

## توثيق شجيرات أصل الكرمة (Ru140) المقاوم لحشرة الفيلوكسيرا في مشاتل وزارة الزراعة باستخدام المؤشرات الجزيئية SSR

د. بيان محمد مزهر\* ، د. علا توفيق الحلبي\*

### الملخص

تم تنفيذ هذا البحث في الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية بهدف توثيق شجيرات أصل الكرمة (Ru140) المقاوم لحشرة الفيلوكسيرا في حقول الأمهات التابعة لمديرية الانتاج النباتي في وزارة الزراعة باستخدام 20 زوجاً من بادئات الـ SSR، حيث تم جمع العينات الورقية من 10 شجيرات متماثلة شكلياً تتبع للأصل Ru140 من كل حقل من حقول الأمهات في مشاتل بابنس (حلب)، الشيخ حميد (حمص)، وخرابو (ريف دمشق)، وتمت المقارنة مع الشاهد الإيجابي الأصل Ru140 المدخل حديثاً من إيطاليا. وقد أثبتت النتائج قدرة 19 زوجاً من الـ 20 زوجاً من البادئات المستخدمة قدرتها في تعريف وتوثيق شجيرات الكرمة المدروسة من الأصل Ru140 في كل موقع من مواقع الدراسة، حيث تبين وجود خلط في شجيرة واحدة مغايرة لباقى الشجيرات والشاهد الإيجابي في مشتل بابنس، وأربع شجيرات في مشتل شيخ حميد، وشجيرتان اثنتان في مشتل خرابو، فيما كانت باقي الشجيرات مطابقة للشاهد الإيجابي مما يستوجب استبعاده الشجيرات المخالفة من حقول الأمهات. وقد كان حجم الأليلات الناتجة في كل بادئ مطابق للحجم المتوقع في الشجيرات المتماثلة فيما كان مغايراً بالنسبة للشجيرات المختلفة، وبذلك أثبتت تقنية الـ SSR كفاءتها العالية في كشف التباينات الوراثية بين الأفراد ضمن النوع الواحد وتمييز الشجيرات المغايرة للأصل Ru140، وبالتالي إمكانية استخدامها كأداة فعالة في تنقية وتوثيق الأصول والأصناف في حقول الأمهات بالتكامل مع توافر الشواهد الإيجابية.

الكلمات المفتاحية: أصول الكرمة، (Ru140)، مقاومة، حشرة الفيلوكسيرا، تقنية الـ SSR

\* الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية- قسم بحوث التفاحيات والكرمة في السويداء.

\* الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية- قسم بحوث التفاحيات والكرمة في السويداء.

## Screening of phylloxera resistant grape rootstock (Ru140) at the nurseries of ministry of agriculture using SSR markers

Bayan Mohammed Muzher, Ola Tawfeek Al-Halabi

### Abstract

This investigation was conducted at the General Commission for Scientific Agricultural Researches, to screen the grape rootstock (Ru140) as a resistant rootstock to phylloxera in the germplasmes of the nurseries which belong to Ministry of Agriculture using 20 primer pairs of SSR, the leaves samples were collected from 10 plants morphologically represent the rootstock (Ru140) from each nursery; Babennes in Aleppo, Shaikh Hmaid in Homs and Kharabo in Damascus countryside, in the comparison with the positive control Ru140 which recently has introduced from Italy. The results showed the ability of 19 primer pairs to identify the samples which related to Ru140 rootstocks in each nursery, there were one different sample in Babennes nursery, four different samples in Shaikh Hmaid nursery and two different samples in Kharabo nursery, while the other samples in each nursery were identical to the positive control. According to these results, the irregular plants in each nursery should be excluded. The allele size which represent each locus for all primers was identical to the expected size with the homologous plants, while it was variant in the dissenting plants. Since, SSR marker was an efficient tool to detect the genetic variation between individuals in the same species and distinguished the dissent plants out of Ru140 rootstock, which could be used as an efficient tool for screening and documentation rootstocks and cultivars in the germplasmes at the nurseries in the integration with the availability of positive controls.

Key words: Grapevine rootstocks, Ru 140, Resistance, Phylloxera, SSR marker.

### المقدمة

تعد الكرمة من أهم الشجيرات التي تنتشر زراعتها في سورية، حيث تحتل المرتبة الرابعة من حيث المساحة بين الشجيرات متساقطة الأوراق بعد اللوز والفسنق الحلبي والتفاح، إذ تبلغ المساحة حوالي 46013 هكتاراً، فيما تحتل المرتبة الأولى بالإنتاج، حيث بلغ الإنتاج 362501 طناً في عام 2012 (المجموعة الإحصائية الزراعية، 2013). تنتشر زراعة الكرمة في كافة محافظات القطر، لكنها تتركز بشكل رئيس في محافظات حمص، السويداء، ريف دمشق، حلب، حماه، ودرعا. تشكل الزراعة المطرية 84% من المساحة المزروعة، و تنتشر زراعة مجموعة من أصناف المائدة والتصنيعية وثنائية الغرض المحلية، والمدخلة التي تتبع جميعها للنوع *Vitis vinifera* الذي يتصف بمقاومته الضعيفة لحشرة الفيلوكسيرا التي تعد من أخطر الآفات التي تواجه زراعة الكرمة. ظهرت حشرة الفيلوكسيرا في ولاية كاليفورنيا في أواخر عام 1850 وسببت أضراراً كبيرة للمزارعين، ومن ثم دخلت إلى فرنسا في عام 1864 وانتشرت بشكل سريع في مزارع العنب التي أسفرت عن إصابة 61 مقاطعة خلال 15 سنة على دخولها، ومن ثم دخلت إلى أوروبا في أواخر عام 1868، وانتشرت في أغلب الدول المنتجة للعنب (Paul و Battey، 2005) ومنها سورية، حيث سجلت الإصابة في عام 1935، وقد قضت على مساحات شاسعة من العنب في محافظة ريف دمشق ومنها انتقلت إلى باقي محافظات القطر، وأصبحت تهدد زراعة الكرمة في بعض المحافظات كما هو الحال في محافظات درعا والسويداء والقنيطرة. كل ذلك دعا العلماء إلى التفكير بوسيلة تنتقد المزارع الأخرى المهددة وتبين أن الحل هو استخدام أصول مقاومة لهذه الحشرة، وكان أفضل هذه الأصول هي الأصول الأمريكية وهجنها نظراً لمقاومتها الكبيرة لهذه الآفة. وقد أجريت العديد من الدراسات على قدرة تلك الأصول على التجذير (Abu-Qaud، 1999)، ومدى تحمل بعضها للإصابة بحشرة الفيلوكسيرا (Makee وزملاؤه، 2004)، وقدرتها على تحمل الجفاف (Williams، 2010) وكذلك تأثير الأصول الأمريكية على إنتاجية الأصناف المطعمة عليها (Scalabrelli وزملاؤه، 2003)، بالإضافة لانتخاب الأصول تبعاً لنوع التربة (whiting، 2003)، وقدرة تلك الأصول على امتصاص العناصر الغذائية (Garcia وزملاؤه، 2001)، وكذلك التوافق بين الأصول المقاومة المستخدمة والأصناف المطعمة عليه (Iacono و Peterlunger، 200)، وتأثيرها على موعد النضج (Shaffer وزملاؤه، 2004). وينكر Arbuckle (2011) أن الأصلين Paulsen 1103 (P1103) و Ruggery 140 (Ru140) يشكلان أكثر من 70% من إجمالي الأصول المكاثرية في المشاتل خلال الفترة من 2008 و 2011 في استراليا. ومن جهة أخرى فإن توثيق الأصول والأصناف يحتاج إلى معرفة دقيقة في التوصيف المورفولوجي الذي يحتاج إلى وقت طويل إضافة لتأثير الظروف البيئية على خصائص النوع المدروس، ومن هنا فقد لعبت التقانات الحيوية دوراً هاماً في تعريف وتوثيق الأنواع والأصناف من خلال استخدام مجموعة من تقنيات البيولوجيا الجزيئية مثل تقنيات الـ AFLP، SSR، RAPD وغيرها، وقد استخدمت تقنية الـ AFLP في توصيف

وتعريف أصول الكرمة حيث أثبتت هذه التقنية كفاءة عالية في التفريق بين تلك الأصول (Sabir وزملاؤه، 2010) كما استخدمت تقنية الـ AFLP بالمقارنة مع تقنية الـ SSR في توصيف أصول الكرمة للمقارنة بين كفاءة هاتين الطريقتين وقد تمكنتنا من التمييز بين الأصول المدروسة بشكل فعال (Andres وزملاؤه، 2007). كما تم توصيف أصول الكرمة بالاعتماد على بادئات ناتجة من المادة الوراثية في الكلوروبلاست (Poczai وزملاؤه، 2013). وتعتبر تقنية الـ SSR من التقنيات الهامة التي تتميز بموثوقيتها العالية وتكراريتها، وقد استخدمت هذه التقنية في تعريف وتوصيف العديد من الأنواع النباتية كالأجاص (Muzher وزملاؤه، 2006) والتفاح (Al-Halabi وزملاؤه، 2009) والكرمة (Nieddu وزملاؤه، 2007). وثبت أن تحاليل الـ SSR من المعلمات المفضلة في دراسات تحاليل النسب ومعرفة الآباء "Parentage" بحكم أنها تنتقل بشكل متعادل السيادة حسب قانون مندل، ففي أي تصالب سيعطي كل من الأبوين أليلاً واحداً لكل موقع "locus" إلى جيل الأبناء، لذلك فكل أليل أظهره الأبناء يجب أن يكون موجوداً على الأقل في أحد الآباء (زيان، 2009). وقد طبق Arnold وزملاؤه (2002) تقنية الـ SSR لتحديد مواقع واسمات الـ SSR في 25 نوعاً من الكرمة بهدف حفظ هذه الأنواع وتحديد هويتها. وقام Eibach وزملاؤه (2009) بتحديد مواقع الـ SSR للمورثات المقاومة لحشرة الفيلوكسيرا في ثمانية طرز ناتجة عن التهجين بين أحد الأصناف Pinot blanc مع ثلاثة أصول مقاومة لحشرة الفيلوكسيرا، حيث اختلفت الشجيرات المدروسة بعدد المواقع التي تحمل صفة المقاومة لتلك الحشرة. ونظراً لأهمية اعتماد أصول موثوقة ومقاومة لحشرة الفيلوكسيرا في سورية ونتيجة لاحتمال وجود الخلط في بساتين أمهات أصول الكرمة المزروعة في مشاتل وزارة الزراعة، فقد هدف البحث إلى تتقنية شجيرات أصل الكرمة Ru140 المقاوم لحشرة الفيلوكسيرا المزروعة في تلك الحقول من خلال تحديد درجة تطابقها مع شواهد إيجابية تم استيرادها لهذا الغرض، وذلك عن طريق البصمة الوراثية باستخدام مؤشرات الـ SSR.

#### مواد البحث وطرائقه

نفذ البحث في حقول الأمهات التابعة لمديرية الإنتاج النباتي في وزارة الزراعة والإصلاح الزراعي، في المحافظات حلب وحمص وريف دمشق، وفي مخبر التقانات الحيوية في قسم بحوث التفاحيات والكرمة في الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية في عامي 2010-2011.

#### المادة النباتية

**الأصل 140 Ruggery (Ru 140):** ناتج عن التهجين بين الأصلين V. Berlandieri x V. Rupestris du lot. يتميز بقوة نموه، نسبة تجذيره تصل إلى 50%، جيد المقاومة للفيلوكسيرا، جيد التحمل للجفاف، لكنه حساس للنيماتودا. ضعيف التحمل للترب الغدقة، يتحمل الكلس الفعال حتى 20%، جيد في الترب الحامضية يتأقلم بشكل جيد مع الترب

الطينية (Keller، 2010) يتميز بقدرته على امتصاص العناصر الغذائية بشكل جيد بالمقارنة مع بعض الأصول الأخرى (Turkmen وزملاؤه، 2011). جيد التوافق مع أصناف الحلواني والبلدي والزيني (Abu-Qaud، 1999).

### طرائق البحث

تم جمع المادة النباتية للأصل Ru140 من حقول الأمهات في مشاتل بابنس (حلب)، الشيخ حميد (حمص)، وخرابو (ريف دمشق)، وذلك بأخذ 10 شجيرات متماثلة شكلياً ومطابقة بنسبة كبيرة للأصل المدروس في كل موقع (وأعطيت الأرقام من 1 إلى 10 في كل موقع)، بالإضافة للأصل Ru140 المدخل حديثاً من إيطاليا إلى الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية والذي استخدم كشاهد الإيجابي (c) للمقارنة معه.

- عزل الـ DNA: جمعت الأوراق الفتية من الشجيرات المحددة، وتم عزل الـ DNA باستخدام طريقة الـ CTAB حسب Doyle و Doyle (1993). وتم قياس تركيز الـ DNA باستخدام جهاز (Eppendorf, Germany) Biophotometer.

### - تقنية الـ SSR (Simple Sequence Repeat):

تم استخدام 20 زوجاً من بادئات الـ SSR (الجدول 1) لتوثيق أصول الكرمة وكشف التباين الوراثي ضمن شجيرات الأصل المدروس، وذلك من خلال إضافة 25 µl من مواد التفاعل التالية إلى أنبوب 0.2 مل: DNA (50ng)، 10X PCR buffer، 10 pmol، 0.2 µl hot start، 2mM dNTPs mix، 10 pmol reverse Primer، forward Primer، Taq polymerase (5U/µ) ووضعت الأنابيب في جهاز البلمرة المتسلسل (PCR) Eppendorf. وكانت الشروط على الشكل التالي: في البداية على درجة حرارة 95° مئوية لمدة 5 دقائق ومن ثم 40 دورة تضمنت كل دورة المراحل التالية: على درجة حرارة 95° مئوية لمدة دقيقة واحدة لفصل سلسلتي الـ DNA (Denaturation)، ومن ثم لمدة دقيقة على درجة حرارة بين 45° و 55° مئوية لمرحلة التزاوج (Annealing)، وبعد ذلك على درجة حرارة 72° مئوية لمدة دقيقة لمرحلة الاستطالة (Extension)، وفي الدورة النهائية 7 دقائق على درجة حرارة 72° مئوية.

وتم تحليل نواتج الـ PCR في هلامة الأجاروز 2% التي تحتوي على الإيثيديوم برومايد 0.5 مايكروغرام / مل، ومحلول 1x TBE، في جهاز الرحلان الكهربائي Electrophoresis، تحت جهد كهربائي مقداره 100 فولط مدة ساعة واحدة، وبعد ذلك تم تصوير الهلامة باستخدام جهاز توثيق الهلام (Gel documentation)، وتعطى الأليلات الموجودة الرقم 1 والأليلات الغائبة رقم 0.

الجدول (1): التسلسل النكليوتيدي لأزواج بادئات الـ SSR المستخدمة، ودرجة حرارة الانصهار لكل منها.

Tm	تسلسل النكليوتيدات	اسم البادئ
----	--------------------	------------

1	Vmc8A7 fwd	GCAGCAACTCTCTTACACACCG	68
	Vmc8A7 rvs	GTGGGAGCACTGGTTGCTTTAG	68
2	Vmc8B12 fwd	AGAGCACGCTGGACCTTCTTC	66
	Vmc8B12 rvs	GCACTGCGCGATTTCACTC	60
3	Vmc8D11 fwd	TGTTGAAGCTAGCATTGTCTCC	64
	Vmc8D11 rvs	ATTCGTCTTTATGCCATTGTT	60
4	Scu5vv fwd	CAAGCAGTTATTGAAGCTGCAAGG	70
	Scu5vv RVS	TCATCCATCACACAGGAAACAGTG	70
5	Scu6vv fwd	CCTAATGCCAGGAAGGTTGC	62
	Scu6vv rvs	CCCTAGTCTCTCTACCTATCCATG	72
6	Scu8vv fwd	CGAGACCCAGCATCGTTTCAAG	68
	Scu8vv rvs	GCAAAATCCTCCCCGCCTACAAGTC	70
7	Scu15vv fwd	GCCTATGTGCCAGACCAAAAAC	66
	Scu15vv rvs	TTGGAAGTAGCCAGCCCAACCTTC	74
8	Scu16vva fwd	CAAAGACAAAGAAGCCACCGAC	66
	Scu16vva rvs	ACCCTCTAAAGCACACACAGGAAC	72
9	VrZag62 fwd	GGTGAATGGGCACCGAACACGC	80
	VrZag62 rvs	CCATGTCTCTCCTCAGCTTCTCAGC	76
10	VrZag79 fwd	AGATTGTGGAGGAGGGAACAAACCG	76
	VrZag79 rvs	TGCCCCATTTTCAAACCTCCTTCC	76
11	VVS2 fwd	CAGCCCGTAAATGTATCCATC	60
	VVS2 rvs	AAATTCAAAATTCTAATTCAACTGG	62
12	VVS4 fwd	CCATCAGTGATAAAACCTAATGCC	66
	VVS4 rvs	CCCACCTTGCCCTTAGATGTTA	66
13	VVMD5 fwd	CTAGAGCTACGCCAATCCAA	60
	VVMD5 rvs	TATACCAAAAATCATATTCCTAAA	85
14	VVMD6 fwd	ATCTCTAACCCATAAACCAT	54
	VVMD6 rvs	CTGTGCTAAGACGAAGAAGA	58
15	VVMD27 fwd	GTACCAGATCTGAATACATCCGTAAGT	76
	VVMD27	ACGGGTATAGAGCAAACGGTGT	66
16	VVMD28 fwd	AACAATTCAATGAAAAGAGAGAGAGA	74
	VVMD28 rvs	TCATCAATTCGTATCTCTATTTGCTG	72
17	VVMD32 fwd	TATGATTTTTTAGGGGGTGAGG	66
	VVMD32 rvs	GGAAAGATGGGATGACTCGC	62
18	SCU04VV fwd	TGTCCTCTTCCCTCTCCAAC	68
	SCU04VV rvs	CAGTCTGTCATCTGACCATGTAGCC	78
19	SCU05VV fwd	CAAGCAGTTATTGAAGCTGCAAGG	70
	SCU05VV rvs	TCATCCATCACACAGGAAACAGTG	70
20	SCU10VV fwd	TACCCCAACAACCCTTTTTCCC	68
	SCU10VV rvs	TTCTCCGCCACCTCCTTTTCCAC	68

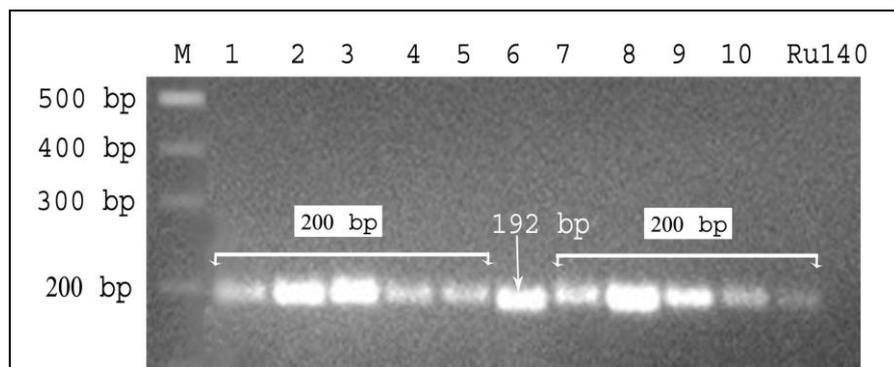
### التحليل الوراثي

تمت دراسة التشابه الوراثي (Genetic similarity) بين الشجيرات المدروسة باستخدام معامل Jaccard (Jaccard, 1908)، حيث تم تسجيل جميع الأليلات الناتجة، وأعطيت الأليلات الموجودة رقم 1، والأليلات الغائبة رقم 0. واستخدم التحليل العنقودي (Cluster analysis) من خلال طريقة UPGMA (Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Averages). وتم حساب معدل التغيرات المورثي ( $H_{av(p)}$  Expected Heterozygosity) بالاعتماد على تكرارية الأليل حسب Lorenzo وزملائه (2007). وقد تم استخدام البرنامج الإحصائي SPSS 17 والبرنامج Past في تحليل النتائج.

### النتائج والمناقشة

أثبت 19 زوجاً من الـ 20 زوجاً من البادئات المستخدمة قدرتهم على تعريف و توثيق شجيرات الكرمة المدروسة من الأصل Ru140 في كل موقع من مواقع الدراسة. وذلك كما يلي:

1- مشتل بابنس: تمكن 19 زوجاً من البادئات من إعطاء 21 أليلاً منها 4 أليلات متعددة شكلياً بنسبة تعددية شكلية (19%)، حيث استطاع البادئ VVMD5 من كشف التباين لدى الشجيرة رقم 2، وتمكن البادئ SCU10VV من كشف التباين لدى الشجيرة رقم 6، فيما كانت باقي الشجيرات متطابقة مع الشاهد الإيجابي (c)، وقد تراوح الوزن الجزيئي للأليلات الناتجة بين bp132 في البادئ Vmc8A7 و bp290 في البادئ Scu16vva، وقد كان الوزن الجزيئي للأليلات الناتجة عن البادئ VVMD5 بالنسبة لكافة الشجيرات المختبرة المتماثلة bp234 فيما كان bp244 بالنسبة للشجيرة المغايرة، أما بالنسبة للبادئ SCU10VV فقد تراوح حجم الأليلات الناتجة بين bp200 للشجيرات المتماثلة و bp192 للشجيرة المغايرة (الشكل 1). ويذكر زيان (2009) أن حجم الأليلات الناتجة عن البادئ VVMD5 تراوح بين 236 و bp240 في دراسته الجزيئية لبعض أصناف الكرمة المحلية في الجزائر وهي كانت مقارنة لما حصلنا عليه في هذا البحث. ووجد Jahnke وزملاؤه (2011) أن البادئ VVMD5 قد أعطى أليلات تراوح حجمها بين 243 و bp265 في الأصل Ru140.



الشكل 1: الأليلات الناتجة عن البادئ SCU10VV المستخدم في تقنية الـ SSR للأفراد المدروسة والشاهد الإيجابي Ru140، حيث M (Marker 100 bp ladder)، في مشتل بابنس.

كما تم حساب درجة التشابه الوراثي بالاعتماد على معامل Jaccard (Jaccard, 1908)، حيث كانت أقل درجة تشابه بين الشجيرتين رقم 2 و 6 (0.82)، فيما كانت درجة التشابه بين هاتين الشجيرتين وباقي الشجيرات (0.90) كما هو موضح في الجدول (2).

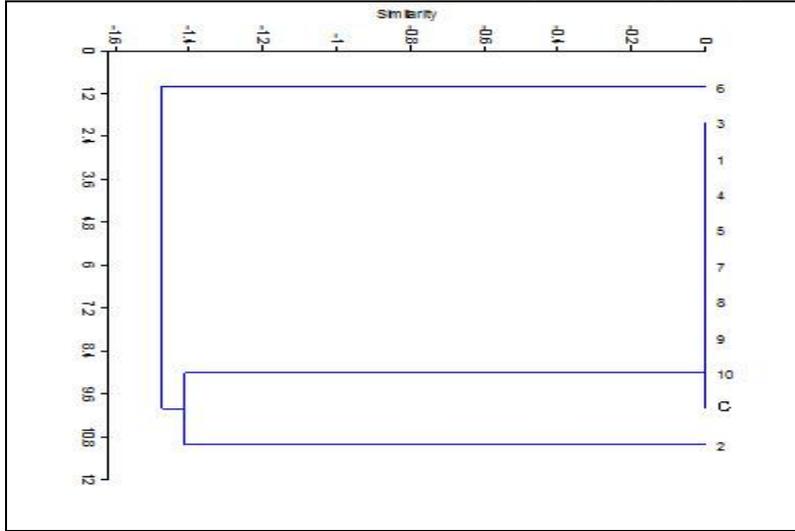
الجدول (2): درجة التشابه الوراثي بين الشجيرات المدروسة في مشتل بابنس.

C	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	
										1	
									1	0.90	
								1	0.90	1	
							1	1	0.90	1	
					1	0.90	0.90	0.90	0.82	0.90	
			1	0.90	1	1	1	1	0.90	1	
		1	1	0.90	1	1	1	1	0.90	1	
	1	1	1	1	0.90	1	1	1	0.90	1	<b>0</b>
1	1	1	1	1	0.90	1	1	1	0.90	1	

وقد قسم التحليل العنقودي الشجيرات المدروسة إلى ثلاث مجموعات، ضمت المجموعة الأولى الشجيرة رقم 2، وضمت المجموعة الثانية الشجيرة رقم 6 فقط، فيما وقعت جميع

الشجيرات المتبقية في المجموعة الثالثة مع الشاهد الإيجابي بنسبة تشابه 100% (الشكل 2). ومن النتائج نجد أن نسبة التماثر في الشجيرات المدروسة كانت مرتفع، ويعود الاختلاف بين الشجيرتين المغايرتين 2 و 6 إلى وجود تباين فيما بينهما بأكثر من موقع (VVM5 و SCU10VV)، وقد يعود هذا الاختلاف إلى تغيرات في المادة الوراثية نتيجة لحدوث طفرات في المادة النباتية المستخدمة أو خلط بين الأصول المستخدمة أثناء زراعتها. كما تم دراسة معدل التغيرات المورثية المتوقع ( $H_{av(p)}$  Expected heterozygosity) حيث كانت قيمته 0.175، وقد كانت هذه القيمة منخفضة بالمقارنة مع ما حصل عليه Jahnke وزملاؤه (2011) في دراستهم لمجموعة من أصناف وأصول الكرمة، حيث كانت لبعض المواقع 0.846.

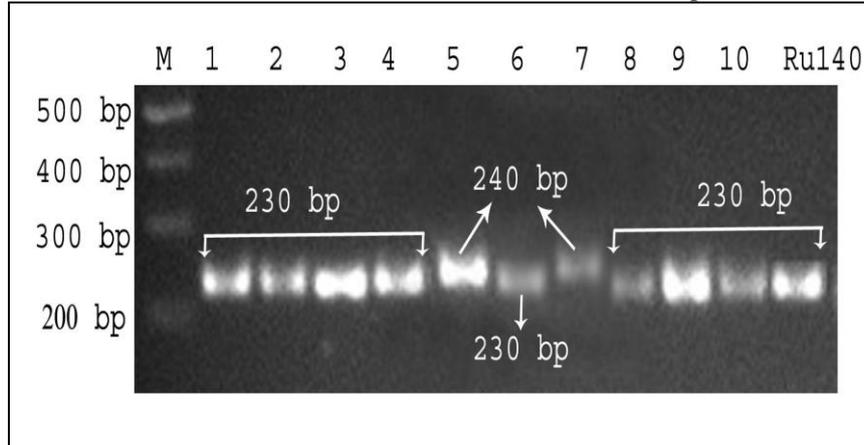
وبالاعتماد على هذه النتائج فقد تم استبعاد الشجيرتين رقم 2 و 6 واعتبارهما مخالفتين لباقي الشجيرات المزروعة المختبرة.



الشكل 2: مخطط التحليل العنقودي الناتج عن تقنية الـ SSR للشجيرات المدروسة مع الشاهد الإيجابي، بالاعتماد على معامل Jaccard من خلال طريقة UPGMA.

2- مشتل الشيخ حميد: تمكن 19 زوجاً من البادئات من إعطاء 24 ألياً منها 10 أليات متعددة شكلياً بنسبة تعددية شكلية (41.6%)، وقد استطاعت خمسة أزواج من البادئات من كشف التباين لدى أربع شجيرات، حيث تمكن البادئ VVM5 من كشف التباين لدى الشجيرتين رقم 5 و 7، وتمكن البادئ SCU10VV من كشف التباين لدى الشجيرة رقم 3 وهما نفس البادئين اللذين كسفا التباين الوراثي بين الشجيرات المدروسة في مشتل بابنس، كذلك تمكن البادئ VrZag62 من كشف التباين الوراثي لدى الشجيرتين رقم 3

و4، والبادئ VVMD28 من كشف التباين لدى الشجيرتين رقم 5 و7، والبادئ VVMD32 من كشف التباين في الشجيرة رقم 5، فيما كانت باقي الشجيرات متطابقة مع الشاهد الإيجابي، وقد تراوح حجم الأليلات الناتجة بين bp132 في البادئ Vmc8A7 وbp290 في البادئ Scu16vva، وكان حجم الأليلات الناتجة عن البادئ VVMD5 bp234 للشجيرات المتماثلة وbp244 للطرزين 5 و7. أما بالنسبة للبادئ SCU10VV فقد كان حجم الأليلات الناتجة bp200 للشجيرات المتماثلة وbp206 للشجيرة رقم 3، وأعطى البادئ VrZag62 أليلات كان حجمها bp210 في الشجيرات المتماثلة وbp248 في الشجيرة رقم 3 وbp242 في الشجيرة رقم 4، وقد وجد اليوسف وزملاؤه (2012) أن حجم الأليلات الناتجة لهذا الموقع في الأصل Ru 140 تراوح بين 192 وbp216، وكان حجم الأليلات الناتجة عن البادئ VVMD28 bp230 بالشجيرات المتماثلة وbp240 للشجيرتين رقم 5 و7 المغايرتين (الشكل 3)، ويقع حجم هذه الأليلات على الموقع VVMD على الصبغي 3 ضمن المجال الذي حصل عليه (زيان، 2009) حيث تراوح حجم الأليلات بين 221 وbp271 باختلاف صنف الكرمة المدروس، في حين وجد اليوسف وزملاؤه (2012) أن حجم الأليلات الناتجة في هذا الموقع كان bp244. وأخيراً أعطى البادئ VVMD32 الذي يقع على الصبغي 4 أليلات كان حجمها bp242 للشجيرات المتماثلة وbp239 للشجيرة رقم 5 المغايرة، حيث كان حجم الأليلات الناتجة يقع ضمن المجال الذي حصل عليه Fatahi وزملاؤه (2003) بالنسبة للأصل DogRidge في دراستهم لبعض الأصناف المحلية وأصول الكرمة في إيران حيث تراوح حجم الأليلات الناتجة بين 235 وbp267.



الشكل 3: الأليلات الناتجة عن البادئ VVMD28 المستخدم في تقنية الـ SSR للأفراد المدروسة والشاهد الإيجابي Ru140، حيث (Marker 100 bp ladder) M، في مشتل الشيخ حميد.

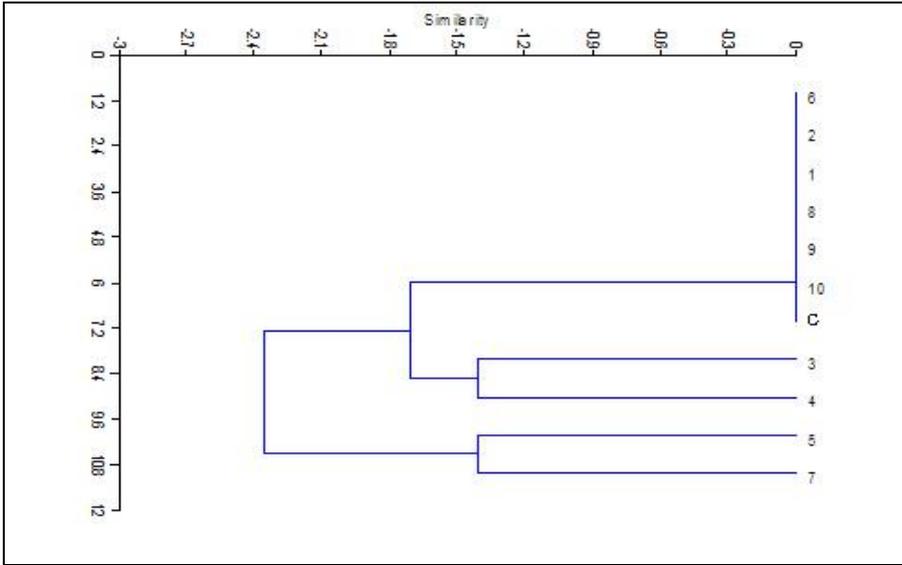
ويشير الجدول (3) إلى درجة التشابه الوراثي بالاعتماد على معامل Jaccard (Jaccard, 1908)، حيث أظهرت الشجيرة رقم 5 أقل درجة تشابه وراثي مع الشجيرة 3 (0.58)، ومن ثم تلتها مع الشجيرة 4 (0.65)، فيما كانت 0.9 مع الشجيرة 7، وكانت مع باقي الشجيرات المتماثلة والمطابقة للشاهد الإيجابي 0.73. أما الشجيرة رقم 3 فقد أظهرت أقل درجة تشابه مع الشجيرة 7 (0.65)، فيما كانت مع الشجيرة 4 (0.9)، في حين سجلت مع باقي الشجيرات المتماثلة درجة تشابه وراثي (0.81). أما الشجيرة رقم 4 فقد كانت درجة تشابهها الوراثي مع الشجيرة 7 (0.73) في حين كانت مع باقي الشجيرات المتماثلة المطابقة للشاهد (0.9). وبالنسبة للشجيرة رقم 7 فقد كانت درجة تشابهها الوراثي مع باقي الشجيرات المتماثلة والمطابقة للشاهد الإيجابي (0.81). ويعود هذا التباين إلى اختلاف الشجيرات المغايرة للشاهد الإيجابي بعدد من الأليلات فيما بينها مما انعكس على درجة التباين الوراثي بشكل ملحوظ، ويتضح من خلال النتائج وجود خلط قد يكون ناجماً عن خطأ في نقل الأصول إلى الأرض الدائمة مما أدى إلى حدوث التباين فيما بين الشجيرات المدروسة.

الجدول (3): درجة التشابه الوراثي بين الشجيرات المدروسة في مشتل الشيخ حميد.

C	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	
										1	1
									1	1	2
								1	0.81	0.81	3
							1	0.9	0.9	0.9	4
						1	0.65	0.58	0.73	0.73	5
					1	0.73	0.9	0.81	1	1	6
				1	0.81	0.9	0.73	0.65	0.81	0.81	7
			1	0.81	1	0.73	0.9	0.81	1	1	8
		1	1	0.81	1	0.73	0.9	0.81	1	1	9
	1	1	1	0.81	1	0.73	0.9	0.81	1	1	10
1	1	1	1	0.81	1	0.73	0.9	0.81	1	1	C

وقد قسم التحليل العنقودي الشجيرات المدروسة إلى ثلاث مجموعات، ضمت المجموعة الأولى الشجيرتين 5 و7، وضمت المجموعة الثانية الشجيرتين 3 و4، فيما وقعت جميع الشجيرات المتبقية في المجموعة الثالثة مع الشاهد الإيجابي بنسبة تشابه 100% (الشكل 4). وقد كان معدل التباين الوراثي (0.33).

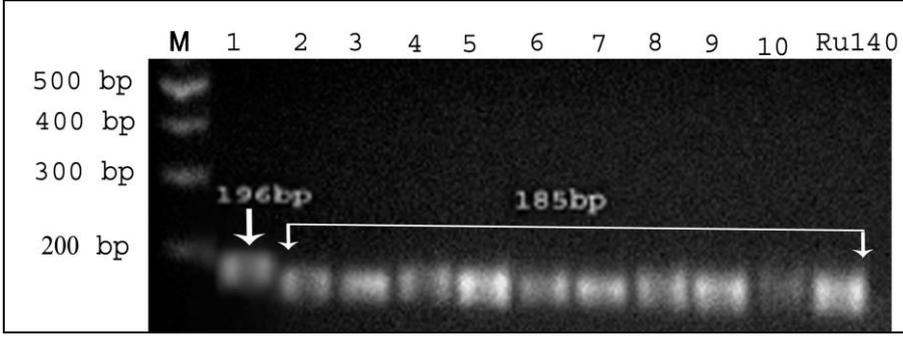
ويتبين من خلال النتائج ارتفاع نسبة الخلط في مشتل الشيخ حميد، وضرورة استبعاد الشجيرات 3، 4، 5، 7.



الشكل 4: مخطط التحليل العنقودي الناتج عن تقنية الـ SSR للشجيرات المدروسة مع الشاهد الإيجابي بالاعتماد على معامل Jaccard من خلال طريقة UPGMA.

3- مشتل خرابو: تمكن 19 زوجاً من البادئات من إعطاء 23 أليلاً منها 8 أليالات متعددة شكلياً بنسبة تعددية شكلية (34.8%)، حيث استطاعت البادئات الثلاث VVMD5 و SCU10VV و VVMD27 من كشف التباين لدى الشجيرة رقم 1، فيما تمكن البادئ VVS4 من كشف التباين لدى الشجيرة رقم 2، فيما كانت باقي الشجيرات متطابقة مع الشاهد الإيجابي، وقد تراوح حجم الأليالات الناتجة بين bp132 في البادئ Vmc8A7 و bp290 في البادئ Scu16vva، وكان حجم الأليالات الناتجة عن البادئ VVMD5 و bp 234 للشجيرات المتماثلة والمطابقة للشاهد الإيجابي، و bp 253 للشجيرة رقم 1، ووجد Laucou وزملاؤه (2008) أن حجم الأليالات الناتجة عن البادئ VVMD5 كان bp255 في الأصل 31Richter، أما بالنسبة للبادئ SCU10VV فقد كان حجم الأليالات الناتجة bp200 للشجيرات المتماثلة والمطابقة للشاهد الإيجابي، و bp206 للشجيرة رقم 1، وأعطى البادئ VVMD27 أليالات كان حجمها bp185 للشجيرات المتماثلة والمطابقة للشاهد الإيجابي، و bp196 للشجيرة رقم 1 (الشكل 5)، وقد توافقت هذه النتائج مع ما حصل عليه Laucou وزملاؤه (2008) في دراستهم لمجموعة من الأصول بهدف تحديد نسب الأصل Fercal حيث كان حجم الأليالات bp186 في الأصل 31Richter الناتج عن التهجين بين نفس الأبوين للأصل Ru140 بالإضافة

لآباء آخرين، فيما أظهر البادئ VVS4 أليلات كان حجمها 170 bp في الشجيرات المتماثلة والمطابقة للشاهد الإيجابي و 175 bp في الشجيرة رقم 2.



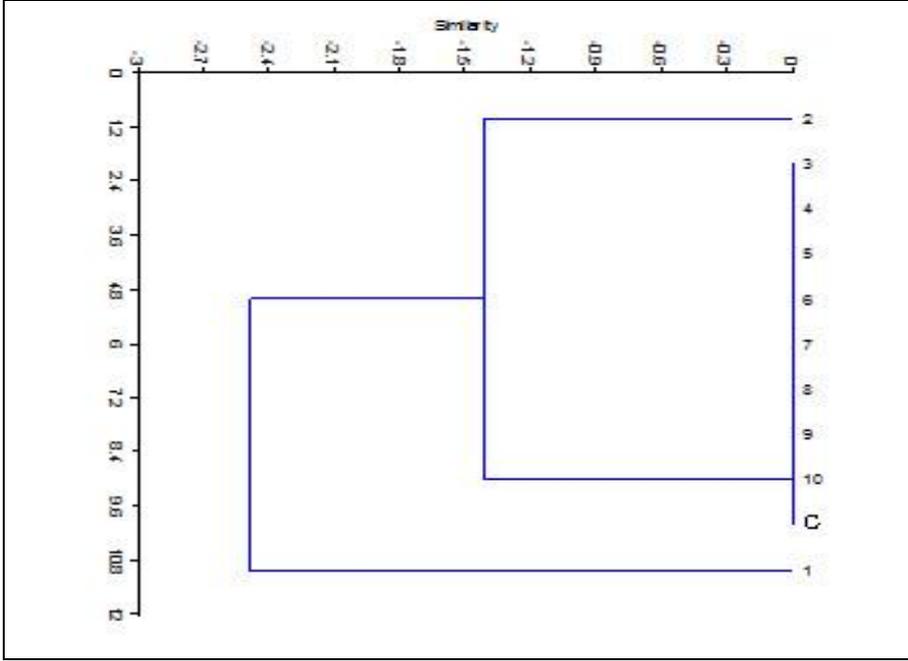
الشكل 5: الأليلات الناتجة عن البادئ VVMD27 المستخدم في تقنية الـ SSR للأفراد المدروسة والشاهد الإيجابي Ru140، حيث M (Marker 100bp ladder)، في مشتل خرابو.

وفي حساب درجة التشابه الوراثي بالاعتماد على معامل Jaccard (Jaccard، 1908)، كانت أقل درجة تشابه بين الشجيرتين رقم 1 و 2 (0.5)، في حين كانت درجة التشابه الوراثي بين الشجيرة رقم 1 مع باقي الشجيرات المتماثلة 0.6، أما الشجيرة رقم 2 فقد كانت درجة تشابهها الوراثي مع باقي الشجيرات المتماثلة 0.85 (الجدول 4).

الجدول (4): درجة التشابه الوراثي بين الشجيرات المدروسة في مشتل خرابو.

C	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	
										1	1
									1	0.5	2
							1	1	0.85	0.6	3
						1	1	1	0.85	0.6	4
					1	1	1	1	0.85	0.6	5
				1	1	1	1	1	0.85	0.6	6
			1	1	1	1	1	1	0.85	0.6	7
		1	1	1	1	1	1	1	0.85	0.6	8
	1	1	1	1	1	1	1	1	0.85	0.6	9
	1	1	1	1	1	1	1	1	0.85	0.6	10
1	1	1	1	1	1	1	1	1	0.85	0.6	C

وقد قسم التحليل العنقودي الشجيرات المدروسة إلى ثلاث مجموعات (الشكل 6)، ضمت المجموعة الأولى الشجيرة رقم 1، وضمت المجموعة الثانية الشجيرة رقم 2، فيما وقعت جميع الشجيرات المتبقية في المجموعة الثالثة مع الشاهد الإيجابي بنسبة تشابه 100%. وقد كانت درجة التباين المورثي المتوقع (0.28). وبالاعتماد على هذه النتائج لابد من استبعاد الشجيرتين رقم 1 و2.



الشكل 6: مخطط التحليل العنقودي الناتج عن تقنية الـ SSR للشجيرات المدروسة مع الشاهد الإيجابي بالاعتماد على معامل Jaccard من خلال طريقة UPGMA.

ومن خلال النتائج نجد تطابق حجم الأليلات الناتجة عن البادئات المدروسة في مواقع الدراسة بالنسبة للشجيرات المتماثلة والمطابقة للشاهد الإيجابي، وبالتالي لم يكن للتوزع الجغرافي دور في حدوث التباين الوراثي بين العينات المدروسة، وقد اقتصر الفرق في حجم الأليلات على الشجيرات المغايرة (الجدول 5). وقد استطاعت 6 أزواج من البادئات من كشف التباين بين الأفراد المدروسة وبالتالي إمكانية اعتماد تلك البادئات في دراسات العلاقات الوراثية ضمن النوع الواحد في الكرمة.

الجدول 5: حجم الأليلات الناتجة عن البادئات المختلفة في الشجيرات المطابقة للشاهد الإيجابي والمغايرة في المواقع المدروسة.

رقم الشجيرة المغايرة	حجم الأليلات في الشجيرات المغايرة / bp			حجم الأليلات في الشجيرات المطابقة للساهد الإيجابي/bp	اسم البادئ
	خرابو	الشيخ حميد	بابنس		
				132	Vmc8A7
				240	Vmc8B12
				130	Scu5vv
				217	Scu6vv
				189	Scu8vv
				183	Scu15vv
				290	Scu16vv
4 و 3		248،242		210	VrZag62
				246	VrZag79
				153	VVS2
2	175			170	VVS4
2(بابنس)، 5 و 7 1 (الشيخ حميد)، 1 (خرابو)	244	253	244	234	VVMD5
				202	VVMD6
1	196			185	VVMD27
7 و 5		240		230	VVMD28
5		239		242	VVMD32
				174	SCU04VV
				158	SCU05VV
3 (الشيخ حميد)، 6 (بابنس)		206	192	200	SCU10VV

### الاستنتاجات

- 1- أثبتت تقنية الـ SSR كفاءتها في كشف التباين الوراثي بين الشجيرات المختلفة ضمن كل موقع، وبالتالي إمكانية اعتمادها لتتقية حقول أمهات أصول الكرمة في مشاتل وزارة الزراعة.
- 2- لم يكن للتوزع الجغرافي دور في حدوث التباين الوراثي بين العينات المدروسة، وقد اقتصر الفرق في حجم الأليلات على الشجيرات المغايرة.

### التوصيات

- 1- اعتماد الشجيرات المطابقة للشاهد الإيجابي التي تم توثيقها لإكثار وإعادة تجديد حقول أمهات الأصل Ru140.
- 2- توفير الشواهد الإيجابية لمتابعة التوصيف الجزيئي لباقي أصول الكرمة المزروعة في حقول الأمهات في مشاتل وزارة الزراعة، والأصول الموجودة في مراكز البحوث بهدف تتقيتها.

### المراجع

1. المجموعة الإحصائية الزراعية. 2013. وزارة الزراعة والإصلاح الزراعي. دمشق. سورية.
2. اليوسف، وائل عبد الحميد، ووسيم اسماعيل محسن، وعبدالله فرحان الطاهر، ورحيم عبدالسلام أبو الجدايل. 2012. التوصيف الجزيئي لبعض أصول الكرمة المنتشرة في سورية باستخدام المؤشرات الجزيئية SSR. المجلة الأردنية للعلوم الزراعية، 8 (3): 483-499
3. زيان، لعياض. 2009. توصيف مظهري Ampélographie وجزيئي (SSR) لتعريف وتثمين أصناف من العنب المحلي (*Vitis vinifera* L.)، رسالة دكتوراه، جامعة منتوري، قسنطينة. 267 ص.
4. -Abu-Qaoud, H. 1999. Performance of Different Grape Cultivars for Rooting and Grafting, An-Najah Univ. J. Res., Vol. 13 : 1-8.
5. Al-Halabi, O., Kh. Maarri and B. Muzher. 2009. Characterization of some local apple Cultivars in Syria Using Some Morphological Traits and molecular markers, Jordan J. for Agriculture Sciences, 5 (1): 73-89.
6. Andres, M. T., J. A. Cabezas. M. T. Cervera. J. Borrego. J. M. Martínez-Zapater and N. Jouve. 2007. Molecular characterization of grapevine rootstocks maintained in germplasm collections. Am. J. Enol. Vitic. 58 (1): 75-86.
7. Arbuckle, K. 2011. Rootstock trends highlight industry priorities, Aust. NZ Grape grower Wine maker, 569:35-36.
8. Arnold C., M. Rossetto. J. McNally and R. J. Henry. 2002. The application of SSRs characterized for grape (*Vitis vinifera*) to conservation studies in Vitaceae, *American Journal of Botany*, 89:22-28.
9. Battey H. N. and Paul E. S. 2005. Phylloxera and the grapevine: a sense of common purpose, *Journal of Experimental Botany* , 56(422):3029-3031.
10. Doyle, J. J. and J. L. Doyle. 1993. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh tissue, *Phytochem. Bull.*, 19:11-15.
11. Eibach, R., L. Hausmann and R. Töpfer. 2009. Marker assisted selection (MAS) as a new tool for developing high quality cultivars with sustainable resistance Federal Research Centre for Cultivated Plants –

- Julius Kuehn-Institute, Institute for Grapevine Breeding Geilweilerhof, Germany. Pp6.
12. Fatahi, R., A. N. Ebadi. N. Bassil. S.A. Mehlenbacher and Z. Zamani. 2003. Characterization of Iranian grapevine cultivars using microsatellite markers, *Vitis*, 42 (4): 185–192.
  13. Garcia M., P. Gallego. C. Daverede and H. Ibrahim. 2001. Effect of three rootstocks on grapevine (*Vitis vinifera L.*) cv. Negrette, grown hydroponically. I. Potassium, calcium and magnesium nutrition, South African J. Enol. Viticult. 22:101-103.
  14. Iacono, F. and E. Peterlunger. 2000. Rootstock-scion interaction may affect drought tolerance in *Vitis vinifera* cultivars. Implications in selection programs, *Acta Hort.*, 528:543-549.
  15. Jaccard, P. 1908. Nouvelles recherches sur la distribution flora. *Bull. Sac. Nat.*, 44: 223-270.
  16. Jahnke, G., K. G. Molnar. M. János. S. Barna. T. Erik. V. Péter and K. László. 2011. Analysis of grape rootstocks by SSR markers, *J. Int. Sci. Vigne Vin*, 45 (3):1-12.
  17. Keller, M. 2010. The science of grapevines: anatomy and physiology. Academic Press, Elsevier Inc., San Diego, USA, 377 p.
  18. Laucou, V., J. M. Boursiquot. T. Lacombe. L. Bordenave. S. Decroocq and N. Ollat. 2008. Parentage of grapevine rootstock 'Fercal' finally elucidated, *Vitis*. 47 (3): 163–167.
  19. 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.
  20. 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 Systems, *In Vitro Cellular & Developmental Biology. Plant*, 40 (2): 225-229.
  21. Muzher, B., A. N. Sharaf and N. A. Abdelmunem. 2006. Application of biochemical and Molecular PCR- based markers to the characterization of

- Syrian pear ( *Pyrus syriacs* Boiss) genotypes, The 4<sup>th</sup> Conference on Scientific Research Outlook & Technology Development in the Arab World, Damascus.
- 22.Nieddu, G., M. Nieddu. G.F. Cocco. P. Erre and I. Chessa. 2007. Morphological and Genetic Characterization of The Saroinian 'Bovale' Cultivars, Acta Hort.,754: 49-54.
- 23.Poczai, P., J. Hyvönen. J. Taller. G. Jahnke and L. Kocsis. 2013. Phylogenetic analyses of Teleki grapevine rootstocks using three chloroplast DNA markers, Plant Mol Biol Rep., 31:371–386.
- 24.Sabir, A., Y. Doğan. S. Tangolar and S. Kafkas. 2010. Analysis of genetic relatedness among grapevine rootstocks by AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) markers, Journal of Food, Agriculture & Environment, 8(1): 210- 213.
- 25.Scalabrelli, G., G. Ferroni. C. D'Onofrio. G. Di Collalto and F. Venerini. 2003. Trials with 'Sa ngevese' Grafted on Several Grapevine Rootstocks in Two Different Areas of Tuscany, Acta Hort. 617:73-83.
- 26.Shaffer, R., T.L. Sampaio. J. Pinkerton and M.C. Vasconcelos. 2004.
- 27.Grapevine Rootstocks for Oregon Vineyards, Oregon State University, Pp10.
- 28.Turkmen, C., A. Dardeniz. N. M. Müftüoğlu. Z. Gökbayrak and A. Kabaoğlu. 2011. Nutrient contents of Ruggeri 140 rootstock canes in dormant season, J. Anim. Plant Sci. 21(4): 730-733.
- 29.Whiting, J. 2003. Selection Grapevine Rootstocks and Clones for Great Victoria, State of Victoria, Department of Primary Industries.Pp 36.
- 30.-Williams, L. E. 2010. Interaction of rootstock and applied water amounts at various fractions of estimated evapotranspiration (ETc) on productivity of Cabernet Sauvignon, Aust. J. Grape Wine Res.16(3):434–444.

Received	2015/04/08	إيداع البحث
Accepted for Publ.	2015/08/04	قبول البحث للنشر