مجلة جامعة تشرين للبحوث والدراسات العلمية _ سلسلة العلوم البيولوجية المجلد (31) العدد (5) 2009
Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies - Biological Sciences Series Vol. (31) No. (5) 2009

تقدير النقاوة الوراثية لسلالات منتخبة من الحمص المزروع باستخدام مؤشرات الـ SSR

الدكتور محمد معلا *
الدكتورة وفاء شومان**
هايل الواوي***

(تاريخ الإيداع 13 / 9 / 2009. قبل للنشر في 12 / 11 / 2009)

□ ملخّص □

أجريت هذه الدراسة خلال موسم 2007 / 2008 في مخبر التقانة الحيوية في المركز الدولي للبحوث الزراعية في المناطق الجافة (ايكاردا) بهدف توصيف وتقدير النقاوة الوراثية لعشر سلالات منتخبة من الحمص المزروع هي جبلي 43، جبلي 48، مراكشي 36، كردي 8، درعوزي 19، حوراني 20، فوعي 13، فوعي 48، بلدي 16، بلدي 49. تم تحليل ثلاثة نباتات من كل سلالة باستخدام اثنى عشر زوجاً من بادئات المقاطع البسيطة المتكررة (SSR). أظهرت النتائج بأن كافة المواقع الوراثية المدروسة كانت مختلفة بين جميع السلالات المنتخبة، وكانت تملك عدد متباين من القرائن، تراوح ما بين / 3 / قرائن على الموقع Ta3 إلى /10/ قرائن على كل من الموقعين Ta5 و Tr1.

سمحت هذه النتائج بإيجاد بصمة وراثية مميزة لكل سلالة ومختلفة عن بصمات السلالات الأخرى. كما أظهرت قراءات القرائن المختلفة وحسابات معدلات التشابه الوراثية بين نباتات السلالة الواحدة و نباتات السلالات المختلفة بأن أكبر نسبة للتشابه كانت بين النباتات التابعة لنفس السلالة مما سمح بتوزيع النباتات المدروسة في شجرة القرابة إلى عشرة فروع يضم كل منها نباتات السلالة الواحدة.

أوضحت التحاليل الجزيئية وجود سلالتين نقيتين فقط، هما سلالة الجبلي 48 وسلالة المراكشي 36 في حين تميزت بقية السلالات بنسبٍ متفاوتة من النقاوة الوراثية. يظهر مخطط القرابة الوراثية وجود تباينات وراثية واضحة بين السلالات المدروسة.

الكلمات المفتاحية: الحمص- سلالات منتخبة - نقاوة وراثية- مؤشرات الـ SSR.

* أستاذ - قسم المحاصيل الحقلية - كلية الزراعة - جامعة تشرين.
** أستاذة - قسم العلوم الأساسية - كلية الزراعة - جامعة تشرين.
*** طالب دراسات عليا (دكتوراه)- قسم المحاصيل الحقلية - كلية الزراعة - جامعة تشرين.

مجلة جامعة تشرين للبحوث والدراسات العلمية _ سلسلة العلوم البيولوجية المجلد (31) العدد (5) 2009
Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies - Biological Sciences Series Vol. (31) No. (5) 2009

The Estimation of Genetic Purity in Selected Cultivated Chickpea Lines Using SSR Markers

Dr. Mouhammad Moualla*
Dr. Wafaa Choumane**
Hayel AL-Wawi***

(Received 13 / 9 / 2009. Accepted 12 / 11 / 2009)

□ ABSTRACT □

This study was performed during the 2007/2008 season in the Biotechnology Laboratory of the International Center for Agricultural Research in the Dry Areas (ICARDA), in order to characterize and estimate the genetic purity in ten chickpea selected lines (Gabaly 43, Gabaly 48, Marakshi 36, Kourdy 8, Daraouzy19, Hourany 20, Fouey 13, Fouey 48, Balady16, and Balady 49). Three plants/ lines were analyzed using twelve SSR primer pairs.

The results showed that all tested loci were polymorphic among all selected lines and they were carrying different numbers of alleles, ranged from 3 (on locus Ta3) to 10 alleles (on loci Ta5 and Tr1). These results provided a specific DNA fingerprint for each line. The score of alleles and the values of genetic similarity between and within lines showed that the highest value of genetic similarity was between plants belonging to the same line. These results allowed the distribution of all plants in ten different branches; each branch contains the plants of one line. The molecular analysis confirmed the presence of two pure lines (Gabaly 48 and Marakshi 36), while the other lines were characterized by different levels of genetic purity. The dendrogram based on genetic similarity demonstrates the presence of genetic diversity between the studied lines.

Key words: Chickpea, Selected Lines, Genetic Purity, SSR Marker.

* **Professor, Field Crop Department, Faculty of Agriculture, Tishreen University, Lattakia, Syria**
****Professor, Basic Science Department, Faculty of Agriculture, Tishreen University, Lattakia, Syria.**
*****Postgraduate Student, Field Crop Department, Faculty of Agriculture, Tishreen University, Lattakia, Syria.**

مقدمة:

تعدّ سورية أحد المراكز الثانوية لنشوء البقوليات الغذائية ومنها الحمص (Ladizinsky, 1975; Van der Maesen, 1987) حيث تنتشر العديد من العشائر المحلية للحمص التي تزرع في العروة الربيعية وتمتاز بقدرتها على الإنتاج تحت مستويات منخفضة نسبياً من الرطوبة، ويتم تداول هذه العشائر من قبل المزارعين الذين يفضلون زراعتها على زراعة الأصناف الشتوية المحسنة.

تعدّ هذه الدراسة استكمالاً لبرنامج يتضمن تقويم سبع عشائر محلية من الحمص (وهي: الجبلي، المراكشي، الكردي الدرعوزي، الحوراني، الفوعي، البلدي) خلال الموسمين 2002/2001-2002/2003. استناداً لعملية التقويم، تم غربلة وانتخاب عدد من الطرز المتميزة من كل عشيرة واستبعاد الطرز غير المرغوبة (معلا وآخرون، 2004)، ومن ثم تمت متابعة الانتخاب والتنقية ضمن الطرز المنتخبة بهدف الحصول على سلالات نقية ودراسة الخواص الإنتاجية والمظهرية والنوعية والتكنولوجية لهذه السلالات المتميزة وانتخاب عدة سلالات مبشرة ذات خواص مرغوبة للمزارع والمستهلك على حدٍ سواء (معلا وآخرون، 2008 ; الواوي وآخرون، 2008). ونظراً لكفاءة بعض هذه السلالات فلا بد من توصيفها جزيئياً ومعرفة مدى النقاوة الوراثية التي وصلت إليها ومعرفة مستوى التشابه الوراثي بين تلك السلالات ليتم لاحقاً اعتمادها والتوصية بزراعتها في العروة الربيعية.

هناك معايير عديدة للتعرف على مدى التجانس الوراثي في المجتمعات النباتية، منها ما يعتمد على المؤشرات المظهرية (Morphological markers) ومنها ما يعتمد على المؤشرات الجزيئية (Molecular markers)، وتتأثر الخواص المظهرية غالباً بظروف الجو المحيطة (Smith, 1984)، في حين تتميز المؤشرات الجزيئية بأنها أكثر دقةً وثباتاً لكونها تعتمد على دراسة جزيئة الـ DNA التي تحمل كافة المعلومات الوراثية مباشرةً. هناك عدة أنواع من المؤشرات الجزيئية التي تختلف عن بعضها بمناطق الـ DNA التي تتعرف عليها وبمستوى التباين الوراثي الذي تكشفه ومنها تقانة التباين في أطوال قطع الـ DNA الناتجة عن الهضم بأنزيمات التحديد Restriction Length Fragment Polymorphism(RFLP) المعتمدة على التهجين الجزيئي (Southern, 1975) ومجموعة التقنيات المعتمدة على التفاعل التسلسلي للبوليميراز Polymerase Chain Reaction (PCR)، منها تقنية المقاطع البسيطة المتكررة (المايكروساتولايت) Simple Sequence Repeats (SSR)، وهي عبارة عن مقاطع لوحدات من الـ DNA قصيرة متكررة يتألف كل منها من 3- 5 أزواج نيوكليوتيدية (Epplen *et al.*, 1991) موزعة على كامل مجين الفرد وتمثل جزءاً هاماً من مجينات حقيقيات النوى الراقية، يحيط بهذه المقاطع المتكررة مقاطع طويلة وحيدة النسخة (Sequences Tagged Microsatellite Sites: STMS)، تستخدم لتصميم بادئات تتعرف على المناطق القصيرة المتكررة، وهذه المقاطع تزودنا بعدد غير محدود من المؤشرات التي تسمح بالتمييز بين الأجناس المختلفة، كما هو الحال بالأجناس التابعة للعائلة البقولية (Pandian *et al.*, 2000; Choumane and Baum, 200) ، وكذلك التمييز بين الأنواع المختلفة التابعة لجنس الحمص Cicer (Choumane *et al.*, 2000) أو بين الأصناف (شومان،1996; Udupa *et al.*, 1999) أو سلالات أو طرز تابعة لنفس النوع ; Smith and Devery, 1995) Choumane *et al.*, 2004 ;Smulders et *al.*, 1997 ; Huttel *et al.*, 1999 ; Hamwieh *et al.*, 2005)

تمتاز هذه المؤشرات بسهولة تطبيقها وتحليل نتائجها التي تتميز بثباتها وبإمكانية تكرارها مما يسمح بتبادل النتائج بين المخابر المختلفة (Matus and Hayes, 2002 ; Macaulay *et al.*, 2001) وتتميز كذلك بارتفاع

مستوى التباينات polymorphism التي تكشفها مقارنةً بأنواع أخرى من التقانات (Russell *et al*, 1997a ; Udupa and Baum, 2001; Rajora and Rahman, 2003; Chabane *et al.*, 2005;) تم استخدام مؤشرات الـ SSR (والـRAPR أيضاً) في مجالاتٍ كثيرة منها دراسة التنوع الوراثي عند القمح الربيعي (Chen *et al.*, 1994) وفي الشعير (Choumane *et al.*, 1998) وفي الذرة الصفراء (Chin *et al.*, 1994) وكذلك في التمييز ضمن بعض الأنواع النباتية (Russell *et al.* 1997b ; Baek *et al.* 2003 ; Feng *et al.* 2006 ; Struss and Plieske, 1998).

أهمية البحث وأهدافه:

يهدف هذا البحث إلى التوصيف الجزيئي لعشر مجموعات من الحمص متشابهة مظهرياً و يعتقد بأنها وصلت لمرحلة السلالات النقية وهي منتخبة من خلال أحد برامج التربية (طريقة الانتخاب الفردي لمدة أربعة مواسم زرعية في مركز البحوث العلمية الزراعية بإدلب)، ومن ثم تقدير مدى نقاوتها الوراثية، وتحديد مدى التشابه والقرابة فيما بينها من خلال إنشاء مخطط القرابة الوراثية.

طرائق البحث ومواده:

مكان إجراء البحث: أجريت هذه الدراسة خلال موسم 2007 / 2008 حيث زرعت البذور في محطة تل صندل التابعة لمركز البحوث العلمية الزراعية بإدلب، وأجريت التحاليل الجزيئية في مخبر التقانة الحيوية في المركز الدولي للبحوث الزراعية في المناطق الجافة (ايكاردا)، حلب، سورية.

– المادة النباتية: استخدمت في هذه الدراسة عشر مجموعات من الحمص(سنسميها تجاوزاً سلالات بعد أن خضعت للانتخاب الفردي لأربعة مواسم زراعية وسيتم التحقق من ذلك من خلال هذه الدراسة) منتخبة من سبع عشائر محلية، وهذه السلالات هي: جبلي 43، جبلي 48، مراكشي 36، كردي 8، درعوزي 19، حوراني 20، فوعي 13، فوعي 48 ، بلدي 16، بلدي 49. اختيرت ثلاثة نباتات من كل سلالة واستخلص الـ DNA من الأوراق الفتية لكل نبات على حدة.

– استخلاص وتجهيز الأحماض النووية: عزلت الأحماض النووية من 0.2غ من الأوراق الفتية المأخوذة من نباتات سليمة بعمر3 أسابيع حسب طريقة (Doyle and Doyle, 1987) ، مع إجراء بعض التعديلات عليها. طحنت العينات بالآزوت السائل، ومن ثم نقلت إلى أنابيب سعة 2 مل، وأضيف إليها 1مل من محلول الاستخلاص ذي درجة الحرارة 65 مْ و المكون من:

2% Cetyltrimethyl Ammonium Bromide (CTAB), 1.4M NaCl, 0.1 M Tris-Cl, 20mM EDTA, pH: 8.0

مزجت العينات جيداً، وتم تحضينها في حمام مائي على درجة حرارة 65 مْ لمدة 30 دقيقة مع التحريك الهادئ. أخرجت العينات وأضيف لها حجم مماثل من المزيج المحضر بنسبة: 24 كلوروفورم / 1 كحول ايزواميل. مزجت العينات جيداً على هزاز أفقي لمدة 10 دقائق.

أجريت عملية التثفيل لمدة 15 دقيقة، بسرعة 4000 دورة / دقيقة وبدرجة حرارة 20 مْ. نقل الوسط المائي المحتوي على الأحماض النووية إلى أنبوب جديد حيث تم ترسيبها باستخدام 0.6 من حجمها من الكحول الأيزوبروبانولي. تركت الأحماض النووية لتترسب مدة 30 دقيقة في درجة حرارة المخبر، ثم جمعت من خلال عملية

التثفيل لمدة 10 دقائق على درجة حرارة (0) مْ وبسرعة 10.000 دورة / دقيقة. تم غسل الراسب مرتين بالكحول الايتيلي 76% ثم جفف وأذيب في المحلول الواقي TE (TE:10 m M Tris, 1Mm EDTA, pH:8).

اختبرت نوعية الـDNA على هلامة ذات تركيز 1%من الأجاروز ومن خلال عملية الرحلان الكهربائي الأفقي. تم تخفيف وتوحيد تركيز الـ DNA لجميع العينات للحصول على 25 نانوغرام من الـ DNA/ ميكروليتر.

التفاعل التسلسلي للبوليميراز والرحلان الكهربائي:

Polymerase Chain Reaction (PCR) and Electrophoresis

تم استخدام اثنا عشر زوجاً من بادئات الـ (SSR) المستخلصة من الحمص (Winter *et al.*, 1999) والموسومة عند النهاية ‘5 بصبغة متوهجة ذات ألوان مختلفة Fluorecnce-dye، (جدول1). وقد تم اختيار هذه البادئات لكونها تتميز بكشف نسبة عالية من التنوع الوراثي ضمن مجين الحمص.

أجري التفاعل في حجم نهائي قدره 10 ميكروليتر. استخدم 50 نانوغرام من الـ DNA و200 ميكرومولار من كل من النيوكليوتيدات الأربعة (dTTP/dATP/dCTP/dGTP) و30 بيكومول من كل من البادئتين و 0.5 وحدة من أنزيم التكثيف *Taq* DNA polymerase.

أجريت عملية المكاثرة Amplification في جهاز الدوران الحراري PCR (Perkin Elmer Applied-9700). وتمت المكاثرة من خلال برنامج مكون من 35 دورة، وذلك بعد تعريض الـ DNA إلى درجة حرارة 94 مْ لمدة 5 دقائق، تتكون كل منها من المراحل التالية: (30) ثانية على درجة حرارة (94) مْ ثم (50) ثانية على درجة حرارة (55) مْ ثم (50) ثانية على درجة حرارة (72) مْ. بعد ذلك تركت العينات مدة 7 دقائق على درجة حرارة 72 مْ لاستكمال عملية تصنيع سلاسل DNA جديدة.

تم تجهيز العينات عن طريق مزج نواتج مكاثرة ثلاث بادئات موسومة بألوان مختلفة (أصفر- أزرق – أخضر). حمّلت العينات على هلامة أكريلامايد ذات تركيز 6%، أجريت عملية الرحلان الكهربائي على جهاز التتالي النيوكليوتيدي الآلي ABI Prism TM 377 DNA Sequencer، ومن خلال برنامجي Genscan وGenotyper المرتبطين مباشرةً بجهاز ABI 377 Sequencer، تم تحليل صور الهلامات وتحديد الوزن الجزيئي لقطع الـ DNA المكاثرة مع البادئات المختلفة.

– التحليل الوراثي: حللت النتائج وأنشئت جداول تتضمن القرائن على كل موقع وراثي وتم حساب معامل البعد الوراثي (Nei and Li., 1979) وانشئت مخططات القرابة باستخدام طريقة المتوسطات الحسابية للمجموعات الزوجية غير المزانة.The un-weighted pair group method for the arithmetic average (UPGMA) (Sneath and Sokal, 1973) وأجريت كل التحاليل الإحصائية باستخدام برنامج:

.(Rholf, 1993) NTSYS-pc, Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System

النتائج والمناقشة:

يمثل كل زوج من البادئات موقعاً واحداً على الصبغي وبالتالي فإن الكشف عن قطع متباينة في الوزن الجزيئي بين العينات المختلفة وباستخدام نفس الزوج من البادئات يدل على وجود عدد من القرائن على نفس الموقع الوراثي ويعطي فكرة عن مدى التنوع الوراثي على هذا الموقع، وبحال كانت العينات التي تحمل القرائن المختلفة تابعة لسلالة واحدة فهذا يدل على عدم النقاوة الوراثية للسلالة المختبرة.

تباينت البادئات بعدد القرائن التي كشفتها على الموقع الواحد وكذلك بدرجة التباينات التي أظهرتها، تراوح عدد القرائن على الموقع الواحد بين (3) قرائن كما هوالحال على الموقع Ta3 حتى وصلت إلى (10) قرائن لكلٍ من الموقعين Ta5 و Tr1، وكان العدد الكلي لقرائن السلالات المدروسة هو (78) قريناً للمواقع الاثنى عشر المختلفة، أي بمتوسط قدره (6.5) قرين على الموقع الواحد (جدول1).

الجدول (1): عدد القرائن التي كشفتها البادئات المستخدمة.

البادئة	Ta 2	Ta 3	Ta 5	Ta 8	Ta 80	Ta 96	Ta 144	Ta 176	Ta 196	Ta 203	TS 45	Tr1	المجموع
عدد القرائن على الموقع الواحد	7	3	10	8	5	8	4	5	6	8	4	10	78

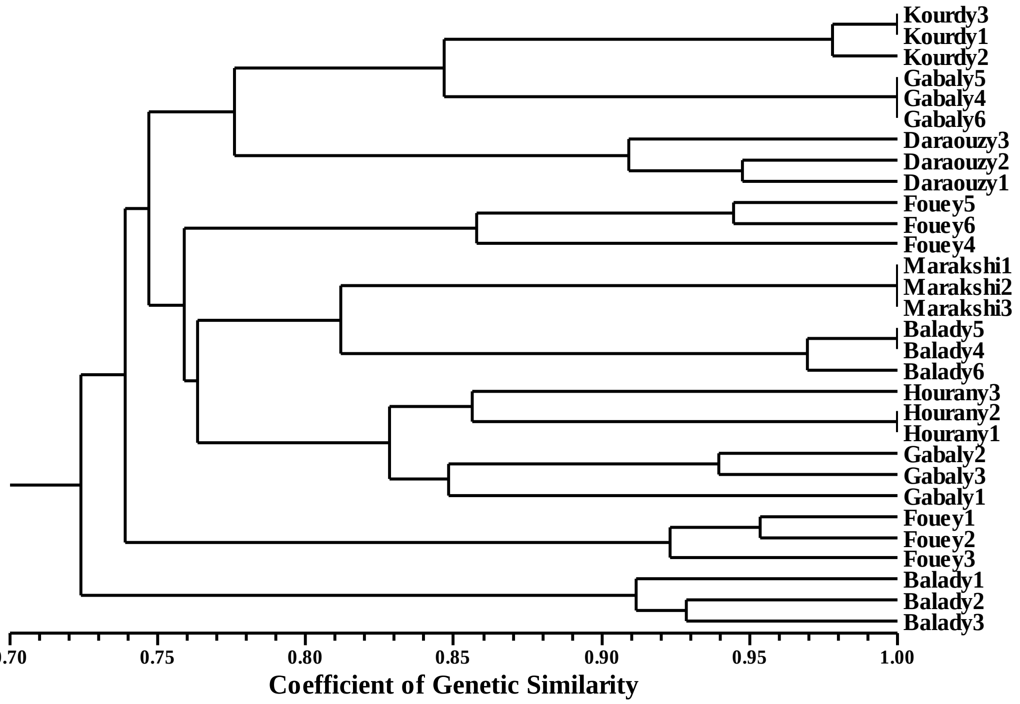
تم حساب معامل التشابه الوراثي بين السلالات المختلفة، واستخدمت هذه القيم في رسم مخطط العلاقات الوراثية بين الأفراد والسلالات المختلفة وذلك باستخدام البرنامج NTSYS ، شكل (1).

يظهر المخطط بوضوح بأن لكل سلالة بصمة وراثية تميزهاعن غيرها ولا يوجد سلالتين متشابهتين تماماً، ويظهر ذلك من خلال وجود أفراد كل سلالة في فرع مستقل عن الآخر، مع الإشارة إلى وجود سلالتين من البلدي وهما بلدي 49 وأفرادها بلدي 1و2 و3 ، بلدي 16 وأفرادها بلدي 4 و5 و6، وكذلك سلالتين من الفوعي وهما فوعي 48 وأفرادها 1و2 و3، فوعي 13 وأفرادها 4 و5 و6 وأيضاً سلالتين من الجبلي وهما جبلي 43 وأفرادها 1 و2 و3 ، وجبلي 48 وأفرادها 4 و5 و6، بينما يوجد سلالة واحدة من كلٍ من الدرعوزي 19 والحوراني 20 والكردي 8 والمراكشي 36 وأفراد كلاً منها هي 1 و 2 و 3.

بينت الدراسة وجود مجموعتين نقيتين تماماً يمكن القول بأنهما سلالتين نقيتين لكون أفراد كلٍ منهما متماثلة تماماً على جميع المواقع المدروسة.، حيث امتلكت النباتات المأخوذة من نفس السلالة نفس القرائن على المواقع المختلفة، وهذا يظهر بوضوح عند كل من سلالة الجبلي 48 و سلالة المراكشي 36، حيث نلاحظ أن عينات الجبلي 4، 5، 6 (Gabaly 4 و5 و6) التي تمثل أفراد السلالة المبشرة جبلي 48 متماثلة تماماً ومعامل التشابه الوراثي عندها هو 100% مما يدعم الملاحظات المعتمدة على المواصفات الشكلية (نتائج قيد النشر)، والتي تدل على وصول هذه السلالة الى مرحلة النقاوة الوراثية لتشابهها بكامل المواصفات المورفولوجية والتكنولوجية، وبالتالي يمكن تسميتها بحق سلالة نقية من الحمص. نفس الأمر ينطبق على عينات المراكشي1 و2 و3 (Marakshi1 و2 و3) التي تمثل أفراد سلالة مراكشي 36 (الشكل1)، وقد تم التأكد من النقاوة عند إعادة العمل والحصول على نفس النتائج على خمسة نباتات إضافية من هاتين السلالتين.

أما السلالات الباقية، فقد ظهر جلياً عدم وصولها لدرجة النقاوة الوراثية، حيث لوحظ وجود تباينات بين الأفراد المختبرة التابعة لنفس السلالة. لقد تباينت هذه السلالات في مدى نقاوتها الوراثية، حيث لوحظ وجود سلالات ذات نقاوة مرتفعة، كما هو الحال في سلالة الكردي 8 التي تحمل نباتين متماثلين تماماً (Kourdy1 وKourdy 3) والنبات الثالث(Kourdy2) يختلف عنهما بنسبة منخفضة جداً، وكذلك هو الحال بالنسبة للسلالة بلدي 16 (Balady 4 و 5 و6) وحوراني 20 (Hourany1 و2 و3) (شكل 1). وللحصول على درجة نقاوة وراثية 100% في هذه السلالات لا بد من استبعاد العينات المختلفة وإكثار نباتات العينات المتشابهة عن طريق عزلها تماماً للتأكد من

تلقيحها ذاتياً ولتجنب أية فرصة للتلقيح الخلطي مهما كانت نسبتها ضئيلة، حيث إن التلقيح السائد في الحمص، بشكل عام، هو التلقيح الذاتي مع نسبة منخفضة من التلقيح الخلطي (0.0 –1.25%) (Toker *et al.*, 2006). بالإضافة لما سبق، نجد بأن هناك عينات ما زالت بعيدة كثيراً عن التركيب الوراثي النقي المميز للسلالة ومنها عينات الـ Balady1 و2 و3 التي تمثل سلالة البلدي 49 وكذلك عينات سلالتي الفوعي 48 (Fouey1 و2 و3) والفوعي 13 (Fouey 4 و5 و6) وأيضاً عينات الجبلي (Gabaly1 و2 و 3) التي تمثل السلالة جبلي 43، وعينات الدرعوزي 19 (Daraouzy1 و 2 و 3)، لذلك لا بد من الاستمرار بالتلقيح الذاتي في هذه المجموعات واستبعاد النباتات التي تحمل تباينات وراثية وغير المتماثلة تماماً في خواصها المظهرية مع كافة نباتات المجموعة المدروسة ومن ثم إعادة تحليل الـ DNA الخاص بها للتأكد من نقاوتها الوراثية ليتم اعتمادها لاحقاً كسلالة نقية وراثياً.



الشكل (1): مخطط علاقات القرابة الوراثية المبنية على معامل التشابه بين نباتات الحمص المدروسة.

Balady 1 و2 و3 – تمثل السلالة بلدي 49. Balady 4 و 5 و 6 - تمثل السلالة بلدي 16.
Daraouzy 1 و2 و 3 – تمثل السلالة درعوزي 19. Fouey 1 و2 و3 – تمثل السلالة فوعي 48.
Fouey 4 و 5 و 6 – تمثل السلالة فوعي 13. Gabaly 1 و2 و 3 - تمثل السلالة جبلي 43.
Gabaly 4 و 5 و 6 – تمثل السلالة جبلي 48. Hourany 1 و 2 و 3 – تمثل السلالة حوراني 20.
Kourdy 1 و 2 و 3 – تمثل السلالة كردي 8. Marakshi 1 و 2 و 3– تمثل السلالة مراكشي 36.

بالإضافة للنقاوة الوراثية للسلالة الواحدة فإن مربي النبات يهتم بالحصول على سلالات مختلفة وراثياً عن بعضها البعض، لكي يكون لديه مخزوناً وراثيا واسعاً ومتبايناً في محتواه من المورثات والصفات بهدف الاستفادة منه لاحقاً في برامج التحسين لاحتمال احتوائه على مجموعة أكبر من المورثات والقرائن المختلفة التعبير والمسؤولة عن صفات معينة ذات أهمية كبيرة لكل من المربي والمستهلك. نلاحظ من خلال شجرة القرابة الوراثية توزع السلالات

المدروسة في عدة أفرع، حيث تراوحت نسب التشابه بين السلالات ما بين 73% بين البلدي 49 والكردي 8 إلى 83% بين الجبلي 43 والحوراني 20. (الشكل1).

تشير النتائج التي حصلنا عليها الى وجود تباينات واضحة ما بين السلالات النقية والمجموعات التي ستصبح قريباً سلالات نقية، وبالتالي سيصبح لددينا عدد من السلالات ذات المواصفات الجيدة والمختلفة عن بعضها البعض مما سيفتح الباب واسعاً أمام برامج التحسين للاستفادة من هذه التباينات الوراثية في جمع أكبر عدد من الصفات المرغوبة في سلالةٍ واحدة.

الاستنتاجات والتوصيات:

يظهر لدينا من خلال تحليل الـ DNA وباستخدام مؤشرات المقاطع القصيرة المتكررة (الـ SSR)، بأن لدينا سلالتين نقيتين من الناحية الوراثية (بعد أن أثبتت تشابهاً في عدة صفات مورفولوجية وإنتاجية اقتصادية ومنها ارتفاع النبات، ومكونات الغلة وطبيعة التفرع وغيرها وذلك في نتائج قيد النشر) هما سلالة الجبلي 48 و سلالة المراكشي 36، ويمكن مكاثرتهما واعتمادهما كسلالات نقية. بالإضافة لهما، لدينا ثلاث مجموعات ذات درجات نقاوة عالية وهي بالتالي قريبة من بنية السلالة النقية، وهي كردي 8 وبلدي 16 وحوراني 20، حيث يمكن استبعاد النباتات غير المتشابهة منها وتعريض الأفراد الباقية للتلقيح الذاتي وإعادة اختبار المواقع التي كانت مختلفة للتأكد من نقاوتها ولاعتمادها كسلالات نقية أيضاً. أما باقي المجموعات فما زالت بعيدة عن النقاوة الوراثية ولا بد من إخضاعها للتلقيح الذاتي والانتخاب لعدة أجيال للوصول لمرحلة النقاوة الوراثية.

لوحظ وجود تباين وراثي واسع بين السلالات المدروسة مما يعكس اتساع القاعدة الوراثية لسلالات الحمص المنتخبة وبالتالي إمكانية الاستفادة من الاختلافات الموجودة بين هذه السلات في برامج تحسين الحمص المزروع مستقبلاً.

المراجع:

1- شومان، وفاء،- *التمييز بين بعض أصناف الحمص وهجنها من خلال بصمة الـ DNA*. مجلة جامعة تشرين للدراسات والبحوث العلمية، المجلد 18، العدد 4، 1996، 227 - 242.

2- معلا، محمد، غزال، حسن، الواوي، هايل- *التنوع الوراثي في عشائر محلية من الحمص المزروع*، مجلة جامعة تشرين للدراسات والبحوث العلمية، سلسلة العلوم الزراعية المجلد 26، العدد1،2004.

3- معلا، محمد، وفاء، شومان، الواوي، هايل – *الخواص النوعية والتكنولوجية لسلالات محلية منتخبة من الحمص المزروع*، مجلة جامعة تشرين للدراسات والبحوث العلمية، سلسلة العلوم البيولوجية، 2008.

4- الواوي، هايل، معلا، محمد، شومان، وفاء – *دراسة بعض الخواص الإنتاجية والمظهرية لسلالات محلية منتخبة من الحمص المزروع*.*Cicer arietinum* L ، مجلة جامعة تشرين للدراسات والبحوث العلمية، سلسلة العلوم البيولوجية، 2008.

5- BAEK, H. J.; BEHARAV, A.; NEVO, E. *Ecological- genomic diversity of microsatellite in wild barley (Hordeum Spomtaneum) populations in Jordan.* Theor Appl Genet. Vol. 106, 2003, 397 – 410.

6- CHABANE, K.; ABLETT, G. A.; CORDEIRO,G. M.; VALKOUN, J.; HENRY, R. J. *EST versus genomic diversity microsatellite markers for genotyping wild and cultivated barley*. Genetic Resources and Evaluation. Vol. 52, 2005, 903 – 909.

7- CHEN, H. B.; MARTIN, J. M.; TALBERT, L. E. *Genetic diversity in hard red spring wheat based on sequence -Tagged - Site PCR marker*. Crop-Sciences, Vol. 34, N°. 6, 1994, 1628-1632.

8- CHIN, E. C. L.; SENIOR, M. L.; SHU. H.; SMITH, J. S. C. *Maize simple repetitive DNA sequences*. Abundance and allele variation.Genome, No. 39, 1994, 866-873.

9- CHOUMANE, W.; ACHTAR, S.; VALKOUN, J.; WEIGAND, F. *Genetic variation in core and base collections of barley from WANA as revealed by RAPD's*. A. A Jaradat (Ed.), Triticeae III. Science Publishers, Inc., Enfield, NH, USA, 1998, 159-164.

10- CHOUMANE, W.; WINTER, P.; WEIGAND, F.; KAHL, G. *Conservation and Variability of Sequences Tagged Microsatellite Sites from Chickpea (Cicer arietinum) within the genus Cicer*. Theor Appl Genet, N°. 101, 2000, 269-278.

11- CHOUMANE, W.; BAUM, M. *Conservation of Sequence Tagged Microsatellite Sites (STMSs) between Cicer and Pisum*. Tishreen University Journal for Studies and Scientific Research- Agriculture Science Series Vol. 24, N^0. 12, 2002.

12- CHOUMANE, W.; VAN BREUGEL, P.; BAZUIN, T.O.M.; BAUM, B.; AYAD, G.W.; AMARAL, W. *Genetic Diversity of Pinus brutia in Syria detected by molecular markers.* Forest Genetics, Vol. 2, N^0. 11, 2004, 87-102.

13- DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. *A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf material*. Phytochem Bull. Vol. 19, 1987, 11-15.

14- EPPLEN, J. T.; AMMER, H.; EPPLEN, C. O*ligonucleotide fingerprinting using simple repeats motifs a convenient ubiquitosusly applicable method to detect hypervariability for multiple purposes*. In DNA fingerprinting approaches and application. Edited by Burk T., Dolf G., JEFFREYS A. J. ; WOLFF, R. Birkhauser Bsel, 1991, 50-69.

15- FENG, Z. Y.; ZHANG, L. L.; ZHANG, Y. Z.; LING, H. Q. *Genetic diversity and geographical differentiation of cultivated sixi-rowed naked barley landraces from the Qinghai-Tibet plateau of China detected by SSR analysis.* Genetic and Molecular Biology. Vol. 29, N°. 2, 2006,330-338.

16- HAMWIEH, A.; UDUPA, S.M.; CHOUMANE, W; SARKER, A.; DREYER, F.; JUNG, C; 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. Vol. 110: 2005, 669- 677.

17- HUTTEL, B.; WINTER, P.; WEISING, K.; CHOUMANE, W.; WEIGAND, F.; GUNTER, K. *Sequence-tagged microsatellite site markers for chickpea (Cicer arietinum* L.*) Genome.*, 42, 1999, 210-217

18- LADIZINSKY, G. *A new Cicer from Turkey. Notes from the Royal Botanic Gardens*, Edinburgh, N°. 34,1975, 201-206.

19- MACAULAY, M.; RAMSAY, L.; POWELL, W.; WOUGH, R. *A representative ,highly informative genotyping set of barley SSRs*. Theor Appl Genet. Vol. 12, 2001, 801 –809.

20- MATUS, I. A.; HAYES, P. M. *Genetic diversity in three groups of barley germplasm assessed by simple sequence repeats*. Genome. Vol. 45, 2002,1095–1106.

21- NEI, M.; LI, W. H. *Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases*. Proc Natl Acad Sci. USA, Vol. 76. N°.10, 1979, 5269- 5273.

22- PANDIAN, A.; FORD, R.; TAYLOR, P. W .J. *Transferability of sequence tagged microsatellite sites (STMS) across four major pulses*. Plant Mol Biol Rep 18: 2000. 395a–395h.

23- RAJORA, P.O.; RAHMAN, M. H. *Micsatellite DNA and RAPD fingerprinting identification and genetic relationships of hybrid poplar (populus X Canadensis) cultivars*. Thero Appl Genet. Vol. 106, 2003, 470-477.

24- RHOLF, F. J. *NTSYS-pc, Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System*. Applied Biostatistical Inc., new York, 1993.

25- RUSSELL, J. R.; FULLER, J. D.; MACAULAY, M.; HATZ, B. G.; JAHOOR, A.; POWELL ,W.; WAUGH, R. *Direct comparison of levels of genetic variation among barley accessions detected by RFLP –AFLP –SSR – and RAPD.* Theor Appl Genet. Vol. 95 , 1997a, 714 – 722.

26- RUSSELL, J.; FULLER, J.; YOUNG, G.; THOMAS, B.; TARAMINO, G.; MACAULAY, M.; WAUGH, R.; POWELL, W. *Discriminating between barley genotypes using microsatellite markers*. Genome. Vol. 40, 1997b, 442 – 450.

27- SMITH, J. S. C. *Genetic variability within U. S hybrid maize: multivariate analysis of isozyme data*. Crop Sciences. N°. 24, 1984, 1041-1046.

28- SMITH, D. N.; DEVERY, M. E. *Occurrence and inheritance of microsatellites in Pinus radiate*. Genome, N°. 37, 1995, 977-983.

29- SMULDERS, M. J. M.; BREDEMEIJER, G.; RUSKORTEKAAS, ARENS, P.; VOSMAN, B. *Use of short microsatyellites from database sequences to generate polymorphism among Lycopersicon Esculantum cultivars and accessions of the Lycopersicon species*. Theor. Appl. Gene. Vol. 94, N°.2, 1997. 264-272.

30- SNEATH, P. H.; SOKAL. *Numerical taxonomy – the principals and practice of numerical classification,* W.H. Freeman and Co., San Francisco, 1973.

31- SOUTHERN, E. *Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis*. J. Mol. Biol. Vol. 98, 1975, 503-517.

32- STRUSS, D.; PLIESKE, J. *The use of microsatellite markers of detection of genetic diversity in barley populations*. Theor Appl Genet. Vol. 97, 1998, 308 – 315.

33- TOKER, C.; CANCI, H.; CEYLAN.; F. *Estimation of outcrossing rate in chickpea (Cicer arietinum L.) sown in autumn.* Euphytica. Vol. 151, N°. 2, 2006, 201-205(5).

34- UDUPA, S. M.; ROBERTSON, L.D.; WEIGAND, F.; BAUM, M.; KAHL. G. *Allelic variation at (TAA)* $_n$ *microsatellite loci in a world collection of chickpea (Cicer arietinum L.) germplasm*. Mol. Gen. Genet. N°. 261, 1999, 354-363.

35- UDUPA, S. M.; BAUM. M. *High mutation rate and mutational bias at microsatellite loci in chickpea (Cicer arietinum L*). *Mol. Gen.* N°. 265, 2001, 1097-1103.

36- VAN DER MAESEN, L.J.G. *Cicer* L. *Origin, history and taxonomy of chickpea*. In: M.C. Saxena and K.B. Singh (ed.), The Chickpea. C.A.b. International Cambrian News Ltd, Aberystwyth, UK.1987, 11-34.

37- WINTER, P.; PFAFF, T.; UDUPA, S.M.; HUTTEL, B.; SHARMA, P. C.; SAHI, S.; ARREGUIN-ESPINOZA,R.;WEIGAND, F.; MUEHLBAUER F.J.; KAH, G. *Characterization and mapping of sequence tagged microsatellite sites in the chickpea (Cicer arietinum* L.*) genome.* Mol Gen Genet 262, 1999, 90–101.