دراسة توصيفية شكلية - جزيئية لطرز التوت الشامي (Morus nigra L.) في موقع الكوم من محافظة القنيطرة

م.علاء عبود* أ.د. فيصل حامد د. فهد البيسكي*****

الملخص

نفذت هذه الدراسة في موقع الكوم (محافظة القنيطرة). خلال موسمي النمو (2018/2017) و(2019/2018). تضمنت هذه الدراسة مقارنة 28 مؤشراً شكلياً لـ /9/ طرز مظهرية من التوت الشامي (الأسود) المزروعة، بهدف دراسة المواصفات الشكلية لهذه الطرز.

أظهرت النتائج اختلافاً بين طرز التوت الشامي المحلية (المزروعة) فيما يتعلق بالصفات الشكلية والزراعية. حيث بلغ متوسط قيم عدم التوافق (PDV) للموقع المدروس 0.16، باستخدام متوسطات المجموعات الزوجية غير المزانة (UPGMA). وللدراسة الجزيئية استُخدمت تقنية تكراريات التسلسل البسيط البينية ISSR لهذه الطرز مع (10) مرئسات. أظهرت الدراسة الجزيئية اختلافات وراثية بين الطرز المدروسة حيث كان متوسط قيم عدم التوافق (PDV) 0.60. أظهرت النتائج بشكلٍ عام عدم وجود ارتباط معنوي بين النتائج الشكلية والجزيئية (r=0.30). وقد أظهرت النتائج أيضاً كفاءة تقنية ISSR في تحديد درجة التباين الوراثي والتمييز بين الطرز المدروسة، وبالتالي إمكانية استخدام هذه الطرز في برامج التحسين الوراثي للتوت.

الكلمات المفتاحية: التوت الأسود (الشامي)، .Morus nigra L، التعددية الشكلية، ISSR، التنوع الوراثي.

* طالب دكتوراه
** أستاذ، قسم علوم البستنة، كلية الهندسة الزراعية، جامعة دمشق، سورية.
*** باحث، قسم التقانات الحيوية، الهيئة العامة للتقانات الحيوية، سورية.

Morphological-Molecular Descriptive Study of Berries Shami (Morus nigra L.) Tree in Al-Koum site (Al-Qunetira) - Syria.

A. Aboud[*] F. Hamed[**] F. Albiski[***]

Abstract

This study was carried out in Al-Koum site (Al-Quneitra), during the (2017/2018) and (2018/2019) grown seasons. This study involved comparison of 28 morphological characteristics of 9 cultivated berries Shami phenotypes, in order to study morphological characteristics of these phenotypes.

Results showed a clear variation among the studied local berries Shami phenotypes (cultivated) regarding the morpho-agronomical characteristics. The average percent disagreement values (PDV) of the studied site was recorded to be 0.16 using Unweighted Pair Group Mean Arithmetic average (UPGMA). For molecular study, Inter Simple Sequence Repeats (ISSR) technique has been used with 10 primers. Molecular study revealed genetic variations among the studied phenotypes with a mean PDV average of 0.60. In general, results showed no significant correlation between morphological and the molecular data (r=0.30). Also, results showed ISSR efficacy for genetic variation determination and discrimination among the studied phenotypes, thereby, possibility of using these phenotypes in berry genetic improvement programs.

KEYWORDS: berries Shami, ISSRs, Morus nigra L., Genetic diversity, Polymorphism.

[*].PhD. Student

.[**] Professor, Dept., of Horticulture, Faculty of Agriculture, Damascus University, Syria

.[***] Main Researcher at the Department of Biotechnology, (GCB), Syria

المقدمة:

تعد شجرة التوت الشامي (الأسود) Morus nigra L. ذات أهمية اقتصادية وغذائية وطبية عالية. ما يجعلها من أهم الأنواع المستخدمة في الصناعات الدوائية والغذائية والصناعية (Singhal وزملاؤه، 2010). كما أنها تعدُّ واحدة من أهم الأشجار المثمرة في سورية.

ينتمي التوت الشامي Black mulberry إلى رتبة Urticalis، والعائلة التوتية Moraceae وللجنس Morus. وتضم العائلة التوتية نحو 70 جنساً وأكثر من 1000 نوعاً تنتشر في المناطق المدارية وشبه المدارية، ويوجد منها في المناطق المعتدلة 4 أجناس أهمها الجنس Morus spp. والذي ينتمي إليه أكثر من 24 نوعاً (Orhan و Ercisli، 2010؛ داؤود، 1979). ومن أهمها التوت الأبيض Morus alba L. (White mulberry)، والتوت الأحمر Morus rubra L. (Red mulberry)، والتوت الأسود Morus nigra L. (Black mulberry).

يعتقد Chandler (1958) بأن نشأة التوت من الصين، وقد ذكر Roger (1998) أن الموطن الأصلي لانتشار نوع التوت الشامي M. nigra هو شمالي إيران، وتركيا، وسورية، وشبه جزيرة العرب، وجنوب الجزء الأسيوي لروسيا. وعلاوة على ذلك يزرع في أوروبا والولايات المتحدة الأمريكية واستراليا والهند.

يعدُّ التوصيف الشكلي (المورفولوجي) أحد الدعامات الأساسية التي اعتُمد عليها لتعريف الطرز وتمييزها، إذ تم وضع معايير عالمية لتوصيف الطرز الوراثية (Smith، 1997).

قامت منظمة الأغذية والزراعة التابعة للأمم المتحدة الفاو(FAO) بوضع مفتاح توصيفي لأشجار التوت الأسود Morus nigra L. بالتحديد (Rao، 2002)،

إذ قامت بوضع استمارة شاملة لتوصيف هذا النوع، يضم قراءات متُعددة تُؤخذ منذ البدء كوصف للبيئة والموقع الذي ستتم فيه الدراسة، وموعد نضج الثمار، ووصف للنبات وطبيعة الأزهار وشكلها، وتوصيف للثمار من حيث اللون والطعم والشكل والحجم، وتحديد النورات المؤنثة والمذكرة، وتفتح البراعم الخضرية والثمرية، والنسبة المئوية للعقد، إضافةً للعديد من الصفات المخبرية والحقلية الأخرى. كما وتعد تحديد درجة القرابة الوراثية بين أنواع وطرز التوت من الدراسات المهمة، وذلك للمحافظة على الأصول الوراثية لأشجار التوت بأنواعه (Srivastava وزملاؤه، 2004).

أجرى Jolly وزملاؤه (1986) دراسةً على طبيعة الإزهار في 124 مدخلاً تنتمي إلى 9 أنواع تابعة للجنس Morus من مناطق جغرافية مختلفة، وأظهرت النتائج أن 75 مدخلاً ثنائي المسكن، و44 مدخلاً وحيد المسكن، و5 مدخلات غير مزهرة، ومن بين المدخلات ثنائية المسكن: 17 مدخلاً مذكراً (13.7%) و58 مدخلاً مؤنثاً (46.7%)، أما المدخلات وحيدة المسكن فتحمل مزيجاً من الأزهار المؤنثة والمذكرة.

كما درس Tikader وزملاؤه (1995) التركيب الجنسي للأزهار في 301 طرازاً من التوت تم جمعها من مناطق جغرافية مختلفة مزروعة في مركز البحوث الزراعية في ولاية البنغال بالهند، وأظهرت النتائج أن 49 منها كانت (16%) مذكرة، و 161 (53%) مؤنثة، و52 (17%) وحيدة المسكن، و39 (13%) خنثى.

قام Koyuncu (2004) بدراسة شكلية لـ 153 طرازاً من التوت الأسود M. nigra من 6 مواقع بالاعتماد على الصفات الشكلية والكيميائية والصفات النوعية للثمار لانتخاب أفضل الطرز وإدخالها في برامج التربية والتحسين الوراثي.

ودرس Banerjee وزملاؤه (2007) التنوع الوراثي باستخدام مؤشرات مورفولوجية لـ 25 طرازاً تابعاً لأربعة أنواع من التوت، مزروعة في ظروف بيئية

مختلفة بالاعتماد على 14 صفةً شكليةً، حيث أظهر التحليل العنقودي وجود اختلافات كبيرة بين الطرز التي توزعت على 7 مجموعات متباينة، مما أكد إمكانية استخدام التوصيف الشكلي لإظهار التباين الوراثي وإمكانية استخدام النتائج في التحسين الوراثي للتوت.

أشار Boubya وزملاؤه (2009) في دراستهم على 23 صنفاً من التوت الأبيض والأسود والأحمر في تونس، إلى أن التوت من الأشجار المهددة بالانقراض وتقتصر زراعته على بعض البساتين في المناطق الساحلية. فقاموا بدراسة شكلية لهذه الأصناف بالاعتماد على شكل الأوراق ومساحتها، ودرجة تفصيصها، ووجود الزغب، وأظهرت الدراسة وجود تباين واضح بين أصناف التوت المدروسة.

ودرس Bootprom وزملاؤه (2014) التباين الوراثي لـ 21 طراز من التوت في تايلاند بالاعتماد على بعض الصفات الشكلية والكيميائية لثمار التوت في مواقع مختلفة، وقد أظهرت نتائج التحليل العنقودي توزّع الطرز المدروسة على 6 مجموعات متباينة، ويعد هذا التباين الأساس لعمليات التربية والتهجين للتوت مستقبلاً.

كما قيّم Peris وزملاؤه (2014) التباين الوراثي بين خمسة طرز للتوت، ثلاثة منها تنتمي للتوت الأبيض M. alba واثنان للتوت الهندي M. indica، وذلك بالاعتماد على المؤشرات الشكلية للأوراق (الطول، العرض، طول العنق، ثخانة العنق، شكل حافة الورقة، شكل قمة الورقة، المسافة بين العقد) وقد أظهرت النتائج وجود تباين وراثي واضح بين الطرز المدروسة.

كما قام Camphell (2014) بدراسة التباينات الشكلية بين ثلاثة أنواع من التوت (الأبيض والأحمر والأسود) نظراً للخلط الشائع بين هذه الأنواع، إذ تعد صفة وجود الزغب على السطح السفلي للأوراق من أكثر الصفات أهميةً للتمييز بينهما،

فالتوت الأحمر M. rubra يملك زغباً كثيفاً قائماً، بينما يملك الأبيض M. alba زغباً قصيراً متناثراً، وعليه تم وضع بعض الصفات الشكلية للتمييز بين هذه الأنواع الثلاثة.

تواجه النظم البيئية التي تنتشر فيها الأشجار المثمرة البرية والمزروعة ومن ضمنها التوت الشامي تدهوراً سريعاً في تنوعها الأحيائي، وتراجعاً في المساحات المزروعة، وتعدُّ درجة تدهوره كبيرةً (النابلسي، 2004)، وبالرغم من وجود عدد من الدراسات في بلاد الهند والصين وبعض دول البحر الأبيض المتوسط، إلا أن مثل هذه الدراسات في سورية بشكل عام ما تزال قليلةً جداً ونادرة وغير كافية، وفي هذا الإطار تحتل دراسة التنوع الحيوي لطرز التوت الشامي ركناً أساسياً، إذ تشكل قاعدةً مهمةً في حفظ المصادر الوراثية من جهة، ونقطة البدء في برامج التحسين الوراثي من جهة أخرى، حيث يشكل التوصيف الشكلي وتفسير العلاقات الوراثية بين الطرز الموجودة في أي مجتمع نباتي صلة الوصل المهمة في حفظ الأصول الوراثية والاستخدام الأمثل لها. ومن هنا يبرز دور المؤشرات الشكلية كضرورة ملحة لتحديد وتوصيف طرز التوت الشامي.

تُعد طرائق توصيف وتصنيف الأنواع النباتية اعتماداً على الصفات الشكلية والإنتاجية من الطرائق الشائعة والمستخدمة بشكل واسع، ولكن العديد من هذه الصفات غالباً ما تتأثر بالظروف البيئية السائدة مما قد يعطي نتائج مختلفة يصعب الاعتماد عليها في تمييز التباينات (Claros وزملاؤه، 2000; Wjhani، 2004)، كما أنها أيضاً تتطلب وقتاً وجهداً كبيرين. لذلك كان لا بد من دعمها بطرائق التقانات الحيوية الحديثة، ومن أهمها تقانات المؤشرات الجزيئية التي تتميز بدقتها في التمييز وسرعتها، كما أنها تتطلب كمية قليلة من الحمض الريبي النووي منقوص الأكسجين DNA (Ricciardi وزملاؤه، 2002). وتعتمد هذه التقانات في أساسها

على دراسة المؤشرات الجزيئية للـ DNA، والتي تتميز بكثرة عددها وعدم تأثرها بالظروف البيئية، والتي يمكن استخدامها في تحديد التنوع الوراثي وتقدير التشابه الوراثي (Eleuch وزملاؤه، 2008). كما تعد المؤشرات الجزيئية Molecular markers ذات أهمية قصوى على صعيد تربية النبات، بفعل عدة عوامل منها: إمكانية تحديد موقع وراثي مطلوب لطراز وراثي معين مباشرة، وعدم وجود أي علاقة بين الأطوار الفينولوجية للنبات والمؤشرات الجزيئية وعدم تأثّر هذه المؤشرات بالمؤثرات البيئية كما هو الحال في المؤشرات الشكلية، والحصول على عدد كبير من المؤشرات بزمن قصير نسبياً، إضافة إلى أنها تعد مؤشرات مساعدة في تسريع عمليات الانتخاب والتربية. وهي بذلك تختصر الزمن الذي تستغرقه عمليات التربية، إضافة إلى خفضها للتكاليف المادية (سيد، 2001). إن استخدام تقانات المؤشرات الجزيئية في برامج التربية، يقلّل من تعقيدات إدخال عدد من الصفات المرغوبة في الطراز الوراثي (Qi وزملاؤه، 1996). تعتمد معظم تقانات المؤشرات الجزيئية على التفاعل التسلسلي البوليميرازي (PCR Polymerase Chain Reaction)، حيث يتم تضخيم قطعة محددة من الـ DNA باستخدام مرئسات محددة (Weising وزملاؤه،1995)

أدى تطور التقانات الحيوية الجزيئية إلى ظهور عدد كبير من المؤشرات الجزيئية الهامة التي تسمح بتوصيف الكائنات الحية، والتمييز حتى بين الوحدات التصنيفية الصغيرة، ومن أكثر التقانات المستخدمة حالياً في دراسة التباين الوراثي في النبات:

1. تقانة التعددية الشكلية لمعلمات الـ DNA المضخمة عشوائياً RAPD (DNA Randoly Amplified Polymorphic) (Williams وزملاؤه، 1990).

2. تقانة تباين أطوال قطع الدنا المضخمة AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) (Zabeau and Vos، 1993).
3. تقانة التكرارات التسلسل البسيطة SSR (Simple Sequence Repeat or Microsatellite) (Tautz,1989).
4. تقانة تكراريات التسلسل البسيط البينية ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) (Zietkiewicz وزملاؤه، 1994) وجدت تقانة ISSR منذ عام 1994، تعتمد على تكرارات التسلسلات البسيطة الداخلية، وتعطي مستويات عالية من التعددية الشكلية للـ DNA. وتستخدم هذه التقانة كمؤشر جزيئي في دراسات البنية الوراثية والتنوع الوراثي (Fu- Rong وزملاؤه، 2007). تعتمد تقانة ISSR على تضخيم المواقع بين التوابع الدقيقة المتقاربة والمتوضعة بشكل متعاكس (Zietkiewicz وزملاؤه، 1994)، وذلك باستخدام مرئسات وحيدة طولها 16–18bp (Nagaraju وزملاؤه، 2002; Bornet وزملاؤه، 2002).

إن الفائدة الرئيسية لهذه التقانة هي أنها لا تتطلب وقتاً طويلاً لبناء المكتبة الوراثية، وهي مؤشرات ذات طبيعة عشوائية، فهي مناسبة بشكل خاص لدراسات علم الوراثة العرقي وتقييم التنوع الوراثي وتحديد الأصناف (Korbin وزملاؤه، 2002; Raina وزملاؤه، 2001)، وإن بساطة مؤشرات ISSR تزيد من إمكانية استخدامها في الوسم الجينومي (Ammiraju وزملاؤه، 2001)، كذلك لكون مؤشرات ISSR غزيرة فإنها تعطي عدداً كبيراً من الحزم، ومستوى من التعددية الشكلية مرتفع أو متوسط، كما أن الجهد والتكلفة اللازمتان لتنفيذها منخفضة نسبياً. (Gui وزملاؤه، 2008; Sheppard و Smith، 2000) كما استخدمت تقانة الـ ISSR في دراسة التباين الوراثي والتنوع الحيوي للعديد من الأشجار المثمرة، وكذلك استخدمت تقانة

الـISSR علـى أصـناف التـين (Khadari، 2004)، واللـوز(MirAli and Nabulsi,2003b)، والفستق الحلبي (MirAli and Nabulsi, 2003a)، والزيتون (MirAli and Nabulsi، 2004) والتفاح (الحلبي، 2007). كما أجريت دراسات جزيئية على الأشجار البرية في مناطق انتشارها الطبيعية مثل الأجاص (MirAli وزملاؤه، 2007)، والزعرور (ميرعلي وزملاؤه، 2009).

استخدم Srivastava وزملاؤه (2004) تقانة الـISSR لدراسة التنوع الوراثي وتصنيف الأصول الوراثية بين الأنواع المختلفة للتوت وذلك لـ 12 نوع من الأنواع البرية وثلاثة أنواع من الأنواع المزروعة للتوت، حيث بينت النتائج إلى أن المؤشرات الجزيئية باستخدام تقانة الـISSR كانت مفيدة في دراسة التنوع الوراثي وتصنيف الأصول الوراثية للتوت.

كما قام Thumilan and Dandin (2009) باستخدام تقانة المؤشرات الجزيئية باستخدام تقانة الـISSR والـSSR لدراسة التنوع الوراثي لـ 27 نوع من أنواع التوت منها 19 نوع من الأنواع المزروعة، وثمانية أنواع برية من التوت. حيث بينت النتائج بأن التنوع الوراثي الموجود بين الأنواع البرية أعلى من التنوع الوراثي الموجود بين الأنواع المزروعة. كما بينت النتائج بأن الأنواع البرية بعيدة وراثياً عن الأنواع المزروعة المدروسة.

قام Banerjee.R وزملاؤه (2016) بدراسة جزيئية على 14 طراز من التوت باستخدام تقنيتي RAPD و ISSR، لمعرفة درجة التنوع الوراثي فيما بينها، ومن بين 25 مرئسة اختبرت على العينات، تم استخدام 20 منها (8 لـRAPD، و 12 لـISSR). أدى تضخيم الحمض النووي الجيني للأنماط الجينية الأربعة عشر باستخدام تحليل RAPD، إلى إنتاج 67 حزمة، بنسبة تعددية شكلية بلغت 87.5٪. أما المرئسات المستخدمة بتقنية الـ ISSR فقد أعطت 104 حزم بتعددية شكلية 93%.

كما تمت دراسة ثلاثة أنواع من التوت M. alba L., M. latifolia,Poir & M. bombycis,Koidz. لدراسة التباين الوراثي باستخدام تقانة الـ AFLP، حيث بلغت نسبة التعددية الشكلية 72.2%، وبلغ معدل التشابه الوراثي داخل النوع M. bombycis 0.845 و0.884 في النوع M. alba و0.869 في النوع M. latifolia (Botton وزملاؤه، 2005).

أما بالنسبة للدراسة الجزيئية فتعد هذه الدراسة الأولى التي تتناول شجرة التوت الشامي في المنطقة الجنوبية من الجمهورية العربية السورية.

الأهداف:

1- دراسة توصيفية شكلية لبعض طرز التوت الشامي (Morus nigra L.) المزروعة في موقع الكوم الوراثي في محافظة القنيطرة ولأول مرة في سورية باستخدام دليل التوصيف الشكلي المعتمد من منظمة الأغذية والزراعة /FAO/.

2- دراسة توصيفية جزيئية باستخدام تقنية ISSR.

3- تحديد درجة القرابة الوراثية لهذه الطرز وإظهار حجم التباين الوراثي فيما بينها.

مواد البحث وطرائقه:

نُفذت الدراسة التوصيفية من هذا البحث في موقع الكوم من محافظة القنيطرة الذي يشتهر بزراعة أشجار التوت الشامي وذلك خلال موسمي النمو (2018/2017) و(2019/2018) حيث يرتفع موقع الدراسة عن سطح البحر 938م والاحداثيات الطبوغرافية له 33°11'N35°53'E، أما الدراسة الجزيئية فقد تمت في مخابر الهيئة العامة للتقانة الحيوية قسم التقانات الحيوية النباتية.

اختلفت المعطيات المناخية بين مناطق وموسمي الدراسة، وذلك من حيث معدلات الهطول المطري والحرارة والرطوبة، علماً أن مناطق الدراسة تقع ضمن منطقتي الاستقرار الأولى (350–600) ملم والثانية (250–300) ملم.

تشير المعطيات المناخية بالنسبة لموقعي خان أرنبة والكوم في محافظة القنيطرة بأن كمية الأمطار بلغت خلال موسمي النمو (469 و486.5) ملم على التوالي، حيث تركز الهطول المطري في شهر يناير، وتميّز هذا الشهر أيضاً بتسجيل أخفض درجة حرارة مقارنة بالأشهر الأخرى خلال موسمي الدراسة (0.2 و2.8) مْ، إذ بلغ متوسط درجة الحرارة الصغرى (9.92 و11.8) مْ على التوالي. بينما تميز شهر أغسطس خلال موسمي الدراسة بارتفاع درجة الحرارة عن بقية الأشهر (32 و34) مْ، وبلغ متوسط الحرارة العظمى (21.3 و 23.06) مْ.

اختلفت المعطيات المناخية بين مناطق وموسمي الدراسة، وذلك من حيث معدلات الهطول المطري والحرارة والرطوبة، علماً أن مناطق الدراسة تقع ضمن منطقتي الاستقرار الأولى (350–600) ملم والثانية (250–300) ملم.

تشير المعطيات المناخية بالنسبة لموقعي خان أرنبة والكوم في محافظة القنيطرة بأن كمية الأمطار بلغت خلال موسمي النمو (469 و486.5) ملم على التوالي، حيث تركز الهطول المطري في شهر يناير، وتميّز هذا الشهر أيضاً بتسجيل أخفض درجة حرارة مقارنة بالأشهر الأخرى خلال موسمي الدراسة (0.2 و2.8) مْ، إذ بلغ متوسط درجة الحرارة الصغرى (9.92 و11.8) مْ على التوالي. بينما تميز شهر أغسطس خلال موسمي الدراسة بارتفاع درجة الحرارة عن بقية الأشهر (32 و34) مْ، وبلغ متوسط الحرارة العظمى (21.3 و 23.06) مْ.

طرائق الدراسة:

التوصيف الشكلي:

تمت دراسة الصفات الشكلية لطرز التوت الشامي المدروسة باختيار تسعة طرز لكل منطقة بأعمار متقاربة (15 إلى 20) سنة، وذلك وفق الاستمارة المعتمدة لتوصيف التوت الشامي (الأسود) من منظمة الأغذية والزراعة الفاو (Rao، 2002) إذ تمت دراسة 28 صفة وهي:

طبيعة النمو والتفرع وشكل البراعم، ومواصفات الأوراق بدقة من حيث: شكل القمة والقاعدة والحافة، وملمس السطح، وبقاء الأذينة، وعدد الفصوص، ولون الورقة ولمعانها، وقياس زاوية التوضّع بين سويقة الورقة والجذع (حادة، شبه منحنية، أفقية، متدلية)، وطول وعرض الورقة وشكلها، بالإضافة إلى طول وعرض السويقة. كما دُرس موعد الإزهار، والتعبير الجنسي إذ تمت معاينة جنس الأزهار والنورات المتوضّعة على الأشجار المدروسة والتي يمكن أن تكون منفصلة أو ثنائية الجنس وفق الاستمارة المعتمدة، والنورات الزهرية من حيث: عددها، وطولها، وعدد الأزهار في النورة الواحدة، وتمت دراسة الثمار من حيث: الطول، والعرض، والوزن، والطعم، وأخيراً تم حساب المساحة الورقية باستخدام برنامج Image.J، وهو برنامج لتحليل ومعالجة ملفات الصور مرخص مجاناً، يمكن من خلاله الحصول على مساحة دقيقة للأوراق المدروسة.

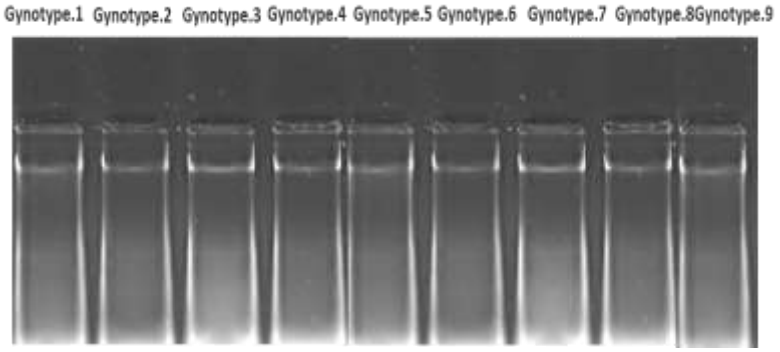
التوصيف الجزيئي:

اختيرت تقنية ISSR كتقنية ذات وثوقية عالية ولا تحتاج لمعرفة مسبقة بالمجين الهدف ومنخفضة التكاليف إلى حد ما. علاوة على ذلك فقد ثبت نجاحها على عدد كبير من المحاصيل والأشجار المثمرة ومنها التوت الشامي (Baraket وزملاؤه، 2009)،

وتمت الخطوات على الشكل الآتي:

استخلاص الـ DNA: عزل الـ DNA من 0.2 غ من الأوراق الفتية وفق طريقة CTAB المعدلة (Murray و Thompson، 1980)، حيث طحنت الأوراق، ثم نقل المسحوق إلى أنابيب معقمة سعة 2 مل، ثم أضيف لكل عينة 750 µl من محلول الاستخلاص CTAB المحتوي على المكونات التالية: 3% (CTAB , 100 (w/v mM Tris-HCl (pH 8), 1.4 M NaCl, 20 mM) EDTA (pH 8) , 0.2 % 2-mercaptoethanol (v/v)). ثم حضنت العيّنات في الحمام المائي على درجة حرارة 65م° مع التحريك المستمر لمدة 60 دقيقة، ثم وضعت في الثلج لمدة 5 دقائق، ثم أضيف لها 750 µl من مادة chloroform/ isoamylalchohol (1: 24)، ومُزجت برفق لمدة 10 دقائق ثم وضعت في جهاز الطرد المركزي على سرعة 10000 دورة/د لمدة 10 دقائق على درجة حرارة 4 م°، نقل بعدها الطور الطافي (المحتوي على DNA) إلى أنابيب جديدة سعة 1.5 مل، وأُعيدت تنقيته مرة أخرى بكمية مماثلة من مادة chloroform/ isoamylalchohol (1: 24). أضيف 500 µl من الايزوبروبانول المبرد على حرارة –20م° مع التحريك بلطف، وتركت العينات بعدها على درجة حرارة – 20 م° من أجل ترسيب DNA. في اليوم التالي أعيد التثفيل بسرعة 10000 دورة/د لمدة 10 دقائق، ثم تم التخلص من الرشاحة وغسل الراسب (DNA) بإضافة 200µl من محلول إيتانول 70%. ثفّلت الأنابيب بعد ذلك على سرعة 10000دورة/د لمدة 10 دقائق، واستبعد الجزء الطافي وجفف راسب DNA على حرارة 37 م° لمدة 20 دقيقة، ثم أذيب DNA في 50 µl من الماء المقطر المعقم. تم التخلص من الـ RNA بإضافة 2µl من أنزيم RNase (10 مغ/مل) والتحضين على درجة 37 م° مدة نصف ساعة، وخزنت العينات على درجة حرارة –20 م° لحين الاستخدام. استخدم جهاز المطياف الضوئي (Spectrophotometer UV)، لتقدير كمية الحمض النووي DNA وتحديد

نقاوته عن طريق قياس امتصاص الحمض النووي DNA للأشعة بموجات طولها 260 و280 نانومتر. حُمل 6 µl من DNA في هلامه من الآغاروز تركيزها 1% والحاوية على 2 µl من الإيثيديوم بروماید بتركيز 10 ml/mg ضمن محلول TBE (1X) لتحديد نوعية DNA المستخلصة للتأكد من عدم تقطعها. ثم مُددت عينات DNA للحصول على تركيز 25 نانوغرام/ميكرولتر لتستخدم في تفاعل الـ PCR (الشكل 1).



الشكل (1): الرحلان الكهربائي لعينات الـ DNA على هلامة الأغاروز 1%

التفاعل التسلسلي المتعدد (PCR):

من بين 16 مرئسة تم اختبارها على عينات الطرز المدروسة باستخدام تقنية الـISSR، تمّ تضخيم الـ DNA باستعمال 10 مرئسات أعطت تعددية شكلية (الجدول **1**) والتي تم الحصول عليها من شركة Eurofins الأوروبية.

الجدول (1): مرنسات الـ ISSR المستخدمة في تحليل DNA لطرز التوت الشامي المدروسة ودرجة حرارة التحامها

اسم البادئة	تسلسل القواعد النيتروجينية	درجة حرارة الالتحام (Cº)
MISSR.47	GTCGTCGTCGTCGTCGTC	60.50
MISSR.49	AGAGAGAGAGAGAGAGT	50.40
MISSR.50	GAGAGAGAGAGAGAGAT	50.40
MISSR.51	GAGAGAGAGAGAGAGAA	50.40
MISSR.52	ACACACACACACACACAC	53.70
MISSR.53	ACACACACACACACACAG	53.70
MISSR.59	GAGGAGGAGGAGGC	48.00
MISSR.64	GAGAGAGAGAGAGG	44.00
MISSR.65	TGTGTGTGTGTGTGTGGT	53.70
MISSR.66	AGAGAGAGAGAGAGAGTC	53.70

جرى تفاعل الـ PCR باستخدام KAPA PCR KIT بحسب تعليمات الشركة المصنعة في حجم نهائي قدره 25 µl. وذلك وفق البرنامج الحراري التالي:

- **االمرحلة الأولى (مرحلة الفصل الأولي):** وتتم لمرة واحدة على درجة حرارة 95 م° لمدة 3 دقائق.
- **االمرحلة الثانية:** وتتكرر 40 مرة وتضم الخطوات التالية:

1.**مرحلة الفصل:** وتتم على درجة حرارة 95 م° لمدة 15 ثانية.

2. **مرحلة الالتحام:** تتم على درجة الحرارة المناسبة لكل بادئة من بادئات المستخدمة لمدة دقيقة واحدة.

3. الاستطالة: تتم على درجة حرارة 72 م° لمدّة دقيقة واحدة.

- **االمرحلة الثالثة (الاستطالة النهائية):** تتم لمرة واحدة على درجة حرارة 72 م° لمدّة 5 دقائق.

الرحلان الكهربائي والتلوين والتصوير لنواتج الـPCR :

رحلت نواتج تفاعل الـ PCR على هلامة الآجاروز 2% في المحلول المنظم X TBE1 والمكون من: {(10 X TBE buffer = 108 g Tris borate + 55 g 8.0 Boric acid + 9.2 EDTA, pH)} والمضاف إليها 5µl من صبغةٌ Read safe ...، كما تم حقن مؤشر من الحمض النووي (100 pb DNA) من شركة (KAPA, USA)، ثم تم الترحيل لمدة ساعتين ونصف بمرور تيار كهربائي شدته 100 فولط، صورت الهلامة بعد ذلك بوجود الأشعة فوق البنفسجية بجهاز تصوير هلامة الآغاروز Image analyzer.

التحليل الإحصائي:

تم تحديد درجة القرابة الوراثية بين الطرز المدروسة استناداً إلى الصفات الشكلية من خلال تحويل البيانات إلى صيغ رقمية على أساس وجود الصفة (1) أو غيابها (0)، إذ تم إنشاء مصفوفة النسب المئوية لعدم التوافق (PDV) Percent Disagreement Values بتطبيق متوسطات المجاميع الزوجية غير المزانة (UPGMA) Unweighted Pair Group Method With Arithmetic Averages باستخدام برنامج Statistica الإحصائي، ومن ثم وضع النتائج على شكل شجرة قرابة (Statsoft, Inc، 2003). وللتوصيف الجزيئي حدد طول حزم الـDNA الناتجة عن التضخيم باستخدام برنامج Total Lab، وحوّلت المعطيات إلى النظام الثنائي (1 للحزمة الموجودة و0 للحزمة الغائبة). ثم تم حساب مصفوفة عدم التوافق الوراثي اعتماداً على معامل Jaccard، ثم استخدمت هذه المصفوفة لإجراء التحليل العنقودي بطريقة (UPGMA) ورسم شجرة القرابة الوراثية.

ولمقارنة مصفوفات البيانات الشكلية والجزيئية الناتجة في هذه الدراسة ومعرفة درجة ومعنوية الارتباط بين النتائج الشكلية والجزيئية فقد استُخدِمَ معيار Mantel من برنامج NTSYS الإحصائي (Rohlf, 1995).

النتائج والمناقشة:

تحديد درجة القرابة الشكلية بين الطرز المدروسة:

يتضح من معطيات الدراسة باستخدام المؤشرات الشكلية (28 صفة) تباين الصفات الشكلية بين الطرز ولتحديد درجة التشابه والاختلاف فيما بينها تم استخدام شجرة القرابة الشكلية على أساس مقارنة جميع الصفات المدروسة ومقاطعتها مع الطرز على أساس وجود الصفة (1) أو غيابها (0)، وايجاد مصفوفة النسب المئوية لعدم التوافق (PDV). تراوحت قيم النسب المئوية لعدم التوافق (PDV) للصفات الشكلية في موقع الكوم (الجدول 2) بين 0.00 سجلت في ثلاث حالات بين الطرز: (k1+k3) و(k2+k5) و (k6+k7). و0.30 سجلت بين الطرازين (k9+k4). وبمتوسط عام للموقع وقدره 0.16.

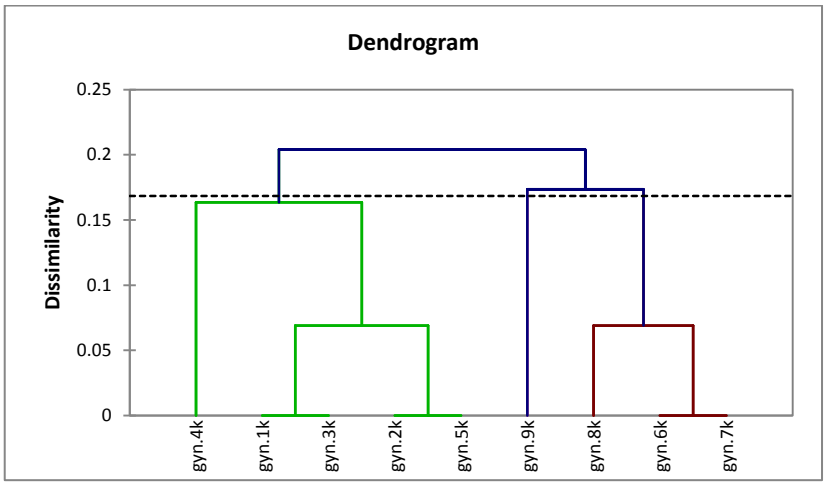
الجدول (2): مصفوفة النسب المئوية لعدم التوافق (PDV) الناتجة عن الدراسة الشكلية لموقع الكوم.

Gen. K9	Gen. K8	Gen. K7	Gen. K6	Gen. K5	Gen. K4	Gen. K3	Gen. K2	Gen. K1	Genotype
								0	Gen. K1
							0	0.07	Gen. K2
						0	0.07	0.00	Gen. K3
					0	0.19	0.13	0.19	Gen. K4
				0	0.13	0.07	0.00	0.07	Gen. K5
			0	0.25	0.25	0.19	0.25	0.19	Gen. K6
		0	0.00	0.25	0.25	0.19	0.25	0.19	Gen. K7
	0	0.07	0.07	0.19	0.19	0.13	0.19	0.13	Gen. K8
0	0.13	0.19	0.19	0.19	0.30	0.13	0.19	0.13	Gen. K9
0.18	0.14	0.18	0.18	0.14	0.21	0.12	0.14	0.12	المتوسطات

المتوسط العام =0.16 التشابه الوراثي =84

أدى التحليل العنقودي (الشكل 2) إلى تقسيم شجرة القرابة الشكلية للطرز المدروسة إلى ثلاثة مجموعات تعكس درجة القرابة الشكلية فيما بينها، مما يؤكد إمكانية استخدام التوصيف الشكلي لإظهار الاختلافات بين الطرز، وإمكانية استخدام النتائج في برامج التحسين الوراثي للتوت، حيث ضمت المجموعة الأولى خمسة طرز هي: (K1,K2,K3,K4,K5)، والتي انقسمت بدورها إلى عنقودين: ضم الأول الطراز K4، وضم الثاني الطرز (K1,K2,K3,K5).

وضمت المجموعة الثانية ثلاثة طرز هي: (K6,K7,K8)، والتي انقسمت بدورها إلى عنقودين: ضم الأول الطراز K8، وضم الثاني الطرازين (K6,K7). أما المجموعة الثالثة فضمت الطراز K9 والذي انفرد في عنقود مستقل.



الشكل (2): شجرة القرابة الشكلية بين الطرز المدروسة

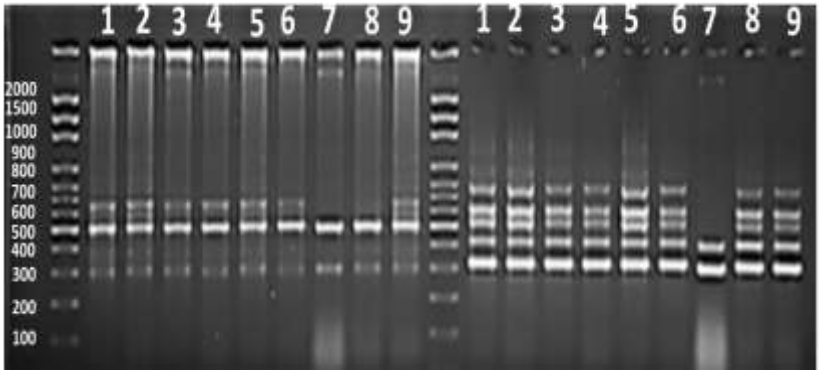
التوصيف الجزيئي:

لقد أظهرت تقنية ISSR وجود درجة تباين وراثي بين الطرز المدروسة، حيث تمكّنت البادئات المستخدمة من الالتحام في مناطق متعددة من جينوم طرز التوت الشامي التسعة المدروسة، بلغ عدد الحزم الكلية الناتجة 107 حزم، تشابهت منها ستة حزم فقط في جميع العينات، في حين تباينت الحزم الباقية وعددها 107 حزمة، وبالتالي بلغ متوسط نسبة التعددية الشكلية (Polymorphism) 93.50% (الجدول 3). أعطت البادئات (P49, P47, P66) أعلى عدد من الحزم الكلية وصل إلى (17، 14، 14) حزمة بتعددية شكلية (94، 100، 100) %، على التوالي (الجدول 3)، في حين أعطت البادئة (P51) 3 حزمة بتعددية شكلية 100% (الجدول 3). تُنتج بادئات الـ ISSR عدد مختلف من حزم الـ DNA بحسب تسلسل التكرارات البسيطة التي تحويها، ومن بين

العشرة بادئات ISSR المستخدمة في هذا البحث أعطت ست بادئات نسبة تعددية شكلية 100 % (الجدول 3). وتدل هذه النتائج على إمكانية استعمال هذه البادئات بشكل فعال.

الجدول (3): عدد الحزم الكلية المتشابهة والمتباينة ونسبة التعددية الشكلية للبادئات المستخدمة في الدراسة

البادئة	عدد الحزم الكلية	عدد الحزم المتشابهة	عدد الحزم المتباينة	نسبة التعددية الشكلية (%)	الحزم الفريدة
P47	14	0	14	100.00	4
P49	17	1	16	94.11	5
P50	13	0	13	100.00	1
P51	3	0	3	100.00	0
P52	9	1	8	88.88	4
P53	10	0	10	100.00	0
P59	11	0	11	100.00	3
P65	8	3	5	62.50	2
P66	14	0	14	100.00	4
P64	8	1	7	87.50	3
المجموع	107	6	101	-	26
المتوسط	10.70	1.5	10.10	93.50	3.25



الشكل (3): يوضح نواتج تضخيم DNA للطرز المدروسة باستخدام المرنستين P65 و P66 وبوجود معلم جزيئي ذو وزن جزيئي 100 bp

تمت دراسة العلاقة الوراثية بين الطرز المدروسة من خلال حساب مصفوفة عدم التوافق الوراثي (PDV) اعتماداً على معامل Jaccard لتحديد درجة التباين الوراثي فيما بينها، والذي يفيد في تأمين قاعدة وراثية كبيرة للاستفادة منها في برامج التحسين الوراثي. كان الطرازان (K4+K5) هما الأقرب وراثياً بتباين وراثي قدره 0.276، بينما كان الأبعد وراثياً هما الطرازان (K3+K8) بتباين وراثي قدره 0.757 (الجدول 4).

الجدول (4) مصفوفة عدم التوافق (PDV) بين طرز التوت المدروسة استناداً إلى معامل Jaccard

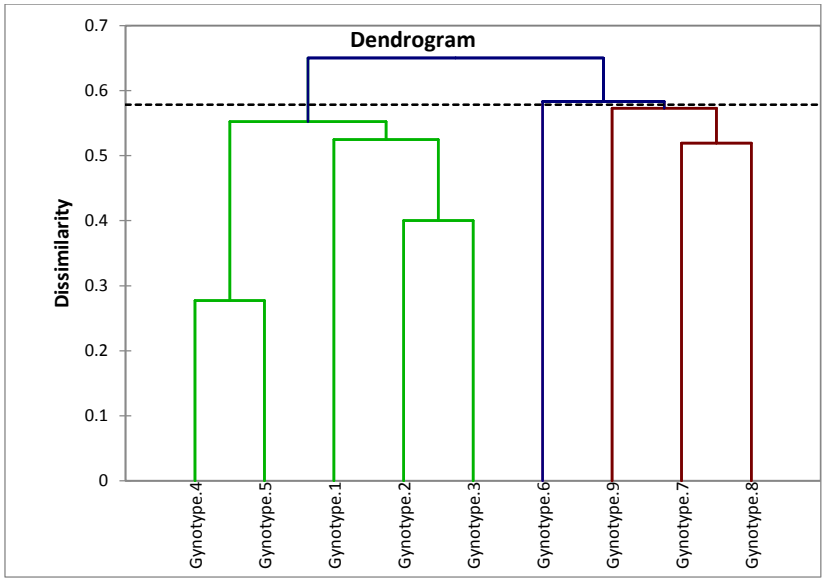
Gen. K9	Gen. K8	Gen. K7	Gen. K6	Gen. K5	Gen. K4	Gen. K3	Gen. K2	Gen. K1	Genotype
								0	**Gen. K1**
							0	0.557	**Gen. K2**
						0	0.400	0.493	**Gen. K3**
					0	0.579	0.468	0.589	**Gen. K4**
				0	0.276	0.587	0.513	0.579	**Gen. K5**
			0	0.516	0.597	0.603	0.639	0.615	**Gen. K6**
		0	0.569	0.662	0.708	0.619	0.653	0.729	**Gen. K7**
	0	0.519	0.582	0.609	0.619	0.757	0.622	0.747	**Gen. K8**
0	0.554	0.593	0.600	0.643	0.707	0.681	0.671	0.612	**Gen. K9**
0.632	0.626	0.631	0.590	0.548	0.568	0.589	0.565	0.615	**المتوسطات**

المتوسط العام: 0.600 متوسط التشابه الوراثي 40%

تم إجراء التحليل العنقودي للطرز المدروسة اعتماداً على معطيات الـ ISSR، وأدى التحليل العنقودي إلى تقسيم الطرز المدروسة إلى ثلاث مجموعات مختلفة. ضمت المجموعة الأولى خمسة طرز هي: (K1,K2,K3,K4,K5)، والتي انقسمت بدورها إلى عنقودين: ضم الأول الطرازين (K4,K5)، والثاني ضم الطرز (K1,K2,K3). وانفرد الطراز K6 في مجموعة. أما المجموعة الثالثة فضمت ثلاثة طرز هي (K7,K8,K9)، والتي انقسمت بدورها إلى عنقودين:

ضم الأول الطراز K9، وضم الثاني الطرازين (K7,K8). (الشكل 4). وبالنتيجة تثبت نتائجنا أن تقنية الـ ISSR، وبشكل خاص البادئات المستخدمة في هذا البحث، هي أداة سريعة وفعّالة لتحديد درجة التباين الوراثي ما بين طرز التوت الشامي المختلفة، وبالتالي يمكن أن تساعد هذه المؤشرات في اختيار الطرز المناسبة لإدخالها في برامج التربية. كما تدل درجة التباين الوراثي المرتفعة ما بين الطرز المدروسة على إمكانية

استخدام هذه الطرز في برامج التحسين الوراثي للتوت الشامي مما يسمح بتوسيع القاعدة الوراثية الانتخابية لمربي النبات. في الاختيار الصحيح للطرز الأكثر تنوعاً أحيائياً وتباعداً وراثياً. حيث تميزت هذه الطرز التسعة بحزم فريدة، إشارة إلى تَمكّن تقنية الـ ISSRالمستخدمة في هذه الدراسة من كشف الفروق الوراثية بين هذه الطرز. وهذا يتوافق مع (Banerjee.R وزملاؤه، 2016) حيث أكد على نجاح تقنية الـ ISSR في تقييم التنوع الوراثي بين الأنماط الوراثية للتوت.



الشكل (5): مخطط شجرة القرابة الوراثية لطرز التوت الشامي المدروسة اعتماداً على التحليل العنقودي لبيانات التباين الوراثي.

درجة التوافق ما بين التوصيف الشكلي والجزيئي:

لقد تم في هذه الدراسة إلقاء الضوء على حجم التباينات الوراثية بين طرز التوت الشامي المدروسة، مستخدمين تحليلاً خاصاً لهذا الغرض (Mantel)، حيث تم مقارنة نتائج

الدراسة الجزيئية المعتمدة على تضخيم DNA باستخدام المؤشرات الجزيئية ISSR ونتائج الدراسة الشكلية. أظهرت نتائج التحليل عند دمج البيانات الشكلية والجزيئية بوجود علاقة ارتباط ضعيفة جداً أو درجة تطابق ضعيفة جداً بين الدراستين الشكلية والجزيئية بقيمة بلغت (r=0.30). إن نتائج الدراسة تؤكد على استخدام تقنيات البصمة الوراثية لفعاليتها ودقة نتائجها وعدم تحيزها في التوصيف وفي تقدير درجة القرابة الوراثية بين الطرز بشكل أكثر دقة، وهذا يتفق مع (Guasmi وزملاؤه، 2006). وقد استُخدِمَت تقنية ISSR على اعتبار أنها أحدث من تقنية RAPD وأكثر موثوقية كونها تحتاج لمرئسات ذات عدد أسس أكبر، مما يتطلب استخدام درجات حرارة التحام أعلى وبالتالي أكثر تخصصية (Bornet and Branchard، 2001). كما أنها أثبتت فعاليتها في تحديد درجة التنوع الوراثي لطرز التوت (Dandin and Thumilan، 2009)، حيث أنها متعددة الأشكال كثيراً ولا تتأثر بالظروف البيئية بشكل كبير (Khadari وزملاؤه، 2004).

الاستنتاجات والمقترحات:

ان العلاقة الارتباطية الضعيفة بين التوصيف الشكلي والجزيئي يثبت بصورة لا شك فيها أن البصمة الوراثية هي التي تحدد هوية الطرز الوراثية، وهذا لا يلغي دور التوصيف الشكلي الذي يمكن استخدامه في الدراسات الأولية لعمليات التصنيف النباتي، وعليه نقترح:

1- ضرورة إدخال التوصيف الجزيئي لطرز التوت الشامي بما يشمل كافة المناطق التي تشتهر بزراعته وخاصة المناطق الجنوبية من سورية، وذلك باستخدام تقنية (ISSR). وتوسيع هذا التوصيف ليشمل عدة تقنيات جزيئية أخرى لدراسة التنوع والتباين الوراثي.

2- نوصي باعتماد الطرائق الرياضية المستندة على البيانات الجزيئية لتكوين صورة واقعية وبالأرقام عن درجة التنوع الوراثي ضمن وبين الطرز والمواقع.

3- تأسيس بنك نواة للمادة الوراثية لطرز التوت الشامي وحفظ الأصول الوراثية وإدارتها، وبناء قاعدة بيانات علمية ودمجها وتطويرها وصولاً إلى قاعدة بيانات وطنية لاستخدامها في برامج التحسين الوراثي.

المراجع References :

1. النابلسي غسان، 2004 –حالة المصادر الوراثية للأشجار المثمرة وصيانتها واستثمارها. مشروع الحفظ والاستخدام المستدام للتنوع الحيوي الزراعي في المناطق الجافة، وزارة الزراعة والإصلاح الزراعي بالتعاون مع UNDP – ACSAD. ص 27.
2. الحلبي، علا. (2007). التوصيف المورفولوجي والجزيئي لبعض أصناف التفاح المحلية. رسالة ماجستير، كلية الزراعة، جامعة دمشق.
3. داؤد داؤد محمود، 1979. تصنيف أشجار الغابات. كلية الزراعة والغابات، جامعة الموصل، صفحة 429.
4. سيد، محمود هيثم. (2001). استخدام مؤشرات من الدنا DNA في انتخاب مورثات المقاومة للأمراض في الشعير، جامعة دمشق، كلية الزراعة، أطروحة دكتوره.
5. ميرعلي، نزار. العودات، محمد. حيدر، ناديا. والنابلسي، عماد. (2009). جنس الزعرور دراسة بيئية وجزيئية. تقرير عن دراسة علمية مخبرية– هيئة الطاقة الذرية هـ ط ذ س – ب ج/ت د ع 810.48.

6. Ammiraju, J. S. S., Dholakia, B. B., Santra, D. K., Singh, H., Lagu, M. D., Tamhankar, S. A., Dhaliwal, H. S., Rao, V. S., Gupta, V. S. and Ranjekar, P. K. (2001). Identification of inter simple sequence repeat (ISSR) markers associated with seed size in wheat. Theor. Appl. Genet. 102: 726-732.
7. Banerjee, R; S. Roychowdhuri; H. SAU; K. B. DAS; P. Ghosh, and B. Saratchandra. (2007). Genetic diversity and interrelationship among Mulberry phenotypes. Journal of genetic and genomics,34,8, 691-697.

8. Banerjee, R; Chattopadhyay. S, and Saha, A. K. 2016. Genetic Diversity and Relationship of Mulberry Genotypes Revealed by RAPD and ISSR Markers, Pages 478-492, Published online: 21 Jun 2016.
9. Baraket, G.; Chatti, K.; Saddoud, O.; Mars, M.; Marrakchi, M.; Trifi, M. and Salhi Hannachi, A. (2009). Genetic analysis of Tunisian fig (Ficus carica L.) cultivars using amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers. Scientia Horticulturae 120:487–492.
10. Bornet, B. and Branchard, M. (2001). Nonanchored Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) markers: Reproducible and Specific Tools for Genome Fingerprinting. Plant molecular Biology Reporter 19(3): 209-215.
11. Bornet B, Muller C, Paulus F, and Branchard. M. (2002).Highly informative nature of inter simple sequencerepeat (ISSR) sequences amplified using triand tetranucleotideprimers from DNA of cauliflower (Brassicaoleraceavar. botrytis L.). Genome 45: 890–896.
12. Bootprom, N; P. Songsri; N. Kong Pun, and K. A. Sabrao. 2014. Genetics diversity based on horticultural traits and total soluble solid content in mulberry (Morus alba) varieties. Journal of Breeding and Genetics, 46, 2, 231- 240.
13. Botton, M.; Lorini, I.; Afonso, A. P. (2005). Ocorrência de Sitophilus zeamais Mots.(Coleoptera: Curculionidae) danificando a cultura davideira no Rio Grande do Sul.Neotropical Entomology, v. 34, n. 2, p. 355-356.
14. Boubya, A; B. M. Salah; N. Marzougui; A. Ferchichi. 2009. Pomological characterization of the Mulberry tree (Morus spp.) in the South of Tunisia. Journal of Arid land studies, 19, 1: 157-159.
15. Camphell, J. 2014. A mess of Muddled Mulberries. Bluegrass.
16. Chandler, W.H. 1958. Deciduous orchards. Third edition. Lodon.

17. Claros, M.G., R. Crespillo, M.L. Aguilar & F.M. Cánovas. (2000). DNA fingerprinting and classification of geographically related genotypes of olive-tree (Oleaeuropaea L.). Euphytica 116: 131–142.
18. Eleuch, L., A. Jalil, S. Grando, S. Ceccarelli, M.K. Schmising, H. Tsujimoto, A.Hajer, A. Daaloul. and M. Baum. (2008). Genetic diversity and association analysis for salinity tolerance, heading date and plant height of barley germoplasm using simple sequence repeat markers. J. Integ. Plant Biolo. 50(8):1005-1015.
19. Fu- Rong, G., Jian- Ying, G. and Fang- Hao, W. 2007. Application of ISSR Molecular marker in invasive plant species study. State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests Institute of Plant Protection, Yunnan Agricultural University, Kunming Chin.J. Appl. Ecol., 18(4): 919-927.
20. Guasmi, F.; Ferchichi, A.; Fares, K. and Touil, L. (2006). Identification and differentiation of Ficus carica L. cultivars using inter simple sequence repeat markers. African J. Biotechnology., 5(15): 1370-1374.
21. Gui, MM, Lee KT, Bhatia S. (2008) Feasibility of edib le vs. non-edible oil vs. waste edible oil as biodiesel feedstock. Energy. 32:1646-1653.
22. Jolly, M.S., S.B. Dandin, S. Rabindran, and R. Kumar. 1986. Sexual polymorphism in genus Morus L. Proceeding of the Indian Academy of Sciences (Plant Science) 96 (4): 315–320
23. Khadari, B.; Oukabli, A.; Ater, M.; Mamouni, A.; Roger, J. P. and Kjellberg, F. (2004). Molecular Characterization Of Moroccan Fig Germplasm Using Intersimple Sequence Repeat Markers To Establish A Reference Collection. Hort Science 40(1):29-32.
24. Korbin, M.; Kuras, A.; Zurawicz, E. (2002). Fruit plant germplasmcharacterization using molecular markers in RAPD and ISSR-PCR.Cellular and Molecular Biology Letters 7: 785-794.
25. Koyuncu, F. 2004. Morphological and agronomical characterization of black mulberry (Morus nigra L.) Insutculer, Turkey.

26. MirAli, N. and Nabulsi, I. (2003a). Genetic diversity of Syrian grown almond cultivars (Amygdalus communis L.) Using RAPD technique. Scientia Horticutura 98/4, 461-471.
27. MirAli, N. and Nabulsi, I.(2003b). Genetic diversity of Syrian pistachio cultivars (Pistachia vera L.) using RAPD technique. Advances in Hort. Science17/4, 215-222.
28. MirAli, N. and Nabulsi, I. (2004). Molecular characterization and genetic relatedness among olive cultivars using RAPD markers. Advances in Hort. Science. 18/4, 173-180.
29. MirAli, N.; Haider, N.; Nabulsi, I. and Al-Oudat, M. (2007). Pyrus syriaca: An Ecological and Molecular study. Advances in Horticultural Sci. 21 (2) 89-95.
30. Murray,M.G.and W.F.Thompson.1980.Rapid Isolation of high molecular weight DNA.Nucleic Acid Res.8(19):4321-4325.
31. Nagaraju J, Kathirvel M, Ramesh Kumar R, Siddiq EA, Hasnain SE .(2002) Genetic analysis of traditional and evolved Basmati and non-Basmati rice varieties by using fluorescence-based ISSR-PCR and SSR markers. ProcNatlAcadSci USA. 99:5836-5841.
32. Orhan E, and Ercisli S, 2010. Genetic relationships between selected Turkish mulberry phenotypes (Morus spp) based on RAPD markers. Genetics and Molecular Research, 9(4):2176-2183. http://www.funpecrp.com.br/gmr/year2010/vol9-4//pdf/gmr958.pdf.
33. Peris, W. N; M. K. Gacheri; M.M. Ophillus, and N. Lucas. 2014. Morphological characterization of Mulberry (Morus spp) accession grown in Kenya. Sustainable agriculture research, 3, 1, 1927- 0518.
34. Raina, V.K., Srivastava, S.K., Aggarwal, K.K.,Syamasundar, K.V. & Kumar, S. (2001). Essentialoil composition of Syzygiumaromaticumleaf from LittleAndaman, India. Flavour Fragrance Journal 16:334-336.
35. Rao Ananda, A. 2002. Conservation status of mulberry genetic resources in India. Central Sericultural Germplasm Resources Centre. Central Silk Board, (Govt. of India), Ministry of Textiles. P.B.No-44, Thally Road. FAO, Rome.

36. Ricciardi, L., V.Giorgio. C. De Giovanni. C. Lotti. A. Gallotta and G. Fanizza. (2002). The genetic of apulian apricot genotypes (Prunus armeniacaL.) assessed using AFLP markers. Cellular and Molecular Biology Letters. 7:431-436.
37. Roger J,P.1998- Description of mulberry tree workshop pomological exhibition on "conservation and utilisation of minor fruit tree species in europe" Florence-Italy- www.unifi.it/ueresgen 29/ds15/htm.
38. Rohlf, F. J. (1995). NTSYS-PC Numerical taxonomy and multivariate analysis system. Version 1.8 Exeter Software, Setauket, NY.
39. Sheppard WS and Smith DR. (2000) Identification of African-derived bees in the Americas: A survey of methods. Ann Entomol Soc Am 93:159-176.
40. Singhal, K. B; A. M. Khan; A. Dhar; M. F. Baqual, and B. B. Bindroo. 2010. Approaches to industrial exploitation of mulberry (Morus sp) fruits.18, 1, 83-99.
41. Smith, S. 1997. Cultivar identification and varietal protection. In: Anolles, G. C. and Gresshoff, P. M (Eds). DNA marker protocols, applications, and overviews. Wiley-Liss, Inc. United States of America: 283-285.
42. Srivastava, P. P; K. Vijayan; K. A. Awasthi, and B. Saratchandra. 2004. Genetic analysis of Morus alba through RAPD and ISSR markes. India journal of biotechnology, 3, 527- 532.
43. Statsoft, Inc. (2003). STATISTICA (data analysis software system), version 6. www.statsoft.com.
44. Tautz, D. (1989). Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic markers. Nucl. Acids Res. 17: 6463-6471.
45. Thumilan MB, Dandin SB. (2009) Genetic analysis of diploid and colchi-tetraploid mulberry (Morus indicaand Morus alba) by molecular and morphological markers. Internat J Plant Breed 3(1):58-64.

46. Tikader, A. K; K. Vijayan; M. K. Raghunath; S. P. Chakroborti; B. N. Roy, and T. Pavankumar. 1995. Studies on sexual variation in mulberry (Morus spp.).Euphytica, Volume 84, Issue 2: 115–120.
47. Weising K, Nybom H, Wolff K, Meyer W. (1995). DNA Fingerprinting in Plants and Fungi. CRC Press, Boca Rato.
48. Wjhani, Y. (2004). Genetic studies on the biodiversity of local and wild Syrian wheat usingmodern biotechnological techniques. Thesis submitted in partial fulfillment for the requirements of the degree of doctor of philosophy in agriculture scince (genetics), Department of genetics, Cairo university, Faculity of agriculture, 119p.
49. Williams, J.G.K.; Kubelik, A.R.; Levak, K.J.; Rafalski, J.A. and Tingey, S.V. (1990). DNA polymorphism amplification by arbitrary primers are useful as genetic markers Nucleic Acids Resources 18, 6531-6535.
50. Zietkiewicz, E.; Rafalski, A. and Labuda, D. (1994). Genome fingerpriting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. Genomics 20, 176-183.
51. Zabeau M, P Vos. (1993). Selective Restriction Fragment Amplification: A general method for DNA fingerprints .Zietkiewicz, E.; Rafalski, A. and Labuda, D. (1994). Genome fingerpriting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. Genomics 20, 176-183.