التشابه الوراثي بين طرز مؤنثة، مذكرة وثنائية الجنس في البطم الأطلسي *P.atantica* Desf باستخدام تقنية الـ SSR

نجوى متعب الحجارو بيان محمد مزهر

الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية في سوريا

استلام 7 أبريل 2015م - قبول 14 يناير 2016م

الملخص

تعد كافة أنواع الجنس *Pistacia* أحادية الجنس ثنائية المسكن، إلا أنه تم تعريف طرز جديدة ثنائية الجنس من البطم الأطلسي (*P. atlantica* Desf.) ذات تركيب مختلف سواء على مستوى النورة الزهرية أو الأزهار، لذا هدفت الدراسة إلى دراسة التباينات الوراثية بين الطرز ثنائية الجنس بالمقارنة مع الطرز الوراثية المؤنثة والمذكرة باستخدام تقنية الـ SSR (Simple Sequence Repeat). أجري البحث في الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية باستخدام 15 زوجاً من بادئات الـ SSR، أظهر منها 14 زوجاً التعددية الشكلية، حيث أعطت 40 أليلاً كان منها 35 أليلاً متعدد شكلياً بنسبة تعددية شكلية (87.5 %)، وتراوح عدد الأليلات بين 1-9 أليلات بمتوسط 2.86 أليلاً لكل موقع. وتراوحت درجة التشابه الوراثي بين 0.3 بين الطرازين ثنائيي الجنس PA37 و PA52، إلى 0.9 بين الطرازين المذكرين PM1 و PM2. كما كانت درجة التشابه الوراثي بين الطرز المؤنثة والطرز ثنائية الجنس 0.456، وبين الطرز المذكرة والطرز ثنائية الجنس 0.508. قسم التحليل العنقودي اعتماداً على طريقة UPGMA (Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Averages) وفقاً لمعامل Jaccard الطرز المدروسة إلى مجموعتين رئيستين ضمت المجموعة الأولى بعض الطرز ثنائية الجنس والطرز المذكرة في حين ضمت المجموعة الثانية ما تبقى من الطرز ثنائية الجنس مع الطرز المؤنثة. ولتقدير كفاءة تقنية الـ SSR تم حساب كل من معدل التغاير المورثي الملاحظ Ho (observed heterozygosity) (0.357)، ومعدل التغاير المورثي المتوقع (expected heterozygosity) He(0.672)، وكذلك دليل الواسم MI (Marker Index) (23.52). وخلصت النتائج إلى دور وكفاءة تقنية الـ SSR في كشف التباينات الوراثية ضمن النوع *P.atlantica*، ولا سيما أن بعض البادئات أعطت مواقع خاصة للطرز ثنائية الجنس قد يكون لها دور في المستقبل في فهم آلية وراثة الجنس ضمن النوع النباتي المدروس.

الكلمات المفتاحية: بطم أطلسي، التشابه الوراثي، تقنية الـ SSR، طرز ثنائية الجنس.

المقدمة

ينتمي البطم الأطلسي إلى العائلة *Anacardiacea* والجنس *Pistacia* (Monjauze, 1980 and karimi *et al.*, 2009). يعود الموطن الأصلي للجنس *Pistacia* إلى المناطق الجافة وشبه الجافة في إيران وتركيا وسوريا (Padulosi, *et al.*, 1996). وتعد الدراسات التي تناولت هذا النوع النباتي قليلة وبالتالي فإن المعلومات حول التكيف من الناحية الإيكولوجية والمورفولوجية غير مدروسة على نطاق واسع ضمن الكثافات النباتية (Belhadj *et al.*, 2007). وذكر (Alvarez *et al.*, 2008) أن التطور التاريخي للجنس *Pistacia* والعلاقات التصنيفية بين الأنواع ما زالت غامضة وغير محددة بشكل واضح. ويعد النوع *P.atlantica* Desf من أكثر الأنواع الشجرية أهمية من الناحية الاقتصادية في العديد من المناطق المحيطية في إيران (Pourreza *et al.*, 2008). إن عمليات إدارة الغابات تختلف محلياً وهي غير مستدامة في معظم المناطق (Ghazanfari *et al.*, 2004). تشكل أنواع الجنس *Pistacia* هجناً ناتجة عن التهجين بين الأنواع مقترحة بذلك علاقات وراثية متقاربة جداً وبالمقابل تؤدي إلى اختلاف في عدد الصبغيات. كما أن نباتات الجيل الأول F1 يمكن تحديدها بسهولة بشكل نسبي ولكن نباتات الجيل الثاني F2 صعبة التحديد، وبالتالي فإن المستوى الفعلي والعلاقات الوراثية ضمن وبين الأنواع تبقى غير واضحة (Parfitt and Badenes, 1997). كما ذكر Kafkas (2002) أن جميع الأنواع التابعة للجنس *Pistacia* منفصلة الجنس ثنائية المسكن، وهذه الصفة تؤثر سلباً على الإنتاج ونوعية الثمار، ووجدت الأنماط الوراثية أحادية المسكن من النوع *P.atlantica* في جبال Yunt في محافظة Manisa. كما أشار (Isfendiyaroglu, 2007) إلى وجود أزهار خنثى في بعض الأنماط الوراثية التابعة للنوع *P.atlantica* في منطقة Barbaros plain of Izmir، وقد ذكر أن الأزهار المؤنثة والمذكرة تتوضع بشكل معقد في النورات الزهرية في الأنماط ثنائية الجنس. وأشار (Gercheva *et al.*, 2008) إلى وجود أنماط وراثية ثنائية الجنس monoeciousness من النوع *P.atlantica* ويفترض أنها تورث في الجيل الثاني من نباتات مؤنثة ثنائية

الجنس، لذلك فإن دراسة النباتات أحادية وثنائية الجنس والهجن الناتجة عنها باستخدام المعلمات الجزيئية (molecular markers) تساهم في توضيح وتحديد آلية التوريث لهذه الصفة ضمن الجنس. وبالتالي فإن أهمية الأنماط الوراثية ثنائية الجنس لها دلالات اقتصادية مهمة من خلال استخدامها في برامج التهجين مع النوع *P.vera* بهدف إمكانية نقل هذه الصفة.

أشار (Abdelkader *et al.*, 2009) إلى وجود أنماط ثنائية الجنس بتراكيب مختلفة في المغرب العربي. وقد أجرى (Kafkas *et al.*, 2005) تهجيناً بين أنماط ثنائية الجنس من النوع *P.atlantica* مع الأصناف Ohadi وSiirt من النوع *P.vera* وذلك بهدف الحصول على أصناف ثنائية الجنس من النوع *P.vera* وتحديد آلية وراثة الجنس ضمن الجنس *Pistacia* عن طريق التهجين (intra and inter- specific hybridization)، حيث تم استخدام نمطين من البطم الأطلسي، إحداهما ثنائي الجنس بشكل كامل (كامل الأزهار ثنائية الجنس) والنمط الآخر يحمل خليطاً من الأزهار المذكرة والأزهار المؤنثة. أجري عشرون تهجيناً كان من بينها أربع تهجينات تخدم لتربية أنماط وراثية ثنائية الجنس من النوع *P.vera* في حين أن بقية التهجينات خدمت في دراسة وراثة الجنس ضمن الجنس *Pistacia*. وفي عام 2013 أشار (2013 Turkeli and Kafkas,) أنه تم تأسيس أول خريطة وراثية ناتجة عن التهجين بين الصنف سيرت والنمط ثنائي الجنس من البطم الأطلسي (Pa-18 genotype) باستخدام المعلمات الجزيئية ISSR, SRAP, AFLP. كما درست بعض الطرز التابعة للنوع *P.atlantica* جنوب سوريا باستخدام تقنية الـ RAPD (Alhajjar *et al.*, 2011). وتعد تقنية الـ SSR من التقنيات الجزيئية المهمة إذ تعطي السيادة المشتركة ونسبة عالية من التعددية الشكلية، وهي تتطلب معرفة مسبقة لجينوم النوع النباتي المدروس(Karp *et al.*, 1997; Jones, *et al.*, 1999). وتم تطوير أزواج بادئات SSR من جينوم أنواع مختلفة من الجنس *Pistacia* استخدمت بشكل واسع في دراسة التباينات الوراثية (Zaloglu *et al.*, 2009; Zaloglu *et al.*, 2015). لذا هدفت الدراسة إلى تحديد العلاقات الوراثية بين الطرز ثنائية الجنس من البطم الأطلسي بالمقارنة مع الطرز الوراثية المذكرة والمؤنثة باستخدام تقنية الـ SSR بما يساهم في فهم التباينات الوراثية والتي قد تكون مرتبطة بآلية وراثة الجنس ضمن الجنس *Pistacia* بما يخدم برامج التربية والتهجين.

المواد وطرق العمل

أجريت الدراسة في مخبر التقانات الحيوية في مركز البحوث العلمية الزراعية في السويداء لعام 2013-2014.

المادة النباتية:

شملت خمسة طرز ثنائية الجنس من البطم الأطلسي تميزت باختلاف تركيب النورة والأزهار، وقورنت على المستوى الجزيئي مع طرز مؤنثة (3 طرز) وأخرى مذكرة (3 طرز)، وفيما يلي الوصف النباتي لهذه الطرز حسب (الحجار وآخرون، 2009؛ Alhajjar, *et al.*, 2011).

مجموعة الطرز ثنائية الجنس:

PA12: تحمل الشجرة نورات زهرية مؤنثة وأخرى مذكرة على نفس الفرع بنسبة 50 % لكل منها، ويتميز بوجود مادة دبقة على الأزهار، كما هو موضح في الشكل (a1).

PA13: كافة أزهار النورة ثنائية الجنس، مع وجود أزهار مؤنثة بنسبة 5 %، ويتوضع المئبر إلى جانب ميسم ريشي ثنائي التفرع، بشكل يعلو المبيض، وهذه الأزهار تتطور بصورة طبيعية وتعطي ثماراً كاملة، مع بقاء المئبر على شكل إبرة في قمة الثمرة (الشكل،1b).

PA35: تحتوي النورة الزهرية خليطاً من الأزهار، أزهار خنثى وأزهار مذكرة وأزهار مؤنثة. بالإضافة إلى وجود نورات مؤنثة وأخرى مذكرة على نفس الفرع (الشكل 1 c).

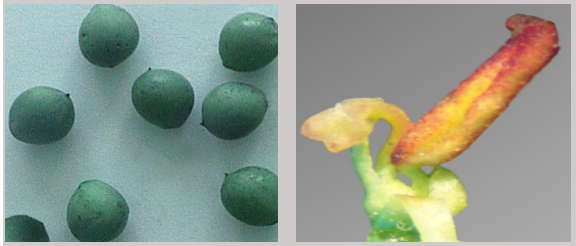
PA37: تحتوي النورة خليطاً من الأزهار المذكرة والمؤنثة، وكذلك الأزهار ثنائية الجنس والتي قد تكون ذات مئبر واحد أو مئبرين (الشكل1d).

PA52: كافة أزهار النورة ثنائية الجنس، ولكن تركيب الزهرة يختلف عن الطراز PA13، حيث يخرج المئبر عند القاعدة السفلية للمبيض، وتمتاز الزهرة هنا بطول القلم، ويعتقد أن هذا هو السبب في قلة العقد في هذه الأزهار، كما أننا لم نلاحظ وجود بقايا المئبر في الزهرة (الشكل1e).

1 a: الأزهار المؤنثة والمذكرة والثمار في الطراز PA12

1 c: الأزهار المؤنثة والمذكرة والثمارفي الطراز PA35

1 d: الأزهار المؤنثة والمذكرة والثمارفي الطراز PA37



1 e: الأزهار ثنائية الجنس والثمار في الطراز PA52

أزهار خنثى — عقد أزهار مؤنثة (1) - عقد أزهار خنثى (2)

ثمار ناتجة عن أزهار مؤنثة — ثمار ناتجة عن أزهار خنثى

1 b: الأزهار المؤنثة والمذكرة في الطراز PA13 مع توضيح الفروقات في شكل الثمرة الناتجة عن الأزهار الخنثى أو الأزهار المؤنثة

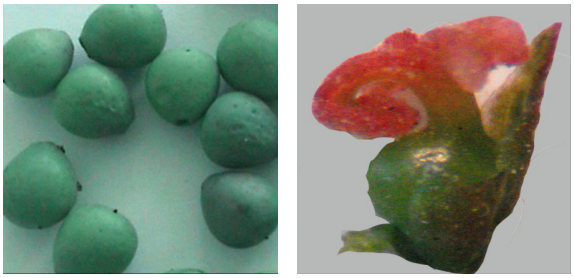
الشكل1: التراكيب المختلفة للأزهار في الطرز ثنائية الجنس من النوع *P.atlantica* والثمار الناتجة عن الأزهار المؤنثة والأزهار ثنائية الجنس

مجموعة الطرز المؤنثة:

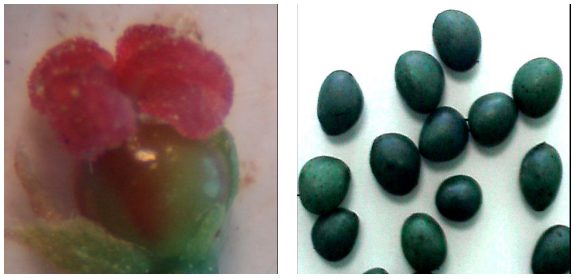
PF1: طراز مؤنث يمتاز بكبر حجم ثماره، والميسم ريشي ثلاثي التفرع أحمر اللون (الشكل 2 a).

PF2: طراز مؤنث، والميسم ريشي ثلاثي التفرع قصير القلم (الشكل 2 b).

PF3: طراز مؤنث، يمتاز باللون الأسود لثماره وهي صفة مميزة ونادرة في البطم الأطلسي (الشكل 2 c).



2 a: الأزهار المؤنثة والثمار في الطراز PF1



2 b: الأزهار المؤنثة والثمار في الطراز PF2

2 c: الأزهار المؤنثة والثمار في الطراز PF3

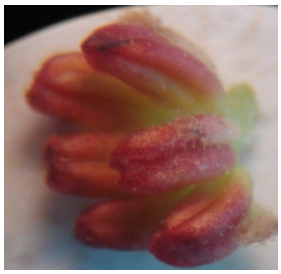
الشكل 2: شكل الأزهار والثمار الناتجة عنها في الطرز المؤنثة من النوع *P.atlantica*

مجموعة الطرز المذكرة:

PM1: طراز مذكر، تحوي أزهاره بالمعظم 5 أسدية.

PM2: طراز مذكر تحتوي أزهار بالمعظم 6 أسدية.

PM3: طراز مذكر يمتاز بكبر حجم الأوراق والنورات الزهرية والأزهار، وتتلون الأسدية باللون الأصفر (الشكل 3).



PM2

PM1

PM3

الشكل 3: الأزهار في الطرز المذكرة من النوع *P.atlantica*

المواد وطرق العمل

عزل و استخلاص الـ DNA:

تم عزل الـ DNA من الأنسجة الورقية الفتية السليمة وفقاً لطريقة CTAB حسب (Porebski *et al*., 1997). طحنت الأوراق باستخدام الأزوت السائل المبرد (- 196°م) إلى بودرة ناعمة، أخذ 1 غ من البودرة ووضعت في أنبوب 25 مل، وأضيف إليها 50 مغ من مادة PVP (Polyvinyle Polyrolidone)، والـ CTAB buffer المسخن على درجة حرارة 64°م بمعدل 5 مل، كما أضيف الـ Proteinase-K بمعدل 1 مايكروغرام/ مل، أجري لها مزج (vortex)، ثم وضعت الأنابيب في حمام مائي على درجة حرارة 64°م لمدة 40 دقيقة، مع إجراء تقليب خفيف بفاصل زمني 8 دقائق، تركت الأنابيب لتبرد في جو الغرفة العادية، وأضيف إليها الـ Chloroform-isoamyle alcohol (24:1) بمقدار (حجم: حجم) لتنقيتها من الشوائب، ثم تحريك خفيف، وبعدها ثفلت لمدة 15 دقيقة بسرعة 12000 دورة/د للحصول على الطور السائل والطور الصلب. تم نقل الطور السائل الذي يحتوي على الـ DNA وأضيف إليه الـ Isopropanol بمقدار (حجم : حجم) مع تقليب خفيف لترسيب الـ DNA ووضعت في الثلاجة مدة 45 دقيقة، ثم ثفلت لمدة 5 دقائق بسرعة 4000 دورة/د للحصول على الـ DNA المترسب (Pellet)، الذي تم غسله باستخدام محلول الـ washing buffer ومن ثم التثفيل لمدة 5 دقائق بسرعة 4000 دورة/د، بعدها تم التخلص من السائل الإضافي وترك الـ DNA في جو الغرفة حتى تمام التجفيف، ثم أذيب في الماء المقطر وحفظ على درجة حرارة -20°م.

تقدير تركيز الـ DNA:

تم قياس تركيز الـ DNA بالطريقة البصرية، باستخدام جهاز الرحلان الكهربائي، من خلال حقن الـ DNA مع معلم قياسي معروف التركيز (Marker) في هلامة من الآغاروز، ثم تم تحديد تركيز الـ DNA بالمقارنة مع تركيز المعلم القياسي (Marker).

تطبيق تقنية الـ SSR:

تم استخدام 15 زوجاً من بادئات الـ SSR، حسب (Vendramin *et al*., 2010؛Ahmad *et al*., 2003) والتي تم تطويرها من مكتبة الـ DNA لجينوم الفستق الحلبي كما هو موضح في الجدول (1)، وتم إجراء تفاعل البلمرة المتسلسل من خلال إضافة 25µl من مواد التفاعل التالية إلى أنبوب 0.2 مل: 1X PCR buffer; 100 mM Tris-HCl (pH 8.4), 500 mM KCl. 2 mM of mix dNTPs, 10Pmol (forward and reverse), 1U of Taq DNA Polymerase enzyme and 50 ng of genomic template DNA

ووضعت الأنابيب في جهاز تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) وفقاً للبرنامج التالي: 95°م لمدة 5 دقائق ثم أخضعت لمدة 35 دورة تضمنت المراحل: 95°م لمدة 45 ثانية، 54- 64°م لمدة 45 ثانية، 72°م لمدة دقيقة وبعدها تركت على درجة حرارة 72°م لمدة 5 دقائق. تم تحليل نواتج التفاعل في هلامة آغاروز 1.8 % في جهاز الرحلان الكهربائي وصورت باستخدام Gel documentation نوع (VILBER LOURMOT Germany) بعد تعريضها للأشعة فوق البنفسجية.

الجدول (1): أزواج بادئات الـ SSR المستخدمة في الدراسة وحجم الأليلات الناتجة

references	Primer	SSR motif	Primer Sequence 5' => 3'	Ta (C)	Allele Size bp
Vendramin *et al* (2010)	EPVF019b GH270737	(CCA)4/GGT) 4	F: AACCCTTGTCAGCAAACACC R: AATATAGGCCACCACCACCA	54	450-455
Vendramin *et al* (2010)	EPVM016 GH271177	(AAG)4	F: GCACTGGTTTGGTGGTTTCT R: TGTCCCTGGATCTCACTTCC	54	480-520
Vendramin *et al* (2010)	EPVM021 GH271243	(CAC)4/CCA) 4	R: GGCCCTTCATATACTGGGGT F: TTCATTACAAGCCACCACCA	52	312-318
Vendramin *et al* (2010)	EPVM056 GH271610	(TGG)4/(GGT)4	F: AGGGACGCTATCGAAGGAAT R: AAAAACAGCACGAAACCGAT	50	383-405
Ahmad *et al* (2003)	Ptms-14	(CA)46	F:GGGAAACACAAACATGCAAA R:GGCCTCTGGAGAACATGGTA	55	172-200
Ahmad *et al* (2003)	Ptms-31	(CT)20	F: CTGATCATGGGGCCTTTG R:GGAAGCACACACATGCAAAC	60	120-145
Ahmad *et al* (2003)	Ptms-42	(CTT)10	F:AAACAGGTGTTCCCGTTCAG R:ACGACAGGATTGGATGATGG	55	150-162
Ahmad *et al* (2003)	Ptms-40	(CTTT)4	F:CAGCTCTCACTGATCCGATTC R:TTCGAAAGCCAGTCTCAGGT	55	200-212
Ahmad *et al* (2003)	Ptms-3	(CA)16	F:TGATGAACAAGTCCAAAAGGG R:AAAACAGCACAGCATGCATC	55	132-145
Ahmad *et al* (2003)	Ptms-7	(CA)15	F:TGATGCTCTTGGTGTTGCTC R:CCTGAGTAGCTCCAGTTCCG	55	189-208 217-225
Ahmad *et al*(2003)	Ptms-9	(CA)7	F:TTGACCGTGGACTTGAAGC R:AACCTCCTCTCTTCTCTTTGCC	55	165-185
Ahmad *et al* (2003)	Ptms-45	(CAAA)3(CA)4	F:GCTTGTGTGTTTTAGCTCGAAAT R:AGCAATGCTTAACATTTTCCAA	55	145-152 185-196
Ahmad *et al* (2003)	Ptms-11	(CT)13	F:GTACACGGZCCCAATCCTG R:TCTAACATCATGTTAAACATCG	55	125-142
Ahmad *et al* (2003)	Ptms-33	(CA)12	F:TTCTGCTGGTCATGGGGC R:TGCCATTTAACCCAAAGGAG	55	155-165
Ahmad *et al* (2003)	Ptms-47	(CTT)13	F: GGATCCTCCACCATCTCGTA R:TTCTTCTTCCATGCCGACTT	60	175-180

التحاليل الوراثية:

تم تسجيل كافة الأليلات الناتجة، حيث أعطيت الأليلات الظاهرة رقم 1 والأليلات الغائبة رقم 0 باستخدم برنامج الـ Past، ودرس التشابه الوراثي باستخدام معامل Jaccard (Jaccard, 1908) وفقاً للمعادلة:

$$GS_{(ij)} = a/ (a + b + c)$$

حيث:

GS: درجة التشابه الوراثي بين i و j

a : عدد الحزم المشتركة بين i و j

b: عدد الحزم الموجودة في i و الغائبة في j

استخدم التحليل العنقودي من خلال طريقة UPGMA (Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Averages). كما تم حساب معدل التغاير المورثي المتوقع (expected heterozygosity) He اعتماداً على تكرار الأليلات بالمقارنة مع التغاير المورثي الملاحظ (observed heterozygosity) Ho. وتم حساب دليل الواسم MI (marker index) وفقاً لـ (Powell *et al.*, 1996). تم حساب قيم Chi square بين الأليلات الملاحظة والأليلات المتوقعة لكل زوج من البادئات، عند درجة حرية (n-1=2)، حيث تمثل n توزع كل من p و pq و q وفقاً لقانون الوراثة الماندلية حسب المعادلة

$$x^2 = \Sigma(O_i - E_i)^2 / E_i$$

حيث:

Observed number of alleles :O_i

Expected number of alleles :E_i

النتائج والمناقشة

التعددية الشكلية:

استطاع 14 زوجاً من الـ 15 زوجاً من بادئات الـ SSR المستخدمة كشف التباين بين الطرز المدروسة، وبلغ عدد الأليلات الناتجة 40 أليلاً كان منها 35 أليلاً متعددة شكلياً بنسبة تعددية شكلية 87.5 %(الجدول 2). تراوح عدد الأليلات الناتجة بين 1-9 أليلات بمتوسط 2.86 أليل في كل موقع. وقد حصل (Ahmad *et al.*, 2005) عند دراستهم 4 أنواع مختلفة من الجنس *Pistacia* من بينها النوع *P.atlantica* باستخدام 12 زوجاً من بادئات الـ SSR على عدد أليلات 5-2 بمتوسط 2.9 أليلاً لكل موقع. وذكر (Zaloglu *et al.*, 2009) أنهم حصلوا على 203 أليلا كان منها 172 أليلاً متعددة شكلياً. كما درس (Kafkas *et al.*, 2009) العلاقات الوراثية بين 46 نمطاً وراثياً من الجنس *Pistacia* تعود إلى 12 نوعاً مختلفاً باستخدام 13 زوجاً من بادئات الـ SSR. وقد حصلوا على 169 أليلاً كان منها 165 أليلاً متعدداً شكلياً، وتراوح عدد الأليلات الإجمالية والمتعددة شكليا بين 7-26 أليلاً. كما بلغ متوسط عدد الأليلات لكل زوج من البادئات 13 أليلاً.

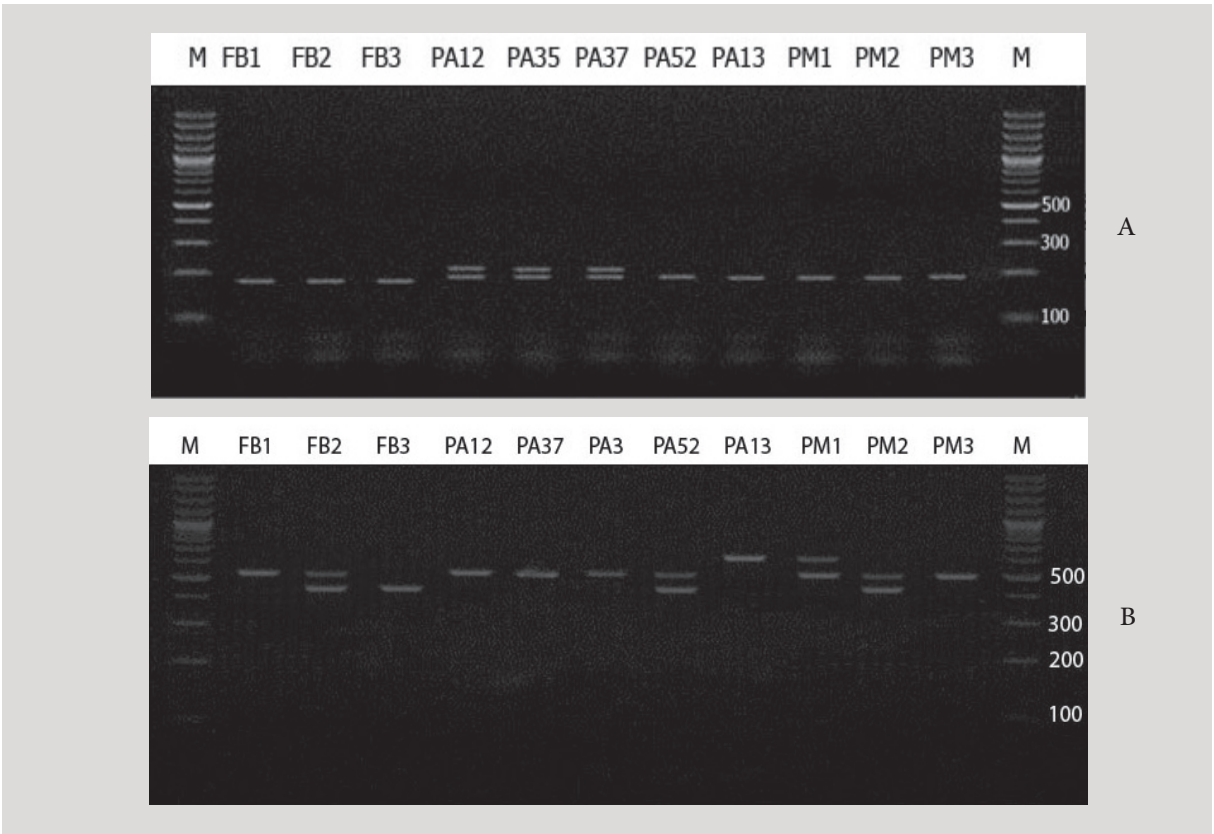
استطاعت أزواج البادئات EST-SSRs إعطاء نواتج تضخيم مميزة في الطرز ثنائية الجنس في البطم الأطلسي بالمقارنة مع مجموعة أزواج بادئات Ptms المطورة من جينوم الصنف الأمريكي كيرمان (Ahmad *et al.*, 2003) باستثناء البادئ Ptms-7 الذي أظهر السيادة المشتركة في الطرز ثنائية الجنس PA12, PA35, PA35، حيث اشتركت بإحدى الأليلات (182bp) مع الطرز المذكرة (PM1, PM2, PM3)، بينما اشتركت مع الطرز المؤنثة (FB1, FB2, FB3) بالأليل ذي الحجم 171 bp. كما أظهر البادئ EPVM016 السيادة المشتركة في كل من الطراز المؤنث PF2 وفي الطرازين المذكرين PM1 وM2 وكذلك في الطراز ثنائي الجنس PA13، ومن الأهمية بمكان الإشارة إلى أن الأليل ذا الحجم 624 bp في الطراز ثنائي الجنس PA13 كان مشتركاً مع الطراز المذكر PM1 (الشكل 4). أعطى البادئ EPVF019 (9) أليلات كانت جميعها متعددة شكلياً، كذلك أعطى البادئ EPVM021 (6) أليلات متعددة شكلياً، في حين لم تبد البادئات Ptms-11, Ptms-33, Ptms-40, Ptms-42 تعددية شكلية وأعطت أليلات وحيدة التكوين monomorphic. كما استطاع البادئ Ptms-3 إظهار السيادة المشتركة في الطراز المذكر PM3 فقط، مما يدل على أن هذا الطراز هجين.

وصل أكبر عدد من الأليلات في الطراز ثنائي الجنس PA37 إلى (22 أليلاً)، بينما ظهر أقل عدد من الأليلات في الطراز المؤنث FB3 والطراز ثنائي الجنس PA13 (17 أليلاً). ذكر (Dogan *et al.*, 2009) أن استخدام معلم SSR في دراسة الأنواع البرية للجنس *Pistacia* يعطي معلومات وراثية مهمة للدراسات المستقبلية.

تراوح حجم الأليلات الناتجة بين 76 bp عند استخدام البادئ Ptms-11 إلى 667 bp عند استخدام البادئ EPVF019. ذكر (Vendramin *et al.*, 2010) أنهم حصلوا على حجم أليلات تراوحت بين 766-213 bp في النوع *P.integerrima*، وبين 766-219 bp في النوع *P.terebinthus*.

الجدول (2): النسبة المئوية للتعددية الشكلية وعدد الأليلات الناتجة عن البادئات المختلفة

العدد	البادئ	عدد الأليلات	عدد الأليلات متعددة الأشكال	التعددية الشكلية%	حجم الأليلات (bp)
1	Ptms-3	3	3	100	129-138-154
2	Ptms-7	3	3	100	171-182-202
3	Ptms-9	2	2	100	116-125
4	Ptms-11	1	0	0	76
5	Ptms-14	3	3	100	108-113-117
6	Ptms-31	2	2	100	121-129
7	Ptms-33	1	0	0	176
8	Ptms-40	1	0	0	192
9	Ptms-42	1	0	0	183
10	Ptms-45	2	2	100	154- 163
11	EPVM021	6	6	100	101-113-147-307-338-491
12	EPVM016	3	3	100	488-550-624
13	EPVM056	3	3	100	300-375-520
14	EPVF019	9	9	100	112-120-161-196-202- 297-377-532-667
	SUM	40	35	87.5	
	AVE	2.86	2.5		



الشكل 4: الأليلات الناتجة عن استخدام أزواج بادئات الـ SSR (B: EPVM016, A: Ptms-7)
في الطرز المدروسة من النوع *P.atlantica*

التشابه الوراثي:

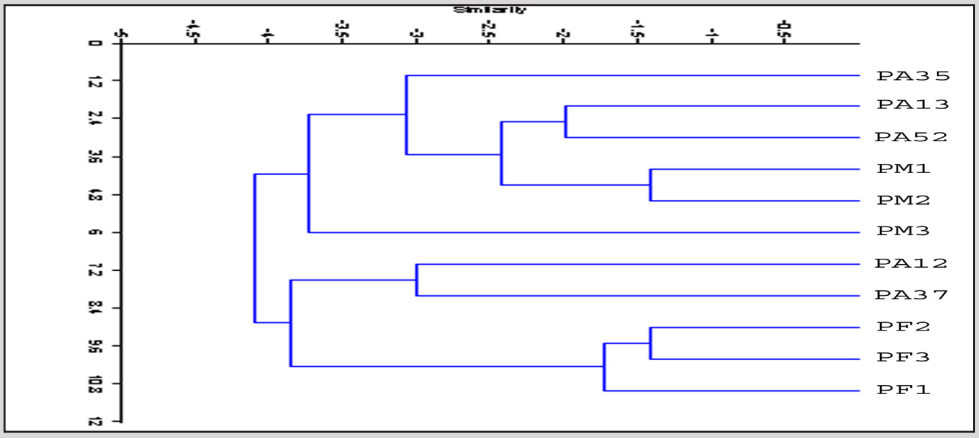
تراوحت نسبة التشابه الوراثي بين 0.3 بين الطرازين ثنائي الجنس PA37 وPA52، إلى 0.9 بين الطرازين المذكرين PM1 و PM2. وبلغت نسبة التشابه الوراثي بين الطرز المؤنثة والطرز المذكرة 0.318، فيما بلغت نسبة التشابه الوراثي بين الطرز المؤنثة والطرز ثنائية الجنس 0.456، كما بلغت نسبة التشابه الوراثي بين الطرز المذكرة والطرز ثنائية الجنس 0.508، في حين كانت نسبة التشابه الوراثي فيما بين الطرز ثنائية الجنس 0.514، وكانت فيما بين الطرز المؤنثة 0.755، وبين الطرز المذكرة 0.651 كما هو مبين في الجدول (3). درس ((Baghizadeh et al., 2010 31 صنفاً ونمطاً وراثياً من الفستق باستخدام معلمات الـ RAPD, ISSR, SSR حيث بلغ متوسط قيمة التشابه الوراثي في تقنية الـ SSR 0.4374 بين الطرز المدروسة.

الجدول (3): درجة التشابه الوراثي بين الطرز المدروسة اعتماداً على معادلة Jaccard

	PF1	PF2	PF3	PA12	PA37	PA35	PA13	PA52	PM1	PM2	PM3
PF1	1										
PF2	0.850	1									
PF3	0.842	0.895	1								
PA12	0.500	0.429	0.410	1							
PA37	0.482	0.464	0.440	0.650	1						
PA35	0.520	0.444	0.420	0.519	0.556	1					
PA13	0.423	0.407	0.380	0.379	0.367	0.696	1				
PA52	0.400	0.333	0.360	0.310	0.300	0.609	0.800	1			
PM1	0.370	0.310	0.290	0.379	0.367	0.560	0.727	0.710	1		
PM2	0.370	0.357	0.330	0.379	0.367	0.560	0.810	0.640	0.900	1	
PM3	0.440	0.370	0.350	0.444	0.379	0.520	0.4231	0.350	0.480	0.480	1

التحليل العنقودي:

قسم التحليل العنقودي اعتماداً على طريقة UPGMA وفقاً لمعامل Jaccard الطرز المدروسة إلى مجموعتين رئيسيتين (الشكل 5)، حيث انقسمت المجموعة الأولى إلى ثلاث تحت مجموعات، ضمت تحت المجموعة الأولى الطراز ثنائي الجنس PA35، في حين انقسمت تحت المجموعة الثانية إلى وحدتين، ضمت الوحدة الأولى الطرازين ثنائي الجنس PA52, PA13 وهذان الطرازان يتميزان باحتواء النورات فيهما على أزهار خنثى بنسبة 95-98 %. وضمت الوحدة الثانية الطرازين المذكرين PM2 ,PM1. ووقع الطراز PM3 مستقلاً تحت المجموعة الثالثة. فيما ضمت المجموعة الثانية تحت مجموعتين شملت الأولى منهما الطرازين ثنائي الجنس PA37 وPA12، علماً أن الطراز PA12 يحتوي على نورات مؤنثة بنسبة 50%، والطراز PA37 يحتوي على أزهار مؤنثة إلى جانب الأزهار ثنائية الجنس. في حين انقسمت تحت المجموعة الثانية إلى وحدتين، شملت الوحدة الأولى الطرازين المؤنثين PF2 و PF3، في حين وقع الطراز المؤنث PF1 مستقلاً في الوحدة الثانية.



الشكل 5: التحليل العنقودي للطرز المدروسة من البطم الأطلسي (مذكرة ومؤنثة وثنائية الجنس) اعتماداً على معامل Jaccard

وبهدف تقييم كفاءة تقنية الـ SSR في كشف التباينات الوراثية فقد تم تقدير كل من معدل التغاير المورثي الملاحظ Ho، ومعدل التغاير المورثي المتوقع He ودليل الواسم MI. حسبت قيمة Ho اعتماداً على البادئات التي أظهرت السيادة المشتركة من مجموع البادئات المستخدمة وهي 0.357، وبالنسبة للتغاير المورثي المتوقع He فقد بلغت قيمته (0.672).

كانت النتائج أعلى بالمقارنة مع دراسة (Vendramin *et al*., 2010)، حيث بلغ متوسط نسبة الأنماط مختلفة اللواقح المتوقعة 0.27 ومعدل التغاير المورثي الملاحظ 0.31 عند دراسة الأنواع البرية (*P. terebinthus – P. integerrima*) باستخدام تقنية الـSSR، وهذا يدل على التنوع والاختلاف الوراثي الكبير بين الطرز المدروسة من البطم الأطلسي. أما دليل الواسم MI فقد بلغت قيمته 23.52. كما بينت قيم Chi square للبادئات Ptms-7 و EPVM021 و EPVF019 و EPVM016 أن الفروقات كانت غير معنوية بين عدد الأليلات الملاحظة وعدد الأليلات المتوقعة وفق قانون ماندل حيث كانت على التوالي (5.706 و 5.344 و 5.881 و 5.745)، وهي أقل بالمقارنة مع القيمة الجدولية (5.991) عند مستوى ثقة 95 % ودرجة حرية 2، في حين كانت الفروقات معنوية بين عدد الأليلات الملاحظة والمتوقعة باستخدام البادئات الأخرى، وأعطت أزواج البادئات Ptms-33 و Ptms-40 و Ptms-42 أليلات وحيدة التكوين monomorphic وبالتالي لم تخضع لقانون الوراثة الماندلية.

دلت النتائج على الدور الفعال وكفاءة تقنية الـ SSR في كشف التباينات الوراثية ضمن الطرز المختلفة من النوع المدروس (*P. atlantica* Desf.)، حيث أعطت البادئات المستخدمة (EST-SSRs, Ptms-SSRs) نواتج تضخيم واضحة وبنسبة تعددية شكلية مرتفعة مشيرة إلى التنوع الوراثي الكبير ضمن النوع المدروس (*P.atlantica* Desf.)، خاصة أن بعض البادئات أعطت مواقع خاصة بالطرز ثنائية الجنس والتي قد يكون لها دور في المستقبل في فهم آلية وراثة الجنس ضمن النوع النباتي المدروس، إضافة إلى الكشف عن مواقع مضاعفة التكرارات على طول الجينوم، وكذلك مواقع ذات سيادة مشتركة، والذي يعود إلى الانعزالات الوراثية الناتجة عن التكاثر البذري للكثافات النباتية الطبيعية، وكذلك الخلط الوراثي الناتج عن التصالبات الطبيعية نتيجة التلقيح الخلطي ضمن النوع الواحد أو بين الأنواع، خاصة مع وجود طرز وراثية تبدي مواصفات مختلفة عن البطم الأطلسي، قد تنتمي لأنواع برية أخرى ضمن الجنس *Pistacia*، وبالتالي تشكيل هجن وراثية غير محددة الآباء ضمن مناطق الانتشار الطبيعي للأنواع البرية. ولابد من تعميق الدراسات الجزيئية باستخدام المعلمات الجزيئية المختلفة بهدف فهم وتوضيح آلية توريث الجنس ضمن النوع المدروس وتحديد العلاقات الوراثية المختلفة فيما بينها.

المراجع

الحجار، نجوى متعب؛ و مزهر، بيان؛ وحامد، فيصل. 2009. التنوع الوراثي في الجنس Pistacia في محافظة السويداء، رسالة ماجستير، كلية الزراعة، جامعة دمشق، سوريا.

Abdelkader, Y., Latifa, E., and Benyounes, H. 2009. Etude biologique de *Pistacia atlantica* Desf. de la region orientale du Maroc. Biomatec Echo. 3(6): 39-49

Ahmad, R., Ferguson, L., and Southwick, S. 2003. Identification of pistachio (*Pistacia vera* L.) nuts with microsatellite markers. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 128(6): 898-903

Ahmad, R., Ferguson, L. and Southwick, S. 2005. Molecular marker analysis of pistachio rootstocks by simple sequence repeat and sequence-related amplified polymorphism. Journal of Horticultural Science and Biotechnology. 80(3): 382-386

Alhajjar, NM., Muzher, BM., and Hamed, F. 2011. Morphological and molecular characterization of *Pistacia atlantica* Desf. in the South of Syria/ Swaida province. Jordan Journal of Agricultural Sciences. 7(3): 458-472

Alvarez, R., Encina, A., and Hidalgo, NB. 2008. *Pistacia terebint* L. leaflets: An anatomical study. Pl Syst Evol. 272: 107-118

Baghizadeh, A., Noroozi, S.h., and Javaran, M.J. 2010. Stud on genetic diversity of some Iranian pistachio (*Pistacia vera* L.) cultivars using random amplified polymorphic DNA RAPD), inter sequence repeat (ISSR) and simple sequence repeat (SSR) markers: A comparative study. African Journal of Biotechnology. 45: 7632-7640

Belhadj, S., Derridj, A., Civeyrel, L., Gers., Ch., Aigouy, Th., Otto, Th., and guaquelin, Th. 2007. Pollen morphology and fertility of wild atlas pistachio (*Pistacia atlantica* Desf. Anacardiaceae). Grana. 46: 148-156

by simple sequence repeat markers. 5th International Symposium on Pistachios and Almonds. ISHS- Sanliurfa- Turkey, Oct. 06-10. Abstr., P: 84

Karimi, HR., Zamani, Z., Ebadi, A., and Fatahi, MR. 2009. Morphological diversity of *Pistacia* species in Iran. Genet-Resour Crop Evol. 56: 561-571

Karp, A., Kresovich, S., Bhat, KV., Ayada, WG., and Hodgkin, T. 1997. Molecular tools in plant gentic resources conservation: a guide to the technologies. IPGRI technical bulletin No2. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy.

Monjauze, A. 1980. Connaissance du "betoum" *Pistacia atlatica* Desf. Rev. For. Fr. 32: 357-363

Padulosi, S., Caruso, T., and Barone, E. 1996. Taxonomy, distribution, conservation and uses of *Pistacia* genetic resources. Palermo, Italy. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy. 1996. P: 69

Parfit, D.E., and Badenes, M.L. 1997. Phylogeny of the genus *Pistacia* as determined from analysis of the chloroplast genom. The National Academy of Science of the USA. 94(15): 7987-7992

Porebski, S., Bailey, G.L., and Baum, B.R. 1997. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. Plant Molecular Biology Reporter. 15(1): 8-15

Pourreza. M., Shaw, J.D., and Zangeneh, H. 2008. Sustainability of wild pistachio (*Pistacia atlantica* Desf.) in Zagros forests, Iran. Forest Ecology and Management. 255: 3667-3671

Powell, W., Morgante, M., Andre, C., Hanafey, M., Vogel, J., Tingey, S., and Rafalski, A. 1996. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. Mol. Breed. 2: 225-228

Turkeli, Y. and Kafkas, S. 2013. First linkage map in pistachio constructed using an interspecific cross between *Pistacia vera* L. and monoecious *Pistacia atlantica* Desf. Scientia Horticulturae. 151: 30-37

Dogan, Y., Zaloglu, S., and Kafkas, S. 2009. Transferability of SSR markers in *P.vera* to the other *Pistacia* species. 5th International Symposium on Pistachios and Almonds. ISHS- Sanliurfa- Turkey. Oct. 06-10. Abstr., P: 83

Gercheva, P., Zhivondov, A., Nacheva, L., and Avanzato, D. 2008. Transsexual forms of pistachio (*Pistacia terebinthus* L.) from Bulgaria biotechnological approaches for preservation, multiplication inclusion in selection programs. Bulgarian Journal of Agricultural Science. 14(5): 449-453.

Ghazanfari, H., Namiranian, M., Sobhani, H., and Mohajer, RM. 2004. Traditional forest management and its application to encourage public participation for sustainable forest management in the Northern Zagroz Mountains of Kurdstan province, Iran. Scond. J. For. Res. 4: 65-71

Isfendiyaroglu, M. 2007. Hermaphroditism in *Pistacia atlantica* Desf. A new report from Izmir/ Turkey. Ege Univ. Ziraat Fak. Derg. 44(3): 1-12

Jaccard, P. 1908. Nouvelles recherches sur la distribution. Florale. Bull Soc Vaud Sci Nat. 44: 223-270

Jones, CJ., Edwards, K.J., Castrglione, S., Winfield, M.O., Sale, F., Van de Wiel, C., Bredemeijer, G., Buiatti, M., Maestri, E., Malcevshi, A., Marmiroli, N., Aert, R., Volckaert, G., Rueda, J., Linacero, R, Vazquez, A., and Karp, A. 1999. Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a network of European laboratories. Molecular Breeding. 3: 381-390

Kafkas, S. 2002. Developing of monoecious pistachio (*P.vera* L.) population and the sex determination mechanism in *Pistacia* by crossbreeding. Acta Horticulturae. 591: 285-289

Kafkas, S., Acar, I. and Gozel. H. 2005. A project on developing monoecious pistachio (*P.vera* L.) population and determination of sex mechanism in *Pistacia*. Options Mediterraneennes: Serie A. Seminaires Mediterraneens. 63: 57-60

Kafkas, S., Dogan, Y. and Zalogiu, S. 2009. Phylogenetic analysis in the genus *Pistacia*

Vendramin, E., Aparicio Gallego, J., Micalli, S., Giovinazzi, J., Verde, I., Dettori, M.T., and Quarta, R. 2010. Development and Characterization of fourteen EST-SSRs from *Pistacia vera* L. inflorescence transcriptome. Molocular Ecology Resources. P: 1-7

Zaloglu, S., Dogan, Y., and Kafkas, S. 2009. Development of microsatellite marker in P. *vera*. 5th International Symposium on Pistachios and Almonds. ISHS- Sanliurfa-Turkey, Oct. 06-10. Abstr., P: 82

Zaloglu, S., Kafkas, S., Dogan, Y., and Guney, M. 2015. Development and characterization of SSR markers from pistachio (*Pistacia vera* L.) and their transferability to eight *Pistacia* species. Scientia Horticulturae. 189(25): 94-103

Genetic Similarity among Female, Male, and Bisexual Genotypes of *Pistacia atlantica* Desf. Using SSR Technique

Najwa Motaeb Alhajjar and Bayan Mohammed Muzher

General Commission for Scientific Agricultural Research, Syria

Received 7 April 2015 - Accepted 14 January 2016

ABSTRACT

All *Pistacia* species are dioecious, male and female flowers are born on different trees. The recent studies identified new bisexual genotypes of *P. atlantica* with different structure of clusters and flowers in the South of Syria. Hence, our research aimed to assess genetic variation using SSR technique (Simple Sequence Repeat). The research was conducted at the General Commission of Scientific Agricultural Research using 15 SSR primer pairs, 14 of them were able to detect the polymorphism, which revealed 40 putative alleles, 35 of them were polymorphic (87.5%). Allele's number ranged from 1 to 9, with an average 2.86 allele per locus. Genetic similarity among all studied genotypes ranged from (0.3) between the two bisexual genotypes PA37 and PA52, to (0.9) between the two male genotypes PM1 and PM2. Genetic similarity between bisexual and female genotypes was 0.456, while the genetic similarity between bisexual and male genotypes was 0.508. Cluster analysis using UPGMA method (Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Averages) according to Jaccard coefficient clustered all genotypes into two main clusters, the first cluster contains some of the bisexual genotypes and male genotypes, while the other cluster includes the remains bisexual genotypes and female genotypes. To estimate the efficacy of SSR technique, each of observed heterozygosity (Ho), expected heterozygosity (He), and marker index (MI) were calculated, Ho (0.357), He (0.672), MI (23.52). The results showed the importance and the efficacy of SSR technique by revealing the genetic variation among *P.atlantica* genotypes, since some primer pairs revealed special alleles in bisexual *P.atlantica* genotypes which may help to understand the mechanism of sexual inheritance within the studied species.

Key Words: Bisexual genotypes, Genetic similarity, *P.atlantica,* SSR technique