مجلة جامعة تشرين للدراسات والبحوث العلمية _ سلسلة العلوم الأساسية المجلد (23) العدد (10) 2001

Tishreen University Journal for Studies and Scientific Research-Basic Science Series Vol (23) No (10) 2001

استخدام تقنية PCR-RAPD في دراسة التباينات الوراثية لمجموعة من الطرز الوراثية من الجرجير Nasturtium .officinale المنتشرة في المنطقة الساحلية.

الدكتور محمد يحيى معلا *

الدكتور عزيزة يوسف**

غالب طيوب***

(قبل للنشر في 1999/6/19)

□ الملخّص □

يشير هذا البحث إلى إمكانية استخدام تقنية التفاعل التسلسلي للبوليمراز / PCR- RAPD / بهدف معرفة التباينات الوراثية من خلال تحديد الهوية الوراثية للطرز المدروسة، حيث استخدم في هذا البحث عدد من البوادئ Primers (8 بوادئ)، وتم حساب معامل التشابه والبعد الوراثي باعتماد طريقة (Nei and Li., 1979) ، فأظهرت نتائج الرحلان الكهربائي Electrophoresis اختلافاً في عملية مكاثرة الـ Amplification DNA تبعاً للبادئ المستخدم، وتبين أن هناك بوادئ لم يكن لها مقاطع متممة في DNA الطرز المدروسة، بينما كان هناك مكاثرة للـ DNA عند القسم الأخر من البوادئ.

وتبين لنا من هذه الدراسة ومن حساب معامل التشابه والبعد الوراثي للطرز المدروسة ومقارنة النتائج مع بعضها البعض أن معامل التشابه بين الطرز المختلفة يتراوح ما بين (0,369 – 0,996) وبالتالي فإن أكبر بعد وراثي كانت قيمته / 0,631 / وأصغر بعد وراثي كانت قيمته 0,004. وإن هناك تدرج في التباينات الوراثية للطرز المدروسة ما بين هذه القيم المحسوبة لمعامل التشابه والبعد الوراثي.

مفاتيح الكلمات:

PCR- RAPD: Polymerase chain reaction Random Amplified polymorphic DNA

Nasturtium officinale. البادئ Primer . التباين الوراثي

*أستاذ في قسم المحاصيل الحقلية – كلية الزراعة–جامعة تشرين –اللاذقية –سورية .

**أستاذ مساعد في كلية الصيدلة–جامعة تشرين–اللاذقية –سورية.

***طالب ماجستير في قسم العلوم الطبيعية –كلية العلوم –جامعة تشرين – اللاذقية –سورية .

مجلة جامعة تشرين للدراسات والبحوث العلمية _ سلسلة العلوم الأساسية المجلد (23) العدد (10) 2001

Tishreen University Journal for Studies and Scientific Research-Basic Science Series Vol (23) No (10) 2001

The use of (PCR- RAPD) technique for studying the genetic diversity among different genotypes of Nasturtium officinale

M.Y.MOUALLA *

A.YOUSSEF**

G.TAYOUB***

(Accepted 19/6/1999)

□ ABSTRACT □

This study indicates the possibility of using PCR -RAPD technique for studying the genetic diversity by identifying the genetic identity of studied genotypes .

Eight operon primers have been used in this study. The genetic similarity and distance coefficients were calculated using (Nei and Li., 1979) procedure. The results of electrophoresis showed variations in DNA amplification according to primers used.

Some primers gave no complimentary fragments to the DNA of studied genotypes whereas other primers gave help for DNA amplifications. The genetic similarity coefficient among studied genotypes was between 0,369 and 0,996, and the largest and smallest genetic coefficients were 0,63 and 0,004 respectively, with gradual values of genetic diversity among studied genotypes for genetic similarity and distance coefficients.

***Professor at Crap Production, Faculty of Agriculture Tishreen University, Lattakia, Syria**

****Associate Professor at Faculty of Pharmacology, Tishreen University, Lattakia, Syria.**

*****Postgraduate Student at Department of Natural Science - Faculty of Science Tishreen University, Lattakia, Syria**

مقدمة:

ينتمي الجرجير Nasturtium officinale R.Br إلى الفصيلة الملفوفية Brassicaceae (الصليبية.Cruciferae) حيث يتميز هذا النبات بنموه في المناطق الرطبة على ضفاف الأنهار والسواقي والينابيع ويعتبره البعض نباتاً مائياً أو محباً للرطوبة كما يتميز هذا النبات بأهمية كبيرة من الناحية الغذائية والطبية، نظراً لاحتواء أوراقه وسوقه على مجموعة من العناصر المعدنية الهامة لاسيما الفوسفور والصوديوم والبوتاسيوم والكالسيوم وعلى العديد من الفيتامينات أهمها VitB6.C (Planchon and al., 1946). وأنزيمة الميروزيناز (المنجد , 1976). لقد أشار كلٌ من (الطبَّاع، 1984) و(العودات ولحام , 1987) إلى الأهمية الطبية لهذا النبات، حيث أصبح يستخدم كمقوٍ ومنبّه للجسم ويستخدم في علاج الروماتيزم ومن قبل مرضى السكري.

وقد أشارت الدراسات (Mouterde, 1946) إلى أن الانتشار الطبيعي لهذا النبات هو في حوض البحر الأبيض المتوسط، ولوحظ أنه ينتشر في مناطق عديدة من سورية وتحديداً في الساحل السوري في محافظتي اللاذقية وطرطوس، إذ توجد تجمعات كبيرة من هذا النبات بالقرب من مجاري الأنهار والينابيع والسواقي.

كان الهدف من هذه الدراسة هو معرفة التنوع الوراثي لهذا النبات في المناطق الساحلية من القطر وذلك باستخدام تقنية التفاعل التسلسلي للبوليمراز (PCR- RAPD)

Polymerase Chain Reaction – Random Amplified Polymorphic DNA

التي تساعد بإظهار التباينات الوراثية بكل دقة بعيداً عن التأثيرات البيئية على نتائج الدراسات المورفولوجية والكيميائية للنبات، وكذلك تحديد الطرز الوراثية التي يمكن أن تستخدم فيما بعد في عملية التحسين الوراثي لهذا النبات.

لقد استخدمت هذه الطريقة بنجاح في تحديد هوية الطرز الوراثية عند عدد من المحاصيل فقد استخدمها (Hu and Quiros ., 1991) في الملفوف، واستخدمتها (شومان وفايكند . 1996) في تحديد البعد الوراثي بين بعض الطرز الوراثية في نبات الشعير واستخدمها (Vierling and al ., 1994) في تحديد مدى القرابة الوراثية بين سلالات منتخبة من نبات الذرة البيضاء السورغمية sorghum وإنشاء شجرة نسب لها. كما طبقها (Javed and Lane., 1995) في تحديد هوية ستة أصناف من نبات الشيلم (Secale cereale) ومدى نقاوتها وراثياً. بينما استخدمها Rogowsky) and al, 1991) لوضع الخرائط الصبغية لهجن من التريتكالي واستخدمها (De vos and Gal., 1992) عند القمح.

كما استخدمها بنجاح: (Lashermes and al., 1993) عند البن و wilkie and al., 1993))عند الثوم، وطبقت هذه الطريقة بنجاح عند دراسة التباينات الوراثية لمجموعة من الطرز الوراثية للشاي (Wachira and al., 1995) .

المواد وطرق الدراسة:

I- المادة النباتية:

استخدمت في الدراسة / 20 / عينة نباتية تمثل / 20 / طرازاً وراثياً من الجرجير Nasturtium officinale مأخوذة من سبع مناطق جغرافية مختلفة، منها أربع مناطق في محافظة اللاذقية هي: القنجرة . أرض الرمانة . السامية . سرجون وثلاث مناطق في محافظة طرطوس هي: القلوع . مرقية . المنطار. حيث أخذت ثلاث عينات من كل منطقة باستثناء منطقة (أرض الرمانة) أخذت عينتين فقط. مستخدمين الأوراق الفتية بمعدل /g 2/ من كل نبات.

II- الطرق المستخدمة:

1- طريقة استخراج الـ DNA:

اتبع في عملية استخلاص الـ DNA طريقة(Doyle and Doyle. 1987)مع أجراء بعض التعديلات. يسحق/ g 2 / من الأوراق الفتية باستخدام الأزوت السائل، ثم يعامل المسحوق الناتج في محلول الاستخلاص .

2% Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide. 1,4 NaCl, 0,1 M Tris
20 m M EDAT, 0,2% B- Mercaptoethanol. PH=8
ويحضن في حمام مائي درجة حرارته / 60 C° / لمدة / 30 / دقيقة مع التحريك الهادئ. تستخرج الأحماض النووية بإضافة حجم مماثل من المزيج (كلورفورم + كحول ايزواميل بنسبة 24: 1) وخلطه بهدوء لمدة / 10 / دقائق ثم يفصل الوسط المائي الذي يحوي الأحماض النووية عن الوسط العضوي بالتثفيل مدة / 20 / دقيقة وبسرعة 4000 دورة/د وبدرجة حرارة 20 C° . تكرر العملية، ثم ترسب الأحماض النووية بإضافة 3/2 حجم من ايزوبروبانول البارد ثم تترك الأحماض النووية لتترسب مدة / 30 / دقيقة بدرجة حرارة (0 C°). تجمع الأحماض النووية كراسب بالتثفيل لمدة / 5 / دقائق بدرجة حرارة (0 C°) بسرعة 10000 دورة في الدقيقة. يغسل الراسب بالكحول الأيتلي (76) مْ ثم يجفف ويذاب في محلول الواقي TE.

TE: 10 m M Tris, 1 m M EDAT. PH=8)
يستبعد الـ RNA بمعاملة الأحماض النووية بأنزيم R-Nase بدرجة حرارة / 25 C° / ولمدة نصف ساعة. قدرت كمية الـ DNA باستخدام جهاز الطيف الضوئي بوجود الأشعة فوق البنفسجية (U.V) عند طول موجة 260 نانومتر. بحيث كل قراءة قدرها / 1 / كثافة ضوئية تعادل كمية / 50 / ميكروغرام DNA في 1 مل من المحلول.

2- التفاعل التسلسلي للبوليمراز والفصل على هلامة الأجاروز:

تمّ تجربة / 18 / بادئاً عشوائياً يتكون كل منهم من عشر نيوكليوتيدات من شركة (Operon Technologies) واختيرت البوادئ التي تسمح بكشف التباينات الوراثية بين الأفراد وتعطي نتائج واضحة وعددها (8) (جدول 1).
تم التفاعل التسلسلي للبوليميراز في أنبوب e ppendrof سعته 500 ميكروليتر في وسط من (30 نانوغرام من الـ DNA في كل تفاعل)، 5 بيكوغرام من البادئ المختار (يعادل /1/ ميكروليتر)، 100 ميكرومول من كل من النيوكليوتيدات الأربعة d CTP و d ATP و d TTp و d GTP تعادل 3 ميكروليتر من كل منها)، 0.5 وحدة أنزيمية من أنزيم التكثيف Taq DNA Polymerase . (Williams et al., 1990 ,2,5) ميكروليتر من المحلول الواقي الخاص بأنزيم التكثيف Taq Polymerase
(10 mM Tris-HCl PH= 8 , 50 mM KCl , 2 mM Mg Cl2)
وأكمل الحجم إلى 25 ميكروليتر بالماء المقطر المعقم.
تمت عملية المكاثرة (Amplification) في الجهاز المخصص، وصمم البرنامج المناسب للمادة النباتية المستخدمة فكان 40 دورة. قبل بداية الدورة الأولى يعرض الـ DNA إلى حرارة / 94 C° / مدة /4/ دقائق بهدف فصل سلسلتي الـ DNA عن بعضها البعض وتحويله إلى DNA وحيد السلسلة ثم تبدأ دورات البرنامج التي تقسم إلى ثلاث مراحل هي:

1- /30/ ثانية على درجة حرارة /94 C°/.
2- /1/ دقيقة على درجة حرارة /36 C°/.
3- /2/ دقيقة على درجة حرارة /72 C°/.

وتترك العينات بعد الدورة الأربعين لمدة /5/ دقائق في درجة /72 C°/.
بعد خروجها من جهاز الـ PCR يضاف لكل عينة 10% من حجمها محلول التحميل Loading buffer.

Loading buffer: Bromophenol blue, 50% Glycerol, 60 m M EDAT PH=8

تفصل المكونات الناتجة عن التفاعل على هلامة ذات تركيز (1%) أجاروز بعملية الرحلان الكهربائي Electrophoresis ثم تلون الهلامة مدة نصف ساعة في مادة بروميد الأيتديوم (Et br) تركيزه / 0.5 / ملغ /مل ثم

تصور بوجود الأشعة فوق البنفسجية .

جدول (1)يبين البوادئ المختارة من أجل مكاثرة ال DNAوالقواعد النيوكليوتيدية المؤلفة لها

الرقم	البوادئ cade	التركيب الينوكليويتدي
1	OPB-10	CTGC TGGGAC
2	OPC-04	CCGCATCTAC
3	OPA-03	AGTCAGCCAC
4	OPA-02	TGCCGAGCTG
5	OPA-07	GAAACGGGTG
6	OPA-06	GGTCCCTGAC
7	OPA-04	AATCGGGCTG
8	OPK-01	CATTCGAGCC

النتائج والمناقشة:

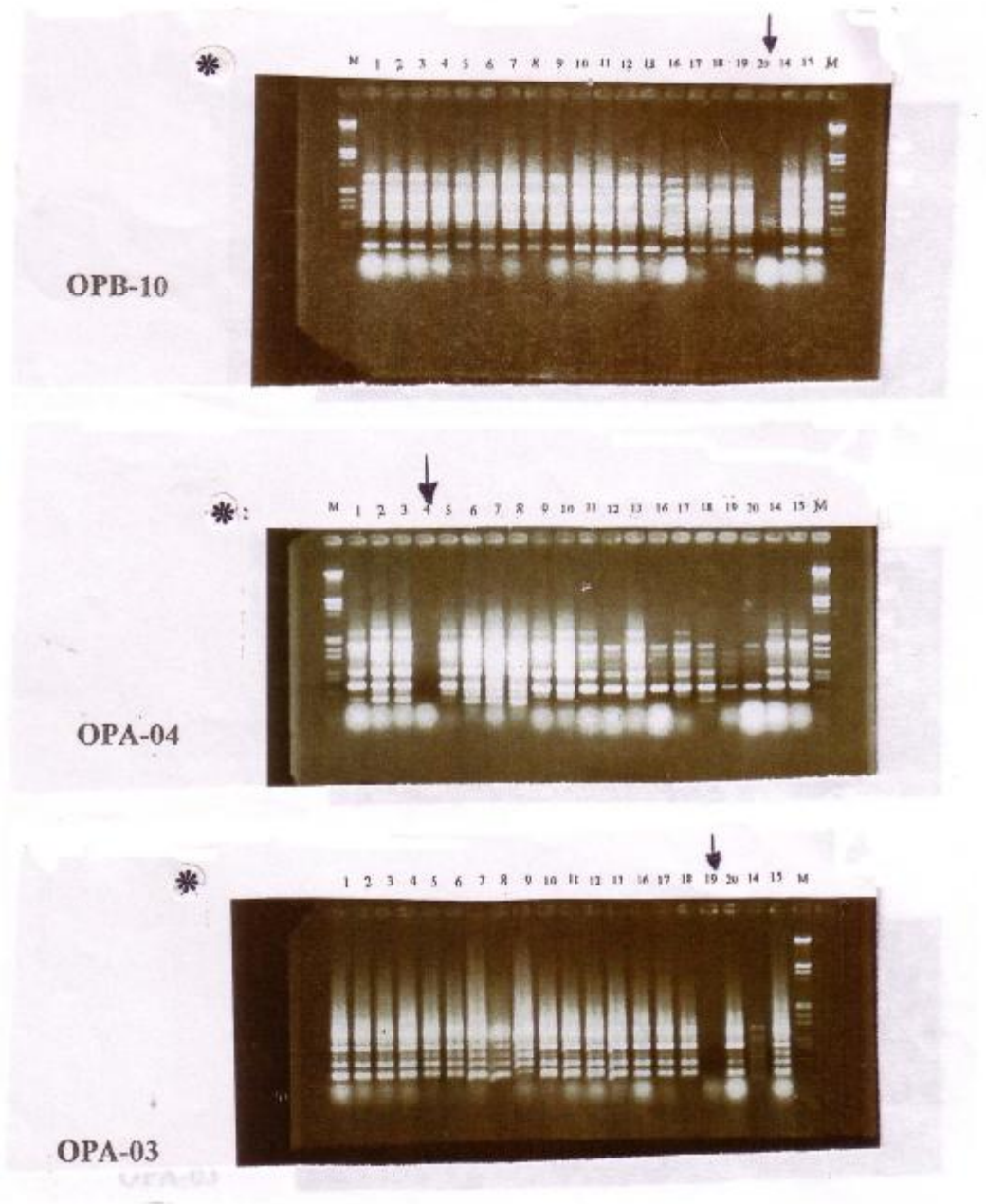
أظهرت نتائج الرحلان الكهربائي اختلافاً في نواتج عملية مكاثرة الـ /DNA/ /amplification/ تبعاً للبادئ المستخدم وعلى هذا الأساس قسمت البوادئ المستخدمة إلى مجموعتين:

I- بوادئ لم تظهر أية مكاثرة Non-amplification: وهي OPK-01 أي لم يكن لها مقاطع متممة في DNA وبالتالي لم تحدث عملية مكاثرة للـ DNA رغم وضعها في وسط التفاعل لذلك عند ترحيل العينات على الهلامة ثم تلوينها وتصويرها، كانت الصورة خالية من أي أثر للـ DNA (جدول رقم 2) كذلك البادئ OPA-04 في العينة رقم /4/ والبادئ OPB-10 في العينة رقم /20/، والبادئ OPA-03 في العينة رقم /19/ في الشكل /1/.

ب- بوادئ سمحت لعملية المكاثرة amplification بالحدوث حيث ظهر لها مقاطع متممة من DNA الطرز المدروسة وكشفت عن تباينات وراثية بين الطرز المدروسة (جدول 2) شكل (1).

جدول (2) يبين عدد قطع ال DNA التي أعطاها كل بادئ

رقم البادئ	اسم البادئ	عدد قطع الـ DNA
1	OPB-10	9
2	OPA-04	9
3	OPA-03	7
4	OPA-02	7
5	OPA-07	8
6	OPA-06	8
7	OPC-04	8
8	OPK-01	-
المجموع	8	56



شكل (1) يبين البوادئ التي أعطت مكاثرة لقطع الـ DNA ويظهر وجود تباينات وراثيةعندبعض الطرز

*: -M مؤشر لمعرفة الوزن الجزيئي للـ DNA

. تمثل الأرقام من (1 - 20) العينات المأخوذة من المناطق المختلفة، موزعة على النحو التالي:

- 1 ، 2 ، 3 = منطقة القلوع
- 4 ، 5 ، 6 = منطقة السامية
- 7 ، 8 ، 9 ، = منطقة المنطار
- 10 ، 11 ، 12 = منطقة سرجون
- 13 ، 14 = منطقة أرض الرمانة
- 15، 16، 17 = منطقة مرقية
- 18 ، 19 ، 20 = منطقة القنجرة.

¬ : تمثل الأرقام 4 ، 20 ، 19 الطرز التي لم تظهر أية مكاثرة مع البوادئ المستخدمة بحيث أن:

. الرقم (4) = عينة مأخوذة من منطقة السامية

(20) = عينة مأخوذة من منطقة القنجرة

(19) = عينة مأخوذة من منطقة القنجرة

اعتبر في كافة الطرز المدروسة وجود أو غياب هذه القطع هو الأساس في إنشاء الجداول الأساسية التي تستخدم في حساب معامل التشابه والبعد الوراثي بين الطرز المختلفة وذلك تبعاً لطريقة (Nei and Li., 1979)

حيث أن:

معامل التشابه: = 2 × عدد قطع الـ DNA المشتركة ما بين الطرازين المقارنين / العدد الكلي لقطع DNA الطراز الأول + العدد الكلي لقطع DNA الطراز الثاني.

معامل البعد الوراثي = 1− معامل التشابه

ويوضح الجدول (3) قيم معامل التشابه بين العينات المقارنة في مختلف المناطق المدروسة.

تبين لنا من خلال حساب معامل التشابه والبعد الوراثي للطرز الوراثية ومقارنة النتائج مع بعضها البعض، أن معامل التشابه بين الطرز المختلفة يتراوح ما بين (0,359 - 0,995) المقابل على التتالي للطرز (11 – 14: سرجون . أرض الرمانة) و (14 – 15: أرض الرمانة . مرقية). أي أن أكبر بعد وراثي كان ما بين الطرازين (11 – 14) وقيمته 0,631 وهي أكبر قيمة محسوبة وتدل على أن هذين الطرازين يتمتعان بأكبر قدر من البعد الوراثي وإنهما متباعدين وراثياً عن بعضها. بينما البعد الوراثي ما بين الطرازين (14 – 15) كان 0,004 وهي أصغر قيمة محسوبة مما يدل على أن هذين الطرازين يتمتعان بأكبر قدر من التشابه الوارثي، وهذا يعني أنها أقرب طرازين وراثيين إلى بعضهما.

تعتبر دراستنا هذه الأولى التي تم إنجازها باستخدام تقنية PCR-RAPD على الجرجير N.officinale والتي حصلنا من خلالها على نتائج تظهر تباينات وراثية في المناطق المدروسة التابعة للمحافظتين (باستثناء البادئ OPK-01) من خلال مكاثرة الحمض النووي DNA، حيث لوحظ أن بعض البوادئ أعطت / 9 / قطع من الـ DNA ، بينما بوادئ أخرى لم تعطي أية مكاثرة (جدول رقم 2) وهذه النتائج تتطابق مع نتائج حصل عليها باحثون آخرون في دراسة التباينات الوراثية عند نباتات أخرى (Hu and Quiros ., 1991)عند الملفوف، (Koller and al., 1993) عند التفاح. (طنطاوي ، فرنانديز . 1998) عند دراسة التغيرات الوراثية للفطر المسبب لمرض البيوض على نخيل التمر، (العطية ،1996) عند الشعير.

جدول (3) يبين قيم معامل التشابه

	قلوع			السامية			المنطار			سرجون			أرض الرمانة		مرقية			قنجرة		
	طرطوس			اللاذقية			طرطوس			اللاذقية			اللاذقية		طرطوس			اللاذقية		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1		0,894	0,901	0,779	0,818	0,835	0,857	0,869	0,882	0,898	0,878	0,811	0,843	0,695	0,828	0,754	0,903	0,729	0,445	0,690
2			0,884	0,707	0,686	0,805	0,842	0,88	0,837	0,853	0,805	0,773	0,742	0,773	0,789	0,686	0,735	0,8	0,524	0,89
3				0,733	0,835	0,823	0,873	0,861	0,869	0,861	0,805	0,657	0,769	0,771	0,816	0,677	0,73	0,746	0,607	0,571
4					0,615	0,714	0,779	0,793	0,771	0,794	0,8	0,793	0,66	0,529	0,745	0,68	0,745	0,745	0,59	0,59
5						0,739	0,909	0,773	0,875	0,83	0,666	0,708	0,628	0,707	0,787	0,626	0,758	0,8	0,426	0,627
6							0,855	0,878	0,923	0,923	0,878	0,848	0,688	0,666	0,835	0,793	0,779	0,788	0,653	0,465
7								0,666	0,676	0,898	0,848	0,84	0,695	0,695	0,827	0,666	0,774	0,81	0,581	0,69
8									0,895	0,882	0,861	0,823	0,761	0,676	0,869	0,733	0,819	0,739	0,555	0,629
9										0,925	0,875	0,865	0,806	0,716	0,852	0,779	0,833	0,638	0,603	0,641
10											0,923	0,852	0,793	0,686	0,898	0,766	0,819	0,739	0,629	0,629
11												0,892	0,8	0,369	0,909	0,842	0,586	0,771	0,627	0,666
12													0,761	0,703	0,869	0,8	0,754	0,849	0,666	0,629
13														0,73	0,718	0,763	0,75	0,705	0,612	0,612
14															0,996	0,666	0,794	0,794	0,518	0,481
15																0,754	0,756	0,756	0,756	0,581
16																	0,754	0,909	0,608	0,695
17																		0,695	0,553	0,86
18																			0.61	0.61
19																				0,61

يمكن الإشارة إلى أن حساب معامل التشابه والبعد الوراثي بين طرز المناطق المختلفة يساعد في الكشف عن المخزون الوراثي لهذه النباتات ودرجة التباينات الوراثية فيما بينها فتسهم بشكل أفضل في عمليات التحسين الوراثي حيث تسهل على مربي النبات انطلاقاً من هذه المعطيات الوراثية التي تُظهر درجة التشابه أو التباين بين الأفراد التابعة للمنطقة الواحدة أو المناطق المختلفة، الاختيار الأفضل للتهجينات والأكثر فائدة وأهمية. وبالتالي تسهم تقنية الـ PCR-RAPD في التحسين النوعي لبرامج تربية النبات وإكثار أو إنتاج البذار واختباراتها (Mcdonald and al., 1994)

تعتبر هذه الدراسة مبدئية نظراً لأن عدد البوادئ المستخدمة فيها لم تكن كافية لتحديد البعد الوراثي الحقيقي ما بين الطرز لأن استخدام عدد أكبر من البوادئ يسمح لنا بكشف أدق للتباينات الوراثية الموجودة بين الطرز .

انطلاقاً من ذلك تعتبر معرفة هذه التباينات الوراثية باستخدام تقنية الـ PCR-RAPD مكملة للدراسات الأخرى (المواصفات المورفولوجية، الفينولوجية . الكيميائية) التي أجريت على نبات الجرجير لدراسة التباينات الوراثية بين الطرز في المناطق المختلفة وتأثير العامل البيئي عليها (هذه الدراسة التحليلية للمواصفات المورفولوجية ... المذكورة سيتم نشرها لاحقاً.

لقد تم إجراء هذه الدراسة في المركز الدولي للبحوث الزراعية في المناطق الجافة (الايكاردا . ICARDA) مخبر التقنيات الحيوية .

المراجع الأجنبية:

.....

1- DE vos, K.M. and GALE ,M.D. (1992). The use of random amplified polymorphic DNA markers in Wheat. Theor. Appl. Genet. 84:567-572

2- DOYLE. J.J and DOYLE J.L. (1987) A rapide DNA isolation procedure for small quantities of Fresh leaf tissue. Phytochmical bulletin 19: 11-15

3- HU J. and QUIROS C.F (1991). Identification of broccoli and cauliflower cultivars with RAPD markers. Plant Cell. Rep. 10,505-511.

4- JAVED IQBAL M. and LANE RAYBURN A. (1995) DNA polymorphism revealed by RAPD analysis among rye (secale cereale L.) cultivars.
Department of Agronomy, 320 PABL, 1201W. Gregory Ave, University of Illinois at Urbana-Champaign, Urbana, IL 61801 (USA), Submitted.

5- KOLLER, B. A. Lehmann, J.M.McDermott and.GERMOTT ,C. and GESSLER ,C.
(1993). Identification of apple cultivars using RAPD markers.
Theor. Appl. Genet. 85, 901-904.

6ALSHERMES Ph., J CROS, Ph .MARNEY and CHARRIER. A (1993) Use of random amplified polymorphic DNA markers to analyse genetic variability and relationships of Coffea species. Crop Evol Genet Res 40, 91-99.

7- Mchonald ,M. B., ELLIOT LORI J. and SWEENEY ,P. M. (1994).
DNA extraction from dry seeds for RAPD analyses in varietal identification stedies. Seed Sci. & Technol., 22: 171-176.

8-MOUTERDE P.S.J. (1946) Nouvelle flore du liban et de le syrie. Tome II . dar. el. machreq editeurs.p. 1161

9- NEI M and LI W. (1979) Mathematical model for studing genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proc. Nalt Acad. Sci. USA 76:5269-5273.

10- PLANCHON, L. and BRETIN ,Ph .and MANCEAU,P. (1946). Precis de matiere medicale paris. P-727

11- ROGOWSKY, M.P.S WEINING, K.W Shepherd and LANGRIDE, P.(1991). RFLP Mapping of wheat Rye Recombinants and the use of P.C.R in cereal Mapping. In proc. of the 2.nd puplic. Workshop of the Inter. Triticeare Mapping Initiative, 27-29 sep 1991. Manhaattan Kansas.

12- VIERLING, R.A., XIANG,Z., JOSHI, C.P., GILBERT, M.L. and NGUYEN, H.T. (1994). Genetic diversity among elite Sorghum Lines revealed by restriction fragment length polymorphisms and random amplified polymorbhic DNAs. (T.A.G.). 87: 816-820.

13- WACHIRA ,F.N., R.W.Augh, C.A and POWELL,W. (1995) Detecction of genetic diversity in tea (Camellia snensis) using RAPD markers. Genome, 38,201-210.

14- WILLIAMS, J.G.K., AR. KUBELIK, J.L. KENNETH, RAFALSKIi and TINGV, S.V.

(1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic. markers. Nuc. Ac. Res., 18, 6522-6531.
15- WILKIE, S.E., ISAAC,P.G and STATER, R.J. (1993) Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for genetic analysis in Allium. Theor. Appl. Genet. 86, 497-504.

المراجع العربية :

.....

1- الطبّاع، أيمن عزت . 1984 . المشرد إلى طبابة الأعشاب . دار النهضة العربية . دمشق. 528 صفحة.
2- العودات، محمد . لحام ، جورج . 1987 . النباتات الطبية استعمالاتها . دار الأهالي . دمشق. 412.
3- . العطية، عزيزة . 1996 . استخدام تقنية الـ PCR- RAPD في تقدير البعد الوراثي بين ستة طرز وراثية من نبات الشعير مشروع تخرج من مستلزمات الحصول على درجة الدبلوم في الهندسة الزراعية كلية الزراعة جامعة حلب.
4- المنجد، حسان . 1976 . العقاقير وتركيبها الكيميائي. مديرية الكتب والمطبوعات الجامعية . كلية الصيدلة . جامعة دمشق 579 صفحة.
5- شومان، وفاء- فايكند، فرانز . 1996 . تقدير البعد الوراثي بين بعض الطرز الوراثية في الشعير باستخدام التفاعل التسلسلي للبوليميراز والرفلب . أسبوع العلم السادس والثلاثين.
6 – طنطاوي، عبد العزيز . فرنانديز، ديانا . 1998 . التشخيص المبكر ودراسة التغيرات الوراثية للفطر المسبب لمرض البيوض على نخيل التمر إصدارات الندوة العلمية لبحوث النخيل /المغرب/.