الارتقاء بالبحوث العلمية طريقنا لخدمة المجتمع

تحديد البصمة الوراثية و البعد الوراثي لعدد من التراكيب الوراثية لنبات الباقلاء باستخدام مؤشرات الـRAPD-PCR

رافع زيدان مخلف السكماني[1] ، عقيل حسين علي العاصي[1] ، جاسم محمد عزيز الجبوري[2]

[1]قسم علوم الحياة ، كلية العلوم ، جامعة تكريت ، تكريت ، العراق

[2]قسم المحاصيل الحقلية ، كلية الزراعة ، جامعة تكريت ، تكريت ، العراق

معلومات البحث

الكلمات المفتاحية: البصمة الوراثية، RAPD-PCR، نبات الباقلاء

الاسم: رافع زيدان مخلف السكماني

البريد الاليكتروني:

رقم الهاتف:

الملخص

الهدف: هدف البحث هو تحديد البصمة الوراثية DNA Fingerprinting والبعد الوراثي Genetic distance لثمان تراكيب وراثية نقية لنبات الباقلاء تم الحصول عليها من منظمة ICARDA باستخدام مؤشرات الـ RAPD-PCR (Randomly Amplified Polymorphic DNA-PCR).

المواد وطرق العمل: تم استخلاص الـDNA من الاوراق الفتية للعينات بعد (45) يوما من زراعتها وتم قياس تركيز ونقاوة الـDNA باستخدام جهاز الـNanodrop وطبقت مؤشرات الـ RAPD-PCR على DNA التراكيب الوراثية الثمانية باستخدام (34) بادئاً عشوائياً ورحلت النتائج على هلام الاكروز وصبغت العينات ببروميد الأثيديوم وكشفت على الاشعة فوق البنفسجية وصورت بكامرا رقمية وحفظت الصور بالحاسوب واجري التحليل الاحصائي لها.

النتائج: أنتجت البادئات المستخدمة (829) حزمة منها (176) حزمة عامة و(653) حزمة متباينة. تم تحديد بصمة وراثية لأغلب التراكيب الوراثية بتميزها بعدد من الحزم المميزة بلغت (72) حزمة كان منها (50) حزمة فريدة و (22) حزمة غائبة فقد حصل التركيب G2 على أعلى عدد من الحزم الفريدة بلغت (11) حزمة في حين حصل التركيب G8 على اقل عدد للحزم الفريدة فأمتلك حزمة واحده ، أما الحزم الغائبة فقد تميز التركيب G4 بأعلى عدد لتلك الحزم التي بلغت (6) حزم، بالمقابل لم يمتلك التركيبان G6،G1 أي من الحزم الغائبة، و تباينت البادئات في أحجام الحزم الناتجة فقد تراوحت أحجامها بين (100– 2500bp) ظهر أن قيم البعد الوراثي تراوحت بين (0.275 –0.664)، حيث كان أقل بعد وراثي بين التركيبين الوراثيين G6،G3 حيث بلغ (0.275) ويعد ذلك أعلى تشابه ما بين التركيبين الوراثيين الداخلة في الدراسة، أما أعلى بعد وراثي بلغ (0.664) بين التركيبين الوراثية G7،G5 ويعد ذلك أقل تشابه وراثي بين التركيب الوراثية.

الاستنتاج: تميزت التراكيب الوراثية المدروسة بوجود تباين وراثي عالي بينها، تميزت جميع التراكيب الوراثية بحزم مميزة (فريدة وغائبة)، حدد البعد الورثي والشجرة الوراثية بين التراكيب الوراثية للاستفادة منها في برامج التربية الداخلية للنبات، اظهرت مؤشرات الـRAPD كفاءة عالية في تحديد البصمة الوراثية والبعد الوراثي للتراكيب الوراثية المدروسة.

المقدمة

يعود نبات الباقلاء *Vicia faba* L) الى العائلة البقولية ويعتبر من اهم محاصيلها وذلك لاحتواء بذوره على نسبة عالية من البروتين تتراوح ما بين 23–37% وكذلك احتوائها على كميات من المواد السكرية والنشوية وبعض الفيتامينات وتستخدم بقايا النبات بعد الحصاد علف للحيوانات او تستخدام بذورها اليابسة مصدراً للبروتين في العلائق المركزة [1] بالإضافة الى الدور المهم في تحسين خواص التربة عن طريق تثبيت النتروجين الجوي مع بكتريا العقد الجذرية التي تتعايش معها ([2]-FAO,2003). يحتوي نبات الباقلاء على عدد

من الأحماض الأمينية ،الكربوهيدرات ،الفيتامينات والمواد الدهنية الأخرى ، يستعمل المحصول في علاج العديد من الحالات كالفشل الكلوي وحصى الكلى وضعف الكبد وأمراض العيون [3].

يمتاز جنس *Vicia faba* بقلة عدد الكروموسومات عن الأنواع الأخرى التابعة لنفس الجنس (2N = 12) أذ يقدر حجم الجينوم Genome بـ (13000Mbp) تقريبا[4]. تعد الصين اكثر الدول انتاجا واستهلاكا للباقلاء أذ يقدر أنتاجها حوالي (1.4) مليون طن في السنة، أما في العراق قد بلغت المساحة المزروعة بمحصول الباقلاء (9382) دونما بلغ الإنتاج الكلي (4947) الف طن بذور بمعدل إنتاجية 527.4 كغم/دونم لعام 2012 [5].

تعد دراسة التباين الوراثي Genetic variation بين خطوط التربية الداخلية Inbred line للمحاصيل المزروعة خطوة مهمة لنجاح برامج التربية في استنباط أصناف مميزة و تراكيب وراثية جديدة. أذ يمكن من خلال تقييم الأصول الوراثية قبل و بعد دخولها في برامج التربية معرفة مدى تميز تلك الأصول الوراثية عن غيرها، و معرفة درجة القرابة الوراثية واستنباط سلالات جديدة [6]، تم نشر العديد من البحوث التي استخدمت المؤشرات الجزيئية في الانتقاء الوراثي Genetic purity للأصناف والسلالات النباتية [7].

استثمرت تقنية الـ Polymerase Chain Reaction (PCR) في تقييم و تحسين المحاصيل الزراعية ،وقد استخدمت مؤشرات الـRandomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD-PCR) لهذا الغرض لتفوقها من حيث السهولة ،الدقة ، إمكانية الكشف بأوسع مساحة لجينوم النباتPlant genome وقلة التكلفة مقارنة بالمؤشرات الاخرى [8]، تساهم مؤشرات الـ RAPD-PCR في الكشف المبكر وانتخاب السلالات والتراكيب الوراثية المرغوبة للمحاصيل الحقلية عن طريق تحديد التراكيب التي تثبت تفوقها حتى قبل زراعتها بطريقة أسرع وأكثر كفاءة مقارنة بالطرق التقليدية[9]. بالإضافة إلى اختيار هذا المؤشر يعد نبات الباقلاء متميز بقدر واسع من التباينات الوراثية فضلا عن قلة الدراسات الجزيئية لهذا النبات لذلك هدف البحث تحديد البصمة الوراثية للتراكيب الوراثية الثمانية و البعد الوراثي بينها.

المواد وطرق العمل

1- **جمع العينات Sample collection:** جمعت عينات نبات الباقلاء بعد شهر ونصف من موعد الزراعة من جميع التراكيب الوراثية المبينة في الجدول (1) حيث تم أخذ (4-5) أوراق فتية من القمة النامية ثم وضعت في اكياس معقمة ومعلمة ثم نقلت الى المختبر مباشرا لإجراء عملية عزل الـDNA منها.

الجدول (1): التراكيب الوراثية المستخدمة في الدراسة الاباء ورموزها المستخدمة في الدراسة

Origin	Pedigree	Entry	الرمز
ICARDA	2000/DSO/0405-HBP/7005-2/B7/ DT	PO6-OO1FB / FL	G1
ICARDA	2000/DSO/0405-HBP/7841/B7/ DT	PO6-OO2FB / FL	G2
ICARDA	2000/DSO/0405-HBP/7106-1/B7/ DT	PO6-OO3FB / FL	G3
ICARDA	2000/DSO/0405-HBP/7380/B7/ DT	PO6-OO5FB / FL	G4
ICARDA	Selection from ILB 1814	PO6-OO9FB / FL	G5
ICARDA	2000/DSO/0405-HBP/7038/B7/ DT	PO6-O11FB / FL	G6
ICARDA	2000/DSO/0405-HBP/7486/B7/ DT	PO6-O13FB / FL	G7
ICARDA	0405-SP80B(DS)/7986/B7/ DT	PO6-O14FB / FL	G8

2- **أستخلاص الدنا المجيني Genomic DNA extraction**

تم أستخلاص الـ DNA من الأوراق الفتية وحسب طريقة الـ (CTAB) وفقاً لما ذكره [10,11] وتم تنقية الـDNA باستخدام طريقة جديدة مستحدثة في هذا البحث محورة عن طريقة العزل ، وتم قياس تركيز ونقاوة الـDNA باستخدام جهار الـnanodrop.

جدول(2) يمثل البادئات المستخدم في الدراسة الـRAPD-PCR على التراكيب الوراثية

ت	اسم البادئ	تتابع البادئ 3. 5 .	ت	اسم البادئ	تتابع البادئ . 3 5
1	OPC- 05	GATGACCGCC	18	OPJ -12	GTCCCGTGGT
2	OPG- 15	ACTGGGACTC	19	OPJ -14	CACCCGGATG
3	OPO- 11	GACAGGAGGT	20	OPG -11	TGCCCGTCGT
4	OPB- 15	GGAGGGTGTT	21	OPQ -15	GGGTAACGTG
5	OPB- 12	CCTTGACGCA	22	OPB -20	GGACCCTTAC
6	0PA- 06	GGTCCCTGAC	23	OPB -10	CTGCTGGGAC
7	OPP- 07	GTCCATGCCA	24	OPH-01	GGTCGGAGAA
8	OPG -13	CTCTCCGCCA	25	OPAB-12	CCTGTACCGA
9	OPD -08	GTGTGCCCCA	26	OPH-08	GAAACACCCC
10	OPD -03	GTCGCCGTCA	27	OPN-10	ACAACTGGGG
11	OPA -20	GTTGCGATCC	28	OPO-05	CCCAGTCACT
12	OPE -20	AACGGTGACC	29	OPO 12	CAGTGCTGTG
13	OPA- 13	CAGCACCCAC	30	OPM -10	TCTGGCGCAC
14	OPF -16	GGAGTACTGG	31	OPW -13	CACAGCGACA
15	OPA-11	CAATCGCCGT	32	OPP -01	GTAGCACTCC
16	OPO -06	CCACGGGAAG	33	OPO -04	AAGTCCGCTC
17	OPD -02	GGACCCAACC	34	OPW -08	GACTGCCTCT

3- أجراء تفاعلات الـRAPD-PCR: تم إجراء تفاعلات الـRAPD لعينات التراكيب الوراثية الثمانية لنبات الباقلاء *Vicia faba* باستخدام (34) بادئاً عشوائاً بحسب الطريقة التي ذكرها مع بعض التعديلات [12] كما موضحة في الجدول رقم (2). تم تحضير خليط التفاعل الرئيسي Master Reaction وذلك بمزج مكونات التفاعل في أنبوبة Eppendroffe tube سعة 2 مل معقمة و تم نبذ المزيج في جهاز Microfuge لمدة 5-3 ثانية لإتمام مزج مكونات التفاعل، مع مراعاة أن يكون العمل داخل Hood معقما وارتداء القفازات ووضع الأنابيب داخل ثلج وكما هو مبين بالجدول (3) الآتي:

جدول (3) المحاليل المستخدمة في تفاعلات الـRAPD

ت	المكونات	التركيز النهائي	الحجم لعينة واحدة
.1	خليط التفاعل Green Master mix	1X	12.5 مايكرولتر
.2	البادئ Primer	10 بيكومول	2 مايكروليتر
.3	ماء مقطر Nuclease free water to	–	8.5 مايكروليتر
.4	قالب الدنا DNA template	50 مايكروليتر	2 مايكروليتر

تم تطبيق برنامج تفاعل الـRAPD-PCR الموضح في الجدول (4). بعد انتهاء وقت التفاعل رفعت الأنابيب من جهاز المبلمر الحراري وحفظت في التجميد، ويتم سحب (5) مايكروليتر من الأنابيب وثم وضع المزيج في حفر هلام الأكاروز المحضر مسبقا وبتركيز 1.5 % مع الدليل الحجمي Ladder Marker بعدها تم ترحيل العينات على جهاز الترحيل الكهربائي بفولتية 1.5 فولت /سم2 من الهلام لمدة 60 دقيقة ، بعد الانتهاء من الترحيل نقل الهلام وغمر في حوض مائي حاوي على بصبغة بروميد الإثيديوم لمدة ساعة واحدة مع التحريك وبعدها عرض لمصدر الأشعة فوق البنفسجية على جهاز UV-transilluminator وصور الهلام باستخدام كاميرا رقمية عالية الدقة، نقلت الصور في الحاسوب لاجراء التحليل الاحصائي لها في ما بعد.

الجدول (4) يمثل برنامج التفاعل للـPCR

المرحلة	C درجة الحرارة	الزمن اللازم	عدد الدورات
المسخ الاولي	94	7 دقائق	1
المسخ الاعتيادي	93	45 ثانية	40
أرتباط البادئ	36	1 دقيقة	
الاستطالة	72	1.5 دقيقة	
الاستطالة النهائية	72	10 دقائق	1

4- التحليل الاحصائي statistical analysis

أ- تقدير الكفاءة والقدرة التمييزية لبادئات الـ RAPD

قدرت الكفاءة لكل بادئ باستخدام المعادلة التي ذكرها [13]: الكفاءة = (عدد الحزم لكل بادئ \العدد الكلي لحزم التضاعف لكل بادئات)× 100

القدرة التمييزية تم إيجادها اعتماداً على المعادلة التالية: القدرة التمييزية=(عدد الحزم المتباينة لكل بادئ\ العدد الكلي للحزم المتباينة لجميع البادئات)×100

ب- تقدير البعد الوراثي

تم تقدير البعد الوراثي للتراكيب الوراثية المستخدمة عن طريق تحويل نتائج مؤشرات الـRAPD التي حصلنا عليها والتي ظهرت في الهلام إلى جداول التوصيف بوضع (1) عند وجود الحزمة و (0) عند غياب الحزمة وبغية إيجاد العلاقة الوراثية بين التراكيب الوراثية، واجريت التحاليل الاحصائية بواسطة الحاسوب باستخدام البرنامج الذي ذكره [14] ويتم الاعتماد هذا البرنامج على معادلة التي ذكرها [15].

النتائج والمناقشة

استخدمت لدراسة البصمة الوراثية والبعد الوراثي لـ8 تراكيب وراثية مؤشرات الـRAPD (34) بادئاً عشوائياً ، أعطى منها (32) بادئ على مواقع على جينوم Genome وإنتاج حزم مختلفة كشفت على هلام الاكروز، كان بادئ واحد من بين تلك البادئات هو OPD-02 انتج حزم عامة لجميع العينات اما البقية فأنتجت حزم مختلفة بين العامة والمتباينة، في حين لم تتعرف ثلاث بادئات هي (OPH-08,OPN-10,OPO-05) على أي موقع على المجين لأنها لم تظهر حزم على هلام الاكاروز، يعد استخدام عدد كبير من البادئات في مؤشرات الـRAPD مؤشر لزيادة الدقه العالية في تحديد البعد الوراثي وامكانية كشف اكبر مساحة للجينوم وخاصة عندما تكون تلك نسبة البادئات المنتجة للحزم 94% من المجموع الكلي البادئات المستخدمة ويكون البادئات المنتجة للحزم المتباينة النسبة الاكبر من تلك البادئات وهذا يتفق مع [16] في دراسة باستخدام (18) بادئ كان منها (16) بادئ انتجت حزم متباينة وبادئين انتجت حزما عامة لعشرة تراكيب وراثية من نبات الباقلاء وهذا يتفق مع أغلب الباحثين الذين استخدموا مؤشرات الـRAPD في دراسة التباين الوراثي [17,18,19].

1- نتائج البادئات

أظهرت نتائج البادئات المستخدمة و الموضحة في الجدول (5) أنماط مختلفة من الحزم فكان المجموع العام للمواقع التي تعرفت عليها البادئات على مجين العينات (234) موقع بمعدل (7.3) حزمة لكل بادئ (22) منها موقع عامة بمعدل (0.75) لكل بادئ و(212) موقع متباينة بمعدل (6.6) حزمة لكل بادئ، وقد تميزت البادئات OPP-(01,OPW-09,OPG-11) بأعلى عدد لمواقع المنتجة التي بلغت (11) موقع وكان البادئ OPD-02 أقل إنتاجا للمواقع وبلغت موقعين كما موضحة في الصور (1,2,3,4)، كلما ازداد عدد الحزم المتباينة تزيد من كفاءة البادئات في تحديد البعد الوراثي وتزيد من امكانية الحصول على بصمة وراثية للتراكيب الوراثية لكون جينوم الباقلاء يمتلك تباين عالي ادى الى ظهور عدد عالي للحزم المتباينة بلغت نسبتها 90% من مجموع الحزم وهذا يتوافق مع دراسة [20]على 26 صف من نبات الباقلاء باستخدام 11 بادئ على مؤشرات الـRAPD اذ كان معدل الحزم (8.5) حزمة لكل بادئ ومعدل الحزم المتباينة (5.5) حزمة لكل بادئ، يحدث التباين نتيجة حدوث الطفرات الذاتية أو الطفرات المستحثة التي أثرت في المسافة بين المواقع الوراثية التي تحدث بشكل طبيعي في أثناء العملية التطورية للكائنات الحية، وقد يكون التباين قد حدث نتيجة حذف أو إضافة في الموقع الذي يرتبط به البادىء [21].

تبين أن المجموع الكلي الحزم Total bands التي أنتجت من تلك المواقع والموضحة في الجدول (5) هي (829) حزمة كان منها (176) حزمة عامة Main band و(653) حزمة متباينة Polymorphic band، أذ أنتج البادئ OPP-01 أعلى عدد للحزم المنتجة بلغت (47) حزمة واقل عدد للحزم للبادئ OPM-10 بلغت (11) حزمة، وكانت نسبة التباين Variation Ratio العامة للبادئات المنتجة 90% ، إن من الأسس التي تعتمد عليه مؤشرات الـ RAPD هو عدد الحزم التي يظهرها مجين أي نموذج وهي تمثل بدورها عدد المواقع التي يجدها البادئ ويرتبط بها. يتأثر أعداد تلك المواقع بعاملين أساسيين هما حجم المجين المدروس وتتابعات البادئ، وبناءاً على ذلك أشارت الإحصائيات التقديرية بهذا المجال إن البادئات العشوائية القصيرة (9-10) قاعدة يمكن أن تجد لها (2-10) موقع على دنا مجين الكائنات الراقية مثل النباتات [17,22].

تميزت بعض التراكيب الوراثية بحزم مميزة (حزم فريدة Unique band، حزم غائبة Absent band) والموضحة في الجدول (6) فقد كان مجموع الحزم المميزة الناتجة عن البادئات المنتجة في هذه الدراسة (72) حزمة مميزه كان (50) حزمة فريدة و (22) حزمة غائبة، حصل التركيب G2 أعلى نسبة من الحزم الفريدة التي بلغت (11) حزمة في حين حصل التركيب G8 اقل عدد للحزم الفريدة فأمتلك حزمة واحده ، أما الحزم الغائبة فقد تميز بها التركيب G4 بأعلى عدد لتلك الحزم بلغت (6) حزم، بالمقابل لم يمتلك التركيبان G1,G6 أي من الحزم الغائبة، تعد تلك الحزم صفة تمييزية وتشخيصه لتلك التراكيب لكون ظهور تلك الحزم فقط في تركيب واحد وهذا يدل على حدوث طفرة في موقع معين أدى الى تعرف البادئ وظهور الحزمة الفريدة ، اما بالنسبة للحزم الغائبة كذلك حدوث طفرة في موقع تعرف البادئ فقط في التركيب وراثي واحد مما أدى الى ألغاء الموقع التعرف وأخفى ظهور الحزمة ، وهذا يتفق مع نتائج الكثير من الباحثين السابقين [17,18,19]، تعد هذه الحزم مركز اهتمام الباحثين عن بصمة الدنا Fingerprinting DNA لكونها تختصر الجهود والإمكانيات للوصول إلى أهدافهم بأقل عدد من تلك التفاعلات [21,22]. وهذا ما يفتح أفق المستقبل ليس لإيجاد الحزم مميزة لتراكيب وراثية أخرى فحسب بل لربط هكذا قطع مع صفات حقلية أو تحليلية أخرى لتسهيل مهمة مربي النبات [23,24].

تباينت البادئات المنتجة في أحجام الحزم الناتجة الموضحة في الجدول (6) فقد تراوحت أحجامها بين (100-2500bp) أقل حجم جزيئي (100bp) في البادئ OPC-05 بينما أعلى حجم جزيئي (2500bp) للبادئين OPW-09,OPA-06 . تباينت كفاءة البادئات

Proficiency في إظهار التباين بين التراكيب الوراثية المدروسة فكانت أقل كفاءة للبادئ OPM-10 التي بلغت (1.2) بينما أعلى كفاءة كانت للبادئ PJ-14 بلغت (4.9) والموضحة في الصور(5,6). أما القدرة التمييزية Ability discriminatory للبادئات فتميز البادئ OPP-01 بأعلى قدرة تمييزية بلغت (6) في حين بلغت صغر في البادئ OPD-02 لكون البادئ لم يظهر حزم متباينة ، من نتائج الRAPD أعلاه يتبين ان لتلك البادئات كفاءة متباينة ولكن اغلب تلك البادئات امتلكت كفاءة مناسبة ويستنتج من ذلك فقد تزداد كفاءة البادئ بازدياد عدد الحزم الناتجة بمعنى ان البادئ الذي يتمكن من اظهار 10 حزم لتركيب وراثي معين تتراوح الأحجام الجزيئية بين (100-2500bp) يتمكن هذا البادئ من مسح (5000bp) من جينوم ذلك التركيب الوراثي وهذا يتوافق مع استخدام عدد من البادئات في هذه الدراسة والتي امتلكت قدرة على تمييز التباين بين التراكيب الوراثية المدروسة من خلال الحزم المتباينة الناتجة عن هذا الكم من الحزم التي مسحت اكبر ما يمكن من جينوم الباقلاء[22,24].

الجدول (5) يمثل نتائج البادئات المستخدمة في تفاعلات الـRAGD للآباء

ت	اسم البادئ	عدد المواقع التي انتجها	عدد المواقع العامة	عدد المواقع المتباينه	عدد الحزم الكلي للبادئ	عدد الحزم العامة	عدد الحزم المتباينة	عدد الحزم الفريدة	عدد الحزم الغائبة	نسبة التباين%
1	OPC- 05	4	-	4	14	-	14	1	1	100
2	OPQ -15	8	-	8	30	-	30	3	1	100
3	OPG- 15	6	1	5	20	8	12	1	-	83
4	OPJ -12	8	-	8	25	-	25	2	-	100
5	OPJ -14	10	1	9	41	8	33	-	1	90
6	OPG -11	11	-	11	33	-	33	2	-	100
7	OPW -08	9	2	7	39	16	23	2	1	77
8	OPW-09	11	2	9	40	16	24	4	-	81
9	OPG -01	11	1	10	47	8	39	3	2	90
10	OPO -04	8	1	7	30	8	22	2	1	87
11	OPW -13	7	1	6	34	8	26	2	3	85
12	OPO- 11	6	-	6	24	-	24	1	1	100
13	OPB- 15	6	2	4	33	16	17	-	1	66
14	OPB -20	5	-	5	23	-	23	1	1	100
15	OPB- 12	6	1	5	24	8	16	1	1	83
16	OPB -10	5	2	3	21	16	5	2	-	60
17	0PA- 06	8	-	8	20	-	20	3	-	100
18	OPG- 07	5	1	4	15	8	7	2	-	80
19	OPG -13	8	1	7	23	8	15	4	0	87
20	OPD -08	7	-	7	25	-	25	3	1	100
21	OPD -03	5	-	5	20	-	20	1	1	100
22	OPA -20	4	-	4	17	-	17	-	1	100
23	OPE -20	5	1	4	23	8	15	1	-	80
24	OPA- 13	4	-	4	14	-	14	1	-	100
25	OPA- 11	4	1	3	24	8	16	-	1	75
26	OPE -16	6	1	5	29	8	21	2	2	83
27	OPO -06	7	-	7	25	-	25	1	-	100
28	OPD -02	2	2	-	16	16	-	-	-	0
29	OPO 12	8	-	8	34	-	34	1	1	100
30	OPM -10	3	1	2	11	8	3	1	-	66
31	OPH-01	10	-	10	30	-	30	3	-	100
32	OPAB-12	5	-	5	25	-	25	-	1	100
المجموع		212	22	190	829	176	653	50	22	90%

الجدول (6) يمثل الحزم المميزة وكفاءة البادئات والقدرة التمييزية للبادئات المستخدمة

اسم البادئ	الحجم الجزيئي	الحزم المميزة في الاباء																الكفاءة	القدرة التمييزية
		G1		G2		G3		G4		G5		G6		G7		G8			
	bG	فريدة	غائبة	فريدة	غائبة	فريدة	غائبة	فريدة	غائبة	فريدة	غائبة	فريدة	غائبة	فريدة	غائبة	فريدة	غائبة		
OGC- 05	100-800	-	-	-	1	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1.6	2.1
OGQ -15	450-1000	-	-	1	-	-	-	1	-	-	-	1	-	-	-	-	1	3.6	4.5
OGG- 15	300-1100	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	2.4	1.8
OGJ -12	475-1500	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	2.9	3.6
OGJ -14	425-1800	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	4.9	5
OGG -11	425-1600	1	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3.9	5
OGW 08	175-950	1	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	4.7	3.4
OGW09	200-2500	-	-	1	-	2	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	3.4	3.6
OGG -01	175-2250	-	-	1	1	-	1	-	1	-	-	1	-	-	1	-	-	5.7	6
OGO -04	175-1300	-	-	-	-	-	1	-	-	1	-	1	-	-	-	-	-	3.3	3.7
OGW 13	200-1000	1	-	-	-	-	-	1	3	-	-	-	-	-	-	-	-	4.1	4
OGO- 11	150-900	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1	-	-	2.5	3.6
OGB- 15	150-1200	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3.9	2.6
OGB -20	175-1100	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	2.7	3.5
OGB- 12	250-1000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1	2.9	2.3
OGB -10	500-1350	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	2.5	0.7
0GA- 06	475-2500	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	2.4	3
OGG- 07	350-800	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	1	-	1.8	1
OGG -13	400-1500	1	-	1	-	1	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	2.8	2.2
OGD -08	400-950	-	-	1	-	-	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-	1	2.9	3.7
OGD -03	320-1000	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	2.4	2.9
OGA -20	400-700	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	2.6
OGE -20	300-1000	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	2.8	2.2
OGA- 13	250-550	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1.6	2.1
OGA- 11	150-850	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	2.9	2.4
OGE -16	150-1100	-	-	2	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	3.4	3.1
OGO -06	250-950	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2.9	3.7
OGD -02	600-1700	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.9	0
OGO 12	200-725	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	4.1	5.2
OGM -10	200-650	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.2	0.3
OGH-01	300-1300	-	-	1	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3.6	4.5
OGAB12	475-1400	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	4.8	3.6
المجموع		5	0	11	5	7	3	5	6	7	1	8	0	5	3	1	4		

2- تقدير البعد الوراثي بالاعتماد على مؤشرات الـRAPD

تم تقدير البعد الوراثي Genetic distance من نتائج تفاعلات مؤشرات الـRAPD بين التراكيب الوراثية الداخلة في الدراسة لنبات الباقلاء *Vicia faba*، وذلك باستخدام البرنامج الوراثي (NTSYS_PC. Version 2.10) الذي يعتمد على وجود الحزم المشتركة بين كل تركيب من التراكيب الوراثية ويعتمد في تحليلاته على المعادلة التي ذكرها [15].

يوضح الجدول (7) قيم الأبعاد الوراثية للتراكيب الوراثية المدروسة باستخدام (34) بادئاً عشوائياً من بادئات الـRAPD ففي حالة تتطابق المادة الوراثية بين تركيبين وراثيين فهذا يدل أن البعد الوراثي بينهما يجب أن يكون مساويا للصفر، أما نسبة التشابه الوراثي فأنه يمثل المقياس لدرجة التشابه او التماثل الوراثي genetic similarity بين اي فردين [25] . لذلك تكون مساوية عند عدم وجود تباين وراثي بين التراكيب الوراثية ويظهر ذلك عند اشتراك الافراد بالحزم العامة وعدم ظهور حزم متباينة بينهم، ما يقلل الاهتمام في هكذا نتائج هو استخدام عدد قليل من البادئات ، ولكنها تصبح ذات قيمة معنوية عند زيادتها كالتي استخدمت في هذا البحث.

أما التراكيب الوراثية المتباعدة وراثيا فهي التي تشترك بأقل عدد من الحزم مع بعضها؛ وذلك لوجود اختلافات في تسلسل النيكليوتيدات في المجين تلك الأصناف ويتضح هنا دور استخدام بوادئ مختلفة تستهدف عدة مناطق من المجين، وبذلك يظهر الاختلاف إن وجد بين الأصناف المدروسة حسب تسلسل البادئ ودرجة الاختلاف بين مجينات الأصناف المدروسة [19,26] .

تبين من خلال قيم البعد الوراثي المشار لها في الجدول (7) أن قيم البعد الوراثي تراوحت بين (0.275–0.664)، حيث كان أقل بعد وراثي بين التركيبين الوراثيين G3,G6 حيث بلغ 0.275 وبعد ذلك أعلى تشابه ما بين التركيبين الوراثيين الداخلة في الدراسة، أما أعلى بعد وراثي بلغ 0.664 بين التركيبين الوراثية G7،G5 وبعد ذلك أقل تشابه وراثي بين التركيب الوراثية قيد الدراسة في حين تراوحت قيم البعد الوراثي لباقي التراكيب بين تلك القيم .

3- التحليل العنقودي Cluster analysis

ان ترتيب التراكيب الوراثية وبالاعتماد على قيم البعد الوراثية شجرة القرابة الوراثية او مخطط التحليل التجمعي Dendogram ويعتمد على المدى الوراثي الذي ترتبط فيه المجاميع الرئيسية وبالتالي فان وجود قسم من

التراكيب الوراثية في مجموعة معينة يدل على مدى الكم الوراثي المتشابه لتلك التراكيب في تلك المجموعة [27,28].

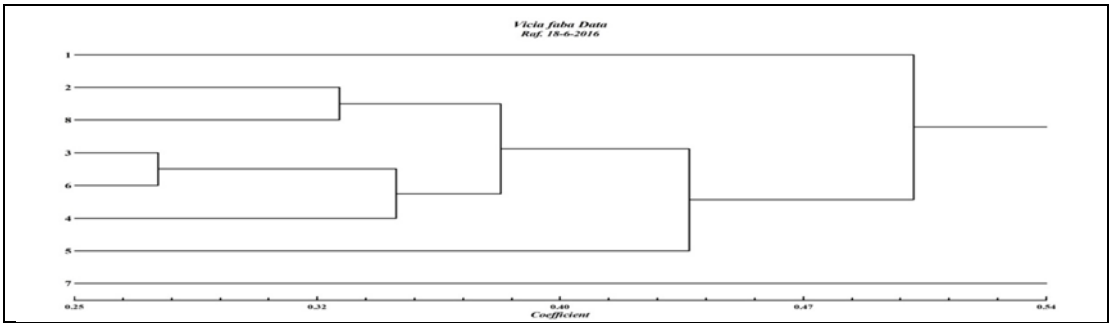
أنشئت مجموعة تحليل التجميعي dendrogram المخطط (1) للتراكيب الوراثية الثمانية لنبات الباقلاء *Vicia faba* باستخدام التحليل العنقودي أذ أظهرت العلاقة الوراثية بين التراكيب الوراثية قيد الدراسة باستخدام مؤشرات الـRAPD وقد تبين أنها تنقسم الى مجموعتين رئيسية هي A و B حيث تضمنت المجموعة A التركيب الوراثي G7 فقط، أما المجموعة B فقد تضمنت باقي التراكيب السبعة وقد انقسمت المجموعة B الى مجموعتين فرعية رئيسية B1 و B2 وقد اشتملت المجموعة B1 على التركيب الوراثي G1 فقط أما المجموعة B2 تضمنت باقي التراكيب الوراثية، وقد انقسمت المجموعة B2 الى مجموعتين فرعية المجموعة الأولى B2a وقد تضمنت التركيب الوراثي G5 والمجموعة الاخرى B2b اشتملت باقي التراكيب وانقسمت الى مجموعتين فرعية أخرى المجموعة الاولى B2b1 وقد اشتملت التركيبين G2،G8 والمجموعة الثانية B2b2 تضمنت التراكيب الوراثية G3 و G6 في مجموعة فرعية أخرى B2b2c وتمتلك تلك المجموعة أعلى نسبة تشابه فيما بينها من بين المجاميع قيد الدراسة أما المجموعة الفرعية الثانية B2b2d فقد ضمت التركيب الوراثي G4.

من خلال تلك النتائج يتبين وجود درجة من التشابه أو الاختلاف الوراثي بين التراكيب الوراثية الداخلة في الدراسة ويرجع السبب الى أمرين الأول: قد تكون الاختلافات بين بعض التراكيب في الطراز المظهري هو ناتج تأثير البيئة وهذا ما يعول علية في الكثير من برامج تربية النبات، أما الامر الثاني قد يظهر تشابه عالي وراثياً بين التراكيب ولا يتوافق مع الطراز المظهري ويرجع ذلك الى التشابه في المناطق الغير مشفرة للجينات Non coding [29] وهذا يتفق مع العديد من الباحثين في مجال تربية النبات الذين استخدموا مؤشرات الـRAPD في دراسة التباين الوراثي للعديد من الاصناف النباتية في القطر مثل دراسة [17] في استخدامها في تحليل التنوع الوراثي للشعير استخدم فيها(36) بادئاً عشوائياً تمكن (16) منها من إيجاد البصمة الوراثية لعشرة تراكيب وراثية من الشعير، وفي دراسة [30] لتحليل التباين الوراثي للبرتقال باستخدام (19) بادئاً عشوائياً، وكذلك في دراسة [26] تحديد التباين الوراثي لعدد من أصناف نخيل التمر باستخدام (13) بادئاً عشوائياً، كما أكدت نتائجهم كفاءة مؤشرات الـRAPD في إيجاد التباين والبصمة الوراثية.

أما في نبات الباقلاء ففي دراسة [16] للتباين الوراثي لعشرة أصناف من نبات الباقلاء المستزرعة في مدينة السليمانية باستخدام (18) بادئ عشوائي في مؤشرات الـRAPD معظم تلك البادئات اظهرت التباين الوراثي وكذلك بعض البادئات اظهرت حزم مميزة للأصناف. وكذلك دراسة [20] التي استخدم فيها مؤشرات الـRAPD في ايجاد التباين الوراثي لـ26 صنف من الباقلاء من مواقع مختلفة في فلسطين باستخدام (26) بادئ عشوائي اظهرت كفاءة مؤشر الRAPD . وكذلك في دراسة [6] على ثمان تراكيب وراثية من نبات الباقلاء وهجنه الفردية فقد استخدم (14) بادئا عشوائيا وقد ظهرت كفاءتها في ايجاد البعد الوراثي لتلك التراكيب في المملكة العربية السعودية.

الجدول(7) يمثل قيم البعد الوراثي للتراكيب الوراثية لنبات الباقلاء قيد الدراسة

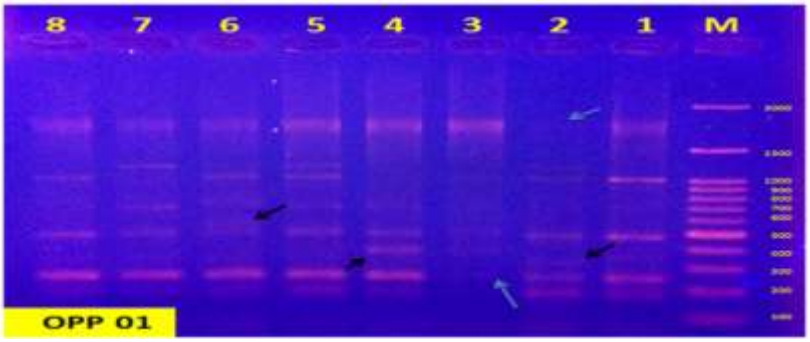
	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8
P1	0.000							
P2	0.432	0.000						
P3	0.576	0.425	0.000					
P4	0.447	0.381	0.339	0.000				
P5	0.489	0.580	0.386	0.401	0.000			
P6	0.613	0.348	0.275	0.353	0.423	0.000		
P7	0.639	0.405	0.530	0.497	0.664	0.535	0.000	
P8	0.446	0.329	0.359	0.381	0.377	0.370	0.517	0.000



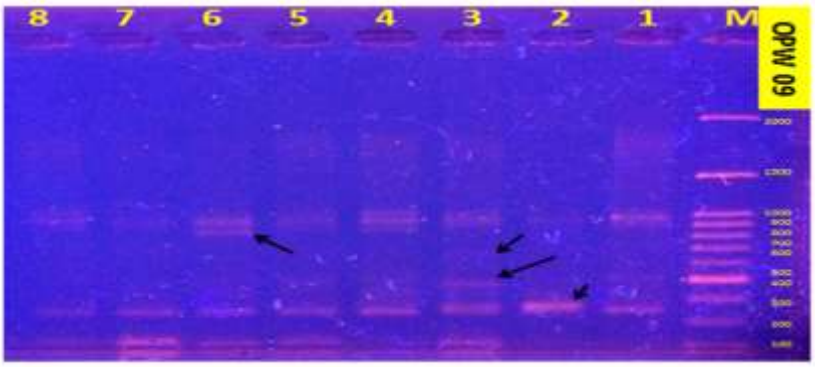
المخطط (1) العلاقة الوراثية للأباء الثمانية بالاعتماد على البعد الوراثي لمؤشرات الـRAPD

يستنتج من هذا البحث وجود تباين وراثي بين التراكيب الوراثية المدروسة وكذلك كفاءة مؤشرات الـRAPD في تحديد البصمة الوراثية لجميع التراكيب الوراثية بالإضافة الى تحديد البعد الوراثي بين التراكيب الوراثية وتحديد درجة القرابة الوراثية بينها ، ويستنتج من ذلك كلما زاد

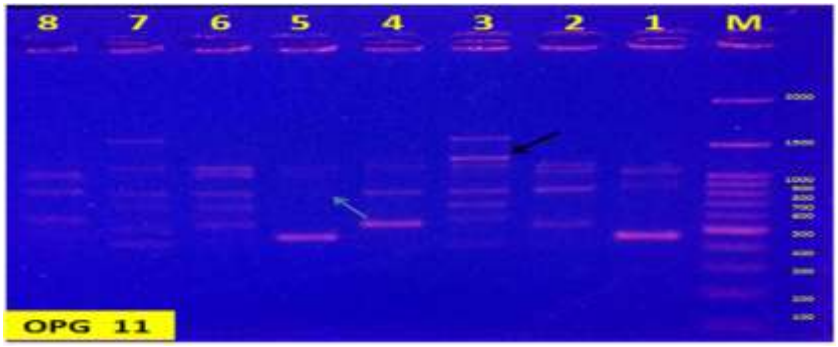
عدد البادئات المستخدمة يزيد من كفاءة المؤشر في تحديد البصمة الوراثية وتحديد البعد الوراثي، أذ ان زيادة عدد البادئات يزيد عدد مناطق الارتباط حسب تسلسل البادئ المستخدم فالذي يحدد القرب أو البعد الوراثي بين التراكيب الوراثية هو عدد الحزم المشتركة فكلما كثر عدد تلك الحزم قل البعد الوراثي والعكس صحيح، فتلك الحزم المشتركة تدل على تشابه في المادة الوراثية في تلك المنطقة من المجين للتراكيب الوراثية المدروسة الذي قد يمثل تشابه في الصفات المظهرية وخصوصا كمية المحصول أو في صفات آخري تتعلق بالإنتاجية والتكاثر والمقاومة للأمراض أو التشابه في التكيف الوراثي للمتطلبات البيئية الملائمة للنمو والإنتاج أو غير ذلك من الصفات الكثيرة أو قد يكون التشابه في منطقة من المناطق غير المشفرة أي التي ليس لها تعبير جيني وتعرف بـ Non-coding DNA.



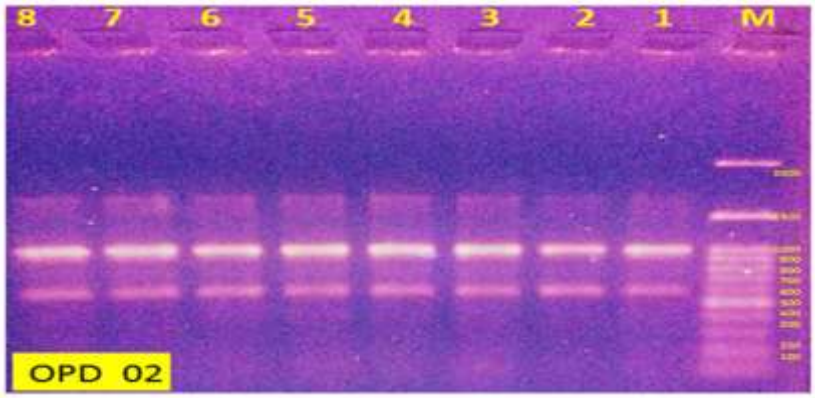
الصورة (1) يمثل نواتج تضاعف البادئ OPP-01 مع دنا ألأباءالثمانية لجنس *Vicia faba* والمرحلة على هلام الأكاروز بتركيز 1.5% مع الدليل الحجمي M



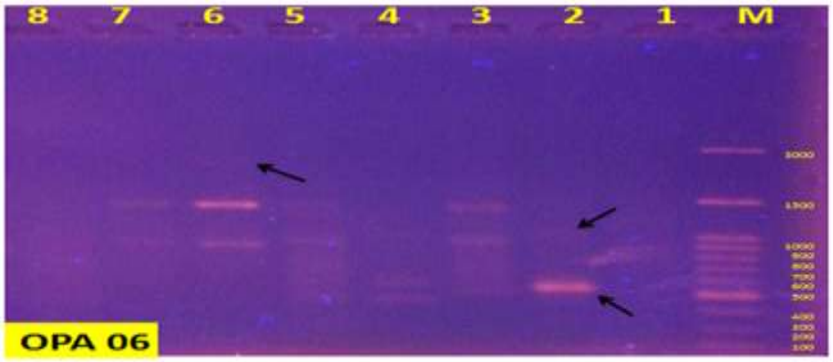
الصورة (2) يمثل نواتج تضاعف البادئ OPW-09مع دنا ألأباءالثمانية لجنس *Vicia faba* والمرحلة على هلام الأكاروز بتركيز 1.5% مع الدليل الحجمي M



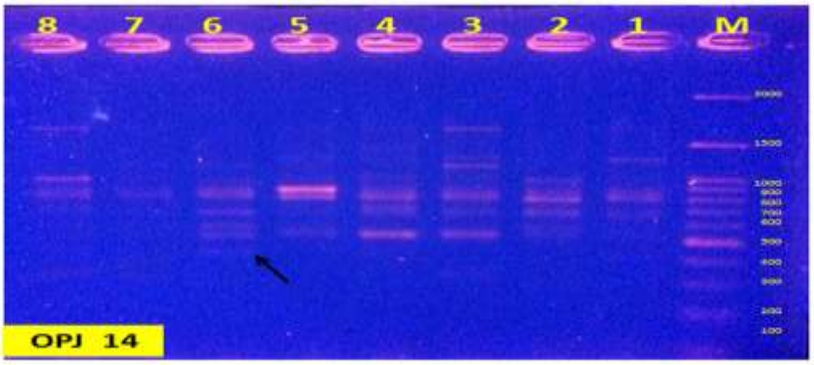
لصورة (3) يمثل نواتج تضاعف البادئ OPG-11مع دنا ألأباءالثمانية لجنس *Vicia faba* والمرحلة على هلام الأكاروز بتركيز 1.5% مع الدليل الحجمي M



الصورة (4) يمثل نواتج تضاعف البادئ OPD-02مع دنا ألأباءالثمانية لجنس *Vicia faba* والمرحلة على هلام الأكاروز بتركيز 1.5% مع الدليل الحجمي M



الصورة (5) يمثل نواتج تضاعف البادئ OPA-06مع دنا ألأباءالثمانية لجنس *Vicia faba* والمرحلة على هلام الأكاروز بتركيز 1.5% مع الدليل الحجمي M



الصورة (6) يمثل نواتج تضاعف البادئ OPJ-14مع دنا ألأباءالثمانية لجنس *Vicia faba* والمرحلة على هلام الأكاروز بتركيز 1.5% مع الدليل الحجمي M

المصادر

1- الجبوري، حاتم محمد حسن (2014). تأثير المسافات بين المروز على الحاصل ومكوناته لبعض اصناف الباقلاء Vicia faba L.))، رسالة ماجستير، كلية الزراعة – جامعة كركوك.

2- FAO.(2003). Data base: Rome, Italy. Future Opportunities. Field Crops Res. 26: 141 – 169.

3-جري، عواطف نعمة وخيون عبد عبد السيد وهتاف حمود جاسم (2014). تأثير موعد الزراعة ورش الارجنين في مؤشرات نمو وحاصل نباتات الباقلاء. مجلة جامعة البصرة للعلوم الزراعية.

4- Rispail N, Kaló P, Kiss GB, Ellis TH, Gallardo K, Thompson RD, Prats E, Larrainzar E, Ladrera R, González, EM, Arrese-Igor C,Ferguson BJ, Gresshoff PM, Rubiales D (2010). Model legumes contribute to faba bean breeding. Field Crops Res 115:253–269

5- الجهاز المركزي للإحصاء وتكنلوجيا المعلومات، التقارير الزراعية (2012). وزارة التخطيط والتعاون الانمائي – العراق.

6- الغامدي، سالم بن سفر حمود (2009) . تطبيق التقنية الحيوية في تحسين المحاصيل الحقلية ((الفول البلدي)) . أطروحة دكتوراه .

كلية العلوم الاغذية والزراعة – جامعة الملك سعود. المملكة العربية السعودية.

7- Huang, J. and M. Sun (2000). Genetic diversity and relationships of sweet potato and its wild relatives in Ipomoea series Batatas (Convolvulaceae) as revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) and restriction analysis of chloroplast DNA. Theor. Appl. Genet., 100: 1050-1060.

8- عمير، هديل عبد الهادي .(2009). استخدام مؤشرات الـ RAPD لتحليل التباين الوراثي لبعض أنواع الجنس Alternaria رسالة ماجستير، كلية العلوم، جامعة تكريت، العراق.

9- Liu ZW, Fu TD, Tu JX, Cheng BY (2005). Inheritance of seed colour and identification of RAPD and AFLP markers linked to the seed colour gene in rapeseed (Brassica napus L.). Theorical and Applied Genetics 110,303–310. doi: 10.1007/s00122-004-1835-1.

10- Weigand , F., Baum, M. and Udupa, S. (1993). DNA molecular marker techniques, technical manual. No.20. International Center for Agricultural Research in the Dry Area(ICARDA). Aleppo, Syria

11- Huang, Q.X. ;Wang, X.C.; Kong, H.; Guo, Y.L. and Guo, A.P. (2013). An efficient DNA isolation method for tropical plants. Afr. J. Bio. 12(19):2727-2732.

12- Williams, J.G.K; A.R., Kubelik K.J., Livak, J.A. Rafalski, and S.V. Tingey, (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucl. Acids Rese. 18: 6531-6535.

13- Grudman, H; C. Schneider, D; Hartung, F. D; Daschner, and T. L; Pith (1995). Discriminatory power of three DNA Typing techniques for Plant aeruginosn. J. clin. Microbiol. 3: 528-532.

14- Rohlf, F.J. (1993) Numerical taxonomy and multivariate analysis system. Version 1.80 Exeter software. Setauket. N. Y.

15- Nei, M. and W.H. Li (1979). Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proceeding of the National Academy of Science, USA. 74, 5269-5273. C. F. by Henry, R.J. (1997).

16- Tahir, A. nawroz (2015).identification of genetic variation in some faba bean (Vicia faba) genotypes grown in Iraq estimated with RAPD and SDS-PAGE of seed proteins .endian journal of biotechnology.vol 14. pp 351-356

17- العاصي، عقيل حسين علي . (2002). استخدام مؤشرات ألدنا في تحليل التنوع الوراثي للشعير (Hordeum vulgare L.) المزروع في العراق .أطروحة دكتوراه ، كلية التربية، جامعة بغداد.

18- القيسي، عماد خلف خضر (2013). تقدير الفعل الجيني في بعض الصفات الحقلية في الذرة الصفراء (Zea mays). أطروحة دكتوراه، كلية الزراعة والغابات، جامعة الموصل.

19- الزهيري، نزار سليمان علي (2014). طبيعة عمل المورثات باستخدام الهجن الفردية والثلاثية والزوجية بين سلالات نقية من الذرة الصفراء (Zea mays L.) والتنبؤ بمواصفات الهجن الزوجية. أطروحة دكتوراه، كلية الزراعة والغابات ،جامعة الموصل.

20- Basheer-Salimia R, Awad M and Ward J (2012). Genetic diversity of Palestine landraces of faba bean (Vicia faba) based on RAPD markers). Am. J. Plant Sci. 3: 1241-1251.

21- Tingey, S.V. and Tufo Del, J.P.(1993). Genetic analysis with RAPD markers. Plant physiology. 101:349-352pp.

22- Borovkova, I. G., Jin, Y., Steffenson, B. J., Kilian, A., Blake, T. K. and kleinhofs, A. (1997). Identification and mapping of a leaf rust resistance gene in barley line Q 21861. Genome, 40: 236-241.

23- Smith, J. S. C. and smith, O. S. (1992). Fingerprinthin crop varieties. In: Advanced in agronomy, sparks, D. L. (ed). 47: 98-107.

24- Hormaza, J.I.; Pinney. K. and Polito, V.S. (1998). Genetic diversity of Pistachio (Pistacia vera, Anacardiaceae) Germplasm based on Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Markers. Economic Botany. 52(1). 78-87.

25- Khierallah, H. S. M.; Al-Sammarraie, S. K. I., and Mohammed, H. I. (2014). Molecular characterization of some Iraqi date palm cultivars using RAPD and ISSR markers. Journal of Asian Scientific Research, 4(9): 490–503.

26- ياسين ، معن حسن صالح (2011). تحديد التباين الوراثي لعدد من أصناف نخيل التمر في العراق باستخدام مؤشراتRAPD وISSR. رسالة ماجستير، كلية العلوم/جامعة تكريت. العراق.

27- الزيدي، مهند رشيد حسين وشذى عايد يوسف ونجم عبدالله جمعة (2016). استخدام تقانة التضاعف العشوائي المتعدد الاشكال لسلسلة الدنا في تشخيص بعض الاصناف العراقية من نخيل التمر Phoenix dactylifera L.. مجلة ديالى للعلوم .العدد: 12المجلد1.

28- El Kichaoui, A.; Abu Zayed, M., and Ayesh, B. (2013). Genotyping and identification of six date palm (Phoenix dactylifera L.) cultivars of the Gaza Strip by random amplification of polymorphic DNA. Emir. J. Food Agric., 25(11), 916–925.

29- عبود ،أكرم محمد وسعدي سبع خميس وعبد الجاسم محيسن جاسم (2014). تشخيص التغايرات الوراثية بين سلالات الذرة الصفراء

وهجنها باستخدام مؤشرات الـRAPD .مجلة الانبار للعلوم الزراعية .المجلد:12 العدد (2).

30- محمد، مقداد شهاب أحمد ،(2010) . تحليل التباين الوراثي للبرتقال (Citrus sinensis L.) في العراق باستخدام مؤشرات RAPD الأساسية والمحورة. رسالة ماجستير، كلية العلوم/جامعة تكريت. العراق.

Determine the DNA fingerprinting and genetic distance of a number of genotypes to *Vicai faba*. L by using the RAPD-PCR markers

Rafea Z .Mukhlif Al-Sugmiany[1] , Akeel H. Ali Al-Assie[1] , Jassim M.Azez. AL-Joburi[2]

[1] *Department of Biology , College of Science , Tikrit University , Tikrit , Iraq*

[2] *Dept. of Field Crops College of Agriculture , Tikrit University , Tikrit , Iraq*

Abstract

Objective: This study aimed to determine the DNA fingerprinting and the genetic distance of eight pure genotypes of the *Vicai faba* from the ICARDA using Markers Randomly Amplified Polymorphic DNA-PCR (RAPD-PCR).

The materials and methods: The DNA was extracted from the young leaves of the samples after (45) days of cultivation. The concentration and purity of the DNA was measured using the Nanodrop device. The RAPD-PCR markers were applied to the DNA of the eight genotypes using 34 randomly primers results. It was exposed to ultraviolet radiation, photographed with a digital camera and stored in computer images.

Results: The used primers (829) produced a bands of (176) general bands and (653) polymorphic bands. Genetic fingerprinting of most genotypes was identified by a number of unique bands of (72) bands, of which 50 were unique and 22 were absent. The G2 had the highest number of unique bands of 11 bands. On the lowest number of unique bands, one bands is available. The absent bands have the highest G4 (6) bands. In contrast, G1 and G6 have no absent bands, and the primers varied in the resulting bands sizes. (100-2500 bp) showed that the values of the genetic distance ranged between (0.275 -0.664), where there was a less genetic distance between the genotypes G3, G6 (0.275). This is the highest similarity between the two genotypes in the study. The highest genetic distance was 0.664 between the G5 and G7.

Conclusion: The studied genotypes were characterized by the existence of a high genetic variation among them. All genotypes were characterized by a distinctive bands (unique and absent bands), determined the genetic distance and the genetic tree between the genotypes for use in the plant's internal inbred line programs. The RAPD markers showed high efficiency in DNA fingerprinting And the genetic distance of the studied genotypes.