Bull. Fac. Agric., Cairo Univ., 61: 390-398 (2010)

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF SOME *Medicago* SPECIES

(Received: 22.7.2010)

By
G. Tarabin, G. Al Amir, and S. Lawand*

Department of Agronomy, Faculty of Agriculture, Damascus University, Syria
**Department of Medicinal and Aromatic Plants, General Commission for Scientific Agricultural Research, Syria*

ABSTRACT

This investigation was carried out at the Laboratory of Biotechnology at the Faculty of Agriculture - University of Damascus, during the season 2009-2010. Ten wild species and a cultivated one (as a control) were planted to study the genetic diversity among them and to determine the degree of genetic similarity using the ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) technique. The used primers proved their effectiveness in showing polymorphism among the studied species and the control. Primers gave a total of 92 allele with a polymorphic percentage of 100%. The number of bands for each primer varied from a minimum of 5 bands for the primer (ISSR34) to a maximum of 21 bands for the primer (ISSR-41) with an average of 11.5 bands for each primer. Cluster analysis and Dendrogram showed the highest degree of genetic similarity between species *M. rotata* and *M. polymorpha* (0.23), while it was low between species *M. orbicularis* and both species *M. rotata* and *M. intertexta* (0.57). Results showed a vast genetic diversity among the studied species.

***Key words**: genetic diversity, medicago, molecular characterization.*

التوصيف الجزيئي لبعض أنواع الجنس *Medicago*

جورج طربين -غيداء الأمير- سلام لاوند*

قسم المحاصيل الحقلية- كلية الزراعة - جامعة دمشق - سورية
*قسم النباتات الطبية والعطرية - الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية- سورية

ملخص

نفذ هذا البحث في مخبر التقانات الحيوية التابع لكلية الزراعة-جامعة دمشق خلال موسم 2009-2010. زرعت عشرة أنواع برية ونوع مزروع (كشاهد) من أجل دراسة التنوع الوراثي لهذه الأنواع وتحديد درجة القرابة الوراثية فيما بينها وذلك باستخدام تقانة ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) واستخدم لهذا الغرض 8 بادئات. أثبتت البادئات المستخدمة فعاليتها في إعطاء تعددية مظهريه Polymorphic بين الأنواع المدروسة والشاهد ونجم عن استخدامها مجموعه 92 أليل (قرين)، وبلغت نسبة هذه التعددية 100 %، تراوح عدد الحزم لكل بادئة بين 5 حزم كأقل عدد مع البادئة (ISSR34)و21 حزمة كأعلى عدد مع البادئة (ISSR- 41) بمتوسط 11.5 حزمة لكل بادئة. أظهر كلاً من التحليل العنقودي وشجرة القرابة الوراثية أن أعلى درجة قرابة وراثية كانت بين النوعين *M. rotata* و*M. polymorpha* (0.23) في حين كانت أقل درجة قرابة وراثية بين النوع *M. orbicularis* وكلا النوعين *M.rotata* و *M.intertexta* (0.57). دلت النتائج على التنوع الوراثي الكبير للأنواع البرية لجنس *Medicago* في سورية.

1. مقدمة

تمتاز سورية بتباينات جغرافية ومناخية وبيئية لها انعكاساتها على الغطاء النباتي من حيث التنوع على مستويات الأنظمة البيئية والأنواع وحتى على المستوى الوراثي من حيث تحت الأنواع والسلالات داخل النوع الواحد وقد شمل هذا التنوع موارد وراثية متباينة كالحبوب والبقوليات، حيث تعد البقوليات مجموعة غذائية هامة يوجد في سورية العديد من أجناسها الغذائية والعلفية مما يجعلها من أهم مراكز نشوء هذه الأجناس في هذه المنطقة.

يعد التنوع الوراثي الموجود ضمن الأنواع النباتية جزءاً هاماً من التنوع الحيوي، حيث تتميز المصادر الوراثية النباتية بتنوعها الوراثي الكبير وبقدرتها على تحمل الإجهادات الإحيائية واللإحيائية وال تبكير في النضج (شاهرلي وآخرون، 1995). تشمل هذه المصادر طائفة متنوعة من الموارد الوراثية والأصناف المزروعة حديثاً بالإضافة إلى الأقارب البرية وغيرها من أجناس النبات المستخدمة كغذاء حيث تشكل هذه الموارد المادة الخام الأهم لمربي النبات ومورد أساسي للمزارعين كما أنها ذخيرة للتطويع الوراثي للوقاية من التغيرات البيئية والاقتصادية الضارة المحتملة (Lane, 2007). وفيما يتعلق بالجنس موضوع الدراسة (*Medicago* L.) فإن أنواعه تشكل ذخيرة وراثية ذات أهمية محلية وعالمية، تجمع وتصنف وتخزن في بنوك للأصول الوراثية، لكي يتسنى للمختصين القيام بدراسات وبحوث عليها بهدف انتخاب وتربية الأنواع والأصناف الملائمة للظروف المحلية، وتحسين الأنواع المزروعة لمنعها من الانقراض وإنتاج السلالات والهجن والأصناف الملائمة للظروف البيئية والزراعية والإنتاجية المختلفة، هذا وبالإضافة إلى أن أنواعه تستخدم كعلف للحيوانات لكونها مصدراً ممتازاً للفيتامينات والعناصر المعدنية بالإضافة إلى أنها يمكن أن تعمل كحاجز للحد من انتشار الأمراض والحشرات على المحاصيل الأخرى المتعاقبة بالدورة الزراعية (Bauchan and Greene, 2000 وتشكل أحد المصادر الرعوية والعلفية الهامة في المناطق الجافة من سورية لأن لها مقدرة على التأقلم مع نطاق واسع من المناخات بالإضافة إلى أنها تتحمل الجفاف وملوحة التربة، وتحسن من خواص التربة ال طبيعية والكيميائية حيث تضيف كميات جيدة من الآزوت والمادة العضوية، وتحمي التربة من التعرية والانجراف (Anand *et al*., 2000).

تشكل محاولات البحث عن معايير جديدة للتمييز بين الوحدات التصنيفية، واحدة من مهام علم التصنيف النباتي، كما تعد دراسة الغطاء النباتي، وتحديد مناطق انتشار الأنواع في سورية مهمة ملحة وهامة نظراً لقلة الدراسات المتخصصة في هذا المجال، خاصة تلك المنجزة بواسطة الخبرات المحلية وبلغتنا العربية وبما أن سورية أحد أهم مراكز التنوع الوراثي لهذه الفصيلة(البقولية) Fabaceae، ولأنواع الجنس موضوع الدراسة (*Medicago* L.) لذا يعد حصر هذه الأنواع وتوصيفها بدقة وراثياً (جزيئياً) ومورفولوجياً ذو أهمية كبيرة (مخول والعبد، 2005).

ورغم أهمية الصفات الشكلية والخصائص الف سيولوجية وكذلك الخصائص الشكلية المظهرية الزراعية إلا أن الحاجة للمؤشرات الجزيئية أصبحت أكثر أهمية وإلحاحاً ويرجع ذلك للأسباب التالية:

توفر المؤشرات الجزيئية نتائج مبكرة مما يساعد في الإسراع بعمليات الانتخاب والتربية (Powell *et al*., 1996)، وبذلك تختصر الزمن الذي تستغرقه إضافة إلى خفض كلفة المادة التي تحتاجها الدراسات المورفولوجية(سيد، 2001)، وعدم وجود أي علاقة بين الأطوار والفينولوجية للنبات والمؤشرات الجزيئية وبالتالي يمكن استخلاص المادة الوراثية من الدنـا (DNA) من المراحل الأولى للنبات، وسهولة تحديد موقع وراثي مطلوب لطراز وراثي معين Genotype مباشرة، وعدم تأثر المؤشرات بالشكل الظاهري للنباتات والمؤشرات البيئية كما في برامج التربية التقليدية، والحصول على عدد كبير من المؤشرات بزمن قصير نسبياً. كما أوضح Qi *et al*., 1996, Ramsay *et al*., 2000 أن استخدام تقانات المؤشرات الجزيئية، يمكن أن يقلل من تعقيدات إدخال عدد من الصفات المرغوبة في النمط الوراثي الواحد. كذلك يمكن استخدام المؤشرات الجزيئية بشكل فعال في تحاليل التنوع الوراثي وتقدير التشابه الوراثي (Powell *et al*., 1996; Eleuch *et al*., 2008).

طُور التفاعل التسلسلي البوليميرازي (البيسرة) (Polymerase Chain Reaction- PCR) من قبل الباحث (Saiki *et al*.,1985) الذي كان له أثراً مهماً على صعيد الدراسات الوراثية الجزيئية، حيث يعد هذا الإنجاز تطوراً هاماً ساعد في سرعة وكفاءة غربلة العديد من المجموعات الانعزالية (Saiki *et al*., 1985; Tragoonrung *et al*., 1992). يقوم هذا التفاعل بمضاعفة Amplification قطع محددة من الدنـا (DNA) باستخدام بادئات عشوائية أو متخصصة مصممة لهذا الهدف، مما يسمح بالحصول على ملايين النسخ المضاعفة من قطعة واحدة من الدنـا (DNA) التي تتضاعف أسياً، وذلك باستخدام دورات حرارية متعددة (Karp *et al*., 1997; Ayad *et al*., 1997 ; سيد، 2001). وقد ساعد تصنيع أجهزة التدوير الحراري automated thermo cycler واكتشاف أنزيم البوليميراز DNA Polymerase في تطوير هذا التفاعل وفي ظهور تقانات أخرى تعتمد عليه وتستخدم في إجراء التحاليل الوراثية وإنشاء خرائط الارتباط الوراثية (Saiki *et al*., 1988; Rafalski *et al*.,1996). تعد تقنية التوابع الترادفية البسيطة الداخلية (Inter Simple Sequence Repeats- ISSR) واحدة من التقانات الهامة حيث طبقت من قبل(Ziekiewicz *et al*.1994,)، وهي تعتمد على فاعل البيسرة (PCR) ومؤشرات جزيئية مثالية للأسباب التالية:

تُضخم منطقة التوابع الترادفية البسيطة ويستخدم بادئ وحيد مؤلف من قطع متكررة ومحاط في بعض الأحيان بـ 2-4 نوتيده إما في المنطقة ' 3 أوفي المنطقة 5' حيث أن تقنية ISSR توصف بأنها أكثر تكرارية من تقنية الرابيد RAPD بسبب طول البادئ المستخدم والذي يعكس درجة حرارة عالية لمرحلة تشفع البادئات (Chowdhury *et al.*, 2002). إمكانية الكشف عن التتاليات النيوتيدية ذات السيادة في التوريث، ووفر ة و جودها في الاطقم الوراثية لحقيقيات النوى النباتية ولاتحتاج إلى معلومات عن التسلسل الجيني المدروس (Kijas *et al.*,1995). نتائجها ثابتة عند تكرارها وسريعة كما أنها تتطلب كمية قليلة من الدناDNA. يمكن أتمتتها automation حيث أنه يمكن نشر البادئات وتبادلها بسهولة بين المخابر بمجرد معرفة التسلسل النكليوتيدي لها. تكشف نسب عالية من التعددية الشكلية polymorphism وبنفس مقدرة تقنية SSR، كما استخدمت هذه التقنية لدراسة التنوع الوراثي في البطاطا(Bornet *et al.*, 2002) والشعير (Ferández *et al.*, 2002) والارز (Joshi *et al* ., 2000) والقمح (Nagaoka and Ogihara, 1997).

قام Petolescu and Nedelea (2009) بدراسة التنوع الوراثي في30 طرازاً وراثياً من النوع *M. sativa* باستخدام تقنية ISSR حيث أعطت خمس بادئات تعددية شكلية و تراوح الوزن الجزيئي للحزم ما بين 130-2420 pb و تراوح عدد الحزم النقية من كل بادئ 10-26.

قام Touil *et al.*, (2008) بدراسة 26 عشيرة نباتية للنوع *M. sativa* (12 عشيرة محلية موطنها جنوب تونس و14 مدخلة من إيطاليا، أستراليا، فرنسا، المغرب) باستخدام بادئين من بادئات ISSR حيث أظهرت هذه البادئات تعددية شكلية كبيرة حيث تراوح عدد الحزم مابين 8-9 حيث انقسمت هذه العشائر إلى 4 مجموعات كبيرة تم الحصول عليها.

أجرى Valizadeh *et al.*, (1996) دراسة على 9 أنواع تعود إلى أربعة تحت أجناس تنتمي للجنس *Medicago* باستخدام تقنية RFLP حيث تم تحليل 85-132 من حزم الريفليبات RFLP والتي تم الحصول عليها من الدنـا (DNA) الخاص بالصانعات الخضراء (الكلوروبلاستيدات) حيث وجد أن أكثر الأنواع قرابة هي *M.truncatula*، *M .sativa* والأكثر اختلافاً هو النوع *M.lupulina*.

أجرى Sigovia-Lerma *et al.*, (2003) تقييماً لثلاثين طرازاً وراثياً من الفصة المزروعة *Medicago sativa* L. تم جمعها من عدة بلدان وذلك باستخدام 34 زوجا من البادئات الـ AFLP أعطت 3754 حزمة تم من خلالها التعرف على 1541 حزمة ذات تعددية شكلية. كان عدد الحزم يتراوح بين 20 إلى 85 حزمة لكل زوج من البادئات.

2. المواد وطرق العمل

1.2. المواد المستخدمة

1.1.2 المادة النباتية

جمعت التراكيب الوراثية المدروسة من عدة قرى من المحافظات السورية كما في الجدول (1) وذلك من خلا ل القيام بالعديد من جولات الجمع الحقلية.

2.2. طرق العمل

1.2.2 تعقيم البذور وزراعتها

عقمت البذور حيث نقعت في م حلول الإيثانول تركيز 70% لمدة 30 ثانية، بعد ذلك نقلت إلى ثلاثة دو ارق زجاجية بالتوالي يحوي كل منها ماء مقطر معقم، تركت في كل بيشر لمدة 5 دقائق، ونقلت هذه البذور لوضعها في بيشر يحوي مادة كلوروكس 5 % لمدة 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 الدناDNA.

2.2.2 استخلاص الدنـا DNA بطريقة SDS

طحن 1جرام من الأوراق الخضراء باستخدام الآزوت السائل حتى الحصول على مسحوق ناعم ، نقل بعدها إلى حوجلة زجاجية سعة 50 مل وأضيف لها 10 مل من محلول الاستخلاص SDS (Sodium Dodecyle Sulphate) والمكون من (0.1 M Tris-HCl,PH=8.2, 50mM EDTA, o.1M NaCl, 2% SDS, 1 mg /ml proteinase K). حضنت العينات لمدة 60 دقيقة مع التحريك المستمر ضمن حمام مائي عند 37°م. أضيف 10 ml من مزيج كل من كلوروفورم/أيزواميل كحول بنسبة 1:24 . نقل المزيج إلى أنبوب تثفيل سعة 30 مل وثقل المزيج (عملية الطرد المركزي) لمدة 10 دقائق بسرعة (10000 rpm) بدرجة حرارة 4°م. أضيف الإيزوبروبانول Iso-propanol بمعدل 3/2 من حجم الوسط المائي، نقل الدنـا(DNA) المترسب إلى أنبوب صغير سعة 2 مل وأضيف 0.5مل من محلول الغسيل Washing buffer (كحول إيثيلي 76%)البارد (المحفوظ بدرجة – 20ْم) بالتثفيل بسرعة (10000 rpm) لمدة 10 دقائق وبدرجة حرارة 4ْم . أذيبت عينات الدنـا(DNA) في 500 ميكروليتر من المحلول المنظم TE المكون من (10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA). تم التخلص من الرنـا RNA بإضافة (2 µl) من أنزيم RNase(10 mg /ml) والتحضين على درجة (37° م) مدة نصف ساعة، و أضيف حجم مماثل من الكلوروفورم: ايزوميل الكحول (1:24). وبعد التثفيل ونقل الطور العلوي لأنبوب جديد أضيف له ضعف كمية المزيج من الإيتانول النقي ethanol لإعادة ترسيب الدنـا DNA، وترك عند الدرجة(4°م) لمدة ساعة ثم رسب المزيج بالتثفيل بسرعة (10000rpm) و لمدة 10 دقائق وغسل ثانية بواسطة الإيثانول 70% و جفف في الهواء للتخلص

الجدول (1): الأنواع المدروسة و بيانات جمعها(خطوط الطول والعرض مأخوذة حسب النظام العشري).

خط العرض N	خط الطول E	الارتفاع م	منطقة الجمع		الاسم العلمي للأنواع المدروسة	الأنواع المدروسة
			القرية	المحافظة		
32.595	36.58	430	قلعة صلاح الدين	اللاذقية	*M. minima* Lam.	نوع بري
33.717	36.107	1110	الزبداني	دمشق	*M. rigidula* (L.) Desr.	نوع بري
34.709	36.613	200	عين التينة	حمص	*M. rotata* Boiss.	نوع بري
34.673	36.232	300	تل كلخ	حمص	*M. intertexta* (L.)Miller	نوع بري
36.215	36.597	380	حارم	ادلب	*M. blancheana* Boiss.	نوع بري
35.758	36.363	230	جسر الشغور	ادلب	*M. polymorpha* L.	نوع بري
35.918	35.973	800	كسب	اللاذقية	*M. turbinata* (L.) Willd.	نوع بري
35.088	36.197	970	المقرمدة	طرطوس	*M. scutellata* Mill.	نوع بري
33.717	36.107	1110	الزبداني	دمشق	*M. orbicularis* (L.) All.	نوع بري
33.682	36.100	1300	الزبداني	دمشق	*M. sativa* L.	نوع مزروع
35.148	36.092	740	الحطانية	طرطوس	*M. truncatula* Gaerth.	نوع بري

من آثار الإيثانول أذيب الدنـا DNA في محلول TE المعقم.

3.2.2. التقدير الكمي والنوعي للدنـاDNA

استخدم جهاز Power WaweXTM (BIO-TEK Instruments, Inc.) لتقدير كمية الدنـا DNA وتحديد نقاوته حيث يعتمد الجهاز في عمله على قياس كمية الدنـاالموجودة عن طريق تقديره لامتصاص الدنـا DNA للأشعة فوق البنفسجية بموجات طولها 260 و 280 نانومتر. حيث ذكر Maniatis *et al* عام 1982 أن النسبة بين قراءة الموجة 260 نانومتر والموجة 280 نانومتر OD 260/ OD 280 تساعد في تقدير نقاوة الدنـاإذ يجب أن تتراوح هذه النسبة بين 1.8-2. تم التقدير النوعي على جل Agaros 0.8% ، إذ يظهر (الدنـا) ذو النوعية الجيدة على شكل حزمة Band، بينما يكون (الدنـا) سيء النوعية مبعثراً وغير واضح الحدود ومقطّع Smear.

4.2.2. تقنية الـ ISSR المطبقة لإجراء الدراسة الجزيئية

اختبر(8) بادئات تم الحصول عليها من الهيئة العامة للطاقة الذرية في سورية بتركيز (10 mM)، ويوضح الجدول رقم (2) التسلسل النوتيدي للبادئات المستخدمة في الدراسة.

أجري تفاعل البيسره PCR وفقاً لطريقة Williams *et al.,* 1990 مع بعض التعديلات فكان حجم التفاعل النهائي (25 µl) كما يظهر الجدول رقم (3) مكونات هذا

جدول رقم (2) : التسلسل النكليوتيدي للبادئات المختبرة في تقانة ISSR.

التسلسل النوتيدي 3' - 5'	البادئة
AGAGAGAGAGAGAGAGC	ISSR-32
GAGAGAGAGAGAGAGAT	ISSR-33
CTCTCTCTCTCTCTCTG	ISSR-34
CACACACACACAACAG	ISSR-35
TCTCTCTCTCTCTCTCC	ISSR-36
TGTGTGTGTGTGTGTGG	ISSR-37
ACACACACACACACACTT	ISSR-40
ACACACACACACACACGG	ISSR-41

التفاعل الذي تم الحصول عليه من شركة (Fermentas, Germany):

ويتم هذا التفاعل في جهاز التدوير الحراري وفقاً للظروف التالية :

1- الانفصال : عند درجة حرارة 94°م لمدة 5 دقائق ليتم انفصال سلسلتي الدنـا.

جدول رقم (3) : مكونات تفاعل البلمرة المتسلسل PCR

الكميات	مكونات تفاعل البيسره PCR
0.05 units/µl	Taq DNA Polymerase
4 Mm	MgCl2
2.5 µl	dNTPs
2 µl (25 ng/µl)	DNA
2.5 µl (10pmol/µl)	Primer
10X	Buffer
	H_2O

2- 40 دورة تتضمن كل منها المراحل التالية:التحطم : يتم عند حرارة 94°م لمدة 30 ثانية. الالتحام: عند

حرارة 51°م لمدة دقيقة واحدة . الاستطالة: عند حرارة 72°م لمدة دقيقة .

3- اكتمال التفاعل عند حرارة 72°م مدة عشر دقائق. ثم تحفظ العينات في درجة حرارة 4°م لتفصل الحزم بعدها بالتفريد الكهربائي علي چل الاجاروز.

5.2.2. التفريد الكهربائي والتلوين والتصوير

تم التفريد الكهربائي علي چل 2 % في المحلول المنظم TBE 1X (10X TBE buffer = 108 g Tris borate + 55 g } {Boric acid + 9.2 EDTA,pH 8.0) و المضاف اليها 5µl من صبغة الايثيديوم بروومايد (10 mg/ml)

حملت عينات الدنـا DNA على چل الآجاروز بإضافة 5 ميكرولتر من سائل التحميل الخاص (1X Loading buffer Bromophenol blue) والمكـون من (15% Ficoll 400 + 1.03 % bromophenol Blue + 0.03 % xylene cyanol FF + 0.4 % Orange G + 10 mM Tris-HCl + 50 mM EDTA)

الناتجة عن التضخيم. تم تصوير الـچل باستخدام جهاز Image Analyzer (Agle Eye II Staratagene).

3.2. تحليل النتائج

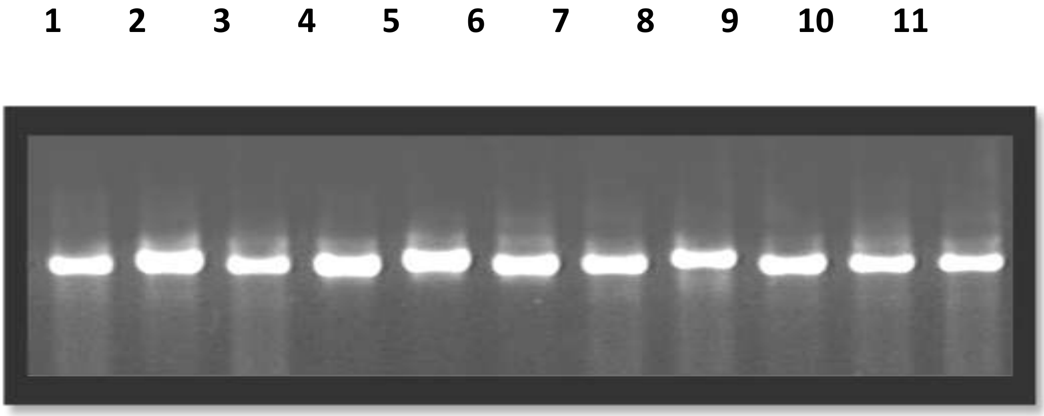
جمعت نتائج عملية التضخيم في جداول اعتماداً على مقارنة وجود أو غياب حزم الدنـا DNA بين النباتات المدروسة، حيث أعطي الرقم (1) عند وجود حزمة الدنـا DNAوالرقم (0) لعدم وجود الحزمة، ذلك يتضمن الحزم الواضحة فقط وقد نظمت الجداول لكل بادئة على حدى، ورسمت شجرة القرابة الوراثية Dendrogram بتطبيق متوسطات المجموعات الزوجية غير المزانة UPGMA Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averaging باستخدام برنامج Pop gene 1.31 الإحصائي طبقا لطريقة Nei (1987).

3.النتائج والمناقشة

1.3. الدراسة الوراثية على مستوى الدنـاDNA

استخلص الدنـا DNA من البادرات الفتية بعمر 2-3 أسابيع وقيس تركيزه ونقاوته بجهاز المطياف الضوئي حيث تراوحت التراكيز بين 0.56 و 1 ميكرو جرام /ميكروليتر ونقاوة العينات بين 1.8-2، وخفف تركيز الدنـا DNA ليصبح 40 نانو جرام/ميكروليتر، وطبقت عملية التفريد الكهربائي على هلامة الآجاروز بتركيز 0.8 % لمعرفة نوعية الدنـا DNA المستخدم.

ثم طبقت تقنية ISSR باستخدام 8 بادئات . فأعطت البادئات الثماني حزم واضحة وذات تعددية شكلية كما يبين الشكل(2) هذه الحزم.

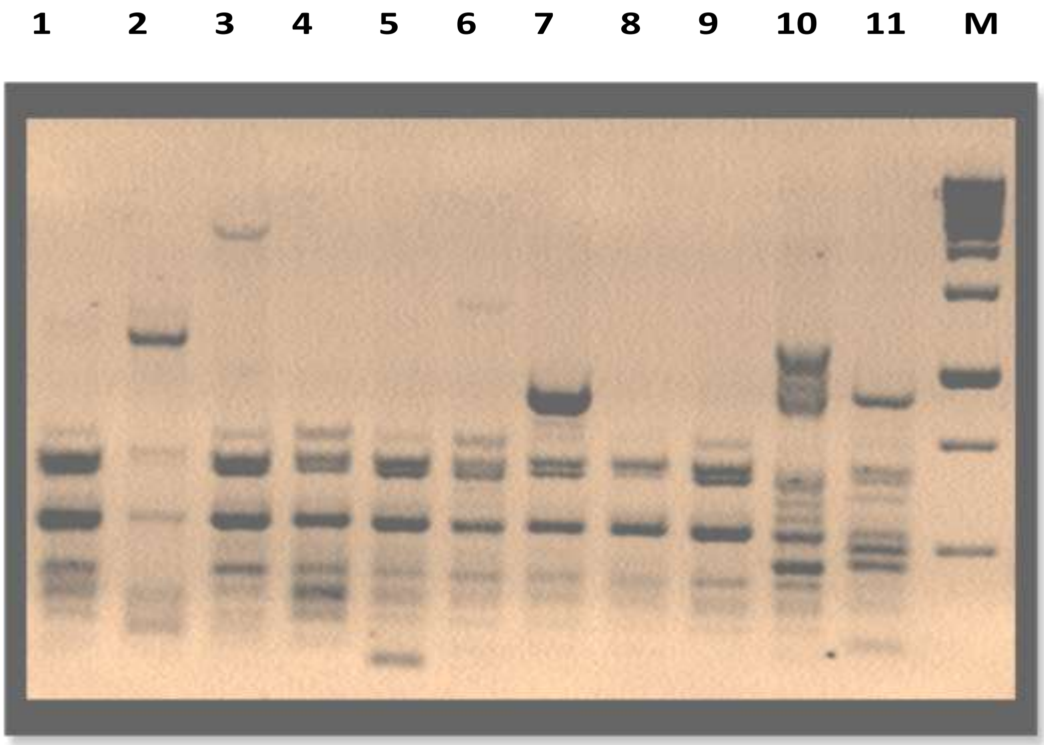


الشكل(1): صورة هلامة الآجاروز بتركيز 0.8% لتحديد نوعية الدنـاDNA.

كما تم حقن مؤشر من الدنـا(DNA 1Kpb من شركة (Fermentas, Germany) وذلك لتحديد الحجم و الوزن الجزيئي للحزم الناتجة ليتم بعد ذلك التفريد بمرور حقل كهربائي قدره 100 فولت وذلك لفصل حزم الدنـا

2.3. التعددية الشكلية Polymorphism الناتجة عن تطبيق تقنية ISSR

تضمنت الدراسة اختبار الأنواع العشرة البرية للفصة والنوع المزروع الذي استخدم كشاهد. يبين الجدول (4) أن



الشكل (2): صورة هلامة الآجاروز 2% لملاحظة التعددية الشكلية الناتجة عن استخدام البادئة (ISSR-32) في جميع الأنواع المدروسة والشاهد M يمثل المؤشر الجزيئي لتحديد الأوزان وأحجام حزم الدنـا DNA.
(1): *M.minima*, (2): *M.rigidula*, (3): *M.rotata*, (4): *M.intertexta*,
(5): *M.blancheana*, (6): *M.polymorpha*, (7): *M.turbinata*, (8): *M.scutellata*,
(9): *M.orbicularis*, (10): *M.sativa*, (11): *M.truncatula*, M :(1Kb)معلم جزيئي

جميع البادئات المستخدمة أعطت منتجات تضخيم في تفاعل البلمرة المتسلسل حيث أثبتت البادئات المستخدمة فعاليتها في إعطاء تعددية شكلية بين الأنواع المدروسة والشاهد ونجم عن استخدام هذه البادئات ما مجموعه 92 حزمه، حيث أعطت جميع هذه البادئات تعددية شكلية polymorphic ونسبة التعددية 100 % ، كما تراوح عدد الحزم لكل بادئة بين 5 حزم كأقل عدد مع البادئة (ISSR34) و21 حزمة كأعلى عدد مع البادئة (ISSR-41) بمتوسط 11.5 حزمة لكل بادئة.

3.3. تحديد درجة القرابة الوراثية بين الأنواع المدروسة

يفيد تحديد درجة القرابة الوراثية ضمن الأنواع في برامج تربية النبات، لتأمين قاعدة وراثية كبيرة، للاستفادة منها في برامج التهجين. وتمت دراسة العلاقة الوراثية بين نباتات أنواع الفصة المدروسة بتطبيق مصفوفة النسب المئوية لعدم التوافق Percent Disagreement (PDV) Values حيث أن ارتفاع قيم هذه المصفوفة يدل على وجود اختلاف وراثي وبازدياداها يزداد التباين الوراثي بين النباتين المدروسين ويتم إنشاء هذه المصفوفة وفقاً لعدد وحدات التضاعف المشتركة. نلاحظ من خلال الجدول (5) أن أقل قيمة لـ PDV هي 0.23 بين النوع *M.rotata* والنوع *M.polymorpha* بينما كانت أعلى قيمة لها 0.57 بين النوع *M.orbicularis* والنوعين *M.rotata*، و*M.intertexta* مما يدل على وجود تباين وراثي كبير بينها.

4.3. التحليل العنقودي Cluster analysis للأنواع المدروسة والشاهد الناتج عن استخدام تقنية ISSR

يسمح التحليل العنقودي بتقسيم الأنواع المدروسة إلى مجموعات، وتعكس هذه المجموعات درجة القرابة الوراثية فيما بينها، وقد تتجمع العينات ضمن مجموعة واحدة بناءاً على موطنها الأصلي أو بناءاً على أصلها ونسبها. أجري التحليل العنقودي للنتائج التي تم الحصول عليها وذلك لإنشاء شجرة القرابة الوراثية Dendrogram لتحديد درجة القرابة الوراثية ورسم شجرة القرابة الوراثية بين الأنواع المدروسة والشاهد *M.sativa*. ولوحظ من الشكل (3) أن الأنواع المدروسة انقسمت إلى تحت عنقودين ضم الأول الأنواع: *M.minima* ، *M.rotata*، *M.polymorpha*، *M.blancheana*، *M.intertexta* حيث وجد أن النوعين *M.rotata*، *M.polymorpha* على درجة عالية من القرابة الوراثية بمسافة 11.57، في حين ضم تحت العنقود الثاني الأنواع: *M.rigidula*، *M.turbinata*، *M.scutellata*، *M.sativa*، *M.truncatula*، *M.orbicularis* حيث انقسمت أنواعه إلى تجمعين ضم الأول النوعين *M.sativa*،

```
                              18.41
       M.minima ----------------------------------------------+
                                          !
       M.rotata -----------------------------+           7----+
          11.57                   1---------+      !    !
   M.polymorpha -----------------------------+       4-------+    !
          15.48                        !          9----+
   M.blancheana--------------------------------------+         !    !
          20.36                                          !    !
   M.intertexta--------------------------------------------------+    !
          15.48                                               !
     M.rigidula---------------------------------------+             !
                         5-----+         10-
    M.turbinata ------------------------------------+  !     !         !
          14.38                        3--+     !          !
   M.scutellata------------------------------------+       6----+     !
                          !    !    !
       M.sativa ----------------------------------+        !    !    !
          13.66                   2---------+   8-----+
    M.truncatula-----------------------------------+            !
          19.75                                               !
   M.orbicularis --------------------------------------------------+
```

الشكل (3) التحليل العنقودي Cluster Analysis للأنواع المدروسة والشاهد، الناتج عن استخدام تقنية ISSR.

جدول (4): رموز البادئات المستخدمة، عدد الحزم الكلية والمتباينة، النسبة المئوية للتعددية الشكلية % في الأنواع المدروسة.

اسم البادئ	عدد الحزم الكلية	عدد الحزم المتباينة	النسبة المئوية للتعددية الشكلية%
ISSR-32	18	18	100
ISSR-33	17	17	100
ISSR-34	5	5	100
ISSR-35	7	7	100
ISSR-36	6	6	100
ISSR-37	7	7	100
ISSR-40	11	11	100
ISSR-41	21	21	100
المجموع	92	92	100
المتوسط	11.5	11.5	100

M.truncatula حيث بلغت المسافة الوراثية 13.66، في حين ضم التجمع الثاني النوعين *M.scutellata* ، و*M.turbinata* بمسافة وراثية بلغت 14.38.

4. الاستنتاجات والمقترحات

- تم تقييم التنوع الوراثي لنباتات الفصة بتطبيق تقنية ISSR والتي أظهرت فعالية في التمييز بين هذه النباتات بالاعتماد على نتائج 8 بادئات فكانت نسبة التعددية الشكلية 100%.

- أعطت جميع البادئات المستخدمة منتجات تضخيم في تفاعل البلمرة المتسلسل حيث أثبتت البادئات المستخدمة فعاليتها في إعطاء تعددية شكلية بين الأنواع المدروسة ونجم عن استخدام هذه البادئات ما مجموعه 92 حزمه جميعها ذات تعددية شكلية polymorphic.

- تكثيف الجولات الحقلية لتشمل الجزء الأكبر من مناطق سورية ومتابعة المحاولة لوضع خارطة لانتشار أنواع الفصة البرية في سورية.

جدول (5) : مصفوفة النسب المئوية لعدم التوافق (PDV) بين الأنواع المدروسة والشاهد والناتجة عن تطبيق متوسطات المجموعات الزوجية غير المزانة UPGMA بتطبيق تقانة الـ ISSR بالاعتماد على (Nei, 1987).

	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**
1	0										
2	0.41	0									
3	0.36	0.51	0								
4	0.39	0.41	0.39	0							
5	0.36	0.44	0.30	0.46	0						
6	0.38	0.39	0.23	0.38	0.32	0					
7	0.38	0.30	0.44	0.41	0.35	0.33	0				
8	0.33	0.32	0.43	0.43	0.39	0.41	0.29	0			
9	0.39	0.44	0.57	0.57	0.43	0.48	0.38	0.36	0		
10	0.43	0.32	0.50	0.46	0.46	0.44	0.38	0.30	0.39	0	
11	0.46	0.38	0.50	0.50	0.50	0.55	0.41	0.33	0.39	0.27	0

(1): *M.minima*,(2): *M.rigidula*, (3): *M.rotata*,(4): *M.intertexta*,(5): *M.blancheana*,(6): *M.polymorpha*,
(7): *M.turbinata*, (8): *M.scutellata*, (9): *M.orbicularis*, (10): *M.sativa*, (11): *M.truncatula*

- العمل على عزل وتحديد مواقع المورثات المس ئولة عن الصفات الهامة باستخدام QTLs للاستفادة منها في برامج التربية واستخدامها كآباء في عمليات التهجين.

5.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؛ الأوبري، خالد؛ نابلسي، غسان ومولوي، بسام.(1995). أولويات حفظ المصادر الوراثية البرية في سوريا، دمشق، سوريا.

مخول، جرجس والصالح العبد، بسام.(2005). دراسة تصنيفية لجنس *Medicago* L. فصيلة) Fabaceae (Lindl.) في محافظة اللاذقية باستخدام معايير مورفولوجية وتشريحية، مجلة جامعة تشرين للدراسات والبحوث العلمية- سلسلة العلوم البيولوجية،27(1):25-47.

5. REFERENCES

Anand A., Baig M.J. and Mandal, P.K.(2000). Response of alfalfa genotypes to saline water irrigation. Biol. Plant. 43: 455-457.

Ayad W.G., Hodgkin T., Jaradat A and Rao V.R.(1997). Molecular genetic techniques for plant genetic resources. Report for an IPGRI workshop, IPGRI, Rome, Italy, p.p. 11-12.

Bauchan G.T. and Green S. (2000). Report on the Status of *Medicago* Germplasm in the United States. Alfalfa C. G. C., USDA-ARS.

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.

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.

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 germplasm using simple sequence repeat markers. J. Integr. Plant Biolo. 50(8):1005-1015.

Fernández ME., Figueiras AM. 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. Theoretical and Applied Genetics 104: 845–851.

Joshi S.P., Gupta V.S., Aggarwal R.K., Ranjekar, P.K. and Brar, D.S. (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.

Karp A., Kresovich S., Bhat K. V., Ayad W. G. and Hodgkin, T.(1997). Molecular tools in plant genetic resources conservation: a guide to the technologies. 1st ed. IPGRI Technical Bulletin NO. 2. IPGRI, Rome, Italy, pp. 9-21.

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.

Lane A. (2007). An introduction to crop wild relatives, Geneflow, Publication about Agricultural Biodiversity, Biodiversity International, p:19.

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

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.

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

Petolescu C. and Nedelea G.(2009). Genetic Diversity Analysis of the *In Vitro* Regenerated Alfalfa Plants Using Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) Markers. Romanian Biotechnological Letters ,1416: 4882-4886.

Powell W., Morgante M., Doyle J.J., Mcnical J., Tingey S.V. and Rafalski A.J. (1996). Genepool Variation in Genus *Glycine Subgenus* Soja Revealed by polymorphic Nuclear and chloroplast microsatellites, Genetics 144:793-803.

Qi X., Stam P. and Lindhout P.(1996). Comparison and integration of four barley genetic maps. Genome 39:379–394.

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.

Ramsay L., Macaulay M., Degli Ivanissevich S., Maclean K., Carsle L., Fuller J., Edwards K.J., Tuvesson S., Morgante M., Massari A., Maestri E., Marmiroli N., Sjakste T., Ganal M., Powell W. and Waugh R. (2000). A simple sequence repeat- based linkage map of barley. Genetics 156:1997-2005.

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.

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.

Sigovia- Lerma, A., Cantrell, R. G., Conway, J. M. and Ray, I. M.(2003). AFLP- based assessment of genetic diversity among nine alfalfa germplasms using bulk DNA templates. Genome 46: 51-58.

Touil L., Guesmi F., Fares K., Zagrouba, C. and Ferchichi A. (2008). Genetic Diversity of Some Medditerranean Populations of the Cultivated Alfalfa (*Medicago stiva* L.) Using ISSR Markers, Pakistan Journal of Biological Sciences11(15): 1923-1929.

Tragoonrung S., Kanazin V., Hayes P.M. and Blake T.K. (1992). Sequence tagged site facilitated PCR for barley genome mapping. Theor. Appl. Genet. 84:1002-1008.

Valizadeh M., Kang K. K., Kanno A and Kameya, T.(1996). Analysis of genetic distance among nine *Medicago* species by using DNA polymorphisms. Breeding Science 46:pp. 7-10

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

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