تحديد درجة القرابة الوراثية بين بعض الطرز من الشعير المحلي البري و المزروع السوري (*Hordeum* spp.) باستخدام تقنية Inter Simple Sequence Repeats (ISSR)

علي الصهيوني* د. سلام لاوند**

(الإيداع: 5 نيسان 2021، القبول: 20 حزيران 2021 2021)

الملخص:

أجريت دراسة جزيئية على صنفين من الشعير البري (*Hordeum spontaneum*، *Hordeum bulbosum*) من أربع محافظات سورية (دمشق، ريف دمشق، طرطوس، حماه) وأصناف محلية سورية من الشعير المزروع (عربي أسود، عربي أبيض محسن، فرات 3، فرات 6، فرات 7، فرات 9) تمّ الحصول عليها من الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية السورية، كما تمّ جمع طرز نباتية من الشعير المزروع لدى المزارعين في محافظات (طرطوس ، حماه) لمقارنتها وراثياً مع الأصناف السابقة حيث جمعت جميع هذه الأصناف خلال الموسم الزراعي (2018–2019). رُسِمت شجرة القرابة الوراثية بين الأصناف المدروسة باستخدام النتائج المستحصل عليها من تحليل التباين الوراثي بتقنية Inter Simple Sequence Repeats (ISSR) وذلك باستخدام 16 بادئة ثم استخدمت الأوزان الجزيئية لقطع الحمض النووي الناتجة في تجهيز الجداول المناسبة للتحليل وحساب قيمة معامل التعددية الشكلية PIC على مستوى الموقع الواحد. أظهرت الدراسة أن 14 بادئةً من البادئات المستخدمة أعطت منتجات تضخيم في تفاعل البلمرة المتسلسل حيث أثبتت هذه البادئات فعاليتها في إعطاء تعددية شكلية بين الطرز المدروسة ونتج عن استخدامها 94 حزمةً، حيث أعطت تعدديةً شكليةً Polymorphic وصلت نسبتها المئوية 85.1%، وتراوح عدد الحزم لكل بادئة بين حزمةٍ واحدةٍ مع البادئة ($ISSR_{13}$) وعشرة حزم مع البادئة ($ISSR_1$، $ISSR_3$، $ISSR_6$، $ISSR_{11}$) بمتوسط 6.7 حزمة لكل بادئة، وكانت النسبة المئوية للتعددية الشكلية الأقل مع البادئة ($ISSR_5$) بمقدار 62.7% والأكبر مع البادئات ($ISSR_{11}$–$ISSR_{13}$–$ISSR_{14}$) بمقدار 100%. تبين أن أقل قيمة لمصفوفة عدم التوافق PDV هي 0.1542 بين الطرازين (حماه مزروع ، حماه *H.bulbosum*) وهذا يدل على أنهما على درجة كبيرة من القرابة الوراثية، بينما كانت أعلى قيمة لها 0.5025 بين الطرازين (عربي أسود، دمشق *H.spontaneum*) و (طرطوس *H.bulbosum*، ريف دمشق *H.spontaneum*) مما يدل على وجود تباين وراثي كبير بينها.

الكلمات المفتاحية: الشعير البري، الشعير المزروع، شجرة القرابة الوراثية، تقانة تكرارات التسلسلات البسيطة الداخلية ISSR، معامل التعددية الشكلية (PIC).

* طالب ماجستير، قسم التقانات الحيوية، كلية الزراعة، جامعة دمشق.

** أستاذ مساعد، قسم المحاصيل الحقلية، كلية الزراعة، جامعة دمشق.

Determining the degree of genetic relationship between some genotypes of local wild and cultivated Syrian barley (*Hordeum* spp.) using the Inter Simple Sequence Repeats (ISSR) technique

Ali Alsahioni* Salam Lawand**

(Received: 5 April 2021, Accepted: 20 June 2021)

Abstract:

A molecular study was conducted on a group of tow wild barley varieties (*Hordeum spontaneum, H. bulbosum*) from four Syrian governorates (Damascus, Damascus Countryside, Tartous, Hama) and Syrian cultivated barley varieties (Arabi aswad, Arabi abiad, Furat 3, Furat 6, Furat 7, Furat. 9) It was obtained from the General Commission for Agricultural Scientific Research (GCSAR), also genotypes of cultivated barley were collected in the governorates (Tartous, Hama) for a genetically compared with previous varieties, where all these varieties and genotypes were collected during the agricultural season (2018-2019). The genetic Dendrogram was drawn between the studied taxa using the results obtained from the genetic variance analysis using the Inter Simple Sequence Repeats technique (ISSR) with 16 primers, then the molecular weights of the resulting DNA fragments were used in preparing the appropriate tables for the analysis and calculating the value of the Polymorphism Information Content (PIC). The study showed that 14 of the used primers gave amplification products in the polymerase chain reaction and resulted in their use 94 bands, as well as gave a polymorphic percentage 85.1%, and the number of bands per primer ranged between one band with the prefix ($ISSR_{13}$) and ten bands with the primers ($ISSR_1$, $ISSR_3$, $ISSR_6$, $ISSR_{11}$) with an average of 6.7 bands per primer , The percentage for polymorphism was lowest with primer ($ISSR_5$) by 62.7% and largest with primers ($ISSR_7$-$ISSR_9$-$ISSR_{10}$-$ISSR_{11}$-$ISSR_{13}$-$ISSR_{14}$) at 100%. it was found that the lowest percent disagreement values (PDV) were 0.1542 between the two genotypes (Hama cultivated, Hama *H. bulbosum*) and this indicates that they have a large degree of genetic affinity, while the highest value was 0.5025 between the two genotypes (Arabi aswad, Damascus *H. spontaneum*) and (Tartous *H. bulbosum*, Damascus Countryside *H. spontaneum*), indicating the existence of great genetic variation between them

Key words: wild barley, cultivated barley, Dendrogram, Inter Simple Sequence Repeats technique (ISSR), Polymorphism Information Content (PIC).

***Master's student, Department of Biotechnology, Faculty of Agriculture, Damascus University.**

** **Assistant Professor, Department of Field Crops, Faculty of Agriculture, Damascus University.**

1- المقدمة والدراسة المرجعية Introduction & Review of Literature

ينتمي محصول الشعير (*Hordeum vulgare* L.) إلى العائلة النجيلية Paoaceae، التي تُعد أكبر فصائل النباتات أحادية الفلقة، والرتبة Poales، والجنس Hordeum، الذي يضم قرابة 32 نوعاً (Samah وزملاؤه، 2018) ويشغل محصول الشعير المرتبة الرابعة ضمن لائحة المحاصيل الحبية Cereals في العالم، ويأتي من حيث الأهمية الاقتصادية، والمساحة Area و الإنتاج بعد القمح (*Triticum* ssp.) Wheat، والرز (*Oryza sativa* L.) Rice، والذرة الصفراء(*Zea mays* L.) Corn (Chahal و Gosa، 2002).

يعد الشعير النبات المفضل في الدراسات الوراثية، نظراً لثنائية التضاعف (2n = 2x =14) وتميزه بالتلقيح الذاتي، والحجم الكبير للصبغيات والتباين الوراثي الكبير ضمن الجنس Hordeum وسهولة التهجين، والتكيف الواسع والمتطلبات المائية والغذائية المحدودة نسبياً. حيث يملك مجين الشعير سبعة أزواج من الصبغيات تم تحديدها والتعرف على خصائص كل منها (Kashif و Khaliq، 2003)

يعد التباين الوراثي أمراً مهماً ليتمكن المربي من ممارسة عمله التربوي في التحسين الوراثي لأي محصول وبالتالي لابد من الكشف عن التباينات الوراثية الجديدة باستمرار لمتابعة عملية التحسين وتعد عمليات الإدخال، الانتخاب والتهجين الطرائق الأساسية لإحداث هذه التباينات في المحاصيل ذاتية التلقيح كما تلعب الطفرات دوراً مهماً أيضاً (Canci وزملاؤه، 2003) .بيّن Ismael وزملاؤه (2019) أن الوصول إلى أصناف جديدة ذات إمكانيات وراثية عالية للغلة الحبية أصبح هدفاً دائماً لجميع برامج التربية ولتحقيق هذا الهدف لابد لمربي النبات من معرفة التركيب الوراثي وطبيعة عمل المورثات المتحكمة باستجابة النبات للبيئات المختلفة.

استخدمت العديد من التقنيات الكيميائية والحيوية لتوصيف الشعير (Al_Hadeithi، 2015)، لكن هذا التوصيف لم يكن فعالاً وكافياً بسبب انخفاض التباين الأليلي.

رغم أهمية الصفات الشكلية والخصائص الفيزيولوجية وكذلك الخصائص الشكلية المظهرية الزراعية إلا أن الحاجة للمؤشرات الجزيئية أصبحت أكثر أهمية وإلحاحاً ويرجع ذلك للأسباب التالية (Nadeem وزملاؤه، 2018):

- توفر المؤشرات الجزيئية نتائج مبكرة مما يساعد في الإسراع بعمليات الانتخاب والتربية، وبذلك تختصر الزمن الذي تستغرقه إضافة إلى خفض كلفة المادة التي تحتاجها الدراسات المورفولوجية.
- عدم وجود أي علاقة بين الأطوار الفينولوجية للنبات والمؤشرات الجزيئية، وبالتالي يمكن استخلاص المادة الوراثية من الحمض الريبي النووي (DNA) في المراحل الأولى للنبات.
- سهولة تحديد موقع وراثي مطلوب لطراز وراثي معين Genotype مباشرة.
- عدم تأثر المؤشرات بالشكل الظاهري للنباتات والعوامل البيئية كما في برامج التربية التقليدية، والحصول على عدد كبير من المؤشرات بزمن قصير نسبياً.

تعد تقنية التوابع الترادفية البسيطة الداخلية (Inter Simple Sequence Repeats – ISSR) واحدة من التقانات المهمة المعتمدة على التفاعل التسلسلي البوليميرازي (Polymerase Chain Reaction – PCR) وقد طبقت من قبل (FAO، 2006) .

بين Khatab وزملاؤه (2019) من خلال دراستهم على خمس مدخلات من الشعير لدراسة التنوع الوراثي باستخدام 10 بادئات ISSR أعطى استخدام 6 منها 48 حزمة منها 25 حزمة متباينة شكلياً، حيث أعطى البادئ UBC-810 وجود 12 حزمة منها 9 حزم متباينة شكلياً بتعددية شكلية 75%، في حين أعطى استخدام البادئتين UBC-822 و

UBC-815 10 و 9 حزم على التوالي منها 6 حزم متباينة شكلياً حيث بلغت النسبة المئوية للتعددية الشكلية للبادئتين 66.6% و 60% على التوالي، كما أعطى البادئ UBC-812 10 حزم منها 4 متباينة شكلياً بتعددية شكلية 40%.

أظهرت دراسة Sadeghpour وزملاؤه (2018) نجاح استخدام المعلمات الجزيئية لتحليل التنوع الوراثي. تمت دراسة التنوع الوراثي بين 45 نوعاً وراثياً من الشعير باستخدام تسعة بادئات ISSR حيث كان مجموع الحزم المتباينة شكلياً 438 بحجم 80-3000 زوج قاعدي. تراوحت قيم معامل التعددية الشكلية (PIC) من 0.121 لـ ISSR7 و 0.227 لـ ISSR2بمتوسط 0.19.

بينت نتائج El-Awady وزملاؤه (2012) التي تمّ الحصول عليها باستخدام 10 بادئات ISSR ما مجموعه 51 حزمة بمتوسط 7.4 حزمة لكل بادئ . كما أظهرت النتائج تفوق البادئين UBC835 و UBC840 حيث أعطت 10 حزم وكانت قيمة معامل التعددية الشكلية (PIC) 0.42، بينما أظهر البادئ UBC807 5 حزم فقط . تراوح حجم الحزم التي تضخيمها بين 300 و 2000 زوج قاعدي. كما أظهرت البادئات الثلاثة UBC828 و UBC878 و UBC847 تعددية شكلية 33.3% وكانت قيم معامل التعددية الشكلية (PIC) 0.41 و 0.45 و 0.45 على التوالي.

قيّم Khatab و Samah (2013) التنوع الوراثي بين 6 طرز وراثية من الشعير باستخدام 10 بادئات ISSR، سجلت ما مجموعه 41 حزمة منها 32 متباينة شكلياً. تم الحصول على أكبر عدد من الحزم باستخدام البادئين ISSR6 و ISSR5 حيث أعطت 11 و 7 حزم على التوالي منها 8 و 5 متباينة شكلياً وكانت النسبة المئوية للتعددية الشكلية 72.7 % و 71.4% على التوالي. في حين أن البادئات ISSR1 و ISSR4 و ISSR10 أعطت أعلى تعددية شكلية 100% مقارنة بالبادئات الأخرى.

قام Vasileva (2018) بدراسة التنوع الوراثي لـ 24 طرازاً من الشعير منها 11 سلالة تربية و13 سلالة محلية تمّ الحصول عليها من 7دول وذلك باستخدام 9 بادئات ISSR، أظهرت النتائج تنوعاً وراثياً كبيراً حيث بلغت التعددية الشكلية 54.22%، وكان عدد الحزم الكلية 83 حزمة بمتوسط 9.22 حزمة لكل بادى منها 45 متباينة شكلياً بمتوسط 7.50 لكل بادئ أيضاً.

درس Shayan وزملاؤه (2019) التباين الوراثي بين 28 طرازاً وراثياً، حيث أظهرت النتائج أنه من بين 14 بادئة ISSR تم استخدامها ، أعطت 11 بادئة منها 559 حزم متباينة شكلياً بحجم 80-3000 زوج قاعدي، وكانت قيم معامل التعددية الشكلية (PIC) بين 0.116 و 0.252 بمتوسط 0.187.

تصل الفجوة الوراثية في إنتاجية الشعير إلى حدود 40%، الأمر الذي يتيح لمربّي النبات اللجوء إلى التنوع الحيوي(Rosenberg،2004) لزيادة غلة الشعير وخاصةً في البيئات المجهدة (Smith و Griffiths،1993) من خلال إدخال واستثمار التنوع الوراثي المتوفر الذي يضم الطرز البرية والمحلية والأصناف المحسّنة، وقد شغلت جميعها حيزاً جيداً في برامج التربية باستثناء الطرز الوراثية التابعة لأنواع الشعير التي حتى الآن لم تلاقي العناية والاهتمام الكافي لإدخالها في برامج التربية والتحسين الوراثي وخاصةً في سورية على الرغم مما تملكه من مواصفات كميّة ونوعيّة وتكنولوجية عالية وقدرة على تحمّل الإجهادات الإحيائية واللاإحيائية ويعود ذلك إلى قلة انتشارها عالمياً وعدم توفر معرفة كافية عنها إضافةً إلى نقص الأبحاث المتعلقة بها.

يهدف البحث إلى تحديد درجة القرابة الوراثية بين طرز وراثية من الشعير باستخدام تقنية ISSR.

2- مواد البحث وطرائقه Materials and Methods

2-1- المادة النباتية Plant material

تمّ جمع الطرز الوراثية من الشعير البري (*H. spontaneum*، *H. bulbosum*) من أربع مواقع في محافظات (ريف دمشق، دمشق، حماة، طرطوس) ، كما تمّ الحصول على أصناف الشعير المزروع (عربي أسود، عربي أبيض محسن، فرات 3، فرات 6، فرات 7، فرات 9) من الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية، كما تمّ جمع عينات نباتية من الشعير المزروع لدى المزارعين في محافظات (طرطوس ، حماه) لمقارنتها وراثياً مع الأصناف السابقة حيث جمعت جميع هذه الأصناف خلال الموسم الزراعي (2018-2019).

الشعير التلقائي *Hordeum spontaneum* :هو شعير حولي ذاتي التلقيح ثنائي الصف 2N = 14 ويعد أحد أسلاف الشعير المزروع H.vulgare ويحتوي نفس عدده الصبغي ويتميز الشعير *H .spontaneum* بسنبلة ضعيفة المحور وبكونه يشكل مصدراً هاماً للمورثات بالإضافة إلى تحمله للإجهادات الإحيائية واللاإحيائية وينتشر إلى جانب الشعير المزروع على جوانب الحقول وينمو فوق أتربة مختلفة من كلسية وطينية وجبسية ومحلية كما وينتشر في كافة المناطق والمحافظات السورية.

الشعير البري البصيلي *Hordeum.Bulbosum*: شعير معمر خلطي التلقيح، ينتشر في حوض البحر الأبيض المتوسط، حتى أفغانستان شرقاً. يعطي هذا النوع عدداً كبيراً من الإشطاءات، وسنابل خضراء فاتحة أو بنفسجية ضاربة للخضرة، بطول (45-165mm). تنتهي الساق بعدة بصيلات ذات غلاف ليفي (4-3بصيلات)، لتتوقف عن النمو مع سكون البصيلات ودخول النبات في سبات داخلي.

عربي أسود (ثنائي الصف) : طراز محلي معتمد للزراعة في منطقة الاستقرار الثالثة، متوسط ارتفاع النبات75-85 سم، السنابل متطاولة، الحبوب متطاولة ذات غلاف ملتصق مع الحبة (حبوب مغطاة)، لون غلاف البذرة أسود، متوسط وزن الألف حبة32.5غ، متوسط نسبة البروتين في الحبوب12.9%، متوسط عدد الأيام اللازمة للإسبال130 يوماً، وللنضج التام 160 يوماً.

عربي أبيض محسن : صنف محلي معتمد للزراعة في منطقة الاستقرار الثانية منذ عام 1994، متوسط طول النبات53 سم، متوسط عدد الأيام اللازمة للتسنبل 130 يوماً وحتى النضج التام 167 يوماً، الحبوب بيضاء اللون، شكل السنبلة هرمي، متوسط وزن الألف حبة 36.4 غ، متوسط نسبة البروتين في الحبوب 12.2%،متوسط الإنتاجية 2385 كغ.هكتار-1، حساس للرقاد. (تقرير الاعتماد لسلالة الشعير عربي أبيض محسن، البحوث العلمية الزراعية 1993).

فرات3 : صنف محلي معتمد للزراعة في مناطق الاستقرار الثالثة، ثنائي الصف، النبات من متوسط إلى طويل، مبكر في النضج، الحبوب بيضاء مخضرة، حساس إلى متوسط الحساسية بالنسبة للأمراض، مقاوم للجفاف والرقاد، ومتوسط المقاومة للصقيع، متوسط إنتاجيته 1900 كغ.هكتار-1 . تقرير الاعتماد لسلالة الشعير فرات4806A ، البحوث العلمية الزراعية، (2000).

فرات6 : صنف محلي معتمد للزراعة في منطقة الاستقرار الثانية منذ عام 2004، ثنائي الصف، متوسط طول النبات 57 سم، متوسط عدد الأيام الازمة للتسنبل 108 يوماً وللنضج التام 140 يوماً، الحبوب بيضاء اللون، شكل السنبلة هرمي ـ متوازي، متوسط وزن الألف حبة 36.8غ، متوسط نسبة البروتين في الحبوب 11.4%، متوسط الإنتاجية 2435 كغ.هكتار-1، مقاوم جداً للرقاد. تقرير الاعتماد لسلالة الشعير فرات5406E، البحوث العلمية الزراعية، (2003).

فرات7: صنف محلي معتمد للزراعة في مناطق الاستقرار الثالثة منذ عام 2002، ثنائي الصف،نتج عن الانتخاب الفردي من الصنف المحلي القديم عربي أبيض، متوسط طول النبات 63سم، متوسط الألف حبة 37.2غ، متوسط إنتاجيته1850 كغ.هكتار-1. تقرير الاعتماد لسلالة الشعير فرات5337A لمنطقة الاستقرار الثالثة، البحوث العلمية الزراعية، (2001).

فرات 9: صنف محلي معتمد للزراعة في منطقة الاستقرار الثالثة منذ عام 2007، ثنائي الصف، متوسط طول النبات 45 سم، عدد الأيام اللازمة للتسنبل 100يوماً وحتى النضج التام 130 يوماً، الحبوب سوداء اللون، شكل السنبلة هرمي، متوسط وزن الألف حبة 32.9 غرام، متوسط نسبة البروتين في الحبوب 12.5%، متوسط الإنتاجية 2630 كغ.هكتار-1، متوسط المقاومة للرقاد. تقرير الاعتماد لسلالة الشعير فرات5337A، البحوث العلمية الزراعية، (2007).

الجدول رقم (1): الإحداثيات الجغرافية لمواقع جمع الشعير البري والمزروع.

المحافظة	المنطقة	الطراز الوراثي	خط الطول	خط العرض	الارتفاع عن سطح البحر
دمشق	مزرعة أبي جرش	*H. spontaneum*	36.3202	33.5408	750 م
ريف دمشق	بقعسم	*H. spontaneum*	35.9333	33.4000	1120 م
طرطوس	الشيخ بدر	*H. spontaneum*	36.0811	34.9905	490 م
		H. bulbosum			
		H. vulgare			
حماه	سلمية	*H. spontaneum*	37.2035	34.9803	555 م
		H. bulbosum			
		H. vulgare			

الجدول رقم (2): أصناف الشعير المزروع المعتمدة المدروسة

الصنف الوراثي	النسب
عربي أبيض	صنف محلي
عربي أسود	صنف محلي
فرات3	Arabi Abiad -10 Kr M4 KRB-1982-2
فرات6	EBC (A) // WI2291/Harmal-03 KRB 87-5-E0-E1-E0
فرات7	Arabi Aswad – Sel – Has 87-1
فرات9	Arabi Aswad – Sel 9 – Hasaki

2-2- مكان تنفيذ البحث

نُفذ البحث في مخبر التقانات الحيوية في كلية الزراعة بجامعة دمشق خلال عامي 2019- 2020.

2-3- تعقيم البذور وزراعتها

عُقمت البذور بنقعها في مادة الإيتانول تركيز 70% مدّة 30 ثانية، بعد ذلك نُقلت على التوالي إلى ثلاثة أوعية يحوي كل منها ماء مقطر معقّم، تُركت في كل وعاء مدّة 5 دقائق، ونُقلت هذه البذور لوضعها في وعاء يحوي مادة كلوروكس 5%

مدة 5 دقائق، ثم نُقلت مرة أخرى لتنقع في الماء المقطر ثلاث مرات كل منها 5 دقائق، ثم زرعت البذور في أطباق بتري بواقع 10 بذور في كل طبق ، وعندما أصبحت البادرات بعمر 2-3 أسابيع أُخذت الأوراق الطازجة من أجل استخلاص الـ DNA للدراسة الوراثية.

2-4- استخلاص الحمض الريبي النووي DNA بطريقة SDS

استُخلص الحمض النووي منقوص الأوكسجين DNA وفق الخطوات الآتية:

1- تمّ طحن 1 غرام من الأوراق الخضراء المأخوذة من البادرات الفتية بعمر2-3 أسابيع "غير المجففة" في هاون بورسلان باستعمال الآزوت السائل حتى الحصول على مسحوق ناعم حسب (Dellaporta وزملاؤه، 1983)، نُقل بعدها إلى حوجلة زجاجية سعة 50ml وأضيف لها 10ml من سائل الاستخلاص Sodium Dodecyle SulpHat (SDS)، والمكون من:

(0.1M Tris-HCl,pH=8.2, 50mM EDTA, 0.1M NaCl, 2% SDS,1mg/ml proteinase K) ثمّ مُزجت جيداً.

2- حُضنت العينات مدّة 60 دقيقة مع التحريك المستمر ضمن حمام مائي عند 37°م، ثمّ نُقلت الحوجلة إلى الثلج، ووضعت فيه مدّة 5-10 دقائق.

3- أضيف بعد ذلك 10ml من مزيج كل من كلوروفورم/أيزواميل كحول بنسبة 1:24 ثمّ مُزج الخليط مدّة 15 دقيقة باستعمال هزاز آلي عند درجة حرارة المخبر.

4- تمّ نقل المزيج إلى أنبوب تثفيل سعة 30ml، وثفل المزيج (عملية الطرد المركزي) مدّة 10 دقائق بسرعة 10000 دورة بالدقيقة (10000 rpm).

5- أُخذت الطبقة العليا (المتشكلة عن عملية التثفيل، التي تمثل الوسط المائي الذي يحوي الأحماض النووية) بوساطة ماصة ونُقلت إلى أنابيب تثفيل جديدة.

6- أضيف الكحول الإيزوبروبانولي Iso-propanol بمعدل 3/2 من حجم الوسط المائي، ومُزج بهدوء بقلب الأنبوب رأساً على عقب عدّة مرات (تمّ في هذه المرحلة ترسيب الأحماض النووية على شكل كتلة خيطية هلامية أو بيضاء).

7- نُقل الحمض النووي (DNA) المترسب بوساطة ماصة دقيقة ذات نهاية معقوفة إلى أنبوب صغير سعة 2ml، وأضيف1.5mlمن محلول الغسيل Washing buffer(كحول إيثيلي 70%) البارد(المحفوظ بدرجة -20 ْم)، وتُرك مدّة 20 دقيقة في الثلج حيث جمع الحمض النووي (DNA) بالتثفيل بسرعة (10000 rpm) مدّة 10 دقائق وبدرجة حرارة 4 ْم.

8- استُبعد سائل الغسيل، وحُفظ الحمض النووي (DNA) المتجمع في قعر الأنبوب، وجُففت العينات باستعمال التجفيف مع التفريغ الحراري في مجفدة Vacuum dryer مدّة 10-20 دقيقة.

9- أُذيبت عينات الحمض النووي (DNA) في (500µl) من المحلول المنظم TE المكون من (10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA)، وذلك عن طريق تركها على هزاز آلي مدّة 12-24 ساعة وعند درجة حرارة 4 ْم.

10- خلال كل عملية استخلاص للحمض النووي (DNA) فإنّه لابدّ من وجود كمية من الحمض النووي (RNA) الناتجة عن عملية الاستخلاص (تختلف كمية الحمض النووي RNA باختلاف طريقة الاستخلاص، وباختلاف النسيج النباتي وعمره)، وعليه فإنّه لابد من استبعاد هذه الحمض النووي وفق مايلي:

إضافة (2µl) من أنزيم RNase (10 mg/ml)، والتحضين على درجة 37 م° مدّة نصف ساعة وأضيف حجم مماثل من الكلوروفورم:ايزوميل الكحول (1:24)، وبعد التثفيل نُقل الطور العلوي لأنبوب جديد، وأُضيف له ضعف كمية المزيج من الإيتانول Ethanol النقي، لإعادة ترسيب الحمض النووي (DNA)، وتُرك عند الدرجة (4 مْ) مدّة ساعة، ثمّ رُسب المزيج بالتثفيل بسرعة (10000 rpm) ومدة 10 دقائق، وغُسل ثانيةً بواسطة الإيثانول 70%، وجُفف في الهواء للتخلص من آثار الإيتانول ضمن جهاز المجفف بالتفريغ والحرارة، ثمّ أُذيب الحمض النووي (DNA) في محلول TE المعقّم.

2-5- التقدير الكمي والنوعي للحمض الريبي النووي DNA بواسطة الأشعة فوق البنفسجية

استخدم جهاز الطيف الضوئي (UV Spectrophotometer) لتقدير كمية الحمض النووي DNA وتحديد نقاوته، حيث يعتمد الجهاز في عمله على قياس كمية الحمض النووي الموجودة، عن طريق تقديره لامتصاص الحمض النووي DNA للأشعة فوق البنفسجية بموجات طولها 260 و280 نانومتر (Prabhakar و Mark، 2002)، وقد ذكر Maniatis وزملاؤه (1982) أنّ النسبة بين قراءة الموجة 260 نانومتر والموجة 280 نانومتر OD 260 /OD 280 تُساعد في تقدير نقاوة الحمض النووي، إذْ يجب أن تتراوح هذه النسبة بين 1.8-2، كما أوضح الباحثون أنفسهم أنّ قراءة الامتصاص على طول الموجة 260 نانومتر تسمح بحساب تركيز (DNA) في العينة المُقاسة، إذْ أنّ كل وحدة من الكثافة الضوئية (Optical density, OD) تقابل نحو 50 µg/ml من (DNA) (ذات السلاسل المضاعفة)، وبذلك حُسب تركيز (DNA) من المعادلة الرياضية الآتية (Maniatis وزملاؤه، 1982):

$$\text{DNA con. } (\mu g/\mu l) = \{OD_{260} \times 100 \text{ (Dilution Factor)} \times 50\ \mu g/ml\}/1000$$

إذْ تمثل OD260 الكثافة الضوئية لامتصاص الحمض النووي (µg) عند الموجة 260 نانومتر، ثمّ مُددت عينات DNA للحصول على تركيز (40ng/µl)، كما تمّ التقدير النوعي على هلامة Agaros، إذْ يظهر الحمض النووي (DNA) ذي النوعية الجيدة على شكل حزمة Band، بينما يكون الحمض النووي (DNA) سيء النوعية ممسحاً وغير واضح الحدود Smear.

2-6- تطبيق تقانة Inter Simple Sequence Repeats (ISSR)

استُخدم في الدراسة 16 بادئةً تمَّ الحصول عليها من الهيئة العامة للطاقة الذرية في سورية بتركيز (10 Micromole)، ويوضح الجدول رقم (3) التسلسل النيكليوتيدي ودرجة حرارة الالتحام للبادئات المستخدمة في الدراسة. كما استعمل (2X PCR Master Mix) الذي تمّ الحصول عليه من شركة (Fermentas, Germany) الحاوي على المكونات التالية ($MgCl_2$,Taq-Polymerase, dNTPs).

الجدول رقم (3): التسلسل النيكليوتيدي للبادئات المختبرة في تقانة ISSR.

البادئة	التسلسل النيكليوتيدي 3' – 5'	درجة حرارة الالتحام
ISSR1	GAGAGAGAGAGAGAGAGC	52 °م
ISSR2	CACACACACACACACAG	52 °م
ISSR3	GAGAGAGAGAGAGAGACG	56 °م
ISSR4	ACACACACACACACACGG	56 °م
ISSR5	GTGTGTGTGAGAGAGAGA	54 °م
ISSR6	ACACACACACACACATATAT	54 °م
ISSR7	ACACACACACACACACT	50 °م
ISSR8	KKVRVRVTGTGTGTGTGTG	50 °م
ISSR9	CACACACACACACACAA	50 °م
ISSR10	GAGAGAGAGAGAGAGAGAGA	58 °م
ISSR11	AGGAGGAGGAGGAGG	58 °م
ISSR12	CACACACACACACACACACACA	56 °م
ISSR13	CCTCTCTCTGTGTGTGTG	56 °م
ISSR14	CACACACACACACACACACACA	56 °م
ISSR15	TCTCTCTCTCTCTCTCGA	54 °م
ISSR16	TCTCTCTCTCTCTCTCAG	54 °م
ملاحظة: K: G/T, V: G/C/A, R: G/A		

أُجري تفاعل البلمرة المتسلسل PCR وفقاً لـ Williams وزملاؤه (1990) مع بعض التعديلات في كميات مكونات التفاعل، فكان حجم التفاعل النهائي 25µl، كما يظهر الجدول (4) مكونات هذا التفاعل.

الجدول رقم (4): مكونات تفاعل البلمرة المتسلسل PCR (المعدل)

مكونات تفاعل البلمرة المتسلسل PCR	الكميات
2X master mix	**12.5 µl**
DNA	**2 µl (40 ng/µl)**
Primer	**2.5 µl (10pmol/µl)**
H_2O	**8 µl**

ويتم هذا التفاعل في جهاز التدوير الحراري من شركة (APOLLO, USA) موديل ATC401 وفقاً للظروف الآتية:

1- الانفصال: عند درجة حرارة 94 ْم، مدّة 5 دقائق ليتم انفصال سلسلتي الحمض النووي (DNA).

2- 40 دورة تتضمن كل منها المراحل التالية:

- مرحلة التحطم الحراري Denaturation: تمّ في هذه المرحلة رفع درجة الحرارة حتى 94 ْم ليتم انفصال سلسلتي الحمض النووي (DNA) عن بعضهما البعض، لتُصبحا في حالة سلسلة مفردة.

– مرحلة الالتحام Annealing: تمّ خفض درجة الحرارة إلى درجة تتراوح بين 50– 65 مْ، وذلك تبعاً لطول البادئة، وعدد النيكليوتيدات المكونة لها، ليتم التحام البادئة بالقطعة المكملة لها من الـــحمض النووي (DNA)، وتُعد هذه المرحلة الأهم خلال التفاعل لكي تتم مضاعفة سلسلة (DNA) بشكلٍ صحيح.

– مرحلة الاستطالة Extension: تمّ رفع درجة الحرارة لتصل إلى 72ْ م، ليتم إكمال تكوين السلاسل الجديدة بوجود أنزيم Taq–Polymerase، والنيكليوزيدات ثلاثية الفوسفات، وبعد انتهاء هذا التفاعل تمّ الحصول على عدد كبير من سلاسل الحمض النووي DNA بدءاً من قطعة واحدة.

3– اكتمال التفاعل عند حرارة 72ْ م مدّة عشر دقائق.

ثمّ حُفظت العينات في درجة حرارة 4ْ م، لتفصل الحزم بعدها بالترحيل على هلامة الآغاروز.

2–7– الرحلان الكهربائي لنواتج للتفاعل المتسلسل PCR Product Electrophoresis

تم الترحيل على هلامة الآغاروز 2% في المحلول المنظم TBE 1X ،

(10X TBE buffer = 108g Tris borate +g55 Boric acid + 9.2 EDTA) pH=8، والمضـــاف إليها 5 ميكروليتر من صـــبغة الإيتيديوم بروماید (10 ميكروغرام/ميكروليتر)، حيث حُملت عينات الحمض النووي DNA على هلامة الآغاروز، بإضـــافة 5 ميكروليتر من ســـائل التحميل الخاص 1X loading buffer BromopHenol blue والمكون من

(15%Ficoll 400 + 1.03% bromopHenol blue + 0.03%Xglene cyanolff + 0.4% orange G + 10mM Tris–Hcl + 50mM EDTA)، كمـا تم حقن مؤشـــر من الحمض النووي (DNA) 1Kpbمن شـــركـة (Fermentas, Germany)، لتحديد الحجم والوزن الجزيئي للحزم الناتجة، ليتم بعد ذلك الترحيل بمرور حقل كهربائي قدره 100 فولط، لفصل حزم الـــ DNA الناتجة عن عملية التضخيم، وصُورت الهلامة بجهاز تصوير هلامة الآغاروز Image Analyzer(Agle Eye II staratagene) (Serwer، 1983).

2–8– التحليل الإحصائي

جُمعت نتائج عملية التضـخيم في جداول اعتماداً على وجود أو غياب حزم الحمض النووي DNA في العينات المدروسـة، حيث يدل الرقم (1) على وجود حزمة الـــحمض النووي DNA الواضحة فقط والرقم (0) تدل على عدم وجود الحزمة، وقد نُظمت الجداول لكل بادئة على حدا ورُسـمت شـجرة القرابة الوراثية Dendrogram بتطبيق Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averaging (UPGMA) باستخدام برنامج Pop gene 1.31 الإحصائي.

2–9– تحليل النتائج الجزيئية

اســتخدمت الأوزان الجزيئية لقطع الحمض النووي الناتجة في تجهيز الجداول المناســبة للتحليل، ومن ثم تم حســاب قيمة التنوع المورثي PIC وذلك على مستوى الموقع الواحد تبعاً لـ Anderson وزملائه (1993) حسب المعادلة التالية:

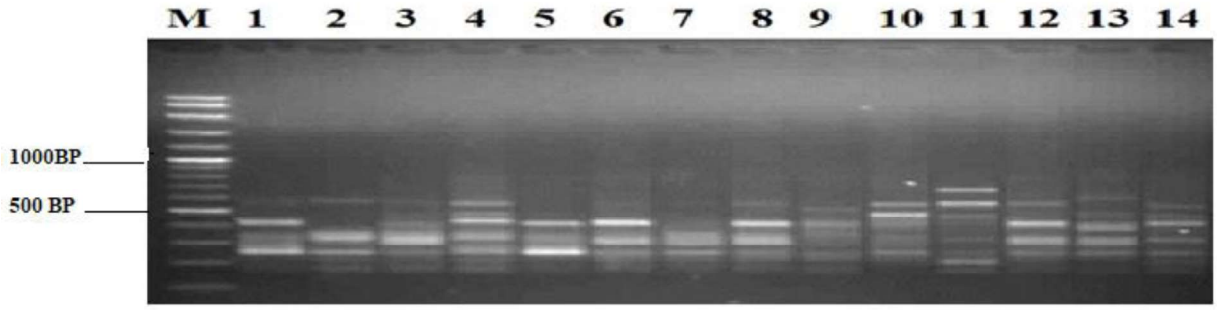
$$PIC = 1 - \sum_{j=1}^{n} p^2{}_{ij}$$

حيث p_{ij} هي نسبة تكرار كل قرين على الموقع المورثي نفسه الناتج عن استخدام البادئ i.

3- النتائج والمناقشة

3-1- التعددية الشكلية Polymorphism

تضمنت الدراسة اختبار الطرز الوراثية المدروسة ويبين الجدول (5) أن 14 بادئةً من البادئات المستخدمة أعطت منتجات تضخيم في تفاعل البلمرة المتسلسل حيث أثبتت هذه البادئات فعاليتها في إعطاء تعددية شكلية بين الطرز المدروسة ونجم عن استخدام هذه البادئات ما مجموعه 94 حزمة، حيث أعطت هذه البادئات تعدديةً شكليةً Polymorphic ونسبة التعددية 85.1%، وهذا تخالف مع كلٍ من (Khatab وزملاؤه، 2019 ؛ Sadeghpour وزملاؤه، 2018 ؛ El-Awady وزملاؤه، 2012 ؛ Khatab و Samah ، 2013 ؛ Vasileva ، 2018 ؛ Shayan وزملاؤه ،2019) من حيث عدد البادئات المستخدمة وعدد الحزم الكلية والنسبة المئوية للتعددية الشكلية ومعامل التعددية الشكلية . كما تراوح عدد الحزم لكل بادئة بين حزمةً واحدةً كأقل عدد مع البادئة ($ISSR_{13}$) وعشرة حزم كأعلى عدد مع البادئة ($ISSR_1$، $ISSR_3$، $ISSR_6$، $ISSR_{11}$) بمتوسط 6.7 حزمةً لكل بادئة، وكانت النسبة المئوية للتعددية الشكلية الأقل مع البادئة ($ISSR_5$) بمقدار 62.7% والأكبر مع البادئات ($ISSR_7$–$ISSR_9$–$ISSR_{10}$–$ISSR_{11}$–$ISSR_{13}$–$ISSR_{14}$) بمقدار 100%. أما باقي البادئات التي أعطت منتجات تضخيم في تفاعل الـPCR فقد أعطت نسبة مئوية للتعددية الشكلية بلغت 100%، وبالنسبة لقيم معامل التعددية الشكلية (PIC) فقد تراوحت ما بين (0.105) كأقل قيمة مع البادئ ($ISSR_{14}$) و(0.498) كأعلى قيمة مع البادئ ($ISSR_7$) بمتوسط عام بلغ (0.336)، وتكمن أهمية التنوع الوراثي (قيمة الـPIC) أنها تزودنا بقوة التمييز لموقع ما على المجين من خلال الأخذ بالحسبان ليس فقط عدد النظائر في الموقع الواحد بل أيضاً التكرار النسبي لتلك النظائر ضمن أفراد الصنف المدروس، بمعنى آخر تعبر قيمة الـPIC عن احتمال أن تمتلك العينات المسحوبة عشوائياً أليلات مختلفة لذات الموقع الوراثي، والشكل (1) يمثل النماذج التي تم الحصول عليها من حزم الـ DNA.



الشكل رقم (1): هلامة الآغاروز 2% لملاحظة التعددية الشكلية

M: المؤشر الجزيئي لتحديد الأوزان وأحجام حزم الحمض النووي DNA. 1- عربي أسود، 2- طرطوس *H. spontaneum* ، 3- طرطوس مزروع، 4- طرطوس *H. bulbosum*، 5- فرات (3)، 6- فرات (9)، 7- حماه *H. spontaneum*، 8- فرات(7)، 9- فرات(6)، 10- دمشق *H. spontaneum* ،11- ريف دمشق *H. spontaneum*، 12- حماه مزروع، 13- حماه *H. bulbosum*، 14- عربي أبيض.

الجدول رقم (5): رموز البادئات المستخدمة، عدد الحزم الكلية والمتباينة والنسبة المئوية للتعددية الشكلية في الطرز الوراثية المدروسة.

اسم البادئ	عدد الحزم الكلية	عدد الحزم المتباينة شكلياً	النسبة المئوية للتعددية الشكلية (%)	معامل التعددية الشكلية (PIC)
$ISSR_1$	10	8	80	0.344
$ISSR_2$	8	6	75	0.323
$ISSR_3$	10	9	90	0.335
$ISSR_4$	6	5	83.3	0.343
$ISSR_5$	8	5	62.5	0.475
$ISSR_6$	10	9	90	0.457
$ISSR_7$	6	6	100	0.498
$ISSR_8$	9	6	66.7	0.239
$ISSR_9$	5	5	100	0.430
$ISSR_{10}$	5	5	100	0.472
$ISSR_{11}$	10	10	100	0.413
$ISSR_{12}$	3	2	66.7	0.176
$ISSR_{13}$	1	1	100	0.153
$ISSR_{14}$	3	3	100	0.105
$ISSR_{15}$	–	–	–	–
$ISSR_{16}$	–	–	–	–
المجموع	94	80	85.1	–
المتوسط	6.7	5.7		0.336

يتبين من الجدول (6) وجود 31 حزمة فريدة (واسمة) للطرز المدروسة، منها 25 حزمة موجودة و6 حزم غائبة، وقد ميزت هذه الحزم الطرز الوراثية المدروسة البرية والمزروعة، حيث امتلك الطراز الوراثي البري (حماه *H. bulbosum*) أكبر عدد من الحزم الفريدة (الموجودة والغائبة) بمعدل (11 حزمة)، في حين بلغ أقل عدد من الحزم الفريدة في الطراز الوراثي البري (حماه *H. spontaneum*) حزمتان، وهذا يدل على التنوع الوراثي الكبير بين الطرز الوراثية المدروسة، والذي استطاعت البادئات المدروسة الكشف عنه. فكلما زاد عدد الحزم الفريدة دل ذلك على وجود تنوع وراثي كبير.

الجدول رقم (6): عدد الحزم الفريدة (الموجودة والغائبة) في طرز الشعير البري والمزروع المدروسة الناتجة عن تطبيق تقنية ISSR

الطراز الوراثي	عدد الحزم الموجودة	عدد الحزم الغائبة	المجموع
عربي أسود	+3	–	3
طرطوس *H. bulbosum*	+4	–	4
فرات 3	+3	−1	4
حماه *H. spontaneum*	+2	–	2
ريف دمشق *H. spontaneum*	+1	−2	3
حماه *H. bulbosum*	+10	−1	11
عربي أبيض	+2	−2	4
المجموع	+25	−6	31

3-2- تحديد درجة القرابة الوراثية بين الأنواع المدروسة

يفيد تحديد درجة القرابة الوراثية ضمن الأنواع في برامج تربية النبات، لتأمين قاعدة وراثية كبيرة، للاستفادة منها في برامج التهجين. وتمت دراسة العلاقة الوراثية بين الطرز الوراثية المدروسة بتطبيق مصفوفة النسب المئوية لعدم التوافق (PDV) Percent Disagreement Values حيث أن ارتفاع قيم هذه المصفوفة يدل على وجود اختلاف وراثي وبازديادها يزداد التباين الوراثي بين الطرازين المدروسين ويتم إنشاء هذه المصفوفة وفقاً لعدد وحدات التضاعف المشتركة بينها (Nei ،1987). نلاحظ من خلال الجدول (7) أن أقل قيمة لـ PDV هي 0.1542 بين الطرازين (حماه مزروع، حماه *H. bulbosum*) وهذا يدل على أنهما على درجة كبيرة من القرابة الوراثية، بينما كانت أعلى قيمة لها 0.5025 بين الطرازين الطرازين (عربي أسود، دمشق *H. spontaneum*) و (طرطوس *H. bulbosum*، ريف دمشق *H. spontaneum*) مما يدل على وجود تباين وراثي كبير بينها.

3-3- التحليل العنقودي Cluster analysis (شجرة القرابة)

يسمح التحليل العنقودي بتقسيم الطرز الوراثية المدروسة إلى مجموعات، وتعكس هذه المجموعات درجة القرابة الوراثية فيما بينها، وقد تتجمع العينات ضمن مجموعة واحدة بناءً على موطنها الأصلي أو على أصلها ونسبها.

أجري التحليل العنقودي للنتائج التي تمّ الحصول عليها وذلك لإنشاء شجرة القرابة الوراثية Dendrogram لتحديد درجة القرابة الوراثية حيث أظهر هذا التحليل الشكل (2) فرعين رئيسين الفرع الأول ضم الطرازين (عربي أسود، عربي أبيض) بمسافة 9.9 بينما ضم الفرع الثاني بقية الطرز المدروسة. أيضاً انقسم الفرع الثاني إلى تحت فرعين انقسم تحت الفرع الأول إلى مجموعتين ضمت المجموعة الأولى الطرازين (طرطوس *H. spontaneum*، طرطوس مزروع) بمسافة 12.7، وضمت المجموعة الثانية الطراز (طرطوس *H. bulbosum*) وهذا يعود إلى التقارب الجغرافي بين الطرز المدروسة. بينما انقسم تحت الفرع الثاني إلى مجموعتين ضمت المجموعة الأولى الطراز (دمشق *H. spontaneum*) وانقسمت المجموعة الثانية إلى تحت مجموعتين ضمت تحت المجموعة الأولى الطُرز (حماه *H. spontaneum*، حماه مزروع، حماه *H. bulbosum*

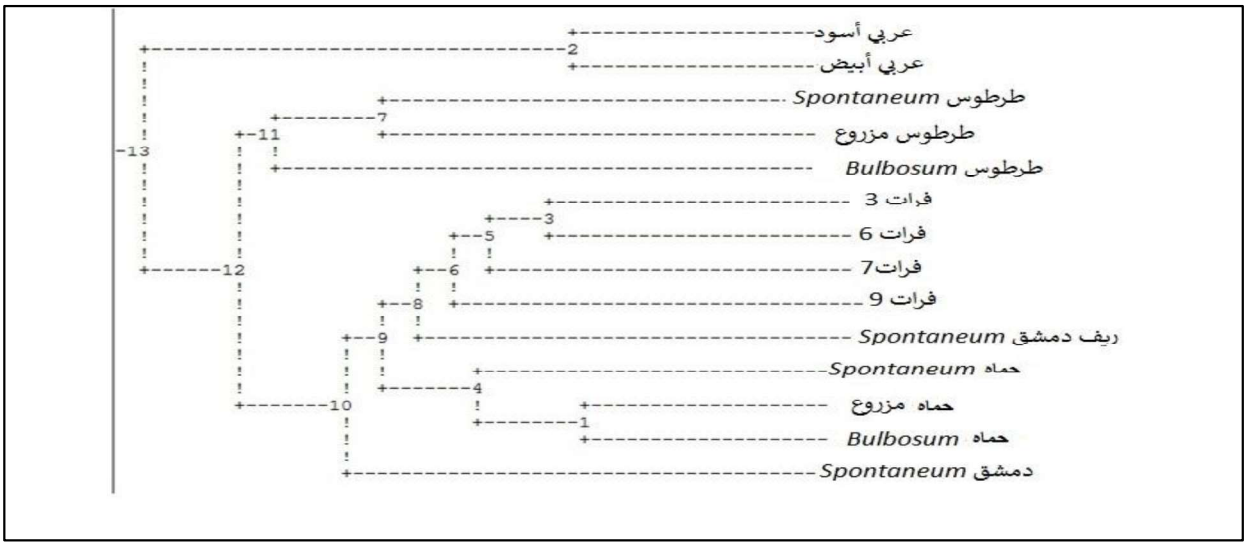
) وهذا يعود أيضاً إلى التقارب الجغرافي بين هذه الطرز، بينما ضمت تحت المجموعة الثانية الطرز (فرات3، فرات6، فرات7، فرات9، ريف دمشق *H. spontaneum*).

من خلال الشكل (2) يتبين أن الطرز البرية لم تنفصل في مجموعة مستقلة وإنما تداخلت مع الأصناف المزروعة لأنه يعتقد وبحسب النشأة الوراثية للشعير فإن الطرز الوراثية المزروعة قد نشأت من استئناس الطرز البرية خلال سنوات عديدة (Yan وزملاؤه ،2015 ؛ Morrell وزملاؤه ، 2014)

الجدول (7) مصفوفة النسب المئوية لعدم التوافق (PDV) بين الطرز المدروسة والناتجة عن تطبيق متوسطات المجموعات الزوجية غير المزانة UPGMA بتطبيق تقانة ISSR حسب Nei (1987).

14	13	12	1 1	10	9	8	7	6	5	4
							3	2	1	
									****	1
								****	0.4616	2
							****	0.2683	0.3132	3
						****	0.3724	0.3018	0.4751	4
					****	0.3365	0.3018	0.3483	0.4484	5
				****	0.2465	0.3603	0.3724	0.3724	0.3971	6
			****	0.3018	0.3724	0.3018	0.3603	0.3603	0.4616	7
		****	0.3132	0.2573	0.2148	0.3483	0.3132	0.3847	0.3603	8
	****	0.2465	0.2905	0.2573	0.1942	0.3483	0.2905	0.3603	0.3603	9
0.2573	0.3248	0.3971	0.3132	0.2683	0.4887		0.3971	0.4751	0.5025	10
										****
0.2252	0.3132	0.3603	0.2573	0.2793	0.5025		0.4097	0.3847	0.4616	11
									****	0.3248
0.2252	0.2465	0.1640	0.2573	0.2793	0.3018		0.3365	0.3847	0.4616	12
								****	0.2905	0.2573
0.1942	0.2358	0.2793	0.2683	0.2683	0.2905		0.3248	0.3248	0.4484	13
							****	0.1542	0.3018	0.2044
0.3483	0.3248	0.4484	0.4353	0.4353	0.4887		0.3018	0.3971	0.1542	14
					****		0.4097	0.4224	0.4484	0.4616

1- عربي أسود، 2- طرطوس ***H. spontaneum*** **، 3- طرطوس مزروع، 4- طرطوس** ***H. bulbosum*** **، 5- فرات (3)، 6- فرات (9)، 7- حماه** ***H. spontaneum*** **، 8- فرات (7)، 9- فرات (6)، 10- دمشق** ***H. spontaneum*** **، 11- ريف دمشق** ***H. spontaneum*** **، 12- حماه مزروع، 13- حماه** ***H.bulbosum*** **، 14- عربي أبيض.**



الشكل رقم (2): شجرة القرابة الوراثية Dendrogram بين الطرز المدروسة

4- الاستنتاجات والمقترحات

1- تمّ استخدام 16 بادئً من البادئات حيث أعطت ما مجموعه 94 حزمة.

2- أظهرت تقانة ISSR فعاليةً في التمييز بين الطرز الوراثية المدروسة حيث كانت النسبة المئوية للتعددية الشكلية 85.1%.

3- تمَّ فصل الطرز المدروسة في شجرة القرابة الوراثية حسب بيئاتها وهذا يمكن أن يساعد في تحديد هوية الطرز الوراثية وتعريفها.

4- يمكن العمل مستقبلاً على تحديد مواقع المورثات المسؤولة عن الصفات المهمة باستخدام QTLs وعزلها للاستفادة منها في برامج التربية واستخدامها كآباء في عمليات التهجين.

5- المراجع

1. تقرير الاعتماد لسلالة الشعير عربي أبيض محسن، البحوث العلمية الزراعية (1993)
2. تقرير الاعتماد لسلالة الشعير فرات4806A ، البحوث العلمية الزراعية، (2000).
3. تقرير الاعتماد لسلالة الشعير فرات5406E، البحوث العلمية الزراعية، (2003).
4. تقرير الاعتماد لسلالة الشعير فرات5337A لمنطقة الاستقرار الثالثة، البحوث العلمية الزراعية، (2001).
5. تقرير الاعتماد لسلالة الشعير فرات5337A، البحوث العلمية الزراعية، (2007).
6. Al_Hadeithi Z. S. M.; (2015). Using ISSR markers to build a phylogenetic of Barley Genotypes. Iraqi Journal of Science, Vol 56, No.2C, pp: 1682-1688
7. Anderson, J.A., G.A. Churchill, J.E. Autrique, S.D. Tanksley and M.E. Sorrells, 1993. Optimization parental selection for genetic linkage maps. Genome, 36: 181-186. DOI: 10.1139/g93-024

8. Canci, P., L.M. Nduulu, R. Dill-Macky, G. Muehlbauer, D. and Smith, p. (2003).Genetic relationship between kernel discoloration and grain protein concentration in barley. Crop Science, 43(5), pp: 1671-1679
9. ChahalG. S. , GosaS. S. (2002). Principles and Procedures of Plant Breeding: Biotechnological and Conventional Approaches. Alpha Science International, 2002 - Science - 604 pages
10. Dellaporta S, J Wood, and JB Hicks. 1983. A plant DNA minipreparation: version II. Plant Mol Biol Rept 1:19–21.
11. El-Awady, M. A. H. M., El-Tarras, A. A. E.-S., & El-Assal, S. E.-D. J. A. J. o. A. S. (2012). Genetic diversity of some saudi barley (Hordeum vulgare L.) landraces based on two types of molecular markers. 9(5), 752 .
12. FAO (Food and Agricultural Organization of The United Nation). 2006 a. Planning for The Future: An Assessment of Food Security Early Warning Systems in Sub-Saharan Africa – Synthesis Report, By J. Tefft, M. Mcguire, and M. Maunder. Prepared for The African Union with Financial Assistance from The European Commission. Rome
13. Ismael A. Khatab , AlmoatazBellah Ali El-Mouhamady, Samah A Mariey and T. A. Elewa (2019). Assessment of Water Deficiency Tolerance Indices and their Relation with ISSR Markers in Barley (Hordeumvulgare L.) Current Science International ISSN: 2077-4435 Volume : 08 | Issue : 01| Jan.- Mar. 2019 Pages: 83-100
14. Kashif, M., and Khaliq.T. (2003). Determination of general and specific combining ability effect in diallel cross in spring wheat. Pakistan Journal of Biological Sciences. 6(18):1616-1620
15. Khatab, I. A., & Samah, M. A. J. C. R. J. o. B. S. (2013). Development of agronomical and molecular genetic markers associated with salt stress tolerance in some barley genotypes. 5(5), 198-204 .
16. Khatab, I. A., El-Mouhamady, A., Mariey, S. A., & Elewa, T. J. C. S. I. (2019). Assessment of water deficiency tolerance indices and their relation with ISSR markers in barley (Hordeum vulgare L.). 8, 83-100 .
17. Maniatis. T, E. F. Fritsch, and J. Sambrook. 1982. Molecular cloning, a laboratory manual (Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory).
18. Morrell, P. L., Gonzales, A. M., Meyer, K. K., and Clegg, M. T. 2014. Resequencing data indicate a modest effect of domestication on diversity in barley: a cultigen with multiple origins. J. Hered. 105: 253–264.

19. Nadeem, M.A., Nawaz, M.A., Shahid, M.Q., Doğan, Y., Comertpay, G., Yıldız, M., Hatipoğlu, R., Ahmad, F., Alsaleh, A., Labhane,N., Özkan, H., Chung,G., & Baloch, F.S. (2018) DNA molecular markers in plant breeding: current status and recent advancements in genomic selection and genome editing, Biotechnology & Biotechnological Equipment, 32:2, 261-285, DOI: 10.1080/13102818.2017.1400401
20. Nei, S.M. (1987).Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. Genetics 89: 583-590.
21. Prabhakar, M; Mark, D. 2002. Ultraviolet Spectroscopy and UV Lasers. New York: Marcel Dekker. ISBN 0-8247-0668-4.
22. Rosenberg NA. 2004. Distruct: a program for the graphical display of population structure. Mol Ecol Notes. 4:137–138.
23. Sadeghpour, F., Shayan, S., Mohammadi, S., Moghaddam Vahed, M., & Ghassemi-Golezani, K. (2018). Genetic diversity of winter barley genotypes using ISSR markers.
24. Samah A. Mareiy1, Mona A. Farid2 and A. R. Karima. 2018 Morphological and Molecular Characterization of Some Egyptian Barley Cultivars under Calcareous Soil conditions, Middle East Journal of Agriculture Research. Volume : 07, Pages:408-420
25. Serwer, Ph. (1983). "Agarose gels: Properties and use for electrophoresis". Electrophoresis 4 (6): 375–382.
26. Shayan, S., Moghaddam Vahed, M., Mohammadi, S. A., Ghassemi Golezani, K., Sadeghpour, F., & Youssefi, A. J. J. o. P. P. (2019). Genetic diversity of winter barley genotypes for root traits and ISSR markers and interrelationship of these characters .
27. Smith J.A.C. & Griffiths H. 1993 Water Deficits: Plant Responses from Cell to Community. Bios Scientific Publishers, Oxford, UK, pp. 1–332.
28. Vasileva, S. J. P. B. (2018). APPLICATION OF HORDEINS AND ISSR MARKERS FOR EVALUATION OF GENETIC DISTANCES IN BARLEY GENOTYPES. 170 .
29. Williams, J.G.K., 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 Research 18 (22): 6531-6535.
30. Yan, S., Sun, D., and Sun, G. 2015. Genetic divergence in domesticated and non-domesticated gene regions of barley chromosomes. PLOS One 10: e0121106.