P- ISSN 1991-8941 , E-ISSN 2706-6703
2016,10 (3) :01-20

مجلة جامعة الانبار للعلوم الصرفة (JUAPS)

Open Access

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

معتز عبدالجبار فرحان عبدالمجيد عبدالعزيز حمادي

جامعة الانبار – كلية التربية للعلوم الصرفة

معلومات البحث:

تاريخ التسليم: ٢٠١٣/٠٠/٠٠
تاريخ القبول: ٢٠١٤/٥/٦
تاريخ النشر: / / ٢٠٢٢

DOI: 10.37652/juaps.2016.134880

الكلمات المفتاحية:

تنوع وراثي ،
ذرة صفراء ،
RAPD.

الخلاصة:

إستُخدِمَت في هذه الدراسة ستة أصناف من الذرة الصفراء وهي (الحلوة Z١ ، الصيوانية Z٢ ، المنغوزة Z٣ ، الشامية Z٤ ، المغلفة Z٥ والطحينية Z٦) ، و١٠ 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 (٦٥-٩٠) مايكروغرام لكل غرام واحد من أوراق الأصناف المدروسة بعد عزل (DNA) بطريقة (CTAB) ، وبنقاوة تراوحت بين (١.٥-١.٨٥) وأجريت تفاعلات (PCR) ورُحِلت العينات على هلام الاكاروز.أوضحت نتائج تفاعلات (RAPD) ان البادئ (OPW-09) لم يُظهِر اي نتائج تضاعف ، بينما أظهرت ٩ بوادئ ٢٧٧ حزمة ، (١٢٠) حزمة منها متماثلة وبنسبة مئوية (٤٣.٣٢%) و(١٥٧) حزمة متباينة وبنسبة مئوية (٥٦.٦٧%) ، 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 رُسِمت شجرة القرابة الوراثية للأصناف المدروسة وقُسِمت الى ثلاث مجاميع رئيسية ، ضمت المجموعة الأولى الصنف حلوة (Z1) فقط ، والمجموعة الثانية الصنف طحينية (Z6) فقط ، بينما إنقسمت المجموعة الثالثة الى ثلاث مجاميع ثانوية ، ضمت الأولى الصنف شامية (Z4) ، والثانية الصنف منغوزة (Z3) ، بينما ضمت المجموعة الثالثة الصنفين (صيوانية Z2 ومغلفة Z5).

المقدمة:

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 الاقتصادية [١].

لقد كان الاعتماد بشكل كبير على الصفات المظهرية كمؤشرات وراثية Genetic markers للتمييز بين الأصناف وبما أن هذه الصفات تستند بظهورها على العديد من العوامل الوراثية بالإضافة إلى تأثرها الكبير بالظروف البيئية المحيطة بها لذا يصبح التنوع المعتمد على مثل تلك الصفات ضيقاً [٢] ، ومن المؤشرات الوراثية الأخرى التي إستخدمت كطرق تمييزية وتصنيفية هي تلك المعتمدة على المحتوى البروتيني [٣] ، والمتناظرات الأنزيمية [٤] ، إلا أن محور التحفظات على هذه الطرق تركز على كونها غير كفوءة بدرجة كافية للكشف عن التباينات بشكل مستقر وشامل من جهة وقلة مؤشراتها وتحددها بنوعية النسيج والمرحلة العمرية من جهة أخرى بالإضافة إلى تأثرها بالبيئة [٥] .

في السنوات الأخيرة وفي ظل التطور السريع في مجال إستخدام 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) من قبل DNA [٦].

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

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 [٧] ، لذا طوعت لهذا الغرض العديد من المؤشرات للكشف عن التباينات ومنها : RFLP, RAPD, SSR, AFLP وغيرها [٨] ، 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 (١) .

جدول (١) يبين المجاميع الداخلة في الدراسة

الرمز	الاسم العلمي	Scientific name
Z١	الذرة الصفراء الحلوة	*Z. mays saccharata*
Z٢	الذرة الصفراء الصيوانية	*Z. mays indurate*
Z٣	الذرة الصفراء المنغوزة	*Z. mays indentata*
Z٤	الذرة الصفراء الشامية	*Z. mays everta*
Z٥	الذرة الصفراء المغلفة	*Z. mays tunicate*
Z٦	الذرة الصفراء الطحينية	*Z. mays amylacea*

اذ عُزِل (DNA) الأوراق الفتية لأصناف الذرة الصفراء بالطريقة التي ذكرها Benito واخرون (١٩٩٣) [٩] ، باستخدام محلول الاستخلاص (CTAB) (100 ملي مولار Tris-HCl ، 1.4 مولار NaCl ، 2 % CTAB و 20 ملي مولار Na_2EDTA) ، محلول الكلوروفورم : ايزواميل (١:٢٤) ، الأيزوبروبانول المبرد ، محلول الغسل Washing buffer المبرد ومحلول الإذابة (TE) (0.010 مولار Tris-HCl و 0.001 مولار Na_2EDTA).

تقدير تركيز DNA المستخلص ونقاوته :

قُدِرَ تركيز DNA بقياس الامتصاصية لطيف الأشعة فوق البنفسجية باستخدام جهاز قياس الكثافة الضوئية Spectrophotometer وعند الطول الموجي (٢٦٠) نانوميتر وطُبِقت المعادلة التالية لحساب تركيز DNA :

تركيز DNA مايكروغرام/ مايكروليتر = قراءة الامتصاصية لكل 1 مل من العينة عند الطول الموجي (٢٦٠) × معكوس التخفيف (100)×1000/50.

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

تفاعلات RAPD :

أُجريت تفاعلات RAPD على (٦) عينات من الذرة الصفراء قيد الدراسة وبالاستناد إلى ما جاء به [١٠] وباستخدام ١٠ بوادئ (OPC-01 ، OPC-02 ، OPC-07 ، OPC-08 ، OPC-09 ، OPE-15 ، OPP-14 ، OPW-١٣ ، OPW-٠٩ و OPY-09) مجهزة من شركة (operon U.S.A).

- طريقة العمل :

ضُبِط 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 (٢).

جدول (٢) مكونات خليط التفاعل

ت	المكونات	الحجم لعينة واحدة	التركيز النهائي
١	ماء مقطر معقم ddH_2O	١١.٨ مايكروليتر	-
٢	القواعد النتروجينية ثلاثية الفوسفات dNTPs	٢.٥ مايكروليتر	٢٥٠ مايكرومولر
٣	محلول منظم PCR Buffer بقوة X10 مع $MgCl_2$	٢.٥ مايكروليتر	1X
٤	البادئ Primer	١ مايكروليتر	٨ بيكومول
٥	إنزيم بلمرة *Taq* DNA polymerase	٠.٢ مايكروليتر	١ وحدة/تفاعل
٦	القالب DNA DNA template	٢ مايكروليتر	٢٥-٥٠ نانوغرام/مايكرولتر

ونُقِلت الأنابيب إلى المبلمر الحراري ثم تطبيق البرنامج (دورة واحدة مدة ٥ دقائق على درجة حرارة (٩٤)°م للمسخ الأولي لشريط DNA تليها (٤٠) دورة تضاعف تتضمن كل دورة دقيقة واحدة بدرجة حرارة (٩٤)°م لمسخ الشريط المزدوج ودقيقة واحدة بدرجة حرارة (٣٦)°م لارتباط البادئ بـDNA القالب ودقيقتين بدرجة حرارة (٧٢)°م لاستطالة البادئ ، بعد ذلك دورة أخيرة لمدة ١٠ دقائق وعلى درجة

حرارة (٧٢)°م لاستكمال مرحلة الاستطالة) وحُمِلَ المزيج في حفر الهلام المحضر مسبقا وبتركيز ١ % مع الدليل الحجمي DNA ladder (١٠٠) bp ورُحلِت العينات ، ومن ثم عُرِض الهلام لمصدر الأشعة فوق البنفسجية على جهاز UV-transilluminator ، وصُوِرت حزم DNA باستخدام كاميرا رقمية عالية الدقة.

التحليل الاحصائي

أخذت نتائج بوادئ RAPD في جدول اعتماداً على مقارنة وجود أو غياب قطع DNA للعينات المختلفة إذ يرمز لوجود قطعة DNA بالرقم (١) ولعدم وجودها بالرقم (٠). تم حساب معامل البعد الوراثي ومعامل التشابه بين الأصناف المدروسة باستخدام معامل Nei [١١] ثم اجريَ التحليل العنقودي (Cluster analysis) وتم رسم مخطط البعد الوراثي باستخدام طريقة : The unweighted pair group method for the arithmetic average (UPGMA). [١٢]. واجريت التحاليل الإحصائية بواسطة الحاسوب باستخدام البرنامج : Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System (NTSYS PC , -[١٣] . 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

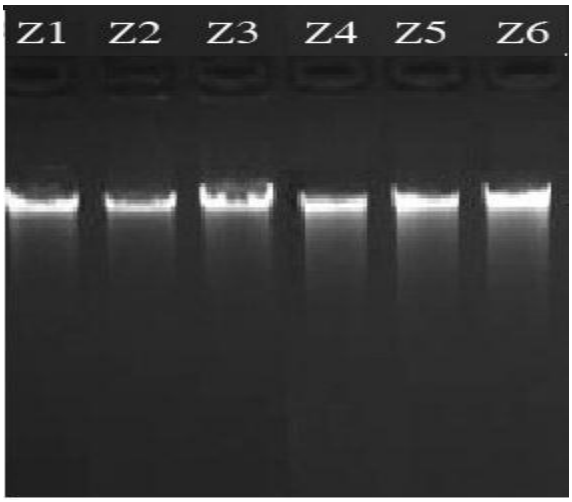
Ni : عدد الحزم في النموذج i و Nj : عدد الحزم في النموذج j

النتائج والمناقشة

استخلاص DNA المجيني

إن DNA المستخلص كان جيداً ، اذ تم الحصول على كمية من DNA تقدر بـ(٦٥-90) مايكروغرام لكل غرام من الأوراق لكل صنف من أصناف الذرة الداخلة في الدراسة ، وبنقاوة تراوحت بين (١.٥-١.٨٥) وخُفِفت عينات DNA للحصول على تركيز (٥٠ng) لكل مايكروليتر، وهو التركيز المناسب لإجراء تفاعلات PCR ، ويوضح الشكل (١) عينات DNA لأصناف الذرة الداخلة في الدراسة.

ذكر [١٤] 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 طريقة [٩] ؛ لأنها من الطرائق الكفوءة والمناسبة لعزل DNA المجيني من العديد من النباتات ومن ضمنها الذرة إضافة لكونها طريقة سهلة وغير مكلفة وتتضمن عدة خطوات بعضها ذات طابع ميكانيكي والأخرى كيميائي وكل خطوة من هذه الخطوات تقوم بإزاحة أحد مكونات الخلية من دون التأثير على DNA الذي يتم الحصول عليه في نهاية الاستخلاص.



الشكل (١) عينات DNA. لأصناف الذرة الصفراء المرحلة على هلام الاكاروز ١% ، Z١- الحلوة Z٢- الصيوانية Z٣- المنغوزة Z٤- الشامية Z٥- المغلفة Z٦- الطحينية

- نتائج تفاعلات RAPD

اختبرت 10 بوادئ من تلك المصنعة من قبل شركة Operon Technology وتبين من نتائج إستخدام تلك البوادئ في تفاعلات RAPD اختلاف في عدد المواقع المتضاعفة وأحجامها الجزيئية باختلاف البادئ المستخدم والناتجة من الاختلاف في عدد الموقع المكملة لذلك البادئ في مجين كل صنف من أصناف الذرة الداخلة في هذه الدراسة [١٠].

حُلِلَت 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 بادئا واحد لم يُظهِرَ اي تضاعف وعلى هذا الأساس قُسِمت النتائج إلى مجموعتين هما :

المجموعة الأولى First group

تتضمن هذه المجموعة البوادئ التي لم تظهر اي حزم تضاعف وشملت هذه المجموعة بادئا واحدا وهو (OPW-09) والسبب يعود لعدم وجود موضع ارتباط مناسب للبادئ على شريط DNA القالب [١٥] . إن البوادئ التي لاترتبط مع DNA ولاتظهر حزم تضاعف لايمكنها التفريق بين أنواع الجنس الواحد ولكن أهميتها التصنيفية تكمن في تفريقها بين الأنواع التابعة لأجناس مختلفة [١٠].

المجموعة الثانية The second group

شَمِلت هذه المجموعة البوادئ التي أظهرت حزماً متباينة الأعداد والمواقع بين الأصناف قيد الدراسة والتي تمثلت بتسع بوادئ أنتجت (٢٧٧) حزمة كان (١٥٧) حزمة منها متباينة وبنسبة مئوية (%٥٦.٦٧) و(١٢٠) حزمة متماثلة (حزمة رئيسية) وبنسبة مئوية (%٤٣.٣٢). إن عملية إيجاد التباين الوراثي تعتمد على هذه الحزم حيث أن من اسس إيجاد التباين الوراثي هي نسبة الحزم المتباينة إلى العدد الكلي للمواقع [١٦ ، ١٧]. قسمت النتائج حسب البوادئ فظهرت كما في الجدول (٣) :

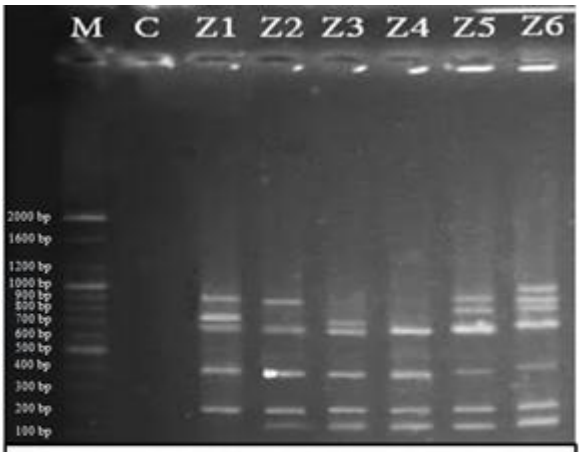
أنتج البادئ (OPY-09) (٥١) حزمة مسجلاً أعلى عدد من الحزم بين البوادئ الأخرى ، اما البادئ (OPP-14) أظهر (١٣) حزمة كأقل عدد من الحزم ، كان أعلى حجم جزيئي في البادئين (OPW-13 و OPY-09) بأكثر من ٢٠٠٠ bp ، اما أقل حجم جزيئي فقد بلغ (١٣٠) bp في البادئ (OPC-08) ، وسجل البادئ (OPC-07) أعلى عدد من المواقع الفريدة بلغت (٦) مواقع في حين لم تظهر اي مواقع فريدة في البوادئ (OPE-15 ، OPP-14 و OPY-09) ، وامتلك البادئ (OPE-15 و OPY-09) أعلى عدد من المواقع التي غابت فيها الحزم حيث بلغت (٢) موقع على النقيض من ذلك لم تظهر اي مواقع غابت فيها الحزم في البوادئ (OPC-01 ، OPC-09 و OPW-13).

اسم البادئ	عدد ونسبة الحزم	اقل واعلى حجم جزيئي (bp)	عدد ونسبة الحزم المتماثلة	عدد ونسبة الحزم المتباينة	موقع وحجم الحزم الغائبة (bp)	موقع وحجم الحزم الفريدة (bp)
OPC-01	32 (%١١.٥٥)	١٠٧٠-٣١٥	0 (%٠)	32 (%١٠٠)	0	765 (Z4) 435 (Z1) 360 (Z1) 315 (Z1)
OPC -02	28 (%١٠.١١)	١١٨٠-٢٧٥	6 (%٢١.٤٣)	22 (%٧٨.٥٧)	750 (Z6)	1180 (Z4) 660 (Z4) 625 (Z4)
OPC-07	20 (%٧.٢٢)	142٥-555	0 (%٠)	20 (%100)	1380 (Z3)	900 (Z1) 765 (Z2) 655 (Z1) 600 (Z1)
OPC-08	32 (%١١.٥٥)	1000-1٣٠	18 (%٥٦.٢٥)	14 (%43.75)	130 (Z1)	1000 (Z5)
OPC-09	31 %(١١.١٩)	1000-240	12 (%٣٨.٧١)	19 (%61.29)	0	1000 (Z5) 600 (Z5)
OPE-15	25 (%٩.٠٣)	1315-365	12 (%٤٨)	13 (%52)	1315 (Z1) 930 (Z1)	0
OPP-14	(%٤.٦٩) 13	1110-200	(%٤٦.١٥) 6	(%53.85) 7	300 (Z6)	0
OPW-13	٤٥ (%١٦.٢٥)	٣٠٠- اكثر من ٢٠٠٠	36 (%٨٠)	9 (%20)	0	1780 (Z6) 855 (Z6)
OPY-09	٥١ (%١٨.٤١)	٢٣٥- اكثر من ٢٠٠٠	30 (%٥٨.٨٢)	21 (%41.18)	500 (Z3) 430 (Z1)	0
المجموع	٢٧٧ (%١٠٠)		١٢٠(%٤٣.٣٢)	١٥٧ (%٥٦.٦٨)		

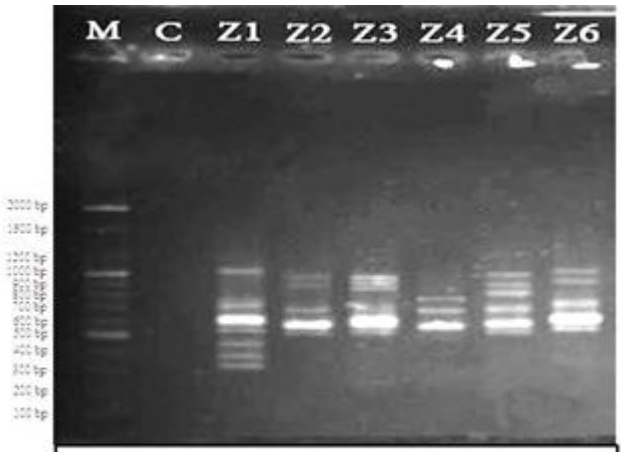
جدول (٣) يبين البوادئ وبعض نتائج التضاعف لتقانة RAPD حيث تمثل (Z1) الذرة الصفراء الحلوة ، (Z2) الذرة الصفراء الصيوانية ، (Z3) الذرة الصفراء المنغوزة ، (Z4) الذرة الصفراء الشامية ، (Z5) الذرة الصفراء المغلفة و(Z6) الذرة الصفراء الطحينية

وكما مبين في الاشكال :

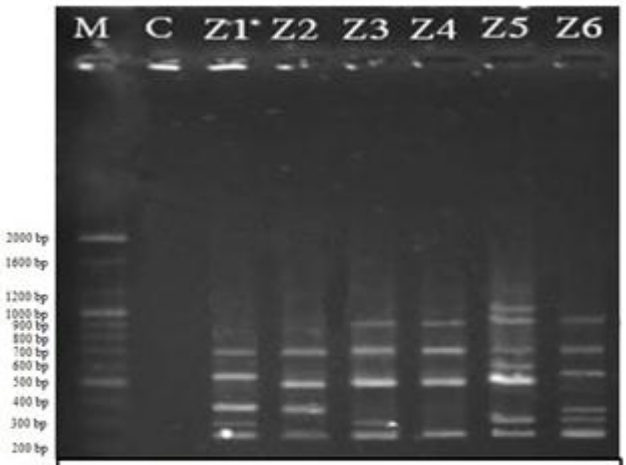
P- ISSN 1991-8941 , E-ISSN 2706-6703 (*JUAPS*) مجلة جامعة الانبار للعلوم الصرفة Open Access
2016,10 (3) :30-38



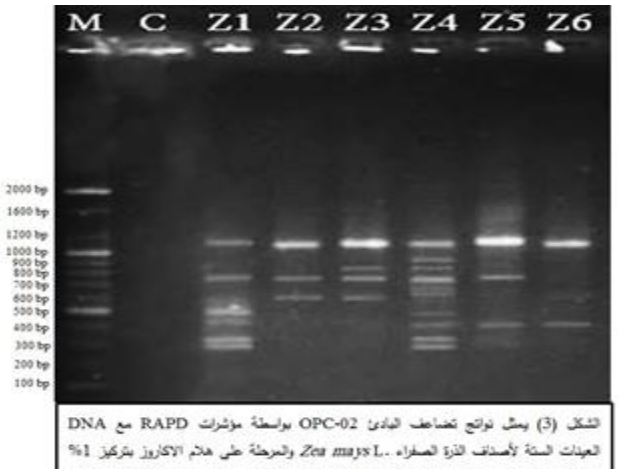
الشكل (5) يمثل نواتج تضاعف البادئ OPC-08 بواسطة مؤشرات RAPD مع DNA العينات الستة لأصناف الذرة الصفراء *Zea mays* L. والمرحلة على هلام الاكاروز بتركيز 1% ، M تمثل الدليل الحجمي ، C تمثل عينة السيطرة Control ، Z1- الحلوة ، Z2- الصيوانية ، Z3- المنغوزة ، Z4- الشامية ، Z5- المغلفة و Z6- الطحينية



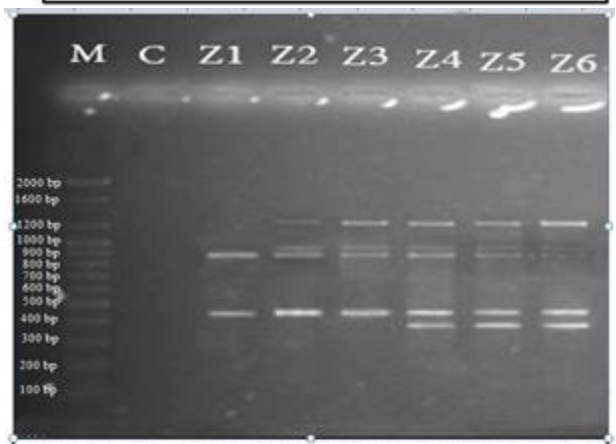
الشكل (2) يمثل نواتج تضاعف البادئ OPC-01 بواسطة مؤشرات RAPD مع DNA العينات الستة لأصناف الذرة الصفراء *Zea mays* L. والمرحلة على هلام الاكاروز بتركيز 1% ، M تمثل الدليل الحجمي ، C تمثل عينة السيطرة Control ، Z1- الحلوة ، Z2- الصيوانية ، Z3- المنغوزة ، Z4- الشامية ، Z5- المغلفة و Z6- الطحينية



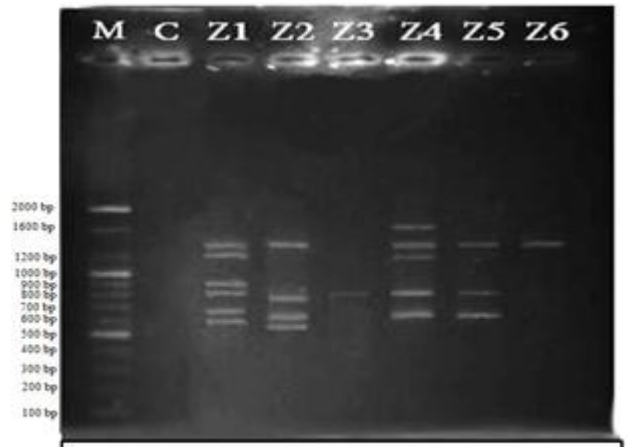
الشكل (6) يمثل نواتج تضاعف البادئ OPC-09 بواسطة مؤشرات RAPD مع DNA العينات الستة لأصناف الذرة الصفراء *Zea mays* L. والمرحلة على هلام الاكاروز بتركيز 1% ، M تمثل الدليل الحجمي ، C تمثل عينة السيطرة Control ، Z1- الحلوة ، Z2- الصيوانية ، Z3- المنغوزة ، Z4- الشامية ، Z5- المغلفة و Z6- الطحينية



الشكل (3) يمثل نواتج 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- الحلوة ، Z2- الصيوانية ، Z3- المنغوزة ، Z4- الشامية ، Z5- المغلفة و Z6- الطحينية



الشكل (7) يمثل نواتج 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- الحلوة ، Z2- الصيوانية ، Z3- المنغوزة ، Z4- الشامية ، Z5- المغلفة و Z6- الطحينية



الشكل (4) يمثل نواتج 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- الحلوة ، Z2- الصيوانية ، Z3- المنغوزة ، Z4- الشامية ، Z5- المغلفة و Z6- الطحينية

P- ISSN 1991-8941 , E-ISSN 2706-6703 (*JUAPS*) مجلة جامعة الانبار للعلوم الصرفة Open Access
2016,10 (3) :30-38

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 ومعتمدا في تحليلاته على معادلة Nei [١١].

يوضح الجدول (٤) الأبعاد الوراثية بين الأصناف الستة وتراوحت القيم بين (0.56484–0.21749) ففي حالة تتطابق المادة الوراثية بين صنفيين فهذا يدل على ان البعد الوراثي بينهما يجب ان يكون مساويا للصفر، اما نسبة التشابه الوراثي فتكون مساوية لـ١ (١٠٠%) ١٨ والتطابق هنا يحدث عند عدم وجود تباين وراثي بين الأصناف باستخدام عدد من البوادئ، لكن عند إستخدام عدد اكثر من البوادئ أو إستخدام مؤشر وراثي آخر قد تختلف النتيجة وذلك لاختلاف مناطق الارتباط حسب تسلسل البادئ المستخدم .

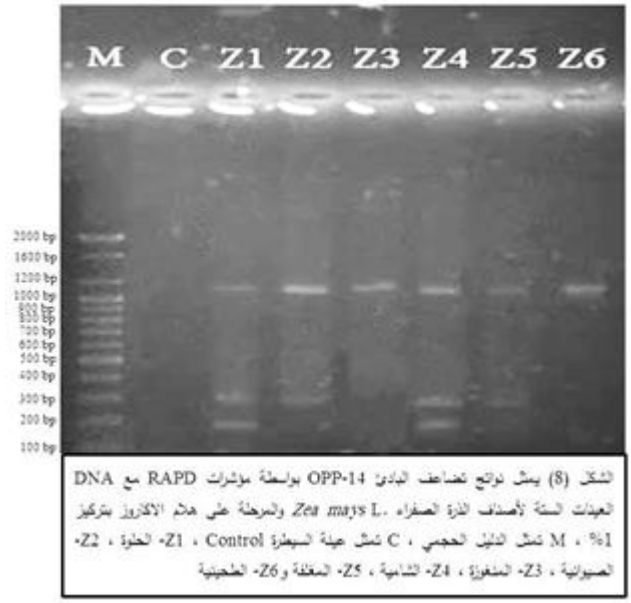
جدول (٤) قيم البعد الوراثي لأصناف الذرة الداخلة في الدراسة

	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**

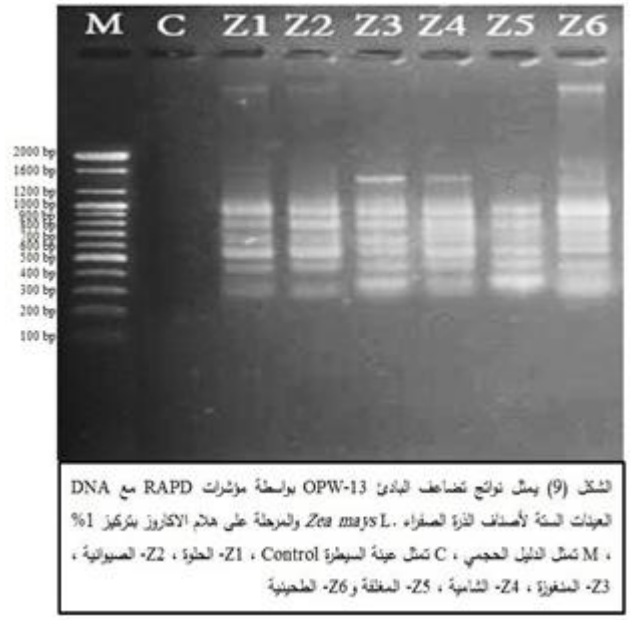
كانت أقل قيمة للبعد الوراثي (0.21749) بين النوعين (صيوانية Z2 ومغلفة Z5) فهذا يدل على أنهما يمتلكان اكبر نسبة تشابه في المادة الوراثية بالاستناد إلى البوادئ المستخدمة في هذه الدراسة ، إذ اشار بعض الباحثين إلى أن الذرة الصفراء المغلفة غريبة وقد تشابه في سويدائها لأحد صفات سويداء الأصناف الأخرى ١٩ ، ٢٠ كما هو موضح في الجدول (٣).

أما أعلى بعد وراثي فكان بين الصنف (حلوة Z1 ومغلفة Z5) بلغ (0.56484) هذا يعني وجود أقل نسبة للتشابه في المادة الوراثية بين هذين النوعين فهما اشتركا بأقل عدد من الحزم بالنسبة للأنواع الأخرى ، إن هذا الاختلاف ناتج من اختلافهما الكبير في الصفات المظهرية وهذا ما اشار اليه ٢٠ كما هو موضح في الجدول (٤).

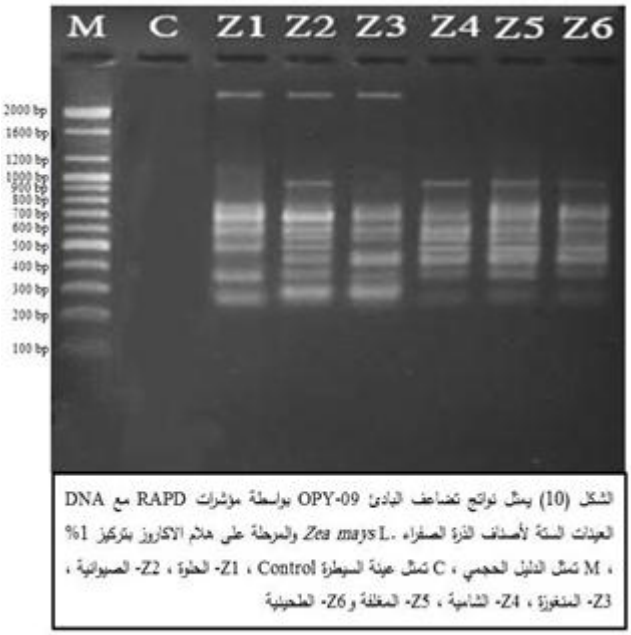
وقد تم استثمار قيم البعد الوراثي بين الأنواع الستة في إيجاد العلاقة الوراثية التي تربطها جميعها وبشكل مجاميع Clusters والمتمثلة بالشكل (١١) إذ قسمت إلى ثلاث مجاميع رئيسية :-



الشكل (8) يمثل نواتج تضاعف البادئ OPP-14 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- الحلوة ، Z2- الصيوانية ، Z3- المنغوزة ، Z4- الشامية ، Z5- المغلفة و Z6- الطحينية



الشكل (9) يمثل نواتج تضاعف البادئ OPW-13 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- الحلوة ، Z2- الصيوانية ، Z3- المنغوزة ، Z4- الشامية ، Z5- المغلفة و Z6- الطحينية



الشكل (10) يمثل نواتج تضاعف البادئ OPY-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- الحلوة ، Z2- الصيوانية ، Z3- المنغوزة ، Z4- الشامية ، Z5- المغلفة و Z6- الطحينية

المجموعة الرئيسة الأولى First main group

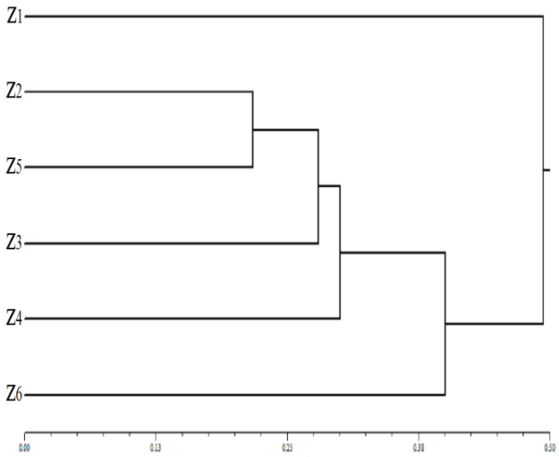
ضمت هذه المجموعة الصنف حلوة (Z1) فقط كونه لم يرتبط مع الأنواع المدروسة كافة إلا بعدد قليل من مواقع RAPD وأظهر بذلك تفرداً في عدد تلك المواقع وأطوالها مما جعله يبتعد عن الجميع بحيث أعطى نمطا مميزا يختلف بشكل كامل عن مجاميع الأنواع الأخرى وقد يعود سبب ذلك لقلة التغيرات الوراثية التي طرأت عليه مقارنة مع بقية الأصناف أو قد يكون الأقرب وراثياً إلى الأصل الذي انحدر منه نبات الذرة الشكل (١١).

المجموعة الرئيسة الثانية Second main group

تكونت هذه المجموعة من صنف واحد ايضاً هو الصنف طحينية (Z6) إذ ابتعد عن مجاميع الأصناف الأخرى والسبب يعود إما للاختلاف في الصفات المظهرية أو الكمية كعدد العرانيس أو عدد الحبوب في العرنوس الواحد أو وزن الحبوب وحجمها الشكل (١١).

المجموعة الرئيسة الثالثة Third main group

ضمت هذه المجموعة ثلاث مجاميع ثانوية ، إذ شملت المجموعة الثانوية الأولى الصنف شامية (Z4) والمجموعة الثانوية الثانية الصنف منغوزة (Z3) ، اما 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 (١١).



الشكل (١١) العلاقة الوراثية بين أصناف الذرة الصفراء تبعا لمؤشرات RAPD اذ تمثل Z١- الحلوة Z٢- الصيوانية Z٣- المنغوزة Z٤- الشامية Z٥- المغلفة Z٦- الطحينية

إستُخدِمت في هذه التفاعلات ١٠ 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 الجديدة [٢١]. وتبرز أهمية هذا النوع من النتائج في تحديد ملامح المحتوى المجيني للصنف وبالتالي تمييزه عن باقي الأصناف التي تمتلك أي نوع من الحزم مع هذه البوادئ وبذلك لا تقل أهميتها في دراسات التحليل الوراثي للأفراد أو الأنواع والأجناس [٢٢]، وهذا البادئ اعطى نتائج تضاعف عندما استخدمه [٢٣] مع مجموعة من البوادئ على هجائن من الذرة المنغوزة ، كذلك[24] اعطى هذا البادئ حزما عندما استخدمه مع عدد من البوادئ الأخرى لإيجاد المسافة الوراثية بين ١٦ هجين من الذرة الصفراء.

أما البوادئ الأخرى المستخدمة في هذه التفاعلات فجميعها أظهرت نواتج تضاعف ، إذ أنتجت (٢٧٧) حزمة منها ١٥٧ حزمة متباينة Polymorphic band و١٢٠ 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 القطع [25] ، 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

المتباينة [٢٦] ، 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-٠١ 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-٠١ 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 ٧ بوادئ ، ووجودها يدل على وجود قطعة مشتركة من DNA في تلك الأصناف ، ويعول على هذه الحزم في تحديد هوية النماذج المجهولة الأصل أو فاقدة التصنيف ؛ كونها تمثل في أغلب الأحيان موقعا تشترك به كل افراد الجنس الواحد genus أو النوع species [٢٧] .

ومن الدراسات التي إستخدمت فيها بوادئ مشابهة لبعض البوادئ الموجودة في الدراسة الحالية دراسة [٢٨] ، إذ استخدم في دراسته ١٧ هجين من الذرة تابعة للذرة الصيوانية لتحديد المسافة الوراثية بينها باستخدام ١٤ بادئ حيث اشتركت هذه الدراسة مع الدراسة الحالية بـ٦ بوادئ جميعها اعطت تضاعف في الحزم ، كذلك الدراسة التي قام بها [٢٩] ، إذ قام بحساب المسافة الوراثية بين ١٨ هجين من الذرة في البرازيل وباستخدام ٣٢ بادئ .

المصادر

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

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 : 314-33l .

٨- حمدالله ، ماجد شايع (٢٠٠٩). دور التقانات الجزيئية في رسم الخرائط الوراثية وتقدير التباعد الوراثي والبصمة الوراثية. مجلة العلوم الزراعية العراقية ٤٠ (٣) : ٥٠ -٦٢ .

9- Benito, C ; Figueiras, A. M. ; Zaragozal, 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.

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. Theo. 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.
١٩- شفشق، صلاح الدين عبدالرزاق والدبابي، عبدالحميد السيد (٢٠٠٨). انتاج محاصيل الحقل. كلية الزراعة بمشتهر/ جامعة بنها.
٢٠- الساهوكي، مدحت مجيد (١٩٩٠). 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 indurate* (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 dendogram 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).