

تشخيص التباين الجزيئي بين سلالات الذرة الصفراء وهجنها باستخدام مؤشرات RAPD

أكرم محمد عبود سعدي سبع خميس عبد الجاسم محيسن جاسم
كلية العلوم – جامعة الأنبار كلية العلوم – جامعة الأنبار مركز بحوث التقنيات الأحيائية
جامعة النهرين

الخلاصة

نفذت دراسة مختبرية في مركز بحوث التقانات الأحيائية – جامعة النهرين – بغداد في العام 2013 بهدف تقييم حجم التباعد الوراثي بين سبع سلالات نقيه من الذرة الصفراء واثنى عشر هجينا فرديا ناتجا عن تضريب السلالة × الفاحص بين تلك السلالات. استخدم لهذا الغرض عشر من مؤشرات RAPD الجزيئية (OPA-07 و OPA-09 و OPA-11 و OPA-13 و OPC-12 و OPD-20 و OPI-01 و OPO-04 و OPN-16 و GB8)، نجح خمس منها فقط (OPA-09 و OPC-12 و OPD-20 و OPN-16 و GB8) في التمييز بين السلالات وهجن الجيل الأول بإظهارها نمطا متباينا لقطع DNA المكوثر. أثبتت نتائج تحليل التشابه الوراثي وشجرة الصلة الوراثية، إن السلالتين T1 و T6 هما إلا بعد وراثيا عن بعضهما البعض بحيازتهما لأقل قيمه للتشابه الوراثي البالغة 68.6%، مما يشير إلى دورهما المهم في الدراسات المستقبلية وإنتاج هجن متفوقة.

Detection of Molecular Variation Among Maize Lines and Their Hybrids Using RAPD Markers

Akram M. Abood Sadie S. Khamees AbdAljasem M. J
Collage of Science Collage of Science Research center for Biotech
University of Anbar University of Anbar AL-Nahrain University

Abstract

A laboratory experiment was carried out at the Biotechnology Research Center – Nahrain University – Baghdad for the year 2013 at the aim of assessing the extent of genetic divergence among seven inbred lines of maize and the twelve single hybrids results from Line X Tester crossing among these lines. Ten of RAPD molecular markers have been used for this purpose (OPA-07, OPA-09, OPA-11, OPA-13, OPC-12, OPD-20, OPI-01, OPO-04, OPN-16 and GB8), just five of these (OPA-09, OPC-12, OPD-20, OPN-16 and GB8) were succeeded in distinguishing among parent lines per se and their F1 hybrids by showing different pattern of DNA fragmentation. The results of genetic similarity analysis and dendrogram tree revealed that the inbred lines T1 and T6 were the most genetic divergent lines as they gained the minimum

value of genetic similarity reached 68.6%, which indicates their important role in the future studies and to produce elite hybrids.

المقدمة

حدثت في بداية القرن الأخير زيادة ملحوظة في إنتاجية الذرة الصفراء بسبب تطوير أساليب التربية والتهجين التي حددها Shull (4). إن استخدام التقانة الحيوية في دراسة علم الوراثة الكمي على المستوى الجزيئي إسهامات كبيرة في تطوير أكثر الأساليب فعالية في تنظيم تربية النباتات لجميع أنواع المحاصيل تقريباً (4). إن الخصائص المورفولوجية (الشكل الظاهري) للنبات والجزيئية للمادة الوراثية لمحصول الذرة الصفراء تعد أمراً حاسماً لتحسين هذا المحصول وزيادة إنتاجية كونه من المحاصيل المهمة اقتصادياً، ويعد أمراً مهماً جداً أيضاً تأكيد علاقات الأنساب والتكهن بنوعية التراكيب الهجينة المخصبة الناتجة، والتي تكون ذات مواصفات مرغوبة ومفضلة على غيرها التي تؤدي إلى زيادة كمية الإنتاج لمحصول الذرة الصفراء وباقي المحاصيل الأخرى التي أجريت عليها عمليات التهجين، علاوة على ذلك فإن التشخيص المظهري والجزيئي لسلالات الذرة الصفراء يعد أحد أهم الخطوات في مجال التحسين الوراثي لتلك السلالات وإنتاج الهجن المتفوقة، خصوصاً درجة التباعد الوراثي التي تكتسب أهمية كبيرة في رسم العلاقة الوراثية والتنبؤ بقوة الهجين عند التضريب بين تلك السلالات (11). تتمتع المعلومات الجزيئية بعدد من الخصائص التي تتميز بها عن الطرائق التقليدية من حيث الدقة العالية في التمييز بين التراكيب الوراثية المختلفة، وعدم تأثرها بالظروف البيئية، وهذا مكن تطبيقها في أي مرحلة من مراحل نمو النبات.

أدى التقدم الكبير في مجال التقنيات الحيوية الجزيئية واستخدام عدد من معلومات DNA الجزيئية إلى توفير كم كبيراً من معلومات حول البنية الوراثية للمجمعات النباتية، ولعل من أبسطها معلومات RAPD التي تمتاز بقصر نتابعاتها وعشوائيتها مما يسهل طريقة استعمالها وعدم الحاجة إلى معرفة مسبقة بنتابع DNA الموضوع تحت الاختبار (2). فضلاً عن سرعتها في إتمام مسح سريع للجينوم وكثرة نتابعات قصيرة متممة لتابع البادئ المستخدم، والأخيرة تظهر بشكل أنماط مختلفة من الحزم تعد بمثابة بصمة في عملية الترحيل الكهربائي وتستخدم للتمييز بين التراكيب الوراثية (1).

إن هدف البحث هو دراسة حجم التباعد الوراثي بين الفواحص والسلالات مع الهجن الناتجة في تجربة مقارنة وإيجاد العلاقة بين التباعد الوراثي الجزيئي. إن مؤشرات الـ DNA هي عبارة عن نتابعات على الدنا يمكن من خلالها الاستدلال على مواقع معينة على الجين، حيث أن لكل جين موقعاً خاصاً على الكروموسوم يسمى (locus).

استعملت مؤشرات الدنا في الكشف عن الجينات المقاومة للجفاف والأمراض وذلك لكفاءتها العالية في هذا المجال مقارنة مع المؤشرات المظهرية التي لا تستطيع الكشف عن الجينات. حيث انه باستعمال هذه المؤشرات يمكن تحديد الجينات الفعالة في المقاومة واستعمالها في بناء الخرائط الوراثية أو الجينية (12).

وبسبب عدم تأثر هذه المؤشرات بالبيئة واحتياجها إلى كميات قليلة من العينات وسرعتها وقدرتها في الكشف عن مئات المواقع الجينية (locus) وبعدها اليات للموقع الواحد، فإنها تفضل على المؤشرات الأنزيمية والمظهرية (6) ويمكن الحصول على نفس النتائج عند تحليل أي جزء من الكائن الحي وفي أي مرحلة عمرية، بسبب اعتماد هذه المؤشرات على مادة الـDNA الموجودة في جميع خلايا الكائن الحي، وهي تمتاز بالثبات والقدرة على كشف التباينات بين الأفراد (13). من هذه المؤشرات هي المؤشرات المعتمدة على تقانة الـPCR هو PCR Polymerase، عبارة عن تفاعل انزيمي خارج خلوي يمكن من خلاله تكثير تسلسلات قصيرة من الدنا باستعمال بواقي عشوائية أو متخصصة، قواعد نتروجينية dNTPs وإنزيم البلمرة Taq DNA polymerase (8).

المواد وطرائق العمل

1- التراكيب الوراثية (Genotype)

استخدمت في الدراسة سبع سلالات من الذرة الصفراء واثنان عشر هجيناً فردياً ناتجاً عن تضريب (سلالة × الفاحص) بين تلك السلالات) كما مبين في أدناه:

جدول (1) يمثل السلالات المستخدمة في الدراسة

اسم السلالة	رقم السلالة
DK	1 أباء
OH40	2 أباء
W17	3 أباء
ZP607	4 أمهات
R153	5 أمهات
IK8	6 أمهات
HS	7 أمهات

استخلاص الحامض النووي DNA

تمت عمليات استخلاص الحامض النووي DNA في مركز بحوث التقنيات الأحيائية في جامعة النهريين سنة 2013 وفقاً للطريقة المرفقة (Geneaid@genomic DNA mini kit Plant) مع عدة الاستخلاص، وتتضمن هذه العدة المحتويات المدرجة في الجدول (2) بالإضافة إلى المواد الأتية:

جدول (2) مكونات عدة استخلاص DNA

Name	Name
Elution Buffer	GP1 Buffer
RNase(10mg/ml)	GPX1 Buffer
Filter Column	GP2 Buffer
GD Column	GP3 Buffer
2ml collection tube	W1 Buffer
	Wash Buffer

طريقة العمل

- 1- أخذت كمية عشوائية من الحبوب لكل تركيب وراثي وطحنت جيدا.
- 2- طحنت الحبوب بعد معاملتها بسائل النيتروجين على شكل مسحوق (Powder)، ونقل المسحوق إلى أنبوبة طرد مركزي 1.5 مللتر.
- 3- وزن 20 غم من الحبوب المطحونة لكل عينة وأخذ كمية 2-4 غم لكل عينة.
- 4- أضيف 400 مايكروليتر GP1 و 5 مايكروليتر RNase A إلى أنابيب الطرد المركزي، ووضع في جهاز المازج الدوار (Centrifuge/Vortex) لمدة 5 دقيقة.
- 5- حضنت أنابيب الطرد المركزي بدرجة حرارة 65م لمدة عشر دقائق مع الرج لكل خمس دقائق في الحمام المائي، وبنفس الوقت يحضن Elution Buffer للاستعمال في الخطوات اللاحقة.
- 6- أضيف 100 مايكروليتر من GP2 Buffer ووضع في جهاز المازج الدوار.
- 7- وضعت الأنابيب في الثلج لمدة (3) دقائق.
- 8- وضع Filter column في أنبوبة الجمع Collection tube حجم 2 مللتر ونقلت العينة إلى Filter column.
- 9- تم نبذ الأنابيب بجهاز الطرد المركزي بسرعة 13000 دورة/دقيقة لمدة دقيقة واحدة.
- 10- تم التخلص من Filter column ونقل الراشح بحذر من أنبوبة الجمع (2 مللتر) إلى أنبوبة طرد مركزي أخرى (1.5 مللتر).
- 11- أضيف حجم ونصف GP3 Buffer (مثلا إضافة 750 مايكروليتر من GP3 و 500 مايكروليتر من الراشح) وتوضع مباشرة إلى جهاز المازج الدوار لمدة 5 ثانية.
- 12- تم إجراء الخطوات (3-9) لغرض تحليل الأنسجة.
- 13- وضع GD Column في أنبوبة الجمع (Collection Tube) حجم 2 مايكروليتر.
- 14- يوضع في جهاز الطرد المركزي لمدة 3 دقيقة بسرعة فائقة 13000 دورة/دقيقة.
- 15- إعادة عملية الطرد المركزي ليُجف GD Column تماما.
- 16- إضافة محلول الغسل ثم إضافة 400 مايكروليتر من الايثانول المطلق إلى GD Column.

- 17- ثم الطرد مركزيا بالسرعة الفائقة 13000 دورة/ دقيقة لمدة 30 ثانية يهمل الراشح ويوضع GD Column في أنبوبة جمع جديد.
- 18- اعادة عملية الطرد المركزي ليجف GD Column تماما لمدة 3 دقيقة.
- 19- نقل GD Column الى انبوب طرد مركزي جديد ونظيف 1.5 مللتر
- 20- اضافة 100 مايكروليتر من Solution Elution مباشرة إلى حشوة الفلتر .
- 21- انتظر حتى يتسنى لـ Solution Elution أن يمتص من قبل حشوة الفلتر لمدة (3-5) دقيقة .
- 22- يطرد مركزيا بالسرعة الفائقة 13000 دورة/ دقيقة لمدة 30 ثانية حيث يتم الحصول على الـ DNA النقي.

تقدير تركيز الحامض الـ DNA ونقاوته

تمت عملية تخفيف الحامض النووي DNA وذلك بإضافة 990 ميكروليتر ماء مقطر إلى 10 ميكروليتر من DNA وقراءة مقدار امتصاص العينة للأشعة فوق البنفسجية بجهاز UV Spectrophotometer الذي يستخدم لقياس الكثافة الضوئية عند الطول الموجي 260 و 280 نانوميتر. وتم تطبيق القانون التالي

تركيز الـ DNA (ملغرام/مايكروليتر) = مقدار الامتصاصية عند طول موجي 260 نانوميتر لمليتر واحد من العينة المخففة × عامل التخفيف × 40

النقاوة = الامتصاصية عند طول موجي 260 نانوميتر / الامتصاصية عند طول موجي 280 نانوميتر.

نسبة النقاوة هي احدى المؤشرات الدالة على نقاوة استخلاص DNA ومدى تلوثه بالبروتين (7).

تفاعل أنزيم البوليميريز المتسلسل PCR استخدمت في الدراسة عشرة بوائى المبينة تفصيلها في أدناه:

جدول (3) البادئات المستخدمة في الدراسة

Name Primer	5'-3' Sequence Primer
OPA-07	5'-AAGTCCGCTC -3'
OPA-09	5'-GGGTAACGCC -3'
OPA-11	5'-CAATCGCCGT -3'
OPA-13	5'-CAGCACCCAC -3'
OPC-12	5'-TGTCATCCCC -3'
OPD-20	5'-TGTCATCCCC -3'
OPI-01	5'-AACCTGGCA-3'
OPO-04	5'-AACCTGGCA-3'
OPN-16	5'-CAAGGTGGGT -3'
GB8	5'-GTCCACACGG -3'

طريقة العمل:

- 1- استخدمت الطريقة المرفقة مع العدة AccuPower® PCRPreMix المجهزة من شركة Bioneer.
- 2- إضافة 1.5 مايكروليتر (NaCl) الى الأنبوبة الخاصة بالطقم المستخدم.
- 3- إضافة 2 مايكروليتر من البادئ المستخدم.
- 4- إضافة 6.5 مايكروليتر من الماء المقطر.
- 5- ثم تضاف كمية 5 مايكروليتر من DNA الخاص بكل تركيب وراثي إلى الإضافات السابقة بحيث يصبح الحجم 20 مايكروليتر مع المادة الموجودة في الأنبوبة.
- 6- ترج جيدا في جهاز وتترك مدة دقيقتين لحين تجانس المواد المضافة.
- 7- توضع العينات في جهاز المبادل الحراري (Thermocycler) ونفذ البرنامج كما في الجدول (4).

جدول (4).

Step	Temperature	Time	No. of cycles
Denaturation	94 °C	1 min	40
Annealing	41 °C	1 min	
Extension	72 °C	10 min	
Final Extension	72 °C	3 min	

بعد انتهاء التفاعل وضعت العينات في المجمدة.

ترحيل ناتج PCR في هلام الاكاروز

1. تم تحضير الهلام بإضافة 0.4 غم من الاكاروز ذات تركيز 1.5% إلى 50 مللتر من TBE بقوة 1X ثم وضع في بيكر داخل جهاز Microwave oven إلى حين اكتمال الإذابة وترك ليبرد إلى درجة حرارة 55-50 م°.
2. تحضير القالب المعد ووضع المشط وسكب الهلام برفق وبشكل مستمر داخل القالب لمنع حدوث الفقاعات وترك حتى يتصلب.
3. رفع المشط وغمر القالب الذي يحتوي على الهلام في محلول TBE بقوة 1X.
4. وضع 3 مايكروليتر من صبغة التحميل على ورق الألمنيوم لـ عينة ثم مزجت مع 7 مايكروليتر من الحامض النووي RNA لكل عينة وأيضاً مع 5 مايكروليتر من الدليل الحجمي (DNA Marker).
5. وضع الدليل الحجمي في الحفرة الأولى للمقارنة، ثم حملت العينات الأخرى حسب التسلسل المعلم عليها.
6. تشغيل الجهاز وتثبيت الفولتية بقدرة 50 فولت.
7. ينتهي الترحيل بعد مرور ساعة ونصف إي عندما تصل الصبغة الزرقاء إلى حافة نهاية الهلام.
8. رفع الهلام ووضع في حوض يحتوي على صبغة بروميد الاثيديوم في مكان مظلم مدة 30 دقيقة.

فحص الهلام باستخدام جهاز الأشعة فوق البنفسجية U.V وتصويره باستخدام كاميرا من نوع Polaroid

Black – White Film Type 667.

معادلات حساب درجة القرابة الوراثية:

$$\text{Genetic Similarity (GS)} = 2N_{ij}/(N_i+N_j)$$

Where: G_s =Genetic Similarity between two populations.

N_{ij} = Total number of loci (bands) in populations i and j .

N_i = Total number of loci (bands) in population i .

N_j = Total number of loci (bands) in population j .

Polymorphism was estimated according to the following formula:

$$\text{Polymorphism \%} = (N_p/N_t) \times 100$$

Where: N_p =the number of polymorphic bands of primer.

N_t = the total number of bands of same primer.

النتائج والمناقشة

عزل الـDNA المجيني

تم استخلاص الـDNA من البذور للتراكيب الوراثية التسعة عشر المستخدمة في الدراسة بحسب طريقة (Genedia) والمعتمدة أساساً على مبادئ العزل الواردة في (Saghai-Marouf وآخرون، 1984)، وأن الـDNA المستخلص بهذه الطريقة مناسب لتفاعلات الـPCR من حيث الكمية والنقاوة، فقد تم الحصول على كمية جيدة من الـDNA تقدر بـ (150-200) مايكرو غرام لكل 20 غرام من البذور لكل صنف من التراكيب الوراثية، وبنقاوة تتراوح بين (1.4) إلى (1.73). إذ تم الاعتماد على قراءة الامتصاص لطيف الأشعة فوق البنفسجية عند الطول الموجي (260) و(280) نانوميتر؛ لتقدير كمية الـDNA المستخلص ونقاوته، وتم ضبط تخفيف عينات الـDNA للحصول على تركيز (50 نانوغرام) لكل مايكرو ليتر، وهو التركيز المناسب لإجراء تفاعلات الـPCR.

نتائج الـRAPD

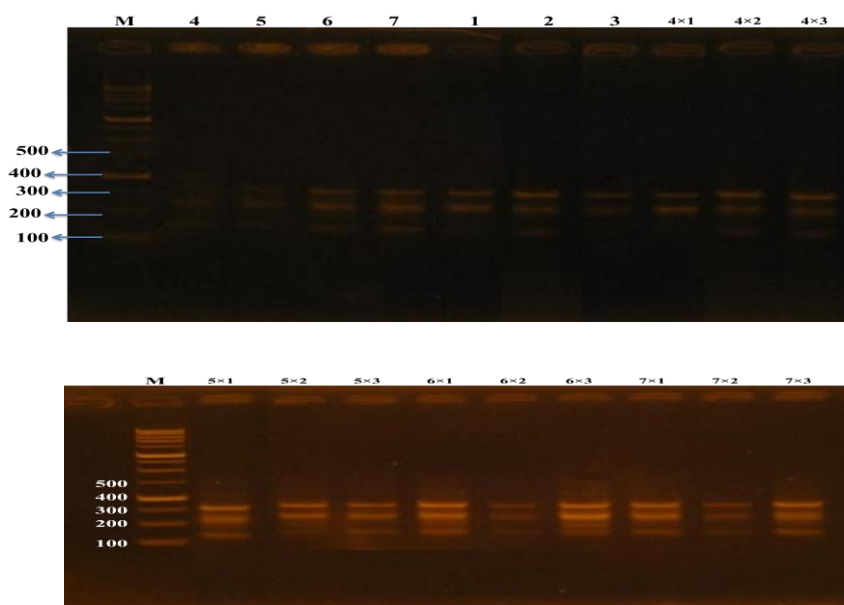
أجريت عدة تجارب للوصول إلى ظروف تفاعل مثلى (Optimization) فمن خلال استخدام تراكيز مختلفة للدنا المجيني أظهر التركيز الذي تراوح بين (25-50) نانوغرام/مايكروليتر أفضل النتائج، وكذلك فقد تم برمجة جهاز المبلر الحلقي Thermocycler بعدة برامج وتنفيذها بأعداد دورات ودرجات حرارة وفترات زمنية مختلفة وكان أكثر البرامج ملائمة هو البرنامج الذي استخدم في هذه الدراسة والذي كانت عدد دوراته (40) دورة.

كما اظهر التركيز (10) بيكومول للبادئ أفضل النتائج، أما بالنسبة لتركيز أيونات المغنيسيوم فقد تم اختيار التركيز الأمثل له بعد ضبط تركيز إنزيم البلمرة اللازم للتفاعل فقد وجد أن الوحدة الأنزيمية الواحدة (1U) لكل عينة هي التركيز المناسب وباستخدام تراكيز مختلفة لأيونات المغنيسيوم تم التوصل إلى أن التركيز (1.5) ملي مولر هو التركيز الذي يعطي أعلى فعالية للإنزيم ضمن خليط التفاعل، وكذلك للحصول على دقة في العمل يجب التأكد من دقة الماصات المستخدمة في إجراء التجارب وضبط قياساتها وبعد ضبط جميع هذه العوامل والظروف أجريت تجارب RAPD على الدنا المجيني للتراكيب الوراثية الهجن مع إبانها وحصلنا على النتائج الآتية:-

تم استخدام عشرة بوائى في هذه الدراسة خمسة منها لم تظهر نتيجة، قد يعود السبب إلى عدم عثور البائى على موقع مكمّل له ضمن تتابعات الـDNA المجيني للتراكيب الوراثية المدروسة (الأباء والهجن الناتجة عنها) (Devos وGale، 1992). أما بقية البوائى الأخرى فقد وجدت لها تتابعات مكملة على الـDNA المجيني للتراكيب الوراثية المستخدمة في هذه الدراسة وقد بينت من خلال هذه الدراسة التباعد الوراثي والتقارب الوراثي بين التراكيب الوراثية هذه وهي كالاتي:

أ- البائي GB8

أنتج هذا البائي ثلاثة حزم متباينة بالعدد والوزن الجزيئي بين التراكيب الوراثية المستخدمة في هذه الدراسة في حين أن هذا البائي تمكن من التعرف على التتابعات المكملة له في الـDNA المجيني للتراكيب الوراثية حيث أظهرت هذه الحزم تباينا واضحا في الموقع والوزن الجزيئي لها، تراوحت الأوزان الجزيئية من (100 الى (300 bp (شكل 1).

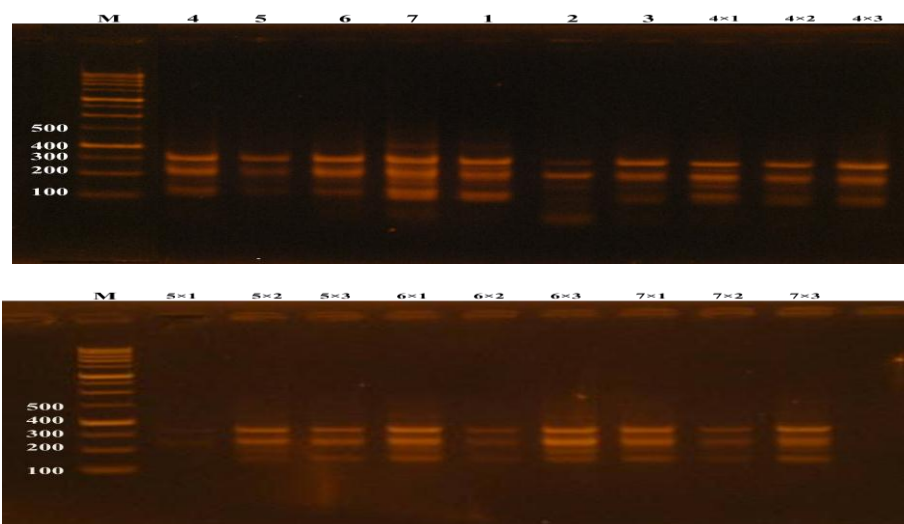


شكل (1) : ترحيل نواتج تفاعل PCR للبادئ GB8 ولأبائها وهجنها من الذرة على هلام الاكاروز 0.8 % (1.30 ساعة ، 5V/cm ، 1X TBE) المصورة تحت الأشعة فوق البنفسجية . U. V بعد التصبغ بصبغة بروميد الاثيديوم

ومن خلال الشكل يوضح بأن الحزمتين ذات الوزن الجزيئي (200 و 300) bp قد اظهرت في اغلب التراكيب الوراثية وهذا يدل على وجود متمات لها في جميع هذه التراكيب، أما الحزمة ذات الوزن الجزيئي (100) bp فقد ظهرت في جميع التراكيب الوراثية نتيجة البادئ على المتمات الخاصة به على DNA المجيني لكل تركيب وراثي عدا التراكيب الوراثية (1 و 3) والهجين (1×4) إذ لم يعثر البادئ على تتابع متم له في جينوم التراكيب المذكورة وبذا فهي مميزة لها.

ب -البادئ OPA-09

في هذا البادئ تم الحصول على أربعة حزم متباينة بالعدد والوزن الجزيئي بين التراكيب الوراثية التسعة عشر حيث تمكن هذا البادئ من التعرف على التتابعات المكملية له في الـDNA المجيني للتراكيب الوراثية، حيث أظهرت تباينا واضحا في الموقع والوزن الجزيئي الذي تراوح بين (100-400) bp (شكل 2) ومن خلال الشكل الظاهر بالأسفل الذي يوضح بان الحزمتين ذات الوزن الجزيئي (300) و (400) قد ظهرت في جميع التراكيب الوراثية وهذا ما يدل على عثور هذا البادئ على التتابعات الخاصة به في هذه التراكيب الوراثية أما في الحزمة ذات الوزن الجزيئي (200) فقد أعطت توافقا مع جميع التراكيب الوراثية عدا التراكيب التالية (5 و 4×3 و 5×1 و 5×3 و 6×2 و 7×2) فان هذا البادئ لم يعطي أي توافقا معها وبهذا يمكن تمييز هذه التراكيب الوراثية عن باقي التراكيب الأخرى التي أعطت توافقا للبادي بهذه الحزم .

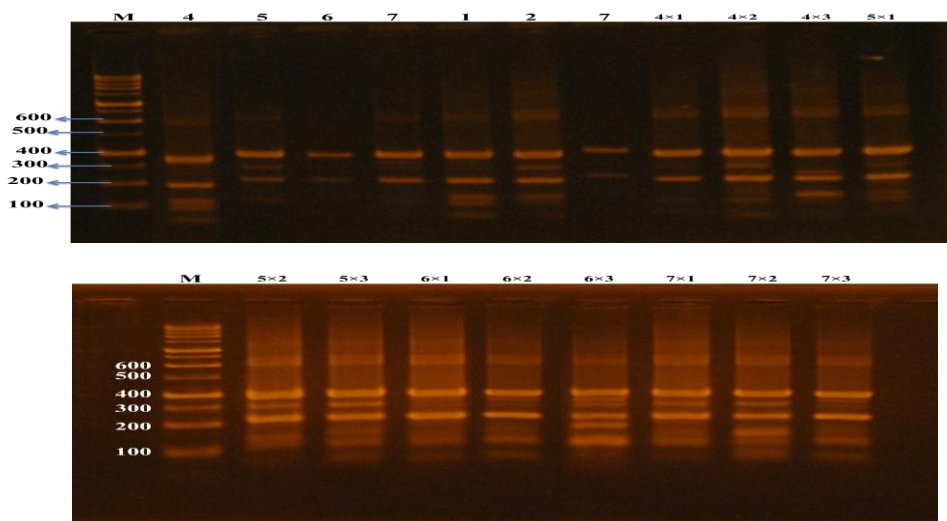


شكل (2): ترحيل نواتج تفاعل PCR للبائ OPA-09 للآباء وهجنها من النرة على هلام الاكاروز 0.8 % (1.30 ساعة ، 5V/cm ، 1X TBE) المصورة تحت الأشعة فوق البنفسجية . U. V. بعد التصبغ بصبغة بروميد الاثيديوم

ج -البادئ OPC-12

في هذا البادئ تم الحصول على ست حزم متباينة العدد والوزن الجزيئي للتركيب الوراثية التسعة عشر حيث تمكن هذا البادي من التعرف على التتابعات المكمل له في الـDNA المجيني للتركيب الوراثية المذكورة ، حيث اظهر تباينا واضحا في الوزن الجزيئي للحزم حيث تراوح بين (100- 600) bp. اظهر هذا البادي توافقا بين تسلسل البادئ وتتابع الـDNA القالب في جميع التركيب الوراثية في الحزمتين ذات وزن جزيئي (200 و 400) bp، كما اظهر هذا البادئ توافقا مع الـDNA القالب في جمع التركيب الوراثية إلا في السلالة (5 و 6 و 7) والفاحص (3) بالنسبة للآباء والهجين (5×1) بالنسبة للهجن حيث لم يكن هنالك توافقا بين تسلسل البادئ وتتابع الـDNA مما نتج عنه اختفاء لقطعة وزنها الجزيئي (100bp).

كذلك اظهر البادئ توافقا مع الـDNA القالب لجميع التركيب الوراثية عدا التركيب التالية الفاحص (3) والسلالة (6) فانه لم يكن هنالك توافقا بين تسلسل البادئ وتتابع الـDNA مما نتج عنه اختفاء لقطعة وزنها الجزيئي (600bp). كذلك اظهر البادئ توافقا مع الـDNA القالب لجميع التركيب الوراثية عدا التركيب التالية الفاحص (3) والسلالة (4 و 6) والهجين (1×6) فانه لم يكن هنالك توافقا بين تسلسل البادئ وتتابع الـDNA مما نتج عنه اختفاء لقطعة وزنها الجزيئي (300bp). أما الحزمة ذات الوزن الجزيئي فلم يظهر فيها اي توافق بين تسلسل البادئ الـDNA المجيني للتركيب الوراثي وكما بينت في (الشكل 3).



شكل (3): ترحيل نواتج تفاعل PCR للبادئ OPC-12 وللآباء وهجنها من الذرة على هلام الاكاروز 0.8 % (1.30 ساعة، 1X TBE , 5V/cm) المصورة تحت الأشعة فوق البنفسجية U. V. بعد التصبغ بصبغة بروميد الاثيديوم

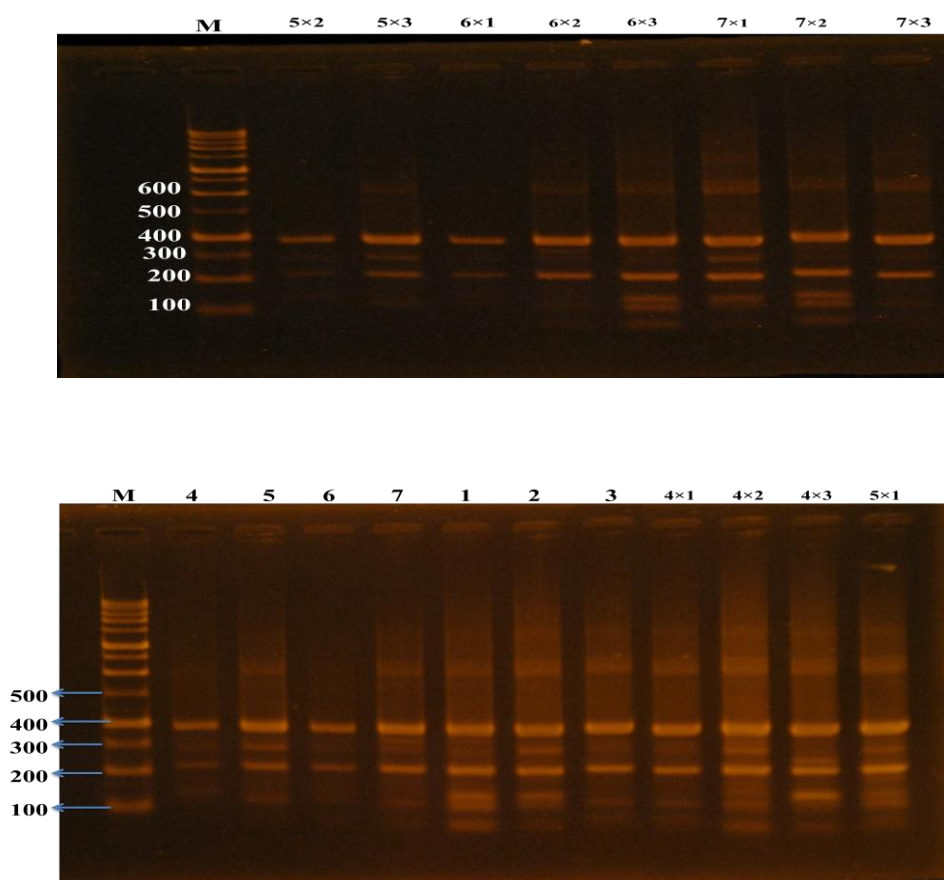
د- البادئ OPN-16

في هذا البادئ تم الحصول على اربع حزم متباينة العدد والوزن الجزيئي للتركيب الوراثية التسعة عشر حيث تمكن هذا البادي من التعرف على التتابعات المكمل له في الـDNA المجيني للتركيب الوراثية المذكورة، حيث اظهر تباينا واضحا في الوزن الجزيئي للحزم حيث تراوح بين (100-400) bp.

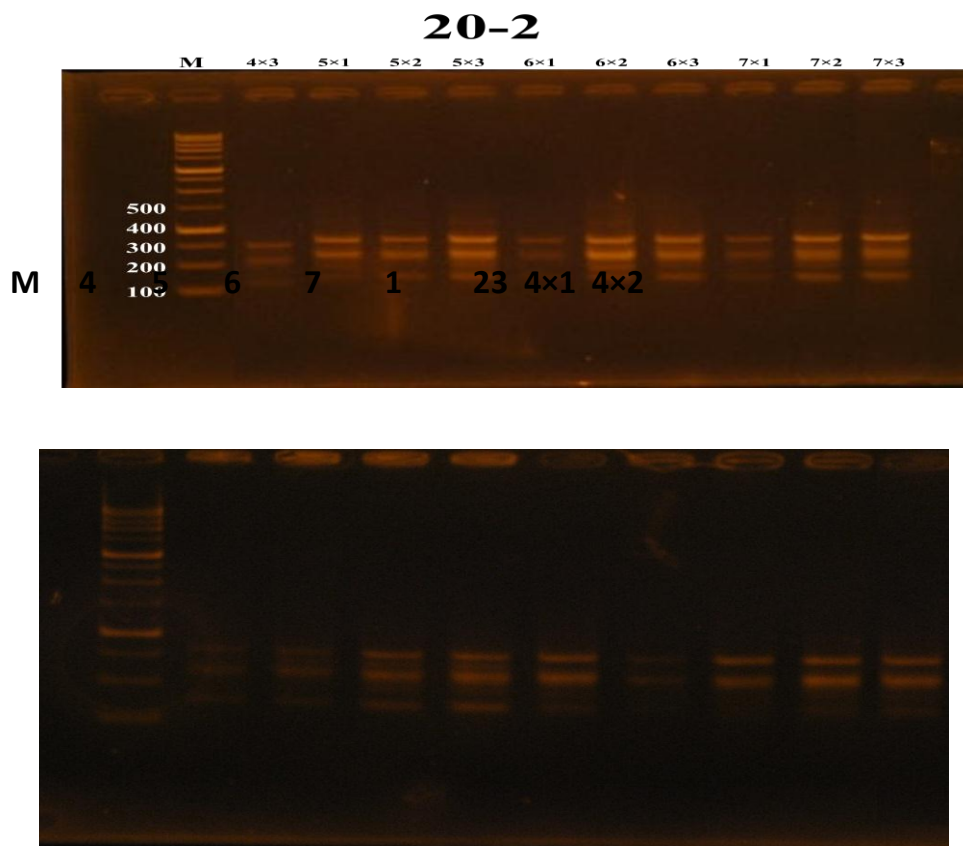
اظهر هذا البادي توافقا بين تسلسل البادئ وتتابع الـDNA القالب في جميع التراكيب الوراثية في الحزمتين ذات وزن جزيئي (200 و 400 bp). واطهر هذ البادئ توافقا مع الـDNA القالب في جميع التراكيب الوراثية إلا في التراكيب (6 و 6×1) لم يكن هناك توافقا تسلسل البادئ وتتابع الـDNA القالب مما أدى إلى اختفاء لقطعة وزنها الجزيئي (100 bp). كذلك اظهر البادئ توافقا مع التراكيب الوراثية إلا في الهجن (6×1 و 7×3 و 5×2) لم يكن هناك توافقا بين تسلسل البادئ وتتابع الـDNA القالب مما أدى إلى اختفاء لقطعة وزنها الجزيئي (300 bp) كما في (الشكل 4).

هـ -البادئOPD-20

في هذا البادئ تم الحصول على ثلاثة حزم متباينة العدد والوزن الجزيئي للتراكيب الوراثية التسعة عشر حيث تمكن هذا البادي من التعرف على التتابعات المكملة له في الـDNA المجيني للتراكيب الوراثية المذكورة، حيث اظهر تباينا واضحا في الوزن الجزيئي للحزم حيث تراوح بين (100-300) bp. اظهر هذا البادي توافقا بين تسلسل البادئ وتتابع الـDNA القالب في جميع التراكيب الوراثية التسعة عشر إلا في التراكيب (2 و 3) لم يكن توافقا بين تسلسل البادئ وتتابع الـDNA القالب مما أدى إلى اختفاء قطعة وزنها (100) bp وكما في الشكل (5).



شكل (4): ترحيل نواتج تفاعل PCR للبادئ OPN-16 للآباء وهجنها من الذرة على هلام الاكاروز 0.8 % (1.30 ساعة، 5V/cm، 1X TBE) المصورة تحت الأشعة فوق البنفسجية V. U بعد التصبغ بصبغة بروميد



شكل (5): ترحيل نواتج تفاعل PCR للبادئ OPD-20 ولاباء وهجنها من الذرة على هلام الاكاروز 0.8 %
(1.30 ساعة، 5V/cm، 1X TBE) المصورة تحت الأشعة فوق البنفسجية U. V. بعد التصبغ بصبغة بروميد الاثديوم

قيم الأبعاد الوراثية بين التراكيب الوراثية (السلالات والفواحص) للذرة الصفراء باستخدام تقانة RAPD

عند حساب البعد الوراثي بين التراكيب الوراثية قيد الدراسة بالاعتماد على النتائج التي أظهرت عشرون حزمة ذات تعدد شكلي باستخدام برنامج (Nei&Li's Coefficient 1979)، وبالاعتماد على مقياس التشابه Hamming Similarity Index وكما مبين في الجدول (5). أظهرت النتائج بأن أقل نسبة من التشابه (0.686) كانت بين الفاحص (1) والسلالة (6) إذ شكلا أقل مجموعة صغيرة وهي أقل قيمة ظهرت في جدول التباعد الوراثي في حين وجدت أعلى نسبة من التشابه الوراثي (0.905) بين الفاحص (3) والسلالة (5)، ومن خلال الجدول نفسه نلاحظ بأن الفاحص (T6) أكثر الأصناف المتباعدة وراثياً عن بقية الأصناف المدروسة، وعليه نجد بأن الفاحص (1) والسلالة (6) هما الأبعد وراثياً وهذا يمكننا من إجراء التهجين بينهم للحصول على هجين فردي ممكن أن يكون أفضل ما يكون عند الزراعة بالمقارنة مع صفاتهم الأخرى

وهذا بدوره يعطي المزارعين مجال أوسع للبحث الأفضل لتكثير النباتات المتباعدة وراثيا ذات الإنتاجية والمواصفات العالية واستبعاد النباتات ذات الكفاءة القليلة .

جدول (5) يوضح قيم الأبعاد الوراثية للأبء (الفواحص والسلالات) باستخدام تقنية RAPD

	4	5	6	7	1	2	3
4	1						
5	0.8	1					
6	0.848	0.8	1				
7	0.821	0.878	0.765	1			
1	0.829	0.837	<u>0.686</u>	0.762	1		
2	0.8	0.903	0.722	0.829	0.791	1	
3	0.778	0.824	<u>0.905</u>	0.757	0.821	0.737	1

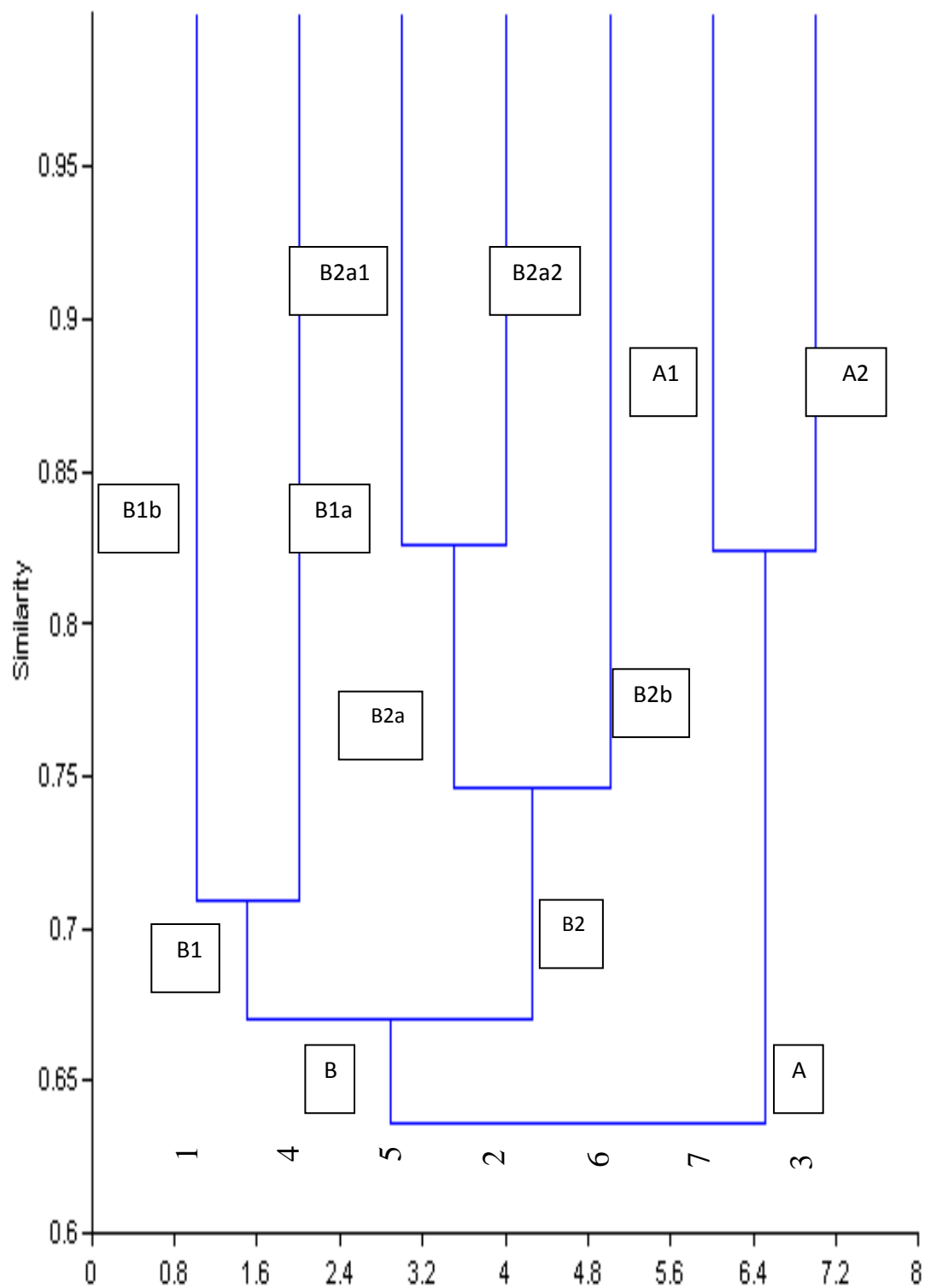
4-4 رسم شجرة القرابة الوراثية للأبء اعتماداً على مؤشرات RAPD

أن شجرة القرابة هي تخطيط يظهر العلاقات التطورية لمجموعة من الكائنات الحية التي نشأت من سلف مشترك. يكون السلف المشترك في جذع الشجرة والكائنات التي تنشأ منه توجد في نهاية فروع الشجرة. تشير المسافة بين المجموعة الواحدة والمجموعات الأخرى إلى درجة العلاقة بينهم. فالمجموعات القريبة من بعضها توضع في فروع قريبة من بعضها، وعلى الرغم من ذلك فإن هذه الطريقة تقديرية ولكنها طريقة سهلة لدراسة علاقات القرابة والتطور. وبشكل عام فإن الكائنات التي تكون متشابهة شكلياً مع بعضها أو متشابهة وراثياً مع بعضها من المحتمل تكون قريبة من بعضها أكثر من الكائنات التي تكون ذات بنى أو تسلسلات مختلفة.

وقد تكون الأفراد مختلفة مع بعضها مظهرياً ولكنها قريبة من بعضها جينياً وبالتالي قد تعود هذه الاختلافات إلى التأثيرات البيئية فقط لتؤخذ بعين الاعتبار في تحديد درجة القرابة بين الأفراد. أظهر التحلي العنقودي للأصناف المدروسة باستخدام مؤشرات RAPD واعتماداً على طريقة Unweighted Pair-Group Method using an Average أن الأبء التي استخدمت في الدراسة ومن خلال الشكل (6) قد توزعت في مجموعتين رئيسيتين A و B وان نسبة التشابه بين المجموعتين 62%، ضمت المجموعة A تركيبين وراثيين هما a1 ويمثل الفاحص 3 والصنف الآخر a2 ويمثل السلالة (6) وان نسبة التشابه بين الصنفين تقريباً 83%. أما المجموعة الثانية B ضمت مجموعتين رئيسيتين هما B1 و B2 وان نسبة التشابه ما بين المجموعتين حوالي 67% في حين احتوت المجموعة B1 على تركيبين وراثيين هما B1a ويمثل الفاحص (1) و B1b ويمثل السلالة (4) وان نسبة التشابه بينهما حوالي 71%.

وشملت المجموعة B2 مجموعتين ثانويتين وكانت درجة التشابه بينهما حوالي 74% والمجموعتين هما B2a وضمت هذه المجموعة تركيبين وراثيين هما B2a1 وهو يمثل التركيب الوراثي للسلالة (4)

والتركيب الآخر هو B2a2 وضم التركيب الوراثي للفاحص (2) وكانت درجة القرابة بينهما حوالي 83% تقريباً. أما المجموعة الأخرى فضمت تركيب وراثي واحد مثل بالسلالة (7)



شكل رقم (6) شجرة القرابة الوراثية بين الأبناء

المصادر

- 1-Alfalahi ,Ayoob O. Mohammed.2011. Molecular and Phenotypic variations among maize cmspopulations . Doctorate Dissertation .Agric. Coll. –Univ of Baghdad. Pp.100.
- 2-Bardakci, F. 2001. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)
- 3-Betran, F. J., J. M. Ribaut, D. Beck and D.G. de Leon 2004. Genetic
- 4-Crow, J.F. 1998. 90 years ago: The beginning of hybrid maize. *Genetics*,148:923-928.
- 5-Devos, K. M. and Gale , M. D. (1992). The use of random amplified polymorphic DNA markers in wheat. *Theo. And Appl.Genet.*84:567-572.
- diversity, specific combining ability and heterosis in tropical maize
- 6-Han , Y.; Liu , X.; Benny , U.; Kistler , H. C. and Venetten , H. D.(2001). Genes determining pathogenicity to pea are clustered on asupernumerary chromosome in the fungal plant pathogen *Nectria haematococca* .*The Plant Journal*.25 (3): 1-11.
- 7-Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J. (2001). *In Vitro* Application of DNA by the Polymerase Chain Reaction, in *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. , Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA, p.691. Markers. *Turk J. Biol*, 25:185-196.
- 8-Roche. Molecular . Biochemical company .(1999). *Taq* DNA polymers from *Thermusaquaticus* BM. Germany .
- 9-Saghai- Maroof, M. A., Soliman, K. M., Jorgensen, R. A. and Allard, R. W. (1984). Ribosomal DNA spacer length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location and population dynamics *Proc. Natl. Acad. Sci*, USA. 81: 8014-8018.
- 10- Saghai- Maroof, M. A., Soliman, K.M., Jorgensen, R. A. and Allard, R. W.(1984). Ribosomal DNA spacer length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location and population dynamics *proc. Nalt. Acad. Sci*, USA. 81:8014 - 8018.
- 11- Trindade, A.P.R., R.J.B. Pinto, A.T.A. Junior, C.A. Mangolin, M.F.S. Machado and C.A. Scapim. 2010. Genetic diversity of breeding popcorn lines determined by SSR markers. *Electronic Journal of Biotechnology*, 13(1): 1-9.under stress and non-stress environment. *Crop Sci*. 43: 797-806.
- 12- Wang, L. F., Ma, J. X., Zhou, R. H., Wang, X. M, and Jia, J. Z. (2002). Molecular tagging of the yellow rust resistance gene *Yr10* in common wheat, P.I. 178383 (*Triticumaestivum* L.). *Euphytica* 124:71-73.
- 13- Weigand, F. Baum,M. and Udupa,S.(1993).DNA molecular marker techniques, technical manual.No.(20). international center foragri cultural research in the dry area . alppo, Syria .