Genetic variations between some Damask rose (Rosa damascena Mill.) genotypes dispersed in different areas of Lattakia based on RAPD marker.

Dr. Hafez Mahfoud [*]
Dr. Mazen Nassour [**]
Tharwat Redwan[***]

(Received 30 / 12 / 2018. Accepted 23 / 6 /2019)

□ ABSTRACT □

This research was carried out to estimate the genetic variability btween 20 Rosa damascene genotypes dispersed in different areas of Lattakia and to compare them with two genotypes from Al- Marah site, to save the genetically different genotypes characterized high quality trait to be used in multiplication and for breeding and genetic improvement programs.

The DNA was extracted from young leave samples followed by running (PCR-RAPD) reactions and analyzed with (12) RAPD random primers. All primers showed efficiency in estimating genetic variation between studied genotypes. Twelve primers produced 105 fragments in all studied genotypes, seventy-three fragments were polymorphic. According to the dendrogram. The genetic distance between Lattakia genotypes and Al-Marah genotypes was (30%) while this value reached (24%) between Lattakia genotypes. Some primers such as (FRO-11) have shown high efficiency of distinguishing between genotypes of Lattakia and genotypes of AL- Marah.

Key words: Rosa damascena Mill., Genetic Diversity , RAPD, Genetic Variaility

[*]**postgraduate student, department of horticulture, faculty of agriculture, Tishreenn Tishreen University, Lattakia,Syria.Email:tharwat.redwan@yahoo.com.**

[**]**assistant Prof.,department of horticulture, faculty of agriculture, Tishreen University, Lattakia , Syria. Email: Mazen.nassour@gmial.com**

[***] **researcher,department of biotechnology,general commission for scientific, agriculture, research, lattakia. Syria. E mail: Hafez.mahfoud@ yahoo.com.**

التباين الوراثي بين بعض طرز الوردة الدمشقية (*Rosa damascena* Mill.) المنتشرة في مناطق مختلفة من اللاذقية بالاعتماد على مؤشر الـ RAPD.

د.حافظ محمد محفوض *
د. مازن علي نصّور **
ثروت سليم رضوان ***

(تاريخ الإيداع 30 / 12 / 2018. قبل للنشر في 23 / 6 / 2019)

□ ملخّص □

أجري البحث لتحديد مدى التباين الوراثي بين (20) طرازاً من طرز الوردة الدمشقية *Rosa damascena* المنتشرة في مناطق مختلفة من اللاذقية و مقارنتها بطرازين من المراح بغية حفظ الطرز المتباينة وراثياً و ذات الصفات النوعية الجيدة للاستفادة منها سواء بإكثارها أو إدخالها في برامج التربية و التحسين الوراثي.

تم استخلاص الـ DNA من النموات الورقية الحديثة، و أجري التفاعل التسلسلي للبوليميراز (PCR– RAPD) باستخدام (12) بادئة عشوائية، أظهرت البادئات جميعها كفاءة في كشف الاختلافات الوراثية بين الطرز المدروسة. أعطت البادئات الـ (12) بالإجمال (105) حزم في كافة الطرز المدروسة حيث وصل عدد الحزم المتباينة منها عند كافة الطرز إلى (73) حزمة. بلغت نسبة التباين الوراثي بين طرز اللاذقية و طرازي المراح وفقاً لشجرة القرابة الوراثية (30%) في حين لم تتجاوز النسبة (24%) ضمن طرز اللاذقية، أظهرت بعض البادئات كالبادئة (FRO–11) كفاءة عالية في التمييز بين طرز اللاذقية و طرازي المراح.

الكلمات المفتاحية: الوردة الدمشقية، التنوع الوراثي، RAPD، التباين الوراثي.

* **باحث – قسم التفانات الحيوية – الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية – اللاذقية – سورية.**
ha.mahfoud@hotmail.com
** **أستاذ مساعد – قسم البساتين – كلية الزراعة – جامعة تشرين – اللاذقية – سورية.**
mazen.nassour@gmial.com.
*** **طالبة دراسات عليا(دكتوراه) – قسم البساتين – جامعة تشرين – اللاذقية – سورية.**
tharwat.redwan@yahoo.com.

مقدمـة:

يعدَ نبات الورد الدمشقي من أكثر أزهار الزينة الشائعة في الكثير من بلدان العالم و ذلك لجمال أزهاره و رائحته العطرية المميزة، إضافة إلى استخداماته المتعددة في النواحي التزيينية و الطبية و التصنيعية. حيث استخدم زيت الورد منذ القدم في تحضير أنواع العطور الغالية الثمن، إضافة لاستخدامه في صناعة الأدوية والصناعات الغذائية على حد سواء. تستخدم أزهاره في تشكيل باقات الورود و يمكن زراعته في الحدائق أو كنبات تحديد أو سياج (الدجوي، 1996).

تبرز أهمية الوردة الدمشقية في سورية على وجه الخصوص كون اسمها مشتق من اسم دمشق Damask rose (*Rosa damascena* Mill.) و بالتالي فهي تشكل رمزاً هاماً للقطر إضافة لكونها مصدراً من مصادر الدخل الوطني.

تنتشر زراعة الوردة الدمشقية عالمياً في العديد من الدول (بلغاريا، فرنسا، تركيا، إيران، اليونان، الهند، الصين، روسيا، سورية، المغرب، مصر)، و تُعد كل من شيراز مشهد في إيران، و إسبارتا في تركيا، و وادي كازانلك في بلغاريا مناطق الإنتاج الرئيسة للوردة الدمشقية (Ozkan, 2004).

أمّا في القطر العربي السوري فتمثل المساحة المزروعة اقتصادياً بالوردة الدمشقية نسبة قليلة من إجمالي المساحات المستثمرة لا تتعدى 0.005 % (إحصائيات وزارة الزراعة، 2008)، و تتوزع هذه المساحة في محافظتي ريف دمشق 75% و حلب 25%. أما في باقي المحافظات فتقتصر زراعتها على الحدائق المنزلية و الحدائق العامة.

ينتمي الورد الدمشقي (*Rosa damascena* Mill.) إلى العائلة الوردية Rosaceae، و للجنس *Rosa* الذي يضم أكثر من (200) نوعاً، و من أهم الأنواع التابعة لجنس الورد هو الوردة الدمشقية (الشامية). *Rosa damascena* Mill. و المعروفة بالاسم الانكليزي Damask rose (Cronquist, 1981).

تعدّ التباينات الشكلية من أقدم المعايير التي استخدمت و لا تزال تستخدم على نطاق واسع في التوصيف و التصنيف النباتي و تحديد التباينات بين و ضمن الأنواع النباتية المختلفة، نظراً لبساطتها وسهولة تطبيقها وعدم حاجتها لمخابر معقدة التجهيز. فيما يخص الورد الدمشقي استخدمت مختلف أجزاء النبات لتحديد التباين المظهري بين مختلف سلالاته و طرزه كصفات الأزهار (Farooq *et al*., 2011)، أو صفات كلا المجموعين الخضري و الزهري (عباس، 2010)، أو محتوى الأزهار من الزيت العطري و مكوناته (Tabaei-Aghdaei *et al*., 2007).

بالرغم من أهمية المعايير التصنيفية المعتمدة على المواصفات المظهرية إلا أنه يعاب عليها ارتباطها بشكل أساسي بالظروف البيئية المحيطة لذلك ظهرت الحاجة لاستخدام تقنيات تتميز بثباتها ضمن الظروف البيئية المتغيرة و فعاليتها في كشف التباينات الوراثية لذلك تم اللجوء لاستخدام المؤشرات الجزيئية في توصيف النبات على مستوى DNA, و المعروفة بكونها لا تتأثر بالظروف الخارجية أو المحيطة، و تُظهر تباينات يمكن أن تُفيد في رسم الخرائط الوراثية، و تحديد درجات القرابة (Weising *et al*., 2005).

تعد المؤشرات القائمة على مبدأ التفاعل التسلسلي للبوليميراز PCR (Polymerase Chain Reaction) الذي اكتشف من قبل (Mullis *et al*., 1986)، من أهم و أكثر التقنيات المستخدمة حالياً لكشف التباينات بين مختلف أنواع الكائنات الحية على مستوى الـ DNA كتقنيات الـ RAPD (Random Amplification Polymorphic DNA) و SSR (Simple Sequence Repeat) وغيرهما.

تعتبر مؤشرات الـ RAPD ذات أهمية تطبيقية خاصة في كشف التباينات الوراثية، لبساطتها وسهولة استخدامها وانخفاض تكاليفها مقارنةً بالمؤشرات الأخرى، بالإضافة إلى أنّها لا تحتاج إلى معرفة وراثية مسبقة بالنبات المدروس و باستخدامها بادئات غير متخصصة(Hadrys *et al.,* 1992; Welsh and Clelland, 1990)و قد استخدمت

العديد من المؤشرات الجزيئية لكشف التباينات الوراثية ضمن مختلف أنواع الجنس *Rosa* بشكل عام (Cubero *et al.*, 1996; Debener and Mattiesch 1998; Jan *et al.*, 1999; Reynders and Bollereau, 1996). و نوع الورد الدمشقي بشكل خاص (Tabaei-Aghdaei *et al.*, 2006; Kiani *et al.*, 2008; Bashir *et al.,* 2014).

استخدمت المؤشرات الجزيئية في العديد من الدراسات المحلية، فقد استخدمت مؤشرات RAPD من قبل عباس و آخرون (2008) لتحديد التباين الوراثي بين تسعة طرز للوردة الدمشقية من ثلاثة مواقع في دمشق و ريفها (دوما، الريحان، النبك) و مقارنتها ببعض طرز النوع *R. canina* وطرز النوع الهجين *R. hybrida*، أظهرت النتائج مستويات مُرضية من التعددية الشكلية (62.9 %) بين الطرز المدروسة وذلك باستخدام 19 بادئة عشوائية (RAPD).

استخدمت مؤشرات ISSR وRAPD من قبل Mirali وآخرون (2012) لتوصيف (7) طرز من الوردة الدمشقية المنتشرة في مناطق مختلفة من سورية و تحديد محتواها من الزيت العطري. أظهرت النتائج فعالية التقنيتين المستخدمتين في كشف التباينات الوراثية بين الطرز المدروسة والتقارب الكبير في نتائجهما حيث توزعت الطرز المدروسة في مجموعتين مستقلتين ضمن شجرتي القرابة الوراثية، و أكدت النتائج وجود تقارب وراثي بين طرز المنطقة الواحدة و وتباعد بين طرز المواقع المختلفة .

أما عالمياً، فقد استخدمت مؤشرات الـ RAPD في إيران من قبل Tabaei-Aghdaei و آخرون (2006) لتقييم التنوع الوراثي بين (12) طرازاً من طرز الوردة الدمشقية المنتشرة في شمال غرب إيران، و تراوح معامل التشابه ضمن شجرة القرابة الوراثية بين (0.26-0.99)، و لم يلاحظ وجود أثر واضح للعوامل المناخية في توزع التراكيب الوراثية للطرز المدروسة ضمن شجرة القرابة الوراثية بحيث ضمت المجموعات الناتجة طرزاً من مواقع متباينة و متباعدة جغرافياً.

استخدمت نفس المؤشرات لتحديد درجة التباين الوراثي بين (41) طرازاً برياً للوردة الدمشقية من مناطق مختلفة من إيران إضافة لطراز وحيد مزروع في بلغاريا، توزعت الطرز المدروسة في ثماني مجموعات ضمن شجرة القرابة الوراثية، تضمنت المجموعة الأولى غالبية الطرز المدروسة إضافة لطراز بلغاريا. و قد خلص الباحثون إلى وجود تباين وراثي كبير بين الطرز المدروسة مشيراً لحجم القاعدة الوراثية الكبير للوردة الدمشقية في إيران و أهمية ذلك في برامج التربية و التحسين الوراثي (Kiani *et al.*, 2008).

أختبر Kaur و آخرون (2007) التباين الوراثي بين ستة طرز منتخبة من الوردة الدمشقية المزروعة في الهند باستخدام (58) بادئة RAPD، أستطاعت إحدى البادئات تمييز الطرز التي تتصف باحتوائها على نسب مرتفعة من الزيت العطري ضمن أزهارها عن باقي الطرز.

قام Bashir و آخرون (2014) باستخدام مؤشرات RAPD لتحديد درجة التباين الوراثي بين طرز تتبع لأربعة أنواع من الورد المزروعة في باكستان منها نوع الوردة الدمشقية .*R. damascena* Mill، و ذلك باختبار (19) بادئة عشوائية، و قد أظهرت إحدى البادئات المستخدمة قدرة على تمييز النوع *R. bourboniana* عن باقي الأنواع المدروسة و ذلك من خلال ظهور حزمة خاصة بهذا النوع و غيابها لدى باقي الأنواع.

استخدم Zakaria و آخرون (2017) مؤشرات RAPD لتحديد الاختلافات بين نباتات الوردة الدمشقية الناتجة عن زراعة الأنسجة، حيث تبين وجود (3) حزم متباينة من أصل (801) حزمة كلية و بالتالي أشارت الدراسة إلى كفاءة مؤشرات الـ RAPD في إظهار الاختلافات الوراثية حتى ضمن النباتات المكاثرة بالأنسجة.

أهمية البحث و أهدافه:

على الرغم من أن سورية موطناً أصلياً للوردة الدمشقية و اسمها مشتق من اسم أقدم مدن التاريخ (دمشق)، إضافة لأهميتها الاقتصادية الكبيرة المتمثلة باستخداماتها المتعددة وعلى وجه الخصوص زيتها العطري، إلا أنّ زراعتها وإنتاجها لاقت تراجعاً و تدهوراً كبيراً في مناطق انتشارها الرئيسة نظرا للظروف السيئة التي يمر بها القطر و قلة وعي المزارعين بأهميتها.

يتأثر إنتاج الوردة الدمشقية من الأزهار ومحتواها من الزيت العطري بالعوامل البيئية المختلفة، إضافة لارتباط كمية الزيت بالتراكيب الوراثية المتباينة لطرز الوردة الدمشقية (Kaur *et al.*,2007)، و بالتالي فإن البحث عن تراكيب وراثية متباينة يشكل الخطوة الأولى والأهم في برامج التربية والتحسين الوراثي للوردة الدمشقية المزروعة تليها خطوات لاحقة لتقييم هذه الطرز من ناحية الإنتاج كماً و نوعاً و مدى مقاومتها لمختلف أنواع الأمراض و الحشرات السائدة وذلك ضمن ظروف بيئية متباينة.

يهدف هذا البحث إلى دراسة التباينات الوراثية بين طرز الوردة الدمشقية المزروعة في مناطق مختلفة من اللاذقية ومقارنتها مع طرز من موقع المراح (النبك – ريف دمشق) باستخدام مؤشرات الـ RAPD كخطوة أولى و من ثم سيتم تقييم الطرز المدروسة إنتاجياً لحفظ المتميز منها و إكثاره.

طرائق البحث ومواده:

مكان و مدة تنفيذ البحث:

أجري البحث في مخابر شعبة التقانات الحيوية – مركز البحوث العلمية الزراعية باللاذقية خلال العامين 2017– 2018.

المادة النباتية:

تم جمع 20 طرازاً من الوردة الدمشقية .*Rosa damascena* Mill من مناطق مختلفة من محافظة اللاذقية (سواء أكانت معروفة المصدر أو مجهولة المصدر) و التي تنتشر بشكل أساسي في الحدائق المنزلية الخاصة أو كسياج حول أطراف الحقول و المزارع، إضافة إلى طرازين من الوردة الدمشقية المنتشرة في موقع المراح التابعة لمنطقة النبك في ريف دمشق. الجدول (1).

جدول (1) طرز الوردة الدمشقية المدروسة *R. damascena*.

الطراز	الموقع	ارتفاع الموقع / م	معدل الأمطار ملم/ سنة
R2 – R1	الشبطلية	25	850
R4 –R3	منطقة العدرا	30	850
R6 – R5	القسطل– الرمادية	300	1130

R8 – R7	القسطل	320	1130
R10 –R9	الربوة	850	1270
R11 – R12	مزار القطرية	130	1201
R13 – R14	منطقة الشجرة (كسب)	650	1270
R15 – R16	كسب	800	1270
R17 – R18	القرداحة – قلعة المهالبة	750	1067
R19 – R20	النبك – المراح	1400	120
R21 – R22	جبلة – الدالية	500	1320

- **طرائق البحث :**

· **جمع العينات النباتية و حفظها:**

جمعت العينات الورقية (نموات ورقية حديثة) و جففت مباشرة عند جمعها بمادة السيليكا (Silica–Gel) و وضعت ضمن أكياس محكمة الإغلاق لحين استخلاص الـ DNA.

· **استخلاص و مكاثرة الحمض النووي DNA :**

تم استخلاص الـ DNA من الطرز المدروسة وفق طريقة CTAB (Doyle and Doyle, 1990). ثم أجري اختبار لنوعية الـ DNA المستخلص بواسطة جهاز الرحلان الكهربائي باستخدام هلامة أغاروز 1%، و بوجود الـ DNAالقياسي (2000 bp DNA). تمت مكاثرة الحمض النووي DNA باستخدام جهاز التفاعل السلسلي للبوليميراز (PCR) بحجم تفاعل 25 ميكرولتر لكل عينة، يتضمن 15 نانوغرام من DNA، محلول منظم (PCR buffer 1x)، $MGCL_2$ 1.5 mM ، 0.125mM مزيج نيكلوتيدات dNTPs، 10 بيكومول من كل بادئة، و وحدة أنزيمية واحدة من DNA Taq polymerase. تم مضاعفة الحمض النووي DNA باستخدام (12) بادئة RAPD مصنعة من قبل الشركتين الألمانيتين Metabion و VBC biotech (جدول 2) ضمن جهاز (PCR) وفق برنامج مكون من 45 دورة، تتضمن كل دورة، مرحلة فصل سلاسل الـ DNA (Denaturation) لمدة دقيقة واحدة بدرجة حرارة 94 س°، مرحلة التحام البادئة بـ DNA (Annealing) لمدة دقيقة واحدة بدرجة حرارة 32–34 س° حسب البادئة، مرحلة الاستطالة (Extension) لمدة دقيقتين بدرجة حرارة 72 س°، سبق البرنامج عملية فصل أولية لسلاسل

الـ DNA على درجة حرارة 94 س° لمدة 4 دقائق، وانتهى بمرحلة تحضين للعينات لمدة خمس دقائق على درجة حرارة 72 س°، ثم حفظت نواتج الـ PCR على درجة حرارة 4 س° لحين الاستخدام.

جدول (2): البادئات المستخدمة لتوصيف طرز الوردة الدمشقية *R.damascena* مع تسلسلها النيوكليوتيدي و درجة الحرارة اللازمة لالتحام البادئة.

الرقم	البادئة	التسلسل النيوكليوتيدي (5´ – 3´)	درجة حرارة التحام البادئة (مْ)
1	RARO-01	5´-CCGTCGCTGC-3´	34
2	RARO-02	5´-CATTCGACGG-3´	34
3	RARO-03	5´-CGTGCGGACT-3´	32
4	RARO-04	5´-ACGCGAGATA-3´	32
5	RARO-05	5´-CAGCCAGATG-3´	34
6	FRO-2	5´-TGGCTCGGCT-3´	36
7	FRO-5	5´-GGACGACCGT-3´	36
8	FRO-8	5´-TGGACTCGGT-3´	34
9	FRO-9	5´-TCGTCGCAAT-3´	34
10	FRO-11	5´-AAGTGCCCTC-3´	34
11	FRO-12	5´-TTGTCGGTGC-3´	34
12	FRO-14	5´-CCAATCGACG-3´	34

- **الرحلان الكهربائي و تلوين نواتج الـ PCR:**

تم فصل نواتج الـ PCR بواسطة جهاز الرحلان الكهربائي وذلك باستخدام هلامة من الأغاروز بتركيز 1.5%، تحتوي على الإيثيديوم بروميد 0.5 µg/ml، و محلول الرحلان TBE buffer (**1x**) ، وتطبيق جهد كهربائي مقداره 80 فولت لمدة ساعتين، ثم تصوير الهلامة بتعريضها للأشعة فوق البنفسجية (UV) باستخدام جهاز Gel doc.

- تحليل النتائج: Analysis of Results

أُخضعت النتائج لبرنامج التحليل NTSYS (Numerical Taxonomy and Multivariant Analysis System) (Rohlf, 2002) قدر معامل عدم التشابه الوراثي من خلال طريقة (UPGMA: Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean) استخدمت المعطيات لرسم شجرة القرابة الوراثية بين الطرز المدروسة على شكل عنقودي Dendrogram. أدخلت في التحليل الحزم الواضحة التي تتصف بالتكرارية و الوزن الجزيئي الذي يتراوح بين (200 – 1800) bp حيث وضعت المعطيات في جداول أعطيت الحزمة الموجودة رقم 1 و في حال غيابها رقم 0.

حسب معامل التنوع الوراثي للبادئة بالمعادلة:

$$\text{Gene Diversity} = 1 - \sum_{n=1}^{n=j}(p^2)$$

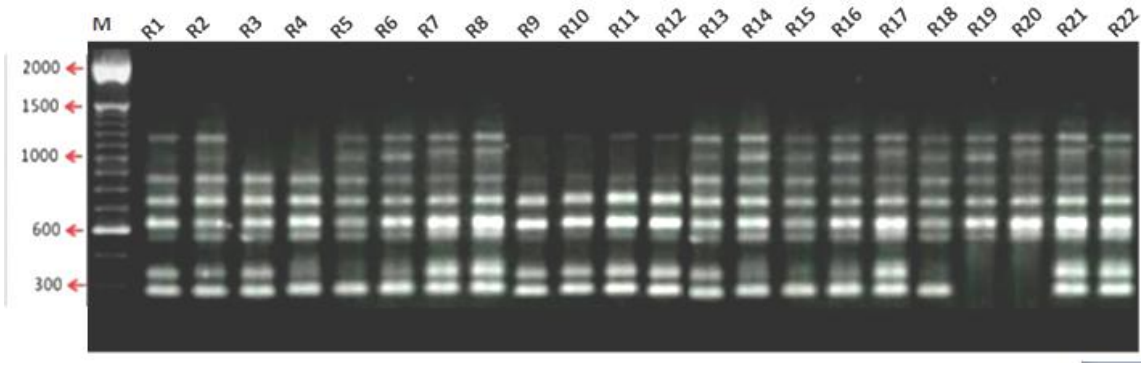
حيث: p^2 = مربع نسبة كل قطعة ضمن المجتمع المدروس.
j = عدد القطع التي تكشفها /تكاثرها/ البادئة. (Weir, 1990).

النتائج و المناقشة :

أظهرت البادئات المستخدمة (12 بادئة) كفاءة عالية في كشف الاختلافات الوراثية بين طرز الوردة الدمشقية المدروسة، حيث أعطت البادئات بالإجمال 105 حزم، بمعدل 8.75 حزمة للبادئة الواحدة. وصل عدد الحزم المتشابهة (monomorphic) منها إلى 32 حزمة في حين بلغ عدد الحزم المتباينة (polymorphic) 73 حزمة و بالتالي بلغت نسبة الحزم المتباينة 69.52% من إجمالي عدد الحزم الكلية (الجدول 3).

اختلفت البادئات من حيث إجمالي عدد الحزم التي أعطتها البادئة الواحدة و عدد الحزم المتباينة منها (الشكل 2، الجدول 3)، حيث نتج عن البادئة (FRO–11) أعلى عدد من الحزم (13 حزمة) بنسبة تنوع وراثي للبادئة وصل إلى (0.346). تميزت الحزم الناتجة عن هذه البادئة بأنها جميعاً متباينة بين طرز الوردة الدمشقية المدروسة، في حين أعطت البادئة (RARO–02) أدنى عدد من الحزم الكلية (6 حزم) منها أربع حزم متباينة بنسبة تنوع وراثي للبادئة (0.198)، وبلغ متوسط التنوع الوراثي لكافة البادئات (0.239).(الجدول 3، 4). أظهرت بعض البادئات إمكانية للتمييز بين طرز الوردة الدمشقية المزروعة في محافظة اللاذقية وطرز المراح، حيث ظهرت حزم فريدة في طرز المراح كما في إحدى الحزم التي أعطتها البادئة FRO–11، بينما غابت بعض الحزم في طرز المراح و ظهرت لدى باقي الطرز المدروسة وفقاً لنتائج البادئة RARO–01 (الشكل1).

عند مقارنة التنوع الوراثي للطرز في كل موقع من المواقع المدروسة الجدول (5) أظهرت البادئات المستخدمة أن طرز موقع الشبطلية أعطت أعلى قيمة لمتوسط التنوع الوراثي (0.076)، تلاها طرز كل من (القسطل – الرمادية، الشجرة، كسب، القرداحة – قلعة المهالبة– المراح) حيث بلغت قيمة التنوع الوراثي لكل موقع منها(0.038)، أما بالنسبة لباقي المواقع المدروسة فقد أظهرت البادئات المستخدمة انعدم التنوع الوراثي لطرزها وتماثلها التام مع بعضها البعض.



RARO-01

الشكل (1) الرحلان الكهربائي لمنتجات تفاعل الـ PCR مع البادئةRARO-01 بعد تمريرها على هلامة آغاروز تركيزها 1.5 %.

عينات : R22,R21,R20,R19,R18,R17,R16,R15, R14, R13, R12, R11,R10, R9, R8, R7, R6, R5,R4, R3, R2,R1 ال DNA1 من المواقع المدروسة، M : مؤشر الوزن الجزيئي، وأطوال القطع مقدرة bp.

جدول (3):عدد الحزم الكلية والمتباينة ونسبة الحزم المتباينة الناتجة عن استخدام 12 بادئة RAPD لتوصيف الطرز المدروسة من الوردة الدمشقية *R. damascena*

الرقم	البادئة	عدد الحزم الكلي	عدد الحزم المتباينة	نسبة الحزم المتباينة %
1	RARO-01	8	4	50
2	RARO-02	6	4	66.66
3	RARO-03	8	5	62.5
4	RARO-04	11	6	54.54
5	RARO-05	7	4	57.14
6	FRO-2	10	7	70
7	FRO-5	8	5	62.5
8	FRO-8	9	6	66.66
9	FRO-9	6	5	83.83
10	FRO-11	13	13	100
11	FRO-12	7	6	85.71
12	FRO-14	12	8	66.66
	المجموع	105	73	69.52

الجدول(4):عدد الحزم الناتجة و مستوى التنوع الوراثي للبادئة عند طرز الوردة الدمشقية المدروسة *R. damascena*

البادئة	عدد الحزم الكلي	عدد الحزم الكلية الخاصة بطرز اللاذقية	عدد الحزم المتباينة الخاصة باللاذقية	عدد الحزم الكلي لطرازي المراح	التنوع الوراثي للبادئة
RAPO-01	8	8	3	6	0.173
RARO-02	6	6	3	4	0.198
RARO-03	8	8	4	4	0.270
RARO-04	11	10	5	9	0.159
RARO-05	7	7	3	5	0.344
FRO-02	10	10	7	7	0.179
FRO-05	8	8	3	3	0.29
FRO-08	9	9	6	9	0.233
FRO-09	6	6	6	3	0.238
FRO-11	13	11	11	7	0.346
FRO-12	7	7	6	3	0.203
FRO-14	12	12	8	8	0.287
المجموع	105	102	66	67	0.239

جدول (5) التنوع الوراثي لطرز الوردة الدمشقية *Rosa damascena* في مواقع الدراسة.

متوسط التنوع الوراثي عند كل منطقة	الشبطلية	العدرا	القسطل الرمادية	القسطل	الربوة	مزار القطرية	الشجرة	كسب	القرداحة	المراح	جبلة الدالية	المتوسط العام
	0.076	0.038	0.038	0	0	0	0.038	0.038	0.038	0.038	0	0.027

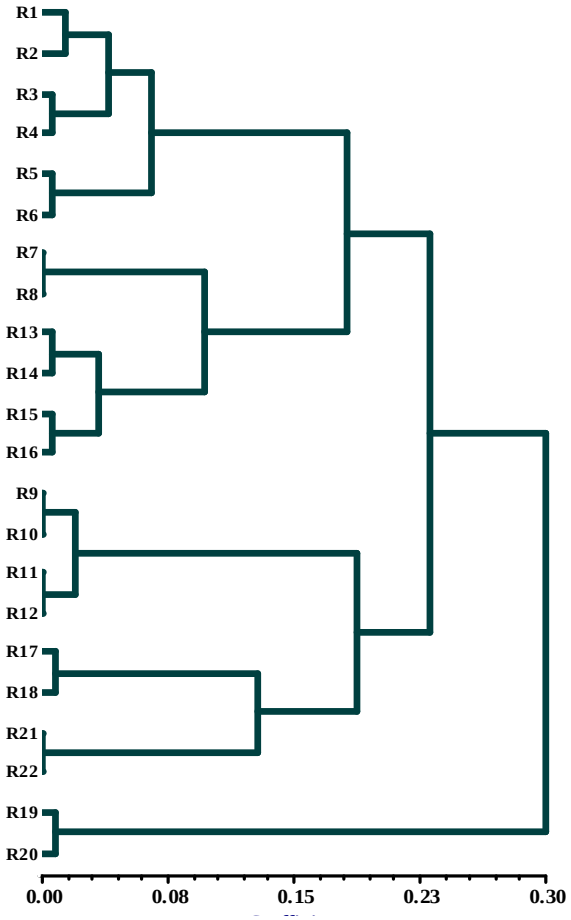
أظهرت شجرة القرابة العنقودية الناتجة عن تحليل نتائج مؤشرات RAPD (الشكل 2) نسب متفاوتة من التباين الوراثي بين طرز الوردة الدمشقية التي تناولتها الدراسة الحالية سواء بين طرز المواقع المختلفة أو بين طرز الموقع الواحد، حيث انعدم التباين الوراثي بين بعض طرز الموقع الواحد كما في الطرازين R7 و R8 من موقع قسطل المعاف، أو ظهر التباين بنسب منخفضة جداً (أقل من 1%) كما في الطرازين R3 و R4 من موقع العدرا، أو نسب مرتفعة من التباين كما في طرز قسطل المعاف – الرمادية (R6, R5) و قسطل المعاف (R8, R7). كما أظهرت شجرة القرابة

نسب متفاوتة من التباين الوراثي بين طرز المواقع المختلفة و بلغت هذه النسب أعلاها (30%) بين طرازي المراح R19 و R20 مع باقي الطرز المدروسة.

توزعت الطرز المدروسة ضمن شجرة القرابة الوراثية إلى ثلاثة مجموعات رئيسية، شكلت طرز الشبطلية R1 و R2 و العدرا R3 و R4 و قسطل المعاف R7 و R8 إضافة لطرز موقع الشجرة (كسب) و كسب (R13 ، R14 و R15 و R16 المجموعة الأولى (12 طرازاً)، توزعت طرز هذه المجموعة إلى تحت مجموعتين ضمت الأولى طرز الشبطلية R1 و R2 و العدرا R3 و R4 و الطرازين R5 و R6 من موقع قسطل المعاف (الرمادية)، بينما ضمت تحت المجموعة الثانية طرز موقعي كسب و الشجرة (كسب) (R13 ، R14 و R15 و R16 و الطرازين R7 و R8 من قسطل المعاف.

أما المجموعة الثانية فضمت ثمانية طرز من ثلاثة مواقع متباينة، تفرعت طرز هذه المجموعة بدورها إلى فرعين ضم الفرع الأول طرز موقع الربوة (كسب) R 9 ، R10 و مزار القطرية R 11 ، R12 في حين ضم الفرع الثاني طرز جبلة R 17 ، R18 و القرداحة R 21 ، R22.

شكل طرازي موقع المراح (النبك) R19 ، R20 مجموعة مستقلة (المجموعة الثالثة) ومتباعدة بشكل واضح عن طرز المجموعتين السابقتين.



الشكل(2) شجرة القرابة الوراثية لطرز الوردة الدمشقية *R. damascena* المدروسة اعتماداً على نتائج مؤشرات الـ RAPD.

توصلت نتائج الدراسة الحالية و بشكل مماثل للعديد من الدراسات السابقة (عباس و آخرون، 2008)، (Tabaei-Aghdaei *et al.*, 2006, Kiani *et al.*, 2008 إلى الكشف عن مستويات مُرضية من التعددية الشكلية بين طرز الوردة الدمشقية المنتشرة في مناطق مختلفة من العالم، و التباين الواضح بين طرز الوردة الدمشقية في هذه الدراسة بالرغم من كونها مزروعة ضمن ظروف جغرافية متماثلة إلى حد ما (باستثناء طراز المراح)، يعطي مدلولاً عن حجم القاعدة الوراثية الواسع للوردة الدمشقية في القطر.

بالرغم من كفاءة مؤشرات الـ RAPD في إظهار نسب عالية من التباينات الوراثية بين طرز الوردة الدمشقية إلا أن نسبة التباين الوراثي قد انعدمت في بعض الحالات وخاصة بين طرز الموقع الواحد، و هذا يتوافق مع نتائج (Kiani *et al.*, 2008) في دراستهم لطرز الوردة الدمشقية المزروعة في مناطق متباعدة جغرافياً في إيران، حيث تراوحت نسبة التباين الوراثي بين 0-84% ، لم يلاحظ أي نسب من التباين الوراثي لدى بعض طرز الموقع الواحد أو ضمن مواقع متقاربة جغرافياً، أما بالنسبة للتنوع الوراثي للطرز المدروسة في كل مواقع من مناطق الدراسة فقد أظهرت البادئات المستخدمة أن طرز الشبطلية أعطت أعلى نسبة تنوع وراثي (0.076) ويمكن أن يعزى ذلك إلى اختلاف منشأ الطرز المزروعة في هذا الموقع، في حين انعدم التنوع الوراثي في عدة مواقع كالقسطل ومزار القطرية والدالية و قد يعزى انعدام التنوع الوراثي ضمن المنطقة الواحدة إلى طبيعة الإكثار لهذه النباتات حيث يعتمد بشكل أساسي على الإكثار الخضري و الذي يعطي نباتات مشابهة تماماً للنبات الأم. التباين الوراثي بين الطرز المدروسة كان منخفض (30 %)، مقارنة في الدراسة التي أجريت في ايران (Kiani *et al.*, 2008) حيث وصل إلى 84% وذلك يعود إلى عدد العينات الكبير والمساحات الكبيرة المزروعة بالوردة الدمشقية في ايران.

وقد يعود التباعد الكبير بين بعض طرز اللاذقية مقارنة بطرازي المراح (منطقة النبك) و(الذي يعتقد بأنه من الطرز الممثلة للوردة الدمشقية في منطقة انتشارها الطبيعي، حيث يتواجد طرازا المراح على ارتفاع 1400 م ومعدل هطول الأمطار السنوي لا يتجاوز 200 ملم في العام (وهو أعلى ارتفاع بين المناطق المدروسة و أقل معدل هطول مطري مقارنة بباقي المناطق)، إلى تأثير العوامل البيئية على التراكيب الوراثية للطرز المدرسة. وبنفس السياق لوحظ أن الطرز التي تواجدت على ارتفاع بين (25 و 300) م كانت متقاربة وراثياً من بعضها مقارنة مع باقي الطرز المدروسة (باستثناء طراز مزار القطرية)، حيث أشارت العديد من الدراسات لوجود تباين بين طرز الوردة الدمشقية المنتشرة في مناطق متباعدة و متباينة جغرافياً و قد أعزوا التباين الوراثي بين تلك الطرز بشكل أساسي كنتيجة لتكيفها مع الظروف البيئية السائدة في مناطق انتشارها (Kiani *et al.*, 2008, Padmesh *et al.*, 2006)، بينما أسند البعض هذا التباين لعمليات تهجين محتملة سواء بين طرز الوردة الدمشقية فيما بينها أو بينها و بين طرز أنواع الورد الأخرى (Kiani *et al.*, 2008).

الاستنتاجات و التوصيات:

الاستنتاجات:

- الكشف عن مستويات مُرضية من التباينات الوراثية بين طرز الوردة الدمشقية ***R. damascena*** المدروسة.
- التنوع الوراثي للطرز في موقع الشبطلية كان هو الأعلى مقارنة مع باقي المواقع المدروسة.

– التباين الوراثي الواضح بين الطرز المدروسة يعطي مدلولا عن حجم القاعدة الوراثية الكبير للوردة الدمشقية في سورية و أهمية ذلك في برامج التربية و التحسين الوراثي للوردة الدمشقية بشكل خاص و لمختلف أنواع الورد بشكل عام.

التوصيات:

– توصيف الطرز المدروسة جزيئياً بالاعتماد على مؤشرات ISSR بهدف تغطية مناطق متباينة من مجين الفرد مما يسمح بعملية تقييم أفضل للاختلافات الوراثية و لمستوى التباينات الوراثية.

– متابعة الدراسة لتشمل أكبر قدر ممكن من طرز الوردة الدمشقية المنتشرة في مختلف محافظات القطر، إضافة لحفظها ضمن مجمعات وراثية قبل زوالها نتيجة للتعديات والأخطار المختلفة التي تتعرض لها.

المراجع:

– المراجع العربية:

· الدجوي، علي. موسوعة *نباتات الزينة و تنسيق الحدائق*، مكتبة مدبولي، القاهرة، 1996.

· عباس، سوسن؛ نصور، مازن؛ خنشور، أنس؛ عبد القادر، أحمد. *التوصيف الجزيئي لبعض لطرز المحلية من الورد الشامي* (*Rosa damascene* Mill.) باستخدام مؤشرات RAPD. مجلة جامعة تشرين للدراسات والبحوث العلمية– سلسلة العلوم البيولوجية. المجلد (30)، العدد (4)،2008، ص121– 135.

· عباس، سوسن. 2010. *التوصيف والإكثار الخضري الدقيق لبعض الطرز المحلية التابعة لنوعي الورد Rosa damascene* Mill. و *Rosa canina*. رسالة ماجستير، كلية الزراعة، قسم البساتين، جامعة تشرين.

· إحصائيات وزارة الزراعة، مديرية الإرشاد الزراعي، قسم الإعلام. 2008.

– المراجع الأجنبية:

· BASHIR, K.M.I.; AWAN, F.S.; KHAN, I.A.and USMAN, M. Identification And Authentication of Rosa Species Through Development of Species-Specific SCAR marker(s). Genet. Mol. Res. V.13 , N°. 2, 2014, 4130-4139.

· CRONQUIST, A. Integrated System of Classification of Flowering Plants. Columbia Univ.1981, Press, NY. 1262 pp.

· CUBERO, J.I; MILLAN, T., OSUNA, F.; TORRES, A.M and COBOS,S. Varietal Identification Rosa by Using Isozyme and RAPD Markers. Acta Hort, 424:1996, 261-263.

· DEBENER, T. and MATTIESCH,L. Effective Pair Wise Combination of Long Primers for RAPD Analyses in Roses. Plant Breed., 177:1998,1-5.

· DOYLE, J. J., DOYLE, J. L. Isolation of Plant DNA from Fresh Tissue. Focus, V.12,N°.1, 1990, 13-15.

· FAROOQ, A.; KHAN, A.M.; Ali.,A. and RIAZ, A. Diversity of Morphology and Oil Content of Rosa damascena Landraces and Related Rosa Species From Pakistan. Pak. J. Agri. Sci., V.48, N°. 3, 2011, 177-183.

· HARDY,H.; BALICK,M and SCHIERWATER, B. Application Of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) In Molecular Ecology. Mol. Ecol.1,1992, 55-63.
· . JAN, C,H. and BYRNE,D.H. Rose Germplasm Analysis with RAPD Markers. Hort Science, V.34, N°. 2,1999, 341-345.
· KAUR, N.M.; SHARMA, R.K.; SHARMA, M.K.; SINGH, V.M. and AHUJA, P.S. Molecular Evaluation And Micropagation of Field Selected Elites of R. damascena. Gen. Appl. Plant Physiology. V.33,N°. (3-4), 2007,171-186.
· KIANI, M.; ZAMANI, Z.; KHALIGHI, A.; FATAHI, R. and BYRNE, H.D. Wild Genetic Diversity of Rosa damascena Mill. Germplasm in Iran As Revealed by RAPD Analysis. Scientia Horticulturae. 115,2008, 386-392.
· MIRALI , N.; AZIZI, R. and NABULSI, I. Genetic Characterization of Rosa damascena Species Growing in Different Regions of Syria and Its Relationship To The Quality of The Essential Oils Int. J. Med. Arom. PlantsV. 2, N°.1,2012, 41-52.
· MULLIS, K.; FALOONA, S.; SCHARF, S.; SAIKI, R..; HORN, G and ERLICH, H.. Specific Enzymatic Amplification of DNA In vitro: The Polymerase Chain Reaction. Cold spring HarborSymp.Quant.Biol.V.51, 1986, 263–273.
· OZKAN, M.G. Antioxidant and Antibacterial Activities of Rosa damascena Mill flower Extracts. Food Science and Technology International, V. 10,N°.4, 2004, 16 (1-2).
· PADMESH, P.; REJI, J.V.; DHAR, M.J.and SEENI, S. Estimation of genetic diversity in varieties of Mucuna pruriens using RAPD. Biol. Plant V.50, N°. 3, 2006, 367–372.
· REYNDERS , S. and BOLLEREAU , P. Characterisation of Genetic Diversity in Genus Rosa by Randomly Amplified Polymorphic DNA. Acta Hort., 424, 1996, 253-260.
· ROHLF, F.J. Numerical Taxonomy and Multivariate Abalysis System. NTSYS version 2.11a.Applied Biostatistics Inc., New York, Stoy Book. N.Y.,USA 231,2002.
· TABAEI-AGHDAEI, S.R.; HOSSEINI, H.N.; FAHIMI, H.N.; EBRAHIMZADE, H.K.; JEBELLY, M.A.and NAGHAVI, M.R. Genetic Variation Analysis of Different Populations of Rosa damascene Mill in NW. Iran. Using RAPD Markers- Tehran –Iran-. J. Bot. V.12, N° .2, 2006, 121-127.
· TABAEI-AGHDAEI, S.R.; BABAEI,A.; KHOSH-KHUI, M.; JAIMAND. K.; REZAEE, B.M.; ASSAREH,.M.H. and NAGHAVI,. M.R. Morphological And Oil Content Variations Amongst Damask Rose (Rosa damascena Mill.) landraces from different regions of Iran. V.113, N°1,2007,44-48.
· WEIR, B. S. Genetic Data Analysis: Methods for Discrete Population Genetic Data, 1990, P: 445. Sunderland, Masschusetts: Sinauerr Assosiates.
· WEISING ,K.; NYBOM, H.; WOLFF,K and KAHL, G. DNA Fingerprinting in Plants Principles, Methods, and Applications Second Edition. Taylor & Francis Group is the Academic Division of T&F Informa plc. Boca Raton London New York Singapore, 2005, 470.
· WELSH, J. & MCCLELLAND, M. Fingerprinting Genomes Using PCR With Arbitrary Primers. Nucleic Acids Res. 18:1990, 7213–7218.
· ZAKARIA, M.H.; DESSOKY, S.E.; ISMAIL, A.I.; ATTIA, O.A.and El-HALLOUS, I.E. Analysis of Genetic Stability of The In vitro Propagated Rosa damascene (Taif rose) Plant. Int. J. Adv. Res. V. 5, N°.4,2017,117-122.