مجلة جامعة دمشق للعلوم الزراعية . (2017) المجلد (33) . العدد 1. الصفحات: 239-256

التشابه الوراثي بين الطرز والأصناف المؤنثة للفستق الحلبي *Pistacia vera* L. المزروعة في محافظة السويداء باستخدام تقنية الـ SSR

نجوى الحجار* فيصل حامد** بيان مزهر***

الملخص

نُفذ البحث في مخبر التقانات الحيوية في الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية، مركز بحوث السويداء، في حقول المزارعين في مناطق انتشار الفستق الحلبي في منطقة الحزام الأخضر، بهدف تحديد درجة التشابه الوراثي بين الأصناف المعتمدة من قبل وزارة الزراعة (عاشوري، باتوري، عجمي، وناب الجمل)، و43 طرازاً وراثياً مختلفاً من الفستق الحلبي باستعمال تقانة الـ SSR. واستعمال 20 زوجاً من بادئات الـ SSR، أظهر منها 16 زوجاً قدرة على كشف التعددية الشكلية، حيث أعطت 43 أليلاً كان منها 38 أليلاً متعدداً شكلياً بنسبة تعددية شكلية (88.37%). تراوح عدد الأليلات بين 1-7 أليلات بمتوسط 2.69 أليلاً لكل موقع. وصلت درجة التشابه الوراثي إلى 100% بين الصنف عجمي (Ajam) والطراز Ajam.2 (عجمي شائع)، وكذلك الأمر بين الصنف ناب الجمل (Nab) والطراز Nab.1(ناب الجمل شائع)، ما يُشير إلى التطابق بينهما. كما قسم التحليل العنقودي الطرز المدروسة إلى ثلاث مجموعات رئيسة اعتماداً على طريقة UPGMA بالاعتماد على معامل Jaccard، حيث استقل الطرازان باتوري وباتوري جراحي (Bat.1, Batg.mj) عن كافة الطرز التابعة للصنف باتوري، واستقل كذلك الطراز عاشوري أبو ريحة عن كافة طرز الصنف عاشوري (Ash). ولتقدير كفاءة تقانة الـ SSR، تمَّ حساب كل من معدل التغاير المورثي الملاحظ Ho (0.25)، ومعدل التغاير المورثي المتوقع He (0.691)، بالإضافة إلى دليل الواسم MI (26.258). وخلصت النتائج إلى كفاءة تقانة الـ SSR في كشف التباينات الوراثية على مستوى الأفراد ضمن النوع *P.vera*، لاسيما أنَّ بعض الواسمات قد أعطت أليلات فريدة، ومواقع ذات سيادة مشتركة خاصة في طرازي باتوري جراحي، التي قد تكون هجناً ناتجة عن التصالبات الطبيعية نتيجة التلقيح الخلطي.

الكلمات المفتاحية: التشابه الوراثي، الفستق الحلبي، تقانة الـ SSR، التغاير المورثي المتوقع He

* طالبة دكتوراه في جامعة دمشق – كلية الزراعة.

** أستاذ دكتور في جامعة دمشق، كلية الزراعة، قسم علوم البستنة.

*** باحث في الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية، مركز بحوث السويداء، قسم التقانات الحيوية.

Genetic Similarity Among Pistacho (*Pistacia vera* L.) Female Genotypes and Cultivars Planted in Sweida province Using SSR Technique

Najwa Motaeb Alhajjar[*], Faisal Hamed[**] and Bayan Mohammed Muzher[***]

Abstract

This researehwork was conducted at the General Commission for Scientific Agricultural Research, Sweida Research Center and in the farmer fields at the greenbelt area where pistachio cultivars ara . widely expanding, to assess the genetic variation among female cultivars accredited by Ministry of Agriculture (Ashouri, Batouri, Ajami and Nab Al-jamal) and 43 genetic genotypes using SSR technique. 20 SSR Primer pairs were used, 16 of them were able to detect the polymorphism, which revealed 43 putative alleles, 38 of them were polymorphic (88.37%). The number of alleles ranged from 1 to 7, with an average of 2.69 allele per locus. Genetic similarity was 100% among Nab Al-jamal cultivar and Nab.1 genotype, also between Ajami cultivar and Ajam.2 genotype, indicating that those genotypes are congruentl with the accredited cultivars by Ministry of Agriculture. Cluster analysis using UPGMA method according to Jaccard coefficient clustered all genotypes into 3 main clusters. The genotypes Batouri Grahi (Batg.mj, Bat.1) were separated in an indepent sub group comparison with all other Batouri genotypes comprising the Batouri cultivar. Also the genotype Ashouri Abu Riha (Ash.6) was separated from all other Ashouri genotypes including Ashouri cultivar. To estimate the efficacy of

[*] phD student at Damascus University- Faculty of Agriculture. Dept. of Horticulture.
[**]Professor at Damascus University, Faculty of Agriculture, Horticulture Department.
[***]Researcher at the General Commission for Scientific Agricultural Research, Department of Biotechnology.

SSR technique, each of the observed heterozygosis (Ho), expected heterozygosity (He), and marker index (MI) were calculated, Ho (0.25), He (0.691), MI (26.258). The results showed the importance and the efficiency of SSR technique in revealing the genetic variation among cultivars at *P.vera* individual genotypes, especially that some primer pairs revealed unique alleles and co-dominant loci particularly in Batouri Grahi genotypes indicating that these genotypes are might be hybrids due to naturally open cross pollination.

Key Words: Genetic similarity, *P.vera*, SSR technique, Expected

المقدمة

ينتمي النوع P.VERA إلى الجنس pistaca والعائلة Anacardiacea، ويعدُّ غرب ووسط آسيا الموطن الأصلي للجنس *Pistacia* ،وبخاصةٍ المناطق الجافة وشبه الجافة في إيران وتركيا وسورية (Padulosi وزملاؤه، 1996). تمتاز شجرة الفستق الحلبي بخصائص اقتصادية وبيئية متميزة تجعلها من الأنواع الشجرية المهمة لتأقلمها مع الظروف البيئية للمناطق الجافة وشبه الجافة (حج ابراهيم وزملاؤه، 1998). تّم تعريف مركزين أساسيين للتنوع الوراثي ضمن النوع *P.vera*؛ يمتد الأول من إيران وحتى شرق تركيا، ويمتد المركز الثاني بين شمال أفغانستان حتى جنوب تركمنستان (Harandi و Ghaffari، 2001). تنتشر في سورية عدة أنواع برية من البطم بعضها يستخدم كأصول أو ملقحات لأصناف الفستق الحلبي وهي: *P.atlantica, P.terebinthus, P.palistins, P.khinjuk* (Muzher، 2001). تُعد محافظة حلب المنطقة الرئيسة لزراعة أصناف الفستق الحلبي المختلفة وأنتشارها (Hadj-hassan وKardouch، 1995). تأتي شجرة الفستق الحلبي في المرتبة الثالثة بعد الزيتون واللوز من حيث المساحة المزروعة في سورية (59903 هكتاراً)، وقد بلغ الإنتاج قرابة 54516 طناً وفقاً (المجموعة الإحصائية السورية،2014). وتنتشر زراعة الفستق الحلبي في محافظة السويداء في منطقة الحزام الأخضر على ارتفاع يتراوح بين 900-1200 م فوق سطح البحر.

لاتزال زراعة الفستق الحلبي في سورية تعتمد على قاعدة وراثية ضيقة، على الرغم من وجود العديد من الطرز الوراثية المنتشرة بشكلٍ هامشي، التي تتميز بمواصفات اقتصادية مهمة، وقد جرى تعريف عدد منها، ووجد من بينها نماذج فردية وصفت لأول مرة باستعمال تقانة الـ AFLP (Basha وزملاؤه، 2007). ينتشر في المنطقة الجنوبية العديد من الطرز غير الموثقة، والمتباينة بالعديد من المواصفات المعتمدة في تقييم أصناف الفستق الحلبي وفقاً لموصف الـ IPGRI (1997)، ما ينعكس على تقييم سلوكية الصنف بالكامل،أخذت بعض هذه الطرز تسميات محلية مختلفة، في حين أن بعضها الآخر غير معروف النسب أو المصدر. تعد تقانة الـ SSR من التقانات الجزيئية المهمة، إذْ تُعطي السيادة المشتركة ونسبة مرتفعة من التعددية الشكلية، إلاّ أنهّا تتطلب معرفة مسبقة لجينوم Genome النوع النباتي المدروس (Karp وزملاؤه، 1997). وقد تمّ تطوير واسمات SSR من جينوم أنواع مختلفة من الجنس *Pistacia* استعملت بشكلٍ واسعٍ في دراسة التباينات الوراثية، حيث أثبتت كفاءة عالية (Zaloglu وزملاؤه، 2009)، انطلاقاً من ذلك، فقد هدفت الدراسة إلى تحديد درجة التشابه الوراثي بين الطرز المختلفة من النوع *P.vera* بالمقارنة مع الأصناف التجارية المعتمدة من قبل وزارة الزراعة والمشاتل الزراعية في المنطقة الجنوبية، باستعمال تقانة الـ SSR، ووضع هوية وراثية للطرز المختلفة تُسهم في توثيق بعض الطرز، من أجل الحفظ المستدام.

مواد البحث وطرائقه

نُفذت الدراسة في مخبر التقانات الحيوية في مركز البحوث العلمية الزراعية بالسويداء- الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية، وفي مناطق انتشار زراعة الفستق الحلبي في منطقة الحزام الأخضر على ارتفاع (900-1100 م فوق سطح البحر). تراوحت درجة الحموضة للتربة (pH) بين 6.72- 7.64، وتراوحت الناقلية الكهربائية لمحلول عجينة التربة ECe بين 0.12-0.31، وتميزت الترب بانخفاض محتواها من كربونات الكالسيوم ($CaCO_3$)، والمادة العضوية Organic mattes، والآزوت (N)، في حين كانت غنية بالفوسفور (CP_2O_5) (<ppm20)، وتباين محتوى البوتاسيوم من تربٍ فقيرة (ppm110) إلى الغنية جداً (ppm528.75). وتراوحت النسبة المئوية للطين بين 31-60.67% (الجدول 1).

الجدول 1: تحليل مقاطع التربة فيزيائياً وميكانيكياً في مواقع انتشار زراعة الطرز المختلفة من النوع (*P.vera* L.)

المنطقة	pH	EC	CaCO3	المادة العضوية	آزوت ppm	بوتاسيوم ppm	فوسفور ppm	التحليل الميكانيكي %		
								رمل	طين	سلت
المزرعة	7.64	0.31	7.94	0.74	18.8	528.75	25.87	21.83	60.67	17.33
قنوات	6.72	0.13	1.20	0.87	21.75	195.00	34.15	19.67	49.67	30.33
السهوة	6.83	0.12	0.43	0.94	23.5	110.00	20.55	20.50	31.00	48.50

1. المادة النباتية: شملت المادة النباتية 43 طرازاً من الفستق الحلبي منتشراً في حقول المزارعين، أُطلق على بعضها تسميات محلية، في حين أنّ بعضها الآخر مجهول المصدر، إضافة إلى أربعة أصناف معتمدة من قبل وزارة الزراعة، وهذه الطرز والأصناف هي:

- طرازا الصنف ناب الجمل: Nab1, Nab2
- طرز الصنف باتوري: Bat.2 وBat.7 وBat.8 و Bat.9 و Bat.10 – باتوري جراحي: Bat1 و Batg.mj
- طرز الصنف عجمي: Ajam.2 وAjam.3، Ajam.4 وAjam.6 وAjam.7 عجمي رأس الخروف:Ajam.1 و AjamR.2– عجمي بيض الحمام: Ajam.egp
- طرز الصنف عاشوري: Ash.1: عاشوري شائع وAsh.2: عاشوري ماوردي مخملي وsh.3: عاشوري ماوردي وsh.4: عاشوري أبيض وAsh.5: عاشوري لسان الطير وAsh.6: عاشوري أبو ريحة.
- طرز غير معروفة النسب: أعطيت الرموز من X1 حتى X16.
- الأصناف التجارية: عاشوري (Ash)، باتوري (Bat)، عجمي (Ajam)، ناب الجمل (Nab)

طرائق البحث

1-2. عزل الـ DNA واستخلاصه: تمّ عزل الـ DNA من الأنسجة الورقية الفتية السليمة؛ بالاعتماد على طريقة CTAB وفقاً لـ Porebski وزملائه (1997)، وحفظ على درجة حرارة -20مº.

2-2. تقدير تركيز الـ DNA:

تم قياس تركيز الـ DNA بالاعتماد على الطريقة البصرية، باستعمال جهاز الرحلان الكهربائي، من خلال حقن الـ DNA مع معلم Marker قياسي معروف التركيز (100 bp).

2-3. تطبيق تقانة الـ SSR: تمّ استعمال 20 زوجاً من بادئات الـ SSR، (Ahmad وزملاؤه، 2003؛ Vendramin وزملاؤه، 2010)، تمّ تطويرها من مستودع الـ DNA لجينوم الفستق الحلبي في (الجدول، 2)، وتمّ إجراء تفاعل البلمرة المتسلسل من خلال إضافة 25µl من مواد التفاعل التالية إلى أنبوب 0.2 مل:

1X PCR buffer; 100 mM Tris-HCl (pH 8.4), 500 mM KCl. 2 mM of mix dNTPs, 10Pmol (forward and reverse), 1U of Taq DNA of genomic Polymerase enzyme and 50 ng template DNA ووضعت الأنابيب في جهاز تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) وفقاً للبرنامج التالي: 95ºم مدّة 5 دقائق، ثمَّ أُخضعت لمدة 35 دورة تضمنت المراحل: 95ºم مدّة 45 ثانية، 54- 64ºم مدّة 45 ثانية، 72ºم مدّة دقيقة، تركت بعدها على درجة حرارة 72ºم مدّة 5 دقائق. تم تحليل نواتج التفاعل في هلامة آغاروز 1.8% في جهاز الرحلان الكهربائي، وصورت باستعمالGel documentation نوع (VILBER LOURMOT Germany) بعد تعريضها للأشعة فوق البنفسجية.

الجدول 2: أزواج بادئات الـ SSR المستخدمة في الدراسة وحجم الأليلات الناتجة

No	Primer	SSR motif	Primer Sequence 5' => 3'	AT (C)	Allele Size bp
1	EPVF019b GH270737	(CCA)4/GGT)4	F: AACCCTTGTCAGCAAACACC R: AATATAGGCCACCACCACCA	54	450-455
2	EPVM016 GH271177	(AAG)4	F: GCACTGGTTTGGTGGTTTCT R: TGTCCCTGGATCTCACTTCC	54	480-520
3	EPVM021 GH271243	(CAC)4/CCA)4	R: GGCCCTTCATATACTGGGGT F: TTCATTACAAGCCACCACCA	52	312-318
4	EPVM056 GH271610	(TGG)4/(GGT)4	F: AGGGACGCTATCGAAGGAAT R: AAAAACAGCACGAAACCGAT	50	383-405
5	EPVF013 GH270668	(CT)10	F:ACAAACCCCTTCCTTGCTTT R: CAGTTTCCAGCTTTGTTGCC	52	600-609
6	EPVM058 GH271646	(TC)6	F: TGGGCATTCATCAGATTCAA R: TGGAGTGGAGACCAATCTCA	50	480-520
7	Ptms-14	(CA)46	F:GGGAAACACAAACATGCAAA R:GGCCTCTGGAGAACATGGTA	55	172-200
8	Ptms-31	(CT)20	F: CTGATCATGGGGCCTTTG R:GGAAGCACACACATGCAAAC	60	120-145
9	Ptms-42	(CTT)10	F:AAACAGGTGTTCCCGTTCAG R:ACGACAGGATTGGATGATGG	55	150-162
10	Ptms-40	(CTTT)4	F:CAGCTCTCACTGATCCGATTC R:TTCGAAAGCCAGTCTCAGGT	55	200-212

11	Ptms-3	(CA)16	F:TGATGAACAAGTCCAAAAGGG R:AAAACAGCACAGCATGCATC	55	132-145
12	Ptms-7	(CA)15	F:TGATGCTCTTGGTGTTGCTC R:CCTGAGTAGCTCCAGTTCCG	55	189-208 217-225
13	Ptms-9	(CA)7	F:TTGACCGTGGACTTGAAGC R:AACCTCCTCTCTTCTCTTTGCC	55	165-185
14	Ptms-45	(CAAA)3(CA)4	F:GCTTGTGTGTTTTAGCTCGAAAT R:AGCAATGCTTAACATTTTCCAA	55	145-152 185-196
15	Ptms-11	(CT)13	F:GTACACGGZCCCAATCCTG R:TCTAACATCATGTTAAACATCG	55	125-142
16	Ptms-33	(CA)12	F:TTCTGCTGGTCATGGGGC R:TGCCATTTAACCCAAAGGAG	55	155-165
17	Ptms-47	(CTT)13	F: GGATCCTCCACCATCTCGTA R:TTCTTCTTCCATGCCGACTT	60	175-180
18	Ptms-10	(CT)15	F:CAGGATGCTTGTTGGTGATG R:ACAGTGGATACAAACATGCTGC	55	140-142 330-342
19	Ptms-12	(CT)21	F: TCCGCTTCTCTGTGAGTGTG R: CGATAGTTTCCTTCCCAGACC	55	120-128
20	Ptms-41	(CT)11	F: AGAAGAGGGGAACAGGGAGA R: CTGAGGACTGGGCAGAATGT	55	230-245

2-4. التحليل الوراثي: تمَّ تسجيل الأليلات الناتجة كافة، حيث أعطيت الأليلات الظاهرة رقم 1 والأليلات الغائبة رقم 0، وتمّت دراسة التشابه الوراثي باستعمال معامل Jaccard، (Jaccard، 1908) وفقاً للمعادلة:

$$GS(ij)= a/(a+b+c)$$

حيث: GS: درجة التشابه الوراثي بين i و j

a: عدد الحزم المشتركة بين i و j

b: عدد الحزم الموجودة في i والغائبة في j

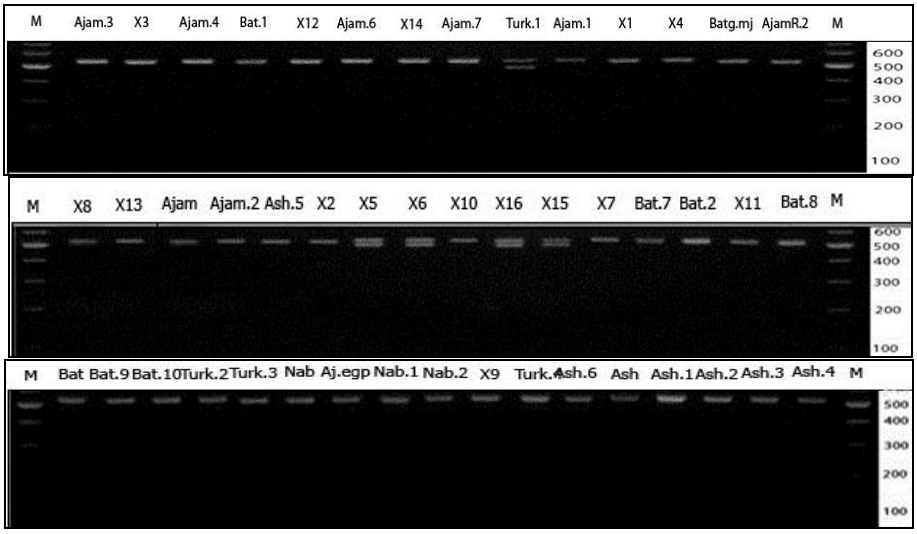
استعمال التحليل العنقودي من خلال طريقة UPGMA (Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Averages). كما تم حساب معدل التغاير المورثي المتوقع (He) اعتماداً على تكرار الأليلات حسب Lorenzo وزملاؤه (2007). تم حساب دليل الواسم I(M) marker index) وفقاً لـ (Powell وزملاؤه 1996)، واستعمال برنامج الـ Past في تحليل النتائج.

النتائج والمناقشة

تعود أهمية واسمات الـ SSR إلى أنّها تظهر السيادة المشتركة، إضافة إلى موثوقيتها ودقتها العالية وقدرتها على كشف التعددية الشكلية (McCouch وزملاؤه 1997).

1. **التعددية الشكلية Polymorphism:** تمكنّ 16 زوجاً من أزواج البادئات الـ 20 المستعملة، من إعطاء نواتج تضخيم واضحة في كافة الطرز المدروسة، حيث أعطت

43 أليلاً، كان منها 38 أليلاً متعدداً شكلياً بنسبة تعددية شكلية نحو88.37%. وتراوح عدد الأليلات الناتجة بين 1- 7 أليلات، بمتوسط 2.69 أليلاً لكل موقع. يتوافق ذلك مع نتائج دراسة Arabenzhad وزملائه (2011)، إذْ تراوح عدد الأليلات الناتجة لديهم بين 1- 6 أليلات، وبلغ متوسط عدد الأليلات 2.8 لكل موقع. وقد استطاعت الواسمات Ptms-7 وEPVF021 وEPVF019 إعطاء أكبر عدد من الأليلات، (الجدول، 3)، وتم وسم طرازي الباتوري جراحي (Bat.1, Batg.mj) بعدة أليلات فريدة ذات حجوم 298 – 478 bp باستخدام الواسم EPVF021 و 203-391-463 bp باستعمال الواسم EPVF019. كشفت بعض الواسمات (Ptms-9, Ptms-14, Ptms-42) عن أليلات وحيدة التكوين (Monomorphic)، في حين أظهرت الواسمات الأخرى التعددية الشكلية. ووصل أكبر عدد من الأليلات إلى 39 أليلاً في الطراز باتوري جراحي Bat.1، في حين كان أقل عدد من الأليلات (17 أليلاً) في الطرازين باتوري (Bat.3) وناب الجمل (Nab.2). وقد استطاعت بعض الواسمات (EPVF016، EPVF019 و EPVF021) إظهار السيادة المشتركة في بعض الطرز المدروسة، فقد أظهر الواسم EPVF016 السيادة المشتركة في الطراز التركي Turk.1 وفي بعض الطرز غير معروفة النسب أو المصدر بالنسبة للأصناف والطرز المحلية المنتشرة وهي (X5، وX6، و X15، و X16) كما هو موضح في الشكل (1). كما كشف الواسم Ptms-7 عن مواقع مضاعفة التكرارات في كافة الطرز والأصناف المؤنثة باستثناء الطرازين X3 وX4. وظهر الأليل 300 bp في أحد الطرز التركية (Turk.4) وفي بعض الطرز الأخرى (X1، وX7، وX8 ، وX10، وX11) باستعمال الواسم EPVF056، وهذا يدل على وجود بعض الطرز المدخلة، التي زادت نسبة الخلط الوراثي بين الأصناف المحلية، إضافةً إلى فشل عملية التطعيم للغراس البذرية في بعض الحالات عند الزراعة في الأرض الدائمة، أو إلى عدم تطعيم هذه الغراس بالأصناف المعتمدة من قبل وزارة الزراعة، والمشاتل الزراعية وبالتالي حدوث انعزالات وراثية بذرية المنشأ.



الشكل 1: التعددية الشكلية في الطرز والأصناف المؤنثة في النوع *P.vera* باستعمال الواسم EPVF016

وتراوح حجم الأليلات بين 76-633 bp في الطرز والأصناف المدروسة كافة، حيث أعطت مجموعة الـ EST SSRs حجوم أليلات أكبر بالمقارنة مع مجموعة الـ Ptms SSRs (الجدول، 3)، في حين حصل Vendramin وزملاؤه (2010) على حجوم أليلات تراوحت بين 206-209 bp في النوع *P.vera*. وقد بيّنت النتائج قدرة بادئي الـ SSR, Est-SSRs) (Ptms SSRs على كشف مواقع متعددة شكلياً، ما يدل على وجود هجن نتجت عن تصالبات طبيعية في مواقع الطرز المؤنثة المدروسة، وبالتالي أدت إلى الخلط والتنوع الوراثي الكبير ضمن الصنف الواحد.

الجدول 3: عدد الأليلات الإجمالي، الأليلات المتعددة شكلياً، التعددية الشكلية (%) وحجم الأليلات الناتجة bp

البادئ	عدد الأليلات	الأليلات المتعددة شكلياً	التعددية الشكلة (%)	حجم الأليلات (bp)
Ptms-3	3	3	100	141-138-129
Ptms-7	5	5	100	310 -242-222-202-182
Ptms-9	1	0	0	125
Ptms-11	1	0	0	76
Ptms-14	1	0	0	108
Ptms-31	2	2	100	345-129
Ptms-33	2	2	100	176-184
Ptms-40	2	2	100	192-184
Ptms-42	1	0	0	183
Ptms-45	2	2	100	163-154
EPVF021	6	5	83.33	-478-322-298-167-101 491
EPVF013	3	3	100	633-612-603
EPVF016	2	2	100	572-488
EPVF056	2	2	100	283-300
EPVF019	7	6	85.71	-391 – 377-261-203-189 463 -420
EPVM058	2	2	100	249-280
SUM	43	38	88.37	
AVE	2.69	2.38		

2-3. التشابه الوراثي Genetic Similarity: تمّ تحديد درجة التشابه الوراثي بين الطرز والأصناف المدروسة اعتماداً على معامل Jaccard، ودلّت النتائج على تباين درجة التشابه الوراثي بين الطرز التابعة لكل صنف، حيث وصلت درجة القرابة الوراثية بين الطرز التركية

إلى 0.722. وبين طرز الصنف عاشوري إلى 0.700، حيث وصلت درجة التشابه الوراثي إلى 0.594 بين الصنف عاشوري (Ash) مع الطراز عاشوري أبو ريحة (Ash.6)، وهي تدل على التباعد الوراثي بينهما، وبالتالي فإنّ إدراج هذا الطراز تحت تسمية الصنف عاشوري يزيد من نسبة الخلط الوراثي ضمن الصنف. يتوافق ذلك مع دراسة Basha وزملائه (2007) باستعمال تقانة الـ AFLP، حيث وصلت درجة التشابه الوراثي بين أبو ريحة وعاشوري إلى 0.46. وبلغت درجة التشابه الوراثي بين الطراز عاشوري ماوردي Ash.3 والصنف عاشوري (Ash) المعتمد من قبل وزارة الزراعة قرابة 0.759، ودرجة التشابه الوراثي بين الطراز عاشوري ماوردي مخملي مع الصنف عاشوري المعتمد من قبل وزارة الزراعة نحو 0.676. وهي تتقارب مع نسبة التشابه الوراثي في دراسة Basha وزملائه (2007) حيث وصلت إلى 0.69 بين الطراز وارداني في محافظة حلب والصنف عاشوري. يدل تقارب درجة التشابه الوراثي في كلا الدراستين على إمكانية أن يكون هذا الطراز المنتشر في المنطقة الجنوبية هو الطراز وارداني نفسه في محافظة حلب، وبالتالي فإنّ اختلاف التسميات يعود إلى عدم توثيق الأصناف من المصدر. وبلغت درجة التشابه الوراثي بين الطراز Ash.5 (عاشوري لسان الطير) والصنف عاشوري Ash نحو 0.793. كما بلغت درجة التشابه الوراثي بين طرز الصنف عجمي بما فيها الطرز التي تدعى محلياً عجمي رأس الخروف وبيض الحمام قرابة0.817. وقد بيّنت نتائج الدراسة أن درجة التشابه الوراثي بين الطراز Ajam.2 (عجمي شائع) والصنف عجمي (Ajam) المعتمد من قبل وزارة الزراعة قد بلغت 100%، ما يدل على التطابق التام بين هذين الطرازين.

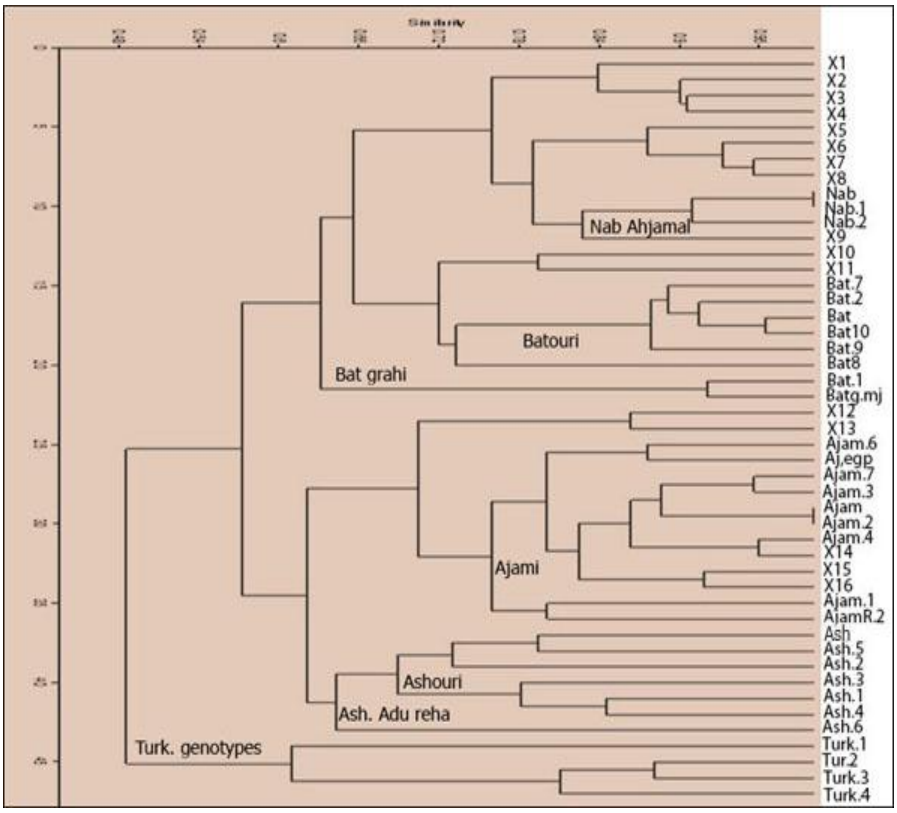
بلغت درجة التشابه الوراثي بين طرز الصنف باتورير قرابة 0.831، حيث وصلت أعلى درجة تشابه وراثي إلى 0.963 بين الصنف باتوري والطراز Bat.10. وكذلك وصلت درجة التشابه الوراثي إلى 0.92 بين الطرازين Bat.1 و Batg,.mj، وهما طرازان يدعيان محلياً باسم باتوري جراحي من موقعين مختلفين، وبمتوسط درجة تشابه وراثي مع الصنف باتوري Bat المعتمد من قبل وزارة الزراعة 0.619. وقد كانت درجة التشابه الوراثي بين الطرز X5, X1, X2, X3, X4 X6, X7, X8 مرتفعة، وصلت إلى0.907، وكذلك بين الطرز (0.870). تدل نسبة التشابه الوراثي العالية بين هذه الطرز على أنّها قد تعود لصنف واحد غير موثق في منطقة الدراسة. وقد تطابق الطراز التابع للصنف ناب الجمل (Nab.1) مع الصنف ناب الجمل المعتمد من قبل وزارة الزراعة، حيث وصلت درجة التشابه الوراثي بينهما إلى 100% باستعمال واسمات الـ SSR المدروسة، في حين وصلت درجة التشابه الوراثي بين الطراز Nab.2 مع الصنف ناب الجمل Nab إلى 0.909، وبالتالي فإنَّ التنوع الوراثي ضمن هذا الصنف قليل. حصل Pazouki وزملاؤه (2010) على درجة تشابه وراثي بين أنواع الجنس *Pistacia spp.* تراوحت بين 0.04-0.8، في حين حصل Kafkas وزملاؤه

(2008) على درجة تشابه وراثي تراوحت بين 0.08- 0.98 ضمن 46 طرازاً تعود إلى 12 نوعاً من الجنس *Pistacia*.

3-3. التحليل العنقودي Cluster analysis: قسم التحليل العنقودي المجتمع المدروس إلى ثلاثة عناقيد رئيسة، علماً أن كافة الأصناف التجارية المعتمدة من قبل وزارة الزراعة والطرز التابعة لها وقعت في مجاميع مستقلة عن بعضها، كما وقعت بعض الطرز غير معروفة النسب في مجموعة مستقلة، ولتي قد تتبع لصنفٍ غير معروف ضمن منطقة الدراسة، في حين وقعت الطرز الأخرى غير المعروفة مع الأصناف التجارية المنتشرة. يمكن أن يُفسرّ هذا التنوع في بعض الحالات بأنه ناتج عن الانعزال الوراثي الناتج عن التكاثر البذري إلى جانب التلقيح الخلطي وتشكيل هجن سواءً ضمن النوع أو بين الأنواع، وذلك بسبب انتشار كثافات من الأنواع البرية متمثلة بشكلٍ رئيس بالنوع *P.atlantica*، ما يُشير إلى كفاءة تقانة الـ SSR في كشف التباينات الوراثية على مستوى الأفراد ضمن النوع الواحد (الشكل، 2)، حيث تفرع العنقود الأول إلى مجموعتين رئيستين ضمتا الطرز التركية، إذ تفرعت المجموعة الأولى إلى تحت مجموعتين، ضمّت تحت المجموعة الأولى الطراز التركي Turk.4، وضمّت تحت المجموعة الثانية الطرازين التركيين (Turk.1, Turk.2)، في حين ضمت المجموعة الثانية الطراز Turk.1 بشكلٍ مستقل.

كما انقسم العنقود الثاني إلى مجموعتين رئيستين، تفرعت المجموعة الأولى إلى تحت مجموعتين، وقع الطراز عاشوري أبو ريحة (Ash.6) مستقلاً في تحت المجموعة الأولى. وتفرعت تحت المجموعة الثانية إلى وحدتين، انقسمت الوحدة الأولى إلى تحت وحدتين، احتوت تحت الوحدة الأولى الطرازين Ash.1 (عاشوري شائع)، وAsh.4 (عاشوري أبيض)، في حين استقل الطراز Ash.3 (عاشوري ماوردي) مستقلاً في تحت الوحدة الثانية. كما تفرعت الوحدة الثانية إلى تحت وحدتين، وجاء فيها الطراز عاشوري ماوردي مخملي (Ash.2) مستقلاً في تحت الوحدة الأولى، وشملت تحت الوحدة الثانية الطرازين Ash.5 (عاشوري لسان الطير) والصنف عاشوري Ash. وضمت المجموعة الثانية الطرز التابعة للصنف عجمي، وتفرعت إلى تحت مجموعتين، حيث تفرعت المجموعة الأولى إلى وحدتين رئيستين، شملت الوحدة الأولى الطرازين (Ajam.1 و Ajam.R2)، اللذين يدعيان محلياً عجمي رأس الخروف، في حين تفرعت الوحدة الثانية إلى تحت وحدتين، شملت تحت الوحدة الأولى بعض الطرز التابعة للصنف عجمي مع الصنف عجمي، إضافةً إلى عدد من الطرز غير معروفة النسب (X.16، X.15، X.14، Ajam.4، Ajam.2، Ajam، Ajam.7، Ajam.3)، مشيرة إلى التشابه الوراثي فيما بينها، في حين شملت تحت الوحدة الثانية الطرز العجمي Ajam.6 و عجمي بيض الحمام Aj.egp بدرجة تشابه وراثي 0.875. وضمت تحت المجموعة الثانية الطرازين X.13 و X.12.

تفرع العنقود الثالث إلى ثلاث مجموعات رئيسة، ضمّت المجموعة الأولى الطرازين Bat.1 و Batg,.mj وهما طرازان يدعيان محلياً باسم باتوري جراحي من موقعين مختلفين، حيث استقلت عن كافة طرز الصنف باتوري. تتوافق هذه النتيجة مع ما حصل عليه Mir Ali و Nabulsi. (2003) فيما يتعلق بالصنف باتوري إزرع، اللذين استخدما 12 بادئاً في تقانة الـ RAPD، حيث أظهرت مصفوفة التشابه لكل الحزم المتعددة شكلياً أنّ الصنف باتوري ازرع هو الأقل تشابهاً مع باقي الأصناف، ولم يشكل أي عنقود مع أي صنف آخر، وتميز عن بقية الأصناف بأنّه مختلف وراثياً بشكلٍ كبير عنها؛ ما يؤكد على الخلط الوراثي الكبير ضمن الصنف الواحد، والعشوائية في إطلاق التسميات المحلية المندرجة تحت الاسم نفسه. كما تفرعت المجموعة الثانية إلى تحت ثلاث مجموعات، ضمّت تحت المجموعة الأولى الطراز Bat.8 بشكلٍ مستقل، وتفرعت تحت المجموعة الثانية إلى وحدتين، ضمّت الوحدة الأولى الطراز Bat.9، وضمّت الوحدة الثانية الصنف باتوري المعتمد من قبل وزارة الزراعة Bat والطرز Bat.10, Bat.2, Bat.7. وضمت تحت المجموعة الثالثة الطرازين غير معروفي النسب X10, X11، بدرجة تشابه وراثي 0.710 مع الصنف باتوري Bat. تفرعت المجموعة الثالثة إلى تحت ثلاث مجموعات، تفرعت تحت المجموعة الأولى إلى وحدتين، احتوت الوحدة الأولى على الطراز X9، واحتوت الوحدة الثانية على الصنف ناب الجمل بدرجة تشابه وراثي 100% مع الطراز Nab.1 مشيرة إلى التطابق الوراثي التام بينهما، وبدرجة تشابه وراثي عالية 0.909 مع الطراز Nab.2. ضمّت تحت المجموعة الثانية الطرز غير معروفة النسب X5, X6, X7, X8، في حين ضمت تحت المجموعة الثالثة الطرز غير معروفة النسب (X1, X2, X3, X4)؛ ما يُشير إلى أن هذه الطرز قد تنتمي إلى صنف واحد غير معروف من قبل المزارعين، نتيجة إدخال بعض الأصناف من المناطق الرئيسة لانتشار زراعة الفستق الحلبي دون توثيقها من المصدر.



الشكل 2: التحليل العنقودي للطرز المدروسة من الفستق الحلبي (*P.vera* L.)

اعتماداً على معامل Jaccard

تقدير كفاءة تقانة الـ SSR: تمَّ تقدير كفاءة تقانة الـ SSR بتحديد درجة التنوع الوراثي،وذلك بحساب معدل التغاير المورثي المتوقع (He)، ونسبة التغاير المورثي الملاحظ (Ho)، بالإضافة إلى دليل الواسم بين كافة الطرز والأصناف المدروسة. وقد وصلت قيمة التغاير المورثي المعدل إلى 0.491 اعتماداً على تكرارية الأليلات في كافة المواقع المتعددة شكلياً في الطرز المؤنثة من النوع *P.vera*؛ ما يعكس التنوع الوراثي الكبير فيما بينها، وهذا يدل على كفاءة تقانة الـ SSR في كشف المواقع مضاعفة التكرارات. كما وصلت نسبة التغاير المورثي الملاحظ إلى 0.25. ووصل دليل الواسم (MI) اعتماداً على نسب التضاعف الفعّالة إلى 18.658. حصل Albaladejo وزملاؤه (2008) على معدّل تغاير مورثي متوقع تراوح بين 0.139- 0.895 باستعمال 8 مواقع SSR متعددة شكلياً في كثافتين مختلفتين من النوع *P. letiscus*. كما حصل ZhiZhuang وزملاؤه (2010) على معدل تغاير مورثي

متوقع يقدّر بنحو 0.742 ضمن ثمان كثافات من النوع *P. chinensis* باستعمال 9 أزواج من بادئات الـ SSR.

الاستنتاجات

1. بيّنت النتائج الخلط الوراثي الكبير ضمن النوع *P.vera*، والذي يعزى إلى وجود طرز مدخلة، طبيعة التلقيح الخلطي، والانعزالات الوراثية الناجمة عن التكاثر البذري.
2. استقل طرازا الباتوري جراحي عن كافة الطرز التابعة للصنف باتوري، كما استقل الطراز عاشوري أبو ريحة عن كافة الطرز التابعة للصنف عاشوري.
3. وقعت الأصناف التجارية والطرز التابعة لها في مجاميع مستقلة، بما فيها الطرز مجهولة النسب والطرز التركية التي استقلت عن كافة الطرز والأصناف المحلية.
4. أكدت النتائج كفاءة وفعالية تقانة الـ SSR في كشف التباينات الوراثية بين الطرز المختلفة من النوع *P.vera* ، ومقدرة هذه التقانة في التمييز بين الأفراد.

التوصيات

يُوصى بتوسيع الدراسات الجزيئية التي تُساعد على فهم العلاقات الوراثية ضمن النوع *P.vera* وتوضيحها، لوضع هوية وراثية للأصناف والطرز المختلفة، بهدف إيجاد قاعدة وراثية وصولاً إلى بنك وراثي يدعم برامج التربية والتهجين المستقبلية.

References المراجع

- المجموعة الإحصائية الزراعية السنوية السورية. 2014. وزارة الزراعة والإصلاح الزراعي
- حج إبراهيم، إبراهيم، محمد كردوش، ورفيق الريس. 1998. شجرة الفستق الحلبي وتقنياتها المختلفة. المركز العربي لدراسات المناطق الجافة والأراضي القاحلة (أكساد)؛ 59: 162ص
- Ahmad, R., L. Ferguson and S. Southwick. 2003. Identification of pistachio (*Pistacia vera* L.) nuts with microsatellite markers. J. Amer. Soc. Hort. Sci., 128(6): 898-903
- Albaladejo, R.G., F. Sebastiani, A. Aparicio and A. Bounamici. 2008. Development and characterization of eight polymorphic microsatellite loci from *Pistacia Lentisecus* L. (*Anacadiaceae*). Molecular Ecology Resources., 8: 904-906
- Arabnezhad, H., M. Bahar and A T. Pour. 2011. Evaluation of genetic relationships among Iranian pistachios using microsatellite markers developed from *Pistacia khinjuk* stocks. Scientia Horticulturae., 128(3): 249- 254
- Basha, A.I., S. Padulosi, K. Chabane and A. Hadj-Hassan. 2007. Genetic Diversity of Syrian Pistachio (*Pistacia vera* L.) Varieties Evaluated by AFLP Markers. Genet Resour Crop Evol., 54: 1807- 1816
- Hadj-Hassan, A. and M. Kardouch. 1995. Status of pistachio nut cultivation in Syria. Acta Hort., (ISHS) 419: 221-228
- Harandi, O.F., and M. Ghaffari. 2001. Chromosom studies on pistachios (*Pistacia vera* L.) from Iran. In: XI Grempa Seminar on Pistachios and Almonds. Ak, B.E. (ed.). Cahiers Options Mediterraneennes., 56: 35-40
- IPGRI. 1997. *Pistacia vera* L. descriptor. P53
- Jaccard, P. 1908. Nouvelles Recherches Sur La Distribution. Florale. Bull Soc Vaud Sci Nat., 44: 223-270
- Kafkas, S., B.E. Ak and H. Ozken. 2008. Development of microsatellite markers in pistachio and their transferability to other Pistacia species. ADANA. MSc Thesis., P:67

- Karp, A., S. Kresovich, KV. Bhat, WG. Ayada and T. Hodgkin. 1997. Molecular tools in plant gentic resources conservation: a guide to the technologies. IPGRI technical bulletin No2. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy.
- Lorenzo, P. S., R.A.M. Cabrer and H.M.B. Diaz. 2007. Evaluation of genetic identity and variation of local apple cultivars (*Malus x domestica* Borkh) from Spain using microsatellite markers, Genetic Resources and Crop Evaluation., 54(2): 405-420
- McCouch, S.R., X. Chen, O. Panaud, S. Temnykh and Y. Xu. 1997. Microsatellite marker development mapping and applications in rice genetics and breeding. Plant Molecular Biology., 35: 89-99
- Mir Ali, N. and I. Nabulsi. 2003. Genetic Diversity of Almonds (*Prunus dulcis*) using RAPD technique. Scientia Horticulturae., 98(4): 461-471
- Muzher, B.M. 2001. Pistachio in the Southern province of Syria. Conservation and Sustainable Use of Dryland Agrobiodiversity Funded by GEF/UNDP., 5: 12-15
- Padulosi, S., T. Caruso and E. Barone. 1996. Taxonomy, distribution, conservation and uses of *Pistacia* genetic resources. Palermo, Italy. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy; 1996. P: 69
- Pazouki, L., M. Mardi, P.S. Shanjani, M. Hagidimitriou, S.M. Pirseyedi, M.R. Naghavi, D. Avanzatto, E. Vendramin, S. Kafkas, B. Ghareyazie, M.R. Ghaffari and S.M. Khayam Nekoui. 2010. Genetic Diversity and Relationships among *Pistacia* Species and Cultivars. Conserv Genet., 11: 311-318
- Porebski, S., G,L. Bailey and B,R. Baum. 1997. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. Plant Molecular Biology reporter., 15 (1): 8-15
- Powell, W., M. Morgante, C. Andre, M. Hanafey, J. Vogel, S. Tingey and A. Rafalski. 1996. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. Mol. Breed., 2: 225-228
- Vendramin, E., J. AparicioGallego, S. Micalli, J. Giovinazzi, I. Verde, MT. Dettori and R. Quarta. 2010. Development and Characterization of

fourteen EST-SSRs from *Pistacia vera* L. inflorescence transcriptome. Molocular Ecology Resources., P: 1-7

- Zaloglu, S., Y. Dogan and S. Kafkas. 2009. Development of microsatellite marker in *P.vera*. 5th International Symposium on Pistachios and Almonds. ISHS- Sanliurfa- Turkey, Oct. 06-10. Abstr., P: 82
- Zhizhuang, W.U., Z. Zhixiango, W. Zejun, L.T. Jinxia and W. Xueyong. 2010. SSR analysis on genetic diversity of Natural populations of *Pistacia Chinensis* Bunge. China J Appl Environ Biol., 16(6): 803-80

Received	**17/05/2015**	**البحث إيداع**
Accepted for Publ.	**09/06/2015**	**قبول البحث للنشر**