حوليـات العلـوم الزراعية
جامعة عين شمس ، القاهرة
مجلد(٥٥)، عدد (٢)، ١٦٥-١٧٦، ٢٠١٠

دراسة التنوع الوراثي للوردة الدمشقية باستخدام كشافات جزيئية للتسلسلات البسيطة الداخلية (ISSR)

[١٣]

وصف الدين السليمان[١] - نبيل البطل[٢] - سلام لاوند[٣]
١- قسم علوم البستنة - كلية الزراعة - جامعة دمشق - سوريا
٢- قسم علوم البستنة - كلية الزراعة - جامعة دمشق - سوريا
٣- قسم المحاصيل - كلية الزراعة - جامعة دمشق - سوريا

الكلمات المفتاحية: الوردة الدمشقية، التنوع الوراثي، تقنية تكرارات التسلسلات البسيطة الداخلية، برايمر(بادىء)، طراز وراثي

الموجز

تم في هذا البحث دراسة التنوع الوراثي للوردة الدمشقية المنتشرة في محافظتي ريف دمشق وحلب (سوريا)، حيث تم استخدام ٨ بادئات لتقنية تكرارات التسلسلات البسيطة الداخلية ISSR تم الحصول عليها من الهيئة العامة للطاقة الذرية السورية. ونجم عن استخدام هذه البادئات ما مجموعه ٣٩ أليل (قرين) ذات تعددية شكلية Polymorphic وقد بلغت النسبة المئوية للتعددية الشكلية ١٠٠%.

كما تراوح عدد حزم حمض DNA بين (٣) كأقل عدد مع كل من البادئات (ISSR-3, ISSR-5, ISSR-6) و(٧) كأعلى عدد مع البادئ (ISSR-1) بمتوسط وقدره ٤,٨٧ لكل بادئ.

كما أظهر التحليل العنقودي وشجرة القرابة الوراثية أعلى درجة قرابة وراثية بين الطرازين (R.D---A, R.D---B) المنتشرين في محافظة ريف دمشق (٠,١٦٧١)، وأقل درجة قرابة وراثية بين الطراز (R.D---C) في محافظة حلب والطراز (R.D---B) المنتشر في محافظة ريف دمشق (1.2657).

(سلم البحث فى ٢٦ يوليو ٢٠١٠)
(ووفق على البحث فى ٢٥ أغسطس ٢٠١٠)

المقدمـــة

تعد سورية موطناً أصلياً للكثير من الأصول المنتشرة طبيعياً كبعض أنواع الأشجار المثمرة مثل اللوز والزيتون، والكثير من النباتات الخشبية والحراجية المثمرة كالغار والخرنوب، إضافة للعديد من نباتات المحاصيل كالقمح والشعير والحمص والفول، كما تزخر الفلورا السورية بعدد وافر من الأنواع الطبية مثل المليسة والمردقوش، وأخرى تزينية مثل السوسن والعسلة، بالإضافة إلى بعض النباتات الرعوية والغابوية ويرتبط ذلك بالتاريخ العريق للزراعة في بلاد مابين النهرين والهلال الخصيب وحوض البحر الأبيض المتوسط حيث بدأ الإنسان منذ زمن بعيد باستئناس بعض الأنواع والتحول عن الانتخاب الطبيعي الذي كان فيه البقاء للأقوى.

تتميز الموارد الوراثية النباتية في سورية بوجود درجة عالية من التباين الوراثي ضمن الأنواع النباتية ويشكل هذا التباين الذي يعد جزءاً من التنوع الحيوي الكلي مصدراً هاماً للمورثات المفيدة في تحسين إنتاجية الأصناف المزروعة عن طريق استخدام التقنيات الحيوية الحديثة.

الوردة الدمشقية *Rosa damascene* ، الوردة الوطنية للجمهورية العربية السورية، وشعار وزارة السياحة السورية، ثروة وطنية أبقى من النفط وأغلى من الذهب، تزرع الوردة الدمشقية في بلدان العالم المختلفة لأغراض تزينية أو طبية أو عطرية. تنتشر زراعتها عالمياً في العديد من الدول: بلغاريا- فرنسا- تركيا - إيران- اليونان- الهند- الصين- روسيا- المغرب **(Lawrence, 1991)**. أما في القطر العربي السوري فتشكل المساحة المزروعة اقتصادياً بالوردة الدمشقية نسبة قليلة من إجمالي المساحات المستثمرة حيث لا تتعدى 0.005 %، وتتوزع هذه المساحة في محافظتي ريف دمشق وحلب بنسبة 75% في ريف دمشق و25% في حلب.

تنتمي الوردة الدمشقية إلى مجموعة الورود القديمة Old Roses وهي عبارة عن شجيرات غزيرة التفريعات أوراقها مركبة مسننة إلا أنها أصغر وأخشن من أصناف الورد الحديث، أزهاره قليلة البتلات ألوانها فاتحة، ولا تدوم فترة طويلة على النبات الأم، تعطي الشجيرات أزهاراً غزيرة جداً متفاوتة في أحجامها وأشكالها، ولها رائحة عطرية قوية، شديدة المقاومة للظروف البيئية القاسية وبخاصة انخفاض درجات الحرارة **(البطل ،2003)**.

الوردة الدمشقية هجين خصب بين *Rosa gallica* × *Rosa moschata*، وبناء على نتيجة تحليل الـDNA للوردة الدمشقية تبين وجود نوع ثالث *Rosa fedschenkoana* مرتبط وراثياً بالوردة الدمشقية **(Harkness, 2003) الشكل (١)**.

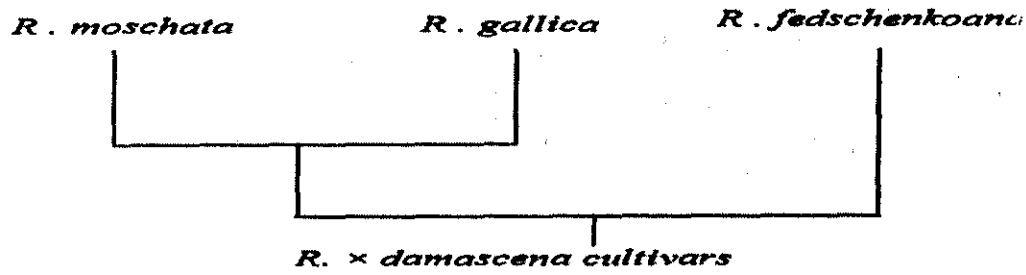
تعد الوردة الدمشقية محصول زيتي هام جداً، يستعمل زيت الورد الذي يحصل عليه بالتقطير في العديد من المجالات الطبية ومستحضرات التجميل والعطارة، والصناعات الغذائية **(Farooqi *et al* 1994)**، يستعمل ماء الورد الناتج الثانوي للتقطير بالبخار في العديد من المجالات الطبية والغذائية كعامل منكه **(Singh and Ram, 1987)**.

إن التفاعل بين البيئة والتركيب الوراثي مسألة هامة في إنتاج المحصول، حيث يتم التوصية لطراز وراثي معين لبعض المناطق أو لمنطقة واحدة. فلا يمكن تغير الظروف البيئية الزراعية في حين يمكن تغير التركيب الوراثي إما عن طريق التهجين أو بإتباع طرق التقانات الحيوية المناسبة والمتوفرة، لهذا الغرض يحتاج مربوا النبات دائماً إلى خلق تراكيب وراثية لتطوير المحاصيل لتناسب المناطق المناخية الزراعية المتنوعة **(Nawaz *et al* 2004)**.

يستند التوصيف الجزيئي Molecular Characterization على معلومات مأخوذة من جزيئة الـ DNA والتي تسمح بالتمييز ما بين فردين محددين، حيث تعد المؤشرات الجزيئية حالياً الأكثر استخداماً وانتشاراً لكونها تتميز بالخصائص التالية:

١. إن التباينات التي تُكشف بإستخدام المؤشرات الجزيئية هي ناتجة عن تغيير بالتركيب النيوكليوتيدي لجزيء الـ DNA وليست عن تأثر بالظروف البيئية ، فهي مؤشرات لا تتأثر بالظروف البيئية المحيطة.
٢. لا تتأثر نتائجها بعمر ونوع النسيج النباتي المستخدم في الدراسة وبالتالي إمكانية إجراء الدراسة الجزيئية في أي طور من أطوار النمو.
٣. سرعة الحصول على النتائج ودقتها في كثير من الحالات.
٤. القدرة على كشف نسبة أكبر من التباينات الوراثية.
٥. تغطية كافة مناطق جينوم (Genome) الفرد.

ازدادت في السنوات الأخيرة الدراسات المتعلقة بتطبيقات تقنيات الـ DNA بالنسبة للورد وأجريت دراسات عديدة بهدف دراسة التنوع الوراثي للورد في العديد من الدول وخاصة الدول ذات الإنتاجية العالية بالنسبة للزيت العطري، تطورت الخرائط الوراثية وخريطة متكاملة للورد نشرت من قبل **(Jan *et al* 1999)**، كما دُرست عدد من الجينات المسؤولة



الشكل١. أصل الوردة الدمشقية المزروعة

والمسيطرة على عدد من الصفات الهامة من ضمنها المقاومة للأمراض والجينات المسؤولة عن الرائحة العطرية المميزة للورد.(**Lavid *et al* 2002**).

أظهرت الدراسات السابقة التنوع الوراثي الكبير بين أنوع الورد عند المقارنة مع الأنواع البرية وقد أستخدم هذا التنوع الوراثي في مجال تربية النبات وإكثار الطرز الوراثية ذات الإنتاجية العالية من الزيت العطري (**Debener *et al* 1996; Jan *et al* 1999**)

أجريت مؤخراً ثلاث دراسات باستخدام معلمات RAPD, AFLP , SSR على التنوع الوراثي للوردة الدمشقية، أشارت النتائج بأن طرز الوردة الدمشقية المزروعة في مناطق مختلفة من تركيا وفي بلغاريا والتي تظهر بعض الاختلافات المورفولوجية فيما بينها أن هذه الاختلافات ظاهرية فقط، وأن كل النباتات التي أجريت عليها الدراسة كانت منحدرة من نمط وراثي واحد بالإكثار الخضري.
(**Agaoglu *et al* 2000; Baydar *et al* 2004; and Rusanov *et al* 2005**)

ومنذ عام ١٩٩٤ وُجدت تقنية جديدة للمؤشرات الجزيئية تدعى تقانة الـ ISSR (Inter Simple Sequence Repeats). تسمح هذه التقانة بإنشاء خرائط الارتباط الوراثية، لما تملكه هذه التقنية من تكرارية و وثوقية عالية وغير مكلفة مقارنة مع غيرها من التقنيات سواء من حيث احتياجها لتجهيزات معقدة أو مواد حيوية غالية الثمن، علاوة على ذلك فقد ثبت نجاحها على عدد كبير من الأنواع النباتية، تمتاز هذه التقنية بأنها لاتحتاج إلى معلومات مسبقة عن الجينوم وينجم عنها أنماط ذات تعددية شكلية كبيرة ناجمة عن عدة مواقع وراثية. (**Zietkiewicz *et al* 1994; Bornet and Branchard, 2001**).

أهداف البحث

دراسة التنوع الوراثي للوردة الدمشقية المنتشرة في سوريا في محافظتي ريف دمشق وحلب باستخدام تقنية الكشافات الجزيئية للتسلسلات البسيطة الداخلية (ISSR).

مواد البحث وطرائقه

١- **مكان تنفيذ البحث:** مخبر التقانة الحيوية في كلية الزراعة بجامعة دمشق بسوريا.

٢- **المادة النباتية Plant Material**

أجريت الدراسة على شجيرات الوردة الدمشقية المنتشرة في محافظتي ريف دمشق وحلب، حيث تم اختيار مواقع الدراسة بالاعتماد على الدراسات المرجعية والمصادر البشرية الخبيرة من سكان محليين ومعمرين وبالتعاون مع غرفة زراعة دمشق والوحدات الإرشادية في المناطق المذكورة، استخدمت مجموعة من الرموز للإشارة إلى الشكل النباتي المدروس ، فالرمز (R.D) هو مختصر للوردة الدمشقية *Rosa Damascena* بينما الأحرف (A, B, C, D, E, F) تشير إلى اسم الشكل النباتي المدروس والمنتشر في مواقع الدراسة، كما هو موضح في **الجدول (١)**.

الجدول١. مواقع الدراسة وتاريخ جمع العينات

المحافظة	منطقة الدراسة (القرية)	الارتفاع (م)	خط العرض Latitude	خط الطول Longitude	رمز الشكل النباتي المدروس	تاريخ جمع العينات
ريف دمشق	المراح	1500	34° 01' 10"	36° 44' 00	R . D---A R . D---B	تم جمع العينات خلال شهري آذار ونيسان لعام ٢٠١٠
حلب	النيرب	385	36° 11' 18"	37° 15' 25"	R . D---C	
ريف دمشق	عرنة	1400	33° 21' 55"	35° 52' 39"	R . D---D	
	مسرابا	825	33° 32' 51"	36° 24' 07"	R . D---E	

٣- استخلاص الـ DNA DNA Extraction

جرى استخلاص الـ DNA بالاعتماد على طريقة CTAB حسب (Doyle and Doyle, 1987) (مع إجراء بعض التعديلات الطفيفة)، حيث جمعت الأوراق الحديثة لشجيرات الوردة الدمشقية وطحنت باستخدام الازوت السائل (-١٩٦°م) إلى بودرة ناعمة حيث تم العمل وفق الخطوات التالية:

١. استخدمت أنابيب ابندورف Eppendorf Tube سعة ٢ مل وضع فيها حوالي ٠,٥ غرام من المادة النباتية المسحوقة، حيث تم ترقيم الأنابيب حسب أرقام العينات النباتية، ثم أضيف لكل أنبوب ١ مل من محلول الاستخلاص CTAB (Cetyltrmethylammonium) (مسخن لحرارة ٦٥ درجة مئوية) والمكون من:
120mM Tris-HCl, PH 8.0;80 mM EDTA PH 8.0; 4% β -mercaptoethanol; 2% CTAP; 2% PVP;1.4 NaCl

٢. بعد المجانسة وضعت على حمام مائي ٦٥ °م ولمدة ساعة واحدة (مع مراعاة المجانسة مرة ثانية بمنتصف مدة التحضين بالحمام المائي). ثم وضعت الأنابيب بعد ذلك في الثلج لمدة ٥ دقائق.

٣. وضعت الأنابيب بعد ذلك في جهاز الطرد المركزي centrifuge لمدة 10 دقائق وبسرعة 10000 دورة / دقيقة حتى تشكلَ طوران ثم نقلَ الطور العلوي المنفصل بحذر إلى أنابيب Eppendorf جديدة سعة 1.5 مل..

٤. تم إضافة حجم مماثل من الكلورفورم أيزوأميل الكحول (1:24) Chloroform Isoamyl alcohol لكل عينة، تمت المجانسة بلطف على الرجاج ولمدة عشرين دقيقة، وضعت الأنابيب بعد ذلك في جهاز الطرد المركزي centrifuge لمدة 10 دقائق وبسرعة 10000 دورة / دقيقة حتى تشكلَ طوران علوي (upper aqueous phase) وكرية مترسبة وذلك لفصل راسب البقايا النباتية عن الرشاحة الحاوية على الأحماض النووية، ثم نقلَ الطور العلوي المنفصل بحذر إلى أنابيب Eppendorf جديدة سعة 1.5 مل.

٥. كررت مرة ثانية خطوات المعاملة بالكلوروفورم أيزوأميل الكحول والمجانسة والتثفيل كما في الخطوات السابقة.

٦. تم إضافة 600 ميكروليتر من إيزوبروبانول البارد و60µl من أسيتات الصوديوم Sodium acetate (3M) لترسيب DNA العينات تلتها مجانسة وتحضين على درجة حرارة (- ٢٠ °م) حتى اليوم الثاني.

٧. جرى التثفيل بسرعة (١٠,٠٠٠) دورة/دقيقة ولمدة خمس دقائق، ثم يتم التخلص من الطور السائل ويغسل الراسب بـ 500 ميكروليتر من

محلول الغسيل Wash buffer المكون من (الإيتانول Ethanol %76)، أسيتات الأمونيوم Ammonium acetate (5 M) لمدة 30 دقيقة.

٨. يجفف الراسب في الهواء للتخلص من آثار الإيتانول، ثم يتم إذابة الـDNA في ١٠٠ ميكروليتر من المحلول الواقي (المنظم) TE (10mM Tris, PH 8.0; 1mM EDTA,pH 8.0).

٩. تم التخلص من الحمض النووي RNA بإضافة (2ul) من أنزيم RNase (10 mg /ml) والتحضين على درجة (٣٧°م) لمدة ٣٠ دقيقة.

٤- تقدير تركيز ونقاوة الـ DNA باستخدام المطياف الضوئي UV-

تم تقدير كمية الحمض النووي (DNA) بواسطة جهاز المطياف الضوئي Spectrophotometer، حيث تؤخذ القراءات في جهاز المطياف عند طول الموجات ٢٦٠ نانومتر(nm) و٢٨٠ نانومتر (nm)، تسمح النسبة بين قراءة الموجة بطول ٢٦٠/ ٢٨٠ نانومتر بتقدير نقاوة DNA ، حيث يملك الحمض النووي (DNA) النقي قيم قراءات OD260/OD280 مابين ١,٨ إلى ٢.

تم تقدير نوعية الأحماض النووية الـ DNA بالاعتماد على طريقة الهجرة الكهربية باستخدام جيل الأجاروز(agarose gel) تركيز1% مضافاً لها مادة Ethidium bromide، التي ترتبط مع الـ DNA مشكلاً معقداً يتوهج إثر تعرضه للأشعة فوق البنفسجية، حيث أن جزيئات الحمض النووي DNA تهاجر على هلامة الأغاروز كحزم أو بقع، وتكون عينات الحمض النووي DNA ذات جودة جيدة عند عدم وجود تقطعات فيها.

٥- تقانة الـ ISSR المطبقة لإجراء الدراسة الجزيئية

تضمنت هذه الدراسة تطبيق تقنية الـ ISSR والتي تعتمد بشكل أساسي على تفاعل البلمرة المتسلسل Polymerase Chain Reaction (PCR) وتتميز هذه التقنية عن التقنيات الأخرى بسهولتها وسرعتها فهي لا تتطلب وقت طويل **(Williams *et al* 1990)** ويتم خلال تفاعل البلمرة إكثار قطعة من الحمض النووي DNA والحصول على عدد كبير من السلاسل الجديدة وذلك بعدد من الدورات يصل حتى (٤٠) دورة. أجري اختبار (٨) بادئات تم الحصول عليها من الهيئة العامة للطاقة الذرية السورية بتركيز (10 Micro Mol). كما استخدم 2 X PCR Master Mix الحاوي على المكونات التالية :

Taq-Polymerase, dNTPs, MgCl2 . ويوضح **الجدول رقم (2)** التسلسل النكليوتيدي للبادئات المستخدمة في الدراسة.

أجري تفاعل البلمرة المتسلسل PCR وفقاً لـ **(Williams *et al* 1990)** مع بعض التعديلات فكان حجم التفاعل النهائي (25ul) كما يظهر **الجدول رقم (٣)** مكونات هذا التفاعل:

ويتم هذا التفاعل في جهاز الـ PCR وفقاً للظروف التالية:

الانفصال : عند درجة حرارة ٩٤°م لمدة ٥ دقائق ليتم انفصال سلسلتي الحمض النووي DNA.

٣٥ دورة تتضمن كل منها المراحل التالية:

- الفصل : يتم عند حرارة ٩٤°م لمدة ٣٠ ثانية.
- الالتحام : عند حرارة ٥١°م لمدة دقيقة واحدة.
- الاستطالة : عند حرارة ٧٢°م لمدة دقيقة.

اكتمال التفاعل عند حرارة ٧٢ °م مدة عشر دقائق.

ثم تحفظ العينات في درجة حرارة ٤ °م لتفصل الحزم بعدها بالفصل على جيل الأجاروز

٥- الرحلان الكهربائي والتلوين والتصوير

تمت الهجرة الكهربية على جيل الأجاروز ٢ % وذلك لفصل قطع الحمض النووي DNA الناتجة عن التضخيم.

ثم أضيف 5µl من صبغة الايثيديوم بروميد (50mg/ml) كما تم حقن عينة من مؤشر الـ-1000) DNA (bp وذلك لتحديد الطول الجزيئي للحزم الناتجة وتم الفصل الكهربي من خلال حقل كهربائي

الجدول٢. التسلسل النكليوتيدي للبادئات المختبرة في تقانة الـ ISSR

البادئة	التسلسل النيوكليوتيدي ٣' – ٥'
ISSR – 1	AGAGAGAGAGAGAGC
ISSR – 2	GAGAGAGAGAGAGAT
ISSR – 3	CTCTCTCTCTCTCTG
ISSR – 4	CACACACACACAACAG
ISSR – 5	TCTCTCTCTCTCTCC
ISSR – 6	TGTGTGTGTGTGTGG
ISSR – 7	ACACACACACACACTT
ISSR – 8	ACACACACACACACGG

الجدول٣. مكونات تفاعل البلمرة المتسلسل PCR

مكونات الـPCR	الكميات
Taq DNA Polymerase	0.05 units/µl
MgCl2	4 mM
dNTPs	2.5 µl
DNA	2 µl
Primer	2.5 µl
Buffer	10X

على ١٠٠ فولط ولمدة ساعتين ونصف ثم تتم مشاهدة حزم DNA بوجود الأشعة فوق البنفسجية UV-light وتم تصوير الجيل.

٦- التحليل الإحصائي Statistical Analysis

جمعت النتائج في جداول اعتماداً على مقارنة وجود أو غياب قطع DNA بين النباتات التي جمعت من المواقع المختلفة، حيث أعطي الرقم (١) عند وجود حزمة الحمض النووي DNA والرقم (٠) لعدم وجود الحزمة، ذلك يتضمن الحزم الواضحة فقط وقد نظمت الجداول لكل بادئة على حده، ورسمت شجرة القرابة الوراثية Dendrogram بتطبيق متوسطات المجموعات الزوجية غير المزانة UPGMA Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averaging باستخدام برنامج Popgene 1.31 الإحصائي.

النتائج والمناقشة

تم استخلاص الحمض النووي DNA من الأوراق الصغيرة للوردة الدمشقية، وقيس تركيزه ونقاوته بجهاز المطياف الضوئي UV(Spectrophotometer) حيث تراوح التركيز بين ٠,٥٦ و١ ميكروغرام

/ميكروليتر ونقاوة العينات بين ١,٨-٢، ومدد تركيز الحمض النووي DNA ليصبح ٤٠ نانوغرام /ميكروليتر، وطبقت عملية الرحلان الكهربائي على جيل الأجاروز بتركيز ١% لمعرفة نوعية الحمض النووي DNA المستخدم. **الشكل رقم (٢).**

✓ التعددية الشكلية Polymorphism الناتجة عن تطبيق تقنية ISSR

تضمنت الدراسة اختبار ٨ بادئات على الطرز المدروسة للوردة الدمشقية لمعرفة درجة القرابة الوراثية بين الأشكال النباتية المدروسة للوردة الدمشقية ، يبين **الجدول (٤)** أن جميع البادئات المستخدمة أعطت منتجات تضخيم في تفاعل البلمرة المتسلسل، حيث أثبتت البادئات المستخدمة فعاليتها في إعطاء تعددية شكلية بين الأشكال المدروسة للوردة الدمشقية ونجم عن استخدام هذه البادئات ما مجموعه ٣٩ أليل (قرين) ذات تعددية شكلية Polymorphic وقد بلغت النسبة المئوية للتعددية الشكلية ١٠٠%.

كما تراوح عدد حزم الحمض DNA بين (٣) كأقل عدد مع كل من البادئات (ISSR-3, ISSR-5, ISSR-6) و(٧) كأعلى عدد مع البادئ (ISSR-1) بمتوسط وقدره ٤,٨٧ لكل بادئ.

✓ تحديد درجة القرابة الوراثية بين السلالات المدروسة

يفيد تحديد درجة القرابة الوراثية ضمن الأنواع في برامج التربية وذلك لتأمين قاعدة وراثية كبيرة للاستفادة منها في برامج التهجين. تمت دراسة العلاقة الوراثية بين الأشكال النباتية المدروسة للوردة الدمشقية بتطبيق مصفوفة النسب المئوية لعدم التوافق Percent Disagreement Values (PDV) حيث أن ارتفاع قيم هذه المصفوفة يدل على وجود اختلاف وراثي وبازديادها يزداد التباين الوراثي بين النباتين المدروسين ويتم إنشاء هذه المصفوفة وفقاً لعدد وحدات التضاعف المشتركة.

نلاحظ من خلال **الجدول(5)** أن أقل قيمة لـ PDV هي 0.1671 بين شجيرات الوردة الدمشقية المنتشرة في محافظة ريف دمشق(منطقة المراح) (R.D---A, R.D---B)، بينما كانت أعلى قيمة لـ PDV هي 1.2657 بين شجيرات الوردة الدمشقية في محافظة حلب- منطقة النيرب (R.D---C) وشجيرات الوردة الدمشقية في محافظة ريف دمشق- منطقة المراح (R.D---B) مما يدل على وجود تباين وراثي كبير فيما بينهما.

✓ التحليل العنقودي Cluster analysis للسلالات المدروسة للوردة الدمشقية الناتج عن استخدام تقنية ISSR

يسمح التحليل العنقودي بتقسيم السلالات المدروسة إلى مجموعات، وتعكس هذه المجموعات درجة القرابة الوراثية فيما بينها، وقد تتجمع العينات ضمن مجموعة واحدة بناءاً على موطنها الأصلي أو بناءاً على أصلها ونسبها.

أجري التحليل العنقودي للنتائج التي تم الحصول عليها وذلك لإنشاء شجرة القرابة الوراثية Dendrogram لتحديد درجة القرابة الوراثية ورسم شجرة القرابة الوراثية بين السلالات المدروسة وفق **الشكل رقم (٣).**

قسم التحليل العنقودي للشجيرات المدروسة للوردة الدمشقية اعتماداً على بيانات الـISSR من مصفوفة الـPDV إلى مجموعتين:

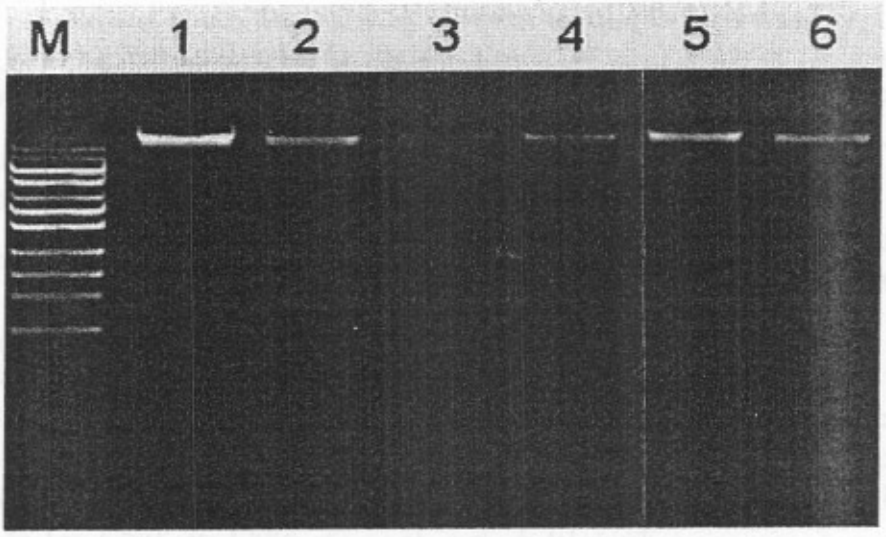
__المجموعة الأولى:__ تضم كلا من الأشكال النباتية (R.D---A, R.D---B, R.D---D). انقسمت هذه المجموعة إلى تحت مجموعتين:

١- شجيرات الوردة الدمشقية المنتشرة في محافظة ريف دمشق-منطقة المراح (R.D---A, R.D---B).
٢- شجيرات الوردة الدمشقية في محافظة ريف دمشق – منطقة عرنة(R.D---D).

__المجموعة الثانية:__ تضم كلا من الأشكال النباتية (R.D---C, R.D---E, R.D---F) انقسمت هذه المجموعة إلى تحت مجموعتين:

١- شجيرات الوردة الدمشقية في محافظة حلب – منطقة النيرب (R.D---C).

٢- شجيرات الوردة الدمشقية فـي محافظـة ريـف دمشق- منطقة مسرابا(R.D---E, R.D---F).



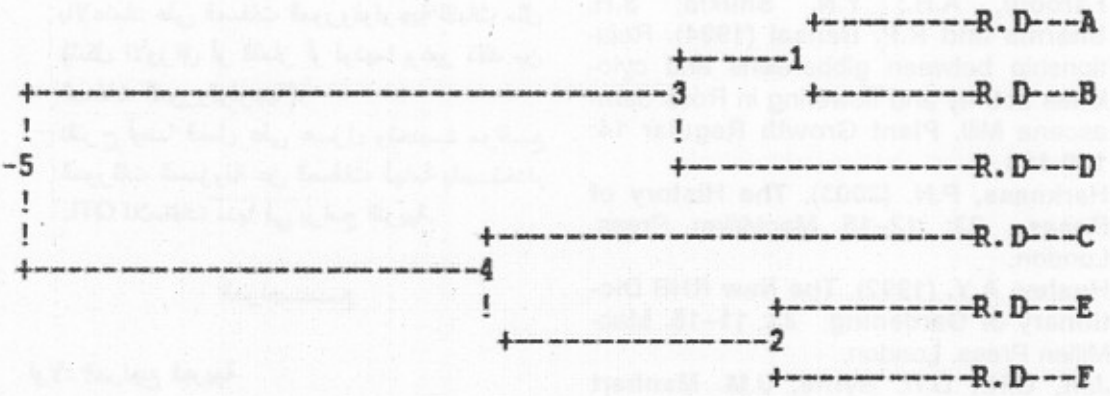
الشكل٢. جيل الأجاروز بتركيز ٠,٨% لتحديد نوعية الحمض النووي DNA.

الجدول ٤. رموز البادئات المستخدمة- عدد الحزم- النسبة المئوية للتعددية الشكلية بين الأشـكال النباتيـة المدروسة للوردة الشامية

البادئة	عدد الحزم الكلية	عدد الحزم ذات التعددية الشكلية	النسبة المئوية للتعددية الشكلية%
ISSR – 1	7	7	100%
ISSR – 2	6	6	100%
ISSR – 3	3	3	100%
ISSR – 4	6	6	100%
ISSR – 5	3	3	100%
ISSR – 6	3	3	100%
ISSR – 7	5	5	100%
ISSR – 8	6	6	100%
المجموع	39	39	
المتوسط	4.87	4.87	

الجدول ٥. مصفوفة النسب المئوية لعدم التوافق (PDV) بين شجيرات الوردة الدمشقية والناتجة عن تطبيق متوسطات المجموعات الزوجية غير المزانة UPGMA بتطبيق تقانة الـ ISSR.

PDV	R.D---A	R.D---B	R.D---C	R.D---D	R.D---E	R.D---F
R.D---A	0.00					
R.D---B	0.1671	0.00				
R.D---C	1.0986	1.2657	0.00			
R.D---D	0.2963	0.2963	1.0986	0.00		
R.D---E	0.7732	1.0245	0.4855	0.6678	0.00	
R.D---F	0.7191	0.9555	0.4447	0.7191	0.1978	0.00



الشكل٣. شجرة القرابة الوراثية بين الطرز المدروسة للوردة الدمشقية باستخدام بيانات الـISSR اعتماداً على طريقة UPGMA

الاستنتاجات والتوصيات

- تشكل الوردة الدمشقية نواة وراثية هامة جداً لاستنباط طرز وراثية جديدة ذات إنتاجية عالية من الزيت العطري وذات مردود اقتصادي هام جداً.
- تم تقييم التنوع الوراثي للوردة الدمشقية بتطبيق تقانة الـ ISSR والتي أثبتت فعالية في كشف التباينات الوراثية بين الطرز الوراثية المدروسة والتي تنتمي لمواقع مختلفة بالاعتماد على نتائج ثمانية بادئات، فكانت النسبة المئوية للتعددية الشكلية ١٠٠ %.
- أعلى درجة للقرابة الوراثية كانت بين الطرازين (R.D---A, R.D---B) في محافظة ريف دمشق حيث بلغت درجة القرابة الوراثية 0.1671، بينما أقل درجة للقرابة الوراثية كانت بين الطراز (R.D---C) في محافظة حلب والطراز (R.D---B) المنتشر في محافظة ريف دمشق حيث بلغت درجة القرابة الوراثية 1.2657.
- الدراسات الجزيئية التي تستند إلى المادة الوراثية بعينها دون غيرها، تجنبنا الأخطاء الشائعة في تسمية الأصناف نسبة إلى مكان تواجدها أو بالاعتماد على الصفات المورفولوجية للنبات مثل (شكل الأوراق أو الثمار أو لونهما وغير ذلك من الصفات المورفولوجية).
- نقترح أيضاً العمل على عزل وتحديد مواقع المورثات المسؤولة عن الصفات الهامة باستخدام QTL للاستفادة منها في برامج التربية.

المراجع

اولاً: المراجع العربية

البطل، نبيل .(٢٠٠٣). نباتات الزينة الخارجية، كلية الزراعة، جامعة دمشق. سوريا.

ثانياً: المراجع الأنجليزية

Agaoglu, Y.N.; A.Y. Ergul and N.Y. Baydar. (2000). Molecular analyses of genetic diversity of oil rose (Rosa damascene Mill.) grown in Isparta (Turkey) region. **J. Biotechnology, 111: 263 – 367.**

Baydar, N.Y.; H.A. Baydar and T.N. Debener. (2004). Analysis of genetic relationships among *Rosa damascene Mill* plants grown in Turkey by using AFLP and italic microsatellite markers. **J Biotechnology, 110: 262 – 266.**

Bornet, B.N. and M.Y. Branchard. (2001). Nonanchored Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) Markers: Reproducible and Specific Tools for Genome Fingerprinting, **Plant Molecular Biology Reporter 19: 209 –215.**

Debener, T.N.; C.N. Bartels and L.Y. Mattiesch. (1996). RAPD analysis of genetic variation between a groups of rose cultivars and selected wild rose species. **Mol. Breed. 119: 71-74.**

Doyle, J.J. and J.L. Doyle. (1987). Rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Photochemical Bullettin, 19: 11 – 15.**

Farooqi, A.H.; Y.N. Shukla; S.H. Sharma and R.P. Bansal (1994). Relationship between gibberellins and cytokines activity and flowering in Rosa damascena Mill. **Plant Growth Regular 14: 109-113.**

Harkness, P.N. (2003). The History of Roses., 23: 12–15 MacMillan Press. London.

Huxley, A.Y. (1992). The New RHS Dictionary of Gardening. 23: 11–15. MacMillan Press. London.

Jan, C.H.; D.H. Byrne; J.M. Manhart and H.M. Wilson. (1999). Rose germplasm analysis with RAPD markers. **Hortscience 34: 206-209.**

Lavid, N.L.; J.M. Wang; M.Y. Shalit; I.M. Guterman; E.F. Bar; T.Y. Beuerle; N.T. Menda; S.M. Shafir; D.N. Zamir; Z.M. Adam; A.M. Vainstein; D.N. Weiss and E.T. Pichersky. (2002). Genetic and Genomic of Rosacae. **Plant Physiology 19: 109-113.**

Lawrence, B.M. (1991). Progress in essential oils- rose oil and extracts. **Perf. Flav., 16: 43 - 77.**

Nawaz, N.T.; A.L. Razzaq; Z.M. Ali and M.L. Yousaf. (2004). Performance of different oat (*Avena sativa* L.) varieties under the agro-climatic conditions of Bahawalpur-Pakistan. **Int. J. Agric. Biol. 41(2): 379- 389.**

Rusanov, K.N.; N.L. Kovatcheva; B.N. Vosman; L.M. Zhang; S.M. Rajapakse; A.L. Atanassov and I.J. Atanassov. (2005). Microsatellite analysis of *Rosa damascena Mill.* Accessions reveals genetic similarity between genotypes used for rose oil production and old Damask rose varieties. **Theory Appl Genet, 111: 804- 809.**

Singh, D.V. and M.Y. Ram. (1987). Effect of spacing extent of pruning growth hormone and nutrients on flower yield of essential oil bearing rose (*Rosa damascena Mill*) in subtropical India. **Acta Hort., 18: 5225 – 5226.**

Williams, J.G.; A.R. Kubelik; K.J. Levak; J.A. Rafalski and S.V. Tingey. (1990). DNA polymorphism amplification by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Res., 18(18): 6231– 6235.**

Zietkiewicz, E.L.; A.N. Rafalski and D.Y. Labuda. (1994). Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. **Genomics, 22(20): 176 – 183.**

Annals
Agric. Sci.,
Ain Shams Univ.,
Cairo, 55(2), 165-176, 2010

A GENETIC DIVERSITY STUDY OF DAMASK ROSE (*ROSA DAMASCENE*) BY USING INTER SIMPLE SEQUENCE REPEATS MARKERS

[13]

Wassffe Aldine Silliman[1]; Nabil al batal[2] and Slam Lawand[3]

1. Department of Horticulture Science, Faculty of Agriculture, Syria
2. Department of Horticulture Science, Faculty of Agriculture, P. O. Box 30621, University of Damascus, Syria
3. Department of Agronomy, Faculty of Agriculture, P. O. Box 30621, University of Damascus, Syria

Keywords: Rose Damask, Genetic Diversity, Inter Simple Sequence Repeats Technique, Primer, Genotype

ABSTRACT

In this research study the genetic diversity of Rose damascene spreaded in the provinces of countryside of Damascus and Aleppo (Syria), using Inter Simple Sequence Repeats technique with 8 primer obtained from the Atomic Energy Commission of Syria. The total number of all alleles resulted from the primers was 39 alleles with polymorphic (100%). The number of alleles ranged between (3) alleles with each of the primers (ISSR-3, ISSR-5, ISSR-6) and (7) as the highest number with the primers (ISSR-1) with the average of 4.87 for each primer. The cluster analysis and relationship tree showed that the highest relationship was between the genotypes. (R.D---A, R.D---B) in the province of Damascus countryside(0.1671), and the lowest relationship was between the genotype (RD --- C) in the province of Aleppo and the genotype (R.D --- B) in the province of Damascus Countryside (1.2657).

(Received July 26, 2010)
(Accepted August 25, 2010)

تحكيم: أ.د سمير عبد العزيز إبراهيم