التوصيف الجزيئي لبعض طرز البطاطا (*Solanum tuberosum*) باستخدام المقاطع التتابعية البسيطة الداخلية الـ ISSR

د. فهد البيسكي*

الملخص

تم في هذا البحث التوصيف الجزيئي لعشرة طرز من البطاطا المزروعة في سورية بهدف الاستفادة منها في تطوير برامج تربية فعالة للبطاطا. استخدم في التوصيف 16 بادئة ISSR، وأعطت جميعها حزم من الـ DNA مع الطرز المدروسة كافة، بلغ عدد الحزم الكلية الناتجة 436 حزمة، بمتوسط 27.25 حزمة لكل بادئة، وبلغ مجموع الحزم المتباينة 433 حزمة بمتوسط 27.06 حزمة لكل بادئة، بينما كان مجموع الحزم المتشابهة 3 حزمة فقط، بلغ متوسط النسبة المئوية للتعددية الشكلية للبادئات المستخدمة 99.30 %. كان الطرازان Faluka وTarus هما الأقرب وراثياً ببعد وراثي قدره 0.523، بينما الأبعد وراثياً فهما الطرازان Challenger وSoraya ببعد وراثي قدره 0.836. أدى التحليل العنقودي اعتماداً على معطيات الـ ISSR إلى تقسيم الطرز المدروسة إلى خمس مجموعات، حيث ضمت المجموعة الأولى ثلاثة طرز هي: Rumba، Tarus وFaluka،

*باحث في الهيئة العامة للتقانة الحيوية، وزارة التعليم العالي – دمشق.

وضمت المجموعة الثانية ثلاثة طرز هي: Camberra، Alaska وSoraya، وضمت المجموعة الثالثة الطرازان Challenger وKastelli، وضمت المجموعة الرابعة الطراز Royalفقط، أما المجموعة الخامسة فضمت الطرازSylvana. تشير هذه النتائج إلى كفاءة واسمات الـ ISSR في تحديد درجة التباين الوراثي ما بين طرز البطاطا المختلفة، كما تشير درجة التباين الوراثي المرتفعة ما بين الطرز المدروسة إلى إمكانية استخدام هذه الطرز في برامج التحسين الوراثي للبطاطا.

الكلمات المفتاحية: البطاطا.*Solanum tuberosum*، التوصيف الجزيئي، المقاطع التتابعية البسيطة الداخلية ISSR.

Molecular characterization of some potato (*Solanum tuberosum*) genotypes using Inter Simple Sequence Repeat (ISSR)

Dr. Fahed Albiski*

Abstract

Ten potato genotypes grown in Syria were studied for Molecular characterization to benefit from the development of effective breeding programs of potato. 16 ISSR primers were used for molecular characterization; all used primers produced DNA fragments in all studied genotypes.The total number of amplified bands was 436 bands with an average of 27.25bands/primer. The total number of polymorphic bands was433with and average of 27.06bands/primer.Only3monomorphic bands were detected. The average of polymorphism percentages for the used primers was 99.30%. The closely relatedgenotypes were Tarus and Falukawith a genetic distance value of 0.523, while the most distant genotypes were Challenger and Soraya with a genetic distance of 0.836. The cluster analysis, based on ISSR data, divided the studied genotypes into 5 groups,the first group included three genotypes: Rumba, Tarus and Faluka, the second group included three genotypes: Camberra, Alaska and Soraya, the third group included Challenger

* National Commission for Biotechnology (NCBT), Damascus, P. O. Box: 301902, Syria.

and Kastelli, the fourth group included Royal only, and the fifth group included Sylvana. These results indicate that the ISSR is an effective tool to determine the genetic variation among different potato genotypes, and the high genetic variation between the analysed genotypes indicate also the possibility of using them in the potato genetic improvement programs.

Key words: Potato. *Solanum tuberosum*, molecular characterization, ISSR marker.

المقدمة:

تعد البطاطا أحد أهم المحاصيل الزراعية وغذاءً أساسياً في جميع أنحاء العالم (Spooner وزملاؤه،2007). فهي خامس أكبر محصول من المحاصيل الغذائية بعد القمح والشعير والذرة والأرز (Alleman وزملاؤه، 2004). بلغ إجمالي المساحة المزروعة بالبطاطا عالمياً نحو 19098 مليون هكتار، والإنتاج 382 مليون طن سنوياً، والإنتاجية قرابة 19985 كغ/هكتار(FAO، 2017). تأتي البطاطا في المرتبة الثانية بعد البندورة في سورية بين محاصيل الخضار في كمية الإنتاج، فقد بلغ انتاجها نحو539 ألف طن بمساحة نحو 29.88 ألف هكتار(المجموعة الإحصائية الزراعية السنوية ،2017) .تنتمي البطاطا *Solanum tuberosum* إلى الجنس *S olanum* وتتبع الفصيلة الباذنجانية *Solanaceae* التي تضم نحو 90جنساً و2000 نوع تقريباً (بوراس وزملاؤه، 2006). تكوّن أنواع البطاطا سلسلة متصلة من التراكيب الصبغية المتضاعفة، فهناك الأنواع الثنائية 2n=2x=24 والثلاثية n=3x=36 والرباعية 2n=4x=48 والخماسية 2n=5x=60 والسداسية 2n=6x=72 (مسعود،1981؛ بوراس، 1989).

تتميز المصادر الوراثية النباتية في سورية بتنوعها ويشكل التباين الذي يعد جزءً من التنوع الحيوي الكلي مصدراً هاماً للمورثات المفيدة في تحسين إنتاجية الأصناف المزروعة، وأن الوصول إلى طرز جديدة ذات امكانيات وراثية عالية الإنتاجية أصبح هدفاً دائماً لجميع برامج التربية، ولتحقيق هذا الهدف لابد لمربي النبات من معرفة التركيب الوراثي ووظيفة المورثات المتحكمة باستجابة النبات للبيئات المختلفة. يتوقف نجاح برامج التربية لتحسين صفة تحمل الإجهاد بشكل عام على وجود التباين الوراثي في الطرز الوراثية، وتحديد أهم الصفات الوراثية ومنها تلك المرتبطة بتحمل الإجهاد والقابلة للتوريث، بالإضافة إلى إمكانية توظيف هذا التباين الوراثي لعزل الطرز المتحملة للإجهاد

واستبعاد الطرز الحساسة (Epestin وزملاؤه، Shannon;1980 وزملاؤه، 1984). إن معرفة التباين الوراثي للطرز المحلية والمعتمدة لمحصول البطاطا على المستوى الجزيئي (DNA) ومعرفة درجة القرابة بين تلك الطرز سيساعد مربي النبات في الاختيار الصحيح للطرز الأكثر تنوعاً إحيائياً وتباعداً وراثياً مما سيسمح بتوسيع القاعدة الوراثية الإنتخابية لمربي النبات في الأجيال الانعزالية وذلك عند التهجين بين تلك الطرز.

تُعد الواسمات الجزيئية Molecular markers ذات أهمية قصوى في تربية النبات، بفعل عدة عوامل منها: إمكانية تحديد موقع وراثي مطلوب لطراز وراثي معين مباشرةً، وعدم وجود أية علاقة بين المراحل التطورية للنبات والواسمات الجزيئية، وعدم تأثّر هذه الواسمات بالعوامل البيئية، والحصول على عدد كبير من الواسمات بزمنٍ قصيرٍ نسبياً، إضافةً إلى أنّها تُعد مساعدة في تسريع عمليات الانتخاب والتربية (سيد، 2001). ويُقلّل استعمال تقانات الواسمات الجزيئية في برامج التربية من تعقيدات إدخال عدد من الصفات المرغوبة في الطراز الوراثي (Qi وزملاؤه، 1996).

تعطي تقانة التكرارات التتابعية البسيطة البينية Inter Simple Sequence Repeats (ISSR) مستوياتٍ مرتفعة من التعددية الشكلية للحمض النووي DNA ما بين الأفراد (Fu-Rong وزملاؤه، 2007) من خلال تضخيم المواقع بين التوابع الدقيقة المتقاربة والمتوضعة بشكلٍ متعاكس (Zietkiewicz وزملاؤه، 1994)، وذلك باستعمال بادئات مفردة ذات نيكليوتيدات متكررة بطول يصل إلى16–18 bp (Bornet وزملاؤه، 2002؛ Nagaraju وزملاؤه، 2002). ولكون واسمات الـISSR غزيرة فإنّها تعطي عدداً كبيراً من الحزم، ومستوى من التعددية الشكلية Polymorphism مرتفع أو متوسط (Sheppard و Smith، 2000؛ Gui وزملاؤه، 2008)، وقد استخدمت في الدراسات الوراثية للعديد من الأنواع النباتية لكونها فعّالة في كشف المستويات المنخفضة جداً من التباينات

الوراثيةGenetic variability (Klliker وزملاؤه، 2003). وبناءً لـ Hantula وزملاؤه (1996) وCharters وزملاؤه (1996)، فإن تقنية الـ ISSR أكثر دقة وثباتية من تقنية التباينات الشكلية المضاعفة عشوائياً Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) وتنتج عدداً أكبر من الحزم المتباينة شكلياً من كل بادئ.

استخدمت تقانة الـISSR في الدراسات الوراثية للبطاطا وفي تقييم الهجن الجسمية الناتجة عن دمج بروتوبلاست الأصناف التجارية: Cardinal وNicola وAminca (Ellouza وزملاؤه، 2006)، وقد بين Taylor وزملاؤه (2001) أن البصمة الوراثية للDNA أداة مفيدة في تحديد الإختلافات الوراثية في البطاطا ودراسات التنوع الوراثي في عدد كبير من نباتات البطاطا، وهي تكشف وبشكل سريع البصمات عن تعددات شكلية كثيرة ، وبذلك فهي تحدد الاختلافات الوراثية بين طرز البطاطا وقد استخدمت هذه التقنية كوسيلة جيدة للتوصيف الوراثي في البطاطا وفي برامج إدارة المادة الوراثية (Bornet وزملاؤه،2002 ;Powell وزملاؤه، 1996). كما قام McGregor وزملاؤه (2000) بمقارنة عدة تقنيات للوسم الجزيئي (RAPD، AFLP، SSR وISSR) لدراسة البصمة الوراثية لأصناف البطاطا، وتشير نتائجهم إلى أنه يمكن استخدام أي من هذه التقنيات لكن تفوقت تقنية الـ ISSR من حيث متوسط عدد الحزم المتباينة شكلياً لكل بادىء. تم كذلك استخدام تقنية الـ ISSR بنجاح في تقييم مستوى التباين الوراثي ما بين وضمن أصناف البطاطا المختلفة (Bornet وزملاؤه، 2002؛ Gorji وزملاؤه، 2011؛ Mahfouz وزملاؤه، 2012).

ساعدت برامج التربية والتحسين الوراثي للبطاطا في تطوير بعض الطرز الجديدة، التي تلبي متطلبات السوق من حيث مقاومتها للإجهادات، وتحسين الجودة والإنتاجية. تعد تربية البطاطا أقل نجاحاً بالمقارنة مع المحاصيل الأخرى، بسبب التعقيد الوراثي للنبات،

ويحتاج التحسين الوراثي بالطرائق التقليدية في البطاطا إلى وقت وجهد كبير وتكاليف باهظة (Veilleux وزملاؤه، 2005). ونظراً لأهمية معرفة التباين الوراثي لطرز البطاطا ومعرفة درجة القرابة بين تلك الطرز، والدور الهام الذي يلعبه تحديد مدى التباين الوراثي في تطوير برامج تربية سريعة وفعالة ودقيقة، واستخدامها في برامج التحسين الوراثي الهادفة للوصول إلى طرز متحملة للإجهادات البيئية مع المحافظة على الطاقة الإنتاجية للمحصول.فقد هدف البحث لدراسة التباين الوراثي ما بين طرز البطاطا باستخدام تقنية ISSR.

مواد البحث وطرائقه Material and Methods:

مدة ومكان تنفيذ البحث Duration and Site of Research:

نفذ البحث في مخبر التقانات الحيوية النباتية في الهيئة العامة للتقانة الحيوية– وزارة التعليم العالي خلال الفترة 2017– 2018.

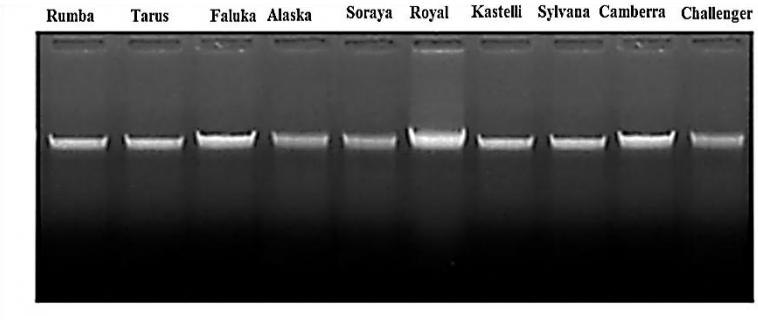
2–3 المادة النباتية Plant Material:

استخدم في تنفيذ هذا البحث عشرة طرز من البطاطا *Solanum. Tuberosum* التي تم الحصول عليها من الهيئة العامة للتقانة الحيوية والهيئة العامة للبحوث الزراعية وهي: Rumba، Tarus، Faluka، Camberra، Alaska، Soraya، Challenger، Kastelli، Royal و Sylvana. تم الأخذ بعين الاعتبار معيار التباعد الوراثي والجغرافي لدى اختيار هذه الطرز، وتعتبر هذه الطرز من أهم الطرز التجارية رباعية الصيغة الصبغية المرغوبة والمعتمدة والتي أجريت عليها الدراسة لأول مرة في سورية. تم أخذ الأوراق الفتية من النباتات الكاملة (Plantlets) بعمر ثلاثة أسابيع لاستخدامها في استخلاص الـ DNA.

استخلاص الـ DNA واختباره:

عزل الـ DNA من 0.2غ من الأوراق المأخوذة من نبيتات بعمر 3 أسابيع وفق طريقة CTABالمعدلة (Murray وThompson، 1980)، حيث طحنت الأوراق بالآزوت السائل، ثم نقل المسحوق إلى أنابيب معقمة سعة 2 مل، ثم أضيف لكل عينة 750 µl من محلول الاستخلاص CTAB المحتوي على المكونات التالية: 3% (w/v) CTAB,100 mM Tris-HCl (pH 8), 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA (pH 8) , Mercaptoethanol (v/v) % 0.2−2). ثم حضنت العيّنات في الحمام المائي على درجة حرارة 65 م° مع التحريك المستمر لمدة 60 دقيقة، ثم وضعت في الثلج لمدة 5 دقائق، ثم أضيف لها750 µl من مادةchloroform/ isoamylalchohol (1: 24)، ومُزجت برفق لمدة 10 دقائق ثم وضعت في جهاز الطرد المركزي على سرعة 10000 دورة/د لمدة 10 دقائق على درجة حرارة 4 م°، نقل بعدها الطور الطافي (المحتوي على DNA) إلى أنابيب جديدة سعة 1.5 مل، وأعيدت تنقيته مرة أخرى بكمية مماثلة من مادة chloroform/ isoamylalchohol (1: 24). أضيف 500µl من الايزوبروبانول المبرد على حرارة − 20 م° مع التحريك بلطف، وتركت العينات بعدها على درجة حرارة −20 م° من أجل ترسيب DNA.في اليوم التالي أعيد التثفيل بسرعة 10000 دورة / د لمدة 10 دقائق، ثم تم التخلص من الرشاحة وغسل الراسب (DNA) بإضافة 200 µl من محلول إيتانول 70%. ثفلت الأنابيب بعد ذلك على سرعة 10000 دورة/ د لمدة 10 دقائق، واستبعد الجزء الطافي وجفف راسب DNA على حرارة 37 م° لمدة 20 دقيقة، ثم أذيب DNA في 50 µl من الماء المقطر المعقم، وخزنت العينات على درجة حرارة −20 م° لحين الاستخدام.

استخدم جهاز المطياف الضوئي (Spectrophotometer UV)، لتقدير كمية الحمض النووي DNA وتحديد نقاوته عن طريق قياس امتصاص الحمض النووي DNA للأشعة بموجات طولها 260 و280 نانومتر.حُمل6 µl1 من الـDNA المستخلص،بعد خلطه بمحلول التحميل الخاص (1X Loading buffer Bromophenol blue)، في هلامة من الأغاروز تركيزها 1% والحاوية على 2 µl من الإيثيديوم بروماید بتركيز 10 mg/ml ضمن محلول TBE (1X)للتأكد من عدم تقطعه. ثم مُددت عينات DNA للحصول على تركيز 25 نانوغرام/ميكرولتر لتستخدم في تفاعل الـ PCR الشكل رقم (1).



الشكل رقم (1) الرحلان الكهربائي لعينات الـ DNA على هلامة الأغاروز 1%

التفاعل التسلسلي المتعدد (PCR):

تمّ تضخيم الـ DNA باستعمال 16 بادئة للتكرارات التتابعية البسيطة الداخلية ISSR (الجدول 1)، والتي تم الحصول عليها من شركة euro fins الأوروبية.

أجري تفاعل الـ PCR باستخدام PROBE FAST qPCRKIT Master Mix(2X) universal (KAPA,USA)، بحسب تعليمات الشركة المصنعة في حجم نهائي قدره 25µl. وذلك وفق البرنامج الحراري التالي:

- المرحلة الأولى (مرحلة الفصل الأولي): وتتم لمرة واحدة على درجة حرارة 95 م° لمدة 3 دقائق.
- المرحلة الثانية: وتتكرر 40 مرة وتضم الخطوات التالية:

1. مرحلة الفصل: وتتم على درجة حرارة 95 م° لمدة 15 ثانية.
2. مرحلة الالتحام: تتم على درجة الحرارة المناسبة لكل بادئة من بادئات المستخدمة لمدة دقيقة واحدة.
3. الاستطالة: تتم على درجة حرارة 72 م° لمدّة دقيقة واحدة.

- المرحلة الثالثة (الاستطالة النهائية): تتم لمرة واحدة على درجة حرارة 72 م° لمدّة 5 دقائق (Mullis وزملاؤه، 1986).

الرحلان الكهربائي والتلوين والتصوير لنواتج الـPCR:

رحلت نواتج تفاعل الـ PCR على هلامة الآجاروز 2% في المحلول المنظم 1X TBE والمكون من: { 10X TBE buffer = 108 g Tris borate + 55 g Boric acid + 9.2 (EDTA, pH 8.0} والمضاف إليها 5µl من صبغة الايثيديوم بروماید (10 mg/ml)، حيث تحمل عينات الحمض النووي DNA على هلامة الآجاروز بإضافة 5 ميكرولتر من سائل التحميل الخاص (1X Loading buffer Bromophenol blue) والمكون من: (15% Ficoll 400 + 1.03 % Bromophenol blue + 0.03 % xylene cyanol FF + 0.4 %Orange G + 10 mM Tris-HCl + 50 mM EDTA)، كما تم حقن مؤشر من الحمض النووي (DNA)100 pb من شركة (KAPA, USA)، ثم تم الترحيل لمدة

ساعتين ونصف بمرور تيار كهربائي شدته 100 فولط، صورت الهلامة بعد ذلك بوجود الأشعة فوق البنفسجية بجهاز تصوير هلامة الآجاروز Image analyzer.(Sambrook وزملاؤه، 1989؛ Lawyer وزملاؤه، 1993).

التحليل الإحصائيStatistical analysis:

حدد طول حزم الـ DNA الناتجة عن التضخيم باستخدام برنامج Total Lab، وحولت المعطيات إلى النظام الثنائي (1 للحزمة الموجودة و0 للحزمة الغائبة). ليتم حساب مصفوفة عدم التوافق الوراثي اعتماداً على معامل Jaccard، ثم استخدمت هذه المصفوفة لإجراء التحليل العنقودي بطريقة Unweighted Pair Group Method of Arithmetic Means (UPGMA) ورسم شجرة القرابة الوراثية وذلك باستعمال برنامج Power Marker. تم كذلك حساب محتوى التعددية الشكلية Polymorphism Information Content (PIC) لكل بادئة من البادئات المستخدمة على مستوى الموقع الواحد وفقاً لـ Weir(1996) حسب العلاقة التالية:

$$PIC=\sum pi2$$

حيث Pi: هي نسبة تكرار كل قرين على الموقع الوراثي نفسه.

ويمثل محتوى التعددية الشكلية Polymorphism Information Content (PIC) لموقع وراثي معين على المادة الوراثية Genome قدرة هذا الموقع على التمييز ما بين الطرز الوراثية، أي تعبر عن احتمال أن يكون للعينتان المسحوبتان عشوائياً حزمتين مختلفتين للموقع الوراثي ذاته.

تم حساب التنوع المورثي Gene Diversity(GD) لكل بادئة من البادئات المستخدمة ضمن مجموعة الطرز الوراثية المدروسة وفقاً لـ Nei (1987) تبعاً للعلاقة التالية:

$$GD=n(1-\sum pi2\ )/(n-1)$$

حيث تمثل nعدد المدخلات وPi هي نسبة تكرار كل قرين على الموقع الوراثي نفسه. ويعبر التنوع المورثيGene Diversity عن الاختلاف في تكرار مورث ما فيما ما بين الطرز الوراثية (1973,Nei).

النتائج والمناقشة:

تمكنت بادئات الـ ISSR المستخدمة من الالتحام في مناطق متعددة من جينوم طرز البطاطا العشرة المدروسة، بلغ عدد الحزم الكلية الناتجة 436 حزمة، تشابهت منها ثلاثة حزم فقط في جميع العينات، في حين تباينت الحزم الباقية وعددها 433 حزمة، وبالتالي بلغ متوسط نسبة التعددية الشكلية Polymorphism % 99.30 (الجدول 2).

أعطت البادئة p3 أعلى عدد من الحزم الكلية وصل إلى36 حزمة بتعددية شكلية 100% (الشكل2)، في حين أعطت البادئةp11 15 حزمة وبتعددية شكلية 100% (الجدول 2). تنتج بادئات الـ ISSR عدد مختلف من حزم الـDNA بحسب تسلسل التكرارات البسيطة التي تحويها، ومن بين الستة عشر بادئةISSR المستخدمة في هذا البحث أعطت14بادئة نسبة تعددية شكلية 100% (الجدول2)، وتدل هذه النتائج على إمكانية استعمال هذه البادئات بشكل فعال في الدراسة الجزيئية للتمييز بين طرز البطاطا المدروسة. تراوحت قيمة محتوى التعددية الشكلية (PIC) 0.868 لزوج البادئةP11 وحتى 0.891 لزوج البادئات P1 وP2 وP3 وP4 وP5 وP6 وP7 وP8 P9 وP10 وP12 وP13 وP14 وP15 وP16 وبلغ المتوسط 0.889. كما تراوحت قيمة التنوع المورثي (GD) مابين0.88 لزوج البادئةP11 وحتى 0.90 لزوج البادئاتP1 وP2 وP3 وP4 وP5 وP6 وP7 وP8P9 وP10 وP12 وP13 وP14 وP15 وP16 و وبلغ المتوسط 0.898 (الجدول2).

تمت دراسة العلاقة الوراثية بين الطرز المدروسة من خلال حساب مصفوفة عدم التوافق الوراثي (PDV) اعتماداً على معامل Jaccard لتحديد درجة التباين الوراثي فيما بينها، والذي يفيد في تأمين قاعدة وراثية كبيرة للاستفادة منها في برامج التحسين الوراثي. كان الطرازان Faluka وTarus هما الأقرب وراثياً بتباين وراثي قدره 0.523، بينما الأبعد وراثياً فهما الطرازان Challenger و Soraya بتباين وراثي قدره 0.836 يليها الطرازان Sylvana وFaluka بتباين وراثي قدره0.832 (الجدول 3). تم إجراء التحليل العنقودي للطرز المدروسة اعتماداً على معطيات الـ ISSR، وأدى التحليل العنقودي إلى تقسيم الطرز المدروسة إلى خمس مجموعات مختلفة. ضمت المجموعة الأولى ثلاثة طرز هي Rumba،Tarus وFaluka، وضمت المجموعة الثانية ثلاثة طرز هيCamberra، Alaska وSoraya، وضمت المجموعة الثالثة الطرازان Challenger وKastelli، وضمت المجموعة الرابعة الطرازRoyal، أما المجموعة الخامسة فضمت الطراز Sylvana(الشكل 3). وتتوافق نتائجنا هذه مع ما توصل إليه Bornet وزملاؤه (2002) بأن تقنية الـ ISSR تعد مناسبة جداً لتقييم التباين الوراثي ما بين طرز البطاطا المختلفة، حيث قاموا بدراسة التباين الوراثي ما بين 28 صنف من البطاطا باستعمال 15 بادئ ISSR، والتي أعطت جميعها نسبة تعددية شكلية مرتفعة. كما تتوافق النتائج مع نتائج ما توصل إليه Aversano، (2009) وزملاؤه حيث استخدموا تقنية ISSR لتحديد درجة التباين الوراثي بين تسعة طرز من البطاطا، وقد استخدم عدد من البادئات حيث أعطت 98 حزمة بنسبة اختلاف 87%، وبلغت أعلى قيمة للتشابه الوراثي 0.827 بين الصنفين Caruso وAlliance بينما كان الأبعد وراثياً الصنفان Charlotte وBafana بقيمة 0.418. كما تتوافق النتائج مع نتائج ما توصل إليه Tiwari، (2015) حيث استخدمت تقنية ISSR لتحديد درجة التباينات الوراثية للبطاطا بين النباتات الأم والنباتات

المتجددة عنها وقد استخدم عدد من البادئات حيث أعطت 118 حزمة بنسبة اختلاف 91.4%. كذلك تتوافق نتائجنا مع نتائج Giglou وزملاؤه (2015)، والذين استخدموا تقنية الـ ISSR لدراسة التباين الوراثي ما بين 45 طراز وراثي مختلف من البطاطا. وتوافقت مع ما توصل إليه Onamu وزملاؤه، (2016) حيث استخدمت تقنية ISSR في توصيف 35 مدخل من البطاطا مصدرها المكسيك، أوروبا والولايات المتحدة الامريكية وذلك بهدف الحصول على معطيات عن التنوع الوراثي والعلاقة بين التراكيب الوراثية من أجل استخدامها في برامج التحسين الوراثي، حيث استخدم 5 بادىء للـ ISSR، وبلغ متوسط عدد الحزم التي تم الحصول عليها 16.4 وكانت نسبة الحزم المتباينة 81.4%.

وبالنتيجة، أثبتت نتائجنا أن تقنية الـ ISSR، وبشكل خاص البادئات المستخدمة في هذا البحث، هي أداة سريعة وفعالة لتحديد درجة التباين الوراثي ما بين طرز البطاطا المختلفة، وبالتالي يمكن أن تساعد هذه المؤشرات في اختيار الطرز المناسبة لإدخالها في برامج التربية. كما تدل درجة التباين الوراثي المرتفعة ما بين الطرز المدروسة على إمكانية استخدام هذه الطرز في برامج التحسين الوراثي للبطاطا مما سيسمح بتوسيع القاعدة الوراثية الانتخابية لمربي النبات. في الاختيار الصحيح للطرز الأكثر تنوعاً أحيائياً وتباعداً وراثياً.

الجداول:

الجدول (1) بادئات الـ ISSR المستخدمة في تحليل DNA طرز البطاطا المدروسة ودرجة حرارة التحامها

رقم البادئة	تسلسل القواعد النتروجينية	درجة حرارة الالتحام(C^o)
ISSR1	$(CCA)_5$	45
ISSR2	$GAG(CAA)_5$	45
ISSR3	$(CT)_8TG$	49
ISSR4	$(CT)_8AC$	49
ISSR5	$(CT)_8GC$	51
ISSR6	$(CA)_6GG$	39
ISSR7	$(CA)_6AG$	37
ISSR8	$(GTG)_3GC$	33
ISSR9	$(AG)_8$	43
ISSR10	$(GAG)_3GC$	33
ISSR11	$(CA)_6GT$	49
ISSR12	$(CTC)_3GC$	33
ISSR13	$(GA)_8GG$	51
ISSR14	$(AG)_8TG$	49
ISSR15	$(GCC)_5$	55
ISSR16	$(CAC)_3GC$	33

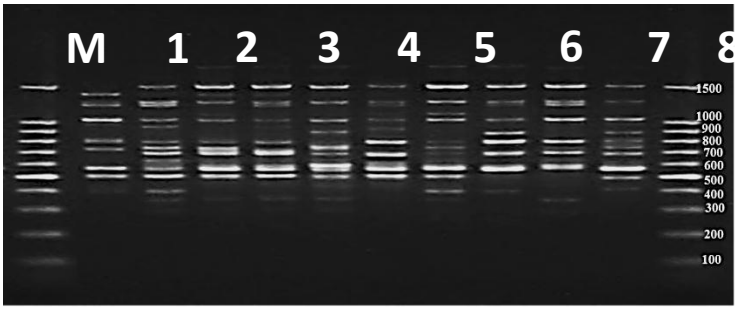
الجدول (2) عدد الحزم (الكلية، المتشابهة والمتباينة) ونسبة التعددية الشكلية ومحتوى التعددية الشكلية (PIC) والتنوع المورثي (GD) للبادئات المستخدمة في الدراسة

البادئة	عدد الحزم الكلية	عدد الحزم المتشابهة	عدد الحزم المتباينة	نسبة التعددية الشكلية (%)	محتوى التعددية الشكلية (PIC)	التنوع المورثي (GD)
P1	26	2	24	92.31	0.8910	0.9000
P2	33	0	33	100.00	0.8910	0.9000
P3	36	0	36	100.00	0.8910	0.9000
P4	28	0	28	100.00	0.8910	0.9000
P5	30	0	30	100.00	0.8910	0.9000
P6	32	0	32	100.00	0.8910	0.9000
P7	29	0	29	100.00	0.8910	0.9000
P8	28	1	27	96.43	0.8910	0.9000
P9	20	0	20	100.00	0.8910	0.9000
P10	24	0	24	100.00	0.8910	0.9000
P11	15	0	15	100.00	0.8680	0.8800
P12	24	0	24	100.00	0.8910	0.9000
P13	27	0	27	100.00	0.8910	0.9000
P14	24	0	24	100.00	0.8910	0.9000
P15	29	0	29	100.00	0.8910	0.9000
P16	31	0	31	100.00	0.8910	0.9000
المجموع	436	3	433	–	–	–
المتوسط	27.25	1.5	27.06	99.30	0.8896	0.8988

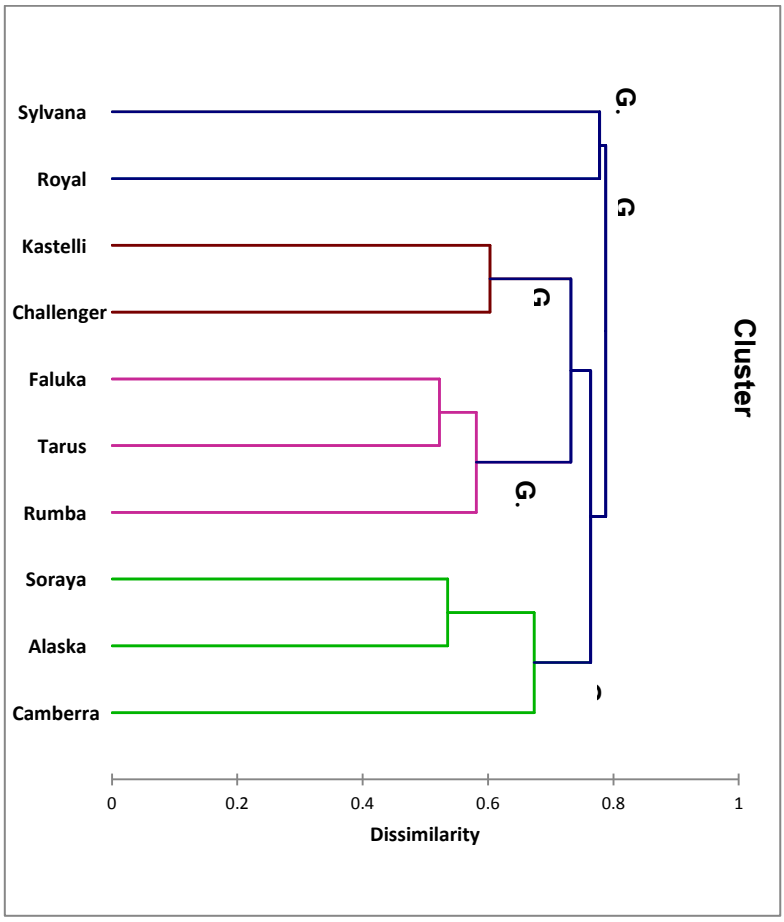
الجدول (3) مصفوفة عدم التوافق الوراثي (PDV) بين طرز البطاطا المدروسة استناداً إلى معامل Jaccard

	Rumba	Tarus	Faluka	Camberra	Alaska	Soraya	Challenger	Kastelli	Royal	Sylvana
Rumba	0									
Tarus	0.549	0								
Faluka	0.613	0.523	0							
Camberra	0.701	0.734	0.761	0						
Alaska	0.749	0.714	0.780	0.678	0					
Soraya	0.725	0.724	0.786	0.670	0.536	0				
Challenger	0.744	0.736	0.772	0.823	0.812	0.836	0			
Kastelli	0.705	0.688	0.748	0.785	0.768	0.762	0.603	0		
Royal	0.751	0.791	0.804	0.793	0.781	0.781	0.820	0.753	0	
Sylvana	0.780	0.771	0.832	0.810	0.814	0.793	0.792	0.742	0.778	0

الأشكال:



الشكل رقم(2) يوضح نواتج تضخيم الـDNA للطرز المدروسة باستخدام البادئة P3 وبوجود معلم جزيئي ذو وزن جزيئي
100bp (1: Rumba، 2: Tarus، 3: Faluka، 4: Camberra، 5: Alaska، 6: Soraya، 7: Challenger، 8: Kastelli، 9: Royal، 10: Sylvana).



الشكل رقم(3) مخطط شجرة القرابة الوراثية لطرزا لبطاطا المدروسة اعتماداً على التحليل العنقودي لبيانات التباين الوراثي

المراجع References:

1. المجموعة الإحصائية الزراعية السنوية.2017. وزارة الزراعة والإصلاح الزراعي. مديرية التخطيط. قسم الإحصاء الزراعي.
2. بوراس، متيادي. 1989. إنتاج الخضار. منشورات جامعة دمشق، كلية الزراعة، ص438 -460.
3. بوراس، متيادي وأبو ترابي، بسام والبسيط، إبراهيم. 2006 . إنتاج محاصيل الخضر - الجزء النظري -جامعة دمشق، ص: 396 - 410 .
4. مسعود، كاسر. 1981. أساسيات تربية النبات، منشورات جامعة حلب، كلية الزراعة، ص: 350 .
5. سيد، محمود هيثم. 2001. استخدام مؤشرات من الدنا في انتخاب مورثات المقاومة للأمراض في الشعير، جامعة دمشق، كلية الزراعة، أطروحة دكتوراه.
6. Alleman, J., Laurie, S.M., Thiart, S. and Vorster, H.J. 2004. Sustainable production of root and tuber crops (potato, sweet potato, indigenous potato, cassava) in southern Africa. South African Journal of Botany 70 (1): 60-66.
7. Aversano R, Savarese S, Nova JMD, Frusciante L, Punzo M and Carputo D 2009. Genetic stability at nuclear and plastid DNA level in regenerated plants of Solanum species and hybrids. Euphytica 165: 353-361.
8. Bornet, B., Goraguer, F., Joy, G. and Bran chard, M. 2002. Genetic diversity in European and Argentinian cultivated potatoes (*Solanum tuberosum subsp. tuberosum*) detected by inter-simple sequence repeats (ISSRs). Genome 45:481-484.
9. Charters, Y.M., A. Robertson, M.J. Wilkinson and G. Ramsay. 1996. PCR analysis of oilseed rape cultivars using 50 anchored simple sequeunce repeat (SSR) primers. Theoretical and Applied Genetics 92: 442-447.

10. Ellouza, O. N., R. J. Bouzidb, D. Sihachakrc, M. A. Trikid, G. Ducreuxe, N. Driraf and L. Lakhouag. 2006. Production of potato intraspecific somatic hybrids with improved tolerance to PVY and Pythiumaphanidermatum. Journal of Plant Physiology.163: 1321-1332.
11. Epestin, E., Norlynn, J. J. Rush, G. W. Kingsbury, R. W. Kelly, D. W. Cunning ham, G. A. and Wrona, A. F. 1980. Saline culture of crops: A genetic approach. Sci.210:399-404.
12. FAOSTAT. Food and agriculture organization of the United Nations. 2017. http://faostat.fao.org/.
13. Fu- Rong, G., Jian- Ying, G. and Fang- Hao, W. 2007. Application of ISSR Molecular marker in invasive plant species study. State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests Institute of Plant Protection, Yunnan Agricultural University, Kunming Chin.J.Appl. Ecol., 18(4): 919-927.
14. Giglou, M.T., P. Jaber, S.A Mohammadi, F.Z. Nahandi, A.M. Azar and J. Śliwka. 2015. DNA and morphological diversity and relationship analysis of selected cultivated, wild potatoes and some promising hybrids. Journal of Biodiversity and Environmental Sciences 6(2): 175-186.
15. Gorji, A.M., P. Poczai, Z. Polgar and J. Taller. 2011. Efficiency of Arbitrarily Amplified Dominant Markers (SCOT, ISSR and RAPD) for Diagnostic Fingerprinting in tetraploid Potato. American Journal of Potato Research 88: 226-237.
16. Gui, F.R., Wan, F. H. and Guo, J.Y. 2008. Population genetics of *Ageratinadenophora* using inter simple sequence repeat (ISSR) molecular markers in China. Plant Biosystems, 142 (2):255-263.
17. Hantula, J., M. Dusabenygasani and R.C. Hamelin. 1996. Random amplified microsatellites (RAMS)- a novel method for characterizing genetic variation within fungi. Eur. J. For Path. 26: 159-166.
18. Klliker, R., D. Herrmann, B. Boller and F. Widmer. 2003. Swiss Mattenklee landraces, a distinct and diverse genetic resource of red

clover (Trifolium pratense L.). Theoretical and Applied Genetics, 107:306-315.

19. Lawyer, F.; S. Stoffel, R. Saiki, S. Chang, P. Landre, R. Abramson, and D. Gelfand. 1993. High-level expression, purification, and enzymatic characterization of full-length The rmusaquaticus DNA polymerase and a truncated form deficient in 5' to 3' exonuclease activity. PCR methods and applications, 2 (4): 275–287.
20. Mahfouze, S.A., K.A.F. El-Dougdoug, O.E. El-Sayed, M.A. Gomaa and E.K. Allam. 2012. Genetic diversity of cultivated and wild-type potatoes under potato spindle tuber viroid infection. New York Science Journal 5(7): 9-18.
21. McGregor, C.E., C.A. Lambert, M.M. Greyling, J.H. Louw, and L. Warnich. 2000. A comparative assessment of DNA fingerprinting techniques (RAPD, ISSR, AFLP and SSR) in tetraploid potato (*Solanum tuberosum* L.) germplasm. Euphytica 113: 135-144.
22. Mullis, K., Faloona, S., Scharf, R., Saiki, O., Horn, O. and Erlich, H. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: Thepolymerase chain reaction. Cold Spring Harbor Symp. Quant.Biol., 51, 263-273.
23. Murray,M.G.and W.F.Thompson.1980.Rapid Isolation of high molecular weight DNA.Nucleic Acid Res.8(19):4321-4325.
24. Nagaraju, J., Kathirvel, M., Kumar, R.R., Siddiq, E.A. and Hasnain, S.E. 2002. Genetic analysis of traditional and evolved Basmati and non-Basmati rice varieties by using fluorescence-based ISSR-PCR and SSR markers. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 99: 5836-5841.
25. Nei, M. 1973. Analysis of gen diversity in subdivided populations. Proceedings of the Nation Academy of Science of the USA.70:3321-3323.
26. Nei, M. 1987.Molecular Evolutionary Genetics. Columbia universityPress, New York, NY.
27. Onamu R., Legaria J., Rodríguez J. L., Sahagùn J. and Pèrez J. 2016. Molecular characterization of potato (Solanum tuberosum L.)

genotypes using random amplified polymorphic DNA (RAPD) and inter simple sequence repeat(ISSR) markers . African Journal of Biotechnology, Vol. 15(22), pp. 1015-1025,1 June.

28. Powell. W, M. Morgante, J. J. Doyle, J. Mcnical, S.V. Tingey, and A.J. Rafalski. 1996. Genepool Variation in Genus Glycine Subgenus Soja Revealed by polymorphic Nuclear and chloroplast microsatellites, Genetics 144:793-803.
29. Qi, X., Stam, P. and Lindhout, P. 1996. Comparison and integration of four barley genetic maps. Genome 39: 379-394.
30. Sambrook, J., Fritch, E.F. and Maniatus, T. 1989. Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
31. Shannon M. C. 1984. Breeding, Selection and the genetics of salts tolerance in: R. C. staples and G. H. Toeniessen (Eds.), salinity tolerance in plant; strategies for crops improvement. P: 231-245. jhon Wiley. New York.
32. Sheppard, W. S. and Smith D. R. 2000. Identification of African-derived bees in the Americas: A survey of methods. Ann. Entomol. Soc. Am., 93:159-176.
33. Spooner D.M., Núñez J., Trujillo G., Del Rosario Herrera M., Guzmán F. and Ghislain M. (2007) Extensive simple sequence repeat genotyping of potato landraces supports a major reevaluation of their gene pool structure and classification. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 104: 19398–19403. [PMC free article] [PubMed].
34. Taylor, W.J., Rebecca, F. and Peter, F. 2001. DNA fingerprinting and genetic relations of potato cultivars(*Solanum tuberosum* L.) commercially grown in Australia.Issn.52:911-918.
35. Tiwari, J. K., Saurabh,s., Chandel,P., Singh,BP and Bahrdwaj V.2015 Assessment Genetic and Epigenetic Variation in Potato Somatic Hybrids by methylation-Sensitive ISSR and RAPD Markers. Bangladesh J. Bot. 44(1): 45-50, 2015 (March) .

36. Veilleux, R.E., Compton, M.E. and Saunders, J.A.2005. Use of Protoplasts for Plant Improvement: In Plant Development and Biotechnology. Trigiano, R.N. and D.J. Gray (Eds.).
37. Weir,B.S.1996.Genetic data analysis II 2nded Sinauer Associates. Inc. Sunderland, MA.
38. Zietkiewicz, E., Rafalski, A. and Labuda, D. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. Genomics, 20: 176–183. Aversano, R., S. Savarese, J.M.D. Nova, L. Frusciante, M. Punzo and D. Carputo. 2009. Genetic stability at nuclear and plastid DNA level in regenerated plants of *Solanum* species and hybrids. Euphytica 165: 353-61.