J.Agric.Chem. and Biotech.,Mansoura Univ.,Vol. 2 (12): 275 - 281, 2011

GENETIC VARIATION OF BULBOUS *IRIS* SPP. IN SYRIA USING ISSR-PCR

Al-Houlani, A. [1] ; N. Al-Batal [1] and Lawand S.[2]
[1] Dep. of Horticulture, Fac. Agric., Damascus Univ., Damascus, Syria.
[2] Dep. of Field crop, Fac. Agric., Damascus Univ., Damascus, Syria.

التباين الوراثي لأنواع السوسن البصلي *Iris* spp. طبيعية الانتشار في سورية باستخدام تقنية ISSR-PCR

عبد السلام الحولاني[1] ، نبيل البطل[1] ، سلام لاوند[2]
[1] قسم علوم البستنة، كلية الزراعة، جامعة دمشق، سورية.
[2] قسم المحاصيل الحقلية، كلية الزراعة، جامعة دمشق، سورية.

الملخص

أجريت الدراسة على ستة أنواع تابعة لجنس السوسن *Iris* تمتاز بامتلاكها مجموع تحت أرضي بصلي هي: *I. sisyrinchium, I. nusairiensis, I histrio, I.sindjarensis, I.postii, I.persica* وصفت هذه الأنواع جزيئياً باستخدام تقنية Inter Simple Sequence Repeat (ISSR-PCR) بهدف الكشف عن التباينات الوراثية، وجد أن العدد الكلي للحزم (78) حزمة منها (59) ذات تعددية شكلية (75.66%) نتجت عن استخدام (15) بادئة. بينت الدراسة وجود قرابة وراثية تراوحت بين(48.84%) بين النوعين *I. nusairiensis* و *I.persica* و (78.18%) بين النوعين: ***I.sindjarensis*** و ***I.persica***. وبالاعتماد على نتائج التوصيف الوراثي رسمت شجرة القرابة الوراثية بين الأنواع المدروسة، حيث انقسمت الأنواع إلى عنقودين ضم العنقود الأول الأنواع (***I. hisrio ،I. postii ،sindjarensis***) بينما ضم العنقود الثاني الأنواع (*I.persica ،I. nusairiensis ،I. sisyrinchium*).

الكلمات المفتاحية: *Iris*، ISSR، سورية.

المقدمة

ينتمي جنس السوسن *Iris* إلى الفصيلة السوسنية Iridaceae والتي تضم قرابة (70) جنساً وأكثر من (1500) نوعاً (Guassen *et al.*, 1982)، تختلف آراء الباحثين حول عدد الأجناس والأنواع السورية التابعة إلى هذه الفصيلة ففي حين يؤكد Post (1934) أنه يمثل هذه الفصيلة (4) أجناس هي:
1- *Crocus* L. 2- *Gladiolus* L. 3-. *Romulea* Marttii 4-*Iris* L

ينفرد جنس السوسن بـ (20) نوعاً منها (12) نوعاً متأصلاً Endimic، يعتبر Mouterde (1966) أن عدد الأجناس الممثلة لهذه الفصيلة في سورية (5) حيث أخذ بوجهة النظر التي تفرد النوع *I. sisyrinchium* بالجنس Gynandriris، يختص جنس السوسن بـ (25) نوعاً منها (16) نوعاً متوطناً، تنتمي أنواع السوسن السورية إلى /5/ أجناس هي: Apogon، Pogoniris، Oncocylus، Jono، Xiphioum. تنحصر الأنواع البصلية بالجنسين الأخيرين. وجدت الأنواع التابعة للجنس Jono في إسبانيا وشمال إفريقيا وآسيا الصغرى وإيران وشرقاً حتى الهند (Fred *et al.*, 1951) ويمثل هذا الجنس في سورية (٥) أنواع هي: *I.persica*، *I.sindjarensis*، *I. nusairiensis*.، *I.postii*، *I.fumosa*، في حين وجدت أنواع الجنس Xiphioum في اسبانيا ، البرتغال ، صقلية ، شمال افريقيا ، آسيا الصغرى وتركستان، ويمثله في سورية الأنواع: *I.vartani* ،*I. histrio*. وانطلاقاً من ضرورة المحافظة على الأصول البرية، ونظراً لما تتمتع به الأنواع التابعة لجنس السوسن *Iris* من خصوصيات

جغرافية ومن مقومات جمالية واقتصادية، فضلاً عن أهميتها الخاصة في مجال الدراسات التطبيقية للتنوع الحيوي، فقد كان هذا حافزاً لدراستها، وتوصيفها وراثياً على أسس جزيئية ، خاصة بعد التقدم النوعي في مجال استخدام الطرق الجزيئية لمعرفة التنوع الوراثي النباتي التي شهدته السنوات الأخيرة. وخاصة تلك الطرق التي تعتمد على دراسة الحمض النووي DNA وقد أجريت عدة دراسات بهدف دراسة التنوع الوراثي للسوسن:

فقد قام Arafeh *et al.*(2002) بدراسة التنوع الوراثي لنوعين من أنواع السوسن تنتظمان تحت الجنيس Onocyclus هما *I. haynei* و *I. atrofusca* ، حيث تم تحديد /8/ مواقع للدراسة، اختبرت الاختلافات المورفولوجية والوراثية بين وداخل المواقع المدروسة، وقد درست /15/ صفة شكلية ترتبط بالأوراق والساق والأزهار. وجمعت العينات الورقية وحللت وراثياً باستخدام تقنية RAPD باستخدام /10/ بادئات ، أظهرت الدراسة الشكلية مجموعتين متميزتين:

مواقع النوع *I. haynei* جمعت سوية في المجموعة الأولى بينما مواقع النوع *I. atrofusca* جمعت في المجموعة الثانية وقد جاءت نتائج تقنية RAPD لتعزز النتيجة السابقة إضافة لذلك فقد وجد الباحث أن التنوع الوراثي بين وداخل المجتمعات كان 20%و 5% على التوالي.

وتوصل Makarevitch *et al.* (2003) إلى قناعة مفادها فصل الجنيس Pardanthopsis في جنس مستقل إثر دراسة أجريت لتحديد القرابة الوراثية بين الأنواع التابعة للمجموعة Siberian باستخدام تقنية RAPD في حين انفصلت باقي الأنواع التابعة لهذه المجموعة Siberian في /٤/ تحت مجموعات ، وقد خلص في نهاية هذه الدراسة إلى ضرورة إعادة النظر في الوضع التصنيفي للجنس *Iris*

وفي دراسة أجرها Al-Gabbiesh *et al.* (2006) بهدف دراسة القرابة الوراثية بين /7/ أنواع تابعة للجنس *Iris* وهي: *I. germanica, I. petrana, I. atrofusca, I. nigricans, I.vartanii, I. aucheri, I. edomensis* باستخدام تقنية RAPD وذلك باستخدام أربعة بادئات وبعد التضخيم نتج 125 حزمة يتراوح أطوالها بين30 إلى 1500 bp (زوج من القواعد النتروجينية) ووجد أن المرئس OPB-10 أعطى العدد الأكبر من الحزم (38) وتراوح التشابه بين هذه الأنواع بين 4% بين النوعين *I. vartanii* و*I. Petrana* ، 85% بين النوعين *I. germanica* و *I. atrofusca*

كما درس Wroblewska *et al.* (2006) التنوع الوراثي للنوع *I. aphylla* في سبعة مناطق من بولندا باستخدام تقنية الـ RAPD حيث تم تضخيم /461/ حزمة DNA كانت جميعها ذات تعددية شكلية. أظهرت الدراسة عدم وجود ارتباط بين خصائص البيئة والتنوع الوراثي على الصفات المدروسة (حجم الزهرة، عدد الأزهار، عدد الثمار).

تعد تقانة ISSR من المؤشرات الجزيئية التي تسمح بالكشف عن الاختلافات الوراثية بين الأنواع لما تمتلكه من دقة وتخصص كونها تتطلب بادئات نوعية تتكون من عدد لا بأس به من النيوكلتيدات. يتم بهذه التقانة تضخيم قطع DNA المحصورة بين تسلسلات بسيطة متكررة.

هدفت الدراسة إلى توصيف أنواع السوسن البصلية المنتشرة طبيعياً في سورية توصيفاً جزيئياً على مستوى DNA باستخدام تقانة ISSR-PCR لتحديد درجة القرابة الوراثية فيما بينها.

مواد البحث وطرائقه

المادة النباتية: جمعت عينات من الأنواع : *I. persica* ،*I. postii* ،*I. histrio* ،*I.sindjarensis* ، *I. nusairiensis* ،*I. sisyrinchium*، من مناطق انتشارها الطبيعية والجدول (١) يبين المواقع التي جمعت منها الأنواع المدروسة

جدول ١. المعلومات الجغرافية للمواقع المدروسة

الاسم العلمي	الموقع	المحافظة	المعلومات الجغرافية		
			خط الطول	خط العرض	الارتفاع عن سطح البحر
I. persica	عسال الورد	ريف دمشق	036 25 00	33 53 55	1755
I. nusairiensis	قمة النبي متى	اللاذقية	036 13 11	35 36 27	1389
I. sindjarensis	الهزة	حمص	036 56 02	34 36 38	788
	دارة عزة	حلب	036 18 12	36 24 16	466
I.postii	القسطل	ريف دمشق	036 38 00	33 51 12	1322
	البريج	حمص	036 13 11	35 36 27	1389
I. histrio	بتوسة	حماة	036 18 33	34 51 18	856
	جبل سمعان	حلب	036 48 13	36 06 30	481
I. sisyrinchium	حديدة	حمص	036 24 35	34 39 37	504
	الهزة		036 56 02	34 36 38	788

التوصيف الجزيئي

استخلاص الحمض النووي DNA:

استخلص الحمض النووي DNA من قمم الأوراق الفتية بطحنها باستخدام النتروجين السائل ثم إضافة محلول الاستخلاص (SDS 2%, NaCl 0.1M, EDTA 50mM ; Tris 0.1M pH=8) وفقا لـ (Doly and Doly, 1990) ومع إجراء بعض التعديلات قدرت كمية ونوعية الحامض النووي DNA المستخلصة بواسطة مقياس الطيف الضوئي (UV Spectrophotometer) عند موجة 260 والموجة 280 نانومتر، وأختبرت نوعية الحمض النووي DNAعلى هلامة الأجاروز تركيز 1%، تم ضبط تركيز الحمض النووي DNA في جميع العينات إلى (40-60) نانوغرام/ ميكروليتر.

البادئات المستخدمة :

أجري تفاعل PCR باستخدام (16) بادىء مختلف وبحجم نهائي قدره 25 ميكرو ليتر لكل عينة ، ويبين جدول (٢) البادئات المستخدمة وتسلسلها النيكليوتيدي ودرجة حرارة التحامها.

جدول ٢. البادئات المستخدمة وتسلسلها النيكليوتيدي ودرجة حرارة التحامها

رمز المرامس	التسلسل النيوكليوتيدي للبادئات	درجة حرارة الالتحام (م)
ISSR- IR(01)	(AG)8 T	50
ISSR- IR(02)	(GA)8 C	52
ISSR- IR(04)	(AC)8 G	52
ISSR- IR(05)	(AC)8 T	50
ISSR- IR(06)	(GA)8 CG	56
ISSR- IR(07)	(TC)8 GA	54
ISSR- IR(08)	(TC)8 AG	54
ISSR- IR(09)	(AC)8 GG	56
ISSR- IR(14)	CCAG (GT)7	56
ISSR- IR(15)	(GT)4 (GA)5	54
ISSR- IR(16)	(AC)7 (AT)3	54
ISSR- IR(18)	C(CT)4 (GT)4 G	56
ISSR- IR(40)	(AC)8 TT	50
ISSR- IR(41)	(AC)8 CG	50
ISSR- IR(43)	(CT)8 G	52

التفاعل البوليميريزي المتسلسل (PCR):

تم استخدم (2) ميكروليتر DNA لكل عينة و12.5 ميكرو ليتر 2X PCR Master Mix و20 بيكو مول من البادئ، أكمل الحجم إلى 25 ميكرو ليتر بالماء المقطر، أجري تفاعل PCR برفع درجة الحرارة في البداية إلى 94م ولمدة 5 دقائق في جهاز التدوير الحراري ، وقد تم ذلك وفقا للبرنامج التالي:

- التمسخ (Denaturation): على درجة حرارة 94م ولمدة ٣٠ ثانية لفصل سلاسل DNA عن بعضها.

- الالتحام (Annealing): حسب درجة حرارة البادئ ولمدة 30 ثانية.
- الاستطالة (Extention): على درجة حرارة 72مْ ولمدة 1 دقيقة.

وفي نهاية35 دورة تركت العينات في جهاز PCR لمدة 10 دقائق على حرارة 72مْ.

فصلت نواتج تفاعل PCR على هلامة الأجاروز ذات تركيز 2%، واستعمل مؤشر جزيئي بحجم 50 kp، ثم لونت الهلامة بغمرها في حوض يحوي 200 مل 1X TBE و٥ ميكروليتر من الإيثيديوم بروميد (50 mg/ ml) كي يتمكن من الالتحام مع DNA ليمكن الايثيديوم بروميد من رؤية حزم DNA بوجود الأشعة فوق البنفسجية UV- Light ثم توثيق النتائج على الهلامة المتضمنة الحزم بواسطة كميرا موصولة بطابعة.

التحليل الإحصائي:

سجلت القراءات وجمعت نتائج عملية التضخيم في جداول اعتماداً على مقارنة وجود أو غياب حزم الحامض النووي بين النباتات التي جمعت من المواقع المختلفة، وقد نظمت الجداول لكل بادئة على حده، حيث رمز لوجود الحزم بالرقم (1) وغيابها بالرقم(0)، ورسمت شجرة القرابة الوراثية Dendrogram بتطبيق متوسطات المجموعات الزوجية غير المزانة UPGMA باستخدام برنامج PopGene V.32 الإحصائي الحيوي.

النتائج والمناقشة

التوصيف الجزيئي:

التعددية الشكلية الناتجة عن تطبيق تقنية Issr:

تضمنت الدراسة اختبار (5) أنواع تابعة لجنس السوسن *Iris* بالإضافة إلى النوع *I. sisyrinchium* والذي أضيف إلى الأنواع المدروسة بسبب تباين وجهات النظر في انتمائه التصنيفي. يبين الجدول (3) فعالية البادئات المستخدمة في إعطاء تعددية شكلية بين الأنواع المدروسة. نتج عن استخدام هذه البادئات (78) حزمة، منها (59) حزمة (75.64%) ذات تعددية شكلية Polymorphic بينما (19) منها (24.36%) وحيدة التكرار. تراوح عدد الحزم الناتجة بين (2)حزمة مع البادئة (P7) و(9) حزمة مع البادئة(P41)، كما يظهر الجدول (3). وتراوح عدد الحزم المتباينة أو ذات التعددية الشكلية بين (٠) مع البادئة (P14) و(6) مع كل من البادئات (P1-P4-P43).

جدول ٣. العدد الكلي للحزم وعدد الحزم المتباينة والحزم التي لم تعط تعددية شكلية ونسبتهما المئوية

البادئة	العدد الكلي للحزم	العدد ذو التعدد الشكلي	النسبة المئوية للتعددية الشكلية	عدد الحزم التي لم تعط تعددية	النسبة المئوية للحزم التي لم تعط تعددية شكلية
P1	٦	٦	١٠٠	٠	٠
P2	٥	٥	١٠٠	٠	٠
P4	٧	٦	٨٥.٧١	١	١٤.٢٩
P5	٥	٤	٨٠	١	٢٠
P6	٤	٤	١٠٠	٠	٠
P7	٢	١	٥٠	١	٥٠
P8	٣	١	٣٣.٣٣	٢	٦٦.٦٧
P9	٧	٥	٧١.٤٣	٢	٢٨.٥٧
P14	٣	٠	٠	٣	١٠٠
P15	٤	٣	٧٥	١	٢٥
P16	٧	٥	٧١.٤٣	٢	٢٨.٥٧
P18	٥	٣	٦٠	٢	٤٠
P40	٥	٥	١٠٠	٠	٠
P41	٩	٥	٥٥.٥٦	٤	٤٤.٤٤
P43	٦	٦	١٠٠	٠	٠
المجموع	٧٨	٥٩		١٩	
النسبة المئوية للتعدد الشكلي		٧٥.٦٤		24.36	

تحديد درجة القرابة الوراثية بين الأنواع المدروسة:

درست درجة القرابة الوراثية بين أنواع السوسن المدروسة بتطبيق النسب المئوية لعدم التوافق (PDV) Percent Disagreement Values لمعرفة درجة القرابة الوراثية بين الأنواع المدروسة. يلاحظ من الجدول (4) أن أقل قيمة لـ PDV هي (48.649%) بين النوعين ***I. nusairiensis*** و***I.persica*** بينما كانت أعلى قيمة لها(78.182%) بين النوعين: ***I.sindjarensis***، ***I.persica***

الجدول(4): مصفوفة عدم التوافق

النوع	*I. sindjarensis*	*I. postii*	*I. histrio*	*I. sisyrinchium*	*I. persica*	*I. nusairiensis*
I. sindjarensis	0					
I. postii	0.61111	0				
I. histrio	0.67303	0.70588	0			
I. sisyrinchium	0.78182	0.70451	0.65116	0		
I. persica	0.73585	0.70451	0.73913	0.48649	0	
I. nusairiensis	0.72222	0.70588	0.75000	0.71111	0.61905	0

التحليل العنقودي Cluster analysis للأنواع المدروسة باستخدام تقنية ISSR:

أجري التحليل العنقودي للنتائج التي تم الحصول عليها وذلك لإنشاء شجرة القرابة الوراثية Dendrogram لتحديد درجة القرابة الوراثية إعتماداً على مصفوفة Nie بين الأنواع المدروسة، لوحظ من الشكل (1) أن الأنواع انفصلت إلى عنقودين: ضم العنقود الأول الأنواع (***I. histrio*** ، ***I.sindjarensis***، ***I.postii***) وضم العنقود الثاني باقي الأنواع المدروسة. ويلاحظ بأن النوع ***I. sisyrinchium*** قد انتظم مع أنواع العنقود الثاني وكان الأقرب وراثياً للنوع ***I.persica*** من باقي الأنواع المدروسة، مما يستوجب إعادة النظر في وضعه التصنيفي المعمول به حالياً (حيث أنه يعامل على أنه أحد أنواع الجنس *Gynandriris*، وهناك من يعتبره يتبع للجنس *Moreae*) وإعادته إلى الجنس *Iris*

الاستنتاجات:

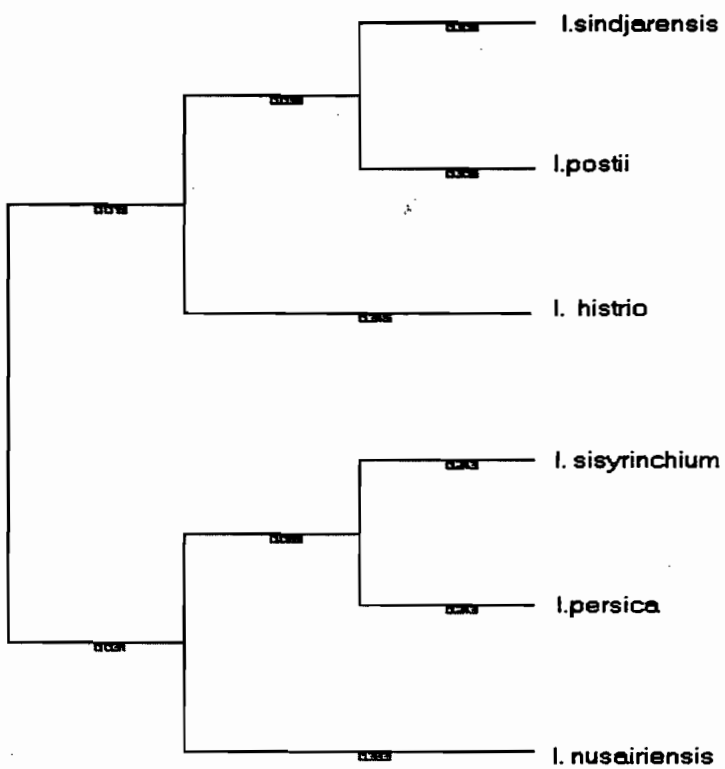
1- تم تقييم التنوع الوراثي لأنواع السوسن البصلية بتطبيق تقنية **ISSR**، حيث أظهرت هذه التقنية فعالية بين أنواع السوسن بالاعتماد على نتائج (15) بادئة فكانت نسبة التعددية الشكلية **75.64%** .

2- أثبتت البادئات المستخدمة فعاليتها في إعطاء تعددية شكلية بين النباتات المدروسة ونتج عن استخدام هذه البادئات ما مجموعه (78) حزمة منها (59) ذات تعددية شكلية .

3- حددت القرابة الوراثية بين الأنواع المدروسة فانقسمت إلى عنقودين ضم العنقود الأول الأنواع ***(I. histrio ،I. postii ،I.sindjarensis)*** وضم العنقود الثاني بقية الأنواع .

المقترحات والتوصيات:

١. ضرورة إعادة النظر في الوضع التصنيفي للنوع تسمية للنوع *I. sisyrinchium* وإعادته للجنس *Iris* بعد أن كان قد فصل فيما مضى في الجنس *Gynandriris* .
٢. التوسع في دراسة الأنواع التابعة للجنس *Iris* في جميع محافظات القطر.
٣. استخدام معايير إضافية في توصيف الأنواع المدروسة إضافة للمعيار الوراثي المبني على أسس جزيئية.
٤. وضع خطة لحماية هذه الأنواع، وإقامة مجمعات وراثية لأنواع السوسن لتكون نواة لعمليات التحسين الوراثي
٥. إكثار هذه النباتات باستخدام تقنية زراعة الأنسجة خاصة وإن بعض هذه الأنواع يصلح للاستخدام كنبات زينة في وضعه الراهن ودون الحاجة لأي عملية تحسين وراثي.



شكل ١. شجرة القرابة الوراثية للأنواع المدروسة

المراجع

Al- Gabbiesh A. H., Hassawi D. S., Afifi F. U., 2006. Determination of Genetic Diversity among *Iris* Species Using Random Amplified Polymorphic DNA Analysis, Biotechnology 5 (2) : PP. 173-179.

Arafeh R. M. H., Sapir Y., Shmida A., Iraki N., Fragman O., Comes H. P., 2002. Patterns of genetic and phenotypic variation in *Iris haynei* and *I. atrofusca* (Iris sect. onocyclus = the royal irises) along an ecogeographical gradient the West Bank, Mol. Ecol., 11,pp.39-53.

Doly J. J., Doly J.L., 1990. Isolation of Plant DNA from Fresh Tissue. Focus. Vol.12:13-15.

Fred J., Chittendeno Be., F.s., V.M. H, 1951. Dictionary of Gardening, The Royal Horticutural Socity, Oxford, England, Vol.II.

Gaussen H., Leroy J. F. et Ozenda P., 1982. Preces de Botanhque,T.II Vegetaux superieurs 2eme Edition Massom Paris.

Makarevitch I., Golovnina K., Scherbik S., Blinon A., 2003. Phylogenetic Relationships of the Siberian *Iris* species Inferred from Noncoding Chloroplast DNA Sequences, International Journal of plant sciences, vol, 164,pp.229-237.

Mouterde P., 1966. Nouvelle Flore du Liban et de la Syrie. 3Tomes + Atlas , Dar El Mashreq , Beyrouth , Liban.

Post G., 1934. Flora Of Syria Palaestine and Sinai . Vol. 2 Second Edition, American Press , Beirut , Lebanon.

Wrobleska A., Brzosko E., 2006. The genetic structure of the steppe plant *Iris aphylla* L. at the northern limit of its geographical range, Botanical Journal of the Linnean Society,152,PP. 245-255.

GENETIC VARIATION OF BULBOUS *IRIS* SPP. IN SYRIA USING ISSR-PCR

Al-Houlani, A. [1] ; N. Al-Batal [1] and Lawand S.[2]

[1] Dep. of Horticulture, Fac. Agric., Damascus Univ., Damascus, Syria.

[2] Dep. of Field crop, Fac. Agric., Damascus Univ., Damascus, Syria.

ABSTRACT

This work was conducted to determine the genetic variation between six species of Iris bulbes which are: *I.persica, I.sindjarensis, I.postii, I. nusairiensis, I histrio,*and *I. sisyrinchium,* by using Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) with 15 primers. The total number of bands were (78) bands (59) out of them were polymorphic (75.64%). Result revealed that there was genetic relation-ship ranged from (48.84%) between *I. nusairiensis* and *I.persica* to (78.18%) between *I. persica* and *I. sindjarensis.* The dendrogram was drawn which showed that there were two clusters. The first cluster includes: *I. histrio* , *I.postii* and *I.sindjarensis*, while the second cluster includes: *I. persica, I. nusairiensis* and *I. sisyrinchium.*

Keywords: Iris, ISSR, Syria.

قام بتحكيم البحث

أ.د / خليفه عبد المقصود زايد — كلية الزراعة – جامعة المنصورة

أ.د / اميمه محمد عبد الكافى — كلية الزراعة – جامعة المنصورة