

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

نضال عبد الحسين مسان البديري

محمد احمد ابراهيم الانباري

حمزه محسن كاظم الخفاجي*

المخلص

نفذت 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. استعملت تقانة التضاعف العشوائي المتعدد الأشكال لسلسلة الـ DNA (RAPD) المعتمد على تقانة الـ PCR و 10 من البادئات. استعملت معلمات RAPD لتقييم التغيرات الوراثية بين ستة سلاسلات من زهرة الشمس أنتجت جميع البادئات العشرة 110 حزمة بمعدل 11 حزمة للبادئ الواحد تراوح عدد القطع الناتجة بين 8 للبادئ OPC-04 و 14 في البادئ OPA-17 ، وبوزن جزيئي تراوح بين 123-1495 bp. بلغ العدد الكمي والنسبة المئوية للحزم المتباينة 50 ، 45.09% بالتتابع، بلغت أعلى نسبة مئوية للقطع المتباينة 63.64% للبادئ OPA-19 بينما أظهر البادئ OPA-16 أوطأ نسبة مئوية للحزم المتباينة بلغ 30% ، أعطى أعلى كفاءة البادئ OPA-17 بلغت 12.73% وأعلى قابلية تمييزية للبادئ OPA-19 و OPM-13 وبلغت 14%. واعتمادا على البيانات الثنائية والتشابه الوراثي باستخدام طريقة UPGMA في إنشاء مخطط الصلة تم فصل السلاسلات ضمن مجموعتين رئيسيتين هما A و B ومجاميع ثانوية ومجاميع تحت الثانوية، وأظهر تحليل المجاميع الذي تمت فيه المقارنة بين السلاسلات ضمن مخطط الصلة إن السلالة C أعطت تباعداً وراثياً مع بقية السلاسلات كان أبعداً وراثياً عن السلالة A وبلغ 0.74 . بينما قل التباعد الوراثي بين السلالتين I و E وكذلك بين I و Q وبلغ 0.30 و 0.32 بالتتابع. أشارت النتائج الى ان معلمات RAPD ذات كفاءة عالية في تشخيص التباعد الوراثي بين سلاسلات زهرة الشمس.

كلمات مفتاحية: RAPD ، PCR ، نقاوة 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.

*البحث مستل من أطروحة دكتوراه للباحث الأول.

المقدمة

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 التباعد الوراثي بين المحاصيل كونها تعكس المستوى الحقيقي للتغاير الوراثي الموجود بين التراكيب الوراثية على 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 الوراثية 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 Mahmoud و Abdel-Fatah (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 ستة سلالات نقية من زهرة الشمس من خلال عزل وتنقية الـ DNA باستعمال مؤشرات الـ RAPD والتغيرات الجزيئية بين السلالات من أجل استخدامها في برامج التربية والتحسين.

بذور من كل سلالة والموضحة وزرعت في سنادين بمعدل ثلاثة سنادين لكل سلالة وبذرتين بكل سنادة، 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.

إن محصول زهرة الشمس *Helianthus annuus* L. هو أحد 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 متباعدة 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 نايبروجينية تقترن مع مكملاتها على المجين بوجود إنزيم البلمرة *Polymerase DNA* لتظهر تباين بين التراكيب الوراثية من خلال وجود أو عدم

المواد والطرائق

نفذت التجربة في مختبر الوراثة الجزيئية في قسم علوم الحيات/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 ستة

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	EU7L5G1	EuroFlore	فرنسي
F	FL1H1G1	Flamme	تركي	A	ARG5L1Q1	Argensun	أرجنتيني

1 - البادئات primer

جهزت البادئات المعتمدة في هذه الدراسة من قبل شركة Bioneer في شكل مجفد Lyophilized ، وكان عددها 10 بادئ، وتم تحضيرها باستعمال دارئ ddH₂O للحصول على التركيز النهائي (المحلول الأصلي) 100 pmol/μL ، ومن هذا المحلول تم تحضير البادئ الذي يستعمل في تفاعل البلمرة بتركيز 10 pmol/μl جدول (2).

الجدول (2) : يبين رقم البادئ، اسم البادئ وتتابع النيوكليوتيدات.

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

2 - خليط التفاعل: Reaction Mixture (Master Mix)

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:

الجدول (3) : مكونات خليط التفاعل الرئيسي 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 ₂	1.5 mM
Stabilizer and tracking dye	5μM

- الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز Agarose Gel Electrophoresis

أجري الترحيل الكهربائي وفقا لـ Sambrook و Russel (2001) كما يلي:

- تم إعداد لوح التحميل باستخدام لوح زجاجي إذ احييت حافات اللوح بشرط لاصق قوي وثبت عليه المشط الخاص لتكوين الحفر عند احد أطراف الهلام. مسندها في وحدة الترحيل الكهربائي الأفقية المتمثلة بالحوض المستعمل للترحيل الكهربائي وملئ الحوض بدارئ TBE بحيث يغطي سطح الهلام.
- تم إضافة 5 μl من الدليل الحجمي DNA Ladder في أول حفرة. واستعمل هذا لمعرفة حجم قطع DNA المفصلة.
- وضع 3 ml من عينة DNA على غطاء شمعي مطاط Parafilm، وخلط مع 2 ml 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، 366 nm)، صور بعدها الهلام.

- 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 1 gm من الاكاروز في 10 ml من دارئ TBE 10x وتم يكمل إلى 100 ml 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 5 مايكروليتر من محلول بروميد الاثيديوم (10 mg/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

ويكمل الحجم النهائي للتفاعل بإضافة الماء المقطر منزوع الايونات ليصل حجم المحلول 20 μl.

- أضيفت 5 μl من قالب DNA، 2 μl من البادئ إلى أنبوبة التفاعل الرئيسي Master Reaction الجاهزة

(c) ثم 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	72C°	Final Extension	

$$100 \times \frac{\text{عدد الحزم المتباينة في البادئ}}{\text{عدد الحزم الكلية في البادئ}}$$

(e) القوة التشخيصية للبادئ Discrimination power وهذه حسبت كالآتي :
القوة التشخيصية للبادئ =
عدد الحزم المتباينة للبادئ
 $100 \times \frac{\text{عدد الحزم المتباينة لكل البادئات}}{\text{عدد الحزم المتباينة في البادئ}}$

- ايجاد العلاقات الوراثية بين السلالات.

تم تحليل النتائج حسب جداول التوصيف المعدة مسبقاً باستخدام البرنامج الإحصائي الحيوي PAST الإصدار 62.1 ، (Hammer وآخرون، 2001) وكالآتي :

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 (UPGMA) Unweighted pair group method with arithmetic average
لبيان توزيع هذه السلالات الى مجاميع أو عنائيد Clusters رئيسية وثانوية اعتماداً على البعد بينها وبشكل مخطط شجرة القرابة الوراثية Dendrogram .

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

رسم مخطط تحليل المكون الرئيس 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 المبلمر الحراري وتم سحب 5 µl 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 للتصوير، (Hashemi وآخرون، 2009).

- تقدير الأحجام الجزيئية للحزم المميزة Unique bands

قدرت الأحجام الجزيئية للقطع المميزة للأصناف وذلك باستعمال البرنامج الحاسوبي Photocapt Mw DNA Ladder القياسي الإصدار 10، وذلك بالمقارنة مع DNA 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.
(b) كفاءة البادئ % Primer efficiency . وحسب من المعادلة :
نسبة كفاءة البادئ =

$$\frac{\text{عدد الحزم الكلية لجميع البادئات}}{\text{العدد الكلي لحزم البادئ}} \times 100$$

- (c) عدد الحزم المتباينة (ذات التعدد الشكلي) Polymorphic bands
(d) النسبة المئوية المتباينة % وحسبت كالاتي :
نسبة الحزم المتباينة =

- نتائج عزل وتوصيف DNA المجيني من أوراق السلاسلات:

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

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

من خلال إجراء عملية عزل الأحماض النووية الكلية من الأوراق الفتية للسلاسلات 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 260 nm و 280 nm وذلك عند فحص العينات بجهاز Nanodropes . spectro-photometer إذ بلغ أعلى تركيز للأحماض النووية 9.611 µg/ml للسلسلة A بلغت نقاوته 1.713 ، وأقل تركيز للسلسلة C إذ بلغ 3.169 µg/ml وبلغت نقاوته 1.711 . كما في الجدول (4).

2.3.4- نتائج الحزم باستعمال بادئات RAPD والمناقشة.

جدول (5) : المعلمات الخاصة بالبادئات المستخدمة بالدراسة في تحليل مؤشرات RAPD لستة سلاسلات 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

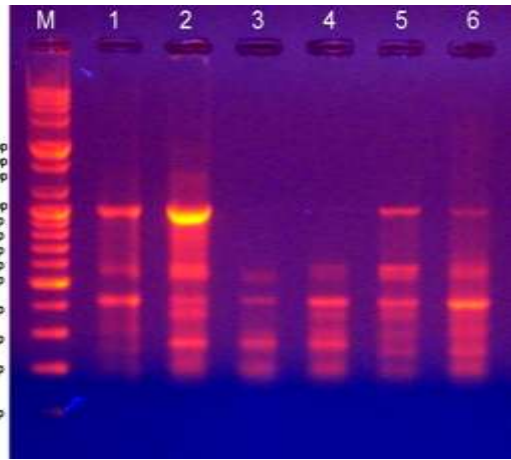
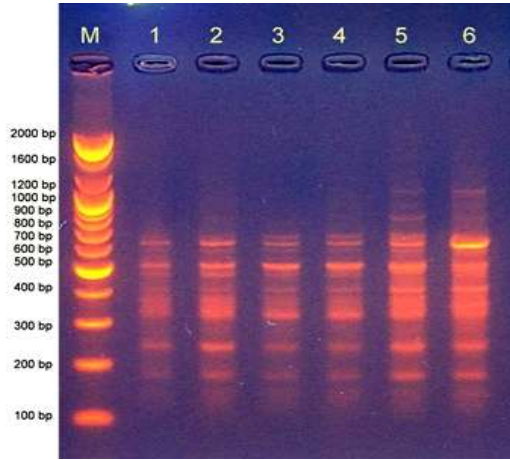
حين اعطى البادئ OPA-16 و OPT-10 و OPC-04 عدد حزم متباينة بلغ 3 ونسبة 30.00% ، و 33.33% و 37.50% على التوالي، واعطى البادئ OPA-19 أعلى نسبة حزم متباينة بلغ 63.64% ، كانت أعلى نسبة كفاءة 12.73% في البادئ

OPA-17 ، وبلغت أعلى نسبة للقابلية التمييزية 14% في البادئ OPA-19 ، تميزت البادئات المستخدمة بوزن جزيئي تراوح بين 123 – 1495 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

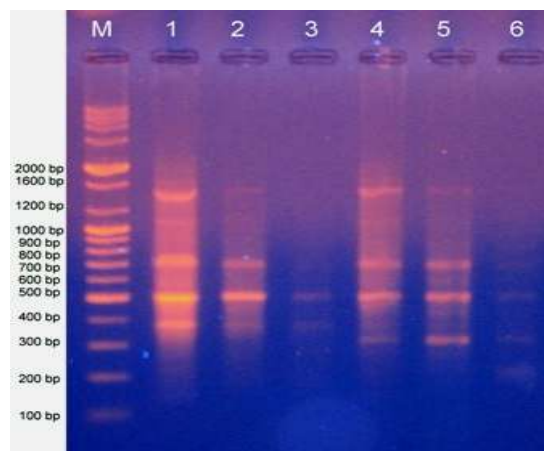
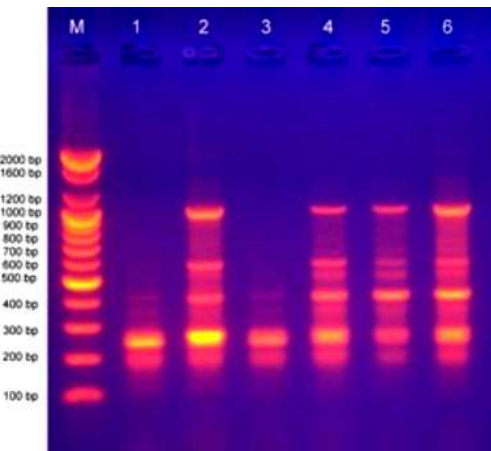
OPA-17 اعطى اعلى عدد من الحزم بلغ 14 حزمة في حين اعطى البادئ OPC-04 اقل عدد من الحزم مقدارها 8 ، بلغ عدد الحزم الكلية 110 حزمة بينما بلغ عدد الحزم المتباينة

الكلية 50 حزمة ونسبة 45.09% اذ اعطى البادئ OPM-13 و 19 عدد حزم متباينة بلغ 7 ونسبة 63.64% و 58.33% على التوالي، فـ



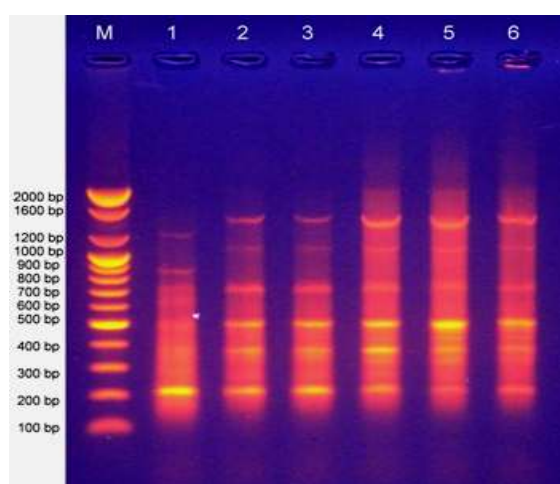
شكل (2) : نواتج تفاعل RAPD الناتجة من تفاعل البلمرة باستعمال البادئ OPA-17 على هلام الاكاروز بتركيز 1% لستة سلالات من زهرة الشمس (M : يمثل المؤشر القياسي بحجم 100 زوج قاعدي)، الارقام من 1 - 6 تمثل السلالات.

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.

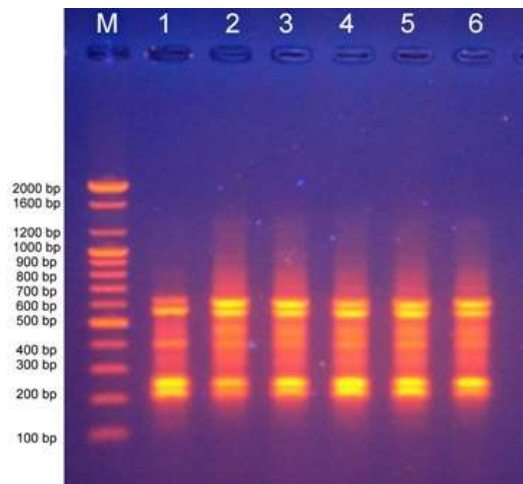


شكل (4) : نواتج تفاعل RAPD الناتجة من تفاعل البلمرة باستعمال البادئ OPB-05 على هلام الاكاروز بتركيز 1% لستة سلالات من زهرة الشمس (M : يمثل المؤشر القياسي بحجم 100 زوج قاعدي)، الارقام من 1 - 6 تمثل السلالات.

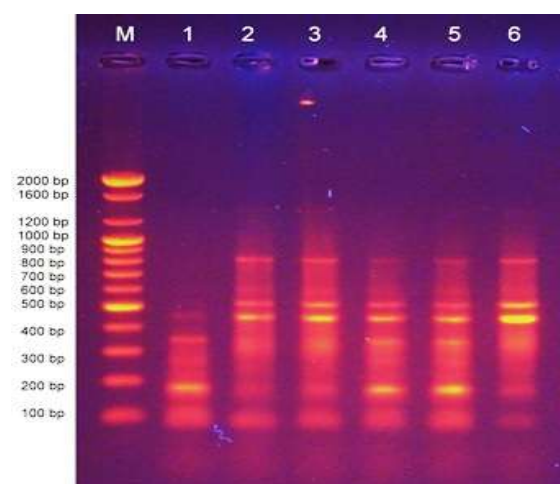
شكل (3) : نواتج تفاعل RAPD الناتجة من تفاعل البلمرة باستعمال البادئ OPA-19 على هلام الاكاروز بتركيز 1% لستة سلالات من زهرة الشمس (M : يمثل المؤشر القياسي بحجم 100 زوج قاعدي)، الارقام من 1 - 6 تمثل السلالات.



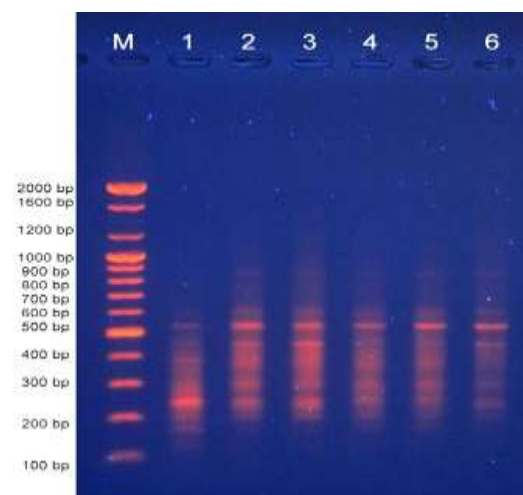
شكل (6) : نواتج تفاعل RAPD الناتجة من تفاعل البلمرة باستعمال البادئ OPC-05 على هلام الاكاروز بتركيز 1% لستة سلالات من زهرة الشمس (M : يمثل المؤشر القياسي بحجم 100 زوج قاعدي)، الارقام من 1 - 6 تمثل السلالات.



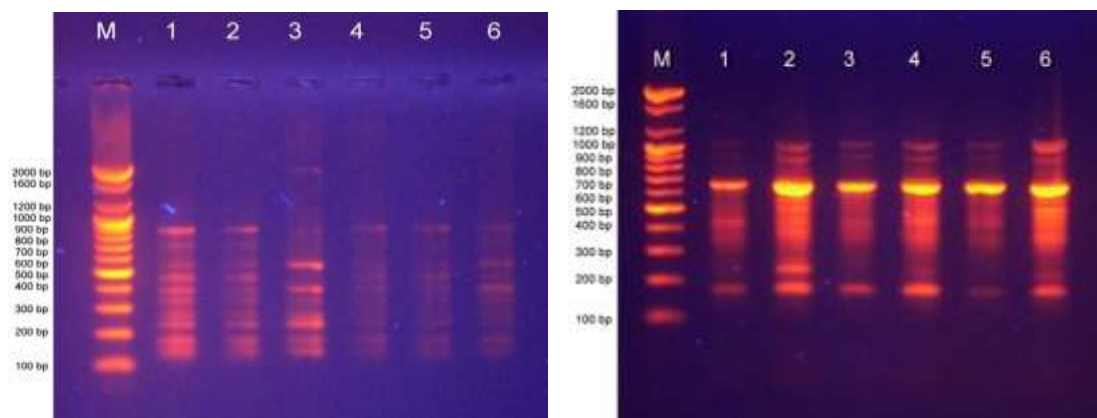
شكل (5) : نواتج تفاعل RAPD الناتجة من تفاعل البلمرة باستعمال البادئ OPC-04 على هلام الاكاروز بتركيز 1% لستة سلالات من زهرة الشمس (M : يمثل المؤشر القياسي بحجم 100 زوج قاعدي)، الارقام من 1 - 6 تمثل السلالات.



شكل (8) : نواتج تفاعل RAPD الناتجة من تفاعل البلمرة باستعمال 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 باستعمال 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 الأقليدية 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 الأقليدية بين السلالات في العراق بالاعتماد على 50 حزمة متباينة فقد وجد أن أعلى مسافة أقليدية بلغت 0.74 بين A و C في حين بينت نتائج الجدول نفسه أن أقل مسافة أقليدية 0.30 كانت بين سلالة E و I . أن نتائج الدراسة الحالية

جدول (6) : الأبعاد الأقليدية 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

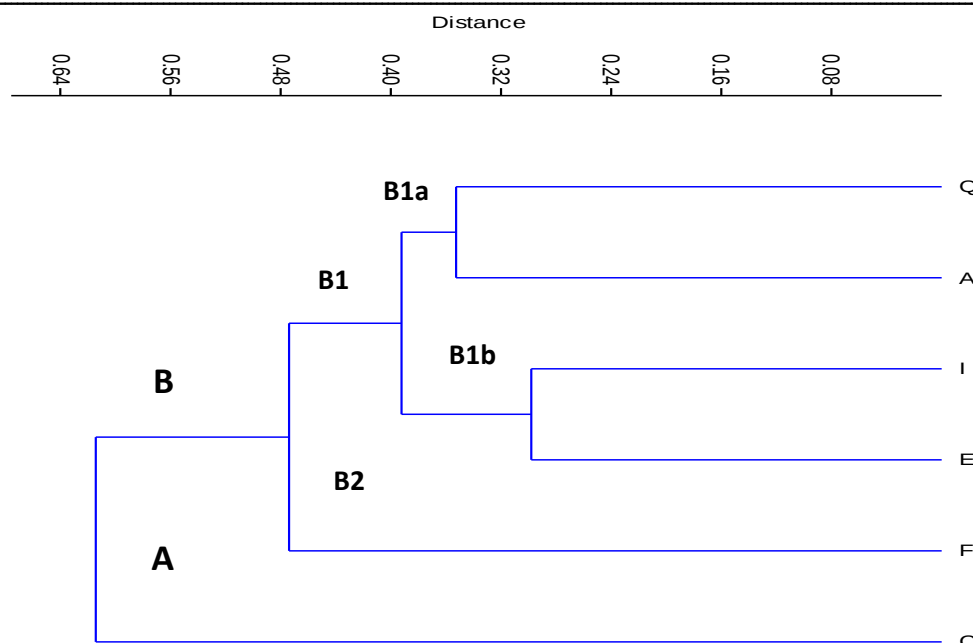
الثانية B والبعد الأقليدي بين المجموعتين الرئيسيتين كان 0.62 ، كما انقسمت المجموعة الرئيسة الثانية الى مجموعتين فرعيتين B1 و B2 والبعد الأقليدي بينهما 0.48 التي ضمت في الفرع الأول مجموعتين فرعيتين ثانويتين B1a و B1b والبعد الأقليدي بينهما 0.35 تضمنت المجموعة

- 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 بأن السلالات الستة المزروعة في العراق قد توزعت في مجموعتين رئيسيتين المجموعة الأولى A والتي تضمنت من السلالات C والمجموعة الثانية

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 اعتماداً على نتائج 10 بادئات وتضاعف العشوائي المتعدد الأشكال لمتسلسلة DNA (RAPD) .

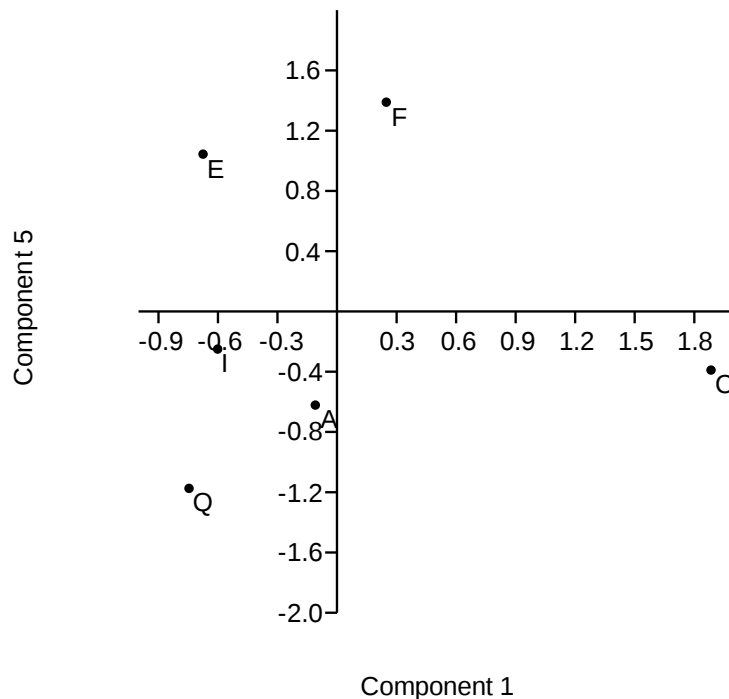
- نتائج تحليل المكون الرئيس للسلالات استناداً إلى مؤشرات RAPD

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 المتعتمد للمحورين وتوزيعها من خلال جميع المواقع الجينية المدروسة مما يعكس واقعية هذه المؤشرات وشموليتها لكل مناطق المادة الوراثية للكائن الحي.

أظهرت نتائج تحليل المكونات Principal Component Analysis (PCA) 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 Principal Component Analysis (PCA) 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.

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



شكل (12) : توزيع ستة سلالات على المستوى المتعامد حسب تحليل (PCA) PrincipalComponent Analysis
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.
- Faroog, S., Shah T.M. and Arif M. (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 Doc. of Philo.
- Erlich, A.; Gelfand D., and Sminsky J., (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 poly-morphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.*, 18: 6531-6535.