دراسة الاختلافات الوراثية لأنواع نبات الداودي باستخدام مؤشرات AFLP

جَنان قاسم حسين

قسم البستنة ، كلية الزراعة ، جامعة بابل ، بابل – العراق.

المستخلص

نفذت التجربة في مختبرات التقانات الاحيائية – الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية – الجمهورية العربية السورية في صيف 2010. استخدمت تقانة تباينات أطوال القطع المتضاعفة Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) المعتمدة على تقانة PCR وبخمسة ازواج من البادئات، لايجاد البصمة الوراثية والنسبة المئوية للبعد الوراثي لخمسة انواع من نبات الداودي .*Chrysanthemum spp* (الكروية، العنكبوتية، المفتوحة، الانيمون والبنبون). تضمنت مراحل العمل عزل وتنقية DNA الاجزاء النباتية ثم الكشف عن التباينات بين القطع المتضاعفة لكل نوع بعد ترحيل العينات بجهاز الترحيل الكهربائي. بينت نتائج التحليل الوراثي بمؤشرات AFLP وبعد حساب النسبة المئوية للبعد الوراثي بين الانواع وجود تغايرات وراثية فيها، اذ بلغت اعلى نسبة مئوية للبعد الوراثي 45.1% بين النوعين بنبون والكروية ، واقلها 17.8% بين النوعين المفتوحة والكروية.

الكلمات المفتاحية: الداودي ، التنوع الوراثي ، المؤشرات الجزيئية، تقانة تباينات اطوال القطع المتضاعفة.

المقدمة

ينتمي نبات الداودي *Chrysanthemum spp.* الى العائلة المركبة compositae، وتعد الصين ومناطق جنوب شرق آسيا المواطن الأصلي لنبات الداودي، ومنها انتشرت زراعته فى كل بلاد العالم تقريباً ويحتوى جنس *Chrysanthemum* على ما يزيد عن 160 نوعاً ويتزايد عدد الأصناف التابعة للداودي بإستمرار نتيجة عمليات التربية والتحسين التي تجرى عليه ، وترجع أهمية نباتات الداودي إلى أن موعد أزهار فى فصل الخريف حيث يقام معرض زهور الخريف اذ تقل أزهار النباتات الأخرى وبالتالى يزداد الإقبال عليه، توجد الازهار فى نورات متعددة الأشكال والألوان، وتعيش الأزهار المقطوفة لفترة تتراوح بين 3-4 أسابيع فى أوانى التنسيق بالإضافة إلى ذلك تصلح بعض الأصناف للزراعة فى الأصص، كما يمكن إنتاج ازهار الكريزانثيمم على مدار السنة إذا أمكن التحكم فى طول الفترة الضوئية [8].

اهتم الباحثون في الاونة الاخيرة بدراسة التنوع الحيوي وخاصة العاملون في مجال التربية والتحسين ووجدوا غياب انواع نباتية كثيرة وبسرعة كبيرة وذلك بفعل عوامل شتى، ولمواجهة هذه التحديات عمل المجتمع الدولي أقطارا ومنظمات ومراكز دولية واقليمية على بناء البرامج والمنشآت اللازمة من اجل المحافظة على الموارد الوراثية خاصة المتعلقة بالزراعة، وقد تم البدء بعملية حفظ الاصول الوراثية سواء في الموقع In Situ ضمن الحقول والبراري والمواقع الاصلية او في بنوك الجينات Gene Banks ومن ثم الحفاظ عليها وترشيد أدارتها واستخدامها في برامج التربية المختلفة. اوجد التقدم المتسارع في علوم البايولوجيا الجزيئية العديد من الوسائل والطرق التي وظفت في دراسات وتقييم التباينات والعلاقات بين التراكيب الوراثية، فهناك العديد من التقانات الحيوية الحديثة المعتمدة على دراسته وتحليل المادة الوراثية، يتم من خلالها استعمال مؤشرات يمكن من خلالها دراسة الاختلافات على مستوى جزيئة DNA، تميزت هذه الطرق بالكفاءة العالية وبالدقة الكبيرة وبثبات النتائج، متغلبة بذلك على محددات الوسائل السابقة المعتمدة على دراسة التباينات على مستوى الصفات الشكلية والخصائص الفسيولوجية وكذلك الخصائص الزراعية [4].

تعد مؤشرات تباينات أطوال القطع المتضاعفة Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) من المؤشرات المهمة في دراسة التنوع الوراثي، تعتمد هذه التقانة على الكشف عن قطع DNA المقيدة بأنزيمات التقييد والمضاعفة بتفاعل الـ PCR، ثم تحميلها

على هلامة من البولي اكريلامايد Polyacrylamide وتشابه ه ــذه التقانــة تقانــة البصمة الوراثية DNA Fingerprinting من حيث انها تسمح بإظهار عدد كبير من التعدادت الشكلية Polymorphism [22].

تمثل الــ AFLP قطعاً من DNA متضاعفة amplified بواسطة بادئات primers خاصة بالهضم التحديدي restriction digestion لجينوم DNA النبات وبالاعتماد على أختلاف ترتيب النيوكليوتيدات تعطي هذا التقنية البصمة الوراثية لأي DNA ومن اي مصدر دونما حاجة إلى أية معرفة مسبقة عنه، وقراءة البيانات بهذه الطريقة تعتمد على مبدأ وجود او عدم وجود مواقع الجينات بدلاً من تحديد موقعها أو طولها، تتضمن الطريقة الاستعانة بأختبار الــ PCR لتضخيم القطع المحددة من الــ DNA عن طريق هضم الــ DNA بانزيمات التحديد، وربط مولفات adapters على قطع الــ DNA ثم مضاعفة تلك القطع. يمكن تضخيم معدل 75–150 قطعة fragment لكل توليفة بادئات مستخدمة في الاختبار، وبذلك يتم الحصول على معلومات واسعة جدا بحسب تعدد البادئات المستخدمة. تمثل كل قطعة تم تشخيصها بهذه الطريقة موقعاً جينياً مميزاً عن غيره. أن اهم فائدة لطريقة الــ AFLP هي أنتاج اكبر عدد من الاشكال المتغايرة Polymorphism [5].

تمتاز مؤشرات AFLP بالدقة العالية لقدرتها على اظهار الطرز patterns المميزة لكل فرد فأصبحت الطريقة السائدة والمثلى لبناء البصمة الوراثية لما تمتلكه هذه الطريقة من ثبوتية لمؤشراتها اذ يمكن الحصول على نفس الطرز من الحزم عند تكرار نفس التجربة فضلا عن انها لا تتطلب معرفة مسبقة بتتابعات DNA المدروس. وتمتاز هذه المؤشرات عن غيرها من مؤشرات DNA بامكانية الاحتفاظ بمحاليل خزنية من كل مرحلة عمل دون الرجوع الى تحضيرها مرة اخرى وهذا ما يزيد من امكانية المناورة بتلك المحاليل ولفترات طويلة [10].

استخدمت هذه المؤشرات في عدد كبير من الدراسات والابحاث، حيث تم من خلالها دراسة وتقويم التنوع الوراثي Genetic Diversity لعدد من الانواع النباتية. فقد قام Zeid واخرون [27] بدراسة التنوع الوراثي لــ 79 سلالة نقية من الفول *Vicia faba* L. مستنبطة من اصناف عالمية من اسيا واوربا وشمال افريقيا باستخدام تقانة AFLP، وتراوح معامل التشابه الوراثي بين 0.53 و 0.88 كما أظهرت النتائج ان المجموعة الاسيوية اعطت تباينا وراثيا واضحا تفوق على مثيله في بقية المجموعات. كما اجريت دراسة لتقييم التنوع الوراثي لــ 45 سلالة من الذرة البيضاء من خلال كل من مؤشرات AFLP و SSR (Simple-sequence repeats) وبعض الصفات الشكلية، واوضحت ان اعلى معدل لتقييم التنوع والاختلافات Polymorphism كانت قد كشفتها مؤشرات AFLP بمعدل قدره 0.65 مقارنة بــ 0.46 لمؤشرات SSR، كما كان متوسط قيم البعد الوراثي يساوي (0.62 و 0.60 و 0.57) لكل من AFLP و SSR والصفات الشكلية على التوالي [14].

قام Fang واخرون [13] بدراسة التنوع الوراثي لــ 60 سلالة حديثة من اللوبيا *Vigna unguiculata* L. من خلال 6 ازواج من بادئات AFLP، وكان اجمالي الحزم 382 حزمة وقدر عدد الحزم المتباينة منها بــ 207 حزمة، واشاروا الى انه بالرغم من تنوع وتباعد اماكن جمع السلالات الا ان معدل التشابه لم يقل عن 0.86. كشفت تقانة AFLP عن التغايرات الوراثية التي أحدثها الصعق الكهربائي في نبات حلق السبع *Antirrhinum majus* حيث كانت أعلى نسبة للبعد الوراثي 27.5% عند معاملة البذور المستنبتة بالمعاملة 8 امبير ولفترة 6 دقائق [7]. كما استخدمت مؤشرات AFLP لدراسة وتقويم التنوع الوراثي لعدد من الانواع النباتية الاخرى، كالموز البري [24]، البطاطا الصينية [16] ، الشاي [17] والزيتون [15].

ان هدف الدراسة تقدير التنوع الوراثي لانواع الداودي وذلك بتوظيف مؤشرات تباينات أطوال القطع المتضاعفة (AFLP) وتحديد التوليفات المناسبة من البادئات التي تعطي اكبر عدد ممكن من الحزم المتغايرة، ومن ثم تحديد القرابة الوراثية بين الانواع المستخدمة والهوية الوراثية من خلال تحليل البصمة الوراثية لكل من الأصناف الداخلة في انواع الجنس المدروسة.

المواد وطرائق العمل

نفذت التجربة في مختبر التقانات الحياتية في الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية – سوريا. استخدمت خمسة أصناف يعود كل صنف الى نوع مختلف لجنس الداودي (الكروية، العنكبوتية، المفتوحة، الانيمون والبنبون) والجدول (1) يوضح بعض الصفات العامة لهذه الأصناف. جمعت الأوراق النظيفة والخالية من الإصابات المرضية والحشرية بتاريخ 15-8-2010 ولكل صنف على حدا، والتي استخدمت في عزل وتحليل DNA باستخدام تقانة AFLP.

عزلت الاحماض النووية من الاوراق السليمة وفقا لطريقة Weigand وآخرين [25] المعتمدة على طريقة Sahgi-Maroof وآخرون [19]، وقدرت كمية الحامض النووي DNA في العينات باستخدام جهاز (Spectrophotometer Beckman Du-61) بوجود الاشعة فوق البنفسجية UV وطول موجي 260 نانوميتر، وكانت كل قراءة للكثافة الضوئية على الجهاز مقدارها 1 تعادل 50 ميكروغرام من DNA/1 مل من السائل. كما قدرت نقاوة DNA من خلال قسمة رقم قراءة الكثافة الضوئية عند طول موجي 260 نانومتر على رقم قراءة الكثافة الضوئية على طول 280 نانو متر، ويعد الحمض النووي نقيا اذا تراوح حاصل قسمة القرائتين بين المدى 1.8-2 [6] (جدول2).

جدول (1)

بعض الصفات العامة لأصناف الداودي الخمسة.[2] ، [8] ، [11].

النوع	ارتفاع النبات،سم	عدد الافرع	حجم الزهرة	عدد الازهار	نوع الزهرة	صفات عامة
كروية Incurved	70-100	قليل الافرع	كبير جدا	قليل	قطمر	تمتاز الازهار بشكلها الكروي المنتظم ،بتلاتها عريضة ذات اطراف مستديرة ومندمجة بعضها فوق بعض وتغطي قرص النورة تغطية كاملة.
عنكبوتية Spidery	60-80	قليل الافرع	كبير	قليل	قطمر	الازهار بتلاتها انبوبية طويلة رفيعة ولاتكتسب الزهرة شكلا منتظما، تسمى احيانا بالريشية Feathery .
مفتوحة Reflexed	60-90	متوسط الافرع	كبير	متوسط	قطمر	الازهار كروية الشكل ولكن تتهدل البتلات بعضها فوق بعض فلا تغطي قرص النورة الزهرية.
أنيمون Anemone	40-60	كثير الافرع	صغير	كثير	قاطية	الازهار لاتحتوي على اكثر من صفين من البتلات والقرص الزهري مندمج ويرتفع قليلا عن مستوى البتلات.
بمبون Pompon	30-50	كثير الافرع	صغير	كثير جدا	قطمر	الازهار صغيرة الحجم عديدة البتلات تكاد لاتحتوي على قرص وسطي والبتلات صغيرة مندمجة بعضها مع بعض وشكل الزهرة كروي.

تم استعمال 10 ازواج من بادئات AFLP للمضاعفة الانتخابية وذلك بهدف اختيار افضل البادئات في اعطاء نتائج واضحة ودقيقة وقادرة على كشف نسبة مناسبة من التباينات الوراثية ، وعليه تم اختيار خمسة ازواج من البادئات المختبرة (جدول 3) وتم اعتماد نتائجها في تحليل كافة العينات.

أجريت تفاعلات (PCR-AFLP) وفقا لـ Vos واخرون [23]. مررت نواتج التفاعل عبر هلامة من البولي

اكريلمايد تركيزها 6% في جهاز الترحيل الكهربائي العامودي لمدة ساعة ونصف وبوجود المحلول القياسي 1X TBE، ثم لونت هلامة الفصل بمادة نترات الفضة Silver nitrate. جمعت نتائج AFLP في جدول خاص أعتمادا على وجود او غياب قطع DNA للعينات المختلفة، حيث رمز لوجود قطعة DNA المتضاعفة بالرقم 1 ولعدم وجودها بالرقم 0. أستعمل برنامج SIMQUL لغرض ايجاد العلاقة الوراثية بين الاصناف الداخلة في هذه الدراسة، يعتمد هذا البرنامج على معادلة قيم التشابه Similarity المقدرة [18] الذي يعتمد على المعادلة:

Similarity = 2nxy / nx + ny

ثم قدرت النسبة المئوية للبعد الوراثي Genetic distance بين الاصناف والتي تعتمد على نتائج التشابه الوراثي وفقا للمعادلة الآتية:

Genetic distance=1–(2nxy/nx+nyx) 100

حيث ان :

nxy : تمثل عدد الحزم المشتركة بين النموذجين x و y والتي تمثل صنفين من الاصناف.

nx : عدد الحزم الكلية في النموذج x.

ny : عدد الحزم الكلية في النموذج y.

جدول (2)

نتائج نقاوة عينات DNA لاصناف الداودي باستخدام جهاز المطياف الضوئي.

عينات DNA الاصناف	A260	A280	260/280
كروية Incurved	0.4747	0.2361	2.0461
عنكبوتية Spidery	0.2420	0.1242	2.0219
مفتوحة Reflexed	0.3108	0.1607	2.0165
أنيمون Anemone	0.3412	0.1711	2.0566
بمبون Pompon	0.3639	0.1880	2.0152

جدول (3)

البادئات وانزيمات التحديد وتسلسلها النيوكليوتيدي المستخدمة بتقانةAFLP.

Primer	3´Sequence 5´
M39-E58	GATGAGTCCTGAGTAAAGA - GACTGCGTACCAATTCCGT
M39-E47	GATGAGTCCTGAGTAAAGA - GACTGCGTACCAATTCCAA
M39-E44	GATGAGTCCTGAGTAAAGA - GACTGCGTACCAATTCATC
M64-E33	GATGAGTCCTGAGTAAGAC - GACTGCGTACCAATTCAAG
M33-E32	GATGAGTCCTGAGTAAAAG - GACTGCGTACCAATTCAAC
Tru91 Forward adapter	GACGATGAGTCCTGAG
Tru91 Reverse adapter	TACTCAGGACTCAT
Pst I Forward adapter	CTCGTAGACTGCGTACATGAC
Pst I Reverse adapter	TGTACGCAGTCTAC
POO	GACTGCGATCATGCAG
MOO	GATGATCCTGAGTAA

النتائج والمناقشة

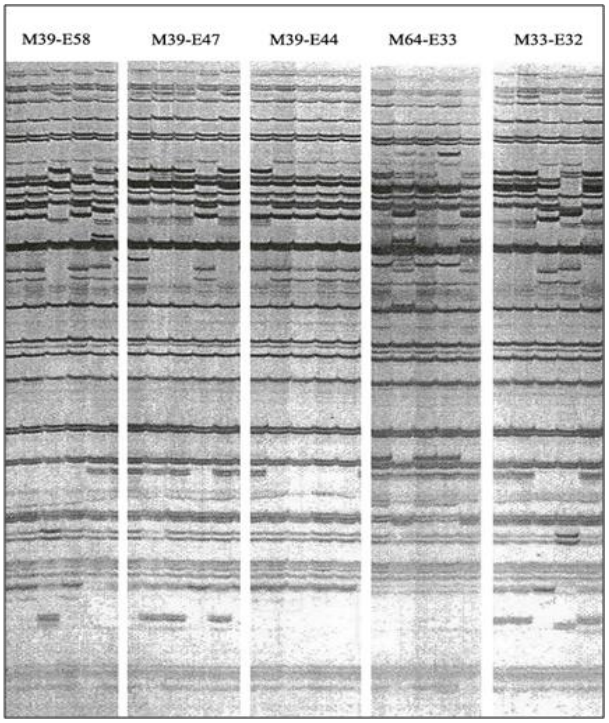
اعتمدت طريقة تحـــليل نتائج دراسة العـــلاقة الوراثية على وجود أو غياب الحزم الناتجة من تضاعف قطع معينة من جينوم النباتات المستخدمة وعلى الأوزان الجزيئية لتلك الحزم التي تعتمد على العدد والمواقع المكملة لتسلسلات البادئات على شريط DNA القالب ، اهملت الحزم الخفيفة جدا، ويتفق هذا مع [12] و[20].

أما التباين المعتمد على الاختلافات في شدة Intensity تألق الحزم التي تكون ناتجة عادة من ظهور بعض الحزم المتضاعفة معاً في نفس الوزن الجزيئي فتظهر على شكل حزمة سميكة واحدة (هي بالحقيقة أكثر من حزمة Comigrating bands) قد تكون ناتجة من حالة homozygotsity حيث يتم فيها تضاعف نفس الموقع على الاليل الآخر ، وبما أنها بنفس الوزن الجزيئي لذلك تتجمع القطع المتضاعفة في تلك المواقع معا، وأحيانا زيادة تركيز DNA القالب يؤدي إلى تكرار عدد نسخ DNA الهدف مما يؤدي الى تضاعف نفس الموقع أكثر من مرة وبما ان التركيز الدقيق للـــ DNA يكون من الصعوبة تحديده لتاثره بعدة عوامل لذلك لا يمكن استخدام الاختلاف في سمك الحزم الناتجة كمقياس للتباين الوراثي يتفق هذا مع ما ذكره Vogtواخرون [21] بعدم الاعتماد على شدة تالق الحزم كمقياس للتباين لصعوبة ضبط التركيز الدقيق DNA.

أعتمدت نتائج البادئات المستخدمة في تقدير نسبة البعد الوراثي Genetic distance بين كل صنفين من الاصناف المنتخبة والموصوفة من قبل NeiوLi [18] والتي تستند على وجود الحزم المشتركة بين زوج من تلك النباتات .

بينت نتائج تفاعلات AFLP (شكل 1) اختلافات في عدد الحزم المتضاعفة وأوزانها الجزيئية باختلاف البادئ المستخدم والناتجة من الاختلاف في عدد المواقع المكملة لذلك البادئ في جينوم كل نبات من النباتات المدروسة. يتفق هذا مع جميع النتائج المنشورة في هذا المجال منها (1 ، 3 ، 9 ، 26). ان بعضاً من هذه البوادىء لم يُعط أية نتيجة بالرغم من إعادتها أكثر من مرة ويتفق ذلك مع نتائج أخرى لم تتوصل كذلك الى نواتج تضاعف عند تطبيق مؤشرات AFLP كما في استخدام بعض البوادىء مع حلق السبع [7] والشعير [4] وذلك بسبب غياب المواقع المكملة لتسلسلات تلك البوادىء في جينوم نباتات الداودي ، وبوادىء أخرى لم تعط نتائج كاملة عند استخدامها إذ يلاحظ فقدان الحزم في بعض العينات المدروسة. بذلك فقد تم اختبار خمسة ازواج من البادئات لنباتات الداودي التي أظهرت تباينات واضحة بين الانواع المختارة (شكل1).

تباين عدد قطع الـــ DNA المتضاعفة تبعاً لزوج البادئات المستخدم (جدول 4)، حيث تراوح عدد الحزم المتضاعفة من 33حزمة باستخدام زوج البادئات M64-E33 إلى 42 حزمة باستخدام زوج البادئات M39-E44، بمتوسط قدره 37.8 حزمة للزوج الواحد من البادئات . كما اختلفت البادئات في عدد الحزم المتباينة التي استطاعت التعرف عليها، حيث تراوحت هذه النسبة ما بين 22 حزمة DNA مع زوج البادئات M39-E47 حتى 31 حزمة مع زوج البادئات M39-E44 وبمتوسط يساوي 26 حزمة متباينة من الـــ DNA لكل زوج من البادئات وهذا يقابل تباينات تتراوح ما بين 61.54% (M39-E58) إ لى 73.81% (M39-E44). كان اجمالي عدد حزم الـــ DNA التي تمت مضاعفتها مع كافة البادئات ولجميع الانواع هو 189 حزمة، من بينها 130 حزمة متباينة، تمثل نسبة 68.69% من كامل الحزم (جدول4).



شكل(1). نتائج تحليل DNA الاصناف الخمسة لنبات الداودي بتقانة AFLP مع توليفة البادئات الخمسة والمرحلة كهربائياً على هلام البولي أكريلاميد بتركيز6%.

جدول (4)

العدد الكلي لحزم DNA وعدد الحزم المتباينة التي كشفتها بادئات AFLP في جميع اصناف الداودي المدروسة.

أزواج البادئات المدروسة	العدد الكلي لحزم DNA	عدد الحزم DNA المتباينة	التباين%
M39-E58	39	24	61.54
M39-E47	35	22	62.86
M39-E44	42	31	73.81
M64-E33	33	24	72.73
M33-E32	40	29	72.5
المجموع	189	130	-
المتوسط	37.8	26	68.69

بعد إدخال البيانات الناتجة من استخدام البادئات في البرنامج المعد خصيصا لهذا الغرض على الحاسب الآلي تم إيجاد البعد الوراثي Genetic distance بين الاصناف المختارة وكما موضح في الجدول [5].

يتبين من نتائج جدول [5] عدم وجود تشابه تام بين أي من الانواع المدروسة وبالتالي امكن تمييز كافة المدخلات التي تم دراستها، حيث اعطى نبات الداودي نوع بنبون نسبة مئوية للبعد الوراثي مرتفعة مع باقي الانواع وكانت اعلاها 45.1% مع النوع الكروي الازهار ثم تلتها 42.9% مع المفتوحة ، 36.6% مع العنكبوتية و 25.7% مع الانيمون، قد يعود سبب البعد الوراثي العالي بين البنبون والانواع الكروية، المفتوحة والعنكبوتية لكونه لاينتمي الى نفس مجموعة هذه الانواع التي تتميز بحجم ازهارها الكبير والنبات مرتفع وقلة عدد ازهاره على العكس من نبات البنبون قليل الارتفاع وذو ازهار كثيرة العدد وصغيرة الحجم (جدول 1)، بينما كانت النسبة المئوية للبعد الوراثي تقل مع النوع انيمون لكونهما ينتميان الى نفس المجموعة (مجموعة الازهار صغيرة الحجم).

اختلف النوع انيمون مع باقي انواع الداودي وبنسب مئوية للبعد الوراثي عالية أيضا وبلغت 33.4% مع الكروية، 31.9% مع المفتوحة و 27.2% مع العنكبوتية (جدول5)، ينعكس هذا البعد الوراثي نتيجة الاختلافات المظهرية في شكل المجموع الخضري والزهري بين نبات الانيمون والانواع السابقة الذكر وكما موضح في جدول[1].

اعطى نوع الداودي ذو الازهار العنكبوتية نسب مئوية للبعد الوراثي 31.6% و 24.3% مع الانواع المفتوحة والكروية على التوالي (جدول5) مع كونهم ينتمون الى نفس المجموعة (مجموعة الازهار كبيرة الحجم) ويعود سبب هذا الاختلاف الوراثي الى عمليات التربية والتحسين من تهجين وتطفير التي اجريت على النوع العنكبوتية الازهار لتغيير شكل ازهارها (جدول1) .

اما اقل نسبة مئوية للبعد الوراثي اعطاها النوع كروي الازهار مع النوع مفتوح الازهار وبلغت 17.8% بسبب التشابه العالي في الصفات المظهرية لهما وكونهما يعودان الى مجموعة الازهار كبيرة الحجم (جدول1).

نستنتج مما تقدم ان مؤشرات AFLP كشفت عن التغايرات الوراثية بين انواع الداودي المدروسة من خلال تحليل نتائج البصمة الوراثية المعتمدة على ازواج البادئات الخمسة التي بينت هذه الاختلافات دون الحاجة الى اختبار العديد من البادئات. كما نلاحظ ان النسبة المئوية العالية للبعد الوراثي تكون بين الانواع التي تنتمي الى مجاميع مختلفة (مجموعة الازهار الكبيرة X مجموعة الازهار الصغيرة) بينما تكون النسبة المئوية للبعد الوراثي قليلة بين الانواع التي تنتمي الى نفس المجموعة ، إضافة الى الاختلافات في المواقع الجغرافية التي تنتمي اليها اصول الانواع الداخلة في الدراسة.

جدول (5)

البعد الوراثي (%) بين انواع الداودي اعتمادا على البيانات الناتجة من استخدام ازواج البادئات الخمسة في مؤشرات AFLP.

الانواع	كروية Incurved	عنكبوتية Spidery	مفتوحة Reflexed	أنيمون Anemone	بمبون Pompon
كروية Incurved	0.0				
عنكبوتية Spidery	24.3	0.0			
مفتوحة Reflexed	17.8	31.6	0.0		
أنيمون Anemone	33.4	27.2	31.9	0.0	
بمبون Pompon	45.1	36.6	42.9	25.7	0.0

المصادر

[1] أشتر، سها. تحديد وتقدير التنوع الحيوي في الشعير بأستخدام معلمات الحامض النووي DNA. رسالة ماجستير. قسم المحاصيل الحقلية .كلية الزراعة. جامعة حلب – سوريا .ع ص 126. 1999.

[2] أمين، سامي كريم محمد و محسن خلف محمود. الزينة وهندسة الحدائق. جامعة بغداد- كلية الزراعة- وزارة التعليم العالي والبحث العلمي-جمهورية العراق . ع ص 424. 1989.

[3] الحسني، خلود ابراهيم حسن. استخدام المؤشرات الجزيئية المعتمدة على التفاعل التضاعفي لسلسلة الدنا في دراسة التنوع الوراثي للبطاطا *Solanum tuberosum* L. . اطروحة دكتوراه. كلية العلوم .قسم علوم الحياة. جامعة بغداد.ع ص 200. 2002.

[4] الخولاني، محمد العزي. دراسة التباينات الوراثية لاصناف الشعير في الجمهورية اليمنية بأستخدام المؤشرات الجزيئية للـــ DNA. اطروحة دكتوراه. قسم المحاصيل الحقلية. كلية الزراعة. جامعة تشرين. الجمهورية العربية السورية. ع ص 132. 2008.

[5] الساهوكي، مدحت مجيد. تربية النبات بمساعدة المعلمات الجزيئية. مجلة العلوم الزراعية العراقية. 37(4): 67-72. 2006 .

[6] حسين، جَنان قاسم. تأثير الصعق الكهربائي في تغايرات النمو الخضري والزهري و DNA بعض نباتات الزينة . اطروحة دكتوراة. قسم البستنة. كلية الزراعة. جامعة بغداد. جمهورية العراق.ع ص 141. 2007.

[7] حسين، جَنان قاسم، كاظم ديلي و سامي كريم محمد امين. تأثير الصعق الكهربائي في DNA نبات حلق السبع. مجلة العلوم الزراعية العراقية. 39(5) : 38- 51. 2008.

[8] خضر، محمود. نباتات الزينة. كلية الزراعة- جامعة حلب- وزارة التعليم العالي- الجمهورية العربية السورية.ع ص 336. 2001.

[9] خير الله، حسام سعد الدين محمد. الاكثار الدقيق لصنفين من نخيل التمر بأستخدام النورة الزهرية ودراسة الثبات الوراثي بأستخدام مؤشرات تباين اطوال قطع الـــ DNA المتضاعفة(AFLP). أطروحة دكتوراه. قسم البستنة- كلية الزراعة. جامعة بغداد.ع ص312. 2007.

[10] سيد، محمود هيثم. أستخدام مؤشرات من الـــ DNA في انتخاب مورثات المقاومة للأمراض في الشعير. رسالة ماجستير. قسم المحاصيل الحقلية-كلية الزراعة. جامعة حلب- سوريا.ع ص 177. 2001.

[11] شريتح، محمد علي و مها عبد اللطيف. نباتات الزينة وهندسة الحدائق. وزارة التعليم العالي- جامعة تشرين - كلية الزراعة- الجمهورية العربية السورية.ع ص 362. 2004.

[12] Barone, A., A. Sebastiano and D. Carputo. Chromosome pairing in Solanum commersonii, S. tuberosum sexual hybrids detected by commersonii–specific RAPDs and cytological analysis. Genome 42: 218 –224. 1999.

[13]Fang, J., C. Chao, P. Roberts and J. Ehlers. Genetic diversity of cowpea in four West

Frijters, J. Pot, J. peleman , M. Kuiper and M. Zabeau. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Research 23 (21): 4407 – 4414. 1995.

[24]Wang, X., T. Chiag , N. Roux, G. Hao and X. Ge. Genetic diversity of wild banana in China as revealed by AFLP markers. Genetic Resources and Crop Evolution. 54:1125-1132. 2007.

[25]Weigand, F., M. Baum, and S. Udupa . DNA molecular marker techniques. Technical manual. No. 20 International Research for Agricultural reaearch in the Dry Areas, Aleppo, Syria. 1993.

[26]Williams, J., A. R. Kubelik, K., J. Livak, J. A Rafalaki and S. V. Tingey. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Research 18 (22): 6531 – 6535. 1990.

[27]Zeid, M., C. Schon and W. Link. Genetic diversity in recent elit Faba bean lines using AFLP markers. Theoretical and Applied Genetic. 107(7 : 1304-1314. 2003.

Abstract

The study was carried out at biotechnology laboratories- GCSAR- Syria in summer season 2010. The Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)based on Polymerase Chain Reaction (PCR) with five primers were applied, was used to estimate fingerprinting and Genetic Distance for five cultivars of *Chrysanthemum spp*. (Incurved, Spidery, Reflexed, Anemone and Pompon). Phases of work included, the isolation and purification of DNA plant parts and DNA polymorphisms were scored within amplified fragments by electrophoresis. The genetic analyses by using AFLP and Genetic Distance for *Chrysanthemum* cultivars genetic variability were determinately. High Genetic Distance *Chrysanthemum* cultivars (45.1%) in AFLP markers was registered between the two cultivars (Pompon X Incurved) and were found the lowest Genetic Distance (17.8%) between (Reflexed X Incurved) .

Keywords: *Chrysanthemum spp*., Genetig diversity, Molecular markers, AFLP.

African and USA breeding programs as determined by AFLP analysis. Genetic Resources and Crop Evolution. 54: 1197-1209. 2007.

[14]Geleta, N., M. Labuschagne and C. Viljoen. Genetic diversity analysis in sorghum germplasm as estimated by AFLP, SSR and morpho-agronomical markers. Biodiversity and Conservation. 15(10); 3251-3265. 2006

[15]Gratikamoun, N., F. Mahmoud and A. Seer. Genetic diversity of Tunisian olive tree cultivars assessed by AFLP markers. Genetic Resources and Crop Evolution. 53(2 : 265-275. 2006.

[16]Hong, H., C. Yili and J. Liping. Genetic diversity analysis of some Chinese cultivated potato varieties by AFLP. Acta Horticulturae Sinica. 33(6): 1349-1352. 2006.

[17]Jianan, H., L. Jiaxian, H. Junwu and L. Zhihua.2006. Genetic diversity of tea cultivars revealed by AFLP analysis. Acta Horticulturae Sinica. 33(2): 317-322.

[18]Nei, M. and W.H. Li . Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 74:5269 – 5273. 1979.

[19]Sahgi-maroof, M.A., K.M. Soliman, R.A. Jorgens and R. W. Allard. Ribosomal DNA spacer lenth polymorphisms in barley. Proc. Natl. Acad.Sci.USA.81: 8014 – 8018. 1984.

[20]Swoboda, I. and P. L. Bhalla . RAPD analysis of genetic variation in the Australian sun flower Scaevola. Genome, 40: 600 – 606. 1997.

[21]Vogt, T., M. Francoise, K. Frank, J. Welsh and M. Clelland . Fingerprinting of DNA and RNA using arbitrarily primed PCR. IN: G. Anolles and P. M. Gresshof (eds.). DNA Markers, Protocols, Application and Overview. New York. p.55-74. 1997.

[22]Von, B., R. N. Jacobsen, C. Baden, R.B. Jorgensen and Linde– Laursen. An Ecogeographical Studies on Crop Genepools 7. International Plant Genetic Resources Institute. Rome. 1995.

[23]Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T.V.D. Lee, M. Hornes, A.