مجلة المختار للعلوم
مجلد (31)، العدد (01)، السنة (2016) 73-91
جامعة عمر المختار، البيضاء، ليبيا
رقم ايداع دار الكتب: 280\2013\بنغازي

التعدد الشكلي لأطوال القطع المضخمة AFLP

خالد المبروك المير[1*]، محمد طاهر البكوري[2]

[1]قسم البستنة، كلية الزراعة، جامعة عمر المختار، البيضاء.
[2]قسم الانتاج الحيواني، كلية الزراعة، جامعة سبها، سبها.
[*]البريد الكتروني: elmeer@gmail.com

DOI: https://doi.org/10.54172/mjsc.v31i1.213

الملخص

تقنية التعدد الشكلي لأطوال القطع المضخمة AFLP من الواسمات الجزيئية المهمة في دراسة البصمة الوراثية والتنوع الوراثي، وهذه التقنية تعتمد على الكشف عن حزم الحمض النووي DNA المقطوعة بإنزيمات التحديد والمضخمة بواسطة تفاعل البلمرة المتسلسل PCR، حيث يمكن فصل الحزم بطريقة الهجران الكهربائي ومشاهدتها على هلام عديد الأكلاراميد أو بواسطة الطرق الحديثة المعتمدة على الخاصية الشعرية وصبغات الفلورسنت. هذه الدراسة استعراضية تعطي معلومات عن فكرة الواسمة و تطبيقاتها و آلية عملها مع التطرق إلى مزاياها وعيوبها.

مفتاح الكلمات: التنوع الوراثي، الواسمات الجزيئية، إنزيمات التحديد و البادئات الإنتقائية.

المقدمـة

تعتبر تقنية التعدد الشكلي لأطوال القطع المضخمة AFLP من الواسمات التي تعتمد على القطع بواسطة إنزيمات التحديد ثم التضخيم بواسطة المدوّر الحراري، الذي يؤمن الحصول على الكمية الكافية من الحمض النووي DNA لدراسته ومقارنته دون الحاجة لعملية الوسم بالنيوكليوتيدات المشعة التي كانت ضرورية في حالة استخدام الهضم الأنزيمي لوحده (Vos وآخرون، 1995). تم اختراع أساس هذه التقنية عن طريق Zabeau وVos من جامعة Wageningen الزراعية بهولندا ومُنِحا عليها شهادة براءة سنة 1993م من المكتب الأوروبي لبراءة الاختراعات (Zabeau و Vos، 1993)، ثم صدر بحث لـ Vos وآخرون سنة (1995م)، تم فيه تفصيل تقنية AFLP واستخدامها كبصمة وراثية للحمض النووي DNA.

تاريخ الاستلام: اغسطس 21، 2015؛ تاريخ القبول: فبراير 15، 2016.

© للمؤلف (المؤلفون)، يخضع هذا المقال لسياسة الوصول المفتوح ويتم توزيعه بموجب شروط ترخيص إسناد المشاع الإبداعي CC BY-NC 4.0

وتعتمد واسمة AFLP على فكرة دمج مزايا نوعين من الواسمات الجزيئية وهما واسمة الRFLP والـ RAPD (Jonah وآخرون، 2011) مما يتيح الحصول على أكبر عدد من التباينات الشكلية والذي هو ناتج بالأساس من عملية قطع الحمض النووي إلى قطع متعددة الأطوال والأشكال وذلك بواسطة إنزيمات التحديد بناءً على فكرة واسمة RFLP إضافة إلى إمكانية الحصول على نفس النتائج عند تكرار نفس التجربة مما يمنح هذه الواسمة صفة الثبات وهي من المميزات المهمة في دراسة التحليل الوراثي للكائنات الحية، كما أن فكرة واسمة RAPD تقوم بعملية تضخيم هذه القطع المتباينة في وقت قصير وبكميات كبيرة عن طريق تفاعل البلمرة المتسلسل PCR مما يمنح هذه الواسمة السرعة والدقة.

تنتج هذه التقنية قِطعاً من الحمض النووي DNA متضاعفة بواسطة بادئات خاصة بالهضم التحديدي Restriction digestion لجينوم الكائن المراد دراسته وبالاعتماد على اختلاف ترتيب النيوكليوتيدات تعطي هذه التقنية البصمة الوراثية لأى كائن حي ومن أي مصدر دونما حاجة مسبقة لمعرفة تتابعات حمضه النووي DNA، وقراءة البيانات بهذه الطريقة تعتمد على مبدأ وجود أو عدم وجود مواقع الجينات بدلاً من تحديد موقعها أو طولها، حيث تعتمد الطريقة على هضم الحمض النووي بإنزيمات التحديد وربط ملائمات Adaptors على قطع DNA ثم مضاعفة تلك القطع ويمكن تضخيم أكثر من 100 قطعة Fragment لكل توليفة بادئات مستخدمة في الإختبار، وبذلك يتم الحصول على معلومات واسعة جداً بحسب تعدد البادئات المستخدمة، وتمثل كل قطعة تم تشخصيها بهذه الطريقة موقعاً جينياً مميزاً عن غيره، مما يمكن واسمة AFLP من إنتاج أكبر عدد من التعدد الشكلي Polymorphism (الساهوكي، 2006؛ حسين، 2012).

تطبيقات تقنية AFLP

مجال النبات والحاصلات الزراعية: تستخدم واسمة AFLP في عدد كبير من الدراسات والأبحاث، فقد استخدمت في دراسة التنوع الوراثي Genetic diversity، وفي إنشاء خرائط الارتباط الوراثي لعدد من الأنواع النباتية والمحاصيل الزراعية (Becker وآخرون، 1995)، و في تحليل الصفات الوراثية الكمية في بعض المحاصيل الحقلية (Powell وآخرون، 1997)، و في تحديد مواقع مقاومة الذبول الذي يسببه فيوزاريم الأوعية (Hamwieh وآخرون، 2005)، وفي توضيح العلاقات الوراثية بين وضمن الأنواع النباتية المختلفة (Ozkan وآخرون، 2005؛ Sasanuma وآخرون، 2004)، وفي تحديد درجة النقاوة والتماثل الوراثي وتتبع الإنعزالات الوراثية في خطوط تهجين نبات الشعير (Oleszczuk وآخرون، 2002)، وفي دراسة التركيب الوراثي وتحديد اماكن الطفرات التي تميز الاختلافات بين النسل في أشجار العنب (Scott وآخرون، 2000؛ Zulini وآخرون، 2005)، وفي رسم الخرائط الوراثية لبعض اشجار الغابات ومنها شجرة الحور *Populus deltoids* (Wu وآخرون، 2000)، كما استخدمت واسمة AFLP في التفريق بين 18 صنف من نخيل التمر في العراق وقد

أظهرت قدرة فائقة في تقدير العلاقة الوراثية بين هذه الأصناف (Jubrael وآخرون، 2005)، كما تم استخدام هذه الواسمة كذلك في الكشف عن التباينات الوراثية لنباتات النخيل الناتجة من زراعة الأنسجة ومدى الاختلاف بينها وبين الآباء والتي قد تحدث بها طفرات تجعلها غير مطابقة للصنف الأصلي (Diaz وآخرون، 2003)، كما استعمل هذه الواسمة Griffiths و Orr (1999)، في دراسة التعبير الجنسي في الكائنات الحية وتم الحصول على بعض المؤشرات Markers يمكنها التفريق بين الجنسين خصوصاً في المراحل المبكرة والتي يصعب فيها التفريق وهذا يوفر على الباحثين في مجال التربية والتهجين وقتاً وجهداً كبيرين، كما استعملت في دراسة التباين الوراثي في الحمضيات (Dorji و Yapwattanaphun، 2015)، وفي التعرف على المؤشرات الوراثية المصاحبة لبعض صفات ثمار الزيتون (Ipek وآخرون، 2015)، وفي دراسة الإختلافات الوراثية لنباتات الزينة (حسين، 2012).

مجال الكائنات الدقيقة والأمراض النباتية: إن مراقبة صحة النبات واكتشاف الأمراض في أوقات مبكرة من الأمور المهمة التي تقلل من الخسائر وتعتبر الواسمات الجزيئية المعتمدة على تضخيم الحمض النووي مثل واسمة AFLP من الأدوات الأساسية والمهمة في التشخيص والتعرف والتفريق بين سلالات وأنواع كثير من المسببات المرضية (Martinelli وآخرون، 2015)، فقد استخدم خاروف وآخرون (2012)، و Benslimane وآخرون (2013) واسمة AFLP في تعريف سلالات الفطر المسبب لمرض الصدأ على القمح حيث جمعت سلالات تنتمي إلى مناطق جغرافية متقاربة وتم تحديد نسبة القرابة الوراثية وأظهرت واسمة AFLP توافق في النتائج بين تعريف السلالات اعتماداً على رد فعل الأصناف التفريقية مع اختبارات المادة، كما تم بواسطة واسمة AFLP رسم موقع المورث المسئول عن مقاومة مرض الصدأ على الكروموسوم وتتبعه في الجيلين الثاني والثالث (Zhang وآخرون، 2015)، وفي تحديد مورث المقاومة لمرض البياض الدقيقي في هجين الشعير (السيد وآخرون، 2002)، وللتفريق ين أنواع الفيوزاريوم المسبب لمرض عفن الجذور في نبات القمح (El–Khalifeh وآخرون، 2009). واسمة AFLP استخدمت أيضاً في دراسة الفروق بين سلالات البكتيريا وذلك لمعرفة المناسب منه لصناعة الأجبان (Karahan وآخرون، 2010)، كما تم التعرف على 147 سلالة من البكتيريا تتبع لنفس النوع عن طريق واسمة AFLP وهي تفيد في مجال علم الأوبئة (Janssen وآخرون، 1996).

مجال علم الحيوان والإنتاج الحيواني: تستخدم واسمة AFLP على نطاق واسع في دراسة التباين الوراثي وشجرة النسب في النباتات ولكنها استخدمت في الأنواع الحيوانية و الثدييات بنسبة أقل، حيث تمكن Dasmahapatra وآخرون (2009)، من دراسة 23 نوع من حيوانات الفقمة (أسد البحر)، وتحصلوا على 310 مؤشر يمكن من خلالها التعرف على التباين بين هذه الأنواع ورسم شجرة القرابة بين الأنواع وداخلها، كما

استخدمت في دراسة التنوع الوراثي لسلالات الماعز في البانيا (Hoda وآخرون، 2012)، وفي دراسة الإختلافات بين سلالات الأبقار الأوربية عن طريقة البصمة الوراثية (Negrini وآخرون، 2007)، وفي رسم الخرائط الجينية في بعض سلالات الخيول (Caetanoet وآخرون، 1999)، وفي دراسة التنوع الوراثي لسلالات الدواجن الصينية ومقارنتها مع السلالات الفرنسية (Gao وآخرون، 2008)، كما تم استخدام البصمة الوراثية بواسطة واسمة AFLP في دراسة التباين الوراثي بين نوعين من الأسماك في اندونيسيا (Wang وآخرون، 2000)، و تم استخدامها كمؤشر للتعرف على الجنس في بعض سلالات الأسماك الصينية (Rao وآخرون، 2012).

الخطوات الأساسية لتقنية AFLP

1. عملية استخلاص الحمض النووي DNA

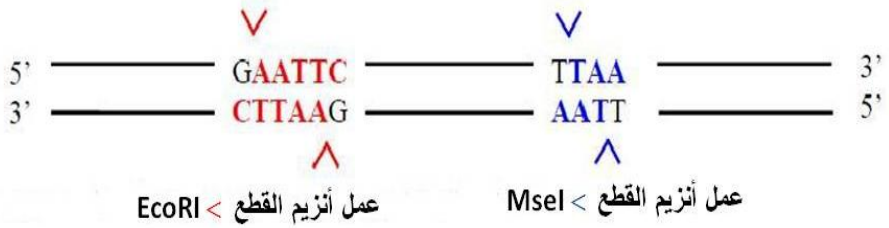
حيث يلزم لتقنية AFLP أن يكون الحمض النووي المستخلص ذو تركيز عالي ودرجة نقاوة جيدة (Solé، 2003) والتي من أجلها يتم اختيار طريقة الاستخلاص المناسبة للكائن المراد دراسته وللجزء الذي تؤخذ منه العينية حتى نتحصل على الحمض النووي بالمواصفات المطلوبة من التركيز والنقاوة، علماً بأنه توجد عدة طرق لاستخلاص الحمض النووي من انسجة الكائن الحي سواءً كان نباتاً أو حيواناً أو من الكائنات الدقيقة ولكل طريقة استخلاص توجد محاليل كيميائية تختلف عن الطريقة الأخرى، وبما أن واسمة AFLP تعتمد على إنزيمات القطع وعلى تفاعل البلمرة المتسلسل والذي يعتمد على انزيم البناء، فقد تتأثر نتائج الواسمة تبعاً لطريقة الإستخلاص (Benjak وآخرون، 2006).

2. عملية تقطيع الحمض النووي DNA

وذلك باستخدام نوعين مختلفين من إنزيمات القطع أو التحديد، والتي تعزل من عدة انواع من البكتيريا، حيث تستخدمها كوسيلة للدفاع عن نفسها حين تهاجمها الفيروسات، فتقوم هذه الإنزيمات بالتعرف على تتابعات محددة على الحمض النووي وتكسر الأواصر الفوسفاتية ثنائية الاستر التي تربط النيوكليوتيدات المتجاورة في الموقع المحدد التي تعرفت عليه، حيث لكل إنزيم قطع موقع محدد على شريط الحمض النووي فينتج عن ذلك القطع نهايات لزجة لتسّهل مهمة لصقها مرة أخرى مع التتابعات المتممة لها في مرحلة اللحام.

ويستخدم في تقنية واسمة AFLP نوعين من إنزيمات التحديد احدهما يمتاز بالقطع عالي التكرار Frequent Cutter حيث يحدد أو يقطع أكبر عدد من القطع وهو إنزيم MseI لأنه يقطع في تتابعات قصيرة وهي 4 قواعد

والإنزيم الأخر يتخصص بالقطع قليل او نادر التكرار Rare Cutter ويحدد أقل عدد من القطع لأن يقطع في تتابعات أطول وهي 6 قواعد، كما في الشكل رقم (1) وبالتالي إحتمالية وجود هذه القواعد الـ 6 مرتبة احتمالية قليلة، وهو إنزيم EcoRI (Solé، 2003).



شكل 1. اماكن قطع أنزيمي التحديد EcoRI المتخصص في 6 قواعد، وإنزيم التحديد MseI المتخصص في 4 قواعد فقط.

قد تستعمل إنزيمات أخرى مثل PstI وغيرها، وذلك لكي تناسب تقنية واسمة AFLP بعض الأجناس أو الأنواع الأخرى، فمثلاً يتم تغيير إنزيم التحديد MesI ويستعمل بدلاً منه TruII كما ذكر Gustavo وآخرون (2006)، في تجربة عن النحل كما يمكن أن يتم تغيير MesI ويستعمل بدلاً منه Bgl II كما قام بذلك Masumu وآخرون (2006)، في تجربة عن الصفات الوراثية لطفيليات مسببة للأمراض تصيب الأبقار وغيرها من الحيوانات.

الإنزيم الذي يحدد عدد كبير من القطع MseI ينتج عنه قطع صغيرة متباينة ذات وزن جزيئي صغير والتي بدورها تتضخم بصورة جيدة وتعطي حجم مناسب في عملية الفصل على الهلام بينما الإنزيم الذي يحدد عدد قليل من القطع EcoRI والكبيرة نسبياً يقلل من عدد القطع المضخمة (Solé، 2003). وفي هذه المرحلة يتم اجراء هضم كامل للحمض النووي DNA أي يتم تقطيعه بواسطة الإنزيمات المضافة، فنتحصل في نهاية عملية الهضم على ثلاثة أنواع من القطع، تلك الناتجة عن التحديد بالأنزيم الأول فقط، وتكون نهايتي القطعة من الجهتين مقطوعة بإنزيم واحد MseI/MseI وهو انزيم عالي التكرار وتشكل 90% من مجموع قطع الحمض النووي DNA كما ذكر Vos وآخرون (1995)، وكذلك Levin (2008).

النوع الثاني هي القطع الناتجة من القطع بالإنزيم الثاني فقط حيث تكون نهايتي القطعة من الجهتين مقطوعة بإنزيم واحد EcoRI/EcoRI وهو أنزيم قليل التكرار وتشكل ما يقارب 3.5% من مجموع قطع الحمض النووي DNA (Vos وآخرون، 1995؛ Levin، 2008). والنوع الثالث هي القطع الناتجة من القطع بالإنزيمين معاً

الأول والثاني أي ذات نهايتين مختلفتين Rare/Frequent Cutter Fragments وتكون القطعة بأحد طرفيها نيوكليوتيدات تمثل جزء من مقطع الأنزيم الأول ومن طرفها الثاني جزء من مقطع الأنزيم الثاني EcoRI/MseI وتشكل ما يقارب 6.5% من مجموع قطع الحمض النووي DNA (Vos وآخرون، 1995؛ Levin، 2008)، وهذا النوع الذي ترتكز عليه تقنية الواسمة AFLP لأنه سيقلل الحاجة إلى زيادة عدد النيوكليوتيدات الإضافية للبادئات المستخدمة، كما أنه يزيد من احتمال وجود تباين بين القطع الأمر الذي يزيد من كفاءة التقنية ويوفر أعداد كبيرة من مؤشرات التباين باستخدام توليفات قليلة من البادئات (أبوالجدايل، 2014).

إن استخدام انزيمين مختلفين في التقطيع في آن واحد يمتاز بفوائد، منها أن الإنزيم ذو القطع عالي التكرار ينتج قطعاً من DNA صغيرة تكون مناسبة لعملية التضخيم اثناء التفاعل البلمرة المتسلسل PCR ومناسبة في عملية الفصل بالهجران الكهربائي على هلام البولي اكرلامايد، لأنه ذو مسام صغيرة ولا يتناسب مع القطع الكبيرة، كما أن أعداد القطع المضخمة سيكون كبير جداً ولا يمكن الاستفادة منها لظهورها على هلام الفصل بشكل مسحة طويلة، فلذلك يتم تقليلها بواسطة الإنزيم الثاني قليل التكرار، وينتج من استخدام الإنزيمين معاً في حالة هضم DNA جينوم النبات قطعاً بأحجام تتراوح من 50 إلى 2000 زوج قواعد (Vos وآخرون، 1995؛ Saunders وآخرون، 2001)، كما ان استخدام إنزيمين للقطع يمكننا من أن نوسم أو نعلم سلسلة واحدة من الخيط المزدوج لقالب DNA في تفاعل PCR وهذا يمنع حدوث عملية المزاوجة في الهلام بسبب عدم تساوي حركة القطع المزدوجة بعد التضخيم، إضافة إلى أن استخدام إنزيمين للتحديد مختلفين يعطي مجال واسع لعملية تحوير وتعديل عدد القطع المضخمة ويمكننا من الحصول على عدد كبير من التباينات في البصمة الوراثية عن طريق اختلاف التوليفات بعدد قليل من البادئات (Vos وآخرون، 1995).

3. عملية لحام الملائمات Adapters Ligation

تعتبر هذه المرحلة أساسية في تقنية واسمة AFLP حيث يتم استخدام ملائمات Adapters قصيرة التتابعات النيوكليوتيدية تتكون من زوج من الأشرطة Double strands وتتكون تتابعاتها القصيرة من جزئين هما التتابعات الأساسية Core sequence وهي تتابعات معروفة يتم تحضيرها صناعياً قد تصل إلى 20 نيوكليوتيدية وتستخدم لاحقاً كتتابعات متممة للبادئة في عملية التضخيم عن طريق تفاعل PCR في المدوّر الحراري (Vos وآخرون، 1995)، ثم التتابعات المكملة لأنزيم القطع كما في الشكل رقم (2). ويتم لصق أو لحام هذه الملائمات بواسطة أنزيم اللصق Ligation إلى طرفي القطع المهضومة وذلك لتهيئتها إلى عمليات التضاعف اللاحقة (Solé، 2003)، وبناء عليه فالملائمة محددة ومعروفة التتابع وذات نهايتين لزجتين منزوعتي الفوسفات،

تركيب الملائمة EcoRI

5-CTCGTAGACTGCGTACC
CATCTGACGCATGGTTAA-5

تركيب الملائمة MseI

5-GACGATGAGTCCTGAG
TACTCAGGACTCAT-5

شكل 2. الملائمة EcoRI والملائمة MseI ومكوناتهما من التتابعات الأساسية والمكملة لإنزيمي القطع.

لزجتين منزوعتي الفوسفات، تتوافق مع تتابعات موضع إنزيم القطع سواء EcoRI أو MseI. في الغالب عملية القطع واللحام، أي قطع الحمض النووي بإنزيمي القطع EcoRI أو MseI ثم عملية لحام الملائمات مع قطع الحمض النووي المحددة، تحدث في تفاعل واحد، وينتج عن عملية لحام الملائمة مع قطع الحمض النووي المحددة تغيير في تتابعات موقع القطع وذلك لمنع إنزيم القطع من إعادة قطع الحمض النووي مرة أخرى بعد عملية لصقها ولحامها مع الملائمة (Solé، 2003).

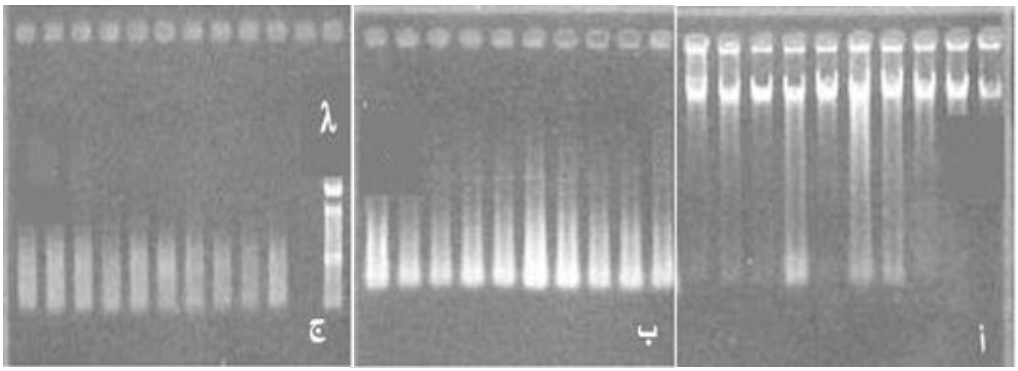
وتعتمد عملية لصق أو ربط قطع DNA على فعالية انزيم لحام الحمض النووي DNA Ligase الذي يتصف بقابليته على لحم الكسور في العمود الفقري لجزئية DNA عن طريق اعادة بناء الاواصر الفوسفاتية ثنائية الاستر Phosphate diester bonds وذلك بين مجموعة الهيدروكسيل OH في النهاية 3- لإحدى النيوكليوتيدات ومجموعة الفوسفات PO4- في النهاية 5- للنيوكليوتيدة المجاورة و ذلك لربط سلسلة واحدة من الشريط أما السلسلة الثانية فتربط نتيجة لنشاط انزيم البلمرة Tap DNA polymerase الذي يقوم بملء الفراغ الحاصل بين قطع المكيفات وسلسلة DNA المجاورة (أبوالجدايل، 2014).

4. مرحلة التضخيم التمهيدي Preamplification

في هذه الخطوة يتم تضخيم قطع الحمض النووي DNA التي تم تحديد نهايتها بإنزيمي القطع المختلفين وربطت مع الملائمات المتوافقة معها باستخدام المدوّر الحراري وعن طريق تفاعل البلمرة التسلسلي PCR ويستخدم فيها بادئات خاصة تحتوي على تتابعات مكملة لتتابعات الملائمة المعروفة مسبقاً بالإضافة إلى تتابعات مكملة لموقعي القطع الإنزيمي (Solé، 2003).

وتكمن اهمية هذه المرحلة في استبعاد قطع الحمض النووي DNA التي لا تتوفر فيها شروط القطع والالتحام لعدم وجود مواقع الارتباط بها من مزيج التفاعل وكذلك استبعاد القطع صغيرة الحجم والناتجة (على الأرجح) من إنزيم القطع عالي التكرار التي تشكل 90% من العدد الكلي الناتج من عملية التقطيع، وذلك من خلال استخدام درجة حرارة التحام عالية High Annealing Temperature لان البادئات الملائمة لهذه القطع تتطلب درجات التحام واطئة وهي أقل من درجة التحام البادئات الملائمة لقطع DNA ذات الاحجام الأكبر وبذلك تكون القطع الصغيرة أقل كفاءة من الالتحام مقارنة بالقطع الأخرى (Vos وآخرون، 1995؛ أبوالجدايل، 2014).

يمكن استخدام خطوة إضافية لتنقية الحمض النووي وإزالة القطع ذات النهاية MseI/MseI وذلك بإضافة البايوتين إلى بروتين الحمض النووي لملائمة EcoRI وتسمى العملية Biotinylation ثم يتم جذبها بواسطة حبيبات الستربتافيدين Streptavidin beads فيتم جذب القطع التي تحوي على EcoRI ويتم التخلص من القطع الأخرى (Vos وآخرون، 1995)، وتعرف هذه الخطوة بمرحلة التضخيم التمهيدي، الذي يسمح بالإختيار الأول للقطع بواسطة الملائمات المختلفة من الجهتين وإضافة إلى تتابعات الملائمة يتم زيادة قاعدة نيوكليوتيدية واحدة للبادئة، والتي تسبب في تقليل عدد القطع المضخمة إلى الربع، وإذا أضيفت قاعدة واحدة للبادئتين يقلص عدد القطع المضخمة إلى $1/16$، و بإضافة 3 قواعد لكل بادئة يتقلص عدد القطع المضخمة بمقدار 4096 ضعف (Liu و Cordes، 2004)، فإذا كان جينوم الكائن الحي يحتوي على 10^9 زوج قواعد فعند التحديد أو التقطيع بإنزيم EcoRI يعطي ما يقارب 250000 قطعة، وحينما يقطع بالإنزيمين EcoRI مع MseI معاً يعطي ما يقارب 500000 قطعة، وإذا تم إضافة 3 قواعد للبادئة فسوف يكون عدد القطع الناتجة ما يقارب 122 قطعة أي 50000\4096 (Liu و Cordes، 2004)، وذلك لأنه في هذه المرحلة تكون أعداد قطع DNAكثيرة جداً وخصوصاً في جينوم الكائنات الراقية. وتعتبر هذه المرحلة من المراحل الحساسة والتي تتطلب ظروف مثلى من تفاعل PCR وتركيز البادئات وإنزيم البلمرة وكذلك DNA القالب. ولذلك يمكن عمل عدة تفاعلات وبتراكيز مختلفة لهذه المواد بغية الحصول على التركيز الأمثل لها (أبوالجدايل، 2014؛ Solé، 2003). الخطوات الأربع السابقة (إستخلاص الحمض النووي، القطع، اللحام بالملائمات، والتضخيم التمهيدي بالبادئات مع زيادة قاعدة نيوكليوتيدية واحدة) يمكن مشاهدتها على هلام الآجاروز بتركيز 1.6% (Solé، 2003) كما هو موضح في الشكل رقم (3).

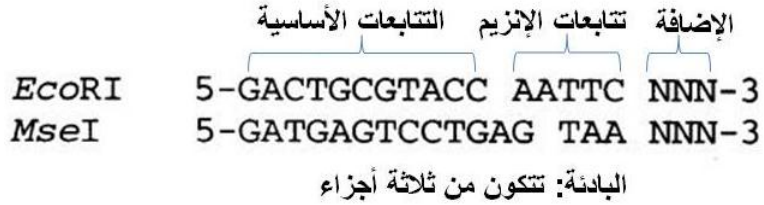


شكل 3. يظهر على هلام الآجاروز بتركيز 1.6%: أ) استخلاص الحمض النووي DNA. ب) الحمض النووي بعد عمليتي القطع بإنزيمي EcoRI و MseI واللحام، ويلاحظ الكمية الوفيرة للقطع ذات الوزن الجزيئي الصغير. ج) عملية التضخيم التمهيدي ويظهر جز من القطع المضخمة على هيئة مسحة من 100 إلى 800 زوج قواعد مع مؤشر لامبدا.

الكائنات الراقية ذات الجينوم الكبير يكون التضخيم بواسطة PCR على مرحلتين، المرحلة الأولى وتسمى التضخيم التمهيدي ويستخدم فيه بادئتين يضاف إليهما نيوكليوتيدة واحدة فقط ويستعمل 30 نانوجرام من البادئتين معاً ولا يتم توسيم البادئات بالمواد المشعة في هذا التضخيم، بعد هذه الخطوة (خطوة التضخيم التمهيدي) الناتج يخفف 10 مرات بواسطة 10 ملي مول Tris–Hcl مع 0.1 ملي مول EDTA بدرجة حموضة (pH) 8 ويستخدم الناتج أو القالب في تفاعل التضخيم الثاني (التضخيم الإنتقائي) ويكون التضخيم الإنتقائي مثل التضخيم التمهيدي بزيادة 3 نيكليوتيدات في البادئة (Vos وآخرون، 1995).

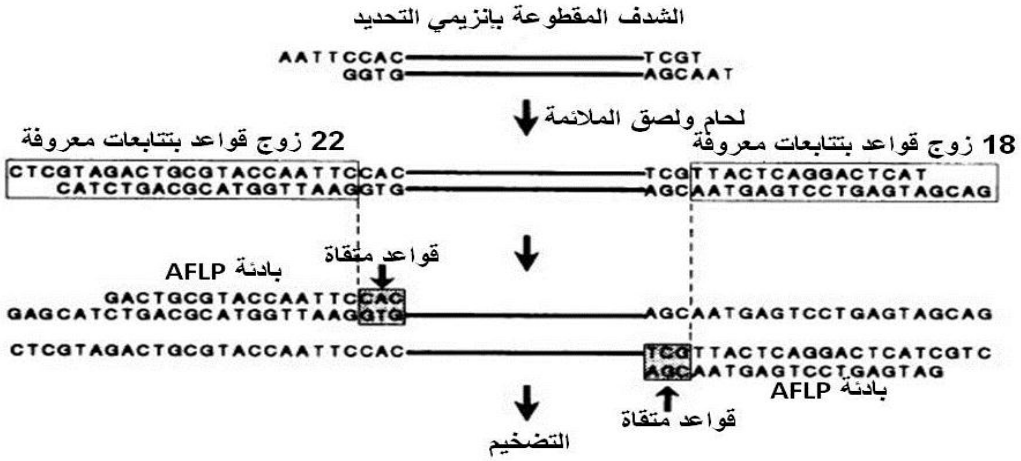
5. مرحلة التضخيم النهائي أو التضخيم الإنتقائي Selective Amplification

الهدف من هذه الخطوة هو حصر مستويات التباين أو التعدد الشكلي Polymorphism ويتم في هذه المرحلة إضافة 3 قواعد نيوكليوتيدية عشوائياً في النهاية 3' من تتابعات البادئات التي تستخدم في التضخيم وبالتالي تتكون البادئة من (تتابعات الملائمة الأساسية + تتابعات موضع قطع الإنزيم + 3 نيوكليوتيدات إضافية) (Solé، 2003). كما هو موضح في الشكل رقم (4).



شكل 4. البادئة تتكون من تتابعات الملائمة الأساسية، ثم تتابعات موضع قطع الإنزيم ثم 3 نيوكليوتيدات اضافية

إن قطع الحمض النووي DNA في خليط التفاعل في هذه المرحلة يكون كبير العدد على الرغم من محاولات تقليلها في المراحل السابقة فينصح بتخفيف نواتج المرحلة السابقة إلى حد قد يصل إلى 10 مرات تعتمد على عدة عوامل منها مقدار حجم جينوم الكائن المراد دراستها وذلك لتقليل عدد نسخ كل قطعة، ومن ثم القيام بعملية انتخاب ومضاعفة قطع الحمض النووي مختلفتي الطرفين rare/frequent fragment ends اعتمادا على نفس الاسس التي اعتمدت في مرحلة التضاعف التمهيدي (أبوالجدايل، 2014؛ Solé، 2003) ويتراوح عدد الحزم الناتجة من استعمال زوج من البادئات من 50 إلى 100 حزمة (Agarwal و آخرون، 2008)، وقد يصل إلى 200 حزمة (Savelkoul وآخرون، 1999)، ومن المعلوم أن النيوكليوتيدات التي تضاف إلى البادئة تجعل التضخم أكثر إنتقائية وكذلك يقلل من عدد القطع المقطوعة المضخمة كما في الشكل رقم (5).



شكل 5. عملية القطع بإنزيمي التحديد ثم عملية لحام الملائمة ثم التضخيم الإنتقائي نقلاً عن (Vos و آخرون، 1995)

ويضاف زوج من البادئات في كل تفاعل PCR لننتقي من بين هذا الكم من القطع ما هو ملائم لها مما يؤدي إلى تقليل عدد القطع المتضاعفة، الشكل رقم (5) يوضح عملية القطع بإنزيمي التحديد ثم عملية لحام الملائمة ثم التضخيم الإنتقائي. برنامج التضخيم في جهاز المدوّر الحراري يلعب دوراً مهماً في تقليل وانتخاب قطع الحمض النووي DNA وفي تمييز وانتخاب القطع المرغوبة وذلك عن طريق درجة حرارة التصاق البادئات بقالب الحمض النووي ويتم ذلك برفع درجة الالتحام إلى 65 درجة مئوية والتي تناسب ارتباط البادئات بالقطع الكبيرة مما يؤدي إلى إقصاء قطع الحمض النووي الصغيرة وذلك من خلال دورة أولية

First cycleفي برنامج الPCR، ثم يتم خفض درجة حرارة الالتحام بمعدل 0.7 لكل دورة في الدورات اللاحقة وهي الثانية وحتى الدورة الثالثة عشر حتى تصل إلى درجة حرارة 56 درجة مئوية والتي ستؤدي إلى استبعاد القطع الكبيرة جداً والتي تمثل معظمها قطع الحمض النووي DNA الناتجة من إنزيم القطع قليل التكرار في خليط التفاعل حتى نصل إلى انتخاب القطع الاكثر تنافساً مع البادئين المستخدمين وهي عادة تكون القطع ذات الطرفين الناتجين من فعل إنزيمي القاطع، أما المرحلة الأخيرة من التضاعف فتتم من خلال الدورة 14 إلى 36 و تكون فيها درجة الالتحام واحدة هي 56مْ، كما ان عملية اختيار البادئة المناسبة والتي يتم فيها تغيير القواعد الإضافية الثلاثة الأخيرة بعدة توليفات حتى يتم اختيار التوليفة الانسب للكائن المراد دراسته في التجربة إضافة إلى دقة تركيز البادئات من العوامل المهمة التي تحدد عدد ونوعية القطع المتضخمة (Vos وآخرون، 1995؛ أبوالجدايل، 2014؛ Solé، 2003).

وفي بعض الأحيان يتم توسيم أو ربط البادئة بمادة معلمة (Jonah وآخرون، 2011)، غالباً ما يتم توسيم بادئة EcoRI والتي يمكن من خلالها رؤية القطع المحددة فقط بإنزيم EcoRI، ولا يمكن مشاهدة القطع ذات النهاية MseI/MseI في عملية فصل القطع عن طريق الهجران الكهربائي، ويمكن مشاهدة نتائج التضخيم وتباينات حزم الحمض النووي DNA المقطوعة والمضخمة والتي غالباً ما تكون ذات وزن جزيئي صغير قد لا يتجاوز 500 زوج من القواعد Base pair باستخدام الرحلان الكهربائي على هلام البولي أكرلامايد وصبغه بنترات الفضة بدلاً من هلام الآجاروز لأنه ذو مسام صغيرة تتناسب مع صغر حجم الحزم المقطوعة ذات الوزن الجزيئي الصغير، كما يمكن استخدام صبغة الفلوريسنت لصبغ أحدى البادئات وفي الغالب تستخدم بادئة EcoRI لتكون بادئة معلمة Laballed، وفي طريقة الخاصية الشعرية يمكن مشاهدة تباينات الحمض النووي أو القطع المحددة على هيئة قمم ومنحنيات كما في الشكل رقم (6) وكل قمة في الشكل تقابل حزمة في عملية الهجران الكهربائي بطريقة البولي اكلارامايد العادي كما يكون مدى الحزم من 30 إلى 500 قاعدة زوجية (Solé، 2003).

السيادة والسيادة المشتركة في واسمة AFLP

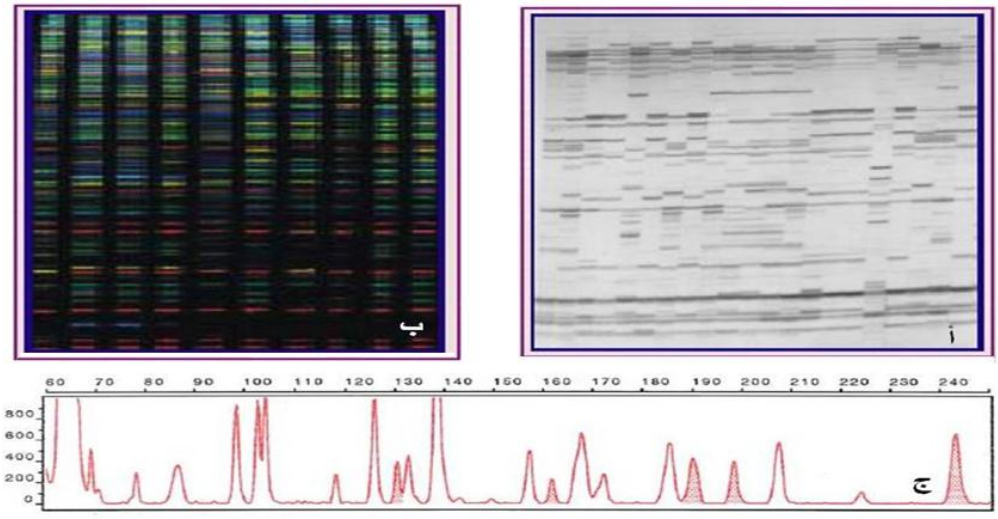
كما يمكن التغلب على بعض عيوب واسمة AFLP مثل السيادة Dominant وهي عدم التفريق بين التركيب الوراثي المتماثل AA وغير المتماثل Aa و ذلك عن طريق تحويلها إلى سيادة مشتركة Codominant عن طريق شدة كثافة الحزمة (Gort وآخرون، 2010)، أي التحكم في كمية نواتج تفاعل البلمرة المتسلسل ولكنها قد تبقى عرضة لبعض الأخطاء نتيجة للتباين في القياسات، كما يمكن ذلك عن طريق الإستدلال بقياس الكثافة الضوئية (Optical Density OD) لحزمة الحمض النووي على الهلام حيث تكون الحزمة المتماثلة وراثياً

Homozygous أكبر في الكثافة الضوئية من الحزمة غير المتماثلة Heterozygous (Piepho و Koch، 2000).

تحليل النتائج

تعتمد طريقة تحليل نتائج دراسة العلاقات الوراثية على وجود أو غياب الحزم الناتجة من تضاعف قطع معينة من الجينوم وعلى الوزن الجزيئي لتلك الحزم التي تعتمد على الأعداد والمواقع المكملة لتسلسلات البادئات على شريط DNA القالب، و يتم إهمال الحزم الخفيفة جداً (حسين، 2012).

أما التباين المعتمد على الاختلافات في شدة تألق الحزم Intensity والتي تكون عادةً ناتجة من ظهور بعض الحزم المتضاعفة معاً في نفس الوزن الجزيئي فتظهر على شكل حزمة سميكة واحدة وهي في الحقيقة أكثر من حزمة Comigrating bands وقد تكون ناتجة من حالة التماثل الوراثي Homozygozity حيث يتم فيه تضاعف نفس الموقع على الأليل الآخر وبما أنها بنفس الوزن الجزيئي لذلك تتجمع القطع المتضاعفة في تلك المواقع معا،



شكل 6. أ) فصل حزم الحمض النووي DNA باستعمال صبغة نترات الفضة. ب) فصل حزم الحمض النووي DNA باستعمال صبغة الفلورسنت. ج) فصل حزم الحمض النووي DNA باستعمال الخاصية الشعرية وتظهر الحزم على هئية منحنيات.

وقد يحتمل أن يكون لزيادة تركيز DNA القالب والذي يؤدي إلى تكرار عدد نسخ DNA الهدف مما يؤدي إلى تضاعف نفس الموقع أكثر من مرة، وبما أن التركيز الدقيق للحمض النووي DNA يكون من الصعب تحديده لأنه يتأثر بعدة عوامل فلذلك لا يمكن استخدام الاختلاف في سمك الحزم الناتجة كمقياس للتباين الوراثي (حسين، 2012).

تُجمع نتائج واسمة AFLP في جدول خاص اعتماداً على وجود أو غياب حزم الحمض النووي DNA للعينات المختلفة، حيث يرمز للحزم الموجودة بالرقم 1 ولعدم وجودها بالرمز 0 وتستعمل برامج الحاسوب المتعددة لعملية التحليل وإيجاد العلاقات الوراثية ودرجات القرابة والبعد بين الأصناف والأنواع الداخلة في الدراسة (حسين، 2012).

مميزات واسمة AFLP

1. لا تتطلب معرفة مسبقة بتتابعات الحمض النووي DNA المدروس (Liu و Cordes، 2004؛ Jonah وآخرون، 2011).
2. تمتاز واسمة AFLP بالدقة العالية لقدرتها على إظهار الطرز Patterns المميزة لكل فرد نتيجة لدقة ظروف عمل جهاز المدوّر الحراري مما جعلها من الطرق المثلى لبناء البصمة الوراثية (حسين، 2012؛ Jonah وآخرون، 2011).
3. ثبوتية مؤشراتها حيث يمكن الحصول على نفس الطرز من الحزم عند تكرار نفس التجربة (حسين، 2012؛ Liu و Cordes، 2004).
4. تمتاز هذه التقنية بإمكانية الاحتفاظ بمحاليل تخزن من كل مرحلة عمل دون الرجوع إلى تحضيرها مرة أخرى وهذا ما يزيد من إمكانية المناورة بتلك المحاليل ولفترات طويلة (حسين، 2012).
5. بخلاف تقنية واسمة RAPD والتي يستعمل فيها مجموعة كبيرة من البادئات ونتحصل على نتائج غير موثوقة فإنه في واسمة AFLP يتم استخدام بادئين فقط ونتحصل على نتائج يمكن تكرارها (Vos وآخرون، 1995).
6. يمكن الحصول في تقنية واسمة AFLP على تباينات وراثية مختلفة ومتعددة بمجرد تغيير نيوكليوتيدة واحدة في التتابعات الإضافية للملائمة أو البادئة (Vos وآخرون، 1995).

عيوب واسمة AFLP

1. تعتبر من الواسمات السائدة والتي لا تفرق بين الأليلات في حالة عدم التماثل الوراثي (Semagn وآخرون، 2006).
2. تعدد الخطوات التي تتطلبها التقنية حتى تصل إلى النتيجة النهائية (Semagn وآخرون، 2006).

3. توفر كمية كبيرة جداً من المعلومات والتي يصعب تفسيرها وقد تحتاج إلى برامج لتحليلها.
4. مقارنة بواسمة RAPD تحتاج واسمة AFLP إلى كمية أكبر من الحمض النووي DNA (10 نانوجرام لكل عينة مقارنة بـ 10 مايكروجرام لكل عينة).
5. تشترط وخصوصاً في عينات الكائنات الدقيقة مثل البكتيريا والفطريات و غيرها أن يتم عزل الكائن الحي أولاً ثم يتم استخلاص الحمض النووي وإجراء اختبار واسمة AFLP وذلك لضمان عدم اختلاط كائنات حية دقيقة أخرى في الاختبار حيث أن واسمة AFLP ليست متخصصة في تتابعات معينة لكائن معين مثل المايكروستالايت ولكنها يمكنها أن تتعامل مع جميع الكائنات الحية دون تخصص.
6. يجب خلو الحمض النووي القالب من جميع المثبطات التي قد تتداخل مع إنزيمات التحديد (Semagn وآخرون، 2006).
7. التقنية تحتم استعمال هلام البولي اكرلامايد مع صبغة نترات الفضة أو طريقة الأشعة او الفلورسينت وكلها مقارنة بهلام الآجاروز تعتبر أقل أماناً ومكلفة و تحتاج إلى عمالة (Semagn وآخرون، 2006).

الخلاصة

تعتبر واسمة AFLP من الواسمات الجزيئية المهمة في دراسة البصمة الوراثية، والتنوع الوراثي، وإنشاء الخرائط الوراثية للعديد من الأنواع النباتية والحيوانية وكذلك الأحياء الدقيقة، فهي تجمع بين تقنيتين هما RFLP و RAPD، كما أنها تمتاز بالدقة العالية مع ثبوت المؤشرات عند تكرار التجربة ولا تحتاج إلى معرفة مسبقة بالتركيب الوراثي للكائن المراد دراسته، إلا أن خطواتها متعددة وطويلة ولا تفرق بين الأليلات في حالة عدم التماثل الوراثي.

المراجع

أبوالجدايل، رحيم. (2014). التقانات الحيوية – البيولوجيا الجزيئية و الهندسة الوراثية. http://raheemaboualjadayel.blogspot.com/2014/04/ssr-issrrapdrflpaflp-pcr-uv.html. Accessed March 2016.

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

السيد، هيثم؛ كيال حامد، جهور أحمد، و باوم مايكل. (2002). تحديد مورث المقاومة لمرض البياض الدقيقي والمؤشرات الدناوية المرتبطة به في هجين (*Hordeum vulgare* L.) من الشعير. مجلة جامعة دمشق للعلوم الزراعية، 18: 13-32

حسين، جنان قاسم (2012). دراسة الإختلافات الوراثية لأنواع نبات الداودي بإستخدام مؤشرات AFLP. مجلة جامعة النهرين، 15 :32-39.

خاروف، شعلة؛ العظمة محمد فواز، يحياوي عمر و باوم مايكل. (2012). التباين الوراثي و التوزع الإقليمي لمجتمع فطر الصدأ المخطط الأصفر *Puccinia striiformis* f. sp *tritici* على القمح في سورية باستخدام المؤشرات الجزيئية للدنا (AFLP) خلال موسمي 2006 و2007 . مجلة جامعة دمشق للعلوم الزراعية، 28: 455-472.

Agarwal, M., N. Shrivastava and H. Padh. (2008). Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. Plant cell reports, 27:617-631.

Becker, J., P. Vos, M. Kuiper, F. Salamini and M. Heun. (1995). Combined mapping of AFLP and RFLP markers in barley. Molecular and General Genetics, 249:65-73.

Benjak, A., J. Konradi, R. Blaich and A. Forneck. (2006). Different DNA extraction methods can cause different AFLP profiles in grapevine. Vitis vinifera:15-21.

Benslimane, H., S. Lababidi, A. Yahyaoui, F. Ogbonnaya, Z. Bouznad and M. Baum. (2013). Genetic diversity of Pyrenophora tritici-repentis in Algeria as revealed by Amplified Fragement Length Polymorphism (AFLP) analysis. African Journal of Biotechnology, 12:4082-4093.

Caetano, A.R., Y. L. Shiue, L. A. Lyons, S. J. O'Brien, T. F. Laughlin, A. T. Bowling and J. D. Murray. (1999). A comparative gene map of the horse (*Equus caballus*). Genome research, 9:1239-1249.

Dasmahapatra, K., J. Hoffman and W. Amos. (2009). Pinniped phylogenetic relationships inferred using AFLP markers. Heredity, 103:168-177.

Diaz, S., C. Pire, J. Ferrer and M.J. Bonete. (2003). Identification of Phoenix dactylifera L. varieties based on Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) markers. Cellular and Molecular Biology Letters, 8:891-900.

Dorji, K. and C. Yapwattanaphun. (2015). Assessment of the genetic variability amongst mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) accessions in Bhutan using AFLP markers. BMC Genetics, 16:1-7.

El-Khalifeh, M., A. El-Ahmed, A. Al-Saleh and M. Nachit. (2009). Use of AFLPs to differentiate between Fusarium species causing root rot disease on durum wheat (*Triticum turgidum* L. var. durum). African Journal of Biotechnology, 8:4347-4352.

Gao, Y., Y. Tu, H. Tong, K. Wang, X. Tang and K. Chen. (2008). Genetic variation of indigenous chicken breeds in China and a Recessive White breed using AFLP fingerprinting. South African Journal of Animal Science, 38:193-200.

Gort, G. and F. A. van Eeuwijk. (2010). Codominant scoring of AFLP in association panels. Theoretical and Applied Genetics, 121:337-351.

Griffiths, R. and K. Orr. (1999). The use of Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) in the isolation of sex-specific markers. Molecular Ecology, 8:671-674.

Gustavo, R., J. Robert and H. Klaus., (2006). An optimized method for the generation of AFLP markers in a stingless bee (*Melipona quadrifasciata*) reveals a high degree of intracolonial genetic polymorphism. Apidologie, 37:687-698.

Hamwieh, A., S. Udupa, W. Choumane, A. Sarker, F. Dreyer, C. Jung and M. Baum. (2005). A genetic linkage map of Lens sp. based on microsatellite and AFLP markers and the localization of fusarium vascular wilt resistance. Theoretical and Applied Genetics, 110:669-677.

Hoda, A., L. Sena and G. Hykaj. (2012). Genetic diversity revealed by AFLP markers in Albanian goat breeds. Archives of Biological Sciences, 64:799-807.

Ipek, M., M. Seker, A. Ipek and M. Gul. (2015). Identification of molecular markers associated with fruit traits in olive and assessment of olive core collection with AFLP markers and fruit traits. Genetics and Molecular Research, 14:2762-2774.

Janssen, P., R. Coopman, G. Huys, J. Swings, M. Bleeker, P. Vos, M. Zabeau and K. Kersters. (1996). Evaluation of the DNA fingerprinting method AFLP as a new tool in bacterial taxonomy. Microbiology, 142:1881-1893.

Jonah, P., L. Bello, O. Lucky, A. Midau and S. Moruppa. (2011). Review: The importance of molecular markers in plant breeding programmes. Global journal of science frontier research, 11: 5-12.

Jubrael, J.M., S.M. Udupa and M. Baum. (2005). Assessment of AFLP-based genetic relationships among date palm (*Phoenix dactylifera* L.) varieties of Iraq. Journal of the American Society for Horticultural Science, 130:442-447.

Karahan, A., G. B. Kılıç, A. Kart, H. Ş. Aloğlu, Z. Öner, S. Aydemir, O. Erkuş and Ş. Harsa. (2010). Genotypic identification of some lactic acid bacteria by Amplified Fragment Length Polymorphism analysis and investigation of their potential usage as starter culture combinations in Beyaz cheese manufacture. Journal of dairy science, 93:1-11.

Levin, R. E. (2008). DNA-based technique: Polymerase Chain Reaction (PCR). In: Modern techniques for food authentication. Ed.: Daw-Wen Sun, Elsevier, Burlington, USA, P:411-476.

Liu, Z. and J. Cordes. (2004). DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. Aquaculture, 238:1-37.

Martinelli, F., R. Scalenghe, S. Davino, S. Panno, G. Scuderi, P. Ruisi, P. Villa, D. Stroppiana, M. Boschetti and L.R. Goulart. (2015). Advanced methods of plant disease detection. A review. Agronomy for Sustainable Development, 35:1-25.

Masumu, J., D. Geysen, E. Vansnick, S. Geerts and P. Van den Bossche. (2006). A modified AFLP for Trypanosoma congolense isolate characterisation. Journal of biotechnology, 125:22-26.

Negrini, R., I. Nijman, E. Milanesi, K. Moazami-Goudarzi, J. Williams, G. Erhardt, S. Dunner, C. Rodellar, A. Valentini and D. Bradley. (2007). Differentiation of European cattle by AFLP fingerprinting. Animal Genetics, 38:60-66.

Oleszczuk, S., J. Zimny and P. T. Bednarek. (2002). The application of the AFLP method to determine the purity of homozygous lines of barley (*Horedum vulgare* L.). Cellular and Molecular Biology Letters, 7:777-784.

Ozkan, H., S. Kafkas, M.S. Ozer and A. Brandolini. (2005). Genetic relationships among South-East Turkey wild barley populations and sampling strategies of *Hordeum spontaneum*. Theoretical and Applied Genetics, 112:12-20.

Piepho, H.-P. and G. Koch. (2000). Codominant analysis of banding data from a dominant marker system by normal mixtures. Genetics, 155:1459-1468.

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

Rao, H., J. Deng, W. Wang and Z. Gao. (2012). An AFLP-based approach for the identification of sex-linked markers in blunt snout bream, Megalobrama amblycephala (*Cyprinidae*). Genetics and molecular research, 11:1027-1031.

Sasanuma, T., K. Chabane, T. Endo and J. Valkoun. (2004). Characterization of genetic variation in and phylogenetic relationships among diploid *Aegilops* species by AFLP: incongruity of chloroplast and nuclear data. Theoretical and Applied Genetics, 108:612-618.

Saunders, J.A., S. Mischke and A. Hemeida. (2001). The use of AFLP techniques for DNA fingerprinting in plants. Beckman Coulter Application Notes, A1910A: l-9.

Savelkoul, P., H. Aarts, J. De Haas, L. Dijkshoorn, B. Duim, M. Otsen, J. Rademaker, L. Schouls and J. Lenstra. (1999). Amplified-Fragment Length Polymorphism analysis: the state of an art. Journal of clinical microbiology, 37:3083-3091.

Scott, K.D., E.M. Ablett, L.S. Lee and R.J. Henry. (2000). AFLP markers distinguishing an early mutant of Flame Seedless grape. Euphytica, 113:243-247.

Semagn, K., Å. Bjørnstad and M. Ndjiondjop. (2006). An overview of molecular marker methods for plants. African Journal of Biotechnology, 5:2540-2568.

Solé, M. (2004). Factors affecting the genotypic and genetic diversity of the dioecious clonal plant Cirsium arvense at the metapopulation level. UFZ- Leipzig-Halle GmbH.

Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. Van de Lee, M. Hornes, A. Friters, J. Pot, J. Paleman and M. Kuiper. (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic acids research, 23:4407-4414.

Wang, Z., P. Jayasankar, S. Khoo, K. Nakamura, K. Sumantadinata, O. Carman and N. Okamoto. (2000). AFLP fingerprinting reveals genetic variability in common carp stocks from Indonesia. Asian Fisheries Science, 13:139-147.

Wu, R., Y. Han, J. Hu, J. Fang, L. Li, M. Li and Z.-B. Zeng. (2000). An integrated genetic map of *Populus deltoides* based on Amplified Fragment Length Polymorphisms. Theoretical and Applied Genetics, 100:1249-1256.

Zabeau, M. and P. Vos. (1993). Selective restriction fragment amplification: A general method for DNA fingerprinting. European patent application, 92402629.

Zhang, P., H. Zhou, C. Lan, Z. Li and D. Liu. (2015). An AFLP marker linked to the leaf rust resistance gene LrBi16 and test of allelism with Lr14a on chromosome arm 7BL. The Crop Journal, 3:152-156.

Zulini, L., E. Peterlunger and E. Fabro. (2005). Characterization of the grapevine cultivar Picolit by means of morphological descriptors and molecular markers. Vitis,44:35-38.

Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)

Khaled Elmeer[1*] and Mohamed Bakory[2]

[1]*Horticulture Department, Faculty of Agriculture, Omar AL-Mukhtar University Libya*
[2]*Animal production Department Faculty of Agriculture, Sabha University Libya*
[*]*E-mail: elmeer@gmail.com*

Abstract

Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) is one of the most important molecular marker techniques which is used for fingerprinting and genetic diversity study, AFLP based on detecting of DNA fragments which are digested by restriction enzymes then amplified by polymerase chain reaction PCR, the fragments are visualized on polyacrylamide gels or by using fluorescent detection in capillary systems. This article provides a detailed review for principles, methodologies, applications, advantages and limitations of AFLP.

Keyword: Genetic diversity, molecular markers, restriction enzymes and selective primers.