كشف التباينات الوراثية لبعض سلالات البطاطا الطافرة باستخدام RAPD

وائل متوج(1)* **ومازن رجب**(1) **وحسان خوجة**(2)

(1). شعبة التقانات الحيوية، الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية ،دمشق، سورية

(2). قسم البساتين، كلية الزراعة، جامعة تشرين، اللاذقية، سورية.

(*للمراسلة: د. وائل متوج ، البريد الإلكتروني: mtwjmrym@gmail.com).

تاريخ الاستلام: 2022/06/14 تاريخ القبول: 25 /2022/10

الملخص

نُفِّذ البحث في مركز بحوث اللاذقية التابع للهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية خلال عامي 2017/2016. استخدمت تقنية التضخيم العشوائي المتعدد الأشكال لسلسلة الـ DNA (RAPD) (Randomly Amplified Polymorphic DNA المعتمدة على تقنية PCR (Chain Reaction Polymerase) بخمسة عشر بادئة لتمييز التباينات الوراثية بين ست سلالات طافرة استحدثت من صنف البطاطا مارفونا – بالتطفير الكيميائي بمركب ايتيل ميتان سلفونات (EMS)، وانتخبت لتحمل ظروف الإجهاد بكلوريد الصوديوم (NaCl) في جيل الطفرة الخامس (M5), تفوقت معاملة التطفير 40 ميلليمول وزمن غمر (3−2) ساعة وكانت السلالات (403p2, 403p14,402p31) الأكثر تحملاً للملوحة− شملت مراحل العمل عزل وتنقية DNA من الأوراق الحديثة للسلالات M5 الداخلة بالبحث والكشف عن التباينات بين القطع المكاثرة لكل سلالة بعد رحلان العينات بجهاز الرحلان الكهربائي في تفاعلات RAPD. بينت نتائج التحليل الوراثي اختلافاً واضحاً في عدد حزم DNA المضخمة تبعاً لأوزانها الجزيئية للبادىء المستخدم، تم الكشف عن التباينات بين الحزم المضخمة لكل سلالة (عدد ووزن الحزم الجزيئي) على هلامة من الآغاروز بعد صبغها ببروميد الايثيديوم. وبعد اختبار15 بادئ تم اختيار نتائج 3 بادئات، حيث بلغ عدد الحزم الكلية 27 حزمة أي بمعدل 9.0 حزمة لكل بادئ, أبدت 6 حزم تشابهاً في ظهورها بين العينات، بينما ظهرت 21 حزمة متباينة لكافة البادئات، فشكلت نسبة تعددية شكلية بلغت 77.03 % من عدد الحزم الكلية، بينت النتائج وجود تباين في عدد الحزم الكلية التي ظهرت من استخدام البادئ الواحد، حيث سجل البادئ OPJ01 أعلى عدد للحزم بلغ 13 حزمة، وأظهر البادئ OPC04 أدنى عدد للحزم بلغ 6 حزم فقط. إن السلالات (403p2, 403p14,,404p13) أظهرت تبايناً وراثياً عن نباتات الشاهد غير الطافر بعدد حزم متباينة (10,12،5) حزمة على التوالي بالمقارنة بالسلالات (402p31,403p42,404p46) التي أبدت حزم متباينة عددها (1,1,2) حزمة على التوالي والتي ظهرت من استخدام كافة البادئات.

الكلمات المفتاحية: البطاطا، مارفونا، RAPD

المقدمة:

تُعد البطاطا (*Solanum tuberosum* L.) من المحاصيل الغذائية الرئيسة في العالم، حيث تحتل المرتبة الرابعة في الأهمية الإقتصادية عالمياً بعد القمح والذرة الصفراء والرز (Fernie and Willmizer, 2001). دخلت زراعة البطاطا سورية في بداية القرن العشرين، وصلت المساحة المزروعة بها إلى حوالي 27489 هكتاراً، وبلغ الإنتاج حوالي 647319 طناً بحسب المجموعة الإحصائية السورية الصادرة عن وزارة الزراعة والإصلاح الزراعي لعام 2020.

إن التقدم السريع في العلوم البيولوجية الجزيئية أنتجت العديد من الوسائل والطرائق التي استخدمت في دراسة تقييم التنوع الوراثي، ودراسة القرابة الوراثية بين الأنواع النباتية، ومن أهم تلك الطرائق المستخدمة المؤشرات الجزيئية التي ساعدت مربي النبات في تحسين كفاءة طرائق التربية التقليدية، واختصار زمن برامج التربية المتبعة عند استنباط أصناف وسلالات نباتية جديدة (Jones *et al*., 1997)، فهناك العديد من التقانات الحيوية الحديثة التي تعتمد على دراسة وتحليل المادة الوراثية، منها تقنية التضخيم العشوائي المتعدد الأشكال لسلسلة DNA الـ RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)، حيث تعتمد هذه التقانة على إكثار قطع DNA النباتية عشوائياً في تسلسلها النيوكليوتيدي من خلال تضخم قطع ADN الحاوية على تتاليات نيوكليوتيدية يمكن رؤيتها على شكل حزم (bands) مختلفة الوزن الجزيئي في هلامة من الآغاروز. تتميز تقانة RAPD بأنها لا تحتاج لمعرفة مسبقة بالتركيب النيوكليوتيدي للمادة الوراثية المراد دراستها, ومفيدة لدراسة العشائر ذات الأعداد الكبيرة من الأفراد, كما لا يتطلب انجازها وقتاً طويلاً وأنها غير معقدة ولا تحتاج إلى وجود مواد مشعة, وتوفر عدد كبير جداً من البادئات التي يمكن تبادلها بين مراكز البحث, إضافة إلى سهولة معرفة التسلسل النيوكليوتيدي للبادئ, وتتصف بإمكانية تطبيقها على DNA لأي كائن حي, واستخدامها لبادئات عامة (Universal primers).'تعتبر مؤشرات الـ RAPD جيدة في كشف التباينات الوراثية بين أصناف البطاطا المختلفة حسب ما أكدته نتائج دراسات عديدة (Bordallo *et al*., 2004; Collares, 2004; Ehsanpour *et al*., 2007.; Rocha *et al*., 2010; Gorji, 2011). توصل Hassan (2002) لانتخاب 6 طرز وراثية (S20, S30, S40, D20, D30, D40) من صنفي البطاطا Spunta و Diamant في جيل الطفرة الثاني M2، بناءاً على الإنتاجية المرتفعة (عدد ووزن الدرنات / النبات)، ودرس التغيرات الوراثية لها مقارنة بآبائها من خلال استخدام 11 بادئة RAPD، والتي أعطت (56) حزمة مميزة منهم (31) حزمة متباينة بلغت نسبتها (57.5%)، فأعطت البادئة OPA-03 أكبر عدد من الحزم (8 حزمة)، بينما أعطت البادئة OPA-08 أقل عدد من الحزم (3 حزمة)، سجل التركيبين الوراثيين (S30, S40) أعلى عدد حزم (31 حزمة) تلاهما التركيبين (S20, D40) فأعطيا 15 حزمة، فالتركيب D30 الذي أعطى 12 حزمة، بينما سجل التركيب الوراثي D30 أقل عدد من الحزم (4 حزم). تمّكن Afrasiab (2006) من عزل وانتخاب ثماني طفرات من صنفي البطاطا Desiree و Diamant، باستخدام 24 بادئة RAPD، من مزارع الكالوس الناتج من زراعة الأنسجة بتراكيز مختلفة من المادة المطفرة ايتيل ميتان سلفونات EMS (0، 0.1، 0.2، 0.4، 0.6، 0.6، 0.8، 1) %. كما أشارت العديد من الدراسات لإمكانية توظيف تقنية الـ RAPD في كشف التباينات الوراثية بين أصناف البطاطا بأقل عدد من البادئات (Khatab and El-Banna, 2011; Munir *et al*., 2011; Afrasiab and Iqbal., 2012; Ahmad *et al*., 2013, Hoque *et al*., 2013). استخدمت مؤشرات الـ RAPD للتمييز بين أصناف البطاطا النامية من حيث تحمل الإجهاد الملحي, فخلصت العديد من الدراسات إلى أن الحساسية والتحمّل ترجع إلى الاختلافات الوراثية بين الأصناف (Levy and Veill, 2007; Aghaei; 2008). استخدام الداود وزملاؤه (2008) 27 بادئة عشوائية RAPD في كشف التباين الوراثي بين 10 سلالات من صنفي البطاطا Spunta و Draja المطفرة

باستخدام أشعة غاما، والنامية بظروف إجهاد ملحي. بينما استخدام الحسيني وجلادت (2008) 72 بادئة عشوائية لتحديد التباينات الوراثية بين 21 صنفاً من البطاطا، فأظهرت نتائجهما وجود اختلافاً في عدد الحزم الكلية التي ظهرت من استخدام البادئ الواحد، واختلاف عدد الحزم الكلية باستخدام جميع البادئات من صنف إلى آخر؛ إذ ظهر أعلى عدد للحزم (241) حزمة في الصنف Estima وأقل عدد للحزم (187) حزمة في الصنف Marfona. كما تم توظيف تقنية الـ RAPD في دراسة yaycili وAlikamanoğlu (2012)؛ لتحديد التباين الوراثي بين 19 سلالة من صنف البطاطا (Marfona) الطافرة والمنتخبة لتحمّل تراكيز ملحية مختلفة من كلوريد الصوديوم (50، 100، 125) ميليمول، من خلال استخدام 6 بادئات عشوائية (OPH-19، OPH-17، OPH-16، OPH-14، OPH-13، OPH-12) من أصل 10 بادئات ظهر أعلى عدد للحزم (20) حزمة في الطفرة ذي الرقم Mutant 15 وأقل عدد للحزم (11) حزمة في نباتات الشاهد Marfona غير الطافر، وبنسبة 89.66% للتعددية الشكلية. كما استخدم Khan وآخرون (2014) 20 بادئة RAPD للتمييز بين 38 سلالة طافرة منتخبة من صنف البطاطا (Desiree) لتحمّل الإجهاد الملحي باستخدام تقنية زراعة الأنسجة النباتية، وخلصت الدراسة إلى أنّ 4 بادئات (OPAA 08، OPAA 05، OPAA 03، OPAA-01) تمكنت من تحديد التباينات الوراثية بين 6 أنسال خضرية منتخبة. هدفت الدراسة لاستخدام تقنية التضخيم العشوائي لسلسلة الحمض النووي الـ DNA كمؤشر وراثي رخيص التكلفة ولا يتطلب وقت وجهد في إعطاء تصور مبدئي يسهم في كشف التباينات الوراثية لدى 6 سلالات طافرة والتي ابدت استجابة جيدة لتحمل ظروف الاجهاد الملحي بكلوريد الصوديوم في جيل الطفرة الخامس M5 من صنف البطاطا مارفونا

مواد البحث وطرائقه

1.مكان تنفيذ البحث:

نُفّذ البحث في الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية – مركز بحوث اللاذقية– مخابر شعبة التقانات الحيوية بالتعاون مع كلية الزراعة– قسم البساتين

2.المادة النباتية:

أُستخدم 6 سلالات بطاطا تم الحصول عليها من الصنف مارفونا الحساس للملوحة بطريقة التطفير الكيميائي باستخدام مادة مطفرة هي الايتيل ميتان سلفونات (EMS) بثلاثة تراكيز (20,30,40) ميليمول وثلاث فترات غمر (2,3,4) ساعة للدرنات المكتملة الانبات, زرعت حقلياً ضمن أكياس من البولي ايتيلن سعة 6 كيلو غرام تحوي خلطة ترابية مكونة من الخفان والرمل النهري بنسبة 3:1 حجم/حجم بمعدل درنة كاملة بكل كيس, وقيمت لتحمل ظروف الإجهاد الملحي من خلال معاملتها بعمر شهر اسبوعياً بتراكيز مختلفة كلوريد الصوديوم (200,150,100,50,0) ميليمول في جيل الطفرة الخامس M5, وانتخبت اعتماداً على بعض المؤشرات الخضرية والإنتاجية (صفة الإنتاج ومكوناته) والبيوكيميائية (محتوى الأوراق من اليخضور وحمض البرولين الأميني) وبعض التغيرات المورفولوجية من بحث سابق وهذه السلالات : (304/P46,402/p31, 403/p2, 403/p14, 403/p42, 404/p13) (جدول 1)

الجدول (1): بعض صفات سلالات البطاطا المدروسة والمنتخبة من جيل الطفرة الخامس

الرمز	طول النبات	قطر الساق	عدد الأوراق	مساحة الورقية	عدد درنات	وزن درنات
شاهد مارفونا غير طافر	52.2 -	0.68 -	14.9 -	159.5 -	5.69 -	282.1 -
304P46	61.6 +	1.3 ++	19 +	212.6 ++	8.02 +	658.6 ++

402p31	61.9 ++	1.3 ++	14.4 -	217.3 ++	7.94 +	659.8 ++
403P2	61.9 ++	1.3 ++	20 ++	215.3 ++	7.90 +	661.9 ++
403p14	61.7 +	1.3 ++	20.5 ++	218.4 ++	7.60 +	658.7 ++
403p42	61.6 +	1.3 ++	19 ++	212.7 ++	7.98 +	657.5 ++
404p13	60.9 +	1.3 ++	15.5 +	215.3 ++	7.91 +	658.5 ++

*ملاحظة إشارة ++ تدل على وجود فرق معنوي عال مع الشاهد، + فرق معنوي مع الشاهد، − لا يوجد فرق معنوي مع الشاهد.

تمّ استخلاص الحمض النووي الريبي منقوص الأكسجين DNA من الأوراق الغضة للنباتات المنتخبة وفقاً لطريقة (Doyle and Doyle, 1990) المعتمدة على مادة الـ CTAB (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide). وتمّ التقدير النوعي للحمض النووي DNA بواسطة الرحلان الكهربائي الأفقي؛ باستخدام هلامة أغاروز تركيز 1 % مضافاً إليه محلول الرحلان TBE (1X) (Tris- Boric acid EDTA) والكاشف بروميد الايثيديوم 0.5 µg/ml، ومن ثم أُظهرت حزم الحمض النووي DNA باستخدام الأشعة فوق البنفسجية (UV) وأُستخدم مؤشر قياسي للإشارة لمواقع وحجم الحزم، وتمّ انتقاء الأفضل من العينات ذات النوعية الجيدة التي ظهرت على شكل حزم Bands، وتمّ التقدير الكمي للحمض النووي DNA في العينات باستخدام مقياس الطيف الضوئي Spectrophotometer (UV)، كما تمّ التأكد أيضاً من نقاوة الحمض DNA بحساب نسبة الامتصاصية عند أطوال الموجات الضوئية 260 إلى 280 نانوميتر؛ إذ تراوحت نسبة الـ DNA بين (1.8−2) للعينات المدروسة مما يدل على النقاوة الجيدة لـ DNA وفق (Maniatis *et al.*, 1982)، مُددت بعدها عينات الحمض النووي DNA بالماء المقطر المعقم وصولاً إلى تركيز (100) ng /µl. أُستخدمت تقنية التضخيم العشوائي المتعدد الأشكال (RAPD)، حيث تمّ مضاعفة الـ (DNA) باستخدام 15 بادئة عشوائية (جدول 4). أجريت المضاعفة في جهاز التدوير الحراري (Polymerase Chain Reaction) PCR من شركة (Filexigene) بحجم تفاعل كلي مناسب 25 µl (جدول 2).

الجدول (2): مكونات تفاعل الـ PCR

المادة	التركيز	الحجم/ميكرولتر
محلول منظم (Buffer)	10×	µl (2.5)
كلوريد المغنيزيوم (MgCl2)	25 mM	1.4
القواعد الأزوتية (dNTPs)	2 mM	2
البادئ (Primer)	5 p.m	4
إنزيم بلمرة DNA (*Taq-Polymerase*)	1 u	1
الـ DNA القالب (Tampate)	50 ng	2

ثم أكمل الحجم بالماء المقطر المعقم, وتم إضافة (20−25) µl من زيت معدني حفاظًا على محتويات الأنبوبة من التبخر قبل أن تنقل إلى جهاز الـ PCR لبدء التفاعل التضاعفي.

الجدول (3): برنامج عمل الـ PCR.

المرحلة	درجة الحرارة	الزمن	عدد الدورات
فصل أولي للسلاسل (Initial Denaturation)	94م°	3 دقائق	1
فصل السلاسل Denaturation	94م°	30 ثانية	35
التحام البادئة Annealing	32م°	45 ثانية	

استطالة Extension	72م°،	2 دقيقة	
استطالة نهائية	72م°،	7دقائق	1
حفظ	4م°	لانهائي	

تمّ ترحيل نواتج تفاعل الـ PCR في هلامة الأغاروز بتركيز 1 % تحت جهد كهربائي قدره 85 فولت لمدة ساعتين ونصف، ثم صُورت الحزم الظاهرة بوجود الأشعة فوق البنفسجية؛ باستخدام جهاز. Gel documentation؛ لتظهير نواتج التفاعل حسب (Williams *et al*., 1990)، تم بعدها حساب عدد الحزم الناتجة مع أحجامها الجزيئية باستخدام كل بادئة.

الجدول(4): التسلسل النكليوتيدي لبادئات الـ RAPD ودرجة حرارة الالتحام والانصهار.

اسم البادئة	التسلسل النكليوتيدي ' 5- 3'	طول البادئة (bp)	درجة حرارة الالتحام (مْ)	درجة حرارة الانصهار (مْ)
OPJ01	CCCGGCATAA	10	32	94
OPC01	TTCGAGCCAG	10	32	94
OPC04	CCGCATCTAC	10	32	94
OPK17	CCCAGCTGTG	10	34	94
OPK12	TGGCCCTCAC	10	34	94
OPF18	GGCTCGATGT	10	32	94
OPH10	CCTACGTCAG	10	32	94
OPO08	CCTCCAGTGT	10	32	94
OPN01	CTCACGTTGG	10	32	94
OPAF14	GGTGCGCAC	10	34	94
OPL11	ACGATGAGC	10	32	94
OPD08	GTGTGCCCCA	10	34	94
OPB17	AGGGAACGAG	10	32	94
OPZ02	CCTACGGGGA	10	34	94
OPZ19	GTGCGAGCAA	10	32	94

التحليل الإحصائي:

حُللت نتائج التضخيم لعينات الحمض النووي للسلالات المختبرة بالمدور الحراري من خلال جمع نتائج عمليات المكاثرة لثلاث بادئات أعطت حزماً مميزة من أصل 15بادئة مختبرة, وتم ذلك في جداول خاصة اعتماداً على وجود أو غياب حزم معينة من الـ DNA في العينات المختلفة، يرمز لوجود حزمة الـ DNA بالرقم (1) ولعدم وجودها بالرقم (0).

النتائج والمناقشة

أظهرت النتائج أنه من أصل 15 بادئة مستخدمة سجلت 3 بادئات RAPD كفاءة جيدة في كشف التباينات الوراثية بين السلالات المختبرة بالمقارنة مع نباتات الشاهد غير الطافر؛ بهدف وضع هوية جزيئية لها (الجدول 5)، حيث أعطت البادئات المستخدمة 27 حزمة في السلالات المنتخبة كافة بمتوسط 9 حزم لكل بادئة مستخدمة، حيث وصل عدد الحزم المتشابهة (Monomorphic) إلى 6 حزم في حين بلغ عدد الحزم المتباينة (Polymorphic) 21 حزمة، وبالتالي بلغت نسبة التعددية الشكلية 77.03% من إجمالي عدد الحزم الكلية، وقد أعطت البادئة (OPJ 01) أعلى عدد من الحزم بلغ 13 حزمة (الشكل 1) في حين أعطت البادئة OPC04 أقل عدد من الحزم (6 حزمة)، وتراوح الوزن الجزيئي للحزم بين 300–1369 زوج نكليوتيدي مما يدل على وجود تباينات وراثية واضحة بين السلالات المنتخبة ونباتات الشاهد مارفونا (الجدول 5).

الجدول(5): عدد الحزم الكلية والمتباينة ونسبة التباين بين السلالات المنتخبة.

البادئة	عدد الحزم الكلية	عدد الحزم المتباينة	نسبة التباين %	مجال الوزن الجزيئي (زوج نكليوتيدي)
OPJ01	13	10	76.92	1369-481
OPC04	8	7	87.50	1150-300
OPC01	6	4	66.67	1167-467
المجموع	27	21	-	
المتوسط	9.0	7.0	77.03	

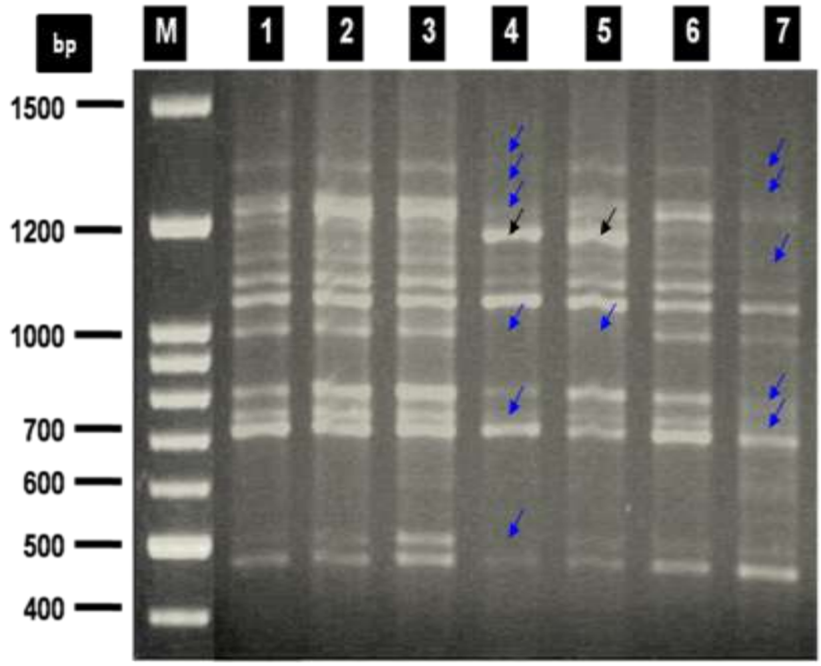
1–نتائج التضخيم لعينات الحمض النووي DNA للسلالات المدروسة باستخدام البادئةOPJ01 :

أظهرت نتائج تحليل التضخيم العشوائي لعينات الحمض النووي DNA للسلالات المدروسة باستخدام البادئة العشوائية OPJ01 المبينة في (الجدول 6) و(الشكل 1) أن هذه البادئة أنتجت 13 حزمة بوزن جزيئي تراوح بين (481–1369) زوج نكليوتيدي منها 10 حزم متباينة وبنسبة تعددية شكلية بلغت 76.92% سجل أعلى عدد للحزم بلغ 12 حزمة لدى السلالات 403p42 ,304p46،402p31,403p14، والشاهد مارفونا على التوالي، بينما سجل أدنى عدد للحزم عند السلالة 404p13، كما أظهرت النتائج أن الحزم المتشابهة بين السلالات المنتخبة والشاهد تراوح وزنها الجزيئي (481، 721، 1051) زوج نكليوتيدي على التوالي لدى الحزم ذوات الأرقام (1، 3، 7)، بينما أظهرت السلالات (403p2, 403p14, 404p13) عشر حزم متباينة مع نباتات الشاهد عند استخدام هذه البادئة.

الجدول(6): نتائج التضخيم لعينات الحمض النووي DNA للسلالات المدروسة باستخدام البادئة العشوائية OPJ01.

رقم الحزمة	الوزن الجزيئي زوج نكليوتيدي	الشاهد مارفونا	304p46	402p31	403p2	403p14	403p42	404p13
1	481	1	1	1	1	1	1	**1**
2	500	1	1	1	0	1	1	**1**
3	720	1	1	1	1	1	1	**1**
4	760	1	1	1	0	1	1	**0**
5	800	1	1	1	1	1	1	**0**
6	1000	1	1	1	0	0	1	**1**
7	1050	1	1	1	1	1	1	**1**
8	1100	1	1	1	1	1	1	**0**
9	1150	1	1	1	0	1	1	**0**
10	1200	0	0	0	1	1	0	**0**
11	1213	1	1	1	0	1	1	**0**
12	1239	1	1	1	0	1	1	**0**
13	1369	1	1	1	0	1	1	**0**
العدد الكلي		12	12	12	6	12	12	**5**

1= يدل على وجود الحزمة.............0= يدل على غياب الحزمة.



الشكل 1 . الرحلان الكهربائي لنواتج تفاعل الـ PCR في اختبار الـRAPD على هلامة آغاروز 1.% للسلالات المدروسة باستخدام بادئة M: marker. 1: Marfona control, 2: P46, 3: p31, 4: p2, 5: p14, 6:p42 , 7:p13(1500 bp) OPJ01

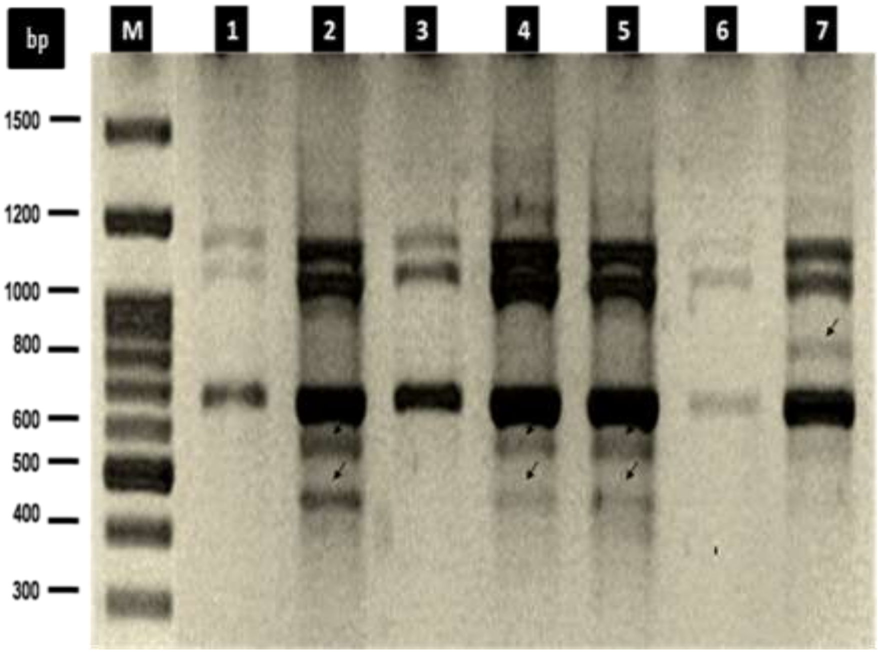
2− نتائج التضخيم لعينات الحمض النووي DNA للسلالات المدروسة باستخدام البادئةOPC01 :

بينت نتائج تحليل التضخيم العشوائي لعينات الحمض النووي DNA للسلالات المختبرة باستخدام البادئة العشوائية OPC01 المبينة في (الجدول 7) و(الشكل 2) أن البادئة أعطت 6 حزم بوزن جزيئي تراوح بين (467−1167) زوج نكليوتيدي منها 4حزم متباينة وبنسبة تعددية شكلية بلغت 66.67%، حيث سجل أعلى عدد للحزم 5 حزم لدى السلالات 304p46, 403p2, 403p14 على التوالي، في حين سجل أدنى عدد للحزم 3 حزم سجل عند الشاهد والسلالتين 403p42, 403p31 على التوالي، فالحزم ذوات الأرقام (3، 5، 6) والتي بلغت أوزانها الجزيئية (700، 1011، 1167) زوج نكليوتيدي على التوالي هي حزم متشابهة بين السلالات المنتخبة والشاهد، كما ظهرت حزم متباينة مقارنة مع الشاهد لمعظم السلالات المنتخبة؛ باستثناء السلالتين 402p31, 403p42 عند استخدام هذه البادئة.

الجدول(8): نتائج التضخيم لعينات الحمض النووي DNA للسلالات المدروسة باستخدام البادئة العشوائية OPC01.

رقم الحزمة	الوزن الجزيئي زوج نكليوتيدي	[illegible]	30	40	40	40	40	40
1	467	0	1	0	1	1	0	**0**
2	600	0	1	0	1	1	0	**0**
3	700	1	1	1	1	1	1	**1**
4	800	0	0	0	0	0	0	**1**
5	1011	1	1	1	1	1	1	**1**
6	1167	1	1	1	1	1	1	**1**
العدد الكلي		3	5	3	5	5	3	**4**

1= يدل على وجود الحزمة.............0= يدل على غياب الحزمة.



الشكل 2. الرحلان الكهربائي لنواتج تفاعل الـ PCR في اختبار الـ RAPD على هلامة آغاروز 1.% للسلالات مع البادئة OPC01 (M: marker. 1: Marfona control, 2: P46, 3:p31, 4: p2, 5: p14, 6: p42 , 7: p13(1500bp

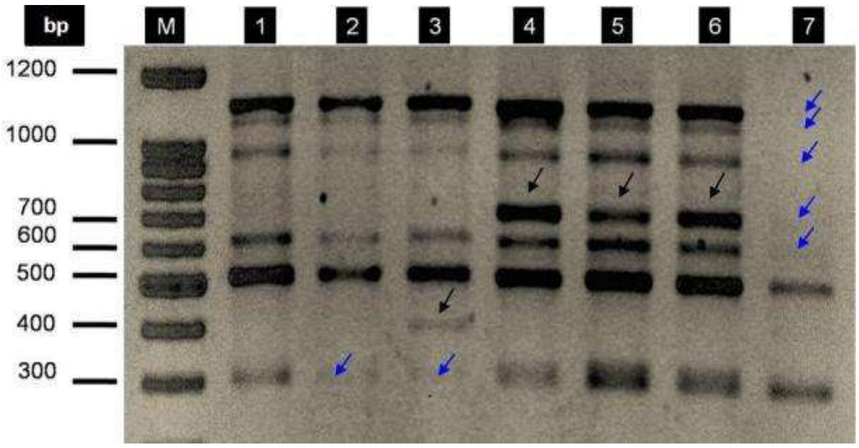
3- نتائج التضخيم لعينات الحمض النووي DNA للسلالات المدروسة باستخدام البادئةOPC04:

أظهرت نتائج تحليل التضخيم العشوائي لعينات الحمض النووي DNA للسلالات المدروسة باستخدام البادئة العشوائية OPC04 المبينة في (الجدول 9) و(الشكل 3) أن هذه البادئة أنتجت 8 حزم بوزن جزيئي تراوح بين (300-1150) زوج نكليوتيدي منها 7 حزم متباينة وبنسبة تعددية شكلية بلغت 87.50%، وسجل أعلى عدد للحزم 7 حزم لدى السلالات 403p2, 403p14, 403p42, على التوالي، بينما أقل عدد للحزم 2 حزمة سجل عند السلالة 404p13، كما إن الحزمة رقم (3) ذات الوزن الجزيئي 350 زوج نكليوتيدي هي الحزمة الوحيدة فقط المتشابهة بين السلالات المنتخبة والشاهد، فمعظم السلالات المنتخبة أبدت اختلافاً عن الشاهد عند استخدام هذه البادئة.

الجدول(9): نتائج التضخيم لعينات الحمض النووي DNA للسلالات المدروسة باستخدام البادئة العشوائية OPC04.

رقم الحزمة	الوزن الجزيئي زوج نكليوتيدي	الشاهد مارفونا	404/p46	402/p31	403/p2	403/p14	403/p42	404/p13
1	300	1	0	0	1	1	1	**1**
2	400	0	0	1	0	0	0	**0**
3	550	1	1	1	1	1	1	**1**
4	617	1	1	1	1	1	1	**0**
5	750	0	0	0	1	1	1	**0**
6	1000	1	1	1	1	1	1	**0**
7	1075	1	1	1	1	1	1	**0**
8	1150	1	1	1	1	1	1	**0**
العدد الكلي		6	5	6	7	7	7	**2**

1= يدل على وجود الحزمة.............0= يدل على غياب الحزمة.



الشكل(3): الرحلان الكهربائي لنواتج تفاعل الـ PCR في اختبار الـ RAPD على هلامة آغاروز 1.% للسلالات باستخدام بادئة OPC04 (1200 bp) M: marker. 1: Marfona control, 2: P46, 3: p31, 4: p2, 5: p14, 6: p42 , 7: p13

تمّ دراسة التباينات الوراثية لست سلالات منتخبة من نباتات جيل الطفرة الخامس M_5 والتي أبدت أفضل استجابة لتحمّل ظروف الإجهاد الملحي مقارنة مع نباتات الشاهد، وذلك باستخدام 3 بادئات RAPD؛ كأسلوب مفيد في تحديد الهوية الوراثية للسلالات المنتخبة وتحسين الانتخاب في النباتات المعاملة بالمواد المطفرة، وأظهرت نتائج الدراسة أن السلالات المنتخبة تختلف وراثياً عن الشاهد. اتفقت هذه النتائج مع العديد من الدراسات التي بينت إمكانية استخدام تقنية الـ RAPD؛ للتمّييز بين أصناف البطاطا الحساسة والمتحمّلة للملوحة (Ochatt *et al*., 1999; Aghaei *et al*., 2008)، اتفقت نتائج الدراسة مع الداوود وآخرون (2008)، والتي تناولت استخدام 27 بادئة عشوائية؛ للتمييز بين 18 سلالة بطاطا طافرة من الأصناف (Draja, Diamant, Spunta) من حيث تحملها وحساسيتها لتركيزي (100−150) mM من كلوريد الصوديوم وخلصت الدراسة لأهمية تقنية في كشف التباينات بين السلالات الطافرة. انسجمت نتائج هذه الدراسة جزئياً مع Afrasiab (2006) الذي تمّكن باستخدام 24 بادئة RAPD من عزل وانتخاب 8 طفرات ناتجة من استخدام المادة المطفرة EMS على صنفي البطاطا Diamant وDesiree، والتي تميزت بزيادة في إنتاجيتها. فأعطت البادئات المستخدمة 26 حزمة في الطفرات المنتخبة، وبلغ عدد الحزم 4 حزم متشابهة (Monomorphic) و22 متباينة (Polymorphic)، وتراوح وزنها بين 300−2000 زوج نكليوتيدي. وبنسبة تعددية شكلية 65 % من إجمالي عدد الحزم الكلية. واتفقت مع دراسة Khatab and El-Banna (2011) والتي استخدم فيها 10 بادئات RAPD؛ للتمّييز بين 14 سلالة جسمية منتخبة من تخليق نموات خضرية من نسيج الكالوس لدى أربعة أصناف من البطاطا Desiree و Spunta, Silana و Ijsselster، وخلصت الدراسة إلى أن أربعة بادئات فقط RAPD (OPV02, OPA12, OPQ14 and OPE02) تمّكنت من تحديد التباينات الوراثية بين الأنسال المنتخبة. انسجمت نتائج هذه الدراسة مع yaycili وAlikamanoğlu (2012) استخدم فيها 6 بادئات عشوائية (OPH-12, OPH-13, OPH-14, OPH-16, OPH-17, OPH-19)؛ لتمييز درجة تحمل 19 سلالة منتخبة من صنف البطاطا مارفونا لظروف الإجهاد الملحي؛ لتحديد السلالات المتحملة والحساسة، وأظهرت النتائج أن عدد الحزم للطفرة رقم Mutant 15 بلغ 20 حزمة مقارنة بالشاهد غير الطافر 11 حزمة ونسبة 89.66% للتعددية الشكلية. كما انسجمت معطياتنا مع العديد من الدراسات التي بينت إمكانية توظيف تقنية RAPD؛ لتحديد التباينات الوراثية بين أصناف البطاطا بأقل عدد من البادئات العشوائية (Khatab and El-Banna, 2011; Munir *et al*., 2011; Afrasiab and Iqbal., 2012; Ahmad *et al*., 2013, Onamu *et al*., 2016). كما اتفقت مع دراسة Khan وآخرون (2014) استخدم فيها 20 بادئة RAPD؛ للتمّييز بين 38 سلالة طافرة منتخبة من مزارع كالوس لصنف

البطاطا (Desiree) من حيث درجة تحمّلها للإجهاد الملحي تركيز 100 mM لكلوريد الصوديوم، وخلصت الدراسة إلى أن أربع بادئات RAPD (OPAA.01 - OPAA 03 - OPAA 05 - OPAA 08) تمّكنت من كشف التباينات الوراثية بين السلالات وتمييز 6 أنسال (TC36, TC34, TC30, TC24, TC10, TC6)، والتي أبدت أفضل استجابة لتحمل ظروف الإجهاد الملحي. السلالات (403p2, 402p31, 403p14) كانت الأكثر تحملاً للملوحة مقارنة بباقي السلالات والشاهد غير الطافر بمتوسط وزن درنات/نبات (661.9, 659.8, 658.7) غرام على التوالي (جدول 1).

الشكل(4): بعض السلالات المنتخبة لتحمل الملوحة من جيل الطفرة الخامس M_5

الاستنتاجات والتوصيات:

تم تمييز الاختلافات الوراثية بين أنسال البطاطا المنتخبة من جيل الطفرة الخامس M_5 باستخدام تقنية الـ RAPD، مما يساعد في إنشاء مجمعات وراثية تجتمّع فيها صفات الإنتاجية الجيدة مع القدرة على التأقلم مع الإجهادات غير الإحيائية.

.يعتبر هذا العمل مفتاح للدخول في برنامج تحسين وراثي لصنف البطاطا مارفونا من خلال تحفيز تراكيب وراثية وعلى هذا نوصي بالتالي:

1. استخدام مؤشرات جزيئية وبيوكيميائية متخصصة على النباتات المنتخبة وآبائها لتأكيد الثبات الوراثي.
2. الإستفادة من التراكيب الوراثية الواعدة وإدخالها ضمن برامج التحسين الوراثي؛ لاستنباط أصناف جديدة تتحمل الإجهادات الإحيائية وغير الإحيائية.

المراجع

الحسني، خلود وجلادت جبرائيل (2008). استخدام المؤشرات الجزيئية المعتمدة على التفاعل التضاعفي لسلسلة الدنا في تشخيص أصناف البطاطا المكثرة خارج الجسم الحي، كلية الزراعة، جامعة بغداد، العراق. 52–59 صفحة

الداود، انطونيوس وبسام الصفدي وعماد نابلسي ونزار مير علي (2008). دراسة إمكانية عزل وتوصيف المورثات المسؤولة عن تحمّل الملوحة لدى بعض طفرات البطاطا المحدثة بأشعة غاما، تقرير عن تجربة علمية استطلاعية قسم البيولوجيا الجزيئية والتقانة الحيوية. 1− 22 صفحة.

المجموعة الإحصائية الزراعية السنوية وزارة الزراعة والإصلاح الزراعي (2020). مديرية الإقتصاد الزراعي، قسم الإحصاء، دمشق سوريا، http://www.syrian-agriculture.org/index_ar.htm

Afrasiab, H. (2006). Biochemical and molecular markers of somaclonal variants and induced mutants of potato (*Solanum tuberosum* L.). Thesis university of the Punjab Lahore, Pakistan. Pp 281.

Afrasiab, H and J. Iqbal (2012). Biochemical and molecular characterization of somaclonal variants and induced mutants of potato (*Solanum tuberosum* L.) cv. Desiree. Pak. J. Bot. 44, 5, 1503-1508.

Aghaei, K.; A.A. Ehsanpour; G. Balali and A. Mostajeran (2008). *In vitro* screening of potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivars for salt tolerance using physiological parameters and RAPD analysis. American Euroasian J. Agric. Environ. Sci. 3(2):159-164.

Ahmad; S. Khan; M.A. Javed; F.Z. Huyop; M. Tariq and I.A. Nasir (2013). RAPD and protein analysis revealed polymorphism in mutated potato cultivars. J Teknologi. 64:15-19.

Bordallo, P.N.; Silva, D.H.; Maria, J.; Cruz, C.D. and E.P. Fontes (2004). Somaclonal variation on *in vitro* callus culture potato cultivars. Horticultura Brasileira, BrasÌlia. 22 (2):300-304.

Collares, E.A.S.; E. Choer, and A. da Silva, Pereira, (2004). Characterization of potato genotypes using molecular markers. Pesa. Agropec. Bras. Brasilia. 39 (9):871-878.

Doyle, J.J. and J.L. Doyle, (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus v.12:13-15.

Ehsanpour, A.A.; S. Madani and H. Hoseini (2007). Detection of somaclonal variation in potato callus induced by UV-C radiation using RAPD–PCR. Gen Appl Plant Physiol. 33:3-11.

Gorji, A.M. (2011). Increasing the efficiency of potato resistance breeding with conventional and molecular genetic methods Ph.D Thesis, Keszthely Hungary. Pp 147.

Hassan, I.O.I (2002). Biotechnological studies on the irradiated potato (*Solanum tuberosum* L.) with Gamma rays, M.Sc. Agric. Sci (Biotechnology), Fac. Agric., Cairo Univ., Egypt. Pp 101.

Hoque, M.E.; H. Huq and N.J. Moon (2013). Molecular diversity analysis in potato(*Solanum tuberosum* L.) through RAPD markers. SAARC J. Agri. 11(2):95-102.

Jones, C.J.; K.J. Edwards; S. Castaglione; M.O. Winfield; F. Sala; C. van de Wiel; G. Bredemeijer; B. Vosman; M. Matthes; A. Daly; R. Brettschneider; P. Bettini; M. Buiatti; E. Maestri; A. Malcevschi; N. Marmiroli; R. Aert; G. Volckaert; J. Rueda; R. Linacero; A. Vazquez and A. Karp, (1997). Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a network of European laboratories. Molecular Breeding. 3:381-390.

Khan, M.S.; D. Ahmad; M. Adnan and M.M. Khan (2014). The effect of somaclonal variation on salt tolerance and glycoalkaloid content of potato tubers. Australian Journal Crop Science. 8 (12):1597-1606 .

Khatab, I.A. and A.N. El-Banna (2011). Detection of somaclonal variation in potato using RAPD primers. Egypt J Genet Cytol. 40:227-238.

Levy, D. and R.E. Veilleux (2007). Adaptation of potato to high temperatures and salinity a review. Amer. J. of Potato. Res. 84:487-506

Maniatis, T.; E.F. Fritsch and J. Sambrook (1982). Molecular cloning: laboratory manual. cold spring harbor laboratory press, cold Spring Harbor/ NY.

Munir, F.; S.M.S. Naqvi and T. Mahmood (2011). *In vitro* culturing and assessment of somaclonal variation of *Solanum tuberosum* L. var. Desiree. Turk. J. Biochem. 36:296-302.

Ochatt, S.J.; P.L. Marconi; S. Radice; P. Amozis and O.H. Caso (1999). *In vitro* recurrent selection of potato; production and characterization of salt tolerant cell lines and plants. Plant Cell Tissue and Organ Culture. 55:1-8.

Rocha, E.A.; L.V. Paiva; H.H. Carvalho and C.T. Guimarães, (2010). Molecular characterization and genetic diversity of potato cultivars using SSR and RAPD markers. Crop Breeding and Applied Biotechnology. 10:204-210.

Yaycili, O and S Alikamanoglu (2012) Induction of salt tolerant potato (*Solanum tuberosum* L.) mutant with gamma irradiation and characterization of genetic variations via RAPD–PCR analysis, Turk. J. Biol. 36,405-412.

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

Detection of Genetic Variation in Mutants Potato Clones Using RAPD Primers

Wael Mtawj [1]*, Mazen Rajab[1]and Hassan Khojah[2]

(1). Researcher, General Commission for Scientific Agricultural Research (GCSAR), Biotechnology Dept, Lattakia, Syria

(2). Professor, Horticulture Dept., Faculty of Agriculture, Tishreen, University, Lattakia, Syria.

(*Corresponding author: Wael Mtawj. E-Mail.:mtwjmrym@gmail.com)

Received: 14/06/2022 Accepted: 25/10/2022

Abstract

This study was conducted at Lattakia Research Center, General Commission for Scientific Agricultural Research GCSAR, during 2017/2016. The random amplified polymorphic DNA (RAPD) based on Polymerase Chain Reaction (PCR) with fifteen primers were applied, used to estimate genetics variation to six clones chemical mutagen by EMS (Ethel methan sulphonat) and salt tolerant M5 of potato Marfona cv. umutant. The results showed that the treatment 40mM/2-3hr were the bes and tthe clones 403P14, 403P2, 402P31 were the most tolerant for salinity. Phases of work included the isolation and purification of DNA plant parts and DNA polymorphisms were scored within amplified fragements by electrophoresis. The results of RAPD analysis were clear differences in the number of DNA amplified fragments and molecular weights depending on the primers user of the 15 random primers tested, 3 primers generate polymorphic RAPD patterns. These primers produced 27 bands across all 6 potato clones corresponding to average of 9.0 bands per primer. Only 6 bands of them were monomorphic, A total number of polymorphic amplified 21 fragments for all primers used. whereas the others were polymorphic reaching 77.03 % of the total bands produced. The maximum number of bands was 13 with opj01 primer tested, while the lowest number of bands (6) observed with the primer OPC04. The results were showed than potato clones (403p2, 403p14,404p13) variation on Marfona cv. umutant by number of polymorphic amplified (5,10,12) fragments, while the lowest number of Polymorphic (1,1,2) bands of the clones (402p31,403p42,404p46) for all primers used.

Keywords: Potato , Marfona , RAPD.