مجلة جامعة دمشق للعلوم الزراعية ــ (2008) ــ المجلد (24) ــ العدد 1 ــ الصفحات: 263 -282

التوصيف الجزيئي ودرجة القرابة بين بعض طرز الزعتر البري *Thymus serpyllum* في سورية باستخدام تقانة التضخيم العشوائي متعدد الأشكال للدنا RAPD

راما أحمد عزيز[1] و فيصل حامد[2] و نجلاء عبد المنعم عبد الله[3]

الملخص

استخدمت تقانة الدنا المضخم عشوائياً RAPD للحصول على معلومات عن درجة القرابة الوراثية بين 13 طرازاً برياً من نباتات الزعتر *Thymus serpyllum* في سورية.

استخدمت 27 مرئسة عشوائية (Primers)، أعطت بمجملها تعددية شكلية (Polymorphism) بين الطرز المدروسة. أظهرت نتائج التحليل الإحصائي باستخدام برنامج STATISTICA وروتين CLUSTER ومصفوفة النسب المئوية لعدم التوافق Percent Disagreement Values (PDV) أن قيم PDV قد تراوحت بين 0.02 (بين الطرازين 1و3 من حمص) و0.26 (بين الطرازين 4 من حماة و11 من اللاذقية)، وكان العنقود الشجري الناتج متوافقاً - إلى حد كبير - مع قيم مصفوفة عدم التوافق.

أظهرت النتائج وجود علاقة قيمة بين درجة قرابة الطرز المدروسة والمواقع الجغرافية وأمكن تجميع الطرز بحسب مواقعها الجغرافية و لوحظ أن عناقيد المنطقة الواحدة تتجمع مع بعضها بعضاً وعلى نحو مستقل عن غيرها من المواقع مما يساعد على تمييز المواقع المختلفة بعناقيدها المستقلة. علاوة على ذلك، أثبتت نتائج هذه الدراسة مقدرة تقانة RAPD على تحديد هوية الطرز المدروسة (البصمة الوراثية) للزعتر والكشف عن درجة القرابة فيما بينها.

إن لنتائج هذه الدراسة أهمية كبيرة في مجال دراسات التنوع الحيوي في القطر الذي يعوزه استخدام التقانات على المستوى الجزيئي ونوصي بالاستفادة من هذه التقانات في توصيف الطرز الوراثية بشكل عام ودراسة علاقات القربى فيما بينها، وبشكل خاص في دراسة الأنواع الطبية البرية المهمة التي لم توصف في القطر على المستوى الجزيئي.

الكلمات المفتاحية: توصيف جزيئي تنوع وراثي مرئسات زعتر RAPD.

[1] طالبة دكتوراه، [2] أستاذ، قسم البساتين، كلية الزراعة، جامعة دمشق، سورية.
[3] أستاذ، قسم الوراثة، كلية الزراعة، جامعة القاهرة، القاهرة.

Molecular Characterization and Genetic Relatedness Between some Accessions of *Thymus serpyllum* in Syria Using RAPD Technique

R. A. Aziz[(1)] ; F. Hamed[(2)] and N. A. Abdulaa[(3)]

ABSTRACT

Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) technique was used to study the genetic relationship among 13 wild accessions of *Thymus serpyllum* grown in Syria. All the 27 random decamer primers used were produced polymorphism. Results showed using the STATISTICA computer package and CLUSTER routine with Percent Disagreement Values (PDV), that PDV ranges between 0.02 (between 1st and 3rd accession from Homs), and 0.26 (between 4th from Hama and 11th accession from Lattakia), and the resulting dendrogram was in general in agreement with the matrix.

The results further showed a good relationship between the degree of accessions relatedness and their geographical localities, with the accessions of each locality being clustered together independently from other localities which made it possible to discriminate between different localities in its separate clusters. Moreover, the results of this study proved the ability of RAPD technique to identify some Thymus genotypes through unique fingerprints and to unveil the degree of its relationship in the cluster.

The results of this study may have a great impact on the national biodiversity program which lacks the employment of molecular techniques. therefore we recommend the use of these techniques in genotype identification in general, and to study the relationship among them, and in particular, studying important wild species of medical importance which have not been described yet at the molecular level.

Key words: Molecular characterization, Genetic diversity, Primers, Thymus, RAPD.

[(1)]Ph. D. aspirant, [(2)] Professor, Dept., of Horticulture, Faculty of Agriculture, Damascus University, Syria.
[(3)] Professor, Dept., of Genetics, Faculty of Agriculture, Cairo University, Cairo.

المقدمة

عرف الإنسان منذ القدم أهمية النباتات الطبية العطرية واستخدمها في الغذاء وعلاج الأمراض وصناعة مستحضرات التجميل، وقد اتجه التفكير العلمي في السنوات الأخيرة نحو استخدام النباتات الطبية والعطرية في علاج كثير من الأمراض والابتعاد ما أمكن عن الأدوية الكيميائية المصنعة، ذات التأثيرات الجانبية (وإن كانت ذات فعالية علاجية كبيرة)، والتي تشكل خطورة على صحة الإنسان والتي لا تظهر نتائجها إلا بعد فترة زمنية طويلة من استخدامها.

تتميز منطقة شرق المتوسط ببيئة جغرافية ومناخية ملائمة لنمو عدد كبير من الأنواع النباتية المختلفة، ونظراً لأن سورية متميزة بتنوع مناخها وطبوغرافيتها (من جبال شاهقة وهضاب وسهول متباينة الإرتفاع) جعلها زاخرة بتشكيلة غنية من النباتات الطبيعية والتي تشكل مخزوناً وراثياً واقتصادياً مهماً. ويتبين من الجولات الميدانية في المناطق المختلفة من سورية وجود العديد من الأجناس والأنواع للنباتات الطبية والعطرية والتي يمكن توظيفها في صناعات طبية وصيدلانية وتجميلية وغذائية، وتشكل بدورها دخلاً جيداً للمواطنين، خاصة في المناطق الزراعية الهامشية. علماً أن غالبية هذه المصادر الوراثية مهددة بالانقراض والاندثار الوراثي، نتيجة تدمير تجمعات هذه الأنواع البرية تحت تأثير ضغوط الإنسان من رعي جائر واحتطاب وقطع وتوسع زراعي وغيره. ورغم هذا التدهور الكبير للأصول البرية لهذه النباتات الطبية، فما زالت بقاياها منتشرة في بيئات مختلفة، ومقاومة للعوامل البيئية القاسية، ومن أهمها: نبات الزعتر والمريمية واكليل الجبل وسواها، وهذا ما حدا بالباحثين والمهتمين في مجال التنوع الحيوي بالمبادرة إلى القيام بالدراسات والنشاطات المتعددة للمحافظة على هذه الموارد الطبيعية وحمايتها من التدهور والانقراض والاستفادة منها واستخدامها للأجيال القادمة.

فقد أوصى المؤتمر العربي الأول المنعقد في دمشق من 5-8 تشرين الأول عام 1992 تحت شعار «استخدام النباتات الطبية كعقاقير علاجية وفق الأساليب العلمية الحديثة» على تشجيع ومساعدة طلاب الدراسات في كليات الطب والصيدلة والعلوم والزراعة على دراسة النباتات الطبية للاستفادة منها بوصفها مواد أولية في تصنيع الأدوية من زراعة وحفظ وادخار وتحسين الإنتاج ونوعيته، ودراسة التأثيرات الدوائية كيميائياً وسريراً واستخلاص المواد الفعالة منها. من هذا المنطلق كان الدافع لنا بالقيام بدراسة أحد النباتات التابعة للفصيلة الشفوية، التي تعد واحدة من أهم الفصائل النباتية ذات القيمة الاقتصادية العالية في إنتاج الزيوت الطيارة، والتي تنتشر أنواعها بصورة طبيعية في مناطق مختلفة وهو نبات الزعتر *Thymus serpyllum*، الذي يحظى بأهمية طبية وصيدلانية كبيرة والدليل على ذلك ورود ذكره في دستور الأدوية البريطاني

(British Pharmacopoeia, 2001) ودستور الأدوية الأوربي (European Pharmacopoeia, 2002)، حيث يستخدم نبات الزعتر بأنواعه المختلفة كشراب لعلاج حالات الزكام، التهابات الصدر والقصبات الحاد، السعال، والتهابات الحنجرة. كما يتميز زيته العطري بخواص مضادة لالتهاب الأغشية المخاطية ويساعد على التخلص من الزكام والتهاب الجيوب الأنفية، فضلاً عن التهابات الأذن والآلام المرتبطة بها (Tyler, 1994; Chevallier ,1996). ويستخدم منقوع النبات لغسل الجروح والتقرحات وزيته كمطهر خارجي في مراهم التئام الجروح، ومعقم في الشرابات لعلاج الاضطرابات التنفسية، وبمستحضرات الاستنشاق. وتعود خواص العقار المعقمة والمطهرة والمقشعة إلى محتواه العالي من الثيمول والكارفاكرول (Bluementhal,2000)، وإن فعاليته ضد الفطريات والبكتريا تفوق الفينول الصناعي بقرابة 25 مرة، وذلك لوجود التيمول الأقل سمية من الفينول الطبي (BHP, 1983; Evans, 2001).

وعلى الرغم من هذه الأهمية البالغة فلا يزال هذا النبات مهملاً، وذلك من خلال ندرة المراجع والبحوث المحلية التي تتمحور في موضوعها حول هذا النبات من جهة، وتراجع الاهتمام بزراعته من جهة أخرى، مما يستدعي تسليط الضوء عليه من خلال دراسته ومعرفة درجات القرابة الوراثية بين طرزه البرية، وقد جرى تسخير إحدى التقانات الحديثة لخدمة أهداف هذا البحث، فقد استخدمت تقانة الدنا المضخم عشوائياً RAPD) Random Amplified Polymorphic DNA)، والتي تفيد في الكشف عن درجة الاختلافات الوراثية بين الطرز المدروسة على المستوى الجزيئي والذي - كما هو معروف - لا يتأثر بالظروف البيئية التي تؤثر معنوياً في شكل النبات ودرجة نموه.

وتجدر الإشارة إلى أن هذا البحث يعدُّ مساهمة مهمة في صون مصادرنا الوراثية النباتية والحفاظ عليها.

هدف الدراسة

1- تقدير التباين الوراثي بين الطرز المدروسة التابعة لنبات الزعتر باستخدام تقانة الدنا المضخم عشوائياً (RAPD).

2- الحصول على معلومات عن درجة القرابة الوراثية بين الطرز المدروسة.

3- تعريف واسمات (مؤشرات) جزيئية فريدة تميز بعض الطرز، ومن ثم تحديد البصمة الوراثية لهذه الطرز.

4- دراسة العلاقة الممكنة بين التوزع الجغرافي وأنماط الحزم الناتجة من تقنية RAPD.

مــواد البحث وطــرائقه

أجري هذا البحث ضمن اتفاقية التوأمة مابين كلية الزراعة بجامعــة دمــشق وكليــة الزراعة بجامعة القاهرة، وقد أجريت التحاليل بالتعاون مابين كليــة الزراعــة بجامعــة دمشق، ومخابر هيئة الطاقة الذرية في سورية.

المادة النباتية:

شملت المادة النباتية مجموعة طرز من نباتات الزعتر *Thymus serpyllum* البريــة التابعة للفصيلة الشفوية (Labiatae=Lamaiaceae) وعددها (13 طرازاً)، والمتميــزة بأهميتها الطبية واستخداماتها الصيدلانية، والموجودة في مناطق جغرافية مختلفة، وذلــك حسب ما هو موضح في الجدول (1)، فضلاً عن استخدام عينة كشاهد للمقارنة وهو يتبع الجنس Ziziphora من العائلة نفسها.

الجدول (1) مواقع العينات المدروسة من نبات الزعتر

الرقم	الموقع	النوع	الارتفاع (م)	خط الطول	خط العرض
1	حمص - حسية	*Thymus serpyllum*	570	36.43.32	34.46.05
2	حمص - المختارية	*Thymus serpyllum*	490	36.42.25	34.44.18
3	حمص - حسية	*Thymus serpyllum*	585	36.41.47	34.42.41
4	حماة بيرة الجرد	*Thymus serpyllum*	290	36.36.44	35.08.09
5	حماة - مصياف	*Thymus serpyllum*	300	36.11.24	35.00.07
6	حلب - عفرين	*Thymus serpyllum*	355	37.17.21	36.12.26
7	حلب - اعزاز	*Thymus serpyllum*	350	37.16.32	36.14.10
8	طرطوس - شيخ بدر	*Thymus serpyllum*	537	36.05.24	34.59.26
9	طرطوس - دريكيش - ملاجة	*Thymus serpyllum*	500	36.07.30	34.49.06
10	طرطوس - شاهد	*Ziziphora*	598	36.03.29	30.43.94
11	اللاذقية الحفة	*Thymus serpyllum*	335	36.02.38	35.36.23
12	اللاذقية القرداحة	*Thymus serpyllum*	260	36.02.15	35.25.53
13	اللاذقية صليب البهلولية	*Thymus serpyllum*	190	36.37.22	35.10.29
14	اللاذقية صلنفة	*Thymus serpyllum*	1123	36.10.24	35.24.20

استخلاص الــDNA

عُزلت الــ DNA لكامل الجينوم من الأوراق الفتية للعينات المدروسة. حيث عُزلت الــ DNA بطريقــة CTAB (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide) (Suman *et al.*,1999) مع إجراء بعض التعديلات اللازمة عليها بحيــث تمكنــا مــن الحصول على كمية كبيرة من الــ DNA، وتتلخص خطوات طريقة العزل وتعــديلاتها كما يأتي:

- وزنت عينات ورقية بحدود 1 -2 غ من كل نبات أخضر، وطحنت بوجود الآزوت السائل للحصول على المادة النباتية بشكل مسحوق. ومن ثم نقلت إلى دورق سعة 50 مل يحوي على 10 مل من محلول الاستخلاص مكون من:

{100 mM Tris HCl (PH=8); 1.5 mM NaCl; 25 mM EDTA; 1% P.V.P (polyvinilpyrolidone); 0.2 % Mercaptoethanol}.

- أُجريت المجانسة ثم وضعت الدوارق الحاوية على المزيج في حمام مائي في درجة حرارة 65 درجة مئوية مدة نصف ساعة مع التحريك المستمر.
- أضيف إلى المزيج 6.5 مل (كلورفورم: أيزوميل الكحول) (24:1) خلطت بلطف مدة عشر دقائق على الرجاج، ثم التثفيل بسرعة 6500 دورة بالدقيقة مدة 15 دقيقة.
- رُفعت الرشاحة إلى أنبوب جديد، وأضيف إليها (3/2 من حجمه) كحول الايزو بروبانول المبرد ثم مزج محتوى الأنبوب جيداً وبهدوء حتى تبدأ خيوط الحمض النووي الريبي منقوص الاوكسجين DNA بالظهور، ثم حفظ في المجمدة في درجة حرارة 4 مْ مدة نصف ساعة.
- التثفيل مدة 5 دقائق بسرعة 4000 دورة/ دقيقة.
- غسل الـDNA بمحلول غسيل مبرد Buffer (ايتانول 76% وأمونيوم اسيتات 10 mM).
- استبعاد الرشاحة والتجفيف مدة 10 دقائق، تبعه إذابة الـ DNA بإضافة 200 ميكروليتير ماءً مقطراً معقماً طول الليل وفي درجة حرارة 4 م.

تقانة التضخيم العشوائي متعدد الأشكال للدنا (الدنا المضخم عشوائياً)

تم الحصول على المرئسات من شركة (Operon Technologies Inc. USA) وشركة (Amersham Pharmacia Biotech Inc.). أذيبت المرئسات بالماء المقطر للحصول على تركيز 20 نانوغراماً/ مايكروليتر. واستخدمت 27 مرئسة تم اختيارها على نحو عشوائي (الجدول 2) تم الحصول على dNTPs من شركة Rouche وعلى كل من Mg Cl2 و *Taq* DNA polymerase والمحلول الموقي 10X PCR من شركة Eurobio.

تمت شروط التضخيم كما وصفت من قبل (Williams *et al.*, 1990) مع بعض التعديلات وكان حجم التفاعل النهائي 25 ميكروليتراً متضمناً:

20 mM Tris-HCl (PH= 8.4 at 25C), 50 mM KCL, 3.4 mM MgCl2, 0.3 mM dNTPs, 60 ng primer, 5U/Ml *Taq* DNA polymerease, 30 ng tamplate DNA المحسوب كميتها على جهاز (Cintra 5- UV-Vis Double-Bam

Spectrometer من شركة GB) سبق ذلك ضبط الشروط المثلى (لنبات الزعتر) للتضخيم بجهاز PCR، وحددت الكمية المثلى لكل من الـ *Taq* و DNA. أجري تفاعل PCR باستخدام جهاز الدوران الحراري Hybaid Thermal Cycler (Geniu) من شركة TECHNE حيث تضمنت ظروف التضخيم:

الجدول (2) يبين رموز المرئسات المستخدمة في تقانةRAPD وأطوالها الجزيئية وتسلسلها النيوكليوتيدي

الرقم	رمز المرئسة	أسس المرئسة	الرقم	رمز المرئسة	أسس المرئسة
1	Amersham 4	AAGAGCCCGT	**15**	OPN-03	GGTACTCCCC
2	Amersham 6	CCCGTCAGCA	**16**	OPN-07	CAGCCCAGAG
3	OPC-01	TTCGAGCCAG	**17**	OPN-08	ACCTCAGCTC
4	OPC-11	AAAGCTGCGG	**18**	OPN-10	ACAACTGGGG
5	OPC-12	TGTCATCCCC	**19**	OPN-11	TCGCCGCAAA
6	OPC-13	AAGCCTCGTC	**20**	OPN-12	CACAGACACC
7	OPD-01	ACCGCGAAGG	**21**	OPE-01	CCCAAGGTCC
8	OPD-11	AGCGCCATTG	**22**	OPO-10	TCAGAGCGCC
9	OPD-15	CATCCGTGCT	**23**	OPO-15	TGGCGTCCTT
10	OPE-01	CCCAAGGTCC	**24**	OPO-16	TCGGCGGTTC
11	OPE-12	TTATCGCCCC	**25**	OPO-18	CTCGCTATCC
12	OPE-16	GGTGACTGTG	**26**	OPO-19	GGTGCACGTT
13	OPF-01	ACGGATCCTG	**27**	OPR-19	CCTCCTCATC
14	OPF-12	ACGGTACCAG			

- تمسخ (Denaturation) فصل أولي لجديلتي الـ DNA وذلك في حرارة 94 درجة مئوية مدة دقيقة واحدة، تبعها 45 دورة حيث تضمنت كل دورة:
  - تمسخ (Denaturation): في حرارة 94 درجة مئوية مدة عشر ثوانٍ.
  - إسقاء (Annealing): في حرارة 35 درجة مئوية مدة عشر ثوانٍ.
  - استطالة (Extension): في حرارة 72 درجة مئوية مدة دقيقة وعشر ثوانٍ.
- استطالة نهائية لدورة واحدة فقط على حرارة 72 درجة مئوية مدة دقيقتين.

أبقيت نواتج التفاعل في درجة حرارة 4 درجة مئوية، ثم فصلت على هلامة أغاروز 1.2% (من شركة Merck) ضمن محلول موقي 0.5X TBE مضافاً إلى تلك الهلامة إثيديوم بروماید (من شركة Fluka) لكشف حزم الـ DNA من خلال ضوء الـUV واستعمل مؤشر قياسي (سلم دنا) 1kb(من شركة Invitrogen) يشير إلى مواقع الحزم وحجمها لمعرفة الأوزان الجزيئية التقريبية لنواتج التضخيم. طبق الرحلان الكهربائي بجهد 85 فولتاً مدة ساعتين ونصف، ثم صورت الهلامة بجهاز فيديو حاسوبي.

تحليل البيانات

درست نواتج التضخيم للمرئسات المدروسة بمقارنة المسارات الناتجة فيما بينها، وأحصيت الحزم الناتجة عن أجزاء الدنا DNA على أساس وجود الحزمة (1)، أو غيابها (0)، ولمعرفة درجة القرابة الوراثية بين الطرز المدروسة اعتماداً على عدد وحدات التضاعف، تم إنشاء مصفوفة النسب المئوية لعدم التوافق (PDV) Percent Disagreement Values بتطبيق متوسطات المجموعات الزوجية غير المزانة (UPGMA)، باستخدام برنامج STATISTICA (StatSoft, 2003)، ثم وضعت النتائج على شكل شجرة قرابة تمثل التحليل العنقودي (Dendrogram).

النتائج

يستخدم التفاعل السلسلي للبوليميراز (PCR) حالياً في تقانات عديدة جداً لها استعمالات في مختلف العلوم البيولوجية والطبية، ومن أقدم هذه التقانات وأوسعها انتشاراً تقانة الـ RAPD (Williams *et al.*, 1990) التي استخدمناها هنا لدراسة درجة القرابة بين طرز الزعتر المختلفة ومعرفة درجة التعددية الشكلية بينها polymorphism. لهذه التقانة كما لكل التقانات الأخرى العديد من الميزات والمساوئ. من أهم ميزات الـ RAPD البساطة وقلة التكلفة والسهولة النسبية وعدم الحاجة لأي معرفة مسبقة بالجينوم المدروس، حيث تعتمد على مرئسات عشوائية مؤلفة من عشر قواعد آزوتية decamers، ويؤخذ عليها انخفاض إمكانية الإعادة، حيث تصعب مقارنة النتائج بين مخابر مختلفة. تعزى التعددية الشكلية الكبيرة في الـ RAPD إلى قدرة المرئسات العشوائية على الارتباط بالجينوم في عدة مواقع، وتنتج التباينات للوحدات المتضاعفة amplicons من حدوث طفرات للجينوم تؤدي إلى تنوع في موقع ارتباط المرئسات مما يجعلها تستخدم كأداه لتقانات المؤشرات الجزيئية Molecular Markers.

دراسة التعددية الشكلية لنباتات الزعتر باستخدام تقانة الـ RAPD

يبين الجدول (3) المرئسات المستخدمة والعدد الكلي لوحدات التضاعف (amplicons) على الطرز الـ 13 المدروسة، والتعددية الشكلية لوحدات التضاعف (amplicons)، فضلاً عن عدد الحزم الكلية الناجمة عن استخدام كل من المرئسات على الطرز المدروسة والتي تم تحليلها على المستوى الجزيئي. وكذلك عدد التعدديات الشكلية polymorphisms في كل مرئسة. وقد أدخلت طرز الشاهد لإظهار مدى بعدها عن النوع المدروس ولكنها لم تدخل في الحسابات.

وقد نتج عن تطبيق الـ27 مرئسة على طرز الزعتر *T. serpyllum* 198 وحدة تضاعفية amplicons كانت 18 منها وحيدة التكرار Monomorphic في حين كانت

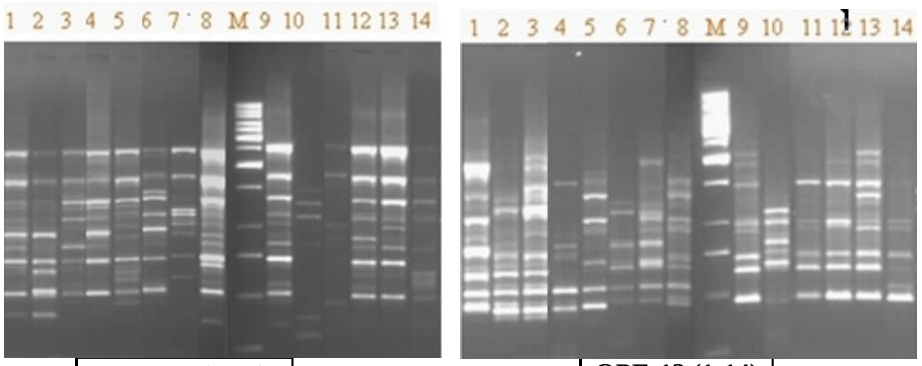
180 ذات تعددية شكلية Polymorphic. وقد أظهرت جميع المرئسات تعددية شكلية عند استخدامها مع طرز الزعتر *T.serpyllum* المدروسة كما هو موضح في الجـــدول (3) والشكل (1).

الجدول (3) يبين عدد وحدات التضاعف amplicons وحزم التعددية الشكلية polymorphic fragments الناتجة من مرئسات الـــ RAPD مع الطـــرز المختلفـــة لنباتـــات الزعتر *Thymus serpyllum*

الرقم	رمز المرئسة	العدد الكلي لـــ Amplicons	التعددية الشكلية لـــ Amplicons	النسبة المئوية للتعددية الشكلية%	مجموع الحزم الكلي	مجموع حزم التعددية فقط	نسبة التعددية لمجموع الحزم	الوزن الجزيئي لـــ Monomorphic
1	Amer 4	6	5	83.33	40	27	67.5	1000
2	Amer 6	4	3	75	31	18	58.6	500
3	OP-C11	8	8	100	50	50	100	
4	OP-C12	6	5	83.33	38	25	65.79	1000
5	OP-D15	9	9	100	46	46	100	
6	OP-E16	4	**2**	50	28	2	7.14	550 1100
7	OP-F12	7	5	71.43	42	16	38.10	550 1000
8	OP-O10	6	6	100	48	48	100	
9	OP-O15	5	4	80	37	24	64.86	800
10	OP-O18	9	9	100	59	59	100	
11	OP-O19	8	6	75	33	7	21.21	1200 1500
12	OP-N7	7	6	85.71	68	55	80.88	1500
13	OP-R19	5	4	80	42	29	69.05	1000
14	OP-O16	11	11	100	49	49	100	
15	OP-E12	**14**	**13**	92.86	75	62	82.67	750
16	OP-C13	7	6	85.71	44	31	70.45	750
17	OP-D11	6	5	83.33	42	29	69.05	1000
18	OP-N3	8	8	100	53	53	100	
19	OP-N8	6	5	83.33	44	31	70.45	500
20	OP-N10	10	10	100	47	47	100	
21	OP-N11	10	10	100	39	39	100	
22	OP-E1	**3**	3	100	29	29	100	
23	OP-N12	8	8	100	30	30	100	
24	OP-F1	9	8	88.89	44	31	70.45	1400
25	OP-O1	8	8	100	40	40	100	
26	OP-C1	6	5	83.33	29	16	55.17	1100
27	OP-D1	8	8	100	34	34	100	
المجموع		**198**	**180**		**1161**	**914**		**18**
المتوسط		**7.33**	**6.67**	**90.91**			**78.73**	

تم حصر عدد وحدات التـــضاعف لكـــل مرئـــسة (Number of amplified DNA fragments) وقد تراوح بين 3 مع المرئسة OP-E1 و14مع المرئسة OP-E12 بمتوسط

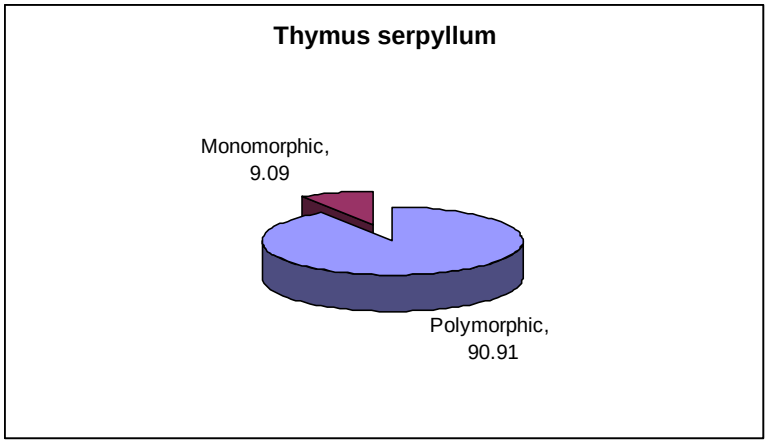
وقدره 7.33 لكل مرئسة بين طرز الزعتر المدروسة. في حين تراوح عدد وحدات التضاعف ذات التعددية الشكلية (Number of polymorphic amplicons) بين 2 مع المرئسة OP-E16 و13 مع المرئسة OP-E12 بمتوسط 6.67 لكل مرئسة. ويلاحظ من خلال الجدول أن النسبة المئوية للتعددية الشكلية في هذا النوع كانت 90.91، وهذا يعني أن نسبة التعددية الأحادية Monomorphic كانت 9.09 (الشكل 2)، وهذه النسبة تفيد في البحث عن حزمة مميزة لهذا النوع وكلما زاد عدد هذه الحزم المفردة دل ذلك على درجة التجانس داخل النوع. وقد أمكن الحصول على 18 حزمة مميزة لهذا النوع مع 15 مرئسة من المرئسات المستخدمة كما هو موضح في الجدول (3). في حين أن نسبة التعددية لمجموع الحزم في النوع *T.serpyllum* كانت 78.73 وكانت أقل بكثير من النسبة المئوية للتعددية الشكلية مما يدل على وجود تقارب لبعض الطرز داخل النوع نفسه.



الشكل (1) يبين التغاير الشكلي الناجم من استخدام المرئسات OP-E12، OP-O18، OP-E16 بين طرز الزعتر الـ 13 المدروسة في تقانة الـ RAPD كمثال لبعض النتائج المتحصل عليها.

دراسة العلاقة الوراثية بين الطرز المختلفة من الزعتر باستخدام تقانة الـ RAPD

دُرست العلاقة الوراثية بين طرز الزعتر البري عن طريق حصر عدد وحدات التضاعف من تقانة الـ RAPD وأُنشئت منها مصفوفة النسب المئوية لعدم التوافق Percent Disagreement Values (PDV) (الناجمة عن تطبيق متوسطات المجموعات الزوجية غير المزانة (UPGMA) باستخدام برنامج STATISTICA الإحصائي) لمعرفة درجة القرابة الوراثية بين الطرز المدروسة لنبات الزعتر اعتمادا على عدد نواتج التضاعف المشتركة، وأدخلت في هذه المصفوفة قيم عينة الزيزيفورا كشاهد بعيد في الدراسة (الجدول 2).



الشكل (2) يوضح النسب المئوية للتعددية الشكلية الأحادية والمتعددة لطرز الزعتر المدروسة باستخدام تقانة الـ RAPD .

يوضح الجدول (2) قيم الـ PDV، وقد تراوحت بين 0.02 بين الطرازين 1 و3 بنسبة تشابه 0.98، في حين كانت أعلى قيمة PDV هي 0.26 بين الطرازين 4 و11 بنسبة تشابة 0.74. وهنا كان التنوع الوراثي عالياً بين هذين الطرازين، فهما من منطقتين مختلفتين بيئياً (حماة واللاذقية)، مقارنة بطرازي حمص واللذين لهما الظروف البيئية نفسها.

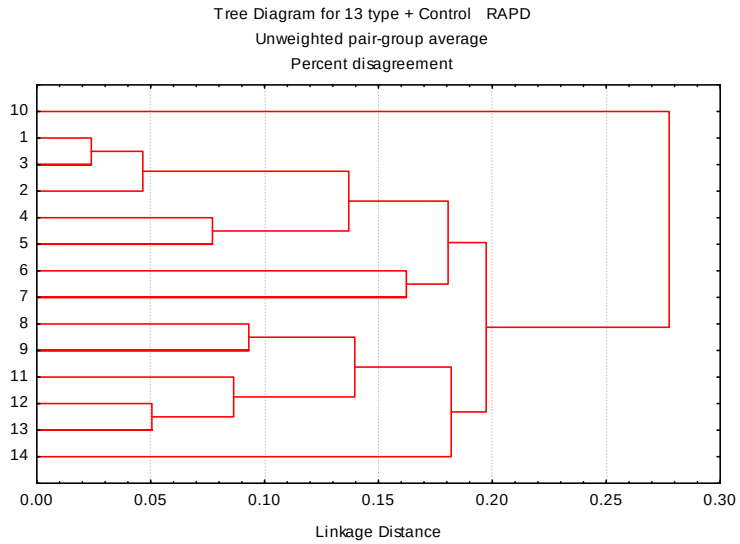
الجدول (4) مصفوفة النسب المئوية لعدم التوافق (PDV) بين الطرز المدروسة لنبات الزعتر *T. serpyllum* الناجمة من تطبيق متوسطات المجموعات الزوجية غير المزانة UPGMA لنتائج تقانة RAPD.

	10	1	3	2	4	5	6	7	8	9	11	12	13	14
10	0.00													
1	0.27	0.00												
3	0.27	0.02	0.00											
2	0.26	0.04	0.05	0.00										
4	0.28	0.14	0.14	0.14	0.00									
5	0.27	0.14	0.14	0.13	0.08	0.00								
6	0.25	0.20	0.19	0.19	0.13	0.16	0.00							
7	0.24	0.19	0.18	0.18	0.20	0.18	0.16	0.00						
8	0.25	0.15	0.15	0.14	0.15	0.14	0.18	0.17	0.00					
9	0.28	0.16	0.15	0.16	0.16	0.16	0.20	0.19	0.09	0.00				
11	0.31	0.22	0.22	0.22	0.26	0.24	0.24	0.24	0.21	0.14	0.00			
12	0.31	0.17	0.18	0.18	0.19	0.18	0.23	0.22	0.15	0.09	0.08	0.00		
13	0.34	0.19	0.18	0.20	0.19	0.20	0.24	0.23	0.15	0.10	0.10	0.05	0.00	
14	0.27	0.24	0.25	0.23	0.25	0.23	0.22	0.21	0.19	0.20	0.18	0.16	0.19	0.00

التحليل العنقودي لطرز الزعتر باستخدام تقانة الـ RAPD

دُرس التنوع الوراثي بين طرز الزعتر البري المدروسة بناء على بيانات مصفوفة نسب عدم التوافق Percent Disagreement Value وأُنشئتْ شجرة القرابة الوراثية (التحليل العنقودي) Dendrogram بينها لمعرفة العلاقة الوراثية والمسافة الارتباطية بين الطرز المختلفة. وعموماً دراسة العلاقة بين الطرز الوراثية المختلفة يكون بناء على الصفات المظهرية والكيميائية والواسمات (المؤشرات) الجزيئية التي تفرق بين الطرز على مستوى الـ DNA.

نجد من خلال الشكل (3) وبناء على التحليل العنقودي لنتائج الـ RAPD وجود توافق كبير بين البيانات المصفوفة وشجرة القرابة، والتي قسمت بدورها النوع *T.sepyllum* عند قيمة عدم توافق 0.20 إلى تحت تجمعين أحدهما يشمل طرزاً من حمص وحماة وحلب والآخر يشمل على طرز من طرطوس واللاذقية. مع ملاحظة تجمع طرز كل منطقة جغرافية مع بعض. وكان التنوع الوراثي عالياً في طرز حلب (6 و7) أكثر من 0.16، في حين كان التنوع الوراثي منخفضاً في حمص (1 و3) 0.02 وتبتعد العينة 2 عنهم بمقدار 0.05، أي أن الطرز الثلاثة تقع في تجمع واحد ودرجة التشابه بينها كانت أعلى من 90%. وتشير بيانات الشكل (3) إلى وجود علاقة ظاهرية بين طرز الزعتر المدروسة وموقعها الجغرافي، حيث تجمعت طرز كل منطقة في عنقود مستقل.



الشكل (3) يبين شجرة القرابة بين طرز الزعتر الـ 13 اعتماداً على النسبة المئوية لعدم التوافق لمتوسطات المجموعات الزوجية غير المزانة UPGMA

أما بالنسبة لطرز الشاهد فاستخدم طراز من العائلة نفسها وهو يتبع الجنس الـــ Ziziphora لإثبات أن هذا الجنس مختلف وراثياً، وأيضا للتأكد من دقة التجارب وعدم حدوث تلوث في أثناء اختبارات الـ PCR. فوجد من التحليل أنّه يقع في تجمع منفصل بعيداً عن جميع طرز الزعتر المدروسة على مسافة ارتباطية أكثر من 0.28 لعدم التشابه كما هو متوقع.

تمييز الطرز الوراثية باستخدام تقانة الـRAPD

يمكن الاعتماد على المعلمات الوراثية في دراسة البصمة الوراثية Fingerprinting والتفريق بين الطرز من خلال وجود نوعين من الحزم المتباينة وغير المتباينة إذ تعدُّ هذه الحزم مفيدة في التمييز بين الطرز المدروسة. وقد أمكن التمييز بين 10 طرز تابعة للنوع *T. serpyllum* باستخدام 27 مرئسة عشوائية بواسطة 34 حزمة فريدة (منها 26 حزمة موجبة و8 حزم سالبة) (الجدول 5).

الجدول (5) الطرز الوراثية لنبات الزعتر التي تميزت بحزم فريدة عند استخدام تقانة الـــ RAPD

الطراز	الحزم الفريدة المتباينة			الحزم الفريدة غير المتباينة			المجموع الكلي
	المرئسة	الموقع التقريبي للحزم pb	العدد الكلي للواسم	المرئسة	الموقع التقريبي للحزم pb	العدد الكلي للواسم	
1	OP-O19	700	1				**1**
2	OP-N10	600	1				**1**
5	OP-R19	450	1				**1**
6	OP-E16	500- 750	2	OP-N11	750	1	**3**
7	OP-D15	250- 350	6	OP-O10	2000	1	**7**
	OP-O19	1000					
	OP-N11	800					
	OP-F1	650					
	OP-D1	600					
8	OP-O16	1100	3				**3**
	OP-E12	1400- 1550					
9	OP-O16	1400	3				**3**
	OP-N11	700- 1700					
11	OP-F12	800	3	OP-O1	1200- 1450	2	**5**
	OP-O19	500- 550					
12	OP-N10	1450	1				**1**
13	OP-F1	2000	1				**1**
14	OP-D15	400	7	OP-O10	950	4	**11**
	OP-O19	350		OP-N7	2000		
	OP-N11	550- 600		OP-N8	700		
	OP-O1	400- 650		OP-E1	550		
	OP-C1	1250					
			29			8	**37**

ويلاحظ من خلال الجدول أن المرئسات OP-N11 وOP-O19 استطاعت أن تميز 4 طرز. في حين أن كلاً من المرئسات OP-R19 OP-E16 OP-OP-D1 OP-E12 OP-F12 OP-C1 OP-N7 OP-N8 OP-E1 استطاعت أن تميز طرازاً واحداً فقط. وقد تراوح حجم الشدف المضخمة لطرز الزعتر *T. serpyllum* بين 250 و2000 زوج من القواعد، وأعلى وزن جزيئي كان مع المرئسات OP-O10 وOP-N7 والطرز 7و14 على التوالي وعند وزن جزيئي 2000 زوج من القواعد، في حين كان أقل وزن جزيئي 200 زوج من القواعد مع المرئسة OP-D15 والطراز7. وقد أمكن تمييز طرز حمص (1 2 3) بمجموعة حزم مشتركة، وكذلك طرز حماة (4 5) وطرز اللاذقية (11، 12، 13، 14)، وكذلك مجموعة طرز المنطقة الساحلية من طرطوس واللاذقية (8 9 11 12 13 14) كما هو موضح في الجدول (6).

الجدول (6) الحزم المميزة لكل مجموعة طرز ضمن النوع عند استخدام تقانة الـRAPD

الطرز	الحزم الفريدة الموجبة			الحزم الفريدة السالبة			المجموع الكلي
	المرئسة	الموقع التقريبي للحزم pb	العدد الكلي للواسم	المرئسة	الموقع التقريبي للحزم pb	العدد الكلي للواسم	
3- 2- 1	Amersham 4	600	6				**6**
	Amersham 6	500					
	OP-D11	700					
	OP-N11	900					
	OP-N12	750					
	OP-O1	700					
5- 4	OP-D15	850	3				**3**
	OP-F12	550					
	OP-N3	850					
- 11 - 12 14- 13	OP-O15	800	3	OP-O15	750	5	**8**
	OP-D11	1500- 1600		OP-N7	600		
				OP-R19	950		
				OP-D11	650- 700		
- 9- 8 - 11 - 12 14- 13	OP-C12	450- 550	9				**9**
	OP-O15	750					
	OP-O16	350- 500					
	OP-C13	900- 1000					
	OP-D11	500- 450					
المجموع			21			5	**26**

المناقشة

إن الاعتماد على الصفات المظهرية (المورفولوجية) والفيزيولوجية للتمييز بين الطرز الوراثية له العديد من السلبيات، وذلك بسبب تأثر هذه الصفات بالظروف البيئية المحيطة ومراحل نمو النبات، فضلاً عن الزمن اللازم لإنجاز هذا العمل (Tanksley *et al*., 1989). لذا تستخدم المعلمات (المؤشرات) الجزيئية لهذا الغرض حيث إن المادة الوراثية أكثر ثباتاً فضلاً عن أن معظم مناطق التعددية للـ DNA تعدُّ مفيدة كمعلمات وراثية (Al-Said, 2001). وعموماً تعدُّ دراسة التنوع الوراثي والعلاقة بين الطرز المختلفة متطلباً أساسياً لحفظ الأصول الوراثية. ونجد أن معلمات الـDNA تسمح لنا بإيجاد التنوع في المعلومات الوراثية التي تحملها الطرز المختلفة، وتعطي معلومات موثوقاً بها تفيد في برامج التربية لنقل الصفات المرغوب فيها من الطراز البري إلى الطرز المزروعة (Ratnaparkhe *et al*., 1995)، وكذلك لتخفيض عدد المدخلات المتكررة في بنك الجينات (Virk *et al*., 1995).

من خلال هذا البحث طُبقت تقانة الـ RAPD من المعلمات (المؤشرات) الجزيئية للتمييز بين طرز مختلفة من نوع الزعتر *Thymus serpyllum*. ومن المعروف أن تقانة الـ RAPD تعتمد على موقع ارتباط المرئسات العشوائية على الجينوم (Powell *et al*., 1996).

وتعدُّ التقانات المعتمدة على التفاعل السلسلي للبوليميراز من التقانات المتميزة بسهولتها وقدرتها على التمييز بين المدخلات بشكل جيد مقارنة بالتقانات الأخرى. حيث تبين نتيجة إجراء دراسة عن التحليل الوراثي لعشرة طرز من البازلاء باستخدام تقانة RFLP و3 تقانات تعتمد على التفاعل السلسلي للبوليميراز هي RAPD ISSR، AFLP أن نتائج التقانات المعتمدة على التفاعل السلسلي للبوليميراز كانت أفضل وأقوى في الكشف عن التباين الوراثي من تقانة RFLP ضمن الطرز المدروسة (Lu *et al*.,1996). وهذا يتفق مع ماتوصل إليه Ibtisam عام 1997 الذي درس التنوع الوراثي لنباتات المريمية *Salvia fructicosa* التابعة للفصيلة الشفوية Labiateae والمجموعة من مناطق مختارة من جزيرة كريت باستخدام تقانة RAPD، وقد لوحظ أن 9 مرئسات أعطت 135 عصابة أحادية الشكل مع تباين وراثي عال، تراوحت بين 250 1458 زوج من القواعد. وقد بينت النتائج أن تقانة RAPD هي تقانة سريعة ودقيقة لتحديد الطرز الوراثية للنوع S.*fructicosa*. كذلك استطاعت هذه التقانة أن تميز نباتات الأوريغانوم *Origanum magorana* L. بعد إجراء بعض التعديلات على ظروف التفاعل السلسلي للبوليميراز (PCR) (Klocke *et al*., 2002).

وقد استخدم Talhinhas وزملاؤه عام 2003 معلمات AFLP ISSR RAPD لمعرفة التنوع الوراثي بين أنواع Lupinus وأظهرت هذه التقانات تشابهاً وراثياً كبيراً بين عدد من الأنواع. وذكر Belaj وزملاؤه عام 2004 أن تقانة RAPD تعدُّ طريقة سهلة ورخيصة وتعطي نتائج واقعية لحصر الأعداد الكبيرة من المصادر الوراثية للزيتون، ويفضل أن تتبع بتقانات وراثية كـ AFLP وISSR للحصول على بيانات أدق ولتخفيض الأعداد المدروسة من العينات.

ففي حالة النوع المدروس *T.serpyllum* وجد أن تقانة الـ RAPD أعطت نسبة من التعددية الشكلية (90.91). وكان متوسط عدد وحدات التضاعف 7.33. ووجد أيضا أن متوسط عددها للتعددية الشكلية كان 6.67. وقد أمكن تمييز37 وحدة تضاعفية فريدة مع 10 طرز مدروسة، منهم 8 حزم سالبة و29 حزمة موجبة مع تقانة الـ RAPD بواسطة 17 مرئسة عشوائية مختلفة.

وقد توافق ذلك مع ما ذكره Choudhury وآخرون عام 2001 حيث ذكروا أن تقانة الـ RAPD تعطي تعددية شكلية عالية مقارنةً بالتقانات الأخرى مع نباتات الرز. وقد أمكن تمييز 54 وحدة تضاعفية فريدة مع الـ 9 طرز المدروسة في تقانة الـ RAPD منهم 6 حزم سالبة و48 حزمة موجبة.

وقد استخدم Vieira وزملاؤه عام 2003 المؤشرات الجزئية لدراسة التنوع الوراثي في جنس Basil (*Ocimum spp.*L.) التابع للفصيلة الشفوية Lamiaceae باستخدام تقانة RAPD وقد أعطت المرئسات العشوائية المستخدمة (وعددها 11) 98 حزمة متعددة الشكل، تراوح حجمها بين 300 2000 زوج من القواعد، بين 8 أجناس من Ocimum. وقد أظهرت الدراسة إمكانية التصنيف إلى أنواع وتحت أنواع باستخدام هذه التقانة.

أما بالنسبة للموقع الجغرافي فقد أمكن ربط الطرز المأخوذة من الموقع الجغرافي نفسه ببعض الحزم المشتركة بها (الجدول 6)، ففي الطرز المأخوذة من حمص (1 و2 و3) استطاعت 6 مرئسات في تقانة RAPD أن تعطي 6 وحدات تضاعف مشتركة في هذا الموقع الجغرافي (Amer 4, Amer 6,OP-D11, OP-N11, OP-N12, OP-O1) تراوح حجمها بين 900-500 زوج من القواعد مع المرئسات، وقد استطاعت المرئسات OP-D15 OP-F12 OP-N3 أن تميز طرز حماة (4،5) بواسطة 3 وحدات تضاعف مشتركة تراوح حجمها بين 550 -850 زوجاً من القواعد. في حين استطاعت المرئسات OP-C12, OP-O15, OP-O16, OP-C13, OP-D11 أن تميز طرز المنطقة الساحلية لكل من اللاذقية (11 و12 و13 و14) وطرطوس (8 و9) بتسع وحدات تضاعف مشتركة لهذه المنطقة تراوح حجمها بين 350 -1000 زوج من القواعد. هذا فضلاً عن أن طرز اللاذقية فقط تميزت بـ 8 وحدات تضاعف مشتركة (3 وحدات

موجبة و6 وحدات سالبة) مع المرئسات OP-O15, OP-N7, OP-R19,OP- D11 تراوح حجمها بين 600 1600 زوج من القواعد. وقد ذكر Russel وزملاؤه عام 1993 في دراسة على الكاكاو لتحديد الاختلافات الوراثية بين 25 عينة وضمنها تمثل ثلاث مناطق جغرافية مختلفة أن التباين الوراثي بين العينات المدروسة اعتماداً على تقانة RAPD كان متوافقاً مع التباين الجغرافي والبيئي للمناطق التي جمعت منها العينات، فضلاً عن ذلك فقد كان معدل التباين ضمن العشائر أعلى من معدله بينها. وهذا يثبت كفاءة تقانة RAPD في كشف التباين الوراثي وتوزعه عبر العشائر والمناطق الجغرافية وفائدتها في تسهيل إنشاء البنوك الوراثية عن طريق إعطاء معلومات موثوق بها تفيد في تخفيض عدد المدخلات المتكررة ضمن البنوك الوراثية فضلاً عن إعطائها تحديداً دقيقاً للتنوع الوراثي الموجود في بنوك المورثات.

وفي الاتجاه نفسه درس Menkir وزملاؤه عام 1997 التباين الوراثي لخمسة أصناف مزروعة من الذرة البيضاء تضم كل منها 38 عينة باستعمال تقانة RAPD وأظهرت الدراسة وجود توافق بين العينات والأصل الجغرافي لها فوجدوا أن 13% من التباين الوراثي يمكن أن يعزى إلى الاختلافات الجغرافية. واستطاعت هذه التقانة تحديد الهوية الوراثية للأصناف المدروسة فضلاً عن تحديد المناطق الجغرافية التي تضم أعلى قدر من التباين الوراثي. ومن هنا نستنتج أهمية هذه التقانة في تحديد التباين الوراثي وفائدة ذلك في اختيار الطرز والتراكيب الوراثية المتباينة لإدخالها في برامج التربية المختلفة. وقد توافقت هذه النتائج مع ماذكره Gallois وزملاؤه عام 1998 عند استخدام تقانة الـ RAPD لدراسة وتقويم العلاقات الوراثية للأنواع المنتمية لفصيلة Fagaceae وبالاعتماد على نتائج RAPD والتحليل العنقودي للبيانات أمكن تجميع الأفراد المدروسة تبعا للتوزع الجغرافي لها وذكروا أن النباتات المجموعة من مكان واحد كانت أقرب وراثياً لبعضها من العشائر التي تنتمي لأماكن متباعدة. وقد توافقت النتائج مع الدراسة التي أجراها Mir Ali and Nabulsi عام 2003 للكشف عن درجة القراية الوراثية بين الأصناف ضمن بعض الأنواع الشجرية في سورية باستخدام تقانة الـ RAPD، حيث أمكن تجميع بعض الأصناف في مجاميع تبعاً للتوزع الجغرافي.

كما تمييز النوع *T. serpyllum* المدروس بوجود وحدة تضاعف واحدة مميزة للنوع مع المرئسة OP-F1 في تقانة الـ RAPD عند وزن جزيئي 1400 زوج من القواعد.

وقد توافقت هذه النتائج مع ما قام به Gorge وزملاؤه عام 2003 حيث استخدم تقانة RAPD لتقدير التشابه الوراثي بين طرز من الشاي البرتغالي واختبر 118 مرئسة، استطاعت 25 مرئسة منها أن تعطي حزماً متعددة الشكل وتكرارية أعطت بيانات جديدة. وقد أظهرت النتائج تنوعاً وراثياً واضحاً. ومن خلال تحليل UPGMA أمكن بواسطته تميز العينات عن بعضها. واستطاعت تقانة RAPD تمييز أنواع الشاي، وضمن كل نوع

أعطت تحت أنواع قسمت تبعاً للموقع الجغرافي وبذلك يظهر أن تحليل RAPD يعدُّ طريقة جيدة لتقدير التنوع الوراثي بين نباتات الشاي ولتفريق المدخلات تبعاً للموقع الجغرافي. وكذلك تمكن M-Ribu and Hiluعام 1994 من دراسة التباين الوراثي بين الأنواع وضمنها لنبات Panicum millet حيث استطاعت تقانة الـ RAPD التمييز بين الأنواع، ورغم أن كل نوع كان يتألف من عدد قليل من المدخلات وأن كمية المادة المدروسة كانت قليلة إلا أن هذه التقانة استطاعت إعطاء هوية خاصة بكل نوع وجعلت من الممكن التمييز بين هذه الأنواع وطرزها.

وفي دراسة أجراها Shasany وزملاؤه عام 2002 حول التنوع الوراثي لنبات النعناع .*Mentha spicata* L التابع للفصيلة الشفوية باستخدام تقانة RAPD. استخدم فيها 15عينة من البنك الجيني الوطني في المعهد المركزي للنباتات الطبية العطرية (CIMAP) في لكنو - الهند أجري فيها التحليل على المستوى الوراثي باستخدام مرئسات عشوائية في طريقة PCR وبعد إجراء تحليل UPGMA ودراسة الارتباط الجيني والاختلافات الشكلية بين الحزم تبين أن تقانة RAPD كانت مؤشراً جيداً للتمييز بين المدخلات باختلاف المناطق الجغرافية.

الاستنتاجات و المقترحات

أظهرت نتائج هذه الدراسة مقدرة تقانة الـ RAPD على الكشف عن العلاقات الوراثية بين طرز الزعتر المدروسة، كما استطاعت أن تميز بين الطرز المدروسة بواسطة حزمة أو عدة حزم خاصة بها على نحو جيد، وعلى تحديد درجة القرابة بينها، فضلاً عن قدرتها على إيجاد العلاقة بين نواتج التضخيم والموقع الجغرافي للطرز المدروسة، حيث ظهر جلياً أن طرز المنطقة الواحدة تجمعت مع بعضها بعضاً بشكل مستقل.

تكتسب نتائج هذه الدراسة أهمية كبيرة في مجال التنوع الحيوي في القطر الذي يعوزه استخدام التقانات على المستوى الجزيئي. ونوصي بالاستفادة من هذه التقانات في توصيف الأصناف والأنواع والطرز عامة، والأنواع الطبية البرية المهمة خاصة كنبات اكليل الجبل والنعناع ودراسة علاقات القربى فيما بينها، على أن تجرى أمثلة الاستخلاص وبرمجة التفاعل بما يتناسب مع كل نوع.

REFERENCES

Al-Said, M. (2001). Genetic studies on Egyptian cotton using molecular markers. M. Sc. thesis in Science, Cairo University, Egypt. pp130.

Belaj, A.; Satovic, Z.; Rolo, I. and Trujillo, I. (2004). Optional use of RAPD markers to identifying varieties in olive (*Olea europea* L.) germplasm collections. J. American Society for Hort. Sci. 129: 266-270.

Bluementhal, M. (2000). The complete German commission E Monographs. Austin, Texas: American Botanical Council.

British Herbal pharmacopoeia. (1983). Keighley: Bristish Herbal medicine Association.

British pharmacopoeia. (2001). London: The Stationery Office.

Chevallier, A. (1996). The Encyclopedia of Medicinal plants. Dorling Kindersley Limited. London.

Choudhury, H.; Revert, A.; Lalusin, G. and Pank, E. (2001). Genetic analysis of rice using RAPD markers. Breeding Sci. 54(3): 195 – 201. Tokyo, Japan.

European pharmacopoeia. (2002). Strasbourg: Council of Europe.

Evan, W. (2001). Trease and Evans´ Pharmacognosy. W B Saunders Company Ltd. U.K. 498-488.

Gallois, A.; Audran, J. C. and Burrus, M. (1998). Assessment of genetic relationships and population discrimination among *Fagus sylvatica* L. by RAPD. Theoretical and Applied Genetics. 97(1–2): 211–219.

Gorge, S.; Pedroso, M. C. and Brown, G. (2003). Genetic differentiation of Portuguees tea plant using RAPD markers. Hort. Sci. 38(6): 1191 – 1197. Alexandria, USA.

Ibtisam, H. (1997). Evaluation of the genetic diversity in *Salvia fruticosa* selected clones from Greek, using RAPD markers. Chania (Greece), 113p.

klocke, E.; Langbehn, J.; Grewe, C.; Pank, F. and Franz, C. (2002). DNA fingerprinting by RAPD on *Origanum majorana* L.. Breeding research on aromatic and medicinal plants. part 1. Selected paper from the Second International Conference on Breeding Research on Medicinal and Aromatic Plants, Chania, Crete. J. Herbs -Spices and Medicinal Plants. :9 - 3,171- 2 176.

Lu, J. H.; Knox, M. R.; Ambrose, M. J.; Brown, J. K. and Ellis, T. N. (1996). Comparative analysis of genetic diversity in pea assessed by RFLP and PCR based methods. Theoretical and Applied Genetics. 93(7): 1103-1111.

Menkir, A.; Goldsbrough, P. and Ejeta, G. (1997). RAPD based assessment of genetic diversity in cultivated races of Sorghum. Crop Sci. 37: 564 – 569.

Mir Ali, N. and Nabulsi, I. (2003). Genetic diversity of Syrian pistachio cultivars using RAPD technique. Advances in Hort. Sci. 17: 215-222.

M-Ribu, H. K. and Hilu, K. W. (1994). Detection of interspecific and intraspecific variation in panicum millets through random amplified polymorphic DNA. Theoretical and Applied Genetics. 88(3-4): 412 – 416.

Powell, W.; Morgante, M.; Andre, C.; Hanafey, M.; Vogel, J.; Tingey, S. and Rafalski, A. (1996). The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. Mol. Breed. 2: 225-228.

Ratnaparkhe, M. B.; Gupta, V.; Ven-Murthy, M. R. and Ranjekar, P. K. (1995). Genetic fingerprinting of Pigeonpea (*Cajanus cajan* L. Mill) and its wild relatives using RAPD markers. Theoretical and Applied Genetics, 91: 893 – 898.

Russell, J. R.; Hosein, F.; Johnson, E.; Waugh, R. and Powell, W. (1993). Genetic differentiation of Cocoa (*Theobroma cacao* L.) populations revealed by RAPD analysis. Molecular Ecology. 2:89-97.

Shasany, A. k.; Alka, S.; Bahl, J. R.; Sharma, S.; Sushil, K.; Khanuja, S. and Kumar, S. (2002). Genetic diversity assessment of *Mentha spicata* L. germplasm through RAPD analysis. Plant Genetic Resources Newsletter. 5- 130,1.

StatSoft. (2003). Statistica (data analysis software system), version 6. on line: www. statsoft. com.

Suman, P. S.; Shasany, A. K.; Darokar, M.P. and Kumar, S. (1999). Rapid isolation of DNA from dry and fresh samples of plants producing large amounts of secondary metabolites and essential oils. Plant Molecular Biology Reporter. 17: 1-7.India.

Talhinhas, P.; News-Martins, J. and Leitao, J. (2003). AFLP, ISSR and RAPD markers reveal high levels of genetic diversity among *Lupinus spp*. Plant Breeding 122(4): 507-510. Berlin, Germany.

Tanksley, S. D.; Young, N. D.; Paterson, A. H. and Bonierbale, M. W.(1989). RFLP mapping in plant breeding, new tools for an old science. BioTechnology. 7: 257-264.

Tyler, V.E.(1994). Herbs of Choice: The therapeutic use of phytomedicinals. New York: pharmaceutical products press.

Vieira, R. F.; Goldsbrough, P. and Simon, J. E. (2003). Genetic diversity of Basil (*Ocimum* spp.) based on RAPD markers. J. American Soc. Horti. Sci. 128(1): 99- 94.

Virk, P. S.; Ford-Lloyd, B. V.; Jackson, M. T. and Newbury, H. J. (1995). Use of RAPD for the study of diversity within plant germplasm collections. Heredity, 74: 170-179.

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

Received	**2006/03/29**	**إيداع البحث**
Accepted for Publ.	**2006/05/25**	**قبول البحث للنشر**

كلمة شكر

نتقدم بالشكر الجزيل لهيئة الطاقة الذرية السورية على مساهمتها الكبيرة في إنجاز هذا البحث.