذي ينمو على شكل مصراعين (McKell, 1994)، وتكمن أهميةٍ أنواع الرغل في أنّها مصدر علفي أساسي لتغذية الحيوانات في المناطق الجافة، خاصةً في فصلي الصيف والخريف قبل نمو الأنواع العشبية (Kessler, 1990) فضلاً عن محتواها العالي من البروتين الخام والعناصر المعدنية (Mulas and Mulas, 2004) وفيتامين E (Pearce *et al*., 2005). وتستعمل هذه الأنواع لإعادة تأهيل المناطق المتدهورة (السمان، 2006)، وتصلح لاستزراع بعض مناطقِ البادية السورية نظراً إلى قدرتها على تحمل الجفاف وتخزين الأملاح في نسجها، فضلاً عن دورها في الحد من الانجرافين المائي والهوائي ووقف التصحر وحفظ التوازن البيئي (الرباط وأبوزخم، 2001).

ينتشر الرغل السوري والرغل الملحي طبيعياً في سورية (Mouterde, 1966, 1970, 1983) وقد أُدخل العديد من أنواع الرغل إلى المنطقة في مراحل زمنية مختلفة (Mulas and Mulas, 2004).

تُعدُّ طرائق توصيف الأنواع النباتية وتصنيفها اعتماداً على الصفات الشكلية والإنتاجية الأكثر قدماً، ولكنها تتأثر غالباً بالظروف البيئية السائدة وتعطي نتائج متقاربة ومتشابهة يصعب الاعتماد عليها في تمييز الاختلافات (Wjhani, 2004)، كما أنها تتطلب وقتاً وجهداً كبيرين، لذلك يجب دعم هذه الطرائق بطرائق التقانات الحيوية الحديثة (Ricciardi *et al*., 2002) في توصيف المصادر الوراثية باستخدام المؤشرات الجزيئية إذْ تتميز بكثرة عددها وثباتية نتائجها وعدم تأثرها بالظروف البيئية، ويمكن استخدامها في تحاليل التنوع الوراثي وتقدير التشابه الوراثي (Eleuch *et al*., 2008).

طوّر Saiki وزملاؤه (1985) تقنية التفاعل التسلسلي البوليميرازي (Polymerase Chain Reaction-PCR)، وقد كان لها أثر مهم في صعيد الدراسات الوراثية الجزيئية، كما ساعدت على سرعة غربلة العديد من المجموعات الانعزالية وكفاءتها، وقد ساعد تصنيع أجهزة التدوير الحراري التلقائية Automated Thermo Cycler واكتشاف أنزيم البوليميراز DNA Polymerase على تطوير تفاعل PCR وعلى ظهور تقنيات أخرى تعتمد عليه وتستخدم في إجراء التحاليل الوراثية وإنشاء خرائط الارتباط الوراثية (Saiki *et al*., 1988; Rafalski *et al*.,1996). تُعدُّ تقنية مابين تكراريات التسلسلات البسيطة (Inter Simple Sequence Repeats-ISSR) واحدة من التقنيات المهمة إذْ طبقت من قبل (Ziekiewicz *et al*., 1994)، وهي تعتمد على تفاعل الـ PCR وتنتج مؤشرات جزيئية مثالية للأسباب الآتية:

1- تُضخّم منطقة مابين تكراريات التسلسلات البسيطة ويُستخدم مرئس وحيد مكون من نيكليوتيدات (Nucleotides) مطابقة في تسلسلها لإحدى تكراريات التسلسلات البسيطة ومحاط في بعض الأحيان بـ 1-4 نيكليوتيدات إما في النهاية '3 أوفي النهاية '5 ، إذ تعدُّ تقنية ISSR أكثر تكرارية (نتائجها ثابتة عند تكرارها) مقارنةً بتقنية التعدد الشكلي لقطع الحمض النووي DNA المضخمة عشوائياً RAPD بسبب طول المرئس المستخدم الذي يعكس درجة حرارة عالية لمرحلة تشفع المرئسات (Chowdhury *et al*., 2002).
2- إمكانية الكشف عن التتاليات النيكليوتيدية ذات السيادة في التوريث، ووفرتها ووجودها في مجينات حقيقيات النوى النباتية، وعدم حاجتها إلى معلومات عن التسلسل المجيني المدروس (Kijas *et al*.,1995).
3- إنها سريعة وتتطلب كمية قليلة من الحمض النووي DNA.
4- إمكانية أتمتته Automation، إذْ يمكن نشر المرئسات وتبادلها بسهولة بين المخابر بمجرد معرفة التسلسل النيكليوتيدي لها.
5- قادرة على كشف نسب عالية من التعددية الشكلية polymorphism وبمقدرة تقنية تكراريات التسلسلات البسيطة SSR نفسها، كما استخدمت هذه التقنية لدراسة التنوع الوراثي في البطاطا (Bornet *et al*., 2002) والشعير (Ferández *et al*., 2002) والقمح (Nagaoka and Ogihara, 1997) والفصة (طربين، 2010).

تتميّز أنواع الرغل المنتشرة في مناطق حوض المتوسط بتنوعها الوراثي وعدم تفاوتها Heterozygosity، ونظراً إلى نقص البيانات عن تحليل التباين بين أنواع الرغل (Bouda *et al.*, 2008)، وعدم وجود أي دراسة جزيئية سابقة لأنواع الرغل المنتشرة في سورية، فإننا بحاجة ماسة لدراسة التباين الوراثي لها.

أهداف البحث:

- التوصيف الجزيئي لبعض الأنواع النباتية العائدة لجنس الرغل *Atriplex* spp. المنتشرة (الطبيعية والمدخلة التي تأقلمت مع الظروف المحلية) في الجمهورية العربية السورية باستخدام تقنية ISSR.
- تحديد درجة القرابة الوراثية بينها اعتماداً على المعطيات المأخوذة من التحليل باستخدام مؤشرات ISSR.

مواد البحث وطرائقه

أولاً- المادة النباتية:

جمعت المادة الوراثية خلال عدة جولات تم القيام بها على مختلف محافظات القطر السوري كما استعين بعدد من المدخلات جرى تبادلها مع المركز الدولي لدراسات المناطق الجافة (ايكاردا)، وقد اختير 20 مدخلاً موضحاً في الجدول (1).

الجدول (1) المدخلات المدروسة ومصدرها ورمزها.

التسلسل	الاسم العربي	الاسم العلمي	المصدر والمنشأ	رمز العينة
1	رغل ملحي	*A.halimus*	حماه-وادي العزيب	*A.halimus*1
2	رغل ملحي	*A.halimus*	اللاذقية-الكورنيش الجنوبي	*A.halimus*2
3	رغل ملحي	*A.halimus*	درعا-وادي اليرموك	*A.halimus*3
4	رغل ملحي	*A.halimus*	درعا-وادي اليرموك	*A.halimus*4
5	رغل ملحي	*A.halimus*	ايكاردا-تونس	*A.halimus*5
6	رغل سوري	*A.leucoclada*	حماه-وادي العزيب	*A.leucoclada*1
7	رغل سوري	*A.leucoclada*	حماه-وادي العزيب	*A.leucoclada*2
8	رغل سوري	*A.leucoclada*	الحسكة-خاتونية	*A.leucoclada*3
9	رغل سوري	*A.leucoclada*	الحسكة-خاتونية	*A.leucoclada*4
10	رغل سوري	*A.leucoclada*	الحسكة-خاتونية	*A.leucoclada*5
11	رغل أمريكي	*A.canescens*	ايكاردا-USA	*A.canescens*1
12	رغل أمريكي	*A.canescens*	حماه-وادي العزيب	*A.canescens*2
13	رغل عدسي	*A.lentiformis*	ايكاردا-USA	*A.lentiformis*1
14	رغل عدسي	*A.lentiformis*	تدمر	*A.lentiformis*2
15	رغل كاليفورني	*A.polycarpa*	ايكاردا-USA	*A.polycarpa*1
16	رغل كاليفورني	*A.polycarpa*	حماه-وادي العزيب	*A.polycarpa*2
17	رغل استرالي	*A.nummularia*	ايكاردا-استراليا	*A.nummularia*1
18	رغل استرالي	*A.nummularia*	حماه-وادي العزيب	*A.nummularia*2
19	رغل مزرق	*A.glauca*	ايكاردا-استراليا	*A.glauca*1
20	رغل مزرق	*A.glauca*	حماه-وادي العزيب	*A.glauca*2

ملاحظة: تتميز المدخلات التابعة للنوع نفسه والمجموعة من الموقع نفسه (الارتفاعات نفسها) ببعض الفروقات الشكلية عن بعضها، كما هو الحال في مدخلي الرغل الملحي (3، 4) ومصدرهما وادي اليرموك (الارتفاع: 392 م)، ومدخلي الرغل السوري (6، 7) ومصدرهما وادي العزيب (الارتفاع: 428 م)، ومدخلات الرغل السوري (8، 9، 10) ومصدرها الخاتونية (الارتفاع: 426 م).

ثانياً- مراحل التوصيف الجزيئي باستخدام تقنية ISSR:

عزل الحمض النووي DNA لكامل الجينوم من أوراق نبات الرغل المجففة طبيعياً بطريقة CTAB (Cety Trimethyl Ammonium Bromide) بحسب (Doyle and Doyle, 1993)، بعد إجراء بعض التعديلات عليها.

فُحصت نوعية الحمض النووي DNA بواسطة الرحلان الكهربائي الأفقي باستخدام هلامة أغاروز (gel agarose) 1% مضافاً إليها محلول 1xTBE buffer والكاشف بروميد الايثيديوم، ومن ثم أظهرت حزم الحمض النووي DNA باستخدام الأشعة فوق البنفسجية (UV) واستخدم مؤشر قياسي للإشارة إلى مواقع الحزم وحجمها. انتُقي الأفضل من العينات ذات النوعية الجيدة التي ظهرت على شكل حزم (Bands)، وأُعيد عزل الحمض النووي DNA من العينات ذات النوعية غير الجيدة التي بدت كلطخة متطاولة غير واضحة الحدود (Smear) نتيجة تقطع الحمض النووي، وقِيس تركيز الحمض النووي DNA في العينات باستخدام مقياس الطيف الضوئي (spectrophotometer)، كما تم التأكد أيضاً من نقاوة الحمض DNA بحساب النسبة الامتصاصية عند أطوال الموجات الضوئية 260 على 280 إذْ راوحت النسبة بين (1.7- 2) للعينات المدروسة مما يدلُّ على النقاوة الجيدة للـ DNA وفقاً لـ (Maniatis *et al.*, 1982)، ثم مددت عينات الحمض النووي DNA بالماء المقطر المعقم، للوصول إلى تركيز (20ng/µl)، وهو التركيز المطلوب لتفاعل PCR.

أجريت عملية تضاعف الحمض النووي DNA باستخدام جهاز PCR طراز Mastercycler-Eppendorf، واختبر في البحث 20 مرئساً بتركيز (10 بيكومول)، استطاعت عشرة منها التمييز بين المدخلات المدروسة (الجدول 2).

فصلت نواتج تفاعل PCR بواسطة جهاز الرحلان الكهربائي، باستخدام هلامة من الأغاروز 2%، تحتوي على الإيثيديوم برومايد 0,5 مايكروغرام/مل، ومحلول 1xTBE buffer، كما جرى رحلان مؤشر قياسي من الحمض النووي (DNA ladder) (100bp) إلى جانب العينات؛ وذلك لتحديد حجم الحزم الناتجة للعينات المختبرة، طُبّقَ جهد كهربائي قدره 85 فولتاً مدة ساعتين ونصف، ثم ظُهّرت حزم الحمض النووي DNA بتعريض الهلامة للأشعة فوق البنفسجية وصُوّر باستخدام جهاز توثيق الهلامة Gel Documentation.

أُجري التحليل الإحصائي لتحديد درجة التشابه الوراثي بين المدخلات المدروسة بقراءة حزم الحمض النووي DNA الظاهرة في الهلامة، حيث أعطيت الحزمة بحال وجودها الرقم 1 والحزمة الغائبة الرقم 0، ثم استخدمت هذه البيانات لحساب درجة التباين الوراثي بين المدخلات المدروسة؛ وذلك بالاعتماد على معامل جاكارد Jaccard

(Jaccard, 1908) coefficient. أجري التحليل العنقودي (Cluster analysis) باستخدام برنامج PAST (Hammer *et al.*, 2001) وذلك لرسم شجرة القرابة الوراثية على شكل عنقودي Dendrogram التي تعكس درجة التشابه الوراثي بين المدخلات المدروسة.

الجدول (2) التسلسل النكليوتيدي لمرئسات ISSR المستخدمة ودرجة حرارة التحام كل منها.

اسم المرئس	التسلسل النيكليوتيدي 3' - 5'	درجة الحرارة المئوية للالتحام (درجة مئوية)
ISSR-4	CACACACACACACACAAC	**48**
ISSR-5	CACACACACACACACAGT	**48**
ISSR-8	CACACACACACACACAGA	**49**
ISSR-16	CGTCACACACACACACAC	**-**
ISSR-17	CAGCACACACACACACAC	**51**
ISSR-23	GAGTCTCTCTCTCTCTCT	**51**
ISSR-807	AGAGAGAGAGAGAGAGT	**-**
ISSR-811	GAGAGAGAGAGAGAGAC	**44**
ISSR-812	GAGAGAGAGAGAGAGAA	**49**
ISSR-813	CTCTCTCTCTCTCTCTT	**-**
ISSR-830	TGTGTGTGTGTGTGTGG	**-**
ISSR-862	AGCAGCAGCAGCAGCAGC	**53**
ISSR-866	CTCCTCCTCCTCCTCCTC	**53**
ISSR-8082	CTCTCTCTCTCTCTCTCTG	**-**
ISSR-8564	CACCACCACCACCACCACCAC	**-**
ISSR-8565	GTCACCACCACCACCACCACCAC	**-**
ISSRW814	CTCTCTCTCTCTCTCTTG	**-**
ISSRA830241	ACTGACTGACTGACTGACTG	**-**
ISSR-17899B	CACACACACACAGG	**38**
ISSRnlssr3	CAGCAGCAGCAGCAG	**-**

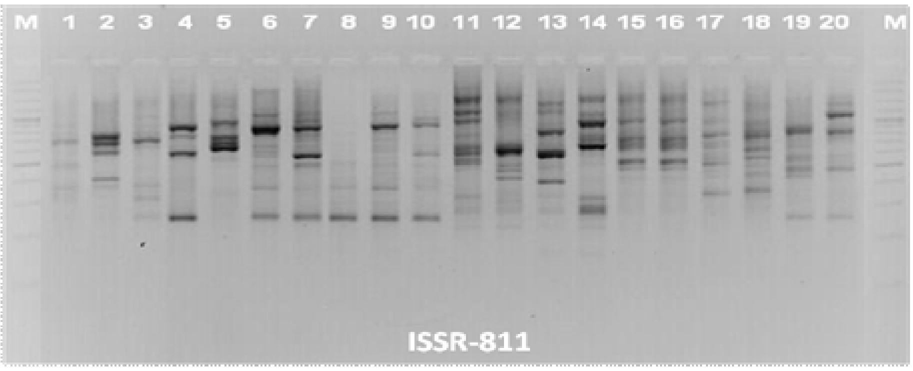
النتائج والمناقشة

التعددية الشكلية(polymorphism) الناتجة عن تطبيق تقنية ISSR:

استطاعت 10 مرئسات أن تعطي حزماً واضحةً، وأثبتت كفاءة في إعطاء تعددية شكلية بين المدخلات المدروسة، ويظهر الشكل (1) الحزم الناتجة عن استخدام المرئس ISSR-811.

وقد كشفت المرئسات المستخدمة 195 أليلاً (قريناً)، وبلغت نسبة التعددية الشكلية 100%، وكان متوسط عدد الحزم الكلية للمرئس (19.5 حزمة)، وقد أعطى المرئس

ISSR-862 أعلى عدد من الحزم (27 حزمة)، في حين أعطى المرئس ISSR-4 أقل عدد من الحزم (12 حزمة) (جدول3).



الشكل (1) صورة هلامة الآجاروز 2% توضح نماذج التعددية الشكلية الناتجة عن استخدام مرئس ISSR-811 في المدخلات المدروسة. (الأرقام 1-20 تمثل المدخلات المدروسة)

مما يدلُّ على الاختلافات الوراثية الكبيرة بين الأنواع المدروسة، وهذا ينسجم مع Bouda وزملائه (2006) في دراستهم التنوع الوراثي لثمانية أنواع من جنس الرغل منتشرة في المغرب (*A.amnicola, A.canescens, A.halimus* MAR, *A.halimus* USA, *A.lentiformis, A.nummularia, A.semibaccata, A.undulate.*) باستخدام تقنية RAPD، إذْ وجدوا مستويات عالية من التباين الوراثي بين الأنواع المدروسة، ونجم عن اختبار 13 مرئساً تعددية شكلية (95%) وراوح عدد الحزم لكل مرئس 11-21.

الجدول (3) عدد الحزم الكلية والمتباينة والنسبة المئوية للتعددية الشكلية في المدخلات المدروسة.

اسم المرئس	عدد الحزم الكلية	عدد الحزم المتباينة	النسبة المئوية للتعددية الشكلية%
ISSR-4	12	12	100
ISSR-5	18	18	100
ISSR-8	16	16	100
ISSR-17	19	19	100
ISSR-23	24	24	100
ISSR-811	21	21	100
ISSR-812	21	21	100
ISSR-862	27	27	100
ISSR-866	20	20	100
ISSR-17899B	17	17	100
المجموع	195	195	100
المتوسط	19.5	19.5	100

تحديد درجة القرابة الوراثية بين الأنواع المدروسة:

كانت أعلى درجة قرابة وراثية بحسب معامل Jacard (0.64) بين المدخلين *A.leucoclada*1(6) و*A.leucoclada*2(7)؛ وذلك يعود إلى أنّهما ينتشران في المنطقة نفسها (وادي العزيب)، وعند مقارنة درجات القرابة بين الأنواع السبعة المدروسة وجد أن الرغل الملحي قريباً نسبياً من الرغل السوري إذْ بلغت درجة القرابة (0.44) بين المدخلين *A.halimus*4(4) و*A.leucoclada*2(7) وذلك نظراً إلى أنّهما ينتشران طبيعياً في منطقة غرب آسية وشمال أفريقية (Mulas and Mulas, 2004). وقد كان الرغل الأمريكي أقرب الأنواع الأخرى[1] لهما تبعاً لمتوسط درجة القرابة الوراثية فيما بينهما، إذْ بلغت هذه الدرجة (0.31، 0.25) بين المدخل *A.canescens*1(11) وكل من المدخلين *A.leucoclada*2(7) و*A.halimus*2(2) على التوالي، وهذا يدعم ما جاء به Ortiz-Dorda وزملاؤه (2005) في دراسته لتحليل العلاقات التطورية للرغل الملحي مع أنواع الرغل *A.breweri, A.canescens, A.glauca, A.prostrata* اعتماداً على تقنية التسلسلات الداخلية المستنسخة ITS إذْ كان النوع *A.canescens* قريباً نسبياً من النوع *A.halimus*.

كما بيّنت النتائج أن الرغل المزرق (المدخل من استراليا) هو الأبعد عن الرغل الملحي والسوري المنتشرين طبيعياً في منطقة غرب آسية وشمال أفريقية (Mulas and Mulas, 2004)، ومن ضمنها سورية، إذْ بلغت درجة القرابة الوراثية (0.10) بين المدخلين *A.leucoclada*3(8) و*A.glauca*2(20)، وهي أقل قيمة لها ما بين المدخلات المدروسة جميعها (جدول 4)، وهذا يتوافق مع انتمائهما إلى مواطن جغرافية متباعدة.

ومما تجدر الإشارة إليه هنا هو الأهمية الكبيرة لتحديد درجة القرابة الوراثية بين الأنواع وضمنها في برامج التحسين الوراثي، وذلك من خلال الاعتماد على الطرز المتباعدة وراثياً التي تؤمن الحصول على قاعدة وراثية كبيرة (Muzher, 2004).

[1] التي هي بالأساس مدخلة من أمريكا واستراليا في مراحل زمنية مختلفة

الجدول (4) درجة التشابه الوراثي بين المدخلات المدروسة بالاعتماد على معامل Jaccard.

	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**	**13**	**14**	**15**	**16**	**17**	**18**	**19**
1	1																		
2	0.31	1																	
3	0.41	0.54	1																
4	0.26	0.34	0.30	1															
5	0.25	0.32	0.28	0.38	1														
6	0.21	0.29	0.24	0.43	0.37	1													
7	0.27	0.36	0.31	0.44	0.36	**0.64**	1												
8	0.25	0.18	0.18	0.24	0.21	0.31	0.31	1											
9	0.24	0.42	0.26	0.37	0.35	0.39	0.43	0.43	1										
10	0.26	0.32	0.26	0.39	0.31	0.43	0.48	0.40	0.51	1									
11	0.20	0.25	0.21	0.20	0.17	0.27	0.31	0.13	0.25	0.26	1								
12	0.16	0.21	0.21	0.19	0.15	0.25	0.25	0.13	0.17	0.23	0.54	1							
13	0.22	0.20	0.18	0.18	0.19	0.25	0.26	0.11	0.17	0.19	0.38	0.35	1						
14	0.17	0.18	0.20	0.18	0.21	0.23	0.26	0.12	0.20	0.19	0.33	0.32	0.44	1					
15	0.21	0.24	0.21	0.15	0.17	0.22	0.21	0.12	0.19	0.17	0.32	0.35	0.30	0.34	1				
16	0.24	0.19	0.19	0.12	0.17	0.20	0.23	0.13	0.16	0.17	0.29	0.30	0.28	0.31	0.56	1			
17	0.19	0.21	0.21	0.14	0.19	0.23	0.25	0.20	0.21	0.19	0.25	0.19	0.21	0.23	0.17	0.28	1		
18	0.17	0.17	0.16	0.16	0.14	0.17	0.23	0.15	0.18	0.20	0.27	0.21	0.21	0.21	0.20	0.22	0.55	1	
19	0.16	0.16	0.12	0.16	0.13	0.16	0.19	0.12	0.11	0.15	0.22	0.20	0.26	0.20	0.18	0.16	0.23	0.39	1
20	0.16	0.17	0.18	0.19	0.17	0.19	0.21	**0.10**	0.17	0.18	0.25	0.24	0.25	0.27	0.30	0.15	0.22	0.31	0.55

التحليل العنقودي للمدخلات المدروسة:

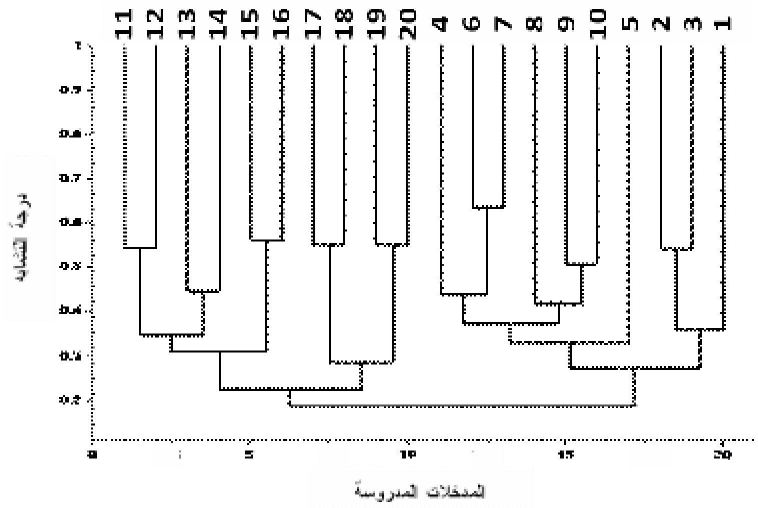
يمكن من خلال التحليل العنقودي تقسيم المدخلات المدروسة إلى مجموعات تبيّن درجة القرابة الوراثية بين الأفراد المدروسة، وقد تتجمع الأفراد المدروسة ضمن مجموعة واحدة بناءً على موطنها الجغرافي، أو بحسب أصلها ونسبها (Perez *et al*., 2005). استخدمت في الدراسة الحالية قيم التشابه الوراثي في رسم مخطط القرابة بين المدخلات المدروسة، وأظهر الجدول (5) والشكل (2) توزع المدخلات إلى مجموعتين أساسيتين، ضمت الأولى المدخلات ذات الأرقام من 1-10 التابعة لنوعي الرغل السوري والملحي إذْ كان متوسط نسبة التشابه بين مدخلات هذه المجموعة 0.34 وضمت الثانية المدخلات العشرة الأخرى التابعة لأنواع الرغل الأمريكي والعدسي والكارليفورني والأسترالي والمزرق، وكان متوسط نسبة التشابه بين مدخلات هذه المجموعة 0.19. أي انتظمت أنواع الرغل في تحت مجموعات منفصلة باستثناء الرغل السوري والملحي، حيث هجر مدخلان من الملحي (رقم4 و5) إلى تحت المجموعة التي تضم مدخلات الرغل السوري الذي يمكن أن يعود إلى التلقيح الخلطي الحادث فيما بينها وانتشارها بشكل بري من جهة، واستزراع طرز من الرغل الملحي ذات مصادر جغرافية مختلفة في سورية من جهة أخرى، وقد احتوت المجموعة الأولى المدخلين(6)*A.leucoclada*1 و(7)*A.leucoclada*2

التي تجمعهما أعلى درجة قرابة وراثية على مستوى المدخلات جميعها (0.64)، وكانت أقل درجة قرابة وراثية ضمنها بين المدخلين (1)*A.halimus*1 و(6)*A.leucoclada*2 (0.21)، وفي المجموعة الثانية كانت درجة القرابة بين مدخلي الرغل الكاليفورني (0.56) هي الأعلى، مقارنة بدرجات القرابة بين كل من مدخلي الرغل الأسترالي (0.55) والمزرق (0.55) والأمريكي (0.54)، والعدسي (0.44)، في حين كانت أقل درجة قرابة وراثية ضمن المجموعة الثانية بين المدخلين (16)*A.polycarpa*2 و(20)*A.glauca*2 اللذين يعودان إلى مواطن جغرافية متباعدة.

هذه النتائج انسجمت مع دراسة (Bouda *et al.*, 2006) إذْ وجدوا انعزالاً ملحوظاً لأنواع الرغل المنتشرة في المغرب (ليس من بينها الرغل السوري) وتوزع كل نوع ضمن مجموعة مستقلة. والجدير بالذكر أن الرغل السوري الذي ينتشر طبيعياً في سورية وصف جزيئياً للمرة الأولى في دراستنا، وتبيّن أنه على درجة قرابة وراثية كبيرة نسبياً مع الرغل الملحي.

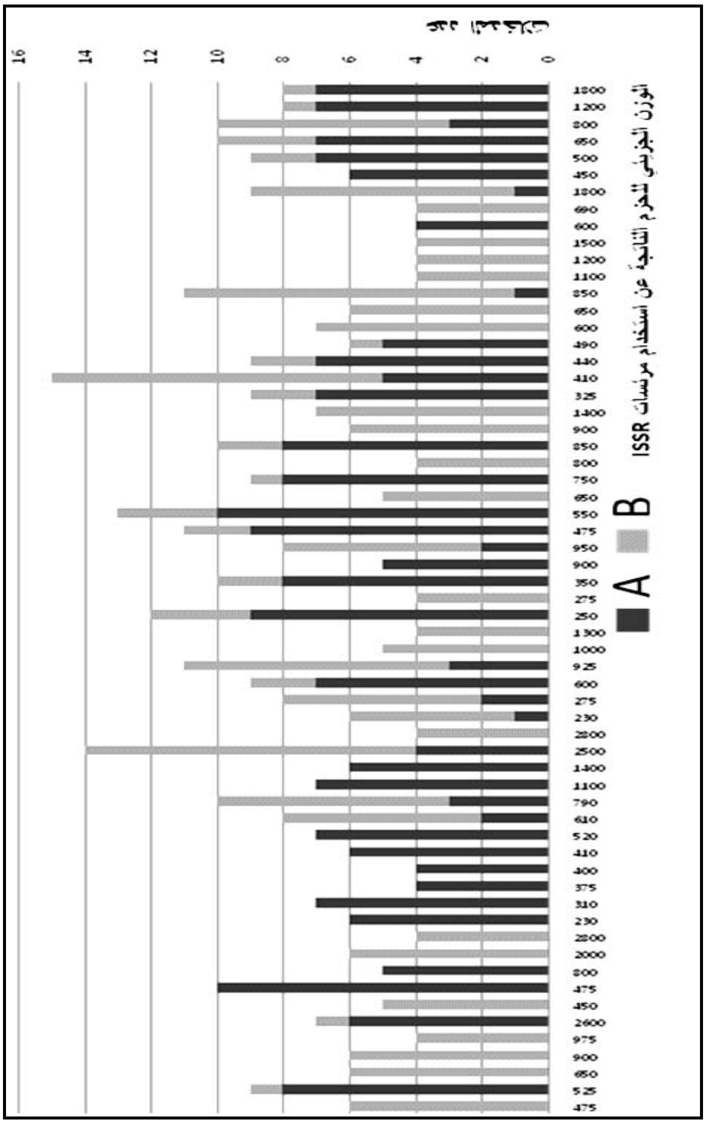
الجدول (5) تقسيم المدخلات المدروسة اعتماداً على شجرة القرابة الوراثية

المجموعة الرئيسية	تحت المجموعة الرئيسية	المدخلات
الأولى	تحت المجموعة الرئيسة الأولى	2،3،1
	تحت المجموعة الرئيسة الثانية	4،6،7،8،9،10،5
الثانية	تحت المجموعة الرئيسة الأولى	17،18،19،20
	تحت المجموعة الرئيسة الثانية	11،12،13،14،15،16



الشكل (2) شجرة القرابة الوراثية لمدخلات الرغل (الأرقام 1-20 تمثل المدخلات المدروسة)

بشكل عام، تباينت مدخلات الرغل المدروسة ضمن المجموعتين بين بعضها بالعديد من الحزم بحسب مرئسات ISSR المستخدمة (شكل 3).



شكل (3) توزع مدخلات الرغل وإسهامها في المجموعتين الأولى والثانية بناء على توزع حزم مقاطع مرئسات ISSR لديها
(A: مدخلات المجموعة الأولى، B: مدخلات المجموعة الثانية)

إذْ لوحظ أن التباين بين المجموعتين كان مرتبطاً بشكل خاص بمجموعة مــن الحــزم لــثمانية مرئسات ISSR، فانضوت المدخلات التي تميّزت بظهور مجموعة من الحــزم عند المرئــسات ISSR-4$_{450}$، ISSR-811$_{900}$، ISSR-862$_{1400, 1100, 520, 410, 310, 230}$، ISSR-866$_{800, 475}$ في المجموعة الأولى وهي المدخلات المنتشرة طبيعياً في سورية والمنطقــة العربية كما أسلفنا، أي إنّ هذه المرئسات أظهرت مقدرة على تمييز المــدخلات الــسابقة وأمكن تمييزها عن المدخلات الأخرى المستقدمة من أمريكا واستراليا قديماً أو حديثاً التي دخلت في المجموعة الثانية وتميّزت بتحديــد مجموعــة مــن الحــزم عنــد المرئــسات ISSR-8$_{650, 600}$، ISSR-23$_{1400, 900, 650}$، ISSR-812$_{1000}$، ISSR-866$_{2000, 450}$، ISSR-17899$_{900, 650, 475}$.

النتيجة

تمكنت الدراسة الحالية، التي تم فيها طُبّقت فيها تقنية ISSR أول مرة من تقييم التنوع الوراثي لأنواع الرغل، وقد أظهرت فعالية في التمييز بين هذه النباتات بالاعتمــاد علــى نتائج 10 مرئسات فكانت نسبة التعددية الشكلية 100%، ونجم عن استخدام هذه المرئسات ما مجموعه 195 أليلاً، مما يدلُّ على التنوع الوراثي الكبير لأنواع الرغــل المدروســة، وهذا يُمكّن من إنشاء مجتمعات وراثية صنعية تجتمع فيها صــفات الاستــساغة العاليــة والإنتاجية العلفية الجيدة مع القدرة على التجدد السريع والتأقلم مع العوامل البيئية المميــزة للبيئات شبه الجافة (مثل جفاف الصيف، والملوحة العالية، والشتاء البارد...).

التوصيات

1- تعميق الدراسات الجزيئية لتشمل أنواع الرغل المنتشرة في سورية جميعها، وتحليــل الاختلافات الوراثية بين هذه الأنواع وضمنها، مع استخدام عدد أكبر من المرئسات.
2- العمل على عزل مواقع المورثات المسؤولة عن الصفات المهمة وتحديــدها (تحمــل الجفاف، وقدرة النمو على ترب مالحة، وتحمل السمية المعدنيــة) باســتخدام QTLs للإفادة منها في برامج التحسين الوراثي.
3- الإفادة من المدخلات الوراثية المدروسة بإدخالها في برامج التحسين الوراثي لاستنباط أصناف متحملة للجفاف والملوحة ذات صفات مرغوب فيها تستخدم في إعادة تأهيــل الأراضي المتدهورة التي تخرج من نطاق الاستثمار الزراعي.

REFERENCES المراجع

الخطة الوطنية لمكافحة التصحر في الجمهورية لعربية السورية. 2002. وزارة الدولة لـشؤون البيئـة، مديرية الأراضي، برنامج الأمم المتحدة الإنمائي، 97 ص.

الرباط، محمد. فؤاد. أبوزخم، عبدالله. 2003. أساسيات وطـرق صـيانة المراعـي. الطبعـة الثالثـة. منشورات جامعة دمشق، كلية الزراعة، 280 ص.

السمان، باسم. 2006. دراسة بعض الأنواع النباتية الهامة واختبارها لتأهيل المراعي المتـدهورة فـي جنوب سورية. رسالة ماجستير، جامعة دمشق، كلية الزراعة، قسم الحراج والبيئة. 100 ص.

سنكري، محمد نذير. 1983. أنواع الرغل الهامة لاستزراع المناطق الجافة وشبه الجافـة فـي القطـر العربي السوري. الدورة التدريبية الرابعة للمشاتل الرعوية والاستزراع في المناطق الجافـة وشـبه الجافة، أكساد، دمشق، سورية، ص3-20.

الشوربجي، مصطفى. 1988. التباين الوراثي والتعرية الوراثية للأصول الوراثية فـي الـوطن العربـي وبرنامج المركز العربي لجمعها وتقييمها وصيانتها، الدورة التدريبية العربية الثانيـة فـي المنـاطق الجافة، أكساد، دمشق، سوريا. ص 56-68.

طربين، جورج. 2011. التوصيف المورفولوجي والجزيئي لبعض أنواع الجـنس *Medicago*. رسـالة ماجستير، جامعة دمشق، كلية الزراعة، قسم المحاصيل الحقلية.137 ص.

Bornet, B.; Goraguer, F.; Joly, G. and Branchard, M. (2002). Genetic diversity in European and Argentinean cultivated potatoes (Solanum tuberosum subsp. tuberosum) detected by inter-simple sequence repeats (ISSRs). Genome 45: 481-484.

Bouda, S.; Haddioui, A.; Baaziz, M.; Del Campo, F.F. and Hernández, L.E. (2006). Genetic diversity characterization of genus Atriplex using RAPD markers. Congrès International de Biochimie. Agadir, 09-12 Mai 2006. 64-68.

Chowdhury, M.A.; Vandenberg, B. and Warkentin, T. (2002). Cultivar identification and genetic relationship among selected breeding lines and cultivars in chickpea (Cicer arietinum L.). Euphytica 127: 317–325.

Doyle, J.J. and Doyle, J.L. (1987). A rapid isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochem. Bull. 19: 11–15.

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

Fernandez, M.E.; Figueiras, A.M. and Benito, C. (2002). The use of ISSR and RAPD markers for detecting DNA polymorphism. Genotype identification and genetic diversity among barley cultivars with known origin, Theor, Genet, 102: 200-205.

Ghazanfar, S.A.; Miller, A.G.; McLeish, I.; Cope, T.A.; Cribb, P. and Al-Rawahi, S. H. (1995). Plant conservation in Oman. Par-I. A study of the endemic, regionally endemic and threatened plants of the Sultanate of Oman. April 1995. 15 p. Sultan Qaboos University, Oman.

Hammer, O.; Harper, D.A.T. and Ryan, P. D. (2001). PAST: Palaeontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica*. 4(1):9pp. http://palaeo-electronica. org/ 2001/past/issue1 01.htm

Jaccard, P. (1908). Nouvelles recherches sur Ia distribution flora. Bull. Sac. Nat. 44: 223-270.

Kessler, J. J. (1990). *Atriplex* forage as a dry season supplementation feed for sheep in the Montane Plains of the Yemen Arab Republic. J. Arid Environments, 19: 225-234.

Kijas, J.M.H.; Fowler, J.C.S. and Thomas, M.R. (1995). An evaluation of sequence tagged microsatellite site markers for genetic analysis within Citrus and related species. Genome 38:349–355.

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

Mckell, C.M. (1994). Salinity tolerance in Atriplex: Fodder shrubs of arid land in: Pessarki, P. ed. Handbook of Plant and Crop Stress. New york: Marcel Dekker, inc., PP 497-503.

Mouterde, P. (1966, 1970, 1983). Nouvelle Flore du Liban et de la Syria. 3Tomes, Dar El Mashreqh, Beiruth, Liban.

Mulas, M. and Mulas, G. (2004). The strategic use of Atriplex and Opuntia to combact desertification. short and medium-term priority environmental action programme (SMAP), University of Sassari Desertification Research Group. 101 p.

Muzher, B.M. (2004). Application of biochemical and PCR based molecular markers to the characterization of Syrian pears (*Pyrus syriaca Boiss*) Genotypes. Ph.D. Degree in Agricultural Science. Cairo University. 108 p.

Nagaoka, T. and Ogihara, Y. (1997). Applicability of inter-simple sequence repeat polymorphisms in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers. Theoretical and Applied Genetics 94: 597–602.

Ortiz-Dora, J.; Martinez-Mora, C.; Coreal, E.; Simon, B. and Cenis, J.L. (2005). Genetic structure of *Atriplex halimus* populations in the mediterranean basin. Published by Oxford University Press on behalf of the Annals of Botany Company, Annals of Botany, Vol. 95(5): 827-834.

Pearce, K.L.; Masters, D.G.; Smith, G.M.C.; Jacob R.H. and Pethick, D.W. (2005). Plasma and tissue α-tocopherol concentrations and meat colour stability in sheep grazing saltbush (*Atriplex* spp.). *Australian Journal of Agricultural Research*, 56: 663–672.

Peres, S.R.; Ruiz, D.; Dicenta, F.; Egea, J. and Gomez, M.P. (2005). Application of simple sequence repeat (SSR) markers in apricot breeding: molecular characterization, protection, and genetic relationships. Scientia Horticultrae, vol. 103(3): 305-315.

Rafalski, J.A.; Vogel, J.M.; Morgante, M.; Powell, W.; Andre, C. and Tingey, S.V. (1996). Generating and using DNA markers in plants. No mammalian Genomic Analysis: A Practical Guide. 4:75-134.

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

Saiki, R.K.; Scharf, S.; Faloona, F.; Mullis, K.B.; Horn, G.T.; Eriich, H.A. and Amheim, N. (1985). Enzymatic amplification of b-globulin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anaemia. Science 230:1350-1354.

Saiki, R.K.; Gelfand, D.H.; Stoffel, S.; Scharf, S.J.; Higuchi, R.; Horn, G.T.; Mullisand, K.B. and Eriich, H.A. (1988). Prime-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science 239:487-491.

Vavilove, N.I. (1992). Origine and geography of cultivated plants (English translation for Russian Proikhzahdenie). Cambridge university press. Cambridge.U.K. 498 p.

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 scince (genetics), Department of genetics, Cairo university, Faculty of agriculture, 119 p.

Ziekiewicz, E. Rafalski, A. and Labuda, A. (1994). Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) anchored polymerase chain reaction amplification. Genomics 20:178–183.

Received	**2011/10/10**	**إيداع البحث**
Accepted for Publ.	**2012/06/06**	**قبول البحث للنشر**