Journal homepage
www.ajas.uoanbar.edu.iq
Anbar Journal of Agricultural Sciences
(University of Anbar – Agriculture College)

التقييم الجزيئي للتباين الوراثي بين بعض سلالات الذرة الصفراء Zea mays L. وعلاقتهُ بقوة الهجين

سيف صلاح محيميد العبيدي — كلية الزراعة – جامعة الانبار
محمد عويد غدير العبيدي — كلية الزراعة – جامعة الانبار
فرنسيس اوراها جنو — وزارة الزراعة – دائرة البحوث الزراعية

Article info

Received: 10-04-2018
Accepted: 26-06-2018
Published:04-12-2018

DOI -Crossref:
10.32649/aagrs.2018.153334

Cite as:
Al-Obaidi, S. S., AL-Ubaidi, M. O., and Geno, F. O. (2018). Molecular Evaluation of Genetic Variation Among Some Maize (Zea mays L.) Inbred Lines And Its Relationship With Hybrid Vigor. Anbar Journal of Agricultural Sciences, 16(1): 180- 196.

©Authors, 2018, College of Agriculture, University of Anbar. This is an open-access article under the CC BY 4.0 license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

الخلاصة:

اجري التضريب التبادلي الكامل بين ست سلالات من الذرة الصفراء في الموسم الخريفي 2016 في أحد حقول كلية الزراعة جامعة الانبار (الموقع البديل – أبو غريب – بغداد)، وقورنت في الموسم الربيعي 2017 في أحد حقول المزارعين في منطقة الصوفية التابعة لمدينة الرمادي غربي العراق وتضمنت التجربة زراعة بذور السلالات والهجن الناتجة من التضريب بينها والتي شملت 30 هجيناً تبادلياً وعكسياً. هدفت الدراسة الى تقويم سلوك السلالات وهجنها التبادلية والعكسية بالطرق الجزيئية.

أوضحت نتائج التحليل الجزيئي لمؤشرات RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) أن البادئات الخمس المستخدمة قد نجحت في تشخيص 32 موقع قطع متخصص منتشرة ضمن جينومات السلالات الأبوية وهجنها التبادلية والعكسية، تعدد شكل 26 موقعاً منها (Polymorphic Loci) مسجلةً نسبة مئوية لتعدد أشكال القطع بلغت 81%، واشارت نتائج مؤشرات ISSR (Inter Single Sequence Repeat) ان البادئات الخمس المستخدمة حققت نجاحاً متميزاً خاصتاً اذا ما قورنت بمؤشرات RAPD حيث سجلت 40 موقع ارتباط، 39 منها متعددة الشكل وبنسبة مئوية لتعدد الأشكال بلغت 97%. جاءت نتائج التحليل العنقودي (Cluster Analysis) للمواقع المكوثرة متماثلة الى حدٍ كبير في كلا التقنيتين المستخدمة في الدراسة، اذ انفصلت التراكيب الوراثية إلى ثلاث مجموعات رئيسة وفقاً لطريقة الجار الأقرب. كانت السلالتان 1 و2 الأكثر تباعداً، إذ انتمتا إلى المجموعتين الأكثر تغايراً على طرفي التجمع الهرمي.

Keywords: Molecular Evaluation, Maize (Zea Mays L.) Inbred, Hybrid Vigor.

MOLECULAR EVALUATION OF GENETIC VARIATION AMONG SOME MAIZE (ZEA MAYS L.) INBRED LINES AND ITS RELATIONSHIP WITH HYBRID VIGOR

S. S. M. Al-Obaidi
University of Anbar
College of Agriculture

M. O. G. AL-Ubaidi
University of Anbar
College of Agriculture

F. O. Gen
Ministry of Agriculture
Dep. of Agricultural Research

Abstract

A full cross was carried out among six inbred lines of maize in the autumn season (2016) in one of the fields of the college of Agriculture, University of Anbar (alternative site-Abu Ghraib-Baghdad). In the spring season (2017) west of Iraq. The experiment included cultivating the seeds of inbreds lines and hybrids resulting from the crossing among them, which included 30 hybrid and reverse hybrids. The aim of the study was to evaluate the behavior of inbred lines and their diallel hybrid and reverse axes by molecular methods.

The results of the Molecular Analysis of RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) showed that the five prefixes were successful in diagnosing 32 specialized cutting sites spread within the genomes of the paternal and crossbreeding genomes, 26 of them polymorphic loci, The results of the ISSR (Inter Single Sequence Repeats) indicators showed that the five prefixes used were particularly successful when compared with RAPD indicators. There were 40 correlation sites, 39 of which were multiform and 97% of the polymorphisms. Cluster analysis results for replicated sites were very similar in both techniques used in the study. The genotypes were separated into three main groups according to the nearest neighbor method. The two breeds 1 and 2 were the most divergent, as they belonged to the two most heterogeneous groups on both ends of the hierarchical assembly.

المقدمة

مثلت الذرة الصفراء (*Zea mays* L.) مصدراً فعلياً للاستهلاك والدخل لملايين الناس في عدة بلدان (18). كونها تساهم مع الحنطة لوحدهما بأكثر من 50% من الانتاج العالمي للحبوب (8). وتبرز اهميتها في الاستهلاك المباشر للإنسان وماشيتهُ. وعلى صعيد آخر تعد مصدراً للمواد الخام في العديد من الصناعات الهامة، بدءً من إنتاج الايثانول (الوقود الحيوي)، والبلاستيك والأصباغ وغيرها (20)

تعتبر الحاجة المتزايدة لهذا المحصول من أهم الدوافع والأسباب لاستنباط أصناف عالية الإنتاج ومتأقلمة، أول ما تبدأ به هذه العملية هو تقييم التنوع الوراثي وتحديد القرابة الوراثية فيما بينها تمهيداً لاختيار المناسب منها وإدخاله

كلمات مفتاحية: التقييم الجزيئي، سلالات الذرة، قوة الهجين.

ضمن برنامج التربية بحسب الهدف. إن زيادة الطلب على رفع إنتاج المحاصيل لسد الحاجة المتزايدة للغذاء في العالم جعل من الضروري البحث والاعتماد على وسائل وطرق جديدة في التربية أكثر قوة وفعالية من الطرق الكلاسيكية. لذا اقترحت أنظمة الوسم الجزيئي والتي تعتبر مستقلة عن التأثيرات البيئية التي تستند إلى المعلمات البيوكيميائية والخلوية لتحديد التنوع الوراثي. وقدمت المؤشرات الجزيئية إسهامات هائلة في استكشاف التنوع الجيني، من المؤشرات الجزيئية شائعة الاستخدام هي مؤشرات RAPD (Randomly Amplified

Polymorphic DNA) ومؤشرات ISSR (Inter Single Sequence Repeats). هذه الأنواع المختلفة من المؤشرات الجزيئية لديها القدرة على التمييز والكشف عن الاختلافات بين الأنماط الجينية هي أفضل التقنيات لتحديد التباين بين مختلف التراكيب الوراثية فيما يتعلق التكلفة، وسهولة الاستخدام، كونها اكثر كفاءة وقابلة للتكرار من النتائج، كما تمثل اختصار للوقت كونها سريعة اذا ما قورنت بالطرق التقليدية (10 و14). ويعتمد معيار اختيار تقنية معينة دون أخرى على عدة عوامل منها: قدرتها على الكشف عن التباين الوراثي، مدى تغطيتها للمجموعة الكروموسومية للنبات قيد الدراسة، ودرجة موثوقيتها وأخيراً حجم المجتمعات (Populations) المدروسة. من هنا جاءت اهمية البحث عن المواد الوراثية ذات الاداء الحقلي المتفوق وتقويم سلوكها الوراثي بالطرق الجزيئية الحديثة لدعم تربية النبات.

مواد وطرائق العمل

ادخلت في الدراسة ست سلالات من الذرة الصفراء (Zm1، Zm2، Zm3، Zm4، Zm5 وZm6). لغرض اجراء التضريبات بينها وانتاج الهجن الفردية وحسب برنامج التضريب التبادلي الكامل (Full diallel) وفق طريقة Griffing (1956) الاولى. اجريت التضريبات في الموسم الخريفي (2016) في احد حقول تجارب كلية الزراعة – جامعة الانبار – أبو غريب، وتم تقييم الاداء للتراكيب الوراثية (6 سلالات و30 هجين فردي) خلال الموسم الربيعي (2017) في مدينة الرمادي مركز محافظة الانبار في حقل أحد المزارعين (منطقة الصوفية). أجريت التحاليل المختبرية الجزيئية في مختبرات دائرة فحص وتصديق البذور – وزارة الزراعة. بعد وصول النباتات لمرحلة 3–5 أوراق أخذت عينة من القمة النامية لكل تركيب وراثي وحفظت مباشرة في أكياس ذات إغلاق منزلق (Zipper bags) في حاوية مبردة ونقلت إلى المختبر. تمت عملية استخلاص الدنا باستخدام عدة الاستخلاص Geneaid (Geneaid Biotech Ltd., South Korea) وحسب تعليمات المجهز.

تم التأكد من كمية ونوعية الدنا المستخلص باستخدام جهاز القطرة النانوية (Nanodrop) وتراوحت قراءة الجهاز بين 1.7. 2 لجميع العينات، وفق المعادلة التالية:

$$\text{Purity of DNA} = O.D_{260} / O.D_{280} = \geq 1.8$$

حيث أن... Optical Density =OD كثافة طيف الامتصاص.

جدول 1 رموز وتتابعات بادئات RAPD المستخدمة في التحاليل المختبرية الجزيئية.

ت	تتابع البادئ `3 → `5	رمز بادئ RAPD
1	TGGGGGACTC	OPH-09
2	GGAAGTCGCC	OPH-04
3	GGAGGGTGTT	OPB-15
4	GTGACGTAGG	OPA-08
5	TGCGCCCTTC	OPB-05

جدول 2 رموز وتتابعات بادئات ISSR المستخدمة في التحاليل المختبرية الجزيئية.

ت	تتابع البادئ `3 → `5	رمز بادئ ISSR
1	AGAGAGAGAGAGAGAGYC	UBC835
2	AGAGAGAGAGAGAGAGYT	UBC834
3	ACACACACACACACACG	UBC827
4	GACAGACAGACAGACA	UBC873
5	GAGAGAGAGAGAGAGAYC	UBC841

جدول 3 البرنامج الحراري لتفاعل PCR لبادئات RAPD لخطوة المضاعفة.

الخطوات	درجة الحرارة C°	الوقت اللازم	عدد الدورات
Initial Denaturation	95	4 min.	1
Denaturation	95	40 Sec.	35
Annealing	42	1 min.	
Extension	72	2 min.	
Final Extension	72	10 min.	1
Hold	4	——	——

جدول 4 البرنامج الحراري لتفاعل PCR لبادئات ISSR لخطوة المضاعفة.

الخطوات	درجة الحرارة C°	الوقت اللازم	عدد الدورات
Initial Denaturation	95	5 min.	1
Denaturation	95	90 Sec.	42
Annealing	55	90 Sec.	
Extension	72	30 Sec.	
Final Extension	72	7 min.	1
Hold	4	——	——

النتائج والمناقشة

التحليل الجزيئي لمؤشرات RAPD

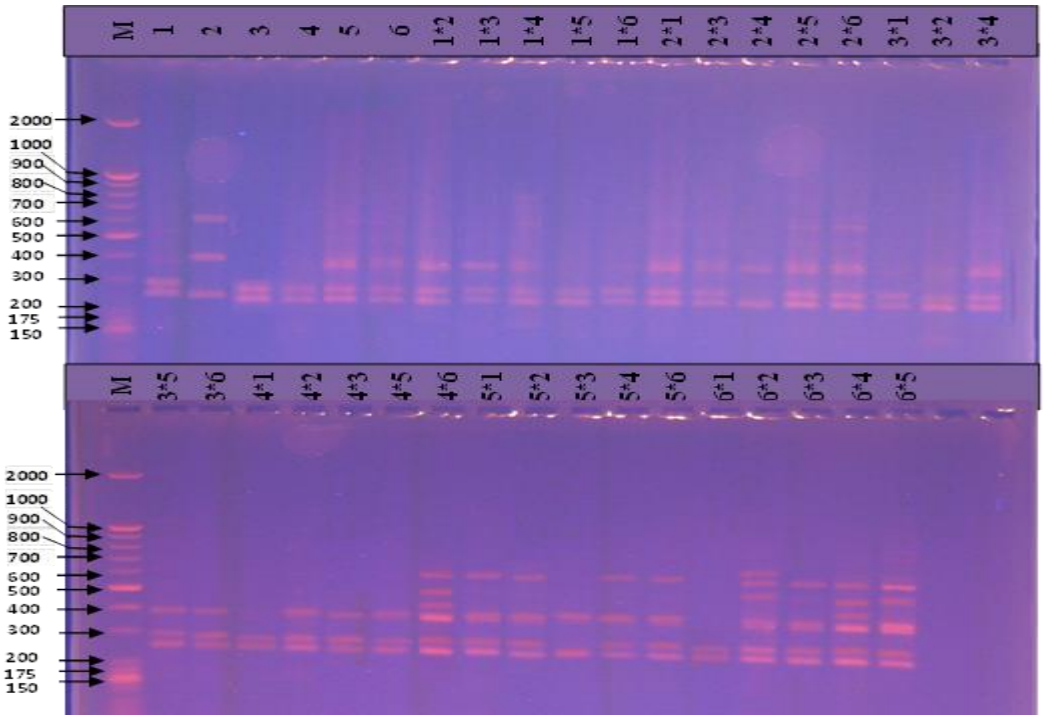
أشارت نتائج التحليل الجزيئي لمؤشرات RAPD إلى ظفر البادئات الخمس المستخدمة بالنجاح في تشخيص ما مجموعه 32 موقع قطع متخصص (Specific Loci) في جينومات التراكيب الوراثية، أذ أظهرت اختلافاً واضحاً في عدد الحزم المتضاعفة وأوزانها الجزيئية وذلك تبعاً للبادئ المستخدم، بلغ عدد الحزم المتباينة 26 حزمة لتصبح نسبة تعدد الأشكال فيها 81.25%، واعتمدت طريقة تحليل نتائج دراسة العلاقة الوراثية على وجود الحزم الناتجة من تضاعف قطع معينة من جينوم نبات الذرة الصفراء أو غيابها وعلى الاوزان الجزئية لتلك الحزم التي تعتمد على العدد والمواقع المكملة لتسلسلات البادئات على شريط الدنا القالب، كما في الجدول 5.

جدول 5 عدد الحزم (bands) الظاهرة باستخدام خمسة بادئات RAPD والنسبة المئوية لتعدد الشكل فيها في الذرة الصفراء.

البادئ	العدد الكلي للقطع المكوثرة	عدد القطع المتعددة الشكل	النسبة المئوية لتعدد أشكال القطع (%)	حجم القطع (زوج قاعدة) bp
OPH-09	7	6	86	700-200
OPH-04	10	8	80	1000-150

OPB-15	4	4	100	500-175
OPA-08	7	6	86	700-200
OPB-05	4	2	50	500-150
المجموع	32	26	81.25	1000-150

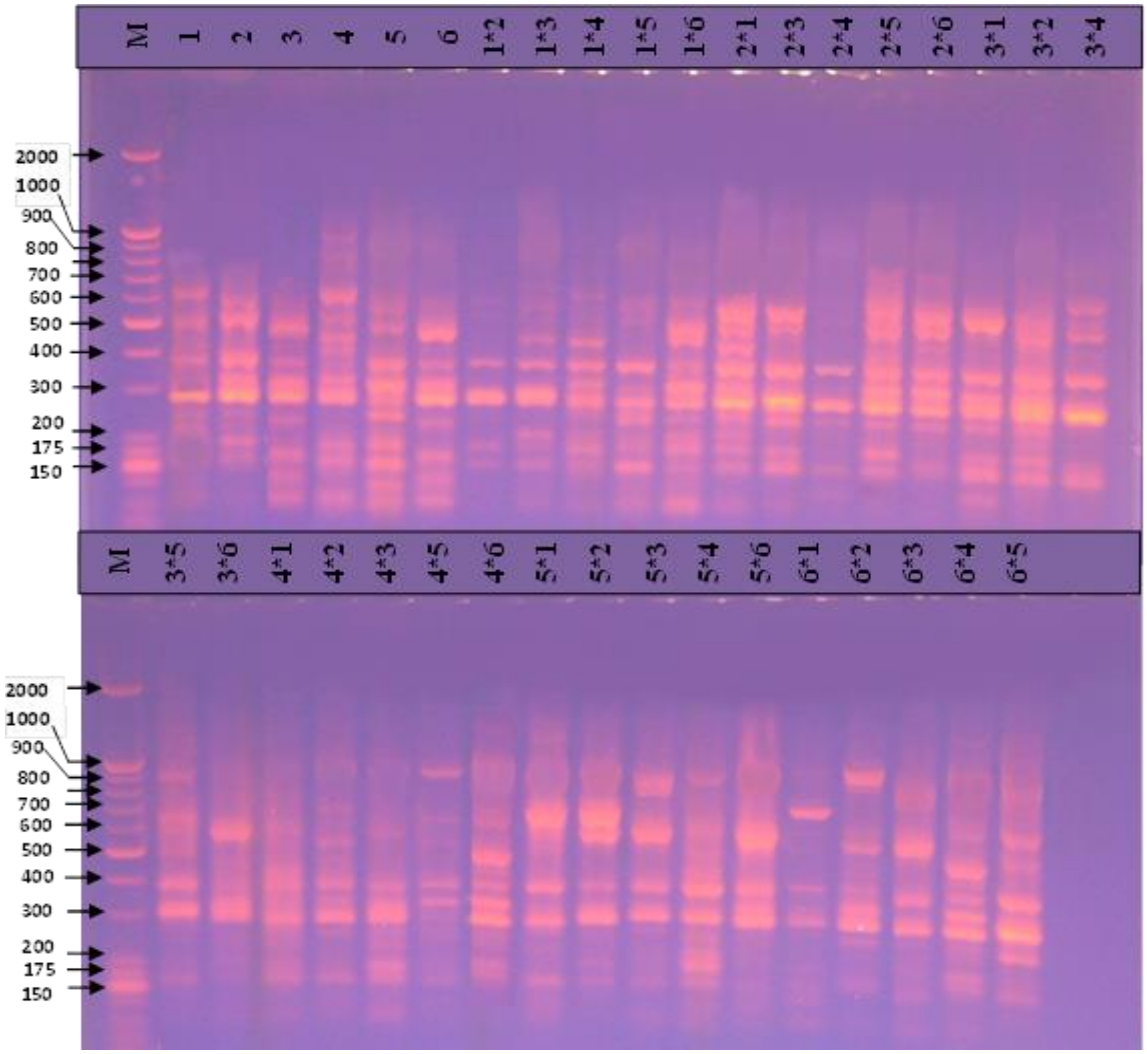
اظهر البادئ OPH-09 (جدول 5) 7 حزم وقد بلغ عدد الحزم المتباينة 6 (polymorphic Fragments) حزم وبالتالي بلغت النسبة المئوية للأشكال المظهرية 86% من اجمالي عدد الحزم الكلية. وأظهرت تبايناً واضحاً في الموقع والوزن الجزيئي الذي تراوح بين 200-700 bp. ويتضح من الشكل 1 ان الحزمة ذات الوزن الجزيئي 150 bp قد ظهرت في جميع التراكيب الوراثية المدخلة. ومن خلال التشخيص الجزيئي تبين أن الهجن 4x6 و6x2 و6x4 قد اعطت أعلى عدد حزم كلية وبالمقارنة مع عدد من التراكيب الوراثية التي أعطت اقل عدد من الحزم الكلية (2 حزمة)، فيما ظهرت حزمة فريدة في الهجين 6x2 عند وزن جزيئي 700 bp، وبذلك يمكن اعتبارها بصمة وراثية للهجين في هذا البادئ. وفي هذا السياق ذكر Handi وآخرين (9) عند استخدامهم عدة بادئات غياب الحزم في تراكيب وراثية ووجودها في اخرى. وهي التي توضح التباين بين التراكيب الوراثية المستخدمة فيما يخص البعد الوراثي.



الشكل 1 الحزم الناتجة عن البادئ OPH-09 في توصيف التباعد الوراثي بين ست سلالات وهجنها التبادلية والعكسية في الذرة الصفراء باستخدام مؤشرات RAPD على هلام اكاروز.

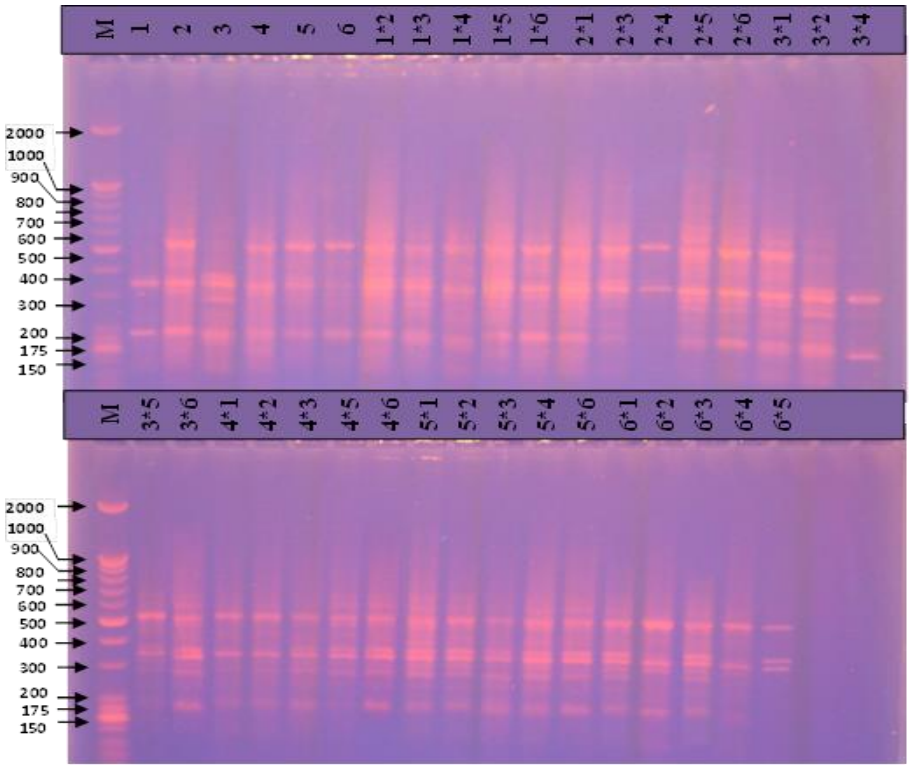
اعطى البادئ OPH-04 في الجدول 5، 10 حزم، وقد بلغ عدد المتباينة منها 8 حزم، هذا انعكس على النسبة المئوية للأشكال المظهرية التي بلغت 80%. كذلك ان هذا البادئ قد تعرف على التتابعات المكملة له في دنا جينوم التراكيب الوراثية مما اظهرت تبايناً واضحاً في الموقع والوزن الجزيئي الذي تراوح بين 150-1000 bp. نلاحظ في الشكل 2 ظهور حزمتين في جميع التراكيب الوراثية بوزن جزيئي 300 و400 bp وكان ظهور اكبر عدد من الحزم في السلالتين 4 و5 مع الهجين 2x1، ولم يتم العثور على اي حزمة منفردة.

اظهر البادئ OPB-15 (جدول 5) 4 حزم كلية كانت جميعها متباينة الظهور مما جعل النسبة المئوية للاشكال المظهرية تبلغ 100%، وتمكن البادئ من التعرف على التتابعات المكملة له في دنا الجينوم تراوحت اوزانها الجزيئية بين 175–500 bp. ويتبين من الشكل 3 ان عدد الحزم لكل تركيب قد تراوح ما بين 2–4 حزمة، ولم تظهر حزمة فريدة في اي من التراكيب الوراثية قيد الدراسة.

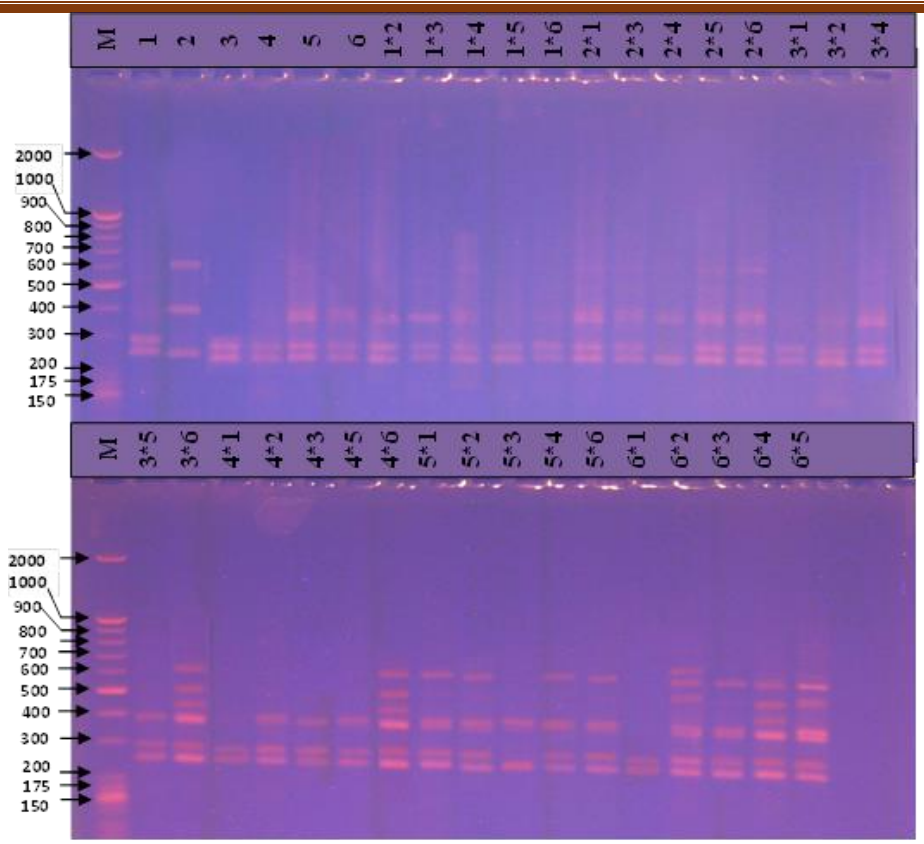


شكل 2 الحزم الناتجة عن البادئ OPH-04 في توصيف التباعد الوراثي بين ست سلالات وهجنها التبادلية والعكسية في الذرة الصفراء باستخدام مؤشرات RAPD على هلام اكاروز.

اظهر البادئ OPA-08 (جدول 5) 7 حزمة كلية من بينها 6 حزم متباينة وبالتالي بلغت النسبة المئوية للاشكال المظهرية 86 % من اجمالي عدد الحزم الكلية. كما ان البادئ قد تعرف على التتابعات المكملة له في قالب الدنا للتراكيب الوراثية المستخدمة وأظهرت تبايناً واضحاً في الموقع والوزن الجزيئي الذي تراوح بين 200–700 bp. ويلاحظ (شكل 4) ان الحزمة ذات الوزن الجزيئي 200 bp قد ظهرت في جميع التراكيب الوراثية وهذا يدل على ان البادئ قد تعرف على التتابعات الخاصة به في جميع التراكيب الوراثية المستخدمة في الذرة الصفراء. كذلك اظهرت نتائج التشخيص الوراثي زيادة عدد الحزم الكلية في بعض التراكيب الوراثية الى 6 حزم بينما اعطت بعض التراكيب الوراثية أدنى عدد للحزم الكلية وبلغ 2 حزمة، كما ظهرت حزمة منفردة في الهجين 6x2 وبوزن جزيئي 700 bp.

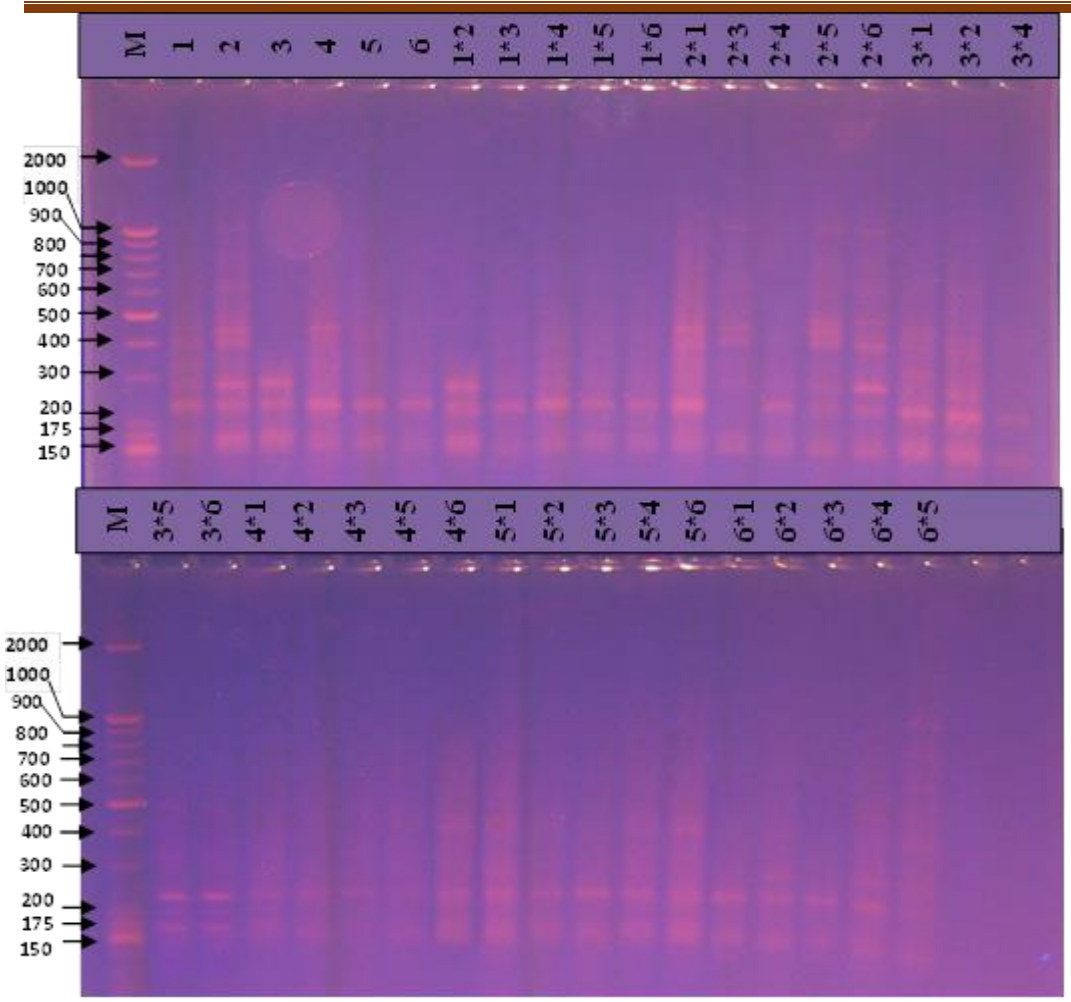


شكل 3 الحزم الناتجة عن البادئ OPB-15 في توصيف التباعد الوراثي بين ست سلالات وهجنها التبادلية والعكسية في الذرة الصفراء باستخدام مؤشرات RAPD على هلام اكاروز.



شكل 4 الحزم الناتجة عن البادئ OPA-08 في توصيف التباعد الوراثي بين ست سلالات وهجنها التبادلية والعكسية في الذرة الصفراء باستخدام مؤشرات RAPD على هلام اكاروز.

كان البادئ OPB-05 (جدول 5) عدد حزم بلغ 4 حزم كلية واظهر 2 حزمة متباينة الظهور مما بلغت نسبتها المئوية للأشكال المظهرية 50%، وتمكن البادئ من التعرف على التتابعات المكملة في دنا جينوم التراكيب الوراثية إذ اظهر تبايناً واضحاً في الوزن الجزيئي تراوح بين 150–500 bp. وتبين من خلال التشخيص الجزيئي (الشكل 5) ظهور حزمتين بوزنيين جزيئيين 150 و200 في جميع التراكيب الوراثية قيد الدراسة، كما يتضح أن السلالة 2 قد اعطت أعلى عدد من حزم، ولم تظهر اي حزمة منفردة.



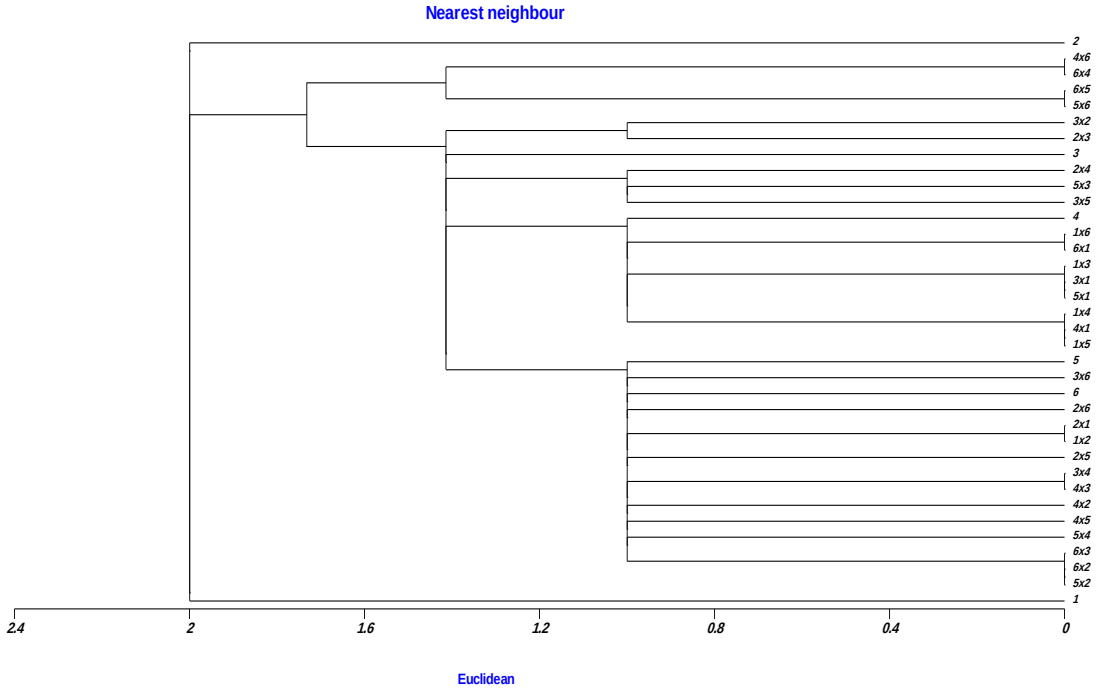
شكل 5 الحزم الناتجة عن البادئ OPB-05 في توصيف التباعد الوراثي بين ست سلالات وهجنها التبادلية والعكسية في الذرة الصفراء باستخدام مؤشرات RAPD على هلام اكاروز.

أظهرت النتائج بشكل عام وجود كمية عالية من الاختلافات الوراثية مما يؤكد فعالية هذه التقانة في التمييز بين السلالات. مما يشير إلى انه حتى عند وجود درجات منخفضة من الاختلافات الوراثية فان التقنية كانت قادرة على تحديد السلالات التي تختلف عن بعضها البعض بحزمة واحدة على الأقل. تتفق هذه النتائج مع النتائج التي حصل عليها باحثون آخرون (1، 2، 4، 5، 6، 11، 12، 13، 15، 16، 17، 19).

التحليل العنقودي لمؤشرات RAPD

يتضح من خلال نتائج التحليل العنقودي للمناطق المكوثرة باستخدام مؤشرات RAPD (شكل 6) في ست سلالات من الذرة الصفراء مع هجنها التبادلية والعكسية، أن المجامع الوراثية انفصلت الى ثلاث عناقيد رئيسية، حيث ظهر الأب 1 في مجموعة رئيسية والأب 2 في مجموعة رئيسية أخرى، بينما اندرجت الآباء المتبقية مع الهجن التبادلية والعكسية في عنقود رئيسي آخر الذي بدوره انقسم الى مجموعتين فرعيتين ضمت الاولى هجينين تبادليين (4x6 و5x6) مع نظيريهما العكسيين (6x4 و6x5)، كما احتوت المجموعة الفرعية الثانية 30 تركيب وراثي.

يبدو واضحاً تجمع كل هجين تبادلي مع نظيره العكسي في عنقود واحد هذه الحالة رافقت أغلب الهجن وهذا أمر متوقع إلى حدً ما سببه هو نفس الأبوين يشتركان في الهجينين الأمامي والعكسي (نفس المادة الوراثية النووية) ومع غياب المادة الوراثية السايتوبلازمية في التحاليل الجزيئية التي ربما تلعب دور كبير في توريث تغايرات في اي هجينين ناتجين من نفس الأبوين تبعاً لمصدر السايتوبلازم. وفي ذات الوقت يمكن ملاحظة تغلب السلوك الفردي لعدد من الهجن عندما حافظت على وجودها بعيدة نظيرتها العكسية. وعليه تشكل مجتمعات هذه الهجن مصادر جيدة لتغايرات وراثية تزيد من حجم التباعد الكلي الذي قد ينتج أصناف تركيبية جيدة.



شكل 6 التجميع الهرمي (Hierarchical clustering) وفق طريقة "الجار الأقرب" (Nearest neighbor) لستة سلالات من الذرة الصفراء وهجنها التبادلية والعكسية اعتماداً على نتائج استعمال خمس بادئات في تقنية RAPD

التحليل الجزيئي لمؤشرات ISSR

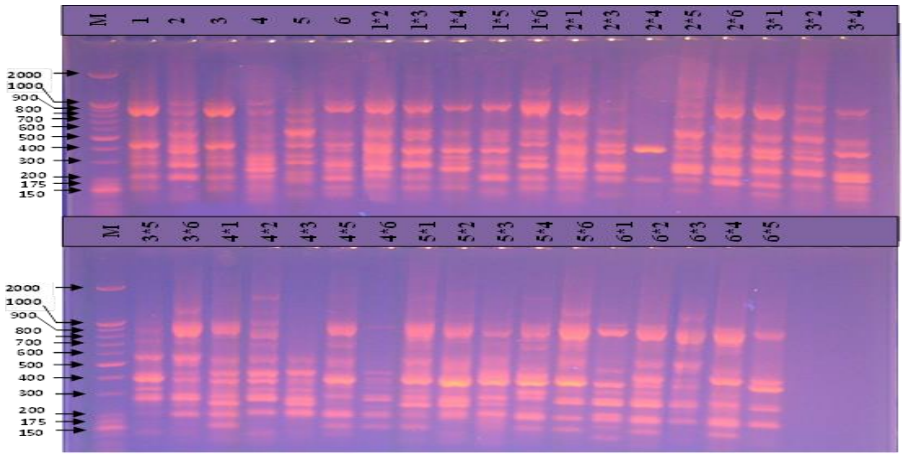
تبين نتائج استخدام خمسة بادئات في تفاعلات ISSR اختلاف في عدد المواقع المتضاعفة وأحجامها الجزيئية باختلاف البادئ المستخدم والناتجة من الاختلاف في عدد الموقع المكملة لذلك البادئ في جينوم كل تركيب وراثي من الذرة الصفراء المدخلة في هذه الدراسة، حيث حققت تلك البادئات نجاحاً متميزاً خاصتاً اذا ما قورنت بمؤشرات RAPD اذ تعددت الأشكال فيها بنسبة 97.5% بعد ان بلغ العدد الكلي للقطع المكوثرة 40 حزمة، مما يجعلها جديرة بالكشف عن التنوع الوراثي.

حُلِلَت النتائج بالاعتماد على وجود او غياب مواقع الدنا المضاعفة ومجموع مواقع الارتباط ومجموع الحزم والنسبة المئوية لمجموع الحزم، كذلك الاختلاف في حجوم وأعداد المواقع وأعلى وأقل عدد لمواقع الارتباط في كل تركيب وفي كل بادئ ووجود المواقع الفريدة والمواقع الغائبة وكما في الجدول 6.

جدول 6 عدد الحزم (bands) الظاهرة باستخدام خمسة بادئات ISSR والنسبة المئوية لتعدد الشكل فيها في الذرة الصفراء.

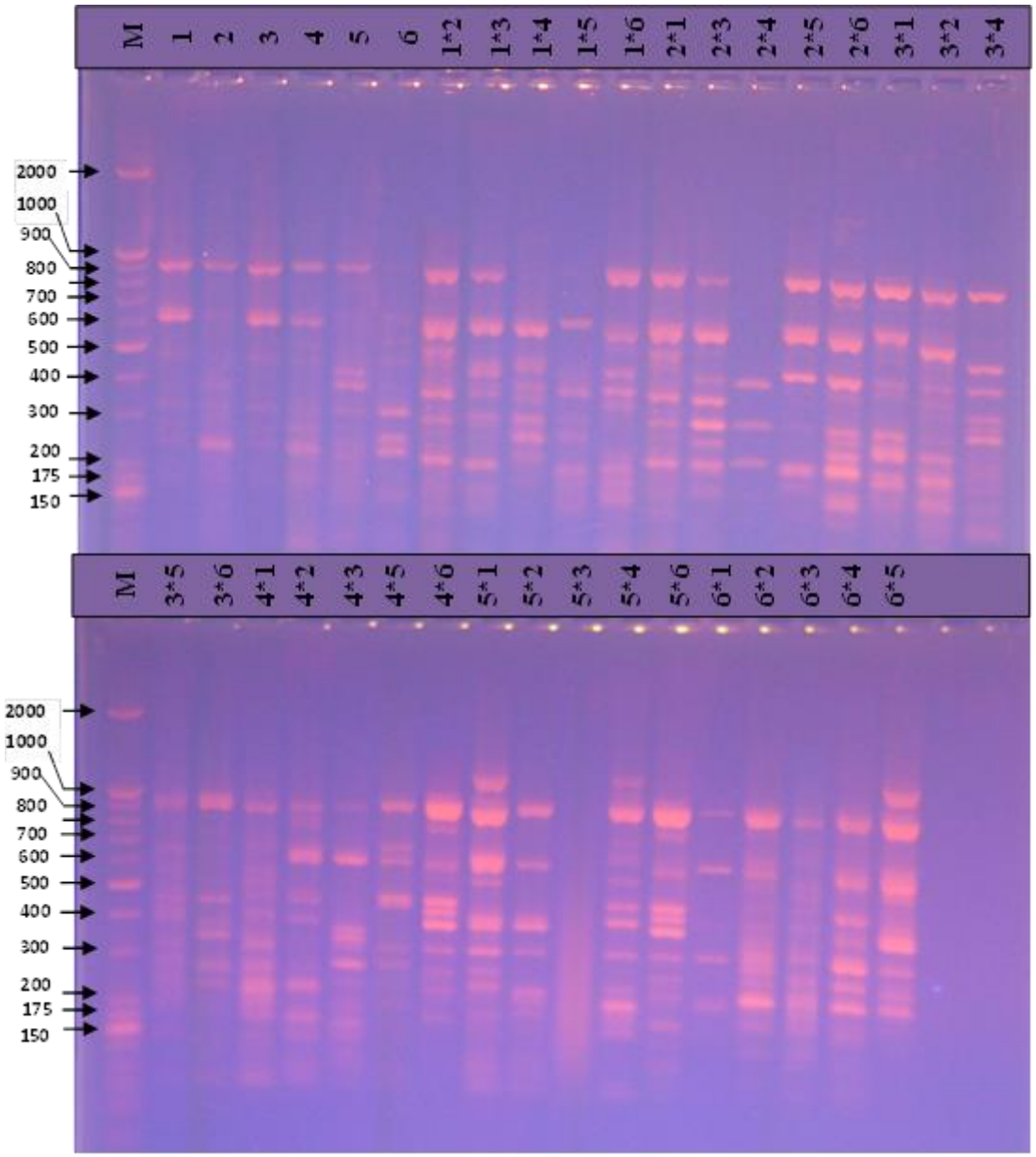
البادئ	العدد الكلي للقطع المكوثرة	عدد القطع المتعدة الشكل	النسبة المئوية لتعدد أشكال القطع (%)	حجم القطع (زوج قاعدة) bp
UBC835	6	6	100	1000-150
UBC834	9	9	100	1200-150
UBC827	7	7	100	1000-200
UBC873	8	8	100	1000-100
UBC841	10	9	90	1000-100
المجموع	40	39	97.5	1200-100

مع البادئ UBC835 بلغ عدد الحزم الكلية 6 حزمة جميعها كانت متباينة (جدول 6) وبذلك تكون النسبة مئوية لتعدد أشكال القطع 100%، يتضح من الشكل 8 ان الحجم الجزيئي لمواقع الارتباط في هذا البادئ تراوح بين 150-1000 bp، أمتلك الهجين التبادلي 1x3 مع نظيره العكسي 3x1 أعلى عدد من الحزم المكوثرة (6 حزمة) في حين ظهرت حزمة واحدة بوزن جزيئي 300 bp في السلالة 4، ولم تظهر حزمة منفردة بل على العكس من ذلك كانت هناك حزمة غائبة في الهجين 2x4 وبمستوى وزن جزيئي 300 bp.



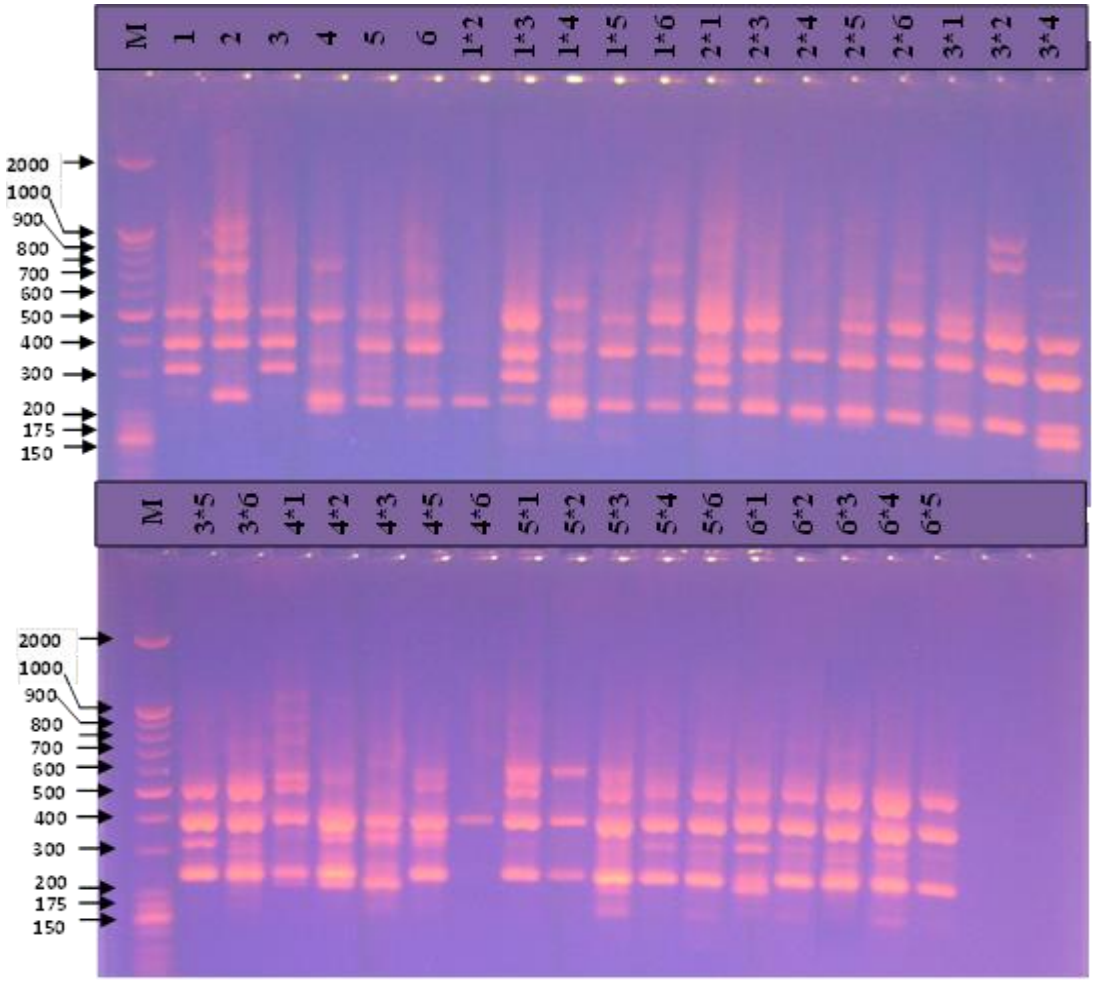
شكل 7 الحزم الناتجة عن البادئ UBC835 في توصيف التباعد الوراثي بين ست سلالات وهجنها التبادلية والعكسية في الذرة الصفراء باستخدام مؤشرات ISSR على هلام اكاروز.

أوضحت نتائج مضاعفة دنا التراكيب الوراثية الداخلة في الدراسة مع البادئ UBC834 (جدول 6) وجود 9 مواقع ارتباط كلها كانت متباينة، هذا يعني ان نسبة تعدد الأشكال 100%، تراوح الوزن الجزيئي لمواقع الارتباط في هذا البادئ بين 150–1200 bp، يتبين من الشكل 9 ان أقل مواقع ارتباط في الهجينين 3x5 و6x3 تمثل بموقع واحد فقط عند الوزن الجزيئي 900 bp، بينما أعلى مواقع ارتباط ظهرت في الهجين 6x4 بلغ 7 مواقع ارتباط، تميز الهجين 5x3 بغياب الحزم المكوثرة تماماً، اشترك الهجينين 5x1 و6x5 بإظهار موقع ارتباط عند وزن جزيئي 1200 bp، كما اشترك الهجينين 3x1 و3x4 بموقع واحد عند وزن جزيئي 150 bp.



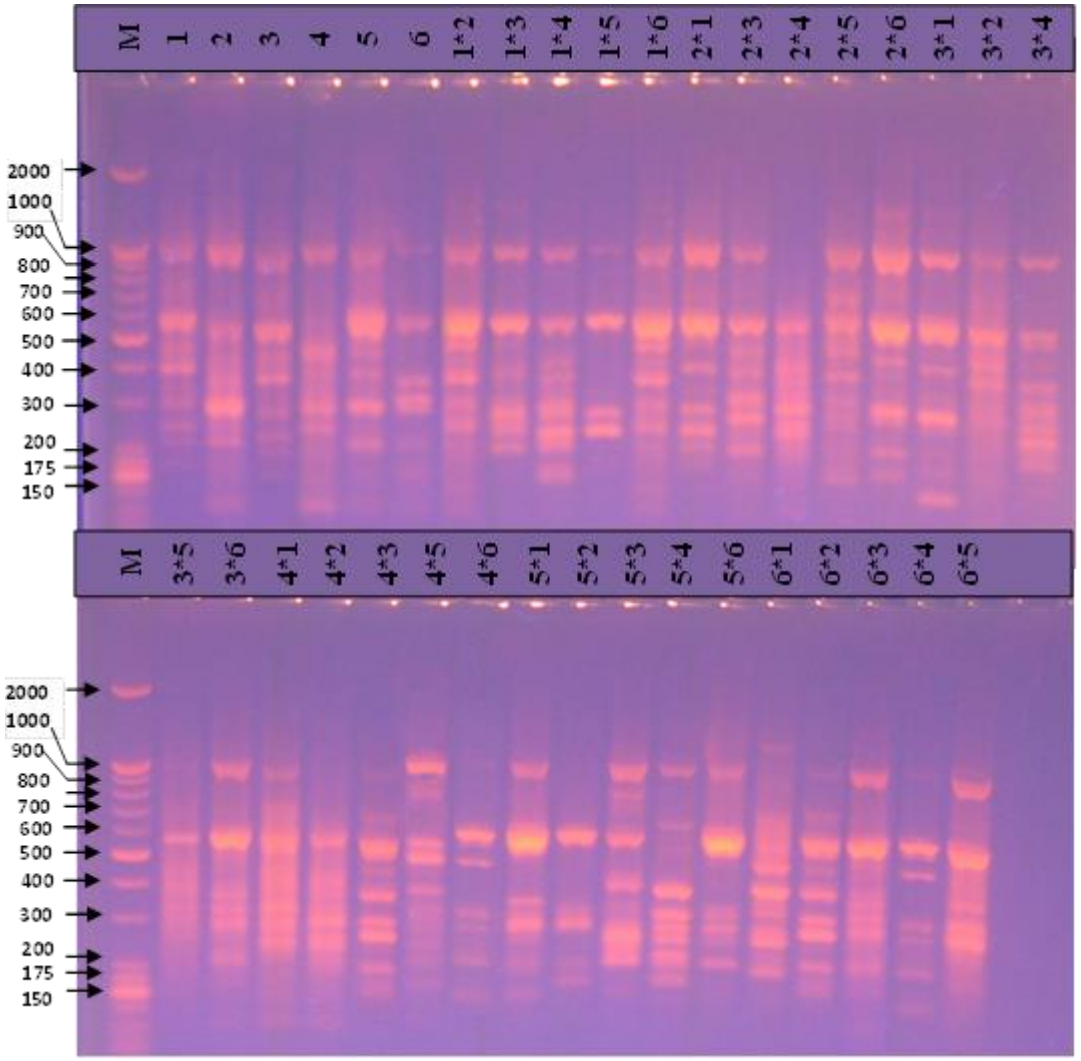
شكل 8 الحزم الناتجة عن البادئ UBC834 في توصيف التباعد الوراثي بين ست سلالات وهجنها التبادلية والعكسية في الذرة الصفراء باستخدام مؤشرات ISSR على هلام اكاروز.

سبعة مواقع ارتباط نتجت بعد إجراء عملية التضاعف مع البادئ UBC827 (جدول 6)، جميع الحزم التي ظهرت كانت متباينة وبالتالي بلغت نسبة تعدد الأشكال 100%، وتراوح الوزن الجزيئي بين 200–1000 bp، يبين الشكل 10 ان الأب 2 امتلك أعلى عدد من المواقع تمثل في 6 مواقع على العكس من الهجين 1x2 الذي امتلك أقل عدد من المواقع تمثل بموقع واحد، لم تظهر اي حزم فريدة في هذا البادئ، اشترك الأب 2 مع الهجين 3x2 بموقع ارتباط عند وزن جزيئي بلغ 1000 bp.



شكل 9 الحزم الناتجة عن البادئ UBC827 في توصيف التباعد الوراثي بين ست سلالات وهجنها التبادلية والعكسية في الذرة الصفراء باستخدام مؤشرات ISSR على هلام اكاروز.

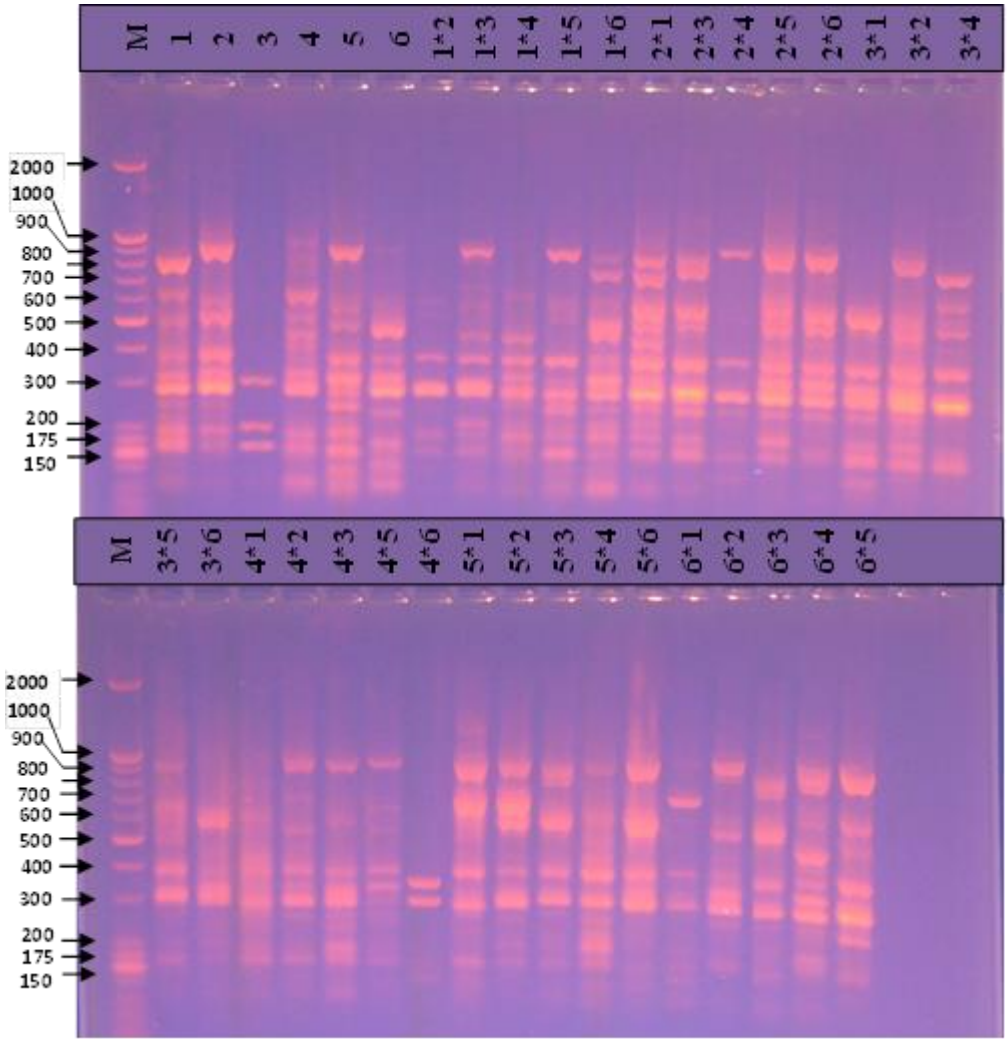
أظهرت نتائج تضاعف البادئ UBC873 (جدول 6) 8 مواقع ارتباط ميعها كانت متباينة وبذا تكون نسبة تعدد الأشكال للمواقع المكوثرة 100%، تراوح الحجم الجزيئي للحزم ما بين 100–1000 bp، كما يبين الشكل 11 ان الهجينين 2x6 و5x4 امتلكا أعلى عدد من مواقع الارتباط حيث بلغ 6 مواقع في حين بلغ أقل عدد من مواقع الارتباط واحد مواقع في الهجين 3x5، ولم يظهر هذا البادئ اي مواقع فريدة في حين غابت حزمة واحدة في السلالة 4 عند الوزن الجزيئي 600 bp، واشتركت السلالة 4 مع الهجين 3x1 بموقع ارتباط واحد عند وزن جزيئي 100 bp، وكذلك الهجن 1x4 و2x6 و4x3 و5x4 بموقع.



شكل 10 الحزم الناتجة عن البادئ UBC873 في توصيف التباعد الوراثي بين ست سلالات وهجنها التبادلية والعكسية في الذرة الصفراء باستخدام مؤشرات ISSR على هلام اكاروز.

ضُوعِفَ دنا التراكيب الوراثية الداخلة في الدراسة مع البادئ UBC841 ، وأنتج هذا البادئ 10 موقع ارتباط، كانت 9 منها متباينة لتصبح النسبة المئوية لتعدد الأشكال 90%، بلغ الحجم الجزيئي لمواقع الارتباط في هذا البادئ بين 100–1000 bp (جدول 6)، يوضح الشكل 12 ان هذا البادئ أنتج موقع بوزن جزيئي 300 bp اشتركت فيه جميع التراكيب الوراثية كموقع رئيسي وهذا يدل على أن هذا التتابع موجود في دنا جميع التراكيب المدروسة، وقد حصل الأب 5 مع الهجين 2x1 على أعلى عدد لمواقع الارتباط تمثلت في 8 مواقع كحد أعلى، فيما امتلكت عدد من الهجن (3x5 و3x6 و4x1 و4x6) موقعين ارتباط فقط كحد أدنى، في حين لم تظهر اي مواقع لحزم منفردة.

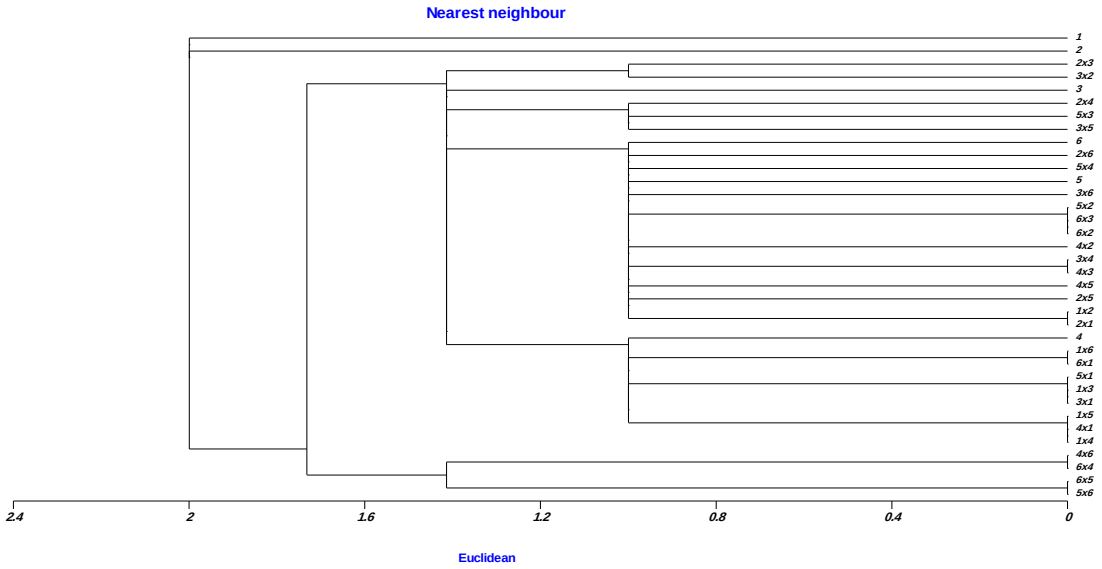
تمكنت تقانة ISSR من الكشف عن الاختلافات الوراثية بشكل ادق من تقانة RAPD، مما يشير الى كفاءتها العالية، وأكدت دراسات سابقة (3، 7، 10، 14) ان تقانة ISSR لديها القدرة الجيدة في الكشف عن التغايرات الوراثية.



شكل 11 الحزم الناتجة عن البادئ UBC841 في توصيف التباعد الوراثي بين ست سلالات وهجنها التبادلية والعكسية في الذرة الصفراء باستخدام مؤشرات ISSR على هلام اكاروز.

التحليل العنقودي لمؤشرات ISSR

ما تحدثنا به سابقاً بخصوص التحليل العنقودي لمؤشرات RAPD يمكن ان ينسحب ذات الكلام الى التحليل العنقودي لمؤشرات ISSR وفق طريقة الجار الأقرب (شكل 13)، حيث يمكن ملاحظة السلوك المميز للسلالتين 1 و2 اللتين كانتا الأكثر تباعداً على مستوى الدنا، وذلك بانضمامهما إلى المجموعتين الأكثر تغايراً على طرفي الشكل الهرمي، مما ينبئ بزيادة حجم التغاير الكلي بين مثل تلك السلالات الذي قد يساهم في زيادة قوة الهجين، كما اندرجت باقي السلالات مع جميع الهجن التبادلية والفردية في مجموعة رئيسية أخرى وهذه الأخيرة اتجهت إلى تشكيل مجموعتين ثانويتين التي ضمت الأولى هجينين تبادليين (4x6 و5x6) مع نظيريهما العكسيين (6x4 و6x5)، بينما ضمت الثانية 30 تركيباً وراثياً. وبدا واضحاً عدم ابتعاد أغلب الهجن التبادلية عن نظيرتها العكسية وهذا الامر مغاير لسلوك تلك الهجن في ادائها الحقلي مما يوعز بمدى أهمية الفعل السايتوبلازمي.



شكل 12 التجميع الهرمي (Hierarchical clustering) وفق طريقة "الجار الأقرب" (Nearest neighbor) لست سلالات من الذرة الصفراء وهجنها التبادلية والعكسية اعتماداً على نتائج استعمال خمس بادئات في تقنية ISSR.

المصادر

1. Alazawi., G. L. (2011). Discovery of Genetically Modified Maize in Iraqi Markets. M.Sc. Thesis. Institute of Genetic Engineering and Biology. Technology. University. of Baghdad. pp. 93.
2. Asif, M., M. Rahman and Y. Zafar. (2006). Genotyping analysis of six maize hybrids DNA fingerprinting technology. In Pakistan Journal Bot, 46 (2), 15- 20.
3. Berilli, A. P. C. G., Pereira, M. G., Gonçalves, L. S. A., da Cunha, K. S., Ramos, H. C. C., Souza Filho, G. A., & do-Amaral-Júnior, A. T. (2011). Use of molecular markers in reciprocal recurrent selection of maize increases heterosis effects. Genetics and molecular research, 10(4), 2589-2596.
4. Bruel, D. C., Carpentieri-Pípolo, V., Gerage, A. C., Júnior, F., da Silva, N., Prete, C. E. C., Ruas, C. de Fátima, Ruas, P. M., de Souza, S. G. H., & Garbuglio, D. D. (2006). Genetic distance estimated by RAPD markers and its relationship with hybrid performance in maize. Pesquisa Agropecuária Brasileira, 41(10), 1491-1498.
5. Carvalho, V. P., Ruas, C. F., Ferreira, J. M., Moreira, R. M., & Ruas, P. M. (2004). Genetic diversity among maize (Zea mays L.) landraces assessed by RAPD markers. Genetics and Molecular Biology, 27(2), 228-236.
6. Cholastova, T., Soldanova, M., & Pokorny, R. (2011). Random amplified polymorphic DNA (RAPD) and simple sequence repeat (SSR) marker efficacy for maize hybrid identification. African Journal of Biotechnology, 10(24), 4794-4801.
7. Costa, R., Pereira, G., Garrido, I., Tavares-de-Sousa, M. M., & Espinosa, F. (2016). Comparison of RAPD, ISSR, and AFLP molecular markers to reveal and

classify orchardgrass (Dactylis glomerata L.) germplasm variations. PloS one, 11(4), 1-15.
8. Daryanto, S., Wang, L., & Jacinthe, P. A. (2016). Global synthesis of drought effects on maize and wheat production. PLoS One, 11(5), 1-15.
9. Handi, S., Sasidharan, N., Sudeshna, C., Macwana, S., Trivedi, R., Punwar, B. S., & Vala, A. G. (2013). Genetic diversity among maize varieties revealed by phenotypic descriptors and RAPD profiles. Journal of Agricultural Sciences, 8(2), 91-106.
10. Junior, A.T.A.,Oliveira, E. C., GonÁalves, L. S. A., Scapim, C. A., Candido, L. S., da ConceiÁ, T. R., Vittorazzi, C., & da Cunha, K. S. (2011). Assessment of genetic diversity among maize accessions using inter simple sequence repeats (ISSR) markers. African Journal of Biotechnology, 10(69), 15462-15469.
11. Liet, V. V., & Thinh, P. D. (2009). Genetic diversity of local maize (Zea mays L.) accessions collected in highland areas of Vietnam revealed by RAPD markers. Journal Sciences Development, 7(2), 192-201.
12. Mandal, S. S., & Akhtar, S. A. (2001). Gene action for knob number in corn. Maize Genetics Cooperation Newsletter, 75, 5-5.
13. Maniatis, T., Fritsch, E. F., & Sambrook, J. (2001). In vitro application of DNA by the Polymerase Chain Reaction. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA, 691.
14. Muhammad, R. W., Qayyum, A., Ahmad, M. Q., Hamza, A., Yousaf, M., Ahmad, B., Younas, M., Malik, W., Liaqat, S. & Noor, E. (2017). Characterization of maize genotypes for genetic diversity on the basis of inter simple sequence repeats. Genetics and molecular research: GMR, 16(1), 1-19.
15. Mukharib, D. S., Patil, V. S., Biradar, D. P., Salimath, P. M., & Chimmad, V. P. (2010). Assessment of molecular diversity in selected maize inbreds. Karnataka Journal of Agricultural Sciences, 23(3), 409-412.
16. Nei, M., & Li, W. H. (1979). Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proceedings of the National Academy of Sciences, 76(10), 5269-5273.
17. Rabbani, M. A., Pervaiz, Z. H., & Masood, M. S. (2008). Genetic diversity analysis of traditional and improved cultivars of Pakistani rice (Oryza sativa L.) using RAPD markers. Electronic journal of biotechnology, 11(3), 52-61.
18. Salami, H. A., Sika, K. C., Padonou, W., Aly, D., Yallou, C., Adjanohoun, A., Kotchoni, S., & Baba-Moussa, L. (2016). Genetic diversity of maize accessions (Zea mays l.) cultivated from benin using microsatellites markers. American Journal of Molecular Biology, 6(01), 12-24.
19. Weigand, F., Baum, M., & Udupa, S. (1993). DNA molecular marker techniques. Technical Manual No. 20. International Center for Agricultural Research in the Dry Area (ICARDA).Aleppo, Syria. pp.135.
20. Yang, Q., Balint-Kurti, P., & Xu, M. (2017). Quantitative disease resistance: dissection and adoption in maize. Molecular plant, 10(3), 402-413.