التوصيف الشكلي والجزيئي باستخدام تقنية ISSR لبعض أصناف الفستق الحلبي السورية والتونسية

Morphological and Molecular Characterization Using ISSR Technique for Some of Syrian and Tunisian Pistachio Varieties (*Pistacia vera*)L.

د. ساهر الباكير[1]　　د. سلام لاوند[2]　　د. علي أبو عفيفة[1]

Dr. Saher Albakeer[1]　　Dr. Salam Lawand[2]　　Dr. Ali Abu Afifeh[2]

(1) المركز العربي لدراسات المناطق الجافة والأراضي القاحلة/ أكساد، دمشق، سورية.

(1) The Arab Center for the Studies of Arid Zones and Dry Lands/ACSAD, Damascus, Syria

(2) قسم المحاصيل الحقلية، كلية الزراعة، جامعة دمشق، سورية.

(2) Field Crops Department, Faculty of Agriculture, Damascus University, Syria

الملخص

نفذ هذا البحث في محطة ومخابر المركز العربي لدراسات المناطق الجافة والأراضي القاحلة (اكساد) خلال الفترة (2017-2019)، بهدف دراسة الاختلافات الشكلية والجزيئية بتقانة ISSR لستة أصناف تحت ظروف المنطقة الجنوبية من سورية في محطة ازرع (محافظة درعا)، ثلاثة منها سورية (عاشوري، باتوري، وباتوري ازرع) وثلاثة أخرى تونسية (ماطر، قيثار، مكناسي)، بحيث تم توصيفها شكلياً ومن ثم جزيئياً. أظهرت الدراسة وجود تباين كبير مابين الأصناف من حيث شكل النموات (شبه قائمة في الصنف العاشوري وماطر ومتدلية في الباتوري ، بينما شبه متدلية في باتوري ازرع، وقائمة إلى متوسطه في المكناسي وقيثار)، ودرجة تفرعها (قليلة التفرع في الصنفين عاشوري وماطر، ومتوسط في الباتوري والباتوري ازرع وكبير في مكناسي وقيثار)، وفي موعد نضج ثمارها (مبكرالنضج في عاشوري وماطر وباتوري ، ومتوسط في باتوري ازرع ، ومتوسط إلى متأخر النضج في قيثار ومكناسي)، وكذلك في مواصفات الثمار من حيث اللون والوزن، إذ سجل أكبر وزن للثمار في الصنف باتوري ازرع (3.85 غ) متفوقاً على باقي الأصناف المدروسة ، كما وجدت فروق معنوية بين أغلب الأصناف المدروسة من حيث أجزاء الثمرة، ونسبة تفتح(بلغ أعلى نسبة في الصنف السوري العاشوري وصلت إلى 90-95% و وكانت بين 95-98% في الصنفين التونسين قيثار ومكناسي، وتصافي الثمار(تراوحت بين 35.57% في الصنف باتوري ازرع و 38.41 % في الصنف العاشوري ، وكانت أقل نسبة تصافي وبفروق معنوية عن بقية الأصناف المدروسة موجودة في الصنف التونسي مكناسي والتي بلغت 26.44%). كما لوحظ تباين كبير بين الأصناف المدروسة من الناحية الجزيئية، إذ انفصلت شجرة القرابة الوراثية (الشكل 3) إلى عنقودين رئيسين، ضم الأول الصنف السوري باتوري ازرع، وهو أكثر تباعداً مع باقي الأصناف، وانقسم العنقود الثاني إلى مجموعتين ضمت الأولى الصنفين التونسيين قيثار ومكناسي، بينما ضمت المجموعة الثانية الصنفين السوريين باتوري وعاشوري، بالإضافة للصنف التونسي الشهير ماطر.

الكلمات المفتاحية: الفستق الحلبي، عاشوري، مكناسي، قيثار، ISSR.

©2023 The Arab Center for the Studies of Arid Zones and Dry Lands, All rights reserved. **ISSN: 2305-5243; AIF-023 (p: 115 - 134)**

Abstract

This study was conducted at the research station and labs of ACSAD during 2017-2019. In the present study, morphological and molecular variations using ISSR technology were studied for six varieties under the conditions of the southern region of Syria in Izra Station - Daraa Governorate. Three varieties were Syrian (Achouri, Batory, and Batory Izra) and three Tunisian (Mater, Kesar, and Mknasy), which were characterized morphologically and then molecularly.

It was noted that there is a large variation among the varieties in plant lets form (semi-standing in the Ashory and Mater varieties and drooping in Albatori, while semi- drooping in Batory Izra, and standing to medium in Mknasy and Kesar) and the degree of branching (low branching in Ashory and Mater varieties, and medium in Batory and Batory Izra, and high in Mknasy and Kesar). The maturity date of fruits (early maturity in Ashory, Mater and Batory, medium in Batory Izra, medium to late maturity in Kesar, and Mknasy). as well as in the specifications of the fruits in terms of color and weight where the largest weight of the fruits in Batory Izra variety, reached 3.85g, superior to the other Studied varieties. Also found that significant differences among most of the studied varieties in parts of the fruit, percentage of split nuts and net rate of fruits.

In another wise the analyses result of ISSR technique shows a large variation among of the studied varieties molecularly, where the phylogenetic dendrogram separated into two main clusters. The first cluster included only the Syrian variety (Batory Izra). And the second cluster contained two groups, the first group consisted the two Tunisian varieties (Kesar and Mknasy) while the other group consisted the Syrian varieties (Batory and Ashory) and the Tunisian variety (Mater).

Keywords: Pistachio, Ashory, , Mknasy, Kesar, ISSR.

المقدمة

يعود الاهتمام بالمصادر الوراثية النباتية والتنوع الوراثي النباتي في تاريخه إلى بدايات القرن الماضي عندما وضع العالم Vavilov (1926) نظرياته حول مراكز التنوع للنباتات المزروعة، واعتبر أن مراكز التنوع (Centers of diversity) تعني مراكز الموطن (Centers of origin)، بالإضافة إلى وجود الأقارب البرية (Wild relatives).

وذكر Vavilov (1965) أن "المواقع ذات التنوع الوراثي الأكبر عادةً ما تحوي عدداً من الأشكال المستوطنة، ويمكن عدّها كمراكز لتشكيل الأنماط، وكذلك أشار بالقول: أنه "ليس من السهل انتشار النباتات وأصنافها من رقعة إلى أخرى بالرغم من آلاف السنين من ترحال الناس والقبائل".

يعد الموطن الأصلي لشجرة الفستق الحلبي هو منطقة غربي آسيا، وآسيا الصغرى امتداداً من سورية إلى القوقاز وأفغانستان (Crfg،1997) . تتواجد هذه الشجرة في مناطق ذات ارتفاعات مختلفة تتراوح بين 50 م عن سطح البحر كما في مربين التابعة لفكتوريا (أستراليا) وحتى 1900 م تقريباً عن سطح البحر كما في منطقة كرمان في إيران (Maggs،1975؛ حاج حسن، 1988). وقد أدخلت شجرة الفستق الحلبي إلى العديد من المناطق شبه الاستوائية في العالم كالصين والهند وكذلك دول البحر الأبيض المتوسط (Duke،1989) . كما أثبتت الدراسات التاريخية في تركيا أن ثمار الفستق استخدمت غذاءً منذ نحو 7000 سنة قبل الميلاد (Crfg،1997). وقد ذكر Russell (1974) أن شجرة الفستق الحلبي كانت تزرع باهتمام كبير وتلقى الرعاية الفائقة في منطقة حلب، وأدخل هذا النوع من الأشجار المثمرة إلى إيطاليا من سورية في أوائل القرن الأول بعد الميلاد على يد القنصل فيتاليو، ثم انتشرت زراعته في دول البحر الأبيض المتوسط. وكان أول إدخال لهذه الشجرة إلى الولايات المتحدة الأمريكية عام 1854، إذ قام Charles Mason بزراعة بعض البذور على سبيل التجربة في كاليفورنيا وتكساس وبعض الولايات الغربية. وفي عام **(1875)** أدخلت بعض الأشجار إلى فرنسا لتزرع في مناطق Sonoma و Calif . وفي بداية القرن التاسع عشر جمعت وزارة الزراعة الأمريكية مجموعةً من ثمار أنواع وأصناف الفستق الحلبي المختلفة لمحطة إدخال النبات Chico Chlif.

تقدر المساحة العالمية المزروعة بأشجار الفستق الحلبي بنحو554436.11 هكتاراً، بإنتاج وصل إلى 757653.11 طناً، وتعد إيران والولايات المتحدة الأمريكية وتركيا والصين وسورية على التوالي من البلدان الرائدة في الإنتاج (FAO،2016).

وتبعاً لإحصائيات وزارة الزراعة والإصلاح الزراعي السورية ومنظمة الأغذية والزراعة العالمية (FAO)، فإن إنتاج الفستق الحلبي في سورية في عام 1993 قد تراوح من نحو 13000 طناً إلى نحو 52840 طناً في عام 2002. وكان الإنتاج إلى حد بعيد ثابتاً (نحو14500 طناً) خلال الفترة من 1990 إلى 1995، ولكن هذه القيمة ازدادت مرةً أخرى خلال السنوات الأخيرة (1996 إلى 2000)، وبلغت في عام 2016 نحو 56833 طناً.

وتعد حلب وحماة وإدلب المحافظات الأساسية في إنتاج الفستق الحلبي في سورية، علماً أن الزراعة البعلية تشكل نحو 90 %. وتقدر المساحة المزروعة بالفستق الحلبي في سورية بنحو 55406 هكتارات (FAO،2016).

تعد ثمار الفستق الحلبي ذات قيمة غذائية جيدة لا تقل عن بقية أنواع النقل (الجوز واللوز)، إذ تحتوي هذه الثمار على نسبة مرتفعة من الزيت ومتوسطة من البروتين، فضلاً عن احتوائها على السكريات والأملاح. وتستهلك ثمار الفستق الحلبي بعدة أشكال إذ تؤكل الثمار خضراء طازجة وهي شائعة في سورية ولبنان، وتمتاز هذه الثمار ولا سيما الصنف العاشوري بطعمها ومذاقها اللذيذ لارتفاع نسبة الدهون. كما تستهلك كميات كبيرة من لب ثمار الفستق الحلبي المجففة وتستخدم في صناعة الحلويات والمثلجات، يضاف إلى ذلك تمليح وتحميص ثمار الفستق الحلبي بغلافها الخشبي واستخدامها مع المكسرات. كما تستخدم أوراق وثمار الفستق الحلبي في علاجات طبية مختلفة وتصنيعية مثل دباغة الجلود وغيرها.

تعد سورية من أقدم البلدان المنتجة للفستق الحلبي وهي أحد المواقع المهمة من حيث الانتشار الطبيعي لأنواع البطم البرية مثل *P. atlantica, P. palaestina, P. khinjuk , P. lentiscus* (خليفة، 1958 ;Maggs ،1973; Chandler،1965). وذكر حاج حسن (1988) أنه يوجد حقل فستق تاريخي يحوي نماذج يزيد عمرها على ألف سنة في قرية عين التينة التي تبعد نحو 60 كم شمالي مدينة دمشق، ولا تزال هذه الأشجار منتجةً وتحتاج للحماية من التدهور والانقراض تفادياً لفقدان هذا الصنف المحلي الذي يعد من مصادر الفستق الحلبي السورية المهمة. كما نشر الحصني (1972) بعض المعلومات العامة حول مواصفات بعض الأصناف السورية. وقام النحلاوي وزملاؤه (1985) بنشر نتائج لدراسة مقارنة خمسة أصناف سورية (عاشوري، عليمي، باتوري، بندقي، وعين التينة) تحت الظروف المناخية الجافة نسبياً في منطقة حوران جنوبي سورية.

يوجد في تونس أكبر مزارع للفستق الحلبي في شمال أفريقيا، ولم تكن هناك أصناف مؤنثة منتخبة قبل إدخال صنف ماطر، ولكن يوجد صنفان محليان آخران هما صفاقس والقيثار. ولكن يبقى الصنف ماطر أفضلها وهو يشبه شبهاً كبيراً الصنف عاشوري (Jacquy ،1973). ويشمل هذا الصنف ثلاثة طرز وراثية: A 25 (مذكر مبكر الإزهار)، A 40 (مذكر متأخر الإزهار)، والمؤنث D 11 (Mlika ،1980; Ghorbel & Kchouk،1996).

تتعرض زراعة الفستق الحلبي في تونس إلى خطر التعرية الوراثية، وذلك بسبب زراعة الصنف الواحد وهو *ماطر* المنتشر بشكل واسع، ولذلك يمكن ملاحظة أن عشائر الصنفين القيثار وصفاقس أصبحت مهملةً وتواجه خطراً حقيقياً بالانقراض (Ghorbel & Kchouk،1998). وقد تم في تونس إنشاء أول مجمع وراثي حسب المقاييس العالمية على مساحة ثلاث هكتارات. وقد صمم ليشمل جميع الأصناف المحلية (الأشجار المذكرة والمؤنثة) والأصول (*P. vera* وغيرها)، وذلك من أجل دراسات مقارنة للمجموع الخضري والنمو الثمري بين هذه المدخلات (Ghorbel & Kchouk، 1996).

لقد طُور التفاعل التسلسلي البوليميرازي (Polymerase Chain Reaction- PCR) من قبل Saiki وزملائه (1985)، الذي كان له أثراً مهماً على صعيد الدراسات الوراثية الجزيئية، إذ عُد هذا الإنجاز تطوراً مهماً ساعد على سرعة وكفاءة غربلة العديد من المجموعات الانعزالية (Tragoonrung وزملاؤه، 1992). ويقوم هذا التفاعل بمضاعفة (Amplification) قطع محددة من الحمض الريبي النووي (DNA) باستخدام بادئات عشوائية أو متخصصة مصممة لهذا الهدف، مما يسمح بالحصول على ملايين النسخ المضاعفة من قطعة واحدة من الحمض الريبي النووي (DNA) التي تتضاعف أسياً، وذلك باستخدام دورات حرارية متعددة (Ayad وزملاؤه،1997؛ Karp وزملاؤه،1997؛ سيد،2001). وقد ساعد تصنيع أجهزة التدوير الحراري (Automated thermo cycler) واكتشاف أنزيم البوليميرازDNA Polymerase على تطوير هذا التفاعل وفي ظهور تقانات أخرى تعتمد عليه وتستخدم في إجراء التحاليل الوراثية وإنشاء خرائط الارتباط الوراثية (Saiki وزملاؤه 1985؛ Rafalski وزملاؤه، 1996).

تعد تقانة التكرارات الترادفية البسيطة الداخلية (Inter Simple Sequence Repeats- ISSR) والتي طبقت من قبل Ziekiewicz وزملائه (1994) واحدةً من التقانات المهمة المعتمدة على التفاعل التسلسلي البوليميرازي للأسباب التالية:

- تضخم منطقة التكرارات الترادفية البسيطة وتستخدم بادئاً وحيداً ومؤلفاً من نكليوتيدات متكررة ومحاطاً في بعض الأحيان بـ 2-4 نيكليوتيدات إما في المنطقة '3 أو'5.
- توصف تقانة ISSR بأنها أكثر تكرارية من تقانة RAPD بسبب طول البادئ المستخدم والذي يعكس درجة حرارة عالية لمرحلة تشفع البادئات (Bornet وBranchard، 2001؛ Chowdhury وزملاؤه، 2002).
- إمكانية الكشف عن التتاليات النيكليوتيدية ذات السيادة في التوريث.
- وفرتها ووجودها في مجينات حقيقيات النوى النباتية ولا تحتاج إلى معلومات عن التسلسل المجيني المدروس (Tautz وRenz،1984 ; Kijas وزملاؤه، 1995).
- نتائجها ثابتة عند تكرارها، وهي سريعة، كما أنها تتطلب كميةً قليلةً من الحمض النووي DNA، ويمكن أتمتتها (Automation)، إذ يمكن نشر البادئات وتبادلها بسهولة بين المخابر بمجرد معرفة التسلسل النيكليوتيدي لها. وتكشف نسب عالية من التعددية الشكلية polymorphism وبمقدرة تقانة SSR نفسها.

ولإعطاء فكرة حول الاستفادة من التحاليل الجزيئية في مجال تحديد درجة القرابة بين أنواع جنس *Pistacia* والأصناف التابعة للفستق الحلبي *P. vera* يمكن عرض بعض نتائج الدراسات التي أجريت في هذا المجال كما يلي:

- تم دراسة العلاقة بين أنواع الجنس *Pistacia* بالاعتماد على الوصف الشكلي والانتشار الجغرافي، ولكن بدراسة النسب بين عشرة أنواع باستخدام تقانة RFLP، فقد أكدت النتائج وجود مجموعتين رئيستين تضمان هذه الأنواع. ويعد النوع *P. vera* الأقدم بين هذه الأنواع، ولوحظ أن *P. chinensis* و *P. integerrima* هما نوعان منفصلان متميزان، علماً بأن المنحى التطوري لهذه الأنواع كان من الثمار كبيرة الحجم إلى الصغيرة، ومن الأوراق التي تحتوي عدداً قليلاً من الوريقات ذات المسطح الكبير إلى عدد أكبر من الوريقات ولكنها تتصف بمسطح صغير(Parfitt وBadenes، 1996)، كما جرت دراسة وراثية لتحديد أنساب الأصناف التابعة للنوع *P. vera* مؤلفة من16 صنفاً مؤنثاً و8 أصناف مذكرة موجودة في مجمع وراثي بجزيرة صقلية (Caruso وزملاؤه، 1998) وبشكل عام لوحظ وجود تعدد شكلي كبير بين الأصناف المدروسة، ولكن لم تستطع هذه الدراسة فصل الأصناف المؤنثة المزروعة في حوض البحر الأبيض المتوسط عن الأصناف الإيرانية ووسط آسيا (Hormaza وزملاؤه ، 1994) .
- كما استخدمت تقانة RAPD لدراسة التطور النوعي بين أنواع الجنس *Pistacia* المنتشرة في تركيا، إذ لوحظ عموماً وجود تباعد وراثي بين الأنواع *P. atlantica, P. terebinthus , P. khinjuk , P. eurycarpa* بعضها عن بعض وكان أكثرها انحرافاً *P. terebinthus* في حين تبين وجود تقارب نسبي بين النوعين *P. atlantica, P.eurycarpa* (Kafkas وPerl-Treves، 2001).
- وتم الحصول على بعض الواسمات عن طريق تحليل RAPD ممّا يساعد على تحديد الجنس فيما إذا كانت الغراس مذكرة أو مؤنثة، وذلك بالنسبة للأنواع البرية في تركيا *P. eurycarpa P. atlantica, P. terebinthus,*) (Kafkas وزملاؤه ،2001).
- كذلك استخدمت طريقة الأنزيمات المتشابهة Isozymes في مجال التنوع الوراثي للجنس *Pistacia*، إذ تم تحديد التنوع لستة أنواع وهي *P. atlantica, P. terebinthus, P. khinjuk, P. integerrima, P. palaestina, P. vera*) (Rovira وزملاؤه 1994)؛ وتم تحديد التعددية الأنزيمية لنظام غلوكوز فوسفات إيزوميراز Glucose Phosphate Isomerase (GPI) على55 صنفاً من 13 دولة، إذ أظهرت النتائج وجود 8 طرز مظهرية Phenotype وبذلك أثبت هذا النظام فعالية عالية في تمييز الأصناف (Rovira وزملاؤه، 1998).

مبررات وأهداف البحث: إن من مسوغات القيام بهذا البحث، أن عدداً بسيطاً فقط من الأصناف التجارية للفستق الحلبي المزروعة في سورية والدول العربية قد أجريت عليها دراسات متعمقة نسبياً، بينما لايزال الكثير من الأصناف المنتشرة بحاجة إلى دراسة علمية مستفيضة. مما يستدعي إعادة تسليط الضوء على هذه الشجرة من خلال إجراء مسح جغرافي بيئي شامل للأصناف المؤنثة من الفستق الحلبي *Pistacia vera* لتقويم الوضع الحالي للتنوع، وكذلك تحديد مدى القرابة الوراثية بين الطرز والأصناف المزروعة في سورية مع ما يماثلها من أصناف تونسية وعربية، وإبراز الخصائص البيئية والزراعية والغذائية لكل صنف، وبالتالي حفظ واستخدام هذه المصادر.

ولهذا الغرض وبغية إجراء تحديد دقيق لمستوى القرابة الوراثية بين الأصناف السورية والتونسية فقد استخدمت تقانة (ISSR)، والتي تفيد في رسم شجرة القرابة الوراثية للطرز المدروسة. وبمقارنة النتائج مع التوصيف الشكلي والتوزع الجغرافي يمكن تحديد الأصناف المزروعة والتنوع الوراثي في سورية وتونس، ممّا يساعد على تطوير زراعة هذه الشجرة لأهميتها الاقتصادية الكبيرة لأنها تتحمل الجفاف وفقر التربة ومتأقلمة في المناطق الجافة وشبه الجافة التي تغطي معظم المساحة في العالم العربي، **لذلك هدف البحث إلى:**

- التوصيف الشكلي لأهم أصناف الفستق الحلبي المؤنثة المزروعة في سورية وتونس.
- دراسة القرابة الوراثية بين بعض أصناف الفستق الحلبي السورية والتونسية.
- تقويم هذه المصادر الوراثية لحفظها في مجمع وراثي لاستخدامها في التطبيق العملي وتحقيق أغراض التحسين الوراثي.

مواد البحث وطرائقه

نفذت عملية مسح وتوصيف الأصناف المدروسة في محطة بحوث المركز العربي لدراسات المناطق الجافة والأراضي القاحلة- اكساد (ازرع – محافظة درعا) في سورية، كما تم إجراء التحاليل المخبرية المختلفة في مخابر التقانة الحيوية في المركز العربي- اكساد.

1- المادة النباتية.

شملت المادة النباتية ستة أصناف مثلت 6 مدخلات (3 أصناف سورية وهي العاشوري والباتوري وباتوري ازرع، وثلاث أصناف من تونس وهي ماطر وقيثار ومكناسي). ولتحديدها كمجموعة أصناف استخدمت هذه المدخلات في إجراء دراستين، الأولى دراسة شكلية (Morphological study) والثانية دراسة جزيئية (Molecular study).

2 - الدراسة الشكلية.

تم تحديد الأشجار الممثلة لعينات البحث وجرى تكرار زيارتها عدة مرات خلال فترة البحث في مواعيد مختلفة تتوافق مع مراحل نمو وتطور الأوراق والأزهار والثمار. وجمعت هذه الأجزاء النباتية من الحقل بمعدل عشر أوراق و25 ثمرة من كل صنف، وتم توصيفها حقلياً، ومخبرياً في مخابر المركز العربي- اكساد.

وتم اختيار المعايير الشكلية المعتمدة في عملية توصيف طبيعة نمو الأشجار والأوراق والإزهار والثمار باستخدام دليل قياسي لتوصيف الفستق الحلبي المسمى بالفستق الحقيقي Descriptors for Pistachio - *Pistacia vera* L. (IPGRI، 1997) المعتمد لدى المعهد الدولي للمصادر الوراثية النباتية. إذ قيست أطوال وأقطار الأجزاء النباتية الموصّفة بوساطة الورنية الرقمية Digital caliper. وتم استخدام ميزان حساس دقيق لوزن الثمار.

3- التحليل الجزيئي Molecular Analysis

3-1 عزل الدنا DNA extraction

طحن1 غرام من الأوراق الخضراء "غير المجففة" في هاون بورسلان وباستخدام الآزوت السائل حتى الحصول على مسحوق ناعم، نقل بعدها إلى حوجلة زجاجية سعة 50 مل وأضيف لها 10 مل من سائل الاستخلاص **Sodium Dodecyle (SDS) Sulphat**، ثم مزجت جيداً. حضنت العينات لمدة 60 دقيقة مع التحريك المستمر ضمن حمام مائي عند 37°م، ثم نقلت الحوجلة إلى الثلج، ووضعت فيه لمدة 5-10 دقائق.أضيف بعد ذلك 10 مل من مزيج كل من كلوروفورم/أيزواميل كحول بنسبة 24:1 ثم مزج الخليط لمدة 15 دقيقة باستخدام هزاز آلي في درجة حرارة المخبر.نقل المزيج إلى أنبوب تثفيل سعة 30 مل وثفل المزيج (عملية الطرد المركزي) لمدة 10 دقائق بسرعة (10000 rpm).أخذت الطبقة العليا (المتشكلة عن عملية التثفيل، والتي تمثل الوسط المائي الذي يحوي الأحماض النووية) بوساطة ماصة ونقلت إلى أنابيب تثفيل جديدة.أضيف الكحول الإيزوبروبانولي Iso-propanol بمعدل 3/2 من حجم الوسط المائي ومزج بهدوء بقلب الأنبوب رأساً على عقب عدة مرات(تم في هذه المرحلة ترسيب الأحماض النووية على شكل كتلة خيطية هلامية أو بيضاء).نقل الحمض النووي (DNA) المترسب بوساطة ماصة دقيقة ذات نهاية معقوفة إلى أنبوب صغير سعة 2 مل وأضيف 1.5 مل من محلول الغسيل Washing buffer (كحول إيتيلي 76%) البارد(المحفوظ بدرجة –20ْم) وترك لمدة 20 دقيقة في الثلج حيث جمع الحمض النووي (DNA) بالتثفيل بسرعة (10000 rpm) لمدة 10 دقائق وبدرجة حرارة 4ْم.استبعد سائل الغسيل وحفظ الحمض النووي (DNA)المتجمع في قعر الأنبوب، وجففت العينات باستخدام التجفيف مع التفريغ الحراري في مجففة(vacuum dryer) لمدة 10-20 دقيقة.أذيبت عينات الحمض النووي (DNA) في (500µl) ميكروليتر

من المحلول المنظم TE المكون من (10 mMTris-HCl, 1mM EDTA) وذلك عن طريق تركها على هزاز آلي مدة 12-24 ساعة وعند درجة حرارة 4° م. خلال أية عملية استخلاص للحمض النووي (DNA) فإنه لابد من وجود كمية من الحمض النووي(RNA) الناتجة عن عملية الاستخلاص (تختلف كمية الحمض النووي (RNA) باختلاف طريقة الاستخلاص وباختلاف النسيج النباتي وعمره)، وعليه فإنه لابد من استبعاد هذه الحمض النووي (RNA) وفق مايلي:إضافة (2µl)ميكروليتر من أنزيم RNase (10 mg/ml) ملغ/مل والتحضين على درجة (37° م) مدة نصف ساعة، وأضيف حجم مماثل من الكلوروفورم: ايزوميل الكحول (1:24). وبعد التثفيل، نقل الطور العلوي لأنبوب جديد، وأضيف له ضعف كمية المزيج من الإيتانولethanol النقي لإعادة ترسيب الحمض النووي (DNA)، وترك عند الدرجة 4° م لمدة ساعة، ثم رسب المزيج بالتثفيل بسرعة (10000 rpm) ولمدة 10 دقائق وغسل ثانيةً بوساطة الإيتانول70% وجفف في الهواء للتخلص من آثار الإيتانول ضمن جهاز المجفف بالتفريغ والحرارة (block Heaterdry) نوع Labtech ثم أذيب الحمض النووي (DNA) في محلول TE المعقم.

2-3 التقدير الكمي والنوعي للـ DNA

تم التقدير الكمي والنوعي للحمض النووي DNA بواسطة الأشعة فوق البنفسجية باستخدام جهاز PowerWaveXTM (BIO-TEK Instruments,Inc.) لتقدير كمية الحمض النووي (DNA) وتحديد نقاوته، حيث يعتمد الجهاز في عمله عن طريق تقديره لامتصاص الحمض النووي (DNA) للأشعة فوق البنفسجية بموجات طولها 260 و280 نانومتر، ثم مددت عينات DNA للحصول على تركيز (40ng/µl نانوغرام/ميكروليتر) كما تم التقدير النوعي على هلامة Agaros 0.8%.

3-3 استخدام تقانة ISSR لإجراء الدراسة الجزيئية:

تم اختبار (18) بادئة مصدرها الهيئة العامة للطاقة الذرية في سورية بتركيز (10 ميكرومول) كما استخدم 2 X PCR Master Mix) والذي تم الحصول عليه من شركة (Fermentas,Germany). ويوضح الجدول (1) التسلسل النكليوتيدي للبادئات المستخدمة.

الجدول 1. التسلسل النيكليوتيدي للبادئات المختبرة في تقانة ISSR ودرجة حرارة الالتحام.

البادئة	التسلسل النيكليوتيدي 3' - 5'	درجة حرارة الالتحام (مْ)
ISSR2	GAGAGAGAGAGAGAGAC	52
ISSR4	CACACACACACACACAG	56
ISSR6	GAGAGAGAGAGAGAGACG	54
ISSR7	TCTCTCTCTCTCTCTCGA	50
ISSR9	ACACACACACACACACGG	50
ISSR14	CCAGGTGTGTGTGTGTGT	56
ISSR15	GTGTGTGTGAGAGAGAGA	54
ISSR16	TCTCTCTCTCTCTCTCAG	54
ISSR17	KKVRVRV(TG)6	50
ISSR18	CCTCTCTCTGTGTGTGTG	56
ISSR32	AGAGAGAGAGAGAGAGC	52
ISSR33	GAGAGAGAGAGAGAGAT	52
ISSR34	CTCTCTCTCTCTCTCTG	52
ISSR35	CACACACACACAACAG	52
ISSR36	TCTCTCTCTCTCTCTCC	52
ISSR37	TGTGTGTGTGTGTGTGG	52
ISSR40	ACACACACACACACACTT	52
ISSR43	TGTGTGTGTGTGTGTGAA	52
R: G/ A	K: G/ T	V: G/ C /A

أجري تفاعل البلمرة المتسلسل PCR وفقاً لـ Williams وزملاؤه (1990) مع بعض التعديلات فكان حجم التفاعل النهائي (25 ميكروليتر) كما يظهر الجدول 2 مكونات هذا التفاعل:

الجدول 2. مكونات تفاعل البلمرة المتسلسل PCR.

الكميات	مكونات تفاعل البلمرة المتسلسل PCR
0.3 µl	Taq DNA Polymerase (0.05 units/µl)
0.5 µl	$MgCl_2$ (4 mM)
2.5 µl	DNTPs (5 µM)
2 µl	DNA (40ng/µl)
2.5 µl	Primer (10pmol/µl)
10X	Buffer
Up to 25 µl	H_2O

ويتم هذا التفاعل في جهاز التدوير الحراري من شركة (APOLLO, USA) موديل ATC401 وفقاً للظروف التالية:

1- **الانفصال**: عند درجة حرارة 94ْم لمدة 5 دقائق ليتم انفصال سلسلتي الـحمض النووي (DNA).

2- 35 دورة تتضمن كل منها المراحل التالية:

- **التحطم**: يتم عند حرارة 94ْم لمدة 30 ثانية.
- **الالتحام**: عند حرارة كما هو موضح في الجدول (1) لمدة دقيقة واحدة.
- **الاستطالة**: عند حرارة 72ْم لمدة دقيقة.

3- اكتمال التفاعل عند حرارة 72ْم لمدة عشر دقائق.

ثم تحفظ العينات في درجة حرارة 4ْم لتفصل الحزم بعدها بالترحيل على هلامة الآغاروز.

الرحلان الكهربائي والتلوين والتصوير:

تم تحضير هلامة الآغاروز وتلوينها وتصويرها كالتالي:

- تم إضافة 2 غرام من الآغاروز لـ 100مل من المحلول المنظم 1X TBE buffer

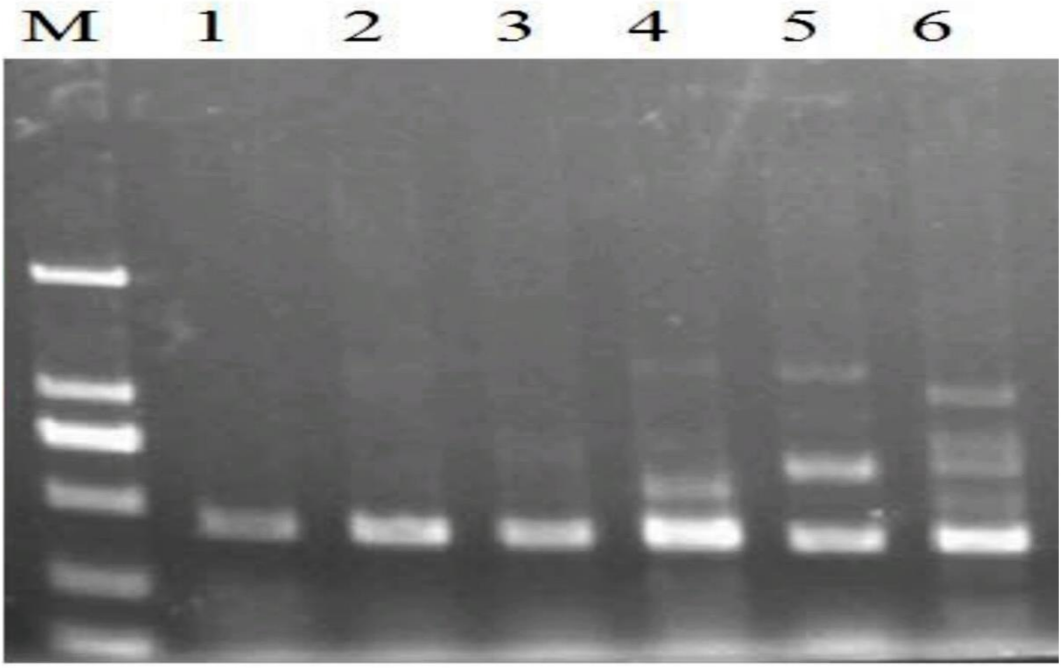
5X TBE buffer (54 غرام Tris borate + 27.2 غرام Boric acid + 20 ملEDTA 0.5، pH =8.0) و (يعتمد حجم الهلامة المستخدمة وتركيزها عل عدد عينات الأحماض النووية DNA المراد تحليلها ونوعها وحسب حجم جهاز الرحلان الكهربائي المستخدم).

تم تحضير صبغة الترحيل Bromophenol blue الحاوية على المكونات التالية:

(15% Ficoll 400 + 1.03 % bromophenol Blue + 0.03 % xylene cyanol FF + 0.4 % Orange G + 10 mMTris-HCl + 50 mM EDTA)

ثم تضاف 5 ميكرو ليتر من هذه الصبغة لـ 15 ميكروليتر لكل عينة من منتجات التضخيم وتحقن في أبار هلامة الآغاروز التي تم تحضيرها و5 ميكروليتر من صبغة الايثيديومبرومايد (50 مغ/مل) كما يتم حقن عينة من مؤشر الحمض النووي (DNA)من شركة (Fermentas, Germany) وذلك لتحديد الحجم الجزيئي للحزم الناتجة ليتم بعد ذلك الترحيل.

صورت الهلامة بجهاز تصوير هلامة الآغاروز Image Analyzer (Agle Eye II taratagene)، وبعد أن يتم التأكد من نوعية وكمية الحمض النووي (DNA) يتم تمديدها بالشكل الصحيح والبدأ باستخدام التقانة اللازمة لتضخيم الحمض النووي (DNA)، ودراستها بالاعتماد على التفاعل السلسلي البوليميرازي.



صورة (1): الرحلان الكهربائي

التحليل الإحصائي Statistical Analysis

تم تحليل نتائج الدراسات المخبرية والتوصيف الشكلي للأصناف، باستخدام برنـامجي Systat 8 و Genestat 12على الحاسوب الآلي لمعرفة معنوية الفروقات بطريقة ANOVA (فيشر F والاحتمالية P)، وتم أخذ 3 مكررات بحيث يتمثل كل شجرة مكرر، وذلك من اجل التوصيف الشكلي.

كما تم استخدام البرامج الإحصائية الخاصة بالتقانات الحيوية المستخدمة لإجراء الدراسة الوراثية، إذ جمعت نتائج عملية التضخيم في جداول اعتماداً على مقارنةً وجود أو غياب حزم الحمض النووي DNA بين النباتات التي جمعت من المواقع المختلفة، حيث أعطي الرقم (1) عند وجود حزمة الحمض النووي (DNA) والرقم (0) 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 Pop gene 1.31الإحصائي.

النتائج والمناقشة

أولاً- المواصفات المورفولوجية

لوحظ من خلال التوصيف الشكلي لأشجار الأصناف المدروسة ، بأن الصنف العاشوري يتميز بشجرة ذات نموات شبه قائمة ، قليلة التفرع وهو صنف مبكر النضج ، أما الصنف الباتوري فإن الشجرة ذات نموات متدلية أو متهدلة وتشكل أنموذجاً خيمياً، والتفرع فيها متوسط والثمار تنضج مبكراً بعد الصنف العاشوري، أما الصنف باتوري ازرع، فكان شكل النموات شبه قائمة إلى متدليه، والتفرع فيها متوسط، والثمار متوسطة النضج، أما الأصناف التونسية فكان شكل الشجرة في الصنف ماطر شبه قائم تشبه

العاشوري، والتفرع فيها قليل إلى متوسط وحجم الشجرة أقل من الصنف قيثار، والثمار مبكرة النضج، أما الصنف مكناسي فشكل النموات فيها قائم إلى متوسط، والتفرع فيها كبير والصنف متوسط إلى متأخر النضج، أما في الصنف قيثار فكان شكل النموات قائماً وكثير التفرع، والصنف متوسط إلى متأخر النضج.

1- مواصفات الوريقة والورقة

تم أخذ العينات من الأوراق وذلك من منصف الفرع، وبمعدل 10 أوراق من فروع مختلفة، تمثل الاتجاهات الأربعة، وعلى ارتفاعات مختلفة، وقد تضمن الجدول رقم (3) مواصفات الوريقة والورقة والتي كانت كمايلي:

- **طول الوريقة:** كان أطول الوريقات في الصنف عاشوري إذ بلغت 8.66 سم، ولم يكن هناك أي فروق معنوية مع الصنفين باتوري وباتوري ازرع، كما لوحظ عدم وجود فروق معنوية بين كل من الأصناف باتوري وباتوري ازرع والتونسي مكناسي، كما سُجل أقل طول وريقة في الصنف قيثار (4.58 سم) وبفروق معنوية عن باقي الأصناف (الجدول 3).
- **عرض الوريقة:** وجدت أعرض وريقة في الصنف عاشوري، إذ بلغت في المتوسط لحوالي 5.88 سم متفوقة وبفروق معنوية عن باقي الأصناف المدروسة تلاها الصنف الباتوري بعرض وريقة بلغ 4.92 سم وأيضاً بفروق معنوية عن باقي الأصناف المدروسة، ثم الصنف باتوري ازرع، ولم يكن هناك فروق معنوية بين الأصناف ماطر ومكناسي وكذلك بين باتوري ازرع ومكناسي، وسُجل أقل عرض ورقة في الصنف قيثار وبفروق معنوية عن باقي الأصناف إذ بلغ 2.52 سم (الجدول 3).
- **طول الورقة:** وجدت أطول ورقة في الصنف باتوري وبفروق معنوية عن بقية الأصناف المدروسة حيث بلغ طولها 18.1 سم، كما لوحظ عدم وجود فروق معنوية بين الأصناف عاشوري وباتوري ازرع وقيثار، حيث تراوح طول الورقة بين 15.17 و15.90 سم، كما لوحظ عدم وجود فروق معنوية بين الأصناف باتوري ازرع وماطر ومكناسي من حيث طول الورقة (الجدول 3).
- **عرض الورقة:** تبين عدم وجود فروق معنوية بين جميع الأصناف المدروسة من حيث عرض الورقة، وقد تراوح العرض من 12.5 سم في الصنف مكناسي إلى 15.33سم في الصنف عاشوري، وهذا يتوافق مع ابراهيم باشا،2003 حيث وجد أبعاد الورقة في العاشوري بين 15 و16 سم، والباتوري بين 17-18 سم (الجدول 3).

الجدول 3. المواصفات المورفولوجية لورقة الأصناف المدروسة

الصنف	طول الوريقة (سم)	عرض الوريقة (سم)	طول الورقة (سم)	عرض الورقة (سم)
عاشوري	8.66^{a}	5.88^{a}	15.90^{b}	15.33^{a}
باتوري	7.92^{ab}	4.92^{b}	18.10^{a}	15.00^{a}
باتوري ازرع	7.72^{ab}	4.14^{c}	15.17^{bc}	13.40^{a}
ماطر	5.56^{c}	3.44^{d}	14.10^{c}	12.67^{a}
مكناسي	6.92^{b}	3.90^{cd}	13.90^{c}	12.50^{a}
قيثار	4.58^{c}	2.52^{e}	15.83^{b}	13.83^{a}
LSD 0.05	**1.331**	**0.563**	**1.522**	**3.023**

2 - مواصفات الثمرة الطازجة

أخذت عينات بمعدل 25 ثمرة من كل مكرر (شجرة) ، وذلك من الأصناف المدروسة، وقد تم أخذ العينات(الثمار) لكل صنف عندما وصلت لدرجة النضج، وذلك بالتسلسل حسب الأصناف (مبكرة، متوسطة، متأخرة)، ونقلت إلى المخبر بنفس اليوم وحفظت في البراد على درجة حرارة (7 مئوية) لليوم التالي، حيث أجريت عليها القياسات المطلوبة ، وقد تميز لون الغلاف اللحمي الخارجي

عند النضج لثمار صنفي العاشوري والماطر باللون الأحمر الجذاب ، بينما كان اللون سمنياً، في ثمار الصنفين قيثار ومكناسي ، وتميزت ثمار الصنف الباتوري بلون أصفر شاحب يميل إلى الزهري الخفيف، وكان لون ثمار الباتوري ازرع أقرب للسمني.

المؤشرات المدروسة للثمار:

- **طول الثمرة:** وجدت أطول ثمار في الصنف الباتوري وبفروق معنوية عن باقي الأصناف المدروسة، والتي بلغت في المتوسط 2.81 سم، تلاه الصنف العاشوري بطول ثمرة بلغ 2.67 سم وبفروق معنوية عن باقي الأصناف، أما أقصر الثمار طولاً فكانت في الصنف مكناسي (1.78 سم) بفروق معنوية عن باقي الأصناف المدروسة (الجدول 4).
- **عرض الثمرة:** وجدت أعرض الثمار في الصنفين العاشوري والباتوري، إذ بلغت (1.5، 156 سم) على التوالي دون فروق معنوية بينهما وتفوقا على باقي الأصناف المدروسة وبدلالة معنوية، وكذلك تشابه الصنفان العاشوري والباتوري ازرع وبدون فروق معنوية بينهما من حيث صفة عرض الثمرة، وكانت أضيق الثمار موجودة في الأصناف ماطر ومكناسي وقيثار، إذ لوحظ عدم وجود فروق معنوية بينها وتراوحت بين 1.10سم في الصنف مكناسي و1.13سم في الصنف قيثار (الجدول 4).
- **وزن الثمرة الكاملة الطازجة:** سُجل أكبر وزن للثمار في الصنف باتوري ازرع (3.85غ) متفوقاً على باقي الأصناف المدروسة، كما لوحظت فروق معنوية بين أغلب الأصناف المدروسة، باستثناء الصنفين قيثار ومكناسي، وكذلك بين الصنفين قيثار وماطر، وهذا يتوافق مع ما توصل إليه إبراهيم باشا،2003 حيث وجد أن وزن الثمرة في العاشوري يمكن أن يتراوح مابين 2.06-2.65 غ (الجدول 4).

الجدول 4. يوضح أبعاد ووزن الثمرة الطازجة للأصناف المدروسة

الصنف	طول الثمرة (سم)	عرض الثمرة (سم)	وزن الثمرة الكاملة الطازجة (غ)
عاشوري	2.67[b]	1.50[ab]	2.64[c]
باتوري	2.81[a]	1.56[a]	3.37[b]
باتوري ازرع	2.27[c]	1.42[b]	3.85[a]
ماطر	2.02[d]	1.15[c]	1.02[d]
مكناسي	1.78[e]	1.10[c]	0.76[e]
قيثار	1.94[d]	1.13[c]	0.95[de]
LSD 0.05	**0.105**	**0.084**	**0.226**

3 - مواصفات أجزاء الثمرة الطازجة

- **وزن الثمرة الطازجة دون قشرة لحمية:** بلغ أكبر وزن ثمرة طازجة دون قشرة لحمية ملونة 2.08 غ، في الصنف الباتوري وبفروق معنوية عن باقي الأصناف المدروسة، يليه كل من الصنفين باتوري ازرع وعاشوري بوزن بلغ 1.63 و1.71 غ على التوالي دون فروق معنوية بينهما، ولكن بفروق معنوية مع باقي الأصناف، ثم ماطر ومكناسي وأيضاً دون فروق معنوية بينهما، وسُجل أدنى وزن في الصنف مكناسي (0.55 غ) وبفروق معنوية عن باقي الأصناف المدروسة (الجدول 5).
- **وزن الغلاف الخشبي: تبين** أن أعلى وزن للغلاف الخشبي الطازج موجود في الصنف الباتوري، إذ بلغ 0.871 غ وبفروق معنوية عن باقي الأصناف المدروسة، تلاها كل من الصنفين السوريين باتوري ازرع وعاشوري بوزن بلغ 0.758 و0.771 غ على التوالي دون فروق معنوية بينهما، مع وجود فروق بينهما وبين باقي الأصناف المدروسة، كما لوحظ أن أخف وزن للغلاف الخشبي الطازج موجود لدى الأصناف التونسية الثلاثة وبدون فروق معنوية بينها، والذي تراوح بين 0.346 غ في الصنف المكناسي و0.381 غ في الصنف ماطر (الجدول 5).

- **وزن النواة الطازج:** بلغ أكبر وزن للنواة الطازجة في ثمار الصنفين السوريين باتوري وباتوري ازرع 1.26 و1.37 غ على التوالي دون فروق معنوية بينها، ولكن تفوقت على باقي الأصناف المدروسة بفروق معنوية، تلاهما الصنف السوري عاشوري وبفروق معنوية عن باقي الأصناف، كما سُجل أخف وزن للنواة الطازج لدى الأصناف التونسية الثلاثة دون فروق معنوية بينها، والذي تراوح بين 0.20 غ في الصنف المكناسي و 0.37 غ في الصنف ماطر (الجدول 5).
- **نسبة التصافي:** لم تلحظ أية فروق معنوية بين أغلب الأصناف المدروسة السورية والتونسية من حيث نسبة تصافي الثمار والتي تراوحت بين 35.57% في الصنف باتوري ازرع و38.41 % في الصنف العاشوري وهذا يتعارض مع ماوجده ابراهيم باشا (2003) حيث وجد أن نسبة التصافي في المتوسط بالصنف عاشوري كانت 30.26% والباتوري 19.87%، وسُجلت أقل نسبة تصافي وبفروق معنوية عن بقية الأصناف المدروسة في الصنف التونسي مكناسي (26.44%) (جدول 5).

الجدول 5. مواصفات أجزاء الثمرة الطازجة للأصناف المدروسة.

الصنف	وزن الثمرة بدون قشرة لحمية (غ)	وزن الغلاف الخشبي (غ)	وزن النواة (غ)	نسبة التصافي %
عاشوري	1.63^{b}	0.758^{b}	1.02^{b}	38.41^{a}
باتوري	2.08^{a}	0.871^{a}	1.26^{a}	37.46^{a}
باتوري ازرع	1.71^{b}	0.771^{b}	1.37^{a}	35.57^{a}
ماطر	0.75^{c}	0.381^{c}	0.37^{c}	36.94^{a}
مكناسي	0.55^{d}	0.346^{c}	0.20^{c}	26.44^{b}
قيثار	0.72^{c}	0.371^{c}	0.34^{c}	37.49^{a}
LSD 0.05	**0.113**	**0.0569**	**0.170**	**7.77**

4 - مواصفات الثمرة الجافة:

لقد تم تجفيف العينات الطازجة عبر الفرن الحراري على درجة حرارة (105 مئوية)، ولمدة 12 ساعة، ومن ثم أجريت عليها القياسات المطلوبة، وقد اختلفت نسبة تفتح الثمار في الأصناف المدروسة، إذ بلغت أعلى نسبة في الصنف العاشوري ووصلت إلى 90 و95%، بينما بلغت 43 % في الصنف الباتوري، و61 % في الصنف باتوري ازرع، أما الأصناف التونسية فكانت نسبة تفتح الثمار فيها عالية جداً ، ووصلت إلى أكثر من90% في الصنف ماطر ، وتراوحت بين 95 و98% في الصنفين قيثار ومكناسي.

المؤشرات المدروسة للثمرة الجافة:

- **وزن الثمرة الجافة دون قشرة لحمية:** وجد أن أعلى وزن للثمار الجافة موجودة في الصنفين السوريين الباتوري والباتوري ازرع وبفروق معنوية عن باقي الأصناف المدروسة، إذ بلغت 1.48 و1.64 غ على التوالي، تلاهما الصنفين العاشوري السوري وماطر التونسي دون فروق معنوية بينهما، ويماثلهما الصنفين التونسين ماطر ومكناسي، كما وجد أن أخف الثمار الجافة هي للصنف قيثار بوزن بلغ 0.59 غ وبفروق معنوية عن بقية الأصناف المدروسة (الجدول 6).
- **وزن الغلاف الخشبي الجاف:** لوحظ أن هذا المعيار سلك سلوك المعيار نفسه، وكان أعلى وزن للغلاف الخشبي الجاف في الصنفين باتوري وباتوري ازرع 0.720 و0.770 غ على التوالي دون فروق معنوية بينهما، وأدنى وزن في الصنف التونسي قيثار بوزن بلغ 0.264 غ بفروق معنوية عن باقي الأصناف المدروسة (الجدول 6).
- **وزن النواة الجافة:** بلغ أعلى وزن للنواة الجافة في الصنف السوري باتوري ازرع (0.880 غ) وبفروق معنوية عن بقية

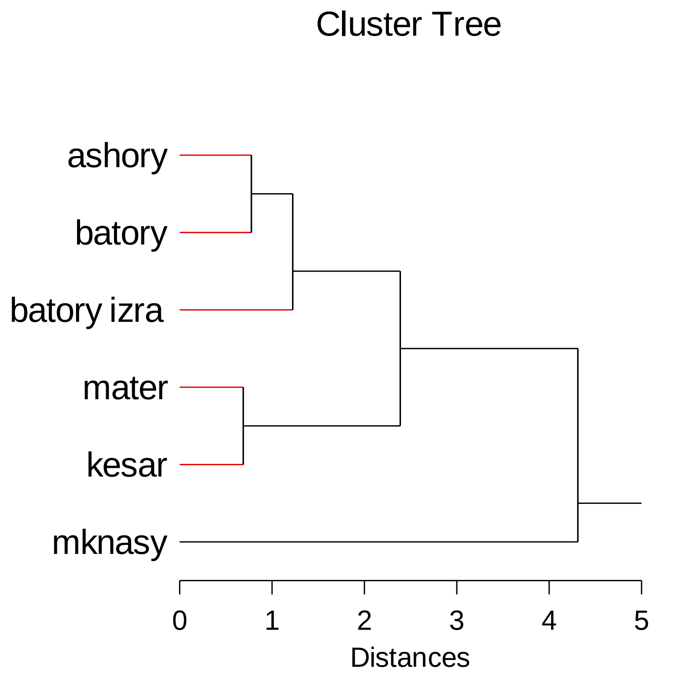
الأصناف المدروسة، تلاه الصنف باتوري بوزن بلغ 0.760 غ أيضاً وبفروق معنوية عن باقي الأصناف المدروسة، كما لوحظ عدم وجود فروق معنوية بين الصنف العاشوري السوري والصنفين التونسيين ماطر ومكناسي من حيث وزن النواة الجافة، وسُجل اقل وزن للنواة في الصنف التونسي قيثار وبفروق معنوية مع باقي الأصناف المدروسة (الجدول 6).

الجدول 6. أوزان الثمرة وأجزاؤها الجافة للأصناف المدروسة.

الصنف	وزن الثمرة الجافة بدون قشرة لحمية (غ)	وزن الغلاف الخشبي(غ)	وزن النواة الجافة (غ)
عاشوري	1.03[b]	0.490 [b]	0.540[c]
باتوري	1.48[a]	0.720[a]	0.760[b]
باتوري ازرع	1.64[a]	0.770[a]	0.880[a]
ماطر	0.93[bc]	0.432[bc]	0.502[c]
مكناسي	0.81[c]	0.369[c]	0.445[c]
قيثار	0.59[d]	0.264[d]	0.328[d]
LSD 0.05	**0.169**	**0.0785**	**0.0933**

ومن خلال متوسط جميع المواصفات الكمية للأصناف المدرسة التي تم قياسها ، تم رسم شجرة القرابة بناء على تلك المواصفات الكمية المورفولوجية والتي أظهرت مايلي (الشكل 2):

انقسمت الأصناف المدروسة إلى ثلاث مجموعات بناءً على تلك المواصفات، وضمت المجموعة الأولى الأصناف السورية العاشوري والباتوري و باتوري ازرع ، إذ وجد أكبر تقارب وراثي ضمن هذه المجموعة بين الباتوري والعاشوري بمسافة بلغت 0.777 ، بينما وصل التباعد الوراثي بين الصنفين (باتوري وعاشوري) مع الصنف الباتوري ازرع بمسافة 1.224، أما المجموعة الثانية فقد ضمت الصنفين التونسيين ماطر وقيثار، وكان أكبر نسبة تشابه بينهما ضمن جميع الأصناف المدروسة بمسافة بلغت 0.688، وكانا اقرب في الشبه مع الأصناف السورية أكثر من الصنف التونسي مكناسي، والذي انفرد بمجموعة ثالثة مستقلة لوحده حسب مواصفاته الكمية المورفولوجية.



الشكل 2. التحليل العنقودي أو شجرة القرابة بناء على المواصفات الكمية والشكلية.

ثانياً- التوصيف الجزيئي

1 - التعددية الشكلية:

تضمنت الدراسة اختبار 18 بادئة، ويبين الجدول7 أن 13 بادئة أثبتت فعاليتها في إعطاء تعددية شكلية بين الأنواع المدروسة في تفاعل التسلسل البوليميرازي، في حين لم تعطِ خمس بادئات آية نتائج تضخيم، ونجم عن استخدام هذه البادئات ما مجموعه 96 حزمة، حيث أعطت هذه البادئات تعدديةً شكليةً Polymorphic بلغت نسبتها 82.6%. وتترواح عدد الحزم لكل بادئة من حزمتين كأقل عدد مع البادئة (ISSR-2)، و13 حزمة كأعلى عدد مع البادئة (ISSR-6)، بمتوسط 7.38 حزمة لكل بادئة. وكانت النسبة المئوية للتعددية الشكلية الأقل مع البادئات (ISSR-43,ISSR-37) بمقدار25%، تلاه مع البادئة (ISSR-35) بمقدار 55.6%، والأكبر مع البادئات (ISSR-18، ISSR-4، ISSR-2، ISSR-4، ISSR-32) بمقدار100%.

الجدول7. رموز البادئات المستخدمة، عدد الحزم الكلية والمتباينة، والنسبة المئوية للتعددية الشكلية (%) في الأصناف المدروسة.

البادئة	عدد الحزم الكلية	عدد الحزم المتباينة شكلياً	النسبة المئوية للتعددية الشكلية (%)
ISSR2	2	2	%100
ISSR4	8	8	%100
ISSR6	13	12	%92.3
ISSR9	11	10	%90.9
ISSR14	5	3	%60
ISSR15	3	2	%66.7
ISSR18	10	10	%100
ISSR32	10	10	%100
ISSR35	9	5	%55.6
ISSR36	10	9	%90
ISSR37	4	1	%25
ISSR40	7	7	%100
ISSR43	4	1	%25
المجموع	96	80	%82.6
المتوسط	7.38	6.15	

2- التحليل العنقودي Cluster analysis (شجرة القرابة):

يسمح التحليل العنقودي بتقسيم الطرز الوراثية المدروسة إلى مجموعات، وتعكس هذه المجموعات درجة القرابة الوراثية فيما بينها، وقد تتجمع العينات ضمن مجموعة واحدة بناءً على موطنها الأصلي، أو بناءً على أصلها ونسبها. أجري التحليل العنقودي للنتائج التي تم الحصول عليها، وذلك لإنشاء شجرة القرابة الوراثية (Dendrograme) لتحديد درجة القرابة الوراثية، إذ انفصلت شجرة القرابة الوراثية إلى عنقودين رئيسيين (الشكل 3):

- ضم العنقود الأول الصنف السوري باتوري ازرع، وهو أكثر تباعداً مع باقي الأصناف وهو ذو لون أصفر شاحب (الشكل 5).

- وانقسم العنقود الثاني إلى مجموعتين ضمت الأولى الصنفين التونسين (قيثارومكناسي)، وهما من الأصناف ذات اللون السمني (الشكل 6)، بينما ضمت المجموعة الثانية كل من الأصناف السورية (باتوري وعاشوري) بالإضافة للصنف التونسي الشهير(ماطر)، ويلاحظ التقارب الوراثي الكبير بين الصنفين الشهيرين العاشوري السوري وماطر التونسي، وهما من الأصناف ذات اللون الأحمر الجذاب (الشكل 4).

- ويجب أن نميز بين الطراز المظهري Phonotype: هو التعبير الآني عن التركيب الوراثي ضمن ظروف بيئية محددة. والطراز الوراثي لفرد ما Genotype فهو مجموعة المورثات التي تؤثر في صفاته فمهما اختلفت ظروف البيئة فإن التركيب الوراثي يبقى ثابتاً، في حين أن الشكل الظاهري يتغير بتغير الظروف البيئة. وقد تتشابه الأشكال الظاهرية على الرغم من أن مكوناتها الوراثية مختلفة.
- ويمكن التعبير عن ذلك بالتالي:

مظهر الفرد = تركيبه الوراثي + تأثير البيئة + تفاعل التركيب الوراثي مع البيئة

$$\text{Phenotype} = \text{Genotype} + \text{Environment} + \text{Interaction}$$

$$P = G + E + GE$$

وبالتالي فإن التباينات المظهرية Phenotypic Variances (VP) يمكن كتابتها كالتالي:

$$VP = VG + VE + VGE$$

حيث أن:

Vp = التباين المظهري في صفة من الصفات بين مجموعة من الأفراد. VG = التباين الوراثي.

VE = التباين البيئي (الذي يعود لعوامل بيئية). VGE = التباين الناتج عن تفاعل التركيب الوراثي مع العوامل البيئية.

أما التباين الوراثي (VG) فيمكن تحليله إلى مكوناته وهي:

$$VG = VA + VD + VI$$

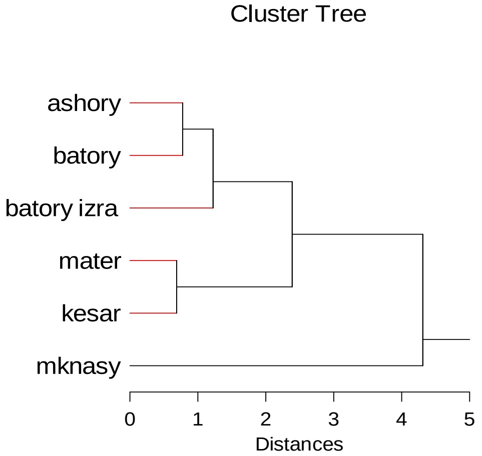
حيث:

VA = الجزء من التباين الوراثي الذي يعود للفعل المتجمع للمورثات

VD = الجزء من التباين الوراثي الذي يعود لفعل السيادة (تامة - غير تامة - فائقة)

VI = الجزء من التباين الوراثي الذي يعود للتفوق.

وبالتالي عند مقارنة شجرة القرابة لكل من الصفات الوراثية والمظهرية نستنتج أن الأصناف المدروسة هي ذات تراكيب مظهرية Phonotype لعدم تطابق شجرة القرابة الوراثية مع شجرة القرابة الشكلية.



الشكل (3): شجرة القرابة الوراثية للأصناف السورية والتونسية المدروسة حسب تقنية ISSR.

الشكل (4): مقارنة شجرة القرابة بناء على المواصفات الكمية المورفولوجية والوراثية.

المقترحات

- يوصى باستخدام تقانة ISSR لدراسة درجة القرابة الوراثية بين أصناف الفستق الحلبي نظراً لكفاءتها في التمييز بين أصناف النوع *Pistacia vera* L.
- اعتماد تسمية الصنف باتوري ازرع باسم الصنف (اكساد)، كونه بعيد في مواصفاته الشكلية والجزيئية عن الصنف الباتوري العادي، وإدخاله في برامج التهجين مع الأصناف الأخرى للاستفادة منه في برامج التربية والتحسين الوراثي كونه أيضاً من الأصناف المتباعدة وراثياً مع بقية الأصناف المدروسة.
- يُقترح مستقبلاً توسيع الدراسة واستخدام تقانة ISSR في دراسة التباين الوراثي لجميع أصناف الفستق الحلبي السورية والعربية.

المراجع

- الحصني بشير، 1972 – الفستق. نشرة رقم 22 وزارة الزراعة والإصلاح الزراعي، سورية.
- ابراهيم باشا عامر،2003- مسح جغرافي بيئي وتقييم التنوع الو راثي للأصناف المؤنثة من الفستق الحلبي *Pistacia vera* L. في سورية، رسالة ماجستير – قسم البساتين- كلية الزراعة- جامعة حلب.
- حاج حسن عدنان، 1988 – مواصفات أهم أصناف الفستق الحلبي المؤنثة السورية المنتشرة في منطقة حلب، أولاً- دراسة مواصفات الأصناف الرئيسية - اكساد /ث ن/ن1988/25.
- خليفة طاهر، 1958 – إقليم الفستق. دائرة المعارف الزراعية، مطبوعات ومنشورات غرفة زراعة حلب، /63/ صفحة.
- النحلاوي نظير؛ محمد عدنان القطب؛ عدنان حاج حسن؛ إبراهيم حج إبراهيم، 1985- تأثير التقنيات الحديثة في تنمية أشجار الفستق الحلبي تحت ظرف المناطق الجافة اكساد /ث ن /ن17 /1985.
- سيد، محمود هيثم. 2001- استخدام مؤشرات من DNA في انتخاب مورثات المقاومة للأمراض في الشعير، جامعة دمشق، كلية الزارعة، أطروحة دكتوراه.
- Ayad, W.G.; T. Hodgkin; A. Jaradat, and V.R. Rao,. 1997. Molecular genetic techniques for plant genetic resources. Report for an IPGRI workshop, IPGRI, Rome, Italy: 11-12.

- Bornet, B. and M. Branchard. 2001. Non-anchored inter-simple sequence repeat (ISSR) markers: reproducible and specific tools for genome fingerprinting. Plant Molecular Biology Reporter 22:427–432
- Caruso, T., C. Lannini, F. Monastra, G. Zakynthinos, D. Rouskas, E. Barone, F. P. Marra, F. Sottile, I. Batlle, F. Vargas, M. Romero, S. Padulosi, CI. Greco, M. R. Sabina, G. Martelli, B.E. AK, M. Laghezali. 1998. Genetic and Phenotypic Diversity in Pistachio (P. vera L.) Germplasm Collected in Mediterranean Countries. In: L. Ferguson and D. Kester (ed.). Proceeding of The Second International Symposium on Pistachios And Almonds. Acta Horticulturae Number 470.
- Chandler, W.H. 1965. Deciduous Orchards. Lea and Febiger pub. Philadelphia, USA.
- Chowdhury, M.A., B. Vandenberg and T. Warkentin. 2002. Cultivar identification and genetic relationship among selected breeding lines and cultivars in chickpea (*Cicer arietinum L*.).
- CRFG, California Rare Fruit Growers. 1997. Pistachio. http://www.crfg.org/pubs/ff/pistachio.html
- Duke, J. A. 1989. CRC Handbook of Nuts. CRC Press. pp. 240-243.
- FAO,2016.FAOSTATdatabase. Http://Apps.Fao.Org/Page/Form?Collection=Production.Crops.Primary&Domain=Production&Servlet=1&Language=EN&Hostname=Apps.Fao.Org&Version=Default
- Ghorbel, A. and M. L. Kchouk. 1996. Genetic Resources of Horticultural Crops in Tunisia. Second Meeting of the WANA Working Group on Horticultural Crops. 8-15 May 1996. International Plant Genetic Resources Institute, Aleppo, Syria.
- Ghorbel, A. and M. L. Kchouk. 1998. Status and Needs of Genetic Resources for Horticultural Crops in Tunisia. WANANET Meeting, 9-11 February 1998. International Plant Genetic Resources Institute, Aleppo, Syria.
- Hormaza, J. J., L. Dollo and V. S. Polito, 1994. Determination of Relatedness and Geographical Movements of Pistacia vera (Pistachio, Anacardiaceae) Germplasm By RAPD Analysis. Econ. Botany 48(4):349-358.
- IPGRI, 1997. Descriptors for Pistachio (*Pistacia vera* L.). International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy.
- Jacquy, P. 1973. La Culture du Pistachier en Tunisie. AGP. TUN/72/003. FAO, Rome, Italy.
- Kafkas, S. and R. Perl-Treves. 2001. Morphological and Molecular Phylogeny of Pistacia Species in Turkey. Theoretical and Applied Genetics Vol:102, :908-915
- Kafkas, S., S. Centner and R. Perl-Treves. 2001. Development of Sex-Associated RAPD Markers in Wild Pistacia. Journal of Horticultural Science & biotechnology Vol:76, :242-246
- Karp, A.; S., Kresovich.; K. V., Bhat.; W. G., Ayad and T., Hodgkin. 1997. Molecular tools in plant genetic resources conservation: a guide to the technologies. 1st ed. IPGRI Technical Bulletin NO. 2. IPGRI, Rome, Italy, : 9-21
- Kijas, J.M.H., J.C.S. Fowler and M.R. Thomas. 1995. An evaluation of sequence tagged microsatellite site markers for genetic analysis within Citrus and related species.
- Maggs, D. H. 1973. Genetic Resources of Pistachio. FAO Genetic Resources Newsletter, No. 29, :7-15.

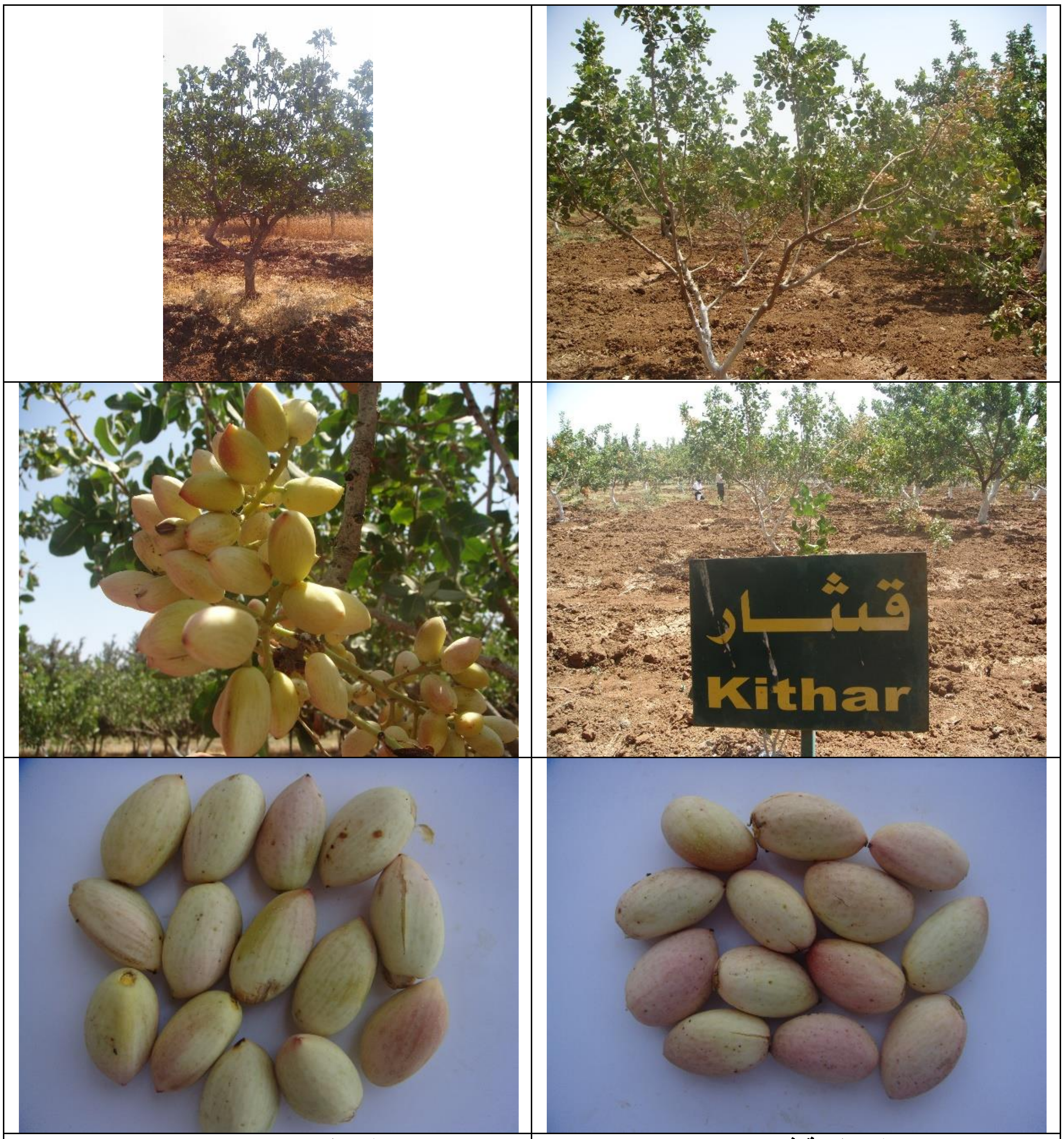
- Maggs, D. H. 1975. Prospects for Pistachio Nut Growing in Australia. Yearbook published by the West Australian Nut Growing Society, P. O. Box 27, Subiaco, W. A. 6008 , Vol. 1 csiro, Merbein, Victoria, Australia.
- Mlika, M. 1980. Contribution A L’étude Du Pistachier En Tunisie. Mémoire de fin d’études, INA Tunis, Tunisia 75pp.
- Parfitt, D. E. and M. L. Badenes, 1998. Molecular Phylogenetic Analysis of The Genus Pistacia. In: L. FERGUSON and D. KESTER (ed.). Proceeding of The Second International Symposium on Pistachios And Almonds. Acta Horticulturae Number 470.
- Rafalski, J.A.; J.M., Vogel; M., Morgante.; W., Powell.; C., Andre and S.V., Tingey.(1996). Generating and using DNA markers in plants. No mammalian Genomic Analysis: A Practical Guide. 4:75-134.
- Rovira, M., I. Batlle, M. Romero and F. J. Vargas, 1994. Isoenzymic Identification of Pistacia Species. Pistachio Cultivar Improvement at IRTA- Mas Bové. First International Symposium on Pistachio Nut. ISHS-FAO, Adana (Turkey). Acta Horticulturea.
- Rovira, M., I. Battle, M. Romero and F. J. Vargas, 1998. Characterization of Pistachio Cultivars Using Isozymes. CIHEAM Cahiers Options Méditerranéennes Vol: 33. :113-120.
- Russell, A. 1794. The Natural History of Aleppo. G. G. and J. Robinson, London.
- Saiki, R. K.; S. Scharf; F. Faloona; K. B. Mullis; G. T. Horn; H. A. Eriich and N. Amheim. 1985. Enzymatic amplification of b-globulin genomic sequences and restric tion site analysis for diagnosis of sickle cell anaemia. Science, 230:1350-1354.
- Tautz, D. and M., Renz. 1984. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. Nucleic Acids Research 12:4127–4138.
- Tragoonrung, S.; V. Kanazin; P.M. Hayes and T.K. Blake. 1992. Sequence tagged site facilitated PCR for barley genome mapping. Theor. Appl. Genet. 84:1002-1008.
- Vavilov, N. I., 1926. Tzentry Proiskhozhdeniya Kulturnyky Rastenii. The Centers of Origin of Cultivated Plants. Works of applied botany and plant breeding 16(2) 248P. (Russian, English).
- Vavilov, N. I., 1965. Izbrannye Trudy. Problemy Proiskhozhdeniya, Geografii, Genetiki, Selektzii Rastenii, Rastenievodstva I agronomii. Selected Works. The Problems of Origin, Geography, Plant Breeding, Plant Industry and Agronomy. Vol. 5. USSR Academy of Science Press, M.-L. 788p.
- Williams, J.G.K.; A.R. Kubelik; K.J. Livak; J.A. Rafalski and S.V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Research 18(22) :6531-6535.
- Ziekiewicz, E., A. Rafalski and A. Labuda.1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) anchored polymerase chain reaction amplification.

الصنف عاشوري- سورية	الصنف ماطر- تونس

الشكل 4. مواصفات الصنف العاشوري السوري وماطر التونسي.

الصنف باتوري- سورية	الصنف باتوري ازرع(اكساد)- سورية

الشكل 5. مواصفات الصنفين السوريين باتوري وباتوري ازرع (اكساد).



الصنف قيثار-تونس	الصنف مكناسي- تونس

الشكل 6. مواصفات الصنفين التونسيين قيثار ومكناسي.

N° Ref: 960