

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 الحولاني¹، نبيل البطل¹، سلام لاوند²

¹ قسم علوم البستنة، كلية الزراعة، جامعة دمشق، سورية.

² قسم المحاصيل الحقلية، كلية الزراعة، جامعة دمشق، سورية.

المخلص

أجريت الدراسة على ستة أنواع تابعة لجنس السوسن *Iris* تمتاز بامتلاكها مجموع تحت أرضي بصلي هي: هذه الأنواع جزئياً 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) بادنة. 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*. وباعتماد على نتائج التوصيف الوراثي رسمت شجرة القرابة الوراثية بين الأنواع المدروسة، حيث انقسمت الأنواع إلى عنقودين ضم العنقود الأول الأنواع (*I. postii*، *I. sindjarensis*) و (*I. hisrio*) بينما ضم العنقود الثاني الأنواع (*I. sisyriochium*، *I. nusairiensis*، *I. persica*). 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 متأسلاً Endimic، يعتبر Mouterde (1966) أن عدد الأجناس الممثلة لهذه الفصيلة في سورية (5) حيث أخذ بوجهة النظر التي تفرد النوع *I. sisyriochium* بالجنس *Gynandriris*، يختص جنس السوسن بـ (25) نوعاً منها (16) نوعاً متوطناً، تنتمي أنواع السوسن السورية إلى 5/ أجناس هي: *Jono*، *Oncocylus*، *Pogoniris*، *Apogon*، *Xiphium*. تنحصر الأنواع البصلية بالجنسين الأخيرين. وجدت الأنواع التابعة للجنس *Jono* في إسبانيا وشمال إفريقيا وأسيا الصغرى وإيران وشرقاً حتى الهند (Fred et al., 1951) ويمثل هذا الجنس في سورية (5) أنواع هي: *I. persica*، *I. sindjarensis*، *I. nusairiensis*، *I. postii*، *I. fumosa*، في حين وجدت أنواع الجنس *Xiphium* في إسبانيا، البرتغال، صقلية، شمال إفريقيا، آسيا الصغرى وتركستان، ويمثله في سورية الأنواع: *I. histrio*، *I. vartani*. 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 تنتظم تحت الجينس *Onocylus* 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 الجينس *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 /4/ تحت مجموعات ،

وقد خلص في نهاية هذه الدراسة إلى ضرورة إعادة النظر في الوضع التصنيفي للجنس *Iris* وفي دراسة أجراها (Al-Gabbiesh et al. 2006) بهدف دراسة القرابة الوراثية بين /17/ أنواع تابعة

للجنس *Iris* وهي: *I. germanica*, *I. petrana*, *I. atrofusca*, *I. nigricans*, *I. vartanii*, *I. edomensis* و *aucheri* باستخدام تقنية RAPD وذلك باستخدام أربعة بادئات وبعد التضخيم نتج 125 حزمة يتراوح أطوالها بين 30 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. atrofusca* و *I. germanica* 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 النيوكليوتيدات. 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. sisyrrinchium*، من مناطق انتشارها الطبيعية والجدول (1) يبين المواقع التي جمعت منها الأنواع المدروسة

جدول 1. المعلومات الجغرافية للمواقع المدروسة

الاسم العلمي	الموقع	المحافظة	المعلومات الجغرافية		
			خط الطول	خط العرض	الارتفاع عن سطح البحر
<i>I. persica</i>	عسال الورد	ريف دمشق	036 25 00	33 53 55	1755
<i>I. nusairiensis</i>	قمة النبي متى	اللاذقية	036 13 11	35 36 27	1389
<i>I. sindjarensis</i>	الهزة	حمص	036 56 02	34 36 38	788
	دارة عزة	حلب	036 18 12	36 24 16	466
<i>I. postii</i>	القسطل	ريف دمشق	036 38 00	33 51 12	1322
	البريج	حمص	036 13 11	35 36 27	1389
<i>I. histrio</i>	بتيسة	حماة	036 18 33	34 51 18	856

481	36 06 30	036 48 13	حلب	جبل سمعان	
504	34 39 37	036 24 35		حديدة	
788	34 36 38	036 56 02	حمص	الهزة	<i>I. sisyrinchium</i>

التوصيف الجزيئي

استخلاص الحمض النووي DNA:

استخلص الحمض النووي DNA من قسم الأوراق القلبية بطحنها باستخدام **النتروجين** السائل ثم إضافة محلول الاستخلاص SDS (Tris 0.1M pH=8 , EDTA 50mM , NaCl 0.1M, SDS2%) وفقاً لـ (Doly and Doly, 1990) ومع إجراء بعض التعديلات قدرت كمية ونوعية الحمض النووي DNA المستخلصة بواسطة مقياس الطيف الضوئي (UV Spectrophotometer) عند موجة 260 والموجة 280 نانومتر، وأختبرت نوعية الحمض النووي DNA على هلامة الأجاروز تركيز 1%، تم ضبط تركيز الحمض النووي DNA في جميع العينات إلى (40-60) نانو غرام/ ميكرو ليتر.

البيانات المستخدمة:

أجري تفاعل PCR باستخدام (16) بادئ مختلف وبحجم نهائي قدره 25 ميكرو ليتر لكل عينة ، وبيبن جدول (٢) البيانات المستخدمة وتسلسلها النيكلوتيدي ودرجة حرارة التحامها.

جدول ٢. البيانات المستخدمة وتسلسلها النيكلوتيدي ودرجة حرارة التحامها

رمز المرئس	التسلسل النيكلوتيدي للبيانات	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 البوليميري المتسلسل (PCR):

تم استخدام (2) ميكرو ليتر DNA لكل عينة و12.5 ميكرو ليتر 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 94°م ولمدة 5 دقائق في جهاز التدوير الحراري ، وقد تم ذلك وفقاً للبرنامج التالي:

- التسخن (Denaturation): على درجة حرارة 94°م ولمدة 30 ثانية لفصل سلاسل DNA عن بعضها.
- الالتحام (Annealing): حسب درجة حرارة البادئ ولمدة 30 ثانية.
- الاستطالة (Extention): على درجة حرارة 72°م ولمدة 1 دقيقة.

وفي نهاية 35 دورة تركت العينات في جهاز PCR لمدة 10 دقائق على حرارة 72°م. 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 و5 ميكرو ليتر من الإيثيديوم برومايد (50 mg/ ml) كي يتمكن من الالتحام مع DNA ليتمكن الإيثيديوم برومايد من رؤية حزم DNA بوجود الأشعة فوق البنفسجية UV- Light ثم توثيق النتائج على الهلامة المتضمنة الحزم بواسطة كميتر موصولة بطابعة.

التحليل الإحصائي:

سجلت القراءات وجمعت نتائج عملية التضخيم في جداول اعتماداً على مقارنة وجود أو غياب حزم الحمض 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 (0) مع البادئة (P14) و(6) مع كل من البادئات (P43-P4-P1).

جدول 3. العدد الكلي للحزم وعدد الحزم المتباينة والحزم التي لم تعط تعددية شكلية ونسبتهما المنوية

البادئة	العدد الكلي للحزم	العدد ذو التعدد الشكلي	النسبة المنوية للتعددية الشكلية	عدد الحزم التي لم تعط تعددية شكلية	النسبة المنوية للحزم التي لم تعط تعددية شكلية
P1	6	6	100	0	0
P2	5	5	100	0	0
P4	7	6	85.71	1	14.29
P5	5	4	80	1	20
P6	4	4	100	0	0
P7	2	1	50	1	50
P8	3	1	33.33	2	66.67
P9	7	5	71.43	2	28.57
P14	3	0	0	3	100
P15	4	3	75	1	25
P16	7	5	71.43	2	28.57
P18	5	3	60	2	40
P40	5	5	100	0	0
P41	9	5	55.56	4	44.44
P43	6	6	100	0	0
المجموع	78	59	75.64	19	24.36
					النسبة المنوية للتعدد الشكلي

تحديد درجة القرابة الوراثية بين الأنواع المدروسة:

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

الجدول(4): مصفوفة عدم التوافق

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

التحليل العنقودي Cluster analysis للأنواع المدروسة باستخدام تقنية ISSR:

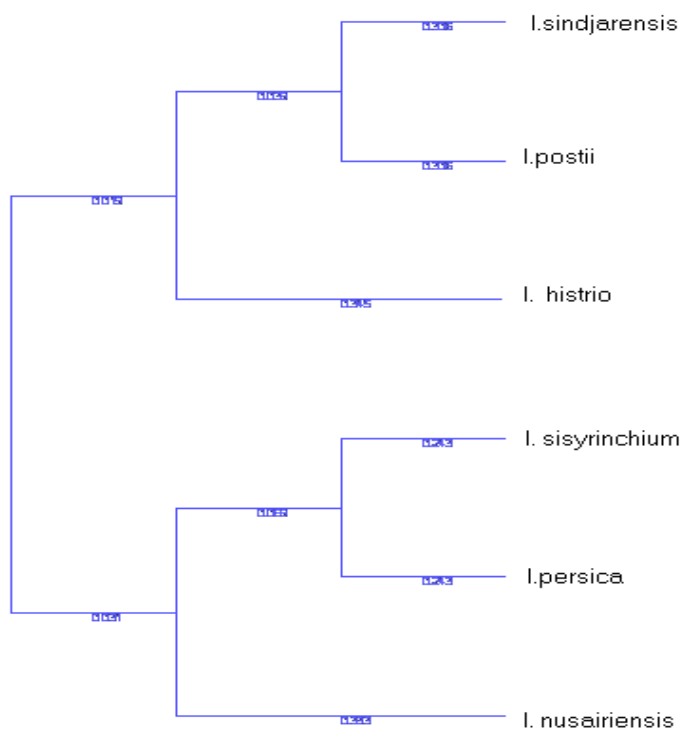
أجري التحليل العنقودي للنتائج التي تم الحصول عليها وذلك لإنشاء شجرة القرابة الوراثية Dendrogram لتحديد درجة القرابة الوراثية اعتماداً على مصفوفة Nie بين الأنواع المدروسة، لوحظ من الشكل (1) أن الأنواع انفصلت إلى عنقودين: ضم العنقود الأول الأنواع (*I. postii*، *I. histrio*، *I. sindjarensis*)، وضم العنقود 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. sindjarensis*، *I. postii*، *I. hisrio*) وضم العنقود الثاني بقية الأنواع .

المقترحات والتوصيات:

1. ضرورة إعادة النظر في الوضع التصنيفي للنوع تسمية للنوع *I. sisyrinchium* وإعادته للجنس *Iris* بعد أن كان قد فصل فيما مضى في الجنس *Gynandriris* .
2. التوسع في دراسة الأنواع التابعة للجنس *Iris* في جميع محافظات القطر .
3. استخدام معايير إضافية في توصيف الأنواع المدروسة إضافة للمعيار الوراثي المبني على أسس جزيئية .
4. وضع خطة لحماية هذه الأنواع، وإقامة مجتمعات وراثية لأنواع السوسن لتكون نواة لعمليات التحسين الوراثي
5. إكثار هذه النباتات باستخدام تقنية زراعة الأنسجة خاصةً 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 Horticultural Society, Oxford, England, Vol.II.
- Gausson 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.
- Wroblecka 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. sisyrrinchium*, 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. sisyrrinchium*.

Keywords: Iris, ISSR, Syria.

قام بتحكيم البحث

أ.د / خليفة عبد المقصود زايد

أ.د / اميمه محمد عبد الكافي

كلية الزراعة – جامعة المنصورة

كلية الزراعة – جامعة المنصورة