مجلة جامعة تشرين للدراسات والبحوث العلمية _ سلسلة العلوم البيولوجية المجلد (29) العدد (3) 2007
Tishreen University Journal for Studies and Scientific Research - Biological Sciences Series Vol. (29) No. (3) 2007

توزع التنوع الوراثي للشعير في اليمن وتقييمه من خلال مؤشرات الـ AFLP

الدكتورة وفاء شومان*
الدكتور محمد معلا**
محمد العزي الخولاني***

(تاريخ الإيداع 3 / 4 / 2007. قبل للنشر في 2007/6/26)

□ الملخّص □

تم تقدير التنوع الوراثي لمجموعة من الشعير مكونة من مئة و خمسة وثلاثين مدخلاً، جمعت من إحدى عشرة منطقة مختلفة في اليمن، وذلك باستخدام مؤشرات الـ AFLP (المؤشرات المبنية على مكاثرة قطع الـ DNA المتباينة والناتجة عن الهضم الانزيمي). تم استخلاص الـDNA وتحليله باستخدام خمسة أ زواج من البادئات. كان العدد الكلي لقطع الـ DNA الناتجة عن المكاثرة مساوياً لـ 178قطعة. كانت نسبة القطع المتباينة ضمن كامل المجموعة مساوية لـ 78%. تراوح معدل التنوع الوراثي ما بين 0.28- 0.41. وجدت أعلى نسبة للتباينات الوراثية في محافظةحجة(0.41).

كانت نسبة التنوع الوراثي في مدخلات الشعير غير مرتفعة، إلا أنها متفاوتة بين المناطق المختلفة جغرافياً.

بينت النتائج وجود علاقة ما بين التباينات الوراثية والمناطق الجغرافية التي جمعت منها العينات. اعتماداً على النتائج، يمكن اقتراح رفع مستوى التباينات الوراثية في الهيئة العلمية للبحوث الزراعية في اليمن، من خلال جمع مدخلات جديدة من الشعير، مع التركيز على المناطق التي تتمثل بعدد قليل من المدخلات في الهيئة.

الكلمات المفتاحية: الشعير، التنوع الوراثي، مؤشرات الـ AFLP، المؤشرات الجزيئية، اليمن.

* أستاذة في قسم العلوم الأساسية، كلية الزراعة، جامعة تشرين، اللاذقية، ص.ب. 2099، سورية.
** أستاذ في قسم المحاصيل الحقلية، كلية الزراعة، جامعة تشرين، اللاذقية، سورية.
*** طالب دكتوراه، قسم المحاصيل، كلية الزراعة، جامعة تشرين، اللاذقية، سورية.

مجلة جامعة تشرين للدراسات والبحوث العلمية _ سلسلة العلوم البيولوجية المجلد (29) العدد (3) 2007
Tishreen University Journal for Studies and Scientific Research - Biological Sciences Series Vol. (29) No. (3) 2007

Evaluation and Distribution of Genetic Diversity in the Yemeni Barley by AFLP

Dr. Wafaa Choumane[*]
Dr. Mouhamad Moualla[**]
Mohamad El-Ezzy Alkhoulany[***]

(Received 3 / 4 / 2007. Accepted 26/6/2007)

□ ABSTRACT □

The genetic diversity in 135 barley accessions collected from different regions of Yemen was evaluated by AFLP markers. DNAs were analyzed with 5 primer pair combinations. The total number of produced fragments was 178. The percentage of polymorphic fragments was 78% within the whole barley collection. The level of genetic diversity ranged between 0.28 and 0.41. The higher level of genetic variability was detected in Hejji region. The level of genetic diversity within the barley accessions was not high, but was different from region to region.

The results demonstrated the presence of co-relation between the genetic diversity and the geographical regions from where the samples were collected.

Based on the results, a suggestion of increasing the level of genetic diversity by a collection of new barley accessions is made, especially from the regions where the number of accessions analyzed is small.

Key words: Barley, Genetic diversity, Molecular markers, AFLP markers., Yemen.

[*]**Professor, Department of Basic Sciences, Faculty of Agriculture, Tishreen University, P.O. Box 2099, Lattakia, Syria. E.mail: Wafaa627@scs-net.org**
[**]**Professor, Department of Crop Field, Faculty of Agriculture, Lattakia, Syria.**
[***]**Ph. D. Student, Department of Crop Field, Faculty of Agriculture, Lattakia, Syria.**

المقدمة:

يعد الشعير *(Hordeum vulgare* L) أحد أكثر محاصيل الحبوب انتشاراً في العالم، إذْ يحتل المرتبة الرابعة عالمياً بعد القمح والأرز والذرة الصفراء من حيث المساحة والانتاج. ينتمي جنس الشعير *Hordeum* إلى العائلة النجيلية *Triticeae*، ويضم حوالي 300 نوعاً، تتوزع ما بين ثنائي أو رباعي أو سداسي الصيغة الصبغية (2n= 2x, 4x , 6x)، ذلك أن العدد الصبغي الأساسي للجنس *Hordeum* هو (x = 7) (Bothmer, 1992)

يزرع الشعير في كافة النطاقات الجغرافية في اليمن، باستثناء النطاق الساحلي الغربي والجنوبي، ويحتل المرتبة الخامسة بعد الذره البيضاء والذرة الصفراء والدخن والقمح من حيث المساحة والإنتاجية، إذْ تشكل مساحة الشعير وإنتاجيته 6.19% و 6.26% على التوالي من إجمالي مساحة محاصيل الحبوب وإنتاجيتها في اليمن (الإحصاء الزراعي، 2004).

إن عملية الاهتمام بالتنوع الحيوي وحمايته من التدهور والانجراف بكل مسبباته تشكل العوامل الهامة في عملية تطور الأنظمة الزراعية واستدامتها ، وقد أسهمت المؤشرات الجزيئية بشكل عام، وتلك المعتمدة على التفاعل التسلسلي للبوليميراز بشكل خاص، في عملية الحماية والحفاظ وتطوير العديد من الأنواع النباتية، وذلك من خلال دراسة التنوع الوراثي وتقييمه ضمن المجتمعات الموجودة.

تعدّ المؤشرات المبنية على مكاثرة قطع الـ DNA المتباينة، والناتجة عن الهضم الانزيمي Amplified Fragment Length polymorphism (AFLP)، من أهم المؤشرات التي تستخدم في دراسة التنوع الوراثي وتقديره. تأتي أهمية هذه التقنية من كونها تجمع بين ميزات تقنيتين أساسيتين، تعتمد الأولى على الهضم بأنزيمات التحديد في مناطق معينة ومحددة من جزيئة الـ DNA، في حين تعتمد الثانية على التفاعل التسلسلي للبوليميراز الذي يؤمن الحصول على الكمية الكافية من الـ DNA لدراسته ومقارنته، دون الحاجة لعملية الوسم بالنيوكليوتيدات المشعة التي كانت ضرورية بحال استخدام الهضم الانزيمي وحده(Vos et al., 1995).

تتمثل هذه التقانة بهضم الـ DNA بأنزيمي تحديد يختلفان بنسبة وجود المقاطع التي يتعرفان عليها في مجين Genomeالنبات، حيث يتميز الأول بإعطائه عدداً كبيراً من قطع الـ DNA المتباينة ذات الوزن الجزيئي الصغير، في حين يعطي الثاني عدداً قليلاً من القطع الكبيرة نسبياً. نحصل في نهاية عملية الهضم على ثلاثة أنواع من القطع، تلك الناتجة عن القطع بالأنزيم الأول فقط أو بالثاني فقط أوبالأنزيمين معاً، وتحمل هذه الأخيرة بأحد طرفيها نيوكليوتيدات تمثل جزءاً من مقطع الأنزيم الأول، وتمثل من طرفها الثاني جزءاً من مقطع الأنزيم الثاني. تخضع جميع قطع الـ DNA المهضومة لعملية ربط، يتم من خلالها ربط مقاطع من الـ DNA تسمى الملائمات Adaptors إلى النهايات الطرفية لقطع الـ DNA، الناتجة عن الهضم الأنزيمي. تخضع فقط قطع الـ DNA التي تحمل نهايتين مختلفتين للمكاثرة الأولية باستخدام بادئات متخصصة، وتستبعد الأنواع الأخرى من قطع الـ DNA. في المرحلة التالية من التقانة تتم المكاثرة الانتخابية لقطع الـ DNA باستخدام بادئات Primers تختلف عن تلك المستخدمة في المكاثرة الأولية باضافة 1– 4 نيوكليوتيدات إلى النهاية '3 من البادئات. يتمّ في المرحلة الأخيرة الحصول على قطع الـ DNA المكاثرة بكمية كبيرة وكافية لتعريضها لعملية الرحلان الكهربائي على هلامة الاكريلاميد، وتلوينها بنترات الفضة، لتحليلها ومقارنتها بين الأفراد المراد تعرّفها. بالإضافة لاستخدام تقنية الـ AFLP في مجال دراسة التنوع الوراثي وتقييم التباينات الوراثية لبنوك المورثات

(Chabane et al., 1999; Turpeinen et al., 2003; Choumane et al., 2004; Prakash et al., 2005; Genet et al., 2005; Mwase et al., 2006) ، فقد استخدمت في عدد من التطبيقات الأخرى، مثل إنشاء خرائط الارتباط الوراثية لعدد من الأنواع النباتية والمحاصيل الزراعية (Lokko et al., 2005 ; Powell et al., 1997; Baum et al., 2004; Becker et al., 1995 ; Hamwieh et al., 2005) ، وفي توضيح العلاقات الوراثية بين الأنواع النباتية المختلفة وضمنها، (Sasanuma et al., 2004; Ozkan et al., 2005) ، وفي التأكد من حدوث عمليات التهجين الحقلية أو المخبرية وبتتبع الانعزالات الوراثية (Oleszczuk et al., 2002)، وكذلك في رسم السياسات الزراعية وتوجيهها (Inocencio et al., 2005).

الهدف من الدراسة:

هدفت هذه الدراسة إلى تقدير التنوع الوراثي لـ 135 مدخلاً من الشعير اليمني، وإلى تحديد درجة القرابة بين كافة المدخلات، ومن ثم دراسة إمكانية ربط التباينات الوراثية بالمواقع الجغرافية التي جمعت منها العينات، وذلك من خلال استخدام تقانة مؤشرات مكاثرة قطع الـ DNA المتباينة والناتجة عن الهضم الأنزيمي (AFLP).

مكان إجراء البحث:

أجريت مراحل استخلاص واختبار الـ DNA في مخبر الوراثة الجزيئية في كلية الزراعة. جامعة تشرين، في حين أنجزت مراحل التحليل بالـ AFLP في مخبر التقانات الحيوية في المركز الدولي للبحوث الزراعية في المناطق الجافة (إيكاردا)، حلب، سوريا، خلال عام 2006 .

طريقة البحث ومواده:

المادة النباتية:

تكونت المادة النباتية المستخدمة في هذه الدراسة من 135 مدخلاً من الشعير المزروع (أصناف محلية)، تم الحصول عليها من بنك الأصول الوراثية التابع للهيئة العامة للبحوث الزراعية اليمنية وقد جمعت من مناطق جغرافية مختلفة شملت إحدى عشرة محافظة يمنية (جدول 1، شكل 1) .

جدول (1): عدد مدخلات الشعير المستخدمة في الدراسة ومناطق جمعها.

المناطق (المحافظة)	عدد المدخلات	المناطق (المحافظة)	عدد المدخلات	المناطق (المحافظة)	عدد المدخلات
صنعاء	30	البيضاء	8	مأرب	7
ذمار	25	صعده	8	حجة	4
أب	25	عمران	7	أبين	2
تعز	12	المحويت	7	المجموع	135

شكل (1) : الموقع الجغرافي للمناطق التي جمعت منها مدخلات الشعير المستخدمة في الدراسة

طرائق العمل:

استخلاص الأحماض النووية:

تمت الزراعة في أصص صغيرة، وبدرجة حرارة بين 20 – 25 درجة مئوية. جمعت العينات المتمثلة بأوراق نباتية فتية من نباتات سليمة بعمر أربعة أسابيع. أجريت عملية عزل الـ DNA من كل نبات على حدة بطريقة CTAB، وفقاً لـ Benito et al., (1993). تم طحن 0.1 غ من الأوراق الخضراء بسائل الاستخلاص، (100 m M Tris PH=8 , 50 mM EDTA, 500mM NaCl, 1.5% SDS, 0.7%). وضعت العينات المطحونة في حمام مائي على درجة حرارة 60 ^{0} س و لمدة 30 دقيقة. فصلت البقايا النباتية عن الـ DNA الذائب في محلول الاستخلاص، بعد المعاملة بمزيج الكلوروفورم(24) إيزواميل(1)، من خلال عملية التثفيل بسرعة 4000 دورة / دقيقة ولمدة 10 دقائق. تم ترسيب الـ DNA بإضافة 0.6 حجم من كحول الأيزوبروبانول إلى وسط الاستخلاص، و جمع الـ DNA في قاع الأنبوب بالتثفيل بسرعة 10.000 دورة / دقيقة ولمدة 10 دقائق. تم غسل الـ DNA بالكحول الإيتيلي 76%، ثم جفف بالهواء وأذيب في 300–400 ميكروليتر من الماء المقطر المعقم.

تم تقدير كمية الـ DNA بواسطة مقياس الطيف الضوئي Spectrophotometer ، كما تم الاعتماد على صور الأشعة فوق البنفسجية (UV) في اختبار نوعية الـ DNA، من خلال تحميل العينات على هلامة إجاروز ذات تركيز 1%، وتمّ الترحيل باستخدام جهاز الرحلان الكهربائي الأفقي والصبغ بمادة بروميد الايثيديوم. كذلك تمَّ تجهيز العينات للعمل عن طريق تخفيفها بالماء المقطر والمعقم، لتوحيد التراكيز والحصول على 100 نانوغرام* / ميكروليتر**.

* 1 نانوغرام = 1×10^{-6} من الميلي غرام

** 1 ميكروليتر = 1×10^{-3} من الميلي ليتر

تفاعل مكاثرة قطع الـDNA المتباينة AFLP:

أجري التفاعل وفقا لـ Vos et al., (1995) مع بعض التحويرات البسيطة. يتضمن التفاعل أربعة مراحل يتم خلالها مايلي: هضم 500 نانوغرام من الـDNA بواسطة أنزيمي التحديد (*Tru*91, *Pst*I)، بإضافة 5 وحدات أنزيمية من كل أنزيم في حجم نهائي قدره 20 ميكروليتر، وبوجود المحلول الواقي المناسب لعمل الأنزيميين، ثم تحضين العينات على درجة حرارة 37 ^{0}م لمدة 5 ساعات. تم بعد ذلك ربط القطع المهضومة بالملائمات Adaptors بواسطة أنزيم الربط T4 Ligase، وذلك لمدة 3 ساعات بدرجة حرارة 37^{0}م، و من ثم أجريت المكاثرة الأولية حسب البرنامج التالي: 94 ^{0}م لمدة 30 ثانية ، 56 ^{0}م لمدة 30 ثانية ، 72 ^{0}م لمدة دقيقة واحدة ، ومن ثم تم إجراء المكاثرة الانتخابية وفق البرنامج الحراري، وهو دورة واحدة وبالظروف التالية: 94 ^{0}م لمدة 30 ثانية ، 65 ^{0}م لمدة 30 ثانية ، 72 ^{0}م لمدة دقيقة واحدة ؛ تليها 11 دوره حرارية تتناقص فيها درجة حرارة الارتباط بمعدل 0.7 ^{0}م خلال كل دورة، ثم 23 دورة من المراحل التالية (94 ^{0}م لمدة 30 ثانية، 56 ^{0}م لمدة 30 ثانية 72 ^{0}م لمدة دقيقة واحدة) ثم تترك العينات على درجة حرارة 72 ^{0}م لمدة 30 دقيقة، بهدف استكمال تصنيع الجزيئات الجديدة (Vos et al., 1995; Choumane et al., 2004). أجريت كل من المكاثرة الأولية والانتخابية في جهاز الدوران الحراري Perkin Elmer Cetus 9600.

اختبر 20 زوجاً من بادئات الـ AFLP للمكاثرة الانتخابية وذلك بهدف اختيار أفضل البادئات في إعطاء نتائج واضحة ودقيقة وقادرة على كشف نسبة مناسبة من التباينات الوراثية. تم اختيار أفضل خمسة أزواج من البادئات المختبرة (جدول 2)، اعتمدت في تحليل كافة العينات. تم فصل نواتج عمليات المكاثرة الانتخابية على جهاز الرحلان الكهربائي العمودي باستخدام هلامة الاكريلامايد ذات التركيز 6%، ومن ثم تم تظهيرالقطع الناتجة من خلال التلوين بنترات الفضة (Bassam et al., 1991).

جدول (2) : التسلسل النيوكليوتيدي (التركيب) للبادئات المستخدمة في هذه الدراسة.

أزواج البادئات	Forward primer / *Pst*I, 5'to 3' البادئة بالاتجاه المباشر	Reverse primer / *Tru*91, 5' to 3' البادئة بالاتجاه المعكوس
P71/M88	GACTGCGTACATGCAGGGA	GATGAGTCCTGAGTAATGC
P71/M34	GACTGCGTACATGCAGGGA	GATGAGTCCTGAGTAAAAT
P294/M62	GACTGCGTACATGCAGTACC	GATGAGTCCTGAGTAACTT
P109/M95	GACTGCGTACATGCAGAATG	GATGAGTCCTGAGTAAAAAC
P100/M95	GACTGCGTACATGCAGAACC	GATGAGTCCTGAGTAAAAAC

تحليل النتائج:

جمعت نتائج عمليات المكاثرة للبادئات الخمس المستخدمة في هذه الدراسة في جداول خاصة، إذْ تم اعتماد الرقمين (1) و (0) للدلالة على وجود قطع الـ DNA أو غيابها على التوالي. تم تقدير التنوع الوراثي باستخدام البادئات الخمس تبعاً لعلاقة Nei (1987):

$$GD = n(1- \Sigma pi^2)/(n-1)$$

حيث pi هي نسبة تكرار كل قرين، و n هي عدد المدخلات المستخدمة في الدراسة. قدرت نسبة عدم التشابه Dissimilarity بين المدخلات وفقاً لـ Nei and Li (1979) وباستخدام البرنامج الإحصائي Numerical Taxonomy and Multivariant Analysis System NTSYS-2-PC (Rohlf, 1993). تم إجراء

التحاليل العنقودية Cluster analysis، ومن ثم رسم مخطط البعد الوراثي، باستخدام طريقة المجموعات الزوجية غير المزانة (UPGMA) بالبرنامج DARwin 5.0 (Perrier et al., 2003)، كما تم تحديد بنية التنوع الوراثي باستخدام برنامج STRUCTURE 2.0 (Pritchard et al., 2000).

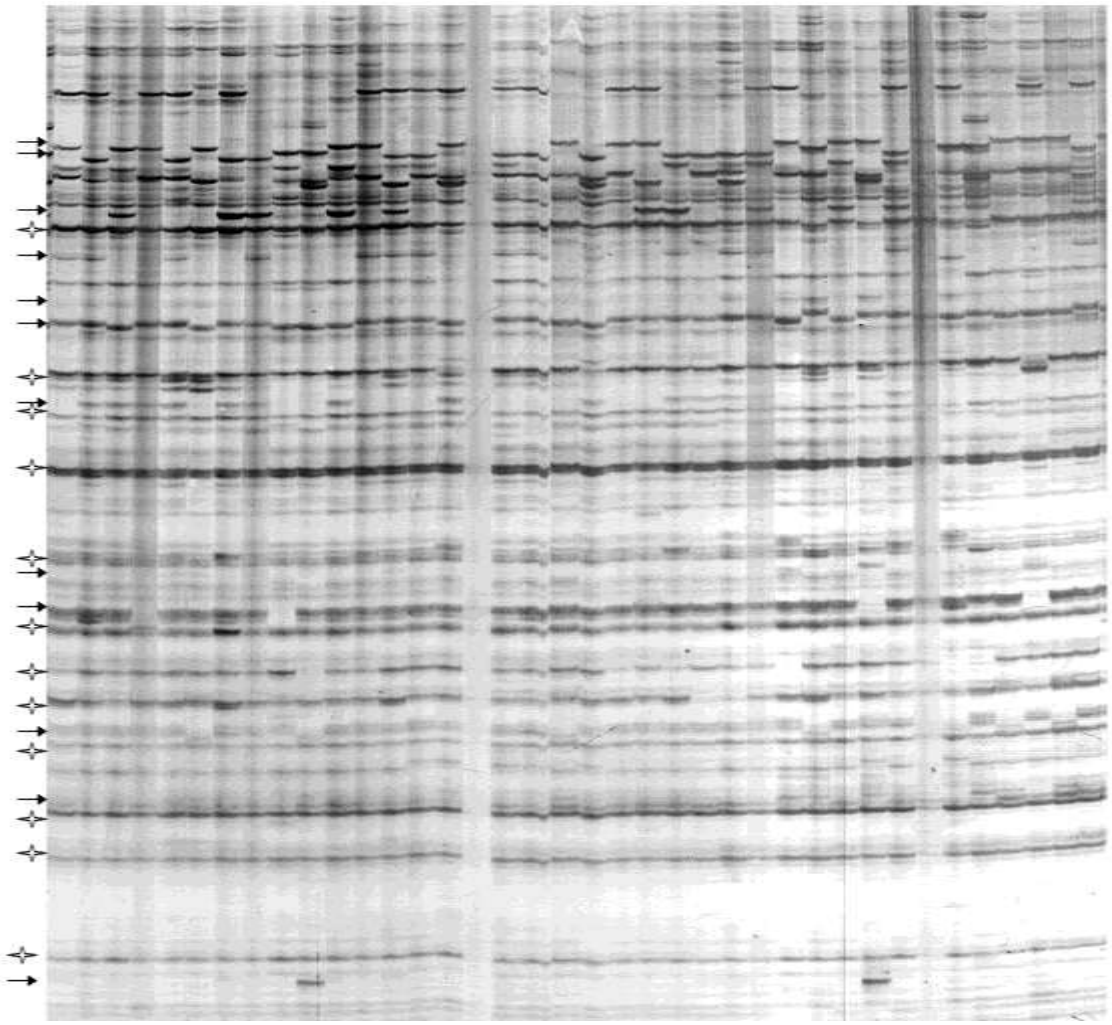
النتائج:

تم في هذه الدراسة تحليل عينات الـ DNA المستخلصة من 135 مدخلاً من الشعير اليمني، من خلال استخدام خمسة أزواج من بادئات الـ AFLP. تباينت البادئات في عدد قطع الـ DNA التي كشفتها بين المدخلات المختلفة (شكل 2). تراوح العدد بين 28 قطعة مع زوج البادئات M95/P109 و 41 قطعة مع زوج البادئات M88\P71 بمتوسط قدره 35.6 قطعة للزوج الواحد من البادئات (جدول، 3).

جدول (3) : عدد قطع الـ DNA الناتجة عن المكاثرة الانتخابية، وعدد القطع المتباينة، وقيم التنوع الوراثي

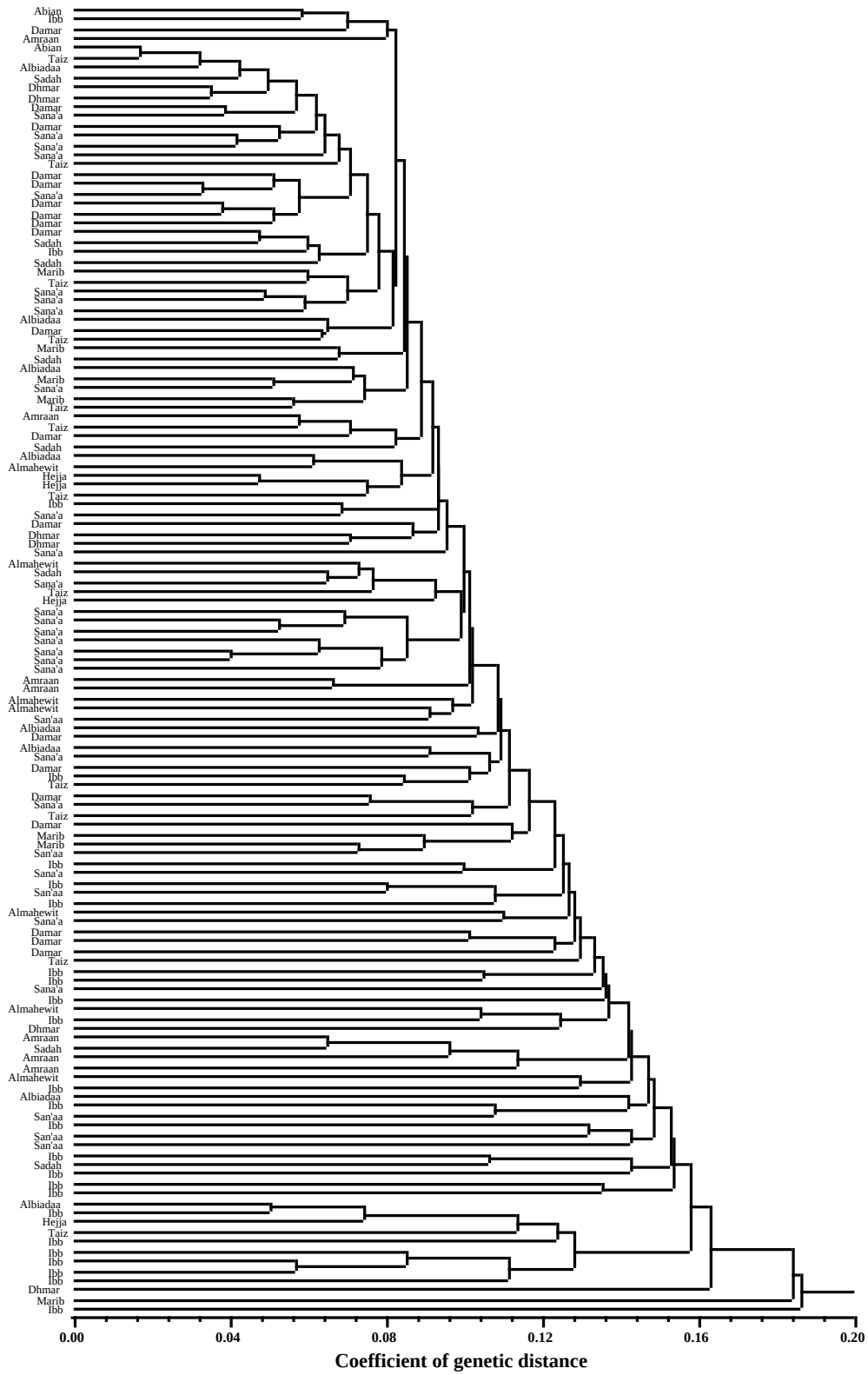
أزواج البادئات	العدد الكلي لقطع الـ DNA	عدد قطع الـDNA المتباينة	التباين %	التنوع الوراثي
M88\P71	41	28	68.29	0.1888
M34\P71	31	23	74.19	0.3289
M62\P294	40	32	80	0.4042
M95\P109	28	21	75	0.2195
M95\P100	38	35	92.1	0.3756
المجموع	178	139	–	–
المتوسط	35.6	27.8	78	0.3034

اختلفت البادئات في عدد القطع المتباينة التي استطاعت تعرّفها، إذْ تراوحت هذه النسبة ما بين 21 قطعة DNA مع زوج البادئات M95\P109 حتى 35 قطعة مع زوج البادئات M95\P100، وبمتوسط يساوي 27.8 قطعة مختلفة من الـ DNA لكل زوج من البادئات. وهذا يقابل تباينات تتراوح ما بين 68.29% (M88/P71) إلى 92.1% (M95\P100). كان إجمالي عدد قطع الـ DNA التي أمكن الكشف عنها من خلال كافة البادئات للمدخلات كافة هو 178 قطعة ، من بينها 139 قطعة متباينة ما بين العينات وهذا يقابل نسبة 78% من القطع المكاثرة، في حين احتوت جميع المدخلات المدروسة على 39 قطعة DNA متماثلة في جميع العينات (22% من العدد الكلي للقطع) .



شكل (2): المكاثرة الانتخابية لـ DNA المستخلص من 135 مدخلاً من الشعير بالبادئة P100/M95.
يشير السهم للقطع المختلفة بين جميع المدخلات، في حين تشير النجمة إلى القطع المتشابهة.

عند مقارنة عدد القطع المتباينة ما بين المدخلات المأخوذة من مناطق جغرافية متنوعة، لوحظ وجود تباين في عدد القطع التي وجدت في المناطق المختلفة. حيث وجد أكبر عدد من قطع الـ DNA في محافظة أب (177 قطعة)، في حين ان أقل عدد من القطع تم كشفه في محافظة أبين (154 قطعة). وعند تقدير عدد القطع المتباينة بين مدخلات المنطقة الواحدة لوحظ بأن محافظة أب امتلكت أكبر عدد من القطع المتباينة (120 قطعة)، في حين كان أقل عدد من القطع المتباينة قد وجد في محافظة أبين (18). لم يلاحظ وجود قطع معينة من الـ DNA محددة الوزن الجزيئي في منطقة جغرافية معينة دون أخرى، مما يدل على عدم وجود قطع DNA متخصصة في أماكن معينة، إلا أنه لوحظ وجود اختلاف في نسبة تكرار بعض القطع ووجودها بنسب متباينة تبعاً للمواقع التي جمعت منها. استخدمت هذه المعطيات في تحديد البعد الوراثي بين المدخلات المختلفة(شكل3).



شكل 3: البعد الوراثي بين الـ 135 مدخلاً من الشعير اليمني.

التنوع الوراثي:

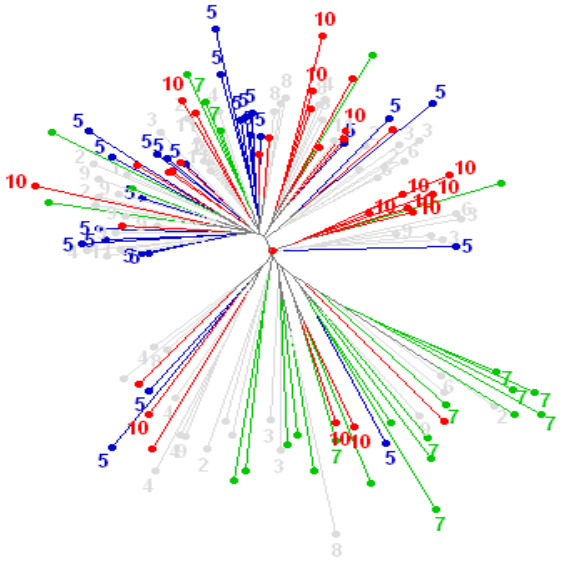
تباينت أزواج البادئات في قيم التنوع الوراثي التي أظهرتها للمدخلات التي تمت دراستها كافةً (شكل 3)، فقد تراوحت هذه القيم بين 0.1888 (M88\P71) و 0.4042 (M62\P294) بمتوسط مقداره 0.3034. لوحظ وجود تباين في قيم التنوع الوراثي بين محافظات اليمن المختلفة (جدول، 4) حيث وجد اكبر معدل للتنوع الوراثي ضمن مدخلات محافظة حجة، (0.4156) في حين وجد أقل معدل ضمن مدخلات محافظتي (ذمار وصنعاء) 0.2858 و 0.2802 على التوالي .

جدول (4): التنوع الوراثي في المناطق الجغرافية التي جمعت منه مدخلات الشعير تبعاً لزوج البادئات المختلفة ولجميع البادئات معاً

Regions	M88\P71	M34\P71	M62\P294	M95\P109	M95\P100	المتوسط	المناطق
Abian	0.2368	0.8958	0.7258	0.1296	0.5441	0.50642	أبين
Albiadaa	0.1842	0.4285	0.4653	0.2391	0.4627	0.35596	البيضاء
Almahewit	0.2255	0.3277	0.4937	0.3231	0.3925	0.3525	المحويت
Amraan	0.1968	0.3056	0.4837	0.267	0.3957	0.32976	عمران
Dhmar	0.1932	0.2809	0.4427	0.1597	0.3528	0.28586	ذمار
Hejja	0.2437	0.4345	0.5859	0.3065	0.5078	0.41568	حجة
Ibb	0.2126	0.4328	0.422	0.3187	0.519	0.38102	أب
Marib	0.2339	0.3992	0.5277	0.2032	0.5161	0.37602	مأرب
Sadah	0.1857	0.4196	0.4558	0.2174	0.3143	0.31856	صعدة
San'aa	0.1694	0.2959	0.4301	0.1678	0.3378	0.2802	صنعاء
Taiz	0.2085	0.3696	0.4084	0.2467	0.3319	0.31302	تعز

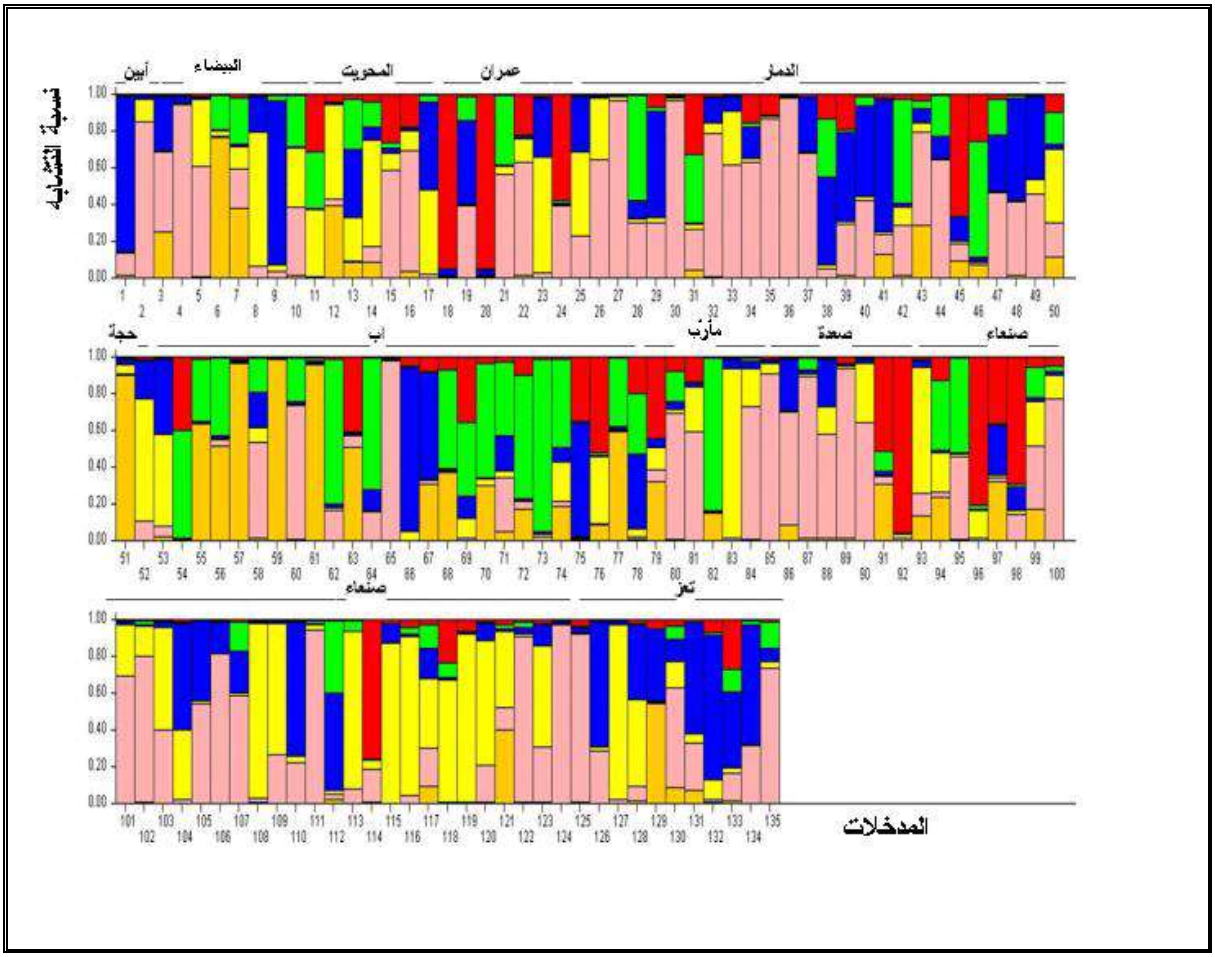
العلاقات الوراثية:

تم حساب العلاقات الوراثية للمدخلات كافة من خلال المقارنة ما بين قطع الـ DNA المتشابهة والمختلفة الناتجة من المكاثرة مع البادئات كافةً. تراوح هذا المعامل ما بين 0.02 وحتى 0.19 (شكل 3). استخدمت قيم معامل البعد الوراثي في رسم مخطط القرابة الوراثية ما بين المدخلات المختلفة (شكل 4)، كما استخدمت في تجميع المدخلات، تبعاً لنسب تشابهها، لتعرّف البنية التي تتوزع فيها الاختلافات (شكل 5).



شكل (4): التمييز بين مدخلات المناطق الجغرافية المختلفة اعتماداً على نتائج الـ AFLP.

5: مدخلات من منطقة أب، 7: مدخلات من صنعاء، 10: مدخلات من ذمار.



شكل (5): بنية توزع التباينات الوراثية في الـ 135 مدخلاً من مدخلات الشعير في اليمن

المناقشة:

تتميز مؤشرات الـ AFLP عن غيرها من المؤشرات الجزيئية بقدرتها على كشف نسبة أكبر من التباينات الوراثية مقارنة بالمؤشرات الأخرى. تسمح هذه المؤشرات بإجراء عملية مسح لكامل مجين الفرد، ولا يقتصر وجودها على موقع واحد على الصبغي. وقد تم إثبات ذلك في كثير من الدراسات. يمكن لزوج واحد من هذه البادئات ان يسمح بمقارنة 40 –60 موقعاً وراثياً ما بين المدخلات المختلفة (Vos et al., 1995). إن هذه الخاصية تجعل هذه المؤشرات مناسبة جداً للأبحاث المتعلقة في مجال التوصيف الجزيئي، والتنوع الوراثي، وتوضيح العلاقات الوراثية ما بين مدخلات النباتات المدروسة. هذا ما أكدته الأبحاث العديدة التي أجريت في هذه المجالات (Russell et al., 1997; Struss and Pliesk 1998; Choumane et al., 2004; Malysheva-Otto et al., 2006; Karuppanapandian et al., 2006).

لقد تم في دراستنا هذه تقدير التنوع الوراثي لـ 135 مدخلاً من الشعير الذي جمع من مناطق جغرافية مختلفة في اليمن، وذلك باستخدام خمسة أزواج من بادئات الـ AFLP. كان إجمالي عدد قطع DNA التي تم الحصول عليهاهو178 قطعة ، كان منها 139 قطعة متباينة ما بين المدخلات المختلفة (78% من القطع الناتجة). وهذه النتيجة أقل من التي حصل عليها Turpeinen et al.,، عام 2003 في دراسته للتنوع الوراثي عند 94 مدخلاً من الشعير البري، تم جمعها من عشر مناطق مختلفة في فلسطين المحتلة، من خلال استخدام ثمان بادئاتAFLP؛ إذْ حصل على 204 قطع من الـ DNA كان منها 189 قطعة متباينة (93%)، كما تباينت المناطق في عدد قطع الـ DNA التي وجدت فيها، فقد تراوحت بين 177 و 154 قطعة DNA. وهذا يدل على أن مدخلات الشعير في فلسطين تتميز بمعدل من التنوع الوراثي أعلى من ذلك الموجود في مدخلات الشعير في اليمن.

توافقت النتائج التي حصلنا عليها في مجال الاختلاف في عدد القطع المتباينة من الـ DNA، التي تم كشفها تبعاً للمناطق الجغرافية التي جمعت منها المدخلات مع النتائج التي حصل عليها .Ozkan et al في عام (2005). لقد وجد أكبر معدل للتنوع الوراثي في محافظة حجة (0.4156)، في حين وجد أقل معدل له في محافظتي ذمار (0.2858) وصنعاء (00.2802). وقد وضحت المخططات المبنية على البعد الوراثي وجود تداخل بين مدخلات منطقتي أب وذمار مما يدل على ارتفاع نسبة التشابه الوراثي فيما بينهم، في حين يلاحظ و بوضوح توضع المدخلات الآتية من صنعاء بفرع منفصل عنهم. يظهر من هذه النتائج بأن هذه المؤشرات سمحت بتجمع نسبة كبيرة من المدخلات الآتية من المنطقة ذاتها مع بعضها البعض (شكل 4)، بالاضافة إلى أنها سمحت بتجمع المدخلات المجموعة من مناطق قريبة من بعضها البعض جغرافياً (أب وذمار) (شكل 1) في فروع قريبة من بعضها البعض (شكل 4). قد يعود وجود هذا التشابه بين مدخلات ذمار وأب لتبادل المزارعين في المنطقتين للبذار فيما بينهم، مما يرفع من نسبة التشابه الوراثي ما بين مدخلات المنطقتين، وكذلك يؤدي لانخفاض نسبة التباينات الوراثية فيما بينهم. تلاحظ أيضاً بأن أغلب المدخلات المجموعة من صنعاء قد تجمعت مع بعضها البعض في جزء منفصل من المخطط (شكل 4)، مما يدل على ارتفاع نسبة التشابه بين هذه المدخلات.

تشير هذه النتائج إلى أن هذه المؤشرات تسمح بتمييز المدخلات تبعاً للمناطق الجغرافية التي جمعت منها. ويبدو هذا الاستنتاج أكثر وضوحاً في مدخلات المناطق التي جمع منها عدد أكبر من المدخلات (أب وذمار وصنعاء).

يظهر الشكل 5 بنية التنوع الوراثي للمدخلات المختلفة، حيث تعبر الألوان المختلفة عن طرز وراثية متباينة وتظهر المستطيلات ذات الألوان المختلفة، ضمن نفس العامود، التشابه الوراثي بين المدخلات المختلفة. ويظهر هذا الشكل بوضوح وجود مدخلات مميزة موجودة في أب وغائبة في أية منطقة أخرى.

على الرغم من وجود تباينات وراثية بين المدخلات المدروسة التي سمحت بالتمييز فيما بينها، وبتوزيعها ضمن مجموعات متميزة عن بعضها البعض، إلا أن نسبة التباينات الوراثية كانت منخفضة بشكل عام. قد يعود السبب في ذلك إلى محاولة الدولة تعميم زراعة بعض أصناف الشعير عن طريق الهيئات البحثية الزراعية، مما يؤدي إلى ضيق القاعدة الوراثية في الشعير في اليمن، وهي التي تؤدي إلى انخفاض معدل التنوع الوراثي بين المدخلات المستخدمة، بالاضافة إلى أن عملية تبادل البذار بين المزارعين تدعم التشابه الوراثي وتقلل من معدل التنوع الوراثي ضمن هذا المحصول.

الاستنتاجات والتوصيات:

سمحت تقنية الـ AFLP بتعرّف التباينات الوراثية في مدخلات الشعير المجموعة من إحدى عشرة منطقة في اليمن. أظهرت النتائج أن نسبة التنوع الوراثي في مدخلات الشعير غير مرتفعة، إلا أنها متفاوتة بين المناطق المختلفة جغرافياً. بينت النتائج وجود علاقة ما بين التباينات الوراثية، اعتماداً على قطع الـ DNA الناتجة بتقنية الـ AFLP، والمناطق الجغرافية التي جمعت منها العينات. كما تبيّن أن التشابه الوراثي كان واضحاً في المدخلات العائدة إلى مناطق قريبة من بعضها جغرافياً. اعتماداً على ما سبق، وبهدف رفع كفاءة بنك المورثات في اليمن، في حفظ أكبر قدر من التنوع الوراثي في نبات الشعير للاستفادة منها لاحقاً في برامج التربية والتحسين، يمكن اقتراح رفع مستوى التباينات الوراثية في الهيئة العلمية للبحوث الزراعية من خلال جمع مدخلات جديدة من الشعير مع التركيز، بشكل خاص، على المناطق التي تتمثل بعدد قليل من المدخلات في الهيئة، وذلك من خلال جولات علمية مدروسة مرفقة بتحاليل وراثية دقيقة تتم على مستوى جزيئة الـ DNA.

الشكر:

يتوجه الباحثون بالشكر للسيد الدكتور مايكل باوم رئيس مخبر التقانات الحيوية في المركز الدولي للبحوث الزراعية في المناطق الجافة (إيكاردا)، في حلب، سورية، لدعمه الكبير لهذا البحث وذلك من خلال استقبال الطالب في مخبره وتغطيته لكامل نفقات البحث.

المراجع:

- كتاب الاحصاء الزراعي. وزارة الزراعة والري، الجمهورية اليمنية. 2004.
- BAUM, M; GRANDO, S; CECCARELLI, S; AND JAHOOR, A. *Localiztion of Quantitative Trait Loci for Dryland Characters in Barley by Linkage Mapping*. Crop Science Society of America and America Society of Agronomy, 2004, 677 S. SegeRd. .
- BASSAM, B. J; CAETANO-ANDLS, G., AND GRESSHOLF, P. M . *Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels* . Anal. Biochem, 196: 1991, 80 – 83.
- BECKER, J; VOS, P; KUIPER, M; SALAMINI, F; AND HEUN, M. *Combined mapping of AFLP and RFLP markers in barley* . Mol. Gen. Genet. 249, 1995, 65 – 73.
- BENITO, C; FIGUEIRAS, C; ZARAGOZA, F. J; GALLEGO, A. DE LAPENA, A. *Rapid identification of Triticeae genotypes from single seeds using the polymerase chain reaction.* Plant. 21: 1993, 181 – 183.
- BOTHMER, R. *The genpool of barley and preservation of wild species of Hordeum* . In: International Crop Network Series No. 9. Int. Board Plant Genetics Res., Rome, Italy . Pp .1992, 32 – 35.
- CHABANE, K; BARKER, J . H. A; KARP, A; VALKOUN, J. *Evalution of genetic diversity in diploid wheat: Triticum uratu using AFLP markers.* Al Awamia 100, 1999, 9 – 18.
- CHOUMANE, W., VAN BREUGE, P; BAZUIN, T. O. M; BAUM, M; AYAD, W; AND AMARAL, W. *Genetic diversity of Pinus brutia in Syria as revealed by DNA markers* . Forest Genetic 11(2): 2004, 87 – 101.
- FEDERICI, M. T; VAUGHAN, D; TMOOKA, N; KAGA, A WANG, X. W; DOI, K; FRACIS, M., ZORRILLA, G AND SALAIN, N. *Analysis of Uruguayan weedy rice genetic diversity using AFLP molecular markers.* EJB Electronic Journal of Biotechnology. 4, 3, December 15, 2001, 131- 145.
- GENET, T; VILJOEN, C. D; AND LABUSCHAGNE, M. T. *Genetic analysis of Ethiopian mustard genotypes using amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers*. African Journal of Biotechnology. Vol.4, 9, 2005, 891 – 897.
- HAMWIEH, A; UDUPA, S. M; CHOUMANE, W; SARKER, A; DREYER, F; JUNG, C AND BAUM, M. *A genetic linkage map of Lens sp based on microsatellite and AFLP markers and the localization of fusarium vascular wilt resistance*.Theor Appl Genet. 110: 2005, 669- 677 .
- INOCENCIO, C; COWAN, RS; ALCARAZ, F; RIVERA, D; AND FAY, MF. *AFLP fingerprinting in Capparis subgenus Capparis related to the commercial sources of capers.* Genetic Resources Crop Evaluation 52: 2005, 137 – 144.
- KARUPPANANDIAN, T; KARUPPUDURAI, T; SINHA, P. B; HANOHARAN. *Genetic diversity in green gram [Vigna radiata (L.)] landraces analyzed by using random amplified polymorphic DNA (RAPD).* African Journal of Biotechnology. 5, 13: 2006, 1214-1219.
- LOKKO, Y; DANQUAH, E. Y; OFFEI, S. K; DIXON, A. G. O., AND GEDIL, A. *Molecular markers associated with a new source of resistance to the cassava mosaic disease* . African Journal of biotechnology .4, 9: 2005, 873 – 881.
- MALYSHEVA-OTTO, L; GANAL, M. W; AND RODER, S. *Analysis of molecular diversity, population structure and linkage disequilibrium in a worldwide survey of cultivated barley germplasm (Hordeum vulgare L.).* BMC Genetics .7, 6: 2006, 1–14.

- MWASE, W. F; BIORNSTAD, A; STEDJE, B; BOKOSI, J. M; AND KWAPATA, M . B. *Genetic diversity of Uapaca kirkiana muel. arg. populations as revealed by amplified fragment length polymorphisms (AFLPs).* African Journal of Biotechnology, 5, 13, 2006, 1205-1213.
- NEI, M., AND LI, WH. *Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases* . Proc Natl Acad Sci USA,10: 1979, 5269 – 5273.
- NEI, M. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York, NY, 1987.
- OLESZCZUK, S., ZIMNY, J., AND BEDNAREK, P . T. *The Appliction of the AFLP method to determine the purity of homozygous lines of barley (Hordeum vulgare L.)*. Celluar & Molecular Biology Letters, 7: 2002, 777 – 783.
- ORDON, F., AHLEMEYER, J., WERNER, K., KOHLER, W., AND FRIEDT, W. *Molecular assessment of genetic diversity in winter barley and its use in breeding*. Euphytica, 146: 2005, 21 – 28.
- OZKAN, H., KAFKAS, S., OZER, M. S., AND BRANDOLINI, A. *Genetic relationships among south-east Turkey wild barley populations and sampling strategies of Hordeum spontaneum*. Theor Appl Genet , 112: 2005, 12 – 20.
- PERRIER, X., FLORI, A., BONNOT, F. *Methods of data analysis*. In: HAMON S, SEGUIN M, PERRIER X, GLASZMANN J-C (eds) *Genetic diversity of cultivated tropical plants*. CIRAD, Montpellier (France), 2003, 31–63
- POWELL, W., THOMAS, W. T. B., BAIRD, E., LAWRENCE, P., BOOTH, A., HARROWER, B., MCNICAL, J. W., AND WAUGH, R. *Analysis of quantitative traits in barley by the use of Amplified Fragment Length polymorphisms* . Heredity , 79: 1997, 48 – 59.
- PRAKASH, N. S., COMBES, M. C., DUSSERT, S., NAVEEN, S., AND LASHERMES, P. *Analysis of genetic diversity in Indian robusta coffee genepool (Cofee canephora) in comparision with a representative core collection using SSRs and AFLPs.* Genetic Resources and Evolution, 52: 2005, 333 – 343.
- PRITCHARD, J. K., STEPHENS, M., AND DONNELLY, P. *Inference of population structure using multilocus genotype data*. Genetics, 155, 2000, 945-959.
- ROHLF, J. *NTSYS-pc, Numerrical Taxonomy and Multivariate Analysis System.* Applied Biostatistical Inc,1993. New York .
- RUSSELL, J., FULLER, J., YOUNG, G., THOMAS, B., TARAMINO, G., MACAULAY, M., WAUGH, R., AND POWELL,W. *Discriminating between barley genotypes using microsatellite markers* . Genome, 40:1997, 442 – 450.
- SASANUMA, T., CHABANE, K., ENDO, T. R., AND VALKOUN, J. *Characterization of variation and phylogenetic relationships among diploid Aegilops species by AFLP: incongruity of chloroplast and nuclear data.* Theor Appl Genet, 108: 2004, 612 – 618.
- STRUSS, D., AND PLIESK, J. *The use of microsatellite markers for detection of genetic diversity in barley populations* . Theor Appl Genet, 97: 1998, 308 – 315.
- TURPEINEN,T., VANHALA,T., NEVO, E., AND NISSILA, E. *AFLP genetic polymorphism in wild barley (Hordeum spontaneum) populations.* Theor Appl Genet. 106, 2003, 1333 – 1339.
- VOS, P., HOGERS, R., BLEEKER, M., REIJANS, M., LEE,T . V. D., HORNES, M., FRIJTERS, A ., POT, J ., PELEMAN, J ., KUIPER, M ., AND ZABEAU, M. *AFLP : a new technique for DNA fingerprinting.* Nucleic Acids Research, 2, 21: 1995, 4407 – 4414.