التمييز بين بعض منتخبات اصناف الرقي بأستعمال تقانة ISSR

مريم سامي الياس
مدرس مساعد
جامعة بغداد – كلية الزراعة – قسم البستنة وهندسة الحدائق
Maream1983_sami@yahoo.com

المستخلص

نفذت التجربة بأستعمال 12 بادئاً تعود لتقانة ISSR في التمييز بين 21 منتخب تعود الى ثلاثة اصناف من الرقي *Citrullus lanatus* وهي كل من الصنف Crimson Sweet والذي رُمز لمنتخباته بالرموز W1 وW2 وW3 وW4 والصنف Sugar Baby الذي رُمز لمنتخباته بالرموز SH1 وSH2 وSH3 وSH4 وSH5 وSH6 وSH7 والصنف Charleston Gray الذي رُمز لمنتخباته بالرموز G1 وG2 وG3 وG4 وG5 وG6 وG7 وG8 وG9 وG10 . اوضحت النتائج ان البادئات المستخدمة اعطت 89 حزمة كلية كانت جميعها ذات تعددية شكلية بلغ مقدارها 100 % . وجد ان البادئات 810 و840 و 864 كانت ذات كفاية عالية من طريق اعطاءها اعلى عدد من الحزم في حين كان البادئان 808 و 834 ذات كفاية قليلة من طريق إعطائها اقل عدد من الحزم . تمكنت 9 بادئات من اعطاء حزم فريدة لبعض المنتخبات مما تميزها عن بقية البادئات الاخرى . اظهرت النتائج ان تحليل المكونات الرئيسة PCA للصنف Crimson Sweet بين ارتباط المنتخبين W1 و W2 في حين ان المنتخبين W3 و W4 لا يوجد ارتباط لهما مع المنتخبين السابقين او مع بعضهما وتبين ارتباط المنتخبات SH1 و SH3 وSH6 مع بعضهما بمعزل عن المنتخبات SH4 وSH7 وSH2 و SH5 في الصنف Sugar Baby اما الصنف Charleston Gray فقد توزعت المنتخبات العشرة الى مجموعتين ، ضمت المجموعة الاولى ارتباط المنتخبات G7 وG5 وG6 وG4 وG8 بمعزل عن المجموعة الثانية التي شملت المنتخبات G1 وG2 وG3 و G9 و G10 . و وجد ان اكبر بعد وراثي كان بين الصنفين Charleston Gray وSugar Baby . عليه ان بادئات ISSR قد اظهرت التباين بين المجتمعات حسب تباين ترتيب القواعد النيوكليوتيدية ويمكن الاستنتاج بأمكانية استعمال التقانات الاحيائية في برامج التربية والتحسين.

الكلمات المفتاحية : PCA – PIC- AMOVA - التعددية الشكلية - Crimson Sweet - Sugar Baby - Charleston Gray .

DISTINGUISH AMONG SOME SELECTIVE WATERMELONS BY USING ISSR TECHNOLOGY

M. S. Elias
Assistant of Lecturer
Dept. of Horticulture- Coll. of Agric. - Univ. of Baghdad
Maream1983_sami@yahoo.com

ABSTRACT

This experiment conducted Using 12 primers related to ISSR technology in distinguishing among the 21 selective back to the three variety of watermelon they are each of the selective Crimson Sweet which code to W1 ،W2 ،W3 and W4 and the variety Sugar Baby which coded to SH1 ,SH2 ,SH3 ,SH4 ,SH5,SH6 and SH7 and the variety Charleston Gray which is coded to G1 ,G2,G3 ,G4 ,G5 ,G6 ,G7 ,G8, G9 and G10 . The results showed that the primers used gave 89 total bands were all of the polymorphism was 100%. Found that the primers 810, 840 and 864 were high ability of the way to give it the highest numbers of bands while the primers 808 and 834 of the ability of the few by giving them fewer bands. 9 primers able to give distinct bands for some selective, which distinguishes them from the rest of the other primers. The results showed that the principles component analysis (PCA) for the variety Crimson Sweet correlation the selective W1 and W2 while W3 not correlation with W4 or with each other, and correlation SH1 , SH3 and SH6 with each other apart from the SH4 , SH7 , SH2 and SH5 in the variety Sugar Baby as to the selective of Charleston Gray has divided into two groups, the first group included five selective G7 , G5 ,G6, G4 and G8 apart from the second group, which included five selective G1 , G2 , G3 , G9 and G10. . And it found that the high genetic distance between the two varieties Charleston Gray and Sugar Baby. Therefore the primers ISSR showed that the variance between the communities by variance of arrangement of nucleotide. It can be concluded the possibility of the use of biotechnology in breeding programs.

Key words: PCA ،PIC ،AMOVA ،Polymorphism, Crimson sweet, Sugar baby ،Charleston gray.

المقدمة

تُعرف التقانات الاحيائية بأنها مجمل التقانات التي تستعمل الانظمة الحيوية في الكائنات الحية او مكوناتها في انتاج او تحوير او تطوير منتجات او عمليات من اجل استخدامات معينة تكون ذات قيمة ومردود للانسان (16) ، إذ تستعمل بشكل فعال في برامج التحسين الوراثي سواء في وضع برامج التربية والتي تشمل اختيار المادة الاولية وتقويم نواتج عمليات التربية او في رفع كفاية برامج التربية من طريق الكشف المبكر عن وجود الصفة المرغوبة في المصدر الوراثي الى جانب ذلك التحقق من درجة الخلط او الاصالة الوراثية (4) ، فضلاً عن تحديد هوية الاصناف إذ ان عملية الفصل فيما بين الاصناف تعد ذات اهمية في مجال تجارة البذور وذلك لضمان حماية حقوق المربي وان تحديد هوية الاصناف واختبار نقاوتها تعد من العمليات المهمة في مجال صناعة البذور (20) . تم تطوير العديد من التقانات التي تعتمد على مؤشرات DNA والمستخدمة في الكشف عن التباينات الوراثية ودراسة القرابة الوراثية بين الانواع او الطرز الوراثية ورسم خرائط الارتباط الوراثي مما ساعد في تطوير برامج التربية ورفع كفايتها منها تقانة Inter Simple Sequence Repeats (ISSR) إذ تعد من التقانات البسيطة والسريعة وذات المصداقية العالية ، تعتمد على تفاعل البلمرة المتسلسل PCR (Polymerase Chain Reaction) و لها مميزات تقانة RAPD فضلاً عن انها اكثر تكرارية منها بسبب طول البادئ المستعمل . وتستعمل هذه التقانة في مجالات واسعة لتحديد الاصناف ورسم الخرائط الوراثية والتنوع الوراثي (4 و7 و 18و 26 و28) . توجد طرائق احصائية عدة تعتمد على نتائج مؤشرات ISSR ومن ضمنها تحليل المكونات الرئيسة Principle Components Analysis (PCA) الذي يعد احد التحاليل المستخدمة في تلخيص البيانات واختصارها إذ يقوم بتحويل العدد الكبير من المتغيرات المترابطة ولو بشكل جزئي الى مجموعة صغيرة ، وتحليل معامل التنوع الوراثي PIC(Polymorphism Information Content) الذي يبين قيمة متوسط الموقع (Locus) والتي تساعد في معرفة التمييز Informativeness الذي يعطيه الموقع (Locus) من طريق حساب تكرار اليلات هذا الموقع في المنتخبات قيد الدراسة (6) ، وتحليل التباين الجزيئي AMOVA Analysis of Molecular Variance) وهو تقدير التباين الوراثي بين المنتخبات ضمن الصنف الواحد (Among population) وكذلك بين الاصناف (within population) للرقي. وجد Levi واخرون (19) عند دراسة التشابه الوراثي بين 4 أصناف من الرقي وبأستعمال 38 بادئ من بادئات ISSR ان 31 بادئ كانوا ذات تعددية شكلية وكانت النتيجة مقاربة لما توصل اليه عند استخدامه لتقانة AFLP في حين كانت غير متقاربة لنتائج تقانة RAPD . وجد Behera واخرون (5) ان التقانات الاحيائية التي تعتمد على المؤشرات الجزيئية والمتمثلة بـ RAPD و AFLP و ISSR كانت مجدية لايجاد التنوع الوراثي بين 38 صنف من القرع المُر Bitter Gourd (*Momordica charantia* L.) إذ استعمل 29 بادئ لتقانة RAPD و 15 بادئ لتقانة ISSR و 6 بادئات لتقانة AFLP إذ اعطت تقانة RAPD (36.5 %) من التعددية الشكلية من 208 حزمة اما AFLP فقد اعطت (78.5 %) من التعددية الشكلية من 519 حزمة اما ISSR فقد اعطت 125 حزمة كانت ذات تعددية شكلية مقدارها (74.7%) . لاحظ Dje` واخرون (8) من طريق استخدامه تقانة ISSR وعند دراسته على 80 صنف من الرقي ان 20 بادئ المستعملة قد اعطت 258 حزمة كان منها 252 حزمة وبنسبة 97.67 % ذات تعددية شكلية وكانت قيمة PIC من 0.13 للبادئ $DHB-(CGA)_5$ الى 0.24 للبادئ $BDB-(CAC)_5$ وبمتوسط قدره 0.18. استعملت Marilene واخرون (21) تقانتي RAPD و ISSR وبعدد بادئات مقداره 20 و 15 بادئ بالتتابع لدراسة التنوع الوراثي لـ 40 سلالة من *Cucurbita Spp.* في البرازيل ، اعطت تقانة ISSR 137 حزمة كانت ذات تعددية شكلية بلغ مقدارها 126 في حين اعطت تقانة RAPD 141 حزمة كانت ذات تعددية شكلية بلغت 137 . أظهرت Uluturk واخرون (29) العلاقة الوراثية بين 90 منتخب من الرقي *Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum إذ حسبت نتائج PCA وفق ما اظهرته تقانة SRAP Sequence Related Amplified Polymorphism إذ قسمت الى مجموعتين رئيستين ضمت المجموعة الاولى 58 منتخب في حين ضمت المجموعة الثانية 32 منتخب وهذا يشير الى كفاية البادئات المستخدمة في كشف التنوع الوراثي بين المنتخبات. اعطت بادئات تقانة EST-SSR Expressed Sequence Tags-simple Sequence (Repeat) قدرة عالية في اظهار التنوع الوراثي بين 32 منتخب من الرقي في زمبابوي إذ حسبت نتائج PCA وفق ما اظهرته التقانة وقسمت الـ 38 منتخب الى مجموعتين رئيستين (22) . وجدت (2) ان نتائج PCA التي حسبت على اساس نتائج التقانات الاحيائية لتحديد الارتباط بين 15 سلالة نقية من سلالات قرع الكوسة الى عدم ارتباط السلالتين A و B مع بقية السلالات الاخرى في حين ارتبطت بقية السلالات مع بعضها

ضمن عنقود رئيس واحد قسم ايضا الى عناقيد ثانوية عدة ، شمل العنقود الاول ارتباط السلالتين C و D وشمل العنقود الثاني السلالات O و N و K وضم العنقود الثالث السلالات E وF وG وH وJ .

استخدم Munisse واخرون (23) 24 بادئ تعود لتقانة SSR إذ اعطت البادئات 110 حزمة (اليل) كانت قيمة PIC من 0.0 في البادئ MCPI-44 الى 0.74 في البادئ MCPI-13 وبمعدل 0.37 واظهرت نتيجة تحليل التباين الجزيئي AMOVA الى وجود اختلاف بنسبة 8 % بين المحافظات التي جمعت منهاالبذور بينما كانت نسبة الاختلاف بين المناطق 13 % اما الاختلاف على مستوى القرى فكانت بحدود 27 % إذ جمعت البذور من 12 قرية تعود الى شمال موزنبيق و 12 قرية من جنوب موزنبيق و 8 قرى من وسط موزنبيق . ونظراً لما تتمتع به التقانات الاحيائية من مميزات عدة ولما تزخر به الاسواق المحلية من منتخبات لاصناف عدة من الرقي فقد استخدمت تقانة ISSR للتميز بين منتخبات ثلاثة اصناف من الرقي .

المواد والطرائق

نفذت الدراسة الجزيئية بأستعمال تقانة التكرارات الترادفية البسيطة البينية ISSR في وحدة البحث والتطوير – قسم المختبرات والبحوث المركزي – دائرة البيطرة – وزارة الزراعة للمدة من (2014/12/1 الى 2015/3/25) بعد زراعة 21 منتخب تعود الى ثلاثة اصناف من الرقي منتجة من شركات تجارية مختلفة ذات مناشئ عالمية مختلفة وفي سنين انتاج مختلفة للبذور، إذ اختبرت 10 منتخبات من الصنف Charleston Gray رُمز لها بالرموز G1 المنتج من شركة (Peto Seed في سنة 2005) وG2 (المنتج من شركة Agree Seed في سنة 2013) و G3 (المنتج من شركة Sun Shine في سنة 2009) و G4 (المنتج من شركة Modesto في سنة 2010-2011) وG9 (المنتج من شركة Niagara في سنة2011) و G10 (المنتج من شركة Emerald seeds في سنة 2005-2006) وكلها كانت ذات منشأ امريكي اما المنتخبات التي كانت من منشأ هولندي فشملت G5 (المنتج من شركة Monarch Seed في سنة 2013) و G6 (المنتج من شركة Popvriend Seeds في سنة 2009) و G7 {المنتج من شركة Syngenta الشركة (OHISENS ENKE) في سنة 2008 } والمنتخب ذات المنشأ اليوناني G8 (المنتج من شركة Aspero في سنة)، وتكون الصنف Sugar Baby من 7 منتخبات قُسمت حسب منشأها الى مجموعتين إذ احتوت المجموعة ذات المنشأ الامريكي على المنتخبات SH1 {المنتج من شركة Modesto Premium (American Vegetable Seeds) في سنة 2004 } و SH2 (المنتج من شركة Peto Seed في سنة 2004) و SH7 (المنتج من شركة Royal sluis في سنة 2003) اما المجموعة ذات المنشأ الهولندي فاحتوت المنتخبات SH3 (المنتج من شركة Bakker Brothers في سنة 2003) و SH4 (المنتج من شركة Monarch Seeds في سنة 2007) و SH5 (المنتج من شركة Monarch Seeds في سنة 2007) ايضاً و SH6 (المنتج من شركة Popvriend Seeds في سنة 2004) ، وضم الصنف Crimson Sweet 4 منتخبات رُمز لها W1 (المنتج من شركة Argeto التركية في سنة 2011) و (W2المنتج من شركة United gentics الامريكية في سنة 2009) وW3 (المنتج من شركة Modesto seeds الامريكية في سنة 2004) و(W4 المنتج من شركة Popvriend Seeds الهولندية في سنة 2008) .

تم عزل DNA هذه المنتخبات بعد ظهور اوراقها الحقيقية ووفق خطوات العزل المرفقة ضمن محاليل عزل (Genomic DNA DNA Mini kit(plant)Protocol) مع اجراء بعض التعديلات عليها وحسب الطريقة المتبعة من قبل شركة Geneaid فضلاً عن عزل DNA بعض المنتخبات (SH2 و SH4 وSH5 وSH7 و W3 وW4) من البذور مباشرة بعد إزالة القشرة الخارجية لتأخر انباتها وعدم ظهور الاوراق الحقيقية منها . تم قياس تركيز DNA ونقاوته بأستخدام جهاز Scan drop للتأكد من ان DNA ذو نوعية جيدة إذ تعد من الخطوات الجوهرية ضمن تطبيق خطوات استخلاص DNA من النبات (27) .

استعمل في الدراسة 12 بادئ خاصة بتقانة ISSR تم الحصول عليها من شركة Bioneer ويوضح الجدول 1 التسلسل النيوكليوتيدي ودرجة حرارة الالتحام للبادئات المستعملة في الدراسة مع تغيير درجات حرارة الالتحام لبعض البادئات للحصول على النتيجة الافضل .

جدول 1 . التسلسل النيوكليوتيدي للبادئات ودرجة حرارة التحام كل بادئ

البادئ	التسلسل النيوكليوتيدي ´3-´5	درجة حرارة الالتحام
808	(AG)8C	59
809	GAGG(GA)5GG	59
810	(GA)8T	53
818	(CA)8G	54
826	(AC)8C	60-62
834	(AG)8YT	59
840	(GA)8YT	54
845	(CT)8RG	54
852	(TC)8AGA	54
864	(ATG)6	54
880	GGAGAGGAGAGGAGA	54
889	AGTCGTAGT(AC)7	60-62

ثم أجري تفاعل البلمرة المتسلسل PCR وفقاً لما ذكره (30) مع اجراء بعض التعديلات عليها فكان حجم التفاعل النهائي (25 مايكرولتر) بأستخدام 2X Master mix تم الحصول عليه من شركة (TOP TAG MASTER MIX KIT, GERMANY QIAGEN)واجري التفاعل في جهاز التدوير الحراري وفقاً للظروف الاتية :

التفاعل	عدد الدورات	الوقت	درجة الحرارة
فصل شريطي الدنا (DNA Denaturation)	1	3 دقائق	94 مْ
40 دورة تضمنت كل منها المراحل الاتية			
Denaturation	1	30 ثانية	94 مْ
Anneling	1	1 دقيقة	حسب درجة حرارة التحام كل بادئ وكما موضح في الجدول 1
Extension	1	1 دقيقة	72 مْ
اكتمل التفاعل عند درجة حرارة 72 مْ لمدة 10 دقائق ثم انهي التفاعل على حرارة (4 مْ) وخزنت العينات بعد ذلك بحرارة (4 مْ) في الثلاجة			

ثم فصلت نواتج تفاعل PCR لـ ISSR كهربائياً بأستعمال جهاز الترحيل الكهربائي الافقي على هلامة الاكاروز بتركيز 1.5 % المذاب في المحلول المنظم (TAE Buffer 1X) من انتاج شركة Cleaver.U.K. ، (27). ثم فحص الهلام من طريق تعريضه للاشعة فوق البنفسجية لرؤية حزم DNA وصورت الهلامة بأستعمال جهاز تصوير خاص Gel documentation system .

حللت نواتج مؤشرات ISSR بعد قراءة كل هلامة من هلامات الـ ISSR يدوياً بتحويل نتائجها الى جداول توصيف اعتماداً على وجود حزم DNA او غيابها في العينات قيد الدراسة وذلك بوضع 1 عند وجود الحزمة و 0 عند غيابها وحسبت نواتج بادئات مؤشرات ISSR المستخدمة كالاتي :

1. عدد الحزم الكلية الناتجة من كل بادئ .
2. النسبة المئوية للتعدد الشكلي Polymorphism للبادئات

   النسبة المئوية للتعدد الشكلي للبادئ =
3. النسبة المئوية للتعدد الشكلي للاصناف Polymorphism of Loci(%P)

   النسبة المئوية للتعدد الشكلي =

$$\frac{\text{العدد الكلي للحزم المتباينة في الصنف}}{\text{العدد الكلي لحزم الصنف}} * 100$$

4. عدد الحزم للبادئات 12 في الصنف الواحد No. Bands
5. عدد الحزم المتميزة للبادئات 12 في الصنف الواحد No. Private Bands
6. العلاقة الوراثية بين الاصناف الثلاثة إذ تم تحويل بيانات التوصيف الى قيم الاختلاف المقدرة استناداً الى معادلة Nei وLei (24) بأستعمال جهاز الحاسوب الالي وفق البرنامج الاحصائي (13) الاصدار6 وكما موضح في المعادلة الاتية :

Genetic Distance = 1-(2 n x y / n x + n y)

إذ إنَّ

Genetic Distance = البعد الوراثي

n x y= تمثل عدد الحزم المشتركة بين الانموذجين x و y التي تمثل أياً من الاصناف قيد الدراسة .

n x = عدد الحزم الكلية في الانموذج x .

n y = عدد الحزم الكلية في الانموذج y .

7. كفاية البادئ = (العدد الكلي لحزم البادئ \ العدد الكلي لحزم كل البادئات) * 100
8. الوزن التقريبي للحزم المتميزة
9. اجري تحليل المكونات الرئيسة PCA للمنتخبات ضمن الصنف الواحد وكذلك لجميع المنتخبات التي تضمنتها

الاصناف الثلاثة من نتائج مؤشرات ISSR بأستعمال جهاز الحاسوب الالي وفق البرنامج الاحصائي PAST وبحسب المعادلة الاتية (15) :

$$Cn = an_1X_1 + an_2X_2 + \ldots + ankXn$$

، إذ تمثل :

Cn = قيمة المكون الرئيس

ank = معامل الانحدار لـ حزم DNA [مؤشرات ISSR].

Xn = 21 منتخب من 3 اصناف من الرقي

10. حُسب معامل التنوع الوراثي PIC(Polymorphism Information Content) بأستعمال برنامج Power Marker 3.7 وحسب معادلة (3)

$$PIC = 1-(F^2) + (E^2)$$

PIC = معامل التنوع الوراثي

F = عدد الحزم الموجودة التي اعطيت الرقم 1

E = عدد الحزم المفقودة التي اعطيت الرقم 0

11. اجري تحليل التباين الجزيئي AMOVA (Analysis of Molecular Variance بأستعمال البرنامج الاحصائي GenAlEx 6 وحسب ما ذكره Excoffier (9) .

النتائج والمناقشة

عدد الحزم الكلية الناتجة من كل بادئ و النسبة المئوية للتعدد الشكلي Polymorphism و كفاية البادئ و معامل التنوع الوراثي (PIC(Polymorphism Information Content :

اوضحت نتائج جدول 2 ان 12 بادئاً من بادئات تقانة ISSR والتي استعملت على 21 منتخب تعود لـ 3 أصناف من الرقي اعطت 89 حزمة كلية 7.42 بمتوسط حزمة . بادئ$^{-1}$كما اظهرت البادئات جميعها تعددية شكلية بلغ مقدارها 100 % واعطت البادئات 810 و 840 و 864 اعلى عدد من الحزم بلغ مقدارها 11 و 11 و10 حزمة على التتابع وبكفاية قدرها 12.2 و 15.9 و 9.64 على التتابع وبمعامل تنوع وراثي عالٍ PIC قدره 0.3750 و 0.3531 و 0.3698 على التتابع في حين اعطت البادئتان 808 و 834 اقل عدد من الحزم بلغت 4 حزم وبكفاية قدرت 5.03 و 3.21 على التتابع وبمعامل تنوع وراثي PIC قدره (0.3698 و 0.3538) على التتابع ، ان النسبة المئوية العالية للتعددية الشكلية والتباين في عدد الحزم الناتجة وكفاية البادئات المستعملة تعزى الى وجود اختلافات بالتسلسل النيوكليوتيدي في جينوم النبات مما يؤثر في مواقع ارتباط البادئات وقد تعود هذه الاختلافات عن استبدال زوج من النيوكليوتيدات Substitutions او الادخال Insertions اوالحذف Deletions او لحدوث طفرات معينة و تشير القيمة العالية للـ PIC ان البادئ المستخدم قد اظهر كفاية عالية في ايجاد التنوع الوراثي الناتج من تخالف الزيجة او ما يعرف بمحتوى معلومات التعدد الشكلي إذ يساعد في معرفة عدد الاليلات في الموقع الواحد مع تكرار نسبي في المجتمع المدروس وجاءت النتائج مماثلة لماوجده باحثون اخرون (14 و22) .

جدول2. عدد الحزم والتعددية الشكلية وكفاية وقيمة معامل التنوع الوراثي PIC للبادئات المستخدمة

البادئ	عدد سطور الحزم/بادئ	عدد الحزم الكلي	النسبة المئوية للتعددية الشكلية	كفاية البادئ	PIC
808	4	47	100	5.03	0.3698
809	9	95	100	10.18	0.3750
810	11	114	100	12.2	0.3750
818	6	67	100	7.18	0.3740
826	9	77	100	8.25	0.3663
834	4	30	100	3.21	0.3538
840	11	149	100	15.96	0.3531
845	6	76	100	8.14	0.3641
852	7	62	100	6.64	0.3688
864	10	90	100	9.64	0.3698
880	6	62	100	6.64	0.3749
889	6	64	100	6.85	0.3747
المجموع	89	933			0.3683
المتوسط	7.42				

الحجم التقريبي للحزم المتميزة

يبين الجدول 3 الحزم المميزة للبادئات المستعملة إذ تمكنت 9 بادئات من اعطاء حزم فريدة لبعض المنتخبات مما تميزها عن بقية المنتخبات الاخرى إذ نجد ان البادئ 809 اعطى حزم مميزة للمنتخبين SH6 و G10 عند الموقع 900 Kbp بين SH6 و S1 عند الموقع 450 Kbp واعطى البادئان 810 و 818 حزم مميزة عند الموقع 400 Kbp بين المنتخبات SH6 و SH3 و SH1 على التتابع وبين SH6 و G5 على التتابع اما البادئ 826 فاعطى 3 مواقع متميزة وهي 800 و 500 و400 Kbp على التتابع بين المنتخبات G3 و G2 وG7 وW4 على التتابع واعطى البادئ 834 حزم مميزة عند الموقعين 900 و 700 Kbp على التتابع للمنتخبات W1 و SH6 على التتابع واظهر البادئ 880 حزمة ذات وزن جزيئي عالي 1000 Kbp

في المنتخب G10 في حين اعطى البادئ 845 حزم ذات وزن جزيئي منخفض 300 Kbp للمنتخبين W3 وG3 على التتابع اما البادئ 852 فقد اظهر موقعين متميزين 1700 و 800 Kbp على التتابع اشتركت بها المنتخبات SH6 و W1 وG7 واخيرا اعطى البادئ 864 حجمين جزيئيين متميزين 700 و200 Kbp bp على التتابع للمنتخبين G9 و SH7 على التتابع ، ان هذا يشير الى وجود تقارب بين المنتخبات المشتركة مع بعضها بالحزم المتميزة فضلاً عن كفاية البادئات في اظهار المواقع المتميزة في جينوم المنتخب والتي تميزها عن المنتخبات الاخرى من حيث بعدها الوراثي وامكانية استخدام تقانة ISSR في عمليات التصنيف النباتي للمنتخبات وهذا هو الدور الهام الذي تؤديه التقانات الاحيائية في تربية النبات وتحديد الاصناف وجاءت النتائج مقاربة لما وجدته (17) .

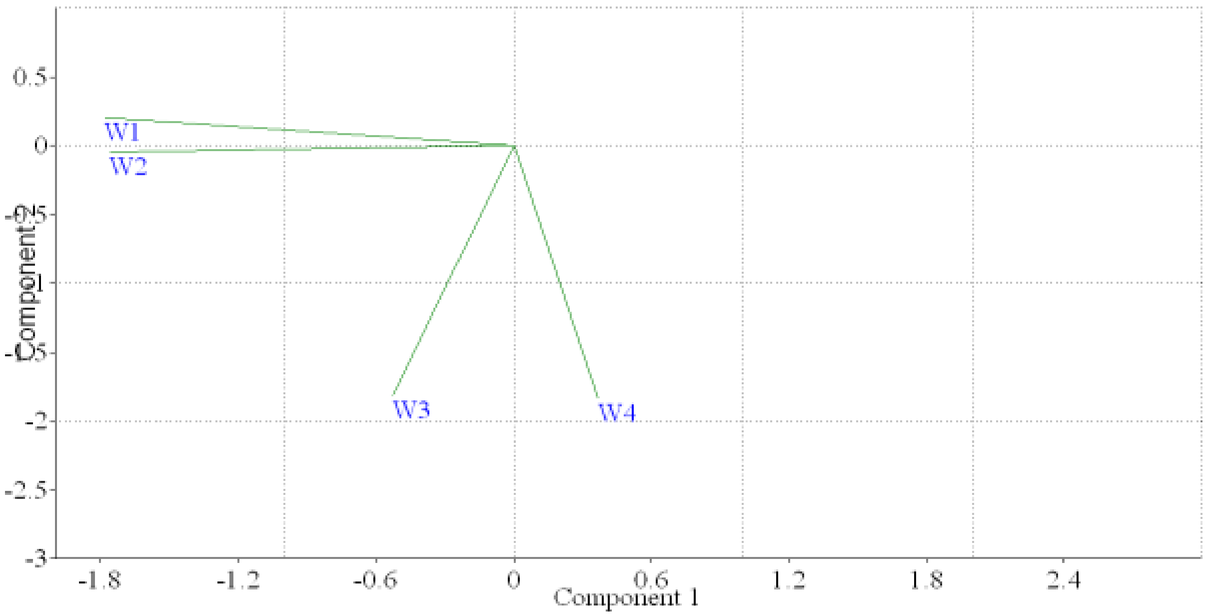
جدول3. الحجم الجزيئي التقريبي للحزم المميزة للبادئات المستخدمة

الحجم الجزيئي التقريبي Kbp	المنتخب	البادئ
900	SH6 وG10	809
450	SH6 وS1	
400	SH6 وSH3 وSH1	810
400	SH6 وG5	818
800	G3 و G2	826
500	G7	
400	W4	
900	W1	834
700	SH6	
1000	G10	880
300	W3 وG3	845
1700	SH6 وW1 وG7	852
800	SH6 وW1 وG7	
700	G9	864
200	SH7	

تحليل المكونات الرئيسة PCA

1. **الصنف Crimson Sweet**

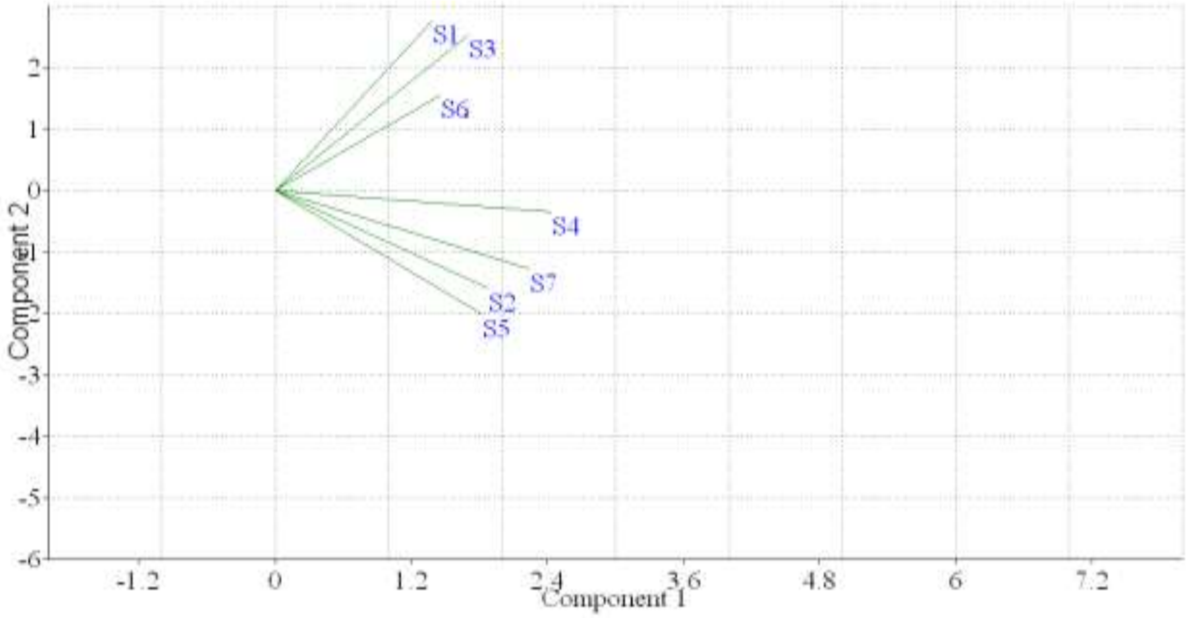
يظهر الشكل 1 تحليل المكونات الرئيسة PCA المعتمد على نتائج مؤشرات ISSR ارتباط المنتخبين W1 وW2 مع بعضهما ذات المنشأ والشركة وسنة الانتاج المختلفة وربما يعود ذلك الى اشتراك كلا الشركتين بأنتاج بذور تعود الى مصدر واحد في حين نجد عدم ارتباط المنتخبين W_3 و W4 مع المنتخبين السابقين او مع بعضهما ويعود ذلك الى اختلاف المنتخبين عن بعضهما او مع المنتخبات الاخرى من حيث اختلاف طريقة التربية المتبعة من قبل مربي النبات فضلاً عن اختلاف الشركة المنتجة وسنة الانتاج . يتبين من ذلك ان بادئات مؤشرات ISSR قد اظهرت التنوع الوراثي العالي بين المنتخبات على الرغم من تباين منشأ المنتخبات وهذا يساعد مربي النبات في الاختيار الانسب للاباء الملائمة للتهجين وجاءت النتائج مماثلة لما وجد باحثون اخرون (1 و 2) .



الشكل 1. مخطط تحليل المكونات الرئيسة PCA للصنف Crimson Sweet

2. **الصنف Sugar Baby**

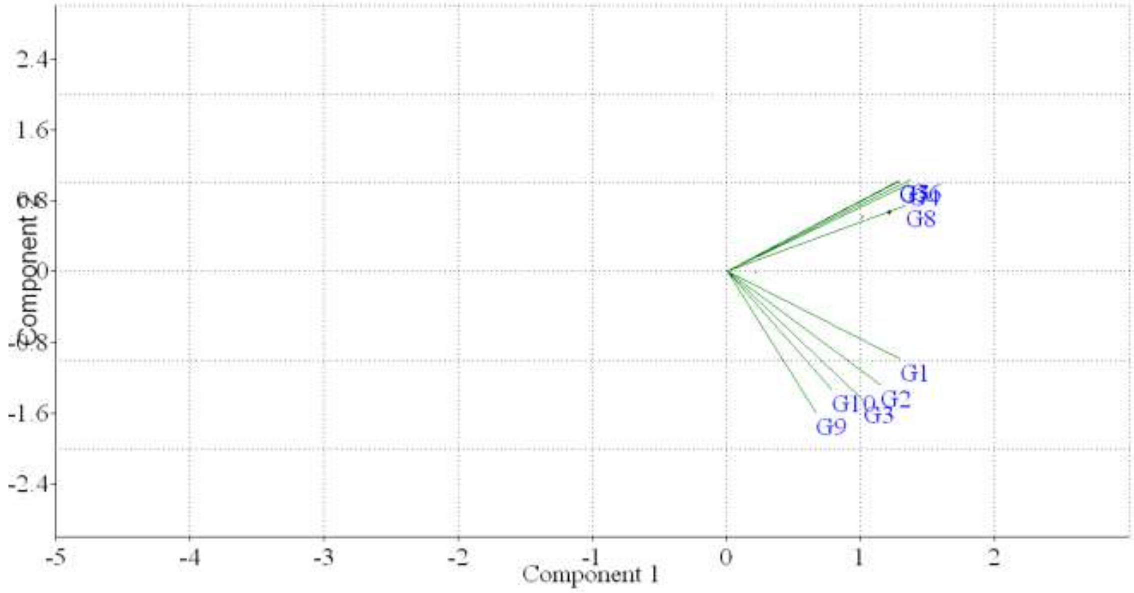
يظهر الشكل 2 تحليل المكونات الرئيسة PCA المعتمد على نتائج مؤشرات ISSR ارتباط المنتخبين SH1 و SH3 مع بعضهما ارتباط ايجابي بسبب صُغر قيمة جيب تمام الزاوية +1 = Cos(0) على الرغم من اختلاف الشركة المنتجة وسنة الانتاج ومن ثم ارتباطهم مع المنتخب SH6 في حين نجد عدم ارتباطهم مع بقية المنتخبات الاخرى SH4 و SH7 و SH2 و SH5 وهذا واضح لكبر قيمة جيب تمام الزاوية 0 = Cos(90) ونجد عدم ارتباط المنتخبين SH4 و SH5 مع بعضهما على الرغم من اشتراكهم بالشركة المنتجة والمنشأ وسنة الانتاج ، ربما يعود الارتباط بين المنتخبات المختلفة من حيث السنة وشركة الانتاج الى انحدار المنتخبين من مصدر وراثي واحد وان عدم ارتباط المنتخبات التي تعود الى منشأ واحد وسنة انتاج واحدة الى ان الشركات انتجت هذه المنتخبات في بيئات مختلفة مما ادى الى هذا التباين وجاءت النتائج مقاربة لما وجدته (2).



الشكل2. مخطط تحليل المكونات الرئيسة PCA للصنف Sugar Baby

3. **الصنف Charleston gray**

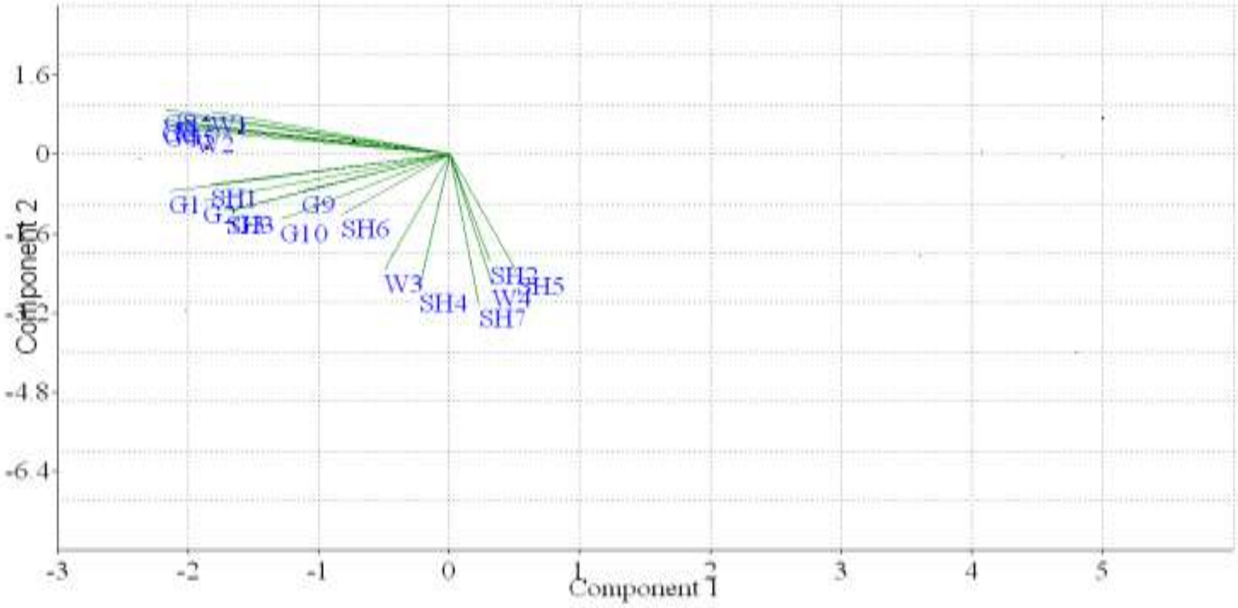
يظهر الشكل 3 تحليل المكونات الرئيسة PCA المعتمد على نتائج مؤشرات ISSR بين المنتخبات العشرة قد توزعت الى مجموعتين بحسب قياس قيمة جيب تمام الزاوية (قيمة Cos) إذ شملت المجموعة الاولى التي تعود الى مناشئ مختلفة المنتخبات G7 و G5 و G6 و G4 و G8 في حين شملت المجموعة الثانية ذات المنشأ الامريكي المنتخبات G1 وG2 و G3 و G10 و G9 ، على الرغم من اختلاف منشأ منتخبات المجموعة الاولى الا انها تجمعت في مجموعة واحدة ربما يعود ذلك الى اشتراكهم بالاب او المصدر الوراثي الذي انتجت منه وعلى الرغم من تشابه واختلاف المناشئ الا ان تقانة ISSR ادت دوراً هاماً في تمييز تلك المنتخبات عن بعضها وجاءت النتائج مقاربة لما وجدته Uluturk (29) .



الشكل3. مخطط تحليل المكونات الرئيسة PCA للصنف Charleston gray

4. **تحليل PCA للمنتخبات 21 العائدة الى 3 اصناف من الرقي .**

يظهر الشكل 4 ان المنتخبات 21 قد توزعت الى ثلاثة مجاميع رئيسة شملت المجموعة الاولى المنتخبات W1 و G8 و G7 و G6 و G4 و G5 و W2 اما المجموعة الثانية فضمت المنتخبات SH1 و G1 و SH3 و G3 و G9 و G10و SH6 في حين شملت المجموعة الثالثة المنتخبات W3 و SH4 و SH7 و W4 و SH2 و SH5 .



الشكل4. مخطط تحليل المكونات الرئيسة PCA للمؤشرات الجزيئية لـ 21 منتخب العائدة الى 3 أصناف من الرقي

نستنتج ان البادئات المستخدمة كانت ذو كفاية عالية في اظهار التنوع الوراثي بين 3 أصناف من الرقي لان منتخبات الاصناف لم تنفصل حسب طبيعة نموها ومنطقتها الجغرافية وانما توزعت حسب تشابه واختلاف مورثاتها ويتبين من ذلك ان هذا التنوع الوراثي العالي بين المنتخبات يساهم في نمو وتطور علم تربية النبات فضلاُ عن تسهيل برامج التربية لدى مربي النبات و ان تحليل المكونات الرئيسة يفيد في الحصول على صورة شاملة ومحيطة على مستوى التنوع الوراثي للحصول على هوية وراثية دقيقة على كافة مستويات النبات ولاسيما الجزيئية منها وكانت النتائج مماثلة لما وجده (10 و 11 و 12).

5. النسبة المئوية للتباين الجزيئي AMOVA

حُسبت النسبة المئوية للتباين الجزيئي AMOVA لـ 21 منتخب تعود الى 3 أصناف من الرقي وهي Sugar baby وCharleston gray و Crimson sweet إذ يظهر جدول 4 ان نسبة التباين في مجتمع اصناف الرقي كانت كبيرة(73%) اما ضمن الصنف الواحد فكانت قليلة إذ اعطت نسبة تباين وقدرها (27%) .

جدول4. تحليل التباين الجزيئي AMOVA بين 3 أصناف من الرقي

Source	df	SS	MS	%
Among Pops	2	95.605	47.802	73%
Within Pops	18	250.014	13.890	27%
Total	20	345.619	61.692	

ويظهر الجدول 5 ان الصنف Charleston gray كان الابعد وراثياً عن الصنف Sugar baby بمقدار 0.349 في حين كان الصنف Sugar baby الاكثر قرابة وراثية مع الصنف Crimson sweet وقدرها 0.149 .

جدول5. قيم البعد الوراثي بين 3 أصناف من الرقي باستخدام 12 بادئ

G	SH	W	
0.000			G
0.349	0.000		SH
0.166	0.149	0.000	W

كما تميز مجتمع الصنف Charleston gray بأعطائه اعلى عدد من الحزم بلغت 81 حزمة (جدول 6) كان منها 5 حزم ذات مواقع متميزة وبنسبة تعددية شكلية قدرها 60.67 % اما مجتمع الصنف Sugar baby ومجتمع الصنف Crimson sweet فقد اشتركوا بأعطائهم 73 حزمة كان منها 5 حزم و 2 حزمة متميزة على التتابع وبنسبة تعددية شكلية قدرها 80.90 و 77.53 على التتابع .

جدول6. عدد الحزم والمواقع المتميزة والتعددية الشكلية لـ 3 أصناف من الرقي

Population (الاصناف)	G	SH	W
No.Bands (عددالحزم)	81	73	73
No.Private Bands(عدد الحزم المتميزة)	5	5	2
Percentage of Polymorphic Loci (%P) (النسبة المئوية للتعدية الشكلية للاصناف)	60.67%	80.90%	77.53%

نستنتج ان استعمال تحليل AMOVA سهل في اظهار التباين بين المجتمعات وهذا تأكيد الى ان مجتمعات الرقي اتت من مناطق جغرافية مختلفة فضلاً عن وجود مورثات متماثلة مع ان مواقع جمعها كانت متباعدة جغرافياً ومن جانب اخر نجد ان منتخبات الرقي المأخوذة من موقع واحد قد توزعت في مجموعات مختلفة ونجد ان بعض المنتخبات التي اظهرت تشابهاً كبيراً كانت من مناطق جغرافية متباعدة وقد جاءت النتائج مماثلة لما ذكرا (22 و 23) وان التباعد الوراثي بين التراكيب الوراثية لا يعتمد على التباعد الجغرافي فقط بل يعتمد على تباعد تربية المادة الوراثية والتي كشفتها نتائج تحليل AMOVA.

REFERENCE

1.Abdel-Ghani, A. H., and A. Mahadeen, .2014. Genetic variation in snake melon (*Cucumis melo* var. *flexuosus*) populations from Jordan using morphological traits and RAPDs . Jordan Journal of Agricultural Sciences, 10 (1): 96-119.

2.Alias, M. S.2014. The genetic variation between morphological and molecular markers in *CUCURBITA PEPO* L.by using multiple correlation and PCA. The Iraqi Journal of Agricultural Sciences – 45(5): 488-494.

14.Higuchi R., C.H.Von Beroldingen, G.F. Sensabaugh and H.A. Erlich .1988. DNA typing from single hairs. *Nature*. 332: 543-546.

15.Hotelling H.1933.Analysis of a complex of statistical variables into principal components. Journal of Educational Psychology, 24:417-441,498-520.

16.Kandil,S.A.2007. Biotechnology in our Contemporary Life. a series of scientific books and cultural/ 4. Research Center Faculty of Sciences. King Saud University.

17.Kattmah, G. , F. Hamed and S.Makhool.2011. Studying the Genetic Relationship of Some Cultivated Wild Olive Types in Mesiaf Region by Using ISSR Technique. Jordan Journal of Agricultural Sciences.7(1):139-148.

18.Kijas, J. M. H., J. C. S. Fowlerand M. R. Thomas. 1995. An evaluation of sequence tagged microsatellite site markers for genetic analysis within Citrus and related species. Genome 38:349–355.

19.Levi, A. C. E. Thomas, M. Newman, O.U.K.Reddy, X.Zhang, and Y.Xu.2004. ISSR and AFLP Markers differ among American Water melon cultivars with Limited Genetic Diversity. J.Amer.Soc.Hort.Sci.129 (4):553-558.

20.Manifesto, M.M., A. R. Schlatter, H. E. Hopp, E. Y. Suarez and J.Dubcovesky.2001. Quantitative evaluation of genetic diversity in wheat germplasm using molecular markers. Crop Science. 41:682-690.

21.Marilene, H. S., R. Rodrigues, L. S. A. Gonçalves1, C. P. Sudré1 and M. G. Pereira1. 2012. Agrobiodiversity in *Cucurbita* spp. landraces collected in Rio de Janeiro assessed by molecular markers .Crop Breeding and Applied Biotechnology 12: 96-103.

22.Mujaju, C., J. Sehic, and H. Nybom.2013. Assessment of EST-SSR Markers for evaluating genetic diversity in watermelon accessions from Zimbabwe . *American Journal of Plant Sciences*. 4: 1448-1456 .

23.Munisse , P., B. D. Jensen and S. B. Andersen, 2013. Genetic differentiation of watermelon landraces in Mozambique using microsatellite markers. African Journal of Biotechnology. 12(36): 5513-5521.

24.Nei, M. and W.H. Lei, 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proc. Natl. Acad.

3.Anderson, J.A., G.A. Churchill, J.E. Autrique, S.D .Tanksley, and M.E.Sorrells. 1993. Optimizing parental selection for genetic linkage maps. *Genome* 36:181–186.

4.Ashter, S. 2009.Evaluation of some genotyps of the Syrian wheat (hexagonal and quaternary) using biochemical and molecular markers are different. Ph.D. Diss. Agronomy Department. Faculty of Agriculture. University of Tthishreen. Syria.P:192.

5.Behera, T. K ., A. B. Gaikward, A. K. Singh and J. E Staub**,.**2008**.** Relative efficiency of DNA markers (RAPD,ISSR and AFLP) in detecting genetic diversity of bitter gourd (*Momordica charantia* L.) **.** Short Communication **.** J Sci Food Agric 88:733–737**.**

6.Botstein, D., L.Raymond, and L.White. 1980.Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms . Am. J.Hum. Genet. 32: 314-331.

7.Chowdhury, M. A, B. Vandenberg and T. Warkentin. 2002. Cultivar identification and genetic relationship among selected breeding lines and cultivars in chickpea (*Cicer arietinum* L.). Euphytica 127:317–325.

8.Dje`,Y, C.G. Tahi, A.I. Zoro Bi, J.-P. Baudoin, and P. Bertin .2010. Use of ISSR markers to assess genetic diversity of African edible seeded Citrullus lanatus landraces . Scientia Horticulturae. 124 : 159–164.

9.Excoffier L., and P.E. Smouse, J.M. Quattro .1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. Genetics 131: 479-491.

10.Ferriol,M., B.Pico, and P. Fernandez and F.Nuez, .2004a Molecular diversity of a germplasm collection of squash (*Cucurbita moschata*) determined by SRAP and AFLP Markers. Crop Sci: 44,653-664.

11.Ferriol, M., B. Pico and F.Nuez, .2004b.Morphological and molecular diversity of a collection of *Cucurbita maxima* landraces.J.Amer.Soc.Hort.Sci. 38, 1688-1696.

12.Gichimu BM, B.O. Owuor, G.N. Mwai, and M.M. Dida .2009. Morphological characterization of some wild and cultivated watermelon (*Citrullus sp*.) accession in Kenya. Arpn J Agr Biol Sci 4: 1990-6145.

13.GenAIEx6, Inc.2006. Genetic Analysis in Excel data analysis software system .version 6.

Sci. USA., 76: 5269-5273.
25.Power Marker, Inc.2001. Data Analysis Software System .Version 3.7
26.Rakoczy-Trojanowska, M. and H. Bolibok,. 2004. Characteristics and a Comparision of Three Classes of Micro Satellite-Based Markers and their Application in Plants. Agricultural university, Nowoursynowska, Wraszawa,Poland.
27.Sambrook J, E.F. Fritsch, and T. Maniatis,. 1989. *Molecular Cloning: a laboratory manual*. NY: Cold Spring Harbor.pp:2028
28.Qian. Z., D. Hong and Z. Dong Hang,. 2007. ISSR Molecular Marker and its application in plant researches. Molecular Plant Breeding, .5(6):123-129.
29.Uluturk ,z. I., A. Frary and S.Doganlar. 2011. Determination of genetic diversity in watermelon [*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum & Nakai] germplasm .AJCS 5(13):1832-1836.
30.Williams, J.G.K., Kubelik A.R., Livak K.J., Rafalski J.A. and Tingey S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucl. Acids Res.18: 6531-6535.