دراسة القرابة الوراثية بين بعض أصول وأصناف العنب باستخدام تقنية ISSR

*فجر عبد الرحمن عبد **بيان محمد مزهر ***فيصل حامد

(الإيداع: 27 آيار 2019، القبول 16 آيلول 2019)

الملخَّص:

نفذ البحث في مخابر هيئة الطاقة الذرية قسم البيولوجيا الجزيئية والتقانة الحيوية في دمشق خلال عامي 2018-2019، لتعريف ودراسة التنوع الوراثي وتحديد درجة القرابة الوراثية لأربعة أصول وأربعة أصناف من العنب تابعة للنوع (*Vitis vinifera* L.) باستخدام تقنية الـ ISSR، وتطبيق 24 بادئة لهذا الغرض. أظهرت 18 بادئة منها فعاليتها في إعطاء تعددية شكلية بين الأصول والأصناف المدروسة، فقد أعطت 430 حزمة منها 376 حزمة متعددة شكلياً، وبلغت نسبة التعددية الشكلية 40.87 %. أظهرت البادئات المستخدمة مستويات متباينة من النسبة المئوية للتعددية الشكلية بين الأصول والأصناف المدروسة، فقد أعطت البادئتان (A42، A4) أعلى نسبة من التعددية الشكلية (100%)، في حين أعطى البادئ B5 أخفض نسبة للتعددية الشكلية (50%). بلغت أعلى درجة للتشابه الوراثي (0.67) بين الصنفين الأسود العانوني والسلطي، في حين كانت أقلها (0.34) بين الأصل Ru140 والصنف السلطي. وقد بين التحليل العنقودي انفصال الأصول عن الأصناف. كما تم تحديد عدد الواسمات الفريدة المميزة للطرز المدروسة (133 واسماً فريداً) منها 104 واسماً موجباً و29 واسماً سالباً، وأثبتت تقنية الـ ISSR كفاءتها في تأكيد وتعريف وتقييم التنوع الوراثي للعنب.

الكلمات المفتاحية: العنب *Vitis vinifera* L.، التنوع الوراثي، تقانة ISSR، البادئات، القرابة الوراثية.

*طالبة دراسات عليا في قسم البساتين – كلية الزراعة–جامعة دمشق–دمشق–سورية.

**باحث في الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية–قسم بحوث التفاحيات والكرمة – سورية.

*** أستاذ في قسم البساتين بكلية الزراعة –جامعة دمشق – دمشق–سورية.

Study of Genetic Similarity of Some Rootstocks and Grapevine Cultivars Using ISSR Technique

Abd, F. A.*   B. M. Muzher **   F. Hamed ***

(Received: 27 May 2019, Accepted: 16 September 2019)

Abstract:

The research was carried out in the laboratories of the Atomic Energy Commission Molecular Biology and Biotechnology Department to identify the genetic diversity and genetic relatedness among four rootstocks and four grapevine cultivars (*Vitis vinifera* L.). Using the ISSR technique. By applying 24 primers for this purpose. Results indicated that 18 primers proved their effectiveness in showing polymorphism among the genotypes examined and the primers gave 430 bands, 376 of them were polymorphic, with polymorphic percentage of 87.40% . The different primers revealed different levels of polymorphic percentage among the studied rootstocks and the cultivars. Primers (A42, A4) gave the highest polymorphic percentage (100%), while primer B5 gave the lowest polymorphic percentage (50%). The highest genetic similarity (0.67) was between cultivars Black eanuni and Salty, while the lowest value (0.34) was between rootstock Ru140 and cultivar Salty. Cluster analysis grouped rootstocks and cultivars in separate clusters. ISSR unique band was estimated (133 unique band; 104 positive and 29 negative), It was concluded that ISSR technique could be used efficiently to emphasize, identify, onsure and evaluate the genetic diversity of grapevines.

Keywords: Grape .*Vitis vinifera* L., genetic diversity, ISSR technique, Primers, genetic similarity.

*Postgraduate student in the Department of Horticulture - Faculty of Agriculture - Damascus University - Damascus - Syria.

**Researcher in General Commission for Scientific Agricultural Research- Pome and Grapevine Division - Syria.

***Prof, Department Of Horticulture –Faculty of Agriculture – Damascus University –Damascus - Syria.

1-مقدمة:

يعد العنب من المحاصيل البستانية المهمة سواءً في سورية أو العالم، فهو يحتل مركز الصدارة بين أشجار الفاكهة، وزراعته قديمة جداً منذ قدم التاريخ وذلك لملائمته للظروف البيئية، إذ يمتلك أهمية اقتصادية كبيرة في استغلال مختلف أنواع الاراضي ومنها الرملية، والقليلة الخصوبة والقليلة العمق. بدأت زراعته في وسط آسيا في المنطقة الواقعة بين جنوب البحر الأسود وبحر قزوين، وقد اتفق عليها معظم علماء النبات بأنها منشأ العنب الأوربي، ومنه نشأت جميع أصناف العنب قبل اكتشاف القارة الأمريكية الشمالية، ثم انتشرت زراعته في الشرق والغرب (حسن وسلمان، 1989).

إن للعنب قيمة غذائية عالية، إذ تحتوي ثماره على السكريات والفيتامينات والأحماض العضوية والأملاح المعدنية والبروتينات والدهون وغيرها، فضلاً على أهميته الطبية في علاج العديد من الأمراض (السعيدي، 2014)، فهو يساهم في تنشيط خلايا المخ وعضلات القلب، ويعتبر مقوياً للكبد والكلى، كما يقلل الإصابة بأمراض المعدة والأمعاء والجهاز البولي (جمال الدين، 2010).

ينتمي العنب *Vitis vinifera* L. إلى العائلة العنبية Ampelideae، وتشمل 14 جنساً، أهمها الجنس Vitis، ويقدر عدد أنواع العنب نحو 700 نوعاً (Alleweldt *et al.*, 1990)، ونحو 14000 صنفاً نبيلاً وهجيناً مزروعاً في العالم (السعيدي، 2014). ويرجع أصل العنب السوري إلى النوع الأوربي *Vitis vinifera* L. (الدجوي، 2006)، وتعد سورية من أغنى البلدان في منطقة شرق البحر الأبيض المتوسط بالأصول الوراثية للأشجار المثمرة وبخاصة العنب، إذ يشكل التنوع الوراثي حاجزاً واقياً من التغيرات السلبية التي تحدثها الآفات والأمراض والتغيرات المناخية.

إن دراسة الصفات الشكلية لاتعد كافية لدراسة التنوع الحيوي، وخصوصاً عند وجود تقارب كبير بين الطرز المدروسة، كما أن الصفات الشكلية شديدة التأثر بالظروف البيئية المحيطة بالنبات (Wjhani, 2004)، وتعد التباينات الشكلية من المعايير الأولى التي استخدمت في عملية التوصيف والتصنيف ودراسة التباينات بين وضمن الأنواع المختلفة، إلا أنه في الآونة الأخيرة، وفي ظل التطور المتسارع في علم التقنيات الحيوية اكتشفت معايير ومؤشرات أكثر دقة يمكنها تحقيق هذا الهدف، باستخدام المعلمات الجزيئية التي تستند على معلومات مأخوذة من جزيء الـ DNA، ومن أهمها (RAPD, SSR, ISSR, AFLP)، والتي تعتمد على تفاعل البلمرة المتسلسل (Semagn *et al.*, 2006). وقد ذكر Eleuch وزملاؤه (2008) أنه يمكن استخدام المؤشرات الجزيئية بشكل فعال في تحاليل التنوع الوراثي وتقدير التشابه الوراثي.

تعد تقنية التكرارات الترادفية البسيطة الداخلية (Inter Simple Sequence Repeats (ISSR، من التقانات المهمة، وقد طبقت من قبل Zietkiewicz وزملاؤه (1994)، وتعتبر مثالية للأسباب الآتية: تُضخم منطقة التكرارات الداخلية البسيطة، كما أنها أكثر تكرارية من تقنية RAPD بسبب طول البادئ المستخدم الذي يعكس درجة حرارة عالية لمرحلة انفصال سلسلة DNA المزدوجة إلى سلسلتين مفردتين (Chowdhury *et al.*, 2002)، إضافة إلى إمكانية الكشف عن التتاليات النيوكليوتيدية ذات السيادة في التوريث، ووفرتها ووجودها في مجينات حقيقيات النوى النباتية، ولا تحتاج إلى معلومات عن التسلسل النكليوتيدي المدروس (Kijas *et al.*, 1995)، وتعطي نتائج ثابتة، كما أنّها تتطلب كمية قليلة من الحمض النووي DNA، وتكشف نسب عالية من التعددية الشكلية وبمقدرة تقنية SSR ، وتستخدم بشكل واسع في مجالات تحديد هوية الأصناف، ورسم الخرائط الوراثية، والتنوع الوراثي، ووضع بادئات التكرارات البسيطة الترادفية SSR (Qian *et al.*, 2007).

درس Dhanorkar وزملاؤه (2005) العلاقة الوراثية بين 43 صنفاً من العنب مزروعة في الهند، باستخدام تقانة الـ ISSR و13 بادئاً، نتج عنها 139 حزمة منها 96 حزمة متعددة شكلياً، وقد تأرجحت درجة القرابة الوراثية بين 0.56-0.96%، وانقسمت الطرز المدروسة وفقاً للتحليل العنقودي إلى مجموعتين رئيستين.

درس Sabır وزملاؤه (2008) العلاقة الوراثية بين 16 طرازاً من العنب مزروعة في تركيا، باستخدام 50 بادئاً من ISSR، 14 منها أعطت نواتج تضخيم. نتج عنها 110 حزمة، منها 88 حزمة متعددة شكلياً بنسبة تعددية 80.5%.

أعطى Sabir وزملاؤه (2009) وصفاً جزيئياً ومورفولوجياً لـ 44 صنفاً من العنب، وتم التوصيف الجزيئي باستخدام تقنية الـISSR ، باستخدام 20 بادئة، وقد أعطت البادئات 157 حزمة منها 140 حزمة متعددة شكلياً، بمتوسط 7 حزم لكل بادئ، وبلغت النسبة المئوية للتعددية الشكلية 88.6%.

درس Karimi وزملاؤه (2011) التباين الوراثي لـ 15 طرازاً من العنب (7 طرز من خرسان، و8 طرز من تركمانستان) باستخدام تقنيتي الـ RAPD وISSR، فأعطت جميع البادئات المستخدمة نواتج تضخيم في تفاعل البلمرة المتسلسل. وتم الحصول على 59 حزمة باستخدام 7 بادئات RAPD، وبمتوسط 8.4 حزمة لكل بادئ، في حين أعطى ذات العدد من البادئات المستخدمة في تقنية ISSR 58 حزمة، بمتوسط 8.2 حزمة للبادئ الواحد. وقد فصل التحليل العنقودي باستخدام المجموعات الزوجية غير المزانة الطرز المدروسة إلى مجموعتين رئيستين، وشكلت التراكيب الوراثية التركمانية المجموعة الأولى، في حين تجمعت الخرسانية في المجموعة الثانية.

درس Hassan وزملاؤه (2011) التنوع الوراثي لـ 3 أصناف من العنب مزروعة في مصر باستخدام تقنية الـ ISSR، وباستخدام 10 بادئات. وقد أعطت جميع البادئات نواتج تضخيم في تفاعل البلمرة المتسلسل، ونتج عنها 89 حزمة منها 48 حزمة متعددة شكلياً، بمتوسط 4.8 حزمة لكل بادئ، وبلغت النسبة المئوية للتعددية الشكلية 53.93%.

استخدم Zeinali وزملاؤه (2012) تقنية الـ ISSR، إضافة للتوصيف المورفولوجي للتحقيق في الاختلافات الوراثية بين الطرز المختلفة من العنب، فقد درس التنوع الوراثي لـ 20 طرازاً من العنب باستخدام 10 بادئات ISSR، وقد أعطت البادئات المستخدمة 108 حزمة منها 91 حزمة متعددة شكلياً، بمتوسط 9.1 حزمة للبادئة، وبلغت النسبة المئوية للتعددية الشكلية 70.17%. وقد أوضحت الدراسة وجود تنوع واضح بين الطرز المدروسة.

درس Choudhary وزملاؤه (2014) التباين الوراثي لأربعة أصناف من العنب باستخدام 10 بادئات ISSR، سبعة منها أعطت نواتج تضخيم في تفاعل البلمرة المتسلسل، وقد أعطت 86 حزمة منها 56 متعددة شكلياً. وقد قسم التحليل العنقودي الأصناف الأربعة إلى مجموعتين رئيستين.

درس Salayeva (2016) التنوع الوراثي لـ 31 طرازاً من العنب المزروع، و34 طرازاً من العنب البري الذي ينمو في المنطقة القريبة من بحر قزوين بجمهورية اذربيجان، باستخدام 5 بادئات ISSR، حيث تم تضخيم 51 حزمة منها 45 حزمة متعددة شكلياً. وقد أظهر التحليل العنقودي أن الطرز الوراثية المدروسة يمكن تجميعها في 7 مجموعات رئيسة، كما لم يتم الكشف عن وجود اختلاف بين الطرز البرية والمزروعة.

2-أهداف البحث:

1- تقدير التنوع الوراثي وتحديد درجة القرابة الوراثية بين أصول وأصناف العنب المدروسة باستخدام تقنيةISSR .

2- تحديد البادئات (ISSR-primers) القادرة على التمييز بين أصول وأصناف العنب المدروسة لاستخدامها في توثيقها وتمييزها في المشاتل.

3-مواد البحث وطرائقه:

المادة النباتية ومكان وزمان تنفيذ البحث:

أجريت الدراسة على ثمانية طرز من الكرمة موجودة في قسم بحوث التفاحيات والكرمة في السويداء، الذي يتبع للهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية، نفذت الدراسة الجزيئية في مخابر هيئة الطاقة الذرية قسم البيولوجيا الجزيئية والتقانة الحيوية في دمشق خلال الفترة 2019/2018.

❖ **الأصول المدروسة:**

الأصل B41:

ناتج عن التهجين بين (*Vitis berlandieri*× *Vitis vinifera*)، مصدره فرنسا، وهو من أكثر الأصول تحملاً للكلس في التربة، ومقاومته جيدة للفلوكسيرا، ونسبة التجذير 20-40%، ويتحمل Nacl 0.5-0.7 %، وتحمله للجفاف جيد جداً، وجيد التوافق مع الأصناف المطعمة عليه (Bavaresco *et al.*, 1991).

Ru140:

ناتج عن التهجين بين (*V.berlandieri* × *V.rupestris*)، مصدره إيطاليا، مقاوم للفلوكسيرا، يتحمل الكلس الفعال 21%، يتحمل Nacl 0.6%، نسبة التجذير 40-60%، تحمله للجفاف جيد جداً (Ezzahouani and Williams, 1995).

BB Kober 5:

ناتج عن التهجين بين (*V.berlandieri* × *V riparia*) مصدره فرنسا، مقاوم للفلوكسيرا بشكل جيد جداً، يتحمل مستويات عالية من الكلس، غير مناسب كثيراً للترب الجافة، ولا يقاوم ملوحة التربة.

Paulsen 1103:

ناتج عن التهجين بين (*V.berlandieri* × *V.rupestris*)، يستعمل في إيطاليا وجنوب فرنسا وأمريكيا الشمالية، له مقاومة عالية للفلوكسيرا، أكثر مقاومة للجفاف من Ru140، متوسط المقاومة للملوحة، إلا أن تمثيل البوتاسيوم فيه قليل.

الأصناف المدروسة:

الحلواني:

يعتقد أن منشأه الشرق الأوسط، حيث ينتشر على نطاق واسع في سورية والدول المجاورة (لبنان، العراق، الأردن، فلسطين)، ويعتبر في طليعة أصناف العنب السورية، ويتوافق مع الأصل B41، ويستعمل في عمليات الانتخاب والتربية، ويتحمل النقل والتخزين (دعبول ،2008).

السلطي:

سمي نسبة إلى منطقة السلط في الأردن، كما يدعى بالعجلوني، ويعتبر أهم صنف عصيري في جبل العرب، ويستعمل للمائدة ولصناعة الدبس والتقطير والزبيب.

السلموني:

يوجد في حماه (منطقة السلمية)، ويسمى أيضاً بالبياضي، لونه أبيض، القشرة سميكة، واللب عصيري، حلاوته جيدة، بذور الحبة من 2-3 بذرة، يستعمل للتخمير والدبس.

أسود عانوني:

ينتشر في جبل العرب، مصدره من منطقة عينون من فلسطين، يستعمل للمائدة، ينضج خلال الفترة 15-30 أيلول.

طرائق البحث:

استخلاص الحمض الريبي النووي الدناDNA Extraction :

جرى استخلاص الـ DNA بالاعتماد على طريقة CTAB حسب Doyle وDoyle(1987)، حيث تم جمع الأوراق الفتية من الأصول والأصناف المدروسة، وطحنت باستخدام الآزوت السائل (-196 مْ) إلى بودرة ناعمة، نقلت بعدها إلى أنابيب إبندورف سعة 2 مل وضع فيها نحو(0.5) غرام من البودرة. بعدها أضيف 1 مل من محلول 2X CTAB (مسخن لحرارة 65 مْ) ومكون من: 1.4 مول Nacl، 0.1 مول pH8،Tris Hcl ، 0.1% B-mercaptoethanol. وبعد المجانسة وضعت على حمام مائي رجاج 65 مْ ولمدة ساعة واحدة. أضيف 900 ميكروليتر من كلوروفورم ايزوأميل الكحول (24:1).

تمت المجانسة على الرجاج ولمدة عشرين دقيقة. جرى التثقيل بسرعة (10,000) دورة/دقيقة ولمدة عشر دقائق. رفعت الرشاحة إلى أنبوب 2 مل جديد، وأضيف (3/2) من الحجم ايزوبروبانول مبرد (Isopropanol 20°C−) تلتها مجانسة وتحضين بالبراد لحوالي النصف ساعة. جرى التثقيل بسرعة (10,000) دورة/دقيقة ولمدة خمس دقائق. استُبعدت الرشاحة وأضيف 1 مل كحول (75%) مبرد. جرى التثقيل مرة أخرى بسرعة (10,000) دورة/دقيقة ولمدة خمس دقائق. استُبعدت الرشاحة وجفف الراسب لمدة عشر دقائق، تلاها إذابة الـ DNA بإضافة 60 ميكروليتر من الماء المنزوع الشوارد والمعقم، وتركت العينات على الرجاج بحرارة 4 مْ طوال الليل. أضيف 2 ميكروليتر RNAse وحضنت العينات مدة نصف ساعة على درجة حرارة 37 مْ. قُدرت كمية الـ DNA بواسطة جهاز المطياف الضوئي Spectrophotometer . بحيث وحدت تراكيز كافة العينات إلى 40 نانوغرام في الميكروليتر.

تضخيم الدنا DNA Amplification:

تم تضخيم الـ DNA الناتج من عملية الاستخلاص للأصول والأصناف المدروسة باستخدام 24 بادئةISSR، جرى الحصول عليها من الهيئة العامة للطاقة الذرية في سورية، ويوضح الجدول (2) التسلسل النيكليوتيدي للبادئات المستخدمة في الدراسة، وكان الحجم النهائي في الأنبوب الواحد 25 ميكروليتر كما هو موضح بالجدول (1).

الجدول رقم (1): مكونات تفاعل الـ PCR في تقنية الـ ISSR.

المكونات	الحجم (µl)
H_2o	9.6 µl
Buffer NH_4 SO_2(10X)	2.5 µl
$MgCl_2$ (50Mm)	1.7
dNTPs (10mM)	2.5
Primer Forward (10 pM)	5
Taq DNA polymerase (5U/uL)	0.7
DNA(40 ng/uL)	3 µl
Total volume	**25 µl**

وكان برنامج جهاز التسخين الحلقي على جهاز Eppendorf كما يلي:

– فصل أولي لسلسلتي الـ DNA (Denaturation) على حرارة (94 مْ)، ولمدة خمس دقائق، تبعت بـ (40) دورة كل دورة تضمنت:

- فصل (Denaturation) على درجة حرارة (94 مْ)، ولمدة 30 ثانية.
- التحام (Annealing) على درجة حرارة (50 مْ)، ولمدة 30 ثانية.
- استطالة (Extension) على درجة حرارة (72 مْ)، ولمدة 30 ثانية.

–استطالة نهائية ولدورة واحدة عند درجة حرارة (72مْ)، ولمدة سبع دقائق. وأبقيت نواتج التفاعل على درجة حرارة (4 مْ).

الرحلان الكهربائي والتلوين والتصوير:

فصلت نواتج تفاعل الـ PCR على هلامة أغاروز (2%) ضمن محلول الرحلان TBE 1X، وأضيف لتلك الهلامة إثيديوم بروماید لكشف حزم DNA، واستعمل معلم Ladder DNA (Pb100) ليشير لمواقع وحجم الحزم. وتم الرحلان عند 90 فولتاً لمدة ساعة، واستخدمت الأشعة فوق البنفسجية (UV) بعد ذلك لتظهير حزم الدنا ومقارنتها مع حزم مؤشر الدنا القياسي، وتم تصوير وتوثيق الهلامة باستخدام جهاز توثيق الهلامة.

الجدول رقم (2): التسلسل النكليوتيدي للبادئات المستخدمة في تقنية الـ ISSR.

No	Primer code	Sequence	No	Primer code	Sequence
1	A4	CACACACACACARY	13	UBC 850	GTGTGTGTGTGTGTGTCTC
2	A8	CACACACACACARM	14	UBC 855	ACACACACACACACACCTT
3	A26	CACACACACACAK	15	UBC 857 C	ACACACACACACACACCTGC
4	A30	AGCAGCAGCAGCR	16	UBC 857 G	ACACACACACACACACCTGG
5	A38	AGCAGCAGCAGCM	17	UBC 864	ATGATGATGATGATGATGATG
6	A41	AGCAGCAGCAGCK	18	IG-09	AGAGAGAGAGAGAGAGC
7	A42	AGCAGCAGCAGCS	19	IG-10	AGAGAGAGAGAGAGAGT
8	B1	CTCTCTCTCTCTCTCTTG	20	IG-12	GAGAGAGAGAGAGAGAC
9	B5	CACACACACACAGG	21	IG-13	GAGAGAGAGAGAGAGAA
10	B7	GTGGTGGTGGC	22	IG-3	GAGGGTGGAGGATCT
11	C31	AGAGAGAGAGAGAGAGT	23	UBC 825	ACACACACACACACACT
12	UBC 840	GAGAGAGAGAGAGAGACTT	24	UBC 826	ACACACACACACACACC

التحليل الإحصائي Statistical analysis :

أجري التحليل الإحصائي لتحديد درجة القرابة الوراثية بين الطرز المدروسة اعتماداً على معامل Jaccard (Jaccard, 1908)، بعد تحويل البيانات إلى صيغ رقمية بوجود الحزمة أو عدم وجودها (1 أو 0)، وأخذ بالحسبان الحزم الواضحة فقط

والمكررة في اختبارين مستقلين، حيث تم إنشاء مصفوفة نسب التوافق Percent Agreement Values (PAV) بتطبيق متوسطات المجاميع الزوجية غير المزانة Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averaging (UPGMA) باستخدام برنامج STATISTICA، لتظهر النتائج على شكل شجرة قرابة (Statsoft, Inc, 2003).

4-النتائج والمناقشة:

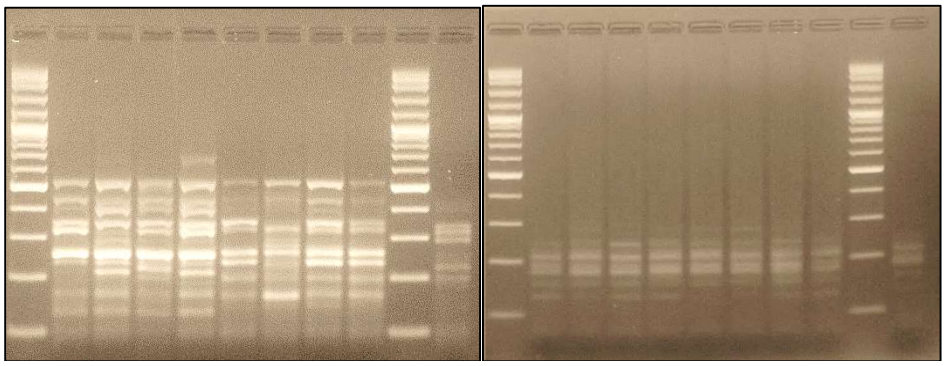
التعددية الشكلية الناتجة عن استخدام تقنية الـ ISSR

يبين الجدول (3) البيانات التي تم الحصول عليها من استخدام البادئات الـ 24 في الدراسة، وعدد الحزم الكلية وعدد الحزم ذات التعددية الشكلية. وقد أعطت جميع البادئات المستخدمة نواتج تضخيم، 18 بادئة منها أعطت تعددية شكلية، وبلغ عدد الحزم الكلية الناتجة عن البادئات الـ 24 المستخدمة 430 حزمة، وبلغ عدد الحزم التي أعطت تعددية شكلية 376 حزمة، بمتوسط 15.7، وبلغت النسبة المئوية للتعددية الشكلية 87.40%. كما ويتضح من معطيات الجدول (3) أيضاً اختلاف البادئات المستخدمة في نسبة التعددية الشكلية الناتجة عنها بين الطرز المدروسة، فقد أعطت البادئات (**A8**، **A26** ، **A30**،**A38** ، B**1**، **UBC 857G**) أعلى مستوى من التعدد الشكلي وكانت جميع الحزم الناتجة متعددة شكلياً (100%)، في حين أعطت البادئة **B5** أخفض نسبة من التعددية الشكلية مقارنة مع البادئات التي أعطت تعددية شكلية، فقد أعطت 5 حزم متعددة شكلياً من أصل 10 حزمة أي بنسبة (50%)، (الشكل1).

إن نسبة الحزم ذات التعددية الشكلية المتحصل عليها في الدراسة أقل من تلك التي حصل عليها Hassan وزملاؤه (2011) عند استخدام ذات التقنية (10 بادئات ISSR) على 3 أصناف من العنب مزروعة في مصر، فقد بلغت النسبة المئوية للتعددية الشكلية (53.93%)، وأقل أيضاً في دراسة Zeinali (2012) على 20 نوع من العنب وباستخدام 10 بادئات ISSR (70.17%)، في حين تقاربت نتائج الدراسة مع نتائج Sabir وزملاؤه (2009)، فقد بلغت النسبة المئوية للتعددية الشكلية (88.6%).

الجدول رقم (3): عدد الحزم الناتجة، وعدد الحزم المتعددة شكلياً، والنسبة المئوية للتعدية الشكلية، الناتجة عن البادئات المستخدمة في تقنية الـ ISSR للأصول والأصناف المدروسة من العنب.

الرقم المتسلسل	البادئة	عدد الحزم الكلي	عدد الحزم المتعددة شكلياً	النسبة المئوية للتعددية الشكلية
1	**A4**	26	20	77%
2	**A8**	20	20	100%
3	**A26**	23	23	100%
4	**A30**	19	19	100%
5	**A38**	19	19	100%
6	**A41**	17	15	88%
7	**A42**	26	24	92.30%
8	**B1**	7	7	100%
9	**B5**	10	5	50%
10	**B7**	14	11	78.60%
11	**C31**	20	17	85%
12	**UBC 840**	17	16	94.10%
13	**UBC 850**	23	21	91.30%
14	**UBC 855**	22	15	68.20%
15	**UBC 857 C**	5	4	80%
16	**UBC 857 G**	23	23	100%
17	**UBC 864**	18	16	88.90%
18	**IG-09**	18	16	88.90%
19	**IG-10**	15	12	80%
20	**IG-12**	24	22	91.70%
21	**IG-13**	17	14	82.40%
22	**IG-03**	15	11	73.3
23	**UBC 825**	10	9	90%
24	**UBC 826**	22	17	77.30%
	المجموع	**430**	**376**	**87.40%**
	المتوسط	**17.9**	**15.7**	



البادئ (B5) البادئ (C31)

الشكل رقم (1): التعددية الشكلية الناتجة عن استخدام البادئ (C31)، والبادئ (B5).

تحديد درجة القرابة الوراثية بين الطرز المدروسة:

أنشئت مصفوفة النسب المئوية للتوافق Percent Agreement Values (PAV) الناجمة عن تطبيق متوسطات المجموعات الزوجية غير المزانة (UPGMA) باستخدام البرنامج الإحصائي STATISTICA لمعرفة درجة القرابة الوراثية بين الطرز المدروسة اعتماداً على عدد نواتج التضاعف المشتركة، إذ إن ارتفاع قيم هذه المصفوفة يدل على وجود تقارب وراثي وبازديادها يزداد التقارب الوراثي. فقد تأرجحت قيم النسبة المئوية للتوافق لمعلمات ISSR بين الأصول والأصناف المدروسة في حدود من (0.34) بين الأصل Ru140 والصنف سلطي، إلى (0.67) بين الصنفين أسود عانوني وسلطي (الجدول 4)، وتعد هذه النتيجة مخالفة لنتائج Dhanorkar وزملاؤه (2005)، فقد تأرجحت درجة القرابة الوراثية في حدود (0.56– 0.96).

أما فيما يتعلق بالأصول، فيلاحظ أن الأصلين Ru140 و B41 كانا الأقرب وراثياً لبعضهما، فقد بلغت درجة القرابة الوراثية بينهما (0.64)، في حين أن أقل درجة قرابة (0.51) بين الأصلين Paulsen 1103 و Ru140، وبين الأصلين Paulsen 1103 و B41. أما الأصناف فإن الصنفان أسود عانوني والسلطي كانا الأقرب وراثياً لبعضهما (0.67)، في حين الصنفان الأبيض السلموني والسلطي الأبعد وراثياً (0.42).

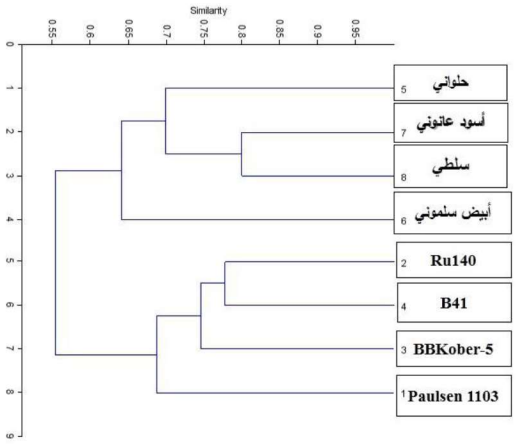
الجدول رقم (4): مصفوفة النسب المئوية للتوافق (PAV) بين طرز العنب المدروسة والناتجة عن تطبيق تقنية ISSR حسب Jaccard(1908).

الطرز	Paulsen 1103	RU 140	BB Kober 5	B41	حلواني	أبيض سلموني	أسود عانوني	سلطي
Paulsen 1103	1							
Ru140	0.51	1						
BB Kober 5	0.56	0.6	1					
B41	0.51	0.64	0.59	1				
حلواني	0.4	0.4	0.43	0.43	1			
أبيض سلموني	0.37	0.35	0.39	0.37	0.51	1		
أسود عانوني	0.38	0.38	0.37	0.4	0.57	0.48	1	
سلطي	0.4	**0.34**	0.36	0.37	0.51	0.42	**0.67**	1

التحليل العنقودي لطرز العنب المدروسة:

يقسم التحليل العنقودي الطرز المدروسة إلى مجموعات تبين درجة القرابة الوراثية بينها، بناءً على معطيات المعلمات الجزيئية التي تفرق الأنماط المدروسة على مستوى الـ DNA. وقد تتجمع الأفراد المدروسة ضمن مجموعة واحدة تبعاً لموطنها الجغرافي، أو أصلها (Hormaza, 2002; Peres *et al.*, 2005). وتؤكد شجرة القرابة العنقودية المتحصل عليها على المستوى الجزيئي للأصول والأصناف المدروسة (الشكل 2)، فقد انفصلت الأصول في مجموعة مستقلة عن الأصناف وبشكل واضح، كما انفصلت الأصناف عن بعضها تبعاً للموقع الجغرافي.

توزعت الطرز المدروسة في مجموعتين رئيستين، فقد توزعت الأصول في مجموعة والأصناف في مجموعة أخرى. انقسمت مجموعة الأصول إلى تحت مجموعتين رئيستين، انفرد الأصل Paulsen 1103 في تحت مجموعة مستقلة، في حين تفرعت تحت المجموعة الثانية إلى تحت فرعين، فقد انفصل فيهما الأصل BBKobber-5 عن الأصلين Ru140 و B41 الأقرب وراثياً لبعضهما. أما مجموعة الأصناف فقد تفرعت أيضاً إلى تحت فرعين، ضم الأول الصنف الأبيض السلموني، في حين انفصل تحت الفرع الثاني الصنف الحلواني عن الصنفين أسود عانوني والسلطي، ويفسر انفصال الصنف الأبيض السلموني عن بقية الأصناف بأنه يتبع لمنطقة جغرافية مختلفة (السلمية-محافظة حماه)، في حين تتبع بقية الأصناف لمحافظة السويداء. وعليه فقد نجحت نتائج التحليل العنقودي وشجرة القرابة الوراثية إلى حد ما في توزيع الأصول والأصناف المدروسة في مجموعات تبعاً لموقعها الجغرافي كما هو موضح في الشكل (2).



الشكل (2): شجرة القرابة بين أصول وأصناف العنب المدروسة.

تمييز أصول وأصناف العنب المدروسة باستخدام الواسمات الفريدة (Unique band) الناتجة عن تقنية الـ ISSR:

استطاعت تقنية ISSR إيجاد حزم دنا مميزة فريدة قادرة على التمييز بين الأصول والأصناف المدروسة، ويمكن استخدامها كمعلمات مميزة لحفظ حقوق مربي النبات؛ فقد تم الحصول على 133 حزمة مميزة، منها (104 حزمة موجبة و29 حزمة سالبة) يمكن أن تستخدم من قبل البنوك الوراثية لتمييز الأصول والأصناف المذكورة. وقد تميز الصنف الأبيض السلموني بأعلى عدد من الواسمات الفريدة 31 واسماً (19 واسماً فريداً موجباً و12 واسماً فريداً سالباً)، في حين تميز الصنف السلطي بأقل عدد من الواسمات الفريدة 11 واسماً (7 واسمات فريدة موجبة و4 واسمات فريدة سالبة) كما هو موضح في الجدول (5).

الجدول رقم (5): عدد الواسمات الفريدة السالبة والموجبة لكل طراز من طرز العنب المدروسة.

الطراز	الواسمات الفريدة الموجبة	الواسمات الفريدة السالبة	مجموع الواسمات الموجبة والسالبة
Paulsen 1103	10	3	13
Ru140	16	2	18
BB Kober 5	12	3	15
B41	16	0	16
حلواني	11	4	15
أبيض سلموني	19	12	31
أسود عانوني	13	1	14
سلطي	7	4	11
المجموع	**104**	**29**	**133**

استطاعت جميع البادئات أن تميز معظم طرز العنب المدروسة، وقد اختلفت فيما بينها في عدد الواسمات الفريدة التي ميزت بها بين الأصول والأصناف، فبلغ أعلى عدد من الواسمات الفريدة (10) باستخدام البادئ A4 وA38، في حين نتج أقل عدد (1) باستخدام البادئ UBC 857 C كما هو موضح بالجدول (6).

الجدول رقم (6): عدد الواسمات الفريدة السالبة والموجبة لكل بادئ من البادئات المدروسة.

البادئ	الموجبة	السالبة	المجموع
A4	8	2	10
A8	6	0	6
A26	1	8	9
A30	4	2	6
A38	7	3	10
A41	2	1	3
A42	3	1	4
B1	1	1	2
B5	1	1	2
B7	8	0	8
C31	5	3	8
UBC 840	7	0	7
UBC 850	4	1	5
UBC 855	6	0	6
UBC 857 C	1	0	1
UBC 857 G	4	2	6
UBC 864	4	0	4
IG-09	6	0	6
IG-10	1	1	2
IG-12	7	2	9
IG-13	7	0	7
IG-03	3	0	3
UBC 825	4	0	4
UBC 826	4	1	5
المجموع	**104**	**29**	**133**
	133		

5-الاستنتاجات:

أظهرت البادئات المستخدمة في تقنية الISSR فعالية في التمييز بين أصول وأصناف العنب المدروسة مع وجود تنوع وراثي كبير بينها، فقد أظهر التحليل العنقودي للبيانات الجزيئية وشجرة القرابة الوراثية انقسام الأصول عن الأصناف المدروسة إلى مجموعتين رئيسيتين، ضمت الأولى الأصناف المدروسة، وضمت الثانية الأصول المدروسة. وبلغت أعلى درجة قرابة وراثية بين الصنفين أسود عانوني والسلطي (0.67%)، وأقل درجة قرابة بين الأصل Ru140 والصنف السلطي 0.34%.

6-المقترحات:

– امكانية استخدام تقنية الـ ISSR في تحديد القرابة الوراثية بين أصول وأصناف العنب وتوثيقها.

– استخدام بادئات ISSR التي أظهرت قيماً مرتفعةً نسبياً للتعددية الشكلية، واستطاعت أن تظهر التباينات بين الطرز وتميزها فيما بينها.

– إمكانية إدخال الطرز المدروسة في برامج التحسين الوراثي التقليدية لاستنباط أصناف وأصول ذات صفات مرغوبة من خلال تحديد مؤشرات مرتبطة بمواقع وراثية مسؤولة عن تلك الصفات.

المراجع **References**:

- **جمال الدين، فهمي أحمد(2010)**. موسوعة النباتات الطبية. الطبعة الثانية. منشأة المعارف. الاسكندرية. جمهورية مصر العربية، 215 ص.
- **حسن، جبار عباس ومحمد عباس سلمان (1989)**. إنتاج الاعناب. بيت الحكمة، جامعة بغداد، وزارة التعليم العالي والبحث العلمي، العراق.
- **الدجوي، علي (2006)**. العنب، زراعة، إنتاج، فوائد، مكتبة مدبولي، القاهرة مصر، 262 ص.
- **دعبول، جورج طلال (2008)**. تأثير بعض أنواع الأسـمدة العضـوية في إنتاجية صـنفي العنب البلدي والحلواني، أطروحة دكتوراة. جامعة دمشق، 356 ص.
- **السعيدي، ابراهيم حسن محمد (2014)**. تصنيف الأعناب، دار الوضاح للنشر وعشتار للاستثمارات الثقافية المملكة الأردنية الهاشمية/ عمان، 543 ص.

- **Alleweldt, G.P, ASpijei- Roy and B. Reich. (1990)**. Grapes genetic resources of temperate fruit and nut crop. Acta Horticultuer, 290:289-328.
- **Bavaresco, L., Fregoni, M. and Fraschini, P. (1991)**. Investigations on iron uptake and reduction by excised roots of different grapevine rootstocks and *V. vinifera* cultivar. Plant and Soil 130:109-113
- **Choudhary, R. S. Zagade, V. S. Urrahman, M. Khalakar, G. D. and N. K. Singh. (2014)**. ISSR Based Genotypic Differentiation of Grape (*Vitis Vinifera* L.) BIOSCAN 9(2): 823-828.
- **Chowdhury, M. A, B. Vandenberg and T. Warkentin. (2002)**. Cultivar identification and genetic relationship among selected breeding lines and cultivars in chickpea (Cicer arietinum L.). Euphytica 127:317–325.
- **Dhanorkar, V.M. Tamhankar, S.A. Patil, S.G. and Rao, V.S. (2005)**. ISSR-PCR for assessment of genetic relationships among grape varieties cultivated in India. Vitis 44 (3), 127–131.
- **Doyle, J.J. and Doyle, J.L. (1987)**. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemical Bullettin 19: 11-15.
- **Eleuch, L., A. Jalil, S. Grando, S. Ceccarelli, M.K. Schmising, H. Tsujimoto, A. Hajer, A. Daaloul. and M. Baum. (2008)**. Genetic diversity and association analysis

for salinity tolerance, heading date and plant height of barley germplasm using simple sequence repeat markers. J. Integ. Plant Biolo. 50(8):1005-1015.

- **Ezzahouani, A. and Williams, LE. (1995).** Influence of rootstock on leaf water potential, yield, and berry composition of *Ruby* Seedless grapevines, Amer. J. Enol. Viticult. 46: 559-563.
- **Hassan, N. A. El-Homosany, A. Gomma, A.H. and Shaheen, M.A. (2011).** Morphological and ISSR Polymorphisms in Some Egyptian Grapes (*Vitis vinifera* L.) Collection. World Applied Sciences Journal 15 (10): 1369-1375.
- **Hormaza, J. I. (2002).** Molecular characterization and similarity relationships among apricot (*Prunus armeniaca* L.) genotypes using simple sequence repeats. TAG Theoretical and Applied Genetics, vol. 104(2- 3):321-328.
- **Jaccard, P. (1908).** Nouvelles recherché sur la distribution flora. Bull.Sac.Nat.44, p: 223-270.
- **Karimi, M.R. Dehvari, V. and Hajiyan, M. (2011).** Genetics diversity of some grape genotypes by ISSR and RAPD markers. Article in European Journal of Horticultural Science 76(5):201-207.
- **Kijas, J. M. H., J. C. S. Fowler and M. R. Thomas. (1995).** An evaluation of sequence tagged microsatellite site markers for genetic analysis within Citrus and related species. Genome 38:349–355.
- **Peres, S. R.; Ruiz, D.; Dicenta, F.; Egea, J. and Gomez, M. P. (2005).** Application of simple sequence repeat (SSR) markers in apricot breeding: molecular characterization, protection, and genetic relationships. Scientia Horticulturae, vol. 103(3): 305-315.
- **Qian.Z, Hong D., Dong Hang Z. (2007).** ISSR Molecular Marker and its application in plant researches. Molecular Plant Breeding V.5.No (6). Pp: 123-129.
- **Sabır, A. Kafkas, S. Tangolar, S. and Büyükalaca S. (2008).** Genetic Relationship of Grape Cultivars by ISSR (Inter-Simple Sequence Repeats) Markers. Europ.J. Hort. Sci. 73 (2). S. 84–88,
- **Sabir, A. Tangolar, S. Buyukalaca, S. and Kafkas, S. (2009).** Ampelographic and Molecular Diversity among Grapevine (Vitis spp.) Cultivars. Czech J. Genet. Plant Breed. 45, 2009 (4): 160–168.
- **Salayeva, S. J. Ojaghi, J. M. Izzatullayeva, V. I. Akhundova, E. M. and Akperov, Z. I. (2016).** Genetic diversity of Vitis vinifera L. in Azerbaijan. 2016. Russian Journal of Genetics. Volume 52, Issue 4, pp. 391–397.
- **Semagn, K.; Bjornstad, A. and Ndjiondjop, M.N. (2006).** An overview of molecular marker methods for plants. African Journal of Biotechnology. 25(5): 2540-2568.

- **Statsoft, Inc. (2003)** - STATISTICA (data analysis software system), version 6. www.statsoft.com.
- **Wjhani, Y. (2004).** Genetic studies on the biodiversity of local and wild Syrian wheat using modern biotechnological techniques. Thesis submitted in partial fulfillment for the requirements of the degree of doctor of philosophy in agriculture science (genetics), Department of genetics, Cairo Univ., Fac. Agric., 119 p.
- **Zeinali, R. Rahmani, F. Abaspour. N. and Baneh, H. D. (2012).** Molecular and Morphological Diversity among Grapevine (*Vitis Vinifera* L.) Cultivars in Iran. , International Journal of Agriculture: Research and Review. Vol., 2 (6), 735-743.
- **Zietkiewicz, E.; Rafalski, A. and Labuda, D. (1994).** Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20, 176-183.