

الجمهورية العربية السورية
وزارة التعليم العالي
جامعة دمشق - كلية الزراعة
قسم علوم البستنة

**التوصيف الجزيئي لبعض أصناف وطرز المشمش
في سورية**

**Molecular Characterization of Some Apricot
Varieties and Genotypes in Syria.**

رسالة أعدت لنيل درجة الماجستير في علوم البستنة
إعداد
صبا ياسين سرحان

إشراف

المشرف المشارك
د. عبد الله الطاهر
الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية

المشرف العلمي
د. رولا بايرلي
كلية الزراعة - جامعة دمشق

2009

الفهرس

	- فهرس الأشكال
	- فهرس الجداول
	- الملخص
1	- المقدمة
3	- أهداف البحث
4	- الفصل الأول: الدراسة المرجعية
4	1- تقنية تكراريات التسلسلات البسيطة Simple Sequence Repeat
17	2- تقنية التعددية الشكلية المضخمة بين مواقع إدخال العناصر النقالة: IRAP (Inter-Retrotransposon Amplified polymorphism)
27	- الفصل الثاني: مواد وطرائق البحث
27	1- المادة النباتية
27	2- استخلاص الدنا
28	3- اختبار نوعية وتركيز الدنا
29	4- تقنية تكراريات التسلسلات البسيطة SSR
29	4-1- تضاعف الدنا
32	4-2- الرحلان الكهربائي لنواتج تفاعل البلمرة المتسلسل
34	5- تقنية التعددية الشكلية المضخمة بين مواقع إدخال العناصر النقالة IRAP
34	5-1- تضاعف الدنا
37	5-2- الرحلان الكهربائي لنواتج تفاعل البلمرة المتسلسل
37	6- التحليل الإحصائي
39	- الفصل الثالث: النتائج والمناقشة
39	1- التعددية الشكلية بين الأصناف والطرز المدروسة
39	1-1- التعددية الشكلية الناتجة عن استخدام تقنية SSR

48	1-2- التعددية الشكلية الناتجة عن استخدام تقنية IRAP
54	2- تحديد درجة التشابه الوراثي بين الأصناف والطرز المدروسة
54	2-1- تحديد درجة التشابه الوراثي بين الأصناف والطرز المدروسة باستخدام تقنية SSR
55	2-2- تحديد درجة التشابه الوراثي بين الأصناف والطرز المدروسة باستخدام تقنية IRAP
56	2-3- تحديد درجة التشابه الوراثي بين الأصناف والطرز المدروسة باستخدام تقنيتي SSR و IRAP معاً
57	3- التحليل العنقودي للأصناف والطرز المدروسة
57	3-1- التحليل العنقودي الناتج عن استخدام تقنية SSR
58	3-2- التحليل العنقودي الناتج عن استخدام تقنية IRAP
59	3-3- التحليل العنقودي الناتج عن استخدام تقنيتي SSR و IRAP معاً
60	4- تمييز الأصناف والطرز باستخدام الواسمات الفريدة الناتجة عن استخدام تقنية SSR
63	5- تمييز الأصناف والطرز باستخدام الواسمات الفريدة الناتجة عن استخدام تقنية IRAP
67	6- حساب معدل التغاير المورثي المتوقع H_e وقيمة التغاير المورثي الملحوظة H_o في تقنية SSR
68	7- مقارنة كفاءة تقنيتي SSR و IRAP في تحليل جينوم أصناف وطرز المشمش المدروسة
70	- الفصل الرابع : الاستنتاجات و التوصيات
70	1- الاستنتاجات
72	2- التوصيات
73	- الاختصارات
74	- الملحق (I)
75	- المراجع العربية
76	- المراجع الأجنبية
	الملخص بالانكليزي

فهرس الأشكال

الصفحة	الموضوع
41	الشكل (1): نواتج تضخيم تقنية SSR باستخدام زوج المرئسات DP96-001
41	الشكل (2): نواتج تضخيم تقنية SSR باستخدام زوج المرئسات UDP98-412
42	الشكل (3): نواتج تضخيم تقنية SSR باستخدام زوج المرئسات UDP98-406
42	الشكل (4): نواتج تضخيم تقنية SSR باستخدام زوج المرئسات Pchgms 20F1-R1
43	الشكل (5): نواتج تضخيم تقنية SSR باستخدام زوج المرئسات Pchgms 21F1-R1
47	الشكل (6): الفرق بين نواتج تضخيم تقنية SSR بالرحلان على هلامة الأكريلاميد وهلامة الميثافور
50	الشكل (7): نواتج تضخيم تقنية IRAP باستخدام زوج المرئسات Nikita F-Sakkula F
50	الشكل (8): نواتج تضخيم تقنية IRAP باستخدام زوج المرئسات 5LTR2 R-Sakkula F
51	الشكل (9): نواتج تضخيم تقنية IRAP باستخدام زوج المرئسات LTR6149F-3LTR2R
51	الشكل (10): نواتج تضخيم تقنية IRAP باستخدام زوج المرئسات LTR6150R-NikitaF
58	الشكل (11): مخطط التحليل العنقودي الناتج عن تقنية SSR
59	الشكل (12): مخطط التحليل العنقودي الناتج عن تقنية IRAP
60	الشكل (13): مخطط التحليل العنقودي الناتج عن تقانتي SSR و IRAP
62	الشكل (14): نماذج الواسمات الفريدة الناتجة عن زوج المرئسة pchgms4 بين الأصناف والطرز المدروسة
62	الشكل (15): نماذج الواسمات الفريدة الناتجة عن زوج المرئسة UDP96-019 في الأصناف والطرز المدروسة
63	الشكل (16): نماذج الواسمات الفريدة الناتجة عن زوج المرئسة UDP98-405 بين الأصناف والطرز المدروسة
66	الشكل (17): نماذج الواسمات الفريدة الناتجة عن زوج المرئسة TDK12 بين الأصناف والطرز المدروسة
66	الشكل (18): نماذج الواسمات الفريدة الناتجة عن زوج المرئسة 5-LTR1R بين الأصناف والطرز المدروسة
67	الشكل (19): نماذج الواسمات الفريدة الناتجة عن زوج المرئسة TDK2 بين الأصناف والطرز المدروسة

فهرس الجداول

الصفحة

الموضوع

30

الجدول (1): بيانات حول المرئسات المستخدمة في تقنية SSR

- 31 الجدول(2): درجات حرارة الالتحام المناسبة لكل زوج من مرئسات تقنية SSR
- 31 الجدول(3): مكونات تفاعل البلمرة المتسلسل PCR لتقنية SSR
- 32 الجدول(4): برنامج عمل تفاعل البلمرة المتسلسل PCR لتقنية SSR
- 34 الجدول(5): خطوات طريقة الصبغ بالفضة
- 35 الجدول(6): مكونات تفاعل البلمرة المتسلسل PCR لتقنية IRAP
- 35 الجدول(7): برنامج عمل تفاعل البلمرة المتسلسل PCR لتقنية IRAP
- 36 الجدول(8): بيانات حول المرئسات المستخدمة في تقنية IRAP
- 36 الجدول(9): درجات حرارة الالتحام المناسبة لكل زوج من مرئسات تقنية IRAP
- 40 الجدول(10): عدد الأليلات الناتجة عن أزواج المرئسات المستخدمة في تقنية SSR وعدد الأليلات المتعددة وعدد الأليلات غير المتعددة شكلياً و النسبة المئوية للتعددية الشكلية وحجم الأليلات الناتجة
- 44 الجدول(11): عدد الأليلات الناتجة عن أزواج المرئسات المستخدمة في تقنية SSR في الأصناف و الطرز المدروسة
- 49 الجدول(12): عدد الحزم الكلي، وعدد الحزم المتعددة شكلياً، وغير المتعددة شكلياً و النسبة المئوية للتعددية الشكلية الناتجة عن المرئسات المستخدمة في تقنية IRAP في الأصناف و الطرز المدروسة
- 52 الجدول(13): عدد الحزم الناتجة عن المرئسات المستخدمة في تقنية IRAP في الأصناف والطرز المدروسة
- 55 الجدول(14): درجة التشابه الوراثي بين اصناف و طرز المشمش المدروسة الناتجة عن تقنية SSR
- 56 الجدول(15): درجة التشابه الوراثي بين اصناف و طرز المشمش المدروسة الناتجة عن تقنية IRAP
- 57 الجدول(16): درجة التشابه الوراثي بين اصناف و طرز المشمش المدروسة الناتجة عن تقانتي SSR و IRAP
- 61 الجدول(17): أسماء المرئسات التي أعطت الواسمات الفريدة وعدد الواسمات الفريدة وحجمها مع أسماء الأصناف والطرز التي ميزتها هذه الواسمات في تقنية SSR.
- 65 الجدول(18): أسماء المرئسات التي أعطت الواسمات الفريدة وعدد هذه الواسمات ووزنها الجزيئي مع أسماء الأصناف والطرز التي ميزتها هذه الواسمات في تقنية IRAP
- 69 الجدول (19): عدد الحزم الكلية وعدد الحزم المتعددة شكلياً، وعدد الحزم الناتجة عن كل مرئسة والنسبة المئوية للتعددية الشكلية والنسبة المئوية للحزم المتعددة شكلياً في كل مرئسة في كلتا

الملخص

تم إجراء هذا البحث في قسم التقانات الحيوية في الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية وفي قسم علوم البستنة في كلية الزراعة - جامعة دمشق بهدف تحديد التشابه الوراثي بين ستة

أصناف من المشمش وهي: الشكربارا، التدمري، البلدي الماوردي، البلدي الحبي، الوزري، العجمي بالإضافة إلى خمسة طرز للأصل الكلابي للمشمش K1,K2,K3,K4,K5 استخدم في هذا البحث تقنيتين معتمدتين على تقانة PCR وهما تقنية تكراريات التسلسلات البسيطة (SSR) و تقنية التعددية الشكلية المضخمة بين مواقع إدخال العناصر النقالة (IRAP) حيث تم استخدام 26 زوجاً من مرئسات تكراريات التسلسلات البسيطة SSR والمطورة من مكتبة الجينوم في الدراق و 33 زوجاً من المرئسات الخاصة بالعناصر النقالة مشتقة من الشعير والموز .

أوضحت النتائج أن هناك 22 زوج من أزواج المرئسات المستخدمة في تقنية SSR ذات فعالية كبيرة في كشف التباينات الوراثية بين الأصناف والطرز المدروسة بنسبة تعددية شكلية 92.3% حيث تم الكشف عن 78 أليل بمتوسط 3 أليل/موقع، وبلغت قيمة متوسط التباين المورثي المتوقعة 0.48 وقيمة التباين المورثي الملحوظة 0.29، بينما كشفت نتائج تقنية IRAP أن هناك 32 زوج من أزواج المرئسات المستخدمة ذات فعالية كبيرة في كشف التباينات الوراثية بين الأصناف والطرز المدروسة بنسبة تعددية شكلية 74.4%.

أظهرت تقنية SSR أعلى درجة قرابة وراثية بين الصنفين الوزري والبلدي الحبي (0.69) و أقل درجة قرابة وراثية بين الصنفين البلدي الماوردي والعجمي (0.27)، بمتوسط درجة قرابة 0.48 بين كافة الأصناف والطرز المدروسة، كما أظهرت تقنية IRAP أعلى درجة قرابة وراثية بين الطرازين K4 و K5 (0.78) و أقل درجة قرابة وراثية بين الصنفين البلدي الماوردي والوزري (0.55)، بمتوسط درجة قرابة 0.67 بين كافة الأصناف والطرز المدروسة.

كما وزع التحليل العنقودي الناتج عن تقنية SSR أصناف وطرز المشمش المدروسة في عنقودين رئيسيين على درجة تشابه 0.43 و جاء الصنفين البلدي الماوردي والعجمي مستقلين عنهما كل على حده حيث بقي هذا الأخير متميزاً عن المجموع، احتوى العنقود الأول ستة أصناف ويمكن تقسيمه إلى تحت عنقودين: تضمن الأول الصنفين البلدي الحبي والوزري بالإضافة للطرازين K3 و K1 واحتوى تحت العنقود الثاني الصنف التدمري مع الطراز K2 واحتوى العنقود الرئيسي الثاني كل من الطرازين K4 و K5 والصنف شكربارا .

ووزع التحليل العنقودي الناتج عن تقنية IRAP أصناف وطرز المشمش المدروسة إلى عنقودين رئيسيين انفصل عنهما الطراز K1 و الصنف العجمي كل على حده والبلدي الماوردي بقي متميزاً عن المجموع، احتوى العنقود الأول ستة أصناف وأمكن تقسيمه إلى تحت عنقودين احتوى تحت العنقود الأول الصنفين البلدي الحبي والوزري أما الثاني فقد شمل الصنف التدمري مع الطراز K3 والصنف شكربارا والطراز K2 كل على حده أما العنقود الرئيسي الثاني فشم الطرازين K4 و K5.

تمكنت تسعة أزواج من المرئسات المستخدمة في تقنية SSR من وسم بعض الأصناف والطرز المدروسة بـ 14 أليل فريد حيث تميز الصنف العجمي بأعلى عدد من الواسمات (5)، بينما استطاعت تقنية IRAP تمييز أربعة من الطرز الوراثية الخمس من المشمش الكلابي وجميع الأصناف المدروسة بـ 35 واسم فريد حيث تميز الصنف البلدي الماوردي بأعلى عدد من الواسمات (10).

أثبتت تقنيتا SSR و IRAP فعالية في كشف التباينات الوراثية بين الأصناف والطرز المدروسة وكذلك تمييزها بشكل واضح، وبالتالي إمكانية اعتماد هاتين التقنيتين في التوصيف الجزيئي للأصناف بهدف تعريف المصادر الوراثية المحلية ، وتقييم المجمعات الوراثية.

قدمت هذه الرسالة استكمالاً لمتطلبات نيل درجة الماجستير في علوم البستنة من كلية الزراعة بجامعة دمشق.

This thesis has been submitted as partial fulfillment of the requirement for the degree of master of Horticulture science at the Faculty of Agriculture, Damascus University.

نوقشت هذه الرسالة بتاريخ 2009/8/12 وأجيزت.

لجنة الحكم:

الأستاذ الدكتور فيصل حامد في قسم علوم البستنة-كلية الزراعة جامعة دمشق(عضواً)

الدكتور نزار مير علي مدير بحوث ورئيس قسم البيولوجيا الجزيئية والتقانة الحيوية في هيئة
الطاقة الذرية
(عضواً)

الدكتورة رولا بايرلي في قسم علوم البستنة-كلية الزراعة جامعة دمشق (عضواً مشرفاً).

شهادة

نشهد بأن العمل الموصوف في هذه الرسالة نتيجة بحث علمي قامت به المرشحة (صبا ياسين سرحان) تحت إشراف الدكتورة (رولا بايرلي) في قسم علوم البستنة-كلية الزراعة-جامعة دمشق، والدكتور (عبد الله الطاهر) في قسم التقانة الحيوية في الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية، وأي مراجع أخرى بحثت في هذه الرسالة موثقة في النص.

المشرف العلمي	المشرف المشارك	المرشح
الدكتورة رولا بايرلي	الدكتور عبد الله الطاهر	صبا ياسين سرحان

Certificate

It is hereby certificated that the work described in this thesis is the result of the author`s own investigations under the supervision of Dr. Roula Bayrely ,Horticulture Department, Faculty of Agriculture, Damascus University, and Dr. Abd Allah Altaher, Biotechnology Department, in General Commission for Scientific Agricultural Research, and any references to other research work has duly acknowledged in the text.

Supervision	Co-supervision	Candidate
Dr.Roula Bayrely	Dr. Abd Allah Altaher	Seba Yassin Sarhan

تصريح

أصرح بأن هذا البحث (التوصيف الجزيئي لبعض أصناف وطرز المشمش في سورية) لم يسبق أن قبل للحصول على أي شهادة. ولا هو مقدم حالياً للحصول على شهادة أخرى.

المرشح

صبا ياسين سرحان

Declaration

It is hereby declared that this work (Molecular Characterization of Some Apricot Varieties and Genotypes in Syria) has not been accepted for any degree yet, nor it has been submitted concurrently any other degree.

Candidate

Seba Yassin Sarhan

كلمة شكر

أشكر لجنة الحكم الدكتور نزار مير علي والأستاذ الدكتور فيصل حامد لتقييمهما للبحث وإعنائهما له،
وأتوجه بجزيل الشكر للدكتورة رولا بايرلي في قسم علوم البستنة في كلية الزراعة لتكرمها بالإشرافه
والتحكيم.

وأقدم بكل الشكر والتقدير للدكتور عبد الله الطاهر في قسم التقانات الحيوية في الهيئة العامة
للبحوث العلمية الزراعية لتكرمه بالإشرافه والمساعدة في كافة مراحل العمل والكتابة.

وأتوجه بجزيل الشكر للدكتور أحمد عبد القادر للمساعدة في تسهيل أمور العمل في الهيئة العامة
للبحوث العلمية الزراعية وجميع الزملاء في قسم التقانات الحيوية: المهندس أنس خنشور والمهندسة
نبيلة علي باشا والمهندسة نور الأسعد للمساعدة في إنجاز هذا العمل.

وأشكر كل من قدم لي يد العون والمساعدة من دكاترة كلية الزراعة لتسهيل إنجاز هذا البحث
وخاصة الدكتور عبد العزيز الصباغ والدكتور حمزة بلال عميد كلية الزراعة.

وأخص بالشكر المهندسة إيمان مطر في قسم البستنة في الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية
للمساعدة في تحديد الأشجار وتقديم النصح في التوصيف الشكلي للأصناف المدروسة، وكذلك
الدكتور علاء حموية والمهندس عامر جنبدان والمهندس سامر لباييدي من إيكاردا للمساعدة في
برامج التحليل الإحصائية.

والشكر الجزيل لجميع الأهل والأصدقاء ولكل من ساهم في إنجاز هذا العمل.

وكل الشكر والامتنان لزوجي العزيز المهندس حسام الفاعوري على دعمه ومساندته في كل مرحلة
من مراحل هذا العمل.

المقدمة Introduction

تحتل شجرة المشمش المرتبة الثالثة عالمياً من الناحية الاقتصادية بعد الدراق والخوخ بين أشجار الفاكهة ذات النواة الحجرية، لذا فقد انتشرت زراعتها حول العالم في المناطق المعتدلة، وشبه الاستوائية (Maghuly et al., 2005)، وخصوصاً في منطقة حوض المتوسط والتي تنتج أكثر من 80% من الإنتاج العالمي للمشمش (Fideghelli et al., 1999) والذي بلغ 3067952 طن عام 2007 بمساحة بلغت 466056 هكتار (FAO, 2007).

أما في القطر العربي السوري، فقد قدرت المساحة المزروعة بالمشمش لعام 2008 بحوالي 13561 هكتار مزروعة بحوالي 3052.8 ألف شجرة مشمش أنتجت حوالي 100902 طن. وتنتشر زراعة هذه الشجرة في معظم المحافظات حيث تحتل محافظة ريف دمشق المرتبة الأولى من حيث المساحة وعدد الأشجار والإنتاج تليها محافظة حمص، ثم ادلب فمحافظة اللاذقية (المجموعة الإحصائية الزراعية السنوية، 2008).

ولقد بوشر بزراعة هذه الشجرة منذ القدم حيث انتشرت زراعتها من الصين ووسط آسيا إلى الهند وشمال إفريقيا والأقطار العربية وخاصة سورية ويعد موطن النشوء لهذه الشجرة المناطق الشرقية من بلاد الصين الغربية أما الأصناف المقاومة للصقيع الشتوي فيرجع موطنها الأصلي إلى سيبيريا (القطب وقطنا، 1988).

تعود معظم الأصناف المزروعة عالمياً من المشمش للجنس *Armeniaca*، تحت العائلة Prunoidea والعائلة الوردية Rosaceae (حامد والعيسى، 1990).

ويختلف أصل المشمش ومنشؤه في القطر العربي السوري، فالأصناف التي نمت في غوطة دمشق منذ القدم وتأقلمت مع الظروف البيئية وتميزت بمجموعة من الصفات المرغوبة عرفت بأسمائها المحلية، وتوارثها الآباء عن الأجداد، وهي بدورها تعد مصدراً أساسياً للتنوع الحيوي، ومستودعاً لكثير من المورثات التي يمكن الاستفادة منها في برامج التربية والتحسين الوراثي، لذا كان من الضروري تحديد الأصناف والطرز الوراثية المتميزة بصفات مرغوبة، والاستفادة منها في عملية التحسين الوراثي وإكثار الأصناف المتميزة منها والمهددة بالانقراض مثل الصنف البلدي (حامد والعيسى، 1990) المتأقلم مع الظروف المناخية المحلية.

وعلى الرغم من الجهود التي بذلت في مجال التوصيف الشكلي لهذه الأصناف والذي يعد أحد الدعامات الأساسية التي تم الاعتماد عليها قديماً في تمييز الأصناف إلا أن طرائق التوصيف الشكلي تحتاج إلى وقت طويل، كما أنها تتأثر بالظروف البيئية والأطوار الفينولوجية للنبات مما يؤدي إلى عدم ثبات القراءات لذلك يجب دعم هذه الطرائق بالطرائق الحديثة التي تعتمد على التوصيف الجزيئي (Ricciardi et al., 2002)، تستخدم لذلك العديد من المَعْلَمَات الجزيئية مثل تباين أطوال القطع المحددة (RFLP Restriction Fragment Length) (Polymorphism)، وتقنية الدنا المتعدد الأشكال المضخم عشوائياً (RAPD Random

(Amplified Polymorphic DNA)، وتقنية تكراريات التسلسلات البسيطة (Simple SSR) (Sequence Repeats).

أصبحت معلّات تكراريات التسلسلات البسيطة SSR الأداة المستخدمة في تعريف العديد من الأنواع النباتية في الوقت الراهن لأنها تعتمد على تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) وذات تكرارية عالية، متعادلة السيادة وذات تعددية شكلية في جينوم النبات (Powell *et al.*, 1996) إضافة إلى أنها في العديد من الحالات تعد ثابتة بين الأنواع وهذا ما يجعلها ذات قابلية للانتقال بين الأنواع المتقاربة (Huang *et al.*, 1998) وبالمقارنة مع التقنيات المعتمدة على الدنا DNA فإن تقنية تكراريات التسلسلات البسيطة SSR هي التقنية الأكثر فاعلية وفائدة في دراسات التنوع الوراثي (Zhebentyayeva *et al.*, 2003; Hormaza, 2002; Romero *et al.*, 2003; Regner *et al.*, 2004).

اكتشف Kalender وآخرون عام 1999 طريقة جديدة تعتمد على العناصر النّقالة في الجينوم حيث يتم تضخيم قطع الدنا (DNA) المتوضعة بين موقعي إدخال للعناصر النّقالة وذلك باستخدام زوج من المرئسات يرتبط بالتكرارات الطرفية الطويلة (Long terminal LTRs) (repeats) الموافقة لهذا الموقع وأطلق عليها اسم تقنية التعددية الشكلية المضخمة بين مواقع إدخال العناصر النّقالة (Inter-Retrotransposon Amplified polymorphism) والتي استخدمت بكفاءة عالية في رسم الخرائط الوراثية وبرامج التربية والانتخاب ودراسات التنوع الوراثي (Darius, 2005).

وانطلاقاً من ذلك أجريت هذه الدراسة بهدف التوصيف الجزيئي لبعض الأصناف المحلية للمشمش، و الطرز الوراثية للأصل الكلابي بالإضافة لتحديد درجة التشابه الوراثية فيما بينها.

أهداف البحث

➤ يهدف هذا البحث إلى:

1- التوصيف الجزيئي لبعض أصناف المشمش وطرز الأصل الكلابي للمشمش المنتشرة في سورية باستخدام بعض المؤشرات الجزيئية (SSR, IRAP).

2- حساب درجة التنوع الوراثي بين الأصناف والطرز المدروسة و تحديد درجة التشابه الوراثية بينها اعتماداً على المعطيات المأخوذة من التحليل باستخدام المؤشرات الجزيئية.

الدراسة المرجعية

Literature review

يعد المشمش نباتاً اقتصادياً هاماً في العائلة الوردية مما نحى بالعديد من العلماء لتوصيفه شكلياً ودراسة عدد من أصنافه وطرزه وذلك لكونه يحوي على اختلافات وصفية بين الأنماط السائدة من الأشجار والثمار يضاف لها الصفات الفيزيائية الهامة مثل فترة السكون الشتوي والتوافق الذاتي والمقاومة للأمراض، لذا وخلال العقود الأخيرة حاول العلماء استخدام شببهات الأنزيمات (Isozyme) كمعلّات بيوكيميائية لدراسة التغير الوراثي في المشمش (Byrne and Littleton, 1989; Battistini and Sansavini, 1991; Badenes *et al.*, 1996) إلا أن تحاليل شببهات الأنزيمات لم تكشف عن تعددية شكلية عالية لتعريف كل الأصناف وتوضيح العلاقات فيما بينها، ومع التطور الكبير في استخدام المعلّات الجزيئية المعتمدة على الاختلاف على مستوى المادة الوراثية DNA لتحديد البصمة الوراثية للنباتات المزروعة وأصولها البرية وذلك لما لهذه المعلّات من ميزات كثيرة مثل كثرة عددها وعدم ارتباطها بالأطوار الفينولوجية للنبات وعدم تأثرها بالظروف البيئية على عكس المعلّات الشكلية والبيوكيميائية وخاصة في النباتات الخشبية المعمرة (Wunsch and Hormoza, 2002) توفرت إمكانية جديدة لتقييم التنوع الوراثي بين جينوم النباتات (Karp *et al.*, 1996) ولهذا السبب استخدمت العديد من المعلّات الجزيئية مثل التباين في أطوال القطع المضخمة (AFLP) وتقنية الدنا المتعدد الأشكال المضخم عشوائياً (RAPD) و تكراريات التسلسلات البسيطة (SSR) في رسم الخرائط الوراثية وفي كشف وتحديد العديد من المورثات (Gene tagging) وكشف المورثات المنقولة من أنواع غريبة. أما الاستخدام الأكثر انتشاراً فهو التوصيف الجزيئي للمجمعات الوراثية وإيجاد التشابه الوراثي بين الأنواع والأصناف (Rajapakse, 2003 ; Gomez *et al.*, 2005).

أولاً- تقنية تكراريات التسلسلات البسيطة SSR : (Microsatellite, Simple Sequence Repeat)

عرف Khal في عام 2001 مواقع تكراريات التسلسلات البسيطة (Microsatellite) بأنها تتابعات ترادفية لسلسلة قصيرة من القواعد الأزوتية ذات أطوال بين 2 و 10 أزواج قاعدية ذات تكرارية متوسطة ومرتبة ترادفياً، توجد بشكل كبير وبسلسلات ذات طبيعة متغايرة في المادة الوراثية للفطور والنباتات والحيوان والإنسان وهي أحد صفوف المادة الوراثية المتكررة Repetitive DNA (Tautz and Rentz, 1984 ; Tautz, 1989)، ويعود التباين في مواقع تكراريات التسلسلات البسيطة إلى تباين عدد نسخ أو عدد مرات تكرار الوحدات التكرارية الثنائية أو الثلاثية أو الرباعية في الجينوم من 5 إلى 50 نسخة مثل (AT)₂₉ أو (CAC)₁₆ أو (GACA)₃₂ وهي تتواجد بغزارة في النبات وتوجد مرة كل 6-7 آلاف زوج قاعدي (Cardel *et al.*, 2000).

تحاط مواقع تكراريات التسلسلات البسيطة من جانبيها بتسلسلات نيكلوتيدية، عادة ما تكون فريدة ومحددة للنوع أو الجنس، وبالاعتماد على هذه التسلسلات يمكن تصميم مرئستين متخصصتين إحداها مكملة لهذه التسلسلات الفريدة على إحدى سلسلتي الدنا والمرئسة الأخرى مكملة لهذه التسلسلات الفريدة على السلسلة الأخرى بحيث يكون اتجاه كلا المرئستين نحو داخل مواقع تكراريات التسلسلات البسيطة وذلك لتضخيمها.

ونظراً لاختلاف عدد نسخ الوحدة التكرارية في مواقع تكراريات التسلسلات البسيطة على الجينوم بين المدخلات المدروسة فإن نواتج تضخيم تقانة تفاعل البلمرة المتسلسل PCR وباستخدام مرئستين متخصصتين بالموقع تكون بأطوال مختلفة وعليه يمكن فصل وتحديد منتجات التضخيم المختلفة الأطوال على هلامه الآغاروز أو الميتافور أو الأكريلاميد.

ويمكن تحديد مواقع تكراريات التسلسلات البسيطة بعدة طرق مثل البحث ضمن قواعد بيانات الدنا مثل EMBL and Genebank أو من خلال معرفة التتابع النيكلوتيدي لقطع صغيرة من الدنا (200-600 زوج قاعدي) (Powell et al., 1996).

أصبحت معلّات تكراريات التسلسلات البسيطة هي المعلّات الوراثية المختارة لتحديد البصمة الوراثية في أنواع نباتية عديدة (Tautz, 1989) وذلك لأن هذه المعلّات تعتمد على تقانة تفاعل البلمرة المتسلسل PCR وذات تباين وتكرارية عالية وعادة ما تكون متعادلة السيادة وموجودة بغزارة ضمن المادة الوراثية لحقيقيات النوى (Powell et al., 1996; Gupta and Varschney, 2000).

استخدمت تقنية تكراريات التسلسلات البسيطة في توصيف معظم أنواع الفاكهة، وكذلك في دراسات التنوع الوراثي، وتحديد درجة التشابه الوراثية. حيث طبقت على نطاق واسع في رسم الخرائط الوراثية وتحليل البنية الوراثية للجماعات (Barreneche et al., 1998). واستخدمت بشكل واسع في العائلة الوردية (Rosaceae) وكانت بداية على التفاح لتوصيف مصادر التفاح الوراثية وذلك من قبل Hokanson ورفاقه في عام 1998، وكذلك بين مجموعة من أصناف الأجاص (Kimura et al., 2002)، وبين أصناف السفرجل (Yamamoto et al., 2004)، وفي توصيف و تحديد درجة التشابه بين مجموعة من أصناف التفاح والأجاص (Bassil et al., 2006).

استطاع Cipriani ورفاقه في عام 1999 تحديد سبعة عشر زوجاً من مرئسات تكراريات التسلسلات البسيطة التي تم عزلها وتحديد تتابعها من مكتبتني الجينوم للدراق واللّتين تعدان غنيتين بتتابعات AC/GT و AG/CT وبتطبيقها على عشرة طرز وراثية من الدراق والنكتارين أظهرت خمسة عشر من المواقع (نسبة 88%) تعددية شكلية، وبمعدل 2-4 قرين لكل موقع وكان

متوسط التباين المورثي لكل المواقع 0.32 والتي تعد قيمته أكثر معنوية من تلك التي أظهرتها شبيهات الأنزيمات والمعلّات الجزيئية الأخرى (RFLP، RAPD). كما أعطت أزواج المرئسات العشرة السابقة نتائج تضخيم إيجابية عندما طبقت على أنواع مختلفة من الجنس *Prunus sp* (الخوخ الأوروبي، الخوخ الياباني، المشمش، اللوز، الدراق، النكتارين، الكرز الحلو والكرز الحامض) كما أعطت ثلاثة أزواج من المرئسات نتائج مماثلة في التفاح (*Malus sp*) مما بين القابلية العالية لانتقال معلّات SSR بين الأنواع والأجناس (Cross-species transportability).

تمكن Testolin وآخرون عام 2000 من عزل وتحديد التتابعات لستة وعشرين موقع من تكراريات التسلسلات البسيطة Microsatellite مشتقة من مكتبة الجينوم للدراق كانت سبعة عشر منها هي نفس المواقع المحددة من قبل Cipriani ورفاقه عام 1999 و تسعة مواقع جديدة أخرى ثم استخدمت هذه المواقع للتمييز بين خمسين صنفاً من الدراق والنكتارين فأظهرت كل المواقع تعددية شكلية تراوحت من 2-8 قرين للموقع الواحد وكان متوسط قيمة التباين المورثي لكل المواقع 0.47 وأبدت هذه المجموعة من المواقع القدرة على تمييز كافة الأصناف المدروسة باستثناء الأصناف المختلفة بطفرة أو الأصناف التي يعتقد بأن لها نفس النسب، ولذلك أوصي باستخدام هذه المواقع كمؤشرات جزيئية لتحديد البصمة الوراثية للدراق.

قام Sosinski ورفاقه عام 2000 بتوصيف معلّات تكراريات التسلسلات البسيطة في الدراق (*prunus persica*) إذ أنه بعد فحص مكتبة الجينوم للدراق وجد أن تتابعات السيتوزين-ثيمين (CT) تظهر كل 100 ألف زوج قاعدي وتتابعات السيتوزين-أدينين (CA) تظهر كل 420 ألف زوج قاعدي أما تتابعات الأدينين-غوانين-غوانين (AGG) فتظهر كل 700 ألف زوج قاعدي. وبعد تحديد التتابعات تم تصميم المرئسات المخصصة لتفاعل البلمرة المتسلسل وذلك لتضخم المنطقة الحاوية على تكراريات التسلسلات البسيطة وتقييم التعددية الشكلية بين ثمانية وعشرين صنفاً من الدراق حيث أعطى كل زوج من المرئسات من 1-4 قرين لكل موقع.

صمم Lopes وآخرون عام 2002 واحد وعشرين زوجاً من المرئسات لمواقع تكراريات التسلسلات البسيطة المشتقة من مكتبة الجينوم للمشمش (*Prunus armeniaca L.*) والتي استخدمت في دراسة 25 صنف من المشمش الأوروبي فأعطت كل المرئسات تعددية شكلية بمعدل 3-12 قرين للموقع وبالتالي كانت أكثر فاعلية من تقنيتي شبيهات الأنزيمات وتباين أطوال القطع المحددة (RFLP)، ولدى دراسة التنوع الوراثي لهذه الأصناف تمكن أحد هذه الأزواج من تضخيم موقعين من تكراريات التسلسلات البسيطة وذلك نظراً لحدوث تضاعف للموقع بطولين مختلفين بسبب تتالي الطفرات.

استطاع Hormaza عام 2002 باستخدام سبعة وثلاثين زوجاً من المرئسات المطورة من أنواع مختلفة تابعة للجنس *Prunus* دراسة ثمانية وأربعين طرازاً وراثياً من المشمش ذات مواطن جغرافية مختلفة بهدف تمييزها وتوصيفها وتحديد العلاقات الوراثية بينها، أعطى واحد وثلاثون من هذه المرئسات تضخيماً صحيحاً وعشرون منها أعطت نماذج تضخيم قابلة للتكرار ذات تعددية شكلية في جميع الطرز المدروسة حيث تم الكشف عن اثنين وثمانين قريناً في عشرين موقعاً وبذلك تم التمييز بين الطرز المدروسة وبشكل واضح باستخدام أزواج المرئسات السابقة كما أظهرت النتائج قابلية انتقال معلمات SSR بين الأنواع مما يسمح بحدوث تضخيم بين الطرز الوراثية المختلفة لنوع معين من أشجار الفاكهة باستخدام تتابعات مطورة من أنواع أخرى. وتبين أن تحليل القطاعات العنقودية (Unweighted Pair Group Method using arithmetic Averages UPGMA) فصل الطرز الوراثية المدروسة وفقاً لموطن النشوء والنسب.

لدى فحص مكتبة الجينوم في الدراق الغنية بالتتابعات النيكلوتيديدية سيتوزين-ثيمين (CT) حدد Dirlewanger ورفاقه عام 2002a واحداً وأربعين موقعاً لتكراريات التسلسلات البسيطة وصممت أزواج مرئسات للمناطق المحيطة بتكراريات التسلسلات البسيطة ثم قيّمت هذه المرئسات على سبعة وعشرين صنفاً من الدراق وواحد وعشرين صنفاً من الكرز الحلو فأعطت جميعها نواتج تفاعل بلمرة متسلسل مضخمة في الدراق وقد أعطت ستة أزواج من المرئسات (10%) نواتج تفاعل بلمرة متسلسل مضخمة لعدة مواقع من تكراريات التسلسلات البسيطة في العينة الواحدة بينما أعطى ثلاثة وثلاثين زوجاً من المرئسات نواتج تفاعل بلمرة متسلسل مضخمة في الكرز الحلو وقد أعطت ثمانية (20%) منها نواتج تفاعل بلمرة متسلسل مضخمة لعدة مواقع من تكراريات التسلسلات البسيطة في العينة الواحدة، ومن بين ثلاثة وثلاثين موقعاً مفرداً لتكراريات التسلسلات البسيطة في الدراق والكرز الحلو أعطى ثلاثة عشر منها تعددية شكلية في كل من الدراق والكرز الحلو وتسعة عشر آخر كان ذا تعددية شكلية في الدراق فقط وواحد في الكرز الحلو فقط، تراوح عدد القرائن في كل موقع من 1 وحتى 9 للدراق ومن 1 حتى 6 في الكرز الحلو أما قيمة التباير المورثي تراوحت بين 0.07 و 0.79 للدراق وبين 0.39 وحتى 0.76 للكرز الحلو، أما متوسط قوة التمييز (Discrimination power) كانت 0.54 و 0.72 للدراق والكرز على التوالي وبذلك تم تمييز كل أصناف الدراق والكرز الحلو باستخدام ثلاثة مواقع لتكراريات التسلسلات البسيطة فقط. وتستخدم هذه المواقع الأكثر فعالية في تمييز المدخلات لأجل تحديد البصمة الوراثية للدراق والكرز الحلو بالمجمع الوطني الفرنسي وفي تحاليل التوافق الجيني (Synteny) في الجنس *Prunus*.

تتمة لدراساته السابقة درس Dirlewanger ورفاقه عام 2002b إمكانية انتقال معلّات تكراريات التسلسلات البسيطة بين الأنواع والأجناس والفصائل النباتية المختلفة حيث استخدمت أزواج المرئسات السابقة في دراسة التباين الوراثي في أنواع الجنس *Prunus* وهي الكرز الحلو *P. avium mazzard* والكرز الحامض *P. cerasus*، الخوخ الأوربي *P. domestica*، اللوز *P. amygdalus*، المشمش *P. armeniaca* وخوخ مايروبلان *P. cerasifera* Ehrh وكذلك أنواع أخرى تتبع الفصيلة الوردية وهي التفاح *Malus* والفريز *Fragaria* وكذلك أنواع أخرى لا تتبع الفصيلة الوردية وهي الكستناء *Castanea*، الجوز *Juglans* والعنب *Vitis*. أعطت 75.6% من المرئسات تضخيماً في كل أنواع الجنس *Prunus* و29.3% منها تضخيماً في كل الأنواع المدروسة من العائلة الوردية في حين أعطت 80.5%، 43.9%، 31.7% من المرئسات تضخيماً في الكستناء، العنب والجوز على التوالي.

توصل Aranaza ورفاقه في عام 2002 لحقيقة تثبت أن تكراريات التسلسلات البسيطة هي معلّات فعّالة ومؤثرة في التطبيقات الوراثية والتربوية في الدّراق وذلك من خلال تطوير خمسة وثلاثين موقعاً لتكراريات التسلسلات البسيطة (SSR) من مكتبة الجينوم في الدّراق الغنية بتتابعات السيتوزين-ثيمين/الأدينين-غوانين (AG/CT) ولقد وجد أن أربعة وعشرين منها ذات تعددية شكلية عند اختبارها على أربعة عشر صنفاً من الدّراق وأحد عشر صنفاً من النكتارين، حيث ظهر ما مجموعه 82 قرين (أليل) في المواقع ذات التعددية الشكلية، ووجد أنه كلما ازداد عدد التتابعات في المواقع كلما ازداد عدد القرائن المرتبطة بها كما تمكنوا من تمييز جميع الأصناف كل على حده ماعدا صنفين منها ولقد أثبتوا أن ثلاثة مواقع لتكراريات التسلسلات البسيطة (SSR) تعد كافية لتمييز أربعة وعشرين طرازاً من أصل خمسة وعشرين ونتيجة للتحليل العنقودي تجمعت كل أصناف النكتارين في عنقود منفرد بينما كانت أصناف الدّراق أكثر تغيّراً من النكتارين.

عزل Testolin وزملاؤه عام 2002 ستة وعشرين موقعاً لتكراريات التسلسلات البسيطة من مكتبة الجينوم للدّراق (*Prunus persica* L) والغنية بتتابعات الأدينين-سيتوزين/غوانين-ثيمين (AC/GT) والأدينين-غوانين/سيتوزين-ثيمين (AG/CT) على التوالي، ولقد تم فحص قابلية الانتقال للمعلّات ضمن الجنس *Prunus* على أنواع تابعة للجنس *Prunus* وهي الدّراق، النكتارين، اللوز، المشمش، الخوخ الأوربي، الخوخ الياباني، الكرز الحلو، الكرز الحامض بالإضافة للتفاح. وكانت النتيجة أنه أكثر من نصف تكراريات التسلسلات البسيطة (52%) أعطت تضخيماً صحيحاً في كل أنواع الجنس *Prunus* حيث كان حجم قطع الدنا المضخمة ضمن مجال الحجم المتوقع منسجمة في عددها مع المستويات المعروفة من الصّيغة الصّبيغة

ولقد كان معدل التضخيم منخفضاً عند الأنواع ذات العلاقة الوراثية التطورية الأقل مع الدراق مثل الخوخ الأوربي والياباني والكرز.

أما على نبات الكرز الحلو فقد تم توصيف ستة وسبعين طرازاً وراثياً باستخدام أربعة وثلاثين زوجاً من مرئسات تكراريات التسلسلات البسيطة والتي عزلت مسبقاً من الدراق حيث أعطى أربعة وعشرون زوجاً منها تضخيماً في مواقع تكراريات التسلسلات البسيطة وكان أربعة عشر زوجاً فقط ذات تعددية شكلية، تم انتقاء تسعة أزواج بحسب التعددية الشكلية ونوعية التضخيم واستخدمت هذه الأزواج والقرائن السبعة والعشرون الناتجة عنها لتحديد الهوية الوراثية لاثنتين وسبعين طرازاً وراثياً من الكرز الحلو، استطاعت هذه المرئسات تحديد الهوية المميزة لثمانية وستين طرازاً ولكنها لم تستطع تمييز الطرز المطفرة من الطرز الأصلية، بلغ متوسط القرائن لكل موقع 3.7 بينما كانت القيمة المتوسطة للتغاير المورثي للمواقع التسعة المتعددة شكلياً 0.49 وبالتالي أثبتت هذه النتائج الفائدة الناتجة عن قابلية انتقال معلّات SSR بين الأنواع والتي تسمح بتمييز الطرز الوراثية المختلفة لأنواع أشجار الفاكهة باستخدام تتابعات مطورة من أنواع أخرى تتبع لنفس الجنس كما عكس تحليل القطاعات العنقودي UPGMA انقسام الطرز الوراثية القديمة المدروسة إلى مجموعتين مميزتين بشكل واضح حسب الموطن الجغرافي لنشونها (Wunsch and Hormaza, 2002).

ونظراً إلى أن رسم خرائط مواقع تكراريات التسلسلات البسيطة يحتاج إلى زمن طويل وتكلفة مرتفعة إضافة إلى أن معظم هذه المواقع غير مرتبطة بشكل محدد مع مواقع المورثات المهمة سعى Wang ورفاقه في عام 2002 إلى الجمع بين تقنية رسم الخرائط القليلة التكلفة نسبياً وبين التحديد السريع لمواقع تكراريات التسلسلات البسيطة المعروفة مسبقاً بواسطة تقنية AFLP في المناطق المهمة من الخريطة الوراثية وبفضل هذا الاتجاه تم تطبيق هذه الاستراتيجية لتحديد مواقع تكراريات التسلسلات البسيطة المرتبطة بصفتين هامتين تورثان بسهولة في الدراق وهما المقاومة لنيماتودا تعقد الجذور وصفة النمو الدائم (Evergrowing) كما تمكنوا من إثبات قابلية معلّات تكراريات التسلسلات البسيطة بين أنواع الجنس *Prunus* الأخرى بما فيها المشمش.

في دراسة أجراها Romero وزملاؤه في عام 2003 تم استخدام تقنية تكراريات التسلسلات البسيطة بكفاءة عالية في توصيف وتمييز أربعين طرازاً وراثياً من المشمش ذات أصول جغرافية مختلفة وذلك باستخدام ستة عشر زوجاً من المرئسات الخاصة بمواقع تكراريات التسلسلات البسيطة المختلفة والمشتقة أساساً من جينوم الدراق. حيث كانت نسبة التغاير المورثي 32%، لدى إجراء تحليل القطاعات العنقودية للطرز المدروسة انفصلت الطرز في مجموعات بشكل متوافق مع النسب وموطن النشوء.

عمد Zhebetyayeva وزملاؤه عام 2003 إلى استخدام ثلاثين زوجاً من مرئسات تكراريات التسلسلات البسيطة المطورة من مكتبي الجينوم للدراق في دراسة التباين الوراثي في سبعة وأربعين طرازاً وراثياً من المشمش فأعطى ثمانية عشر زوجاً من المرئسات تضخيماً لمواقع تكراريات التسلسلات البسيطة منها ستة عشر في نفس مجال الحجم الملحوظ في الدراق واثنان مغايران، وأعطت بعض الأزواج تضخيماً لأكثر من موقع كما أظهر اثنا عشر زوجاً من المرئسات تعددية شكلية عالية لأربعة عشر موقعاً لتكراريات التسلسلات البسيطة ، بينما كانت نتائج التعددية الشكلية عالية مقارنة بنتائج أنظمة المعلومات الوراثية المتعادلة السيادة الأخرى مثل RFLP و Isozymes وكانت نسبة التنوع الوراثي للطرز الوراثية الأصلية في المجموعات البيئية التقليدية (القديمة) منخفضة لوجود نسبة عالية من التماثل الوراثي بين المجموعات (>0.75) بينما عكس تحليل القطاعات المتجاورة للمسافات الواقعة بين المعلومات بين الأصناف المدروسة التاريخ المعقد لإدخال المشمش واستثناسه مما نتج عنه انفصال الأصناف في مجموعات لا تتوافق مع الأصل الجغرافي لها.

لدى تحديد أربعة وأربعين موقعاً لتكراريات التسلسلات البسيطة من مكتبة الجينوم للوز والغنية بتتابعات الأدينين - سيتوزين (AC) وتسعة وتسعين موقعاً من المشمش والغنية بتتابعات الأدينين - غوانين (AG) استطاع Messina وزملاؤه في عام 2003 من إثبات الكفاءة العالية لبرنامج تحديد المواقع المستخدم في المشمش حيث تم تحديد 99 موقعاً من أصل 127 موقعاً متوقعاً مقارنة مع اللوز (44 موقعاً من أصل 93 موقعاً متوقعاً) وبعدما تم تصنيع المرئسات الملائمة لعشرين موقعاً من كل من مكتبي الجينوم وتطبيقها على ثمانية أنواع تتبع الجنس *Prunus* (اللوز، الدراق، النكتارين، المشمش، الخوخ الأوربي، الخوخ الياباني، الكرز الحلو والكرز الحامض) بالإضافة للنجاح *Malus domestica* تم إثبات قابلية الانتقال الواسعة لمعلومات تكراريات التسلسلات البسيطة SSR بين أنواع الجنس *Prunus* .

وفي دراسة مغايرة عما سبق قام Yamamoto وزملاؤه عام 2003 بتحليل الأبوة للدراق الياباني باستخدام معلومات تكراريات التسلسلات البسيطة حيث درس الأصل لستة عشر صنفاً من الدراق (تسعة منها ربيت بالتهجين المتحكم به، اثنان منها كانت طفرات برعمية، وخمسة منها من بادرات) باستخدام سبعة عشر معلماً من تكراريات التسلسلات البسيطة حيث تم إثبات العلاقات بين النسل والآباء في تسعة أصناف مهجنة وذلك لأن قرائن تكراريات التسلسلات البسيطة قد انتقلت للأصناف من آباءها في كل المواقع المدروسة، وأثبتت هذه الدراسة تطور بعض الأصناف من أصناف أصلية بالطفرة البرعمية بناءً على التشابه في نمط انعزال مواقع التتابعات. كما أثبتت الدراسة أن بعض أصناف الدراق غير معروفة النسب تشاركت بقرين واحد مع الأب الافتراضي في كل موقع لتكراريات التسلسلات البسيطة ولقد اقترحت الدراسة أن هذه

الأصناف لم تكن طفرات ولكن ناتجة عن بادرات للأب الافتراضي مما أكد فاعلية معلّات تكراريات التسلسلات البسيطة في تحاليل الأبوة.

صمم Clarke و Tobutt عام 2003 مرئسات بناءً على واحد وعشرين موقعاً من تكراريات التسلسلات البسيطة والتي تم تحديدها من النوع (*Prunus avium*) (Napoleon) أظهر تسعة عشر زوجاً من المرئسات تعددية شكلية عند تحليل أربعة عشر صنفاً من الكرز الحلو بوجود من 2 إلى 7 قرين لكل موقع ولقد أمكن استخدام ثلاثة أزواج من المرئسات لتمييز كل الأصناف المدروسة كما ضخم اثنا عشر زوجاً من المرئسات نواتج التفاعل في ثلاثة أصناف من الدراق أعطت 7 منها تعددية شكلية.

استطاع Mnejja وزملاؤه عام 2003 تحديد خمسة وثلاثين موقعاً لتكراريات التسلسلات البسيطة ذات تعددية شكلية وذلك باستخدام مكتبة الجينوم للخوخ الياباني الغنية بتتابعات السيتوزين-ثيمين/أدينين-غوانين (CT/AG) وتصميم أزواج مرئسات متخصصة لهذه المواقع حيث ضخم 27 منها موقعاً منفرداً للزوج الواحد أما الثمانية المتبقية فضخمت أكثر من موقع واحد. لوحظ أيضاً مستوى عالٍ من التباين الوراثي في مجموعة من ثمانية أصناف قد اختبرت بأزواج المرئسات السبعة والعشرين ذات الموقع المفرد حيث بلغ متوسط عدد القرائن لكل موقع 5.7 أما نسبة التباير المورثي الملحوظة كانت 0.73 وقوة التمييز 74%، كما لوحظ إمكانية انتقال 85% و 78% من المعلّات المدروسة إلى كل من الدراق واللوز على التوالي.

بيّن Canli في عام 2004 الفاعلية العالية لمعلّات تكراريات التسلسلات البسيطة كأداة قيمة في عملية انتخاب الصفات و خاصة الكمية منها ورسم الخريطة الوراثية لأن هذه المعلّات ذات تعددية شكلية مرتفعة وتورث وفقاً لمبدأ السيادة المتعادلة (Co-Dominant) وذلك عند دراسته لخرائط الارتباط الوراثية في النسل الناتج من تهجين صنفين من أصناف الكرز الحامض رباعية الصيغة الصبغية وذلك باستخدام خمسة وأربعين زوجاً من المرئسات المحددة في التفاح، الدراق، الكرز الحلو والكرز الحامض حيث استطاع تمييز سبعة عشر معلماً ارتبطت بشكل قوي مع عدد من الصفات الكمية مثل وقت الإزهار ووزن الثمرة وتماوت المدقة.

تم تحديد التنوع الوراثي بين أربعة عشر صنفاً من الخوخ وستة أصناف Pluots (وهو هجين مفترض بين الخوخ *P. salicia lindi* والمشمش *P. armeniaca*) وصنف تجاري Plumcot بالإضافة لسبعة أصناف من المشمش لمعرفة فيما إذا كان المشمش يعد من أسلاف أصناف Pluots أو الصنف Plumcot وباستخدام 28 معلماً من تكراريات التسلسلات البسيطة منها 25 محددة في الكرز الحلو وثلاثة في الدراق. أعطت 80% من المرئسات المحددة في الكرز تضخيماً في أصناف الخوخ و أصناف Pluots بعدد قرائن بلغ 100 قرين بمعدل 4.3 قرين لكل زوج من المرئسات مما أثبت قابلية الانتقال لمعلّات تكراريات التسلسلات البسيطة بين أنواع

الجنس *Prunus*. وتحليل القرائن الناتجة وجد أن 83% من القرائن التي ظهرت في أصناف Pluots تعود إلى الخوخ و12% من القرائن كانت مشتركة مع الخوخ والمشمش ولم يكن هناك أي قرين مشترك مع المشمش لوحده بينما في صنف Plumcot أظهرت نتائج التضخيم 49 قريناً منها 51% عائدة للخوخ و36% للمشمش و12% مشتركة مع الخوخ والمشمش. وتحليل المخططات البيانية شكلت أصناف Pluots و الخوخ قطاعاً بعيداً عن المشمش بينما توضع صنف Plumcot في فرع منفصل بين قطاعي المشمش والخوخ (Ahmad et al., 2004).

استطاع Testolin ورفاقه عام 2004 اختبار التعددية الشكلية وقابلية الانتقال لعشرين معلماً من تكراريات التسلسلات البسيطة المصممة بناءً على مواقع تكراريات التسلسلات البسيطة من مكتبة الجينوم للوز (*Prunus amygdalus* Batsch) والغنية بتتابعات الأدينين-سيتوزين (AC) على سبعة أنواع مختلفة تابعة للجنس *Prunus* هي الدراق، النكتارين، المشمش، الخوخ الأوربي، الخوخ الياباني، الكرز الحلو والكرز الحامض بالإضافة للتفاح حيث تراوحت قيمة التغير المورثي المتوقعة بين 0.62 و0.89 وقد أعطت 30% من المرئسات تضخيماً واضحاً في أنواع الجنس *Prunus* كما أعطى زوجين من المرئسات تضخيماً في التفاح.

وفي دراسة أجراها Messina وآخرون عام 2004 تم تحديد تسعة وتسعين موقعاً لتكراريات التسلسلات البسيطة حددت من مكتبة الجينوم للمشمش (*Prunus armeniaca*) الغنية بتتابعات الأدينين-غوانين/ السيتوزين-ثيمين (AG/CT) حيث تم بعد ذلك اختبار التعددية الشكلية لعشرين موقعاً منها في ستة عشر صنفاً من المشمش فتراوح عدد القرائن لكل موقع من 2 وحتى 9 وكانت قيمة التغير المورثي المتوقعة تتراوح بين 0.26 و0.82 كما ظهرت قابلية الانتقال لمعلومات تكراريات التسلسلات البسيطة بين أنواع الجنس *Prunus* المختلفة (الوز، الدراق، النكتارين، الخوخ الأوربي، الخوخ الياباني، الكرز الحلو والكرز الحامض) حيث أعطت 20% منها تضخيماً واضحاً في كل الأنواع السابقة بينما لم تعط أي منها تضخيماً في التفاح.

استطاع Dirlewanger ورفاقه في عام 2004 مقارنة الجينوم بين سبعة أصناف مضاعفة الصيغة الصبغية تابعة للجنس *Prunus* ($X=8$) (الوز، الدراق، المشمش، الكرز، *P. davidiana*, *P. cerasifera* و *P. ferganensis*) وذلك باستخدام خريطة المرجع للجنس *Prunus* (*Prunus reference map*) والتي تشمل 562 من المعلومات الجزيئية القابلة للانتقال (RFLP, SSR) بالإضافة لثلاثة عشرة خريطة مبنية على مجموعات أصغر من هذه المعلومات واعتمدت المقارنة على تطابق المعلومات (colinearity) حيث أظهرت النتائج المبدئية لمقارنة الخرائط بين التفاح والمشمش مستوى عال من التوافق (synteny) بين الجنسين، كما تم اكتشاف مناطق وراثية محافظة بين جنس *Prunus* و *Arabidopsis*. وبمقارنة بيانات الخرائط المختلفة أمكن تحديد مواقع المورثات الثمانية والعشرين الأساسية التي تؤثر على

الصفات الإنتاجية الموجودة في الأنواع المختلفة للجنس *Prunus* وذلك من خلال دراسة 277 زوجاً من مرئسات تكراريات التسلسلات البسيطة في 101 من نباتات الجيل الأول الناتجة عن التصالب الثلاثي ضمن الجنس *Prunus* بين الخوخ الكرزي مع هجين اللوز والدراق حيث ارتبطت المعلّات بشكل قوي مع المورثات الأساسية المسؤولة عن الصفات الهامة (المقاومة للأمراض والحشرات، كمية الثمار، عدم التوافق الذاتي وغيرها) وهي بدورها تستخدم حالياً في عمليات الانتخاب بمساعدة معلّات جزيئية (Marker assisted selection) في برامج التربية. طبقت تقنية تكراريات التسلسلات البسيطة للبحث عن معلّات جديدة يمكنها أن تميز بين أصناف المشمش وأصناف الفريز التجارية ولإثبات أنها هي الطريقة الأسرع للتحكم بالنوعية وثنائية الصنف وذلك من قبل Bowley عام 2004 حيث درس ثمانية وأربعين صنفاً من الفريز، سبعة عشر صنفاً من توت العليق، أربعين صنفاً من الكرز الحلو، ستة عشر صنفاً من الكرز الحامض، تسعة أصناف من الخوخ الياباني، اثنين وسبعين صنفاً من الخوخ الأوروبي، اثنين وستين صنفاً من الدراق، خمسة أصناف من النكتارين، خمسة أصناف من المشمش وستة أصول من الكرز وباستخدام مرئسات متخصصة لكل نوع تم التمييز بين معظم أصناف النوع بثلاثة أزواج من المرئسات فقط ما عدا أصناف الدراق التي استلزم تمييزها عن بعضها استخدام سبعة أزواج من المرئسات المتخصصة وتم استنتاج أن البصمة الوراثية المعتمدة على تكراريات التسلسلات البسيطة ليست ملائمة لتحديد الطفرات الثانوية مثل التغير في لون الأزهار لكنها تعد وسيلة فعالة للكشف عن الأصناف التجارية المغايرة للطراز الحقيقي أو المعتمد.

وفي دراسة أجراها Pedryc وزملاؤه في عام 2004 بهدف المقارنة بين تقنيتي تكراريات التسلسلات البسيطة SSR وشيبيات الأنزيمات isozyme في مجال التوصيف الجزيئي لستة وتسعين صنفاً من المشمش تمت الدراسة بداية باستخدام معلّات شيبيات الأنزيمات isozyme والتي لم تعط تعددية شكلية كافية بين الأصناف المدروسة أو أن توحى بوجود علاقة بينها، أما معلّات تكراريات التسلسلات البسيطة المستنبطة من مكتبي الجينوم للمشمش والدراق فقد مكنت وباستخدام أربعة أزواج من المرئسات فقط من كشف تعددية شكلية بين الأصناف وتحديد العلاقات الوراثية بينها.

وفي دراسة قام بها Ohta وآخرون عام 2005 لتقييم التنوع الوراثي لخمسة عشر صنفاً من الكرز المزهر (Flowering cherry) باستخدام 85 من معلّات SSR والمطورة من أنواع أخرى قريبة له وراثياً (الدراق، الكرز الحلو والحامض) أعطت 29% من المعلّات تضخيماً في كافة العينات المدروسة ولقد وجد أن التباين الوراثي في الكرز المزهر أعلى منه في الدراق والكرز الحلو.

تمكن Maghuly وزملاؤه عام 2005 وباستخدام عشرة معلّات من تكراريات التسلسلات البسيطة ذات التعددية الشكلية والمطورة من المشمش من دراسة التنوع الوراثي لاثنتين وستين صنفاً من المشمش تم جمعها من مناطق مختلفة في وسط أوروبا حيث تم الحصول على أربعة وثمانين قريناً بمعدل 8.4 قرين لكل موقع وكانت قيمة التغير المورثي 0.61 وبتحليل البيانات وفق برنامج التحليل العنقودي UPGMA المعتمد على المسافات الوراثية تجمعت المدخلات وفقاً للنسب كما أكدت هذه النتائج صحة نتائج التوصيف الشكلي وتحليل تقنية الدنا المتعدد الأشكال المضخم عشوائياً (RAPD) التي أجريت سابقاً للأصناف نفسها.

في دراسة أخرى حدد Mnejja ورفاقه عام 2005 مجموعة جديدة تتألف من 47 موقع من تكراريات التسلسلات البسيطة مشتقة من مكتبة الجينوم للوز والغنية بتتابعات السيتوزين-ثيمين/أدينين-غوانين (CT/AG) كانت 42 منها ذات تعددية شكلية عند دراستها على ثمانية أصناف من اللوز وواحد وثلاثين منها كانت ذات موقع واحد وكان متوسط عدد الأليلات في الموقع 6.6 ومتوسط التغير المورثي الملحوظ 0.65 والمتوقع 0.76 مما دل على تنوع وراثي عالي وكذلك كانت قابلية انتقال هذه المعلّات مرتفعة (83-100%) إلى أنواع مختلفة من الجنس *Prunus* مثل الدراق، الكرز الحلو، الخوخ الياباني والمشمش.

ولمقارنة التوصيف الجزيئي باستعمال معلّات تكراريات التسلسلات البسيطة مع التوصيف الشكلي في المشمش، قام Sanchez-Perez ورفاقه عام 2005a بتطبيق تقنية تكراريات التسلسلات البسيطة باستخدام عشرة مواقع لتكراريات التسلسلات البسيطة على أربعين صنفاً للمشمش جمعت من أوروبا وأمريكا الشمالية وثلاثة عشر سلالة مرباة للمشمش وقاموا بدراسة عدة صفات حقلية مثل وقت الإزهار، النضج، التوافق الذاتي، لون الطبقة الجلدية واللبن وحجم الثمرة. مكنت المعلّات الجزيئية المعتمدة على تكراريات التسلسلات البسيطة من تمييز كافة الطرز الوراثية المدروسة وبناءً على شجرة التشابه تجمعت الطرز في مجموعات محددة بحسب الأصل الجغرافي والنسب بينما أظهرت شجرة التشابه بالاعتماد على الصفات الحقلية والشكلية أن الطرز قد تجمعت بحسب صفاتها الثمرية، وكان الارتباط ضعيفاً بين التوصيف الجزيئي والشكلي.

في دراسة أخرى عمل Sanchez-Perez عام 2005b على التوصيف الجزيئي لثمانية أصناف من المشمش وأربعة عشر خط تربية من برنامج تربية المشمش وثلاثة أصناف معتمدة حديثاً باستخدام سبعة عشر معلّماً من معلّات تكراريات التسلسلات البسيطة المطورة من الدراق حيث أعطى أربعة عشر منها تضخيماً ذو تعددية شكلية وتراوح عدد القرائن من 1 إلى 9 وكان متوسط عدد القرائن للموقع 4.1 وبذلك أعطت النتائج تمييزاً جزيئياً لكل الطرز الوراثية حيث تجمعت كل الطرز في سبعة مجموعات رئيسية وفقاً لموطنها الأصلي والنسب، مما أعطى بدوره

رؤية جديدة لتطبيقات أخرى في تصميم تهجينات جديدة في برامج تربية المشمش وحماية الأصناف المعتمدة حديثاً.

لتوصيف بعض المصادر الوراثية للمشمش في منطقة حوض البحر الأبيض المتوسط قام Guerriero ورفاقه عام 2006 بدراسة الصفات الزراعية والشكلية لمئة مدخل من المشمش مأخوذة من المجمع الوراثي في إيطاليا وكذلك تمت دراسة البصمة الوراثية لستة وخمسين مدخلاً من هذه المدخلات باستخدام أربعة مواقع لتكراريات التسلسلات البسيطة ذات تعددية شكلية عالية، ثم أجري التحليل العنقودي للمدخلات باستخدام نتائج التوصيف الشكلي في البداية وتمت إعادته باستخدام نتائج التوصيف الجزيئي وبمقارنة المخططات البيانية الناتجة تم استنتاج المواطن المحتملة والعلاقات الوراثية بين مجموعات المدخلات.

و قد تمت دراسة علاقات التشابه الوراثي واختبار التعددية الشكلية لمواقع تكراريات التسلسلات البسيطة بين خمسة وأربعين صنفاً من أصناف المشمش وذلك باستخدام أزواج من المرئسات المطورة من أربعة مصادر مختلفة من المشمش والدراق وكانت النتيجة أن نسبة 90% من المرئسات المستخدمة قد ضخمت مواقع تكراريات التسلسلات البسيطة في المشمش وأكثر من نصفها كانت ذات تعددية شكلية وقد ثبت أن استخدام عشرة أزواج من المرئسات كان كافياً لتشكيل بصمة وراثية مميزة لمعظم الأصناف المدروسة أما مخطط شجرة التشابه الناتج فقد فصل الأصناف المدروسة ضمن مجموعتين أساسيتين ضمت كل منهما تحت مجموعات عديدة، كما أكدت هذه الدراسة إمكانية انتقال معلّات SSR بين أنواع الجنس الواحد (Ruthner et al., 2006).

وبهدف توصيف مجمع وراثي للمشمش باستخدام تكراريات التسلسلات البسيطة عمد Foroni ورفاقه عام 2006 إلى استخدام اثني عشر زوجاً من المرئسات المقابلة لستة مواقع من تكراريات التسلسلات البسيطة لتوصيف 42 طراز من المشمش، حيث تم فصل نواتج التضخيم لتفاعل البلمرة المتسلسل PCR على هلامه الآغاروز 2%، وكانت النتيجة أن بعض تكراريات التسلسلات البسيطة أظهرت مستوى عالٍ من التباين الوراثي وتراوح عدد القرائن لكل موقع بين 4 و 11 وقد مكنت معلّات SSR من دراسة العلاقات الوراثية بين الأصناف المدروسة وتحديد هوية كل منها.

لدراسة البنية الوراثية لثلاثة مجتمعات نباتية من المشمش البري (*Prunus armeniaca*) المنتشرة في إحدى ولايات الصين الغربية استخدم Tian-ming وآخرون عام 2007 مجموعة من معلّات تكراريات التسلسلات البسيطة فأثبتت هذه المعلّات قابلية الانتقال بين أنواع الجنس *Prunus* وفعالية عالية في دراسات التنوع الوراثي للمشمش البري حيث أظهرت الدراسة أن مجتمعات المشمش البري ما زالت محافظة على مستوى عالٍ نسبياً من التباين الوراثي والذي

يمكن بين أفراد المجتمع الواحد (83.6-86.3%) كما ظهر تباين بين المجتمعات المختلفة، وأوضحت الدراسة أن المسافة الوراثية بين المجتمعات مرتبطة معنوياً بالمسافات الجغرافية بين المدخلات.

تم توصيف تسع عشرة سلالة من الدراق غير معروفة النسب في اسبانيا وذلك لمعرفة التنوع الوراثي بينها ولتوضيح علاقاتها المحتملة مع عشرة أصناف تقليدية من الدراق وذلك باستخدام عشرين زوجاً من المرئسات المطورة من الدراق وذات التعددية الشكلية العالية وكانت النتيجة الحصول على ستة وأربعين قريناً بمعدل 1 إلى 6 قرائن وبمتوسط 2.3 قرين للموقع و كانت أربعة عشر من مواقع تكراريات التسلسلات البسيطة ذات تعددية شكلية في الطرز الوراثية المدروسة كما ساعد رسم شجرة التشابه الوراثي في ترتيب الطرز الوراثية بحسب علاقاتها الوراثية (Bouhadida et al., 2007).

درس Zhang وزملاؤه عام 2008 الاختلافات الوراثية بين أربعة وأربعين مدخلاً من أحد الأنواع البرية للكرز *Tomentosa* (*Prunus tomentosa* thunb) جمعت من عشرة مناطق جغرافية-بيئية في المقاطعات الصينية الشمالية وسبعة مدخلات من ثلاثة أنواع متقاربة (*P. glandulosa*, *P. japonica*, *humilis*) وذلك باستخدام 110 من معلّات تكراريات التسلسلات البسيطة المطورة من الدراق، الكرز الحلو، الكرز الحامض والمشمش فأعطت 44 منها تضخيماً مما يعني أن نسبة 40% من هذه المعلّات انتقلت إلى كرز *Tomentosa* والأنواع الثلاثة الأخرى ولقد تم الحصول على 250 قريناً بمعدل 5.68 قرين لكل موقع وبمتوسط تعددية شكلية فعالة 52%. استطاعت هذه النتائج إيضاح قدرة معلّات تكراريات التسلسلات البسيطة على الانتقال من الأنواع المزروعة إلى الأنواع البرية للجنس *Prunus* وقدرتها على التمييز بين الطرز الوراثية. ولدى إجراء تحليل القطاعات العنقودي UPGMA لبيانات تكراريات التسلسلات البسيطة شكل كل من *P. humilis* و *P. japonica* و *P. glandulosa* مجموعة واحدة بينما شكلت طرز *P. tomentosa* مجموعة منفصلة وقد توزعت الطرز ضمن المجموعة وفق موطنها الجغرافي.

درس Maghuly وزملاؤه عام 2008 التشابه الوراثي لأربعة وأربعين طرازاً وراثياً من المشمش من المجتمعات الوراثية وذلك باستخدام عشرة أزواج من مرئسات تكراريات التسلسلات البسيطة والتي طورت مسبقاً من المشمش، أعطت كل المرئسات أنماط تعددية شكلية توحى بوجود 85 قريناً مختلفاً، كان متوسط عدد القرائن لكل موقع 8.5 ولقد ظهر واحد وعشرون من هذه القرائن لمرة واحدة فقط في العينات المدروسة وتراوحت قيمة التباين المورثي لكل موقع منفرد من 0.3182 إلى 0.9545، أما تحليل القطاعات العنقودي UPGMA أدى إلى انفصال الطرز وفقاً للأصل الجغرافي إلى مجموعتين هما مجموعة الطرز ذات الأصل الأوربي ومجموعة طرز وسط

آسيا مما أكد أهمية استعمال تقنية تكراريات التسلسلات البسيطة لتحديد البصمة الوراثية لحماية الحقوق الفكرية لمربي النبات وأيضاً للمساعدة في برامج تربية الماش. ثانياً -تقنية التعددية الشكلية المضخمة بين مواقع إدخال

العناصر النقالة IRAP:

(Inter-Retrotransposon Amplified polymorphism)

يطلق تعبير transposons على العناصر الوراثية النقالة (mobile genetic elements) ذات المقدرة على تغيير مواقعها في الجينوم وقد تم اكتشاف هذه العناصر النقالة في النباتات العشبية قبل ما يقارب ستين سنة في الذرة الصفراء من قبل الباحثة McClintock عام (1948) وهي تشكل حوالي 80% من جينوم بعض الأنواع المحددة مثل الذرة (Flavell *et al.*, 1996; SanMingual *et al.*, 1977). وتنتشر عادة على صبغيات النبات وهذا ينسجم مع أسلوب تضخمها، إلا أنها من الممكن أن ترتبط بمناطق محددة من الجينوم وتعمل لدى دخولها إلى الجينوم كعوامل مطفرة. وقد تغيرت النظرة إلى هذه العناصر الوراثية النقالة من كونها عناصر أنانية (Selfish) أو طفيلية (parasite) بحسب رأي Orgel وCrick عام 1980 إلى أنها عوامل هامة في تطور جينوم النباتات بحسب Wessler ورفاقه عام 1995.

تقسم العناصر النقالة إلى صنفين: تدعى عناصر الصف الأول retrotransposons وهي التي تغير موقعها بالجينوم بطريقة النسخ و اللصق وباستخدام الحمض النووي الريبسي (الRNA) كوسيط، بمعنى أنه يتم نسخ العنصر النقال، ومن ثم لصق وإدراج النسخة الناتجة في موقع آخر من الجينوم مع بقاء النسخة الأصلية أو المانحة في مكانها من الجينوم. وهي تتكاثر نتيجة النسخ العكسي وإدخال نسخ جديدة من الحمض النووي DNA المكمل (complementary DNA) (5-10 آلاف زوج قاعدي) إلى داخل الجينوم وهي شبيهة جداً بالفيروسات القهقرية (Lentiviruses) (Flavell *et al.*, 1992)، في حين تدعى عناصر الصف الثاني transposons وهي التي تغير موقعها بالجينوم بطريقة القطع و اللصق، بمعنى أنه يتم استئصال العنصر النقال من المنطقة الأصلية أو المانحة و ثم لصقه في موقع آخر من الجينوم يدعى الموقع المستلم.

يمكن لهذه العناصر النقالة أن تتضخم إلى أعداد هائلة من النسخ وأن تكون المساهم الأساسي في حجم الجينوم والتغيرات الوراثية إذ أنها تنتقل بين الأنواع وعبر الأجيال من خلال الانتقال العمودي والأفقي على التوالي.

وتقسم العناصر النقالة بناءً على الصفات البنائية إلى فوق العائلة والعائلة وتحت العائلة ومن أهم فوق العائلات للصف الأول retrotransposons هي العناصر النقالة ذات التكرارات

الطرفية الطويلة LTR وهي الأكثر غزارة في مغلفات البذور، أمثلة عن هذه العناصر تشمل العناصر الشبيهة بالـ *Ty1/copia* و العناصر الشبيهة بالـ *Ty3/gypsy* (Vitte and Panaud, 2005). إن بنية وآلية التكاثر لهذه العناصر تميزها كمعلّات وذلك لأنها تحتوي على تتابعات طويلة ومحددة وثابتة، يمكن استخدامها في استنساخ المعلّات المحددة والتتابعات المحيطة بها كما أنها عناصر نشطة تكرارياً في عائلة retrotransposon تنتج مدخلات جديدة في الجينوم تؤدي لتعددية شكلية، كما أن هذه المدخلات الجديدة يمكن أن تكتشف وتستخدم في ترتيب أحداث الإدخال مرحلياً في النسل وهذا بدوره يساعد في دراسة تطور السلالات (Alavia-Kia et al., 2008).

نظراً لوفرة هذه العناصر النّقالة وقدرتها على إيجاد نسخ جديدة فقد تم تطوير عدة تقنيات لتحديد مواقع إدراج العناصر النّقالة (Amar and Hirochika, 2001; Hirochika, 2001) ومن أهمها تقنية التعددية الشكلية المضخمة بين مواقع إدخال العناصر النّقالة-Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism (IRAP) و تقنية تضخيم قطع الدنا DNA المتوضعة بين موقع SSR وموقع إدخال للعنصر النّقال Retrotransposon-Microsatellite Amplified Polymorphism (REMAP) واللّتان تعتمدان على تفاعل البلمرة المتسلسل PCR (Waugh et al., 1997; Kalendar et al., 1999; Price et al., 2003). وتعتمد تقنية REMAP على مكاثرة قطع الدنا بين موقع إدراج العناصر النّقالة retrotransposon وموقع لتتابع تكراري بسيط، في حين أن تقنية IRAP تعتمد على مكاثرة قطع الدنا DNA بين موقعي إدراج للعنصر النّقالة retrotransposon. وتكشف كلا التقنيتين عن التباين الوراثي بالاعتماد على وجود أو عدم وجود نواتج التضخيم بتفاعل البلمرة المتسلسل، حيث أن انعدام التضخيم يدل على غياب العناصر النّقالة في موقع معين على الجينوم. تعد تقنية IRAP من تقنيات المعلّات الجزيئية المعتمدة على تفاعل البلمرة المتسلسل، سريعة، سهلة وغير مكلفة نسبياً وتكشف عن مستويات عالية من التعددية الشكلية (Flavell et al., 1992)، كما أنها لا تحتاج إلى هضم الدنا أو تهجين المسبر لإظهار بيانات المعلّات وهذا يزيد من سهولة وموثوقية التحليل وهي تقوم على مبدأ تضخيم منطقة من الدنا DNA تقع بين موقعي إدخال متجاورين للعنصر النّقالة وذلك باستخدام مرئستين تتعرفان على منطقة تعرف بالتكرار الطرفي الطويل (LTR) long terminal repeat المحددة لكل عنصر نّقال (Kalendar et al., 1999)، وبالتالي يتحدد التعدد الشكلي بوجود أو عدم وجود نواتج تضخيم (PCR Product) لهذه المناطق الواقعة بين عنصرين نّقالين (Inter-Retrotransposon) وفي حال عدم وجود أي تضخيم فهذا يعني عدم وجود العنصر النّقال Retrotransposon على الموقع المحدد وبالتالي فإنه يمكن الحصول على أفضل نتائج للتعدد الشكلي باستخدام تقنية

IRAP عند استخدام مرئسات خاصة بمواقع العناصر النّقالة Retrotransposon والتي تمتلك عدد أكبر من النسخ على الجينوم (Grzebelus., 2006).

وينتج التباين الوراثي في تقنية IRAP عن عملية حيوية فريدة للعناصر النّقالة retrotransposon إذ أن عملية إدراج العنصر النقال هي عملية لا عكوسة (irreversible event) ناتجة عن الإدراج في مواقع جديدة مع الاحتفاظ بالنسخ الأبوية في مكانها (Nakatsuka *et al.*, 2002). ينجم عن هذا الإدراج للعناصر النّقالة تعديل ضمن مجال بضع مئات إلى بضع آلاف من أزواج قواعد الدنا DNA مقارنة مع تقنية تكراريات التسلسلات البسيطة المبنية على الاختلاف في واحد إلى بضع عشرات من أزواج القواعد (Price *et al.*, 2002).

طبقت هذه التقنية بداية على الشعير من قبل Kalender ورفاقه عام 1999 حيث تم تصميم مرئسات للتكرارات الطرفية الطويلة LTR الموافقة للعناصر النّقالة في الشعير ثم طبقت على عشرة أصناف من الشعير جمعت من عدة مجموعات وراثية حول العالم وناتجة عن برامج تربية مختلفة، وذلك بهدف إثبات قدرة هذه التقنية على التمييز والتوصيف الوراثي للأصناف المدروسة مقارنة بتقنيات أخرى وهي تقنية مابين تكراريات التسلسلات البسيطة (Inter-simple sequence repeats) وتقنية REMAP وأظهرت النتائج أن نسبة الحزم المتغايرة شكلياً (polymorphic bands) الناتجة عن تقنية IRAP بلغت 67 % مقارنة مع كل من ISSR (46.5%) و REMAP (62.3%) وتراوح حجم القطع المضخمة بين 2000-330 زوج قاعدي في تقنية IRAP و 2800-300 زوج قاعدي في ISSR و 2400-250 زوج قاعدي في تقنية REMAP. ولاختبار التكرارية تمت إعادة التجربة فأظهرت تقنيتي IRAP و REMAP تكرارية أعلى وبفرق معنوي مقارنة مع تقنية ISSR. كما أظهر مخطط التشابه الوراثي تجمع الأصناف المدروسة في مجموعات منفصلة تعكس الأصول الوراثية والجغرافية لهذه الأصناف وتتفق تماماً مع برامج التربية التي نتجت عنها هذه الأصناف.

استطاع Price ورفاقه عام 2002 تطبيق تقنية IRAP على النخيل الزيتي (Oil palm) حيث تمت قراءة اثنتين وعشرين حزمة وتم رسم ثماني عشرة منها في الخريطة الوراثية للنخيل الزيتي. أعطى زوجي المرئسات (LTR6F/LTR7R و LTR7R/LTR5R) حزماً متماثلة تقريباً في تتابع القواعد بنسبة 98-99% وبحجم 450 زوجاً قاعدياً، وهذا يدل على أن هذه الحزم هي تكرار طرفي طويل واحد أو أنها عدة تكرارات طرفية طويلة أدرجت في إحداها الأخرى. استطاعت هذه التقنية إظهار التعددية الشكلية من خلال تضخيم المنطقة بين موقعين من التكرارات الطرفية الطويلة LTR وفي كلا الاتجاهين وقد تم إثبات أن هذه التقنية لا تحتاج

لهضم الدنا إلى قطع صغيرة باستخدام أنزيمات القطع أو إلى ربط المؤقلمات (Adapters). ويمكن استخدامها أيضاً في كشف التاريخ التطوري لإدراج العناصر النقالة في جينوم النباتات. استطاع Baumeل ورفاقه عام 2002 اكتشاف تواجد العناصر النقالة في الأنواع الأبوية للنوع *Spartina anglica* وهي *S. townsendii* و *S. alterniflora* وذلك باستخدام معلّات IRAP و REMAP المتعددة المواقع. إذ أنه نتيجةً لفحص التغاير الشكلي في مجتمع *Spartina anglica* تم الكشف عن نمط وراثي واحد من العناصر النقالة وهو متعدد المواقع وهو مماثل لهجن الجيل الأول للأنواع الأبوية بالإضافة إلى وجود بعض المواقع الجديدة للعناصر النقالة في جينوم *Spartina anglica* مما يدل على أن جينوم هذا الأخير لم يطرأ عليه أية تغيرات شديدة منذ تشكله.

ثبت في السنوات الأخيرة والحالية أن لتطوير وتحديد البصمة الوراثية قيمة كبرى في مجالات التنوع الحيوي وأن توزع ووفرة العناصر النقالة في جينوم النباتات يمنح أساساً متيناً لتطوير نظم معلّات وراثية يعتمد عليها ووفقاً لذلك استطاع Varasano وآخرون في عام 2002 عن طريق فحص مكتبة الجينوم للكرز (Cherry) التعرف على تتابع مواقع التكرارات الطرفية الطويلة LTR ومن ثم تصميم المرئسات بناءً على هذه التتابعات والتي استخدمت بدورها في تقنيتي IRAP و REMAP حيث تضخمت حزم قليلة بتقنية IRAP مما يدل على عدم تجمع العناصر النقالة ضمن قطاعات عنقودية متقاربة ضمن الجينوم. أما في تقنية REMAP فقد نتجت أنماط حزم معقدة تميّزت عن تقنية ISSR وبمعدل تعددية شكلية أعلى مما دل على أن هذا النظام من أنظمة المعلّات الوراثية هو الأكثر كفاءة في دراسات التنوع الوراثي.

تتميز منطقة التكرارات الطرفية الطويلة LTR بأنها مناطق محفوظة جداً في الجينوم أي قليلة التغير وذلك لأنها تحتوي على تتابعات ضرورية للتعبير المورثي. تؤدي الإدراجات الجديدة للعناصر النقالة إلى التباين في نمط إظهار تقنية IRAP لذلك قام Lightbourn ورفاقه في عام 2002 باستخدام تقنيات AFLP و IRAP لتوصيف النباتات المتجددة والناجمة عن زراعة الأنسجة للهجن الجسمية من برنامج دمج البروتوبلاست لنوعين من البطاطا أحادية الصيغة الصبغية (Haploid potato)، حيث تم تصميم مرئسات خاصة تتوافق مع التكرارات الطرفية الطويلة LTR المميز للعناصر النقالة (Tst1) والمعزول أصلاً من البطاطا وقد نتجت 78 حزمة عند تطبيق تقنية IRAP كانت منها حزمتان فريدتان مميّزتان للهجن الجسمية عن النباتات الناتجة عن التجديد والحاملة لصفات جسمية مغايرة (somaclons) ناتجة عن الطفرات التي تعزى إلى الزراعة في أوساط مغذية اصطناعية. وقد كان عدد الحزم المضخمة أكثر ولكن مستوى التعدد الشكلي أقل بتقنية IRAP مقارنة بتقنية AFLP مما دل على عدم نشاط العناصر النقالة Tst1 أثناء تجدد البروتوبلاست إلى نبات كامل.

واجه العلماء صعوبات في دراسة التنوع الوراثي بين أصناف النوع *Citrus clementine* باستخدام المعلّات الجزيئية وذلك لكون الأصناف الموجودة لم تنتج عن طريق التهجين بل بواسطة انتخاب الطفرات التلقائية (spontaneous mutations) المؤثرة على الصفات الزراعية المرغوبة وهذا ما يفسر بشكل جزئي التنوع الكبير للصفات الزراعية مقارنة بالتغيرات على المستوى الجزيئي وانطلاقاً من هذه الصعوبات قام Breto ورفاقه في عام 2002 باستخدام أشكال مختلفة من التقنيات التي تعتمد على التتابعات العشوائية، تكراريات التسلسلات البسيطة وتتابعات العناصر النّقالة لكشف الطفرات والتهجين الجسمي، ونشاط العناصر النّقالة على التوالي حيث استخدمت هذه التقنيات لمقارنة التباين الوراثي لأربعة وعشرين صنفاً من Clementine. فأعطت تحاليل كل من ISSR، RAPD و AFLP حزميتين فقط متعددتين شكلياً (نسبة 2.4 %) وميّزت صنفين فقط ولم تكشف تقنية تكراريات التسلسلات البسيطة SSR عن أية تباينات. بينما باستخدام تقنية IRAP المعتمدة على تتابعين للعناصر النّقالة من شبّهات العناصر النّقالة Copia تم الحصول على تعددية شكلية عالية (14.6 %) مقارنة بأنماط المعلّات السابقة الذكر حيث انفصلت الأصناف المدروسة إلى مجموعتين متباعتين جغرافياً الأولى من شمال إفريقيا والأخرى من إسبانيا.

وفي دراسة قام بها Yannic وزملاؤه في عام 2004 لدراسة التنوع الجزيئي بالاعتماد على المادة الوراثية النووية (Nuclear genome) والمادة الوراثية في حبيبات اليخضور (Chloroplast genome) لعشر مجتمعات نباتية للنوع *Spartina maritima* وذلك باستخدام عدة تقنيات وهي ISSR، IRAP، RAPD و RFLP. أبدت النتائج مستوى منخفض جداً من التنوع الوراثي بين المجتمعات النباتية حيث أعطى معلماً واحداً فقط تعددية شكلية من أصل 98 معلم مبني على الجينوم، فسّر ذلك في ضوء التكاثر الخضري المحصور بين الأنواع الموجودة في منطقة الدراسة.

تمكن Pereira وآخرون في عام 2005 من عزل التتابع الكامل لأول عنصر نقّال Gret1 من النوع *Vitis vinifera* والمنتشر على طول الجينوم بمواقع متكررة والذي استخدم بدوره لتصميم المرشّات التي سمحت بتحليل جينوم أصناف من العنب وبتطبيق تقنيتي IRAP و REMAP ظهرت تعددية شكلية بين الأصناف مشيرة إلى الاختلافات في توزيع العنصر Gret1 بين الأصناف ولكن ليس بين سلالات الصنف الواحد كما اقترحت نتائج الدراسات الخلوية و الجزيئية وجود دور للعنصر النّقال Gret1 في تنظيم المورثات (Gene regulation) وفي توضيح الاختلاف الكبير بالشكل الظاهري الموجود بين الأصناف.

استخدم Othman و Muhammad عام 2005 تقنيتي RAPD و IRAP لتوصيف الصفات الجسمية المغايرة (somaclons) الناتجة عن الطفرات التي تعزى إلى الزراعة في أوساط مغذية

اصطناعية وذلك لمجموعة من أصناف الموز المقاومة للفيوزاريوم، والناجمة عن طريق زراعة الأنسجة، ومجموعة أخرى من الأصناف غير المقاومة. ف لوحظ لدى تطبيق تقنية RAPD أن خمس عشرة مرئسة من أصل ثماني وعشرين قد أعطت تعددية شكلية عالية و كانت نسبة التباير المورثي 37.6% كما تراوح حجم القطع المضخمة بين 200-1500 زوج قاعدي. ووفقاً لمخطط التشابه الوراثي انفصلت الأصناف المقاومة عن غير المقاومة في مجموعتين متباعتين بشكل واضح. ومع استخدام سبعة مرئسات وتطبيق تقنية IRAP أظهرت النتائج أنه عندما استخدمت المرئسات بشكل منفصل (نفس المرئسة باتجاهين) أعطت تبايراً وراثياً تراوح بين 8% و 50% كما تراوح عدد الحزم الناتجة بين خمس إلى ثلاث عشرة حزمة فكان إجمالي عدد الحزم 69 منها ثماني عشرة ذات تعددية شكلية (26%). أما في حالة استخدام المرئسات بشكل أزواج (Combination) نتجت 85 حزمة كانت 12% منها متعددة شكلياً وبالمتوسط تراوحت نسبة التعددية الشكلية لكل مرئسة بين 11% و 40%. وعند إعادة التجربة لاختبار التكرارية (Reproducibility) وبنفس الظروف السابقة لوحظ أن استخدام تقنية IRAP قد أدى إلى تكرارية عالية جداً 96% بينما لم تتجاوز التكرارية نسبة 75% في تقنية RAPD وبالتالي كانت تقنية IRAP أكثر كفاءة في توصيف و تمييز أصناف الموز المقاومة عن تلك غير المقاومة. كذلك تم تصنيف وتوصيف أصناف الموز المزروعة في جنوب الهند باستخدام تقنية IRAP وطبقت على 36 صنف من أصناف الموز الناتجة من تهجين نوعين بريين هما (*Musa acuminata* Colla و *Musa balbisiana* Colla) والتي تعتبر مصدر الجينوم A و الجينوم B على الترتيب. حيث تم تصميم مرئسة تتعرف على التكرار الطرفي الطويل LTR المعروف للعنصر النقال Ty3-gypsy ومن ثم تم تطبيقها على أصناف الموز موضوع الدراسة فأظهرت تعددية شكلية عالية ميّزت الأصناف عن بعضها البعض بشكل واضح. وتمكنوا من تحديد حزمة من الدنا DNA بوزن جزيئي 350 زوجاً قاعدياً ميّزت كل الأصناف التي تمتلك في مخزونها الوراثي على الجينوم B. وعند إعادة التجربة لاختبار التكرارية، كانت النتائج متطابقة. وبالتالي تم الحصول على معلّم جزيئي قادر على تمييز أصناف الموز التي تمتلك الجينوم B عن تلك التي لا تمتلكه الأمر الذي يسهل عمليات الانتخاب للأصناف ذات الأهمية في برامج التربية المستقبلية (Ashalatha et al., 2005).

قام Guo ورفاقه عام 2005 بدراسة علاقات التشابه الوراثي بين طرز وراثية مختلفة من الكاكي (*Diospyros kaki* Thunb) باستخدام تقنيتي IRAP و REMAP حيث تمت دراسة اثني عشر طرازاً وراثياً بالإضافة إلى ستة أنواع تابعة للجنس *Diospyros sp.* حيث أظهرت كلتا التقنيتين تنوعاً شكلياً كبيراً بين مختلف الطرز الوراثية المدروسة وتمت مضاعفة 117 حزمة واضحة اعتمدت في تحليل النتائج تراوح حجمها بين 250-2000 وكانت نسبة الحزم المتعددة

شكلياً 86% مما سمح بتمييز كل من الطرز الوراثية المدروسة بعضها عن بعض بشكل واضح ومنفرد، وانفصلت بشكل واضح الطرز اليابانية والطرز الصينية والأنواع ذات الصلة وتراوحت قيمة معامل تشابه جاكارد (Jaccard Similarity coefficient) المحسوب من جمع بيانات التقنيتين بين 0.86 إلى 0.99 بالنسبة للطرز الوراثية اليابانية و بين 0.81 إلى 0.97 بالنسبة للطرز الوراثية الصينية. ولدى رسم شجرة التشابه الوراثي بالاعتماد على معامل التشابه انفصلت الطرز الوراثية المدروسة في أربع مجموعات وبحسب المواقع الجغرافية التي جمعت منها. قام Teo ورفاقه عام 2005 باستخدام تقنية IRAP في توصيف ودراسة التركيب الوراثي لستة عشر صنفاً من أصناف الموز المختلفة وراثياً (ثنائية و ثلاثية ورباعية الصيغة الصبغية) وباستخدام ستة عشر زوجاً من المرئسات نتجت 301 حزمة كانت 283 منها متنوعة بنسبة بلغت 94% وهي تعد نسبة عالية تعكس الاختلاف الكبير في التركيب الوراثي لأصناف الموز المدروسة كما أنه تم تحديد وتمييز حزم خاصة مميزة لكل من الجينوم A و الجينوم B وبالتالي تحديد التركيب الوراثي لكل هجين وراثي (AAB, ABB, AABB, AAAB). وقد أوضحت هذه النتائج آلية انتقال مواقع العناصر النقلة retrotransposon عند تكوّن وإنشاء الهجن، الأمر الذي يمكّن وبدرجة كبيرة من معرفة الأصول الوراثية لكل صنف أو هجين وراثي. وهذا ما أكدته شجرة التشابه الوراثي بين الأصناف المدروسة والتي انفصلت في مجموعات مستقلة ومتناسقة من حيث التشابه أو الأصول الوراثية سواء كانت ثنائية أو ثلاثية أو رباعية الصيغة الصبغية نقيّة التركيب الوراثي أو أنها هجن فيما بينها. وهذا ما لم تستطع تقنيات أخرى تمييزه في دراسات أخرى.

استطاع Antonius ورفاقه عام 2006 تحديد ثلاثة من العناصر الوراثية النقلة ذات التكرارات الطرفية القصيرة (Terminal-repeat retrotransposon in miniature (TRIM في جينوم التفاح *Malus domestica* و لوحظ حين استعمالها في تفاعل البلمرة المتسلسل ظهور الحزم المتعددة حتى باستخدام مرئسة واحدة فقط مما يدل على وجود عدد كبير من النسخ للعناصر النقلة TRIM قد تكون متجمعة أو حتى متداخلة معاً ضمن منطقة من الجينوم وقد استخدمت هذه العناصر النقلة كمعلّقات جزيئية باستخدام تقنيتي IRAP و REMAP لتوصيف تسعة عشر صنفاً من التفاح ودراسة العلاقات الوراثية بينها. إذ أعطت مرئسات TRIM التسعة أنماطاً متعددة من البصمة الوراثية للحمض النووي الريبسي منقوص الأكسجين حتى حين استخدام مرئسة واحدة في تقنية IRAP حيث أعطت المرئسة الواحدة من ست إلى خمس عشرة حزمة فعالة. وكانت النتيجة أن كلاً من الأصناف المعيارية المدروسة أعطت نمطاً منفرداً بينما أعطت الطفرات التابعة لنفس الصنف أنماطاً موحدة. ولقد تم العمل على هذه التجربة ضمن مخبرين متباعدين وتم الحصول على نتائج متطابقة مع بعض الاختلافات في قوة

الحزم الناتجة. وبالتالي استطاعت كل من التقنيتين المطبقتين التمييز وبوضوح بين الأصناف المدروسة، ولكن ليس بين الأشكال الطفرية لها.

قام Tao ورفاقه عام 2007 بدراسة التنوع الوراثي لـ 56 من الأجسام الثمرية لنوع الفطر المشروم *Tricholoma matsutake* ذي القيمة الغذائية العالية والذي ينمو طبيعياً في منطقة Yunnan الصينية، حيث تم جمع العينات من ثلاثة عشر موقعاً من تسعة مناطق مختلفة جغرافياً، وعند استخدام تقنية IRAP كان التنوع الوراثي بين المجموعات المدروسة منخفضاً، بينما وجد معظم التغير ضمن المجتمعات وهذا ما أكدته معامل التشابه 99%. ولدى رسم مخطط التشابه الوراثي، انفصلت الطرز في مجموعات تطابقت مع المواقع الجغرافية التي جمعت منها. وبهدف دراسة التشابه الوراثي بين 51 صنفاً من الأرز (*Oryza sativa* L.) قام Branco ورفاقه عام 2007 باستخدام تقنيتي IRAP و REMAP وباستخدام ستة أزواج من المرئسات المشتقة من العناصر النقالة Tos17 وهي من مجموعة شبيهات العناصر النقالة Copia حيث أنتجت أزواج المرئسات الستة المستخدمة في تقنية IRAP حزماً بمتوسط 9.16 حزمة و تعددية شكلية عالية (96%) إذ أعطى زوج المرئسات LTR2/LTR3 أعلى عدداً من الحزم (17) أما الزوج LTR4 فقد أعطى أقل عدد من الحزم (5). وبحساب معدل التشابه ومعامل الارتباط تم الاستنتاج أن الصنفين Yonoashi و Matsuyama هما أكثر الطرز الوراثية تشابهاً مما يفرض وجود علاقة قوية بين تحت مجموعة الأصناف اليابانية أما الصنفان K.sim و IAC5544 فقد كانا أكثر الأصناف تباعداً وبمخطط القطاعات تشكلت أربع مجموعات واضحة ومنفصلة حيث شملت تحت مجموعة من القطاع الرابع الأصناف البرازيلية المروية. كما تم الكشف عن وجود تشابه عالٍ بين الأصناف البرازيلية المروية والأصناف البرازيلية المزروعة في الأراضي المرتفعة مما تعارض مع النتائج السابقة لتقنية AFLP.

استطاع Häkkinen ورفاقه عام 2007 التمييز بين جينومي صنفين للموز *Musa beccarii* var *beccarii* و *Musa beccarii* var *hottana* باستخدام تقنية IRAP حيث بينت التعددية الشكلية العالية الناتجة أن هذين الصنفين متباعين وراثياً وهذا جاء مطابقاً للتوصيف الشكلي الذي تم مسبقاً لهذين الصنفين. إذ أعطت أزواج المرئسات الأربعة المستخدمة حزم متعددة بحجوم مختلفة. كما تمت ملاحظة وجود حزم نوعية محددة ميّزت بشكل واضح الصنفين *beccarii* و *hottana* عن صنف آخر تابع للنوع *M. coccinea* كما ظهرت حزم إضافية مميزة مفردة خاصة بالصنف *hottana* ميّزته عن الصنف *beccarii* مما دعى إلى الاقتراح أن الصنف *beccarii* هو الأكثر قدماً في النشوء. كما تبين أن النسخ الجديدة من التكرارات الطرفية الطويلة LTR قد حافظت على مواقعها الأصلية ومع مرور الوقت أدى التراكم والتثبيت

والاستئصال غير الكامل لمواقع الإدخال للعناصر النقالة إلى توليد المزيد من حزم تقنية IRAP مما يدل على التنوع في الجينوم. كما فسر ظهور الحزم الخاصة في ضوء اندماج نسخ المواقع النقالة بعد توزيع جينوم الآباء كما أن الاختلاف في عدد الصبغيات بين *M. coccinea* ($2n=20$) و *M. beccarii* var *beccarii* ($2n=18$) يمكن أن يساهم في وجود أو غياب الحزم النوعية الخاصة بجنس الموز.

تمكن Alavi-kia ورفاقه عام 2008 وباستخدام تقنية IRAP من تحليل علاقات التنوع الوراثي والشكلي للأنماط الوراثية لجنس الزعفران *Crocus sp* المنتشرة في إيران اعتماداً على سبعة مرئسات للتكرارات الطرفية الطويلة (LTR) والمشتقة أساساً من الشعير حيث أعطى خمسة عشر زوجاً من المرئسات المستخدمة نتائج على جينوم الجنس *Crocus* بمعدل 65.9 ناتج تضخيم لكل عينة منفردة وهذا مما دل على وجود تشابه بين جينومي الشعير والزعفران في مناطق التكرارات الطرفية الطويلة LTR وكذلك قدرة معلّات العناصر النقالة Retrotransposon على الانتقال بين الأجناس المختلفة. وقد بين تحليل الاختلاف الجزيئي (Analysis of molecular variance, AMOVA) وجود تباين وراثي معنوي بين المجتمعات (العشائر) 44.5% وبنسبة أعلى ضمن المجتمع الواحد (العشيرة) 55.5%. كما أن تحليل التناسق (Principle Coordinate analysis) فصل المجتمعات المدروسة إلى مجموعات منفصلة، وذلك بالاعتماد على نمط العشيرة والأصل الجغرافي، كما أظهر التحليل تشابه كبير بين النوع المزروع *C. sativus* مع ثلاثة أنواع برية هي *C. almehensis* و *C. cancellatus* و *C. michelosnii*. بينما أظهر مخطط التشابه الوراثي اختلافاً عن النتائج السابقة بانفصال النوعين *C. gilanicus* و *C. caspius* في مجموعة منفردة. وعليه أظهرت هذه الدراسة أن الأنواع *C. almehensis* و *C. michelosnii* كانت الأقرب وراثياً للنوع المزروع *C. Sativus* وغالباً ما تعد هذه الأنواع هي الأسلاف البرية له.

مواد وطرائق البحث

Material and methods

تم إنجاز هذا البحث في قسم التقنيات الحيوية في الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية وفي قسم علوم البستنة في كلية الزراعة - جامعة دمشق، وذلك في عام 2008-2009 .

1- المادة النباتية **plant material**:

أجريت هذه الدراسة على ستة أصناف من المشمش ذات صفات شكلية وإنتاجية مميزة ومرغوبة (الملحق 1) وتلعب دوراً هاماً في برامج تربية المشمش في سورية وهي: الشكربارا، التدمري، البلدي الماوردي، البلدي الحبي، الوزري، العجمي بالإضافة إلى خمسة طرز للأصل الكلابي للمشمش (K1,K2,K3,K4,K5).

تم جمع العينات النباتية من المجمع الوراثي التابع لإدارة البستنة في جوسية الخراب - الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية في بداية شهر نيسان وأخذت النموات الورقية الحديثة من شجرة واحدة ممثلة لكل صنف وكذلك الحال بالنسبة لطرز المشمش الكلابي حيث مثلت كل شجرة طرازاً وراثياً مستقلاً، ثم تم غسل العينات وتنظيفها بالماء المقطر وتقطيعها إلى أجزاء صغيرة وتم وضعها في أنابيب Eppendorf معقمة سعة 2 مل ومن ثم تم تخزينها على درجة حرارة -80 م° لحين الاستخدام.

2 - استخلاص الدنا **DNA extraction**:

تم استخلاص الدنا (DNA) من العينات الورقية بطريقة CTAB كما هو مذكور عند Hormaza عام 1998 مع تعديلات بسيطة و ذلك وفق الخطوات التالية:

أخذت العينات المحفوظة في المجمدة وأضيف لكل أنبوب Eppendorf كرية طحن ووضع الأنبوب في الآزوت السائل لتسهيل عملية طحن العينة بجهاز الطحن (Retsch 101 m) لمدة دقيقة واحدة وعلى سرعة 20 هرتز/دقيقة وتم الحصول على مسحوق ناعم من المادة النباتية.

أخذت كمية 0.5 غرام من العينة المطحونة، ووضعت في أنابيب Eppendorf معقمة سعة 2مل وتم ترقيم الأنابيب حسب أرقام العينات النباتية، ثم أضيف لكل أنبوب 800 ميكروليتر من محلول الاستخلاص CTAB والمكون من:

100 mM Tris-HCl pH 8.0 , 1.4 M NaCl , 20 mM EDTA pH 8.0, 2% CTAB , 1% PVP, 0.2% β -mercaptoethanol.

تم تحضين العينات على درجة حرارة 65 م° لمدة نصف ساعة مع التحريك كل 10 دقائق، ومن ثم تمت إضافة حجم مماثل من كلورفورم: أيزوأميل الكحول (24: 1) وذلك تحت المخلية ثم تم تحريك الأنابيب برفق مدة عشر دقائق.

وضعت الأنابيب في جهاز الطرد المركزي لمدة 15 دقيقة وبسرعة 6000 دورة / دقيقة على درجة حرارة الغرفة (15م°) حتى تشكل طوران علوي (upper aqueous phase) وكريه مترسبة، ثم نقل الطور العلوي المنفصل بحذر إلى أنابيب Eppendorf جديدة سعة 1.5 مل. أعيدت خطوة الاستخلاص بالكلورفورم: أيزوأميل الكحول من جديد ثم تمت إضافة 500 ميكروليتر من إيزوبروبانول البارد لترسيب DNA العينات مع التحريك بلطف وتحفظ على حرارة 26- م° مدة نصف ساعة.

تم تثقيب العينات في جهاز الطرد المركزي لمدة 5 دقائق وبسرعة 13000 دورة / دقيقة وبدرجة حرارة 4+ م° ثم تم التخلص من الرشاحة ، وغسلت الخثرة المترسبة في 500 ميكروليتر من محلول الغسيل المكون من الأمونيوم أسيتات 10مل مولار في 76% إيتانول لمدة 30 دقيقة. تم تثقيب العينات لمدة 5 دقائق بسرعة 6000 دورة / دقيقة على درجة حرارة الغرفة وأزيلت الرشاحة بحذر وجففت كرية الدنا لمدة 45 دقيقة.

تم حل كرية الحمض النووي في 200 ميكروليتر من محلول TE (pH8.0) 10mM Tris-) HCl, 1mM EDTA) و تمت إضافة 2 ميكروليتر من محلول A الرنا بتركيز 10 ملغ/مل وحضنت العينات على درجة حرارة 37 م° لمدة 30 دقيقة وحفظت بدرجة حرارة 4+ م° لمدة 24 ساعة ومن ثم خزنت على درجة حرارة -20 م° لحين الاستخدام.

3- اختبار نوعية وتركيز الدنا:

Determination of DNA quality and concentration

تم قياس تركيز الدنا (DNA) بالاعتماد على طريقة الرحلان الكهربائي باستخدام هلامية أغاروز (agarose gel) تركيز 1% مضافاً لها مادة Ethidium bromide، وبعد ذلك تم تحميل عينات الدنا على الهلامية مع معلّم قياسي (DNA Marker) معروف التركيز (Precision Molecular Mass Standard) من شركة BIO RAD وتم الرحلان على 90 فولت لمدة ساعة واستخدمت الأشعة فوق البنفسجية (UV) لتظهير حزم الدنا وتم تحديد تراكيز الحمض بمقارنة كثافة الحزم مع كثافة حزم المعلم مع تراكيز المعلم وقيس أيضاً تركيز ونقاوة الدنا في العينات باستخدام مقياس الطيف الضوئي (spectrophotometer) على طول موجة 260 و280 نانومتر.

ثم تم توحيد تركيز الدنا لكافة العينات (بمحلول TE) إلى 50 نانوغرام بالميكروليتر وهو التركيز المطلوب في كلتا التقنيتين لتفاعل البلمرة المتسلسل (PCR).

4-تقنية تكراريات التسلسلات البسيطة SSR (Microsatellite, Simple Sequence Repeat):

1-4- تضاعف الدنا DNA Amplification:

تم استخدام 26 زوجاً من مرئسات تكراريات التسلسلات البسيطة SSR (primer-pairs) والمطورة من الدّراق (الجدول، 1) بالاعتماد على قابلية انتقال معلّّات SSR بين الأنواع المرتبطة مع بعضها البعض (وفق التسلسل النيكلوتيدي الموصى به من قبل كل من Cipriani ورفاقه عام 1999 و Testolin ورفاقه عام 2000 و Sosiniski ورفاقه عام 2000 و Wang ورفاقه عام 2002) والمصنعة لدى شركة MWG GmbH، كما تم حساب درجات حرارة الالتحام المناسبة لكل زوج من المرئسات حيث اختلفت درجات الحرارة حسب عدد القواعد ونسبة GC حيث ترتفع بارتفاع هذه النسبة (الجدول، 2)، ثم تم القيام بتفاعلات تضخيم الحمض النووي استناداً إلى طريقة Cipriani ورفاقه عام 1999 مع بعض التعديلات. تم ضبط برنامج جهاز تفاعل البلمرة المتسلسل PCR طراز Mastercycler-Eppendorf و تحضير حجم تفاعل 25 ميكروليتر (الجدول، 3) وبعدها دورات بلغ 35 دورة، إذ تكونت كل دورة من ثلاث مراحل تؤدي إلى توليد سلاسل جديدة من الدنا (DNA) (الجدول، 4).

الجدول (1): التسلسل النكليوتيدي للمرئسات المستخدمة في تقنية تكراريات التسلسلات البسيطة SSR والنسبة المئوية GC % وتكراريات التسلسلات البسيطة لكل مرئسة مع حجم الأليل المتوقع

الرقم	اسم المرئسة	التسلسل النكليوتيدي	GC%	تكراريات التسلسلات البسيطة	حجم الأليل المتوقع
1	UDP96-001F	5' AGTTTGATTTTCTGATGCATCC 3'	36.4	(CA)17	111-150
2	UDP96-001R	5' TGCCATAAGGACCGGTATGT 3'	50		
3	UDP96-003F	5' TTGCTCAAAAGTGTCGTTGC 3'	45	(CT)11(CA)28	90-130
4	UDP96-003R	5' ACACGTAGTGCAACACTGGC 3'	55		
5	UDP96-005F	5' GTAACGCTCGCTACCACAAA 3'	50	(AC)16TG(CT)2CA(CT)11	80-260
6	UDP96-005R	5' CCTGCATATCACCACCCAG 3'	57.9		
7	UDP96-008F	5' TTGTACACACCCTCAGCCTG 3'	55	(CA)23	110-140
8	UDP96-008R	5' TGCTGAGGTTTCAGGTGAGTG 3'	55		
9	UDP96-010F	5' CCCATGTGTGTCCACATCTC 3'	55	(GT)21(GAGT)4(GA)18	80-120
10	UDP96-010R	5' TTGATGATTCCATGCGTCTC 3'	45		
11	UDP96-018F	5' TTCTAATCTGGGCTATGGCG 3'	50	(AC)21	210-260
12	UDP96-018R	5' GAAGTTCACATTTACGACAGGG 3'	45.5		
13	UDP96-019F	5' TTGGTCATGAGCTAAGAAAACA 3'	36.4	(TG)18(AG)7	160-220
14	UDP96-019R	5' TAGTGGCACAGAGCAACACC 3'	55		
15	UDP97-402F	5' TCCCATAAACCAAAAAAACACC 3'	36.4	(AG)17	130-170
16	UDP97-402R	5' TGGAGAAGGGTGGGTACTTG 3'	55		
17	UDP98-405F	5' ACGTGATGAATGACACCCA 3'	50	(AG)9	110-140
18	UDP98-405R	5' GAGTCTTTGCTCTGCCATCC 3'	55		
19	UDP98-406F	5' TCGGAAACTGGTAGTATGAACAGA 3'	41.7	(AG)15	90-120
20	UDP98-406R	5' ATGGGTCGTATGCACAGTCA 3'	50		
21	UDP98-409F	5' GCTGATGGGTTTTATGGTTTTTC 3'	40.9	(AG)19	130-170
22	UDP98-409R	5' CGGACTCTTATCCTCTATCAACA 3'	43.5		
23	UDP98-021F	5' AAGCAGCAATTGGCAGAATC 3'	45	(GA)22(CA)11	110-140
24	UDP98-021R	5' GAATATGAGACGGTCCAGAAGC 3'	50		
25	UDP98-411F	5' AAGCCATCCACTCAGCACTC 3'	55	(TC)16	160-190
26	UDP98-411R	5' CCAAAAACCAAAACCAAGG 3'	40		
27	UDP98-412F	5' AGGGAAAGTTTCTGCTGCAC 3'	50	(AG)28	90-130
28	UDP98-412R	5' GCTGAAGACGACGATGATGA 3'	50		
29	Pchgms2F	5' GTCAATGAGTTTCAGTGTCTACTC 3'	44	(CT)24	140-180
30	Pchgms2R	5' AATCATAACATCATTCAGCCACTGC 3'	40		
31	Pchgms4F	5' ATCTTCACAACCCTAATGTC 3'	40	(CT)21	140-190
32	Pchgms4R	5' GTTGAGGCAAAAGACTTCAAT 3'	38.1		
33	Pchgms5F	5' CGCCCATGACAAACTTA 3'	47.1	(CA)9(TA)8	240-300
34	Pchgms5R	5' GTCAAGAGGTACACCAG 3'	52.9		

199-200	(TA)11	38.1	5' AAGCAATAAAACCAGCAGCAA 3'	pchgms11F1	35
		40	5' TCAATCAATTGGCATGTTCCG 3'	pchgms11R1	36
442-490	(CT)9(TC)20(CA)9	44	5' CGACACTTAGCTAGAAAGTTGCCTTA 3'	pchgms12F	37
		50	5' TCAAGCTCAAGGTACCAGCA 3'	pchgms12R	38
500	(CT)11(CAA)11	40	5' GCAAAGAGTACAACAATATCTACCG 3'	pchgms14F	39
		55	5' GGATGGTGAAGACGATGAGG 3'	pchgms14R	40
219	(AT)8	52.6	5' ATGCACTCAAGTGGCAAGC 3'	pchgms17F	41
		42.9	5' GGTTTTGAGCAAAGATGCAC 3'	pchgms17R	42
252	(TA)15(TC)11	45	5' AATTGCATCACAGCAAGAGC 3'	pchgms20F1	43
		52.6	5' GGGGGTTTGGTTAAGATCG 3'	pchgms20R1	44
560	(TA)15(TC)11	55	5' CCCTTACCCCTTACCACTT 3'	pchgms20F2	45
		50	5' ACCACCATTTTGGCTCTCTG 3'	pchgms21F1	46
274	(TA)14	45	5' ACCACCACAACCAACCATT 3'	pchgms21R1	47
		45	5' CATGCAACCCAAAACCATCT 3'	pchgms21R2	48
234	(TA)14	50	5' CAACGAGCTCCCATGACTTT 3'	pchgms24F	49
		45	5' ACCACCACAACCAACCATT 3'	pchgms24R	50

الجدول (2): درجات حرارة الالتحام المناسبة لكل زوج من مرئسات تقنية SSR

اسم زوج المرئسات	حرارة الالتحام (°م) Annealing temperature
UDP98-411F/R	50
Pchgms4F/R	
Pchcms5F/R	
R/UDP96-019F	52
UDP97-402F / R	
pchgms11F1/R1	
pchgms17F/R	
pchgms20F1/R1	
UDP96-001F/R	53
pchgms21F1/R1	
pchgms21F1/R2	
pchgms24F/R	
UDP96-003F/ R	54
UDP96-005F/ R	
UDP96-010F/ R	
UDP98-405F/ R	
UDP98-406F/ R	
pchgms20R1/ F2	
pchgms14F/ R	
UDP98-021F/R	
UDP98-412F/R	
pchgms12F/ R	55
UDP96-018F/R	
UDP96-008F/ R	
UDP98-409F/ R	
Pchgms2F/ R	57

الجدول (3): مكونات تفاعل البلمرة المتسلسل PCR لتقنية SSR

المادة	التركيز النهائي
Taq buffer	1X

2mM	MgCl ₂
0.32mM	dNTPs
4 p.m	primer F
4 p.m	primer R
0.02 U	Taq DNA polymerase
50 ng	DNA
تكملة الحجم إلى 25 ميكروليتر	H ₂ O

الجدول (4): برنامج عمل تفاعل البلمرة المتسلسل PCR

عدد الدورات	الدورة	الزمن	الحرارة/ درجة مئوية
1	التمسخ (Denaturation)	5دقيقة	95
35	التمسخ (Denaturation)	1دقيقة	95
	الالتحام (Annealing)	1 دقيقة	حسب الحرارة المناسبة لكل زوج من المرئسات
	الاستطالة (Extension)	1دقيقة	72
1	الاستطالة (Extension)	10دقيقة	72
حفظ		لا نهاية	4

2-4-الرحلان الكهربائي لنواتج تفاعل البلمرة المتسلسل PCR Product electrophoresis:

تم فصل نواتج التفاعل بطريقتين مختلفتين:

2-4-1- الرحلان على هلامة الميتافور آغاروز Metaphor agarose gel electrophoresis :

تم تحليل نواتج تفاعل البلمرة المتسلسل بتحميل 10 ميكروليتر من منتجات تفاعل البلمرة بعد صبغها بصبغة التحميل على هلامة الميتافور 3% والتي تحتوي على الإيثيديوم برومايد، في جهاز الرحلان الكهربائي (BIORAD,USA) وبتطبيق جهد كهربائي مقداره 90 فولت لمدة ساعتين .

تم تظهير حزم الدنا (DNA) بتعريض الهلامة للأشعة فوق البنفسجية وتم التصوير باستخدام جهاز توثيق الهلامة (Gel Documentation) وقيس حجم الحزم الناتجة باستخدام معلم

DNA القياسي (100 زوج قاعدي) حيث أعطيت الحزمة الموجودة رقم 1 والحزمة الغائبة رقم 0 (Romero *et al.*, 2003).

4-2-2- الرحلان على هلامة من البولي أكريلاميد Polyacrylamid gel electrophoresis :

تم الرحلان على هلامة الأكريلاميد (PAGE) والتي تتصف بالدقة العالية في فصل قطع الدنا المضخمة. وتشمل هذه الطريقة عدد من الخطوات وهي:

- تحضير محلول الأكريلاميد 6% (19:1) gels: Preparation of 6% polyacrylamide
تم حل 6 غرام أكريلاميد (Acrylamide) + 0.315 غرام بيس أكريلاميد (Bis-Acrylamide) + 42.2 غرام يوريا (Urea) في 10 مل من محلول 10X TBE و 10 مل من الماء المقطر وبعد ذلك أكمل الحجم إلى 100 مل بالماء المقطر وذلك لتحضير 100 مل من محلول الأكريلاميد وبعد تمام الذوبان تمت فلترة المحلول وحفظه في زجاجة عاتمة على +4 درجة مئوية.

* معاملة الألواح الزجاجية بمادة Repel-silane :

تم غسل الألواح الزجاجية بالماء المقطر بشكل جيد بعد ذلك نظف الوجه العلوي من اللوح بالإيثانول 100% وذلك بمسح الألواح بالمناديل الورقية الناعمة بشكل دائري، ثم أضيف 300 ميكروليتر من مادة Repel-silane للوجه العلوي وتم المسح بالمناديل الورقية الناعمة بعد ذلك مسح الوجه بالإيثانول 100% وترك ليجف، عند الانتهاء من تحضير اللوحين الزجاجيين والتأكد من تمام جفافهما وضعت الفواصل في مكانها المناسب ثم تم جمع كلا اللوحين بالمشابك المناسبة.

* صب هلامة الأكريلاميد Polyacrylamid gel pouring:

تمت عملية الصب بين الألواح ذات الأبعاد 16x16 سم وذلك بعدما تم مزج 20 مل من محلول الأكريلاميد 6% مع 100 ميكروليتر من محلول (25%) Ammonium persulfate + 20 ميكرو ليتر من مادة TEMED حيث مزجت جيداً وتم الصب بسرعة بين اللوحين الزجاجيين مع الحيلولة دون ظهور أي فقاعات والتخلص منها عند ظهورها، بعد ذلك وضع المشط وتركت الهلامة لمدة ساعتين حتى تجمد.

* تحميل هلامة الأكريلاميد Polyacrylamid gel running:

أزيلت الفواصل والمشط من الهلامة ثم تم الغسيل بالماء المقطر من بقايا الأكريلاميد المتبلمر واليوريا ثم ركبت الألواح ضمن جهاز الرحلان الخاص وأضيف محلول 1X TBE في الحوض العلوي والسفلي للجهاز وتمت عملية غسل الآبار باستخدام الإبرة ومحلول 1X TBE .

تم تشغيل الجهاز مبدئياً لمدة 15 دقيقة تحت جهد كهربائي 200 فولت وذلك لتنظيف وتسخين الهلامية في هذه الأثناء تم فصل جديليتي منتجات تفاعل البلمرة المتسلسل لمدة 5 دقائق على درجة حرارة 95 م° في جهاز تفاعل البلمرة المتسلسل وذلك بعدما تمت إضافة الصبغة للعينات (5 ميكروليتر/25 ميكروليتر من نواتج التفاعل).

رفعت العينات من الجهاز مباشرة ووضعت في الثلج وتمت عملية غسيل الآبار للمرة الثانية، ثم تم تحميل 6 ميكروليتر من منتجات تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) بالإضافة لتحميل 3 ميكروليتر من المعلم القياسي (100 زوج قاعدي) إلى جانبها وتمت عملية الرحلان تحت 200 فولت في البداية لمدة 10 دقائق ثم رفع الجهد الكهربائي إلى 400 فولت لمدة ساعة ونصف وذلك حتى اكتمال خروج الصبغة الزرقاء الداكنة (Bromophenol Blue) من الطرف السفلي للهلامية في حال كان حجم الحزم المتوقع صغيراً وحتى خروج الصبغة الزرقاء الفاتحة (Xylene cyanol) في حال كانت الحزم ذات حجم كبير (Ansorge, 1985).

*-تظهير الهلامية Gel visualisation :

تم تظهير الحزم باستخدام طريقة الصبغ بالفضة (silver staining) وفق الخطوات الموضحة في الجدول (5):

الجدول(5):خطوات طريقة الصبغ بالفضة

الخطوة/المعاملة	المادة المستخدمة	الحجم المطلوب	المدة الزمنية
1- التثبيت Fixation	100% إيثانول	20 مل	3 دقائق مع التحريك
	الماء المقطر	180 مل	
	حمض الخل	1 مل (يضاف قبل الاستخدام مباشرة)	
2- الصبغ staining	الماء المقطر	200 مل	5 دقائق مع التحريك
	نترات الفضة	0.4 غرام	
3-4 الغسيل washing	الماء المقطر	200 مل	ثوان قليلة
5- التظهير visualization	ماءات الصوديوم 1.5%	150 مل	حتى بدء ظهور الحزم ووضوحها
	فورم ألدهيد	450 ميكرو ليتر	

وبعد ظهور الحزم بشكل واضح تم تصوير الهلامية وأعطيت الحزمة الموجودة رقم 1 والحزمة الغائبة رقم 0 (Bssam et al., 1991).

5- تقنية التعددية الشكلية المضخمة بين مواقع إدخال العناصر النقالة IRAP :

1-5- تضاعف الدنا DNA Amplification:

استخدم جهاز تفاعل البلمرة المتسلسل PCR طراز Mastercycler-Eppendorf بحجم تفاعل 25 ميكرو لتر وضحت مكوناته في الجدول (6) حيث أجري التفاعل ضمن ظروف التضخيم المحددة من قبل Branco ورفاقه عام 2007 مع بعض التعديلات البسيطة وبعدد من الدورات بلغ 35 دورة، حيث تكونت كل دورة من ثلاث مراحل أدت إلى توليد سلاسل جديدة من الدنا (DNA) كما هو مبين في الجدول (7). كما تم استخدام المرئسات الموصى بها من قبل كل من Nakatsuka ورفاقه عام 2002 و Kalendar ورفاقه عام 1999 و المصنعة من قبل شركة MWG GmbH (الجدول، 8). كما كانت درجات حرارة التحام جميع المرئسات المسماة TDK هي 45.5 °م بينما أزواج المرئسات الأخرى فهي وفقاً للجدول (9).

الجدول (6) :مكونات تفاعل البلمرة المتسلسل PCR لتقنية IRAP

المادة	التركيز النهائي
Taq buffer	1X
MgCl ₂	3.5mM
dNTPs	0.4mM
primer F	4 p.mol
primer R	4 p.mol
Taq DNA polymerase	0.04
DNA	50 ng
H ₂ O	تكملة الحجم إلى 25ميكرو لتر

الجدول (7): برنامج عمل تفاعل البلمرة المتسلسل PCR لتقنية IRAP

عدد الدورات	الدورة	الزمن	الحرارة/ درجة مئوية
1	التمسخ (Denaturation)	5 دقيقة	95
35	التمسخ (Denaturation)	1 دقيقة	95
	الالتحام (Annealing)	1.30 دقيقة	حسب درجة الحرارة المناسبة لكل زوج من المرئسات
	الاستطالة (Extension)	2.30 دقيقة	72
1	الاستطالة (Extension)	10 دقيقة	72

4	لا نهاية	حفظ
---	----------	-----

الجدول (8): التسلسل النكليوتيدي للمرئسات المستخدمة في تقنية IRAP

المرئسة	رقم	اسم المرئسة	التسلسل النيكليوتيدي
51	TDK1 F	5' TCAATCGGACTTGTTCAAAACCCCA 3'	
52	TDK1R	5' TACAGACCAAATGCTCACCATCACT 3'	
53	TDK2F	5' GAAGTTAGTGGGAGCAAAAGATGT 3'	
54	TDK2R	5' TACCAATGTCGGGAGGCTTGTGTCA 3'	
55	TDK10F	5' CTTTGTGATAGAACTTGGGTTTGCT 3'	
56	TDK10R	5' AGACTTGGTCCATCCTTCCTTTAGA 3'	
57	TDK11F	5' AGGTATGGTTTCAAGATGATGGATG 3'	
58	TDK11R	5' ACCCGCTGGTTGTGTGTCAGATAGATT 3'	
59	TDK12F	5' ATACAACAGACTCAATGCCGACCCT 3'	
60	TDK12R	5' ACCTGCCAACCAACTTCTTTTCCTC 3'	
61	TDK13F	5' TCCTGATGGGAACTTCGTTGCTCGT 3'	
62	TDK13R	5' CCTGACACCTCAAAACCTTCTGGCT 3'	
63	LTR 6149F	5' CTCGCTCGCCCACTACATCAACCGCGTTTATT 3'	
64	LTR 6150R	5' CTGGTTCGGCCCATGTCTATGTATCCACACATGTA 3'	
65	5-LTR1R	5' TTGCCTCTAGGGCATATTTCCAACA 3'	
66	5-LTR2R	5' ATCATTCCTCTAGGGCATAATTC 3'	
67	3-LTR1F	5' TGTTTCCCATGCGACGTTCCCCAACA 3	
68	Sakkula-F	5' GATAGGGTCGCATCTTGGGCGTGAC 3'	
69	Nikita-F	5' CGCATTTGTTCAAGCCTAAACC 3'	

الجدول (9): درجات حرارة الالتحام المناسبة لعمل كل زوج من مرئسات تقنية IRAP

	LTR6149	LTR6150	5'LTR1	5'LTR2	3'LTR	Sukkula	Nikita
LTR6149	40.5	40.5	41.5	45.5	45.5	45.5	45.5
LTR6150		40.5	45.5	40.0	45.5	48.4	45.5
5'LTR1			41.5	43.2		43.2	40.5
5'LTR2				45.5	48.4	43.2	45.5
3'LTR					48.4	47.0	47.0
Sukkula						O	45.5

Nikita							48.4
--------	--	--	--	--	--	--	------

O: أي لم يكن هناك اي تضخيم.

2-5- الرحلان الكهربائي لنواتج تفاعل البلمرة المتسلسل PCR products :electrophoresis

فصلت نواتج التفاعل بالرحلان الكهربائي بعدما تمت إضافة الصبغة (5 ميكروليتر/25 ميكروليتر من نواتج التفاعل) بتحميل 10 ميكروليتر من منتجات تفاعل البلمرة، على هلامة من الأغاروز (2.5%) احتوت على الإيثيديوم برومايد، بتطبيق جهد كهربائي 90 فولت لمدة ثلاث ساعات ونصف. وقيس حجم الحزم الناتجة باستخدام معْلَم VC DNA marker(vivantis). تم تظهير حزم الدنا (DNA) بتعريض الهلامة للأشعة فوق البنفسجية و تم التصوير باستخدام جهاز توثيق الهلامة (Guo *et al.*, 2005).

6- التحليل الإحصائي :staistical analyses

تم إجراء التحليل الإحصائي لتحديد درجة التشابه الوراثية بين الأصناف والسلالات المدروسة وتم تسجيل الحزم الناتجة عن كلتا التقنيتين (SSR, IRAP) على الشكل التالي: أعطيت الحزمة الموجودة رقم 1 والحزمة الغائبة رقم 0. ثم استخدمت هذه البيانات الناتجة عن كل تقنية على حده لحساب درجة التشابه الوراثية بين الأصناف والطرز المدروسة وذلك بالاعتماد على معامل Jaccard (Jaccard, 1908) وفقاً للمعادلة التالية:

$$GS(ij)=a/(a+b+c)$$

GS :تمثل درجة التشابه الوراثية بين الطرازين الوراثيين i و j .

a : تمثل عدد الحزم المشتركة بين i و j.

b : تمثل عدد الحزم الموجودة في i، والغائبة في j.

c : تمثل عدد الحزم الغائبة في i، والموجودة في j .

فيما تم استخدام التحليل العنقودي الذي يعتمد على نسبة التشابه الوراثي، والتي تستخدم المتوسط الحسابي للمجموعة الزوجية غير المزانة (UPGMA Unweighted Pair Group Method using arithmetic Averages) وذلك للحصول على مخطط (dendrogram) لتقسيم الأصناف و الطرز المدروسة إلى مجموعات حسب درجة التشابه فيما بينها. كما تم حساب قيم Bootstrap لتحديد موثوقية حدود مخطط التحليل العنقودي UPGMA برسم 1000 عينة

عشوائية للقطع المتعددة شكلياً في كل من التقنيتين باستخدام البرنامج الإحصائي PAST (Hammer *et al.*, 2001).

تم حساب معدل التباير المورثي المتوقع (H_e Expected heterozygosity) ونسبة التباير المورثي الملحوظ (H_o Observed heterozygosity) في تقنية تكراريات التسلسلات البسيطة SSR حيث تحسب قيمة معدل التباير المورثي المتوقع من المعادلة:

$$H_e = 1 - \sum P_i^2 \quad (\text{Powell } et al., 1996)$$

حيث P_i : تكرارية الأليل في الموقع i .

أما نسبة التباير المورثي الملحوظ فهي نسبة الأفراد غير المتجانسة بين الأفراد المدروسة وذلك وفقاً لبرنامج Power marker version 3.01 (Liu and Muse, 2005).

وتمت مقارنة كفاءة كلا التقنيتين في تقييم التنوع الوراثي بين جينوم أصناف وطرز المشمش المدروسة وكذلك معامل الارتباط (correlation coefficient) بين تقنيتي SSR و IRAP .

النتائج والمناقشة

Results and Discussion

1- التعددية الشكلية (Polymorphism) بين الأصناف والطرز المدروسة:

ينتج التعدد الشكلي في تقنية تكراريات التسلسلات البسيطة SSR عن الاختلاف في عدد الوحدات التكرارية في موقع التتابع التكراري البسيط عند استخدام أزواج المرئسات المصممة وفقاً للمنطقة المحيطة بالموقع وبالتالي يتحدد التعدد الشكلي باختلاف أطوال منتجات التضخيم لهذه المناطق باستعمال تقانة تفاعل البلمرة المتسلسل. بينما ينتج التعدد الشكلي في تقنية IRAP عند استخدام مرئسات خاصة بمواقع العناصر النقالة تعمل على تضخيم منطقة من الدنا تقع بين موقعي إدخال متجاورين للعناصر النقالة وذلك باستخدام مرئستين تتعرفان على منطقة التكرار الطرفي الطويل LTR المعرفة لكل عنصر نقال (Kalendar *et al.*, 1999). وبالتالي يتحدد التعدد الشكلي بوجود أو عدم وجود منتجات تضخيم (PCR Product) للمناطق الواقعة بين أي اثنين من العناصر النقالة (Grzebelus, 2006).

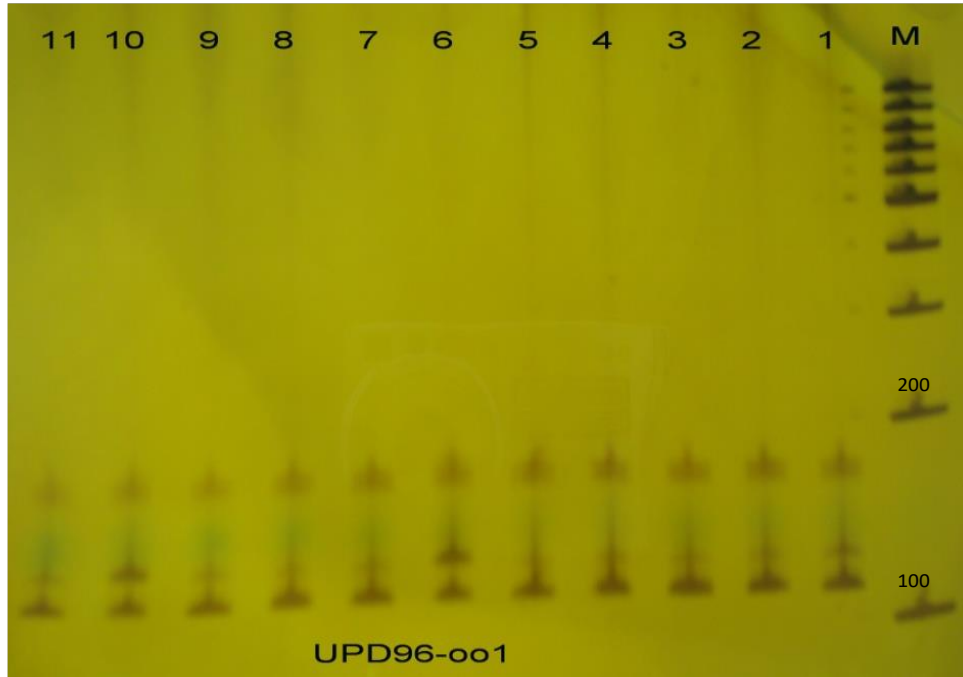
1-1- التعددية الشكلية الناتجة عن تطبيق تقنية SSR:

أعطت جميع أزواج المرئسات المستخدمة (26 زوج) منتجات تضخيم في تفاعل البلمرة المتسلسل وكان اثنان وعشرون زوج منها ذو فعالية كبيرة في كشف التعددية الشكلية بين الأصناف و الطرز المدروسة (84.6%)، إذ أعطت الأزواج الست والعشرون من المرئسات ما مجموعه 78 أليل (قرين) منها 72 أليل متعدد شكلياً (92.3%) وبتعددية شكلية بلغت 92.3% إذ أعطت أزواج المرئسات (UDP98-405, pchgms4, pchgms12) تعدداً شكلياً متوسطاً (50.0, 66.6, 66.6 على التوالي) بينما أعطت بقية أزواج المرئسات تعدداً شكلياً بنسبة 100 %، باستثناء ثلاثة أزواج من المرئسات المستخدمة لم تعط أية أليلات متعددة شكلياً وهي pchgms11, pchgms14, pchgms17.

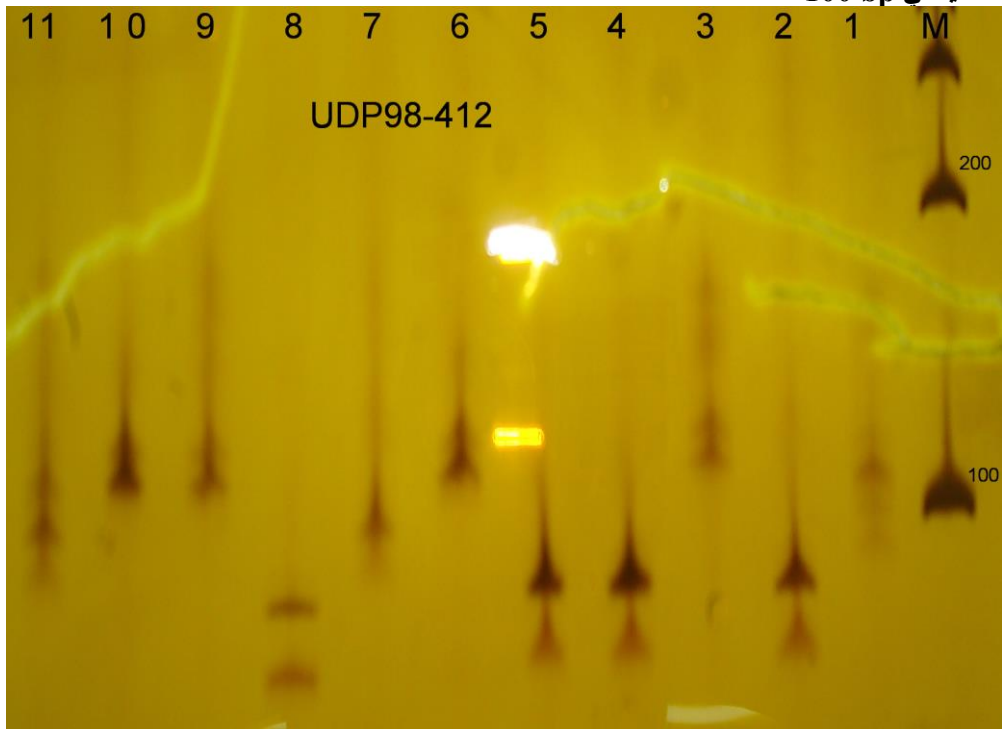
وتراوح عدد الأليلات في المواقع المختلفة بين 1-6 أليل بمعدل 2.8 أليل متعدد في كل موقع حيث أعطى زوج المرئسة UDP96-008 أعلى عدد من الأليلات (6 أليل) بينما أعطت أزواج المرئسات pchgms14,pchgms11,pchgms17 أقل عدد من الأليلات (1 أليل) (الجدول، 10 والأشكال 1,2,3,4,5)، ويختلف عدد الأليلات في كل موقع حسب خاصية الوحدات التكرارية لمواقع التتابعات فيكون منخفضاً عندما تكون الوحدات التكرارية في الموقع بسيطة وغالباً قصيرة ويزداد عدد الأليلات بزيادة طول التكرار أو زيادة تعقيده.

الجدول (10): عدد الأليلات الناتجة عن أزواج المرئسات المستخدمة في تقنية تكراريات التسلسلات البسيطة SSR وعدد الأليلات المتعددة شكلياً Polymorphic alleles وعدد الأليلات غير المتعددة شكلياً non polymorphic alleles و النسبة المئوية للتعددية الشكلية % Polymorphism وحجم الأليلات الناتجة.

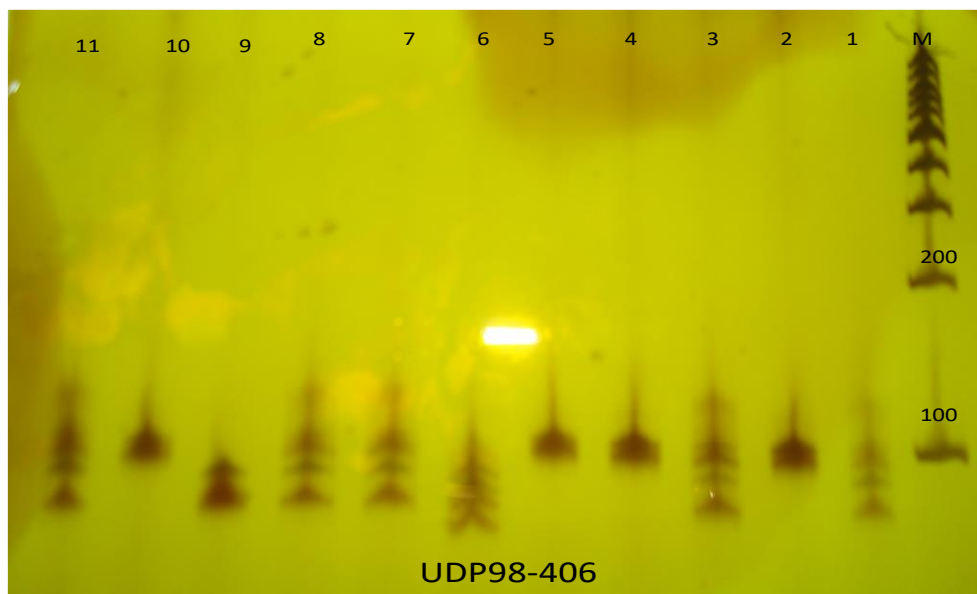
المرئسة	عدد الأليلات الناتجة	عدد الأليلات المتعددة شكلياً	عدد الأليلات غير المتعددة شكلياً	النسبة المئوية للتعددية الشكلية	حجم الأليلات الناتجة
UDP96-001	2	2	0	100	110-113
UDP96-003	4	4	0	100	90-130
UDP96-005	4	4	0	100	80-140
UDP96-008	6	6	0	100	110-140
UDP96-010	3	3	0	100	80-120
UDP96-018	2	2	0	100	210-260
UDP96-019	5	5	0	100	160-220
UDP97-402	4	4	0	100	130-170
UDP98-405	3	2	1	66.6	110-140
UDP98-406	3	3	0	100	90-120
UDP98-409	5	5	0	100	150-170
UDP98-021	4	4	0	100	110-140
UDP98-411	3	3	0	100	160-190
UDP98-412	4	4	0	100	90-120
Pchgms2	4	4	0	100	140-180
Pchgms4	3	2	1	66.6	150-190
Pchgms5	4	4	0	100	300
Pchgms11	1	0	1	0	200
Pchgms12	2	1	1	50	500
Pchgms14	1	0	1	0	500
Pchgms17	1	0	1	0	219
pchgms20F1/R1	2	2	0	100	250-255
pchgms20R1/pchgms20F2	2	2	0	100	560
pchgms21F1/pchgms21R1	2	2	0	100	288
pchgms21F1/pchgms21R2	2	2	0	100	250
Pchgms24	2	2	0	100	500
المجموع	78	72	6		
المتوسط	3	2.8	0.23	92.3	



الشكل (1): نواتج تضخيم تقنية SSR باستخدام زوج المرئسات DP96-001 والرحلان على هلامية الأكريلاميد حيث: (1) شكربارا، (2) تدمري، (3) بلدي ماوردي، (4) بلدي حبي، (5) وزري (6) عجمي، (7) K1، (8) K2، (9) K3، (10) K4، (11) K5، (M) المعلم القياسي 100 bp



الشكل (2): نواتج تضخيم تقنية SSR باستخدام زوج المرئسات UDP98-412 والرحلان على هلامية الأكريلاميد حيث: (1) شكربارا، (2) تدمري، (3) بلدي ماوردي، (4) بلدي حبي، (5) وزري، (6) عجمي، (7) K1، (8) K2، (9) K3، (10) K4، (11) K5، (M) المعلم القياسي 100 bp.



الشكل (3): نواتج تضخيم تقنية SSR باستخدام زوج المرئسات UDP98-406 والرحلان على هلامية الأكريلاميد حيث: (1) شكربارا، (2) تدمري، (3) بلدي ماوردي، (4) بلدي حبي، (5) وزري، (6) عجمي، (7) K1، (8) K2، (9) K3، (10) K4، (11) K5، (M) المعلم القياسي 100 bp.



الشكل (4): نواتج تضخيم تقنية SSR باستخدام زوج المرسّات 20F1-R1 Pchgms والرحلان على هلامة الأكريلاميد حيث: (1)شكربارا، (2)تدمري، (3)بلدي ماوردي، (4) بلدي حبي، (5) وزري، (6)عجمي، (7)K1، (8)K2، (9)K3، (10)K4، (11)K5، (M) المعلم القياسي 100 bp.



الشكل (5): نواتج تضخيم تقنية SSR باستخدام زوج المرسّات 21F1-R1 Pchgms والرحلان على هلامة الأكريلاميد حيث: (1)شكربارا، (2)تدمري، (3)بلدي ماوردي، (4) بلدي حبي، (5) وزري، (6)عجمي، (7)K1، (8)K2، (9)K3، (10)K4، (11)K5، (M) المعلم القياسي 100 bp.

كما اختلف عدد الأليلات في أصناف و طرز المشمش المدروسة وذلك باستخدام أزواج المرسّات الست والعشرين المستخدمة، حيث تراوح عددها بين 32 و 38 أليل أقلها في الطراز K1 وأعلىها في الصنفين شكربارا والبلدي الماوردي وفي الطراز K4 بينما تساوت أعداد الأليلات في الصنف العجمي و الطراز K2 (36 أليل) وفي الصنفين البلدي الحبي و الوزري و الطراز K3 (34 أليل)(الجدول، 11).

الجدول (11): عدد الأليلات الناتجة عن أزواج المرئسات المستخدمة في تقنية تكراريات التسلسلات البسيطة SSR في الأصناف و الطرز المدروسة

المرئسة	الصنف/الطرز	الشكربارا	التدمري	البلدي الماوردي	البلدي الحي	الوزري	العجمي	K1	K2	K3	K4	K5
UDP96-001	2	1	1	1	1	1	2	1	1	1	2	1
UDP96-003	2	1	1	1	2	2	1	2	2	1	2	2
UDP96-005	2	2	2	2	1	1	1	1	1	1	2	2
UDP96-008	1	1	1	1	1	1	2	2	2	1	2	2
UDP96-010	2	2	2	1	2	2	1	1	2	2	1	1
UDP96-018	1	2	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1
UDP96-019	1	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2
UDP97-402	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
UDP98-405	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
UDP98-406	2	2	2	2	1	1	2	1	1	1	1	2
UDP98-409	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
UDP98-021	1	1	1	2	1	1	2	1	1	2	2	1
UDP98-411	2	1	2	2	2	2	2	1	1	2	2	2
UDP98-412	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Pchgms2	2	1	1	2	1	1	2	1	2	1	2	2
Pchgms4	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Pchcms5	2	1	2	2	1	1	2	1	1	1	1	1
pchgms11	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
pchgms12	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1
pchgms14	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
pchgms17	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
pchgms20F1/R1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
pchgms20R1/pchgms20F2	2	2	2	2	2	2	0	2	2	2	2	2
pchgms21F1/pchgms21R1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
pchgms21F1/pchgms21R2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
pchgms24	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
المجموع	38	35	38	34	34	34	36	32	36	34	38	37

أعطت جميع المرئسات المستخدمة في هذه الدراسة نواتج تضخيم واضحة و لقد كانت هذه النسبة (100 %) أعلى من النسبة (90 %) التي حصل عليها Ruthner ورفاقه عام 2006 ومن النسبة 60 % عند Zhebentyayeva ورفاقه عام 2003 وكذلك من النسبة 68.75 % عند Romero ورفاقه عام 2003 ويعزى السبب في ارتفاع هذه النسبة في هذا البحث هو استخدام مرئسات منتقاة أعطت تضخيماً واضحاً في المشمش في دراسات سابقة.

كما بلغت نسبة المرئسات التي أعطت تعددية شكلية في هذه الدراسة 84.6% وهي كانت أعلى من النسبة عند Zhebentyayeva ورفاقه عام 2003 (66.6%) ومقاربة للنسبة 85.5% عند Ruthner ورفاقه عام 2006.

تطابقت نتيجة التعددية الشكلية في هذا البحث (92.3%) مع نتيجة التعددية الشكلية عند Tian-Ming ورفاقه عام 2007 والتي تراوحت ما بين 80.54 إلى 85.41 % في المجتمعات البرية الثلاث للمشمش التي تمت دراستها.

أما بالنسبة للتعددية الشكلية للمرئسات فلقد تطابقت نسبة التعددية الشكلية لزوج المرئسة Pchgms4 في هذه الدراسة مع ماوجده Tian-Ming ورفاقه عام 2007 حيث بلغت 66.6% بينما كانت نسبة التعددية الشكلية (100%) لزوجي المرئستين Pchgms2 و Pchgms5 أعلى مما قد تم الحصول عليه لديهم حيث بلغت 88.89% و 77.31% لكل منهما على التوالي .

بلغ متوسط عدد الأليلات المتعددة شكلياً في الموقع 2.8 أليل /موقع حيث تراوح عددها بين 1 و 6 أليل متعدد في الموقع وقد كانت النتيجة مطابقة لدراسات Dirlewanger ورفاقه عام 2002 على الكرز (2.8 أليل/موقع) ومقاربة لما وجده Aranzana ورفاقه عام 2002 في الدراق (3.2 أليل /موقع) ومع Romero ورفاقه عام 2003 في المشمش (3.10) ومع Ruthner ورفاقه عام 2006 (3.5) ولكن أقل مما لاحظته Hormaza 2002 في المشمش (4.1) و Testolin ورفاقه عام 2000 (4.2) و Dirlewanger ورفاقه عام 2002 في الدراق (4.5) بعدد الأليلات تراوح بين 1 إلى 9 أليل متعدد/موقع.

كما أن حجوم جميع الأليلات الناتجة كانت مشابهة لتلك المسجلة من قبل Cipriani ورفاقه عام 1999 و Testolin ورفاقه عام 2000 في المشمش وكذلك Hormaza و Aranzana ورفاقه عام 2002 في المشمش والدراق على التوالي وهذا مما يدل على أن مواقع تكراريات التسلسلات البسيطة في الدراق هي ذاتها في المشمش.

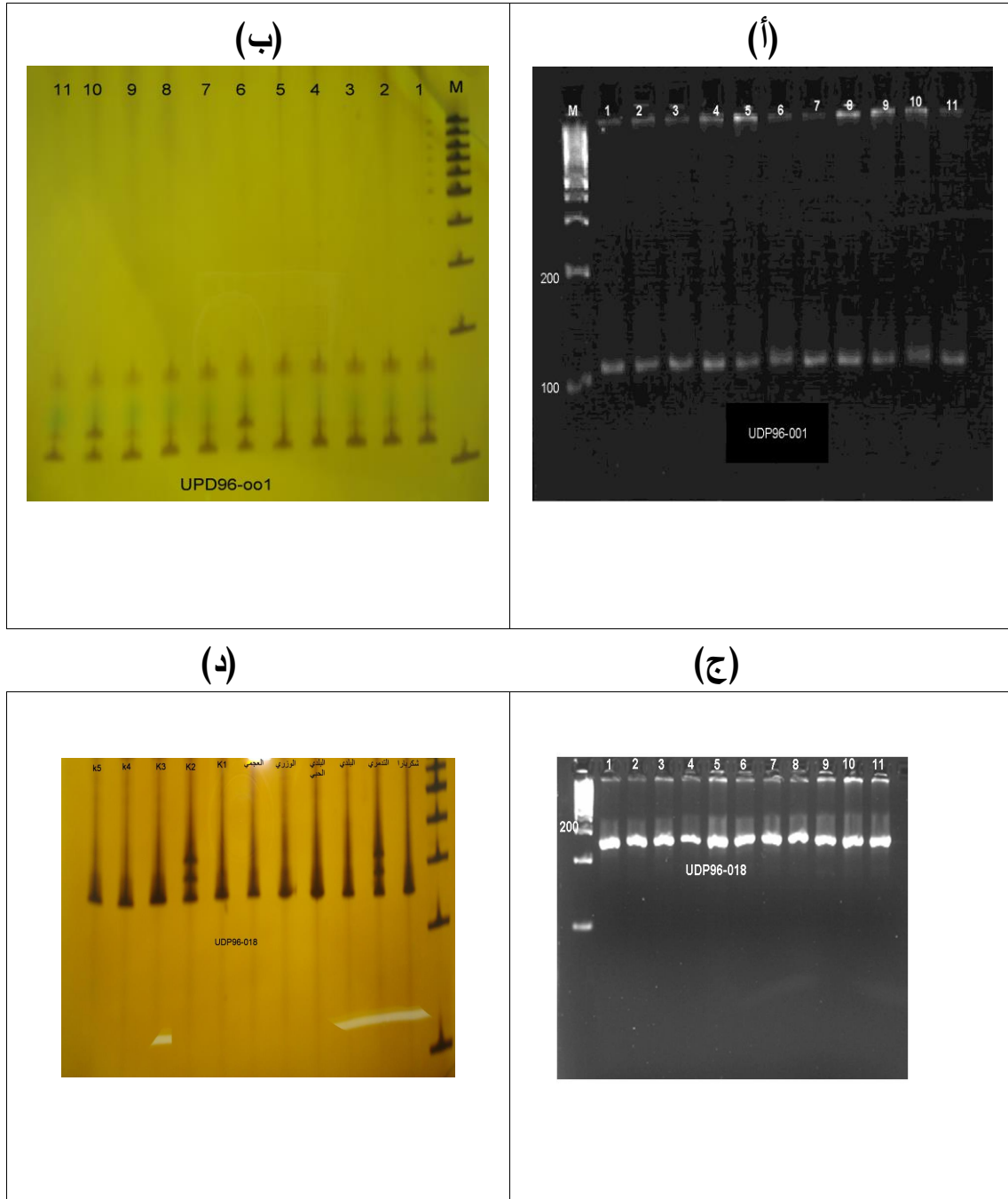
لقد اتفقت نتائج هذه الدراسة مع Ruthner ورفاقه عام 2006 في أن زوج المرئسة pchgms14 لم يعط أية حزم متعددة شكلياً وخالفت Cipriani ورفاقه عام 1999 عندما تمت دراسة قابلية انتقال معلّات تكراريات التسلسلات البسيطة SSR في أنواع الجنس *Prunus* وهي (الخوخ الأوروبي، الخوخ الياباني، المشمش ، اللوز، الدراق، النكتارين، الكرز الحلو والكرز الحامض فأعطى زوج المرئسة UDP96-010 تضخيماً فقط في أصناف الدراق الحقيقي بينما في هذه الدراسة أعطى تضخيم واضح في أصناف وطرز المشمش المدروسة. كما ان زوج المرئسة UDP98-411 الذي تم حذفه من بيانات Romero ورفاقه (2003) السابقة لعدم تمكنه من الكشف عن فروق أليلية (null allele) في 11 صنف من المشمش قد أعطى أليلات في كل الأصناف في الدراسة الحالية كما أنه في الدراسة السابقة لـ Romero ورفاقه غاب الأليل في

أحد الأصناف المدروسة عند استخدام زوج المرئسة UDP96-018 بينما غاب الأليل في هذه الدراسة من الصنف العجمي باستخدام زوج المرئسات pchgms20R1/pchgms20F2 وهذا قد يدل على حدوث طفرة في مكان ارتباط المرئسة بالمنطقة المحيطة بموقع تكراريات التسلسلات البسيطة.

أما بالنسبة لقابلية انتقال معلّات تكراريات التسلسلات البسيطة (SSR) في أنواع الجنس *Prunus* والتي يقصد بها إمكانية استخدام مرئسات تكراريات التسلسلات البسيطة المطورة بناءً على تتابع القواعد في الدنا في أحد الأنواع التابعة لجنس معين مع أنواع أخرى تتبع لنفس الجنس فلقد لوحظت إمكانية الانتقال العالية لمعلّات SSR بين أنواع الجنس *Prunus* وذلك عندما تم استخدام مرئسات جميعها مطورة من الدراق في دراسة التنوع الوراثي في المشمش إذ أن جميع أزواج المرئسات المستخدمة كانت قادرة على تضخيم مواقع لتكراريات التسلسلات البسيطة SSR في المشمش ولقد كانت 84.6% منها متعددة شكلياً وهذا توافق مع Ruthner عام 2006 حيث أعطت 90 % من أزواج المرئسات التي تم استخدامها في دراسته السابقة تضخيماً في المشمش وأكثر من نصف أزواج المرئسات أعطت تعددية شكلية.

ولاختبار التكرارية تمت إعادة التجربة فأظهرت هذه التقنية تكرارية عالية وبنسبة 100% ولعدة مرات مما يزيد من موثوقية ومصداقية هذه التقنية .

وبالمقارنة بين طريقتي التظهير لنتائج تقنية SSR بالرحلان الكهربائي على هلامة الأكريلاميد والصبغ بنترات الفضة والرحلان الكهربائي على هلامة الميتافور أغاروز والصبغ بالإيثيديوم برومايد، اللتين تم استخدامهما نجد أن التظهير باستخدام الميتافور أغاروز كانت الطريقة الأسهل والأسرع حيث أن ظهور الحزم المقطعة جعل من الصعب تحديد عدد الأليلات بطريقة الأكريلاميد مقارنة بالميتافور أغاروز حيث كانت أفضل النتائج عند حجوم أليلات تراوحت بين 100-200 زوج قاعدي على الرغم من أن التظهير على هلامة الأكريلاميد يعد أكثر دقة في الكشف عن التباينات بين الأليلات بفروق 2 زوج قاعدي إذ أن بعض الأليلات التي تعد متماثلة شكلياً على هلامة الآغاروز تظهر متعددة شكلياً على هلامة الأكريلاميد (الشكل، 6) وهذا توافق مع ما تمت ملاحظته في دراسة Ruthner ورفاقه عام 2006.



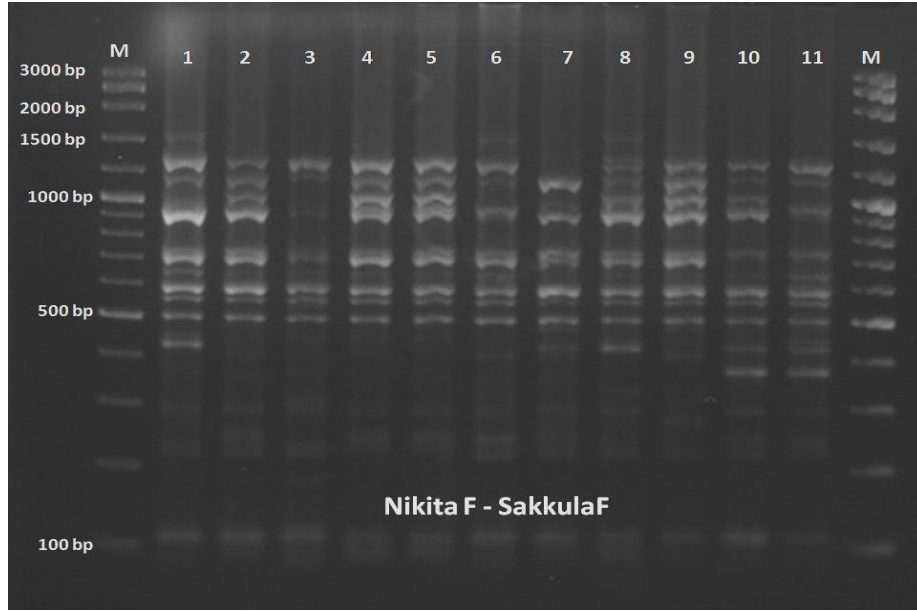
الشكل (6): الفرق بين نماذج الحزم الناتجة من تقنية SSR بطريقتي التظهير المختلفتين: حيث (أ): نواتج تفاعل المرئسة UDP96-001 على هلامة الميتافور، (ب): نواتج تفاعل المرئسة UDP96-001 على هلامة الأكريلاميد، (ج): نواتج تفاعل المرئسة UDP96-018 على هلامة ميتافور (د) : نواتج تفاعل المرئسة UDP96-018 على هلامة الأكريلاميد حيث: (1) شكربارا، (2) تدمري، (3) بلدي ماوردي، (4) بلدي حبي، (5) وزري، (6) عجمي، (7) K1، (8) K2، (9) K3، (10) K4، (11) K5، (M) المعظم القياسي 100 bp.

2-1- التعددية الشكلية (polymorphism) الناتجة عن استخدام تقنية IRAP:

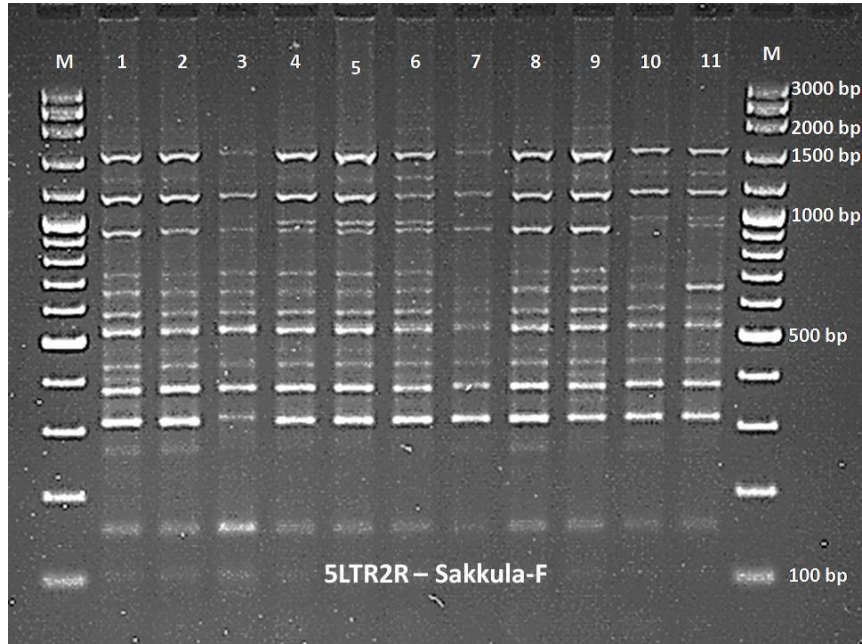
أعطت كافة أزواج المرئسات (33 زوج) تضخيماً واضحاً باستثناء المرئسة Sakkula وأثبتت 32 منها فعالية في كشف التباينات الوراثية بين الطرز والأصناف المدروسة فقد أعطت أزواج المرئسات المستخدمة ما مجموعه 344 حزمة في مجموع الأصناف والطرز المدروسة كافة حيث بلغت بالمتوسط 10.75 حزمة لزوج المرئسة الواحد و كان من بينها 88 حزمة متشابهة (monomorphic) و 256 حزمة متعددة شكلياً (polymorphic) حيث بلغت النسبة المئوية للتعددية الشكلية 74.4 % وهذا مما يدل على الانتشار الواسع للعناصر النقالة في جينوم أصناف وطرز المشمش المدروسة (الجدول، 12 والأشكال 7,8,9,10)، حيث أعطى زوج المرئسات LTR6149F/NikitaF أعلى عدد من الحزم (24 حزمة) في حين أعطت ستة أزواج من المرئسات LTR 6149F/3-LTR1F ، 5-LTR1R/5-LTR2R ، 5-LTR1R/، 5-LTR1R/5-LTR2R ، 5-LTR1R/3-LTR1F و Sakkula-F أقل عدد من الحزم (5 حزم) وربما يعزى ذلك للانتشار المحدود للعناصر النقالة التي استخدمت لتصميم أزواج المرئسات الستة السابقة.

الجدول(12) : عدد الحزم الكلي، وعدد الحزم المتعددة شكلياً، وغير المتعددة شكلياً و النسبة المئوية للتعددية الشكلية الناتجة عن المرئسات المستخدمة في تقنية IRAP في الأصناف و الطرز المدروسة :

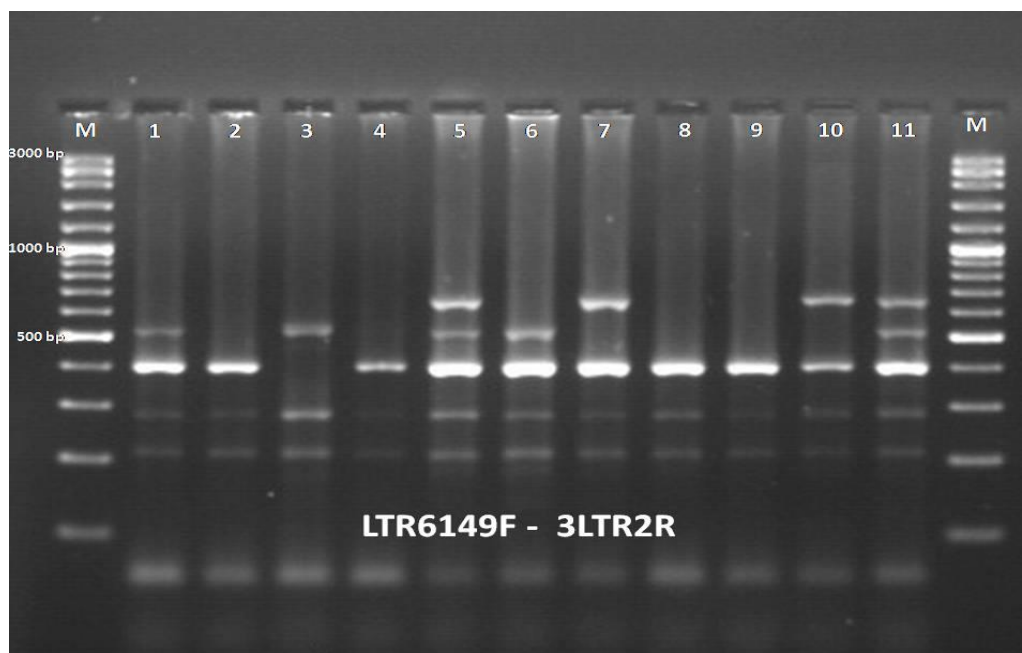
النسبة المئوية للتعددية الشكلية	عدد الحزم غير المتعددة شكلياً	عدد الحزم المتعددة شكلياً	عدد الحزم الناتجة	المرئسة
62.5	3	5	8	TDK1
60	4	6	10	TDK2
81.8	2	9	11	TDK10
80	2	8	10	TDK11
92.8	1	13	14	TDK12
70	3	7	10	TDK13
72.7	3	8	11	LTR 6149F
57.1	3	4	7	LTR 6149F/ LTR 6150R
66.7	3	6	9	LTR 6149F/5-LTR1R
78.6	3	11	14	LTR 6149F/5-LTR2R
40	3	2	5	LTR 6149F/3-LTR1F
100	0	14	14	LTR 6149F/ Sakkula-F
66.7	8	16	24	LTR 6149F/ Nikita-F
86.7	2	13	15	LTR 6150R
66.7	5	10	15	LTR 6150R/5-LTR1R
91.7	1	11	12	LTR 6150R/5-LTR2R
70	3	7	10	LTR 6150R/3-LTR1F
58.3	5	7	12	LTR 6150R/ Sakkula-F
81.8	2	9	11	LTR 6150R/ Nikita-F
66.7	3	6	9	5-LTR1R
40	3	2	5	5-LTR1R/5-LTR2R
66.7	3	6	9	5-LTR1R/ Sakkula-F
60	2	3	5	5-LTR1R/ Nikita-F
81.8	2	9	11	5-LTR2R
100	0	5	5	5-LTR2R/3-LTR1F
85.7	2	12	14	5-LTR2R/ Sakkula-F
84.6	2	11	13	5-LTR2R/ Nikita-F
83.3	1	5	6	3-LTR1F
60	2	3	5	3-LTR1F/ Sakkula-F
50	4	4	8	3-LTR1F/ Nikita-F
81.3	3	13	16	Sakkula-F/ Nikita-F
68.8	5	11	16	Nikita-F
	88	256	344	المجموع
74.4	2.75	8	10.75	المتوسط



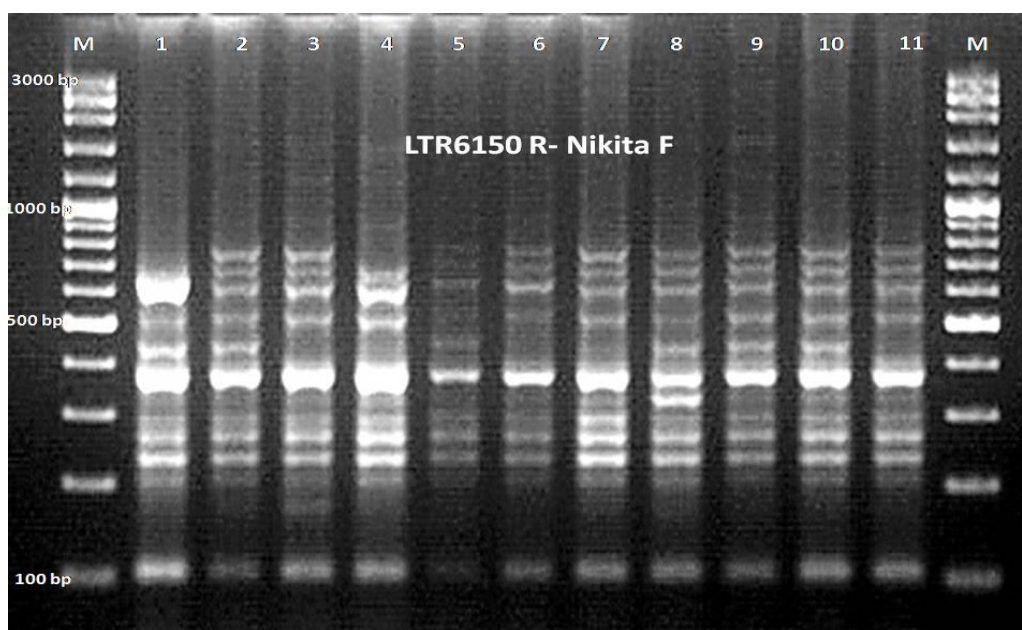
الشكل (7): نواتج تضخيم تقنية IRAP باستخدام زوج المرسات NikitaF- SakkulaF والرحلان على هلامية الأغاروز حيث: (1) شكريارا، (2) تدمري، (3) بلدي ماوردي، (4) بلدي حبي، (5) وزري، (6) عجمي، (7) K1، (8) K2، (9) K3، (10) K4، (11) K5، VC DNA marker(vivantis)(M)



الشكل (8): نواتج تضخيم تقنية IRAP باستخدام زوج المرسات 5LTR2R- SakkulaF والرحلان على هلامية الأغاروز حيث: (1) شكريارا، (2) تدمري، (3) بلدي ماوردي، (4) بلدي حبي، (5) وزري، (6) عجمي، (7) K1، (8) K2، (9) K3، (10) K4، (11) K5، (M) VC DNA marker(vivantis)



الشكل (9): نواتج تضخيم تقنية IRAP باستخدام زوج المرسّات LTR6149F-3LTR2R والرحلان على هلامة الأغاروز حيث: (1) شكربارا، (2) تدمري، (3) بلدي ماوردي، (4) بلدي حبي، (5) وزري، (6) عجمي، (7) K1، (8) K2، (9) K3، (10) K4، (11) K5، (M) VC DNA marker(vivantis)



الشكل (10): نواتج تضخيم تقنية IRAP باستخدام زوج المرسّات LTR6150R-NikitaF والرحلان على هلامة الأغاروز حيث: (1) شكربارا، (2) تدمري، (3) بلدي ماوردي، (4) بلدي حبي، (5) وزري، (6) عجمي، (7) K1، (8) K2، (9) K3، (10) K4، (11) K5، (M) VC DNA marker(vivantis).

كما تباين عدد الحزم في الأصناف والطرز المدروسة حيث أعطى الطراز الكلابي K2 أعلى عدد من الحزم (237 حزمة) في حين أعطى الطراز الكلابي K1 أقل عدد من الحزم (204 حزمة) أما الطرز K3 و K4 و K5 فقد أعطت أعداد متساوية من الحزم (231 حزمة). وقد أعطى الصنف العجمي 19 حزمة عند تطبيق زوج المرئسات LTR 6149F/Nikita-F وهو أعلى عدد من الحزم، في حين كان أقل عدد من الحزم هو حزمة واحدة في الصنف شكربارا عند تطبيق زوج المرئسات 5-LTR2R/3-LTR1F (الجدول، 13).

كما اختلفت أزواج المرئسات المستخدمة في كشف التعددية الشكلية بين الأصناف والطرز المدروسة حيث أعطى زوجا المرئسات LTR 6149F/ Sakkula-F و 5-LTR2R/3-LTR1F أعلى مستوى من التعدد الشكلي (100 %) حيث كانت جميع الحزم الناتجة وعددها 14، 5، على التوالي متعددة شكلياً ، كما أعطى زوجا المرئسات LTR 6149F/3-LTR1F و 5-LTR1R/5-LTR2R أخفض مستوى من التعدد الشكلي (40%).

الجدول(13): عدد الحزم الناتجة عن المرئسات المستخدمة في تقنية IRAP في الأصناف والطرز المدروسة

الصنف / المرئسة	شكربار	التدمري	البلدي ماوردي	البلدي الحبي	وزري	عجمي	K1	K2	K3	K4	K5	المجموع
TDK1	6	8	5	7	7	7	7	7	4	7	7	72
TDK2	8	9	6	8	7	9	8	9	9	7	8	88
TDK10	7	8	8	7	7	6	5	3	6	7	5	69
TDK11	5	4	5	7	7	5	4	5	6	4	7	59
TDK12	4	5	8	7	4	6	4	7	4	8	7	64
TDK13	8	6	5	7	6	7	8	6	8	8	8	77
LTR 6149F / LTR 6149F	7	7	7	7	7	8	6	7	6	7	9	78
LTR 6149F/ LTR 6150R	4	5	6	6	5	6	7	5	5	7	5	61
LTR 6149F/5-LTR1R	6	7	5	7	6	7	6	6	7	7	5	69
LTR 6149F5-LTR2R /	8	8	9	8	7	10	8	10	13	12	10	103
LTR 6149F/3-LTR1F	4	3	4	3	5	4	4	3	3	4	5	42
LTR 6149F/ Sakkula-F	7	3	11	13	2	11	11	13	11	9	9	100
LTR 6149F/ Nikita-F	17	15	12	12	15	19	16	17	16	18	16	173
LTR 6150R/ LTR 6150R	12	8	10	8	9	7	5	7	11	7	4	88
LTR 6150R/5-LTR1R	6	8	10	8	8	9	7	7	6	8	9	86
LTR 6150R/5-LTR2R	8	8	8	9	9	3	9	9	8	9	8	88
LTR 6150R/3-LTR1F	8	9	7	7	6	5	7	6	5	5	6	71
LTR 6150R/ Sakkula-F	9	11	10	9	6	8	10	12	10	11	10	106
LTR 6150R/ Nikita-F	9	8	10	7	9	9	5	9	8	10	10	94
5-LTR1R/5-LTR1R	6	5	7	4	5	5	6	6	5	6	7	62
5-LTR1R/5-LTR2R	4	4	4	4	4	5	4	4	4	4	4	45
5-LTR1R/ Sakkula-F	8	6	6	9	7	7	8	9	8	6	5	79
5-LTR1R/ Nikita-F	5	5	4	5	5	2	5	5	5	5	5	51
5-LTR2R/5-LTR2R	8	7	9	6	6	5	4	7	7	7	6	72
5-LTR2R/3-LTR1F	1	2	3	3	3	3	1	3	3	2	3	27
5-LTR2R/ Sakkula-F	12	11	7	10	11	13	5	11	11	10	12	113
5-LTR2R/ Nikita-F	7	10	9	9	10	7	8	9	10	6	8	93
3-LTR1F/3-LTR1F	5	4	4	4	3	4	2	5	3	3	4	41
3-LTR1F/ Sakkula-F	4	3	5	4	4	4	2	4	4	4	4	42
3-LTR1F/ Nikita-F	6	7	5	7	7	7	6	6	6	6	7	70
Sakkula-F/ Nikita-F	11	9	7	10	9	9	9	11	10	10	10	105
Nikita-F/ Nikita-F	10	6	9	10	8	9	7	9	9	7	8	92
المجموع	230	219	225	232	214	226	204	237	231	231	231	2480

بلغ متوسط النسبة المئوية للتعددية الشكلية في هذه الدراسة 74.4 %، وهي اخفض من النسبة الناتجة عند Branco ورفاقه عام 2007 (96 %) على الأرز ومن النسبة (86.3%) عند Guo وزملاؤه في عام 2005 على الكاكي. وتقارب متوسط عدد الحزم لكل مرئسة في هذه الدراسة (10.75) حزمة مع المتوسط الذي توصل له Branco ورفاقه عام 2007 على الأرز (9.16) حزمة.

وكان متوسط عدد الحزم المتعددة شكلياً للزوج الواحد من المرئسات في هذه الدراسة 8 وهو أخفض مما وجده Tao ورفاقه في عام 2007 عند دراسة 56 نوع من الفطرمشروم (11.11) وأعلى مما حصل عليه Guo وزملاؤه في عام 2005 (6 حزم متعددة شكلياً).

أعطت دراسات Teo ورفاقه عام 2005 على 16 صنف من الموز وباستخدام 16 زوج من المرئسات 118 حزمة متعددة شكلياً بينما بلغت في هذه الدراسة 256 حزمة متعددة شكلياً، ربما يعود ذلك إلى استخدام عدد أكبر من أزواج المرئسات في هذه الدراسة (33 زوج). كما يعزى العدد العالي من القطع المضخمة إلى ارتفاع عدد نسخ العناصر النقلة في الجينوم وإلى دورها المحتمل في بنية جينوم المشمش وعدد نسخها العالي في الجنس *Prunus*.

أعطت معظم المرئسات المستخدمة تضخيماً واضحاً باستثناء المرئسة Sakkula-F أي بنسبة 97% وبمجموع 225.5 حزمة لكل عينة مدروسة مع مجموع أزواج المرئسات (32 زوج) بينما أعطت 53.6% من المرئسات التي استخدمها Alavi-kia ورفاقه عام 2008 عند دراسته لجنس الزعفران تضخيماً واضحاً وبمعدل 65.9 حزمة لكل عينة وهذا مما يدل على وجود تشابه بين جينومي الشعير والمشمش في مناطق التكرارات الطرفية الطويلة LTR أكبر مما هو عليه بين الشعير والزعفران وكذلك قدرة معلمات العناصر النقلة (Retrotransposon) على الانتقال بين الأجناس المختلفة.

تراوح عدد القطع المضخمة الناتجة من أزواج المرئسات المستخدمة بين 5-24 قطعة بحجم تراوح بين 80-3000 زوج قاعدي بينما تراوح عدد القطع المضخمة في دراسة Alavi-kia ورفاقه في عام 2008 على الزعفران بين 6-22 وبشكل مطابق لحجوم القطع الناتجة في هذه الدراسة وذلك عند استخدام أزواج المرئسات ذاتها التي تم استخدامها في هذه الدراسة. ولاختبار التكرارية تمت إعادة التجربة فأظهرت هذه التقنية تكرارية عالية وبنسبة 100% ولعدة مرات مما يزيد من موثوقية ومصداقية هذه التقنية .

2-تحديد درجة التشابه الوراثية (Genetic similarity) بين الأصناف والطرز المدروسة :

1-2- تحديد درجة التشابه الوراثية (Genetic similarity) بين الأصناف والطرز المدروسة باستخدام تقنية SSR:

تم تحديد درجة التشابه الوراثية بين الأصناف و الطرز المدروسة بالاعتماد على معامل Jaccard (Jaccard Coefficient) (الجدول،14) حيث كانت أعلى درجة تشابه وراثية بين الصنفين الوزري والبلدي الحبي (0.69) و أقل درجة تشابه وراثية بين الصنفين البلدي الماوردي و العجمي (0.27)، بمتوسط درجة تشابه 0.48 بين كافة الأصناف والطرز المدروسة، ويلاحظ بشكل واضح انخفاض درجة التشابه الوراثية بين الصنف العجمي وسائر الأصناف والطرز المدروسة فقد كانت أقل درجة تشابه وراثية مع الصنف البلدي الماوردي (0.27) وأعلىها مع الطراز K5 (0.54) بمتوسط درجة تشابه 0.41 و هي أقل من المتوسط العام لدرجة التشابه (0.48). وقد يعزى ذلك إلى ابتعاد هذا الصنف في معظم صفاته الشكلية عن بقية الأصناف والطرز المدروسة من حيث لون الثمرة الأبيض المصفر قليلاً وحجمها الكبير مع الصلابة الجيدة إضافة لظاهرة اختزال المبايض المتواجدة في هذا الصنف فقط (الغماز والمطر،2004).

لوحظ أيضاً بشكل واضح ارتفاع درجة التشابه الوراثية بين طرز الكلابي المدروسة فيما بينها فقد كانت أعلى درجة تشابه وراثية بين الطرازين K4 و K5 (0.58) وأقلها بين الطرازين K2 و K5 والطرازين K1 و K4 (0.33) و بمتوسط درجة تشابه 0.46، وهذا يعلل بكون هذه الطرز هي انعزالات لنسل صنف واحد هو الكلابي.

حصل Zhebentyayeva ورفاقه عام 2003 على متوسط أعلى (0.70) من التشابه الوراثي لأربعة وسبعين صنف من المشمش مقارنة بمتوسط درجة التشابه في هذه الدراسة، كما وجد Romero وزملاؤه عام 2003 عند دراسة التشابه الوراثي بين أربعين صنف من المشمش أعلى درجة تشابه 0.73 وهي أعلى من نتيجة هذه الدراسة ولكن كانت أقل درجة تشابه وراثية 0.06 أقل بكثير من أقل درجة تشابه تم الحصول عليها في هذه الدراسة (0.27)، وقد يعود السبب في هذه الفروقات إلى الاختلاف في المادة النباتية المدروسة من حيث منطقة النشوء أو التوزيع الجغرافي أو قد يعود السبب إلى اختلاف المرئسات المستخدمة وقدرتها في كشف التباينات الوراثية.

الجدول(14): درجة التشابه الوراثية بين اصناف و طرز المشمش المدروسة باستخدام تقنية SSR بالاعتماد على

معامل Jaccard

K5	K4	K3	K2	K1	عجمي	وزري	بلدي حبي	بلدي ماوردي	تدمري	شكربارا	
										1	شكربارا
									1	0.453	تدمري

								1	0.326	0.422	بلدي ماوردي
							1	0.386	0.567	0.488	بلدي حبي
						1	0.686	0.377	0.552	0.442	وزري
					1	0.341	0.288	0.270	0.318	0.386	عجمي
				1	0.325	0.459	0.472	0.4	0.472	0.4	K1
			1	0.472	0.289	0.341	0.348	0.355	0.567	0.386	K2
		1	0.390	0.486	0.390	0.487	0.540	0.5	0.540	0.428	K3
	1	0.442	0.386	0.333	0.386	0.476	0.525	0.391	0.525	0.422	K4
1	0.575	0.475	0.333	0.486	0.538	0.487	0.463	0.431	0.463	0.536	K5

2-2- تحديد درجة التشابه الوراثية (Genetic similarity) بين الأصناف والطرز المدروسة باستخدام تقنية IRAP:

تم استخدام معامل Jaccard (Jaccard Coeffeciant) لتحديد درجة التشابه الوراثية بين الأصناف و الطرز المدروسة (الجدول،15) حيث كانت أعلى درجة تشابه وراثية بين الطرازين K4 و K5 (0.78) و أقل درجة تشابه وراثية بين الصنفين البلدي ماوردي و الوزري (0.55) و بمتوسط درجة تشابه 0.67.

لوحظ بشكل واضح انخفاض درجة التشابه الوراثية بين الصنف البلدي ماوردي و سائر الأصناف والطرز المدروسة فقد كانت أقل درجة تشابه وراثية مع الصنف الوزري (0.55) وأعلىها مع الطراز K3 (0.62) وبمتوسط درجة تشابه 0.59 وهي أقل من المتوسط العام لدرجة التشابه (0.67) وقد يعود ذلك إلى أن هذا الصنف هو الوحيد من بين الأصناف والطرز المدروسة الذي يحمل صفة البذرة اللاصقة (الغماز والريس،1992).

أوضحت النتائج أيضاً ارتفاع درجة التشابه الوراثية بين طرز الكلابي المدروسة فيما بينها فقد كانت أعلى درجة تشابه وراثية (0.78) بين الطرازين K4 و K5 وأقلها (0.66) بين الطرازين K1 و K5 و بمتوسط درجة تشابه 0.72 وهي أعلى من المتوسط العام لدرجة التشابه (0.67)، وهذا ما تؤكدته الصفات الشكلية المشتركة بين هذه الطرز من حيث قوة النمو واللون البرتقالي للثمرة مع صغر حجمها والبذرة المرة (الغمازو المطر،2004).

وبمقارنة نتائج هذه الدراسة مع الدراسات السابقة نجد أن متوسط درجة التشابه الوراثية (0.67) أقل مما قد ذكره Branco وزملاؤه عام 2007 على الرزوهي (0.74) وعند Guo وآخرون عام 2005 على الكاكي وهي (0.79). كما نجد أن الحد الأعلى لدرجة التشابه الوراثية (0.78) أقل من الحد الأعلى المذكور من قبل كل من Guo ورفاقه (2005) و Branco ورفاقه (2007) وهي 0.99 و 0.98 على التوالي. إضافة إلى أن الحد الأدنى لدرجة التشابه الوراثية (0.55) أعلى من الحد الأدنى المذكور في الدراستين السابقتين وهي 0.48 و 0.17 على التوالي، وقد تعود هذه

الاختلافات إلى اختلاف المادة النباتية المدروسة من حيث منطقة النشوء والتوزيع الجغرافي وكذلك المرئسات المستخدمة في التقنية.

الجدول (15): درجة التشابه الوراثية بين اصناف و طرز المشمش المدروسة باستخدام تقنية IRAP بالاعتماد

على معامل Jaccard

	شكربارا	تدمري	بلدي ماوردي	بلدي حبي	وزري	عجمي	K1	K2	K3	K4	K5
شكربارا	1										
تدمري	0.740	1									
بلدي ماوردي	0.608	0.574	1								
بلدي حبي	0.692	0.715	0.592	1							
وزري	0.688	0.739	0.546	0.763	1						
عجمي	0.695	0.636	0.605	0.653	0.642	1					
K1	0.669	0.692	0.571	0.683	0.646	0.641	1				
K2	0.717	0.714	0.615	0.724	0.670	0.684	0.690	1			
K3	0.740	0.751	0.623	0.702	0.686	0.644	0.680	0.733	1		
K4	0.733	0.692	0.611	0.678	0.648	0.669	0.693	0.671	0.705	1	
K5	0.701	0.692	0.594	0.660	0.648	0.644	0.660	0.671	0.674	0.777	1

3-2 تحديد درجة التشابه الوراثية (Genetic similarity) بين الأصناف والطرز المدروسة باستخدام تقنيتي SSR و IRAP معاً:

تم استخدام معامل Jaccard (Jaccard Coeffeciant) لتحديد درجة التشابه الوراثية بين الأصناف و الطرز المدروسة (الجدول،16) حيث كانت أعلى درجة تشابه وراثية (0.75) بين الصنفين الوزري والبلدي الحبي وأقل درجة تشابه وراثية (0.52) بين الصنفين البلدي ماوردي والوزري وبمتوسط درجة تشابه 0.64.

توافقت بيانات التشابه الناتجة عن هذه الدراسة مع الموصفات الشكلية والزراعية للأصناف والطرز المدروسة حيث أكدت درجة التشابه العالية بين الصنفين الوزري والبلدي الحبي التماثل العالي بينهما في الصفات الشكلية والإنتاجية والكيميائية مثل الباكورية بالإنتاج وشكل الثمرة المسطح ذات اللون الأصفر مع الخد الأحمر ودرجة الصلابة المتوسطة مع صفة البذرة الحلوة المنفصلة. أما بالنسبة للصنفين البلدي ماوردي والوزري ارتبطت نسبة التشابه المنخفضة بينهما مع الاختلاف بالصفات من حيث قوة النمو (قوي،متوسط على التوالي)، لون الثمرة (برتقالي مع عدم وجود خد أحمر،أصفر مع وجود الخد الأحمر بنسبة 12 % على التوالي) ومن حيث التصاق البذرة (لاصقة، منفصلة على التوالي) (الغمازو المطر،2004).

الجدول (16): درجة التشابه الوراثية بين اصناف و طرز المشمش المدروسة باستخدام تقنيتي IRAP و SSR بالاعتماد

على معامل Jaccard

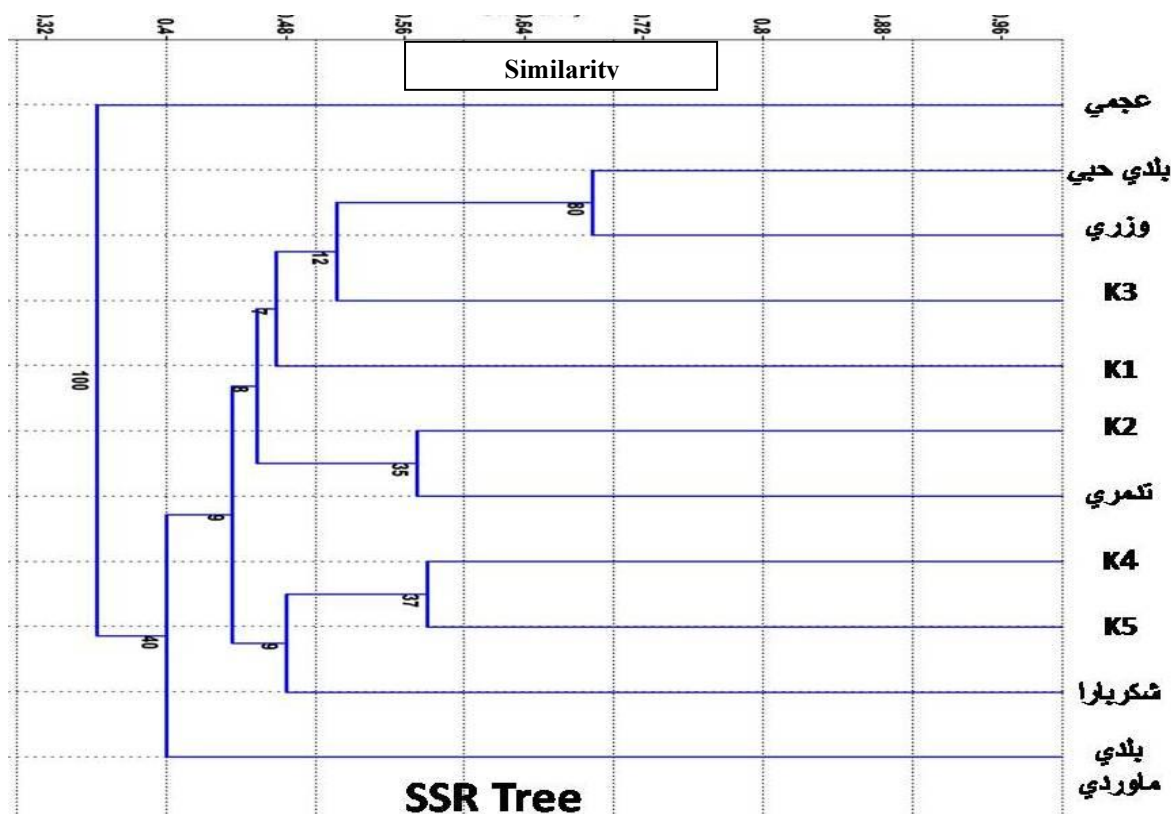
K5	K4	K3	K2	K1	عجمي	وزري	بلدي حبي	بلدي ماوردي	تدمري	شكربارا	
										1	شكربارا
									1	0.700	تدمري
								1	0.540	0.582	بلدي ماوردي
							1	0.565	0.697	0.665	بلدي حبي
						1	0.753	0.523	0.714	0.653	وزري
					1	0.599	0.602	0.556	0.592	0.651	عجمي
				1	0.599	0.622	0.658	0.549	0.664	0.633	K1
			1	0.663	0.628	0.624	0.673	0.580	0.696	0.670	K2
		1	0.663	0.656	0.637	0.660	0.682	0.607	0.724	0.697	K3
	1	0.668	0.656	0.642	0.623	0.625	0.658	0.580	0.667	0.688	K4
1	0.750	0.649	0.642	0.639	0.631	0.627	0.634	0.573	0.661	0.679	K5

3- التحليل العنقودي (cluster analysis) للأصناف والطرز المدروسة :

يسمح التحليل العنقودي بتقسيم الأصناف والطرز المدروسة إلى مجموعات، وتعكس هذه المجموعات درجة التشابه الوراثية فيما بينها، وقد تتجمع الأصناف المدروسة ضمن مجموعة واحدة وفقاً لموطنها الجغرافي، أو وفقاً للأصل والنسب (Hormaza, 2002).

3-1- التحليل العنقودي الناتج عن استخدام تقنية SSR :

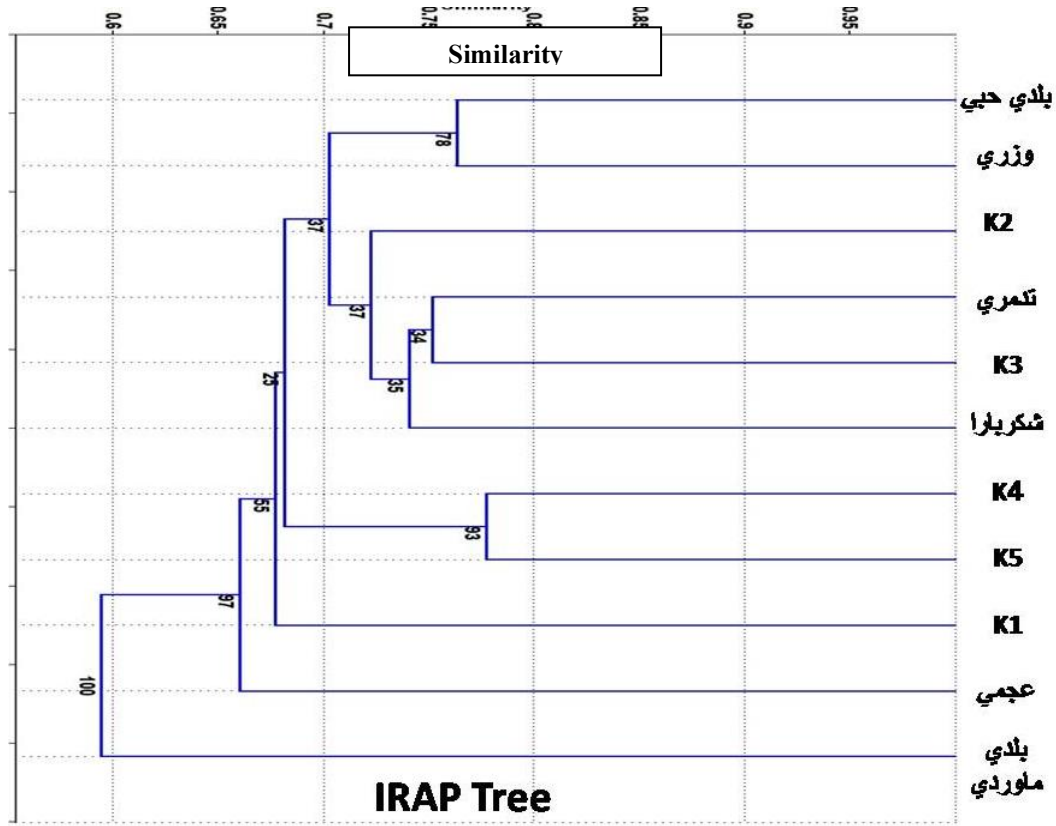
وزع التحليل العنقودي الناتج عن تقنية SSR أصناف وطرز المشمش المدروسة في عنقودين رئيسيين على درجة تشابه 0.43 وهذا التوزيع تدعمه قيمة bootstrap بلغت 8 % وبقي الصنفان البلدي الماوردي والعجمي مستقلين خارج العنقودين كل على حده (الشكل، 11) احتوى العنقود الرئيسي الأول ستة أصناف ويمكن تقسيمه إلى تحت عنقودين على درجة تشابه 0.46 وقيمة bootstrap بلغت 7 % تضمن تحت العنقود الأول الصنفين البلدي الحبي والوزري على درجة تشابه 0.66 عند قيمة عالية من الموثوقية حيث كانت قيمة bootstrap 80 % بالإضافة للطرزين K3 و K1 واحتوى تحت العنقود الثاني الصنف التدمري مع الطراز K2 على درجة تشابه 0.57 وقيمة bootstrap بلغت 37 % واحتوى العنقود الرئيسي الثاني كل من الطرازين K4 و K5 على درجة تشابه 0.58 وقيمة bootstrap تساوي 37% والصنف شكربارا جاء منفرداً . لقد تمت ملاحظة المستوى العالي من الموثوقية في تحليل bootstrap بقيمة 100% وذلك عند الصنف العجمي فقط.



الشكل (11): مخطط التحليل العنقودي للأصناف المدروسة الناتج عن تقنية SSR , بالاعتماد على معامل Jaccard ، من خلال طريقة UPGMA.

2-3- التحليل العنقودي الناتج عن استخدام تقنية IRAP :

وزع التحليل العنقودي الناتج عن تقنية IRAP أصناف وطرز المشمش المدروسة إلى عنقودين رئيسيين على درجة تشابه 0.67 وقيمة bootstrap بلغت 25 % وانفصل عنهما الطراز K1 على قيمة bootstrap تساوي 55 % والصنف العجمي على قيمة عالية 97% كل على حده والبلدي الماوردي بقي متميزاً عن المجموع بموثوقية عالية 100% في تحليل bootstrap (الشكل، 12): احتوى العنقود الأول ستة أصناف وطرز وراثية وأمكن تقسيمه إلى تحت عنقودين على درجة تشابه 0.70 احتوى تحت العنقود الأول الصنفين البلدي الحبي والوزري على درجة تشابه 0.76 وقيمة bootstrap 78% أما تحت العنقود الثاني فقد شمل الصنف التدمري مع الطراز K3 على درجة تشابه 0.75 والصنف شكريلوا والطراز K2 كل على حده أما العنقود الرئيسي الثاني فشمّل الطرازين K4 و K5 على درجة تشابه 0.77 وقيمة موثوقية عالية من bootstrap (93%).

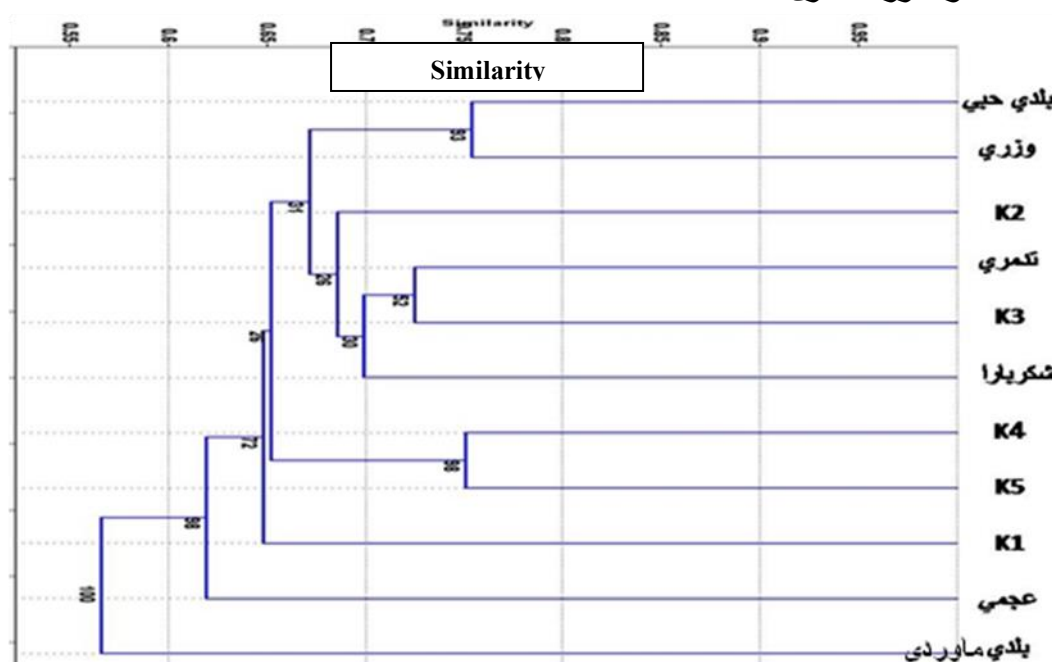


الشكل (12): مخطط التحليل العنقودي للأصناف المدروسة باستخدام تقنية IRAP بالاعتماد على معامل Jaccard ، من خلال طريقة UPGMA.

3-3- التحليل العنقودي الناتج عن استخدام تقنيتي SSR و IRAP معاً

تطابق التحليل العنقودي الناتج عن استخدام كلتا التقنيتين معاً مع التحليل العنقودي الناتج عن تقنية IRAP مع اختلافات بسيطة بدرجات التشابه ويعمل ذلك بالعدد العالي من المعلومات الناتجة عن تقنية IRAP (344) مقارنة مع تقنية SSR (78) لذا فقد وزع التحليل العنقودي الناتج عن تقنيتي SSR و IRAP معاً (الشكل، 13) أصناف وطرز المشمش المدروسة إلى عنقودين رئيسيين على درجة تشابه 0.65 وقيمة bootstrab تساوي 26% وانفصل عن العنقودين الرئيسيين كل من الطراز K1 والصنف العجمي (قيمة bootstrab 72% و 98% على التوالي) وكذلك البلدي الماوردي بقي متميزاً عن المجموع بسوية عالية من الموثوقية وهي 100%. حيث احتوى العنقود الأول ستة أصناف وطرز وراثية وأمكن تقسيمه إلى تحت عنقودين على درجة تشابه 0.67 احتوى تحت العنقود الأول الصنفين البلدي الحبي والوزري على درجة تشابه 0.75 أما تحت العنقود الثاني فقد شمل الصنف التدمري مع الطراز K3 على درجة تشابه 0.72 والصنف شكريلرا والطراز K2 كل على حده أما العنقود الرئيسي الثاني فشمّل الطرازين K4 و K5 على درجة تشابه 0.75 .

أظهرت نتائج هذه الدراسة أن الأصناف ذات درجة التشابه 0.70 فما فوق كان لها صفة البذرة المنفصلة، كما أن الصنفين البلدي الحبي والبلدي الماوردي كانا مرتبطين مع بعضهما بدرجة تشابه 0.57 وهي أقل من درجة ارتباطهما مع الأصناف والطرز الأخرى إذ أن الصنف البلدي الحبي له درجة تشابه عالية مع الصنف الوزري إشارة إلى تشابه نسب محتملة. كما وأظهرت نتائج هذه الدراسة بأن الصنفين العجمي والبلدي الماوردي لا يشكلان أي عنقود مع أي صنف آخر وهما يتميزان عن الجميع بسهولة مما يؤكد بأنهما مختلفين وراثياً بشكل كبير عن الأصناف والطرز الأخرى.



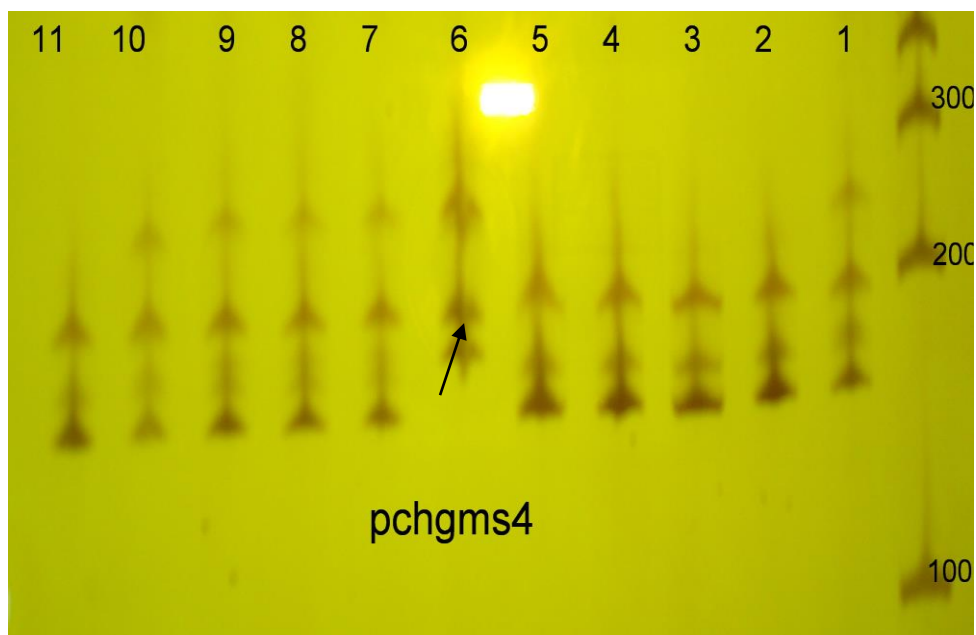
الشكل (13): مخطط التحليل العنقودي للأصناف المدروسة باستخدام تقنيتي SSR و IRAP ، و بالاعتماد على معامل Jaccard ، من خلال طريقة UPGMA.

4- تمييز الأصناف والطرز باستخدام الواسمات الفريدة (unique bands) الناتجة عن استخدام تقنية SSR: تمكنت تسعة أزواج من المرئسات من بين أزواج المرئسات الست وعشرين المستخدمة في تقنية SSR من وسم بعض الأصناف والطرز المدروسة بـ 14 واسم فريد (الجدول، 17 والأشكال، 14, 15, 16) حيث ميزت أزواج المرئسات UDP98-411 ، UDP98-405 و Pchgms4 الصنف العجمي بالليل فريد لكل منها، بينما تميز الصنف البلدي ماوردي بالليلين فريدين باستخدام زوج المرئسة 019 - UDP96- و الليل فريد باستخدام Pchgms12، واستطاع زوج المرئسة UDP98-412 تمييز صنف الشكر بار بالليل فريد أما زوج المرئسة UDP96-008 ميّز كل من الصنف العجمي والطرزين K1 و K2 بالليل فريد لكل منها وكذلك زوج المرئسة UDP97-402 ميّز الشكر بار والطرز K2 بالليل فريد لكل منهما وزوج

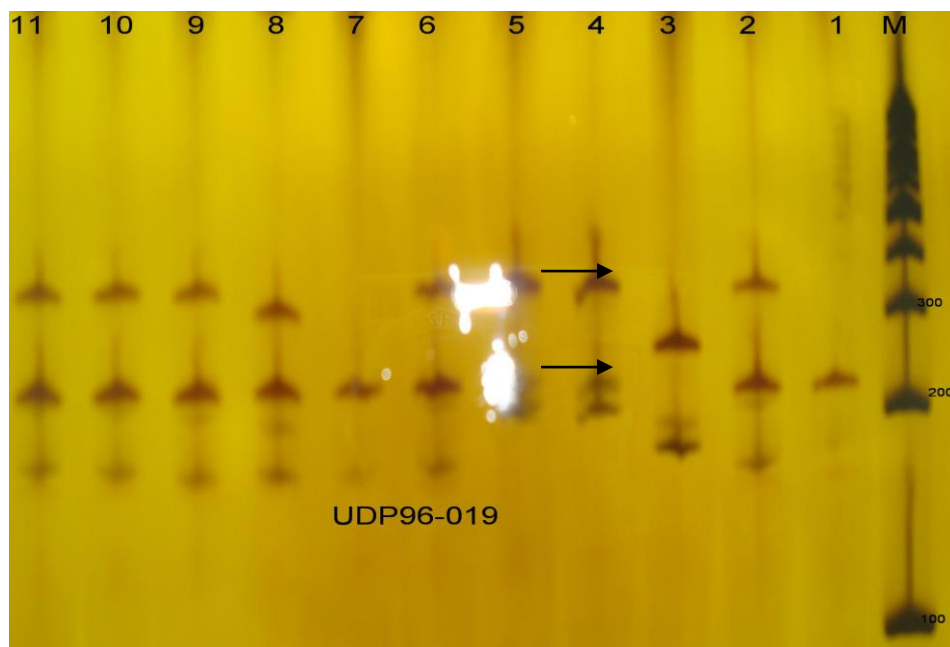
الرئسة Pchgms5 حيث ميز كل من الصنفين العجمي والشكريا بالليل فريد لكل منهما، وبالتالي يمكن استخدام هذه الواسمات الفريدة في عمليات التصنيف النباتي لغراس المشمش في البنوك الوراثية أو في حقول المزارعين لدراسة مدى انتشار صنف أو طراز معين من المشمش. حصل Zhebentyayeva ورفاقه (2003) على الأليلات الفريدة في الأصناف الصينية فقط من أصناف المشمش التي تمت دراستها وذلك عند استخدام أزواج المرئسات Pchgms12، Pchgms14، Pchgms5 ولم تظهر أية واسمات فريدة في المجموعات الجغرافية الأخرى للمشمش.

الجدول (17): اسماء المرئسات التي أعطت الواسمات الفريدة وعدد الواسمات الفريدة وحجمها مع أسماء الأصناف والطرز التي ميزتها هذه الواسمات في تقنية SSR.

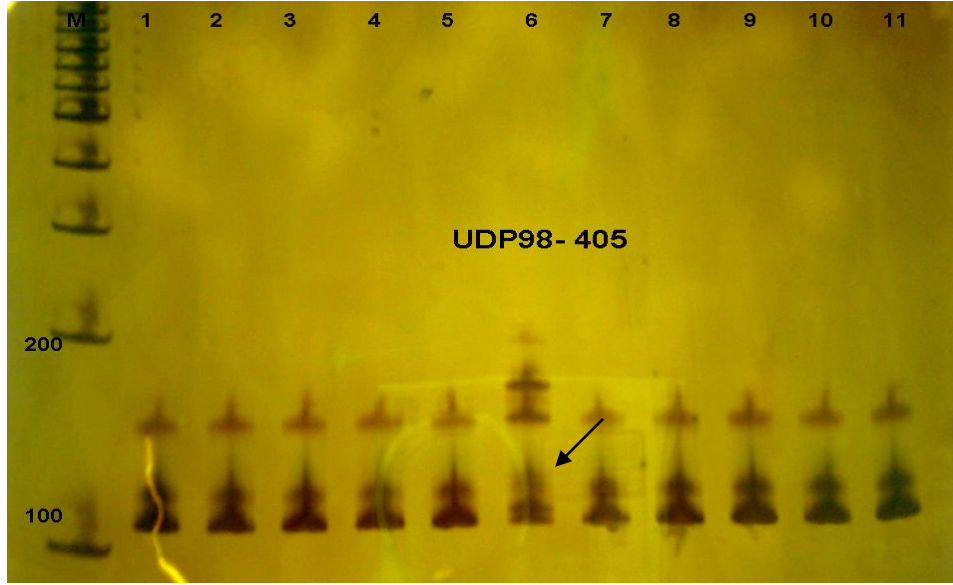
أزواج المرئسات	عدد الأليلات الفريدة	الصنف/الطرز	حجم الأليل الفريد (زوج قاعدي)
UDP98-411	1	العجمي	160
UDP96-008	3	العجمي	120
		K1	130
		K2	140
UDP97-402	2	شكريا	160
		K2	170
UDP98-405	1	العجمي	120
UDP96-019	2	البلدي ماوردي	180
		البلدي ماوردي	200
UDP98-412	1	شكريا	110
Pchgms4	1	العجمي	170
Pchgms5	2	العجمي	240
		شكريا	300
Pchgms12	1	البلدي ماوردي	500
المجموع	14		



الشكل (14): نماذج الواسمات الفريدة الناتجة عن زوج المرئسات pchgms4 بين الأصناف والطرز المدروسة باستخدام تقنية SSR حيث: (1):شكريارا، (2):تدمري، (3):بلدي ماوردي ، (4): بلدي حبي، (5): وزري، (6):عجمي، (7):K1، (8):K2، (9):K3، (10):K4، (11):K5 (M) المعلم القياسي 100bp وتمت الإشارة إلى الواسمات الفريدة بالأسهم.



الشكل (15): نماذج الواسمات الفريدة الناتجة عن زوج المرئسات UDP96-019 في الأصناف والطرز المدروسة باستخدام تقنية SSR حيث: (1):شكريارا، (2):تدمري، (3):بلدي ماوردي ، (4): بلدي حبي، (5): وزري، (6):عجمي، (7):K1، (8):K2، (9):K3، (10):K4، (11):K5 (M) المعلم القياسي 100bp وتمت الإشارة إلى الواسمات الفريدة بالأسهم.



الشكل (16): نماذج الواسمات الفريدة الناتجة عن زوج المرئسات UDP98-405 بين الأصناف والطرز المدروسة باستخدام تقنية SSR حيث: (1): شكربارا، (2): تدمري، (3): بلدي ماوردي ، (4): بلدي حبي، (5): وزري، (6): عجمي، (7): K1، (8): K2، (9): K3، (10): K4، (11): K5. (M): المعلم القياسي 100bp وتمت الإشارة إلى الواسمات الفريدة بالأسهم.

5- تمييز الأصناف والطرز باستخدام الواسمات الفريدة (unique bands) الناتجة عن استخدام تقنية IRAP : استطاعت تقنية IRAP تمييز أربعة من الطرز الوراثة الخمس من المشمش الكلابي وجميع الأصناف المدروسة بـ 35 واسم فريد (الجدول، 18) حيث تميز الصنف البلدي ماوردي بأعلى عدد من الواسمات الفريدة (10) ثم تلاه الطراز K2 بتسعة واسمات والصنف البلدي الحبي بأربعة واسمات والصنف العجمي بثلاثة واسمات وتساوى الصنفان شكربارا والتدمري والطرزان K3 و K5 بواسمين فريدين، بينما تم وسم الطراز K1 بواسم فريد وحيد. تمكن 18 زوج من المرئسات من بين 33 زوج من المرئسات المستخدمة في تقنية IRAP من إعطاء واسمات فريدة حيث تميز زوج المرئسات LTR6150/5-LTR1 بإعطاء أعلى عدد من الواسمات الفريدة (5) في حين أعطى زوج المرئسة TDK12 أربعة واسمات (الشكل، 17) وتساوت أزواج المرئسات LTR6149/Nikita و LTR1-5 (الشكل، 18) و Nikita بعدد الواسمات (3) أعطى كل من أزواج المرئسات TDK2 (الشكل، 19)، LTR6150/5-LTR2، 5-LTR2/Nikita، 5-LTR2/5-LTR1، في حين أعطى كل من LTR6149/5-LTR1، LTR6150، LTR6149/5-LTR2، LTR6150/3-LTR1، LTR6150/Sakkula، 3-LTR1، 5-LTR2/3-LTR1، 3-LTR1/Nikita و 3-LTR1/Sakkula واسم وحيد.

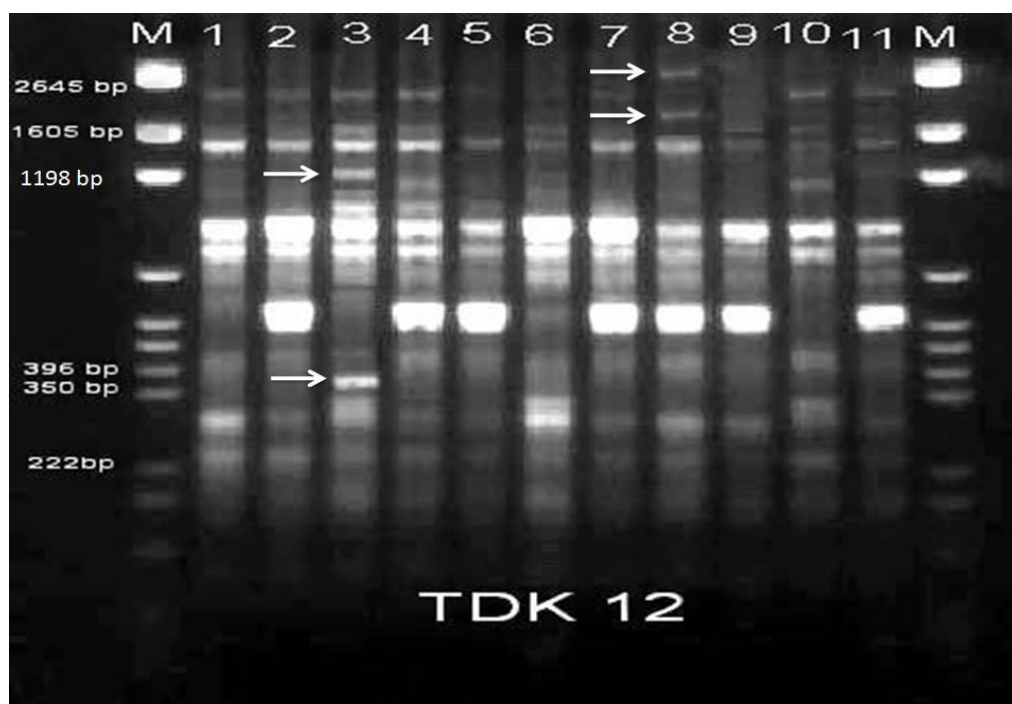
مكنت هذه التقنية من ايجاد مؤشرات متخصصة لتمييز هذه الأصناف والطرز المدروسة، لذلك تعتبر هذه الواسمات مؤشرات متخصصة ومميزة للصنف أو الطراز إذ أن هذه القطع تواجدت في طراز أو صنف معين وغابت من الطرز والأصناف الأخرى (الجدول، 18). فعلى سبيل المثال، نجد بأن تحليل صنف الشكريارا باستخدام زوج المرئسة Nikita يعطي 10 حزم منها حزمة وحيدة من الدنا DNA ذات وزن جزيئي 400 زوج قاعدي وجدت في هذا الصنف فقط ولم توجد في بقية الأصناف والطرز الأخرى، وقد أعطى زوج المرئسات ذاته مع الصنف البلدي الحبي حزمتان فريدتان (1000,900 زوج قاعدي) لم تتطابقا في وجودهما أو وزنهما الجزيئي مع أي صنف أو طراز آخر وبالتالي يمكن استخدام هذه الواسمات الفريدة وبشكل مكمل للصفات الشكلية في عمليات التصنيف النباتي لغراس وأشجار المشمش في المشاتل والبنوك الوراثية وحقول الفلاحين لدراسة مدى انتشار صنف أو طراز معين من المشمش وتحديد الأصناف والطرز المهددة بالانقراض.

الجدول (18): أسماء المرئسات التي أعطت الواسمات الفريدة وعدد هذه الواسمات ووزنها الجزيئي مع أسماء

الأصناف والطرز التي ميزتها هذه الواسمات في تقنية IRAP

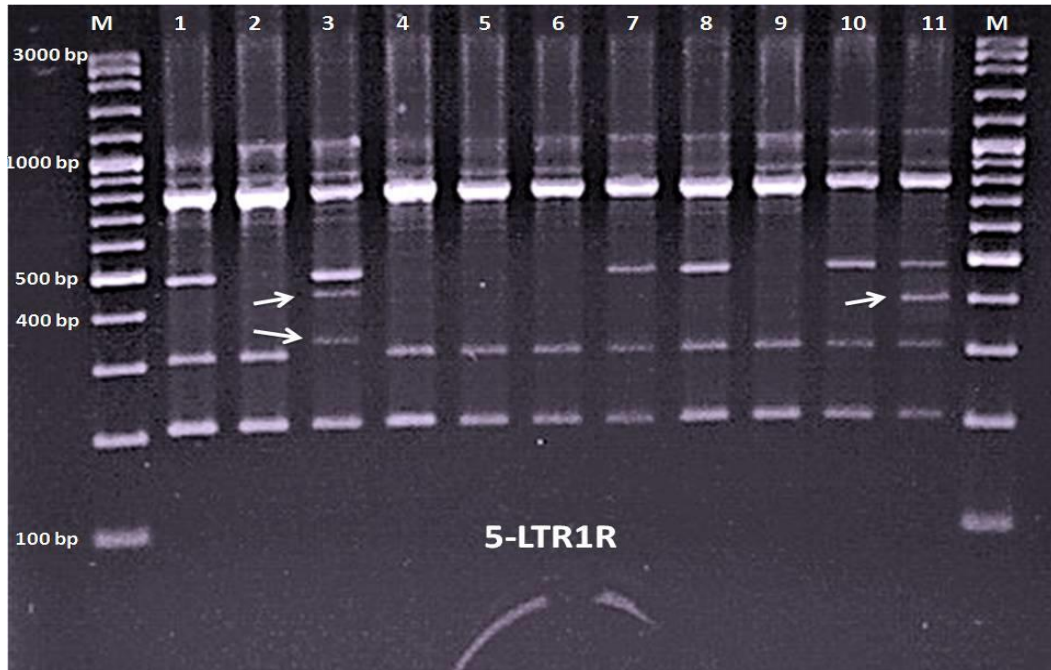
K5	K4	K3	K2	K1	عجمي	وزري	بلدي	بلدي	تدمري	شكريارا	المرئسة/الصنف
----	----	----	----	----	------	------	------	------	-------	---------	---------------

							حبي	ماوردي			
			470						485		TDK2
			2000					350			
			2700					1200			TDK12
			320								LTR6149/5-LTR1
				250							LTR6149/5-LTR2
			420				450				
							680				LTR6149/Nikita
								280			LTR6150
			80		50			250	600		LTR6150/5-LTR1
					550						LTR6150/5-LTR2
			180		90						LTR6150/3-LTR1
									800		LTR6150/sakkula
			350								
400								310			5-LTR1
								450			
								500			5-LTR2
								850			
		300									5-LTR2/3-LTR1
		2000						600			5-LTR2/ Nikita
			330								3-LTR1
								850			3-LTR1/sakkula
260											3-LTR1/ Nikita
							900			400	Nikita
							1000				
2	0	2	9	1	3	0	4	10	2	2	المجموع

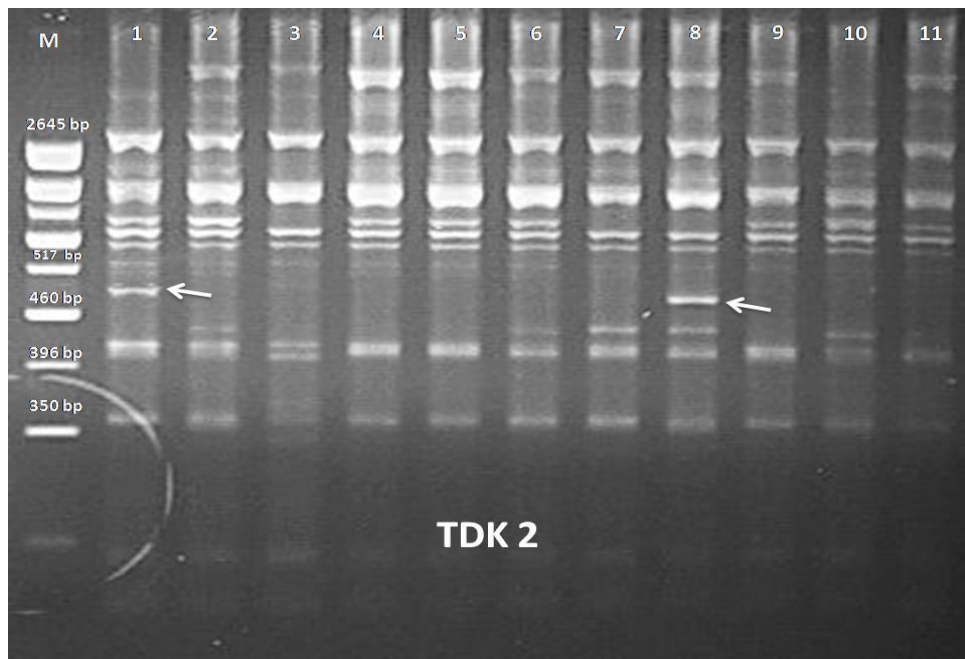


الشكل (17): نماذج الواسمات الفريدة الناتجة عن زوج المرئسات TDK12 بين الأصناف والطرز المدروسة حيث: (1):شكريارا،(2):تدمري،(3):بلدي ماوردي ، (4): بلدي حبي،(5):

PGEM (11) K4:(10) K3:(9) K2:(8) K1:(7)، عجمي،(6) وزري،
marker(M).K5 وتشير الأسهم إلى الواسمات الفريدة.



الشكل (18): نماذج الواسمات الفريدة الناتجة عن زوج المرئسات 5-LTR1R بين الأصناف والطرز المدروسة حيث: (1):شكريارا،(2):تدمري،(3):بلدي ماوردي ، (4): بلدي حبي،(5): وزري،(6):عجمي،(7):K1 (8):K2 (9):K3 (10):K4 (11):VC DNA (M).K5
marker(vivantis). وتشير الأسهم إلى الواسمات الفريدة.



الشكل (19):نماذج الواسمات الفريدة الناتجة عن زوج المرئسات TDK2 بين الأصناف والطرز المدروسة حيث: (1):شكريارا،(2):تدمري،(3):بلدي ماوردي ، (4): بلدي حبي،(5):

وزري،(6):عجمي،(7):K1 (8) K2:(9) K3:(10) K4:(11) K5. PGEM
marker (M) تشير الأسهم إلى الواسمات الفريدة.

6-حساب معدل التباير المورثي المتوقع H_e وقيمة التباير المورثي الملحوظة H_o في تقنية SSR :
تم حساب متوسط قيمة التباير المورثي المتوقع H_e (Expected heterozygosity)، وتم حساب قيمة التباير المورثي الملحوظة H_o (Observed heterozygosity) في تقنية SSR. إذ تراوحت قيم التباير المورثي المتوقعة بين 0 و 0.71 وبمتوسط 0.48 وهذه القيمة كانت أعلى مما وجدته Cipriani وآخرون عام 1999 على الدراق (0.32) وعند Romero وآخرون عام 2003 على المشمش (0.32) ومطابقة للنتيجة التي تم الحصول عليها Wunsch وHormaza عام 2002 (0.49) على الكرز الحلو وأقل مما حصل عليه Maghuly ورفاقه عام 2005 على المشمش (0.61) ويعزى ارتفاع قيمة التباير المورثي في المشمش مقارنة مع الدراق إلى ارتفاع الدرجة المعنوية من عدم التوافق الذاتي الملحوظ في المشمش مقارنة مع الدراق (Romero et al., 2003).

أما نسبة التباير المورثي الملحوظ (وهي نسبة الأفراد غير المتجانسة بين الأفراد المدروسة) كانت 0.29 حيث تراوحت بين 0 و 0.91 وهذه القيمة أقل مما تمت ملاحظته عند Mnejja عام 2005 و 2004 حيث بلغت 0.73 و 0.65 على التوالي.

7-مقارنة كفاءة تقنيتي SSR و IRAP في تحليل جينوم أصناف وطرز المشمش المدروسة :

تمت مقارنة فعالية كلتا التقنيتين SSR و IRAP من خلال مقارنة كل من عدد الحزم الكلية الناتجة عن كل تقنية، وعدد الحزم الناتجة في كل صنف وطرز مدروس، والنسبة المئوية للتعددية الشكلية (%polymorphism)، والنسبة المئوية للحزم المتعددة شكلياً مع كل زوج من المرئسات، ومتوسط عدد الحزم الناتجة عن كل زوج من المرئسات (Multiplex ratio)، كما تم حساب معامل الارتباط (correlation coefficient) بين درجات التشابه الوراثي الناتجة عن كل تقنية.

أعطت أزواج المرئسات الاثنان وثلاثين المستخدمة في تقنية IRAP ما مجموعه 344 حزمة في الأصناف والطرز كافة بمعدل 10.75 حزمة لكل زوج من المرئسات (Multiplex ratio)، كان من بينها 256 حزمة متعددة شكلياً أي بنسبة مئوية للتعددية الشكلية بلغت 74.4 % وبمعدل 2.25 % لكل زوج من المرئسات (الجدول، 19)، واختلف عدد الحزم في الأصناف والطرز المدروسة حيث أعطى الطراز K2 أعلى عدد من الحزم (237)، في حين أعطى الطراز K1 أقل

عدد من الحزم (204)، كما أعطت كل من الطرز K3 و K4 و K5 أعداد حزم متماثلة (231) (الجدول، 20).

أما في تقنية SSR فقد أظهرت أزواج المرئسات الست والعشرون المستخدمة ثمانية وسبعين أليلًا في الأصناف والطرز كافة كان منها 72 أليل متعدد شكلياً بنسبة مئوية للتعددية شكلية بلغت 92.3%، وتراوح عدد الأليلات في المواقع المختلفة بين 1-6 أليلات بمعدل 3 أليل في كل موقع (Multiplex ratio) وبنسبة تعددية شكلية 3.55 % لكل زوج من المرئسات (الجدول، 19)، كما اختلف عدد الأليلات في أصناف و طرز المشمش المدروسة، حيث تراوح عددها بين 32 و 38 أليل أقلها في الطراز K1 و أعلاها في الصنفين شكربارا و البلدي الماوردي وفي الطراز K4 (الجدول، 20).

نجد مما سبق أن متوسط عدد الحزم الناتجة عن كل زوج من المرئسات Multiplex ratio في تقنية IRAP (10.75) أعلى مما هو عليه في تقنية SSR (3)، في حين كانت النسبة المئوية للتعددية الشكلية (92.3 %) والنسبة المئوية للحزم المتعددة شكلياً في كل زوج من المرئسات (3.55%) في تقنية SSR أعلى مما هو في تقنية IRAP (حيث كانت 74.4 % و 2.25 % على التوالي) (الجدول، 19).

ويعود تفسير ذلك إلى العوامل المختلفة المتعلقة بالجينوم، وبالمرئسات المستخدمة مثل تكرارية السلاسل المكملية للرئسة في الجينوم، وبعدها النيكلوتيدات في كل زوج من المرئسات، ويختلف ذلك بحسب التقنية المستخدمة والذي يحكم إمكانية إيجاد السلاسل المكملية ضمن الجينوم المدروس، وبالتالي عدد الحزم الناتجة، إذ أن مناطق التكرارات الطرفية الطويلة ذات تكرارية مرتفعة في الجينوم أما مرئسات SSR فهي مصممة بناء على مواقع محددة في الجينوم محيطة بموقع تكراريات التسلسلات البسيطة (flanking regions)، لذلك يكون عدد الحزم الناتجة عن كل زوج من المرئسات (Multiplex ratio) في تقنية SSR أخفض مما هو في تقنية IRAP، أما النسبة المئوية للتعددية الشكلية، ونسبة الحزم المتعددة شكلياً في كل مرئسة فتكون في تقنية SSR أعلى مما هو في تقنية IRAP .

الجدول (19) : عدد الحزم الكلية وعدد الحزم المتعددة شكلياً ، وعدد الحزم الناتجة عن كل مرئسة والنسبة المئوية للتعددية الشكلية والنسبة المئوية للحزم المتعددة شكلياً في كل زوج من المرئسات في كلتا التقنيتين

التقنية	عدد الحزم الكلي	عدد الحزم المتعددة شكلياً	عدد الحزم الناتجة عن كل مرئسة Multiplex ratio	النسبة المئوية للتعددية الشكلية	النسبة المئوية للحزم المتعددة شكلياً في كل مرئسة
SSR	78	72	3	92.3	3.55
IRAP	344	256	10.75	74.4	2.25

الجدول(20): عدد الحزم الناتجة في كل صنف وطرارز وراثي في كلتا التقنيتين SSR و IRAP

الصنف التقنية	شكربارا	تدمري	بلدي ماوردي	بلدي حبي	وزري	عجمي	K1	K2	K3	K4	K5	المجموع
SSR	38	35	38	34	34	36	32	36	34	38	37	392
IRAP	230	219	225	232	214	226	204	237	231	231	231	2480

تم حساب معامل الارتباط بين التقنيتين بالاعتماد على درجة التشابه الوراثية الناتجة، حيث بلغت قيمة معامل الارتباط بين مصفوفتي التشابه الوراثي للتقنيتين ($r=0.57$) وهذا يدل على موافقة ضعيفة بينهما.

ومن خلال نتائج التوصيف الجزيئي التي تم الحصول عليها في دراسة الأصناف والطرز المحلية استطاعت كل من تقنيتي SSR و IRAP تمييز الأصناف والطرز المحلية المدروسة بشكل واضح، وبالتالي إمكانية اعتماد هاتين التقنيتين في التوصيف الجزيئي للأصناف بهدف تعريف المصادر الوراثية المحلية ، وتقييم المجمعات الوراثية.

الفصل الرابع

الاستنتاجات و التوصيات

Conclusions and recommendations

الاستنتاجات:

- 1- أثبتت تقنيتا SSR و IRAP فعالية في كشف التباينات الوراثية بين الأصناف والطرز المدروسة حيث أعطت تقنية SSR تعددية شكلية بمعدل 92.3 % بين الأصناف والطرز المدروسة، في حين أعطت تقنية IRAP تعددية شكلية بمعدل 74.4 %.
- 2- أظهرت تقنية SSR أعلى درجة تشابه وراثية بين الصنفين الوزري و البلدي الحبي (0.69) و أقل درجة تشابه وراثية بين الصنفين البلدي الماوردي و العجمي (0.27)، في حين أظهرت تقنية IRAP أعلى درجة تشابه وراثية بين الطرازين K4 و K5 (0.78) وأقل درجة تشابه وراثية بين الصنفين البلدي الماوردي والوزري (0.55).

3- عزل التحليل العنقودي في كلا التقنيتين الصنفين البلدي الماوردي والعجمي كل على حده عن بقية الأصناف والطرز المدروسة.

4- تم وسم خمسة من الأصناف والطرز المدروسة بأربعة عشر واسم فريد عند استخدام تقنية SSR ، وأربعة من الطرز الوراثية الخمس من المشمش الكلابي وجميع الأصناف المدروسة بـ 35 واسم فريد عند استخدام تقنية IRAP .

5- إن التعددية الشكلية الجيدة لمعلّات SSR (92.3%) و القيمة المرتفعة لمتوسط عدد الأليلات في الموقع 3 ومتوسط التباير المورثي المتوقع 0.48 تؤكد جميعها أن تقنية SSR هي الأداة الأكثر ملاءمة لتعريف أصناف المشمش وهو يعكس قدرة معلّات SSR على تأمين أنماط وراثية فريدة لكل طراز وراثي ولكل صنف.

6- سمحت قابلية الانتقال لمعلّات SSR بين أنواع الجنس *Prunus* من استخدام المعلّات المطورة من الدراق لدراسات التنوع الوراثي في المشمش إذ أن جميع أزواج المرئسات المستخدمة كانت قادرة على تضخيم مواقع SSR في المشمش ونسبة 84.6 منها كانت متعددة شكليا وَوَظْهَرت هذه المواقع متوسط 2.8 أليل متعدد /موقع.

7- إن تماثل حجوم الأليلات مع الدراسات السابقة يثبت أن معلّات SSR هي معلّات محافظة (conservative) بين الأنواع (Cross-species) كما أنها تعكس المستوى العالي من التشابه Homology بين المناطق المحيطة بمواقع التتابعات في جينومي الدراق والمشمش.

8- تعد معلّات IRAP من المعلّات الجزيئية التي يعتمد عليها لأنها سهلة وسريعة وذات تكلفة منخفضة نسبياً وهي تعطي معلومات إضافية في تقييم الجينوم و البصمة الوراثية.

9- إن درجة التعددية الشكلية العالية (74.4%) لنواتج التضخيم في تقنية IRAP والنتيجة عن استخدام أزواج مرئسات مطورة بناءً على العناصر النقالة في الشعير والموزمدهشة إذ يمكن أن يتوقع المرء أن العناصر النقالة ممكن أن لا تكون فعالة ونشطة بشكل كافي وثابتة بين جنسين مختلفين وبالتالي فإنها لن تبدي أية تعددية شكلية مدخلة في الجينوم غير الأصلي مثل المشمش، ولقد أشار البحث الحالي إلى أن الأجناس النباتية المختلفة قد تتشارك بعائلات من العناصر النقالة وهي فعالة وثابتة ويمكن أن تطبق مباشرة على الأجناس المختلفة.

10- إن تسجيل التكرارية العالية وثباتية النتائج لمعلّات SSR و IRAP عند إعادة التجربة ولعدة مرات يزيد من موثوقية ومصداقية هاتين التقنيتين .

11- استطاعت كل من تقنيتي SSR و IRAP تمييز الأصناف والطرز المدروسة بشكل واضح، وبالتالي إمكانية اعتماد هاتين التقنيتين في التوصيف الجزيئي للمشمش بهدف تعريف المصادر الوراثية المحلية ، وتقييم المجمعات الوراثية.

التوصيات :

1- تطوير معلّات SSR من نوع واحد للجنس *Prunus* لإجراء التحاليل الوراثية اللازمة لكل الأنواع الأخرى التابعة لهذا الجنس. مما يقلل من التكلفة والوقت اللازمين لهذه العملية.

2- استخدام المعلّات الوراثية المعتمدة على العناصر النقالة كأداة قيمة لمربي المشمش كما أن تواجد التكرارات الطرفية الطويلة LTR retrotransposon بوفرة في جينوم النبات يقترح أن استخدام هذه التقنية يسمح للمربين من إيجاد معلّات فريدة مميزة ومرتبطة بالصفات الزراعية الهامة وهذا مما يمكن من استخدام هذه المعلّات في برامج التربية بمساعدة المعلّات (Marker assisted breeding) وانتخاب الغراس في المراحل المبكرة من النمو.

3- استخدام الواسمات الفريدة الناتجة عن تقنيتي SSR و IRAP في التوصيف النباتي لغراس وأشجار المشمش في المشاتل والمجمعات الوراثية وحقول المزارعين للتأكد من المدخلات الوراثية

وتجنب عملية وجود نفس الطراز الوراثي تحت اسمين مختلفين في المجمع الوراثي بسبب اختلافات شكلية عائدة للعوامل البيئية فقط، وكذلك حصر الطرز الوراثية المهددة بالانقراض ومحاولة الحفاظ عليها في المجمعات الوراثية وإكثارها وإعادة نشرها في حقول المزارعين.

Abbreviations

AFLP	Amplification Fragment Length Polymorphism
AMOVA	Analysis of Molecular Variance
APS	Ammonium per sulfate
CTAB	Cetyltrimethyl ammonium bromide
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTPs	Deoxynucleotide tri phosphate(dCTP,dTTp,dATP,dGTP)
EDTA	Ethylene diamine tetra acetic acid
H _e	Expected Heterozygosity
H _o	Observed Heterozygosity
IRAP	Inter- Retrotransposon Amplified Polymorphism

ISSR	Inter-Simple Sequence Repeats
LTR	Long terminal repeat
PCOA	Principle Coordinate Analysis
PCR	Polymerase chain reaction
PVP	Polyvinyl pyrrolidone
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
REMAP	Retrotransposon-Microsatellite Polymorphism
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphisms
SSR	Simple Sequence Repeats
TBE	Tris-Borate-EDTA
TE	Tris-EDTA
TRIM	Terminal-repeat retrotransposon in miniature
UPGMA	Unweighted Pair Group Method using arithmetic Averages

الملحق (1)

الصنف	قوة النمو	لون البشرة الرئيسي	الألوان الإضافية	الصلابة	التصاق البذرة	طعم البذرة	شكل الثمرة
شكريارا	قوي	سمني	تحدد أحمر 25%	جيدة	منفصلة	حلو	دائري
التدمري	قوي	مشمشي	تحدد أحمر	وسط	منفصلة	حلو	كروي
البلدي الماوردي	قوي	برتقالي	-	وسط	لاصقة	حلو	مسطح
البلدي الحبي	قوي	أصفر	أحمر 5%	وسط	منفصلة	حلو	مسطح

الوزري	متوسطة	أصفر	أحمر 12%	وسط	منفصلة	حلو	مسطح
العجمي		الأبيض المصفر	-	جيدة	منفصلة	حلو	مسطح

المراجع العربية

- الغماز، انتصار والريس، رفيق. (1992). دراسة عدد من أصناف المشمش المحلية والأجنبية في مركز بحوث حمص. منشورات وزارة الزراعة والإصلاح الزراعي. 25 ص.
- الغماز، انتصار والمطر، إيمان. (2004). شجرة المشمش. منشورات وزارة الزراعة والإصلاح الزراعي. 460.
- القطب، محمد عدنان وقطنا، هشام. (1988). الفاكهة متساقطة الأوراق. منشورات جامعة دمشق. 383 ص: 222-264.
- المجموعة الإحصائية الزراعية السنوية (2008). وزارة الزراعة والإصلاح الزراعي.
- حامد، فيصل والعيسى، عماد. (1990). الفاكهة إنتاجها وتخزينها. منشورات جامعة دمشق. 432 ص: 7-8.

المراجع الأجنبية

- Ahmad, R.; Potter, D. and Southwick, S.M. (2004). Identification and characterization of plum and pluot cultivars by microsatellite markers. The Journal of Horticultural Science and Biotechnology. 79(1):164-169.
- Alavi-Kia, S.S.; Mohammadi, S.A.; Aharizad, S. and Moghaddam, M. (2008). Analysis of genetic diversity and phylogenetic relationships in Crocus genus of Iran using inter-retrotransposon amplified polymorphism. Biotechnol and Biotechnol.EQ:795-800.
- Amar, K. and Hirohika, H. (2001). Applications of retrotransposons as genetic tools in plant biology. Trends in Plant Sci. 6:127-133.

- Ansorge, W. (1985). Silver staining of acrylamid gels. *The Journal of Biochem and Biophys. Methods.* 11:13-20.
- Antonius-klemola, K.; Kalendar, R. and Sculman, A.H. (2006). Trim retrotransposon occur in apple and are polymorphic between varieties but not sports. *Theoretical and Applied Genetics.* 112 (6): 999-1008.
- Aranzana, M.J; Garcia-Mas, J.; Carbo, J. and Aru's, P. (2002). Development and variability analysis of microsatellite markers in peach. *Plant Breeding.* 121(1):87-92.
- Ashalatha, N.S.; Teo, C.H.; Schwarzacher, T. and Harrison, P.H. (2005). Genome classification of banana cultivars from south India using IRAP markers. *Euphytica.* 144 (3):285-290.
- Badenes, M.L.; Asins, M.J.; Carbonell, E.A. and Glaser, G. (1996). Genetic diversity in apricot, *Prunus armeniaca* L. aimed at improvement of resistance to plum pox virus. *Plant Breed.* 115:133-139.
- Barreneche, T.; Bodenes, C.; Lexer, C.; Trontin, J.F.; Fluch, S.; Streiff, R.; Plomion, C.; Roussel, G.; Steinkellner, H.; Burg, K.; Favre, J.M.; Glossl, J. and Kremer, A. (1998). A genetic linkage map of *Quercus robur* L. (pedunculate oak) based on RAPD, SCAR, Microsatellite, isozyme and 5S rDNA markers. *Theor. Appl. Genet.* 97: 1090–1103.
- Bassam, B.J.; Caetano-Anolles, G. and Gresshoff, P.M. (1991). Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 196:80-83.
- Bassil, N.V.; Hummer, K.E. and Postman, J.D. (2006). Microsatellites are used to examine apple and pear identities and genetic relationships. *Hort. Sci.* 41 (4):993.
- Battistini, S. and Sansavini, S. (1991). Electrophoretic analysis of isozyme variability in apricot germplasm. *J. Genet. Breed.* 45:117-122.

- Baumel, A.; Ainouche, M.; Kalendar, R. and Schulman, A.H. (2002). Retrotransposon and genomic stability in populations of the young allopolyploid species *Spartina anglica* C.E Hubbard (*Poaceae*). *Molecular Biology and Evolution*. 19 (8):1218-1227.
- Bouhadida, M.; Casas, A.M.; Moreno, M.A. and Gogorcena, Y. (2007). Molecular characterization of Miraflores variety and relatives using SSRs. *Scientia Horticulturae*. 111:140-145.
- Bowley, S. (2004). SR9124. Application of SSR markers for DNA fingerprinting of *prunus* and *fragaria* varieties. Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs.
- Branco, C.J.S.; Vieira, E.A.; Malone, G.; Kopp, M.M.; Malone, E. Beltrames, A.; Mistura, C.C.; Carvalho, F.I.F. and Oliveira, C.A. (2007). IRAP and REMAP assessments of genetic similarity in rice. *Appl. Genet*. 48 (2):107-113.
- Breto', M.P.; Ruiz, C.; Pina, J.A. and Asins, M.J. (2002). The diversification of Citrus clementina, a vegetatively propagated crop species. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 21:285-293.
- Byrne, D.H. and Littleton, T.G. (1989). Characterization of isozyme variability in apricots. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 126:205-209.
- Canli, F.A. (2004). Development of a second generation genetic linkage map for sour cherry using SSR markers. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 7:1676-1683.
- Cardle, L.; Ramsay, L.; Milbourne, D.; Macaulay, M.; Marshall, D. and Waugh, R. (2000). Computational and experimental characterisation of physically clustered simple sequence repeats in plants. *Genetics*, 156: 847-854.
- Cipriani, G.; Lot, G.; Huang, W-G.; Marazzo, MT.; Peterlunger, E. and Testolin, R. (1999). AC/GT and AG/CT microsatellite repeats in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch]: isolation, characterization and cross-species amplification in *Prunus*. *Theor. Appl. Genet* 99:65–72.

- Clarke, J.B and Tobutt, K.R. (2003).Development and characterization of polymorphic microsatellites from *prunus avium* 'Napoleon'. Molecular Ecology Notes.3: 578-580.
- Darius, G. (2005).Transposon Insertion polymorphism as a new source of molecular markers. Journal of Fruit and Ornamental Plant Research. 14: 21-29.
- Dirlewanger, E.; Cosson, P.; Tavaud, M.; Aranzana, M.J.; Poizat, C.; Zanetto, A.; Aru's, P. and Laigret, F.(2002a). Development of microsatellite markers in peach (*prunus persica*L. Batsch) and their use in genetic diversity analysis in peach and sweet cherry (*prunus avium* L.). Theoretical and Applied Genetics.105: 127-138.
- Dirlewanger,E.; Cosson,P.; Tavaud,M.; Poizat,C.; Moing,A.; Zanetto,A.; Aranzana,M.J. and Aru's,P.(2002b).Development of peach SSRs and their use in fingerprinting peach and sweet cherry cultivars.ISHS Acta Horticulturae.592:V International Peach Symposium.
- Dirlewanger, E.; Graziano, E.; Joobeur, T.; Garriag-Caldere, F.; Cosson, P.; Howad, W. and Aru's, P. (2004).Comparative mapping and marker-assisted selection in Rosaceae crops. PNAS.101 (26):9891-9896.
- FAO stat. (2007).Food and Agriculture Organization of the United Nations.Rome.Italy.
- Fideghelli, C.; Della Strada, G.; Grassi, F.; Sartori, A. and Vitellozzi, A. (1999).Il patrimonio genetico della specie *Prunus armeniaca* in Italia. Italus. Hortus. 6: 37-38.
- Flavell, R.B.; Rimpau, J.andSmith, D.B. (1977).Repeated sequence DNA relationshipsin four cereal genomes.Chromosoma.63:205-222.
- Flavell, A.J.; Dunbar, E.; Anderson, R.; Pearce, S.R.; Hartley, R.and Ku-mar, A.(1992).Ty1-copia group retrotransposons are ubiquitous and heterogeneous in higher plants.Nucl.Acids.Res.20:3639-3644.

- Foroni, I.; Bencivenni, M. and Rao, R. (2006). Study of genetic diversity in apricot (*prunus armeniaca*) using simple sequencing repeats. Proceeding of the 50th Italian Society of Agricultural Annual Congress.ISBN.88.

- Gomez, M. P.; Sanchez-Perez, R.; Rubio, M.; Dicenta, F.; Gradziel, T.M. and Sozzi, G.O. (2005). Application of recent biotechnologies to *prunus* tree crop genetic improvement. Cien.Inv.Agr.32 (2):73-96.

- Grzebelus, D. (2006).Transposon insertion polymorphism as a new source of molecular marker. Journal of Fruit and Ornamental Plant Research.14:1-29.

- Guerriero, R.; Moteleone, P.; D'onofrio, C.; Ruiz, C.; Asins, M.J. and Carbonel, E.A. (2006). Characterisation of Italian apricot germplasm by phenotypic and microsatellite markers. ISHS Acta horticulturae.717: XIII International Symposium on Apricot Breeding and Culture .

- Guo, D.; Zhang, H. and Luo, Z. (2005).Genetic relationships of *Diospyros kaki* thumb. and related species revealed by IRAP and REMAP analysis. Plant Science. 170:528-533.

- Gupta, P.K. and Varshney, R.K. (2000).The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis on bread wheat. Euphytica. 113:163-185.

- Hammer, O.; Harper, D.A.T. and Ryan, P.D. (2001). PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis.Palaeontologia Electronica.4 (1):9pp.
http://palaeo-electronica.org/2001/past/issue1_01.htm

- Häkkinen, M.; Teo, C.H. and Othman, Y.R. (2007).Genome constitution for *Musa beccarii* (Musaceae) varieties. Acta Phytotaxonomica Sinica. 45(1):69-74.

- Hirochika, H. (2001).Contribution of the *Tos17* retrotransposon to rice functional genomics.Curr.Op.Plant Biol.4:118-122.
- Hokanson, S.C.; Szewc-McFadden, A.k.; Lamboy, W.F.; McFerson , JR.(1998). Microsatellite (SSR) markers reveal genetic identities, genetic diversity and relationships in a *Malus* × *domestica* Borkh. Core subset collection. Theor. Appl. Genet. 97:671–683.
- Hormaza, J.I. (1998).Early selection in cherry combining RAPDs with embryo culture.Scientia Horticulturae.79:121-126.
- Hormaza, J.I. (2002).Molecular characterization and similarity relationships among apricot (*Prunus armeniaca* L.) genotypes using simple sequence repeats. Theoretical and Applied Genetics.104: 321-328.
- Huang, W.G.; Cipriani, G.; Morgante, M. and Testolin, R. (1998). Microsatellite DNA in *Actinidia chinensis*: isolation, characterization, and homology in related species .Theor .Appl. Genet .97:1269-1278.
- Jaccard, P. (1908).Nouvelles recherches sur la distribution flora. Bull .Sac.Nat.44:223-270.
- Kahl, G. (2001).The Dictionary of Gene Technology. Wiley-VCH.Weinheim.
- Kalendar, R.; Grob, T.; Regina, M.; Suoniemi, A. and Schulman, AH. (1999). IRAP and REMAP: Two new retrotransposon-based DNA fingerprinting techniques. Theor. Appl .Genet. 98: 704-711.
- Karp, A.; Seberg, O. and Buatti, M. (1996).Molecular techniques in the assessment of botanical diversity .Ann.Bot.78:143-149.
- Kimura,T.; Ban,Y.; Yamamoto,T.; Shi, Y.Z.; Kotobuki, K.; Matsta, N. and Hayashi, T.(2002).The Japanese pear genome program I. development of SSR markers and identification of pears. Acta Horticulturae 587:237-241.

- Lightbourn, G. and Veilleux, R. (2002). Retrotransposon based markers to characterize somatic hybrids and assess variation induced by protoplast fusion of monoploid potato. *ISHS Acta Horticulturae*. 619.
- Liu, K.; Muse, S.V. (2005). Power Marker: An integrated analysis environment for genetic marker analysis. *Bioinformatics*. 21(9): 2128.
- Lopes, M.; Sefck, S.M.; Laimer, M. and Camara machado, A. (2002). Identification of Microsatellite loci in apricot. *Molecular Ecology Notes*. 2: 24-26.
- Maghuly, F.; Borroto Fernandez, E.; Laimer, M.; Ruthner, S.; Bisztray, G.D. and Pedryc, A. (2005). Microsatellite characterization of apricot (*prunus armeniaca* L.) cultivars grown in central Europe. *ISHS Acta Horticulturae*. 717: XIII International Symposium on Apricot Breeding and Culture: 207-212.
- Maghuly, F.; Borroto Fernandez, E.; Zegler, R. Marschall, K.; Katinger, H. and Laimer, M. (2008). Genetic differentiation of apricot (*prunus armeniaca* L.) cultivars with SSR markers. *European Journal of Horticultural Science*. 73.
- McClintock, B. (1948). Mutable loci in maize. *Carnegie Inst. Wash. Yearbook*. 47: 155-169.
- Messina, R; Lain, O.; Marrazzo, M.T.; Huang, W-G.; Cipriani, G. and Testolin, R. (2003). Isolation of microsatellites from almond and apricot genomic libraries and testing for their transportability across different prunus species. *ISHS Acta Horticulturae*. 663: XI Eucarpe Symposium of Fruit Breeding & Genetics.
- Messina, R; Lain, O.; Marrazzo, M.T.; Cipriani, G. and Testolin, R. (2004). new set of microsatellite loci isolated in apricot. *Mol. Ecol. Notes*. 4: 432-434.
- Mnejja, M.; Garcia-Mas, J.; Howad, W.; Bandeness, M.L. and Aru's, P. (2003). Simple-sequence repeat (SSR) markers of Japanese plum (*prunus salicina* Lind L.) are highly polymorphic

and transferable to peach and almond. *Molecular Ecology Notes*.4:163-166.

- Mnejja, M.; Garcia-Mas, J.; Howad, W. and Aru's, P. (2005). Development and transportability across *prunus* species of 42 polymorphic almond microsatellites. *Molecular Ecology Notes*.5 (3): 531-535.
- Muhammad, A.J. and Othman, Y. (2005). characterization of fusarium wilt-resistant and fusarium wilt-susceptible somaclones of banana cultivars rastali (*Musa* AAB) by Random Amplified Polymorphic DNA and retrotransposon markers. *Plant Molecular Biology Reporter*.24:1-249.
- Nakatsuka, A.; IWami, N.; Matsumoto, S. Itamura, H. and Yamagishi, M. (2002). Ty1-copia group retrotransposon in persimmon (*Diospyros kaki* Thunb). *Genes. Gent. Syst.*77:131-136.
- Ohta, S.; Katsuki, T.; Tanaka, T.; Hayashi, T.; Soto, Y. and Yamamoto, T. (2005). Genetic variation in flowering cherries (*prunus* subgenus *cerasus*) characterized by SSR markers. *Breeding Science*.55 (4):415-424.
- Orgel, L.E.; and Crick, F.H.C. (1980). Selfish DNA: the ultimate parasite. *Nature*.284:604-607.
- Pedryc, A.; Ruthner, S.Z.; Bisztray, Gy.D. and Laimer, M. (2004). Characterization of different apricot cultivars grown in Hungary with SSR markers. *International Symposium on In vitro Culture and Horticultural Breeding*.725:691-698.
- Pereira, H.S.; Bara'o, A.; Delgado, M.; Morais-cecilio, L. and Viegas, W. (2005). Genome analysis of Grapevine retrotransposon (Gret1) in *Vitis vinifera*. *Theoretical and Applied Genetics*. 111(5):871-878.
- Powell, W.; Morgante, M.; Andre, C.; Hanafey, M.; Vogel, J.; Tingley, S. and Rafalski, A. (1996). The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Mol. Breed.* 2: 225–238.

- Price, Z.; Dumortier, F. and Mayes, S. (2002).Development and application of IRAP (Inter Retrotransposon Amplified Polymorphism) based on copia like retrotransposon in african oil palm (*Elaeis guineensis* JaCQ).
- Price, Z.; Shulman, A.H.and Mayes, S. (2003).Development of new marker methods-an example from oil palm. *Plant Genetics Res.*1:103-113.
- Rajapakse, S. (2003).Progress in application of molecular markers to genetic improvement of horticultural crops. *Acta Horticultural* 625:29-36.
- Regner, F.; Kickenweiz, M.and Hack, R. (2004).Genotyping apricots (*Prunus armeniaca* L.) by SSR markers .*Mitteilungen Klosterneuburg.* 54:33-42.
- Ricciardi, L.; Giorgio, V.; DEGiovanni,C.;Lotti,C.;Gallotta,A.and Fanizza,G.(2002).The genetic of apulian apricot genotypes (*prunus armeniaca* L) assessed using AFLP markers.*Cellular & Molecular Biology Letters.* 7:431-436.
- Romero, C.; Muñoz, V.; Lláce, G. and Badenes, M.L. (2003). Genetic diversity of different apricot geographical groups determined by SSR markers. *Genome* 46: 244–252.
- Ruthner,S.Z.; Pedryc,A.; Kriska,B.; Romero,C. and Badenes,M.L.(2006).Molecular characterization of apricot (*Prunus armeniaca* L.) cultivars using cross species SSR amplification with peach primers. *International Journal of Horticultural Science.*12 (3): 53-57.
- Sanchez-Perez, R.; Ruiz, D.; Dicenta, F.; Egea, J. and Martinez-Gomez, P. (2005a).SSR based genetic diversity assessment among apricot cultivars and breeding lines, and its relationship with agronomic traits. *Acta Horticulturae (ISHS).*717.
- Sanchez-Peres, R.; Ruiz, D.; Dicenta, F.; Egea, J. and Martinez-Gomez, P. (2005b). Application of simple sequence repeat (SSR)

markers in apricot breeding: molecular characterization, protection, and genetic relationships. *Sci. Hort.* 103(3): 305-315.

- SanMinguel, P.; Tikhonov, A.; Jin,Y.K.; Motchoulskaia, N.; Zakharov, D.and Melake-Berhan, A.(1996).Nested retrotransposon in the intergenic regions of the maize genome.*Science*.274:765-768.
- Sosinski, B.; Gannavarapu, M.; Hager, L.D.; Beck, L.E.; King, G.J.; Ryder, C.D.; Rajapakse,S.; Baird, M.V.; Ballard, R.E. and Abbott, A.G.(2000). Characterization of microsatellite markers in peach (*prunus persica*L. Batsch). *Theoretical and Applied Genetics*.101: 421-428.
- Tautz, D.and Rentz, M. (1984). Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eucariotic genomes. *Nature*. 322: 652-656.
- Tautz, D. (1989). Hyper variability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Res*.17:6463-6471.
- Tao,S.;HanBo,Z.;HuaSun,D.;ZongJu,L.;LiZhong,C.;ZhiWei,Z.and YaPing,Z.(2007).Genetic diversity of *Tricholoma matsutake* in Yunnan province. *Chinese Science Bulletin*.52 (9):1212-1216.
- Teo,C.H.; Tan,S.H.; Ho,C.L.; Faridah,Q.Z.; Othman,Y.R.; Heslop-Harrison,J.S.; Kalendar,R. and Schulman,A.H.(2005).Genome constitution and classification using retrotransposon-based markers in the orphan crop banana. *Jouالرناء of Plant Biology*.48 (1):96-105.
- Testolin ,R.; Marrazzo, T.; Cipriani, G.; Quarta, R.; Verde, I.; Dettori, M.T.; Pancaldi, M. and Sansavini, S.(2000). Microsatellite DNA in peach *Prunus persica* L. Batsch and its use in fingerprinting and testing the genetic origin of cultivars. *Genome*. 43: 512–520.
- Testolin,R.; Marrazzo,T. and Cipriani,G.(2002).Cross-species amplification of microsatellite markers isolated from peach by means of heterologous primer pairs .*ISHS*.538.

- Testolin, R.; Messina, R.; Lain, O.; Marrazzo, M.T.; Huang, W-G. and Cipriani, G. (2004). Microsatellites isolated in almond from an AC-repeat enriched library. *Mol.Ecol.Notes*.4: 459-461.
- Tian-Ming, He.; Xue-Sen, C.; Zheng, Xu.; Jiang-Sheng, Gao.; Pei-Jun, Lin.; Wen, Liu.; Qing, Liang and Yan, Wu. (2007). Using SSR markers to determine the population genetic structure of wild apricot (*Prunus armeniaca* L.) in the Ily Valley of West China. *Genetic Resources and Crop Evolution* .54: 563–572.
- Varasano, E.; Porceddu, A.; Lanfaloni, L. and Baldoni, L. (2002). Fingerprinting cherry CVs by a retrotransposon based molecular markers .ISBN.88.
- Vitte, C. and Panaud, O. (2005). LTR retrotransposon and flowering plant genome size: emergence of the increase/decrease model. *Cytogenet Genome Res.* 110:91-107.
- Wang, Y.; Georgi, L.L.; Zhebentyayeva, T.N.; Reighard, G.L.; Scorza, R. and Abbott, A.G. (2002). High-throughput targeted SSR marker development in peach (*prunus persica*). *Genome*.45: 319-328.
- Waugh, R. McLean, K. Flavell, A.J.; Pearce, S.R.; Kumar, A.; Thomas, B.B.T. and Powell, W. (1997). Genetic distribution of Bare-1-like retrtotransposon elements in the barley genome revealed by sequence-specific amplification polymorphisms (S-SAP). *Mol.Gen .Genet.* 253:687-694.
- Wessler, S.R.; Bureau, T.E. and White, S.E. (1995). LTR-retrotransposons and MITEs: important players in the evolution of plant genomes. *Curr.Opin.Genet.Dev.* 5:814-821.
- Wunsch, A. and Hormaza, J.I. (2002). Molecular characterization of sweet cherry (*prunus avium* L.) genotypes using peach (*prunus persica* L. Batsch) SSR sequences. *Heridity*.89 (1):56-63.
- Yamamoto, T.; Mochida, K.; Lmai, T.; Haji, T.; Yaegaki, H.; Yamaguchi, M.; Matsuta, N.; Ogiwara, I. and Hayashi, T. (2003).

Parentage analysis in japanese peaches using SSR markers. *Breeding Science*.53: 35-40.

- Yamamoto, T.; Kimura, T.; Soejima, J.; Sanada, T.; Ban, Y. and Hayashi, T. (2004). Identification of quince varieties using SSR markers developed from pear and apple. *Breeding Science*, vol.54 (3):239-244.
- Yannic, G.; Baumel, A. and Ainouche, M. (2004).Uniformity of the nuclear and chloroplast genomes of *Spartina maritima* (*Poaceae*), a salt-marsch species in decline along the western European coast.*Heredity*.93:182-188.
- Zhang, Q.; Yan, G.; Dai, H.; Zhang, X.; Li, C.and Zhang, Z. (2008). Characterizaion of Tomentosa cherry (*prunus tomentosa* Thunb.) gonotypes using SSR markers and morphological traits. *Scientia Horticulturae*.118: 39-47.
- Zhebentyayeva , T.N.; Reighard, G.L.; Gorina ,V.M. and Abbott, A.G.(2003). Simple sequence repeats (SSR) analysis for assessment of genetic variability in apricot germplasm. *Theor.Appl. Genet.* 106: 435–444.

ABSTRACT

This investigation was carried out in The General Commission of Scientific Agricultural Research, Department of Biotechnology and in Damascus University, Faculty of Agriculture, Department of Horticulture Science. The aim of the study was to determine the genetic relationships among six of apricot cultivars: Shukrbara, Tadmori, Baladi Mawrdi, Baladi Habi, Wzri, Ajami in addition to five genotypes of Alklabi rootstock K1, K2, K3, K4, K5 .Tow PCR-based techniques were utilized in this study namely SSR and IRAP markers.For SSR, 26 primer pairs flanking microsatellite sequences (developed from Peach genomic library) were assayed, and for IRAP 33 primer pairs of the retrotransposon elements(developed from Barley and Banana).

SSR results showed that 22 primer pairs gave high efficiency in revealing the genetic diversity among the studied cultivars and genotypes. The Polymorphism percentage was 92.3% and a total of 78 alleles were detected with a mean value of 3 alleles/locus. The mean value of the expected heterozygosity was 0.48 and the observed

heterozygosity was 0.29. The IRAP results showed that 32 primer pairs gave high efficiency in revealing the genetic diversity among the studied cultivars and genotypes. The Polymorphism percentage was 74.4%.

SSR analysis showed maximum genetic relationship between the two varieties Wzri and Baladi Habi (0.69) and minimum relationship between the two varieties Baladi Mawrdi and Ajami (0.27), with the mean value of genetic relationship of 0.48 among all studied varieties and genotypes. Furthermore, IRAP technique showed maximum genetic relationship between K4 and K5 genotypes (0.78) and minimum relationship between Baladi Mawrdi and Wzri varieties (0.55) with the mean value of genetic relationship of 0.67 among all studied genotypes.

The cluster analysis based on SSR results grouped the studied apricot varieties and genotypes into two main clusters at 0.43 similarity degree with the two varieties Baladi Mawrdi and Ajami separated away independently from both clusters and the genotype Ajami remained distinguished from all studied genotypes. The first cluster contained six varieties distributed to two sub-clusters, first sub-cluster contained two varieties Baladi Habi and Wzri in addition to two genotypes K1 and K3. The second sub-cluster contained the variety Tadmori with the genotype K2, and the second main cluster contained both genotypes K4 and K5 along with variety Shukrbara.

The cluster analysis based on IRAP results grouped the studied apricot varieties and genotypes into two main clusters at 0.67 similarity degree with the genotype K1 and Ajami variety separated away independently from both clusters and the genotype Baladi Mawrdi remained distinguished from all studied genotypes. The first cluster contained six varieties distributed to two sub-clusters, first sub-cluster contained two varieties Baladi Habi and Wzri, meanwhile the second sub-cluster contained the variety Tadmori with the genotype K3 and the variety Shukrbara with the genotype K2 independently, and the second main cluster contained both genotypes K4 and K5. Nine primer pairs in SSR technique could mark some studied varieties and genotypes with 14 unique alleles with the variety Ajami having largest number of unique alleles (5 alleles), meanwhile IRAP technique could distinguish four out of the five Alklabi apricot genotypes and all studied varieties with 35 unique alleles with the variety Baladi Mawrdi having maximum number of unique markers (10 markers).

Both SSR and IRAP techniques confirmed high efficiency in detection of genetic diversity among studied varieties and genotypes and also its distinguishing with unique markers and hence ability of using both techniques in molecular

characterization of apricot and evaluation of gene pools and for accelerating breeding programmes.