Molecular characterization of two tobacco varieties treated with gamma radiation using the ISSR technique

Dr. Saleh koubili*
Dr. Majd Darwish**
Dr. Nizar Moalla***
Manar Alreyahi****

(Received 13 / 6 / 2023. Accepted 30 / 8 /2023)

□ ABSTRACT □

The research was carried out in the Faculty of Agriculture, Tishreen University, the Tobacco Research Center and the Atomic Energy Commission, using the Virginia and Baladi tobacco varieties. The seeds were treated with several doses of gamma radiation (0-100-200-and 300 Gy) to study the effect of radiation at the molecular level using the ISSR technique. The DNA was extracted by CTAB method and amplified by PCR using ISSR technology with 22 primers, The results of amplification in the Virginia variety gave 672 total bundles, with an average of 30.54, of which 62 were morphologically polymorphic, with a rate of 9.2%. In the Baladi variety ,it gave 622 total bundles, with an average of 28.27 for each primer. The number of morphologically multiple bundles was 62, with a rate of 9.96%. In both cultivars, the primer D8 excelled in the total number of bundles produced. The ISSRS results were used to create an UPGMA chart for both varieties, which showed the distribution of coefficients in two main groups: The first group included the Virginia variety, the treatment V3, and the second group included the treatments V-V1-V2 with a genetic distance of 0.25, where V1 and V2 were the closest genetically with a similarity of 95% and the furthest was V3 with a genetic divergence of 25%. In the Baladi variety, treatment B3 was placed in a separate group, and treatments B-B1-B2 were placed in a second group with a genetic distance of 0.25. B1 and B2 were the closest genetically with a similarity of 91%, and the furthest was B3 with a genetic divergence of 23%.The results indicate the effectiveness of the ISSR technique in determining the effect of irradiation among tobacco varieties.

Key words: Nicotiana tabacum – Gamma rays - Molecular characterization – ISSR.

Copyright **:**Tishreen University journal-Syria, The authors retain the copyright under a CC BY-NC-SA 04

* **Professor- department of field crops, Faculty of Agriculture, Tishreen University , Lattakia, Syria. Salehkoubaili@gmail.com).**
****Associate Professor- department of field crops, Faculty of Agriculture, Tishreen University , Lattakia, Syria.majd26@yahoo.com).**
*****Assistant Professor- department of field crops, Faculty of Agriculture, Tishreen University , Lattakia, Syria. nizarrmoualla@gmail.com)**
******Postgraduate (PhD) student in department of field crops, Faculty of Agriculture, Tishreen University , Lattakia, Syria. m33manarm@gmail.com**

التوصيف الجزيئي لصنفين من التبغ معاملين بأشعة غاما باستخدام تقنية ISSR

د. صالح قبيلي*

د. مجد درويش**

د. نزار معلاّ***

منار الرياحي****

(تاريخ الإيداع 13 / 6 / 2023. قبل للنشر في 30 / 8 / 2023)

□ ملخّص □

تمّ تنفيذ البحث في كلية الزراعة جامعة تشرين و مركز بحوث التبغ و هيئة الطاقة الذرية ، باستخدام صنفي التبغ الفيرجينيا والبلدي، تمت معاملة البذور بعدة جرعات من أشعة غاما (0–100–200–and 300 Gy) لدراسة تأثير الأشعة على المستوى الجزيئي باستخدام تقنية ISSR . تمّ استخلاص الحمض النووي بطريقة CTAB و تضخيمه بواسطة تفاعل البلمرة المتسلسل باستخدام تقنية ISSR بوجود 22 بادئة .

أعطت نتائج التضخيم في صنف الفيرجينيا 672 حزمة كلية وبمتوسط 30.54 منها 62 حزمة متعددة شكلياً بنسبة 9.2% ، وفي صنف البلدي أعطت 622 حزمة كلية بمتوسط 28.27 لكل بادئة ، وبلغ عدد الحزم المتعددة شكلياً 62 حزمة بنسبة 9.96% ، ولدى كلا الصنفين تفوقت البادئة D8 في عدد الحزم الكلي الناتج .

استخدمت نتائج ISSRs لإنشاء مخطط UPGMA لكلا الصنفين حيث أظهرت توزع المعاملات في مجموعتين رئيسيتين : ضمت المجموعة الأولى لصنف الفيرجينيا المعاملةV3 و المجموعة الثانية المعاملات V2 – V1 –V ببعد وراثي 0.25، حيث كان V1 و V2 الأقرب وراثياً بنسبة تشابه 95% و الأبعد هو V3 بنسبة تباعد وراثي مقداره 25%. وفي صنف البلدي توضعت المعاملة B3 في مجموعة منفصلة و المعاملات B2– B1 –B في مجموعة ثانية ببعد وراثي 0.25 ، وكان B1 و B2 الأقرب وراثياً بنسبة تشابه 91% و الأبعد هو B3 بنسبة تباعد وراثي 23%.

أثبتت النتائج فعالية تقنية ISSR في تحديد تأثير المعاملة بالأشعة بين أصناف التبغ المعاملة بالأشعة.

الكلمات المفتاحية: تبغ – أشعة غاما– توصيف جزيئي – ISSR.

حقوق النشر : مجلة جامعة تشرين– سورية، يحتفظ المؤلفون بحقوق النشر بموجب الترخيص CC BY–NC–SA 04

*أستاذ –قسم المحاصيل الحقلية– كلية الهندسة الزراعية – جامعة تشرين – اللاذقية – سورية . (Salehkoubaili@gmail.com)

**أستاذ مساعد –قسم المحاصيل الحقلية –كلية الهندسة الزراعية – جامعة تشرين – اللاذقية –سورية (majd26@yahoo.com)

***مدرّس –قسم المحاصيل الحقلية –كلية الهندسة الزراعية – جامعة تشرين– اللاذقية – سورية (nizarmoualla@gmail.com)

****طالبة (دكتوراه) –قسم المحاصيل الحقلية –كلية الهندسة الزراعية – جامعة تشرين – اللاذقية – سورية(m33manarm@gmail.com

مقدمة :

يعدّ التبغ .Nicotiana tabacum L أحد أهم المحاصيل غير الغذائية المزروعة في العالم ، وتتم زراعة أصناف عديدة لها خصائص شكلية و كيميائية مميزة . (Piano *etal* ,2006) و يعتبر من المحاصيل الإقتصادية الهامة في العالم كمادة خام لصناعة السجائر . (Arslan and Okumus ,2006)

تعتبر Nicotiana SPP واحدة من أهم المحاصيل المزروعة على نطاق واسع حول العالم ، تنتمي إلى الفصيلة الباذنجانية Solanaceae التي تضم أكثر من 64 نوع ، أهم الأنواع المزروعة بينها هو Nicotiana *tabacum* (Moon *etal* ,2009)

نشأ التبغ في أمريكا الجنوبية ومن هناك انتشر بسرعة في جميع أنحاء أوربا و أفريقيا و آسيا استراليا. (Albert ,1996) في سوريا ، تزرع العديد من أصناف التبغ ، كصنف شك البنت (البلدي) من تبوغ القوة وبريليب وبصما من الأصناف العطرية ، وزغرين (أبحاث 7) وغرناطة(أبحاث 5) من الأصناف المحايدة (نصف العطرية)، و البرلي والفيرجينيا من التبوغ الأمريكية ، اضافة إلى التنباك المحلي . (التبغ السوري ،1981)

الدراسة المرجعية :

تسبب أشعة غاما أنواع مختلفة من تلف الحمض النووي .(Shirly *etal* ,1992) ، و تؤدي إلى انخفاض معدل انبات البذور ومعدل التكاثر و ضعف حيوية الأجنة والحد من النمو، وإحداث ضرر مثل الحروق المباشرة للأنسجة المكشوفة. (Ryan ,2012) يعتمد تأثر النبات بأشعة غاما على الجرعة و عوامل أخرى مثل الأنواع النباتية ، وعمر النبات والصنف و حجم وحالة جينوم النبات. (Di micco *etal*, 2011) .

أثبتت التجارب أن أشعة غاما أكثر اقتصادية و فعالية مقارنة بالإشعاعات المؤينة الأخرى ، بسبب سهولة توفرها و قوة اختراقها.(Moissa, 2006)

يؤدي تعرض النظام البيولوجي للإشعاع المؤين إلى تنشيط عدد من التفاعلات الفيزيائية و الكيميائية بين الإمتصاص الأولي للطاقة و الإصابة البيولوجية النهائية ، أحد أهم الأهداف هو جزيء الماء الموجود في كل مكان ، ويتم تحفيز التأينات على طول مسار الإشعاع. (Esnault *etal* ,2010)

للجذور الحرة الناتجة عن المعاملة بأشعة غاما تأثير على الحمض النووي والكربوهيدرات و الدهون الغشائية (Suzuki *etal,* 2012) كما تعمل على تعديل مكونات الخلية وقد يظهر هذا التأثير على وظائف الأعضاء و التشريح حسب الجرعات الإشعاعية، وتتضمن هذه التأثيرات تغيرات في بنية الخلايا النباتية والتمثيل الغذائي والضوئي و مضادات الأكسدة و المركبات الفينولية .(Kim *etal,*2004) (wi *etal*,2005)

يمكن للواسمات الجزيئية أن تكشف الإختلافات بين النباتات المشعة وغير المشعة على مستوى الحمض النووي ، وبالتالي توفر أداة أكثر مباشرة وموثوقية و فعالية.(Kumar *etal* , 2006) .

تمّ في الآونة الأخيرة تطوير العديد من الواسمات الجزيئية و استخدامها بشكل متزايد كأسلوب حديث لتمييز الأنماط الجينية للكائنات الحية، توفر هذه التقنية أداة قوية لتحليل تعدد أشكال الحمض النووي و التقييم الجيني و التطور الوراثي و تقييم التنوع الجيني. (Botstein *etal*,1980)

تشمل الفوائد الكبيرة لمعظم الواسمات التحليل السريع والنتائج المفيدة للغاية والإستقلالية عن العوامل البيئية . (Morganet and olivieri ,1993) كما تمّ تطوير تقنيتي التكرار البسيط (SSR) و (ISSR) (Inter Simple Sequence Repeat) من أجل الدراسات الوراثية لنباتات المحاصيل . (Zietkiewicz etal, 1994)

تستخدم العديد من الواسمات الجزيئية، خاصة المعتمدة على تقنية PCR (Polymerase Chain Reaction) المطلوبة والواسعة الإنتشار بسبب بساطتها واحتياجها لكميات صغيرة من عينة الحمض النووي، وتعد تقنية ISSR التي تعتمد على PCR واستخدام البادئات مفيدة لأنها لاتحتاج معلومات جينية سابقة لاستخدامها.
(Bornet and Branchard, 2001)

تتميز تقنية ISSR بالبساطة وتحتاج كميات صغيرة من الحمض النووي ولا تتطلب معلومات عن تسلسل الحمض النووي ، كما يتم تصميم بادئات ISSR من أشكال SSR ويمكن إجراؤها لأي نوع نباتي. (Buhulikar *etal*, 2004) تستخدم تقنية ISSR لتحديد بصمة الحمض النووي ودراسات علم الوراثة (Liu *etal*,2008) واكتشاف أوجه التشابه بين الأنواع وداخلها. (Ghariani *etal* ,2003)

تعتمد تقنية ISSR على تفاعل تضخيم البوليمراز المتسلسل PCR، وتمّ اختيارها كتقنية لحل مشكلة تحديد أصناف التبغ (Bussell *etal* ,2005) كما تمّ استخدامها على نطاق واسع في العديد من النواحي مثل دراسة التنوع الجيني في الشعير (Brantestem *etal,* 2004) وتحليل تعدد الأشكال في القطن , (Liu and Wend,2001) والتعرف على أصناف الزيتون (Terzopoulose *etal* , 2005)

يعد اختيار البادئات المستخدمة في معظم تحاليل التنوع الجيني خطوة مهمة جداً لتفاعل PCR، و تعد الخصائص المطلوبة لبادئات ISSR أن تكون قادرة على إعطاء منتجات متعددة الأشكال و قابلية استنساخ عالية. (Pharmawat *etal* ,2005)

بالرّغم من أن التبغ هو أحد أهم النباتات المزروعة عالمياً ، إلاّ أنه لا يوجد سوى عدد قليل من الدراسات السابقة للتنوع الجيني والعلاقات الوراثية بين أنواع وأصناف التبغ باستخدام الواسمات الجزيئية و خاصة تقنية ISSR (Yang *etal*, 2005)

في دراسة لتحديد الإختلافات الوراثية بين 24 صنفاً من التبغ باستخدام تقنية ISSR ، تمّ تقسيم الأصناف إلى خمس مجموعات رئيسية تحتوي أكبرها على 12 صنف ، وكان مقدار التشابه الوراثي بين 0.66 – 0.85 ، وأشار انخفاض التنوع إلى ضرورة توسيع القاعدة الجينية للتبغ. (Yang *etal,* 2005)

تمت دراسة 96 مدخلاً من التبغ من الصين وخارجها باستخدام تقنية ISSR لمعرفة التنوع الجيني بين الأنواع المزروعة والبرية في جنس Nicotiana ، كان التنوع الوراثي كبير بين الأنواع ، كذلك وجد تباعد وراثي كبير بين التبوغ الشرقية و نوع التباك *Nicotiana rustica* .(Min *etal* , 2012)

دُرست العلاقات الوراثية بين أصناف التبغ المستوردة والمحلية في تايلاند باستخدام تقنية ISSR ، استخدمت20 بادئة تمّ توصيف 11 صنفاً محلياً مشابه مورفولوجياً ووراثياً لبعض الأصناف المستوردة و يمكن أن تكون قد نشأت منها. (Denduangboripant *etal* , 2010)

أظهرت دراسة قام بها (Yang *etal* ,2005) باستخدام تقنية ISSR تشابهاً كبيراً وتنوعاً جينياً منخفضاً بين صنفي التبغ البرلي والفيرجينا.

عُوملت بذور البندورة بأشعة غاما وفق الجرعات (0– 100 – 150 – 200 – 250 gy) و تمّ استخدام تقنية ISSR لمعرفة الفروق بين النباتات المشعة باستخدم عشر بادئات ، أشارت النتائج في شجرة القرابة الوراثية إلى أن قيم التنوع الجيني كانت أقل ما يمكن عند النباتات المعاملة بالجرعة gy200 ، وكانت أعلى قيمة في النباتات المعاملة بالجرعة gy100 وغير المشعة .(El–Fiki *etal*,2021)

قام (Mohamed *etal*, 2021) بمعاملة خمسة أصناف من البطاطا بأشعة غاما و مقارنتها مع النباتات غير المعاملة بالأشعة باستخدام تقنية ISSR، أظهرت النتائج قيمة تشابه جيني مرتفع وصل حتى 93% كما أدت المعاملة إلى تحفيز المقاومة للملوحة. وفي دراسة أخرى قام بها (Al-Hussaini *etal*,2019) لتحسين المقاومة للملح عن طريق معاملة البطاطا بأشعة غاما واستخدام تقنية ISSR مع ستة بادئات بلغت نسبة التباين الوراثي 89.66%

تراوحت نسبة التشابه الوراثي بين بذور Sophora davidii المعاملة بأشعة غاما بين 0.68- 1 ، باستخدام تقنية ISSR ، وأشارت هذه النتائج إلى أن تأثير الجرعات المختلفة من الإشعاع على البذور كان بعيداً عن بعضه. (Wang *etal*,2017)

أهمية البحث و أهدافه:

نظراً لأهمية التبغ كأحد المحاصيل الزراعية غير الغذائية المزروعة في العالم، و كونه من المحاصيل الصناعية الإستراتيجية المزروعة في سورية التي تحقق فرص عمل لعشرات الآلاف من العمال ، من الزراعة حتى التصنيع النهائي ، فإن بحثنا هذا يهدف إلى دراسة تأثير المعاملة بأشعة غاما بمستويات مختلفة على المستوى الجزيئي لصنفي التبغ البلدي و الفيرجينيا .

طرائق البحث ومواده:

مكان تنفيذ البحث : جامعة تشرين - مركز بحوث التبغ - هيئة الطاقة الذرية.

المادة النباتية :تم استخدام بذور صنفين من التبغ المزروع في سورية هما البلدي (شك البنت) و الفيرجينيا.

البلدي: صنف محلي المنشأ. الشكل العام للنبات مخروطي مزدوج، متوسط ارتفاع النبات: 45-50 سم، عدد الأوراق على النبات 13-16 ورقة . يزرع في المرتفعات الجبلية على ارتفاع (350-900 م) عن سطح البحر، بكثافة 13-16 شتلة في المتر المربع الواحد ، مقطوع العنقود الزهري ، و يجفف في المناشر الشمسية، يمتاز بطعمه الخاص والمميز و بقوة تدخين ظاهرة جداً.

الفيرجينيا : صنف زيمبابوي المنشأ. الشكل العام للنبات : مخروطي الشكل، متوسط ارتفاع النبات :185-210 سم ، عدد الأوراق على النبات : 22-25 ورقة، يزرع مروياً في السهول الساحلية ،الكثافة (2.2- 2.5)شتلة في المتر المربع الواحد، العنقود الزهري مقطوع ، يجفف ضمن أفران خاصة بالفيرجينيا ، القوة خفيفة إلى ما دون الوسط العطر جيد مع طعم حلو و مميز.

المعاملة بأشعة غاما :

تمت معاملة بذور كلا الصنفين بأربع جرعات من أشعة غاما في هيئة الطاقة الذرية أربع جرعات لكل صنف هي (0 - 100 - 200 - 300 gy) ، بواسطة جهاز خلية غاما سيزيوم 137 ، معدل الجرعة 217.46 غراي /ساعة في هيئة الطاقة الذرية بدمشق.

زرعت البذور في كؤوس صغيرة و جمعت أوراق الشتول الصغيرة وتم استخلاص الحمض النووي DNA و تقدير كميته بواسطة جهاز المطياف الضوئي Spectrophotometer شركة (Amersham Biociences) و استخدام تقنية ISSR .

استخلاص DNA : وفق (Dorokhov ,1997)

تم وزن 0.5 غ من المادة النباتية الطرية المسحوقة ، و أضيف إليها 10 ميكرو ليتر ايتانول 1% ثم اضافة 800 ميكرو ليتر من محلول الإستخلاص المكون من (200Mm Tris – HCL,PH7.5 ; 25mMNaCl ; 25Mm Na2EDTA ; 0.5% SDS) والمجانسة على الرجاج لمدة 5 ثواني ، و حضنت على حمام مائي بدرجة 65 درجة مئوية لمدة ساعة، ثم إضافة 750 ميكروليتر كلوروفورم ، الرج 5 دقائق بهدوء والتثفيل لمدة 15 دقيقة(12500 د/د) و نقل الرشاحة لأنبوب جديد ثم الترسيب بإضافة نفس الحجم من الإيزوالبروبانول Isopropanol المبرد، ثم إضافة 400 ميكرو ليتر (7.5M Ammonium acetate) مبرد مسبقاً و محفوظ على درجة −20 درجة مئوية في المجمدة لمدة 10 دقائق، و أجري التثفيل على سرعة(12000 د/د) لمدة 15 دقيقة ثم استبعاد الرشاحة و أخذ الراسب، والغسل لمرتين بالكحول 75 % ثم التثفيل على سرعة 12000 د/د لمدة 10 دقائق ، والتجفيف تحت الخيمة العقيمة للتخلص من الكحول حوالي 10 دقائق. تمت إذابة DNA ب 100 ميكروليتر ماء مقطر معقم، ثم تقدير كمية DNA بواسطة جهاز المطياف الضوئي Spectrophotometer عند طول الموجة 260 نانو غرام، وتمّ توحيد تراكيز كافة العينات إلى 10 نانو غرام/ مل .

تقنية ISSR : (Internal Simple sequences repeats)

تمت أمثلة مكونات تفاعل PCR وكان الحجم النهائي لمحلول التفاعل 25 ميكرو ليتر.

تضمن برنامج التضخيم باستعمال جهاز بلمرة متسلسل من نوع Eppendrof وفق المراحل التالية :

- التمسيخ أو الدنترة Denaturation الأولية لفصل جديلتي DNA على حرارة 94 م^0 لمدة خمس دقائق تلاها 40 دورة كل دورة تضمنت كل منها :
  - التمسيخ على حرارة 94 م^0 لمدة ثلاثين ثانية.
  - الالتحام Annealing على حرارة 50م^o لمدة ثلاثين ثانية .
  - الاستطالة Extension على حرارة 72م^o لمدة سبع دقائق .

حفظت نواتج التفاعل على حرارة 4م^o حتى استخدامها.

الرحلان الكهربائي: جرى فصل نواتج تفاعل PCR على هلامة أغاروز 1.8% ضمن محلول دارئ TBE 0.5X ، وأضيف لتلك الهلامة إثيديوم بروميد لكشف حزم DNAL من خلال الضوء فوق البنفسجي (UV) ، واستعمل معلم Ladder DNA (100 bp) ليشير إلى مواقع وحجم الحزم.

تمّ فحص 22 بادئة لكل صنف من الصنفين المعاملين بأشعة غاما بواقع مكررين وفق التراكيز المتبعة .

درست نواتج التضخيم للبادئات المختلفة المستخدمة بمقارنة المسارات الناتجة فيما بينها لكافة العينات المدروسة ، وأُحصيت الحزم على أساس وجود الحزمة (1) أو غيابها (0) ، و أُخذت بالإعتبار الحزم الواضحة فقط و المكررة في اختبارين مستقلين .

لمعرفة درجة القرابة الوراثية بين الأصناف المستخدمة اعتماداً على عدد نواتج التضاعف المشتركة ، حيث تمّ إنشاء مصفوفة النسب المئوية لقيم عدم التوافق للسلالات المدروسة بطريقة UPGMA الموجودة في برنامج STATISTICA لإنشاء المصفوفات وشجرات القرابة الوراثية .

النتائج والمناقشة :

جدول (1) : البادئات المستخدمة في تقنية ISSR لصنفي البلدي الفيرجينيا:

الرقم	البادئة	تسلسل القواعد الآزوتية
1	UBC856	ACACACACACACACA412CYA
2	164.1	AGAGAGAGAGAGAGAGAGAK0GT
3	D8	AGCAGCAGCAGCS
4	A 8	CACACACACACARM
5	A11	CACACACACACARK
6	A38	AGCAGCAGCAGCM
7	C 7	AGCAGCAGCAGCR
8	C 31	AGAGAGAGAGAGAGAGT
9	164/2	AGAGAGAGAGAGAGAGAGAGC
10	UBC857	ACACACACACACACACYG
11	A1	CACACACACACARR
12	A4	CACACACACACARY
13	A28	CACACACACACAS
14	A35	AGCAGCAGCAGCY
15	164.3	ACTGACTGACTGACTG
16	HB10	GAGAGAGAGAGACC
17	HB12	CACCACCACGC
18	A40	AGCAGCAGCAGCK
19	A 25	CACACACACACAK
20	B10	CAGCAGCAGCAGCAG
21	B16	GACAGACAGACAGACA
22	B16	GTGGTGGTGGC

تأثير أشعة غاما على الصنف فيرجينيا :

يوضح الجدول اختلاف الحزم بمقدرتها على التضخيم لدى صنف الفيرجينيا، بلغ عدد الحزم الكلي 672 حزمة بمتوسط 30.54 . تفوقت البادئة D8 على البادئات الأخرى حيث تمكنت من إظهار عدد حزم كلي 35 حزمة مقارنة بباقي البادئات حيث لم تظهر البادئة A35 أي حزمة و أظهرت البادئة A28 حزمة واحدة فقط ، كما بلغ عدد الحزم المتعددة شكلياً 62 حزمة بمتوسط 501 ، و من بين جميع البادئات أعطت البادئة D8 أكبر عدد من الحزم المتعددة شكلياً بلغ ست حزم ، كما بلغت النسبة المئوية للحزم المتعددة شكلياً 9.22% من مجموع الحزم الكلي .

جدول (2) : البادئات المستخدمة في تقنية ISSR مع تسلسلاتها وعدد سطور الحزم

لكل منها وعدد السطور المتعددة الشكلية ، وعدد الحزم الناتجة من التضخيم لصنف الفيرجينيا:

الرقم	البادئة	تسلسل القواعد الآزوتية	مجموع أسس البادئة	عدد السطور	عدد السطور المتعددة الشكلية	النسبة المئوية للسطور المتعددة الشكلية	عدد الحزم الكلي	مجموع حزم التعددية	النسبة المئوية للحزم التعددية
1	UBC856	ACACACACACACACACYA	81	3	1	33.3	9	1	11.1
2	164.1	AGAGAGAGAGAGAGAGAGAGT	28	4	1	25	13	1	7.7
3	D8	AGCAGCAGCAGCS	81	11	6	54.5	35	11	31.4
4	A 8	CACACACACACARM	81	3	0	0	12	0	0

5	A11	CACACACACACARK	81	4	2	50	12	4	33.3
6	A38	AGCAGCAGCAGCM	81	6	4	66.7	14	6	42.9
7	C 7	AGCAGCAGCAGCR	81	1	0	0	4	0	0
8	C 31	AGAGAGAGAGAGAGAGT	81	2	0	0	8	0	0
9	164/2	AGAGAGAGAGAGAGAGAGAGC	28	3	1	33.3	9	1	11.1
10	UBC857	ACACACACACACACACYG	81	3	0	0	12	0	0
11	A1	CACACACACACARR	81	2	1	50	5	1	20
12	A4	CACACACACACARY	81	3	1	33.3	9	1	11.1
13	A28	CACACACACACAS	81	1	0	0	1	0	0
14	A35	AGCAGCAGCAGCY	81	2	0	0	8	0	0
15	164.3	ACTGACTGACTGACTG	81	2	0	0		0	0
16	HB10	GAGAGAGAGAGACC	81	3	1	33.3	10	2	20
17	HB12	CACCACCACGC	88	11	6	54.5	30	10	33.3
18	A40	AGCAGCAGCAGCK	81	1	1	0	4	0	0
19	A 25	CACACACACACAK	81	2	1	50	6	1	16.7
20	B10	CAGCAGCAGCAGCAG	81	1	0	0	4	0	0
21	B16	GACAGACAGACAGACA	81	2	1	50	5	1	20
22	B16	GTGGTGGTGGC	88	3	0	0	12	0	0
المجموع				37	62		672	20	
المتوسط				7.7	2.6	60.7	22.1	2.1	11

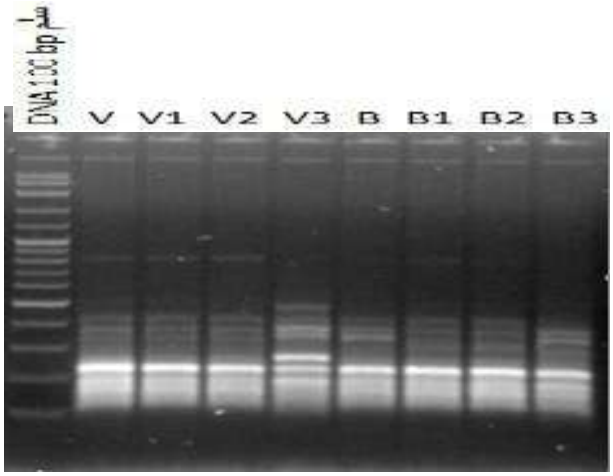
تأثير أشعة غاما على الصنف البلدي:

أظهر الجدول (3) اختلاف الحزم بمقدرتها على التضخيم لدى صنف البلدي، بلغ عدد الحزم الكلي 622 حزمة بمتوسط28.27. تفوقت البادئة D8 على البادئات الأخرى و تمكنت من إظهار عدد حزم كلي 31 حزمة مقارنة بباقي البادئات وكان أقل عدد من الحزم عند البادئة A38 التي أظهرت أربع حزم ، كما بلغ عدد الحزم المتعددة شكلياً 62 حزمة بمتوسط 2.6 ، و من بين جميع البادئات أعطت البادئة HP12 أكبر عدد من الحزم المتعددة شكلياً بلغ ست حزم ، كما بلغت النسبة المئوية للحزم المتعددة شكلياً 9.96% من مجموع الحزم الكلي .

جدول (3): البادئات /المرئسات/ المستخدمة في تقنية ISSR مع تسلسلاتها وعدد سطور الحزم لكل منها وعدد السطور المتعددة الشكلية ، وعدد الحزم الناتجة من التضخيم لصنف البلدي

الرقم	البادئة	تسلسل القواعد الآزوتية	مجموع أسس البادئة	عدد السطور لكل مرئسة	عدد السطور المتعددة الشكلية	النسبة المئوية للسطور المتعددة الشكلية	عدد الحزم الكلي	مجموع حزم التعددية	النسبة المئوية للحزم التعددية
1	UBC856	ACACACACACACACACYA	81	2	0	0	8	0	0
2	164.1	AGAGAGAGAGAGAGAGAGAGT	28	3	0	0	12	0	0
3	D8	AGCAGCAGCAGCS	81	9	3	33.3	31	7	22.6
4	A 8	CACACACACACARM	81	3	1	33.3	10	2	20
5	A11	CACACACACACARK	81	3	1	33.3	10	2	20
6	A38	AGCAGCAGCAGCM	81	5	3	60	12	8	66.7
7	C 7	AGCAGCAGCAGCR	81	1	0	0	4	0	0
8	C 31	AGAGAGAGAGAGAGAGT	81	2	0	0	8	0	0
9	164/2	AGAGAGAGAGAGAGAGAGAGC	28	3	1	33.3	9	1	11.1
10	UBC857	ACACACACACACACACYG	81	3	0	0	12	0	0
11	A1	CACACACACACARR	81	2	0	0	8	0	0

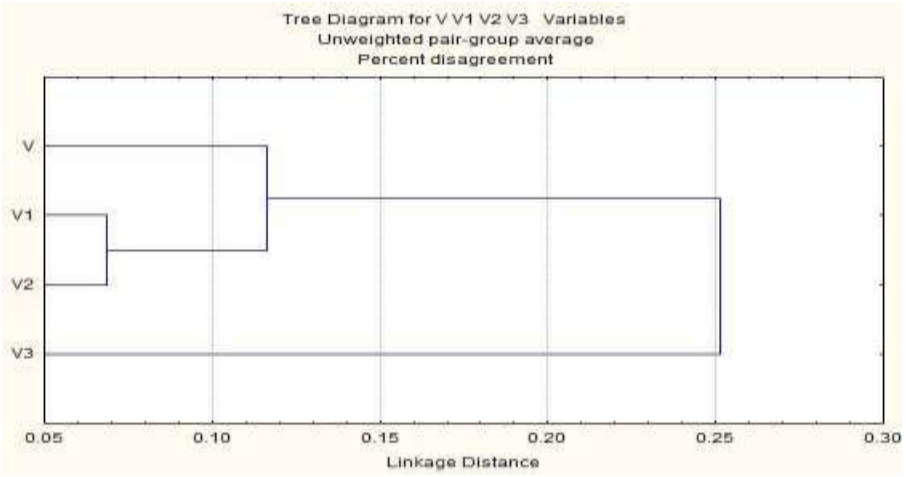
11.1	1	9	33.3	1	3	81	CACACACACACARY	A4	12
33.3	2	6	50	1	2	81	CACACACACACAS	A28	13
27.3	3	11	50	2	4	81	AGCAGCAGCAGCY	A35	14
0	0	8	0	0	2	81	ACTGACTGACTGACTG	164.3	15
0	0	8	0	0	2	81	GAGAGAGAGAGACC	HB10	16
47.8	11	23	66.7	6	9	88	CACCACCACGC	HB12	17
0	0	4	0	0	1	81	AGCAGCAGCAGCK	A40	18
0	0	8	0	0	2	81	CACACACACACAK	A 25	19
0	0	4	0	0	1	81	CAGCAGCAGCAGCAG	B10	20
0	0	4	0	0	1	81	GACAGACAGACAGACA	B16	21
20	2	10	33.3	1	3	88	GTGGTGGTGGC	B16	22
	72	622		62		22			المجموع
26.3	2.2	2.2		2.2		7			المتوسط



الشكل (1): نواتج تضخيم $ISSR_S$ الناتجة عن البادئة D8 المستخدمة للأشكال الوراثية المدروسة للتبغ الصنفين الفيرجينيا والبلدي

أظهر التحليل العنقودي انفصال شجرة القرابة الوراثية شكل (2) للمعاملات إلى مجموعتين ، ضمت المجموعة الأولى V , V1 V2 , و التي بدورها تفرعت إلى تحت مجموعتين الأولى ضمت المجموعة الأولى المعاملة V وضمت الثانية المعاملتين , V1 V2 ، البعد الوراثي بين تحت المجموعتين كان 0.12 ، وبين V1 و V2 كان 0.7، بينما وصل البعد الوراثي بين المجموعة الثانية الحاوية على V3 وبين المجموعة الأولى الحاوية على V2 , V1 , V إلى 0.25 وقد يعود ذلك إلى التأثيرات المختلفة للإشعاع على المادة الوراثية و يتفق مع ما توصل إليه كل من (Wang *etal,*2017) عند معاملة نبات Sophora davidii بأشعة غاما وصلت نسبة التشابه إلى 0.68 ومع (Mohamed *etal*, 2021) عند معاملة البطاطا بأشعة غاما حيث كان التشابه الجيني بنسبة 93%.

التحليل العنقودي :



الشكل (2): شجرة القرابة الوراثية بين الأشكال الوراثية المحللة للتبغ
باستخدام بيانات $ISSR_S$ اعتماداً على نسب عدم التوافق لصنف الفيرجينيا V .

انفصلت شجرة القرابة الوراثية لمعاملات الصنف البلدي إلى مجموعتين رئيسيتين احتوت المجموعة الأولى على المعاملات B2, B1 , B و التي انقسمت أيضاً إلى تحت مجموعتين ضمت الأولى المعاملة B وببعد وراثي 0.17عن تحت المجموعة الثانية التي ضمت B2 , B1 ببعد وراثي 0.9 ،بينما كان البعد الوراثي بين المجموعة الثانية الحاوية على المعاملة B3 والمجموعة الأولى 0.23 ويمكن تفسير ذلك بأن الجرعات المختلفة من أشعة غاما وخاصة الجرعة 300gy تمكنت من إختراق المادة الوراثية وتحفيز نشاط جيني معين وهذا يتوافق مع نتائج كل من (El-Fiki *etal*,2021) الذي كانت نسب التنوع الجيني متباينة باختلاف الجرعات المستخدمة و(Al-Hussaini *etal*,2019)

البلدي B.

الشكل (3): شجرة القرابة الوراثية بين الأشكال الوراثية المحللة للتبغ باستخدام بيانات $ISSR_S$ اعتماداً على نسب عدم التوافق لصنف

الاستنتاجات والتوصيات:

الاستنتاجات:

1-أدت المعاملة بأشعة غاما إلى تأثيرات مختلفة على المستوى الجزيئي لصنفي التبغ البلدي والفيرجينيا ، حيث أعطت نتائج التضخيم بتقنية ISSR و باستخدام 22 بادئة 672 حزمة كلية في الفيرجينيا بنسبة 9.22% للحزم المتعددة شكلياً و 622 حزمة كلية في البلدي بنسبة 9396% للحزم المتعددة شكلياً .

2-تميزت البادئة D8 في كلا الصنفين المدروسين وأعطت35 حزمة كلية و 11 حزمة متعددة .

3- أظهرت شجرة القرابة الوراثية توزع المعاملات لكلا الصنفين في مجموعتين ، توضعت الجرعة الأعلى 300gy في مجموعة منفصلة ببعد وراثي 0.25 للفيرجينيا و 0.23 للبلدي ، بينما كانت الجرعات الثلاثة الباقية في مجموعة واحدة.

التوصيات :

نوصي بمتابعة الدراسة على أصناف أخرى باستخدام جرعات مختلفة من أشعة غاما ، و بواسطة تقنيات جزيئية أخرى مثل RAPD أكثر دقة.

References:

1_PIANO,D.L.,SORRENTINOC,C.,ABET,M.,DIMURG,A.,BABATO,L.,SICIGNANO,M.,C UCINIEHO,A.,OZZOLINO,E.*Genetic polymorphism of tobacco varieties based on ISSR markers.* Coresta congress,Vol.(13),2006 .

2-ARSLAN, B.,and OKUMUS,A. *Genetic and Geographic polymorphism of gultivated Tobacco (Nicotiana tabacum L.) in Turkey.*Genetika ,Vol.(42)2006, 667-671 .

3-MOON, H. S.*Microsatellite_based analysis of tobacco (Nicotiana tabacum L.)genetic resources* .Cropscience,Vol.(49)No.(60) 2009 ,2149-2159 .

4-ALBERT, F. H.*Hill's Economic Botany ,Tata McGraw.*Hill puplishing company limited, Indi,1996 .

5-SHIRLY, W.B.,HANLY, S.,GOODMAN, M.H.*Effect of Ionizing Radiation on a Plant Genome:Analysis of Two Arabidopsis* . Plant cell.Vol.(4) 1992,333.

6-RYAN, L. J.*Ionizing Radiation :The Good ,The bad , and the ugly*, Journal of Invest Dermatol,Vol.(132)No.(9)2012 ,85 .

7-DEMICCOo, V.,ARENA, C.,PIGANALOa, D.,DURANTt, M. *Effect of sparsely and densely ionizing radiation on plants.* Journal of Radiat environ Biophys,Vol.(50),2011 ,1-19 .

8-MOUSSA, J.P. *Role of gamma irradiation of NO3 level rocket (Eruca vescaria subsp. Sativa) plants. Russ.* Journal of plant physiol. Vol.(53) 2006 ,193-197 .

9-ESNAULT, A. M., LEYUE, F., CHENAL, C. *Ionization radiation: advances in plant respons.* Journal of Environ. Expbot. Vol.(68) No.(10)2010 ,231-237 .

10-SUZUKI, N., K, S., MITTELER, R., MILLER, G. *ROS and RODEX signaling in the respons of plants to abiotic stress.* Journal of plant cell Environ. Vol.(35) 2012 ,259-270 .

11-WI, S. C., CHUNG, B. Y., KIM, J. H., BAEK, M. H., YANG, D.H., LEE, J. W., KIM, J.S. *Ultrastructural change of cell organelles in Arabidopsis stem after gamma irradiation.*Journal of Plant Biol. Vol.(48)No.(2) 2005, 195-200 .

12-KIM, J. H., BAEK, M. H., CHUANG, B. Y., WI, S. G., KIM, J .S.*Alteration in the photosynthic pigments and antioxidant machineries of red pepper (Capsicum annum L.) seedlings from gamma – irradiation seeds.* Journal of plant Biotecnology. Vol.(47)No.(2) 2004, 314-321 .

13-KUMAR, S., PRASAD, K. V. and CHOUDHARY, M. L.*Detection of genetic variability among chrysanthemum radiomutants using RAPD markers.* Journal of Curr.Sci. Vol.(90) 2006, 1108-1113 .

14- BOSTEIN, D., WHITEe, R. L., SHOLNICK, M. And DAVID, R. *Construction of a Genetic linkage Map in Man using Restriction Fragment length polymorphisms*. Journal of Hum. Genet. Vol.(32) 1980 ,314-331 .

15-MORGANET, M. and OLIVIER, A. M.*PCR-amplified Micosatellitesas Markers in plant Genetics* .Journal of plant. Vol.(3) 1993 ,175-182 .

16- ZIETKIEWICZ, a., RAFALSTLK, A. and LABUDA, S. *Genome finger printing by Simple Sequence Repeat(SSR) -anchored polymerase chain Reaction Amplification.* Journal of Genomes. Vol.(20) 1994 ,176-183 .

17-BORNET, B. and BRANCHARD, M. *Nonachored Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) Markers: Reproducible fingerprinting.* Journal of plant Molecular Biology. Vol.(19) 2001 ,209-215 .

18-BUHULIKAR, R. A., STANCULESCU, D., PRESTON, C. A. and BAIDWIN, I. T.*ISSR and AFLP Analyses of the Temporal and spatial population structure of the post-fire Annual Nicotiana attenuate in SW Utah.* Journal of BMC Ecology. Vol.(4) 2004 , 1-13

19-LIU, J.J., EKRAMODDOULLAH, A. K. M ., HUNT, R. and ZAMANI, A. *Identification and characterization of RAPD markers inked to amajorgene (cr2) for resistance to cronartium-ribicola (Fish) in Dinusmanticola.* Journal of phytopathology. Vol.(95) 2008 ,395-399 .

20- GHARIANI, S., TRIFI-FARAH, N., CHAKROUN, M., MARGHALI, S .and MARRAKCHI, M. *Gentic diversity in Tunisian perennial ryegrass revealed by ISSR markers Genetic.* Journal of Resources crop. Vol.(50) 2003 , 809-815 .

21-BUSSELLA, J. D., WAYCOT, M. and CHAPPILL, A. *Arbitkarily Amplifed DNA Markers as Characteris for phylogenetic Inference perspect.* Journal of Plant Ecol. Evol. Syst. Vol.(7) 2005 ,3-26 .

22- BRANTESTEM, A. K., BOTHMER, R. V., DAYTEGE, C., RASHAL, I., TUVESSON, S. and WEIBULL, J. *Inter Simple Sequence Repeat Analysis of Genetic Diversity and Relation ship in Gultivated Burly of Nordic and Baltic origin.* Journal of Hereditas. Vol.(141) 2004 ,186-192.

23-LIU, B. and WENDEL, J.F. *Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) Polymorphisim as a Genetic Markers system in cotton.* Journal of Mol. Eco. Notes. Vol.(1) 2001 ,205-208 .

24-TERZOPOULOS, P. J., KOLAMO, B., BEBEIL, p. j., KALTSIKS, J. and METZIDKIS. *Identification of olea europaea L. Gultivars using Inter -Simple Sequence Repeat Markers.* Journal of Scientia Horticulturae. Vol.(105) 2005 ,45-51 .

25- PHARMAWATI, M., YAN, G., and FINNEGAN, P. M. *Molecular variation and Finger printing of Leucadendron cyltivars (Protaeaceae) by ISSR Markers.* Journal of Ann. Bot. Vol.(95) 2005, 1163-1170 .

26- YANG, B. C., XIAO, B. G., CHEN, X. J. and SHI, C. H. *Genetic Diversity of Flue – cured Tobacco varieties Band on ISSR markers.* Journal of Hereditas (Beijing). Vol.(27) 2005, 753-758.

27- YANG, B. C., XIAO, B. G., CHEN, X. J. and SHI, C. H. *Genetic diversity of flue-cured tobacco varities based on ISSR markers.* Journal of Yichuan. Vol.(27) No.(5) 2005, 753-758

28-MIN, Q. J., XIA, L. J., XIA, C. M., TANG, X. J., PING, N. X., ZOU, D. X., TAO, W. and HUI, C. S. *Genetic diversity and evolutionary analysis of Tobacco (Nicotiana tabacum L.) germplasm resovrces based on ISSR and SRAP markers.* Journal of Acta Agronomica sinica. Vol.(30) No.(8) 2012, 1425-1434 .

29- DENDUANGBORIPAT, J., SETAPHAN, S., SUWANPRASART, W. and PAMHA, S. *Determination of local Tobacco Cultivars using ISSR Molecular Marker.* Journal of Chiang Mai J. Sci. Vol.(37)No.(2) 2010 , 293- 303 .

30- EL-FIKI, A., FAHMY, M. E., ABODOMA, H. A., HELMY, O., ADLY M. and ELMETABTEB, G. *The genetic variation Assessment of in vitro irradiation Tomato (Lycopersicon esculentum Mill) by SCOT and ISSR markers.* Journal of m b f s. VOL.(10)No.(4) 2021, 557-565 .

31- MOHAMED, A. E., ELSADANY, O., MANAL, E., SAMAH, A., SALAH, G., HAZEM, M. K., JACEK, W. and NABIL, E. *Impact of gamma irradiation pretreatment on biochemical and molecular responses of potato growing under salt stress.* Journal of Chemical biological technologies agriculture. 2021 .

32- AL-HUSSAINI, Z., TOUSIF, S., and AL-AJEEL, S.*Utilization of different display reverse trancrptase- DDRT for detection of salt tolerant clones of potato (Solanum tuberosum L.). Journal of Bio Sci Res.*Vol.(19) 2019, 1891- 1899 .

33- WANG, P., ZHANG, Y., ZHAO, L., BENTIAN, M. O. and LUO, T. *Effect of Gamma rays on Sophora davidii and detection of DNA polymorphism through ISSR marker.* Journal of Bio Med Research International.Vol.(85) 2017, 76-85 .