التوصيف الجزيئي والتنوع الوراثي بين طرز من خوخ الدب *Prunus ursina* KY المنتشرة في الساحل السوري

وفاء شومان[1] وهيثم اسماعيل[1] وصفاء صبوح*[2] ومازن رجب[3] وعمار عمران[3]

(1). كلية الزراعة، جامعة تشرين، اللاذقية، سورية.
(2). إدارة بحوث البستنة، الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية، دمشق، سورية.
(3). قسم التقانات الحيوية، مركز بحوث اللاذقية، الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية، دمشق، سورية.
(*للمراسلة: د. صفاء صبوح. البريد الإلكتروني: safasaboh@gmail.com).

تاريخ الاستلام: 2019/06/16 تاريخ القبول: 2019/08/02

الملخص

نفذت هذه الدراسة خلال الفترة الممتدة بين 2016 و2018 في 6 مواقع جغرافية (جبلة، وكسب، ودريكيش، والغاب، وبرمانة المشايخ، ومصياف) بهدف إجراء التوصيف الجزيئي وتقييم التنوع الوراثي لأشجار تابعة لنوع خوخ الدب *P. ursina* Ky المنتشرة في المنطقة الساحلية. تم اختيار (35) عينة (شجرة) لاستخلاص DNA وتحليله باستخدام (17) زوجاً من بادئات المقاطع القصيرة المتكررة SSR. أظهرت النتائج بأن ستة أزواج من البادئات فقط قادرة على كشف التباينات الوراثية بين العينات، في حين 11 زوجاً من البادئات أعطى كل منها قريناً واحداً فقط. قدّر عدد القرائن المكتشفة بنحو (14) قريناً، وتراوح عدد القرائن من (2) إلى (4) بمتوسط 2.3 قريناً/موقع. وقدّر التنوع الوراثي على المواقع الوراثية المدروسة، ووجد أن أقل معدل للتنوع الوراثي كان 0.37 على الموقع (TPScp9) في حين وصل إلى 0.51 عند بادئتين هما (BPPCT038) و(CPDCT014/AY862451). استخدمت المعطيات المتحصل عليها في تقدير البعد الوراثي بين العينات المدروسة، وتبين وجود مجموعتين أساسيتين؛ ضمت الأولى عينات برمانة المشايخ، وجبلة، وكسب، في حين ضمت المجموعة الثانية عينات مصياف، والغاب، والدريكيش. وكانت العينات المأخوذة من الدريكيش هي الأبعد وراثياً ضمن عينات الفرع الثاني. كما أظهرت النتائج غياب التباين الوراثي بين أشجار الموقع الواحد، ووجود تباين طفيف بين أشجار المواقع المختلفة، مما يتطلب الاستمرار بجمع وتحليل عدد أكبر من العينات لكشف نسبة أعلى من التباينات الوراثية، وحفظها في بنك المورثات، لاستخدامها في برامج التحسين الوراثي مستقبلاً.

الكلمات المفتاحية: خوخ الدب *Prunus ursina* KY، التوصيف الجزيئي، التنوع الوراثي، الساحل السوري.

المقدمة:

يقدر عدد الأنواع النباتية المنتشرة في سورية بما يقارب 3650 نوعاً تنتظم في أكثر من 130 فصيلة وحوالي 910 جنساً بحسب الفلورات المتداولة، ومن الأجناس الهامة المنتشرة في الساحل السوري جنس *Prunus* KY. الذي ينتمي لتحت فصيلة *Prunoideae*، والفصيلة الوردية *Rosaceae* ذات الانتشار الواسع، والتي تضم عدداً كبيراً من الأجناس والأنواع ذات الأهمية الاقتصادية؛ مثل: الدراق (*P. persica* L.)، والخوخ الأوروبي (*P. domestica* L.) ، والخوخ الياباني (*P. salicina* Lindl)، والكرز الحامض (*P. cerasus* L.)، والكرز الحلو (*P. avium* L.)، والمشمش (*P. armeniaca* L.) (Burgo *et al.*, 2007).

تنسب بعض الدراسات *P. ursina* Ky إلى *P. cocomilia* من حيث سلوكه، وشكل الورقة، وشكل الثمرة، وخصائص حامل الورقة (Donmez and Yildirm, 2000)، ويعتبر كل من Davis, (1965), و Balls (1975) بأن *P. ursina* هو تحت نوع تابع للنوع *P. cerasifera*.

يعد خوخ الدب *P. ursina* Ky من أكثر أنواع الخوخ انتشاراً في الساحل السوري، وتتصف نباتاته بأنها أشجار وشجيرات يبلغ ارتفاعها 4–8 م، ومتشعبة بكثرة، وتحمل أغصانها أشواكاً في بعض الأحيان، والأغصان مخملية ناعمة، والأوراق مسننة بيضوية أو بيضوية متطاولة، يتراوح طولها 2–3 سم، والثمار كروية صفراء إلى أرجوانية يتراوح طولها إلى 2– 3 سم، غير صالحة للأكل حتى وهي طازجة. يستخدم خوخ الدب كأصل لتطعيم أصناف الخوخ، ومن مزاياه الهامة التي يجب أخذها بعين الاعتبار في برامج التحسين الوراثي هو لون ثماره الجذاب، ومقاومته للأمراض المختلفة التي تصيب اللوزيات (Mouterd, 1960)، كما أنه مقاوم للبرودة، ومتأخر النضج، حيث تبقى الثمار على الطراز حتى نهاية كانون الأول، كما يعيش على الصخور الكلسية.

سمح التقدم السريع في مجال التقانات الحيوية بإيجاد العديد من الطرق والوسائل التي استخدمت في دراسة التباينات والعلاقات الوراثية، والتي تعتمد على استخدام المؤشرات الجزيئية المبنية على تحليل جزيئة DNA. تعتبر تقنية التفاعل التسلسلي للبوليميراز (PCR) Polymerase Chain Reaction التي وضعت من قبل (Mullis *et al.*, 1986) نقطة تحول أساسية في تطور التقانات الحيوية، حيث ساهمت في إيجاد وتطوير العديد من المؤشرات الجزيئية. تكشف المؤشرات الجزيئية تباينات يمكن أن تسمح بتمييز الأفراد عن بعضها، وتحديد درجات القرابة، ويمكن أن توظف نتائجها بشكل فعال في برامج التربية والتحسين الوراثي (Baydar *et al.*, 2004).

تعد مؤشرات الميكروساتلايت Microsatellite أو المقاطع القصيرة المتكررة (Simple sequence repeats–SSRs) من أكثر المؤشرات الجزيئية المستخدمة في الأبحاث الحالية والمرتبطة ببرامج التربية والتحسين الوراثي عند النباتات، وفي دراسات التنوع الوراثي وعلاقات القرابة بين وضمن الأنواع النباتية والحيوانية (Zhang *et al.*, 2002; Zheebentyayeva *et al.*, 2003; Choumane *et al.*, 2004; Khadari *et al.*, 2007; EL–Mouie *et al.*, 2011a, 2011b; Al_Jallad *et al.*, 2012).

تمتلك مؤشرات SSRs قدرة كبيرة على كشف مستويات مرتفعة من التباينات الوراثية والتي تمثل بقرائن (Alleles) متعددة لنفس الموقع الوراثي، وتختلف عن بعضها بعدد الوحدات الصغيرة المتكررة التي تحتوي عليها، ويعكس عدد قرائن الموقع الواحد المرتفع معدل الطفرات التي تعرض لها هذا الموقع ويترجم بمستوى عال من التنوع الوراثي (Powell *et al.*, 1996).

تمت دراسة التباين الوراثي عند الخوخ الياباني باستخدام 35 زوجاً من بادئات SSR، حيث أظهرت تبايناً وراثياً كبيراً، وبينت الدراسة إمكانية استخدام هذه المؤشرات لإظهار التباين الوراثي عند نوعي الخوخ والدراق باستخدام 145 بادئة SSR مأخوذة من جنس *Prunus*

وأظهر إمكانية استخدامها ضمن أنواع هذا الجنس (الدراق، والمشمش والخوخ الياباني والكرز واللوز) لدراسة التباينات الوراثية ضمن هذه الأنواع (Mnejja *et al.*, 2004). وقد أظهرت إحدى الدراسات إمكانية دراسة القرابة الوراثية بين طرز اللوز المنتشرة في تونس مع أصناف اللوز الأمريكية والأوروبية وذلك باستخدام 10 بادئات SSR (Gouta *et al.*, 2010). فقد تميّز 18 زوجاً من أصل 21 زوجاً بادئات EST–SSR المطورة من جينوم الدراق بقدرتها على كشف التباين الوراثي بين 22 طرازاً من الدراق، وبينت الدراسة إمكانية استخدام هذه البادئات بنجاح لدراسة التباين الوراثي ضمن أنواع تابعة للجنس *Prunus* (اللوز ، والمشمش، والكرز الحلو، والخوخ الياباني، والخوخ الأوروبي) (Vendramin *et al.*, 2007)، كما تم تطوير 10 بادئات SSR من كلوروبلاست الخوخ الياباني، وكان لها القدرة على إظهار التباينات الوراثية ضمن 17 نوعاً من جنس *Prunus* (Ohta *et al.*, 2005).

تظهر المنطقة الساحلية من سورية تنوعاً وراثياً ضخماً عند الخوخ البري وهو غير مدروس بدقة حتى الآن، ونظراً لأهمية الخوخ وتعدد أنواعه وطرزه، كان لا بد من التوصيف الجزيئي لطرز من نوع خوخ الدب *P. ursina* المنتشرة في الساحل السوري وتقييم تنوعها الوراثي بغية جمع وحفظ أكبر قدر من التباينات الوراثية للطرز المدروسة، لإنشاء بنك وراثي للمحافظة على التنوع الوراثي لهذا النوع، ولاستخدامها لاحقاً في تحسينه وراثياً.

يهدف البحث إلى التوصيف الجزيئي لطرز منتخبة من نوع خوخ الدب *P.ursina* KY المنتشرة في الساحل السوري وتقييم التباينات الوراثية بين الطرز المدروسة.

مواد البحث وطرائقه:

1. مواقع الدراسة والمادة النباتية:

تم حصر بعض مواقع انتشار أشجار خوخ الدب في المنطقة الساحلية من سورية، ثم حددت المواقع واختير 35 طرازاً برياً من طرز خوخ الدب لتتم الدراسة عليها، (الجدول 1). وأجريت الدراسات الجزيئية في مخبر الوراثة الجزيئية التابع لقسم العلوم الأساسية في كلية الزراعة بجامعة تشرين، ومخبر التقانات الحيوية في مركز البحوث العلمية الزراعية باللاذقية.

الجدول 1. مواقع الدراسة وإحداثياتها وعدد ورمز أشجار طرز خوخ الدب في كل موقع.

اسم الموقع	المحافظة	E شرق	N شمال	الارتفاع عن سطح البحر/ م	اتجاه السفح	رمز الطراز	عدد الطرز
جبلة (دوير بسنديانة)	اللاذقية	36° 6'33.90"	35°16'31.62"	850	جنوب	J	7
كسب (النبعين)	اللاذقية	35°58'6.35"	35°54'15.73"	850	شرق	K	6
برمانة المشايخ (الشوح طي)	طرطوس	36°10'7.09"	35° 1'4.53"	705	شمال	B	6
دريكيش (حيلاتا)	طرطوس	36°15'29.45"	34°56'48.46"	850	شمال	D	5
غاب (بتمازة)	حماه	36°16'29.00"	35°15'9.24"	850	شمال	KAB	6
مصياف (وادي حيلين)	حماه	36°13'38.66"	35° 4'54.34"	807	شمال	M	5

2. طرائق العمل:

2.1. استخلاص المادة الوراثية (DNA):

تم استخلاص DNA عن طريق طحن 0.2 غ من أوراق حديثة النمو خالية من الأمراض في هاون بورسلان بوجود سائل الإستخلاص CTAB المعدل (Kahl, 2001) الساخن 65 مْ والمكون من (1.4M NaCl, 20mM EDTA, 100mM Tris–HCl, pH8, 2% CTAB, 1% PVP) المضاف إليه 2% من مادة β –mercaptoethanol .

حضن المزيج في حمام مائي على حرارة 65 س° لمدة 35 دقيقة، ثم أضيف إليه حجماً مماثلاً من مزيج مكون من 24 كلوروفورم: 1 كحول أيزوأميل، ووضع على الهزاز الميكانيكي مدة 20 دقيقة. تم بعد ذلك فصل الوسط المائي الحاوي على DNA بعملية التثفيل بسرعة 5000 دورة /دقيقة لمدة 10 دقائق، بحرارة 20 مْ، ونقل إلى أنبوب جديد وأضيف إليه مرة ثانية حجم مماثل من مزيج كلوروفورم: كحول الأيزوأميل (1:24) وأعيدت العملية بذات الظروف السابقة.

تم ترسيب DNA من خلال نقل الوسط المائي الذي يحتوي عليه إلى أنابيب جديدة سعة 2 مل وإضافة كحول الآيزوبروبانول بمعدل 3/2 من حجمه. تركت العينات لليوم التالي بدرجة حرارة 20C°–.

جمعت جزيئات DNA عن طريق التثفيل بسرعة 10.000 دورة/دقيقة على درجة حرارة 4 سْ لمدة 15 دقيقة، ثم استبعد الوسط السائل وتجمّع DNA في قاع الأنبوب. تم غسيل DNA مرتين متتاليتين بالكحول الايتيلي البارد 76% ومن ثم ترسيبه بالتثفيل بسرعة 10.000 دورة / دقيقة على درجة حرارة 4C° لمدة 10 دقيقة. استبعد الكحول وترك DNA ليجف لمدة ساعة على درجة حرارة المختبر، ثم أذيب في 200 mL من الماء المقطر المعقم، وحفظ بدرجة 4 س° لحين الاستخدام.

2.2. تفاعلات PCR والرحلان الكهربائي:

تم اختيار (17) زوجاً من بادئات SSR لاستخدامها في تحليل DNA (الجدول 2).

الجدول 2. أزواج البادئات المستخدمة في الدراسة الجزيئية وتركيبها النيوكلوتيدي

التسلسل	البادئات (المواقع)	التسلسل النيوكليوتيدي للبادئات	درجة ارتباط البادئة بالقالب (Co)	المرجع
1	TPScp8F	5′-AGA ACA ATA TAG TAA AGT TAA GT-3′	52	Ohta *et al.*, 2005
	TPScp8R	5′-TGA AAG TAA AGG AGC AAT AAT A -3′		
2	TPScp9F	5′-CTC AAG GGC AAG AAT CTA AGG T-3′	55	Ohta *et al.*, 2005
	TPScp9R	5′-CCG TTT TTT GTG ATT TCT TTC T -3′		
3	CPSCT039 F	5′-GCC GCA ACT CGT AAG GAA TA-3′	58	Mnejja *et al.*, 2004
	AY426224 R	5′-TCC ACC GTT GAT TAC CCT TC -3′		
4	EMPA009F	5′-CAT GAT CTG CAC TGG GAA TC-3′	58	Clarke *et al.*, 2003
	EMPA009R	5′-AGA GGG CAA GAA AAA GAC GC -3′		

5	CPDCT022 F	5′-TGA TCG GCG TCT CCT TTA TC-3′	54	Aranzana *et al.*, 2002
	AY862459 R	5′-AAA GCA AGC AGG CAA ATG AA -3′		
6	BPPCT07F	5′-TCA TTG CTC GTC ATC AGC-3′	54	Dirlewanger *et al.*, 2002
	BPPCT07R	5′-CAG ATT TCT GAA GTT AGC GGT A -3′		
7	BPPCT038F	5′-TAT ATT GTT GGC TTC TTG CAT G-3′	55	Dirlewanger *et al.*, 2002
	BPPCT038R	5′-TGA AAG TGA AAC AAT GGA AGC -3′		
8	CPSCT033 F	5′-TCC TCA TTT GAG TGT TGT GGA -3′	54	Mnejja *et al.*, 2004
	AY426218 R	5′-TGC CCA ATT TGA AAA CTT TGT -3′		
9	CPDCT034 F	5′-GAG AAC CTT TTG TTT GGC CTT A -3′	58	Aranzana *et al.*, 2002
	AY862471 R	5′-CGT CGT ATT TAG TGC CGT TG -3′		
10	CPDCT014 F	5′-TGC AAA GAA AAA CGG AGA GG -3′	56	Aranzana *et al.*, 2002
	AY862451 R	5′-GAA ACT CAG TGG CAC AAT CG -3′		
11	CPDCT037 F	5′-TGG TCA ACA TGG CAA ACA TT -3′	54	Aranzana *et al.*, 2002
	AY862474 R	5′-CAA CTC ACC TTC AGC AGC AA -3′		
12	CPDCT045 F	5′-TGT GGA TCA AGA AAG AGA ACC -3′	56	Aranzana *et al.*, 2002
	AY862482 R	5′-AGG TGT GCT TGC ACA TGT TT-3′		
13	CPDCT047 F	5′-TCA AAA ACA CCC ATT ATT GAA -3′	52	Aranzana *et al.*, 2002
	AY862437 R	5′-AAA CAT TTA GGG CTT GTT TGG -3′		
14	UDA-001 F	5′-CAT ATA GGG TCA AGG GAG TG-3′	58	Testolin *et al.*, 2004
	BV102468 R	5′-AAA TAA ATA TAT ACA CAC ACA CAC AC -3′		
15	UDA-005 F	5′-CAT CAC ACA CAA ACA CAA ATG C -3′	58	Testolin *et al.*, 2004
	BV102480 R	5′-GCA TTG TGC TCT TCA TGG AC -3′		
16	UDA-012 F	5′-CCT CCG GGG CTC TTA TAA AT-3′	58	Testolin *et al.*, 2004
	BV102472 R	5′-ATG TGT GAT GGC CAG AGC TT -3′		

17	UDA-025 F	5′-TCG AGA AAG CTG CAC TGG TA -3′	57	Testolin *et al.*, 2004
	BV102478 R	5′-AAA GCT GCT TAT TCG TGT GTG-3′		

أجري تفاعل PCR بحجم 25 ميكرو لتراً يحتوي على (50) نانوغرام من DNA، وبوجود 1X من PCR buffer و 1.5mM MgCl2 و200µM من مزيج النيوكليوتيدات الأربعة، و2 µM من كل بادئة، ووحدة إنزيمية واحدة من أنزيم التكثيف DNA Taq Polymerase. أجريت المكاثرة في جهاز الدوران الحراري وفق برنامج مكون من (37) دورة، تتضمن كل دورة مرحلة التحطيم لمدة دقيقة على درجة 94 سْ، والارتباط لمدة دقيقة واحدة على الدرجة المناسبة لكل برايمر وفقاً للجدول (2)، ثم الاستطالة لمدة (1) دقيقة على الدرجة 72 سْ، سبق البرنامج عملية فصل أولية لسلاسل DNA لمدة 5 دقائق على الدرجة 94 سْ، وانتهى بتحضين العينات لمدة 5 دقائق على درجة حرارة 72 سْ.

تم تحميل العينات المكونة من 3µl من نواتج تفاعلات الـ PCR مع 3µL من سائل التحميل 3X المكون من:

(10 mM NaOH, 95% formamide, 0.05 % bromophenol blue, 0.05 % xylene cyanol FF) على هلامة الأكريلاميد بتركيز 6%، وبسماكة 0.4 mm، وأجريت عملية الرحلان الكهربائي ضمن سائل 1X TBE بشدة 200 فولت، واستطاعة 60 واط، مدة ساعتين ضمن جهاز الرحلان الكهربائي العمودي.

بعد انتهاء عملية الرحلان الكهربائي لعينات DNA، لونت الهلامة ببروميد الايتيديوم (0.5mg/L) مدة نصف ساعة وتم التصوير بوجود الأشعة فوق البنفسجية UV بجهاز التصوير والتوثيق Gel documentation.

التحليل الإحصائي:

سجلت نتائج التضخيم في جداول، حيث تم اعتماد الرقمين (1) و(0) للدلالة على وجود أو غياب القرائن على المواقع المختلفة.

تم استخدام البرنامج Numerical Taxonomy and Multi-variant Analysis System (NTSYS-2-PC) لحساب معامل التشابه بين الطرز ولإنشاء مخططات القرابة بالاعتماد على التحاليل العنقودية Cluster analysis (Rohlf, 1993).

قدر التنوع الوراثي Genetic Diversity (G.D) ضمن مجموعة المدخلات المدروسة وفقاً لعلاقة Nei (1987):

$$G.D = n(1-\sum P^2)/(n-1)$$

حيث:

n: عدد المدخلات

P: نسبة تكرار كل قرين على الموقع الوراثي.

النتائج والمناقشة:

أظهرت نتائج تحليل عينات DNA المأخوذة من 35 شجرة من خوخ الدب، بأن ستة أزواج فقط من أصل (17) زوجاً من بادئات SSR كانت قادرة على كشف تباينات وراثية بين العينات المدروسة، في حين أظهر التحليل باستخدام (11) زوجاً من البادئات وجود قريناً واحداً متماثلاً Monomorphic allele في كافة العينات المدروسة. وتراوح عدد القرائن Alleles على المواقع الوراثية الستة المعرفة بأزواج البادئات الستة ما بين قرينين وأربعة قرائن بعدد كلي وصل إلى (14) قريناً، وبمتوسط قدره 2.3 قريناً /الموقع (الجدول 3).

إذا أخذت كافة المواقع بعين الاعتبار (المتباينة والمتماثلة) وجد بأن العدد الكلي للقرائن المختلفة المتحصل عليها على 17 موقعاً هو 25 قريناً بمتوسط قدره 1.47 قريناً/الموقع مما يقود للاستنتاج بأن مجتمع خوخ الدب لم يتعرض لطفرات كثيرة في المناطق المدروسة من الساحل السوري.

قدّر التنوع الوراثي على المواقع الوراثية الستة التي أظهرت تباينات بين العينات، وتراوحت قيمه مابين 0.37 على الموقع (TPScp9R/TPScp9F) حتى0.51 على الموقعين BPPCT038(R+F) و (CPDCT014 / AY862451) بمتوسط قدره 0.45/الموقع (الجدول 3). لا تعكس هذه القيم للتنوع الوراثي مستوى التنوع الوراثي الحقيقي الموجود فعلاً في مجتمع خوخ الدب المدروس، لأنه لو أخذنا كافة المواقع الـ (17) بعين الاعتبار حيث معدل التنوع الوراثي على المواقع الـ 11 غير المتباينة مساوٍ للصفر، نجد أن معدل التنوع الوراثي يترواح ما بين صفر و0.51 ولكن بمتوسط قدره 0.1588، وهو أكثر منطقية لكونه يعكس نتائج تحليل كافة العينات بكافة بادئات SSR (17 زوجاً محددة لـ 17 موقعاً وراثياً).

تشير قيم التنوع الوراثي في المناطق المدروسة لتشابه كبير بين اشجار خوخ الدب في المناطق المدروسة، وبأنها لم تتعرض لطفرات كثيرة على المواقع الوراثية المختارة من الجين، على الرغم من أن المؤشرات المستخدمة (الـ SSR) تتعرف على مناطق المايكروساتلايت التي تعد من المناطق سريعة التطور والتغير في جينات الكائنات الحية (Weber and Wong, 1993). تنتج الطفرات غالباً إما عن انزلاق أنزيم البوليميراز أثناء عملية النسخ للـ DNA أو بسبب عملية انقسام غير متساو أثناء عملية تكوين الخلايا الجديدة (Udupa and Baum, 2001).

الجدول 3. عدد القرائن لمواقع الـ SSR المتباينة بين الطرز وقيم التنوع الوراثي عند طرز خوخ الدب المدروسة.

رقم التسلسل لزوج البادئات	Primers	العدد الكلي للقرائن على الموقع الواحد No. of alleles	التنوع الوراثي Genetic diversity (G.D)
2	TPScp9	4	0.37
4	EMPA00	2	0.43
7	BPPCT038	2	0.51
10	CPDCT014/AY862451	2	0.51
13	CPDCT047/AY862437	2	0.43
16	UDA-012/BV102472	2	0.45
	المجموع	14	2.7
	المتوسط	2.3	0.45

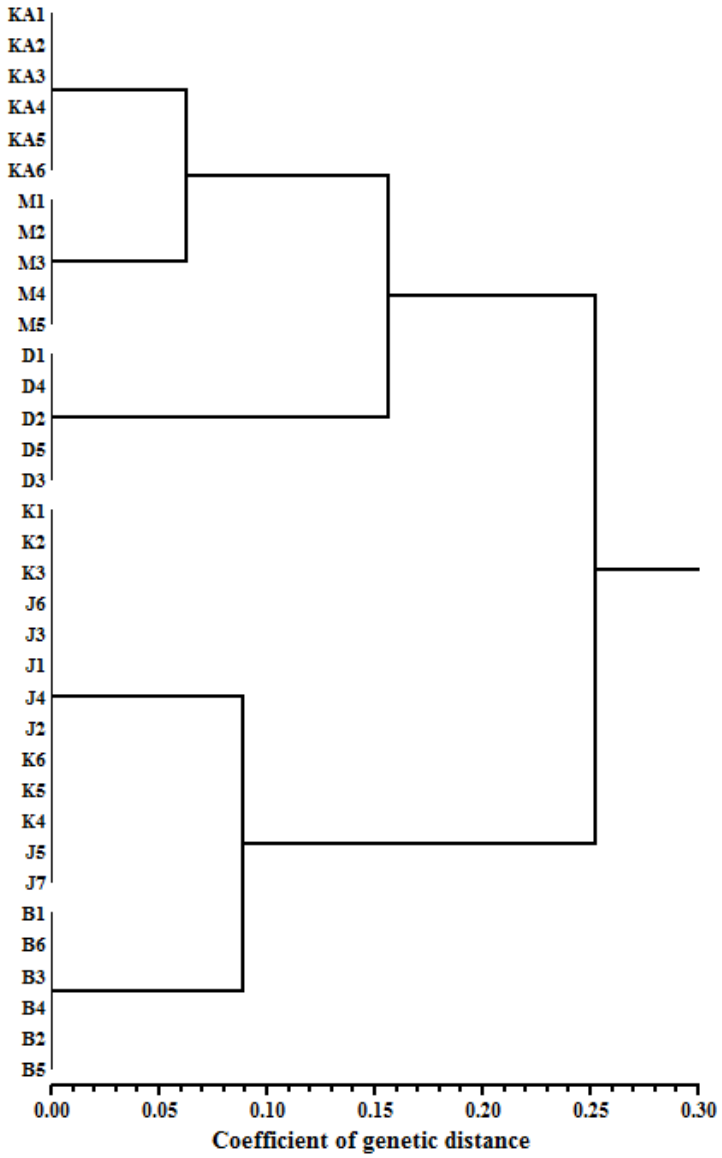
استخدمت الجداول المجهزة اعتماداً على مقارنة وجود أو غياب القرائن المتحصل عليها باستخدام 17 زوجاً من البادئات لحساب معامل التشابه الوراثي ومعامل البعد الوراثي بين العينات المدروسة. أنشئ مخطط البعد الوراثي ليوضح علاقات القرابة بين كافة الأشجار المدروسة ومن المناطق الست (الشكل 1).

أظهر مخطط القرابة توزع جميع طرز خوخ الدب المدروسة ضمن فرعين رئيسين، ضم الأول طرز برمانة المشايخ وكسب وجبلة في حين ضم الفرع الآخر طرز دريكيش والغاب ومصياف.

تميزت الطرز الوراثية المجموعة من نفس المنطقة بالتماثل التام على كافة المواقع الوراثية المدروسة، حيث كان معامل البعد الوراثي فيما بينها مساو للصفر، مما يشير لغياب التنوع الوراثي ضمن الموقع الواحد. عند مقارنة طرز المواقع المختلفة مع بعضها البعض، تبين

وجود اختلافات وراثية بين طرز المواقع المختلفة كافة، باستثناء طرز موقعي كسب وجبلة، حيث وجدوا ضمن مجموعة واحدة وكان معامل البعد الوراثي فيما بينهم مساو للصفر. تشير هذه النتائج إلى أن طرز موقعي كسب وجبلة هم الأقرب لبعضهم وراثياً (معامل البعد الوراثي= صفر). كانت طرز برمانة المشايخ هي أقرب الطرز الوراثية لطرز جبلة وكسب حيث كانوا جميعاً ضمن نفس الفرع.

ضم الفرع الثاني بمخطط القرابة مجموعتين أساسيتين، احتوت الأولى على الطرز التابعة لموقع الدريكيش والتي كانت منفصلة تماماً عن طرز المجموعة الثانية، بمعامل بعد وراثي مساو للقيمة 0.16. ضمت المجموعة الثانية طرز موقعي مصياف والغاب والتي تميزت بمستوى عال من التشابه الوراثي، ولم يتجاوز معامل البعد الوراثي فيما بينها 0.07، إلا أنها كانت الطرز الأبعد وراثياً عن طرز المجموعة الأولى.



الشكل 1. مخطط القرابة الوراثية بين طرز خوخ الدب المدروسة اعتماداً على نتائج مؤشرات SSR

على الرغم من وجود اختلافات وراثية بين طرز المواقع المختلفة إلا أن معامل البعد الوراثي فيما بينها منخفض، مما يؤكد على المستوى المنخفض للتنوع الوراثي ضمن نوع خوخ الدب في المناطق المدروسة. لقد تشابهت كافة الأشجار ومن كافة المناطق المدروسة على 64% من المواقع الوراثية المدروسة (المختبرة بـ 11 زوجاً من البادئات) واختلفت على 36% فقط من المواقع الوراثة المدروسة (المختبرة بـ 6 أزواج من البادئات)، إضافة إلى أنه حتى على المواقع الوراثية المتباينة فقد كان عدد ونسب تواجد القرائن المختلفة منخفضاً دالاً على انخفاض مستوى الطفرات التي تعرضت لها هذه المواقع الوراثية وعلى انخفاض مستوى التنوع الوراثي لأشجار خوخ الدب في المناطق المدروسة من الساحل السوري، مع التأكيد على أن الاختلاف كان بين عينات المناطق المختلفة وليس عينات المنطقة الواحدة مما يشير لدور الموقع الجغرافي للمنطقة بنسبة ونوع الطفرات الوراثية التي حدثت.

في دراسة لصبوح وآخرين (2017) لطرز خوخ الدب ذاتها، أجري التوصيف المظهري بالاعتماد على(24) صفة مظهرية تضمنت مواصفات الأزهار والأوراق والثمار، أظهر مخطط القرابة تجمع طرز برمانة المشايخ والدريكيش ضمن مجموعة واحدة مع درجة اختلاف منخفضة فيما بينها، في حين توزعت طرز بقية المواقع ضمن مجموعة واحدة، وانعزل الطرازان K1 و K 2 المنتشرين في موقع كسب ضمن مجموعة مستقلة، هذا الاختلاف في التوزع بين الدراستين الجزيئية والمورفولوجية يعود إلى الاختلاف في الظروف البيئية السائدة في مواقع الدراسة والتي تؤثر بشكل أساسي على الخصائص المورفولوجية، ويعود أيضاً لدقة التوصيف الوراثي الذي يستبعد فيه تأثير الظروف البيئية وخطأ المقياس للمواصفات الشكلية التي تختلف مهاراتها من باحث لآخر وتذكر العديد من الدراسات هذه الفكرة. كان التشابه بين المجموعتين الرئيسيتين الناتجتين عالياً حيث بلغت قيمته (0.87) بالمقارنة مع قيمة التشابه باستخدام بادئات SSR والتي بلغت (0.75). وتتشابه هذه النتيجة مع ما توصل إليه(2011) ,.Kadkhodaei *et al* في دراسة نفذت في إيران لتحديد درجة القرابة بين 53 طرازاً من اللوز اعتماداً على المعطيات الجزيئية والخصائص المورفولوجية باستخدام 9 أزواج من بادئات SSR و دراسة 39 صفة مظهرية، حيث أظهرت نتائج الدراسة أن متوسط التشابه المورفولوجي كان عالياً وبلغت قيمته (0.59) مقارنة مع التشابه باستخدام بادئات SSR حيث بلغت قيمته (0.23).

الاستنتاجات:

وجود تقارب وراثي بين أشجار خوخ الدب المزروعة في بعض المناطق الساحلية في سورية، ووجود تنوع وراثي نسبي بين المواقع لطرز خوخ الدب المنتخبة في المنطقة الساحلية.

التوصيات:

متابعة دراسة التنوع الوراثي على طرز جديدة لخوخ الدب من مناطق أخرى للحصول على نسبة أكبر من التباينات الوراثية ضمن النوع، حفظ الطرز المنتخبة من خوخ الدب في مجمع وراثي للاستفادة منها لاحقاً في برامج التربية والتحسين الوراثي.

المراجع:

صبوح، صفاء (2017). دراسة الطرز الوراثية لنوع خوخ الدب Ky *Prunus ursina* المنتشرة في المنطقة الساحلية وإمكانية استخدامها كأصول في اللوزيات، أطروحة دكتوراه، كلية الزراعة، جامعة تشرين، سورية.

Al_Jallad, T.; W. Choumane; and M. Hmeshe (2012). Characterization and estimation of genetic diversity in two syrian chicken phenotypes using molecular markers. International Journal of Poultry Science. 11 (1): 16-22.

Aranzana, M.J.; J. Garcia-mas; J. Carbo; and P. Arus (2002). Development and variability analysis of microsatellite markers in Peach. Plant Breed. 121: 87-92.

Balls, E.K. (1975). Early uses of Californian plants. University of California Press. ISBN: 520 – 00072.

Baydar, N.G.; H. Bayda; and T. Debener (2004). Analysis of genetic relationships among Rosa damascene plants grown in Turkey by using AFLP and microsatellite markers. The Journal of Horticultural Science and Biotechnology. 3: 263-267.

Burgo, L.; C. Petr; and M.L. Badenes (2007). *Prunus* spp. biotechnology in agriculture and forestry. 60:283-307.

Choumane, W.; P. Van breugel; T.O.M. Bazuin; M. Baum; G.W. Ayad; and W. Amaral (2004). Genetic Diversity of *Pinus brutia* in Syria detected by molecular markers. Forest Genetics. 11 (2): 87-101.

Clarke, J.B.; and K.R. Tobutt (2003). Development and characterization of polymorphic microsatellites from *Prunus avium* 'Napoleon'. Mol. Ecol. Notes. 3:578–580.

Dirlewanger, E.; P. Cosson; M. Tavaud; M.J. Aranzana; C. Poisat; A. Zanetto; P. Arus and R. Laigret (2002). Development of microsatellite markers in peach (*Prunus persica* L. Batsch) and their use in genetic diversity analysis in Peach and sweet cherry (*Prunus avium* L.). Theor. Appl. Genet., 105: 127-138.

Davis, P.H. (1965). Flora of Turkey. Edinburgh university Press.

Donmez, A.; and S. Yildirimli (2002). Taxonomy of the genus *Prunus* L. (*Rosaceae*) In Turkey, Hacehepe University, Faculty of Science. Department of Biology .06532, Beytepe, Ankara, Turkey. 24: 189Pp.

EL- Mouei, R.; W. Choumane; and F. Dway (2011 a). Molecular characterization and genetic diversity in Citrus genus in Syria. The International Journal for Agriculture and Biology. 13(3): 351-356.

EL- Mouei, R.; W. Choumane; and F. Dway (2011 b). Characterization and estimation of genetic diversity in citrus rootstocks. The International Journal for Agriculture and Biology. 13(4): 571–575.

Gouta, H.; E. Ksia; T. Buhner; M. Moreno; M. Zarrouk; A. Mliki; and Y. Rcena (2010). Assessment of genetic diversity and relatedness among Tunisian almond germplasm using SSR markers. Hereditas. 147: 283–292.

Kadkhodaei, S.; M. Shahnazari; M. Khayyam; M. Ghasemi; H. Etminani; A. Imani; B. Arbakariya; and B. Ariff (2011). A comparative study of morphological and molecular diversity analysis among cultivated almonds (*Prunus dulcis*). AJCS. 5(1): 82-91.

Kahl, G. (2001). The dictionary of gene technology. Wiley- VCH, Weinheim.

Khadari, B. ; J. Charafi ; A. Moukhli ; and M. Ater (2007). Substantial genetic diversity in cultivated Moroccan olive despite a single major cultivar: a paradoxical situation evidenced by the use of SSR loci. Tree Genetics and Genomes. 4:213-221.

Mnejja, M.; J. Garcia-mas; W. Howad; M. L. Badenes; and P. Arus (2004). Simple-sequence repeat (SSR) markers of Japanese plum. (*Prunus salicina* Lindl.) are highly polymorphic and transferable ot peach and almond. Mol Ecol. Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, Apartado Oficial. 4:163-166 Moncada. València. Spain.

Mouterd, P. (1960). Nouvelle flore du Liban et de La Syrie. dar el Machriq Berouth.

Mullis, K.; F. Faloona; S. Scharf; R. Saiki; G. Horn; and H. Erlich (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. Cold spring Harb. Symp. Quant. Biol., 51: 263-273.

Nei, M. (1987). Molecular evolutionary genetics. Columbia University Press. New York. NY.

Ohta, S.; C. Nishitani; and T. Yamamoto (2005). Chloroplast microsatellites in *Prunus*, *Rosaceae*. Molecular Ecology, Shizuoka. 5: 837-840.

Powell, W.; M. Morgante; C. Andre; M. Hanafey; J. Vogel; S. Tingey; and A. Rafalski (1996). The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR for germplasm analysis. Mol. Breed. 2: 225-238.

Rohlf, F.G. (1993). NTSYS-pc. Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. Applied Biostatistical Inc. New York.

Testolin, R.; R. Messina; O. Lain; M.T. Marrazzo; W.G. Huang; and G. Cipriani (2004). Microsatellites isolated in almond from an AC-repeat enriched library. Mol. Ecol. Notes. 4:459–461.

Udupa, S.M.; and M. Baum (2001). High mutation rate and mutational bias at microsatellite loci in chickpea (*Cicer arietinum* L.). Mol. Gen. Gen., 265:1097-1103.

Vendramin, E.; M.T. Dettori; J. Giovinazzi; S. Micali; R. Quarta; and I. Verde (2007). A set of EST-SSRs isolated from peach fruit transcriptome and their transportability across *Prunus* species. Molecular Ecology. Via di Fioranello 52. 00134 Rome. Italy.

Weber, J.L.; and C. Wong (1993). Mutation of human short tandem repeats. Human Molecular Genetic. 2:1123-1128.

Zhang, X.Y.; C.W. LI; L.F. Wang; H.M. Wang; G.X. You; and Y.S. Dong (2002). An estimation of the minimum number of SSR alleles needed to revealed genetic relationships in wheat varieties. Theor. Appl. Genet., 106:112-117.

Zheebentyayeva, T.N.; G.L. Reighard; V.M. Gorina; and A.G. Abbott (2003). Simple sequence repeat (SSR) analysis for assessment of genetic variability in apricot germplasm. Theor. Appl. Genet., 106:435-444.

Molecular Characterization and Genetic Diversity in *Prunus ursina* KY Genotypes in the Syrian Coast

Wafaa Choumane [(1)] Haytham Ismael[(1)] Safaa Sabbouh[*(2)] Mazen Rajab[(3)] and Ammar Amran[(3)]

(1). Faculty of Agriculture, Tishreen University, Lattakia, Syria.
(2). Administration of Horticulture, General Commission for Scientific Agriculture Research (GCSAR), Damascus, Syria.
(3). Department of Biotechnology, Latakia Research Center, GCSAR, Damascus, Syria.

Received: 16/06/2019 Accepted: 02/08/2019

Abstract

The target of this research was the molecular characterization and the estimation of genetic diversity of trees belonging to *P. ursina* in the Syrian coastal area. This study was conducted during the period started from 2016 to 2018. 35 trees (genotypes) were collected from (6) sites (Jabla, Kasab, Drekesh, Kab, Brmant AL mshaeh and Msiaf) and were used for DNA analysis by 17 SSR primer pairs. The results showed that out of 17 primer pairs, only 6 were polymorphic and produced 14 different alleles. Number of alleles ranged from (2) to (4) with a mean of 2.3 alleles/primer pair. The genetic diversity was estimated for each locus and ranged from 0.37 (TPScp9F/ TPScp9R) to 0.51 (BPPCT038F/BPPCT038R) and (CPDCT014/AY862451). Dendrogram based on genetic distance results was established and two groups were obtained. The first group included samples from Brmant AL mshaeh, Kasab and Jabla, while the second group had samples from Msiaf, Kab and Drekesh. Samples from Drekesh were the most distant. No variation was detected between samples from the same site, but found among the different sites. Level of genetic diversity in *P. ursina* was low in the sites investigated, therefore there is a need to continue collecting more samples from other sites to detect the genetic diversity of *p. ursina* and keep them in gene bank gene bank in order to use them in future genetic improvement programs.

Key words: *P. ursina*, Molecular characterization, Genetic diversity, Syrian coast.