



الكشف عن التنوع الوراثي لعدد من أصناف الذرة الصفراء العراقية باستخدام تقنية RAPD-PCR

عبدالمجيد عبدالعزيز حمادي

معتز عبد الجبار فرحان

جامعة الانبار – كلية التربية للعلوم الصرفة

الخلاصة:

استُخدِمت في هذه الدراسة ستة أصناف من الذرة الصفراء وهي (الحلوة Z1 ، الصيوانية Z2 ، المنغوزة Z3 ، الشامية Z4 ، المغلفة Z5 والطحينية Z6) ، و 10 بوادئ لمؤشر RAPD للكشف عن التنوع الوراثي بين DNA الاصناف المدروسة وتحديد العلاقة الوراثية بينها كذلك تحديد البصمة الوراثية لهذه الاصناف. تم الحصول على كمية (DNA) تراوحت بين (65-90) مايكروغرام لكل غرام واحد من أوراق الأصناف المدروسة بعد عزل (DNA) بطريقة (CTAB) ، وبنقاوة تراوحت بين (1.5-1.85) وأجريت تفاعلات (PCR) وُجِلت العينات على هلام الاكاروز. أوضحت نتائج تفاعلات (RAPD) ان البادئ (OPW-09) لم يُظهر اي نتائج تضاعف ، بينما أظهرت 9 بوادئ 277 حزمة ، (120) حزمة منها متماثلة وبنسبة مئوية (43.32%) و (157) حزمة متباينة وبنسبة مئوية (56.67%) ، وأظهرت نتائج البعد الوراثي لتفاعلات (RAPD) أن أقل قيمة للبعد الوراثي كانت (0.21749) بين الصنفين (صيوانية Z2 ومغلفة Z5) ، وأعلى قيمة كانت (0.56484) بين الصنفين (حلوة Z1 ومغلفة Z5) ، وحسب التحليل الوراثي للنتائج رُسمت شجرة القرابة الوراثية للأصناف المدروسة وقُسمت الى ثلاث مجاميع رئيسية ، ضمت المجموعة الأولى الصنف حلوة (Z1) فقط ، والمجموعة الثانية الصنف طحينية (Z6) فقط ، بينما انقسمت المجموعة الثالثة الى ثلاث مجاميع ثانوية ، ضمت الأولى الصنف شامية (Z4) ، والثانية الصنف منغوزة (Z3) ، بينما ضمت المجموعة الثالثة الصنفين (صيوانية Z2 ومغلفة Z5).

معلومات البحث:

تاريخ التسليم: 2013/00/00

تاريخ القبول: 2014/5/6

تاريخ النشر: 2022 / /

DOI: 10.37652/juaps.2016.134880

الكلمات المفتاحية:

تنوع وراثي ،
ذرة صفراء ،
RAPD.

المقدمة:

الصفات تستند بظهورها على العديد من العوامل الوراثية بالإضافة إلى تأثيرها الكبير بالظروف البيئية المحيطة بها لذا يصبح التنوع المعتمد على مثل تلك الصفات ضيقاً² ، ومن المؤشرات الوراثية الأخرى التي استخدمت كطرق تمييزية وتصنيفية هي تلك المعتمدة على المحتوى البروتيني³ ، والمتناظرات الأنزيمية⁴ ، إلا أن محور التحفظات على هذه الطرق تركز على كونها غير كفوءة بدرجة كافية للكشف عن التباينات بشكل مستقر وشامل من جهة وقلة مؤشراتنا وتحديدنا بنوعية النسيج والمرحلة العمرية من جهة أخرى بالإضافة إلى تأثيرها بالبيئة⁵ . في السنوات الأخيرة وفي ظل التطور السريع في مجال استخدام مؤشرات DNA ساعد في الكشف عن أنواع حديثة وعديدة من تلك المؤشرات التي تعتمد على واحد من الإنجازات البارزة والذي تحقق قبل نهاية الألفية الثانية ألا وهو ابتكار تفاعل استطالة السلسلة (PCR) DNA من قبل⁶.

يعد محصول الذرة الصفراء (*Zea mays* L.) من محاصيل الحبوب المهمة حيث يستعمل كغذاء للإنسان لما تحتويه من مواد نشوية وبروتينية وزيوت وفيتامينات ومواد معدنية وتدخل حبوبها كمادة أساسية في العليقة الحيوانية ، تزرع في مساحات واسعة من العالم ويأتي في المرتبة الثالثة بعد محصولي الحنطة والرز من حيث الأهمية الاقتصادية¹.

لقد كان الاعتماد بشكل كبير على الصفات المظهرية كمؤشرات وراثية Genetic markers للتمييز بين الأصناف وبما أن هذه

* Corresponding author at: University of Anbar - College of Education for Pure Sciences,
E-mail address:

تركيز DNA مايكروغرام/ مايكروليتر = قراءة الامتصاصية لكل 1 مل من العينة عند الطول الموجي (260) × معكوس التخفيف (100)×50/1000.

أما النقاوة فتم تقديرها من حاصل قسمة قراءة الامتصاصية عند الطول الموجي (260) على قراءة الامتصاصية عند الطول الموجي (280) نانوميتر.

تفاعلات RAPD :

أجريت تفاعلات RAPD على (6) عينات من الذرة الصفراء قيد الدراسة وبالإستناد إلى ما جاء به ¹⁰ وباستخدام 10 بواي (OPC-01) ، OPC-02 ، OPC-07 ، OPC-08 ، OPC-09 ، OPE-15 ، OPP-14 ، OPW-13 ، OPW-09 و OPY-09) مجهزة من شركة (operon U.S.A).

- طريقة العمل :

ضبط تركيز DNA العينات المدروسة بالتخفيف بواسطة محلول TE للحصول على التركيز المطلوب (25-50) نانوغرام/ مايكروليتر لكل عينة لإجراء تفاعلات RAPD ، وجُهِزَ خليط التفاعل الرئيس Master Reaction على شكل أنبوبة Eppendroffee سعة 0.25 مل معقمة حاوية على جميع مكونات التفاعل عدا البادئ و DNA القالب جدول (2).

جدول (2) مكونات خليط التفاعل

ت	المكونات	الحجم لعينة واحدة	التركيز النهائي
1	ماء مقطر معقم ddH ₂ O	11.8 مايكروليتر	-
2	القواعد النيتروجينية ثلاثية الفوسفات dNTPs	2.5 مايكروليتر	250 مايكرومولر
3	محلول منظم PCR Buffer بقوة X10 مع MgCl ₂	2.5 مايكروليتر	1X
4	البادئ Primer	1 مايكروليتر	8 بيكومول
5	إنزيم بلمرة DNA Taq polymerase	0.2 مايكروليتر	1 وحدة/تفاعل
6	قالب DNA template	2 مايكروليتر	50-25 نانوغرام/مايكروليتر

ونُقِلَت الأنابيب إلى المبلر الحراري ثم تطبيق البرنامج (دورة واحدة مدة 5 دقائق على درجة حرارة (94)°م للمسخ الأولي لشريط DNA تليها (40) دورة تضاعف تتضمن كل دورة دقيقة واحدة بدرجة حرارة (94)°م للمسخ الشريط المزدوج ودقيقة واحدة بدرجة حرارة (36)°م لارتباط البادئ بـ DNA القالب ودقيقتين بدرجة حرارة (72)°م لاستطالة البادئ ، بعد ذلك دورة أخيرة لمدة 10 دقائق وعلى درجة

تستخدم هذه المؤشرات المادة الوراثية الأساسية DNA في جسم الكائن الحي كمؤشرات وراثية تدعى بمؤشرات DNA ، ومن خلالها تمكن الباحثون من تجاوز كل العقبات التي واجهت الطرق السابقة. وتتصف هذه المؤشرات بالعديد من المميزات المهمة كون DNA مادة مستقرة لا تتأثر بالبيئة وهي ذاتها في كل أجزاء الكائن ومراحل عمره ، بالإضافة إلى أن هذه المؤشرات تتوارث وبالتالي يمكن متابعتها في الأجيال اللاحقة ومنذ المراحل المبكرة من النمو ⁷ ، لذا طوعت لهذا الغرض العديد من المؤشرات للكشف عن التباينات ومنها : RFLP ، RAPD ، SSR ، AFLP وغيرها ⁸ ، ويهدف البحث الى الكشف عن التنوع الوراثي بين DNA الاصناف المدروسة وتحديد العلاقة الوراثية بينها ، كذلك تحديد البصمة الوراثية لهذه الاصناف .

المواد وطرائق العمل

نفذت التجربة في مختبرات كلية التربية للعلوم الصرفة على ستة اصناف من الذرة الصفراء العراقية كما مبينة في الجدول (1) .

جدول (1) يبين المجاميع الداخلة في الدراسة

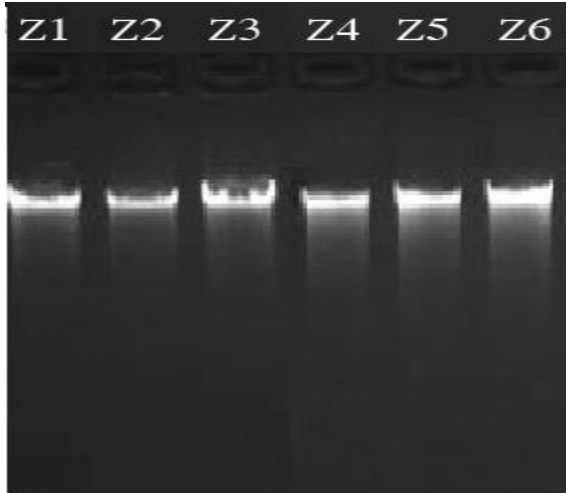
الرمز	الاسم العلمي	Scientific name
Z1	الذرة الصفراء الحلوة	<i>Z. mays saccharata</i>
Z2	الذرة الصفراء الصوانية	<i>Z. mays indurate</i>
Z3	الذرة الصفراء المنغوزة	<i>Z. mays indentata</i>
Z4	الذرة الصفراء الشامية	<i>Z. mays everta</i>
Z5	الذرة الصفراء المغلفة	<i>Z. mays tunicate</i>
Z6	الذرة الصفراء الطحينية	<i>Z. mays amylacea</i>

اذ عُولَ (DNA) الأوراق الفتية لأصناف الذرة الصفراء بالطريقة التي ذكرها Benito وآخرون (1993) ⁹ ، باستخدام محلول الاستخلاص (CTAB) (100 ملي مولر Tris-HCl ، 1.4 مولر NaCl ، 2 % CTAB و 20 ملي مولر Na₂EDTA) ، محلول الكلوروفورم : ايزوميل (1:24) ، الأيزوبروبانول المبرد ، محلول الغسل Washing buffer المبرد ومحلول الإذابة (TE) (0.010 مولر Tris-HCl و 0.001 مولر Na₂EDTA).

تقدير تركيز DNA المستخلص ونقاوته :

قُدِّرَ تركيز DNA بقياس الامتصاصية لطيف الأشعة فوق البنفسجية باستخدام جهاز قياس الكثافة الضوئية Spectrophotometer وعند الطول الموجي (260) نانوميتر وطُبِّقَت المعادلة التالية لحساب تركيز DNA :

ومن ضمنها الذرة إضافة لكونها طريقة سهلة وغير مكلفة وتتضمن عدة خطوات بعضها ذات طابع ميكانيكي والأخرى كيميائي وكل خطوة من هذه الخطوات تقوم بإزالة أحد مكونات الخلية من دون التأثير على DNA الذي يتم الحصول عليه في نهاية الاستخلاص.



الشكل (1) عينات DNA لأصناف الذرة الصفراء المرحلة على هلام الاكاروز 1% ، Z1- الحلوة Z2- الصوانية Z3- المنغوزة Z4- الشامية Z5- المغلفة Z6- الطحينية

- نتائج تفاعلات RAPD

اختبرت 10 بوادئ من تلك المصنعة من قبل شركة Operon Technology وتبين من نتائج استخدام تلك البوادئ في تفاعلات RAPD اختلاف في عدد المواقع المتضاعفة وأحجامها الجزيئية باختلاف البادئ المستخدم والنتيجة من الاختلاف في عدد المواقع المكمل لذلك البادئ في مجين كل صنف من أصناف الذرة الداخلة في هذه الدراسة¹⁰.

حُلِّت النتائج بالاعتماد على وجود أو غياب مواقع DNA المضاعفة ومجموع مواقع الارتباط ومجموع الحزم والنسبة المئوية لمجموع الحزم ، كذلك الاختلاف في حجوم وأعداد المواقع وأعلى وأقل عدد لمواقع الارتباط في كل صنف وفي كل بادئ ووجود المواقع الفريدة والمواقع الغائبة.

أظهرت تسع بوادئ من البوادئ العشرة المستخدمة في هذه التقنية تضاعفاً في المواقع في حين أن هناك بادئاً واحداً لم يُظهر أي تضاعف وعلى هذا الأساس قُسمت النتائج إلى مجموعتين هما :

المجموعة الأولى First group

حرارة (72)°م لاستكمال مرحلة الاستطالة) وحُمِلَ المزيج في حفر الهلام المحضر مسبقاً وبتركيز 1 % مع الدليل الحجمي DNA ladder (100) bp ورُجِلَت العينات ، ومن ثم عُرض الهلام لمصدر الأشعة فوق البنفسجية على جهاز UV-transilluminator ، وصُوِّرَت حزم DNA باستخدام كاميرا رقمية عالية الدقة.

التحليل الإحصائي

أخذت نتائج بوادئ RAPD في جدول اعتماداً على مقارنة وجود أو غياب قطع DNA للعينات المختلفة إذ يرمز لوجود قطعة DNA بالرقم (1) ولعدم وجودها بالرقم (0). تم حساب معامل البعد الوراثي ومعامل التشابه بين الأصناف المدروسة باستخدام معامل Nei¹¹ ثم أجري التحليل العنقودي (Cluster analysis) وتم رسم مخطط البعد الوراثي باستخدام طريقة : The unweighted pair group method for the arithmetic average (UPGMA)¹². وأجريت التحاليل الإحصائية بواسطة الحاسوب باستخدام البرنامج : Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System (NTSYS) PC ، وتم الاعتماد في استنتاج نتائج هذا البرنامج على معادلة Nei لكشف التشابه الوراثي بتكوين جدول متسلسل يشمل كافة نتائج البوادئ مع جميع النماذج المدروسة وتنص المعادلة على :

$$GD=1-\{2x(Nij / Ni + Nj)\}$$

إذ أن Nij : عدد الحزم المشتركة بين النموذجين i , j

Ni : عدد الحزم في النموذج i و Nj : عدد الحزم في النموذج j

النتائج والمناقشة

استخلاص DNA المجيني

إن DNA المستخلص كان جيداً ، إذ تم الحصول على كمية من DNA تقدر بـ(65-90) مايكروغرام لكل غرام من الأوراق لكل صنف من أصناف الذرة الداخلة في الدراسة ، وبنقاوة تراوحت بين (1.5-1.85) وخُفِّفَت عينات DNA للحصول على تركيز (50ng) لكل مايكروليتر، وهو التركيز المناسب لإجراء تفاعلات PCR ، ويوضح الشكل (1) عينات DNA لأصناف الذرة الداخلة في الدراسة.

ذكر¹⁴ أن هناك العديد من الطرائق لعزل الأحماض النووية من النباتات ؛ لأن النباتات متنوعة وتحوي كميات مختلفة من الأحماض النووية وبذلك فأن طريقة واحدة لعزل الأحماض النووية تكون غير مناسبة لكل النباتات. تم الاعتماد في استخلاص DNA المجيني من أصناف الذرة الصفراء الداخلة في الدراسة على طريقة⁹ ؛ لأنها من الطرائق الكفوءة والمناسبة لعزل DNA المجيني من العديد من النباتات

1180 (Z4) 660 (Z4) 625 (Z4)	900 (Z1) 765 (Z2) 655 (Z1) 600 (Z1)	1000 (Z5)	1000 (Z5) 600 (Z5)	0	0	1780 (Z6) 855 (Z6)	0	500 (Z3) 430 (Z1)	157 (%56.68)
750 (Z6)	1380 (Z3)	130 (Z1)	0	1315 (Z1) 930 (Z1)	300 (Z6)	0	9	21 (%41.18)	43.32 (120) (%56.68)
22 (%78.57)	20 (%100)	14 (%43.75)	19 (%61.29)	13 (%52)	7 (%53.85)	36 (%80)	30 (%58.82)	51 (%18.41)	277 (%100)
6 (%21.43)	0 (%0)	18 (%56.25)	12 (%38.71)	12 (%48)	6 (%46.15)	300 اكثر من 2000	235 اكثر من 2000	0	
1180-275	1425-555	1000-130	1000-240	1315-365	1110-200	45 (%16.25)	45 (%16.25)	0	
28 (%10.11)	20 (%7.22)	32 (%11.55)	31 (%11.19)	25 (%9.03)	13 (%4.69)				
OPC-02	OPC-07	OPC-08	OPC-09	OPE-15	OPP-14	OPW-13	OPY-09		المجموع

جدول (3) يبين البوادي وبعض نتائج التضاعف لتقانة

RAPD حيث تمثل (Z1) الذرة الصفراء الحلوة ، (Z2) الذرة الصفراء الصيونية ، (Z3) الذرة الصفراء المنغوزة ، (Z4) الذرة الصفراء الشامية ، (Z5) الذرة الصفراء المغلفة و (Z6) الذرة الصفراء الطحينية

وكما مبين في الاشكال :

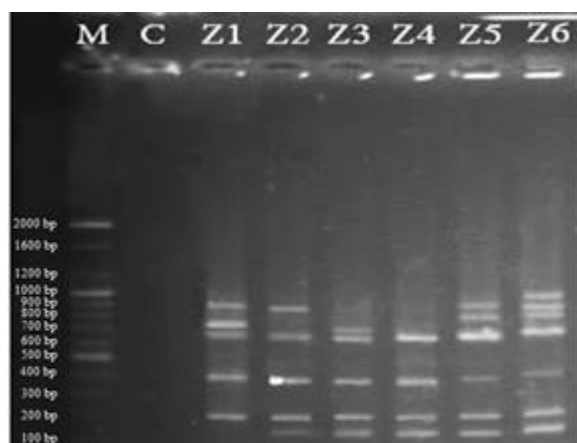
تتضمن هذه المجموعة البوادي التي لم تظهر اي حزم تضاعف وشملت هذه المجموعة بادئا واحدا وهو (OPW-09) والسبب يعود لعدم وجود موضع ارتباط مناسب للبائى على شريط DNA القالب ¹⁵ . إن البوادي التي لا ترتبط مع DNA ولا تظهر حزم تضاعف لا يمكنها التفريق بين أنواع الجنس الواحد ولكن أهميتها التصنيفية تكمن في تفريقها بين الأنواع التابعة لأجناس مختلفة ¹⁰ .

المجموعة الثانية The second group

شملت هذه المجموعة البوادي التي أظهرت حزماً متباينة الأعداد والمواقع بين الأصناف قيد الدراسة والتي تمثلت بتسع بوادي أنتجت (277) حزمة كان (157) حزمة منها متباينة وبنسبة مئوية (56.67%) و (120) حزمة متماثلة (حزمة رئيسية) وبنسبة مئوية (43.32%). إن عملية إيجاد التباين الوراثي تعتمد على هذه الحزم حيث أن من اسس إيجاد التباين الوراثي هي نسبة الحزم المتباينة إلى العدد الكلي للمواقع ¹⁶ ، ¹⁷ . قسمت النتائج حسب البوادي فظهرت كما في الجدول (3) :

أنتج البادي (OPY-09) (51) حزمة مسجلاً أعلى عدد من الحزم بين البوادي الأخرى ، اما البادي (OPP-14) أظهر (13) حزمة كأقل عدد من الحزم ، كان أعلى حجم جزئي في البادئين (OPW-13 و OPY-09) بأكثر من 2000 bp ، اما أقل حجم جزئي فقد بلغ (130) bp في البادي (OPC-08) ، وسجل البادي (OPC-07) أعلى عدد من المواقع الفريدة بلغت (6) مواقع في حين لم تظهر اي مواقع فريدة في البوادي (OPE-15 ، OPP-14 و OPY-09) ، وامتلك البادي (OPE-15 و OPY-09) أعلى عدد من المواقع التي غابت فيها الحزم حيث بلغت (2) موقع على التقبض من ذلك لم تظهر اي مواقع غابت فيها الحزم في البوادي (OPC-01) ، OPC-09 و (OPW-13).

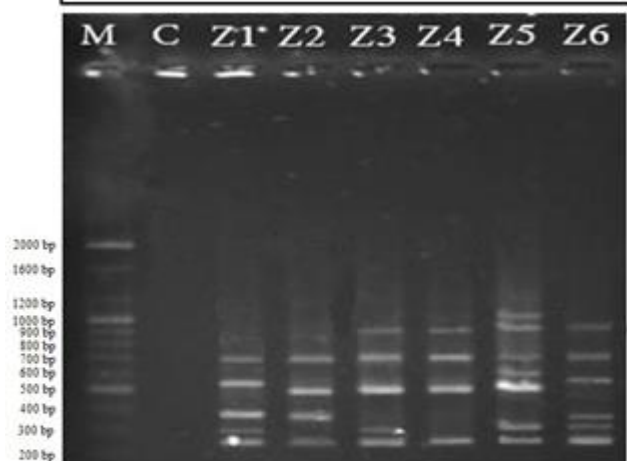
اسم البادي	عدد ونسبة الحزم	أقل وأعلى حجم جزئي (bp)	عدد ونسبة الحزم المتباينة	عدد ونسبة الحزم المتماثلة	موقع وحجم الحزم القابلة (bp)
OPC-01	32 (%11.55)	1070-315	0 (%0)	32 (%100)	765 (Z4) 435 (Z1) 360 (Z1) 315 (Z1)



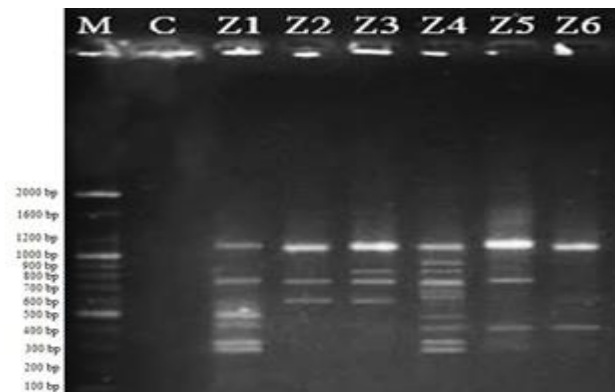
الشكل (5) يمثل نتائج تضاعف البادئ OPC-08 بواسطة مؤشرات RAPD مع DNA العينات الستة لأصناف الذرة الصفراء *Zea mays* L. والمرحلة على هلام الاكاروز بتركيز 1% ، M تمثل الدليل الحجمي ، C تمثل عينة السيطرة Control ، Z1 - الحلو ، Z2 - الصيوانية ، Z3 - المنفوعة ، Z4 - الشامية ، Z5 - المغلفة و Z6 - الطحينية



الشكل (2) يمثل نتائج تضاعف البادئ OPC-01 بواسطة مؤشرات RAPD مع DNA العينات الستة لأصناف الذرة الصفراء *Zea mays* L. والمرحلة على هلام الاكاروز بتركيز 1% ، M تمثل الدليل الحجمي ، C تمثل عينة السيطرة Control ، Z1 - الحلو ، Z2 - الصيوانية ، Z3 - المنفوعة ، Z4 - الشامية ، Z5 - المغلفة و Z6 - الطحينية



الشكل (6) يمثل نتائج تضاعف البادئ OPC-09 بواسطة مؤشرات RAPD مع DNA العينات الستة لأصناف الذرة الصفراء *Zea mays* L. والمرحلة على هلام الاكاروز بتركيز 1% ، M تمثل الدليل الحجمي ، C تمثل عينة السيطرة Control ، Z1 - الحلو ، Z2 - الصيوانية ، Z3 - المنفوعة ، Z4 - الشامية ، Z5 - المغلفة و Z6 - الطحينية



الشكل (3) يمثل نتائج تضاعف البادئ OPC-02 بواسطة مؤشرات RAPD مع DNA العينات الستة لأصناف الذرة الصفراء *Zea mays* L. والمرحلة على هلام الاكاروز بتركيز 1% ، M تمثل الدليل الحجمي ، C تمثل عينة السيطرة Control ، Z1 - الحلو ، Z2 - الصيوانية ، Z3 - المنفوعة ، Z4 - الشامية ، Z5 - المغلفة و Z6 - الطحينية



الشكل (7) يمثل نتائج تضاعف البادئ OPE-15 بواسطة مؤشرات RAPD مع DNA العينات الستة لأصناف الذرة الصفراء *Zea mays* L. والمرحلة على هلام الاكاروز بتركيز 1% ، M تمثل الدليل الحجمي ، C تمثل عينة السيطرة Control ، Z1 - الحلو ، Z2 - الصيوانية ، Z3 - المنفوعة ، Z4 - الشامية ، Z5 - المغلفة و Z6 - الطحينية



الشكل (4) يمثل نتائج تضاعف البادئ OPC-07 بواسطة مؤشرات RAPD مع DNA العينات الستة لأصناف الذرة الصفراء *Zea mays* L. والمرحلة على هلام الاكاروز بتركيز 1% ، M تمثل الدليل الحجمي ، C تمثل عينة السيطرة Control ، Z1 - الحلو ، Z2 - الصيوانية ، Z3 - المنفوعة ، Z4 - الشامية ، Z5 - المغلفة و Z6 - الطحينية

تقدير البعد الوراثي بالاعتماد على نتائج RAPD

استثمرت نتائج RAPD في تقدير البعد الوراثي Genetic distance بين النماذج المدروسة التابعة للذرة الصفراء باستخدام البرنامج الوراثي (NTSYS-PC. Version 1.7) الذي يعتمد على وجود الحزم المشتركة بين كل صنف من الأصناف ومعتداً في تحليلاته على معادلة Nei¹¹.

يوضح الجدول (4) الأبعاد الوراثية بين الأصناف الستة وتراوحت القيم بين (0.21749-0.56484) ففي حالة تتطابق المادة الوراثية بين صنفين فهذا يدل على أن البعد الوراثي بينهما يجب أن يكون مساوياً للصفر، أما نسبة التشابه الوراثي فتكون مساوية 100% (1) والتطابق هنا يحدث عند عدم وجود تباين وراثي بين الأصناف باستخدام عدد من البوادي، لكن عند استخدام عدد أكثر من البوادي أو استخدام مؤشر وراثي آخر قد تختلف النتيجة وذلك لاختلاف مناطق الارتباط حسب تسلسل البادئ المستخدم .

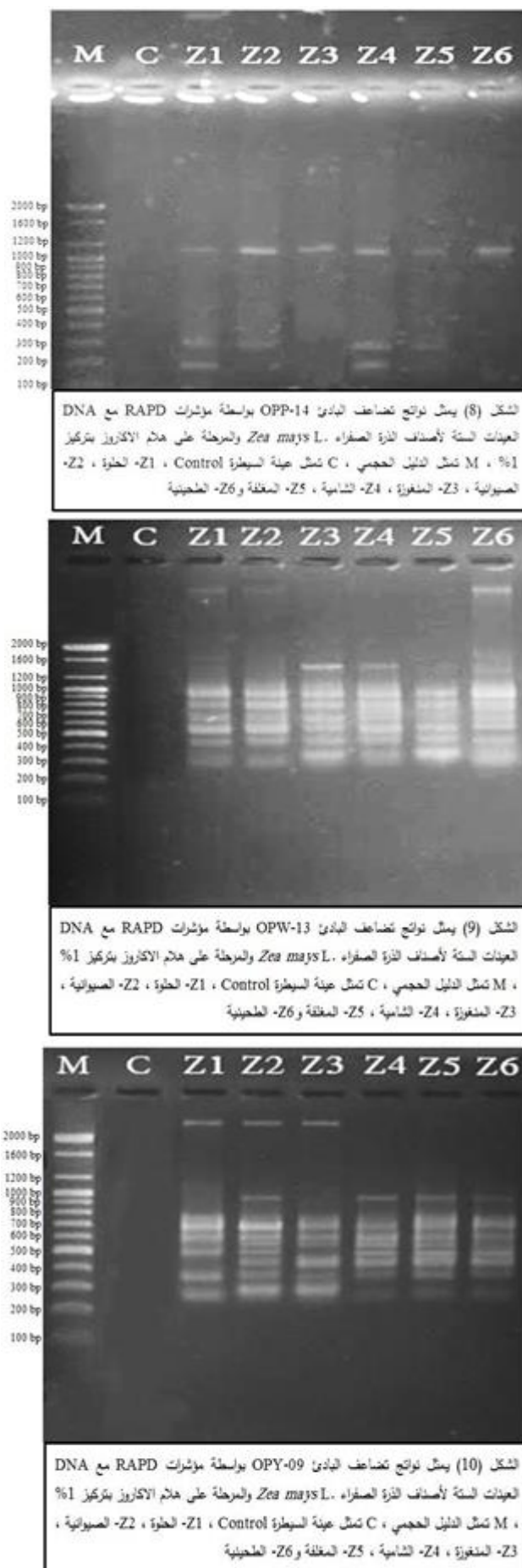
جدول (4) قيم البعد الوراثي لأصناف الذرة الداخلة في الدراسة

	Z1	Z2	Z3	Z4	Z5	Z6
Z1	0.0000					
Z2	0.47164	0.0000				
Z3	0.50928	0.26938	0.0000			
Z4	0.51002	0.32361	0.34167	0.0000		
Z5	0.56484	0.21749	0.29112	0.23713	0.0000	
Z6	0.41593	0.38366	0.45026	0.45596	0.31303	0.0000

كانت أقل قيمة للبعد الوراثي (0.21749) بين النوعين (صيوانية Z2 ومغلقة Z5) فهذا يدل على أنهما يمتلكان أكبر نسبة تشابه في المادة الوراثية بالاستناد إلى البوادي المستخدمة في هذه الدراسة ، إذ أشار بعض الباحثين إلى أن الذرة الصفراء المغلقة غريبة وقد تشابه في سويدياتها لأحد صفات سويدياء الأصناف الأخرى 19 ، 20 كما هو موضح في الجدول (3).

أما أعلى بعد وراثي فكان بين الصنف (حلو Z1 ومغلقة Z5) بلغ (0.56484) هذا يعني وجود أقل نسبة للتشابه في المادة الوراثية بين هذين النوعين فهما اشتراكاً بأقل عدد من الحزم بالنسبة للأنواع الأخرى ، إن هذا الاختلاف ناتج من اختلافهما الكبير في الصفات المظهرية وهذا ما أشار إليه 20 كما هو موضح في الجدول (4).

وقد تم استثمار قيم البعد الوراثي بين الأنواع الستة في إيجاد العلاقة الوراثية التي تربطها جميعها وبشكل مجاميع Clusters والمتمثلة بالشكل (11) إذ قسمت إلى ثلاث مجاميع رئيسية :-



المجموعة الرئيسية الأولى First main group

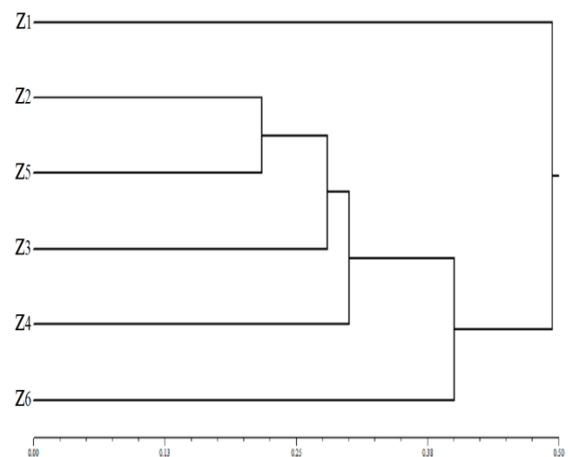
ضمت هذه المجموعة الصنف حلوة (Z1) فقط كونه لم يرتبط مع الأنواع المدروسة كافة إلا بعدد قليل من مواقع RAPD وأظهر بذلك تفرداً في عدد تلك المواقع وأطوالها مما جعله يبتعد عن الجميع بحيث أعطى نمطا مميزا يختلف بشكل كامل عن مجاميع الأنواع الأخرى وقد يعود سبب ذلك لقلّة التغيرات الوراثية التي طرأت عليه مقارنة مع بقية الأصناف أو قد يكون الأقرب وراثيا إلى الأصل الذي انحدر منه نبات الذرة الشكل (11).

المجموعة الرئيسية الثانية Second main group

تكونت هذه المجموعة من صنف واحد أيضاً هو الصنف طحينية (Z6) إذ ابتعد عن مجاميع الأصناف الأخرى والسبب يعود إما للاختلاف في الصفات المظهرية أو الكمية كعدد العرائيس أو عدد الحبوب في العرنوس الواحد أو وزن الحبوب وحجمها الشكل (11).

المجموعة الرئيسية الثالثة Third main group

ضمت هذه المجموعة ثلاث مجاميع ثانوية ، إذ شملت المجموعة الثانوية الأولى الصنف شامية (Z4) والمجموعة الثانوية الثانية الصنف منغوزة (Z3) ، أما بالنسبة للمجموعة الثانوية الثالثة فقد ضمت صنفين هما (صيوانية Z2 ومغلفة Z5) والذين كانا اقرب صنفين وراثيا من بقية الأصناف ، إذ اشتركا بأكبر عدد من الحزم بينهما الشكل (11).



الشكل (11) العلاقة الوراثية بين أصناف الذرة الصفراء تبعا

لمؤشرات RAPD إذ تمثل Z1- الحلوة Z2- الصيوانية Z3- المنغوزة

Z4- الشامية Z5- المغلفة Z6- الطحينية

إستُخدمت في هذه التفاعلات 10 بوادئ ، إذ لوحظ عدم ظهور

أي حزم في البادئ (OPW-09) ، مع جميع الأصناف ، وهذه الحالة

تدل على عدم وجود تسلسل لقواعد DNA على مجين هذه الأصناف متكاملة مع تسلسل البادئ المستخدم ، مما يؤدي إلى عدم حدوث تفاعل وبالتالي عدم ظهور حزمة على هلام الاكاروز وهو انعكاس للأساس الجزيئي الذي يكتنف هذا الصنف أو ذاك والناتج من احد أسباب التباين الوراثي المعروفة مثل الحذف والإضافة أو الاستبدال أو الانقلاب أو الاتحادات الجديدة²¹. وتبرز أهمية هذا النوع من النتائج في تحديد ملامح المحتوى الجيني للصنف وبالتالي تمييزه عن باقي الأصناف التي تمتلك أي نوع من الحزم مع هذه البوادئ وبذلك لا نقل أهميتها في دراسات التحليل الوراثي للأفراد أو الأنواع والأجناس²²، وهذا البادئ اعطى نتائج تضاعف عندما استخدمه²³ مع مجموعة من البوادئ على هجائن من الذرة المنغوزة ، كذلك²⁴ اعطى هذا البادئ حزما عندما استخدمه مع عدد من البوادئ الأخرى لإيجاد المسافة الوراثية بين 16 هجين من الذرة الصفراء.

أما البوادئ الأخرى المستخدمة في هذه التفاعلات فجميعها أظهرت نواتج تضاعف ، إذ أنتجت (277) حزمة منها 157 حزمة متباينة Polymorphic band و120 حزمة متماثلة (حزمة رئيسية) Main band ، وان من أسباب التباين بين اصناف الذرة الصفراء أو اي صنف من أصناف الأنواع الأخرى من النباتات قد يكون استبدال نيوكليوتيدة ضمن احد أو كلا موقعي ارتباط البادئ ؛ مما يؤدي إلى وجود أو غياب التباين أو إلى تغيير في حجم القطعة المضاعفة ، غرس أو حذف deletion قطعة صغيرة من DNA ؛ مما يؤدي إلى تغيير في حجم القطع المتضاعفة ، حذف احد موقعي ارتباط البادئ ينتج عنه اما فقدان قطعة ، أو زيادة في حجم القطعة المضاعفة أو نتيجة غرس Insertion قطعة كبيرة من DNA بين مواقع ارتباط البادئ ؛ مما يتجاوز قابلية PCR ، والنتيجة فقدان في القطع²⁵ ، وبذلك أظهرت نواتج تلك البوادئ حزم متباينة في الموقع والعدد والحجم ، ومن بين تلك الحزم توجد ما يعرف بالحزم الفريدة التي لها دور في تحديد البصمة الوراثية لصنف معين دون بقية الأصناف الداخلة في الدراسة ، فوجود الحزم الفريدة يقلل الكلفة والجهد ، لأنها تعطي نتائج تمييزية عالية بوقت قياسي ، كذلك الحال عند غياب حزمة من صنف معين فهي ايضا مهمة في تحديد البصمة الوراثية لذلك الصنف من بين الأصناف الداخلة في الدراسة ، وان البوادئ التي تنتج حزما متباينة عديدة تحظى بفرصة اكبر في ايجاد حزم فريدة للأصناف ، مع ان الفرص تبقى قائمة بالنسبة إلى البوادئ التي تنتج اعداداً قليلة من الحزم

- 2- Lookhart, G. L. and Bietz, J. A. (1990). Practical wheat identification in the united states. Cereal foods world 35 : 404-407.
- 3- Tanksley, S. D. and Drton, T. J. (1983). "Isozymes in Plant Genetics and Breeding" Parts A and B Elsevier. Amsterdam.
- 4- Hamrick, J. L. ; Linhartm Y. B. and Millo, J. B. (1979) Relationships between life history characteristic and electrophoretically detectable genetic variation in plants. Annual Review of Ecology and Systematics, 10 : 173-200.
- 5- Huebner, F. R. ; Kaczowski, J. and Bietz, J. A. (1990). Quantitative variation of wheat proteins from grain at different stages of maturity and from different spike locations Cereal. Chem. 67, 464-470.
- 6- Mullis, K. B. ; Faloona, F. ; Scharf, S. ; Saiki, R. K. ; Horn, G. ; and Erlich, H. A. (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. Cold spring Harbor symp. Quant. Biol. 51: 263-273.
- 7- Botstein, D. ; White, K. L. ; Skolnick, M. and Davis, R. W. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. Am. J. Hum. Genet., 32 : 314-331 .
- 8- حمدالله ، ماجد شايح (2009). دور التقانات الجزيئية في رسم الخرائط الوراثية وتقدير التباين الوراثي والبصمة الوراثية. مجلة العلوم الزراعية العراقية 40 (3) : 50 - 62 .
- 9- Benito, C ; Figueiras, A. M. ; Zaragoza, C. ; Gallego, F. j. and Dela Penal A. (1993). Rapid identification of Triticeae geno types from single seed using the polymerase chain reaction. Journal Plant Molecular Biology. 21 (1) : 181-183.
- 10- 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.
- 11- Nei, M. and Li, W. H. (1979). Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction Endonucleases. Proceeding of the National Academy of Science, USA. 74, 5269-5273. Cited by Henry, R. J. (1997)
- 12- Sokal, R. R. and Sneath, P. H. A. (1973). Numerical taxonomy : The principles and practice of numerical classification. W.H. Freeman co. San Francisco. California.
- 13- Rohlf, F. J. (1993). Numerical taxonomy and multivariate analysis system. Version 1.80 Exeter software. Setauket. N. Y.
- 14- Loomis, M. D. (1974). Overcoming problems of phenolics in the isolation of plant enzyme and organelles. Meth. Enzymol. 31:528-545.

المتباينة²⁶ ، ومع العلم ان الحزم الفريدة أو الغائبة تميز الأصناف التي ظهرت بها عن باقي الأصناف الداخلة في الدراسة ، فعند زيادة عدد الأصناف الداخلة في الدراسة قد لا تبقى تلك الحزم مميزة لأصنافها فقط أو قد تبقى مميزه حسب المواقع المتممة على مجين تلك الأصناف .

ففي كل من البادئ OPC-01 والبادئ OPC-07 ظهرت ثلاث حزم ميزت الصنف حلوة (Z1) عن بقية الأصناف الداخلة في الدراسة وجعلته يبتعد عن بقية الأصناف ، وحزمة في الصنف شامية (Z4) في كل من البادئ OPC-01 والبادئ OPC-07 وثلاث حزم ايضا لهذا الصنف في البادئ OPC-02 ميزته عن باقي الأصناف الستة ، وحزمتين للصنف مغلفة (Z5) في البادئ OPC-09 وحزمة في البادئ وللصنف حزمة في البادئ OPC-08 وحزمتين في البادئ OPW-13 ، وظهرت حزمتين في الصنف في البادئ OPC-07 وغابت حزمة في الصنف طحينية (Z6) في كل من البادئين OPC-02 وOPP-14 وحزمة لكل من الصنفين (منغوزة Z3 وحلوة Z1) في البادئين OPC-07 وOPC-08 على التوالي وحزمتين للصنف (حلوة Z1) في البادئ OPE-15 وحزمتين للصنفين (منغوزة Z3 وحلوة Z1) في البادئ OPY-09 وبأوزان مختلفة .

اما الحزم الرئيسية فقد ظهرت في 7 بوائد ، ووجودها يدل على وجود قطعة مشتركة من DNA في تلك الأصناف ، ويعول على هذه الحزم في تحديد هوية النماذج المجهولة الأصل أو فائدة التصنيف ؛ كونها تمثل في أغلب الأحيان موقعا تشترك به كل افراد الجنس الواحد genus أو النوع species²⁷ .

ومن الدراسات التي استخدمت فيها بوائد مشابهة لبعض البوائد الموجودة في الدراسة الحالية دراسة²⁸ ، إذ استخدم في دراسته 17 هجين من الذرة تابعة للذرة الصبوانية لتحديد المسافة الوراثية بينها باستخدام 14 بادئ حيث اشتركت هذه الدراسة مع الدراسة الحالية بـ 6 بوائد جميعها اعطت تضاعف في الحزم ، كذلك الدراسة التي قام بها²⁹ ، إذ قام بحساب المسافة الوراثية بين 18 هجين من الذرة في البرازيل وباستخدام 32 بادئ .

المصادر

- 1- الدليمي ، حمدي جاسم (2004). التحليل الإحصائي للمعالم الوراثية في الذرة الصفراء (Zea mays L.). أطروحة دكتوراه ، قسم علوم الحياة ، كلية العلوم/ جامعة الأنبار.

- 23- Carvalho, P. V. ; Ruas, C. F. ; Ferreira, J. M. ; Moreira, R. M. P. and Ruas, P. M. (2004a). Genetic diversity among maize (*Zea mays* L.) landraces assessed by RAPD markers. *Genetics and molecular biology* 27 (2) : 228-236.
- 24- Bruel, D. C. ; Souza, S. G.; Garbuglio, D. D. ; Pípolo, V. C. ; Prete, E. C. ; Gerage, A. C. ; Júnior, S. F. ; Ruas, C. F. and Ruas, P. M. (2006). Genetic distance estimated by RAPD markers and its relationship with hybrid performance in maize. *Pesq. agropec. bras., Brasília*, 41 (10) :1491-1498.
- 25- Weising, K. ; Atkinson, R.G. and Gardner, R. C. (1995). Genomic fingerprinting by microsatellite-primed PCR : a critical evaluation, *PCR Methods*.
- 26- Williams, J. G. ; Reiter, R. S. ; Young, R. M. and Scolhik, P. A. (1993). Genetic mapping of mutations using phenotypic pools and mapped RAPD markers. *Nucleic Acid Research*. 21:75-95.
- 27- Penner, G. A. ; Clarke, J. ; Bezte, L. J. and Leisle, D. (1995). Identification of RAPD markers linked to a gene governing cadmium up take in durum wheat. *Genome*, 38: 543-547.
- 28- Okumus, A. (2007). Genetic variation and relationship between Turkish flint maize landraces by RAPD markers. *Amer. J. of agricultural and biological sci.* 2 (2) : 49-53.
- 29- Lanza, L. L. ; de Souza, C. L. ; Ottoboni, L. M. ; Vieira, M. L. and de Souza, A. P. (1997). Genetic distance of inbred lines and prediction of maize single-cross performance using RAPD markers *Theor. Appl. Genet.* 94 : 1023-1030.
- 15- Devos, K. M. and Gale, M. D. (1992). The use of random amplified polymorphic DNA markers in wheat. *Theor. And Appl. Genet.* 84 : 567-572.
- 16- Ahmad, F. (1999). Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) analysis reveals genetic relationships among the annual Cicer species. *Theor. Appl. Genet.* 98 : 657-663.
- 17- Bai, D. ; Brandle, J. and Reeleder, R. (1997). Genetic diversity in north American ginseng (*paxa quinquefolius* L.) grown in Ontario by RAPD analysis . *Genome* . 40 : 111-115 .
- 18- Esselman, E. J. ; Crawford, D. J. ; Brauner, S. ; Stuessy, T. F. ; Anderson, G. J. and Mariosilva, O. (2000). RAPD markers diversity within and divergence among species of *Dendroseris* (Asteraceae : lactuceae). *Am. J. Bot.* 87: 591-609.
- 19- شفشق، صلاح الدين عبدالرزاق والدبابي، عبدالحميد السيد (2008). انتاج محاصيل الحقل. كلية الزراعة بمشنتهر/ جامعة بنها.
- 20- الساهوكي، مدحت مجيد (1990). الذرة الصفراء ، انتاجها وتحسينها. مطابع التعليم العالي ، بغداد.
- 21- Smith, J. S. C. and smith, O. S. (1992). Fingerprint in crop varieties. In: *Advanced in agronomy, sparks, D. L. (ed).* 47: 98-107.
- 22- Haley, S. D. ; Afanador, L. and Kelly, J. D. (1994). Selection for monogenic pest resistance traits with coupling and repulsion phase RAPD markers *crop sci.* 34: 1061-1066.

Detection of genetic diversity for number of Iraqi maize cultivars (*Zea mays* L.) by using the RAPD-PCR technique

Muataz A. Farhan

Abdul Majeed A. Hamadi

E.mail:

Abstract:

In this study six varieties of maize (*Zea mays* L.) used which where *Z. mays saccharata* (Z1), *Z. mays indurata* (Z2), *Z. mays indentata* (Z3), *Z. mays everta* (Z4), *Z. mays tunicate* (Z5) and *Z. mays amylacea* (Z6), and (10) RAPD primers for detection of the genetic variation among the DNA of these varieties and determine the genetic relationship among them and also determine the genetic fingerprint. the mount of DNA was between (65-90) microgram for each (1) gram of the leaves of these varieties after isolation the genomic DNA by (CTAB) method with purity range between (1.5-1.85) and interfering (PCR) reactions and then electrophoresis on agarose gel. The results of RAPD reactions showed that the primer (OPW-09) didn't show amplified results while nine primers appear (277) band, (120) bands are monomorphic and the percent (43.32%), (157) bands polymorphic and at percent (56.67%). The results of genetic diversity appeared the RAPD is the least value of the genetic diversity was (0.21349) between the varieties (Z2, Z5) and the highest value was (0.56484) between (Z1, Z5). according to genetic analysis for the results, the dendrogram divided in to three major groups, the first major group include (Z1), and the second group (Z6) only while the third major group was divided in to three minor groups. The first minor group contained (Z4) and the second group (Z3) while the third group includes (Z2, Z5).