الفصل الأول

المقدمة
Introduction

يتبع نبات البرسيم الحجازي (*Medicago sativa* L.) العائلة القرنية (Fabaceae) ، وتعتبر هذه العائلة من أهم العائلات ذات القيمة الاقتصادية حيث تعتبر مصدر غذائى غنى بالبروتين للإنسان والحيوان، وهو من أهم محاصيل العلف على مستوى العالم، ويحتل المرتبة الأولى بين محاصيل العلف في المملكة العربية السعودية لتميزه بمميزات عديده جعلت من الصعب منافسته من قبل محاصيل العلف الاخرى، كما إنه من أكثر المحاصيل ملائمة للزراعه والتأقلم والنمو في بيئات مختلفة ويتحمل الجفاف والملوحة والظروف البيئية القاسيه بالأضافة الى مقدرته العالية على الانتاج وأرتفاع نسبة البروتين والفيتامينات والأملاح المعدنية في العلف. وقد أدى التطور الذي تشهده المملكة في مجال الثروة الحيوانية الى زيادة الطلب على البرسيم الحجازي، لذلك أصبح لزاماً على المختصين والباحثين في مجال تغذية الحيوان تقديم الابحاث والدراسات التطبيقية الهادفة إلى زيادة الانتاج وتحسين النوعية على السواء لأصناف البرسيم الحجازي.

تطورت الآن طرق تحسين الانتاج النباتى من المحاصيل حيث لجأ المهتمون بتربية النبات الى دراسة الإختلافات الوراثية بين أنواع وأصناف النباتات المختلفة واستخدام الطرق البيوكيميائية والجزيئية (biochemical and molecular Methods) لإنتخاب سلالات جديدة تحمل الصفات المحصولية المرغوبة فى وقت قصير بدلا من تجارب التهجين طويلة المدى والتي تتطلب جهداً ً كبيراً نسبياً. إن دراسة التباين الوراثى فى النباتات على أساس النتائج الجزيئية والبيوكيميائية يستخدم الآن بكثرة حيث أن التباين فى الخصائص الكمية المورفولوجية لايعطى تقدير حقيقى للإختلافات الوراثية كما أنها تتأثر بالبيئة المحيطة ولايمكن تعريفها الا فى مرحلة محددة من مراحل نمو النبات بالإضافة الى أن التباين المتحصل علية قليل وغير كاف للإمداد بالمعلومات عن التنوع الحيوي (Biodiversity) داخل الأنواع والسلالات النباتية المختلفة (Yang and Quiros, 1993 and Trtineni *et al*., 1996) وذلك بعكس الدلائل الجزيئية فهي لا تتأثر بالبيئة بالاضافة لإمكانية استخدامها فى أى مرحلة من مراحل نمو النبات (Cao *et al*., 2001 and El-Rabey *et al*., 2006 & 2009a) .

وقد ظهرت في الفترة الأخيرة العديد من التقنيات الحديثة ذات قدره وكفاءة عالية في تعريف وتميز الكائنات، فهي تعطي دلائل واضحة كما أن التباين المتحصل عليه من هذه الدلالات كبير، وتعتبر المعلومات الناجمة عن هذه التقنيات الحديثة ذات أهمية كبيره في المستقبل لعمل بنوك لحفظ الأصول الوراثية ومراكز لتحسين إنتاجها، كما أنها تساعد على إختيار الأصناف عالية الجودة لإنتاج أصناف جديدة ذات صفات جيدة.

يعتبر الفصل الكهربي للبروتين على هلام عديد الإكريلاميد [Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)] واحداً من التقنيات العديدة التي استخدمت في تقييم التنوع الوراثي ودراسة العلاقات الوراثية للعديد من الأصناف والأنواع والأجناس النباتية وغيرها من الكائنات (Laemmli, 1970). كما أتاح أيضاً اكتشاف الإستنساخ المعملى لجزئ الدنا (DNA) عن طريق تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) إلى تطوير واسنباط عدة طرق جزيئية تستخدم فى تحديد البصمة الوراثية والإختلافات الوراثية بين الكائنات ومن أكثر تلك الطرق شيوعا تلك التى توصل اليها (Williams *et al*., 1990 and Welsh and McClelland, 1990) باستخدامه عدد من البوادئ (Primers) العشوائية التتابع النيوكليتوتيدى. أطلق على تلك الطريقة اسم تقنية التضخيم العشوائى المتباين للدنا (Random amplified polymorphic DNA) RAPD حيث يتم فحص التباين بين العينات المختلفة من خلال عدد وطول الحزم التى يمكن استخدامها كدلائل جزئية وراثية (Molecular Genetic markers).

(1-1) : الهدف من الدراسه The aim of the study

يتميز البرسيم الحجازي بوجود عدد كبير من الأصناف التي تختلف عن بعضها البعض، وترجع الإختلافات بين الأصناف الى الاختلافات في التراكيب الوراثية لهذه الأصناف وسلوك هذه التراكيب في النباتات المختلفة. وتتطلب برامج التربية معرفة خصائص الشكل الظاهري للأصناف المختلفة كما تتطلب معرفة تركيبها الوراثي، لذلك أجريت هذه الدراسة بهدف دراسة التنوع الوراثي بين بعض أصناف البرسيم الحجازي التي تزرع في المملكة وعمل بصمة وراثية لهذه الأصناف والتي يمكن أن تستعمل كمصدر للأصول الوراثية لاستنباط أصناف عالية الإنتاجية وذلك باستخدام تقنية التضخيم العشوائى

المتباين للدنا (RAPD) والفصل الكهربى للبروتينات (SDS-PAGE) ودراسة بعض الصفات المورفولوجية لهذه الأصناف وذلك من خلال:

1- إيجاد البصمة الوراثية الجزيئيه والبيوكيميائية لعشره أصناف من البرسيم الحجازي باستخدام تقنية التضخيم العشوائي المتباين (RAPD) لمقاطع الـــDNA كدلائل جزيئيه ودلائل الفصل الكهربي للبروتينات (SDS-PAGE) كدلائل بيوكيميائيه .

2- دراسة بعض الصفات المورفولوجية لأصناف البرسيم الحجازي العشره قيد الدراسه عن طريق تعريف وقياس بعض صفات الشكل الظاهري.

3- تقدير العلاقات الوراثية بين الأصناف موضع الدراسة من خلال بناء شجرات القرابة الناتجة من التحليل التجميعي (Cluster analysis) لبيانات RAPD وبيانات SDS-PAGE وبيانات الشكل الظاهري مستقلة ومجتمعة.

الفصل الثاني

الدراسات السابقة

Review of literature

يعتبر البرسيم الحجازى (*Medicago sativa* L.) من أهم محاصيل العلف في العالم (Sumberg *et al*., 1983 and Rumbaugh *et al*., 1988) وهو من أقدم محاصيل العلف البقولية التى عرفتها البشرية ويزرع في الجزيرة العربية منذ الاف السنين، ولا يزال حتى الان أحد أهم محاصيل العلف نظرا لأهميته الإقتصادية العالية . يحتل البرسيم الحجازي المرتبة الأولى بين محاصيل العلف في المملكة العربية السعودية على الرغم من وجود محاصيل علف أخرى منتجة مثل الشعير والذره الرفيعه وهو يمتاز بمميزات عديده جعلت من الصعب منافسته من قبل محاصيل العلف الأخرى فهو يعتبر من أكثر المحاصيل ملائمة للزراعة والتأقلم والنمو في بيئات مختلفة فضلا على قيمته الغذائية المرتفعه لإحتوائه على نسبةعالية من البروتين والاملاح المعدنية والفيتامينات مثل فيتامين د، هـ ، و ك ومقدرته العالية على الإنتاج ، كما أنه يعطى محصول علف أخضر طول العام (Al- Doss, 2003 and Al-Doss and Alsuhaibani, 2003). وبما أنه من محاصيل العائلة البقولية (Fabaceae) فإنه يعتبر مصدراً هاماً للنتروجين الحيوى المثبت فى التربة لذا فهو يستخدم في تحسين خواص التربة بالإضافة الى تحمله الجفاف والملوحة والظروف البيئيه القاسيه .

معظم أنواع البرسيم المنزرعة فى العالم تتبع النوع *M. sativa* أو ما يعرف بالبرسيم الحجازى ذو الأزهار الأرجوانية وهناك أنواع أقل إنتشارا هى البرسيم الحجازى ذو الأزهار الصفراء. وترجع نشأة بعض أصناف البرسيم الحجازى إلى التهجين الطبيعى بين النوعين السابقين. وتعتبر الولايات المتحدة الأمريكية من أكبر البلاد المنتجة للبرسيم الحجازي في العالم وخاصة ولاية كاليفورنيا. ونظراً لإتساع إنتشار البرسيم الحجازى فى العالم وتأقلمه في بيئات مختلفة فقد ظهر منه عدد كبير جدا من الأصناف تختلف فيما بينها من حيث طول موسم النمو وقدرتها على النمو ومتطلباتها البيئية وترجع

الإختلافات بين الاصناف الى الاختلافات في تركيبها الوراثي وسلوك هذه التراكيب الوراثية في النباتات المختلفة (Maureira *et al*., 2004)

ينمو البرسيم الحجازى بنجاح فى ظروف مناخية متباينة طالما توفرت مياه الرى إذ أنه له القدرة على تحمل الحرارة المرتفعة والبرد القارس ولو أن نموه يتأثر فى كلا الحالتين. وعموماً يعتبر المناخ المعتدل شبه الجاف مثاليا بالنسبة لإنتاج البرسيم الحجازى إذ أن النمو المثالى يحدث فى درجات حرارة النهار ما بين 15–25 °م ودرجة حرارة الليل ما بين 10– 20 °م. أما من حيث التربة الملائمة فينمو البرسيم الحجازى فى معظم أنواع الأراضى الرملية إلى الطينية ولكنها تعطى أجود محصول عند زراعتها فى الأراضى المختلطة العميقة جيدة الصرف وذات القدرة المتوسطة على الإحتفاظ بالرطوبة. أما فى الأراضى الرملية فتزداد حاجة النبات للتسميد والرى حتى يعطى محصولاً جيدا (Al- Doss, 2002).

شهدت المملكة العربية السعودية توسعاً كبيراً في زراعة وانتاج البرسيم وقد أدى التطور الذي تشهده المملكة في مجال الثروة الحيوانية الى زيادة الطلب على البرسيم الحجازي لتوفير الغذاء اللازم للماشية مما ساعد على تحول الكثير من المزارعين لزراعة البرسيم الحجازي بالرغم من سياسة وزارة الزراعة في الحد من التوسع في زراعة المحاصيل ذات الاحتياج المائي الكبير (Al- Doss, 2003).

إن معدل إنتاج البذور من الأصناف المحلية مثل الصنف الحساوي تراوحت مابين 100–150 كليوجرام/هكتار بينما إنتاج الأصناف المستورده تراوح ما بين 600 إلى 800 كيلوجرام/هكتار كما كان الصنف الحساوي عموماً أقل من الصنف التجاري كاف 101 في نسبة عقد القرون ومحصول البذور. لقد كان لانخفاض انتاج البذور من الأصناف المحلية من البرسيم الحجازي دور في تقلص استخدامها في زراعة المشاريع الزراعية (Al-Doss and Alsuhaibani, 2003) ، لذلك فإن من الأهمية أن يعمل مربوا النبات في كثير من دول العالم على إدخال تحسينات على السلالات والأنواع المختارة منها وإنتاج أصناف جديدة أكثر ملائمة لظروف البيئة وأكثر إنتاجية للعلف ذو النوعية الجيدة (Al-Doss, 2002 & 2003).

(2-1): الدلائل الجزيئية القائمة على التضخيم العشوائي لقطع الـ DNA RAPD molecular markers

تشهد الثورة العلمية في العصر الحاضر تطور كبير في مجال البيولوجيا الجزيئيه فقد تطورت فى العقدين الأخيرين عدة طرق جزئية لتحديد البصمة الوراثية للدنا (DNA Fingerprinting) والتعرف على التنوع الوراثي ورسم الخرائط الوراثية بالإضافة الى التطور الملحوظ في تربية النباتات، وقد أتاح اكتشاف تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل (Polymerase chain reaction PCR) تطوير عدة طرق ومن أشهرها طريقة التضخيم العشوائى لمقاطع DNA المتباينة (RAPD) التي أكتشفها Williams *et al*., (1990) و Welsh and Mc-Clelland (1990)، حيث يتم التفاعل في جهاز التدوير الحراري (Thermo-Cycler) ثم تفصل قطع DNA التى تم تضخيمها كهربيا على هلام الأجاروز Agaros gel ويمكن مشاهدتها كحزم (Bands) مختلفة الطول عند صبغها ببروميد الايثيديم (Ethidium bromide) وفحصها بالأشعة فوق البنفسجية (UV) بحيث يمكن إستنتاج التباين على أساس وجود أو غياب القطع المتضحمه (Amplified product).

تختلف الطرق المعتمدة على تفاعل البلمرة المتسلسل عن بعضها في طريقة عملها ومن أكثرها إستخداماً طريقة RAPD بالإضافة الى الطرق التالية:

1- التباين في أطوال مقاطع DNA المستنسخة (AFLP) Amplified Fragment Length Polymorphism (Zabeau and Vos, 1993)
2- التتابعات البسيطة المتكررة Simple Sequence Repeats (SSR) (Tautze, 1989)
3- التتابعات البينية البسيطة المتكررة (ISSR) Inter Simple Sequence Repeats (Kantety *et al*., 1995)

تتميز تقنية الـ RAPD بسهولتها وقلة تجهيزاتها كما أنها آمنة لعدم الحاجة لإستخدام مواد مشعة (Wolfe and Liston, 1998; Powell *et al*., 1995) ومن مميزاتها أيضاً أنها تتطلب كمية

قليلة من DNA ، ولاتتطلب معرفة مسبقة عن تتابع القواعد النيوكليوتيدية فى المجين (genome) كما أنها تتميز بامكانية استخدام عدد غير محدود من البوادئ (Bustos *et al*., 1998 & 1999) ، لذلك نجد أنها واسعة الإستخدامات حيث تستخدم فى مجال تربية النبات والحيوان. ويفيد استخدام تقنية RAPD فى تحديد البصمة الوراثية للعديد من الكائنات وفى تقييم التباينات بين الأفراد وعزل الدلائل الفريدة والمميزة لهم (Williams *et al*., 1990 and Al- Mutairi, 2005). كما إنها مفيدة في تعريف أنواع وأصناف النباتات المختلفة وتحديد العلاقات الوراثية بينهم فهى قادرة على التمييز بين النباتات حتى داخل النوع الواحد(Al- Hussainin, 2007 and Marijana *et al*., 2008) .

يتحكم في عدد وطول ووضوح حزم RAPD الناتجة عدد من العوامل المؤثرة منها تركيز البادئ، تركيزانزيم البلمرة DNA polymerase *Tag* ، تركيز DNA، وتركيز كلوريد المغنسيوم، درجة حرارة اللحام (Annealing temperature) ومدة اللحام (Annealing time) وعدد الدورات (Number of cycles). وجد Zhang *et al*., (1996) أن التركيز المنخفض من إنزيم البلمرة *Tag* DNA polymerase يظهر حزم غير واضحه، في حين تؤدي زيادة تركيز الإنزيم من وحدة واحده الى وحدتين إلى زيادة عدد الحزم التي تتميز بالوضوح. أما بالنسبة لتركيزكلوريد المغنيسيوم فقد قام Williams *et al*., (1990) باختبار حزم RAPD عند التراكيز 1,5 ، 2 ، 2,5، 3، 3,5 و 4 مليمول من كلوريد المغنيسيوم ووجد أن التركيز المناسب لمعظم البوادئ يتراوح ما بين 1,5و3,5 مليمول وأن زيادة تركيز كلوريد المغنيسيوم إلى 4,5 مليمول يمكن أن تثبط بناء DNA.

من ناحية أخرى فإن التركيز المناسب من DNA غير محدد لجميع البوادئ (Devos and Gale, 1992)، وقد اتضح أن تركيز DNA بين 25 و100 نانوجرام للتفاعل المحتوي على 100 ميكرولتر يعطي نتائج واضحه وأن التركيز المنخفض لاينتج حزم واضحه لفشل البادئ في الالتحام بـDNA لقلة مواقع الالتحام (Welsh and McClelland, 1990) بينما تؤدئ التركيزات الأعلى من ذلك لتثبيط التفاعل (Wilkie *et al*., 1993) .

يشترط أن يكون الـ DNA المستخدم في تفاعل RAPD عالي النقاوة وخالي من الحامض النووي الريبوزي RNA حيث أنه اذا وجد في التفاعل يتنافس مع DNA في الالتحام بالبادئ مما يؤدي

الى ظهور حزم ضعيفة وهالة تغطي نتائج الفصل الكهربي لذلك يجب معاملة DNA بـــإنزيم RNase للحصول على نتائج جيدة (Zhang *et al*., 1996) بالإضافة إلى ذلك فقد وجد أن درجة حرارة اللحـــام مابين 33°م–36°م هي درجة الحرارة المناسبة لعدد كبير من البوادئ للإلتحام بـــDNA، أما رفع درجة حرارة اللحام الى 40°م فلا ينتج عنه حزم واضـــحه (Williams *et al*., 1990 and Wilkie *et al*., 1993) كما أن زيادة الحرارة أعلى من ذلك تؤدي لفشل عملية اللحام (Devos and Gale, 1992).

يشترط أيضاً في البوادئ العشوائية التتابع (Arbitrary sequence) أن يكون محتوى البادئ من قواعد السيتوسين Cytosine والجوانين Guanine (C+G) مابين 60 و80 ٪ ، وأن لا يكـــون تتـــابع البادئ في الاتجاه ´3 ← ´5 مكمل لتابعه بالاتجاه المعاكس ´5 ←´3 ، أي عدم إكمال البـــادئ لتتابعـــه المتناوب (Palindromic sequences) بالإضافة إلى ذلك لابد أن يكون البادئ قصير مـــن 9 –10 نيوكليوتيدات (Williams *et al*., 1990)، ولذلك ينبغي قبل استخدام البوادئ لانتاج الـــدلائل الوراثيـــة اختبار فرص التحامها بـــDNA حيث أن قلة مواقع التحام البوادئ يؤدي لقلة نواتج التفاعل، مع العلم أنه من سلبيات هذه التقنية حساسيتها الشديدة لظروف التفاعل (Devos and Gale, 1992) ولتفـــادى هـــذه المشكلة لابد من إجراء مكررات لكل عينةDNA للتأكد من ثبات الحزم الناتجة (Virk *et al*.,1995) .

تعتبر تقنية RAPD من أنســـب الطرق الجزيئيـــة لبنـــاء الخرائط الوراثيـــة (Genetic map) كما تفيد في تعريف الأصناف في برامج تربية النبات (Kiss *et al*., 1993) بالأضـــافة لـــبعض الدلائل الأخرى مثل دلائل الشكل الظاهري والتتابعات البسيطة المتكررة مما يحسن فاعلية برامج تربيـــة النبات باختيـــار الـــدلائل المحـــددة (Marker-assisted selection (MAS المرتبطـــــة بالصـــفة المرغوبة. ولدلائلRAPD أهمية خاصة في
توصيف الأنواع والأصناف وتحديد العلاقات الوراثية بينهما، فهي قادرة على التمييز بين النباتات حتـــى داخل النوع الواحد (Demeke *et al*., 1992 and Bolaric *et al*., 2005) كما يمكن استخدامها فـــي إيجاد التباين الوراثي بين النباتات الناتجة من مزارع الأنسجة بالإضافة الى تحديد البصمة الوراثية للعديد من النباتات (El- Rabey, 2006) وإيضاح العلاقات الوراثيـــة المتفقـــة مـــع النســـب (Pedigree) المعروف عن هذه النباتات (Fernāndez *et al*., 2002 and Musial, *et al*., 2002).

ولقد أشار الباحث Willams *et al*., (1990) إلى إمكانية الحصول على بصمة وراثية عن طريق إحداث تضاعف عشوائي متباين للدنا (RAPD) باستخدام بادئ مفرد ذو ترتيب عشوائي من النيوكليوتيدات بواسطة تقنية PCR. وأوضح هؤلاء الباحثون أن وجود مقدار ضئيل من الإختلافات بين اثنين من الجينوم يعطي بصمة وراثية مختلفة لكل منهما وأن حزم الدنا المتضاعفة والمشتركة في عدد من الافراد وفي نفس الوقت غائبة في أفراد أخرى تعتبر دلالات متباينة (polymorphic markers) مما يمكن من استخدامها في تقدير العلاقات التطورية والتصنيفية بين الكائنات المختلفة.

لقد أجريت العديد من الدراسات عن البصمة الوراثية والتنوع الوراثي بين أنواع وأصناف كثيراً من النباتات. ومن ذلك تحديد العلاقات الوراثية بين أنواع من جنس *Brassica* (Demeke *et al*., 1992)، وتعريف وتصنيف أصناف الكرفس *Apium graveolens* L. (Yang and Quiros, 1993) وتقدير التباين الوراثي بين ثلاثة أنواع من جنس القهوة *Coffea* (Orozco-Castillo *et al*., 1994) و لتقييم التنوع الوراثي لعشائر الشاي (Wachira *et al*., 1995)، وأصناف القرنبيط Cauliflower و الملفوف Cabbage (Margale *et al*., 1995) وللتمييز بين نوعين من القطن هما *Gossypium hirsutum* و *G. Barbadense* (Tatineni *et al*., 1996) وتعريف أصناف البطاطا من جنس *Dioscorea* من ماليزيا واليابان (Isa, 2000).

كما استخدمت دلائل RAPD لتقييم التنوع الوراثي في اللوبيا *Vigna radiate* L. (Lakhanpaul *et al*., 2000) ولتقدير المسافة الوراثية لأصناف الفلفل *Capsicum annuum* (Lefebvre *et al*., 2001)ولتقدير العلاقة الوراثية لأصناف من الذرة الرفيعة (Abdel-Tawab *et al*., 2001) ، والشعير(Terzi *et al*., 2001) ولتعريف نوعين من أصناف الملوخية هما *Corchorus olitorius* و *C. capsularis* (Hossain *et al*., 2002)، ولدراسة التنوع الوراثي لأصناف من نبات الزيتون *Olea europaea* (Gonzalo-Claras *et al*., 2000 ; Belaj *et al*., 2001 & 2002 and Saeed *et al*., 2005) وللتمييز بين عدد من أصناف نخيل التمر جمعت من المغرب (Sedra *et*

(*al*.,1998) ومن مصر (Soliman *et al*., 2003) وأظهرت النتائج تبايناً ضعيفاً داخل التجمعات المغربية وفسر هذا على طريقة الحفاظ على الأصول الوراثية لنخيل البلح في المغرب بالإضافة على عدم إدخال أصناف جديدة. كما استخدمت الدلائل الجزيئية لتقييم التنوع الوراثي بين اصناف القمح المختلفة من حيث مقاومتها للحرارة (Motawei *et al*., 2007).

كما استخدمت دلائل RAPD مع دلائل التتابعات البسيطة المتكررة SSR لتحليل الاختلافات الوراثية بين بعض أصناف الفول السوداني *Arachis hypogaea* (Raina *et al*., 2001) واستخدمت أيضاً مع دلائل SSR و ISSR لتقييم التنوع الوراثي لأصناف القطن *Gossypium hirsutum L*. (Wu *et al*., 2001) .

كذلك استخدمت دلائل RAPD، مع دلائل AFLP وSSR ايضاً لتقييم العلاقات الوراثية بين 46 مدخلا من الذرة الرفيعة *Sorghum bicolor* من جنوب أفريقيا (Uptmoor *et al*., 2003) بينما استخدمت دلائل RAPD وSSR وRFLP والمتشابهات الإنزيمية Isozymes لبناء الخرائط الوراثية لنبات البطيخ *Citrullus lanatus* (Hashizume *et al*., 2003)

استخدمت دلائل RAPD كدلائل جزيئية مع أنماط الفصل الكهربى للبروتين PAGE لتعيين الاختلافات الوراثية بين نوعين من البرسيم هما البرسيم الحجازي(*Medicago sativa*) والبرسيم بوليمورفا *Medicago polymorpha* (Barakat *et al*., 1999) وفي بعض أصناف من الشعير (Faccioli *et al*., 1999)، ولتقييم التنوع الوراثي بين سبعة أنواع من جنس *Brassica* (Ibrahim, 2003) .

استخدمت دلائل RAPD لتحديد العلاقات الوراثية ولتقييم التنوع الوراثي في بعض محاصيل الفاكهة فقد استعمل Bhat *et al*., (1995) 60 بادئ ذو تتابع عشوائي للتعرف على التنوع الوراثي بين 57 سلالة من الموز، كما استخدمت أيضاً هذه التقنية لتقييم التنوع الوراثي لموز شرق أفريقيا (Pillay *et al*., 2001) ولإستنباط درجات التشابه والعلاقة الوراثية لمجموعة من اشجار المانجو (Schnell *et al*., 1995).

استخدم Hassan *et al*., (2002a) أيضاً تقنيتي الهجرة الكهربية للبروتين والتضخيم العشوائي المتباين للدنا للتعرف على البصمة الوراثية ودرجات التشابه لسبعة أصناف من أشجار الجوافة التي تنمو في مصر. أوضحت النتائج أن طرز حزم البروتين المفصول من الأوراق كانت ذات فاعلية متوسطة في تعريف أنواع الجوافة قيد الدراسة، بينما كانت تقنية RAPD ذات فعاليه كبيره حيث نجحت أربعة بادئات في تميز تلك الأصناف وإن كانت بعض البادئات اكثر قدرة عن غيرها من باقي البادئات .

تم عمل البصمة الوراثية القائمة على التباين في أنماط البروتين والتضخيم العشوائي المتباين في الدنا لأحد عشر منتخباً تمثل 6 أصناف من الخوخ المنزرع بمصر حيث تم حصر 147 حزمة متباينة منها 30 حزمة متفردة. وقد أعطت كل البادئات حزم متفردة ما عدا البادئ OPA- 07 وقد استخدمت هذه الحزم لتمييز منتخبات الخوخ، كما أنه لم يعطي بادئ واحد طرز متفردة تميز الأصناف قيد الدراسة. وقد استخدمت النتائج المجمعة من التباين في حزم البروتين والبادئات العشوائية لعمل شجرة القرابة (Hassan *et al*., 2002b).

استخدمت دلائل RAPD لتصنيف كثير من محاصيل الحبوب ذات الأهمية الاقتصادية ولتحديد العلاقات الوراثية بينهم فقد استخدم (Tinker *et al*., 1993) دلائل RAPD لتحليل التشابه الوراثى بين أصناف الشعير الربيعى حيث تم اختبار 33 بادئ انتج 14 بادئ منها 31 حزمة متباينه تم استخدمها كدلائل وراثية بينما أنتج 19 بادئ حزم متطابقة لكل الأصناف وأشارت الدراسة الى أن دلائل RAPD تعطي معلومات عن التشابهه والإختلاف الوراثي بين الأصناف أكثر مما يمكن معرفتة من خلال بيانات النسب.

ومن تطبيقات دلائل RAPD أيضاً ما قام به كل من Lashermers *et al*., (1994) و Sivolap and Kalendar (1995) و Arii *et al*., (1995) لدراسة التباين الوراثي بين بعض أصناف الشعير حيث قاموا ببناء شجرة علاقات القرابة بين هذه الأصناف من خلال تلك الدلائل.

قام Virk *et al*., (1995) بتقدير التنوع الوراثى بين 12 مدخلا (accession) من الأرز *Oryza sativa* باستخدام 24 بادئ كما استخدم (Oliveira *et al*.,1999) 60 بادئ لتحليل الاختلاف

الوراثى بين ثمان عشائر من الأرز *Oryza rufipogan* من الصين والبرازيل ،وانتجت تلك البوادئ 78 حزمة متباينة وأظهرت مستوى عال من التباين بين العشائر وتميزت العشائر الصينية بمستوى تباين أعلى من تباين العشائر البرازيلية.

استخدم الباحثين Gourmet and Rayburn, (1996) دلائل RAPD لتعريف بعض عشائر الذرة المكسيكية التي تملك مجموعة الصبغيات ب (B-Chromosomes) وقد تمكن 17 بادئ منها في تمييز الأصناف المحتوية على هذه الصبغيات عن الأصناف التي لا تملك تلك الصبغيات. كما استخدمت دلائل RAPD، مع دلائل AFLP وSSR لتحديد البصمة الوراثية لأصناف من الذرة الشامية *Zea mays* L. (Rady, 2001) قد أنتج 40 بادئ 527 حزمة في أصناف الذرة الشامية منها 414 حزمة متباينة بنسبة 78.6 ٪ ، واتفقت نتائج RAPD مع AFLP و SSR على تقسيم الطرز الوراثية إلى مجموعتين رئيستين.

كما أجرى Russell *et al.*, (1997) دراسة لتحديد العلاقات الوراثية بين 18 صنفاً من الشعير المزروع، باستخدام دلائل RAPD و RFLP و AFLP و SSR ومقارنة نتائج تلك الدلائل مع علاقات النسب وقد تمكنت الطرق الجزيئية الأربعة من تحديد البصمة الوراثية لكل الأصناف كما أوضحت النتائج تطابق بيانات نسب الأصناف مع بيانات الطرق الجزيئية الأربع.

استخدم Hang *et al.*, (1997) عدد 16 بادئ عشوائي من بين 22 بادئ تم اختبارهما لدراسة العلاقة الوراثية بين ستة أصناف من الشعير، وقد انتجت هذه البوادئ 422 حزمة ثابتة .

أجرى Baum *et al.*, (1997) دراسة لتحديد التنوع الوراثي لعدد 88 طراز وراثي من 20 عشيرة من الشعير البري في فلسطين وتركيا وإيران باستخدام تقنية RAPD و33 بادئ عشوائي ، انتجت 22 منها 86 حزمة متباينة تراوح طولها بين 271–1558 زوج قاعدة بعدد يتراوح من حزمة واحدة إلى 11 حزمة لكل بادئ وقد أشارت النتائج الى عدم ظهور فروق بين الأصناف قيد الدراسه لأن معظم الأختلاف الوراثي (97 ٪) وجد داخل العشائر.

أجرى Bustos *et al*., (1998) دراسة على 102 عشيرة تمثل أربع أنواع من الشعير في أسبانيا وذلك باستخدام دلائل RAPD. أظهرت النتائج أن من بين 64 بادئ استخدمت في هذه الدراسة، أنتجت فقط 10 بوادئ 250 حزمة بعدد يتراوح بين 8 و 49 حزمة لكل بادئ . أيضاً قام شومان ولآخرون (2001) بتقييم التنوع الوراثي في 23 طراز وراثي من الشعير السوري باستخدام ستة بوادئ أظهرت 23 حزمة متباينة سمحت بالتمييز بين جميع الطرز الوراثية، وقد تباين مستوى الاختلافات الوراثية بين الطرز الوراثية وداخلها.

استخدم Faccioli *et al*., (1999) أنماط الفصل الكهربي لبروتين الشعير هوردين (Hordein A-PAGE) كدلائل كيميائية حيوية ودلائل AFLP و RAPD كدلائل جزيئية لتحديد البصمة الوراثية للشعير. وقد أشارت الدراسة إلى أن استخدام دلائل AFLP و الـ RAPD أداة جيدة للبصمة الوراثية، في حين تم استثناء البصمة الوراثية المعتمدة على الفصل الكهربي للبروتين هوردين بسبب إنحلاله.

كما استخدم Aly *et al*., (2000) تقنيتي الهجرة الكهربية للبروتين والتضخيم العشوائي للدنا لتقدير التباين الوراثي لعدة أصناف من الأرز المصري من أصل آسيوي، بعضها ذات تركيب وراثي هندي وبعضها من أصل ياباني. وكشفت النتائج عن تباين قليل في أنماط البروتين وأن هذا التباين غير كافي للتمييز بين الأصناف قيد الدراسة بينما أعطت تقنية التضخيم العشوائي المتباين تباين كبير بين هذه الأصناف.

ومن الأمثلة أيضاً على استخدام دلائل RAPD في محاصيل الحبوب تقييم الاختلافات الوراثية بين ستة أصناف من القمح باستخدام 26 بادئ ، حيث تم تقسيم الأصناف إلى ثلاث مجموعات، وتراوح التشابه الوراثي من 41٪ إلى 84٪ (Barakat *et al*., 2000)، كما استخدم Cao *et al*., (2000) هذه التقنية لتحديد العلاقات الوراثية بين خمس مجموعات من القمح سداسي المجموعة الصبغية Hexaploid wheat غير واضحة التصنيف وقد تطابقت نتائج RAPD مع التصنيف الظاهري للمجموعات كما حددت التشابه الوراثي بينها. وفي دراسة عن استخدام دلائل RAPD في تمييز أصناف من القمح مقاومة للتبقع بفطر *Septoria nodorum* باستخدام بادئين وجد Cao *et al*., (2001) شريطتين فريدتين في أنماط الفصل الكهربي لنواتج RAPD في الأصناف المقاومة دون الأصناف القابلة للإصابة.

استخدم Hassan, (2001a) تقنية التضخيم العشوائي لأجزاء من الدنا والهجرة الكهربية للبروتين المخزن في البذور لعمل البصمة البيوكيميائية والجزيئية لتسعة أصناف من فول المانج (*Vigna radiate* L.). وقد أظهرت حزم البروتين الناتجة مستوى تباين منخفض مما يجعلها غير مؤثرة في التمييز بين هذه الأصناف. ورغم هذا فإن الحزم الناتجة لها طرز خاصة يمكن استخدامها كبصمة بيوكيميائية عامة لفول المانج. بينما كشف التضخيم العشوائي لأجزاء من الدنا مستوى عالي من التباين حيث أعطت ستة بوادئ 100 حزمة متباينة و 30 حزمة متفردة وقد أمكن تمييز كل الأصناف قيد الدراسة بحزمة متفردة أو أكثر. استخدمت هذه النتائج في عمل شجرة القرابة وتحديد درجات التشابه بين هذه الأصناف.

درس Hassan, (2001b) درجات الأختلاف والتشابه بين أحد عشر صنف من العدس (*Lens esculenta* Moench) على أساس التباين في أنماط البروتين المخزن في البذور وحزم الدنا. كشفت النتائج عن تباين قي المنطقة ذات الوزن الجزيئي من 85 إلى 66.2 كيلو دالتون . كما أظهر التحليل باستخدام تقنية RAPD نتائج واضحة حيث نجحت ست بوادئ منها في إنتاج أنماط من حزم الدنا ذات تباين كبيربالإضافة انتاج 25 حزمة متفردة من بين 112 حزمة متباينة. وقد أوضحت نتائج هذه الأبحاث الى أن دلائل RAPD تعتبر أداة جيده لعمل بصمه وراثيه والتمييز بين أصناف العدس قيد الدراسه في حين أظهرت نتائج التفريد الكهربى للبروتين مستوى منخفض من التباين وأوضح الباحثون أنه يمكن اعتبار أنماط البروتين بصمة عامة لهذه النباتات.

استخدم Barakat (2004) التباين في أنماط البروتين والتضخيم العشوائي المتباين للدنا للتمييز بين 6 أصناف من فول الصويا (*Glycine max* L.). أوضحت الدراسة وجود تباين قليل بين أنماط البروتين المستخلص من بذور هذه الأصناف، بينما أعطت نتائج الدلائل الجزيئية RAPD باستخدام 4 بادئات تباين واضح. وقد أعطت هذه البادئات 60 حزمة متباينة منها 30 حزمة متفردة و30 حزمة مختلفة المظهر. وبدمج نتائج البروتين والتباين العشوائي أمكن حساب درجات التشابه والإختلاف بين هذه الأصناف.

استخدمت أيضا تقنية SDS-PAGE مع دلائل المشابهات الإنزيمية Isozymes والتضخيم العشوائي المتباين للدنا RAPD (Barakat and Elham, 2004) للتعريف والتميز بين نوعين من القطن احدهما بري تم جمعة من المملكة العربية السعودية وهو *Gossypium hersutum* وبين عدد من أصناف القطن المنزرعة في مصر والتابعة للنوع *Gossypium barbedense* وأوضح الباحثان أنه باستخدام أربعة بوادئ عشوائية أمكن الحصول على بعض الأشرطة الفريدة التي استخدمت للتمييز بين النوعين.

ومن تطبيقات RAPD الدراسة التي أجراها Xin-ming and Xiao-liang (2005) على ثمانية أصناف من *Pennisetum* لدراسة العلاقات الوراثية بينهم باستخدام 19 بادئ عشوائي حيث أنتجت 111 حزمة عشوائية بنسبة تباين 65.7٪ مما يدل على وجود تباين وراثي كبير بين هذه الأصناف.

وأيضاً الدراسة التي قام بها Bolaric *et al*., (2005) لمعرفة الأختلافات الوراثية بين 22 صنف من ryegrass أحد محاصيل الأعلاف من أصول أوروبية حيث أعطت 6 بوادئ عشوائية عدد 165 من الدلائل المتباينة وكانت درجة التباين 88 ٪، كما أفاد الباحثون إلى أهمية هذه التقنية حيث أنها لا تتطلب معرفة مسبقة للتتابع الجينومي بالإضافة إلى أنه من خلال هذه التقنية يمكن عمل مسح شامل لكل الجينوم.

استخدم El- Rabey *et al*., (2006) وEl- Rabey, (2006) دلائل RAPD مع أنماط الفصل الكهربي للبروتين لعمل بصمة وراثية لسبعة أصناف من هجين الذره ولصنفين من أصناف القمح المتداولة في الزراعة المصرية على التوالي باستخدام تفاعل البلمرة المتسلسل للحمض النووي DNA بطريقة RAPD-PCR وكذلك تفريد البروتينات البذرية الذائبة في الماء. وقد أسفرت نتائج RAPD أن 22 بادئ عشوائي انتجت عدد 105 من قطع الحمض النووي المضاعف، منها 58 قطعة متشاركة و47 قطعة أبدت تبايناً في ظهورها بين أصناف الذرة محل الدراسة، بينما أعطى 11 بادئ من البوادئ المستخدمة في عمل البصمة الوراثية لصنفين القمح 45 دليلا شائعاً في كل من الصنفين ولذلك تكمن اهميتهم كبصمة وراثية ولا يستفاد منهم في التفريق بين الصنفين. أما بالنسبة إلى نتائج البروتينات الذائبة في الماء فقد أظهر

التفريد الكهربي لهجن الذرة وجود 19 حزمه من البروتينات منها عدد 2 حزمه ذات وزن جزيئي 56 و35 كيلو دالتون أبدت تبايناً بين أصناف الذرة وعدد 20 حزمة من البروتين في صنفين القمح قيد الدراسة منها 15 شائعين وخمسة مميزة لكل منهما. كما أظهرت التحاليل الإحصائية للبيانات الناتجة من كل من RAPD-PCR والتفريد الكهربي لبروتينات البذرة باستخدام برنامج SPSS تمكن الأدلة الوراثية المستخدمة في التميز بين الأصناف محل الدراسة مما يدعم من استخدامها لعمل البصمات الوراثية للأصناف الأخرى.

درس El- Rabey, (2008a) التصنيف الجزيئي لمجموعة من الشعير البري المصرية وذلك بعمل بصمة وراثية للحمض النووي DNA بطريقة RAPD-PCR والتحليل الكهربي لبروتين البذرة المختزن. أظهرت نتائج البصمة الوراثية أن22 بادئ عشوائي أعطت عدد 123 دليل منها 56 شائع ، بينما 67 الباقية متباينة . أما نتائج التحليل الكهربي لبروتينات البذرة التي تذوب في الماء فقد أظهرت عدد 25 وحدة بروتين 6 منهم شائعة بينهما والباقي متباينة الإنتشار. وبتحليل النتائج باستخدام برنامجي SPSS (Statical Package for Social Sciences), NTSYS-pc2 (Numerical Taxonomy System) نجحت الأدلة المستخدمة في فصل العينات محل الدراسة.

كما قام أيضاً El- Rabey, (2008b) بعمل دراسة تصنيفية على أسس بيوكيميائية وجزيئية على بعض الوحدات التصنيفية من جنس الشوفان *Avena* L. حيث قام بتحليل البروتينات التي تذوب في الماء بطريقة التفريد الكهربي و باستخدام 21 بادئ عشوائي وتقنية RAPD-PCR لعمل بصمة وراثية جزيئية للأصناف قيد الدراسة. وقد تمكنت الأدلة التصنيفية التي استخدمت في هذه الدراسة من التفريق بين الوحدات الجزيئية والبيوكيميائية للنوع الواحد.

قام Guirgis, *et al*., (2009) بدراسة التنوع الوراثي لعدد 12 صنف من أصناف القمح السداسي المصري وذلك باستخدام أحد عشرة صفة مورفولوجية وكذلك المعلمات الجزيئية مستعيناً بتقنية RAPD-PCR. أوضحت هذه الدراسة ظهور 115 علامة جزيئية ناتجة من البصمة الوراثية باستخدام 11 بادئ عشوائ في إثنى عشر صنفاً من القمح محل الدراسة، كان منها 88 علامة جزيئية متباينة الظهور بين الأصناف و 27 علامة جزيئية موجودة في كل الأصناف. وبتحليل النتائج باستخدام برنامج NTSYS-pc لدراسة العلاقات بين الأصناف أظهرت الدراسة نتائج متشابهه تقريباً من خلال دراسة كلا

من الصفات المورفولوجية والجزيئية لأصناف القمح محل الدراسة وعليه يمكن استخدام كل من الصفات المورفولوجية والجزيئية في تحديد الإختلافات الوراثية لهذه الأصناف.

ومن أمثلة استخدامات تقنية RAPD في المملكة العربية السعودية ما قام بـــه Askari *et al.*, (2003) حيث استخدم هذه التقنية مع السمات الظاهرية للثمار كالشكل والحجم واللون ، لإيجاد العلاقـــات الوراثية بين بعض أصناف نخيل التمر *Phoenix dactylifera* التي تنمو بالمملكة، وأشارت الدراســـة الى امكانية استخدام RAPD لتحديد التنوع الوراثى بين أصناف النخيل.

كما أظهرت نتائج دراسة أخرى قام بها AL-Khalifah and Askari, (2003) للتميزأيضـــاً بين أصناف نخيل التمر في المملكة وباستخدام 14 بادئ قدرة تقنية RAPD على كشف التباين بين الطرز الوراثية شديدة الارتباط وأظهرت امكانية هذه الدلائل الى جانب الصفات الظاهرية والمتشابهات الإنزيمية لتعريف الأصناف.

كما قام Al – Khalifah *et al.*, (2005) بدراسة ثمانية أصناف من نبات الثيل *Cynodeon dactylon* فى المملكة العربية السعودية من خلال مقارنة الخصائص الظاهريـــة واســـتخدام 20 بـــادئ RAPD، وأظهرت بيانات RAPD تباينا واضحا بين الأصناف كما أظهرت الأصناف درجة عالية من الأختلافات في شكلها الظاهري .

قام أيضاً Al – Mutairi, (2005) بتعريف عشرة أصناف من الشعيرالمحلي والمستورد وتحديد البصمة الوراثية لهم باستخدام نوعين من الدلائل، النوع الأول خصائص الشكل الظاهرى والثاني دلائل التضخيم العشوائي لمقاطع DNA المتباينة (RAPD) لهذه الأصناف وقد تم تحليل النتائج بطريقتين مـــن طرق التحليل التجميعي باستخدام برنامج الحاسوب NTSYS-pc. وقد تمـــت دراســـة ســـمات الشـــكل الظاهري بقياس 12 صفة كمية وثلاث صفات نوعية . اما تجارب RAPD فقد تـــم اختبـــار 11 بـــادئ تمكنت اربعة منها من انتاج 53 حزمة واضحة وثابتة منها 42 حزمة متباينة بنسبة 79.25 ٪ وتم تحديد الدلائل الجزيئية الفريدة والمميزة لبعض الأصناف دون غيرها والتي تفيد في تعريف أصناف الشعير .

استخدمت تقنية الهجرة الكهربية للبروتين مع دلائل RAPD و ISSR لإستنباط البصمة الوراثية لإحدى عشر صنف من أصناف العنب التي تنمو في المملكة العربية السعودية لتوضيح درجة القرابة بينهم وذلك باستخدام برنامج الحاسوبSPSS-11 (Al- Hussainin, 2007)، وأوضحت النتائج أن البصمة الوراثية باستخدام أنماط البروتين سجلت نسبة منخفضة من التباين قدرها 43.75 ٪ بينما أعطت الدلائل الجزيئية المستنبطة من نتائج التضخيم العشوائي المتباين للدنا فروقات واضحة في عدد الحزم وفي أطوالها الجزيئية حيث أعطى 19 بادئ عشوائي تباين واضح بين الأصناف قيد الدراسة ، أما بالنسبة لتقنية ISSR فقط أعطت خمس بادئات 55 حزمة متباينة منها ثلاث حزم متفردة.

(2-2): الدلائل الوراثية القائمة على التباين في أنماط البروتين:

Genatic markers based on protein patterns

استخدم التفريد الكهربى للبروتين على هلام عديد الاكريلاميد (polyacrylamid gel electrophoresis) PAGE بواسطة عدد كبير من الباحثين للتعرف على البصمة الوراثية البيوكيميائية لعدد من السلالات والانواع النباتية المتشابه ظاهرياً وتقدير درجات القرابة بينها (Ladizinsky and Hymowitz, 1979; Cook, 1984 & 1988; Krochko and Bewley, 1988; El-Shazly *et al*., 2006; Wael *et al*., 2008; Vural *et al*., 2009 and Siddiqui and Naz, 2009). إن فصل البروتينات بواسطة جهاز التفريد الكهربى (Electrophoresis) على هلام عديد الأكريلاميد والقائمة على التباين فى أنماط البروتين تستعمل الآن كطريقة جيدة وسريعة في الدراسات الوراثية والتصنيفية. لقد أوضح Gray *et al*., (1973) أن البروتين المخزن فى البذور الجافة الناضجة لايطرأ عليها تغيرات نتيجة الظروف البيئية أو التقلبات الموسمية ولذلك فإن تحليل الطرز البروتينية لبذور العديد من النباتات يمكن استخدامها بنجاح للتمييز بين بعض أصناف محاصيل النباتات المختلفة.

إن البروتين المخزن فى البذور يمكن فصله بعدة طرق من أهمها استخدام تقنية PAGE التى وصفت بواسطة Laemmli, (1970). فى هذه الطريقة يتم فصل البروتينات على أساس حجم وشحنة هذه الجزيئات حيث تشاهد فى صورة حزم (bands) مختلفة الطول وذلك عند صباغة الهلام بعدة أصباغ منها صبغة الكوماسي COBB (Stegmann ,1979) . ويمكن دراسة التباين بين العينات المختلفة من خلال عدد وطول هذه الحزم التى يمكن استخدامها كدلائل بيوكيميائية Rao *et al*., 1990; Krochko and Bewley, 2000; Sharawy, 2008; Emre *et al*., 2006 and Emre, 2009).

أوضح Hussain *et al.*, (1986) أنه بمقارنة الدلائل البروتينية المفصولة كهربيا من نبات الفاصوليا (*Phaseolus vulgaris*) أمكن التميز بوضوح وسهولة بين الأصناف المختلفة حيث أعطت نتائج واضحة مقارنة بالنتائج المتحصل عليها عند استخدام الصفات المرفولوجية والفسيولوجية . استخدم Bianchi-Hall, (1993) تقنية SDS-PAGE لمعرفة التباين بين 55 مدخلاً من (*Arachis*) من جنوب امريكا وأوضحت هذه الدراسة وجود تباين واضح في طرز البروتين المخزن في البذور أمكن استخدامها كدلائل جزيئية.

استخدم Al-Helal, (1994) تقنية الهجرة الكهربية للبروتين على هلام عديد الاكريلاميد SDS-PAGE لتوصيف 8 أنواع من جنس *Acacia* جمعت من المملكة العربية السعودية. وأوضحت طرز حزم البروتين الناتجة تباين بين العينات موضع الدراسة. كما أظهرت الدراسة أيضاً أنه يمكن استخدام التباين الناتج من بعض مشابهات الإنزيمات مع التباين في حزم البروتين كدلائل لمعرفة التباين الوراثي وتمييز بعض أصناف وأنواع جنس (*Acacia*). كما قام Badr, (1995) بتقدير الاختلافات في أنماط حزم البروتين للتمييز بين مجموعة من أصناف البرسيم الاسكندراني. وأوضحت النتائج أن هذه الطريقة ذات كفاءة عالية في تمييز هذه النباتات وتقديرعلاقات القرابة بينهما.

استخدم Badr *et al*., (1998) الإختلافات في أنماط حزم البروتين لإعادة تقييم 24 نوع تنتمي لجنس السيسبان (*Sesbania*) وأظهرت النتائج 44 حزمة من البروتين تم تحليلها باستخدام برنامج الحاسوب NTSYS-pc وأوضحت النتائج وجود 8 حزم من البروتين مشتركة بين جميع العشائر المنتمية

لأنواع السيسبان قيد الدراسة مما يدل على وجود تشابه كبير بين العشائر التي تنتمي إلى نفس النوع وعلى كفاءة تقنية الهجرة الكهربية للبروتين.

استخدم Khalifa *et al*., (1998) طرز البروتين كدلالات لإعادة تقييم العلاقات الوراثية بين 45 نوع تنتمي إلى 15 جنس وثمانية رتب من الفصيلة الباذنجانية Solanaceae عن طريق التحليل العددي باستخدام برنامج التحليل الإحصائي NTSYS-pc (Numerical Taxonomy System). كما استخدم Ghareeb *et al*., (1998) طريقة الهجرة الكهربية بالإضافة لدلائل الشكل الظاهرى (Morphological markers) لتمييزعشرة أنواع من جنس كاسيا *Cassia*. استعملت أيضاً هذه التقنية للتفرقة بين عشرة أصناف من الشعير (Abdel-Salam *et al*., 1998) وللتفرقة بين بعض أصناف من القمح (Afiah *et al*., 1999).

استخدم الباحثان Aboel-Atta and Abou-EL-Enain, (2000) تقنية الهجرة الكهربية للبروتين لإعادة تقييم الوضع التقسيمي لإثنى عشر نوعاً تنتمي الى ثلاثه أجناس من العائلة Primulaceae. وأوضحت النتائج تباين واضح في أنماط حزم البروتين المستخلص من هذه النباتات. كما قام Atanassov *et al*., (2001) بتقييم التنوع الوراثى لعدد 49 صنف من الشعير العارى الحبوب وذلك باستخدام تباين بروتين الحبوب (كدلائل كيميائية حيوية) والسمات الظاهرية للأصناف. وقد أظهر الفصل الكهربي للبروتين أربعة أنماط تختلف عن بعضها في الوزن الجزيئي استخدمت في تعريف 30 صنفاً.

درس Zayed *et al*., (2005) التركيب الوراثي لبعض النباتات الصحراوية النادرة في منطقة جبل علبة وذلك بدراسة التحليل الكهربي لبروتينات البذرة التي تذوب في الماء والتي لاتذوب فيه وتحليل البيانات التي نتجت من البروتين أحصائيا باستخدام برنامج SPSS.

استخدم الباحث Emre *et al*., (2006) البروتين المخزن في بذور 9 أنواع من *Lathyrus* جمعت من أماكن مختلفة من تركيا لعمل البصمة الوراثية القائمة على التباين في أنماط حزم البروتين. وقد تم تحليل النتائج المتحصل عليها باستخدام برنامج التحليل الإحصائي SPSS، وأظهرت النتائج وجود عدد كبير من الحزم البروتينية الثابتة وأن البذور غنية بالبروتين.

استخدم الباحثان Yaprak and Yurdakulol, (2007) تقنية الهجرة الكهربية للبروتين SDS-Protein لدراسة العلاقة بين بعض أصناف من *Salicornia europaea L.* . من خلال النتائج المتحصل عليها والمتمثلة في تكون 48 حزمة متباينة، أمكن بشكل واضح التفريق بين هذه الاصناف.

درس Sharawy, (2008) التباين في حزم البروتين لإعادة تقييم العلاقة التصنيفية بين 21 عينة تمثل 8 أنواع من جنس *Orobanche* جمعت من مصر والمملكة العربية السعودية وأوضح الباحث وجود درجة تشابه كبيرة في الحزم البروتينية بين العينات التي تتبع نفس النوع.

قام الباحث Emre, (2009) بتقدير التباين في أنماط حزم البروتين للتمييز بين 7 أنواع من *Lathyrus* جمعت من أماكن و بيئات مختلفة من تركيا. أظهرت النتائج وجود إختلافات واضحة بين الانواع. وأوضح الباحث امكانية استخدام تقنية التفريد الكهربي للبروتين المخزن في البذور في الدراسات التصنيفية للتمييز بين Leguminous plant .

استخدم الباحثان Siddiqui and Naz, (2009) تقنية SDS-PAGE لدراسة التباين في بروتين حبوب عشره أصناف من القمح لمعرفة التنوع الوراثي بينهم وذلك بتحليل النتائج عن طريق UPGMA. cluster أوضحت النتائج وجود درجة عالية من التشابه بين بعض الأصناف وصلت نسبتها الى 95٪. وأفاد الباحث بفائدة هذه التقنية في برامج تربية النباتات.

استخدم El-Rabey *et al.*, (2009a) توصيف الهيئة الكروموسومية (karyotype) والتفريد الكهربي للبروتينات المخزونة في البذرة لدراسة العلاقات الوراثية والتمييز بين سبعة أصناف من الشعير المنزرعة في مصر. وأوضحت الدراسة ظهور 24 حزمة بروتينية تراوح الوزن الجزيئي لها ما بين 22 و 212 كيلو دالتون، ثلاثة منها شائعة في كل الأصناف محل الدراسة والباقي متباين الظهور والتي أستخدمت للتمييز بين الأصناف وتحديد درجة العلاقة الوراثية بينهم مما يسهل من اختيار أنسب ألأصناف للتربية والحصول على أقوي هجين وبالتالي أعلى انتاجية وأعلى درجات المقاومة للأمراض والظروف المناخية والبيئية القاسية مثل الجفاف والملوحة.

كما قام أيضاً El-Rabey *et al*., (2009b) بدراسة العلاقة التطورية من الناحية الوراثية لعدد 60 صنف من الشعير ممثلة لتسعة أنواع وذلك باستخدام دلائل AFLP وتقنية التفريد الكهربي للبروتين المخزن في البذور. وأسفرت نتائج AFLP عن وجود عدد اجمالي 366 من قطع الحمض النووي، منها 339 متباية استخدمت لدراسة التباين الوراثي بين الأنواع محل الدراسة بينما أسفرت نتائج تحليل البروتين عن وجود 47 حزمه من البروتينات الذائبة والغير ذائبة في الماء في التسعة أصناف محل الدراسة، منها واحدة فقط مشتركة بين جميع الأنواع و46 متباينة.

استخدم Vural *et al*., (2009) التباين في أنماط حزم البروتين مع الصفات الظاهرية كدلالات وراثية لإعادة تقييم العلاقة الوراثية في 10 انواع من *Veronica* . كذلك درس Abd El-Gawwad *et al*., (2009) التوصيف الجزيئي والوراثي الخلوي لبعض أصناف القمح المنزرع بمناطق مختلفة من مصر وذلك باستخدام دراسة تحليل الهيئة الكروموسومية (Karyotype) للجينومات الثلاثة (A, B and D) بالإضافة إلى تحليل البروتين والنشاط الكيميائي الحيوي لإنزيم البيروكسيديز والالفا استيريز إلى جانب الصفات المورفولوجية والبصمة الوراثية باستخدام تقنية ISSR مع إحدى عشرة بادئ. ومن نتائج هذه الدراسة استنتج الباحث أن الأدلة الوراثية والجزيئية التي استخدمت في هذه الدراسة أمكنها التمييز بين أصناف القمح محل الدراسة وتفوق في ذلك تحليل البروتين والبصمة الوراثية للحمض النووي باستخدام DNA ISSR-PCR مما يساعد في اختيار الأصناف المناسبة لعمل تهجينات فيما بينها للحصول على أعلى إنتاجية.

كما درس Moawed, (2010) التباين في أنماط بروتينات البذرة مع الصفات المورفولوجية والصفات التشريحية للبذور باستخدام الميكرسكوب الإلكتروني الماسح لعدد 47 وحدة تصنيفية تمثل 46 نوعا لتحت الفصيلة الطلحية– الفصيلة القرنية لمعرفة نسبة التشابه والإختلاف بين هذه الأصناف والتمييز بينهم.

(2–3): التنوع الوراثي للبرسيم الحجازي:

Genetic diversity of *Medicago sativa* L.

استخدمت العديد من الطرق المختلفة لمعرفة التباين الوراثي في البرسيم الحجازي وتعريف أصنافه وإيجاد درجة التشابه Similarity والاختلاف الوراثي Genetic polymorphism بينهم، مثل الصفات المورفولوجية ؛الزراعية ؛ الفسيولوجية ؛ سجل النسب بالإضافة إلى الدلائل الجزيئية مفردة أو مجمعة . من الدلائل الجزيئية التي استخدمت لتقييم التباين الوراثي في البرسيم تقنية RFLP (Kidwell *et al*., 1994 and Maureira *et al*., 2004) و التضخيم العشوائي لمقاطع من الدنا RAPD (Crochemore *et al*., 1996; Gjuric and Smith, 1996; and Musial, 2002) و التتابع المتكرر البسيط Simple sequence repeat (SSR) (Flajoulot *et al*. 2005) و Sequence Related amplified polymorphism (SRAP) (Vandemark *et al*., 2005).

استخدم الباحثان تقنية التفريد الكهربي (Krochko and Bewley, 2000) (One and two-dimensional) لدراسة البروتين المخزن في بذور 27 نوع من البرسيم الحجازي وأوضحت النتائج أن البروتين المخزن في فلقات بذور البرسيم لها وزن جزيئي عال هو اللوجيومين (Legumine) ويمثل 30٪ و Vicilin ويمثل 10٪ وآخر له وزن جزيئي منخفض هو (albumin) ويمثل 20٪ من البروتين الكلي المستخرج من فلقات البذور الناضجة.

بالإضافة للدلائل الكيميائية الحيوية فقد استخدمت تقنية RAPD لتقييم التنوع الوراثي في البرسيم وتعريف أصنافه وإيجاد درجة التشابه Similarity والاختلاف الوراثي Genetic polymorphism بينهم، حيث استخدم تفاعل البلمرة المتسلسل (Polymerase chain reaction – PCR) مع 19 بادئ عشوائي (10-mer primers of arbitrary sequence) لتكبير أجزاء عشوائية من جينوم عشائر من البرسيم الحجازي الثنائي (2n= 2x= 16). من بين التسعة عشر بادئ التي تم اختبارهم أعطت 13 بادئ 37 حزمه متباينة وأوضحت النتائج أن دلائل RAPD ذو كفاءة في الحصول على معلومات وراثية عن جينوم بعض أنواع من البرسيم الحجازي حيث لا تتوفر عنها كثير من المعلومات الوراثية (Echt, *et al*., 1992). اتضحت أيضاً أهمية الدلائل الجزيئية مثل دلائل RAPD و RFLP مع دلائل المشابهات الإنزيمية والسمات المورفولوجية في بناء الخرائط الوراثية للبرسيم الحجازي ثنائي المجموعة الصبغية (Kiss *et al*., 1993).

اجري Kangfu and Pauls,(1993) دراسة لتحديد درجة القرابة باستخدام دلائل RAPD بين عدد من عشائر البرسيم الحجازي ، حيث استخدم 10 بوادئ عشوائية مع الـــ DNA المفصول من 10 نباتات لكل عشيرة على حدة . أظهرت النتائج أن حزم RAPD الناتجة من الممكن استعمالها في تعيين المسافة الوراثية بين العشائر والأصناف قيد الدراسة، كما استخدمت دلائل RAPD لعمل بصمة وراثية لعدد من أصناف البرسيم الحجازي بعد تعرضها لبعض الطفرات (alfalfa meiotic mutant) وأوضحت النتائج أن البوادئ تختلف في قدرتها على أظهار التباين بين الأصناف (Baraccia *et al*., 1994).

اثبتت أيضاً دلائل RAPD كفاءتها في معرفة الإختلافات داخل وبين ستة أنواع جنس البرسيم (*Medicago scutellata* Mill., *M. disciformis* DC., *M. murex* Willd., *M. truncatula* هي Gaertn., *M. polymorpha* L., and *M. rugosa* Desr) وذلك باستخدام 10 بوادئ عشوائية (Brummer *et al*., 1995).

استخدم Maria-Lucia *et al*., (1998) دلائل RAPD مع السمات الظاهرية والزراعية لدراسة التباين الوراثي بين 46 عشيرة من البرسيم الحجازي تضم تحت نوعين هما *Medicago sativa* ssp *falcata* و ssp *sativa* وأظهرت النتائج وضع العشائر البرية لتحت النوعين في مجموعة واحدة بسبب طبيعة نموهما الزاحف ودرجة كمونهما المنخفض. كما أشارت النتائج إلى وجود مدى واسع من التنوع الوراثي بين أصناف البرسيم المنزرع في منطقة البحر المتوسط ومنطقة شمال أوروبا، بينما أظهرت العشائر التركية سلوك وسطي بين المجموعتين السابقتين.

قام Ghérardi *et al*., (1998) بتقدير المسافة الوراثية بين عشائر البرسيم الحجازي المـــزروع وبين عشائر البرسيم البري لكل من *Medicago sativa* و *M. falcat*a باستخدام دلائل RAPD ،وقد انتجت 5 بوادئ 64 حزمة واضحة وأظهرت النتائج مستوى تباين عالي من الأختلافات الوراثيـــة بـــين وداخل العشائر . كما استخدم أيضاً Eric *et al*., (1998 & 2002) دلائـــل RAPD والمشـــابهات الأنزيمية والسمات الظاهرية لمعرفة الأختلافات الوراثية بين عشائر البرسيم الحجازي البرية والمنزرعة في أسبانيا.

أجرى Mengoni *et al*., (2000) دراسة لمعرفة العلاقات الوراثية لعشرة عشائر من البرسيم الحجازي في مصر وإيطاليا باستخدام 41 من دلائل RAPD و 37 من دلائل SSR وقد اشارت النتائج أن كلا الدلائل الجزيئية المستخدمة أعطت مدى واسع من التباين الوراثي داخل العشائر المنزرعة وأن دلائل RAPD قادرة على فصل العشائر الإيطالية عن الأنواع المصرية كما أن دلائل SSR استطاعت فصل الأربعة أنواع من العشائر ذات الأصول الإيطالية الموجودة في بيئات مختلفة.

كما أجرى Yang-Qing *et al*., (2001) دراسة على التباين الوراثي بين أصناف البرسيم الحجازي المقاومة للملوحة وبين الأصناف غير المقاومة، وذلك باستخدام دلائل RAPD وأوضحت النتائج كفاءة ثلاث من البوادئ في تمييزتلك الأصناف.

استخدم Weder, (2002) أيضاً تقنية RAPD للتمييز والتفرقة بين عدد من أنواع البقوليات المستخدمة في الغذاء أو المستخدمة كعلف، وأوضح أن ثلاث بوادئ عشوائية انتجت حزم واضحة مع الـ DNA المعزول من بذور 63 نبات تمثل 27 نوع من البقوليات منها فول الصويا (soybeans) ، العدس (Lentils) والبرسيم الحجازي (alfalfa) .

ومن تطبيقات دلائل RAPD ما قام به Musial *et al*., (2002) لدراسة وتقييم مستوى التباين الوراثي بين وداخل أصناف البرسيم الحجازي النامي في استراليا حيث تم تحليل 19 نبات من كل صنف من الأصناف العشرة قيد الدراسة باستخدام 11 بادئ ، أنتجت 96 حزمة متباينة وتراوح متوسط التشابه الوراثي بين الأصناف من 0.31 الى 0.49 وقد تم بناء شجرة علاقات القرابة بين أصناف البرسيم من خلال تلك الدلائل.

كما استخدم Zhen-wu, (2004) دلائل RAPD و SSR و ISSR لعمل بصمة وراثية لـ 55 صنف محلي ومستورد من البرسيم الحجازي، حيث أنتج 36 بادئ عشوائي 182 حزمة متباينة، في حين أنتج 8 أزواج من بوادئ SSR و 12 من ISSR عدد 120 حزمة متباينة وأشارت النتائج أن دلائل SSR و ISSR تظهر تباين كبير بين الأصناف مقارنة بدلائل RAPD .

قام Bi *et al*., (2005) بدراسة تأثير الطفرات الوراثية على بعض الصفات المورفولوجية لإزهار البرسيم الحجازي باستخدام نوعين من الدلائل وهي دلائل الـ RAPD والسمات الظاهرية . وأوضحت النتائج أن الأختلافات الوراثية للصفات الزهرية كانت من 0.80 إلى 0.53 . كما أظهر تحليل RAPD أن الأختلاف في المسافة الوراثية تكون من 0.21 إلى 0.35 .

استخدم الباحثان Tiwarikapil and Chandra, (2007) تقنية RAPD-PCR لمعرفة درجة القرابة بين خمسة عشائر من البرسيم الحجازي باستخدام سبعة بوادئ عشوائية حيث فصل DNAالمستخلص من عينات مجمعة (bulk samples of genomic DNA) وكانت المسافة الوراثية من خلال حزم RAPD تراوحت من 0.077 الى 0.346 وأظهرت النتائج أن عينات DNA يجب أن يكون مجمعة على الأقل من 10 أفراد لحصول تمثيل لأغلب الحزم الموجودة في العشائر قيد الدراسة.

ومن أمثلة استخدامات دلائل RAPD مع الدلائل الظاهرية الدراسة التي قام بها Marijana *et al*., (2008) لتقييم التنوع الوراثي بين وداخل بعض عشائر البرسيم ذات الأصول الجغرافية المختلفة، ومقارنة النتائج المتحصل عليها من هذين النوعين من الدلائل، حيث أوضحت أن 91.86 ٪ من الإختلاف الوراثي ترجع الى الإختلافات بين الأفراد داخل الأصناف وأن هذه الأختلافات مرتبطة ببعض العوامل البيئية الجغرافية.

كما استخدمت أيضاً دلائل RAPD لتعريف 10 أنواع من البرسيم الحجازي حيث أعطت 5 بوادئ عشوائية من 20 بادئ استخدمت في الدراسة 25 حزمه متباينة وأوضح التحليل التجميعي أن العشرة أنواع قيد الدراسة انفصلت إلى مجموعتين رئيسيتين وأن دلائل الـ RAPD أمكنها بنجاح في تعريف التباين الوراثي بين الأنواع المختلفة من البرسيم الحجازي وأن الأصناف الإسترالية تختلف عن الأصناف الأوروبية المطورة (Litoriya *et al* ., 2009)

استخدمت تقنيةAFLP (amplified fragment length polymorphism) لتقييم التنوع الوراثي في البرسيم الحجازي وتعريف أصنافه وحساب المسافة الوراثية بينهم ، ومن أمثلة استخدامات دلائل AFLP الدراسة التي قام بها Segovia-Lerma, (2003) لتقييم التنوع الوراثي بين تسعه طرز

وراثيه باستخدام 34 بادئ وأنتجت 3754 حزمة منها 1541 حزمة متباينة بعدد يتراوح بين 20 الى 85 حزمة لكل بادئ سمحت بالتميز بين الطرز الوراثية. ومن خلال بناء شجرات المسافة الوراثية الناتجة من التحليل التجميعي (Cluster analysis) لبيانات دلائل AFLP ظهرت مجموعتين رئيسيتين تضم الأولى *Medicago sativa* subsp. *sativa* و *M. sativa* subsp *varia* وتضم المجموعة الثانية *M. sativa* subsp. *Falcate* . كما استخدمت دلائل AFLP أيضاً لدراسة العلاقة الوراثية بين 34 نبات من البرسيم الحجازي تم تجميعها من مناطق مختلفة من Anatolia لتربية و تحسين نوع جديد من البرسيم يتلائم مع البيئية لهذه المنطقة باستخدام 15 بادئ حيث أنتجت 460 حزمة متباينة من بين 1002 حزمة ناتجة بعدد يتراوح من 7 إلى 67 حزمة، وقد تراوحت المسافة الوراثية من 5.93 إلى 1.14 (Gulbitti *et al*., 2009)

استخدمت أيضاً دلائل (SSR) لتقييم التنوع الوراثي ولتحديد الدلائل المرتبطة بمورثات السمات المرغوبة في نبات البرسيم الحجازي ومن ذلك الدراسة التي قام بها Flajoulot *et al*., (2005) لمعرفة الإختلافات الوراثية بين 7 أصناف من البرسيم الحجازي والتي نشأت من برنامج تربية واحد. كما استخدمت نفس التقنية لدراسة الأختلافات الوراثية بين 120 طرز وراثي تمثل عشيرتين باستخدام إثنين من دلائل SSR (Herrmann *et al*., 2009).

الفصل الثالث

المواد وطرق البحث

Materials and Methods

(3-1) : العينات النباتية Plant materials

تشمل العينات النباتية التي أجريت عليها الدراسة عشرة أصناف (Cultivars) مختلفة من البرسيم الحجازي التي تكثر زراعتها في اماكن مختلفة من المملكة العربية السعودية وهو يعتبر نبات عشبي معمر جذره وتدي والساق قائمه مسمطه ومتفرعه والأوراق معنقه ومكونه من ثلاث وريقات ومرتبه على الساق بالتبادل وللوريقه الوسطى عنق طويل عن الوريقتين الجانبيتين ويتراوح لون الزهره من الأبيض للبنفسجي ويعتمد ذلك على الصنف والثمره قرنيه بذورها كلوية الشكل ولونها أصفر مخضر يتحول إلى اللون الغامق بطول مدة التخزين ويوضح الجدول رقم (3-1) أسماء هذه الأصناف المستخدمه في الدراسه ومصدر كل منها.

تمتازهذه الاصناف العشرة بصفات مختلفة ومتباينة، فالصنف SW9720 يتميز بتحمل الملوحه ومقاومة بعض الأمراض التي تصيب نبات البرسيم مثل النيماتودا والفيوزاريم والصنف SW9628 يمتاز بتحمل الحراره الشديده والجفاف. كما يمتاز الصنف سوبريم فورجر بحجم الأوراق الكبير وملمسها الناعم. أما الصنف سوبر سوبريم فيتميز بسرعة النمو والإنتاجيه العاليه ومقاومة بعض الأمراض و الصنف سوبر10 يمتاز بتحمل الملوحه كذلك الصنفان جراسيس 2 والصنف كاف101 يمتازان بأن لهما القدرة على التأقلم في مجال جغرافي واسع والقدره على كسر الكمون ، كما يتميز الصنف ماجنا901

بمقاومة أوراقه للبروده وهو من الأصناف المعمره لفترات طويله و يمتاز الصـــنف بيرفكـــت بتحمـــل الحراره وكبر حجم أوراقه وإنتاجيته العاليه، .أما بالنسبـــة للصنف سيري نافا فقد تم تطـــويره للحصـــول على انتاجيـــه عاليه كما أنه يتحمـــل الصقيع والعطش وذلك بتهجين الصنف كـــاف101 مـــع الصـــنف ريفرهنتر.

جدول (3-1): أسماء ومصدر أصناف البرسيم المستخدمة في الدراسة

NO.	Cultivar الصنف	Sourceالمصدر
1	SW9720	Genetics International Inc. California USA – University of Arizona
2	SW9628	Genetics International Inc. California USA
3	Supreme Forgar سوبريم فورجر	Cal/West, California USA
4	Super Supreme سوبر سوبريم	Cal/West, California USA
5	Cuf -101 كاف- 101	Cal/West, California USA
6	Grasis II جراسيس 2	Cal/West, California USA
7	Super10 سوبر 10	Cal/West, California USA
8	Magna 901 ماجنا 901	Diary Land Comp. USA

9	perfect برفكت	Cal/West, California USA
10	Sirinafa سيري نافا	SEEDMARK-Australia (Produced for Nafa Agriculture Comp.)

(3-2): طرق البحث Methods

(3-2-1): تجربة التضخيم العشوائي لمقاطع DNA المتباينة

RAPD Experiment

(3-2-1-1): إستخلاص DNA المجيني

Extraction of genomic DNA

تم استخلاص DNA المجيني بطحن الأوراق الصغيرة والحديثة لأصناف البرسيم العشره المستخدمه في الدراسه بإستخدام الهاون الصيني Mortar عند درجة حرارة الغرفه وذلك عن طريق تجميدها بإستخدام النيتروجين السائل للمساعده على تكسير الخلايا عند طحنها، ومن ثم تم عزل الحامض النووي DNA من العينات قيد الدراسة باستخدام Qiagen kit والتي تتضمن خطوة تحليل الخلايا بإستخدام خليط يتكون من مادة SDS, EDTA وأنزيم Proteinase حيث تقوم مادة SDS بتفكيك البناء الرباعي للبروتينات وتحرير الوحدات التحت بروتينيه التي يتكون منها البروتين الموجود في جدار الخليه والغشاء البلازمي وغشاء النواه وبالتالي يساعد على تحليل الخلايا ويجعل المحلول في صورة مستحلب وتقوم مادة EDTA بنزع الأيونات الثنائيه مثل أيونات الكالسيوم والمغنيسيوم اللازمه لنشاط أنزيمات تحطيم DNA فيتوقف نشاطها أثناء عملية الأستخلاص أما بالنسبه لأنزيم البروتينيز فهو يقوم بتفكيك الهستونات المرتبطه بالدنا لذلك تعمل كل مكونات الخليط مجتمعه على إزالة الجدار الخلوي وإضعاف الغشاء البلازمي والنووي وإنفجاره في النهايه محرراً بذلك محتويات الخليه في المحلول ومعها جزيئات الـ DNA ، كما تم تحليل الحامض النووي RNA بإستخدام أنزيم الـ RNase ثم تحضين محتويات الأنبوبه (أنسجة الأوراق المطحونه ومحلول تحليل الخلايا وأنزيم RNase) لمدة عشره دقائق

عند 60 درجه مئويه بعد ذلك تم التخلص من كل المكونات الثقيله مع الـــ DNA من خليط تحليل الخلايا وذلك بالطرد المركزي ليبقى الـــ DNA معلق في الرائق الناتج الذي تم نقله إلى أنبوبه محتويه على فلتر دقيق لترسيب الـــ DNA بإستخدام الإيثانول بعدها تم تمرير الـــ DNA الناتج بخطوتي غسيل بإستخدام الإيثانول ثم تم نقله إلى أنبوبه جديده بإذابة الـــ DNA المترسب في محلول ملحي وحفظت العينات عنـــد درجة – 20 درجه مئويه . تم فحص DNA الناتج من أصناف البرسيم العشرة بفصله كهربياً على هلام الأجـــاروز Agarose gel بتركيـــز1٪ والمضـــاف اليـــه صـــبغة بروميـــد الإيثيـــديم بتركيـــز 0.2 ميكروغرام/مليلتر وذلك عند جهد كهربي 80 فولت لمدة ساعه ، ومن ثم تم قياس تركيز DNA في هذه العينات باستخدام جهاز المطياف الضوئي Ultraviolet spectrophotometer عند طول مـــوجي 260 نانوميتر، وإختبار نقاوته عند280 و 260 نانوميتر حيث كانت النسبة من 1.7 –1.8 بعد ذلـــك خففـــت العينات للحصول على تركيز 5 نانوجرام / ميكروليتر للعينات العشره .

(3–2–1–2): البوادئ المستعملة: The used primer

في هذا البحث تم استخدام عدد من البوادئ العشوائية التتابع طولها عشـــرنيوكليوتيدات، انتجـــت بواسطة شركة Operon حيث روعي في تتابع هذه البوادئ ألا يكون تتابع البادئ من الاتجاه ´5 ← ´3 مكمل للتتابع من الاتجاه المعاكس ´3 ← ´5 ، كما روعي أن تكون نسبة قواعـــد السيتوســـين Cytosin والجوانين Guanine (G+C) 60–70 ٪ من مجموع القواعد النيوكليوتيدية للبادئ. ويوضح الجدول رقم (3–2) ترتيب القواعد النيوكليوتيدية للبوادئ التي أعطت حزم ثابته وواضحه وذلك من بين 30 بادئ تم إستخدامها في هذه الدراسه.

(3–2–1–3): تفاعل البلمرة المتسلسل

Polymerase chain reaction (PCR)

تم تحضير كيماويات تفاعل البلمرة المتسلسل بحيث يحتوي كل تفاعل على 250 ميكرومول من dNTPs (مـــزيج القواعـــد النيكليوتيديـــه الأربعـــه dATP و dGTP و dCTP و dTTP)، 2.5 ميكرولتر من محلول تفاعل البلمرة (100 مليمول من محلول Tris-HCl pH 8.3 و 500 مليمول مـــن KCl)، 3–4 مليمول من كلوريد المغنسيوم MgCl2، 50 بيكومول من البادئ، 5 ميكروليتر من DNA

، وحدة إنزيمية واحدة من إنزيم البلمرة *Tag* DNA polymerase ثم إكمال الحجم بالماء المقطر المعقم إلى 25 ميكرولتر.

أجريت التجربه بتحضير مزيج كلي Master mix لكل بادئ في أنبوبه سعة 1,5 مليلتر يكفي لـ 10 تفاعلات ، ثم توزيع المزيج في أنابيب سعة 200 ميكروليتر مرقمه بأرقام عينات DNA بواقع 20 ميكرولتير لكل أنبوبه ، ثم يضاف حجم 5 ميكروليتر من كل عينه من الـ DNA إلى محتويات الأنبوبه الخاصه بها ليصبح الحجم الكلي لمحتويات التفاعل 25 ميكرولتر وكررت كل تجربه ثلاث مرات على الأقل للتأكد من ثبات الحزم الناتجه من تفاعل البلمره المتسلسل على هلام الأجاروز .

وضعت أنابيب التفاعل في جهاز الدوران الحراري Thermal cycler لإجراء برنامج تفاعل البلمرة المتسلسل المتكون من الدنترة Denaturation عند درجة حرارة 94 ºم لمدة خمس دقائق تليها 40 دورة، تتكون كل دورة من ثلاث خطوات، دنترة لمدة دقيقة عند94 ºم، لحام Annealing بين البادئ و DNA القالب لمدة دقيقة واحدة عند درجة حرارة 36 ºم، إستطالة البادئ لمدة دقيقه عند 72 ºم ويلي تلك الدورات 7 دقائق عند 72 ºم لإستكمال السلسلة.

(3-2-1-4): الفصل الكهربي لنواتج التضخيم العشوائي لمقاطع DNA المتباينة: Elctrophoresis of RAPD products

تم فصل نواتج RAPD كهربياً باستخدام جهاز الفصل الكهربي وذلك على هلام الأجاروز Agarose gel المذاب في محلول Tris Borate EDTA (TBE) بإذابة المكونات التالية في لترماء (54 جم من Tris ، 27.5 جم من Boric acid ، 20 مليلتر من EDTA pH 8). تم تحضير هلام الأجاروز بتركيز 2,5٪ ويضاف إلية صبغة بروميد الإيثيديم بتركيز 0.2 ميكروجرام/مليلتر، ويصب في القالب الخاص ثم يوضع المشط الخاص بالجهاز في المكان المخصص له، ثم ينزع المشط بعد أن يجمد هلام الأجاروز. يوضع محلول TBE المضاف اليه صبغة بروميد الإثيديم في حوض الجهاز حتى يغمر هلام الأجاروز. يمزج 10 ميكرولتر من نواتج التفاعل مع 2 ميكرولتر من صبغة بروموفينول الزرقاء (Loading buffer) وتحضر من (20 جم سكروز، 2جم من صبغة بروموفينول و 50 مل ماء مقطر)

وتتميز بكثافتها وشدة لزوجتها، مما يعطي الكثافة المطلوبة لنواتج التفاعل ليسهل وضعها في ثقوب هلام الأجاروزكما تعطي العينات اللون الأزرق مما يسهل متابعة سريانها في الهلام.

توضع نواتج RAPD في ثقوب الهلام ثم يوصل التيار الكهربي بالجهاز عند جهد كهربـــي 80 فولت لمدة تقريباً 4 ساعات. تم تحديد طول الحزم الناتجة بمقارنتها بحزم معلومـــة الطـــول (100 bp DNA ladder)، ثم تصوير الحزم تحت الأشعة فوق البنفسجية باستخدام جهاز تصوير.

جدول (3–2): التتابع النيوكليوتيدي للـــعشرون بادئ من بادئات RAPD المستخدمه في الدراسه

NO.	Primer	Nucleotide sequence	GC%
1	OPA- 05	5́-AGGGGTCTTG-3´	60%
2	OPA-11	5́- CAATCGCCGT-3´	60%
3	OPA-13	5´-CAGCACCCAC-3´	70%
4	OPA-14	5´-TCTGTGCTGG- 3´	60%
5	OPA-16	5´-AGCCAGCGAA-3´	60%
6	OPB-01	5´-GTTTCGCTCC- 3´	60%
7	OPB- 07	5´-GGTGACGCAG-3´	70%
8	OPB-09	5´-TGGGGGACTC-3´	70%
9	OPB-10	5´-CTGCTGGGAC-3´	70%
10	OPB-13	5´- TTCCCCCGCT-3´	70%
11	OPC-01	5´- TTCGAGCCAG-3´	60%
12	OPC-02	5´- GTGAGGCGTC-3´	70%
13	OPC-04	5´-CCGCATCTAC-3´	60%
14	OPC- 10	5´-TGTCTGGGTG-3´	60%
15	OPC- 11	5´-GACGGATCAG-3´	60%
16	OPD- 08	5´-GTGTGCCCCA-3´	70%
17	OPE- 04	5´-GTGACATGCC-3´	60%
18	OPE- 05	5´-TCAGGGAGGT-3´	60%

19	OPO-14	5´- AGCATGGCTC-3´	60%	
20	OPP- 01	5´GTAGCACTCC-3´	60%	

10-Mer kits (OPA=Operon kit A, OPB= Operon kit B, OPC= Operon kit C, OPD= Operon kit D, OPO= Operon kit O, OPP= Operon kit P)

(3-2-2): التحليل الكهربي للبروتينات المخزنه في بذورالبرسيم

Electrophoresis of storage seed protein

(3-2-2-1): المحاليل المستخدمة في التفريد الكهربي:

- **محلول الاكريلاميد: (Acrylamide solution)**

يحضر بإذابة 58.4 جم اكريلاميد (Acrylamide) و1.6 جم بس أكريلاميد (Bis-acrylamide) في 100 مل ماء مقطر . و بعد الذوبان يكمل المحلول إلى 200 مل بماء مقطر ثم يرشح ويحفظ في الظلام عند درجة حرارة 4 درجة مئوية.

- **(1.5 M Tris-Hcl pH 8.8): Separating gel buffer solution**

يحضر بإذابة 36.3 جم من Tris Hcl في 100 مل ماء مقطر ويضبط الأس الهيدروجيني (pH) عند درجة 8.8 بواسطة حمض الهيدروكلوريك المركز، ثم يكمل المحلول إلى 200 مل بماء مقطر ويحفظ عند درجة حرارة 4 درجة مئوية.

- **(0.5M Tris-Hcl pH 6.8):Stacking gel buffer solution**

يحضر بإذابة 6 جرام من Tris-Hcl في 50 مل ماء مقطر ويضبط الأس الهيدروجيني (pH)عند 6.8 بواسطة حمض الهيدروكلوريك المركز، ثم يكمل المحلول إلى 100 مل بماء مقطر ويحفظ عند درجة حرارة 4 درجة مئوية.

- **(1M Tris-Hcl pH 8.8):Extraction solution**

يحضر بإذابة 12.11 جرام من Tris-Hcl في 50 مل ماء مقطر يضبط الأس الهيــدروجيني (pH) عند 8.8 بواسطة حمض هيدروكلوريك مركز، ثم يكمل الحجم إلى 100 مل بماء مقطر ويحفــظ عنــد درجة حرارة 4 درجة مئوية.

- محلول سلفات دوديسيل الصوديوم(10٪):

(10% Sodium dodecyle sulphate SDS)

يحضر بإذابة 10جرام من سلفات دوديسيل الصوديوم (SDS) في 100 مل ماء مقطر.

- محلول بيرسلفات الأمونيوم 10 ٪

(Ammonium persulphate solution)

يحضر بإذابة واحد جرام من بيرسلفات الأمونيوم في 10 مل ماء مقطر. المحلول يحضر مباشرة قبل استعماله لانه غير ثابت.

- Treatment buffer solution:

يحضر هذا المحلول بخلط التالي:

1-	0.5 M Tris-buffer pH 6.8 (Stacking gel buffer)	2.5 ml
2-	10% SDS	4 ml
3-	2-mercaptoethanol	1 ml
4-	Glycerol	2 ml
5-	H2O	Up to 10 ml

- Tank buffer solution:

يحضر هذا المحلول بخلط الآتي:

1-	Tris- Hcl	12 g
2-	Glycine	57.6g

3-	SDS 10%	40 ml
4-	Distilled H2O	Up to 4liters

- محلول صبغة الكوماسي: (Coomassie stain solution)

يحضر محلول الصبغة بخلط المكونات التالية:

1-	Commassie blue R-250	1 g
2-	Methanol	455 ml
3-	Acetic acid glacial	90 ml
4-	Distilled water	455 ml

– محلول إزالة الصبغه Destaining solution:

يحضر المحلول بأضافة الآتي:

1-	Methanol	500 ml
2-	Acetic acid glacial	100 ml
3-	Distilled water	To 1 liter

(3-2-2-2): تحضير الهلام: (Gel preparation)

يحضر كل من separating gel و stacking gel باستخدام المحاليل التي تم تحضيرها سابقاً كما في الجدول التالي:

Gel solution	Separation gel	Stacking gel
1- Acrylamide solution	10 ml	1.33 ml
2- Separating gel buffer	7.5 ml	___
3- Stacking gel buffer	____	2.5ml
4- 10% SDS	0.3 ml	0.1 ml
5- Distilled water	12.0 ml	6.1 ml

6- Ammonium persulphate	150 ìl	50 ìl
7- TEMED (Tetramethylene diamine)	20 ìl	5.0 ìl
Final volume الحجم النهائي	30 ml	10 ml

(3-2-2-3): فصل البروتينات الذائبة باستخدام تقنية SDS-PAGE

Separating proteins by SDS –PAGE technique

تستعمل تقنية PAGE (Polyacrylamid gel electrophoresis) لفصل البروتين الذائب في الماء من بذور البرسيم الحجازي قيد الدراسة وذلك باستخدام جهاز الفصل الكهربي (Electrophoresis) الرأسي حيث يتم فصل البروتين على هلام عديد الاكريلاميد (10٪) في وجود SDS وذلك تبعاً لطريقة Laemmli, (1970) حسب الخطوات التالية :-

- ينظف اللوحين الزجاجين للجهاز (16 X18 سم) تنظيفاً جيداً مع وضع الفاصل بينهما.
- يحضر أولاً محلول الهلام الأساسي (Separating gel) بخلط المحاليل مرتبة كما ذكرت سابقاً.
- بعد أضافة TEMD مباشرة يصب المحلول وبسرعة في الفراغ بين اللوحين الزجاجين لجهاز الفصل الكهربي (1.5 مل) وبإرتفاع ثلثي المسافة (حوالي 12 سم) ثم يوضع واحد مل من الماء المقطر فوق الهلام بعناية شديدة ويترك الهلام في وضع رأسي وبدون تحريك لمدة ساعة على الأقل حتى تتم عملية البلمرة (Polymerization) ويتجمد الهلام.
- يحضر محلول (Stacking gel) بخلط المكونات المذكورة سابقاً وبنفس ترتيبها ثم يصب المحلول مباشرة وبسرعة بعد إضافة (TEMD) بين اللوحين الزجاجين وفوق طبقة الهلام الأولى (Separating gel) بعد التخلص من الماء المقطر.
- يوضع المشط (Comb) مباشرة بعد صب (Staking gel) في المكان المخصص له بين اللوحين الزجاجيين وذلك لعمل عدد من الفجوات (Wells) اللازمة لتحميل العينات النباتية (loading) قيد الدراسة، يترك الهلام حتى تتم عملية البلمرة ويتجمد.
- يثبت اللوحين الزجاجيين وبهما الهلام في مكانهما المخصص في الجهاز ثم يملاء الحوضين الأعلى والأسفل بمحلول (Tank buffer) ثم يتم نزع المشط من الهلام .

– يتم تحضير العينات النباتية وذلك بطحن واحد جرام من بذور البرسيم الحجازي قيد الدراسة باستخدام النيتروجين المسال (liquid nitrogen) ثم يضاف عليه واحد مل من محلول الإستخلاص (Extraaction buffer).

– يتم فصل البروتين الذائب باستخدام جهاز الطرد المركزي لمدة خمس دقائق.

– يأخذ 40 ميكرولتر من البروتين المستخلص لكل عينه ويضاف اليها نفس الحجم من (Treatment buffer) كما تضاف 5 ميكرولتر من صبغة Bromophenol blue (0.025٪) ثم تسخن العينات على حمام مائى لمدة 90 ثانية.

10– يتم تحميل العينات النباتية في الفجوات (Wells) وكذلك يتم تحميل البروتين الدليل (Protein marker) والتي لها الوزن الجزيئي التالي205 ، 119 ، 98، 52 ، 36 ، 30، 22 و12 كيلو دالتون.

– يوصل القطب الكهربي (الالكترود electrode) بالمصدر الكهربي (Power supply) لتبدأ عملية الفصل الكهربي للعينات عند 100 فولت كهربي ويترك الجهاز ليعمل من 4 –6 ساعات حتى تصل صبغة البروموفينول أو (Tracing dye) إلى نهاية الهلام.

– يفصل التيار الكهربي عن الجهاز وينزع اللوحين الزجاجين ثم يفصل الهلام من بينهما بحذر شديد ويوضع في حوض مملوء بمحلول صبغة الكوماسي (Coomassie stain) .

– يتم التخلص من صبغة الكوماسي بعد 12 ساعة ويغطى الهلام بمحلول (destaining solution) ويتم تغيير المحلول عدة مرات حتى تظهر الحزم البروتينية بوضوح.

– يتم تصوير الهلام مباشرة وتحليله بواسطة (Gel documentation system)

(3–2–3): تجربة قياس الصفات الظاهرية

Morphological characters measurement

أجريت الزراعة في الموسم 2008 م تحت الظرف الطبيعية ، وتم عمل ثلاث مكررات لكل صنف . تمت مكافحة الحشائش عن طريق إ زالتها باليد، وقد تم ريها حسب حاجة النبات للماء.

(3–2–3–1): زراعة الأصناف Varieties cultivation

زرعت أصناف البرسيم العشرة تحت الظروف الطبيعية بعمل ثلاث مكررات لكل صنف بحيث يكون عدد النباتات من كل صنف في المكررة الواحدة 15 نبات. نثرت البذور بحيث تبعد عـــن بعضـــها بمسافة 20 سنتيمتر بينها.

(3-2-3-2): قياس صفات الشكل الظاهري

Measurments of morphological characters

تم قياس ثلاثة عشر صفة وذلك بانتقاء عشرة نباتات لكل صنف وتسجيل قياسات الصفات الظاهرية لكل نبات ثم حساب متوسط القياسات وهي كالتالي:

1- طول عنق الورقة (Petiole length)

2- شكل الوريقة الطرفية (Terminal leaflet shape)

3- طول الوريقية الطرفيه (Terminal leaflet length)

4- عرض الوريقة الطرفية (Terminal leaflet width)

5- شكل الوريقة الجانبية (Lateral leaflet shape)

6- طول الوريقة الجانبيه (Lateral leaflet width)

7- عرض الورقية الجانبية (Lateral leaflet shape)

8- شكل قمة الوريقة الطرفيه (Terminal leaflet apex shape)

9- شكل قمة الوريقة الجانبية (Lateral leaflet apex shape)

10 – شكل حافة الوريقه الطرفيه (Terminal leaflet margin shape

11- شكل حافة الوريقه الجانبيه (Lateral leaflet margin shape)

12- شكل أذينات الورقه (Leaf stipules shape)

13- طول أذينات الورقه (Stipules length)

(3-3): تحليل النتائج Data analysis

عند تحليل نتائج كل من التضخيم العشوائى لمقاطع الدنا للبوادئ المستخدمة وبيانات طرز البروتين تم تسجيل الحزم الناتجة بحيث تعامل كصفات ثنائية يمثل وجود الحزمة بواحد وغيابها بصفر. ومن هذه النتائج تم حساب العدد الكلي لحزم RAPD التي يظهرها كل بادئ وتحديد عدد الحزم الفريدة والمتباينة والمتطابقة وحساب درجة التباين وكذلك حساب حزم البروتين المتباينة والمتطابقة.
كذلك بالنسبه لتحليل الإختلافات في السمات الظاهرية بين الأصناف تم تمثيلها بواحد عند وجود الصفة وصفر عند إختفاء الصفة .

وقد تم إجراء التحليلات العددية للنتائج وتقدير التشابه الوراثي بين أصناف البرسيم وبناء شجرات المسافة الوراثية باستخدام برنامج الحاسوب NTSYS-pc (Rohlf, 2000)، وإستخدمت قيم التشابه في بناء شجرات المسافه الوراثيه بإستخدام طريقة التحليل التجميعي (APGMA) . وقد تم بناء شجرات القرابة الوراثية استناداً إلى بيانات RAPD والبروتين وبيانات الشكل الظاهري كل على حدة، كما تم بناء شجرة القرابة الوراثية بين الأصناف إستناداً إلى بيانات الـ RAPD والبروتين والشكل الظاهري مجتمعين.

الفصل الرابع

النتـــــائـــج

Results

(4-1): التضخيم العشوائى لمقاطع الـ DNA:

Random amplification of DNA

(4-1-1): وصف أنماط الفصل الكهربى لنواتج RAPD

Description of RAPD pattern

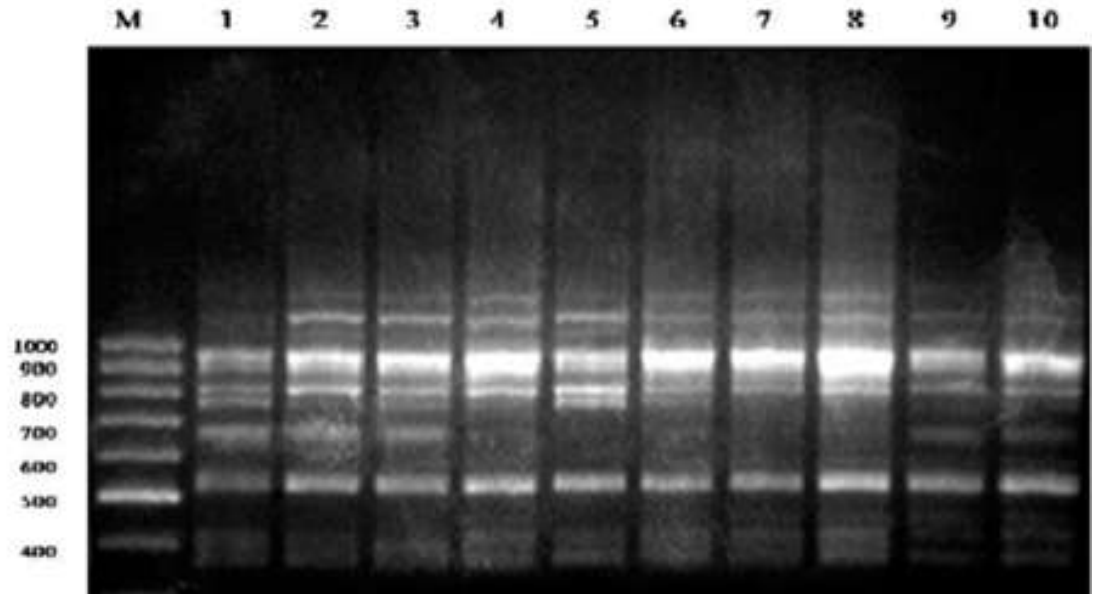
من بين البوادئ التي تم اختبارها، تميز عشرون بادئ فقط بإنتاج حزم واضحة وثابتة من DNA مع جميع الأصناف (جدول 2) ، وقد استبعدت البوادئ التي لم تظهر أي نواتج في تفاعل البلمرة المتسلسل أو التي تميزت نواتجها بالضعف.

(4-1-1-1):انماط الفصل الكهربي للطراز الحزمي للبادئ OPA-05

يوضح الشكل رقم (4-1) أنماط الفصل الكهربي لنواتج RAPD باستخدام البادئ OPA-05، ويبين الجدول رقم (4-1) توزيع حزم RAPD التي أظهرها هذا البادئ في أصناف البرسيم العشرة موضع الدراسة.

أظهر هذا البادئ 9 حزم تراوح طولها ما بين 1320 و 350 زوج قاعدة، وتراوح عددها في الأصناف ما بين تسعة حزم في الأصناف سوبر سوبريم، سوبريم فورجر، SW9720 و SW9628 وسبعة حزم في الصنفين سوبر10 وماجنا901، في حين ظهرت ثمانية حزم في بقية الأصناف. اشتركت جميع الأصناف بوجود سبعة حزم متطابقة Monomorphic ، بينما تباينت حزمتين فقط Polymorphic تبلغ أطوالها 780 و680 زوج قاعدة.

تشير النتائج أن البادئ OPA-05 سجل نسبة منخفضة من التباين بين أصناف البرسيم مقدارها 22,22٪. وأن هذا البادئ لم ينجح في التميز بين معظم اصناف البرسيم موضع الدراسة حيث لم تظهر حزم فريده تميز أي صنف من هذه الأصناف.


M
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
1000
900
800
700
600
500
400

جدول (4–1): توزيع الحزم الناتــجة من البادئ OPA-05 في أصناف البرسيم الحجازي العشرة

Band	Approx.	Cultivars

شكل (4-1) : النمط الحزمي الناتج من البادئ OPA-05 فى أصنــاف البرسيم الحجازى الـعشـرة.

1 – 10 = أصناف نبات البرسيم الحجازي

(1) SW9720	(2) SW9628
(3) سوبريم فورجر	(4) سوبر سوبريم
(5) كاف 101	(6) جراسيس 2
(7) سوبر 10	(8) ماجنا 901
(9) برفكت	(10) سيري نافا

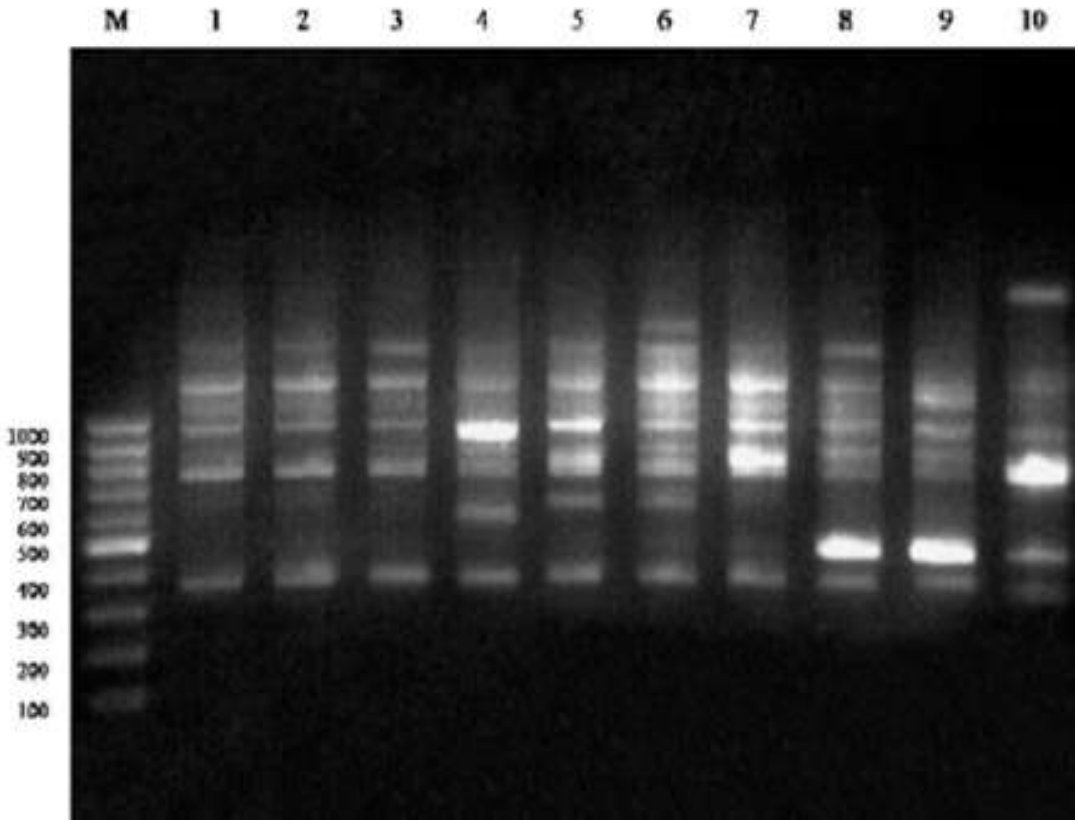
M= حزم معلومة الوزن الجزيئى (100 bp DNA ladder)

	Band size in bp	SW 9720	SW 9628	سوبريم فورجر	سوبر سوبريم	كاف 101	جراسيس 2	سوبر 10	ماجنا 901	برفكت	سيري نافا
1	1320	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2	1190	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3	965	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4	810	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
5	780	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0
6	680	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1
7	515	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
8	390	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
9	350	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Total	----	9	9	9	9	8	8	7	7	8	8

(4-1-1-2):انماط الفصل الكهربي للطراز الحزمي للبادئ OPA-11

أظهر البادئ OPA-11 (شكل 4–2، جدول4–2) 13 حزمة تراوح طولها 2450 و385 زوج قاعدة، وكان عددها في الأصناف ما بين تسعة حزم في الصنف جراسيس2 و ست حزم في الأصناف SW9628, SW9720، سوبريم فورجر وكاف101 وسيري نافا بينما ظهرت سبعة حزم في بقية الأصناف.

اشتركت جميع الأصناف في وجود أربعة حزم متطابقة Monomorphic تبلغ أطوالها 1435، 1050 ، 800 و 385 زوج قاعدة، في حين تباينت بقية الحزم وعددها تسعة حزم Polymorphic بنسبة 69,23٪. وقد تميز كل من الصنف سوبر سوبريم ،برفكت، جراسيس2 و سيري نافا عن بقية الأصناف بوجود حزمة فريدة طولها 580 ،1275 ، 2030 و 2450 زوج قاعدي على الترتيب. وتميز الصنفان كاف 101 وجراسيس2 بظهور حزمة طولها 610 زوج قاعدة، بينما تميز الصنفان برفكت و سيري نافا بغياب حزمة طولها 1805 زوج قاعدة.



شكل (2-4) :النمط الحزمي الناتج من البادئ OPA-11 فى أصنــاف البرسيم الحجازي العشره.

1 – 10 = أصناف نبات البرسيم الحجازي

جدول (2-4): توزيع الحزم الناتــجة من

(1) SW9720	(2) SW9628
(3) سوبريم فورجر	(4) سوبر سوبريم
(5) كاف 101	(6) جراسيس 2
(7) سوبر 10	(8) ماجنا 901
(9) برفكت	(10) سيري نافا

M = حزم معلومة الوزن الجزيئى (100 bp DNA ladder)

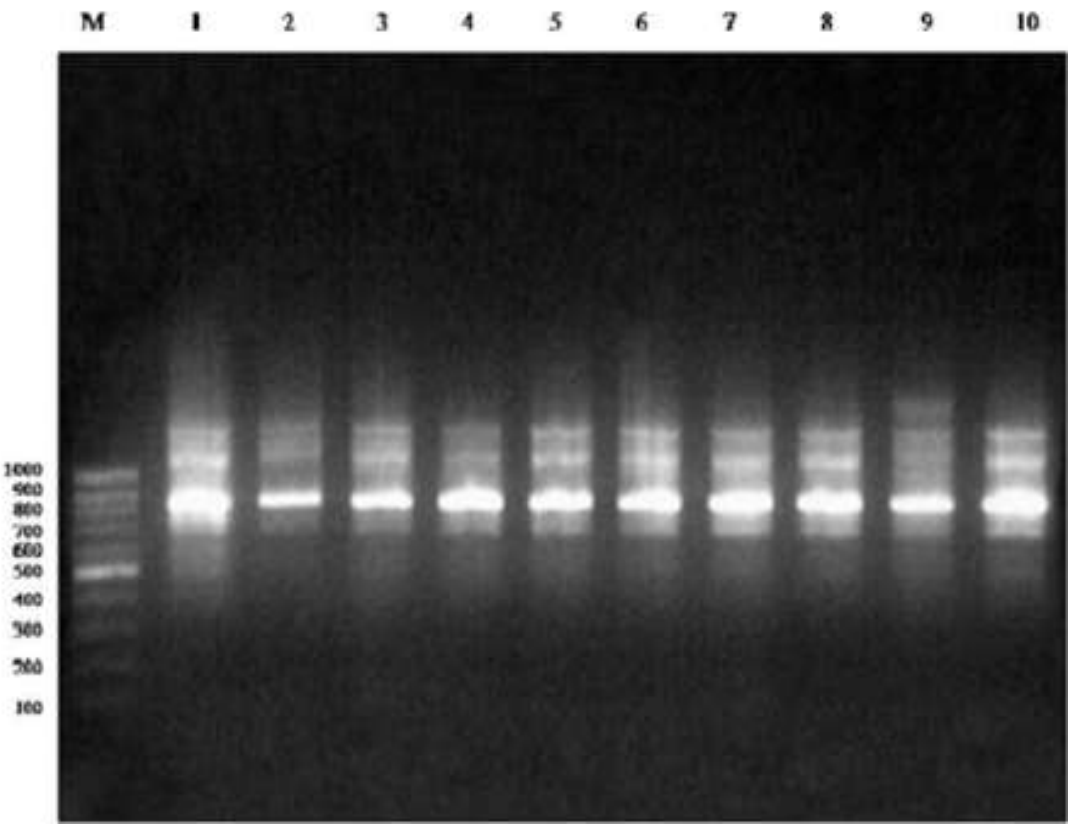
البادئ OPA-11 في أصناف البرسيم الحجازي العشرة

Band	Approx. Band size in bp	Cultivars									
		SW 9720	SW 9628	سوبريم فورجر	سوبر سوبريم	كاف 101	جراسيس 2	سوبر 10	ماجنا 901	برفكت	سيري نافا
1	2450	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
2	2030	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
3	1805	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
4	1435	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
5	1275	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
6	1225	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0
7	1050	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
8	865	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0
9	800	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
10	610	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
11	580	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
12	450	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
13	385	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Total	----	6	6	6	7	6	9	7	7	7	6

(4-1-1-3):أنماط الفصل الكهربي للطراز الحزمي للبادئ OPA-13

أظهر البـــادئ OPA-13 (شكل 4-3، جدول 4-3) عدد خمس حزم فقط تراوح طولها مـــابين 1895 و 685 زوج قاعدي ، وكان عددها أربعة حزم في جميع الأصناف المستخدمة في الدراسة ماعـــدا الصنف برفكت حيث ظهرت خمسة حزم.

اشتركت جميع الأصناف في وجود أربعة حزم متطابقـــة أطوالهـــا 1470، 1200 ، 840 و 685 زوج قاعدة، بينما تميز الصنف برفكت بحزمة فريدة طولها 1895 زوج قاعدي تقريباً، وقد أظهرت حزم هذا البادئ نسبة تباين قدرها 20٪ .



شكل (4-3) : النمط الحزمي الناتج من البادئ OPA-13 فى أصنـاف البرسيم الحجازى الـعشـرة.

جدول (4-3): توزيع الحزم الناتـجة من البادئ

1 – 10 = أصناف نبات البرسيم الحجازي

(1) SW9720	(2) SW9628
(3) سوبريم فورجر	(4) سوبر سوبريم
(5) كف 101	(6) جراسيس 2
(7) سوبر 10	(8) ماجنا 901
(9) برفكت	(10) سيري نافا

M = حزم معلومة الوزن الجزيئى (100 bp DNA ladder)

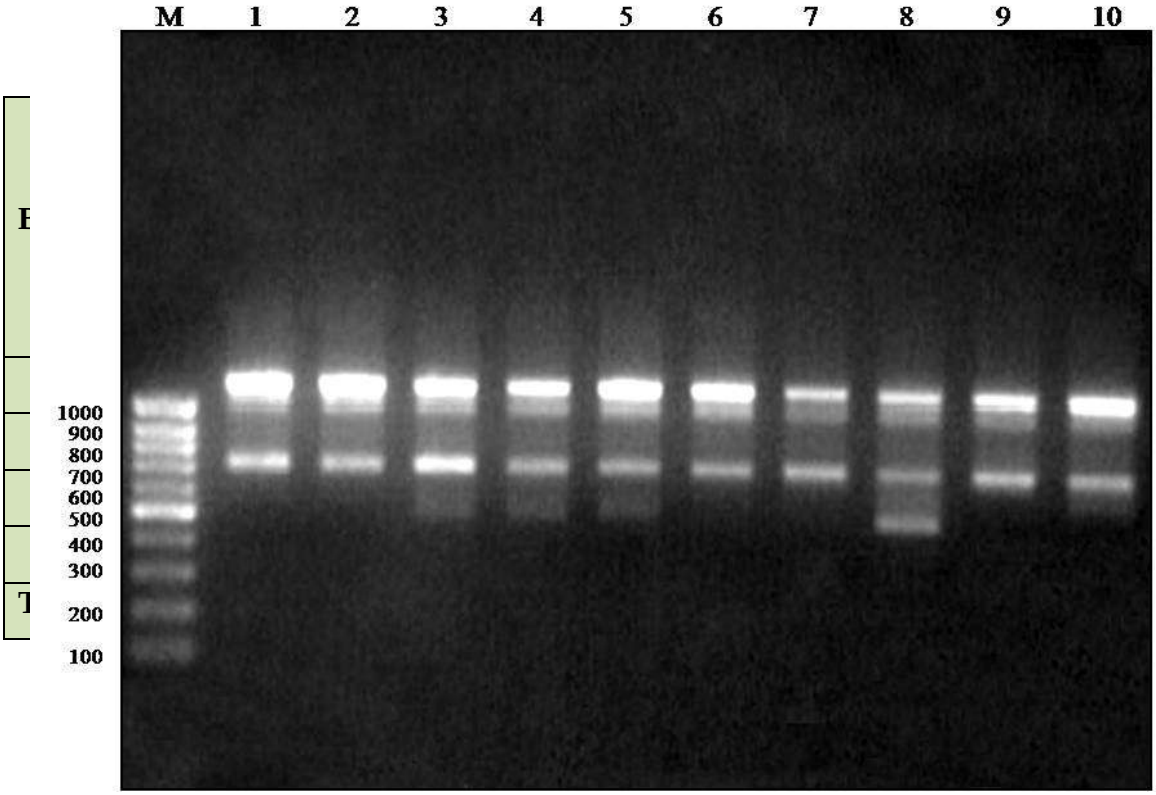
OPA-13 في أصناف البرسيم الحجازي العشرة

Band	Approx. band size in bp	Cultivars									
		SW 9720	SW 9628	سوبريم فورجر	سوبر سوبريم	كاف 101	جراسيس 2	سوبر 10	ماجنا 901	برفكت	سيري نافا
1	1895	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
2	1470	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3	1200	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4	840	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
5	685	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Total	---	4	4	4	4	4	4	4	4	5	4

(4-1-1-4):أنماط الفصل الكهربي للطراز الحزمي للبادئ OPA- 14

أظهر البادئ OPA-14 (شكل 4-4، جدول 4-4) أربعة حزم فقط تراوح طولها مابين 1220 و 415 زوج قاعدة وتراوح عددها بين أثنين في الأصناف SW9628, SW9720 ، جراسيس2 ، سوبر10 ، برفكت و سيري نافا وثلاث حزم في بقية الاصناف.

أشتركت جميع الأصناف في اثنين من الحزم المتطابقة ذات الاطوال 1220 و780 زوج قاعدة . وقد ظهرت حزمة فريدة طولها 415 زوج قاعدة في الصنف ماجنا901 فقط دون بقية الاصناف، وقد أظهرت حزم هذا البادئ نسبة تباين قدرها 50٪ .



جدول (4 – 4): توزيع الحزم الناتـــجة من البادئ OPA-14 في أصناف البرسيم الحجازي العشرة

شكل (4-4) : النمط الحزمي الناتج من البادئ OPA-14 فى أصنــاف البرسيم الحجازى الـعشـرة

1 – 10 = أصناف نبات البرسيم الحجازي

(1) SW9720	(2) SW9628
(3) سوبريم فورجر	(4) سوبر سوبريم
(5) كاف 101	(6) جراسيس 2
(7) سوبر 10	(8) ماجنا 901
(9) برفكت	(10) سيري نافا

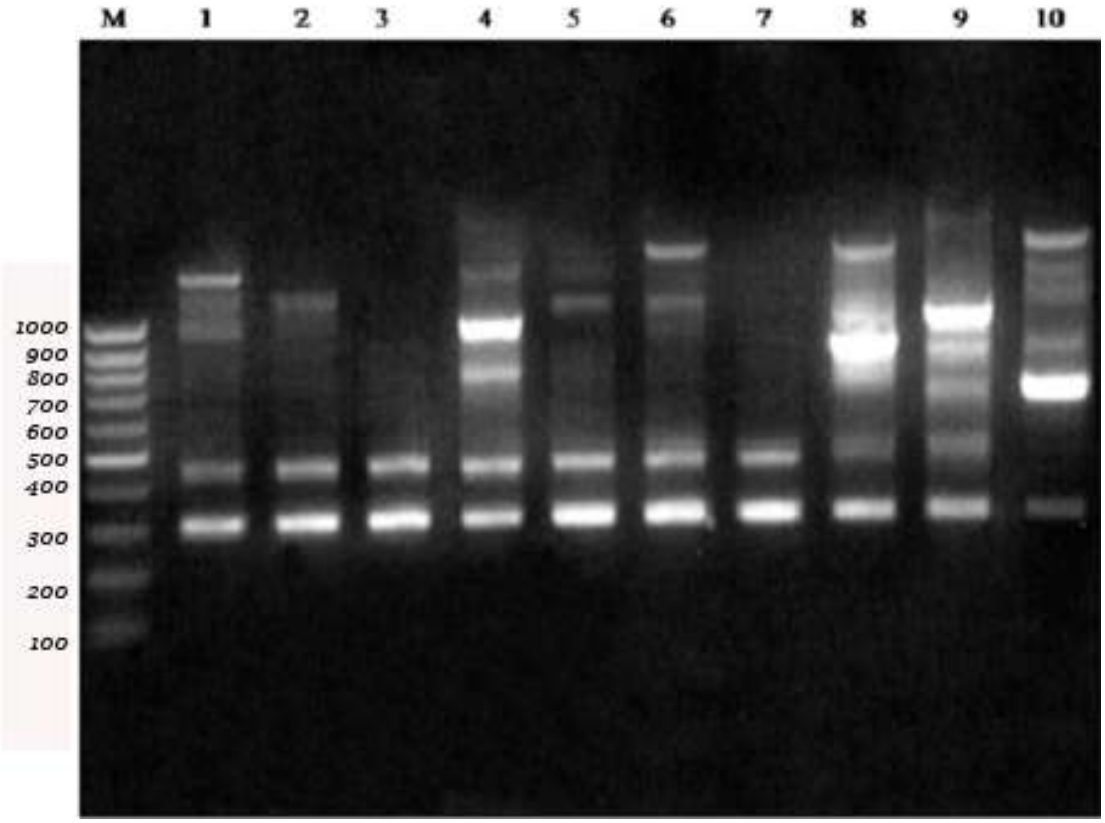
M= حزم معلومة الوزن الجزيئى (100 bp DNA ladder)

(4-1-1-5):أنماط الفصل الكهربي للطراز الحزمي للبادئ OPA-16

يوضح الشكل رقم (4-5) أنماط الفصل الكهربي لنواتج RAPD باستخدام البادئ OPA-16، ويبين الجدول رقم (4-5) توزيع حزم RAPD التى أظهرها هذا البادئ في أصناف البرسيم العشرة موضع الدراسة.

أظهر هذا البادئ 12 حزمة تراوح طولها ما بين 1915 و 300 زوج قاعدة، وتراوح عددها في الأصناف ما بين حزمتين في الصنفين سوبر 10 وسوبر فورجر وستة حزم في الصنف سيري نافا ، كما ظهرت ثلاثة حزم في الصنف SW9628 وأربعة حزم في الصنفين كاف 101 و جراسيس 2 ، أما بقية الأصناف فقد أظهرت خمس حزم.

تباينت الحزم الناتجة من البادئ OPA-16 بنسبة 91,67٪ ما عدا حزمة متطابقة واحدة فقط طولها 300 زوج قاعدة (جدول 4-5). أنتج هذا البادئ ثلاث حزم فريدة. تميز الصنف سوبر سوبريم بحزمة فريدة طولها 790 زوج قاعدة، بينما تميز الصنف سيري نافا بوجود حزمتين فريدتين طولهما 1665 و 1445 زوج قاعدة كما تميز بغياب حزمة طولها 485 زوج قاعدة رغم ظهورها في بقية الأصناف. أنتج هذا البادئ حزمة طولها 1210 زوج قاعدي في الصنفين ماجنا901 و برفكت ، كما ظهرت حزمة طولها 1055 زوج قاعدة في الصنفين سوبرسوبريم و SW9720 وحزمة طولها 665 زوج قاعدة في الصنفين سيرى نافا و برفكت دون بقية الاصناف.


M
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
1000
900
800
700
600
500
400
300
200
100

شكل (4-5) : النمط الحزمي الناتج من البادئ OPA-16 فى أصنــاف البرسيم الحجازى الـعشـرة.

1 – 10 = أصناف نبات البرسيم الحجازي

(1) SW9720 (2) SW9628
(3) سوبريم فورجر (4) سوبر سوبريم
(5) كاف 101 (6) جراسيس 2
(7) سوبر 10 (8) ماجنا 901
(9) برفكت (10) سيري نافا

M = حزم معلومة الوزن الجزيئى (100 bp DNA ladder)

جدول (4–5): توزيع الحزم الناتــجة من البادئ OPA-16 في أصناف البرسيم الحجازي العشرة

Band	Approx. Band size in bp	Cultivars									
		SW 9720	SW 9628	سوبريم فورجر	سوبر سوبريم	كاف 101	جراسيس 2	سوبر 10	ماجنا 901	برفكت	سيري نافا
1	1915	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1
2	1665	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
3	1605	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0
4	1445	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
5	1300	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0

6	**1210**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**1**	**1**	**0**
7	**1055**	**1**	**0**	**0**	**1**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**
8	**880**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**1**	**1**	**1**
9	**790**	**0**	**0**	**0**	**1**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**
10	**665**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**1**	**1**
11	**485**	**1**	**1**	**1**	**1**	**1**	**1**	**1**	**1**	**1**	**0**
12	**300**	**1**	**1**	**1**	**1**	**1**	**1**	**1**	**1**	**1**	**1**
Total	**----**	**5**	**3**	**2**	**5**	**4**	**4**	**2**	**5**	**5**	**6**

(4-1-1-6): أنمـــاط الفصـــل الكـــهربي للطراز الحزمي للبـــادئ OPB-01

يوضـــح شكل (4−6) أنمـــاط الفصل الكـــهربي لنواتج RAPD باســـتخدام البـــادئ OPB-01 ويبين الجدول رقم (4−6) توزيع حزم RAPD التي أظهرها هذا البادئ في اصناف البرسيم العشرة موضع الدراسة.

اظهر البادئ OPB-01 ثلاث حزم فقط تراوح طولها مابين 930 و 435 زوج قاعدي . ظهرت ثلاث حزم في الأصناف سوبريم فورجر ، سوبر سوبريم و جراسيس2 بينما ظهرت حزمتين في بقية الأصناف ، إشتركت جمع الأصناف في حزمتين متطابقتين ذات الأطوال 930 و435 زوج قاعده وكانت نسبة التباين 33,33٪ ولم تظهر حزم فريدة لأي صنف من الأصناف قيد الدراسه باستخدام هذا البادئ.

شكل (4-6) : النمط الحزمي الناتج من البادئ OPB-01 فى أصنـاف البرسيم الحجازى العشـرة.

1 – 10 = أصناف نبات البرسيم الحجازي

(1) SW9720	(2) SW9628
(3) سوبريم فورجر	(4) سوبر سوبريم
(5) كاف 101	(6) جراسيس 2
(7) سوبر 10	(8) ماجنا 901
(9) برفكت	(10) سيري نافا

M = حزم معلومة الوزن الجزيئى (100 bp DNA ladder)

جدول (4–6): توزيع الحزم الناتــجة من البادئ OPB-01 في أصناف البرسيم الحجازي العشرة

Band	Approx. Band size in bp	Cultivars									
		SW 9720	SW 9628	سوبريم فورجر	سوبر سوبريم	كاف 101	جراسيس 2	سوبر 10	ماجنا 901	برفكت	سيري نافا
1	930	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2	790	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0
3	435	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Total	----	2	2	3	3	2	3	2	2	2	2

(4-1-1-7): أنمـــاط الفصـــل الكـــهربي للطراز الحزمي للبـــادئ OPB-07

أظهر البادئ OPB-07 (شكل 4-7، جدول4-7) سبعة حزم تراوح طولها مـــا بـــين 1150 و180 زوج قاعدة، وتتراوح عددها في الأصناف ما بين خمسة حزم في الصـــنف SW9720 و أربعـــة حزم في الصنفين سيري نافا و برفكت وسبعة حزم في بقية الأصناف.

اشتركت جميع الأصناف في أربع حزم متطابقة أطوالهـــا 820، 640، 420 و340 زوج قاعـــدة تقريباً، في حين تباينت ثلاث حزم بنسبة 42,86٪ وقد تميز الصنفين برفكت و سيري نافا بغياب حزمـــة طولها 180 زوج قاعدي بينما ظهرت في جميع الأصناف ولم تظهر حزم فريده لأي صنف من الأصناف قيد الدراسه بإستخدام هذا البادئ .

شكل (4-7) : النمط الحزمي الناتج من البادئ OPB-07 فى أصنـاف البرسيم الحجازى الـعشـرة.

1 – 10 = أصناف نبات البرسيم الحجازي

SW9720 (1)	SW9628 (2)
(3) سوبريم فورجر	(4) سوبر سوبريم
(5) كاف 101	(6) جراسيس 2
(7) سوبر 10	(8) ماجنا 901
(9) برفكت	(10) سيري نافا

M = حزم معلومة الوزن الجزيئى (100 bp DNA ladder)

جدول (4-7): توز

يع الحزم الناتــجة من البادئ OPB-07 في أصناف البرسيم الحجازي العشرة

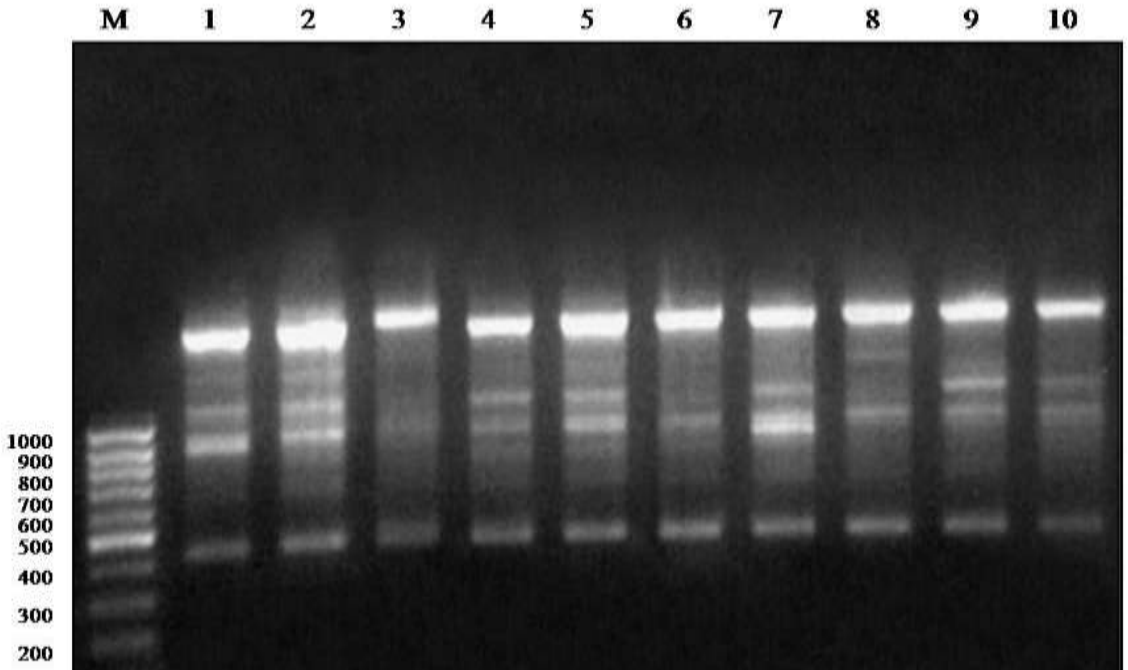
Band	Approx. Band size in bp	Cultivars									
		SW 9720	SW 9628	سوبريم فورجر	سوبر سوبريم	كاف 101	جراسيس 2	سوبر 10	ماجنا 901	برفكت	سيري نافا
1	1150	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0
2	820	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3	640	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4	495	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0
5	420	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
6	340	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
7	180	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
Total	----	5	7	7	7	7	7	7	7	4	4

(4-1-1-8): أنمــاط الفصــل الكــهربي للطراز الحزمي للبــادئ OPB-09

أظهر البــادئ OPB-09 (شكل 4-8، جدول 4-8) ثمانية حزم تراوح طولها ما بين 2850 و 485 زوج قاعدي ، وتراوح عددها في الأصناف مابين سبعة حزم فــي الصــنف SW9628 وكــاف 101وثلاث حزم في الصنف سوبريم فورجر .

اشتركت جميع الأصناف في حزمتين متطابقين يتراوح طولها 985 و 485 زوج قاعدي في حــين تباينت بقية الحزم وعددها ستة بنسبة 75 ٪ . انتج هذا البادئ حزمة فريدة واحــدة طولهــا 2850 زوج قاعدي ميزت الصنف سوبريم فورجر دون بقية الأصناف ، علاوه على أنه تميز أيضاً بغياب حزمه فريده

طولها 2635 زوج قاعدي بينما ظهرت باقي الأصناف. كما ظهرت حزمة طولها 1960 زوج قاعدي في الأصناف SW920 ، SW9628 ،كاف 101 و ماجنا 901 بينما تغيبت في بقية الأصناف.



شكل (4-8) : النمط الحزمي الناتج من البادئ OPB-09 فى أصنـــاف البرسيم الحجازى الـعشـرة.

1 – 10 = أصناف نبات البرسيم الحجازي

(1) SW9720	(2) SW9628
(3) سوبريم فورجر	(4) سوبر سوبريم
(5) كاف 101	(6) جراسيس 2
(7) سوبر 10	(8) ماجنا 901
(9) برفكت	(10) سيري نافا

M = حزم معلومة الوزن الجزيئى (100 bp DNA ladder)

جدول (4–8): توزيع الحزم الناتـــجة من البادئ OPB-09 في أصناف البرسيم الحجازي العشرة

Band	Approx.	Cultivars

	Band size in bp	SW 9720	SW 9628	سوبريم فورجر	سوبر سوبريم	كاف 101	جراسيس 2	سوبر 10	ماجنا 901	برفكت	سيري نافا
1	**2850**	**0**	**0**	**1**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**
2	**2635**	**1**	**1**	**0**	**1**	**1**	**1**	**1**	**1**	**1**	**1**
3	**1960**	**1**	**1**	**0**	**0**	**1**	**0**	**0**	**1**	**0**	**0**
4	**1455**	**1**	**1**	**0**	**1**	**1**	**0**	**1**	**0**	**1**	**1**
5	**985**	**1**	**1**	**1**	**1**	**1**	**1**	**1**	**1**	**1**	**1**
6	**855**	**0**	**1**	**0**	**1**	**1**	**1**	**1**	**1**	**0**	**0**
7	**700**	**0**	**1**	**0**	**1**	**1**	**1**	**1**	**1**	**0**	**0**
8	**485**	**1**	**1**	**1**	**1**	**1**	**1**	**1**	**1**	**1**	**1**
Total	**---**	**5**	**7**	**3**	**6**	**7**	**5**	**6**	**6**	**4**	**4**

(4−1−1−9):أنماط الفصل الكهربي للطراز الحزمي للبادئ OPB-10

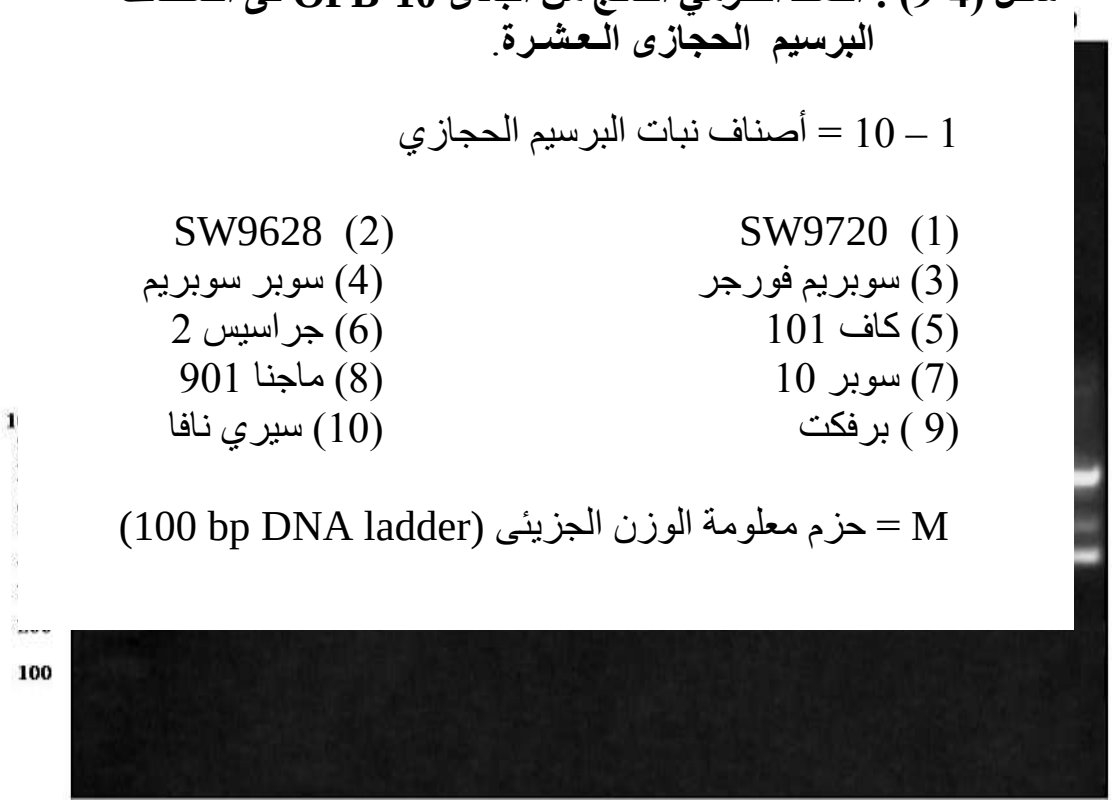
أظهر البادئ OPB-10 ستة حزم تراوح طولها مابين 1720 و 385 زوج قاعدي وتراوح عددها في الأصناف مابين ستة حزم في الأصناف SW 9720 ، SW9628 و سوبريم فورجر وأربعة حزم في الصنفين سوبر سوبريم و سوبر10 أما بقية الأصناف فقد أظهرت خمسة حزم (شكل 4–09، جدول 4–9). اشتركت جميع الأصناف في أربعة حزم متطابقة اطوالها 1720، 700، 490 و385 زوج قاعدة في حين تباينت حزمتين بنسبة 33,33 ٪ ، ولم تظهر أي حزم فريده لأي صنف من الأصناف قيد الدراســه بإستخدام هذا البادئ.

شكل (4-9) : النمط الحزمي الناتج من البادئ OPB-10 فى أصنــاف البرسيم الحجازى الـعشـرة.

1 – 10 = أصناف نبات البرسيم الحجازي

(1) SW9720
(2) SW9628
(3) سوبريم فورجر
(4) سوبر سوبريم
(5) كاف 101
(6) جراسيس 2
(7) سوبر 10
(8) ماجنا 901
(9) برفكت
(10) سيري نافا

M = حزم معلومة الوزن الجزيئى (100 bp DNA ladder)



جدول (4–9): توزيع الحزم الناتــجة من البادئ OPB-10 في أصناف البرسيم الحجازي العشرة

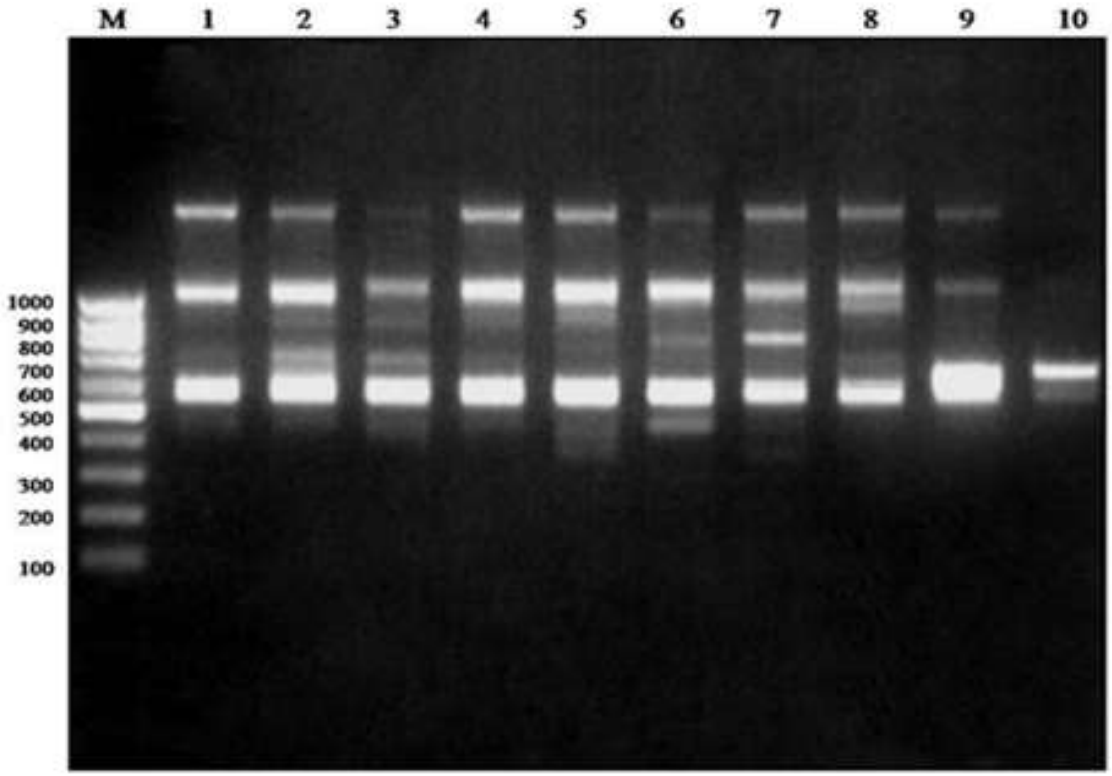
Band	Approx. Band size in bp	Cultivars									
		SW 9720	SW 9628	سوبريم فورجر	سوبر سوبريم	كاف 101	جراسيس 2	سوبر 10	ماجنا 901	برفكت	سيري نافا
1	1720	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2	1425	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1
3	985	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0
4	700	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
5	490	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
6	385	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Total	---	6	6	6	4	5	5	4	5	5	5

(4-1-1-10):أنماط الفصل الكهربي للطراز الحزمي للبادئ OPB-13

يوضح الشكل رقم (4-10) انماط الفصل الكهربي لنواتج RAPD باستخدام البادئ OPB-13 ويبين الجدول رقم (4-10) توزيع حزم RAPD التي اظهرها هذا البادئ في اصناف البرسيم العشرة موضع الدراسة.

اظهر البادئ تسعة حزم تراوح طولها مابين 2125 و 430 زوج قاعدة ، وتراوح عددها في الأصناف مابين خمسة حزم في الأصناف SW 9628، سوبرفورجر و جراسيس 2 وثلاث حزم في الأصناف SW9720 ، برفكت و سيري نافا وأربعة حزم في بقية الأصناف.

اشتركت جميع الأصناف بوجود حزمتين متطابقتين طولها 1230 و 570 زوج قاعدة ، كما تباينت بقية الحزم وعددها سبعة بنسبة 77,78 ٪. انتج هذا البادئ ثلاث حزم فريدة احدهما تميز الصنف جراسيس 2 طولها 430 زوج قاعدة وأخرى ميزت الصنف ماجنا 901 طولها 1025 زوج قاعدة ، كما تميز الصنف سيري نافا بحزمة فريدة طولها 640 زوج قاعدي وغياب حزمة طولها 2125 زوج قاعدة رغم ظهورها في جميع الأصناف. أنتج هذا البادئ أيضاً حزمة طولها 795 زوج قاعدة في الصنفين جراسيس 2 و سوبر10 وحزمة طولها 690 زوج قاعدي في الصنفين SW928 و سوبريم فورجر دون بقية الأصناف.



شكل (4-10) : النمط الحزمي الناتج من البادئ OPB-13 فى أصنــاف البرسيم الحجازي العشره.

جدول (4-10): توزيع الحزم الناتــجة من البادئ OPB-13 في

1 – 10 = أصناف نبات البرسيم الحجازي

(1) SW9720	(2) SW9628
(3) سوبريم فورجر	(4) سوبر سوبريم
(5) كف 101	(6) جراسيس 2
(7) سوبر 10	(8) ماجنا 901
(9) برفكت	(10) سيري نافا

M = حزم معلومة الوزن الجزيئى (100 bp DNA ladder)

أصناف البرسيم الحجازي العشرة

Band	Approx. Band size in bp	Cultivars									
		SW 9720	SW 9628	سوبريم فورجر	سوبر سوبريم	كاف 101	جراسيس 2	سوبر 10	ماجنا 901	برفكت	سيري نافا
1	2125	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
2	1230	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3	1025	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
4	920	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0
5	795	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0
6	690	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
7	640	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
8	570	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
9	430	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Total	----	3	5	5	4	4	5	4	4	3	3

(4-1-1-11):أنماط الفصل الكهربي للطراز الحزمي للبادئ OPC-01:

يوضح الشكل رقم (4-11) أنماط الفصل الكهربي لنواتج RAPD باستخدام البادئ OPC-01 ، ويبين الجدول رقم (4-11) توزيع الحزم التي أظهرها هذا البادئ.

أظهر البادئ 11 حزمة تراوح طولها مابين 2115 و 255 وتراوح عددها في الأصناف مابين حزمتين في الصنف كاف101 وسبعة حزم في الصنف جراسيس2 ، في حين ظهر أربعة حزم في

الصنف ماجنا901 وخمسة حزم في الأصناف SW9720 ، SW9628 ، برفكت و سيري نافا وستة حزم في بقية ألأصناف.

اشتركت جميع الأصناف بوجود حزمتين متطابقتين تبلغ طولها 840 و625 زوج قاعـــدي، كمـــا تباينت بقية الحزم وعددها تسعة بنسبة تباين 81,82٪. انتج هذا البادئ ثلاث حزم فريدة احدهما ميـــزت الصنف ماجنا 901 طولها 1545 زوج قاعده وأخرى ميزت الصنف برفكت طولها 1450 زوج قاعـــده كما تميزالصنف سيري نافا بحزمة طولها 950 زوج قاعده. انتج هذا البادئ أيضاً حزمة طولهـــا 1575 زوج قاعدي في الصنفين جراسيس 2 و سيري نافا دون بقية الأصناف كما غابت حزمـــة طولهـــا 995 زوج قاعدي في الصنف كاف 101 وسيري نافا.