مجلة جامعة تشرين للدراسات والبحوث العلمية _ سلسلة العلوم الأساسية المجلد (26) العدد (1)2004
Tishreen University Journal for Studies and Scientific Research- Basic Science Series Vol (26) No (1) 2004

استخدام تقانة الدنا (DNA) المضخم عشوائيا RAPD لكشف درجة القرابة بين بعض أنواع جنس الحوذان Ranunculus, L في الساحل السوري

الدكتور سرحان لايقة*
الدكتور محمد معلا**
عفيفة عيسى***

(قبل للنشر في 2003/11/2)

□ الملخّص □

تهدف هذه الدراسة الحصول على معلومات حول القاعدة الوراثية ودرجة القرابة بين طرز وراثية من جنس الحوذان *Ranunculus, L.* موزعة على الشريط الساحلي في سوريا باستخدام تقانة الدنا (DNA) المضخم عشوائيا RAPD. استخدم 27 مرئسة (primer) استطاع 16 منها إظهار درجة مختلفة من التعدديات الشكلية التي قسمت الطرز المدروسة استنادا إلى نتائج التحاليل بالمتوسط الحسابي للمجموعات الزوجية غير المزانة UPGMA والنسبة المئوية لدرجة عدم التوافق Percent disagreement إلى عنقودين رئيسين ضم العنقود الأول الأنماط الوراثية الرطبة و ذات لون التويج الأصفر و شكل الأوراق المجزأ، بينما تضمن العنقود الثاني الأنماط الوراثية المائية وذات التويج الأبيض و شكل الأوراق الخيطي. توافقت هذه النتائج المستحصل عليها بتقانة RAPD بشكل كامل مع جميع البيانات المتوفرة المستندة إلى دراسة الصفات المورفولوجية والتوزع البيئي لهذه الطرز.

الكلمات المفتاحية: تحديد أنواع، تنوع وراثي، حوذان، RAPD .

* أستاذ في قسم علم الحياة النباتية – كلية العلوم – جامعة تشرين – اللاذقية – سورية.
** أستاذ في كلية الزراعة – جامعة تشرين – اللاذقية – سورية.
*** معيدة في قسم علم الحياة النباتية – كلية العلوم – جامعة تشرين – اللاذقية – سورية.

مجلة جامعة تشرين للدراسات والبحوث العلمية _ سلسلة العلوم الأساسية المجلد (26) العدد (1)2004
Tishreen University Journal for Studies and Scientific Research- Basic Science Series Vol (26) No (1) 2004

Using of Random Amplified DNA for Detection (or: Determination) of Relationship Degree between of Genus: Ranunculus in the Syrian Coast Species

Dr. Sarhan Layka*
Dr. Mohamad Moualla**
Afifa Issa***

(Accepted 2/11/2003)

□ ABSTRACT □

This study seeks to obtain information about genetic base and relationship degree between genotypes belonging to genus Ranunculus distributed at coastal line in Syria by using RAPD technique. Twenty seven primers were used, sixteen primers exhibited deferent degree of polymorphism's which divided studied types according to results of analysis by UPGMA and percentage of disagreement degree into two main clusters: The first cluster includes hygrogenotypes (or: wet genotypes) and with yellow corolla and divided (or parted) leaves form (or :morph), while, the second cluster includes genotypes with white corolla and fellamental (or: thread) leaves form.

These results which are obtained by RAPD technique completely agreed with all available data depending on studying morphological characters and environmental distribution for these types.

*Professor, Department of Biological Vegetables, Faculty of Sciences, Tishreen University, Lattakia, Syria.

**Professor, Faculty of Agriculture, Tishreen University, Lattakia, Syria.

***postgraduate student Department of Biological Vegetables, Faculty of Sciences, Tishreen University, Lattakia, Syria.

مقدمة:

إن أهمية علم التصنيف ينطلق من الاهتمام العلمي بالنباتات ولأن علم التصنيف علم دائم الحركة يعكس تطور مختلف العلوم إذ توجد عدة نظم لتصنيف النباتات حيث تأخذ علاقة المنشأ والنسب بين النباتات أساساً للتصنيف (السحار 1997).

ومن النباتات الواسعة الانتشار في جميع القارات التي تنمو في بيئة مائية ورطبة نباتات الفصيلة الحوذانية Ranunculaceae التي تتوزع في مناطق متعددة وتلعب دوراً هاماً في التوازن البيئي بالإضافة إلى الأهمية الاقتصادية لبعض أجناسها مثل Adonis والحوذان Ranunculus حيث يستخرج مواد طبية شبه قلوية عديدة الاستخدامات مثل الحصول على مستخلصات طبية لمكافحة الفطور النباتية الممرضة ولمعالجة أمراض الأوعية الدموية TAKHTAJAN 1980.

يضم جنس الحوذان حوالي 600 نوع (TAKHTAJAN 1980) (Boulos, 1999) ويوجد في الفلورة السورية اللبنانية 29 نوع (Mouterde 1960).

إن المواصفات المورفولوجية ذات أهمية كبيرة في تحديد التباينات الوراثية في المجتمعات أو على مستوى النوع الواحد، ويعتبر المعيار المورفولوجي من المعايير الأساسية المستخدمة لدى علماء التصنيف النباتي التي تعتمد على النظام التكاثري الأعضاء التكاثرية المذكرة والمؤنثة (Antomovics 1968) (Mayr 1970).

فقد استخدم هذا المعيار (معلا، حربا 1997) في دراستهم وتوصيفهم لبعض الطرز الوراثية التابعة للنوع Vicia faba بهدف تحديد الطرز المدروسة حيث تم اعتماد مواصفات البذور أساساً في الدراسة واعتمد أيضاً (kupicha 1983) المعيار المورفولوجي للتمييز بين /13/ نوع من الجلبان Lathyrus وقد بين (Hussein 1994) إن صفات الثمار هامة وتسهم بشكل كبير بتحديد درجة الاختلاف بين الطرز الوراثية غير أن هذا المعيار يتأثر بدرجة أو بأخرى بالظروف البيئية السائدة خلال مراحل النمو مما ينعكس على التغيرات التي تصيب بعض الصفات الشكلية وبالتالي فإن دقة التصنيف تغيب باستخدام المعيار المورفولوجي.

إن التقدم الكبير في مجال التقنيات البيولوجية ساهم في تطوير نظم جديدة أو معايير دقيقة تستخدم في التصنيف إلى جانب المعيار المورفولوجي وفي هذا المجال استخدمت تقنية الرحلان الكهربائي Electrophoresis للبروتينات. في الكشف عن التباينات الوراثية وعن الأصالة الوراثية وأصبحت تستخدم بشكل واسع في التعرف على الطرز الوراثية وتحديدها وأيضاً في التعرف على صفات جديدة بواسطتها والمرغوب فيها دون الحاجة إلى الزراعة الحقلية أو المخبرية وهذا ما سرع برامج تربية النبات بشكل كبير وأسهم في خفض تكاليفها (معلا، حربا 1994) وقد استخدمت تقنية الرحلان الكهربائي للبروتينات المدخرة في القمح (Lafiandra et al, 1990) لتحديد القيمة الغذائية وأيضاً في الدراسة التصنيفية واستنتاج طرق التطور ومعرفة الاختلافات الوراثية في المجتمعات الطبيعية ولأول مرة من قبل كل من (Lewon et al 1960) و (Harris 1966).

واستخدم كل من (Zillman et al 1979) تقنية الرحلان الكهربائي للغليادينات كتقنية بيولوجية جديدة لتقييم وتحديد أصناف القمح ودرسوا مدى تأثير العوامل البيئية على بعض الصفات التي ثبتت لهم أنها صفة وراثية لا تتأثر بالعوامل البيئية وأيضاً استخدمت هذه الطريقة كوسيلة لتمييز الأصناف المحلية والمدخلة من القمح من قبل (مير علي، الصفدي 1995).

هدف الدراسة:

هدفت هذه الدراسة إلى الحصول على معلومات حول الخلفية الوراثية لأهم الأنماط الوراثية للحوذان المنتشرة على الساحل السوري.

باستخدام البصمة الوراثية DNA finger primting بتقانة RAPD Random (DNA) amplified polymorphic ودراسة درجة القرابة الوراثية بين الأنماط الوراثية المدروسة.

المواد و الطرائق:

المادة النباتية:

جدول رقم /1/ الأنواع المدروسة

رقم المسار	الاسم اللاتيني للنوع	البيئة والتوزع	مكان الجمع	موعد الازهار	ملاحظات
1	Ranunculus arvensis	رطب	حديقة جامعة تشرين- اللاذقية	آذار - حزيران	تويج أصفر الأوراق ثلاثية القطع
2	R.fluitans	مائي	مستنقعات بجانب سد 16 تشرين- اللاذقية	نيسان- حزيران	تويج أبيض أوراق خيطية
2b	R. marginatus	رطب	جانب مستنقع ثكنة صلاح الدين	شباط- أيار	تويج أصفر أوراق ثلاثية القطع
3	R. muricatus	رطب	حديقة جامعة تشرين-اللاذقية	آذار- تموز	تويج أصفر نصل الأوراق دائري
4	R.sphaerosperms	مائي	نهر السن - اللاذقية	آذار- حزيران	تويج أبيض أوراق خيطية
5	R. circinatus	مائي	بحيرة سد 16 تشرين -اللاذقية	نيسان- حزيران	تويج أبيض أوراق خيطية
6	R. trichophylus	مائي	طريق حمص اللاذقية	آذار- أيار	تويج أبيض أوراق خيطية

استخدم سبع أشكال وراثية في هذه الدراسة (جدول 1). تم الحصول على عينات ورقية خلال شهري نيسان و أيار. غسلت العينات الورقية ثلاث مرات في ماء مقطر ومعقم ثم وضعت في اسطوانة الآزوت سائل و من بعدها حفظت على درجة -60م حتى الاستخدام.

الأنـواع المدروسة:

:Ranunculus arvensis, L. -1

نبات عشبي حولي 10-20سم موبر، السوق منتصبة ومتفرعة، الأوراق القاعدية ذات عنق طويل موبرة. ونصلها بيضوي ذات 3 فصوص مسننة. ومجزأة أكثر في الأجزاء العلوية من الساق، الأزهار إبطية وأعناقها موبرة، السبلات 5 منفصلة خضراء مصفرة أقصر من البتلات، البتلات 5 صفراء ليمونية، الأسدية عديدة، الثمرة إكينية طولها بين 5-8مم متضمنة طول المنقار يصل طوله (2-3مم) شوكية وحافتها ذات أشواك قاسية، ينمو في الحقول والأراضي الرطبة والحدائق.

:R. fluitans, lam. -2

نبات عشبي مائي مغمور. أزهاره وحيدة خنثوية منتظمة يتجاوز حامل الزهرة طول الأوراق. التويج أبيض اللون. الأسدية عديدة منفصلة الكرابل عديدة منفصلة يتراوح عددها بين (30-75) كربلة وحيدة البذرة، يتم التأبير بواسطة الحشرات، يعيش في البرك والسواقي.

:K. marginatus, d'Urv -3

نبات عشبي حولي يصل طوله 10-25سم مغطى بشعيرات (زغب) بشكل ضئيل. وأحياناً بدون شعيرات. السوق منتصبة، متفرعة. الأوراق السفلية ذات عنق طويل نصل الورقة 2-5سم ثلاثية الفصوص أو مجزأة أكثر من ذلك. الأوراق العلوية ذات فصوص بيضوية كلوية وأحياناً مستطيلة خيطية الشكل، الأزهار صفراء قطرها 1.5سم، السبلات منعكسة عددها 5 والبتلات صفراء عددها 5 منفصلة، الإكينات عددها من 10-20 طولها بين 3-5مم مسطحة وبيضوية الشكل.

:R. muricatus, L. -4

نبات عشبي حولي 10-20سم، السوق منتصبة أو منبطحة على الأرض متفرعة، نصل الأوراق القاعدية مستديرة إلى كلوية الشكل وعنقها طويل مسننة أو مدورة الحواف بشكل قليل، الأوراق الموجودة على الساق مجزأة والعلوية منها ذات عنق قصير وتكون الأوراق متقابلة، الأزهار قطرها بين 1-1.5سم، السبلات 5 ملتوية (منعكسة)، البتلات صفراء باهتة، الأسدية عديدة، الاكينات عديدة طولها 7-8مم بما فيها المنقار والمنقار معقوف حاد وقد يكون بطول الإكينة أو أقصر قليلاً.

: R. Sphaerospermus Boiss et BI -5

نبات مائي مغمور ذات لون أخضر زيتوني ساقه اسطوانية جوفاء أوراقه مغمورة بأكملها ذات غمد غشائي الأوراق القاعدية متباعدة (المسافة بين العقد كبيرة)، السبلات مبسوطة مائلة للخضرة غشائية دائرية الشكل، البتلات بطول 8-10مم بيضاء اللون صفراء عند القاعدة، الأسدية عديدة والمآبر صفراء، الإكينات سمراء اللون بيضوية الشكل عليها زغب وطولها 1مم، ينمو في المناطق الضعيفة الجريان.

:R. circinatus, sibth -6

نبات مائي غاطس، عشبي، حولي. أزهاره وحيدة خنثوية منتظمة ويتجاوز حامل الزهرة (شمراخ) طول الورقة. أوراقه خيطية تنتشر أزهاره البيضاء الجميلة فوق سطح الماء، الكأس 5 قطع خضراء طولها بين (2.5-3.5مم)، التويج 5 قطع بيضاء طولها بين (4-5مم)، الأسدية يزيد عددها على 25 سداة في محيطات، الكرابل عديدة منفصلة، الثمرة مجموعة اكينات عددها بين (30-70) اكينة، ينمو في البرك والمستنقعات

:Ranunculus trichophyllus chaix -7

نبات عشبي مائي حولي يعيش لفترة قصيرة، الأوراق بدون عنق تقريباً طولها من 6–8سم مقسمة إلى أجزاء خيطية نحيفة عنق الثمرة منحني. السبلات 5 والبتلات 5 طولها من 3–5مم بيضاء اللون وصفراء عند القاعدة، الإكينات 0.8–1.8مم بدون أوبار وأحياناً تكون مويرة، محدبة وذات منقار قصير، ينمو في الترب البركانية.

استخلاص الدنا (DNA):

استخدمت طريقة سريعة لعزل الدنا وعدلت بحيث تمكنا من الحصول على كمية DNAكبيرة تتناسب مع الكمية التي تستهلك لمقياس الطيف الضوئي وتتلخص الخطوات التي اتبعت بطريقة العزل هذه وتعديلاتها كما يلي :

- استخدمت أنابيب ابندورف سعة 2 مل وضعت فيها (0.5) غرام من المادة النباتية المسحوقة بوجود النتروجين السائل ، والمحفوظة ضمن مجمدة درجة حرارتها – 60 درجة مئوية .
- أضيف 800 ميكرو ليتر من محلول استخلاص مكون من: (200mM Tris HCL ; 250mM NaCL; pH7.5, 25 mMEDTA; ; 0.5%SDS). تمت المجانسة ثم وضعت على رجاج 5 ثواني. تلاها تحضين على حمام مائي 65 درجة مئوية ولمدة 15 دقيقة .
- أضيف 400 ميكرو ليتر (5M Potassium acetate) مبرد مسبقاً ثم وضعت بالثلج مدة 10دقائق .
- التثفيل بسرعة 12000 دورة / بالدقيقة ولمدة 20 دقيقة .
- رفع الرشاحة لأنبوب جديد (حوالي 500 ميكرو ليتر) وإضافة 0.6 من الحجم (Isopropanol)، وتترك بجو المخبر 10 دقائق .
- التثفيل بسرعة2500دورة / بالدقيقة ولمدة 5 دقائق.
- تلاها غسل الـ DNA بـ كحول 70 % ولمرتين.
- التثفيل بسرعة 2500 دورة / بالدقيقة ولمدة 5 دقائق .
- تجفيف تحت الخيمة العقيمة للتخلص من الكحول تلاها إذابة الـ DNA بمحلول (TE) 150 ميكرو ليتر .

تم استخلاص الدنا من كل طراز وراثي مرتين بنفس الطريقة.

تضخيم الدنا (DNA):

استخدم 27 مرئسة عشوائية من شركة (Operon Technologies Inc . USA) للتضخيم في تفاعل الPCR. تم القيام بتفاعلات تضخيم الدنا استنادا إلى Williams et al (1990) مع بعض التعديلات. برمج جهاز التسخين الحلقي من نوع Hybaid Thermal Cycler (Genius من شركة TECHNE) حسب MirAli & Nabulsi (2002) على الشكل الآتي: دورة واحدة لمدة دقيقة على 94م^0 تلاها 45 دورة تألفت كل دورة منها من (10 ثوان على 94م^0، 10 ثوان على 35م^0، و 70 ثانية على 72م^0) و اتبعت الدورة الأخيرة بفترة حضن نهائية لمدة دقيقتين على 72م^0 .كان حجم التفاعل النهائي 25ميكروليتر متضمناً:

[20mM Tris-HCl ، 50 mM KCl ،4 mM MgCl2 ،Gelatin 0.001 %، 0.11 mM لكل واحد من الأسس (dCTP, dGTP, dTTP, dATP) ، 1.25 وحدة من Taq DNA Polymerase ،

15 ng من الـ DNA والمحسوب كميتها على جهاز Cintra 5 UV- Vis Double-Beam Spectrometer) من شركة (GBC) و 30 ng من كل مرئسة primer .

تم بعد ذلك فصل نواتج تفاعل الـPCR بهلامة أغاروز 1.2% من شركة (BIO-RAD) ضمن محلول موقي TBE 0.5X مضاف لتلك الهلامة إثيديوم بروماید من شركة Fluka لكشف حزم الـDNA من خلال ضوء الـUV واستعمل معلم يشير لمواقع وحجم الحزم 1 Kb Ladder من شركة (" Gibco BRL Chemicals" Life Technologies).

تحليل البيانات:

تم مسح و تصوير الحزم الناتجة تحت الأشعة فوق البنفسجية. كررت جميع التفاعلات مرتين على الأقل و دخل في التحاليل فقط الحزم الواضحة والتي اتصفت بالتكرارية(reproducible) و ذات الوزن الجزيئي بين 500bp و 2.1kb . استخدمت البيانات لوضع مصفوفة استنادا الى النسبة المئوية لعدم التوافق Percent disagreement و المتوسط الحسابي للمجموعات الزوجية غير المزانة UPGMA من برنامج STATISTICA (Statistica 2001).

النتائج والمناقشة:

تم اختبار 27 مرئسة و أعطى منها 16 مرئسة تعددية شكلية واضحة بنتيجة استخلاصي دنا و تفاعلي PCR و دخل في التحاليل فقط الحزم المتكررة و الواضحة. يبين الجدول (2) تسلسل المرئسات التي أعطت تعددية شكلية إضافة إلى مجموع الحزم الناجمة نتيجة تطبيق كل مرئسة من المرئسات المختلفة على الطرز الوراثية السبعة الداخلة في الدراسة، وعدد الشدف المتعددة شكليا في كل مرئسة. كما يبين نفس الجدول النسبة المئوية للتعددية الشكلية إلى مجموع الحزم الناجمة عن كل مرئسة.

تراوح عدد الحزم (الشدف) الناتجة عن التفاعل ما بين 8 (المرئسة OPD-18) و 19 (المرئسة OPA-16) حزمة للمرئسات المدروسة. بينما تراوحت التعددية الشكلية لهذه الحزم polymorphic bands بين 4 (المرئسة OPC-18) و 10 (المرئسة OPE-18). وأظهرت النتائج وجود نسبة مئوية عالية للتعددية الشكلية عند نسبتها الى المجموع الكلي للحزم الناجمة عن التفاعل حيث تراوحت هذه النسبة بين 29% (المرئسة OPO-18) و71% (المرئسة OPE-18). يظهر الشكلان 1 و 2 التعدديات الشكلية الناجمة عن استخدام المرئسات OPN-11 OPE-19 و على التوالي.

وضعت البيانات المستحصل عليها من جميع المرئسات و ذات التعددية الشكلية في الجدول (3) الذي يظهر أن نسب عدم التوافق الناجمة عن استخدام المرئسات الـ16 راوحت بين 74% بين الطرازين الوراثيين 3 و4 (الأبعد وراثيا) و 16% بين الطرازين الوراثيين 1 و2b (الأقرب وراثيا). وضعت هذه البيانات في شجرة القرابة (شكل 3) حيث ظهر بوضوح عنقودان رئيسان على درجة عدم توافق حوالي 53%:

العنقود الأول احتوى على 3 طرز وراثية هي 1، 2b و 3 حيث كانت درجة عدم التوافق بينها أقل من 25% (درجة تشابه أكبر من 75%)، و العنقود الثاني شمل الطرز الوراثية الأربعة الأخرى على درجة تشابه 60% و التي كان أقرب الطرز منها لبعضها البعض الطرازان 2 و 5 (درجة توافق 80%) تلاها الطراز 6 (درجة توافق 73%) ثم الطراز 4. هذه البيانات توافقت بشكل كامل مع البيانات المتوفرة لدينا عن توزع الطراز

البيئي حيث أن طرز العنقود الأول جميعها وجد في الأماكن الرطبة، بينما وجدت طرز العنقود الثاني في الماء. علاوة على ذلك كان شكل الأوراق مجزأ في المجموعة الأولى و التي كانت أيضا ذات لون تويج أصفر على حين أن شكل الأوراق في المجموعة الثانية كان خيطيا و لون التويج أبيض.

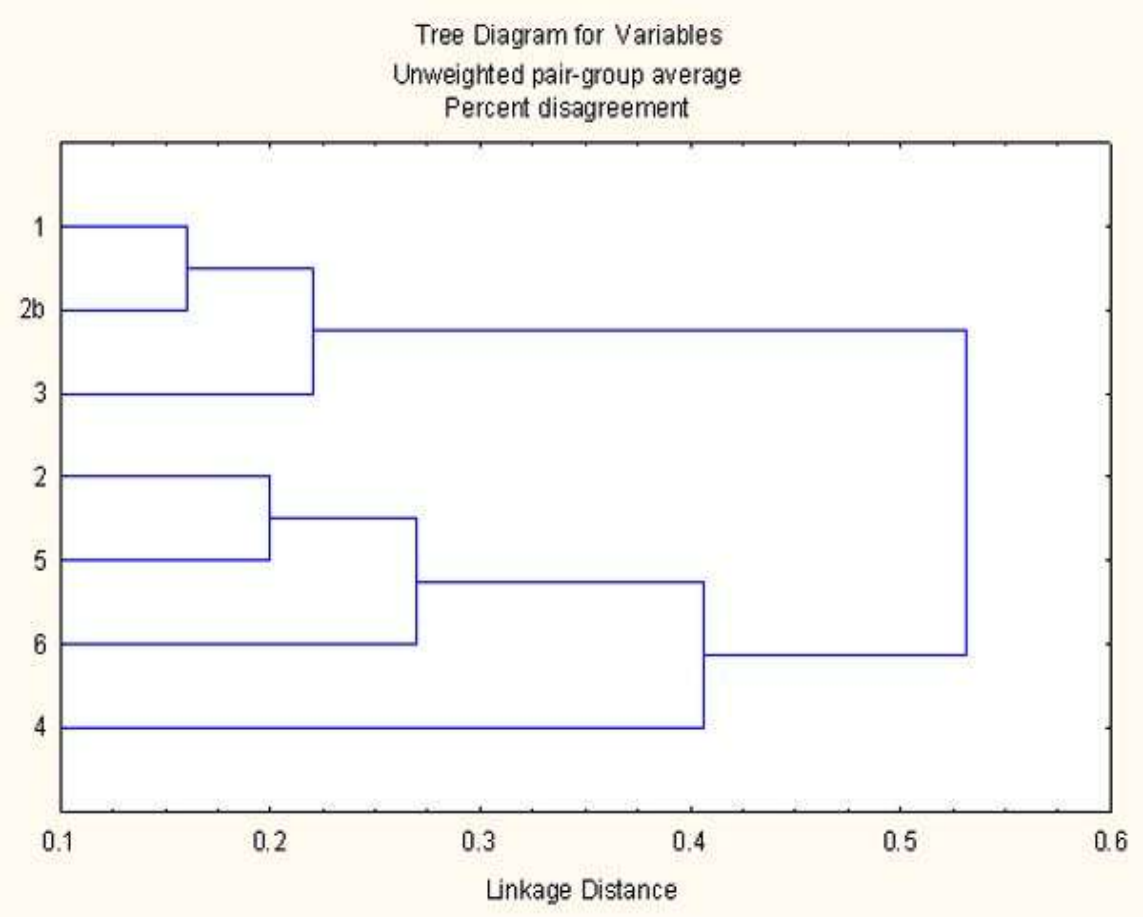
أظهرت هذه الدراسة بوضوح مقدرة هذه الطريقة (RAPD) على تمييز جميع الطرز المدروسة هنا باستخدام عدد قليل نسبيا من المرئسات. كما أن هذه الدراسة أظهرت أنه بالامكان الكشف عن أية أخطاء ممكنة بالتصنيف استنادا الى منطقة جغرافية واحدة ، فمثلا الطرازان 2 و 2b تبين أنمها بعيدان وراثيا عن بعضهما رغم وجودهما في نفس المنطقة حيث كان أحدهما ناميا في الماء و لآخر في مكان رطب. لذا فان الطريقة المعتمدة في هذه الدراسة عند أمثلتها بشكل جيد و عند استخدام أكثر من مكرر واحد فانها قد تملك ميزات غير موجودة في الطرائق الجزيئية الأحدث و التي تحتاج علاوة على الكلفة الكبيرة، إلى معلومات جزيئية بشكل مسبق لاستخدامها كمعلومات عن المرئسات أو المسابر حسب الطريقة.

جدول /2/ يبين رمز كل مرئسة (بادئ) والقواعد النيوكليوتيدية المؤلفة له.

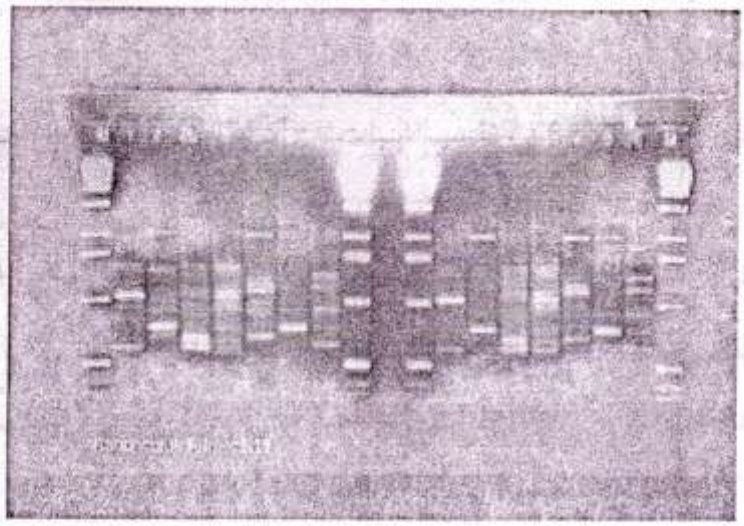
المسلسل	**المرئسات**	أسس المرئسة	مجموع الحزم الناتجة للأنماط الوراثية السبعة	**التعددية الشكلية**	**نسبة التعددية لمجموع الحزم**
1	OPA-16	AGCCAGCGAA	19	11	57.89
2	OPC-18	TGAGTGGGTG	13	4	30.77
3	OPD-18	GAGAGCCAAC	8	4	50.00
4	OPD-19	CTGGGGACTT	13	5	38.46
5	OPE-18	GGACTGCAGA	14	10	71.43
6	OPE-19	ACGGCGTATG	14	7	50.00
7	OPO-18	CTCGCTATCC	17	5	29.41
8	OPO-19	GGTGCACGTT	11	5	45.45
9	OPN-11	TCGCCGCAAA	18	9	50.00
10	OPI-01	ACCTGGACAC	11	7	63.64
11	OPI-02	GGAGGAGAGG	10	3	30.00
12	OPI-03	CAGAAGCCCA	11	4	36.36
13	OPI-11	ACATGCCGTG	16	8	50.00
14	OPZ-12	TCAACGGGAC	10	5	50.00
15	20OPE-	AACGGTGACC	8	4	50.00
16	OPR-13	GGACGACAAG	15	8	53.33

جدول/3/ يظهر نسب عدم التوافق

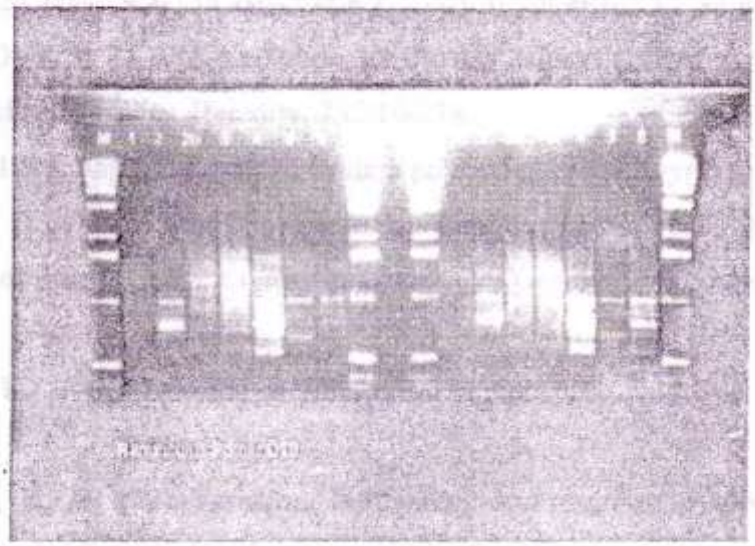
	1	2	2b	3	4	5	6
1	0.000						
2	0.460	0.000					
2b	0.160	0.500	0.000				
3	0.250	0.570	0.190	0.000			
4	0.650	0.390	0.690	0.740	0.000		
5	0.460	0.200	0.480	0.550	0.390	0.000	
6	0.390	0.270	0.430	0.460	0.440	0.270	0.000
Means	0.250	0.270	0.270	0.360	0.480	0.250	0.200
Std.Dev.	0.435	0.446	0.446	0.482	0.502	0.435	0.402
No.Cases	100.000						
Matrix	3.000						



شكل/3/ شجرة القرابة بين الأنواع



الشكل (1) يظهر التعددية الشكلية الناجمة عن استخدام المرشات OPN-11



الشكل (2) يظهر التعددية الشكلية الناجمة عن استخدام المرشات OPN-19

المراجع:

.....

1- السحار فؤاد قاسم (1997) تقسيم النبات – كتاب (554) صفحة – المكتبة الأكاديمية، القاهرة.

2- معلا محمد – حربا نزار (1994) التحسين الوراثي لنباتات الفاكهة والخضار–مديرية الكتب والمطبوعات الجامعية–كلية الزراعة–جامعة تشرين.

3- معلا محمد–حربا نزار (1997). إنتاج واختبارات البذور مديرية الكتب والمطبوعات الجامعية–كلية الزراعة–جامعة تشرين 427صفحة.

4- مير علي نزار–الصفدي بسام (1995) استخدامات التقانات الحيوية في تحسين الإنتاج النباتي الهيئة العربية للطاقة الذرية (تونس) هيئة الطاقة الذرية السورية (دمشق).

5- ANTONOVICS, J. 1968-Evolution in Closely adjacent plant populations. V. Evolution of self-fertility. Heredity, 23:219-238.

6- Boulos, L. 1999. Flora of Egypt Al Hadara publishing cairo, Egypt.

7- Dorokhov D.B. and E.Klocke 1997. A Rapid and Economic Technique for RAPD Analysis of Plant Genomes .*Russian Journal of Genetics*,Vol.33,No. 4, ,pp.358-365.

8- HARRIS, H. 1966 –Enzyme polymorphism in man, proc. Roy. Soc. Ser. B., 164: 298-310.

9- HUSSEIN, H. A, 1994-Variation, heritability and response to selection in okra. Assiut Journal of Agricultural sciences. 25 (2): 193-202. University of Assiut, Assiut, Egypt.

10- KUPICHA, F. K. 1983-the infrageneric structure of **Lathyrus**. Notes R. B. G. Edimb., 41 (2): 209-244.

11- LAFIANDRA, D. BENEDETTELLI, S., MARGIOTTA, B., SPAGNOLETTI ZEULI, P. L., PORCEDDU, E. 1990-Seed storage proteins and wheat genetic resources. In: Srivastava, J. p. and Damania, A. B. (eds)., wheat genetic resources: meeting diverse needs: 73-87.

12- LEWON et al 1960 Amolecular approach to the study of genic heterozygosity in matural population. I. The number of alleles at different Loci in Drosphila pseudoobcura. Geneties, 57: 291-300.

13- MAYR, E. 1970 Populations, species, and evolution cambridge, Mass. Harvard Univ. Press.

14- Mouterde, P. 1960, Nouvelle flore du liban et de la syrie, vols 1, 2, Dar El-Machreq, Beirut.

15- Mir N. Ali and I. Nabulsi,2002 Genetic diversity of almonds (*Prunus dulcis*) Using RAPD technique , *Scientia Horticulturae*, in press

16- STATISTICA.vertion 6, 2001, Statsoft Inc.

17- TAKHTAJAN, A. L., 1980-outine of the classification of flowering plantd (Mangnoliophyt a). Bot. Rev. 46:226-359.

18-WILLIAMS JGK. KUBELICK AR., LIVAK kJ, RAFALSKY JA. & TICGEY SV. (1990) DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acid res. 18: 6531-6537.

19- ZILLMAN, R. R. & BUSHUK, W. (1979) Wheat cultivar identification by glladin electrophroegrams, II. Effecis of enironment and experimental factors on gliadin electrophroegram. Can. J. plant sci. J. plant sci. 59: 218-286.