مجلة جامعة دمشق للعلوم الزراعية ــ (2013) المجلد (29) ــ العدد 3 ــ الصفحات: 213-225

تنوع بعض الطرز الوراثية المدخلة من الحُمُّص المزروع (*Cicer arietinum* L.) باستخدام تقنية ISSR

جورج طربين[1] و سلام لاوند[2] و يوسف وجهاني[3]

المُلخَّص

نُفِّذَ البحث في مخبر التقانات الحيوية بكلية الزراعة - جامعة دمشق خلال عام 2012 بالتعاون مع الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية، إذْ زُرع 11 طرازاً وراثياً مدخلاً من الحمص المزروع لتقدير التنوع الوراثي وتحديد درجة القرابة الوراثية فيما بينها؛ وذلك باستخدام 16 بادئة من نوع ISSR، واستخدم لهذا الغرض 16 بادئة. أظهرت 9 منها فعاليتها في إعطاء تعددية شكلية بين الطرز الوراثية المدروسة ونجم عن استخدامها ما مجموعه 91 أليلاً (قريناً)، وبلغت نسبة هذه التعددية 93.4%، راوح عدد الحزم لكل بادئة بين حزمتين كأقل عدد مع البادئتين ISSR7 - ISSR13، و16 حزمة كأعلى عدد مع البادئة ISSR11 بمتوسط قدره 9.1 حزمة لكل بادئة. بيّنت دراسة التشابه الوراثي أن درجة القرابة الوراثية راوحت مابين 46-78% إذْ كانت أعلاه (78%) بين الطرازين أفغانستان والمغرب، تلاها (77%) بين كل من الطرز تونس مع أفغانستان وإيران، ثمّ تلاها (50%) بين الطرز إسبانيا مع إيران والباكستان، في حين كانت أقل درجة قرابة وراثية(46%) بين الطرازين أفغانستان والباكستان.

الكلمات المفتاحية: الحمص، قرابة وراثية، تقنية ISSR.

[1] و[2] قسم المحاصيل الحقلية، كلية الزراعة، جامعة دمشق، سورية.

[3] قسم الأصول الوراثية، الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية، دمشق، سورية.

Genetic diversity in some genotypes of cultivated chickpea (*Cicer arietinum* L.) using ISSR

Tarabain, G.[1], S. Lawand[2] and Y. Wjhani[3]

Abstract

The research was carried out in the biotechnology Laboratory at the Faculty of Agriculture, Damascus University, in cooperation with the General Commission For Scientific Agricultural Research (GCSAR), during the year 2012. Eleven genotypes of cultivated chickpea were planted to determine their genetic diversity and the degree of genetic similarity using the ISSR technique. 16 primers were used for this purpose. Results indicated that Nine primers proved their effectiveness in showing polymorphism among the genotypes examined and the primers gave a total of 91 alleles with a polymorphic percentage of 93.4%. The number of bands for each primer varied from a minimum of 2 bands for the primers ISSR7-ISSR13 to a maximum of 16 bands for the primer ISSR11, with an average of 9.1 bands per a primer. The results also showed that the degree of genetic similarity ranged between 46 and 78%, where the highest was 78% between the genotypes of Afghanistan – Morocco, then 77% between the genotypes Tunisia-Afghanistan and Tunisia- Iran and followed by Spain- Iran and Spain- Pakistan (50%) and the lowest was 46% between genotypes Afghanistan- Pakistan.

Keywords: Chickpea, Genetic Similarity, ISSR.

[1],[2] Dept. Crop Sci. , Fac. Agric., Damascus University, Syria.

[3]Dept. Gen. Res., General Commission for Sci. Agric. Res.. Damascus, Syria.

المقدمة

يعدُّ التنوع الوراثي ضمن الأنواع النباتية جزءاً مهماً من التنوع الحيوي، إذْ تتميّز المصادر الوراثية النباتية المحلية بتنوعها الوراثي الكبير وبقدرتها على تحمل الإجهادات الأحيائية واللاأحيائية كما تتميّز بالباكورية في النضج (شاهرلي وزملاؤه، 1995). تشمل هذه المصادر الوراثية الأصناف المزروعة المحلية القديمة فضلاً عن أقاربها البرية إذْ تشكل هذه الموارد المادة الخام الأهم لمربي النبات ومورداً أساسياً للمزارعين، كما أنها ذخيرة للتطويع الوراثي للوقاية من التغيرات البيئية والاقتصادية الضارة المحتملة (Lane، 2007).

يعدُّ الحمص المزروع *Cicer arietinum* واحداً من المحاصيل البقولية الغذائية المهمة في العالم، إذْ يشكل أحد أهم الأغذية الأساسية في المنطقة بعد القمح فهو مصدر أساسي للبروتين النباتي فضلاً عن أنّه مصدر علفي غني بالبروتين للحيوان، كما أن زراعته تغني التربة بالآزوت الجوي بفضل كفاءة جذوره في تثبيت الآزوت الجوي، ممّا ينعكس على أهميته الكبيرة في الدورة الزراعية في تحسين خصوبة التربة وخاصة في المناطق الجافة ومناطق الزراعات البعلية (Togay وزملاؤه، 2008). كما أن الحمص من النباتات ذات الصيغة الصبغية المضاعفة (2n=2x=16)، ويبلغ حجم المجين فيه نحو 750Mbp (Aggarwal وزملاؤه، 2011).

تعد 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 وزملاؤه، 2002) في توصيف المصادر الوراثية باستخدام المؤشرات الجزيئية إذْ إنّ تتميّز بكثرة عددها وثباتية نتائجها وعدم تأثرها بالظروف البيئية، كما أن استخدام التقانات الحيوية على المستوى الجزيئي للمادة الوراثية DNA أدى إلى تسريع وتيرة تحسين المحاصيل (Powell وزملاؤه، 1996)، إذ إنها تساعد على عمليات الانتخاب والتربية مختصرة بذلك الزمن الذي تستغرقه عمليات التربية (سيد، 2001)، لأسباب عديدة منها عدم وجود أي علاقة بين الأطوار الفينولوجية للنبات والواسمات الجزيئية، ومن ثمّ يمكن استخلاص المادة الوراثية من الحمض الريبي النووي (DNA) من المراحل الأولى للنبات، وسهولة تحديد موقع مورثة معينة مسؤولة عن صفة ما مباشرة وعدم تأثر الدراسة الجزيئية بالشكل الظاهري للنباتات وبالعوامل البيئية كما هو الحال في برامج التربية التقليدية.

أوضح Ramsay وزملاؤه (2000) أن استخدام التقانات الجزيئية، يمكن أن يقلل من تعقيدات إدخال عدد من الصفات المرغوب فيها في النمط الوراثي الواحد، كذلك يمكن

استخدام المؤشرات الجزيئية بشكل فعال في تحاليل التنوع الوراثي وتقدير التشابه الوراثي (Eleuch وزملاؤه، 2008).

تعدُّ تقنية Inter Simple Sequence Repeats (ISSR) واحدة من التقانات المهمة إذْ طبقت من قبل Ziekiewicz وزملاؤه (1994)، تعتمد على تفاعل البلمرة المتسلسل Polymerase Chain Reaction(PCR) وتعدُّ من التقانات المثالية للأسباب الآتية: تُضخم منطقة التكرارات الداخلية البسيطة حيث يستخدم بادئ وحيد مؤلف من قطع متكررة ومحاط في بعض الأحيان بـ 2-4 نيكليوتيدات إمّا في المنطقة '3 أوفي المنطقة '5، لأنّ تقنية ISSR توصف بأنها أكثر تكرارية من تقنية RAPD بسبب طول البادئ المستخدم الذي يعكس درجة حرارة عالية لمرحلة انفصال سلسلة DNA المزدوجة إلى سلسلتين مفردتين (Chowdhury وزملاؤه، 2002). إمكانية الكشف عن التتاليات النيكليوتيدية ذات السيادة في التوريث، ووفرتها ووجودها في مجينات حقيقيات النوى النباتية ولا تحتاج إلى معلومات عن التسلسل النكليوتيدي المدروس (Kijas وزملاؤه، 1995). تعطي نتائج ثابتة ولو نفذت في مكررات أو في أماكن متعددة وسريعة، كما أنّها تتطلب كمية قليلة من الحمض النووي DNA، يمكن أتمتتها automation إذْ يمكن نشر البادئات وتبادلها بسهولة بين المخابر بمجرد معرفة التسلسل النيكليوتيدي لها. تكشف نسب عالية من التعددية الشكلية وبمقدرة تقنية SSR نفسها، كما أن هذه التقنية استخدمت لدراسة التنوع الوراثي في القمح (Nagaoka وOgihara، 1997) والرز (Joshi وزملاؤه، 2000) والبطاطا (Bornet وزملاؤه، 2002) والشعير (Fernández وزملاؤه، 2002).

قُيّم التنوع الوراثي لــ12 طرازاً وراثياً من الحمص المزروع باستخدام تقنية ISSR؛ وذلك باستخدام 10بادئات إذْ أعطت ما مجموعه 492 حزمة ذات تعددية شكلية (Bhagyawant وSrivastava، 2008).

دُرست علاقة القرابة الوراثية بين 19 طرازاً وراثياً من الحمص المزروع *C.arietinum* و5 طرز وراثية عائدة للنوع البري *C.reticulatum* باستخدام تقنيتي RAPD وISSR ولوحظ أن البادئات ذات التعددية الشكلية في الطرز الوراثية البرية اشتركت بنسبة 77.8% مع الطرز الوراثية المزروعة في تقنية RAPD و79.6% في تقنية ISSR. وكل بادئ من بادئات RAPD أعطى بالمتوسط 6 حزم، أمّا بادئات ISSR فقد أعطت بالمتوسط 11 حزمة لكل بادئ، وبتحليل نتائج تقنية RAPD وجد أن نسبة التعددية الشكلية للبادئات المستخدمة بلغت 51.7% بين الطرز الوراثية البرية و50.5% بين الطرز الوراثية المزروعة، في حين بلغت نسبة التعددية الشكلية 65.6% بين الطرز الوراثية البرية و56.3% بين الطرز الوراثية المزروعة عند استخدام تقنية ISSR، ومن ثمّ فإن ذلك يشير إلى كفاءة تقنية ISSR في دراسة علاقة القرابة الوراثية لجنس *Cicer* (Rao وزملاؤه، 2007).

قام Sudupak (2004) بدراسة القرابة الوراثية بين نوعين معمرين وستة أنواع حولية من الحمص باستخدام تقنية ISSR إذْ أظهرت أن النوع المعمر *C.incisum* قريب من الناحية الوراثية مع الأنواع الحولية (*C.pinnatifidum, C.bijugum, C.judaicum*) في حين كان النوع البري *C.reticulatum* هو الأقرب إلى النوع المزروع *C.arietinum*.

عمل Bhadana (2011) على دراسة القرابة الوراثية بين 14 نوعاً عائدة للجنس *Cicer* (8 أنواع معمرة و6 أنواع حولية تتضمن النوع المزروع *C.arietinum*)؛ وذلك باستخدام تقنية RAPD إذْ استخدم في الدراسة 12 بادئاً أعطت بالمجمل 234 حزمة ذات تعددية شكلية بمتوسط 19.5 حزمة لكل بادئ، وأظهرت شجرة القرابة الوراثية التي رسمت بالاعتماد على معامل جاكارد للتشابه (Jaccard similarity index) أن الأنواع انفصلت عن بعضها بحسب طبيعة النمو والمنطقة الجغرافية، إذْ تبيّن أن النوع *C.reticulatum* كان الأقرب وراثياً إلى النوع *C.echinospermum* من باقي الأنواع المدروسة الأخرى، ممّا يدلّ على إمكانية انتقال المورثات بين الأنواع. ومما سبق فقد هدف هذا البحث إلى التوصيف الجزيئي لبعض المدخلات من الحمص المزروع وتحديد درجة القرابة الوراثية بينها باستخدام تقنية ISSR.

مواد البحث وطرائقه

المادة النباتية:

تتكون المادة النباتية من 11 طرازاً وراثياً (الجدول 1) من الحمص المزروع *C.arietinum* حصلٍ عليها من البنك الوراثي للهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية التي جُمعت من أماكن مختلفة ضمن منطقة وانا (غرب آسية وشمال أفريقية) وعلى ارتفاعات متباينة راوحت بين 9 و1683م عن سطح البحر.

الجدول (1) الطرز الوراثية المدروسة من الحمص (*C. arietinum*).

الطراز الوراثي	المنشأ	خط الطول	خط العرض	الارتفاع (م)
1	الأردن	E35 44	N32 03	947
2	تونس	E10 29	N36 38	82
3	أفغانستان	E68 51	N36 06	950
4	إيران	E47 04	N34 19	1683
5	العراق	E47 45	N30 41	9
6	قبرص	E33 05	N35 08	250
7	الباكستان	E71 32	N32 35	220
8	الجزائر	W01 21	N34 56	700
9	المغرب	W07 41	N33 23	770
10	اسبانيا	W00 23	N39 29	27
11	روسيا	E42 06	N45 21	265

مكان التنفيذ وطريقة العمل: نُفّذ البحث في مخبر التقانات الحيوية في كلية الزراعة بجامعة دمشق.

تعقيم البذور وزراعتها:

عقمت البذور بنقعها في مادة الإيتانول تركيز 70% مدة 30 ثانية، نقلت بعد ذلك إلى ثلاثة أوعية يحوي كل منها ماءً مقطراً معقماً، تركت في كل وعاء مدة 5 دقائق، ونقلت هذه البذور لوضعها في وعاء يحوي مادة كلوروكس 5% مدة 5 دقائق، ثم نقلت مرة أخرى لتنقع في الماء المقطر ثلاث مرات كل منها 5 دقائق، ثم زرعت البذور في أصص خاصة وبعمر 2-3 أسابيع، أخذت الأوراق الطازجة من أجل استخلاص الحمض النووي DNA للدراسة الوراثية.

استخلاص الحمض الريبي النووي الدنا (DNA) بطريقة SDS:

استخلص الدنا من البادرات الفتية بعمر 2-3 أسابيع بطحن 1g من الأوراق الخضراء باستخدام الآزوت السائل حتى الحصول على مسحوق ناعم، نقل بعدها إلى حوجلة زجاجية سعة 50 مل وأضيف إليها 10 مل من محلول الاستخلاص SDS المكون من: (0.1M Tris-HCl,PH=8, 50mM EDTA, 0.1M NaCl, 2% SDS,1mg/ مل proteinase K) حضنت العينات مدة 60 دقيقة مع التحريك المستمر ضمن حمام مائي عند 37°م. أضيف 10مل من مزيج كل من كلوروفورم/أيزواميل كحول بنسبة 1:24. نقل المزيج إلى أنبوب تثفيل سعة 30مل وثفل المزيج (عملية الطرد المركزي) مدة 10 دقائق بسرعة (10000 rpm) بدرجة حرارة 4°م. أضيف الأيزوبروبانول Iso-propanol بمعدل 3/2 من حجم الوسط المائي، نقل الحمض النووي DNA المترسب إلى أنبوب صغير سعة 2مل وأضيف 0.5مل من محلول الغسيل (كحول إيتيلي 76%) البارد (المحفوظ بدرجة –20°م) ثم جرى التثفيل بسرعة (10000 rpm) مدة 10 دقائق وبدرجة حرارة 4°م. أذيبت عينات DNA في 500µl من المحلول المنظم TE المكون من-Tris (10mM HCl, 1mM EDTA). تم التخلص من الحمض النووي RNA بإضافة 2µl من أنزيم *RNAse* (10 مغ/ مل) والتحضين في درجة (37°م) مدة نصف ساعة، ثم مدد تركيز DNA ليصبح (40ng/µl).

التقدير الكمي والنوعي للدنا بواسطة الأشعة فوق البنفسجية:

استخدم جهاز Power WaweXTM لتقدير كمية الدنا وتحديد نقاوته، يعتمد الجهاز في عمله على قياس كمية الحمض النووي الموجودة عن طريق تقديره لامتصاص الحمض النووي DNA للأشعة فوق البنفسجية بموجات طولها 260 و280 نانومتراً.

تطبيق تقنية ISSR:

استخدم في الدراسة 16 بادئة جرى الحصول عليها من الهيئة العامة للطاقة الذرية في سورية، ويوضح الجدول (2) التسلسل النيكليوتيدي ودرجة حرارة الالتحام للبادئات المستخدمة في الدراسة.

الجدول(2) التسلسل النيكليوتيدي للبادئات المختبرة في تقنية ISSR

البادئة	التسلسل النيكليوتيدي '3 - '5	درجة حرارة الالتحام
$ISSR_1$	$(GA)_8GC$	52 °م
$ISSR_2$	$(CA)_8G$	52 °م
$ISSR_3$	$(GA)_8G$	56 °م
$ISSR_4$	$(AC)_8GG$	56 °م
$ISSR_5$	$(GT)_4(GA)_5$	54 °م
$ISSR_6$	$(AC)7(AT)_3$	54 °م
$ISSR_7$	$(AC)_8T$	50 °م
$ISSR_8$	$KKVRVRV(TG)_6$	50 °م
$ISSR_9$	$(CA)_8A$	50 °م
$ISSR_{10}$	$(GA)_{10}$	58 °م
$ISSR_{11}$	$(AGG)_5$	58 °م
$ISSR_{12}$	$(CA)_{11}$	56 °م
$ISSR_{13}$	$C(CT)_8G$	56 °م
$ISSR_{14}$	$(CA)_{12}$	56 °م
$ISSR_{15}$	$(TC)_8GA$	54 °م
$ISSR_{16}$	$(TC)_8AG$	54 °م
ملاحظة: K: G/T, V: G/C/A, R: G/A		

أجري تفاعل البلمرة المتسلسل PCR وفقاً لــ (Williams وزملاؤه، 1990) مع بعض التعديلات فكان حجم التفاعل النهائي (25µl) باستخدام 2X Master mix جرى الحصول عليه من شركة Fermentas, Germany: يتكون التفاعل من 2µl من البادئ بتركيز (10mM)، 12.5µl من Master Mix، 9µl ماءً مقطراً وDNA بتركيز 40ng/µl. ويجري هذا التفاعل في جهاز التدوير الحراري وفقاً للظروف الآتية:

1- التقسيم: عند درجة حرارة 94°م مدة 5 دقائق لتنفصل سلسلتا الحمض النووي DNA.

2- 40 دورة تتضمن كل منها المراحل الآتية:

2-1- التقسيم: يجري عند درجة حرارة 94°م مدة 30 ثانية.

2-2- الالتحام: بحسب درجة حرارة الالتحام لكل بادئ من الجدول(2)؛ وذلك مدة دقيقة

2-3- الاستطالة عند حرارة 72 ْم مدة دقيقة.

3- اكتمال التفاعل عند درجة حرارة 72 ْم مدة عشر دقائق.

ثم تحفظ العينات في درجة حرارة 4 ْم، بعد ذلك نقوم بالترحيل على هلامة الآجاروز.

الرحلان الكهربائي والتلوين والتصوير:

جرى الترحيل على هلامة الآجاروز 2% في المحلول المنظم TBE 1X

{(10X TBE buffer=108g Tris borate+55g Boric acid+9.2 EDTA,pH 8.0)} والمضاف إليها 5µl من صبغة الايثيديوم برومايد (10مغ/مل) حيث حملت عينات الدنا على هلامة الآجاروز بإضافة 5µl من سائل التحميل الخاص (1X Loading buffer Bromophenol blue) المكون من: (15% Ficoll 400 + 1.03 % Bromophenol Blue + 0.03 % Xylene Cyanol FF + 0.4 % Orange G + 10 mM Tris-HCl + 50 mM EDTA) كما حُقن مؤشر من الدنا 1Kpb من شركة (Fermentas, Germany) وذلك لتحديد الحجم والوزن الجزيئي للحزم الناتجة ليجري بعد ذلك الترحيل بمرور حقل كهربائي قدره 100 فولت؛ وذلك لفصل حزم الحمض النووي DNA الناتجة عن التضخيم، لتصور الهلامة بعد ذلك بجهاز تصوير هلامة الآجاروز Image Analyzer (Agle Eye II Staratagene).

التحليل الإحصائي:

جمعت نتائج عملية التضخيم في جداول اعتماداً على وجود حزم الدنا أو غيابها في العينات المدروسة، إذ يدلّ الرقم 1 على وجود حزمة الدنا الواضحة فقط والرقم 0 تدلّ على عدم وجود الحزمة، وقد نظمت الجداول لكل بادئة على حدة ورسمت شجرة القرابة الوراثية بتطبيق (UPGMA) Unweighted Pair Group Method With Arithmetic Averaging باستخدام برنامج Pop Gene 1.31 الإحصائي.

النتائج والمناقشة

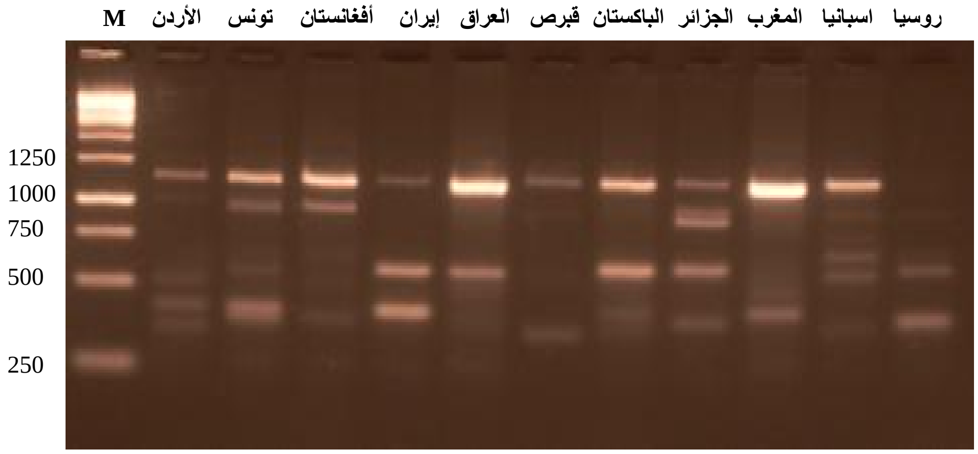
التعددية الشكلية polymorphism:

يبيّن الجدول(3) والشكل (2) أن 10 بادئات من البادئات المستخدمة أعطت منتجات تضخيم في تفاعل البلمرة المتسلسل و9 بادئات أثبتت فعاليتها في إعطاء تعددية شكلية بين الطرز المدروسة، ونجم عن استخدام هذه البادئات ما مجموعه 91 أليلاً (قريناً)، إذْ أعطت هذه البادئات تعددية شكلية بنسبة 93.4%، كما راوح عدد الحزم لكل بادئة بين حزمتين كأقل عدد مع البادئتين ($ISSR_{13}$-$ISSR_7$) و16 حزمة كأعلى عدد مع البادئة

($ISSR_{11}$) بمتوسط 9.1 حزمة لكل بادئة، وكانت النسبة المئوية للتعددية الشكلية الأقل مع البادئة ($ISSR_4$) بمقدار 77.8% والأكبر مع البادئات ($ISSR_2$-$ISSR_3$-$ISSR_5$-$ISSR_6$-$ISSR_{10}$-$ISSR_{13}$) بمقدار 100%.

الجدول (3) رموز البادئات المستخدمة، عدد الحزم الكلية والمتباينة شكلياً، النسبة المئوية للتعددية الشكلية % في الطرز الوراثية المدروسة.

اسم البادئ	عدد الحزم الكلية	عدد الحزم المتباينة شكلياً	النسبة المؤية للتعددية الشكلية %
$ISSR_1$	-	-	-
$ISSR_2$	15	15	%100
$ISSR_3$	14	14	%100
$ISSR_4$	9	7	%77.8
$ISSR_5$	9	9	%100
$ISSR_6$	10	10	%100
$ISSR_7$	2	0	-
$ISSR_8$	-	-	-
$ISSR_9$	8	7	%87.5
$ISSR_{10}$	6	6	%100
$ISSR_{11}$	16	15	%93.7
$ISSR_{12}$	-	-	-
$ISSR_{13}$	2	2	%100
$ISSR_{14}$	-	-	-
$ISSR_{15}$	-	-	-
$ISSR_{16}$	-	-	-
المجموع	91	85	%93.4
المتوسط	9.1	8.5	



الشكل (2) صورة هلامة الآجاروز2% لملاحظة التعددية الشكلية الناتجة عن استخدام البادئة ($ISSR_5$) في الطرز المدروسة جميعها، M(1Kb) يمثل المؤشر الجزيئي لتحديد الأوزان وأحجام حزم الحمض النووي. DNA.

2- تحديد درجة القرابة الوراثية بين الأنواع المدروسة:

يفيد تحديد درجة القرابة الوراثية ضمن الأنواع في برامج تربية النبات في تأمين قاعدة وراثية كبيرة، للإفادة منها في برامج التربية والتهجين، ودُرست العلاقة الوراثية بين الطرز الوراثية المدروسة بتطبيق مصفوفة النسب المئوية للتوافق Percent (PAV) Agreement Values إذْ إنّ ارتفاع قيم هذه المصفوفة يدلُّ على وجود تقارب وراثيٍ وبازدياده يزداد التقارب الوراثي بين الطرازين المدروسين. تنشأ هذه المصفوفة وفقاً لعدد وحدات التضاعف المشتركة بينها. يلاحظ من الجدول 4 أن أكبر قيمة لـ PAV هي 0.78 بين الطرازين (أفغانستان، المغرب) ويدلُّ هذا على أنهما على درجة كبيرة من القرابة الوراثية، تلاهما الطرازان (تونس، أفغانستان) والطرازان (تونس، إيران) بقيمة 0.77 على التوالي لكل منهما، ثم تلاهما الطرازان (المغرب، روسيا) بقيمة 0.75 والطرازان (تونس، المغرب) بقيمة 0.74، تلاه الطرازان (إيران، اسبانيا)، (الباكستان، اسبانيا) بقيمة 0.50 لكل منها على التوالي، في حين كانت أقل قيمة لها 0.46 بين الطرازين (أفغانستان، الباكستان) ممَّا يدلّ على وجود تباين وراثي كبير بينها.

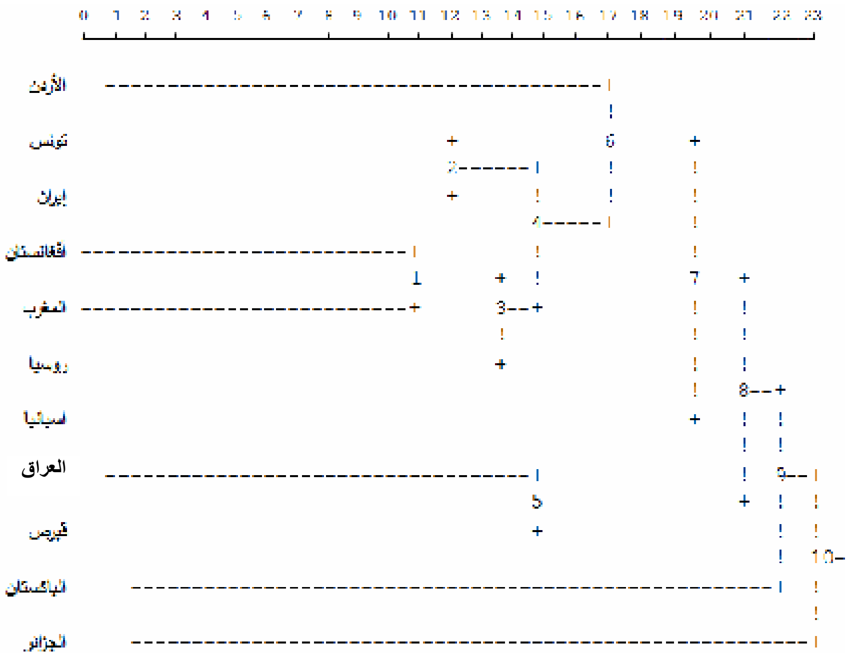
الجدول (4) مصفوفة النسب المئوية للتوافق (PAV) بتطبيق تقنية ISSR بحسب Nei (1987).

	الأردن	تونس	أفغانستان	إيران	العراق	قبرص	الباكستان	الجزائر	المغرب	اسبانيا	روسيا
الأردن	1										
تونس	0.66	1									
أفغانستان	0.68	0.77	1								
إيران	0.65	0.77	0.63	1							
العراق	0.53	0.63	0.58	0.58	1						
قبرص	0.51	0.55	0.60	0.57	0.71	1					
الباكستان	0.55	0.58	0.46	0.66	0.62	0.53	1				
الجزائر	0.53	0.57	0.52	0.58	0.53	0.51	0.55	1			
المغرب	0.68	0.74	0.78	0.69	0.58	0.60	0.57	0.51	1		
اسبانيا	0.58	0.68	0.63	0.50	0.51	0.53	0.50	0.51	0.60	1	
روسيا	0.65	0.71	0.69	0.72	0.65	0.63	0.63	0.58	0.75	0.66	1

التحليل العنقودي Cluster Analysis:

يسمح التحليل العنقودي بتقسيم الطرز الوراثية المدروسة إلى مجموعات تعكس درجة القرابة الوراثية فيما بينها، وقد تتجمع العينات ضمن مجموعة واحدة بناءً على موطنها الأصلي أو بناءً على أصلها ونسبها. أجري التحليل العنقودي للنتائج التي جرى الحصول عليها بهدف إنشاء شجرة القرابة الوراثية dendrogram لتحديد درجة القرابة الوراثية، وقد تبين وجود فرعين رئيسين، ضم الفرع الأول الطراز (الجزائر)، في حين انقسم

الثاني إلى تحت فرعين رئيسين ضم الأول الطراز (الباكستان) في حين ضم تحت الفرع الثاني باقي الطرز المدروسة، وبشكل عام كان الطرازان (أفغانستان، المغرب) الأقرب بمسافة11، في حين تلاهما الطرازان (تونس، إيران) بمسافة 11.7، في حين كان الطراز الجزائر الأبعد عن باقي الطرز بمسافة 23، تلاه الطراز الباكستان بمسافة 21.7، (الشكل3).



الشكل(3) التحليل العنقودي للطرز الوراثية المدروسة الناتج عن استخدام

واستُنتج بأن الواسمات المستخدمة أظهرت فعالية في التمييز بين الطرز الوراثية المدروسة من الحمص المزروع مع وجود تنوع وراثي كبير بين الطرز الوراثية المستخدمة في الدراسة. وكان الطراز الوراثي الجزائر الأكثر بعداً وراثياً عن باقي الطرز الوراثية المدروسة، ما يشير إلى البعد الجغرافي (أو العزل الجغرافي) لم يكن ذا فعالية في تصنيف الطرز المدروسة. ويوصى بإدخال هذه الطرز الوراثية المدروسة في برامج التحسين الوراثي التقليدية لاستنباط أصناف ذات صفات مرغوب فيها.

References المراجع

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

شاهرلي، مخلص. وخالد الأوبري، وغسان نابلسي، وبسام مولوي. 1995. أولويـــات حفـــظ المـــصادر الوراثية البرية في سورية، دمشق، سورية.

Aggarwal, H., A. Rao, J. S. Rana, J. Singh, A. Kumar, V. Chhoka and V. Beniwal. 2011. Inter Simple Sequence Repeats Reveal Significant Genetic Diversity Among Chickpea (*Cicer arietinum* L.) Genotypes. J. Plant Sci.6(5): 202-212.

Bhagyawant, S. S. and N. Srivastava. 2008. Genetic fingerprinting of chickpea (*Cicer arietinum* L.) germplasm using ISSR markers and their relationships. African Journal of Biotechnology 7 (24):4428-4431.

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

Bhadana, P. 2011. Analysis of chickpea using RAPD markers. BioInfo Bank Institute, biolnfobank library.

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

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

Fernández, M. E., A. M. Figueiras and C. Benito. 2002. The use of ISSR and RAPD markers for detecting DNA polymorphism, genotype identification and genetic diversity among barley cultivars with known origin. Theoret. and Appl. Gen. 104: 845–851.

Joshi, S. P., V. S. Gupta.. R. K. Aggarwal. P.K. Ranjekar. and D. S. Brar. 2000. Genetic diversity and phylogenetic relationship as revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) polymorphism in the genus *Oryza*. Theoretical and Applied Genetics 100:1311–1320.

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

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

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

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

Powell, W., M. Morgante, J. J. Doyle, J. Mcnical, S. V.Tingey. A.J. Rafalski. J. M. Vogel, et al. 1996. Generating and using DNA markers in plants. No mammalian Genomic Analysis: A Practical Guide. 4:75-134.

Ramsay, L., M. Macaulay. S. Degli Ivanissevich. K. Macleanm. L. Carsle.; J. Fuller, et al. 2000. A simple sequence repeat-based linkage map of barley. Genetics, 156:1997-2000.

Rao, L.; P. Usha Rani. P. Deshmukh. P. Kumar and S. Panguluri. 2007. RAPD and ISSR fingerprinting in cultivated chickpea (*Cicer arietinum* L.) and its wild progenitor Cicer reticulatum Ladizinsky Genetic. Resources and Crop Evolution, 54(6): 1235-1244.

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

Sudupak, M.A. 2004. Inter and intra-species Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) variations in the genus Cicer. Euphytica, 135(2): 229-238.

Togay, N. Y. Togay. K. Cimrin. and M. Turan. 2008. Effect of Rhizobium inoculation, sulfur and phosphorus application on yield, yield components and nutrient uptake in chicpea (*Cicer arietinum* L.)// Afr. J. Biotechnol.7(6):776-782.

Williams, J. G. K., A. R. Kubelik, K. J. Livak. J.A. Rafalski and S.V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Research 18(22): 6531-6535.

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

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

Received	**2013/02/14**	إيداع البحث
Accepted for Publ.	**2013/04/10**	قبول البحث للنشر