

تسجيل النوع *Equisetum arvense* (ذنب الخيل الحقلي) في الفلورا السورية لأول مرة ومقارنته بالنوع *Equisetum telmateia* (ذنب الخيل المستنقي أو العملاق) بالاعتماد على سلسلة الجين rps4

منار الذياب العلي* د. جورجيت بابوجيان* د. فرانسواه قره بت**

الملخص

يعد نبات ذنب الخيل (Equisetum) Horsetail من النباتات الطبية المعروفة، لاسيما في البلدان التي تعتمد على العلاج بالطب الشعبي لأمراض الكلى والمسالك البولية. أجريت دراسة تصنيفية جزيئية للتمييز بين أنواعه؛ إذ جمعت عينات من *E. arvense* و *E. telmateia* من مناطق مختلفة من مدينتين على الساحل السوري: اللاذقية وطرطوس (عين اللبن - قمين - نهر الخوابي) بين آذار وأيار 2015، صنفت وفقا للمفاتيح المورفولوجية المعتمدة، وتبين بواسطة ذلك صعوبة التمييز بين النوعين وتشابه صفاتهما الظاهرية كشكل المخروط وعدد الأسنان في العقد بين السلالميات، لذا لجأنا لسلسلة جين rps4 بوصفها إحدى الجينات المرجعية بتحديد الأنواع، تمت مقارنة ناتج السلسلة لكلا العينتين مع النتائج النيكلوتيدي للجين rps4 المميز لكلا النوعين والمأخوذ من البنك الجينومي، وخلصت الدراسة بتسجيل النوع *E. arvense* لأول مرة في سورية، وتأكيد تصنيف النوع *E. telmateia* بوصفه نوعا مسجلا سابقا بالفلورا السورية.

الكلمات المفتاحية: ذنب الخيل الحقلي، ذنب الخيل المستنقي، جين rps4.

* قسم علم الحياة النباتية، كلية العلوم، جامعة دمشق.

** قسم الكيمياء، كلية العلوم، جامعة دمشق.

Registration *Equisetum arvense* (field horsetail) For the first time in Syrian Flora and compare it with *Equisetum telmateia* (Great or swamp horsetail) based on rps4 gene sequence

Manar Z. Al-ali* Dr. G. Babujian Dr. F.Kara bit**

Abstract

Equisetum is a well-known medicinal plant, especially in countries that rely on folk medicine treatment for kidney and urinary tract diseases. A molecular taxonomic study was conducted to distinguish between its types. Samples of *E. arvense* and *E. telmateia* were collected from different regions of two cities on the Syrian coast: Latakia and Tartous (Ain al-Laban - Qamin - Al-Khawabi River) between March and May 2015, The samples were classified according to the morphological keys, This showed that it is difficult to distinguish between the two species and their similarity to their phenotypic characteristics such as the cone shape and the number of teeth in the nodes in the stem, So we resorted to rps4 sequencing as one of the reference genes determine species. The sequence result of both samples was compared with the nucleotide sequence of the rps4 gene from the genomic bank, The study concluded that *E. arvense* was registered in the first time in Syria and confirmed the classification of *E. telmateia* as previously recorded in Syrian flora.

Keywords: *E. arvense*, *E. telmateia*, rps4 gene.

* Faculty of Sciences, Department of Plant Biology, Damascus, Syria.

** Faculty of Sciences, Department of Chemistry, Damascus, Syria.

المقدمة:

ينتشر في سورية عدد كبير من الأنواع النباتية ذات الأهمية الطبية والبيئية والتصنيفية، ومن هذه النباتات؛ جنس ذنب الخيل *L.Equisetum*، وهو من أحد أجناس النباتات الوعائية، الذي يتبع تصنيفيا إلى فصيلة أذنان الخيل Equisetaceae، رتبة أذنان الخيل Equisetales، صف أذنان الخيل Equisetopsida، فوق شعبة التريديات Pteridophytes. يعود الاستعمال الطبي لهذا النبات لقرون سابقة عديدة؛ إذ استعمله اليونانيون القدامى، وذكره الأنطاكي وابن البيطار والغساني وابن سينا بوصفه نباتا طبييا ولاسيما عصارته. وفي عصرنا الحالي يدخل ذنب الخيل الحقلي *Equisetum arvense* في تركيب الأدوية المدرة للبول لمعالجة تجمع السوائل في الجسم (Sandhu et al., 2008)، كما يوصف لحالات السعال المزمن، ولمعالجة التهاب القصبات الهوائية، والبواسير، والروماتيزم، والتهاب المثانة والكلى والتخلص من الرمل والحصى في المجاري البولية (رويحة، 1983)، كما يستخدم بوصفه مضاد أكسدة طبيعي، ومضاد جرثومي، ومضاد فطري (Dukic et al., 2008; Geetha et al., 2011; Sinha, 2012). ويستخدم نوع ذنب الخيل المستقعي *E. telmateia* بوصفه مدرا للبول، أيضا، ويساعد على تفتيت الحصى البولية وتخفيض الحرارة، ويفيد في الوقاية من الإصابة بالتهاب العصب الوركي (Rassouli et al, 2009).

ومن الناحية الشكلية تتميز الأنواع المختلفة لذنب الخيل بالترتيب السواري للأوراق والفروع؛ إذ يعد تبادل مواضع الأوراق مع مواضع الأفرع الجانبية أمرا نادرا بين النباتات الوعائية، فعادة ما تخرج الأفرع من آباط الأوراق فتكون مواجهة وليست متبادلة الوضع معها كما هي الحال في جنس ذنب الخيل (مجاهد وآخرون، 1983). يوصف النبات بأنه معمر بوساطة جذامير زاحفة، ذات لون بني قاتم إلى أسود، يظهر عليها نمطان من السوق: السوق الخصبية (الربيعية) منتصبية، وصلبة، وقصيرة (35سم)، ولا يخضورية، وغير متفرعة، تنتهي بمخاريط متطاولة تحمل العديد من الأكياس البوغية بنية اللون، أما السوق العقيمة

(الصيفية) فتكون متفرعة بشكل دواربي، وطولها نحو (60 سم)، يتعاقب على دورة حياة النبات جيلين: الجيل البوغي (2n) والجيل العروسي (1n).

ينتشر هذا النبات على سطح الكرة الأرضية في مناطق التربة الرطبة والظليلة (Post, 1933) على ضفاف الأنهار والجداول والبحيرات، وعلى التربة الرملية والجافة وفي المستنقعات (Zohary, 1966).

اعتمد كثير من الباحثين المعيار المورفولوجي في تصنيف أذنان الخيل بواسطة دراسة بعض الصفات كطول النبات وشكل الأوراق والمخاريط، والبنية التشريحية للعقدة والسلامية والمخروط، وعدد الأسنان في الغمد الورقي بمنطقة العقدة، وذلك بهدف التمييز بين أنواعه المختلفة (Post, 1933; Zohary, 1966; Mouterde, 1966)، لكن التشابه المورفولوجي لبعض الصفات بين الأنواع، وظهور أنواع جديدة غير مسجلة بالفلورا السورية جعل تصنيف النباتات بالاعتماد على المعلمات الجزيئية أكثر مدلولية ودقة، فقد استخدمت هذه التقانات في إنشاء الخرائط الوراثية بالاعتماد على تضخيم أجزاء محددة من الـ DNA المعزول من الأنواع المختلفة بواسطة التفاعل التسلسلي للبوليمراز Polymerase chain reaction (PCR) ومن هذه التقانات الـ RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) و Simple SSR (Amplified Fragment Length Polymorphism) AFLP و Sequense Repeat).

تتميز الواسمات المعتمدة على DNA النواة بمستوى تطور سريع ومتنوع الأشكال مقارنة بـ DNA الصانعات الخضراء مما يجعلها مختصة أكثر بالنوع المدروس، وذلك بسبب الاختلاف في DNA النواة على مستوى تحت النوع (Nadot *et al.*, 1994)، وبما أن DNA الصانعات الخضراء يتمتع بمستوى تطور أقل من DNA النواة ويتم توارثه عن طريق أحد الأبوين فقط لغالبية الأنواع (Guillon and aquin, 2000) فبالتالي تعد مقارنة الاختلافات الوراثية في DNA الصانعات الخضراء للتمييز بين الأنواع النباتية أكثر مدلولية من مقارنة الاختلافات الوراثية في DNA النواة، لذلك استندت العديد من الأبحاث التصنيفية على تحديد

تسلسل مناطق معينة من جينوم الصانعات الخضراء مثل *matK* ، *rpoC2* ، *ndhF* ، *rbcL* وجين *rps4* المرمز للبروتين الريبوزومي S4 S4 (Des Marais, ribosomal protein S4 S4) (2003) اعتمدت العديد من الدراسات على الاختلافات في تتالي النيكلوتيدات لجين *rps4* للتفريق بين الأنواع المختلفة لجنس ذنب الخيل وتحديد دقيق للنوع (Guillon, 2004; Guillon, 2007).

أهمية البحث وأهدافه:

يعد نبات ذنب الخيل نباتا طبييا واسع الاستعمال ومهددا بالانقراض لكونه الجنس الوحيد المعاصر من رتبته وفصيلته التصنيفية، ونظرا للاعتماد على التوصيف المورفولوجي اعتمادا أساسيا في تصنيف التريديات وندرة الدراسات الجزيئية المختصة بتصنيف أنواع نبات ذنب الخيل في منطقتنا فقد هدف البحث إلى تأكيد التوصيف المورفولوجي لبعض أنواع نبات ذنب الخيل بالاعتمادا على سلسلة جزء من جين *rps4* ومقارنتها مع تسلسلات الأنواع الموجودة في البنك الجينومي.

مواد البحث وطرائقه:

أجري البحث في مختبر البحوث بقسم علم الحياة الحيوانية في كلية العلوم بجامعة دمشق وفي مخابر هيئة الطاقة الذرية السورية على النحو الآتي:

1- جمع العينات:

جمعت العينات من مناطق مختلفة من مدينتي اللاذقية وطرطوس (سد 16 تشرين - عين اللبن فيدره - قمين - نهر الخوابي) في أثناء شهري آذار وأيار لعام 2015؛ إذ تبدأ النباتات العروسية بالنمو والانتشار في هذه الفترة من كل عام مرتبطة بالهطولات السنوية ودرجات الحرارة المناسبة، ووضعت داخل عبوات معقمة مرفقة بمعلومات تتضمن: رقم العينة، وتاريخ الجمع، ومكان الجمع، وطبيعة المكان. حددت الأنواع بالرجوع إلى المفاتيح التصنيفية لكل من (Moutterde, 1933) (Post, 1966)، ثم جففت السوق والأوراق تمهيدا لاستخلاص الـ DNA.

2- استخلاص الـ DNA:

استخلص الـ DNA من خلايا الساق باستعمال كيت خاص باستخلاص الـ DNA من النبات (GeneDirex)، يعتمد على أعمدة كروماتوغرافيا مكروية تحوي على غشاء من السيليكا رابطة للـ DNA. تتميز هذه الأعمدة بألفة عالية للـ DNA في وسط كحولي. تم وزن (50) mg من العينة الجافة ووضعت بالآزوت السائل ومن ثم طحنت باستعمال هاون من البورسلان لضمان تكسير الجدار الخلوي للعينة النباتية، وتمت متابعة العمل بحسب تعليمات الشركة الصانعة لكيت الاستخلاص.

وقيست تراكيز الـ DNA المستخلص باستعمال جهاز مقياس طيف ضوئي Nanodrope (Thermo).

3- الرحلان الكهربائي:

تم التأكد من جودة استخلاص الـ DNA ومن نتائج PCR بتقنية الرحلان الكهربائي الأفقي على هلامه أغاروز (Roth) بتركيز 1% في دائرة الرحلان من TBE. وصبت الهلام في قوالب خاصة بجهاز الرحلان (PeQlab) وأضيف الإتيديوم برومايد بتركيز نهائي قدره 0,5 µg/ml. مزجت العينات مع 2 µl من دائرة التحميل Loading Buffer X6 ضمن حجم نهائي قدره 12 µl. رحلت العينات وواسمات الأطوال المعيارية DNA Ladder (100bp) و (1Kb) (GeneDirex) بتطبيق تيار كهربائي قدره 100 فولت مدة 30 دقيقة. وكشفت عصابات DNA باستخدام منبع أشعة فوق بنفسجية قصيرة الموجة (Cleaver)، ووثقت الهلام باستخدام جهاز موثق الهلام Gel Documentation مزود بآلة تصوير رقمية ذات مرشحة خاصة بالأشعة فوق البنفسجية.

4- التفاعل التسلسلي للبوليمراز Polymerase chain reaction:

استخدم تفاعل PCR لتضخيم أجزاء من المورثة rps4 باستعمال شفع البادئات - الموضحة في الجدول (1) - التي أنيبت بكمية كافية من الماء المقطر للحصول على تركيز نهائي قدره

100 μ M، ثم مدد إلى محلول تركيزه 10 μ M واستعمل طقم (GeneDirex) OnePCR لإجراء التفاعل التسلسلي للبوليمراز (PCR)، وهو عبارة عن Master Mix تركيزه 2 X. حدد الحجم النهائي للتفاعل بـ 50 μ l، وقد تضمن حوالي 100 نانوغرام من الـ DNA و 0.5 μ M من كل بادئة. وأنجز تفاعل الـ PCR باستخدام جهاز مدور حراري (PeQlab)، وقد برمج الجهاز بما يتوافق مع البادئات المستخدمة كما هو موضح بالجدول (2)، وحلت النتائج بالرحلان الكهربائي على هلامة من الأغاروز 1%.

الجدول (1) شفع البادئات المستخدمة وتسلسل أسسها الآزوتية

| | |
|----------------------------|----------|
| 5` AGTCGAATCAAAGAAAAATC 3` | rps4 for |
| 5` GTTCAGAGAGCGATAAAGTA 3` | rps4 rev |

الجدول (2) البرنامج المستخدم لإنجاز تفاعل PCR

| عدد الدورات | الزمن | درجة الحرارة | مراحل التفاعل |
|-------------|-------|--------------|--------------------|
| دورة واحدة | 5min | 94 C° | تمسخ Denaturation |
| 43دورة | 30sec | 94 C° | تمسخ Denaturation |
| | 30sec | 52 C° | التحام Annealing |
| | 1min | 72 C° | استطالة Extraction |
| دورة واحدة | 5min | 72 C° | استطالة Extraction |

5- تنقية ناتج تفاعل PCR:

نقي ناتج تفاعل الـ PCR للتخلص من النكليوتيدات الحرة والبادئات والأملاح والأنزيم تحضيراً للسلسلة، باستعمال كيت (Invitrogene) Cleanup وذلك بحسب خطوات عمل ورقة معطيات الشركة المصنعة.

6- سلسلة ناتج الـ PCR:

يعتمد مبدأ هذه الطريقة على استخدام شريط من DNA بوصفه قالباً، بالإضافة إلى استخدام بادئة تتقابل مع النهاية 3 لتبدأ عملية البناء. تم سلسلة كل ناتج PCR من كلا الطرفين وذلك في تفاعلين منفصلين باستعمال البادئة الأمامية في التفاعل الأول والبادئة العكسية في التفاعل الثاني. تمت قراءة النتائج وتحليلها باستعمال برنامج المعلوماتية الحيوية Geneos، ومن ثم تمت مقارنة التسلسلات الناتجة بالتسلسلات المرجعية المعتمدة في البنوك الجينية بواسطة برنامج الرصف Alignment الحاسوبي BLAST المتوفر عبر الموقع الخاص بالمركز الوطني لمعلومات التقانة الحيوية National Center For Biotechnology Information. NCBI. أجريت السلسلة في مخابر هيئة الطاقة الذرية السورية بواسطة جهاز السلسلة الآلية أو ما يعرف بتحليل سمات الجينوم DNA Genetic analyzer (Apied biosystem).

النتائج والمناقشة:

توصلت الدراسة إلى وجود نوعين من أنواع نبات ذنب الخيل في المواقع المدروسة كما هو موضح في الجدول رقم (3) مع ملاحظة اختلاف فترات ظهور المخاريط بينهما (*Equisetum arvense* في شهر آذار، *Equisetum telmateia* في أوائل شهر أيار)، وكانت أبرز النتائج تسجيل النوع *E. arvense* لأول مرة في سورية حيث لم يذكر تواجده سابقاً في كل من (Post, 1933) و (Mouterde, 1966)، بالإضافة لتسجيل أماكن ظهور جديدة للنوع *E. telmateia* في نهر الخوابي و قمين.

الجدول (3) النوعان المدروسان وأماكن انتشارهما

| الأصناف | مكان الجمع | مكان الجمع وفقاً لـ Mouterde و Post |
|---------------------|---|-------------------------------------|
| <i>E. arvense</i> | مفرق فدره - عين اللين | لم يذكر |
| <i>E. telmateia</i> | النهر الكبير الشمالي (سد 16 تشرين) - قمين - نهر الخوابي (طرطوس) | النهر الكبير الشمالي |

درست الصفات المورفولوجية والتشريحية وفقا للمفاتيح التصنيفية المذكورة سابقا، ووضحت النتائج نسبة التشابه الكبير بين النوعين المدروسين كما يوضح الشكل (1) و (2)، بالإضافة إلى وجود بعض الفروق الشكلية كعدد الأسنان، وتفرع الجذور، وعدد الأفرع الجانبية التي يمكن أن تتأثر بالظروف البيئية المحيطة أو تتلف خلال عملية الجمع وهذا ما أكده (Hauke, 1963, 1968, 1987) من خلال أبحاثه حول تصنيف نبات ذنب الخيل، لذا كان المعيار المورفولوجي غير كاف للتمييز بينها.



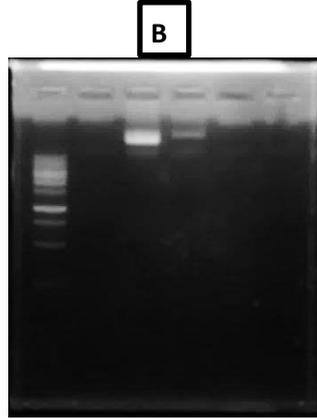
الشكل (1) النوع ذنب الخيل الحقلي *E. arvensis* الشكل (2) النوع ذنب الخيل المستنقعي *E. telmateia*

كانت دراستنا لذنب الخيل المستنقعي مشابهة لدراسة (ديبو، 2014)؛ إذ اتبعت الصفات المورفولوجية والتشريحية نفسها، وأضافت عليها دراسة الأبواغ في المخاريط بوصفها صفة مميزة لمواجهتها صعوبة التمييز بين الأنواع، بالإضافة إلى تسجيل ذنب الخيل المتفرع *E. ramosissimum* لأول مرة في مدينة اللاذقية بعد أن سجل سابقا في دمشق (Moutterde, 1966).

ونتيجة لما سبق كان من الضروري اعتماد المعيار الجزيئي بوصفه أداة تصنيفية فاصلة بين النوعين؛ إذ تم استخلاص DNA النبات والتأكد من جودة الاستخلاص بالرحلان الكهربائي

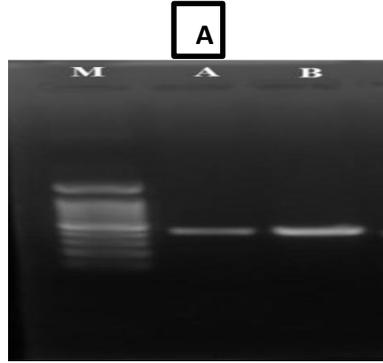
تسجيل النوع *Equisetum arvense* (ذنب الخيل الحقلية) في الفلورا السورية لأول مرة ومقارنته... العلي، بابوجيان، قرة بت

الأفقي على هلامه أغاروز 1% الشكل (3). أظهرت النتائج وجود عصابة واحدة بطول كبير، تموضعت أعلى من عصابة 10Kb لواسمات الأطوال المعيارية مما يدل على جودة الاستخلاص. كانت تراكيز عينات DNA المستخلص بحدود 6ng/μl.



الشكل (3) صورة لهلامه الرحلان الكهربائي لـ DNA المستخلص من النوعين *E. telmateia* و *E. arvense*

العمود M واسمات أطوال معيارية (1Kb) Ladder DNA - العمود A: DNA المستفرد من النوع *E. arvense*. العمود B: DNA المستفرد من النوع *E. telmateia*. ضخ جزء من جين rps4 ابتداء من DNA المستخلص بتقنية PCR باستخدام شفع من البادئات rps4 for و rps4 rev، فكانت النتائج كما هو موضح في الشكل (4).



الشكل (4) صورة هلامة الرحلان الكهربائي لنواتج تفاعل PCR المضخم لجزء من جين *rps4*.

العمود M واسمات أطوال معيارية (100bp) -Ladder DNA: A: جزء من جين *rps4* في

النوع *E. arvensis* - B: جزء من جين *rps4* في النوع *E. telmateia*.

تمت تنقية ناتج PCR وقياس تركيزه (30 ng/ μ l) وأرسل للسلسلة. بعد معالجة التسلسلات الخام

باستعمال برنامج Genieos تبين أن تسلسل جين *rps4* في النبات الأول (النوع *E. arvensis*):

```
G TTCAGAGAGCGATAAAGTAAGGTGATCAGGTATCTGATCCTAA
G CAAAAGCTTCTATTCTTTTAGTAATAATGGATTGATAAGTTTTAG
G TGCTCCTATTGTAATAATATCTTTGGGTTTACAATGAAAACCTTG
G TATATCAACAATACGATTATTCAGTACTAGAATATGTCTATGATTAAT
G CAATTGTCTTGCAGAAGGAATAGTAGGGACAACACCTAGACGAA
G ACAAATATTATCTAAACGCATTTCAAGTAATTGTAATAATATTT
G GTCCAGTGGATCCTTTAGCGCATCTAGCAATACGTACGTAATTTA
G GTAATTGTCGTTCTGTTAATCCATAATTAATCGTAATCTTTGTTT
G AGCTTCCAAACGAATACCATATTGTGAAACTTTTTTCTGAATTGAT
G TGATCATTCCCCTTGCTTGATTTTTCTTTG
```

والنبات الثاني (النوع *E. telmateia*):

```
G TTCAGAGAGCGATAAAGTAAGATGTTTCAGGTATCTGGTCCTTAG
G CAAAAGATTCTATTCTTTTAGTAATAATGGATTGATAAGTTTTAG
G TGCTCCTATGGTAATAATATCTTTGGGTTTACAATGAAAACCTTG
```

تسجيل النوع *Equisetum arvense* (ذنب الخيل الحظلي) في الفلورا السورية لأول مرة ومقارنته.... العلي، بابوجيان، قره بت

GTATATCACCAATACGATTATTCCCCTAGAATATGTCTATGATTA
ATCAATTGTCTGGCAGAAGGAATAGTAGGGACAACACCTAGACG
AAACAAAAATATTATCTAAACGCATTTCAAGTAATTGTAATAATA
ATTTGTCCAGGTGGATCCTTTAGCGCATCTAGCAATACGTACGTA
ATTTAGTAAATTGTCGTTCTGTTAATCCATAATTAATCGTAATCT
TTGTTTAGCTTCCAAACGAATACCATATTGGGGAACCTTTTTCTGA
TTTGATTGATCACTCCCACCTGTTTGATTTTTCTTTG

بعد مقارنة هذه التسلسلات بالتسلسلات المرجعية في البنوك الجينية بطريقة الرصف باستعمال البرنامج الحاسوبي BLAST تبين أن التسلسل الأول مماثل بنسبة 98% لتسلسل الجين rps4 للنوع *E. arvense* المسجلة بالرقم المرجعي MH750112.1 الشكل (5)، وقيمة حرز Score عالية (771 bits)، الأمر الذي يؤكد التصنيف السابق باعتماد الصفات المورفولوجية، كما أن التسلسل الثاني مماثل بنسبة 94% لتسلسل الجين rps4 للنوع *E. telmateia* المسجلة بالرقم المرجعي MH750136.1 الشكل (6)، وقيمة حرز Score عالية (775 bits) ما يؤكد تصنيفه السابق باعتماد الصفات المورفولوجية.

Equisetum arvense subsp. boreale isolate 41073 small ribosomal protein 4 (rps4) gene, complete cds; plastid
Sequence ID: MH750112.1 Length: 920 Number of Matches: 1

| Score | Expect | Identities | Gaps | Strand |
|---------------|--|--------------|-----------|------------|
| 771 bits(417) | 0.0 | 431/438(98%) | 0/438(0%) | Plus/Minus |
| Query 1 | GTTCAGAGCGATAAAGTAAGGTGATCAGGTATCTGATCCTAAGCAAAAGCTTCTATTC | 60 | | |
| Sbjct 688 | GTTCAGAGAGCGATAAAGTAAGGTGATCAGGTATCTGATCCTAAGCAAAAGCTTCTATTC | 629 | | |
| Query 61 | TTTTAGTAATAATGGATTGATAAGTTTTAGGTGCTCCTATTGTAATAATATCTTTGGGTT | 120 | | |
| Sbjct 628 | TTTTAGTAATAATGGATTGATAAGTTTTAGGTGCTCCTATTGTAATAATATCTTTGGGTT | 569 | | |
| Query 121 | TACAATGAAAACCTGGTATATCAACAATACGATTATTCACCTAGAATATGCTATGATTAA | 180 | | |
| Sbjct 568 | TACAATGAAAACCTGGTATATCAACAATACGATTATTCACCTAGAATATGCTATGATTAA | 509 | | |
| Query 181 | TCAATTGCTCTTGCGAAGGAATAGTAGGACAAACCTAGACGAAACAAAATATTATCTA | 240 | | |
| Sbjct 508 | TCAATTGCTCTTGCGAAGGAATAGTAGGACAAACCTAGACGAAATAAAATATTATCTA | 449 | | |
| Query 241 | AACGCATTTCAAGTAATTGTAATAATATTGTCAGTGGATCCTTTAGCGCATCTAGCAA | 300 | | |
| Sbjct 448 | AACGCATTTCAAGTAATTGTAATAATATTGTCAGTGGATCCTTTAGCGCATCTAGCAA | 389 | | |
| Query 301 | TACGTACGTAATTTAGTAATTGTCGTTCTGTTAATCCATAATTAATCGTAATCTTTGTT | 360 | | |
| Sbjct 388 | TACGTACGTAATTTAGTAATTGTCGTTCTGTTAATCCATAATTAATCGTAATCTTTGTT | 329 | | |
| Query 361 | TAGCTTCCAAACGAATACCATATTGTGAAACTTTTTCTGAATTGATTGATCATTCCAC | 420 | | |
| Sbjct 328 | TAGCTTCCAAACGAATACCATATTGTGAAACTTTTTCTGATTGATTGATCATTCCAC | 269 | | |
| Query 421 | TTGCTTGATTTTTCTTTG | 438 | | |
| Sbjct 268 | TTGCTTGATTTTTCTTTG | 251 | | |

الشكل (5) تسلسل الجين rps4 للنوع *E. arvense* المسجلة بالرقم المرجعي MH750112.1

Equisetum telmateia subsp. braunii isolate 40817 small ribosomal protein 4 (rps4) gene, complete cds; plastid

Sequence ID: [MH750136.1](#) Length: 907 Number of Matches: 1

Range 1: 252 to 689 [GenBank](#) [Graphics](#)

▼ Next Match ▲ Previous Match

| Score | Expect | Identities | Gaps | Strand |
|---------------|--------|--|-----------|------------|
| 725 bits(392) | 0.0 | 427/443(96%) | 5/443(1%) | Plus/Minus |
| Query 1 | 60 | GTTCAGAGAGCGATAAAGTAAGATGTTTCAGGTATCTGGTCCTTAGCAAAAGATTCTATTTC | | |
| Sbjct 689 | 630 | GTTCAGAGAGCGATAAAGTAAGATGATCAGGTATCTGGTCCTTAGCAAAAGATTCTATTTC | | |
| Query 61 | 120 | TTTATAGTAATAATGGATTGATAAGTTTTAGGTGCTCCTATGGTAATAATATCTTGGGGTT | | |
| Sbjct 629 | 570 | TTTATAGTAATAATGGATTGATAAGTTTTAGGTGCTCCTATGGTAATAATATCTTGGGGTT | | |
| Query 121 | 180 | TACAATGAAAACCTGGTATATCACCAATACGATTAATCCCTAGAAATATGCTATGATTA | | |
| Sbjct 569 | 511 | TACAATGAAAAGCTGGTATATCACCAATACGATTAATCCCTAGAAATATGCTATGATTA | | |
| Query 181 | 240 | ATCAATTGCTGGCAGAGGAATAAGTAGGGACAACACCTAGACGAAACAAAATATTATC | | |
| Sbjct 510 | 452 | ATCAATTGCTGGCAGAGGAATAAGTAGGGACAACACCTAGACGAAACAAA-TATTATC | | |
| Query 241 | 300 | TAAACGGATTTCAGTAATTTGTAATAATAATTTGCCAGGTGGATCCTTAGCGCATCTA | | |
| Sbjct 451 | 394 | TAAACGGATTTCAGTAATTTGTAATAATA-TTTGTCCA-GTTGATCCTTAGCGCATCTA | | |
| Query 301 | 360 | GCAATACGTACGTAATTTAGTAAATTTGCTGTTCTGTTAATCCATAATTAATCGTAATCT | | |
| Sbjct 393 | 335 | GCAATACGTACGTAATTTAGTAA-TTGTGCTGTTCTGTTAATCCATAATTAATCGTAATCT | | |
| Query 361 | 420 | TTGTTTAGCTTCCAAACGAATACCATATTGGGGAAACCTTTTCTGATTTGATTGATCACT | | |
| Sbjct 334 | 275 | TTGTTTAGCTTCCAAACGAATACCATATTGTGAAACTTTTTTCTGATTTGATTGATCACT | | |
| Query 421 | 443 | CCCACTGTTGATTTTCTTTG 443 | | |
| Sbjct 274 | 252 | CCCACTGTTGATTTTCTTTG 252 | | |

الشكل (6) تسلسل الجين rps4 للنوع *E. telmateia* المسجلة بالرقم المرجعي MH750136.1

تتفق هذه النتيجة مع دراسة (Guillon, 2004) ، الذي اعتمد على سلسلة جزء من مورثة rps4 الموجودة في الصناعات الخضراء للتمييز بين ثمانية أنواع لنبات ذنب الخيل من بينها ذنب الخيل الحقلي *E. arvense* وذنب الخيل المستنقعي *E. telmateia* ، أكد في دراسته صعوبة التمييز بينها ظاهريا ولا سيما بأشكال المخاريط، ونفرع السوق، وخلايا البشرة الداخلية؛ إذ توضع كل من النوعين في موقعين متباعدين من شجرة القرابة. كما اتفقت دراستنا مع دراسة أحدث (Guillon, 2007) الذي اعتمد على سلسلة جزء من مورثة atpB الموجودة في الصناعات الخضراء للتمييز بين (15) نوعا من نبات ذنب الخيل بالإضافة إلى المورثات (rbcL, trnL-trnF, rps4) كتسلسلات مرجعية من دراسة (Des Marais, 2003)؛ إذ أظهرت النتائج توضع كل من النوعين في موقعين متباعدين من شجرة القرابة وبمؤشرات (DI, CI) مختلفة.

الاستنتاجات والتوصيات:

- 1- تمت دراسة نوعين فقط من جنس ذنب الخيل، وهما: ذنب الخيل الحقلي *E. arvense* و ذنب الخيل المستنقعي *E. telamteia*.
- 2- تسجيل النوع *E. arvense* لأول مرة في الفلورا السورية.
- 3- وجود تشابه بين النوعين المدروسين مع اختلاف في أماكن تواجدهما حيث يظهر *E. arvense* في الحقول، في حين يظهر *E. telamteia* بالقرب من مجرى الأنهار والسواقي والمستنقعات.
- 4- تأكيد تسمية النوعين بالاعتماد على سلسلة جزء من جين rps4 الموجود في الصناعات الخضراء.
- 5- نوصي بالتعمق في دراسة هذا الجنس بواسطة المجهر الإلكتروني الماسح. والبحث عن أنواع جديدة؛ بسبب الأهمية الطبية لبعض أنواعه، والاهتمام بدراسة التنوع الحيوي؛ وذلك بهدف إضافة كل جديد إلى الفلورا السورية.
- 6- بذل جهود أكبر في مجال تطوير دراساتنا التصنيفية، وتوفير التقانات الحديثة والمتطورة اللازم استخدامها في مجال الدراسات الكيميائية والجزيئية.

المراجع:

1. مجاهد أحمد، شلبي أحمد، باصهي عبد الله، 1983- النباتات الوعائية غير البذرية، منشورات جامعة الملك سعود، كلية العلوم، ص 232.
2. ديبو سلمى، دراسة تصنيفية ومورفولوجية لأنوعين من جنس ذنب الخيل *Equisetum L.* من فصيلة Equisetaceae ينتشران في بعض مناطق اللاذقية- سورية، مجلة جامعة تشرين للبحوث والدراسات العلمية، المجلد (36)، العدد(6)، 2014.
3. رويحة، أمين. التداوي بالأعشاب (طريقة علمية تشمل الطب الحديث والقديم)، الطبعة السابعة، بيروت، لبنان 1983, 261-264.
4. Des Marais, D, 2003. Phylogenetic Relationships and Evolution of Extant Horsetails, *Equisetum*, Based on Chloroplast DNA Sequence Data (*rbcL* and *trnL-F*), International Journal of Plant Sciences Volume 164, Number 5.
5. Dukic, N., Simin, N., Cuejic, J., Jovin, E., Orcic, D., Bozin, B, 2008. Phonolic Compounds in Field Horstail (*Equisetum arvense L.*) as Natural Antioxidants, National institutes of health., 13(7):pp1455-64..
6. Geetha, R, V; Anitha, R. 2011. In Vitro Evaluation Of Antibacterial Activity Of *Equisetum Arvense Linn* On Urinary Tract Pathogens, Saveetha Dental College, Vela Ppanchavady, Chennai.
7. Guillon, J, 2004. Phylogeny of Horsetails (*Equisetum*) based on the Chloroplast *rps4* Gene and Adjacent Noncoding Sequences Systematic Botany, 29(2): pp.251-259.
8. Guillon, J, 2007. Molecular phylogeny of horsetails (*Equisetum*) including chloroplast *atpB* sequences, Journal of Plant Research volume 120, pp.569-574.
9. GUILLON, J.-M. and C. RAQUIN. 2000. Maternal inheritance of chloroplasts in the horsetail *Equisetum variegatum* (Schleich.). Current Genetics 37:pp 53-56.
10. HAUKE, R. L. 1963. A taxonomical monograph of the genus *Equisetum* subgenus *Hippochaete*. Beheifte zur Nova Hedwigia 8: pp.1- 123.

11. HAUKE, R. L. 1968. Gametangia of *Equisetum bogotense*. Bulletin of the Torrey Botanical Club 95: 341–345.
12. HAUKE, R. L. 1969. Gametophyte development in Latin American horsetails. Bulletin of the Torrey Botanical Club 96: 568–577.
13. Mouterde, P. 1966-. Nouvelle flore du Liban et de la Syrie.
14. Nadot S., 1994. The chloroplast gene rps4 as a tool for the study of Poaceae phylogeny; 191(1):pp27-38.
15. POST, G. E; DIMSMORE, J. E. 1933 Flora Of Syria, Palestine And Sinai, Equisetaceae, Horsetail Family, American University Of Beirut, pp 815-816.
16. RASSOULI, M. B; NASARI, F. G; NHKRAVESH, M. R; MOGHIMI, A. 2009. Neuroprotective Effects Of *Equisetum Telmateia* In Rat, University Of Mashhad, Iran.
17. Sandhu NS, Kaur S, Chopra D, 2010. *Equisetum aervens*: Pharmacology and Phytochemistry- A review. *Asian J. Pharmaceut. Clin. Res.*, 3(3): pp146-150.
18. SINHA, S. N. 2012. In Vitro Anti-Bacterial Activity Of Ethanolic Extract Of *Equisetum Arvense* L, University Of Kalyani, India, Vol 3.
19. ZOHARY, M. 1966. Flora Palestina, Part 1, Equisetaceae To Moringaceae,.. Jerusalem, VOL 1, pp 43-44.