التوصيف الجزيئي باستخدام تقنية RAPD لطرز التفاح البري *Malus trilobata* (Lab) المنتشرة في جبال منطقتي جبلة والقرداحة

اياد دنوره*(1) وحافظ محفوض(1) وعلي ديب(2)

(1). مركز بحوث اللاذقية، الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية، دمشق، سورية.

(2). قسم البساتين– كلية الزراعة– جامعة تشرين– اللاذقية– سورية.

(*للمراسلة: د. اياد دنوره. البريد الالكتروني: eyed.dannoura@gmail.com)

تاريخ الاستلام: 2020/08/10 تاريخ القبول: 2020/09/6

الملخص

أُجريت الدراسة على التفاح البري *Malus trilobata* (Lab) المنتشر في جبال محافظة اللاذقية بين عامي 2013 و 2017 و شملت الدراسة عشرة مواقع، وهي بشراغي وحلبكو والمنيزلة ورأس الشعرة والدالية والإريزة وبيت زنتوت وزنيو وخربة السنديانة وجوبة برغال، يتراوح ارتفاعها عن سطح البحر بين 730– 1250 متر، ونُفذت الدراسة في مخبر البيولوجيا الجزيئية في مركز البحوث العلمية الزراعية في اللاذقية، هدفت هذه الدراسة إلى إجراء التوصيف الجزيئي باستخدام تقانة RAPD، وقد بّينت نتائج التوصيف الجزيئي كفاءة البادئات المستخدمة (16 بادئة) في كشف الاختلافات الوراثية بين الطرز المدروسة، إذ أعطت هذه البادئات 92 حزمة كلية منها 37 حزمة متباينة بمتوسط نسبة تباين 40.21%، ومكنت من رسم شجرة القرابة الوراثية لها، وانقسمت الطرز المدروسة بنتيجة التحليل العنقودي إلى مجموعتين منفصلتين بنسبة تباين وصلت حتى 29%، كما بّينت وجود قاعدة وراثية كبيرة للنوع المدروس، مما يفسح المجال واسعاً لإدخاله في برامج التربية والتحسين الوراثي للتفاحيات في سورية.

الكلمات المفتاحية: التفاح البري، التوصيف الجزيئي، تقانة RAPD، التحليل العنقودي.

المقدمة

أصبح البحث في الآونة الأخيرة عن المصادر الوراثية البرية محط اهتمام الكثير من الباحثين والعاملين في المؤسسات العلمية ذات الصلة بالعلوم الزراعية والوراثية، لما لها من أهمية كبيرة على صعيد البحث العلمي، وما ينتج عنه من فائدة على الصعيد الاقتصادي، من خلال الاعتماد عليها كمصدر للصفات الجيدة، مثل تحمل الإجهادات البيئية والأمراض ونقلها للنباتات المزروعة باتباع أساليب التهجين والانتخاب، أو الاعتماد عليها كأصول للتطعيم عليها وعلى وجه الخصوص أصول الفاكهة، وقد أولت الدول المنتجة للفاكهة، ومن ضمنها سورية اهتماماً كبيراً لتعريف وتوثيق وحفظ هذه المصادر بهدف الاستفادة منها في برامج التحسين الوراثي للأنواع والأصناف المزروعة (Lateur, 2002)، وحديثاً اتجه الباحثون نحو الاهتمام بدراسة هذه المصادر وتوصيفها وفق معايير علمية حديثة كالمعيار الجزيئي، وهذه الطرز البرية أكثر تحملاً ومقاومةً لمعظم الاجهادات البيئية والمرضية، كونها متأقلمة مع بيئتها ولا زالت موجودة فيها حتى الآن،

إلّا أنها تعاني من خطر التدهور الوراثي والميل للانقراض، مما يستدعي الاهتمام بها وتوصيفها لإعطائها هوية محددة وإدخالها لاحقاً في برامج التربية والإكثار .

يتبع جنس التفاح نحو27 نوعاً برياً من ضمنها النوع *Malus trilobata* (Lab)، (Moore and Ballington, 1990) الذي ينمو بشكلٍ جيد في كافة أنواع الأترية الخفيفة والمتوسطة والثقيلة، كما ينمو في الترب ذات الرطوبة العالية دون ضرر يذكر (Zahreddine *et al*., 2007)، ويمكن أن يعد كل نوع من هذه الأنواع البرية مخزوناً وراثياً هاماً في منطقة تواجده بسبب تأقلمه مع البيئة في هذه المنطقة (Janick and Moore, 1996).

ينتمي التفاح إلى الجنس *Malus* الذي يتبع تحت الفصيلة التفاحية Pomoideae، والفصيلة الوردية Rosaceae التي تضم عدد كبير من الأنواع يصل إلى أكثر من 3500 نوع تابعة لـ 100 جنس (أسود و الورع، 1992)، ومنها النوع *Malus trilobata* (Lab) الأكثر انتشاراً في منطقة غرب آسيا ومن ضمنها سورية (Qrnflech, 1994).

تندرج أنواع التفاح في مجموعتين:

- التفاح الحقيقي (Eumalus).
- التفاح البري (Sosbomalus)، والذي يملك أوراق غير منتظمة الحواف (محفوض، 1982).

يعد القوقاز ووسط آسيا وجبال الهيمالايا إضافة إلى الهند و باكستان وغرب الصين الموطن الأصلي له (Juniper *et al*., 1998)، ويتبع للجنس *Malus* عدة أنواع برية، لعل أهمها *Malus sylvestris* (L) Mill و *Malus pumilla* Mill و *Malus sieversii* (Lodeb.)Roem. و *Malus sieboldii* (Regel) Rehd. (Bean, 1981; Stephan *et al*., 2003; Will, 2008).

يطلق في الدراسات الحديثة اسم (Grabapple) على الأنواع البرية في مناطق انتشارها الطبيعية، ومن أهم هذه الأنواع *Malus trilobata* (Lab) والذي يمتاز بتاج خضري كثيف متفرع وثمار صغيرة حامضية الطعم (Rombauer *et al*., 2002)، (ديب و آخرون، 2010).

التوصيف الجزيئي:

برزت الحاجة الماسة مؤخرا لطرق تصنيفية حديثة ودقيقة لحل المشاكل التصنيفية الناتجة عن الطرق التقليدية القديمة، خاصة فيما يتعلق بالأنواع المتشابهة مورفولوجياً والطرز التابعة لنوع واحد أو أكثر، إن تطور التقنيات لا سيما أنظمة الرحلان الكهربائي والمؤشرات الجزيئية والتفاعل التسلسلي للبوليميراز **Polymerase Chain Reaction (PCR)**، أدى إلى تطور متسارع في مجال توصيف النباتات ومعرفة مدى القرابة الوراثية، وبالتالي تم الاتجاه لإيجاد طرائق تصنيفية تعتمد على المؤشرات الجزيئية التي تعد الوسيلة الأكثر دقة لكشف التباينات الوراثية على مستوى الـ DNA، كتقنية RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)، وتقنية ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) وSSR (Simple Sequence Repeats)، إضافة لتقنية RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) المطورة من قبل Welsh and Mcclelland عام 1990، وقد استخدمت جميع هذه التقنيات لتحديد التباينات الوراثية بين الأنواع التابعة لتحت الفصيلة التفاحية، ومنها *التفاح* (Zhou and Li, 2000; Gonzalez *et al.,* 2003; Modgil *et al.,*2005; Iannaccone *et al.,* 2007;).

تعتبر تقنية الـ RAPD من التقنيات الهامة والكثيرة الاستخدام، وذلك لعدة أسباب منها انخفاض تكاليفها مقارنةً بالتقنيات الأخرى، إضافةً لسهولة استخدامها وحاجتها لكمية قليلة من الـ(DNA) ولا تحتاج إلى معرفة مسبقة بالتركيب النيوكليوتيدى للمادة الوراثية المراد دراستها، في سورية استخدمت هذه التقنية بشكل واسع لتوصيف مختلف الأشجار والأصول البرية، كنبات *الكمثرى السورية* Bioss *Pyrus syriaca* (Muzher, 2004)، *والخرنوب* .L *Ceratonia siliqua* (Mahfoud *et al*., 2018).

استخدمت هذه التقنية بشكلٍ كبير لدراسة أصناف وأصول التفاح في مختلف أنحاء العالم، فقد استخدم Bisognin, *et al.,* (2009) تقنية RAPD لمعرفة درجة تشابه النباتات الناتجة عن إنبات بذور .Borkh *Malus domestica* مع النبات الأم، وذلك لتقييم هذه النباتات والحصول على أصول تفاح قوية من هذا النوع انطلاقاً من الإكثار الجنسي لأشجار جيدة مختارة مسبقاً.

كما تم دراسة الأنواع المهمة والمهددة بالانقراض في ألمانيا ومنها Mill (L) *Malus sylvestris*، وذلك من خلال معرفة تنوعها الوراثي الطبيعي، إذ تم دراسة 202 طراز من مختلف مناطق ألمانيا لمعرفة تركيبها الوراثي ومقارنتها مع التركيب الوراثي لـ 321 طرازاً من .Borkh *Malus domestica*، وكانت النتيجة الأهم هي أن التباينات الوراثية بينهما عالية نسبياً وتتراوح بين 30–45 %، (Wagner *et al.,* 2004).

واستخدم Modgil, *et al.* (2005) تقنية الـRAPD لدراسة الثبات الوراثي للنباتات المطعمة على الاصل MM106، وذلك باختبار عدة سلالات خضرية من النوع Mill *Malus pumila*.

في دراسة مشتركة بين جامعة Naples الإيطالية وأكاديمية Zeighian للعلوم الزراعية في الصين، توصل Manfredi, *et al*., (1996) إلى إمكانية التمييز بين سبعة أصناف تفاح ضمن النوع Mill *Malus pumila* باستخدام تقنية RAPD.

قام Kaya, *et al*., (2015) بدراسة 35 طرازاً من نوع التفاح.Borkh *Malus domestica*، باستخدام هذه التقنية لمعرفة مدى الترابط بين نوعية الثمار والتركيب الوراثي لهذه الطرز، وكشفت الدراسة أن هناك تنوع كبير في صفات الثمار الفيزيائية والكيميائية للطرز المدروسة يواكبه تنوع وراثي كبير أظهرته تقنية الـ RAPD باستخدام عشر بادئات فقط.

تمت دراسة 114 طراز من التفاح .Borkh *Malus domestica* في شمال غرب اسبانيا ومقارنتها مع 26 صنف مدخل، وبينت الدراسة بأن التركيب الوراثي للأصناف الإسبانية مختلفة نسبياً عن الأصناف المدخلة (Lorenzo *et al*., 2006).

تأتي أهمية دراسة طرز التفاح البري في جبال منطقتي جبلة والقرداحة، من أنها تعد مادة نباتية موجودة في الطبيعة لم تدرس بعد، وتحتوي على مخزون وراثي كبير ومهم لم يتم الاستفادة منه، وخاصةً أنه مدرج ضمن الأنواع المهددة بالانقراض فقد صدر من قبل وزارة الزراعة والإصلاح الزراعي ما بين عامي 1996 و 1999 عدة قرارات تقضي بتشكيل عدة محميات طبيعية من بينها محمية الفرنلق ومحمية الشوح والأرز، وذلك لحماية الأنواع الطبيعية الموجودة في هذه المحميات والمهددة بالانقراض، ومن ضمن هذه الأنواع التفاح البري والكمثرى السورية وغيرها (وزارة الزراعة و الإصلاح الزراعي، 1996،1999)، كما يفسح المجال واسعاً للقيام بأي دراسة لاحقة لاستثمار هذه الطرز، وقد تم الاعتماد على

تقنية RAPD لأنها تستخدم عند عدم توافر المعرفة المسبقة بالتسلسل النيكليوتيدي للطراز المدروس، كما أن هذه التقنية عشوائية ، وبالتالي يمكن استخدامها في هذا البحث.

مما سبق يمكن تحديد هدف البحث بحصر الطرز البرية لنوع التفاح البري (*Malus trilobata* (Lab في مواقع انتشارها في جبال منطقتي جبلة والقرداحة، وتوصيفها جزيئياً بتقنية RAPD وتحديد مدى القرابة الوراثية بين الطرز المدروسة.

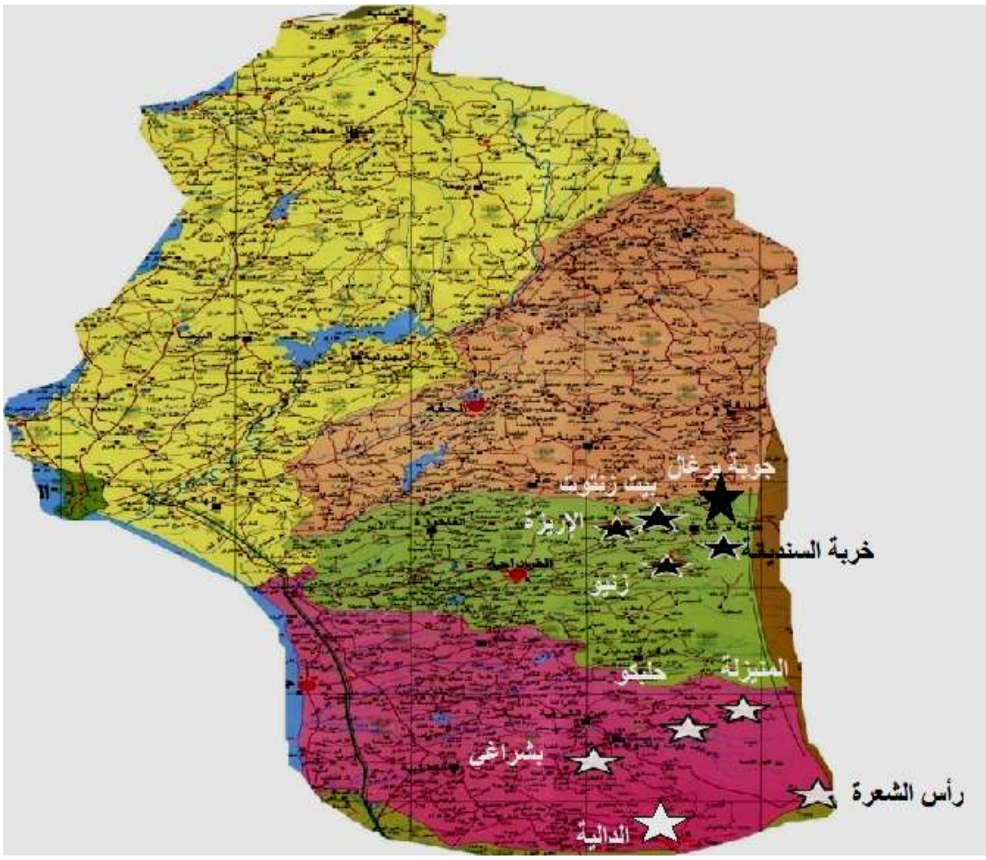
مواد البحث وطرائقه:

المادة النباتية:

تمت الدراسة على مجموعة من الطرز البرية لنوع التفاح البري (*Malus trilobata* (Lab المنتشرة طبيعياً في منطقتي جبلة والقرداحة بمحافظة اللاذقية.

مواقع الدراسة:

اعتماداً على دراسة (ديب و آخرون، 2010)، التي أشارت إلى وجود ستة طرز من النوع *Malus trilobata* (Lab) في جبال المنطقة الساحلية، تم البحث عن هذا النوع في جبال محافظة اللاذقية بدءاً من ارتفاع 600 متر عن مستوى سطح البحر، تم **العثور على 27 طرازاً في مواقع الدراسة** وتم إعطاء كل طراز رمزاً مؤلف من الحرف الأول لاسم الموقع مضافاً له رقم بحسب عدد طرز كل موقع (شكل 1)، (جدول1).



(الشكل 1). مواقع الدراسة في محافظة اللاذقية

(جدول 1). الطرز المدروسة و أماكن جمعها

المنطقة	المواقع المدروسة	رمز الطراز	الارتفاع عن سطح البحر(م)
جبلة	بشراغي	P1, P2, P2	780
	حلبكو	H1, H2	1000
	المنيزلة	M1, M2	1250
	رأس الشعرة	R1, R2	980
	الدالية	D1	1100
القرداحة	الإريزة	E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7, E8	730
	بيت زنتوت	B1, B2, B3	810
	زنيو	Z1, Z2,	800
	خربة السنديانة	K1, K2, K3	900
	جوبة برغال	G1	1000

طرائق العمل

جمع العينات النباتية وحفظها:

تم أخذ عينة من كل طراز مدروس(كل نبات يعتبر طراز مظهري، وبالتالي لدينا 27 طرازاً)، من النموات الحديثة ونقلها مبردة إلى مركز البحوث العلمية الزراعية في اللاذقية، إذ تم غسلها جيداً بالماء المقطر وحفظها في المجمدة على درجة حرارة – 80 درجة مئوية لحين استخلاص الـ DNA.

استخلاص الـ DNA:

تم استخلاص الـDNA من الطرز المدروسة وفق طريقة CTAB المعدلة (Kahl, 2001)، مع إضافة الـ PVP 1%.

اختبار نوعية الـDNA و قياس تركيزه:

تم اختبار نوعية الـ DNA بواسطة الرحلان الكهربائي باستخدام هلامة أغاروز 1%، وذلك بوزن 1 غ من الأغاروز وحلها في 100 ml من TBE (1%) وإضافة 4 µl إيثيديوم برومايد و2 µl من صبغة التحميل (Looding buffer) ووضع الـ DNA القياسي (Ladder)، ثم استخدام جهاز الرحلان الكهربائي وتطبيق جهد كهربائي مقداره 80 فولت لمدة نصف ساعة، كما تم قياس تركيز الحمض النووي DNA في العينات باستخدام مقياس الطيف الضوئي (Spectrophotometer)، والتي تراوحت بين 1.68 -1.84.

مكاثرة الحمض النووي الـ DNA:

تمت مكاثرة الحمض النووي باستخدام جهاز التفاعل السلسلي للبوليميراز PCR (Flexi gene- Germany) بحجم تفاعل 25 ميكرولتر(24.4µl مكونات تفاعل الـ PCR و 0.6 µl DNA ممدد 1/10) (الجدول 3)، و35 دورة تكونت كل دورة من ثلاث مراحل (الجدول 4)، أدت إلى تصنيع سلاسل جديدة من الـ DNA وذلك باستخدام (16) بادئة عشوائية مصنعة من قبل شركتي biotech VBC و metabion (Germany) موضحة في(الجدول 2).

(الجدول 2). البادئات المستخدمة في توصيف طرز التفاح البري (Lab) *M. trilobata* مع تسلسلها النيوكليوتيدي ودرجة الحرارة اللازمة لالتحام البادئة

الرقم	اسم البادئة	التسلسل النيوكليوتيدي (´3 - ´5)	درجة حرارة التحام البادئة
1	OPA-09	5´-GGGTAACGCC-3´	34
2	OPAL-16	5´-CTTTCGAGGG-3´	32
3	OPAN-09	5´-GGGGGAGATG-3´	34
4	OPAI-12	5´-GACGCGAACC-3´	32
5	OPAR-17	5´-CCACCACGAC-3´	34
6	OPAU-02	5´-CCAACCCGCA-3´	34
7	OPAX-02	5´-GGGAGGCAAA-3´	32
8	OPB-18	5´- CCACAGCAGT-3´	32
9	OPBB-02	5´-CCCCCGTTAG-3´	34
10	OPF-16	5´- GGAGTACTGC-3´	32
11	OPF-18	5´- GGCTCATGTC-3´	32
12	OPJ-01	5´- CCCGGCATAC-3´	32
13	OPK-12	5´- TGGCCCTCAC-3´	34
14	OPK-17	5´- CCCAGCTGTG-3´	34
15	OPL-11	5´- ACGATGAGCC-3´	32
16	OPAN-06	5´- GAGACGCACA-3´	32

(الجدول 3). مكونات تفاعل الـ PCR

مكون التفاعل	التركيز	الكمية/ µ L
محلول منظم (buffer 10x PCR)	1 M Tris-HClpH8 1M KCl, dH2O	2.5
مزيج نيوكليوتيدات DNTPs	10Mm	2.5
البادئة Primer	10 mM	1.25
MgCl2	25 mM	1
Taq polymerase	(1 unit)	0.2
ماء مقطر H2O	-	16.95
DNA	1/10	0.6
المجموع الكلي		25

(الجدول 4). مراحل تفاعل PCR المستخدمة في هذه الدراسة

المرحلة	درجة الحرارة (مْ)	الزمن	عدد الدورات
مرحلة تمهيدية	94	3 دقيقة	1
فصل سلاسل الـ DNA (Denaturation)	94	30 ثانية	35
التحام البادئة بـ DNA (Annealing)	34-32	45 ثانية	
مرحلة الاستطالة (Extension)	72	2 دقيقة	
مرحلة نهائية	72	7 دقيقة	1
حفظ	4	لا نهاية	-

تظهير نواتج تفاعل PCR:

تم فصل نواتج التفاعل بواسطة جهاز الرحلان الكهربائي نوع APELEX – France باستخدام هلامة من الأغاروز بتركيز 1.5%، تحتوي على الإيثيديوم بروما يد 0.5 µg/ml، ومحلول رحلان TBE buffer 1%، وتطبيق جهد كهربائي مقداره 80 فولت ولمدة ساعتين ونصف، ثم تصوير الهلامة بتعريضها للأشعة فوق البنفسجية (UV) باستخدام

جهاز CAMAG Reprostar 3 – Switzerland، إذ ظهرت قطع الـDNA المكاثرة على شكل حزم مضيئة على الهلامة.

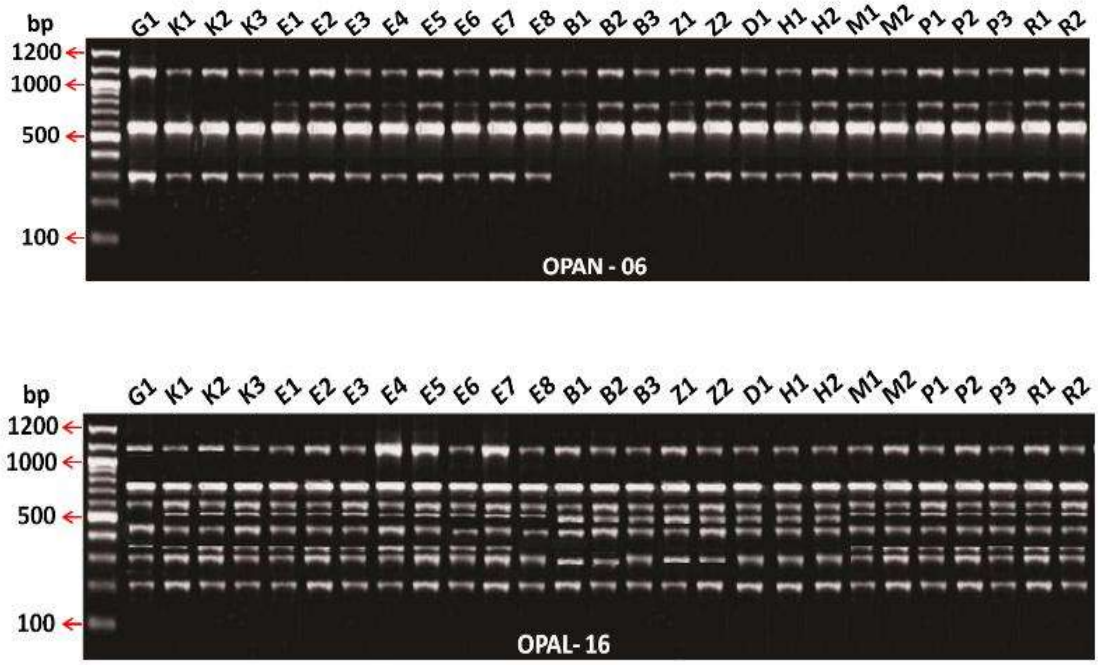
التحليل الإحصائي:

أُخضعت النتائج الخاصة بالتوصيف الجزيئي للبرنامج الإحصائي NTSYS (Rohlf, 2002) لإجراء التحليل العنقودي (Cluster analysis)، استخدم في التحليل الحزم الواضحة فقط وذات الوزن الجزيئي بين (100–1200)bp حيث أعطيت الحزمة الموجودة رقم 1 والحزمة الغائبة رقم0، وتم استخدام التحليل العنقودي الذي يعتمد على نسبة عدم التشابه الوراثي وذلك لرسم شجرة القرابة الوراثية بين الطرز المدروسة على شكل عنقودي Dendogram.

النتائج و المناقشة

أظهرت البادئات المختبرة بالإجمال كفاءة جيدة في كشف الاختلافات الوراثية بين الطرز المدروسة (الشكل2)، إذ أعطت البادئات الـ16 المستخدمة 92 حزمة في الطرز المدروسة كافة وصل عدد الحزم المتشابهة (monomorphic) إلى 55 حزمة في حين بلغ عدد الحزم المتباينة (polymorphic) 37 حزمة، وبالتالي بلغت نسبة الحزم المتباينة 40.21% من إجمالي عدد الحزم الكلية.

أعطت البادئة (OPAL16) أعلى عدد من الحزم (9 حزمة) والبادئة (OPK–17) أقل عدد من الحزم (3 حزمة) كما في (الجدول 5).

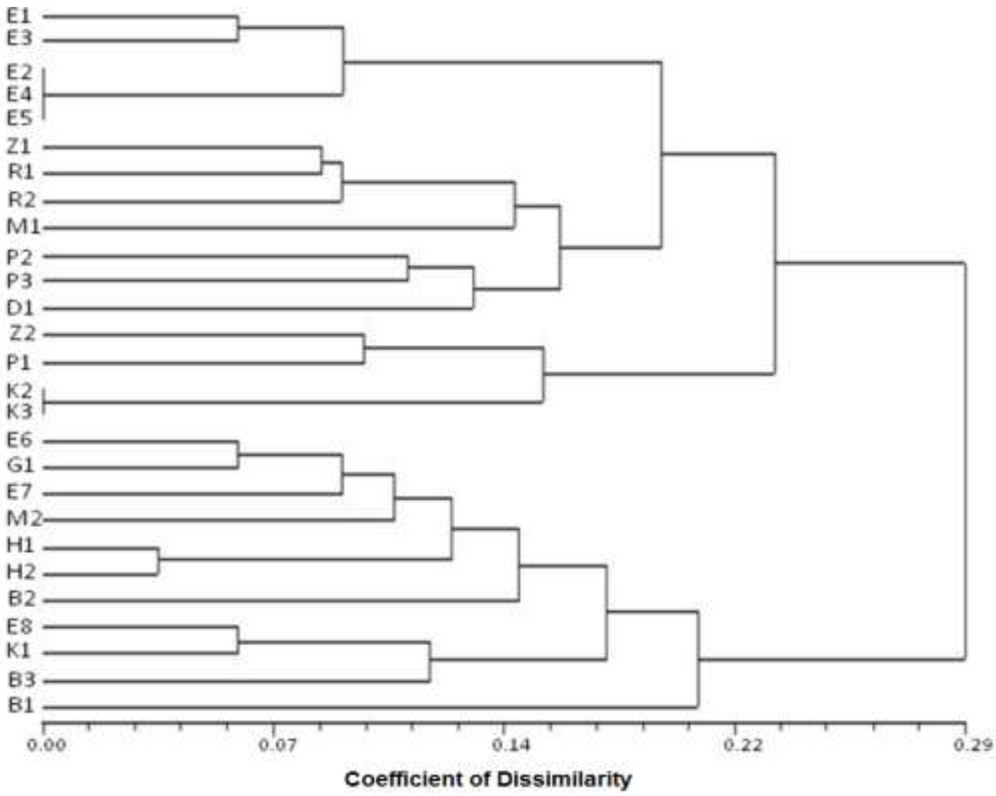


(الشكل 2). الرحلان الكهربائي لنواتج تفاعل الـ PCR في اختبار الـRAPD على هلامة اغاروز 1.5% للطرز المدروسة مع البادئتين OPAN.06 , OPAL.16 (**100–1200 bp** DNA Ladder)

(الجدول 5) .عدد الحزم الكلية والحزم المتباينة ونسبة التباين الناتجة عن استخدام 16 بادئة RAPD

الرقم	اسم البادئة	عدد الحزم الكلية	عدد الحزم المتباينة	نسبة التباين %
1	OPA-09	5	2	40
2	OPAL-16	9	3	33.33
3	OPAN-09	6	3	50
4	OPAI-12	4	1	25
5	OPAR-17	5	2	40
6	OPAU-02	4	1	25
7	OPAX-02	8	3	37.5
8	OPB-18	6	2	33.33
9	OPBB-02	8	4	50
10	OPF-16	5	3	60
11	OPF-18	5	2	40
12	OPJ-01	7	3	42.85
13	OPK-12	8	2	25
14	OPK-17	3	1	33.33
15	OPL-11	5	3	60
16	OPAN-06	4	2	50
المجموع		92	37	40.21

أظهرت شجرة القرابة الوراثية (الشكل 3)، وجود تباين وراثي واضح بين الطرز المدروسة، إذ توزعت ضمن مجموعتين مستقلتين وصلت نسبة التباين بينهما إلى 29%(حسب معامل الاختلاف Coefficient Of Dissimilarity ويساوي حسب نتيجة التحليل 0.29 أي 29%)، ضمت المجموعة الأولى (16) طرازاً من سبعة مواقع متباينة، في حين ضمت المجموعة الثانية (11) طرازاً من ستة مواقع، وانقسمت المجموعة الأولى بدورها إلى تحت مجموعتين، بنسبة تباين وصلت لـ (23.4%)، ضمت تحت المجموعة الأولى (12) طرازاً من ستة مواقع في حين ضمت تحت المجموعة الثانية (4) طرز من موقعين، كما انقسمت المجموعة الثانية إلى تحت مجموعتين أيضاً، بنسبة تباين وصلت حتى (20.7%)، ضمت تحت المجموعة الأولى (10) طرز في حين ضمت تحت المجموعة الثانية على طراز واحد فقط من موقع بيت زنتوت في القرداحة(B1)، كما أظهرت شجرة القرابة الوراثية عدم وجود اختلافات وراثية واضحة بين بعض طرز الموقع الواحد كطرز موقع الأريزة (E2, E4, E5) وأيضاً الطرازين (K2, K3) من موقع خربة السنديانة، إذ لم تسجل أي نسبة تباين بين هذه الطرز، في حين أظهرت شجرة القرابة وجود اختلافات وراثية واضحة بين معظم طرز الموقع الواحد حيث توزعت غالبية الطرز المنتشرة في المواقع المدروسة (سبعة مواقع) ضمن المجموعتين المذكورتين سابقاً وبنسبة تباين وصلت لـ (29%) باستثناء طرز مواقع (بشراغي، رأس الشعرة، زنيو) التي جاءت جميعها ضمن المجموعة الأولى.



(الشكل 3). شجرة القرابة الوراثية لطرز التفاح البري (Lab) *M. trilobata* اعتماداً على نتائج RAPD

كما أظهرت شجرة القرابة الوراثية وجود تنوع وراثي ضمن الطرز المدروسة بنسب تباين مختلفة، وقد أبدت بعض الطرز المنتشرة في موقع جغرافي محدد نسبة تباين وراثي فيما بينها تفوق نسبة التباين لطرز هذا الموقع مقارنة ببعض طرز المواقع الأخرى، ففي حين نجد أن نسبة التباين بين الطراز Z1 من موقع زنيو التابع لمنطقة القرداحة والطراز R1 من موقع راس الشعرة التابع لمنطقة جبلة لا تتعدى 8.4%، نجد أن نسبة التباين بينه وبين الطراز Z2 من موقع زنيو تصل حتى 23.4%، وهذا مؤشر واضح على عدم ارتباط التباينات لمعظم الطرز المدروسة بالظروف البيئية وإنما عائد لصفات وراثية مرتبطة بالطراز نفسه، وهذا يتفق مع نتائج عدد من الدراسات التي تشير لعدم ارتباط القرابة الوراثية لبعض الطرز والأنواع النباتية بموقعها الجغرافي، كما في دراسة ضميرية وآخرون (2010) الذين أشاروا إلى عدم ارتباط القرابة الوراثية بين طرز الزعرور المنتشرة في ريف دمشق بموقعها الجغرافي، ويناقض عدد من الدراسات التي تشير إلى وجود تقارب وراثي بين الأفراد التي تعيش في بيئة جغرافية واحدة متقاربة في أصلها ونسبها (Oliveira *et al.,* 1999; Peres *et al.,* 2005). يدفعنا وجود التباين الوراثي في بعض طرز المنطقة الواحدة من جهة، وغيابه في طرز بعض المناطق الأخرى إلى الإشارة لأهمية تحديد درجة القرابة الوراثية بين الطرز المدروسة قبل إدخالها في برامج التحسين الوراثي، إذ أن الطرز المتباينة وراثياً تؤمن قاعدة وراثية كبيرة لبرامج التربية والتحسين الوراثي (Muzher, 2004).

الاستنتاجات

1- أظهرت الدراسة وجود نسب من التباين الوراثي بين الطرز المدروسة، بالرغم من تقارب مواقع انتشارها وتقارب الظروف البيئية المحيطة بها، كما ظهر التباين الوراثي بشكل واضح في الكثير من الحالات ضمن طرز الموقع الواحد .

2- بالرغم من الظروف البيئية المتغيرة والكثير من الأخطار التي تعرضت لها طرز التفاح البري في مواقع انتشارها الطبيعية (رعي جائر, حرائق, قطع جائر)، إلا أن بعض أشجار التفاح البري بقيت محافظة على تواجدها في بعض هذه المواقع.

التوصيات:

1- ضرورة متابعة الدراسة على طرز التفاح البري في مختلف مواقع انتشارها، و ضرورة إكثارها واستخدامها بشكل مباشر كأصول لأصناف التفاح البري، كون معظم الأصول المستخدمة حاليا أصول مدخلة.

2- تشكل الطرز التي تناولتها هذه الدراسة قاعدة وراثية جيدة، يجب المحافظة عليه وحفظها ضمن مجمعات وراثية بغية إدخالها في برامج التربية والتحسين الوراثي للتفاحيات في سورية.

3- ضرورة إنشاء مجمع وراثي يتضمن الطرز المدروسة المكاثرة خضرياً من نفس الأشجار التي أُخذت منها العينات، وذلك للحفاظ عليها من أجل سهولة استخدامها في المستقبل كأصول أو عند إدخالها في برامج التربية.

المراجع:

أسود، محمد وليد والورع، حسان بشير .(1992). تصنيف النبات. مديرية الكتب و المطبوعات الجامعية. جامعة حلب.

ديب، علي وسليمان سليمان وديوب، سمر .(2010). حصر الأصول البرية للتفاح في جبال المنطقة الساحلية. مجلة جامعة تشرين للبحوث و الدراسات العلمية. سلسلة العلوم البيولوجية . المجلد 31 (4)، ص: 79-98.

ضميرية، جهاد وحميدان مروان وخنشور أنس وعبد القادر أحمد.(2010). التوصيف الجزيئي لبعض الطرز البرية من الزعرور *Crataegus azarolus* L. باستخدام تقنية RAPD. مجلة جامعة دمشق للعلوم الزراعية. مجلد 26(1)، ص: 93 – 106.

محفوض، محمد.(1982). التفاحيات و الكرمة. مديرية الكتب و المطبوعات الجامعية، جامعة تشرين. 382 صفحة.

نظام، محمد ومحفوض حافظ واسماعيل هيثم وحويجي مها (2015). التوصيف الجزيئي للخوخ البري *Prunuus cerasia* Blanche. المجلة الأردنية في العلوم الزراعية. مجلد 11(4)، ص: 1234 – 1249.

وزارة الزراعة و الإصلاح الزراعي، قرار وزاري /19/ ت ، تاريخ 1996/6/22 بتشكيل محمية الشوح و الأرز.

وزارة الزراعة و الإصلاح الزراعي، قرار وزاري/17/ت ، تاريخ 1999/5/18 بتشكيل محمية الفرنلق.

Bean, W. (1981). Trees and Shrubs Hardy in Great Britian. Vol.1-4.

Bisognin, C; SEEMULLER, E; CITTERIO, S; VELASCO, R; GRANDO, M. S; JARAUSCH, W.(2009). Use of RAPD markers to assess sexual vs. apomictic origin and ploidy level of breeding derived from crosses of apple proliferation-resistant Malus sieboldii and its hybrids with *Malus* × *domestica cultivars*.Plant Breeding, vol. 128, issus 5, 507-513.

GONZALEZ, H. A; Matines, P. R. A; castano-tostado, E.(2003). Analysis of low chilling apple *(Malus spp)* population from central Mexico based on molecular marcers RAPD. Acta Horticulturae, 606, 41-44.

Iannaccone, M; Palumbo, D; Ventimiglia, I; Patocchi, A; Spingo, P; capparelli, R.(2007).Use of molecular marcers and folw cytometry to preserve ancient annurca apple germplasm. Biotechnology letters, 29(2), 279-284.

Janick, J; Moore, J.(1996). Fruit breeding vine and small fruits. Wiley, New York, vol. II.

Juniper, B. E; Watkins, R; Harris, S. A.(1998). The origin of the apple. Acta Horticulture, 27-34.

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

Kaya, T; Balta, F ; Şensoy, S.(2015). Fruit quality parameters and molecular analysis of apple germplasm resources from van lake basin, Turkey, Turk J Agric, 39.

Lateur, M.(2002). Short note on *malus/pyrus* genetic resources in Belgium, In: MAGGIONI, L; FISCHER, M; LATEUR, M; LAMONT, E.J; LIPMAN, E. (Eds.). Report of working group on *malus/pyrus*. IPGRI. 19.

Lorenzo, S. P; Cabrer, A. M. R., Hernandez, M. B. D.(2006). Evaluation of genetic identity and variation of local apple cultivars (*Malus domestica Borkh*.) from Spain using micro satellite markers, Genetic resources and crop evaluation.

Mahfoud, H; Ameen, T; Kazngi, F; Nasser, S. (2018). Morphological and genetic variability of natural syrian carob (*Ceratonia Silique* L.). SSRG International Journal of Agriculture & Environmental Science (SSRG-IJAES), 5(2), 70-76.

Manfredi, P; Monti, L.M; Rao, R; Zhu, S; Santangelo, I.(1996). Molecular characterization of apple tree [*Malus pumila*] cultivars. The reproducibility of RAPD [random amplified polymorphic DNA] markers. http://agris.fao.org/agris-search/home.

Modgil, M; Mahajan, K; Chakrabarti, S. K; Sharma, D. R; Sopti, R. C.(2005). Molecular analysis of genetic stability in micropropagated apple rootstock MM106. Scientia Horticulturae, 104(2), 151-160.

Moore, J. N; Ballington, R.(1990). Genetic resources of temperate fruit and nut crops. Acta Hor,9789066052741, 290.

Muzher, B. M.(2004). Application of biochemical and PCR based molecular markers to the characterization of Syrian Pears*(Pyrus syriaca* .Boiss*)*.Genotypes. PH.D.Degree in Agricultural Science. Cairo University, 1-108

Oliveira, C.M; Mota, M; Monte-Ccorvo, L; Goulao, L; Silva, D. M.(1999). Molecular typing of *Pyrus* based on RAPD markers. Scientia Horticulturae, 79(4) 163-174.

Peres, S. R; Ruiz, D; Dicenta, F; Egea, J; Gomez, M. P.(2005). Application of simple sequence repeat (SSR) markers in apricot breeding:moleculer characterization, protection, and genetic relationships. Scientia Horticulturae, 103(3) , 305-315.

Qrnflech, M. M.(1994). Studies on the hawthoren*/ Crataegus Azarolus/* apontential root stock for golden delicious. Apple wiliams. Pear. Horticulture. Ural. Science, vol. 68.

Rohlf, F. J.(2002). Numerical taxonomy and multivariate abalysis system. NTSYS version, Applied Biostatistics Inc., New York, Stoy Book. N.Y.USA, 231.

Rombauer, I; Becker, M. R; Becer, E.(2002). All about canning and preserving (The joy of cooking series).New York:Scribner, ISBN, 0-7432-1502- 8, 72.

Stephan, B.R; Wanger, I; Kleinschmit, J.(2003). Technical guidelines for genetic conservation and use for wild Apple and Pear, International Plant Genetic, Resources Institute, ROME.

Wagner, I; Schmitt, H. P; Maurer, W; Tabel, U.(2004). Izozyme polymorphism and genetic structure of *Malus sylvestris* (L.) Mill. Native in western areas of Germany with respect to *Malus* × *domestica* Borkh, ISHS Acta Horticultural, 1, 663.

Welsh, J; Mcclelland, M.(1990). Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucleic acids Research, 18, 7213-7218

Will, C.(2008). Tree of wisconsin usda plant database virginia tech dendrology.

Zahreddine, H. G; Struve, D. K; Talhouk, S. N.(2007). *Malus trilobata* Schneid and *Acer syriacum* Boin and Gaill water use as affected by two fertilizer rates. Scientia Horticulturae, 112 (1), 99-107.

Zhou, Z. Q; Li, Y. N.(2000). The RAPD evidence for the phylogenetic relationship of the closely related species of cultivated apple. Genetic Resources and crop Evaluation, Vol. 47(4): 353-357.

Molecular Characterization of Wild Apple *Malus trilobata* (Lab) in Jable and Kerdaha Mountains Using RAPD Technique

Eyad Dannoura [(1)*], Hafez Mahfoud [(1)] and Ali Deeb [(2)]

(1). General Commission For Agricultural Scientific Research (GCSAR), Lattakia, Syria.

(2).Department Of Horticulture, Faculty, Of Agriculture, Tishreen University, Lattakia, Syria.

(*corresponding author: Dr. Eyad Dannoura. Email: eyed.dannoura@gmail.com)

Received: 10/08/2020 Accepted: 6/09/2020

Abstract

This study was carried out on the wild apple *Malus trilobata* (Lab) prevailing in Lattakia mountains, during (2013 – 2017), in ten areas (Pichraghe, Helbako, Almonaizlah, Raas al chaara, Aldalia, Aleriza, Beet zantot, Zanuo, Kherpat alsendiana, Gaopet bergal) , at an altitude between (730-1250) m above sea level. The study was achieved at Molecular Biotechnology lab/ Latakia Research Center. The aims of this study were to perform the molecular characterization by using RAPD technique. The results of the molecular characterization showed the efficiency of the primers used (16 primers) in detecting the genetic differences among the studied genotypes. Whereas all primers produced 92 fragments and showed efficiency in detecting genetic variation among the genotypes, only thirty-seven fragments were polymorphic and allowed to detect an average of genetic variability equal to 40.21% and helping in preparing the relevant dendrogram. The cluster analysis revealed that studied genotypes were divided into two groups with a variance ratio reached (29%). It also showed the existence of a large genetic base for the studied species, which allows it to be used in the breeding and genetic improvement programs for apples in Syria.

Keywords: Wild apple, Molecular characterization, Technique (RAPD), The cluster analysis.