

تقدير الإبعاد الوراثية بين بعض أصناف الباميا المحلية باستعمال مؤشرات التضاعف العشوائي المتعدد الأشكال لسلسلة الدنا (RAPD)

¹ ثامر خضير مرزة

² حيدر صادق جعفر

¹ قسم علوم الحياة - كلية العلوم - جامعة الكوفة - جمهورية العراق

² قسم البستنة وهندسة الحدائق - كلية الزراعة - جامعة الكوفة - جمهورية العراق

المستخلص

أجريت هذه التجربة في مختبر البيولوجي الجزيئي في كلية العلوم / جامعة الكوفة سنة 2016 م، لمعرفة البعد الوراثي لستة أصناف من الباميا المحلية باستعمال مؤشرات التضاعف العشوائي المتعدد الأشكال لسلسلة الدنا (RAPD) Randomly Amplified Polymorphic DNA. كشف عن التباينات بين القطع المتضاعفة لكل صنف (إعدادها وأحجامها الجزيئية) بعد ترحيل نواتج التضاعف للعينات على هلام الاكاروز وتصيغها ببروميد الاثيديوم. اختيرت خمسة بوادئ والتي أظهرت نواتج تضاعف متباينة بين الأصناف قيد الدراسة، إذ أعطت تلك البوادئ 19 حزمة متباينة Polymorphic bands من مجموع 41 حزمة كلية. بينت النتائج أن اقل حجم جزيئي للقطع المتضاعفة كان عند البادئ UBC-514 إذ بلغ 276 زوج قاعدي بينما البادئ OPX-18 امتلك أعلى حجم جزيئي للقطع المتضاعفة وبلغ 1654 زوج قاعدي. وأعطى البادئ UBC-210 أعلى القيم لعدد الحزم الكلية والمتضاعفة والمتباينة بلغت 14 و 46 و 9 حزمة قياساً "البادئ UBC-620 الذي أنتج اقل قيمة" لتلك الحزم بلغت 2 و 12 و 0 حزمة، على التتابع. أن أعلى نسبة مئوية للتباين الشكلي وكفاءة البادئ بلغت 64.3% و 0.2% على التتابع أعطاهما البادئ UBC-210، بينما لم يعط البادئ UBC-620 أي نسبة مئوية للتباين الشكلي ولا كفاءة البادئ. أشارت النتائج إلى أن أعلى قيمة للبعد الوراثي (مسافة وراثية) كانت بين الصنفين حسيناوية كربلاء 2 وحسيناوية الحلة 5 وبلغت 0.676 مقارنة باقل قيمة للبعد الوراثي بين الصنفين بتيرة بغداد 3 وحسيناوية الحلة 5 وبلغت 0.143. فيما كشف التحليل التجميعي (شجرة العلاقة الوراثية) مجموعتين وراثيتين رئيسيتين (A و B) البعد بينها 0.533، ضمت المجموعة الكبيرة وتدعى A أربعة أصناف هي بتيرة بغداد وخنيسري البصرة وحسيناوية الحلة والموصالية بينما ضمت المجموعة الصغيرة وتدعى B صنفان هما حسيناوية الناصرية وحسيناوية كربلاء.

يستنتج من التجربة أن لمؤشرات RAPD أهمية في كشف التغيرات الوراثي وتعتمد كفاءتها على عدد البوادئ والتباين الوراثي بين الأصناف قيد الدراسة.

كلمات مفتاحية: التباين الوراثي، الشجرة الوراثية، المؤشرات الجزيئية.

* البحث جزء من أطروحة دكتوراه للباحث الثاني.

المقدمة

بالظروف البيئية السائدة في ظروف نمو النباتات (21). وأشار Backman و Soller (7) إلى أن دراسة المؤشرات البروتينية تتأثر بنوع النسيج ومرحلة نموه وعمره وتداخلها مع الظروف البيئية، لذلك برزت الحاجة إلى إيجاد نوع من المؤشرات التي تدرس تلك العلاقات الوراثية على مستوى الدنا DNA، تلك هي مؤشرات الدنا DNA Markers التي تمتاز بكثرة أعدادها وسرعة الحصول عليها وعدم تأثرها بالبيئة ونوع النسيج والمرحلة العمرية للنبات قيد الدراسة، يضاف لذلك أنها تستطيع الكشف عن التغيير ليس فقط في أجزاء الدنا المشفر عنها بل أيضاً الأجزاء غير المشفرة فضلاً عن تحديد الجينات ذات الأهمية في برامج تربية النبات وتحسينه (11).

وأثبتت تقنية RAPD بأنها أداة قوية في تقييم الأداء الوراثي للنبات وتوضيح العلاقات الوراثية ضمن وبين النوع الواحد، فقد استعمل Aladele وآخرون (5) هذه التقنية في تجاربهم لبيان العلاقة الوراثية لـ 93 تركيباً وراثياً من الباميا، 50 تركيب وراثي أفريقي و 43 تركيب وراثي آسيوي، إذ أوضح التحليل الجزيئي أن جميع البادئات الثلاثة عشر المستعملة أظهرت تنوع أكثر في التراكيب الوراثية للباميا الآسيوية من الأفريقية، وأشارت التجربة أن هذا التنوع يشير إلى أن هذه التراكيب جمعت من ستة مناطق مختلفة. وأوضح Saifullah وآخرون (18) في تجاربهم تقييم التنوع الوراثي لـ 121

تعود الباميا (Okra Moench) *Abelmoschus esculentus* L. إلى العائلة الخبازية Malvaceae وهي من محاصيل الخضر الصيفية المزروعة في أغلب المناطق الاستوائية وشبه الاستوائية بالعالم (9). واعتقد بوراس وآخرون (2) أن موطنها الأصلي قارة أفريقيا وبالتحديد أثيوبيا والسودان إذ وجد النبات مزروعاً هناك منذ 4000 سنة ق.م. ومنها انتشرت إلى منطقة حوض البحر الأبيض المتوسط والجزيرة العربية والهند.

الباميا واسعة الانتشار في العراق وتتميز بأن ثمارها مرغوبة بدرجة كبيرة لدى أكثر السكان لكثرة طرائق استعمالها إذ تؤكل بعد طهيها أو تجفيفها أو تجميدها أو تعلقب لغرض استهلاكها في فصل الشتاء (1)، ولاحتوائها على بعض العناصر الغذائية والمواد الكربوهيدراتية والبروتينات.

أن دراسة التنوع الوراثي بين أصناف الباميا مهمة لتحديد هوية الأصناف وتقدير القرب أو البعد الوراثي بينها التي تثبت جداره في غرض معين لأهميته في برامج التربية إذ يتم عن طريقها اختيار انسب الأباء للأهداف المرسومة لها، إذ كان الاعتماد سابقاً على المؤشرات المظهرية بشكل كبير كمؤشرات وراثية للتمييز بين الأصناف رغم مساوئها بكونها عادت غير كفوءة في التحديد الدقيق للبعد الوراثي بين الأصناف لتأثرها الكبير

المواد وطرائق العمل

أجريت التجربة في مختبر البايولوجي الجزيئي / كلية العلوم / جامعة الكوفة للمدة من 14 / 2 / 2016 ولغاية 13 / 4 / 2016 وتضمنت ما يلي:

1- البادئات

جهزت البادئات المعتمدة في هذه الدراسة من قبل شركة Bioneer الكورية في شكل مجفد Lyophilized والبالغ عددها 5 بادئات، وتم تحضيرها باستعمال دارئ TE للحصول على التركيز النهائي، وجدول 1 يبين أسمه وتتابعه.

تركيباً وراثياً" في الباميا باستعمال مؤشرات RAPD أن البادئات العشوائية المستعملة أعطت 38 حزمة مختلفة، وأشار مخطط dendrogram للحزم الناتجة إلى وجود 8 مجاميع طبقاً لتنوع هذه التراكييب كما أن تقنية التحليل الوراثي كانت مشابهة لما موجود بالطرز المظهرية، وأوضحت التجربة وجود قاعدة وراثية عالية للتنوع الوراثي يمكن أن تستغل في برامج التربية.

وتهدف التجربة إلى تحديد البصمة الوراثية للأصناف قيد الدراسة وتقدير البعد الوراثي فيها الأمر الذي له أهمية في توجيه مربّي النبات لاختيار الأصناف لبرامج تربية وتحسين النبات.

جدول 1: اسم وتتابع البادئ

اسم البادئ	تتابع البادئ
UBC-210	5'GCACCGAGAG3'
OPX-18	5'GACTAGGTGG3'
UBC-465	5'GGTCAGGGCT3'
UBC-514	5'CGGTTAGACG3'
UBC-620	5'TTGCGCCCGG3'

(5) Aladale

2- عزل DNA من النماذج النباتية

وخيصري البصرة وبتيرة بغداد وحسناوية كربلاء وحسناوية الناصرية)، وباستعمال خطوات مجهزة من قبل شركة Geneaid الصينية.

عزل DNA من الأوراق النباتية الفتية بعمر 42 يوم لأصناف الباميا الستة قيد الدراسة وهي (الموصلية وحسناوية الحلة

3- تحضير خليط التفاعل PCR خاصة معقمة وتحتوي كل أنبوبة المكونات الآتية وبالتراكيز المبينة إزاء كل مادة، وجدول 2 يوضح ذلك.

جهاز خليط التفاعل الرئيس Master mix من قبل شركة Bioneer في أنابيب

جدول 2: مكونات خليط التفاعل الرئيس Master mix

حجم التفاعل	المكونات
Reaction size (20 µl reaction)	Component
1Unit	DNA polymerase
µ 250M	Each: dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
10 mM	Tris-HCl (pH 9.0)
30 mM	KCl
1.5 mM	MgCl ₂
µ 5M	Stabilizer and tracking dye

4- تفاعل البلمرة المتسلسل

الايونات الذي يكمل الحجم النهائي للتفاعل ليصل حجم المحلول 20 مايكروليتر.

تم تطبيق المؤشر الجزيئي المعتمد في هذه الدراسة RAPD في تقنية PCR وفق ما يلي:

- ثم وضعت الأنابيب الحاوية على خليط التفاعل والعينات في جهاز المبلمر الحراري Thermocycler لبدء التفاعل وحسب البرنامج الآتي:

- أضيفت 5 مايكروليتر من قالب DNA، 2 مايكروليتر من البادئ إلى أنبوبة التفاعل الرئيس Master Reaction المضاف لها سابقاً 13 مايكروليتر ماء مقطر منزوع

الوقت	درجة الحرارة	الخطوة	البادئ
5 min.	94 °C	Initial Denaturation	UBC-210
No. of Cycles = 40 Cycles			
			OPX-18

UBC-465	Denaturation	94 °C	1 min.
UBC-514	Annealing	40 °C	2 min.
UBC-620	Extension	72 °C	2 min.
	Final Extension	72 °C	5 min.

(6) Al-Badeiry

5- الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز

أجري الترحيل الكهربائي وفقاً لـ Sambrook و Russe (19) علمياً أن تركيز الهلام 1.2% وبفولتية مقدارها 70 فولت لمدة 60 دقيقة مع الدليل الحجمي 1kb، وتم فحص الهلام بعد تصبغة بصبغة بروميد الاثيديوم تحت الأشعة فوق البنفسجية لغرض تصوير الهلام بجهاز Gel documentation system.

6- تحليل البيانات

تم تحويل النتائج التي ظهرت في الهلام إلى جداول التوصيف وذلك بوضع 1 عند وجود الحزمة و 0 عند غيابها بغية إيجاد العلاقة الوراثية بين الأصناف الداخلة في هذه الدراسة، وتم تحويل بيانات التوصيف Characterization data إلى قيم التشابه Similarity المقدر استناداً إلى Nei و Lei (13) باستعمال الحاسوب ضمن برنامج .SIMQUL.

$$\text{Similarity} = \frac{2nxy}{nx + ny} \times 100$$

والتي تعتمد على نتائج التشابه الوراثي وفقاً للمعادلة الآتية:

$$\%G.D. = 1 - \frac{2nxy}{nx + ny} \times 100$$

وتم تقدير النسبة المئوية للبعد الوراثي Genetic Distance (GD) بين الأصناف

علمياً أن:

nxy = تمثل عدد الحزم المشتركة بين النموذجين x و y والتي تمثل أي صنفين من الأصناف قيد الدراسة.

$$nx = \text{عدد الحزم الكلية في النموذج } x.$$

$$ny = \text{عدد الحزم الكلية في النموذج } y.$$

وبعد إيجاد العلاقة الوراثية بين الأصناف قيد الدراسة يتم رسم مخطط التحليل التجميعي Dendrogram بالاستناد إلى طريقة (UPGMA) Unweighted Pair - Group Method for the Arithmetic Average (20) التي تبين توزيع هذه الأصناف إلى مجاميع، فالأصناف المتشابهة جداً تبقى في مجموعة واحدة وترتبط المجاميع المتشابهة معاً في مجاميع أكبر (بدرجة تشابه أقل) وهكذا، ويتم ذلك ضمن البرنامج الإحصائي NTSYS (17).

وقدرت النسبة المئوية للتغاير الشكلي لكل بادئ بتطبيق المعادلة الآتية ومن قبل Grudman وآخرون (19).

عدد الحزم المتباينة للبادئ

$$100 \times \frac{\text{عدد الحزم المتباينة للبادئ}}{\text{عدد الحزم الرئيسية للبادئ}} = (\%) \text{ التباين الشكلي}$$

عدد الحزم الرئيسية للبادئ

والنسبة المئوية لكفاءة البادئ تم إيجادها اعتماداً على المعادلة الآتية:

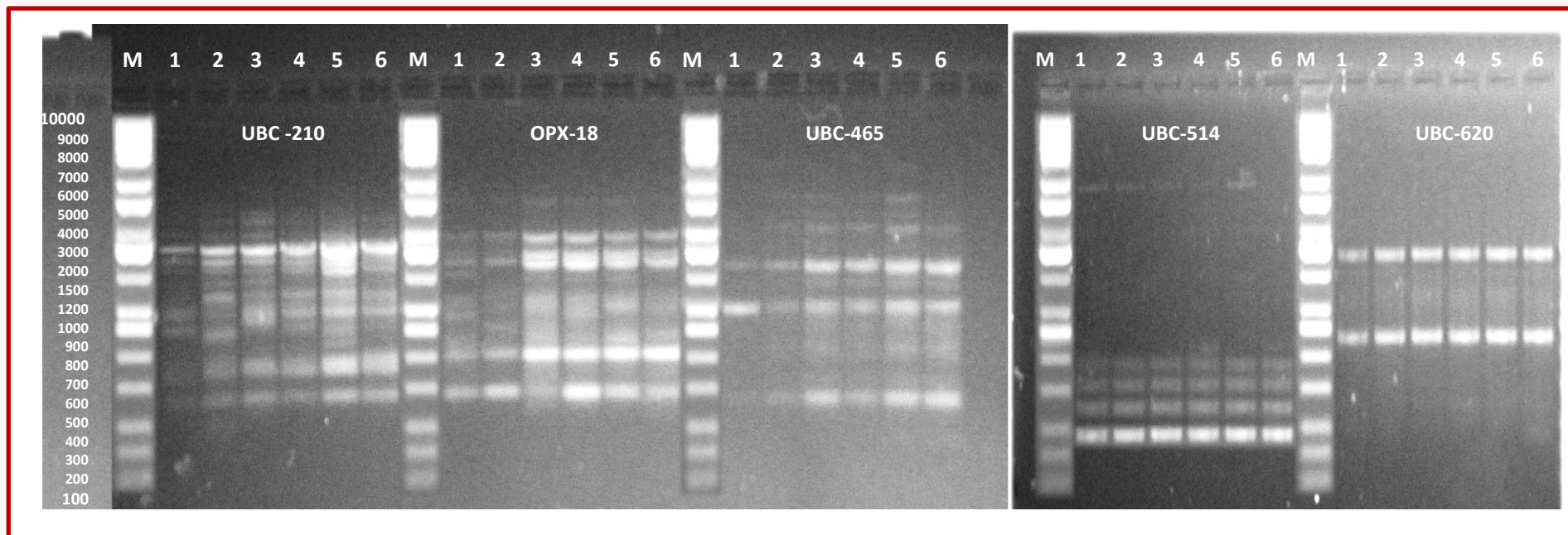
عدد الحزم المتباينة للبادئ

$$100 \times \frac{\text{عدد الحزم المتباينة للبادئ}}{\text{عدد الحزم المتضاعفة للبادئ}} = (\%) \text{ الكفاءة}$$

عدد الحزم المتضاعفة للبادئ

النتائج والمناقشة

يبين الشكل 1 نواتج التضاعف لخمسة من البوادئ العشوائية (OPX-18 و UBC-210 و UBC-465 و UBC-514 و UBC-620).



شكل (2) نواتج تضاعف البوادي بعد ترحيلها على هلام الاكاروز بتركيز 1.2% مع الدليل الحجمي القياسي M لستة أصناف من الباميا
1- الموصلية 2- حسيناوية (الحلة) 3- خنصري (البصرة) 4- بتيرة (بغداد) 5- حسيناوية (كربلاء) 6- حسيناوية (الناصرية)

جدول 3: بيانات خمسة من البوادي العشوائية RAPDs تتضمن حجم الحزم المتضاعفة مقدره بالزوج القاعدي وعدد الحزم الرئيسية وعدد الحزم المتضاعفة وعدد الحزم المتمثلة وعدد الحزم المتغايرة وعدد الحزم المنفردة والنسبة المئوية للتغاير الشكلي وكفاءة البادئ

البوادي	حجم الحزم المتضاعفة (زوج قاعدي)	عدد الحزم الرئيسية	عدد الحزم المتضاعفة	عدد الحزم المتمثلة	عدد الحزم المتغايرة	عدد الحزم المنفردة	التغاير الشكلي %	كفاءة البادئ %
UBC-210	377-1110	14	46	3	9	2	64.3	0.2
OPX-18	500-1654	12	43	4	5	3	41.7	0.11
UBC-465	380-1361	8	33	3	4	1	50	0.12
UBC-514	276-1552	5	28	4	1	0	20	0.03
UBC-620	565-883	2	12	2	0	0	0	0
Total		41	162	16	19	6		

أظهرت نتائج الجدول 3 الخاصة بالترحيل الكهربائي للقطع المتضاعفة أن اصغر حجم جزئي لها أعطاه البادئ UBC-514 بلغ 276 زوج قاعدي قياساً بأكبر حجم جزئي للقطع المتضاعفة عند البادئ OPX-18 وبلغ 1654 زوج قاعدي. أن عدد الحزم الرئيسية والمتضاعفة والمتغايرة بلغت 14 و 46 و 9 و حزمة أعطاه البادئ UBC-210 وكانت الأعلى قيمة مقارنة مع اقل القيم لعدد الحزم الرئيسية والمتضاعفة والمتغايرة في البادئ

UBC-620 والتي بلغت 2 و 12 و 0 حزمة، على التتابع. ويوضح الجدول نفسه أعطاه البادئين OPX-18 و UBC-514 أكثر عدد للحزم المتمثلة بلغ 4 حزمة مقارنة باقل عدد للحزم المتمثلة وبلغ 2 حزمة أعطاه البادئ UBC-620. أما الحزم المنفردة فكانت أعلى قيمة لها عند البادئ OPX-18 بلغت 3 حزمة بينما البادئين UBC-514 و UBC-620 لم يعطيا أي حزمة منفردة. أن البادئ UBC-210 أعطى أعلى نسبة مئوية للتغاير الشكلي

وكفاءة البادئ وبلغت 64.3% و 0.2%، على التتابع. بينما لم يعط البادئ UBC-620 أي نسبة مئوية للتغاير الشكلي وكفاءة البادئ. يوضح الجدول 4 أن أعلى قيمة للبعد الوراثي (مسافة وراثية) كانت بين الصنفين

جدول 4: البعد الوراثي لستة أصناف من الباميا (1- حسيناوية الناصرية 2- حسيناوية كربلاء 3- بتيرة بغداد 4- خنيصري البصرة 5- حسيناوية الحلة 6- الموصلية) باستعمال

مؤشرات RAPD

الأصناف	1	2	3	4	5	6
1	0					
2	0.296	0				
3	0.563	0.559	0			
4	0.456	0.521	0.206	0		
5	0.665	0.676	0.143	0.273	0	
6	0.390	0.483	0.359	0.328	0.387	0

في عدد المواقع المكملية لذلك البادئ بين الأصناف قيد الدراسة. وعموماً فإن معدل عدد الحزم للبادئات المستعملة لهذه التجربة بلغ 5.40 حزمة لكل بادئ. ووجد Williams وآخرون (22) التناسب ما بين عدد الحزم المتوقعة عندما استعمل البادئات العشوائية مع دنا الأصناف. وأوضح Newbury و Ford-Lloyd (14) أن حجم القطعة المتضاعفة يستند على البعد بين مواقع ارتباط البادئ على شريطي الدنا القالب أي أنها تمثل المنطقة

فيما كشف التحليل التجميعي (شجرة العلاقة الوراثية) مجموعتين وراثيتين رئيسيتين ضمت المجموعة الأولى صنفين وراثيين هما حسيناوية الناصرية وحسيناوية كربلاء بينما ضمت المجموعة الثانية أربعة تراكيب وراثية هي بتيرة بغداد وخنيصري البصرة وحسيناوية الحلة والموصلية، وكما هو مبين في الشكل 2.

أن الاختلاف في عدد الحزم الناتجة من استعمال كل بادئ سببها يعود إلى الاختلاف

ويشير الجدول 4 إلى أن اقل بعد وراثي تحقق بين الصنفين بتيرة بغداد 3 وحسيناوية الحلة 5 معناه أن التشابه الوراثي بين هذين الصنفين كان أعلى ما يمكن بينما اكبر بعد وراثي متحقق بين الصنفين 2 حسيناوية كربلاء و 5 حسيناوية الحلة ومعناه أن هذين الصنفين التشابه فيهما اقل ما يمكن وأن نسبة البعد الوراثي بين الأصناف كانت بين 0.143-0.676.

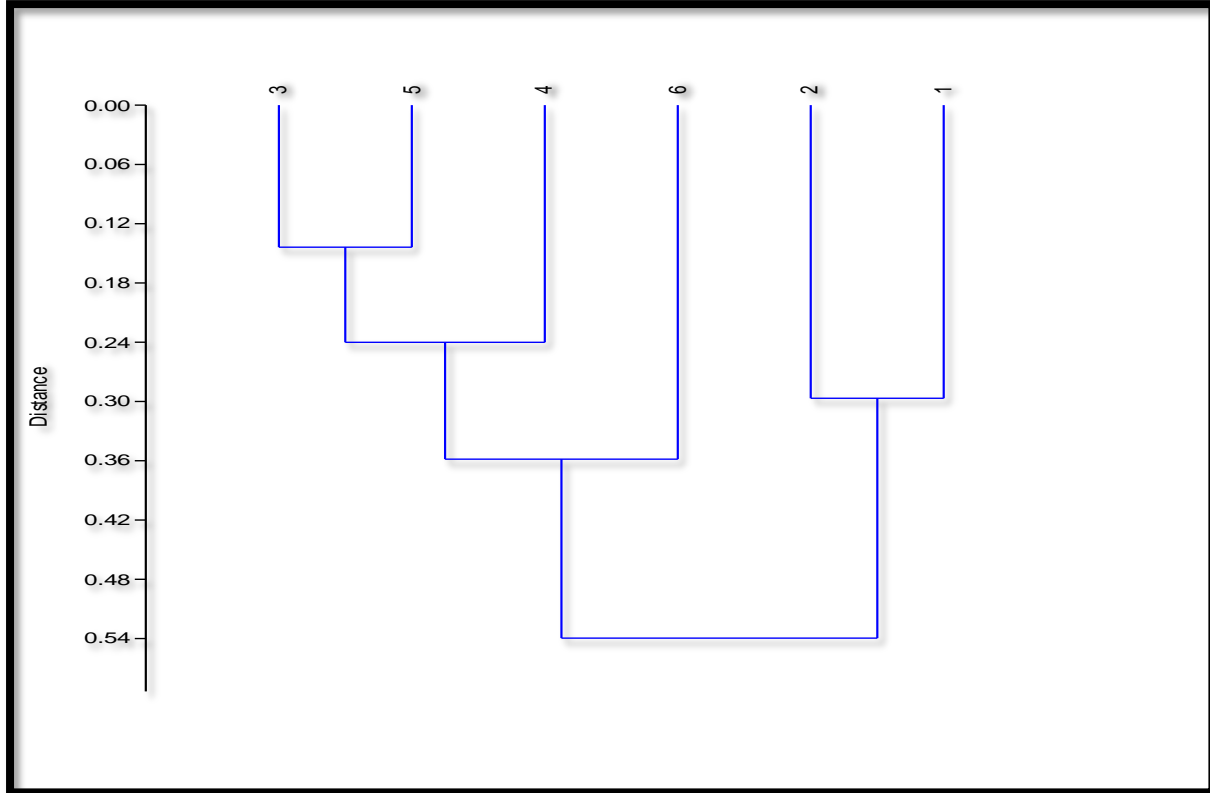
ولاحظ Bai وآخرون (8) أن البعد الوراثي المستخرج من تطبيق مؤشرات RAPD يتأثر بعدد الحزم الناتجة، ووجد أيضاً أن نسبة عدد الحزم المتغايرة إلى عدد الحزم الكلية تعد العامل المهم في تقدير البعد الوراثي. وتوصل Priyanka وآخرون (16) إلى أن وجود التشابه الوراثي العالي بين الصنفين يعود إلى اشتراكهما بنفس الاليلات التي انحدر إليهما من سلف مشترك Ancestor وبهذا الأساس تبنى العلاقة الوراثية، وقد ترتبط البادئات بها وأن ارتباط البادئات بالمناطق المشتركة تظهر على شكل حزم مشتركة فتزداد نسبة التشابه الوراثي بينهما وعند مراجعة صفات التركيبين المظهرية وجد بأنهما يشتركان بالعديد من الصفات المظهرية مثل ارتفاع النبات والمساحة الورقية ومن هنا نستنتج بأن وجود هذه الصفات والمشاركة منها تساهم في زيادة نسبة التشابه الوراثي بين العينات قيد الدراسة، وهذه جاءت متفقة مع ما ذكره Bai وآخرون (8). وهذه التجربة تتفق مع ما توصل إليه

المحصورة بين موقعي الارتباط تلك، وبما أن تلك المواقع منتشرة على الجينوم بشكل عشوائي فأن حدوث أي تغير في تسلسل النيوكليوتيدات نتيجة لحدوث الطفرات التلقائية spontaneous أو المستحثة Induced يؤثر على البعد بين موقع وآخر وعلى يتغير حجم القطعة المتضاعفة. ويمكن الاستفادة من وجود الحزم المشتركة بين بعض الأصناف دون أصناف أخرى بربطها بصفات معينة تشترك بها تلك الأصناف مثلها تحمل الظروف البيئية غير الملائمة ومقاومة المسببات المرضية، وهذا ما أكده Saifullah وآخرون (18) و Prakash وآخرون (15) و Mahmood وآخرون (12) في تجاربهم على نباتات الباميا والحمص ومع ما توصلت إليه بني حسن (3) في تجربتها على محصول الرز.

أظهرت نتائج الجدول 3 وجود الحزم المتفردة في البادئات (18-OPX و UBC-210 و UBC-465) بينما البادئين UBC-514 و UBC-620) لم يظهر بهما أي حزمة متفردة، وأن دورها واضح في تحديد البصمة الوراثية للصنف لأنها تعطي نتائج ذات ميزة عالية بوقت قياسي، ويضاف أيضاً أهمية الحزم المتغايرة في تحديد البصمة الوراثية لذلك الصنف من بين الأصناف قيد الدراسة، كما أن البادئات التي تؤدي نتائج تفاعلاتها إلى وجود حزماً متغايرة عدة تكون فرصتها اكبر في إيجاد بصمة مميزة للأصناف قيد الدراسة (22).

الناتجة عن مؤشرات RAPD تعتمد وبصورة أساسية على الأصناف قيد الدراسة.

Degani وآخرون (10) وحسين (4) في تجربتهما على نباتات الفراولة والباذنجان بالتتابع، إذ وجد أن درجة التشابه الوراثي



شكل 2: شجرة العلاقة الوراثية بين ستة أصناف من الباميا (1- حسيناوية الناصرية 2- حسيناوية كربلاء 3- بتيرة بغداد 4- خنيسري البصرة 5- حسيناوية الحلة 6- الموصلية) باستعمال مؤشرات RAPD

1- الدجوي، علي. 1996. تكنولوجيا زراعة وإنتاج الخضر. مكتبة مدبولي. جمهورية مصر العربية.

2- بوراس، ميتادي وبسام أبو ترابي وإبراهيم البسيط. 2006. محاصيل الخضر. الجزء الثاني. كلية الزراعة. جامعة دمشق. مطبعة الداودي. جمهورية سوريا.

من نتائج التجربة نستنتج أن لمؤشرات RAPD أهمية في كشف التغاير وتحديد بصمة مميزة للأصناف قيد الدراسة إلا أن ذلك يعتمد على عدد البوادي المستعملة وعدد الأصناف وهذا مستقبلاً قد يكون له أهمية في مجال تربية النبات وتحديد بصمة للأصناف الواعدة لبرامج تربية وتحسين النبات.

المصادر

- length polymorphism in genetic improvement: Methodologies, Mapping and costs. Theory Appl. Genet., 67: 35-43.
- 8- Bai, D.; J. Brandle and Reeleder, R. .1997. Genetic diversity in North American ginseng (*Panax quinquefolius* L.) grown in Ontario by RAPD analysis. Genome., 40: 111-115.
- 9- Benchasri, S. .2012. Okra *Abelmoschus esculentus* (L.) Moench as a valuable vegetable of the world. Ratar. Porrt., 49: 105-112.
- 10- Degani, C.; L. J. Rowland; J. A. Saunders; S. C. Hokanson; E. L. Ogden; G. A. Golan and Galletta, G. J. .2001. A comparison of genetic relationship measures in strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) based on AFLPs, RAPDs, and Pedigree data. Euphytica, 117: 1-12.
- 3- بني حسن، سلوى حمزة حسين. 2016. التوصيف الوراثي لبعض أصناف الرز (*Oryza sativa* L.) باستخدام المؤشرات الجزيئية وبروتين البذور الكلي. رسالة ماجستير. كلية التربية للبنات. جامعة الكوفة. جمهورية العراق.
- 4- حسين، جان قاسم. 2010. توظيف المؤشرات الجزيئية في دراسة التنوع الوراثي لبعض أصناف الباذنجان (*Solanum melongena* L.) مجلة الفرات للعلوم الزراعية، 2 (2): 97-105.
- 5- Aladale, S. E.; O. J. Ariyo and Lapena, R. .2008. Genetic relationship among West African okra (*Abelmoschus caillei*) and Asian genotypes (*Abelmoschus esculentus*) using RAPD. Africa J. Biotech., 7(10): 1426-1431.
- 6- Al-Badeiry, N. A. H. .2013. Molecular and cytological studies on some (*Zea mays* L.) varieties in Iraq. Ph.D. Thesis, Faculty of Science, Kufa University, Republic of Iraq.
- 7- Backman, J. S. and Soller, M. .1983. Restriction Fragment

- Plant Growth Regulation, 12: 43-51.
- 15- Prakash, K. M. P. and Ravishankar, K. V. .2011. Assessment of genetic relatedness among okra genotypes *Abelmoschus esculentus* (L.) Monech using RAPD markers. Electronic J. Plant Breeding, 2(1): 80-86.
- 16- Priyanka, M.; J. Devendra; K. Sumita and Kothari, S. .2013. Analysis of genetic diversity among (*Tagetes patula* L.) cultivars based on RAPD markers. Indian Journal of Horticulture, 70(4): 549-554.
- 17- Rohlf, F. J. .1993. Numerical taxonomy and multivariate analysis system. Version 1-8. Exeter Software. Setauket. N. Y.
- 18- Saifullah, M.; M.G. Rabbani and Garvey, E. J. .2010. Estimation of genetic diversity of okra *Abelmoschus esculentus* (L.)
- 11- Kylin, M. .2010. Genetic diversity of rose root (*Rhodiola rosea* L.) from Sweden, Greenland and Faroe Island. M.Sc. Thesis. College of Landscape Planning, Horticulture and Agriculture Sciences. Swedish University of Agricultural Sciences.
- 12- Mahmood, Z.; M. Athar; M. Aurangzeb; K. Ali Muhammad; S. Shahzadi and Dasti, A. .2011. Analysis of genetic diversity in chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers African J. Biotech., 10(2): 140-145.
- 13- Nei, M. and Li, W.H. .1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proc. Nat Acad. Sci., USA. 74: 5269-5273.
- 14- Newbury, H. J. and Ford-Lyod, B. V. .1993. The use of RAPD for assessing variation in plants.

Monech using RAPD markers
SAARC. J. Agric., 8(2): 19-28.

- 19- Sambrook, J. and Russell, D. W. .2001. *In vitro* application of DNA by the polymerase chain reaction, in molecular cloning: Chapter 8: 691-733. A laboratory manual. 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- 20- Sneath, P. H. A. and Sokal, P. R. .1973. Numerical taxonomy, Freeman, San Francisco, USA, 573 PP.
- 21- Tanksley, S. D.; N. D. Young; A. H. Paterson and Bonierable, M. W. .1989. RFLP mapping in plant breeding new tools for an old science. *Biotechnology*, 7: 257-264.
- 22- Williams, J. G. K.; M. K. Hanafey; J. A. Rafalski and Tingey, S. V. .1993. Genetic analysis using Random Amplified Polymorphic DNA markers. *Methods in Enzymology*, 218: 704-741.

Estimation of Genetic Distances Among Some Local Okra Cultivars Using Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Markers

Thamer Khudair Merza

Hayder Sadaq Jaafer

Department of Biology – Faculty of Science – University of Kufa – Republic of Iraq

Department of Horticulture and Landscape - Faculty of Agriculture - University of
Kufa – Republic of Iraq

Abstract

An experiment was conducted in Molecular Biological laboratory in the Faculty of Science / University of Kufa in 2016 to find out genetic distance of six Local okra cultivars using Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD). Polymorphisms were scored within amplified fragment (their number and molecular sizes) using agarose gel electrophoresis after staining with ethidium bromide. Five primers generated polymorphic patterns and selected among studied cultivars. These primers gave 19 Polymorphic bands from total 41 main bands. The results revealed that, the lowest molecular size to the amplified fragments was generated by UBC-514 reach 276 bp while (1654 bp) was amplified by OPX-18 primer that has the highest molecular size of the amplified fragments. From all of the used primers in the experiment, the primer UBC-210 gave the highest values to the main, amplified and polymorphic band numbers which reached 9, 46 and 14 band compared with the lowest values to these bands which reached 0, 12 and 12 band respectively, produced from primer UBC-620. The highest percentage of polymorphism ratio and the primer efficiency from primer UBC-210 reached %64.3 and %0.2 on sequence while, primer UBC-620 did not reveal give any percentage of the polymorphism ratio and primer efficiency. The results also showed that the highest value of genetic distance (genetic distance) was between the two cultivars: 2 Husinawia Karbala and 5 Husinawia Al-Halle that reached 0.676 comparing with the lowest value to the genetic distance between the two cultivars, 3 Batira Baghdad and 5

Husinawia Al-Halle that reached 0.143. Cluster analysis (phylogenetic tree) revealed two main groups (A and B) with 0.533 distance, Cluster A contained 4 cultivars: Batira Baghdad, Khinyasri Al-Basra, Husinawia Al-Halle and Al-Mawassalia while Cluster B contained 2 cultivars: Husinawia Al-Nasiryia and Husinawia Karbala.

The results concluded that RAPD parameters were important in revealing polymorphism genetic and its efficiency on the primers number and the genetic distance between the studied cultivars.

Keywords: Genetic polymorphism, Genetic tree, Molecular indicators.

* Part of Ph.D dissertation of the second author.