التنوع والعلاقات الوراثية لانواع جنس *Gladiolus* L. (Iridaceae) النامية برياً في العراق باستعمال تقنية RAPD – PCR

اريج عبد الستار فرمان
مازن نواف عبود
قسم علوم الحياة / كلية التربية للعلوم الصرفة (ابن الهيثم)/جامعة بغداد

استلم البحث في:29/ايلول/2015،قبل البحث في:15/تشرين الثاني/2015

الخلاصة

بينت هذه الدراسة التنوع والعلاقات الوراثية بين 4 انواع تابعة لجنس *Gladiolus* L. البري باستعمال مؤشرات الدنا DNA في تقنية التضخيم العشوائي متعدد الاشكال لسلسلة الدنا RAPD، شملت الدراسة استخلاص الدنا المجيني Genomic DNA من الاوراق النباتية الجافة باستعمال عدة استخلاص دنا النباتات ، وتم استعمال 4 بوادئ Primers عشوائية انتجت عدد من الحزم متعددة الاشكال Polymorphic بين الانواع الاربعة المدروسة ، كذلك تم تحديد البصمة الوراثية لجميع الانواع من خلال ظهور عدد من الحزم الفريدة Unique bands ، وتم تحديد البعد الوراثي بين الانواع اذ تراوح بين 0.10 الى 0.86 ، فضلا عن استعمال التحليل العنقودي لبناء شجرة التنوع الوراثي اذ تكوّنت الشجرة من مجموعتين رئيسيتين تعتمد على سلفهم وصفاتهم المظهرية والتشريحية وبالاعتماد على نتائج هذه الدراسة ونتائج دراسات اخرى كالتشريح وحبوب اللقاح تم تسجيل نوع جديد في العراق ضمن هذا الجنس هو *G.anatolicus* Boiss. .

الكلمات المفتاحية : *Gladiolus* ، DNA ، RAPD

*البحث مستل من اطروحة دكتوراه

المقدمة

يعد جنس *Gladiolus* L. ثاني اكبر الاجناس التابعة للعائلة السوسنية Iridaceae من نباتات ذوات الفلقة الواحدة Monocotyledon بعد الجنس *Iris* L. ، اذ تضم هذه العائلة 70 جنساً منتشرة عالمياً لاسيما في شمال وجنوب المناطق المعتدلة ينمو منها في العراق 4 اجناس فقط احداها الجنس قيد الدراسة [1] ، ان المظهر الخارجي Morphology يبقى الدليل الاكثر استعمالا لتحديد التاريخ العرقي Phylogeny ، الا ان البيانات الجزيئية تستعمل اليوم لبناء شجرة الحياة Tree of life بكل فروعها وليس لمجموعات محددة كتلك التي يمكن تمييزها بسهولة [2]، فضلاً عن التغيير الكبير الذي حدث في علم التصنيف الذي بدأ حين قدم المختصين بعلم التصنيف الجزيئي معلومات غاية في الاهمية من خلال ما قاموا به من تحليل لبيانات تسلسل الحامض النووي الرايبوزي منقوص الاوكسجين DNA [3]، اذ ان التطور السريع الذي حدث في مجالات علم الحياة الجزيئي Molecular biology، الذي اتاح الادوات المناسبة لدراسة المادة الوراثية وتحليلها الجزيئي مما ساعد كثيراً في ظهور علم التصنيف الجزيئيMolecular Taxonomy ، اذ عمل هذا العلم على حل الكثير من المشاكل التصنيفية عن طريق الاستدلال على وجود علاقات القرابة بين الكائنات اذ ظهرت مؤشرات الدنا DNA markers التي تستعمل لدراسة العلاقات الوراثية بين الافراد وايجاد البصمة الوراثية لكونها تعكس الاختلافات في المعلومات الـــوراثية المخـــزنة فيـــهم [4].

لم تحضَ انواع هذا الجنس بدراسة من هذا النوع في العراق لذلك تعد هذه الدراسة الاولى في ايجاد التنوع والعلاقات الوراثية بين 4 انواع نامية برياً في العراق التي تعود الى جنس *Gladiolus* L. ، اذ تم استعمال تقنية التضخيم العشوائي لقطع الـ DNA (RAPD-DNA) المعتمدة على سلسلة تفاعلات البلمرة PCR التي تستند على تضخيم اي جزء من الDNA مهما كان صغيرا خارج الجسم الحي بوجود انزيم DNA polymerase والبادئات primers التي عادة ما تكون عشوائية .

المواد وطرائق العمل

تم الحصول على العينات الطرية من مناطق مختلفة من العراق جدول (1) ، من خلال السفرات الحقلية التي اجريت وهي المناطق التي تنمو فيها الانواع التابعة للجنس المدروس بعدذلك تم تجفيفهاووضعهافي اكياس خاصة لحين استعمالها استخلص الدنا المجيني من الاوراق النباتية الجافة باستعمال عدة استخلاص الدنا الخاصة بالنبات Genomic DNA mini kit (plant) ، و تم وزن 25 ملغم من مسحوق الاوراق النباتية بميزان حساس ووضع في انبوب دقيق Microcentrifuge tube و خاص بجهاز الطرد المركزي اتبعت خطوات خاصة في استخلاص الدنا وحسب الارشادات في قائمة العمل الخاصة بعدة الاستخلاص .

تم قياس نقاوة وتركيز الدنا باستعمال جهاز المطياف للاشعة تحت البنفسجية الدقيق (Spectrophotometer(nanodrop الذي يتم فيه استعمال كمية قليلة من الحامض النووي (0.5 مايكروليتر) لغرض فحصها وهو مبرمج ليستعمل المعادلة الخاصة بقياس وتركيز الحامض النووي بالاعتماد على امتصاصية المحلول المحتوي على الدنا والبروتينات المرافقة له عند كثافة بصرية 280/260OD انكستروم على التوالي وهي :

$$dsDNA\ concentration = 50\ \mu g/mL \times OD_{260\ or\ 280} \times dilution\ factor$$

وتراوحت القيم المتحصل عليها للنقاوة بين 1.7 الى 1.8

من خلال تقانة PCR تم استخدام 4 بادئات عشوائية ، جدول (2) للانواع الاربعة للجنس المدروس ، اذ حضرت البادئات المناسبة وحسب الارشادات المرفقة مع العبوات وبعد اذابتها بماء معقم مضاعف التقطير ddH□O تم الحصول على تركيز 10) 10% pmol/µl) .

تم تحضير الحجم المناسب من خليط التفاعل 20µl وذلك باضافة 12.5µl من الخليط الرئيس GoTaq ®Green master mix الذي يحتوي Taq DNA-polymerase و $Mgcl_2$ و dNTPs(dATP،dCTP،dGTP،dTTP) ثم اضيفت الكمية المناسبة من البادئ 1µl ، بعد توزيع خليط التفاعل على انابيب صغيرة 0.2µl اضيف 5µl من الدنا المستخلص لكل انبوبة ثم اكمل الحجم بماء مضاعف التقطير الى 25µl لكل انبوبة . وضعت الانابيب في جهاز المدوّر الحراري Thermal cycler الذي تمت برمجته حسب الجدول ادناه :

Initial denaturation	Temp.95ºC	ime: 5min.	
Denaturation	Temp.95ºC	Time: 30 sec.	35cycles
Annealing	Temp.36ºC	Time: 40 sec.	
Extension	Temp.72ºC	Time: 2 min.	
Final extension	Temp.72ºC	Time: 5 min.	

حضر هلام الاكاروز agarose gels 1.5% وبعد تصبيغه بصبغة بروميد الاثيديوم Ethidium bromide تم تحميل 10µl من كل عينة ناتجة من التضخيم في الحفر الخاصة بالهلام فضلاً عن الى تحميل 5µl من سلّم الدنا DNA ladder بعد غمرالهلام بمحلول

TBE-1x اذ تم الترحيل الكهربائي له بفولتية 50 volt/cm لمدة ساعتين ، ثم فحص بجهاز الاشعة فوق البنفسجية UV المجهز بكاميرا وتم تصوير الهلام الحاوي على حزم الدنا ، ثم تمت دراستها ومقارنتها مع بعضها ومع حزم سلّم الدنا المفصولة .
تم حساب تعدد الأشكال الوراثية (%) باستعمال البواديء العشوائية وحللت البيانات التي استُحصل عليها من الكشف عن قطع الـ DNA المتعددة الأشكال، ودونت المعلومات التي تم الحصول عليها من تضخيم قطع الـ DNA بواسطة تقانة PCR من جميع الأنواع المستعملة مع أي باديء، اذ أعطي الرقم "1" لوجود كل حزمة في الهلام وسجل الرقم "0" لعدم وجود الحزمة نفسها ذات الحجم نفسه في الأنواع الأخرى [5] . استعملت المعادلة الاتية في حساب تعدد الاشكال الناتجة من كل بادئ :

$$\text{تعدد الاشكال \%} = (NT / NP) \times 100$$

NP = عدد الحزم متعددة الاشكال من تضخيم الدنا باستعمال احد البوادئ العشوائية ، NT = العدد الكلي للحزم الناتجة من استعمال البادئ نفسه ، وتم تحليل العلاقات الوراثية وقياس المسافة الوراثية عن طريق حساب البيانات الناتجة من تحليل مواقع قطع الدنا المتعددة الأشكال التي ظهرت على مواقع محددة من الهلام بعد الترحيل، واعتمدت الحزم الواضحة فقط ، تم حساب تقديرات المسافة الوراثية (GD) بين كل زوج من الأصناف وفقاً لـ[6] بناءً على مصفوفة البيانات واستنادا إلى الصيغة الاتية:

$$G.D = 1-\{2Nab/(Na + Nb)\}$$

Na = العدد الاجمالي لقطع DNA شوهدت في الفرد أ ، Nb = العدد الكلي لقطع DNA التي اظهرها الفرد ب ، Nab = عدد قطع DNA المشتركة بين الفردين أ وب
بعد ذلك تم استعمال طريقة (UPGMA) Unweighted Pair-Group Method with Average arithmetic) طريقة مجاميع الازواج غير الموزونة مع المعدل الحسابي [7] ، واجريت العمليات الحسابية اللازمة باستعمال برنامج الحاسوب الخاص بنظام التصنيف العددي والتحليل متعدد المتغيرات (NTSYS) الاصدار 2.1 (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System) [8] ، وذلك لغرض اجراء التحليل العنقودي Cluster analysis لبناء مخطط شجرة العلاقة الوراثية بين انواع الجنس *Gladiolus* . تم الجزء العملي من البحث في مختبرات كلية التربية للعلوم الصرفة – ابن الهيثم .

النتائج والمناقشة :

تم استعمال اربعة بوادئ مع الانواع الاربعة للجنس وهي :
البادئ OPC-9 : اعطى هذا البادئ 10 حزم تقع عند الاوزان الجزيئية بين 450 bp و 1600bpجميعها متعددة الاشكال Polymorphic وبنسبة 100%، وانتج ثلاثة حزم فريدة Unique bands اثنتان منها للنوع Boiss.*G.atroviolacious* تقع عند الوزنين الجزيئيين bp (650 و 900) وواحدة سجلت للنوع Mill *G.italicus* عند الوزن الجزيئي 500bp، لوحة (1) ،جدول (3)
البادئ RAPD-2 : انتج 9 حزم تقع عند الاوزان الجزيئية 500 bp و 1500 bp،7 من الحزم كانت متعددة الاشكال وبنسبة 77.77% اما الحزم الاحادية فكانت اثنتان وبنسبة 22.22%،اعطى هذا البادئ حزمتين فريدتين الاولى سجلت للنوع *G.atroviolasious* كانت عند الوزن الجزيئي 1000bp والثانية عند الوزن الجزيئي 900bp سجلت للنوع *G.italicus* لوحة (1) ، جدول(3)
البادئ R-15 : انتج 10 حزم تقع جميعها عند الاوزان الجزيئية 290bp و 1200bp، جميع هذه الحزم متعددة الاشكال وبنسبة 100%، انتج هذا البادئ ثلاثة حزم فريدة واحدة مع النوع Boiss *G.anatolicus* عند الوزن الجزيئي 300bp واثنتان سجلت للنوع *G.italicus*عند الوزنين الجزيئيين bp (500 و700)، لوحة (2) ، جدول (3)
البادئ R-8 : عدد الحزم الكلي لهذا البادئ 9 ، كانت جميعها عند الاوزان الجزيئية بين 200 bp و1500 bp،7 من الحزم متعددة الاشكال وبنسبة 77.7%، وكان عدد الحزم الاحادية التي انتجها هذا البادئ حزمتين وبنسبة 22.2%، كان العدد الاكبر من الحزم الفريدة هو 6 سجلت لهذا البادئ اذ اعطى ثلاثة حزم مع النوع *G.atroviolacious*عند الاوزان الجزيئية bp (390 و400 و450) وثلاثة اخرى مع النوع Boiss *G.kotschyanus* بالاوزان الجزيئية bp (250 و900 و1500)، لوحة (2)، جدول (3)
ان البوادئ الاربعة التي اثبتت فعالية في تضخيم الـDNA لكل من الانواع الاربعة لجنس *Gladiolus*، انتجت عدة حزم عند ترحيلها بالهلام، تراوح عدد الحزم بين 10-9 حزم وحسب البادئ المستعمل مع متوسط اليل لكل موقع وراثي يساوي 9.5، تراوحت احجام الحزم من 200 الى 1600 زوج قاعدي(bp) وذلك من خلال ملاحظة صور الترحيل للهلام، لوحة (1) و(2) اذ كان الحد الادنى لعدد الحزم هو 9 اعطته كل من البوادئRAPD-2 و R-8، وكانت النسبة المئوية لتعدد الاشكال للبادئينRAPD-2 و R-8 هي 18.4 قياساً بعدد البوادئ الكلي، وكان الحد الاعلى لعدد الحزم هو 10 سجله كلٌ من البادئينOPC-9 و R-15 الذين اظهرا تعدد الاشكال بنسبة 26.3 قياساً بعدد البوادئ الكلي،جدول (4). تم استعمال معاملات التشابه الوراثي للانواع الاربعة للجنس *Gladiolus* استناداً الى قطع الـDNA التي ظهرت في الهلام بعد استخدام طريقة RAPD لبناء المخطط الشجيري، الشكل(1) عن طريق استعمال تحليل UPGMA، اذ تم تقسيم الانواع الاربعة في مجاميع ووجد ان نسبة التشابه الوراثي بينها تراوحت بين 0.86-0.10، وكانت اقل مسافة وراثية هي 0.10 لوحظت بين النوعين *G.italicus* و *G.kotschyanus* وايضا بين النوعين *G.italicus* و *G.anatolicus*. جدول (5).

التحليل العنقودي Cluster Analysis

شيدت مجموعة تحليل dendrogram شكل(1) للانواع الاربعة العائدة لجنس *Gladiolus* باستخدام التحليل العنقودي اذ اظهرت العلاقة الوراثية بين الانواع الاربعة لجنس *Gladiolus* النامية في العراق مجموعتين رئيسيتين هما I و II المجموعة الاولى شملت مجموعتين ثانويتين وهي IA تمثلت بالنوع *G.atroviolacious* والمجموعة الثانوية IB تمثلت بالنوعين*G.kotschyanus* و *G.anatolicus* اما المجموعة الرئيسية الثانية مثّلها النوع *G.italicus* .

اوضح المخطط الشجيري لانواع الجنس *Gladiolus* شكل (1)، اذ تمثلت IA بالنوع *G.atroviolacious*وقد انفصل في مجموعة ثانوية عن الانواع و اختلف في كونه يمتلك اسطوانة وعائية ذات شكل بيضي Ovoid vascular bundle، اما النوعين *G.kotschyanus* و*G.anatolicus* (IB) فهما متشابهان في اغلب صفاتهما المظهرية والتشريحية، وهذا ما جعلهما في مجموعة واحدة اي انه دليل على تقاربهما الوراثي الكبير، النوع الاخير *G.italicus*(II) انفصل ايضا عن بقية الانواع الاخرى بمجموعة رئيسة ثانية اذ اختلف عن الانواع الاخرى بكونه يمتلك ثمرة ذات شكل بيضي عريض broadly-ovoid فضلا عن الشكل البيضي- البيضي الطويل Ovoid-long ovoidلاسطوانته الوعائية. جدول (6) .

لقد استعملت تقنية RAPD-PCR لأنها لاتتطلب معلومات وراثية مسبقة حول الكائن الحي مثل تسلسل القواعد النيوكليوتيدية الأمر الذي يؤدي إلى تصميم بواديء متخصصة أواستعمال تقانات أخرى ذات علامات وراثية محددة، على الرغم من أننا اختبرنا العديد من البادئات العشوائية قليلة النوكليوتيدات والخاصة بتقانة RAPD نظراً لعدم وجود دراسة بهذا الاسلوب حول انواع جنس *Gladiolus* في العراق، وان 4 بادئات فقط التي اختيرت بسبب وجود اختلافات في عدد الحزم بين العينات عند ترحيل نواتج استعمال تقانة PCR مع البواديء في الهلام نتيجة الأختلاف في الوزن الجزيئي للحزم وهو مايتوضح من خلال حركتها أثناء الترحيل الكهربائي لها في الهلام وهذا ما يدل على ان النوع *G.anatolicus* هو نوع جديد على العراق، وتتميز هذه الطريقة بكفاءة عالية عند استعمالها في دراسة التغايرات الوراثية بين الأنواع، التي تجعل من المفيد أن يتم اعتمادها في برامج المحافظة على التنوع الحيوي في البيئة. ان استخراج الحامض النووي DNA من الأنسجة النباتية يتم بطرائق متنوعة، و ان طرق استخلاص ال DNA تختلف في بعض انواع النباتات وذلك بسبب محتواها من الفينولات المتعددة Polyphenols ونواتج ثانوية اخرى من العمليات الايضية [9] ، اذ تم استخلاص الـDNA في هذه الدراسة من الاوراق النباتية المجففة بغض النظرعن كونها فتية او غير فتية وهذا ما يتفق مع [10] ، اذ ان الاوراق الفتية والاوراق المتفتحة جزئياً هي المفضلة في عملية العزل وذلك لانها تحتوي كمية اقل من الفينولات المتعددة والمكونات الاخرى التي تمنع الحصول على DNA نقي، لذلك تم استعمال طرائق مختلفة لاستخلاص الحامض النووي تكون مناسبة للنباتات قيد الدراسة اذ يتم سحق انسجة الاوراق للعينات المستخدمة باستعمال النيتروجين السائل والهاون المختبري، وهي طريقة مفيدة لمنع تلف العينات عند الحفظ وذلك بتثبيط عمل الانزيمات النووية مثل DNase وNuclaese التي يتم إطلاقها عندما تتكسر جدران الخلايا، أوضحت بعض التقارير اهمية اعتماد بعض الطرائق على استعمال النيتروجين السائل، بالرغم من أنها تعد من المواد غير الامنة [11] .

درجة النقاوة ونوعية وكمية DNA ممكن ان تتباين بسبب النبات او البروتوكولات المستعملة في العزل وهذا يتفق مع نقاوة وكمية الـDNA التي تم الحصول عليها في هذه الدراسة اذ هناك طرائق مختلفة ومتعددة وتقنيات متوفرة لعزل DNAالمجيني وهي تعتمد على اختيار عوامل مختلفة اصبحت ممكنة لاسيما في الحصول على نقاوة عالية وهي مهمة في اختصار الوقت والنتائج .

استعملت طريقة RAPD بنجاح اذ تم الكشف عن العلاقات الوراثية بين 4 انواع تعود للجنس المدروس، وان هذه الطريقة استعملت في الماضي بنجاح للكشف عن العلاقات الوراثية بين الافراد [12] ، وتم استخدام تقانة RAPD-PCR لتعيين تعدد الأشكال والتنوع الوراثي باستعمال DNA المستخلص من الانواع المدروسة،اذ تم تحسين ظروف عمل تقانة PCR التي شملت المواد الكيميائية وعدد الدورات المستعملة في البرنامج الخاص بعمل الجهاز لاسيما مرحلة annealing اذ تم ضبطها بما يناسب عينات الـDNA المستخدمة التي اعطت النتائج المطلوبة التي ادت الى تضخيم قطع الحامض النووي التي ظهرت بعد استعمال البواديء المناسبة،أن تحسين ظروف عمل تقانة PCR(Optimization) ضروري للحصول على أعلى خصوصية وأفضل النتائج المطلوبة [13] ، ان مبدا استعمال RAPD هو عدد الحزم التي ظهرت في مجين (جينوم) الانواع المدروسة والذي يوضح عدد المواقع التي كشف عنها الباديء بعد ارتباطه معها عند التضخيم بوساطة جهاز تقانة PCR اذ تم الحصول على عدد من الحزم لكل بادئ تم استعماله مع DNA العينات وتم مقارنتها مع DNA ladder، ويتأثر عدد هذه المواقع بأثنين من العوامل هما ، حجم الجينوم والتسلسل النيوكليوتيدي للبواديء [14] ، ويمكن استخدام نتائج تعدد الأشكال الوراثية التي ظهرت في هذه الدراسة كمؤشر وراثي بين أنواع الجنس المدروس ، فضلا عن الحزم الفريدة التي انتجتها بعض البوادئ فقد انتج البادئ R-8 ستة حزم فريدة مع بعض انواع جنس *Gladiolus* وهو العدد الأكبر ، اذ يمكن استعمالها كبصمة وراثية خاصة بتعريف تلك الانواع لاسيما النوع الجديد *G.anatolicus* الذي تم تسجيله في هذه الدراسة ، فضلاً عن ذلك فأن بعض البواديء أنتجت حزماً أحادية الشكل monomorphic كما في البادئان RAPD-2 و R-15 بينما انتج البادئان OPC-9 و R-15 حزم متعددة الاشكال فقط ، يحدث تعدد الأشكال نتيجة حدوث الطفرات الذاتية أو الطفرات المستحثة التي أثرت في المسافة بين المواقع الوراثية التي قد تحدث بشكل طبيعي في أثناء العملية التطورية للكائنات الحية، وقد يكون تعدد الأشكال قد حدث نتيجة حذف أو إضافة في الموقع الذي يرتبط به الباديء [15] وهذا ما يتفق مع هذه الدراسة .

ان احجام الحزم الناتجة تراوح بين 200 و 1500 زوج قاعدي، وان عدد الحزم متعددة الاشكال تراوح من 9-10 مع تعدد اشكال 77.77 % في البادئين RAPD-2 و R-8 و 100 % في البادئين OPC-9 و R-15 ، جدول (4) .

ان انواع الجنس المدروسة تباينت من حيث قربها الوراثي اذ ارتبط النوعان *I.kotschyanus* و *I.anatolicus* ارتباطاً وثيقاً جداً لتشابههما في الكثير من الصفات المظهرية والتشريحية اما الانواع الاخرى فكان ارتباطها الوراثي اقل وهذا واضح في اختلافها في بعض الصفات الوراثية والتشريحية .جدول (6) وشكل (1) .

وبالاعتماد على نتائج هذه الدراسة نستطيع ان نثبت ان النوع *G.anatolicus* هو نوع جديد في العراق اذ اختلف عن الانواع الاخرى التي تعود للجنس نفسه في عدد ونوع الحزم الناتجة من التضخيم باختلاف البوادئ المستعملة في الدراسة وهذا ما كان واضحا في صور الهلام والتحليلات والنتائج التي تم التوصل اليها.

المصادر

1- Mathew,B.(1985) in Tonwnsend,C.C. and Guest,E.Flora of Iraq. Monocotyledones.Minstry of Agriculture and Agrarian reform , Baghdad , 8:226-256 .

2-Olmost,R.G. and Scotland,R.W.(2005).Molecular and morphological datasets.Taxon, 54(1):7-8.

3- Taia,W.K.(2005).Modern trends in plant taxonomy.Asian J. plant Sci. 4:58-62.

4- Williams,C.E. and St-clir,D.A.(1993).Phonelic relationship and level of vriability detected by restriction fragment length polymorphism and random amplified DNA analysis of cultivated and wild accession of (*lycopersicon esculentum*) Genome .36:619-630.

5- Bibi,S.; M.U., Dahot; I.A., Khan; A., Khatri; and Naqvi M.H.,. (2009).Study of genetic diversity in Whet using RAPD markers.Pakistan.Pak.J.Bot., 41(3):1023-1027.

6- Ni,M. and Li , W.H.(1979).Mathmatical model for studying genetic variation in terms of restriction Endonucleases.*Proceeding of the National Academy of Sciens*, USA 74:5267-5273.

7- Sneath,P.H.A. and Socal, R.R. (1973).Numerical taxonomy : The principels and practice of numerical classification .*W.H. Freeman co*.San.Francisco.California.

8- Roholf ,F.J.(2004).NTSYSPc,Numerical taxonomy and multivariate analysis system.Version 2.1.47 Roult 25A,Suit 2, Setauket, New York. 11733-2870.

9- Aljanabi,S.M.; Forget, L.; and Dookum, A. (1999).An inproved and RAPID protocol for the isolation of polysaccharide-and polyphenol-free sugarcan DNA. Plant Mol.Biol.Rep.,17:81-281.

10- Shankar,k.; Chavan,L.; Shinde,S.; and Patil, B .(2011).An improved DNA extraction protocol from four *in vitro* Banana cultivars.Asian J.Biotechnol. 3:84-90.

11- Sharma,A.D.; Gill, P.K.; and Singh ,P. (2002).DNA isolation from dry and fresh sample of polysaccharide-rich plants.*Plant Mol.Biol.Rep*. 20:415a-415f.

12- Goswami,S. and Tripathi, V.(2010).The use ISSR and RAPD markers for detecting DNA polymorphism ,genotype identification and genetic diversity among *Trichosanthes dioica* Roxb.Cultivars .*International Jornal of Biodiversity and Conversation*.India 2(12):405-413.

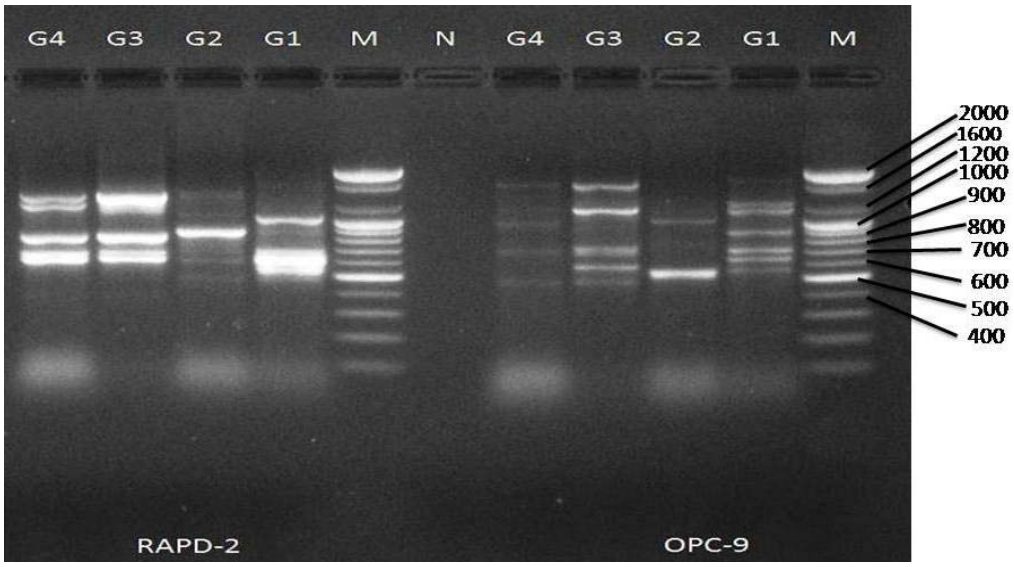
13- Williams,J.G.; Kubelic, A.R.; Livak, K.J.; Rafalaski, J.A.; and Tingey, S.V.(1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers.*Nucleic Acid Res*.18:6531-6535pp.

14- AL-Asi,A.H.A.(2002).The use of DNA markers for genetic diversity analysis of (*Hordum vulgar* L.)cultivated in Iraq.PhD thesis.Biology department ,college of Ibn AL-Haitham Education.University of Baghdad.221p.

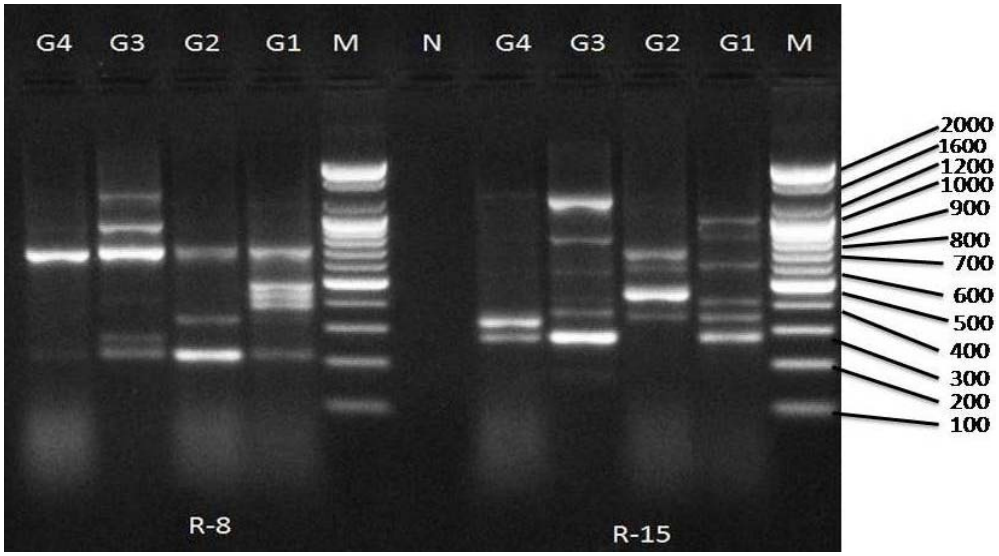
15- Tingey,S.V. and Tufo Del, J.P.(1993). Genetic analysis with RAPD markers. *Plant physiology*.101:349-352pp.

16-Azimi,M.H.; Sadeghian, S.Y.; Razavi Ahari ,V. ; Khazaei, F.; and Fathi Hafashjani , A. (2012).Genetic variation of Iranian *Iris* species using morphological characteristics and RAPD markers.International Jornal of Agrisciece.2(9):875-889.

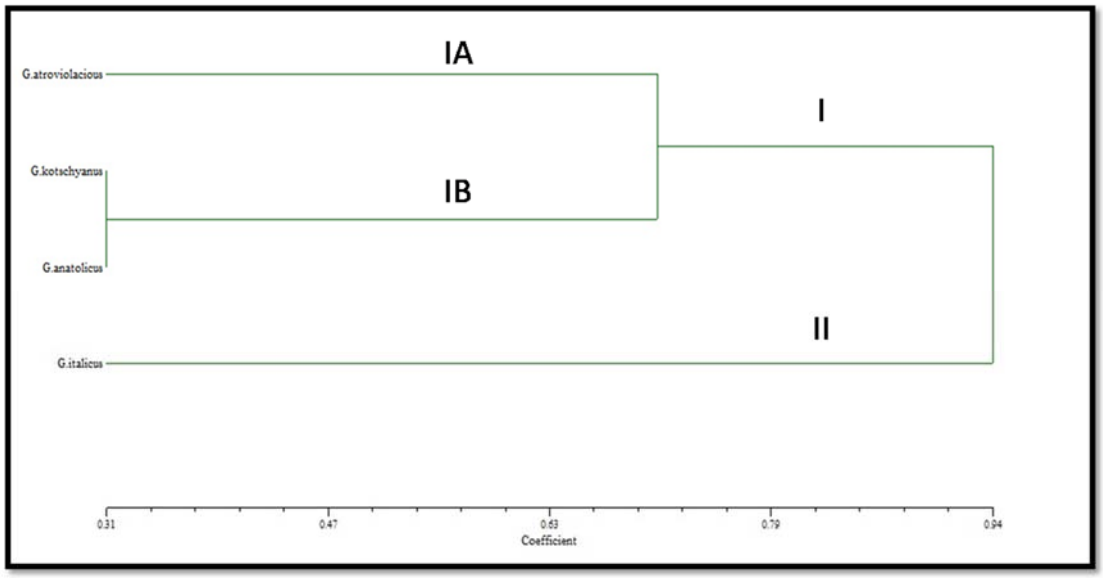
17- Nasir,I.A.; Jamal, A.; Rahman, Z.; and Husnain, T. (2012).Molecular Analyses of *Gladiolus* lines with improved resistance against Fusarium with .Pak.J.Bot.44(1):73-79.



لوحة (1) ,1.5% هلام الاكاروز بعد الترحيل الكهربائي لتفاعل RAPD-PCR للبادئين OPC-9 و RAPD-2 لعينات DNA للانواع الاربعة لجنس *Gladiolus* صورت تحت الاشعة فوق البنفسجية بعد تصبيغها بصبغة بروميد الاثيديوم. G1 (*G.atroviolacius*)، G2 (*G.italicus*)، G3 (*G.kotschyanus*)، G4 (*G.anatolicus*)، M=100bp DNA ladder، N=negative sample



لوحة (2),1.5% هلام الاكاروز بعد الترحيل الكهربائي لتفاعل RAPD-PCR للبادئين R-15 و R-8 لعينات DNA للانواع الاربعة لجنس *Gladiolus* صورت تحت الاشعة فوق البنفسجية بعد تصبيغها بصبغة بروميد الاثيديوم. G1 (*G.atroviolacius*)، G2 (*G.italicus*)، G3 (*G.kotschyanus*)، G4 (*G.anatolicus*)، M=100bp DNA ladder، N=negative sample



الشكل (1) شجرة التحليل الوراثي Dendrogram تظهر المسافة الوراثية للانواع الاربعة لجنس *Gladiolus* باستخدام التحليل العنقودي UPGMA.

جدول(1) الانواع المستخدمة في الدراسة ومناطق جمعها.

No.	taxa	location
1	*Gladiolus.atroviolacius*	Erbil
2	*G.italicus*	Dahook،Erbil،Suleimaniyha
3	*G.kotschyanus*	Suleimaniyha
4	*G.anatolicus*	Dahook

جدول (2) اسماء وتسلسلات القواعد للبادئات العشوائية التي استخدمت في الدراسة مع مصادرها.

No.	Primers name	Sequence 5'…….3'	Reference
1	OPC-9	CTCACCGTCC	[16]
2	RAPD-2	TGCGCCCTTC	[16]
3	R-15	GGACAACGAG	[17]
4	R-8	CCCGTTGCCT	[17]

جدول (3) البوادئ وعدد الحزم الفريدة التي انتجتها واوزانها الجزيئية (M.W.bp) لانواع جنس *Gladiolus*

Primer	Unique bands	Taxa	M.W.(bp)
OPC-9	3	*G.atroviolacious*	650
			900
		G.italicus	500
RAPD-2	2	*G.atroviolacious*	1000
		G.italicus	900
R-15	3	*G.anatolicus*	300
		G.italicus	500
			700
R-8	6	*G.atroviolacious*	390
			400
			450
		G.kotschyanus	250
			900
			1500

جدول (4) البوادئ المستخدمة مع الانواع الاربعة لجنس *Gladiolus*، NT = عدد الحزم الكلي لكل بادئ، NP = عدد الحزم متعددة الاشكال لكل بادئ ،NM = عدد الحزم المفردة لكل بادئ .

Primer's name	NT	Sizeof bands/bp	Np	%	NM	%
OPC-9	10	450-1600	10	100	0	0
RAPD-2	9	500-1500	7	77.77	2	22.22
R-15	10	390-1200	10	100	0	0
R-8	9	200-1500	7	77.77	2	22.22
Total	38	200-1600	34	355.54	4	44.44

جدول (5) قيم المسافة الوراثية GD بين الانواع الاربعة لجنس Gladiolus

	G.1	*G.2*	*G.3*	*G.4*
G.atroviolacius(G.1)	0.00			
G.italicus(G.2)	0.79	0.00		
G.kotschianus(G.3)	0.54	0.10	0.00	
G.anatolicus(G.4)	0.86	0.10	0.31	0.00

جدول (6)التقارب الوراثي بين انواع جنس *Gladiolus* والتشريحية مع بعض الصفات المظهرية

cluster	subcluster	SP.	Morphological characters			Anatomical characters	
			Shape of fruit	Seeds	stigmas	Shape of c.s. stem	Shape of v.b.
I	IA	*G.atroviolacius*	obovate	-	Equal	circular	Ovoid
		G.kotschyanus	obovate	winged	Unequal	Ovoid-circular	Long ovoid
	IB	*G.anatolicus*	obovate	-	Equal	circular	Ovoid-long ovoid
II		*G.italicus*	Broadly-ovoid	Unwinged	Unequal	ovoid	Triangle-long ovoid

C.S. = cross section
V.b. = vascular bundle

Biodiversity and Genetic Relationships to the Species for the genus *Gladiolus* L. (Iridaceae) Wild Growing in Iraq Using RAPD-PCR Technique

Areej A.Farman
Mazin N. Aboud
Dept. of Biology/ College of Education for Pure Science (Ibn-Al-Haitham)/ University of Baghdad.
Received in:29/September/2015,Accepted in:15/November/2015

Abstract

This study observed the genetic diversity and relationships among 4 species belonging to genus *Gladiolus* L. , by using the Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) technique , the study includes extraction of genomic DNA from the dray leaves by using commercial kit . 4 random primers used the produced of many polymorphic bands among the 4 species , it was also possible to fined the DNA fingerprint of all studied species.Through the appearance of a number of bands that were unique to each species.Genetic distances ranged from 0.10 to 0.86, and used cluster analysis were performed to construct dendrogram.Cluster analysis grouped the 4 species Into tow main clusters depending on their ancestor and their morphological and anatomical traits. Depending on the results of this study and other such as anatomical and palynologycal studies we can record a new species in Iraq belonging to genus *Gladiolus*, it is *G. anatolicus*.

Key words: *Gladiolus* , DNA , RAPD