تأثير الصعق الكهربائي في DNA نبات حلق السبع

جنان قاسم حسين
كلية الزراعة/جامعة بغداد

كاظم ديلي حسن
كلية الزراعة/جامعة بغداد

سامي كريم محمد أمين
كلية الزراعة/جامعة بغداد

المستخلص

نفذت التجربة في الظلة الخشبية التابعة لقسم البستنة \ كلية الزراعة \ جامعة بغداد، خلال الموسم الخريفي2005.كان ذلك لمعرفة تأثير الصعق الكهربائي في التركيب الوراثي لنبات حلق السبع *Antirrhinum majus* .استخدمت شدة تيار (AC) (10,8,6 أمبير) لمدة (6,4,2 دقائق) فضلاً عن معاملة عدم الصعق(القياس) باستخدام جهاز صمم لهذا الغرض. عوملت الأجزاء النباتية البذور المستنبتة والشتلات لنباتات حلق السبع بالمعاملات آنفة الذكر بعد نقعها بمحلول ملح الطعام 1% لثلاث ساعات. زرعت البذور المستنبتة والشتلات في التربة بعد غسلها بالماء العادي لثلاث ساعات أيضاً. تضمنت الدراسة الوراثية أيجاد البصمة الوراثية لعدد من النباتات المنتخبة لحلق السبع وايجاد النسبة المئوية للبعد الوراثي باستخدام نوعين من مؤشرات الـDNA (DNA markers) المعتمدة على تقانةPCR وهي مؤشرات التضاعفي العشوائي المتعدد الاشكال لمسلسلة Randomly (RAPD)DNA Amplified Polymorphic DNAومؤشرات تباينات أطوال القطع المتضاعفة بأختبار(AFLP) Amplified Fragment Length Polymorphismوذلك في مختبرات التقانات الحيوية في المركز الدولي للبحوث الزراعية في المناطق الجافة (ICARDA) في الجمهورية العربية السورية. تضمنت مراحل العمل عزل وتنقيةDNAالاجزاء النباتية ثم الكشف عن التباينات بين القطع المتضاعفة لكل نبات منتخب بعد ترحيل العينات بجهاز الترحيل الكهربائي في تفاعلاتRAPD أوAFLP. أعطت نباتات حلق السبع المنتخبة تغايرات مظهرية واضحة سواء في المجموع الخضري أو الزهري وقد بينت نتائج التحليل الوراثي بمؤشرات RAPD و AFLP وبعد حساب النسبة المئوية للبعد الوراثي بين النباتات المنتخبة ونبات القياس وجود تغايرات وراثية فيها، أذ بلغت أعلى نسبة للبعد الوراثي 42% في مؤشرات RAPD و27.5% في مؤشرات AFLP لنفس النبات المنتخب التي عوملت بذوره المستنبتة بالمعاملة
(8أمبير X 6دقائق).

The Iraqi Journal of Agricultural Science 39 (5) : 38-51 (2008) Hussein et al.

THE EFFECT OF ELECTRIC SHOCK ON DNA STRUCTURE OF *Antirrhinum majus*

Janan K. Hussein
Coll. of Agric.,
Univ. of Baghdad

Kadhim D. Hassen
Coll. of Agric.,
Univ. of Baghdad

Sami K. M. Ameen
Coll. of Agric.,
Univ. of Baghdad

ABSTRACT

The experiment was conducted in the lathhouse of Horticulture Department – College of Agriculture – Baghdad University in fall season of 2006 to investigate the effect of electric shock (E.S.) on DNA of *Antirrhinum majus*.Three levels of E.S. severity AC (6,8,10 Ampere) and three timings of treating (2,4,6 minutes) were tested plus the control. A special electric apparatus was prepared for this purpose. Sprouted seeds and seedlings were soaked (before the E.S. treatments) for 3h in a 1% NaCl solution. Then they soaked in a fresh water for the same period (3h) before they planted in the soil. The genetic study included DNA finger printing for some selected plants of *Antirrhinum majus*. Testing Genetic Distance by using two DNA markers based on Polymerase Chain Reaction (PCR) was applied. Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) and Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) were employed. The study was carried out at International Center for Agricultural Research in the Dry Areas (ICARDA)-Aleppo-Syria. *Antirrhinum majus* showed clear morphological differences on either the vegetative or flowering growth. The genetic analyses by RAPD or AFLP and Genetic Distance for selected treated plants comparing to untreated (control) was performed. Highest Genetic Distance (42%) by RAPD markers and 27.5% by AFLP markers was recorded on plants that their sprouted seeds were treated by (8A X 6mins).

Part of Ph.D. dissertation for the first author البحث مستل من اطروحة دكتوراه لنباحث الاول

المقدمة

استثمرت الطاقة الكهربائية المنخفضة في البذور 6-26 ملي فولت (17) لاستحداث تغايرات وراثية في النبات على أعتبار أن التيار الكهربائي العالي الذي تتعرض له النباتات يحدث تغييراً في التركيب الوراثي أو النسيج النباتي نتيجة الفرق العالي بين جهد التيار المنخفض في البذور أو البادرات والتيار ذي الفولتية العالية المستخدم في عملية الصعق (9)، فيما كان أول أستخدام لهذه التقانة عام 1992 على فول الصويا (4).

توجد عدة تقانات تعتمد على دراسة DNA وتختلف عن بعضها البعض بنوع التباينات الوراثية التي تكشفها من بين أهمها التي استخدمت في هذه الدراسة هي تقانة التضاعف العشوائي المتعدد الاشكال لسلسلةRandomly Amplified (RAPD)DNA Polymorphic DNA وتقانة تباينات اطوال القطع المتضاعفة(AFLP) Amplified Fragment Length Polymorphism التي تعتمد على التفاعل التسلسلي للبوليميريز Polymerase Chain Reaction (PCR) المكتشف من قبل Mullis في عام 1983. تعد تقانة PCR الأكثر استخداماً في مختبرات الوراثة الجزيئية في العالم لما تمتاز به من سرعة وسهولة وكفاءة في العمل، فضلاً عن تحسسها العالي، لذلك اتسعت تطبيقاتها في مجال تشخيص الأمراض الوراثية والمسببات المرضية، وفي دراسة DNA الأنواع المنقرضة (24).

تتضمن تقانتا AFLP و RAPD مضاعفة قطع محددة من الحامض النووي DNA للحصول عليها بكمية كافية تسمح برؤيتها بوجود الأشعة فوق البنفسجية للمقارنة بين الأفراد قيد الاختبار ويتم ذلك باستخدام بادئات (Primers) هي عبارة عن قطع قصيرة مفردة من الحمض النوويDNA محددة التركيب النيوكليوتيدي ترتبط بالحمض النووي المكمل لها من DNA الفرد قيد البحث ثم تبدأ عملية تصنيع جزيئات DNA الجديدة التي لها نفس التركيب.

تعتمد تقانة RAPD على إكثار قطع DNA النباتية في تسلسلها النيوكليوتيدي عشوائيا حيث تضخم قطع DNA الحاوية على تتاليات نيوكليوتيدية، التي يمكنها أن تشكل تتامية مع البادئات العشوائية في نهايتها، أذ تمكن رؤيتها على شكل حزم bands مختلفة الوزن الجزيئي في هلامة من الاكاروز(Agarose gel)(28).

قدرت الحسني (2) البعد الوراثي والعلاقة الوراثية بين 21 صنفا من البطاطا باستخدام تقانة RAPD ،وقد بينت النتائج ان توزيع الاصناف الى مجاميع كان مرتبطا بالصفات المظهرية على الاغلب وباصل تلك الاصناف في بعض الاحيان ، مما يجعل امكانية التكهن ببعض الصفات المظهرية لأحد الاصناف من خلال انتمائها الى مجموعة معينة، كما استخدمت الباحثة Ali وآخرون(12) مؤشرات RAPD للتحقق من الثبات الوراثي لنباتات النخيل المنتجة بطريقة تكوين الاجنة الجسمية لصنف النخيل البرحي أستخدام 30بادئاً، ولاحظت أن ثلاثة بوادىء منها فقط تم من خلالها الحصول على حزم متباينة وأستنتجت حدوث تغايرات وراثية في نباتات النخيل الناتجة من التقانة المستخدمة. أشار الباحث Al-Khalifah(13) الى ان مؤشرات RAPD تعد وسيلة فعالة في الكشف المبكر عن التغايرات الوراثية التي تحصل من النباتات المنتجة من زراعة الانسجة النباتية وذلك في دراسة لثلاثة أصناف من النخيل هي برحي وسكري وخلاص ، وبالاشارة الى كفاءة تقانة RAPD في الكشف عن التغايرات الوراثية أستخدمت هذه التقانة في مقارنة محصول الرز بسمتي370 مع أثنين من الطوافر القصيرة الارتفاع المشتقة منه بينما فشلت المؤشرات الانزيمية Isozyme في تشخيصها نتيجة أنخفاض مستوى التباينات الوراثية(Polymorphism) بينهما (3).

تمثل تقانة AFLP قطعا من DNA متضاعفة بواسطة برايمرات خاصة بالهضم التحديدي(restriction digestion) لجينوم DNA النبات وبالاعتماد على أختلاف ترتيب النيوكليوتيدات يعطي هذا التكنيك البصمة الوراثية لاي DNA لاي مصدر دونما حاجة الى أية معرفة مسبقة عنه. ان أهم فائدة لتقانة الـAFLP هي أنتاج أكبر عدد من الاشكال المتغايرة (Polymorphism) (3).طور Zabeau وVos (29) تقانة AFLPالتي تتضمن مزيجا من عدة تقانات تساعد في رسم خرائط الارتباطات الوراثية بشكل كبير وبخاصة في النباتات التي تحوي جينوماً كبيرا وذات التعدد

الشكلي Polymorphism المنخفض . تعتمد هذه التقانة على الكشف عن قطع DNA المقيدة بأنزيمات التقييد والمضخمة بالتفاعل PCR (26) ، ثم تحميلها على هلامة من البولي اكريلامايد Polyacrylamide gel ، وتشابه هذه التقانة تقانة البصمة الوراثية DNA Fingerprinting من حيث انها تسمح بإظهار عدد كبير من التعدادت الشكلية Polymorphism. استخدمت هذه التقانة حديثا لتحديد المؤشرات الجزيئية molecular markers المرتبطة بشكل وثيق بمواقع مقاومة ، كما انها استخدمت في تحديد البصمة الوراثية لجينوم البكتيرية ، وفي الكشف عن الاختلافات الموجودة في الخرائط الوراثية لمختلف المجموعات النباتية، وفي أنشاء خرائط الارتباطات الوراثية في نباتات أحادية المجموعة الكروموسومية المضاعفة في الشعير (15) .

تهدف هذه التجربة الى تحديد التغايرات الوراثية الناتجة عن الصعق الكهربائي للبذور والشتلات المستنبتة لنبات حلق السبع من خلال عزل وتنقية DNA نباتاتها ودراسة البصمة الوراثية للنباتات الناتجة.

المواد وطرائق العمل

أستنبت بذور حلق السبع المنتجة من قبل شركة Fito الاسبانية في أطباق بتري وعند ظهور الجذير قسمت إلى مجاميع، غلفت كل مجموعة بورق السيلوفين المثقب ونقعت في محلول كلوريد الصوديوم بتركيز 1% لمدة ثلاث ساعات للسماح بنفاذ المحلول داخل النسيج النباتي لزيادة التوصيل الكهربائي المسلط عليها لاحقاً. نقلت البذور النابتة بعد ذلك إلى حوض زجاجي سعة 10 لتر من خلال جهاز تم تصنيعه لهذا الغرض (4). استخدمت شدة تيار مختلفة (10,8,6أمبير) ولمدة زمنية 6,4,2دقائق فضلاً عن معاملة القياس (من دون صعق)حيث أجريت عليها كافة العمليات السابقة عدا استخدام التيار الكهربائي . بعد الانتهاء من عملية الصعق كل معاملة وضعت البذور في إناء يحتوي على ماء عذب جار لمدة ثلاث ساعات لغسل الملح من النسيج النباتي لتجنب الإضرار بالبذور. زرعت البذور في أصص بقطر 15سم بتأريخ 2005\9\1 لحين بلوغها مرحلة الشتل ثم نقلت إلى الأرض المستديمة بتأريخ 2005\10\15 . كما تم تعريض مجموعة من الشتلات(لم تعامل بذورها) لنباتات حلق السبع للصعق الكهربائي بعد بلوغها مرحلة 2-3 أزواج من الأوراق الحقيقية إذ قسمت الشتلات إلى مجاميع وعوملت بنفس الجهاز والمعاملات السابقة ثم زرعت مباشرة في الأرض المستديمة بتأريخ 2005\10\20. زرعت جميع النباتات في الارض المستديمة على خطوط المسافة بين خط وأخر 30سم وبين نبات واخر 25سم في تربة مكونة من 3:1 بيت موس وتربة مزيجة . أجريت عمليات الخدمة من سقي وتسميد وتعشيب ومكافحة كلما دعت الحاجة.

انتخب 18 نباتاً من نباتات حلق السبع تميزت بوجود تغايرات واضحة في شكلها المظهري فضلا عن نباتين من نباتات القياس هماT1 وT2 متشابهين في جميع الصفات عدا لون الازهار (شكل 2) لبيان البعد الوراثي الناتج عن اختلاف اللون. أجريت الاختبارات في مختبرات التقانات الحيوية في المركز الدولي للبحوث الزراعية في المناطق الجافة(ICARDA) في الجمهورية العربية السورية.اعتمدت تقانتان لدراسة الاختلافات الوراثية بين النباتات المعاملة بالصعق الكهربائي هما طريقة RAPD وطريقة AFLP.

تم عزل DNA وفقاً لطريقة Weigandوآخرون(27)المعتمدة على طريقة Sahgi-Maroof وآخرون(20)،وقدرت كمية الحامض النووي DNA في العينات باستخدم جهاز (Spectrophotometer Beckman Du-61) الذي يعتمد في عمله على قياس كمية الحامض النووي الموجودة عن طريق امتصاصه للأشعة فوق البنفسجية بموجات طولها 260 و 280 نانوميتر.

تم في تقانة RAPD استخدام بوادىء مكونة من عشر قواعد نيوكليو تيدية عشوائية adecanucleotide primers، تم الحصول عليها من شركة Opron Technologies Inc. Alameda.Calif وهو عبارة عن مجموعة متسلسلة من البوادىء مصنفة في مجموعات تحمل الحروف الإنكليزية من A إلى Z، يحوي كل حرف على 20 بادئاً. اختبرت من خلال البحث مجموعة من البادئات (A3, A11, B15,C11, G14, G15, G16, G20, H12,H15,K18) (جدول1) لمعرفة أي منها تعكس تعددا

شكلياً polymorphism في DNA .أجريت كافة تفاعلات التضخيم العشوائي (16). مررت نواتج التفاعل عبر هلامة من الأكاروز تركيزها 1.2%في جهاز الترحيل الكهربائي الافقي لمدة 5 ساعات بوجود المحلول القياسي1X TBE (21). صبغت DNA في هلامة الأكاروز بمادة بروميد الاثيديوم(بتركيز 0.5مايكروغرام \ مل) لمدة 30 دقيقة، ثم صورت الهلامة بجهاز فيديو حاسوبي Video imaging system وأخذت القراءات من خلال الصور المحفوظة في الحاسوب مع جهاز الفيديو.

أما تقانة AFLP فقد أجريت تفاعلاتها تبعاً للطرائق الموصوفة (29) المعدلة (19) .

تم تحليل النتائج الوراثية للنباتات المنتخبة التي اعطت اشكالاً مظهرية مختلفة عن باقي النباتات وأجريت لها البصمة الوراثية بطريقتي RAPD وAFLP وتم تحويل النتائج التي ظهرت في الهلام الى جداول التوصيف وذلك بوضع 1 عند وجود الحزمة و 0 عند غيابها.

لغرض ايجاد العلاقة الوراثية بين النباتات الشاذة المنتخبة في هذه الدراسة تم تحويل بيانات التوصيف (Characterization data) الى قيم التشابه (Similarity) المقدرة استنادا الى Nei وLei (18) بأستخدام الحاسوب ضمن برنامج(SIMQUL) الذي يعتمد على المعادلة:

$$\text{Similarity} = 2nxy / nx + ny$$

قدرت النسبة المئوية للبعد الوراثي بين النباتات الشاذة التي تعتمد على نتائج التشابه الوراثي وفقا للمعادلة الآتية:

$$\text{Genetic distance} = 1 - (2nxy / nx + ny) \times 100$$

حيث ان :

nxy : تمثل عدد الحزم المشتركة بين النموذجين x و y والتي تمثل أياً من النباتين من النباتات المنتخبة.

nx : عدد الحزم الكلية في النموذج x .

ny : عدد الحزم الكلية في النموذج y .

كما تم حساب معامل التغاير (C.V.%) للنباتات المنتخبة ذات الاختلافات المظهرية والوراثية للتعبير عن مقدار الاختلاف بين المعاملات التجريبية المختلفة، ويعبر معامل التغاير عن النسبة المئوية لنسبة الانحراف القياسي إلى معدلها (5).

جدول 1. البوادىء وتسلسلها النيوكليوتيدي المستخدمة بطريقتي RAPD و AFLP.

RAPD		AFLP	
Primer	5Sequence 3	Primer	5Sequence 3
A3	AGTCAGCCAC	P100\M95	AACC\AAAA
A11	CAATCGCCGT	P100\M62	AACC\CTT
B15	AATGGCGCAG	P100\M293	AACC\TACA
C11	AAAGCTGCGG	P100\M82	AACC\TAT
G14	GGATGAGACC	P16\M82	CC\TAT
G15	ACTGGGACTC	Tru91 Forward adapter	GACGATGAGTCCTGAG
G16	AGCGTCCTCC	Tru91 Reverse adapter	TACTCAGGACTCAT
G20	TCTCCCTCAG	Pst I Forward adapter	CTCGTAGACTGCGTACA TGAC
H12	ACGCGCATGT	Pst I Reverse adapter	TGTACGCAGTCTAC
H15	AATGGCGCAG	POO	GACTGCGATCATGCAG
K18	CCTAGTCGAG	MOO	GATGATCCTGAGTAA

النتائج والمناقشة

بينت نتائج تفاعلات RAPD (شكل 1) اختلافات في عدد الحزم المتضاعفة وأوزانها الجزيئية باختلاف البادئ المستخدم والناتجة من الاختلاف في عدد المواقع المكملة لذلك البادئ في جينوم كل نبات من النباتات المنتخبة من معاملات الصعق في هذه التجربة. يتفق هذا مع جميع النتائج المنشورة

في هذا المجال منها (1 ، 2 ، 10 ، 28). ان بعضاً من هذه البوادىء لم يُعط أية نتيجة بالرغم من إعادتها أكثر من مرة ويتفق ذلك مع نتائج أخرى لم تتوصل كذلك الى نواتج تضاعف عند تطبيق مؤشرات RAPD كما في استخدام بعض البوادىء مع النخيل(22) والحمص (11) وذلك بسبب غياب المواقع المكملة لتسلسلات تلك البوادىء في جينوم نباتات حلق السبع ذي العدد الكروموسومي(2n=16) (30) وبوادىء أخرى لم تعط نتائج كاملة عند استخدامها إذ يلاحظ فقدان الحزم في بعض العينات قيد الاختبار. بذلك فقد تم اختبار بادئين لنباتات حلق السبع التي أظهرت تباينات واضحة بين النباتات المنتخبة(شكل1).

اعتمدت طريقة تحليل نتائج دراسة العلاقة الوراثية على وجود أو غياب الحزم الناتجة من تضاعف قطع معينة من جينوم النباتات المستخدمة على الأوزان الجزيئية لتلك الحزم التي تعتمد على العدد والمواقع المكملة لتسلسلات البوادىء على شريط DNA القالب (اهملت الحزم الخفيفة جدا) و يتفق هذا مع اخرين(14 ، 23). أما التباين المعتمد على الاختلافات في شدة تألق الحزم التي تكون ناتجة عادة عن ظهور بعض الحزم المتضاعفة معاً في نفس الوزن الجزيئي فتظهر على شكل حزمة سميكة واحدة (هي بالحقيقة أكثر من حزمة (Comigrating bands)) قد تكون ناتجة من حالة homozygote حيث يتم فيها تضاعف نفس الموقع على الاليل الآخر، وبما أنها بنفس الوزن الجزيئي، لذلك تتجمع القطع المتضاعفة في تلك المواقع معا،وأحيانا تؤدي زيادة تركيز DNA القالب إلى تكرار عدد نسخ DNA الهدف مما يؤدي الى تضاعف نفس الموقع أكثر من مرة وبما ان تركيزDNA الدقيق يكون من الصعوبة تحديده لتاثره بعدة عوامل لذلك لا يمكن استخدام الاختلاف في سمك الحزم الناتجة كمقياس للتباين الوراثي خاصة ان مؤشرات RAPD وAFLP هي من المؤشرات التي تتبع السيادة التامة وبذا فلا يمكن بها تقدير عدد الاليلات للموقع الواحد (2) ويتفق هذا مع ما ذكره Vogt وآخرون (25) بعدم الاعتماد على شدة تألق الحزم كمقياس للتباين لصعوبة ضبط تركيز DNA الدقيق .

استخدمت نسبة البعد الوراثي بين النباتات المنتخبة بأعتماد نتائج البادئين المستخدمين في تقدير نسبة البعد الوراثي بين نباتين من النباتات المنتخبة وبين كل نبات منتخب ونبات القياس والموصوفة من قبل Nei وLi (18) التي تستند على وجود الحزم المشتركة بين زوج من تلك النباتات .

أظهرت دراسة البادئين المختبرين لنبات حلق السبع وجود اختلافات في عدد الحزم وموقعها بين النباتات المنتخبة مما يشير الى وجود تغايرات وراثية واضحة بين النباتات فضلا عن وجود اختلافات واضحة بين البادئين (شكل 1). بعد إدخال البيانات الناتجة من استخدام البادئين في البرنامج المعد خصيصا لهذا الغرض على الحاسب الآلي تم إيجاد البعد الوراثي بين النباتات المنتخبة وكما موضح في الجدول 2.

انتخب نباتان من معاملة القياس هما T1 و T2 متشابهان في جميع الصفات تقريبا عدا لون الأزهار(شكل2) لغرض معرفة النسبة المئوية للبعد الوراثي بين النباتين الناتجة عن اختلاف اللون ، وكانت النسبة تساوي صفراً(جدول2) أي عدم وجود اختلافات وراثية بين النباتين عند استخدام كلا البادئين وقد يظهر الاختلاف الوراثي بينهما في حالة استخدام بوادئ أخرى .

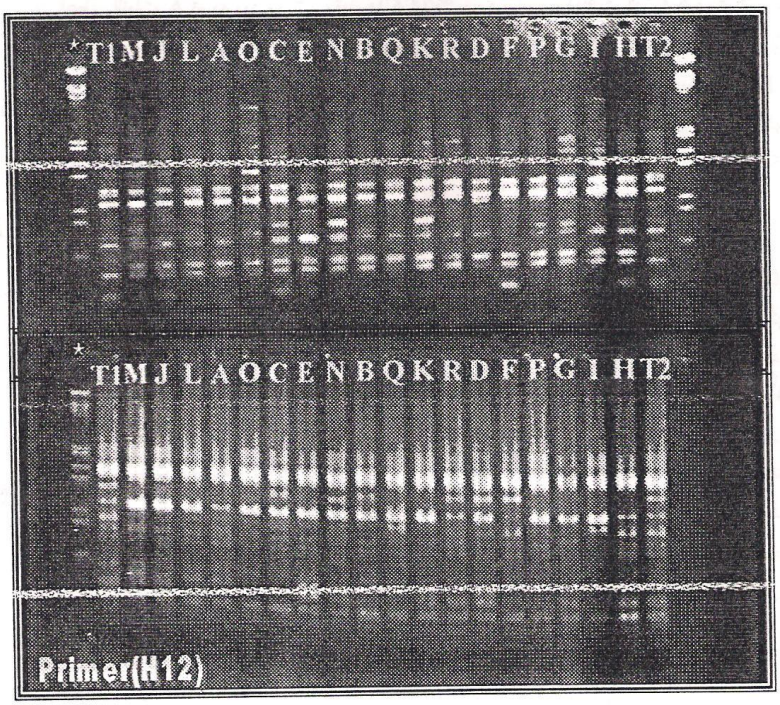
تشير نتائج جدول 2 الى وجود اختلافات وراثية واضحة بين النباتات المنتخبة مقارنة بنباتات القياس ، حيث ان أعلى نسبة مئوية للبعد الوراثي في نبات I بلغت 42.00 % مقارنة بمعاملة القياس(T1،T2) إذ كان الشكل المظهري لهذا النبات يتميز بقصره وزيادة عدد أفرعه الذي انعكس على زيادة عدد النورات الزهرية مع عدد متوسط من الزهيرات في النورة (جدول 3). اختلف هذا النبات عن باقي النباتات بشكل الزهيرات التي اندمجت أوراقها التويجية لتعطي شكل البوق إذ يمكن رؤية الأعضاء التكاثرية للزهيرة . كما أعطى نبات N نفس شكل نبات I عدا اختلاف اللون(شكل 3) بالرغم من اختلاف معاملة الصعق الكهربائي والنسبة المئوية للبعد الوراثي التي بلغت 36% عن معاملة القياس(جدول2). يمكن استخدام النباتين I وN للزراعة في الحدائق لشكل النبات المفترش والقصير.

اختلف النبات O وراثيا عن نباتات القياس بنسبة 37%(جدول2) إذ تميز بكثرة عدد الافرع والنورات الزهرية وزيادة عدد الزهيرات فيها (جدول3) وتقاربها من بعضها البعض واتجاه الزهيرات للأعلى (شكل 4) أما بتلات

الزهيرات فكانت مجعدة جدا مع مغمور في الأعضاء التكاثرية التي منعت هذا النبات من تكوين البذور.

أعطى النبات K زهيرات اندمجت فيها أوراق التويج بشكل دائري وبجزئين خارجي وداخلي لكل زهيرة (شكل5) وكانت النورة الزهرية طويلة بسبب الشكل الأنبوبي للزهيرات ، وعدد الأفرع قليل وعدد النورات متوسط(جدول 3). كانت قيم الصفات قيد الدراسة متدنية بشكل عام مقارنة بنباتات القياس الذي اختلف عنها وراثيا بنسبة 29%(جدول 2). أعطى النباتان M و E نورات زهرية مشابهة لنورات النبات k ولكن ذات

شكل 1. نتائج تحليل 20 نباتاً منتخباً من نباتات حلق السبع المعاملة بالصعق الكهربائي بتقانة الـRAPD مع البادئين B15 وH12 والمرحلة كهربائياً على هلام الآكاروز بتركيز1.2%.



❁ الاحرف المثبتة تمثل النباتات المنتخبة.

ألوان مختلفة مع تشوه بعض الزهيرات بالرغم من اختلاف معاملات الصعق والنسبة المئوية للبعد الوراثي التي كانت 28.5% و 27% لكل نبات عن معاملة القياس على الترتيب(جدول2).

اختلف النبات Q وراثيا عن نباتات القياس بنسبة 36.5% وكان مبكر جدا في التزهير إذ أزهر بعد 128 يوماً من الزراعة، ولم يتجاوز ارتفاع النبات عن 25 سم وكان عدد الأفرع والنورات قليلاً فضلاً عن قلة عدد الزهيرات في النورة الزهرية مقارنة بنباتات القياس (جدول 3)، والزهيرات كانت طبيعية الشكل وغير مشوهة (شكل 6). يمكن استخدام النبات للزراعة في احواض الازهار او للتحديد. انتخب النباتان J و L بسبب تشوه شكل الزهيرة وذلك بانطباق البتلات العليا على البتلات السفلى وعدد الزهيرات كبير في النورة الزهرية وقطر النورة قليل بسبب اتجاه الزهيرات الى الأعلى والنبات متوسط الارتفاع (جدول3) وقد ايد هذه الاختلافات المظهرية البعد الوراثي

لهذين النباتات عن نباتات القياس الذي بلغ 24.5% و 20% على الترتيب(جدول2).

أدت المعاملة بالصعق الكهربائي الى اختلاف النبات B وراثيا عن نباتات القياس بنسبة 27.5 % فأعطى زهيرات أنبوبية الشكل ومتجهة الى الأعلى مما انعكس سلباً على قطر النورة الزهرية وقد سجل النبات تراجعاً في اغلب الصفات قيد الدراسة اذ لم يمتلك أية صفة مرغوبة (جدول 3).

أعطى النبات A نسبة بعد وراثي مقدارها 24.5% عن معاملة القياس ، وقد انعكس هذا الاختلاف الوراثي على الشكل المظهري للنبات ، إذ بدت أوراق التويج ملتفة للأعلى والأسفل والزهيرات كثيرة العدد ومزدحمة في النورة الزهرية والنبات نشط النمو ومتوسط الارتفاع فيمكن استعماله كنبات لانتاج ازهار القطف (جدول 3).

اختلف النبات G وراثيا عن نباتات القياس وبنسبة بعد وراثي مقدارها 27.5 % بسبب المعاملة بالتيار الكهربائي الذي أدى الى انخفاض في نمو النبات وقلة عدد الأفرع وعدد النورات الزهرية (جدول 3) ،اما النورة الزهرية فكانت زهيراتها متباعدة جدا الذي زاد من طول النورة الزهرية وصغر قطرها وبذلك لم يعط هذا النبات ازهار ذات صفات انتاجية جيدة .أعطى النبات D زهيرات لا تحتوي على البتلة السفلى كما في الازهار الطبيعية إذ بدت البتلات السفلى مفتوحة ومستوية(شكل7)وعدد النورات متوسط وعدد الزهيرات قليلة والنبات جيد الارتفاع(جدول3)مقارنة بنباتات القياس الذي اختلف عنها وراثيا بنسبة 22.5% (جدول 2).

اختلفت النباتات C و P و R وراثيا عن نباتات القياس بنسب بعد وراثية متقاربة بلغت 18%و18%و17% على الترتيب(جدول2) رغم اختلاف الوان الازهار واختلاف معاملة الصعق الكهربائي التي تعرض لها كل نبات، وانتخبت هذه النباتات على أساس نشاطها العالي في النمو وتكوين عدد كبير من الأفرع الذي أدى الى افتراش النبات كما انتخبت هذه النباتات لزيادة عدد النورات الزهرية التي تميزت بطول وقطر عالي (جدول3) أما الزهيرات كانت ذات حجم وعدد كبير ومميز، وهي افضل النباتات في صفاتها الانتاجية التي يمكن اعتبارها ازهار قطف جيدة جداً.

اعطى النباتان F و H اقل بعداً وراثيا عن نباتات القياس بلغ 10% و 6% على الترتيب (جدول2)، اما مظهريا فقد تميز هذان النباتان بزيادة ارتفاع النبات بلغ 145 سم و 153سم على الترتيب اذ تفوقا على جميع النباتات المزروعة وكان ذلك على حساب عدد الافرع المتكونة حيث لم يعط سوى 12 فرعاً و 8 أفرع بالتتابع التي كونت نورات زهرية قليلة الا انها ذات صفات انتاجية جيدة (جدول 3).

اختلفت النسبة المئوية للبعد الوراثي بين النباتات المنتخبة يوضح جدول 2 انخفاض وارتفاع هذه النسبة اذ بلغ اقل بعد وراثي(11%) بين النباتين(J و C) وهذا يشير الى ان معاملتي الصعق الكهربائي لهذين النباتين تعطي نسبة تغايرات وراثية متقاربة وهذا يعتبر كمؤشر لمربي النبات بأن هذه المعاملات تعطي نفس القدر من التغايرات الوراثية ، في حين كانت اعلى نسبة مئوية للبعد الوراثي بين نباتات (E وO) و (I و E) وبلغت 37.5 % لكليهما ويشير التباعد العالي الى أن معاملات الصعق الكهربائي لهذه النباتات ادت الى تكوين تغايرات وراثية بنسب متباعدة ، على الرغم من معاملة النباتين I وE بنفس المعاملة (8امبير X 6دقائق) وهذا يؤكد ان معاملة الصعق تؤثر بشكل مختلف على كل نبات بالرغم من ثبات التيار ومدة الصعق. كما قد تعطي معاملة الصعق نسبة تغايرات متساوية للنباتين ،لكن ليس بالضرورة ان يكون هذا التأثيرعلى نفس الموقع من DNA فيظهر النباتان مختلفان مظهرياً.

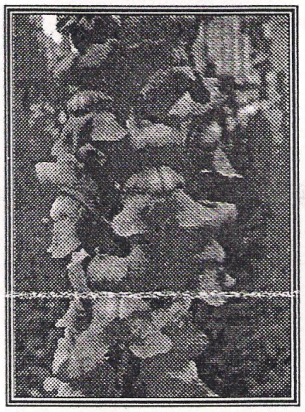
اختلف النبات G وراثيا عن نباتات القياس وبنسبة بعد وراثي مقدارها 27.5 % بسبب المعاملة بالتيار يتبين من جدول(3) ان لمعاملات الصعق الكهربائي تأثيراً كبيراً في تغيير التركيب الوراثي لهذه النباتات مما انعكس على صفاتها المظهرية غير المتجانسة وهذا مايؤكدها معامل التغاير C.V.% الذي يشير الى وجود اختلافات كبيرة بين النباتات في ارتفاع النبات وعدد الافرع وعدد النورات وعدد الزهيرات في النورة بينما كان التغاير متوسطاً في طول وقطر النورة ومقبولاً في قطر الزهيرة .حيث يعد التغاير عالياً(معنويا) اذا كان C.V.% > 20% (الساهوكي ووهيب1990).

جدول 2. نتائج البعد الوراثي(%) بين نباتات حلق السبع المنتخبة بأستعمال البيانات الناتجة من استعمال البادئان B15 وH12 في مؤشرات الـRAPD،والاحرف المثبتة تمثل النباتات المنتخبة :

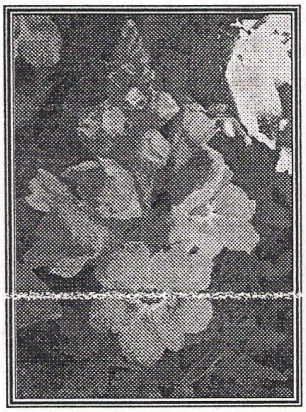
	T1	M	J	L	A	O	C	E	N	B	Q	K	R	D	F	P	G	I	H	T2
T1	0.0																			
M	28.5	0.0																		
J	24.5	12.5	0.0																	
L	20.0	13.0	9.5	0.0																
A	24.5	15.0	11.5	12.0	0.0															
O	37.0	21.0	18.0	18.0	28.5	0.0														
C	18.0	24.0	11.0	18.5	19.0	28.0	0.0													
E	27.0	30.0	17.5	25.5	25.5	37.5	25.5	0.0												
N	36.0	31.5	31.0	31.0	37.0	34.0	25.5	26.5	0.0											
B	27.5	24.5	22.0	25.5	22.0	26.5	18.5	29.0	21.5	0.0										
Q	36.5	22.0	16.0	28.5	17.0	30.0	24.0	24.0	24.5	19.0	0.0									
K	29.0	16.5	15.5	23.5	28.5	23.5	19.0	16.5	14.5	26.5	16.5	0.0								
R	17.0	25.5	24.0	26.5	21.0	33.0	8.5	16.0	27.5	22.5	27.0	20.0	0.0							
D	22.5	31.5	26.0	33.5	32.0	34.0	19.0	26.5	21.5	29.0	26.5	14.5	16.0	0.0						
F	10.0	22.0	18.5	14.0	19.5	22.5	12.5	33.0	32.0	21.5	31.5	25.5	16.0	26.5	0.0					
P	18.0	17.0	16.5	12.0	15.0	26.0	21.5	17.5	36.5	19.0	27.5	26.5	20.0	36.5	22.0	0.0				
G	27.5	30.0	19.0	22.5	28.0	22.5	27.5	21.5	31.0	22.0	25.5	23.5	26.0	34.0	30.0	20.5	0.0			
I	42.0	3.5	23.0	31.0	31.5	26.5	31.0	37.5	33.5	30.0	19.0	31.0	34.0	33.5	33.5	33.5	26.5	0.0		
H	6.0	15.0	11.5	12.0	12.5	29.5	12.5	19.0	30.5	27.0	24.0	17.0	17.0	19.5	13.0	15.0	20.5	30.0	0.0	
T2	0.0	28.5	24.5	20.0	24.5	37.0	18.0	27.0	36.0	27.5	36.5	29.0	17.5	22.5	10.0	18.0	27.5	42.0	6.0	0.0

جدول3. بعض الصفات المقاسة لنباتات حلق السبع المنتخبة من النباتات المعاملة بالصعق الكهربائي على اساس أختلاف شكلها المظهري والمتباينة البعد الوراثي عن نباتات القياس.

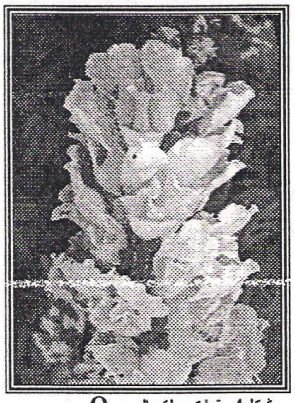
رمز النبات	المعاملات		الجزء النباتي المعامل	ارتفاع النبات (سم)	عدد الافرع	عدد النورات	طول النورة (سم)	قطر النورة (سم)	عدد الزهيرات	قطر الزهيرة (سم)
	التيار امبير	المدة دقائق								
T1	0	0	بذور مستنبتة	90	48	34	25.0	8.5	36	3.7
T2	0	0	شتلات	95	51	41	27.0	7.0	33	3.5
I	6	8	بذور مستنبتة	53	76	46	27.0	9.5	27	5.6
N	4	8	بذور مستنبتة	56	68	27	28.0	9.0	36	5.0
O	6	10	بذور مستنبتة	78	71	35	32.0	8.7	47	4.5
K	6	10	شتلات	66	43	27	35.0	8.4	41	4.0
M	2	8	بذور مستنبتة	60	39	23	30.0	8.0	38	4.5
E	6	8	بذور مستنبتة	69	47	28	37.0	7.8	44	4.5
Q	6	8	شتلات	25	31	15	10.0	6.5	15	4.0
J	6	6	بذور مستنبتة	82	52	26	33.0	7.5	46	3.0
L	4	6	بذور مستنبتة	86	48	25	30.0	6.5	42	3.0
B	2	10	بذور مستنبتة	67	39	18	26.0	6.0	28	3.5
A	2	6	شتلات	72	68	33	27.5	10.0	44	4.0
G	4	8	شتلات	75	36	26	40.0	6.5	17	3.5
D	6	6	بذور مستنبتة	87	53	27	34.5	7.5	22	4.0
C	4	6	شتلات	93	80	36	30.0	9.5	45	4.5
P	6	6	شتلات	81	77	40	34.0	9.5	47	4.0
R	2	8	شتلات	87	81	41	31.0	9.0	46	4.0
F	4	6	شتلات	145	12	10	34.0	8.5	41	4.5
H	4	8	شتلات	153	8	5	32.0	9.0	38	3.8
معامل التغاير C.V.%				35.24	40.91	35.69	20.33	20.25	27.20	15.52



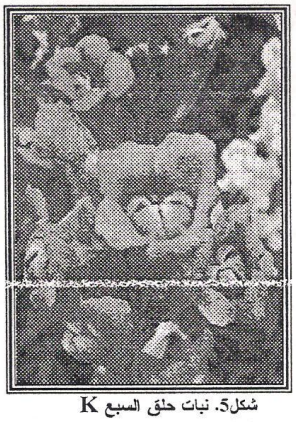
شكل2. نبات حلق السبع (القياس)



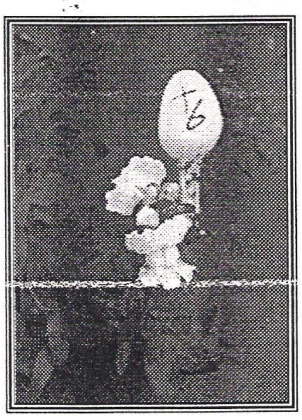
شكل3. نبات حلق السبع N



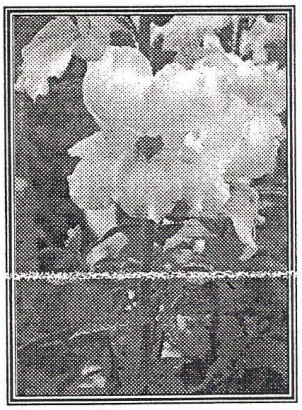
شكل4. نبات حلق السبع O



شكل5. نبات حلق السبع K

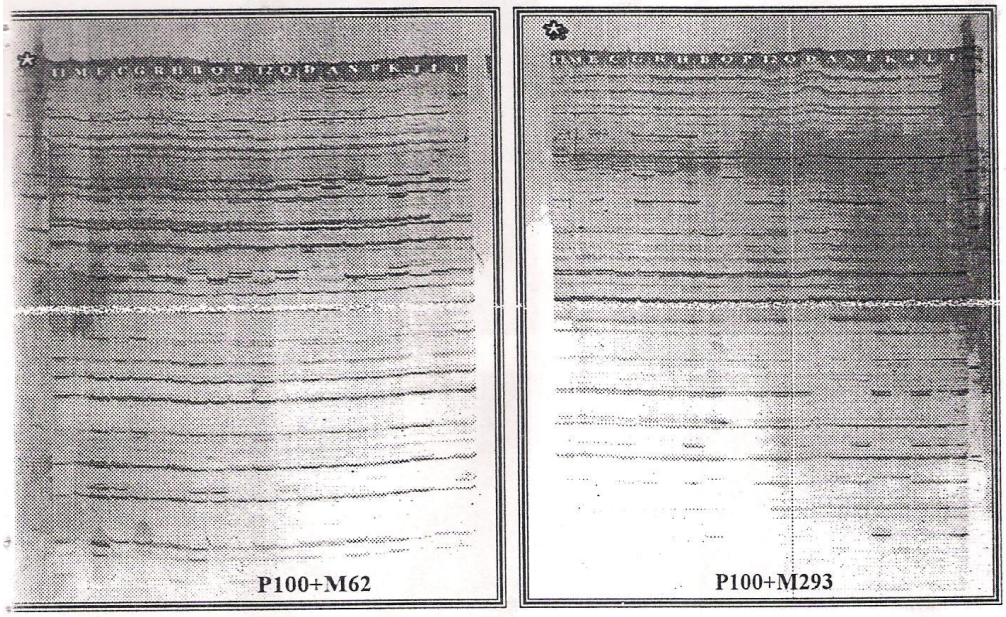


شكل6. نبات حلق السبع Q



شكل7. نبات حلق السبع D

شكل 8. نتائج تحليل 20 نباتاً منتخباً من نباتات حلق السبع المعاملة بالصعق بتقانة AFLP مع توليفة البادئات (P100+M62) و (P100+M293)المرحلة كهربائياً على هلام البولي أكريلاميد بتركيز6%.



الاحرف المثبتة تمثل النباتات المنتخبة.

أكدت نتائج تفاعلات AFLP لنبات حلق السبع النتائج السابقة من RAPD التي أجريت على نفس النباتات المنتخبة . تعد نتائج AFLP اكثر دقة وكفاءة من نتائج RAPD لانها تكشف عن اكبر عدد ممكن من الحزم المتضاعفة لمادة DNA وكما موضح في الشكل(8) الذي يبين الحزم المتضاعفة لمادة DNA عند استخدام توليفات من البادئات وبعد تحويل هذه البيانات التوصيفية الى بيانات رقمية وتحليلها بالبرنامج المعد خصيصا لهذا الغرض تم حساب البعد الوراثي بين النباتات المنتخبة وكما موضح في الجدول 4 الذي يبين وجود بعد وراثي بنسبة 2.5% بين نباتي القياس (T1 و T2)والذي قد يعود الى اختلاف النباتين في لون الازهار وهذا يؤكد مدى دقة طريقة AFLP عن طريقة RAPD التي لم تعط أي بعد وراثي بين نباتي القياس (جدول2).

يبين جدول 4 وجود اختلافات وراثية واضحة بين المتغايرات المنتخبة ونباتات القياس والتي تتفق مع النتائج التي تم الحصول عليها من تفاعلات RAPD لكل نبات . كانت اعلى نسبة تباعد وراثي بين المتغايرات المنتخبة ونباتات القياس 27.5% في نبات I ، بينما كانت اقل نسبة للتباعد الوراثي في نبات H وبلغت 6.5%. اما اعلى نسبة للتباعد الوراثي بين النباتات المنتخبة فكانت 36% بين المتغايرين(I و D) في حين اعطى المتغايرين(C و M)اقل نسبة مئوية للبعد الوراثي وبلغت 8% ، يمكن الاستفادة من نسب التباعد الوراثي بين النباتات المنتخبة في التعرف على تقارب او تباعد تاثير معاملات الصعق الكهربائي في التركيب الوراثي للنبات .

جدول 4. نتائج البعد الوراثي(%) بين نباتات حلق الصبغ المنتخبة بأستخدام البيانات الناتجةمن أستخدام البوادىء في مؤشرات AFLP . الاحرف المثبتة تمثل النباتات المنتخبة.

	T1	M	E	C	G	R	H	B	O	P	T2	Q	D	A	N	F	K	J	L	I
T1	0.0																			
M	21.0	0.0																		
E	18.0	14.0	0.0																	
C	14.5	8.0	10.0	0.0																
G	16.0	18.5	13.5	19.0	0.0															
R	12.5	14.0	16.0	14.5	11.5	0.0														
H	6.5	23.5	15.5	18.5	15.5	15.0	0.0													
B	20.5	18.0	17.0	16.5	15.0	19.5	20.0	0.0												
O	23.5	17.0	18.0	14.5	15.0	18.0	24.0	18.5	0.0											
P	13.0	25.5	19.5	18.5	18.5	16.5	14.0	20.5	22.0	0.0										
T2	2.5	22.0	17.5	15.5	17.0	13.5	5.5	23.5	24.0	12.5	0.0									
Q	23.5	31.0	22.0	30.0	25.5	25.0	22.5	27.5	23.5	25.5	22.5	0.0								
D	16.0	26.0	22.5	25.0	20.5	20.5	23.5	30.0	22.5	23.0	17.0	27.5	0.0							
A	16.5	23.0	29.5	24.0	22.0	21.5	20.0	26.5	13.5	20.5	18.5	31.5	24.5	0.0						
N	22.0	19.0	33.0	23.5	25.0	24.5	21.0	28.0	29.5	21.5	21.5	31.5	20.0	16.0	0.0					
F	10.0	21.0	25.0	17.5	19.5	14.0	17.5	26.0	21.0	16.0	10.0	25.5	19.0	16.0	18.5	0.0				
K	21.5	29.0	24.5	24.5	21.0	24.5	24.0	27.5	30.0	26.5	21.0	27.5	23.0	22.5	23.5	18.0	0.0			
J	18.0	25.0	25.0	21.0	21.5	21.0	19.5	26.0	32.0	21.5	16.5	27.0	27.0	21.0	20.5	14.0	20.0	0.0		
L	16.0	23.5	25.5	18.0	19.5	23.0	16.0	23.0	27.0	20.0	16.5	24.0	21.5	18.0	12.0	17.0	20.5	19.0	0.	
I	27.5	29.0	29.5	28.0	29.5	30.5	26.0	23.5	28.5	27.0	26.5	25.0	36.0	26.5	27.5	23.5	23.5	20.5	20.5	0.0

يتضح من نتائج الاختبارات الوراثية السابقة امكانية إحداث تغايرات وراثية في DNA النباتات باستخدام معاملات مختلفة من شدة التيار الكهربائي ومدة تعريض الجزء النباتي للتيار الكهربائي وهذا يتفق مع ما ذكره الساهوكي(4) في إحداث طفرات وراثية عند معاملته خمس سلالات من فول الصويا بالصعق الكهربائي إذ لاحظ بعد خمسة أجيال ان الصعق الكهربائي قد اختزل ارتفاع النباتات وزاد من حاصل البذور.كما تتفق النتائج السابقة مع نتائج آخرين(6 ، 7 ، 8) عند معاملتهما البذور المستنبتة لنباتات الحنطة والشعير وزهرة الشمس والذرة الصفراء بالصعق الكهربائي إذ لاحظوا ظهور نباتات تحمل تغايرات وراثية تختلف عن النباتات غير المعاملة،ففي نبات الحنطة حصلوا على نباتات عديمة السفا في الجيل الثاني وعند زراعتها في الجيل الثالث أعطت نباتات عديمة السفا أيضا. اما في نبات زهرة الشمس فقد حصلا على15متغيرا في الجيل الثاني تمثلت في نباتات متقزمة ونباتات ذات أوراق مفصصة تفصصا عميقا ونباتات ذات اقراص مشوهة ونباتات عديمة القرص، بينما حصلا من نباتات الذرة الصفراء على زيادة في طول العرنوص بنسبة 53.85%عن نباتات القياس ظهر في الجيل الثاني والثالث،بينما لم تحدث اي تغايرات مظهرية فردية في محصول الشعير بسبب الصعق الكهربائي.

من الجدير بالذكر أنه ليس بالضرورة ان تكون النباتات التي لم تعط شكلاً مظهرياً غريباً انها ثابتة وراثيا وانما قد تكون الطفرات الوراثية التي حدثت فيها من النوع Micro-Mutation التي لا تحدث تأثيرا مباشرا وظاهراً في صفات الفرد خصوصاً عندما تكون في الصفات الكمية التي تتأثر بعدد كبير من الجينات ذات التأثير القليل في الصفة ،وهنا يأتي دور مربي النبات في استخدام طريقة الانتخاب المستمر لهذه الصفات عبر الاجيال ليرفع من مستواها الى اقصى حد بعد انعزال العوامل الرئيسية.

المصادر

1. أشتر ، سها .1999. تحديد وتقدير التنوع الحيوي في الشعير بأستخدام معلمات الحامض النووي DNA . رسالة

ماجستير . قسم المحاصيل الحقلية .كلية الزراعة . جامعة حلب – سوريا .ع ص126.

2. الحسني ، خلود ابراهيم حسن .2002. استخدام المؤشرات الجزيئية المعتمدة على التفاعل التضاعفي لسلسلة الدنا في دراسة التنوع الوراثي للبطاطا *Solanum tuberosum L.* . اطروحة دكتوراه. كلية العلوم .قسم علوم الحياة. جامعة بغداد.ع ص200.

3. الساهوكي ، مدحت مجيد .2006. تربية النبات بمساعدة المعلمات الجزيئية. مجلة العلوم الزراعية العراقية . 37(4): 67-72.

4. الساهوكي ، مدحت مجيد .1992. تقويم طوافر فول الصويا مستحدثة بطريقة الصعق الكهربائي . مجلة العلوم الزراعية العراقية .22(2): 99-105.

5. الساهوكي ، مدحت وكريمة محمد وهيب. 1990 .تطبيقات في تصميم وتحليل التجارب،جامعة بغداد . وزارة التعليم العالي والبحث العلمي ،العراق.ص 480.

6. الساهوكي، مدحت مجيد ووليد عبد الرضا السباهي . 2001a. أحداث تغايرات وراثية في الحنطة والشعير بالصعق الكهربائي . مجلة العلوم الزراعية العراقية . 32(5): 139-145.

7. الساهوكي، مدحت مجيد ووليد عبد الرضا السباهي . 2001b. تغايرات صفات زهرة الشمس بتأثير الصعق الكهربائي. مجلة العلوم الزراعية العراقية . 32(5) :91-96.

8. الساهوكي، مدحت مجيد ووليد عبد الرضا السباهي . 2001c. تغايرات وراثية للذرة الصفراء مستحدثة بالصعق الكهربائي . مجلة العلوم الزراعية العراقية . 32(5): 101-107.

9. السباهي ، وليد عبد الرضا جبيل.1996 .احداث تغايرات وراثية في بعض المحاصيل الحقلية بالصعق الكهربائي . اطروحة دكتوراه . قسم المحاصيل الحقلية- كلية الزراعة . جامعة بغداد.ع ص90.

10. خير الله ،حسام سعد الدين محمد .2007. الاكثار الدقيق لصنفين من نخيل التمر بأستخدام النورة الزهرية ودراسة الثبات الوراثي بأستخدام مؤشرات تباين اطوال قطع الـDNA المتضاعفة(AFLP).أطروحة دكتوراه . قسم البستنة- كلية الزراعة . جامعة بغداد.ع ص312.

11. Ahmed, F. 1999. Random Amplified Polymorphic DNA. RAPD analysis reveals genetic relationships among the annual cicer species . Theor. Appl. Genet. 98: 657-663 .

12. Ali, T.A., J.M Jubrail, and A.M. Jassim. 2006. The use of RAPDs technique for the detection of genetic stability of the regenerated plantles (Barhi cv.) in Iraq. 3rd Inter, Date Palm , Conf. Feb 19-21. Abu-Dhabi. UAE, p. 86-98.

13. Al-Khalifah, N.S. and E. Askari. 2006. Early detection of genetic variation in date palm propagated from tissue culture and offshoots by DNA fingerprinting. 3rd Inter, Date Palm, Conf. Feb, 19-21. Abu-Dhabi. UAE, p.184-191.

14. Barone, A., A. Sebastiano and D. Carputo. 1999. Chromosome pairing in Solanum commersonii, S. tuberosum sexual hybrids detected by commersonii–specific RAPDs and cytological analysis. Genome 42: 218 –224.

15. Becker, J. and M. Heum .1995. Barley microsatellites: Allele variation and mapping. Plant Mol. Biol. 27:835-845.

16. Haley, S.D. , L.K. Afanador , P.N. Miklas , J.R. Starely , and J.D. Kelly .1994. Hetergeneous inbred populations are useful as sources of near-isogenic lines for RAPD marker localization. Theor Appl genet 88: 337-342.

17. Mathes, R.K. , A.H. Boyd and J.C. Viability .1968. Physical properties related to seed viability. The 1968 Ann. Meeting South East Reg. Amer. Soc. Agric. Engr., Louisville, Kentucky, USA, p 8093-8044.

18. Nei, M. and W.H. Li .1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 74:5269 – 5273.

19. Powell, W. , W.T.B. Thomas , E. Baird , P. Lawrence , A. Booth , B. Harrower , J.W. Me nical and R. Waugh .1997. Analysis of quantitative traits in barley by the use of Amplified Fragment Length Polymorphisms. Heredity 79: 48 – 59.

20. Sahgi-maroof, M.A. , K.M. Soliman, R.A. Jorgens and R. W. Allard .1984. Ribosomal DNA spacer lenth polymorphisms in barley. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 81: 8014 – 8018.
21. Sambrook, J. , E.F. Fristsch and T. Maniatis .1989. Molecular Cloning, a laboratory manual, 2nd edn. Cold Spring Harbor laboratory. Cold Spring Harbor. New york, p 112.
22. Sedra, M. H. , P. lashermes , P. Trouslot , M. C. Combes and S. Homan .1998. Identification and genetic diversity analysis of date palm (Phoenix dactylifera L.) varieties from Morocco using RAPD makers. Euphytica 103: 75 – 82.
23. Swoboda, I. and P. L. Bhalla .1997. RAPD analysis of genetic variation in the Australian sun flower Scaevola. Genome, 40: 600 – 606.
24. Tragoonring, S., V. Kanazin , P.M. Hayes and T.K. Blake .1992. Sequence–tagged–site–facilitated PCR for barley genome mapping. Theor. Appl. Genet. 84: 1002 – 1008.
25. Vogt, T.,M. Francoise,K.Frank,J.Welsh and M.Clelland.1997.Fingerprinting of DNA and RNA using arbitrarily primed PCR.In: G Caetano–Anolles, and Gresshof. P. M. (eds.), DNA Markers. Protocols, Application and Overview.New York.p.55-74.
26. Von, B. , R. N. Jacobsen , C. Baden , R.B. Jorgensen and Linde – Laursen .1995. An ecogeographical studies on crop genepools 7th. International Plant Genetic Resources institute. Rome. p 45-63.
27. Weigand, F., M. Baum, and S. Udupa .1993. DNA molecular marker techniques. Technical manual. No. 20 International Research for Agricultural Reaearch in the Dry Areas, Aleppo, Syria, p103-122.
28. Williams, J. G. K. , A. R. Kubelik , K., J. Livak , J. A Rafalaki and S. V. Tingey .1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Research 18 (22): 6531 – 6535.
29. Zabeau, M. and P. Vos .1993. Selective restriction fragment amplification : general method for DNA fingerprinting. European Patent. Application number 92402629.7,publication number 0 534 858A1.
30. Zhang, D. , Q. Yang , W. Bao and Y. Zhang.2004. Molecular Cytogenetic characterization of the Antirrhinum majus genome. Genetics Society America. Genet. 169:325-335.