

دراسة التوصيف المورفولوجي والجزئي لأنواع الإفدرا الموجودة في سورية

إعداد طالبة الدكتوراه

هيفاء حواصلتي*

ومشاركة الدكتور

محمد عصام حسن آغا***

إشراف الأستاذ الدكتور

أحمد سمير النوري**

الملخص

خلفية البحث وهدفه: تتميز شجيرة الإفدرا بأنها ثنائية الجنس، مقاومة للجفاف والصقيع على حد سواء، معمرة، وذات قيمة دوائية كبيرة لاحتوائها على قلويدات الإفرين.

تبيّن من خلال الدراسة المرجعية أنه لم تجر دراسة تفصيلية لهذا النبات الطبي المهم المنتشر طبيعياً في سورية الذي تزايد عليه الطلب عالمياً.

دراسة أنواع الإفدرا الموجودة في سورية مورفولوجياً وباستخدام المؤشرات الجزيئية بتقانة الدنا المضخم عشوائياً (Random Amplified Polymorphic DNA RAPD)

مواد البحث وطرائقه: جمعت العينات لنبات الإفدرا من عدة مواقع في سورية وأجريت الدراسة المورفولوجية لها عياناً وباستخدام المكبرة أيضاً، إذ فحصت الأزهار الذكرية، والمخاريط الأنثوية الناضجة، وحافات قنابات وأغصان الأوراق.

كما استخلصت المادة الوراثية من العينات وضخم الحمض النووي باستخدام سبع بادئات لاختبارات الدنا المضخم عشوائياً (RAPD) لدراسة التباين الوراثي على المستوى الجزيئي.

النتائج: أظهرت الدراسة المورفولوجية بناءً على الصفات الظاهرية المذكورة وجود ثلاثة أنواع من الإفدرا في سورية هي: *E.alata*, *E.aphylla*, *E.foemina*. كما أثبتت البادئات المستخدمة فعاليتها في الكشف عن تباين بين التراكيب الوراثية المدروسة، ونجم عن استخدامها ما مجموعه 55 من الحزم الكلية من بينها 51 حزمة متعددة شكلياً (متباينة)، وكانت النسبة المئوية للحزم المتباينة 92%، وقد بلغ متوسط عدد الحزم المتباينة مع كل بادئة 7.28 حزمة. حددت درجة القرابة الوراثية للتراكيب المذكورة وتمثلت بشجرة القرابة بناءً على مصفوفة التشابه وفق طريقة (UPGMA).

توزعت التراكيب الوراثية المدروسة لشجرة القرابة الوراثية على مجموعتين أساسيتين، تألفت الأولى من تركيبين وراثيين وضمت الثانية بقية التراكيب الوراثية، وجد أن أقل قيمة للتشابه الوراثي 0.18 لوحظت بين التركيبين B و K، وأعلى قيمة للتشابه الوراثي بين التركيبين B و D بلغت 0.70 بين B و D.

الاستنتاج: تبيّن وجود ارتباط واضح بين نتائج كل من الدراسة المورفولوجية والموقع الجغرافي ودرجة القرابة للتراكيب الوراثية المدروسة.

الكلمات المفتاحية: إفدرا، التوصيف المورفولوجي، التوصيف الجزيئي، المؤشرات الجزيئية، البعد الوراثي، التضخيم العشوائي لقطع الدنا المتباينة (RAPD).

* قسم العقاقير - كلية الصيدلة - جامعة دمشق.

** قسم العقاقير - أسناد - كلية الصيدلة - جامعة دمشق.

*** قسم العقاقير - كلية الصيدلة - جامعة دمشق.

Morphological & Molecular characterization of *Ephedra* species found in Syria

Haifa Hawasli*

A.S.Al-Nouri**

M.E.H.Agha***

Abstract

Background & Objective: Ephedra is a dioecious, drought- and frost-resistant, perennial, evergreen shrub with high medicinal value due to its content of ephedrine alkaloids. It became quite clear throughout referential studies that this significant medical plant which is spontaneously widespread in Syria and there have been an increased international demand on it hasn't been studied yet.

The objective of this research was study Ephedra species found in Syria, using morphological traits and molecular markers.

Materials & Methods: Ephedra plants were collected from different locations of Syria. Morphological characters (male flowers, ripe female cones, and the edges of leaves and sheaths bracts were observed by naked eyes and magnifier.

The DNA of all genotypes was extracted and amplified using seven randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) primers to study genetic variability at the molecular level.

Results: Morphological data showed differences between three species: *E.alata*, *E.aphylla*, *E.foemina*.

Tested RAPD primer gave repeatable polymorphic products producing a total of 55 bands, 51 of them were polymorphic. The level of polymorphism was 92% with an average of 7.28 bands/ primer. The similarity coefficient matrix of seven *Ephedra* genotypes based on the data of 7 RAPD primers using the UPGMA method was used to construct a dendrogram.

Discussion: Two major clusters were obtained from the dendrogram belonging to studied genotypes; Cluster I and cluster II. Cluster I comprised two genotypes, Cluster II comprised the other five minor genotypes. The highest value about 0.70 of similarity was observed between genotypes D & B. The lowest value of similarity 0.18 was observed between K & B.

Conclusion: A significant correlation was found between morphological distances, genetic distances and geographic distances of the studied genotypes.

Key words: Ephedra, plant morphology, Molecular markers, Genetic distance, Random amplified polymorphic (RAPD) DNA.

* Dept. of Pharmceecogmosy, Faculty of Pharmacy, Damascus University

** Dept. of Pharmceecogmosy, prof. Faculty of Pharmacy, Damascus University

*** Dept. of Pharmceecogmosy, Faculty of Pharmacy, Damascus University.

مقدمة:

تنتشر في سورية قرابة 3150 نوع نباتي تتوزع في السهول والبادية والمرتفعات¹. ولم يدرس حتى الآن إلا القليل منها، واختير نبات الإفدرا *Ephedra* من الفصيلة الإفدرية *Ephedraceae* (الجنتميات *Gnetaceae*) لدراسته نظراً إلى أهميته الطبية التي عرفت منذ زمن بعيد². للعقار خواص مقبضة للأوعية الدموية وموسعة للقصبات، وله خواص منشطة للجملة العصبية المركزية. وتسلسل الضوء بشكل أكبر على التأثير المضاد للسعال والموسع للقصبات وللاحتقان الأنفي (الذي يعود سببه إلى حمى القش والتحسس الأنفي وأمراض البرد والتهاب الجيوب)، كما أن هنالك اهتماماً كبيراً بتأثيره المثبط للشهية^{3 4 5}. وتجدر الإشارة هنا إلى أن إساءة استخدام العقار يمكن أن يتسبب بحوادث خطيرة قد تصل للموت.

تعود الخواص الدوائية للإفدرا إلى وجود قلويدات الإفدرين، وهي من الأدوية المقلدة للجملة العصبية الودية *sympathomimetic*، ولها تأثير مباشر وغير مباشر في مستقبلات الأدرينالين ألفا وبيتا وتأثير منشط للجملة العصبية المركزية⁶.

يوجد في سورية بحسب فلورا موتيرد ثلاثة أنواع: *Ephedra alata* تنتشر في البادية ومنطقة دمشق و *Ephedra campylopoda* أو *Ephedra foemina* وتنتشر في الجبال الساحلية وحارم و *Ephedra alte* أو *Ephedra aphylla* وتنتشر في تدمر والبوكمال ومنطقة دمشق⁷. كما ذكر في الجزء الأخير الملحق من الفلورا أنه يعتقد أن هذه الأنواع الثلاثة هي نوع واحد وأطلق عليه اسم *Ephedra transitoria*.

كان الهدف من هذا البحث دراسة أنواع الإفدرا الموجودة في سورية باستخدام المؤشرات المورفولوجية والمؤشرات الجزيئية الـ RAPD، إذ تبين من خلال الدراسة المرجعية

أنه لا توجد دراسة لهذا النبات الطبي المهم محلياً الذي تزايد عليه الطلب عالمياً.

ينبغي عدم إهمال النواحي المورفولوجية إذا أردنا الحصول على معلومات كافية، وذلك لأن النواحي المورفولوجية بحد ذاتها تؤدي دوراً مهماً في التحليل الوراثي، وقد كان هذا واضحاً منذ أن استنتج ماندل Mendel المبادئ الأساسية لعلم الوراثة عبر الصفات المورفولوجية في حقل البازلاء⁸.

ومن الأهمية دعم الدراسة المورفولوجية بأخرى جزيئية وتطبيق طرائق التقانات الحيوية الحديثة للوصول إلى نتائج أكثر دقة، خاصة أن الصفات المورفولوجية تتأثر بالظروف البيئية والأطوار الفينولوجية للنبات. إن التطور السريع الذي حصل في البيولوجيا الجزيئية *Molecular Biology* وفر الأدوات المناسبة للتحليل الجزيئي للمادة الوراثية التي تتحكم في صفات الكائنات الحية؛ مما أدى إلى ثورة في مجال المؤشرات الوراثية، ومنها مؤشرات الدنا *DNA markers* التي تعرف بأنها تتابعات من الدنا (DNA) يمكن الاستدلال بها على موقع معين على الكروموسوم، تستخدم لدراسة العلاقات الوراثية بين الأفراد وإيجاد البصمة الوراثية لأنها تعكس التباين في المعلومات الوراثية المخزونة.

يعتمد مبدأ عمل التضخيم العشوائي للحمض النووي المتعدد الأشكال (RAPD) على التفاعل التسلسلي للبوليمراز *Polymerase Chain Reaction (PCR)* التي طورت بشكل مستقل من قبل عدة علماء في مقدمتهم ويلش وويليم^{9 10} على وجود قطعة من الحمض النووي الجينومي المراد دراسته الذي يستخدم كقالب تتعرف إليه بادئات (مرئسات - *Primers*) عشوائية يتكون كل منها من عشر قواعد آزوتية (نيكليوتيدات)، حيث يتضاعف إلى شظايا صغيرة من خلال تفاعل البلمرة المتسلسل (*PCR*) إلى أكثر من ترليون مرة خلال 40 دورة من

بين الأنواع المدروسة. كان صنف عوجاً أكثر بعداً وراثياً مقارنة بالأصناف الأخرى، وتجمعت الأنواع البرية والحلوة في مجموعات مفصولة عن بعضها.

ووجد ضميرية وآخرون (2010) باستخدام تقانة RAPD 13 في التوصيف الجزئي لمجموعة من الطرز البرية لنوع الزعرور *Cazarolus* المنتشرة في ريف دمشق بعد تحديد درجة القرابة الوراثية بين الطرز المدروسة، أنه لا يوجد ارتباط بين الطرز القريبة من بعضها وراثياً والمناطق التي جمعت العينات منها، فقد توزعت عينات المنطقة الواحدة على كامل فروع مخطط القرابة¹⁷.

ودرس عاطف رياز وآخرون (2011)¹⁴ الخواص المورفولوجية والتوصيف الجزئي باستخدام تقانة RAPD لخمسة أنماط من الورد البري جمعت من مناطق مختلفة في شمال الباكستان فكانت نتائج الدراسة المورفولوجية متناقضة مع النتائج المعتمدة على تقانة RAPD.

المواد والطرائق:

المادة النباتية:

جمعت عدة عينات من السوق النباتية الفتية (نظراً إلى أن الأوراق فيه ضامرة ومختزلة) من عدة مواقع في سورية: ادلب، معربا، الدريج، التل، قاسيون، الهامة، دير الزور اعتماداً على المعلومات الواردة في فلورا سورية ولبنان (الشكل 1)، وذلك في أيلول/2010، تشرين الأول/2010، تشرين الثاني/2010. وحفظت في الآزوت السائل بدرجة حرارة -80° في مختبرات الهيئة العامة للتقانة الحيوية في كلية الزراعة - جامعة دمشق لاستخلاص الأحماض النووية، واحتفظ بالباقي للدراسة المورفولوجية.

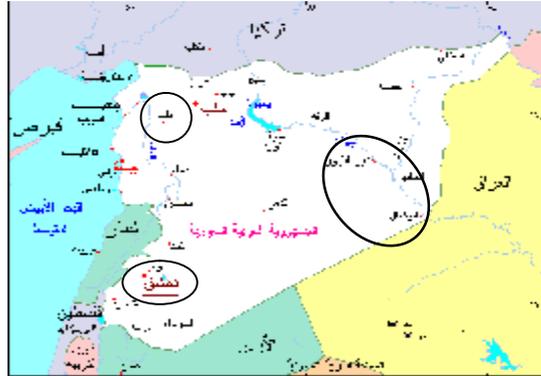
التفاعل، ويستخدم أنزيم الـ Taq DNA Polymerase لتضخيم مقاطع من الدنا بين تسلسلات قريبة من بعضها أصغر من 2000 قاعدة بحيث تكون هذه المقاطع متممة للبادئات المستخدمة. تتوقف التعدديات الشكلية على إمكانية التحام البادئات في سلاسل الدنا DNA، بعد ذلك تفصل نواتج التضخيم لقطع DNA على هلامية من الأغاروز باستخدام جهاز الرحلان الكهربائي. وتتميز تقانة RAPD بأنها لا تحتاج إلى معرفة مسبقة بالتركيب النيوكليوتيدي للمادة الوراثية المراد دراستها ومكانتها، كما أنها تفيد في دراسة الفصائل النباتية، ولا يتطلب إنجازها وقتاً طويلاً ولا تحتاج وجود مواد مشعة، كما أنها تستخدم كميات قليلة جداً من المادة الوراثية DNA، إذ تحتاج فقط إلى جهاز للتدوير الحراري فضلاً عن أن تكاليف إنشائها قليلة ويمكن أتمتها. كما تتميز بتوافر عدد كبير جداً من البادئات التي يمكن تبادلها بين مراكز البحوث التي من السهل معرفة التسلسل النيوكليوتيدي لها¹⁰. هذا ويمكننا من خلال هذه التقانة الكشف عن الاختلافات الصغيرة بين الأصناف والتي تظهر من خلال أنماط حزمية متميزة لأن أي تغيير في إحدى القواعد الآزوتية قد يغير من مواقع ارتباط البادئة. تعدُّ تقانة RAPD ذات أهمية عالية في الدراسات الهادفة إلى الكشف عن درجات القرابة بين الطرز الوراثية والتنوع الوراثي. فقد أجرى mir Ali and Nabulsi عام 2003¹¹ دراسة عن التنوع الوراثي لشجرة اللوز باستخدام تقانة RAPD، وقد أمكن تحديد درجة القرابة الوراثية بين الطرز المدروسة، كما استطاعت هذه التقانة - في بعض الأحيان - ربط الموقع الجغرافي بوجود بعض الحزم المشتركة.

واستخدم عبد اللطيف علي وآخرون تقنية RAPD¹² لدراسة الارتباط الوراثي بين 16 صنف لوز مزروعاً و برياً. إنَّ التحليل RAPD أثبت وجود اختلافات وراثية

الدراسة المورفولوجية:

لوحظت الخواص المورفولوجية العيانية وباستخدام المكبرة أيضاً (أعماد الأوراق وحافات القنابات فهي جرداء أم مهدبة؟ السوق منتصبه، متسلقة أو متدلية، وعدد مآبر الأزهار الذكورية وأهي ذات سويقة مميزة أم لاطئة؟ وطول الأوراق، والمخاريط الذكورية الناضجة لحمية أم غير لحمية) الشكل (2).¹⁵

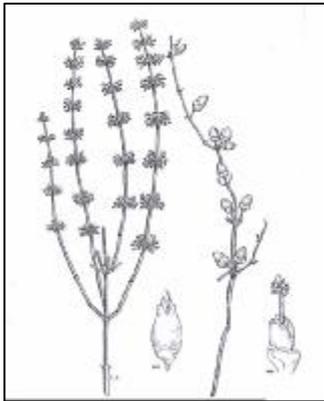
كما لوحظت الصفات الأخرى مثل ارتفاع الجنبه وانتصابها أو كونها متسلقة، وعدد مآبر الأزهار المذكورة وأهي لاطئة أم لا، وعدد أشفاح قنابات المخاريط المؤنثة وأهي متطورة إلى غمد لحمي أم غير لحمي.¹⁶



الشكل (1) خارطة سورية يبين فيها الأماكن المختلفة لجمع عينات الإفدرا

جدول (1) يبين مناطق جمع العينات من مختلف المناطق في سورية مع رمز العينة

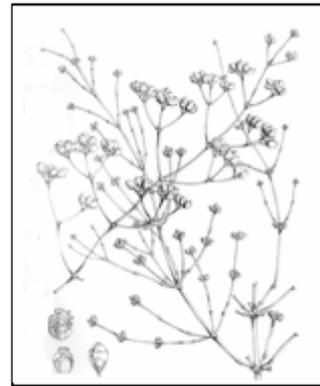
رمز التركيب الوراثي	مناطق الجمع
A	ادلب
B	درية
C	معربا
D	التل
E	قاسيون
N	هامة
K	دير الزور



E. foemina



E. alata



E. aphylla

الشكل (2) أنواع الإفدرا الثلاثة¹⁵

الدراسة الجزيئية

استخلاص الأحماض النووية DNA Extraction

جمعت العينات النباتية واستخلص الحمض النووي DNA من السوق الفتية بعمر 2-3 أسابيع من نبات فردي بحسب طريقة (Doyle and Doyle, 1990) 17، مع إجراء بعض التعديلات. طحنت العينات بالأزوت السائل Liquid N2، ومن ثم نقلت إلى أنابيب بسعة 2ml، وأضيف إليها 700 µl من محلول الاستخلاص 17 (الجدول 2):

الجدول (2): مكونات محلول استخلاص DNA بحسب (Doyle and Doyle, 1990)

NaCl	1.4 M
CTAB	2% w/v
Tris-HCl	0.1 M
EDTA	20 mM
Na ₂ S ₂ O ₅	1% w/v
β-mercaptoethanol	0.2% v/v

مزجت العينات جيداً وحضنت في حمام مائي بدرجة حرارة 65°م مدة 60 دقيقة مع التحريك المستمر والهاديء. أخرجت العينات وأضيف إليها حجم مماثل من الكلورفورم/ الأيزوميل (CIA) /chloroform/ isoamyl alcohol بنسبة 1:24، ثم خلط المزيج جيداً مدة 5 دقائق. فصلت البقايا النباتية عن الحمض النووي DNA الذائب في محلول الاستخلاص بعملية التنفيل باستخدام المثقلة بسرعة 13,000 rpm دورة/الدقيقة ومدة 10 دقائق بدرجة حرارة 4°م. نقل الوسط المائي (الطبقة العلوية) الحاوي على الحمض النووي DNA إلى أنبوب جديد وأضيف 1 µl من كلورفورم/ أيزوميل، ثم خلط المزيج جيداً مدة 5 دقائق وأجريت عملية التنفيل بسرعة 13000 دورة/الدقيقة ومدة 10 دقائق، ورسب الحمض النووي بإضافة 400µl من الإيزوبربانول isopropanol المبرد في درجة حرارة -20°م وإضافة 50µl من أسيتات الصوديوم Sodium

acetate (3.5M) و 40µl من أسيتات الأمونيوم 10 M، وترك الحمض النووي DNA ليترسب في درجة حرارة -20°م مدة 20 ساعة تقريباً، بعد ذلك جمع الحمض النووي DNA بالتنفيل مدة 5 دقائق وبسرعة 10000 دورة/دقيقة بدرجة حرارة 15 مئوية. تم التخلص من الطور السائل وغسل الراسب بمحلول الغسيل 200µl (الإيتانول 76%، أسيتات الأمونيوم 10mM) مدة 10 دقائق وجفف الراسب في الهواء للتخلص من آثار الإيتانول وأذيب الحمض النووي DNA في 100µl من المحلول المنظم (10mM Tris-Hcl, 1M TE RNAase)، ليحضن DNA المذاب مع أنزيم RNAase مدة 30 دقيقة بدرجة حرارة 37°م للتخلص من RNA الموجود، ونكون بذلك قد حصلنا على كامل الحمض النووي DNA الموجود في الجينوم.

تقدير تركيز الحمض النووي DNA ونقاوته باستخدام جهاز مطياف الأشعة فوق البنفسجية قدرت كمية DNA بواسطة جهاز UV-Spectrophotometer، حيث أخذت القراءات في جهاز المطياف عند طول الموجات 260 نانومتراً (nm) و 280 نانومتراً (nm)، تسمح قراءة الامتصاصية عند طول الموجة 260 نانومتراً لحساب تركيز DNA في العينة. علماً أن قراءة الكثافة الضوئية للامتصاصية المساوية لـ 1 (OD: Optical Density =1) التي تقابل 50 ميكروغراماً/ مل لسلاسل DNA المزدوجة و 40 ميكروغراماً/ مل لسلاسل DNA المفردة و RNA. في حين تسمح النسبة بين قراءة طول الموجة 260/ 280 نانومتراً بتقدير نقاوة الحمض النووي DNA، إذ يملك الحمض النووي DNA النقي قيم قراءات OD280/OD260 بين 1.8 - 2 (14). حسب تركيز DNA من خلال المعادلة الآتية:

$$\left\{ \text{DNA concentration } (\mu\text{g/ml}) = \text{OD260} \times \text{عامل التمديد} \times 50\mu\text{g/ml} \right\}$$

أجري هذا التفاعل في جهاز التذوير الحراري وفقاً للشروط الآتية: الدنترة عند درجة حرارة 94 درجة مئوية مدة 5 دقائق، ثم 40 دورة تتضمن: التحطم برفع درجة الحرارة إلى 94 درجة مئوية مدة 30 ثانية، ثم الالتحام عند الدرجة 38 مدة دقيقة واحدة، ثم الاستطالة عند الدرجة 72 مدة 10 دقائق، بعد ذلك حفظت العينات بحرارة 4 درجة مئوية.

الرحلان الكهربائي والتلوين والتصوير:

حمل ما يعادل 6 ميكروليتر من DNA مضافاً إليه 2 ميكروليتر من سائل التحميل 0.25% (bromophenol blue, 30% glycerol) ووضعت في الآبار المخصصة لها ضمن الهلامية، مع تحميل مؤشر marker (1Kbp ladder). فصلت نواتج عمليات التضخيم في جهاز الرحلان الكهربائي Ultrapure fingerprinting (USA) على هلامية من الأغاروز بتركيز 2% في محلول 1X TBE 90 واستمر الترحيل مدة ثلاث ساعات على 90 فولتاً، ولونت الهلامية مدة (30) دقيقة في محلول الإيثيديوم برومايد بتركيز 1 ميكروغرام/ملييلتر، ثم صورت بوجود الأشعة فوق البنفسجية بواسطة جهاز UV transilluminator - بطول موجة 302 نانومتراً (الشكل 3)

التحليل الإحصائي Statistical analysis:

جمعت نتائج عمليات التضخيم للمرئسات المستخدمة في جداول اعتماداً على مقارنة وجود حزم الحمض النووي DNA أو غيابها للعينات المختلفة، وقد أدخلت في التحاليل فقط الحزم الواضحة، و يرمز لوجود حزم DNA بالرقم (1) ولعدم وجودها بالرقم (0)، وحسب التشابه الوراثي Genetic Similarity بين العينات المدروسة باستخدام معامل Jaccard (1908) وفق المعادلة الآتية:

$$GS(ij) = a/(a+b+c)$$

GS: يمثل قيمة التشابه الوراثي وتراوح ما بين 0 و 1

a: تمثل عدد الحزم المشتركة في كلا المسارين i و j

b: تمثل عدد الحزم الموجودة في المسار i و الغائبة في المسار j

وقدرت نوعية الحمض النووي DNA بواسطة جهاز الرحلان الكهربائي باستخدام هلامية الأغاروز 1%، لتظهر بواسطة الأشعة فوق البنفسجية UV وبوجود مادة إيثيديوم برومايد الذي يرتبط مع الحمض النووي DNA مشكلاً معقداً يتألق إثر تعرضه للأشعة فوق البنفسجية، يهاجر الحمض النووي DNA على هلامية الأغاروز كحزم، وتكون عينات الحمض النووي DNA ذات نوعية جيدة عندما تظهر كحزمة واحدة. 18

تضخيم الحمض النووي:

أجري باستخدام باستخدام تقنية RAPD التي تعتمد اعتماداً أساسياً على التفاعل السلسلي للبوليمراز polymerase Chain Reaction (PCR)، استخدمت سبع بادئات بتركيز 10 Micro Mol (الجدول 3).

(الجدول 3) يبين النتائج النيكلوتيدي لسبع من البادئات مجموعة

RAPD

البادئة	التسلسل النيكلوتيدي 3' - 5'
OPC-08	TGGACCGGTG
OPC-15	GACGGATCAG
OPD-03	GTCGCCGTCA
OPC-11	AAAGCTGCGG
OPC-05	GATGACCGCC
T-16	GGTGAACGCT
E-01	CCCAAGGTCC

أجري تفاعل PCR وفقاً 17 مع بعض التعديلات فكان حجم التفاعل النهائي 25 ميكرولتراً من المواد الكيميائية الآتية:

Taq DNA Polymerase 0.05 units/μl, MgCl₂ 4 mM, dNTPs 2.5 μl, DNA 2 μl (25 ng/μl), primer 2.5 μl (10pmol/μl), Buffer 10X

c: تمثل عدد الحزم الموجودة في المسار z والغائبة في المسار i اعتماداً على معامل التشابه Jaccard جرى الفصل الوراثي بين العينات المدروسة باستخدام طريقة التحليل العنقودي الشبكي المراتبي التكتلي التسلسلي (SAHN) Sequential Agglomerative Hierarchical Nested cluster analysis التي تستخدم المتوسط الحسابي للمجموعة الزوجية غير الموزونة (UPGMA) Unweighed Pair Group Method

كما استخدم تحليل المكونات الأساسية للتأكد من مدى دقة الفصل الناتج بواسطة الشجرة الوراثية، (التحليل الإحصائية جميعها أجريت باستخدام برنامج NSTS-pc version 2.1).¹⁹

النتائج:
نتائج الدراسة المورفولوجية
من خلال الدراسة الشكلية، بناءً على الصفات الظاهرية المذكورة ميزت ثلاثة أنواع من نبات الإفدرا الجدول (4).

الجدول (4) يوضح الصفات المعتمدة في تمييز الأنواع الثلاثة من الإفدرا فضلاً عن مناطق جمع العينات ورموز التراكيب الوراثية

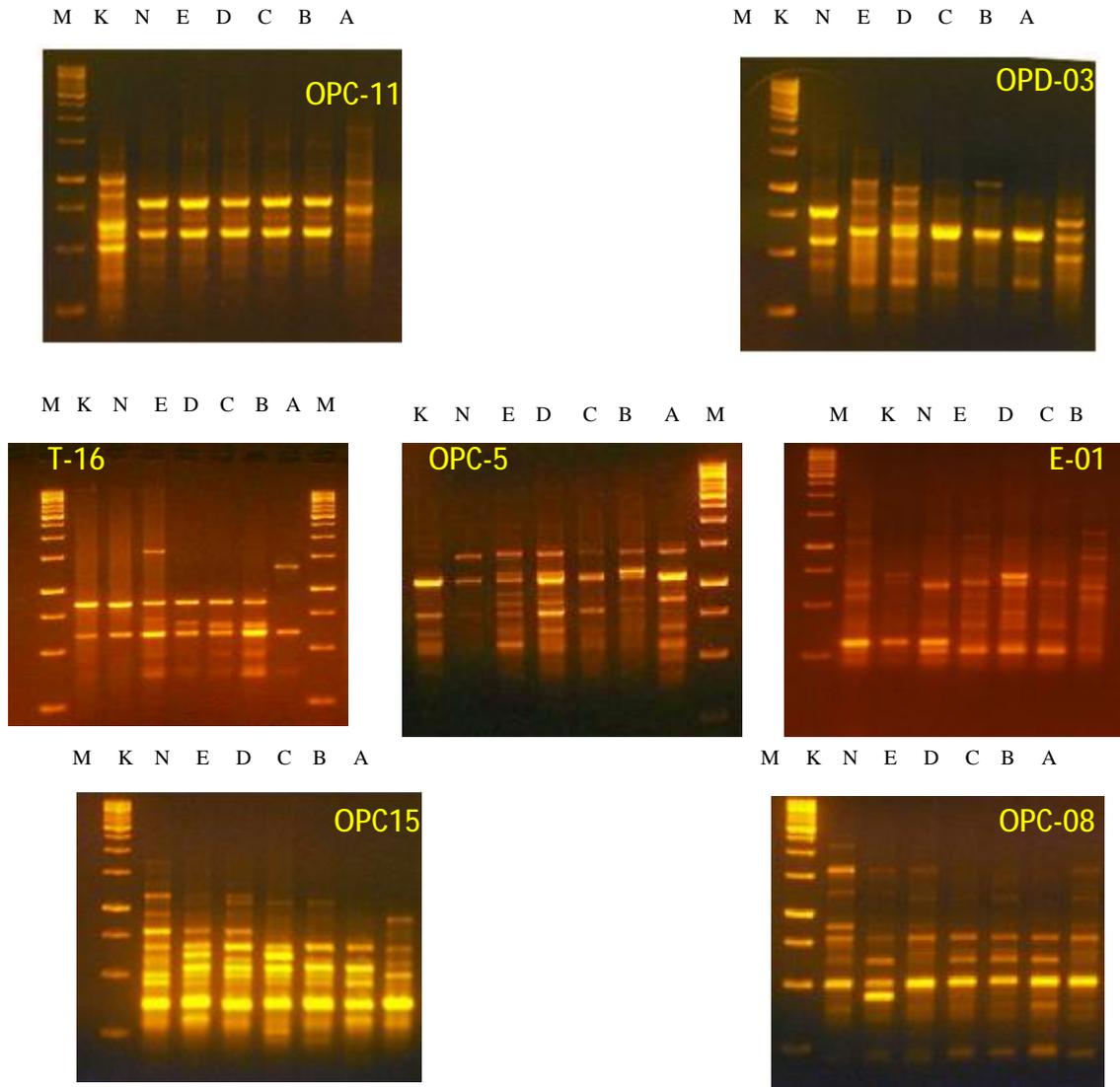
أنواع الإفدرا	مناطق الجمع مع رموز التراكيب الوراثية	الأزهار الذكرية	المخاريط الأنثوية الناضجة	حافات القنابات وأعماد الأوراق
إفدرا الاتا <i>E.alata</i>	دير الزور K	6-4 مآبر ذات سوقة مميزة	5 أشفاغ من القنابات المتراخية ، المجنحة ولا تصبح لحمية القوام بل تبقى حرسفية	مهذبة
إفدرا أفيللا <i>E.aphylla</i>	دمشق N,E,D,C,B	4-3 مآبر لاطنة	3 أشفاغ من القنابات الداخلية منها حمراء ولحمية القوام	مهذبة
إفدرا فومينا <i>E.foemina</i>	ادلب A	6-4 مآبر لاطنة	3-2 أشفاغ من القنابات، الداخلية منها ثنائية الفص تتطور الى غمد غير لحمي يحيط بالبذور	جرداء

البادئة E-01 أقل عدد من الحزم (6). كما اختلفت البادئات المستخدمة في كشف التباينات الوراثية بين الطرز المدروسة، فقد أعطت البادئة OPC-15 أكبر عدد من الحزم (9 حزم منها 8 حزمة متباينة) بنسبة تباين 88%، فيما أعطت البادئة OPC-08 أقل مستوى من التباين (9 حزم منها 7 حزمة متباينة) بنسبة تباين 71%، كما في الجدول (5).

نتائج الدراسة الجزئية
1. التباينات الشكلية polymorphism الناتجة عن استخدام تقنية RAPD في التراكيب الوراثية المدروسة:
أعطت البادئات المستخدمة 55 حزمة من الحزم الكلية من بينها 51 حزمة متعددة شكلياً (متباينة) وكانت النسبة المئوية للحزم المتباينة 92%، وبلغ متوسط عدد الحزم المتباينة مع كل بادئة 7.28 حزمة. أعطت البادئات OPD-03,OPD-08,OPD-15 أعلى عدد من الحزم (9) في حين أعطت

(الجدول 5): رموز البادئات المستخدمة - عدد الحزم الكلي - عدد الحزم المتباينة - النسبة المئوية للمتعددية الشكلية

عدد الحزم الكلية	عدد الحزم المتعددة شكلياً	النسبة المئوية للمتعددية الشكلية
7	7	100
9	7	71
9	8	88
8	8	100
7	6	85
6	6	100
9	9	100
55	51	644
7,8	7.28	92



(الشكل 3) أنماط RAPD الناتجة عن استخدام سبع بادئات للتركيب الوراثية المدروسة

3- تحديد درجة القرابة الوراثية بين التركيب الوراثية أن أقل قيمة للتشابه الوراثي 0.18 بين عينة دير الزورK المدروسة: وعينة الدريج B، وأعلى قيمة للتشابه الوراثي بلغت 0.70 . جرى تحديد درجة القرابة الوراثية بين التركيب الوراثية بين عينة التل D وعينة الدريج B . المدروسة بالاعتماد على معامل Jaccard (الجدول6) فنتبين

(الجدول6): التشابه الوراثي Genetic similarity بين العينات المدروسة استناداً إلى معامل Jaccard

A	B	C	D	E	N	K	
-	-	-	-	-	-	1	K
-	-	-	-	-	1	0.25532	N
-	-	-	-	1	0.46341	0.31373	E
-	-	-	1	0.525	0.51429	0.2	D
-	-	1	0.7	0.38095	0.6129	0.21277	C
-	1	0.65385	0.7037	0.43243	0.55172	0.18182	B
1	0.26471	0.23077	0.2439	0.34884	0.21951	0.29545	A

2. التحليل العنقودي للتراكيب الوراثية المدروسة:

يمكن تقسيم الأفراد المدروسة من خلال التحليل العنقودي إلى مجموعات تبيّن درجة القرابة الوراثية بين الأفراد المدروسة، وقد تتجمع الأفراد المدروسة ضمن مجموعة واحدة بناء على موطنها الجغرافي، أو بحسب أصلها ونسبها. أجري التحليل العنقودي للنتائج التي تم الحصول عليها؛ وذلك لإنشاء شجرة القرابة الوراثية Dendrogram لتحديد القرابة الوراثية (الشكل 4).

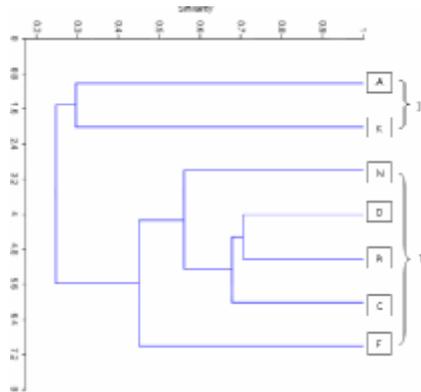
المناقشة:

تبيّن النتائج السابقة للدراسة المورفولوجية لنبات الإفدرا باستخدام الصفات المظهرية (عدد مآبر الأزهار الذكرية، وأهي ذات سويقة مميزة أم لاطئة، والمخاريط الذكرية الناضجة لحمية أم غير لحمية، وعدد أشفاق قنابات المخاريط المؤنثة وأهي متطورة إلى غمد لحمي أم غير لحمي، أعماد الأوراق وحافات القنابات أهي جرداء أم مهدبة)¹⁵ وجود ثلاثة أنواع: عينة دير الزور *E. alata*، وعينات دمشق (الهامة، قاسيون، دريچ، النل، معربا) *E. aphylla*، ثم أخيراً عينة ادلب *E. foemina*.

كما أظهرت نتائج الدراسة الجزئية المعتمدة على تقنية RAPD أنها كانت مفيدة في تقدير العلاقة الوراثية بين

التراكيب الوراثية، فقد أعطت البادئات المستخدمة جميعها منتجات تضخيم في تفاعل PCR كما أثبتت فعاليتها في إعطاء تعددية شكلية بين التراكيب الوراثية المدروسة. تبيّن من (الشكل 4) توزع التراكيب الوراثية على مجموعتين أساسيتين، ضمت الأولى التركيبين الوراثيين A & K. وضمت الثانية مجموعتين ثانويتين. تشمل المجموعة الأولى الثانوية التراكيب الوراثية C & B & D & N. أمّا المجموعة الثانية الثانوية فانفرد فيها بفرع مستقل التركيب الوراثي E الذي جمع من قاسيون. لوحظ في هذه الدراسة أن التراكيب الوراثية كانت مختلفة عن بعضها بعضاً وهذا يدل على التنوع الوراثي الكبير والمتباين بين التراكيب الوراثية لنبات الإفدرا.

وأخيراً فقد وجد من خلال نتائج هذه الدراسة لنبات الإفدرا الذي ينمو طبيعياً في سورية من الناحية المورفولوجية والجزئية التي كانت الأولى في القطر لهذا النبات المهم طبياً واقتصادياً أن هنالك توافقاً واضحاً بين البعد الوراثي والبعد المورفولوجي والبعد الجغرافي، ويمكن تأكيد ذلك بإجراء المزيد من الدراسات باستخدام مؤشرات جزئية أخرى.



(الشكل 4): علاقات القرابة الوراثية اعتماداً على بيانات التشابه الوراثي Jaccard بين نباتات الإفدرا المدروسة باستخدام طريقة

UPGMA إذ A التركيب الوراثي لعينة ادلب، K التركيب الوراثي لعينة دير الزور، N التركيب الوراثي لعينة الهامة، D التركيب الوراثي لعينة النل، B التركيب الوراثي لعينة دريچ، C التركيب الوراثي لعينة معربا، E التركيب الوراثي لعينة قاسيون.

References

- 1-<http://www.unep.org/biosafety/files/SYNBFrepAR.pdf>
- 2-Chevallier, A. The Encyclopedia of Medicinal Plants. New York: DK Publishing Inc. 1996; 93
- 3-Barnes,J, Anderson,L, Phillipson,J.D .Herbal Medicines. Third edition . 2007; 243-246
- 4-Tyler V, et al. Pharmacognosy. 9th edn. Lea and Febiger, Philadelphia. 1988;110
- 5-Bruneton J . Pharmacognosy phytochemistry medicinal plants , 2nd edition technique documentation . 1999; 210
- 6-Dewick, P.Medicinal Natural Products, 2nd edition, John Wiley & SonsLtd, West Sussex, PO191UD, England.2002; 383
- 7-Mouterde , P. Nouvelle flore du liban et de la Syrie. Dar el – Machreq – Bayrooth . 1983 ;1: 20-21
- 8-Sattler & Rutishauser, Relevance of Morphology , Annals of Botany.1999; 80:571-582
- 9-Welsh, et al. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucleic Acids Research .1990;18: 7213-7218
- 10 -Williams, J. et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Research . 1990; 18: 6531-6535
- 11-Mir Ali N & Nabulsi I.Genetic diversity of almand using RAPD technique , Scientia Horticulturae. 2003; 98: 461- 471.
- 12- Abdul Latief Ali Al-Ghzawi , Ibrahim M Rawashdeh, Genetic Relatedness among Wild and Cultivated Almond Genotypes Using DNA (RAPD) Markers in Jordan JJBS.2009; 2: 89 – 96
- 13- Dumireih M. Houmydan A. Khanshour and A. Abdul- Kader. Molecular Characterization of Some Wild Genotypes of Hawthorn Using RAPD Technique. Jornal of Damascus University of agriculture science.2010;106
- 14- Atif Riaz, Mansoor Hameed, Azeem Iqbal Khan. Assessment of biodiversity based on morphological characteristics and RAPD markers among genotypes of wild rose species.A.J.B. 2011 ; 12520-12526
- 15- Boulos L. Flora of Egypt. Al-Hadara Publishing, Cairo, Egypt.1999;I:41
- 16- Post,M.D. Rev.George).Flora of Syria,Palestine,and Sinai Syrian Protestant College Beirut,Syria .1980; 23
- 17- Doyal J.J.,Doyal J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue, Phytochem. Bull.1987; 19: 11
- 18- SAMBROOK et al. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory
- 19- Rohlf, F.J. NTSYS-pc: Numerical taxonomy and multivariate analysis system. Version 2.0. Applied Biostatistics, New York,1998
- 20- Ghafoor,S et al. Molecular characterization of *Ephedra* species found in Pakistan.Genet. Mol. Res. 2007; 6: 1123-1130
- 21- Molecular Characterization of Rose Genotypes Based on RAPD-PCR Mikail ÇALIŞKAN1 Y. Sabit AĞAOĞLU2. 2009; 18:36-42
- 22- Ebrahimi R, Zamani Z, Kashi A. Genetic diversity evaluation of wild Persian shallot (*Allium hirtifolium* Boiss.) using morphological and RAPD markers. Sci. Hortic. 2009;119: 345-351
- 23- Shahram Mohammady and Elahe Abdolvahabi, Using single morphological and RAPD molecular markers to classify a segregating generation of wheat into two earliness groups AJCS.2011; 5:851-857
- 24-K.K.Nkongolo,P.Michael,and W.S.Gratton, Identification and characterization of RAPD markers inferring genetic relationships among Pine species. Genome.2002; 45:51–58121.

تاريخ ورود البحث إلى مجلة جامعة دمشق 2012/5/17.

تاريخ قبوله للنشر 2012/8/27.