مجلة جامعة تشرين للدراسات والبحوث العلمية - سلسلة العلوم الزراعية المجلد (18) العدد (4) 1996
Tishreen University Journal for Studies and Scientific Research -Agricultural Science Series Vol. (18) No (4) 1996

التمييز بين بعض أصناف الحمص وهجنها من خلال بصمة الـDNA

الدكتورة وفاء شومان*

□ الملخّص □

استخدمت البصمة الوراثية للـDNA في التمييز بين صنفين من أصناف الحمص وفي تحليل مجموعتين من النباتات الناتجة عن التهجين الرجعي لأفراد الجيل الأول مع الأب المؤنث حددت في البداية البصمة الوراثية للـDNA عند الأبوين من خلال عمليات الهضم الأنزيمي باستخدام أنزيمات التحديد EcoR1-Dra 1-BamH1 و HindIII وهجنت نواتج عمليات الهضم بالمسابر الموسومة (GATA)4 – (GGAT)4 – (GACA)4 و (GTG)5.

أظهرت النتائج وجود قطع من الـDNA خاصة بكل صنف تسمح بتمييز الأصناف عن بعضها بعضاً، كما أظهرت بأن التهجين الرجعي كان ناجحاً في مجموعة واحدة وبنسبة 40% فقط من النباتات المدروسة.

* مدرسة في قسم العلوم الأساسية - كلية الزراعة - جامعة تشرين - اللاذقية - سورية.

مجلة جامعة تشرين للدراسات والبحوث العلمية - سلسلة العلوم الزراعية المجلد (18) العدد (4) 1996
Tishreen University Journal for Studies and Scientific Research -Agricultural Science Series Vol. (18) No (4) 1996

Distinction entre quelques variétés de pois-chiche et de leurs hybrides à travers l'empreinte de l'DNA

Dr. Wafaa CHOUMANE*

❒ RÉSUMÉ ❒

L'empreinte génétique de l'AND a été utilisée afin de distinguer entre deux variétés de pois chiche et d'analyser deux groupes de plantes, résultant des recroisements des F1 par le parent femelle. Les empreintes génétiques des AND des parents ont été réalisées par digestions enzymatiques, en utilisant les enzymes de restriction: BamH1, Dra1, EcoR1 et HindIII et hybridations des fragments de restriction obtenus par les sondes d'oligonucleotides marquées: (GATA)4, (GACA)4, (GGAT)4 et (GTG)5.

Les résultats obtenus détectent des fragments spécifiques d'AND permettant la distinction entre variétés, et montrent que les recroisements étaient réussis dans un seul groupe de plantes, avec seulement un pourcentage de 40% de plantes analysées.

* Enseignante au Département de Sciences de Bases, Faculté d'Agronomie, Université de Tichrine Lattaquié, Syrie.

أهمية البحث والهدف منه:

الحمص Cicer arietinum من محاصيل الفصيلة البقولية، ذو عدد صبغي (2 ن = 16)، ذاتي التلقيح بشكل أساسي، إضافة لوجود نسبة من التلقيح الخلطي. يتميز بقيمته الغذائية المرتفعة لاحتوائه على نسبة عالية من البروتين والنشويات والمواد الأخرى التي يحتاجها جسم الإنسان.

كانت تقتصر زراعة الحمص في القطر العربي السوري على الأصناف الربيعية التي تعتمد على مياه الأمطار، أما الآن فقد أدخلت إلى القطر أصناف شتوية ذات إنتاجية عالية ومقاومة للأمراض والصقيع. تختلف هذه الأصناف في خصائصها، لذلك مازالت الرغبة في تجميع الصفات الجيدة في صنف واحد هي أحد أهداف مربي النبات. على هذا، توجد برامج تربية تهدف لنقل صفة معينة من صنف إلى آخر عن طريق عمليات التهجين. في هذا النوع من الطرق التقليدية في تحسين النباتات لا نستطيع التأكد من نجاح عمليات التهجين إلا بعد حصولنا على البذار الهجين وزراعته ومن ثم انتظار وصول النباتات إلى طور مناسب، وأحياناً لنهاية دورة حياته، ومن ثم إجراء الدراسات عليها. وهذا يتطلب العمل على عدد كبير من النباتات ولفترة طويلة من الزمن قبل التأكد من نجاح أو فشل عملية التهجين، مما يضيع على المربي وقتاً وجهداً كبيرين. حالياً وبوجود التقنيات الحيوية الحديثة يمكننا اختصار هذه المراحل بتحليل الـDNA المستخرج من نباتات فتية من الأبويين والهجين المفترض، وبحصولنا على ما يسمى ببصمة الـDNA للأفراد المختبرة نستطيع التأكد من نجاح أو فشل عملية التهجين.

إن جزءاً هاماً من مجينات Génomes حقيقيات النوى الراقية مكون من مقاطع DNA قصيرة، متكررة وموزعة في المجين، تضم هذه المقاطع عدة أنواع، منها: المقاطع البسيطة المتكررة ميكروساتوليت Microsatellites وهي مكونة من تجمع عدد كبير جداً من المقاطع القصيرة المتكررة على طول جزيئة الـDNA، كل منها مكون من 3–5 أزواج نيوكلوتيدية، (Epplen et al, 1991; Tautz and Renz, 1984) والمينيساتوليت Minisatellites ويتكون من مقاطع نيوكليوتيدية قصيرة ومتكررة، ولكن وحداتها الأساسية أكبر من السابقة وتساوي (15–25) زوج نيوكليوتيدي (Jeffreys, 1987; Jeffreys et al, 1985). تجمع بين هذين النوعين من المقاطع المتكررة خاصة مشتركة وهي تعدد وتباين مظاهرها وأشكالها Polymorphism والتي تترجم

بوجود قطع من الـ DNA ذات أوزان جزيئية مختلفة، تنشأ في أغلب الأحيان عن اختلاف في عدد الوحدات الأساسية المتكررة المكونة لهذه المقاطع، مما يؤدي للحصول على قطع من الـ DNA تختلف بدرجة تشابهها ما بين الكائنات المختلفة. وهذا ما لوحظ عند مقارنة DNA مستخرج من أفراد تختلف عن بعضها بعضاً في درجة قرابتها أو بعدها الوراثي (Tautz, 1989; Tatuz et al. 1986) أو قريبة من بعضها بعضاً وراثياً، كما في القمح (Vaccino et al, 1993).

إن عملية هضم الـ DNA لفرد ما بأنزيمات التحديد Enzyme de restrection، ومن ثم تعريضه لعملية تهجين باستخدام مقاطع DNA قصيرة ومصنعة Oligonucleotide كمسبر، يخلق ما يسمى ببصمة الـ DNA الخاصة بالفرد ويكشف لنا عن وجود عدة مواقع مورثية متباينة ما بين الأفراد المختبرة (Schafer et al, 1988; Ali et al, 1986). لقد حددت بصمة الـ DNA لمجموعة مختلفة من الكائنات: الإنسان وبعض الثدييات الأخرى [Jeffreys, 1987] والطيور (Burke and Bruford, 1987) وعدد من النباتات الراقية (Devey et al, 1991; Nybom et al, 1990; Rogstad et al, 1988; Dallas, 1988) والفطريات (Braithwaite and Manner, 1989) والبكتريا (Huey and Hall, 1989). إن هذه المقاطع تزودنا بعدد غير محدود من المسابر التي تسمح بالتمييز ما بين الأنواع المختلفة، أو بين أصناف من النوع نفسه أو حتى بين أفراد تابعة للصنف نفسه، وذلك من خلال إنشاء بصمة الـ DNA الخاصة بكل فرد. يمكن استخدام مقاطع الـ DNA المصنعة كمسابر سواء بعد وسمها بالنيوكلوتيدات المشعة أو بمواد أخرى غير مشعة.

المواد والتقنيات Materiels et Methodes:

المادة النباتية:

تم الحصول على بذور النباتات المستخدمة في هذه الدراسة من المركز الدولي للأبحاث الزراعية في المناطق الجافة (ايكاردا)، حلب. الأصناف المستخدمة هي ILC3279 - ILC1272 وبذور الجيل الأول F1 الناتج عن التهجين ILC1272♀×ILC3279♂ ومجموعتين من البذور ناتجة عن تهجين أفراد الجيل الأول بالأب المؤنث تهجيناً رجعياً ILC1272♀×F1♂. ويرمز لها في النص: المجموعة الأولى 4.4×2.4 والأرقام من (1-5) هي أرقام النباتات المأخوذة، والمجموعة الثانية (5-1) 4.3×2.3.

زرعت البذور في أصص منفردة، في ظروف مراقبة ضمن البيت

البلاستيكي. لم تنبت بذور F1 وبالتالي لم نحصل على نباتات الجيل الأول، في حين أن جميع البذور الباقية أعطت نباتات جيدة النمو. الأجزاء النباتية المستخدمة في هذه الدراسة هي الأوراق المأخوذة من نباتات فتية بعمر 4–6 أسابيع.

استخراج الأحماض النووية:

تم استخراج الأحماض النووية بحسب طريقة (Doyle and Doyle, 1987) مع إجراء بعض التعديلات عليها. يسحق 0.2 غ من الأوراق المجففة والمبردة في 10 مل من المحلول (1)،

1 : 2% Cetyl Trimethlamonium Bromide, 1.4m NaCl, 0.1m Tris, 20mM EDTA, 0.2% B-Mercaptoethanol. pH:8.

ويحضن في حمام مائي مدة 30–60 دقيقة بدرجة حرارة 60°م مع التحريك الهادئ. تستخرج الأحماض النووية بإضافة حجم مماثل من المزيج كلوروفورم/كحول ايزواميل المحضر بنسبة 1/24 على الترتيب وخلطه بهدوء مدة 10 دقائق ثم يفصل الوسط المائي الذي يحوي الأحماض النووية عن الوسط العضوي بالتثقيل مدة 10 دقائق وبسرعة 4000 دورة/د بدرجة 20°م.تكرر العملية، ثم ترسب الأحماض النووية بإضافة الكحول 2-ايزوبروبانول البارد بمعدل 0.6 من حجم الوسط المائي. تترك الأحماض النووية لتترسب مدة 30 د. في درجة حرارة -20°م، ثم تجمع الأحماض النووية كراسب بالتثقيل مدة 10 د. على درجة حرارة (0)°م بسرعة 10000 دورة/د.يغسل الراسب بالكحول الاتيلي 76° ثم يجفف ويذاب في المحلول الواقي TE.

TE : 10 mM Tris, 1mM EDTA, pH:8.

يستبعد الـRNA بمعاملة الأحماض النووية بأنزيم الـRNase، بدرجة حرارة 25°م لمدة نصف ساعة. تقدر كمية الـDNA باستخدام جهاز الطيف الضوئي، بوجود الأشعة فوق البنفسجية، طول الموجة 260 أنغستروم، ونرى أن كل قراءة تعادل -1- كثافة ضوئية يقابلها كمية من الـDNA تقدر بـ50 ميكروغرام/مل.

الهضم الأنزيمي والرحلان الكهربائي:

استخدم 2-3 ميكروغرام من الـDNA في كل عملية من عمليات الهضم الأنزيمي والتي تمت باستخدام أنزيمات التحديد HindIII – DraI – EcoR1 – BamHI، بمعدل 5 وحدات أنزيمية لكل 1 ميكروغرام من الـDNA، وباستخدام المحاليل الواقية الخاصة بكل أنزيم وبدرجة الحرارة المناسبة (حسب توصيات الشركة الصانعة). فصلت قطع الـDNA الناتجة عن عمليات الهضم الأنزيمي بعملية الرحلان الكهربائي. على هلامة ذات تركيز 0.8-1% أجاروز، بوجود المحلول الواقي TAE،

TAE : 1mM EDTA, 40mM Tris, 20mM Na-acetate. ph:7.8.

وبشدة حقل 1-2 فولت/سم. تلون الهلامة بنهاية العملية مدة 30 دقيقة بمادة بروم الأيتيديوم المضافة إلى محلول الـTAE بمعدل 0,5 ميكروغرام/مل ثم تصور الهلامة بوجود الأشعة فوق البنفسجية.

نقل الـDNA، إجراء التهجين الجزيئي، التلوين:

استخدمت طريقة Southern، (1975) في نقل الـDNA إلى غشاء من النيلون (Hybond)، وثبت الـDNA بطبخ الغشاء مدة 15 دقيقة بدرجة حرارة 110°م. تمت عملية التهجين باستخدام مسابر من مقاطع نيوكليوتيدية مصنعة وموسومة Digoxigenated oligonucleotide بحسب طريقة Boehringer، (1991). المسابر المستخدمة هي: 1- 4(GATA)، 2- 4(GACA)، 3- 4(GGAT)، 4- 5(GTG). تمت عملية التحضير للتهجين والتهجين الجزيئي بدرجات حرارة 30°م للمسبر (1)، 38°م للمسبرين (2و3) و40°م للمسبر (4). تغسل الأغشية ومن ثم تخضع لمعاملة تجنبها الارتباط غير النوعي للأجسام المضادة. تغسل الأغشية بمحاليل مناسبة ثم توضع على تماس مع هلامة من الأجاروز تحوي الملونات NBT وBCIP

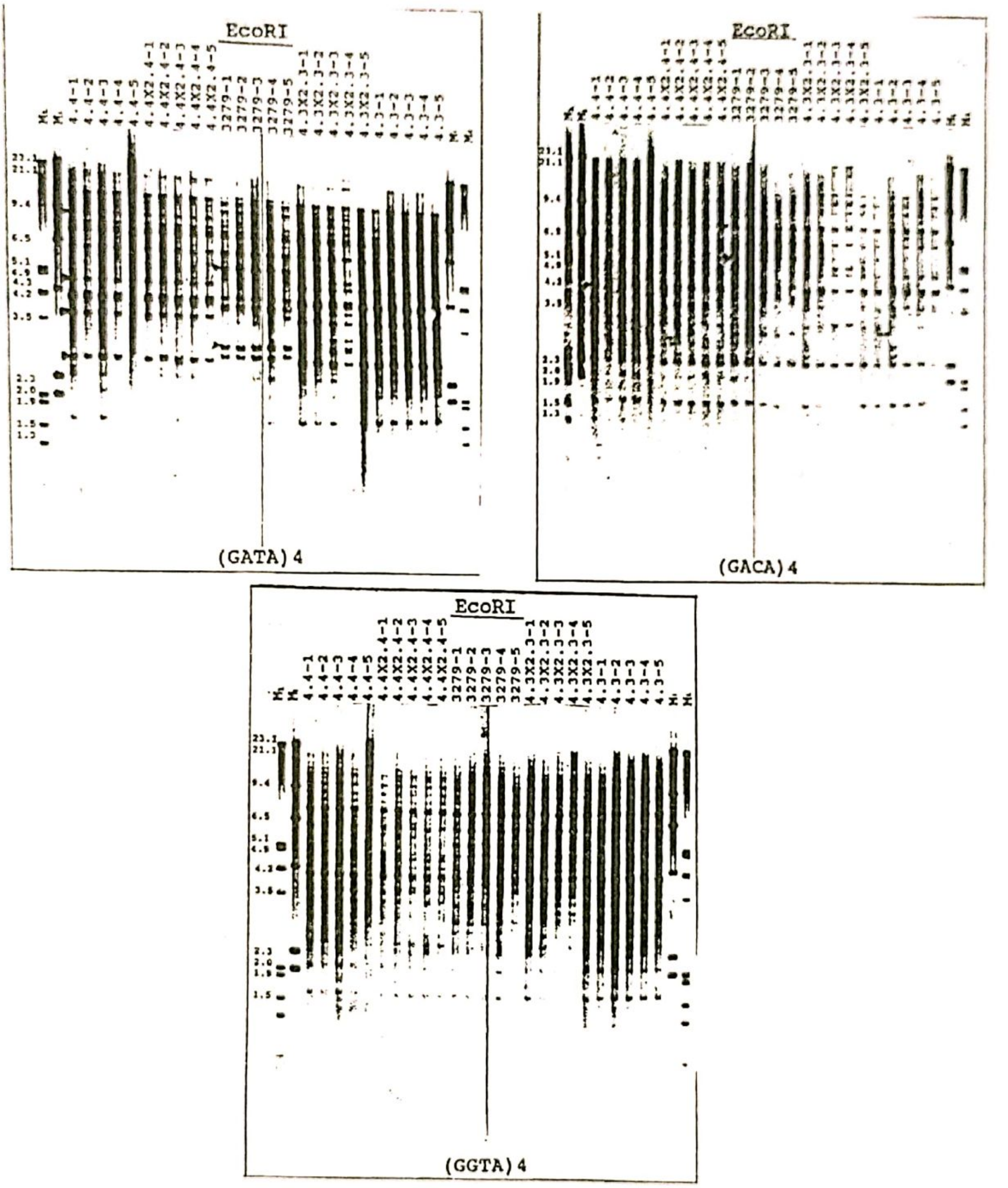
NBT : Nitroblue Tetrazolium.
BCIP : 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl phosphate.

حسب طريقة Zischler et al، (1989)، تغطى بطبقة أخرى من الهلامة، تترك في الظلام تحت الرطوبة المناسبة لتتم عملية التلوين. يوقف تفاعل التلوين بنقل الأغشية

إلى محلول TE، ثم تجفف وتبدأ عملية تحليل النتائج.

النتائج والمناقشة Resultats et discussion:

استخرج الـDNA النووي لكل من النباتات المستعملة في هذه الدراسة بشكل فردي. استخدمت في هذه التحاليل خمس نباتات من كل صنف أو مجموعة. تم هضم الـDNA لكل نبات بأربعة أنزيمات تحديد مختلفة هي HindIII – BamH1 – Dral – EcoR1، ثم فصلت قطع الـDNA الناتجة عن الهضم الأنزيمي على هلامات من الأجاروز ذات تركيز 0.8–1%. نقل الـDNA إلى أغشية من النيلون ومن ثم هجن بالمسابر المكونة من مقاطع قصيرة وموسومة هي (GATA)4 , (GACA)4 , (GGAT)4 و(GTG)5 وحصلنا على النتائج التالية:



الشكل (1): DNA مستخرج من نباتات الحمص بعد هضمه بأنزيم EcoR1، وفصل قطع التحديد على هلامة تركيز 1% أجاروز، ثم نقلها إلى أغشية من النيلون وتهجينه مع المسابر الموسومة - 4(GACA) - 4(GGAT) .4(GATA)

M1 وM2 مؤشران للوزن الجزيئي، هما عبارة عن DNA لامبدا مهضوم بـــEcoR1 وHindIII على الترتيب.

من 1- 4.4 حتى 5- 4.4 - خمس نباتات من الأب المؤنث ILC1272.

من 1- 4.4×4.2 - خمس نباتات من المجموعة الأولى من التهجين الرجعي.

من 1- 2.3×4.3 حتى 5- 2.3×4.3 - خمس نباتات من المجموعة الثانية من التهجين الرجعي.

من 1-4.3 حتى 5- 4.3 - خمس نباتات من الأب المؤنث ILC1272.

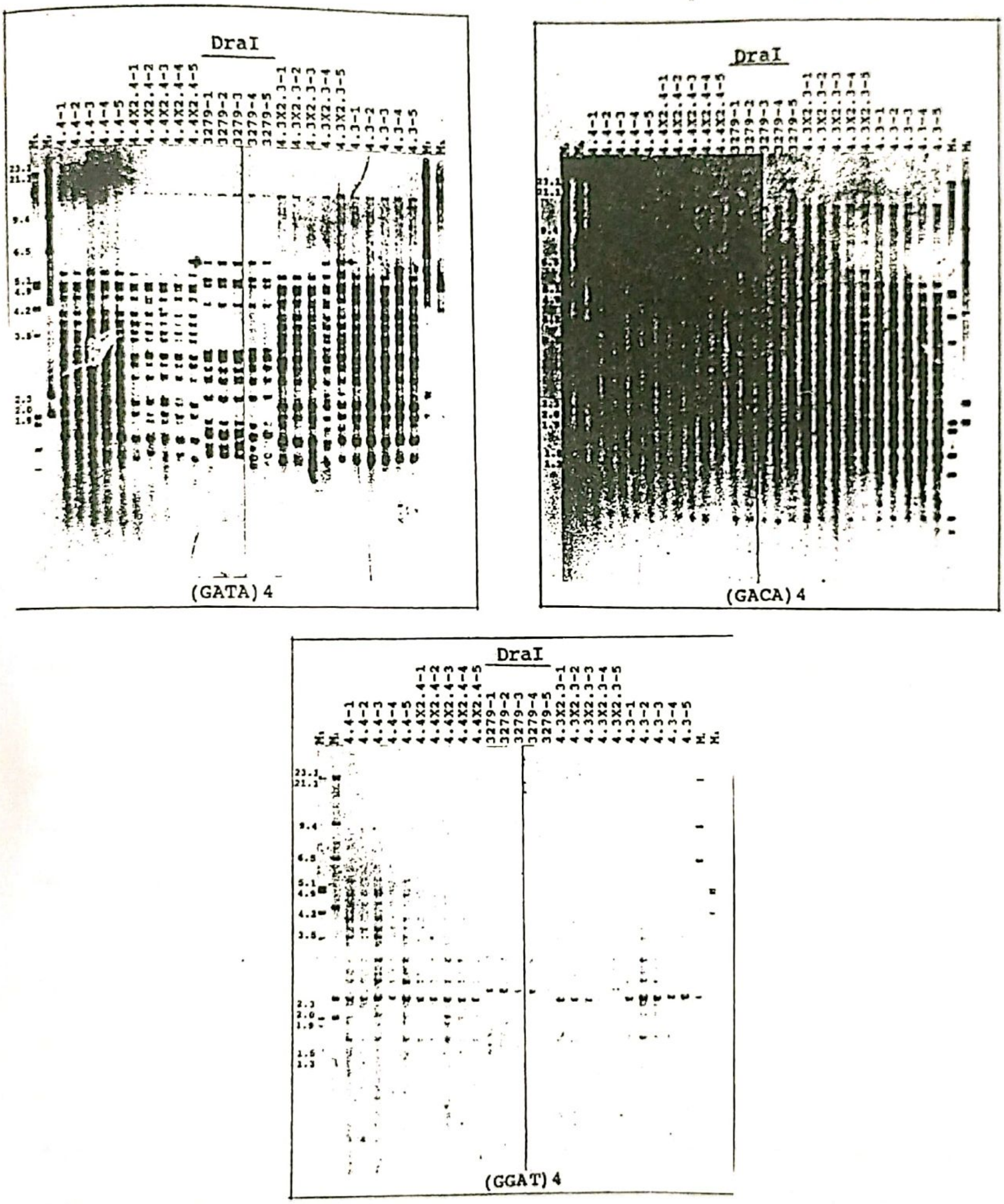
الأرقام على اليسار تدل على الوزن الجزيئي لقطع الـــDNA المستخدمة كمؤشر جزيئي ومقدرة بـــ1000 زوج من النيوكليوتيدات.

أظهرت الأغشية جميعها التي عرضت للتهجين الجزيئي وجود شرائط أو حزم متعددة (وهي قطع من الـDNA ذات أوزان جزيئية محددة) مع المسابر المستخدمة جميعها، مما يدل على أن كمية كبيرة من DNA النباتات المدروسة موجودة بشكل مقاطع قصيرة متكررة وموزعة ضمن مجين نباتات الحمص ومكملة لقطع الـDNA المستخدمة كمسابر (شكل 1و2). أظهرت عمليات تهجين الـDNA، المهضوم بالأنزيمات المختلفة، وجود حزم تختلف في عددها وكثافتها ووزنها الجزيئي تبعاً للأنزيم والمسبر المستخدمين نجد على سبيل المثال أن الـDNA المهضوم بالأنزيم EcoR1 يعطي بعد تهجينه مع المسبر 4(GACA) عدداً من الحزم الواضحة يختلف تبعاً للصنف المستخدم حيث نجد /4/ حزم في الصنف ILC1272 في حين أن عدد الحزم يساوي /5/ في الصنف ILC3279، وذلك إضافة لوجود عدد من الحزم ضعيفة الكثافة قليلة الوضوح، في حين أن تهجين نواتج الهضم نفسها مع المسبر 4(GATA) يعطي عدداً أكبر من الحزم الواضحة يتراوح ما بين (13و16) حزمة تبعاً للصنف المستخدم (شكل 1). ويعود الاختلاف في عدد قطع الـDNA المهجنة مع المسابر المختلفة لاختلاف نسبة تواجد مقاطع الـDNA المكملة لها ضمن مجين الفرد المختبر.

من مقارنة حزم الـDNA الناتجة عن عملية تهجين نواتج الهضم الأنزيمي بأنزيم ما، نجد بأن هناك مجموعة من الحزم تمثل قطعاً من الـDNA موجودة في أصناف الحمص جميعها ولها الوزن الجزيئي نفسه، كما هو الحال في قطع الـDNA ذات الوزن الجزيئي 7و2.3 و1.6 ك.ز.ن. (1000 زوج من النيوكليوتيدات) والتي نحصل عليها من تهجين نواتج الهضم بالأنزيم EcoR1 مع المسبر 4(GACA) (شكل 1) تعتبر هذه القطع من الـDNA مميزة لنباتات الحمص بشكل عام.

هناك عدد من الحزم (قطع الـDNA) ذات وزن جزيئي محدد، موجودة في صنف وغائبة في صنف آخر، تعتبر هذه القطع مميزة للصنف. نجد ذلك بوضوح عند تهجين نواتج الهضم بالأنزيم EcoR1 بالمسبر 4(GATA) فنلاحظ وجود قطع الـDNA ذات الأوزان الجزيئية (6و3 ك.ز.ن.) وهي تقابل الحزم ذات الرقم (9و13 على الترتيب من الأعلى إلى الأسفل) الموجودة في جميع نباتات الصنف ILC3279 وغائبة في نباتات الصنف ILC1272، في حين أن قطع الـDNA ذات الوزن الجزيئي (4.5و3.6 ك.ز.ن.) موجودة في جميع

نباتات الصنف ILC1272 وغائبة في نباتات الصنف ILC3279. شكل (1) إن نواتج الهضم الأنزيمي لـDNA الأفراد الناتجة عن التهجين الرجعي المفترض، (المجموعة الأولى (1-5) 4.4×2.4) لها أوزان جزيئية مماثلة تماماً للأب المؤنث (4.4 - ILC1272) شكل رقم (1و2).



الشكل (2): DNA مستخرج من نباتات الحمص بعد هضمه بأنزيم DraI، وفصل قطع التحديد على هلامة ذات تركيز 0.8% أجاروز، ثم نقلها إلى أغشية من النيلون وتهجينه مع المسابر الموسومة – 4(GGAT) 4(GACA) – 4(GATA). جميع الأرقام والرموز مماثلة لما هو الحال في الشكل (1).

نجد عند مقارنة قطع الـDNA الناتجة عن الهضم الأنزيمي لأفراد المجموعة الثانية من التهجين الرجعي المفترض (1-5) 4.3×2.3 أن هناك نباتين (رقم 4و5) يحملان قطعاً من الـDNA مميزة للأب المؤنث (4.3 – ILC1272) إضافة لقطع أخرى مميزة للأب المذكر ILC3279، نرى ذلك بوضوح في الـDNA المهضوم بالأنزيم Dra1 والمهجن مع المسبر 4(GATA) ونجد أن قطعة الـDNA ذات الوزن الجزيئي 5.5 ك.ز.ن. المميزة للصنف ILC3279 موجودة في الفرد الهجين إضافة لمجموعة من قطع الـDNA ذات وزن جزيئي بين 3.5-4.5 ك.ز.ن.) ومميزة لنباتات الصنف ILC1272 (شكل 2).

إن تهجين نواتج عمليات الهضم بأنزيمات التحديد المختلفة بالمسبر 5(GTG) تكشف وجود قطع من الـDNA متشابهة من حيث العدد والكثافة والوزن الجزيئي في جميع نباتات الحمص المستخدمة (الصور غير معروضة). لذلك فإن هذا المسبر غير مفيد في تمييز الأصناف عن بعضها وبالتالي ليس له أهمية في التأكد من نجاح أو فشل عمليات التصالب بين نباتات أصناف الحمص المختلفة.

لاحظنا من خلال النتائج التي حصلنا عليها أن جزءاً هاماً من المجين Genome في نباتات الحمص يحتوي على مقاطع قصيرة متكررة ومكملة للمقاطع 4(GGAT) – 4(GACA) – 4(GATA) و5(GTG) وهذا ما يترافق مع نتائج Weising et al، (1991a.m, 1991b) حيث أكدوا احتواء فطر الاسكوكيتا على مقاطع قصيرة متكررة موزعة في مجينه، كما أثبت ذلك Tzuri et al، (1991) في عدد من نباتات الزينة وSchmidt et al، (1993) في الشوندر السكري. هذه المقاطع القصيرة من الـDNA تحمل بعض التباينات التي تسمح بالحصول على بصمة للـDNA تمكننا من تمييز الأنواع أو الأصناف عن بعضها بعضاً. هذه المقاطع من الـDNA توجد بشكل مبعثر ضمن المجين، موزعة على عدة صبغيات وليست على صبغي واحد (Weising et al, 1992).

لقد استطعنا تحديد بصمة الـDNA للصنفين المدروسين، ووجدنا بأن لكل صنف بصمة DNA تميزه عن غيره وهي بدورها تنتج عن تهجين قطع الـDNA مختلفة الأوزان الجزيئية، – الناتجة عن عمليات الهضم بالأنزيمات المختلفة– مع عدة مسابر موسومة مكونة من مقاطع DNA قصيرة تعطي بصمات مختلفة –نتيجة لاختلاف أطوال قطع الـDNA المهجنة– ما بين الأصناف المختلفة. هذا الاختلاف في أطوال قطع

الـDNA قد ينتج عن اختلاف في عدد الوحدات الأساسية المكونة لها، أو عن طفرات موضعية تصيب نيوكليوتيد واحد وتؤدي لاستبداله بآخر أو استبعاده نهائياً مما يسبب ظهور أو اختفاء موقع أنزيمي معين ينتج عنه اختلاف في طول قطع الـDNA الناتجة عن عملية الهضم الأنزيمي، كما قد يعود سبب هذه الاختلافات في طول قطع الـDNA إلى إضافة أو اختفاء مقطع نيوكليوتيدي كامل (Welsh and McClelland, 1991).

لقد وجدنا أن الصنف ILC3279 المستخدم كأب مذكر يمكن التعرف عليه وتمييزه بسهولة إذا استخدمنا الأنزيم EcoR1 والمسبر 4(GATA) أو الأنزيم (Dra1) والمسبر 4(GATA) لأنهما يعطيان قطعاً محددة من الـDNA موجودة فقط في هذا الصنف، وبالتالي يمكن اعتمادها كمؤشر جزيئي يميز لنا هذا الصنف من الحمص. كذلك الأمر بالنسبة للصنف الثاني ILC1272 المستخدم كأب مؤنث حيث يمكن بهذين الأنزيمين وهذا المسبر التعرف عليه مباشرة وتمييزه عن غيره من الأصناف. على هذا وبما أن هذا النوع من البصمات يتم توريثه من الآباء إلى النسل، كما أكدت دراسات Devey et al، (1991) المطبقة على نسل عدة أجيال من نبات الصنوبر، فإن مراقبة بصمة الـDNA ستخدمنا كمؤشر في معرفة مدى نجاح عمليات التهجين.

من الناحية النظرية، عند تهجين ILC1272♀×ILC3279♂ نحصل على أفراد الجيل الأول التي تحوي في مجينها البصمتين المميزتين للأصناف الأبوية المستخدمة بالتهجين. عندما نهجن أفراد الجيل الأول تهجيناً رجعياً (ILC1272♀F1)، نحصل في بصمات الفرد الناتج على قطع من الـDNA مميزة للأبوين، لكن النسبة الأكبر من قطع الـDNA ستكون من الأب المؤنث ILC1272، لأن إعادة تلقيح أفراد F1 بالصنف ILC1272 ستزيد نسبة وجود مجين الأب المؤنث في الأفراد الناتجة وتقل بالتالي نسبة مجين الأب الآخر ILC3279. لهذا فإن كثافة القطع الناتجة عن الهضم الأنزيمي لـDNA الأفراد الناتجة عن عملية التهجين الرجعي والمشابهة للأب ILC1272 تكون أكبر من تلك المشابهة للأب ILC3279، وهذا ما يمكن ملاحظته في الشكل (1و2) في النباتات (4.5) 2.3×4.3.

من ملاحظتنا لنتائج DNA أفراد المجموعة الأولى من التهجين الرجعي (1-5) 2.4×4.4 نجد بأن بصمة الـDNA تشبه الأب المؤنث تماماً مما يدل على أن أفراد F1 التي استخدمت بالتهجين الرجعي، لم تكن بالحقيقة ناتجة عن عملية تهجين ناجحة، بالتالي البذور التي زرعت لم تكن بذور الهجين F1 وإنما كانت بذوراً ناتجة عن عملية تلقيح

ذاتي للصنف ILC1272 ومن ثم عند إجراء عملية التهجين الرجعي المفترضة F1×ILC1272 تم تكرار وتثبيت المحتوى الوراثي نفسه وبالتالي كانت بصمتها مطابقة للنتائج التي نحصل عليها من عملية تلقيح ذاتي، وهذا هو السبب في أن بصمة المجموعة (1-5) 4.5×2.4 مطابقة لبصمة الأب المؤنث تماماً. على هذا فإن عملية التهجين الأولى لم تكن ناجحة ولم نحصل على نباتات F1 بالأصل، وما تم استخدامه في عملية التهجين الرجعي على أنه نباتات F1 لم يكن سوى أفراد ناتجة عن تلقيح ذاتي للأب المؤنث ILC1272. أما بالنسبة للمجموعة الثانية من التهجين الرجعي (1-5) 4.3×2.3 فنجد بأن هناك نباتين فقط من أصل نباتات الخمسة المختبرة، يحويان على بصمة للـDNA تحمل قطعاً مشتركة من الأبوين، مما يدل على أن عملية التهجين فيها كانت ناجحة إلى حد ما، وحصلنا على مجموعة من البذار أعطت بزراعتها نباتات الجيل الأول وأدى استخدامها بالتهجين الرجعي لحصولنا على قطع الـDNA المميزة للأبوين، في هذين النباتين فقط، في حين أن نباتات الثلاث الأخرى ناتجة عن عملية تلقيح ذاتي. أي أن 5/2 فقط من DNA النباتات التي حللت كانت ناتجة عن عمليات تهجين رجعي ناجحة.

الخلاصة:

نستنتج مما سبق أن لكل صنف من أصناف الحمص المدروسة بصمة DNA مميزة له، يمكن باستخدامها تمييز أصناف الحمص عن بعضها بعضاً. يمكن في هذه الحالة، وعند الشك في أي صنف موجود، إجراء بعض التحاليل باستخدام عدد محدود من الأنزيمات والمسابر، وأن نحدد تماماً الصنف الذي بحوزتنا. كما يمكننا من خلالها معرفة مدى نقاوة الصنف حيث أن تشابه بصمة الـDNA في جميع نباتات صنف ما تعطي فكرة عن درجة نقاوة الصنف المختبر، في حين أن التباين في بصمات الـDNA يعبر عن وجود تباينات وراثية ضمن الصنف المدروس. كما يمكن لبصمة الـDNA أن تساعدنا في التأكد من نجاح عمليات التهجين في مرحلة مبكرة من حياة النبات وذلك من خلال تحليل قطعة من الجذر أو عدة وريقات فتية، مما يوفر علينا الاستمرار في تربية نباتات لم تنتج حقيقة عن التهجين المرغوب من قبل المربي وبالتالي لن تحقق أهدافه في المستقبل، وبذلك يمكنه الاحتفاظ بالنباتات المرغوبة فقط. إضافة لما سبق فإن الهدف الكبير من تحديد البصمة الوراثية هو محاولة ربط وجود قطع معينة من الـDNA بظاهرة زراعية مهمة واستخدامها فيما بعد كمؤشر جزيئي يدل وجوده على احتواء الفرد على تلك الصفة المرغوبة. هذه القطعة من

الـــDNA قـــد تكـــون نفســـها المـــورث المسؤول عن هذه الصفة، أو قطعـــة مـــن الـــDNA متوضعة قربه مباشرة ويكـــون وجودها دلـــيلاً علـــى وجـــود المـــورث المرغوب. كل هذه المعلومات ستسهل على مربي النبات عمله وقد تمكنه من التحديـــد الدقيق للمورث الهام ومن ثم عزله وإدخاله إلى أفراد محددة من خلال تقنيات الهندسة الوراثية التي تتطور بسرعة كبيرة جـــداً.

REFERENCES المراجع

- ALI S., MULLER C.R., EPPLEN J.T. 1986. DNA fingerprinting by oligonucleotides probes specific for simple repeats. Hum. Genet. 74: 239-243.
- BOEHRINGER M. 1991. Dig-labeling and detection kit laboratory manual. Mannheim.
- BRAITHWAITE K.S. and MANNERS J.M. 1989. Human hypervariable miniastellite probes detect DNA polymorphisms in the fungus colleto trichum gloesporioedes. Curr. Genet. 16: 473-475.
- BURKE T. and BRUFORD M.W. 1987. DNA fingerprinting in birds. Nature (London). 327: 149-152.
- DALLAS J.F. 1988. Detection of DNA fingerprinting of cultivated rice by hybridization with a human minisatellite DNA probe. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 6831-6835.
- DEVEY ME., JERMSTAD K.D., TAUER C.G. and NEALD. B. 1991. Inheritance of RFLP loci in a loblolly pine three generation pedigree. Thero. Appl. Genet. 83: 238-242.
- DOYLE J.J. and DOYLE J.L. 1987. A Rapide DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Photochemical bulletin. 19: 11-15.
- EPPLEN J.T. AMMER H. and EPPLEN C. 1991. Oligonucleotide fingerprinting using simple repeats motifs: a convenient ubiquitously applicable method to detect hypervariability for multiple purposes. In DNA fingerprinting: approches and application. Edited by Burk T., Dolf G., Jeffreys A.J. and Wolff R. Birkhauser Bsel. 50-69.
- HUEY B. AND HALL J. 1989. Hypervariable DNA fingerprinting in E. coli: minisatellite probe from bacteriophage M13. J. Bacteriol. 171: 2528-2532.
- JEFFREYS A.J., WILSON V. and THEIN S.L. 1985. Individual specific fingerprints of human DNA. Nature (London). 315: 76-79.
- JEFFREYS A.J. 1987. Highly variable minisatellite and DNA fingerprints. Biochem. Soc. Trans. 15: 309-317.
- NYBOM H., ROGSTAD S.H. and SCHAAL B.A. 1990. DNA fingerprints applied to paternity analysis in apples (Malus×Domestica). Theor. Appl. Genet. 79: 153-156.
- ROGSTAD S.H., PATTON J.C.II and SCHAAL B.A. 1988. M13 repeat probe detects DNA minisatellite-like sequences in gymnosperms and angyosperms. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85: 9176-9178.
- SCHAFER R., ZISCHLER H., BIRSNER U., BERKER A. and EPPLEN J.T. 1988. Optimized oligonucleotide probes for DNA fingerprinting. Electrophoresis. 9: 369-374.
- SCHMIDT T., BOBLENZ K., METZLAFF M., KAEMMER D., WEISING K. and KAHL G. 1993. DNA fingerprinting in sugar beet (Beta

vulgaris) Identification of double – haploid breeding lines. Theor. Appl. Genet. 85: 653-657.

- SOUTHERN E.M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J.Mol. Biol. 98: 503-517.
- TAUTZ D. and RENZ M. 1984. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. Nucleic Acid Res. 12: 4127-4138.
- TAUTZ D., TRICK M. and DOVER G.A. 1986. Cryptic simplicity in DNA is major source of genetic variation. Nature (London). 322: 652-656.
- TAUTZ D. 1989. Hypervaiability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. Nucleic acids res. 17: 6463-6471.
- TZURI F., HILLEL J. and LAVI U. 1991. DNA fingerprint analysis of ornamental plant. Plant. Sci. 76: 91-97.
- VACCINO P., ACCERBI M. and CORBELLINI M. 1993. Cultivar identification in T. aestivum using highly polymorphic RFLP probes. 86: 833-836.
- WEISING K., BEYERMANN B., RAMSER J. and KAHL G. 1991A. plant DNA fingerprinting with radioactive and digoxygenated oligonucleotide probes complementary to simple repetitive DNA sequences. Electrophresis. 12: 159-169.
- WEISING K., KAEMMER D., EPPLEN J.T., WEIGAND F., SAXENA M. and KAHL G. 1991B. DNA fingerprinting in Ascochyta rabiei with synthetic oligonucleotides. Curr. Genet. 19: 483-489.
- WEISING K, M KAEMMER D., WEIGAND F., EPPLEN J.T. and KAHL G. 1992. Oligonucleotide fingerprinting reveals various probe – dependent levels of informativeness in chickpea (Cicer arietinum). Genome 35: 1-11.
- WELSH J. and McCLELLAND M. 1991. Genomic fingerprinting using arbitrarily primed PCR and a matrix of pairwise combination of primers. Nucleic acids res. 19: 5275-5279.
- ZISCHLER H., NANDA I., SCHAFER R., SCHMID M. and EPPLEN J.T. 1989. Digoxyenated oligonucleotide probes specific for simple repeats in DNA fingerprinting and hybrodization in situ. Hum. Genet. 82: 227-233.