التوصيف الجزيئي لعشبة الباذنجان البري *Solanum elaeagnifolium* Cav. في سورية

Molecular Characterization of Silverleaf Nightshade (*Solanum elaeagnifolium* Cav.) in Syria

د. ندى البرني[1] أ. د. أنور المعمار[2] د. غسان إبراهيم[2]

N . Albarni A . Al-Mouemar G. Ibrahim

(1) الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية، إدارة بحوث الموارد الطبيعية، دمشق، سورية. albarninada@hotmail.com

(2) قسم وقاية النبات، كلية الزراعة، جامعة دمشق، دمشق – سورية.

الملخص

يُعدُّ الباذنجان البري *Solanum elaeagnifolium* Cav. من النباتات الغازية، وهو من أهم أنواع الأعشاب الضارة الخطيرة التي تهدِّد زراعة المحاصيل في سورية. تم في هذه الدراسة التوصيف الجزيئي للطرازين الوراثيين لهذا النوع المنتشرين في البيئة السورية (ذو الأزهار البنفسجية، وذو الأزهار البيضاء) باستخدام تقانة ISSR-PCR، التي أظهرت تعددية شكلية بلغت 91.33 % بين عينات الباذنجان البري والمزروع، إذ انفصلت الأنواع البرية في عنقود والأنواع المزروعة في عنقود آخر.

ضم تحت العنقود الأول نوعي الباذنجان البري ذو الأزهار البنفسجية والبيضاء. وانقسمت أنواعه إلى تجمعين: ضم الأول الباذنجان البري ذو الأزهار بنفسجية اللون المأخوذ من موقعين جغرافيين مختلفين، وهما على درجة عالية من القرابة الوراثية وبمسافة وراثية قدرها 10.48. في حين ضم التجمع الثاني نوع الباذنجان البري ذو الأزهار بيضاء اللون بمسافة وراثية بلغت 20.62. وهذا يطرح إمكانية إعادة تسميته كنوع أو صنف جديد من الباذنجان البري. في حين ضم تحت العنقود الثاني أصناف الباذنجان المزروع.

الكلمات المفتاحية: الباذنجان البري، الطراز الوراثي، التعددية الشكلية، ISSR-PCR.

Abstract

Silverleaf nightshade (*Solanum elaeagnifolium* Cav.) is the most serious invasive weed, threatening crops in Syria. Molecular Characterization of the two genotypes of silverleaf nightshade (violet and white flowers) spread in the Syrian environment was done using ISSR-PCR technique. The ISSR-PCR technique has showed polymorphism (91.33%) between silverleaf nightshade and cultivated eggplant, as the wild and cultivated species were separated in two different clusters. The first cluster included both violet and white flowers genotypes of silverleaf nightshade, and had two groups: the first group included the genotype with violet flowers, collected from two different geographical sites, and they were at a high genetic relevance degree with a genetic distance of about 10.48, while, the second group included the genotype with white flowers, with a genetic distance of about 20.62. This raises the possibility of renaming it as a new species or variety of silverleaf nightshade. The second cluster included cultivated eggplant varieties.

Key words: Silverleaf nightshade, Genotype, Polymorphism, ISSR-P.

©2016 The Arab Center for the Studies of Arid Zones and Dry Lands, All rights reserved.

ISSN:2305 - 5243 ; AIF(NSP)-316

المقدمة

يُعدُّ الباذنجان البري *Solanum elaeagnifolium* Cav. (Nightshade Silverleaf) (Solanaceae) من أهم أنواع الأعشاب الضارة الغازية الخطيرة التي تلحق أضراراً بالإنتاج الزراعي في حوض البحر المتوسط، ولاسيما في الدول التي تتميَّز بصيف حار وجاف (المعمار وزملاؤه، 2010). وقد أصبح هذا النوع في السنوات الأخيرة الأكثر أهميةً لدى باحثي الأعشاب الضارة ومكافحتها في العالم نظراً لانتشاره الواسع خارج موطنه الأصلي وهو جنوب غربي الولايات المتحدة الأمريكية وشمالي المكسيك (Anonyme، 1980)، وأكَّد Almouemar (2005) أن نبات الباذنجان البري له قدرة وسرعة كبيرة على الانتشار والانتقال في منطقة وجوده، وبالرغم من ارتباط طرائق وأنماط انتشاره بشكل مباشر أو غير مباشر مع أنماطه التكاثرية المختلفة، وصفاته الشكلية والفيزيولوجية، وأطواره الحياتية، فإنها كثيرة وفعَّالة. لقد استطاع هذا النوع في سورية بفضل خصائصه البيئية والبيولوجية، أن يغزو المحاصيل الزراعية الحولية أو المعمِّرة، والمناطق غير الزراعية، وجوانب الطرق وأقنية الري، ما جعل منه نباتاً غازياً لجميع البيئات الزراعية وغير الزراعية (البرني وزملاؤها، 2011).

ينتشر الباذنجان البري بشكل رئيس في المناطق الشمالية الشرقية من سورية، التي تعدُّ المناطق الرئيسة لزراعة محصولي القطن والقمح. قُدّرت المساحة الإجمالية المصابة بهذا النوع لعام 2003 بأكثر من 14810 هكتار. وبلغت في عام 2011 نحو 26862 هكتاراً موزعةً بين الحقول الزراعية والأراضي غير المزروعة وجوانب الطرق والأماكن العامة (تقارير مصالح وقاية المزروعات، 2003 و2011). تظهر الأضرار غير المباشرة للباذنجان البري من خلال إعاقته تنفيذ العمليات الزراعية، وسد المصارف وأقنية الري، وتدني خصوبة الأراضي التي ينتشر فيها (Ameur، 1993; Gmira وزملاؤه، 1998)، إضافةً لتأثيره السام في المواشي والإنسان (Bell وزملاؤه، 1990). أما أضراره المباشرة فتظهر من خلال التنافس الميكانيكي بينه وبين المحصول المزروع، وعن طريق إفرازه لمركبات سامة ومثبِّطة لنمو المحاصيل الزراعية والأعشاب الأخرى (Bell وزملاؤه، 1990; Albarni، 2013).

بيَّنت الدراسة الكمية والوصفية أن صبغيات الباذنجان البري صغيرة بشكل عام يبلغ عددها (2n=24) صبغياً، ويتراوح طولها بين 1 و 6 ميكرونات، وغالباً يوجد زوج أو زوجان من التوابع (Krishnappa وChennavee-Raiah، 1976; Khanas، 1996). وبالاعتماد على الصفات الشكلية يوجد للباذنجان البري طرازان وراثيان: ذو الأزهار البنفسجية، وذو الأزهار البيضاء. وتُعدُّ التباينات الشكلية من المعايير الأولى التي استُخدمت في عملية التوصيف والتصنيف ودراسة التباينات بين الأنواع المختلفة وفي داخلها. لكن الاعتماد على الصفات الشكلية لدراسة التنوع النباتي غير كاف، وبشكل خاص عند وجود تقارب كبير بين النباتات، نتيجة التأثُّر الشديد للصفات المظهرية بالظروف البيئية المحيطة بالنبات (Degani وزملاؤه، 1998). وتم مؤخَّراً دراسة التنوع الوراثي باستخدام المؤشرات الجزيئية المهمة التي تعتمد على تفاعل الـ PCR (Hodgkin وزملاؤه، 2001) من أهمها: تقانة التوابع الترادفية البسيطة الداخلية (ISSR) (Zietkiewicz وزملاؤه، 1994)، والتي تستخدم معلماً جزيئياً في دراسة البنية الوراثية، والتنوع الوراثي، والخصائص التحسينية للنباتات المدروسة (Bornet وزملاؤه، 2002). تعتمد هذه التقانة على تضخيم المواقع (100-3000 bp) بين التوابع الدقيقة المتقاربة والمتوضعة بشكل متعاكس (Zietkiewicz وزملاؤه، 1994)، باستخدام بادئات وحيدة طولها بين 16 و 18 bp. ويكون عدد الحزم المنتجة مرتبطاً بشكل عكسي مع عدد النكليوتيدات في وحدة تكرار المحضر (Nagaraju وزملاؤه، 2002)، وهي تعطي مستويات عالية من التعددية الشكلية لـ DNA. وتمتاز هذه التقانة بأنها سريعة، وذات تكرارية ووثوقية عالية (Chowdhury وزملاؤه، 2002)، ولا تحتاج إلى معلومات مسبقة عن المجين (Kijas وزملاؤه، 1995). كما أنها لا تحتاج إلى تراكيز عالية من الـ DNA للمادة المدروسة (Bornet و Branchard، 2001)، ويمكن الكشف عن التتاليات النيكليوتيدية ذات السيادة في التوريث. وتعدُّ مؤشرات ISSR مفيدة جداً في كشف اختلافات السلالات الخضرية الجسمية (Albani وWilkinson، 1998)، وبسبب بساطتها فإنها تزيد من إمكانية استخدامها في الوسم المجيني (Ammiraju وزملاؤه، 2001). وتمتاز مؤشرات ISSR بأنها غزيرة، لذلك فهي تعطي عدداً كبيراً من الحزم، كما أن مستوى التعددية الشكلية عالٍ إلى متوسط، وطبيعة التوريث سائد إلى متنحٍ، والقدرة على التضخيم عالية إلى متوسطة، والتكاليف منخفضة، بالإضافة إلى أن جهد تنفيذها منخفض (Van der Nest وزملاؤه، 2000). تفيد تقانة ISSR في إمكانية دراسة غزارة انتشار SSR في المجين، إذ أن الحزم المنتجة من قبل مرسئة ISSR مع تسلسل تابع دقيق معطى يعكس التسلسل المرتبط بالحافز في المجين. كما يمكن تصميم مرسئات ISSR بسهولة ومن دون معلومات مسبقة عن التسلسل المجيني، وتستخدم بشكل واسع في مجالات المجتمعات الوراثية، ورسم الخرائط الوراثية، ووسم المورثات (Rakoczy-Trojanowska وBolibok، 2004). لقد استُخدمت هذه التقانة لدراسة التنوع الوراثي في العديد من الأنواع النباتية مثل البطاطا (Bornet وزملاؤه، 2002). قام Shiro وزملاؤه (2008) بدراسة التنوع الوراثي لثمانية أصناف من الباذنجان المزروع *Solanum melongena* L.، وثمانية أنواع أخرى من جنس *Solanum* بتطبيق تقانة ISSR-PCR، إذ تم تضخيم 552 حزمةً ذات تعددية شكلية بنسبة 99.1 %، نتجت عن 34 بادئةً أعطت نتائج تضخيم من أصل 100 بادئة مستخدمة. وقد انقسمت أنواع الجنس *Solanum* نتيجة التحليل العنقودي إلى سبعة عناقيد كالتالي: (1) أصناف الباذنجان المزروع *S. aethiopicum*، (2) *S. melongena* و *S. anguivi*، (3) *S. incanum*، (4) *S. violaceum* و*S. kurzii*،

(5) *S. macrocarpon*، (6) *S. virginianum*، (7) *S. Torvum*. وعند تطبيق تقانة ISSR-PCR من قبل Mahmoud وEl-Mansy (2012) على عشرة أصناف مصرية من الباذنجان المزروع، تم تضخيم 71 حزمةً منها 47 حزمةً أبدت تعددية شكلية بنسبة 61 %، نتجت عن 7 بادئات من أصل 20 بادئةً مستخدمةً. وانقسمت شجرة القرابة الوراثية للأصناف المدروسة إلى عنقودين، احتوى كل عنقود على الطراز الوراثي للأصل. بينما أشار Channe وزملاؤه (2013) عند تطبيق تقانة ISSR-PCR على خمسة أصناف هندية من الباذنجان المزروع إلى وجود 69 حزمة قابلة للعد منها 44 حزمة أبدت تعدديةً شكليةً نتجت عن 11 بادئة، بمتوسط 4 حزم لكل بادئة. وانقسمت شجرة القرابة الوراثية للأصناف المدروسة إلى عنقودين، ضم العنقود A الطراز الوراثي للصنف MPKV فقط، بينما ضم العنقود B ثلاثة طرز وراثية.

هدف البحث: دراسة التوصيف الجزيئي للطرازين الوراثيين لعشبة الباذنجان البري *S. elaeagnifolium* المنتشرين في سورية باستخدام تقانة ISSR-PCR.

مواد البحث وطرائقه

نُفِّذت التجارب المخبرية في مخبر البيولوجيا الجزيئية التابع لكلية الهندسة الزراعية في جامعة دمشق (سورية)، ومخبر أبحاث الأعشاب الضارة التابع للهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية في سورية.

تم جمع الثمار الحاوية على البذور لنباتات الباذنجان البري *S. elaeagnifolium* في شهر تشرين الأول (أكتوبر) خلال طور النضج التام من الحقول المزروعة بالقطن في محافظة دير الزور لموسم عام 2010، فجُمعت بذورالنباتات ذات الأزهار البنفسجية من بلدة موحسن، وبذور النباتات ذات الأزهار البيضاء من بلدة العبد الشرقية. كما تم جمع بذور النباتات ذات الأزهار البنفسجية من الأراضي غير المزروعة وجوانب الطرق في بلدة حتيتة التركمان التابعة لمحافظة ريف دمشق. واختيرت هاتان المنطقتان وفقاً لاختلافاتهما في مواصفات البيئة الزراعية، وكونهما مناطق لانتشار عشبة الباذنجان البري (الجدول 1). وتم الحصول على بذور أصناف الباذنجان المزروع *S. melongena* المدروسة من مخبر أبحاث اعتماد أصناف بذور الخضار التابع للهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية في سورية.

الجدول 1. مواقع أماكن جمع العينات المدروسة.

مكان الجمع	خط الطول	خط العرض	الارتفاع عن سطح البحر (قدم)
موحسن (دير الزور)	40°19`09.69" E	35°14`14.91" N	643
العبد الشرقية (دير الزور)	40°17`07.94" E	35°14`36.12" N	650
حتيتة التركمان (ريف دمشق)	36°22`01.32" E	33°25`11.57" N	2123

تم التعقيم السطحي لبذور كل من الباذنجان البري ذو الأزهار البنفسجية، والباذنجان البري ذو الأزهار البيضاء، وثلاثة أصناف من الباذنجان المزروع *S. melongena* والعادي Solistice (شركة Bourget et Sanvisin)، والمتطاول 41 SRR-71 (شركة Serria)، وشبيه بالحمصي Yaghoute F1 (شركة Vilmorin) باستخدام محلول هيبوكلوريد الصوديوم NaOCl تركيز 5 % لمدة دقيقة واحدة، ثم غُسلت خمس مرات بالماء المقطَّر، وجُفِّفت بين سطحي ورق نشَّاف جاف (Martin وزملاؤه، 1990). زُرعت البذور المُعقَّمة سطحياً من كل من الباذنجان البري والمزروع كلٍ على حدة، وبشكل متناوب في ثنيات ورقة الإنبات نوع Pleated Paper بمعدل 25 بذرة/ورقة موضوعة على طبقة من الكرات الزجاجية المخبرية بسماكة 1 إلى 1.5 سم داخل علب إنبات بلاستيكية شفافة (20 × 14 × 9) سم مُزوَّدة بأغطية شفافة محكمة الإغلاق، وحُضِّرت أربعة مكررات لكل نوع من أنواع البذور. تمت إضافة 50 مل من الماء المقطَّر لكل علبة على حدة، وتم تغذيتها بمحلول سمادي متوازن (9.5غ/ل). أُغلقت العلب بإحكام وتم لفُّها ببارافيلم 2 إنش للمحافظة على الرطوبة، ثم وضعت على طاولة في غرفة نمو على درجة حرارة 25°م و16 ساعة إضاءة، لمدة 15 يوماً.

تم عزل الـ DNA بطريقة CTAB المعدَّلة وفقاً لما أشار إليه Saghai-Marrof وزملاؤه (1984) مع إجراء بعض التعديلات الطفيفة. حيث طُحنت 2 إلى 3 أوراق فتية خضراء من بادرات الطرز البرية والأصناف المزروعة في الآزوت السائل حتى الحصول على مسحوق ناعم، ثم مُزجت بـ 1 مل من محلول الاستخلاص Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide (CTAB)، وحُضِنت الأنابيب في حمام مائي على درجة 65°م مع التحريك المستمر لمدة 3 ساعات، ثم وضعت بعد ذلك على الثلج لمدة 5 دقائق، وأضيفت بعد ذلك كمية مماثلة من مزيج (24:1) كلوروفورم: آيزوميل الكحول. ومُزج الخليط بلطف لمدة 10 دقائق باستخدام هزاز آلي عند درجة حرارة المخبر. ثم تم تثفيل المزيج بوساطة جهاز الطرد المركزي عند سرعة 10000 دورة/دقيقة لمدة 10 دقائق، ونُقل الطور العلوي المتشكِّل الحاوي على الأحماض النووية بعد عملية التثفيل بوساطة ماصة إلى أنابيب تثفيل جديدة، وأضيف لها آيزوبروبانول مبرَّد بمعدل 0.6 من حجم الرشاحة، ثم تم تحريك المزيج بلطف بقلب الأنبوب رأساً على عقب عدة مرات، ووضع على درجة الحرارة - 20 م° حتى اليوم الثاني ليترسب الـ DNA. أضيف لـ DNA المُترسِّب 100 ميكروليتر من محلول الإيتانول 80 % البارد (المحفوظ

بدرجة – 20 م°)، وتُرك في الثلج لمدة 20 دقيقة، ثم تم التخلُّص من محلول الغسيل بعد التثفيل عند سرعة 10000 دورة/دقيقة لمدة 10 دقائق على درجة 4°م. تم تجفيف راسب الـ DNA باستخدام التجفيف مع التفريغ الحراري في مجفدة على درجة حرارة 37 م° لمدة 10 دقائق. وأُذيبت عينات الـDNA في 50 ميكروليتر من المحلول المنظم (10 mM Tris- HCl، 1mM EDTA) (TE) باستخدام هزاز آلي لمدة 12 إلى 24 ساعة على درجة الحرارة 4 م°. كما تم التخلُّص من الـ RNA الناتجة عن عملية الاستخلاص وذلك بإضافة 2 ميكروليتر من أنزيم RNase (10 مغ/مل) والتحضين على درجة الحرارة 37 م° لمدة نصف ساعة، ثم أُضيف حجم مماثل من الكلوروفورم: أيزوميل الكحول (1:24). وبعد التثفيل تم نقل الطور العلوي لأنبوب جديد. أُضيف له 0.6 من الحجم آيزوبروبانول وتُرك على درجة الحرارة 4 م° لمدة ساعة، وتم ترسيب الـ DNA بعد التثفيل بسرعة 10000 دورة/دقيقة لمدة 10 دقائق، ثم غُسِلَ ثانيةً بوساطة الإيتانول 80 %، وجُفِّف هوائياً للتخلُّص من آثار الإيتانول ضمن جهاز المُجفِّف بالتفريغ والحرارة (block Heater Dry) نوع Labtech. ثم أذيب الـDNA في محلول TE المعقَّم.

تم استخدام جهاز (Power Wave XTM (BIO-TEK Instruments، Inc. لتقدير كمية الـ DNA وتحديد نقاوته. إذ أن النسبة بين قراءة الموجة 260 نانومتر والموجة 280 نانومتر تساعد على تقدير نقاوة الحمض النووي، ويجب أن تتراوح هذه النسبة بين 1.8 و2 (Maniatis وزملاؤه، 1982). كما أن قراءة الامتصاص على طول الموجة 260 نانومتر تسمح بحساب تركيز الـ DNA في العينة المقاسة. وتمَّ حساب تركيز الـ DNA وفق المعادلة التالية (Maniatis وزملاؤه، 1982):

$$\text{DNA concentration (g/L)} = [OD_{260} \times \text{معامل التمديد} \times 50\ (g/ml)] / 1000$$

حيث تُمثِّل OD_{260} الكثافة الضوئية لامتصاص الحمض النووي (µg) عند الموجة 260 نانومتر. ثم مُددت عينات الـ DNA للحصول على التركيز 40 نانوغرام/ ميكروليتر.

تم التقدير النوعي على هلامة الآغاروز، إذ يظهر الـDNA ذو النوعية الجيدة على شكل حزمة (Band)، بينما يكون الـDNA سيء النوعية مبعثراً وغير واضح الحدود (Smear). وتم تطبيق تقانة ISSR-PCR وأُجري اختبار 18 بادئة تم الحصول عليها من الهيئة العامة للطاقة الذرية في سورية بتركيز 10 ميكرومول (2 ميكروليتر) من البادئ. كما استخدم 12.5 ميكروليتر من 2 X PCR Master Mix والذي تم الحصول عليه من شركة (Fermentas، Germany) الحاوي على المكوِّنات التالية: (Taq-Polymerase, dNTPs، MgCl2 و DNA بتركيز 40 نانوغرام/ ميكروليتر)، وأكمل الحجم إلى 25 ميكروليتر بالماء المقطَّر. أُجري تفاعل البلمرة المتسلسل PCR وفقاً لـ Williams وزملائه (1990) مع بعض التعديلات، فكان حجم التفاعل النهائي 25 ميكروليتراً. وقد تم هذا التفاعل في جهاز التدوير الحراري من شركة (APOLLO، USA) موديل ATC 401 وفقاً للظروف التالية:

1 ـ الانفصال: 94 م° لمدة 5 دقائق.

2 ـ 40 دورة تتضمن كل منها:

أ. التحطم: 94 م° لمدة 30 ثانية.

ب. الالتحام: حسب درجة حرارة البادئات لمدة دقيقة واحدة.

جـ. الاستطالة: 72 م° لمدة دقيقة.

ء. اكتمال التفاعل على درجة الحرارة 72 م° لمدة عشر دقائق.

حُفظت العينات على درجة الحرارة 4 م°، لتفصل الحزم بعدها بالترحيل على هلامة الأغاروز 2 %. وتم تحضير هلامة الأغاروز بتركيز 2 % وذلك لفصل حزم الـ DNA الناتجة عن التضخيم. حيث حُضِّرت صبغة الترحيل (Bromophenol blue) التي تحتوي على المُكوِّنات التالية:

(15% Ficoll 400 + 1.03 % Bromophenol Blue + 0.03 % Xylene Cyanol FF + 0.4 % Orange G + 10 mM Tris-HCl + 50 mM EDTA)

وأُضيف 5 ميكروليتر من هذه الصبغة Bromophenol blue لـ 25 ميكروليتر لكل عينة من منتجات التضخيم، وحُقنت في آبار هلامة الأغاروز التي تم تحضيرها، و 5 ميكروليتر من صبغة الايثيديوم بروماید (50 ميلي غرام/مل). كما تم حقن عينة من مؤشِّر 1000 bp DNA من شركة (Fermentas، Germany) وذلك لتحديد الحجم الجزيئي للحزم الناتجة. وتم الترحيل على هلامة الآغاروز بمرور حقل كهربائي قدره 100 فولط لمدة ساعتين ونصف، ثم تم تصوير الهلامة التي تحتوي على الحزم بجهاز Image Analyzer (Agle Eye II Taratagene). ومشاهدة حزم الـ DNA بوجود الأشعة فوق البنفسجية UV- light.

التحليل الإحصائي:

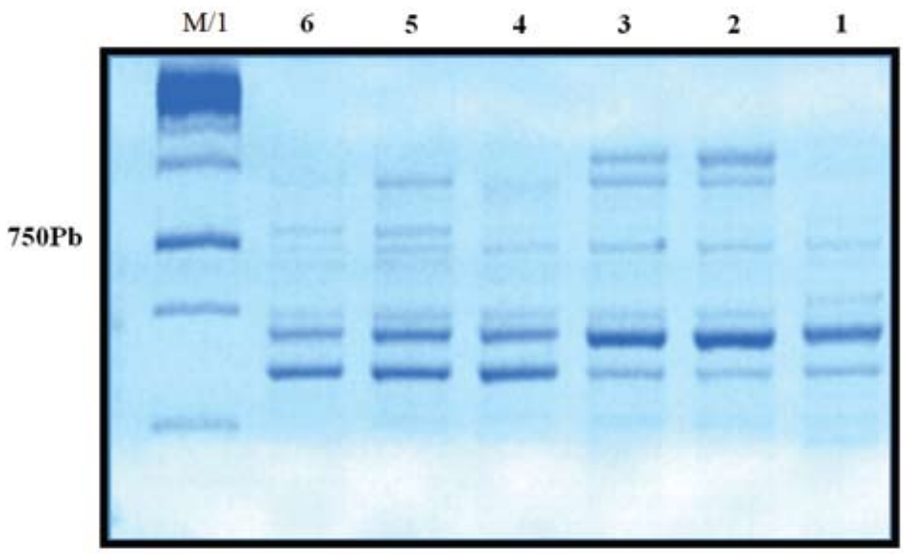
حُدِّدت درجة القرابة الوراثية، ورُسمت شجرة القرابة الوراثية (Dendrogram) بين نباتات نوعي الباذنجان المدروسين، بتطبيق طريقة التحليل العنقودي (Cluster Analysis) باستخدام برنامج Popgene 1.31 الإحصائي. إذ يسمح التحليل العنقودي بتقسيم النباتات المدروسة إلى مجموعات، تعكس هذه المجموعات درجة القرابة الوراثية فيما بينها، إذ تتجمع العينات ضمن مجموعة واحدة بناءً على موطنها الأصلي، أو بناءً على أصلها ونسبها.

تم جمع نتائج عملية التضخيم في جداول اعتماداً على مقارنة وجود أو غياب حزم الحمض النووي DNA بين النباتات التي جُمعت من المواقع المختلفة، فأعطي الرقم (1) عند وجود حزمة الـ DNA ذات وزن جزيئي محدد عند أي طراز أو صنف، والرقم (0) لعدم وجودها. ويتضمن ذلك الحزم الواضحة فقط. وقد نُظِّمت الجداول لكل بادئة على حده (Adonina وزملاؤه، 2005; Suman وزملاؤه، 2005; Zhi-Peng وزملاؤه، 2007; Zhong وزملاؤه، 2009). ولهذا شُكِّلت مصفوفة النسب المئوية لعدم التوافق (Percent Disagreement Values) (PDV). وقد تمَ إنشاء هذه المصفوفة وفقاً لعدد وحدات التضاعف المشتركة، بتطبيق متوسطات المجموعات الزوجية غير المزانة (UPGMA) (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averaging)، إذ أن ارتفاع قيم هذه المصفوفة يدل على وجود اختلاف وراثي، وبازديادها يزداد التباين الوراثي بين العينات المدروسة (Nei، 1972 و 1978).

النتائج والمناقشة

تم استخلاص الحمض النووي DNA من البادرات الفتية بعمر أسبوعين، وقياس تركيزه ونقاوته بجهاز المطياف الضوئي، فتراوحت التراكيز بين 0.56 و 1 ميكروغرام/ميكروليتر، ونقاوة العينات بين 1.8 و 2.

مُدد تركيز الحمض النووي DNA ليصبح 40 نانوغرام/ميكروليتر. وطُبِّقت تقانة ISSR-PCR للتمييز بين الطرز والأصناف المدروسة، فتم اختبار 18 بادئةً، أعطت 10 بادئات منها حزماً واضحة وذات تعددية شكلية (الشكل 1).



الشكل 1. التعددية الشكلية مع البادئة ISSR-36.

1. الباذنجان البري ذوالأزهار البيضاء (دير الزور)
2. الباذنجان البري ذو الأزهار البنفسجية (دير الزور)
3. الباذنجان البري ذو الأزهار البنفسجية (ريف دمشق)
4. الباذنجان المزروع العادي
5. الباذنجان المزروع المتطاول
6. الباذنجان المزروع شبيه بالحمصي

M. معلم جزيئي

تضمَّنت الدراسة اختبار التراكيب الوراثية من الباذنجان البري والباذنجان المزروع. إذ يُبيِّن الجدول 2 أن 10 بادئات من أصل 18 بادئة أعطت منتجات تضخيم في تفاعل البلمرة المتسلسل، وقد أثبتت البادئات المستخدمة فعاليتها في إعطاء تعددية شكلية بين التراكيب الوراثية المدروسة.

نجم عن استخدام هذه البادئات ما مجموعه 37 حزمةً، منها 33 حزمةً ذات تعددية شكلية، إذ بلغت هذه التعددية 91.33 %. وتراوح عدد الحزم لكل بادئة بين 1 كأقل عدد مع البادئتين (ISSR-41) و(ISSR-21) و 6 كأعلى عدد مع البادئة (ISSR-36) بمتوسط بلغ 3.7 لكل بادئة. وتراوح عدد الحزم ذات التعددية الشكلية بين 1 مع البادئتين (ISSR-21) و(ISSR-41) و 5 مع البادئتين (ISSR-23) و (ISSR-10)بمتوسط قدره 3.3 لكل بادئة (الجدول 2).

وبالعودة إلى ما تم عرضه للدراسات العلمية السابقة، يُستدل على وجود توافق بين النسبة المئوية للتعددية الشكلية التي تم الحصول عليها في هذه الدراسة مع النسبة (99.1 %) التي ذكرها Shiro وزملاؤه (2008)، ولكنها اختلفت عن النسبة (61 %) التي توصَّل إليها Mahmoud وEl-Mansy (2012)، وذلك عند دراسة التنوع الوراثي لعدة أصناف من الباذنجان باستخدام تقانة ISSR-PCR.

الجدول 2. رموز البادئات المستخدمة، وعدد الحزم الكلي وعدد الحزم المتباينة، والنسبة المئوية للتعددية الشكلية (%).

اسم البادئة	عدد الحزم الكلي	عدد الحزم المتباينة	النسبة المئوية للتعددية الشكلية (%)
ISSR-6	4	4	100
ISSR-2	3	3	100
ISSR-23	5	5	100
ISSR-24	4	4	100
ISSR-21	1	1	100
ISSR-10	5	5	100
ISSR-19	5	4	80
ISSR-41	1	1	100
ISSR-36	6	4	66.66
ISSR-40	3	2	66.66
المجموع	37	33	
المتوسط	3.7	3.3	91.33

يُبيِّن الجدول 3 أن أقل قيمة لـPDV هي 0.2097 بين الطراز 2 والطراز 3(نوعي الباذنجان البري ذو الأزهار بنفسجية اللون المأخوذ من موقعين مختلفين جغرافياً)، ما يدل على التقارب الوراثي بينهما. بينما كانت أعلى قيمة لها 0.9719 بين الطراز 1 (الباذنجان البري ذو الأزهار بيضاء اللون) والنوعين 4 و 5 (صنفي الباذنجان المزروع العادي والمتطاول) على التوالي. وأيضاً بين الطراز 3 (الباذنجان البري ذو الأزهار بنفسجية اللون) والصنف 5 (صنف الباذنجان المزروع المتطاول SRR 41-71) مما يدل على وجود تباين وراثي كبير بينها (الجدول 3).

الجدول 3. مصفوفة النسب المئوية لعدم التوافق (PDV) بين الأنواع المدروسة والشاهد، والناتجة عن تطبيق متوسطات المجموعات الزوجية غير المزانة (UPGMA) بتطبيق تقانة ISSR-PCR (Nei، 1978).

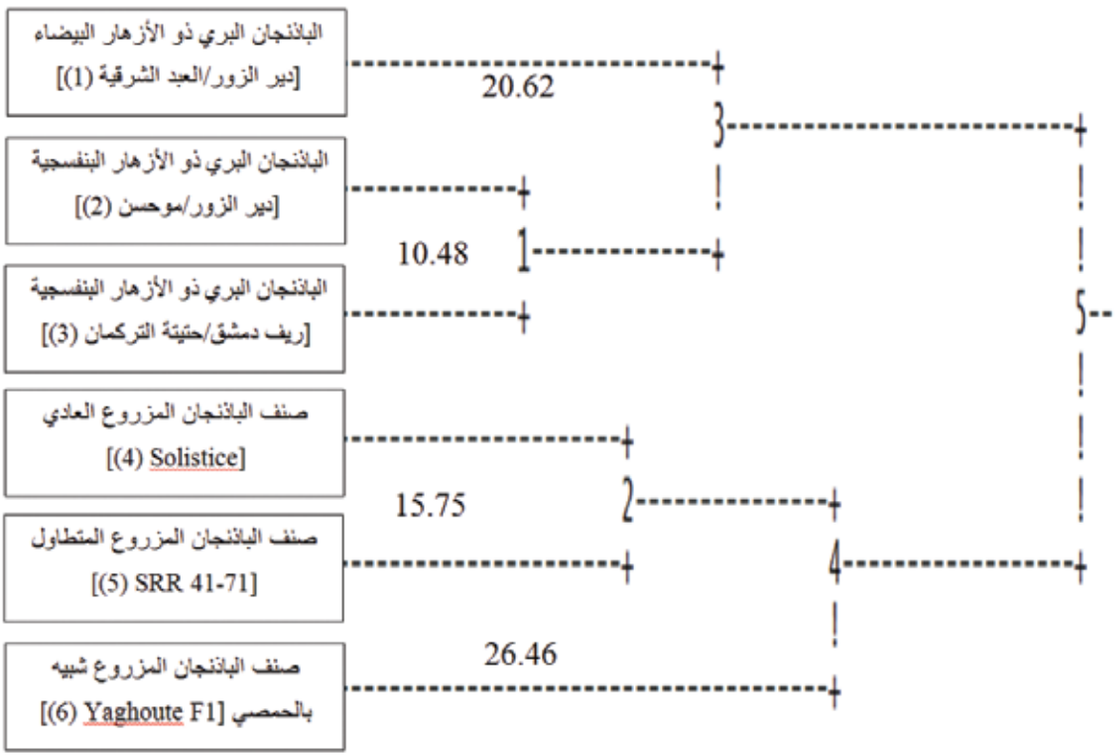
		1	2	3	4	5	6
الباذنجان البري ذو الأزهار البيضاء (دير الزور)	1	****					
الباذنجان البري ذو الأزهار البنفسجية (دير الزور)	2	0.4329	****				
الباذنجان البري ذو الأزهار البنفسجية (ريف دمشق)	3	0.3920	**0.2097**	****			
الباذنجان المزروع العادي	4	**0.9719**	0.6665	0.8383	****		
الباذنجان المزروع المتطاول	5	**0.9719**	0.9029	**0.9719**	0.3151	****	
الباذنجان المزروع شبيه بالحمصي	6	0.5199	0.6665	0.6152	0.6665	0.3920	****

يُلاحظ من شجرة القرابة الوراثية (Dendrogram) بين الطرزوالأصناف المدروسة المبيَّنة في الشكل 2، أنها انقسمت إلى تحت عنقودين، فضم تحت العنقود الأول طرازي الباذنجان البري 1 و2 و3، وانقسمت الطرز بدورها إلى مجموعتين: ضمَّت الأولى الباذنجان البري ذو الأزهار بنفسجية اللون المأخوذ من موقعين مختلفين جغرافياً (دير الزور/موحسن) و(ريف دمشق/حتيتة التركمان) وهما الطرازان 2 و3 وعلى درجة عالية من القرابة الوراثية وبمسافة وراثية قدرها 10.48. وهذا يدل بوضوح تام على التشابه الوراثي بين عينات الباذنجان البري ذو الأزهار بنفسجية اللون، الذي بدأ انتقاله إلى أماكن جديدة في سورية والذي غالباً ما يتم بسرعة كبيرة عن طريق الأغنام أو السماد العضوي (Almouemar، 2005). بينما ضمَّت المجموعة الثانية طراز الباذنجان البري ذو الأزهار بيضاء اللون (دير الزور/العبد الشرقية) (الطراز 1) وبمسافة وراثية قدرها 20.62. وهذا يثير التساؤل حول إمكانية إعادة تسميته كطراز جديد أو صنف من الباذنجان البري.

كما ضم تحت العنقود الثاني أصناف الباذنجان المزروع (4 و5 و6) (العادي Solstice، والمتطاول SRR 41-71، وشبيه الحمصي Yaghoute F_1).

إذ انقسمت أصنافه إلى مجموعتين: ضمَّت الأولى صنفي الباذنجان المزروع العادي والمتطاول (الصنفان 4 و5)، إذ بلغت المسافة الوراثية 15.75. في حين ضمَّت المجموعة الثانية صنف الباذنجان المزروع شبيه الحمصي Yaghoute F1 (الصنف 6) وبمسافة وراثية بلغت 26.46. وقد انسجمت هذه النتيجة مع ما أشار إليه Mahmoud وEl-Mansy (2012)، وChanne وزملاؤه (2013)، حيث انفصلت شجرة القرابة الوراثية لأصناف الباذنجان المزروع المدروسة المصرية والهندية إلى تحت عنقودين.

وبالعودة إلى ما تم عرضه ولما سبق ذكره من معطيات للدراسات العلمية السابقة يُستدل على وجود توافق للنتائج التي تمَ الحصول عليها من هذه الدراسة مع ما توَّصل إليه Shiro وزملاؤه (2008)، إذ انفصلت في شجرة القرابة الوراثية أصناف الباذنجان المزروع المدروسة في عنقود وباقي أنواع الجنس *Solanum* في عناقيد أخرى.



الشكل 2. التحليل العنقودي للطرز والأصناف المدروسة باستخدام تقانة ISSR-PCR.

الاستنتاجات

1. أظهرت تقانة ISSR-PCR تعدديةً شكليةً تمثلت في إظهار التباينات بين عينات الباذنجان البري والمزروع، إذ بلغت التعددية الشكلية 91.33 %، باستخدام 18 بادئةً من بادئات ISSR، أعطت 10 بادئات نتائج تضخيم، وانفصلت الطرز البرية في عنقود والأصناف المزروعة في عنقود آخر.
2. أظهرت هذه التقانة أيضاً فروقاً بين طراز الباذنجان البري ذو الأزهار البنفسجية وطراز الباذنجان البري ذو الأزهار البيضاء، وهذا يطرح إمكانية إعادة تسميته طرازاً جديد من الباذنجان البري.
3. دلت الدراسة على التشابه الوراثي الكبير بين عينات الباذنجان البري ذي الأزهار البنفسجية، وهذا يعود لحداثة دخول الطراز إلى سورية، ويعطي فكرةً عن إمكانية استجابة نباتاته لعمليات المكافحة الحيوية أو الكيميائية.

المقترحات

مما سبق تقترح الدراسة القيام بالتوصيف الجزيئي لنباتات الباذنجان البري في جميع مناطق انتشارها في سورية لمعرفة مدى درجة القرابة الوراثية فيما بينها، ومع عينات باذنجان بري في الدول المجاورة.

المراجع

- البرني، ندى والمعمار، أنور وإبراهيم، غسان.2011. تأثير مساحيق الباذنجان البري .*Solanum elaeagnifolium* Cav خلال طور النضج التام في إنبات ونمو القمح. مجلة الكيمياء البيولوجية والعلوم البيئية. 6 (3): 416-428.
- تقارير مصالح وقاية المزروعات.2003. مديريات الزراعة والإصلاح الزراعي في الحسكة والرقة ودير الزور- تقارير غير منشورة.
- تقارير مصالح وقاية المزروعات.2011. مديريات الزراعة والإصلاح الزراعي في الحسكة والرقة ودير الزور وحلب وحمص – تقارير غير منشورة.
- المعمار، أنور ومحمد، عبد الحكيم وعثمان، عدنان وطباش، سمير ويونس، خلدون.2010. الباذنجان البري. وزارة الزراعة والإصلاح الزراعي – مديرية وقاية النبات بالتعاون مع الهيئة العليا للبحث العلمي، منشورات وزارة الزراعة والاصلاح الزراعي: 5-24.
- Adonina, I. G.; E. A. Salina, E. G. Pestsova and M. S. Röder.2005. Transferability of Wheat Microsatellites to Diploid *Aegilops* Species and Determination of Chromosomal Localizations of Microsatellites in The S Genome. Genome. 48: 959 - 970.
- Albani, M. C;. and M. J. Wilkinson.1998. Inter Simple Sequence Repeat Polymerase Chain Reaction For The Detection of Somaclonal Variation. Plant Breeding. 117: 573 - 575.
- Albarni, N. 2013. Allelopathic Effect of Silverleaf Nightshade (*Solanum elaeagnifolium* Cav.) on Germination and Growth of Wheat (*Triticum* spp.). Ph.D Thesis, Damascus University, Damascus, Syria. 249 pp.
- Almouemar, A.2005. Morelle Jaune (*Solanum elaeagnifolium* Cav.) Une Espèce Envahissante Des Cultures Cotonnières du Nord de la Syrie. Workshop International "Invasive Plants in The Mediterranean Type Regions of The World" Montpellier. P 42.
- Ameur, A.1993. Dynamique de la Levée de la Morelle Jaune (*Solanum elaeagnifolium* Cav.) Dans la Betterave à Sucre et le Blé au Tadla. Mèm. Troisième Cycle Agro. Opt. Malher. IAV. Hassan II, Rabat. P 226.
- Ammiraju, J. S. S.; B. B. Dholakia, D. K. Santra, H. Singh, M. D. Lagu, S. A. Tamhankar, H. S. Dhaliwal, V. S. Rao, V. S. Gupta and P. K. Ranjekar.2001. Identification of Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) Markers Associated With Seed Size in Wheat. Theor. Appl. Genet. 102 (5): 726 - 732.
- Anonyme, T.1980. Report of Silverleaf Nightshade Research. Keih Turnbull Research Institute- Victoria- Australia. Dep. of Grown Lands and Survey. Pamplet Nº 79.
- Bell, C. E.; I. G. Elefthe Rohorinos and E. Koutoula-Syka.1990. Biology and Control of Silverleaf Nightshade (*Solanum elaeagnifolium* Cav.). Zizaniologia. 2 (3): 135 - 143.
- Bornet, B. N. and M. Y. Branchard.2001. Non-Anchored Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) Markers: Reproducible and Specific Tools For Genome Fingerprinting. Plant Molecular Biology Reporter. 19: 209432-22:427 ,215-.
- Bornet, B.; F. Goraguer, G. Joly and M. Branchard.2002. Genetic Diversity in European and Argentinean Cultivated Potatoes (*Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum*) Detected by Inter-Simple Sequence Repeats (ISSRs). Genome. 45: 481 - 484.
- Channe, J. B.; N. V. More and R. S. Kadam.2013. Assortment of Genetic Diversity in Brinjal (*Solanum melongena*) Genotypes Using ISSR Markers. Indian Journal of Applied Research. 3 (6): 44 - 46.
- Chowdhury, M. A.; 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.
- Degani, C.; L. G. Rowland, A. Levi Hortynski and G. J. Galletta.1998. DNA Fingerprinting of Strawberry (*Fragaria xananassa*) Cultivars Using Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Markers. Euphytica. 1025: 247 - 253.
- Gmira, N.; A. Douira and M. Bouhache.1998. Ecological Grouping of *Solanum elaeagnifolium*: a Principal Weed in The Irrigated Tadla Plain (Central Morocco). Weed Research. 38 (2): 8794-. {a} Lab. Bot. d' Ecol. Veg., Fac. Sci. BP 133, Kenitra, Morocco.
- Hodgkin, T.; R. Roviglioni, M. C. De Vicente and N. Dudnik.2001. Molecular Methods In The Conservation and Use Of Plant Genetic Resources. Acta Hort. ISHS. 546:107 - 118.
- Khanas, M.1996. Etude de la Variabilité Morphplogique et Cytologique Chez les Populations á Fleurs Violette et Blanch de la Morelle Jaune (*Solanum elaeagnifolium* Cav.) Dans le Tadla. Doctorat de Troisieme Cycle. Université Mohammed V, Fac. Scie. Rabat.

- Kijas, J. M. H.; J. C. S. Fowler and M. R. Thomas.1995. An Evaluation of Sequence Tagged Microsatellite Site Markers For Genetic Analysis Within Citrus and Related Species. Genome. 38:349 - 355.
- Krishnappa, D. G. and M. S. Chennavee-Raiah.1976. Karyomorphological Studies in Spinaceous Species of Solanum. Proceedings of The Indian National Science Academy. 42 (1): 25 - 28.
- Mahmoud, M. I. and A. B. El-Mansy.2012. Molecular Identification of Eggplant Cultivars (*Solanum melongena* L.) Using ISSR Markers. Journal of Applied Sciences Research. 8 (1): 69.
- Maniatis, T.; E. F. Fritsch and J. Sambrook.1982. Molecular Cloning: Laboratory Manual. Cod Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor/NY.
- Martin, V. L.; E. L. McCoy and W. A. Dick.1990. Allelopathy of Crotat Residues Influences Corn Seed Germination and Early Growth. Agron. J. 82: 555 - 560.
- Nagaraju, J.; M. Kathirvel, R. 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. 99: 5836 - 5841.
- Nei, M.1972. Interspecific Gene Differences and Evolutionary Estimated From Electrophoretic Data on Proteinidentify. Amer. Naturalist. 106: 283 - 292.
- Nei, M.1978. Estimation of Average Heterozygosity and Genetic Distance From A Small Number of Individuals. Genetics. 89: 583 - 590.
- Rakoczy-Trojanowska, M. and H. Bolibok.2004. Characteristics and Comparison of Three Classes of Microsatellite-Based Markers and Their Application in Plants. Cell. Mol. Biol. Lett. 9: 221 - 238.
- Saghai-Marrof, M.A.; R. W. Allard and Q. Zhang.1984. Genetic Diversity and Ecogeographical Differentiation Among Ribosomal DNA Alleles in Wild and Cultivated Barley. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87: 8486 - 8490.
- Shiro, I.; I. Naoko, M. D. Khan and M. Rahim.2008. ISSR Variations in Eggplant (*Solanum melongena* L.) and Related Solanum Species. Scientia Horticulturae. 117 (3): 186 - 190.
- Suman, S.; B. Singh and S. N. Govinder.2005. Genetic Relationship Among Wheat Genotypes, as Revealed by Microsatellite Markers and Pedigree Analysis. J. Appl. Genet. 46 (4): 375 - 379.
- Van der Nest, M.A.; E. T. Steenkamp, B. D. Wingfield and M. J. Wingfield.2000. Development of Simple Sequence Repeats (SSR) Markers in *Eucalyptus* From Amplified Inter-Simple Sequence Repeats (ISSR). Plant Breeding. 119: 433 - 436.
- Williams, J. G. K; A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafalski and S. V. Tingey.1990. DNA Polymorphism Amplification by Arbitrary Primers Is Useful As Genetic Markers. Nucleic Acids Research. 18 (22): 6231 - 6235.
- Zhi-Peng, L.; L. Gong-She and Y. Qing-Chuan.2007. A Novel Statistical Method for Assessing SSR Variation in Autotetraploid Alfalfa (*Medicago sativa* L.). Genetics and Molecular Biology. 30 (2): 385 - 391.
- Zhong, J.; X. Lv, R. Liu and H. Chen.2009. Genetic Relationship of Sweet Cherry (*Prunas avium* L.) Based on SSR Markers. Plant Sciences Research. 2 (1): 6 - 10.
- Zietkiewicz, E. L.; A. N. Rafalski and D. Y. Labuda.1994. Genome Fingerprinting by Simple Sequence Repeat (SSR) Anchored Polymerase Chain Reaction Amplification. Genomics. 22 (20): 176 - 183.

Nº Ref- 476