مجلة جامعة دمشق للعلوم الزراعية ــ (2014) المجلد (30) ــ العدد1 ــ الصفحات: 141-150

# تقييم التنوع الوراثي عند الماعز الشامي السوري باستخدام تقانة التكرارات البسيطة الترادفية الداخلية (ISSR)

علي كنعان[1] و بسام عيسى[2] و سلام لاوند[3]

## الملخَص

**يعدُّ الماعز الشامي في سورية من العروق الزراعية المحلية المهمة، لما يملك من ميزات إنتاجية ومواصفات تمكنه من الإنتاج والتناسل ضمن الظروف البيئية القاسية، لهذا فقد استخدم في برامج الخلط التربوية مع الماعز الجبلي كمعطي لمورثات صفة إنتاج الحليب الجيدة. قُيِّم في هذا البحث التنوع الوراثي عند مجموعات من ذكور وإناث الماعز الشامي النقي باستخدام تقانة التكرارات الترادفية البسيطة البينية (ISSR) لعينات من دم هذه الحيوانات، وأشارت النتائج إلى وجود تنوع وراثي بين عينات الماعز المدروسة، وقد بلغت التعددية الشكلية 100%.**

**الكلمات المفتاحية**: ماعز شامي، التنوع الوراثي، تقانةISSR، سورية.

[1] طالب دكتوراه، [2] قسم الإنتاج الحيواني، [3] قسم التقانة الحيوية، كلية الزراعة، جامعة دمشق، سورية.

# Evaluation of genetic diversity in Shami goats using inter-simple sequence repeat technique (ISSR)

**Kanaan, A.[(1)]; B. Issa[(2)] and S. Lawand[(3)]**

## Abstract

**Shami goat in Syria is one of the important domestic breeds, because of its high productivity and breeding capacity under the hard environmental conditions and it is still being used in crossbreeding with Mountain goats as a donor for milk producing traits. This breed is still far away from scientific investigations even it has been exposed to a random crossbreeding with Mountain goats by goat breeders. This has lead to the possibility of losing some of its genetic characteristics which are not detected yet. In this research the genetic diversity among groups of pure Shami goats was determined using ISSR-PCR on blood and results indicated that there was a molecular genetic diversity among studied goats and polymorphic rate was register to 100%.**

**Keywords**: Shami goats, Genetic diversity, ISSR–technique, Syria.

[(1)] PhD student [(2)] Prof. Dr., [(3)] Assoc. Prof. Dept of Crop Sci., Fac. Agric. Damascus Univ.

## المقدمة

تعدُّ صيانة الموارد الوراثية الحيوانية المحلية وتطويرها من أولويات العمل للمؤسسات العلمية لما تمتلكه هذه الموارد الوراثية من أهمية تجعلها في مرتبة الثروة الحيوية والاقتصادية والثقافية. ويبرز الماعز الشامي بوصفه إحدى هذه الثروات الوراثية المحلية في سورية، وعلى الرغم من انخفاض نسبة مايشكله الماعز الشامي من إجمالي الماعز في سورية، فإنه يمتلك ميزات وصفات جعلته مرغوباً فيه إقليمياً وعالمياً. إلا أن الدراسات المنفذة على هذا الحيوان الزراعي الهام ماتزال دون مستوى الطموح، من حيث كونها لا تسهم كثيراً في تطويره، ومازال الاهتمام العلمي والإداري أقل من أهميته وسمعته. فما زالت الدراسات والبحوث العلمية قاصرة عن تقديم البرامج والمناهج الكفيلة بتطويره، وكذلك التعليمات الإدارية التي ماتزال بعيدة عن هذا الشأن. تعدُّ تقانات الوراثة الجزيئية أسلوباً حيوياً مهماً يسهم في التعرف إلى هذه الحيوانات بطريقة غير تقليدية لأنه يكشف عن أحد أهم مواقع تطويرها وهو موروثها الجزيئي. فمع تحسن طرائق البحث العلمي وتطور تقانات التجارب انتقلت دراسة القواعد الوراثية من المستوى الشكلي والخلوي والفيزيولوجي والكيمياء الحيوية إلى المستوى الجزيئي الذي يدرس الحمض النووي بشكل رئيسي.

تتنوع الواسمات الجزيئية التي تستخدم في الكشف عن التنوع الوراثي ضمن الأنواع وبينها، وقد استخدمت تقنية ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) (أي التكرارات الترادفية البسيطة البينية) التي تعتمد على تضخيم المواقع (100-3000 bp) بين التوابع الدقيقة المتقاربة والمتوضعة بشكل متعاكس (Zietkiewicez وزملاؤه، 1994) باستخدام بادئات وحيدة طولها (16-18bp) ومؤلفة من نكيلوتيدات متكررة، ومحاطة في أغلب الأحيان بـ (2-4) نكليوتيدات إمّا في المنطقة (5) أو (3) (Borne وزملاؤه، 2002؛ Nagaragu وزملاؤه، 2002) وعادة ما يضخم ISSR من 25 -50 حزمة في التفاعل الواحد، ويمكن أن يكون عدد الحزم المنتجة مرتبطاً ارتباطاً عكسياً مع عدد النيكلوتيدات في وحدة تكرار المحضر. وعلى الرغم من حقيقة كونها تورث كواسمات سائدة وأحياناً غير سائدة، إلا أنها واسمات ذات طبيعة عشوائية، فهي مناسبة بشكل خاص لدراسة علم الوراثة العرقي وتقييم التنوع الوراثي وتحديد الأصناف (Gupta وزملاؤه، 1994؛ Fang وRoos، 1997؛ Wolfe وزملاؤه، 1998؛ Blair وزملاؤه، 1999؛ Jain وزملاؤه، 1999؛ Cavan، 2000؛ Raina وزملاؤه، 201؛Karbin وزملاؤه، 2002). كذلك فإن بساطة واسمات ISSR تزيد من إمكانية استخدامها في الوسم المجيني (Ammiraju وزملاؤه، 2001) فضلاً عن أن واسمات ISSR تتميّز بأنها غزيرة فهي تعطي عدداً كبيراً من الحزم، ومستوى التعددية الشكلية متوسط إلى عال، وطبيعة التوريث تخضع لقوانين ماندل، والقدرة على التضخيم عالية إلى متوسطة، والتكاليف منخفضة كما أن جهد تنفيذها منخفض ( Van

der nest وزملاؤه، 2000) باختصار فإن هذه التقنية تعدُّ بسيطة وسريعة وذات مصداقية عالية، ولها الميزات نفسها لواسمات التعددية الشكلية (DNA) المضخم عشوائياً (RAPD) (Random Amplified Polymoirphic DNA). ويمكن تصميم بادئاتها بسهولة ودون معلومات مسبقة عن التسلسل الجيني لقطعة الحمض الريبي النووي منقوص الأوكسجين المستهدف، وتستخدم استخداماً واسعاً في مجالات تحديد الأصناف، ورسم الخرائط الوراثية، والتنوع الوراثي، ووضع بادئات التكرارات الترادفية البسيطة (SSR) ( Rakoczy – Troganowska وBolibok، 2004) (Qian وزملاؤه، 2007). وبالحديث عن استخدامات تقنية ISSR في التحاليل الوراثية عند الحيوانات فقد تعددت أهدافها وتعددت موادها. إذْ أفاد Bai Xiu-jual وli Hui (2001) من تقنية ISSR عند دجاج اللحم للانتخاب لصفة أقل كثافة من الليبوبروتين عند الجيل الثالث لنسبين أحدهما نحيل و الآخر مكتنز. كما قام Glazko وزملاؤه (1999) بتحاليل مقارنة للتمايزات الوراثية بين ثلاثة أجناس بقرية: ذكور أوروبية وأمريكية مع الأبقار، وذلك باستخدام أنماط مختلفة من الواسمات الوراثية الجزيئية والكيمياء الحيوية التوريثية ومعلمات الـ (DNA) مثل: (ISSR) و(RAPD) إذْ ظهر أن تقدير الصفات الوراثية داخل الأنواع كانت مرتبطة مع الواسمات الوراثية الجزيئية المحددة التي تضمنتها الدراسة بشكل أكبر عند مقارنتها بمعلمات تنتمي لنموذج لا على التعيين. كما قام Bai Xiu- jua (2004) باستخدام تقنية ISSR لدراسة التشابه الوراثي بين النمور الموجودة في مركز Hengdaohezi Breeding Center وبين النمور الموجودة في مقاطعة Heilongjiang الصينية.

وفي مجال استخدام ISSR عند الماعز تمكن Wang Jie وزملاؤه (2009) من استخدام (10 بادئات) من ISSR لتحديد الاختلاف الوراثي الجزيئي في صفة ارتفاع التصالب الحوضي بين أفراد الماعز التيبيتي التي تعيش في مناطق مختلفة الارتفاع. أمَّا فيما يتعلق بدراستنا الحالية بشكل مباشر فقد استخدم Wang Yong (2010) هذه التقنية لتحليل التنوع الوراثي عند عشائر الماعز التيبيتي في منطقة (ريتو كونتي) إذْ اختيرت (البادئات) من بين (93 بادئة ISSR) ثم استخدمت للكشف عن التنوع الوراثي في (107) عينات من الماعز التيبيتي، وقد أعطت هذه الـ (البادئات) (112 حزمة DNA) من ضمنها (75حزمة) متعددة شكلياً، وكان حجم القطع المضخمة يراوح بين (219- 534 bp)، مما يؤكد نوعية هذه المرئسات التي استطاعت إنتاج فقط حزماً متعددة شكلياً، كما أكدت النتائج أيضاً أن عشيرة الماعز المدروس أبدى مستوى عالياً من التنوع والاختلاف الوراثي الموجود ضمن الأفراد. رغم ذلك مازال هذا الحيوان بعيداً عن ساحة البحث العلمي، فضلاً عن تعرضه من مربي الماعز لعملية خلط عشوائي مع الماعز الجبلي، مما سيؤدي وعلى المدى الطويل إلى ضياع مصدر وراثي حيواني محلي مهم لم تكتشف ميزاته كلّها.

وعلى ذلك فقد استُخدمت في هذا البحث تقنية ISSR من أجل تحليل التنوع الوراثي في عشيرة الماعز الشامي السوري والإفادة من هذا التنوع لوضع لبنة يعتمد عليها في برامج التحسين الوراثي لهذا الحيوان، وعدم الاستهتار بهذه المادة الوراثية وحفظها من الضياع.

## مواد البحث وطرائقه

**الحيوانات واستخلاص الـ (DNA):**

جرى الحصول على 20 عينة من دم قطيع الماعز الشامي النقي الخالي من الأمراض والإصابات والآفات الموجودة في محطة البحوث العلمية الزراعية (قرحتا)، حيث أُجري التزاوج بشكل عشوائي (تربية داخلية) (10 ذكور عادية + 10إناث) من الوريد الوداجي، ثم استُخلص (DNA) كما يأتي:

جمعت عينات الدم الكامل في أنابيب مفرغة من الهواء وحوت مانع تخثر (EDTA-K2) وخزنت في درجة حرارة أقل من (4 $^0$ م). فصلت الخلايا بالمزج اليدوي قبل الاستخلاص. وضع (1ml) من الدم الكلي في أنبوب، أضيف (1ml) من دارئ حال للخلايا (0.32 مم سكروز، 10µµ Tris-Hcl، PH=7.6، 5µµ Mgcl2، 1% (x-100 Triton$^R$)) إلى الأنبوب. ثفل الأنبوب بسرعة (4000 rpm) مدة 5 دقائق مع إعادة هذه الخطوة مرة ثانية للتخلص من الشوائب. أضيف 500µl من دارئ هضم البروتين (10مم Tris-Hcl، PH=8، 10مم Nacl، 10مم EDTA) إلى الأنبوب. ثفلت الأنابيب بسرعة (4000 rpm) مدة 5 دقائق في درجة حرارة 4° م. أضيف (225 µl) من دارئ هضم البروتين، و(25 µl) من محلول أنزيم البروتيناز (k) (10mg/µl) إلى الأنبوب. وضعت الأنابيب في درجة حرارة (65 ° م) في حمام مائي، وحضنت مدة ساعتين. ثفلت الأنابيب مدة (2 دقيقة بسرعة 10000 rpm) للتخلص من البقايا الخلوية. أُخِذَ الجزء المائي (الطافي) ورُسّب الحمض الريبي النووي DNA باستخدام 0.6 من حجم محلول الإيزوبروبانول. غُسل DNA بالإيتانول (70%) وحل بـ (50ml من x 1TE) وحفظت عينة DNA بدرجة حرارة أقل من (20-م°) إلى حين الاستخدام.

**مضاعفة قطع من الحمض الريبي النووي باستخدام تقانة الـ (PCR):**

أُضيف الماء المقطر والمعقم لحل الحمض الريبي النووي DNA للوصول إلى تركيز الحمض الريبي النووي (40ng/ µl) في الماء المقطر والمعقم. ثم أُجريت مضاعفة قطعاً من (DNA) باستخدام 15 بادئة من بادئات (ISSR). تم مضاعفة قطع DNA في محلول نهائي (25µl) متضمناً: (12,5µl) (Master Mix) من شركة (Promega) الأمريكية، و(8,5 µl) ماءً مقطراً معقماً و(2µl) من محلول البادئ المستخدم تركيز (10µµ)، و DNA بتركيز (40ng ).

**الجدول (1) يوضح رمز البادئات والتسلسل النكليوتيدي ودرجة الحرارة المستخدمة**

| رقم البادئ | التسلسل النكليوتيدي | درجة حرارة الالتحام م° |
|---|---|---|
| 1 | $(AG)_8T$ | 50 |
| 3 | $(CA)_8A$ | 50 |
| 5 | $(AC)_8T$ | 50 |
| 6 | (GA)8CG | 56 |
| 7 | (TC)8GA | 54 |
| 8 | (TC)8AG | 52 |
| 9 | $(GA)_8CG$ | 52 |
| 14 | CCAG(GT)7 | 52 |
| 15 | $(AC)_8GG$ | 52 |
| 32 | $CCAG(GT)_7$ | 52 |
| 33 | $(GT)_4(GA)_5$ | 52 |
| 34 | $(AC)_7(AT)_3$ | 52 |
| 35 | $(CT)_8G$ | 52 |

أُجريت عملية فصل نواتج المضاعفة باستخدام جهاز الرحلان الكهربائي بشدة 100 فولت مدة 3.5 ساعة باستخدام هلامة الآغاروز تركيز(2%) ومحلول الفصل الكهربي (TBE-1x)، أضيف إلى الهلامة إيثيديوم بروماید بمقدار (5mg/ml) لكل (100 ml) من هلامة الآغاروز؛ وذلك لإظهار الحزم بشكل واضح عند تعريضها للأشعة فوق البنفسجية (Weising وزملاؤه، 1995). أضيف واسم متدرج (1kb Ladder) للكشف عن مواقع الحزم وأحجامها باستخدام التصوير بالأشعة فوق البنفسجية (UV).

جُمعت نتائج عملية التضخيم في جداول اعتماداً على مقارنة وجود قطع (حزم) الـ DNA أو غيابها بين العينات المدروسة، وأعطي الرقم 1 عند وجود الحزمة والرقم 0 عند غيابها؛ وذلك يتضمن الحزم الواضحة فقط. وقد نظمت الجداول لكل بادئة على حدة. ورُسمت شجرة القرابة الوراثية Dendrograma بتطبيق متوسطات المجموعات الزوجية غير المزانة (UPGMA). وجرت دراسة التنوع الوراثي وتحديد درجة البعد الوراثي اعتماداً على بياناتها الجزيئية، وحللت باستخدام برنامج (Pop Gen 32) الإحصائي.

## النتائج والمناقشة

استُخدمت (15) بادئة من بادئات لتقنية ISSR على عينات من ذكور وإناث الماعز الشامي، (11) منها أعطت نتائج تضخيم، وهي كما هو مبيّن في الجدول (2)، في حين بقي (4) لم تعط نتائج لمضاعفة الـ DNA. بلغ عدد الحزم الكلية الناتجة عن هذه البادئات (65) حَزمة، أي بمعدل (5.91) حزمة لكل بادئة وقدرت النسبة المئوية للتعددية الشكلية (100%). كما أظهرت البادئات جميعها تعددية شكلية (100%) وأعطت البادئتان (32-34) أقل عدد من الحزم (3 حزم) في حين أعطت البادئتان (1، 35) أكبر عدد من الحزم (11 حزمة) جدول (2).

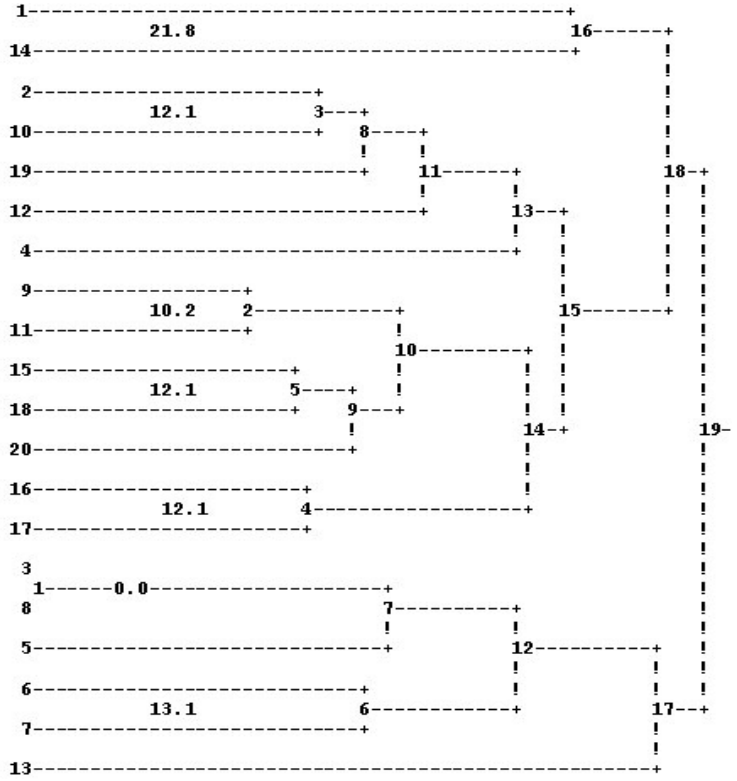
**الجدول (2) الحزم الناتجة عن البادئات المستخدمة والنسبة المئوية التعددية الشكلية**

| رمز البادئة | عدد الحزم الكلي | عدد الحزم المتعدد شكلياً | النسبة المئوية للحزم المتعددة شكلياً (%) |
|---|---|---|---|
| ISSR1 | 11 | 11 | 100 |
| ISSR3 | 6 | 6 | 100 |
| ISSR5 | 7 | 7 | 100 |
| ISSR9 | 6 | 6 | 100 |
| ISSR15 | 5 | 5 | 100 |
| ISSR32 | 3 | 3 | 100 |
| ISSR33 | 4 | 4 | 100 |
| ISSR34 | 3 | 3 | 100 |
| ISSR35 | 11 | 11 | 100 |
| ISSR36 | 4 | 4 | 100 |
| ISSR37 | 5 | 5 | 100 |
| المجموع | 65 | 65 | 1100 |
| المعدل | 5.91 | 5.91 | 100 |

**التحليل العنقودي للعينات المدروسة الناتجة عن استخدام تقنية ISSR**:

أُجري التحليل العنقودي للنتائج التي تم الحصول عليها؛ وذلك لإنشاء شجرة القرابة الوراثية (Dendrograma) لتحديد درجة هذه القرابة ورسم شجرتها بين العينات المدروسة، فقد لوحظ من الشكل أن العينات المدروسة قُسّمت إلى مجموعات تعكس درجة القرابة الوراثية فيما بينها بناءً على بيانات المعلمات الجزيئية التي قامت بتمييز العينات المدروسة على المستوى الجزيئي (الشكل 1). وقد انقسمت الشجرة الوراثية إلى عنقودين رئيسين: انقسم كل منهما إلى تحت عناقيد متعددة يشمل العينات المدروسة بتوزع منطقي ضم العنقود الأول 1- cluster العينتان (1 – 14 – 2 – 10 – 19 – 12 – 9 – 11 – 15 – 18 – 20- 16– 17). وضم العنقود الثاني 2- cluster العينات 3 – 8 – 5 – 6 – 7 – 13. حيث كانت العينتان (3 – 8) هما الأقرب إلى بعضهما بعضاً وببعد وراثي (0%)، أي على درجة عالية من القرابة الوراثية، ويمكن أن تكون **توائم حقيقية** وهما أيضاً إناث. ثم الأقرب هما العينتان (9 – 11) (إناث – ذكور) على التوالي وهما على درجة من الاختلاف بمقدار (10 %) ويعود ذلك إلى الاختلاف في الصفات الجنسية. وكذلك الأمر بالنسبة إلى العينتين (1– 14) أمّا العينتان (2–10) فهما إناث وهما على درجة من الاختلاف بمقدار (12 %)؛ ويعود ذلك إلى مجموعة من الصفات الشكلية. وهذا أيضاً ينطبق على العينتين (6–7). أمّا العينات (15–18) و(16–17) فهي ذكور وعلى درجة من الاختلاف تقريباً (12%)؛ ويعود ذلك إلى مجموعة من الصفات الشكلية. إذْ لوحظ أن هناك توافقاً في توزع عينات الإناث وعينات الذكور بنسب تشابه تصل إلى

90% واختلاف بنسبة 10 % يعزى إلى اختلاف الصفات الجنسية الثانوية بين الـذكور والإناث (9+11) (1+14) (دعم برامج التربية والتحسين الوراثي)، كما يلاحـظ وجـود عينات نسبة الاختلاف فيها 0% والتشابه 100%، وهي على الأغلب تمثل توائم حقيقيـة (3+8). وأمَّا عينات الذكور بمقارنتها بعينات الإناث فقد كانت منفصلة تماماً عن بعضها، فارتبطت عينات الذكور -إلى حد ما- ببعضها، وكذلك عينات الإناث. ولم يلاحظ تداخل بين الذكور والإناث إلا في حالة واحدة (9+11) التي يمكن أن تعزى لوجود قرابة بينهما.




**الشكل (1) التحليل العنقودي لعينات الماعز المدروسة الناتجة عن استخدام تقانة ISSR (Nei، 1987).**

واستنتج بأن تقنية ISSR أظهرت تعددية شكلية تقـدر بنحـو 100% فـي إظهـار التباينات بين عينات الماعز المدروسة ويمكن التمييز بين العينات المدروسة أهي إخوة أم توائم؟. ويُقترح بضرورة التوسع في بحوث التنوع الحيوي والبيولوجية الجزيئية في مجال الإنتاج الحيواني.

## References المراجع


**Ammiraju, J.S.S., B. B. Dholakia, D. K. Santra,., H. Singh, M. D. Lagu and M.D., Tamhankar, *et al.* 2001. Identification of inter simple sequece repeat (ISSR) markers associated with seed size in wheat. Theor. Appl. Genet. 102: 726-732.**

**Bai, X.and H. Li. 2001. Study on ISSR fingerprinting of broiler chicken divergently selected for very low density lipoprotein (VLDL). J. of Jilin Agric. Univ., 23(1): 80-82.**

**Blair, M. W., O. Panaud and S. R. McCouch, .1999. Inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification for analysis of microsatellite motif frequency and fingerprinting in rice (*Oryza sativa* L.). Theor. Appl. Genet. 98: 780-792.**

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

**Cavan, G., V. Potier and S. R. Moss. 2000. Genetic diversity of weeds growing in continuous wheat. Weed Res. 40: 301-310.**

**Fang, D. Q. and M. L. Roose. 1997. Identification of closely related citrus cultivars with inter-simple sequence repeat markers. Theor. Appl. Genet. 95: 408-417.**

**Glazko VI., T. N. Dyman, S. I. Tarasiuk and A. V. Dubin. 1999. The polymorphism of proteins, RAPD-PCR and ISSR-PCR markers in European and American bison and cattle. Tsitol Genet. 33(6):30-9**

**Gupta, M., Y. S. Chyi, J. Romero-Severson and J. L. Owen. 1994. Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple sequence repeats. Theor. Appl. Genet. 89, 998-1006.**

**Jain, A., C. Apparanda and P. L. Bhalla. 1999. Evaluation of genetic diversity and genome fingerprinting of Pandorea (*Bignoniaceae*) by RAPD and inter-SSR PCR. Genome 42: 714-719.**

**Karbin, M., A. Kuras and E. Żurawicz. 2002. Fruit plant germplasm characterisation using molecular markers generated in RAPD and ISSR-PCR. Cell. Mol. Biol. Lett., 785-794.**

**Nagaraju, J., M. Kathirvel, R. Ramesh Kumar, E. A. Siddiq and S. E. Hasnain. 2002. Genetic analysis of traditional and evolved Basmati and non-Basmati rice varieties by using fluorescence-based ISSR-PCR and SSR markers. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99: 5836-5841.**

**Nei, M. 1987. Molecular evolution genetics. columbia university press, New York.**

**Qian. Z., D. Hong and Z. Dong Hang. 2007. ISSR Molecular Marker and its application in plant researches. Molecular Plant Breeding, .5(6):123-129.**

**Raina, S. N., V. Rani, T. Kojima, Y. Ogihara, K. P. Singh and R. M. Devarumath. 2001. RAPD and ISSR fingerprints as useful genetic markers for analysis of genetic diversity, varietal identification, and phylogenetic relationships in peanut (*Arachis hypogaea*) cultivars and wild species. Genome 44, 763- 772.**

**Rakoczy-Trojanowska, M. and H. Bolibok. 2004. Characteristics and a comparision of three classes of Micro satellite- based markers and their application in plants. Agricultural university, Nowoursynowska, Wraszawa, Poland.**

**Van der Nest, M. A., E. T. Steenkamp, B. D. Wigfield. and M. J. Wingfield. 2000. Development of simple sequence repeat (SSR) markers in Eucalyptus from amplified inter-simple sequence repeats (ISSR). Plant Breed. 119: 433-436.**

**Weising, K., H. Nybom, K. Wolff, and W. Meyer. 1995. DNA fingerprinting in plants and fungi, CRC Press, Inc., London.**

**Wolfe, A.D., Q.Y. Xiang and S. R. Kephart. 1998. Assessing hybridization in natural populations of Penstemon (*Scrophulariaceae*) using hypervariable inter simple sequence repeat markers. Mol. Ecol. 71:1107-1125.**

**Zietkiewicz, E., A. Rafalski and D. Labuda. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) - anchoredpolymerase chain reaction amplification. Genomics 20: 176-183.**



| | | |
|---|---|---|
| **Received** | **2012/04/03** | **إيداع البحث** |
| **Accepted for Publ.** | **2012/07/18** | **قبول البحث للنشر** |