مساهمة أولية في التوصيف الجزيئي لأهم الأنواع الطبية البرية التابعة للفصيلة الشفوية *Lamiaceae* في جبل الوسطاني (ادلب)

أحمد دركلت[1] – وسيم حكيم[2] – محمود دهان[3] – علاء الزيدان[1]

١– قسم الموارد الطبيعية المتجددة والبيئة– كلية الزراعة – جامعة حلب– سوريا

٢– المركز العربي لدراسة المناطق الجافة والأراضي القاحلة – أكساد.

٣– قسم علوم الأغذية – كلية الزراعة – جامعة حلب– سوريا

Accepted 17 / 5 / 2010

الملخص: أنجز هذا البحث كأول محاولة في سورية لتحديد درجة القرابة الوراثية بين أهم خمسة أنواع نباتية طبية برية وبين طرازين بينيين تابعين للنوع *Teucrium poliuml* وجميعها تتبع للفصيلة الشفوية *Lamiaceae* في منطقة شمال غرب سورية (محافظة ادلب ــ جبل الوسطاني). أظهرت نتائج التوصيف الجزيئي باستخدام خمس بوادئ AFLP في أربعة توافيق وجود درجة منخفضة من القرابة الوراثية للأنواع الطبية الخمسة المدروسة وكذلك الأمر بين الطرازين التابعين لنوع *Teucrium poliuml* .

تمثلت درجة القرابة الوراثية " حسب معامل التشابه لـ Jaccard " بنسبة 24% بين *Lycopus europaeus* L. و *Teucrium polium* L.، وانخفضت النسبة لتصل لـ 17.5% بين كلا النوعين *Mentha longifolia* L. و *Majorana syriaca* (L.) Rafin. فيما ابتعد النوع *Ballota semaanica* Recg. fil. في درجة التشابه التي انخفضت الى 11% عن بقية الأنواع. منشأ هذه الاختلافات تم مناقشته في معرض هذا البحث.

كلمات افتتاحية: AFLP، نبات طبي، *Lamiaceae*، توثيق جزيئي، تنوع وراثي، جبل الوسطاني.

المقدمة

يتزايد الاهتمام بالأنواع النباتية الطبية، ولاسيما نباتات الفصلية الشفوية *Lamiaceae* التي تتربع في صدارة الفصائل النباتية الطبية الذاخرة أنواعها بالزيوت العطرية والقدرات الاستشفائية للكثير من الأمراض، إلا أن ما يعانيه التنوع النباتي الطبي من اضطراب نتيجة عمليات الجمع غير المنظم يجعل منها عرضةً للانجراف الوراثي، من خلال اندثار عدد كبير من الطرز الوراثية "التي قد تشكل بعض مورثاتها في يوم ما مفتاح لعلاج بعض الأمراض المستعصية التي لم يُكتشف علاجها بعد". بناءً على ما سبق فإن دراسة الأنواع النباتية البرية ذات الفوائد الطبية على المستوى الجزيئي " الذي نفتقر إليه كثيراً" يعد أمراً بالغ الأهمية. فقد ساهمت طرق الوراثة الجزيئية في دراسة الموارد الوراثية النباتية، ورسم الخريطة الوراثية للعديد من المورثات الهامة ودراسة علاقات القرابة بين المجاميع الوراثية وفي تمييز الأفراد من خلال تحديد البصمة الوراثية DNA Fingerprint[1] المميزة لكل فرد أو طراز وراثي أو نوع. وإن التقانة المستخدمة لدراسة التنوع الحيوي للمصادر الوراثية تعتمد على تحديد التعدد الشكلي لتتالي الـ DNA الفعلي، التي منها تقنيتي RAPD[2] & AFLP[3] اللتان لعبتا دوراً كبيراً في توصيف المصادر الوراثية النباتية حول العالم (Lee et al., 2001).

وتحاول هذه الدراسة استثمار بعض التقانات الجزيئية خاصة تقانة AFLP لتشكل أحدى المحاولات الأولى في دراسة التنوع الوراثي للأنواع الطبية البرية في سورية.

يعود الفضل الكبير في دراسة المصادر الوراثية على نحو دقيق إلى تطوير واستخدام معلمات (واسمات) الدنا **DNA** ومن هذه الطرق:

- التهجين الجيني: منها طريقة التعدد الشكلي لطول القطع المحددة RFLP[4]

. (Batstein et al., 1980)

1: Deoxy Ribonucleic Acid: DNA
2: RAPD :Random Amplified Polymorphic DNA
3 :AFLP : AmplifiedFragment Length Polymorphism
4: RFLP:Restriction Fragment Length Polymorphism

- التفاعل السلسلي للبوليميراز: منها التعددية الشكلية باستخدام تقانة الدنا المضخم عشوائياً RAPD (Williams et al., 1990)، وطريقة التعدد الشكلي لتكرار التتالي البسيط SSR[1] (Tautz, 1989).
- الطريقتين معاً عبر استخدام التعدد الشكلي لطول قطع الدنا المضخمةAFLP (Zabeau and Vos, 1993).

تعتبر تقانة AFLP من أكثر تقانات البصمة الوراثية شيوعاً وقدرة على التمييز في الوقت الحالي (Vos et al., 1995). حيث تعتمد هذه التقانة على هضم الدنا DNA بواسطة إنزيمات التجزيء (عموماً EcoRI وMseI) ومن ثم استخدام بوادئ خاصة بإنزيم التجزيء المستخدم ومن ثم إضافة سلسلة قصيرة (3 نيوكليدات عموماً) إلى التتابع الخاص بإنزيم التجزيء. يمكن للـAFLP أن تولد مئات الواسمات قابلة النسخ وبسرعة كبيرة من الـDNA لأي كائن حي ممّا يسمح بدراسة الطرز الوراثية عبر البصمة الوراثية. كما أن لها القدرة على المسح المتزامن للمناطق المختلفة والمنتشرة بشكل عشوائي في الجينوم (مجموعة الصبغيات بما عليها من مورثات) (Mueller and Wolfenbarger, 1999).

إن دراسة وتوصيف التنوع الوراثي للأنواع الطبية البرية وإنشاء بنك للمعلومات على غرار الأنواع النباتية الأخرى المدروسة يشكل حلا ناجعا "آنيا ومستقبليا" للحفاظ على التنوع الوراثي للأنواع، والمحافظة على درجة من التأقلم في ظل هذا التغير في الظرف البيئي.

وباعتبار أن علم البيولوجيا الجزيئية وتطبيقاته العملية من العلوم الفتية في القطر العربي السوري ولعدم وجود أو ندرة الدراسات الخاصة بالنباتات الطبية البرية، تأتي هذه الدراسة كمحاولة أولية لتحديد درجة التقارب أو التباعد الوراثي لخمس أنواع نباتية طبية وبين طرازين بيئيين كلها تتبع الفصيلة الشفوية ***Lamiaceae*** في منطقة جبل الوسطاني باستخدام تقانة AFLP التي تعتبر من أهم طرق البصمة الوراثية.

---

[1]: SSR : Simple Sequence Repeat Polymorphism

مواد وطرائق البحث MATERIALS AND METHODS

المادة النباتية Plant Material

أُختيرت النباتات المدروسة نظراً لأهميتها الطبية، وقلة الدراسات المتعلقة بها، وأهميتها بالنسبة للسكان المحليين، وهذه النباتات هي:

Lycopus europaeus L., *Majorana syriaca* (L.) Rafin. = *Origanum syriacum* L.,

Mentha longifolia L., , *Teucrium polium* L. *Ballota semaanica* Recg.fil.

شملت المادة النباتية المستخدمة على أوراق فتية لخمسة أنواع موجودة في جبل الوسطاني في شمال غرب سورية في محافظة إدلب، حيث جُمعت هذه العينات وحُفظت مباشرة في حاويات خاصة تحتوي على النتروجين السائل لحفظ العينات لحين نقلها إلى المخبر بغرض استخلاص الدنا DNA ، ومن ثم حُفظت العينات الورقية في مجمدات على درجة حرارة – 40 مْ ، ثم طُحنت العينات الورقية بهاون مصنوع من البورسلان بوجود النتروجين السائل، ثم تمت تعبئة المسحوق في أنابيب ابندورف حتى وصل حجم العينة المعبأ في الأنبوب إلى 5 مل، وفي النهاية حُفظت الأنابيب في المجمدة ثانيةً.

التحليل الجزيئي Molecular Analysis

١-عزل الدنا النباتي Extraction of DNA:

تمت عملية استخلاص الدنا DNA في مختبرات المركز الدولي لأبحاث المناطق الجافة ICARDA ، وذلك باستخدام طريقة CTAB[1]، حيث أخذ 100 ملغ من الأوراق المطحونة لكل نبات وأضيف إليها 1 مل من محلول الاستخلاص CTAB، ثم تركت ضمن حمام مائي عند درجة حرارة 65 سْ لمدة 60 دقيقة، ثم أضيف إلى كل أنبوب 1 مل من المزيج Iso-amyl-alcohol chloroform+ (على التوالي; 24:1). ثم وضعت الأنابيب

---

[1] : CTAB :Cytel Trimethyl Ammonium Bromide

في جهاز الطرد المركزي حيث استخلصت الطبقة العلوية وأضيف لكل منها 1 مل من مادة أيزوبروبانول تركيزها 100% ، أجريت عملية التثفيل بجهاز الطرد المركزي ليتم بعدها إفراغ السائل من الأنابيب، ثم غُسلت كتلة DNA بالإيثانول تركيزه 75%. تُوضع الأنابيب بعد ذلك في جهاز الطرد المركزي وتُترك لتجف في درجة حرارة المختبر. ثم أُضيف لكل أنبوب 100 µl من مادة TE (Trisma base + Ethylene) وتُركت الأنابيب حتى اليوم التالي عند درجة حرارة 4 سْ. أُجري بعد ذلك قياس تركيز الـ DNA ونقاوته باستخدام جهاز مقياس الطيف الضوئي (Spectrophotometer) عند طول موجة 260 nm.

٢- مرحلة تقطيع (هضم) الدنا: DNA digestion

تم هضم الـ DNA باستخدام خليط من إنزيمي التجزيء (PstI+MseI)، وذلك بمعدل 0.8 µl لكل 1.3 µl من DNA النبات (تركيز 80 ng / µl) مع إضافة 2 µl من محلول التفاعل ومن ثم تُوضع الأنابيب في حاضنة ثم في حمام مائي ثم تُوضع مباشرة في الثلج لعدة دقائق.

٣- مرحلة الالتحام: Ligation of adapters

أضيف 9.6 µl من محلول الالتحام (Adapter ligation solution) مع 0.4 µl من أنزيم التفاعل(T4-ligase)، نخلط المواد السابقة ثم نستخدم مادة TE الخاصة AFLP لنمدد العينات لخمسة أضعاف.

٤- مرحلة ما قبل التضخيم: Pre- Amplification

نأخذ 2 µl من الناتج الممدد، ونُضيف لها 16 µl من خليط بادئين (Primers)، (2 µl محلول منظم و0.15 µl من أنزيم البلمرة Taq Polymerase). تُخلط هذه المواد بهدف إجراء تفاعل PCR ثم يتم تمديد الناتج إلى خمسة أضعاف باستخدام TE خاص باختبار AFLP.

٥- مرحلة التضخيم الانتقائي للـ AFLP : Selective AFLP amplification

نضيف لـ 2.5 µl من ناتج تخفيف المرحلة السابقة 4.16 µl ماء مقطر على مرحلتين، ويُؤخذ 1 ميكرومول من محلول PCR. ويُعتمد على البادئات الخاصة بكل من أنزيمات التجزيء PstI و MseI متبوعة بثلاثة نيكليوتيدات باستخدام أربع توافيق: (PstI + ACT/ MseI CTG)، (PstI+ ACT/ MseI GAA) (PstI + ACT/ MseI CAT) (PstI + ACT/ MseI ACC)

أُضيف إلى المزيج المذكور سابقا 0.09 µl من بادئ الإنزيم الأول و 2.25 µl من بادئ الإنزيم الثاني ومن ثم أضيف 0.075 µl من أنزيم Taq Polymerase ويُجري تفاعل الـ PCR وفق ظروف التضخيم التالية:

- البرنامج الأول مؤلف من 13 دورة بحيث ترفع درجة الحرارة في كل دورة إلى 94 سْ لمدة 30 ثانية ثم تخفض إلى 65 سْ لمدة 30 ثانية، ثم تنخفض درجة الحرارة بمعدل 0.7 سْ في كل دورة ثم ترفع إلى 72 سْ لمدة 60 ثانية. يسمى هذا القسم من برنامج التضخيم ببرنامج Touchdown
- تستمر عملية التضخيم بالبرنامج الثاني الذي يتضمن 23 دورة حيث تصل درجة الحرارة في كل دورة إلى 94 سْ لمدة 30 ثانية وتنخفض إلى 56 سْ لمدة 30 ثانية ثم ترفع إلى 72 سْ لمدة 60 ثانية ومن ثم تخفض درجة الحرارة الى 15 سْ بشكل دائم.

٦- فصل جزيئات DNA المضخمة على هلام الأكريلاميد

تُفصل جزيئات DNA المضخمة على هلام الأكريلاميد باستخدام جهاز التفريد الكهربائي بعد أن تحضر الهلامة بسماكة 0.4 سم بين لوحين زجاجيين، يترك القالب حتى يتبلمر الهلام بشكل جيد، ثم يثبت على جهاز التفريد الكهربائي. يُضاف المحلول المنظم TBE X1 ثم تُحقن العينات (نضيف لها حجم مماثل من مادة Stop Sequencing) ثم

نحقن واسم الأطوال[1] Lader Markers. بعد الانتهاء، يُمرر التيار الكهربائي في الجهاز بجهد 70 واط وحرارة 50 سْ لمدة ساعتين.

٧- تثبيت الحزم وتلوين وتظهير الهلام

يُفك القالب ويوضع اللوح الزجاجي الحامل للهلام في محلول حمض الأسيتيك النقي لتثبيت الحزم الظاهرة، ثم يغسل عدة مرات بالماء لإزالة آثار حمض الاسيتيك ومن ثم يوضع اللوح الزجاجي في حوض يحتوي على محلول نترات الفضة (بتركيز 1 غ نترات الفضة/1 لتر من الماء النقي) لتلوين الهلام، بعد ذلك يوضع اللوح الزجاجي في حوض يحتوي على محلول التظهير (كربونات الصوديوم بتركيز 30 غ كربونات الصوديوم/ 1 لتر ماء نقي، ومن ثم يضاف إليه قبل الاستخدام محلول ثيوسلفات الصوديوم)، تستمر عملية التحريك الأفقي للحوض بلطف وذلك حتى تظهر حزم الـ DNA، وعند ظهور الحزم بشكل جيد يضاف محلول حمض الاسيتيك لحين يتكشف لون الحزم ويصبح لون الهلام أكثر تبايناً، ثم يُنزع اللوح الزجاجي الحامل للهلام من الحوض ويغسل جيدا بالماء النقي لحين تحليل الحزم المتحصل عليها.

٨-قياس الدنا DNA quantification

تم تصوير الهلام، ثم تنقل الصورة إلى الحاسب لتحضيره للقراءة، وتتم قراءة الحزم المضخمة من خلال مقارنة مواقعها الناتجة بعضها مع بعض يدوياً، حيث تم إحصاء الحزم الواضحة فقط الناتجة عن تضخيم انتقائي للـ DNA على أساس أن رقم (1) يشير إلى وجود الحزمة و الرقم (0) إلى غيابها وذلك لمعطيات البوادئ وعددها ٥ استخدمت ضمن 4 توافقيات.

التحليل الإحصائي Statistical Analysis

أُدخلت قراءات الحزم المضخمة ضمن مصفوفة واحدة، تم تحليلها إحصائياً بالتحليل العنقودي الشبكي التسلسلي التراكمي SAHN[2] : استخدم هذا التحليل لحساب معامل الارتباط

---

(١) واسم الأطوال: وهو مجموعة قطع من الـ DNA معروفة الأطوال وذلك للارتكاز عليها أثناء تحديد طول الحزم المتحصل عليها في التجربة المذكورة

[2] Sequential Agglomerative Hierarchical Nested :SAHN

بين جميع القراءات ورسم شجرة القرابة على شكل عنقودي Dendrogram لترتيب الأنواع البرية المدروسة مما يساعد على تحديد درجة القرابة الوراثية بينها، وذلك باستخدام طريقة المجموعات الزوجية غير المزانة UPGMA[1] من برنامج NTSYS-PC-2.02i. (Sneath & Sokal, 1973)

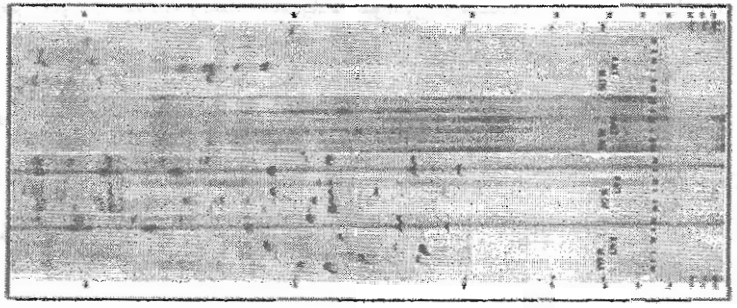
النتائج والمناقشة RESULTS AND DISCUSSION

يبين الشكل(1) صورة لهلامة AFLP المأخوذة للتوافقيات (ACT/CTG, ACT/ACC, ACT/CAT, ACT/GAA) المستخدمة لدراسة التعددية الشكلية حيث تم الحصول على ١٠٦ تعددية شكلية (جدول: 1) مقسمة كما يلي بالترتيب:

(ACT/CTG, ACT/ACC, ACT/CAT, ACT/GAA) (55, 0, 31, 20)

نحصل على مصفوفة ثنائية العد Binary code matrix تحوي 6 أعمدة تمثل الأنواع والطرز البيئية الطبية المدروسة، و١٠6 صفاً تمثل مواقع التعددية الشكلية للواسمات.هذه النتائج تظهر نجاح ثلاث توافقيات في إحداث التضخيم الانتقائي لطول قطع الدنا DNA مما يشكل دليلا على جودة برنامج التضخيم PCR المستخدم.

على العكس من ذلك، إن عدم المقدرة على استثمار التوافقية (ACT/ACC) يبين أن التضخيم الانتقائي لهذه التوافقية لم يكن على درجة كافية من التخصصية، ويمكن تفسير ذلك بأن التضخيم شمل الحزم التخصصية بالإضافة إلى تضخيم غير تخصصي يظهر على الهلامة بعد التلوين وبالتالي استثنيت هذه التوافقية من التحليل.



الشكل 1 صورة هلامة AFLP للتوافقيات المدروسة

[1] Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages : UPGMA

وفيما يلي تظهر الجدول: (1) و (٢) و (٣) التعددية الشكلية المعتمدة للتحليل والأنواع المدروسة.

جدول ١. التعددية الشكلية المعتمدة للتحليل في الأنواع المدروسة بعد إستخدام التوافقية ACT/GAA .

Polymorphic fragment size (bp)	Species					
	P1	P2	B	L	O	Mt
182	1	0	0	0	0	0
180	1	0	0	0	1	0
173	1	0	0	0	0	0
168	1	0	0	0	0	0
167	1	0	0	0	0	0
165	1	0	0	1	0	0
160	1	0	0	0	0	0
157	1	0	0	0	0	0
156	1	0	1	0	0	0
158	0	1	0	1	0	0
142	0	0	0	1	1	0
138	1	1	0	1	0	0
136	0	1	0	0	0	0
134	0	0	0	1	0	1
126	1	1	0	0	0	0
118	0	1	0	1	0	0
116	0	1	0	1	1	0
114	0	1	0	1	0	0
127	0	0	0	0	0	1
112	0	0	0	0	1	0

جدول ٢. التعددية الشكلية المعتمدة للتحليل في الأنواع المدروسة بعد إستخدام التوافقية ACT/CTG

Polymorphic fragment size (bp)	Species					
	P1	P2	B	L	O	Mt
304	0	0	1	0	0	0
290	0	0	0	1	0	0
281	0	0	1	0	1	1
178	0	0	1	0	0	0
232	0	0	0	1	0	0
212	0	0	0	1	0	0
226	0	0	0	0	1	0
210	0	0	0	1	0	0
207	0	0	0	1	0	0
200	0	1	0	0	0	1
198	1	1	0	1	1	1
195	1	0	0	0	0	0
194	0	0	0	0	1	0
192	0	1	0	0	0	1
176	0	0	1	0	1	1
149	0	0	1	0	0	0
156	0	0	0	0	0	1
170	0	0	0	0	1	0
178	0	0	0	1	0	0
164	0	0	0	0	1	0
162	0	0	0	0	1	0
138	0	0	0	0	0	1
160	0	1	0	0	0	0
158	1	1	0	0	1	0
148	1	0	1	0	0	0
140	0	0	1	0	1	0
144	0	1	0	0	0	0
136	0	0	1	0	0	0
134	1	1	0	0	0	0
132	1	1	1	1	1	1
131	0	0	0	0	1	1
130	0	1	0	0	0	0
129	1	1	1	1	1	1

تابع جدول ٢.

Polymorphic fragment size (bp)	Species					
	P1	P2	B	L	O	Mt
127	0	0	1	0	0	0
128	0	0	0	0	1	1
125	0	0	0	0	1	0
126	0	0	0	0	0	1
118	0	0	0	0	0	1
119	0	0	0	1	1	0
117	0	0	0	1	1	0
114	0	0	0	0	1	0
112	0	0	1	1	0	1
98	0	1	1	1	0	1
97	0	0	0	1	0	0
87	0	0	0	1	0	0
127	1	0	0	0	0	0
96	1	0	1	0	1	0
92	0	0	1	0	0	0
94	0	0	0	0	0	1
88	0	0	0	0	0	1
86	1	0	1	0	1	0
84	1	1	0	0	0	1
82	0	0	1	1	0	0
83	0	1	0	0	0	0
81	0	0	0	0	1	0

جدول ٣. التعددية الشكلية المعتمدة للتحليل في الأنواع المدروسة بعد إستخدام التوافقية ACT/CAT

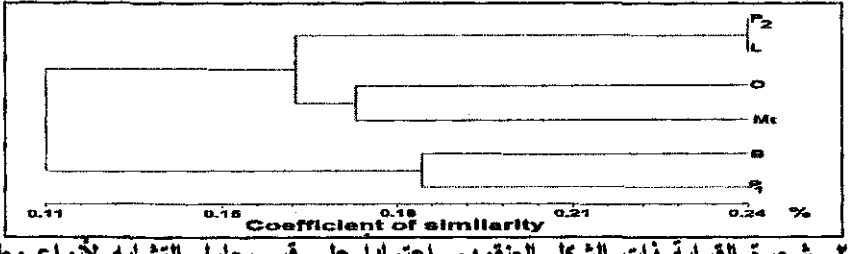
Polymorphic fragment size (bp)	Species					
	P1	P2	B	L	O	Mt
280	0	0	0	1	0	0
278	0	1	0	0	1	0
258	0	0	0	1	0	0
232	0	0	0	0	1	0
205	0	0	0	0	1	0
215	1	0	0	0	0	0
208	0	0	0	0	0	1
194	0	0	0	0	1	1
168	0	0	0	0	0	1
186	0	0	0	1	1	0
184	0	1	0	1	0	0
178	0	1	0	1	1	0
175	0	1	0	1	1	0
94	0	1	0	0	0	0
164	0	0	0	0	0	1
174	0	0	0	1	0	0
128	0	0	0	0	1	0
163	0	0	0	0	0	1
158	0	0	0	0	0	1
118	0	0	1	0	0	0
122	0	0	0	0	1	1
120	0	0	0	0	0	1
100	1	0	1	0	0	0
119	0	0	0	1	1	0
117	0	0	0	0	1	0
115	0	0	0	1	0	1
114	0	0	0	0	0	1
99	0	0	0	1	1	1
96	0	0	0	1	1	1
86	0	0	0	1	0	1
82	0	0	0	0	0	1

تبين مصفوفة معامل تشابه SAHN أن علاقة الارتباط (جدول ٤) في درجة القرابة الوراثية ما بين الأنواع الطبية المدروسة منخفضة بشكل عام حتى مابين الطرازين البيئيين (P1,P2) التابعين لنفس النوع، ويعزى هذا إلى قلة التوافقيات المستعملة وعدم توفر توافقيات متخصصة بالنباتات المدروسة، ونلاحظ هذا جلياً في النتائج المنطقية التي حصلنا عليها عندما استبعدنا التوافقية ACT/GAA.

جدول ٤. مصفوفة معامل التماثل لأنواع وطرز برية طبية من *Lamiaceae* بإستخدام البيانات الناجمة عن ثلاث توافقيات.

الأنواعSpecies	الرمز	P1	P2	B	O	L	M
***Teucrium polium* L.1**	**P1**	**1.00**					
***Teucrium polium* L.2**	**P2**	**0.19**	**1.00**				
***Ballota semaanica* Recg. fil.**	**B**	**0.18**	**0.07**	**1.00**			
***Majorana syriaca* (L.) Rafin.**	**O**	**0.14**	**0.14**	**0.13**	**1.00**		
***Lycopus europaeus* L**	**L**	**0.09**	**0.25**	**0.09**	**0.20**	**1.00**	
***Mentha longifolia* L.**	**M**	**0.07**	**0.14**	**0.13**	**0.17**	**0.17**	**1.00**

كما تبين عند إنشاء شجرة القرابة ذات الشكل العنقودي اعتماداً على قيم معامل التشابه لـ Jaccard (الشكل 2) أن أعلى درجة تقارب في العمق الوراثي متحصل عليها لا تتعدى 24% وذلك بين الطراز البيئي P2 للنوع *Teucrium polium* L. و Lycopus *europaeus* L ، كما تنخفض درجة التقارب الوراثي إلى 17.5% في مستوى يشمل النوعين *Majorana syriaca* (L.) Rafin. و *Mentha longifolia* L.، وتنخفض درجة التشابه بحدة إلى 11% وذلك بين الأنواع السابقة المذكورة من جانب و النوع الطبي *Teucrium polium* L للنوع P1 والطراز البري *Ballota semaanica* Recg. fil. من جانب آخر.



شكل٢. شجرة القرابة ذات الشكل العنقودي اعتمادا على قيم معامل التشابه لأنواع وطرز برية طبية من *Lamiaceae* باستخدام البيانات الناجمة عن ثلاث توافقيات.

P1: *Teucrium polium* L.
P2: *Teucrium polium* L.2
B: *Ballota semaanica* Recg. fil.
O: *Majorana syriaca* (L.) Rafin.
L: *Lycopus europaeus* L
M: *Mentha longifolia* L.

إن انخفاض درجة التشابه في العمق الوراثي ما بين جينومات الأنواع الطبية البرية المدروسة لم تكن مرتفعة وهذا يمثل مؤشرا ايجابيا على زيادة التنوع الوراثي لهذه الأنواع. بشكل عام، قد لا يكون من المفاجئ الحصول على درجة تنوع وراثي عالية ما بين الأنواع المدروسة كون المقارنة أجريت أساسا ما بين أنواع نباتية تابعة لنفس الفصيلة (شكل2). فقد يُفسر ذلك بأن الأنواع التابعة لنفس الفصيلة قد نشأت في غابر الزمان منذ ألاف السنين من نبات سلف واحد (Ancestor) هذا يعني أن جينوم كل من هذه الأنواع قد تباعد عن الآخر (Divergence) منذ زمن طويل وقد حصل تغيرا في تركيب المادة الوراثية (DNA) في مواقع التضخيم المتحصل عليها. ولكن ما بدا مثيرا للاهتمام هو الحصول على درجة تشابه منخفضة أيضا ما بين الطرازين الوراثيين P1 و P2 التابعين لنفس النوع *Teucrium polium* L. وذلك عند تحليل جميع التوافقيات مجتمعة (شكل 2)، فمن المفترض أن هذين الطرازين يمثلان درجة القرابة الوراثية الأكبر كون التباعد الوراثي حصل في فترة زمنية اقصر مقارنة مع تلك التي مضت بين الأنواع. فلمعرفة سبب هذا التباعد عن قرب قمنا بتحليل نتائج كل توافقية على حدا (نتائج غير مظهرة في البحث)، فتبين لنا أن كلا التوافقيتين ACT/CTG و ACT/CAT أظهرا معا اختلافا كبيرا في العمق الوراثي ما بين هذين الطرازين مما أدى إلى تباعدهما على شجرة القرابة الوراثية، أما التوافقية ACT/GAA فقد مثلت درجة التشابه الأكبر. يمكن تفسير هذه النتيجة بالقول أن هذين الطرازين P1 و P2 قد تباعدا وتمايزا منذ فترة زمنية كبيرة كافية لإظهار هذا التباعد وانه لم يحصل خلطا وراثيا فيما بينهما رغما تواجدهما في منطقة جغرافية واحدة. فمن نفس المنظور، يمكن تفسير درجة القرابة الوراثية المرتفعة نسبيا (24%) ما بين النوعين الطبيين البريين *Teucrium polium* L. و *Lycopus europaeus* L مقارنة مع الأنواع الطبية الأخرى على أن زمن تكون وتكاشف هذان النوعان قد حدث في فترة زمنية أقل من تلك التي تكونت فيها الأنواع الطبية *Majorana syriaca* (L.) Rafin. ،*Mentha longifolia* L. و *Ballota semaanica* Recg. Fil وهذا النوع الأخير يبدو أكثر تباعدا وراثيا عن غيره وقد يعزى السبب لكونه قد تكاشف عن نباتات الفصيلة *Lamiaceae* منذ فترة زمنية أطول. وعلى ضوء هذه النتائج يمكن الحصول على خلاصة مهمة ألا وهي أن التنوع الوراثي ما زال في درجة جيدة ما بين الأنواع وما بين الطرز الوراثية التابعة لنفس النوع. ومن اجل دعم هذه النتائج، يستوجب علينا توسيع الدراسة إلى مدى يشمل عدد أكبر من أزواج البادئات الجزيئية (Primers) لزيادة عدد المواقع المضخمة على الجينوم وبنفس الوقت يجب زيادة عدد الأنواع الطبية المدروسة، ليس فقط في منطقة جبل الوسطاني بل لتشمل الأنواع الطبية المنتشرة في

عدة مناطق من القطر العربي السوري. ومن الجدير بالاهتمام دراسة التنوع الوراثي ما بين الطرز الوراثية التابعة لنفس النوع لمعرفة مدى الانجراف الوراثي الحاصل وإنشاء شجرة قرابة تمثل مرجعا للمخزون الوراثي الموجود في البيئة السورية لتحقيق الاستفادة القصوى من هذا المخزون في البحث عن صفات ذو إفادة سواء في المجال الطبي أو من أجل الحفاظ على الصفات التي تساعد الطرز الوراثية على التأقلم مع الظرف البيئي المتغير وبالتالي حماية النوع من الانقراض. ففي هذا الإطار، جاءت هذه الدراسة لتشكل أحدى المحاولات الأولى في التوصيف الجزيئي للنباتات الطبية البرية الموجودة في البيئة السورية.

المراجع

Botstein, D., R. L. White, M. Skolnick and R. W. Davis. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. Am. J. Hum. Genet., 32:314- 331.

Lee, Y.A., S.C. Fan, L.Y. Chiu and K.C. Hasia. 2001. Isolation of an insertion sequence from *Ralstonia solanacearum* race 1 and its potential use for strain characterisation .*Appl.Environ.Microbiol.*, 67:3943-3950.

Mueller, U. G. and L. L. Wolfenbarger. 1999. AFLP Genotyping and Fingerprinting. Trends in Ecology and Evolution, 14: 389–394.

Sneath, P. H. A, and R. R. Sokal. 1973. Numerical taxonomy. Freeman, San Francisco.

Tautz, D. 1989. Hypervariability of simple sequences as a general source of polymorphic DNA markers. Nucleic Acids Res., 17:6463-6471.

Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. V. D. LEE, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper and M. Zabeau. 1995. AFLP: a New Technique for DNA Fingerprinting. Nucleic Acids Research, 23: 4407-4414.

Williams, J.K.F., A.R. Kubelik, K.G. Livak, J.A. Rafalki and S.V. Tingey . 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucl Acids Res., 18:6531-6535.

Zabeau, M and P. Vos. 1993. Selective restriction fragment amplification: A general method for DNA fingerprinting. European Patent Application number 92402629.7. Publication number 0534858A1. Comparison of markers for diversity studies in tropical maize 587.

A PRIMARY CONTRIBUTION TO THE MOLECULAR CHARACTERIZATION OF MOST IMPORTANT WILD MEDICINAL PLANTS BELONGING TO THE FAMILY *LAMIACEAE* IN "JABAL EL-WASTANI" REGION (IDILB)

Darkalt[1], A., W. Hakim [2], M. Dehan [3] and A. Al-Zaidan [1]

[1-] Dept. Nat. Reso. and Ecology, Fac. of Agric., Aleppo Univ., Syria.

[2-] Expert at A.C.S.A.D, Syria.

[3-] Dept. Food Tech., Fac. Agric., Aleppo Univ., Syria.

ABSTRACT: **This work was performed as the first attempt in Syria to characterize the phylogenetic relationships between five wild medicinal plants and two ecotypes belonging to the same species and all species belong to *Lamiaceae* in Jabal El-wastani – Idilb in the Northwest of Syria. The utilization of five AFLP primers used in four combinations has showed a low degree of similarity among the five studied medicinal plants as well as to the two ecotypes. According to the Jacquard's similarity coefficient, the degree of genetic similarity reached to 24% between *Lycopus europaeus* L. and *Teucrium polium* L. and decreased to 17.5% between *Mentha longifolia* L. and *Majorana syriaca* (L.) Rafin. While for the species *Ballota semaanica* Recg. Fil. the degree of similarity declined to 11%. The interpretation of the origin of such variations has been discussed in this paper.**

Key words: AFLP, Medicinal Plants, *Lamiaceae*, Molecular Characterization, Genetic Biodiversity, Jabal El-wastani.