مجلة اتحاد الجامعات العربية
للعلـــوم الزراعيـــة
جامعة عين شمس ، القاهرة
مجلد(19)، عدد (1)، 109-116، 2011

دراسة درجة القرابة الوراثية لبعض أصناف الزيتون المزروعة في مجمع أكساد الوراثي بجلين

[6]

نوران مصطفى[1]- فيصل حامد[2]- سلام لاوند[3]
1- قسم علوم البستنة - كلية الزراعة - جامعة دمشق - سوريا
2- قسم علوم البستنة - كلية الزراعة - جامعة دمشق - سوريا
3- قسم المحاصيـل - كلية الزراعة - جامعة دمشق - سوريا

الكلمات المفتاحية: زيتون ، شجرة القرابة الوراثية ، التكرارات البسيطة الترادفيه الداخلية (ISSR)

الموجـــز

تعد شجرة الزيتون (*Olea europaea* L.) إحدى أهم أشجار الفاكهة محلياً وعالمياً. ولهذه الشجرة عدد كبير من الأصناف مترافقة مع أخطاء في التسمية وكثرة المتجانسات والمترادفات، الأمر الذي يسبب مشاكل حقيقية في إكثارها والحصول على مادة وراثية لعمليات التحسين الوراثي. تمت في هذا البحث دراسة درجة القرابة الوراثية لإثني عشرة صنف زيتون (ماوي إستنبولي، خلخالي خشن، دان، منيقري، أدكم، دعيبلي، جلط، خلخالي صغير، قرماني مدعبل، ماوي أبو شوكة، صوراني، أبو شوكة)، مزروعة في المجمع الوراثي للمركز العربي لدراسات الأراضي الجافة و المناطق القاحلة (أكساد) في جلين، باستخدام تقنية ISSR بهدف تحديد درجة القرابة بين هذه الأصناف حيث لوحظ وجود درجة قرابة عالية نسبياً بين هذه الأصناف و بدرجة تتراوح بين 60% و85%، ولوحظ تباعد الصنف منيقري بصفاته عن باقي الأصناف، كما كانت نسبة التعددية الشكلية 92.94%.

المقدمـــة

تعد شجرة الزيتون (*Olea europaea* L.) من أقدم أشجار الفاكهة المثمرة التي عرفها الإنسان واستزرعها منذ زمن بعيد، وتعد سوريا الموطن الأصلي لشجرة الزيتون، حيث لوحظ انتشار الزيتون البري في مناطق عديدة من سوريا (حارم والغاب وسفوح جبل الشيخ)، وأشار(**Breton *et al* 2006**) إلى وجود عدد من طرز الزيتون البري التابعة للصنف *Olea europaea* ssp. *europaea* var *sylvestris* أو ما يعرف باسم Oleaster في سوريا وتركيا وفلسطين وتونس وليبيا وسيسليا وجزيرة كورسيكا.

وتحتل شجرة الزيتون المركز الأول بين الأشجار المثمرة في سوريا وذلك بمساحة بلغت 617060 هكتاراً، بإنتاجية قدرها 827933 طن ويبلغ عدد الأشجار المزروعة في سوريا 9042900 شجرة منها 66393700 شجرة مثمرة. (**إحصائيات وزارة الزراعة والإصلاح الزراعي للعام 2008**).

يقدر عدد أصناف الزيتون المزروعة في أنحاء العالم بـ 1200 مع أكثر من 3000 مرادف لأسماء الأصناف (**Rugini and Lavee, 1992**). وفي سوريا سجل ما يزيد عن 50 صنفاً محلياً وأكثر من 40 صنفاً مدخلاً (**زغلولة، 2000**).

ويسبب هذا العدد الكبير من الأصناف مشكلة كبيرة نتيجة الخلط الواضح والملموس في أسمـاء العديد منها. حيث أن البعض منها متشابـه جداً من الناحية المورفولوجية (**Cipriani *et al* 2002**). وأكثر من ذلك فـإن التنـوع الوراثـي ضمن الصنف الواحد

(سلم البحث فى 8 أكتوبر 2010)
(ووفق على البحث فى 1 نوفمبر 2010)

أدى لظهور طرز عديدة ضمن نفس المجمعات المزروعة (**Gregoriou, 1996**) الأمر الذي أدى لتباين في الإنتاج وصفات الجودة (**Besnard *et al* 2001**).

ويظهر الزيتون تغيراً مستمراً ومرونة عالية في معظم صفاته الشكلية والفسيولوجية والبيوكيميائية كونه محصول خلطي التلقيح. الأمر الذي يزيد إمكانية حصولا أخطاء في التوصيف والتسمية (**Hernandez *et al* 2001**).

كما أن الأصناف المحلية خلطية التلقيح والموزعة عشوائياً مع التسمية الخاطئة لها والنقل المستمر للمادة النباتية بين مختلف المناطق والدول الزارعة التي تزرع الزيتون بدون تحديد واضح للأصناف ممايزيد من تعقيد تحديدها، معطياً نموذجاً مضطرباً لتوزعها الجغرافي (**Sarri *et al* 2006**).

ولهذا السبب يعد توصيف المصادر الوراثية للزيتون وتطويرها ضرورياً، على الرغم من أن تحديد هوية أصناف الزيتون معقد نظراً للأعداد الكبيرة من المتجانسات والمترادفات والتبدل الكبير للمادة النباتية، وتواجد الكلونات المختلفة ومشاكل سوء تسمية الأصناف في المشاتل (**Bandelj *et al* 2002**).

إن غنى المجمع الوراثي السوري للأصناف المزروعة من الزيتون، والإرباك في الأسماء المنسوبة لها وفق المناطق المختلفة، إضافةً إلى وجود اختلافات فيما بينها وعدم التوازن بين مجموعاتها ضمن البلاد المختلفة لزارعة الزيتون لاستخدامها كمصدر للمادة النباتية الموثوقة والمجربة، مما يفسر المشكلات الكبيرة التي تواجه عملية توصيف هذه الأصناف. (**Trujillo *et al* 2006**).

يضاف إلى هذا الخلط الذي يحصل للأصناف عند قيام مزارعي الزيتون بإجراء عمليات الإكثار العشوائية للزيتون بغية تجديد الشجرة أو تغيير الصنف المزروع، مما يعيق معرفة الأصناف بشكل دقيق، إضافة إلى عدم توثيق الشتلات المباعة من قبل المشاتل وعدم اهتمام المزارعين في بعض المناطق بالصنف الذي يزرعونه نظراً لرخص أسعار شتلات الزيتون مقارنةً بشتلات الأشجار المثمرة الأخرى. كل هذه الأمور تجعل من المهم بل من الضروري إجراء توصيف جزيئي لأصناف الزيتون المختلفة بحيث يصبح لكل صنف بصمة وراثية خاصة به تميزه عن غيره .

تعتبر التكرارات البسيطة الترادفية الداخلية ISSR (Inter simple sequence repeats) من المعلمات الجزيئية البسيطة والسريعة ذات المصداقية العالية، ويمكن تصميم بادئاتها بسهولة وبدون معلومات مسبقة عن التسلسل الجيني لقطعة الحمض الريبي النووي منقوص الأكسجين DNA المستهدف، كما أنها تعطي حزماً ذات تعددية شكلية عالية، وتستخدم بشكل واسع في مجالات تحديد الأصناف، ورسم الخرائط الوراثية، والتنوع الوراثي ووضع بادئات التكرارات البسيطة الترادفية (Simple sequence repeats) ISSR. (**Qian *et al* 2007**).

وقد أجريت أبحاث عديدة على تطبيق ISSR على الزيتون، نذكر منها مما أجري على تحديد الأصناف، فقد قام (**Gomes *et al* 2009**)، بدراسة التنوع الوراثي لـ41 صنفاً من الزيتون البرتغالي باستخدام تقنية ISSR، وأعطت 11 بادئة 135 حزمة، كان منها 108 ذو تعددية شكلية بنسبة 79%، وبينت هذه الدراسة الأهمية الكبيرة لاستخدام بادئات ISSR لدراسة الاختلاف بين الأصناف.

وقد تم التركيز في هذا البحث على عدد من الأصناف المحلية ذات الأهمية الاقتصادية الجيدة لجودة ثمارها أو لتحملها للظروف البيئية المختلفة بغرض تسليط الضوء عليها للعمل على زيادة نشر زراعتها وتوثيقها كمادة وراثية ذات أهمية عالية لتكون لبنةً يعتمد عليها في برامج التحسين الوراثي للزيتون.

مواد وطرائق البحث

المادة النباتية واستخلاص DNA

تم الحصول على عينات من أوراق أشجار الزيتون من مجمع جلين الوراثي (محافظة درعا) التابع للمركز العربي لدراسات المناطق الجافة والأراضي القاحلة (أكساد) من إثنا عشر صنفاً من الزيتون السوري المزروع في المجمع وهي (ماوي استنبولي، خلخالي خشن، دان، منيقري، أدكم، دعيبلي، جلط، خلخالي صغير، قرماني مدعبل، ماوي أبو شوكة، صوراني، أبو شوكة)، وكانت هذه الأوراق

خالية من الإصابات المرضية والحشرية. وقد تم استخلاص DNA من أوراق الأصناف المدروسة وفق (**Pospiech & Neumann, 1995**) مع إجراء بعض التعديلات عليها.

تضخيم DNA

أجري تضخيم DNA الناتج من عملية الاستخلاص للأصناف الإثنى عشرة المدروسة باستخدام 13 بادئة ISSR، حيث كان الحجم النهائي في الأنبوب الواحد 25 ميكروليتر، متضمنة: 12.5 ميكروليتر Master, Mix ماء مقطر معقم 6.5 ميكروليتر، البادئ المستخدم 2 ميكروليتر، و4 ميكروليتر DNA. ويبين **الجدول (1)** رموز البادئات المستخدمة، وتسلسلها النكليوتيدي، ودرجات حرارة التزاوج لكل منها، بعد ذلك تم فصل نواتج التضخيم على جيل الأجاروز 2% ضمن محلول الفصل الكهربي TBE1X مع إضافة معلم متدرج 1 Kb (ladder) للكشف عن مواقع وأحجام الحزم باستخدام التصوير بالأشعة فوق البنفسجية UV كما في **الشكل (1).**

التحليل الإحصائي

تم تحديد درجة القرابة الوراثية بين الأصناف المدروسة اعتماداً على بياناتها الجزيئية، وقد حللت باستخدام برنامج PopGen 32 الإحصائي وذلك بعد تحويل البيانات إلى صيغ رقمية بوجود الحزمة أو عدم وجودها (1 أو 0). ورسمت شجرة القرابة الوراثية اعتماداً على هذا البرنامج **شكل (2)**، كما يبين **الجدول (2)** مصفوفة نسب عدم التوافق PDV بتطبيق UPGMA .

النتائج والمناقشة

يبين **الجدول (3)** البيانات التي تم الحصول عليها من استخدام البادئات الـ13، من حيث عدد الحزم الكلية وعدد الحزم ذات التعددية الشكلية. وكان عدد الحزم الكلية الناتجة عن البادئات الـ13 المستخدمة 96 حزمة، بمعدل 7.38. وكان عدد الحزم التي أعطت تعددية شكلية 88 حزمة، و بلغت النسبة المئوية للتعددية الشكلية 93%، و أعطت 8 بادئات تعددية شكلية بنسبة 100%. اعطى البادئ 41 أعلى عدد للحزم المدروسة (16 حزمة)، وأعطى البادئ 34 أقل عدد من الحزم (حزمتين فقط).

تراوحت قيم النسبة المئوية لعدم التوافق (PDV) لمعلمات ISSR بين أصناف الزيتون الإثني عشر المدروسة بين 0.59 (منيقري وخلخالي خشن)، و0.15 (صوراني و أبو شوكة) بمتوسط عام قدره 0.30.

وكانت اعلى درجة قرابة وراثية بين الصنفين صوراني مع أبو شوكة ,(PDV=0.15) ، يليها بين الصنفين قرماني مدعبل مع ماوي أبو شوكة، وقرماني مدعبل مع أبو شوكة (PDV=0.16)، يليها بين الصنفين ماوي أبو شوكة مع أبو شوكة (PDV=0.18) .

وبشكل عام أظهرت نتائج الدراسة وجود درجة تشابه وراثي عالية بين الأصناف المدروسة وكانت 70% (PDV=0.30).

ويبين **الشكل (2)** شجرة القرابة العنقودية للصفات الجزيئية للأصناف المدروسة والتي انقسمت إلى مجموعتين رئيسيتين، ضمت الأولى-Cluster-1 الصنف منيقري فقط وهو الأكثر بعداً عن بقية الأصناف (0.21).

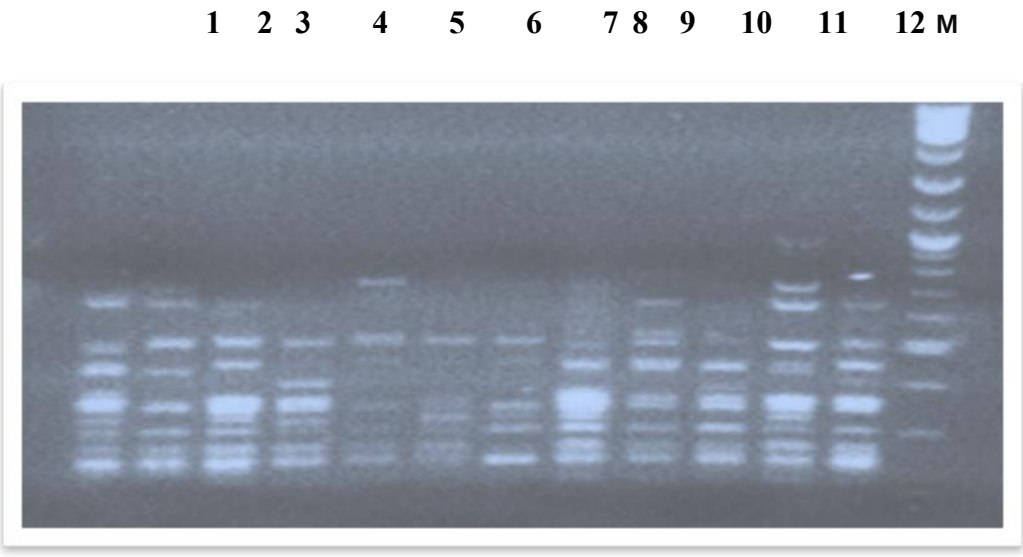
أما المجموعة الثانية -2- Cluster فقد ضمت بقية الأصناف المدروسة. حيث انقسمت إلى تحت مجموعتين، ضمت تحت المجموعة الأولى الصنفين ماوي استنبولي و جلط (0.15)، وضمت تحت المجموعة الثانية بقية الأصناف المدورسة، وقسمت هذه المجموعة إلى فرعين، ضم الأول الصنفين دان وأدكم (0.12) ، وضم الثاني الأصناف الباقية.

المقترحات

يعد الزيتون من أكثر المحاصيل الزيتية انتشاراً وأهمية في منطقة حوض المتوسط، و يؤثر الخلط في الأصناف سلباً على نوعية الزيت، وعلى هذا نوصي باستخدام الطرق الوراثية في التمييز بين أصناف

جدول 1. الرموز والتسلسل النكليوتيدي ودرجة الحرارة للبادئات المستخدمة

رقم البادئ	التسلسل النكليوتيدي	درجة حرارة التزاوج ْم
1	$(AG)_8T$	50
3	$(CA)_8A$	50
4	$(CA)_8G$	52
5	$(AC)_8T$	50
6	$(GA)_8CG$	56
9	$(AC)_8GG$	56
14	$CCAG(GT)_7$	56
15	$(GT)_4(GA)_5$	54
16	$(AC)_7(AT)_3$	54
34	$(CT)_8G$	50
37	$(TG)_8G$	50
40	$(AC)_8TT$	50
41	$(AC)_8CG$	50



الشكل 1. نواتج التضخيم على جيل الأجاروز 2% ضمن محلول الفصل الكهربي

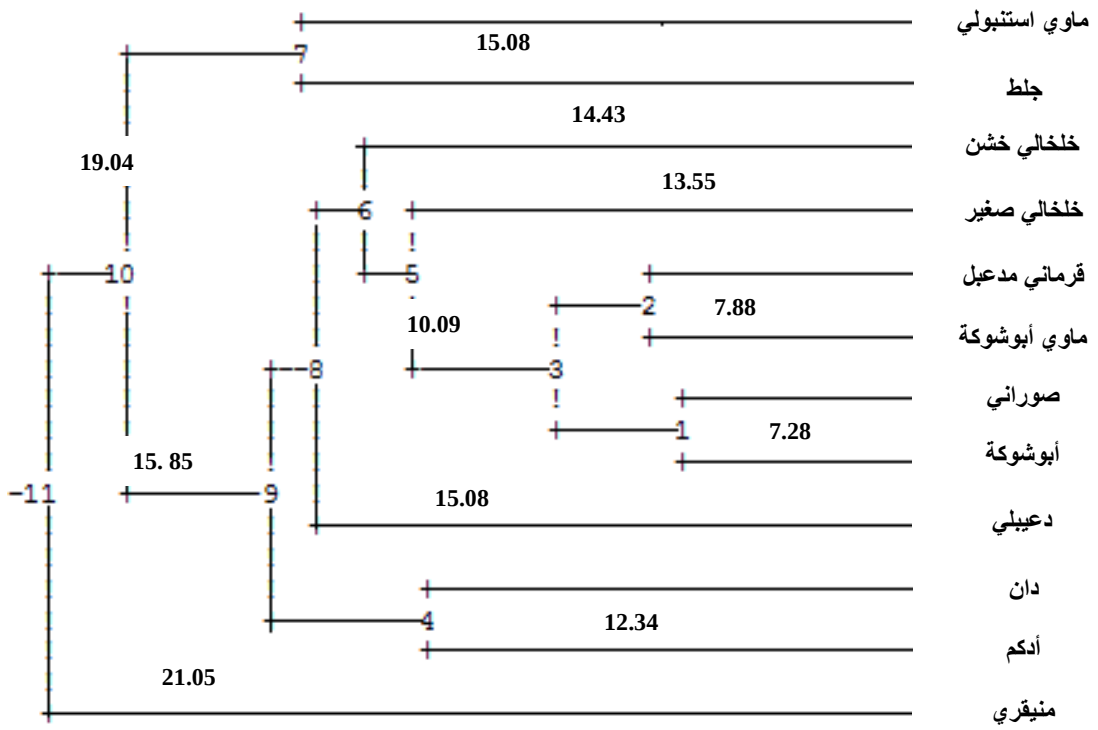
M: معلم، 1: الصنف ماوي استنبولي، 2: الصنف خلخالي خشن، 3: الصنف دان، 4: الصنف منيقري، 5: الصنف أدكم، 6: الصنف دعيبلي، 7: الصنف جلط، 8: الصنف خلخالي صغير، 9: الصنف قرماني مدعبل، 10: الصنف ماوي أبوشوكة، 11: الصنف صوراني، 12: الصنف أبوشوكة

جدول 2. مصفوفة المتوسط العام لنسب عدم التوافق الناتجة عن دراسة متوسط التشابه الوراثي للصفات الكمية للأصناف المدروسة

	ماوي إستنبولي	خلخالي خشن	دان	منيقري	أدكم	دعيبلي	جلط	خلخالي صغير	قرماني مدعبل	ماوي أبو شوكة	صوراني	أبو شوكة
ماوي إستنبولي	0.00											
خلخالي خشن	0.42	0.00										
دان	0.37	0.42	0.00									
منيقري	0.50	0.59	0.34	0.00								
أدكم	0.36	0.44	0.25	0.39	0.00							
دعيبلي	0.42	0.41	0.33	0.45	0.32	0.00						
جلط	0.30	0.37	0.39	0.33	0.41	0.47	0.00					
خلخالي صغير	0.47	0.30	0.26	0.44	0.42	0.36	0.45	0.00				
قرماني مدعبل	0.30	0.26	0.27	0.42	0.29	0.21	0.32	0.22	0.00			
ماوي أبو شوكة	0.27	0.29	0.22	0.36	0.26	0.26	0.26	0.30	0.16	0.00		
صوراني	0.44	0.36	0.29	0.41	0.36	0.33	0.39	0.29	0.22	0.25	0.00	
أبو شوكة	0.36	0.23	0.27	0.39	0.29	0.29	0.37	0.27	0.16	0.18	0.15	0.00
المتوسط	0.38	0.37	0.29	0.40	0.34	0.32	0.36	0.27	0.18	0.22	0.15	0.00

جدول 3. الحزم الناتجة عن البادئات المستخدمة والتعددية الشكلية

اسم البادئ	عدد الحزم الكلي	عدد الحزم المتعدد شكلياً	النسبة المئوية للحزم المتعددة شكلياً	عدد الحزم غير المتعددة	النسبة المئوي للحزم غير المتعددة
1	7	7	100	0	0
3	5	4	80	1	20
4	7	7	100	0	0
5	8	8	100	0	0
6	4	4	100	0	0
9	9	9	100	0	0
14	8	8	100	0	0
15	9	8	89	1	11
16	6	5	83	1	17
34	2	2	100	0	0
37	8	7	87.5	1	12.5
40	7	7	100	0	0
41	16	12	68.75	4	31.25
المجموع	**96**	**88**		**8**	**91.75**
المعدل	**7.38**	**6.77**	**92.94**	**0.62**	**7.06**



الشكل 2. شجرة القرابة بين الأصناف المدروسة حسب البيانات الجزيئية

الزيتون المختلفة، وتوسيع العمل ليشمل بقية الأصناف المحلية والمدخلة في مجمعات المركز العربي الوراثية ليكون لكل صنفٍ بصمة شكلية ووراثية خاصة به تميزه عن غيره ، وذلك للحصول على مادة وراثية تستخدم في برامج التحسين الوراثي.

المراجـع

أولاً: المراجع العربية

المجموعة الإحصائية الزراعية السورية (2008). قسم الإحصاء، مديرية الإحصاء والتخطيط، وزارة الزراعة والإصلاح الزراعي، دمشق.

زغلولة محمد عادل. أطلس أهم أصناف الزيتون المحلية و المدخلة المنتشرة في سوريا (2000). قسم بحوث البستنة الشجرية، مديرية البحوث العلمية الزراعية، وزارة الزراعة والإصلاح الزراعي، دمشق.

ثانياً: المراجع الأجنبية

Bandelj, D.; J. Jakse and B. Javornik, (2002). DNA fingerprinting of olive varieties by microsatellite markers. **Food Technol. Biotechnol. 40(3): 185-190.**

Besnard, G.; C. Breton; P. Baradat; B. Khadari and A. Bervillé, (2001). Cultivar identification in olive based on RAPD markers. **J. Amer. Soc. Hort. Sci., 126: 668–675.**

Breton, C.; M. Tersac and A. Bervillé, (2006). Genetic diversity and gene flow between the wild olive (Oleaster, *Olea europaea* L.) and the olive: several Plio-Pleistocene refuge zones in the Mediterranean basin suggested by simple sequence repeats analysis. **Journal of Biogeography 33: 1916–1928.**

Cipriani, G.; M.T. Marrazzo; R. Marconi; A. Cimato and R. Testolin, (2002). Microsatellite markers isolated in olive (*Olea europaea* L.) are suitable for individual fi ngerprinting and reveal polymorphism within ancient cultivars. **Theor. Appl. Genet., 104: 223–228.**

Gomes, S.; P. Martins-Lopes; J. Lopes and H. Guedes-Pinto (2009). Assessing Genetic diversity in *Olea europaea* L. using ISSR and SSR markers. **Plant Molecular Biology Reporter. V. 27(3): 365-373.**

Gregoriou, C. (1996). Assessment of variation of landraces of olive tree in cyprus. **Euphytica, 87: 173–176.**

Hernández, P.; R. de la Rosa; L. Rallo; G. Dorado and A. Martín, (2001). Development of SCAR markers in olive *(Olea europaea)* by direct sequencing of RAPD products: Applications in olive germplasm evaluation and mapping. **TAG 103: 788–791.**

Pospiech, A. and B. Neumann, (1995). A versatile quick-prep of genomic-DNA from Gram-positive bacteria. **Trends in Genetics. V(11):217-218.**

Qian Z.; D. Hong and Z. Dong Hang, (2007). ISSR Molecular Marker and its application in plant researches. **Molecular Plant Breeding V(6): 123-129.**

Rugini, E. and S. Lavee, (1992). Olive. In: F.A. Hammerschlag and R.E. Litz (eds.). **Biotechnology of Perennial Fruit Crops, PP. 371–382.**

Sarri, V.; L. Baldoni; A. Porceddu; N.G.M. Cultrera; A. Contento; M. Frediani; A. Belaj; I. Trujillo and P.G. Cionini, (2006). Microsatellite markers are powerful tools for discriminating olive cultivars and assigning them to geographically defined populations. **Genome, 49: 1606-1615.**

Trujillo, I.; M.A. Ojed; L. Baldoni and A. Belaj, (2006). Olive cultivar Identification By Means of Microsatellites (ISSR). **Jour-FAO Olive Network, 25: 24-27.**