مجلة جامعة دمشق للعلوم الزراعية ــ (2014) المجلد (30) ــ العدد 4 ــ الصفحات: 213-226

التوصيف الجزيئي لطرز من العدريش (Syrian juniper) *Juniperus drupacea* Labill. في سورية باستخدام مؤشرات الـــ ISSR

جلال أحمد فندي[1] و وسيم الحكيم[2]
ومحمد عصام حسن آغا[1]

المُلَخَّص

جُمعَت 7 عينات نباتية من عدة مواقع لانتشار نبات العدريش *Juniperus drupacea* Labill. في سوريةَ بهدف توصيفها جزيئياً وتحديد درجة القرابة الوراثية فيما بينها، باستخدام تقنية ISSR (Inter Simple Sequence Repeats). وقد استخدم لهذا الغرض 23 بادئةً، أظهرت 12 بادئةً منها قدرتها على كشف تباينات واختلافات بين العينات المدروسة، ونتج عن استخدامها 89 حزمة. وبلغت نسبة هذه التعددية 95.5%، وتراوح عدد الحزم المكاثرة لكل بادئة بين 4 أربع حزم مع البادئتين (ISSR5, ISSR9) و12 حزمة مع البادئة (ISSR1) بمتوسط قدره 7.42 حزمةً/بادئة. وكانت النسبة المئوية للتعددية الشكلية الأقل مع البادئة (ISSR9) بمقدار 25% والأكبر مع كل البادئات باستثناء (ISSR9) بمقدار100%. وبينت الدراسة ارتباط العينات المتقاربة وراثياً بالمناطق التي جمعت منها (الموقع الجغرافي)، فقد كانت أعلى درجة قرابة وراثية (93%) بين عينات اللاذقية (قمة النبي يونس) و(جوبة برغال)، وأقل درجة قرابة وراثية (42%) بين عينات حماه (جب الأحمر) واللاذقية (المقامات). وهذا يدل على وجود بعد وراثي عالٍ بينها. كما أن التحليل العنقودي فرز العينات التي جمعت من مناطق متقاربة جغرافياُ.

الكلمات المفتاحية: العدريش، *Juniperus drupacea* Labill.، توصيف جزيئي، قرابة وراثية، ISSR، سورية.

[1] قسم العقاقير والنباتات الطبية، كلية الصيدلة، جامعة دمشق، سورية.
[2] قسم الموارد الطبيعية المتجددة والبيئة، كلية الزراعة، جامعة دمشق، سورية.

Molecular Characterization of *Juniperus drupacea* Labill. (Syrian juniper) population in Syria Using ISSR Technique

Fandi, J. A. [(1)], W. Alhakim[(2)] and M. I. Hasan Agha[(1)]

Abstract

Seven plant samples were collected from some locations of Syrian juniper (*Juniperus drupacea* Labill.) in Syria for molecular characterization and to determine the genetic relationships between them using ISSR technique (Inter Simple Sequence Repeats). Twenty three ISSR primers were used for this purpose, twelve primers showed polymorphism between studied samples and gave 89 bands, with polymorphism percentage of 95.5%. The band number resulted from each primer ranged between 4 bands for primers ISSR5 and ISSR9, and 12 bands for the primer ISSR1, with an average of 7.42 bands per primer. The minimum polymorphic percentage was 25% for primer ISSR9, and the maximum polymorphic percentage was 100% for the all primers except the primer ISSR9. The study showed correlation between the genetically converged samples and the collection sites (geographic correlation), the highest genetic relationship (93%) was within Latakia samples (Komat Alnabi Yonis – Jobet Bergal) and the lowest genetic relationship (42%) was between samples from Hamah (Jeb Alahmer) and Latakia (Almakamat) which refers to high genetic variation. The cluster analysis showed that the samples from nearby locations were gathered.

Keywords: *Juniperus drupacea*, Labill., Molecular characterization, Genetic relationship, ISSR, Syria.

[(1)]Dept. Pharmacognozy and Medical Plants, Faculty of Pharmacy, Damascus University, Syria.

[(2)]Dept. Natural Renewable Resources and Ecology, Faculty of Agriculture, Damascus University, Syria

المقدمة

أورد شاهرلي والأوبري (2004) أن امتياز سورية بتباينات جغرافية وبيئية انعكس بوضوح على مستوى تعدد الأنظمة البيئية وما تحويه من غطاء نباتي غني بمحتواه النوعي والوراثي (تحت أنواع، سلالات وطرز وراثية)، إذ يُعدّ التباين الوراثي ضمن النوع النباتي جزءاً هاماً من التنوع الحيوي، وغالباً ما تتميز الأنواع الوراثية النباتية المحلية بغناها الوراثي الكبير وبقدرتها عموماً على تحمل الاجهادات الإحيائية واللاإحيائية. وعلى الرغم من أهمية دراسة الصفات الشكلية المظهرية والخصائص الفيزيولوجية المظهرية الزراعية لأي نوع نباتي، أصبحت الدراسة على المستوى الجزيئي للمادة الوراثية DNA للنوع هامة وضرورية لأسباب عدة أهمها أن الواسمات الجزيئية Molecular markers تتميز بأنها أكثر دقةً وثباتاً لأنها تعتمد على دراسة جزيئة الـDNA التي تحمل كافة المعلومات الوراثية، والتي لا تتأثر بالشكل الظاهري للنباتات ولا بالعوامل البيئية نظراً لعدم وجود أي علاقة بين الأطوار الفينولوجية للنبات والمؤشرات الجزيئية بالإضافة إلى إمكانية استخلاص المادة الوراثية من الحمض الريبي النووي (DNA) من المراحل العمرية الأولى للنبات.

وأشار Nagaraju وزملاؤه (2002) وBornet وزملاؤه (2002) إلى أن تقنية (Inter Simple Sequence Repeats-ISSR) واحدةً من التقنيات الهامة التي تعتمد على تفاعل البلمرة المتسلسل (Polymerase Chain Reaction-PCR)، وهي من التقنيات الجيدة لأنها تُضخم المواقع (100-3000bp) بين التوابع الدقيقة والمتوضعة بشكل متعاكس باستخدام بادئات وحيدة طولها (16-18bp) ومؤلفة من نكليوتيدات متكررة، ومحاطة في أغلب الأحيان بـ2-4 نكليوتيدات، إما في المنطقة 5َ أو 3َ، فتقنية ISSR تُوصف بأنها أكثر تكرارية من تقنية RAPD بسبب طول البادئ المستخدم، الذي يعكس درجة حرارة عالية لمرحلة التحام البادئ (Chowdhury وزملاؤه، 2002)، كما أنها تعطي نتائج ثابتة ولو نُفذت في مكررات أو في أماكن متعددة وسريعة، وتتطلب كميةً قليلةً من الحمض النووي DNA. ويمكن نشر البادئات وتبادلها بسهولة بين المخابر بمجرد معرفة التسلسل النيكليوتيدي لها. إضافة إلى أنها تكشف نسباً عاليةً من التعددية الشكلية Polymorphism.

كما أشار Mouterde (1966) وKaraca (1994) إلى أن العدريش *Juniperus* sp. ينتمي إلى جنس العرعر *J. drupacea* Labill. التابع للفصيلة السروية Cupressaceae. ويضم هذا الجنس أكثر من 40 نوعاً موزعة كلها في نصف الكرة الشمالي. إلا أن الانتشار العالمي للعدريش محدود ويتركز في جنوب شرق أوروبا وشرق المتوسط، فهو ينتشر فقط في اليونان، وجبال تركيا، وأكراداغ، والأمانوس. ويوجد

العدريش في سورية في بعض المناطق مثل صلنفة، وجوبة برغال والأقرع. وقد أشار نحال (2002) إلى أنه يوجد بصفته عنصراً جبلياً مرافقاً لغابات الشوح والأرز والعزر، مشكلاً غطاءً أرضياً متفرقاً في أعالي سلسلة الجبال الساحلية، فهو يوجد على ارتفاع 1000م، وفوق في المناطق الجبلية الرطبة الباردة، ونموه بطئ جداً. وهو يوصف بأنه مقاوم (متحمل) للبرد متأقلم مع بيئة أعالي الجبال. ويعدُّ نبات العدريش من الأنواع الشجرية ذات القيمة الاقتصادية الواعدة (طبية، بيئية)، فقد وجد El-Ghorab وزملاؤه (2008) لدى دراستهم لثمار العدريش *J. Drupecea* تأثيراً واضحاً لها بوصفها مضادة للأكسدة. ويمكن استخدام هذه الثمار كمصدر طبيعي لمضادات الأكسدة عن طريق إضافته للأغذية والمشروبات. كما وجدوا تمتع مستخلصات هذه الثمار بتأثير مضاد (مثبط) للكثير من أنواع الميكروبات. وأشار النوري وزملاؤه (2009) إلى أن مستخلص ثمار العدريش مقو ومطهر قوي للجهاز البولي، كما يستخدم داخلياً وخارجياً في علاج التهاب المفاصل المزمن والنقرس والحالات الروماتيزمية. وقد أوضح أبو زيد (1986) أن الزيت العطري الناتج من الأوراق الإبرية والقمم الطرفية والثمار يستخدم في العطور ومستحضرات التجميل الجافة والسائلة، ويستعمل كذلك كمكسبات للرائحة والطعم لبعض الصناعات الغذائية. وله صفات دوائية باعتباره مطهراً خارجياً لعلاج الجروح المتقيحة. وهو يفيد في علاج بعض الأمراض الجلدية مثل مرض الأكزيما، والصدفية عند استعماله خارجياً.

وبالرغم من هذه الأهمية الاقتصادية والاهتمام العالمي بهذا الجنس، مازال مهملاً محلياً، ويتعرض للعديد من الإجهادات البيئية والبشرية. وقد أجري عالمياً العديد من الدراسات الوراثية على عدة أنواع من جنس العرعر؛ فقد وجد Adams و Demek (1993) لدى دراستهم لأربعة وأربعين نوعاً من جنس العرعر المنتشرة في الولايات المتحدة الأمريكية إمكانية تمييز ثلاثة أقسام في الجنس اعتماداً على القرابة الوراثية، ووجود تباينات وراثية أفضت إلى فرز ضروب وراثية متميزة بقدرتها على تحمل بعض الإجهادات البيئية كان أهمها الجفاف. وقد أوصى الباحثون في دراستهم بالعمل مباشرة على إكثار هذه الضروب الوراثية المتميزة بغية الحفاظ على هذه المصادر الوراثية الهامة. وتجدر الإشارة إلى ندرة الأبحاث الوراثية عالمياً ومحلياً على نبات العدريش بالتحديد، ودراستنا هذه هي الدراسة الوراثية الأولى في سورية لنبات العدريش، وهي تسهم في التوصيف الجزيئي لجزء من الطرز الوراثية للعدريش المنتشرة في سورية تمهيداً لاستكمالها على كامل مواقع انتشار النوع، بهدف حفظ التنوع الحيوي الوراثي لهذا النوع في سورية، ولاسيما أنه محدود الانتشار ويتعرض لتدهور شديد.

هدف البحث

التوصيف الجزيئي لسبع طرز من نبات العدريش *Juniperus drupacea* Labill. لتحديد بصمتها الوراثية و درجة القرابة الوراثية فيما بينها باستخدام مؤشرات ISSR.

مواد البحث وطرائقه

1- المادة النباتية ومكان وزمان تنفيذ البحث:

جمعت 7 عينات من أوراق نبات العدريش .*J. drupacea* Labill من سبعة أشـــجار في مواقع انتشاره في سورية في محافظتي اللاذقية وحماه في بداية شهر آذار عام 2012 (الجدول1 والشكل1)، على ارتفاعات متباينة تراوحت بين (690 و1471م) عن ســـطح البحر. وتجدر الإشارة إلى أن عينات عين الكروم وأبو قبيس هي أشجار وحيدة تنمو بعيداً عن تجمعات العدريش.

ونُفذ البحث في مخبر التقانات الحيوية في كلية الزراعة بجامعة دمشق خـــلال العـــام 2013/2012.

الجدول(1)العينات النباتية المدروسة من العدريش.*J.drupacea* Labill وأماكن جمعها وإحداثياتها.

العينة	المحافظة	خط الطول	خط العرض	الارتفاع (م)
1	حماه (عين الكروم)	3522366	3614661	690
2	حماه (جب الأحمر)	3538326	3613426	870
3	حماه (أبو قبيس)	3515888	3613397	1166
4	اللاذقية (المقامات)	3525928	3612083	1410
5	اللاذقية (جب الغار)	3539287	3614353	1256
6	اللاذقية (قمة النبي يونس)	3538485	3612984	1471
7	اللاذقية (جوبة برغال)	3530164	3611761	1253

الشكل (1) خارطة انتشار مواقع جمع العينات

2- طرق العمل:

استخلاص الحمض الريبي النووي DNA بطريقة SDS:

استُخلص الحمض النووي DNA وفق طريقة Maniatis وزملائه (1982) المعدلة من قبل لاوند (2002)، عبر طحن 1غرام من الأوراق الخضراء المجمدة بالآزوت السائل للحصول على مسحوق ناعم، نُقل بعدها إلى حوجلة زجاجية سعة 50ml وأضيف إليها 10ml من محلول الاستخلاص SDS المكون من: 2% SDS, 0.1M NaCl, 50mM EDTA, pH=8.2, 0.1M Tris-HCl) 1mg/ml proteinase K) حُضنت العينات ضمن حمام مائي عند 37ْس مدة 60 دقيقةً مع التحريك المستمر. وأُضيف 10ml من مزيج كل من كلوروفورم/ كحول أيزواميل بنسبة (1:24) وُترك 10 دقائق على الطاولة المتحركة لمزج المكونات وتسهيل الاستخلاص. نُقل المزيج إلى أنبوب تثفيل سعة 30ml وثُفل المزيج (عملية الطرد المركزي) لمدة 10 دقائق بسرعة (10000 rpm). بعد نهاية التثفيل نقل الوسط المائي لأنبوب جديد و أُضيف إليه الإيزوبروبانول Iso-propanol بمعدل 3/2 من حجم الوسط المائي لترسيب الأحماض النووية، ثم نُقل الحمض النووي (DNA) المترسب إلى أنبوب صغير سعة 2ml وأُضيف إليه 0.5ml من محلول الغسيل Washing buffer (كحول إيتيلي 76%) البارد (المحفوظ بدرجة –20°س)، ثمَّ التثفيل بسرعة (10000 rpm) لمدة 10 دقائق وبدرجة حرارة 4°س. استبعد الكحول وجففت العينات هوائياً ثم أُذيبت عينات الحمض النووي (DNA) في 500µl من المحلول المنظم TE المكون من (10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA). تمَّ التخلص من الحمض النووي RNA بإضافة 2µl من إنزيم RNase (10 mg/ml) والتحضين على درجة (37ْس) مدة نصف ساعة، ثم أعيد ترسيبه بالكحول الايتيلي وتجفيفه واذابته والحصول على تركيز (40ng/µl). واستُخدم جهاز Power WaweXTM (BIO-TEK Instruments, Inc.) لتقدير كمية الحمض النووي DNA وتحديد نقاوته.

3- تحليل العينات ببادئات ISSR:

استُخدم في الدراسة 23 بادئةً تمَّ الحصول عليها من الهيئة العامة للطاقة الذرية في سورية، ويوضح الجدول 2 التسلسل النيكليوتيدي ودرجة حرارة الالتحام للبادئات المستخدمة في الدراسة.

أُجري تفاعل البلمرة المتسلسل PCR وفقاً لـ (Adams وزملائه، 2003) مع بعض التعديلات فكان حجم التفاعل النهائي (25 µl) باستخدام 2X Master mix الذي حصل عليه من شركة (Fermentas, Germany): يتكون التفاعل من 2µl من البادئة بتركيز (10mM)، 12.5µlمنMaster mix، 9µl ماء مقطر وكمية الـDNA (1.5 µl) بتركيز 40ng/µl، ويتم هذا التفاعل في جهاز التدوير الحراري وفقاً للظروف التالية:

1- الانفصال: عند درجة حرارة 94 ْس مدة 5 دقائق ليتم انفصال سلسلتي الحمض النووي DNA.

2- 40 دورة تتضمن كل منها المراحل التالية:

الانفصال: يتم عند حرارة 94 ْس مدة 30 ثانية.

الالتحام: حسب درجة حرارة الالتحام لكل بادئة من الجدول (2) مدة دقيقة واحدة.

الاستطالة: عند حرارة 72 ْس مدة دقيقة.

3- اكتمال الاستطالة عند درجة حرارة 72 ْس مدة عشر دقائق.

ثم تحفظ العينات في درجة حرارة 4 ْس، وبعد ذلك كان الترحيل على هلامة الآجاروز، فقد أجري الرحلان الكهربائي على هلامة أغاروز 2% للتأكد من نجاح عملية التضخيم وصورة الهلامة بعد إضافة إيتديوم بروماید (50mg/ml).

الجدول (2) التسلسل النيكليوتيدي للبادئات المختبرة في تقنية ISSR (Adams, 2003).

البادئة	التسلسل النيكليوتيدي 3' - 5'	درجة حرارة الالتحام
$ISSR_1$	GAGAGAGAGAGAGAGAGC	52 °س
$ISSR_2$	CACACACACACACACAG	52 °س
$ISSR_3$	GAGAGAGAGAGAGAGACG	56 °س
$ISSR_4$	ACACACACACACACACGG	56 °س
$ISSR_5$	GTGTGTGTGAGAGAGAGA	54 °س
$ISSR_6$	ACACACACACACACATATAT	54 °س
$ISSR_7$	ACACACACACACACACT	50 °س
$ISSR_8$	KKVRVRVTGTGTGTGTGTG	50 °س
$ISSR_9$	CACACACACACACACAA	50 °س
$ISSR_{10}$	GAGAGAGAGAGAGAGAGAGA	58 °س
$ISSR_{11}$	AGGAGGAGGAGGAGG	58 °س
$ISSR_{12}$	CACACACACACACACACACACA	56 °س
$ISSR_{13}$	GAGAGAGAGAGAGAGATC	52 °س
$ISSR_{14}$	ACCACCACCACCACC	50 °س
$ISSR_{15}$	CTCTCTCTCTCTCTCTTG	54 °س
$ISSR_{16}$	CTCTCTCTCTCTCTCTGC	56 °س
$ISSR_{17}$	GTGGTGGTGGTGGTGGTGG	54 °س
$ISSR_{18}$	AGAGAGAGAGAGAGAGTG	56 °س
$ISSR_{19}$	ACACACACACACACACC	54 °س
$ISSR_{20}$	ACGACGACGACGACGG	54 °س
$ISSR_{21}$	GAGAGAGAGAGAGAGAGAG	54 °س
$ISSR_{22}$	GAGGAGGAGGAGGAGGC	58 °س
$ISSR_{23}$	AGAGAGAGAGAGAGAGT	58 °س

ملاحظة: حيث أن: K= G أوT،R = G أو A، V= G أو A أو C

4 - التحليل الإحصائي:

بوبت نتائج عملية الرحلان الكهربائي في جداول اعتماداً على وجود أو غياب حزم الحمض النووي DNA في العينات المدروسة؛ فالرقم (1) يدل على وجود حزمة الحمض النووي DNA الواضحة فقط والرقم (0) يدل على عدم وجود الحزمة. وقد نُظمت الجداول لكل بادئة على حدة ورُسمت شجرة القرابة الوراثية Dendrogram بتطبيق UPGMA Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averaging باستخدام برنامج Pop gene 1.31الإحصائي. حسبت نسب التباينات لكل بادئة (Yeh، 1999).

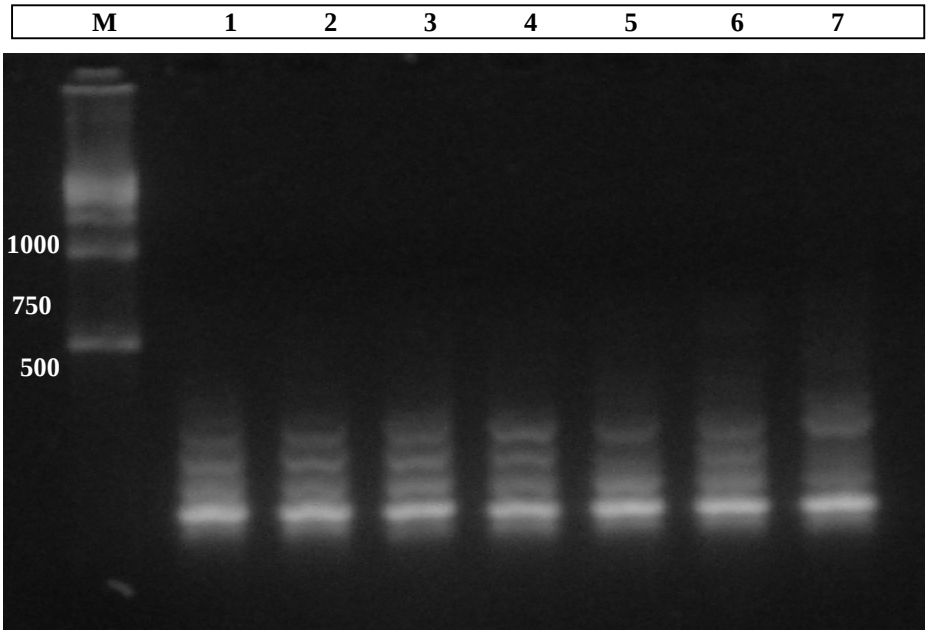
النتائج والمناقشة

التعددية الشكلية polymorphism:

تضمنت الدراسة تحليل العينات النباتية المستخدمة بهذه الدراسة باستخدام 23 بادئة (الجدول3). أظهرت النتائج أن 12 بادئةً من البادئات المستخدمة أعطت (حزماً) من الـ DNA في تفاعل البلمرة المتسلسل، في حين لم تعط بقية البادئات المدروسة حزماً من الـ DNA، وأثبتت هذه البادئات الـ 12 كفاءتها في كشف تباينات بين العينات المدروسة ونجم عن استخدامها ما مجموعه 89 حزمة؛ إذ أعطت هذه البادئات تعدديةً شكليةً Polymorphic، وبلغت نسبة التعددية 95.5%، كما تراوح عدد الحزم لكل بادئة بين أربع حزم وهو أقل عدد مع البادئة (ISSR5,ISSR9) و12 حزمة بوصفه أعلى عدد مع البادئة (ISSR1)، بمتوسط 7.42 حزمةً لكل بادئة، وكانت النسبة المئوية للتعددية الشكلية الأقل مع البادئة (ISSR5) بمقدار 25% والأكبر مع كل البادئات باستثناء (ISSR9) بمقدار100% الجدول (3) الشكل(2).

الجدول (3) رموز البادئات المستخدمة، وعدد الحزم الكلية والمتباينة شكلياً، والنسبة المئوية للتعددية الشكلية % في العينات الوراثية المدروسة.

البادئة	عدد الحزم الكلية	عدد الحزم المتباينة شكلياً	النسبة المئوية للتعددية الشكلية %
$ISSR_1$	12	12	%100
$ISSR_2$	6	6	%100
$ISSR_3$	6	6	%100
$ISSR_4$	10	10	%100
$ISSR_5$	4	1	%25
$ISSR_6$	6	6	%100
$ISSR_7$	9	9	%100
$ISSR_8$	8	8	%100
$ISSR_9$	4	3	%75
$ISSR_{10}$	8	8	%100
$ISSR_{11}$	6	6	%100
$ISSR_{12}$	10	10	%100
المجموع	89	85	%95.5
المتوسط	7.42	7.08	



الشكل (2) تحليل عينات الـ DNA للعينات المدروسة من العدريش باستخدام البادئة (ISSR-5) وتحليل منتجات التفاعل على هلامة 2% من الآجاروز، M. ويمثل المؤشر الجزيئي لتحديد الأوزان وأحجام حزم الحمض النووي DNA.

الجدول (4) عدد الحزم الكلية للطرز المدروسة وفق البادئات المستخدمة.

البادئة / الطراز	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	المجموع	المتوسط
1	5	0	0	4	0	3	1	3	2	5	4	2	29	2.4
2	3	3	1	6	1	2	1	2	2	6	4	6	37	3.1
3	0	1	1	1	2	2	2	1	2	6	4	1	23	1.9
4	0	0	0	0	4	0	0	0	1	1	0	0	6	0.5
5	0	0	0	4	0	0	0	5	2	0	0	5	16	1.3
6	3	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	5	0.4
7	1	0	0	0	0	0	0	1	2	0	3	0	7	0.6
المجموع													123	

بلغ عدد الحزم الكلية للطرز المدروسة 123 حزمة، وأعطى الطراز 2 أعلى عدد للحزم الكلية وبلغ 37 حزمة مع البادئات المستخدمة، في حين أعطى الطراز 6 أقل عدد للحزم الكلية وبلغ 5 حزم فقط مع البادئات المستخدمة ذاتها (الجدول 4).

تحديد درجة القرابة الوراثية بين العينات المدروسة:

إن تحديد درجة القرابة الوراثية ضمن النوع تفيد في بيان مدى امتلاك النوع لقاعدة وراثية واسعة، فقد درست العلاقة الوراثية بين الطرز الوراثية المدروسة بتطبيق مصفوفة النسب المئوية لعدم التوافق Percent Disagreement Values (PDV)، إذ إن ارتفاع قيم هذه المصفوفة يدل على وجود اختلاف وراثي، وبازديادها يزداد التباين الوراثي بين الطرازين المدروسين ويكون إنشاء هذه المصفوفة وفقاً لعدد وحدات التضاعف المشتركة بينها.

نلاحظ من خلال الجدول 5 أن أقل قيمة لـ PDV هي 0.07 بين الطرازين {اللاذقية (قمة النبي يونس)- اللاذقية (جوبة برغال)} وهذا يدل على أنهما على درجة كبيرة من القرابة الوراثية، في حين كانت أعلى قيمة لها 0.58 بين الطرازين {حماه (جب الغار)- اللاذقية (المقامات)}، وهذا يدل على وجود تباين وراثي كبير بينها، ويُرَجَّح أن ذلك يعود إلى اختلاف البيئة (الموقع الجغرافي) (الجدول1، الشكل1).

الجدول (5) مصفوفة النسب المئوية لعدم التوافق (PDV) بين العينات المدروسة والناتجة عن تطبيق متوسطات المجموعات الزوجية غير المزانة UPGMA بتطبيق تقنية ISSR حسب Nei (1987)

	حماه (عين الكروم)	اللاذقية (المقامات)	حماه (أبو قبيس)	اللاذقية (جب الغار)	حماه (جب الأحمر)	اللاذقية (قمة النبي يونس)	اللاذقية (جوبة برغال)
حماه (عين الكروم)	0						
اللاذقية (المقامات)	0.35	0					
حماه (أبو قبيس)	0.31	0.38	0				
اللاذقية (جب الغار)	0.43	0.54	0.27	0			
حماه (جب الأحمر)	0.43	**0.58**	0.4	0.25	0		
اللاذقية (قمة النبي يونس)	0.35	0.52	0.31	0.11	0.21	0	
اللاذقية (جوبة برغال)	0.35	0.45	0.25	0.13	0.21	**0.07**	0

يسمح التحليل العنقودي بتقسيم العينات الوراثية المدروسة إلى مجموعات. وتعكس هذه المجموعات درجة القرابة الوراثية فيما بينها. وقد تتجمع العينات ضمن مجموعة واحدة بناءاً على موطنها الأصلي أو على أصلها ونسبها. لقد أجري التحليل العنقودي للنتائج

التي تمّ حصل عليها، لإنشاء شجرة القرابة الوراثية Dendrogram من أجل تحديد درجة القرابة الوراثية، كما هو موضح في الشكل (3).

الشكل (3) شجرة القرابة الوراثية بين العينات النباتية المدروسة

نلاحظ أن شجرة القرابة الوراثية قد انقسمت نحو الأدنى إلى عنقودين رئيسين ضم الأول (عين الكروم، المقامات)، فقد بلغت المسافة الوراثية بينهما 17.3، في حين انقسم العنقود الثاني إلى مجموعتين رئيسيتين ضمت الأولى (أبو قبيس)، إذ انعزل بشكل منفرد ضمن هذه المجموعة بمسافة وراثية بلغت 15.4 عن باقي الطرز المدروسة، في حين انقسمت المجموعة الثانية نحو الأدنى إلى مجموعتين ضمت الأولى (جب الغار، وقمة النبي يونس، وجوبة برغال) حيث كان (قمة النبي يونس، وجوبة برغال) الأقرب وراثياً ضمن هذه المجموعة بمسافة وراثية 3.9، في حين ضمت تحت المجموعة الثانية (جب الأحمر) بمسافة وراثية 11.3.

وبهذا يتوصل البحث إلى تمييز عدة طرز وراثية من عينات العدريش المدروسة باستخدام تقنية الـ ISSR كما وجد Adams وزملاؤه (2003).

الاستنتاجات والمقترحات

1- أظهرت تقنية ISSR فعاليةً في التمييز بين العينات الوراثية المدروسة، لأنها كشفت نسباً عاليةً من التباينات Polymorphism.

2- فصلت العينات المدروسة في شجرة القرابة الوراثية حسب بيئاتها (الموقع الجغرافي). وهذا يمكن أن يساعد في تحديد هوية طرز وراثية وتعريفها حسب بيئة المناطق التي تنمو فيها هذه الطرز.

3- يمكن العمل مستقبلاً على تحديد الصفات الكمية المسؤولة عن الطرز الوراثية للظروف البيئية المختلفة ومقارنتها مع الطرز القريبة منها وراثياً والنامية في بيئات متباينة نسبياً عن تلك الأولى، إذ يساعد ذلك في إكثار الطرز المتحملة والاستفادة منها بإدخالها إلى بيئات أخرى، مثل تحمل الإجهادات الإحيائية واللا أحيائية مثل عينة أبو قبيس أو عينات عين الكروم وجب الأحمر.

المراجع References

أبو زيد، الشحات نصر. 1986. النباتات والأعشاب الطبية، دار البحار القاهرة مكتبة مدبولي، بيروت، 496 ص.

شاهرلي، مخلص، وخالد الأوبري. 2004. حفظ المصادر الوراثية للأنواع النباتية في سورية، مشروع الحفظ والاستخدام المستدام للتنوع الحيوي الزراعي في المناطق الجافة GEF، الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية، وزارة الزراعة والإصلاح الزراعي.

لاوند، سلام. 2002. الهندسة الوراثية عند نبات الأرابيدوبسيس في نهاية النفس: وظيفة جديدة ضرورية بعد الإنبات ومشابهة لنواقل الأستيل كارنيتين، أطروحة دكتوراه، جامعة جوزيف فوريير، كرونوبل الأولى، فرنسا، الصفحة: 96.

نحال، إبراهيم. 2002. علم البيئة الحراجية، منشورات جامعة حلب، 576 صفحة.

النوري، أحمد سمير، ومحمد عصام حسن آغا. 2009. علم العقاقير وكيمياء العقاقير(1)، منشورات جامعة دمشق، 320صفحة .

Adams, R. and T. Demeke. 1993. Systematic relationships in *Juniperus* based on DNAs (RAPDs). Taxon, 42(3): 553-571.

Adams, R., A. Schwarzbach and R. Pandey. 2003. The concordance of terpenoid, ISSR and RAPD markers and ITS sequence data sets among genotypes: an example from Juniperus, Biochemical Systematics and Ecology, 31: 375–387.

Bornet, B., F. Goraguer, G. Joly and M. Branchard. 2002. Genetic diversity in European and Argentinian cultivated potatoes (*Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum*) detected by inter-simple sequence repeats (ISSRs), Genome, 45: 481-484.

Chowdhury, M., B.Vandenberg and T.Warkentin. 2002. Cultivar identification and genetic relationship among selected breeding lines and cultivars in chickpea (Cicer arietinum L.), Euphytica, 127: 317–325.

El-Ghorab, A., A. Shaaban, K. El-Massry and T. Shibamoto. 2008. Chemical composition of volatile extract and biological activities of volatile and less-volatile extracts of Juniper berry (*Juniperus drupacea* L.) fruit, J. Agric Food Chem., 56(13): 5021–5025.

Karaca, H. 1994. Monumental trees of Turkey: 6. *Juniperus drupacea*. Karaca Arboretum Magazine, 2(3): 135-136.

Maniatis, T., E. Fritsch and J. Sambrook. 1982. Molecular cloning a laboratory manual, Cold Spring Horbor laboratory, pp:89.

Mouterde, p. 1986. Nouvelle flore du Liban et de la Syria, Tomes I. Dar el-Machreq, Beyrouth, Liban. PP:19.

Nagaraju, J., M. Kathirvel, R. Kumar, E. A. Siddiq and S. E. Hasnain. 2002. Genetic analysis of traditional and evolved Basmati and non-Basmati rice varieties by using fluorescence-based ISSR-PCR and SSR markers, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 99: 5836-5841.

Nei, M. 1987. Molecular evolutionary genetics. Columbia University Press, New York, NY, PP:39.

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

Yeh, F. and R. Yang. 1999. Popgene version 1.31 microsoft window based freeware for population genetic analysis quick user guide, University of Alberta And Tim Boyle, Centre for International Forestry Research. pp:28.

Received	**2013/08/29**	**إيداع البحث**
Accepted for Publ.	**2014/02/11**	**قبول البحث للنشر**