مجلة المثنى للعلوم الزراعية المجلد (8) العدد(4) لسنة 2021
Al-Muthanna J. For Agric Sci. Print ISSN: 2226-4086 Online ISSN:2572-5149
DOI 10.52113/mjas04/8.4/4

مجلة المثنى للعلوم الزراعية
www.mjas.com

Identification Of F1 Hybrids From Crosses Of Citrus Rootstocks Tolerant To Shilling Stress Using Molecular Markers SSR

Venus Ebrahem Hasan[1] Hasan Yosef Khojah[2] Ali Essa Elkhateeb[1]

[1] **General Commission Agriculture Scientific Research- Lattakia Syria.**

[2] **Tishreen University- Agriculture College- Horticulture Department- Lattakia Syria.**

Article Info.

Received 2021 / 11 /1
Accepted date 2021 / 12 /16

Keywords

Citrus rootstocks, shilling stress, Simple Sequence Reapet, hybrids

Abstract

The study was carried out at the Agricultural Scientific Research Center in Lattakia, Syria, during (2018-2019) and (2019-2020), after obtaining F1 seedlings resulting from different crosses between the following citrus rootstocks: sour orange., Cleopatra mandarin. and the trifoliate orange. The individuals were selected according to the characteristic of the formal leaf, and then selected individuals were subjected to shilling stress, that is one of the determinants of citrus cultivation in Syria by placing the one-year-old individuals in controlled freezers.The results shows that the percentage of damage in the leaves of the tri-leaf orange hybrids did not exceed 32%, while Cleopatra tangerine hybrid it ranged between 0% and 58%, and in the sour orange hybrids between 6% and 16%. Within 24 hours of applying stress and 11 individuals were selected from the F1 tolerant to the stress of cold shilling (10-)°C and (0)°C for 24 hours, the hybrids continued to grow normally the following spring, Since the citrus seeds are polyembryonic and give nucellular embryos; its genotype similar to the seed parent, the objective of moleculare markers SSR is identification tolerant hybrids. Whereas,. as a result, four primeres were able to effectively identify hybrids, that showing difference with seed parent; and all the individuals were hybrids.

Corresponding author: E-mail(venushasan80@gmail.com) Al-Muthanna University All rights reserved

تحديد الأبناء الهجن **1F** الناتجة من عدة تهجينات لأصول الحمضيات المتحملة لإجهاد البرودة الشديد باستخدام **SSR**

فينوس ابراهيم حسن[1] حسان يوسف خوجه[2] علي عيسى الخطيب[1]

[1] الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية ، اللاذقية، سوريا.

[2] أستاذ مساعد، كلية الزراعة، جامعة تشرين، اللاذقية، سوريا.

الملخص

تمت الدراسة في مركز البحوث العلمية الزراعية في اللاذقية سوريا خلال الأعوام 2018)-(2019 و 2019)-(2020، بعد الحصول على أبناء الجيل الأول الناتج عن تهجينات مختلفة بين أصول الحمضيات التالية: الزفير(النارنج) *Citrus aurantium* L. و اليوسفي كليوباترا . *Citrus reticulata* Blanco والبرتقال ثلاثي الأوراق *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.، تم انتخاب الأبناء المنتخبة حسب صفة الورقة الشكلية، ثم تعريض الأبناء لإجهاد البرد العالي حيث أن إجهاد الصقيع يعتبر من العوامل المحددة لزراعة الحمضيات في سوريا وذلك بوضع الأبناء بعمرسنة في مجمدات مُتحكم بها، وأظهرت النتائج أنه لم تتجاوز نسبة الضرر في أوراق هجن البرتقال ثلاثي الأوراق 32%، بينما تراوحت في أوراق هجن اليوسفي كليوباترا بين 0% و 58%، وفي هجن الزفير(النارنج) بين 6% و 16%. خلال 24 ساعة من تطبيق الإجهاد؛ وتم انتخاب 11 غرسة من أبناء الجيل الأول متحملة لإجهاد البرد العالي – 10مْ والدرجة 0 مْ لمدة 24 ساعة، وتابعت الأبناء النمو بشكل طبيعي في الربيع التالي، وحيث أن بذور الحمضيات متعددة الأجنة وتعطي أجنة خضرية تركيبها الوراثي مشابه للنبات الأم، تم استخدام مؤشرات SSR لتحديد الأبناء الهجينة والتي تحملت الإجهاد، ومن نتائج استخدام SSR استطاعت أربعة بادئات تحديد الأبناء الهجن بشكل فعال، حيث أعطت حزماً مخالفة للحزم التي أعطتها الأم وكانت جميع هذه الأبناء هجناً.

الكلمات المفتاحية: أصول الحمضيات– إجهاد البرد- المقاطع البسيطة التكرارية- هجن

1. المقدمة

تأتي شجرة الحمضيات في مكانة متقدمة بين الأشجار المثمرة في العالم، نظراً لأهميتها الاقتصادية والغذائية والطبية والجمالية والبيئية. وتنتمي إلى العائلة السذبية *Rutaceae* وإلى تحت عائلة *Aurantioideae*. نشأت الحمضيات في المنطقة الاستوائية والمدارية، في جنوب شرق آسيا وشرق الهند، وجنوب الصين

والفلبين، وتنتشر الآن في المناطق الاستوائية وتحت الاستوائية بين خطي عرض 40 - 45 شمالاً و34– 40 جنوباً حيث درجات الحرارة المعتدلة (Manner وآخرون ، 2006)، وفي القطر العربي السوري نلاحظ تطوراً ملحوظاً في زراعة الحمضيات؛ إذ تجاوزت المساحة المزروعة 42 ألف هكتار، وأعطت إنتاجاً تخطى المليون طن (Ministry Of Agriculture ،2009). تعد محافظة اللاذقية عماد الوطن في زراعة وإنتاج الحمضيات في سورية، حيث تشكل المساحة المزروعة في اللاذقية أكثر من 75% من إجمالي المساحة المزروعة بالحمضيات، وتعطي ما يزيد عن 81% من إجمالي إنتاجها من الحمضيات.

زُرعت شجرة الحمضيات لمئات السنين من مصدر بذري، ومع اتساع الرقعة المزروعة بدأت تعاني الأشجار البذرية من مشاكل عديدة تحد انتشارها، منها ما يخص المشاكل البيئية (البرودة والجفاف) عدا عن مشاكل الإنتاج كماً ونوعاً. وكان اعتماد تقنية التطعيم على الأصول المناسبة ذات مقدرة على مقاومة أو تحمل المشاكل التي تعترض كل منطقة، كأحد الحلول الضرورية، وأخذت الأصول الدور الكبير في نجاح زراعة الحمضيات لأن الأصل يلعب دوراً مهماً في نمو وتطور وإنتاج هذه الشجرة (Elkhateeb ، 2001 و2009) وقد بينت أبحاث (Davies و Albrigo،1994) وجود أكثر من عشرين صفة بستانية، كميّة ونوعية مختلفة، يؤثر فيها الأصل على الصنف المطعم، وتطعم الحمضيات في المشاتل على الزفير(النارنج) Sour Orange (الأصل الوحيد في سورية) الحساس لمرض الترستيزا بينما نجد أن البرتقال ثلاثي الأوراق وهجنه معروفة أنها مقاومة لمرض الترستيزا ومتحملة لإجهاد الصقيع (Castle ، 1987)، حيث يعد تحمل البرودة أو الصقيع عاملاً محدداً لنجاح زراعة وانتشار الحمضيات، ويلعب الأصل والطعم ومدة التعرض دوراً في ذلك، وأيضاً يهدف التهجين في الحمضيات الى الحصول على أصول متحملة أو مقاومة للإجهادات الإحيائية وغير الإحيائية (Akgol وآخرون ، 2017) ، حيث استخدم سوينغل البرتقال ثلاثي الأوراق كأب في برنامج التهجين الذي قام به للحصول على أصول مقاومه للبرودة وحصل على أهم مجموعتين هما: السيترانج والسيتروميلو، وكان التهجين مع البرتقال وحصل على (مجموعة السيترانج)، ومع الجريب فروت وحصل على (السيتروميلو).

يعد البرتقال ثلاثي الأوراق مصدر وراثي مهم لبرامج التحسين الوراثي لأصول الحمضيات، وذلك لتحمله الإجهادات ومقاومة الأمراض (Zhu وآخرون، 2015)، تتميز الحمضيات بتعدد الأجنة التي تعطي غراسا خضرية وواحدة جنسية؛ تعتبر هذه الظاهرة مزعجة في برامج التربية لكنها مفيدة في تثبيت الصفة في حالة قوة الهجين أيضا للحفاظ على الأبناء المشابهة في صفاتها للأم خلال فترة زمنية قصيرة والسرعة في الدخول في طور الأثمار وعدم الإطالة بفترة النمو الخضري؛ يبتعد المزاعون غالباً عن الغراس المختلفة للحصول على عدد متماثل من النباتات لكنها صفة غير مجدية بسبب التشابة الجيني بينها (Mondal ، 2005) ؛ ولابد من التمييز بين الشتلات الجنسية والخضرية في وقت مبكر من عمر الشتلة للتسريع من برامج التربية؛ حيث أن الشتلات الخضرية تكون مماثلة للأم في صفاتها بينما الشتلات الهجينة تمتلك قوة الهجين كتحمل البرد الشديد؛ يمكن التمييز بين الشتلات الهجينة والخضرية من خلال تطور الأيزوزيم (Soost وآخرون ، 1980 وTusa وآخرون، 2002) على الرغم من أن 18 نظامًا إنزيميًا معروفًا في الحمضيات؛ إلا أن هذا التحليل يعتمد على الوقت والأنسجة ونوع الإنزيم وعمر النباتات؛ وأُعتمد على التقنيات الجزيئية لتمييز الغراس الجنسية عن الخضرية في الغراس منها تقنية التضخيم العشوائي المتعدد الأشكال RAPD وهي من أوائل تطبيقات تقنيات ال PCR (Welsh وMcClelland ، 1990 و Williamsوآخرون، 1990) وقد انتشرت بسرعة وبشكل كبير بسبب سهولة وسرعة إنجازها وكذلك شمولية بادئاتها أي إمكانية استخدامها على أي كائن حي دون الحاجة لمعلومات وراثية مسبقة عنه هذا بالإضافة إلى انخفاض تكاليفها نسبياً (Vignal وآخرون، 2002 وDas وآخلاون، 2004 وMburu و Hanotte، 2005).

حيث ميز الباحثون باستخدام هذه التقنية الغراس الجنسية والهجينة لـ(Rodríguez Citrus volkameriana وآخرون ، 2004) ، تتميز مؤشرات المقاطع البسيطة المتكررة SSR بوفرة وجودها وتوزعها الكبير في الهجين وقدرتها على كشف مستوى عال من التباينات الوراثية Polymorphism والتمييز بين الأنواع المختلفة أو بين أصناف النوع نفسه وحتى في سلالات الصنف الواحد وهي من المؤشرات مشتركة السيادة وبالتالي يمكن التمييز بين الأفراد النقية وراثياً والأفراد الهجينة أو الخليطة وراثياً وتتميز

مقاطع ال SSR بسرعة تغيرها وتطورها وهذا ينتج عن ارتفاع معدل الطفرات التي تتعرض لها مقارنة بالمواقع الوراثية الأخرى لذلك تعد من المؤشرات الهامة في دراسة التباينات الوراثية ضمن الوحدات التصنيفية الصغيرة

(Martinez وآخرون ، 2000 وMburu و Hanotte، 2005).

استخدم مؤشرات SSR لتمييز الهجن الجنسية لـ Mandarin×Orange hybrids (Ahmad وآخرون ، 2012) ، استخدم Tan وآخرون (2007) مؤشرات SSR لتمييز الهجن الجنسية الناتجة من تصالب Citrus unshiu Marc و C. reticulata Blanco كأم (maternal parent) و Poncirus trifoliata (L.) Raf كملقح (Paternal) ما استخدمت مؤشرات الSSR لتحديد الأفراد المشتقة من الأجنة الجنسية والخضرية من المصادر الوراثية للحمضيات (Woo وآخرون ، 2019)، كما استخدمت مؤشرات ال SSRلتحديد الأفراد الجنسية والخضرية من عدة تهجينات في الحمضيات (Yildiz وآخرون ، 2013).

أدى تعرض سورية لموجات برودة شديدة ومتكررة كان آخرها شتاء 2016- 2017؛ إلى خروج الكثير من أشجار الحمضيات المُطعمة على الزفير (النارنج) من الإنتاج نتيجة الصقيع، وبالتالي كان لابد من البحث والسعي لاستنباط أصول جديدة تناسب البيئة المحلية من حيث المناخ، ويهدف هذا البحث إلى دراسة استخدام أصول جديدة من الحمضيات تتحمل إجهاد البرد الشديد، ومرغوبة محلياً. وتحديد الهجن الجنسية والخضرية من الأفراد ال12 الهجينة التي تحملت اجهاد الصقيع والناتجة عن تهجينات متبادلة بين ثلاثة أصول من الحمضيات النارنج واليوسفي كليوباترا والبرتقال ثلاثي الأوراق

2. مواد البحث وطرائقه

2-1 المادة النباتية المدروسة:

تم استخدام ثلاثة أصول من الحمضيات هي:

2-1-1 البرتقال ثلاثي الأوراق: ***Poncirus trifoliata*** (L.) Raf..

هو أصل متساقط الأوراق، وأكثرأصول الحمضيات تحملاً للبرودة، لذلك يستخدم كأصل في المناطق الباردة (Castle ، 1987)، وهو أصل مقصر، ويدخل في برامج التهجين بكثرة في استنباط أصول متحملة للبرودة. وأشهر برامج الإكثار كانت في فلوريدا قام بها سوينغل للحصول على هجائن مختلفة بغرض تحمل البرودة بعد الصقيع الذي فتك بأشجار الحمضيات المطعمة على النارنج في ولاية فلوريدا عام/1894- 1895/ (Swingle و Reece، 1967)، بذوره عديدة الأجنة Polyembryonic، الأشجار المطعمة عليه صغيرة الحجم، وسريعة الإثمار، وذات محصول جيد، وتعتبر جودة ثمار الأصناف المطعمة عليه الأفضل من بين الأصول المعروفة وتتفوق على النارنج، والعصير ممتاز الصفات، وذو جودة عالية (Elkhateeb، 2009)، وهو أصل مقاوم لمرض التدهور السريع الفيروسي (Hutchison CTV، 1977) والزايلوبوروسس، ومقاوم للنيماتودا بدرجة جيدة، مقاوم جداً لمرض التصمغ، يقاوم الغرق، ولذلك فهو أصل مناسب للأراضي الثقيلة الرطبة ويتحمل ارتفاع مستوى الماء الأرضي، ولكن من عيوبه حساسيته لمرض الإكسوكورتس CEV، والأتربة القلوية، كما لا يتحمل الملوحة، وغير مناسب للترب الرملية، وحساس لارتفاع تركيز كربونات الكالسيوم بالتربة، كما يعتبر قليل التوافق مع معظم الأصناف التجارية، ويعتبر البرتقال ثلاثي الأوراق مصدر وراثي مهم لبرامج التحسين الوراثي لأصول الحمضيات، وذلك لتحمل الإجهادات ومقاومة الأمراض (Zhu وآخرون ، 2015).

2-1-2 الزفير(النارنج) ***Sour Orange*** واسمه العلمي ***Citrus aurantium* L.**

الأصل الأكثر انتشاراً وشهرة عالمياً ومحلياً، وهو أصل نصف مقصر متوسط النمو والأشجار المطعمة عليه متوسطة الحجم وذو توافق جيد مع الأصناف التجارية (Hutchison ، 1977)، البذور متعددة الأجنة. توافقه جيد مع معظم أصناف الحمضيات، عدا البرتقال اليافاوي والشاموتي واليوسفي الساتزوما، والحامض الماير، وهو متحمل لمرض التصمغ، وللجفاف، لذلك يمكن زراعته في مختلف أنواع الترب، من الترب الثقيلة القوام إلى المتوسطة القوام حتى الخفيفة، ودرجة تحمله للكلس عالية، ويتحمل الملوحة وارتفاع درجة الحموضةpH . يعاب عليه أنه أصل حساس لنيماتودا الحمضيات، ونيماتودا تعقد الجذور، وقد دلت الدراسات الحديثة عن المسح والتحري عن النيماتودا محلياً أنّها تنتشر بشكل كبير في معظم بساتين الحمضيات وتسبب النيماتودا ما يسمى بالتدهور البطيء على الحمضيات،.وتصاب

أصناف الحامض المطعمة عليه بالمالسيكو المرض الذي قضى على معظم أشجار الحامض في سوريا، ولكن من أخطر عيوبه حساسية الأصناف المطعمة عليه لمرض التدهور السريع الفيروسي CTV المعروف باسم التريستيزا، ثمار الأصناف المطعمة عليه جيدة النوعية لكنها أقل نوعية من هجائن الثلاثي، يعتبر النارنج الأصل السائد (إن لم يكن الوحيد) في مراكز إنتاج غراس الحمضيات المحلية، وأدى انتشار مرض المالسيكو الفطري إلى موت معظم أشجار الحامض بالقطر، ولكن الأمر الذي يجعل خطورة استخدامه وضرورة البحث عن البدائل هو تسجيل المرض لأول مرة رسمياً في سوريا عام 2006.

2-1-3 اليوسفي كليوباترا ***Cleopatra mandarin*** الاسم العلمي ***Citrus reticulata*** **Blanco** استخدم لأول مرة في الولايات المتحدة عام 1917 تعتبر الهند الموطن الأصلي لليوسفي كليوباترا، والأشجار المطعمة عليه بطيئة النمو، ثماره صغيرة الحجم, وهو يقاوم ال CTV، ويتحمل الترب الكلسية والمالحة، كما أكد Nava Ayala وMonter (1994) بأنّه أصل بطيء النمو في المشتل وصعب التطعيم عليه، ويعتبر هذا الأصل من الأصول الجيدة المتحملة للأمراض الفطرية والفيروسية.

2-2 طرائق البحث

2-2-1 تم تهجين الآباء وفق التوافقات التالية جدول (1)

جدول 1. التهجينات المُنفذة وعدد الأبناء الناتجة

Seed parent ♀	Pollen parent ♂	الرمز	عدد الأبناء
البرتقال ثلاثي الأوراق	الزفير(النارنج)	**A**	**200**
اليوسفي كليوباترا	الزفير(النارنج)	**B**	**200**
الزفير(النارنج)	البرتقال ثلاثي الأوراق	**C**	**200**

2-2-2 زراعة البذور الهجينة

تمت زراعة بذور لكل من الزفير(النارنج)، والبرتقال ثلاثي الأوراق، واليوسفي كليوباترا حسب موعد نضج الثمار عام 2018 ضمن مراقد محددة لكل منها وذات رموز A-B-C حيث الرمزA يتوافق مع هجن البرتقال ثلاثي الأوراق(Seed parent)، والرمزB يتوافق مع هجن اليوسفي كليوباترا(Seed parent)، والرمز C يتوافق مع هجن الزفير(Seed parent)، ثم تم انتخاب الأبناء في شهر أيار من نفس العام من كل مسكبة على حده بالإعتماد على صفة الورقة كصفة مظهرية تنتقل إلى أفراد الجيل الأول الهجينة الجنسية دون الخضرية، هذا ماأكده (Zhu وآخرون ، 2013) .

أعطيت هجن البرتقال ثلاثي الأوراق (Seed parent) الأرقام A-2A1- حتى 200A استخدم فيها حبوب طلع النارنج كأب (pollen parent).كما أعطيت هجن الأم اليوسفي كليوباترا (Seed parent) الأرقام B -2B1 حتى 200B وكان الأب هو الزفير أيضاً (pollen parent)، بينما أعطيت هجن الزفير(النارنج) (Seed parent) الأرقام C –2C1- حتى 200C وكان الأب هو البرتقال ثلاثي الأوراق (pollen parent). يرمز الرقم الثاني إلى رقم النبات في التجربة.

- تم نقل الأفراد الهجينة إلى أكواب زراعية سعة 2 كغ وخلطة ترابية مكونة من التورب والرمل والتربة بنسب متساوية وتمت خدمتها والعناية بها حتى موعد بدء التجربة في تشرين الثاني.

- تم تعريض بادرات الجيل الأول لإجهاد البرد بشكل تدريجي وفقاً لمعاملتين من درجات الحرارة (0)مْ و (10-)مْ حسب (Yelenosky ، 1978) تم تنفيذ جميع العمليات الزراعية من تسميد وري وتعشيب...إلخ وفق القواعد المتبعة في زراعة الحمضيات.

- فيما يخص العمل الجزيئي

2-2-3 تحضير العينات

جمعت الأوراق الفتية بعمر ستة أشهر من أفراد الجيل الأول بعمر سنة (المتحملة للإجهاد) الناتجة عن تصالب بين الزفير(النارنج) كأم و البرتقال ثلاثي الأوراق كأب وأخذت الرمزC– 9C6 والكليوباترا كأم و (الزفير)النارنج كأب أخذت الرمز B19– B1 B–22 والبرتقال ثلاثي الأوراق كأم والزفير(النارنج) كأب أخذت الرمز A– A2– A23– A18– A1 – 25A21 إضافة للآباء رمزت كالتالي البرتقال ثلاثي الأوراق أخذ الرمز A واليوسفي كليوباترا B والزفير(النارنج) C؛ تم استخراج الDNA بواسطة QIAGEN DNeasy Plant Mini Kit، تم استخراج

الDNA مباشرة بعد جمع الأوراق وبعد الإستخلاص تم حفظه على حرارة 20- مْ.

تم اختبار نوعية ال DNA على هلامة الأغاروز

4-2-2 خطوات تحضير هلامة ذات تركيز 1% من الأجاروز

أضيف 2.5 غ أجاروز إلى 250 مل من سائل الرحلان الكهربائي (10X TBE buffer: 107.8g Tris– base , 1) (X TBE 55g Boric acid ,7.44 g EDTA)، وسخن المزيج في المايكروويف حتى الغليان لتمام ذوبان الأجاروز، لونت هلامة الأجاروز بمحلول بروميد الأثيديديوم (10µg/mL25) (ml) الذي يتحد مع الـDNA مكوناً معقداً يتوهج عند تعريضه للأشعة فوق البنفسجية UV، بحيث تكون العلاقة طردية بين شدة التوهج وكمية الـDNA- الموجودة على الهلامة.

5-2-2 تحميل العينات على هلامة الأجاروز

تم اختبار نوعية الـ DNA من خلال تحميل 5 ميكرولتر من عينات الDNA بالإضافة إلى 2 ميكرولتر من سائل التحميل 10 % (bromophenol blue, 50% Glycerol, 60mm 0.25 8EDTA,Ph) على هلامة من الأغاروز ذات التركيز 1 % بعد الإنتهاء من عملية الرحلان الكهربائي Electrophoresis لعينات ال DNA تم التقدير التقريبي لتركيز الـ DNA من خلال مقارنتها مع عينات الـ DNA قياسية تم تحميلها على الهلامة بالتوازي مع العينات المدروسة.

استخدم في هذه الدراسة مؤشرات المقاطع البسيطة المتكررة SSR Simple Sequence Repeats وهي من المؤشرات المتخصصة وتعتمد على التفاعل التسلسلي للبوليميراز (Polymerase Chain Reaction(PCR.

تم تجربة 7 أزواج من بادئات ال SSR حيث أظهرت أربعة أزواج من البادئات تباينات بين الأفراد جدول (2)

6-2-2 ظروف التفاعل

أجري التفاعل في حجم نهائي 25 ميكرولتر وبالكميات والتراكيز التالية: 3 ميكرولتر تحتوي) (100 ng من الDNA، 1 ميكرولتر من البادئات تركيزه(10 pmol) µ (l/، 12.5 ميكرولتر من ال(Taq PCR Master Mix KIT)

(2.5 units Taq DNA Polymerase-1xQIAGEN PCR Buffer 200 µM of each dNTP)

8.5 ميكرو لتر ماء مقطر معقم

وتم استخدام البرنامج الحراري في جهاز التضخيم PCR التالي:

جدول 2. برنامج التضخيم الحراري

المرحلة	درجة الحرارة	الزمن	عدد الدورات
First denaturation	C°94	5دقيقة	1
Denaturation	C°94	30 ثوان	35
Annealing	حسب زوج البادئات جدول 3	45 ثواني	
Extension	C°72	2 دقيقة	
Final extension	C°72	10 دقيقة	-
End temperature	C°4	-	-

7-2-2 عملية تحميل وفصل عينات ال **DNA**

أجريت عملية فصل عينات ال DNA التي تمت مكاثرتها على جهاز الرحلان الكهربائي الأفقي باستخدام هلامة الأجاروز ذات التركيز2% (1% أغاروز 1% (PeqGold MoSieve Agarose. وتم توصيل التيار الكهربائي بجهاز الرحلان الكهربائي بجهد 120 فولت وتتعلق مدة عملية الفصل بالوزن الجزيئي لقطع ال DNA المكاثرة.

تم جمع نتائج المكاثرة ببادئات SSR بجداول خاصة، حيث تم اعتماد الرقمين (0)و (1) للدلالة على غياب أو وجود قرين على التوالي، قدرت نسبة التشابه بين الأفراد والآباء باستخدام البرنامج الإحصائي NTSYS-2PC، (Numerical Taxonomy and Multivariate AnalysisSystem) (Rohlf ، 1993).

جدول3. أسماء أزواج بادئات ال SSR الأمامية والعكسيةالمستخدمة في التحليل وتركيبها النيوكليوتيدي وحرارة ارتباطها			
البادئات Primers	التركيب النيوكليوتيدي للبادئات Primers Sequences(5`-3`)F	التركيب النيوكليوتيدي للبادئات Primers Sequences (5`-3`) R	درجة حرارة الإرتباط
CCSM17	ACATGGACAGGACAACTAAG	GTTATGATACGTCTGTGTCC	54
CCSM147	GCTATGTTATGATACGTCTG	AGACTCACGTAACCTACTTC	49
CCSM18	GTGATTGCTGGTGTCGTT	AACAGTTGATGAAGAGGAAG	50
CCSM13	CTAGAGCCGAATTCACC	AACAGCTACCAAGACACC	49
TTA27	GGATGAAAAATGCTCAAAATG	TAGTACCCACAGGGAAGAGAGC	51
TTA15	GAAAGGGTTACTTGACCAGGC	CTTCCCAGCTGCACAAGC	53
TTA33	GGTACTGATAGTACTGGGGGG	GCTAATGCTAGGTCTTCGC	54

3 النتائج والمناقشة

لقد بيّنت نتائج هذه الدراسة أن إجهاد البرد بدرجة حرارة صفر مئوية؛ لم يؤد إلى إحداث أية أضرار ظاهرية في أنسجة الأوراق، ولا في النموات الحديثة للغراس الهجينة المُختبرة. بينما أدى إجهاد البرودة الشديدة (10-) مْ على غراس الحمضيات؛ إلى حدوث ضرر في أنسجة النبات سواء في الأوراق أو في النموات الحديثة، وهذا يؤكد أن النباتات المتعرضة لإجهاد البرودة مُتحملة أو مقاومة البرودة وهذا التحمل يقف عند عتبة محددة؛ وأن عوامل أخرى وراثية وغيرها تأخذ دورها في ذلك. تتوافق هذه النتيجة مع معطيات (Dahro وآخرون ، 2016) الذين درسوا تأثير المورثة PtrA / NINV التي تم عزلها من البرتقال ثلاثي الأوراق وتبين أنها تلعب دورًا إيجابيًا في تحمل إجهاد البرودة من خلال تعزيز التعديل الإسموزي وإزالة السموم بالإضافة إلى زيادة فعالية التمثيل الضوئي.

يوضح الجدول(4) مقدار الضرر ونسبته في الهجن المدروسة عند تعرضها لإجهاد البرودة الشديدة.

جدول4. يبين نسبة الأوراق الميتة في كل هجين عند إجهاد البرودة الشديد(10-) مْ			
الهجن المدروسة	الآباء	نسبة موت الأوراق في الأبناء المجهدة%	ملاحظات
B5	)كليوباترا♀)×(زفير♂)	18	
B24		58	موت النموات الغضة خلال 48 ساعة
B20		25	
B8		20	موت النموات الغضة خلال 48 ساعة
B9		0	
B10		19	موت النموات الغضة خلال 48 ساعة
C4	(زفير♀)×(البرتقال ثلاثي الأوراق ♂)	8	
C13		6	
C9		16	
A23	(البرتقال ثلاثي الأوراق♀) × (زفير♂)	15	موت القمم النامية خلال 48 ساعة
A18		0	
A1		32	موت القمم النامية والأفرع الغضة خلال 48 ساعة

يتضح من الجدول (4) اختلاف ردة فعل الهجن لانخفاض درجة الحرارة الشديدة، من حيث نسبة موت الأوراق في الهجن بعد يومين من التعرض لإجهاد البرد على درجة حرارة (10- مْ) لمدة 24 ساعة؛ فقد تراوحت بين أعلى نسبة موت (58%) في الهجين 24B، وأقل نسبة موت (6%) في الهجين 13C، بينما لم يحدث أي ضرر في كلا الهجينين 18A أو9B. كما يلاحظ أيضاً أن نسبة الضرر في أوراق هجن البرتقال ثلاثي الأوراق لم تتجاوز 32%، بينما تراوحت في أوراق هجن اليوسفي كليوباترا بين 0% و 58%، وفي هجن النارنج بين 6% و 16%. مما سبق نجد أن الهجن التي كان البرتقال ثلاثي الأوراق أحد أبويها لم تتجاوز نسبة الأوراق الميتة الثلث في حين زادت عن النصف في الهجن ذات الأبوين الكليوباترا والزفير(النارنج)، يمكن تفسير ذلك بأن مقاومة البرتقال ثلاثي الأوراق العالية للصقيع، وهذا ما أكدته الكثير من

الدراسات (Yelenosky وآخرون ، 1973وZhu وآخرون ، 2013).

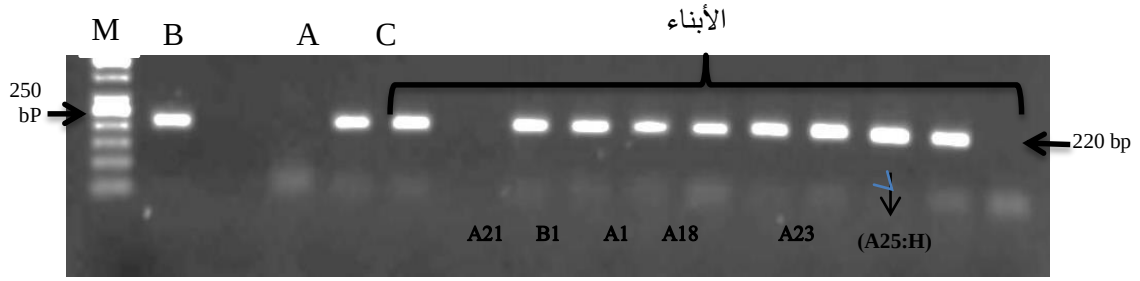
ويعزى سبب موت الأوراق إلى الضرر الكبير الناجم عن انخفاض درجة الحرارة الشديد، الذي أدى إلى تلف الخلايا مما أدى إلى موتها، وفيما بعد لاحظنا يباس كامل على الغراس المُعرضة لهذه الدرجة المنخفضة من الحرارة، في حين لم يكن الضرر الناتج عن انخفاض درجة الحرارة إلى درجة الصفر المئوية لمدة .24 ساعة.معنوياً، حيث توقفت النباتات عن النمو لفترة .ستة أشهر ثم تابعت نموها بشكل طبيعي، وذلك في كل الأبناء(حيث تم انتخاب الأبناء المُتحملة لإجهاد البرد العالي).

لقد استأنفت أربعة هجن من الهجن التي عُرضت لإجهاد البرد الشديد (10-) مْ نموها في فصل الربيع التالي، وبدأت التفرعات الصغيرة والأوراق الغضة بالظهور والنمو وعاود النبات نشاطه الخضري متجاوزاً الإجهاد، وبالتالي فقد تم اعتبارها (بذار مربي) لهجن مستنبطة من الحمضيات عالية التحمل لإجهاد البرد الشديد (10-) مْ، وستدخل في دورة إكثار لإعتبارها أصول لتطعيم الأصناف التجارية عليها ونشرها في المناطق التي تتعرض لصقيع. هذه الهجن هي A– 1A23-A18-C9.

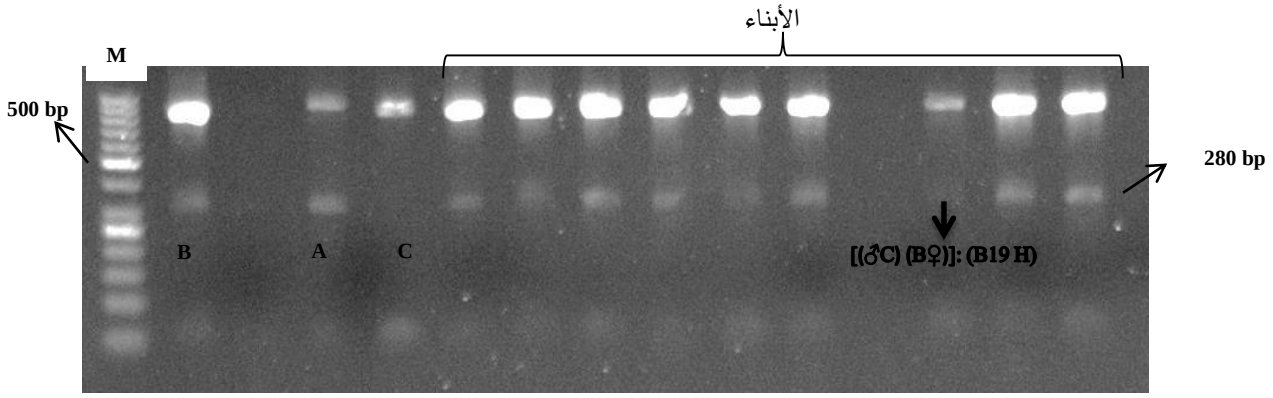
تم اختبار سبعة برايمرات SSR لتمييز الأبناء الهجن من الأبناء الخضرية(النوسيلية) ولم تكن البادئات من سلسلة TTA قادرة على التفريق بين الأبناء وقد أعطت البادئات 27TTAو 33TTAحزمة واحدة بعد تفاعل ال PCRوأعطى 15TTA حزمتين، لكن البادئات من سلسلة CSM وهي CSM147، CSM18، CSM17، 13CSM، فرّقت الأبناء الجنسية من الأبناء الخضرية بشكل واضح، حيث ضخم البادئ 13CSM ثلاث مواقع 950، 280، 80 bp، بينما ضخم البادئ 17CSM موقعين 80،100 bp ، والبادئ 18CSM موقعين 220، 80 bp، والبادئ 147CSM موقعاً 120 bp ، سُجلت الغراس التي أظهرت اختلافاً مع الأم أنها هجينة ؛ حيث أعطت الأبناء الجنسية حزماً مخالفة للأم وبالنتيجة كانت جميع الأبناء هجناً؛ يوضح الشكل 1 التباين الذي أظهره كلاً من 18CSM و 13CSM.

وجد الباحث Ahmad وآخرون (2012) أن البادئ 15TTA مفيداً لتمييز الهجين، بينما في تجربتنا لم يعط أي تباين ملحوظ.

قيّم Novelli وآخرون (2006) أربع مؤشرات SSR لدراسة التباين الوراثي عند *Citrus sinenses* واستطاع تمييز أربع أصناف زراعية منه وهذه المؤشرات هي CSM17، CSM147، CSM13، 18CSM؛ كما قيّم Mondal وآخرون (2015) نفس البادئات الأربعة السابقة في تمييز الهجن عن الغراس الخضرية الناتجة عن *Citrus.reticulata*وأعطت فعالية عالية وهذا يتوافق مع دراستنا جدول(5). تعتبر بادئات ال SSR أكثر موثوقية ويمكن الإعتماد عليها للتمييز بين الغراس الجنسية والخضرية حيث كانت البرايمرات من سلسلة CSM على النحو الذي اقترحه Novelli وآخرون (2006) قادرة على التفريق بين الأبناء الجنسية والخضرية؛ كما تعتبر مؤشرات SSR هي مشتركة السيادة ومتعددة القرائن التي تظهر مستويات عالية من التباين الوراثي ولديها درجة عالية من الموثوقية (Morgante وOlivieri ، 1993) هذه المؤشرات هي الأقوى لفهم الأنماط التفصيلية لتكوين القرابة والتمييز الفردي في السلالات، لذا فهي تستخدم على نطاق واسع لتحديد الأصناف والخرائط الجينية (Tautz ، 1989 وNassar و Collevatti ، 2005)، كما قد أثبتت مؤشرات SSR أنها مؤشرات جينية فعالة لرسم الخرائط الجينية المقارنة بين أنواع الحمضيات (Luro وآخرون ، 2008)، كما استخدم Carrillo-Medrano وآخرون (2018) مؤشرات SSR لتمييز الأبناء الجنسية عن الخضرية لليمون المكسيكي والناتجة عن برامج تهجين سابقة لمقاومة الأمراض كفيروس التدهور السريع والإخضرار الذين كانا مهددان لزراعة الحمضيات ،كما استخدام Carlos وآخرون (2000) علامات SSR صنفت 86.95٪ من الأبناء الهجينة من التهجين بين flying dragon و tangor Ortanique.



التباينات التي أظهرها البادئ CSM18 بين الأبناء والآباء: B كليوباترا، A البرتقال ثلاثي الأوراق، C الزفير المستخدمة بالتهجين، H الهجن A25، A21، A1، A18، A23 أعطى حزمة مغايرة للأم البرتقال ثلاثي الأوراق



التباينات التي أظهرها البادئ CSM13 في الأبناء والآباء :Bكليوباترا، A البرتقال ثلاثي الأوراق، C الزفير والمستخدمة في التهجين

الشكل 1. التباينات الوراثية الناتجةعن استخدام بادئات SSR من سلسلة CSM للأبناء الهجن المتحملة لإجهاد البرد الناتج عن تهجينات مختلفة

جدول5. عدد القرائن التى أعطاها كل زوج من بادئات SSR وكفاءة البادئ والقدرة التمييزية لكل بادئ				
البادئ	عدد القرائن الملاحظ	عدد القرائن الفريدة	القدرة التمييزية	كفاءة البادئ
CSM13	3	3	تمكن من التمييز بين الأفراد والآباء وجدت اختلافات من حيث وجود أو غياب القرائن	تمكنت هذه البادئات من التمييز بين الشتلات الجنسية والهجينة
CSM18	2	2		
CSM17	2	2		
CSM147	2	1		
TTA15	2	-	لم تعط اختلافات بين الأفراد أعطى حزمة واحدة عند جميع الأفراد	لم تتمكن هذه البادئات من التمييزبين الشتلات الجنسية و الخضرية
TTA27	1	-		
TTA33	1	-		

إن التحليل الدقيق لمجموعات مختلفة من الآباء أمر ضروري لتقدم برامج تربية الحمضيات وهذا جعل الدقة العالية لبادئات الSSR فعالة في تحديد الغراس الخضرية من خلال مطابقتها للأم، ففي دراستنا تم تأكيد أن جميع الأبناء هي هجن وليست خضرية من خلال بادئات SSR المختبرة من سلسلة CSM فأعطت الأبناء حزماً مغايرة للأم.

جدول 6. نسبة التشابه بين أبناء الجيل الأول والآباء حسب نتائج **SSR**													
A25	**B22**	**B19**	**A23**	**C9**	**C6**	**A18**	**A1**	**B1**	**A21**	**C**	**B**	**A**	
0.25	0.75	0.25	0.375	0.5	0.375	0.875	0.75	0.75	0.75	0.375	0.625	1	**A**
0.625	0.625	0.625	0.25	0.625	0.5	0.75	0.875	0.625	0.625	0.5	1	0.625	**B**
0.625	0.625	0.625	0.5	0.625	0.75	0.5	0.625	0.375	0.625	1	0.5	0.375	**C**

A البرتقال ثلاثي الأوراق **B**اليوسفي كليوباترا **C** الزفير (النارنج)

نلاحظ أن أعلى نسبة تشابه بين الآباء المدروسة (0.625) بين البرتقال ثلاثي الأوراق والكليوباترا تليها (0.5) بين اليوسفي كليوباترا والزفير (النارنج) ، وكانت أعلى نسبة تشابه (0.875) بين الهجين 1A واليوسفي كليوباترا؛ تليها (0.75) بين الهجين 22B والبرتقال ثلاثي الأوراق؛ وبين الهجين18A و اليوسفي كليوباترا؛ وبين الهجين 1B والبرتقال ثلاثي الأوراق، بينما أقل نسبة تشابه (0.25) بين الهجين 25A والبرتقال ثلاثي الأوراق؛ وأيضاً بين الهجين 19B والبرتقال ثلاثي الأوراق؛ والهجين 23A واليوسفي كليوباترا بنفس النسبة.

4.الإستنتاجات والتوصيات

يمكن الحصول على أصول وهجن من الحمضيات من خلال التهجين والانتخاب؛ تتحمل الإجهادات اللا إحيائية.

يمكن انتخاب هجن تتحمل إجهاد البرد الشديد 10-) (مْ لمدة 24 ساعة بإدخال البرتقال ثلاثي الأوراق في التهجين بغض النظر عن جهة التصالب، أي سواء استخدم كأب أو كأم في التهجين.

تعتبر مؤشرات SSR ذات وثوقية عالية في تفريق الغراس الهجينة من الخضرية، ولها دور مهم في برامج التحسين والتربية وتوفير سنوات من العمل من خلال استبعاد الغراس الخضرية والإبقاء على الجنسية منها.

ونوصي نتيجة دراستنا بالتالي:

إدخال هذه الهجن في دورة إكثار وفق الإجراءات المتبعة في مراكز إنتاج غراس الحمضيات وصولاً إلى مرحلة البذار المعتمدة، ثم توزيعها على المزارعين.

إجراء دراسات تالية على هذه الهجن لمساهمتها الفعالة في توسيع استخدام مثل هذه الهجن كتحمل إجهادات أخرى ودراسات التوافقات مع الأصناف.

المصادر

Manner, H., Buker, R, S., Smith, V. E., Ward, D and Elevitch, C. R., 2006. Citrus (Citrus) And Fortunella (Kumquat**).** *Species Profiles For Pacific Island Agroforestry*, *2*(1), 2-35.

Ministry Of Agriculture, Citrus Office, Tartous. 2019. Statistics For The Season.

Elkhateeb, A.,2001. Effect Of Calcium Carbonate In The Soil On Growth And Mineral Content Of Some Citrus Rootstock Seedlings. ph.d thesis, *horticulture factuly, tishreen university*, p. 219.

Elkhateeb, A., 2009. The Effect Of Five Citrus Rootstocks On The Growth Productivity And Quality Of Orange Fruits Valencia Orange. *Basil Al-Assad Journal For Engineering Sciences, 25*, pp. 65-85.

Davies, F. S And Albrigo, L. G, 1994. Citrus Crop Production Science In Horticulture 2. *Usa,Uk,Cab, International*. Printed By Red Wood Books.Wiltshir. Uk, p(73-107).

Castle, W.S. 1987. Citrus Rootstocks. (eds. rom. r.c and r.f. carlson.).john wiley and sons, new york. Usa .

Akgol, M., Simsek, O., donmez, D., and Kacar, Y. A, 2017. On Overview Of In Vitro Haploid Plant Production In Citrus. *American. Journal Of Plant Biology*, *2*(5-1), 19-23.

Zhu, S., Wang, F., Shen, W., Jiang, D. and Hong, Q, 2015. Genetic Diversity Of Poncirus And Phylogenetic Relationships With Its Relatives Revealed By Ssr And Snp/Indel Markers. *Acta Physiol Plant,37*,141.

Mondal, B. 2005. Studies On The Molecular Diversity Of Mandarin Orange (Citrus Reticulata Blanco) Plant Types Collected From North Eastern Himalayan Region. *Ph.D Thesis, Bidhan Chandra Krishi Viswavidyalaya, India*, 98-100.

Tusa N, Abbate L, Ferrante S, Lucretti S, Scarano MT., 2002. Identification Of Zygotic And Nucellar Seedlings In Citrus Interploid Crosses By Means Of Isozymes. *Flow Cytometry And Issr-Pcr. Cell And Molecular Biology Letters, 7*. pp. 703-708.

Soost, R. K., Williams, T. E and Torres, A. M., 1980. Identification of Nucellar and Zygotic Seedlings of Citrus with Leaf Isozymes. *Hort Science 15*, pp.728-729.

Williams, J. G., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A and Tingey, S. V, 1990. DNA Polymorphisms Amplified By Arbitrary Primers Are Useful As Genetic Markers. *Nucl. Acids Res., 18*. Pp. 6531-6535.

Woo, J. k., Park, Y. C., Lee, J. W., Yun, S. H., Kim, M., Park, S., Lee, Y., Song, K. J and Kim, H. B, 2019. Evaluation Of Polyembryony FoGenetic Resources And Efficacy Of Simple Sequence Repeat Markers For The Identification Of Nucellar And Zygotic Embryo-Derived Individuals In Citrus. *The Korean Society For Applied Biological Chemistry. 62*. 30.

Yildiz, E., Kaplankiran, M., Hakan, T., Aydın, D., Toplu, C., 2013. Identification of Zygotic and Nucellar Individuals Produced from Several Citrus Crosses Using SSRs Markers. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca, 41*(2), pp. 478-484.

Swingle, W. T And Reece, P. C. 1967. The Botany Of Citrus And Its Wild Relatives. In Reuther W, Webber Hj, Batchelor Ld, Editors. *The Citrus Industry, Berkeley, University Of California Press*., 389-390.

Hutchison, D.J., 1977. Influence Of Rootstock On The Performance Of Valencia Sweet Orange. *Proc International Of The Society Of Citriculture, 2*,523-525.

Nava Ayala, J And Monter, A. V, 1994. Nursery Performance Of Rootstocks Tolerant To Citrus Tristeza. *Proceedings Of The Interamerican Tropical Horticulture. 38*,pp. 86 – 89, hort. abs. 66 (11) ,98-78.

Zhu, S., Wu, B ., Ma, Y., Chen, J and Zhong, G, 2013. Obtaining Citrus Hybrids By In Vitro Culture Of Embryos From Mature Seeds And Early Identification Of Hybrid Seedlings By Allele-Specific Pcr. *Scientia Horticulturae, 161*. pp. 300-305.

Yelenosky, G, 1978. Cold Hardening 'Valencia' Orange Trees To Tolerate -6.70c Without Injury. *J Am Soc Hort Sci,103*, pp. 449-452.

Rohlf, F. J. 1993. NTSYS-PC Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System Version 1-80. *Exeter Software*, Setauket, New York.

Dahro, B., Wang, F., Peng, T and Liu, J. H., 2016.:Ptra/Ninv, An Alkaline/Neutral Invertase Gene Of Poncirus Trifoliata, Confers Enhanced Tolerance To Multiple Abiotic Stresses By Modulating Ros Levels And Maintaining

Welsh, J and McClelland, M, 1990. Fingerprinting Genomes Using PCR With Arbitrary Primers. *Nucl. Acids Res, 18*. Pp. 7213-7218.

Das, A., Mondal, B., Sarkar, J and Chaudhuri ,S., 2004. Rapd Profiling Of Some Elite Clones Of Mandarin Orange (Citrus Reticulata Blanco) In The North Eastern Himalayan Region Of India. *Journal Of Horticultural Science And Biotechnology, 79*, pp. 850– 854.

Vignal, A., Milian, D., Cristobal, M.S and Eggen, A., 2002. A Review On SNP And Other Types Of Molecular Markers And Their Use In Animal Genetics. *Genet. Sel. Evol., 34*. Pp. 275-305.

Mburu, D and Hanotte, O, 2005. A Practical Approach To Microsatellite Genotyping With Special Reference To Livestock Population Genetics. *ILRI Biodiversity Project A Manual Prepared For The IAEA/ILRI Training Course On Molecular Characterization Of Small Ruminant Genetic Resources Of Asia, ILRI, Nairobi, Kenya*.1-82. ‘’ www-naweb.iaea.org/nafa/aph/stories/dna-manual.pdf‟.

Rodríguez, M. A., Monter, A. V., Carrillo-Castañeda, G., and García-Velázquez, A, 2004. Polyembryony And Identification Of Volkamerian Lemon Zygotic And Nucellar Seedlings Using RAPD. *Pesq. Agropec. Bras., Brasília, 39*,.(6). pp. 551-559.

Martinez, A. M., Delgado, J. V., Rodero, A and Vega-Pla, J. L., 2000. Genetic Structure Of The Iberian Pig Breeds Using Microsatellites. Anim. *Gene. 31*.pp. 295–301.

Ahmad, M., Javaid, A., Rahman, H., Hussain, S. I., Ramzan, A and Ghafoor, A, 2012. Identification Of Mandarin X Orange Hybrids Using Simple-Sequence Repeat Markers. *Agric. Res, 50* (2). Pp. 225-231.

Tan, M., Song, J., and Deng, X., 2007. Production Of Two Mandarin Trifoliate Orange Hybrid Populations Via Embryo Rescue With Verification By SSR Analysis. *Springer Science, 157*. pp.155–160.

Nassar, N. A. and Collevatti, R. G, 2005. Microsatellite Markers Confirm High Apomixis Level In Cassava Bred Clones. *Heriditas*. *142*. pp. 33-37.

Luro, F. L., Costantino, G., Terol, J., Argout, X., Allario, T., Wincker, P., Talon, M., Ollitrault, P and Morillon, R. 2008. Transferability of the EST‐SSRs developed on Nules clementine (Citrus clementina Hort. ex Tan.) to other Citrus species and their effectiveness for genetic mapping. *BMC Genomics 9*, pp. 287. http://dx.doi.org/10.1186/1471.2164.9.287

Carrillo-Medrano, S. H., Gutierrez-Espinosa, M. A., Robles-González, M. M and Cruz-Izquierdo, S. 2018. Identification Of Mexican Lemon Hybrids Using Molecular Markers SSR, *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas, 9*, 1,11-23.

Carlos Ruiz M. Paz Breto and M.J, (2000). A Quick Methodology To Identify Sexual Seedlings In Citrus Breeding Programs Using SSR Markers. Euphytica, 112:89-94.

Photosynthetic Efficiency. *bmc plant biology, 16*, p76.

Yelenosky, G., Brown, R T And Hearn, C J, 1973. Tolerance Of Trifoliate Orange Selections And Hybrids To Freezes And Flooding. Florida. *State Horticultural Society,9*-104.

Novelli, V. M., Cristofani, M., Souza, A., Machado, M. A., 2006. Development And Characterization Of Polymorphic Microsatellite Markers For The Sweet Orange (Citrus Sinensis L. Osbeck). *Genet. Mol. Biol. 29*(1): 90-96.

Mondal, B., Pramanick, S., Saha, R and Karmakar, M, 2015. Application Of Simple Sequence Repeat Marker For Dermarcation Of Citrus Reticulate Nucellar And Hybrid Seedlings. *International Journal Of Biosciences,6*, pp. 128-133.

Morgante, M. and Olivieri, A. M., 1993. PCR-Amplified Microsatellite As Markers In Plant Genetics. *Plant Journal. 3.* pp. 175-182.

Tautz, D. 1989. Hypervariability Of Simple Sequences As A General Source Of Polymorphic DNA Markers. *Nucl Acid Res 17*, pp. 6463-6471.