التغايرات الجزيئية بين سلالات من الذرة الصفراء

فاضل يونس بكتاش
أستاذ
كلية الزراعة – جامعة بغداد
fadelbaktashi@yahoo.com

زياد عبد الجبار عبد الحميد*
مدرس
كلية الزراعة – جامعة الانبار
zeyadaldraji@yahoo.com

المستخلص

نفذت التجربة في 2013 في مختبرات دائرة فحص وتصديق البذور، بهدف دراسة التغايرات الجزيئية بين 10 سلالات من الذرة الصفراء من اجل استخدامها لأنتاج الهجن. استعملت تقانة التضاعف العشوائي المتعدد الاشكال لسلسلة الـ DNA (RAPD) المعتمد على تقانة الـ PCR و11 من البادئات. أستعملت معلمات RAPD لتقييم التغايرات الوراثيية بين 10 سلالات نقية من الذرة الصفراء أنتجت جميع البادئات الأحد عشر 108 حزمة بمعدل 9.8 حزمة للبادىء الواحد تراوح عدد القطع المكوثرة بين 5 للبادىء OPAV-03 و17 في البادىء OPAW-10، وبوزن جزيئي تراوح بين 160-1800bp. بلغ العدد الكلي والنسبة المئوية للقطع المتباينة 74 و68.5% بالتتابع، بلغت أعلى نسبة مئوية للقطع المتباينة 80% للبادىء OPAK-15 وأظهر البادىء OPAW-11 أوطأ نسبة مئوية للقطع المتباينة بلغ 55.5%، بلغت أعلى كفاءة وأعلى مقدرة تميزية في البادىء OPAW-10 وبلغت 14.1% و17.1% بالتتابع. وأعتماداً على البيانات الثنائية والتشابه الوراثي بأستخدام طريقة UPGMA في انشاء مخطط الصلة تم فصل السلالات ضمن مجموعتين رئيستين هما A وB ومجاميع ثانوية ومجاميع تحت الثانوية، وأظهر تحليل المجاميع الذي تمت فيه المقارنة بين السلالات النقية ضمن مخطط الصلة ان السلالة BK104 أعطت تباعداً وراثياً مع بقية السلالات كان أبعدها وراثياً عن السلالة BK164 وربما انعكس ذلك على هجينهما حقلياً، وبلغ التشابه الوراثي الذي تم تقديره على وفق معامل Nei و Li أعلى قيمة 0.839 بين السلالتين BK164 وBK147 بينما أزداد التباعد الوراثي بين السلالتين BK104 وBK128 وكذلك بين BK104 وBK164 وبلغ 0.377 و0.396 بالتتابع. أشارت النتائج الى ان معلمات RAPD ذات كفاءة عالية في تشخيص النقاوة والتباعد الوراثي بين سلالات الذرة الصفراء.

كلمات مفتاحية: RAPD، PCR، نقاوة وراثية، الباديء و سلالات نقية.

*البحث مستل من أطروحة دكتوراه للباحث الثاني.

MOLECULAR VARIATION BETWEEN OF MAIZE INBREDS

F. Y. Baktash
Prof.
Coll. of Agric. - Univ. of Baghdad
fadelbaktashi@yahoo.com

Z. A. Abdel Al-Hameed*
Instructor
Coll. of Agric. - Univ. of Anbar
zeyadaldraji@yahoo.com

ABSTRACT

This study was carried out at the Agricultural Research Laboratories during 2013. The objective was to investigate genetic diversity among 10 maize inbred lines. The random amplified polymorphic DNA (RAPD) based on PCR with 11 primers. RAPD DNA markers were used to evaluate trends in genetic diversity among 10 0f inbred line .All of the RAPD primers used for initial screening were found to be polymorphic. A total of 108 DNA fragments were generated by 11 random decamer primers with an average of 10.7 per primer ranged. The number of amplified fragments produced per primer ranged from 5 for OPAV-03 primer to 17 for OPAW-10, from with molecular size ranged from 160 bp to 1800 bp. The total number of polymorphic fragment and the percentage of polymorphism were (74, 62.7 %) respectively. Maximum level of polymorphism was 80% 0bserved for the primer OPAK -15 while Primer OPAW -11 showed the lowest percentage of polymorphism. Maximum level of primer efficiency and ability distinction was 14.1%, 17.1% respectively. Based on the bivariate (1 -0) data and genetic similarity with the use of UPGMA cluster method, the dendrogram separated the studied populations in to A and B. Cluster analysis which compared between inbred lines in to dendrogram. Showed BK104 high genetic diversity was high genetic diversity between BK104 and BK164. Genetic similarities computed by Nei and Li,s similarity coefficient revealed that the highest estimate (0.839) was observed between inbred line BK164, BK147. While, the lowest genetic similarity between inbred line BK104, BK128 and BK104, BK164 (0.377, 0.396) respectively. Results indicated that RAPD were highly efficient in delecting the purity and genetic relationship among maize inbred lines.

key words: RAPD, PCR, Homozygosity and Inbred lines.

***Part of Ph.D. Dissertation of the second author.**

المقدمة

الذرة الصفراء (*Zea mays* L.) من المحاصيل الحبوبية المهمة التي تمتاز بسهولة عملية التهجين والأنتاج على نطاق واسع مما ساعد على انتشار زراعتها لتخفيف أزمة الغذاء العالمية. حظي هذا المحصول بأهتمام عدد من مربي النبات وأصبحت الطرائق المتبعة في التربية والتحسين لهذا المحصول تتبع في اغلب المحاصيل الخلطية التلقيح . تزرع الذرة الصفراء على نطاق واسع وتأتي بالمرتبة الثالثة من حيث الاهمية الاقتصادية بعد محصولي الحنطة والرز، وقد نالت هذه الاهمية من خلال استخدامها للغذاء وعلف وزيت وفي الآونة الاخيرة استعملت كوقود حيوي. يتضمن برنامج تطوير هجين متميز العمل على استنباط سلالات ذات حاصل عالي وقابلية اتحاد خاصة عالية. ان مثل هذة السلالات تكون مختلفة في نسبة الميثلة (DNA-methylation) التي تكون عالية عادةً في نباتات السلالات ومنخفضة في نباتات الهجين (10). تعد ظاهرة قوة الهجين من المؤشرات المهمة التي يتمتع بها الهجين، ولايزال السبب العلمي لظهور قوة الهجين غير معلوم على وجه الدقة على الرغم من تطور التقانة الجزيئية وفوق الوراثة. ذكر Cockerham و Zenk (8) أن سيادة الجينات المفضلة هي سبب رئيسي لظهور قوة الهجين قي حاصل حبوب هجن الذرة الصفراء، فيما قام فريق من الباحثين (18) بالتحليل الجزيئي لهجين الذرة الصفراء الامريكي الشائع Mo17 × B73 وابويه ووجدوا ان مايقارب 800 زوج من الجينات اظهرت قوة هجين لأن افراد الهجين تنخفض فيها ميثلة الـ DNA فيما تزداد في السلالات الأمر الذي يؤدي الى تحفيز عدة جينات نتيجة التهجين، في الآونة الاخيرة زاد استخدام هذه التقنيات لتوصيف وتحديد المواد الوراثية المهمة في برامج تربية النبات (17)، وتتميز مؤشرات الDNA بأهمية كبرى عن المؤشرات البايوكيميائية والمورفولوجية بسبب عدم تأثرها بالبيئة وتعتمد على تسلسل الجينات أو المادة الوراثية ويمكن الكشف عن الأختلافات في المادة الوراثية التي يحملها الفرد، وفي هذا البحث تم استخدام مؤشر التضاعف العشوائي لل DNA متعدد الاشكال RAPD (Amplified Random Polymorphic DNA) الذي يمتاز بسهولة وقلة التكلفة واعتماده على تقنية البلمرة المتسلسل لـ DNA PCR (Polymerase Chain Reaction). تهدف الدراسة لمعرفة التغايرات الجزيئية بين عشر سلالات نقية من الذرة الصفراء من خلال عزل وتنقية ال DNA بأستعمال مؤشرات الRAPD والتغايرات الجزيئية بين السلالات من اجل استخدامها في برامج التربية والتحسين.

المواد والطرائق

تمت زراعة بذور السلالات العشرة في حقل دائرة فحص و تصديق البذور، وتم اخذ اوراق الذرة الصفراء (بعمر 7-10 يوم) من السلالات العشر وتحليل العينات في مختبر نفس الدائرة.

عزل الـ DNA للجينوم

تم عزل الـ DNA من الأوراق الفتية للسلالات المدروسة بنجاح بطريقة الـ CTAB التي وصفها (19) إذ تم الحصول على كمية تقدر 50–150 مايكروغرام لكل 1.5 غرام من الأوراق لكل سلالة من سلالات الذرة الصفراء، وبنقاوة تتراوح بين 1.7–2 المُقاسة بجهاز الـ Nanodrop وتم ضبط تخفيف عينات الـ DNA للحصول على تركيز50 نانوغرام/مايكروليتر وهو التركيز المناسب لإجراء تفاعلات الـ PCR. توجد عدة طرائق لعزل الأحماض النووية من النباتات لأنّ النباتات بتنوعها تحوي كميات مختلفة من المركبات النباتية مثل البروتينات والسكريات المتعددة والمعقدة فضلا عن الأحماض النووية وبذلك فإن طريقة واحدة لعزل الأحماض النووية تكون استعملت تقانة التضاعف العشوائي المتعدد الاشكال لسلسلة DNA (RAPD) المعتمد على تقانة الـ PCR و11 من البادئات مناسبة لكل النباتات (جدول 1)، وتم الاعتماد على طريقة Weigand وآخرون (19) في عزل DNA من نبات الذرة الصفراء وهي من الطرائق ذات الكفاءة في عزل DNA من النباتات مثل الذرة الصفراء (3) والحنطة (2). إن عملية عزل DNA من النباتات تكون أصعب نسبياً من الكائنات الأخرى لوجود الجدار السميك المحيط بالغشاء الخلوي فضلاً عن احتواء بعض النباتات على كمية كبيرة من المواد الفينولية والسكريات المتعددة، والتي تعد من الملوثات إذ تترسب أحياناً مع DNA معطية سائلاً ذا لزوجة عالية كما تعد مثبطة لتفاعلات الـ PCR. للتخلص من هذه المواد تم إجراء تخفيفDNA المستخلص لتقليل نسبة السكريات المثبطة (جدول 1).

جدول 1. يمثل البادئات العشوائية المستخدمة في هذه الدراسة مع تتابعات

1	الاول	0PAV - B	⁻5 C T G A C T T C C C ⁻3
2	الثاني	0PAD - 14	-5 G A A C G A G G G T ⁻3
3	الثالث	0PAW - 11	5 C T G C C A C G A G ⁻3
4	الخامس	0PAB - 14	⁻5 A A G T G C G A C C ⁻3
5	السادس	0PAV – O3	⁻5 T G T A G C C G T G ⁻3
6	السابع	0PAW - 08	⁻5 C T G T C T G T G G ⁻3
7	الثامن	0PAV - B	⁻5C T G A C T A T C C C ⁻3
8	التاسع	0PAW - 10	⁻5 G G T G T T T G C C ⁻3
9	العاشر	0PAT - 08	⁻5 T C C T C G T G G G ⁻3
10	الحادي عشر	0PAR - 15	⁻5 A C A C T C T G C C ⁻3
11	الثاني عشر	0PAK - 15	⁻5 A C C T G C C G T T ⁻3

مؤشرات الـ RAPD

استخدمت مؤشرات الـ RAPD في هذه الدراسة لإيجاد التباين الوراثي جزيئياً بين سلالات الذرة الصفراء المدروسة وهي: BK164 (رقم 1) وBK147 (رقم 2) وBK129 (رقم 3) وBK128 (رقم 4) وBK127 (رقم 5) وBK121 (رقم 6) وBK115 (رقم 7) وBK110 (رقم 8) وBK105 (رقم 9) وBK104 (رقم 10). نظراً لما تمتاز به هذه المؤشرات بكونها حساسة جداً لأي تغير في تركيز مكونات التفاعل والظروف المحيطة بها مما يجعل عملية إعادتها والحصول على النتيجة نفسها (Reproducibility) من الأمور الصعبة، فإنّ إيجاد الظروف المثلى لكل تفاعل تختلف باختلاف نوع الـ DNA القالب وتتابع البوادئ المستخدمة وأحياناً باختلاف نوع جهاز المبلمر الحراري المستخدم، لذا فقد تم إجراء عدة تجارب للوصول إلى الظروف المثلى للتفاعل (Optimization) للحصول على أفضل النتائج (20)، وهذه العوامل تتحدد بدرجة الحرارة و عدد الدورات و دقة الماصة الدقيقة (Micropipette) وغيرها أخذت نتائج عمليات المضاعفة للبادئات المستخدمة في كلا المؤشرين كل على حدة في جداول اعتماداً على مقارنة وجود أو غياب قطع الـ DNA للعينات المختلفة حيث يرمز لوجود قطعة الـ DNA بالرقم 1 ولعدم وجودها بالرقم (0). تم حساب معامل البعد الوراثي وكذلك معامل التشابه ما بين السلالات المدروسة باستخدام معامل Nei's 72 (15)، ثم أجري التحليل العنقودي (Cluster analysis) وتم رسم مخطط البعد الوراثي ما بين المدخلات باستخدام طريقة Unweighted Per Group Method Arithmetic (15).

$$GD = 1- [2\times(Nij / Ni + Nj)]$$

إذ أن Nij: تمثل عدد الحزم المشتركة بين الأنموذج j,i.

Ni : تمثل عدد الحزم في الأنموذج i.

Nj: تمثل عدد الحزم في الأنموذج j.

أما احتساب نسبة الحزم المتباينة في البادىء فتنص المعادلة على:

$$Polymorphism\ \% = (Np / Nt) \times 100$$

إذ ان Np = عدد الحزم المتباينة في البادىء.

Nt =عدد الحزم الكلية في البادىء.

اما حساب النسبة المئوية لكفاءة البادئات المستخدمة =

العدد الكلي لحزم البادىء \ العدد الكلي لحزم جميع البادئات × 100

اما لحساب النسبة للقدرة التميزية لكل باديء =

عدد الحزم المتباينة للبادىء\عدد الحزم المتباينة لكل البادئات × 100

النتائج والمناقشة

نلاحظ من جدول 2 إن البادىء OPAW–10 اعطى أعلى عدد من الحزم بلغ 17 حزمة في حين اعطى البادىء OPAV–03 عدد حزم مقدارها 5، بلغ عدد الحزم الكلية الناتجة 108 حزمة بينما بلغ عدد الحزم المتباينة الكلية 74 حزمة وبنسبة 68.5% إذ احرز البادىء OPAW–10 عدد حزم متباينة بلغ 13 وبنسبة 76.5% في حين اعطى البادىء OPAV–03 عدد حزم متباينة بلغ 3 وبنسبة 60% واعطى البادىء OPAK–15 اعلى نسبة حزم متباينة بلغ 80 % كانت اعلى نسبة كفاءة 14.1% في البادىء نفسه وبلغت اعلى نسبة للمقدرة التميزية 17.1% في البادىء OPAW–10 تميزت البادئات المستخدمة بوزن جزيئي تراوح بين bp1800-160.

البوادئ المستخدمة

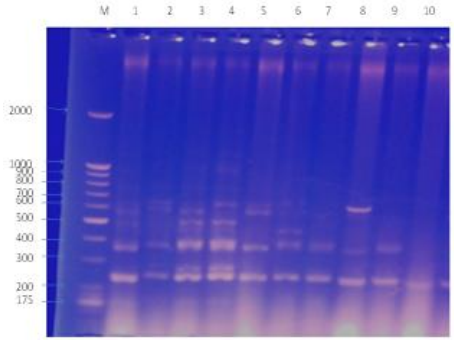
تم استخدام 11 بادئاً وكان اختيارها بشكل عشوائي (جدول 2)، بادئ واحد لم تظهر فيه أي حزمة وهو 0PAD -13 وقد يعود السبب إلى عدم عثور البادئ على موقع مكمل له ضمن تتابعات DNA الجينوم للأنواع المدروسة، وبقية البوادئ هي كما يأتي:

جدول 2. يمثل البادئات مع عدد الحزم الناتجة والحزم المتباينة ونسبها مع نسب الكفاءة والقدرة التميزية لكل باديء

الباديء	الحزم الناتجة	الحزم المتباينة	نسبة الحزم المتباينة %	نسبة كفاءة البادئات %	نسبة المقدرة التميزية %	الوزن الجزيئي bp
OPAV-B	7	4	57.1	5.8	5.2	1800-450
OPAD-14	14	10	71.4	11.6	13.1	1100-235
OPAW-11	9	5	55.5	7.5	6.5	1780-450
OPB-14	8	5	62.5	6.6	6.5	625-190
OPAV-03	5	3	60	4.1	3.9	1050-400
OPAW-08	15	11	73.3	12.5	14.4	1200-175
OPAV-BI	7	4	57.1	5.8	5.2	1100-475
OPAW-10	17	13	76.5	14.1	17.1	1440-185
OPAT-08	7	4	57.1	5.8	5.2	550-190
OPAR-15	9	7	77.7	7.6	9.4	900-160
OPAK-15	10	8	80	8.3	10.5	680-220
المجموع	108	74	68.5			1800-160

1. البادئ OPAV-B

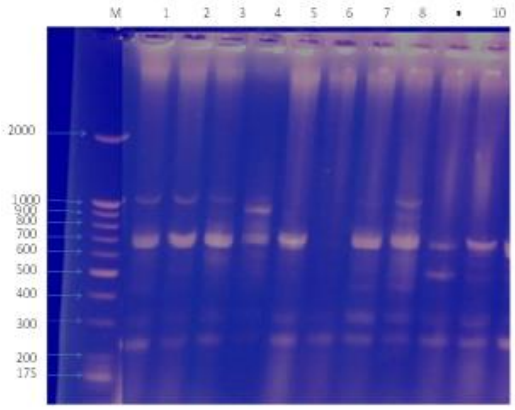
تم الحصول على 7 حزم كلية لذلك انخفضت كفاءته الى 5.8% وبلغ عدد الحزم المتباينة 4 إذ بلغت النسبة المئوية للحزم المتباينة 57.1% وهذا العدد المتباين من الحزم انعكس على المقدرة التميزية وبلغت 5.0% وعلى الرغم من هذه الاعداد فأن الباديء تمكن من التعرف على التتابعات المكملة له في DNA الجينوم للسلالات وأظهرت تبايناً واضحاً في الموقع والوزن الجزيئي الذي تراوح بين 450-1800 bp ومن الشكل 1 يتضح ان الحزم ذات الوزن الجزيئي 350 bp قد ظهرت في جميع السلالات ويدل هذا على عثور هذا الباديء على التتابعات الخاصة به في هذه السلالات، ونلاحظ في السلالة 8 وجود حزمة فريدة في الوزن الجزيئي 600 bp وبذلك يمكن أعتبارها بصمة وراثية للسلالة في هذا الباديء.



شكل 1. نواتج الباديء OPAV-B مع DNA سلالات الذرة الصفراء على هلام الاكاروز بتركيز M.%1.5

2. الباديء OPAD – 14

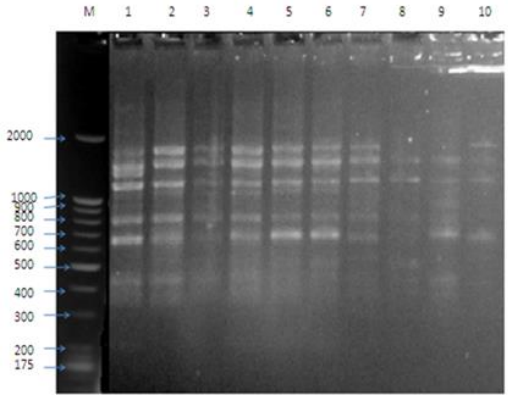
تم الحصول على 14 حزمة كلية وكانت كفاءتها 12.96% وبلغ عدد الحزم المتباينة 10 ونسبتها 71.4% وكانت المقدرة التميزية لها13.1% وتمكن الباديء من التعرف على التتابعات المكملة له في DNA الجينوم للسلالات وقد اظهرت تبايناً واضحاً في الموقع والوزن الجزيئي للحزم تراوح بين 234- 1100 bp، لم يجد الباديء التتابع المكمل له عند السلالة 6 ولذلك لم تظهر اية حزمة (شكل 2).



شكل 2. نواتج الباديء 0PAD-14 مع DNA سلالات الذرة الصفراء على هلام الاكاروز بتركيز M.%1.5

3. الباديء OPAW-

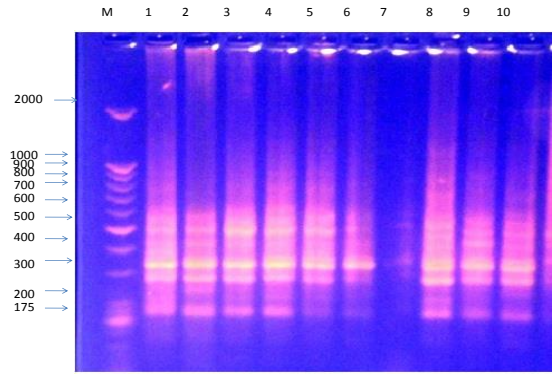
أظهر هذا البادي 7.5% حزمة كان من بينها 5 حزم متباينة الظهور بين السلالات المدروسة مما جعلها تشكل 55.5% من الحزم التي ظهرت في الباديء ومنحها مقدرة تميزية بلغت 6.5%، وتمكن الباديء من التعرف على التتابعات المكملة له في DNA الجينوم تراوحت بين 375-780 bp، واظهر هذا الباديء توافقاً بين تسلسل الباديء وتتابعات DNA القالب في جميع السلالات في الحزمة ذات الوزن الجزيئي 1100 bp وتمكن الباديء من تمييز السلالة 9 من خلال وجود حزمتين فريدتين ذات وزن جزيئي 425 و375 bp وبذلك يمكن اعتبارها بصمة وراثية (شكل 3).



شكل 3. نواتج الباديء 0PAW-11 مع DNA سلالات الذرة الصفراء على هلام الاكاروز بتركيز M.%1.5

4. البادىء OPB-14

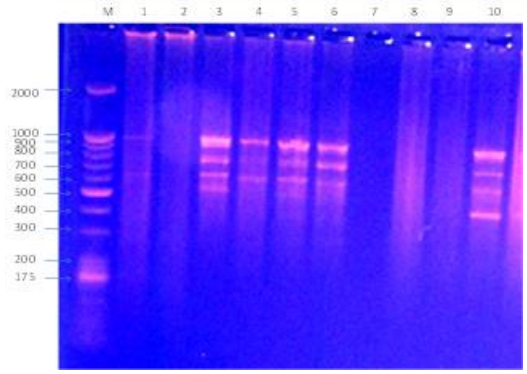
كان لهذا البادىء عدد حزم بلغ 8 حزمة مما منحته بلغت نسبتها كفاءة 6.6% وكانت الحزم المتباينة 5 حزم وبنسبة 62.5% ومقدرتها التميزية 6.5%، وتمكن البادىء من التعرف على التتابعات المكملة له في DNA الجينوم للسلالات وقد اظهر تبايناً واضحاً في الوزن الجزيئي تراوح بين 190–685 bp لم يجد التتابع المكمل له عند السلاله 7 ومن ثم لم تظهر أي حزمة وبذلك يمكن أعتبارها بصمة لهذه السلالة في هذا البادىء (شكل 4).



شكل 4. نواتج البادىء 0PB-14 مع DNA سلالات الذرة الصفراء على هلام الاكاروز بتركيز M.%1.5

5. البادىء OPAV-03

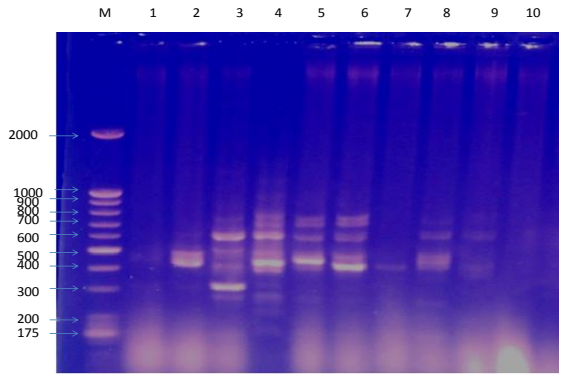
تم الحصول على كمية حزم متواضعة بلغت 5 حزم لذلك انخفضت كفاءته الى 4.1% وبلغت عدد الحزم المتباينة 3 وبلغت نسبتها 60% وبلغت نسبة المقدرة التميزية 3.9%، وتمكن البادىء من التعرف على التتابعات المكملة له في DNA الجينوم للسلالات واظهر تبايناً واضحاً في الوزن الجزيئي تراوح بين 400–1050 bp ونلاحظ ان السلالات 2 و7 و8 و9 لم يظهروا أية حزمة أي لم يجد البادىء التتابع المكمل له لهذه السلالات (شكل 5).



شكل 5. نواتج البادىء 0PAV-03 مع DNA سلالات الذرة الصفراء على هلام الاكاروز بتركيز M.%1.5

6. البادىء OPAW-08

كان لهذا البادىء عدد حزم بلغ 15 حزمة مما منحت هذا البادىء كفاءة مقدارها 12.5% وتوزعت هذه الحزم على 4 حزم متماثلة الظهور و11 حزمة متباينة الظهور بلغت نسبتها 73.3% وبلغت مقدرتها التميزية 14.4 %، وتمكن البادىء من التعرف على التتابعات المكملة في DNA جينوم السلالات حيث اظهر تبايناً واضحاً في الوزن الجزيئي تراوح بين 175–1100 bp ونلاحظ ان السلالتين 1 و10 لم تظهر أية حزمة أي لم يجد البادىء التتابع المكمل له في السلالات، وبالتالي لم تظهر أي حزمة وبذلك يمكن أعتبارها بصمة لهذه السلالة في هذا البادىء (شكل 6).



شكل 6. نواتج البادىء 0PAW-08 مع DNA سلالات الذرة الصفراء على هلام الاكاروز بتركيز M.%1.5

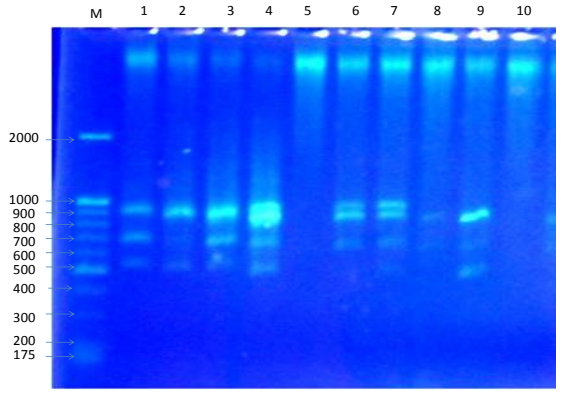
7. البادىء 0PAV-BI

أظهر عدد متواضع من الحزم بلغ 7 وانعكس ذلك على كفاءته وبلغت 5.8%، وكان عدد الحزم المتباينة ونسبتها 4 ونسبة الحزم المتباينة 57.1% وكانت المقدرة التميزية 5.2%، وتمكن البادىء من التعرف على التتابعات المكملة في DNA الجينوم للسلالات واظهر تبايناً واضحاً في الوزن الجزيئي تراوح بين 475 – 1100 bp ونلاحظ ان السلالتين 5 و 10 لم تظهر أية حزمة أي لم يجد البادىء التتابع المكمل له في هاتين السلالتين (شكل 7).

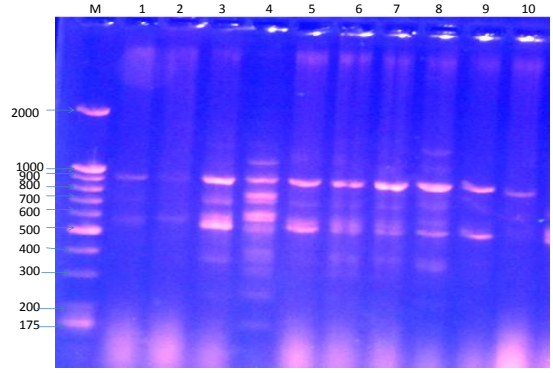
8. OPAW-10

أظهر البادىء عدداً من الحزم بلغ 17 حزمة مما منح كفاءة مقدارها 14.1% كان من بينها 13 حزمة متباينة الظهور بين السلالات المدروسة وجعلها تشكل نسبة 76.5% من الحزم التي ظهرت لهذا البادىء وهذا منحها مقدرة تميزية بلغت نسبتها 17.1%، وتمكن البادىء من التعرف على

التتابعات المكملة في DNA جينوم السلالات تراوحت بين 185 – 1440 bp، يوضح الشكل 8 ان الحزم ذات الوزن الجزيئي 900 bp قد ظهرت في جميع السلالات ونلاحظ في السلالة 4 وجود حزمة عند الوزن الجزيئي 185 bp وربما تعد بصمة وراثية للسلالة في هذا البادىء.



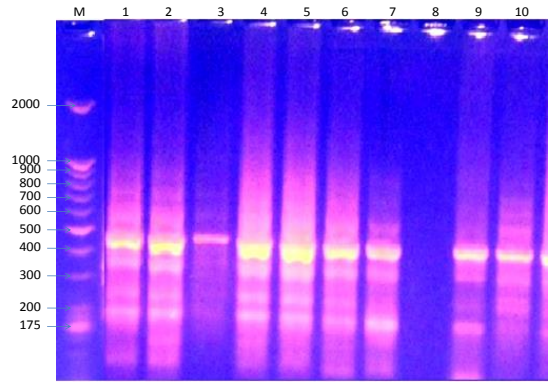
شكل 7. نواتج البادىء 0PAV-BI مع DNA سلالات الذرة الصفراء على هلام الاكاروز بتركيز M.%1.5



شكل 8. نواتج البادىء 0PAW-10 مع DNA سلالات الذرة الصفراء على هلام الاكاروز بتركيز M.%1.5

9. البادىء OPAT-08

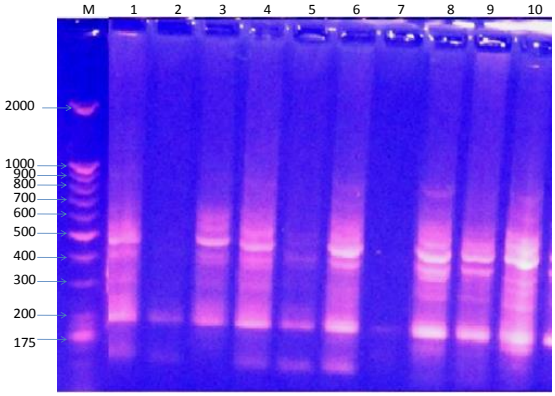
أظهر البادىء عدد من الحزم بلغ 7 حزمة مما منح كفاءة مقدارها 5.8% كان من بينها 4 حزمة متباينة الظهور بين السلالات المدروسة مما جعلها تشكل نسبة 57.1% من الحزم التي ظهرت لهذا البادىء ومنحها مقدرة تميزية 5.2% وتمكن البادىء من التعرف على التتابعات المكملة في DNA الجينوم تراوحت بين 180–550 bp، ونلاحظ ان السلالة 8 لم تظهر أية حزمة أي لم يجد البادىء التتابع المكمل له في هذه السلالة، وتمكن البادىء من تميز السلالة 3 من خلال حزمة ذات وزن جزيئي 475 bp وبذلك يمكن عدها بصمة وراثية للسلالة من هذا البادىء (شكل 9).



شكل 9. نواتج البادىء 0PAT-08 مع DNA سلالات الذرة الصفراء على هلام الاكاروز بتركيز M.%1.5

10. البادىء OPAR-15

أظهر هذا البادىء عدداً حزم بلغ 9 حزمة مما منحت هذا البادىء كفاءة 7.6% كان منها 7 حزم متباينة وبنسبة 77.7% ومقدره تميزية مقدارها 9.4%، وتعرف البادىء على التتابعات المكملة في DNA الجينوم تراوحت بين 160–900 bp، كما كانت لهذا البادىء القدرة على تمييز السلالتين 4 و8 بالتتابع، من خلال الحزمة ذات الوزن الجزيئي 475 bp وممكن عدها بصمة وراثية للسلالتين في هذا البادىء (شكل 10).

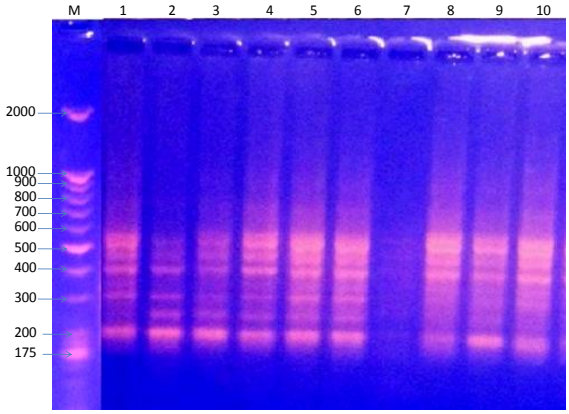


شكل 10. نواتج البادىء 0PAR-15 مع DNA سلالات الذرة الصفراء على هلام الاكاروز بتركيز M.%1.5

11. البادىء OPAK-15

أظهر هذا البادىء عدداً من الحزم بلغ 10 حزمة مما منح كفاءة بلغت نسبتها 8.3 % كان من بينها 8 حزم متباينة الظهور بلغت نسبتها 80% وامتلكت مقدرة تميزية 10.5%، وتمكن البادىء من التعرف على التتابعات المكملة في DNA الجينوم للسلالات تراوحت بين 220 – 680 bp، ونلاحظ ان السلالة 7 لم تظهر أية حزمة وهذا يدل على

ان البادىء لم يجد التتابع المكمل له في هذه السلالة (شكل 11).



شكل 11. نواتج البادىء 0PAR-15 مع DNA سلالات الذرة الصفراء على هلام الاكاروز بتركيز 1.5%.M

نستنتج من ذلك أن البادئات المستعملة في البحث تمكنت من تحديد بصمة اغلب السلالات حيث تم تحديد السلالة 1 و3 بواسطة البادىء OPAW–08 وكذلك تحديد السلالة 2 بواسطة البادىء OPAV–08 اما السلالة 4 فقد تم تحديدها بواسطة البادئان OPAW–10 وOPAR–15، اما السلالة 5 فقد تم تحديدها بواسطة البادىء OPAV–B في حين تم تحديد السلالة 6 بواسطة البادىء OPAW–11، اما السلالة 7 فقد تم معرفة بصمتها الوراثية بواسطة البادئات OPE-121 وOPAV–03 وOPAK-15 في حين تم تحديد البصمة للسلالة 8 بواسطة البادىء OPAV-8 والبادىء OPAT–08 والبادىء OPAR–15 اما السلالة 9 فقد تم تحديد بصمتها الوراثية بواسطة البادىء OPE–14 والبادىء OPAV–03 في حين ان السلالة 10 حددت بصمتها الوراثية بواسطة البادئان OPAW–08 و OPAV–B. اما السلالة 3 فلم يستطع أي بادىء من البادئات المستخدمة من تحديد بصمتها الوراثية لذلك يجب استخدام بادئات آخرى وذات تتابعات مختلفة لأجل معرفة هذه السلالة وتحديد بصمتها. تشير هذه النتائج أن تقنية RAPD قد نجحت في التمييز بين السلالات حتى بين تلك التي لايمكن التمييز بينها على مستوى الشكل الظاهري. أظهرت النتائج بشكل عام وجود كمية عالية من الأختلافات الوراثية مما يؤكد فعالية هذه التقانه في التمييز بين السلالات. مما يشير إلى انه حتى عند وجود درجات منخفضة من الأختلافات 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 و4 و5 و6 و7 و11 و12 و13 و14 و15 و17 و19).

قيم الأبعاد الوراثية بين سلالات من الذرة الصفراء بأستخدام تقانة RAPD

عند حساب معامل البعد الوراثي بين السلالات قيد الدراسة على النتائج التي أظهرت 108 حزمة ذات تعدد شكلي بأستخدام برنامج PAST وبالاعتماد على مقياس التشابه Hamming Similarty Index وكما مبين في الجدول (3)، أظهرت النتائج بأن أعلى نسبة تشابه وراثي (أقل بعد وراثي) بلغت 0.839 بين السلالتين BK164 و BK (147 الرقم 1 و2) بالتتابع اذ شكلا مجموعة صغيرة في حين وجدت أقل نسبة من التشابه الوراثي (أعلى بعد وراثي) 0.377 بين السلالتين BK128 وBK104 (الرقم 4 و 10) وكذلك كان البعد الوراثي بين السلالتين BK164 وBK 104 (الرقم 1 و10) بالتتابع بلغ 0.396 ومن الجدول نفسه نلاحظ ان السلالة BK 104 (رقم 10) كانت أكثر السلالات متباعدة وراثياً عن السلالات المدروسة (9).

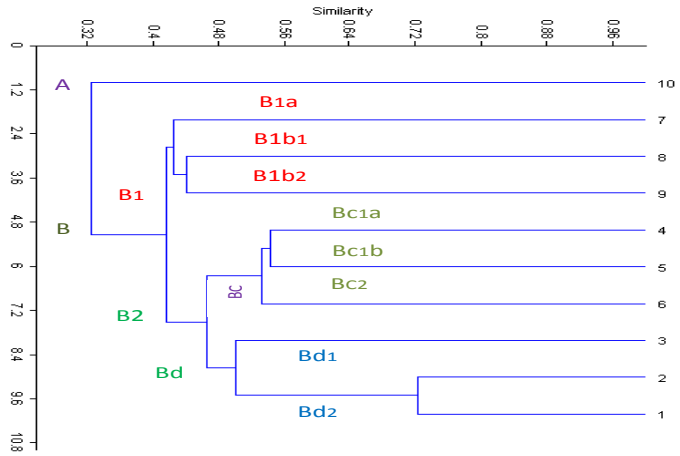
رسم شجرة القرابة الوراثية لسلالات من الذرة الصفراء أعتماداً على مؤشرات RAPD

إن شجرة القرابة هي تخطيط يظهر العلاقة 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، وتشير المسافة بين المجموعة الواحدة والمجموعات الأخرى الى درجة العلاقة بينهم فالمجموعات القريبة من بعضها توضع في فروع قريبة من بعضها، وعلى الرغم من ذلك فأن هذه الطريقة تقديرية ولكنها طريقة سهلة لدراسة علاقات القرابة والتطور، وبشكل عام فإن الكائنات التي تكون متشابهة شكلياً مع بعضها من المحتمل ان تكون قريبة من بعضها أكثر من الكائنات التي تكون ذات بنى أو تسلسلات مختلفة، وترجع أهمية تحديد القرابة الوراثية الى امكانية تنظيم الأصول الوراثية واختيار الأباء الداخلة في برامج التربية والتنبؤ بأفضل الهجن ومعرفة أقل عدد ممكن من التراكيب الوراثية التي تحتوي على أكبر قدر ممكن من

التصنيفات الوراثية في برامج التربية. قد يكون الافراد مختلفين مع بعضها مظهرياً ولكنهم قريبين من بعضهم جينياً ومن ثم قد تعود هذه الاختلافات الى تأثيرات بيئية فقط لاتؤخذ بعين الاعتبار في تحديد درجة القرابة بين الافراد. أظهر التحليل العنقودي للسلالات المدروسة بأستخدام مؤشرات RAPD وأعتماداً على طريقة (UPGMA) ان السلالات العشرة قد توزعت في مجموعتين A و B (شكل 13) ضمت المجموعة الاولى A سلالة واحدة وهي BK104 (رقم 10) أما المجموعة الثانية B فضمت مجموعتين رئيستين B2 و B1 وأن نسبة التشابة بين المجموعتين حوالي 42% وأحتوت المجموعة B1 مجموعتين ثانويتين هما Ba و Bb وان نسبة التشابه بينهما حوالي 44%، ضمت المجموعة Ba سلالة واحدة وهي BK117 (رقم 7)، اما المجموعة فقسمت بدورها الى قسمين هما Bb1 و Bb2 وان نسبة التشابه مابين المجموعتين حوالي 46% تضم المجموعة Bb1 السلالة BK110 (رقم 8) والمجموعة BK105 (رقم 9). أما المجموعة B2 فتقسم بدورها الى قسمين هما Bc و Bd ونسبة التشابه بينهما حوالي 47% في حين أحتوت المجموعة Bc مجموعتين ثانويتين هما Bc1 و Bc2 وكانت نسبة التشابه بينهما حوالي 53% وأحتوت المجموعة Bc1 على مجموعتين تحت الثانوية هي Bc1a و Bc2b وكانت نسبة التشابه بينهما 55% وكانت Bc1a سلالة BK128 (رقم 4) و Bc2b سلالة BK127 (رقم 5)، في حين أحتوت المجموعة Bd على مجموعتين ثانويتين هما Bd1 و Bd2 وكانت نسبة التشابه بينهما حوالي 50% وأحتوت مجموعة Bd1 على السلالة BK129 (رقم 3) والمجموعة Bd2 قسمت الى مجموعتين كانت نسبة التشابه بينهما 72% وضمت احدى المجموعتين السلالة BK147 (رقم 2) وضمت المجموعة الاخرى السلالة BK164 (رقم 1). من الممكن أستخدام تقنية RAPD في تحديد التباعد الوراثي بين السلالات النقية قبل أجراء التضريبات التبادلية بين السلالات وذلك لأنتاج هجن ذات قوة هجين وقابلية اتحاد خاصة عالية.

جدول 3. يوضح قيم الأبعاد الوراثية لسلالات من الذرة الصفراء بأستخدام تقنية RAPD

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	1									
2	0.839	1								
3	0.674	0.659	1							
4	0.633	0.600	0.702	1						
5	0.674	0.704	0.626	0.703	1					
6	0.609	0.543	0.608	0.693	0.696	1				
7	0.623	0.631	0.574	0.562	0.571	0.545	1			
8	0.543	0.575	0.637	0.600	0.591	0.642	0.605	1		
9	0.630	0.611	0.530	0.521	0.575	0.602	0.588	0.611	1	
10	0.396	0.514	0.543	0.377	0.536	0.422	0.424	0.457	0.580	1



شكل 13. شجرة القرابة الوراثية (Dendrogram) لعشر سلالات من الذرة الصفراء اعتماداً على نتائج 108 حزمة

REFERENCES

1. Alazawi., G. L. 2011. Discovery of Genetically Modified Maize in Iraqi Markets. M.Sc. Thesis. Institute of Genetic Engineering and Biol. Technology. Univ. of Baghdad. pp. 93.

2. Altekriti, A. F. 2013. Study of Genetic Diversity for Several Wheat Cultivate in Iraq Depending on the Molecular Markers. M.Sc. Thesis, Dept. of Biology., Coll. of Sci. Univ. of Tekrit. pp. 104.

3. Alfalahi, A. O. 2011. Phenotyping and Molecular Variations of Maize CMS Population and Subpopulations. Ph.D. Thesis, Dept. of Field Crop, Coll. of Agric., Univ. of Baghdad. pp. 98.

4. Asif, M., M. Rahman and Y. Zafar. 2006. Genotyping analysis of six maize hybrids DNA fingerprinting technology. Pak. J. Bot. 46 (2): 15- 20.

5. Bruel, D. C., V. Carpentieri, A. C. Gerage. N. S. Junior, C. E. Prete, C.F. Ruas, P. M. Ruas, S. G. Souza and D. D. Garbuglio. 2006. Genetic distance estimated by RAPD markers and its relationship with hybrid performance in maize .Pesq. Agropec. Bras. 41(10): 1491-1498.

6. Carvalho, V. P., C. F .Ruas, J. M. Ferreira, R. M. Moreira and P.M. Ruas. 2004. Geneticdiversity among maize. Landraces assessed by RAPD marker. Genetic and Molecular Biol. 27(2): 236-288.

7. Cholastova, T. A., M. J. Soldanova and R. B. Pokorny. 2011. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) and simple sequence repeat (SSR) marker efficacy for maize hybrid identification. African. J. of Biotech. 10(24): 4794-4801.

8. Cockerham, C. C., and Z. B. Zeng. 1996. Design III with marker loci. Genetics. 143: 1437-1456.

9- Elsahookie M. M. and Alfalahi A. O.2013. Molecular variation between population and subpopulation of maize inbreds.The Iraqi J.of Agric Sci.44 (3):274-288.

10. Elsahookie, M. M. 2009. An Introduction to Plant Molecular Biology. Coll. of Agric., Univ. of Baghdad. pp. 190.

11. Liet, V. V. and P. D. Thinh. 2009. Genetic diversity of local maize accessions collected in highland areas of vietnam revealed by RAPD markers. J. Sci. Dev. 7(2): 192-201.

12. Mandal, S. S. and S. A. Akhtar. 2001. Gene action for knob number in corn. Maize Genetics Cooperation Newsletter. 75: 5-7.

13. Maniatis, T., E. F. Fritsch and J. Sambrook. 2001. In Vitro Application of DNA by The Polymerase China Reaction in Molecular Cloning Press. New York, U.S.A. p. 691.

14. Mukharib, D. S., V. C. Patil, D. P. Biradar, P. M. Salimath and V. P. Chimmad. 2010. Assessment of molecular diversity in selected maize inbreds. Karnataka J. Agric. Sci. 23(3): 409-412.

15 Nei, M. and W. Li. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endow nucleases. Proc. Nat. Acad. Sci. 76: 5269-5273.

16. Onill, P. M., J. F. Shanahan, J. S. Scheper and B. Galdwell. 2004. Agronomic response of corn hybrid from different ears to deficient and adequate of water and nitrogen. Agron. J. 96: 1660-1667.

17. Rabbani, M. A., Z. H. Pervaiz and M. S. Masood. 2008. Genetic diversity analysis of traditional and improved cultivars of Pakistani rice using RAPD markers. E.J. Biotech. 11(3): full text 3-8.

18. Scheuring, C., R. Barthelson, D. Gailbraith, J. Beltran, J. Cothrin, Z. Zing, and H. Zhang. 2006. Preliminary analysis of differential gene expression between a maize superior hybrid and its parents using the 57 K maize gene-specific long-oligonucleotide microarray. In 48th Ann. Maize Genet. Conf., 9-12 March. California, USA, p. 132.

19. Weigand, F., M. Baum and S. Udupa, 1993. DNA molecular marker techniques, technical manual. No.20.International Center for Agricultural Research in the Dry Area (ICARDA).Aleppo, Syria pp:135.

20. Younan, H. Q. 2010. Identification of Several Rice Genotypes Using DNA Markers Based Method niv. of Baghdad p. 9s. M.Sc. Thesis, Coll. of Sci. Biotechnol. U pp:120.