Zagazig Journal of Agricultural Research
www.zu.edu.eg/agr/journals

تحليل التنوع الوراثي لبعض أصناف القطن *Gossypium hirsutum* L. باستخدام مؤشرات التضاعف العشوائي للدنا المتعدد الأشكال RAPD Markers

عدنان فاضل العزاوي* - عقيل حسين العاصي - سارا قحطان سليمان

قسم علوم الحياة - كلية العلوم - جامعة تكريت - العراق

الملخص

هدفت هذه الدراسة إلى استخدام مؤشرات التضاعف العشوائي المتعدد الأشكال لسلسة الدنا Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Markers المعتمدة على تقانة تفاعل البلمرة المتسلسل PCR في تحليل التباين الوراثي بين خمس أصناف من القطن *Gossypium hirsutum* L. المزروعة في العراق.عزل ال DNA من اوراق النباتات واستخدمت ثمان عشر من البوادئ في تفاعلات تقنية ال RAPD اربع منها لم تعطي أي نتيجة في حين اعطت الاربع عشر الباقية نتائج جيدة ، تم الكشف عن التباينات بين القطع المتضاعفة لكل صنف (أعدادها وأحجامها الجزيئية) بترحيل العينات على هلام الأكاروز. أظهرت نتائج تقنية ال RAPD للأربعة عشر بادئ اختلافا واضحا في عدد حزم ال DNA المتضاعفة وتباينا واضحا في أوزانها الجزيئية إذ بلغ العدد الكلي للحزم (٢٥٨)، كان عدد الحزم المتباينة (٢١٣) بينما كان عدد الحزم المتشابهة (٤٥) حزمة. أعطى البادئ (OPN-07) أعلى عدد من الحزم (٣١ حزمة) بينما اعطى البادئ (OPQ-17) اقل عدد من الحزم (١٠ حزمة). كما اختلفت كفاءة البادئات المستخدمة في كشف التباينات الوراثية بين الاصناف المدروسة فقد اعطى البادئ (OPA-11) أعلى كفاءة (١٣,١٧) في حين أعطى البادئ (OPQ-20) اقل كفاءة (٢,٧١)، ومن جانب آخر أظهر البادئ (OPN-07) أعلى قوة تمييزية (١٤,٥٥) في حين كانت أقل قوة تمييزية (٣,٧٥) للبادئ (OPQ-06). أعلى مسافة للبعد الوراثي (٠,٩٦٧٧) بين الصنف نازلي ٨٧ والصنف كوكر ٣١٠، في حين كانت أقل مسافة للبعد الوراثي (٠,١٠٠٢) بين الصنف أشور والصنف مرسومي ١٠. استطاعت تقنية ال RAPD إيجاد حزم دنا فريدة مميزة قادرة على التمييز بين أصناف القطن المدروسة، أي أن هذه الحزم وجدت في صنف معين وغابت في الأصناف الأخرى ويمكن استخدامها كبصمة وراثية مميزة لحفظ حقوق مربي النبات. أظهرت هذه الدراسة كفاءة تقنية ال RAPD في التمييز بين أصناف القطن المدروسة وفي تحديد درجة القرب والبعد الوراثي بينها مما اسهم في كشف التنوع الوراثي بين بعض أصناف القطن المزروعة في العراق.

الكلمات الاسترشادية: القطن، التنوع الوراثي، مؤشرات التضاعف العشوائي للدانا، تحليل المجموعات.

المقدمة والمشكلة البحثية

ينتمي القطن إلى العائلة الخبازية (Malvaceae) الجنس Gossypium، يوجد منه حالياً عشرين نوعاً في العالم يزرع منها على نطاق تجاري أربعة أنواع نشأ نوعان منها في العالم القديم هما *arborium* و *herbaceum* في حين نشأ في العالم الجديد النوعان الآخران *hirsutum* و*barbadense* فضلا على أن معظم أصناف القطن التجاري في العالم ينتمي إلى النوع *hirsutum* (الملاح، ٢٠٠٩).

يعد القطن *G. hirsutum L.* نبات عشبي أو شجيري معمر ويعامل في الزراعة كنبات حولي وهو من المحاصيل الاقتصادية المهمة فهو احد محاصيل الألياف البذرية ومن أهم المحاصيل الصناعية في العالم لدخوله كمادة أولية في كثير من الصناعات كصناعة الغزل والنسيج حيث تشكل أليافه (٨٥ – ٩٠%) من إنتاج الألياف الأخرى، كما يستخرج من بذوره الزيت المستخدم في بعض الصناعات والذي تتراوح نسبته (١٨- ٢٦%) من وزن البذور، فضلاً عن الكسبة المستخدمة في العلائق الحيوانية والتي تحتوي على نسبة عالية من البروتين، لذا فأن لهذا المحصول أهمية كبيرة في هيكل النشاط الإنتاجي للقطاعين الزراعي والصناعي (حديد، ٢٠٠٧، القيسي، ٢٠١٠ والنعيمي ولهمود، ٢٠٠٨).

التنوع الوراثي شرط أساسي لتحسين أي نوع من أنواع المحاصيل الزراعية، وان تقييم مدى وتوزيع الاختلاف الوراثي بين أنواع المحاصيل وأقاربها ضروري جدا في فهم نمط التنوع والعلاقات التطورية بينها والتي تساعد بتحسين النبات بطريقة أكثر انتظاما. إن

* **Corresponding author: Tel. :** +963932218122
E-mail address: Yahya.saleh2@gmail.com

التعرف والبحث عن التباينات داخل هذه المصادر الوراثية له أهمية كبيرة في توسيع القاعدة الوراثية لها والتي تعد الخطوة الأولى في عملية التحسين الوراثي، لذلك لابد من توصيف هذه المصادر وتصنيفها وإكثارها ومن ثم نقلها إلى المجمعات الوراثية لاستثمارها كأصول برية يمكن التطعيم عليها مستقبلا أو إدخالها كمادة وراثية في برامج التحسين الوراثي بهدف استنباط أصناف جديدة ذات مردود اقتصادي جيد (ضميرية وآخرون، ٢٠١٠ و Patil *et al.*, 2007).

على الرغم من الجهود التي بذلت في مجال طرائق التوصيف المورفولوجي للأصناف النباتية الذي يعد أحد الدعامات الأساسية التي تم الاعتماد عليها قديمًا قي تمييز الأصناف إلا أن هذه الطرائق تحتاج إلى وقت طويل، كما تتأثر بالظروف البيئية، أما الدراسات الكروموسومية فتكون غير قادرة عن الكشف عن التغايرات البسيطة على الكروموسوم في حين ان المؤشرات المعتمدة على البروتينات ترتبط بمرحلة نمو معينة وبنسيج معين مما يؤدي إلى عدم ثباتية النتائج. لذلك يجب دعم هذه الطرائق بطرائق التقانات الحيوية الحديثة في توصيف المدخلات، وتحديد التشابه والتباين الوراثي فيما بينها، ومن هذه الطرائق، مؤشرات الحمض النووي دنا DNA التي تدعى المؤشرات الجزيئية، والتي تتميز بكثرة عددها وثباتية نتائجها وعدم تأثرها بالظروف البيئية وبنوع النسيج والمرحلة العمرية للكائن فضلا عن إنها تستطيع الكشف عن التغيير ليس فقط في أجزاء الدنا المشفر عنها بل للأجزاء غير المشفر عنها أيضا والتي تشكل 50- 90% من حجم الجينوم في الكائنات الراقية بالإضافة إلى تجاوزها للتأثيرات المتداخلة للجينات وطُورت بشكلٍ مكّن من استخدامها في برامج تربية النبات حيث قللت من التعقيدات لدى إدخال عدد من الصفات المرغوبة في النمط الوراثي الواحد، وتعتبر المؤشرات الجزيئية ذات أهمية قصوى على صعيد تربية النبات، إضافة إلى أنها تعد مؤشرات مساعدة في إسراع عمليات الانتخاب والتربية إضافة إلى خفضها للتكاليف المادية. تم استخدام المؤشرات الجزيئية لمعرفة التباينات الوراثية الموجودة داخل العشائر النباتية وتحديد العلاقات الوراثية بين الأصناف والأنواع النباتية حيث أثبتت الدراسات أن المؤشرات الجزيئية هي دلائل قيمة في وصف وتقييم التنوع الوراثي داخل الأنواع، وتعد دراسة التباينات الوراثية ضمن النوع من الأهداف الأساسية التي تساعد على الحفاظ عليه من التدهور (سرحان وآخرون، ٢٠١٠، الأبرص وآخرون، ٢٠١٢ و Russell *et al.*, 1997).

وقد شهدت السنوات الأخيرة تطوراً ملحوظًا في استخدام المؤشرات الجزيئية في تحديد التباين الوراثي للنباتات المزروعة لما لها من ميزات كثيرة، ومن المؤشرات الشائعة والحديثة مؤشرات التضاعف العشوائي متعدد الأشكال لسلسة ألدنا Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) التي تتسم ببساطتها وسرعتها وعدم تطلبها لكمية كبيرة وإمكانية تطبيقها على عشائر وراثية كبيرة الحجم، إضافة إلى أن إمكانية استخدام البادئات العشوائية أو العامة (Universal) في هذه التقنية يسمح بتغطية مناطق مختلفة من جينومات الأفراد المدروسة، ويتم تضاعف منطقة الجينوم الواقعة بين موقعي ارتباط البادئ ويتم الكشف عن النواتج المتضاعفة بترحيل الناتج على هلام الأكاروز وذلك بعد تصبيغها بصبغة بروميد الأثيديوم ويظهر الاختلاف بين الكائنات المختلفة في عدد وحجم القطع المتضاعفة، كما تمتاز هذه المؤشرات بأنها لا تتطلب وقتا طويلا لإنجازها وأنها غير معقدة وعدم احتياجها للنظائر المشعة مما سهل إمكانية استخدامها في كثير من الدول وبذلك أصبح لمؤشرات أل RAPD تطبيقات واسعة في دراسة العلاقة بين العشائر من النوع نفسه أو الأنواع القريبة إلى بعضها البعض، كما استخدمت لتحديد الهوية الوراثية، وكذلك التحري عن الهجن كما يمكن أن تساعد في رسم الخرائط الوراثية إضافة لاستخدامها في معرفة العلاقة الوراثية بين نباتات النوع الواحد بالتقنية ذاتها. بالإضافة إلى استخدامها في مجال التشخيص وإيجاد البصمة الوراثية إذ كان لها طبيقات على مختلف الأحياء كالإنسان والحيوان والبكتريا وتم تصنيف الأصناف التابعة لكثير من الأنواع النباتية (حسين، ٢٠١١ والأبرص وآخرون، ٢٠١٢).

هناك العديد من الباحثين استخدموا أنواع مختلفة من مؤشرات أل DNA لدراسة التباين الوراثي والتوصيف الجزيئي لنبات القطن في أماكن مختلفة من العالم (Russel *et al.*, 1997, Willams *et al.*, 1990، حسين، ٢٠١١ و الأبرص وآخرون، ٢٠١٢)، لكن ومن خلال مراجعة الدراسات الوراثية السابقة التي أجريت على نبات القطن في العراق لم نجد أي دراسة تشير إلى استخدام مؤشرات أل DNA في دراسة التنوع الوراثي لنبات القطن *G. hirsutum* L. في العراق، لذلك هدفت هذه الدراسة إلى استخدام مؤشرات أل RAPD في تحليل التباينات الوراثية بين بعض أصناف القطن *G. hirsutum* L. في العراق وذلك للتمييز بين جميع الأصناف المدروسة والتي تعد كهوية للصنف.

المواد المستخدمة وطرق البحث

زراعة القطن

نفذت التجربة الحقلية في الموسم الصيفي لعام ٢٠١٠ في المزرعة الإرشادية لقضاء الشرقاط ، تم الحصول على بذور أصناف نبات القطن *G. hirsutum* L. (١. لاشاتا، ٢. مونتانا، ٣. ستونوفيل ٤٧٤ ،٤. نازلي ٨٧، ٥. دلتاباين ٥٠) من الهيئة العامة لفحص وتصديق البذور فرع صلاح

الدين. بعد إعداد ارض التجربة من حراثة وتنعيم وتسوية قسمت إلى خمس وحدات تجريبية بمساحة (٣ × ٣)م احتوت على أربعة مروز بطول ٣م، المسافة بين مرز وأخر ١م والمسافة بين الجور ٠,٧٥م. استعمل تصميم القطاعات الكاملة بواقع ثلاث مكررات، تركت مسافة ١,٥م بين كل وحدة تجريبية وأخرى، تم زراعة البذور على عمق ٤سم وبمعدل ٤-٥ بذور لكل جوره ثم الخف بعد أسبوعين من الإنبات إلى نباتين/جورة. أضيف السماد النيتروجيني (اليوريا) على دفعتين متساويتين بمعدل ٤٠٠ كغم.ه$^{-1}$. وأضيف السماد الفوسفاتي أيضا على دفعتين متساويتين بمقدار ١٠٧كجم-ه$^{-1}$ قبل الزراعة على شكل داب ثنائي فوسفات الامونيوم و١٦٥كغم –ه$^{-1}$ من السماد البوتاسي على شكل كبريتات البوتاسيوم. تم اعتماد نظام الري بالتنقيط حيث ربطت عدة أنابيب معدنية بقطر ٤ بوصة مع بعضها ثم ربطت بأنابيب أخرى بقطر ٢ بوصة نصبت على حوض كان مصدره مياه نهر دجلة استعملت كمياه ري خلال موسم النمو. أخذت عينات عشوائية بواقع ٢٥ ورقة من كل صنف ووضعت في أكياس نايلون نظيفة ونقلت إلى جامعة تكريت، كلية العلوم، قسم علوم الحياة – مختبر البيولوجي الجزيئي لإجراء الدراسة المختبرية.

استخلاص ألدنا الكلي من الأوراق

Total Genomic DNA Extraction

تم استخلاص ألدنا حسب طريقة Permingeat *et al.* 1998، أخذ ٠,٥- ١جم من الأوراق الطازجة لكل عينة، غسلت بالماء المقطر وقطعت إلى قطع صغيرة، طحنت في هاون خزفي باستخدام النتروجين السائل Liquid nitrogen ونقل المسحوق إلى أنابيب زجاجية وأضيف إليها ٤ مل من محلول الاستخلاص(100 mM Tris-HCl pH 8, 20 mM EDTA, 1.4 M NaCl, 2% (CTAB, 0.5 M glucose)، حضنت الأنابيب في حمام مائي هزاز بدرجة ٦٥ºم لمدة ٦٠-٩٠ دقيقة. تركت الأنابيب لتكتسب درجة حرارة الغرفة وأضيف إليها ٤ مل من محلول الكلوروفورم:الكحول الآيزواميلي (٢٤:١) لكل أنبوب مع التحريك المستمر مدة ١٥ دقيقة، ثم نقلت إلى جهاز الطرد المركزي ونبذ المزيج بسرعة ٨٠٠٠ دورة/دقيقة بدرجة ٤ºم لمدة (١٠) دقيقة. أخذت الطبقة المائية العليا إلى أنابيب جديدة وأضيف إليها حجم مماثل من كحول الآيزوبروبانول المبرد ومزجت بالتقليب الهادئ إلى أن تظهر كتلة بيضاء تمثل خيوط الـ DNA. سحبت خيوط الـ (DNA) بواسطة قضيب زجاجي معقوف النهاية hook، وضعت في أنبوبة أخرى حاوية على ٢٠٠ميكرولتر من الماء المقطر المعقم وحركت بين فترة وأخرى إلى أن تتم الإذابة للـ DNA تماما. تم اختبار نوعية ألدنا بالاعتماد على طريقة الترحيل الكهربائي باستخدام هلام الاكاروز بتركيز ١% كما قيس تركيز الدنا في العينات باستخدام جهاز (Nanodrop, Germany) وحسبت نقاوته والتي تراوحت بين ١,٦١-١,٨٢، تم توحيد تركيز عينات الدنا إلى ٢٥ نانوجرام/ميكرولتر باستخدام الماء المقطر المعقم.

تحضير تفاعلات الRAPD-PCR

أجريت تفاعلات التضخيم العشوائي لقطع الحمض النووي الدنا (RAPD-PCR) وفقاً لما ذكره Willams (*et al.*, 1990) باستخدام العدة (AccuPower PCR premix Kit) المجهزة من شركة Bioneer الكورية وحسب التعليمات المرفقة. تحتوي كل انبوبة على المكونات الأساسية لتفاعل البلمرة المتسلسل والتي تشمل وحدة واحدة من أنزيم Taq DNA polymerase ، ٢٥٠ µM من مزيج القواعد النتروجينية dNTPs، ١٠ mM Tris-Hcl (pH 9)، ٣٠ mM KCL و ١,٥ mM MgCl2. اضيف اليها ١٠ picomole من البادئ و ٢٥ نانوجرام من ال DNA ثم أكمل حجم التفاعل بالماء المقطر المعقم إلى ٢٠ µL لكل أنبوبة. مزجت الأنابيب بشكل جيد ونقلت إلى جهاز المدور الحراري (Thermocycler) لإنجاز التفاعل التضاعفي بعد أن تمت برمجته حسب البرنامج: دورة واحدة لمدة دقيقتان على درجة حرارة ٩٤مْ للمسخ الأولي لشريط الدنا تليها ٤٠ دورة تضاعف تتضمن كل دورة دقيقة واحدة على درجة٩٢مْ لمسخ القالب ودقيقة واحدة على درجة ٣٦مْ لربط البادئات بألدنا القالب ودقيقة واحدة على درجة حرارة ٧٢مْ للاستطالة مع دورة أخيرة لمدة ٧ دقائق وعلى درجة ٧٢مْ للاستطالة النهائية. رحلت نواتج عملية التضخيم على هلام الأكاروز بتركيز ١,٢% مع الدليل الحجمي المتكون من دنا لإمداد المقطع بأنزيم ال Hind III وال Eco RI ولمدة٩٠ دقيقة بمقدار (٥ فولت/ سم)، فحص الهلام بعد تصبيغه بصبغة بروميد الأثيديوم لمدة ٣٠-٤٥ دقيقة تحت الأشعة فوق البنفسجية (UV-Light) وصور باستخدام Gel Documentation System (Sambrok, 2001).

تسجيل نتائج ال RAPD والتحليل الاحصائي

لتسجيل نتائج الإكثار العشوائي لتقنية الRAPD تم فحص صور أنماط الفصل الكهربائي لكل بادئة وتسجيل الحزم (Bands) لكل بادئة في جدول بحيث تعامل كصفة ثنائية يمثل وجود الحزمة (Band) ب (١) وغياب الحزمة (Band) ب (صفر) ومن هذا الجدول تم حساب العدد الكلي للحزم ال RAPD التي تظهرها كل بادئة في التراكيب الوراثية من القطن المدروسة وتحديد الحزم المتباينة (Polymorphic) والمتطابقة (Monomorphic) وحساب درجة التباين في نواتج ال RAPD. تم حساب معامل البعد الوراثي وكذلك معامل التشابه ما بين العينات المدروسة باستخدام معامل Nei's 72 (Nei and Li, 1979)، ثم أجرى تحليل المجموعات (Cluster analysis)

وتم رسم مخطط البعد الوراثي بين العينات المدروسة باستخدام طريقة The unweighted pair group method for the arithmetic average (UPGMA) (Sneath and Sokal, 1973). أجريت كل التحاليل الاحصائية بواسطة الحاسوب باستخدام برنامج Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System (Rohlf, 1993).

النتائج والمناقشة

إن تشخيص الأصناف على مستوى الدنا باستخدام مؤشرات ال RAPD تعني إيجاد البصمة الوراثية fingerprint لكل صنف من الأصناف وهي الطريقة التي تتوزع فيها القطع المتضاعفة للأصناف المدروسة باستخدام بادئ معين، أي عدد تلك الحزم وأحجامها الجزيئية والتي تكون مميزة لذلك الصنف دون بقية الأصناف وأن إيجاد بصمة وراثية للصنف تعد بمثابة الهوية لذلك الصنف يمكن الاستفادة منها (ضميرية وآخرون، ٢٠١٠).

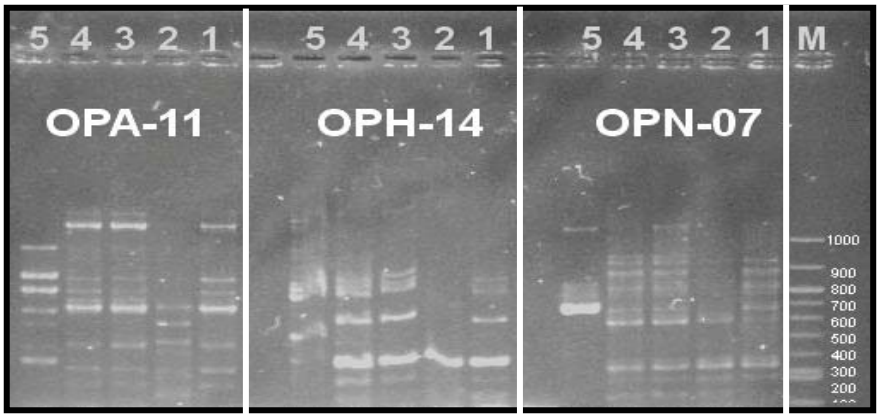
اعتمدت طريقة تحليل نتائج دراسة العلاقة الوراثية على وجود أو غياب الحزم الناتجة من تضاعف قطع معينة من جينوم النباتات المستخدمة وعلى الأوزان الجزيئية لتلك الحزم التي تعتمد على العدد والمواقع المكملة لتسلسلات البادئات على شريط DNA القالب وأهملت الحزم الخفيفة جدا وهذا يتفق مع (Barone *et al.*, 1999, Swobada and Bhalla, 1997). أما التباين المعتمد على الاختلافات في شدة (Intensity) تألق الحزم التي تكون ناتجة عادة من ظهور بعض الحزم المتضاعفة معاً في نفس الوزن الجزيئي فتظهر على شكل حزمة سميكة واحدة هي بالحقيقة أكثر من حزمة (Comigrating bands) قد تكون ناتجة من حالةhomozygotsity حيث يتم فيها تضاعف نفس الموقع على الاليل الآخر، وبما أنها بنفس الوزن الجزيئي لذلك تتجمع القطع المتضاعفة في تلك المواقع معا، وأحيانا زيادة تركيز DNA القالب يؤدي إلى تكرار عدد نسخ DNA الهدف مما يؤدي الى تضاعف نفس الموقع أكثر من مرة وبما أن مؤشرات ال RAPD هي من المؤشرات التي تتبع السيادة التامة لذلك لا يمكن استخدام الاختلاف في سمك الحزم الناتجة كمقياس للتباين الوراثي وبذلك فلا يمكن بها تقدير عدد الأليلات للموقع الواحد (ضميرية وآخرون، ٢٠١٠) وهذا يتفق مع ما ذكره (Vogt *et al.*, 1997).

استخدم في هذه الدراسة ١٨ بادئ اربع منها لم يُعط أية نتيجة بالرغم من إعادتها أكثر من مرة وهذا ربما يعود إلى غياب المواقع المكملة لتسلسلات تلك البادئات في جينوم نبات القطن، البادئات المستخدمة، عدد النوكليوتيدات في كل زوج من البادئات ويختلف ذلك بحسب التقنية المستخدمة وهو ما يحكم إمكانية إيجاد التتابعات المكملة للبادئ ضمن الجينوم المدروس وبالتالي عدد الحزم الناتجة (Willams *et al.*, 1990). ويتفق ذلك مع نتائج دراسات أخرى عند تطبيق مؤشرات ال RAPD كما في استخدام بعض البادئات مع النخيل (Sedra *et al.*, 1998) والحمص (Ahmed, 1999).

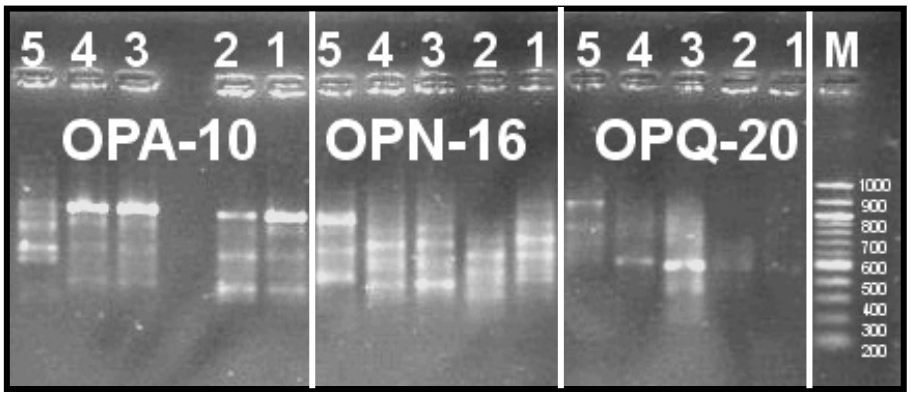
بينت نتائج تفاعلات تقنية ال RAPD للأربع عشر بادئ التي تم ترحيلها على هلام الاكاروز اختلافا واضحا في عدد حزم ال DNA المتضاعفة وتباينا واضحا في أوزانها الجزيئية وذلك تبعا للبادئ المستخدم شكل (١ ، ٢، ٣، ٤) وبلغ العدد الكلي للحزم التي اعطتها البادئات المستخدمة (٢٥٨) وكان عدد الحزم المتباينة (٢١٣) بينما كان عدد الحزم المتشابهة (٤٥) حزمة. أعطى البادئ (OPN-07) أعلى عدد من الحزم (٣١حزمة) بينما أعطى البادئ (OPQ-17) اقل عدد من الحزم (١٠ حزمة). كما اختلفت كفاءة البادئات المستخدمة في كشف التباينات الوراثية بين الأصناف المدروسة فقد أعطى البادئ (OPA-11) أعلى كفاءة (١٣,١٧) في حين أعطى البادئ (OPQ-20) أقل كفاءة (٢,٧١)، ومن جانب آخر كانت أعلى قوة تمييزية للبادئ (OPN-07) هي (١٤,٥٥) أما اقل قوة تمييزية فكانت للبادئ (OPQ-06)، وبلغت (٣,٧٥)(جدول ٢).

استطاعت تقنية ال RAPD إيجاد حزم دنا فريدة مميزة قادرة على التمييز بين اصناف القطن المدروسة أي ان هذه الحزم وجدت في صنف معين وغابت في الاصناف الاخرى ويمكن استخدامها كبصمة وراثية مميزة لحفظ حقوق مربي النبات؛ فلقد تم الحصول في دراسة أخرى على ٣٥ حزمة مميزة (ضميرية وآخرون، ٢٠١٠) يمكن أن تستخدم من قبل البنوك الوراثية لتمييز الأصناف والطرز ألمذكورة وهذا يؤكد أهمية هذه التقنية في دراسات التوصيف الجزيئي والبصمة الوراثية. على سبيل المثال اعطى البادئ (OPA-11) حزمة ذات وزن جزيئي (٩٧٠ زوج قاعدي) وجدت في الصنف (نازلي ٨٧) ولم توجد في بقية الأصناف وكذلك الحزمة ٣٥٠ زوج قاعدي لنفس الصنف (جدول ٢).

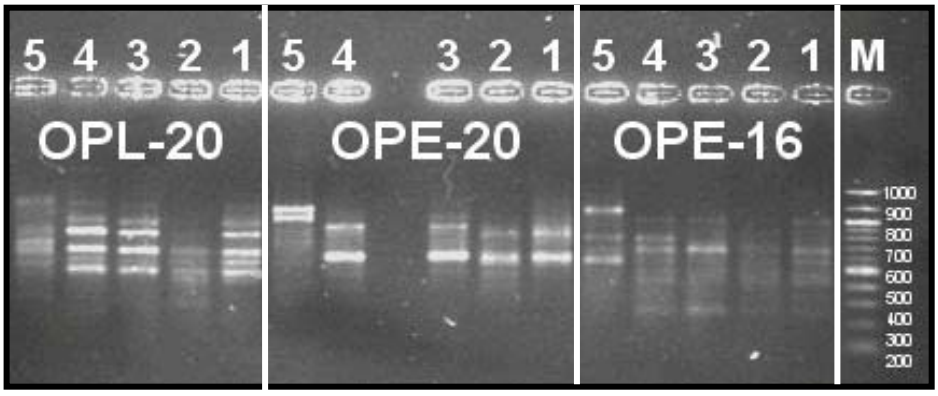
تم عمل شجرة علاقات القرابة الوراثية للأصناف الخمسة استنادًا إلى تحليل بيانات ال RAPDباستخدام طريقة ال UPGMA. فقد أوضحت هذه الشجرة تقسيم التراكيب الوراثية تحت الدراسة إلى مجموعتين، المجموعة الأولى انفردت كفرع مستقل يمثل الصنف نازلي ٨٧. ضمت المجموعة الثانية مجموعتين فرعيتين، الأولى كانت مستقلة وشملت الصنف كوكر٣١٠، في حين شملت المجموعة الفرعية الثانية الاصناف اشور، مرسومي ١٠ ولاشاتا.



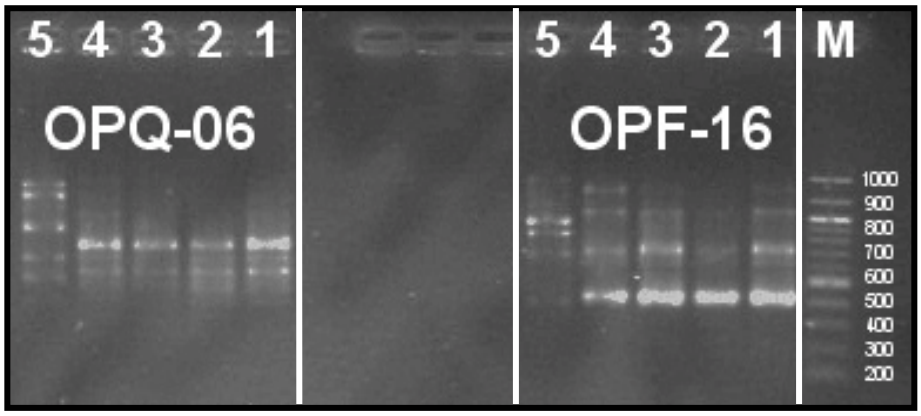
شكل ١. الترحيل الكهربائي لنواتج تقنية ال RAPD-PCR للبادئات OPA-11, OPH-14 ,OPN-07 المرحلة على هلام الاكاروز ١,٢% مع الدليل الحجمي القياسي لأصناف القطن المدروسة كالتالي: ١- لاشاتا ٢- كوكر ٣١٠ ٣- مرسومي ١٠ ٤- أشور ٥- نازلي ٨٧



شكل ٢. الترحيل الكهربائي لنواتج تقنية ال RAPD-PCR للبادئات OPA-10, OPN-16 ,OPQ-20 المرحلة على هلام الاكاروز ١,٢% مع الدليل الحجمي القياسي لأصناف القطن المدروسة كالتالي: ١- لاشاتا ٢- كوكر ٣١٠ ٣- مرسومي ١٠ ٤- أشور ٥- نازلي ٨٧



شكل ٣. الترحيل الكهربائي لنواتج تقنية ال RAPD-PCR للبادئات OPE-16, OPE-20 ,OPL-20 المرحلة على هلام الاكاروز ١,٢% مع الدليل الحجمي القياسي لأصناف القطن المدروسة كالتالي: ١- لاشاتا ٢- كوكر ٣١٠ ٣- مرسومي ١٠ ٤- أشور ٥- نازلي ٨٧



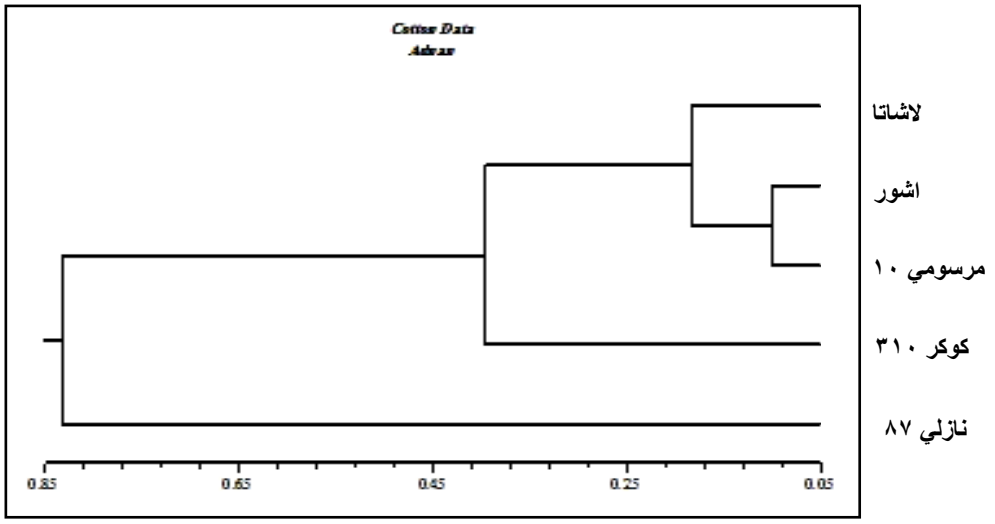
شكل ٤. الترحيل الكهربائي لنواتج تقنية ال RAPD-PCR للبادئات OPQ-06, OPF-16 المرحلة على هلام الاكاروز ١,٢% مع الدليل الحجمي القياسي لأصناف القطن المدروسة كالتالي: ١- لاشاتا ٢- كوكر ٣١٠ ٣- مرسومي ١٠ ٤- أشور ٥- نازلي ٨٧

جدول ١. التسلسل النكليوتيدي للبادئات المستخدمة في تقنية ال RAPD-PCR ، أنواع البادئات التي أظهرت نواتج تضاعف متباينة مع عدد الحزم الكلية والمتباينة ، كفاءة البادئ والقوة التمييزية (%) لكل بادئ

ت	اسم البادئ	التسلسل النكليوتيدي (٣-٥)	عدد الحزم الكلية	عدد الحزم المتباينة	النسبة المئوية للحزم المتباينة	كفاءة البادئ (%)	القوة التمييزية للبادئ (%)
١.	OPN-07	CAGCCCAGAG	٣١	٣١	١٠٠	١٢,٠١	١٤,٥٥
٢.	OPH-14	ACCAGGTTGG	١٨	١٣	٧٢,٢٢	٦,٩٧	٦,١
٣.	OPA-11	CAATCGCCGT	٣٤	٢٩	٨٥,٢٩	١٣,١٧	١٣,٦١
٤.	OPQ-20	TCGCCCAGTC	٧	٧	١٠٠	٢,٧١	٣,٢٨
٥.	OPN-16	AAGCGACCTG	١٩	١٩	١٠٠	٧,٣٦	٨,٩٢
٦.	OPA-10	GTGATCGCAG	٢٠	١٥	٧٥	٧,٧٥	٧,٠٤
٧.	OPE-16	GGTGACTGTG	١٦	١١	٦٨,٧٥	٦,٢	٥,١٦
٨.	OPE-20	AACGGTGACC	١١	١١	١٠٠	٤,٢٦	٥,١٦
٩.	OPL-20	TGGTGGACCA	٢٤	١٩	٧٩,١٦	٩,٣	٨,٩٢
١٠.	OPF-16	GTGAGGCGTC	١٦	١١	٦٨,٧٥	٦,٢	٥,١٦
١١.	OPQ-06	ACGGATCCCC	١٣	٨	٦١,٥٣	٥,٠٣	٣,٧٥
١٢.	OPQ-17	TTCGCCTGTC	١٠	١٠	١٠٠	٣,٨٧	٤,٦٩
١٣.	OPA-06	GGTCCCTGAC	١٤	٩	٦٤,٢٨	٥,٤٢	٤,٢٢
١٤.	OPD-20	ACCCGGTCAC	٢٥	٢٠	٨٠	٩,٦٨	٩,٣٨
		المجموع الكلي	٢٥٨	٢١٣			

جدول ٢. يوضح البادئات التي استطاعت تمييز بعض اصناف القطن واحجام الحزم الناتجة منها

ت	البادئ	الصنف	حجم الحزمة bp
.١	OPA-11	نازلي ٨٧	٩٧٠
.٢	OPA-11	نازلي ٨٧	٣٥٠
.٣	OPQ-20	مرسومي ١٠	٣٥٠
.٤	OPQ-20	نازلي ٨٧	٧٠٠
.٥	OPE-16	نازلي ٨٧	٩٠٠
.٦	OPF-16	أشور	٩٥٠
.٧	OPQ-06	نازلي ٨٧	٩٦٠
.٨	OPQ-06	نازلي ٨٧	٩٤٠



شكل ٥. مخطط التحليل العنقودي (Dendogram) اعتمادًا على قيم معامل البعد الوراثي باستخدام البيانات الناتجة عن بادئ ١٤ عشوائي في تحليل ال UPGMA على أصناف القطن المزروعة في العراق

تشير نتائج جدول ٣ إلى وجود اختلافات وراثية واضحة بين أصناف القطن الداخلة في التجربة والتي كشفت عن البصمة الوراثية باستخدام تقانة RAPD والتي تعتبر الهوية المستخدمة للتشخيص بين الأصناف، وذلك من خلال معرفة البادئات الأربعة عشر القادرة على إظهار التباينات الوراثية بينها دون الحاجة إلى اختبار العديد من البادئات حيث كانت أعلى نسبة للبعد الوراثي (٩٦,٧٧%) بين الصنف نازلي ٨٧ والصنف كوكر ٣١٠ ، قد يعود سبب البعد الوراثي العالي بين نازلي ٨٧ وباقي الأصناف لكونه من الأصناف التي تم إدخالها إلى العراق. في حين كانت اقل نسبة للبعد الوراثي (١٠,٠٢%) بين الصنف أشور والصنف مرسومي ١٠.

أظهرت هذه الدراسة كفاءة تقنية ال RAPD في التمييز بين أصناف القطن المدروسة وفي تحديد درجة القرب والبعد الوراثي بينها مما أسهم في كشف التنوع الوراثي بين بعض أصناف القطن المزرعة في العراق والتي يمكن استثمارها والاستفادة منها في المستقبل ولاسيما في إكثار الأصناف المحدودة الانتشار باستخدام طرائق الأنسجة النباتية من اجل الحفاظ عليها بوصفها مصدرا وراثيا مهما.

جدول ٣. المسافات الوراثية بين أصناف القطن باستخدام البيانات الناتجة من استخدام اربعة عشر بادئ في مؤشرات ال RAPD-PCR

	لاشاتا	كوكر ٣١٠	مرسومي ١٠	أشور	نازلي ٨٧
لاشاتا	٠,٠٠٠٠٠٠				
كوكر ٣١٠	٠,٣٧٨٤٢	٠,٠٠٠٠٠٠			
مرسومي ١٠	٠,١٨٨٥٣	٠,٤٠٨١٠	٠,٠٠٠٠٠٠		
أشور	٠,١٧٧٣٣	٠,٤٠٢٥٢	٠,١٠٠٢٤	٠,٠٠٠٠٠٠	
نازلي ٨٧	٠,٧٥١٨٥	٠,٩٦٧٧٤	٠,٧٩٣٣٦	٠,٨١٢٤٧	٠,٠٠٠٠٠٠

المراجـع

الأبرص، نورس، فيصل حامد، ستيفانو بادولوسي وأحمد محمد مهنا (٢٠١٢). دراسة التنوع الوراثي للشيح الأبيض *Artemisia herba-alba* Asso. باستخدام تقنية RAPD وانتشاره البري في منطقة القلمون - سورية. المجلة العربية للعلوم الصيدلية – مجلة اتحاد الجامعات العربية. المجلد الرابع، العدد الثامن، ربيع الآخر ١٤٣٣ آذار).

القيسي، فادية فؤاد (٢٠١٠). استجابة القطن للكثافة النباتية ومكافحة الأدغال. مجلة العلوم الزراعية العراقية، ٤١ (٥): ٨٠-٩٥.

الملاح، نبيل مصطفى (٢٠٠٩). تأثير التسميد في معقد آفات القطن من مفصليات الأرجل في محافظة نينوى. مجلة جامعة تكريت للعلوم الزراعية، ٩ : ١.

النعيمي، جاسم جواد جادر وأحمد محمد لهمود (٢٠٠٨). مقارنة التراكيب الوراثية في الحاصل ومكوناته ونوعيته لمحصول القطن الابلاند. مجلة القادسية للعلوم الصرفة، ٥ (١): ١-١٤.

حديد، مها لطفي (٢٠٠٧). السلوك الوراثي لبعض صفات الإنتاجية لدى هجينين من القطن. مجلة جامعة دمشق للعلوم الزراعية، ٢٣ (٢): ٣٧ – ٥٠.

حسين، جَنان قاسم (٢٠١١). البعد الوراثي لأنواع ورد باستخدام RAPD مجلة العلوم الزراعية العراقية، ٤٢ (٢): ٧١-٧٩.

سرحان، صبا ياسين، رولا محمد سعيد بايرلي وعبد الله فرحان الطاه (٢٠١٠). التوصيف الجزيئي لبعض أصناف وطرز المشمش في سورية باستخدام تقنية IRAP. المجلة الاردنية في العلوم الزراعية، ٦ : ٤.

ضميرية، جهاد، مروان حميدان، انس خنشور وأحمد عبد القادر (٢٠١٠). التوصيف الجزيئي لبعض الطرز البرية من الزعرور *Crataegus azarolus* L باستخدام تقنية RAPD. مجلة جامعة دمشق للعلوم الزراعية، ٢٦ (١١): ٩٣ – ١٠٦.

Ahmed, F. (1999). Random amplified polymorphic DNA. (RAPD) analysis reveals genetic relationships among the annul Cicer species . Theor. Appl. Genet., 98: 657-663.

Barone, A., A. Sebastiano and D. Carputo (1999). Chromosome pairing in Solanum commersonii, S. tuberosum sexual hybrids detected by commersonii-specific RAPDs and cytological analysis. Genome, 42: 218 –224.

Nei, M. and W.H. Li (1979). Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases". Pro. Natl. Acad. Sci. USA., 74: 5267-5273.

Patil, M.D., D.P. Biradar, V.C. Patil, B.S. Janagoudar and H.L. Nadaf (2007). Analysis of Genetic Diversity of Cotton Genotypes using RAPD PCR Technique. Karnataka J. Agric. Sci., 20 (2): 215-217.

Permingeat, H.R., M.V. Romagnoli and R.H. Vallejos (1998). A Simple Method for Isolating High Yield and Quality DNA from Cotton (*Gossypium hirsutum* L.) Leaves. Plant Molecular Biology Reporter, 16 : 1-6.

Rohlf, F.J. (1993). NTSYS-pc, Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System". Applied Biostatistical Inc., New York.

Russell, J.R., J.D. Fuller, M. Macaulay, B.G. Hatz, A. Jahoor, W. Powell and R. Waugh (1997). Direct comparison of levels of genetic variation among barley accessions detected by RFLPs, AFLPs, SSRs and RAPDs. Theor. Appl. Genet., 95: 714-722.

Sambrok, J.A.D.W.R. (2001). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3rd ed.

Sedra, M.H., P. Lashermes, P. Trouslot, M.C. Combes and S. Homan (1998). Identification and genetic diversity analysis of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) varieties from Morocco using RAPD markers. Euphytica, 103: 75 – 82.

Sneath P.H.A. and Sokal (1973). Numerical taxonomy-the principals and practice of numerical classification. W.H. Freeman and Co., San Francisco.

Swoboda, I. and P.L. Bhalla (1997). RAPD analysis of genetic variation in the Australian sunflower Scaevola. Genome, 40: 600 – 606.

Vogt, T., M. Francoise, K. Frank, J. Welsh and M. Clelland (1997). Fingerprinting of DNA and RNA using arbitrarily primed PCR. IN: G. Anolles and P. M. Gresshof (eds.). DNA Markers, Protocols, Application and Overview. New York, 55-74.

Willams, J.G.K., A.R. Kublik, K.J. Livake, J.A. Rafalski and S.V. Tingey (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res., 18 : 6531-6535.

ANALYSIS OF GENETIC DIVERSITY OF SOME COTTON GENOTYPES USING RANDOM AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA (RAPD) MARKERS

Adnan F. Al-Azawie*, A.H. Al-Assie and Sara Q. Al-Nasserie

Biology Dept., College of Sci., Tikrit Univ., Iraq

ABSTRACT

The aim of the present study was using the random amplified polymorphic DNA (RAPD) based on Polymerase Chain Reaction (PCR) to analyse genetic diversity of five varieties of *Gossypium hirsutum* L. cultivated in Iraq. DNA was isolated from plant leaves and eighteen primers were used initially in the reactions of RAPD technique, four of them did not give any result while the remaining fourteen gave good results. Discrepancies between the fragments multiplied for each variety (numbers and sizes) was revealed by running samples on the agarose gel. The results of RAPD technique for fourteen primers initially showed differences in the number of amplified bands and variation in molecular size, the total number of bands was (258), the number of polymorphic bands valued (213), while the number of monomorphic bands was (45).The primer (OPA-11) gave the highest efficiency (13.17) while primer (OPQ-20) was less efficient (2.71), and on the other hand, the primer (OPN-07) showed the highest discriminatory power (14.55), while the lowest discriminatory power (3.75) was for primer (OPQ-06). Maximum genetic distance (0.9677) was found between Nazly 87 and Coker 310 while the minimum genetic distance (0.1002) was found between Ashur and Marsomy 10. RAPD technique was able to find a unique DNA distinctive band able to distinguish between studied cotton varieties and can be used as a distinctive genetic tag to preserve the rights of plant breeders.This study showed the efficiency of RAPD technique to distinguish between the studied cotton varieties and determine the degree of similarity and distance, including genetic, which shares in the detection of genetic diversity among some cultivated cotton varieties in Iraq.

Key words: Cotton, genetic diversity, RAPD markers, duster analysis.

المحكمـون:

١ـ أ.د. أحمــد عبـدالســـلام محمود أستاذ الوراثة المتفرغ – كلية الزراعة – جامعة الزقازيق.

٢ـ أ.د. السيد محمود إبراهيم محجوب أستاذ الوراثة – كلية الزراعة – جامعة الزقازيق.