

العلاقة الوراثية للأشكال المورفولوجية الثلاثة من السيانوبكتريا المثبتة للنيتروجين
باستخدام تقنية ال-PCR

Genetic relation between three morphological states of N₂-fixing Cyanobacteria
by using PCR technique

باسمة احمد عبدالله *

حميد سلمان خميس *

رواء محمود داود حموشي

كلية علوم البيئة وتقاناتها/ جامعة الموصل
كلية التربية للبنات/ جامعة تكريت*
كلية العلوم/ جامعة الموصل**

Rawaa D. Hamoshi

Hammed S. Khamees*

Bassem A. Abdulla**

College of Environmental Science& Technology/ University of Mosul
College of Education for Women/ University of Tikrit*
College Science/ University of Mosul**

الملخص

أختيرت ثلاث عزلات نقية من السيانوبكتريا المثبتة للنيتروجين الجوي تمثل الأشكال المورفولوجية الثلاث، الأولى *Oscillatoria chlorina* كمثال للسيانوبكتريا الخيطية بدون حوصلة مغايرة، والثانية *Microcystis rubusta* كمثال للسيانوبكتريا أحادية الخلية، والثالثة *Anabaena spiroides* مثال للسيانوبكتريا الخيطية الحاوية على الحوصلة المغايرة، وقد نميت هذه العزلات على وسط ASM-1 الخالي من النيتروجين لمدة عشرون يوماً وتحت ظروف من شدة اضاءة (2500 lux) ودرجة حرارة 25م. تم عزل ال-DNA وتقدير تراكيزه ونقاوته التي تراوحت ما بين (1.3-1.8) وضبط تركيزه للحصول على حجم (100) مايكروليتر بتركيز 50 نانوغرام/مايكروليتر لكل عينة. استخدمت مؤشرات ال-RAPD-PCR لتحليل التباين الوراثي بين الأنواع الثلاثة للسيانوبكتريا قيد الدراسة للكشف عن العلاقة الوراثية ولتحديد البعد الوراثي بين هذه الأنواع ومن ثم استخدام هذه النتائج لإيجاد البصمة الوراثية. استخدم (11) بادئ في تفاعلات ال-RAPD-PCR وأعطت (10) منها تضاعف وامتلك البادئ OPC-50 اعلى عدد من الحزم اذ بلغت (20) حزمة في حين امتلك كل من البادئين OPA-18 و OPJ-13 اقل عدد من الحزم وهي (9) حزمة. تم إيجاد البعد الوراثي بين الأنواع الثلاثة والتي تؤكد وتدعم نتائج الاختبارات المظهرية والمجهريية والفلسجية وأظهرت نتائج التحليل الوراثي أنّ النوعين *Anabaena spiroides* و *Microcystis rubusta* هما الأقرب وراثياً في حين أنّ النوع *Oscillatoria chlorina* كان الأبعد وراثياً عنهما.

الكلمات المفتاحية: الأشكال المورفولوجية، السيانوبكتريا، PCR

Abstract

Three nitrogen fixing Cyanobacteria purified isolates were selected which express the three morphological states, first *Oscillatoria chlorina* as an example of filamentous non Heterocysts Cyanobacteria and second *Microcystis rubusta* as an example of Unicellular Cyanobacteria and third *Anabaena spiroides* as an example of filamentous Cyanobacteria containing a Heterocyst, these isolate were cultured on ASM-1 free nitrogen medium using light tension of lux (2500) and temperature of 25°C. Total DNA were isolated and found that its concentration varied between (1.3 to 1.8) the concentration was fixed in order to obtain that each 100 µl contains 50 ng/µl. Primers for RAPD-PCR were used to detect the genetic variation between the three genera of Cyanobacteria understudy and in order to diagnose the genetic relationship and to detect the genetic dimension between these isolates in order to use these results to found the genetic fingerprint. Eleven primers were used in RAPD-PCR reaction and 10 of them were positive. The OPC-05 gave the high number of bands (20 bands) while OPA-18 and OPJ-13 gave the lowest (9 bands). The genetic dimension between the three isolates were compatible with the morphological, microscopical and physiological results obtained as we found that *Microcystis rubusta* and *Anabaena spiroides* were closely related and *Oscillatoria chlorine* was far genetically.

Key words: morphological states, cyanobacteria, PCR

المقدمة

تعد السيانوبكتريا من الكائنات بدائية النواة Prokaryotes التي لها القابلية على عملية البناء الضوئي وانتاج الاوكسجين نظراً لاحتوائها على كلوروفيل A [1]، يقدر عمرها أكثر من 2.5 بليون سنة بالاعتماد على الصخور الرسوبية في العهد الاثري المتأخر [2] أظهرت المتحجرات أنّ اصلها قديم قد يصل إلى 3.5 بليون سنة، وتشابه المتحجرات الأثرية تلك الموجودة حالياً، والذي يؤدي إلى الاعتماد ببطء تطورها [3].

ظهرت في الآونة الأخيرة تقنية متطورة هي تقنية استخلاص الحامض النووي منقوص الأوكسجين DNA Extraction Techniques المعتمدة على كمية ال-DNA ثم تقنية بلمرة التفاعل المتسلسل PCR Polymerase-Chain Reaction [4] تُمكن

هذه التقانات الحصول على كمية كبيرة جداً من الـ DNA التي تفيد في كثير من المجالات منها الكشف عن الجين المسؤول عن إنتاج الـ ذيفان ومعرفة أو تحديد النوع الجيني لعينة غير معروفة ومنها يتم الحصول على معلومات حول التسلسل دون الحاجة لعملية الكلونة كذلك العلاقة الوراثية بين الأجناس ومدى قرابتها [5].

يهدف البحث الى تنقية وتشخيص ثلاث انواع من السيانيوبكتريا *Oscillatoria chlorina*، *Micrcystis rubusta* و *Anabaena spiroides* واستخلاص الـ DNA ثم تحديد مدى التباين الوراثي للأنواع الثلاثة وتحديد البصمة الوراثية لهذه الأنواع باستخدام تقنية بلمرة التفاعل المتسلسل PCR.

المواد وطرائق العمل

عزل وتشخيص السيانيوبكتريا

استخدم الوسط الانتقائي ASM-1 لتنمية السيانيوبكتريا [6] حيث اخذت عزلات غير نقيه وتمت تنقيتها بطريقة التخطيط Streaking method على الوسط الزراعي الصلب وطريقة التخفيف للوسط الزراعي السائل [7] وتم تشخيصها اعتماداً على [8،1].

تنمية أنواع السيانيوبكتريا

نميت الأنواع المعزولة بتلقيح حملة زرع إلى (100) سم³ من وسط ASM-1 كوسط انتقائي وحضن في حاضنة هزازة عند درجة 25م واضاءة (2500) Lux وتركت لمدة (2-3) اسبوع.

عزل الـ DNA Isolation

استخلاص الحامض النووي المنقوص الأوكسجين المجيني Genomic DNA Extraction

تم استخدام عدة عمل جاهزة من شركة Wizard® Genomic DNA Purification Kit وحسب تعليمات الشركة.

تقدير تركيز ونقاوة الـ DNA المستخلص

تم تقدير تركيز الـ DNA بقياس الامتصاصية لطيف الأشعة فوق البنفسجية باستخدام جهاز الامتصاصية spectrophotometer وعند الطول الموجي (260) نانوميتر، إذ خففت العينات (100) مرة باستخدام دارئ (TE) Tris-EDTA، حيث أخذ (20) مايكروليتر من الـ DNA المجيني وأضيف له (1980) مايكروليتر من الدارئ عند pH (8) ومزجت جيداً وقيست الامتصاصية عند الطول الموجي (260) نانوميتر واستخدم الدارئ كـ Blank لتفسير الجهاز، وتم حساب تركيز الـ DNA وفق المعادلة التالية:

تركيز الـ DNA مايكروغرام/سم³ = قراءة الامتصاصية لكل 1سم³ من العينة (260) × معكوس التخفيف (100) × 50. اما النقاوة فيتم تقديرها من:

حاصل قسمة قراءة الامتصاصية عند الطول الموجي (260) على حاصل قراءة الامتصاصية عند الطول الموجي (280) نانوميتر إذ ان افضل نقاوة تكون ما بين (1.8-2) [9].

تقدير الأوزان الجزيئية Estimation of molecular weight

قدرت الأوزان الجزيئية للـ DNA اعتماداً على المسافات التي قطعتها هذه الجزيئات في الهلام والتي تتناسب عكسياً مع أوزانها الجزيئية وباستعمال قطع من الـ DNA معروفة الوزن الجزيئي هي الدلائل الحجمية (Markers)، اذا استعمل الدليل الحجمي (DNA kbp (1 Lambda) وهو عبارة عن دنا غير مهضوم للعائلي لأمدا والمعزول من بكتريا *Escherichia coli* المصابة بهذا العائلي والذي استخدم كمؤشر للكشف عن الـ DNA المعزولة قيد الدراسة.

تفاعل البلمرة المتسلسل PCR باستخدام مؤشرات التفاعل العشوائي متعدد الاشكال لسلسلة الـ DNA (RAPD)

أخذت عينات الـ DNA لأنواع السيانيوبكتريا قيد الدراسة لاجراء اختبار الـ RAPD واستخدمت عدة عمل مجهزة من Accu power الدنا المعزولة قيد الدراسة وكما يأتي:

البادئات العشوائية Primers المستخدمة قيد الدراسة

استخدمت البادئات العشوائية الموضحة في جدول (1) ادناه والمجهز من شركة (Operon technologies) بهيئة مجفدة Lyophilized form، ولتحضير محلول العمل تم إذابة البادئات في ماء مقطر ومعقم بتركيز نهائي 5pmo/ul

جدول (1): اسماء وتسلسل البادئات المستخدمة في هذه الدراسة

ت	البادئ	تسلسله 3' → 5'	ت	البادئ	تسلسله 3' → 5'
1	OPA-18	AGGTGACCGT	7	OPJ-13	CCCACTACC
2	OPB-19	ACCCCGAAG	8	OPL-20	TGGTGGACCA
3	OPC-05	GATGACCGCC	9	OPM-20	AGTCTTGGG
4	OPE-16	GGTACTGTG	10	OPX-01	CTGGGCACGA
5	OPE-20	AACGGTGACC	11	OPQ-06	GAGCGCCTTG
6	OPH-14	ACCAGGTTGO			

اجريت عملية تضخيم الـ DNA المستخلص من السيانيوبكتريا كما في الخطوات التالية:

- 1- ضبط تركيز الـ DNA في كافة العينات المدروسة بالتخفيف بواسطة دارئ (TE) Tris-EDTA والمتكون من (10) ملي مولار Tris-HCL و 1 ملي مولار EDTA حضر بالماء المقطر ثم عدل الرقم الهيدروجيني الى (8) وعقم بالموصدة للحصول على التركيز المطلوب لاجراء تفاعلات الـ RAPD ويكون تقريباً (25-50) نانوغرام/مايكروليتر لكل عينة [10].
- 2- خليط التفاعل الرئيسي Master Mix Reaction الجاهز من الشركة في انبوية Eppendorff tube سعة (0.2) سم³، والذي يتكون من: انزيم بلمرة Taq polymerase DNA والقواعد النتروجينية ثلاثية الفوسفات dNTP₅ و Tris-HCl و KCl و MgCl₂.
- 3- أضيف لكل انبوية بندروف (12) مايكروليتر ماء مقطر ومعقم ومزج جيداً لإذابة المكونات.
- 4- أضيف البادئ العشوائي بمقدار (1) مايكروليتر ومزج جيداً.
- 5- أضيفت عينة الـ DNA بمقدار (2) مايكروليتر لكل انبوية بحيث يكون الحجم النهائي للمحلول داخل الانبوية (20) مايكروليتر.
- 6- نيد المحلول في الأنابيب في جهاز الطرد المركزي الصغير Microcenterfuge لمدة (3-5) ثانية لاتمام مزج مكونات التفاعل مع مراعاة ان يتم تحت ظروف معقمة تجنباً لحدوث التلوث وان توضع الأنابيب داخل الثلج اثناء العمل.
- 7- ادخلت أنابيب التفاعل الى جهاز المبلمر الحراري Thermocycler لاجراء التفاعل التضاعفي وباستخدام البرنامج المناسب للتضاعف والذيتم تطبيقه على التفاعلات الاحقة جميعها وكما هو مبين في جدول (2).

جدول (2): برنامج التفاعل التضاعفي المستخدم في جهاز المبلمر الحراري

عدد الدورات	المدة	درجة الحرارة
دورة واحدة	4 دقائق	95 م
دورة 45	دقيقة واحدة	93 م
دورة 45	45 ثانية	36 م
دورة 45	دقيقة واحدة	72 م
دورة واحدة	10 دقائق	72 م

8- بعد انتهاء وقت التفاعل رفعت الأنابيب من جهاز المبلمر الحراري وتم سحب (5) مايكروليتر من المحلول ومزجها مع (2-3) مايكروليتر من محلول التحميل .

9- تم تحميل المزيج في حفر هلام الأكاروز المحضر مسبقاً وبتركيز (1.2%) مع الدليل الحجمي DNA Ladder .

10- بعدها تم ترحيل العينات وذلك بتشغيل جهاز الترحيل لمدة (90-120) دقيقة.

11- تم صبغ الهلام بصبغة ايثيديوم برومايد لمدة (30) دقيقة مع التحريك مع تعريضه لمصدر الاشعة فوق البنفسجية وتصويره باستخدام كاميرا رقمية عالية الحساسية.

تقدير معامل التشابه الوراثي بين الأفراد المدروسة

تم تفسير البيانات إلى النظام الثنائي (1,0) حددت النسبة المئوية للتشابه عن طريق المقارنة بين العزلات المدروسة ضمن البرنامج الإحصائي Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System (NTSYS-Pc) [11] للحصول على مصفوفة التشابه Similarity matrix لأجل بناء المخطط الهرمي الشجري Dendrogram تبعاً لـ Unweighted Pair Group Method (UPGMA) using arithmetic Average [12] كأداة في نفس البرنامج الإحصائي.

لتحليل النتائج واستخراج البعد الوراثي اعتمدت الحسابات على معادلة [13].

بعد استخراج الأبعاد الوراثية بين الأنواع تم رسم مخطط التحليل التجمعي Dendrogram الذي يجسد المجاميع الوراثية التي تنتمي إليها هذه الأنواع وبذلك تحدد العلاقة الوراثية بينها.

النتائج والمناقشة

العزل والتشخيص Isolation and Diagnosis

اختبرت ثلاثة أنواع من السيانوبكتيريا ونقيبت باستخدام وسط ASM-1 السائل والصلب وتم تأكيد تشخيص الأنواع الآتية:

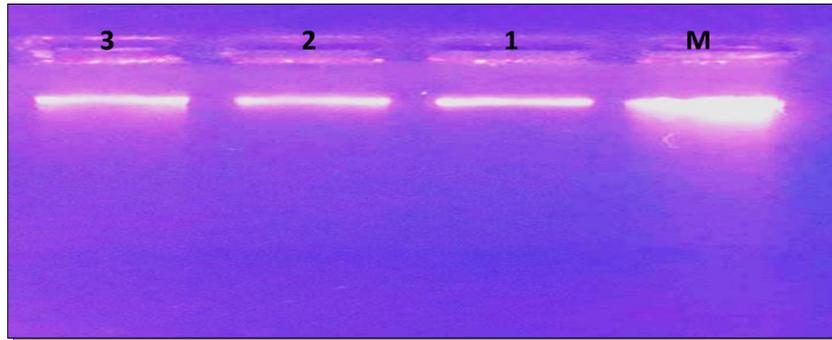
1- *Oscillatoria chlorina* وهي مثال للشكل الخيطي غير الحاوي على الحوصلة المغايرة.

2- *Microcystis rubusta* وهي مثال للشكل وحيد الخلية.

3- *Anabaena spiroides* وهي مثال للشكل الخيطي الحاوي على الحوصلة المغايرة.

عزل الدنا المجيني Isolation Genomic DNA

تم استخلاص الدنا المجيني من خلايا الأنواع الثلاثة للسيانوبكتيريا باستخدام عدة الاستخلاص المجهزة من شركة (Promega) وقِيم تركيزه ونقاوته التي تراوحت ما بين (1.3-1.8) اعتماداً على قراءة الامتصاصية للأشعة فوق البنفسجية باستخدام جهاز المطياف الضوئي Spectrophotometer عند الطول الموجي (260/280) نانوميتر ثم ضبط تركيز الدنا المعزول لجميع العينات إذ تم الحصول على حجم 100 مايكروليتر وبتركيز 50 نانو غرام/ مايكروليتر لكل عينة، ثم التأكد من التركيز بترحيل الدنا للأنواع الثلاثة من السيانوبكتيريا على هلام الأكاروز قبل استخدامه كقالب في تفاعل البلمرة المتسلسل PCR، شكل (1)



شكل (1): نتائج الترحيل الكهربائي للدنا المعزول من أنواع السيانوبكتيريا الثلاثة على هلام الأكاروز بتركيز (1%) و فرق جهد (3) فولت/سم (M) يمثل الدليل الحجمي القياسي للدنا غير المهضوم

المسار 1: الدنا المعزول من *Oscillatoria chlorina*

المسار 2: الدنا المعزول من *Microcystis rubusta*

المسار 3: الدنا المعزول من *Anabaena spiroides*

نتائج تفاعلات RAPD-PCR

أظهرت نتائج تفاعلات تضخيم الدنا العشوائي الـ RAPD للعزلات الثلاثة للسيانوبكتيريا وباستخدام 11 بادئ للحصول على مجموعتين رئيسيتين للبادئات المستخدمة:

المجموعة الأولى

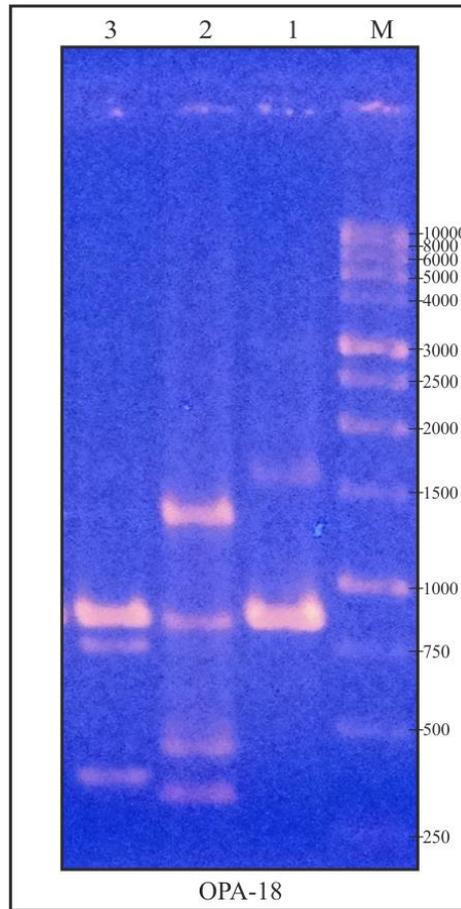
البادئات التي لم تغط أي حزمة ومنها بادئ واحد فقط وهو OPB-19 وقد يرجع السبب لعدم وجود موقع ارتباط مكمل للبادئ على شريط الدنا مما أدى إلى عدم قدرتها على الارتباط والتضاعف [14].

المجموعة الثانية

هي البادئات التي أظهرت حزماً متباينة الأعداد والمواقع بين الأنواع المدروسة والموضحة في جدول (3) إذ شملت هذه المجموعة البادئات التي اختلفت في اظهارها لحزم مميزة Unique bands أو غياب حزمة رئيسية من نوع معين ومن ثم تحديد البصمة الوراثية DNA Finger Print لكل نوع من الأنواع المدروسة.

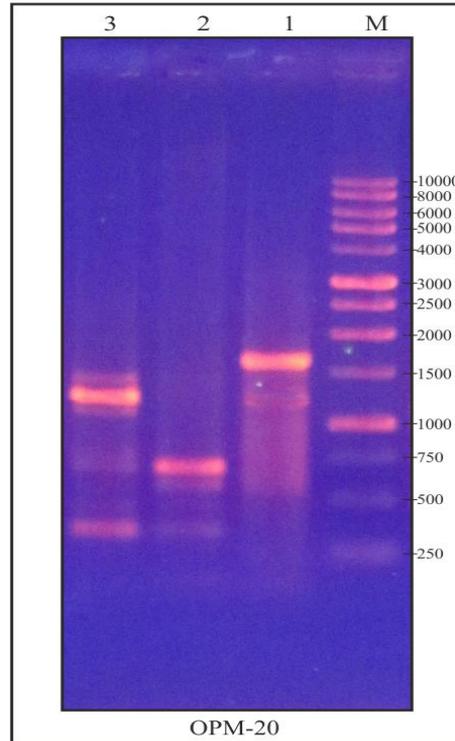
جدول (3): البادئات التي انتجت تضاعف

ت	البادئ	التسلسل 5 → 3
1	OPA- 18	AGGTGACCGT
2	OPC-05	GATGACCGCC
3	OPE-16	GGTGACTGTG
4	OPE-20	AACGGTGACC
5	OPH-14	ACCAGGTTGO
6	OPJ-13	CCACACTACC
7	OPL-20	TGGTGGACCA
8	OPM-20	AGGTCTTGGG
9	OPQ-06	GAGCGCCTTG
10	OPX-01	CTGGGCACGA



شكل رقم (2): حزم تضاعف الباديء OPA-18 بواسطة مؤشر RAPD-PCR للأنواع الثلاثة للسياطوبكتريا والمرحلة على هلام الاكاروز بتركيز 1.2%

M: تمثل الدليل الحجمي 1 kbp DNA Ladder
 المسار 1: الدنا المعزول من *Oscillatoria chlorina*
 المسار 2: الدنا المعزول من *Microcystis rubusta*
 المسار 3: الدنا المعزول من *Anabaena spiroides*



شكل (3): حزم تضاعف الباديء OPM-20 بواسطة مؤشر RAPD-PCR لأنواع الثلاثة للسايانوبكتريا والمرحلة على هلام الاكاروز بتركيز 1.2%

M: تمثل الدليل الحجمي DNA Ladder 1 kbp ؛ 1: *Oscillatoria chlorine*

المسار 1: الدنا المعزول من *Oscillatoria chlorine*

المسار 2: الدنا المعزول من *Microcystis rubusta*

المسار 3: الدنا المعزول من *Anabaena spiroides*

مناقشة نتائج تفاعلات RAPD-PCR

من خلال نتائج هذه الدراسة والتي تم التوصل اليها باستخدام 10 بادئات من مجموع 11 عشوائى Random Primers، يتضح وجود تباينات عديدة في المادة الوراثية DNA ما بين أنواع السايانوبكتريا المستخدمة في هذه الدراسة، وظهور أو عدم ظهور نتائج لبعض البادئات المستخدمة يعد من بين الأسس التي يتم على أساسها بناء التباينات بين الافراد [10،15]. كما أن أهمية عدم وجود مواقع معينة على دنا كائن معين مهم جدا وهو يعادل أهمية وجود مواقع ستنوضح فيما بعد بالحزم على هلام الاكاروز [16].

استغلت هذه الأسس في هذه الدراسة من خلال المجموعة الرئيسية الاولى التي شملت بادئاً واحداً فقط لم ينتج أي حزمة على هلام الاكاروز وهو OPB-19 ويمكن الاستفادة من هذا الباديء في معرفة أنواع اخرى لجنس *Oscillatoria* أو أنواع اخرى لجنس *Microcystis* أو أنواع اخرى لجنس *Anabaena* إذ إن عدم اعطائه نتيجة في تفاعلات RAPD-PCR فهذا يعني انه لا يمتلك مواقع ارتباط مكمل للباديء على شريط الدنا وبالتالي عدم قدرته على الارتباط والتضاعف [14].

وأشار Borovkova [16] إلى أن غياب الحزمة العامة Main band أو ما تسمى بالحزمة الغائبة Absent band تمثل مؤشراً لذلك الصنف وقد أظهر البحث حزم غائبة لأنواع السايانوبكتريا الثلاثة المدروسة والموضحة في جدول (4).

الأساس الثاني الذي يعتمد عليه مؤشر RAPD-PCR هو عدد الحزم التي يظهرها مجيب أي نموذج وبذلك فهي تمثل عدد المواقع المكمل للباديء ليرتبط بها.

اما الأساس الثالث الذي يعتمد في مؤشر RAPD-PCR فهو حجم القطعة المتضاعفة الذي يستند إلى البعد بين مواقع ارتباط الباديء على شريط الدنا القالب، إذ أن آلية ارتباط الباديء منذ الدورة الاولى بمواقع مكمل على شريطي الدنا القالب وبناء شريط جديد يمتد إلى ان يستوقفه موقع ارتباط آخر أو نهاية شريط الدنا القالب. لذا فإن المنطقة المحصورة بين موقع الارتباط هي التي ستمثل حجم القطعة المتضاعفة كون الباديء سيكرر ارتباطه بهذه المواقع في كل دورة، ليضيف قطعة دنا جديدة تعمل قالباً في الدورة اللاحقة، وبما ان تلك المواقع منتشرة على المجيب بشكل عشوائي وانها تتأثر بالعوامل الوراثية التي تحدث نتيجة الطفرات التلقائية أو المستحدثة فان ذلك ينعكس على البعد بين موقع وآخر [17].

اما شدة التآلق فهي Intensity الأساس الرابع الذي تعتمد في مؤشر RAPD-PCR، والتي تعكس الاختلاف في عدد نسخ تلك المواقع فكلما زادت شدة التآلق دلت على وفرة تلك المواقع [18].

وعلى الرغم من ان بعض البحوث لا تعتمد عليه لأن تراكيز الدنا تتراوح ما بين (25-50) نانوغرام إلا أنه أخذ بنظر الاعتبار في دراستنا حيث تم ضبط تركيز الدنا للأنواع المدروسة بشكل دقيق والبالغ (50) نانوغرام.

وقد تباينت الأنواع المدروسة في اظهارها للحزم المتألقة جدول (4)، إذ تحدث ظاهرة الحزمة المتألقة (Intensity) بسبب تكرار التضاعف في عدد من مواقع الارتباط ذات الوزن الجزيئي المتشابهة إذ يؤدي هذا إلى ظهورها بشكل حزمة متألقة على هلام الاكاروز التي يمكن ان يعتمد عليها كمقياس للتباين الوراثي في حالة ضبط تركيز الدنا [19].

كما أظهرت نتائج مؤشر RAPD-PCR نوعاً آخر من الحزم هي الحزم الرئيسية Main bands والتي ظهرت في ثلاثة من البادئات العشرة وهي OPA-18 و OPC-05 و OPE-20، إذ يعول على هذه الحزم في تحديد هوية النماذج المجهولة الاصل أو الفاقدة

للتصنيف لانها تمثل في أغلب الاحيان موقعاً يشترك به كل افراد الجنس الواحد أو النوع [20] ان انماط التضاعف اختلفت مع كل بادئ مستخدم مما ساعد في امكانية تطبيق تقانة الـ RAPD بهدف التأكد من الأنواع الثلاثة للسياونوبكتريا وتحديد بصمتها الوراثية. لوحظ في هذه الدراسة أن أكبر عدد من الحزم المتضاعفة كانت [20] حزمة للبادئ OPC-5 واقل عدد من الحزم المتضاعفة كانت (9) لكل من البادئ OPA-18 و OPJ-13 أما بقية البادئات فكانت عدد الحزم المتضاعفة تتراوح ما بين هذين الرقمين. ان اختلاف عدد الحزم المتضاعفة بين العينات الثلاث للسياونوبكتريا قد يعود لاختلاف المواقع التي يتعرف عليها البادئ ضمن المجين أو إلى عدد هذه المواقع الذي قد يعود إلى حدوث طفرة ضمن مجين الافراد المدروسة (حذف أو اضافة أو استبدال لأحدى النيوكليوتيدات المكونة لتتابعات الـ DNA).

كما اشتملت التباينات أيضاً اختلاف في الحجم الجزيئي للحزم المتضاعفة والذي تراوح ما بين (300) زوج قاعدي عند استخدام البادئ OPM-20 والذي يمثل اقل وزن جزيئي للحزم الناتجة و(5000) زوج قاعدي عند استخدام البادئ OPE-20 والذي يمثل اكبر وزن جزيئي للحزم الناتجة. ان هذا التباين بين الرقمين يعكس الاختلاف في البعد ما بين مواقع ارتباط البادئ ذو التتابع النيوكليوتيدي المكمل لشريط الـ DNA القالب لعزلات السياونوبكتريا [19].

وان عدم ظهور نتائج لبعض البادئات المستخدمة يعد من بين الأسس التي على اساسها كشفت عن وجود التباينات بين الافراد [21,10].

جدول (4): اعداد وانواع حزم الدنا الناتجة من تضخيم الدنا المجيني للسياونوبكتريا باستخدام عدد من البادئات العشوائية

رمز البادئ	عدد الحزم الكلي	ظاهرة فريدة	غائبة	عامة	متألفة
OPA-18	9	6	-	1	3
OPC-05	20	11	3	1	4
OPE-16	11	5	3	-	1
OPE-20	12	2	1	2	3
OPH-14	12	12	-	-	2
OPJ-13	9	5	2	-	3
OPL-20	13	5	4	-	4
OPM-20	10	4	3	-	3
OPQ-06	14	10	2	-	3
OPX-01	13	11	1	-	6

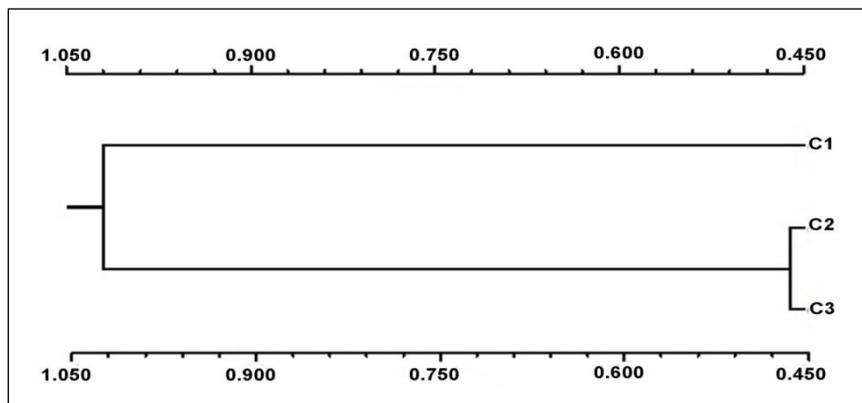
تقدير البعد الوراثي بالاعتماد على نتائج الـ RAPD:

تم تقدير البعد الوراثي Genetic distance بين العينات الثلاث باستخدام البرنامج الوراثي (NTSYS- PC. Version 1.7) الذي يستند على وجود الحزم المشتركة بين كل نوعين من أنواع السياونوبكتريا والذي يعتمد في تحليلاته على معادلة (13). يوضح جدول (5) البعد الوراثي بين الأنواع بالاعتماد على نتائج مؤشر RAPD- PCR حيث تراوحت القيم بين (0.5587 - 0.9806) وتبين أن أقل بعد وراثي كان بين النوعين *Microcystis rubusta* و *Anabaena spiroides* (0.5587) وهذا يدل على أنهما يمتلكان أكبر نسبة تشابه في المادة الوراثية بالاعتماد على البادئات المستخدمة كما أنهما قد اشتراكا بأعلى عدد من الحزم وهذا يعزز بعض النتائج التي تم الحصول عليها في هذه الدراسة.

جدول (5): مصفوفة التشابه للبعد الوراثي بين الأنواع الثلاثة للسياونوبكتريا حسب نتائج RAPD-PCR

	<i>Osillatoria chlorina</i>	<i>Microcystis rubusta</i>	<i>Anabaena spiroides</i>
1	0.00000000000000		
2	0.980669788810087	0.00000000000000	
3	0.976191331780465	0.558732301823659	0.00000000000000

واستثمرت نتائج وقيم البعد الوراثي المستخرجة بنظام (UPGMA) على استنباط العلاقة الوراثية التي تربط نماذج الدراسة وكانت واضحة في شكل (4).

C1: *Oscillatoria chlorina* ; C2: *Microcystis rubusta* C3: *Anabaena spiroides*

شكل (4): العلاقة الوراثية بين أنواع السياونوبكتريا تبعاً لمؤشر RAPD-PCR

وبالاعتماد على قيم البعد الوراثي قسمت الأنواع إلى مجموعتين رئيسيتين:

المجموعة الرئيسية الأولى

ضمت هذه المجموعة النوع الأول *Oscillatoria chlorina* فقط كونه الأبعد وراثياً عن النوعين الآخرين أي أنه اشترك معهم بأقل عدد من الحزم الناتجة عن تفاعلات RAPD-PCR وهذا يوافق بعض نتائج الاختبارات والفحوصات الكيموحيوية التي اجريت في بحوث سابقة مثل معدل النمو وإنتاج الكربوهيدرات والبروتينات وإنتاج ذيفان Microcystin.

المجموعة الرئيسية الثانية

ضمت هذه المجموعة النوعين *Anabaena spiroides* و *Microcystis rubusta* حيث كانا هما الأقرب وراثياً لبعضهما من النوع الأول نظراً لاشتراكهما في أعلى عدد من الحزم فضلاً عن اشتراكهما في الاختبارات الكيموحيوية التي اجريت في دراسات سابقة.

المصادر

1. Willey, J.M., Sherwood, L.M., and Woolverton, C.J. (2011). Prescott's Microbiology 8thed. Mc Graw-Hill companies, Inc.
2. Sheridan, P. P., Freeman, K. H. and Brenchley, J. E. (2003). Estimated minimal divergence times of the major Bacterial and Archaeal phyla. Geomicrobiology Journal. 20: 1-14.
3. Briand, E., Yéprémian. C., Humbert, J.F., Quiblier, C. (2008). Competition Between Microcystin- and Non-microcystin-Producing *Planktothrix agardhii* (Cyanobacteria) Strains under Different Environmental Conditions. Environmental Microbiology. 10:12:3337-3348.
4. Ouellette, A. J. A. and Wilhelm, S. W. (2003). Toxic Cyanobacteria: The Evolving Molecular Toolbox. Frontiers in Ecology and the Environment. 1(7): 359-366.
5. Nubel, U., Garica-pichel, F. and Muyzer, G. (1997). PCR Primers to Amplify 16S rRNA Genes from Cyanobacteria, Applied and Environmental Microbiology. 63(8):3327-3332.
6. Gallon, J.R., Larue, T.A. and Kruttsch, W.G. (1978). Photosynthesis and nitrogenase activity in the blue-green algae gloeocapsa. Can. J. 20:1633-1937.
7. Stein, J.R. (1973). Handbook of phycological methods. Cambridge Univ. press. Cambridge, Uk. Pp.448.
8. Desikachary, T.V. (1959). Cyanophyta Indian. Council of agricultural research. New Delhi, India, pp.686
9. Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989). Molecular cloning laboratory. New York, USA.
10. Williams, G.K., Kubelik, A.R., Lirakj, K.J., Rafalski, A. and Tingey, S.V. (1990). DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic acids Res. 18: 6531-6535
11. Rohlf, F.J. (1993). Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis system. Version 180 Exeter software. Setauket. N.Y.
12. Sneath, P.H.A. and Sokal. (1973). Numerical taxonomy-the principles and practice of numerical classification. W.H. Freeman and Son Co., San Francisco
13. Nei, M. and Li, W.H. (1979). Mathematical Model For studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proc. Natl. Acad. Sci, USA. 76:5269-5273.
14. Mahenthaling, E., Campbell, E., Foster, J., Lam, J.S. and Speert, D.P. (1996). Random amplified polymorphic DNA typing of *P.aeruginosa* isolated recorded from patients with cystic fibrosis, J. Clin. Microbial. 34(5):1129-1135
15. Huang, M.C., Horngl, Y.M., Huang, H.L., Sinly, Y. and Chene, M.J. (2003). RAPD Finger printing for species identification of animals. Asian-Aust. J. Anim. Sci. 16(10):1406-1410.
16. Borovkova, I.G., Jine, Y., Steffenson, B.J., Kilian, A., Blake, T.K. and Kleinhofs, A. (1997). Identification and mapping of a leaf rust resistance gene in barley line Q 21861. Genome. 40:236-241
17. Tingey, S.V. and Del-Tufo, J.P. (1993). Genetic analysis with RAPD Markers. Plant Physiology. 101:349-352
18. Bardakci, F. (2001). Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. Turh. Journal . Biol. 25 : 185-196
19. العاصي، عقيل حسين علي. (2002). استخدام مؤشرات الدنا في تحليل التنوع الوراثي للشعير (*Hordum vulgare* L.) المزروع في العراق. اطروحة دكتوراه، كلية التربية ابن الهيثم، جامعة بغداد.

20. Penner, G.A., Clarke, J., Bezte, L. and Leisle, D. (1995). Identification of RAPD Mrkers linked to a gene governing cadmium up take in durum wheat. *Genome*. 38:543-547.
21. Mullis , K.B. and Faloona, F. (1987). Specific Synthesis of DNA *invitro* via polymerase catalyzed chain reaction, *Methods Enzymol*. 155:335.