تحديد البعد الوراثي بأستخدام مؤشرات التضاعف العشوائي المتعدد الأشكال لسلسلة DNA (RAPD) لطوافر الطماطة المنتخبة تحت الإجهاد الملحي

إياد وليد عبدالله الجبوري خضير عباس علوان

المخلص

أجري البحث في قسم البستنة وهندسة الحدائق/ كلية الزراعة/ جامعة بغداد للموسمين الزراعيين 2013 و2014 لدراسة البعد الوراثي لطوافر الجيل الثاني التي تم اختبارها تحت ظروف الإجهاد الملحي المتمثلة ب 9A و2SA+6A و 2SA و 4SA+3A أجري تحليل البعد الوراثي لهذه المنتخبات مع صنف الاصل باستخدام مؤشرات RAPD الجزيئية و Hظهرت النتائج مدى التشابه و الإختلاف بين الطوافر المنتخبة، إذ تبين ان اعلى نسبة للتشابه تقابل اقل بعداً وراثياً (0.20) بين المنتخبين 9A و2SA+6A ثم البعد (0.50) بين المنتخبين 2SA و4SA+3A وبينت النتائج أيضا ان اعلى بعداً وراثياً كان بين الصنف Red stone وبين المنتخبات الأخرى بلغ (1.00) كذلك كان هناك بعد وراثي مماثل وبلغ (1.00) بين كل من 9A و 2SA و بين 9A و4SA+3A، أيضاً بين 2SA و 2SA+6A ،وكذلك وبين 2SA+6A و 4SA+6A

المقدمة

تُعد تربية الطفرات قاعدة إستراتيجية اساس في استحثاث Induce صفة او صفتين بواسطة المطفرات الفيزيائية والكيميائية . تعرف الطفرة على انها اي تغيير وراثي يطرأ على المادتين الوراثيتين DNA او RNA للكائن الحي خلافاً للحالة الإعتيادية الذي قد يؤثر او لا يؤثر في طبيعة الوظائف البايولوجية لذلك الكائن كل من الساهوكي والفلاحي (4). هناك العديد من الأصناف الطافرة مثبتة لدى المنظمة العالمية للطاقة الذرية IAEA ومنظمة الأغذية والزراعة العالمية FAO المتضمنة 534 صنفاً من الرز و205 صنفاً حنطة و 71 صنفاً ذرة و 66 صنفاً من محاصيل الخضراوات و 59 نوعاً نباتياً من نباتات الزينة وغيرها من المحاصيل و يشار الى ان 70% منها أطلقت مباشرة كأصناف Cultivars مزروعة و 30% ادخلت في برامج التربية (التهجين) (10،12) Maluszynski وجماعته (10) وMartin وجماعته (12). وهذه الأصناف مثبتة في قاعدة بيانات لدى IAEA /FAO (https://MVDI.iaea.org).

ساعدت التقانات الإحيائية في إختصار الوقت والجهد والتكلفة على مربي النبات في برامج التربية والتحسين في التشخيص المبكر للتراكيب الوراثية ذات الصفات الواعدة لاسيما المتحملة منها للإجهاد الحيوي والاجهاد اللاحيوي ، إذ تُعد المؤشرات الجزيئية واحدة من اهم التقانات التي يمكن من خلالها الكشف عن التغييرات الوراثية على مستوى DNA. ومن هذه التقانات RFLP و RAPDو SSRو ISSR و AFLP و SNPs و غيرها من الطرق المستخدمة لدراسة البعد الوراثي والتمييز بين التراكيب الوراثية وبين الأجناس المختلفة. من بين اكثر هذه التقانات إنتشاراً تقانة التضاعف العشوائي المتعدد الاشكال لسلسلةRAPD وذلك لأنها طريقة عامة وتعمل على التراكيب الوراثية جميعها وتستخدم لتحليل الجينوم والخرائط الجزيئية و سريعة ولها القدرة على كشف التغييرات الوراثية الصغيرة نسبياً ولا تحتاج الى معرفة مسبقة عن الجينوم قيد البحث (8) أيضاً أظهرت تقانة RAPD في إمكان التعرف والإنتخاب للصفات المرتبطة بآلية التحمل بوصفها طريقة مساعدة لإنتخاب الصفات الكمية QTLs إذ ما عرفنا

جزء من اطروحة دكتوراه للباحث الاول.

كلية الزراعة، جامعة بغداد، بغداد، العراق.

انً الية التحمل هي متلازمة مركبة (Complex Syndrome) ناتجة من تداخلات لأعداد كبيرة من الجينات (مئات أو آلاف) تتحكم بعشرات الصفات المتباينة التأثير ومئات المركبات في النبات كل من الساهوكي والخفاجي (4) لذلك يكون تشخيص تلك الصفات QTLs من خلال المؤشرات الجزيئية هي الطريق السليم لتشخيص بعض الصفات او بعض المركبات المرتبطة بآلية التحمل للشد الملحي، استطاع Zahid وجماعته (17) تشخيص البعد والتقارب الوراثي بين خمسة أصناف من الحنطة اثنان متحملة للملوحة (دجلة والفرات) وثلاثة حساسة للملوحة (تحدي وتموز2 والنخوة) واستخدم 23 بادئاً فقط 15 منها أعطت أنماطاً متجانسة ومتغيرة ، وأظهر البادئان A11 و N16b أعلى قوة للتميز في حين اعطى البادئ A11 أعلى قوة للتمييز بلغت 24.3% . استطاع Mansour وجماعته (11)ختبار 11 تركيباً وراثياً من الطماطة بأستخدام تقانتين RAPD و ISSR فأظهرت النتائج كفاءة هذه التقانة بتشخيص التراكيب المتحملة لاجهاد الحرارة.

المواد وطرائق البحث

اجري البحث في قسم البستنة وهندسة الحدائق– كلية الزراعة– جامعة بغداد في أبي غريب للموسمين الزراعيين 2013 و2014 . لاختبار البعد الوراثي لأربعة تراكيب وراثية تمثل الجيل الطفوري الثاني (M2) في نباتات الطماطة المعرضة للاجهاد الملحي المتمثلة بالطوافر 9A و 2SA+6A و 2SA و 4SA+3A كل من الجبوري وعلوان (1) اجري تحليل البعد الوراثي لهذه المنتخبات مع صنف الأصل. تم استخلاص الحامض النووي في وحدة أبحاث النخيل/قسم البستنة وهندسة الحدائق /كلية الزراعة /جامعة بغداد. تم عزل DNA وفقاً لطريقة Weigand وجماعته (16) المعتمدة على طريقة Sahgi- Maroof وجماعته (14)، وبعد الإستخلاص نقلَ سائل الإستخلاص المحتوي على مسحوق الأوراق إلى أنبوبة سعة 2مل ثم وضعت في حمام مائي على درجة حرارة 65مْ لمدة 30 دقيقة مع التحريك الهادئ لفصل الدهن والبروتين والبقايا النباتية عن الأحماض النووية . قيس التركيز والنقاوة باستخدام جهاز Nano drop المنتج من قبل شركة Bio Drop وبلغ تركيزه من 191 – 200 µg/ml ومعدل النقاوة 2 أجريت الإختبارات في مركز بحوث التقانات الإحيائية / قسم التقانات الإحيائية النباتية / جامعة النهرين في بغداد باستخدام الطريقة المرافقة مع العدة AccuPower® PCR PreMix المجهزة من شركة Bioneer. استخدمت خمسة عشر بادئاً المبينة في جدول (1) وبإتباع خطوات التفاعل المبينة في (جدول2).

جدول1: يمثل بادئات مؤشرات RAPD

البادئات المستخدمة في تفاعلات الـ RAPD		
ت	البادئ	تتابعه (3 - 5)
1	OPI_06	AAGGCGGCAG
2	OPL_05	ACGCAGGCAC
3	OPJ_13	CCACACTACC
4	OPE_16	GGTGACTGTT
5	OPH-19	CTGACCAGCC
6	OPH-05	AGTCGTCCCC
7	OPH-4	GGAAGTCGCC
8	OPB-09	TGGGGGACTC
9	OPB-11	GTAGACCCGT
10	OPAD-14	GAACGAGGGT
11	OPAW-11	CTGCCACGAG
12	OPE12	TTATCGCCCC
13	OPF03	CCTGATCACC
14	OPH13	GACGCCACAC
15	S39	CAAACGTCGG

جدول 2: برنامج ظروف تفاعل PCR

Step	Temperature	Time	No. of cycles
Pre - Denaturation	94 °C	5 min	1
Denaturation	94 °C	1 min	40
Annealing	36°C	1 min	
Extension	72 °C	2 min	
Final Extension	72 °C	7 min	1

تحليل نتائج مؤشرات تباين أطوال قطع الدنا المتضاعفة

قُرئت كل هلامة من هلامات RAPD بتحويل نتائجها الى جداول توصيف وذلك بوضع 1 عند وجود الحزمة و0 عند غيابها ولإيجاد العلاقة الوراثية بين الطوافر المنتخبة تم تحويل بيانات التوصيف (Characterization Data) الى قيم الإختلاف المقدرة إستناداً الى معادلة Nei و Lei (13) باستخدام جهاز الحاسوب الآلي وفق البرنامج الإحصائي STATISTICA ، الإصدار السادس V.6 (STATSOFT ، 2003) وكما موضح في المعادلة التالية :-

$$\text{Genetic Distance} = 1 - (2\, n_x y / n_x + n_y)$$

إذ إنَّ :-

Genetic Distance = البعد الوراثي

n x y = تمثل عدد الحزم المشتركة بين الانموذجين x و y التي تمثل أياً من النباتات المنتخبة .

n x = عدد الحزم الكلية في الإنموذج x .

n y = عدد الحزم الكلية في الإنموذج y .

رُسم مخطط البُعد الوراثي بين الطوافر المنتخبة باستخدام طريقة

The un-weighted pair group method for the arithmetic average (UPGMA)

النتائج والمناقشة

استخدم في الدراسة 15 بادئاً. الإ ان من بين هذه البادئات أربع منها أعطت حزماً من DNA وهي OPI_06 وOPE12 وOPH13 وS39 موضحة في الأشكال (2 و3 و4) ، واعتمدت نتائج مؤشرات RAPD على الاختلافات في عدد الحزم المتضاعفة باختلاف البادئ المستخدم الناتجة من الإختلاف في عدد المواقع المكملة لذلك البادئ في مجين كل نبات من النباتات ، في هذه الدراسة اعتمدت طريقة تحليل نتائج دراسة العلاقة الوراثية على وجود أو غياب الحزم الناتجة من تضاعف قطع معينة من مجين النباتات المستخدمة وعلى الأوزان الجزيئية لتلك الحزم التي تعتمد على العدد والمواقع المكملة لتسلسلات البادئات على شريط DNA. كما ذكر حسين (5).

أظهرت نتائج جدول (3) مدى البعد الوراثي بين الطوافر المنتخبة، إذ تبين ان أعلى نسبة للتشابه تقابل أقل بعداً وراثياً (0.20) بين المنتخبين 9A و2SA+6A ثم البعد (0.50) بين المنتخبين 2SA و 4SA+3A ، وبينت النتائج ايضاً ان اعلى بعد وراثي كان بين الصنف Red stone وبين المنتخبات الأخرى بلغ(1.00) كذلك كان هناك بعد وراثي مماثل بلغ (1.00) بين كل من 9A و 2SA و بين 9A و4SA+3A، ايضاً بين 2SA و 2SA+6A، وكذلك وبين 2SA+6A و 4SA+6A.

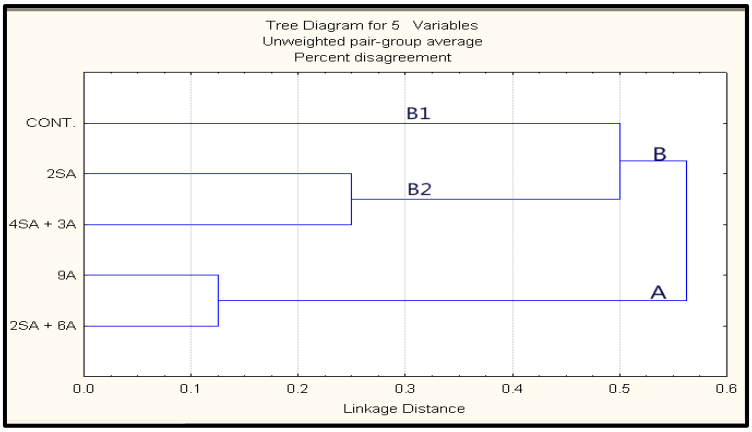
جدول 3:قيم البعد الوراثي بين الصنف Red stone والطوافر المنتخبة في الجيل (M2)

التغايرات الوراثية	Red stone	9A	2SA	2SA+6A	4SA+3A
Red stone					
9A	1.00				
2SA	1.00	1.00			
2SA+6A	1.00	0.20	1.00		
4SA+3A	1.00	1.00	0.50	1.00	

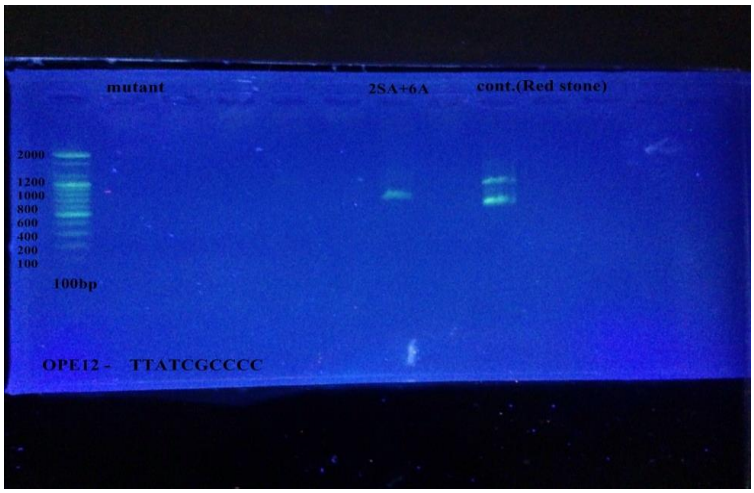
يرجع التباعد الوراثي هذا الى فعالية ازايد الصوديوم في احداث التغييرات الوراثية فهو أداة فعالة تعمل على إحداث طفرات مؤثرة في الجينوم النباتي مما يسهم في تحسين الصفات المهمة ومنها الحاصل و النوعية والمقاومة للأمراض وكذلك الاجهادات البيئية Adebola (7) وKhan وGoya (8) ايضا فأن للصعق الكهربائي تأثيراً واضحاً في احدث التغييرات الوراثية في النباتات من خلال العديد من الدراسات التي أجريت لاختبار النباتات المعاملة على المستوى الجزيئي وهذا يتفق مع كل من السامرائي (3) وعمران (6). استخدم في هذه الدراسة الخلط بين نوعين من المطفرات الفيزيائية المتمثل بالصعق الكهربائي والمطفر الكيميائي المتمثل بأزايد الصديوم ، إذ أظهر نتائجاً مهمة من خلال الصفات المتميزة للطافر المنتخب 2SA+6A في الجيل الثاني (M2) التي حققت إرتفاع معنوياً في صفات النمو الخضري ومكونات الحاصل. يلاحظ في هذه الدراسة ان بعض البادئات ارتبطت مع DNA القالب لبعض الطوافر دون أخرى ربما يرجع هذا الى حدوث طفرات وتغييرات في الاليلات التي لم ترتبط مع تسلسل قواعد البادئات .

كما ان هناك بادئات لم تعط نتائجاً رغم اعادتها أكثر من مرة ويتفق هذا مع دراسات أخرى لم تتوصل الى نتائج تضاعف عند تطبيق مؤشرات RAPD عند استخدام البادئات مع النخيل Sedar وجماعته (15) وفي نبات الشبوي وحلق السبع (2) وذلك بسبب غياب المواقع المكملة لتسلسلات تلك البادئات في الجينوم النباتي. تبين النتائج مدى فاعلية تقانة RAPD –PCR في الكشف عن التغييرات التي تحدثها المطفرات الفيزيائية والكيميائية في احداث التباين على مستوى DNA من خلال حدوث طفرات نقطية mutation Point سواءأ كانت طفرات حذف ام حشر ام إعادة تنظيم الكروموسومات.

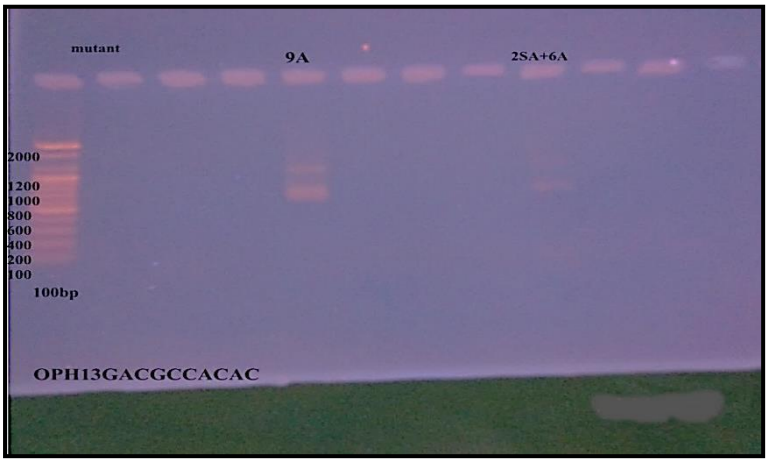
يُظهر مخطط الشجرة للعلاقة الوراثية Dendogram المعتمد على قيم البعد الوراثي باستخدام طريقة UPGMA (شكل 1) الذي اعتمد على نتائج مؤشرات RAPD التي استطاعت تمييز اربع طوافر هي 9A و 2SA و 2SA+6A و 4SA+3A فضلاً عن الصنف Red stone التي توزعت في مجموعتين رئيستين هما (A وB) تضمن العنقود A طافرين هما 9A و2SA+6A الذي كانت افراده بعيدة عن صنف القياس. اما العنقود B فقسم الى عنقودين ثانويين هما B1 الذي ضم الصنفان Red Stone وB2 وشمل الطافران 2SA و4SA+3A يبين المخطط ان الطافرين 9A و 2SA+6A هما أكثر قرباً من بعضهما كذلك كان الطافران 2SA و4SA+3A أكثر قرباً، وان الطوافر في المجموعتين A وB هما أكثر بعداً وراثياً (الاشكال 2و3و4). نستنتج من هذه النتائج ان لعوامل التطفير المستخدمة الفيزيائية والكيميائية تأثير واضح في احداث التغيير الوراثي ويرجع ذلك لما تحدثه هذه المطفرات من إضافة أو فقدان في القواعد النيتروجينية. تتفق هذه النتائج تتفق مع كل من حسين (2) و السامرائي (3).



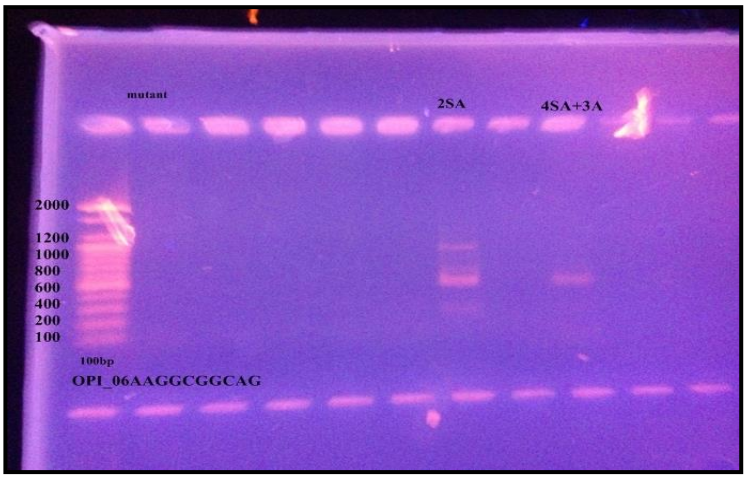
شكل 1: مخطط الشجرة للعلاقات الوراثية بين الطوافر المنتخبة المعتمدة على نتائج تحليل مؤشرات RAPD.



شكل 2: المؤشرات الجزيئية RAPD للطافر 9A و 2SA+6A مع البادئ OPH13.



شكل3: مؤشرات الجزيئية RAPD التي أظهرت الحزم في الطافر2SA+6A مع الصنف stone Red مع البادئ OPE 12.



شكل4: المؤشرات الجزيئية RAPD للطافرين 2SA و4SA+3A مع البادئ 0PI 06.

المصادر

1-الجبوري، اياد؛ عبدالله وخضير عباس علوان (2015). اختبار وتشخيص متغايرات وراثية في الطماطة بتأثير الصعق الكهربائي والصوديوم ازايد تحت ظروف الاجهاد الملحي(مؤشرات النمو الخضري والحاصل). مجلة العلوم الزراعية العراقية، 46(5):802 -812.

2-حسين، جنان قاسم (2007). تأثير الصعق الكهربائي في تغايرات النمو الخضري والزهري وDNA بعض نباتات الزينة. اطروحة دكتوراه ، كلية الزراعة ، جامعة بغداد، العراق.

3-السامرائي، سارة خليل ابراهيم (2010). قوة الهجين وقابلية الأتلاف في قرع الكوسة واستجابته للصعق الكهربائي. رسالة ماجستير، كلية الزراعة، جامعة بغداد، العراق.

4-الساهوكي، مدحت مجيد وايوب عبيد الفلاحي (2009). تلنك: احدث تقنية تجمع بين الطفرات التقليدية والجينوم الفعالة، مجلة العلوم الزراعية العراقية، 40 (1) 1-25.

5-الساهوكي ، مدحت مجيد ومصطفى الخفاجي (2014). آليه تحمل النبات لشد الملوحة. مجلة العلوم الزراعية العراقية، 45(5):430-438.

6-عمران، وفاء هادي حسون (2014). دور بعض العوامل الفيزياوية في مؤشرات الانبات والنمو والحاصل في الفلفل الحلو. اطروحة دكتوراه، كلية الزراعة، جامعة بغداد ،العراق.

7-Adebola, M.O. (2013). Mutagenic effect of sodium azide (NaN3) on morphologic characteristics of tomato *Lycopersicum esculentum*. The international J. RJSITM. 2 (4):1-5.

8-Khan, S. and S. Goyal (2009). Improvement of mungbean varieties through induced mutations. Afr. J. Plant Sci., 3: 174-180.

9-Korir, N.K.; X.Y. Li; X.P. Leng; Z. Wu; C. Wang and J.G. Fang (2013). Anvel and efficient strategy for practical identification of tomato (*Lycopersicon esculantum)* varieties using modified RAPD fingerprints Genetic and Molecular Res., 12(2):1816-1828.

10-Maluszynski, M.; K. Nichterlein; L. Van Zanten and B.S. Ahloowalia (2000). Officially released mutant varieties. the FAO/IAEA Database. Mutation Breeding Review, 12:1-84.

11- Mansour, A.; H.M. Ismail; M.F. Ramadan and G. Gyulai (2009). Variations in tomato(*Lycopersicon esculantum)* cultivars growth under heat tress. J. Verber. Lebensm. 4:118-127.

12-Martin, A.; J. Parry; J. Pippa; Madgwick, B. Carlos; T. Katie; H. Antonio; Marcela; R. Mariann; H. Walid; A. Adnan; O. Hssan, L. Mustapha and L. Andrew (2009). Mutation discovery for crop improvement. J. of Experiment. Botany, 60(10): 2817–2825.

13-Nei, M. and W.H. Lei (1979). Mathematical model for studying genetic variati in terms of restriction endonucleases. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 76:5269-5273.

14-Sahgi-Maroof, M.A.; K.M. Soliman; R.A. Jorgens and R.W. Allard (1984). Ribosomal DNA spacer lenth polymorphisms in barley. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 81: 8014 – 8018.

15-Sedra, M.H.; P. lashermes; P. Trouslot; M.C. Combes and S. Homan (1998). Identification and genetic diversity analysis of date palm (*Phoenix dactylifera L.*) varieties from Morocco using RAPD makers. Euphytica, 103:75 – 82.

16-Weigand, F.; M. Baum and S. Udupa (1993). DNA molecular marker techniques. Technical manual. No. 20 International Res. for Agric. Rea. in the Dry Areas, Aleppo, Syria.

17-Zahid, R.A.; I.I.H. Al-Mishhadani; S.N. Hmmed; D. Mysire; G.L. Aarf and S.M. Majeed (2011). Evaluation of Random Amplified Polymorphic DNA as a genetic Indicator of salt tolerance in Iraqi wheat. Tikrit J. of Pure Sci., 16 (4):12-18.

THE GENETIC DISTANCE USE RANDOM AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA (RAPD) MARKERS FOR TOMATO MUTANT SELECTION UNDER SALT STRESS

A.W.A. Al-Juboori **Kh. A. Alwan**

ABSTRACT

The study was conducted at the Department of Horticulture and Landscape Gardening, College of Agriculture, University of Baghdad during the growing seasons of 2013 and 2014 to study the genetic distance of selected mutants (M2) designated (9A و 2SA+6A و 2SA و 4SA+3A) under salt stress using the Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) markers. The analysis of the genetic distance of these selected mutants in addition to control plants was carried out. The results showed the similarities and differences between the selected mutants. The highest rate of similarity corresponds to less genetic distance (0.02) between select 9Aو 2SA+6A and the distance 0.50 selected between 2SA and 4SA+3A. The results also showed that the highest genetic distance was among the Red Stone and among the other lines was (1) there was also a similar genetic distance (1.00) between 9A and 2SA and between 9A and 4A + 3A, also between 2SA and 2SA + 6A, as well as between SA + 6A and 4SA + 6A.

Part of Ph.D. thesis of the first author.
Agri. College, Baghdad Univ., Baghdad, Iraq.