مجلة جامعة دمشق للعلوم الزراعية . (2016) المجلد (32) . العدد 2 . الصفحات: 31-42

التعددية الشكلية لبروتينات التخزين الهوردئين في طرز الشعير المزروعة والبرية

منار مخول* وحسن عزام** وسلام لاوند ***

الملخَّص

نُفذ البحث في مخبر البيولوجيا الجزيئية التابع للهيئة العامة للتقانة الحيوية في سورية خلال الفترة 2012–2013، حيث استخدمت طريقة SDS-PAGE لتحليل التنوع الوراثي في بروتينات الهوردئين المشفرة من قبل عائلات متعددة المورثات في حبوب 33 طرزاً وراثياً من الشعير المزروع والبري التي جُمعت من عدة مناطق. حدد 13 أليلاً مرتبطاً بالموقع *Hor1* بتكرارية من0.83 إلى 14.17%، و17 أليلاً مرتبطاً بالموقع*Hor2* بتكرارية من0.56 إلى 13.41%، و7 أليلات مرتبطة بالموقع *Hor3* بتكرارية3.63 إلى 30.91%. تراوح عدد الحزم من 8 إلى 26 حسب الطراز الوراثي. فصل التحليل العنقودي طرز الشعير وفق نمط الجينوم الأساسي، حيث تضمن العنقود الأكبر جميع طرز*H.vulgare* و*H.spontaneum* و*H.bulbosum*، وتضمن العنقود الثاني طرز النوعين*H.murinum* و*H.marinum*. أشارت النتائج إلى أهمية استخدام التعددية الشكلية العالية في زمر بروتينات التخزين الهوردئين كأداةٍ ناجحة في تحديد الأنماط الوراثية وتمييزهاعلى أساس نمط الجينوم.

الكلمات المفتاحية: طرز الشعير، SDS-PAGE، التعددية الشكلية، بروتينات التخزين الهوردئين.

* طالب دكتوراه

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

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

Polymorphism of StorageHordein Proteins in Cultivated and Wild Barley

Makhoul, M.[*], H.Azzamand[**], S.Lawand[***]

Abstract

This research was conducted in the Molecular Biology Laboratory, at the National Commission of Biotechnology (NCBT), Syria during the period 2012 - 2013.SDS-PAGE was used to analyze the genetic diversity in the Hordein polypeptides encoded by multigene families in grains of 33genotypes of cultivated and wild barley collected from different regions.Thirteen alleles at the *Hor1* locus with frequencies from 0.83 to14.17%, 17 alleles at the *Hor2* locus with frequencies from 0.56 to 13.41% and 7 alleles at the *Hor3* locus with frequencies from 3.63 to 30.91% had been recognized. The number of bands ranged from 8 to 26, depending on the genotype. The cluster analysis based on Hordein patterns separated the barley genotypes according to their genome types. The largest cluster included all genotypes, which belonged to the species *H.vulgare,H.spontaneumand H.bulbosum.*The second cluster included *H.murinum* and *H.marinum* genotypes. results indicated the relevance of the extensive polymorphism in Hordein patterns as a successful tool in identifying the individual genotypes, which can be roeognized according to the genome type.

Keywords: Barley genotypes, SDS-PAGE, Polymorphism,Storage Hordein Proteins.

[*] Ph.D., student.

[**] Professor, Agronomy Dept., Fac. Agric., Damascus Univ., Syria.

[***] Agronomy Dept., Faculty of AgricuHure. Agric., Damascus Univ., Syria.

المقدمة:

يُعد الشعير (*Hordeum vulgare* L.) من المحاصيل الاستراتيجية التي تدخل ضمن مواد الأمن الغذائي للبشر وللحيوانات على حدٍ سواء، كما يدخل الشعير ضمن الصناعة الغذائية، ويأتي عالمياً في المرتبة الرابعة بعد القمح والرز والذرة الصفراء(FAOSTAT،2010). يمتلك جنس الشعير *Hordeum* تنوعاً حيوياً Biodiversity مميزاً، حيث يضم نحو 32 نوعاً منها الحولي والمعمر، وتمتلك جميعها عدداً أساسياً من الصبغيات (n =7)، في حين تختلف في صيغتها الصبغية (2n) حسب التضاعفات الصبغية Polyploidy ما يساعد في عمليات التربية والتحسين الوراثي للأصناف المزروعة. توصف السلالات المحلية للشعير بشكل عام، بأنها غير متجانسةHeterogeneous (Leino وHagenblad، 2010)، وبالتالي تُعد مصدراً وراثياً قيماً للشعير(شومان وزملاؤها،2007،2001؛ Al- Dakheel وزملاؤه، 2012؛ Muhe وAssefa، 2011).

تُعد المؤشرات الشكلية للتمييز بين الأنواع النباتية وضمنها من أقدم الطرق لدراسة التباين الوراثي، باعتبارها الطريقة الأسهل والأقل تعقيداً، ولازالت تُستخدم إلى الآن، إلا أنها محدودة الإمكانيات، ولا يمكن الاعتماد عليها بشكلٍ كامل في تحديد الاختلافات ودراسات درجات القرابة الوراثية، لذا تمّ اللجوء إلى تطوير تقانات الكيماءالحيوية Biochemical techniques كالرحلان الكهربائي للبروتينات، حيث يتم فيها مقارنة التباينات على هلامة متعدد الأكريلاميد Polyacrylamide، ويُعد البرولامين من بروتينات التخزين الرئيسة في سويداء Endosperm حبوب النجليات. وتُستخدم في دراسة المجتمعات النباتية Population على نطاقٍ واسعٍ، نظراً لتمتعها بمستوى عالٍ من التعددية الشكلية والثباتية، حتى إنه يمكن اعتماد نماذج Patterns ترحيل هذه البروتينات على هلامة متعدد الأكريلاميد والاكتفاء بها فقط في تحديد هوية الأصناف وخصائصها (أشتر،2009؛ Chňapek وزملاؤه،2007). يُضاف إلى ذلك دورها الأساسي في الدراسات التطورية، وتحديد بنية الجينوم، والكشف عن الطفرات، وأخيراً تأثيرها في صناعة الغذاء ونوعية العجين والعلف ومنقوع الشعير Malt (ميرعلي وزملاؤه،1995؛ Dolnik، 2006؛ Cifuentes، 2006؛ Molina-Cano وزملاؤه،2002).

يُعد البرولامين من البروتينات الذّوابة Soluble proteins في الكحول، ويُشكل نحو 35–70% من محتوى البروتين الكلي في حبوب الشعير تبعاً لعوامل البيئة والطراز الوراثي، دون أن يؤثر ذلك في مكونات الهوردئين من الأحماض الأمينية (Marchylo، 1987). وتُصنف بروتينات هوردئين الشعير ضمن ثلاث زمر تبعاً لأوزانها الجزيئية ومكوناتها من الأحماض الأمينية Amino acids (Shewry وTatham،1990؛ Field وزملاؤه، 1982)، حيث تُشكل

الزمرة الأولى B-hordeins نحو 70−80% من بروتينات التخزين، وتضم بروتينات غنية بعنصر الكبريت، تتراوح أوزانها الجزيئية بين 35−46 كيلو دالتون(kDa)، أما الزمرة الثانية C- hordein تشكل 10−12% من بروتينات التخزين، وتحوي بروتينات فقيرة بعنصر الكبريت، تتراوح أوزانها الجزيئية بين 55−75 كيلو دالتون، بينما تضم الزمرة الأخيرة D-hordeins بروتينات ذات وزن جزيئي عالٍ فوق 100 كيلودالتون. كشفت الدراسات أن موقعين وراثيين loci يرمز لهما Hor-1 و Hor-2 يتوضعان على الذراع القصيرة للصبغي رقم 5(1H) يشفران بروتينات B, C-Hordein على التوالي، وتتجمع المورثات في كل موقع على شكل عائلة متعددة المورثات Multigene family (Kanazin وزملاؤه، 1993)، بالمقابل يتوضع الموقع Hor-3 على الذراع الطويلة للصبغي نفسه ويشفر بروتينات D-Hordein (Blake وزملاؤه،1982). تهدف الدراسة إلى تقييم الاختلافات الوراثية بين طرز الشعير المزروع والبري وضمنها، التي تنتمي إلى مجموعات صبغية مختلفة ودراسة القرابة الوراثية فيما بينها، بالإضافة إلى تحليل التباين الوراثي والتعددية الشكلية في زمر الهوردئين D،C،B.

مواد البحث وطرائقه

المادة النباتية:

أجريت الدراسة على خمس مجموعات من الشعير المزروع والبري، تضم 33 طرازاً وراثياً، 12 طرازاً من الشعير المزروع (*H.vulgare*)، 11 طرازاً من الشعير العفوي (*H.spontaneum*)، 5 طرز من الشعير البصلي (*H.bulbosum*)، 3 طرز من *H.murinu m* وطرازين من *H.marinum* الجدول (1).

استخلاص وترحيل بروتينات الهوردئين:

استخلصت بروتينات الهوردئين من حبوب الشعير الناضجة (نبات واحد فقط) وفق طريقة Doll و Andserson (1981)، ونُفذت عملية الرحلان الكهربائي تبعاً لطريقة Laemmli (1970) على هلامة متعدد الأكريلاميد بتركيز 12% واستخدم سلم جزيئي 10-260 كيلو دالتون، ثم وضعت الهلامة بمحلول الصبغ (أزرق كوماسي R-250) وفق طريقة Doll و Andserson (1981)، ثمَّ رُفعت من المحلول ليتم تصويرها بواسطة الماسح الضوئي Microtek Bio-6000T.

الجدول (1): الطرز الوراثية ومواقع الجمع والصيغة الصبغية

المجموعة	النوع	تحت نوع	2n	الجينوم	المدخل /الطراز/ والنسب	الرمز	الموقع	المصدر
1	H. vulgare	subsp. vulagre	2x=14	I	Mr25-84/Att*2//Mari/Aths*2-02(Sel A-22) CYB94-6763-0AP-17AP-0AP-10TR-10TR-0AP	HV1	سورية	ICARDA
					Man/Huiz//M69.69/3/Apm/Rl//H272/4/CP/Bra/5/Joso'S'/6/Hyb 85-6/7/Aths ICB95-0224-0AP-9AP-0AP-8TR-5TR-0AP	HV2	سورية	ICARDA
					Man/Huiz//M69.69/3/Apm/Rl//H272/4/CP/Bra/5/Joso'S'/6/Hyb 85-6/7/Aths ICB95-0224-0AP-9AP-0AP-10TR-5TR-0AP	HV3	سورية	ICARDA
					Harmal	HV4	سورية	ICARDA
					Rihane-03/3/As46/Aths*2//Aths/Lignee686 ICB95-0602-0AP-10AP-0AP-9TR-4TR-0AP	HV5	سورية	ICARDA
					Rihane-03/3/As46/Aths*2//Aths/Lignee686 ICB95-0602-0AP-10AP-0AP-15TR-1TR-0AP	HV6	سورية	ICARDA
					فرات3 / ثنائيالصفوف/	HV7	سورية	GCSAR
					فرات 7 / ثنائي الصفوف/	HV8	سورية	GCSAR
					فرات 9 / ثنائي الصفوف /	HV9	سورية	GCSAR
					عربي أبيض محسن	HV10	سورية	GCSAR
					شعير أسود	HV11	سورية	GCSAR
					Rihane-03/3/As46/Aths*2//Aths/Lignee686 ICB95-0602-0AP-10AP-0AP-11TR-9TR-0AP	HV12	سورية	ICARDA
2	H. vulgare	subsp. spontaneum	2x=14	I	IG39918	HS1	السويداء	ICARDA
					IG121857	HS2	سويداء	ICARDA
					IG40169	HS3	حلب	ICARDA
					IG119438	HS4	حماة	ICARDA
					IG119431	HS5	حمص	ICARDA
					IG40080	HS7	دمشق	ICARDA
					IG40047	HS8	الكرك	ICARDA

					–	HS9	طفس	ICARDA
					IG38639	HS10	الحسكة	ICARDA
					IG39843	HS11	الرقة	ICARDA
					IG39825	HS12	الأردن	ICARDA
3	H. bulbosum	subsp. bulbosum	4x=28	I	–	HB1	حمص	NCBT
					–	HB2	عرنة	NCBT
						HB3	القامشلي	NCBT
					–	HB4	دمشق	NCBT
					–	HB5	السويداء	NCBT
4	H. murinum	subsp. glaucum	2x=14	Xu	IG39948	HMU1	روسيا	ICARDA
		subsp. leporinum	4x=28		IG48945	HMU2	ايران	ICARDA
					144907	HMU3	ليبيا	ICARDA
5	H. marinum	subsp. gussoneanum	x=284	Xa	IG39887	HMA1	قبرص	ICARDA
		subsp.marinum	x=142		IG131621	HMA2	كازاخستان	ICARDA

التحليل الإحصائي:

حُددت الحزم الواضحة والمتكررة، وأشير إلى وجود الحزمة بالرقم (1)، وإلى غيابها بالرقم (0)، باستخدام برنامج تحليل الهلامات (Phoretix 1D v11.5). تمّ تقييم التنوع الوراثي لزمر الهوردئين في كل مجموعة وفق معامل Shannon (Bowman وزملاؤه،1971) حسب المعادلة الآتية:

$$H = -\sum (filnfi)$$

حيث: fi= التكرار الأليلي، وتم حساب التشابه الوراثيGenetic similarity بين المجموعات المدروسة باستخدام معامل Jaccard (1908) حسب المعادلة:

$$GS(ij) = 1 - [\, a/(\, a + b + c\,)\,]$$

حيث: GS(ij)= درجة التشابه بين الفرد j والفرد i. a= عدد حزم البروتين الموجودة في الفردين. b وc عدد الحزم الموجودة بشكل منفرد في أحد الفردين. واعتماداً على مصفوفة التشابه تمَّ رسم الشجرة الوراثية باتباع طريقة المتوسط الحسابي للمجموعات الزوجية غير المزانة (The unweighed pair groups method with Arithmetic mean, UPGMA)، وتمّت جميع التحاليل الإحصائية باستخدام برنامجNTSYS-pcversion 2.1 (Rohlf، 1998).

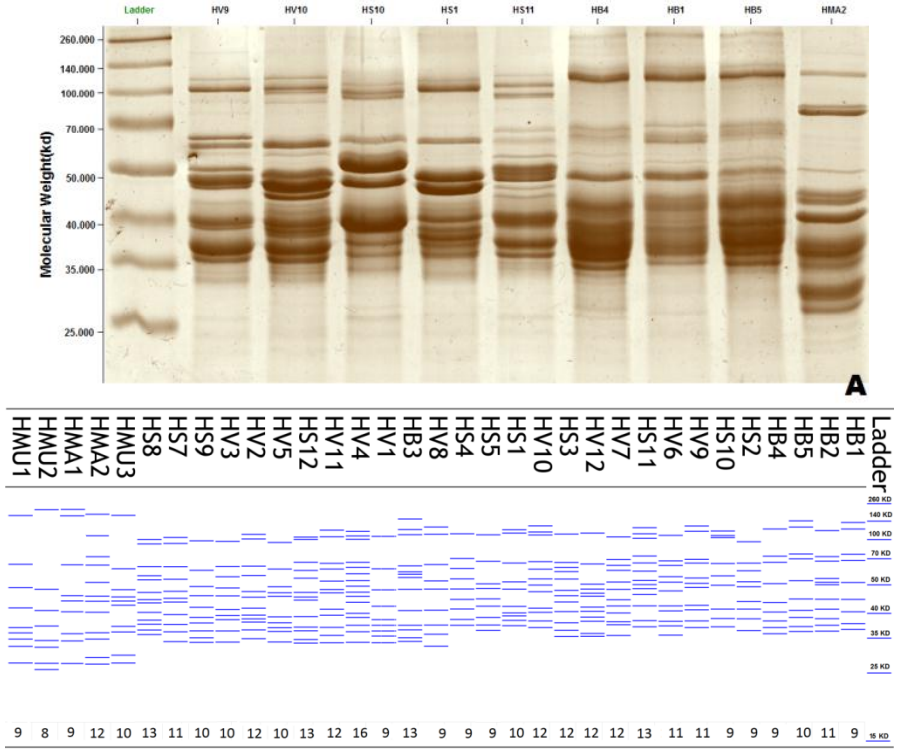
النتائج والمناقشة

أظهرت نتائج الرحلان الكهربائي لبروتينات الهوردئين في جميع الطرز الوراثية المدروسة، أنَّ إجمالي عدد حزم الهوردئين المختلفة 37 حزمة (لاتوجد أي حزمة مشتركة بين جميع الطرز المدروسة). تمَّ تصنيف هذه الحزم تبعاً لوزنها الجزيئي إلى ثلاث زمر D،C،B. كانت بروتينات منطقة D-Hordein الأبطأ هجرة أثناء الرحلان الكهربائي، إذْ استغرق زمن ترحيل أطول للحصول على فصل واضح. ظهرت ضمن هذه المنطقة سبع أليلات Allels، أوزانها الجزيئية أعلى من 100 k Da، وتبعاً لذلك أشير إليها بالرمز .D1 إلى D7، وتخالف هذه النتيجة دراسات كل من Eshghi و Akhundova (2009) و Peltonen وزملاؤه (1994)، حيث لم يجدوا أي تعددية شكلية في المنطقة D. بالمقابل سجل كل من Atanassov وزملاؤه (2001) و Leistrumaite و Paplauskiene (2007) من 3 إلى 6 أليلات في المنطقة D-Hordein. يُبين كل من الشكل (1) و(2) تجمع الجزء الأكبر من الحزم بما يقارب نسبة 80% في منطقتي B و C الموافقة للموقعين الوراثيين Hor-1 و Hor-2 على التوالي، ما يتوافق مع نتائج Shewry وزملاؤه (1995) و Amirouche و Misset (2003). لوحظ 13 أليلاً في المنطقة C-Hordein تتراوح أوزانها الجزيئية بين 85-48 k Da، ونتيجة لذلك رمزت الأليلات من 8−20 بالرمز.C1 إلى C13. أما الأليلات من 21−37 فقد رمزت بالرمز B1 إلىB17، التي تراوحت أوزانها الجزيئية بين 48-25 k Da، وهذا ما أظهرته نتائج Dimova وزملائه(2010) حيث تبين أنّ أكبر تباين بين طرز الشعير كان في المنطقتينB و C.

يُلاحظ من الشكل (1) وجود اختلافات واضحة في كثافة حزم بروتينات الهوردئين وعددها في طرز الشعير المدروسة، إذْ تراوح التباين في عدد الحزم بين الطرز الوراثية بين 16 حزمة في الطرز HV4 (صنف *Harmal*) وثمان حزم في الطراز HMU2. لوحظ وجود اختلافات معنوية في الوزن الجزيئي ضمن المنطقة D، حيث كان الوزن الجزيئي لحزم كل من المجموعتين*vulgare* و *spontaneum* أقل بالمقارنة مع المجموعات الأخرى، وهذا يتفق مع نتائج De Bustos وزملائه (1999)، حيث وجدوا فرقاً بحدود 90 k Da بين الشعير المزروع والشعير البري *H.murinum*في المنطقة D. وتميزت مجموعتا *murinum* و *marinum* بحزم ذات وزن جزيئي منخفض في المنطقة B بالمقارنة مع المجموعات الأخرى.

لوحظ اختلاف في تكرارية الأليلات بين المجموعات المدروسة وضمنها، ويُلاحظ من الجدولين (2 و3) أنّ أليلات C4،C5،C8، C12 كانت الأعلى تكراراً ضمن المنطقة C(>11%)، وB4،B5،B9، B10 في المنطقة B (>10%). تراوحت في المجموعة *vulgare* نسبة تكرار

أليلات المنطقة B من 1.5 إلى 13.6%، وضمن المنطقة C من 2 إلى 16%، وهذا ينسجم مع دراسة Pomortsev وزملائه (2007) المتضمنة تحليل 93 صنفاً من الشعير حيث اكتشف91 أليلاً



الشكل (1):(A) نماذج بروتينات الهوردئين لعدد من العينات المدروسة التي فصلت بطريقة (B) SDS–PAGE. رسم تخطيطي تقريبي لجميع حزم الهوردئين الموجودة في 33 طرازاً وراثياً من الشعير. تُشير الأرقام أسفل الصورة إلى عدد حزم الهوردئين الكلية في كل طراز وراثي. Ladder : السلم الجزيئي يتراوح مجاله بين 15 إلى 260 كيلودالتون.

ضمن منطقتيB وC وبنسبة تكرار تراوحت من 0.11 إلى 8.07% و0.11 إلى 29.34% على التوالي تراوحت نسبة تكرار أليلات المنطقة B في مجموعة *spontaneum* من 1.8 إلى 14%، والمنطقة C من 2.9 إلى 14.3%، وهذا يتفق نتائج Yinوزملاؤه (2003) في الكشف

عن 43 أليلاً ضمن 123 طرازاً من *H.vulgare* subsp .*spontaneum* بتكرارية في المنطقة B تراوحت من 0.8 إلى 32.5%، وفي المنطقة C من 0.8 إلى 22.8%.

الجدول (2): تكرار أليلات (%) C-Hordein وD-Hordein في مجموعات الشعير الخمسة المدروسة.

	مجموعات الشعير					
رقم الأليل	murinum	marinum	bulbosum	spontaneum	vulgare	التكرار الكلي%
D1	33.3	25.0	0.0	0.0	0.0	3.63
D2	33.3	25.0	33.3	0.0	0.0	9.1
D3	33.3	25.0	11.11	5.2	15.0	12.72
D4	0.0	25.0	44.4	10.5	20.0	20.0
D5	0.0	0.0	11.1	36.9	45.0	30.91
D6	0.0	0.0	0.0	26.3	15.0	14.54
D7	0.0	0.0	0.0	21.1	5.0	9.1
n=7	3	4	4	5	5	
رقم الأليل	murinum	marinum	bulbosum	spontaneum	vulgare	التكرار الكلي(%)
C1	0.0	25.0	0.0	0.0	0.0	0.83
C2	0.0	0.0	21.1	2.9	0.0	4.17
C3	0.0	0.0	15.8	4.8	6.0	6.67
C4	0.0	0.0	5.3	14.3	14.0	11.67
C5	20.0	50.0	5.3	9.5	16.0	13.33
C6	20.0	0.0	5.3	12.0	2.0	6.67
C7	0.0	0.0	5.3	4.8	4.0	4.17
C8	0.0	0.0	15.8	14.3	16.0	14.17
C9	0.0	0.0	10.5	4.8	4.0	5
C10	0.0	25.0	10.5	7.1	6.0	7.5
C11	20.0	0.0	0.0	7.1	8.0	6.67
C12	40.0	0.0	5.3	9.5	14.0	11.67
C13	0.0	0.0	0.0	9.5	10.0	7.5
n=13	4	3	10	12	11	

كما تراوحت نسبة التكرار الأليلي في مجموعة *bulbosum* من 5.3 إلى 21.1%، ومن 4.2 إلى 20.9% ضمن C وB على الترتيب، أما بالنسبة لمجموعة *marinum* فقد كانت

نسبة التكرار الأليلي في المنطقة B 7.7 و15.4% و25 و50% في المنطقة C، في حين تميزت المنطقة B في المجموعة *murinum* بنحو. 13 أليلاً بنسبة تكرار تراوحت من5.3 إلى 15.8%، وكانت الأعلى في التنوع الوراثي بين المجموعات 2.527 (جدول4) على الرغم من قلة عدد الطرز الداخلة في التحليل وهذا ينسجم مع نتائج DeBustos وزملاؤه (1999) بوجود تباين كبير في عدد حزم البروتين بين مجتمعات *H.murinum*. في حين كانت نسبة تكرار أليلات المنطقة C ت تراوح بين (20 و40%).

الجدول(3): تكرار أليلات B-Hordein (%) في مجموعات الشعيرالخمسة المدروسة

	مجموعات الشعير					
رقم الأليل	murinum	marinum	bulbosum	spontaneum	vulgare	التكرار الكلي(%)
B1	5.3	15.4	0.0	5.3	6.1	5.59
B2	0.0	0.0	16.7	7.0	1.5	5.03
B3	5.3	15.4	0.0	8.8	1.5	5.03
B4	10.5	0.0	4.2	12.3	13.6	10.61
B5	5.3	15.4	16.7	5.3	12.1	10.06
B6	0.0	0.0	4.2	8.8	9.1	6.7
B7	0.0	0.0	4.7	10.5	4.5	5.59
B8	0.0	0.0	8.3	3.5	10.6	6.15
B9	15.8	0.0	16.7	14.0	13.6	13.41
B10	5.3	7.7	20.9	12.3	6.1	10.06
B11	5.3	7.7	0.0	1.8	3.0	2.79
B12	5.3	7.7	4.2	5.3	10.6	7.26
B13	5.3	7.7	4.2	5.3	6.1	5.59
B14	10.5	0.0	0.0	0.0	1.5	1.68
B15	5.3	7.7	0.0	0.0	0.0	1.12
B16	15.8	15.4	0.0	0.0	0.0	2.79
B17	5.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.56
n=17	13	9	8	13	14	

تمّ حساب التنوع الوراثي لكل زمرة هوردئين في مجموعات الشعير الخمسة كما هو موضح في الجدول رقم (4)، وعند حساب المتوسط الحسابي للتنوع الوراثي لزمر الهوردئين الثلاثة لوحظ أنّ مجموعة *spontaneum* كانت الأعلى تنوعاً بين المجموعات الخمس(2.147)، وهذا يتوافق

مع دراسة Yin وزملاؤه (2003)، وZhang وزملاؤه (1994). كما أشار Nevo (2012) إلى الانتشار الواسع للشعير *H.spontaneum* في بيئات متباينة، وخاصةً تحت ظروف الإجهادات اللاأحيائية يُعد العامل الرئيس لوجود تنوع وراثي كبير ضمن مجتمعات *H.spontameum* ويُلاحظ أيضاً وجود فروقات بين زمر الهودئين الثلاث، حيث كان متوسط زمرة B الأعلى تنوعاً، في حين سجلت الزمرة D أقل مستوى من التنوع الوراثي. ولابدّ من الإشارة إلى أنَّ الاختلاف في الوحدة التصنيفية والتوزع الجغرافي والعوامل البيئية المختلفة وتعدد الصيغ الصبغية ونمط التلقيح Pollination (ذاتي، أو خلطي)، يُضاف إلى ذلك أيضاً عدد الطرز الداخلة في التحليل، يمكن أن يُفسر التباينات بين بروتينات الهوردئين في الطرز موضوع الدراسة.

الجدول(4): التنوع الوراثي لزمر الهوردئين في مجموعات الشعير الخمسة حسب معامل Shannon

الزمرة	*vulgare*	*spontaneum*	*bulbosum*	*murinum*	*marinum*	المتوسط
D-Hordein	*1.4*	*1.447*	*1.217*	*1.1*	*1.386*	1.31
C-Hordein	*2.243*	*2.468*	*2.207*	*1.332*	*1.04*	1.858
B-Hordein	*2.514*	*2.524*	*2.136*	*2.527*	*2.197*	2.3796
المتوسط	*2.052*	*2.146*	*1.853*	*1.653*	*1.541*	

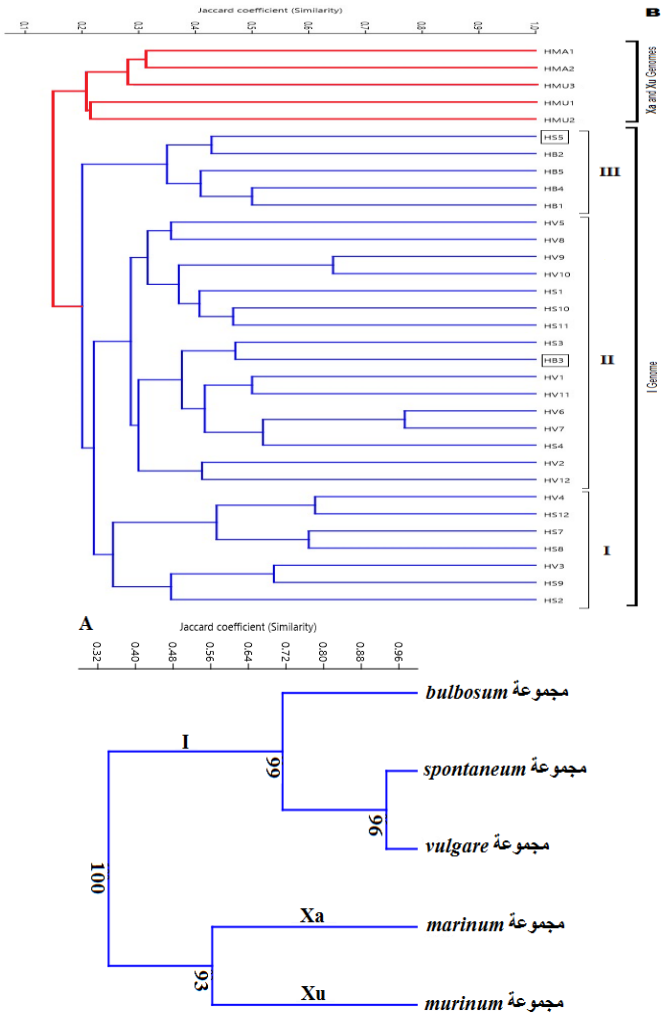
تمّ حساب التشابه الوراثي بين مجموعات الشعير الخمس المدروسة اعتماداً على معامل التشابه Jaccard. ولوحظ في الجدول (5) نسبة تشابه وراثي مرتفعة جداً بين مجموعتي *vulagre* و*spontaneum* (0.935)، وهذا يتفق مع عدة دراسات أجريت على المستوى الجزيئي، التي افترضت أنّ *H.vulgare* subsp.*spontaneum* هو السلف البري للشعير المزروع *H.vulgare* subsp.*vulgare* في أنحاء العالم (Zhang وزملاؤه، 1993؛ Jaradat، 1991)، في حين كانت نسبة التشابه بين مجموعة *bulbosum* مع مجموعتي *vulagre* و*spontaneum*0.69 و0.74 على الترتيب، وهذا يتوافق مع الدراسات الجزيئية والكيمياء الحيوية السابقة التي أكدت أنّ الشعير البصلي على علاقة قريبة مع *H.vulagre*، حيث لوحظ نسبة مرتفعة من الازدواج بين الصبغيات عند التهجين بين *H.vulgare* و*H.bulbosum* (Thomas وPickering، 1988). علاوة على ذلك، يشترك النوعان السابقين فقط ودون غيرهما بالجينوم I.

الجدول(5): مصفوفة التشابه الوراثي بين مجموعات الشعير الخمسة

المجموعة	HMU	HMA	HB	HS	HV
HMU	1				
HMA	0.565	1			
HB	330.3	290.	1		
HS	0.388	0.314	420.7	1	
HV	0.428	0.314	870.6	0.935	1

ورسمت شجرة القرابة الوراثية بين الطرز المدروسة وفقاً لمعامل التشابه Jaccard باستخدام طريقة (UPGMA) ويبين الشكل (2-B) أن الطرز الوراثية أدرجت ضمن عنقودين رئيسين، شمل العنقود الأول طرز مجموعتي *marinum* و*murinum*. أما طرز باقي المجموعات فقد انضوت ضمن العنقود الثاني، الذي انقسم بدوره إلى تحت عنقودين اثنين Sub-clusters. شمل تحت العنقود الأول معظم طرز مجموعة) *bulbosum* (HS5،HB5،HB4،HB2،HB1) باستثناء الطراز HB3. أما تحت العنقود الثاني فانقسم إلى فرعين تضمنت طرز مجموعتي *vulgare* و*spontaneum* باستثناء العينةHS5 التي تجمعت مع طرز مجموعة *bulbosum*.

ودعمت نتائج الشجرة الوراثية باستخدام معاملCophenetic correlation coefficient (r =0.814) الذي تتراوح قيمته ضمن المجال [0−1]، ما تدل على مدى مصداقية توزع الطرز المدروسة في الشجرة الوراثية.



الشكل (2): (A) شجرة التحليل العنقودي يبين مجموعات الشعير الخمس، (B) شجرة التحليل العنقودي لقرابة 33 طرازاً وراثياً من الشعير المزروع والبري، حيث تم التحليل اعتماداً على قيم معامل التشابه الوراثي Jaccard'scoefficient ورسمت الشجرة وفق طريقةUPGMA.

أظهر تحليل شجرة القرابة الوراثية أنَّ الطرز الوراثية توزعت حسب نمط الجينوم، وهذا ما ظهر جلياً عند رسم شجرة القرابة الوراثية بين مجموعات الشعير الخمس في الشكل (2-A)، هذا التوزع ينسجم مع نتائج EL Rabey وزملاؤه (2013،2014) بعد تطبيقه تقنية AFLP وSDS-PAGE على60 طرازاً من الشعيرالمزروع والبري، وفصلت شجرة القرابة الوراثية بين الطرز المدروسة بناءً على نمط الجينوم. كما وجد Jørgensen (1986) أنَّ أنواع الشعير فصلت بشكلٍ واضح إلى أربع مجموعات تقابل الجينومات الأساسية عند دراسة التباين في بروتينات الحبوب. في دراستنا تجمع كل من طرز المجموعة *H.murinum* رباعية Tetraploid وثنائية الصيغة الصبغية Diploid في العنقود نفسه، ما يُشير إلى احتمال حدوث تضاعف صبغي ذاتي، حيث يشتركان بالجينوم Xu نفسه (Kakeda وزملاؤه، 2009)، وبالمثل فقد ظهر كل من *gussoneanum* (4X) و*H. marinum* (2X) subsp. *marinum* في المجموعة نفسها في إشارة إلى امتلاكهما الجينوم ذاته Xa، ما يتفق تماماً مع نتائج Svitashev وزملاؤه (1994) وBothmer وزملاؤه (1989).

الاستنتاجات

1- كشفت طريقة SDS-PAGE عن اختلافات جوهرية بين بروتينات التخزين الهوردئين، وعلى الرغم من القدرة المتواضعة لهذه الطريقة في كشف التباينات، وبالتالي إمكانية استخدام نماذج بروتينات الهوردئين كمؤشر جيد للمقارنة بين الطرز الوراثية ودراسة القرابة الوراثية.
2- أظهرت هذه الدراسة 17 و13 و7 أليلاً مختلفاً ضمن مناطق الهوردئين B وC وD على التوالي.
3- كان متوسط التنوع الوراثي للزمرة B هوردئين الأعلى قيمة بالمقارنة مع الزمرتين C وD الأقل تنوعاً.
4- تميزت المجموعتان*H. marinum* و*H. murinum* بحزم البروتين ذات الأوزان الجزيئية الأعلى في المنطقة D وبالحزم ذات الأوزان الأقل في المنطقة B بالمقارنة مع المجموعات الأخرى.
5- استطاع تحليل بروتينات التخزين أن يفصل طرز الشعير المدروسة وفق نمط الجينوم الأساسي، وكانت أعلى درجة قرابة وراثية (0.935) بين المجموعتين *H. vulgare* و*H. spontaneum*.

التوصيات

1- استخدام كل من التقنيات (Acid-PAGE, SDS-PAGE,IEF) للحصول على فكرة شاملة عن تباين بروتينات التخزين ضمن طرز الشعير.
2- استثمار التعددية الشكلية لبروتينات الهوردئين الناتجة عن الطفرات في تحسين القيمة الغذائية لحبوب الشعير، نظراً لما تتسم به هذه البروتينات من قدرة عالية على تحمل الطفرات، وذلك من خلال تحديد التتابعات النيكليوتيدتة لمورثات الهوردئين الثلاثة وتحديد نسبة الأحماض الأمينية في كل زمرة على حدة، إضافةً إلى دراسة التعبير المورثي لهذه المورثات خلال تطور الحبوب بهدف فهم آلية عملها خلال تشكل الحبوب.
3- يتعين علينا في المستقبل استخدام خرائطQTL وتقدير المسافة بين المورثات المسؤولة عن الصفات الفينولوجية والمورثات المشفرة لبروتينات الهوردئين، بسبب وجود علاقة مهمة بين نسبة بروتينات B-Hordein والصفات التطورية للشعير.

كلمة شكرAcknowledgment: نتوجه بالشكر إلى كل من المهندسة بثينة السلامة (الهيئة العامة للتقانة الحيوية- دمشق) على ما قدمته من مساعدة قيمة، والأستاذ الدكتور فواز العظمة (كلية الزراعة- جامعة دمشق) على ما أدلى به من ملاحظات مهمة.

المراجع العربية

- أشتر، سها.2009. تقييم بعض الطرز الوراثية من الأقماح السورية (السداسية والرباعية) باستخدام معلمات بيوكيمائية وجزيئية مختلفة. أطروحة دكتوراه، قسم المحاصيل الحقلية، كلية الزراعة، جامعة تشرين.
- شومان، وفاء؛ ومحمد معلا؛ ومحمد العزي الخولاني، وباوم مايكل. 2007. التنوع الوراثي للشعير في اليمن باستخدام مؤشرات المقاطع البسيطة المتكررة (SSR). مجلة جامعة تشرين للدراسات والبحوث العلمية، سلسلة العلوم البيولوجية. 29 (1):181–194.
- شومان، وفاء؛ وحسن غزال؛ وسها أشتر، ومايكل باوم. 2001. التنوع الوراثي في الشعير السوري باستخدام مؤشرات الـ RAPD. مجلة جامعة الملك سعود. (99): 5–33.
- مير علي، نزار؛ ومحمد عماد الدين عرابي؛ وبسام الصفدي. 1995. تقويم قوة العجين وعلاقتها ببروتينات التخزين المفصولة باستخدام الرحلان الكهربائي بغية تمييز الأصناف المحلية والمدخلة من القمح. منشورات هيئة الطاقة الذرية السورية.

المراجع References

- Al-Dakheel, A.J; M. B. Fraj; G. M. Shabbir; and A. Q. M. Al-Gailani. 2012. Evaluation of Batini barley landraces from Oman and breeding lines under various irrigation salinity levels, Agri Sci Res. 2(1): 42-50.
- Amirouche, R; and M. T. Misset. 2003. Hordein polymorphism in diploid and tetraploidmediterranean populations of the *Hordeummurinum* L. complex, Plant Syst. 242:83-99.
- Atanassov, P; C. Bories; M. Zaharieva; and P. Monneveux. 2001. Hordein polymorphism and variation of agromorphological traits in a collection of naked barley, Genet Resour Crop. 48: 353-360.
- Blake, T. K; S. E. Ullrich; and R. A. Nilan. 1982. Mapping of the Hor3 locus encoding D hordein in barley, TheorAppl Genet. 63:367–371.
- Bothmer, R. Von; L. Claesson; J. Flink; and I. Linde-Laursen. 1989. Triple hybridization with cultivated barley (*Hordeumvulgare* L.),Theor Appl Genet. 78: 818-824.

- Bowman, K. D; K. Hutcheson; E. P. Odumand; L. R. Shenton. 1971. Comments on the distribution of indices of diversity, Stat Ecol. 3: 315–359.
- Chňapek, M; M. Vivodík; Z. Gálová; and Ž. Gregáňová. 2007. Identification of barley varieties by gel electrophoresis of grainproteins. Acta Biochim. Pol. 54: 44.
- Cifuentes, A. 2006. Recent advances in the application of capillary electromigration methods for food analysis, Electrophoresis. 27 (1): 283-303.
- De Bustos, A; C. Casanova; C. Soler; and N. Jouve. 1999. Analysis of the genetic diversity of wild Spanish populations of the genus Hordeum through the study of their endosperm proteins, Plant Syst. 214 : 235–249.
- Dimova, D; G. Mihova; D. Vulcheva; D. Vulchev; and I. Ivanova. 2010. Using polymorphism of grain storage proteins for identification of feed barley varieties, Bulg J Agric Sci. 16(4): 436-442.
- Doll, H; and B. Andersen. 1981. Preparation of barley storage protein, Hordein, for analytical sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, Anal Biochem. 115 (1): 61-66.
- Dolnik, V. 2006. Capillary electrophoresis of proteins. Electrophoresis, 27 (1): 126-141.
- El Rabey, H. A; A. L. Al-Malki; K. O. Abulnaja; M. K. Ebrahim, T. Kumosani, and J. A. Khan. 2014. Phylogeny of ten species of the genus *Hordeum* L. as revealed by AFLP markers and seed storage protein electrophoresis, Mol Biol Rep. 41(1): 365-372.
- El Rabey, H; K. F. Abdellatif; M. K. Ebrahim; N. Abbas; J. A. Khan; and E. Komor. 2013. Phylogenetic relationships between Mediterranean and middle-Asian wild species of the genus *Hordeum* L. as revealed by biochemical and molecular markers, Pak J Biol Sci. 16(4):168-174.
- Eshghi, R. and E. Akhundova. 2009. Genetic diversity of the monomeric prolamins and hordein in hlless barley genotypes and their relation with agronomical traits, African J Biotech. 8: 1819-1826.

- FAO. 2010. (Food and Agriculture Organization of the United Nations). FAOSTAT. Rome, Italy.
- Field, J. M; P. R. Shewry; and B. J. Miflin. 1982. The purification and characterization of homologous high molecular weight storage proteins from grain of wheat, rye and barley, Theor Appl Genet. 62: 329–336
- Jaccard, P. 1908. Nouvellesrescherchessur la distribution florale, Bull. Soc Vaud Sci Nat. (44):223-270.
- Jaradat, A. A. 1991. Grain protein variability among populations of wild barley(*Hordeumspontaneum* C. Koch) from Jordan, Theor Appl Genet. 83: 164–168.
- Jørgensen, R. B. 1986. Relationships in the barley genus (Hordeum): an electrophoretic examination of proteins, Hereditas. 104: 273–291.
- Kakeda,K; S. Taketa; and T. Komatsuda. 2009. Molecular phylogenyof the genus Hordeum using thioredoxin-like gene sequences, Breed Sci. 59: 595–60.
- Kanazin, V; E. Ananiev; and T. Blake. 1993. Variability among members of the Hor2 multigene family, Genome. 36: 397-403.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, Nature. 227: 685-680.
- Leino, M. W; and J. Hagenblad. 2010. Nineteenth century seeds reveal the population genetics of landrace barley (*Hordeumvulgare*), Mol Biol Evol. 27(4): 964-973.
- Leistrumaite, A; and V. Paplauskiene. 2007. Genetic resources of springbarley, Analysis of Hordein polymorphism, Bioligiya. 53: 30-33.
- Marchylo, B. A. 1987. Barley cultivar identification by SDS gradient PAGE analysis of hordein, Can J Plant Sci. 67: 927-944.
- Molina-Cano, J. L; A. Sopena; J. P. Polo; C. Bergarecheb; M. A. Moralejoa; J. S. Swanstonc; and S. M. Glidewellc. 2002. Relationships between barley hordeins and malting quality in a mutant of cv. Triumph. II. Genetic and environmental effects on water uptake, J Cereal Sci. 36:39-50

- Muhe, K; and A. Assefa. 2011. Diversity and agronomic potential of barley (*Hordeumvulgare* L.) landraces in variable production system, Ethiopia, World J Agric Sci. 7 (5): 599-603.
- Nevo, E. 2012. Evolution of Wild Barley and Barley Improvement. Roceedings of the 11th International Barley Genetic Symposium, April15–20, Hangzhou, China.
- Peltonen, J; H. Rita; R. Aikasalo; and S. Hom.1994. Hordein and malting quality in northern barleys. Hereditas. 120: 231-239.
- Pomorstev, A. A; S. P. Martynov; and E. V. Lialina. 2007. Hordein locuspolymorphism of cultivated barley (*Hordeumvulgare* L.) in Turkey, Russ J Genet. 43: 1294-1300.
- Rohlf, F. J. 1998. NTSYS-PC.Numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.1.Exeter Software, Setauket, NY.
- Shewry, P; J. Napier; and A. Tatham. 1995. Seed storage proteins: structures and biosynthesis. Plant Cell. 7:945-956.
- Shewry, P. R; and A. S. Tatham. 1990. The prolamine storage proteins of cereal seeds: structure and evolution, Biochem J. 267: 1-12.
- Svitashev, S; T. Bryngelsson; A. Vershinin; C. Pederesen; T. Sa¨ll and R. von Bothmer. 1994. Phylogenetic analysis of the genus Hordeum using repetitive DNA sequences, TheorAppl Genet. 89: 801-810.
- Thomas, H. M; and R. A. Pickering. 1988. The cytogenetics of a triploid *Hordeumbulbosum* and of some of its hybrids and trisomic derivatives, Theor Appl Genet. 76: 93-96.
- Yin, Q. Y; D. Q. Ma; and Y. Ding. 2003. Analysis of genetic diversity of hordein in wildclose relatives of barley from Tibet, TheorAppl Genet. 107: 837-842.
- Zhang, Q; G. P. Yan; X. Dai; and J. Z. Sun.1994. A comparativeanalysis of genetic polymorphism in wild and cultivated barleyfrom Tibet using isozyme and ribosomal DNA markers, Genome. 37:631–638.

- Zhang, Q; M. A. Maroof; and A. Kleinhofs. 1993. Comparative diversity analysis of RFLPs and isozymes within and among populations of *Hordeumvulgare* ssp. s*pontaneum*, Genetics. 134: 909-916.

Received	**2015/03/29**	**إيداع البحث**
Accepted for Publ.	**2015/01/16**	**قبول البحث للنشر**