مجلة جامعة تشرين للدراسات والبحوث العلمية _ سلسلة العلوم الزراعية المجلد (23) العدد (11) 2001
Tishreen University Journal for Studies and Scientific Research- Agriculture Science Series Vol (23) No (11) 2001

# تحديد درجة القرابة بين الأنواع الحولية للجنس Cicer باستخدام المؤشرات الجزيئية

الدكتورة وفاء شومان*

( قبل للنشر في 2001/6/5)


## ☐ الملخّص ☐

*كان الهدف من هذه الدراسة تحديد مؤشرات جزيئية مميزة لكل من الأنواع الحولية التسعة التابعة للجنس Cicer ومن ثم إنشاء شجرة قرابة توضح العلاقات الوراثية بين الأنواع التسعة باستخدام تقنية التفاعل التسلسلي للبوليميراز (PCR-RAPD) وفي النهاية تقدير كفاءة تقنية الـ RAPD في دراسة علاقات القرابة بين الأنواع.*

*حلل DNA خمسة مدخلات من كل نوع وعشرة نباتات من كل مدخل باستخدام ثلاثين بادئة. تم الحصول على ثلاثمئة وستين حزمة متباينة من الـ DNA.*

*تم تحديد قطع معينة من الـ DNA تسمح بالتمييز بين الأنواع المختلفة. أنشئت شجرة القرابة بين الأنواع الحولية التسعة اعتمادا" على نتائج مكاثرة الـ DNA مع البادئات الثلاثين. بينت النتائج بأن الأنواع C. arietinum و C. reticulatum وC. echinospermum هي الأكثر قربا" من بعضها البعض من الناحية الوراثية وهذا يتوافق مع علاقات القرابة المحددة مسبقا" اعتمادا" على معايير أخرى (شكلية وخلوية وحيوية وجزيئية) ، في حين تباين موقع أنواع أخرى تبعا" لنوع المعيار أو المؤشر المستخدم وهذا ما تم إيضاحه في المناقشة.*

*سمحت نتائج هذه الدراسة بتحديد بادئات من الـ RAPD يمكن استخدامها وبدقة كمؤشرات في برامج تحسين نبات الحمص. كما أظهرت كفاءة استخدام هذه التقنية في دراسة علاقات القرابة بين الأنواع الحولية التابعة للجنس Cicer.*


***الكلمات المفتاحية:*** *الحمص ، الجنس Cicer ، مؤشرات جزيئية، تحليل الـ RAPD ، العلاقات الوراثية*

* أستاذ مساعد في قسم العلوم الأساسية، كلية الزراعة، جامعة تشرين، اللاذقية، سوريا

مجلة جامعة تشرين للدراسات والبحوث العلمية _ سلسلة العلوم الزراعية المجلد (23) العدد (11) 2001
Tishreen University Journal for Studies and Scientific Research- Agriculture Science Series Vol (23) No (11) 2001

# The phylogenetic relationships between the nine annual species of the genus Cicer by using the molecular markers

**Dr. Wafaa Choumane***

**(Accepted 5/6/2001)**

## ☐ ABSTRACT ☐

The objectives of this study were the characterization and the establishment of phylogenetic relationships among nine annual Cicer species using PCR-RAPD markers. Then the evaluation of the efficiency of the RAPD technique in the Phylogenetic study. Five accessions per species and ten plants per accession were analyzed. 360 polymorphic fragments were generated using 30 decameric primers of arbitrary nucleotide sequences. Most of the primers produced very specific fragments.
Specific markers for each species were identified. Based on RAPD data, a dendrogram of genetic distance between the nine species was established. It showed that C.arietinum, C.reticulatum and C. echinospermum were the most close to each other while C. cuneatum was the farest one. Tree topology was compared with those based on other markers. The efficiency and reliability of RAPD data were demonstrated in the genus Cicer.

**Key words**: RAPD analysis, Molecular markers, Cicer species, Chickpea, Phylogenetic study

*** Associate Professor at Basic Science Department, Faculty of Agriculture, Tishreen University, Lattakia, Syria.**

## المقدمة:

يعتبر الحمص .Cicer arietinum L النبات البقولي الثالث عالميا" من حيث الأهمية الاقتصادية، فهو يستخدم على نطاق واسع في تغذية الإنسان والحيوان بالإضافة إلى دوره في تحسين خصوبة التربة من خلال تزويدها بالازوت (Patankar et al., 1999). تتأثر إنتاجيته بعدد من العوامل والظروف غير المناسبة التي يتعرض لها سواءاً كانت حيوية، ممثلة بالإصابات المرضية ، أو غير حيوية ممثلة بالظروف البيئية غير المناسبة المحيطة به. لذلك يهتم مربو نبات الحمص بتحسينه عن طريق برامج تربية متعددة الأهداف.

ترتبط عملية تحسين أي نبات بمدى اتساع المخزون الوراثي لأفراد النوع الذي ينتمي إليه أو للأنواع البرية القريبة منه والتابعة لنفس الجنس. من المعروف إن الأنواع البرية تتميز بمخزون عال من المورثات المسؤولة عن المقاومة للكائنات الممرضة الموجودة في المنطقة وكذلك تلك المسؤولة عن التكيف مع الظروف البيئية السائدة ، وهذا ما نجده أيضاً في الأنواع البرية للجنسCicer (Reddy and Nene, 1978). لذلك فإنه من الأهمية بمكان البحث عن المورثات المسؤولة عن مثل هذه الصفات في مصادرها الوراثية المختلفة ومحاولة نقلها إلى الأصناف المرغوبة.

يقسم الجنس Cicer، الذي يضم ثلاثة وأربعين نوعاً نباتياً تتوزع بين حولية ومعمرة، إلى أربعة أقسام هي: Monocicer وهو الأكثر أهمية لمربي نبات الحمص لأنه يحتوي على أغلب الأنواع الحولية، و Chamacicer ويضم النوع الحولي C. chorassanicum بالإضافة لمجموعة من الأنواع المعمرة أما الأقسام Polycicer و Acanthocicer فتضم أنواعا" معمرة فقط.

ينتمي نوع الحمص .Cicer arietinum L بالإضافة إلى ثمانية أنواع أخرى إلى مجموعة الأنواع الحولية، وهو النوع الوحيد المزروع في حين توجد الأنواع الحولية الأخرى على شكل بري. قسمت الأنواع الحولية التسع إلى أربع مجموعات متباينة اعتماداً على علاقات القرابة الوراثية التي حددت باستخدام معايير متباينة، منها نتائج الدراسات الصبغية والتهجينات بين الأنواع (Ocampo et al., 1992; Abbo et al., 1994)، نتائج تحليل الأيزوزيمات (Tuwafe et al., 1988; Gaur and Slinkard 1990 a; b; Ahmad et al., 1992; Labdi et al., 1996) والبروتينات المخزنة في البذور (Ahmad and Slinkard, 1992) وكذلك باستخدام بعض المؤشرات الجزيئية (Choumane et al., 2000) . تضم المجموعة الأولى الحمص المزروع بالإضافة للنوع C. reticulatum ،والذي يعتقد بأنه أصل الحمص المزروع ويتميز بأنه يتهجن معه بسهولة ويعطي نسلاً خصباً، والنوع C. echinospermum الذي يمكن أن يتهجن مع C. arietinum ولكنه ينتج نسلاً يتميز بصفة العقم الجزئي. أما المجموعة الثانية فتضم الأنواع الأربعة C. bijugum, C. pinnatifidum, C. judaicum C. yamashitae ، في حين يشكل النوع الحولي C. chorassanicum المجموعة الثالثة والنوع C. cuneatum يكون لوحده المجموعة الرابعة وهما نوعان غير قابلين للتهجين فيما بينهما أو مع أي من الأنواع الحولية الأخرى (Kazan and Muehlbauer, 1991; Singh and Ocampo, 1997). تتميز أنواع المجموعة الثانية بامتلاكها لمجموعة من المورثات الهامة في تحسين الحمص مثل تلك المسؤولة عن المقاومة لفطر الأسكوكايتا والفيوزاريوم ، إلا أنها صعبة التهجين مع C. arietinum وتعطي نسلاً تتفاوت نسبة العقم في أفراده.

إن التقدم السريع في مجال التقانات الحيوية فتح مجالات كبيرة لدراسة التباينات الوراثية وللتمييز بين الأنواع القريبة من بعضها البعض وراثياً. فقد تم وضع تقنية هامة من قبل (Williams et al., 1990) يمكن من خلالها كشف التباينات الوراثية على مستوى جزيئة الـ DNA مباشرة عن طريق التفاعل التسلسلي للبوليميراز Polymerase Chain Reaction (PCR) . تسمح هذه التقنية بمكاثرة قطع من الـ DNA موزعة ضمن مجين الفرد باستخدام بادئات قصيرة مكونة من مقاطع نيوكليوتيدية محدودة (10 نيوكليوتيدات) وسميت هذه التقنية بالتفاعل التسلسلي للبوليمراز المعتمد على مكاثرة قطع من الـ DNA الموزعة عشوائياً في مجين الفرد Polymerase Chain Reaction – Random Amplified

Polymorphic DNA (PCR-RAPD). (Williams et al., 1990; 1993; Quiros et al., 1993). استخدمت تقنية الـ PCR-RAPD لدى مجموعة كبيرة من النباتات ولأهداف مختلفة، مثل تحديد المورثات المسؤولة عن صفة المقاومة للبياض الدقيقي في نبات الخس (Paran et al., 1991) أوللأصداء وللتبقع البكتيري في الفاصولياء (Bai et al., 1997) أو للذبول ولتحمل الصقيع في العدس (Eujayl et al., 1998; 1999)، أو لتحديد علاقات القرابة والنسب في عدد كبير من النباتات (Kazan et al., 1993; Howell et al., 1994; Baum et al., 1997; Choumane et al., 1998; Moller and Shaal, 1999).

كان الهدف من هذه الدراسة هو البحث عن مؤشرات جزيئية تسمح بالتمييز بين جميع الأنواع الحولية التابعة للجنس Cicer لاستخدامها في برنامج تربية بين الحمص المزروع والأنواع البرية القريبة منه، ومن ثم تحديد علاقات القرابة بين هذه الأنواع اعتماداً على مؤشرات الـ RAPD ومن ثم مقارنة شجرة القرابة المنشأة اعتماداً على نتائج الـ RAPD مع تلك المنشأة بالاعتماد على معايير أخرى ومعرفة مدى كفاءة تقنية الـ RAPD في تحديد العلاقات الوراثية بين الأنواع.

# المواد وطرق العمل:

**المادة النباتية:**

استخدمت في هذه الدراسة تسعة أنواع حولية، تم تحليل خمسين نباتا" من كل نوع مأخوذة من خمس مدخلات مختلفة (جدول 1). تم الحصول على هذه البذور من وحدة الأصول الوراثية في المركز الدولي للبحوث الزراعية في المناطق الجافة (ايكاردا)، حلب، سوريا . زرعت البذور في الدفيئة البلاستيكية بدرجة حرارة 20 $^{0}$م لمدة ثلاثة أسابيع للحصول على نباتات فتية خالية من الأمراض. أجري البحث في مخابر التقانات الحيوية في (ايكاردا) ،ما بين عامي 1998–2000.

**جدول 1: الأنواع والمدخلات المستخدمة في الدراسة، أرقامها في بنك المورثات وتوزعها الجغرافي.**

| الأنواع | دخلات | الموقع الجغرافي | الأنواع | دخلات | الموقع الجغرافي |
|---|---|---|---|---|---|
| C. arietinum | ILC 15 | سوريا | C. judaicum | ILW | لبنان |
| | ILC 19 | سوريا | | ILWC | الأردن |
| | ILC 19 | سوريا | | ILWC | سوريا |
| | ILC 25 | سوريا | | ILWC | سوريا |
| | ILC 26 | سوريا | | ILWC2 | لبنان |
| C. bijugu | ILW | تركيا | C. pinnatifid | ILW | تركيا |
| | ILWC | تركيا | | ILWC | تركيا |
| | ILWC | تركيا | | ILWC | سوريا |
| | ILWC1 | سوريا | | ILWC1 | تركيا |
| | ILWC2 | تركيا | | ILWC2 | تركيا |
| C. cuneatum | ILWC | أثيوبيا | C.reticulat | ILWC1 | تركيا |
| | ILWC | أثيوبيا | | ILWC1 | تركيا |
| | ILWC1 | أثيوبيا | | ILWC1 | تركيا |
| | ILWC1 | أثيوبيا | | ILWC2 | تركيا |
| | ILWC2 | أثيوبيا | | ILWC2 | تركيا |
| C. chorassanicu | ILWC | أفغانستان | C. yamashit | ILW | أفغانستان |
| | ILWC | أفغانستان | | ILWC | أفغانستان |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | ILWC9 | أفغانستان | | ILWC5 | أفغانستان |
| | ILWC14 | أفغانستان | | ILWC21 | أفغانستان |
| | ILWC14 | أفغانستان | | ILWC21 | أفغانستان |
| echinospermu | ILWC18 | تركيا | echinosperm | ILWC23 | تركيا |
| | ILWC18 | تركيا | | ILWC23 | تركيا |
| | ILWC23 | تركيا | | | |

**طرق العمل:**

**استخلاص الأحماض النووية :**

تم استخلاص الـ DNA من الأوراق الخضراء، حيث تم طحن / 0.1 / غ منها باستخدام الآزوت السائل وتمت عملية الاستخلاص باستخدام تقنية ( Benito et al, 1993 ).

**مكاثرة الـ DNA وعملية الرحلان الكهربائي:**

تم تحليل DNA الـ 450 فرداً" التابعين للأنواع التسعة باستخدام ثلاثين بادئة من شركة Operon Technologies inc. (جدول 2). تم التفاعل في 15 ميكروليتر من وسط التفاعل المكون من (10 mM Tris-HCl, PH = 8.3, 1.5 mM $MgCl_2$, 50mM KCl ، حيث استخدم 30 نانوغرام من الـ DNA، 250 ميكرو مول من كل من النيوكليوتيدات الأربعة (الأدنين والتيامين والسيتوزين والجوانين)، ووحدة أنزيمية واحدة من أنزيم التكثيف TaqDNA Polymerase و10–20 بيكومول من البادئة (تبعاً" لنوع البادئة المستخدمة، والذي يتم تحديده من خلال التجارب المخبرية).

عرض المزيج إلى 4 دقائق على درجة حرارة 94 $^0$م ومن ثم خضع إلى البرنامج الذي يتألف من 40 دورة، تتألف كل منها من المراحل التالية : 30 ثانية على درجة الحرارة 94 $^0$م ، 1 دقيقة على درجة حرارة 36$^0$م ، 2 دقيقتان على درجة حرارة 72 $^0$ م بعد ذلك تترك العينات لمدة 5 دقائق على درجة حرارة 72 $^0$ م. تم فصل نواتج عمليات المكاثرة في جهاز الرحلان الكهربائي على هلامة من الآجاروز تركيزها 1.5 % في محلول TAE ( 0.04 M Tris – Acetate, 0.001 M ETDA, PH = 7.8 ) لمدة ثلاث ساعات ونصف ثم لونت الهلامة لمدة 30 دقيقة في محلول بروميد الايتيديوم تركيز 0.5 مغ / مل ثم صورت بوجود الأشعة فوق البنفسجية.

**جدول 2: أسماء البادئات المستخدمة وتركيبها النيوكليوتيدي.**

| طع النيوكليوتيدية 5’ | ئة | طع النيوكليوتيدية 5’ | ئة | طع النيوكليوتيدية 5’ | ئة |
|---|---|---|---|---|---|
| CCCAGTCA | OPO- | GATGACCGCC | OPC- | CAGGCCCT | OPA- |
| TCGGCGGTT | OPO- | GGTCTACACC | OPD- | AGGGGTCTT | OPA- |
| CCCCTCACC | OPV- | GGGGTGACGA | OPD- | AGGTGACCC | OPA- |
| ACGCCCAGC | OPV- | TCAGGGAGGT | OPE- | GTTGCGATC | OPA- |
| CTACTGCGC | OPS- | TCACGTCCAC | OPG- | GTTTCGCTC | OPB- |
| CAGAGGTCCC | OPS-( | GTCAGGGCAA | OPG- | CTGCTGGGA | OPB- |
| TCCTGGTCC | OPS-( | CATTCGAGCC | OPK- | CCGCATCTA | OPC- |
| GAGTCAGCA | OPS- | CCAGCTTAGG | OPK- | AAGCCTCGT | OPC- |
| GACCTAGTC | OPR- | GAGCGTCGAA | OPK-1 | GTCGCCGTC | OPD- |
| ACGGCAAGC | OPR- | GGTGCTCCGT | OPN- | TTGGCACGC | OPD- |

**الطرق الإحصائية المستخدمة:**

جمعت نتائج عمليات المكاثرة للبادئات الثلاثين في جداول خاصة اعتماداً على وجود أو غياب قطع معينة من الـ DNA في العينات المختلفة، حيث يرمز لوجود قطعة الـ DNA بالرقم (1) ولعدم وجودها بالرقم (0).

تم حساب معامل التشابه (=2 x عدد قطع الـ DNA المتشابهة بين الفردين أ وب/ العدد الكلي لقطع الـ DNA الموجودة في كل من الفردين أ وب) وكذلك معامل البعد الوراثي (= 1− معامل التشابه) بين الأنواع حسب Nei's72. (Nei and Li; 1979)، ثم رسم مخطط البعد الوراثي بين الأنواع باستخدام طريقة: The un-weighted pair group method for the arithmetic average (UPGMA). (Sneath and Sokal,1973) . أجريت كل التحاليل الإحصائية باستخدام برنامج: NTSYS-pc- Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System- (Rohlf, 1993).

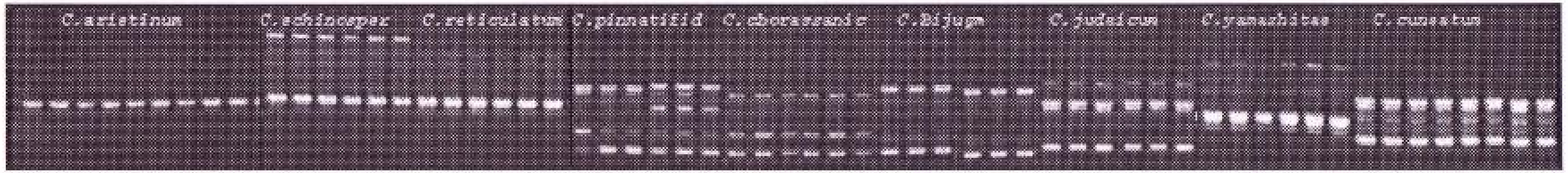
# النتائج والمناقشة:

استخدمت 30 بادئة، تميزت كل منها بقدرتها على كشف تباينات وراثية بين الأنواع المختلفة، في تحليل جميع العينات الممثلة للأنواع الحولية التسعة، وتم تحديد مجموعة من حزم أو قطع الـ DNA الناتجة عن عملية المكاثرة والتي تسمح بتمييز كل من الأنواع التسعة عن بعضها البعض وبشكل واضح ودقيق. تم التأكد من دقة النتائج من خلال اختيار عينات عشوائية وإعادة تحليلها لثلاث مرات متتالية والحصول على نتائج متطابقة في جميع الاختبارات.

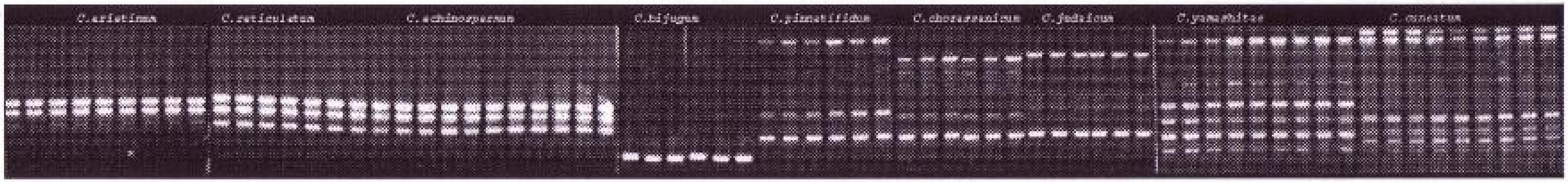
أظهرت التحاليل وجود اختلافات كثيرة بين الأنواع المدروسة وذلك مع جميع البادئات المستخدمة في هذه الدراسة. اختلف عدد قطع الـ DNA المكاثرة تبعا" للتركيب النيوكليوتيدي للبادئة المستخدمة، حيث تراوح العدد بين 8 قطع مع البادئة OPA-05 إلى 16 مع البادئة OPO-05 ، وذلك بمتوسط قدره 12 قطعة متباينة لكل بادئة. لقد سمحت أغلب البادئات المستخدمة بالحصول على هويات وراثية خاصة بكل نوع يمكن من خلالها التمييز بين النوع المزروع C.arietinum والأنواع الأخرى (شكل 1). تميزت كل من هذه الهويات بعدد محدد ووزن جزيئي مختلف لقطع الـ DNA المكاثرة.

يعتبر هذا النوع من البادئات مفيد جدا" في برامج تربية وتهجين أنواع مختلفة من الجنس Cicer مع بعضها البعض حيث يسمح ليس فقط بالتمييز ما بين الأنواع وإنما بالتمييز ما بين الأفراد الهجينة وغير الهجينة وهي بالتالي تسمح بمتابعة انعزالات صفات مختارة ومحددة في الأجيال الإنعزالية المتتالية.

إن تحليل الـ 450 فردا" مع الثلاثين بادئة زودنا بعدد من المؤشرات النوعية الهامة التي تسمح بالتمييز ما بين الحمص المزروع وكافة الأنواع البرية الأخرى. تم التأكد من دقة كل مؤشر في تمييز كل نوع من خلال تحليل 50 فردا" من كل نوع تابعين لخمسة مدخلات مختلفة، واعتمدت فقط قطع الـ DNA الموجودة في كافة الأفراد الخمسين والغائبة في كل أفراد الأنواع الأخرى كقطع مميزة للنوع المدروس، وبالتالي تم تحديد بادئة واحدة على الأقل خاصة بكل نوع بحيث تسمح بتمييزه بسهولة عن النوع المزروع C. arietinum (جدول 3).




**Primer OPC-5**



**Primer OPV-6**

شكل 1: الـ DNA المستخرج من الأنواع الحولية التسعة التابعة للجنس Cicer. تمت المكاثره بالبادئات OPV-6, OPC-5.
أجريت عملية الرحلان الكهربائي على هلامة من الأجاروز ذات تركيز 1,5% ثم لونت الهلامة ببروميد الأيتيديوم وأخذت الصور بوجود الأشعة فوق البنفسجية.

**جدول 3: البادئات المميزة لكل نوع من الأنواع الحولية للجنسCicer . تشير الخلايا الممتلئة إلى النوع الذي يمكن تمييزه بسهولة عن الحمص المزروع باستخدام البادئة الموجودة في نفس العمود.**

| البادئات / الأنواع | OPD-1 | PG-08 | PG-19 | PC-05 | PV-06 | PE-05 | PK-01 | OPB-01 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| C.arietinum | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| C.reticulatum | | | | | ■ | | | |
| C.echinosperm | ■ | | | | | | | |
| C.judaicun | | | | | | ■ | | |
| C.pinnatifidu | | | | ■ | | | | |
| C.bijigu | | ■ | | | | | | |
| C.chorassanicu | | | ■ | | | | | |
| C.yamashitae | | | | | | | ■ | |
| C.cuneatum | | | | | | | | ■ |

## العلاقات الوراثية ما بين الأنواع الحولية في الجنس Cicer:

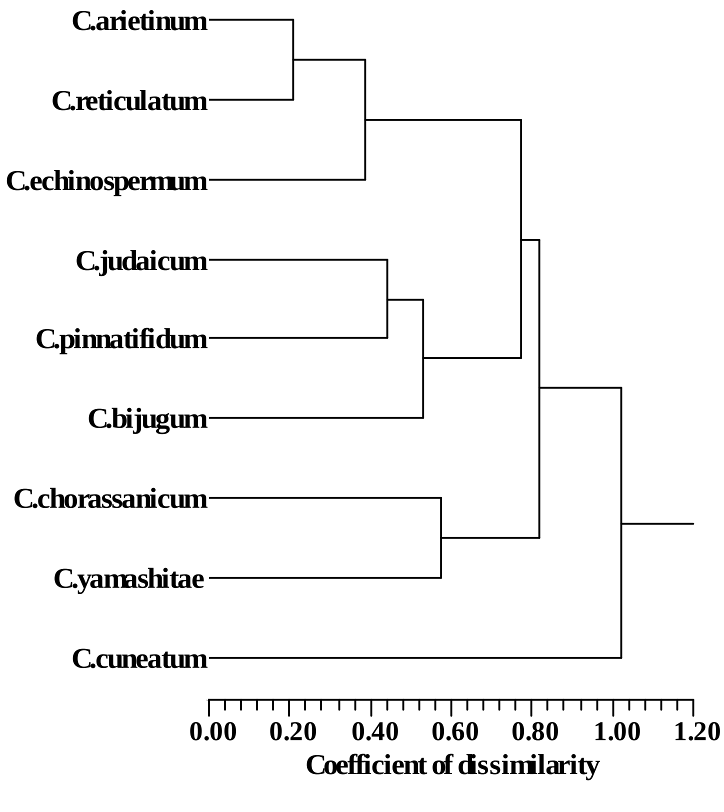
من خلال تجميع نتائج عمليات المكاثرة مع البادئات الثلاثين حصلنا على جدول المعطيات الذي أظهر وجود 360 قطعة DNA مختلفة. اعتمادا" على هذا الجدول تم حساب معامل البعد الوراثي بين الأنواع المختلفة (جدول 4) الذي استخدم كأساس في إنشاء شجرة القرابة ما بين الأنواع الحولية التسعة (شكل 2). أظهرت نتائج تحليل الـ 360 قطعة من الـ DNA مدى التشابه والاختلاف ما بين الأنواع التسعة، حيث أوضحت بأن أعلى نسبة من التشابه والتي تقابل أقل بعدا" وراثيا" (0.2083) كانت ما بين النوع C.arietinum والنوع C.reticulatum حيث شكلا مجموعة صغيرة ، في حين وجدت اصغر نسبة من التشابه والتي تقابل أكبر بعدا" وراثيا" (0.8784) ما بين النوع C.arietinum والنوع C.cuneatum. من ملاحظتنا لمخطط القرابة المنشأ اعتمادا" على معامل البعد الوراثي نجد بأن الأنواع التسعة قد توزعت في أربع مجموعات متميزة.

ضمت المجموعة الأولى الأنواع C. arietinum وC. reticulatum وC. echinospermum وكان النوع C. reticulatum ضمن هذه المجموعة أقرب من النوع C. echinospermum إلى الحمص المزروع C. arietinum . أما المجموعة الثانية فقد ضمت الأنواع C. judaicum و C. Pinnatifidum و C. bijugum ، وكان C .pinnatifidum وC.. judaicum أكثر قربا" مقارنة بـ C. bijugum. في حين ضمت المجموعة الثالثة C. yamashitae وC. chorassanicum ، أما النوع **C. cuneatum** فقد شكل بمفرده المجموعة الرابعة والتي كانت بعيدة جدا" عن بقية الأنواع.

جدول 4: قيم معامل البعد الوراثي (= 1− معامل التشابه) المقدرة اعتمادا" على نتائج الـ RAPD.

| | C.arietin | C.reticula | C.echinos | C.judai | C.pinnati | C.biju | C.chorass | C.yama | C.cunea |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| C. arietinum | 0.0000 | | | | | | | | |
| C. reticulatum | 0.2083 | 0.0000 | | | | | | | |
| C. echinospermum | 0.4029 | 0.3739 | 0.0000 | | | | | | |
| C. judaicum | 0.5975 | 0.7566 | 0.8712 | 0.0000 | | | | | |
| C. pinnatifidum | 0.6958 | 0.8004 | 0.7965 | 0.4408 | 0.0000 | | | | |
| C. bijugum | 0.6958 | 0.8745 | 0.8799 | 0.4964 | 0.5639 | 0.0000 | | | |
| C. chorassanicum | 0.8368 | 0.7647 | 0.7529 | 0.9941 | 0.6926 | 0.8357 | 0.0000 | | |
| C. yamashitae | 0.8743 | 0.8089 | 0.8459 | 0.8022 | 0.7732 | 0.7368 | 0.5760 | 0.0000 | |
| C. cuneatum | 0.8784 | 1.1779 | 1.2430 | 0.9429 | 0.9516 | 1.0004 | 1.0337 | 0.9602 | 0.0000 |

من مقارنة مخطط البعد الوراثي المنشأ اعتمادا" على نتائج الـ PCR-RAPD مع المخططات الأخرى نجد توافقا" كبيرا" ما بينه وبين المخططات المعتمدة على الأيزوزيمات (Labdi et al., 1996) وعلى مؤشرات الـ STMS Single Tagged Microsatellite Sequences, (Choumane et al., 2000). لقد كان مخططنا هذا مطابقا" تماما" لذلك المقام اعتمادا" على نتائج دراسة الأيزوزيمات في حين اختلف قليلا" عن ذلك الذى اعتمد نتائج مؤشرات الـ STMS والذي لم يكن االتمييز فيه واضحا" بالنسبة لأنواع المجموعة الثانية والثالثة (Choumane et al., 2000).




**شكل 2: التدرج العنقودي للعلاقات الوراثية ما بين انواع الجنس Cicer اعتمادا" على معامل البعد الوراثي لـ Nei's72.**

إن وضع النوعين C. yamashitae وC. chorassanicum في نفس المجموعة وبشكل متقارب كان متشابها" مع المخططات المنشأة اعتمادا" على المعايير الثلاثة السابقة الذكر إلا إنه كان مختلفا" عن نتائج التهجين الحقلي.

مما سبق نستنتج بأن أنواع المجموعة الأولى تندرج دائما" في مجموعة واحدة، ومهما اختلف المعيار المستخدم في تحديد درجة القرابة، ، فإن البعد الوراثي بين **C.arietinum** و**C. reticulatum** هو الأقل دائما"، مما يدعم الافتراض القائل بأن **C. reticulatum** هو الأصل الذي انحدر منه الحمص المزروع في حين ان C. echinospermum انفصل عنهما في مرحلة تطورية مبكرة.

من ناحية أخرى، نلاحظ وبجميع المعايير المستخدمة سابقا" وحاليا"، بأن النوع C.cuneatum قد وجد في الموقع الأكثر بعدا" عن C. arietinum ، مما يضيف دعما" اخرا" للمناقشة الدائرة حول مدى دقة وضع هذا النوع في القسم Monocicer الذي تنتمي إليه جميع الأنواع الحولية من الجنس Cicer باستثناء C. chorassanicum .

## الإستنتاجات:

من خلال ما سبق، وبعد تأكدنا من امكانية الحصول على نتائج موثوقة بطريقة الـ RAPD ، يمكن أن نخلص إلى ما يلي:

- إن الكفاءة العالية التي أظهرتها تقنية الـ RAPD في دراسة التباينات الوراثية بين أنواع الجنس Cicer تجعل من المفيد اعتمادها في برنامج تحسين الحمص وخصوصا" في المراحل المبكرة من عمليات التربية. فقد تم تحديد بادئات مميزة لكل نوع من الأنواع الحولية التابعة للجنس Cicer يمكن استخدامها كمؤشرات سريعة لمعرفة مدى نجاح عمليات التهجين بين الأنواع، كما يمكن ربطها ببعض الصفات الهامة ومتابعة انعزالاتها في الأجيال المتلاحقة.
- إن العلاقات الوراثية بين الأنواع الحولية التابعة للجنس Cicer والمحددة اعتمادا" على نتائج الـ RAPD كانت مشابهة لتلك المقدرة اعتمادا" على معايير أخرى (الأيزوزيمات والـ STMS)، وهذا يدل على إن مؤشرات الـ RAPD تغطي مناطق من مجين الفرد تختلف في درجة تطورها وأهميتها. إن مقارنة هذه المناطق الموزعة عشوائيا" ضمن مجينات الأفراد كانت كافية لإعطاء فكرة صحيحة عن درجة القرابة ما بين الأنواع الحولية التابعة للجنس Cicer.
- على الرغم من ان عددا" قليلا" من البادئات كان كافياً للحصول على مؤشرات جزيئية مميزة لكل نوع من الأنواع التسعة إلا إن استخدام عدد كبير نسبيا" من البادئات كان ضروريا" في دراسة علاقات القرابة بين الأنواع المختلفة، لأن ذلك يسمح بتغطية ومقارنة نسبة أكبر من مجين الفرد وبالتالي يسمح بالحصول على نتيجة أكثر دقة حول نسبة التشابه الوراثي الموجودة بين الأنواع المدروسة.

# المراجع:

.................................

* **Abbo S, Miller TE, Reader SM, Dunford RP and King IP** (1994) Ribosomal DNA sites in lentil and chickpea by fluorescent in situ hybridisation. Genome 37: 713-716

* **Ahmad F and Slinkard AE** (1992) Genetic relationship in the genus Cicer L as revealed by polyacrylamide gel electrophoresis of seed storage proteins. Theor Appl Genet 84:688-692

* **Ahmad F, Gaur PM and Slinkard AE** (1992) Isozyme polymorphism and phylogenetic interpretations **in** the genus Cicer L. Theor Appl Genet 83:620-627

* **Bai Y, Michaels TE, and Pauls KP** (1997) Identification of RAPD markers linked to common bacterial blight resistant genes in Phaseolus vulgaris L. Genome 40 :544-551

* **Baum BR, Nevo E, Johnson DA, Beiles A** (1997) Genetic diversity in wild barley (Hordeum spontaneum C. Koch) in the Near East: a molecular analysis using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. Genetic Resources and Crop Evolution
44: 2, 147-157

* **Benito C, Figueiras C, Zaragoza FJ, Gallego A and De La Pena A** (1993) Rapid identification of Triticeae genotypes from single seeds using the polymerase chain reaction. Plant Mol Bio 21: 181-183

* **Choumane W, Achtar S, Valkoun J, and Weigand F** (1998) Genetic variation in core and base collections of barley from WANA as revealed by RAPD's. pp. 159-164 in A.A Jaradat (Ed.), Triticeae III. Science Publishers, Inc., Enfield, NH, USA. Total pages, 478

* **Choumane W, Winter P, Weigand F, Kahl G** (2000) Conservation and variability of sequence-tagged microsatellite sites (STMSs) from chickpea (Cicer arietinum L.) within the genus Cicer . Theor Appl Genet 101: 269-278

* **Eujayl I, Erskine W, Bayaa B, Baum M, and Pehu E** (1998) Fusarium vascular wilt in lentil: Inheritance and identification of DNA markers for resistance. Plant Breeding, 117: 497-499

* **Eujayl I, Erskine W, Bayaa B, Baum M., and Pehu E.** (1999) Inheritance and linkage analysis of frost injury in lentil. Crop Science, 39, 3: 639-642

* **Gaur PM and Slinkard AE** (1990a) Inheritance and linkage of isozyme coding genes in chickpea. J Hered 81: 455-461

* **Gaur PM and Slinkard AE** (1990b) Genetic control and linkage relations of additional isozyme markers in chickpea. Theor Appl Genet 80 :648-656

* **Howell EC, Newbury HJ, Swennen RL, Withers LA and Ford-Lloyd BV** (1994) The use of RAPD for identifying and classifying Musa germplasm. Genome 37: 328-332

* **Kazan K and Muehlbauer FJ** (1991) Allozyme variation and phylogeny in annual species of Cicer (Leguminosae). Pl Syst Evol 175:11-21

* **Kazan K, Manners JM and Cameron DF** (1993) Genetic variation in agronomically important species of stylosanthes determinated using random amplified polmorphic DNA markers. Theor Appl Genet 85: 882-888

* **Labdi M, Robertson LD, Singh KB and Charrier A** (1996) Genetic diversity and phylogenetic relationships among the annual Cicer species as revealed by isozyme polymorphism. Euphytica 88: 181-188

* **Marillia EF.and Scoles GJ** (1996) The use of RAPD markers in Hordeum phylogeny. Genome 39: 646-654

* **Moller DA and Schaal BA** (1999) Genetic relationships among native american maize accessions of the great plains assessed by RAPDs. Thero Appl Genet 99: 1061-1067

* **Nei M, and Li WH** (1979) Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Pro Natl Acad Sci USA. 74: 5267-5273

* **Ocampo B, Venora G, Errico A, Singh KB, and Saccardo F** (1992) Karyotype analysis in the genus **Cicer.** J Genet & Breed 46:229-240

* **Paran I, Kessell RV, Michelmore RW** (1991) Identification of restriction fragment length polymorphism and random amplified polymorphic DNA linked to downy mildew resistance genes in letuce, using near-isogenic lines. Genome 34: 1021-1027
* **Patankar AG, Harsulkar AM, Giri AP, Gupta VS, Sainani MN, Ranjekar PK and Deshpande VV** (1999) Diversity in inhibators of tripsin and Helicoverpa armigera gut proteinases in Chickpea (Cicer arietinum) and its wild relatives. Theor Appl Genet 99: 719-726
* **Quiros CF, Ceada A, Georgescu A, and Hu J** (1993) Use of RAPD markers in potato genetics: Segregating in diploid and tetraploid families. Am. Potato J. 70: 35-42
* **Reddy MV and Nene YL** (1978) Screening of Cicer spp. for resistance to Aschochyta blight. In Third International Congress of Plant Pathology, Aug. 1978. Munchen, Germany (Abstract)
* **Rohlf FJ** (1993) NTSYS-pc, Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. Applied Biostatistical Inc., new York
* **Singh KB and Ocampo B** (1997) Exploitation of wild Cicer species for yield improvement in chickpea. Theor Appl Genet 95:418-423
* **Sneath PHA and Sokal** (1973) Numerical taxonomy – the principals and practice of numerical classification. W.H. Freeman and Co., San Francisco
* **Tartineni V, Cantrell RG, and Davis DD** (1996) Genetic diversity in elite cotton germplasm determined by morphological characteristics and RAPD’s . Crop Science 36: 186-192
* **Tuwafe S, Kahler AL, Boe A, Ferguson M** (1988) Inheritance and geographical distribution of allozyme polymorphisms in chickpea (Cicer arietinum). Heredity 79: 170-174
* **Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA and Tingey S V** (1990) DNA polymorphism amplified by arbitrary primers as useful as genetic markers. Nucleic Acids Res 18: 6531-6535
* **Williams JGK, Hanafey M K, Rafalski JA and Tingey SV** (1993) Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. Methods Enzymol 218: 704-740