

## تطبيق معلمات الـ RAPD لتقدير البعد الوراثي لسلاسلات من زهرة الشمس (*Helianthus annuus L.*)

حمزه محسن كاظم الخفاجي\* محمد احمد ابراهيم الانباري نضال عبد الحسين مسان البديري

### الملخص

نفذنا التجربة في مختبرات الوراثة لقسم علوم الحياة/ كلية التربية للبنات/ جامعة الكوفة خلال 2015, الهدف هو التحري عن دراسة التغيرات الجزيئية بين ستة سلاسلات من زهرة الشمس من اجل استخدامها لإنتاج الهجن. استعملنا تقانة التضاعف العشوائي المتعدد الأشكال للسلسلة الـ DNA ( RAPD ) المعتمد على تقانة الـ PCR و 10 من البادئات. استعملنا معلمات RAPD لتقييم التغيرات الوراثة بين ستة سلاسلات من زهرة الشمس أنتجت جميع البادئات العشرة 110 حزمة بمعدل 11 حزمة للبادئات الواحدة او عدد القطع الناتجة بين 8 للبادئ OPC-04 و 14 في البادئ OPA-17, و بوزن جزيئي تراوح بين 123-1495 bp. بلغ عدد الكميوات النسبية المئوية للحزم المتباينة 50, 45.09% بالتتابع. بلغت النسبة المئوية للقطع المتباينة 63.64% للبادئ OPA-19 بينما أظهر البادئ OPA-16 أو طأنسبة مئوية للحزم المتباينة تبلغ 30%, أعطى الكفاءة للبادئ OPA-17 بلغت 12.73% وأعلى كفاءة لتمييزية للبادئ OPA-19 و OPM-13 وبلغت 14%. واعتمادا على البيانات الثنائية والتشابه الوراثة باستخدام طريقة UPGMA في إنشاء مخطط الصلة تم فصل السلاسلات ضمن مجموعتين رئيسيتين هما A و B ومجموعتان وراثيتان معقدتان ثانوية, وأظهر تحليل المجمع الذي يتم فيه المقارنة بين السلاسلات ضمن مخطط الصلة إن السلسلة C أعطت تباعدا وراثيا معقدية السلاسلات كانا بعدا وراثيا عن السلسلة A وبلغ 0.74. بينما قللت بعد الوراثة بين السلاسلتين I و E وكذلك بين Q و I وبلغ 0.30 و 0.32 بالتتابع. أشارت النتائج إلى أن معلمات RAPD ذات كفاءة عالية في تمييز الخصائص البعد الوراثة بين سلاسلات زهرة الشمس.

كلمات مفتاحية: RAPD, PCR, نقاو وراثية, البادئ وسلاسلات.

## Application of RAPD Markers for Genetic Distance Assessing of Sunflower (*Helianthus annuus L.*) Lines

H. M. K. al-khafaji\* M. A. Al-anbari N. Abdul H. M. Al-Badeiri

### ABSTRACT

This study was carried out at the biology science department/College of Education-girls/kufa university Genetic Laboratories during 2015. The objective was to investigate genetic diversity among six sunflower lines. The random amplified polymorphic DNA (RAPD) based on PCR with 10 primers. Were used RAPD DNA markers were used to evaluate trends in genetic diversity among six of inbred line. All of the eleven RAPD primers produced 110 bands with average 11 bands for each primer. The number of amplified fragments produced per primer ranged from 8 for OPC-04 primer to 14 for OPA-17, primer with molecular size ranged from 123 to 1495 bp. The total number of polymorphic fragment and the percentage of polymorphism bands (50, 45.09 %) respectively. Maximum level of polymorphism was 63.64% observed for the primer OPA-19 while Primer OPA-16 showed the lowest percentage of polymorphism reached 30% for OPA-19 and OPM-13 primers. Maximum level of primer efficiency for OPA-17 was 12.73% and were reached 14%. 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 and secondary cluster analysis which compared between inbred lines in to dendrogram. Showed BK104 high genetic diversity was high genetic diversity between C and A. Genetic Distance that the highest estimate 0.74 was observed between line C, A. While, the lowest genetic Distance between inbred line I, E and Q, I (0.30, 0.32) respectively. Results indicated that RAPD markers were highly efficient in electing the genetic diversity among sunflower lines.

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

\*البحتمستل مناظر وحة دكتوراه للباحث الأول.

المقدمة

إن محصول زهرة الشمس *Helianthus annuus* L. هو احد ثلاث محاصيل حولية زيتية رئيسية في العالم بجانب فول الصويا والسلجم ولذا فهو من المصادر الأساسية للزيت النباتي في العالم . ولغرض النهوض بهذا المحصول وزيادة إنتاجيته في وحدة المساحة يقتضي الأمر إنتاج تراكيب وراثية جديدة وذات إنتاجية عن طريق تضريب بين سلالات متباينة وراثيا. وإن الاعتماد على الصفات المورفولوجية هي من أولى الطرق المستخدمة في دراسة أداء التراكيب الوراثية وقد حققت نتائج ملموسة, لكن يعاب عليها تأثيرها بالبيئة المحيطة, لذا أدخلت في الوقت الحالي تقنيات جديدة تعتمد على دراسة التركيب الوراثي بحد ذاته من دون أن يكون هناك تأثير للبيئة, تعرف بالمؤشرات الوراثية وتدعى بمؤشرات الـ DNA وتعتمد على الـ DNA كمادة أساس وتعرف بأنها المادة الوراثية المستقرة التي لا تتأثر بالبيئة, حيث تتميز هذه المؤشرات بالاستقرارية *Stability* بعكس المؤشرات الوراثية المعتمدة على الصفات المورفولوجية التي تتداخل مع البيئة, فضلا عن ذلك فإن الـ DNA موجود في جميع خلايا الكائن الحي وفي أي مرحلة عمرية ويمكن استخلاصه من أي جزء في النبات, ( Munhoz وآخرون 2009 ). وتعد مؤشرات التضاعف العشوائي متعدد الأشكال *Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)* من أولى المؤشرات التي اعتمدت على تضاعف سلسلة الـ DNA ( PCR ) *Polymerase Chain Reaction* واكتشفت عام 1990 وأخذت مجال كبير في التطبيق, وهي تستند على بادئات مفردة عشوائية مؤلفة من عشرة قواعد نايتروجينية تقترن مع مكملاتها على المجين بوجود إنزيم البلمرة *Polymerase DNA* لتظهر تباين بين التراكيب الوراثية من خلال وجود أو عدم

#### المواد الطرائق

نفذنا التجربة في مختبر الوراثة الجزيئية في قسم علوم الحياة/كلية التربية للبنات/جامعة الكوفة. استخدمت في هذا البحث 6 سلالات من زهرة الشمس في الجيل السابع والتي كان مصدرها أصول وراثية تم الحصول عليها من محطة أبحاث أبي غريب, والشركة العامة لأبحاث المحاصيل الزيتية ومديرية زراعة بابل/التجهيزات الزراعية وهي موضحة كما في الجدول رقم (1). أخذت سنة

وجود هذه المنطقة على المجين أو عدد نسخها وأطوالها. ويتم الكشف عنها بترحيل الناتج على هلام الاكاروز, ( Williams وآخرون, 1990 ). ويعد استخدام المعلومات الوراثية من السبل الحديثة لدراسة التباين الوراثي بين المحاصيل كونها تعكس المستوى الحقيقي للتغيرات الوراثية الموجودة بين التراكيب الوراثية علم مستوى الـ DNA وبالتالي فإنها تقدم معلومات أكثر دقة من التعبير المظهري ومن معلومات الأصل الوراثي, ( Erlich وآخرون 1999 ). يستخدم تحليل RAPD على نطاق واسع للتصنيف من مختلف الأجناس, ( Devos و Gale 1992 ), الأنواع, ( Iqbal وآخرون, 1995 ) و ( Farooq وآخرون, 1995 ) والتفريق بين وحدات الاختلافات بين الأنواع, ( Stiles وآخرون, 1993 ) و ( Mackill وآخرون, 1995 ) و ( Sweeny و Danneberger, 1995 ). اندمج تحليل الـ PCR في الوراثة وبرامج التربية لتصنيف العلاقة بين مختلف السلالات, الأصناف أو الهجين إضافة إلى الأسلاف البرية والأنواع ذات الصلة في كثير من المحاصيل, ( Sivolap و Solodenko, 1998 ). سجل Iqbal (2009) في دراسته لحساب البعد الوراثي لـ 8 سلالات من زهرة الشمس باستخدام مؤشرات RAPD إذ سجل أعلى بعد وراثي بلغ 0.7778 وأقلها بلغ 0.5159, والدراسة التي أجراها Abdel-Fatah و Mahmoud (2012) بين 13 سلالات من زهرة الشمس في جامعة قاريونس/ليبيا التي سجل فيها أعلى بعد وراثي بلغ 0.976 بين السلالات. تهدف الدراسة لمعرفة التغيرات الجزيئية بين سلالات تنقية من زهرة الشمس من خلال عزل وتنقية الـ DNA باستخدام المؤشرات الـ RAPD والتغيرات الجزيئية بين السلالات المتمازجة باستخدامها في مجال التربية وتحسين.

بذور من كل سلالة والموضحة وزرعت في سنادين بمعدل ثلاثة سنادين لكل سلالة وبذرتين بكل سنادنة, بعد ثلاثة أسابيع من الزراعة أخذت الأوراق الحقيقية لكل سلالة وشطفت جيدا بالماء المقطر ثم جففت ولكل سلالة على حدة, والتي استخدمت في عزل وتحليل DNA باستخدام تقانة RAPD.

جدول رقم (1): اسم السلالة والأصل الوراثي والمنشأ لسلالات من زهرة الشمس.

الرمز	رمز السلالة	الأصل الوراثي	المنشأ	الرمز	رمز السلالة	الأصل الوراثي	المنشأ
C	CO3L7Q3	Coban	تركي	I	IR1K3G1	زهرة العراق	عراقي
Q	QU4K2G2	قدس	عراقي	E	EUF7L5G1	EuroFlore	فرنسي
F	FL1H1G1	Flamme	تركي	A	ARG5L1Q1	Argensun	أرجنتيني

جهاز خليط التفاعل الرئيسي master mix من قبل شركة Bioneer في أنابيب خاصة معقمة وتحتوي كل أنبوبة على المكونات في جدول (2) وبالتركيز المبين إزاء كل مادة:

1 - البادئات primer

الجدول (2) : يبين رقم البادئ, اسم البادئ وتتابع الجدول (3) : مكونات خليط التفاعل الرئيسي النيوكليوتيدات. Master mix.

Component	Reaction size (20µl reaction)
DNA polymerase	1Unit
Each: dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	250 µM
Tris-HCl (pH 9.0)	10 mM
KCl	30 mM
MgCl <sub>2</sub>	1.5 mM
Stabilizer and tracking dye	5µM

ت	اسم البادئ	(3' → 5') تتابع البادئ
1	OPA-16	AGCCAGCGAA
2	OPA-17	GACCGCTTGT
3	OPA-19	CAAACGTCGG
4	OPB-05	TGCGCCCTTC
5	OPC-04	CCGCATCTAC
6	OPC-05	GATGACCGCC
7	OPD-02	GGACCCAACC
8	OPM-13	GGTGGTCAAG
9	OPT-10	CCTTCGGAAG
10	OPT-13	GGGTGTGTAG

- الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز Agarose Gel Electrophoresis

أجري الترحيل الكهربائي وبقال Sambrook-Russel (2001) كما يلي:

- تم إعداد لوح التحميل باستخدام لوح زجاجي إذ احيطت حافات اللوح بشريط لاصق قوي وثبت عليه المشط الخاص لتكوين الحفر عند احد أطراف الهلام. مسننها في وحدة الترحيل الكهربائي الأفقية المتمثلة بالحوض المستعمل للترحيل الكهربائي وملئ الحوض بدارئ TBE بحيث يغطي سطح الهلام.
- تم إضافة 51µ من الدليل ألحجمي DNA Ladder في أول حفرة. واستعمل هذا لمعرفة حجم قطع DNA المفصلة.
- وضع 3ml من عينة DNA على غطاء شمعي مطاط Parafilm، وخلط مع 2ml من صبغة التحميل، وتم خلط جيدا باستخدام ماصة دقيقة.
- بعد ذلك تم إغلاق جهاز الترحيل الكهربائي ومرر التيار الكهربائي بمقدار 70 فولت لمدة 45 دقيقة.
- فحص الهلام باستعمال مصدر للأشعة فوق البنفسجية UV transilluminator عند طول موجي (240، 366nm)، صور بعدها الهلام.

- أضيفت 51µ من قالب DNA، 21µ من البادئ إلى أنبوبة التفاعل الرئيسي Master Reaction الجاهزة ويكمل الحجم النهائي للتفاعل بإضافة الماء المقطر منزوع الايونات ليصل حجم المحلول 201µ.

- عزل الـ DNA من النماذج النباتية DNA Isolation from Plant Samples

تم عزل الـ DNA من الأوراق النباتية للأصناف الستة المعتمدة في الدراسة باستعمال عدة استخلاص جاهزة Kit مجهزة من شركة Geneaid، وهذه العدة توفر طريقة سريعة وسهلة للحصول على DNA نقي من الأنسجة النباتية.

- حضر هلام الاكاروز بتركيز 1% عن طريق إذابة 1gm من الاكاروز في 10 ml من دارئ TBE10x وتم يكمل إلى 100ml من الماء المقطر.
- سخن الخليط في فرن الميكروويف حتى اذيب كل مسحوق الاكاروز، واخرج المحلول من الميكروويف قبل وصوله إلى مرحلة الغليان. ثم ترك الهلام ليبرد إلى 65 مئوية.
- أضيف 5مايكروليتر من محلول بروميد الاثيديوم (10mg/ml) بعد أن برد الخليط، وخلط بلطف.
- سكب الهلام ببطء في رف الهلام، وتجنب تكون أي فقاعات في الهلام لذا أزيلت لكي لا يسمح للهلام أن يتشوه ورك لمدة تصل من 20 إلى 30 دقيقة.
- رفع المشط والشريط اللاصق بهدوء من الاكاروز المتصلب وثبتت الصفيحة على

- تم وضعت في جهاز المبلمر الحراري Thermocycler على برنامج خاص لكل مجموعة من البادئات وكما يلي:

- تفاعل البلمرة المتسلسل Polymerase Chain Reaction

تم تطبيق المؤشر الجزيئي المعتمد في هذه الدراسة RAPD من خلال تقنية PCR وفق الخطوات التالية:

(a) أجري العمل بارتداء القفازات وفي حجرة التعقيم Hood مع حفظ المحاليل كافة على الثلج.

Time	Temper.	Step المرحلة	Primer
5 min	94C°	Initial Denaturation	OPA-17
No. of Cycles = 40 Cycles			OPB-05
1 min	94C°	Denaturation	OPC-04
2 min	40C°	Annealing	OPC-05
2 min	72C°	Extension	OPD-02
5 min	72C°	Final Extension	OPM-13
3 min	94C°	Initial Denaturation	OPT-10
No. of Cycles = 45 Cycles			OPA-16
20 sec	94C°	Denaturation	OPA-19
20 sec	37C°	Annealing	OPT-12
40 sec	72C°	Extension	
10 min	72°C	Final Extension	

عدد الحزم المتباينة في البادئ  
 $100 \times \frac{\text{عدد الحزم الكلية في البادئ}}{\text{عدد الحزم المتباينة في البادئ}}$   
 (e) القوة التشخيصية للبادئ  
 وهذه حسبت كالاتي :  
 القوة التشخيصية للبادئ =  
 $100 \times \frac{\text{عدد الحزم المتباينة للبادئ}}{\text{عدد الحزم المتباينة لكل البادئات}}$   
 - ايجاد العلاقات الوراثية بين السلالات.

تم تحليل النتائج حسب جداول التوصيف المعدة مسبقا باستخدام البرنامج الإحصائي الحيوي PAST الإصدار 62.1 (Hammer وآخرون, 2001) وكالاتي :

الأبعاد الوراثية Genetic distances  
 (a) أنشأت مصفوفة الأبعاد الأقليدية Euclidean distances matrix باستخدام البرنامج أعلاه بين السلالات قيد الدراسة.  
 (b) رسم مخطط شجرة القرابة الوراثية Dendrogram  
 رسم مخطط الشجرة للسلالات باستخدام البرنامج أعلاه وبحسب الأبعاد الاقليدية بين هذه الأفراد وذلك بطريقة المجموعة الزوجية غير الموزونة مع المتوسط الحسابي Unweighted pair (UPGMA) group method with arithmetic average  
 لبيان توزيع هذه السلالات الى مجاميع أو عناقيد Clusters رئيسة وثانوية اعتماداً على البعد بينها وبشكل مخطط شجرة القرابة الوراثية Dendrogram .

(c) تحليل المكون الرئيسي Analysis of Principal Component (PCA)

رسم مخطط تحليل المكون الرئيسي ثنائي الأبعاد للسلالات قيد الدراسة باستخدام البرنامج أعلاه وذلك لغرض تأكيد النتائج مخطط شجرة الأبعاد الوراثية، كما تم إيجاد التباين المشترك للمكونات الرئيسية الـ 10 للمؤشرات المظهرية والجزيئية التي تم استخدامها في الدراسة.

بعد انتهاء وقت التفاعل رفعت الأنابيب من جهاز المبلر الحراري وتم سحب 5µl من الأنابيب وتحميلها بحفر هلام الاكاروز المحضر مسبقاً بتركيز 1%، مع تحميل الدليل الحجمي DNA ladder على أحد الجوانب. ثم رحلت العينات وذلك بتشغيل جهاز الترحيل الكهربائي Electrophoresis لمدة ساعة إلى ساعتين. بعدها تعريض الهلام للأشعة فوق البنفسجية على جهاز الـ Gel document-tation system (Hashemi وآخرون, 2009).

- تقدير الأحجام الجزيئية للحزم المميزة Unique bands  
 قدرت الأحجام الجزيئية للقطع المميزة للأصناف وذلك باستعمال البرنامج الحاسوبي PhotocaptMw الإصدار 10، وذلك بالمقارنة مع LadderDNA القياسي المستعمل.

- تحليل المؤشرات الجزيئية للأصناف والسلالات

- تحليل نتائج البادئات المستعملة

حللت نتائج التوصيف الجزيئي باستخدام صور هلام الاكاروز للعينات المرحلة إذ تم إنشاء جداول التوصيف بإعطاء وجود الحزمة الرقم 1 وغيابها الرقم 0. حسبت أعداد الحزم الكلية والمتباينة ذات التعدد الشكلي وتم تقدير المعلمات (parameters) الآتية :

(a) عدد الحزم الكلية المنتجة من كل بادئ.

(c) عدد الحزم المتباينة (ذات التعدد الشكلي)

Polymorphic bands

(d) النسبة المئوية المتباينة % وحسبت كالآتي :

= نسبة الحزم المتباينة

(b) كفاءة البادئ % Primer efficiency . وحسب من

المعادلة :

= نسبة كفاءة البادئ

العدد الكلي لحزم البادئ

 $100 \times \frac{\text{عدد الحزم الكلية لجميع البادئات}}{\text{عدد الحزم الكلية لجميع البادئات}}$ 

- نتائج عزل وتوصيف DNA المجيني من أوراق أسلالات:

من خلال إجراء عملية عزل الأحماض النووية

الكلية من الأوراق الفتية للسلالات باستخدام مادة النايتروجين السائل حسب الطريقة الموصوفة في كيت جينوم النبات Genomic DNA Mini Kit (Plant) والمجهز من قبل شركة Geneaid, تم الحصول على كميات مناسبة من الـ DNA الكلي (المجيني) وحسبت نتائج كمية الـ DNA المستخلص والنقاوة بالاعتماد على قراءة الامتصاص لطيف الأشعة فوق البنفسجية عند الطول الموجي 260nm و 280nm وذلك عند فحص العينات

بجهاز Nanodrop spectro-photometer. إذ بلغ أعلى تركيز للأحماض النووية 9.611µg/ml للسلالة A بلغت نقاوته 1.713، وأقل توكيز للسلالة C إذ بلغ 3.169µg/ml وبلغت نقاوته 1.711 كما في الجدول (4).

جدول ( 4 ) تركيز ونقاوة الـ DNA للعينات المستخلصة من ست سلالات لزهرة الشمس .

نقاوة قراءة الجهاز	تركيز الـ DNA µg/ml	الرمز	N.
280\260			
1.711	3.169	C	1
2.159	7.452	Q	2
1.840	6.571	F	3
1.728	4.457	I	4
1.724	7.146	E	5
1.713	9.611	A	6

2.3.4- نتائج الحزم باستعمال بادئات RAPD والمناقشة.

جدول ( 5 ) : المعلمات الخاصة بالبادئات المستخدمة بالدراسة في تحليل مؤشرات RAPD لستة سلالات من زهرة الشمس.

البادئ	الحزم الناتجة	الحزم المتباينة	نسبة الحزم المتباينة %	نسبة كفاءة البادئات %	نسبة القابلية التمييزية %	الوزن الجزيئي bp
OPA-16	10	3	30.00	9.09	6	1385-189
OPA-17	14	5	35.71	12.73	10	1135-136
OPA-19	11	7	63.64	10.00	14	1493-189
OPB-05	10	5	50.00	9.09	10	1124-123
OPC-04	8	3	37.50	7.27	6	766-216
OPC-05	11	6	54.55	10.00	12	1495-200
OPD-02	13	6	46.15	11.82	12	615-122
OPM-13	12	7	58.33	10.91	14	1297-104
OPT-10	9	3	33.33	8.18	6	1095-175
OPT-13	12	5	41.67	10.91	10	978-128
المجموع	110	50	45.09			1495-123

البادئ OPA-19, تميزت البادئات المستخدمة بوزن جزيئي تراوح بين 1495 – 123.bp

أشارت النتائج الموضحة في جدول ( 5 ) والأشكال

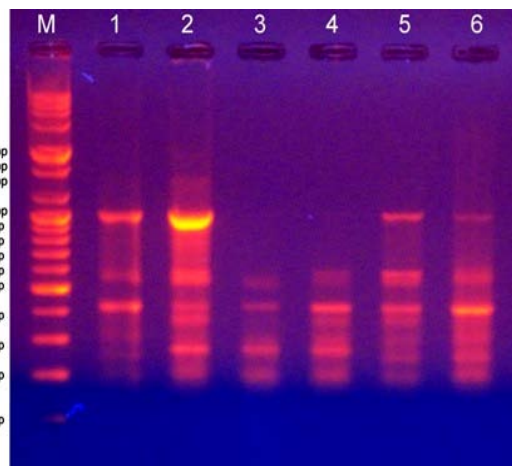
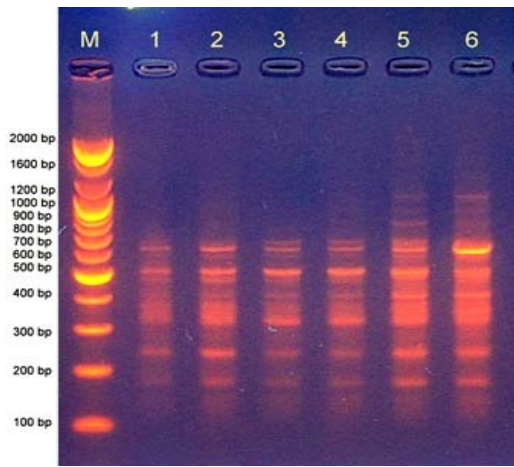
(1 و 2 و 3 و 4 و 5 و 6 و 7 و 8 و 9 و 10) إن البادئ OPA-17 اعطى اعلى عدد من الحزم بلغ 14 حزمة في حين اعطى البادئ OPC-04 اقل عدد من الحزم مقدارها 8 , بلغ عدد الحزم الكلية 110 حزمة بينما بلغ عدد الحزم المتباينة

حين اعطى البادئ OPA-16 و OPT-10 و OPC-04 عدد حزم متباينة بلغ 3 وبنسبة 30.00% , و 33.33% و 37.50% على التوالي,

واعطى البادئ OPA-19 اعلى نسبة حزم متباينة بلغ 63.64% , كانت اعلى نسبة كفاءة 12.73% في البادئ OPA-17 , وبلغت اعلى نسبة للقابلية التمييزية 14% في

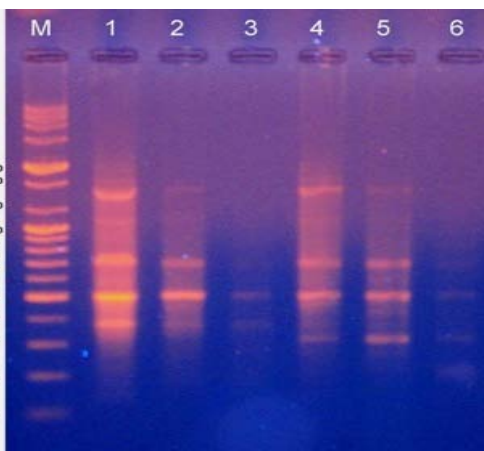
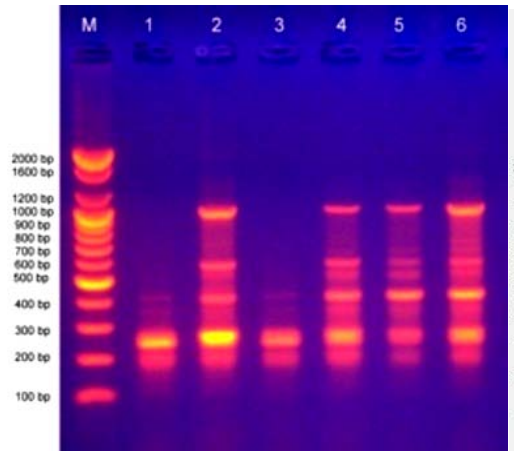
الكلية 50 حزمة ونسبة 45.09% اذا اعطى البادئ OPM-19 و OPM-13 عدد حزم متباينة بلغ 7 ونسبة 63.64% و

58.33% على التوالي, في



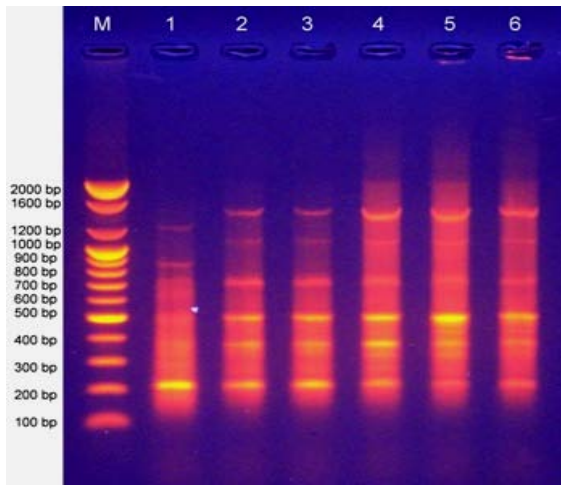
شكل ( 2 ) : نواتج تفاعل RAPD الناتجة من تفاعل البلمرة باستعمال البادئ OPA-17 على هلام الاكاروز بتركيز 1% لستة سلالات من زهرة الشمس ( M : يمثل المؤشر القياسي بحجم 100 زوج قاعدي), الارقام من 1 - 6 تمثل السلالات.

شكل (1) : نواتج تفاعل RAPD الناتجة من تفاعل البلمرة باستعمال البادئ OPA-16 على هلام الاكاروز بتركيز 1% لستة سلالات من زهرة الشمس ( M : يمثل المؤشر القياسي بحجم 100 زوج قاعدي), الارقام من 1 - 6 تمثل السلالات.

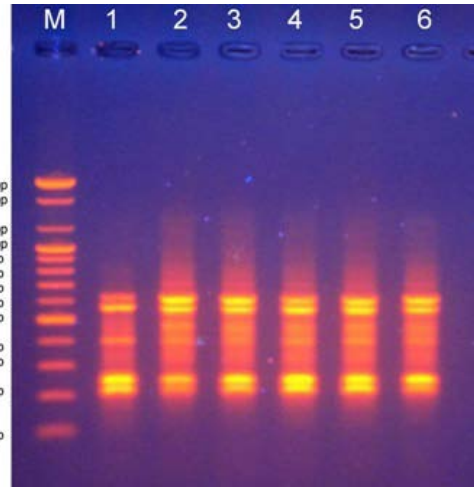


شكل ( 4 ) : نواتج تفاعل RAPD الناتجة من تفاعل البلمرة باستعمال البادئ OPA-05 على هلام الاكاروز بتركيز 1% لستة سلالات من زهرة الشمس ( M : يمثل المؤشر القياسي بحجم 100 زوج قاعدي), الارقام من 1 - 6 تمثل السلالات.

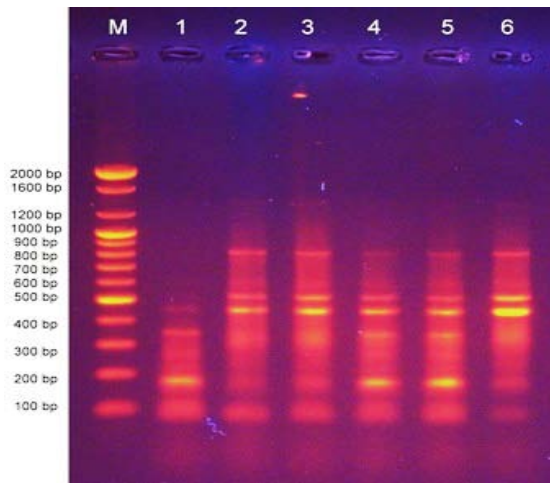
شكل ( 3 ) : نواتج تفاعل RAPD الناتجة من تفاعل البلمرة باستعمال البادئ OPA-19 على هلام الاكاروز بتركيز 1% لستة سلالات من زهرة الشمس ( M : يمثل المؤشر القياسي بحجم 100 زوج قاعدي), الارقام من 1 - 6 تمثل السلالات.



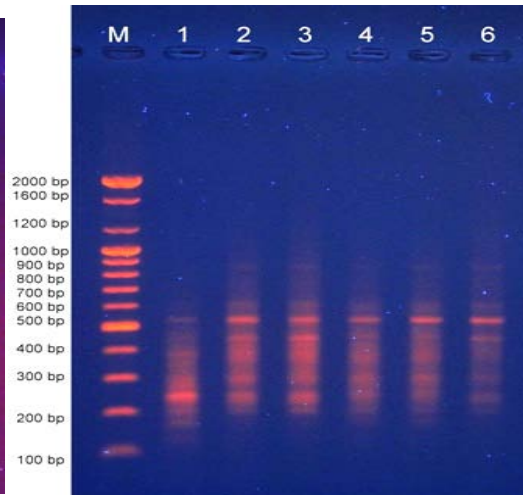
شكل ( 6 ) : نواتج تفاعل RAPD الناتجة من تفاعل البلمرة باستخدام البادئ OPC-05 على هلام الاكاروز بتركيز 1% لستة سلالات من زهرة الشمس ( M : يمثل المؤشر القياسي بحجم 100 زوج قاعدي), الارقام من 1 - 6 تمثل السلالات.



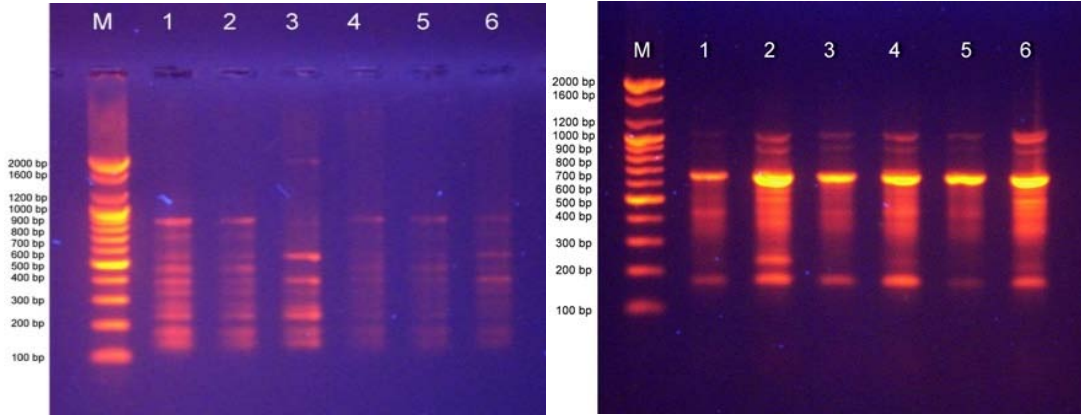
شكل ( 5 ) : نواتج تفاعل RAPD الناتجة من تفاعل البلمرة باستخدام البادئ OPC-04 على هلام الاكاروز بتركيز 1% لستة سلالات من زهرة الشمس ( M : يمثل المؤشر القياسي بحجم 100 زوج قاعدي), الارقام من 1 - 6 تمثل السلالات.



شكل ( 8 ) : نواتج تفاعل RAPD الناتجة من تفاعل البلمرة باستخدام البادئ OPM-13 على هلام الاكاروز بتركيز 1% لستة سلالات من زهرة الشمس ( M : يمثل المؤشر القياسي بحجم 100 زوج قاعدي), الارقام من 1 - 6 تمثل السلالات.



شكل ( 7 ) : نواتج تفاعل RAPD الناتجة من تفاعل البلمرة باستخدام البادئ OPD-02 على هلام الاكاروز بتركيز 1% لستة سلالات من زهرة الشمس ( M : يمثل المؤشر القياسي بحجم 100 زوج قاعدي), الارقام من 1 - 6 تمثل السلالات.



شكل ( 10 ): نواتج تفاعل RAPD الناتجة من تفاعل البلمرة باستعمال البادئ OPT-13 على هلام الاكاروز بتركيز 1% لستة سلالات من زهرة الشمس ( M : يمثل المؤشر القياسي بحجم 100 زوج قاعدي), الأرقام من 1 - 6 تمثل السلالات.

شكل ( 9 ): نواتج تفاعل RAPD الناتجة من تفاعل البلمرة باستعمال البادئ OPT-10 على هلام الاكاروز بتركيز 1% لستة سلالات من زهرة الشمس ( M : يمثل المؤشر القياسي بحجم 100 زوج قاعدي), الأرقام من 1 - 6 تمثل السلالات.

أوضحت بأن المسافة الألفيدية بين السلالات كانت عالية بالمقارنة مع ما توصل اليه Iqbal ( 2009 ) في دراسته لحساب البعد الوراثي لـ 8 سلالات من زهرة الشمس باستخدام مؤشرات RAPD إذ سجل أعلى بعد وراثي بلغ 0.7778 وأقلها بلغ 0.5159 , والدراسة التي أجراها Mahmoud و Abdel-Fatah (2012) التي سجل فيها أعلى بعد وراثي بلغ 0.976 بين السلالات.

- قيم البعد الوراثي اعتمادا على مؤشرات RAPD تشير النتائج الموضحة في الجدول ( 6 ) إلى قيم الأبعاد الألفيدية بين السلالات في العراق بالاعتماد على 50 حزمة متباينة فقد وجد أن أعلى مسافة ألفيدية بلغت 0.74 بين A و C في حين بينت نتائج الجدول نفسه أن أقل مسافة ألفيدية 0.30 كانت بين سلالة E و I . أن نتائج الدراسة الحالية

جدول ( 6 ): الأبعاد الألفيدية باستخدام مؤشرات RAPD بين ست سلالات من زهرة الشمس.

A	E	I	F	Q	C	G.
					0	C
				0	0.62	Q
			0	0.47	0.50	F
		0	0.36	0.32	0.52	I
	0	0.30	0.52	0.51	0.70	E
0	0.35	0.39	0.55	0.35	0.74	A

الثانية B والبعد الألفيدي بين المجموعتين الرئيسيتين كان 0.62 , كما انقسمت المجموعة الرئيسية الثانية الى مجموعتين فرعيتين B1 و B2 والبعد الألفيدي بينهما 0.48 التي ضمت في الفرع الأول مجموعتين فرعيتين ثانويتين B1a و B1b والبعد الألفيدي بينهما 0.35 تضمنت المجموعة

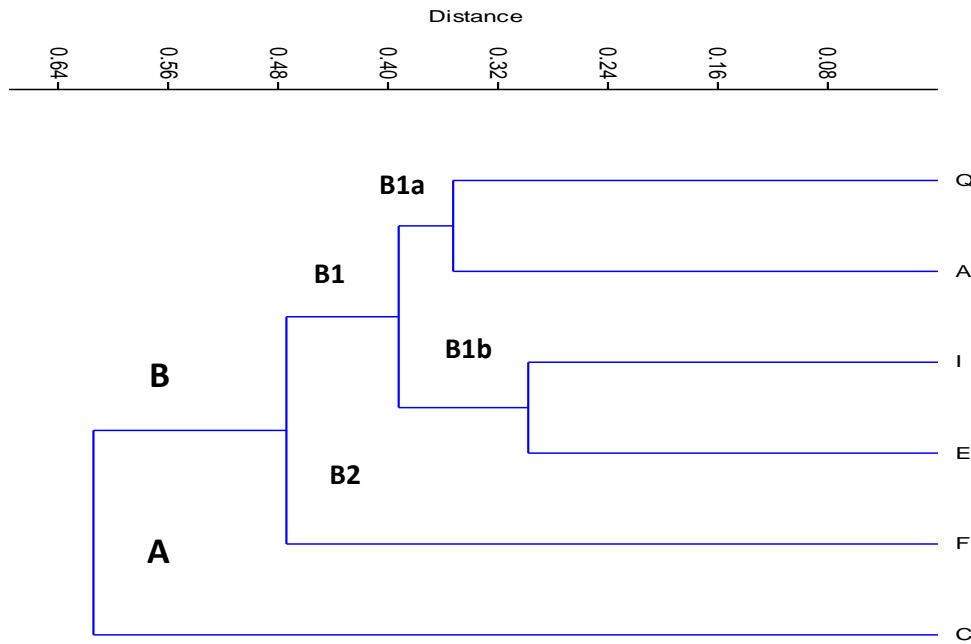
- شجرة القرابة الوراثية بين السلالات استنادا الى مؤشرات RAPD

يوضح الشكل ( 11 ) مخطط التوزيع العنقودي ( Cluster Analysis) اعتماداً على نتائج 10 بادئ للتكرارات البسيطة الترادفية الداخلية بان السلالات الستة المزروعة في العراق قد توزعت في مجموعتين رئيسيتين المجموعة الأولى A والتي تضمن السلالة C والمجموعة

أما السلالة F وقعت ضمن المجموعة الفرعية الثانية .

الفرعية الثانوية الأولى السلالتين Q و A اما المجموعة الفرعية الثانوية الثانية تضمنت I و E





الشكل ( 11 ): شجرة القرابة الوراثية Dendrogram لستة سلالات حسب طريقة UPGMA اعتمادا على نتائج 10 بادئات وتضاعف العشوائيات المتعدد الأشكال المتسلسلة DNA (RAPD).

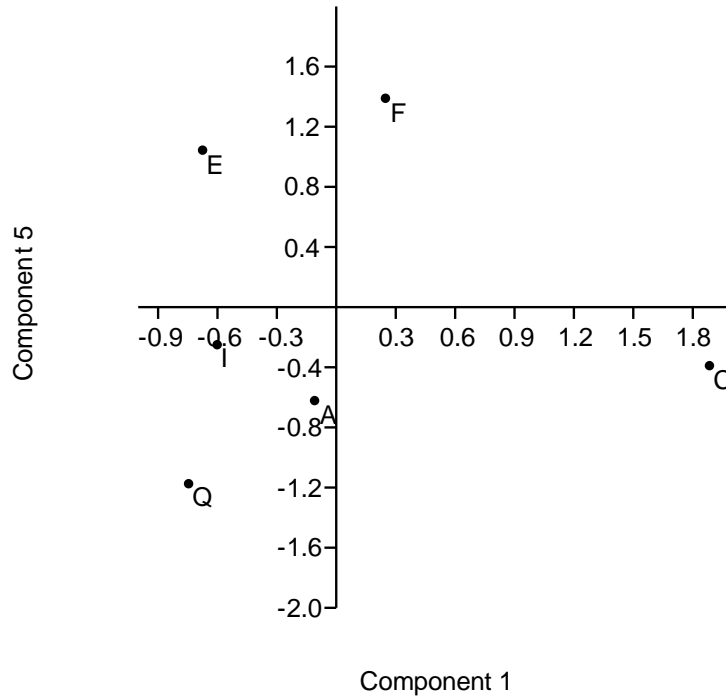
- نتائج تحليل المكون الرئيس للسلالات استنادا إلى مؤشرات RAPD

نسبة تباين وراثي بلغت 6.972 % ومجموعهما 95.239 % اعتماداً على المؤشرات المظهرية. في حين بين الجدول نفسه إلى وقوع السلالات في مكونين رئيسيين بالاعتماد على مؤشرات RAPD إذ سجل Component 1 نسبة تباين مقدارها 56.287 % بينما أعطى المكون الثاني نسبة تباين بلغت 20.659 % ومجموعهما 76.946 % وهذا يعد مؤشراً إيجابياً على كفاءة بادئات الـ RAPD المستخدمة في الدراسة كونها الأكثر فعالية في تشخيص التباينات بين السلالات. إذ تبين من خلال النتائج قدرة هذه المؤشرات على تقدير حجم التغيرات على المستوى الجزيئي وعلى المستوى المتعامد للمحورين وتوزيعها من خلال جميع المواقع الجينية المدروسة مما يعكس واقعية هذه المؤشرات وشموليتها لكل مناطق المادة الوراثية للكائن الحي.

أظهرت نتائج تحليل المكونات (PCA) Principal Component Analysis الموضحة في الشكل ( 12 ) تطابق واضح مع نتائج شجرة القرابة الوراثية المبينة في الشكل ( 11 )، إذ أوضحت نتائج التوزيع مطابقة المجاميع المتكونة لشجرة القرابة الوراثية استناداً إلى مؤشرات RAPD والتي توضح توزيعها في مجموعتين رئيسيتين ضمت المجموعة الأولى السلالة C في حين ضمت المجموعة الثانية بقية السلالات. كما يشير الجدول ( 6 ) إلى وقوع السلالات في مكونين رئيسيين بالاعتماد على مؤشرات RAPD وعلى الصفات المظهرية المشتركة فيما بينها من خلال تحليل المكونات (PCA) - Principal Component Analysis باستخدام برنامج PAST إذ سجل Component 1 نسبة تباين مقدارها 88.267 % في حين أعطى Component 2

جدول ( 6 ): تحليل المكونات الرئيسة استناداً إلى مؤشرات RAPD والمؤشرات المظهرية للسلالات.

% التباين		المكون الرئيسي
المؤشرات المظهرية	RAPD	
88.267	56.287	1
6.972	20.659	2
3.911	15.152	3
0.777	7.3602	4
0.074	0.5417	5



شكل ( 12 ): توزيع ستة سلالات على المستوى المتعامد حسب تحليل  
Principal Component Analysis ( ) PCA بالاعتماد على نتائج مؤشرات الـ RAPD.

#### المصادر

- Devos, K.M. and Gale M. D.(1992) The use of Random Amp-lified Polymorphic DNA Markers in wheat. *Theor. Appl. Genet.*, 84: 567-572.
- Farooq, S., Shah T.M. and ArifM.(1995) Utilization of RAPD markers for the identification of cultivated and wild rice species. *Pakistan Journal of Botany* 27: 127-138.
- Hammer D., Harper A. and Ryan P. (2001) *PAST: Palaeontological Statistics*: 1-31.
- Hashemi, S., Mir mohammadi-Maibody S., Nematzadeh G. and Arzani A. (2009) Identification of rice hybrids using microsatellite and RAPD markers. *African J. Biotech.*, 8(10): 2094-2101.
- Iqbal, M. A. (2009) Genetic Basis of Variation in Achene Yield and Oil Contents in Sunflower (*Helianthus annuus L.*). the part. fulfill. of the req. the deg. of Philo.
- Erlich, A.; GelfandD., and SminskyJ.,(1999) Recent advances in polymerase chain reaction. *Sci. J.* 252: 1643
- in plant Br. and Gen.; Univ. of Agric. Faisalabad, Pakistan.
- Iqbal, M. J., Paden D. W. and Ryburn A. L. (1995) Assessment of genetic relationships among rhododendron species, varieties and hybrids by RAPD analysis. *Scientia Horticulture* 63: 215-223.
- Mackill, D.J., Salam, M. A., Wang, Z. Y., and Tanksley, S. D. (1993).
- A major photoperiod-sensitivity gene tagged with RFLP and isozyme markers in rice. *Theor. Appl. Genet.* 85, 536-540.
- Mahmoud, A. M and Abdel-Fatah B. E. (2012) Analysis of genetic diversity among sunflower genotypes using

- Agromorphological traits and molecular markers. *Aust. j. of bas. and appl. Sci.*,6(13):419-432.
- Munhoz, R. E. F., Prioli A. J., Amaral Júnior A. T. and Scapim C. A. (2009) Genetic distances between popcorn populations based on molecular markers and correlations with heterosis estimates made by diallel analysis of hybrids. *Genet. Mol. Res.* 8: 951-962.
- Sambrook, J. and Russell D. W. (2001) *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sivolap, Yu. M. and Solodenko A. E. (1998) Inter- and Intraspecies Differentiation in the Genus *Helianthus* by RAPD Analysis. *Helia*, 21 (29): 9-18.
- Stiles, J. I., Lemme C., Sondur S., Morshidi M. and R. Manshardt (1993) Using RAPD for evaluating genetic relationships among papaya cultivars. *Theor. Appl. Genet.* 85: 697-70t.
- Sweeny, P. M. and Danneberge T. K. (1995) RAPD characterization of *Poa annua* L. Populations in golfcourse greens and fairways. *Crop Science* 35: 889-894.
- Williams, J. G., Kubelik A. R., Livak K. J., Rafalski J. A. and Tingey S. V. (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.*, 18: 6531-6535.