التوصيف الجزيئي والشكلي لبعض الطرز البرية لنبات البنج الذهبي *Hyoscyamus aureus* L. في المختبر

شذى بشر[1] و يوسف العموري[1] و سلام لاوند[2]

الملخَّص

أجري البحث بهدف الكشف عن التباينات الشكلية والجزيئية بين طرز البنج الذهبي *Hyoscyamus aureus* البرية في جنوب سورية، جُمعت البذور من ستة مواقع وعُقّمت وزُرعت في المختبر (*In Vitro*)، ثم وصّفت النباتات النامية في الأنابيب شكلياً بدراسة عدد من الصفات. كما وصّفت جزيئياً باستخدام تقنية التكرارات التتابعية البسيطة البينية Inter Simple Sequence Repeats (ISSR). أظهرت النتائج وجود فروق معنوية ($p < 0.05$) بين النباتات المدروسة باختلاف مواقع الجمع، إذ راوح طول النبات بين 14.97 و18.97 سم وتباين لون الساق بين الأحمر والأخضر، كما تباينت كثافة الأوبار بين المتوسطة والكثيفة وشديدة الكثافة، وكانت هناك اختلافات كبيرة في أبعاد الأوراق ومساحتها، وراوح طول الجذر الرئيسي بين 6.09 و8.37 سم. أظهر التوصيف الجزيئي أن العدد الكلي للحزم كان 56 حزمة منها 49 حزمة ذات تعددية شكلية (بنسبة 87.5%)، نتجت عن استخدام 11 مرئساً غير نوعي. أظهر التحليل العنقودي انفصال نباتات منطقة صلخد بمسافة وراثية قدرها 0.312، في حين توضعت نباتات باقي المواقع في عنقود رئيسي انقسم إلى تحت عنقودين، ضم تحت العنقود الأول نباتات القلمون والديماس بمسافة وراثية 0.032، وضم تحت العنقود الثاني نباتات بصرى التي انفصلت عن نباتات سد درعا ووادي الزيدي بمسافة وراثية 0.017، ممَّا يعطي مؤشراً أولياً على ارتباط الصفات الوراثية لنباتات هذا النوع بتوزعها الجغرافي والبيئي.

الكلمات المفتاحية: البنج الذهبي، الزرع في المختبر، ISSR، التنوع الوراثي، سورية.

[1] الهيئة العامة للتقانة الحيوية، [2] أستاذ مساعد في قسم المحاصيل الحقلية، كلية الزراعة، جامعة دمشق، سورية.

Molecular and morphological characterization of some wild types of golden henbane (*Hyoscyamus aureus) In Vitro*

Besher, Sh.[(1)], Y. AL-Ammouri[(1)] and S. Lawand[(2)]

Abstract

This research was conducted to detect the morphological and molecular differences between golden henbane (*Hyoscyamus aureus* L) collected from south Syria. Seeds were collected from six locations, then sterilized and grown *In Vitro*. Grown plants were described for some morphological characters. The molecular characterization was carried out using the method of Inter Simple Sequence Repeats (ISSR) to detect genetic variations. The plants showed significant ($p<0.01$) morphological differences among studied locations, Plant height ranged from 14.97 to 18.97 cm and stem color ranged from red to green. Trichome density also ranged between medium, high and very high. Furthermore, significant differences in leaves dimensions were observed according to the plant geographical location. The main root length ranged from 6.09 to 8.37 cm. Molecular analysis by ISSR produced a total of 56 bands, 49 of which were polymorphic (87.5%), resulted from using 11 non-specific primers. A genetic distance dendrogram was drawn. based on the results of genetic characterization of plant from different locations. The plants collected from Salkhad separated with a genetic distance of 0.312 while the plants collected from other locations were grouped together, at the same time, they were divided into two sub groups, the first group comprised plants collected from Qalamoun and Dimas regions with a genetic distance of 0.032, whereas sub group II content Bosra plants which separated clearly from those of Dara' dam and Wadi Al-Zaidi by a genetic distance of 0.017, These results may indicate a relationship between genetic characters of this plant species with geographic distribution.

Keyword: *Hyscyamus aureus*, *In Vitro*, ISSR, Genetic diversity.

[(1)]National Commission for Biotechnology, Damascus, Syria.

[(2)] Associate Professor, Faculty of Agriculture, Damascus University, Syria.

المقدمة

تضم العائلة الباذنجانية نحو 96 جنساً و3000 نوع تنتشر في أنحاء العالم كلّها (Gemeinholzer وWink، 2001)، لكنها أكثر وفرة في أمريكا الشمالية والمناطق المعتدلة ويمكن أن يوجد بعضها في المناطق المدارية، وهي ذات تنوع كبير وتضم أنواعاً ذات أهمية طبية وزراعية واقتصادية (Wink، 2003). وتمتاز بعض نباتات هذه العائلة بقدرتها على تصنيع عدد كبير من القلويدات التي تدخل في عدد من الصناعات الدوائية (Yamada وTabata، 1997)، أهمها الهيوسيامين والسكوبولامين، وهما القلويدان الأكثر استخداماً في نباتات العائلة الباذنجانية والمعروفان بخصائصهما العلاجية العديدة (Suzuki وزملاؤه، 1991)، وقد أشار Roddick وزملاؤه (1991) إلى استخدام الهيوسيامين كمضاد للتشنج ومرخٍ للعضلات وفي علاج الربو وكعقار مسكن. أمَّا السكوبولامين فقد أشير إليه في معالجة الألم البطني المرافق للتقلصات المعوية (Tytgat وGuido، 2007). كذلك تستعمل هذه القلويدات لأغراض دوائية عديدة مضادات للتعرق وترياق للسموم ولعلاج داء باركنسون وللقرحة ولدوار السفر (Cordell، 1978). ويظهر هذان المركبان في قائمة المركبات الدوائية العشر الأولى ذات المنشأ الطبيعي والأكثر استخداماً في الولايات المتحدة الأمريكية (Straus، 1989).

أشار Mouterde (1983) إلى وجود ستة أنواع تتبع جنس البنج موجودة في سورية، تنتشر في المناطق الجافة وشبه الجافة والرطبة، ومنها البنج الذهبي *Hyoscyamus aureus* L. الذي ينتشر في اللاذقية ومصياف ودمشق وجبل قاسيون وبانياس وجبل عبد العزيز وجبل ضوّا وخان أبو الشامات وتدمر، وينوه إلى انتشار هذا النوع عالمياً في جزيرة كريت وتركيا وفلسطين ولبنان وسورية. في حين ذكر Post وDinsmore (1932) وجود جنس *Hyoscyamus* L. في سورية ووجود أربعة أنواع منها تنتمي له أحدها نوع البنج الذهبي *H. aureus* L. الذي ينتشر في حلب وحمص ومصياف واللاذقية واسريا، وعالمياً فهو شرق متوسطي غربي إيراني طوراني. وفي أطلس التنوع الحيوي (2001) في سورية يشار إلى نبات البنج الذهبي *Hyoscyamus aureus* L. الذي ينمو على الجدران القديمة والصخور.

من المعلوم أن المواطن الطبيعية للنباتات الطبية تتراجع حالياً بسرعة وتتعرض للانقراض بسبب التبدلات المناخية والانفجار السكاني والنشاط الاقتصادي (زراعي، صناعي، سياحي،...إلخ) ما زاد من صعوبة تأمين المركبات نباتية المنشأ، ما دفع بالعلماء والصناعيين إلى عدّ الزرع الخلوي مصدراً بديلاً لإنتاج المركبات الدوائية النباتية. إذ يمكن بهذه التقنية زيادة فائدة النباتات وتحسينها بوصفها مصادر قابلة للتجديد للمركبات الكيميائية المشتقة منها. وتتجلى الفائدة الرئيسة للزراعة الخلوية بأن المركبات الثانوية

الفعالة تُصنّع يتم في بيئة متحكم بها وبصورة مستقلة عن ظروف التربة والمناخ، وبعيداً عن الكائنات الحية الدقيقة التي تؤثر سلباً في إنتاج هذه المركبات، مع إمكانية انتخاب السلالات عالية الإنتاجية من المواد الفعالة، وبأمثلة ظروف نمو الخلايا وتنظيم عمليات الاستقلاب يمكن خفض تكلفة الإنتاج مع زيادة الكمية المنتجة من المركبات البيولوجية الفعالة (Mulabagal و Tsay، 2004). وأصبحت تقنيات زراعة *In Vitro* فعَّالة اقتصادياً لابدَّ لها من أن تطور طرائق ووسائل تسمح بتخليق غلة عالية من المركبات الفعالة في المزارع الخلوية (Berlin و Sasse، 1985)، وبانتخاب دقيق للخلايا المنتجة وأمثلة ظروف الزراعة سيتسبب ذلك بتراكم منتجات عديدة بمستويات عالية في الخلايا المزروعة، بما يسمح بالحصول على تراكيز مرتفعة من المركبات الفعالة للاستغلال التجاري.

وما تزال البحوث في إنتاج قلويدات التروبان (الهيوسيامين والسكوبولامين) بزراعة الأنسجة مستمرة منذ اكتشاف قلويدات التروبان في كالوس *Atropa belladonna* (Saidon، 2008)، إذْ يمكن بهذه الأداة الحيوية الحصول على المكونات المطلوبة خلال مدة قصيرة، فضلاً عن أن التخليق الصناعي لهذه الجزيئات يكون مكلفاً جداً في حين بمقدور النباتات إنتاجها بسهولة أكبر وتكلفة أقل.

يعدُّ اختيار الصفات في التوصيف الشكلي خطوة مهمة في إعطاء معلومات واضحة قابلة للتحليل والتمييز سواء في الحقل أو في المخبر (AL- Atawneh وزملاؤه (2009). ومع أهمية الصفات الشكلية والخصائص الفسيولوجية إلا أن الحاجة للمؤشرات الجزيئية على مستوى DNA أصبحت أكثر أهمية وإلحاحاً، إذْ تعدُّ دراسة التباينات الوراثية ضمن النوع هدفاً أساسياً للمحافظة عليه من التدهور (Arafeh وزملاؤه (2002)، لأن الاعتماد على الصفات الشكلية لدراسة التنوع النباتي غير كاف، وخاصة عند وجود تقارب كبير بين النباتات المدروسة، كما أن هذه الصفات المظهريةً شديدة التأثر بالظروف البيئية (Degani وزملاؤه، 1998). لذا يجب دراسة التنوع الوراثي باستخدام تقنيات تعتمد على دراسة المورثات بحد ذاتها دون أي تأثير للبيئة فيها (Migdadi، 2001).

تعدُّ تقنية التكرارات التتابعية البسيطة البينية (ISSR) التي طبقت من قبل Ziekiewicz وزملاؤه (1994) واحدة من التقنيات المهمة المعتمدة على تفاعل بوليميراز التسلسلي، وتتميّز هذه التقنية بسهولتها وسرعتها فهي لا تتطلب وقتاً طويلاً (Williams وزملاؤه، 1990)، وقد درس Ai-Fen وزملاؤه (2009) التنوع الوراثي في 28 مدخلاً من التبغ من العائلة الباذنجانية (*Solanaceae*) باستخدام تقنية ISSR، وكان عدد الحزم الناتجة 334، منها 250 حزمة ذات تعددية شكلية أي ما نسبته 75%، أمَّا نتائج التحليل العنقودي فقد بيّنت توزع المدخلات في عنقودين فضلاً عن نوعين منفردين.

كما قام Isshiki وزملاؤه (2008) باستخدام تقنية ISSR لتحديد درجة القرابة الوراثية بين ثمانية أصناف و12 نوعاً مسجلاً من السولانوم *(Solanum melongena)* من العائلة الباذنجانية وذلك باستخدام 100 مرئسة، أعطت 34 منها 522 حزمة ذات تعددية شكلية بنسبة 99.1%.

الأهداف

هدف هذا البحث إلى التوصيف الجزيئي لبعض الطرز البرية لنوع البنج الذهبي *Hyoscyamus aureus*، وربطها بمعطيات التوصيف الشكلي للنباتات النامية في المختبر (*In Vitro*) من أجل وضع هوية وراثية لهذه الطرز وتوثيقها، إذْ يفيد تحديد التباينات الوراثية بين الطرز المدروسة في إظهار مدى تأثير البيئة والتوزع الجغرافي على التركيب الوراثي للنوع الواحد.

مواد البحث وطرائقه

المادة النباتية: جمعت بذور طرز البنج الذهبي *H. aureus* خلال عدة جولات شملت ستة مواقع من المنطقة الجنوبية من سورية وعلى ارتفاعات مختلفة عن سطح البحر راوحت بين 1400-400 متر؛ وذلك في شهر آب عام 2010، ويبيّن الجدول (1) المعطيات المناخية لمواقع جمع العينات.

الجدول (1) المعلومات الجغرافية و المناخية لمواقع جمع العينات

الموقع	المحافظة	المعلومات الجغرافية			المعلومات المناخية
		خط الطول	خط العرض	الارتفاع (م)	معدل الهطول المطري (مم/السنة) P
صلخد	السويداء	36.40	32.49	1416	236
الديماس	ريف دمشق	36.14	33.29	1041	320
النبك		36.43	34.02	1333	124
بصرى	درعا	36.48	32.51	840	250
وادي الزيدي		35.98	32.69	410	350
سد درعا		36.11	32.59	560	271

مكان تنفيذ البحث: أدخلت البذور في المختبر (*In Vitro*) وأجري التوصيف الشكلي للنباتات الناتجة عنها في مخبر التقنيات النباتية بالهيئة العامة للتقانة الحيوية، أمّا عملية عزل الحمض الريبي النووي منقوص الأوكسجين (DNA) والدراسة الجزيئية فقد أُجريت في مخبر البيولوجية الجزيئية التابع لكلية الزراعة بجامعة دمشق.

الزراعة المخبرية:

تحضير الأوساط المغذية وتعقيمها: حُضّر الوسط المغذي MS (Murashige وSkooge، 1962) ووُزّع في أنابيب اختبار زجاجية من نوع بيركس قياس 25 x150مم

بمعدل 15 مل/ أنبوب، ثم سدت الأنابيب بسدادات قطنية، وعقمت بالأوتوغلاف (Autoclave) في درجة حرارة 121 مْ مدة 20 دقيقة، وتركت لتبرد حتى تصبح جاهزة للزرع.

التطهير السطحي للبذور وتحضيرها للزرع: غسلت البذور بالماء الجاري مدة 30 دقيقة ثم غمرت بالكحول الإيتيلي 70% مدة دقيقة واحدة. بعدها غمرت بمحلول هيبوكلوريت الصوديوم تركيز 1.5% مدة 20 دقيقة، غسلت بعدها بالماء المقطر المعقم ثلاث مرات متتالية مع التحريك لمدة 5 دقائق في كل مرة، ثم تركت مكشوفة مدة 30 دقيقة حتى جفت هوائياً وأصبحت جاهزة للزرع. أجريت عمليتا الغسل النهائي والزرع في شروط تعقيم صارمة تحت جهاز العزل الجرثومي (Laminar airflow hood).

طريقة الزرع: زُرعت 36 بذرة من كل موقع بواقع بذرة في كل أنبوب وزعت على 3 مكررات بواقع 12 بذرة في كل مكرر، حضنت بعدها الأنابيب في درجة حرارة 2 ±24مْ، ثم حسبت نسبة الإنبات بعد أسبوع من الزرع، وقد حضنت النباتات بظروف 16 ساعة إضاءة و8 ساعات ظلام بالتناوب، ومن ثم أُجري التوصيف الشكلي لـ 12 نباتاً من كل موقع أخذت بمعدل 4 نباتات من كل مكرر؛ وذلك بدراسة 11 صفة شكلية هي: لون الساق ووبرية الساق وطول النبات وعدد الفروع وطول الورقة وعرضها ومساحتها وطول الجذر الرئيسي وعدد الجذور الثانوية فضلاً عن نسبة الإنبات.

الدراسة الجزيئية:

استخلاص الدنا (DNA) والتقدير الكمي والنوعي له: أجريت عملية استخلاص الـ DNA من الأوراق الفتية القمية بعد طحنها بالآزوت السائل بطريقة CTAP وفقاً لـ Doyle وDoyle (1990) مع إجراء بعض التعديلات، كما قدرت كمية الـ DNA ونوعيته المستخلصة بوساطة مقياس الطيف الضوئي (UV spectrophotometer) عند طول موجة 260 و280 نانومتراً، واختبرت نوعية الحمض النووي DNA على هلامة الأغاروز تركيز 0.8%. ثم ضُبط تركيز الحمض النووي DNA في العينات جميعها إلى 40 نانوغراماً/ ميكروليتر.

استخدمت في هذه الدراسة تقنية ISSR التي تعتمد اعتماداً أساسياً على تفاعل PCR، ويُضخّم بواسطتها الحمض النووي DNA من خلال تفاعل البلمرة بتضاعف قطع DNA والحصول على عدد كبير من السلاسل الجديدة.

المرئسات المستخدمة: أجري تفاعل PCR (Polymerase chain reaction) باستخدام (18) مرئسة مختلفة (جدول 2)، وبحجم نهائي قدره 25 ميكروليتراً لكل عينة.

الجدول (2) التسلسل النكليوتيدي للمرئسات المستخدمة في تقنية ISSR ودرجة حرارة الالتحام

درجة حرارة الالتحام مْ	التسلسل النيوكليوتيدي للمرئسات 3َ → 5َ		المرئسة
52	(GA)8C	GAGAGAGAGAGAGAGAC	ISSR- IR(02)
50	(CA)8A	CACACACACACACACAA	ISSR-IR(03)
52	(AC)8G	ACACACACACACACACG	ISSR- IR(04)
50	(AC)8T	ACACACACACACACACT	ISSR- IR(05)
56	(GA)8CG	GAGAGAGAGAGAGAGACG	ISSR- IR(06)
54	(TC)8GA	TCTCTCTCTCTCTCTCGA	ISSR- IR(07)
54	(TC)8AG	TCTCTCTCTCTCTCTCAG	ISSR- IR(08)
56	(AC)8GG	ACACACACACACACACGG	ISSR- IR(09)
56	CCAG(GT)7	CCAGGTGTGTGTGTGTGT	ISSR- IR(14)
54	(GT)4(GA)5	GTGTGTGTGAGAGAGAGA	ISSR- IR(15)
56	CC(TC)4(TG)5	CCTCTCTCTGTGTGTGTG	ISSR- IR(18)
51	(AG)8C	AGAGAGAGAGAGAGAGC	ISSR- IR(32)
51	(GA)8T	GAGAGAGAGAGAGAGAT	ISSR- IR(33)
51	(AC)6ACAG	CACACACACACAACAG	ISSR- IR(35)
51	(TC)8C	TCTCTCTCTCTCTCTCC	ISSR- IR(36)
50	(AC)8TT	ACACACACACACACACTT	ISSR- IR(40)
50	(AC)8GG	ACACACACACACACACGG	ISSR- IR(41)
52	(CT)8G	CTCTCTCTCTCTCTCTG	ISSR- IR(43)

تفاعل بوليميراز السلسلي PCR (Polymerase chain reaction):

أجري تفاعل بوليميراز السلسلي PCR في حجم قدره 25 ميكرولتراً يتكـــون مـــن 2 ميكرولتر من المادة الوراثية لكل عينة و12.5 ميكـــرو ليتـــر 2X PCR Master Mix (Frementase) و2 ميكرولتر من المرئسة، أكمل الحجم إلى 25 ميكـــرو ليتـــراً بالمـــاء المقطر، وأُجري تفاعل PCR برفع درجة الحرارة في البداية إلى 94 مْ مدة 5 دقائق فـــي جهاز التدوير الحراري ثم أكمل التفاعل وفقاً للبرنامج الآتي:

I- التفسخ الحراري (Denaturation): في درجة حرارة 94 مْ مـــدة 30 ثانيـــة لفـــصل سلاسل DNA عن بعضها.

II- الالتحام (Annealing): بحسب درجة حرارة المرئسة مدة 30 ثانية.

III-الاستطالة (Extention): في درجة حرارة 72مْ مدة 1 دقيقة.

في نهاية الدورة 35 تركت العينات في جهاز PCR مدة 10 دقائق في حرارة 72مْ. ثم فصلت نواتج تفاعل PCR على هلامة الأغاروز ذات تركيـــز 2%، واســـتعمل مؤشـــر جزيئي بحجم 1000 bp، غمرت الهلامة في حوض يحوي 200 مل 1X TBE

بعد أن أضيف 5 ميكروليترات من صبغة الإيثيديوم بروماید (50 mg/ ml) ثم طبق جهد كهربي مقداره 80 فولطاً مدة ساعتين ونصف، صورت بعدها الهلامة لرؤية حزم DNA بوجود الأشعة فوق البنفسجية.

4- التحليل الإحصائي:

حُلّلت بيانات التوصيف الشكلي بعد تبويبها باستخدام البرنامج الإحصائي Genstat.7 لتحديد قيم أقل فرق معنوي (L.S.D) عند مستوى معنوية 1% ولحساب معامل التباين (C.V)، كما استُخدم البرنامج الإحصائي Pop Gene 32 لتحليل البيانات الوراثية، إذْ جمعت نتائج عملية التضخيم في جداول اعتماداً على مقارنة وجود حزم DNA أو غيابها بين العينات النباتية التي جمعت من المناطق المختلفة. وقد أعطي الرقم 1عند وجود حزمة DNA والرقم 0 عند غيابها، وقد نظمت الجداول لكل مرئسة على حدة ورسمت شجرة القرابة الوراثية Dendrogram بتطبيق متوسطات المجموعات الزوجية غير المزانة (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averaging) UPGMA بحسب (Nei، 1973).

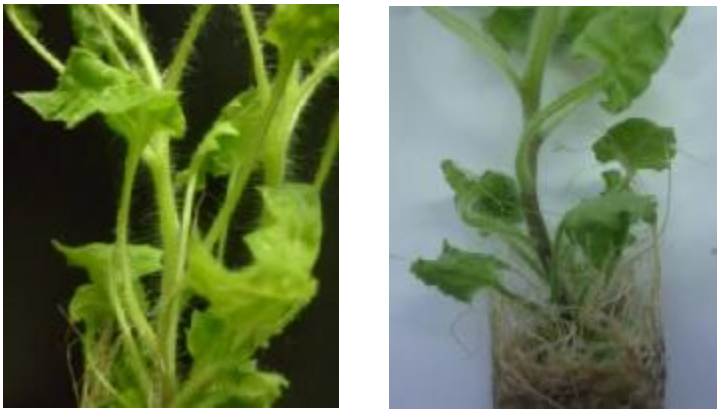
النتائج والمناقشة

الصفات الشكلية للنبات:

لون الساق: يمكن اعتماداً على المقارنة بين لون الساق في مواقع الدراسة تقسيم النباتات إلى ثلاث مجموعات (شكل1). المجموعة الأولى ضمت النباتات ذات السوق خضراء اللون وهي نباتات موقع بصرى، والمجموعة الثانية ضمت نباتات المواقع التي أعطت سوقاً ذات لون أحمر في ثلثها السفلي وتشمل نباتات موقعي صلخد ووادي الزيدي. أمَّا المجموعة الثالثة فقد ضمت نباتات كل من القلمون والديماس وسد درعا حيث كان نصف عدد النباتات بسوق ذات لون أخضر والنصف الآخر بسوق ذات لون أحمر، ويعود اللون الأحمر إلى تراكم صبغة الأنثوسيانين في الأجزاء النباتية إذْ تتكون هذه الصبغة من جزءين الأول سكري (غلوكوز بشكل رئيس)، ومكون لوني هو الأنتثوسيانين (لحام والعودات، 1994) وOgata وزملاؤه (2005)، وهي تعدً من مضادات الأكسدة المهمة في النباتات، وتتحكم بها عوامل وراثية (Evans، 2003).

وبرية الساق: تباينت درجة كثافة الأوبار في المواقع المدروسة بين متوسطة الوبر وكثيفة الوبر وشديدة الكثافة الوبرية، وقد انقسمت النباتات إلى ثلاث مجموعات (شكل 2). ضمت المجموعة الأولى نباتات الديماس وهي متوسطة الكثافة الوبرية، والمجموعة الثانية ضمت نباتات صلخد والقلمون ووادي الزيدي وسد درعا وهي كثيفة الوبر، المجموعة الثالثة: ضمت نباتات بصرى وهي شديد الكثافة الوبرية. تعدُّ صفة الكثافة الوبرية من الصفات المهمة التي تساعد النبات على التكيف مع درجات الحرارة المرتفعة، كما تحمي

النبات من التعرض المباشر لأشعة الشمس مقللة بذلك من كمية المـــاء المفقـــود بعمليـــة البخر- النتح (المقرن، 2009)، وهذا ملاحظ في نباتات بصرى إذْ تمتاز نباتاتها بكثافـــة وبرية عالية لتحمل درجات الحرارة العالية صيفاً مقارنة بالمواقع الأخرى.



a **b**

الساق أخضر **الساق أحمر في الثلث السفلي**

الشكل (1) تباين لون الساق في النباتات بحسب مصدر البذور

a **b** **c**

وبرية متوسطة **وبرية عالية** **وبرية عالية جداً**

الشكل (2) وبرية سوق النباتات بحسب مصدر البذور

نسبة الإنبات: تفوقت نباتات بصرى معنوياً على نباتات باقي المواقع من حيث نسبة الإنبات ما عدا نباتات القلمون (جدول 3). إذْ بلغت نسبة إنبات البذور في بصرى 96% تلتها نباتات القلمون 93.5% من دون فروق معنوية، في حين كانت أقل ما يمكن في نباتات سد درعا 55.1%. ويعود التفاوت في نسبة الإنبات إلى أنَّ البذور تمر بطور كمون ناتج عن امتلاك البذور لأغلفة غير نفوذة للغازات أو إلى أسباب ميكانيكية أو كيميائية أو وراثية أو فيسيولوجية نتيجة انخفاض حيوية الجنين أو موته أو سكونه (AL-Khalifa وزملاؤه، 2004).

تقييم بعض الصفات الكمية للنباتات:

طول النبات: راوح متوسط طول النبات بين 14.97 سم كأقل قيمة في نباتات سد درعا و18.97 سم كأعلى قيمة في نباتات وادي الزيدي وبمتوسط عام قدره 16.87 سم من دون فروق معنوية بين نباتات المواقع المدروسة، وهذا يعود إلى توحيد ظروف الزراعة من إضاءة وحرارة وزراعة البذور على الوسط المغذي نفسه إذْ كانت العناصر الغذائية ميسرة للنباتات جميعها بالدرجة نفسها.

عدد فروع النبات: راوح عدد فروع النباتات بين 1.5 فرعاً كأقل قيمة في نباتات بصرى و2.8 فرعاً كأعلى قيمة في نباتات صلخد وبمتوسط عام قدره 2.2 فرعاً، واعتماداً على قيم L.S.D انقسمت النباتات إلى مجموعتين من دون فروق معنوية بين نباتات المجموعة الواحدة (جدول 3)، ضمت المجموعة الأولى نباتات القلمون وبصرى، وضمت نباتات المجموعة الثانية صلخد والديماس ووادي الزيدي وسد درعا. تتفق هذه النتائج مع ما توصلت إليه حرامي (2002) إذْ ذكرت في دراستها الحقلية أن نبات البنج الذهبي متفرع بشدة.

طول الورقة: راوح طول الورقة بين 4.63 سم كأقل قيمة في نباتات صلخد و6.47 سم كأعلى قيمة في نباتات الديماس وبمتوسط عام قدره 5.62 سم واعتماداً على قيم L.S.D انقسمت النباتات إلى ثلاث مجموعات (جدول 3)، من دون فروق معنوية بين نباتات المجموعة الواحدة: ضمت المجموعة الأولى نباتات من صلخد وبصرى، والمجموعة الثانية نباتات من القلمون والديماس، والمجموعة الثالثة نباتات من وادي الزيدي وسد درعا.

عرض الورقة: راوح عرض الورقة بين 1.73سم كأقل قيمة في نباتات صلخد و2.53 سم كأعلى قيمة في نباتات الديماس وبمتوسط عام قدره 2.14 سم، واعتماداً على قيم L.S.D انقسمت النباتات إلى ثلاث مجموعات (جدول 3)، ضمت المجموعة الأولى نباتات صلخد وسد درعا، والمجموعة الثانية نباتات القلمون وبصرى، والمجموعة الثالثة نباتات الديماس ووادي الزيدي.

المساحة الورقيـــة: قيست المساحة الورقية باستخدام جهاز قارئ المـــساحة الورقيـــة (Area Meter AM 300)، وقد راوحت المساحة الورقية بين 222 مم^2 كأقل قيمـــة فـــي نباتات صلخد و391 مم^2 كأعلى قيمة في نباتات الديماس وبمتوسط عام قدره 311 مـــم^2، واعتماداً على قيم L.S.D انقسمت النباتات إلى مجموعتين (جدول 3)، ضمت المجموعـــة الأولى نباتات صلخد، والمجموعة الثانية نباتات القلمـــون والـــديماس وبـــصرى ووادي الزيدي وسد درعا. تتفق هذه النتائج مع ما توصلت إليه حرامي (2002) إذْ اعتمدت هذه المعايير في الدراسة البيئية لجنس البنج في عدد من المواقع في جنوب سورية، كما تتفق مع نتائج Abu isba (2007) في دراسة التبيانات المورفولوجية بين عشائر جنس البـــنج المنتشرة في عدد من المناطق في الأردن.

الجدول (3) بعض الصفات الشكلية للنباتات بحسب مواقع الجمع

التسلسل	موقع الجمع	نسبة الإنبات	طول النبات (سم)	عدد الفروع	طول الورقة (سم)	عرض الورقة (سم)	طول النصل (سم)	المساحة الورقية / مم^2	طول الجذر الرئيسي/ سم	عدد الجذور الثانوية
1	صلخد	^{a} 91	17.67	^{a} 2.80	^{a} 4.63	^{a} 1.73	^{a} 1.83	^{a}222	6.09	^{a}2.43
2	النبك	^{ab} 93.5	16.3	^{b} 2.03	^{b} 5.94	^{b} 2.17	^{b} 2.50	^{b} 299	6.67	^{b} 3.27
3	الديماس	^{a} 91	16.87	^{a} 2.10	^{b} 6.05	^{c} 2.53	^{b}2.90	^{b}391	8.10	^{a}2.37
4	بصرى	^{b} 96	16.43	^{b} 1.50	^{a} 5.30	^{b} 2.14	^{c} 2.43	^{b}314	6.37	^{b}2.70
5	وادي الزيدي	^{c} 82	18.97	^{a} 2.16	^{c} 5.60	^{c}2.20	^{c}2.43	^{b} 340	8.37	^{b}4.17
6	سد درعا	^{d} 55.1	14.97	^{a} 2.26	^{c} 5.78	^{a} 2.09	^{c}2.27	^{b} 298	7.77	^{b}3.50
المتوسط		84.8	16.87	2.15	5.62	2.14	2.39	311	7.23	3.07
L.S.D %		3.76	4.87	0.87	0.81	0.37	0.43	151.30	4.59	1.70

لايوجد فروق معنوية ($p < 0.05$) بين الأرقام ذات الأحرف المتشابهة في العمود الواحد.

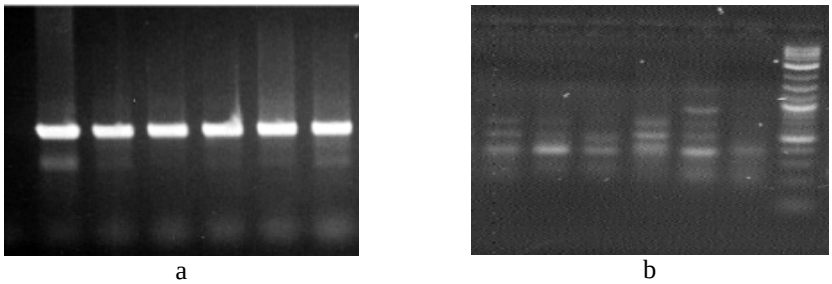
طول الجذر الرئيسي: راوح طول الجذر الرئيسي بين 6.09 سم كأقل قيمة في نباتات صلخد و8.37 سم كأعلى قيمة في نباتات وادي الزيدي، وبمتوسط عام قـــدره 7.23 ســـم (جدول 3)، من دون فروق معنوية بين نباتات المواقع المدروسة.

عدد الجذور الثانوية: راوح عدد الجذور الثانوية بين 2.37 جذراً كأقل قيمة في نباتات الديماس و4.17 جذراً كأعلى قيمة في نباتات وادي الزيدي وبمتوسط عـــام قـــدره 3.07 جذراً (جدول 3). واعتماداً على قيم L.S.D انقسمت النباتات إلى مجمـــوعتين مـــن دون فروق معنوية ضمن المجموعة الواحدة: ضـــمت المجموعـــة الأولـــى نباتـــات صـــلخد والديماس، والمجموعة الثانية: ضمت نباتات القلمون وبصرى ووادي الزيدي وسد درعا.

نتائج الدراسة الجزيئية:

التعددية الشكلية Polyorphism الناتجة عن تطبيق تقنية ISSR: تضمنت الدراسة الجزيئية للبنج الذهبي *Hyoscyamus aureus* استخدام 18 مرئسة أثبتت 11 منها فعاليتها في إعطاء تعددية شكلية بين المواقع المدروسة، نتج عن استخدام هذه المرئسات 56 حزمة، منها 49 حزمة أعطت تعددية شكلية Polymorphic بنسبة 87.5 %، وأعطت المرئسة 6 أقل نسبة للتعددية الشكلية وبلغت 66.66%، في حين أعطت المرئسات 3 و14 و15 و35 و36 و43 تعددية شكلية بلغت 100%، وأعطت كل من المرئسات 6 و14 و35 أقل عدد من الحزم وبلغت 3 حزم، في حين أعطت المرئسة 36 أكبر عدد من الحزم (8 حزم). والجدول (4) يبيّن العدد الكلي للحزم وعدد الحزم ذات التعددية الشكلية ونسبتها المئوية.

a



لنواتج الـــ PCR

b

لإحدى المرئسات

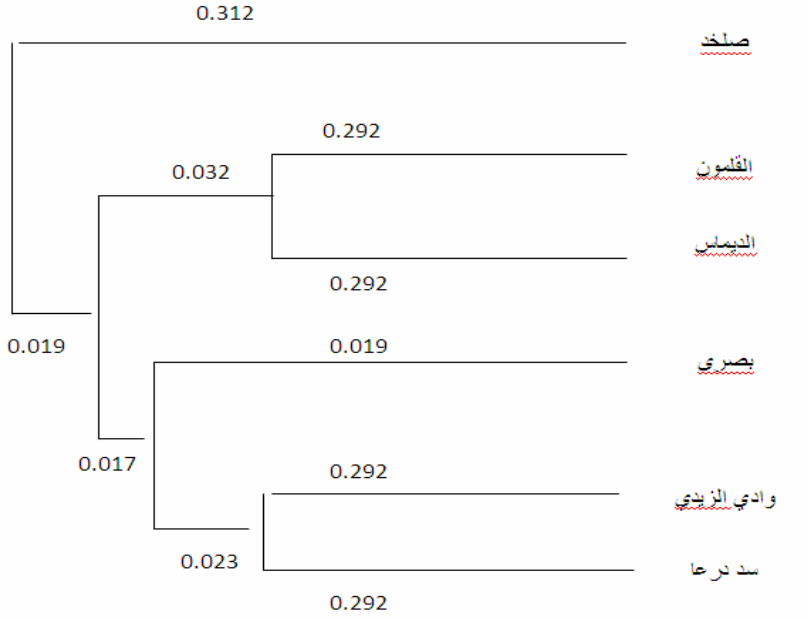
الشكل (3) ترحيل الحمض النووي DNA

الجدول (4)عدد الحزم الكلي وعدد الحزم ذات التعددية الشكلية ونسبتها المئوية نتيجة اختبار ISSR

المرئسة	عدد الحزم الكلية	عدد الحزم ذات التعددية الشكلية	التعددية الشكلية %
ISSR-IR 03	5	5	100.00
ISSR-IR 04	5	4	80.00
ISSR-IR 05	7	6	85.71
ISSR-IR 06	3	2	66.66
ISSR-IR 14	3	3	100.00
ISSR-IR 15	6	6	100.00
ISSR-IR 32	5	4	80.00
ISSR-IR 33	4	3	75.00
ISSR-IR 35	3	3	100.00
ISSR-IR 36	8	8	100.00
ISSR-IR 43	5	5	100.00
المجموع	56	49	87.50

1- التحليل العنقودي لنتائج الدراسة الجزيئية باستخدام تقنية ISSR:

يسمح التحليل العنقودي بتقسيم نباتات المواقع المدروسة إلى مجموعات، وتعكس هذه المجموعات درجة القرابة الوراثية فيما بينها، وقد تتجمع العينات ضمن مجموعة واحدة بناءً على موطنها الأصلي أو بناءً على أصلها ونسبها. أجري التحليل العنقودي للنتائج التي تم الحصول عليها؛ وذلك لإنشاء شجرة القرابة الوراثية بين نباتات المواقع المدروسة. ولوحظ من الشكل انفصال النباتات بحسب الارتفاع عن سطح البحر وتوزعها الجغرافي إذ انفصلت نباتات صلخد بشكل منفرد بمسافة وراثية قدرها 0.312 وكانت الأبعد وراثياً عن نباتات باقي المواقع التي توضعت في عنقود آخر، انقسم بدوره إلى تحت عنقودين ضم تحت العنقود الأول نباتات القلمون والديماس بمسافة وراثية قدرها 0.032، وضم تحت العنقود الثاني نباتات بصرى التي انفصلت عن نباتات وادي الزيدي وسد درعا بمسافة الوراثية 0.017.



الشكل (7) شجرة القرابة الوراثية بين نباتات أماكن الجمع باستخدام تقنية ISSR

وكانت قد استخدمت تقنية ISSR لتحديد التباينات الوراثية في عدد من الأنواع النباتية حيث أظهرت فعالية في فصل مجاميع من البنج المصري *Hyoscyamus muticus* باستخدام خمس مرئسات متخصصة، أعطت المرئسات المختبرة 41 حزمة 15 منها ذات تعددية شكلية (36.59%)، (El-Shawaf وزملاؤه، 2003).

حققت نباتات منطقة صلخد أقل قيمة للصفات الآتية: طول الورقة، وعرض الورقة، وطول النصل، والمساحة الورقية، وطول الجذر، في حين امتلك أكبر عدد فروع، هذا الانفصال الذي تفاوتت شدته من صفة إلى أخرى يتوافق مع نتائج الدراسة الجزيئية التي فصلت نباتات هذا الموقع بشكل مستقل عن نباتات باقي المواقع، وما تجدر ملاحظته أن موقع صلخد يتميّز بارتفاع يفوق 1400 متر عن سطح البحر.

بالعودة لعينات المواقع الأخرى لم تكن التباينات حاسمة فيما بينها على مستوى الصفات المورفولوجية، ومن الناحية الوراثية اجتمعت عيناتها في عنقود رئيسي واحد، إلى أنه يمكن تميّزت عينات كل من سد درعا ووادي الزيدي وبصرى بوقوعها ضمن تحت عنقود منفرد، وبتقاربها من الناحية المورفولوجية إذْ لم تكن الفروق معنوية فيما بينها في الصفات (طول النبات، المساحة الورقية، وطول الجذر الرئيسي، وعدد الجذور الثانوية). وكانت عينات سد درعا ووادي الزيدي الأشد تقارباً من الناحية المورفولوجية، وهذا يتوافق مع نتائج الدراسة الجزيئية التي فصلتهما في عنقود فرعي منفصل. وفيما يخص عينات النبك والديماس، فمن الناحية الوراثية اجتمعتا في تحت عنقود منفرد، ومن الناحية المورفولوجية تقاربتا ببعض الصفات وتباعدتا بصفات أخرى، إذْ اجتمعت عينات كلا الموقعين في مجموعة واحدة من حيث المساحة الورقية وطول الجذر الرئيسي، واختلفتا وبشكل معنوي في عدد فروع النبات وعدد الجذور الثانوية. يمكن ربط نتائج هذه الدراسة بالتوزع الجغرافي للنباتات وببعض الصفات البيئية لمواقع الجمع فضلاً عن البيئة الموضعية للنبات نفسه (وجود النبات في التربة أو بين الصخور أو على الجدران أو على جوانب الطرقات)، فمجموعة موقعي سد درعا ووادي الزيدي هما الأقل ارتفاعاً عن سطح البحر (410-560 م) على التوالي، في حين يقع موقع صلخد على ارتفاع 1416 م عن سطح البحر، هذا التباعد عكس تباعداً في الصفات المورفولوجية التي بدت واضحة بين هاتين المجموعتين، وفي الوقت نفسه عكس تباعداً وراثياً كبيراً بينهما أظهره التحليل العنقودي لمعطيات الدراسة الجزيئية. وكنتيجة نهائية يمكن القول: إنَّ للبنج الذهبي ثلاثة طرز وراثية: الأول طراز صلخد، والثاني (النبك-الديماس) والثالث (سد درعا-وادي الزيدي). ونتيجة لمرور الزمن وتعاقب الأجيال على البنج الذهبي ونتيجة للبعد الجغرافي فضلاً عن اختلاف العوامل البيئية وعلى رأسها الارتفاع عن سطح البحر، ناهيك عن البيئات الموضعية للنبات في مواقع الدراسة، ذلك كلّه أدّى إلى اصطفاء طبيعي لطرز وراثية ظهرت ملامحها في الدراسة الجزيئية، وكذلك المورفولوجية التي تعكس تبايناً وراثياً، إذْ جُمعت البذور من بيئاتها المختلفة وزُرعت ضمن ظروف مخبرية واحدة، مما ينزع عن الصفات المدروسة أثر العوامل البيئية في أثناء إجراء هذه التجربة، ومن ثمَّ فالتباينات الشكلية الظاهرة عائدة لتباينات وراثية.

واستنتج بأنْ التوزع الجغرافي لمواقع الجمع أدَّى دوراً مهماً في توزع الطرز الوراثية للبنج الذهبي، إذ نجد موقع صلخد في منطقة جغرافية منفصلة في أقصى الجنوب، وموقعي النبك والديماس يقعان شمال المنطقة المدروسة، ومواقع بصرى وسد درعا ووادي الزيدي تتوسط منطقة الدراسة جغرافياً. هذا التوزع الجغرافي يتوافق مع نتائج الدراسة الجزيئية وبشكل جزئي مع الصفات المورفولوجية المدروسة، ومن ثمَّ فالتباينات الملاحظة بين النباتات من مختلف المواقع عائدة لتباينات وراثية. وأظهرت ISSR فعالية في الكشف عن التباينات الوراثية الموجودة بين تجمعات النوع الواحد في مواقع الدراسة بالاعتماد على نتائج (18) مرئسة، فكانت نسبة التعددية الشكلية 87.5%. وأثبتت المرئسات المستخدمة فعاليتها في إعطاء تعددية شكلية بين النباتات المدروسة ونتج عن استخدام هذه المرئسات ما مجموعه (56) حزمة، منها 49 ذات تعددية شكلية. وأظهر التحليل العنقودي وشجرة القرابة الوراثية انقسام نباتات المواقع إلى مجموعات وراثية متباينة؛ وذلك تبعاً لتوزعها الجغرافي وارتفاعها عن سطح البحر وعوامل البيئة المختلفة.

شكر وتقدير

يتوجه الباحثون بخالص الشكر إلى الهيئة العامة للتقانة الحيوية ومخبر البيولوجية الجزيئية بكلية الزراعة بجامعة دمشق على توفير مستلزمات البحث والإسهام في إنجازه.

المراجع References

أطلس التنوع الحيوي في سورية. 2011. وزارة الدولة لشوؤن البيئة.

المقرن، ابتسام. 2009. دراسة مورفولوجية وتشريحية لنباتات جنس *Haloxylon* النامية طبيعياً في المملكة العربية السعودية.

لحام، جورج. ومحمد العودات،. 1994. النباتات الطبية واستعمالاتها، مطبعة الأهالي، دمشق.

حرامي، ثناء. (2002). دراسة تصنيفية كيميائية وبيئية لجنس البنج Hyoscyamus في جنوب سورية. أطروحة ماجستير، ص 123.

Abou-Isba, S. M., A. H. Abdel-Ghani and S. Al-Qura'n. 2007. Variation in Hyoscyamus spp. Populations from Jordan Using Morphological Traits and RAPD Markers. Jordan Journal of Agricultural Sciences, 3(4).

Ai-Fen, T., H. L Zhong, M. Q Jian, X. Z Dong, W. Tao and , H. C . Shun. 2009. Comparison and Analysis of IRAP and ISSR Molecular Methods Used for Assessment of Genetic Diversity in Tobacco. Journal of wuhan botanical research.06.

AL-Atawneh, N., A. Shehaden, a. Amri and N. Maxted. 2009. Conservation Field Guide to Medics. ICARDA. Syria.

AL-Khalifa, N. S, A. M. Abdulkader, T.H. Nasroun and A.H. Farhan. 2004. Effect of pretreatment on germination seeds of three desert woody plants indigenous to Saudi Arabia. Journal Soc for Agriculture Science(3)2.

Arafeh, R. M. H.,Y. Sapir, A. Shmida, N. Iraki, O. Fragman and P. Comes. 2002. Patterns of genetic and phenotypic variation Iris hayni and I.atrofusca (Iris sect. Onocyclus = the royal irises) along an ecogeographical gradient in Palastine and the West Bank, Mol. Ecol.,11, 39-53.

Berlin, J and F. Sasse. 1985. Selection and screening techniques for plant cell cultures. Advanced Biochemistry and Engeneering, 31: 99-132.

Cordell, G. A. 1978. Alkaloids in: Mark HF, Othmer DF, Overberger CG, Seaborg GT (eds) Kirk-Othmer encyclopedia of chemical technology, 1: 883-943.

Degani, C., L. Rowland, A. Levi, G. Hortynski and G. J. Galletta. 1998. DNA fingerprinting of strawberry (Fragaria X Ananassa) cultivars using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers, Euphytica, 1025:. 247 – 253.

Doyle, J., J and J. L. Doyle. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus. 12: 13-15.

El-Shawaf, I. I. S., M. Bekhit, A.M. Hassan, F.M. El-Saied and I. M. Masoud,. 2003. Use of RAPD and ISSR markers for the identification of Egyptian Henbane (Hyoscyamus muticus L.) genotypes.

Evans, W. C. 2003. Trease and Evans' Pharmacognosy. 15 th edition, W. B. Sauders Company Ltd. Edinburgh, London, New York, Philadelphia, St Louis, Sydney, Toronto.

Gemeinholzer, B and M. Wink 2001. Solanaceae: occurrence of secondary compounds versus molecular phylogeny. University Heidelberg, Institut fur Pharmazeutische Biologie, Heidelberg, Germany.

Isshiki, S., N. Iwata and M.D.R. Khan. 2008. ISSR variations in eggplant (Solanum melongena L.) and related Solanum species. Scientia Horticulturae 117: 186–190.

Migdadi, H. M. 2001. Genetic variation in some Aegilops species as revealed by morphological and molecular techniques, Ph.D. Thesis, University of Jordan, Amman, Jordan.

Mouterde, P. 1983. Nouvelle Flore du Liban et de la Syrie. Tomes 3, pp. 578. Text and Atlas. Dar El Mashreq, Beyrouth, Liban.

Mulabagal, V and H. S. Tsay. 2004. Plant Cell Culture an alternative and efficient source for the production of biologically important secondary metabolites.

Murashige, T and F. Skoog. 1962. A revised Medium for Rapid growth and bioassays with Tobacco tissue culture. Plant physic., 15(1):473 - 479.

Nei, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. Proc Natl Acad Sci USA 70:3321-3323.

Ogata, J., Y. Kanno, Y. Itoh, H. Tsugawa and M. Sazuki. 2005. Anthocyanin biosynthsis in roses nature, Plant biochemistry,: 757-758.

Post, G and J. Dinsmore. 1932. Flore of Syria, Palestine and Sinai. American press, Beirut. volumes, I, II : 658, 928.

Roddick, J. 1991. The importance of the Solanaceae in medicine and drug therapy. In "Solanaceae 111: Taxon-omy, Chemistry, Evolution". pp: 7-23. Hawkes, J., Lester, R., Nee, M. and Estrada, N., eds. Royal Botanic Garde Kew and Linnean Society of London. London.

Saidon, N. A. 2008. The establishment of embryogenic callus culture of Hyoscyamus niger and the detection of hyoscyamine in the culture.

Straus, A. (989. Hyoscyamus spp: In vitro culture and production of tropane alkaloids. In: Bajaj YPS (ed) Biotechnology in agriculture and forestry, 7:286-314. Medicinal and aromatic plants. Springer, Berlin Heidellberg New York,

Suzuki, K., D. Yun, X. Chen, Y. Yamada and T. Hashimoto. 1991. An Atropa belladonna hyoscyamine 6b-hydroxylase gene is differentially expressed in the root pericycle and anthers. Plant Molecular Biology, 40: 141-152.

Tytgat, A and N. Guido. 2007. Hyoscine butylbromide: A review of its use in the treatment of abdominal cramping and pain. Drugs, 67(9):1343-1357.

Williams, J. G. K.,A. R. Kubelik, K.J. Livak, J.A. Rafalskiand S. V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Research 18 (22): 6531-6535.

Wink, M. 2003).Evaluation of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. Phytochemistry, 64: 3-19.

Yamada, Y and M. Tabata. 1997. Plant biotechnology of tropane alkaloids. Plant biotechnology, 14: 1-10.

Ziekiewicz, E., A. Rafalski and A. labuda. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) anchored pol.

Received	**2012/04/03**	**إيداع البحث**
Accepted for Publ.	**2012/07/18**	**قبول البحث للنشر**