



وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة ديالى

كلية التربية للعلوم الصرفة

قسم علوم الحياة

دراسة جزيئية لبعض اصناف العنب المزروعة في محافظة ديالى بمؤشرات

SSR و RAPD

رسالة مقدمة إلى

مجلس كلية التربية للعلوم الصرفة_جامعة ديالى

وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الحياة

علم النبات

من قبل

علا رباح محمود القره غولي

بكالوريوس علوم حياة 2014

باشراف

أ.م.د.

عمار احمد سلطان

1438 هـ

أ.د.

نجم عبدالله جمعه

2017م

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

﴿ وَهُوَ الَّذِي أَنْزَلَ مِنَ السَّمَاءِ مَاءً فَأَخْرَجْنَا بِهِ نَبَاتَ كُلِّ شَيْءٍ
فَأَخْرَجْنَا مِنْهُ خَضِرًا نُخْرِجُ مِنْهُ حَبًّا مُتَرَاكِبًا وَمِنَ النَّخْلِ مِن
طَلْعِهَا قِنْوَانٌ دَانِيَةٌ وَجَنَّاتٍ مِّنْ أَعْنَابٍ وَالزَّيْتُونَ وَالرُّمَّانَ مُشْتَبِهًا
وغير مُتَشَبِهٍ ^ط أَنْظِرُوا إِلَى ثَمَرِهِ إِذَا أَثْمَرَ وَيَنْعِهِ ^ج إِنَّ فِي ذَٰلِكُمْ لَآيَاتٍ
لِّقَوْمٍ يُؤْمِنُونَ ﴾

صدق الله العظيم

سورة الانعام: الآية ٩٩

{الاهداء}

إلى الذي لا معبود بحق إلا هو سبحانه وتعالى عالم الغيب والشهادة (الله جل جلاله)
إلى من بلغ الرسالة وأدى الأمانة ونصح الأمة إلى رسول الله (سيدنا محمد صلى الله عليه
وسلم)

إلى من كل العرق جبينه . . وشققت الأيام يديه . . إلى من علمني أن الأعمال الكبيرة لا
تتم إلا بالصبر . . رحمه الله وجعله من الشهداء المكرمين ، والذي الشهيد المقدم
(رباح محمود القره غولي)

إلى التي تسكن جنتي تحت قدميها وتغفو راحتي على كفيها . . إلى من نذرت عمرها في
إداء رسالة صنعتها من أوراق الصبر على سراج الأمل بلا فتور أو كلل (امي)

إلى سندي وحببي وقوتي وملاذي بعد الله (زوجي محمد نوري)
إلى اهل بيتي الأعزاء الكرام (والد ووالدة زوجي) حفظهم الله ورعاهم
إلى من اشتروا لنا ليلاً آمناً بدمائهم الطاهرة شهداء عراقنا البواسل

إلى صغيري وملاكي ونور عيني ابني علي

علاء

الشكر والتقدير

قال الله تعالى (رب أوزعني أن أشكر نعمتك التي أنعمت علي وعلى والدي وأن أعمل صالحا ترضاه وأدخلني برحمتك في عبادك الصالحين) الآية ١٩ سورة النمل.

الحمد لله رب العالمين والصلاة والسلام على سيدنا محمد وعلى آله الطيبين الطاهرين وصحبه المنتجبين، الحمد لله على ما أنعم علينا وهدانا إلى طريق العلم والمعرفة ووقفنا إلى إتمام البحث فجلاله قويت عزيمتي وبه كان توفيقى وعليه توكلت.

أتقدم بالشكر الجزيل والإمتنان الخالص والإحترام الكبير إلى أساتذتي و مشرفي أ.د نجم عبدالله جمعة و أ.م.د. عمار احمد سلطان لتوجيهاتهم العلمية السديدة ومتابعتهم لي وحرصهم الشديد على إتمام البحث على نحو علمي فشكراً لكم أساتذتي وشكراً لصبركم الجميل وجهدكم الكبير معي فجزاكم الله عني خير الجزاء وأعزكم بعزه. كما أقدم شكري واعتزاري إلى م.د. اسراء عبد الرزاق مجيد في جامعة بغداد /كلية العلوم على مساعدتها لي في تسهيل مهمة بحثي . وأيضاً اتقدم بالشكر الجزيل والامتنان إلى كل من الدكتورة الفاضلة شذى عايد يوسف/وزارة العلوم والتكنولوجيا و الدكتورة اسيل كاظم /جامعة ديالى على اعطائهما لي النصائح القيمة .

وأتقدم بالعرفان والجميل إلى عمادة كلية التربية للعلوم الصرفة واساتذة قسم علوم الحياة الذين أتاحوا لي فرصة الدراسة وإنجاز متطلبات البحث.

ويمتد شكري وتقديري إلى كل من الدكتور عدنان حسين الوكاع في كلية الزراعة، والاخ الاستاذ لبيد محمود البياتي والاستاذ المفيد محمود البياتي لمساعدتهما لي في كتابة البحث ، ومن باب الوفاء والامتنان اتقدم بجزيل الشكر إلى م.م نسرين صبار هاشم لمساعدتها القيمة لي في اثناء البحث ، وإلى جميع الناس الطيبين الذين وقفوا معي طوال مدة الدراسة.

عادل

اقرار المشرفيين

نشهد بأن إعداد هذه الرسالة الموسومة بـ (دراسة جزيئية لبعض أصناف العنب المزروعة في محافظة ديالى بمؤشرات RAPD وSSR) التي قدمتها طالبة الماجستير (علا رباح محمود) قد جرت تحت إشرافنا وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في تربية علوم الحياة.

التوقيع:

المشرف: أ.م.د. عمار احمد سلطان

التاريخ: 2018/ /

التوقيع:

المشرف: أ.د. نجم عبدالله جمعة

التاريخ: 2018/ /

اقرار رئيس قسم علوم الحياة

بناءً على التوصيات المتوافرة أرشح هذه الرسالة للمناقشة

التوقيع:

الاسم: أ.م.د.عمار احمد سلطان

رئيس قسم علوم الحياة

التاريخ: 2018 / /

إقرار المقوم اللغوي

أشهد بأن الرسالة الموسومة بـ(دراسة جزيئية لبعض أصناف العنب المزروعة في محافظة ديالى بمؤشرات RAPD وSSR) التي قدمتها طالبة الماجستير (علا رباح محمود) قد تمت مراجعتها من الناحية اللغوية وصحح ما ورد فيها من أخطاء لغوية وتعبيرية وبذلك أصبحت الرسالة مؤهلة للمناقشة بقدر تعلق الامر بسلامة الأسلوب وصحة التعبير.

التوقيع:

الاسم:

التاريخ: / / 2018

إقرار الخبير العلمي

أشهد بأن الرسالة الموسومة بـ(دراسة جزيئية لبعض أصناف العنب المزروعة في محافظة
ديالى بمؤشرات RAPD و SSR) التي قدمتها طالبة الماجستير (علا رباح محمود) قد
تمت مراجعتها من الناحية العلمية وبذلك أصبحت الرسالة مؤهلة للمناقشة.

التوقيع:

الاسم:

التاريخ: / / 2018

إقرار لجنة المناقشة

نشهد بأننا أعضاء لجنة المناقشة قد اطلعنا على الرسالة الموسومة بـ (دراسة جزئية لبعض أصناف العنب المزروعة في محافظة ديالى بمؤشرات RAPD وSSR) التي قدمتها طالبة الماجستير (علا رباح محمود) وناقشنا الطالب في محتوياتها وفيما له علاقة بها بتاريخ / / 2017 وانها جديرة بالقبول لنيل درجة الماجستير في تربية علوم الحياة.

التوقيع :

الاسم: رئيس باحثين د. شذى عايد يوسف

التاريخ / / 2018

عضواً

التوقيع:

الاسم: م.د. أسيل كاظم هادي

التاريخ / / 2018

عضواً

التوقيع :

الاسم: أ.د. نجم عبدالله جمعة

التاريخ / / 2018

عضواً ومشرفاً

التوقيع:

الاسم: أ.م.د. عمار احمد سلطان

التاريخ / / 2018

عضواً ومشرفاً

التوقيع

الاسم: أ.د. كاظم محمد ابراهيم

التاريخ / / 2018

رئيس اللجنة

صدقت الرسالة من قبل مجلس كلية التربية للعلوم الصرفة - جامعة ديالى

أ.م.د. نصيف جاسم محمد الخفاجي

عميد كلية التربية للعلوم الصرفة / وكالة

التاريخ : / / 2018

الخلاصة

اجريت هذه الدراسة في مختبر الوراثة الجزيئية في كلية التربية للعلوم الصرفة /جامعة ديالى للكشف عن التباين الوراثي وتقدير البعد الوراثي بين سبع اصناف من العنب المحلي *Vitis vinifera* L. وهي الفرنسي، الكمالي، ديس العنز، الاعجمي، الحلواني، الزيتوني والاسود شدة. استعمل 15 بادئا " عشوائيا" للتحري عن مؤشرات الدنا بتقانة التضاعف العشوائي المتعدد الاشكال لسلسلة الدنا (RAPD) Random Amplified Polymorphic و 10 بوادئ متخصصة للتحري عن مؤشرات الدنا بتقانة المقاطع البسيطة المتكررة (SSR) Simple Sequence Repeat والمعتمدة على تفاعل البلمرة الحراري (PCR) Polymerase Chain Reaction . تضمنت خطوات العمل عزل وتنقية الدنا من الأوراق الفتية للأصناف الداخلة في الدراسة، إذ تم الحصول على تراكيز من الدنا وبنقاوة تراوحت ما بين 1.8-2 . نفذت تفاعلات البلمرة المتسلسل (PCR) مع البادئات المستعملة للكشف عن التباينات بين قطع الدنا المتضاعفة لكل صنف (أعدادها و أحجامها الجزيئية) عند ترحيل نواتج التضاعف للعينات على هلام الاكاروز بعد تصبيغها ببروميد الاثيديوم . بينت نتائج التحليل الوراثي بمؤشرات الRAPD اختلافا " واضحا" في عدد حزم الدنا المتضاعفة واوزانها الجزيئية وذلك تبعا للبادئ المستعمل، إذ بلغ العدد الكلي للحزم المتباينة (polymorphic bands) 88 حزمة لكافة البوادئ، وكان اقل عدد حزم متباينة 6 حزم في البادئين 1227 و OPF-01، في حين كان اعلى عدد من الحزم المتباينة 12 في البادئ OPF-04، واطهرت عدد من البادئات المستعملة في الدراسة حزما " فريدة لبعض من النماذج المدروسة والتي تعد بمثابة بصمة وراثية لتمييز الأصناف عن بعضها، إذ اعطى الصنف اعجمي اعلى عدد من الحزم الفريدة وذلك عند استخدام البوادئ 1225 و OPF-09، إذ اعطت هذه البوادئ حزمتين مميزة ذات اوزان جزيئية متباينة ، بينما اعطى الصنف الاسود اقل عدد من الحزم

الفريدة والتي بلغت حزمة واحدة ذات وزن جزيئي 1121 زوج قاعدي عند استعمال البادئ OPF-09. ولغرض ايجاد نسبة التشابه الوراثي والعلاقة الوراثية بين الأصناف ادخلت البيانات التي تم الحصول عليها إلى الحاسوب ووفق البرنامج الاحصائي SPSS، تراوحت نسبة التشابه بين الأصناف ما بين 0.252-0.892 ، وكانت اكبر نسبة تشابه بين الصنفين الفرنسي والكمالي (حامد الوادي). أما نتائج التحليل التجمعي Dendogram فقد ضمت الأصناف مجموعة واحدة تفرعت إلى خمسة فروع، شمل الفرع الاول الصنفين فرنسي وكمالي (حامد الوادي) وكذلك الصنف زيتوني أما الفرع الثاني فقد شمل الصنف حلواني والفرع الثالث شمل الصنف ديس العنز والرابع شمل على الصنف اعجمي، أما الفرع الاخير فقد شمل على الصنف الاسود. أما بالنسبة لنتائج التحليل الوراثي لتقنية SSR فقد اعطى البادئ VRZAG62 الخاص بهذه التقنية حزمة واحدة فريدة ذات وزن جزيئي 200 زوج قاعدي عدت بمثابة بصمة وراثية تميز الصنف كمالي (حامد الوادي) عن بقية الأصناف الاخرى، وكذلك كان للبادئ VVS4 دور في اظهار حزمة فريدة ذات وزن جزيئي 200 زوج قاعدي عدت بمثابة بصمة وراثية تميز الصنف اسود شدة عن بقية الأصناف الاخرى، أما البوادئ الاخرى فقد غابت فيها الحزم وذلك بسبب عدم وجود تسلسل متمم لها في دنا الأصناف المدروسة.

قائمة المحتويات

الصفحة	المحتويات	التسلسل
I	الخلاصة	
II	قائمة المحتويات	
III	قائمة الجداول	
IV	قائمة الصور	
V-VI	قائمة الاشكال	
VII	قائمة المختصرات	
الفصل الاول _المقدمة		
3-1	المقدمة	1
الفصل الثاني -استعراض المراجع		
4	استعراض المراجع	2
4	توصيف وتصنيف نبات العنب	1-2
5	اصل وتاريخ العنب واهمية زراعته	2-2
6	الموطن الاصلي للعنب وانتشاره	3-2
7	التوزيع الجغرافي لمجاميع العنب	4-2
8	الطرائق المستعملة في تشخيص نبات العنب	5-2
10-21	التقنيات المستعملة في التوصيف الجزيئي والعلاقات الوراثية	6-2
22-24	الدراسات السابقة المتعلقة بالمؤشرات الجزيئية لدراسة التنوع الوراثي للعنب	7-2
الفصل الثالث _المواد ، وطرائق العمل		
25	المواد وطرائق العمل	3
25	المواد	1-3
25-26	الاجهزة والمواد المستخدمة في هذه الدراسة	1-1-3
27	المحاليل والمواد الكيميائية المستخدمة في هذه الدراسة	2-1-3

28	محتويات عدة استخلاص DNA	3-1-3
29-30	طرائق العمل	2-3
29	جمع العينات	1-2-3
31	تحضير العينات النباتية لاستخلاص DNA	2-2-3
31	الدراسة الوراثية الجزيئية	3-3
31	استخلاص DNA	1-3-3
31	محاليل استخلاص DNA	2-3-3
32-34	طريقة استخلاص DNA	3-3-3
34-35	توصيف DNA	4-3-3
36-38	مؤشرات التفاعل التضاعفي العشوائي RAPD لسلسلة DNA	4-3
38-40	مؤشرات التفاعل التضاعفي المتخصص SSR لسلسلة DNA	5-3
40-41	الترحيل الكهربائي	6-3
41	تحليل النتائج	7-3
4_الفصل الرابع النتائج والمناقشة		
42	النتائج والمناقشة	4
42	نتائج تفاعلات RAPD	1-4
62	التعددية الشكلية وكفاءة البودئ وقدرتها التمييزية	2-4
64	مناقشة نتائج تفاعلات RAPD	3-4
66	تقدير البعد الوراثي بين الأصناف المدروسة	4-4
69	نتائج تفاعلات SSR	5-4
5_الفصل الخامس الاستنتاجات والتوصيات		
78	الاستنتاجات	1-5
79	التوصيات	2-5
80-83	المصادر العربية	
83-103	المصادر الانكليزية	

104-119	الملاحق
a-b	الخلاصة باللغة الانكليزية

قائمة الجداول

الصفحة	الجدول	رقم الجدول
7	انتشار زراعة العنب من المنطقة الاصلية إلى مناطق اخرى في العالم	1
25	الأجهزة المستخدمة والشركات المصنعة والمنشأ	2
27	المحاليل والمواد الكيميائية والمنشأ	3
28	محتويات Genomic DNA Mini kit (Plant)	4
37	البادئات العشوائية مع التتابعات الخاصة بها	5
38	برنامج تفاعل مؤشرات التفاعل التضاعفي العشوائي لسلسلة الدنا-PCR RAPD	6
39	برنامج التفاعل التضاعفي المتخصص لسلسلة الدنا PCR-SSR	7
40	البادئات المتخصصة مع التتابعات الخاصة بها	8
44	الحزم المتباينة للبادئ 1224 مع اوزانها الجزيئية	9
45	الحزم المتباينة للبادئ 1225 مع اوزانها الجزيئية	10
47	الحزم المتباينة للبادئ 1227 مع اوزانها الجزيئية	11
49	الحزم المتباينة للبادئ OPF-01 مع اوزانها الجزيئية	12
51	الحزم المتباينة للبادئ OPF-03 مع اوزانها الجزيئية	13
53	الحزم المتباينة للبادئ OPF-04 مع اوزانها الجزيئية	14

15	الحزم المتباينة للبادئ OPF-09 مع اوزانها الجزيئية	56
16	الحزم المتباينة للبادئ OPF-10 مع اوزانها الجزيئية	57
17	الحزم المتباينة للبادئ OPF-11 مع اوزانها الجزيئية	59
18	الحزم المتباينة للبادئ OPF-13 مع اوزانها الجزيئية	61
19	نواتج البادئات من الحزم مع نسب كفاءتها وقدرتها التمييزية	63
20	نسبة التشابه بين اصناف العنب المدروسة	68

قائمة الصور

رقم الصورة	عنوان الصورة	الصفحة
1	نواتج الدنا لاصناف العنب المرحلة على هلام الاكاروز	42
2	نواتج تفاعل RAPD-PCR للبادئ 1224	43
3	نواتج تفاعل RAPD-PCR للبادئ 1225	45
4	نواتج تفاعل RAPD-PCR للبادئ 1226	46
5	نواتج تفاعل RAPD-PCR للبادئ 1227	47
6	نواتج تفاعل RAPD-PCR للبادئ OPF-01	48
7	نواتج تفاعل RAPD-PCR للبادئ OPF-02	49
8	نواتج تفاعل RAPD-PCR للبادئ OPF-03	50
9	نواتج تفاعل RAPD-PCR للبادئ OPF-04	52
10	نواتج تفاعل RAPD-PCR للبادئ OPF-07	54
11	نواتج تفاعل RAPD-PCR للبادئ OPF-08	54
12	نواتج تفاعل RAPD-PCR للبادئ OPF-09	55

57	نواتج تفاعل RAPD-PCR للبادئ OPF-10	13
58	نواتج تفاعل RAPD-PCR للبادئ OPF-11	14
60	نواتج تفاعل RAPD-PCR للبادئ OPF-12	15
61	نواتج تفاعل RAPD-PCR للبادئ OPF-13	16
70	نواتج تفاعل SSR-PCR للبادئ VRZAG62	17
71	نواتج تفاعل SSR-PCR للبادئ VRZAG79	18
72	نواتج تفاعل SSR-PCR للبادئ VVS4	19
72	نواتج تفاعل SSR-PCR للبادئ VVMD5	20
73	نواتج تفاعل SSR-PCR للبادئ VVMD6	21
74	نواتج تفاعل SSR-PCR للبادئ VVMD7	22
75	نواتج تفاعل SSR-PCR للبادئ VVMD27	23
75	نواتج تفاعل SSR-PCR للبادئ VVMD28	24
76	نواتج تفاعل SSR-PCR للبادئ VVMD31	25
77	نواتج تفاعل SSR-PCR للبادئ VVMD32	26

قائمة الاشكال

9	ورقة عنب بالغة	1
17	مخطط عملية تضاعف قطع DNA بواسطة تقنية الـ PCR	2
30	مواقع الدراسة في محافظة ديالى	3
69	مخطط التحليل التجمعي Dendogram للعلاقة الوراثية Geneti Relationship فيما بين اصناف العنب المدروسة	4

قائمة المختصرات

OIV	Office International de la Vigne
DNA	Deoxyribonucleic Acid
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RAPD	Randomly Amplified Polymorphism DNA
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
SSR	Simple Sequence Repeat
ISSR	Inter Simple Sequence Repeat
PCR	Polymerase Chain Reaction
EDTA	Ethylene Diamine Tetra Acetic acid
TBE	Tris/Borate/EDTA
dNTPs	Deoxynucleotide Triphosphates

قائمة الملاحق

116-104	انواع البوادي المستخدمة في الدراسة	1
117	خليط تفاعل الـ PCR (Master mix)	2
119-118	دليل عدة استخلاص الدنا	3
120	كتاب تصنيف النبات	4

1- المقدمة Introduction

ينتمي نبات العنب إلى العائلة Vitacea والتي تضم حوالي 60 نوعاً من أنواع العنب البري في آسيا، أمريكا الشمالية و أوروبا تحت شبه الاستوائية والبحر الأبيض المتوسط والظروف المناخية المعتدلة القارية (Rossetto وآخرون ، 2002 ؛ Sefc وآخرون ، 2003 ؛ Crespan وآخرون ، 2004). وتضم Vitacea عدة اجناس واهمها الجنس *Vitis* الذي ينقسم بدوره إلى قسمين رئيسيين هما تحت جنس *Muscadina* وتحت جنس *Euvitis*، هذا الأخير يضم معظم أنواع *vitis* التي قسمت بدورها إلى ثلاث مجموعات حسب منشئها الجغرافي (Reynier، 1989) وهي مجموعة الأنواع الأمريكية وتشمل غالبية الأصول ومجموعة الأنواع الأوروبية، مجموعة أنواع أوروبا وغرب آسيا والتي ينتمي إليها نوع *Vitis vinifera* L. الذي يضم أشجار عنب المائدة، فضلاً عن العنب الآسيوي. اهتم الإنسان منذ أكثر من ستة آلاف سنة بزراعة العنب وإنتاجه وتصنيع ثماره وعصيره (السرواني، 2008)، يحتل العراق المرتبة الخامسة على الوطن العربي من ناحية الإنتاج والمساحة إذ يشكل إنتاج العنب 16.63% من مجموع إنتاج الفاكهة في العراق فقد بلغ الانتاج سنة من 2001 إلى 2005 ومن 2006 إلى 2007 حوالي 297، 185، 184، 203 ألف طن: ألف هكتار على التوالي (المنظمة العربية للتنمية الزراعية، 2009). تعد زراعة العنب قديمة جداً في العراق منذ نشوء أولى الحضارات وذلك لملائمة الظروف البيئية، تاريخ العنب في العراق قديم يرجع الى استيطان الانسان في وادي الرافدين منذ 3700 سنة ق.م، اذ وجد الكثير من الآثار والكتابات القديمة التي تشير الى الاهتمام بزراعة العنب في العراق (حسن ومحمد، 1989). لقد تطورت زراعة العنب في العراق بشكل واسع وخاصة في السنين الأخيرة، إذ يعد العنب ذا اهمية في إنتاج الزبيب أو العصير أو النبيذ، وينتشر العنب في المناطق المعتدلة الدافئة والمعتدلة الباردة (السعيد، 2014). يتواجد في العراق 75 صنفاً من العنب أغلبها بذرية

وعدد قليل منها عديمة البذور ولم تنتشر زراعتها بصورة تجارية (الملاك، 2001). عدد الأصناف المزروعة في العراق تقدر بحوالي 75 صنفا تتركز معظمها في شمال العراق، للعنب فوائد طبية وعلاجية عديدة وذلك لكونه غذاء متكامل لما تحتويه حباته من سكريات واحماض وبروتينات واللياف غذائية (جمال الدين، 2010)، يعد العنب من بين أنواع الفاكهة المهمة وذلك لقيمه الغذائية العالية، إذ تحوي ثماره على نسبة عالية من السكريات الأحادية والاحماض العضوية والسائد فيها حامض التارتريك والماليك، وتحتوي ثماره على نسبة قليلة من البروتين وعلى بعض الفيتامينات وأملاح معدنية كالپوتاسيوم والمغنيسوم والكالسيوم (Hulme 1970)، ويعد من أشجار الفاكهة الأكثر تحملاً للظروف البيئية (السعيد، 1982). في ظل التطور المتسارع في علم التقانات الحيوية تم تحديد أساليب وطرائق دقيقة لتمييز الأصناف عن بعضها البعض لتجنب الخطأ في التميز من خلال استخدام تقنيات تعتمد على دراسة مورثات بحد ذاتها، أو مواقع معينة من الحمض النووي DNA مثل تقنيات SSR و RAPD وغيرها، والتي تعتمد على التفاعل التسلسلي البوليميرازي (Polymerase Chain Reaction) (Semagn وآخرون، 2006). تعد طرائق توصيف الأنواع النباتية وتصنيفها اعتماداً على الصفات الشكلية والانتاجية الأكثر قدماً، ولكنها تتأثر غالباً بالظروف البيئية السائدة وتعطي نتائج مقاربة ومتشابهة يصعب عليها في تمييز الاختلافات (Wjhani، 2004) وكذلك تتطلب وقتاً وجهداً كبيراً لذلك يجب دعم هذه الطرائق بطرائق التقانات الحيوية الحديثة (Ricciardi وآخرون، 2002). وكان لتقنيات البيولوجي الجزيئي الأثر الكبير في تميز الأصناف عن بعضها البعض وخصوصاً تلك التي اعتمدت على كشف التباينات التي تعتمد قطعة محددة من الدنا، وذلك مثل مؤشرات التضاعف العشوائي المتعددة الأشكال لسلسلة الدنا RAPD، ومؤشرات التضاعف للقطع متباينة الطول AFLP (Khierallah، 2011). استخدمت تقنيات الـ SSR و RAPD في دراسة التنوع الوراثي لأصناف

من العنب المحلي المنتشرة في محافظة ديالى، إذ إن هذه الصفات شديدة التأثير بالظروف البيئية مما يؤدي إلى وجود تشابه بين الأصناف والأصول، لذلك من الضروري استخدام طرائق دقيقة لتمييز الأصول والأصناف. قام Divecchi Staraz (2007) بإجراء دراسات باستخدام مؤشرات SSR حول تقييم التنوع الوراثي للعنب البري، إذ أظهرت هذه الدراسات تباينات واضحة بين الأنماط البرية والمزروعة في نفس المنطقة الجغرافية، وكذلك استخدم مؤشرات RAPD من أجل توصيف وتصنيف اشجار العنب المزروعة.

ونظرا لما تقدم من أهمية العنب من الناحية الاقتصادية ولصعوبة التمييز بين الأنواع من الناحية المظهرية ولقلة وجود دراسات حول استخدام مؤشرات الدنا للكشف عن التنوع الوراثي لأصناف العنب في العراق عامة وفي محافظة ديالى خاصة واعتماداً على التعددية الشكلية للحامض النووي DNA استخدمت في هذه الدراسة تقنية تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل العشوائي PCR – RAPD وتقنية المقاطع البسيطة المتكررة SSR أو ما تسمى بمواقع المايكرو ستلايت Microstallite Loci للكشف عن كل مما يأتي:

1. العلاقة الوراثية بين أصناف العنب المستخدمة في هذه الدراسة والمنتشرة في محافظة ديالى وتقييم درجة التباين الوراثي والتطابقات الممكنة فيما بينها.
2. إيجاد البعد الوراثي بين الأصناف المستخدمة في الدراسة وذلك لغرض معرفة الاصول الجغرافية المحتملة لهذه الأصناف المزروعة في محافظة ديالى.
3. إيجاد درجة التشابه بين الأصناف السبعة من العنب والمنتشرة في محافظة ديالى.

2-استعراض المراجع Literature Review

2-1- توصيف وتصنيف نبات العنب

العنب *Vitis vinifera* (L.) من النباتات المتسلقة المستديمة ذات سيقان منتصبة زاحفة، الأوراق راحية الشكل وعناقيد من الازهار الصغيرة الخضراء اللون، وينتمي نبات العنب الى قسم البذريات، مغطاة البذور، تحت قسم ثنائيات الفلقة، حسب المدونة الدولية لقواعد التسمية النباتية (International Code of Botanical Nomenclature) ويمكن توضيح تصنيف نبات العنب اعتمادا على ما جاء في (united states Department of Agriculture plant data base) كما يأتي:

Kingdom: Plantae

Division: triacheophyta

Class: magnoliopsida

Sub-class: Rosidae

Order: Vitales

Family: Vitaceae

Genus: *Vitis*

Species: *V. vinifera*

تضم عائلة العنبيات 17 جنسا (Divecchi Staraz ، 2007) . ويضم جنس *Vitis*

تحت جنسين هما جنس عنب المسكادينا *Muscadinia* ويحتوي على ثلاث أنواع،

M. rotundifolia (Simpson) ، *M. munsoniana* (Michx) و *M. popenoei* (Fennel)

ويضم جنس اشجار العنب الحقيقية *Euvitis* حوالي 60 نوعا خصب تنتشر في النصف

الشمالي من الكرة الارضية (Mullins وآخرون، 1992). ذكر Arnold وآخرون (2005) حوالي

88 نوعا تنتشر في المناطق المعتدلة من آسيا وأمريكا و أوروبا كما ذكر This وآخرون

(2006)، يستخدم انواع جنس *Vitis* في أوربا في برامج التحسين الوراثي ولها فوائد زراعية كثيرة. ومن اهم الطرازين لهذا النوع في المنطقة الأورو آسيوية وشمال افريقيا:

1. الطراز المزروع أو العنب الأوري *V.vinifera subsp. Sativa*

2. الطراز البري *V.vinifera subsp.sylvestris*

يتواجد في العراق حوالي 75 صنفا من العنب معظمها تتركز في الشمال، تضم محافظات الوسط ومن ضمنها محافظة ديالى حوالي 10 أصناف من العنب .الأصناف المستخدمة في الدراسة هي:

1- ديس العنز *V.hissarica*

2- الفرنسي *V.hissarica* صنف من قبل العالم vassilcz (1947)

3 - الحلواني *V.vinifera L*

4 - الكمالي (*V.vinifera var sativa beck*) صنف من قبل العالم Beck

5- الاسود شدة *V. Berlandieri* صنف من قبل العالم Planch (1880)

6 - الاعجمي *V.Var sativa*

7 - الزيتوني *V.Sylvestris*

(Dinarvand وآخرون، 2015). تختلف الاسماء المحلية للأصناف من منطقة الى أخرى.

2-2- اصل وتاريخ العنب واهمية زراعته

تبين من الدراسات السابقة ان للعنب اهمية كبيرة في حياة البشرية ، إذ عرف البشر العنب منذ بزوغ التاريخ، وروي في اخبار الصين والهند ووجدت آثار قديمة منه جدا في اميركا والبرتغال، إذ عرفت أنواع عديده من العنب منذ عهد النبي نوح عليه السلام ، وزرعت اشجار العنب *Vitis* في ايام قدماء المصريين، وفي حدائق بابل المعلقة، وورد ذكر العنب في التوراة والانجيل وذكر اسم العنب في القرآن الكريم عشر مرات، وايضا تحدث عنه اطباء العرب واطباء الغرب ومن سبقهم من اطباء الامم الأخرى، ويكفي ما قاله الامام ابن قيم الجوزية عن العنب من انه افضل

الفواكه واكثرها منافع، إذ يؤكل رطباً ويابساً واخضرًا ويانعاً، وهو فاكهه مع الفواكه، وقوت مع الاقوات، ودواء مع الأدوية، وشراب مع الأشربة. وأضاف الانطاكي فقال العنب من اجود الفواكه غذاء، يسمن ويعالج الهزال ويصفي الدم، وينظف القنوات الهضمية، ونافع للأمراض المعدية، فلا يخلو كتاب من كتب الطب الشعبي من عشرات الوصفات العلاجية التي يدخل ضمنها العنب (نظيف وآخرون، 1990). يستهلك العنب طازجاً فضلاً عن تصنيعه وكذلك تستخدم مخلفات التصنيع كعلف للحيوانات واسمه عضويه (Baghasa، 2006). يعد العنب من بين الفواكه المستهلكة على نطاق واسع والطلب عليه وعلى منتجاته يتزايد بسبب الفوائد الصحية المرتبطة به، إذ يستخدم العنب في العصائر أو يستهلك بوصفه نوعاً من أنواع الفاكهة أو يتم تناوله كزبيب في الأوقات التي لا تتوفر فيها الفاكهة.

2-3- الموطن الاصلي للعنب وانتشاره

يعود تاريخ زراعة العنب منذ القدم وعرف خلال دراسات سابقة ان الموطن الاصلي للعنب الأوربي هي المنطقة الواقعة حول بحر قزوين (بين اسيا وأوروبا) بالتحديد في المنطقة الواقعة بين جنوب البحر الاسود وبحر القوقاز في اسيا الصغرى، إذ من هناك نقل شرقاً الى اسيا و غرباً الى أوروبا وإفريقيا. لقد بدأت زراعة العنب في المناطق الواقعة حول البحر الابيض المتوسط (منطقة الشرق الأوسط)، ومنها انتقلت الى مناطق أخرى حتى وصلت وادي نهر الرون في فرنسا، وامتدت شمالاً لتصل الى وادي الراين ووادي موسيل في عهد الرومان. اما في القرن الخامس عشر انتشرت زراعته في جنوب افريقيا وأستراليا وأمريكا الجنوبية إذ ادخلت أول أصناف عنب النبيذ الى كاليفورنيا (نظيف وآخرون، 1990).

جدول (1) انتشار زراعة العنب من المنطقة الاصلية الى مناطق أخرى في العالم

تاريخ الزراعة	مناطق انتشار زراعة العنب
6000 ق م	ظهور في منطقتي العنب Mésopotamie في Caucase
3000 ق م	زراعة العنب في مصر و فينيقيا Egypte Phénicie
2000 ق م	ظهوره في اليونان Greece
1000 ق م	زراعته في شمال افريقيا Italie, Sicile و Afrique du Nord
1000-500 ق م	Portugal Espagne و جنوب Franc
العصر الوسيط	زراعته في شمال و جنوب أوروبا تحت تأثير الرومان حتى المملكة البريطانية المتحدة

مستل من (زيان ، 2009).

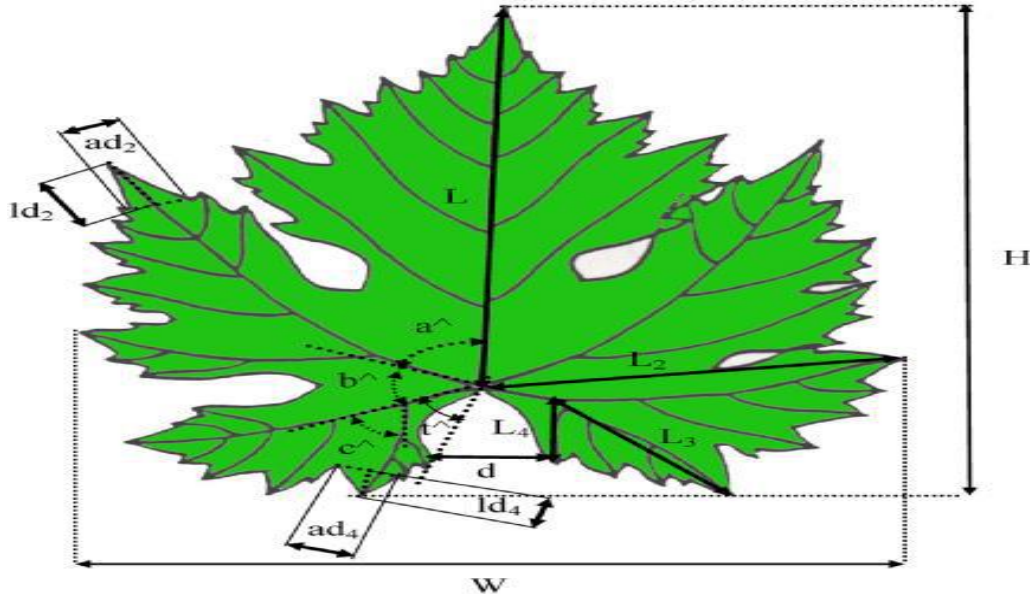
2-4- التوزيع الجغرافي لمجاميع العنب

اجريت دراسة على اشجار العنب من قبل Negrul (1946) إذ قسمت اشجار العنب الى ثلاث مجموعات رئيسة "Proles من الأصناف تتضمن مجموعة "Proles Pontica Negr. وتضم اقدم الأصناف توجد في منطقة حوض البحر الأبيض المتوسط. اما أصناف البحر الميت وخاصة الأصناف التي تشتهر بعنب النبيذ قبل دخول الاسلام فتنسب الى Proles Orientalis sub proles caspica، إذ تضم من بين الأصناف الحديثة أصناف Cinsu و Muscats وتنتشر في اسيا. ان معظم أصناف عنب المائدة تنسب الى Proles Orientalis sub proles antasiatica هذه الانماط الوراثية نشأت من انتخاب أصناف النبيذ التي تعود الى sub proles caspica في عهد توسع المسلمين في حوض البحر الابيض المتوسط (500 إلى 1100 م).

2-5- الطرائق المستعملة في تشخيص نبات العنب

2-5-1 - التشخيص المظهري

أغلب الطرائق التي تهتم بدراسة الوصف الظاهري لنبات العنب تشترك في الاعتماد على الأوراق لكونها الأكثر تميزاً بين الأصناف (Martinez وآخرون، 1997) تتأثر طرائق توصيف الأنواع النباتية وتصنيفها اعتماداً على الصفات الشكلية غالباً بالظروف البيئية السائدة وتعطي نتائج مقارنة ومتشابهة يصعب عليها في تمييز الاختلافات (Wjhani، 2004)، وكذلك تتطلب وقت وجهد كبير لذلك يجب دعم هذه الطرائق بطرائق التقنيات الحيوية الحديثة (Ricciardi وآخرون، 2002)، تتكون أوراق العنب جانبياً على الفرع وتخرج عند العقد وتحتوي على برعم في ابطها، ويكون وضعها متبادل على الفرع وكل ورقة تتركب من ثلاثة اجزاء هي العنق والنصل والاذنين، لون العنق اخضر أو مخطط أو اخضر محمر عند الجانب المعرض للشمس، وقد يكون العنق مغطى بزغب بسيط أو زغب كثيف أو قد يكون العنق ناعماً، في دراسة أخرى اثبت انه من الممكن استعمال عنق الورقة في التمييز بين الأصناف المختلفة من حيث الطول واللون وزوايا اتصاله بالنصل (شكل 1). إذ عرف النصل بأنه الجزء المسطح من الورقة توجد به خمسة عروق تخرج من عنق الورقة ويتفرع من العروق الرئيسية عروفاً أخرى ثانوية، والتي بدورها تتفرع الى فروع أصغر حتى تشغل كل سطح النصل شبكة من العروق، هناك القليل من أصناف العنب تكون أوراقها تامة الحواف، ولكن عادة أوراق العنب مفصصه وتحتوي على خمسة فصوص، والجزء المنخفض بين الفصين يدعى Sinus " والجزء المنخفض بجانب العنق يدعى انخفاض العنق Petiolar sinus (نظيف و آخرون، 1990).



شكل (1) يوضح ورقة عنب بالغة عليها بعض القياسات الامبيلوميترية (Ortiz وآخرون، 2004)

2-5-2-التشخيص الوراثي الجزيئي

بينت دراسات عديدة اهمية المؤشرات الجزيئية وضرورة مقارنتها بالوصف المظهري لتحديد مدى اهمية كل منها في معرفة التنوع الوراثي، إذ اثبتت الدراسات ان المؤشرات المستخدمة في تحديد التنوع الوراثي بين الأصناف الزراعية لها بعض المحددات، ومن اهمها تأثيرها بالبيئة الواحدة، وكذلك العمر الزمني، ونوع العضو النباتي المعتمد في تحديد التنوع بين الأصناف. للمقارنة بين المؤشرات الجزيئية والصفات المظهرية قام الباحث Mari وآخرون (2004) بإجراء دراسة لتقدير التنوع الوراثي بين 14 صنفا من القمح بالاعتماد على الصفات المظهرية وعلى احد مؤشرات الدنا وهي RAPD، إذ استخدم الباحث 12 صفة مظهرية للتمييز بين التراكيب الوراثية، أوضحت النتائج ان مؤشرات ال RAPD بينت درجة عالية من التنوع الوراثي بين الأصناف مقارنة بالوصف المظهري. في دراسة أخرى قام الباحث Askari وآخرون (2003) بإجراء مقارنة للعلاقة الوراثية بين أصناف من نخيل التمر، وذلك بالاعتماد على مؤشرات ال RAPD والخصائص المظهرية للثمار كالشكل ونوعية الثمار واللون، وفي دراسة أخرى قام بها Dahlber وآخرون

(2002) على 94 تركيباً وراثياً من الذرة البيضاء باستعمال صفات الحبوب ومؤشرات الـ RAPD بوجود 17 بادئاً، إذ بينت الدراسة أن هناك تلازماً بين النتائج التي تم الحصول عليها من كلا الطريقتين، يعود سبب افضلية مؤشرات الدنا إلى كونها أكثر استقراراً بخلاف المؤشرات المظهرية التي تتأثر بالظروف البيئية .

2-6 التقنيات المستعملة في التوصيف الجزيئي والعلاقات الوراثية:

2-6-1 تقنية التعدديات الشكلية المضخمة عشوائياً (RAPD)

Randomly Amplified Polymorphic DNA

ساعد تفاعل الـ PCR في تطوير التقنيات الجزيئية المختلفة منها تقنية الـ RAPD إذ استخدمت هذه التقنية في الكشف عن التنوع الوراثي وتعريف النمط الجيني (Williams وآخرون، 1990؛ Zietkiewicz وآخرون، 1994). تعد طريقة RAPD هي أكثر الطرائق انتشاراً، إذ استخدمت في العديد من الدراسات لتحديد العلاقات الوراثية بين أصناف النباتات المختلفة، ومن أهم مميزاتها هي البساطة، وقلة التكلفة، واستخدام كميات قليلة من المادة الوراثية، والشعير (Barua وآخرون، 1993). وكذلك استخدمت هذه التقنية في الكشف السريع للتنوع الوراثي وإيجاد البصمة الوراثية للعديد من الأحياء الدقيقة، وكذلك تصنيف أنواع من الصنوبر Pine (Nkongolo وآخرون، 2002). واستخدمت طريقة RAPD للفرقة بين خمسة أصناف من نخيل التمر المصري، إذ تم من خلالها الحصول على بصمات وراثية مميزة للأصناف المختلفة من النخيل (صقر ومرسي، 1999). كما استخدمت طريقة RAPD لتحديد البصمة الوراثية لعشرين صنفاً من الزيتون (عمار، 2003). وأظهرت النتائج أن هذه التقنية قادرة على إبراز الاختلافات بين أصناف الزيتون، أجرى Kudriavtsev وآخرون (2003) دراسة لتحديد مدى التشابه الوراثي بين 64 صنف من القمح durum باستخدام RAPD. أن مؤشرات الـ RAPD

يمكنها ان تجهز معلومات دقيقة لفصل الأنواع وتصنيفها ورسم الشجرة الوراثية Dendrogram (Sitthiwong وآخرون، 2005) بين الساهوكي (2006) كفاءة تقنية ال RAPD في الكشف عن التغيرات الوراثية ونتيجة لذلك استخدمت هذه المؤشرات في مقارنة محصول الرز بسمتي 370 مع اثنين من الطوافر القصيرة الارتفاع المشتقة منه، وقد أكد الباحثون ان هذا النوع من المؤشرات اكثر دقة في تحديد التنوع الوراثي بين التراكيب الوراثية مقارنة بالطرائق الأخرى.

بين Williams وآخرون (1990) أن تقنية RAPD يستخدم فيها انزيم ال Taq polymerase لتضخيم مقاطع من DNA بين تسلسلات قريبة من بعضها، اما تطبيقات تقنية RAPD فإنها تعمل على كشف مستويات مرضية من التعددية الشكلية بين أصناف من العنب (This وآخرون، 1997; Stavrakakis و YE وآخرون، 1998)، ومع ذلك فإن الخل الرئيسي لهذه التقنية هو اعتماد النتائج على شروط تجريبية صارمة من مختلف الدورات الحرارية Thermocyclers في ال PCR وحساسية تطبيق انزيم " Taq polymerase "، والحمض النووي وتركيزات المرئسة (Buscher وآخرون، 1994). وفي دراسة أخرى قام بها Alfalahi وآخرون (2012) باستخدام تقانة ال RAPD في تقييم التباين الوراثي بين 20 من اصل 24 من مجتمعات العقم الذكري في الذرة الصفراء الناتجة من دورات انتخاب مبكرة ومتأخرة استخدم فيها 10 بادئات جميعها انتجت حزم متباينة بلغ عدد هذه الحزم 139 حزمة بمعدل 13.9 حزمة للبادئ الواحد بين El-badawy وآخرون (2009) أن مؤشرات ال RAPD يمكن ان تستخدم لتحديد التنوع الجيني بين سلالات الذرة الشامية وتحديد المجاميع الوراثية وفق الانماط الجينية المختلفة. الواصم الجزيئي ال RAPD يستعمل في مثل هذه الدراسات لعدة اسباب منها البساطة واختزال الوقت في ظهور النتائج، والكلفة القليلة مقارنة بباقي الواصمات الوراثية إذ لا يتم استخدام مجسات مشعة Radioactive probes، ولا يتطلب المعرفة المسبقة لتسلسل الدنا في تصميم البودائ

Primers design، وكذلك يتطلب كمية قليلة من قالب DNA. تعد مؤشرات RAPD واحدة من المؤشرات التي تعتمد على تقانة PCR لتحليل التباين الوراثي بين التراكيب الوراثية عبر الاجيال ضمن مواقع محددة ومنتشرة على مجين الكائنات الراقية، إذ تشخص نواتج PCR بشكل حزم على هلام الاكاروز، ويتم تصيغ حزم الدنا بالاثيديوم برومايد ليتم توثيق نتائجها (Gupta وآخرون، 2000).

2-6-2 تقنية المقاطع البسيطة المتكررة SSR

تعد مؤشرات المقاطع البسيطة المتكررة (SSR) من المؤشرات الجزيئية الهامة جداً والواسعة الانتشار حالياً. تتكون هذه المؤشرات من مقاطع صغيرة متكررة، تدعى وحدات متكررة، تتواجد بكثرة في مجينات حقيقيات النوى (Sefc وآخرون، 2000)، وتتوزع بصورة مبعثرة على جميع الصبغيات سواء في المناطق المشفرة أو غير المشفرة (Powell وآخرون، 1997). أوضح Sweigart وآخرون (1999) أن التسلسلات المايكروستيليتيه (SSR) هي مؤشرات جزيئية مثالية كونها تحتاج لكميات قليلة من الـ DNA. بين Wang وآخرون (1994) أن مؤشرات الـ SSR تتميز بوفرته وتوزعها ضمن المادة الوراثية، إذ ادخلت في دراسات عديدة ذات اهداف مختلفة، مثل انشاء خرائط الارتباط الوراثية، وكذلك دراسة التنوع الوراثي (Strus Plieske، 1998). تحليل الـ SSR يمكن أن يسمح بتحليل اعداد كبيرة من النباتات وعدد كبير من المواقع الوراثية، بنفس الوقت يمكن تحديد الـ SSR بالبحث في قواعد البيانات الجينية Genebank و يمكن إنتاج مكتبات "DNA" جينومية صغيرة، وتتميز بسهولة تطبيقها وتحليل نتائجها (Chabane وآخرون، 2005; Hayes وآخرون، 2002). تعد تقنية الـ SSR ذات اهمية في انشاء خرائط الارتباط الوراثية لأنواع نباتية مختلفة (Von-Korff وآخرون، 2006). ودراسة التنوع الوراثي (Ozkan وآخرون، 2005) وكذلك في التميز بين الأنواع وتصنيف المجموعات الوراثية (Feng

وآخرون، 2006). ومن أهم استخدامات الـ SSR التميز بين الأنواع وتصنيفها (Thomas و Scott، 1993). استخدمت تقنية SSR لمعالجة المسألة الحيوية المتمثلة في تحديد هوية اشجار العنب المزروعة بشكل خاص (Botta وآخرون، 1995)، ان الامكانات غير عادية أو الخارقة لمؤشرات الـ SSR في التمييز ما بين اشجار العنب المزروعة وما بين الاصول قد تجلى في عدة دراسات (De andres وآخرون، 2007)، ونتيجة لارتفاع القدرة التمييزية لتحاليل الـ SSR فأن اكتشاف تراكيب وراثية متطابقة لعينتين مختلفتين من العنب لأدلة قوية على انهم من نفس الصنف. لذا يمكن استخدام تحاليل الـ SSR في تحديد هوية الأصناف المجهولة المنشأ. قام Warren و Christopher (1998) بإجراء العديد من الدراسات على العنب باستخدام تقنية الـ SSR في دراسة البصمة الوراثية Fingerprinting 110 صنف من العنب، باستخدام خمس بوادئ تم تحديد من 16 الى 38 حزمة ومعامل التعددية الشكلية PIC تراوح بين 0.87-0.95 . ايضا استخدم Akkak وآخرون، (2005) تقنية الـ SSR في تحديد التنوع الوراثي بين 60 صنف من العنب الخمرى المنتشرة في الجزائر وحوض البحر الابيض المتوسط، وباستخدام 12 بادئ تم تمييز 34 صنفًا تباينت وراثيًا عن بعضها البعض وتم تحديد اربع مجموعات تضمنت أصنافًا من العنب تشابهت وراثيًا. وكان متوسط عدد الحزم الناتجة 9.1 ومتوسط معامل التعددية الشكلية PIC 0.77. قام Guido وآخرون (2008) باختبار مجموعة من 45 بادئًا في دراسة مواقع من التسلسلات الميكروستلينية التي تتكون من وحدات (motifs) ثلاثية ورباعية وخماسية (tri - tetra، penta Nucleotide) عند 48 صنفًا من العنب، وكانت النتيجة ان البوادئ اظهرت من 3 الى 16 حزمة، ومعامل PIC. تراوح بين 0.13 0.84 كما استخدمت تقنية الـ SSR لتحديد التباينات الوراثية بين عشر نباتات مستنسخة clones من اصل العنب Keshmeshi، إذ استخدم 23 بادئ SSR لم يتم تحديد أي تباينات وراثية بين النباتات.

ويوجد العديد من الدراسات والابحاث التي استخدمت تقنية SSR على عدد من الأنواع النباتية كالتفاح (Al-Halabi وآخرون، 2009)، والارز (Zhao و Kochert، 1992)، والقمح (Roder وآخرون، 1995). أنجزت خطوات كبيرة في دراسة الخرائط الوراثية للعنب التي ساهمت في تحديد عدد كبير من المواقع الميكروستيلتية المرتبطة بشكل مباشر معها مما يشجع استخدام طرائق التقانات الحيوية في برامج التربية والانتخاب غير المباشر باستخدام المؤشرات الجزيئية Marker Assisted Selection (Eibach وآخرون، 2009). من خلال مقارنة النمط الوراثي الناتج من العينة مع انماط أخرى محفوظة في قواعد البيانات. كذلك ان هذا النوع من التحاليل ضروري في تجارب المكاثرة في المختبر *cultured in vitro* كنوع من المراقبة قبل الاكثار (Sefc وآخرون، 1998). قام De andres وآخرون (2007) باستخدام 9 مواقع للـ SSR مدعمة بتقنية الـ AFLP في الكشف على هويات مزيفة من الاصول يظهر على عكس ما كان يعتقد بالنسبة للأصليين 1103 P و 140 RU وإذ تبين انهما يختلفان عما هو مسجل بالنسبة للأصليين في مجمع للأصول الوراثية وبقيما مجهولين لحد الان. بين Lefort وآخرون (2000a).

2-6-3 تقنية مؤشرات تباين اطوال قطع التقييد

Restriction Fragments Length Polymorphism (RFLP) وهي

مؤشرات الدنا المعتمدة على التهجين الجزيئي (Molecular hybridization – based)

(DNA markers) التي تتضمن مؤشرات تباين اطوال قطع التقييد RFLP Restriction

Fragments Length Polymorphism (Hauschild و tepanovic، 2008 ؛ Nybom

وآخرون، 2014). لقد ظهرت أولى مؤشرات الدنا المعتمدة على التهجين الجزيئي بعد استثمار

الباحثين لانجازين علميين كبيرين، هما اكتشاف إنزيمات التقييد Restriction enzymes

عام 1968، ووصمة سودرن Southren blotting عام 1975، في بناء أول تقانه أطلق

عليها تباين أطوال قطع التقييد Restriction Fragments Length Polymorphism (RFLP)، وتعرف على أنها توارث الاختلافات في مواقع القطع الانزيمي الذي يتسبب في ظهور أطوال مختلفة من قطع الدنا على هلام الاكاروز (Karp، 1997). من أهم مميزات مؤشر: **RFLP** يعد متساوي السيادة، وبالتالي يمكن بواسطته الكشف عن اللواقح المتماثلة homozygosity أو المتخالفة Heterozygosity.

2-6-4 المؤشرات القائمة على مبدأ التفاعل التسلسلي للبوليميراز (PCR)

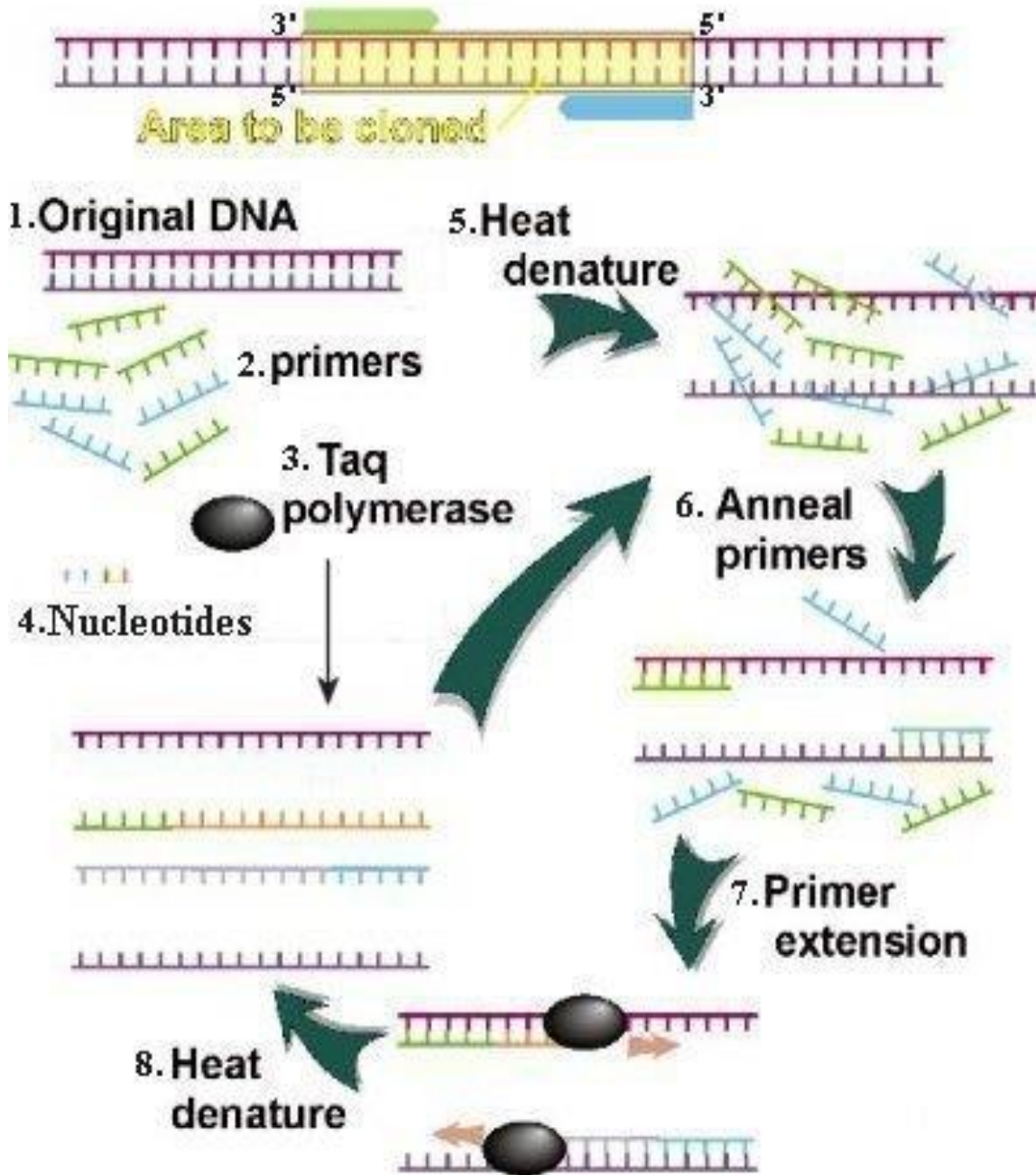
اكتشف تفاعل PCR (Polymerase Chain Reaction) من قبل Mullis وآخرون (1986) تعتمد هذه التقنية على اساس مضاعفة قطعة معينة من الدنا انزيميا وخارج الجسم الحي in vitro، وذلك خلال استخدام تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) وبوجود البادئات Primers التي ترتبط بالنتابع المكمل لها على الدنا القالب Template DNA وكذلك بوجود انزيم البلمرة polymerase الذي يتميز بمقاومته للحرارة العالية (Tong وآخرون، 2012)، ووجود النيوكليوتيدات المفسفرة منقوصة الاوكسجين - Deoxyribonucleotide Triphosphate dNTPs (dATP الادنين - Deoxyadenosine Triphosphate والساييتوسين - Deoxycytidine Triphosphate dCTP والثايمين - Triphosphate dTTP - Deoxythymidine والكوانين dGTP - Deoxyguanosine Triphosphate). يتميز تفاعل PCR بالقوة والفعالية الفائقة، وحساسيته الشديدة، وله تطبيقات في مجالات عديدة، منها البيولوجية الجزيئية الوصفية Molecular biology diagnostics ووراثة المجتمعات. يتضمن تفاعل PCR تركيب وتصنيع متكرر وبشكل مستمر لقطعة محدده من الدنا لينتج كمية كبيرة من الدنا وحيد السلسلة (Saiki وآخرون، 1985). و خلال الدراسات السابقة تبين أن هذا التفاعل يعتمد على وجود قطعة من الدنا ذات تسلسل نيوكليوتيدي معروف تلتصق بالمناطق المحيطة بـ

الدنا المدروس خلال تكرار عملية المسخ Denaturation (فصل سلاسل الدنا) المزدوجة وتحويلها الى سلاسل مفردة عن طريق تحطيم الروابط الهيدروجينية بالحرارة العالية (قاسم، 2011). ثم Annealing التهام القطع المعروفة التسلسل (البادئة) بالمناطق المحيطة بالدنا المدروس وذلك بخفض درجات الحرارة لخليط التفاعل للسماح بارتباط البادئ بالموقع المكمل له على شريط الدنا المفرد (ssDNA) (Gelfand و Innis، 1990)، ثم مرحلة Extension الاستطالة، هي المرحلة الأخيرة من مراحل تفاعل البلمرة وتتضمن تركيب سلسلة دنا جديده (Walker و Wilson، 2005). تعد تقنية الـ PCR الأكثر انتشارا واستخداما في مختبرات الوراثة الجزيئية في جميع دول العالم، والأساس الذي تعتمد عليه معظم الدراسات العلمية البحثية (Sridhar، 2006). هناك أنواع عديدة لهذه المؤشرات، وهي مؤشرات الـ DNA التي تستهدف عدة مواقع على الجينوم تتضمن مؤشرات تستخدم بادئات عشوائية تماما مثل الـ DNA-PCR (RAPD) (Williams وآخرون، 1990)، ومؤشرات تستخدم بادئات شبه عشوائية، مثل مؤشرات تباين اطوال قطع الدنا المتضاعفة AFLP (Meudth و Clark، 2007)، وكذلك مؤشرات تستخدم بادئات متخصصة كمواقع موزعة داخل الجينوم (Garros وآخرون، 2005a)، وكذلك تتضمن تقنية PCR المؤشرات التي تستهدف مواقع محدد معروفة التسلسل (Karp وآخرون، 1997). إن عملية تضخيم أو مضاعفة قطعة معينة من الـ DNA يتطلب فك شريطي الدنا عن بعضهما وتكوين شريط جديد باستخدام أنزيم بلمرة الدنا DNA Polymerase، إذ يرتبط الشريط المتكون الجديد مع الشريط القديم، وبالتالي يصبح هناك جزيئان من الحامض النووي DNA بدلا من جزئ واحد فقط، (Mourad وآخرون، 2010).

من أهم مميزات تفاعل PCR انه لا يحتاج الى معرفة مسبقة بالدنا وذلك في معظم التقنيات المشتقة عنه، وكذلك لا يحتاج إلى تجهيزات مخبرية كبيرة ومتقدمة، وتختلف هذه المميزات

تبعاً للتقانة المستخدمة المشتقة من هذا التفاعل والتي صنفت ضمن طرازين وفق نوعية البادئ المستخدم، وهي تقنيات ذات بادئات PCR عشوائية، أو نصف عشوائية صممت البادئات دون معرفة مسبقه بـ الدنا مثل (ISSR ، AFLP ، RAPD) (Linn وآخرون ، 1996).

The PCR Process



مخطط (2) عملية تضاعف قطع الـ DNA بواسطة تقنية الـ P C R

نقلا عن: <http://www.dna art online use primer>

2-6-5- المؤشرات المبنية على مكاثرة قطع الدنا المتباينة

1- المايكروستلايت Microsatellit هي تتابعات قصيرة متكررة توجد في مجين الكائنات الراقية تشمل تقانات التكرارات البسيطة المتعددة (Simple Sequence Repeat (SSR وما بين تكرارات التسلسلات البسيطة (Inter Simple Sequence Repeats (ISSR (McGregor وآخرون ، 2000؛ Fernández وآخرون، 2002؛ Liu وآخرون ، 2013). إن تقنية (ISSR) Inter Simple Sequence Repeat إحدى طرائق المعلومات التي تعتمد على PCR ، وهي تعتمد على الوجود الغزير والتوزيع العشوائي لـSSR في الجينوم النباتي، وتمتاز بأنها لا تحتاج إلى معلومات مسبقة عن الجينوم، وينجم عنها أنماط ذات تعددية شكلية كبيرة ناجمة عن عدة مواقع وراثية (Bornet و Branchard ، 2001). تعد تقنية ISSR من التقنيات المثالية لأنها تعطي نتائج ثابتة ولو نفذت في مكررات أو أماكن متعددة وسريعة، وتعد هذه التقنية الأكثر تكرارية من تقنية الـ RAPD بسبب طول البادئ المستخدم الذي يعكس درجة حرارة عالية لمرحلة انفصال سلسلة الدنا المزدوجة إلى سلسلتين مفردتين، كما أنها تتطلب كمية قليلة من الحمض النووي DNA، استخدمت العديد من الدراسات والأبحاث هذه التقنية لإيجاد التنوع الوراثي بين الأنواع النباتية كالبطاطا (Bornet وآخرون، 2002)، والرز (Joshi وآخرون، 2000)، والشعير (Fernandes وآخرون، 2002). بين Rao وآخرون (2007) كفاءة تقنية ISSR في دراسة علاقة القرابة الوراثية لجنس Cicer (الحمص) وذلك من خلال دراسة العلاقة الوراثية بين 19 طرازا وراثيا من الحمص المزروع *C.arietinum* و 5 طرز وراثية عائدة للنوع البري *C.reticulatum* باستخدام تقنية RAPD و ISSR لوحظ أن كل بادئ من بادئات RAPD أعطى 6 حزم، أما بادئات ISSR أعطت 11 حزمة لكل بادئ، وتحليل نتائج تقنية RAPD وجد أن نسبة التعددية الشكلية للبادئات المستخدمة 51.7% بين الطرز البرية و 50.5% بين الطرز

المزروعة و 56.3% بين الطرز الوراثية المزروعة عند استخدام ISSR . قام Bhagyawant و Srivastava (2008) باستخدام تقنية ISSR في تقييم التنوع الوراثي لـ 12 طرازا وراثيا من الحمص المزروع، وذلك باستخدام 10 بادئات، إذ أعطت 492 حزمة ذات تعددية شكلية.

2- مؤشرات التباين في القطع المتضاعفة Amplified Fragment Length

Polymorphism (AFLP)

تعد من أهم المؤشرات التي تستخدم في دراسة التنوع الوراثي، إذ ترجع أهمية هذه التقنية إلى كونها تجمع بين مميزات تقنية RFLP وتقانات PCR، تعتمد الأولى على الهضم بأنزيمات التحديد في مناطق معينة ومحددة من جزيئة DNA، أما الثانية فتعتمد على التفاعل التسلسلي للبوليميراز الذي يؤمن الحصول على الكمية الكافية من DNA (OS وآخرون، 1995). تعمل هذه التقنية على هضم الدنا بأنزيمي تحديد، يتميز الأول بإعطائه عددا كبيرا من قطع الدنا المتباينة ذات الوزن الجزيئي الصغير، بينما يعطي الثاني عددا قليلا من القطع الكبيرة نسبيا (Chabane وآخرون، 2006).

2-أ المؤشر الوراثي Genetic marker

هو صفة مميزة تستخدم للاستدلال على وجود موقع معين locus على الكروموسوم أو المجين، وإن معرفة هذا الموقع يساعد على دراسة توارث صفة معينة أو جين معين فالجينات القريبة جدا من المؤشر تتوارث معه (الخطيب، 2000). يعد المؤشر الوراثي صفة مميزة يمكن استعمالها في التوصيف الوراثي وتمييز الأصناف فيما بينها، إذ امتازت هذه المؤشرات بالاستقرار Stability لكون الدنا هو المادة الوراثية المستقرة التي لا تتأثر بالبيئة بعكس المؤشرات الأخرى التي تتأثر بشكل كبير بالظروف البيئية (Weigand وآخرون، 1993). بين King

وStansfield (1990) أن المؤشرات الوراثية هي مؤشر مرتبط بموروث ذات اثر مورفولوجي معروف بحيث يمكن استخدامه لتحديد هوية فرد أو خلية تحمل هذه المورثة. تقسم المؤشرات الوراثية الى ثلاثة أنواع فهي اما مؤشرات تلاحظ بالعين المجردة تدعى المؤشرات المورفولوجية والزراعية Morphological and agronomic traits ،أو انها Biochemical markers ،أو تلك التي تعتمد على تجارب الدنا وتسمى Molecular markers ،لقد استخدمت المؤشرات الوراثية لأول مرة من قبل (Wexselsen ، 1932) ، (Sax ، 1933) .

2-ب مؤشرات الدنا DNA Markers

هي تتابعات من الدنا يمكن الاستدلال بها على موقع معين من الكروموسوم أو المجين، تستخدم لدراسة العلاقات الوراثية بين الافراد وايجاد البصمة الوراثية لكونها تعكس الاختلافات في المعلومات الوراثية المخزونة فيهم، وهذه الاختلافات تكون ناتجة اما من الحذف Deletion ،الادخال Insertin أو اعادة الترتيب Rearrangement للنيوكليوتيدات في مجين الافراد المدروسة لأي سبب كان، كالتغيرات الوراثية، لذلك اعتمدت في دراسات التصنيف الجزيئي Molecular taxonomy ،والدراسات التطورية Evolutionary studies ،وفي بناء الخرائط الوراثية Genetic Mapping (Caetano ، 1997).

2- ج البادئ The Primer

وهو تسلسل من القواعد النتروجينية على شريط قصير من الـ DNA يتراوح طوله بين 20-25 نيوكليوتيده. المكمل لجزء الـ DNA المراد تضخيمه من الحامض النووي ويكون على نوعين هما امامي Forward و خلفي Reverse (التركي، 2010). كذلك يعرف البادئ بأنه قطعة صغيرة من الدنا DNA والرنا RNA ترتبط ب قالب شريط الدنا المفرد الشريط عند النهاية 3' المحتوية على مجموعة الهيدروكسيل OH الضرورية لبدا عمل أنزيم بلمرة الدنا. يمكن تصميم البوادئ بوجود تسلسل معين في تركيبه، كذلك البوادئ المستخدمة في تحليلات تقنية الـ AFLP (أبوالجدايل، 2014). إذ يجب التعرف على القواعد النتروجينية في المنطقة المجاورة لجزء الدنا المراد تضخيمه لكي يتم تصميم البادئ الملائم، إذ ان الطرف الآخر للجزء المراد تضخيمه يحتاج الى بادئ آخر (القرةغولي، 2013).

2-د المحلول المنظم Buffer Solution

وهو المحلول الذي يحافظ على قيمة الرقم الهيدروجيني pH من التغيرات الناتجة عن اضافة حامض أو قاعدة إليه، أو عند تخفيف المحلول الى درجة معينة، ويقوم هذا المحلول بتنظيم عمل انزيم البلمرة والمحافظة على نشاطه. ذكر Coen و Kramer (2001) أن الرقم الهيدروجيني pH للمحلول المنظم يساوي 8.3 فضلا عن 0.1% حجم/ وزن من الجلاتين ليصبح المحلول بقوة X10 ويتم تخفيفه اثناء تحضير التفاعل الى X1. اهمية المحلول المنظم هو ان تركيز الأملاح التي توجد ضمن مكوناته تؤثر على قدرة التحام البادئ بالدنا القالب DNA Template، كذلك يؤثر بشكل كبير جدا على درجة حرارة تفكك الـ DNA في التفاعل الرئيس في أثناء عملية المسخ (التفكك) Denaturation (Chen و Janes ، 2002 ، Roux ، 2009).

2-7 الدراسات السابقة المتعلقة باستخدام المؤشرات الجزيئية لدراسة التنوع الوراثي .

التنوع الوراثي هو اختلاف صفات النباتات الناتجة من اختلافها في التركيب الوراثي عند زراعتها في البيئة نفسها (عبدالغفور وآخرون، 2011). يتم تقييم التنوع الوراثي بين المجتمعات بشكل روتيني خلال استخدام مختلف التقنيات الجزيئية والتي تستخدم في المختبر، مثل تحليل الحامض النووي DNA. تم استخدام تقنيات جزيئية مثل AFLP، RFLP، RAPD، SSR، ISSR لتقدير التنوع الوراثي على مستوى الحامض النووي DNA، وإمكانية تقدير درجة الاختلاف بين الأفراد بدون تأثير الاختلاف البيئي (Miller و Tanksley، 1990). أجريت دراسة من قبل Thomas و Scott (1993) باستخدام الميكروستلايت للتعرف على هوية الـ DNA لـ 26 صنفاً من *Vitis vinifera* L. و 6 أصناف إضافية من *Vitis otundifolia* Muscadinia، إذ تم التعرف على 80 تركيباً وراثياً تحتوي على أصول وراثية، عنب نبيذ، عنب مائده (Thomas وآخرون، 1994). درس Nebauer وآخرون (1999) التنوع الوراثي لعشائر خلطيه التلقيح من النوع النباتي *Digitalis obscura* L. وقاموا بتحليل 50 تركيباً وراثياً تعود إلى 6 عشائر باستخدام تقانة RAPD إذ وجدوا أن أغلب الاختلافات الوراثية التي قدرت بحوالي 84.8% كانت ضمن العشائر، ونسبة أقل من 9.7% بين المناطق، والنسبة الأقل 5.5% كانت بين العشائر ضمن المناطق. اثبتت بعض الدراسات أهمية استخدام المؤشرات الجزيئية من أجل تصنيف أشجار العنب المزروعة (Sefc وآخرون، 2000)، أما بالنسبة للمؤشرات الوراثية SSR فيعد استخدامها ضعيفاً على عدد من أصناف العنب (Staraz وآخرون، 2007)، إذ درس Aradhya وآخرون (2003) 222 صنفاً مزروعاً وتبين أنها ضمن نفس المخزون الوراثي "Gene pool"، أي أن البنية الوراثية كانت متأثرة بالانتخاب الاصطناعي Artificial selection". وفي دراسة أخرى قام بها اليوسف وآخرون (2012) باستخدام 20 بادناً لتحديد

درجة التقارب الوراثي بين ستة أنواع من اصول العنب المقاومة لحشرة الفيلوكسيرا تم تحديد 65 حزمة ، وبلغت نسبة الحزم الفريدة 38.5 % . تبين من خلال حساب التعددية الشكلية ان اكبر مقدرة على اظهار التباينات بين الاصول كانت باستخدام البادئان VRZAG62 و VVMD32 ، إذ كانت قيمة المعامل لهما مرتفعة نسبيا 0.78 . ان معرفة التنوع الوراثي في نوع ما تكون ضرورية للاختيار الامثل للآباء الداخلة ضمن برامج التربية، إذ تمكنت بعض الدراسات باستخدام المؤشرات الجزيئية على نطاق واسع لتجميع الطرز المختلفة من الشعير ضمن مجموعات تبعا للتشابه الوراثي فيما بينها وذلك باستخدام مؤشرات مختلفة مثل RFLP (Casas وآخرون، 1998) ، AFLP (Ellis وآخرون، 1993) و SSR (Russel وآخرون، 1997a). التجارب الأولى للتباين الوراثي اجريت لأول مرة على اشجار العنب البرية من قبل Grando وآخرون (1995)، مستخدما RAPD ، إذ ان هذه المؤشرات لم تصل الى ربط التراكيب البرية المزروعة، و تبين ان هناك تميز وراثي واضح على المستوى المحلي الفرنسي بين الانماط البرية والمزروعة باستخدام مؤشرات SSR (This وآخرون، 2001). قامت الباحثة Ail وآخرون (2006) باستخدام مؤشرات RAPD للتحقق من الثبات الوراثي للنخيل المنتجة بطريقة تكوين الاجنة الجسمية لصنف النخيل البرحي، وتم استخدام 30 بادئا ووجدت ان ثلاث بادئات فقط تم من خلالها الحصول على حزم متباينة، ولاحظت حدوث تغيرات وراثية في نباتات النخيل الناتجة من التقانة المستخدمة، وأشار Askari و AL-Khalifah (2006) إلى أن مؤشرات الـ RAPD تعد وسيلة فعالة في الكشف المبكر عن التغيرات الوراثية التي تحصل في النباتات المنتجة من زراعة الانسجة النباتية وذلك من خلال دراسة ثلاث أصناف من النخيل وهي برحي وسكري وخلص، أوضح Ramsay وآخرون (2000) ان استخدام التقانات الجزيئية يمكن ان يقلل من تعقيدات ادخال عدد من الصفات المرغوب فيها في النمط الوراثي الواحد. ذكر Eleuch وآخرون (2008)

امكانية استخدام المؤشرات الوراثية بشكل فعال في تحاليل التنوع الوراثي وتقدير التشابه الوراثي. قام Staraz وآخرون (2007) بإجراء دراسات باستخدام مؤشرات SSR حول تقييم التنوع الوراثي للعنب البري، إذ أظهرت هذه الدراسات تباينات واضحة بين الانماط البرية والمزروعة في نفس المنطقة الجغرافية، وكذلك استخدمت تقنية SSR للكشف عن الاختلافات بين الأصناف وخاصة بالنسبة لتحديد الأنواع.

3 – المواد وطرائق العمل Materials and Methods

3 – 1 المواد Materials

3 – 1 – 1 الأجهزة والمواد المستخدمة في هذه الدراسة

جدول (2) الأجهزة والمواد المستخدمة والشركات المصنعة والمنشأ

ت	اسم الجهاز Apparatus Name	الشركات المصنعة أو المنشأ Company and origin
1	ثلاجة Deep freeze	Arcelik – Turkey
2	جهاز ترحيل كهربائي Gel Electrophoresis	Labnet – The U. S. A
3	جهاز طرد مركزي دقيق Microcentrifuge	TUV-Germany
4	مجهز للطاقة Power Supply	ECM-Germany
5	ميزان كهربائي حساس Sensitive Electronic Balance	Denver instrument – Germany
6	جهاز Vortex VI plus	Boeco –Eufor
7	حمام مائي Water bath	Mummer-Germany
8	Hot plate magnetic Stirrer	Vision – Korea
9	كابينة الأشعة فوق البنفسجية UV Cabinet	Diocom – The U. K
10	أنابيب أبندروف Eppendrof Tubes	Geneaid – Taiwan
11	Tips	Bio Basic – Canada
12	Micropipettes	Dragonmed– Germany

Passed electrical – The U . K	Gel Documentation جهاز تصوير الجل	13
Labnet Edison NJ – U.S.A	PCR (Thermal Black) جهاز البلمرة الحراري	14
Germany	Approx .500 ml دورق زجاجي مدرج	15
Germany	أنابيب زجاجية مدرجة مختلفة الأحجام Cytoglas.500ml,100ml , 50ml	16
Plastilap – China	Petri Dishes إطباق بتري	17
Safe Pack – U.S.A	Medical Gloves قفازات طبية	18
Kardelen – Turkey	Medical Cotton قطن طبي	19
Spartan – Jordan	قنينة ماء بلاستيكية شفافة (200 . ml)	20
Syria	ورق (سيليفون)	21
Bio Basic INC – Canada	Micro tip short 10.01	22
Bio Basic INC – Canada	Tip rackc sterile BT 222- RS100-1000ul	23
Bio Basic INC – Canada	Eppendrof tube sterile 1.5 ml (100)	24
Bio Basic INC – Canada	PCR rack tube	25
Bio Basic INC Canada	Rack Eppendrof 100 sample	26

3-1-2 المحاليل والمواد الكيميائية المستخدمة في هذه الدراسة

جدول (3) المحاليل والمواد الكيميائية والأصل والمنشأ

ت	المحاليل والمواد الكيميائية	الأصل أو المنشأ
1	Genomic DNA Mini Kit (Tissue) Gs100 Prep	Geneaid – Taiwan
2	Agarose AB 0013 50 mg	Bio Basic INC – Canada
3	TBE A0026 10 x1L	Bio Basic – Canada
4	100 bp DNA Ladder D- 1030 250 ul	Bioneer – Korea
5	PCR Premix K-2012 0.2 ml / 20 ul rxns / 96 tube	Bioneer – Korea
6	Ethidium bromide solution Do 177 . 5 ml	Bio Basic – Canada
7	صبغة تحميل Loading dye	Bio Basic INC – Canada
8	ماء مقطر 100% Distilled water	Kuwait
9	بوادئ متخصصة Specific primers بوادئ عشوائية Random primers	Bioneer – Korea
10	كحول ايثيلي Ethyl Alcohol (96 %)	Iraq
11	كحول الايزوبروبانول Isopropanol	Himedia – India

3-1-3 محتويات عدة استخلاص ألد DNA .

جدول (4) محتويات Genomic DNA Mini kit (Plant) والأصل والمنشأ

الأصل أو المنشأ	المحتويات	ت
Geneaid – Taiwan	GPX1 Buffer	1
Geneaid – Taiwan	Gp1 Buffer	2
Geneaid – Taiwan	GP2 Buffer	3
Geneaid – Taiwan	GP3 Buffer	4
Geneaid – Taiwan	Wash Buffer 25ml Add 100 ml Ethanol	5
Geneaid – Taiwan	W1 Buffer 45 ml	6
Geneaid – Taiwan	Elution Buffer 30 ml	7
Geneaid – Taiwan	Proteinase K	8
Geneaid – Taiwan	Filter Column	9
Geneaid – Taiwan	GD Column أنابيب جيديكولومن	10
Geneaid – Taiwan	Gilson Pipette Tip 200UL	11
Bio Basic Canada INC.	1.5ml Graduated Centrifuge Tubes, Natural , Sterile	12

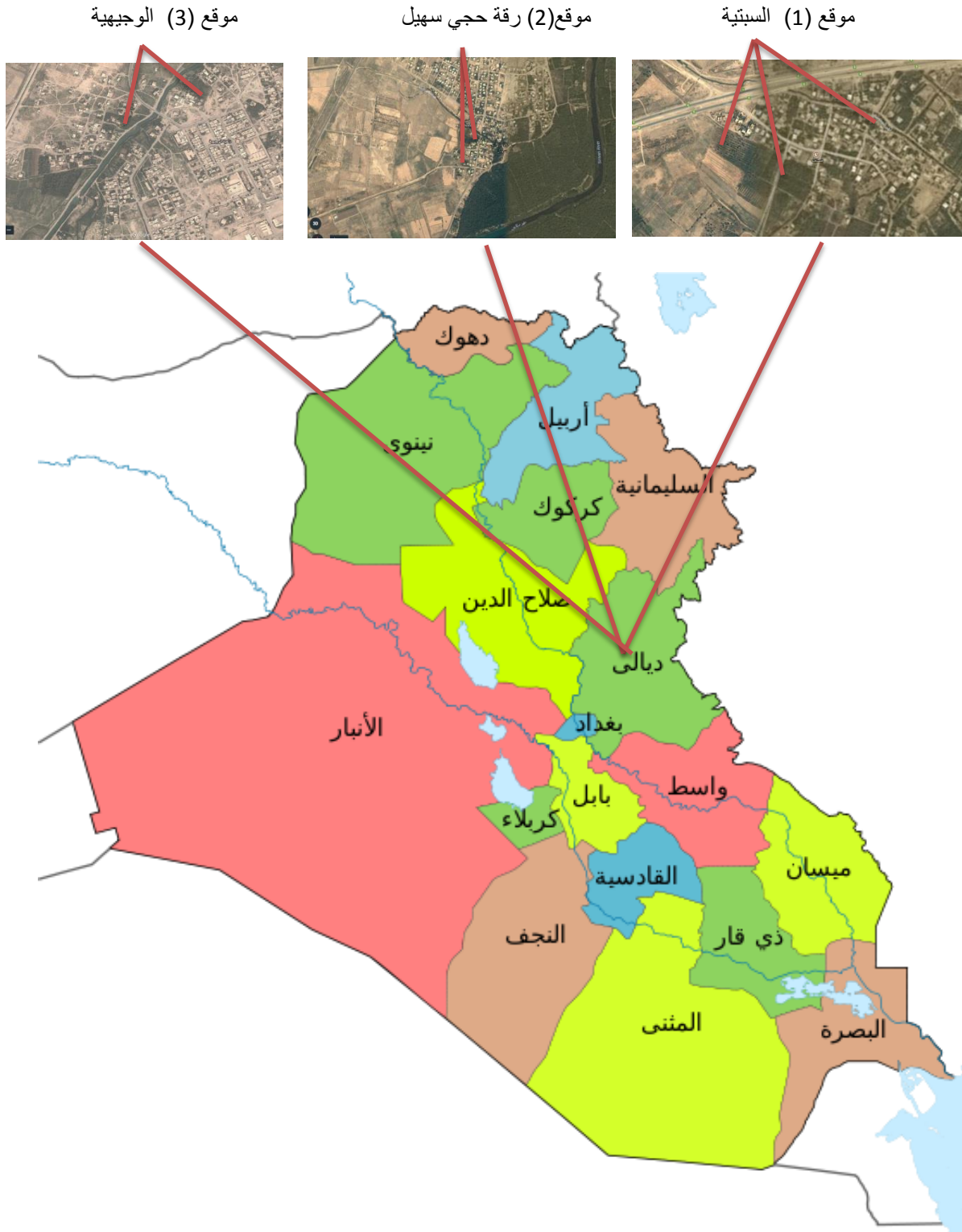
2-3 طرائق العمل Methods

1-2-3 جمع العينات

أنجزت عملية الجمع خلال سنة 2016، إذ جمعت الأوراق الفتية (Baggiolini، 1952). من ثلاث مناطق في محافظة ديالى وهي (السبتية، رقة حجي سهيل والوجيهية)، واختيرت 14 ورقة بصورة عشوائية بمعدل ورقتين من كل شجيرة باعتبار ان لدينا 7 شجيرات لكل صنف ، واكدت العديد من الدراسات ان هذا العدد من التكرارات كافي لمثل هذه الدراسات حسب OIV (2007). تم تحديد مواقع جمع العينات بجهاز GPS. والشكل (3)، يوضح مواقع الجمع، واحداثيات مناطق جمع العينات:

اسم المنطقة	الاحداثيات
السبتية	33 44'41 "N 44 38 '37 "E
رقة حجي سهيل	33. 8430542 "N 44. 5219807 "E
الوجيهية	33. 9691698 "N 44.9305653 "E

*N=North *E=East



شكل (3) مواقع الدراسة في محافظة ديالى. (موقع كوكل الأرض Google earth، 2016)

2-2-3 تحضير العينات النباتية لاستخلاص DNA

تم تحضير العينات النباتية حسب طريقة زيان (2009) مع بعض التحويلات، إذ تم جمع العينات أو الأوراق الفتية من ثلاث مناطق من محافظة ديالى ، وجمعت سبعة اصناف من العنب وهي (الكمالي ،الحلواني، الزيتونى، الفرنسى، الاسود شدة، الاعجيمى وديس العنز)، ثم وضعت في اكياس بلاستيكية وعلمت بأسمائها ثم خضعت بعدها لتنظيف سطحها من الغبار والشوائب العالقة (الناتج من جراء تطبيق المركبات الكيميائية) بواسطة قطن مبلل ثم غسلت الأوراق بالماء المقطر وتركت إلى ان تجف ثم لفت بأوراق المنيوم، وتم خزنها لحين استعمالها.

3-3 الدراسة الوراثية الجزيئية Molecular Genetic Study

1-3-3 استخلاص الـ DNA DNA Extraction

تمت عملية الاستخلاص وفقا لطريقة Genomic DNA Mini Kit Plant Protocol

2-3-3 محاليل الاستخلاص Buffers used in DNA Extraction

GPX1 Buffer

GP2 Buffer

Gp1 Buffer

GP3 Buffer

Proteinase K 20 µ L

W1 Buffer 400 µ L

Elution Buffer 50 µ L

Wash Buffer 600 µ L

3-3-3 طريقة الاستخلاص

تم أستخلاص المادة الوراثية الـ DNA من كامل الجينوم من أوراق العنب الفتية بمعدل ورقتين من كل شجيرة، واجريت عملية الاستخلاص حسب تقنية Genomic DNA Mini Kit (Plant)، تم طحن الأنسجة النباتية بواسطة الهاون والمدقة لعمل مسحوق ثم نقل المسحوق إلى انبوبة على نحو ملائم الحجم، نواصل بعدها الخطوة التي تليها حسب بروتوكول الموضوع من قبل Genomic DNA Mini Kit (Plant) أو الطريقة التقليدية (زيان، 2009) مع بعض التحويرات التي تتم كماياتي:

1. تفكك الانسجة Step Tissue Dissociation

- قطع 50 ملغم من الانسجة النباتية الطازجة (أي مايصل إلى 15 ملغم) من العينة الطرية
- حفظ العينة في أوراق الالمنيوم بدرجة حرارة الغرفة .
- طحن العينة حتى تصبح بشكل مسحوق ناعم جدا وذلك باستخدام الهاون والمدقة ثم تنقل إلى انبوبة ابندروف حجمها 1.5 ml.
- اضافة 400 مايكروليتر من GP1 أو GPX1 و 5 مايكروليتر من Protenase K إلى الانبوبة المحتوية على العينة ثم تمزج محتويات العينة بوساطة جهاز Vortex .
- حضنت الانبوبة في حمام مائي بدرجة حرارة 60 م° و لمدة عشرة دقائق وخلال فترة الحضانة تقلب الانبوبة كل خمس دقائق.

2. التحلل Lysis

- إضافة 100 مايكروليتر من GP2 وتخلط بواسطة Vortex ثم تحضن في الجليد لمدة 3 دقائق .
- وضع فلتر التصفية في انبوبة الجمع التي حجمها 2 مل ثم ينقل الخليط إلى انبوبة الفلتر .
- عمل طرد مركزي لمدة دقيقة وبسرعة 100 دورة بالدقيقة للانبوبة المحتوية على الفلتر ثم بعد الطرد يأخذ الفلتر وتترك الانبوبة .
- ينقل بعناية الطافي من انبوبة الجمع إلى انبوبة ابندروف جديد.
- إضافة 1.5 حجم من GP3 إلى الانبوبة ثم عمل Vortex لمدة خمس ثواني (أي إضافة 750 مايكروليتر من GP3) .

3. ارتباط ال DNA (DNA Binding)

- وضع عمود التصفية أو فلتر التصفية GD في انبوبة الجمع 2 مل.
- نقل 700 مايكروليتر من الخليط واي راسب متبقي إلى انبوبة الجمع GD.
- عمل طرد مركزي لمدة 2 دقيقة وبسرعة 14000 دورة .
- يأخذ الفلتر وتترك انبوبة الجمع ويوضع الفلتر في انبوبة جمع جديدة .

4. الغسل Wash

- إضافة 400 مايكروليتر من محلول W1 إلى الانبوبة المحتوية على الفلتر وعمل طرد مركزي لها لمدة دقيقة وبسرعة 14000 دورة/دقيقة.

- تترك انبوبة الجمع ويأخذ الفلتر ويوضع في انبوبة جمع جديدة ويضاف لها 600 مايكروليتتر من محلول Wash ويعمل لها طرد مركزي لمدة دقيقة وبسرعة 14000 دورة.
- يأخذ الفلتر ويوضع في انبوبة الجمع ويعمل طرد مركزي لها لمدة 3 دقائق لغرض التجفيف (في حالة ظهور اصباغ في العمود المحتوي على الفلتر بعد اضافة ال Wash يضاف 400 مل من الكحول المطلق إلى انبوبة الفلتر ثم يعمل لها طرد مركزي لمدة دقيقة وبسرعة 14000 دورة وبعد ذلك يعمل لها طرد مركزي لمدة 3 دقائق وبسرعة 14000 دورة لغرض التجفيف).

• تنزيل الـ DNA (DNA Elution)

- اضافة 50 مايكروليتتر من Elution إلى الفلتر بعد وضعه في انبوبة ابندروف جديدة ومن ثم وضعه في جهاز الطرد المركزي لمدة دقيقتين وبسرعة 14000 دورة وبذلك يتم الحصول على DNA .

3-3-4 توصيف الدنا Characterization of DNA

ان عملية توصيف الدنا تضمنت:

أ- قياس تركيز الدنا وتقدير نقاوته .

- تم قياس تراكيز الدنا وتقدير نقاوته بواسطة جهاز Nanodrop إذ تم وضع 3 مايكروليتتر من العينة على عدسة الجهاز الذي يقيس الإمتصاصية عند الطول الموجي 260 نانوميتر والطول الموجي 280 نانوميتر. وكانت نقاوة الدنا المستخلص تتراوح من 1.8-2 .

ب- الترحيل الكهربائي لعينات الدنا باستعمال هلام الاكاروز Gel Electrophoresis

1- حضر الهلام بتركيز 1% بإضافة 1 غم من الاكاروز إلى 100 مل من المحلول

TBE الداريء (قوة $1 \times$) ثم سخن بفرن الموجات الدقيقة Microwave oven

إلى حين اكتمال الإذابة وترك ليبرد إلى درجة حرارة 50-55 م⁰.

2- أضيف 3 مايكروليتر من صبغة بروميد الايثيديوم Ethidium bromide .

3- حضر اللوح الزجاجي المعد لصب الهلام وثبت عليه المشط الخاص لتكوين الحفر

عند احد اطراف الحوض.

4- تم سكب الهلام السائل برفق وبشكل مستمر داخل الحوض لمنع حدوث الفقاعات

ثم ترك ليتصلب .

5- بعد تصلب الهلام وضع في حوض الترحيل وغمر بلمحلول الداريء TBE بقوة 1X

ومن ثم رفع المشط .

6- تم مزج 8 مايكروليتر لكل عينة من عينات الدنا المراد تحميلها مع 3 مايكروليتر

من محلول صبغة التحميل loading dye . وزعت العينات داخل الحفر الموجودة

في الهلام.

7- تم توصيل اقطاب التيار الكهربائي وجهاز بقدره 90 فولت لمدة 60 دقيقة.

8- تم فحص الهلام بتعريضه للأشعة فوق البنفسجية بوضعه في جهاز الكشف

والتصوير Gel Documentation لرؤية حزم الدنا.

3-4 مؤشرات التفاعل التضاعفي العشوائي RAPD لسلسلة الدنا

1- تم اجراء التفاعل باستعمال عدة خليط تفاعل البلمرة الحراري AccuPower® PCR PreMix kit حسب طريقة زيان (2009)، إذ تحوي العدة على 96 انبوب صغير سعة 0.2 مايكروليتر تحوي على المكونات الآتية:

أ -انزيم البلمره Top DNA polymerase 2.5 U/ml .

ب - القواعد النيتروجينية ثلاثية الفوسفات dNTPs تركيز 250 μ M .

ت - المحلول المنظم PCR Buffer والذي يتكون من Tris – HCL 10 mM و KCl 30 mM و $MgCl_2$ 1.5 mM.

2 -استعمل 15 بادئ عشوائي كما مبين بالجدول (5) علما ان البادئات مصنعة في شركة Geneaid وبحسب التتابعات الخاصة بشركة Operon.

طريقة العمل

1- حضر خليط التفاعل وذلك باضافة 6 مايكروليتر ماء و 4 مايكروليتر من البادئ العشوائي مع 5 مايكروليتر من عينة DNA لكل انبوب ابندروف صغير من عدة خليط تفاعل البلمرة الحراري .

2- وضعت العينات في جهاز البلمرة الحراري Thermocycler ونفذ البرنامج الموضح في جدول (6).

3- الترحيل الكهربائي Gel Electrophoresis لخليط تفاعل البلمرة الحراري PCR

تم اجراء الترحيل الكهربائي وحسب ما مذكور في الفقرة ب -الترحيل الكهربائي لعينات الدنا باستخدام هلام الاكاروز Gel Electrophoresis .

جدول (5) البادئات العشوائية مع التتابعات الخاصة بها.

No.	Primer Code	Nucleotide Sequence 5"-3"
1	1224	CAGGCCCTTC
2	1225	AGGTGACCGT
3	1226	CGCAGGATGG
4	1227	GTGTGCCCCA
5	OPF -01	ACGGATCCTG
6	OPF-02	GAGGATCCCT
7	OPF-03	CCTGATCACC
8	OPF-04	GGTGATCAGG
9	OPF-07	CCGATATCCC
10	OPF-08	GGGATATCGG
11	OPF-09	CCAAGCTTCC
12	OPF-10	GGAAGCTTGG
13	OPF-11	TTGGTACCCC
14	OPF-12	ACGGTACCAG
15	OPF-13	GGCTGCAGAA

جدول (6) برنامج تفاعل مؤشرات التفاعل التضاع في العشوائي لسلسلة الدنا PCR – RAPD

ت	الحرارة م°	الخطوات	الوقت
1	94	المسخ الأولي لشريط الدنا Initial Denaturation	5 دقيقة
2	94	مسح قالب Denaturation	1 دقيقة
3	36	ارتباط البادئ Primer Annealing	1 دقيقة
4	72	استطالة البادئات Primer Extension	2 دقيقة
5		الخطوات 2-4 تكرر 45 مرة	
6	72	الاستطالة النهائية Final Extension	7 دقيقة

نقلًا عن (Khierallah وآخرون، 2014).

3-5 مؤشرات التفاعل التضاعفي المتخصص SSR لسلسلة الدنا

تمت مضاعفة الحمض النووي باستخدام 10 أزواج من البوادئ المتخصصة (SSR primers) باستخدام تقنية الـ SSR-PCR.

طريقة العمل:

1- حضر خليط التفاعل وذلك بإضافة 6 مايكروليتر ماء و 2 مايكروليتر Forward و 2

Reverse من البادئ المتخصص مع 5 مايكروليتر من عينة DNA لكل أنبوب ابندروف

صغير من عدة خليط تفاعل البلمرة الحراري.

2- وضعت العينات في جهاز البلمرة الحراري Thermocycler ونفذ البرنامج الموضح في

جدول (7).

4-2 -الترجيل الكهربائي Gel Electrophoresis لخليط تفاعل البلمرة الحراري PCR

حسب طريقة عبد الحميد وآخرون (2012) أجريت عملية التضاعف (Amplification) في

أجهزة التدوير الحراري وفق البرنامج الحراري التالي :

جدول (7) برنامج تفاعل مؤشرات التفاعل التضاعفي المتخصص لسلسلة الدنا PCR- SSR

ت	الحرارة م°	الخطوات	الوقت
1	94	المسخ الأولي لشريط الدنا Initial Denaturation	5 دقيقة
2	94	مسح القالب Denaturation	1 دقيقة
3	62-51	ارتباط البادئ Primer Annealing	1 دقيقة
4	72	استطالة البادئات Primer Extension	1.5 دقيقة
5		الخطوات 2-4 تكرر 35 مرة	
6	72	الاستطالة النهائية Final Extension	7 دقيقة

جدول (8) البادئات المتخصصة SSR مع التتابعات الخاصة بها

No.	حرارة Tan الالتحام	Primer Code أسم البادئ	Nucleotide Sequence 5"-3" Forward / Reverse
1	56	VRZAG62	F-GGTGAAATGGGCACCGAACACACGC R-CCATGTCTCTCCTCAGCTTCTCAGC
2	51	VRZAG79	F-GATTGTGGAGGAGGGAACAAACCG R-TGCCCCCATTTTCAAACCTCCCTTCC
3	52	VVS4	F-CCATCAGTGATAAAACCTAATGCC R-CCCACCTTGCCCTTAGATGTTA
4	57	VVMD5	F-CTAGAGCTACGCCAATCCAA R-TATACCAAAAATCATATTCCTAAA
5	52	VVMD6	F-ATCTCTAACCCTAAAACCAT R-CTGTGCTAAGACGAAGAAGA
6	52	VVMD7	F-AGAGTTGCGGAGAACAGGAT R-CGAACCTTCACACGCTTGAT
7	55	VVMD27	F-GTACCAGATCTGAATACATCCGTAAGT R-ACGGGTATAGAGCAAACGGTGT
8	55	VVMD28	F-AACAATTCAATGAAAAGAGAGAGAGA R-TCATCAATTTCTGTATCTCTATTTGCT
9	59	VVMD31	F-CAGTGGTTTTTCTTAAAGTTTCAAGG R-CTCTGTGAAAGAGGAAGAGACGC
10	56	VVMD32	F-TATGATTTTTTAGGGGGGTGAGG R-GGAAAGATGGGATGACTCGC

3-6 الترحيل الكهربائي

تم ترحيل نواتج تفاعل ال PCR في هلام الاكاروز بتركيز 1% مع تحميل مؤشر قياسي

لل DNA (Gene ruler 100bp plus DNA ladder) ذو حزم ثابتة ومحددة الأوزان الجزيئية

، وشوهدت الحزم الظاهرة بوجود الاشعة فوق البنفسجية UV-light باستخدام جهاز Gel

documentation وتم تحديد الأوزان الجزيئية للحزم الظاهرة size (allele) باستخدام برنامج Gel Analysis (عبد الحميد وآخرون، 2012).

3_7 تحليل النتائج Data Analysis

1- حساب الوزن الجزيئي

تمت الاستفادة من برنامج Photo capt الأصدار 10 لحساب الوزن الجزيئي (Cerasela وآخرون، 2011). وهو احد برامج الحاسوب الذي يمتاز بدقته في الكشف عن الحزم الناتجة من تفاعلات البلمرة الحراري PCR ومقارنته بحجم المؤشر DNA Ladder الذي تراوحت اوزانه الجزيئية 100-200 زوج قاعدي.

2- تقدير النسبة المئوية للتشابه Smilarity

تم استعمال البرنامج الإحصائي الجاهز SPSS الأصدار 20 لحساب البعد والنسبة المئوية للتشابه ورسم مخطط التحليل التجمعي. وتم حساب النسبة المئوية للتعددية الشكلية للبادئ المستخدم من المعادلة الآتية :

$$\text{Polymorphsim} = (\text{عدد الحزم المتباينة في البادئ} / \text{العدد الكلي لحزم البادئ}) \times 100$$

تم حساب النسبة المئوية لكفاءة كل بادئ من المعادلة الآتية:

$$(\text{العدد الكلي لحزم البادئ} / \text{العدد الكلي لحزم كل البادئات}) \times 100 .$$

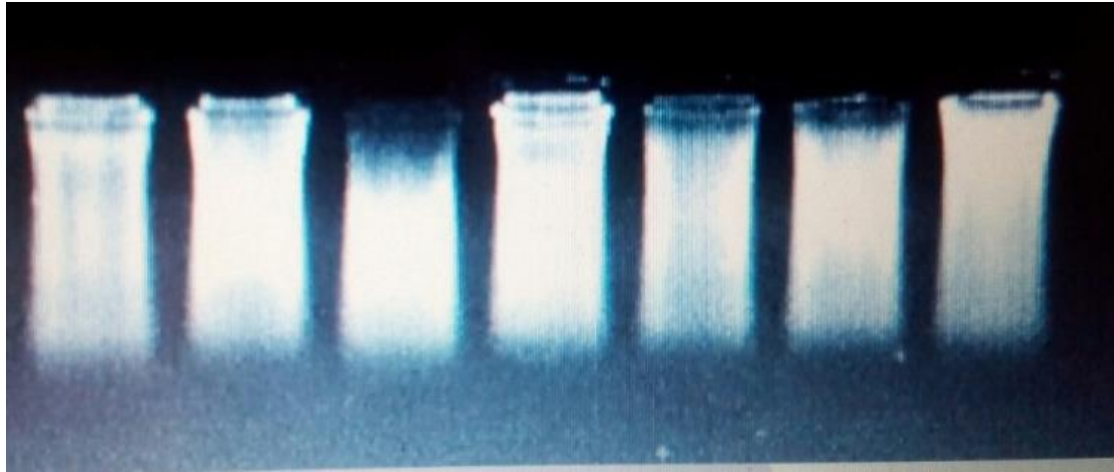
اما حساب النسبة المئوية للمقدرة التمييزية لكل بادئ فتم من خلال المعادلة :

$$(\text{عدد الحزم المتباينة للبادئ} / \text{عدد الحزم المتباينة لكل البادئات}) \times 100 \text{ (Grudman وآخرون، 1995).}$$

4- النتائج والمناقشة Results and Discussion

4-1 نتائج تفاعلات الـ RAPD

<i>V. hissarica</i> <i>vassilcz</i>	<i>V.vinifera</i> var <i>sativa beck</i>	<i>V.Var sativa</i>	<i>V.Sylvestris</i>	<i>V.Berlandieri</i> <i>planch</i>	<i>V.Hissarica</i>	<i>V.vinifera</i>
الفرنسي	الكمالي	الاعجمي	الزيتوني	أسود شدة	ديس العنز	الحلواني

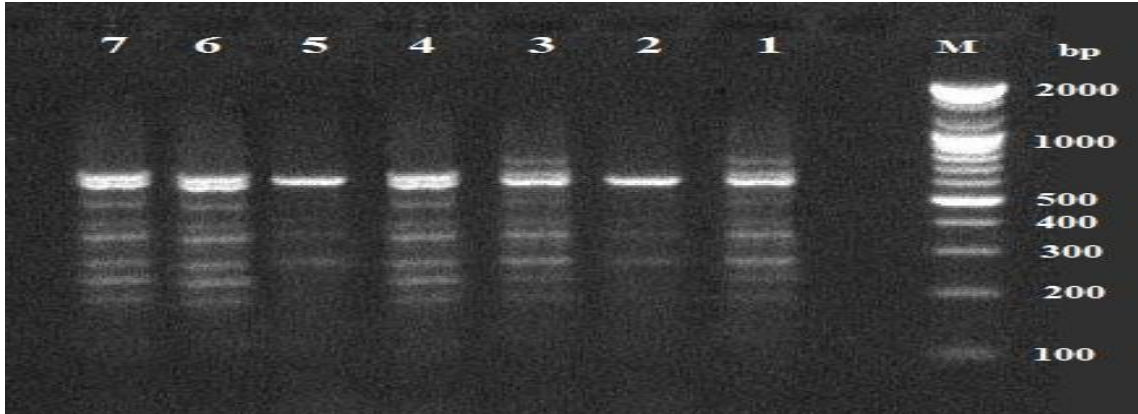


صورة (1) نواتج الدنا لأصناف العنب المرحلة على هلام الاكاروز، 1- فرنسي (*V.hissarica vassilcz*) -2
 كمالي (*V.vinifera var sativa beck*) -3 الاعجمي (*V.Var sativa*) -4 زيتوني (*V.Sylvestris*) -5
 أسود شدة (*V. Berlandieri planch*) -6 ديس العنز (*V. Hissarica*) -7 حلواني (*V.vinifera*) .

تم استعمال مؤشرات الـ RAPD لعينات الدنا المعزولة من سبعة أصناف من العنب المنتشر في محافظة ديالى وبوجود 10 بوادئ عشوائية والمنتجة من شركة Geneaid، ومن ثم وضفت النتائج لإيجاد البصمة الوراثية Fingerprint، وايضا لتحديد التنوع الوراثي والكشف عن العلاقة الوراثية لتحديد القرب أو البعد الوراثي بين الأصناف المدروسة، تم في هذه الدراسة التركيز الأكثر على وجود الحزم الفريدة والحزم الغائبة؛ لأنها تعد من أسس إيجاد البصمة الوراثية، وبما أن أعداد الحزم المتضاعفة وأوزانها الجزيئية مختلفة لكل بادئ، لذا سوف يتم تحليل نتائج كل بادئ على حدة وكما يأتي:

1. البادئ 1224

استعمل البادئ 1224 لمضاعفة عينات الدنا المدروسة الذي يرتبط بالتتابعات المكمل له في قالب الدنا، إذ بلغ العدد الكلي للحزم المتضاعفة 32 حزمة، أظهر هذا البادئ ما بين 2-6 حزمة لكل صنف صورة 2، أظهر الصنف زيتوني وديس عنز وحلواني أعلى عدد من الحزم وهو ستة حزم، والأوزان الجزيئية لهذه الأصناف تراوحت ما بين 198-600 زوج قاعدي، إذ تميز بظهور الحزمة ذات الوزن الجزيئي 496 زوج قاعدي ولم تظهر هذه الحزمة في الأصناف الباقية، لذا إن وجود هذه الحزمة وفي هذا الموقع يمثل مؤشرا وراثيا يميز هذه الأصناف الثلاثة عن بقية الأصناف باستعمال هذا البادئ، وأظهر هذا البادئ حزمة ذات وزن جزيئي 730 زوج قاعدي في الصنفين فرنسي واعجمي في حين لم تظهر الأصناف الأخرى هذه الحزمة، وأظهر البادئ حزم رئيسية ذات أوزان جزيئية 297 و 600 زوج قاعدي ظهرت في الأصناف المدروسة جميعها جدول 9.



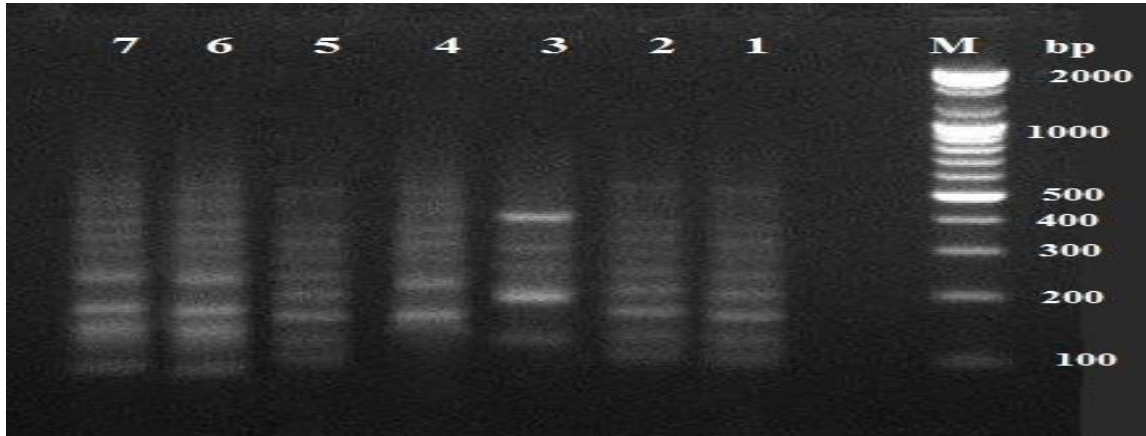
صورة (2) نتائج تفاعلات RAPD-PCR للبادئ 1224 للعينات كافة والمرحلة على هلام الاكاروز بتركيز 1%، ولمدة ساعة ونصف والمصورة تحت الاشعة فوق البنفسجية بعد تصبغها بصبغة بروميد الاثديوم، إذ يمثل M الدليل الحجمي، 1- فرنسي (*V.hissarica vassilcz*) 2- كمالي (*V.vinifera var sativa beck*) 3- الاعجمي (*V.Var sativa*) 4- زيتوني (*V.Sylvestris*) 5- أسود شدة (*V. Berlandieri planch*) 6- ديس العنز (*V. Hissarica*) 7- حلواني (*V.vinifera*) .

جدول (9) الحزم المتباينة للبادئ 1224 مع أوزانها الجزيئية لبعض اصناف من العنب

Molecular Weights	V .hissarica vassilcz الفرنسي	V .vinifera var sativa beck الكمالي	V .Var sativa الاعجمي	V .Sylvestris الزيتوني	V Berlandieri planch أسود شدة	V. Hissarica ديس العنز	V .vinifera الحلواني
730	1	0	1	0	0	0	0
600	1	1	1	1	1	1	1
496	0	0	0	1	0	1	1
376	1	0	1	1	0	1	1
297	1	1	1	1	1	1	1
216	1	0	1	1	0	1	1
198	0	0	0	1	0	1	1

2- البادئ 1225

بعد مضاعفة دنا النماذج المدروسة مع هذا البادئ ضمن تفاعلات RAPD أعطى نتائج متباينة فيما بين التراكيب الوراثية، إذ تراوح عدد الحزم المتضاعفة بين 3-7 حزم، كما بلغ العدد الكلي للحزم 42 حزمة والتي تراوحت أوزانها الجزيئية بين 100-536 زوج قاعدي، أظهر هذا البادئ حزمة ذات وزن جزئي 297 زوج قاعدي لصنفي ديس عنز وحلزوني افتقرت لها بقية الأصناف كما أظهر هذا البادئ حزم ذات أوزان جزيئية 536 و 395 و 237 و 178 لجميع الأصناف باستثناء الصنف اعجمي افتقرت لها بقية النماذج الأخرى لذا كانت بمثابة بصمة وراثية لهذا الصنف وكما هو موضح في صورة (3).



صورة (3) نتائج تفاعلات RAPD-PCR للبادئ 1225 للعينات كافة والمرحلة على هلام الاكاروز بتركيز 1%. ولمدة ساعة ونصف والمصورة تحت الاشعة فوق البنفسجية بعد تصبغها بصبغة بروميد الاثيديوم، اذ يمثل M الدليل الحجمي، 1- فرنسي (*V.hissarica vassilcz*) 2- كمالي (*V.vinifera var sativa beck*) 3- الاعجمي (*V.Var sativa*) 4- زيتوني (*V.Sylvestris*) 5- أسود شدة (*V Berlandieri planch*) 6- ديس العنز (*V. Hissarica*) 7- حلواني (*V.vinifera*) .

جدول (10) الحزم المتباينة للبادئ 1225 مع أوزانها الجزيئية لبعض اصناف من العنب

Molecular Weights	V <i>.hissarica vassilcz</i> الفرنسي	V <i>.vinifera var sativa beck</i> الكمالي	V <i>.Var sativa</i> الاعجمي	V <i>.Sylvestris</i> الزيتوني	V <i>Berlandieri planch</i> أسود شدة	V. <i>Hissarica</i> ديس العنز	V <i>.vinifera</i> الحلواني
536	1	1	0	1	1	1	1
495	0	0	0	1	0	1	1
412	0	0	1	0	0	0	0
395	1	1	0	1	1	1	1
297	0	0	0	0	0	1	1
237	1	1	0	1	1	1	1
200	1	1	1	0	1	0	0
178	1	1	0	1	1	1	1
138	1	1	1	0	1	0	0
100	1	1	0	0	0	1	1

3- البادئ 1226

بعد مضاعفة دنا النماذج المدروسة مع هذا البادئ ضمن تفاعلات RAPD لم يبين هذا البادئ وجود اي حزم وهذا يرجع إلى عدم وجود تسلسل متمم له مع تسلسل الدنا كما هو موضح في صورة 4 .

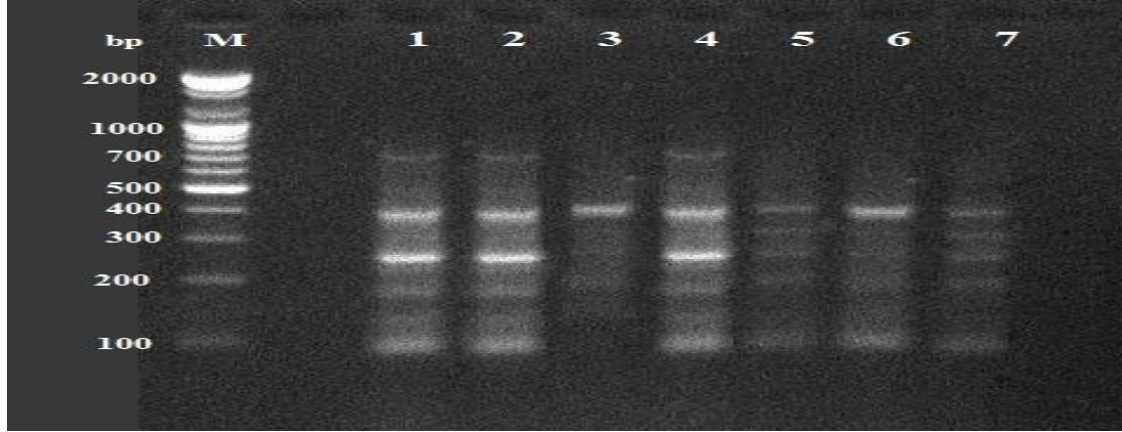


صورة (4) توضح عدم ظهور اي حزمة للبادئ 1226 للعينات كافة والمرحلة على هلام الاكاروز بتركيز 1%. نتائج تفاعلات RAPD-PCR للبادئ 1224 للعينات كافة والمرحلة على هلام الاكاروز بتركيز 1%، ولمدة ساعة ونصف والمصورة تحت الاشعة فوق البنفسجية بعد تصيغها بصبغة بروميد الاثيديوم، اذ يمثل M الدليل الحجمي، 1- فرنسي (V.hissarica vassilcz) 2- كمالي (V.vinifera var sativa beek) 3- الاعجمي (V.Var sativa) 4- زيتوني (V.Sylvestris) 5- أسود شدة (V. Berlandieri planch) 6- ديس العنز (V. Hissarica) 7- حلواني (V.vinifera) .

3-البادئ 1227

تراوحت الحزم المتضاعفة في هذا البادئ بين 2-6 حزمة، أذ بلغ العدد الكلي 25 حزمة والتي تفاوتت في أوزانها الجزيئية ومن خلال ملاحظة الصورة 5 نلاحظ ظهور اربعة حزم لاربعة اصناف فرنسي، كمالي، زيتوني وأسود شدة تراوحت أوزانها الجزيئية 737 و 278 و 192 و 133 في حين افتقرت النماذج الأخرى لها . كما أظهر هذا البادئ حزمة عامة ذات وزن جزيئي 396

زوج قاعدي وكذلك أظهر هذا البادئ حزمة عامة ذات وزن جزيئي 100 زوج قاعدي باستثناء الصنف اعجمي الذي افتقر لهذه الحزم.



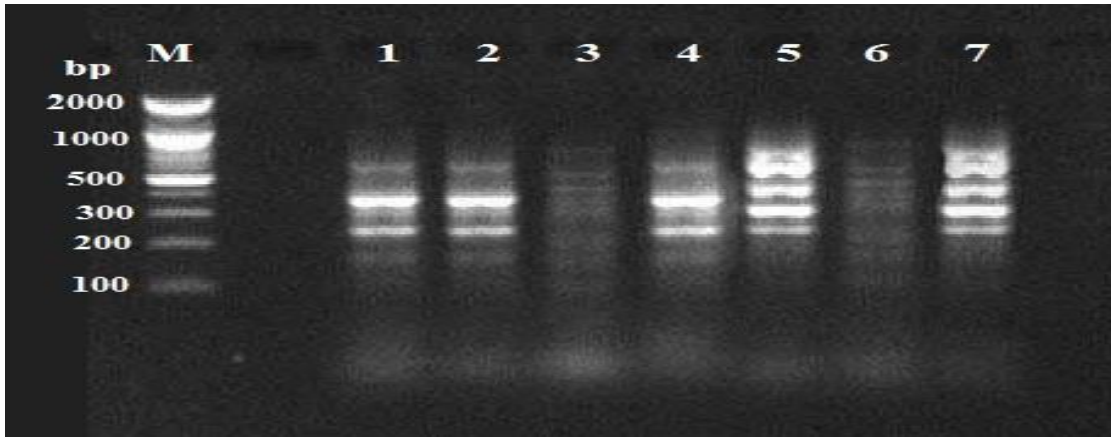
صورة (5) نتائج تفاعلات RAPD-PCR للبادئ 1227 للعينات كافة والمرحلة على هلام الاكاروز بتركيز 1%، ولمدة ساعة ونصف والمصورة تحت الاشعة فوق البنفسجية بعد تصبغها بصبغة بروميد الاثيديوم، اذ يمثل M الدليل الحجمي، 1- فرنسي (V.hissarica vassilcz) 2- كمالي (V.vinifera var sativa beck) 3- الاعجمي (V.Var sativa) 4- زيتوني (V.Sylvestris) 5- أسود شدة (V. Berlandieri planch) 6- ديس العنز (V. Hissarica) 7- حلواني (V.vinifera).

جدول (11) الحزم المتباينة للبادئ 1227 مع أوزانها الجزيئية لبعض اصناف من العنب

Molecular Weights	V .hissarica vassilcz الفرنسي	V .vinifera var sativa beck الكمالي	V .Var sativa الاعجمي	V .Sylvestris الزيتوني	V Berlandieri planch أسود شدة	V. Hissarica ديس العنز	V .vinifera الحلواني
737	1	1	0	1	0	0	0
396	1	1	1	1	1	1	1
278	1	1	0	1	0	0	0
192	1	1	0	1	0	0	0
133	1	1	0	1	0	0	0
100	1	1	0	1	1	1	1

5 -البادئ OPF-01

كان لهذا البادئ نواتج مختلفة بأعداد الحزم وأوزانها الجزيئية على هلام الاكاروز، اذ تراوحت أعداد الحزم للنماذج المدروسة 0-4 حزمة وبلغ العدد الكلي للحزم المتضاعفة 20 حزمة كما هو موضح في صورة 6، لم يظهر هذا البادئ أي حزمة للصنفين اعجمي وديس عنز في حين أظهر هذا البادئ حزمتين تراوحت أوزانها الجزيئية 297-390 زوج قاعدي للصنفين أسود شدة وحلواني افتقرت لها بقية الأصناف كما هو موضح في جدول 12 .



صورة (6) نتائج تفاعلات RAPD-PCR للبادئ OPF-01 للعينات كافة والمرحلة على هلام الاكاروز بتركيز 1%. ولمدة ساعة ونصف والمصورة تحت الاشعة فوق البنفسجية بعد تصبغها بصبغة بروميد الاثيديوم، اذ يمثل M الدليل الحجمي، 1- فرنسي (*V.hissarica vassilcz*) 2- كمالى (*V.vinifera var*) 3- (*sativa beck*) 4- زيتوني (*V.Sylvestris*) 5- أسود شدة (*V*) 6- ديس العنز (*Berlandieri planch*) 7- حلواني (*V.vinifera*) .

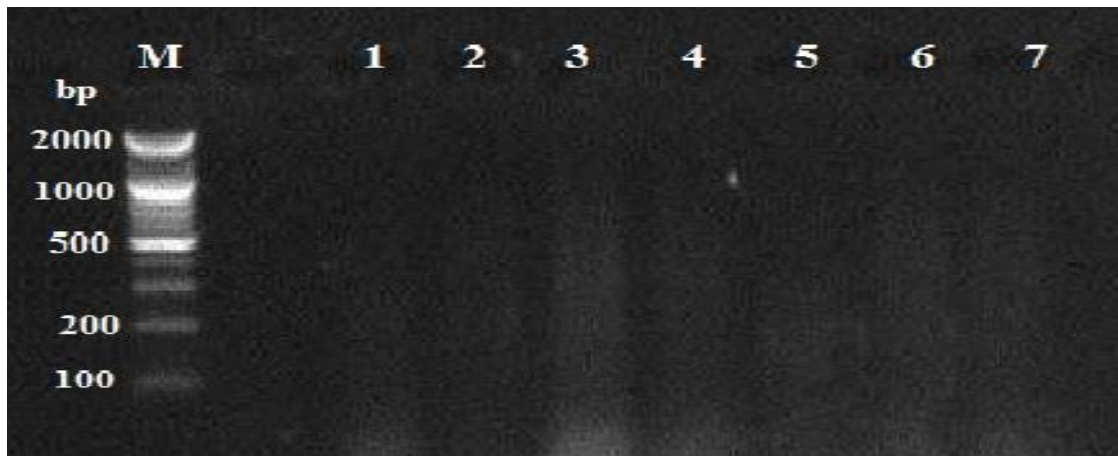
جدول (12) الحزم المتباينة للبادئ OPF-01 مع أوزانها الجزيئية لبعض اصناف من العنب

Molecular Weights	V .hissarica vassilcz الفرنسي	V .vinifera var sativa beck الكمالي	V .Var sativa الاعجيمي	V .Sylvestris الزيتوني	V Berlandieri planch أسود شدة	V. Hissarica ديس الغنز	V .vinifera الحلواني
600	1	1	0	1	1	0	1
390	0	0	0	0	1	0	1
324	1	1	0	1	0	0	0
297	0	0	0	0	1	0	1
228	1	1	0	1	1	0	1
189	1	1	0	1	0	0	0

6- البادئ OPF-02

بعد مضاعفة دنا النماذج المدروسة مع هذا البادئ ضمن تفاعلات RAPD لم يبين هذا البادئ وجود اي حزم وهذا يرجع إلى عدم وجود تسلسل متمم له مع تسلسل الدنا كما هو موضح في

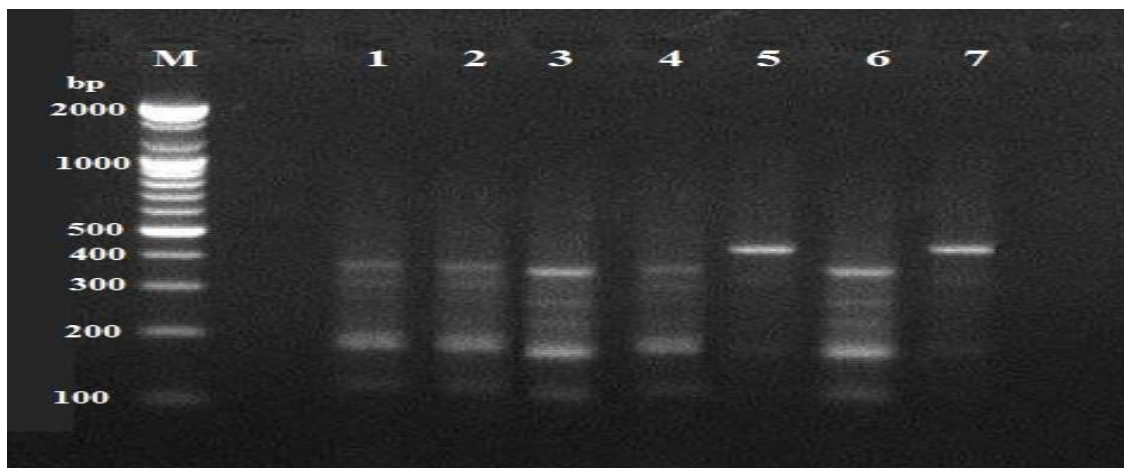
صورة 7.



صورة (7) توضح عدم ظهور اي حزمة نتائج تفاعلات للبادئ OPF-01 للعينات كافة والمرحلة على هلام الاكاروز بتركيز 1%. ولمدة ساعة ونصف والمصورة تحت الاشعة فوق البنفسجية بعد تصبغها بصبغة بروميد الاثيديوم، اذ يمثل M الدليل الحجمي، 1- فرنسي (*V.hissarica vassilcz*) 2- كمالي (*V.vinifera var*) 3- (*sativa beck*) 4- (*V.Var sativa*) زيتوني (*V.Sylvestris*) 5- أسود شدة (*V*) 6- ديس الغنز (*Berlandieri planch*) 7- حلواني (*V.vinifera*) .

7 - البادئ OPF-03

أظهر هذا البادئ عدد من الحزم تراوح ما بين 1-5 حزم، وبلغ العدد الكلي للحزم المتضاعفة 21 حزمة، وفقدت الحزم ذات الوزن الجزيئي 427 زوج قاعدي للأصناف أسود شدة وحلواني. كما أظهر هذا البادئ ثلاث حزم ذات أوزان جزيئية 351-196 للصنفين فرنسي وزيتوني فقدت في الأصناف الأخرى، وكذلك أظهر هذا البادئ حزمة عامة ذات وزن جزيئي 112 زوج قاعدي باستثناء الصنفين أسود شدة وحلواني أذ افتقدا لهذه الحزم، كما أظهر هذا البادئ حزم لثلاث اصناف فرنسي، كمالي وزيتوني ذات وزن جزيئي 351 زوج قاعدي افتقدت لها بقية الأصناف كما هو موضح في صورة 8.



صورة (8) نتائج تفاعلات RAPD-PCR للبادئ OPF-03 للعينات كافة والمرحلة على هلام الاكاروز بتركيز 1%. ولمدة ساعة ونصف والمصورة تحت الاشعة فوق البنفسجية بعد تصبغها بصبغة بروميد الاثيديوم، اذ

- يمثل M الدليل الحجمي، 1- فرنسي (V.hissarica vassilcz) 2- كمالي (V.vinifera var sativa beck)
 3- الاعجمي (V.Var sativa) 4- زيتوني (V.Sylvestris) 5- أسود شدة (V. Berlandieri planch)
 6- ديس الغنز (V. Hissarica) 7- حلواني (V.vinifera).

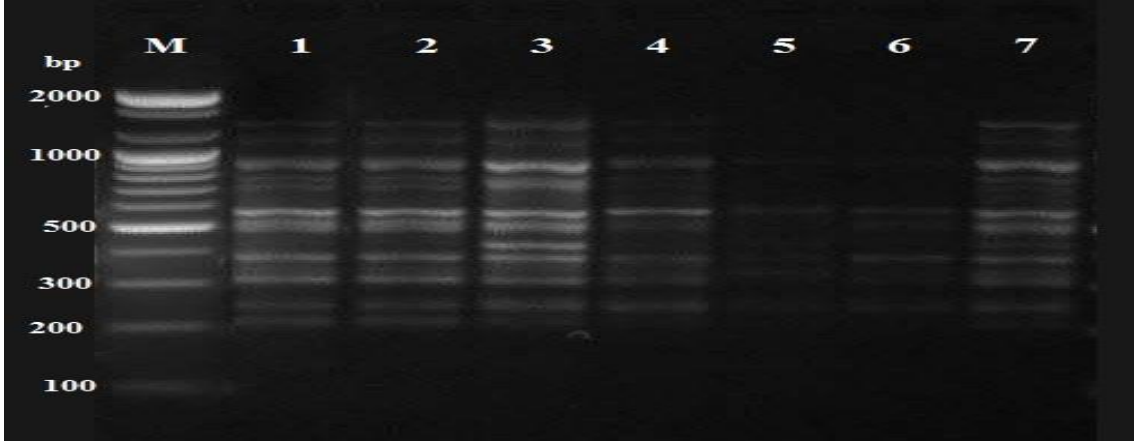
جدول (13) الحزم المتباينة للبادئ OPF-03 مع أوزانها الجزيئية لبعض اصناف من العنب

Molecular Weights	V .hissarica vassilcz الفرنسي	V .vinifera var sativa beck الكمالي	V .Var sativa الاعجمي	V .Sylvestris الزيتوني	V Berlandieri planch أسود شدة	V. Hissarica ديس الغنز	V .vinifera الحلواني
427	0	0	0	0	1	0	1
351	1	1	0	1	0	0	0
326	0	0	1	0	0	1	0
261	0	0	1	0	0	1	0
223	0	0	1	0	0	1	0
196	1	1	0	1	0	0	0
171	0	0	1	0	0	1	0
112	1	1	1	1	0	1	0

8 - البادئ OPF-O4

أظهر هذا البادئ عددا كبيرا نسبيا من الحزم المتضاعفة تراوحت بين 1-12 حزمة، بينما بلغ العدد الكلي 55 حزمة، أظهر هذا البادئ حزمة عامة لجميع الأصناف ذات وزن جزيئي 586 زوج قاعدي، ومن خلال ملاحظة الصورة 9 ظهور حزمتين ذات وزن جزيئي 426 زوج قاعدي للصنفين اعجمي وحلواني وغيابها في بقية الأصناف. كما أظهر هذا البادئ حزم عامة ذات أوزان

جزيئية 394 و 247 زوج قاعدي باستثناء الصنف أسود شدة الذي افتقد لهذه الحزم في حين افتقاد صنف أسود شدة لجميع الحزم باستثناء حزمة واحدة فقط ذات وزن جزيئي 586 زوج قاعدي كما في الجدول 14 .



صورة (9) نتائج تفاعلات RAPD-PCR للبائى OPF-04 للعينات كافة والمرحلة على هلام الاكاروز بتركيز 1%. ولمدة ساعة ونصف والمصورة تحت الاشعة فوق البنفسجية بعد تصبيغها بصبغة بروميد الاثيديوم، اذ يمثل M الدليل الحجمي، 1- فرنسي (*V.hissarica vassilcz*) 2- كمالي (*V.vinifera var sativa beck*) 3- الاعجمي (*V.Var sativa*) 4- زيتوني (*V.Sylvestris*) 5- أسود شدة (*Berlandieri planch V*) 6- ديس العنز (*V. Hissarica*) 7- حلواني (*V.vinifera*) .

جدول (14) الحزم المتباينة للبادئ OPF-04 مع أوزانها الجزيئية لبعض اصناف من العنب

Molecular Weights	V .hissarica vassilcz الفرنسي	V .vinifera var sativa beck الكمالي	V .Var sativa الاعجمي	V .Sylvestris الزيتوني	V Berlandieri planch أسود شدة	V. Hissarica ديس العنز	V .vinifera الحلواني
1455	1	1	1	0	0	0	1
1200	1	1	1	0	0	0	1
968	1	1	1	1	0	0	1
776	1	1	0	0	0	0	1
700	1	1	1	0	0	0	1
586	1	1	1	1	1	1	1
500	1	1	1	1	0	1	1
426	0	0	1	0	0	0	1
394	1	1	1	1	0	1	1
313	1	1	1	1	0	0	1
247	1	1	1	1	0	1	1
202	1	1	1	0	0	0	1

9- البادئ OPF-07

بعد مضاعفة دنا النماذج المدروسة مع هذا البادئ ضمن تفاعلات RAPD لم يبين هذا البادئ

وجود أي حزم وهذا يرجع إلى عدم وجود تسلسل متم له مع تسلسل الدنا كما هو موضح في

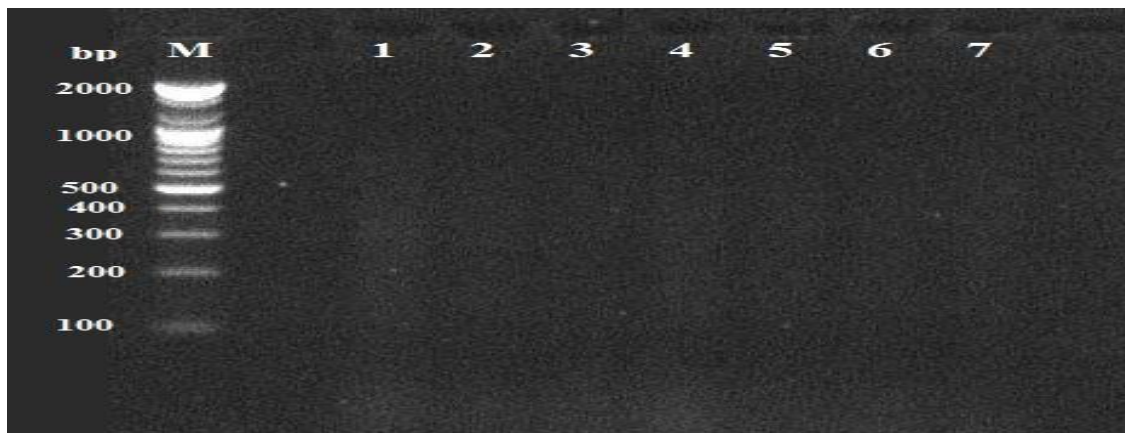
صورة 10.



صورة (10) توضح عدم ظهور اي حزمة نتائج تفاعلات للبادئ OPF-07 للعينات كافة والمرحلة على هلام الاكاروز بتركيز 1%. ولمدة ساعة ونصف والمصورة تحت الاشعة فوق البنفسجية بعد تصبغها بصبغة بروميد الاثيديوم، اذ يمثل M الدليل الحجمي، 1- فرنسي (*V.hissarica vassilcz*) 2- كمالي (*V.vinifera var* *sativa beck*) 3- الاعجمي (*V.Var sativa*) 4- زيتوني (*V.Sylvestris*) 5- أسود شدة (*V*) 6- ديس العنز (*V. Hissarica*) 7- حلواني (*V.vinifera*) .

10-البادئ OPF-08

بعد مضاعفة دنا النماذج المدروسة مع هذا البادئ ضمن تفاعلات RAPD لم يبين هذا البادئ وجود أي حزم وهذا يرجع إلى عدم وجود تسلسل متمم له مع تسلسل الدنا كما هو موضح في صورة 11.



صورة (11) توضح عدم ظهور اي حزمة نتائج تفاعلات للبادئ OPF-08 للعينات كافة والمرحلة على هلام الاكاروز بتركيز 1%. ولمدة ساعة ونصف والمصورة تحت الاشعة فوق البنفسجية بعد تصبغها بصبغة بروميد

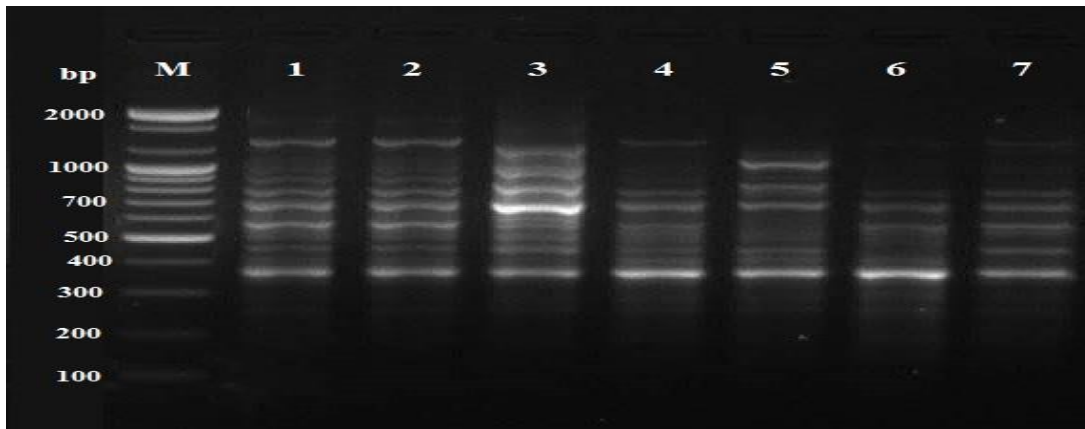
الاثيديوم، اذ يمثل M الدليل الحجمي، 1- فرنسي (*V.hissarica vassilcz*) 2- كمالي (*V.vinifera var*)

3- الاعجمي (*V.Var sativa*) 4- زيتوني (*V.Sylvestris*) 5- أسود شدة (*V*)

6- ديس العنز (*V. Hissarica*) 7- حلواني (*V.vinifera*) ..

11 -البادئ OPF-09

أظهر هذا البادئ نواتج مختلفة بأعداد الحزم وأوزانها الجزيئية على هلام الاكاروز ،إذ تراوحت عدد الحزم للنماذج المدروسة بين 4-6 حزمة، وبلغ العدد الكلي للحزم 38 حزمة جدول 14. أظهر هذا البادئ ثلاث حزم عامة لجميع الأصناف ذات أوزان جزيئية 381 و 700 و 796 زوج قاعدي ومن خلال ملاحظة صورة 12 يمكن تمييز حزمتين الاولى ذات أوزان جزيئية 1200 و 955 زوج قاعدي والتي ظهرت في الصنف اعجمي والثانية ذات وزن جزيئي 1121 زوج قاعدي ظهرت في الصنف أسود كما فقدت هاتين الحزمتين في الأصناف الأخرى.



صورة (12) نتائج تفاعلات RAPD-PCR للبادئ OPF-09 للعينات كافة والمرحلة على هلام الاكاروز بتركيز 1% . ولمدة ساعة ونصف والمصورة تحت الاشعة فوق البنفسجية بعد تصفيفها بصبغة بروميد الاثيديوم، اذ يمثل M الدليل الحجمي، 1- فرنسي (*V.hissarica vassilcz*) 2- كمالي (*V.vinifera var*) 3- الاعجمي (*V.Var sativa*) 4- زيتوني (*V.Sylvestris*) 5- أسود شدة (*V*) 6- ديس العنز (*V. Hissarica*) 7- حلواني (*V.vinifera*) .

جدول (15) الحزم المتباينة للبادئ OPF-09 مع أوزانها الجزيئية لبعض اصناف من العنب

Molecular Weights	V .hissarica vassilcz الفرنسي	V .vinifera var sativa beck الكمالي	V .Var sativa الاعجمي	V .Sylvestris الزيتوني	V Berlandieri planch أسود شدة	V. Hissarica ديس العنز	V .vinifera الحلواني
1320	1	1	0	1	0	0	1
1200	0	0	1	0	0	0	0
1121	0	0	0	0	1	0	0
955	0	0	1	0	0	0	0
796	1	1	1	1	1	1	1
700	1	1	1	1	1	1	1
553	1	1	1	0	0	1	1
482	1	1	1	0	1	0	1
381	1	1	1	1	1	1	1

12- البادئ OPF-10

تم مضاعفة دنا العينات المدروسة باستعمال البادئ OPF-10 وتبين الصورة 13 ظهور

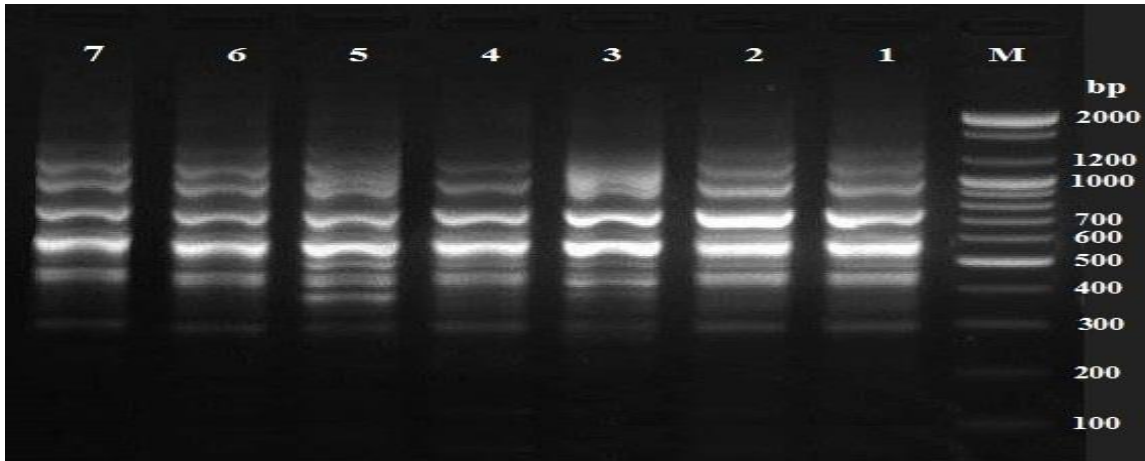
حزم التضاعف، فقد بلغ عدد الحزم ما بين 6-8 حزمة. أظهر البادئ حزمة ذات وزن جزيئي 397

زوج قاعدي للسنف أسود وغيابها في بقية الأصناف إذ تعد بصمة وراثية لهذا الصنف. كما أظهر

البادئ حزم عامة ذات أوزان جزيئية 966 و 700 و 587 و 436 و 300. كما وأظهر هذا البادئ

حزم عامة ذات وزن جزيئي 500 زوج قاعدي باستثناء ديس عنز وحلواني إذ فقدا هذه الحزم كما

هو موضح في جدول 16.



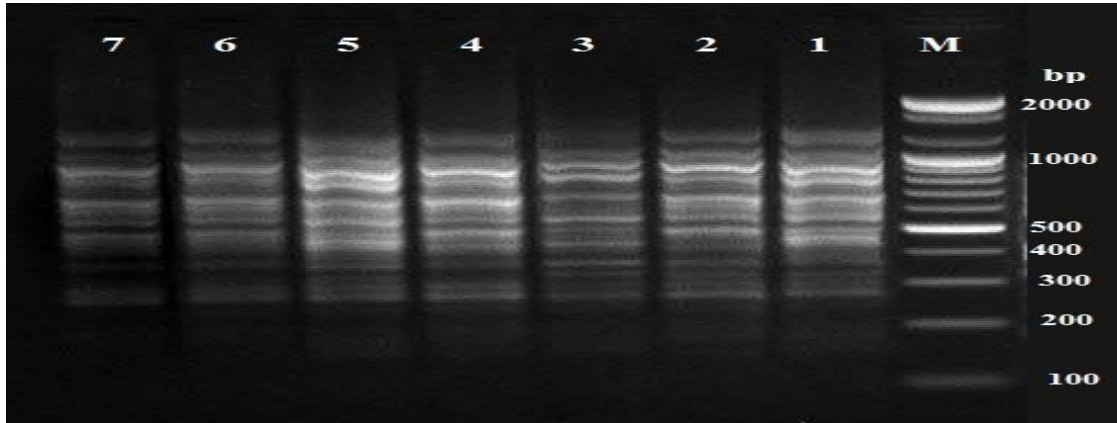
صورة (13) نتائج تفاعلات RAPD-PCR للبادئ OPF-10 للعينات كافة والمرحلة على هلام الاكاروز بتركيز 1%. ولمدة ساعة ونصف والمصورة تحت الاشعة فوق البنفسجية بعد تصفيفها بصبغة بروميد الاثيديوم، اذ يمثل M الدليل الحجمي، 1- فرنسي (*V.hissarica vassilcz*) 2- كمالي (*V.vinifera var sativa beck*) 3- الاعجمي (*V.Var sativa*) 4- زيتوني (*V.Sylvestris*) 5- أسود شدة (*V. Berlandieri planch*) 6- ديس العنز (*V. Hissarica*) 7- حلواني (*V.vinifera*) .

جدول (16) الحزم المتباينة للبادئ OPF-10 مع أوزانها الجزيئية لبعض اصناف من العنب

Molecular Weights	V <i>.hissarica vassilcz</i> الفرنسي	V <i>.vinifera var sativa beck</i> الكمالي	V <i>.Var sativa</i> الاعجمي	V <i>.Sylvestris</i> الزيتوني	<i>Berlandieri V planch</i> أسود شدة	V. <i>Hissarica</i> ديس العنز	V <i>.vinifera</i> الحلواني
1160	1	1	0	1	1	1	1
966	1	1	1	1	1	1	1
700	1	1	1	1	1	1	1
587	1	1	1	1	1	1	1
500	1	1	1	1	1	0	0
436	1	1	1	1	1	1	1
397	0	0	0	0	1	0	0
300	1	1	1	1	1	1	1

13-البادئ OPF-11

أظهر هذا البادئ عددا كبيرا نسبيا من الحزم تراوح ما بين 8-11 حزمة، إذ بلغ العدد الكلي للحزم المتضاعفة 64 حزمة كان من بينها أربع حزم عامة ذات أوزان جزيئية 1050 و 686 و 542 و 287 زوج قاعدي صورة 14، كما فقدت الحزمة ذات الوزن الجزيئي 1200 للأصناف أعجمي وأسود شدة والتي ظهرت هذه الحزمة للأصناف الأخرى جدول 17، ومن خلال ملاحظة الصورة 14 ظهور جميع الحزم ذات الوزن الجزيئي 500 باستثناء الصنف أسود شدة الذي افتقد لهذه الحزمة، وكذلك ظهور جميع الحزم في هذا البادئ ذات الوزن الجزيئي 380 باستثناء الصنف حلواني إذ افتقر لهذه الحزمة، وكذلك أظهر هذا البادئ حزم ذات وزن جزيئي 900 لجميع الأصناف باستثناء زيتوني وأسود شدة إذ افتقر لهذه الأصناف وكذلك افتقار الصنفين ديس العنز والحلواني للحزمة ذات الوزن الجزيئي 810 زوج قاعدي وظهورها في بقية الأصناف.



صورة (14) نتائج تفاعلات RAPD-PCR للبادئ OPF-11 للعينات كافة والمرحلة على هلام الاكاروز بتركيز 1%. ولمدة ساعة ونصف والمصورة تحت الاشعة فوق البنفسجية بعد تصبغها بصبغة بروميد الاثيديوم، اذ يمثل M الدليل الحجمي، 1- فرنسي (*V.hissarica vassilcz*) 2- كمالي (*V.vinifera var sativa beck*) 3- الاعجمي (*V.Var sativa*) 4- زيتوني (*V.Sylvestris*) 5- أسود شدة (*V. Berlandieri planch*) 6- ديس العنز (*V. Hissarica*) 7- حلواني (*V.vinifera*) .

جدول (17) الحزم المتباينة للبادئ OPF-11 مع أوزانها الجزيئية لبعض اصناف من العنب

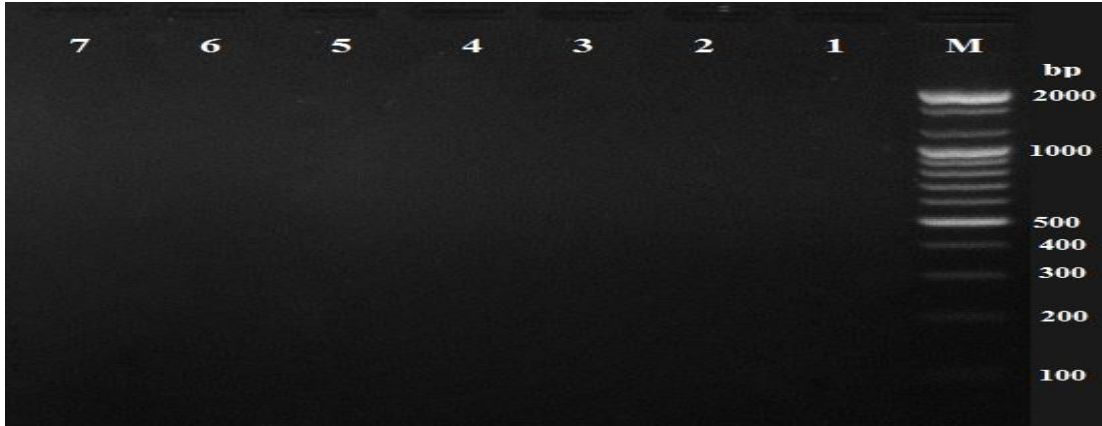
Molecular Weights	V .hissarica vassilcz الفرنسي	V .vinifera var sativa beck الكمالي	V .Var sativa الاعجيمي	V .Sylvestris الزيتوني	V Berlandieri planch أسود شدة	V. Hissarica ديس العنز	V .vinifera الحلواني
1200	1	1	0	1	0	1	1
1050	1	1	1	1	1	1	1
900	1	1	1	0	0	1	1
810	1	1	1	1	1	0	0
686	1	1	1	1	1	1	1
542	1	1	1	1	1	1	1
500	1	1	1	1	0	1	1
766	1	0	1	1	1	0	1
380	1	1	1	1	1	1	0
300	1	1	0	1	1	0	0
287	1	1	1	1	1	1	1

14-البادئ OPF-12

بعد مضاعفة دنا النماذج المدروسة مع هذا البادئ ضمن تفاعلات RAPD لم يبين هذا البادئ

وجود أي حزم وهذا يرجع إلى عدم وجود تسلسل متمم له مع تسلسل الدنا كما هو موضح في

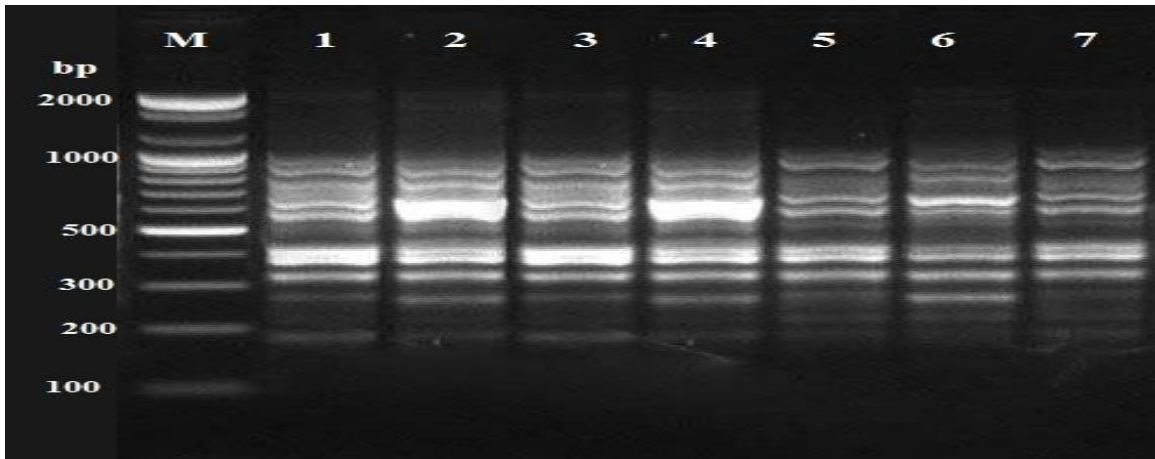
صورة 15.



صورة (15) توضح عدم ظهور أي حزمة للبائى OPF-12 للعينات كافة والمرحلة على هلام الاكاروز بتركيز 1%. ولمدة ساعة ونصف والمصورة تحت الاشعة فوق البنفسجية بعد تصبغها بصبغة بروميد الاثيديوم، اذ يمثل M الدليل الحجمي، 1- فرنسي (*V.hissarica vassilcz*) 2- كمالي (*V.vinifera var sativa beck*) 3- الاعجمي (*V.Var sativa*) 4- زيتوني (*V.Sylvestris*) 5- أسود شدة (*V. Berlandieri planch*) 6- ديس العنز (*V. Hissarica*) 7- حلواني (*V.vinifera*) .

15- البائى OPF-13

بعد مضاعفة دنا النماذج المدروسة مع هذا البائى ضمن تفاعلات RAPD أعطى نتائج جيدة في أعداد الحزم المتضاعفة، إذ تراوحت ما بين 7-10 حزمة وبلغ العدد الكلي للقطع المتضاعفة 58 قطعة ذات أوزان جزيئية تراوحت بين 190-910 زوج قاعدي، كانت من بين تلك الحزم ستة حزم عامة ذات أوزان جزيئية 910 و610 و590 و412 و390 و320 زوج قاعدي ظهرت في النماذج المدروسة جميعها كما هو موضح في صورة 16، ولوحظ غياب حزمتين رئيسية للصنفين أسود شدة وحلواني عند الوزن الجزيئي 877 و796 زوج قاعدي لذا تعد بمثابة مؤشرا لهما كما في جدول 18.



صورة (16) نتائج تفاعلات RAPD-PCR للبادئ OPF-13 للعينات كافة والمرحلة على هلام الاكاروز بتركيز 1%. ولمدة ساعة ونصف والمصورة تحت الاشعة فوق البنفسجية بعد تصفيفها بصبغة بروميد الاثيديوم، اذ يمثل M الدليل الحجمي، 1- فرنسي (*V.hissarica vassilcz*) 2- كمالى (*V.vinifera var sativa beck*) 3- الاعجمي (*V.Var sativa*) 4- زيتوني (*V.Sylvestris*) 5- أسود شدة (*V. Berlandieri planch*) 6- ديس العنز (*V. Hissarica*) 7- حلوانى (*V.vinifera*).

جدول (18) الحزم المتباينة للبادئ OPF-13 مع أوزانها الجزيئية لبعض اصناف من العنب

Molecular Weights	V .hissarica vassilcz الفرنسي	V .vinifera var sativa beck الكمالي	V .Var sativa الاعجمي	V .Sylvestris الزيتوني	V Berlandieri planch أسود شدة	V. Hissarica ديس العنز	V .vinifera الحلوانى
910	1	1	1	1	1	1	1
877	1	1	1	1	0	1	0
796	1	1	1	1	0	0	0
610	1	1	1	1	1	1	1
590	1	1	1	1	1	1	1
412	1	1	1	1	1	1	1
390	1	1	1	1	1	1	1

320	1	1	1	1	1	1	1
287	1	1	1	1	0	1	0
210	0	0	0	0	1	1	0
190	1	1	1	1	0	0	1

4-2- التعددية الشكلية Polymorphism وكفاءة البوادي وقدرتها التمييزية

تضمنت الدراسة استعمال 15 بادئ أثبتت 10 بوادي منها فعاليتها في اعطاء تعددية شكلية بين المواقع المدروسة، اذ نتج عن استعمال هذه البوادي عدد من الحزم بمجموع 88 حزمة منها 66 حزمة اعطت تعددية شكلية كما في الجدول 19، وتباينت البادئات في عدد الحزم وكان أقل عدد حزم 6 حزمة في البادئ 1227 و OPF-01، اما أعلى عدد حزم فظهرت في تفاعل البادئ OPF-04 12 حزمة، كما اختلفت البادئات في اعطاء عدد الحزم المتباينة او ذات التعددية الشكلية، اذ كان أقل عدد حزم متباينة 3 حزمة في البادئ OPF-10 في حين كان أعلى عدد من الحزم المتباينة 11 حزمة في البادئ OPF-04. سجلت خصائص المؤشرات بحساب النسبة المئوية للتعددية الشكلية والكفاءة والقدرة التمييزية لكل بادئ، وأعطت البوادي 1225 و OPF-01 و OPF-03 أعلى نسبة مئوية من التباين او التعددية الشكلية وبلغت 100 % وينتج هذا بسبب ان عدد الحزم المتباينة مساو لعدد حزمها الكلي، اما أقل نسبة مئوية للتعددية الشكلية فكانت 37.5 % في البادئ OPF-10 لان عدد الحزم المتباينة تقريبا نصف عدد الحزم والتي كانت 3 و 8 حزم على التوالي، اذ سجلت أعلى كفاءة في البادئ OPF-04 وكانت 13.63 %، وكذلك أعطى نفس البادئ أعلى قدرة تمييزية وكانت 16.7 % .

جدول (19) نواتج البادئات من الحزم الكلية والمتباينة مع نسب كفاءتها وقدرتها التمييزية لأصناف العنب المدروسة.

رمز البادئ	عدد الحزم الكلية	عدد الحزم ذات التعددية الشكلية	% للتعددية الشكلية للبادئ	% لكفاءة البادئ	% للمقدرة التمييزية للبادئ
1224	7	5	71.4	7.95	7.57
1225	10	10	100	11.36	15.15
1226	0	0	0	0	0
1227	6	5	83.3	6.81	7.57
OPF -01	6	6	100	6.81	9.1
OPF-02	0	0	0	0	0
OPF-03	8	8	100	9.1	12.12
OPF-04	12	11	91.6	13.63	16.7
OPF-07	0	0	0	0	0
OPF-08	0	0	0	0	0
OPF-09	9	6	66.6	10.2	9.1
OPF-10	8	3	37.5	9.1	4.54
OPF-11	11	7	63.6	12.5	10.6
OPF-12	0	0	0	0	0
OPF-13	11	5	45.4	12.5	7.6
المجموع	88	66			

3-4 مناقشة نتائج تفاعلات RAPD

تعتمد تقانة التضاعف العشوائي لقطع الدنا RAPD على استعمال تسلسل قواعد نيتروجينية من بادئ الدنا المفرد DNA primer، فعندما يجد البادئ مناطق مكملية له في شريط الدنا يتضاعف الناتج، وعند تحليل الناتج باستعمال تقانة الهجرة الكهربائية قد تظهر حزم متشابهة، او تظهر حزم مختلفة تدعى تعددية شكلية Polymorphisms (Wang وآخرون، 1994)، ان هذه الاشكال المظهرية تكون ذات توريث (Milbourne وآخرون، 1997)، وتكمن اهمية تقانة RAPD في ايجاد التغيرات الوراثية بين الأصناف وكذلك انها تميز بين اصناف النوع الواحد، ان البادئات التي تنتج حزما متباينة عديدة وفقا لكل الاسس المعتمدة في اظهار التنوع الوراثي تحظى بفرص اكبر في ايجاد حزم فريدة للعينات مع ان الفرص تبقى قائمة بالنسبة للبادئات التي تنتج أعداد قليلة من الحزم المتباينة (Williams وآخرون، 1993)، طريقة تحليل نتائج تفاعلات RAPD اعتمدت على وجود او غياب الحزم الناتجة من تضاعف قطع معينة من جينوم الأصناف المدروسة وعلى الأوزان الجزيئية لتلك الحزم التي تعتمد على العدد والمواقع المكملية لتسلسلات البادئات على شريط الدنا القالب كما اهملت الحزم الخفيفة جدا (Betancor وآخرون، 2004) وهذا يتفق مع (Barone وآخرون، 1999)، ان الحزم المتضاعفة التي تظهر على هلام الاكاروز والتي تختلف بأوزانها الجزيئية تعتمد على نوع البادئ المستعمل، اذ انها تؤثر على حجم الحزم المتضاعفة (Dalmasso وآخرون، 2004)، تباينت نتائج تفاعلات RAPD تبعا للبادئ المستعمل، كان عدد الحزم الناتجة الكلي 88 حزمة مضاعفة عبر النماذج السبعة المختلفة من دنا الأصناف والتي تراوحت أوزانها الجزيئية ما بين 100-1455 زوج قاعدي، اما الحزم المتباينة والتي تعد اساسية في تقدير البعد الوراثي بين اصناف العنب فقد بلغ عددها 66 حزمة كما هو في جدول 19، اذ أعطى البادئ OPF-04 أعلى عدد من الحزم المتباينة والتي بلغت 11 حزمة،

بينما أعطى البادئ OPF-10 أقل عدد من الحزم المتباينة والتي بلغت 3 حزم تضاعف. ان اختلاف عدد الحزم الناتجة باختلاف الأصناف يبدو منطقيا بسبب التغير في تسلسل الدنا بين الأصناف، إذ ان التفاوت في أعداد الحزم الناتجة يعود إلى اختلاف ترتيب القواعد النتروجينية لذلك البادئ والأنماط الوراثية للأصناف المدروسة، أظهرت العديد من البادئات المستعملة في الدراسة حزما فريدة للنماذج المدروسة جميعها والتي تعد بمثابة بصمة وراثية لتمييز الصنف عن الأصناف الأخرى، أذ أعطى الصنف اعجيمي أعلى عدد من الحزم الفريدة وذلك عند استعمال البوادئ 1225 و OPF-09، بينما أعطى الصنف أسود شدة أقل عدد من الحزم الفريدة والتي بلغت حزمة واحدة ذات وزن جزيئي 1121 زوج قاعدي عند استعمال البادئ OPF-09 والتي عدت بمثابة مؤشر وراثي يميز الصنف أسود شدة عن الأصناف المدروسة الباقية. وبالرغم من ان البادئين OPF-09 يمكن به ايجاد بصمة وراثية لصنفين وهي أسود شدة وكانت ذات وزن جزيئي 1121 والثانية للصنف اعجيمي وكانت ذات وزن جزيئي 1200 إلا ان القدرة التمييزية له لم تكن الأعلى وبالتالي لا توجد علاقة طردية بين البادئ الذي يستطيع ايجاد بصمة وراثية مميزة في اكبر عدد من الأصناف، وإنما القدرة التمييزية ارتبطت بأعلى عدد حزم ذات تعددية شكلية، اذ كانت أعلى قدرة تمييزية للبادئ 1225 الذي أعطى بصمة وراثية للصنف اعجيمي كانت ذات وزن جزيئي 412، اذ كانت قدرته التمييزية هي 15.15، لذلك توجد علاقة طردية بين البادئ الذي يستطيع ايجاد البصمة الوراثية و الصنف المدروس. من ناحية اخرى بالرغم من ان النسبة المئوية للتعددية الشكلية للبادئ 1225 و OPF-01 و OPF-03 كانت الأعلى هي 100% إلا انها لم تحظ بأعلى نسبة مئوية من الكفاءة و القدرة التمييزية باستثناء البادئ 1225، وهذا يؤكد على ارتباط القدرة التمييزية للبادئ بعدد الحزم المتباينة وهذا يعني ان زيادة عدد الحزم المتباينة فيه يزيد صفة التميز مما يؤدي إلى زيادة عدد الأصناف المتوقع تشخيصها من قبل ذلك البادئ.

4-4 تقدير البعد الوراثي بين الأصناف المدروسة.

يمثل البعد الوراثي المقياس لدرجة التشابه أو التماثل الوراثي Genetic similarity بين أي فردين أو بين أي مجموعتين من الأفراد أو حتى بين الأنواع العائدة للجنس نفسه. تم في هذه الدراسة استخدام البرنامج الحاسوبي SPSS لغرض إيجاد التشابه الوراثي وذلك بالاعتماد على نتائج RAPD، أي بالاعتماد على النسبة المئوية للبواقي التي تعطي حزما متشابهة للبادئات المستخدمة جميعها، وتمثلت النتيجة بالجدول 20 ومن خلال ملاحظة هذه القيم نستنتج ان قيم نسبة التشابه قد تراوحت ما بين 0.252- 0.892 وكانت اكبر نسبة تشابه بين الصنفين الفرنسي و كمالي (حامد الوادي)، لذلك قد يكون هذين الصنفين هما الأقرب وراثيا من ضمن الأصناف المدروسة، في حين كانت أقل نسبة تشابه بين الصنفين اعجمي وأسود شدة وهذا يعني انهما ابعد الأصناف المدروسة وراثيا (Aradhya وآخرون، 2003). ان العامل المحدد للقرب أو البعد الوراثي بين الأصناف هو عدد الحزم المشتركة فكلما كثر عدد الحزم قل البعد الوراثي، ذكر ياسين (2011) ان الحزم المشتركة تدل على تشابه في المادة الوراثية في تلك المنطقة من المجين للأصناف المدروسة والذي قد يمثل تشابها في الصفات المظهرية وخصوصا الثمار أو قد يكون التشابه في منطقة من المناطق غير المشفرة Non coding DNA والتي ليس لها تعبير جيني. ان ترتيب اصناف العنب المدروسة ضمن طريقة التحليل العنقودي Cluster analysis وبالاعتماد على قيم التشابه الوراثية يتم فيها الحصول على شكل شبيه بالشجرة تدعى شجرة القرابة الوراثية أو مخطط التحليل التجمعي Dendogram ويعتمد على المدى الوراثي الذي ترتبط فيه المجاميع الرئيسية، وبالتالي فان وجود قسم من الأصناف في مجموعة معينة يدل على مدى الكم الوراثي المتشابه لأصناف تلك المجموعة (Askari وآخرون ، 2003 ؛ Elmeer وآخرون ، 2011 ؛ Eissa وآخرون، 2009 ؛ El Kichaoui وآخرون ، 2013 ؛ Khierallah وآخرون ، 2011).

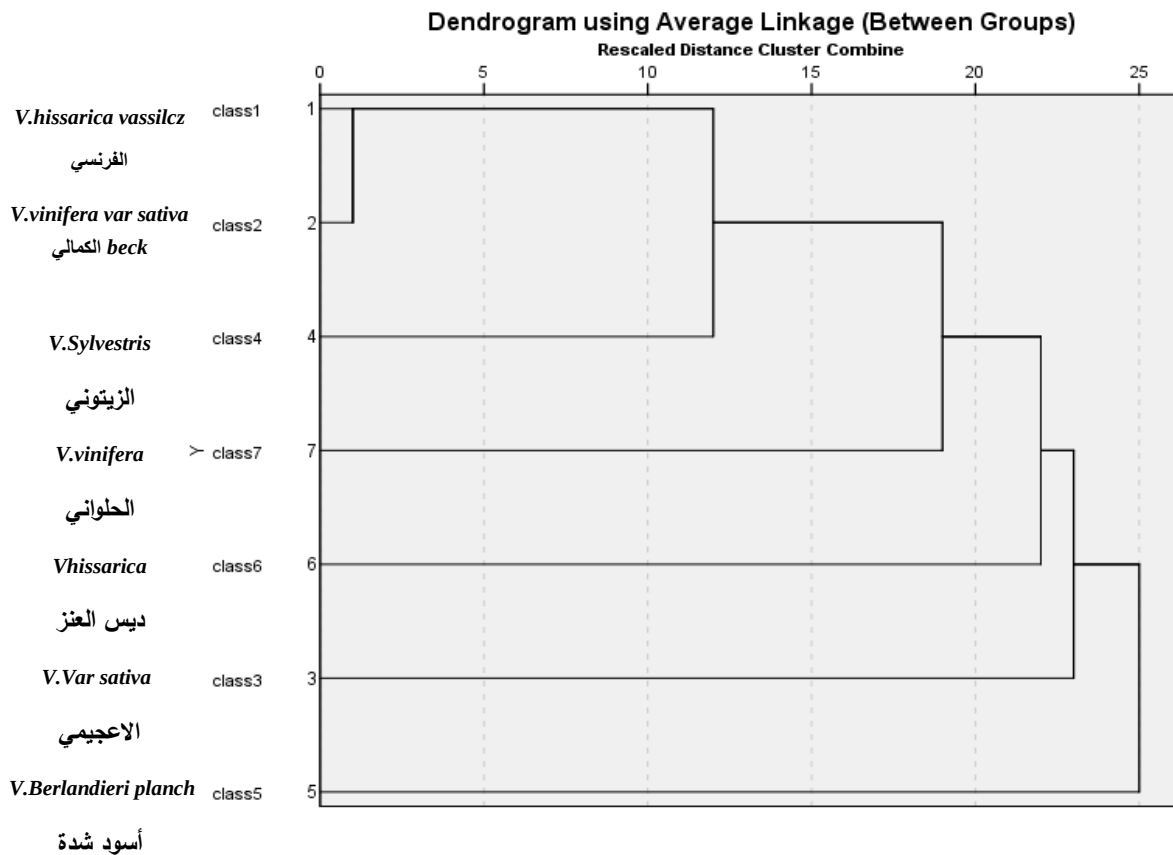
يلاحظ من الشكل 4 ان الأصناف ضمت مجموعة واحدة تفرعت إلى خمسة فروع ،و شمل الفرع الاول الصنفين فرنسي وكمالي (حامد الوادي)، اذ كان الصنف الفرنسي أقرب وراثيا إلى الصنف كمالي ويعود سبب التقارب بينهما إلى التشابه في العديد من الصفات الشكلية والنمو في منطقة بيئية وجغرافية واحدة وهذا يتفق مع ما ذكره (Mir Ali و Nabulsi ،2003)، اذ بلغت درجة التقارب الوراثي بين الصنفين 0.892، وكذلك شمل الفرع الاول الصنف زيتوني الذي كان أقرب وراثيا إلى الصنف فرنسي، اذ بلغت درجة التقارب له 0.659، وكذلك كان أقرب وراثيا إلى الصنف كمالي عن بقية الأصناف، اذ بلغت درجة التقارب الوراثي بينه وبين الصنف كمالي 0.618، وبذلك يكون الصنف زيتوني أقرب وراثيا إلى الصنفين كمالي وفرنسي عن بقية الأصناف، اما الفرع الثاني فشمّل الصنف حلواني، اذ كان أقرب وراثيا إلى الأصناف السابقة، وكانت أعلى درجة تقارب بينه وبين الصنف فرنسي، اذ بلغت درجة التقارب الوراثي بينهما 0.486. بين Quarta وآخرون (2001) عند وجود درجة تقارب عاليه بين صنفين على الرغم من وجود اختلافات شكلية بينهما فيعود ذلك بسبب تأثره بالظروف البيئية المختلفة، اذ انهما كانا قبل التعرض لمثل هذه الظروف نفس الطراز الوراثي Genotype لكن نتيجة لتعرضهما للظروف البيئية التي ادت إلى تغيير في الشكل الظاهري. الفرع الثالث شمل الصنف ديس العنز الذي كان أقرب وراثيا إلى الأصناف السابقة ولكن بلغت أعلى درجة تقارب بينه وبين الصنف حلواني، اذ بلغت درجة تقاربهما 0.447، الفرع الرابع شمل الصنف اعجيمي الذي كان أقرب وراثيا إلى الصنف فرنسي، اذ بلغت درجة التشابه بينهما 0.458، اما الفرع الاخير فشمّل صنف أسود شدة الذي كان أقرب إلى الصنف حلواني، اذ بلغت درجة تقاربهما 0.347. نلاحظ خلال شجرة التقارب ان الصنفين فرنسي وكمالي كانا أقرب وراثيا من بقية الأصناف، اذ بلغت درجة تقاربهما 0.892، اما الأصناف التي كانت ابعد وراثيا عن بعضها فهما الصنفين أسود شدة واعجيمي ويعود

سبب ذلك إلى الاختلاف البيئي والجغرافي والاختلافات الشكلية إذ ان الصنفين يعودان إلى طرز وراثية مختلفة Quarta وآخرون، 2001).

جدول (20) نسبة التشابه بين اصناف العنب المدروسة

	Sokal and Sneath Measure 2						
	V .vinifera الحلواني	V. Hissarica ديس الغنز	V Berlandieri planch أسود شدة	V .Sylvestris الزيتوني	V .Var sativa الاعجيمي	V .vinifera var sativa beck الكمالي	V .hissarica vassilcz الفرنسي
.486	.362	.333	.659	.458	.892	1.000	V .hissarica vassilcz الفرنسي
.453	.351	.339	.618	.405	1.000	.892	V .vinifera var sativa beck الكمالي
.357	.373	.252	.328	1.000	.405	.458	V .Var sativa الاعجيمي
.429	.429	.333	1.000	.328	.618	.659	V .Sylvestris الزيتوني
.347	.300	1.000	.333	.252	.339	.333	V Berlandieri planch أسود شدة
.447	1.000	.300	.429	.373	.351	.362	V. Hissarica
1.000	.447	.347	.429	.357	.453	.486	V .vinifera الحلواني

This is a similarity matrix



مخطط (4) التحليل التجمعي Dendrogram للعلاقة الوراثية Genetic Relationship فيما بين اصناف

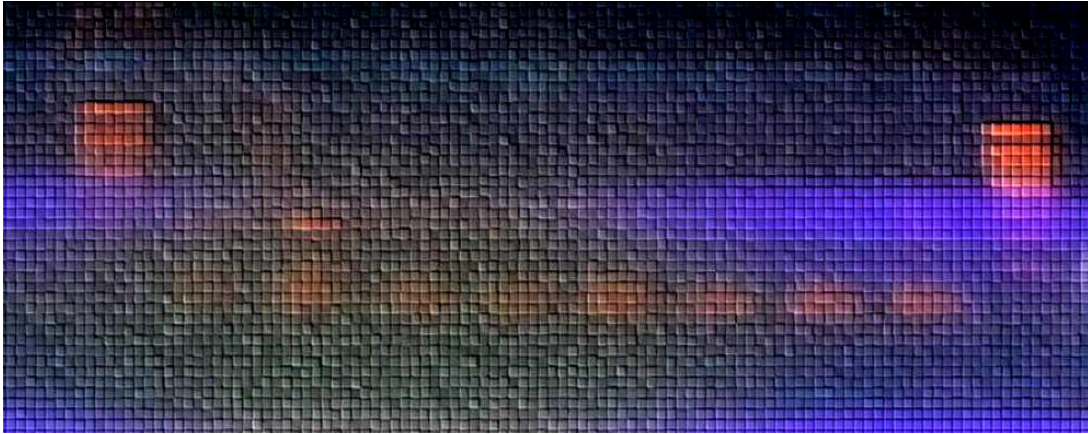
العنب المدروسة

5-4 نتائج تفاعلات ال SSR

تم استعمال مؤشرات ال SSR لعينات الدنا المعزولة من سبعة اصناف من العنب وبوجود 10 بوادئ متخصصة والمنتجة من شركة Gene aid، ومن ثم وضفت النتائج لايجاد البصمة الوراثية وتحديد التنوع الوراثي وايجاد درجة التقارب الوراثي بين الأصناف المدروسة. تم في هذه الدراسة التركيز على وجود وغياب الحزم الفريدة لكل صنف؛ لأنها تعد من اسس ايجاد البصمة الوراثية، وتم في هذه الدراسة تحليل ناتج البادئ الذي أعطى حزمة مميزة عن بقية البوادئ الأخرى ويمكن تحليل نتائجه كالآتي:

1- البادئ VRZAG62

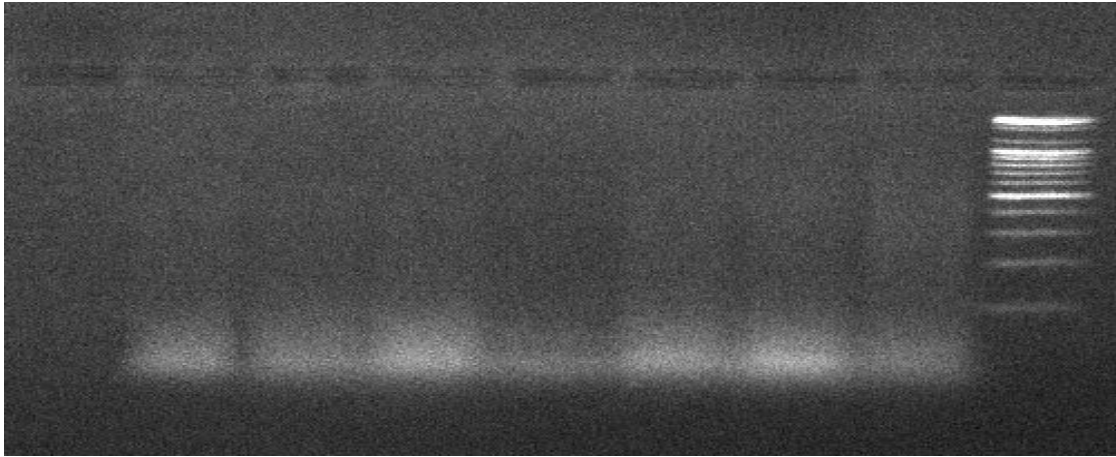
أظهر هذا البادئ نتائج مختلفة ومميزة عن بقية البوادئ الأخرى جميعها، إذ أعطى هذا البادئ حزمة مميزة وفريدة ذات وزن جزيئي 200 زوج قاعدي، ومن خلال ملاحظة الصورة 17 يمكن تمييز هذه الحزمة التي أظهرها هذا البادئ للصنف كمالي (حامد الوادي) والتي تعد بصمة وراثية لهذا الصنف تميزه عن بقية الأصناف الأخرى في حين افتقرت بقية الأصناف إلى وجود الحزم مما يبين ان الصنف كمالي يختلف عن بقية الأصناف الأخرى في درجة التقارب الوراثي. ان تحديد درجة التقارب الوراثي يفيد في تأمين قاعدة وراثية كبيرة للاستفادة منها في برامج التربية والتجهين (طربين وآخرون، 2013).



صورة (17) نتائج تفاعلات SSR-PCR للبادئ VRZAG62 للعينات كافة والمرحلة على هلام الاكاروز بتركيز 1%. ولمدة ساعة ونصف والمصورة تحت الاشعة فوق البنفسجية بعد تصبغها بصبغة بروميد الاثيديوم، إذ يمثل M الدليل الحجمي، 1- فرنسي (*V.hissarica vassilcz*) 2- كمالي (*V.vinifera var*) 3- الاعجمي (*V.Var sativa*) 4- زيتوني (*V.Sylvestris*) 5- أسود شدة (V) 6- ديس الغنز (*Berlandieri planch*) 7- حلواني (*V.vinifera*).

2- البادئ VRZAG 79

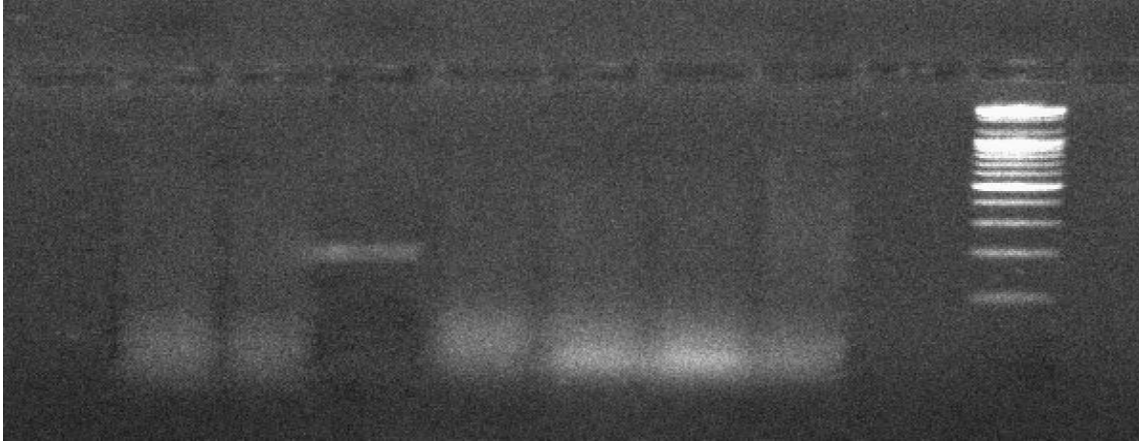
بعد مضاعفة دنا النماذج المدروسة مع هذا البادئ ضمن تفاعلات SSR لم يبين هذا البادئ وجود اي حزم وهذا يرجع إلى عدم وجود تسلسل متم له مع تسلسل الدنا كما هو موضح في صورة 18.



صورة (18) توضح عدم ظهور اي حزمة للبادئ VRZAG -79 للعينات كافة والمرحلة على هلام الاكاروز بتركيز 1%. ولمدة ساعة ونصف والمصورة تحت الاشعة فوق البنفسجية بعد تصبغها بصبغة بروميد الاثيديوم، اذ يمثل M الدليل الحجمي، 1- فرنسي (*V.hissarica vassilcz*) 2- كمالي (*V.vinifera var*) 3- الاعجمي (*V.Var sativa*) 4- زيتوني (*V.Sylvestris*) 5- أسود شدة (*V. sativa beck*) 6- ديس الغنز (*V. Hissarica*) 7- حلواني (*V.vinifera*) .

3- البادئ VVS4

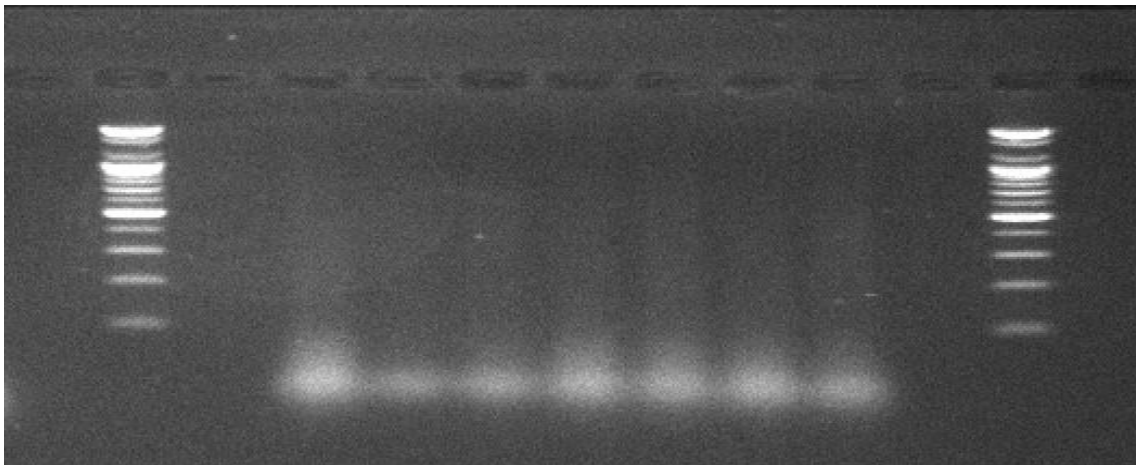
بعد مضاعفة دنا النماذج المدروسة مع هذا البادئ بين وجود اختلاف الصنف أسود شدة عن بقية الأصناف الأخرى في درجة التقارب الوراثي، اذ بين هذا البادئ حزمة فريدة ذات وزن جزيئي 200 زوج قاعدي عدت بمثابة بصمة وراثية تميز الصنف أسود شدة عن بقية الأصناف المدروسة، اما بقية الأصناف الأخرى فقد غابت فيها الحزم ويعود ذلك إلى عدم وجود تسلسل متم لهذا البادئ مع دنا الأصناف المدروسة.



صورة (19) نتائج تفاعلات SSR-PCR للبادئ VVS4 للعينات كافة والمرحلة على هلام الاكاروز بتركيز 1%. ولمدة ساعة ونصف والمصورة تحت الاشعة فوق البنفسجية بعد تصبيغها بصبغة بروميد الاثيديوم، اذ يمثل M الدليل الحجمي، 1- فرنسي (*V. hissarica vassilcz*) 2- كمالي (*V. vinifera var sativa beck*) 3- الاعجمي (*V. Var sativa*) 4- زيتوني (*V. Sylvestris*) 5- أسود شدة (*V. Berlandieri planch*) 6- ديس الغنز (*V. Hissarica*) 7- حلواني (*V. vinifera*) .

4- البادئ VVMD5

بعد مضاعفة دنا النماذج المدروسة مع هذا البادئ ضمن تفاعلات SSR لم يبين هذا البادئ وجود اي حزم وهذا يرجع إلى عدم وجود تسلسل متمم له مع تسلسل الدنا كما هو موضح في صورة 20.

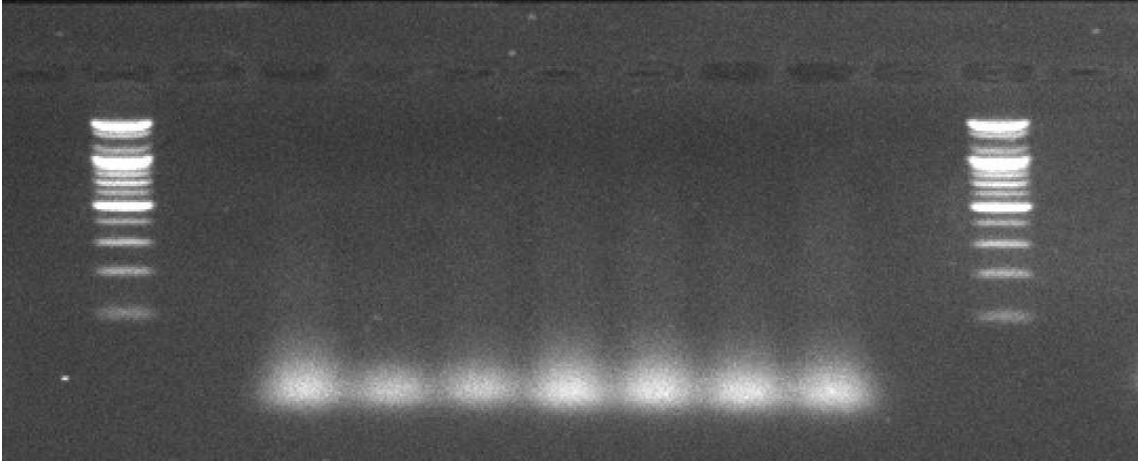


صورة (20) توضح عدم ظهور اي حزمة للبادئ VVMD5 للعينات كافة والمرحلة على هلام الاكاروز بتركيز 1%. ولمدة ساعة ونصف والمصورة تحت الاشعة فوق البنفسجية بعد تصبيغها بصبغة بروميد الاثيديوم، اذ

يمثل M الدليل الحجمي، 1- فرنسي (*V.hissarica vassilcz*) 2- كمالي (*V.vinifera var sativa beck*)
 3- الاعجمي (*V.Var sativa*) 4- زيتوني (*V.Sylvestris*) 5- أسود شدة (*Berlandieri planch V*)
 6- ديس العنز (*V. Hissarica*) 7- حلواني (*V.vinifera*) .

5- البادئ VVMD6

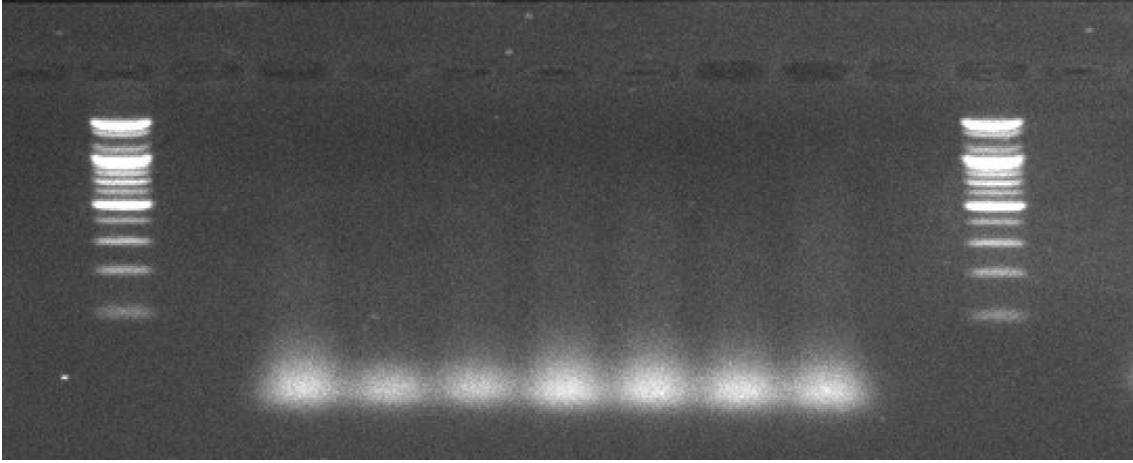
بعد مضاعفة دنا النماذج المدروسة مع هذا البادئ ضمن تفاعلات SSR لم يبين هذا البادئ وجود اي حزم وهذا يرجع إلى عدم وجود تسلسل متم له مع تسلسل الدنا كما هو موضح في صورة 21.



صورة (21) توضح عدم ظهور اي حزمة للبادئ VVMD6 للعينات كافة والمرحلة على هلام الاكاروز بتركيز 1%. ولمدة ساعة ونصف والمصورة تحت الاشعة فوق البنفسجية بعد تصبغها بصبغة بروميد الاثيديوم، اذ
 يمثل M الدليل الحجمي، 1- فرنسي (*V.hissarica vassilcz*) 2- كمالي (*V.vinifera var sativa beck*)
 3- الاعجمي (*V.Var sativa*) 4- زيتوني (*V.Sylvestris*) 5- أسود شدة (*Berlandieri planch V*)
 6- ديس العنز (*V. Hissarica*) 7- حلواني (*V.vinifera*) .

6- البادئ VVMD7

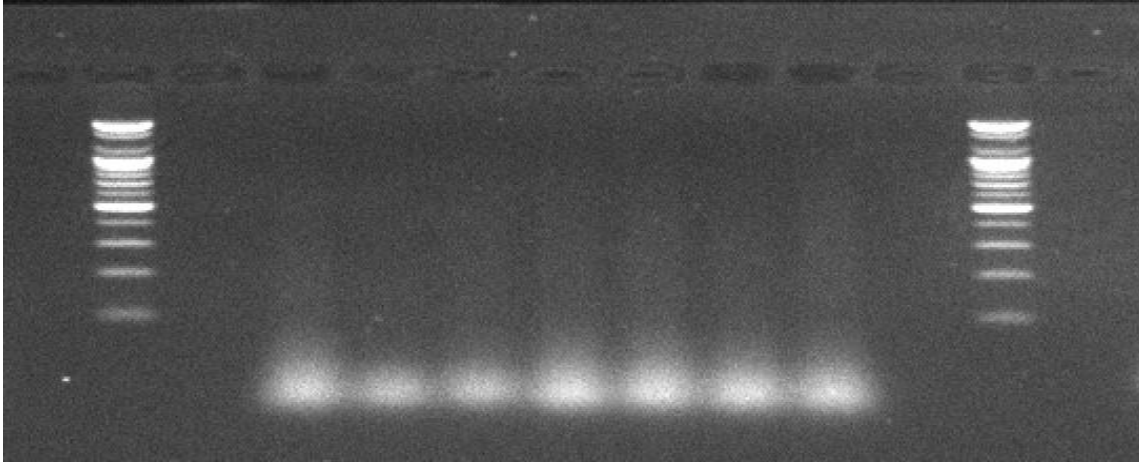
بعد مضاعفة دنا النماذج المدروسة مع هذا البادئ ضمن تفاعلات SSR لم يبين هذا البادئ وجود اي حزم وهذا يرجع إلى عدم وجود تسلسل متمم له مع تسلسل الدنا كما هو موضح في صورة 22.



صورة (22) توضح عدم ظهور اي حزمة للبادئ VVMD7 للعينات كافة والمرحلة على هلام الاكاروز بتركيز 1%. ولمدة ساعة ونصف والمصورة تحت الاشعة فوق البنفسجية بعد تصبغها بصبغة بروميد الاثيديوم، اذ يمثل M الدليل الحجمي، 1- فرنسي (*V.hissarica vassilcz*) 2- كمالي (*V.vinifera var sativa beck*) 3- الاعجمي (*V.Var sativa*) 4- زيتوني (*V.Sylvestris*) 5- أسود شدة (*Berlandieri planch V*) 6- ديس الغنز (*V. Hissarica*) 7- حلواني (*V.vinifera*) .

7- البادئ VVMD27

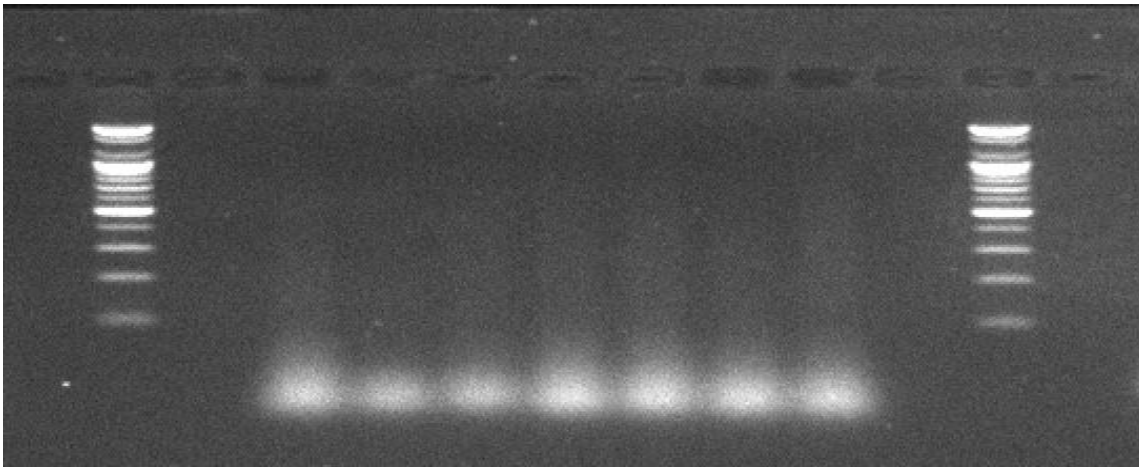
بعد مضاعفة دنا النماذج المدروسة مع هذا البادئ ضمن تفاعلات SSR لم يبين هذا البادئ وجود اي حزم وهذا يرجع إلى عدم وجود تسلسل متمم له مع تسلسل الدنا كما هو موضح في صورة 23.



صورة (23) توضح عدم ظهور اي حزمة للبادئ VVMD27 للعينات كافة والمرحلة على هلام الاكاروز بتركيز 1%. ولمدة ساعة ونصف والمصورة تحت الاشعة فوق البنفسجية بعد تصبيغها بصبغة بروميد الاثيديوم، اذ يمثل M الدليل الحجمي، 1- فرنسي (*V.hissarica vassilcz*) 2- كمالي (*V.vinifera var sativa beck*) 3- الاعجمي (*V.Var sativa*) 4- زيتوني (*V.Sylvestris*) 5- أسود شدة (*Berlandieri planch V*) 6- ديس الغنز (*V. Hissarica*) 7- حلواني (*V.vinifera*) .

8- البادئ VVMD28

بعد مضاعفة دنا النماذج المدروسة مع هذا البادئ ضمن تفاعلات SSR لم يبين هذا البادئ وجود اي حزم وهذا يرجع إلى عدم وجود تسلسل متمم له مع تسلسل الدنا كما هو موضح في صورة 24.



صورة (24) توضح عدم ظهور اي حزمة للبادئ VVMD28 للعينات كافة والمرحلة على هلام الاكاروز بتركيز 1%. ولمدة ساعة ونصف والمصورة تحت الاشعة فوق البنفسجية بعد تصبيغها بصبغة بروميد الاثيديوم، اذ

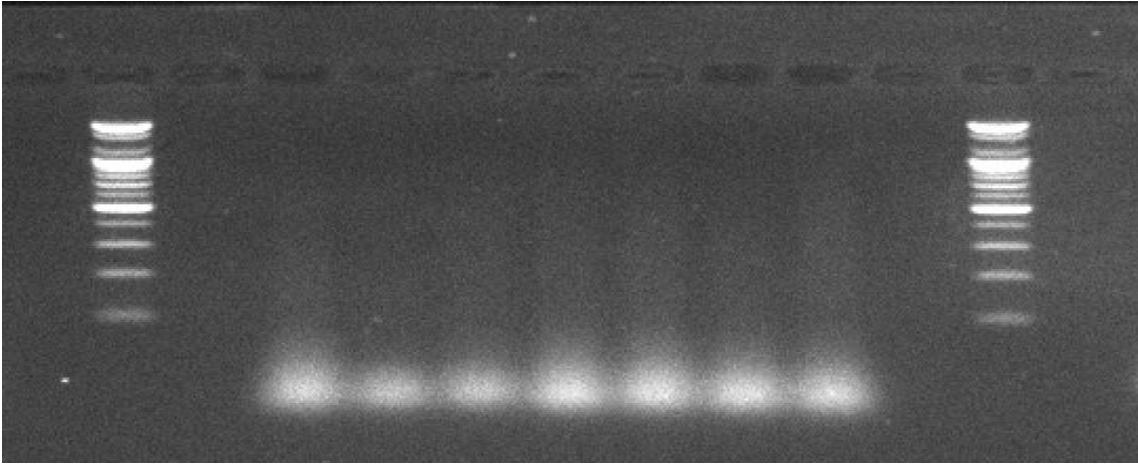
يمثل M الدليل الحجمي، 1- فرنسي (*V.hissarica vassilcz*) 2- كمالي (*V.vinifera var sativa beck*)

3- الاعجمي (*V.Var sativa*) 4- زيتوني (*V.Sylvestris*) 5- أسود شدة (*Berlandieri planch V*)

6- ديس العنز (*V. Hissarica*) 7- حلواني (*V.vinifera*) .

9- البادئ VVMD31

بعد مضاعفة دنا النماذج المدروسة مع هذا البادئ ضمن تفاعلات SSR لم يبين هذا البادئ وجود اي حزم وهذا يرجع إلى عدم وجود تسلسل متم له مع تسلسل الدنا كما هو موضح في صورة 25.



صورة (25) توضح عدم ظهور اي حزمة للبادئ VVMD31 للعينات كافة والمرحلة على هلام الاكاروز بتركيز

1%. ولمدة ساعة ونصف والمصورة تحت الاشعة فوق البنفسجية بعد تصبغها بصبغة بروميد الاثيديوم، اذ

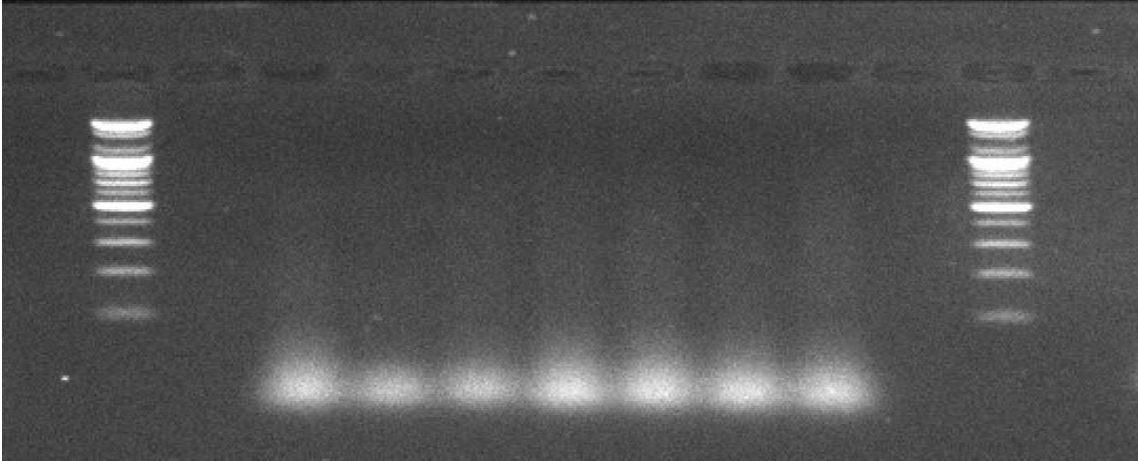
يمثل M الدليل الحجمي، 1- فرنسي (*V.hissarica vassilcz*) 2- كمالي (*V.vinifera var sativa beck*)

3- الاعجمي (*V.Var sativa*) 4- زيتوني (*V.Sylvestris*) 5- أسود شدة (*Berlandieri planch V*)

6- ديس العنز (*V. Hissarica*) 7- حلواني (*V.vinifera*) .

10- البادئ VVMD32

بعد مضاعفة دنا النماذج المدروسة مع هذا البادئ ضمن تفاعلات SSR لم يبين هذا البادئ وجود اي حزم وهذا يرجع إلى عدم وجود تسلسل متم له مع تسلسل الدنا كما هو موضح في صورة 26.



صورة (26) توضح عدم ظهور اي حزمة للبادئ VVMD32 للعينات كافة والمرحلة على هلام الاكاروز بتركيز 1%. ولمدة ساعة ونصف والمصورة تحت الاشعة فوق البنفسجية بعد تصبغها بصبغة بروميد الاثديوم، اذ يمثل M الدليل الحجمي، 1- فرنسي (V.hissarica vassilcz) 2- كمالي (V.vinifera var sativa beck) 3- الاعجمي (V.Var sativa) 4- زيتوني (V.Sylvestris) 5- أسود شدة (V. Berlandieri planch) 6- ديس العنز (V. Hissarica) 7- حلواني (V.vinifera).

5- الاستنتاجات والتوصيات

5-1_ الاستنتاجات

1- إمكانية استعمال مؤشرات التضاعف العشوائي المتعدد الأشكال RAPD ومؤشرات التضاعف المتخصص SSR لسلسلة DNA في الكشف عن التنوع الوراثي بين اصناف العنب، وتميزت هذه المؤشرات بسرعتها وسهولة تطبيقها.

2- قدرت مؤشرات RAPD في اعطاء بصمة وراثية لبعض الاصناف المدروسة وهذه الاصناف هي الصنف اعجمي والصنف اسود شدة، فضلاً عن مؤشرات SSR التي أعطت بصمة وراثية لكل من الصنف الكمالي (حامد الوادي) والصنف الاسود شدة ذلك خلال البادئ الذي اعطى حزمة مميزة .

3- كانت اعداد البادئات المستخدمة كافية لتقدير البعد الوراثي والعلاقة الوراثية التي تربط الاصناف المدروسة.

4- خلال دراسة تقدير البعد الوراثي بين الاصناف السبعة لوحظ إن الصنف الكمالي كان اقرب وراثياً إلى الصنف الفرنسي ، اما الصنف أسود شدة كان أبعد وراثياً عن صنف أعجمي.

5-2_ التوصيات

- 1-زيادة عدد البادئات المستخدمة ضمن مؤشرات RAPD وتوسيع منهج البحث ليشمل اصناف اخرى من العنب.
- 2- التركيز على البادئات التي أعطت حزما فريدة للأصناف المدروسة وتطبيقها على اصناف اخرى من العنب للتحقق من مدى خصوصية تلك الحزم.
- 3- استخدام بوادئ متخصصة أخرى تابعة لتقنية SSR غير التي استخدمت في البحث لايجاد الحزم المطلوبة وايجاد البصمة الوراثية للأصناف الاخرى .
- 4- اتساع نطاق البحث ليشمل جميع مناطق العراق لايجاد البعد الوراثي بين جميع اصناف العنب في العراق.

المصادر

القرآن الكريم

المصادر العربية

- اليوسف، وائل عبد الحميد . (2012).التوصيف الجزيئي لبعض اصول الكرمة المنتشرة في سوريا باستخدام المؤشرات الجزيئية SSR. المجلة الاردنية في العلوم الزراعية .المجلد8، العدد3.
- التركي، رنا عبد العزيز عبد الله .(2010). تفاعل البلمرة التسلسلي Polymerase Chain Reaction (PCR). وحدة الأبحاث الوراثية، المختبر المركزي، جامعة الملك سعود، الرياض، المملكة العربية السعودية . ص : 1-21 .
- الخطيب، تمارا عدنان .(2000) .استخدام مؤشرات التضاعف الع شوائي المتعدد الاشكال لسلسلة الدنا (RAPD) في التمييز لجنس واصناف نخيل التمر *Phoenix dactylifera* L. في العراق .رسالة ماجستير . كلية العلوم . جامعة بغداد -العراق
- السرواني،ايمن علي.(2008).الادارة المتكاملة لحقائق العنب .الدار العربية للنشر والتوزيع. القاهرة.جمهورية مصر العربية.
- السعيد، ابراهيم حسن محمد .(1982). زراعة وانتاج الكروم . جامعة الموصل . مؤسسة دار الكتب للطباعة والنشر - وزارة التعليم العالي والبحث العلمي . العراق ع608.
- السعيد، ابراهيم حسن محمد.(2000) . انتاج الاغراب . الجزء الاول ، جامعة الموصل -وزارة التعليم العالي والبحث العلمي.- ع 784 .
- السعيد، ابراهيم حسن محمد.(2014) . تصنيف الاغراب ، دار الوضاح للنشر وعشطار للاستثمارات الثقافية المملكة الاردنية الهاشمية /عمان .

العياضي، زيان.(2009). توصيف مظهري Ampélographie وجزئي SSR لتعريف وتثمين اصناف من العنب المحلي *Vitis vinifera* L. اطروحة دكتوراه. قسم البيولوجيا و الايكولوجيا .جامعة منتوري ،قسنطينة .

القرة غولي، عمار احمد سلطان.(2013).دراسة وراثية ووراثية خلوية لثلاث مجتمعات سكانية لذبابة ثمار القرعيات (*Dacus ciliatus* (Loew)(Diptera:Tephritidae) ، أطروحة دكتوراه، كلية التربية – جامعة تكريت ، العراق .

الكاتب، يوسف منصور .(1988). تصنيف النباتات البذرية ، دار الكتب للطباعة والنشر ، جامعة الموصل ، العراق ، 243 ص .

المنظمة العربية للتنمية الزراعية.(2009). الكتاب السنوي للاحصاءات الزراعية العربية، جامعة الدول العربية، المجلد 29، ص.77 ، 82 .

أبو الجدايل، رحيم عبد السلام .(2014). التقانات الحيوية – البيولوجيا الجزيئية والهندسة الوراثية، دمشق، سوريا . ص : 1-22 .

اسماعيل منار .(2002). تأثير بعض منظمات النمو واملاح الكالسيوم والطبقات المحررة من غاز ال SO2 في القابلية الخزنية للعنب ، اطروحة دكتوراه ، كلية الزراعة _جامعة بغداد، ص1 .

جبرائيل، جلادت محمد صالح .(2001). التوصيف الوراثي لعدد من أصناف نخيل التمر *Phoenix dactylifera* L. في العراق باستخدام مؤشرات RAPD . مجلة اباء للأبحاث الزراعية .المجلد 11 – ، العدد . 1 ص : 138-148.

جمال الدين، فهمي احمد.(2010). موسوعة النباتات الطبيه ، الطبعة الثانيه ، منشأ المعارف ، الاسكندريه ، جمهورية مصر العربية .

حسن، جبار عباس ومحمد عباس سلمان . (1989) . إنتاج الاعناب. بيت الحكمة، جامعة بغداد، وزارة التعليم العالي والبحث العلمي، العراق.

صقر، محمد محمد و حمدي عبد العزيز مرسى.(1999). تمييز الجزيئي لأصناف نخيل البلح المصرية، البصمات الوراثية، المجلة العربية للبيوتكنولوجيا، عدد (١)، مجلد (2) يوليو 1999 م، ص 71_ 87 .

طلال، جورج.(2008). تأثير بعض انواع الاسمده العضوية في انتاجية صنفى البلدي والحلواني، اطروحة دكتوراه، كلية الزراعة _ جامعة بغداد، ص.2 .

عبد الغفور، عادل هابس وصبري ، نوفل عدنان ومرعي ، احمد عبد الواحد.(2011). تقدير التباينات والارتباطات المظهرية والوراثية ونسبة التوريث بلمعنى الواسع في الذرى الصفراء. *Zea mays*. مجلة ديالى للعلوم الزراعية ، مجلد 3(1): 206_217.

عبد الغني ، وليد .(2005) .مواصفات الهجين الناتج من التضريب بين صنفى العنب العباسي وتومسون سيدلس المركب على ثلاث اصول من العنب الاوربي ، اطروحة دكتوراه ، كلية الزراعة _جامعة بغداد ،ص2 .

عمار، محمد حمدي امام .(2003)، استنباط البصمة الوراثية الجزيئية لبعض اصناف الزيتون، رسالة ماجستير ،قسم الوراثة، كلية الزراعة، جامعة عين شمس، مصر.

قاسم، عصام .(2011). علم الوراثة الجزيئي والهندسة الوراثية .منشورات جامعة دمشق ، كلية العلوم ، سوريا .

نظيف م. ح. خ.، عاطف م. ا. و. و. عبد الحكيم ع. ف. ع. (1990). العنب ، زراعته ، رعايته، إنتاجه. منشأة المعارف الإسكندرية. ص 455 .

ناصر، غالب. (2010). مبادئ اعناب ، قسم البستنة وهندسة الحدائق، كلية الزراعة جامعة ديالى.

ياسين ، معن صالح . (2011). تحديد التباين الوراثي لعدد من أصناف نخيل التمر في العراق باستخدام مشرات RAPD و ISSR . رسالة ماجستير، كلية العلوم، جامعة تكريت، العراق .

المصادر الاجنبية

Akkak, A.; Boccacci, P.; Lacombe, T. and Botta, R. (2005). Relationship and genetic diversity of grapevine *Vitis Vinifera* L. grown in Algeria and in Mediterranean Basin. In: “The role of biotechnology for the characterisation and conservation of crop, forestry, animal and fishery genetic resources” in proceedings of In .workshop. 5-7, Turin, Italy.

Akkaya, M. S. ; Bhagwast, A. A. and P. B. Cregan .(1992). Length Polymorphisms of simple sequence repeat DNA in soybean. Genetics., 132: 1131-1139.

AL_Khalifah , N.S. and Askari , E. (2006) . Early detection of genetic variation in date palm propagated from tissue culture and offshoots by DNA fingerprinting . In :3rd inter, Date palm, conf , feb 19_21.Abu_Dhabi. UAE , P. 149_160.

Alfalahi, A. O.; Elsayhookie, M.M. .; Alobaidi ,B. S.(2012).Molecular variation of maize CMS population and subpopulation subpopulations .Iraqi .J.Biotech.11(2):2929-312.

Al-Halabi, O.; Maarri, Kh. and B. Muzher . (2009). Characterization of some local apple Cultivars in Syria Using Some Morphological Traits and molecular markers. Jordan J. for Ag. Sc. 5(1): 73-89.

Ali, T.A.; Jubrail, J.M. and A.M. Jassim .(2006) .The use of RAPDs technique for the detection of genetic stability of the regenerated plantles (Barhi cv .) in Iraq . 3rd Inter, Date palm , conf , feb , 19_21 .Abu_Dhabi. UAE, p.15_37 .

Aradhy, A. M. K.; Dangl, G. S.; Prins, B. H.; BOursiquot, J. M.;Walker, M.A.;Meredith, C. P. and Simon C. J.(2003). Genetic structure and differentiation in cultivated grape, *Vitis vinifera* L. Genetic Research, 81, 179–192.

Arnold. C; Schnitzler A; Douard A; Peter R and GilleT F. (2005).Is there a future for wild grapevine (**Vitis vinifera** subsp **silvestris**) in the RhineValley? .*Biodiversity and Conservation*, 14 (6), 1507-1523.

Askari, E.; AL-Khalifah, N. S.; T. Ohmura; Y. S. AL-Hafedh; F. A . Khan; A. AL-Hindi and R. Okawara .(2003). Molecular phylogeny of seven date palm *Phoenix dactylifera* L. cultivars by DNA fingerprinting. Pak. J. Bot., 35: 323–330.

Baggiolini, M.(1952). Les stades repères dans le développement annuel de la vigne et leur Utilisation pratique . Rev. Rom. Agrice .Vitic. Arboric., 8,4-6.

Barone, A.; Sebastiano, A. and Carputo, D. (1999). Chromosome pairing in *Solanum commersonii*- *S. tuberosum* sexual hybrids detected by commersonii–specific RAPDs and cytological analysis. Genome, 42: 218 – 224

Baek ,H. J.; Beharav, A. and Nevo E. (2003). Ecological- genomic diversity of microsatellite in wild barley *Hordeum Spontaneum* populations in Jordan. Theor. Appl. Genet., 106, 397 – 410.

Baghasa, H.(2006). Table Grape Trade in Syria. Commoditybrief No 5. Project GCP/SYR/006/ITA. 10 P.

Barua ,U. M.; Chalmers, K. J.; Hackett, C. A.; Thomas, W. T. B.; Powell , Wand R. Waugh.(1993). Identification of (RAPD)markers linked to a phynchosporium secalis resistance locusin barley using nearisogenic lines and bulked segregant analysis. He. 71: 177-184.

Baum ,M .; Grando, S.;Ceccarelli, S . and Jahoor A .(2004). Localization of Quantitative Trait Loci for Dry land Characters in Barley by Linkage Mapping . Crop Science Society of America and America Society of Ag, 677 S. SegeRd.

Betancor, L.; Schelotto, F.; Martinez, A.; Pereira, M.; Algorta, G.; Rodríguez, M.; Vignoli, R. and Chabalgoity, J. (2004). Random amplified polymorphic DNA and phenotyping analysis of *Salmonella enterica* serovar enteritidis isolates collected from humans and poultry in Uruguay from 1995 to 2002. J. Cli. Microbiol., 42(3), 1155–1162.

Bhagyawant, S. S. and N. Srivastava. (2008). Genetic fingerprinting of chickpea *Cicer arietinum* L. germplasm using ISSR markers and their relationships. African. J of Biotechnology 7 (24):4428-4431.

Bornet, B. and Branchard M.(2001). Non anchored inter simple sequence repeat (ISSR) markers: reproducible and specific tools for genome fingerprinting. Plant Molecular Biology Reporter, 19, 209-215.

Bornet, B.; Goraguer,F.; Joly, G and M. Branchard.(2002). Genetic diversity in European and Argentinean cultivated potatoes .*Solanum tuberosum subsp. Tuberosum*. detected by inter-simple sequence repeats (ISSRs). Genome 45: 481-484.

Botta, R.; scott, n.s.; eynard, I.; thomas and M.R.(1995). evaluation of microsatellite sequence-tagged site markers for characterizing *vitis vinifera* cultivars. *vitis*, 34 (2), 99-102.

Bowers, J.E.; dangl, g.S.; vignani, R., and Meredith, C.P. (1996). isolation and characterization of new polymorphic simple sequence repeat loci in grape. *vitis vinifera* L. *ge.* 39, 628-633.

B-scher, N.; zyprian, E.; Bachmann, O.; blai ch and R.(1994). on the origin of the grapevine variety müller- thurgau as investigated by the inheritance of random amplified polymorphic DNA RAPD. *vitis*, 33, 15-17.

Caetano-Anolles, G. and P.M. Gresshoff. (1997). DNA Markers Protocols, Applications, and overviews. Wiley-Liss, Inc.

Casas, A.M.; Igartua, E.; Vallés, M.P. and Molina-Cano J.L.(1998). Genetic diversity of barley cultivars grown in Spain, estimated by RFLP, similarity and coancestry coefficients. *Plant Breed.* 117: 429-435.

Calo, A.; Costacurta, A., Paludetti, G.; Calo, G.; Aruselkar, S. And Parfit D. (1989). The use of isoenzyme markers to characterize grape cultivars. *Rivista Vitic. En.* 42(1),15-22.

Cervera, M. t.; cabezas, J. A, s.nchez-escribano.; cenis, J.L. and martinez-zapater, J. M.(2000). characterization of genetic variation within table grape varieties .*vitis vinifera* L. based on aflp markers. *vitis*, 39, 109-114.

Chabane,K.; barker, J. H A.; karp, A. and valkoun j.(1999). evolution of genetic diversity in diploid wheat: using aflp markers. *al awamia* ,100, 9-18.

Chabane, K.; ablett, G.A.; cordeiro, G.M.; valkoun, J and henry R.J. (2005). est versus genomic diversity microsatellite markers for genotyping wild and cultivated barley. *genet. res. evol.*, 52, 903 – 909.

Chen, B. Y. and Janes, H. W.(2002). PCR cloning protocols. In: Methods in molecular Biology, Vol. 129, and 2nd. Ed. Human press Inc. Tomato, NJ. 423PP.

Choumane, W.; Winter, P.; Weigand, F and Kahl G. (2000). Conservation and variability of sequence –tagged microsatellite sites (STMS) from chickpea *Cicer arietinum* L. within genus Cicer. Theor. Appl. Genet., 101, 269 – 278.

Choumane, W.; van breuge, P.; Bazuin, T . O. M .; Baum, M .; Ayad, W and Amaral W.(2004). Genetic diversity of *Pinus brutia* in Syria as revealed by DNA markers . *Fo. Genetic*, 11(2), 87 – 101.

Cooperative Extension . (2011) . production Guide for organic Grapes , cornell university.NYS. IPM. publication No .224 (2) ,p.1_60.

Crespan ,M. (2004). Evidence on the evolution of polymorphism of microsatellite markers in varieties of *Vitis vinifera* L. Th and Ap. Genetics 108: 231–237

Dalmaso, A.; Fontanella, E.; Piatti, P.; Civera, T.; Rosati, S. and Bottero, M. (2004). multiplex PCR assay for identification of animal species in feedstuffs. *Mole Cell Probes.*, 18 :81-87.

Dahlberg, J. A.; X. Zhang; G. E. ; Hart and J. E. Mullet (2002). Comparative assessment of variation among sorghmgermplasm accessions using seed morphology and (RAPD) measurements. *Crop Sci.*, 42: 291–296.

De andres, M. T.; Cabezas, J. A. ; Cervera ,M. T.; Borrego ,J.;Devos, K. M. and M. D. Gale .(1992). The use of random amplified polymorphic DNA markers in wheat. Th. Ap. Genet. 84: 567-572.

DE Andres M. T; Cabezas J. A; Cervera M. T; Borrego J; Martinez-Zapater J. M. and Jouve N. (2007). Molecular characterization of grapevine Rootstocks maintained in germplasm collection . *Am. J. Enol. Vitic.*, 58, 75-86.

Di vecchi staraz ,M.(2007). Recensement et caractérisation des ressources génétiques autochtones de *Vitis vinifera* L. subsp. *silvestris* .Gmelin. Hegi en Europe. Etude du complexe sauvage cultivé et constitution d'un inventaire national italien. *Thèse doctorat* , SupAgro, Montpellier, 131 p.

Dinarvand, M.; Ejtehad ,H. M.; Jankju, B and Andarzian. (2015).12.31: A new record of the genus *Vitis* (Vitaceae) for the flora of Iran. – Iran. J. Bot. 21 (2):100-102. Tehran.

Dweikat, I.; Mackenzie, S.; Levy, M and Ohm H.(1993). Pedigree Assessment using RAPD in cereal crop species. *Th. Appl. Genet.* 85: 497-505.

Eibach, R.;Hausmann, L and Töpfer, R.(2009). Marker assisted selection (MAS) as a new tool for developing high quality cultivars with sustainable resistance. Federal Research Centre for Cultivated Plants – Julius Kuehn-Institute for Grapevine Breeding Gei. 6p.

Eissa, E.; Abd El-Razek, A.; El-Sharabasy, S. and Rizk, R. (2009).Morphological and molecular genetic characterization of soft datepalm (*Phoenix dactylifera* L.) cultivars in Egypt. *Egypt. J. Genet.Cytol.*, 38: 269-284.

El-Badwy, M.E.L.M.; Morsy ,A.S.; El-hosary, A.A.A.(2009) .Heterosis and combining ability in maize using diallel crosses under tow level of nitrogen and genetic distance by RAPD. *Asian .J. of Crop Sci* .5(1):1-13.

Eleuch, L.; Jalil, A.; Grando, S.; Ceccarelli, S.; Schmising, M.K.;Tsujimoto, H. 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.

Ellis, R.P.; McNicol, J.W.; Baird, E.; Booth, A.; Lawrence, P.; Thomas, W.T.B. and Powell W. (1997). The use of AFLPs to examine genetic relatedness in barley. *Mol. Breed.* 3: 359-369.

Emebiri, L.C.; Platz, G and Moody D.B.(2005).Disease resistance genes in a doubled haploid of population of two- rowed barley segregation for malting quality attributes. *Aust. J. Resear.*, 56, 49 – 56.

Elmeer, K.; Sarwath, H.; Malek, J.; Baum, M. and Hamwieh, A. (2011).New microsatellite markers for assessment of genetic diversity indate palm (*Phoenix dactylifera* L .). 3 *Biotech.*,1: 91–97.

El Kichaoui, A.; Abu Zayed, M., and Ayesh, B. (2013). Genotyping and identification of six date palm (*Phoenix dactylifera* L .) cultivars ofthe Gaza Strip by random amplification of polymorphic DNA. *Emir.J. Food Agric.*, 25(11), 916–925.

Feng, Z. Y.; Zhang, L.;Zhang, Y. Z. and Ling H. Q. (2006).Genetic diversity and geographical differentiation of cultivated sixi-rowed naked barley landraces from the Qinghai-Tibet plateau of China detected by SSR analysis. *Genetic and Molecular Biology.* 29, 330-338.

Fernández, M. E.; Figueiras, A. M. and Benito, C. (2002). The use of ISSR and RAPD markers for detecting DNA polymorphism, genotype identification and genetic diversity among barley cultivars with known origin. *Th. Appl. Genet.*, 104:845–851.

Garros, C.; Harbach, R. E. and Manguin, S .(2005). Systematic and biogeographically Amplification of the phylogenetic relationships between members of the Funestus and Minimus groups of Anopheles .*Diptera:Culicidae* .J of Me. Entomology.42:7-18.

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

Genet, T.; Viljoen, C. D. and Labuschagne M. T.(2005). Genetic analysis of Ethiopian mustard genotypes using amplified fragment length polymorphism AFLP markers. *African J of Biotechnology*. 4(9), 891 – 897.

Grando, M.S.; De Micheli, I.; Biasetto, L and Scienza A. (1995). RAPD markers in wild and cultivated *Vitis vinifera*. *Vitis*, 34, 37–39.

Graner, A.; Ludwig, W.F and Melchinger A.E. (1994). Relationships among European barley germplasm: II. Comparison of RFLP and pedigree data. *Crop Sci.* 34: 1199-1205.

Grassi, F.M.; Labra, S.; Imazio, A.; Spada, S.; Sgorbati, A.; Scienza, A and Sala F.(2003). Evidence of a secondary grapevine domestication centre detected by SSR analysis. *Th. Appl. Genet.*, 107, 1315– 1320.

Grudmann, H.; Schneider, C.; Hartung, D.; Daschner, F. D. and Pith, T. L. (1995). Discriminatory power of three DNA typing techniques for *P. aeruginosa*. *J. clin. microbial.* 3:528-532.

Guido, C.; Maria, T.M.; Gabriele, D.G.; Antonella, P.; Michele, M and Raffaele, T.(2008). A set of microsatellite markers with long core repeat optimized for grape *Vitis* spp. genotyping. *BMC Plant Biology*. 8:127.

H.S.M. Khierallah, S.M. Bader, M. Baum and A. Hamwieh, Assessment of genetic diversity for some Iraqi date palm *Phoenix dactylifera* L. using AFLP markers, *African Journal of Biotechnology*: 136, (2011), (4), pp (282–287).

Hamwieh, A.; udupa, S. M.; choumane, W.; sarker, A.; reyer, F.; jung, Cand baum M.(2005).A genetic linkage map of lens sp based on microsatellite and AFLP markers and the localization of fusarium vascular wilt resistance. *th. appl. genet.*, 110, 669- 677.

Huang, J. and M. Sun (2000). Genetic diversity and relationships of sweet potato and its wild relatives in Ipomoea series Batatas (*Convolvulaceae*) as revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) and restriction analysis of chloroplast DNA. *Theor. Appl. Genet.*, 100: 1050-1060.

Hang, A. N.; C. S. Burton and H. E. Bockelman (2006). Characterization of wild wheat (*Aegilops L.*) and wild Barley (*Hordeum L.*) Germplasm using Inter-simple sequence repeat (ISSR) and General DNA primers.

Plant Genetic Resources News letter 147: 3-8.

Hulme, A. C. (1970). The Biochemistry of Fruit and Their Products, Vol. 1. Academic Press, N.Y., USA, pp 788.

Innis, M.A.; Gelfand, D and H. (1990). Optimization of PCR,. Basic methodology. Part one. In : PCR Protocols, Innis, M.A. ; Gelfand , D.H., Sninsky, J.J. and White, T.J. (eds.) Academic Press, Inc. London.

J.M.S. Jubrael, S.M. Udupa and M. Baum, Assessment of AFLP based genetic relationships among date palm *Phoenix dactylifera L.* varieties of Iraq. *J of the American Society for Horticultural Science*: 130, (2005), pp. (442-447).

Janssen, P.; Coopman, R.; Huys, G.; Swing, J.; Bleeker, M.; Vos, P.; Zabeau, M and Kersters K.(1996). Evaluation of the DNA fingerprinting method AFLP as a new tool in bacterial taxonomy. *Mic .* 142: 1881-1893.

Joshi, C. P. and H. T. Nguyen. (1993). (RAPD) (Random amplified polymorphic DNA) analysis base on intervarietal genetic relationships among hexaploid wheat. *Plant Sci.*, 93:95-103.

Joshi, S. P.; Gupta, V. S. R. K.; Aggarwal, P.K.; Ranjekar, D. S and Brar. (2000). Genetic diversity and phylogenetic relationship as revealed by inter-simple sequence repeat ISSR polymorphism in the genus *Or*. Theoretical and Ap. Genetics 100:1311–1320.

Karakousis, A.; Barr, A.R.; chalmers, J.K.; ablett, G.A.; hoton, T.A.; henry, R.J.; lim, P and langridge P.(2003). potential of ssr markers for plant breeding variety identification in australian barley germplasm. Aus. J. Agri. Resear., 54, 1197 – 1210.

Karp, A.; Edwards, K. J.; Bruford, M.; Vosman, B.; Morgante, M.; Seberg,O.; Kremer, A.; Boursot, P.; Arctander, P.; Tautz, D. And G. M. Hewitt.(1997a). Molecular Technologies for biodiversity valuation: Opportunities and Challenges. Na . Bio. 15: 625 628.

Karp,A.;Edwards,K.J.;Bruford,M.;Funk,S.;Vosman,B.;Morgante,M.;Seberg,O.;Kremer,A.;Boursot,P.;Arctander,P.;Tautz,DandHewitt,G.M.(1997b). Molecular Technologies for biodiversity evaluation:Opportunities andAgarain reform ,Baghdad ,Iraqi .pp.154-196 .

Khlestkina ,E. K.; roder, M. S. ; efremova, T. T.; borner, A. and shumny V.K.(2004). The genetic diversity of old and modern Siberian varieties of common spring wheat as determined by microsatellite markers. Pl. Breed. 123, 122 – 127.

Khierallah, H. S. M.; Bader, S. M.; Baum, M.; Hamwieh, A. (2011). Genetic diversity of Iraqi date palms revealed by microsatellite polymorphism. J. Amer. Soc. Hort. Sci., 136(4): 282–287.

Kramer, M. F. and Coen, D. M.(2001). Enzymatic amplification of DNA by PCR: Standard procedures and Optimization. Curr. Protocol . Toxicol. Appendix. 3 :1-14.

Kudriavtsev, A. M.; Martynov, S. P.; Brodzhno, M. and V.A Pukhal'ski .(2003). Evaluation of the relevance of using(RAPD)- analysis for revealing the phylogenic connection between cultivars of durum wheat *T. durum* Desf. Ge.39:1237-1246.

Lane, A. (2007). An introduction to crop wild relatives, GeneFlow, Publication about Agricultural Biodiversity, Bioversity Inte, p:19.

Lashermes, P.(2005). Analysis of genetic diversity in Indian Robusta coffee gene pool (*Coffea canephora*) in comparison with a representative core collection using SSRs and AFLPs. *Genet. Resour. Evol.*, 52, 333 – 343.

Lefor, T.F.; Anzidei, M.; Roubelakis-Angelakis K.A. and Vendramin G.G., (2000). Microsatellite profiling of the Greek Muscat cultivars with nuclear and chloroplast SSRs markers. *Quaderni della Scuola di Specializzazione in Scienze Viticole ed Enologiche*, 23, 56-80.

Linn, J.J.; Kuo, J.; Ma, J.; Saunders, J.A.; Beard, H.S., MacDonald, M.H.; Kenworthy, W.; Ude, G. N. and Matthews B. L. (1996). Identification of molecular markers in soybean: comparing RFLP, RAPD and AFLP DNA mapping techniques. *Plant Mol. Biol. Rep.* 14: 156-169.

Liu, Z. W.; Biyashev, R. M. and Saghai Maroof M. A.(1996). Development of Simple Sequence Repeat DNA Markers and their integration into a barley linkage map. *Theor Appl Genet.*, 93, 869 – 876.

Liu, J.; Shi, S.; Chang, E.; Yang, W. and Jiang, Z. (2013). Genetic diversity of the critically endangered *Thuja sutchuenensis* revealed by ISSR markers and the implications for conservation. *Int. J. Mol. Sci.*, 14(7): 14860-14871.

Martinez de toda. F and Sancha J.C.(1997). Caractérisation ampélographique des cultivars rouges de *Vitis vinifera* L. conservés en Rioja. *Bull. O.I.V.*, 79:3-79, 221-234 .

Mari, S.; J. Bolari; I. Martin; L. Peji and V. Kozumplik(2004). Genetic diversity of hexaploid wheat Cultivars estimated by (RAPD) markers, morphological traits and coefficients of parentage. Plant Breeding, 123: 366 -369.

M. Marsafari and A.A. Mehrabi, Molecular identification and genetic diversity of Iranian date palm *Phoenix dactylifera* L. cultivars using ISSR and RAPD markers, Australian. J of Crop Science. 7, (2013), (8), pp. (1160-1166).

Macaulay, M.; Ramsay, L.; Powell, W and Wough R. A.(2001). representative , highly informative genotyping set of barley SSRs. Th. Appl. Genet., 12, 801 – 809.

Malysheva-Otto, L.; Ganai, M. W and Roder S.(2006). Analysis of molecular diversity, population structure and linkage disequilibrium in a worldwide survey of cultivated barley germplasm *Hordeum vulgare* L. BMC Genetics. 7 (6) , 1 – 14.

Martinez-Zapater, J. M and Jouve N.(2007). Molecular characterization of grapevine Rootstocks maintained in germplasm collection . Am. J. Enol. Vitic., 58, 75-86.

Matus, I. A. and Hayes P. M.(2002). Genetic diversity in three groups of barley germplasm assessed by simple sequence repeats. Genome, 45, 1095 – 1106.

McGregor, C. E.; Lambert, C. A.; Greyling, M. M.; Louw, J. H. and Warich, L.(2000). A comparative assessment of DNA fingerprinting techniques RAPD, ISSR, AFLP and SSR in tetraploid potato *Solanum tuberosum* L. germplasm. Euphytica. 113: 135-144.

Melchinger, A.E.; Graner, A.; Singh, M and Messmer M.(1994) Relationships among European barley germplasm: I. Genetic diversity among winter and spring cultivars revealed by RFLPs. *Crop Sci.* 34: 1191-119.

Meudth, T.R and Clarke, M.S.(2007). Almost forgotten or latest practice AFLP applications, analysis and advances. *Trends in plant Sc.* 12 (3) : 106-117.

Miller, J. C. and S. P. Tanksley. (1990). RFLP analysis of polygenetic relationships and genetic variation in the genus of *Lycopersicon*. *Th. Appl. Genet.* 80: 437-448.

Milbourne, D.; Meyer, R.; Bradshaw, J.; Baird, E.; Bonar, N.; Provan, J.; Powell, W. and Waugh, R. (1997). Comparison of PCR-based marker systems for the analysis of genetic relationship in cultivated potato. *Molecular Breeding*, 3:127-136.

Mir Ali, N.(2002). *Gliadins* Composition And Cluster Analyses Of Syrian Grown Durum Wheat. *Plant Breeding & Seed Science.* 46: 51-62.

Morgante, M.; Olivieri, A and M.(1993). PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *Plant J.* 3(1): 175-182.

Mourad, S. N.; Ghina, A.; Al-Eater, Raghid and A.(2010). Basic recombinant technique for working DNA. Institute for Genetic Engineering, Ecology and Health (IGEEH) Karlsruhe, Germany postal, Address: Veering four Gentechnik, Okologie and Gesundeit (VGOG) e. v., Haid-Und-Neu-Str. 7, 76131 Karlsruhe, Germany First edition Augus.

Mullis, K.; Faloona, S.; Scharf, S.; Saiki, R.; Horn, G and Erlich H.(1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. *Cold spring Harbor Symp. Qu. Biol.* 51: 263-273.

Mullins M.G; Bouquet A. and Williams L.E.(1992). *Biology of grapevine.* Cambridge University Press, Cambridge. 251p.

- Mwase**, W. F .; Biornstad, A .; Stedje, B .; Bokosi, J . M and K wapata M. B.(2006). Genetic diversity of *Uapaca kirkiana* muel. arg. populations as revealed by amplified fragment length polymorphisms (AFLPs) . African. J of Bio. 5 (13), 1684-5315
- Nagaoka**, T. and Y. Ogihara .(1997). Applicability of Intersimple sequence repeat polymorphism in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and (RAPD) markers. Theor. Appl. Genet., 94: 597-602.
- Negrul** A.M. (1946). Evropejskij iaziatskij vinograd *V. vinifera* L. Ampelografija SSSR .Moscou, 1,63.
- Nebauer** , S. G. ; del Castillo_Agudo ,L and j. segura .(1999) . RAPD variation within and among natural populations of outcrossing willow _leaved foxglove *Digitalis obscura* L. theoretical and Ap .Ge . 98 : 985_994 .
- Nkongolo**, K. K.; Michael, P and W. S. Gratton. (2002).Identification and characterization of (RAPD) markers inferring genetic relationships among Pine species. Genome. 45: 51–58.
- Nybm**, H.; Weising, K. and Rotter, B. (2014). DNA fingerprinting in botany: past, present, future. Inv. Genetics, 5: 1-35
- Ohmic**, wakana.; A and shiraishi S.(1993). study of the parentage of grape cultivars by genetic interpretation of GPI-2 and PGM-2 isoenzymes. Euphytica, 65, 195-202.
- Ortiz**,J.M.;Martin,J.P.;Borrego,J.;Inmaculadarodrigue,Z.J.C.;Munoz,G.; Cabello and F .(2004). Molecular and morphological characterization of a *Vitis* gene bank for the establishment of a base collection. Genet. Res.. Crop Evol. 51,403–409.

Ordon, F.; Ahlemeyer, J.; Werner, K.; Kohler, W and Friedt W.(2005). Molecular assessment of genetic diversity in winter barley and its use in breeding. *Euphytica*, 146, 21 – 28.

Ozkan, H.; Kafkas, S.; Ozer, M. S. and Brandolini A. (2005). Genetic relationships among South-East Turkey wild barley populations and sampling strategies of *Hordeum spontaneum*. *Th. Appl. Genet.*, 112, 12 - 20.

Peter, H. and S.G. Thoms.(2006). Salicylic acid. *Plant Hormone Signaling*. Blackwell Publishing. Ltd. (8): 229-257.

Powell, W.; Thomas, W . T. B .; Baird, E .; Lawrence, P .; Booth, A.; Harrower, B .; McNical, J. W. and Waugh R.(1997). Analysis of quantitative traits in barley by the use of Amplified Fragment Length polymorphisms. *He*.79, 48 – 59.

Prakash, N. S.; Combes, M. C.; Dussert, S.; Naveen, S and Rabelo da costal, F.; Pereira, T. N.S.P.; Vitorial, A.P .; de campos , K.P.;Rodrigues,R.; da Silva, D.H. and Pereira, M. G. (2006) .Genetic diversity among *Capsicum* accessions using RAPD markers. *Crop Breeding and Appl. Biotech.* 6:18_23 .

Rajora, P.O. and Rahman M.H.(2003). Microsatellite DNA and RAPD fingerprinting identification and genetic relationships of hybrid poplar *Populus x Canadensis* cultivars. *Th. Appl. Genet.*, 106, 470 – 477.

Ramsay, L.; macaulay, M.; degli, ivanissevich S.; maclean, K.; cardle, L.; fuller, L.; Edwards, K. J.; tuvesson, S.; morgante, M. ; massari, A. ; meastr, E. ; marmirol, N.; sjakste, T.; ganal, M. ; powell, W and waugh R.(2000a). A simple Sequence Repeats – Based Linkage Map of Barley. *Genetics*. 156, 1997- 2005.

Ramsay, L.; Macaulay ,M. S.; Degli Ivanissevich, K.; Macleanm, L. ;Carsle, J. Fuller, et al.(2000b). A simple sequence repeat-based linkage map of barley. Genetics, 156:1997-2000.

Rao, L.; P. Usha Rani. P. Deshmukh. P. Kumar and S. Panguluri. (2007). RAPD and ISSR fingerprinting in cultivated chickpea (*Cicer arietinum* L.) and its wild progenitor *Cicer reticulatum* Ladizinsky Genetic. Re and Crop Evolution, 54(6): 1235-1244. .

Ricciardi, L.; Giorgio, V.C.; De Giovanni, C.; Lotti, A.; Gallotta, G and Fanizza.(2002). The genetic of apulian apricot genotypes *Prunus armeniaca* L. assessed using AFLP markers. Cellular and Molecular Biology Letters. 7:431-436.

Roder, M.S.; Plaschke, J.; Konig, S.U.; Borner, A.; Sorrells, M.E.; Tanksley, S.D; Ganai, M and. W.(1995). Abundance, variability and chromosomal location of microsatellites in wheat. Mol. Gen. Genet. 246: 327-333

Rossetto, M.; McNally, J.; Henry, R .J.(2002). Evaluating the potential of SSR flanking regions for examining relationships in Vitaceae. Theoretical and Applied Genetics 104: 61–66.

Roux, K. H.(2009).Optimization and Troubleshooting in PCR. Springer Harb. Protocol. 54: 1086-1101.

Russell, J. R.; Fuller, J. D. ; Macaulay, M.; Hatz, b. G.; Jahoor A. ; Powell W and Waugh R.(1997a) .Direct comparison of levels of genetic variation among barley accessions detected by RFLP – AFLP – SSR – and RAPD. Th. Appl. Genet., 95, 714 – 722.

Russell, J.R.; Fuller, J.D.; Macaulay, M.; Hatz, B.G.; Jahoor, A.; Powell, W and Waugh R.(1997b). Direct comparison of levels of genetic variation among barley accessions detected by RFLPs, AFLPs, SSRs and RAPDs. Th. Appl. Genet. 95: 714-722.

S. V, Tingey .(1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.*, 18(22): 6531-6535 .

Saiki ,R.K.; Scharf, S.; Faloona, F.; Mullis, K.B.;Horn, G.T.; Erlich, H.A and Arnheim N.(1985). Enzymatic amplification of b-globulin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*. 230: 1350-1354.

Schut, J.W. Qi. X and Stam P.(1997). Association between relationship measures based on AFLP markers, pedigree data and morphological traits in barley. *Th. Appl. Genet.* 95: 1161- 1168.

Schwengel, D.A.; Jedlicka, A.E.; Nanthakumar ,E.J.; Weber ,J.L and Levitt R.C. (1994). Comparison of fluorescence-based semi-automated genotyping of multiple microsatellite loci with autoradiographic techniques. *Genomics*. 22: 46-54.

Sefc, K.M.; Regner, F.; Steinkellner ,gl.ssl. J and H.(1998). Monitoring der genetischen Variabilität und Pedigree Studien bei Scuola di Specializzazione in Scienze Viticole ed Enologiche, 23, 56-80.

Sefc ,K.M.; Lopes, M. S.; Lefort, F.; Botta, R.; Roubelakisangelakis, K .A. ; Ibanez, J. ; Pejic, I. ; Wagner, H. W. ; Gl.SSL. J and steinkellner h . (2000). Microsatellite variability in grapevine cultivars from different European regions and evaluation of assignment testing to assess the geographic origin of cultivars. *Th. Appl. Genet.*, 100,498–505.

Sefc, K. M.; Steinkellner ,H. ;Lefort, F.; Bottar, A. D.; Machado.; Borrego, J.; Pollefeys, P and Bousquet J. (2003a). Molecular genetic diversity of the French– American grapevine hybrids cultivated in North America. *Genome* 46, 1037-1048.

Sefc, K.M.; Steinkellner, H.; Lefort, F. et al. (2003b). Evaluation of the genetic contribution of local wild vines to European grapevine cultivars. *American. J of Enology and Viticulture* 54: 15–21

- Semagn**, K.; Bjornstad, A .; Ndjiondjop, M and N.(2006). An overview of molecular marker methods for plants. African. J of Bio . 25(5): 2540-2568.
- Shehadeh**,A.,A.(2011).Ecogeographic,Genetic and Taxonomic studies of the genus *Lathyrus* L. ph.D.Thesis,Birmingham Univ. sterreichischer Pflanzenzüchter,71-73.
- Sitthiwong**,K.;Matsui, T.;Sukprakarn,S.;Okuda,N and Kosugi, Y. (2005).Classification of pepper *Capsicum annuum* L . accessions by RAPD analysis. Biotechnology . 4(4):305_309.
- Snoussi**, H. ; Harbi Ben Slimane, M.; Ruiz-Garcia, L.; Martinez Zapater, J.M. and Arroyo-Garca R.(2004). Genetic relationship among cultivated and wild grapevine accessions from Tunisia. Genome, 47, 1211–1219.
- Stavrakakis**, M.N and Biniari K.(1998). Genetic study of grape cultivars belonging to the Muscat family by random amplified polymorphic DNA markers. *Vitis*, 37, 119-122.
- Struss**, D. and plieske J.(1998). The use of microsatellite markers of detection of genetic diversity in barley populations. Th. Appl. Genet., 97, 308 – 315
- Sweigart**, A.; karoly, K.; Jones, A. and Willis, H.J.(1999). The distribution of individual inbreeding coefficients and pairwise relatedness in population of *Mimulus guttatus*. He. 83: 625-632.
- Tessier**, C.; David, J.; This, P.; Boursiquot, J.M. and Charrier A.(1999). Optimization of the choice of molecular markers for varietal identification in *Vitis vinifera* L. Th. Appl. Genet., 89, 171-177.
- This**, P.; Cuisset, C and Boursiquot J.M.(1997). Development of stable RAPD markers for the identification of grapevine rootstocks and the analysis of genetic relationships. Am. J. Enol. Vitic., 48, 492-501.

This, P.; Roux, C.; Parra ,P.; Siret, R.; Bourse, T.; adam, A.F.; Yvon ,M.; Lacombe, T.; David, J and Boursiquot J.M.(2006). Caractérisation de la diversité d'une population de vignes sauvages du Pic Saint-Loup (Herault) et relations avec le compartiment cultivate. Genet. SE. EV. 33, 289–304 .

Thomas, M.R. and Scott N.S.(1993). Microsatellite repeats in grapevine reveal DNA polymorphisms when analysed as sequencetagged sites (STSs). Th. Appl. Genet. 86, 985–990.

Tinker, N.A.; Fortin, M.G. and Mather D.E.(1993). Random amplified polymorphic DNA and pedigree relationships in spring barley. Th. Appl. Genet. 85: 976-984.

Tong, W.; Cao, X.; Wen, S.; Guo, R.; Shen, M.; Wang, J. and Shi, X. (2012). Enhancing the specificity and efficiency of polymerase chain reaction using polyethyleneimine-based derivatives and hybrid nanocomposites. Int. J. Nanomedicine, 7:1069–1078.

Tragoonrung, S.; V.; Kanazin, P. M.; Hayes, T .; Blake and K .(1992). Sequence-tagged-site facilitated PCR for barley genome mapping. Th. Appl. Genet., 84: 1002-1008.

Tschammer, J. and ZYPRIAN E. (1994). Molecular characterization of grapevine cultivars of Riesling-type and of closely related Burgundies. *Vitis*, 33, 249-250.

Turpeinen, T.; Vanhala ,T.; Nevo, E and Nissil.A. E. (2003). AFLP genetic polymorphism in wild barley (*Hordeum spontaneum*) populations. Th. Appl Genet., 106, 1333 – 1339.

Von korff, M.; Wang, H. ; Leon, J and Pillen K.(2006). AB – Qtl analysis in spring barley. Detection of favorable exotic alleles for agronomic traits introgressed from wild barley *Hordeumvulgare ssp spontaneum*. Th. Appl. Genet., 112, 1221 – 1231.

VOS ,P .;Hogers, R .; Bleeker, M .; Reijans ,M .; Lee, T . V . D .; Hornes, M.; Frijters, A .; Pot, J .; Peleman, J .; Kuiper, M and Zabeau M .(1995). AFLP : a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Res, 2(21), 4407 – 4414.

Vouillamoz ,J. F. ;Monacoa. ; Costantinil.; Stefaninim. ; Scienza, A and Grando M. S.(2007). The parentage of 'Sangiovese', the most important Italian wine grape .*Vitis*, 46 (1) ,19-22.

Wang, G.; Castiglione, S.; Zhang, J.; Fu, R.; Ma. J.; Li, W.; Sun, Y. and Sala, F. (1994a). Hybrid rice (*Oryza sativa* L.): identification and parentage determination RAPD fingerprinting. Plant Cell Rep., 14: 112 115.

Wang, Z.; Weber, J.L.; Zhong, G. and Tanksley, S.D.(1994b). Survey of plant short tandem DNA repeats. Th. Appl. Genet. 88: 1-6.

Warren, F.L. and Christopher G.A.(1998). Using Simple Sequence Repeats (SSRs) for DNA Fingerprinting Germplasm Accessions of Grape (*Vitis* L.) Species. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 123(2): 182-188.

Welsh, J. and M. McClelland (1990). Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucleic Acids Res. 18: 7213-7218.

Williams, J. G. K.; Kubelic, A. R.; Lavk, K. L.; Rafalaski, J. A. and Tingery, S. V.(1990a).DNA Polymorphoism amplified by arbitrary primers is useful an genetic marker. Nucleic acid Res. 18: 6531-6535.

Williams, J. G.; A. R. kubelik; livak, K. J.; rafalski ,J. A and S. V. tingey .(1990b). DNA polymorphisms amplified byarbitrary primers are useful as genetic markers. nucleic acids res. 18(22): 6531-6535.

Williams, J. G. K.; Hanafey, M. K.; Rafalski, J.A. and Tingey, S.V. (1993). Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. Methods in Enzymology, 218: 704-740

Williams, J. G.; A. R. Kubelik; K. J. Livak; J. A. Rafalski and Wilson. K. and Walker, J.(2005). Principles and Techniques of Practical Biochemistry. Cambridge University Press.

Wjhani, Y.(2004). Genetic studies on the biodiversity of local and wild Syrian wheat using modern biotechnological techniques. Thesis submitted in partial fulfillment for the requirements of the degree of doctor of philosophy in agriculture science (genetics), Department of genetics, Cairo. Univ., Fac. Agric., 119 p.

YE, G.N.; Soylemezoglu, G.; Weeden ,N.F.; Lamboy, W.F.; Pool, R.M. and Reisch B.I.(1998). Analysis of the relationship between grapevine cultivars, sports and clones via DNA fingerprinting. *Vitis*, 37, 33-38.

Zamanidi, P.K.(2010). New complex-steady high-grade technical black berry variety of grape – Aleksampelo. Scientific Journal Of Kuban State Agrarian University, Krasnodar, Russia. 64(10): 1-17.

Zhao, X. and Kochert, G.(1992). Characterization and genetic mapping of a short, highly repeated, interspersed DNA sequence from rice *Oryza sativa* L. Mol. Gen. Genet. 23(1): 353-359.

Zietkiewicz, E.; Rafalski, A. and D. Labuda. (1994). Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. Genomics, 20: 176-783.

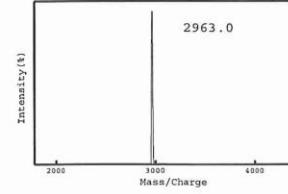
ملحق (1) أنواع البوادي المستخدمة في الدراسة

AULL 1224

CAG GCC CTT C

Optical Density	2.0 OD	Purification	BIO-RP
Total nmole	23.6 nmole	Modification	
Scale	0.025 umoles	GC content	70.0 %
Length	10mer	Molecular Weight	2963.9 g/mole
Tm	34.0 C	Volume for	235.8 ul
		100 pmoles/ul	

MALDI-TOF QC



5-multiplex 기능과 빠른 cycling이 가능한 최고 성능의 Real-Time PCR 장비!

Exicycler™ 96 (ver.4)

- 높은 민감도와 정확도 (Ct variation < 0.3 cycle)
- 빠른 ramp rate로 실험시간 단축 (Max. 5°C/sec)
- Reference dye가 필요없어 5-multiplex PCR 가능
- 9 log 이상의 넓은 dynamic range



AccuOligo® is manufactured in clean-room under strict ISO 9001 to confirm DNase/RNase and DNA free environment

BIONEER
Innovation • Value • Discovery

Bioneer Corporation
8-11 Munpyeongseo-ro, Daedeok-gu
Daejeon, 34302, Republic of Korea
Tel: +82-42-930-8777 (Korea: 1588-9788)
Fax: +82-42-930-8688
E-mail: sales@bioneer.com

Bioneer Inc.
1301 Marina Village PKWY, Suite 110
Alameda, CA 94501, USA
Toll Free: +1-877-264-4300
Fax: +1-510-865-0350
E-mail: orderusa@bioneerus.com

Bioneer R&D Center
Korea Bio Park BLDG #B-702
700 Daewanggang-ro, Bundang-gu, Seongnam-si
Gyeonggi-do, 13488, Republic of Korea
Tel: +82-31-628-0500
Fax: +82-31-628-0555

Bioneer Oligo Synthesis Report

Dr. Almusaib_160926

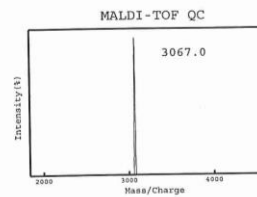
Order No.: 10013877

The mass of each oligonucleotide, indicated by the MALDI-TOF mass spectrum, may differ from the theoretical value by 0.2~0.6%

AULL 1225

AGG TGA CCG T

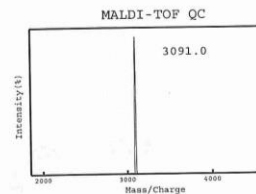
Optical Density	2.0 OD	Purification	BIO-RP
Total nmole	20.1 nmole	Modification	
Scale	0.025 umoles	GC content	60.0 %
Length	10mer	Molecular Weight	3068.0 g/mole
Tm	32.0 C	Volume for	200.6 ul
		100 pmoles/ul	



AULL 1226

CGC AGG ATG G

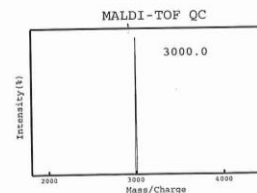
Optical Density	2.0 OD	Purification	BIO-RP
Total nmole	20.2 nmole	Modification	
Scale	0.025 umoles	GC content	70.0 %
Length	10mer	Molecular Weight	3093.0 g/mole
Tm	34.0 C	Volume for	201.8 ul
		100 pmoles/ul	



AULL 1227

GTG TGC CCC A

Optical Density	2.0 OD	Purification	BIO-RP
Total nmole	22.1 nmole	Modification	
Scale	0.025 umoles	GC content	70.0 %
Length	10mer	Molecular Weight	3003.9 g/mole
Tm	34.0 C	Volume for	220.8 ul
		100 pmoles/ul	



5-multiplex 가능과 빠른 cycling이 가능한 최고 성능의 Real-Time PCR 장비!

Exicycler™ 96 (ver.4)

- 높은 민감도와 정확도 (Ct variation < 0.3 cycle)
- 빠른 ramp rate로 실험시간 단축 (Max. 5°C/sec)
- Reference dye가 필요없어 5-multiplex PCR 가능
- 9 log 이상의 넓은 dynamic range



AccuOligo® is manufactured in clean-room under strict ISO 9001 to confirm DNase/RNase and DNA free environment

BIONEER
Innovation • Value • Discovery

Bioneer Corporation
8-11 Munpyeongseo-ro, Daedeok-gu
Daejeon, 34302, Republic of Korea
Tel: +82-42-930-8777 (Korea: 1588-9788)
Fax: +82-42-930-8688
E-mail: sales@bioneer.com

Bioneer Inc.
1301 Marina Village PKWY, Suite 110
Alameda, CA 94501, USA
Toll Free: +1-877-264-4300
Fax: +1-510-865-0350
E-mail: orderusa@bioneerusa.com

Bioneer R&D Center
Korea Bio Park BLDG #B-702
700 Daewangangyo-ro, Bundang-gu, Seongnam-si
Gyeonggi-do, 13488, Republic of Korea
Tel: +82-31-628-0500
Fax: +82-31-628-0555

Bioneer Oligo Synthesis Report

Dr. Almusai b_160926

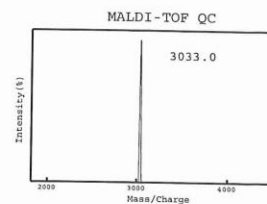
Order No.: 10013877

The mass of each oligonucleotide, indicated by the MALDI-TOF mass spectrum, may differ from the theoretical value by 0.2~0.6%.

AULL OPF- 01

ACG GAT CCT G

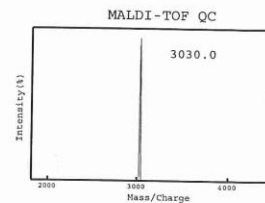
Optical Density	2.0 OD	Purification	BIO-RP
Total nmole	20.9 nmole	Modification	
Scale	0.025 umoles	GC content	60.0 %
Length	10mer	Molecular Weight	3028.0 g/mole
Tm	32.0 C	Volume for	208.8 ul
		100 pmoles/ul	



AULL OPF-02

GAG GAT CCC T

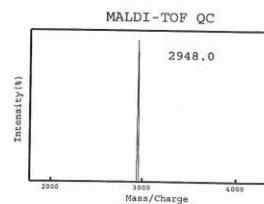
Optical Density	2.0 OD	Purification	BIO-RP
Total nmole	20.9 nmole	Modification	
Scale	0.025 umoles	GC content	60.0 %
Length	10mer	Molecular Weight	3028.0 g/mole
Tm	32.0 C	Volume for	209.0 ul
		100 pmoles/ul	



AULL OPF-03

CCT GAT CAC C

Optical Density	2.0 OD	Purification	BIO-RP
Total nmole	22.7 nmole	Modification	
Scale	0.025 umoles	GC content	60.0 %
Length	10mer	Molecular Weight	2947.9 g/mole
Tm	32.0 C	Volume for	227.0 ul
		100 pmoles/ul	



5-multiplex 기능과 빠른 cycling이 가능한 최고 성능의 Real-Time PCR 장비!

Exicycler™ 96 (ver.4)

- 높은 민감도와 정확도 (Ct variation < 0.3 cycle)
- 빠른 ramp rate로 실험시간 단축 (Max. 5°C/sec)
- Reference dye가 필요없이 5-multiplex PCR 가능
- 9 log 이상의 넓은 dynamic range



AccuOligo® is manufactured in clean-room under strict ISO 9001 to confirm DNase/RNase and DNA free environment

BIONEER
Innovation • Value • Discovery

Bioneer Corporation
8-11 Munpyeongseo-ro, Daedeok-gu
Daejeon, 34502, Republic of Korea
Tel: +82-42-930-8777 (Korea: 1588-9788)
Fax: +82-42-930-8688
E-mail: sales@bioneer.com

Bioneer Inc.
1301 Marina Village PKWY, Suite 110
Alameda, CA 94501, USA
Toll Free: +1-877-264-4300
Fax: +1-510-865-0350
E-mail: orderusa@bioneer.com

Bioneer R&D Center
Korea Bio Park BLDG #B-702
700 Daewangangyo-ro, Bundang-gu, Seongnam-si
Gyeonggi-do, 13488, Republic of Korea
Tel: +82-31-628-0500
Fax: +82-31-628-0555

Bioneer Oligo Synthesis Report

Dr. Almusai b _ 160926

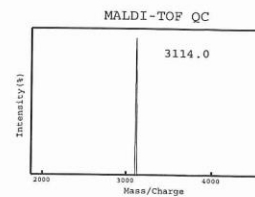
Order No.: 10013877

The mass of each oligonucleotide, indicated by the MALDI-TOF mass spectrum, may differ from the theoretical value by 0.2~0.6%

AULL OPF-04

GGT GAT CAG G

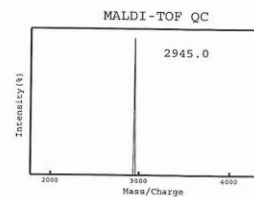
Optical Density	2.0 OD	Purification	BIO-RP
Total nmole	19.5 nmole	Modification	
Scale	0.025 umoles	GC content	60.0 %
Length	10mer	Molecular Weight	3108.0 g/mole
Tm	32.0 C	Volume for 100 pmoles/ul	195.1 ul



AULL OPF-07

CCG ATA TCC C

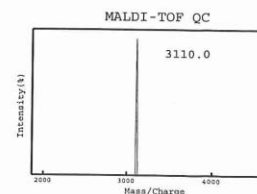
Optical Density	2.0 OD	Purification	BIO-RP
Total nmole	22.1 nmole	Modification	
Scale	0.025 umoles	GC content	60.0 %
Length	10mer	Molecular Weight	2947.9 g/mole
Tm	32.0 C	Volume for 100 pmoles/ul	221.5 ul



AULL OPF-08

GGG ATA TCG G

Optical Density	2.0 OD	Purification	BIO-RP
Total nmole	19.4 nmole	Modification	
Scale	0.025 umoles	GC content	60.0 %
Length	10mer	Molecular Weight	3108.0 g/mole
Tm	32.0 C	Volume for 100 pmoles/ul	194.0 ul



5-multiplex 기능과 빠른 cycling이 가능한 최고 성능의 Real-Time PCR 장비!

Exicycler™ 96 (ver.4)

- 높은 민감도와 정확도 (Ct variation < 0.3 cycle)
- 빠른 ramp rate로 실험시간 단축 (Max. 5°C/sec)
- Reference dye가 필요없이 5-multiplex PCR 가능
- 9 log 이상의 넓은 dynamic range



AccuOligo® is manufactured in clean-room under strict ISO 9001 to confirm DNase/RNase and DNA free environment

BIONEER
Innovation • Value • Discovery

Bioneer Corporation
8-11 Munpyeongseo-ro, Daedeok-gu
Daejeon, 34302, Republic of Korea
Tel: +82-42-930-8777 (Korea: 1588-9788)
Fax: +82-42-930-8688
E-mail: sales@bioneer.com

Bioneer Inc.
1301 Marina Village PKWY, Suite 110
Alameda, CA 94501, USA
Toll Free: +1-877-364-4300
Fax: +1-510-865-0350
E-mail: orderusa@bioneerus.com

Bioneer R&D Center
Korea Bio Park BLDG #B-702
700 Daewangpangyo-ro, Bundang-gu, Seongnam-si
Gyeonggi-do, 13488, Republic of Korea
Tel: +82-31-628-0500
Fax: +82-31-628-0555

Bioneer Oligo Synthesis Report

Dr. Almusai b_160926

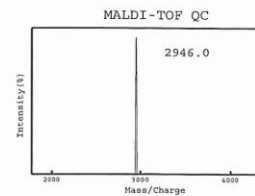
Order No.: 10013877

The mass of each oligonucleotide, indicated by the MALDI-TOF mass spectrum, may differ from the theoretical value by 0.2~0.6%

AULL OPF-09

CCA AGC TTC C

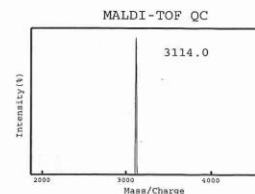
Optical Density	2.0 OD	Purification	BIO-RP
Total nmole	23.1 nmole	Modification	
Scale	0.025 umoles	GC content	60.0 %
Length	10mer	Molecular Weight	2947.9 g/mole
Tm	32.0 C	Volume for 100 pmoles/ul	230.7 ul



AULL OPF-10

GGA AGC TTG C

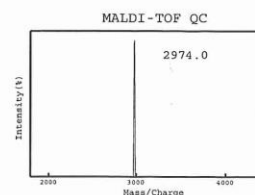
Optical Density	2.0 OD	Purification	BIO-RP
Total nmole	20.1 nmole	Modification	
Scale	0.025 umoles	GC content	60.0 %
Length	10mer	Molecular Weight	3108.0 g/mole
Tm	32.0 C	Volume for 100 pmoles/ul	201.4 ul



AULL OPF-11

TTG GTA CCC C

Optical Density	2.0 OD	Purification	BIO-RP
Total nmole	22.8 nmole	Modification	
Scale	0.025 umoles	GC content	60.0 %
Length	10mer	Molecular Weight	2978.9 g/mole
Tm	32.0 C	Volume for 100 pmoles/ul	227.8 ul



5-multiplex 가능과 빠른 cycling이 가능한 최고 성능의 Real-Time PCR 장비!

Exicycler™ 96 (ver.4)

- 높은 민감도와 정확도 (Ct variation < 0.3 cycle)
- 빠른 ramp rate로 실험시간 단축 (Max. 5°C/sec)
- Reference dye가 필요없어 5-multiplex PCR 가능
- 9 log 이상의 넓은 dynamic range



AccuOligo® is manufactured in clean-room under strict ISO 9001 to confirm DNase/RNase and DNA free environment

BIONEER
Innovation • Value • Discovery

Bioneer Corporation
8-11 Munpyeongseo-ro, Daedeok-gu
Daejeon, 34302, Republic of Korea
Tel: +82-42-930-8777 (Korea: 1588-9788)
Fax: +82-42-930-8688
Email: sales@bioneer.com

Bioneer Inc.
1301 Marina Village PKWY, Suite 110
Alameda, CA 94501, USA
Toll Free: +1-877-264-4300
Fax: +1-510-865-0350
Email: ordersusa@bioneerus.com

Bioneer R&D Center
Korea Bio Park BLDG #B-702
700 Daewangangyo-ro, Bundang-gu, Seongnam-si
Gyeonggi-do, 13488, Republic of Korea
Tel: +82-31-628-0500
Fax: +82-31-628-0555

Bioneer Oligo Synthesis Report

Dr. Almusai b_160926

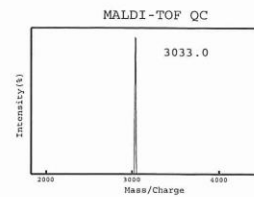
Order No.: 10013877

The mass of each oligonucleotide, indicated by the MALDI-TOF mass spectrum, may differ from the theoretical value by 0.2~0.6%

AULL OPF-12

ACG GTA CCA G

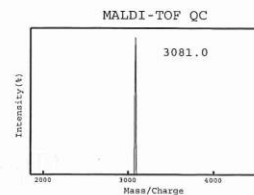
Optical Density	2.0 OD	Purification	BIO-RP
Total nmole	19.7 nmole	Modification	
Scale	0.025 umoles	GC content	60.0 %
Length	10mer	Molecular Weight	3037.0 g/mole
Tm	32.0 C	Volume for 100 pmoles/ul	197.0 ul



AULL OPF-13

GGC TGC AGA A

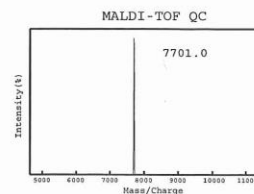
Optical Density	2.0 OD	Purification	BIO-RP
Total nmole	19.8 nmole	Modification	
Scale	0.025 umoles	GC content	60.0 %
Length	10mer	Molecular Weight	3077.0 g/mole
Tm	32.0 C	Volume for 100 pmoles/ul	198.0 ul



AULL VRZAG62 F

GGT GAA ATG GGC ACC GAA CAC ACG C

Optical Density	3.0 OD	Purification	BIO-RP
Total nmole	12.2 nmole	Modification	
Scale	0.025 umoles	GC content	60.0 %
Length	25mer	Molecular Weight	7709.9 g/mole
Tm	68.0 C	Volume for 100 pmoles/ul	121.5 ul



5-multiplex 가능과 빠른 cycling이 가능한 최고 성능의 Real-Time PCR 장비!

Exicycler™ 96 (ver.4)

- 높은 민감도와 정확도 (Ct variation < 0.3 cycle)
- 빠른 ramp rate로 실험시간 단축 (Max. 5°C/sec)
- Reference dye가 필요없어 5-multiplex PCR 가능
- 9 log 이상의 넓은 dynamic range



AccuOligo® is manufactured in clean-room under strict ISO 9001 to confirm DNase/RNase and DNA free environment

BIONEER
Innovation • Value • Discovery

Bioneer Corporation
8-11 Munpyeongseo-ro, Daedeok-gu
Daejeon, 34502, Republic of Korea
Tel: +82-42-930-8777 (Korea: 1588-9788)
Fax: +82-42-930-8688
E-mail: sales@bioneer.com

Bioneer Inc.
1301 Marina Village PKWY, Suite 110
Alameda, CA 94501, USA
Toll Free: +1-877-364-4300
Fax: +1-510-865-0350
E-mail: orderusa@bioneer.com

Bioneer R&D Center
Korea Bio Park BLDG #B-702
700 Daewangpangyo-ro, Bundang-gu, Seongnam-si
Gyeonggi-do, 13488, Republic of Korea
Tel: +82-31-628-6500
Fax: +82-31-628-6555

Bioneer Oligo Synthesis Report

Dr. Almusai b_160926

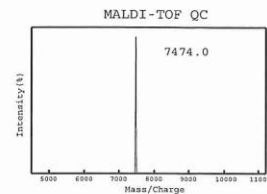
Order No.: 10013877

The mass of each oligonucleotide, indicated by the MALDI-TOF mass spectrum, may differ from the theoretical value by 0.2~0.6%

AULL VRZAG62 R

CCA TGT CTC TCC TCA GCT TCT CAG C

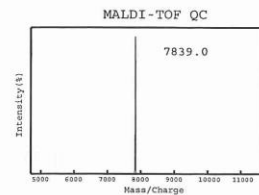
Optical Density	3.0 OD	Purification	BIO-RP
Total nmole	14.1 nmole	Modification	
Scale	0.025 umoles	GC content	56.0 %
Length	25mer	Molecular Weight	7479.7 g/mole
Tm	63.6 C	Volume for 100 pmoles/ul	140.9 ul



AULL VRZAG79 F

AGA TTG TGG AGG AGG GAA CAA ACC G

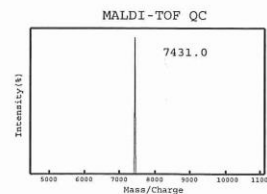
Optical Density	3.0 OD	Purification	BIO-RP
Total nmole	11.4 nmole	Modification	
Scale	0.025 umoles	GC content	52.0 %
Length	25mer	Molecular Weight	7828.9 g/mole
Tm	63.7 C	Volume for 100 pmoles/ul	114.0 ul



AULL VRZAG79 R

TGC CCC CAT TTT CAA ACT CCC TTC C

Optical Density	3.0 OD	Purification	BIO-RP
Total nmole	14.2 nmole	Modification	
Scale	0.025 umoles	GC content	52.0 %
Length	25mer	Molecular Weight	7423.7 g/mole
Tm	64.5 C	Volume for 100 pmoles/ul	142.3 ul



5-multiplex 기능과 빠른 cycling이 가능한 최고 성능의 Real-Time PCR 장비!

Exicycler™ 96 (ver.4)

- 높은 민감도와 정확도 (Ct variation < 0.3 cycle)
- 빠른 ramp rate로 실험시간 단축 (Max. 5°C/sec)
- Reference dye가 필요없어 5-multiplex PCR 가능
- 9 log 이상의 넓은 dynamic range



AccuOligo® is manufactured in clean-room under strict ISO 9001 to confirm DNase/RNase and DNA free environment

BIONEER
innovation • Value • Discovery

Bioneer Corporation
8-11 Munpyeongseo-ro, Daedeok-gu
Daejeon, 34302, Republic of Korea
Tel: +82-42-930-8777 (Korea: 1588-9788)
Fax: +82-42-930-8688
E-mail: sales@bioneer.com

Bioneer Inc.
1301 Marina Village PKWY, Suite 110
Alameda, CA 94501, USA
Toll Free: +1-877-264-4300
Fax: +1-510-865-0350
E-mail: orderusa@bioneer.com

Bioneer R&D Center
Korea Bio Park BLDG #B-702
700 Daewangpangyo-ro, Bundang-gu, Seongnam-si
Gyeonggi-do 13488, Republic of Korea
Tel: +82-31-628-0500
Fax: +82-31-628-0555

Bioneer Oligo Synthesis Report

Dr. Almusai b_160926

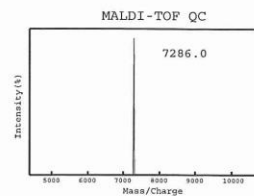
Order No.: 10013877

The mass of each oligonucleotide, indicated by the MALDI-TOF mass spectrum, may differ from the theoretical value by 0.2~0.6%.

AULL VVS4 F

CCA TCA GTG ATA AAA CCT AAT GCC

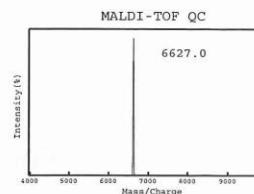
Optical Density	3.0 OD	Purification	BIO-RP
Total nmole	12.7 nmole	Modification	
Scale	0.025 umoles	GC content	41.7 %
Length	24mer	Molecular Weight	7289.6 g/mole
Tm	56.9 C	Volume for	127.2 ul
		100 pmoles/ul	



AULL VVS4 R

CCC ACC TTG CCC TTA GAT GTT A

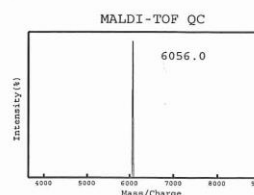
Optical Density	3.0 OD	Purification	BIO-RP
Total nmole	15.1 nmole	Modification	
Scale	0.025 umoles	GC content	50.0 %
Length	22mer	Molecular Weight	6621.2 g/mole
Tm	58.8 C	Volume for	151.4 ul
		100 pmoles/ul	



AULL VVMD5 F

CTA GAG CTA CGC CAA TCC AA

Optical Density	2.0 OD	Purification	BIO-RP
Total nmole	10.3 nmole	Modification	
Scale	0.025 umoles	GC content	50.0 %
Length	20mer	Molecular Weight	6054.9 g/mole
Tm	56.1 C	Volume for	102.7 ul
		100 pmoles/ul	



5-multiplex 가능과 빠른 cycling이 가능한 최고 성능의 Real-Time PCR 장비!

Exicycler™ 96 (ver.4)

- 높은 민감도와 정확도 (Ct variation < 0.3 cycle)
- 빠른 ramp rate로 실험시간 단축 (Max. 5°C/sec)
- Reference dye가 필요없어 5-multiplex PCR 가능
- 9 log 이상의 넓은 dynamic range



AccuOligo® is manufactured in clean-room under strict ISO 9001 to confirm DNase/RNase and DNA free environment

BIONEER
Innovation • Value • Discovery

Bioneer Corporation
8-111 Munpyeongseo-ro, Daedeok-gu
Daejeon, 34302, Republic of Korea
Tel: +82-42-930-8777 (Korea: 1588-9788)
Fax: +82-42-930-8688
E-mail: sales@bioneer.com

Bioneer Inc.
1301 Marina Village PKWY, Suite 110
Alameda, CA 94501, USA
Toll Free: +1-877-264-4300
Fax: +1-510-865-0350
E-mail: orderusa@bioneer.com

Bioneer R&D Center
Korea Bio Park BLDG #B-702
700 Daewangangyo-ro, Bundang-gu, Seongnam-si
Gyeonggi-do, 13488, Republic of Korea
Tel: +82-31-628-0550
Fax: +82-31-628-0555

Bioneer Oligo Synthesis Report

Dr. Almusai b_160926

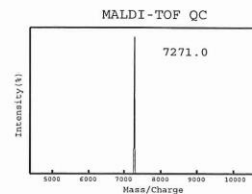
Order No.: 10013877

The mass of each oligonucleotide, indicated by the MALDI-TOF mass spectrum, may differ from the theoretical value by 0.2~0.6%.

AULL VVMD5 R

TAT ACC AAA AAT CAT ATT CCT AAA

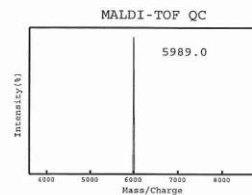
Optical Density	3.0 OD	Purification	BIO-RP
Total nmole	12.1 nmole	Modification	
Scale	0.025 umoles	GC content	20.8 %
Length	24mer	Molecular Weight	7271.7 g/mole
Tm	48.8 C	Volume for 100 pmoles/ul	121.1 ul



AULL VVMD6 F

ATC TCT AAC CCT AAA ACC AT

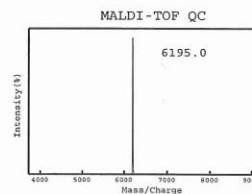
Optical Density	2.0 OD	Purification	BIO-RP
Total nmole	10.4 nmole	Modification	
Scale	0.025 umoles	GC content	35.0 %
Length	20mer	Molecular Weight	5988.9 g/mole
Tm	49.7 C	Volume for 100 pmoles/ul	103.6 ul



AULL VVMD6 R

CTG TGC TAA GAC GAA GAA GA

Optical Density	2.0 OD	Purification	BIO-RP
Total nmole	9.6 nmole	Modification	
Scale	0.025 umoles	GC content	45.0 %
Length	20mer	Molecular Weight	6198.9 g/mole
Tm	53.9 C	Volume for 100 pmoles/ul	95.7 ul



5-multiplex 기능과 빠른 cycling이 가능한 최고 성능의 Real-Time PCR 장비!

Exicycler™ 96 (ver.4)

- 높은 민감도와 정확도 (Ct variation < 0.3 cycle)
- 빠른 ramp rate로 실험시간 단축 (Max. 5°C/sec)
- Reference dye가 필요없어 5-multiplex PCR 가능
- 9 log 이상의 넓은 dynamic range



AccuOligo® is manufactured in clean-room under strict ISO 9001 to confirm DNase/RNase and DNA free environment

BIONEER
Innovation • Value • Discovery

Bioneer Corporation
8-11 Munpyeongseo-ro, Daedeok-gu
Daejeon, 34302, Republic of Korea
Tel: +82-42-930-8777 (Korea: 1588-9788)
Fax: +82-42-930-8688
E-mail: sales@bioneer.com

Bioneer Inc.
1301 Marina Village PKWY, Suite 110
Alameda, CA 94501, USA
Toll Free: +1-877-264-4300
Fax: +1-510-865-0350
E-mail: orderusa@bioneer.com

Bioneer R&D Center
Korea Bio Park BLDG #B-702
700 Daewangpangyo-ro, Bundang-gu, Seongnam-si
Gyeonggi-do, 13488, Republic of Korea
Tel: +82-31-628-0500
Fax: +82-31-628-0555

Bioneer Oligo Synthesis Report

Dr. Almusai b_160926

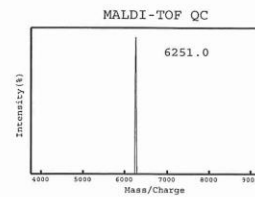
Order No.: 10013877

The mass of each oligonucleotide, indicated by the MALDI-TOF mass spectrum, may differ from the theoretical value by 0.2~0.6%

AULL VVMD7 F

AGA GTT GCG GAG AAC AGG AT

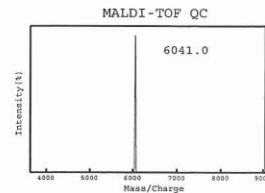
Optical Density	2.0 OD	Purification	BIO-RP
Total nmole	9.5 nmole	Modification	
Scale	0.025 umoles	GC content	50.0 %
Length	20mer	Molecular Weight	6255.0 g/mole
Tm	57.7 C	Volume for 100 pmoles/ul	94.6 ul



AULL VVMD7 R

CGA ACC TTC ACA CGC TTG AT

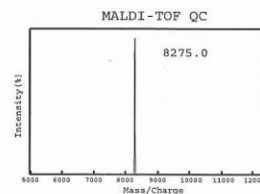
Optical Density	2.0 OD	Purification	BIO-RP
Total nmole	10.9 nmole	Modification	
Scale	0.025 umoles	GC content	50.0 %
Length	20mer	Molecular Weight	6036.9 g/mole
Tm	57.9 C	Volume for 100 pmoles/ul	109.1 ul



AULL VVMD27 F

GTA CCA GAT CTG AAT ACA TCC GTA AGT

Optical Density	3.0 OD	Purification	BIO-RP
Total nmole	11.1 nmole	Modification	
Scale	0.025 umoles	GC content	40.7 %
Length	27mer	Molecular Weight	8267.3 g/mole
Tm	59.3 C	Volume for 100 pmoles/ul	110.6 ul



5-multiplex 기능과 빠른 cycling이 가능한 최고 성능의 Real-Time PCR 장비!

Exicycler™ 96 (ver.4)

- 높은 민감도와 정확도 (Ct variation < 0.3 cycle)
- 빠른 ramp rate로 실험시간 단축 (Max. 5°C/sec)
- Reference dye가 필요없이 5-multiplex PCR 가능
- 9 log 이상의 넓은 dynamic range



AccuOligo® is manufactured in clean-room under strict ISO 9001 to confirm DNase/RNase and DNA free environment

BIONEER
Innovation • Value • Discovery

Bioneer Corporation
8-11 Munpyeongseo-ro, Daedeok-gu
Daejeon, 34302, Republic of Korea
Tel: +82-42-930-8777 (Korea: 1588-9788)
Fax: +82-42-930-8688
E-mail: sales@bioneer.com

Bioneer Inc.
1301 Marina Village PKWY, Suite 110
Alameda, CA 94501, USA
Toll Free: +1-877-264-4300
Fax: +1-510-865-0350
E-mail: orderusa@bioneer.com

Bioneer R&D Center
Korea Bio Park BLDG #B-702
700 Daewangpangyo-ro, Bundang-gu, Seongnam-si
Gyeonggi-do, 13488, Republic of Korea
Tel: +82-31-628-6500
Fax: +82-31-628-6555

Bioneer Oligo Synthesis Report

Dr. Almusai b _ 160926

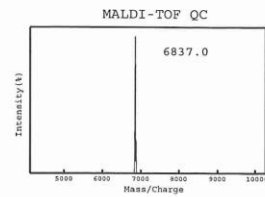
Order No.: 10013877

The mass of each oligonucleotide, indicated by the MALDI-TOF mass spectrum, may differ from the theoretical value by 0.2~0.6%.

AULL VVMD27 R

ACG GGT ATA GAG CAA ACG GTG T

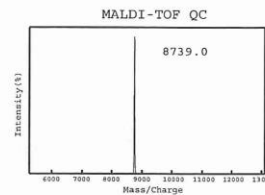
Optical Density	3.0 OD	Purification	BIO-RP
Total nmole	13.2 nmole	Modification	
Scale	0.025 umoles	GC content	50.0 %
Length	22mer	Molecular Weight	6848.3 g/mole
Tm	60.7 C	Volume for	131.6 ul
		100 pmoles/ul	



AULL VVMD28 F

AAC AAT TCA ATG AAA AGA GAG AGA GAG A

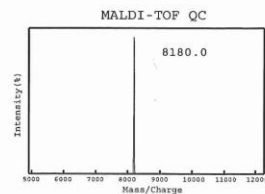
Optical Density	3.0 OD	Purification	BIO-RP
Total nmole	9.5 nmole	Modification	
Scale	0.025 umoles	GC content	32.1 %
Length	28mer	Molecular Weight	8744.6 g/mole
Tm	58.1 C	Volume for	95.2 ul
		100 pmoles/ul	



AULL VVMD28 R

TCA TCA ATT TCG TAT CTC TAT TTG CTG

Optical Density	3.0 OD	Purification	BIO-RP
Total nmole	12.2 nmole	Modification	
Scale	0.025 umoles	GC content	33.3 %
Length	27mer	Molecular Weight	8181.2 g/mole
Tm	57.2 C	Volume for	121.8 ul
		100 pmoles/ul	



5-multiplex 기능과 빠른 cycling이 가능한 최고 성능의 Real-Time PCR 장비!

Exicycler™ 96 (ver.4)

- 높은 민감도와 정확도 (Ct variation < 0.3 cycle)
- 빠른 ramp rate로 실험시간 단축 (Max. 5°C/sec)
- Reference dye가 필요없어 5-multiplex PCR 가능
- 9 log 이상의 넓은 dynamic range



AccuOligo® is manufactured in clean-room under strict ISO 9001 to confirm DNase/RNase and DNA free environment

BIONEER
Innovation • Value • Discovery

Bioneer Corporation
8-11 Munpyeong-ro, Daedeok-gu
Daejeon, 34302, Republic of Korea
Tel: +82-42-930-8777 (Korea: 1588-9788)
Fax: +82-42-930-8688
E-mail: sales@bioneer.com

Bioneer Inc.
1301 Marina Village PKWY, Suite 110
Alameda, CA 94501, USA
Toll Free: +1-877-264-4300
Fax: +1-510-865-0350
E-mail: orderusa@bioneer.com

Bioneer R&D Center
Korea Bio Park BLDG #B-702
700 Daewangang-ro, Bundang-gu, Seongnam-si
Gyeonggi-do, 13488, Republic of Korea
Tel: +82-31-628-0500
Fax: +82-31-628-0555

Bioneer Oligo Synthesis Report

Dr. Almusai b_160926

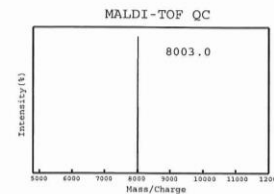
Order No.: 10013877

The mass of each oligonucleotide, indicated by the MALDI-TOF mass spectrum, may differ from the theoretical value by 0.2~0.6%

AULL VVMD31 F

CAG TGG TTT TTC TTA AAG TTT CAA GG

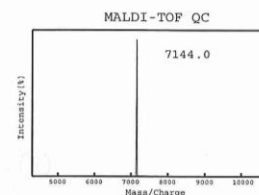
Optical Density	3.0 OD	Purification	BIO-RP
Total nmole	12.0 nmole	Modification	
Scale	0.025 umoles	GC content	34.6 %
Length	26mer	Molecular Weight	8006.1 g/mole
Tm	56.8 C	Volume for	120.0 ul
		100 pmoles/ul	



AULL VVMD31 R

CTC TGT GAA AGA GGA AGA GAC GC

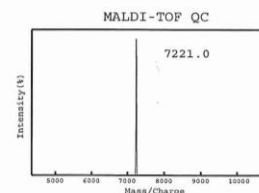
Optical Density	3.0 OD	Purification	BIO-RP
Total nmole	12.8 nmole	Modification	
Scale	0.025 umoles	GC content	52.2 %
Length	23mer	Molecular Weight	7146.5 g/mole
Tm	60.0 C	Volume for	127.6 ul
		100 pmoles/ul	



AULL VVMD32 F

TAT GAT TTT TTA GGG GGG TGA GG

Optical Density	3.0 OD	Purification	BIO-RP
Total nmole	13.1 nmole	Modification	
Scale	0.025 umoles	GC content	43.5 %
Length	23mer	Molecular Weight	7220.6 g/mole
Tm	56.9 C	Volume for	130.6 ul
		100 pmoles/ul	



5-multiplex 가능과 빠른 cycling이 가능한 최고 성능의 Real-Time PCR 장비!

Exicycler™ 96 (ver.4)

- 높은 민감도와 정확도 (Ct variation < 0.3 cycle)
- 빠른 ramp rate로 실험시간 단축 (Max. 5°C/sec)
- Reference dye가 필요없어 5-multiplex PCR 가능
- 9 log 이상의 넓은 dynamic range



AccuOligo® is manufactured in clean-room under strict ISO 9001 to confirm DNase/RNase and DNA free environment

BIONEER
Innovation • Value • Discovery

Bioneer Corporation
8-11 Munpyeongseo-ro, Daedeok-gu
Daejeon, 34302, Republic of Korea
Tel: +82-42-930-8777 (Korea: 1588-9788)
Fax: +82-42-930-8688
E-mail: sales@bioneer.com

Bioneer Inc.
1301 Marina Village PKWY, Suite 110
Alameda, CA 94501, USA
Toll Free: +1-877-264-4300
Fax: +1-510-865-0350
E-mail: orderusa@bioneer.com

Bioneer R&D Center
Korea Bio Park BLDG #B-702
700 Daewangangyo-ro, Bundang-gu, Seongnam-si
Gyeonggi-do, 13488, Republic of Korea
Tel: +82-31-628-0500
Fax: +82-31-628-0555

Bioneer Oligo Synthesis Report

Dr. Almusai b _ 160926

Order No.: 10013877

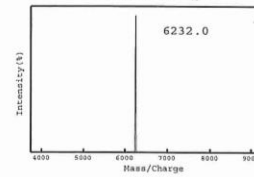
The mass of each oligonucleotide, indicated by the MALDI-TOF mass spectrum, may differ from the theoretical value by 0.2~0.6%

AULL VVMD32 R

GGA AAG ATG GGA TGA CTC GC

Optical Density	2.0 OD	Purification	BIO-RP
Total nmole	9.8 nmole	Modification	
Scale	0.025 umoles	GC content	55.0 %
Length	20mer	Molecular Weight	6230.9 g/mole
Tm	57.5 C	Volume for 100 pmoles/ul	98.3 ul

MALDI-TOF QC



ملحق (2) دليل مكونات خليط التفاعل الرئيسي للـ PCR

BIONEER
Innovation • Value • Discovery

AccuPower® PCR PreMix

Bioneer Corporation
8-11, Munpyeongseo-ro
Daedeok-gu, Daejeon 306-220
Republic of Korea
Tel: (Korea) 1588-9788
(International) + 82-42-930-8777
Fax: + 82-42-930-8600
E-mail: sales@bioneer.com

Bioneer, Inc.
1000 Atlantic Avenue
Alameda, CA 94501 USA
Toll free: + 1-877-264-4300
Fax: + 1-510-865-0350
E-mail: orderusa@bioneer.com

Bioneer Trade(Shanghai) Co., Ltd
806 Room, Building 2, No.500 Jiansun
Road, Zhoupu Town, Pudong New District,
Shanghai, China
Tel: + 86-21-5080-0959/1191/1651
Fax: + 86-21-5080-1620
E-mail: salescn@bioneer.com

Bioneer R&D Center
B-702, Korea Bio Park Bldg, 700,
Daejeong-gangseo-ro, Bundang-gu,
Seongnam-si, Gyeonggi-do, 463-400,
Republic of Korea
Tel: + 82-31-628-0500
Fax: + 82-31-628-0555

Order
E-mail: order@bioneer.co.kr
URL: www.bioneer.com

AccuPower® PCR PreMix is a new, powerful, and ready-to-use PCR reagent optimized for more accurate PCR amplifications.

Advantages

Speed

Substantial reduction in PCR setup time.

Stability

AccuPower® PCR PreMix is the powerful technology for convenient and easy to perform DNA amplification. It contains DNA polymerase, dNTPs, a tracking dye and reaction buffer in a premixed format, freeze-dried into a pellet. The patented chemical stabilizer of this product enables to maintain the activity of pre mixture for over a month even when stored at room temperature (25°C), over 2 years in the freezer.

Reproducibility and Yield

Batch manufacturing under strict ISO 9001 quality control conditions guarantees reproducibility. Minimal handling during reaction set up provides improved accuracy.

Simplicity

Each product line contains an application specific enzyme in an easy to re-suspended, lyophilized premix of dNTPs, reaction buffer, a tracking dye, and a stabilizer. The premix is ready to use, thus offering virtually no reaction set up time.

Contents

Component	20 µl reaction	50 µl reaction
Top DNA polymerase	1 U	2.5 U
Each: dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	250 µM	250 µM
Tris-HCl (pH 9.0)	10 mM	10 mM
KCl	30 mM	30 mM
MgCl ₂	1.5 mM	1.5 mM
Stabilizer and tracking dye		

Experimental Protocol

- Add template DNA and primers to AccuPower® PCR tube.

Concentration of template DNA and primer

	20 µl reaction	50 µl reaction
Template DNA	5 - 50 ng	10 - 100 ng
Primer	5 - 10 pmole	10 - 20 pmole

- Add distilled water to AccuPower® PCR tubes to a total volume of 20 µl or 50 µl.
- Dissolve the lyophilized blue pellet by vortexing, and briefly spin down.
- Add mineral oil. (This step is unnecessary when using a thermal cycler with top heating.)
- Perform PCR of samples.
- Load samples on agarose gel without adding a loading-dye mixture, and perform electrophoresis.

Notice to Purchaser

This enzyme is specifically optimized for increasing base incorporation rate by inactivating 5'→3' exonuclease activity. Therefore, this is not recommended to use for Real Time PCR using Taqman® probe.

Trademark

AccuPower is a trademark of Bioneer Corporation.

Ordering Information

Tube type	Reaction	Cat.No.	Description
0.2ml Tube	20 ul	K-2012	0.2 ml thin-wall 8-strip tubes with attached cap / 96 tubes
		K-2016	0.2 ml thin-wall 8-strip tubes with attached cap / 480 tubes
	50 ul	K-2013	0.2 ml thin-wall 8-strip tubes with attached cap / 96 tubes
		K-2017	0.2 ml thin-wall 8-strip tubes with attached cap / 480 tubes
0.5ml Tube	50 ul	K-2011	0.5 ml thin-wall tubes with attached cap / 100 tubes
96-well	10 ul	K-2260-1	thin-wall 96-well flat plate
		K-2260-2	thin-wall 96-well full-skirted plate
		K-2260-3	thin-wall 96-well semi-skirted plate
	20 ul	K-2260-4	thin-wall 96-well flat plate
		K-2260-5	thin-wall 96-well full-skirted plate
		K-2260-6	thin-wall 96-well semi-skirted plate
384-well	5 ul	K-2080-1	thin-wall 384-well full-skirted plate
	10 ul	K-2080-2	thin-wall 384-well full-skirted plate
	20 ul	K-2080-3	thin-wall 384-well full-skirted plate
Master Mix		K-2018	1 ml of 2 X Master mix solution
		K-2018-1	10 ml of 2 X Master mix solution

A complete product list appears on our web site at www.bioneer.com.

ملحق (3) دليل عدة استخلاص ألدنا Genomic DNA Mini Kit (plant)

Genomic DNA Mini Kit (Plant)

For research use only

Sample: up to 100 mg of fresh plant tissue or up to 25 mg of dry plant tissue

Yield: 3-5 µg (100 mg *Arabidopsis thaliana* leaf), 20-25 µg (100 mg *Nicotiana tabacum* leaf)

Format: spin column

Time: within 30 minutes

Elution volume: 30-200 µl

Storage: dry at room temperature (15-25°C) for up to 1 year without showing any reduction in performance

Geneaid



Introduction

The Genomic DNA Mini Kit (Plant) provides a quick and easy method for purifying total DNA (including genomic DNA, mitochondrial DNA and chloroplast DNA) from various plant species. Homogenized samples are treated with RNase A then filtered to remove cell debris and salt precipitates. In the presence of the binding buffer, coupled with chaotropic salt, genomic DNA in the lysate binds to the glass fiber matrix of the spin column. Contaminants are removed using a Wash Buffer (containing ethanol) and the purified genomic DNA is eluted by a low salt Elution Buffer, TE or water. The procedure does not require DNA phenol extraction or alcohol precipitation, and can be completed in less than 30 minutes. The purified genomic DNA is ready for use in PCR, Real-time PCR, Southern Blotting and RFLP.

Quality Control

The quality of the Genomic DNA Mini Kit (Plant) is tested on a lot-to-lot basis according to Geneaid's ISO-certified quality management system. Genomic DNA is isolated from 50 mg young leaf samples. More than 10 µg of genomic DNA is quantified with a spectrophotometer and analyzed by electrophoresis.

Kit Contents

Component	GP004	GP100
GP1 Buffer	2 ml	50 ml
GPX1 Buffer	2 ml	50 ml
GP2 Buffer	1 ml	15 ml
GP3 Buffer* (Add Isopropanol)	1.5 ml (3 ml)	30 ml (60 ml)
W1 Buffer	2 ml	45 ml
Wash Buffer** (Add Ethanol)	1 ml (4 ml)	25 ml (100 ml)
Elution Buffer	1 ml	30 ml
RNase A (10 mg/ml)	25 µl	550 µl
Filter Columns	4	100
GD Columns	4	100
2 ml Collection Tubes	8	200

Order Information

Product	Package Size	Catalogue Number
Genomic DNA Mini Kit (Blood/Cultured Cell)	100/300 preps	GB100/300
Genomic DNA Maxi Kit (Blood/Cultured Cell)	10/25 preps	GDM10/25
Genomic DNA Mini Kit (Tissue)	50/100/300 preps	GT350/100/300
gSYNC™ DNA Extraction Kit	50/100/300 preps	GS050/100/300
Genomic DNA Mini Kit (Plant)	100 preps	GP100
Genomic DNA Mini Kit (Plant)	10/25 preps	GP100/25
GENEzol™ DNA Reagent Plant	100/200 rxns	GR100/200
Presto™ Mini gDNA Yeast Kit	100/300 preps	GBY100/300
Presto™ Mini gDNA Bacteria Kit	100/300 preps	GBB100/101/300/301
GENEzol™ Micro DNA Extraction Kit	100/300 preps	GM100/300
Presto™ Buccal Swab gDNA Extraction Kit	100/300 preps	GSK100/300
Presto™ 96 Well Blood gDNA Extraction Kit	4/10 x 96 preps	96GBP04/10
Presto™ 96 Well Plant gDNA Extraction Kit	4/10 x 96 preps	96GPP04/10

*Add isopropanol (see the bottle label for volume) to the GP3 Buffer immediately prior to initial use

**Add absolute ethanol (see the bottle label for volume) to the Wash Buffer prior to initial use

Caution

The components contain irritants. During operation, always wear a lab coat, disposable gloves, and protective goggles.

Genomic DNA Mini Kit (Plant) Functional Test Data

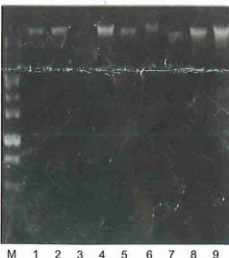


Figure 1. Genomic DNA was extracted from a variety of 100 mg plant species using the Genomic DNA Mini Kit (Plant). A 3 µl aliquot from each 200 µl eluate was analyzed by electrophoresis on a 1% agarose gel.

M = Geneaid 1 Kb DNA ladder

1. *Cinnamomum camphora* (Camphor tree)
2. *Pisum sativum* (Pea sprout)
3. *Arabidopsis thaliana* (Thale cress)
4. *Oryza sativa* (Rice)
5. *Ipomoea batatas* (Sweet potato vine)
6. *Rhizoma dioscoreae* (Chinese yam)
7. *Populus tremula* (Aspen)
8. *Flammulina velutipes* (Mushroom)
9. *Oxalis corniculata* (Clover)



Genomic DNA Mini Kit (Plant) Protocol

Various plant species contain different metabolites such as polysaccharides, polyphenols, and proteins. The standard protocol uses GP1 Buffer for lysis of most common plant species. Alternatively, GPX1 Buffer is provided with the kit to ensure efficient cell lysis of plant species with high polysaccharide content.

IMPORTANT BEFORE USE

- Add isopropanol (see the bottle label for volume) to the GP3 Buffer immediately prior to initial use
- Add absolute ethanol (see the bottle label for volume) to the Wash Buffer prior to initial use
- Additional Requirements: microcentrifuge tubes, isopropanol, absolute ethanol

Step 1 Tissue Dissociation	• Cut off 50 mg (up to 100 mg) of fresh or frozen plant tissue or 10 mg (up to 25 mg) of dry sample. • Freeze the sample with liquid nitrogen. • Grind the sample to a fine powder then transfer it to a 1.5 ml microcentrifuge tube. NOTE: Some plant samples can be ground sufficiently in the absence of liquid nitrogen.
Step 2 Lysis	NOTE: Mix GP1 Buffer or GPX1 Buffer and RNase A immediately prior to use. • Add 400 µl of GP1 Buffer or GPX1 Buffer and 5 µl of RNase A into the sample tube and mix by vortex. • Incubate at 60°C for 10 minutes. During incubation, invert the tube every 5 minutes. At this time, pre-heat the required Elution Buffer (200 µl per sample) to 60°C (for Step 5 DNA Elution). • Add 100 µl of GP2 Buffer and mix by vortex then incubate on ice for 3 minutes. • Place a Filter Column in a 2 ml Collection Tube then transfer the mixture to the Filter Column. • Centrifuge for 1 minute at 1,000 x g then discard the Filter Column. • Carefully transfer the supernatant from the 2 ml collection tube to a new 1.5 ml microcentrifuge tube.
Step 3 DNA Binding	• Add a 1.5 volume of GP3 Buffer (make sure isopropanol was added) then vortex immediately for 5 seconds. E.g. Add 750 µl of GP3 Buffer to 500 µl of lysate. NOTE: If precipitate appears, break it up as much as possible with a pipette. • Place a GD Column in a 2 ml Collection Tube. • Transfer 700 µl of mixture (and any remaining precipitate) to the GD Column. • Centrifuge at 14-16,000 x g for 2 minutes. • Discard the flow-through then place the GD Column back in the 2 ml Collection Tube. • Add the remaining mixture to the GD Column then centrifuge at 14-16,000 x g for 2 minutes. • Discard the flow-through then place the GD Column back in the 2 ml Collection Tube.
Step 4 Wash	• Add 400 µl of W1 Buffer to the GD Column then centrifuge at 14-16,000 x g for 30 seconds. • Discard the flow-through then place the GD Column back in the 2 ml Collection Tube. • Add 600 µl of Wash Buffer (make sure ethanol was added) to the GD Column. • Centrifuge at 14-16,000 x g for 30 seconds. • Discard the flow-through then place the GD Column back in the 2 ml Collection Tube. • Centrifuge for 3 minutes at 14-16,000 x g to dry the column matrix. Optional Residual Pigment Removal Step If pigments remain on the column, perform this optional step. • Following Wash Buffer addition, add 400 µl of absolute ethanol to the GD Column. • Centrifuge at 14-16,000 x g for 30 seconds. • Discard the flow-through then place the GD Column back in the 2 ml Collection Tube. • Centrifuge for 3 minutes at 14-16,000 x g to dry the column matrix.
Step 5 DNA Elution	Standard elution volume is 100 µl. If less sample is to be used, reduce the elution volume (30-50 µl) to increase DNA concentration. If higher DNA yield is required, repeat the DNA Elution Step to increase DNA recovery and the total elution volume to approximately 200 µl. • Transfer the dried GD Column to a clean 1.5 ml microcentrifuge tube. • Add 100 µl of pre-heated Elution Buffer or TE to the center of the column matrix. • Let stand for 3-5 minutes to ensure the Elution Buffer or TE is completely absorbed. • Centrifuge at 14-16,000 x g for 30 seconds to elute the purified DNA.

Troubleshooting

Problem	Possible Reasons/Solution
Column Clogged	Too much sample was used • Reduce the sample volume or separate it into multiple tubes. Precipitate was formed at the DNA Binding step • Reduce the sample material. • Following GP3 Buffer addition, break up any precipitate as much as possible prior to loading GD Column.
Low Yield	Incorrect DNA Elution Step • Ensure that the Elution Buffer or TE is added to the center of the GD Column matrix and is absorbed completely. Incomplete DNA Elution • Elute twice to increase yield. Residual ethanol contamination • Following the Wash Step, dry the GD Column with additional centrifugation at 14-16,000 x g for 5 minutes or incubate at 60°C for 5 minutes.
Eluted DNA does not perform well in downstream applications	

ملحق (4) كتاب تصنيف النبات

Ministry of Higher Education & Scientific Research University of Baghdad College of Science Department of Biology		وزارة التعليم العالي و البحث العلمي جامعة بغداد - كلية العلوم قسم علوم الحياة
Ref. : Date	العدد : ٣٢ التاريخ : ١٩/٥/٢٠١٦	

م/ تصنيف عينات نباتية

الحاقا بامرکم المرقم <<< . الخاص بالطالبة كلد راج محمود
والمضمن تصنيف العينات النباتية المذكورة ادناه قد تم من قبل د. اسراء عبد الرزاق مجيد

العائلة
Vitaceae

النوع
Vitis vinifera L.


 2016/9/25

Abstract

This study is conducted in the Laboratory of Genetics of the Molecular at the college of Education for Pure Sciences/ University of Diyala to detect genetic changes and estimate the genetic distance among seven types of *Vitis vinifera* L which are: The French, *V.hissaricavassilcz*, *V.viniferavar sativa beck*, *V. Hissarica* , *V.Var sativa*, *V.vinifera*, *V.Sylvestris* and *V Berlandieri* planch. 15 primers are randomly used to investigate the performance indicators of the DNA by using Random Amplified polymorphic techniques, for the DNA series, and 10 specialized primers to investigate the DNA indicators by using Simple Sequence Repeat techniques (SSR), based on Polymerase Chain Reaction (PCR). The procedures of this study include isolating and purifying the DNA from the newest leaves of the studied types to get DNA with purity between 2-1.8. The Polymerase Chain Reaction (PCR) are carried out with the used primers to detect the differences between The doubled DNA species for each type (their numbers and their partial sizes) when moving the double results for the samples onto the agarose gel after dyeing with the epithelium of atheidium bromide . The results of the genetic analysis with RAPD indicators show clear differences in the number of doubled DNA band and their partial weights according to the used primer, so the total number for the polymorphic bands are 88 bands for all the primers , and the less number of the polymorphic band are 6 bands in the two primer (1227 , OPF-01) whereas the highest number polymorphic bands are 12 in the primer OPF-04,and the number of the primer in this study show of the unique bands for some of the models studied, which is considered as a genetic print to distinguish each item between them , so *V.Var sativa* type gives the highest number of unique bands because of the using the primer 1225 and OPF-09, these primers give two bands a with different partial weights while the V

Berlandieri planch gives the least number of unique bands that reaches a single band which has 1121 partial weight when using the primer OPF-09 and for the purpose of finding the genetic similarity and genetic relationship between the types species in the computer, and according to the SPSS statistical programme, the similar percentage between the types is 0.892-0.252, and the highest percentage of similarity is between the French *V.hissaricavassilcz* and *V.viniferavar sativa beck* types. While the results of the Dendogram, includes the first group in which it is typed onto five groups , the first type includes French *V.hissaricavassilcz* and *V.viniferavar sativa beck* as well as the *V.Sylvestris* types, whereas the second type includes, *V.vinifera* , the third one includes *V. Hissarica* ,the fourth type includes *V.Var sativa*, and the last one includes *V. Berlandieri planch* type. The results of the genetic analysis for SSR techniques, in which the primer VRZAG62 technique is used, has given one unique band with Partial weight 200 genetic predator which is originally considered as a genetic print which distinguish the *V.vinifera var sativa beck* types from other types, as well the primer VVS4 has an important role in appearing the As well as the unique band with 200 partial weight which also considered as genetic print in which distinguishes the *V. Berlandieri planch* type from the rest of the other items, while the other primers , the bands have been vanished because of the lack of a complementary sequence in the DNA studied types.

Ministry of Higher Education & Scientific
Research
Diyala University
College of Education for Pure Sciences
Biology Department



**Molecular Study some classes of *Vitis*
Culture in Diyala Province by RAPD and
SSR Markers**

A Thesis Submitted to
the Council of the College of Education for Pure Sciences, Diyala
University in Partial Fulfilment of the Requirements for the Degree of
Master in Botany

by

**Aula Rabah Mahmood
Alqaraghuli
(B.S. in Biology in 2014)**

Supervised by
Prof. Najim Abdullah Jumah(PH.D)
Assist Prof. Ammar Ahmed Sultan(PH.D)

2017 A.D

1438 A.H