التوصيف الجزيئي لبعض أصناف وأصول اللوز في سورية باستخدام المؤشرات الـــ SSRs

صبا سرحان[1] و فيصل حامد[2] و وائل اليوسف[3]
وإيمان مطر[4] ونشأت أبو طافش[5]

الملخّص

هدف البحث إلى توصيف التباينات الوراثية وتحديدها بين اثني عشر صنفاً وأربعة أصول وراثية تتبع لجنس اللوز *Amygdalus* المنتشرة في سورية باستخدام تقنية المقاطع البسيطة المتكررة (SSRs)، استخدم 26 زوجا من البادئات وحدد 154 قرينا، وبلغت نسبة القرائن (alleles) المتخصصة منها 30.52%، وتبين أن جميع المواقع الدقيقة المدروسة أظهرت تباينات بالقرائن التي كشفت ما بين الطرز المدروسة، بلغ متوسط قيم كل من معامل PIC والـــ He والـــ Ho 0.58 و0.61 و0.31، على التوالي. انتظمت الأصناف والأصول المدروسة باستخدام التحليل العنقودي في ثلاث مجموعات، ضمت المجموعتان الأولى والثانية أصناف اللوز المحلية والأجنبية معاً، وقد شملت المجموعة الثالثة الأصول المدروسة جميعها. ارتبط توزع الأصناف والأصول ضمن المجموعات والتباين فيما بينها بتوزع مجموعة من القرائن التي تعود إلى ثلاثة مواقع توابع دقيقة وهي UPD98-021(264)، UDP96-010(87) Pchgms5(265).

الكلمات المفتاحية: اللوز، التوصيف الجزيئي، المؤشرات الجزيئية، المقاطع البسيطة المتكررة، SSRs.

[1] طالبة دكتوراه ، [2] أستاذ قسم علوم البستنة، كلية الزراعة، جامعة دمشق.
[3] باحث قسم التقانات الحيوية، [4]مساعد باحث قسم البستنة، [5]مساعد باحث، الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية، سورية.

Molecular characterization of some almond cultivars and rootstocks in Syria using SSR markers

Sarhan, S.[(1)], F. Hamed[(2)], W. Al-Youssef[(3)], E. Matar [(4)] and N. bo Tafesh[(4)]

Abstract

The objective of this study was to characterize and determine the genetic variation among twelve cultivars and four rootstocks, belonging to *Amygdalus* genus in Syria using the simple sequence repeats (SSRs) marker. It was found that 154 alleles were identified by using 26 primer pairs, and the proportion of the specific ones was 30.52%. In addition, it was revealed that all the studied SSR loci produced polymorphic alleles. The average of PIC, He and Ho were 0.58, 0.61, 0.31, respectively. Dendogram based on SSR analysis was divided into three groups. The first and the second groups contained local and introduced almond cultivars, whereas the third one included the rootstocks. The distribution of almond cultivars and rootstocks into groups and the variation between them resulted of the distribution of alleles produced on the three microsatellites loci UPD98-021 (264bp), UDP96-010 (87bp) Pchgms5 (265bp).

Keywords: Almond, Molecular Characterization and Markers, Simple Sequence Repeats

[(1)] Ph.D student [(2)] Prof., Dept. Horti. Scie. Fac. Agric., Univ. Damascus, Syria.
[(3)] Researcher, Biotech. Dept., [(4)]Researcher assistant, Horti. Dept. General Commission for Scientific Agricultural Researches, Syria.

المقدمة

يشغل نبات اللوز *Amygdalus sp.* مكانة مميزة بين أشجار الفاكهة (Miller وزملاؤه، 1989) إذ تعد ثماره من أهم الثمار اللوزية ذات الشعبية الواسعة حول العالم، خاصة أنه يمكن زراعة هذه الشجرة في مختلف المناطق البيئية. تتبع أصناف اللوز للجنس *Amygdalus*، تحت العائلة *Prunoidea* والعائلة الوردية *Rosaceae*، وتعد المناطق الغربية من آسيا وآسيا الصغرى ومناطق من الشرق الأوسط هي المهد الأساسي لشجرة اللوز، وقد تم إدخاله الى اليونان وشمال افريقيا منذ مدة بعيدة جداً (حامد والعيسى، 1990).

بلغت إنتاجية اللوز عالمياً 5.770.07 مليون طن (FAO، 2012). أما في سورية فقد قدرت المساحة المزروعة بأشجار اللوز في عام 2009 بنحو 64226 هكتار وبإنتاجية 97003 طن (المجموعة الإحصائية الزراعية السنوية، 2009).

إن أشجار اللوز من أشجار الفاكهة المهمّة والمرغوب في ثمارها إذ يزداد الاهتمام بزراعتها سنة بعد سنة، ومن هذا المنطلق تم دعم توصيفها بالطرائق الحديثة التي تعتمد على التوصيف الجزيئي إذ استخدمت المؤشرات الجزيئية لدراسة التنوع الوراثي وتوصيف الأصناف، مثل تقنية الدنا المتعدد الأشكال المضخم عشوائياً RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) (MirAli وNabuls، 2003) وتقنية المقاطع البسيطة المتكررة (SSRs) (Simple Sequence Repeats) (Amirbakhtiar وزملاؤه، 2006). التي تتميز بموثوقيتها العالية، حيث استُخدمت في العديد من الدراسات ذات الأهداف المختلفة مثل إنشاء خرائط الارتباط الوراثية، ودراسة التنوع الوراثي (Struss وPlieske، 1998).

طور Mnejja وزملاؤه (2005) منمكتبة جينوم اللّوز مجموعة من البادئات تتعرف 47 موقعاً من التوابع الدقيقة تميز 42 منها بكشف تباينات بعدد القرائن عند دراستها على ثمانية أصناف من اللوز، وكان متوسط عدد القرائن في المواقع 6.6 وقيمة الحالات المتباينة اللواقح الملحوظة (الحقيقية) Observed heterozygosity 0.65 والمتوقعة Expected Heterozygosity 0.76، مشيراً لمستوى عال من التنوع الوراثي. أجريت دراسة أخرى على 93 نمطاً وراثياً من اللوز 63 طراز منها هي من أصناف اللوز الإسبانية وذلك باستخدام تسعة عشر زوجاً من بادئات SSR. تراوح عدد القرائن (Alleles) مابين 4 الى 33 قريناً/موقع بمتوسط قدره 17 قريناً/موقع، حيث كانت قيمة المواقع متباينة اللواقح الملحوظة 0.72، وأظهر مخطط علاقات التشابه الوراثي المعتمدة على نتائج المواقع المدروسة قدرة المؤشرات على فصل الأنماط الوراثية المدروسة حسب أصلها الجغرافي (Fernandez وزملاؤه، 2009). كما قام Gouta وزملاؤه (2010) بدراسة التنوع الوراثي لـ 82 طرازا وراثيا على عشرة مواقع دقيقةSSR، تم الحصول

على 159 قريناً بمعدل 15.9 قرينا/ موقع، إذ أبدت كافة مؤشرات الـــ SSR قدرتها على كشف التباينات الوراثية بين الطرز المدروسة، وأوضحت نتـــائجهم أن هنـــاك اختلافـــا جغرافيا واضحا بين أصناف اللوز التونسي الشمالية والجنوبية.

الأهداف

التوصيف الجزيئي لبعض أصناف اللوز المحلية والأجنبية المنتـــشرة فـــي ســـورية وأصولها، باستخدام المؤشرات الجزيئية SSR وحساب درجة التشابه المورثي بينهـــا مـــع تحديد مجموعة من البادئات القادرة على تمييز الأصناف والأصول الوراثية فيما بينها.

مواد البحث وطرائقه

المادة النباتية: دُرّس على بعض الأصناف المحلية والمتميزة بصفات إنتاجية وشكلية مرغوبة مثل الطعم الجيد وقساوة القشرة وتحمل التخزين، بالإضافة إلى بعض الأصناف الأجنبية المتأقلمة مع ظروف البيئة المحلية، وذات الإنتاجية الجيـــدة، وبعـــض الأصـــول النباتية التابعة لجنس اللوز التي يمكن إدخالها في برامج التحسين الـــوراثي، والموجـــودة ضمن المجمع الوراثي التابع للهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية (محطة بحوث حوط، السويداء) بالإضافة إلى عينة من المشمش الكلابي لاستخدامها شاهدا (الجدول1). وجُمعت العينات الورقية النباتية في بداية شهر نيسان وأخذت النموات الورقية الحديثة (عمر 3-4 أسابيع) الخالية من الإصابات المرضية والحشرية، ومن شجرة واحدة ممثلة لكل صنف أو أصل، وخزّنت على درجة حرارة-80 م° لحين الاستخدام. ونفذ الأعمال المخبريـــة فـــي قسم التقانات الحيوية، الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية.

الجدول (1) أصناف جنس اللوز موضوع الدراسة ومنشأ كل منها.

التسلسل	اسم الصنف	الأصل	التسلسل	اسم الصنف	الأصل
1	فيرادويل	فرنسي	9	حماة 34	محلي
2	جادرما	محلي	10	حماة 47	محلي
3	قسطنطين	تونسي	11	بابنس	محلي
4	فلوتس	فرنسي	12	عوجا	محلي
5	فورنا	فرنسي	13	لوز شرقي1	أصل بري
6	ديسمايوروخو	اسباني	14	لوز شرقي2	أصل بري
7	ضفادعي	محلي	15	*GF677*	أصل هجين دراق×لوز
8	شامي فرك	محلي	16	لوز كورشنسكي	أصل بري

استخلاص الدنا: عُزل الدنا مـــن 1-2 ورقـــة بطريقـــة CTAB حـــسب Hormaza وزملاؤه (1998). تم التأكد من عزل الدنا وتحديد نوعيته في هلامة الأغاروز بتركيـــز 1% وقيست تراكيزه الدنا وتوحيدها في جميع العينـــات إلـــى 50 نـــانوغرام/ميكرولتـــر باستخدام محلول TE (Tris-EDTA).

تحليل عينات الدنا: استخدمت 26 زوجا من البادئات (SSR primers) المطورة من الدّراق واللوز (الجدول2). وباستخدام تقنية الـ PCR بحجم تفاعل نهائي25 ميكرولتر يحتوي على 0.4 ميلي مولار من $MgCl_2$، 0.32 ميلي مولار من dNTPs، 4 بيكو مول من كل بادئة، 0.02 وحدة من Taq DNA polymerase و50 نانوغرام من الدنا.

الجدول (2) أسماء البادئات المستخدمة وحرارة الالتحام Taوقيمة معامل التعددية الشكلية PIC وطول القرين الناتج.

الرقم	اسم البادئة	التسلسل النيكليوتيدي 5' → 3'	Ta	المرجع
1	UDP96-001F	AGTTTGATTTTCTGATGCATCC	53	Cipriani وزملاؤه (1999)
	UDP96-001R	TGCCATAAGGACCGGTATGT		
2	UDP96-003F	TTGCTCAAAAGTGTCGTTGC	54	
	UDP96-003R	ACACGTAGTGCAACACTGGC		
3	UDP96-005F	GTAACGCTCGCTACCACAAA	54	
	UDP96-005R	CCTGCATATCACCACCCAG		
4	UDP96-008F	TTGTACACACCCTCAGCCTG	55	
	UDP96-008R	TGCTGAGGTTCAGGTGAGTG		
5	UDP96-010F	CCCATGTGTGTCCACATCTC	54	
	UDP96-010R	TTGATGATTCCATGCGTCTC		
6	UDP96-018F	TTCTAATCTGGGCTATGGCG	55	
	UDP96-018R	GAAGTTCACATTTACGACAGGG		
7	UDP96-019F	TTGGTCATGAGCTAAGAAAACA	52	
	UDP96-019R	TAGTGGCACAGAGCAACACC		
8	UDP97-402F	TCCCATAACCAAAAAAAACACC	52	
	UDP97-402R	TGGAGAAGGGTGGGTACTTG		
9	UDP98-405F	ACGTGATGAACTGACACCCA	54	
	UDP98-405R	GAGTCTTTGCTCTGCCATCC		
10	UDP98-406F	TCGGAAACTGGTAGTATGAACAGA	54	
	UDP98-406R	ATGGGTCGTATGCACAGTCA		
11	UDP98-409F	GCTGATGGGTTTTATGGTTTTC	55	
	UDP98-409R	CGGACTCTTATCCTCTATCAACA		
12	UDP98-021F	AAGCAGCAATTGGCAGAATC	54	
	UDP98-021R	GAATATGAGACGGTCCAGAAGC		
13	UDP98-411F	AAGCCATCCACTCAGCACTC	50	
	UDP98-411R	CCAAAAACCAAAACCAAAGG		
14	UDP98-412F	AGGGAAAGTTTCTGCTGCAC	54	
	UDP98-412R	GCTGAAGACGACGATGATGA		
15	Pchgms2F	GTCAATGAGTTCAGTGTCTACACTC	57	Sosiniski وزملاؤه (2000)
	Pchgms2R	AATCATAACATCATTCAGCCACTGC		
16	Pchgms4F	ATCTTCACAACCCTAATGTC	50	
	Pchgms4R	GTTGAGGCAAAAGACTTCAAT		
17	Pchgms5F	CGCCCATGACAAACTTA	50	
	Pchgms5R	GTCAAGAGGTACACCAG		

تتمة الجدول (2)...

	52	AAGCAATAAAACCAGCAGCAA	Pchgms11F1	18
		TCAATCAATTGGCATGTTCG	pchgms11R1	
	54	CAAAGAGTACAACAATATCTACCG	pchgms14F	19
		GGATGGTGAAGACGATGAGG	pchgms14R	
	52	ATGCACTCAAGTGGCAAGC	pchgms17F	20
		GGTTTTTGAGCAAAGATGCAC	pchgms17R	
	54	CCCTTACCCCCTTACCACTT	pchgms20F	21
		GGGGGTTTGGTTAAGATCG	pchgms20R	
	53	ACCACCATTTTGGCTCTCTG	pchgms21F1	22
		ACCACCACAACCAAACCATT	pchgms21R1	
		CATGCAACCCAAAACCATCT	pchgms21R2	23
	53	CAACGAGCTCCCATGACTTT	pchgms24F	24
		ACCACCACAACCAAACCATT	pchgms24R	
Mnejja وزملاؤه (2005)	62	TTCCCTAACGTCCCTGACAC	CPDCT025F	25
		TGTGGATCAAGAAAGAGAACCA	CPDCT025R	
Aranzana وزملاؤه (2002)	56	TGAATATTGTTCCTCAATTC	CPPCT030F	26
		CTCTAGGCAAGAGATGAGA	CPPCT030R	

حُفظت نواتج التفاعل على درجة حرارة 4° س، وفصلت نواتج التفاعل على هلامة الميتافور آغاروز بتركيز 3% إذ إنها هلامة الميتافور أغاروز (2-4%) تعادل هلامة الاكريلاميد بتركيز (4-8%) (Asif وزملاؤه، 2008)، لونت الهلامة بإضافة 1ميكروليتر من بروم الايثيديوم (تركيز10ملغ/مل) ثم عرضت الهلامة للأشعة فوق البنفسجية وصورت القرائن الظاهرة.

التحليل الإحصائي: حددت درجة التشابه الوراثية من خلال حساب مصفوفة نسب التقارب ورسم شجرة القرابة الوراثية بين الأصناف والطرز بتطبيق طريقة التحليل العنقودي (Cluster analysis). فقد رُمّز أي قرين ذي وزن جزيئي محدد عند أي طراز بالرقم (1) وعدم وجوده بالرقم (0) حسب ما بناه على أساس مصفوفة (binary matrix نسب التقارب حسب Dice (1945 Dice) باستخدام برنامج PAST (Paleontological Statistics, ver. 1.67). ومن ثم رسم شجرة القرابة الوراثية بين الطرز بتطبيق طريقة وارد المرتبية (Ward Hierarchical Method) التي يعتمد على تمييز الحد الأدنى للتباينات ضمن المجموعات (Ward،1963) باستخدام برنامج NCSS 2007 (Hintze، 2007).

حسب كل من معامل التعددية الشكلية (Polymorphic Information Content) وفقاً لطريقة (Botstein، 1980) ومعدل التغاير المورثي المتوقع H_e (Expected heterozygosity) ونسبة التغاير المورثي الملحوظ H_o (Observed heterozygosity) كما حسبت قيمة معدل التغاير المورثي المتوقع من المعادلة: $H_e=1-\sum P_i^2$ (Powell وزملاؤه، 1996)، حيث P_i: تكرارية الأللیل في الموقع i.

أما نسبة التغاير المورثي الملحوظ فهي نسبة الأفراد غير المتجانسة بين الأفراد المدروسة وذلك وفقاً لبرنامج Power marker version3.01 (Liu وMuse، 2005).

النتائج والمناقشة

حدد 154 قريناً عند الأصناف والأصول المدروسة من اللوز وذلك باستخدام 26 زوجا من البادئات إذ كانت هذه القرائن إما متخصصة (Unique bands) ونسبتها 30.52% من العدد الكلي للقرائن الناتجة، إذ استطاعت 22 بادئة من إظهارها، ولوحظت في كل الأصناف والطرز ما عدا الصنف جادرما حيث حدد باستخدام كل بادئة على حدة من 2 إلى 12 قرينا، وكانت هذه النتيجة منخفضة مقارنة بما وجده Fathi وزملاؤه عام 2008 في دراستهم على 56 صنفا من اللوز إذ تراوح عدد الآلليلات بين 2 إلى 16 قرينا وعند Gouta وزملائه عام 2010 إذ راوح عددها بين 12 -23 قرينا عند 82 طرازا وراثيا من اللوز، وذلك يعود لاستخدامهما عددا أكبر من العينات المدروسة. ويبين الجدول (3) أن نسبة القرائن المتخصصة بين الأصول (59.57) كانت أعلى منها بين الأصناف المدروسة (40.43%) ما يدل على التنوع الكبير بينها، ويعود ذلك لكونها أنواعا برية المنشأ، ويظهر الأصل GF677 أعلى نسبة حزم متخصصة بين الأصول (57.14%) لكونه أصلا هجينا بين اللوز والدراق. كذلك لوحظ أن 26 بادئة (100%) من البادئات المستخدمة أظهرت تعددية شكلية (polymorphic) هذا يتوافق مع Gouta وزملائه، 2010 عند دراستهم 82 صنفا من اللوز وكانت أعلى من النسبة 71.43 عند Fathi وزملائه، 2008عندما استخدموا 35 بادئة في دراسة 56 صنفا من اللوز، وذلك بسبب استخدام بادئات أعطت نتائج تضخيم جيدة في دراسات سابقة.

الجدول (3) القرائن المتخصصة عند الأصناف والأصول المدروسة واسم البادئة والوزن الجزيئي للقرين (bp).

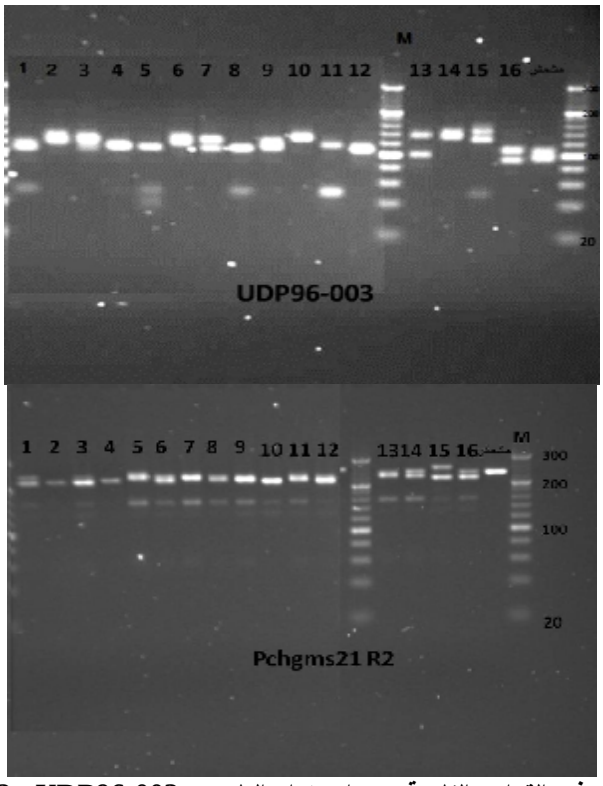
اسم الصنف	اسم البادئة والوزن الجزيئي للقرين
فيرادويل	Pchgms21R2$_{223}$ UPD96-019$_{240}$ UDP96-005$_{176}$
قسطنطين	UDP96-010$_{84}$
فلوتس	UDP96-005$_{136}$UPD98-409$_{189}$ UDP96-003$_{108}$,
فورنا	Pchgms24$_{108}$ Pchgms20$_{390}$
ديسمايوروخو	UPD98-409$_{176}$
ضفادعي	UPD98-405$_{168}$, UDP96-001$_{129}$
شامي فرك	Pchgms14$_{109}$ UDP96-003$_{102}$
حماة 34	UPD98-406$_{100}$ UPD98-405$_{142}$
حماة 47	CPPCT030$_{137}$
بابنس	UPD98-409$_{139}$
عوجا	UDP96-003$_{100}$
لوز شرقي 1	Pchgms20$_{415}$ UDP96-003$_{92}$, UDP96-005$_{213}$
لوز شرقي 2	CPPCT030$_{152}$ Pchgms2$_{130,150}$
لوز كورشنسكي	UPD98-021$_{252}$ UPD98-405$_{125}$ UPD96-019$_{210}$ UDP96-003$_{85,97}$ Pchgms14$_{114}$
GF677	UDP96-003$_{117,132}$ UDP96-005$_{221}$ UDP96-008$_{190}$ UDP96-010$_{168}$ UPD98-405$_{118}$ UDP96-018$_{300}$ UPD98-021$_{244}$ UPD97-402$_{127}$ UDP98-411$_{158}$ Pchgms2$_{158}$ Pchgms4$_{180}$ Pchgms21R2$_{266}$ Pchgms21$_{195}$ Pchgms24$_{113,}$ Pchgms17$_{234}$

يدل الرقم اليميني على الوزن الجزيئي للقرائن المتخصصة والتي تم حسابها باستخدام برنامج Gel Quant.Net (Lazar، 2010).

كما حدد قرينين مختلفتين بالوقت ذاته في عدد من الأصناف والأصول المدروسة، التي تظهر خاصية الـــheterozygousity لديها أي عندما يحدد عند الأصل أو الصنف الواحد زوج من الآليلات المختلفة بعدد التكرارات لموقع التوابع الدقيقة المدروس المتوضعة على الصبغيين المتناظرين (الشكل1)، وكانت ملاحظة عند 23 مـــن المواقـــع المدروســـة، إذ راوحت قيم الحالات المتباينة اللواقح الملحوظة بين 0 و0.94 بمتوسط بلغ 0.31 أما قـــيم الحالات المتباينة اللواقح المتوقعة فقد راوحت بين 0.12 و0.88 بمتوسط 0.61 وكانـــت هذه النتائج منخفضة مقارنة مع نتـــائج كـــل مـــن Gouta وزملائـــه إذ بلـــغ متوســـط قيمةالـــــHe 0.86 أما الـــــ Ho كانت 0.68 مع Mnejja وزملائه حيث كانت النتـــائج 0.76 و0.65 على التوالي وهذا يدل على التقارب الوراثي نوعـــاً مـــا بـــين الأصـــناف المدروسة. وبينما من الممكن أن تتكرر بعض مواقع التوابع الدقيقة في عدة مواقـــع مـــن الجينوم وبذلك يتم الحصول على قرائن قد يكون عددها من 2-4 للصنف الواحد وأحيانـــاً قد تصل للستة ما يدل على أن البادئة قد قامت بمكاثرة موقعين أو أكثر من التوابع الدقيقة المتوضعة على صبغي واحد أو صبغيات مختلفة وهذه الظاهرة لوحظت فـــي كـــل مـــن موقعي التوابع الدقيقة المحددين بالبادئتين Pchgms21 وPchgms21R2.

يعود الاختلاف بالوزن الجزيئي ما بين القرائن المختلفة على موقع واحد إلى الوحـــدة القصيرة (أو المقطع القصير المتكرر) المكونة لمقطع الدنا ولعـــدد تكراراتهـــا (Huang وزملاؤه، 2002)، لـــذلك حـــسب معامـــل التعدديـــة الـــشكلية (PIC) Polymorphic Information Content لكل موقع بادئة على حدة أو الذي يعد معيارا يدل علـــى المقـــدرة الخاصة لموقع SSR المدروس باستخدام زوج البادئات الخاصة به على تمييـــز وإظهارهـــا التباينات الوراثية بين الطرز المختلفة، بالتالي كلما اقتربت قيمة PIC من (1) كانت المقدرة على تمييز وإظهارها التباينات الوراثية أكبر.

في الدراسة الحالية راوحت قيمة PIC على المواقع المدروسة بين 0.11 حتـــى 0.87 (جدول 4)، إذا ظهرت أقل قيمة باستخدامPchgms 11 وكذلك فـــي البادئـــات Pchgms4 وUDP97-402 إذ ظهرت أهمية هذه المواقع بقدرتها على تمييز أحد الأصول عن بـــاقي الأصول وهو الأصل GF بقرائن متخصصة (جدول3)، كانت أيضا قيم PIC منخفـــضة مقارنة بقيم الـــPIC عند Gouta وزملائه (2010) التي راوحـــت بـــين0.90 و0.79 إذ أعطى الموقع CPDCT042 أعلى قيمة 0.91% وهذا يعود لانتقائه مواقع دقيقة مدروسة أعطت تباينات واضحة في دراسات سابقة وكان متوسط القيم 0.64 أقل من النتيجة التـــي ظهرت عند Mnejia وزملائه عام 2005.



الشكل(1) التباين في القرائن الناتجة عن استخدام البادئتين UDP96-003 وPchgms21R2 حيث M: مؤشر وزن جزيئي 20 bp.

أعطت البادئات UDP96-005، UDP96-003، CPDCT025 أعلى قيم للـ PIC وتمكنت من إظهار من 4 إلى 13 قرينا من خلال توزعها بين الأصناف والأصول المدروسة وأظهرت من أربع إلى اثنتي عشرة تعددية شكلية ميزتها من بعضها البعض، وفي كل حالة كان من الممكن ملاحظة عدد من الأصناف والأصول التي مُيّزت بحزم متخصصة. وهكذا من خلال النتائج الموضحة في الدراسة تبين أن الأصناف والأصول المدروسة من اللوز امتلكت تنوعًا مورثياً واضحًا حيث تم تحديد مظاهر متعددة للدنا (polymorphism) مميزة عند جميع الأصناف والأصول كما أن عدد القرائن (alleles) والقيم المرتفعة نسبياً لمعامل التعددية الشكلية PIC دلت على القدرة التمييزية الجيدة لمواقع التوابع الدقيقة المدروسة، إذ أن غالبية البادئات المستخدمة في البحث (76.92%) أظهرت مقدرة جيدة على تمييز أصول اللوز وأصنافه، واستطاع بعضها تمييز غالبية عينات الدراسة في حين استطاع البعض الآخر أن يكون مميزاً وبشكل خاص لأصول محددة فقط.

الجدول(4) اسم البادئة والوزن الجزيئي للقرين الناتج وقيم الـــ PIC وHe وHo.

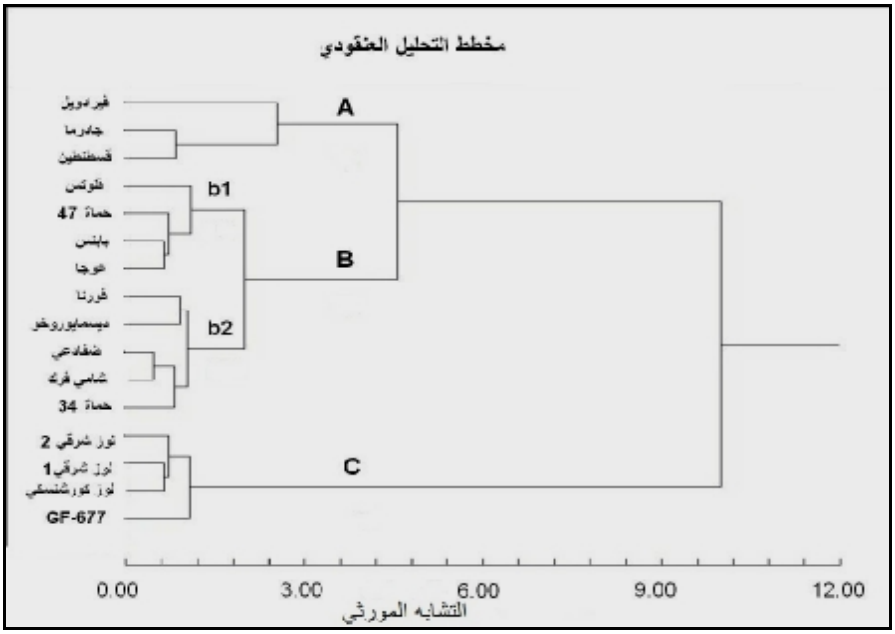
الرقم	اسم البادئة	الوزن الجزيئي للقرينbp	PIC	He	Ho
1	UDP96-001	100-140	0.62	0.67	0.38
2	UDP96-003	85-132	0.87	0.88	0.31
3	UDP96-005	136-221	0.86	0.87	0.69
4	UDP96-008	1.53-190	0.59	0.65	0.25
5	UDP96-010	84-168	0.56	0.61	0.06
6	UDP96-018	248-300	0.44	0.46	0.13
7	UDP96-019	210-259	0.70	0.74	0.44
8	UDP97-402	140-150	0.29	0.32	0
9	UDP98-405	115-168	0.64	0.67	0.50
10	UDP98-406	88-126	0.65	0.69	0.56
11	UDP98-409	120-189	0.78	0.80	0.38
12	UDP98-021	230-264	0.39	0.41	0
13	UDP98-411	158-203	0.78	0.81	0.44
14	UDP98-412	114-157	0.59	0.64	0.25
15	Pchgms2	127-158	0.35	0.37	0.13
16	Pchgms4	122-180	0.21	0.22	0.06
17	Pchgms5	247-273	0.51	0.56	0.19
18	pchgms11	232	0.11	0.12	0
19	pchgms14	102-114	0.66	0.70	0
20	pchgms17	220-234	0.29	0.32	0
21	pchgms20	390-415	0.**60**	0.63	0.13
22	pchgms21	100-195	0.54	0.62	0.94
23	pchgms21R2	223-266	0.82	0.84	0.19
24	pchgms24	78-113	0.71	0.75	0.88
25	CPDCT025	157-222	0.81	0.83	0.69
26	CPPCT030	137-178	0.73	0.76	0.56
	المتوسط		0.58	0.61	0.31

التحليل العنقودي وتحديد درجة التشابه المورثي بين الأصناف والأصول المدروسة:

حُددت نسبة التشابه المورثي بين أصناف اللوز المدروسة وأصوله باستخدام معامـــل Dice، وأظهرت النتائج الموضحة أن نسبة التشابه similarity بين الأصناف والأصـــول راوحت بين 0.12 و0.76، وهذا يؤكد على وجود تنوع كبير بين أصول اللـــوز المدروســـة وأصنافه. كان أعلى مستوى تشابه مورثي بين الصنفين جادرمـــا المحلـــي وقـــسطنطين

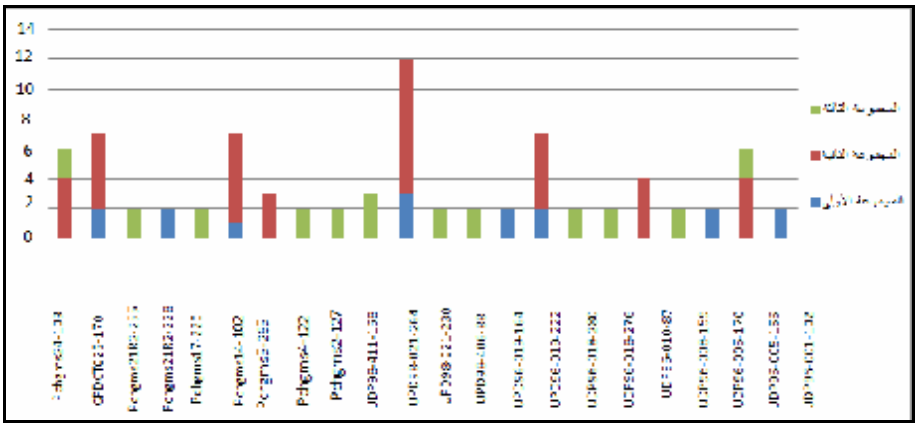
التونسي، وربما يعود ذلك إلى امتلاكهما النسب ذاته أو الأصل الجغرافي وكانت أقل نسبة تشابه مورثي بين الصنف جادرما والأصل GF677.

تجمعت الأصناف والأصول المدروسة اعتماداً على درجة التقارب حسب Ward (الشكل2)، في ثلاثة عناقيد (Clusters): ارتبط العنقود الأول (A) والثاني (B) في مستوى إحداثي متماثل 5، وانقسم العنقود الثاني إلى تحت عنقودين، وضم العنقودان A وB جميع أصناف اللوز ثم ارتبط معهما وعلى أعلى مستوى هرمي وشمل العنقود الثالث (C) الذي شمل جميع الأصول المدروسة. لوحظ أن العنقود A شمل الأصناف قسطنطين وجادرما وارتبط معهما الصنف الفرنسي فيرادويل ما يرجح أن يكون لها أصل مشترك. أما العنقود الثاني B فانقسم إلى عنقودين، الأولb1 جاء فيه الصنفان المحليان عوجا وبابنس معاً وارتبط معهما الصنفان حماة 47 وفلوتس، أما العنقود الثاني فقد ضم باقي الأصناف. وشمل العنقود C كافة الأصول الوراثية البرية والتي تتميز بصغر حجم الورقة والثمرة والطعم المر للبذرة وارتبط معها الأصل GF677.



الشكل (2) التحليل العنقودي بين أصناف وأصول اللوز المدروسة بحسب طريقة Ward باستخدام برنامج NCSS.

بشكل عام أظهرت النتائج أن أصول اللوز وأصنافه ضمن العناقيد الثلاثة تباينت فيما بينها بالعديد من القرائن حسب مواقع التوابع الدقيقة المدروسة لديها، فحسب الشكل (3) يمكن ملاحظة أن توزع الأصناف والأصول ضمن العناقيد كان مرتبطًا بتوزع مجموعة من القرائن التي تعود إلى ثلاثة مواقع توابع دقيقة، حيث تبين أن القرينين UDP96-005(170) و UPD96-019(164) قد ميزا الصنفين Jaderma و Kostanitin من باقي الأصناف والأصول المدروسة والقرين UPD98-021(264) قد ميز العنقود الثالث بغيابه عن العنقودين الأول والثاني، أما القرين UDP96-010(87) فقد ميز أصناف تحت العنقود b2 وميز القرين Pchgms5(265) تحت العنقود b1. ومن خلال المواقع جميعها يمكن ملاحظة ان العنقودين الأول والثاني وجدا معاً في العديد من المواقع، وهذا يدل على مدى التشابه المورثي بين الأصناف المدروسة بينما لم يأت العنقود الأول مع الثالث في أي موقع من المواقع السابقة وهذا يوضح بعد مجموعة الأصول عن تلك الأصناف.



الشكل (3) توزع وإسهام أصول اللوز وأصنافه في العناقيد الأول والثاني والثالث بناء على توزع قرائن مواقع التوابع الدقيقة لديها.

تؤكد هذه الدراسة أهمية استخدام تقنية الـ SSR في توصيف وتوثيق أصناف وأصول اللوز، وكما يوصى باستخدام البادئات المستخدمة في البحث، وخصوصًا التي استطاعت منها أن تظهر التباينات بين الأصناف والأصول وتميز فيما بينها والتي أظهرت قيما مرتفعة نسبيًا لمعامل الـ PIC، وأيضا استخدام البادئات التي امتلكت تعددية شكلية خاصة بها عند بعض الأصول بهدف تمييزها وتوثيقها، بالإضافة إلى استخدام بادئات أخرى للتوسع في دراسة التنوع المورثي في أصناف اللوز وأصوله، وتحديد مؤشرات مرتبطة بمواقع وراثية مسؤولة عن صفات مرغوبة.

References المراجع

حامد، فيصل، وعماد العيسى. 1990. الفاكهة إنتاجها وتخزينها. منشورات جامعة دمشق.432 ص:59، 317.

المجموعة الإحصائية الزراعية السنوية .2009 . وزارة الزراعة والإصلاح الزراعي.

Amirbakhtiar, N., B. H. Shiran. H. Moradi and B.E. Sayed-Tabatabaei. 2006. Molecular characterization of almond cultivars using microsatellite markers, ISHS. Acta. Horticulture. 726 :4.

Aranzana, M. J, J. Garcia-Mas. J. Carbo and P. Aru`s. 2002. Development and variability analysis of microsatellite markers in peach, Plant Breed. 121(1):87-92.

Asif, M., M. Rahman. J. Mirza. Y. Zafar. 2008. High resolution metaphor agarose gel electrophoresis for genotyping with microsatellite markers. Pak. J. Agri. Sci. 45(1).

Botstein, D., L. Raymond and L. White.1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms, Am. J. Hum. Genet. 32: 314-331.

Cipriani, G., G. Lot. W-G. Huang. MT. Marazzo. E. Peterlunger and R. Testolin.1999. AC/GT and AG/CT microsatellite repeats in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch]: isolation, characterization and cross-species amplification in Prunus, Theor. Appl .Genet. 99:65–72.

Dice, L.R. 1945. Measures of the amount of ecologic association between species. Ecology.26: 297-302.

FAO stat. 2012. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome. Italy.

Fathi, A., B. Ghareyazi. A. Haghnazari. M. Reza Ghaffari. S. Mostafa Pirseyedi. S. Kadkhodaei. M. Reza Naghavi, and M. Mardi. 2008. Assessment of the genetic diversity of almond (*Prunus dulcis*) using microsatellite markers and morphological traits. Iranian Journal of Biotechnology. 6(2): 98-106.

Fernandes I, A., J. T. AlonsoM. J. Espiau. M. Rubio-Cabetas and R. Socias I. 2009. Genetic diversity in Spanish and foreign almond germplasm assessed by molecular characterization with simple sequence repeats, J. Amer. Soc. Hort. Sci. 134(5): 535-542

Gouta, H., E. Ksia. T. Buhner. M.A. Moreno. M. Zarrok. A. Mliki and Y. Gogorcena. 2010. Assessment of genetic diversity and relatedness among Tunisian almond germplasm using SSR markers, Hereditas. 147: 283-292.

Hintze, J. 2007. NCSS 2007. NCSS, LLC. Kaysville, Utah, USA. www.ncss.com.

Hormaza, J.I, K. Pinney. V.S. Polito. 1998 .Early selection in cherry combining RAPDs with embryo culture, Sci. Hort. 79:121-126.

Huang, X.Q., A. Borner. M.S. Roderand and M.W. Ganal. 2002. Assessing genetic diversity of wheat (*Triticum aestivum* L.) germplasm using microsatellite markers, Theor. Appl. Genet. 105: 699-707.

Lazar, I. and I. Lazar. 2010. Gel Analyzer a: Freeware 1D gel electrophoresis mage analysis software. Available online: http://www.gelanalyzer.com.

Liu, K. and S. V. Muse .2005.Power Marker: An integrated analysis environment for genetic maker analysis. Bioinformatic.21(9):2128.

Miller, P. J., D. E. Parfitt and S. A. Weinbaum. 1989. Outcrossing in peach, Hort. Science 24: 359-360.

Mir Ali, N. and I. Nabulsi. 2003. Genetic diversity of almonds (*Prunus dulcis*) using RAPD technique. Sci.Hort.98: 461-471.

Mnejja, M., J. Garcia-Mas. W. Howad and P. Aru`s. 2005. Development and transportability across *prunus* species of 42 polymorphic almond microsatellites, Mol. Eco. Notes. 5 (3): 531-535.

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

Sosinski, B., M. Gannavarapu. L.D. Hager. L.E. Beck. G.J. King. C.D. Ryder. S. Rajapakse. M.V. Baird. R.E. Ballard and A. G. Abbott. 2000. Characterization of microsatellite markers in peach (*prunus persica* L. Batsch), Theor. Appl. Genet.101: 421-428.

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.

Ward, J. H. 1963. Hierarchical grouping to optimize an objective function, J. Am. Stat. Assoc. 58: 236-244.

Received	**2013/11/26**	**إيداع البحث**
Accepted for Publ.	**2014/04/24**	**قبول البحث للنشر**