

تحديد درجة القرابة الوراثية بين أنواع اللوز البري (*Prunus amygdalus*) المنتشرة في المنطقة الوسطى والجنوبية الغربية من سورية

عمر الطه الحيجي¹، د. أحمد الحاج أحمد²، د. سلام لاوند³

¹طالب دكتوراة في قسم الموارد الطبيعية المتجددة والبيئة - كلية الزراعة - جامعة دمشق

E-mail: omar.hajji@damascusuniversity.edu.sy

²أستاذ مساعد في قسم الموارد الطبيعية المتجددة والبيئة - كلية الزراعة - جامعة دمشق

³أستاذ مساعد في قسم المحاصيل الحقلية - كلية الزراعة - جامعة دمشق

المُلخَص:

نفذ هذا البحث في مخبر التقانات الحيوية التابع لكلية الزراعة في جامعة دمشق/ سورية للعام 2020/2021. أجريت الدراسة على أنواع اللوز المنتشرة في خمس مناطق رئيسية لتحديد درجة القرابة الوراثية فيما بينها باستعمال تقنية التكرارات الترادفية الداخلية البسيطة (Inter Simple Sequence Repeats) ISSR، واستخدم لهذا الغرض 23 بادئة، أعطت 21 بادئة منها تعددية شكلية polymorphic بين الأنواع المدروسة، نجم عن استخدامها 95 حزمة 93 منها ذات تعددية شكلية وبلغت نسبة التعددية الشكلية 96.51%، وتراوح عدد الحزم ذات التعددية الشكلية بين 2 حزمة مع البادئة P-8 و P-15 و 6 حزم مع البادئات (P-30, P-36, P-37) بمتوسط قدره 4.42 لكل بادئة، وتراوح متوسط معامل التعددية الشكلية (Polymorphic information content) بين 0.0525 مع البادئة P-8 و 0.4998 مع البادئة P-25 بمتوسط قدره 0.4132. وتراوحت نسبة البعد الوراثي بين 46 و 92%، فكانت أدنى قيمة له 46% بين النوعين الشائع (*A. communis*) والكوشنسكي (*A. Korshinskii*)، وتدل هذه القيمة المنخفضة للتبايد الوراثي على درجة كبيرة من القرابة الوراثية، بينما كانت أعلى قيمة للتبايد الوراثي 92% بين النوعين الوزالي (*A. spartioides*) والعربي (*A. arabica*)، ما يدل على وجود تباين وراثي كبير بينهما، ولوحظ أن شجرة القرابة الوراثية انقسمت إلى عنقودين رئيسيين، انفرد النوع الشرقي (*A. orientalis*) بالعنقود الأول، في حين ضم العنقود الثاني الأنواع الأخرى منقسمة إلى تحت عنقودين بدرجات متفاوتة من القرابة الوراثية. وتشير النتائج إلى إمكانية استخدام تقنية ISSR لدراسة القرابة الوراثية ما بين أنواع اللوز البري.

الكلمات المفتاحية: القرابة الوراثية - اللوز البري، سورية - تقنية ISSR.

تاريخ الإبداع: 2022/1/10

تاريخ القبول: 2022/2/13



حقوق النشر: جامعة دمشق -
سورية، يحتفظ المؤلفون بحقوق
النشر بموجب الترخيص CC
BY-NC-SA 04

Determining the Degree of Genetic Relationship Among Wild Almond (*Prunus amygdalus*) Species Spread in the Central and Southwestern Region of Syria

Omar Al-Taha Al-Haiji¹, Dr. Ahmed Hajj Ahmed²

Dr. Salam Lawand³

¹PhD student in the Department of Renewable Natural Resources and Environment - Faculty of Agriculture - Damascus University

E-mail: omar.haiji@damascusuniversity.edu.sy

²Assistant Professor in the Department of Renewable Natural Resources and Environment - Faculty of Agriculture - Damascus University

³Assistant Professor in the Department of Field Crops - Faculty of Agriculture - Damascus University

Abstract:

The research was carried out in the Biotechnology Laboratory of the Faculty of Agriculture at Damascus University / Syria in the year 2020-2021. The study was conducted on almond species spread in five main regions to determine the degree of genetic relationship among them using the ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) technique, 23 primers were used for this purpose, and 21 primers of them gave polymorphism among the studied species. The use of these primers resulted in a total of 95 bands, 93 of them were polymorphic, and the polymorphism ratio was 96.51%. The number of polymorphic bands ranged between 2 bands with the primers (P-8 and P-15), and 6 bands with the primers (P-30, P-36 and P-37) with an average of 4.42 bands for each primer, and the average polymorphic information content coefficient ranged between 0.0525 with the primer P-8 and 0.4998 with the primer P-25, with an average of 0.4132. The percentage of genetic distance ranged between 46 and 92%, and the lowest value was 46% between the two species, *A. communis* and *A. korschinskii*. This low value of genetic distance indicates a large degree of genetic relationship. While the highest value of genetic divergence was 92% between the two species *A. spartioides* and *A. arabica*, which indicates that there is a large genetic variation between them. It was noted that the tree was divided into two main clusters, the *A. orientalis* genotype was unique to the first cluster, while the second cluster included the other genotypes divided into two sub-clusters with varying degrees of genetic relationship. Our results indicate the possibility of using the ISSR technique to study genetic relationship among wild almond cultivars.

Keywords: genetic relationship- wild almond, Syria- ISSR technique.

Accepted: 13/2/2022
Published:



Copyright: Damascus University- Syria, The authors retain the copyright under a CC BY- NC-SA

1- المقدمة Introduction:

تعد سورية موطناً أصلياً للكثير من الأصول المنتشرة طبيعياً كـ بعض أنواع الأشجار المثمرة مثل اللوز (*Prunus amygdalus*) والزيتون (*Olea europaea*)، والكثير من النباتات الخشبية والحرجية المثمرة كالغار (*Laurus nobilis*) والخرنوب (*Ceratonia siliqua*)، كما تذخر الفلورا السورية بعدد وافر من الأنواع الطبية مثل المليسة (*Melissa officinalis*) والمردقوش (*Origanum*)، وأخرى تزيينية مثل السوسن (*Iris*) والعسلية (*Lonicera*)، يرتبط ذلك بالتاريخ العريق للزراعة في بلاد ما بين النهرين والهلال الخصيب وحوض البحر الأبيض المتوسط حيث بدأ الإنسان منذ زمن بعيد باستئناس بعض الأنواع والتحول عن الانتخاب الطبيعي الذي كان فيه البقاء للأقوى (Nesbitt, 1995, 74).

يعد التنوع الوراثي الموجود ضمن الأنواع النباتية التي توفر الغذاء والمأوى والدواء لشعوب العالم جزءاً مهماً من التنوع الحيوي (Michellini and Hallauer, 1993, 277)، حيث يعد التنوع الوراثي الموجود ضمن كل نوع المادة الأولية التي تساعد على استنباط أصناف ذات أهمية اقتصادية ومتأقلمة مع التغيرات المستقبلية (Bioversity International, 2019, 6).

يضم النبات الطبيعي السوري ما يزيد عن ثلاثة آلاف نوع نباتي (3300 نوع)، تنتمي إلى نحو (900) جنساً و(130) فصيلة. ويبلغ المكافئ الجنسي هو 3.5 (أي يقابل كل جنس واحد أكثر من ثلاثة أنواع)، ويقابل الفصيلة الواحدة سبعة أجناس ونحو (23) نوعاً. أما التنوع في وحدة المساحة فيساوي (0.718) فصيلةً و(4.97) جنساً و(16.6) نوعاً في كل (1000 km²) من مساحة سورية (وزارة الإدارة المحلية والبيئة، 2016، 15).

إن الوضع الراهن للتنوع الحيوي في سورية حرج للغاية، وهو يتجلى بتدهور واندثار بعض النظم البيئية والحرجية، أو بتقلص رقعة بعض النباتات البرية أو اختفائها (نحال، 1989، 130). إذ أن زوال الأنواع يعني خسارة مخزونها من الصفات الوراثية التي تطورت خلال آلاف السنين مما يعني فقد فرص كبيرة لإيجاد العديد من الحلول لمشاكل غذائية أو دوائية وربما صناعية (كرزون، 1996، 121).

وتجدر الإشارة إلى أن هذه الخسارة لا تكون عن طريق اختفاء الأنواع فقط، بل إن بعضها يتدهور وراثياً عن طريق زوال العديد من طرزه البيئية Ecotypes وأصنافه Varieties بسبب تقلص رقعة انتشاره الطبيعي وتدهور بيئاته الطبيعية مما يؤثر سلباً في تكيفه مع التغيرات البيئية (نحال، 1989، 127).

من هنا تتبع أهمية إعادة دراسة الغطاء النباتي في سورية خاصةً بعد مضي قرابة نصف قرن على تأليف ونشر أحدث الفلورات النباتية المتداولة وهي الفلورا التي ألفها ووثقها (Mouterde, 1966). وإذا كان قد وقع الاختيار في هذا البحث على نبات اللوز فلما يتمتع به هذه النوع من خصائص واستعمال شعبي واسع، وندرة الدراسات التي تتناوله، إضافة لما يتعرض له من الجمع الجائر والعشوائي، ولغنى الفلورا السورية بالعديد من الأنواع المتوطنة والتي تشكل مخزوناً وراثياً يمكن الاستفادة منه ما أمكن مع المحافظة عليه للأجيال القادمة لما قد تمتلكه هذه الأنواع من أهمية اقتصادية غير مكتشفة حتى الآن. إذ تضم العائلة الوردية بين نباتاتها أعشاب وشجيرات وأشجار بما يقدر بنحو 120 جنساً و3200 نوعاً تنتشر بصورة واسعة في المناطق المعتدلة وشبه المدارية وخاصة النصف الشمالي من الكرة الأرضية (Rehder, 1940, 651; Weiss, 1997, 127; Gudín, 2000, 172).

يتبع جنس اللوز *Amygdalus* إلى الفصيلة الوردية Rosaceae (Mouterde, 1966) ذات الانتشار الواسع في العالم، إذ تضم نحو 100 جنس وأكثر من 3500 نوع يعيش معظمها في النصف الشمالي من الكرة الأرضية (نحال، 2003، 432). يضم جنس

اللوز *Amygdalus L.* نحو 30 نوعاً (نحال، 2002، 175)، تنتشر بشكل رئيس في نصف الكرة الشمالي، وتم استئناس اللوز منذ نحو 5000 عام في الهلال الخصيب (Velasco *et al.*, 2016, 3989)، وتعد الولايات المتحدة الأمريكية وإسبانيا وإيران وإيطاليا وتركيا وتونس والمغرب وسورية واليونان وأستراليا أكبر عشرة دول منتجة للوز (Ardjmand *et al.*, 2014, 3950).

أشارت الدراسات إلى وجود سبعة عشر نوعاً تتبع الجنس *Amygdalus* تتوزع في الشرق الأوسط والبعث منها في سورية ولبنان Bosissier (1872، 7). كما أشارت دراسات أخرى (شليبي وآخرون، 1997، 23) إلى انتشار المصادر الوراثية البرية لشجرة اللوز في غابات القطر العربي السوري وفي جباله وسهوله وهضابه، وفي مناطق بيئية مختلفة ومن أهم الأنواع البرية المنتشرة في القطر العربي السوري اللوز الوزالي (*A. spartioïdes*) والشائع (*A. communis*) والكورشينسكي (*A. korschinskii*) والشرقي (*A. orientalis*) والعربي (*A. arabica*)، سجل وجود هذه الأنواع في حلب و ادلب وفي جبال القلمون وجبل عبد العزيز وجبل الشيخ وجبل العرب وسلسلة لبنان الشرقية والبادية السورية طريق تدمر -السبع بيار ومنطقة خنيفس.

تعد أنواع اللوز البرية بمثابة تجمعات وراثية قيمة لما تتمتع به من صفات مهمة مثل الإزهار المتأخر والنضج المبكر والتكيف مع الجفاف والملوحة ومقاومة درجات الحرارة المنخفضة في الشتاء وتقليل الإصابة بالحشرات والهجمات الفطرية لذا يمكن الاستفادة من هذه الصفات وادخال الأنواع البرية في برامج التربية، وتم العثور على أنواع اللوز البري في الجبال والصحاري في آسيا الوسطى من غرب الصين إلى إيران وتركيا (Rahemi *et al.*, 2012, 181 ; Gharaghani *et al.*, 2017, 171).

لذا، فإن المعرفة المسبقة حول التنوع الوراثي للأصول البرية للوز هي شرط أساسي لمشاركتها في برامج تربية اللوز. من ناحية أخرى، فإن تقييم التباين الوراثي وبنية المجتمع النباتي ضرورية لتقييم المستويات الحالية للتنوع الوراثي وأنماط توزيعه بين المجتمعات النباتية المحلية، والذي يعد ضماناً لإدارة حفظ المجموعات النباتية الطبيعية (Srekanth *et al.*, 2012, 1413; Cohen *et al.*, 1991, 869).

يعد جنس *Amygdalus*، من الأنواع المعقدة وراثياً ما يدفع إلى التعمق في دراسة ومعرفة خصائص وصفات أفراد هذا الجنس في مواقع انتشارها بهدف تمييزها والفصل بينها وصولاً لتثبيت وضعها التصنيفي. يعد نبات اللوز ثنائي الصيغة الصبغية $2n = 2x$ = 16 =حجم المجين (الجينوم) 246 Mb (Sánchez-Pérez *et al.*, 2019, 1097).

تعد تقنية التكرارات الترادفية البسيطة الداخلية (ISSR) والتي طبقت من قبل (Ziekiewicz *et al.*, 1994, 6) واحدة من التقنيات المهمة المعتمدة على تفاعل البلمرة المتسلسل للأسباب التالية: تضخم منطقة التكرارات الترادفية البسيطة وتستخدم بادئة وحيدة ومؤلفة من نكليوتيدات متكررة ومحاط في بعض الأحيان بـ 2-4 نكليوتيدات إما في المنطقة '3 أو 5'، وتوصف تقنية ISSR بأنها أكثر تكرارية من تقنية RAPD بسبب طول البادئ المستخدمة والذي يعكس درجة حرارة عالية لمرحلة تشفع البادئات (Borent أكثر تكرارية من تقنية RAPD بسبب طول البادئ المستخدمة والذي يعكس درجة حرارة عالية لمرحلة تشفع البادئات (Tautz and Branchard, 2001, 429; Chowdhury *et al.*, 2002, 321)، وإمكانية الكشف عن التتاليات النكليوتيدية ذات السيادة في التوريث، وفرتها وجودها في مجينات حقيقيات النوى النباتية ولا تحتاج إلى معلومات عن التسلسل الجيني المدروس (Tautz and Renz, 1984, 4131; Kijas *et al.*, 1995, 351)، أضف إلى أن نتائجها ثابتة عند تكرارها وهي سريعة كما أنها تتطلب كمية قليلة من DNA، ويمكن أتمنتها automation ويمكن نشر البادئات وتبادلها بسهولة بين المخابر بمجرد معرفة التسلسل النكليوتيدي لها. وتكشف نسب عالية من التعددية الشكلية polymorphism وبمقدرة تقنية SSR نفسها.

تعتمد هذه التقنية على تضخيم المواقع (100-3000 bp) بين التتابع الدقيقة Micro Satellite المتقاربة والمتوضعة بشكل متعكس (Ziekiewicz *et al.*, 1994, 7) باستخدام بادئة وحيدة طولها بين (16-18 bp). وتعطي مستويات عالية من التعددية الشكلية للحمض الريبسي النووي منقوص الأوكسجين DNA. وهي تستخدم كمعلم جزئي في دراسة البنية الوراثية، والتنوع الوراثي، والخصائص التحسينية للنباتات المدروسة (Fu-Rong *et al.*, 2007, 922) وتتوزع التتابع الدقيقة عادةً بكمية متناسبة في المجين، وقد أطلق على المناطق التي تتميز بتوافر هذه التسلسلات اسم (مواقع التكرارات البسيطة الترادفية SSR الساخنة) Hot Simple Sequence Repats (SSR) Positions ويمكن أن تفيد هذه المواقع كمصدر لمعلومات ISSR:

(Bornet and Branchard, 2001, 429; Ziekiewicz *et al.*, 1994, 7; Gupta *et al.*, 1994, 1001; Fang *et al.*, 1997, 213; Wolf *et al.*, 1998, 1118; Blair *et al.*, 1999, 787; Jain *et al.*, 1999, 717; Cavan *et al.*, 2000, 303; Raina *et al.*, 2001, 764; Korbin *et al.*, 2002, 786; Nagaraju *et al.*, 2002, 5837)

إن بساطة معلومات ISSR تزيد من إمكانية استخدامها في الوسم المجهني (Ammiraju *et al.*, 2001, 727). كما أنها تعد معلومات ISSR مفيدة جداً في كشف اختلافات السلالات الخضرية الجسمية (Leroy and Leon, 2000, 283; Rostiana *et al.*, 1999, 246; Albani Wilkinson *et al.*, 1998, 573)، ولكون معلومات ISSR تمتاز بأنه غزيرة فإنها تعطي عدداً كبيراً من الحزم، ومستوى التعددية الشكلية عالي إلى متوسط، طبيعة التوريث سائد إلى متحي، القدرة على التضخيم عالية إلى متوسطة، والتكاليف منخفضة كما أن جهد تنفيذها منخفض (Van der Nest *et al.*, 2000, 433).

وفي بحث أجراه (Rahimidvin *et al.*, 2020, 287) لتقييم التنوع الوراثي وبنية المجتمع النباتي والعلاقات بين ما مجموعه 75 فرداً من 10 مجموعات مأخوذة من 4 أنواع من اللوز البري والمزروع باستخدام 12 بادئة ISSR. تم الحصول على 353 حزمة منها 352 حزمة متباينة، بتعددية شكلية (99.69%) بمتوسط 29.41 حزمة لكل بادئة. أعطت البادئة ISSR1 أكبر عدد للحزم وهو 38 حزمة بينما أعطت البادئة ISSR12 أقل عدد للحزم وهو 20 حزمة. وتراوحت التعددية الشكلية بين 96.29% و 100%. تراوحت قيم التعددية الشكلية (PIC) بين 0.845 و 0.973 بمتوسط 0.932 وتراوحت قيم التباعد الوراثي بين 0.0077 و 0.0452. تم تقدير التنوع الوراثي لـ 38 طرازاً وراثياً من اللوز الإيراني المحلي باستخدام تقنيتي RADP و ISSR وقد بين (Mahood and Hama-Salih, 2020, 1739)، أن استخدام 15 بادئة ISSR أعطى 120 حزمة متباينة تراوحت بين 4 و 12 حزمة بمتوسط 8 حزمة. تراوحت قيم معامل محتوى التعددية الشكلية (PIC) بين 0.35 و 0.96 بمتوسط 0.81، وتراوحت قيم التباعد الوراثي بين 0.32 و 0.75 بمعدل 0.54 مما يشير إلى كفاءة التمييز بين المجاميع.

وفي بحث أجراه (El-Sheikh *et al.*, 2020, 9693) لدراسة التباين الوراثي لطرز من الجوز وثلاثة طرز من اللوز باستخدام تقنيتي RADP و ISSR أعطى استخدام 6 بادئات ISSR 68 حزمة 51 حزمة منها متباينة شكلياً، وتراوحت قيم التعددية الشكلية بين 63.64% و 87.5% بمتوسط 75%، أعطت البادئة A49 أقل عدد للحزم وهو 6 حزمة 4 منها متباينة بينما أعطت البادئة HB10 أكبر عدد للحزم وهو 16 حزمة 14 منها متباينة، وتراوحت قيم التباعد الوراثي بين 0.77 و 0.864.

أظهرت دراسة لـ (Abodoma *et al.*, 2018, 409) على 18 طرازاً من اللوز الليبي المزروع باستخدام تقنيتي SRAP و ISSR، أن استخدام 9 بادئات ISSR أعطت 111 حزمة، منها 109 حزمة متعددة شكلياً، بمتوسط 12.33 حزمة لكل بادئة، وأظهرت النتائج وجود تعددية شكلية كبيرة بين طرز اللوز تراوحت بين 75 و 100%، مما يعكس كفاءة تقنية ISSR في دراسة التنوع الوراثي.

وفي مقارنة أجراها (Sorkheh et al., 2017, 1) بين المعلمات الجزيئية التقليدية والحيل الجديد منها خلال دراسة التباين الوراثي بين 18 طرازاً من اللوز البري أظهرت النتائج أن 4 بادئات ISSR أعطت عدداً كلياً للحزم بمتوسط 34.75 حزمة لكل بادئة وكان متوسط عدد الحزم المتباينة لكل بادئة 19.75 حزمة ومتوسط النسبة المئوية للتعددية الشكلية 55.85%، وبلغ متوسط محتوى التعددية الشكلية 0.46.

طبق (Pinar et al., 2015, 13) تقنيتي RAPD وISSR على 95 طرازاً من اللوز لتحديد درجة التباين الوراثي بينها، وأدى استخدام 4 بادئة ISSR إلى إعطاء ما مجموعه 73 حزمة 51 حزمة منها متباينة بمتوسط تعددية شكلية 88%.

وقيم (Xing et al., 2015, 1055) التنوع الوراثي لـ 46 عينة نباتية من اللوز البري الصيني باستخدام معلمات SSR وISSR، حيث استخدمت 9 بادئات ISSR سجلت ما مجموعه 66 حزمة وكانت النسبة المئوية للتعددية الشكلية 100% وتراوح عدد الحزم بين 9 حزمة، وتراوحت قيم معامل محتوى التعددية الشكلية (PIC) بين 0.75 و0.93 بمتوسط 0.83.

وفي دراسة أجراها (Cabrita et al., 2014, 1) لتقييم التنوع الوراثي لأصول اللوز البرتغالي التقليدية، باستخدام المعلمات الجزيئية. طبقت تقنيتي SSR وISSR على 176 شجرة من اللوز وأعطت 13 بادئة ISSR 139 حزمة 72 منها متباينة شكلياً وتراوح عدد الحزم لكل بادئ ما بين 14 حزمة كأعلى قيمة و8 حزمة كأقل قيمة، وبلغت نسبة التعددية الشكلية 51.8%.

كما درس (Martins et al., 2003, 1) التباين الوراثي لـ 15 صنفاً من اللوز البرتغالي بوساطة معلمات RAPD وISSR، تم اختيار 5 بادئات ISSR من أصل 18 بادئ وأعطت البادئات المختارة 61 حزمة 59 منها متباينة شكلياً وتراوح عدد الحزم لكل بادئ ما بين 19 حزمة كأعلى قيمة و6 حزمة كأقل قيمة بمعدل 12.2 حزمة لكل بادئة، وكانت النسبة المئوية للتعددية الشكلية 96.7%.

2- هدف البحث Research Aim:

يهدف البحث إلى تحديد درجة القرابة الوراثية بين أنواع من اللوز البري المنتشرة في بعض المناطق السورية باستخدام تقنية ISSR.

3- مواد البحث وطرائقه Material and Methods

1-3- المادة النباتية Plant Material

أجريت الدراسة على شجيرات اللوز المنتشرة في ثلاث مناطق رئيسية جدول (1).

2-3- مكان تنفيذ البحث

نُفذ البحث في مخابر كلية الزراعة - جامعة دمشق، خلال العام 2020/2021.

الجدول (1): بيانات الجمع لأنواع المدروسة (*A.spartioïdes*, *A.communis*, *A.korschinskii*, *A.orientalis*, *A.arabica*) (خطوط الطول والعرض مأخوذة حسب النظام العشري)

اسم الموقع	المحافظة	خط الطول	خط العرض	الارتفاع (م)
رأس المعرة (<i>A.korschinskii</i> - <i>A.orientalis</i> - <i>A.communis</i>)	ريف دمشق	33° 56' 36"	33° 09' 72"	1820
درج (<i>A.spartioïdes</i>)	ريف دمشق	03° 26' 36"	09° 62' 33"	1090
وادي اللوزية (<i>A.arabica</i>)	حمص	28° 03' 23"	88° 27' 34"	585

3-3- استخلاص الحمض الريبي النووي منقوص الأوكسجين DNA Extraction

3-3-1- تعقيم الأوراق:

عقمت الأوراق الفتية للحصول على الحمض النووي منقوص الأوكسجين (DNA) النقي من أجل الدراسة الوراثية لكل نوع من الأنواع المدروسة ونقعت في مادة الإيثانول تركيز 70% لمدة 30 ثانية، بعد ذلك نقلت إلى ثلاثة بياشر على التوالي يحوي كل منها ماءً مقطراً معقماً، وتركت في كل بياشر لمدة 5 دقائق نقلت بعدها للبياشر الذي يليه، ونقلت هذه الأوراق إلى بياشر يحوي مادة كلوروكس 5% لمدة 5 دقائق، ثم نقلت مرة أخرى لتتقع في الماء المقطر ثلاث مرات كل منها 5 دقائق.

3-3-2- استخلاص الحمض الريبي النووي منقوص الأوكسجين DNA Extraction:

تم عزل الحمض الريبي النووي منقوص الأوكسجين (Genomic DNA) من الأوراق النباتية الطازجة بطريقة CTAB وفقاً لما أشار إليه (Murray and Thompson, 1980, 4321)، حيث وزن 0.8 غ من الأوراق النباتية لكل عينة وطحنت ضمن هاون بوجود الآزوت السائل N2liquid طحناً ناعماً حتى أصبحت على شكل مسحوق ونقلت إلى أنبوب (Eppendorf) معقمة (سعة 2ml).

أضيف لكل عينة (800µl) من محلول الاستخلاص الحاوي على المكونات التالية:

(3% (w/v) CTAB , 50mM Tris-HCl (pH8), 1.4M NaCl, 10 mM EDTA (pH8) , 1% 2-mercaptoethanol (v/v), 1% PVP (w/v)) والمحضن في حمام مائي Julabo حرارته 65° م، ثم حضنت العينات في الحمام المائي على درجة حرارة 65° م مع التحريك المستمر لمدة 30-40 دقيقة، ثم وضعت العينات في البراد على درجة حرارة 4° م لمدة 5 دقائق، ثم أضيف للعينات كمية من مادة كلوروفورم / ايزوأميل الكحول chloroform/ isoamylalcohol (1:24) مماثلة لكمية محلول الاستخلاص، وحركت الأنابيب برفق مدة عشر دقائق و ترك لمدة 20 دقيقة مع التحريك في وسط حراري 4° م، بعد ذلك وضعت الأنابيب في جهاز الطرد المركزي (Centrifuge) على سرعة (10000 rpm) ولمدة 10 دقائق على درجة حرارة 4° م، حيث تم في هذه المرحلة فصل المزيج إلى طورين، نقل بعدها الطور العلوي المنفصل بحذر إلى أنابيب جديدة سعة 1.5مل، وأعيد تنقيته مرة أخرى بكمية مماثلة من مادة chloroform/ isoamylalcohol (1:24)، ثم أضيف 500 ميكرو ليتر من isopropanol المبرد على حرارة - 20° م مع التحريك بلطف وتركت العينات بعدها على درجة حرارة - 20° م لليوم التالي وذلك من أجل ترسيب الحمض النووي DNA.

وفي اليوم التالي أعيد تثقيفها بجهاز الطرد المركزي بسرعة (10000) rpm ولمدة 10 دقائق.

تم التخلص من الرشاحة، ثم أضيف (200 µl) من محلول إيثانول 70% لراسب الحمض النووي DNA، ثقلت الأنابيب بعد ذلك بالمتقلة عند سرعة (10000) rpm مدة (5) دقائق، وجفف راسب الحمض النووي DNA عند حرارة (37°م).

وأذيب الحمض النووي DNA في (50 µl) من محلول TE المكون من 10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA على درجة (4°م).

تم التخلص من الحمض النووي RNA بإضافة (2 µl) من أنزيم RNase (10 mg/ml) والتحصين على درجة (37°م) مدة نصف ساعة، وأضيف حجم مماثل من الكلوروفورم: ايزوميل الكحول (1:24).

وبعد التثقيف ونقل الطور العلوي لأنبوب جديد أضيف له ضعف كمية المزيج من الإيثانول النقي لإعادة ترسيب الحمض النووي DNA، وتركت عند الدرجة (4°م) لمدة ساعة.

رسب المزيج بالطرد المركزي بسرعة 10000 rpm ولمدة 10 دقائق وغسل ثانية بوساطة الإيثانول 70% وجفف في الهواء للتخلص من آثار الإيثانول ضمن جهاز المجفف بالتفريغ والحرارة وأذيت الحمض النووي DNA في 50 ميكرو ليتر من محلول TE المعقم.

بعد ذلك حفظت العينات بدرجة حرارة 4م° لمدة 24 ساعة، ثم خزنت على درجة حرارة 20م° لحين الاستخدام.

4-3- تقدير كمية الحمض النووي DNA ونوعيته Estimate the Quantity and Quality of DNA

لتقدير كمية الحمض النووي DNA في العينات استخدم جهاز المطياف الضوئي (UV spectrophotometer) الذي يعتمد في عمله على قياس كمية الحمض النووي الموجودة عن طريق امتصاصه للأشعة فوق البنفسجية Ultra Violet بموجات طولها 260 و280 نانومتر.

تسمح قراءة الامتصاص على طول الموجة 260 نانومتر بحساب تركيز الحمض النووي nucleic acid في العينة بحيث أن كل واحد من الكثافة الضوئية (OD) optical density تقابل نحو 50 ميكرو غرام/ مل لسلاسل الحمض النووي DNA المضاعفة. إن النسبة بين قراءة الموجة 260 نانومتر/ إلى 280 نانومتر تساعد في تقدير نقاوة الحمض النووي ويجب أن تتراوح هذه النسبة بين 1.8-2.0 لكل من الحمض النووي DNA.

وحملت كمية قليلة من الحمض النووي المجيني DNAgenomic في هلامة من الأغاروز تركيزها 0.8% لتحديد نوعية الحمض النووي DNA المستخلصة للتأكد من عدم تقطعها حيث يجب أن يظهر الحمض النووي DNA على شكل عصابات bands عالية الوزن الجزيئي في هلامة الأغاروز.

ثم مددت عينات الحمض النووي DNA للحصول على تركيز 40 نانوغرام /ميكرو لتر لتستخدم على التفاعل البلمرة المتسلسل.

5-3- تطبيق تقنية التكررات الترادفية الداخلية البسيطة ISSR

تضمنت هذه الدراسة تطبيق تقنية الـ ISSR والتي تعتمد بشكل أساسي على تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) Polymerase Chain Reaction وتتميز هذه التقنية عن التقانات الأخرى بسهولة وسرعتها فهي لا تتطلب وقت طويل (Williams et al., 1990) ، ويتم خلال تفاعل البلمرة إكثار قطعة من الحمض النووي DNA والحصول على عدد كبير من سلاسل الحمض النووي DNA الجديدة بدءاً من قطعة واحدة وذلك بعدد من الدورات يصل حتى (40) دورة.

- أجري اختبار (23) بادئة من بادئات ISSR تم الحصول عليها من شركة Genomics eurofins.

كما استخدم 2 X PCR Master Mix والذي تم الحصول عليه من شركة (eurofins Genomics) الحاوي على المكونات التالية: Taq-Polymerase, dNTPs, MgCl₂, Buffer ويوضح الجدول (2) التسلسل النكليوتيدي للبادئات المستخدمة في الدراسة.

الجدول (2): التسلسل النيكلوتيدي للبادئات المستخدمة في تقنية ISSR ودرجة حرارة الالتحام.

درجة حرارة الالتحام °C	التسلسل النيكلوتيدي '5-'3	البادئة
50	CACACACACACACAAA	P-1
48	GGAGAGGAGAGGAGA	P-3
56	CCAGGTGTGTGTGTGTGT	P-5
52	GAGAGAGAGAGAGAGAC	P-2
52	CACACACACACACACAG	P-4
56	GAGAGAGAGAGAGAGACG	P-6
54	TCTCTCTCTCTCTCGA	P-7
54	TCTCTCTCTCTCTCAG	P-8
56	ACACACACACACACCGG	P-9
56	CCAGGTGTGTGTGTGTGT	P-13
54	GTGTGTGTGAGAGAGAGA	P-14
54	ACACACACACACACATATAT	P-15
56	CCTCTCTCTGTGTGTGTG	P-16
56	CACACACACACACACACACA	P-20
54	GAGAGAGAGAGAGAGAGAGA	P-23
54	AGGAGGAGGAGGAGGAGG	P-25
52	AGAGAGAGAGAGAGAGAT	P-36
52	GAGAGAGAGAGAGAGAT	P-35
52	CTCTCTCTCTCTCTT	P-32
52	CACACACACAACAG	P-33
52	TCTCTCTCTCTCTCC	P-36
52	TGTGTGTGTGTGTGTGG	P-37
52	ACACACACACACACTT	P-40

أجري تفاعل الـ PCR وفقاً لـ (Williams *et al.*, 1990, 6531) فكان حجم التفاعل النهائي (25 µl) كما يظهر الجدول رقم (3) مكونات هذا التفاعل:

الجدول (3): مكونات تفاعل الـ PCR

مكونات الـ PCR	الكميات
2X master Mix	12.5
DNA(40 ng/µl)	2 µl
Primer (10pmol/µl)	2 µl
H2O	حتى الوصول إلى 25 µl

وتم هذا التفاعل في جهاز التدوير الحراري من شركة (Technet- 512, UK) موديل ATC401 وفقاً للظروف التالية:

❖ الانفصال: عند درجة حرارة 94م لمدة دقيقة واحدة ليتم انفصال سلسلتي الـ DNA.

❖ 40 دورة تتضمن كل منها المراحل التالية:

1. التحطم: يتم عند حرارة 94م لمدة 30 ثانية.

2. التهام حسب درجة حرارة البادئات الموجودة في الجدول (2) وذلك لمدة دقيقة واحدة.

3. الاستطالة: عند حرارة 72م لمدة دقيقة واحدة.

4. اكتمال التفاعل عند حرارة 72م مدة عشر دقائق.

ثم حفظت العينات في درجة حرارة 4م لتفصل الحزم بعدها بالرحلان الكهربائي على هلامه الأغاروز.

3-6- الرحلان الكهربائي والتلوين والتصوير:

تم الترحيل على هلامه الأغاروز 2% بالنسبة لتقنية ISSR وذلك لفصل قطع الحمض النووي DNA الناتجة عن التضخيم وفق الخطوات التالية:

- تحضير صبغة الترحيل 10X Bromophenol blue الحاوية على المكونات التالية:

(15% Ficoll 400 + 1.03 % bromophenol Blue + 0.03 % xylene cyanol FF + 0.4 % Orange G + 10 mM Tris-HCl + 50 mM EDTA)

ثم أضيف 2.5µl من هذه الصبغة لـ 25µl عينة من منتجات التضخيم وحقنت في أبار هلامه الأغاروز التي تم تحضيرها بإضافة 2 g من الأغاروز أو 4غ من ميتا فور أغاروز لـ 100 ml من محلول

1X TBE (10 ml 10X TBE buffer +90 ml distilled water)

10X TBE buffer (108g Tris borate+55 g Boric acid+9.3 g EDTA,pH 8.0)

و5µl من صبغة الايثيديوم برومايد (50 mg/ml) كما تم حقن عينة من مؤشر الـ DNA 1000-bp وذلك لتحديد الطول الجزيئي

للحزم الناتجة وتم الرحلان الكهربائي من خلال حقل كهربائي قدره 100 فولط ولمدة ساعتين ونصف ثم تتم مشاهدة حزم الحمض النووي DNA بوجود الأشعة فوق البنفسجية UV-light وتم تصوير الهلام الحاوية على الحزم.

3-7- التحليل الإحصائي Statistical Analysis

جُمعت نتائج عملية التضخيم في جداول اعتماداً على مقارنة وجود أو غياب قطع DNA بين النباتات التي جمعت من المواقع المختلفة، حيث أعطي الرقم (1) عند وجود حزمة الـ DNA والرقم (0) لعدم وجود حزمة DNA، ذلك يتضمن الحزم الواضحة فقط وقد نظمت الجداول لكل بادئة على حده، ورسمت شجرة القرابة الوراثية Dendrogram بتطبيق متوسطات المجموعات الزوجية غير الموزنة UPGMA Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averaging باستخدام برنامج Popgene 1.31 الإحصائي. وتم حساب قيم محتوى التعددية الشكلية (PIC_i) Polymorphism Information Content لكل حزمة وفقاً لـ (De Riek et al., 2001, 1255) حسب العلاقة التالية:

$$PIC_i = 1 - [f^2 + (1 - f)^2]$$

حيث f تكرارية الحزم الموجودة و $(1 - f)$ تكرارية الحزم الغائبة.

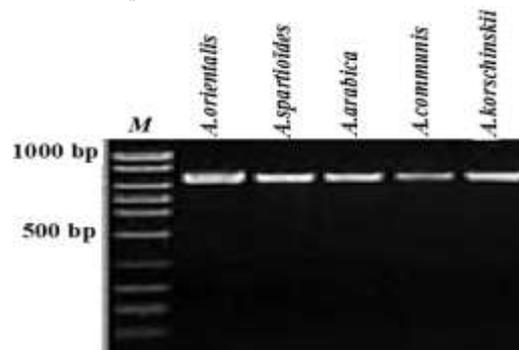
ثم تم حساب محتوى التعددية الشكلية لكل بادئة من البادئات المستخدمة على مستوى الموقع الواحد حسب العلاقة التالية:

$$PIC = 1/n \sum_{i=1}^n PIC_i$$

حيث n هو عدد حزم البادئة التي أعطت تعددية شكلية.

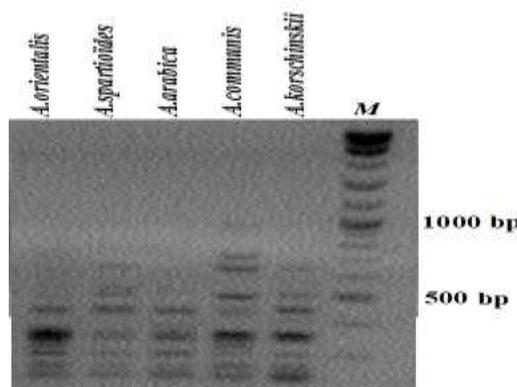
4- النتائج والمناقشة Results and Discussion

استخلص الحمض النووي DNA من الأوراق الفتية وقيس تركيزه ونقاوته بجهاز المطياف الضوئي. حيث تراوحت التراكيز بين 0.263 و 0.450 $\mu\text{g} / \mu\text{l}$ وكانت نقاوة العينات بين 1.85-1.96، ومدد تركيز الحمض النووي DNA ليصبح 140 ng/ μl ، وطبقت عملية الرحلان الكهربائي على هلامة الأغاروز بتركيز 0.8% لمعرفة نوعية الحمض النووي DNA المستخدم إذ يظهر الحمض النووي DNA ذو النوعية الجيدة على شكل حزمة Band من أجل استخدامها في تقنية ISSR شكل (1).



الشكل (1): اختبار نوعية الحمض النووي DNA المستخلص من الأنواع الوراثية المدروسة (*A. spartioides*, *A. communis*, *A. korschinskii*,) بعد تمريرها على هلامة الأغاروز 0.8% وتلوينها بالايثيديوم برومايد حيث M: بوجود معلم نو وزن جزيئي (100 bp) 1-4- تقنية التضخيم لسلسلة الحمض النووي DNA المتباينة شكلياً PCR-ISSR:

طبقت تقنية ISSR للتمييز بين العينات المدروسة فتم اختبار 23 بادئة فأعطت كل منها حزم واضحة وذات تعددية شكلية كما يبين الشكل (2).



الشكل (2): صورة هلامة الأغاروز 2% لملاحظة التعددية الشكلية الناتجة عن استخدام البادئة (P-9) في جميع الأنواع المدروسة (*A. spartioides*,) *A. communis*, *A. korschinskii*, *A. orientalis*, *A. arabica*، حيث M يمثل المؤشر الجزيئي لتحديد الأوزان وأحجام حزم الحمض النووي DNA.

2-4- التعددية الشكلية polymorphism الناتجة عن تطبيق تقنية ISSR.

طبقت تقنية ISSR للتمييز بين الأنواع المدروسة حيث استخدم 23 بادئة من بادئات ISSR وأعطت 21 بادئة نتائج التضخيم ونجم عن استخدام هذه البادئات ما مجموعه 95 حزمة منها 93 حزمة ذات تعددية شكلية Polymorphic وبلغت النسبة المئوية للتعددية الشكلية 96.51% كما أعطت 18 بادئة

(P-3, P-5, P-6, P-7, P-8, P-9, P-13, P-14, P-16, P-23, P-26, P-28, P-30, P-32, P-33, P-36, P-37, P-40) النسبة المئوية الأعلى للتعددية الشكلية والتي بلغت 100% في حين كانت النسبة المئوية للتعددية الشكلية الأقل 66.66% مع البادئة (P-15). وتراوح عدد الحزم ذات التعددية الشكلية بين 2 حزمة مع البادئتين (P-8 و P-15) و6 حزم مع البادئات (P-30, P-37) بمتوسط قدره 4.42 لكل بادئة.

وإن البادئات (P-30, P-36, P-37) أعطت أعلى عدد من الحزم 6 حزم فهذا يدل على أن هذه البادئات ذات دلالة أكبر للتنوع الوراثي مقارنة مع البادئة P-8 التي أعطت أقل عدد من الحزم وهو (2) حزمة. وبما أن نسبة التعددية الشكلية 96.51% فهذا يدل على فعالية تقنية ISSR في كشف التباينات الشكلية بين الأنواع المدروسة الجدول (4).

توافقت النتائج التي تم الحصول عليها مع (Rahimidvin *et al.*, 2020, 287; Abodoma *et al.*, 2018, 409; Pinar *et al.*, 2003, 1; El-Sheikh *et al.*, 2020, 9693;) وتخالفت مع (al.,2015, 13; Xing *et al.*, 2015, 1055; Martins *et al.*, 2003, 1; Sorkheh *et al.*, 2017, 1; Cabrita *et al.*, 2014, 1).

يظهر الجدول (4) أن قيمة معامل التنوع الوراثي PIC وفقاً لـ (Nei, 1973) تراوح بين 0.0525 مع البادئة P-8 و0.4998 مع البادئة P-25 بمتوسط قدره 0.4132، تزودنا قيمة التنوع الوراثي PIC لموقع وراثي ما على الجينوم بقدرته على التمييز بين العينات المدروسة وبمعنى آخر تعبر قيمة PIC عن احتمال أن تمتلك العينتان المحسوبتان عشوائياً موقعين مختلفين لذات الموقع الوراثي (Botstein *et al.*, 1980).

توافقت النتائج التي تم الحصول عليها مع (Sorkheh *et al.*, 2017, 1)، وتخالفت مع (Rahimidvin *et al.*, 2020, 287;) (Mahood and Hama-Salih, 2020, 1739; Xing *et al.*, 2015, 1055)

الجدول (4): رموز البادئات المستخدمة، عدد الحزم الكلية والمتعددة شكلياً، النسبة المئوية للتعددية الشكلية ومعامل التعددية الشكلية في تقنية ISSR.

اسم البادئ	عدد الحزم الكلية	عدد الحزم المتباينة شكلياً	النسبة المئوية للتعددية الشكلية	معامل التعددية الشكلية PIC
P-1	5	4	80	0.4712
P-3	4	4	100	0.480
P-5	4	4	100	0.480
P-6	5	5	100	0.4488
P-7	4	4	100	0.375
P-8	2	2	100	0.0525
P-9	5	5	100	0.420
P-13	5	5	100	0.4928
P-14	4	4	100	0.3988
P-15	3	2	66.66	0.4902
P-16	4	4	100	0.3988
P-23	4	4	100	0.420
P-25	5	4	80	0.4998
P-26	4	4	100	0.480
P-28	5	5	100	0.4712
P-30	6	6	100	0.4712
P-32	5	5	100	0.4712
P-33	5	5	100	0.3432
P-36	6	6	100	0.4872
P-37	6	6	100	0.4992
P-40	4	4	100	0.4988
المجموع	95	93		
المتوسط	4.52	4.42	96.51	0.4132

3-4- تحديد درجة القرابة الوراثية بين الأنواع الوراثية المدروسة

يُفيد تحديد درجة القرابة الوراثية بين الأنواع في برامج تربية النبات، في تأمين قاعدة وراثية كبيرة. وتمت دراسة العلاقة الوراثية بين الأنواع المدروسة بتطبيق مصفوفة النسب المئوية لعدم التوافق Percent Disagreement Values (PDV) حيث أن ارتفاع قيم هذه المصفوفة يدل على وجود اختلاف وراثي ويزاد التباين الوراثي بين الأنواع المدروسة ويتم إنشاء هذه المصفوفة وفقاً لعدد وحدات التضاعف المشتركة.

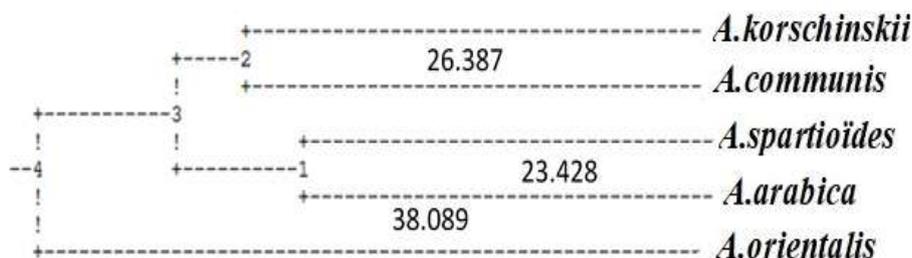
يظهر الجدول (5) أن أقل قيمة لـ PDV هي 0.4686 بين النوع *A. communis* والنوع *A. korschinskii* بينما كانت أعلى قيمة لها 0.927 بين النوع *A. spartioides* والنوع *A. arabica* مما يدل على وجود تباين وراثي كبير بينها. توافقت النتائج التي تم الحصول عليها مع (Mahood and Hama-Salih, 2020, 1739; El-Sheikh et al., 2020, 9693)، وتخالفت مع (Rahimidvin et al., 2020, 287)

الجدول (5): مصفوفة النسب المنوية لعدم التوافق (PDV) بين الأنواع المدروسة (*A.spartioïdes*, *A.communis*, *A.korschinskii*, *A.orientalis*, *A.arabica*) والشاهد والنتيجة عن تطبيق متوسطات المجموعات الزوجية غير المزانة UPGMA بتطبيق تقانة الـ ISSR.

<i>A.korschinskii</i>	<i>A.communis</i>	<i>A.arabica</i>	<i>A.spartioïdes</i>	<i>A.orientalis</i>	
				****	<i>A.orientalis</i>
			****	0.5278	<i>A.spartioïdes</i>
		****	0.9271	0.7448	<i>A.arabica</i>
	****	0.6304	0.5524	0.5156	<i>A.communis</i>
****	0.4686	0.7448	0.7448	0.6170	<i>A.korschinskii</i>

5-4- التحليل العنقودي (Cluster Analysis) للأنواع المدروسة الناتج عن استخدام تقنية ISSR:

يسمح التحليل العنقودي بتقسيم الأنواع المدروسة إلى مجموعات وتعكس هذه المجموعات درجة القرابة الوراثية فيما بينها. أجري التحليل العنقودي للنتائج التي تم الحصول عليها وذلك لإنشاء شجرة القرابة الوراثية Dendrogram وتحديد درجة القرابة الوراثية بين الأنواع المدروسة من اللوز من أجل الحصول على قاعدة وراثية كبيرة. يظهر الشكل (3) أنّ الأنواع المدروسة توزعت في عنقودين رئيسيين ضم العنقود الأول تحت عنقودين، حيث ضم تحت العنقود الأول النوعين: *A.spartioïdes* و *A.arabica* بمسافة وراثية بلغت 23.428 حيث كانا على درجة من القرابة الوراثية، في حين ضم تحت العنقود الثاني النوعين *A.korschinskii* و *A.communis* بمسافة وراثية بلغت 26.387، بينما أنفرد النوع *A.orientalis* في تحت العنقود الثاني بمسافة وراثية 38.089.



الشكل (3): شجرة القرابة الوراثية بين الأنواع المدروسة (*A.spartioïdes*, *A.communis*, *A.korschinskii*, *A.orientalis*, *A.arabica*) باستخدام تقنية ISSR بحسب طريقة UPGMA.

5- الاستنتاجات والتوصيات:

1. أظهرت تقنية ISSR تعددية شكلية Polymorphic بين الأنواع المدروسة في تفاعل التسلسلي البوليميري وبلغت نسبتها 96.51%، وبلغ المتوسط العام لمعامل التعددية الشكلية (PIC) 0.4132، ما يشير إلى قدرة البادئات المستعملة على التمييز بين الأنواع المدروسة.
2. أظهر التحليل العنقودي وشجرة القرابة الوراثية أنّ الأنواع المدروسة توزعت في عنقودين رئيسيين حيث انفصلت حسب توزعها الجغرافي.
3. يمكن العمل مستقبلاً على تحديد مواقع المورثات المسؤولة عن الصفات المهمة باستخدام QTLs وعزلها.

المراجع References:

1. شلبي، محمد نبيل؛ رفيق، الرئيس؛ عبد الله، غزال؛ نابغ، غزال اسود (1997). تحريات أولية بيئية وجغرافية نباتية حول الأصول البرية لجنس اللوز. *Amygdalus L.* في سورية المركز العربي (أكساد)، دمشق: سوريا.
2. كرزون، سليمان (1996). الكستناء *Castania sativa* في سوريا بيئتها الذاتية والاجتماعية كشجرة متعددة الأغراض في الزراعات البستانية. رسالة ماجستير. جامعة حلب 164 صفحة.
3. نحال، إبراهيم (1989). مساهمة في دراسة التنوع البيولوجي في سورية. مجلة بحوث جامعة حلب، العدد الثاني عشر، ص 141-123.
4. نحال، إبراهيم (2002). علم البيئة الحراجية. منشورات جامعة حلب، 370 صفحة.
5. نحال، إبراهيم (2003). علم الشجر (الندروولوجيا). منشورات مديرية الكتب والمطبوعات جامعة حلب. كلية الزراعة. 630 صفحة.
6. وزارة الإدارة المحلية والبيئة (2016). التقرير الوطني الخامس لاتفاقية التنوع الحيوي، 90 صفحة.
7. Abodoma, A. F., Shehata, M. M., Elsherif, N. S., Amar, M. H., Khar, Kh. A. (2018): Biodiversity assessment for some almond genotypes cultivated in Libya using SRAP and ISSR. – Egyptian Journal of Genetics and Cytology, 46(2), 409–431. <https://doi.org/10.21608/ejgc.2018.9212>
8. Albani, M. C. and Wilkinson, M. J. (1998). Inter simple sequence repeat polymerase chain reaction for the detection of somaclonal variation. Plant Breed. 117:573-575.
9. AmmiRaju, S., Dholakia, B., Santra, K., Singh, H., Lagu, D., Tamhankar, A., Dhaliwal, S., Rao, S. Gupta, and P.K. Ranjekar (2001). Identification of inter-simple sequence repeat (ISSR) markers associated with seed size in wheat. Theoretical and Applied Genetics. 102: 726-732.
10. Ardjmand A., Piri S., Imani A., Piri S., (2014). Evaluation of morphological and pomological diversity of 62 almond cultivars and superior genotypes in Iran. J. Nuts, 5(1): 3950.
11. Bioersivity International. (2019). Financial Statements, P:80.
12. Blair, M.W., Panaud, O. and McCouch, S.R. (1999). Inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification for analysis of microsatellite motif frequency and fingerprinting in rice (*Oryza sativa L.*). Theor. Appl. Genet. 98 780-792.
13. Borner, B. and M. Branchard. (2001). Non-anchored inter-simple sequence repeat (ISSR) markers: reproducible and specific tools for genome fingerprinting. Plant Molecular Biology Reporter 22:427–432.
14. Bosissier E. (1872). Flora Orientalis, 2, Basileae et Genevae.
15. Botstein D., white R.L., Skolinck M. and Davis R.W.1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. AM.J. hum. Genet.32:314-331.
16. Cabrita, L., Apostolova, E., Neves, A., Marreiros, A., & Leitão, J. (2014). Genetic diversity assessment of the almond (*Prunus dulcis* (Mill.) D.A. Webb) traditional germplasm of Algarve, Portugal, using molecular markers. Plant Genetic Resources: Characterisation and Utilisation, 12(SUPPL. 1). <https://doi.org/10.1017/S1479262114000471>
17. Cavan, G., Potier, V. and Moss, S.R. (2000). Genetic diversity of weeds growing in continuous wheat. Weed Res. 40 301-310.

18. Chowdhury, M.A.; B, Vandenberg and T., Warkentin. (2002). **Cultivar identification and genetic relationship among selected breeding lines and cultivars in chickpea (*Cicer arietinum* L.)**. Euphytica 127:317–325.
19. Cohen J.I., Williams J.T., Plucknett D.L., Shands H. (1991). **Ex situ conservation of plant genetic resources: global development and environmental concerns**. Science, 253(5022): 866-872.
20. De Riek, J.; Calsyn, E.; Everaert, I.; Van, Bockstaele, E.; De Loose, M. AFLP. (2001). **AFLP based alternatives for the assessment of distinctness, uniformity and stability of sugar beet varieties**. Theoretical and Applied Genetics 103: 1254-1265. doi: 10.1007/s001220100710.
21. El-Sheikh, M. H., Ghareeb, R. Y., Ibrahim, A. A., & Hafez, E. E. (2020). **Genetic diversity among juglans regia and prunus dulcis genotypes using RAPD and ISSR molecular markers** (Vol. 20, Issue 2).
22. Fang, D. Q., M. L. Roose, R. R. Krueger, and C. T. Federici. (1997). **Fingerprinting trifoliolate orange germplasm accessions with ribozymes, RFLPs, and inter-simple sequence repeat markers**. Theoretical and Applied Genetics 95: 211–219.
23. Fu- Rong G., Jian- Ying G., 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. V.18(4) pp: 919-927.
24. Gharaghani A., Solhjoo S., Oraguzie N. (2017). **A review of genetic resources of almonds and stone fruits (*Prunus* spp.) in Iran**. Genetic Res. Crop Evol., 64(3): 611640.
25. Gudin, S. (2000). **Rose: genetics and breeding**. Plant Breeding Reviews, (J. Janick Ed.), John Wiley and Sons, Inc., 17, 159-189.
26. Gupta, M., Y.S. Chyi, J. Romero-Severson and J.L. Owen. (1994). **Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats**. Theor Appl Genet., 89: 998-1006.
27. Jain, A.; C, Apparanda and P.L, Bhalla. (1999). **Evaluation of genetic diversity and genome fingerprinting of *Pandorea* (Bignoniaceae) by RAPD and inter-SSR PCR**. Genome, 42: 714-719.
28. Kijas, J.M.H.; J.C.S., Fowler and M.R., Thomas. (1995). **An evaluation of sequence tagged microsatellite site markers for genetic analysis within Citrus and related species**. Genome 38:349–355.
29. Korbin, M., Kuras, A. and Żurawicz, E. (2002). **Fruit plant germplasm characterisation using molecular markers generated in RAPD and ISSR-PCR**. Cell. Mol. Biol. Lett. 785-794.
30. Leroy, X.J. and Leon, K. A. (2000). **rapid method for detection of plant genomic instability using unanchored-microsatellite primers**. Plant Mol. Biol. Rep. 18 283a-283g.
31. Mahood, A. M. R., & Hama-Salih, F. M. (2020). **Characterization of genetic diversity and relationship in almond (*Prunus dulcis* [mill.] d.a. webb.) genotypes by rapid and issr markers in Sulaimani governorate**. Applied Ecology and Environmental Research, 18(1), 1739–1753. https://doi.org/10.15666/aeer/1801_17391753
32. Martins, M., R. Tenreiro and M.M. Oliveira (2003). **Genetic relatedness among Portuguese almond cultivars assessed by RAPD and ISSR markers**. Plant Cell Reports, 22(1): 71-78. [Impact Factor/5-Year Impact Factor (JCR 2011) = 2.274/2.743]
33. Michelini L. A and A. R, Hallauer. (1993). **Evaluation of exotic and adapted maize (*Zea mays* L.) Germplasm crosses**. Maydica38,275-282.
34. Mouterde, P.(1966). **Nouvelle Flore Du Liban et La Syrie. II**, Beirut.

35. Murray. M.G. and W.F Thompson. (1980). **Rapid isolation of high molecular weight DNA.** Nucleic Acids Res 8: 4321- 4325.
36. Nagaraju, J., Kathirvel, M., Ramesh Kumar, R., Siddiq, E.A. and Hasnain, S.E. (2002). **Genetic analysis of traditional and evolved Basmati and non-Basmati rice varieties by using fluorescence-based ISSR-PCR and SSR markers.** Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99 5836-5841.
37. Nei, M. (1973). **Analysis of gene diversity in subdivided populations.** Proc Natl AcadSciUSA 70:3321-3323.
38. Nesbitt, M. (1995). **Plants and people in ancient Anatolia.** Biblical Archaeologist 58(2):68-81.
39. Pinar, H., Ercisli, S., Unlu, M., Bircan, M., Uzun, A., Keles, D., Baysal, F., Atli, H. S., & Yilmaz, K. U. (2015). **Determination of genetic diversity among some almond accessions.** Genetika, 47(1), 13–22. <https://doi.org/10.2298/GENSR1501013P>
40. Rahemi A., Fatahi R., Ebadi A., Taghavi T., Hassani D., Gradziel T., Folata K., Chaparro J. (2012). **Genetic diversity of some wild almonds and related Prunus species revealed by SSR and EST-SSR molecular markers.** Plant System. Evol., 298(1): 173-192.
41. Rahimidvin, S., Gharaghani, A., & Pourkhaloee, A. (2020). **Genetic diversity, population structure, and relationships among wild and domesticated almond (Prunus spp.) germplasms revealed by ISSR markers.** Adv. Hort. Sci, 34(3), 287–300. <https://doi.org/10.13128/ahsc7415>
42. Raina, S.N., Rani, V., Kojima, T., Ogihara, Y., Singh, K.P. and Devarumath, R.M. (2001). **RAPD and ISSR fingerprints as useful genetic markers for analysis of genetic diversity, varietal identification, and phylogenetic relationships in peanut (Arachis hypogaea) cultivars and wild species.** Genome 44. 763-772.
43. Rehder, A. (1940). **Manual of cultivated trees and shrubs hardy in north america.** 2nd ed New York. USA. Macmillam. 996 pp
44. Rostiana, O., Niwa, M. and Marubashi, W. (1999). **Efficiency of inter-simple sequence repeat PCR for detecting somaclonal variation among leaf-culture-regenerated plants of horseradish.** Breed. Sci. 49 245-250
45. Sánchez-Pérez, R., Pavan, S., Mazzeo, R., Moldovan, C., Cigliano, R. A., Del Cueto, J., Ricciardi, F., Lotti, C., Ricciardi, L., Dicenta, F., López-Marqués, R. L., Møller, B. L. (2019): **Mutation of a bHLH transcription factor allowed almond domestication.** – Science 364(6445): 1095-1098.
46. Sorkheh, K., Dehkordi, M. K., Ercisli, S., Hegedus, A., & Halász, J. (2017). **Comparison of traditional and new generation DNA markers declares high genetic diversity and differentiated population structure of wild almond species.** In Scientific Reports (Vol. 7, Issue 1). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-06084-4>
47. Sreekanth P.M., Balasundaran M., Nazeem P.A., Suma T.B. (2012). **Genetic diversity of nine natural Tectona grandis L. f. populations of the Western Ghats in Southern India.** Conservation Genetics, 13(5): 1409-1419.
48. Tautz, D. and M., Renz. (1984). **Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes.** Nucleic Acids Research 12:4127–4138.
49. Van der Nest, M.A., Steenkamp, E.T., Wigfield, B.D. and Wingfield, M.J. (2000). **Development of simple sequence repeat (SSR) markers in Eucalyptus from amplified inter-simple sequence repeats (ISSR).** Plant Breed. 119. 433-436.
50. Velasco D, Hough J, Aradhya M, Ross-Ibarra J. (2016). **Evolutionary genomics of peach and almond domestication.** G3 (Bethesda)6: 3985–3993.

51. Weiss, H. (1997). **Leilān, in: H. Weiss. (ed.). Archaeology in Syria.** American Journal of Archaeology, 101, pp. 126-129.
52. Williams J. G. K., A. R. Kubelik K. J. Livak, J. A. Rafalski, and S. V. Tingey. (1990). **DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers.** Nucleic Acids Research 18 (22):6531-6535.
53. Wolfe, A.D., Xiang, Q.-Y and Kephart, S.R. (1998). **Assessing hybridization in natural populations of Penstemon (Scrophulariaceae) using hypervariable inter simple sequence repeat markers.** Mol. Ecol. 71(1998) 1107-1125.
54. Xing, C., Tian, Y., Guan, F., & Meng, F. (2015). **Evaluation of genetic diversity in *Amygdalus mira* (Koehne) Ricker using SSR and ISSR markers.** Plant Systematics and Evolution, 301(3), 1055–1064. <https://doi.org/10.1007/s00606-014-1136-3>
55. Ziekiewicz, E.; Rafalski, A. and A., Labuda. (1994). **Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) anchored pol.**