مجلة جامعة دمشق للعلوم الزراعية
المجلد 39 العدد 4 (2023): 1-14

Damascus University Journal of Agricultural Sciences
Vol. 39 No.4 (2023): 1- 14

تحديد درجة القرابة الوراثية للطرز البرية لنبات عرق السوس (*Glycyrrhiza glabra*) في أهم مناطق انتشاره في سورية

أمجد فرح[1]، د. راما عزيز[2]، د. أسامة العبد الله[3]

[1] طالب دكتوراه، قسم علوم البستنة، جامعة دمشق، كلية الزراعة، سورية.

[2] أستاذ مساعد، قسم علوم البستنة، جامعة دمشق، كلية الزراعة، سورية.

[3] باحث، إدارة بحوث البستنة، الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية، دمشق، سورية.

الملخص:

نفذ البحث في الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية/ قسم التقانات الحيوية التابع خلال عام 2020 لدراسة القرابة الوراثية للطرز البرية للعرقسوس المنتشرة في مواقع مختلفة في سورية (حلب/الدادات)، (ريف دمشق/قرحتا، النشابية)، (اللاذقية/ بوقا، سنجوان)، (القنيطرة/نبع الفوار)، وتم استخدام تقنية التكررات الترادفية البسيطة الداخلية (ISSR)، استخدم 12 بادىء، 9منها أعطت منتجات التضخيم تم الاعتماد عليها في البحث، بلغ عدد الحزم الكلية الناتجة عن تضخيم DNA للعينات المدروسة 70 حزمة، تشابهت 42 منها في جميع العينات في حين تباينت الحزم الباقية وعددها 28 حزمة، وبالتالي بلغ متوسط نسبة التعددية الشكلية Polymorphism 45.55%، فصل التحليل العنقودي Dendrogram الطرز المدروسة إلى عنقودين رئيسيين، انقسم العنقود الأول بدوره الى تحت عنقودين: ضم تحت العنقود الأول الطراز (Q1 و Q2) قرحتا/ريف دمشق، بينما انقسم تحت العنقود الثاني الى مجموعتين، ضمت المجموعة الأولى اربعة طرز ولوحظ تطابق الطرازين (N1 و N2) نشابية/ريف دمشق والطرازين (H1 و H2) نبع الفوار/القنيطرة بينما ضمت المجموعة الثانية الطرازين المتطابقين (L1 و L2) بوقا/اللاذقية، أما العنقود الثاني فقد انقسم بدوره إلى تحت عنقودين، ضم تحت العنقود الأول الطرازين (C1 و C2) سنجوان/اللاذقية، بينما ضم تحت العنقود الثاني الطرازين (G1 و G2) الدادت/حلب. ولوحظ من خلال شجرة القرابة الوراثية التقارب الكبير بين الطرز المدروسة وعدم وجود اختلافات وراثية كبيرة بينها.

الكلمات المفتاحية: العرقسوس، درجة القرابة الوراثية، التكررات الترادفية البسيطة الداخلية.

تاريخ الايداع: 2022/4/11
تاريخ القبول: 2022/6/5

حقوق النشر: جامعة دمشق –سورية، يحتفظ المؤلفون بحقوق النشر بموجب الترخيص CC BY-NC-SA 04

Determining the genetic degree of wild types of Licorice (*Glycyrrhiza glabra*) plants in the most important areas in Syria.

Amgad Farah[1], Dr. Rama Aziz[2], Dr.Osama ALAbdullah[3]
[1]PhD student, Hort. Dep., Fac. Agri., Damascus Univ., Syria.
[2] Professor, Hort. Dep., Fac. Agri., Damascus Univ., Syria.
[3] Researcher, Horticultural Research Department, General Commission for Scientific Agricultural Research, Damascus, Syria.

Abstract:

The research was carried out in the General commission for Scientific Agricultural Research/Department of Biotechnology during the year 2020 to study the genetic diversity of wild licorice cultivars spread in different locations in Syria (Aleppo/Al-Dadat), (Rural Damascus/Qarahta, Al-Nashabiya), (Lattakia/Bouka, Sangwan), (Quenitera/Nabe Al- Fawar), and the technique of Inter Simple Sequence Repeats (ISSR) was used, 12 primers were used, 9 of them showed activity in presenting polymorphism. The total number of bandes resulting from DNA amplification of the study samples was 70 bundes, common bandes numbers was 42 was, Polymorphic bandes number 28, and the average percentage of polymorphism was 45.55%, Dendrogram separated the studied into two main clusters, the first cluster was in turn divided into two clusters: under the first cluster (Q1 and Q2) in Qarahta/Damascus Sub Rub, while under the second cluster was divided into two groups, the first group included four models and it was noted that the two models were identical (N1 and N2) Al-Nashabiya/Rural Damascus and the two types (H1 and H2) Nabe` Al-Fawar/Quenitera, while the second group included the two identical types(L1 and L2) Bouka/Lattakia. As for the second cluster, it was divided into two clusters, under the first cluster included the two types (C1 and C2) Sangwan/Latakia, while under the second cluster it included the two types (G1 and G2) Al-Dadet/Aleppo. It was noted through the genetic tree that there is a great convergence between the studied phenotypes and the absence of significant genetic variation between them.

Keywords: Glycyrrhiza Glabra, Genetic Diversity, Inter Simple Sequence Repeats (ISSR).

Received:11/4/2022
Accepted: 5/6/2022

Copyright: Damascus University- Syria, The authors retain the copyright under a CC BY- NC-SA

المقدمة:

يعد نبات العرقسوس *Glycyrrhiza glabra* معمر تتغلغل جذوره في الأرض، يسمى نبات العرقسوس بتسميات عديدة منها Liquorice و Licorice.

كلمة Glycyrrhiza مشتقة من كلمة إغريقية قديمة بمصطلح glykes وتعني الحلو و Rhiza تعني الجذر، فيصبح الجذر الحلو في اللغة العربية، أما في اللغات الأخرى فيعني الخشب الحلو (Nixon و Wang، 2011،8) جنس (Glycyrrhiza) معروف باستخداماته الطبية في العديد من دول العالم.

وقد صنفه (Parle وزملاؤه، 2004، 158) إلى:

المملكة: النباتية، الرتبة: البقولية Fables، الفصيلة: البقولية Fabaceae

الجنس: Glycyrrhiza، الاسم العلمي: *Glycyrrhiza glabra*

يعد حوض البحر المتوسط الموطن الأصلي لهذا النبات، في سورية ولبنان والأردن وفلسطين وتركيا، كما ينمو برياً في قارة أوروبا في الجزء الجنوبي الممتد من اليونان وحتى إسبانيا، وفي وسط آسيا وجنوبها (Vispute و Khopada، 2011، 45).

نبات العرقسوس معمر يتراوح ارتفاع مجموعه الخضري من (50-120 سم)، أوراقه مركبة ريشية متبادلة معنقة وذات وريقات بيضوية كاملة الحواف ويتراوح عددها بين (4-7) أزواج، لونها أخضر باهت.

تحمل الأوراق في آباطها عناقيد زهرية وردية إلى مزرقة اللون، وأحياناً قد تكون الأزهار بيضاء مشوبة باللون البنفسجي، الأزهار كبيرة الحجم نوعاً ما طولها 1سم، متجمعة في صورة عنقودية مكونة من 3-8 زهرات، ويتم الإزهار من شهر آيار وحتى حزيران، ويبلغ عدد الصبغيات في النبات 16=2n صبغي (Shirazi وزملاؤه، 2012، 4641).

ذكر (Mouterd، 1983) وجود الأنواع التالية المنتشرة في سورية:

G.glabra, G.echinata, G.asprrima, G.glandulifera,G.flavescens

يستخدم النبات بوصفه مضاداً للأكسدة لوجود العديد من الفلافونات والصابونين والقلويدات ويتميز النبات بأنه مضاد للفيروسات حيث يعمل على منع الانقسام الخلوي وفي معالجة فيروس الحمى الصفراء (Sheth، 2005، 566).

ويتميز العرق السوس بأنه مضاد للإلتهاب وبفعاليته في علاج التهاب الرئة وهو مقشع ومضاد للسعال والتهابات الحلق والقرحة المعدية ويستخدم في أدوية الربو والأمراض الجلدية والتهابات القصبات واليرقان (Khare، 2004، 233).

يعد توظيف المؤشرات الجزيئية في توصيف النباتات على مستوى الDNA أداة فعالة خاصة أنها لاتتأثر بالظروف الخارجية أو المحيطة، وتظهر تباينات يمكن أن تفيد في رسم الخرائط الوراثية وتميز الأفراد عن بعضها البعض، وتحديد درجات القرابة الوراثية والتباينات الوراثية الأمر الذي يمكن أن يوظف في برامج التحسين الوراثي (Powell وزملاؤه، 1992، 795).

أوضح Ramsay وزملاؤه (2000) أن استخدام التقانات الجزيئية، يمكن أن يقلل من تعقيدات إدخال عدد من الصفات المرغوب فيها في النمط الوراثي الواحد، كذلك يمكن استخدام المؤشرات الجزيئية بشكل فعال في تحاليل

التنوع الوراثي وتقدير التشابه الوراثي، وقد أدت التطورات الأخيرة في البيولوجيا الجزيئية إلى زيادة في غلة المحاصيل ذات الأهمية الاقتصادية.

وتستخدم لذلك العديد من الطرائق الجزيئية، منها تقنيات معتمدة على تفاعل البلمرة المتسلسل Polymerase (PCR) Chain Reaction، مثل تقنية التعددية الشكلية لـ DNA المضخم عشوائياً Random Amplified (RAPD) Williams Polymorphic DNA وزملاؤه، 1990، 6533) والتكرارات البسيطة الترادفية Simple Sequence Repeats (SSR) (Tautz، 1989، 6465) والتكرارات البسيطة الترادفية الداخلية Inter Simple Sequence Repeats (ISSR) (Zietkiewicz وزملاؤه، 1994، 178).

تعد تقنية التكرارت الترادفية البسيطة الداخلية (Inter Simple Sequence Repeats- SSR) واحدة من التقانات الهامة المعتمدة على التفاعل التسلسلي البوليميرازي للأسباب التالية:

– تضخم منطقة التكرارت الترادفية البسيطة وتستخدم بادىء وحيد ومؤلف من نكليوتيدات متكررة ومحاط في بعض الأحيان بـ2–4 نيكليوتيدات إما في المنطقة '3 أو'5.

– توصف تقنية ISSR بأنها أكثر تكرارية من تقنية RAPD بسبب طول البادىء المستخدم والذي يعكس درجة حرارة عالية لمرحلة تشفع البادئات، إمكانية الكشف عن التتاليات النيكليوتيدية ذات السيادة في التوريث (Chowdhury وزملاؤه، 2002، 318).

– أضف إلى أن نتائجها ثابتة عند تكرارها وهي سريعة كما أنها تتطلب كمية قليلة من DNA، ويمكن أتمتتهاautomation ويمكن نشر البادئات وتبادلها بسهولة بين المخابر بمجرد معرفة التسلسل النيكليوتيدي لها، وتكشف نسب عالية من التعددية الشكلية polymorphism.

القدرة على التضخيم عالية إلى متوسطة، والتكاليف منخفضة كما أن جهد تنفيذها منخفض (Van der Nest *et al*., 2000)، كما استخدمت تقانة الـISSR في الدراسات الوراثية للعديد من الأنواع النباتية كونها فعالة في كشف المستويات المنخفضة جداً من التباينات الوراثية.

استخدم Mehrotra وزملاؤه (2012، 265) تقنية (ISSR) لتوصيف نبات العرقسوس جزيئياً، وتم تضخيم 14 بادئة باستخدام تقنية التكررات الترادفية البسيطة الداخلية (ISSR)، 8 بادئات أعطت تضاعف وكان عدد الحزم الكلية المتضاعفة 37 وعدد الحزم المتباينة 5 ونسبة التعددية الشكلية 16.13% وأظهر التحليل العنقودي لكل من تقانتي ISSR وRAPD أن جميع النباتات التي تم اختبارها للنوع *G.glabra* موزعة في مجموعتين رئيستين مع معامل تشابه يتراوح من 0.91–0.96 من RAPD و0.89–0.97 من ISSR.

بينما أشار Altay وزملاؤه (2016، 1026) عند دراسة ثلاثة أنواع مختلفة من العرقسوس spp *G.flavescen* و*G.echinata* و*G.glabra* var glandulifera التي جمعت من مناطق مختلفة من تركيا، واستخدام 14 بادىء بتقنية التكررات الترادفية البسيطة الداخلية (ISSR)، كانت 8 بادئات قابلة للتضخيم وعدد الحزم المتباينة 393 كما بين أن النوع spp *G.flavescen* متقارب وراثياً مع النوعيين الباقيين.

وأشار Yao وزملاؤه (2008، 118) عند دراسة التنوع الوراثي لأربع مواقع وهي(SH-BL-EJ-BY) تم جمعها من مناطق مختلفة بالصين للنوع *G.uralensis* باستخدام تقنية التكررات الترادفية البسيطة الداخلية ISSR تم تضخيم

(20) بادئة، 14 بادئة أعطت تضاعف وكان عدد الحزم الناتجة عن التضاعف 279 وعدد الحزم المتباينة 249 بمتوسط (19.3-17.8) وحجم الحمض النووي تراوح مابين (100-2500 pb) ونسبة التعددية الشكلية 92.2% وبين التحليل العنقودي أنها مقسمة لثلاث مجموعات وأن الموقعين (BY-BL) متقاربين وراثيين مع بعضهما بينما الموقع (SH) مختلف وراثياً عن باقي المواقع.

بينما بين ABD El-humed وزملاؤه (2018، 413) عند دراسة التوصيف الجزيئي للعرقسوس في مصر باستخدام 10 بادئات بتقنية ISSR، 3 بادئات أعطت تضخيم، حيث بلغ عدد الحزم المتشابهة 21، بينما عدد الحزم المتباينة 2.

مبررات البحث:

يعد نبات العرقسوس (*Glycyyrhiza glabra*) من النباتات ذات القيمة الطبية والاقتصادية المهمة في سورية، ويمثل التنوع الحيوي النباتي في العديد من الدول مصدر ثروة كبيرة لا تقل أهمية عن الموارد المادية والتراث الثقافي، تعد التباينات الشكلية من المعايير الأولى التي استخدمت في عملية التوصيف والتصنيف ودراسة التباينات بين وضمن الأنواع المختلفة، إلا أن الاعتماد على الصفات الشكلية لدراسة النوع النباتي غير كافٍ، وبشكل خاص عند وجود تقارب كبير بين النباتات المدروسة. كما أن طرائق التوصيف الشكلي تحتاج إلى وقت طويل، وتتأثر بالظروف البيئية مما يؤدي إلى عدم ثبات القراءات لذلك يجب دعمها بالطرائق الحديثة التي تعتمد على التوصيف الجزيئي.

ونظراً لندرة الدراسات المحلية التي تناولت نبات العرقسوس المنتشر برياً في سورية، كان لابد من اجراء هذه الدراسة لمعرفة الأنواع والطرز المنتشرة في سورية وتوصيفها وتوثيقها جزيئياً لمعرفة درجة القرابة الوراثية بينها.

حيث تم دراسة التنوع المورفولوجي للطرز المدروسة بين المواقع المدروسة حيث لوحظ وجود اختلافات مورفولوجية من حيث ارتفاع النبات وعدد الأوراق وعدد الوريقات وطول الوريقات وشكل الورقة وعدد العناقيد الزهرية وطول العناقيد الزهرية وعدد القرون على النبات وعدد البذور في القرون.

أهداف البحث:

1) تحديد درجة القرابة الوراثية بين الطرز البرية المدروسة باستخدام التحليل العنقودي Cluster Analysis.

1-مواد وطرائق البحث:

1-1-مكان تنفيذ البحث: نفذ البحث في قسم التقانات الحيوية التابع للهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية.

1-2-المادة النباتية: جمعت عينات نبات العرقسوس البري من مواقع مختلفة في سورية.

الجدول (1): مواقع عينات نبات العرقسوس.

المحافظة	الموقع	رمز العينات	الارتفاع عن سطح البحر م	خط الطول E	خط العرض N	الطابق البيومناخي
ريف دمشق	النشابية	N1, N2	660	36º28'59	33º30'35"	جاف معتدل
	قرحتا	Q1, Q2	630	36º26'51	33º34'35"	جاف معتدل
اللاذقية	بوقا	L1, L2	850	35º32'	35º48'	رطب حار
	سنجوان	C1, C2	800	35º47'	35º31'	رطب حار
حلب	الدادات	G1, G2	379	37º36'	36º14'	شبه جاف حار
القنيطرة	نبع الفوار	H1, H2	1010	35º49'	33º07'	شبه رطب بارد جدا

حيث أخذت عينات أوراق نبات العرقسوس الفتية والسليمة بشهر حزيران من المواقع المختلفة وحفظت في المجمدة على درجة حرارة (−40مº) لحين البدء بالتوصيف الجزيئي.

3-1- التوصيف الجزيئي Molecular Characterization :

3-1-1-استخلاص DNA DNA Extraction :

عزل DNA من أوراق العرقسوس الفتية بطريقة CTAB المعدلة (Murray وThompson، 1980، 4322).

- تم وزن 200 ملغ من الأوراق النباتية لكل عينة وطحنت بوجود الآزوت السائل.
- نقل المسحوق النباتي إلى أنابيب معقمة سعة 2 مل، ثم أضيف لكل عينة 750 µl من محلول الاستخلاص CTAB والمسخن مسبقا على درجة حرارة 60 م° والذي يحتوي على:

0.2 % ، 20 mM EDTA (pH8) ، 1.4 M NaCl، 100 mM Tris-HCl (pH 8)، (2% (w/v) CTAB .%1 PVP ، 2-mercaptoethanol (v/v)

- حضنت الأنابيب في حمام مائي لمدة 60 دقيقة على درجة حرارة 60 م° مع التحريك المستمر بالتقليب كل 15دقيقة، ثم وضعت الأنابيب على الثلج لمدة 5 دقائق.
- أضيف 750 µl من chloroform/ isoamyl alchohol (24:1) لكل عينة وحركت جيداً بالتقليب حوالي 5دقائق.
- وضعت الأنابيب في جهاز الطرد المركزي على سرعة 12000 دورة/ د مدة 10 دقائق على درجة حرارة 4 م°، حيث تم في هذه المرحلة فصل المزيج إلى ثلاث طبقات: الطبقة العليا (الطور المائي) ويحوي .DNA، الطبقة الوسطى وتحوي البروتينات والطبقة السفلى تحوي الكلوروفورم.
- نقل بعدها الطور الطافي (المحتوي على DNA) إلى أنابيب جديدة سعة 2 مل، وأعيدت تنقيته مرة أخرى بكمية مماثلة لحجم الطور المائي من مادة chloroform/ isoamyl alchohol (24:1).
- أضيف ما يعادل ثلثي حجم الطور المائي المنقول من isopropanol المبرد على حرارة −20 م° مع التحريك الخفيف، وتركت العينات بعدها على درجة حرارة −20 م° طوال الليل من أجل ترسيب DNA.
- ثم تم التثفيل بسرعة 10000 دورة/د مدة 5 دقائق على درجة حرارة 4 مْ، وتم التخلص من الرشاحة وغسل الراسب (DNA) بإضافة 1 مل من إيثانول 70% المبرد مسبقاً بالتقليب عدة مرات.

- ثفلت الأنابيب بعد ذلك على سرعة 10000 دورة/د مدة 5 دقائق على درجة حرارة 4 مْ، واستبعد الطافي (الإيثانول) واعيد غسل DNA بالإيثانول مرة ثانية ثم جفف راسب DNA في درجة حرارة الغرفة مدة 30 دقيقة، ثم أذيب DNA في (100 µl) من TE، وخزنت العينات على درجة حرارة −20 م° لحين الاستخدام.

3-2-تقدير كمية DNA ونوعيته:

استخدم لتقدير كمية DNA في العينات جهاز المطياف الضوئي نوع LTD PG INSTRUMENTS ، موديل +T85. كما حُملت كمية قليلة من DNA في هلامة من الأغاروز تركيزها 1% لتحديد نوعية DNA المستخلصة للتأكد من عدم تقطعها، تم توحيد تركيز عينات DNA للحصول على تركيز (50 نانوغرام /ميكرولتر) لتستخدم في التفاعل التسلسلي البوليميرازي.

3-3-التفاعل التسلسلي البوليميرازي Polymerase Chain Reaction:

تم تضخيم DNA باستخدام 12 بادئات للتكرارات التتابعية البسيطة الداخلية ISSR التي تمّ الحصول عليها من شركة Alpha DNA، أعطت 9 بادئات تضخيم بينما لم تعط البادئات الثلاث الباقية أي تضخيم.

الجدول (2): التسلسل النيكلوتيدي ودرجة حرارة الالتحام للبادئات المستخدمة في تضخيم DNA طرز العرقسوس.

رمز البادئ	الاسم	التسلسل النيكليوتيدي للبادئات	درجة حرارة الالتحام(م °)
P1	Oligo 1	(GA)8T	50
P2	Oligo 2	(TC)8C	52
P3	Oligo 3	(AC)8C	52
P4	Oligo 4	(CT)7CCT	52
P8	Oligo 8	(CA)8AG	54
P9	Oligo 9	(GT)8TC	54
P10	Oligo 10	(AG)8GC	56
P11	Oligo 11	(GA)8TC	54
P12	Oligo 12	(TG)8A	50

استخدم 2X PCR Master Mix intron solution والحاوي على المكونات التالية:

(Taq-Polymeras، dNTPs، $MgCl_2$).

أجري تفاعل البلمرة المتسلسل PCR وفقاً لـ(Williams وآخرون، 1990، 6533) فكان حجم التفاعل النهائي (20 ul).

مكونات الـ PCR	الكميات
2 X PCR Master Mix intron	10 µl
DNA	100 ng
Primer (10 µl mol)	2 µl
ماء مقطر معقم	حتى الوصول الى حجم تفاعل 20 µl

استخدام جهاز التدوير الحراري (Hangzhou Bioer Technology ، موديل Tc-96/(G) H) وفق المراحل التالية:

- فصل سلسلتي DNA(Denaturation) : عند درجة حرارة 94 مْ مدة 4 دقائق.
- 35 دورة تتضمن كل منها المراحل التالية:
- مرحلة الفصل Denaturation: انفصال شريطي DNA عن بعضهما بعد تعريضه لدرجة حرارة 94 مْ مدة 20 ثانية.
- مرحلة الالتحام Annealing: بحسب الجدول الخاص بالبادئات مدة 10 ثانية.
- مرحلة الاستطالة Extension: عند درجة الحرارة 72 مْ مدة 20 ثانية.
- اكتمال التفاعل عند درجة حرارة 72 مْ لمدة 5 دقائق.

وتم فصل نواتج عمليات التضخيم في جهاز الرحلان الكهربائي على هلامة من الأغاروز ذات تركيز 1.5% والمضاف إليها 10% من صبغة Red gel، بمحلول المنظم (1 X TBE)

(XTBE buffer= 108 g Tris Boric + 55 g Boric acid + 9.2 EDTA ,pH 8)

كما تم حقن مؤشر من الدنا 1Kp من (DNA Marker intron) وذلك لتحديد أطوال الحزم الناتجة، وتم الترحيل بمرور حقل كهربائي قدره 100 فولط لفصل حزم الدنا الناتجة عن التضخيم، وصورت الهلامة بوجود الأشعة فوق البنفسجية UV- Light بجهاز تصوير هلامة الأغاروز Clear view من شركة Cleaver.

1-4-تصميم التجربة والتحليل الإحصائي:

حدد حجم حزم DNA الناتجة عن التضخيم باستخدام برنامج TotalLab (TotalLab 1D version 14.1) ثم تم تقدير عدد الحزم (الكلية، المتباينة، المتشابهة)، وتحويل المعطيات إلى النظام الثنائي (1 للحزمة الموجودة و0 للحزمة الغائبة). ثم حُدِّدت درجة القرابة الوراثية، ورُسمت شجرة القرابة الوراثية Dendrogram بين الطرز المدروسة بتطبيق طريقة التحليل العنقودي Cluster analysis، باستخدام برنامج xcel state إذ يسمح التحليل العنقودي بتقسيم الطرز المدروسة إلى مجموعات تعكس درجة القرابة الوراثية فيما بينها، وشُكِّلت مصفوفة النسب المئوية لعدم التوافق Percent Disagreement Values (PDV) اعتماداً على معامل Jaccard (Weir,1996)، وقد تمَّ إنشاء هذه المصفوفة وفقاً لعدد وحدات التضاعف المشتركة بتطبيق متوسطات المجموعات الزوجية غير المزانة Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averaging (UPGMA) حسب (Sneath و Sokal، 1973)، يدل ارتفاع قيم هذه المصفوفة على وجود اختلاف وراثي، وبازديادها يزداد التباين الوراثي بين العينات المدروسة (Nei، 1973، 3322).

وحُسبت قيم معامل التعددية الشكلية PolimorpHism Information Content (PIC) للبادئات المستخدمة وفق المعادلة: $PIC = \{\Sigma\ 2Pi\ (1-Pi)\}$، حيث Pi تكرارية الحزم i^{th} الناتجة عن استخدام البادئ من جميع العينات المدروسة (Botstein وزملاؤه، 1980، 320).

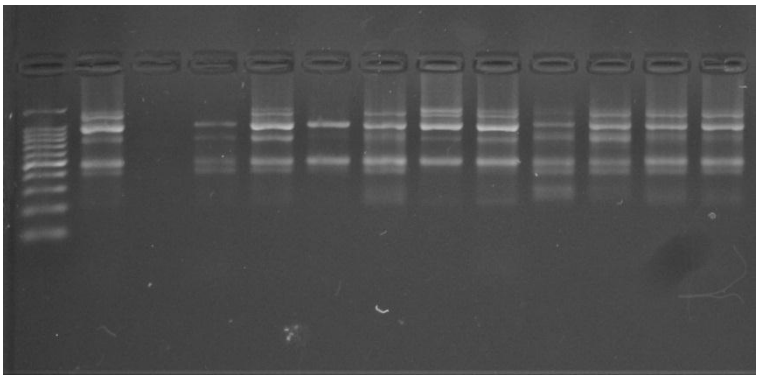
2-النتائج والمناقشة:

2-1-التعددية الشكلية للطرز المدروسة:

استخدم 12 بادئ ISSR لتضخيم DNA طرز العرقسوس المدروسة، أعطت 9 بادئات منها منتجات تضخيم وبالتالي اعتمدت في دراستنا.

بلغ عدد الحزم الكلية الناتجة عن تضخيم DNA للعينات المدروسة 70 حزمة، تشابهت 42 منها في جميع العينات في حين تباينت الحزم الباقية وعددها 28 حزمة، وبالتالي بلغ متوسط نسبة التعددية الشكلية Polymorphism 45.55%.

تراوح عدد الحزم الكلية لكل بادئ بين 5 و12 حزمة وبمتوسط 8.28 حزمة، أعطت البادئات P3 وP9 أعلى عدد للحزم الكلية (12 و10 على التوالي). في حين أعطى البادئ P12 أقل عدد من الحزم الكلية (4 حزمة). أما بالنسبة لعدد الحزم المتباينة فقد تراوح بين صفر و10 حزمة، وقد أعطى P3 أكبر عدد من الحزم المتباينة (10) حزمة بتعددية شكلية 83.33% وكذلك أعطى كل من P2عدد من الحزم المتباينة (5) حزمة بتعددية شكلية 62.5%، بينما لم يعط P4 و12 P أي حزم متباينة بتعددية شكلية 0%.



الشكل (1): صورة لهلامة الأغاروز لنواتج تحليل PCR.

تخالفت نتائج دراستنا مع (Houshang وزملاؤه، 2016، 24) في شرقي ايران لدراسة التباين الوراثي بأربع مواقع مختلفة باستخدام تقنية التكررات الترادفية البسيطة الداخلية (ISSR) بخمس بادئات، اثنتين من البادئات مشابهة للبادئات المستخدمة في هذا البحث، تم الحصول على 139 حزمة متباينة، وتراوحت قيمة التنوع الوراثي مابين (0.301- 0.172).

كما تخالفت نتائجنا مع (Mehrotra وزملاؤه، 2012، 265) لتوصيف نبات العرقسوس جزيئياً، باستخدام تقنية التكررات الترادفية البسيطة الداخلية (ISSR) (13 بادىء)، 8 بادئات أعطت تضاعف وكان عدد الحزم الكلية المتضاعفة 37 وعدد الحزم المتباينة 5 وعدد الحزم المتشابهة 32 ونسبة المئوية للتعددية الشكلية 16.13%، أربعة بادئات كانت متشابهة مع البادئات التي استخدمت في البحث.

بينما بين ABD El-humed وزملاؤه (2018، 413) عند دراسة التوصيف الجزيئي للعرقسوس في مصر باستخدام 10 بادئات بتقنية ISSR، 3 بادئات مشابهة للمستخدمة في البحث وهي التي أعطت تضاعف، حيث بلغ عدد الحزم المتشابهة 21، بينما عدد الحزم المتباينة 2 والتي تخالفت مع نتائج بحثنا.

وأشار Yao وزملاؤه، (2008، 118) عند دراسة التنوع الوراثي لأربع مواقع وهي(SH-BL-EJ-BY) تم جمعها من مناطق مختلفة بالصين للنوع *G.uralensis* باستخدام تقنية التكررات الترادفية البسيطة الداخلية ISSR، تم تضخيم (20) بادئة، 14 بادئة أعطت تضاعف، 4 بادئات منها مشابهة للمستخدمة في هذا البحث، وكان عدد الحزم الكلية الناتجة عن التضاعف 279 وعدد الحزم المتباينة 249 ونسبة التعددية الشكلية 92.2% وبين التحليل العنقودي أنها مقسمة لثلاث مجموعات والتي تخالفت مع نتائج بحثنا.

يمثل محتوى التعددية الشكلية (PIC) لموقع وراثي معين على الجينوم وبالتالي لواسم جزيئي معين قدرة هذا الواسم على التمييز بين الطرز الوراثية (Weir,1996)، وقد بلغ متوسط محتوى التعددية الشكلية (PIC) للبادئات المستخدمة في هذا البحث 0.19، حيث كانت أعلى قيمة للبادىء P12 (0.45) بالنسبة لمحتوى التعددية الشكلية (PIC).

الجدول (3): **يبين عدد الحزم (الكلية، المتباينة، المتشابهة)، نسبة التعددية الشكلية (%)، محتوى التعددية الشكلية.**

البادئ Marker	عدد الحزم الكلية Bands number	عدد الحزم المتباينة Polymorphic bands number	عدد الحزم المتشابهة Common bands number	نسبة التعددية الشكلية(%) percentage of Polymorphism (%)	محتوى التعددية الشكلية PIC
P1	9	2	7	22.2	0.09
P2	8	5	3	62.5	0.22
P3	12	10	2	83.33	0.37
P4	8	0	8	0	0
P8	6	2	4	33.33	0.12
P9	10	4	6	40	0.17
P10	8	3	5	37.5	0.18
P11	5	2	3	40	0.19
P12	4	0	4	0	0.45
المجموع	70	28	42		
المتوسط	7.77	3.11	4,66	45.55	0.19

2-2-تحديد درجة التباين الوراثي بين الطرز المدروسة:

تمت دراسة العلاقة الوراثية بين الطرز الوراثية المدروسة بتطبيق مصفوفة النسب المئوية للتباين الوراثية Dissimilarity إذ أن ارتفاع قيم هذه المصفوفة يدل على وجود تباين وراثي وبازديادها يزداد التباين الوراثي بين الطرز المدروسة.

نلاحظ من خلال الجدول (4) أن أعلى قيمة للتباين الوراثي قد بلغت 0.3088 بين كل من (C1 و N1) و(C1 و N2) و(N1 و G1) و(G1 و N2) وهي قيمة منخفضة تدل على عدم وجود تباين وراثي كبير، بينما كانت أدنى قيمة هي صفر بين (H1 و H2)، و(L1 و L2) مما يدل على وجود تطابق تام بينهما.

نلاحظ أن الجدول يبين التقارب الكبير بين الطرز المدروسة.

حيث أن (Q1 و Q2) يشير الى موقع قرحتا بريف دمشق، و(N1 و N2) يشير الى موقع النشابية بريف دمشق، و(G1 و G2) يشير الى موقع الدادات بحلب، و(H1 و H2) يشير الى موقع نبع الفوار بالقنيطرة، و(L1 و L2) يشير الى موقع بوقا باللاذقية و(C1 و C2) يشير الى موقع سنجوان باللاذقية.

علماً أن (Q1 و Q2)، (N1 و N2)، (H1، H2)، (L1، L2)، (C1، C2)، (G1، G2) هي عينات مأخوذة من نفس الموقع بالنسبة للمحافظات المذكورة السابقة وليست مأخوذة من نفس النبات.

الجدول (4): درجة التباين الوراثي بين الطرز المدرسة

	Q1	Q2	G1	G2	C1	C2	N1	N2	H1	H2	L1	L2
Q1	0											
Q2	0.0508	0										
G1	0.2698	0.2857	0									
G2	0.2381	0.2540	0.0377	0								
C1	0.2131	0.2581	0.1786	0.1754	0							
C2	0.1905	0.2063	0.1552	0.1525	0.0893	0						
N1	0.2319	0.2464	0.3088	0.2794	0.3088	0.2353	0					
N2	0.2319	0.2464	0.3088	0.2794	0.3088	0.2353	0.0000	0				
H1	0.1791	0.1940	0.2308	0.2273	0.2031	0.1250	0.1176	0.1176	0			
H2	0.1791	0.1940	0.2308	0.2273	0.2031	0.1250	0.1176	0.1176	0.0000	0		
L1	0.1846	0.2000	0.2381	0.2344	0.2381	0.1875	0.1765	0.1765	0.1212	0.1212	0	
L2	0.1846	0.2000	0.2381	0.2344	0.2381	0.1875	0.1765	0.1765	0.1212	0.1212	0.0000	0

2-3-التحليل العنقودي Cluster analysis (شجرة القرابة الوراثية):

يسمح التحليل العنقودي بتقسيم الطرز الوراثية المدروسة إلى مجموعات، وتعكس هذه المجموعات درجة القرابة الوراثية فيما بينها، أجري التحليل العنقودي للنتائج التي تم الحصول عليها وذلك لإنشاء شجرة القرابة الوراثية Dendrogram، وفصل الطرز المدروسة اعتماداً على مصفوفة التباين الوراثيDissimilarity إلى عنقودين رئيسين: وانقسم **العنقود الأول** بدوره الى تحت عنقودين: ضم تحت العنقود الأول الطراز (Q1 و Q2).

بينما انقسم تحت العنقود الثاني الى مجموعتين، ضمت المجموعة الأولى اربعة طرز ولوحظ تطابق الطرازين (N1 و N2) والطرازين (H1 و H2) بينما ضمت المجموعة الثانية الطرازين المتطابقين (L1 و L2).

اما العنقود الثاني فقد انقسم بدوره الى تحت عنقودين:

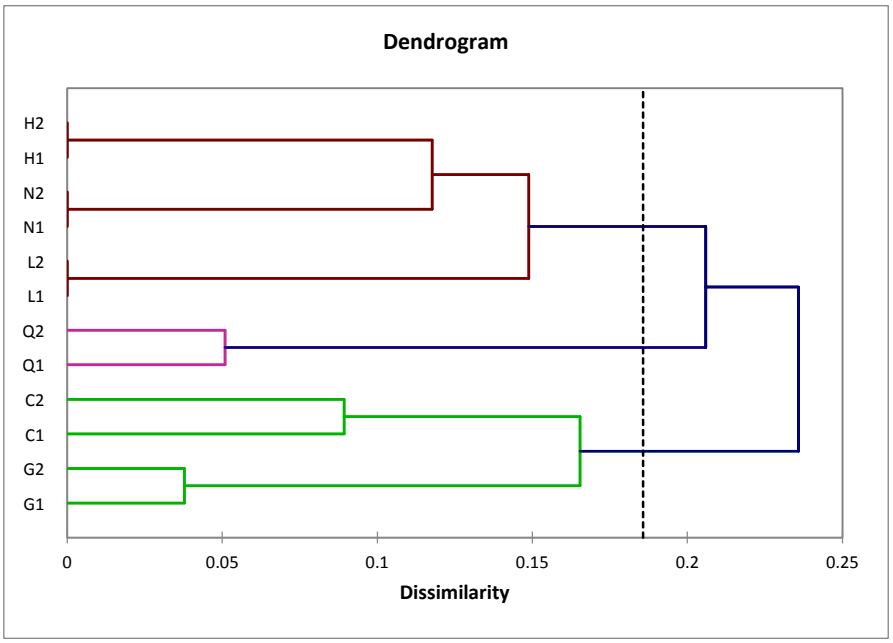
ضم تحت العنقود الأول الطرازين (C1 و C2)، بينما ضم تحت العنقود الثاني الطرازين (G1 و G2).

وهنا تجدر الملاحظة أن نتائج دراستنا تشير إلى عدم وجود تباين وراثي كبير بين الطرز المدروسة.

حيث أن (Q1 و Q2) يشير إلى موقع قرحتا بريف دمشق، و(N1 و N2) يشير الى موقع النشابية بريف دمشق، و(G1 و G2) يشير الى موقع الدادات بحلب، و(H1 و H2) يشير الى موقع نبع الفوار بالقنيطرة، و(L1 و L2) يشير الى موقع بوقا باللاذقية و(C1 و C2) يشير الى موقع سنجوان باللاذقية.

علماً أن (Q1 وQ2)، (N1 وN2)، (H1، H2)، (L1، L2)، (C1، C2)، (G1، G2) هي عينات مأخوذة من نفس الموقع بالنسبة للمحافظات المذكورة السابقة وليست مأخوذة من نفس النبات.

وبالتالي فإنه يمكن القول أن طرز نبات العرقسوس المنتشرة في سورية تتبع نوع واحد *Glycyrrhiza glabra* والذي أكدته الدراسة المورفولوجية للطرز البرية المنتشرة في المحافظات المدروسة (سيتم نشرها في مقالة آخرى) حسب التصنيف النباتي للنبات بالاعتماد على فلورا (Mouterd، 1983).



الشكل(2): شجرة القرابة الوراثية بين الطرز المدروسة

الاستنتاجات:

1- هناك تقارب وراثي كبير بين الطرز المدروسة للعرقسوس رغم اختلاف المواقع المنتشرة فيها.

2- تتبع طرز العرقسوس المدروسة والمنتشرة في سورية إلى نوع واحد *Glycyrrhiza glabra* وهذا لايتوافق مع ماتوصل اليه (Mouterd، 1986) الذي ذكر وجود خمسة أنواع فقط منتشرة في سورية.

التوصيات:

1- استخدام تقانة الـ ISSR والبادئات المستعملة في هذا البحث للتمييز ما بين طرز العرقسوس المنتشرة برياً في سورية.

2- الربط ما بين التوصيف المورفولوجي والتوصيف الجزيئي للطرز المدروسة.

التمويل : هذا البحث ممول من جامعة دمشق وفق رقم التمويل (501100020595).

المراجع References:

1. Altay, V. F. Karahan, M. Öztürk, KR. Hakeem, E. Ilhan,. and M. Erayman, .(2016). Molecular and ecological investigations on the wild populations of Glycyrrhiza L. taxa distributed in the East Mediterranean Area of Turkey. *J Plant Res* 129(6):1021–1032.
2. ASMAA., A, A. EL. ZAKIA, A. MOHAMED, H. WAFAA,.(2018). In vitro and molecular characterization using ISSR markers of *Glycyrrhiza glabra* L. *BioTechnologia* vol. 99(4) C pp. 409–416.
3. Botstein D., R.L. white., M. Skolinck.and R.W. Davis. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. AM.J. hum. Genet.32:31 4-331.
4. Chowdhury, M.A.; Vandenberg, B.; and Warkentin, T.(2002). Cultivar Identification and Genetic Relationship among Selected Breeding Lines and Cultivars in Chickpea (*Cicer arietinum* L.)Euphytica .Vol127:317-325.
5. Houshang., N, H.F. MohammadAli, B.Marjan, and H. Ahmad Razban-.(2016) ISSR variations of four populations of *Glycyrrhiza glabra* (Fabaceae). Biological Diversity and Conservation 9/2 (24-29).
6. Khare, C.P.(2004). Encyclopedia of Indian Medicinal Plants. New York, Springer-Verlag. p: 233-240.
7. Mehrotra, S., Khawaja,O., A.K. Kukreja, and L.Rahman. (2012). ISSR and RAPD Bused Evaluation of Genetic Stability of Encapsulated Micro Shoots of *glycyrrhiza glabra* Following 6 Months of storge. *Mol Biotechnol.* 52: 262- 268.
8. MOUTERDE, P. (1983) .Nouvelle Flore du Liban et de la Syrie. 3Tomes + Atlas , Dar El Mashreq , Beyrouth , Liban.
9. Murray, M.G. and Thompson W.F. (1980). Rapid isolation of high molecular weight DNA. Nucleic Acids Res. 8; 4321-4325.
10. Nei, M. (1973). Analysis of gene diversity in subdivided populations. Proc. Nat. Acad. Sci. 70 (12): 3321-3323.
11. Parle, M., Dhingra D., Kulkarni S. K. (2004). Memory-strengthening activity of *Glycyrrhiza glabra* L. in exteroceptive and interoceptive behavioral models. J. Med Food. 7 (2):157-161.
12. Powell W., M. Morgantw, J.Dolye,. J.Mcnical, S.Tingey and V., Rafalski (1996). Genepool Variation in Genus Glycine Subgenus Soja Revealed by Polymorphic Nuclear and Chloroplast Microsatellite. *Genetics*, Vol.(144): 793-803.
13. Ramsay, L., M. Macaulay. S. Degli Ivanissevich. K. Macleanm. L. Carsle and J.Fuller,. (2000). A simple sequence repeat-based linkage map of barley. Genetics, 156:1997-2000.
14. Sheth, A. (2005). The Herbs of India. 1st Edition. Gujrat: Hi Scan Pvt. Ltd.Vol (2). p: 566.
15. Shirazi. Z., K. Pin, A.M. Asl and T. Hasanloo.(2012). Glycyrrhizin and isoliquiritigenin production by hairy root culture of *Glycyrrhiza glabra*. Journal of Medicinal Plants Research .Vol. 6(31): 4640-4646.
16. Sneath, P. and. Sokal, R. (1973). Numerical Taxonomy. San Francisco: W. H. Freeman.
17. Tautz, D. N. (1989). Hypervariability of Simple Sequences as a general Source for Polymorphic Markers. Nucl, Acids Res. Vol. 18, No. 17,:6463-6471.
18. Van der Nest, M.A., Steenkamp, E.T., Wigfield, B.D. and Wingfield, M.J. (2000). Development of simple sequence repeat (SSR) markers in Eucalyptus from amplified inter-simple sequence repeats (ISSR). Plant Breed. 119: 433-436.
19. Vispute, S. and A. Khopade.(2011). *Glycyrrhiza glabra* Linn. - "Klitaka": A review. Int. J. Pharma. Bio. Sci., 2: 42-50.
20. Wang, Z.Y. and D.W. Nixon.(2001). Licorice and cancer. Nutr Cancer, 39: 1-11.
21. Weir, B. S. (1996). Genetic data analysis II 2nd ed Sinauer Associates. Inc. Sunderland, MA.
22. Williams. J.G.K, 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.
23. Yao, H. Y.Zhao, DF.Chen, JK. Chen, and TS.Zhao .(2008). ISSR primer screening and preliminary evaluation of genetic diversity in wild populations of Glycyrrhiza uralensis. Biol Plant 52:117–120.

24. Zietkiewicz, E., A. Rafalski, and D. Labuda.(1994). Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. Genomics 20: 176-183.