تحديد درجة القرابة الوراثية لطرز من عشب السعد الأرجواني (*Cyperus rotundus* L.) في سورية

محمد عدنان أحمد، غسان إبراهيم* وعبد النبي بشير

قسم وقاية النبات، كلية الهندسة الزراعية، جامعة دمشق، سورية.

*البريد الإلكتروني للباحث المراسل: weeddam@yahoo.com

الملخص

أحمد، محمد عدنان، غسان إبراهيم وعبد النبي بشير. 2025. تحديد درجة القرابة الوراثية لطرز من عشب السعد الأرجواني (*Cyperus rotundus* L.) في سورية. مجلة وقاية النبات العربية، 43(4):561–569. https://doi.org/10.22268/AJPP-001355

هدف هذا البحث إلى تحديد درجة القرابة الوراثية بين 17 طرزاً من السعد باستخدام تقنية ISSR (التكرارات البسيطة الترادفية الداخلية) المعتمدة على التفاعل التسلسلي للبوليميراز (PCR). استخدم لهذا الغرض 17 بادئةً، أثبتت 15 منها فعاليتها في إعطاء تعددية شكلية بين الطرز المدروسة، ونجم عن استخدامها ما مجموعه 62 حزمة، وبلغ أقل عدد للحزم (2 حزمة) مع البادئة ISSR5 و 6 حزم كأعلى عدد مع البادئة ISSR2. بلغت نسبة التعددية الشكلية 94.77%. كما وجد أن أعلى قيمة لمصفوفة النسب المئوية للتوافق PDV بلغت 0.9886 بين الطرازين (كلية الهندسة الزراعية، جامعة دمشق، صافيتا) مما يدلّ على وجود تباين وراثي كبير بينها، في حين بلغت أقل قيمة لـ PDV 0.2348 بين الطرازين (شهبا والمزرعة من محافظة السويداء) مما يشير على أنهما على درجة كبيرة من القرابة الوراثية. انفصلت شجرة القرابة الوراثية إلى تحت عنقودين رئيسين، حيث ضمّ العنقود الأول الطرز المجموعة من المنطقة الجنوبية (كلية الهندسة الزراعية، دمشق)، شهبا والمزرعة في محافظة السويداء وهما على درجة عالية من القرابة الوراثية، ودرعا وخان أرنبة (محافظة القنيطرة). بينما ضمّ العنقود الثاني تحت عنقودين، حيث ضمّ تحت العنقود الأول الطرز الوراثية لمحافظة اللاذقية وطرطوس في حين ضمّ تحت العنقود الثاني الطرز المجموعة من المنطقة الوسطى (مدينة حماة، ووادي العيون قي محافظة حماة) وتلكلخ وفاحل من محافظة حمص، أي أن الطرز المدروسة لنبات السعد قد تجمعت في عناقيد حسب توزعها الجغرافي.

كلمات مفتاحية: السعد الأرجواني، *Cyperus rotundus*، القرابة الوراثية، ISSR، سورية.

المقدمة

ينتمي عشب السعد إلى الفصيلة السعدية (Cyperaceae) ورتبة القبئيات (Cyperales)، وهو من أكثر أنواع النباتات غير المزروعة التي تم بحثها على نطاق واسع. إن الاعتماد على الصفات الشكلية لدراسة التنوع النباتي غير كاف، وبشكل خاص عند وجود تقارب كبير بين النباتات المدروسة (Chowdhury *et al*., 2002). تعدّ التباينات الشكلية من المعايير الأولى التي استخدمت في عملية التوصيف والتصنيف ودراسة التباينات ما بين وضمن الأنواع المختلفة، إلا أنه في الآونة الأخيرة وفي ظلّ التطور المتسارع في علم التقانات الحيوية، اكتشفت معايير ومؤشرات أكثر دقة يمكنها تحقيق هذا الهدف وتطويره، وأهمها دراسة التنوع الوراثي باستخدام المعلمات الجزيئية التي تستند على معلومات مأخوذة من جزيئة الحمض النووي الريبي منقوص الأوكسجين DNA والتي تسمح بالتمييز ما بين فردين محددين. لقد تطورت المؤشرات الجزيئية بشكل كبير وتعددت أنواعها والمبدأ الذي تعتمد عليه وكذلك استخداماتها وتطبيقاتها (Paterson *et al*., 1991).

إن التباينات التي تُكشف باستخدام المعلمات الجزيئية هي ناتجة عن اختلافات في التركيب النيكليوتيدي لجزيئة الحمض النووي الريبي منقوص الأوكسجين DNA وليست عن تأثر بالظروف البيئية، ولا تتأثر نتائجها بعمر ونوع النسيج النباتي المستخدم في الدراسة، وبالتالي من الممكن إجراء الدراسة الجزيئية في أي طور من أطوار النمو، وسرعة الحصول على النتائج ودقتها، والقدرة على كشف نسبة أكبر من التباينات الوراثية، وتغطية كافة مناطق مجين (Genome) النبات. كذلك يمكن استخدام المؤشرات الجزيئية بشكل فاعل في تحاليل التنوع الوراثي وتقدير التشابه الوراثي (Powell *et al*., 1997؛ Sankar *et al*., 2013؛ Stich *et al*., 2010). كما أنها تختصر الزمن إضافة إلى خفضها للتكاليف المادية (سيد، 2001).

https://doi.org/10.22268/AJPP-001355
© 2025 الجمعية العربية لوقاية النبات Arab Society for Plant Protection

تعتمد تقنيات المعلمات الجزيئية على التفاعل التسلسلي للبوليميراز (PCR)، حيث يقوم هذا التفاعل بمضاعفة قطع محددة من الحمض النووي الريبي منقوص الأوكسجين وذلك باستخدام بادئات عشوائية أو متخصصة مصممة لهذا الهدف، مما يسمح بالحصول على ملايين النسخ المضاعفة من قطعة واحدة من الحمض النووي الريبي منقوص الأوكسجين (Weising & Gardner, 1999).

طُور التفاعل التسلسلي للبوليميراز من قبل Saiki *et al.* (1985) الذي كان له أثراً مهماً على صعيد الدراسات الوراثية الجزيئية، ويقوم هذا التفاعل بمضاعفة قطع محددة من الحمض الريبي النووي (DNA) باستخدام بادئات عشوائية مثل تقنية RAPD، أو متخصصة مثل تقنية SSR مصممة لهذا الهدف، أو متخصصة، مما يسمح بالحصول على ملايين النسخ المضاعفة من قطعة واحدة من الحمض الريبي النووي (DNA) التي تتضاعف أسياً، وذلك باستخدام دورات حرارية متعددة (سيد، 2001 ؛ Ayad *et al.*, 1997؛ Karp *et al.*, 1997). تعد تقنية التكرارات الترادفية البسيطة الداخلية (Inter simple sequence repeats- ISSR) (Zietkiewicz *et al.*, 1994) واحدةً من التقانات المهمة المعتمدة على التفاعل التسلسلي للبوليميراز للأسباب التالية: تضخم منطقة التكرارات الترادفية البسيطة وتستخدم بادئاً وحيداً مؤلفاً من نكليوتيدات متكررة ومحاطاً في بعض الأحيان بـ 2-4 نيكليوتيدات إما في المنطقة 3' أو5' وعادةً ما يضخم ISSR 25–50 منتجاً في التفاعل الواحد. كما توصف تقنية ISSR بأنها أكثر تكرارية من تقنية RAPD بسبب طول البادئ المستخدم والذي يعكس درجة حرارة عالية لمرحلة تشفع البادئات (Chowdhury *et al*., 2002)، وإمكانية الكشف عن التتاليات النيكليوتيدية ذات السيادة في التوريث ووفرتها في مجينات حقيقيات النوى النباتية، ولا تحتاج إلى معلومات عن التسلسل المجيني المدروس (Senthilvel *et al*., 2008؛ Tautz & Renz, 1984).

إن الفائدة الرئيسة لهذه التقنية هي أنّها لا تتطلب وقتاً طويلاً لبناء المكتبة الوراثية، وعلى الرغم من حقيقة أنّ الـISSR تورث كمعلمات سائدة وأحياناً غير سائدة، إلّا أنّها معلمات ذات طبيعة عشوائية، فهي مناسبة بشكلٍ خاص لدراسات علم الوراثة العرقي وتقييم التنوع الوراثي وتحديد الأصناف (Cavan *et al.*, 2000؛ Korbin *et al.*, 2002؛ Nagaraju *et al.*, 2002). إنّ بساطة معلمات ISSR تزيد من إمكانية استعمالها في الوسم المجيني (Ammiraju *et al.*, 2001). توصف تقنية الـ ISSR بأنها أكثر تكرارية من تقنية RAPD، بسبب طول البادئ المستعمل، الذي يعكس درجة حرارة مرتفعة لمرحلة تشفع البادئات (Bornet & Branchard, 2001؛ Chowdhury *et al.*, 2002)، كما تتميز بوفرتها ووجودها في مجينات حقيقيات النوى النباتية، ولا تحتاج إلى معلومات عن التسلسل المجيني المدروس (Tautz & Renz, 1984). أضف إلى ذلك أنّ نتائجها ثابتة عند تكرارها، وهي سريعة، كما أنّها تتطلب كمية قليلة من الحمض النووي DNA، ويمكن ميكنتها، حيث يمكن تبادل البادئات بسهولة بين المختبرات بمجرد معرفة تسلسلها النيكليوتيدي، وتكشف نسب متوسطة من التعددية الشكلية (Polymorphism).

قام Long *et al.* (2022) بدراسة التنوع الوراثي باستخدام تقنية التكرارات الترادفية البسيطة الداخلية (ISSR) المعتمدة على الـ PCR لتقييم العلاقة الوراثية بين 24 مجموعة من السعد الأرجواني التي تم جمعها من مناطق مختلفة في الصين، حيث استخدم واحداً وعشرين بادئاً من بادئات ISSR وتم الحصول على 167 حزمة. بلغت النسبة المئوية للتعددية الشكلية 97%، مما يشير إلى مستوى عالٍ من التنوع الوراثي. وانفصلت شجرة القرابة الوراثية حسب المواقع الجغرافية.

تأتي أهمية هذا البحث من خلال تحديد القرابة الوراثية بين مجتمعات نبات السعد تبعاً للمنطقة، مما قد يساعد في تطبيق برامج المكافحة المتكاملة ومدى استجابة العشب لطرائق المكافحة المختلفة وخصوصاً لدراسة مدى الترابط بين مقاومة العشب لمبيدات الأعشاب والطراز البيئي. وتعدّ هذه الدراسة الجزيئية الأولى على هذا النبات في سورية. لذلك هدف هذا البحث إلى تحديد درجة القرابة الوراثية بين 17 طرزاً من السعد باستخدام تقنية التكرارات الترادفية البسيطة (ISSR).

مواد البحث وطرائقه

المادة النباتية وجمع العينات

تم جمع عينات نبات السعد من مناطق مختلفة من محافظات سورية من خلال القيام بالعديد من الجولات الحقلية لجمع النبات من مواقع ومحافظات مختلفة (جدول 1). وأجري العمل في مختبر التقانات الحيوية في مركز بحوث ودراسات المكافحة الحيوية –كلية الهندسة الزراعية بجامعة دمشق خلال العام 2023.

تعقيم الدرنات

تم تعقيم الدرنات قبل زراعتها للحصول على الحمض الريبي النووي منقوص الأوكسجين (DNA) النقي من أجل الدراسة الوراثية، حيث نقعت درنات كل طراز من الطرز المدروسة في مادة الإيتانّول تركيز 70% لمدة 30 ثانّية، ثم نُقلت إلى ثلاثة كؤوس على التوالي يحوي كل منها ماء مقطر معقم، وتُركت في كل كأس لمدة 5 دقائق، ومن ثمّ نُقلت بعدها للبيشر الذي يليه، بعدها نُقلت ووضعت في دورق يحوي مادة كلوروكس 5% وتُركت لمدة 5 دقائق، ثمّ نُقلت لتنقع في الماء المقطر ثلاث مرات لمدة 5 دقائق في كل مرة، وتركت لتجف من أجل استخلاص الحمض الريبي النووي منقوص الأوكسجين DNA.

جدول 1. العينة النباتية ومنطقة الجمع لطرز السعد الأرجواي المدروسة.
Table 1. Plant sample and collection area for the studied purple Saad plant. ecotypes.

رقم الطراز Ecotype No.	مكان الجمع Collection area	المحافظة Governorate
1	جبلة Jableh	اللاذقية Latakia
2	كلية الهندسة الزراعية Faculty of Agricultural Engineering	جامعة اللاذقية Latakia University
3	الدريكيش Drakeesh	طرطوس Tartous
4	صافيتا Safita	طرطوس Tartous
5	القدموس Cadmus	طرطوس Tartous
6	الصفصافة Safsafa	طرطوس Tartous
7	بانياس Baniyas	طرطوس Tartous
8	الشيخ بدر Sheikh Badr	طرطوس Tartous
9	مدينة حماه Hama city	حماه Hama
10	وادي العيون Wadi Al-Oyoun	حماه Hama
11	تلكلخ Talkalakh	حمص Homs
12	فاحل Fahel	حمص Homs
13	المزرعة Almazraea	السويداء Suwayda
14	شهبا Shahba	السويداء Suwayda
15	كلية الهندسة الزراعية Faculty of Agricultural Engineering	جامعة دمشق Damascus University
16	درعا Daraa	درعا Daraa
17	خان أرنبة Khan Arnabeh	القنيطرة Kenitra

عزل الحمض الريبي النووي منقوص الأوكسجين DNA بطريقة SDS

عُزل الحمض الريبي النووي منقوص الأوكسجين DNA وفقاً لطريقة Rogers & Bendich (1989) مع بعض التعديلات، كما يلي: تم طحن 1 غ من الدرنات بوجود الآزوت السائل ونُقلت بعدها إلى أنابيب أبندروف سعة 2 مل وأُضيف لها 1 مل من محلول الاستخلاص (SDS) Sodium dodecyle sulphate، وأضيف بعد ذلك 1 مل من مزيج كل من كلوروفورم وأيزواميل كحول، وثقل المزيج مدة 10 دقائق بسرعة 10000 دورة في الدقيقة. وأُخذت الطبقة العليا والتي تمثل الوسط المائي الذي يحوي الأحماض النووية، والتي عوملت مع Iso-propanol لترسيب الأحماض النووية، ومن ثم التثقيل مرة ثانية من أجل الحصول على DNA، وأُذيبت عينات الحمض الريبي النووي (DNA) في (50µl) من المحلول المنظم TE، وتم استبعاد الحمض الريبي النووي (RNA) بإضافة (2µl) من أنزيم RNase (10 مغ/مل) وحُفظت العينات عند درجة حرارة −20°س لحين الاستخدام.

التقدير الكمي والنوعي لـ DNA بواسطة الأشعة فوق البنفسجية

استُخدم جهاز UV- Spectrophotometer (Power Wave XTM BIO-TEK Instruments, Inc.) لتقدير كمية الحمض الريبي النووي (DNA) وتحديد نقاوته، عن طريق حساب النسبة بين قراءة الموجة 260 نانّومتر والموجة 280 نانّومتر (OD 260/OD 280). تمَّ التقدير النوعي على هلامة الآغاروز تركيزها 0.8% لتحديد نوعية الحمض النووي DNA المستخلصة للتأكد من عدم تقطعها، ثمّ مُدِّدت عينات الحمض النووي DNA للحصول على تركيز 40 نانوغرام/ميكروليتر لتستخدم في التفاعل التسلسلي للبوليميراز.

تطبيق تقنية التكرارات الترادفية البسيطة الداخلية (ISSR)

ضُخّم الحمض الريبي النووي DNA باستعمال 20 بادئة من بادئات تقنية (ISSR) المستخدمة في الدراسة، حُصل عليها من شركة Eurofins Genomics (جدول 2)، كما استعملت 2X PCR Master mix Solution (i-Taq) (25027، iNtRON Biotechnology، كوريا) لتفاعل الـ PCR حيث أجري التفاعل التسلسلي للبوليميراز (PCR) وفقاً لطريقة Lawyer *et al.* (1993) مع بعض التعديلات. أجريت عملية التضخيم لهذا التفاعل وفق البرنامج الحراري التالي: دورة واحدة بدرجة حرارة 94°س مدة 5 دقائق ثمّ 40 دورة للمراحل الآتية: الانفصال عند حرارة 94°س لمدة 30 ثانية ثم الالتحام لمدة 30 ثانية وفق حرارة التحام الموضحة في الجدول 2 ثم الاستطالة لمدة 30 ثانية عند حرارة 72°س، ثمّ تُركت العينات مدة 10 دقائق على حرارة 72°س لإتَّمام التفاعل وحُفظت العينات عند درجة حرارة −20°س لتفصل الحزم بعدها بالرحلان الكهربائي على هلامة الآغاروز.

الترحيل الكهربائي والتلوين والتصوير

رُحل الحمض الريبي النووي منقوص الأكسجين (DNA) على هلامة الآغاروز 0.8% لمعرفة نوعيته، وعلى هلامة الآغاروز 2% لدراسة تقنية ISSR في المحلول المنظم TBE 1X والمضاف إليها 5 ميكروليتر من صبغة الإيثيديوم بروماید (10 ميكروغرام/ميكرولتر)، ليتَّم بعد ذلك الترحيل بمرور حقل كهربائي قدره 100 فولط، لفصل حزم الـ DNA الناتجة عن عملية التضخيم، وصُورت الهلامة بجهاز تصوير هلامة الآغاروز Image Analyzer (Agle Eye II staratagene) (Serwer, 1983).

جدول 2. التسلسل النيكليوتيدي للبادئات المختبرة في تقنية ISSR ودرجة حرارة الالتحام (°س).

Table 2: Nucleotide sequences of the primers tested in the ISSR technique and the docking temperature (°C).

البادئة primer	التسلسل النيكليوتيدي 3' - 5' Nucleotide sequences 5'- 3'	حرارة الالتحام (°س) Annealing temperature (°C)
ISSR1	CACACACACACACACAA	50
ISSR2	ACACACACACACACACT	50
ISSR3	AGAGAGAGAGAGAGAGT	50
ISSR5	CGTCACACACACACACAC	56
ISSR6	CAGCACACACACACACAC	56
ISSR7	CAGCTCTCTCTCTCTCTC	56
ISSR8	GTGTGTGTGTGTGTGTT	50
ISSR9	CTCTCTCTCTCTCTCTCT	54
ISSR10	GAGAGAGAGAGAGAGAT	52
ISSR11	CACACACACACAACAG	52
ISSR12	TCTCTCTCTCTCTCTCC	52
ISSR13	TGTGTGTGTGTGTGTGAA	52
ISSR15	ACACACACACACACACG	52
ISSR16	GGTCACACACACACACAC	56
ISSR35	CACACACACACAACAG	52
ISSR37	TGTGTGTGTGTGTGTGG	52
ISSR40	ACACACACACACACACTT	52

التحليل الإحصائي

طُبِّقت البرامج الإحصائية الخاصة بالتقانات الحيوية المستخدمة لإجراء الدراسة الوراثية لتحليل النتائج، حيث جُمعت نتائج عملية الترحيل الكهربائي في جداول متخصصة اعتماداً على مقارنة وجود أو غياب حزم الحمض الريبي النووي DNA بين النباتات، حيث يعطى الرقم (1) عند وجود حزمة DNA ذات وزن جزيئي محدد عند أي طراز والرقم (0) عند غيابها، ويتضمن ذلك الحزم الواضحة فقط، ونظمت الجداول لكل بادئة على حِده (Zhong *et al*., 2009). وحُددت درجة القرابة الوراثية، ورُسمت شجرة القرابة الوراثية (Dendrogram) بين طرز السعد المدروسة بتطبيق طريقة التحليل العنقودي (Cluster analysis)، باستخدام برنامج Ntsys الإحصائي، حيث يسمح التحليل العنقودي بتقسيم الطرز المدروسة إلى مجموعات تعكس درجة القرابة الوراثية فيما بينها، فمن الممكن أنّ تتجمع العينات ضمن مجموعة واحدة بناءً على موطنها الأصلي، أو بناءً على أصلها ونسبها، ولهذا تُشكَّل مصفوفة النسب المئوية لعدم التوافق (Percent Disagreement Values). يدل ارتفاع قيم هذه المصفوفة على وجود اختلاف وراثي، وبازديادها يزداد التباين الوراثي بين العينات المدروسة (Nei, 1978)، وحُسبت قيم معامل التعددية الشكلية (Polymorphism Information Content) للبادئات المستخدمة حسب Srivastava *et al.* (2019) وفق المعادلة:

$$PIC = 1 - \sum (P_{ij})^2$$

حيث (Pij) تكرارية الحزم i الناتجة عن استخدام البادئ j في جميع العينات المدروسة.

النتائج والمناقشة

التُعددية الشكلية الناتجة عن تقنية ISSR في طرز السعد المدروسة

استخلص الحمض النووي منقوص الأوكسجين (DNA) من كورمات السعد وقيس تركيزه ونقاوته بجهاز المطياف الضوئي. حيث تراوحت التراكيز بين 0.26 و 0.45 ميكروغرام/ميكروليتر وكانت نقاوة العينات بين 1.8– 2.01، ومدد تركيز الحمض النووي DNA ليصبح 40 ميكروغرام/ميكروليتر، وطبقت عملية الرحلان الكهربائي على هلامة الآغاروز بتركيز 0.8% لمعرفة نوعية الحمض النووي DNA المستخدم إذ يظهر الحمض النووي DNA ذو النوعية الجيدة على شكل حزمة.

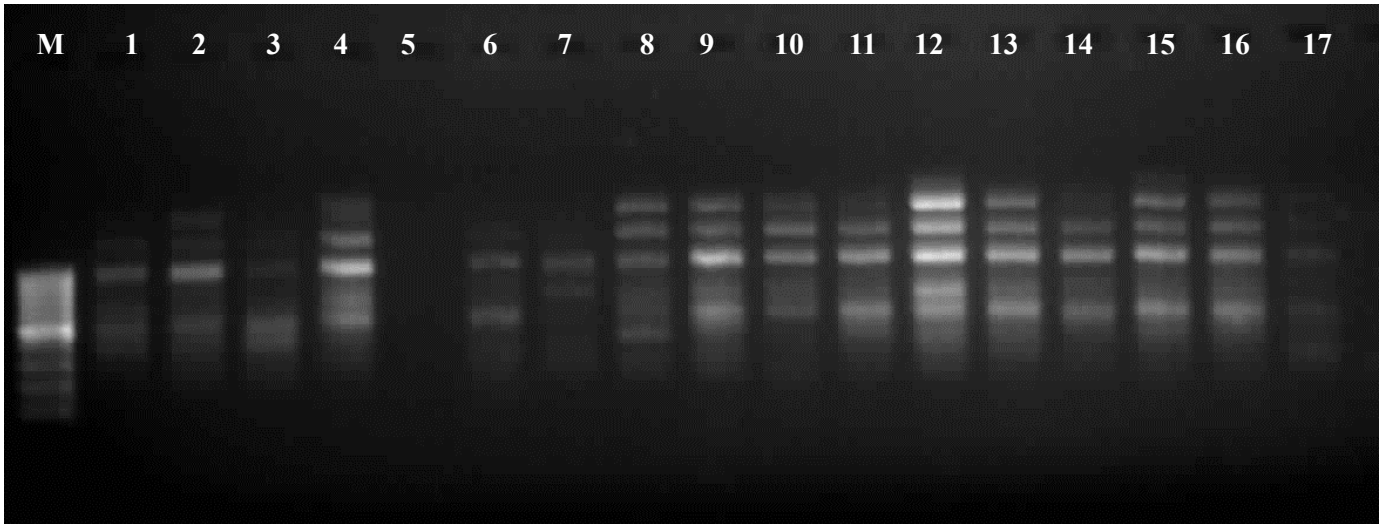
التعددية الشكلية الناتجة عن تطبيق تقانة ISSR

تضمنت الدراسة اختبار الطرز الوراثية المدروسة باستخدام 17 بادئة، ويبين الجدول (3) أن 15 بادئة أعطت منتجات تضخيم في تفاعل البلمرة المتسلسل، في حين لم تعطِ البادئتان ISSR15، ISSR16 أيّ نتائج تضخيم لغياب المواقع المكملة لتسلسلات تلك البادئات، ونجم عن استخدام هذه البادئات ما مجموعه 62 حزمة، وتراوح عدد الحزم الكلية لكل بادئ ما بين 2 حزمة كأقل عدد مع البادئ (ISSR5) و 6 حزمة كأعلى عدد مع البادئ (ISSR2)، أي أن هذه البادئة قد غطت جزء كبير من مجين (جينوم) السعد بمتوسط 4.13 حزمة، كما بلغ عدد الحزم المتعددة شكلياً 59 حزمة بمتوسط 3.39 حزمة، وتراوح عدد الحزم المتباينة شكلياً لكل بادئ بين 2 حزمة كأقل عدد مع البادئ (ISSR5) و 6 حزمة كأعلى عدد مع البادئ (ISSR2)، وبلغت نسبة التعددية الشكلية الكلية 94.77%، حيث كانت الأقل مع البادئة (ISSR10) بمقدار 66.66% تلاه مع البادئتين (ISSR7 – ISSR37) بمقدار 75–80% على التوالي، أما باقي البادئات التي أعطت منتجات تضخيم في تفاعل الـ PCR فقد أعطت نسبة تعددية شكلية بلغت 100%. وبالنسبة لقيم معامل التعددية الشكلية (PIC) فقد تراوحت ما بين (0.11) كأقل قيمة مع البادئ (ISSR6) و 0.49 كأعلى قيمة مع البادئ (ISSR1) بمتوسط 0.362، حيث حُسب معامل التعددية الشكلية (PIC) لكل بادئة على حده، وكلما اقتربت قيمة PIC من (1) كانت المقدرة على تمييز التباينات الوراثية وإظهارها أكبر، ويمكن أن يعطي PIC قيمة (0) عندما تُظهر البادئة حزمة وحيدة ثابتة عند العينات كلها، لذلك يمكن عدّ هذه البادئة غير ذات أهميةٍ في تمييز الطرز الوراثية عن بعضها، حيث أنّها لم تُظهر أيّ تعددية شكلية (جدول 3). ويمثل شكل 1 النماذج التي تم الحصول عليها من حزم الـ DNA.

جدول 3. رموز البادئات المستعملة وعدد الحزم الكلّية والمتباينة شكلياً، النسبة المئوية للتعددية الشكلية، وقيم معامل التعددية الشكلية PIC في الطرز المدروسة من نبات السعد.

Table 3. Symbols of the primers used, the number of total and morphologically distinct bands, the level of polymorphism, and the PIC values in the studied biotypes of purple nutsedge.

محتوى التعددية الشكلية Polymorphism content (PIC)	النسبة المئوية للتعددية الشكلية % Polymorphism rate (%)	عدد الحزم المتباينة شكلياً The number of morphologically distinct bands	عدد الحزم الكلية Number of total bands	البادئات Primers
0.49	100.00	5	5	ISSR1
0.47	100.00	6	6	ISSR2
0.18	100.00	3	3	ISSR3
0.15	100.00	2	2	ISSR5
0.11	100.00	3	3	ISSR6
0.47	80.00	4	5	ISSR7
0.47	100.00	4	4	ISSR8
0.45	100.00	5	5	ISSR9
0.47	66.66	2	3	ISSR10
0.21	100.00	4	4	ISSR11
0.42	100.00	5	5	ISSR12
0.48	100.00	5	5	ISSR13
0.39	100.00	4	4	ISSR 35
0.33	75.00	3	4	ISSR37
0.32	100.00	4	4	ISSR40
-	-	-	-	ISSR15
-	-	-	-	ISSR16
5.44	-	59	62	المجموع Total
0.362	94.77	3.93	4.13	المتوسط Mean



شكل 1. صورة هلامة الآغاروز 2% لملاحظة التعددية الشكلية الناتجة عن استخدام البادئة (ISSR 2) في جميع الطرز المدروسة من نبات السعد، M يمثل المؤشر الجزيئي لتحديد أطوال حزم الحمض النووي DNA. حيث 1 =جبلة، 2 = كلية الهندسة الزراعية، جامعة اللاذقية، 3 = الدريكيش، 4 = صافيتا، 5= القدموس، 6= الصفصافة، =7 بانياس، 8= الشيخ بدر، 9= مدينة حماة، 10 = وادي العيون، 11 = تلكلخ، 12 = شهبا، 13= كلية الهندسة الزراعية، جامعة دمشق، 14 = فاحل، 15 = درعا، 16 = المزرعة، 17 = خان أرنبة.

Figure 1. Image of a 2% agarose gel to observe the polymorphism resulting from the use of the prefix (ISSR 2) in all studied models of the Saad plant. M represents the molecular ladder to determine the size of DNA bands. Where 1= Jableh, 2= Faculty of Agricultural Engineering, Latakia University, 3= Al-Dreikish, 4= Safita, 5= Al-Qadmous, 6= Al-Safsafa, 7= Baniyas, 8= Sheikh Badr, 9= Hama City, 10= Wadi Al-Oyoun, 11= Talkalakh, 12= Shahba, 13= Faculty of Agricultural Engineering, Damascus University, 14= Fahel, 15= Daraa, 16= Al-Mazraa, 17= Khan Arnabeh.

تحديد درجة القرابة الوراثية بين الطرز المدروسة من نبات السعد

تمت دراسة العلاقة الوراثية (درجة القرابة الوراثية) بين الطرز المدروسة من نبات السعد بتطبيق مصفوفة النسب المئوية لعدم التوافق (PDV)، حيث يدل ارتفاع قيم هذه المصفوفة على وجود تباعد وراثي وبتناقصها تزداد القرابة الوراثية بين الطرز المدروسة، ويتم إنشاء هذه المصفوفة وفقاً لعدد وحدات التضاعف المشتركة بينها، نلاحظ من خلال الجدول 4، أن أقل قيمة للـ (PDV) هي 0.2348 بين الطرازين (شهبا والمزرعة من محافظة السويداء) وهذا يدل على أنهما على درجة كبيرة من القرابة الوراثية، بينما كانت أعلى قيمة لها 0.9886 بين الطرازين (كلية الهندسة الزراعية جامعة دمشق– صافيتا) مما يدل على وجود تباين وراثي كبير بينها.

التحليل العنقودي للطرز الوراثية المدروسة من نبات السعد

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

أُجري التحليل العنقودي للنتائج التي تمَّ الحصول عليها بهدف إنشاء شجرة القرابة الوراثية (Dendrogram) لتحديد درجة القرابة الوراثية، ويُلاحظ من الشكل 2 أنّ الطرز المدروسة قد توزعت في عنقودين رئيسين، ضمّ الأوّل الطرز المجموعة من المنطقة الجنوبية (كلية الهندسة الزراعية – دمشق)، (شهبا– المزرعة محافظة السويداء) وهما على درجة عالية من القرابة الوراثية؛ ودرعا وخان أرنبة (محافظة القنيطرة)؛ بينما ضمّ الثاني تحت عنقودين، حيث ضمّ تحت العنقود الأول الطرز الوراثية من محافظة اللاذقية وطرطوس في حين ضمّ تحت العنقود الثاني الطرز المجموعة من المنطقة الوسطى (مدينة حماة– وادي العيون محافظة حماة) و (تلكلخ– فاحل من محافظة حمص). حيث توافقت نتائجنا مع Long *et al.,* 2022.

نستنتج مما سبق أن تقنية ISSR أظهرت فعاليةً في التمييز بين طرز السعد المدروسة، فقد استطاعت 15 بادئة من بادئات ISSR تضخيم 62 حزمة بنسبة تعددية شكلية بلغت 94.77%، وكان متوسط قيم معامل التعددية الشكلية 0.362. كما انفصلت شجرة القرابة الوراثية إلى عنقودين، ضمّ العنقود الأول الطرز المجموعة من المناطق الساحلية والوسطى، وضمّ العنقود الثاني الطرز الوراثية المجموعة من المنطقة الجنوبية أي توزعت الطرز المدروسة من نبات السعد حسب التوزع الجغرافي. لوحظت أعلى درجة قرابة وراثية بين الطرازين الوراثيين شهبا والمزرعة من محافظة السويداء. كذلك لوحظ أنّ أعلى قيمة لمصفوفة النسب المئوية عدم التوافق PDV كانت بين الطرازين كلية الهندسة الزراعية –جامعة دمشق وصافيتا مما يدل على وجود تباعد بينهما، في حين كانت أقل قيمة لـ PDV بين الطراز شهبا والطراز المزرعة مما يدل على وجود تقارب وراثي بينهما.

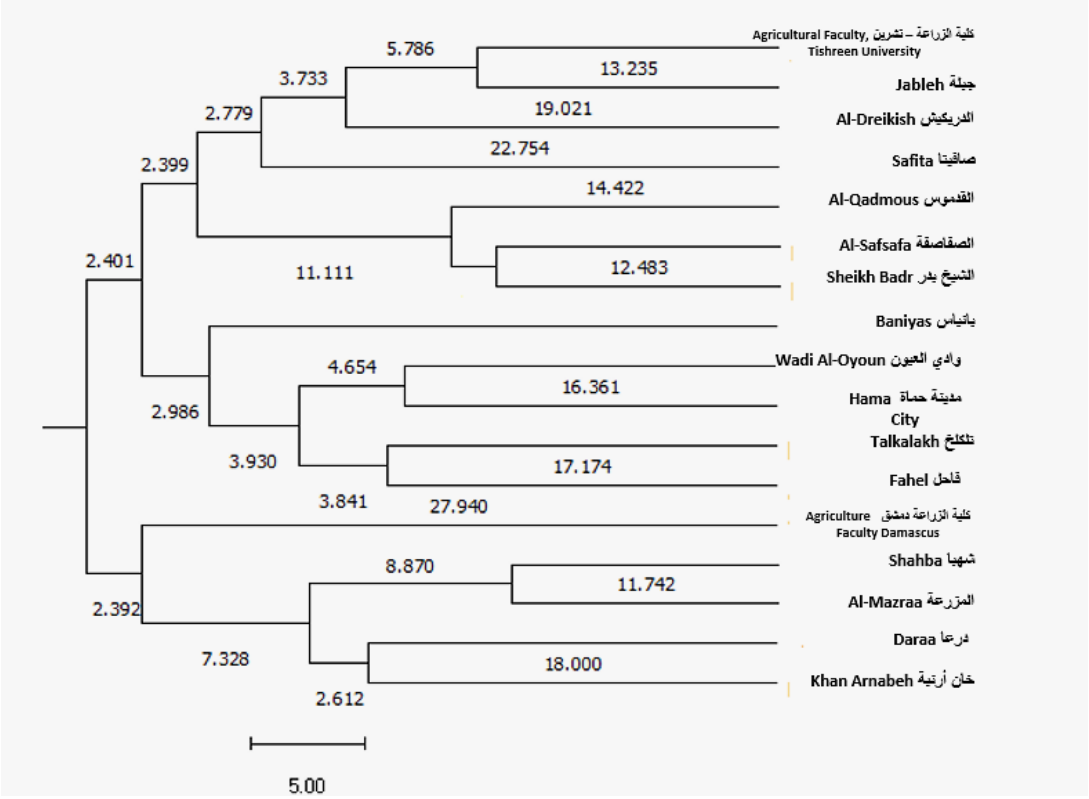
جدول 4. مصفوفة النسب المئوية لعدم التوافق (PDV) بين الطرز المدروسة والناتجة عن تطبيق متوسطات المجموعات الزوجية غير المزانة UPGMA بتطبيق تقنية الـ ISSR.

Table 4. Matrix of the percentages of mismatch (PDV) between the studied biotypes resulting from unbalanced pairwise group averages (UPGMA) and by applying the ISSR technique.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
1	*****																
2	0.3272	*****															
3	0.2497	0.2498	*****														
4	0.5031	0.4654	0.4113	*****													
5	0.4290	0.3600	0.6477	0.4654	*****												
6	0.5031	0.4290	0.6042	0.2647	0.2955	*****											
7	0.6702	0.5423	0.5625	0.5423	0.4290	0.3939	*****										
8	0.6257	0.6702	0.8434	0.9280	0.4290	0.6257	0.5423	*****									
9	0.5225	0.4841	0.6702	0.5225	0.4470	0.4841	0.4842	0.5225	*****								
10	0.5423	0.6257	0.7655	0.7167	0.4654	0.6257	0.3600	0.5831	0.4113	*****							
11	0.6042	0.4841	0.4654	0.6477	0.6042	0.6931	0.5625	0.5624	0.4290	0.3435	*****						
12	0.5625	0.4841	0.4654	0.4470	0.5225	0.4841	0.6931	0.6931	0.5423	0.8434	0.5031	*****					
13	0.7167	0.7655	0.7908	0.9886	0.8168	0.8708	0.9280	0.5831	0.5225	0.7167	0.7908	0.6477	*****				
14	0.6257	0.6258	0.6477	0.5831	0.6257	0.5031	0.7655	0.7655	0.4470	0.5423	0.5625	0.3768	0.4654	*****			
15	0.5031	0.5032	0.5625	0.7655	0.5031	0.6257	0.7167	0.6702	0.4113	0.6257	0.4841	0.3768	0.4290	0.360	*****		
16	0.6477	0.5625	0.6257	0.4113	0.4470	0.4113	0.5625	0.8434	0.5031	0.7908	0.6702	0.2348	0.6931	0.4841	0.4113	*****	
17	0.6042	0.6042	0.5423	0.5225	0.3435	0.4841	0.5225	0.6042	0.3272	0.4470	0.3939	0.5031	0.6477	0.3435	0.6042	0.5031	*****

1 =جبلة، 2 = كلية الهندسة الزراعية، جامعة اللاذقية، 3 = الدريكيش،4 = صافيتا، 5= القدموس، 6= الصفصافة، =7 بانياس، 8= الشيخ بدر، 9= مدينة حماة، 10 = وادي العيون، 11 =تلكلخ، 12 = شهبا، 13= كلية الهندسة الزراعية، جامعة دمشق، 14 = فاحل، 15 = درعا، 16 = المزرعة، 17 = خان أرنبة.

1= Jableh, 2= Faculty of Agricultural Engineering, Latakia University, 3= Al-Dreikish, 4= Safita, 5= Al-Qadmous, 6= Al-Safsafa, 7= Baniyas, 8= Sheikh Badr, 9= Hama City, 10= Wadi Al-Oyoun, 11= Talkalakh, 12= Shahba, 13= Faculty of Agricultural Engineering, Damascus University, 14= Fahel, 15= Daraa, 16= Al-Mazraa, 17= Khan Arnabeh.



شكل 2. التحليل العنقودي للطرز المدروسة من نبات السعد الناتج عن استخدام تقنية ISSR.

Figure 2. Cluster analysis of the studied biotypes of purple nutsedge resulting from the use of the ISSR technique.

Abstract

Ahmad, M.A., A.M. Basheer and G.S. Ibrahim. 2025. Determining the Genetic Relationship of the Purple Nutsedge, *Cyperus rotundus* L. Ecotypes in Syria. Arab journal of Plant Protection, 43(4):561-569.
https://doi.org/10.22268/AJPP-001355

`This study was carried out in 2023 to determine the degree of genetic relationship between 17 ecotypes of purple nutsedge using ISSR (Inter simple sequence repeats) technology based on the polymerase chain reaction (PCR). For this purpose, 17 Primers were used, 15 of which proved effective in showing polymorphism between the studied ecotypes. Their use resulted in a total of 62 bands, and the lowest number of bands was 2 bands with the primer ISSR5 and 6 bands as the highest number with the primer ISSR2, and the polymorphism rate reached 94.77%. It was also found that the highest PDV value of the PDV matrix of concordance was 0.9886 between the two ecotypes (Faculty of Agricultural Engineering, Damascus University and Safita), which indicated the presence of large genetic variation between them, whereas the lowest PDV value was 0.2348 between the two ecotypes Shahba and Al-Mazraa from Suwayda Governorate, suggesting that they have a high degree of genetic relationship. The Dendrogram tree was split into two main clusters, the first cluster included the types collected from the southern region (College of Agricultural Engineering, Damascus, Shahba Al-Mazraa, Suwayda Governorate), and they have a high degree of genetic relatedness, and the second included the types collected from Daraa and Khan Arnaba (Quneitra Governorate). The second cluster was divided to two subclusters, the first subcluster included the genotypes from Latakia and Tartous governorates, whereas the second subcluster included the genotypes collected from the central region (Hama city and Wadi Al-Uyun, Hama governorate) and Talkalakh - Fahel from Homs governorate. The studied ecotypes of purple nutsedge were gathered in clusters based on their geographical distribution.

Keywords: Purple nutsedge, *Cyperus rotundus*, genetic relationship, ISSR, Syria.

Affiliation of authors: *M.A. Ahmad, A.M. Basheer* and G.S. Ibrahim. Department of Plant Protection, Faculty of Agricultural Engineering, Damascus University, Syria. *Email address of the corresponding author: weeddam@yahoo.com*

References

V.S. Gupta and P.K. Ranjekar. 2001. Identification of inter simple sequence repeat (ISSR) markers associated with seed size in wheat. Theoretical and Applied Genetics, 102:726-732. https://doi.org/10.1007/s001220051703

Ayad, W.G., T. Hodgkin, A. Jaradat and V.R. Rao. 1997. Molecular Genetic Techniques for Plant Genetic Resources. IPGRI, Rome. Italy. 137 pp.

المراجع

سيد، محمود هيثم. 2001. استخدام مؤشرات من الدنا DNA في انتخاب مورثات المقاومة للأمراض في الشعير. أطروحة دكتوراه، كلية الزراعة، جامعة دمشق، سورية.

*[**Sayed, M.H.** 2001. Using DNA indicators to select disease resistance genes in barley, Damascus University, Faculty of Agriculture, Ph.D. thesis. (In Arabic)].*

Ammiraju, J.S.S., B.B. Dholakia, D.K.H. Santra, M.D. Lagu, S.A. Tamhankar, H.S. Dhaliwal, V.S. Rao,

Rafalski, J.A., J.M. Vogel, M. Morgante, W. Powell, C. Andre and S.V. Tingey.1996. Generating and Using DNA Markers in Plants. Pp. 75-134. *In:* Nonmammalian Genomic Analysis. B. Birren and E. Lai (eds.), Academic Press. San Diego, USA.

Rogers, S.O. and A.J. Bendich. 1989. Extraction of DNA from plant tissues. Pp. 73-83 In: Plant Molecular Biology Manual. S.B. Gelvin, R.A. Schilperoort and D.P.S. Verma (eds.), Springer, Dordrecht, The Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-009-0951-9

Saiki, R.K., S. Scharf, F. Faloona, K.B. Mullis, G.T. Horn, H.A. Erlich and N. Arnheim. 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science, 230(4732):1350-1354. https://doi.org/10.1126/science.2999980

Sankar, S.M., C.T. Satyavathi, M. Singh, C. Bharadwaj, S.P. Singh, and S. Barthakur. 2013. Genetic Variability and Association Studies in Pearl Millet for Grain Yield and High Temperature Stress Tolerance. Indian Journal of Dryland Agricultural Research and Development, 28:71-76.

Senthilvel, S., B.f. Jayashree, V. Mahalakshmi, P.S. Kumar, S. Nakka, T. Nepolean and C. Hash. 2008. Development and mapping of simple sequence repeat markers for pearl millet from data mining of expressed sequence tags. BMC Plant Biology, 27(8):119. https://doi.org/10.1186/1471-2229-8-119

Serwer, P. 1983. Agarose gels: Properties and use for electrophoresis. Electrophoresis, 4(6):375-382. https://doi.org/10.1002/elps.1150040602

Srivastava, R., R.B.S. Kushwah, V. Lakshmi, S. Bollam, M. Pusuluri, T. Tara and R. Gupta. 2019. Genome-wide association studies (GWAS) and genomic selection (GS) in pearl millet: advances and prospects. Frontiers in Genetics, 10:1389. https://doi.org/10.3389/fgene.2019.01389

Stich, B., B.I. Haussmann, R. Pasam, S. Bhosale, C.T. Hash, A.E. Melchinger and H.K. Parzies. 2010. Patterns of molecular and phenotypic diversity in Pearl Millet [*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.] from west and central Africa and their relation to geographical and environmental parameters. BMC Plant Biology, 10(1):1-10. https://doi.org/10.1186/1471-2229-10-216

Tautz, D. and M. Renz. 1984. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. Nucleic Acids Research, 12(10):4127-4138. https://doi.org/10.1093/nar/12.10.4127

Weising, K. and R.C. Gardner.1999. A set of conserved PCR primers for the analysis of simple sequence repeat polymorphisms in chloroplast genomes of dicotyledonous angiosperms. Genome, 42(1):9-19. https://doi.org/10.1139/g98-104

Wolfe, A.D., Q.Y. Xiang and S.R. Kephart. 1998. Assessing hybridization in natural populations of Penstemon (Scrophulariaceae) using hypervariable inter simple sequence repeat markers. Molecular Ecology, 71(9):1107-1125. https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.1998.00425.x

Bornet, B. and M. Branchard. 2001. Non-anchored inter simple sequence repeat (ISSR) markers: reproducible and specific tools for genome finger printing. Plant Molecular Biology Research, 19:209-215. https://doi.org/10.1007/BF02772892

Cavan, G., V. Potier and S.R. Moss.2000. Genetic diversity of weeds growing in continuous wheat. Weed Research, 40(3):301-310. https://doi.org/10.1046/j.1365-3180.2000.00189.x

Chowdhury, M.A., B. Vandenberg, and T. Warkentin.2002. Cultivar identification and genetic among selected breeding lines and cultivars in Chickpea (*Cicer arietinum* L.). Euphytica, 127:317-325. https://doi.org/10.1023/A:1020366819075

Karp, A., S. Kresovich, K.V. Bhat, W.G. Ayad and T. Hodgkin. 1997. Molecular tools in plant genetic resources conservation: a guide to the technologies. IPGRI Technical Bulletin, 2:9-21.

Korbin, M., Kuras, A. and E. Żurawicz. 2002. Fruit plant germplasm characterization using molecular markers generated in RAPD and ISSR-PCR. Cellular Molecular Biology Letters, 7(2B):785-794.

Lawyer, F.C., S. Stoffel, R.K. Saiki, S.Y. Chang, P.A. Landre, R.D. Abramson and D.H. Gelfand. 1993. High level expression, purification, and enzymatic characterization of full-length Thermus aquaticus DNA polymerase and a truncated form deficient in 5'to 3'exonuclease activity. Genome Research, 2(4):275-287. https://doi.org/10.1101/gr.2.4.275

Long, D., G. Xingxiang, C. Qu, S. Bai, C. Shi, X. Jiang, X. Li, Q. Ju and M. Qu. 2022. Identification of purple nutsedge (*Cyperus rotundus* L.) ecotypes and the effect of environmental factors on tuber sprouting in China. Weed Research, 62(5):360-371. https://doi.org/10.1111/wre.12551

Maniatis, T., E.F. Fritsch and J.K. Sambrook. 1982. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor. New York. 2028pp.

Nagaraju, J., M. Kathirvel, R. Ramesh Kumar, E.A. Siddiq and S.E. Hasnain. 2002. Genetic analysis of traditional and evolved Basmati and non-Basmati rice varieties by using fluorescence-based ISSR-PCR and SSR markers. Proceedings of the National Academy of Science (U.S.A.), 99(9):5836-5841. https://doi.org/10.1073/pnas.042099099

Nei, S.M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. Genetics 89(3):583-590. https://doi.org/10.1093/genetics/89.3.583

Paterson, A.H., Tanksley, S.D. and M.E. Sorrells. 1991. DNA markers in plant improvement. Advances in Agronomy, 46:39-90. https://doi.org/10.1016/S0065-2113(08)60578-7

Powell, W., W.T.B. Thomas, E. Baird, P. Lawrence, A. Booth, B. Harrower and R. Waugh.1997. Analysis of quantitative traits in barley by the use of Amplified Fragment Length Polymorphisms. Heredity, 79(1):48-59. https://doi.org/10.1038/hdy.1997.122

Zietkiewicz, E., J. Rafalski and D. Labuda. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. Genomics, 20(2):176-183. https://doi.org/10.1006/geno.1994.1151

Zhong, C.Y., A.C. Cheng, M.S. Wang, D.K. Zhu, Q.H. Luo, C.D. Zhong and Z. Duan. 2009. Antibiotic susceptibility of *Riemerella anatipestifer* field isolates. Avian diseases, 53(4):601-607. https://doi.org/10.1637/8552-120408-resnote.1

Received: April 28, 2024; Accepted: August 15, 2024

تاريخ الاستلام: 2024/4/28؛ تاريخ الموافقة على النشر: 2024/8/15