

الكشف عن التباينات الوراثية بين أشجار أصل العنب B41 في مشاتل وزارة الزراعة في سورية باستخدام المؤشرات الجزيئية SSR

وائل عبد الحميد اليوسف⁽¹⁾ ووسيم إسماعيل محسن*⁽²⁾ ورحيم عبد السلام أبو الجدايل⁽¹⁾ ونور غازي الأسعد⁽¹⁾ وعبدالله فرحان الطاهر⁽¹⁾

(1). قسم التقانات الحيوية، الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية، دمشق، سورية.

(2). شعبة التقانات الحيوية، مركز البحوث العلمية الزراعية بالسويداء، الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية، دمشق، سورية.

(*للمراسلة: د. وسيم محسن. البريد الإلكتروني: wasimmo6@yahoo.com).

تاريخ القبول: 2016/03/27

تاريخ الاستلام: 2015/09/30

الملخص:

أجري البحث في الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية خلال الأعوام 2010 - 2012 بهدف توثيق وتحديد التباينات الوراثية للكشف عن الخلط بين أشجار أصل العنب B41 المقاوم لحشرة الفيلوكسيرا والمكاثرة في مشاتل حقول الأمهات التابعة لوزارة الزراعة في محافظات ريف دمشق، حمص، حلب والرقّة وذلك باستخدام تقنية التكرارات التتابعية البسيطة SSR. تمت الدراسة على 45 نباتاً منتخباً تمثل الأصل B41 وذلك اعتماداً على المواصفات الشكلية. بينت نتائج الدراسة الجزيئية أن خمسة أزواج من 20 زوجاً مستخدماً من بادئات الـ SSR المتخصصة بالعنب (VVMD5، VVMD6، VVMD7، VVMD28، VVMD32) استطاعت تمييز التباينات الوراثية وكشف الخلط الوراثي بين الأشجار المدروسة. حيث ميزت أربعة منها باستثناء البادئ VVMD6 شجرتين مغايرتين للأصل B41 من مشتل خرابو - ريف دمشق، وثلاثة منها VVMD7، VVMD28، VVMD32 مكنت من تمييز شجرة واحدة مغايرة من مشتل بابنس - حلب، كما استطاع البادئان VVMD5 و VVMD28 أن يميزا شجرة واحدة مغايرة من مشتل الشيخ حميد - حمص. أما في مشتل الرقة كانت كافة الأشجار مطابقة للأصل المدروس B41. وكنتيجة للبحث تم استبعاد الأشجار المخالفة واعتماد الأشجار المطابقة للأصل B41 لمكاثرتها ضمن مشاتل حقول الأمهات ولتوزيعها على المزارعين كأصل موثوق. كما أكدت هذه الدراسة على أهمية اعتماد المؤشرات الجزيئية المعتمدة على تقنية PCR لكشف التباينات الوراثية وتوثيق الأصول الوراثية النباتية لحمايتها من الخلط، كونها تتميز بالدقة العالية مقارنة بالمؤشرات الشكلية.

الكلمات المفتاحية: أصل العنب B41، حشرة الفيلوكسيرا، المؤشرات الجزيئية، التكرارات التتابعية البسيطة SSR.

المقدمة:

تُعدّ شجرة العنب (*vitis vinifera* L.) من الأشجار متساقطة الأوراق الهامة والرئيسية بين أشجار الفاكهة وذلك لنجاح زراعتها في مناطق بيئية مختلفة ولسهولة نقلها بالإضافة إلى إمكانية زراعتها على أنواع مختلفة من الترب ويضاف إلى ذلك ارتفاع درجة تحملها للملوحة أكثر من أنواع كثيرة أخرى من الأشجار المثمرة، يُعدّ حوض البحر الأبيض المتوسط وآسيا الوسطى من المواطن الأصلية للعنب (Albert, 1962)، وتاريخياً تعتبر زراعة العنب من الزراعات القديمة جداً ويُعدّ مركز نشوء العنب الحقيقي (*vitis vinifera* L.) الشرق الأوسط وأوروبا ومنه أنتت واستئبنت العديد من أنواع العنب المزروعة عالمياً (Baghasa, 2006).

تنتشر في سورية زراعة العنب في معظم محافظات القطر (دمشق وريفها، السويداء، القنيطرة، حمص، حماه، إدلب وحلب)، حيث تبلغ المساحة المزروعة بها حوالي 46.821 ألف هكتار، وإنتاج سنوي مقدر بـ 306.736 ألف طن سنوياً (وزارة الزراعة والإصلاح الزراعي، 2013) أي ما يعادل 10% تقريباً من إنتاج الدول العربية و0.4% من الإنتاج العالمي (Makee et al., 2003)، ويستهلك العنب طازجاً أو مجففاً بالإضافة إلى تصنيعه (الدبس والخل) (حامد والحوت، 2000)، وكذلك تستخدم مخلفات التصنيع كعلف للحيوانات وأسمدة عضوية (Baghasa, 2006).

بدأت هذه المساحات في السنوات الأخيرة بالتناقص مما أدى إلى خفض الإنتاج، ويعود ذلك للعديد من الأسباب وأهمها يتمثل في التغيرات المناخية من ارتفاع الحرارة وانحباس للأمطار، وكذلك انتشار العديد من الآفات والأمراض ومن أهمها حشرة الفيلوكسيرا (*Daktulosphaira Vitifoliae Fitch - Grape Phylloxera*)، والتي دخلت إلى سورية عن طريق الأصول الحاضنة المستوردة، وسببت خسائر كبيرة في إنتاجية ونوعية الأصناف المحلية غير المقاومة (الشيخ حسن، 1997). تعتبر أمريكا الشمالية الموطن الأصلي لحشرة الفيلوكسيرا، وهي من الحشرات الماصة، ذات لون أصفر فاتح، وحجم صغير، وذات طول لا يتجاوز 1، 5 مم، يتواجد منها نوعان أحدهما يعيش على جذور أشجار العنب، وبشكل عام تعاني منه الأصول الأمريكية، والآخر على الأوراق وتعاني منه الأنواع الأوروبية والآسيوية. وقد وصلت هذه الحشرة إلى أوروبا من القارة الأمريكية في أواخر القرن التاسع عشر (Astrid and Lars, 2009).

ساهم ظهور حشرة الفيلوكسيرا على الأصول البرية للعنب في الشمال الأمريكي وعلى المدى الطويل من خلال مراحل التطور والانتخاب الطبيعي في تشكل طرز وراثية مقاومة أو قابلة للتعايش معها بدون ظهور أي أعراض سلبية، أما عند الأنواع الأوروبية والآسيوية فلم تتواجد مورثات مقاومة مماثلة بسبب عدم تواجد العامل المؤثر (حشرة الفيلوكسيرا) وبالتالي فإن مراحل التطور والانتخاب الطبيعي بهذا الاتجاه لم تتحقق (Golodriga, 1978). لذلك ومن أجل تعويض هذه المراحل المفقودة من التطور ومنذ بدايات القرن الماضي نشأت ضرورة في إيجاد أصول جديدة من العنب متحملة للعديد من الإجهادات البيئية ومقاومة لحشرة الفيلوكسيرا من خلال استخدام برامج تربية موجهة للحصول على طرز وراثية تجمع بين ميزة المقاومة لحشرة الفيلوكسيرا الموجودة عند الأصول الأمريكية ومزايا الأنواع الأوروبية والآسيوية (Zamanidi, 2010). أدخل النوع (*Vitis vinifera* L.) أو العنب الأوروبي في العديد من برامج التربية لجودة ثماره ونوعيتها، إلا أنه حساس للإصابة بحشرة الفيلوكسيرا، حيث تم تهجينه مع النوع الأمريكي (*V. berlandieri*) الذي يتميز بمقاومته لحشرة الفيلوكسيرا فنتجت عنهما عدة أصول هامة منها: B41، Fercal، EM333. ويتميز الأصل B41 الذي سيكون محور الدراسة، بالإضافة للمقاومة الجيدة للفيلوكسيرا، بتحملة للكلس الفعال حتى 40%، ومتوسط التحمل للجفاف، ونسبة تجذيره من 40-50%، ومتوسط قوة النمو، والأصناف المطعمة عليه تبكر بالنضج (اليوسف وآخرون، 2012a).

تعد التباينات الشكلية من المعايير الأولى التي تستخدم في التوثيق والتصنيف النباتي، إلا أن الاعتماد عليها وحدها غير كاف، وبشكل خاص عند وجود تشابه كبير بين النباتات المدروسة، كما أن هذه الصفات شديدة التأثر بالظروف البيئية (Degani et al., 1998) ما يؤدي لحدوث الخطأ في التمييز عند وجود تشابه بين الأصناف وبين الأصول. لذلك يُعد من الضروري استخدام طرائق البيولوجيا الجزيئية التي تتميز بدقتها في التمييز وتعتمد في مبدأها على دراسة مورثات بحد ذاتها أو مقاطع معينة من الحمض النووي DNA، مثل تقنيات AFLP، SSR، ISSR، RAPD وغيرها، التي تعتمد على التفاعل التسلسلي للبوليميراز PCR. (Semagn et al., 2006).

تُعدّ التكرارات التتابعية البسيطة (Simple Sequence Repeats - SSR) أو التتابع الدقيقة (Micro Satellites - MS) من التقنيات المهمة التي تتميز بوثوقيتها العالية ومثابقتها، وذلك لارتفاع معدل تطورها بحيث تكشف عن وجود الأليلات المتعددة وبالتالي تساهم في كشف التباينات الوراثية بدقة عالية (Rafalski and Tingey, 1993; Sweigart et al., 1999) ووفرته

وتوزعها ضمن الجينوم وكذلك لتطلبها كميات قليلة من المادة الوراثية DNA (Wang *et al.*, 1994). استخدمت تقنية SSR في العديد من الدراسات ذات الأهداف المختلفة مثل إنشاء خرائط الارتباط الوراثية وفي دراسة التنوع الوراثي (Struss and Plieske, 1998) وكذلك في التمييز بين الأنواع، ويوجد العديد من الدراسات والأبحاث التي استخدمت هذه التقنية على عدد من الأنواع والأجناس النباتية كالتفاحيات (Al-Halabi *et al.*, 2009)، واللوزيات كالدراق والكرز (Roder *et al.*, 1995; Zhao and Testolin *et al.*, 2000; Ercisli *et al.*, 2011)، والحبوب كالقمح والرز (Kochert, 1992).

كذلك استخدمت تقنية SSR في العديد من الأبحاث والدراسات على العنب، حيث استخدمها اليوسف وآخرون (2012a) لتوصيف وتحديد التباينات الوراثية لستة من أصول العنب وهي Fercal, Richter99, So4, Ruggeri140, B41 و EM333 التي تنتشر بشكل واسع في مشاتل ومزارع العنب في سورية، حيث نتج عن استخدام 20 بادناً ظهور تعددية شكلية بنسبة 85% التي مكنت من التمييز بين الأصول المدروسة وتحديد التباينات الوراثية لديها بشكل واضح، كما تبين أن أكبر مقدر على إظهار التباينات بين الأصول المدروسة كانت باستخدام البادنان VRZAG62 و VVMD32 حيث كانت قيمة معامل PIC لهما مرتفعة (0.78). بدراسة درجة القرابة باستخدام التحليل العنقودي انتظمت الأصول المدروسة ضمن مجموعتين، وقع في الأولى (Fercal و EM333، B41) وفي الثانية (Ru140، So4 و R99). وكذلك قام اليوسف وآخرون (2012b) بتوصيف وتحديد التباينات الوراثية بين تسعة من أصول العنب المستوردة والمُدخلة حديثاً إلى سورية والمقاومة لحشرة الفيلوكسيرا باستخدام تقنية SSR. وهي الأصول P775، Ru140، 49/161، C11/157، Ru225، P1103، BB5، P779 و EM34. تم تحديد 52 أليلاً باستخدام 17 بادناً، وتبين أن 82% من مواقع التتابع الدقيقة المدروسة امتلكت تعددية شكلية polymorphism استطاعت التمييز بين الأصول المدروسة، وتبين أن أكبر مقدر على إظهار التباينات بين الأصول التسعة كانت باستخدام البادنان VVMD5 و VVMD28، حيث كانت قيمة المعامل PIC لهما مرتفعة نسبياً (0.86 و 0.78) على التوالي.

كما استخدم Warren and Christopher (1998) تقنية SSR لدراسة البصمة الوراثية Fingerprinting لنحو 110 مدخلات من عنب التاكسا *Vitis taxa*، ونتيجة لاستخدام خمسة بادئات تم تحديد من 16 إلى 38 حزمة من الأليلات، وتراوح معامل التعددية الشكلية PIC بين 0.87-0.95.

أيضاً درس Akkac *et al.*, (2005) التنوع الوراثي بين 60 صنف من العنب الخمري المنتشرة في الجزائر وحوض البحر الأبيض المتوسط باستخدام تقنية SSR، حيث استخدم 12 بادناً في تمييز 34 صنفاً تباينياً وراثياً بين بعضها بعضاً وكان متوسط عدد الأليلات الناتجة 9.1 ومتوسط معامل التعددية الشكلية PIC 0.77، كما وُزِعَ التحليل العنقودي أصناف العنب المدروسة ضمن أربع مجموعات.

أختبر Guido *et al.*, (2008) مجموعة من 45 بادناً من بادئات SSR من أجل تحديد التنوع الوراثي بين 48 صنف من العنب، وأظهرت النتائج وجود من 3 إلى 16 أليلاً وتراوح معامل التعددية الشكلية PIC بين 0.13-0.84. نظراً لأهمية اعتماد وتوزيع غراس موثوقة للمزارعين من الأصل B41 المقاوم لحشرة الفيلوكسيرا وتقنية حقول الأمهات لأصول العنب المزروعة في مشاتل وزارة الزراعة واستبعاد أي خلط ممكن فيها. استخدمت تقنية SSR لتوثيق أشجار العنب التابعة للأصل B41 والمكاثرة في عدد من مشاتل الوزارة ودراسة تطابقها مع شاهد إيجابي موثوق للأصل B41 ومستورد خصيصاً لهذا الهدف.

يهدف البحث إلى دراسة وتوثيق تطابق أشجار العنب المكاثرة في مشاتل وزارة الزراعة (حقول الأمهات) مع الشاهد الإيجابي المستورد وهو الأصل B41 والمقاوم لحشرة الفيلوكسيرا، وذلك اعتماداً على المؤشرات الجزيئية باستخدام تقنية SSR.

مواد البحث وطرقه:

مكان تنفيذ البحث:

نفذ البحث قسم التقانات الحيوية في الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية بسورية، من خلال مشروع بحثي بالتعاون مع وزارة الزراعة والإصلاح الزراعي خلال الأعوام 2010-2012.

المادة النباتية:

استورد الأصل الموثوق B41 من إيطاليا ليستخدم كشاهد إيجابي للمقارنة معه، وجمعت عينات ورقية من 45 نباتاً متطابقاً مع الأصل B41، اعتماداً على الصفات الشكلية، من حقول الأمهات للعنب في مشاتل وزارة الزراعة (الجدول 1).

الجدول 1. مواقع الدراسة وعدد العينات النباتية المدروسة للأصل B41 في كل موقع

المحافظة	المشتل	عدد العينات (الأشجار)
ريف دمشق	خرابو	12
حمص	الشيخ حميد	10
حلب	بابنس	11
الرقعة	الرقعة	12
المجموع		45

استخلاص الحمض الريبسي النووي المنقوص الأكسجين (DNA):

تم عزل الحمض النووي من 2-3 أوراق فنية خالية من الإصابات المرضية والحشرية بعمر 3-4 أسابيع بطريقة CTAB حسب طريقة (Doyle and Doyle, 1993). تم الكشف عن DNA وتحديد نوعيته في هلامة الأغاروز بتركيز 1% التي تحتوي على الإيثيديوم برومايد 0.5 مايكروغرام/مل، ومحلول 1xTBE، في جهاز الرحلان الكهربائي الأفقي (Bio Red) تحت جهد كهربائي 80-90 فولط. وتم قياس تراكيز DNA باستخدام جهاز المطياف الضوئي (UV Spectrophotometer) وتوحيدها عند جميع العينات إلى 50 نانوغرام/ ميكرو لتر باستخدام محلول TE (Tris-EDTA pH 8).

تقنية SSR (Simple Sequence Repeat):

تمت مضاعفة الحمض النووي باستخدام 20 زوجاً من بادئات SSR (الجدول 2)، باستخدام تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR)، باستخدام جهاز (Eppendorf PCR و Euro Clone) بحجم تفاعل نهائي 25 ميكرو لتر وفق البرنامج الحراري التالي:

- 1- فصل أولي لسلاسل DNA (Initial Denaturation) على درجة حرارة 94 م° لمدة 5 دقائق.
- 2- إجراء 36 دورة تتضمن:

- فصل السلاسل Denaturation لمدة 45 ثانية على درجة حرارة 94 م°.
- التحام البادئ Annealing لمدة 45 ثانية على حرارة 51 - 65 م° (حسب درجة حرارة الالتحام لكل بادئ).
- استطالة سلسلة الـ DNA الجديدة Extension لمدة 1.5 دقيقة على درجة حرارة 72 م°.
- 3- استطالة نهائية لمدة 7 دقائق على درجة حرارة 72 م°.

تم فصل نواتج تفاعل PCR في هلامة الأغاروز بتركيز 2% مع تحميل مؤشر قياسي DNA (Gene ruler 100bp plus) باستخدام جهاز Gel Documentation، وتم تحديد حجم الأليلات - للحزم الظاهرة (Allele size, bp) والتباينات بينها باستخدام برنامج Gel Analysis، وقد اعتبرت الأشجار غير المطابقة للشاهد في حجم الأليل أشجار مغايرة للأصل B41، وقد

تم حساب التعددية الشكلية (Polymorphism) وهي النسبة المئوية للأليلات المتعددة شكلياً إلى عدد الأليلات الكلي.
الجدول 2. البادئات المستخدمة، وتسلسلها النيكلوتيدي، ودرجة حرارة الالتحام (T_{an}).

الرقم ¹	اسم البادئ	التسلسل (5' → 3') Forward / Reverse	حرارة الالتحام (T_{an})
1	VRZAG62	F- GGTGAAATGGGCACCGAACACACGC R- CCATGTCTCTCCTCAGCTTCTCAGC	56
2	VRZAG79	F- AGATTGTGGAGGAGGGAACAAACCG R- TGCCCCCATTTTCAAACCTCCCTTCC	51
3	VVS4	F- CCATCAGTGATAAAACCTAATGCC R- CCCACCTTGCCCTTAGATGTTA	52
4	VVMD5	F- CTAGAGCTACGCCAATCCAA R- TATACCAAAAATCATATTCTAAA	57
5	VVMD6	F- ATCTCTAACCCTAAAACCAT R- CTGTGCTAAGACGAAGAAGA	52
6	VVMD7	F- AGAGTTGCGGAGAACAGGAT R- CGAACCTTCACACGCTTGAT	52
7	VVMD27	F- GTACCAGATCTGAATACATCCGTAAGT R- ACGGGTATAGAGCAAACGGTGT	55
8	VVMD28	F-AACAATTCAATGAAAAGAGAGAGAGA R- TCATCAATTTTCGTATCTCTATTTGCTG	55
9	VVMD31	F- CAGTGGTTTTTCTTAAAGTTTCAAGG R- CTCTGTGAAAGAGGAAGAGACGC	59
10	VVMD32	F- TATGATTTTTTAGGGGGGTGAGG R- GGAAAGATGGGATGACTCGC	56
11	SCU04VV	F- TGTCTCTTTCCCTCTCCAAC R- CAGTCTGTCATCTGACCATGTAGCC	55
12	SCU05VV	F- CAAGCAGTTATTGAAGCTGCAAGG R- TCATCCATCACACAGGAAACAGTG	61
13	SCU07VV	F- CCGAAGAGGAATATGGGTTTGAG R- CCTAACTTGAAACGAAAGGACTGC	52
14	SCU08VV	F- CGAGACCCAGCATCGTTTCAAG R- GCAAAAATCCTCCCCGCCTACAAGTC	61
15	SCU10VV	F- TACCCCCACAACCCTTTTTCCC R- TTCTCCGCCACCTCCTTTTCAC	59
16	SCU14VV	F- CTGCACTTGAATACGAGCAGGTC R- TGTTATATGATCCTCCCCCTCCTC	52
17	SCU15VV	F- GCCTATGTGCCAGACCAAAAAC R- TTGGAAGTAGCCAGCCCAACCTTC	62
18	SCU16VVa	F- CAAAGACAAAGAAGCCACCGAC R- ACCCTCTAAAGCACACACAGGAAC	61
19	Vmc8A7	F- GCAGCAACTCTTACACACCG R- GTGGGAGCACTGGTTGCTTTAG	62
20	Vmc8D11	F- TGTTGAAGCTAGCATTGTCTCC R- ATTCGTCTTTATGCCATTGTT	55

¹ 2-1 حسب (Sefc *et al.*, 1999)، 3 حسب (Thomas and Scott, 1993)، 4-10 حسب (Bowers *et al.*, 1999)، 11-18 حسب (Scott *et al.*, 2000)، 19-20 حسب (Welter *et al.*, 2007).

النتائج والمناقشة:

أعطت البادئات المستخدمة 25 أليلاً (Allele) عند الأصل المستورد الموثوق من العنب B41 (الشاهد الإيجابي)، وتطابقت هذه النتائج مع نتائج دراسة التوصيف الجزيئي لأصول العنب المنتشرة في سورية (اليوسف وآخرون، 2012a) باستخدام المجموعة نفسها من البادئات المدروسة. وقد أظهرت خمسة بادئات (25% من العدد الكلي) خاصية Heterozygous عند الأصل B41 المدروس، وذلك بتحديد زوج من الأليلات المختلفة بالوزن الجزيئي للموقع الميكروساتيليني المدروس (Micro Satellite Locus) المتوضعة على الصبغيين المتماثلين (Homologous Chromosomes).

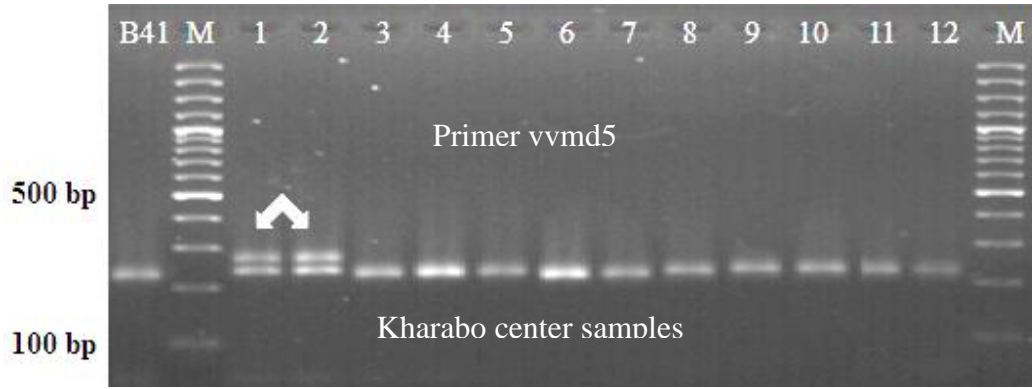
عند دراسة التباين الوراثي بين أشجار العنب المدروسة (45 شجرة) المزروعة في المشاتل التابعة لوزارة الزراعة ومقارنتها مع الأصل الموثوق المقاوم للفيلوكسيرا B41، لوحظ أن خمسة من البادئات المستخدمة (25% من العدد الكلي) وهي VVMD5، VVMD6، VVMD7، VVMD28، وVVMD32 استطاعت أن تميز أربعة أشجار (9% من العدد الكلي) مغايرة وراثياً وأظهرت تعددية شكلية خاصة بها. وهي شجرتان في مشتل خرابو وشجرة في كل من مشتل بابنس ومشتل الشيخ حميد (الجدول 3)، ولم يلحظ أي تباين وراثي بين الأشجار المدروسة في مشتل الرقة والشاهد الإيجابي.

الجدول 3. البادئات التي مكنت من إظهار تعددية شكلية مميزة للعينات المدروسة المغايرة للأصل B41، وعدد وحجم الأليلات الناتجة.

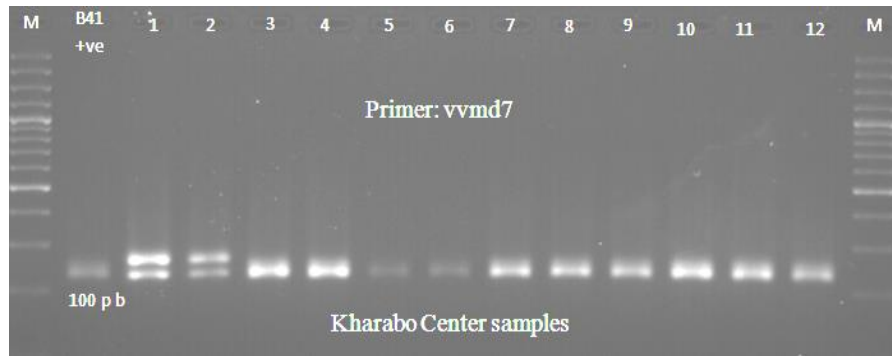
حجم الأليلات الناتجة عند العينات المغايرة مقارنة مع الشاهد الإيجابي حسب المشاتل، bp			حجم الأليلات الناتجة عند الشاهد الإيجابي، bp	عدد الأليلات الناتجة عند الشاهد الإيجابي	البادئ
بابنس الشجرة 2	الشيخ حميد الشجرة 10	خرابو الشجرة 1 و 2			
متطابق	متطابق	240 290	237	1	VVMD5
متطابق	230	متطابق	218	1	VVMD6
232 256	متطابق	230 275	237	1	VVMD7
250	250	230 260	250 275	2	VVMD28
260	متطابق	246 275	246 260	2	VVMD32

في مشتل خرابو أعطت كافة البادئات المستخدمة 32 أليلاً، سبعة منها أظهرت تعددية شكلية مغايرة للأصل B41 بنسبة (21.9%) ولوحظت فقط عند العينتين (الشجرتين) الأولى والثانية، حيث استطاعت أربعة بادئات من تحديدها وهي VVMD5، VVMD7، VVMD28، وVVMD32.

أعطى البادئ VVMD5 ثلاثة أليلات، اثنان منها مغايران للأصل B41 في العينتين الأولى والثانية (240 و 290 bp)، والثالث مطابق للأصل B41 (237 bp) في باقي العينات المدروسة (الشكل 1). كذلك تمكن البادئ VVMD7 من إظهار ثلاثة أليلات، اثنان منها مغايران للأصل B41 في العينتين الأولى والثانية (230 و 275 bp)، والثالث مطابق للأصل B41 (237 bp) في باقي العينات المدروسة (الشكل 2).

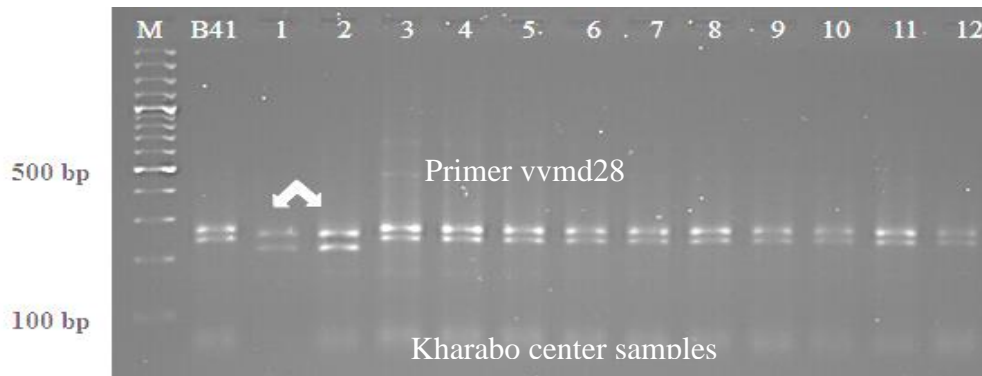


الشكل 1. نتائج الرحلان الكهربائي لنواتج PCR لعينات مشتل خرابو باستخدام البادئ VVMD5. حيث: B41: الشاهد الإيجابي، M: المؤشر القياسي (100 bp ladder)، 1-12: الأشجار المدروسة.



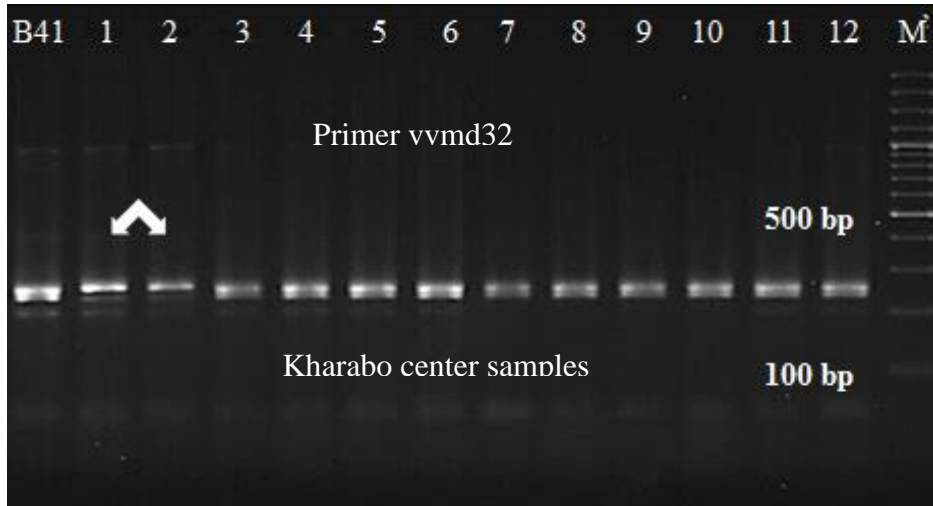
الشكل 2. نتائج الرحلان الكهربائي لنواتج PCR لعينات مشتل خرابو باستخدام البادئ VVMD7. حيث: B41: الشاهد الإيجابي، M: المؤشر القياسي (100 bp ladder)، 1-12: الأشجار المدروسة.

كذلك باستخدام البادئ VVMD28 تم تمييز أربعة أليات متعددة شكلياً، ويبين الشكل (3) أن غالبية العينات أظهرت أليلين بحجم 250 و 275 bp مطابقة للأصل الموثوق B41 ما عدا العينتين الأولى والثانية اللتان أعطتا أليلين مغايرين بحجم 230 و 260 bp.



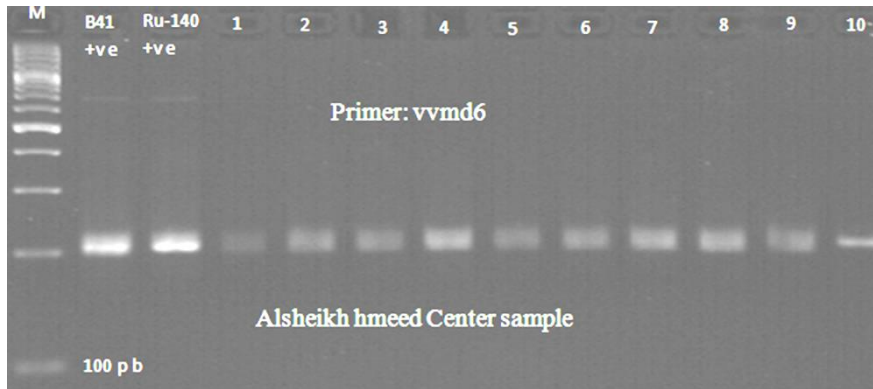
الشكل 3: نتائج الرحلان الكهربائي لنواتج PCR لعينات مشتل خرابو باستخدام البادئ VVMD28. حيث: B41: الشاهد الإيجابي، M: المؤشر القياسي (100 bp ladder)، 1-12: الأشجار المدروسة.

وعند تطبيق البادئ VVMD32 (الشكل 4) كانت جميع العينات مطابقة للشاهد الإيجابي الأصل B41 الذي أعطى أليلين بحجم 246 و 260 bp، باستثناء العينتين الأولى والثانية كانتا مخالفتين حيث ظهر عندهما بالإضافة للأليل 246 bp أليلاً بحجم 275 bp مع غياب الأليل 260 bp، وقد تمكن هذا البادئ من إعطاء ثلاثة أليات أظهرت تعددين شكليين ضمن العينات المدروسة.

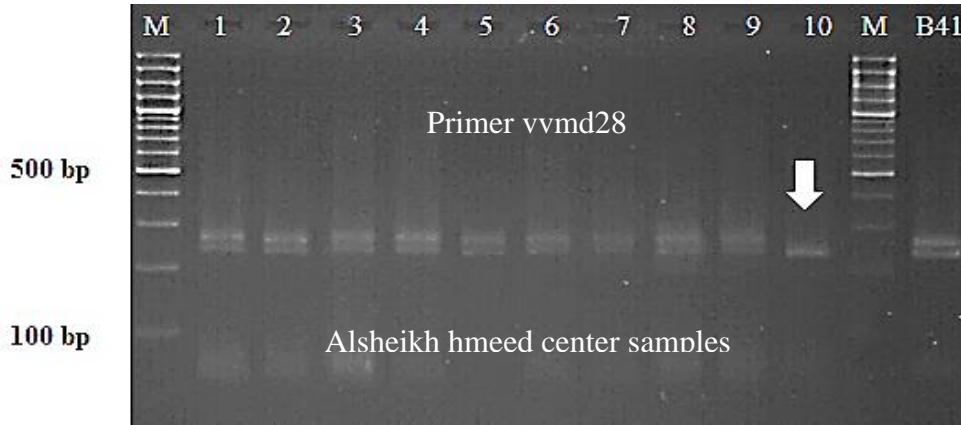


الشكل 4. نتائج الرحلان الكهربائي لنواتج PCR لعينات مشتل خرابو باستخدام البادئ VVMD32. حيث: B41: الشاهد الإيجابي، M: المؤشر القياسي (100 bp ladder)، 1-12: الأشجار المدروسة.

في مشتل الشيخ حميد تم تحديد 26 أليلاً باستخدام كافة البادئات، اثنان منها أظهرتا تعددية شكلية مغايرة للأصل B41 بنسبة (7.7%) ولوحظت فقط عند العينة العاشرة، حيث استطاع بادئان من تحديدها وهما VVMD6 و VVMD28. أعطى البادئ VVMD6 أليلين، أحدهما مطابق للأصل B41 بحجم 218 bp في معظم العينات المدروسة، والثاني مغاير ظهر في العينة العاشرة فقط وبحجم 230 bp (الشكل 5). في حين أن البادئ VVMD28 أظهر أليلين بحجم 250-275 bp (الشكل 6)، حيث تم تحديدهما معاً عند غالبية العينات المطابقة للشاهد الإيجابي ما عدا العينة العاشرة التي حدّد عندها الأليل 250 bp فقط مع غياب الأليل 275 bp.

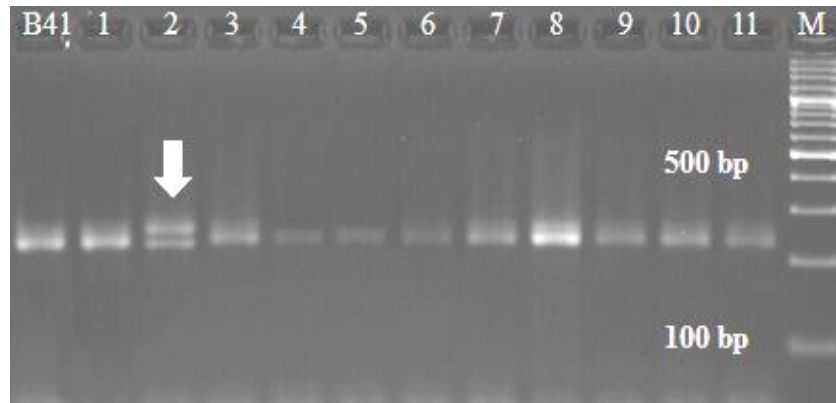


الشكل 5. نتائج الرحلان الكهربائي لنواتج PCR لعينات مشتل الشيخ حميد باستخدام البادئ VVMD6. حيث: B41: الشاهد الإيجابي، M: المؤشر القياسي (100 bp ladder)، 1-10: الأشجار المدروسة.

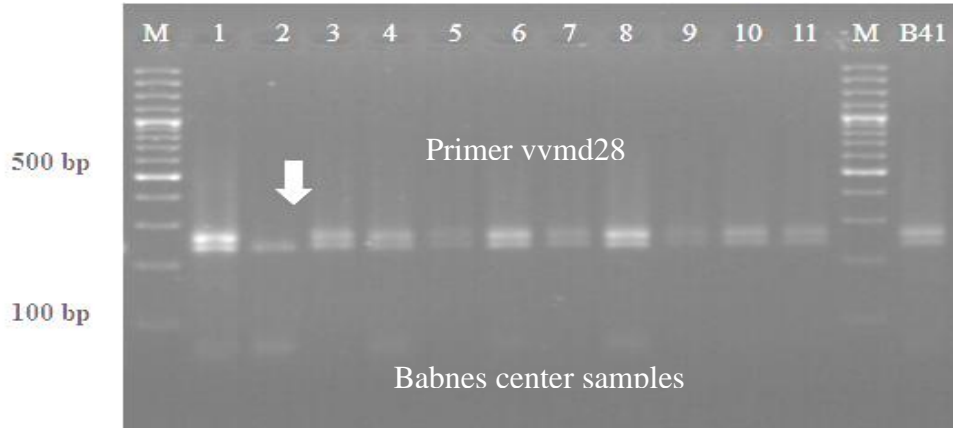


الشكل 6. نتائج الرحلان الكهربائي لنواتج PCR لعينات مشتل الشيخ حميد باستخدام البادئ VVMD28. حيث: B41: الشاهد الإيجابي، M: المؤشر القياسي (100 bp ladder)، 1-10: الأشجار المدروسة.

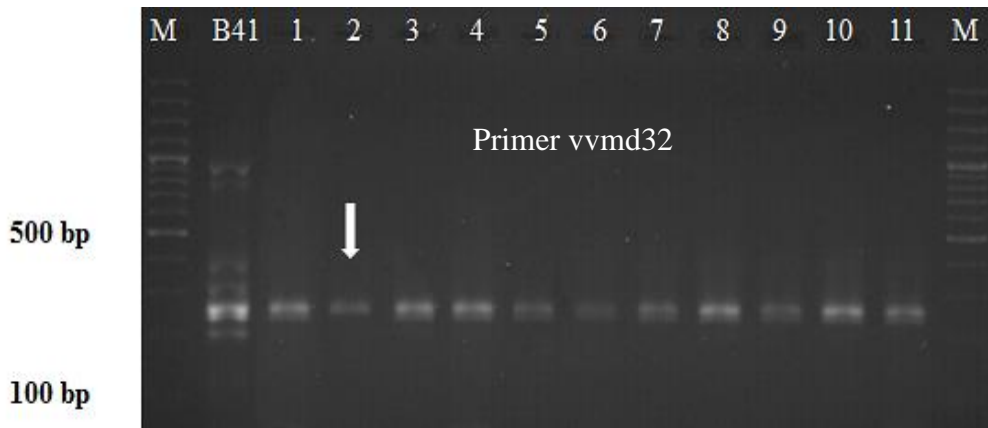
في مشتل بابنس أعطت البادئات المدروسة 27 أليلاً، أربعة منها أظهرت تعددية شكلية مغايرة للأصل B41 بنسبة (14.8%) ولوحظت عند العينة الثانية فقط، وقد استطاعت ثلاثة بادئات تحديدها وهي VVMD7، و VVMD28 و VVMD32. كشف البادئ VVMD7 عن ثلاثة أليالات، أظهرت تعددين شكليين أحدهما مطابق للأصل B41 والثاني مغاير، حيث كانت غالبية العينات مطابقة للأصل الموثوق B41 وأظهرت أليلاً واحداً بحجم bp237 ما عدا العينة الثانية أعطت أليلين بحجم 232 و bp256 (الشكل 7). ومع البادئ VVMD28 تم تحديد أليلين أظهرتا تعددين شكليين، وقد كانت غالبية العينات مطابقة للأصل الموثوق B41 وظهر عندها أليلين بحجم 250 و bp275، ما عدا العينة الثانية التي حدد عندها فقط الأليل bp250 مع غياب الأليل bp275 (الشكل 8). كذلك عند استخدام البادئ VVMD32 (الشكل 9) حيث كانت غالبية العينات مطابقة للأصل الموثوق B41 وأظهرت حزمتين بحجم 246 و bp260 ما عدا العينة الثانية أعطت حزمة بحجم bp260 مع غياب الحزمة bp246.



الشكل 7. نتائج الرحلان الكهربائي لنواتج PCR لعينات مشتل بابنس باستخدام البادئ VVMD7. حيث: B41: الشاهد الإيجابي، M: المؤشر القياسي (100 bp ladder)، 1-11: الأشجار المدروسة.

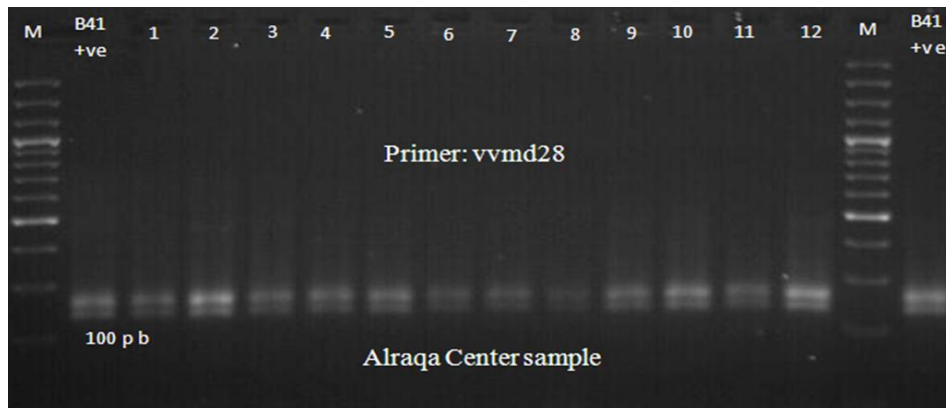


الشكل 8. نتائج الرحلان الكهربائي لنواتج PCR لعينات مشتل بابنس باستخدام البادئ VVMD28. حيث: B41: الشاهد الإيجابي، M: المؤشر القياسي (100 bp ladder)، 1-11: الأشجار المدروسة.



الشكل 9. نتائج الرحلان الكهربائي لنواتج PCR لعينات مشتل بابنس باستخدام البادئ VVMD32. حيث: B41: الشاهد الإيجابي، M: المؤشر القياسي (100 bp ladder)، 1-11: الأشجار المدروسة.

في مشتل الرقة أعطت البادئات المستخدمة 25 أليلاً، وبينت نتائج الرحلان الكهربائي عدم وجود تباينات وراثية ضمن العينات المدروسة (الشكل 10) وبالتالي استبعاد وجود أي خلط وراثي في هذا المشتل، حيث أن جميع العينات كانت مطابقة للشاهد الإيجابي B41.



الشكل 10. نتائج الرحلان الكهربائي لنواتج PCR لعينات مشتل الرقة باستخدام البادئ VVMD28. حيث: B41: الشاهد الإيجابي، M: المؤشر القياسي (100 bp ladder)، 1-12: الأشجار المدروسة.

تطابقت النتائج بالنسبة لأحجام الحزم الناتجة عند العينات المغايرة في المشاتل مقارنة مع مدى الأحجام الناتجة في دراسة (Andrew and Summaira, 2013)، حيث تراوحت أحجام الحزم الناتجة في دراستهما لتحديد مجموعة من مورثات المقاومة لدى أصناف العنب المزروعة في أمريكا الجنوبية، بين 210 - 290 bp بالنسبة للبادئ VVMD5 الذي يقع على الصبغي 16، و 220 - 270 bp بالنسبة للبادئ VVMD7 الذي يقع على الصبغي 7، و 216 - 270 bp للبادئ VVMD28 الذي يقع على الصبغي 3 و 240-280 bp للبادئ VVMD32 الذي يقع على الصبغي 4. وبالتالي فإن النتائج أكدت وجود تعددية شكلية وراثية (Polymorphism) متباينة مكنت من استبعاد الشجرتين الأولى والثانية من مشتل خرابو والثانية من مشتل بابنس والعاشرة من مشتل الشيخ حميد كونهما جميعها مغايرة وراثياً للأصل B41. وقد تكون التباينات الوراثية عند العينات المغايرة ناتجة عن خلط وراثي بين أصول الأشجار المزروعة ضمن المشاتل أو كخطأ ناتج عند إكثارها لاعتبارها ممثلة للأصل B41 نظراً للتشابه الشكلي الكبير بينها.

الاستنتاجات:

- مكنت تقنية البيولوجيا الجزيئية SSR من توثيق وتوصيف أشجار العنب المقاومة لحشرة الفيلوكسيرا المكاثرة في مشاتل وزارة الزراعة (حقول الأمهات) والكشف عن الخلط الوراثي في أشجار العنب المزروعة مقارنة مع الشاهد الإيجابي الموثوق B41. حيث تم تحديد أعلى نسبة خلط في مشتل خرابو (17%)، وكانت نسبياً متقاربة في كل من مشاتل الشيخ حميد وبابنس (10% و 9% على التوالي)، فقط عينات مشتل الرقة أظهرت نقاوة عالية ولم يحدد عندها أي تباينات وراثية.

- أظهرت أزواج البادئات VVMD5، VVMD6، VVMD7، VVMD28 و VVMD32 إمكانية عالية في كشف التباينات الوراثية عند العينات المغايرة مقارنة مع الشاهد الإيجابي وتمييزها عن أشجار الأصل B41 المزروعة ضمن المشاتل.

- النتائج الحاصلة أكدت على أهمية استخدام التقانات الحيوية ممثلة بطرائق البيولوجيا الجزيئية المختلفة، في توثيق وتوصيف الأصول النباتية بالموازاة مع الدراسات الشكلية، كون المؤشرات الجزيئية للحمض النووي DNA ثابتة ولا تتأثر بالعوامل البيئية.

توصي الدراسة:

- اعتماد الأشجار المطابقة للشاهد الإيجابي (B41) التي تم توثيقها في إكثار وإعادة تجديد حقول الأمهات، واستبعاد الأشجار المغايرة.

- التركيز على استخدام البادئات المنتخبة في هذه الدراسة التي مكنت من تمييز الأشجار المغايرة.

- تطبيق دراسات مشابهة لأصول العنب المختلفة المنتشرة في المشاتل وحقول الأمهات في المحافظات الأخرى من القطر بالإضافة للأصول الموجودة في مراكز البحوث بهدف تنقيتها ودرستها جزيئياً.

كلمة شكر:

يشكر الباحثون الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية لتغطيتها تكاليف البحث وتقديمها التسهيلات اللازمة لتنفيذه في قسم التقانات الحيوية.

المراجع:

وزارة الزراعة والإصلاح الزراعي (2013). قسم الإحصاء، مديرية الإحصاء والتعاون الدولي، وزارة الزراعة والإصلاح الزراعي، دمشق، سورية.

اليوسف، وائل ووسيم محسن وعبد الله الطاهر ورحيم أبو الجدايل (2012a). التوصيف الجزيئي لبعض أصول العنب المنتشرة

- في سورية باستخدام المؤشرات الجزيئية SSR. المجلة الأردنية للعلوم الزراعية، العدد 8(3): 499-483.
- اليوسف، وائل ووسيم محسن ورحيم أبو الجدائل وقاسم طعمة وعبدالله الطاهر (2012b). تقدير التنوع الوراثي لبعض أصول العنب المدخلة إلى سورية باستخدام تقنية SSR. مجلة جامعة دمشق للعلوم الزراعية، 28(2): 82-65.
- حامد، فيصل ويوسف الحوت (2000). إنتاج الفاكهة للمعاهد المتوسطة الزراعية. منشورات وزارة التعليم العالي، جامعة دمشق. 150-149.
- الشيخ حسن، طه (1997). موسوعة كرمة العنب. منشورات دار علاء الدين الجمهورية العربية السورية، 543 صفحة.
- Akka, A.; P. Boccacci; T. Lacombe; and R. Botta (2005). Relationship and genetic diversity of grapevine (*Vitis Vinifera* L.) grown in Algeria and in Mediterranean Basin. In proceedings of International workshop. In: "The role of biotechnology for the characterization and conservation of crop" forestry, animal and fishery genetic resources" Turin, Italy. Pp 5-7.
- Alber, J.W. (1962). Grapes Viticulture. University of California press. Pp 633.
- Al-Halabi, O.; B. Muzher; and Kh. AlMaarri (2009). Characterization of some local apple Cultivars in Syria Using Some Morphological Traits and molecular markers. Jordan Journal for Agriculture Sciences. 5(1): 73-89.
- Andrew, W.; and R. Summaira (2013). Genetic mapping of *Xylella fastidiosa* resistance gene(s) in grape germplasm from the southern United States. in Proceedings of the 2013 Pierce's Disease Research Symposium, California Department of Food and Agriculture Sacramento. 200-207 pp.
- Astrid, F.; and H. Lars (2009). (A) sexual reproduction – a review of life cycles of grape phylloxera, *Daktulosphaira vitifoliae*. Entomologia Experimentalis et Applicata, 131: 1-10.
- Baghasa, H. (2006). Table grape trade in Syria. Commodity brief No 5. Project GCP/SYR/006/ITA. 10 P.
- Bowers, J.E.; G.S. Dangl; and C.P. Meredith (1999). Development and characterization of additional microsatellite DNA markers for grape. Am. J. Enol. Vitic., 50: 243-246.
- Degani, C.; L.J. Rowland; A. Levi; J.A. Hortynski; and G.J. Galletta (1998). DNA fingerprinting of strawberry (*Fragaria X ananassa*) cultivars using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. Euphytica. 1025: 247-253.
- Doyle, J.J.; and J.L. Doyle (1993). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh tissue. Phytochem. Bull., 19: 11-15.
- Ercisli, S.; G. Agar; N. Yildirim; B. Duralija; A. Vokurka; and H. Karlidag (2011). Genetic diversity in wild sweet cherries (*Prunus avium*) in Turkey revealed by SSR markers. Genetics and Molecular Research (GMR). 10 (2): 1211-1219.
- Golodriga, P. J.A. (1978). Genetics and selection of grapes on immunity. Kiev. Pp 291.
- Guido, C.; T.M. Maria; D.G. Gabriele; P. Antonella; M. Michele; and T. Raffaele (2008). A set of microsatellite markers with long core repeat optimized for grape (*Vitis* spp.) genotyping. BMC Plant Biology. 8: 127.
- Makee, H.; T. Charbaji; Z. Ayyoubi; and I. Idris (2004). Evaluating resistance of some rootstocks to grape phylloxera with in vitro and excised root testing system. In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant. 40:225-229.
- Rafaiski, J.A.; and S.V. Tingey (1993). Genetic diagnostics in plant breeding: RAPDs

- microsatellites and machines. Trends Genetics. 9(8): 275-280.
- Roder, M.S.; J. Plaschke; S.U. Konig; A. Borner; M.E. Sorrells; S.D. Tanksley; and M.W. Ganal (1995). Abundance, variability and chromosomal location of microsatellites in wheat. Mol. Gen. Genet., 246: 327-333.
- Scott, K.D.; P. Eggler; G. Seaton; M. Rosetto; E.M. Ablett; L.S. Lee; and R.J. Henry (2000). Analysis of SSRs derived from grape ESTs. Theor. Appl. Genet., 100: 723-726.
- Sefc, K.M.; F. Regner; E. Turetschek; J. Glossl; and H. Steinkellner (1999). Identification of microsatellite sequences in *Vitis riparia* and their applicability for genotyping of di Verent *Vitis* species. Genome. 42: 367-373.
- Semagn, K.; A. Bjornstad; and M.N. Ndjiondjop (2006). An overview of molecular marker methods for plants. African Journal of Biotechnology. 25(5): 2540-2568.
- Struss, D. and J. Plieske (1998). The use of microsatellite markers of detection of genetic diversity in barley populations. Theor Appl Genet., 97: 308 - 315.
- Sweigart, A.; K. Karoly; A. Jones; and H.J. Willis (1999). The distribution of individual inbreeding coefficients and pairwise relatedness in population of *Mimulus guttatus*. Heredity. 83: 625-632.
- Testolin, R.; T. Marrazzo; G. Cipriani; R. Quarta; I. Verde; M.T. Dettori; M. Pancaldi; and S. Sansavini (2000). Microsatellite DNA in peach *Prunus persica* L. Batsch and its use in fingerprinting and testing the genetic origin of cultivars. Genome. 43: 512-520.
- Thomas, M.R.; and N.S. Scott (1993). Microsatellite repeats in grapevine reveal DNA polymorphisms when analysed as sequence-tagged sites (STSs). Theor. Appl. Genet., 86: 985-990.
- Wang, Z.; J.L. Weber; G. Zhong; and S.D. Tanksley (1994). Survey of plant short tandem DNA repeats. Theor. Appl. Genet., 88: 1-6.
- Warren, F.L.; and G.A. Christopher (1998). Using Simple Sequence Repeats (SSRs) for DNA fingerprinting germplasm accessions of grape (*Vitis* L.) Species. J. Amer. Soc. Hort. Sci., 123(2): 182-188.
- Welter, L.; N. Göktürk-Baydar; M. Akkurt; E. Maul; R. Eibach; R. Töpfer; and E. Zyprian (2007). Genetic mapping and localization of quantitative trait loci affecting fungal disease resistance and leaf morphology in grapevine (*Vitis vinifera* L.). Mol. Breed., 20: 359-374.
- Zamanidi, P.C. (2010). New complex-steady high-grade technical black berry variety of grape – Aleksampelo. Scientific Journal of Kuban State Agrarian University, Krasnodar, Russia. 64: 1-17.
- Zhao, X.; and G. Kochert (1992). Characterization and genetic mapping of a short, highly repeated, interspersed DNA sequence from rice (*Oryza sativa* L.). Mol. Gen. Genet., 23(1): 353-359.

Detection of the Genetic Variation among Grape Rootstock B41 Trees in the Syrian Agricultural Ministry Nurseries using SSR Markers

Waeil Abdelhamid Al-Youssef⁽¹⁾ Wasim Ismaiel Muhsen*⁽²⁾ Rahim Abdelsalam Abu-Aljadael⁽¹⁾ Noor Ghazzi Alasaad⁽¹⁾ and Abdullah Farhan Altaher⁽¹⁾

(1). Biotechnology Department, General Commission for Scientific Agricultural Research (GCSAR), Damascus, Syria.

(2). Biotechnology Directorate, Agricultural Research Center of Sweida, GCSAR, Damascus, Syria.

(*Corresponding author: Email: wasimmo6@yahoo.com).

Received: 30/09/2015

Accepted: 27/03/2016

Abstract:

This research was carried out during 2010–2012 at the Biotechnology Department, General Commission for Scientific Agricultural Researches (GCSAR), Syria. This study aimed to document and determine the genetic variations to detect the mixture between the grape rootstock B41 trees (propagated in Damascus suburb, Homs, Aleppo and Al-Raqqa governorates), by using SSR technique (simple sequence repeats). 45 trees representing the rootstock B41 were selected based on their morphological characteristics. The results of molecular analyses showed that five primers pairs out of 20 grape specific SSR primers (VVMD5, VVMD6, VVMD7, VVMD28 and VVMD32) could determine the genetic variations among the studied trees. Four primers pairs except the VVMD6 could determine two incompatible trees with the B41 rootstock in Kharabo nursery in Damascus suburb, moreover, three primers; VVMD7, VVMD28 and VVMD32 determined one different tree in Babnes nursery in Aleppo, and two primers pairs; VVMD5 and VVMD28 detected one different tree in Alsheikh Hmeed nursery in Homs. In contrast, all the studied trees located in Al-Raqqa nursery were compatible with the studied rootstock B41. As a result of this study, the incompatible trees with the rootstock B41 were eliminated and the identical ones were approved and authorized in order to regenerate in nurseries and vineyards to be distributed later to the farmers as a reliable and trusty rootstock. Also, this study emphasized on the importance of using molecular markers methods based on PCR technique to detect the genetic variations and fingerprints of the genetic plant resources to save them not to be mixed, because of their high accuracy in comparison with morphological markers.

Keywords: Grape rootstock B41, Phylloxera insect, Molecular markers, SSR technique.