مجلة جامعة تشرين للبحوث والدراسات العلمية _ سلسلة العلوم البيولوجية المجلد (30) العدد (4) 2008
Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies - Biological Sciences Series Vol. (30) No. (4) 2008

التوصيف الجزيئي لبعض الطرز المحلية من الورد الدمشقي (*Rosa damascena Mill*) باستخدام تقنية RAPD

سوسن عباس [*]
الدكتور مازن نصور [**]
أنس خنشور [***]
الدكتور أحمد عبد القادر [****]

(تاريخ الإيداع 24 / 7 / 2008. قبل للنشر في 2008/9/22)

□ الملخّص □

هدف هذا البحث الى اجراء التوصيف الجزيئي ودراسة درجة التباين والقرابة الوراثية بين عدد من الطرز المحلية من الورد الدمشقي *Rosa damascena* باستخدام تقنية RAPD المعتمدة على المكاثرة العشوائية لقطع الدنا المتباينة. تم استخلاص الدنا DNA الكلي من العينات، وأجري التفاعل التسلسلي البوليمرازي (PCR) مع 24 بادئة Primer من شركة VBC-Genomics. أظهرت 19 بادئة من أصل 24 بادئة منها كفاءة في كشف تباينات بين الطرز المدروسة، إذ أظهرت هذه البادئات 210 حزمة كلية متباينة بنسبة 87.6 %. وفي طرز الورد الدمشقي، بلغ العدد الكلي للحزم 143حزمة وكانت نسبة التباين الوراثي 62.9%. أمكن تحديد بادئات تسمح بتمييز أنواع الورد الثلاثة المدروسة، وتحديد بادئات أخرى لتمييز طرز الورد الدمشقي المتباينة و المجموعة من مناطق مختلفة. أظهرت النتائج كفاءة التقنية المستخدمة في إظهار فروقات واضحة بين الطرز المدروسة المأخوذة من مناطق مختلفة، ومكنت من رسم شجرة القرابة لها.

الكلمات المفتاحية: الورد الدمشقي– التوصيف الجزيئي– تقانة RAPD.

[*] طالبة دراسات عليا (ماجستير) – قسم البساتين . كلية الزراعة . جامعة تشرين . اللاذقية . سورية.
[**] مدرس – قسم البساتين . كلية الزراعة . جامعة تشرين . اللاذقية . سورية .
[***] مساعد باحث – قسم التقانات الحيوية – الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية– – دوما– دمشق– سورية.
[****] رئيس قسم التقانات الحيوية . الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية . دوما . دمشق . سورية .

مجلة جامعة تشرين للبحوث والدراسات العلمية _ سلسلة العلوم البيولوجية المجلد (30) العدد (4) 2008
Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies - Biological Sciences Series Vol. (30) No. (4) 2008

Molecular characterization of some local genotypes of Damask rose (*Rosa damascena Mill*) using RAPD technique

Sawsan Abbas [*]
Dr. Mazen Nassour [**]
Anas Khanshour [***]
Dr. Ahmad Abdul-Kader [****]

(Received 24 / 7 / 2008. Accepted 22/9/2008)

□ ABSTRACT □

The aim of the present study was the molecular characterization and the evaluation of variability and genetic relationship of some *Rosa damascena* genotypes using PCR-based RAPD technique. Total DNA was isolated from young green leaves of samples followed by running PCR reactions using 24 random primers. Polymorphism of investigated genotypes was observed in reactions with 19 tested RAPD primes which gave repeatable polymorphic products producing a total of 210 bands. The level of polymorphism amounted to 87.6% in the whole genotypes studied, while it amounted to 62.9% in case of *R. damascena* with a total of 143 bands.

Results proved that RAPD was an efficient technique in discriminating between the studied genotypes collected from different areas and representing the genetic relationships in the form of dendrogramm.

Key words: *Rosa damascene Mill*.; Molecular Characterization; RAPD.

[*]**Postgraduate Student. Horticulture, Faculty of Agriculture, Tishreen Universit, Lattakia, Syria.**
[**]**Assistant Professor, Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Tishreen University, Lattakia, Syria.**
[***] **Assistant Researcher, at GCSAR- Biotechnology Dept, Douma, Damascus, Syria**
[****]**Head of Biotechnology Department, General Commission for Scientific Agricultural Research (GCSAR) – Douma, Damascus, Syria**

مقدمة:

ينتمي جنس الورد Rosa إلى العائلة الوردية *Rosaceae*، ويضم هذا الجنس ما يزيد على 200 نوع تحوي أكثر من 18000 طراز (Gudin 2000)، ويعد نوع الورد الدمشقي *Rosa damascene Mill.* من أهم هذه الأنواع، ويعتقد أن الموطن الأصلي له هو المناطق الغربية من الشرق الأوسط (Widrlechner1981)، وبناء على الدراسات الحديثة، فقد اقترح Iwata وزملاؤه (2000) أن يكون الأصل الأبوي له هي الأنواع *R. moschata, R. gallica, R. fedschenkoan* .

تأتي الأهمية الاقتصادية للورد الدمشقي من استخدامه في صناعة العطور المستخرجة من بتلات الأزهار وكذلك تصنيع ماء الورد وبعض المركبات التجميلية، بالإضافة لمنكهات الطعام (Widrlechner 1981)، وتعد كل من بلغاريا وتركيا المصدر الرئيسي عالمياً لزيت الورد (Baydar *et al.* 2004)، كما بدأت مؤخراً كل من إيران والهند بزراعة هذا النوع على مستوى إنتاجي، وتشير الدراسات الطبية الحديثة أن لزيت الورد الدمشقي دوراً فعالاً كمضاد للأكسدة وقاتل قوي للميكروبات (Ozkan et *al*. 2004; Ardogan *et al*. 2002;Achuthan *et al.* 2003 و Basim and Basim 2003).

محلياً يزرع الورد الدمشقي في حقول كبيرة على مستوى تجاري في منطقة المراح– النبك بهدف إنتاج الأزهار وأيضاً لاستخراج ماء الورد. كما يزرع كسياج حول بساتين أشجار الفاكهة في مناطق عديدة من ريف دمشق مثل دوما والريحان. وتنتشر زراعته بشكل محدود في بعض المشاتل والحدائق المنزلية لأغراض تزيينية.

يعد توظيف تقانات المؤشرات الجزيئية في توصيف النباتات على مستوى الدنا DNA أداة فعالة، خاصةً أنها لا تتأثر بالظروف الخارجية أو المحيطة، وتظهر تباينات يمكن أن تفيد في رسم الخرائط الوراثية وتمييز الأفراد عن بعضها، وتحديد درجات القرابة ودراسة التطور الوراثي لهذه النباتات

(Debener and Mattiesch 1998 وThomas *et al*. 1993)، بالإضافة إلى أن نتائج هذه المؤشرات بما تظهره من تباينات وراثية يمكن أن توظف بشكل فعال جداً في برامج التربية والتحسين الوراثي (Kiani et al. 2008 وBaydar et al. 2004). وقد استخدمت المؤشرات الجزيئية بشكل واسع في التوصيف الوراثي لنباتات الورد بشكل عام والورد الدمشقي بشكل خاص

(Habbared *et al*. 1992, Torres *et al.* 1993, Reynders and Bollereau 1996, Esselink *et al*. 2003, Baydar *et al.* 2004, Wen *et al*. 2004, Rusanov *et al*. 2005, Babaei *et al.* 2007).

ومن بين المؤشرات الجزيئية المختلفة أخذت تقنية الـ RAPD التي طورت من قبل Williams et *al*. (1990) و Welsh and McClelland (1990) أهمية تطبيقية لكشف التباينات الوراثية، لبساطتها وانخفاض تكاليفها مقارنة مع المؤشرات الأخرى، بالإضافة إلى أنها تحتاج كمية قليلة من الدنا

(Caetano-Anolles *et al.* 1991, Hadrys *et al*. 1992, Upadhyay *et al*. 2004)، وقد أثبتت هذه التقنية فعاليةً عاليةً في توصيف طرز مختلفة من الورد الدمشقي المجموعة من مناطق مختلفة ودراسة علاقتها ببعضها.

(Torres *et al*. 1993, Cubero *et al*. 1996, Jan and Byrne 1999, Reynders and Bollereau 1996, Debener and Mattiesch 1998, Kiani *et al*. 2008).

تجدر الإشارة إلى أنه يؤخذ على هذه التقنية عدم ثباتية النتائج عند تكرارها في نفس المخبر أحياناً أو بين المخابر، بمعنى عدم إمكانية الحصول على نفس النتائج حتى داخل المخبر الواحد نظراً لتأثرها بعوامل تقنية عديدة (عامر 2001)، إلا أن بعض العاملين في هذا المجال (Pujar *et al.* 1999 و .Lin *et al*.1996) يعتقدون بإمكانية التغلب على هذه المشاكل عن طريق استخدام درجة الحرارة المثلى لكل بادئة، و بعض المراجع تؤكد تكرارية مقبولة (Rafalski 1997)، كما أن بعض الباحثين يذكر ثباتية نتائج بعض البادئات مع إعادة تكرار التجربة Kiani (2008).

وفي هذا البحث، تم اجراء التوصيف الجزيئي لطرز مختلفة من الورد ودراسة التنوع الوراثي الموجود في بعض مجتمعات الورد ومقارنة نوع الورد الدمشقي مع النوع البري *R. canina* والورد الهجين.

أهمية البحث وأهدافه:

تأتي أهمية هذا البحث لما يتمتع به الورد الدمشقي محلياً من إمكانية توسيع زراعته في مناطق جغرافية متنوعة ومقومات اقتصادية وطبية وجمالية، الأمر الذي يفرض حاجة ملحة للاهتمام بتوصيفه محلياً وحفظ مصادره الوراثية والتوسع في زراعته وتوظيف كل ذلك ضمن برامج تربية وإكثار لهذا المصدر الوراثي الهام في سورية.

وقد هدف البحث الى ما يلي:

1.التوصيف الجزيئي لطرز مختلفة من الورد مجموعة من مناطق جغرافية متعددة في محافظة ريف دمشق واللاذقية ودراسة التنوع الوراثي الموجود في بعض مجتمعات الورد.

2.مقارنة نوع الورد الدمشقي مع النوع البري R. canina المنتشر في منطقة صلنفة (اللاذقية)، نظراً لما يتمتع به من خصائص مميزة تجعله في مقدمة الأصول المستخدمة عالمياً.

طرائق البحث ومواده:

– مكان تنفيذ البحث: أجري هذا البحث في الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية – قسم التقانات الحيوية بدوما خلال الفترة 2007–2008 بالتعاون مع قسم البستنة – كلية الزراعة – جامعة تشرين.

– المادة النباتية: تمت هذه الدراسة على 14طرازاً وراثياً منها 9 طرز تتبع لنوع الورد الدمشقي *Rosa damacsena Mill.* وثلاثة تنتمي للنوع *Rosa canina* وطرازان من الورد الهجين *Rosa hybrida cvs.*، حيث تم تمييز هذه الأنواع على أساس الأزهار والصفات المورفولوجية المميزة للنوع وخاصة الأزهار (الشكل رقم 1).

Rosa hybrida -C	*Rosa canina-B*	*Rosa damacsena L.-A*

الشكل رقم (1): الأنواع المستخدمة في البحث: *Rosa damacsena Mill. -A، Rosa canina -B، Rosa hybrida -C*

جمعت عينات الورد المدروسة من مناطق جغرافية متباعدة في كل من منطقة ريف دمشق واللاذقية كما هو مبين في الجدول رقم (1). حيث تم أخذ نموات ورقية فتية من كل نبات على حده، وبعد تنظيفها وغسلها بالماء المقطر وتجفيفها، تم حفظها في الآزوت السائل، ثم تخزينها على حرارة – 80 درجة مئوية إلى حين استخلاص الدنا منها.

الجدول (1). رموز ونوع وأماكن جمع عينات الورد المدروسة

متسلسل	رمز العينة	نوع الورد	مكان الجمع
1	RD1-RD2	*R. hybrida*	نباتان مختلفان من حديقة مركز البحوث الزراعية في بوقا – اللاذقية
2	RE1-RE2-RE3	*R. damacsena*	ثلاث نباتات مختلفة بعمر أكثر من عشر سنوات من سياج حقل واحد لمزارع في منطقة الريحان في ريف دمشق
3	RDA12- RDA13-RDA14	*R. damacsena*	ثلاث نباتات مختلفة بعمر أكثر من عشر سنوات من سياج حقل واحد لمزارع في منطقة دوما في ريف دمشق.
4	RDM9 –RDM5 –RDM1	*R. damacsena*	ثلاث نباتات مختلفة بعمر أكثر من عشر سنوات من ثلاثة حقول لإنتاج الورد في منطقة المراح – النبك – ريف دمشق
5	RC7-RC8-RC10	*R .canina*	ثلاث نباتات مختلفة بعمر أكثر من عشر سنوات تنمو بشكل بري على جانب الطريق صلنفة– اللاذقية.

– استخلاص الدنا DNA: تم استخلاص الدنا الكلي من العينات المدروسة حسب (Hormaza *et al*. 1999)، بعدها تم اختبار نوعيتها بواسطة هلامة أغاروز 1%، كما تم قياس تركيز الدنا بواسطة جهاز قياس الطيف الضوئي وحساب النسبة المعبرة عن نقاوة الدنا المستخلص والتي تراوحت بين 1.62–1.83.

- مكاثرة الدنا DNA باستخدام تقنية RAPD:

استخدم جهاز التفاعل التسلسلي للبوليميراز PCR من نوع Mastercycler-Eppendorf . تم اجراء التفاعل لكل عينة بحجم كلي 20 µl يحوي 50 ng من الـ DNA، محلول واقي 1X ، 1.75 mM MgCl2، 200 µM من مزيج الأسس النيكليوتيدية dNTPs، و 0.2 µM من البادئة مع وحدة واحدة من أنزيم البوليميراز (Gold Tag®)، وأجري التفاعل حسب البرنامج المبين في(الجدول 2) وقد استخدمت 24 بادئة من شركة VBC-Genomics (الجدول 3).

الجدول(2): برنامج الـPCR المستخدم

عدد الدورات	الزمن	الحرارة/ درجة مئوية
1	2 دقيقة	94
35	45 ثانية	92
	1 دقيقة	36
	2 دقيقة	72
1	5 دقيقة	72
حفظ	لا نهاية	4

الجدول (3): التسلسل النكليوتيدي للبادئات (Primers) المستخدمة في الدراسة

اسم البادئ	التسلسل النيكلوتيديَ3-َ5	اسم البادئ	التسلسل النيكلوتيديَ3-َ5	اسم البادئ	التسلسل النيكلوتيديَ3-َ5
A-01	CAG GCC CTT C	A-02	TGC CGA GCT G	A-04	AAT CGG GCT G
A-05	AGG GGT CTT G	A-07	GAA ACG GGT G	A-08	GTG ACG TAG G
A-10	GTG ATC GCA G	B-01	GTT TCG CTC C	B-03	CAT CCC CCT G
B-04	GGA CTG GAG T	B-06	TGC TCT GCC C	B-12	CCT TGA CGC A
B-16	TTT GCC CGG A	B-17	AGG GAA CGA G	C-03	GGG GGT CTT T
C-04	CCG CAT CTA C	C-12	TGT CAT CCC C	C-14	TGC GTG CTT G
C-15	GAC GGA TCA G	E-14	TGC GGC TGA G	E-15	ACG CAC AAC C
E-20	AAC GGT GAT C	F-04	ACT CCT GCG A	J-05	CTC CAT GGG G

- تظهير نواتج تفاعل الـ PCR :

تـم فصـل نـواتج التفاعـل بواسـطة جهـاز الـرحلان الكهربـائي، باسـتخدام هلامـة مـن الأغـاروز مـن شـركة Amersham Bipsciances, Sweden بتركيز 2,5 %، تحتوي على الإيثيديوم بروماید 0,5 µg/ml ، ومحلول رحلان 1xTBE buffer، وتطبيق جهد كهربائي مقداره 80 فولت ولمدة ساعتين ونصف، ثم تم تصوير الهلامة بتعريضها للأشعة فوق البنفسجية باستخدام .Geldoc من شركة LABORATECHNIK، حيث ظهرت قطع الـ DNA المكاثرة على شكل حزم مضيئة على الهلامة.

- **تحليل النتائج:**

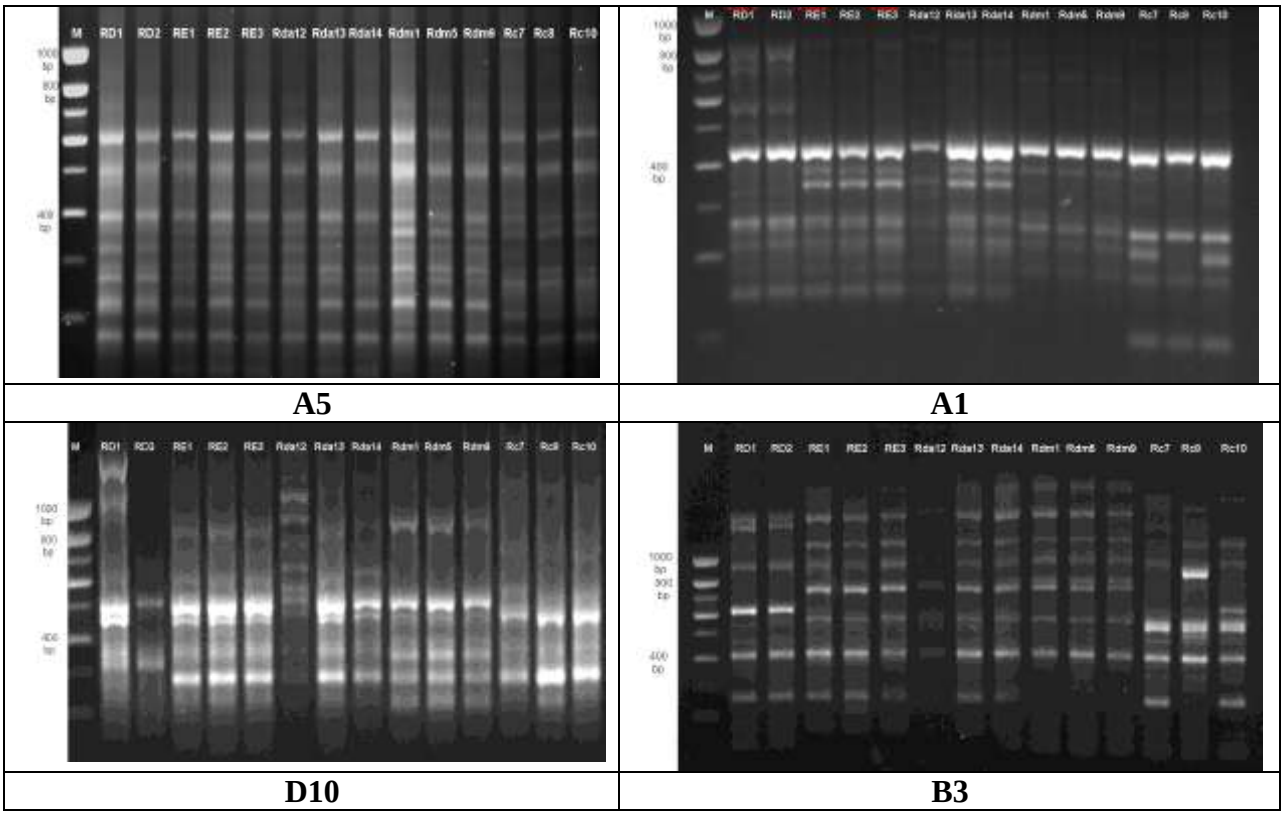
استخدمت في التحاليل فقط الحزم الواضحة والتي تتصف بالتكرارية وذات الوزن الجزيئي بين 100 bp و1.8kb حيث أعطيت الحزمة الموجودة رقم 1 والحزمة الغائبة رقم 0. وتم معالجة البيانات إحصائياً باستخدام برنامج DARwin5.0.155 حسب (Perrier and Jacquemoud-Collet 2006)، وتمت دراسة القرابة الوراثية بين الطرز المدروسة من خلال معامل Jaccard (Jaccard, 1908).

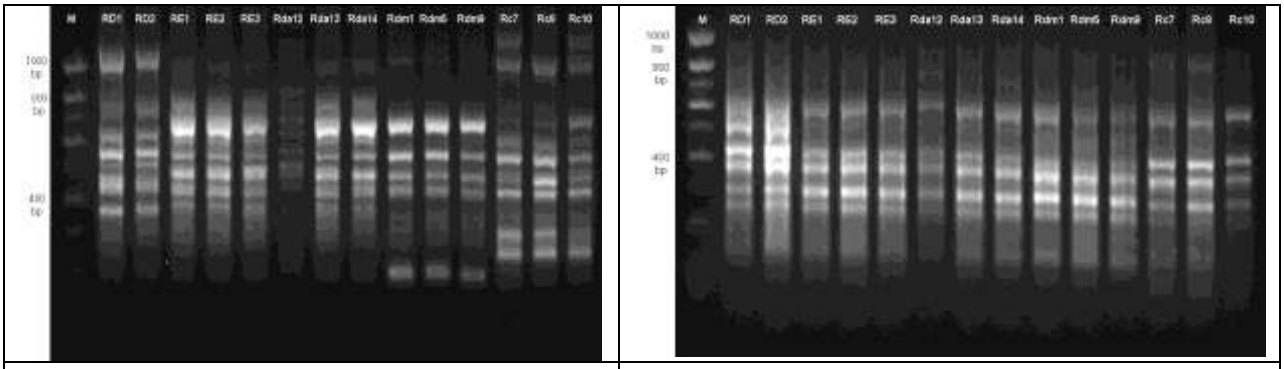
تم استخدام التحليل العنقودي الذي يعتمد على نسبة عدم التشابه الوراثي من خلال طريقة (UPGMA Method using Arithmetic Averages Unweighted Pair Group) وذلك لرسم شجرة القرابة الوراثية بين الطرز النباتية المدروسة على شكل عنقودي Dendogram.

النتائج والمناقشة:

سمحت جميع البادئات المستخدمة بمكاثرة الدنا، وأظهرت 19بادئة كفاءة عالية في كشف التباينات الوراثية بوضوح بين الطرز المحلية المدروسة (الشكل2).

بلغ العدد الكلي للحزم في طرز الورد الثلاثة المدروسة (دمشقي– هجين و *R.canina*) 210 حزم وبنسبة تباين وصلت إلى87.6 %. بينما بلغ العدد الكلي للحزم في طرز الورد الدمشقي 143حزمة وكانت نسبة التباين الوراثي 62.9%، وقد تراوح عدد الحزم باستخدام البادئة الواحدة بين 2 إلى 12 حزمة باستخدام البادئتين C3 و D10 على الترتيب (الجدول 4)، كما تراوح عدد الحزم الناتجة عن كل طراز من طرز الورد الدمشقي المدروسة بين 1و10 حزم.





E14	J5

الشكل(2): الرحلان الكهربائي لنواتج تفاعل الـ PCR في اختبار الـRAPD على هلامة اغاروز 2.5% للطرز المدروسة مع بعض البادئات: A1, A5, B3, D10, E14, J5.

الجدول رقم (4). عدد الحزم الناتجة ونسبة التباين بين الطرز المدروسة

البادئات	عدد الحزم الكلية	الحزم الخاصة بطرز الورد الدمشقي	عدد الحزم المتمايزة بين جميع الطرز	عدد الحزم المتمايزة بين طرز الورد الدمشقي	النسبة المئوية للاختلاف في جميع الطرز	النسبة المئوية للاختلاف في طرز الورد الدمشقي
A1	16	8	16	7	100.0	87.5
A2	11	7	8	4	72.7	57.1
A4	12	9	10	6	83.3	66.7
A5	12	10	6	2	50.0	20.0
A7	14	10	14	6	100.0	60.0
A8	15	10	14	6	93.3	60.0
A10	10	9	7	5	70.0	55.6
B1	6	7	5	3	83.3	42.9
B3	20	10	19	4	95.0	40.0
B4	11	9	10	8	90.9	88.9
B12	7	4	7	3	100.0	75.0
B17	12	7	10	3	83.3	42.9
C3	3	2	3	1	100.0	50.0
D10	16	12	16	10	100.0	83.3
E14	7	4	5	2	71.4	50.0
E15	6	4	6	4	100.0	100.0
E20	7	7	5	4	71.4	57.1
J5	18	11	18	10	100.0	90.9
F4	7	3	7	2	100.0	66.7
المجموع	210	143	186	90	%87.6	%62.9

وتم حساب مصفوفة التباين وفقاً لطريقة Jaccard، (الجدول5)، حيث أظهرت هذه المصفوفة مستوىً عالياً من البعد الوراثي بين الطرز المأخوذة من مناطق مختلفة من جهة وبين الأنواع المدروسة من جهة أخرى. وباستخدام طريقة UPGMA وعند قيمة 0.16 لمعامل التباين قسمت الطرز المدروسة بناء على مخطط شجرة القرابة إلى 4 مجموعات (الشكل 3)، كان أكبرها المجموعة A والتي ضمت الطرز التي تم جمعها من منطقتي دوما والريحان ضمن تحت مجموعة أولى شملت الطرز: (RDA14, RDA13, RE1, RE2-RE3)، وشملت الثانية الطراز :(RDA12) وبمعامل اختلاف منخفض تراوح بين 0.04 و0.01، بينما ضمت المجموعة B الطرز: (RDM9, RDM5, RDM1) والتي تم جمعها من منطقة المراح، وبقيمة منخفضة من معامل التباين بين هذه الطرز نفسها.

أما بالنسبة لطرز كل من النوعين *R. hybrida* و*R. canina* فقد انفصلت طرز كل منهما في مجموعة خاصة C و D على الترتيب، وبناء على مصفوفة التباين فإن أبعد طرازين عن بعضهما من ضمن طرز الورد الدمشقي المدروسة كان RDA12 و RDM9 حيث ارتفعت درجة التباين إلى 0.557، بينما كان أقرب طرازين لبعضهما هما RE1و RE3 حيث انخفضت درجة التباين إلى 0.021. أما مقارنة طرز النوع *R. canina* مع الطرز الأخرى، فقد أظهرت أن قيم التباين كانت أكبر ما تكون بين طرز هذا النوع وبقية الطرز من الورد الدمشقي (الجدول 5).

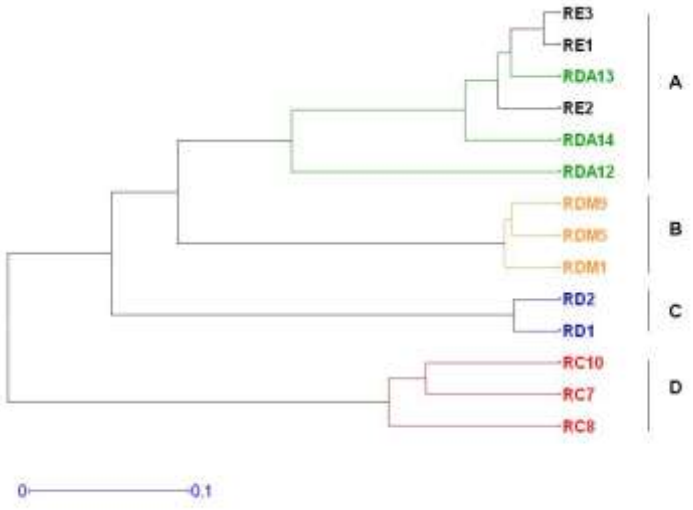
يظهر من الجدول 4 بأن هناك بادئات سمحت بتمييز أنواع الورد المدروسة عن بعضها، حيث إنها أعطت قطع DNA مميزة للطرز التابعة لنوع ما دون النوع الاخر. فعلى سبيل المثال، للتمييز بين أنواع الورد، أعطت البادئة B3 حزمة عند حجم 760 زوج قاعدي عند جميع طرز الورد الدمشقي فقط، ولم تعط أي قطعة في النوعين الآخرين، مما يعني إمكانية اعتماد هذه البادئة لتمييز الورد الدمشقي عن الأنواع الأخرى. ومن جهة أخرى، تميز النوع الهجين بحزمة تقدر بـ 630 زوجاً قاعدياً، بينما لم توجد هذه الحزمة في أنواع الورد الأخرى. أما الورد *R. canina* فقد تميز بحزمة عند مستوى 510 زوج قاعدي، بينما لم توجد هذه الحزمة في أنواع الورد الأخرى. وكذلك يمكن التمييز بين الأنواع بوساطة البادئة J5 الذي أعطى حزماً فريدة عند الأوزان الجزيئية 650 و 950 و 240 و 200 زوج قاعدي للورد الدمشقي من ريف دمشق (دوما والريحان) و الورد الهجين و الـ *R. canina* و الورد الدمشقي المزروع تجارياً في المراح، على التوالي.

من جهة أخرى، للتمييز بين الطرز ضمن النوع الواحد، يمكن الاعتماد على البادئة A1 لتمييز طرز الورد الدمشقي التي تمثل المجموعة A والتي تم جمعها من منطقة بيئية واحدة هي دوما والريحان، في حين غابت في طرز الورد الدمشقي من منطقة المراح والتي تم تمييزها بالبادئة D10 التي تعطي حزمة عند وزن جزيئي 820 زوجاً قاعدياً حيث إن هذه الحزمة غير موجودة في الطرز الأخرى لا الدمشقي الموجود في المناطق الأخرى ولا أنواع الورد الأخرى.

الجدول(5). قيم معامل عدم التشابه بين الطرز المدروسة

الطراز	RD1	RD2	RE1	RE2	RE3	RDA12	RDA13	RDA14	RDM 1	RDM 5	RDM 9	RC7	RC8
RD2	0.058	0											
RE1	0.508	0.516	0										
RE2	0.515	0.534	0.063	0									
RE3	0.515	0.523	0.021	0.062	0								
RDA12	0.570	0.568	0.336	0.363	0.348	0							
RDA13	0.496	0.504	0.052	0.110	0.071	0.324	0						
RDA14	0.496	0.515	0.119	0.154	0.136	0.313	0.070	0					
RDM1	0.642	0.651	0.484	0.504	0.492	0.516	0.448	0.424	0				
RDM5	0.630	0.648	0.480	0.500	0.488	0.557	0.444	0.419	0.069	0			
RDM9	0.648	0.657	0.475	0.508	0.484	0.555	0.451	0.426	0.070	0.061	0		
RC7	0.718	0.719	0.679	0.693	0.683	0.732	0.676	0.655	0.647	0.655	0.634	0	

0	0.222	0.639	0.640	0.652	0.697	0.709	0.755	0.716	0.725	0.712	0.733	0.732	RC8
0.208	0.168	0.654	0.654	0.667	0.693	0.705	0.734	0.712	0.721	0.708	0.711	0.710	RC10



الشكل رقم(3) شجرة القرابة بين الطرز المدروسة من الورد(Darwin 5.0)

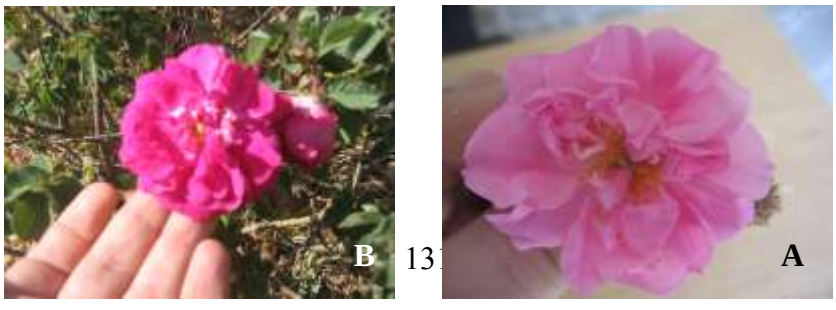
- المناقشة:

يقدم البحث الحالي دراسة حول التباين الوراثي في بعض الطرز المحلية المزروعة من الورد الدمشقي في أماكن انتشارها الرئيسة في دمشق وريف دمشق. فقد أظهرت التقنية المستخدمة في ظروف الدراسة الحالية مستوىً عالياً من التباين الوراثي بين الطرز المدروسة من الورد الدمشقي وتوافق ذلك مع ما توصل إليه (Kiani *et al.* 2008) ، لكن هذا لا يتوافق مع ما تم التوصل إليه في كلٍ من تركيا من قبل (Baydar *et al.* 2004) وكذلك في بلغاريا (Rusanov *et al.* 2005)، ولعل السبب يعود لكون الورد الدمشقي بالأصل نباتا مدخلاً الى بلغاريا ومن ثم إلى تركيا حيث توسعت زراعته هناك عن طريق إكثاره خضرياً مما يعطي نباتات متشابهة وغير متباينة وراثياً.

ولدى مقارنة متوسط نسب التباين الوراثي بين الطرز المحلية من الورد الدمشقي والتي وصلت قيمتها إلى 62.9% مع نسبة التباين الوراثي لجميع الطرز بما فيها النوع *R. canina* ، فنجد أن هذه النسبة ترتفع بشكل كبير

لتصل لمتوسط قدره 87.6 % ، وهذا يعكس إمكانية التمييز بين الأنواع بشكل كبير في جنس الورد باستخدام تقنية الـ RAPD، علماً أن كل الدراسات السابقة لم تقارن نوع الورد الدمشقي مع أي من الأنواع الأخرى من الورد. أمكن باستخدام ال 19 بادئة المستخدمة التمييز بوضوح بين أنواع الورد الثلاثة المدروسة (دمشقي– هجين و *R.canina*). فعلى سبيل المثال البادئة B3 وبناءً على مخطط شجرة القرابة المبينة في الشكل (3) أظهرت مستوىً عالياً من البعد الوراثي بين منطقتين جغرافيتين مختلفتين الأولى ضمت موقعين قريبين البعد بينهما 2 كم هما الريحان ودوما والمنطقة الثانية منطقة المراح التي تبعد عن دوما نحو 50 كم شمال شرق، بينما كان هناك تجانس عالٍ بين العينات المأخوذة من نباتات مختلفة من نفس الحقل في منطقة دوما وهي RDA12, RDA13, RDA14 والعينات المأخوذة من نباتات مختلفة من نفس الحقل في منطقة الريحان وهي: (RE1, RE2, RE3,) ضمن المجموعة A. كما وجد أيضاً تجانس عالٍ بين الطرز المأخوذة من منطقة المراح (RDM9, RDM5, RDM1) والتي جمعت ضمن المجموعة B. وهذا يدل على تشابه طرز الورد ضمن المنطقة الجغرافية الواحدة، حيث يمكن أن يعزى ذلك إلى كون العينات مجموعة من مناطق بيئية متماثلة ضمن دائرة قطرها حوالي 2 كم. تتوافق هذه المعطيات مع نتائج (Kiani *et al.* 2008) ، الذي لم يجد فروقا واضحة ضمن المنطقة الواحدة لطرز الورد الدمشقي المدروسة في إيران، بينما وجد فروقاً واضحةً بين المناطق المختلفة، وهذا على خلاف ما توصل اليه (Babaei *et al.* 2007) الذي لم يجد فروقاً حتى بين المناطق المختلفة، وأوضح أنه لا يوجد ارتباط بين البعد الوراثي من جهة والتباين الجغرافي من جهة أخرى، ولكي يتحدد ذلك لا بد من دراسة عدد كبير جداً من العينات للتمكن من تمييز انعزالات و قد يعزى سببها للتدفق الجيني (gene flow) الناتج عن التهجين او الظروف المناخية التي قد تقود لنوع من التمايز ضمن الطرز المدروسة، ولكن في دراستنا الحالية تبين وجود اختلافات كبيرة بين المناطق الجغرافية دوما والمراح على الرغم من انخفاض عدد العينات المدروسة وهذا يدل على التباين الوراثي العالي بين الطرز المدروسة، وقد تأيدت هذه التباينات بالملاحظات المورفولوجية وخاصة شكل ولون الزهرة (الشكل4)، وقد يعزى التجانس الكبير ضمن المنطقة الواحدة إلى طبيعة الإكثار حيث يعتمد على الاكثار الخضري بالخلفات التي تعطي نباتات متشابهة مع النبات الأم، أما التباين الحاصل بين المواقع الجغرافية البعيدة فيمكن أن يعزى إما لاختلاف منشأ الطرز المزروعة من جهة أو للانتخاب الطبيعي طويل الأمد المرتبط بالظروف البيئية والتي تعد قاسية في منطقة المراح، حيث الزراعة بعلية والتربة محدودة مقارنة بنمط الزراعة المروية في منطقة دوما والريحان.

أما لدى مقارنة طرز الورد الدمشقي مع طرز الورد *R. canina* تبيّن أن هناك اختلافاً كبيراً بحيث انفصلت طرز *R. canina* ضمن مجموع واحدة (D) عن طرز الورد الدمشقي، وهذا يؤكد التباين على مستوى النوع، وتدعم ذلك التباينات الشكلية سواء في شكل الزهرة ولونها ورائحتها وشكل النمو الخضري وفترة وطبيعة الازهار، كما يمكن التمييز بوضوح بين طرز الورد الدمشقي من منطقة دوما والريحان من جهة والورد الدمشقي من منطقة المراح وخاصة بشكل ولون الزهرة كما هو واضح في الشكل4.



الشكل(4): زهرة الورد الدمشقي : A الورد الدمشقي من منطقة دوما، B- الورد الدمشقي من منطقة المراح

الاستنتاجات و التوصيات:

أظهرت الدراسة الحالية إمكانية استخدام تقنية RAPD بشكل فعال لتمييز بعض الطرز المحلية من الورد الدمشقي وكذلك تمييز أنواع الورد بعضها عن بعض. و تجدر الإشارة أيضاً إلى أن هناك حاجة ملحة لتغطية التنوع الوراثي للورد مع عدد كبير من العينات وبشكل أوسع بحيث تشمل مناطق مختلفة بشكل كاف بغية إيجاد صورة أكثر شمولاً و وضوحاً حول التنوع الوراثي للورد في سورية.

كما مكنت هذه الدراسة من كشف تباينات ضمن طرز من الورد الدمشقي على المستوى الجزيئي، والتي يجب أن تدعم بقراءات مورفولوجية وإنتاجية، خاصة نسبة ونوعية الزيت العطري، وعندها ستكون هذه الطرز مادة خام لاستخدامها في برامج التربية والانتخاب المعتمدة على المؤشرات المتخصصة.

إن التوسع في دراسة الطرز المحلية من الورد الدمشقي المنتشر في مناطق جغرافية مختلفة هام جداً لاستكمال هذه الدراسة والحصول على بيانات متكاملة تعطي صورة أكثر وضوحاً عن انتشار هذا النبات ضمن بيئاتنا المحلية ومقارنتها مع طرز من إيران وتركيا وبلغاريا للوصول إلى الأصل التطوري لهذا النبات الطبي والتزييني الهام، وللعمل على توسيع عملية إكثار وزراعة الطرز المتميزة منه بشكل سريع باستخدام تقنية زراعة الأنسجة النباتية، حيث إن المتطلبات البيئية لهذا النبات ليست كثيرة ويمكن استغلال تأقلمه مع ظروف بيئية كثيرة للاستفادة من مساحات كبيرة من سورية لإنتاج زيت الورد الدمشقي كمنتج طبي يعادل الغرام منه ثمن غرام الذهب الخالص.

وتجدر الإشارة إلى أهمية تحليل إنتاج الزيت من الطرز المختلفة لتحديد ما إذا كانت هذه الأنماط الوراثية المختلفة تمتلك فروقاً كمية في إنتاج الزيت و/أو تركيب الزيت الرئيسي، وعند ذلك يمكن توسيع زراعة الأنماط الوراثية المتميزة لإنتاج زيت الورد واستخدامها في برامج التربية.

المراجع

1. ACHUTHAN, C.R.; BABU, B.H.; PADIKKALA,J. *Antioxidant and hepatoprotective effects of Rosa damascena*. Pharmaceutical Biology. 41**:** (2003), 357-361.

2. ARDOGAN B.C.; BAYDAR, H.; KAYA, S.; DEMIRCI, M.; OZBASAR, D.; MUMCU, E. *Antimicrobal activity and chemical composition of some essential oils*. Archives of Pharmaceutical Research. 25: (2002), 860-864.

3. BABAEI, A.; TABAEI-AGHDAEI, S.R.; KHOSH-KHUI, M.; OMIDBAIGI, R.; NAGHAVI, M.R.; ESSELINK, G.D.; SMULDERS, M.J.M. *Microsatellite analysis of Damask rose (Rosa damascena Mill.) accessions from various regions in Iran*

reveals multiple genotypes. BMC Plant Biology 7, 12 (doi:10.1186/1471- 2229-7-12). (2007),

4. BASIM, E.; BASIM. H. *Antibacterial activity of Rosa damascena essential oil*. Fitoterapia. 74: (2003), 394-396.

5. BAYDAR, N.G.; BAYDAR, H.; DEBENER, T. *Analysis of genetic relationships among Rosa damascena plants grown in Turkey by using AFLP and microsatellite markers*. The Journal of Horticultural Science and Biotechnology 3, (2004), 263–267.

6. CAETANO-ANOLLES, G.; BASSAM, B.J.; GRESSHOF, P.M. *DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligo nucleotides primers*. Biotechnology, 9: (1991), 553-556.

7. CUBERO, J.I.; MILLAN, T.; OSUNA, F.; TORRES, A.M.; COBOS, S. *Varietal identification in Rosa by using isozyme and RAPD markers*. Acta Horticulturae 424: (1996), 261–263

8. DEBENER, T.; MATTIESCH, L. *Effective pair wise combination of long primers for RAPD analyses in roses*. Plant Breeding 177: (1998), 1–5.

9. ESSELINK, G.D.; SMULDERS, M.J.M.; VOSMAN, B. *Identification of cut rose (Rosa hybrida L.) and rootstock varieties using robust sequence tagged microsatellite site markers*. Theoretical Applied Genetics, 106: (2003), 277–286.

10. GUDIN, S. *Rose: genetics and breeding*. Plant Breeding Review, 17**:** (2000), 159-189.

11. HADRYS, H.; BALICK, M.; SCHIERWATER, B. *Application of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology*. Molecular Ecology 1: (1992), 55-63.

12. HORMAZA, J. I. *Early selection cherry combining RAPDs with embryo culture*. Scientia Horticulturae. 79 (1-2): (1999), 121-126.

13. HUBBARD, M.; KELLY, J.; RAJAPAKSE, S.; ABBOTT, A.; BALLARD, R. *Restriction fragment length polymorphisms in rose and their use for cultivar identification*. Horticulture Science. 27: (1992), 172–173.

14. IWATA, H.; TSUNEO, K.; OHNO, S. *Triparental origin of Damask roses*. Gene. 259: (2000), 53–59.

15. JACCARD, P. *Nouvelles recherches sur La distribution flora.* Bull. Sac. Nat. 44: (1908). 223-270.

16. JAN, C.H.; BYRNE, D.H. *Rose germplasm analysis with RAPD markers*. Horticulture Science. 34 (2): (1999), 341–345.

17. KIANI, M.; ZAMANI Z.; KHALIGHI, A.; FATAHI, R.; BYRNE, D. H. *Wide genetic diversity of Rosa damascena Mill. germplasm in Iran as revealed by RAPD analysis*. Scientia Horticulturae115 : .(2008), 386–392

18. LIN,J.J., KUO, J., MA, J.SAUNDERS,JA; BREAD HS, Mac Donald MH, Kenworthy, W., UDE GN.; MATTHEWS BF. *Identification of molecular markers in soybean comparing RFLP, RAPD and AFLP DNA mapping techniques*. Plant Molecular Biology Reporter 14: (1996). 156-169.

19. OZKAN, G. SAGDIC, O.; BAYDAR, N.G.; BAYDAR, H. *Antioxidant and antibacterial activities of Rosa damascena flower extracts*. International Journal of Food Science & Technology 10: (2004), 277-281.

20. PERRIER, X.; JACQUEMOUD-COLLET, J.P. *DARwin software* (2006). http://darwin.cirad.fr/darwin

21. RAFALSKI,J.A. *Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis*.(1997). 75-83. In: CAETANO-ANOLLES, G. and GRESSHOF, P.M. *(eds.) DNA markers, protocols, applications and overviews*.Wiley-Liss, Inc., New York.

22. REYNDERS, S.; BOLLEREAU, P. *Characterization of genetic diversity in genus Rosa by randomly amplified polymorphic DNA*. Acta Horticulturae 424: (1996), 253–259.

23. PUJAR, S.;TAMHANKAR,SA.;RAO, VS.; GUPTA, VS.;NAIK,S.; RANJEKAR, PK. *Arpitrary primed-PCR base diversity assessment reflects hierarchical grouping of Indian tetraploid wheat genotypes.* Theoretical Applied Genetics 99: (1999). 868-876.

24. RUSANOV, K.; KOVACHEVA, N.; VOSMAN, B.; ZHANG, L.; RAJAPAKSE, S.; ATANASSOV, A.; ATANASSOV, I. *Microsatellite analysis of Rosa damascena Mill. accessions reveals genetic similarity between genotypes used for rose oil production and old Damask rose varieties*. Theoretical Applied Genetics, 111: (2005), 804–809.

25. THOMAS, M.R.; SATSUMOTO, S.; CAIN, P.; SCOTT, N.S. *Repetitive DNA of grapevine: classes present and sequences suitable for cultivar identification*. Theoretical Applied Genetics, 86: (1993), 173–180.

26. TORRES, A.M.; MILLAN, T.; CUBERO, J. I. *Identifying rose cultivars using random amplified polymorphic DNA.* Horticulture Science, 28: (1993), 333–334.

27. UPADHYAY, A.; JAYADEV, K.; MANIMEKALAI, R.; PARTHASARATHY, V.A. *Genetic relationship and diversity in Indian coconut accessions based on RAPD markers*. Scientia Horticulturae, 99: (2004), 353–362.

28. WELSH, J.; MCCLELLAND, M. *Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers*. Nucleic acids Research 18: (1990), 7213-7218.

29. WEN, X.P.; PANG, X.M.; DENG, X.X. *Characterization of genetic relationships of Rosa roxburghii Tratt and its relatives using morphological traits, RAPD and AFLP markers*. The Journal of Horticultural Science and Biotechnology 79: (2004), 189–196.

30. WIDRLECHNER, M.P. *History and utilization of Rosa damascena*. Journal of Economic Botany 35: (1981), 42–58.

31. WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. *DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers*. Nucleic Acids Research 18: (1990), 6531–6535.

32. عامر، ابراهيم. *واسمات المادة الوراثية المتعددة الشكل المكبرة عشوائياً*. (2001). وقائع المؤتمر الوطني للتقنيات الحيوية – طرابلس – ليبيا ص: 16– 25.