مجلة جامعة تشرين للبحوث والدراسات العلمية _ سلسلة العلوم البيولوجية المجلد (33) العدد (4) 2011
Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies - Biological Sciences Series Vol. (33) No. (4) 2011

دراسة التباينات الوراثية لمجموعة من الطرز الوراثية من النعناع المائي Mentha aquatica المنتشرة في المنطقة الساحلية باستخدام تقنية الـ PCR – RAPD

الدكتورة عزيزة إبراهيم يوسف *
الدكتور جورج حنا ديب **
غادة بيطار ***

(تاريخ الإيداع 3 / 3 / 2011. قبل للنشر في 13 / 7 / 2011)

□ ملخّص □

جمعت عينات من نبات النعناع المائي Mentha aquatica (Water Mint) من سبع مناطق توزعت في الساحل السوري (اللاذقية وطرطوس). تمت دراسة التباينات باستخدام تقانة الـ RAPD بهدف تحديد الهوية الوراثية للطرز المدروسة من خلال استخدام ثمانية عشرة بادئة ، ولكن فقط (7) بادئات أظهرت مكاثرة للـDNA، وتم حساب معامل التشابه والبعد الوراثي باعتماد طريقة (Nei and Li ; 1979).وأنشئت شجرة القرابة الوراثية (التدرج العنقودي)

أظهرت هذه الدراسة النتائج التالية:

-تراوحت قيمة معامل التشابه بين الطرز المختلفة بين (0.02- 0.53) وهناك تدرج في التباينات الوراثية للطرز المدروسة ما بين هذه القيم المحسوبة لمعامل التشابه والبعد الوراثي.

-أظهرت شجرة القرابة الوراثية تبايناً في توزع الطرز الوراثية ، في المناطق المختلفة المدروسة ، تبعاً للبعد الوراثي فيما بينها .

-سمحت نتائج هذه الدراسة بتحديد بادئات يمكن استخدامها بوصفها مؤشرات جزيئية في برامج تحسين نبات النعناع بوصفه نباتاً طبياً وغذائياً، كما أظهر استخدام هذه التقنية كفاءة في دراسة علاقات القرابة لنبات النعناع في مواقع الدراسة المختلفة .

الكلمات المفتاحية: النعناع Mentha، التباين الوراثي، مؤشرات جزيئية، شجرة القرابة.dendrogram

* أستاذة في قسم العقاقير - كلية الصيدلة – جامعة تشرين- اللاذقية – سوريا .
* * أستاذ مساعد في قسم النبات - كلية العلوم - جامعة تشرين- اللاذقية – سوريا .
*** طالبة ماجستير في كلية العلوم - جامعة تشرين- اللاذقية – سوريا .

مجلة جامعة تشرين للبحوث والدراسات العلمية _ سلسلة العلوم البيولوجية المجلد (33) العدد (4) 2011
Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies - Biological Sciences Series Vol. (33) No. (4) 2011

A Study of Genetic Variations of Genetic Types of Mentha Aquatica Distributed in Coastal Region Using PCR-RAPD Technique

Dr. Azyza Ibrahim Youssef [*]
Dr . George Hanna Deeb [**]
Ghadah Bitar[***]

(Received 3 / 3 / 2011. Accepted 13 / 7 /2011)

□ ABSTRACT □

Samples of water mentha (Mentha aquatic) were collected from seven sites distributed along Syrian coast (Lattakia & Tartous). The samples were studied morphological and genetically using RAPD-PCR technique in order to identify the genetic identity of the studied types using 18 primers. However, only seven primers showed DNA amplification. The similarity coefficient as well as genetic distance were calculated using the method cited by (Neiandli ,1979). Dendogram was constructed.

This study showed that the range of similarity coefficient between different types was (0.02 – 0.53). Consequently, there was gradation in genetic variants of studied types between the calculated values for similarity coefficient and genetic relationship. The Dendogram showed variance presence in distribution of the genetic types in the regions studied depending the genetic distance.

The results of this study also showed the possibility of detection of primers using RAPD that can be used as precise indicators in programs of Mentha improvements as medical and nutritional plant. In addition, the study showed the efficacy of this technique in studying the relationships of mentha in different areas of study sites.

Key words : Mentha , genetic, variation, molecular marker , dendogram.

[*]**Professor, Department of Drugs , Faculty of Pharmacy, Tishreen University, Lattakia , Syria.**
****Associate Professor, Faculty of Sciences, Tishreen University, Lattakia, Syria .**
***** Postgraduate Student , Faculty of Sciences, Tishreen University, Lattakia, Syria .**

مقدمة:

ينتمي النعناع المائي Mentha aquatica إلى الفصيلة الشفوية Lamiaceae (Labiatae) وتشمل الفصيلة 200 جنس و2200 نوع تتوزع في جميع أنحاء العالم خاصةً حوض البحر الأبيض المتوسط حيث لوحظ أن النعناع المائي ينتشر في المناطق الرطبة على ضفاف الأنهار والسواقي والينابيع وهو نبات محب للرطوبة، واسع الانتشار في مناطق عديدة من سوريا وتحديداً في الساحل السوري (Mouterde ,1946).

لقد أجريت الدراسة على هذا النبات نظراً لتنوعه الوراثي والبيئي بوصفه غطاءً نباتياً وأيضاً للأهمية الغذائية والطبية حيث يتميز بغنى أوراقه بالمواد الفعالة (زيوت عطرية) ويحتوي مجموعة من العناصر المعدنية الهامة ولا سيما المنغنيز والمغنزيوم والبوتاسيوم والحديد والكالسيوم وعلى العديد من الفيتامينات أهمها A,B, C وهي فيتامينات تمنع ظهور سرطان القولون نظراً لخاصيتها المضادة للأكسدة، كما يحتوي على حمض الفوليك (عرموش، العمري 1999 ; العودات ، اللحام 1987، الطباع 1984) .

يتمثل وصف أي كائن حي وفق ثلاثة مؤشرا ت وهي : المؤشرات المورفولوجية ، والمؤشرات البيوكيميائية والمؤشرات الجزيئية وقد اعتمدنا في هذه الدراسة على المؤشرات الجزيئية باستخدام تقنية الـRAPD – PCR .

لقداستخدمت المؤشرات الكيميائية (التي قلّ الاعتماد عليها حالياً إلا في بعض الحالات) لدراسة التنوع الوراثي للنعناع (Mackill 1995 , srikants, *et al*,1996 , shasany. *et al*,2001 , Mustafa, *et al* 2005).(Botany,2009

استخدم في الوقت المعاصر العديد من الباحثين تقنية الـ PCR - RAPD لدراسة التباينات الوراثية والتمييز بين الأنواع القريبة من بعضها وراثياً وذلك لبساطتها وانخفاض تكاليفها مقارنة مع المؤشرات الأخرى إضافةً إلى أنها تحتاج إلى كميات قليلة من الـ DNA.

فقد أظهرت هذه الطريقة نجاحاً بدراسة التباينات الوراثية من خلال تحديد الهوية الوراثية للطرز المدروسة وحساب البعد الوراثي ودرجة القرابة فيما بينها عند نبات الشعير وتقدير التنوع الوراثي لـ 23 مدخلاً من الشعير السوري التي تُمثّل مناطق زراعة الشعير الرئيسية في سورية، حيث استُخدم(6) بادئات وقد تم الحصول بعد عملية المكاثرة على 23 قطعة مختلفة من الـ DNA سمحت بالتمييز بين جميع المدخلات ، وتقدير البعد الوراثي بين الطرز الوراثية المدروسة من نبات الشعير (العطية ، 1996 شومان، فايكند 1996) كما أجريت عند نبات الجرجير Nasturtium officinal دراسة لسبع مناطق جيوغرافية مختلفة من محافظتي اللاذقية وطرطوس باستخدام مؤشرات الـ RAPD وتم اختيار (8) بادئات سمحت بكشف درجة التباينات الوراثية بين الأفراد من خلال حساب معامل التشابه والبعد الوراثي بين طرز المناطق المختلفة (معلا وآخرون ، 1999)،كذلك استخدمت هذه التقنية عند نخيل التمر(Bader , *et al*. 2007) ، وأيضاً استخدمت تقنية الـ RAPD عند الورد المزروع بنجاح بدراسة التباين داخل 34 صنفاً من الورد المزروع وتم التحليل باستخدام 25 بادئة ، كانت عشر منها فقط كافية لتحليل وتحديد العلاقات الوراثية ما بين الأصناف المدروسة، حيث نتجت 162 قطعة من DNA ، وقد سمح تحليل المجموعات الوراثية بتوزيع الـ 34 صنف المدروس إلى 9 مجموعات متباينة وقد أثبتت هذه الدراسة أن مؤشرات الـRAPD هامة ومفيدة في المساعدة في تنفيذ برامج التربية والتحسين عند الورد (Mohapatra andRout, 2005)، وكذلك المقارنة بين الأصناف المحلية والمدخلة من القمح (مير علي، الصفدي،1995) وتحديد مدى القرابة الوراثية بين سلالات منتخبة من نبات الذرة البيضاء السور غميه Sorghum من قبل (VierLing, *et al*., 1994)

باستخدام تقنية الـ PCR – RAPD وبنفس التقنية تم التوصيف الجزيئي لبعض الطرز من الورد الدمشقي (Rosa damasan)(نصور وآخرون2008 ، kiani ،*et al*, 2000) وبين أنواع الحمص Cicer. spp Choumane, *et al* 2000

أجريت أيضاً دراسة عند نبات العدس لتحديد مؤشرات الـ RAPD المرتبطة بالموقع المورثي المسؤول عن صفة المقاومة لمرض سوسة أوراق العدس وتسهيل عملية تربية النبات وتطوير الأصناف المزروعة ، وذلك باختبار 18 بادئة سمحت نتيجة عملية المكاثرة لل DNA بالتمييز الدقيق بين الأنواع الحساسة والأنواع المقاومة لحشرة سوسة أوراق العدس (صقر، إسماعيل ، 2000) . أما دراسة الـ RAPD التي أجريت على بعض أنواع الزيتون البري باستخدام 20 بادئة فقد لوحظ أن هنالك تباينات وراثية واضحة بين الأنواع المدروسة(القيم، 1999). كذلك أجريت دراسة لتحديد الهوية الوراثية لأنواع بعض الأجناس التابعة للفصيلة الخبازية (الخباز Malva – الختميةAthaea – الباماياء Hibiscus) باستخدام تقنية الـ RAPD ، ورسم المخططات المعتمدة على نسب التشابه ومعدلاتها حيث لوحظ توزع العينات المدروسة إلى مجموعات تبعاً للجنس الواحد ، من خلال البصمات الوراثية المحدّدة التي سمحت بالتمييز بين الأجناس المدروسة ،وكشف التباينات الوراثية ضمن الجنس الواحد (الشغري وآخرون،2007). كما استخدمت هذه التقنية في تحديد التباين الوراثي عند خمسة أنواع من الحمضيات (النارنج– والبرتقال– واليوسفي– والليمون– والليمون الحامض) ولوحظ نتيجة هذه الدراسة وجود تباينات وراثية سمحت بالتمييز بين الأنواع وحتى ضمن النوع الواحد كما تبين أن أقرب الأنواع كان اليوسفي والبرتقال. (بشارة، 2004)، كذلك استخدمت هذه التقنية لتحديد المورثات المسؤولة عن صفة المقاومة للبياض الدقيقي في نبات الخس (Paran*; et al*; 1991) .

لقد قام (Khanuja , *et al.* , 2000) *(* Gilbert , *et al* 2006) بدراسة البصمة الوراثية وتحديد علاقات القرابة لنبات النعناع باستخدام تقنية الـ RAPD وذلك بعد إجراء مجموعة من التعديلات على ظروف تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) وقد بينت نتائج هذه الدراسة أن طريقة الـ RAPD هي طريقة بسيطة واستطاعت التمييز بين النباتات المدروسة.

كذلك درس (Momeni , *et al.* , 2006) درجة القرابة الوراثية وعملية النقل الوراثي بين 27 نباتاً من النعناع المائي باستخدام 15 بادئة في تقنية الـRAPD حيث نتج 92 حزمة DNA مضاعفة منها 77 ذات تعددية شكلية، وقد قسمت شجرة القرابة الوراثية المدخلات إلى 6 مجموعات تبعاً للوصف المورفولوجي، والاستخدام ، والانتشار.

وتمكن Gobert, , et al . 2002 ,Sithithaworn, , et al . 2009 باستخدام تقنية الـ AFLP وبوجود 4 بادئات من تقييم التنوع الوراثي وتحديد درجة القرابة الوراثية، بين 33 عينة من النعناع المائي وقد أمكن تمييز المدخلات في 9 مجموعات في شجرة القرابة الوراثية التي تحتوي على نباتات مميزة للمناطق المأخوذة منها.

أهمية البحث وأهدافه:

تهدف هذه الدراسة إلى معرفة التنوع الوراثي لنبات النعناع المائي في عدة مناطق من الساحل السوري وذلك من خلال دراسة المؤشرات الجزيئية باستخدام تقنية الـ PCR – RAPD التي تساعد بإظهار التباينات الوراثية وتحديد الطرز الوراثية إذ يستفاد من ذلك في عملية التحسين الوراثي لهذا النبات.

طرائق البحث ومواده:

1_ المادة النباتية: استخدمت في الدراسة (34) عينة نباتية تمثل (34) طرازاً وراثياً من النعناع المائي (شكل رقم: 1) مأخوذة من سبع مناطق جغرافية مختلفة منها أربع مناطق من محافظة اللاذقية هي:

أرض الرمانة (A) – والسامية (S) – وبيوت العتيقة (B) – وزغرين (Z) وثلاث مناطق من محافظة طرطوس هي: القلوع (K) – ومرقية (Mr) – والمنطار (Mn) حيث أخذت خمس عينات من كل منطقة. مستخدمين الأوراق الفتية .

شكل رقم (1) : نبات النعناع المائي Mentha aquatic

2_ الطرق المستخدمة :

I) _ استخلاص الـDNA : تمت عملية استخلاص الـ DNA من الأوراق الفتية للنباتات في مواقع الدراسة المختلفة بوساطة سائل الاستخلاص 2xCTAB وفقاً لـ (Benito et al; 1993) مع إجراء بعض التعديلات، يسحق g0.2 من الأوراق الفتية باستخدام الآزوت السائل ثم يعامل المسحوق الناتج في محلول الاستخلاص المكون من (0.1 EDTA (MTris – HclpH 8.0 – 1.4MNacl – 20m M, 2%w/v Ctab,Ph 8,0 المسخن مسبقاً إلى (C°65) .

يحضن في حمام مائي درجة حرارته (C°65) لمدة 30 دقيقة مع التحريك الهادئ ، تستخرج الأحماض النووية بإضافة حجم مماثل من المزيج (كلوروفورم– كحول إيزواميل بنسبة (1.24) وخلطه بهدوء لمدة (10) دقائق ثم يفصل الوسط المائي الذي يحوي الأحماض النووية عن الوسط العضوي بالتثفيل مدة (20) دقيقة وبسرعة 5000 دورة / د وبدرجة حرارة (C°22) ، نكرر العملية ثم ترسب الأحماض النووية بإضافة 3/2حجم من إيزوبروبانول ثم تترك الأحماض النووية لتترسب مدة (30) دقيقة بدرجة(C°0)، تجمع الأحماض النووية كراسب بالتثفيل لمدة (15)دقيقة وبسرعة 12000دورة / د وبدرجة حرارة (C°4) يغسل الراسب بالكحول الإيتيلي (76%).

_ أذيبت عينات الـ DNA في (500) ميكروليتر ماء مقطر معقم وتركت على هزاز آلي لمدة 24 ساعة على حرارة (4C°) .

_ يستبعد الـ RNA بمعاملة الأحماض النووية بأنزيم R-Nase بدرجة حرارة (C°25) لمدة نصف ساعة.

_ قدرت كمية الـ DNA باستخدام جهاز الطيف الضوئي بوجود الأشعة فوق البنفسجية (U.V) عند طول الموجة /260 نانومتر/ بحيث كل قراءة قدرها /1/ كثافة ضوئية تعادل /50/ ميكروغرام DNA في 1 مل محلول . ويعتبر ال DNA نقيا إذا تراوح ناتج قسمة قراءة الامتصاص عند طول الموجة 280/260 نانو متر بين 1.8–2

II)_ التفاعل التسلسلي للبوليميراز والفصل على هلامة الآغاروز :

تم تجربة (18) بادئاً عشوائياً يتكون كل منهم من عشر نيوكليوتيدات من شركة operontechnology ، اخترنا البادئات التي تسمح بكشف التباينات الوراثية بين الأفراد وتعطي نتائج واضحة وعددها /7/ ، جدول رقم(1).

جدول (1) : يبين البوادئ 18 التي تمت تجربتها على العينات وضمنها البادئات الـ /7/ * المختارة من أجل مكاثرة الـ DNA والقواعد النيكليوتيدية المكونة لها

الرقم	البوادئ code	التركيب النوكليوتيدي 5 ⟵ 3
*1	OPj - 04	CCGAACACGG
*2	OPA – 11	CAATCGCCGT
*3	OPB – 17	5AGGGAACGAG
*4	OPB – 15	5GCAGGGTGTT
*5	OPj – 05	5CTCCATGGGG
*6	OPF – 16	5 GGAGTACTGG-3
*7	P132	5AGGGATCTCC-3
8	OPB – 18	5 AGGTGACCGT
9	OPj – 01	5 CCCGGCATAA
10	P159	5 GAGCCGTAGG3
11	OPj – 07	5 CCTCTCGACA
12	OPA – 12	5 TCGGCGATAG
13	OPZ – 19	5 GTGCGAGCAA
14	OPK – 17	5 CCCAGCTGTG3
15	OPD – 20	5 GGTCTACACC3
16	OPK – 13	5 GGTTGTACCC3
17	OPB – 11	5 GTAGACCCGT
18	OPK – 12	5 TGGCCCTCAC 3

تم التفاعل التسلسلي للبوليميراز وفقاً لطريقة (William , et al ;1990) مع بعض التعديلات لمكونات التفاعل لـ PCR (جدول رقم : 2) فكان حجم التفاعل النهائي (25 ul) .

_ تم التفاعل التسلسلي للبوليميراز في أنبوب ppendrof سعته 500 ميكروليتر في وسط من30 نانوغرام من الـ DNA في كل تفاعل 10 بيكوغرام من البادئ المختار يعادل /2.5/ ميكروليتر ، 100 ميكرومول من كل من النيكليوتيدات الأربعة dGTP,dTTP,dATP,dCTP تعادل3 ميكروليتر من كل منها .

_ أخذ0.5 وحدة أنزيمية من أنزيم التكثيف Taqpolymerase (10 m MTris – Hcl Ph = 8,50 m MKcl,4 m M Mgcl) وأكمل الحجم إلى 25 ميكروليتر بالماء المقطر المعقم .

_ تمت عملية المكاثرة Amplification في الجهاز المخصص وصمم البرنامج المناسب للمادة النباتية المستخدمة فكان مؤلف من 35 دورة تتضمن كل منها المراحل التالية :

_ يعرض الـ DNA قبل بداية الدورة الأولى إلى (C°94) مدة 4 / د بهدف فصل سلسلتي الـ DNA وتحويله إلى الـ DNA وحيد السلسلة ثم تبدأ دورات البرنامج التي تقسم إلى المراحل التالية :

-1 التحطم : يتم عند درجة حرارة (C°94) لمدة 30 / C / ثا .

-2 الالتحام : عند حرارة (C°35) لمدة دقيقة واحدة .

-3 الاستطالة : عند حرارة (C°72) لمدة دقيقة واحدة .

-4 اكتمال التفاعل : عند حرارة (C°72) لمدة عشر دقائق .

_ ثم حفظت العينات في درجة حرارة (4 C°) لتفصل الحزم فيما بعد بالرحلان الكهربائي على هلامة الآغاروز أجريت عملية فصل قطع الـ DNA الناتجة عن التضخيم على هلامة الآغاروز 1.2 % .

_ تم تحضير محلول التحميل Bromophenolblue,50% Gly Grol ,50m MEDTA pH= 8 Loading Buffer ثم تلون الهلامة مدة نصف ساعة في مادة بروميد الإيثيديوم 50 mg/ml ثم تصور بوجود الأشعة فوق البنفسجية مع العلم أنه قد تم إجراء التحاليل الوراثية (استخلاص الـ DNA) في مخبر الوراثة الجزيئية – كلية الزراعة – جامعة تشرين وفي مخابر الهيئة العامة للتقانة الحيوية (مكاثرة الـ PCR – DNA) – دمشق ،(حفظت عينات الـ DNA المستخلصة والمثلجة بدرجة 4مْ ونقلت إلى دمشق ضمن ترمس خاص حاوي ثلج) .

جدول (2) : يبين مكونات تفاعل الـ PCR

مكونات الـ PCR	الكميات
Taq DNA polmeras	0.5 units / ul
Mgcl2	4 m M
d NTPs	2.5 ul
DNA	2 ul (25 mg / ul)
Primer	2.5 ul (10 p mol /ul)
BuFFer	10 X

3_ الطرق الإحصائية المستخدمة :

دونت نتائج عمليات المكاثرة للبادئات السبع وتم ترتيبها في جداول خاصة اعتماداً على وجود (1) أو غياب (0) قطع معينة من الـ DNA في العينات المختلفة المدروسة ، اعتمدت طريقة (Nei and Li , 1979) [لحساب معامل التشابه = 2× عدد قطع الـ DNA المشتركة بين الطرازين المقارنين / العدد الكلي لقطع الـ DNA الطراز الأول + العدد الكلي لقطع الـ DNA الطراز الثاني] وأيضاً [لحساب معامل البعد الوراثي = (1− معامل التشابه) بين الأفراد في المناطق المختلفة المدروسة .

تم رسم مخطط البعد الوراثي(شجرة القرابة أو التدرج العنقودي) للعلاقات الوراثية بين الأفراد تبعاً للمناطق المدروسة باستخدام طريقة Mnweighted Pair Group Mean Arithmetic average M.P,G.M.A أجريت التحاليل الإحصائية للمعطيات الناتجة عن الدراسة باستخدام برنامج Statistica .

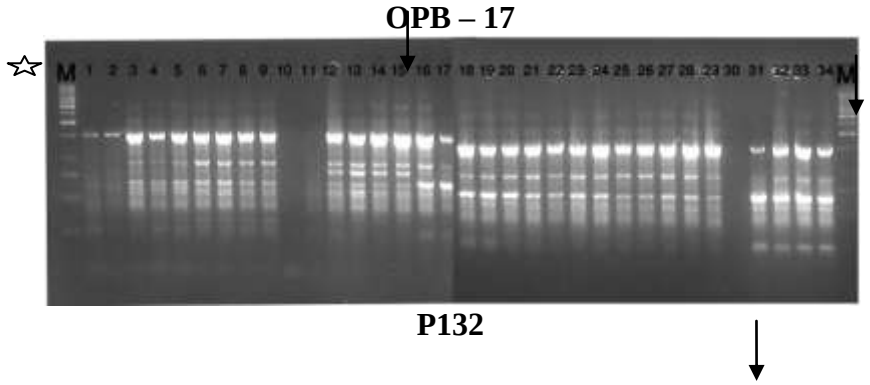
النتائج والمناقشة :

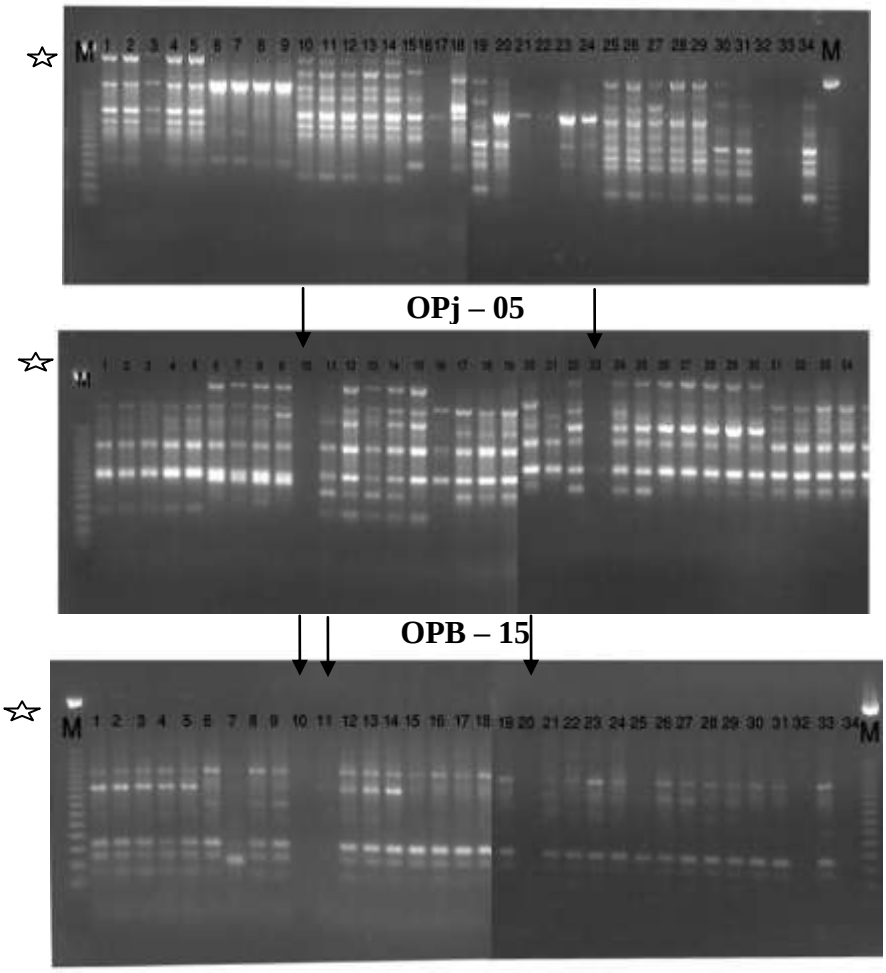
أظهرت نتائج الدراسة لـ 18بادئه أنه يوجد فقط(7) بوادئ (جدول رقم 1) استطاعت إظهار تباين وراثي في نواتج المكاثرة Amplification أو اختلاف مابين قطع الـ DNA للطرز المدروسة تبعاً للبادئات المستخدمة وتركيبها النيكليوتيدي حيث تباين العدد ما بين (6) قطع عند كل من البادئه (OPB - 17) و (P132) و (15) قطعة عند البادئه (OPj – 05) ، جدول رقم (3) .

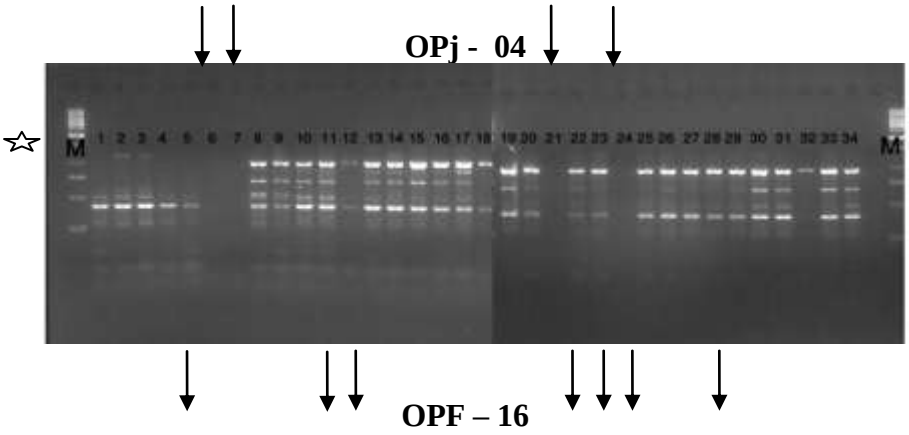
جدول رقم (3) يبين عدد قطع أو حزم الـ DNA التي أعطاها كل بادئ

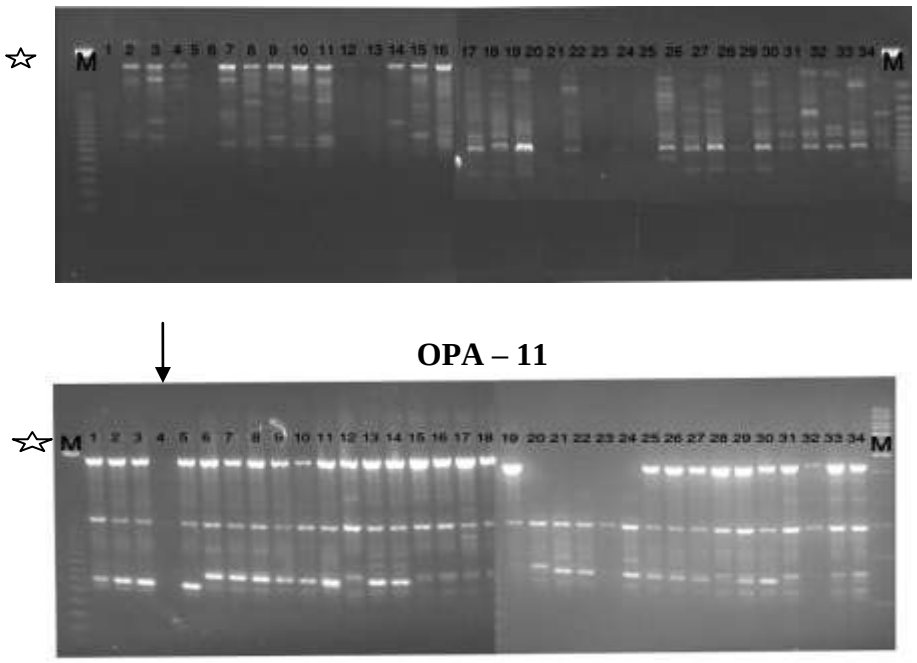
رقم البادئ	رمز البادئ	عدد حزم الـ DNA الكلية	التعددية الشكلية (عدد حزم الـ DNAالمتباينة)	النسبة المئوية للتعددية الشكلية %
1	OPj - 04	9	7	77.7
2	OPA – 11	13	13	100
3	OPB – 17	6	6	100
4	OPB – 15	9	7	77.7
5	OPj – 05	15	15	100
6	OPF – 16	8	6	75
7	P132	6	6	100
المجموع	7	66	60	90.9

ساهمت البادئات المستخدمة بتحديد الهويات الوراثية الخاصة والمميزة لكل فرد من حيث العدد والوزن الجزيئي لمختلف قطع الـ DNA المكاثرة والتي أظهرت أيضاً وبوضوح التباين الوراثي بين هذه الطرز تبعاً للمناطق المختلفة (شكل رقم: 2)




OPj – 05
OPB – 15


OPj - 04
OPF – 16



شكل رقم(2):يظهر قطع الـDNA الناتجة بعد المكاثرة بالبادئات المشار إليهاوتعريضها للرحلان الكهربائي

☆ M مؤشر لمعرفة الوزن الجزيئي للـ DNA .

وتمثل الأرقام من (1 – 34) العينات المأخوذة من المناطق المختلفة موزعة على النحو التالي :

اللاذقية

19.18.17.16.15 : منطقة أرض الرمانة

24.23.22.21.20 : منطقة السامية

29.28.27.26.25 : منطقة بيوت العتيقة

34.33.32.31.30: منطقة زغرين

طرطوس

5.4.3.2.1 : منطقة المنطار

9.8.7.6 : منطقة مرقية

14.13.12.11.10 : منطقة القلوع

← : تمثل الأرقام 5 ، 6 ، 7 ، 21 ، 12 ، 13 ، 23 ، 25 ، 28 ، 4 ، 10 ، 30، 31 ، 32 ، 33، 20 .العينات التي لم تظهر مكاثرة لقطع الـ DNA

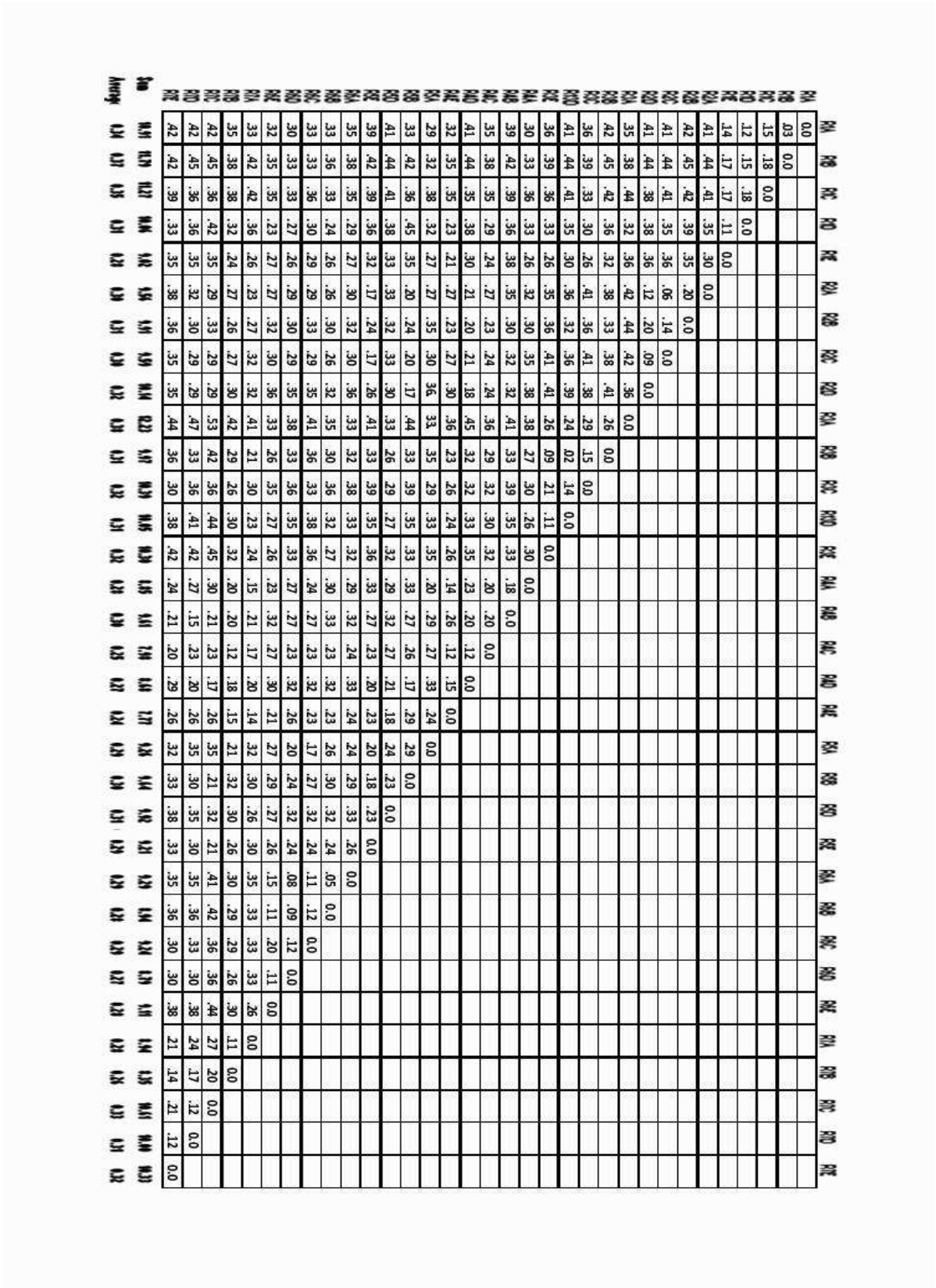
وهذا يوافق ما قام به بعض الباحثين عندما استعملوا المؤشرات الجزيئية (PCR – RAPD) في دراسة القرابة الوراثية عند بعض أنواع النعناع .Botany .,2009 , Dimer .*et al*. , 1998,Neim, et al 1979 Clark, 1997 Supakosol, 2007 ، وفي تقدير البعد الوراثي بين ستة طرز وراثية من نبات الشعير (العطية 1996).

_ تحديد العلاقات الوراثية بين الطرز المدروسة في المناطق المختلفة

تم الاعتماد على نتائج الـ PCR – RAPD على كافة الطرز الوراثية المدروسة من حيث وجود (1) أو غياب (0) قطع الـ DNA المكاثرة تبعاً للبادئات المستخدمة في تنظيم الجداول الأساسية التي اعتمدت في حساب معامل التشابه والبعد الوراثي بين الطرز المختلفة تبعاً لطريقة (Nei and Li 1979) وأيضاً اعتمدت كأساس في إنشاء شجرة القرابة (التدرج العنقودي) مابين الطرز المدروسة في المناطق المختلفة .

تبين لنا من حساب معامل التشابه والبعد الوراثي للطرز الوراثية في مختلف المناطق المدروسة (جدول رقم4) ومقارنة النتائج فيما بينها أن معامل التشابه بين الطرز المختلفة يتراوح بين (0.02-0.53) المقابل على التتالي للطرازين K4,K2 (منطقة القلوع) و K1,A3 (القلوع – أرض الرمانة) أي إن أكبر بعد وراثي هو بين الطرازين (K4,K2) وقيمته 0.98 وهي أكبر قيمة محسوبة وتدل على أن هذين الطرازين يتمتعان بأكبر قدر من البعد الوراثي، بينما لوحظ أن أقل بعد وراثي ما بين الطرازين (K1,A3) وقيمته 0.47 وهي أصغر قيمة محسوبة، وهذا يدل على أن هذين الطرازين يتمتعان بأكبر درجة من التشابه الوراثي.

تتطابق هذه النتائج مع نتائج حصل عليها باحثون آخرون في دراسة التباينات الوراثية عند نباتات أخرى، مثل الزيتون البري (القيم 1999) و نبات النعناع بدراسة القرابة الوراثية بين أنواع مختلفة باستخدام مؤشرات الRAPD Sitthithaworn , *et al*, 2009 Shasany; *et al* , 2001, Mackill. 1995, Hu, and, Quiros ,*et al* 1991



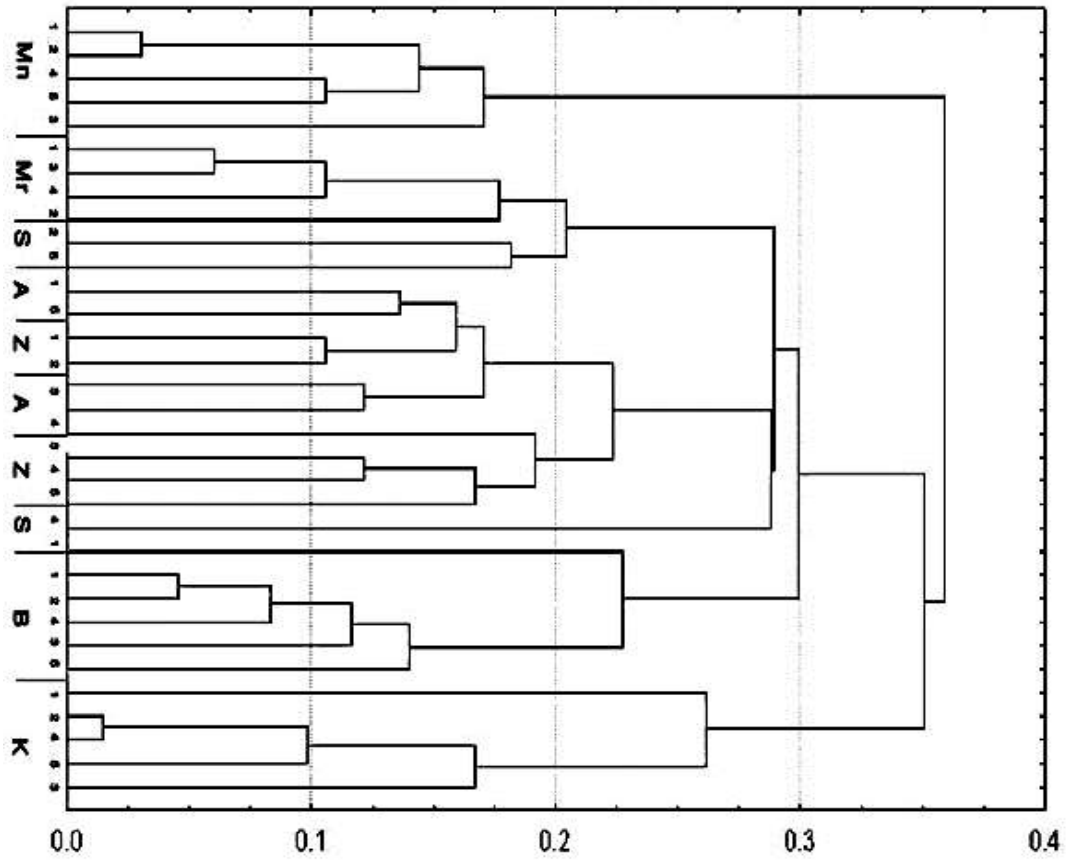
جدول رقم (3): مصفوفة النسب المئوية لعدم التوافق بين الطرز المدروسة الناجمة من تطبيق متوسطات المجموعات الزوجية غير المزانة (UPGMA)

كما تبين من خلال شجرة القرابة (التدرج العنقودي) Dendrogram شكل /رقم 1/ المنشأ اعتماداً على معامل البعد الوراثي ، بأن الطرز الوراثية في المناطق المختلفة المدروسة توزعت إلى تجمعات أظهرت الطرز الوراثية الأكثر تشابهاً فيما بينها وهي: (1 : المنطار) ، و(5 : بيوت العتيقة)، و(6: القلوع).

_ على حين أظهرت التجمعات (2 : المرقية– السامية) و(3: أرض الرمانة – زغرين) و(4: زغرين – السامية) أكبر تباين وراثي بين أفرادها وخاصة بين أفراد منطقة السامية .

_ لوحظ أن أكبر بعد وراثي هو بين الطرز الوراثية للتجمع (1: المنطار) من جهة والتجمع (6: القلوع) من جهة أخرى .

وبمقارنة النتائج التي تمَ الحصول عليها في هذه الدراسة مع نتائج باحثين آخرين تبين أن هنالك توافقاً في هذه النتائج مع (بشارة . 2004) في تحديد البصمة الوراثية لبعض أنواع الحمضيات من خلال مؤشرات الـ RAPD ودراسة التنوع الوراثي في الشعير السوري (شومان وآخرون.2001) وللقرابة الوراثية عند نبات النعنع (Momeni .*et al* Chandrashekar and Nguyen, 1993 ,Koller .Berry., *et al* ,1996 , Caissard.*et al*,1996; ,2006 1993 *et al* وعند نبات الجرجير (معلا،وآخرون 1999).



رسم رقم (2) يظهر التدرج العنقودي Dendrogram (شجرة القرابة الوراثية) بين الطرز المدروسة في المناطق المختلفة اعتماداً على معامل البعد الوراثي لـ Neis's 72

الاستنتاجات والتوصيات:

أظهرت دراسة التباينات الوراثية لمجموعة من الطرز الوراثية عند النعنع باستخدام طريقة الـ PCR – RAPD بالتوصل إلى النتائج التالية :

_ وجود تباين وراثي ما بين هذه الطرز الوراثية تبعاً للمناطق المختلفة وبرز هذا التباين بشكل واضح ما بين الأفراد قي المجتمعات البيئية في المرقية (طرطوس) والسامية وأرض الرمانة و زغرين (اللاذقية) من جهة و مابين المجتمعين البيئيين في طرطوس (المنطار : أفراد متشابهة فيما بينها) و (القلوع : أفراد متشابهة فيما بينها).

_ لوحظ أن تقانة الـ PCR – RAPD أظهرت كفاء عالية في دراسة هذه التباينات الوراثية بين الطرز المختلفة تبعاً للمناطق البيئية المدروسة مما يسمح لنا باعتمادها في عمليات التحسين الوراثي للنعنع سواء فيما يخص الناحية الغذائية أم زيادة نسبة المادة الفعالة ذات التأثير الفيزيولوجي ودخولها في الصناعات الدوائية.

المراجع:

-الشغري ن . ، الجابري ل . وزحلوط : البصمة الوراثية لبعض أجناس الفصيلة الخبازية باستخدام تقنية الـ RAPD ، كلية الزراعة ، جامعة تشرين، 2007 : 112 صفحة

-الطباع أيمن عزت المرشد إلى طبابة الأعشاب، دار النهضة العربية ، دمشق، 1984 : 528 صفحة

-العطية ع :استخدام تقنية الـ PCR - RAPD في تقدير البعد الوراثي بين ستة طرز وراثية من نبات الشعير ، كلية الزراعة ، جامعة حلب ، 1996 : 150 صفحة

-العودات محمد ، لحام جورج : النباتات الطبية استعمالاتها ، دار الأهلي دمشق ،1987 : 412 صفحة

-القيم. فاضل : دراسة التنوع الوراثي للزيتون البري في الساحل السوري،رسالة دكتوراه، كلية الزراعة، جامعة تشرين ، 1999 : 112 صفحة

-بشارة م : تحديد البصمة الوراثية لبعض أنواع الحمضيات من خلال مؤشرات ال RAPD ، كلية الزراعة، جامعة تشرين ،2004 :123 صفحة

-شومان وفاء بوم م، غزال ح . وأشترس: التنوع الوراثي في الشعير السوري باستخدام مؤشرات الـ RAPD، نشرة بحثية رقم 99 من نشرات مراكز البحوث الزراعية جامعة الملك سعود 2001 : 145 صفحة

-شومان وفاء ،فايكند فرامز: تقديرات البعد الوراثي بين الطرز الوراثية في الشعير باستخدام التفاعل التسلسلي للبوليمراز، أسبوع العلم السادس والثلاثين ،1996 :115 صفحة

- صقر ر . وإسماعيل ت: البحث عن مؤشرات الـ RAPD و RELP مرتبطة بصفة المقاومة لسوسة أوراق العدس في مدخلات من العدس البري ،كلية الزراعة ، جامعة تشرين ،2000 : 98 صفحة

-عرموش هاني ،العمري موفق: الأعشاب في كتاب (الاستخدامات – الطبية – التجميلية – التصنيفية) دار النفائس دمشق، 1999 : 350 صفحة

-معلا محمد . يوسف عزيزة . طيوب غالب: دراسة التباينات الوراثية لمجموعة من الطرز الوراثية من الجرجير المنتشرة في المنطقة الساحلية ، رسالة ماجستير ، كلية العلوم ، جامعة تشرين ،1999: 120 صفحة.

-مير علي نزار، الصفدي بسام: تمييز الأصناف المحلية والمدخلة من القمح باستخدام تقانة الـ RAPD، 1995: 112صفحة.

-نصور م . عبد القادر أ . عباس س . خشورأ: التوصيف الجزيئي لبعض الطرز المحلية من الورد الدمشقي باستخدام تقنية الـ RAPD، كلية الزراعة ، جامعة تشرين، 2008: 110 صفحة

-Bader, S . M., Baum M.Khierallah H.S.M., and choumane W. The use of RAPD technique for the detection of genetic stability of data palm plant lets derived from in vitro culture of inflorescence. The first conference on Biology . 2007، 112 : 4-5 September.

-Benito, C., Figueiras C. , Zaragoza F,j., Gallego A. And De la pena A. Rapid identification of Triticeae genotypes from single seeds using the polymerase chain reaction, plant Mol. Bio 1993, 21:181-183.

Botany, DFaculty of scince,Helwan university ,Egypt .Journal .Agriculture and Biological sciences,. 2009. ,5(1) :63 – 71 .

Berry, J.M.,Vanwck.S.L.,Killo.A.Smigocki. Agro bacterium mediated transformation of commercial mints plant cell tissue org .cult. 1996، 44177.181.

Caissard,O., Faure, F., Jullien., M., Colson , A,. Perrin *direct* regeneration in vitro and transient Gus expression in Mentha xpiperita .Plant cell Rep.1996. 16 67 – 70 .

-Clark, M.S., Plant Molecular Biology . A laboratory man .Ual.Springer verlag .Berlin. Sci. 1997،USA 91:161-178

-Chandrashekhar , P.J.H.T., Nguyen.Application of RAPD technique for the detection of polymorphisms among wild and cultivated tetraploid wheats .Iheor Appl Genet 1993 36 : 602 – 609 .

-Choumane, W., Winter, P., Weigand , F., Kahl ,G. *conservation and variability of sequence-tagged microsatellite sites (STMS) from chickpea (cicer arietimum L.)within* us *cicer. Ththe geneor Appl Gent* 2000 101:269-278.

-.Dimer, F., jullien, O., Faure, S ., Moja,M., Colson,E., Matthyas.Rochon, J.C.,Caissard . *High efficiency transformation of peppermint (Mentha xpiperita L.) with Agro bacterium tumebaciens* .Pant science 1998. 136: 101 – 108 .

-Gilbert ,J.E.R., . Lewis, M.J ., Wilkinson and caligari , P.D. *Heterogeneity of three molecular data partition phylogenies of mints related to Mentha piperita* 2006 *200: 110-126*

-Gobert ,V.S., Moja,M ., Colson and Taberlet , P. *Hybridization in the section Mentha (Lamiaceae) inferred fom (AFLP) markers* Am.J.Bol ،2002 ،89:2071 – 2023 .

-Hu,J.L.F., Quiros,.*Identification of broccoli and cauliflower cultivars with RAPD markers plant cell* Replo 1991 ،505 – 511.

-Khanuja ,S.P.S., Shasany ,A.K., Alka srivastava and Kumar suslil ..*Assessment of genetic relationships in Mentha species* .Euphytica 2000 ، 111: 121 – 125 ,

-Kiani , M., ZAMANIZ ., KHALIGHL ,A., FATAHI ,R., BYRNE , D. H.Wide genetic diversity of Rosa damascened Mill germplasmin Iran asrevaled by RAPD analysis scientia Horticulture 2000، 115 : 38 – 392 .

-Koller ,B. A., Lehamann, J.M.M .,cdermott and Germott,C. andGessler,C. *Identification of applecultirars using RAPD markers theor. Appl.Genet.* 1993، 85:901-904

-Mackill ,D.J., *Classifying japanicarice cultivars with RAPD markers crop sci* 1995 ، 35 :889 – 894 .

-Mohapatra, A ., and Rout, G.R. *Identification and analysis of genetic variation among rose cultivars using random amplified polymorphic DNA Z* . 2005 ، 60c. 611 – 617 .

-Momeni ,S,B., Shiran and K.Razmjoo ..*Genetic variation in Iranian mints on the bases of RAPD analysis .Pakistan J.Biological sciences*2006 ، 1898 – 1904 .

-Mouterde .P.S.J. *Novelle flore du liban et de leSyrie tome ii .dar.el.machreq editeures* 1946 ، p.1161.

-Mustafa , A.Z.M.A., Bader,A.F., Mohammed , A.J, Ahmed , A.M., Mervalt ,G. Hassan. .*Genetic diversity among Mentha population in Egypt as Reflected by isozyme polymorphism .International journal of Botany* 2005 ، (2) 188 – 195.

-Nei ,and Li W. *Marhematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases .proc.Nalt Acad sci 1*979 ، USA .74 : 5267 – 5273 .

-Neim,K., Lin.P. M. Hasegawa , R.A., Bressan ,S.C.,Weller. *Transgenic peppermint (Mentha xpiperita L.) plants obtained by co cultivation with agro bacterium cumefacien*s . *plant cell REP*. 1979 ، 17: 165 – 171 .

-Paran, I ., Kessell, RV. , Michelmore, R.W. *: Identification of restriction fragment length polymorphism and random amplified polymorphic DNA linked to downy mildew resistance genes in lettuce , using near – is organic lines Genome* 1991 ، 34 : 1021 – 1027 .

-Shasany , A.K. srivastava ,J.R.Bahl,S.Sharma,S.P.S. Khanja S. and S.Kumar ,. *Genetic diversity of Mentha spicata L.germplasm through RAPD analysis plant Gene .Res . Newslett* , 2001 ، 130:1 – 5 .

-Srikant S , B.R.Tyagi,S.Mandal,V.Singh,H.Singh and S.Sarma ,. *Cluster analysis of 38 genotypes of peppermint (Mentha piperita) based on essential oil yield and quality traits .J.Med Arom .Plant sci* 1996 ، 18 : 280 – 286 .

-Sitthithaworn, w, Vimolmang kang,.S.,chittasupho.c Petcheunsakul.d., and APa adul.s. *pharmacognostic tnvestigation of the leaves of menthe cordiflolia and lts DNA fingerprints thai pharm health scig* 2009.4(1):g-14

-Supakosol, K., Vasorela xant *activity of Mentha cord folia extract on isolated thoracic aorta of experimentally induced hypertensive rats .M.SC.(Medical physiology) thesi*s .*Bangkok .Mahidal University* 2007 ، 15 : 165 – 185 .

-Vierling, R.A.X.I.ANG.Z., Joshi, C.P., Gilbert,M.L., and NGUYEN, H.T. *Genetic diversity among elite sorghum lines revealed by restriction fragment length* polymorphisms and random amplified polymorphic DNA.(T.A.G) 1994 ، 87:816 – 820 .

-Williams, j. G.k., Kubelika, R., Livak K.j., Rafalski j.A., and Tingey, S.V. *DNA polymorphism amplified by arbitrary primers as useful as gentic markers. Nueleic Acids Res.* 1990 ، 18:6531-6535.