الكشف عن الثبات الوراثي لنباتات الديجيتالس الصوفي النسيجية المشعة بذورها باشعة كاما باستخدام تقانة RAPD

سراب عبد الهادي المختار [1] زيد خليل كاظم[1] ايمن جاسم مهدي [2]

مدرس مدرس مساعد

[1]قسم البستنة وهندسة الحدائق – كلية الزراعة / جامعة كربلاء

[2] كلية الصيدلة / جامعة كربلاء

Alsarab2244@gmail.com

المستخلص:

استخدمت تقانة مؤشرات التضاعف العشوائي المتعدد الاشكال لسلسلة DNA(RAPD) والمعتمدة على التفاعل التضاعفي لسلسلة الدنا (Poly Chain Reaction(PCR) للتاكد من الثبات الوراثي لنباتات الديجيتالس الصوفي النامية من بذور مشعة بالجرع (0، 10، 20، 30) كري من اشعة كاما لتحفيز الأنبات والنمو وانتاج المركبات الايضية الثانوية. زرعت البذور المشعة على وسط MS الخالي من منظمات النمو، اجريت اختبارات البصمة الوراثية باستخدام مؤشرات RAPD اذ استخلص الدنا من عينات الاوراق الفتية الخضراء لنباتات الزراعة النسيجية لكل معاملة مع معاملة المحايد بعمر شهر ، وبعد تحديد الظروف المثلى لتفاعلات RAPD، تم الحصول على نتائج واضحة ومتعددة باستخدام ثمانية بوادئ OPA5، OPA11، OPA17، OPR7، OPC4، OPE13، OPF2، OPZ11 وبتطابق تام في نمط توزيع حزم البوادئ لمعاملات التشعيع المدروسة، وعليه اتضح ان مؤشرات RAPD هي من مؤشرات الدنا السهلة والسريعة في مجال تحديد مدى التطابق الوراثي . وبذا فقد اثبتت الدراسة بان الجرع المستعملة هي جرع تحفيزية وهذا هو الغرض من استعمالها ، ولم تحدث اي تغاير وراثي في البذور المشعة او النباتات الناتجة منها بالمقارنة مع معاملة المحايد غير المشعة .

الكلمات المفتاحية: الديجيتالس الصوفي، الثبات الوراثي، تقانةRAPD، اشعة كاما، الزراعة النسيجية

Detection of the Genetic Stability for the Tissue *Digitalis lanata* Plants that Seeds Irradiation with Gamma Ray by Using RAPD Technique

Sarab A. Almukhtar[1] Zaid,K.Kahdim[1] Aymen, J. Mahdi[2]
Lecturer Assis. Lecturer
College of Agriculture / University of Kerbala
College of Pharmacy / University of Kerbala
Alsarab2244@gmail.com

Abstract:

Randomized Amplified Polymorphic DNA (RAPD) technique was used to validate the genetic stability of the digitalis plantlets produced by irradiated seeds by (0, 10, 20, 30) doses of gamma irradiation to stimulate their germination and growth. The irradiated seed was planted on the growth regulator-free MS medium. DNA print tests were performed by using RAPD markers. DNA was extracted from the green leaf samples of the tissue culture plants for each treatment with control at 1 month age. After determining the optimal conditions for RAPD reactions, usingeight starters OPA11, OPA7, OPA7, OPA7, OPC2, OPA11, OPA2 and OP511, with a perfect match in the distribution pattern of the packages for the irradiated treatments. RAPD markers proved to be an easy and rapid DNA marker for genetic compatibility. Therefore, the study proved that the doses used are catalysts and this is the purpose of their use, and there was no genetic heterogeneity in the irradiated seeds or the resulting plants compared with the treatment of non-irradiated control.

Key world: *Digitalis lanata*, genetic stability, RAPD technique, gamma ray, *in vitro*

المقدمة:

نبات الديجيتالس الصوفي (*Digitalis lanata*)من نباتات الزينة الغنية بالكلايكوسيدات القلبية التي تستعمل لتنشيط القلب ، لذا فقد نال اهتماما كبيرا لأكثاره بمختلف الطرائق التقليدية أو بالتقانات الحديثة بزراعة الأنسجة بأستعمال مختلف الوسائل لزيادة فعالية هذه التقانات. تعد تقانة زراعة الانسجة وتوالد الخلايا والاعضاء النباتية خارج الجسم الحي اداة لاغنى عنها في انتاج مواد دوائية مشتقة من النباتات(18 و 19و10). كما ان قسما من هذه المركبات لايمكن تحضيرها مختبريا فمن الجدير بالذكر ان الكلايكوسيدات لايمكن تحضيرها اقتصاديا بطريقة صناعية (كيميائية) او مايكروبايولوجية لذلك سيكون الحل الوحيد للحصول عليها هو استخراجها من النباتات التي تحتويها لكن بكميات قليلة (1)، كما بينت الدراسات تاثير الاشعاعات المؤينة كأشعة كاما في جسم الكائن الحي لقابليتها على اطلاق الالكترونات من المادة التي تمتصها ويرتبط نوع هذا التاثير بمقدار الجرعة المعرض لها النبات فقد تكون منشطة، مثبطة او مميتة (12). تسمى الجرع الاشعاعية المحفزة لنمو وتطور النبات بالجرع المنشطة والتي تقع ضمن مديات الجرع الاشعاعية الواطئة. عرف التاثير

التنشيطي للاشعاع في نمو وتكشف النباتات منذ مدة طويلة وقد اظهرت نتائج معظم الباحثين ان التحفيز يظهر عادة في المراحل الاولى من النمو والتكشف.

تعد تقانة PCR من التقانات الجزيئية التي لها اهمية كبيرة في مجال البايولوجيا الجزيئية وهي تقانة تفاعل البلمرة المتسلسل المتعاقب، وهي تكنيك يستخدم لتضخيم اي جزء من (DNA) بين منطقتين معروفتي التتابع يطلق عليهما اسم الجين Gene، وتضخيم النيوكليوتيدات يتم بواسطة تضاعف لوغارتمي وفي كل دورة منه نحصل على نسختين من كل شريط حتى نصل الى ملايين من النسخ في وقت قصير فضلا عن امكانية استخدام شريط مفرد من DNA، وهناك الكثير من المؤشرات التي تستخدم في تقانة الـ PCR لغرض معرفة البصمة الوراثية واكثرها شيوعا مؤشر Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) الذي استعمل للكشف عن التغايرات الوراثية في النباتات الناتجة من الزراعة النسيجية (5).

تعتمد تقانة RAPD على اكثار قطع الدنا النباتية في تسلسلها النيوكليوتيدي عشوائيا حيث تضخم قطع الدنا الحاوية على تتابعاتنيوكليوتيدية بحيث يمكن رؤيتها على شكل حزم مختلفة الوزن الجزيئي على هلام الاكاروز(17). ان اساس عمل هذا المؤشر يعتمد على استعمال بادئات قصيرة مصنعة من 10 نيوكليوتيدات واحيانا تكون من 17–30 نيوكليوتيدة (4). لهذه البادئات القدرة على الارتباط بمواقع عدة على جانبي شريط الدنا وتضاعفها وبذلك يتم الحصول على قطع متضاعفة يمكن فصلها على هلام الاكاروز بعد تصبيغها ببروميد الاثيديوم والكشف عنها بالاشعة فوق البنفسجية. اشار(9) الى ان كفاءة البادئ المستخدم في تفاعلات RAPD تزداد بزيادة نسبة الكوانين + السايتوسين(G+C) فيه اخذين بنظر الاعتبار ان عدد الاواصر التي تربط G مع C هي ثلاثة اواصر هيدروجينية في حين ان اصرتين تربطان بين T و A وبذلك فان الاتباط يكون اقوى بين البادئ وموقعه المكمل له على قالب الدنا في العينة المدروسة. على ضوء ماتقدم فقد هدف البحث الى استخدام تقانة RAPD لتحديد مدى التطابق الوراثي لنباتات الديجيتالس الصوفي الناتجة من الزراعة النسيجية والمشععه بذورها بالجرع المختلفة من اشعة كاما فضلا عن معاملة المحايد.

المواد وطرائق العمل:

نفذت الدراسة في مختبر التقنات الاحيائية ومختبر بحوث الفيزياء التابع لوزارة العلوم والتكنولوجيا، للفترة من 2014–2015. شععت بذور نبات الديجيتالس الصوفي باشعة كاما بالجرع (10,0 ، 20 ، 30) كري في خلية كاما كوبلت – 60 بعد ان عدلت نسبة رطوبتها الى 11% .

عقمت البذورالمشععة وغير المشععة بغمرها في محلول هابوكلورات الصوديوم NaOCl بتركيز 4.5% ولمدة 15 دقيقة ثم غسلت ثلاث مرات متتالية بالماء المقطر المعقم لازالة اثار المادة المعقمة. زرعت البذورالمعقمة على سطح الوسط الغذائي (MS) الخالي من منظمات النمو في قنانٍ زجاجية سعة 200 مل حاوية على وسط MS بمقدار 50 مل/ قنينة ، وبواقع عشرة تكررات لكل جرعة من اشعة كاما فضلا عن معاملة المحايد ،

حضنت الزروعات في غرفة النمو بدرجة حرارة 25 م^0 +_ 2 وشدة اضاءة 1000 لوكس مدة 16 ساعة/ يوم لمدة شهر لغرض اجراء اختبار التطابق الوراثي للنباتات النسيجية النامية.

استخلاص الدنا:

عزلت المادة الوراثية (DNA) من النموات الخضرية الطرية لشتلات بعمر شهر النامية من البذورالمشععة بالجرع المختلفة من اشعة كاما فضلا عن معاملة المحايد وفقا لطريقة (6) وكما يأتي:

1- اخذ 1 غم من النموات الخضرية وطحنت بسرعة في هاون خزفي مبرد مسبقا باضافة النتروجين السائل بكمية مناسبة واستمر الطحن باضافة كميات اخرى حتى اصبحت النموات على شكل مسحوق ناعم.
2- نقل المسحوق الى انابيب بلاستيكية سعة 20 سم^3 واضيف اليه 3سم^3 من محلول الاستخلاص ومزجت بصورة جيدة مع المحلول وحضنت العينات على درجة حرارة 65 م^0 لمدة 60 دقيقة.
3- رفعت الانابيب البلاستيكية وبردت قليلا واضيف لكل انبوب 5 سم^3 من محلول الكلوروفورم/ ايزواميل مع تحريك الانبوبة لمدة 15 دقيقة.
4- وضعت الانابيب البلاستيكية التي تحتوي المزيج بجهاز النبذ المركزي وبسرعة10000دورة/ دقيقة لمدة 10 دقائق وبدرجة حرارة 40 م^0 .
5- عزلت الطبقة العليا بعد نهاية عملية النبذ المركزي ونقلت الى انابيب بلاستيكية جديدة واضيف اليها 5سم^3 من الايزوبروبانول المبرد لكل عينة لترسيب الدنا والذي ظهر على شكل خيوط بيضاء وترك لليوم التالي لاتمام عملية الترسيب.
6- نبذ المزيج بجهاز النبذ المركزي وبسرعة 10000 دورة/ دقيقة لمدة 15 دقيقة.
7- تم التخلص من الجزء الرائق وغسل DNA بالكحول الاثيلي بتركيز 99%، جففت الانابيب في فرن على درجة حرارة 50 م^0 ولمدة 15 دقيقة للتخلص من الكحول المتبقي. اضيف 0.05 سم^3 من محلول الـ TE buffer لاذابة الدنا الملتصق بجدران الانابيب.
8- تم التخلص من RNA المترسب مع الدنا باضافة 4 مايكوليتر من انزيم RNase على درجة حرارة 37 م^{0}ولمدة 30 دقيقة، ثم رفعت العينات من الحرارة واضيف لها 90 مايكروليتر صوديوم استيت لترسيب وتنظيف الدنا، بعدها اضيف 2 سم^{3}منكحول الايثانول 90% البارد جدا لتجمع الدنا ووضع في جهاز الطرد المركزي (10000 دورة/ دقيقة) لمدة 30 دقيقة. اعيدت عملية الغسل بالايثانول (75%) وجففت العينات في Vacuum oven ثم اضيف لها 100-150 مايكروليتر من الماء المقطر.
9- نقلت عينات الدنا الذائب الى انابيب بلاستيكية Eppendorf tubes ذات غطاء محكم وحفظت العينات على شكل نموذج للدنا الاساس (Stock Sample) على درجة حرارة 20 م^0 لحين الاستعمال.

10- حضر هلام الاكاروز (0.7%) للكشف عن عينات الدنا المعزول، وبعد تصلبه وزعت العينات على الحفر واغلق جهاز الترحيل وبعد 3 ساعات من بدء الترحيل فحص الهلام باستخدام جهاز قياس الكثافة الضوئية UV-spectrophotometer عند طول موجي 260 نانوميتر لرؤية حزم الدنا.

تحضير تفاعلات RAPD

حضرت هذه التفاعلات استنادا الى (21). اختبرت ثمانية بوادئ هي OPA5، OPA11، OPA17، OPR7، OPC4، OPE13، OPF2، OPZ11 لمعرفة اي منها تعكس تعددا (شكليا). قدرت الاحجام الجزيئية للقطع المتضاعفة بالاعتماد على مواقع الحزم ذات الاحجام الجزيئية المعروفة والناتجة من قطع دنا الدليل الحجمي القياسي. رسم المنحنى القياسي بين قيم الاحجام الجزيئية للدليل الحجمي الممثلة على المحور الصادي وقيم المسافات التي تبعد هذه الحزم عن حفر تحميلها داخل الهلام الممثلة على المحور السيني. قيست المسافة التي قطعتها كل حزمة (القطعة المضاعفة) من حزم العينات المدروسة. وباسقاط عمود من تلك المسافة على المنحنى القياسي، ومن نقطة التقاطع هذه، اسقط عمود اخر على المحور الصادي ليمثل حجم القطعة المضاعفة (16).

النتائج والمناقشة

استخلاص الدنا:

عزل الدنا الكلي واستخلص من الاوراق الفتية لنبيتاتالديجيتالس النامية من البذور المشعة بالجرع المختلفة من اشعة كاما فضلا عن معاملة المحايد باستخدام مادة الـ CTAB في محلول الاستخلاص، بموجب طريقة (6) ومن خلالها حصلنا على كمية كافية من الدنا لاجراء عملية الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز، ويلاحظ ان كل مادة من المواد التي استخدمت في عزل الدنا واستخلاصه تعمل على ازاحة احدى مكونات الخلية غير المرغوب فيها وبنفس الوقت لاتسبب ضررا له. تتميز جدر خلايا النبات بسمكها لذا فان تحطيم الخلايا يتم باستخدام السحق اليدوي بوجود النتروجين السائل اذ تعمل درجات الحرارة المنخفظة على ايقاف نشاط الانزيمات النووية والتي تتحرر مباشرة بعد تحطيم الجدار الخلوي (15).

ان وجود مادة الـ CTAB في محلول الاستخلاص يعمل على تكوين معقد مع الحوامض النووية Nucleic Acids CTAB Complex تمنحها مقاومة التحلل وبالتالي تحافظ على هيكلها الاساسي مما يسهل فصلها عن البروتينات، اما اهمية مادة الـ EDTA والتي تعد عاملا مخلبيا (Chelating agent) فانها تعمل على مسك الايونات الموجبة مثل Mg^2 الضرورية لفعالية الانزيمات النووية التي تعمل على تحلل الاحماض النووية وبالتالي تثبيط عمل تلك الانزيمات (13).

يؤدي الكلوروفورم دورا مهما في التخلص من الـ CTAB ومسخ البروتينات في المرحلة التالية من عملية الاستخلاص فضلا عن تخلصه من السكريات المتعددة والمواد الاخرى في الخلية مثل الكلوروفيل بمساعدة النبذ المركزي، في حين يمنع كحول الايزواميل تكون الرغوة اثناء عملية الاستخلاص من خلال تقليله لعملية الشد السطحي للمواد الداخلة في عملية الاستخلاص. ويؤدي ملح كلوريد الصوديوم دورا هاما في المحافظة على الدنا من خلال توفير الازموزية المناسبة له، وبذلك يبقى الدنا بالطور المائي ويرسب بواسطة كحول الايزوبروبانول المبرد، نقي بعدها الدنا المترسب من بقايا الماء والمواد الاخرى بغسله بالايثانول 70%. اما مادة Mercaptoethanol فانها تعمل على تحلل انزيم DNase ومنع اكسدة المواد الفينولية وظهور اللون البني في المستخلص (20).

تفاعلات RAPD:

بينت الجداول والاشكال عدد الحزم الناتجة واوزانها الجزيئية المقدرة لعينات DNA المعزولة من الانسجة الخضرية لنبيتات الديجيتالس الصوفي بعمر شهر والمعاملة بذورها باشعة كاما بالجرع (10، 20، 30) كري فضلاً عن معاملة المحايد، باستخدام البادئات الثمانية (OPZ–11, OPR–7, OPA–5, OPA–11, OPA–17, OPC–4, OPE–13, OPF–2). ويلاحظ اعتماد نقطتين اساسية عند تحليل ومقارنة النتائج للعينات المدروسة وهي ظهور الحزم والوزن الجزيئي لهذه الحزم المتضاعفة.

كشفت البادئات (OPZ–11, OPR–7, OPF–2, OPE–13, OPC–4, OPA–17, OPA–11, OPA–5) والموضحة بالجداول (1–8) والاشكال (1–8) عن عدم وجود اختلافات في عدد الحزم الناتجة واوزانها الجزيئية للمعاملات (30,20,10) كري فضلا عن معاملة المقارنة، فقد اشارت نتائج الجدول (1) والشكل (1) الى ان عينات الدنا للمعاملات قد اعطت 8 حزم تراوحت اوزانها الجزيئية بين (250 – 1400)bp.واعطت المعاملاتالمبينة في الجدول (2) والشكل (2)9 حزم تراوحت اوزانها الجزيئية بين (250 – 1500)bp.

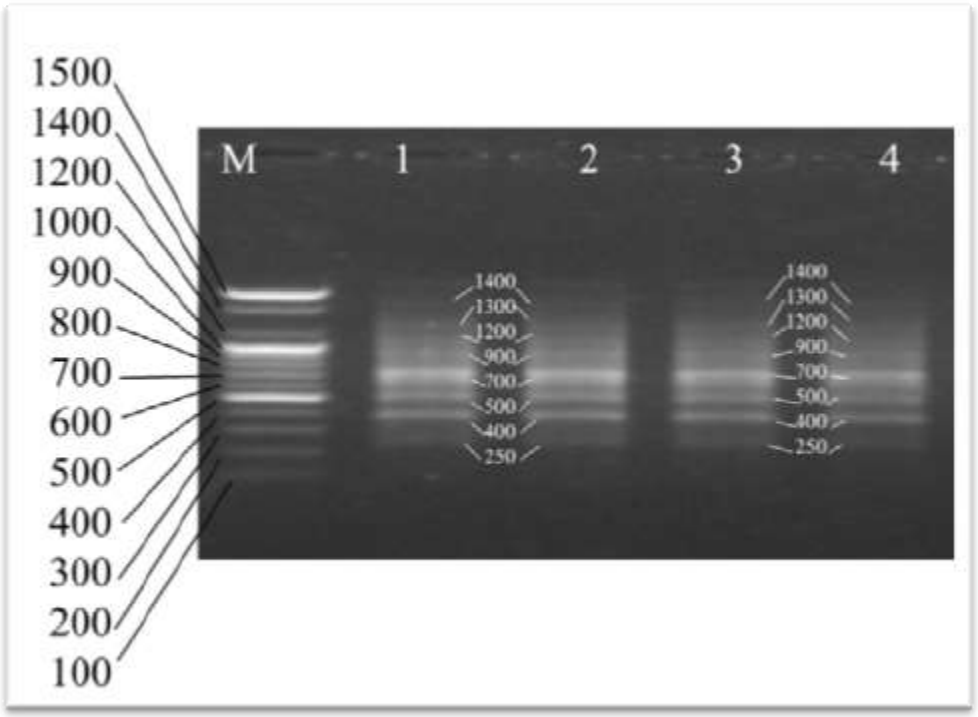
واظهرت البيانات في الجدول (3) والشكل (3) بان المعاملات قداعطت 6 حزم تراوحت اوزانها الجزيئية بين (250 – 1350)bp . كمابين البادئ OPC–4 عن عدم وجود اختلافات في عدد الحزم الناتجة واوزانها الجزيئية المبينة بالجدول (4) والشكل (4) للمعاملات حيث اعطت 10 حزم تراوحت اوزانها الجزيئية بين (300 – 1100)bp وفي الجدول (5) والشكل (5) اعطت جميع المعاملات 8 حزم تراوحت اوزانها الجزيئية بين (250 – 1450)bp .

كما كشف البادئOPF–2 المبين في الجدول (6) والشكل (6)عن عدم وجود اختلافات في عدد الحزم الناتجة واوزانها الجزيئية حيث اعطت جميع المعاملات 13 حزمة تراوحت اوزانها الجزيئية بين (150 – 1450)bp.

ويلاحظ من الجدول (7) والشكل(7) ان جميع المعاملات اعطت 8 حزم تراوحت اوزانها الجزيئية بين (300 – 1450)bp باستخدام البادئ OPR–7. وعند استخدام البادئ OPZ–11 اظهرت البيانات الموضحة بالجدول (8) والشكل (8) انجميع المعاملات اعطت 8 حزم تراوحت اوزانها الجزيئية بين (300 – 1000)bp.

جدول 1: عدد الحزم الناتجة والوزن الجزيئي المقدر (bp) باستخدام البادئ OPA –5لانسجة الافرع الخضرية لنبات الديجيتالس الصوفي المعاملة بذورها بجرع مختلفة من أشعة كاما

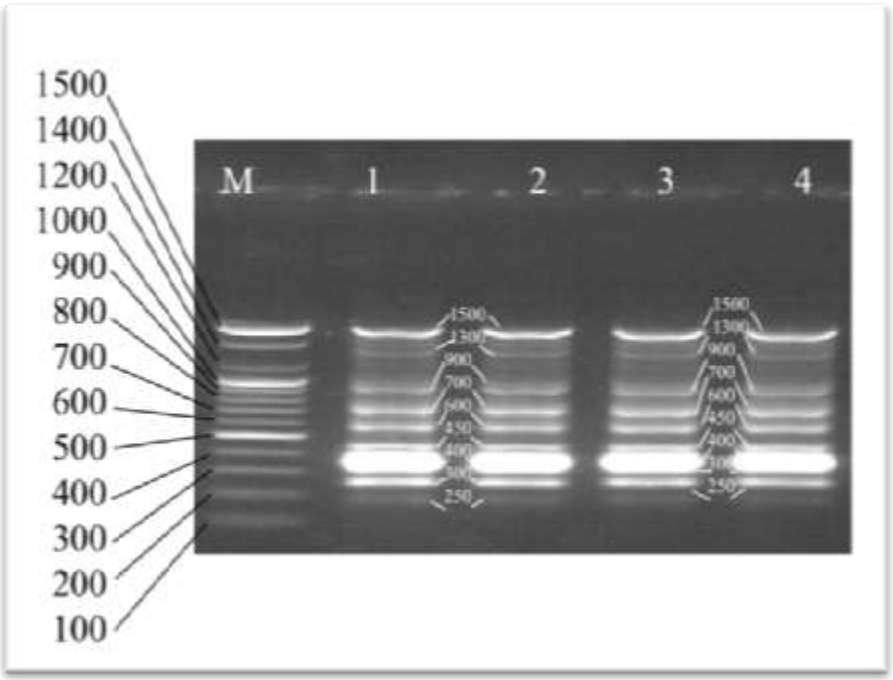
جرع اشعة كاما(كري)							
30		20		10		0	
الوزن الجزيئي bp	عدد الحزم	الوزن الجزيئي bp	عدد الحزم	الوزن الجزيئي bp	عدد الحزم	الوزن الجزيئيbp	عدد الحزم
1400	8	1400	8	1400	8	1400	8
1300		1300		1300		1300	
1200		1200		1200		1200	
900		900		900		900	
700		700		700		700	
500		500		500		500	
400		400		400		400	
250		250		250		250	



شكل 1: نتائج تحليل PCR–RAPD باستخدام البادئ OPA –5.

جدول 2: عدد الحزم الناتجة والوزن الجزيئي المقدر (bp) باستخدام البادئ OPA –11لانسجة الافرع الخضرية لنبات الديجيتالس الصوفي المعاملة بذورها بجرع مختلفة من أشعة كاما.

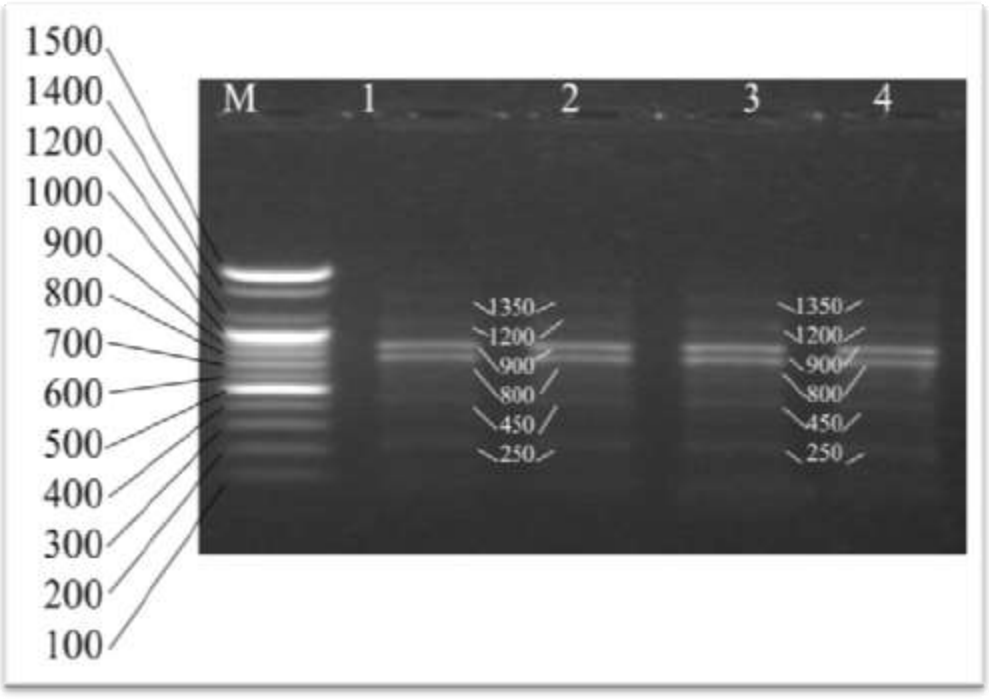
جرع اشعة كاما(كري)							
30		20		10		0	
الوزن الجزيئي bp	عدد الحزم	الوزن الجزيئي bp	عدد الحزم	الوزن الجزيئي bp	عدد الحزم	الوزن الجزيئيbp	عدد الحزم
1500	9	1500	9	1500	9	1500	9
1300		1300		1300		1300	
900		900		900		900	
700		700		700		700	
600		600		600		600	
450		450		450		450	
400		400		400		400	
300		300		300		300	
250		250		250		250	



شكل 2:نتائج تحليل PCR–RAPD باستخدام البادئ OPA –11.

جدول 3: عدد الحزم الناتجة والوزن الجزيئي المقدر (bp) باستخدام البادئ OPA –17لانسجة الافرع الخضرية لنبات الديجيتالس الصوفي المعاملة بذورها بجرع مختلفة من أشعة كاما

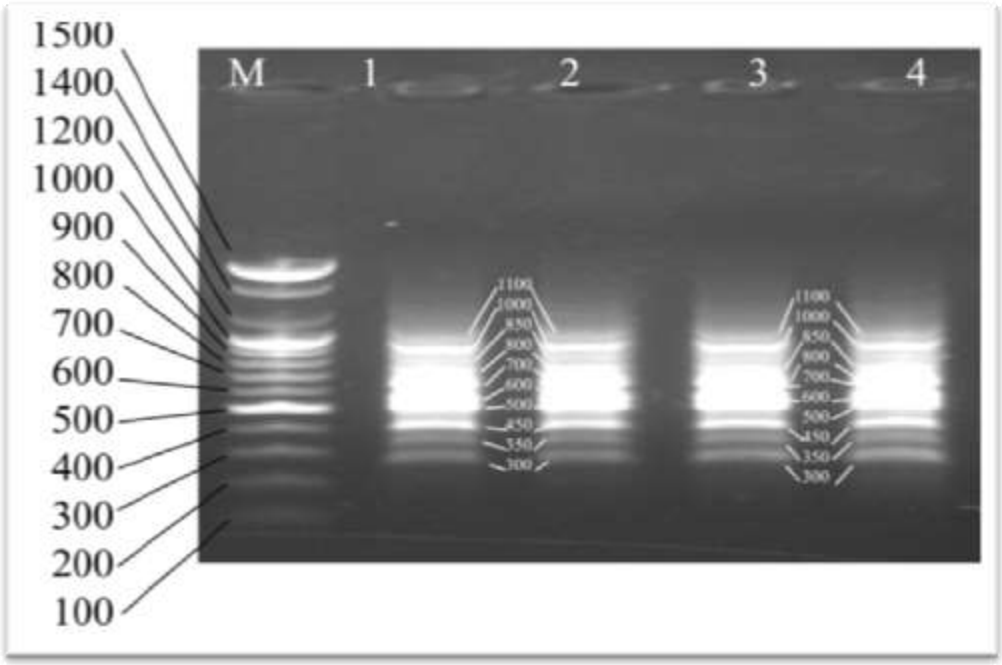
جرع اشعة (كري)							
30		20		10		0	
الوزن الجزيئي bp	عدد الحزم	الوزن الجزيئي Bp	عدد الحزم	الوزن الجزيئي bp	عدد الحزم	الوزن الجزيئيbp	عدد الحزم
1350	6	1350	6	1350	6	1350	6
1200		1200		1200		1200	
900		900		900		900	
800		800		800		800	
450		450		450		450	
250		250		250		250	



شكل 3: نتائج تحليل PCR–RAPD باستخدام البادئ OPA –17.

جدول 4: عدد الحزم الناتجة والوزن الجزيئي المقدر (bp) باستخدام البادئ OPC –4لانسجة الافرع الخضرية لنبات الديجيتالس الصوفيالمعاملة بذورها بجرع مختلفة من أشعة كاما

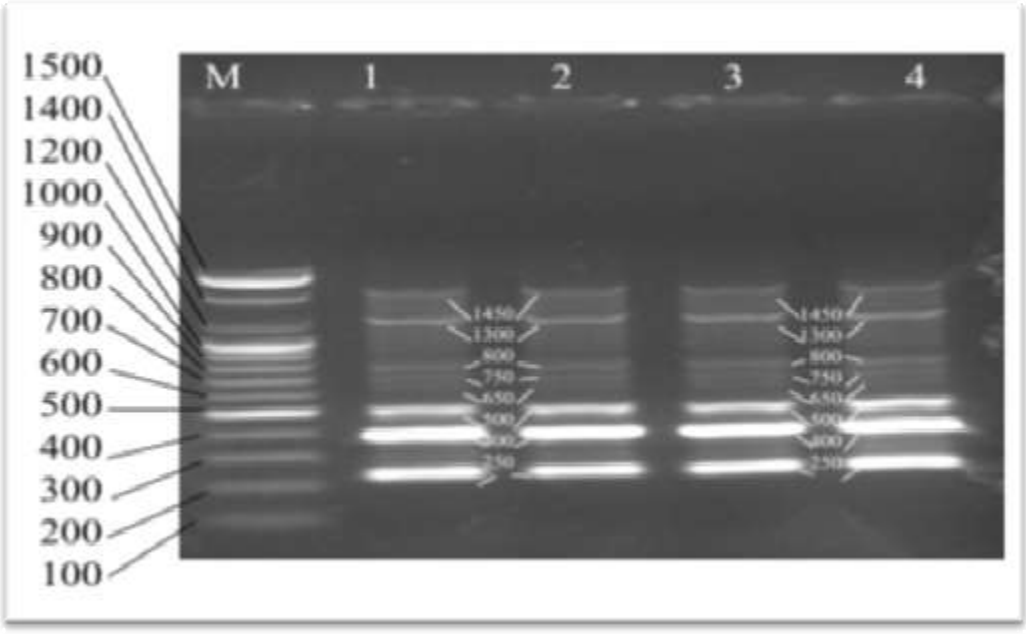
جرع اشعة كاما(كري)							
30		20		10		0	
الوزن الجزيئي bp	عدد الحزم	الوزن الجزيئي Bp	عدد الحزم	الوزن الجزيئي bp	عدد الحزم	الوزن الجزيئيbp	عدد الحزم
1100	10	1100	10	1100	10	1100	10
1000		1000		1000		1000	
850		850		850		850	
800		800		800		800	
700		700		700		700	
600		600		600		600	
500		500		500		500	
450		450		450		450	
350		350		350		350	
300		300		300		300	



شكل 4: نتائج تحليل PCR–RAPD باستخدام البادئ OPC –4.

جدول5: عدد الحزم الناتجة والوزن الجزيئي المقدر (bp) باستخدام البادئ OPE –13لانسجة الافرع الخضرية لنبات الديجيتالس الصوفي والمعاملة بذورها بجرع مختلفة من أشعة كاما.

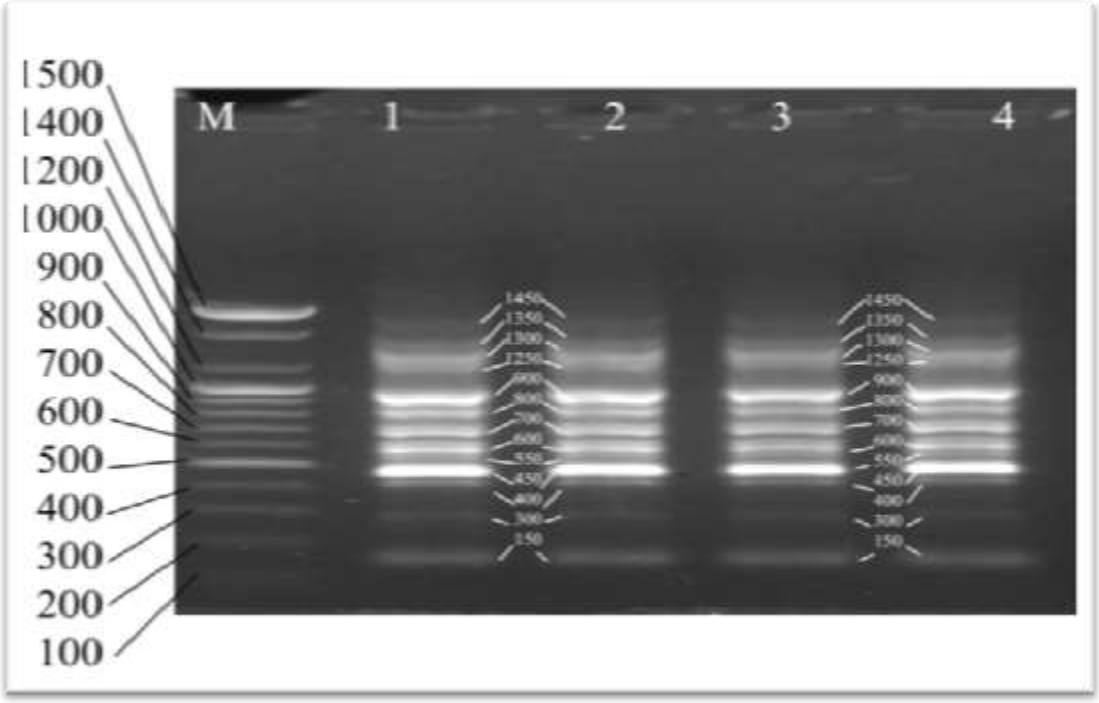
جرع اشعة (كري)							
30		20		10		0	
الوزن الجزيئي bp	عدد الحزم	الوزن الجزيئي bp	عدد الحزم	الوزن الجزيئي bp	عدد الحزم	الوزن الجزيئيbp	عدد الحزم
1450	8	1450	8	1450	8	1450	8
1300		1300		1300		1300	
800		800		800		800	
750		750		750		750	
650		650		650		650	
500		500		500		500	
400		400		400		400	
250		250		250		250	



شكل 5: نتائج تحليل PCR–RAPD باستخدام البادئ OPE –13.

جدول 6: عدد الحزم الناتجة والوزن الجزيئي المقدر (bp) باستخدام البادئ OPF –2لانسجة الافرع الخضرية لنبات الديجيتالس الصوفي والمعاملة بجرع مختلفة من أشعة كاما.

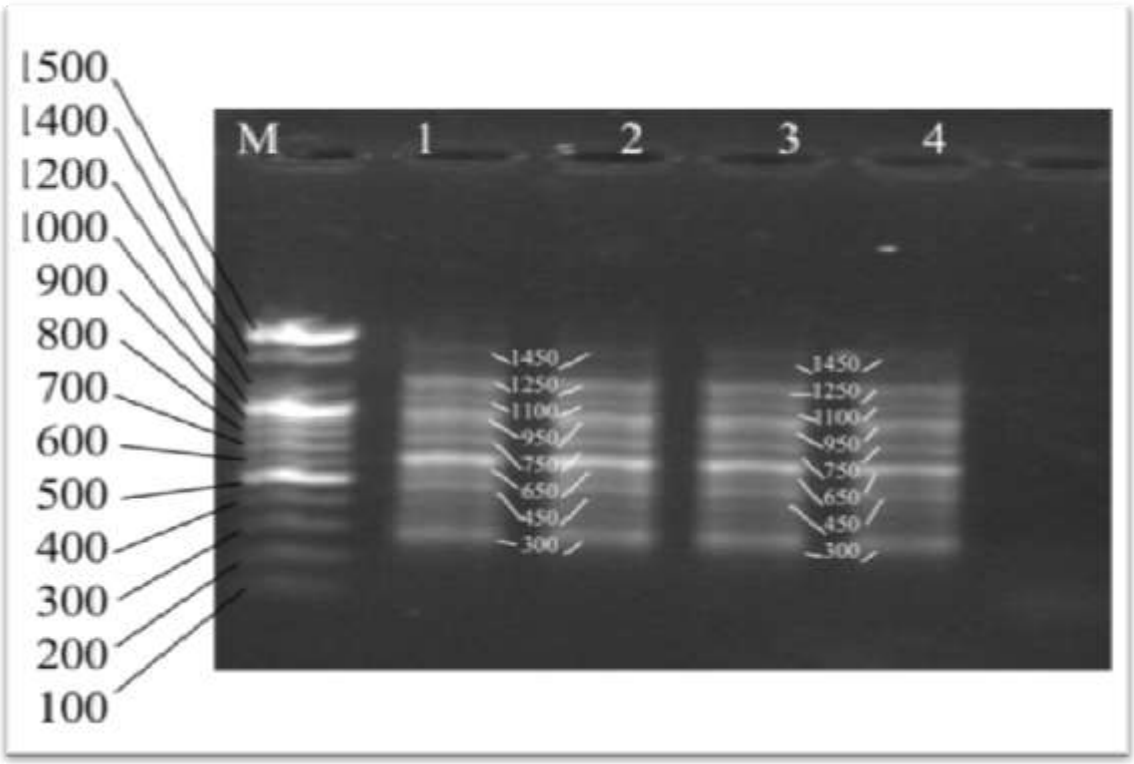
جرع اشعة كاما(كري)							
30		20		10		0	
الوزن الجزيئي bp	عدد الحزم	الوزن الجزيئي bp	عدد الحزم	الوزن الجزيئي bp	عدد الحزم	الوزن الجزيئيbp	عدد الحزم
1450	13	1450	13	1450	13	1450	13
1350		1350		1350		1350	
1300		1300		1300		1300	
1250		1250		1250		1250	
900		900		900		900	
800		800		800		800	
700		700		700		700	
600		600		600		600	
550		550		550		550	
450		450		450		450	
400		400		400		400	
300		300		300		300	
150		150		150		150	



شكل 6: نتائج تحليل PCR–RAPD باستخدام البادئ OPF –2.

جدول 7: عدد الحزم الناتجة والوزن الجزيئي المقدر (bp) باستخدام البادئ OPR –7لانسجة الافرع الخضرية لنبات الديجيتالس الصوفي والمعاملة بجرع مختلفة من أشعة كاما.

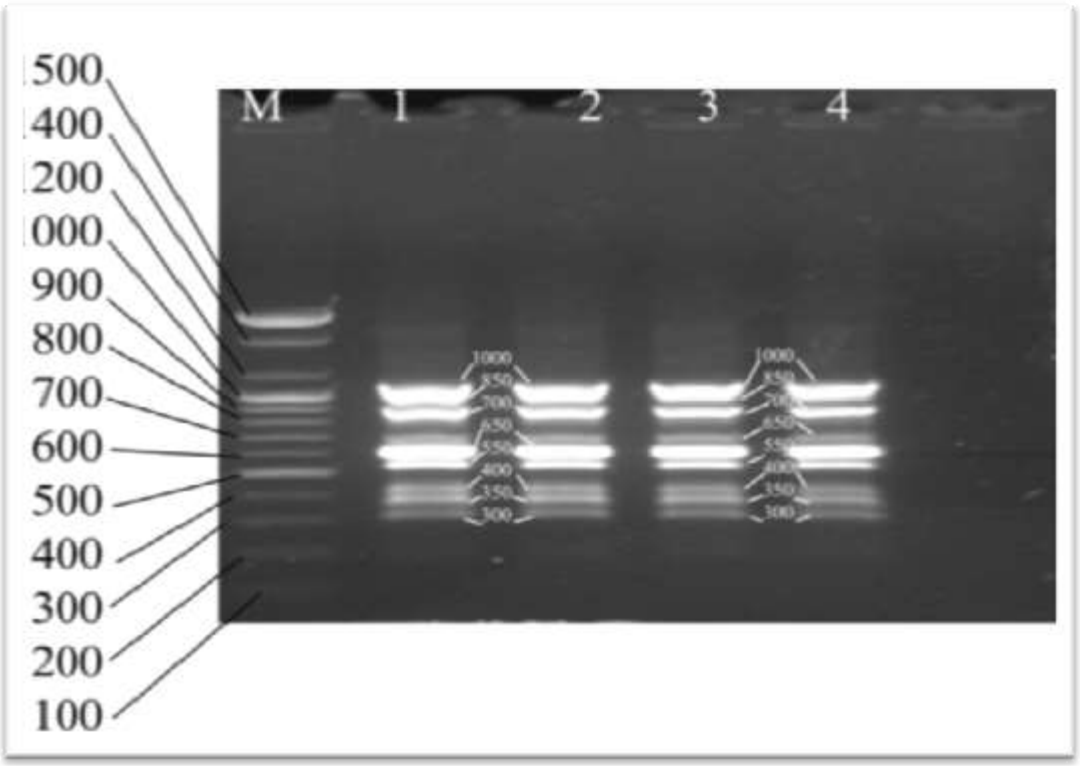
جرع اشعة كاما(كري)							
30		20		10		0	
الوزن الجزيئي bp	عدد الحزم	الوزن الجزيئي bp	عدد الحزم	الوزن الجزيئي bp	عدد الحزم	الوزن الجزيئيbp	عدد الحزم
1450	8	1450	8	1450	8	1450	8
1250		1250		1250		1250	
1100		1100		1100		1100	
950		950		950		950	
750		750		750		750	
650		650		650		650	
450		450		450		450	
300		300		300		300	



شكل 7: نتائج تحليل PCR–RAPD باستخدام البادئ OPR –7.

جدول 8: عدد الحزم الناتجة والوزن الجزيئي المقدر (bp) باستخدام البادئ OPZ –11لانسجة الافرع الخضرية لنبات الديجيتالس الصوفي والمعاملة بذورها بجرع مختلفة من أشعة كاما.

جرع اشعة كاما(كري)							
30		20		10		0	
الوزن الجزيئي bp	عدد الحزم	الوزن الجزيئي Bp	عدد الحزم	الوزن الجزيئي bp	عدد الحزم	الوزن الجزيئيbp	عدد الحزم
1000	8	1000	8	1000	8	1000	8
850		850		850		850	
700		700		700		700	
650		650		650		650	
550		550		550		550	
400		400		400		400	
350		350		350		350	
300		300		300		300	



شكل 8: نتائج تحليل PCR–RAPD باستخدام البادئ OPZ –11.

مما تتقدم يتضح ان مؤشرات الـ RAPD هي من مؤشرات الدنا السهلة والسريعة في مجال تحديد مدى التطابق الوراثي للنباتات المعاملة بجرع مختلفة من اشعة كاما، تتفق هذه النتائج مع كل من (7) عند تشعيع بذور نبات *Jatrophacurcas* ومع(8) عند تشعيع بذور نبات *Jatropha curcas* ومع (3) عند تشعيع القمم الناميه وبراعم نبات *Gypsophila paniculata* النامية نسيجيا ومع (14) عند تشعيع بذور نبات *Glebionis segetu* ومع (11) عند تشعيع بذور نبات *Acorus calamus* النامية نسيجيا ومع (2) عند تشعيع ابصال الزينة Lilium، الذين وظفوا مؤشرات الـ RAPD للتحقق من مدى التطابق الوراثي للنباتات المعاملة بجرع مختلفة من اشعة كاما مع معاملة المقارنة.

References:

1. **Aboudi, Z. J. A. (2002)** Production of cardiac glycoside from the *Digitalis purpurea* plant using tissue culture technology. PhD, College of Agriculture, Department of Horticulture, University of Baghdad.
2. **Aslam, F; S. Naz and S. Javed (2016)** Effect of radiation on morphological characters of different cultivars of Lilium genetic analysis of mutants through molecular markers. *The Journal of Animal & Plant Sciences*, 26(6):1819-1827.
3. **Barakat, M. N. and H. El-Sammak. (2011)** *In vitro* mutagenesis, plant regeneration and characterization of mutants via RAPD analysis in
4. **Cactaqnone-Sereno, P; F.Vanlerberghe-Masutti and F. Leroy(1994)** Genetic polymorphism between and within *Meloidogyne* species detected with RAPD markers. *Genome*, 37:904-909.
5. **Corniqual, B. and Marcier L. (1994)** Date palm (*Phoenix dactylifera*L.) cultivar identification by RFLP and RAPD. *Plant Sciences*,101:163-172.
6. **Dellaporta, L. S; Wood, J. and J. B. Hick. (1983)** A plant DNA mini- preparation. Version II, *Plant Molecular Biology Reporter*, 1:19-21.
7. **Dhakshanamoorthy, D; R. Selvaraj and A. Chidambaram.(2010)** indused mutagenesis in *Jatropha curcas L*. using gamma rays and detection of DNA polymorphism through RABD marker, *CR Biology*, 334(1): 24-30.
8. **Dharman, D. and R. Selvaraj. (2011)** Induced mutagenesis in *Jatropha curcas* L. using gamma rays and detection of DNA polymorphism through RAPD marker. *Comptes Rendus Biologies*. 334, (1) : 24-30.
9. **Fristch, P; Hanson M. A; Spore C. D; Pack, P. E. and Riseberg L. H. (1993)** Constancy of RAPD primer amplification strength among distantly related taxo of flowering plants. Plant Molelculer Biolology Reporter,11:10-20.*Gypsophila paniculata* L. *Australian Journal of Crop Science*, 5(2):214-222.

10. Hopkins,W. G. and Huner N. P. A. (2004) Introduction to plant physiology.3rd. *John Wiley and Sons, New Yourk*.

11. Ja-Hyun, L. and Han T. (2014) Selection of mutants obtained by gamma ray irradiation and analysis of genetic variation using RAPD markers in *Acorus calamus* L. *Horticulture, Environment and Biotechnology*. 55, (3), pp 207–212.

12. Jan, S; P. Talat; R. Hameed and T. Siddiqi. (2013) Effect of presowing gamma irradiation on the photosynthetic pigments, sugar content and carbon gain of *Callencorylifolium (L.)* Medik. Chilean Journal Agricculture Research 73.4.

13. Maniatis,T; E.F. Fritsch, and J. Sambrook.(1982) Molecular Cloning: A laboratory Manual. Cold Spring Harbor laboratory,NewYourk.

14. Manish, K; K. Prabhat and L.Shant. (2014) Gamma radiation induced variation in corn marigold (*Glebionis segetum*) and their RAPD-based Genetic Relationship. *Indian Jornal of Agricultural Science*, 84(7):796- 801.

15. Pandey, R. N; R. P. Adams, and L. E. Flournoy. (1996) Inhibition of random amplified polymorphic DNA (RAPD) by plant polysaccharides. Plant Moleculer. Biology. Reporter; 14:17-22.

16. Sambrook, J; E. F. Fritsch, and T. Maniatis.(1989) Molecular Cloning; A laboratory Manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor.

17. Swobda, I. and P. L. Bhalla.(1997) RAPD analysis of genetic variation in the Australian sun flower Scaevola. *Genome*, 40: 600-606.

18. Tripathi, L. and J. N.Tripathi. (2003) Role of biotechnology in medicinal plant. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 2(2): 243-253.

19. Vanisree, M. and H. Tsay.(2004) Plant cell culture an- alternative and efficient source for the production of biologically important secondary metabolites, *International Jornal of Applied Science and Engineering*. 2,1: 29-48.

***20.* Weising,K. and G. Kahl. (1997)** Hybridization-based micro satellite fingerprinting of plant and fungi, In: Caetano-Anolles, and P.M. Gresshoff: DNA Markers: Protocols, Applications and Overview (eds), Wiley-VCH, *New York.USA.*

21. Williams, G. K; H. R. Kubelik; K. J. Livak; J. A. Rafakski and S. V. Tinegy. (1990) DNA Polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acid Res.*, 18:6531-6535.