

دراسة التنوع الوراثي لمجموعة من أصناف الشعير المحلية الليبية باستخدام تقنية المادة الوراثية متعددة الشكل المكبرة عشوائياً (RAPD)

محمد علي الحاجي*

عبدالكريم إسماعيل أبو شعالة**

خالد الأخضر العيسوي*

محمد رضا أبو شاقور*

المستخلص:

في هذه الدراسة تم تقدير التنوع الوراثي والبصمة الوراثية لعشرة أنماط وراثية من الشعير المحلي الليبي باستخدام تقنية المادة الوراثية متعددة الشكل المكبرة عشوائياً (Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD) وذلك عن طريق التفاعل المتسلسل لإنزيم البلمرة (Polymerase Chain Reaction: PCR). استخدمت المادة الوراثية المستخلصة من أوراق باذرات الشعير. خمس بادئات أعطت 27 حزمة (Band) منها 11 حزمة متعددة الشكل (Polymorphic) بنسبة 40%، ثلاث بادئات فقط أعطت حزم مختلفة الشكل، وباستخدام الحزم المختلفة وتحليلها إحصائياً أمكن الحصول على مصفوفة التشابه الوراثي والشكل العنقودي، وأجريت المقارنات الثنائية بين المدخلات تحت الدراسة فتراوحت قيم التشابه الوراثي بين 0.474 وبين أكساد-176 والدليمي و1.000 بين تاغرمين ووادي الحي، ومن التحليل العنقودي تبين أن الشجرة الوراثية تتكون من مجموعتين تضم المجموعة الأولى 6 مدخلات وتضم المجموعة الثانية 4 مدخلات، وأن أكساد-176 كان أكثر إختلافاً عن باقي المدخلات وتاغرمين ووادي الحي كانا من أكثر المدخلات تشابهاً. وتبين من هذه الدراسة أيضاً أن المدخلات تحت الدراسة على درجة عالية من التشابه الوراثي مما يشير إلى ضيق القاعدة الوراثية. الكلمات الدالة: التنوع الوراثي، البصمة الوراثية، الشعير و (*Hordeum vulgare* L.).

*قسم المحاصيل - كلية الزراعة - جامعة طرابلس.

**المعهد العالي والمتوسط للتقنية الزراعية بالغيران - طرابلس

المقدمة:

الشعير من المحاصيل الهامة في ليبيا، فهو يشكل المحصول الرئيسي وذلك لاستعمال حبوبه كغذاء للإنسان ومخلفاته كعلف للحيوان [2]. من هذا المنطلق كان من الطبيعي الاهتمام باستنباط أصناف من هذا المحصول ذات إنتاجية عالية وملائمة للظروف البيئية السائدة [5]. وبما أن نبات الشعير ذاتي التلقيح فإن أي خلط يحدث في الصنف يكون في الغالب ميكانيكياً أو بسبب تراكم الطفرات، وبمرور الزمن يمكن أن يتراكم هذا الخلط بحيث تضيق معالم الصنف [5]. ولهذا، فإن دراسة طراز الهيئة للصنف وتحديد هويته الوراثية عن طريق بصمة الحامض النووي (DNA) يمكن من المحافظة على نقاوة الصنف [6, 9, 10]. تستخدم اختبارات البصمة الوراثية لدراسة الاختلافات بين الأصناف والسلالات داخل النوع الواحد وبين الأنواع المختلفة، حيث تفيد هذه العملية في اختيار الآباء المتباعدة وراثياً لإدخالها في برامج التهجين للحصول على ما يعرف بقوة الهجين. استخدمت العديد من تقنيات البصمة الوراثية لمعرفة مدى التباين بين الطرز الوراثية، وتعد تقنية المادة الوراثية متعددة الشكل المكبرة عشوائياً (RAPD) من أكثر الطرق انتشاراً لتحديد العلاقات الوراثية بين أصناف وسلالات النباتات المختلفة. وما يميز هذه الطريقة هي البساطة في الاستخدام وقلة التكاليف واستخدام كمية قليلة من المادة الوراثية [14]، وهي سريعة وفعالة لكشف التنوع الوراثي في نباتي القمح والشعير [7, 9].

تهدف هذه الدراسة إلى تقييم التنوع الوراثي لعشرة مدخلات محلية من الشعير وتحديد العلاقات الوراثية في ما بينها عن طريق تحليل البصمة الوراثية لكل منها باستعمال تقنية المادة الوراثية متعددة الشكل المكبرة عشوائياً.

المواد وطرائق البحث:

استعمل في هذه الدراسة عشر تراكيب وراثية من الشعير (جدول 1) تم الحصول عليها من مركز البحوث الزراعية بطرابلس وصنفت إلى سلالات محلية وأصناف محسنة وهي كما يلي:

جدول 1. أصناف وسلالات الشعير المحلية الليبية المستعملة

الصنف أو السلالة	ملاحظات
كاليفورنيا مريوط	صنف مصري قديم أدخل لولاية كاليفورنيا في الولايات المتحدة لأول مرة سنة 1905 ثم أطلق كصنف سنة 1920. أدخل إلى ليبيا في ستينيات القرن الماضي.
بينشر	صنف أسترالي قديم
أكساد-176	صنف مستنبط سنة 1987 بالمركز العربي لدراسات المناطق الجافة والأراضي القاحلة
وادي زارت	صنف ليبي محسن
وادي الحي	صنف ليبي محسن
الدليمي	سلالة محلية
تاغرمين	سلالة محلية
الصيد	سلالة محلية
تاريداء سوداء	سلالة محلية
تاريداء بيضاء	سلالة محلية

طبق اختبار البصمة الوراثية لعينات الشعير في شركة أريستوجين للتقنيات الحيوية بالهند. استخلصت المادة الوراثية من الأصناف والسلالات المستعملة في هذه الدراسة من الباذرات بعد زراعتها بأسبوعين باستخدام محلول الاستخلاص (2xCTAB) [12] وقيست كمية ونقاوة المادة الوراثية (DNA) باستخدام تقنية الطيف الضوئي (Spectrophotometer) وتأكد جودة الاستخلاص باستخدام جهاز الترحيل الكهربائي (Electrophoresis)، حيث يتم ترحيل المادة الوراثية خلال هلام الأجاروز. أجري التفاعل المتسلسل لإنزيم البلمرة (PCR) مع جميع التراكيب الوراثية للمدخلات تحت الدراسة وذلك باستخدام خمس بادئات (جدول 2)، حيث أضيفت مواد التفاعل إلى أنابيب جهاز البلمرة (PCR tubes) بالكميات المطلوب وحسب ترتيبها (جدول 3)، وكان حجم التفاعل النهائي 40 ميكروليتر لكل عينة.

جدول 2. البادئات المستخدمة في التفاعل

المتسلسل لإنزيم البلمرة

البادئ	التتابع (3' – 5')
OPA-13	CAGCACCCAC
OPA-18	AGGTGACCGT
OPB-10	CTGCTGGGAC
OPB-11	GTAGACCCGT
OPD-02	GGACCCAACC

جدول 3. مكونات تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل

المكوّن	تفاعل واحد	عشر تفاعلات
ماء مقطر مرتين	17 ميكروليتر	170 ميكروليتر
المزيج الرئيسي PCR X2	20 ميكرو ليتر	200 ميكرو ليتر
البادئ العشوائي *	1 ميكروليتر	10 ميكروليتر
المادة الوراثية (DNA)	2 ميكروليتر	20 ميكروليتر
الحجم النهائي	40 ميكروليتر	400 ميكروليتر

البادئات العشوائية * : OPA-13 , OPA-18 , OPB-10 , OPB-11 , OPD-02.

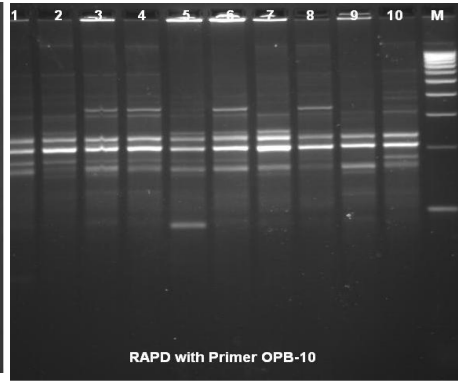
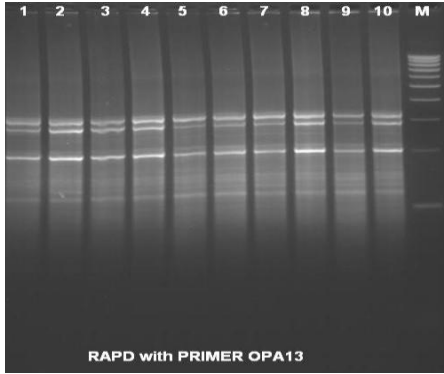
ويحتوي المزيج الرئيسي PCR X2 على 100 μ M من (dNTPs)، و 15 mM من $MgCl_2$ ، و 3 وحدة دولية (U) من إنزيم Taq polymerase. بعد تكوين خليط PCR لعينات الأصناف والسلالات وضعت في جهاز PCR وكان برنامج الدورة الحرارية كما في جدول (4).

جدول 4. درجات الحرارة والزمن والدورات اللازمة لإجراء التفاعل المتسلسل

عدد الدورات	لوقت	الحرارة	إسم الدورة الحرارية
1	120 ثانية	94 م°	تفكيك أولي للخيط الوراثي
40	30 ثانية	94 م°	تفكيك الخيط الوراثي
	60 ثانية	37 م°	ربط البادئ
	90 ثانية	72 م°	إستطالة البادئ
1	7 دقائق	72 م°	إستطالة نهائية للبادئ

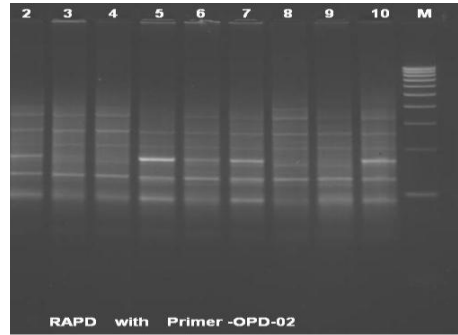
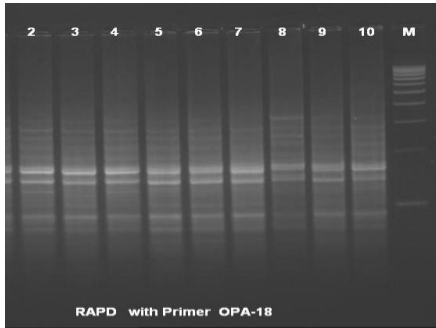
فصلت نواتج التفاعل على هلام الأجاروز بتركيز 1.5 جرام / 100 مللي من مادة 1X TEA، و بعد انتهاء عملية الفصل أخذت صور لهلام الأجاروز بالأشعة فوق البنفسجية (UV) كما هو موضح في شكل 1، وسجلت النتائج، وحددت أطوال الحزم الناتجة عن طريق المقارنة بحزم بحجم قياسي (DNA Ladder)، وهو نوعان: الأول يحتوي على 10 حزم تراوحت في الحجم بين 100 و 1000 زوج قاعدة (bp) والنوع الثاني يحتوي على 10 حزم تراوحت في الحجم بين 100 و 3500 زوج قاعدة.

تم تحليل النتائج المتحصل عليها إحصائياً لتقدير درجة التنوع الوراثي باستخدام 1 و 0 لتحديد وجود وغياب الحزم المكبرة (Amplified Bands) على التوالي. أعطت ثلاث بادئات فقط حزماً متعددة الشكل، وتم بواسطة هذه الحزم الحصول على مصفوفة التشابه الوراثي (Genetic Similarity Matrix) والشجرة العنقودية (Dendrogram). لقد تم الحصول على نسبة التشابه الوراثي استناداً إلى معامل Jaccard: أي بطريقة زوج المجموعات غير الموزونة ذات المتوسط الحسابي (Unweighted pair-group method with arithmetic average: UPGMA) عن طريق الحاسب الآلي [9, 14]. هذه النسبة (التشابه الوراثي) تقع بين 0.000 وتعني عدم وجود حزم مشتركة بين المدخلين و 1.000 وتعني أن جميع الحزم مشتركة بين المدخلين. تم الحصول على الشكل العنقودي (Dendrogram) باستخدام برنامج التحليل الإحصائي عن طريق الحاسب الآلي [6, 8] (6, 8).



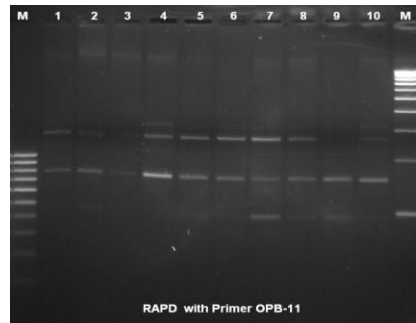
البادئ OPA 13

البادئ OPB-I0



البادئ OPA- 18

البادئ OPD-02



البادئ OPB-11

شكل 1. صور الحزم المتشابهة
والمختلفة للمدخلات المدروسة.

النتائج والمناقشة:

أُجري إختبار البصمة الوراثية للمدخلات تحت الدراسة باستخدام تقنية المادة الوراثية متعددة الشكل المكبرة عشوائياً، Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) وذلك عن طريق التفاعل المتسلسل لإنزيم البلمرة (Polymerase Chain Reaction, PCR)، باستخدام خمس بادئات أعطت 27 حزمة (جدول 5)، وكان عدد الحزم المختلفة (Polymorphic) 11 حزمة بنسبة 40%، و 16 حزمة متشابهة (Monomorphic) بنسبة 59%، وكان متوسط عدد الحزم المختلفة للبادئ 3.7 حزمة (جدول 5).

تراوح عدد الحزم المختلفة بين 2 للبادئ (OPB-10) و 6 للبادئ (OPB-11). هذه النتائج تعد منخفضة مقارنة بنتائج دراسات مماثلة سابقة، حيث تحصل في دراسة على التنوع الوراثي في الشعير البرازيلي على 11.4 حزمة مختلفة للبادئ [13]، وفي دراسة أخرى على التنوع الوراثي في القمح الرباعي تم الحصول على 7.7 حزمة مختلفة للبادئ [11]. وقد يفسر انخفاض المعدلات المتحصل عليها في هذه الدراسة إلى ضيق القاعدة الوراثية (التشابه الوراثي المرتفع)، وهذا يتفق مع نتائج دراسة مشابهة أشارت إلى ضيق القاعدة الوراثية في الشعير المحلي الليبي [1]. وكذلك في دراسة أخرى حول الأصناف السورية واليابانية، حيث تجمعت الأصناف السورية في عنقود واحد وتجمعت الأصناف اليابانية في عنقود واحد نتيجة لارتفاع التشابه الوراثي داخل كل مجموعة [10]. وأيضاً قد يكون ذلك راجعاً إلى العدد المحدود من البادئات المستخدمة (خمس بادئات).

أُجريت المقارنات الثنائية بين الأصناف والسلالات تحت الدراسة، ومن خلال النتائج المتحصل عليها (جدول 6) بلغت هذه المقارنات 45 مقارنة. تراوحت قيم التشابه الوراثي بين 0.474 بين أكساد-176 والدليمي و 1.000 بين تاغرمين ووادي الحي. ومن الشكل العنقودي (شكل 2) والذي تكون من مجموعتين، تضم المجموعة الأولى ست مدخلات وتضم المجموعة الثانية أربع مدخلات كان فيها الصنف أكساد-176

أكثر إختلافاً عن باقي المدخلات، وقد يفسر هذا على أنه من الأصناف المستوردة حديثاً نسبياً وتم تداوله بشكل محدود في نطاق المراكز البحثية وبهذا فقد احتفظ بمعالمه الوراثية ولم يختلط بباقي السلالات والأصناف المحلية. هذه النتيجة تتفق مع ما تم التوصل إليه في دراسات مشابهة للأصناف المحلية الليبية [1, 3]، وأن تاغرمين ووادي الحي كانا من أكثر المدخلات تشابهاً، حيث كانت المسافة الوراثية بينها صفراً وقيمة التشابه الوراثي تساوي واحد. لقد تشابه الصيد وبيتشر بشكل مرتفع (0.867)، وقد يفسر هذا على أن كلاهما من الأصناف والسلالات المستوردة ذات المنشأ نفسه، وهذا يشير أيضاً إلى عدم الدقة في تسمية الأصناف. فسلالة الصيد التي تم الحصول على بذورها من أحد المزارعين والذي ذكر أنها وزعت من قبل الدولة كصنف لغرض استخدام حبويه كعلف قد تم إكثار بذورها وأطلق عليها اسم المزارع الذي جلبها "الصيد"، وهذا يؤكد على أهمية توصيف جميع الموارد الوراثية النباتية بشكل دقيق للحد من هذا الخلط.

جدول 5. البيانات المستخدمة في تقدير درجة الاختلاف والتشابه الوراثي لأصناف وسلالات الشعير المدروسة وحجم الحزم المتكونة (زوج قاعدة bp) والبيانات متعددة الشكل وأحادية الشكل وعدد الحزم المتكونة لهذه البيانات.

البيادئ	تتابع البيادئ (3' - 5')	الحزم المختلفة (متعددة الشكل)	الحزم المتشابهة (أحادية الشكل)	المجموع الكلي للحزم	حجم الحزم (زوج قاعدة bp)
OPA13	CAGCACCCAC	-	3	3	1600 - 1000
OPA 18	AGGTGACCGT	-	4	4	800 - 450
OPB -10	CTGCTGGGAC	2	3	5	1793 - 459
OPD -02	GGACCCAACC	3	4	7	1693 - 400
OPB- 11	GTAGACCCGT	6	2	8	3043 - 82
المجموع	-	11	16	27	-

استخدام برنامج (UPGMA) نتج عنه تكوين الشكل العنقودي (شكل 2) والذي يوضح قدرة تقنية (RAPD) على اكتشاف التنوع الوراثي بين تراكيب وراثية يتوقع أن تكون ذات

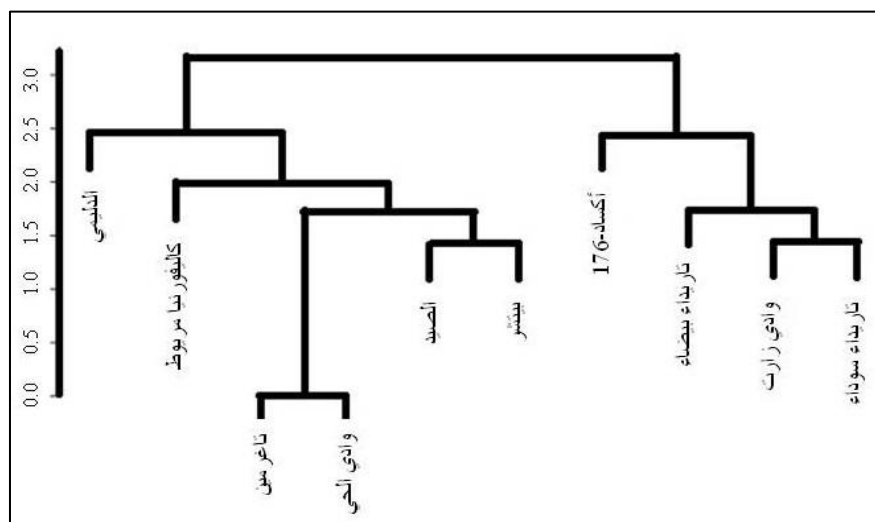
قاعدة وراثية ضيقة وقد نتج عن التحليل تقسيم المدخلات الوراثية تحت الدراسة إلى مجموعتين:

المجموعة الأولى: تضم هذه المجموعة ست مدخلات هي الدليمي وكاليفورنيا مريوط وتاغرمين ووادي الحي والصيد وبيتشر. ومن خلال مصفوفة التشابه الوراثي (جدول 6) كانت القرابة الوراثية شديدة بين تاغرمين ووادي الحي حيث كانت قيمة التشابه الوراثي بينهما 1.000، كذلك فالقرابة الوراثية بين الصيد وبيتشر كانت شديدة أيضاً حيث بلغت قيمة التشابه الوراثي بينهما 0.867.

المجموعة الثانية: ضمت أربع مدخلات هي أكساد-176 وتاريداء بيضاء ووادي زارت وتاريداء سوداء. كانت القرابة الوراثية عالية بين وادي زارت وتاريداء سوداء (0.875). أما قيمة التشابه الوراثي بين السلالتين تاريداء بيضاء وتاريداء سوداء فكانت 0.824 وقد يفسر هذا التشابه على أن السلالتين هما من الشعير السائب.

جدول 6. مصفوفة التشابه الوراثي لعشرة مدخلات من الشعير المحلي.

الصنف أو السلالة	الدليمي	تاغرمين	الصيد	وادي زارت	تاريداء سوداء	بيتشر	تاريداء بيضاء	أكساد-176	وادي الحي	كاليفورنيا م
الدليمي	1									
تاغرمين	0.692	1								
الصيد	0.769	0.789	1							
وادي زارت	0.625	0.750	0.813	1						
تاريداء سوداء	0.714	0.733	0.688	0.875	1					
بيتشر	0.667	0.800	0.867	0.824	0.706	1				
تاريداء بيضاء	0.588	0.706	0.667	0.833	0.824	0.684	1			
أكساد-176	0.474	0.667	0.632	0.789	0.684	0.737	0.842	1		
وادي الحي	0.692	1.000	0.786	0.750	0.733	0.800	0.706	0.667	1	
كاليفورنيا م	0.625	0.750	0.813	0.882	0.765	0.824	0.737	0.700	0.750	1



شكل 2. الشكل العنقودي (Dendrogram) لعشرة مدخلات من الشعير المحلي.

تشير النتائج إلى ضيق القاعدة الوراثية بين المدخلات في هذه الدراسة وهذا يتفق مع ما تم التوصل إليه في دراسة شملت 23 مدخلا من الشعير المحلي [1]. وكذلك مع نتائج دراسة أخرى والتي شملت 15 مدخلا من القمح الطري والصلب المحلي [6] مما يتطلب الأخذ بالتوصيات التالية:

1. يفضل تهجين الأصناف والسلالات المتباعدة وراثياً للحصول على هجن متفوقة.

2. إعادة تقييم هذه الأصناف عن طريق البصمة الوراثية بطريقة RAPD بزيادة عدد العينات لكل صنف وسلالة لمعرفة التباين والتشابه الوراثي بين المدخلات وضمنها بشكل أدق، وفي حالة توفر الإمكانيات يفضل استخدام طرق أكثر دقة من طريقة RAPD مثل طريقة التتابعات البسيطة المكررة (SSR).

3. الاستمرار في إجراء الأبحاث الخاصة بتقييم وتوصيف أصناف وسلالات الشعير بالطرق التقليدية واستخدام تقنيات المادة الوراثية كمساند لها.

Genetic diversity of some local Libyan barley (*Hordeum vulgare* L.) genotypes using Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) markers

Mohamed Alhgi *
Abdulkarim Abushaala **
Khaled Aisawi *
Mohamed Aboushagor*

Abstract:

The Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) method was used to analyze the genetic material (DNA) of ten local barley (*Hordeum vulgare* L.) genotypes with five primers for using the Polymerase Chain Reaction (PCR).

The results of the genetic relationships among the studied cultivars indicated that five primers provided twenty seven bands, eleven (40%) were polymorphic. These polymorphic bands were used in the statistical analyses to provide the genetic similarity matrix and dendrograms. Paired comparison analysis was carried out to measure the genetic similarity between the cultivars. The results of the analysis indicated that the values of the genetic similarity ranged from 0.474 between Acsad-176 and Delimi, and 1.000 between Tagermin and Wadi Alhai.

The genetic tree obtained had two branches (groups of cultivars); the first group contained six cultivars and the second contained four cultivars. The genetic tree indicated that Acsad-176 was the most distant genetically from the other cultivars. On the other hand, Tagermin and Wadi Alhai were the most related cultivars genetically. The ten studied barley cultivars seemed to have a great deal in common in their genetic materials as a result of a tightly linked genetic base.

Key words: Genetic diversity, RAPD, Barley, (*Hordeum vulgare* L.).

* Department of Crop Science, Faculty of Agriculture, University of Tripoli. Libya.

** High Institute of Agricultural Technology, Tripoli. Libya.

المراجع:

أولاً: المراجع العربية:

1. البريكي، ف. و ف. أبو عباقة و س. البي و ع. شرف الدين و إ. بن عامر، 2005. تقدير التنوع الوراثي لبعض أصناف وسلالات وطفرات الشعير باستخدام تقنية المادة الوراثية متعددة الشكل المكبرة عشوائياً (RAPD). المؤتمر الوطني الثالث للتقنيات الحيوية. سبها، ليبيا. الصفحات: 49 - 60. الصغير، خ. 1996. محاصيل الحقل . منشورات جامعة الفاتح، طرابلس، ليبيا.
2. العاقل، م. ع. 2012. التباين في الشكل الظاهري لبعض الأصول الوراثية للقمح (*Triticum ssp*) والشعير (*Hordeum ssp*) في ليبيا. رسالة ماجستير، كلية الدراسات العليا، جامعة النيلين.
3. الهديلي، خ. 2007. دراسة العلاقات الوراثية بين سلالات حديثة منتخبة من القمح باستخدام الوصف المظهري والدلائل الجزيئية. رسالة ماجستير. كلية علوم الأغذية والزراعة، جامعة الملك سعود.
4. حسن، أ. ع. 1991. أساسيات تربية النبات. الدار العربية للنشر والتوزيع، القاهرة، مصر.
5. شرف الدين، عصام. 2003. تقدير درجة الاختلاف الوراثي قي سلالات القمح المحلية باستخدام تقنية التتابع الدقيقة (Microsatellites). مجلة العلوم الأساسية والتطبيقية. 12: 11 - 27.
6. Barua, U. M., K. J. Chalmers, C. A. Hackett, W. T. B. Thomas, W. Powell and R. Waugh, 1993. Identification of RAPD markers linked to a phynchosporium secalis resistance locus in barley using near-isogenic lines bulked segregant analysis. Heredity, 71:177-184.
7. Choumane, W., H. Ghazal, S. Ashtar and M. Baum, 2001. Genetic diversity in the Syrian barley by using random amplified

- polymorphic DNA (RAPD) markers. Res. Cent. Coll. Of Agri., King Saud Univ Res. Bult., 99:5-33.
8. Hou, Y., Z. H. Yan, Y. M. Wei and Y. L. Zheng, 2005. Genetic diversity in barley from west China based on RAPD and ISSR analysis. Barley Genetic Newsletter, 35:9-22.
 9. Kanbar, A. and K. Kondo, 2011. Efficiency of ISSR and RAPD dominant markers in assessing genetic diversity among Japanese and Syrian cultivars of barley (*Hordeum vulgare* L.) Research Journal of Agriculture and Biological Sciences, 7(1):4-10.
 10. Pujar, S., S. A. Tamhankar, V. S. Rao, V. S. Gupta, S. Naik and P. K. Ranjekar, 1999. Arbitrary primed-PCR based diversity assessment reflects hierarchical groupings of Indian tetraploid wheat genotypes. Theor. Appl. Genet., 99:886 –876.
 11. Rogers, S. U., J. A. Bendich, 1988. Extraction of DNA from plant tissue. Plant Mol. Biol. Manual, 6: 1-10.
 12. Selbach, A. and S. Cavalli, 2000. RAPD characterization of Brazilian barley (*Hordeum vulgare* ssp.vulgare) varieties. Euphytica, 111:127-135.
 13. Williams, J. G., A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafalski and S. V. Tingey, 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res., 18 (22):6531-6535.