

## دراسة التنوع الوراثي للقصب البري *Phragmites australis* في العراق بإعتماد تقنية RAPD

نضال نعمة حسين

تغريد عبد الأمير عبد الكريم

قسم علوم الحياة / كلية التربية للعلوم الصرفة - (ابن الهيثم) / جامعة بغداد

حرب عادل عبد محمد

دائرة وقاية المزروعات / وزارة الزراعة

استلم البحث في: 23/ايلول/2014, قبل البحث في: 24/تشرين الثاني/2014

### الخلاصة

دُرِس التنوع الوراثي لـ (31) عينة من القصب البري *Phragmites australis* جُمعت من أهوار العراق المنتشرة في البصرة , وميسان , وذي قار فضلاً عن عينات من محافظة بغداد لتحديد درجة القرابة في ما بينها وذلك بإعتماد تقانة التضاعف العشوائي للـ DNA متعدد الأشكال (RAPD) Random amplified polymorphic DNA . أثبتت البادئات السبعة المستعملة فعاليتها بإعطاء تعددية شكلية Polymorphism بين العينات المدروسة , ونجم عن إستعمال هذه البادئات مجتمعة عدد من الحزم بلغ (102) حزمة توزعت بين 31 عينة قصب ; (6.86 % ) منها كانت Monomorphic , أما الـ (93.13 % ) البقية فكانت Polymorphic متعددة الأشكال أو متباينة التي تراوحت أعدادها بين (10-17) حزمة للبادئ الواحد . البادئ (UBC1) أعطى أعلى عدد من الحزم متعددة الأشكال (17) حزمة , في حين أعطى البادئان (M13, Op-B01) أقل عدد من الحزم متعددة الأشكال (10) حزم , وبلغ معدل الحزم متعددة الأشكال (13.5) حزمة لكل بادئ . أما معدل النسبة المئوية للتباين أو التعدد الشكلي Polymorphism فقد كانت (92.67%) تراوحت بين 71.42% للبادئ M13 و 100% للبادئان Op-B11 , UBC1 . أوضحت نتائج التحليل العنقودي المعتمد على تحليل بيانات RAPD بإعتماد طريقة UPGMA انضمام عينات القصب في ست مجاميع رئيسية بدرجة تشابه 60% لأغلب العينات , كما بيّن مخطط التحليل العنقودي (شجرة القرابة) أن هناك توافقاً ما بين المجموعات المتشكلة والموقع أو البعد الجغرافي لها وأن العينات المعزولة من موقع واحد أو محافظة واحدة في الأكثر تجمعت في مجموعة واحدة فضلاً عن انعزال عينات القصب المأخوذة من المسحب والصلال (البصرة) عن بقية العينات . إن هذه الاختلافات بين عينات القصب البري قد يكون لها أهمية كبيرة في أسلوب مكافحة هذا النبات من حيث إستعمال المواد الكيميائية أو طرائق أخرى للسيطرة عليه.

الكلمات المفتاحية : القصب البري *Phragmites australis* , أهوار العراق , RAPD , التنوع الوراثي .

## المقدمة

ينتمي نبات القصب البري (Common reed) الى العائلة النجيلية Gramineae التي ينتمي اليها بعض أهم نباتات المحاصيل الاقتصادية في العالم كالقمح والشعير والرز وبعض الحشائش الضارة [1]. ينتشر القصب في كل القارات ما عدا القارتين القطبية الشمالية والجنوبية [2]. وينتشر هذا النبات في العراق بنحوٍ واسع في الأهوار والمستنقعات في المنطقة الجنوبية وعلى ضفاف شط العرب ويمتد انتشاره ليشمل المنطقة الوسطى والشمالية وينمو في المياه الضحلة وفي الترب الطينية وفي غابات المناطق الجبلية في الشمال وفي الحقول والبيئات شبه الملحية الرطبة [3]. ووجدت إختلافات مورفولوجية كبيرة ومميزة بين نباتات القصب المعزولة من مجاميع مختلفة وكذلك بين القصب المعزول من المجموعة نفسها، وقد أرجع سبب هذه الاختلافات الى وجود ظاهرة التعدد الكروموسومي في القصب [4];[5];[6];[7].

إن دراسة الصفات الشكلية لتحديد التنوع ضمن النوع الواحد غير كافية نظراً لتأثرها بالظروف البيئية ولاسيما في النباتات المتقاربة مورفولوجياً [8]، لذا لا بد من اللجوء الى طرائق أكثر دقة. دخلت في الوقت الحالي تقانات جديدة تعتمد على دراسة التركيب الوراثي بحد ذاته من دون أن يكون هناك تأثير للبيئة [9] وهذه التقانات هي المؤشرات الجزيئية . Molecular markers

تعد المؤشرات الجزيئية ذات أهمية كبيرة في تربية النباتات، وفتحت أفقاً جديدة في كيفية دراسة التنوع الوراثي والعلاقات التطورية بين شتى الكائنات، فضلاً عن أنها تعد مؤشرات مساعدة في إسرار عمليات الانتخاب والتربية، فضلاً عن خفضها الكلف المادية [10]، ومع ذلك ما تزال الدراسات في التنوع الوراثي لنبات القصب البري محدودة. إتمدت تقانات جزيئية عديدة لدراسة التغيرات الوراثية بين نباتات القصب الموجودة في مناطق مختلفة من العالم إذ إتمدت طريقة RAPD [11];[12];[13];[14]، SSR [15]، AFLPs [16];[17]، و RFLPs [18];[19] تعد طريقة RAPD من المؤشرات الجزيئية التي تتصف ببساطة في دراسة العلاقة بين الجماعات في النوع نفسه أو الأنواع القريبة الى بعض [20]. كما إتمدت لتحديد الهوية الوراثية، وللتحري عن الهجن وفي رسم الخرائط الوراثية فضلاً عن إتمادها في معرفة العلاقة الوراثية بين نباتات النوع الواحد [21].

إن احتمالية نجاح مكافحة غزو نباتات القصب بالمبيدات العشبية قد يزداد مع فهم طبيعة التنوع الجيني ومداه بين مستعمرات القصب، فالكلونات المختلفة وراثياً ربما قد تستجيب بنحوٍ مختلف الى المبيدات المستعملة. أوضحت الدراسات وجود إختلافات وراثية بين نباتات القصب المنتشرة في أوروبا والولايات المتحدة. إتمدت في هذه الدراسة طريقة (RAPD) لتحديد التباين الوراثي بين نباتات القصب المنتشرة في أهوار جنوب العراق وكذلك القصب المنتشر في بغداد لمعرفة مدى التنوع الجيني بين مستعمرات القصب المنتشرة في العراق.

## المواد وطرائق البحث

### جمع العينات

جُمعت الأوراق الفتية والقربية من القمة النامية لنبات القصب *P.australis* من مناطق متعددة من أهوار جنوب العراق، وكذلك من مناطق متعددة من محافظة بغداد، الجدول (1). تم جمع ثلاث الى أربع عينات من كل موقع وكانت المسافة بين العينات المأخوذة من الموقع الواحد لا تقل عن (10) أمتار، أما المسافة بين المواقع المختلفة كانت لا تقل عن (10) كيلومترات. جُمعت العينات بطريقة عشوائية للمدة ما بين شهر (أيلول – كانون الاول / 2013). وضعت العينات في أكياس ورقية التي بدورها وضعت في أكياس بلاستيكية محكمة الإغلاق ووضعت في صندوق مبرد لحين نقلها الى المختبر. تم غسل العينات في المختبر بماء الحنفية، ثم بالماء المقطر، وجففت بالظن ومن ثم حفظت مرة أخرى بالطريقة السابقة نفسها ووضعت تحت درجة حرارة 20- م° لحين الاستعمال.

### استخلاص الـ DNA وتنقيته

تمت عمليات عزل الـ DNA (Genomic DNA) من الأوراق الفتية لنبات القصب *P.australis* بالاعتماد على طريقة الاستخلاص المعتمدة على إستعمال (CTAB) وذلك وفقاً لطريقة [22] المعتمدة على طريقة [23].

### قياس تركيز الـ DNA وتقدير نقاوته

تم قياس التركيز وفقاً لـ [24] عن طريق تخفيف العينة 10 مرات بمحلول TE وقراءة مقدار امتصاص العينة المخففة للأشعة فوق البنفسجية بجهاز قياس الكثافة الضوئية عند الطولين الموجيين 260 , 280 نانوميترًا و يحسب تركيز الـ DNA بحسب المعادلة الآتية :-

$$\text{تركيز الـ DNA / مليلتر} = \text{مقدار الامتصاصية عند الطول الموجي 260 نانوميترًا لـ 1مليلتر من العينة المخففة} \times \text{معكوس التخفيف} \times (50)$$

أما (النقاوة = الامتصاصية عند الطول الموجي 260 نانوميترًا / الامتصاصية عند الطول الموجي 280 نانوميترًا) وتم تقدير نوعية الـ DNA عن طريق ترحيل عينة منه على (1%) هلام الأكاروز وذلك بالتوازي مع مؤشر الدليل الحجمي Ladder .

### تفاعل التضخيم العشوائي لقطع الحامض النووي DNA باعتماد تقانة Random Amplification Polymorphic DNA (RAPD-PCR)

تم إعداد هذا التفاعل بحسب ما ورد في [25] وتوصيات بعض الشركات المجهزة لبعض مواد التفاعل . وقد استعمل سبعة بادئات عشوائية موضحة بالجدول (2) . أجري تفاعل البلمرة المتسلسل في حجم قدره 25 مايكروليترًا لكل عينة والمكون من 50 نانوغراماً من الـ DNA و 250 ميكرومولاً من كل من النيوكليوتيدات الأربعة (dTTP/dATP/dCTP/dGTP) و 10 بيكومول من كل بادئ ووحدة واحدة من أنزيم البلمرة DNA Taq polymerase .

أجريت عملية التضخيم Amplification في جهاز التدوير الحراري Thermocycler Tc(5000)Techne (PCR) على وفق البرامج الآتية :

#### البرنامج الخاص بالبادئات UBC76 , UBC16 , UBC1 [26]

عدد الدورات	المدة الزمنية / دقيقة	درجة الحرارة / م°	الخطوات
دورة واحدة	4	94	Initial denaturation
36 دورة	1	92	Denaturation
	1	35	Annealing
	2	72	Extension
دورة واحدة	5	72	Final extension

#### البرنامج الخاص بالبادئات Op- B01 , Op- B11 , M13 [27]

عدد الدورات	المدة الزمنية / دقيقة	درجة الحرارة / م°	الخطوات
دورة واحدة	4	94	Initial denaturation
40 دورة	1	92	denaturation
	1	35	Annealing
	2	72	Extension
دورة واحدة	5	72	Final extension

## البرنامج الخاص بالبائى [28] Op- D20

عدد الدورات	المدة الزمنية / دقيقة	درجة الحرارة / م°	الخطوات
دورة واحدة	2	94	Initial denaturation
40 دورة	2	92	Denaturation
		35	Annealing
		72	Extension
دورة واحدة	10	72	Final extension

وبعد انتهاء التفاعل حفظت العينات تحت درجة 4 مئوية أو تحمل مباشرة على هلام الأكاروز بتركيز 1.5 % بحسب طريقة [24].

## تحليل النتائج

1- تم قياس النسبة المئوية للتعدد الشكلي Polymorphism بالقانون الآتي [24]:

$$(\text{Polymorphism \%} = (\text{Np} / \text{Nt}) \times 100)$$

(Polymorphic) = Number of polymorphic bands of random primer (Np)

للبيدائى العشوائى

Total number of bands of the same primer (Nt) = عدد الحزم الكلي لنفس البيدائى

2- أجري التحليل الإحصائي بإعتماد برنامج PAST ver.1.91 الذي يعمل بوجود الحزمة (1) وغيابها (0)

لإجراء التحليل العنقودي الذي اعتمد على نسبة التشابه الوراثي لمعامل جاكارد Jaccard's coefficient لرسم مخطط التحليل العنقودي. أجري التحليل العنقودي (Cluster analysis) بإعتماد برنامج PAST [29] وذلك لرسم شجرة القرابة الوراثية بنحوٍ عنقودي (Dendrogram) لتعكس درجة التشابه بين العينات المدروسة.

## النتائج والمناقشة

أظهرت نتائج الترحيل الكهربائي لنواتج PCR لعينات DNA لنبات القصب البري أن العدد الكلي للحزم المضخمة بلغ (102) حزمة التي توزعت بين 31 عينة قصب. سبع منها بنسبة (6.86%) التي كانت Monomorphic, أما الـ 95 حزمة البقية فكانت Polymorphic متعددة الأشكال أو متباينة بنسبة (93.13%) , تراوحت أعدادها بين (10-17) حزمة للبيدائى الواحد. أعطى البيدائى (UBC1) أعلى عدد من الحزم متعددة الأشكال (17 حزمة), في حين البادئان (Op-B01, M13) أعطيا أقل عدد من الحزم المتباينة أو متعددة الأشكال (10 حزم) مما يدل على الاختلافات الوراثية الكبيرة بين العينات المدروسة. بلغ معدل الحزم متعددة الأشكال (13.5) حزمة لكل بادي, أما معدل النسبة المئوية للتعدد الشكلي أو التباين Polymorphism (92.67%) تراوحت بين 71.42% للبيدائى M13 و100% للبيدائين Op-B11, UBC1 (جدول 3). عند مقارنة هذه النتائج مع نتائج دراسات أخرى كان معدل نسبة التعدد الشكلي 83.1% لـ 16 بادئاً و149 حزمة متضخمة للقصب في إيران, 123 حزمة كانت متعددة الأشكال [26]. من الجدير بالذكر أن القصب البري الذي ينتشر طبيعياً في العراق وصف جزئياً للمرة الأولى في هذه الدراسة.

و أظهرت النتائج بنحوٍ عام وجود نسبة كبيرة من الاختلافات الوراثية مما يؤكد فعالية هذه التقانة في التمييز بين نباتات القصب المنتشرة في العراق حتى عند وجود درجات منخفضة من الاختلافات الوراثية (عينات القصب المأخوذة من منطقة واحدة) فإن هذه التقانة كانت قادرة على تمييز النباتات التي تختلف عن بعض بحزمة واحدة وتتفق هذه النتائج مع العديد من الدراسات [27];[12];[30];[4]. كما تناغمت نتائج هذه الدراسة مع أغلب الدراسات الأوروبية حيث تميز القصب المنتشر في القارة الأوروبية بوجود مستويات عالية من التباين الوراثي [31];[32];[19]. كما أظهرت بادئات RAPD عدداً من الحزم المميزة (Unique bands) في بعض العينات التي من الممكن أن تعد مؤشراً لتلك العينات المميزة, وكان عددها (10) حزم مميزة, أربع منها ميزت عينات أبو غريب (بغداد) التي جمعت من منطقة ذات تربة رطبة (ليست مغمورة بالماء), وحزمتان ميزت عينات المسحب والصلال (البصرة) كما في الجدول (4) والأشكال (2-7).

### معامل التشابه الوراثي والتحليل العنقودي لعينات القصب

استثمرت نتائج جميع بادئات الـ RAPD في تقدير البعد الوراثي بين العينات المدروسة لنبات القصب *P. australis* عن طريق البرنامج الاحصائي PAST ver.1.91 واعتماداً على نسبة التشابه لمعامل جاكارد (Jaccards coefficient) , وتمثلت النتيجة بالجدول (5). كان أقل بعد وراثي بين (المسحب والصلال 2 والحسيجي 3) وبين (الدوب 2 والحسيجي 3) وبين (الدوب 2 ومسحب وصالل 2) إذ بلغ (صفرأ) . أما أعلى بعد وراثي فقد كان بين (كرماشية 2 والحسيجي 3) وبين (كرماشية 3 والحسيجي 3) وبين (مسحب وصالل 2 وكرماشية 2) وبين (مسحب وصالل 2 وكرماشية 3) وبين (الدوب 2 وكرماشية 2) وبين (الدوب 2 وكرماشية 3) حيث بلغ (4.899) , وتراوحت قيم بقية العينات بين ذلك .

تم إعداد شجرة القرابة الوراثية اعتماداً على النتائج المتحصلة من استعمال البادئات العشوائية لتقانة الـ RAPD على عينات القصب المدروسة و باستعمال مقياس Jaccard للتشابه الوراثي . يتضح من الشكل (1) بأن العينات أدرجت ضمن التحليل العنقودي في (ست) مجاميع رئيسة : المجموعة الاولى : وضمت الحسيجي 3 (ميسان) , المجموعة الثانية : وضمت المسحب والصلال 2 (البصرة) , المجموعة الثالثة : وضمت الدوب 2 (ميسان) (المجاميع الثلاث أففة الذكر تشاركت في أقل بعد وراثي ألا وهو صفر) , المجموعة الرابعة : وضمت (إثنين) تحت مجموعة , تحت المجموعة الأولى : وضمت الدوب 3 (ميسان) ودجلة 2 (بغداد) , تحت المجموعة الثانية : وضمت كل من مؤخر بريدة 1 , الوادية 1 , الوادية 2 , مؤخر بريدة 3 , مؤخر بريدة 2 , أبو عجل 3 , أبو عجل 2 , وجميع هذه المواقع في محافظة ميسان , فضلاً عن كل من المصب العام 2 , المصب العام 1 (جنوب بغداد). المجموعة الخامسة : وضمت (إثنين) تحت مجموعة , تحت المجموعة الأولى : وضمت الحسيجي 1 (ميسان) , ودجلة 3 (بغداد) , تحت المجموعة الثانية : وضمت كلاً من الوادية 3 , ابو عجل 1 , والحسيجي 2 , والدوب 1 وكلها في ميسان , الكرماشية 3 , الكرماشية 2 , الكرماشية 1 , وكلها من ذي قار , والمصب العام 3 , دجلة 1 , أبو غريب 1 , أبو غريب 2 , أبو غريب 3 , أبو غريب 4 (وكلها في بغداد) , ومسحب وصالل 1 (البصرة) , المجموعة السادسة : وضمت عينة واحدة هي المسحب والصلال 3 (البصرة) .

أوضحت النتائج انضمام عينات القصب في ست مجاميع رئيسة وبدرجة تشابه %60 لأغلب العينات . وبين مخطط التحليل العنقودي (شجرة القرابة) أن هناك توافقاً ما بين المجموعات المتشكلة والموقع أو البعد الجغرافي لها , وأن العينات المأخوذة من موقع واحد أو محافظة واحدة على الأكثر تجمعت في مجموعة واحدة فمثلاً (تحت المجموعة الثانية من المجموعة الرئيسية الرابعة) جمعت أكثر عينات ميسان , إذ شكلت نسبة عدد عينات محافظة ميسان %72 مع وجود بعض الاستثناءات , فمثلاً اجتمعت عينتا الدوب 3 (ميسان) , ودجلة 2 (بغداد) في تحت مجموعة واحدة (تحت المجموعة الاولى من المجموعة الرئيسية الرابعة) , وربما يعود السبب الى أن الأهوار قد جُففت وبقيت جافة لأكثر من عقدين من الزمن , ثم تم إعادة إعمارها بالماء لذا لا يمكن إغفال فكرة الرايزومات والبذور المنقولة بواسطة المياه , وبالأخص مياه نهر دجلة الى الأهوار لذلك نلاحظ في أغلب الأحيان إجتماع عينات من ميسان مع عينات من دجلة (بغداد) , كما تم إنعزال عينة المسحب والصلال (البصرة) في مجموعة مستقلة , قد يعود السبب في إنعزال عينات هذه المنطقة عن باقي المناطق هو موقعها الجغرافي في محافظة البصرة القريب من دول الجوار وانتشار ووصول البذور الى هذا الموقع من تلك الدول , وهذا يتفق مع رأي [33] بأن القصب يمكن أن يتكاثر خضرياً بالرايزومات أو بالبذور التي يمكن أن تنقل بواسطة الرياح أو طافية على الماء الى مسافات طويلة . تتفق النتائج الحالية لمخطط التحليل العنقودي مع النتائج التي توصل اليها كل من [34] الذي درس التباينات المظهرية والوراثية لنبات القصب في جمهورية التشيك لبحيرتين صناعيتين منفصلتين إحداهما قديمة والأخرى حديثة و[26] الذي قام بدراسة التباين الوراثي والاختلافات المظهرية للقصب في عدة محافظات من إيران , اللذين أكدوا أن التحليل العنقودي المعتمد على درجة التشابه الوراثي جمع عينات القصب اعتماداً على الأصول الجغرافية .

### المصادر

- 1- شودي , شوكت علي (1989). الحشائش في المملكة العربية السعودية . المركز الاقليمي لأبحاث الزراعة والمياه بالرياض وزارة الزراعة والمياه . الرياض . المملكة العربية السعودية .
- 2- Nguyen,L.X.;Lambertini,C.;Sorrell,B.K.;Eller,F.;Achenbach,L. and Brix,H. (2013). Photosynthesis of co-existing *Phragmites* haplotypes in their non-native range : are characteristics determined by adaptations derived from their native origin ? . AoB PLANTS 5:plt016;doi:10.1093/aobpla/plt016 .

- 3- السعدي , حسين والمياح , عبد الرضا . (1983). النباتات المائية في العراق . منشورات مركز الخليج العربي . جامعة البصرة . 192 صفحة .
- 4- Hansen, D.L.; Lambertini, C.; Jampeetong, A. and Brix, H. (2007). Clone-specific differences in *Phragmites australis*: effects of ploidy level and geographic origin. *Aquat. Bot.*, 86: 269-279.
- 5- Clevering, O.A.; Brix, H. and Lukavská, J. (2001). Geographic variation in growth responses in *Phragmites australis* .*Aquat. Bot.*, 69: 89-108.
- 6- Clevering, O.A. (1999). Between- and within- population differences in *Phragmites australis*. The effects of nutrients on seedling growth . *Oecologia*, 121: 447-457.
- 7- Björk, S. (1967). Ecological investigation in *Phragmites communis*: studies in theoretic and applied limnology. *Folia Limnol. Scand.*, 14:1-248 .
- 8- Degani, C.; Rowland, L. J.; Levi, A.; Hortynski, J.A. and Galletta, G. J. (1998). DNA fingerprinting of strawberry (*Fragaria X ananassa*) cultivars using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Euphytica*, 102:247-253 .
- 9- Migdadi, H. M.(2001). Genetic variation in some *Aegilops* species as revealed by morphological and molecular techniques, Ph. D. Thesis, University of Jordan, Amman.
- 10- سيد , محمود هيثم . (2001). استخدام مؤشرات من الدنا DNA في انتخاب مورثات المقاومة للأمراض في الشعير , اطروحة دكتوراه , كلية الزراعة , جامعة دمشق , سوريا .
- 11- Curn, V.; Kubatova, B.; Vavrova, P.; Krivackova-Sucha, O. and Cizkova, H. (2007). Phenotypic and genotypic variation of *Phragmites australis*: comparison of populations in two human-made lakes of different age and history. *Aquat . Bot.*, 86:321-330 .
- 12- Keller, B.E.M. (2000). Genetic variation among and within populations of *Phragmites australis* in the Charles River watershed. *Aquat. Bot.*, 66:195-208.
- 13- Koppitz, H. and Köhl, H. (2000). To the importance of genetic diversity of *Phragmites australis* in the development of reed stands. *Wetland Ecol. Manag.*, 8:403-414 .
- 14- Köhl, H.; Koppitz, H.; Rolletschek, H., and Kohl, J.G. (1999). Clone specific differences in *Phragmites australis* stands. I. morphology, genetic and site description. *Aquat. Bot.*, 64:235-246.
- 15- Lambertini, C.; Gustafsson, M.H.G.; Frydenberg, J.; Lissner, J.; Speranza, M. and Brix, H. (2006). A phylogeographic study of the cosmopolitan genus *Phragmites* (Poaceae) based on AFLPs. *Plant Syst. Evol.*, 258: 161-182 .
- 16- Saltonstall, K. (2003b). Microsatellite variation within and among north American lineages of *Phragmites australis*. *Mol. Ecol.*, 12:1689-1702.
- 17- Saltonstall, K. (2002). Cryptic invasion by a non-native genotype of the common reed, *Phragmites australis* into North America. *Proceedings of the Natural Academy of Sciences, USA*, 99: 2445-2449 .
- 18- Saltonstall, K. (2003a). A rapid method for identifying origin of North American *Phragmites* populations using RFLP analysis. *Wetlands*, 23:1043-1047.

- 19- Koppitz, H.; Kühl, H.; Hesse, K. and Kohl, J. G. (1997). Some aspects of the importance of genetic diversity in *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steudel for the development of reed stands. Bot. Acta., 110:217–223.
- 20- Gonzalar, J.M. and Ferrer, M. (1993). Random amplified polymorphic DNA analysis in *Hordeum* species. Genome, 36:1029-1031.
- 21- Adam, R.P.; Hsieh, C.; Murata, J. and Pandey, R.N. (2002). Systematics of *Juniperus* from eastern Asia based on random amplified polymorphic DNAs (RAPDs). Bioch. Syst. Eco., 30:231–241.
- 22- Weigand, F.; Baum, M. and Udupa, S. (1993). DNA molecular marker techniques. technical manual. No.20. International Center for Agricultural Research in the Dry Areas. Aleppo, Syria.
- 23- Saghai- Maroof, M. A., Soliman, K. M., Jorgensen, R. A. and Allard, R. W. (1984). Ribosomal DNA spacer length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location and population dynamics Proc. Natl. Acad. Sci., USA. 81: 8014-8018.
- 24- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, J. (1989). Molecular cloning , a laboratory Manual. 2<sup>nd</sup> edition. Cold spring Harbor laboratory press, New York.
- 25- Williams, J.G., Kubelik A.R., Livak K.J., Rafalski J.A. and Tingey S.V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucl. Acids Res., 18: 6531-6535 .
- 26- Diyanat, M.; Booshehri, A.A.S.; Alizadeh, H.M.; Naghavi, M.R. and Mashhadi, H.R. (2011) . Genetic diversity of Iranian clones of common reed (*Phragmites australis*) based on morphological traits and RAPD markers . Weed Science, 59:366-375.
- 27- Koppitz, H. (1999). Analysis of genetic diversity among selected populations of *Phragmites australis* world-wide. Aquat. Bot., 64:209–221.
- 28- Al-Hadeithi, Z.S.M. (2012). Molecular characterization for Iraqi barley (*Hordeum vulgare*) varieties using random amplification polymorphic DNA technique . M.Sc. thesis. Baghdad university . Iraq. 112 pp.
- 29- Hammer, Ø.; Harper, D.A.T and Ryan, P.D. (2001). PAST: Palaeontological Statistics software package for education and data analysis. Paleontologia Electronica 4(1):1-9.
- 30- Bussell, G. D.; Waycott, M. and Chappill, J. A. (2005). Arbitrarily amplified DNA markers as characters for phylogenetic interference. Perspect. Plant Ecol. Evol. Syst., 7:3–26 .
- 31- Kühl, H. and Neuhaus, D. (1993). The genetic variability of *Phragmites australis* investigated by random amplified polymorphic DNA. Seeuferzerstorung and Seeferrenturierung in Mitteleuropa-Limnologie aktuell., 5:9–18 .
- 32- Zeidler, A.; Scheneiders, S.; Jung, C.; Melchinger, A. E. and Dittrich, P. (1994). The use of DNA fingerprint in ecological studies of *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steudel. Bot. Acta., 107:237–242 .
- 33- McCormick, M. K. ; Kettenring, K. M. ; Baron, H. M. and Whigham, D. F. (2010). Extent and reproductive mechanisms of *Phragmites australis* spread in brackish wetlands in Chesapeake Bay, Maryland (USA). Wetlands , 30 : 67 –74 .



- 34- Krivackova-Sucha,O.;Vavrova,P.;Cizkova,H.;Curn,V. and Kubatova, B. (2007). Phenotypic and genotypic variation of *Phragmites australis* :a comparative study of clones originating from two populations of different age .Aquat. Bot., 86:361-368 .

جدول رقم (1) مواقع وإحداثيات العينات المدروسة

الإحداثيات	المحافظة	الموقع
38R 0756507 UTM 3394047	البصرة	المسحب والصلال
38R 0740710 UTM 3499327	ميسان	الدوب
38R 0687948 UTM 3485863	ميسان	الوادية
38R 0719629 UTM 3478056	ميسان	ابو عجل
38R 0737379 UTM 3495096	ميسان	الحسيجي
38R 0675816 UTM3502949	ميسان	مؤخر بريدة
38R 649763 UTM 3413422	ذي قار	الكرماشية
38S 441039 UTM 3660135	جنوب بغداد	المصب العام
38S 440988 UTM 3682147	بغداد	دجلة
38S 427466 UTM 3686000	غرب بغداد	أبو غريب

جدول رقم (2) البادئات العشوائية المستعملة مع تتابعاتها

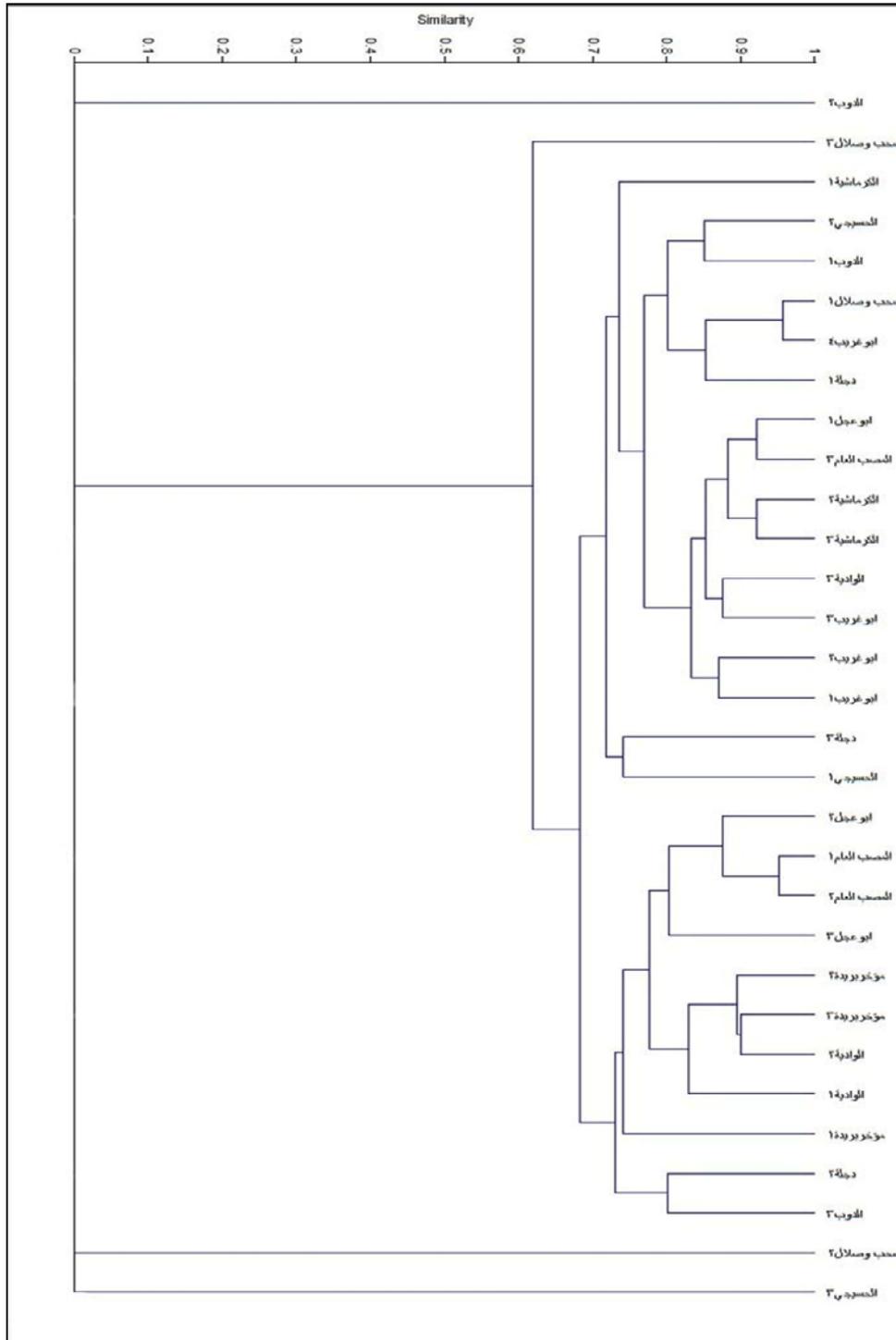
تتابع البادئ 3 5 →	اسم البادئ	ت
CCT GGG CTT C	UBC1	1
GGT GGC GGG A	UBC16	2
GAG CAC CAG T	UBC76	3
GAGGGTGGCGTTCT	M13	4
GTT TCG CTC C	Op-B01	5
GTA GAC CCG T	Op-B11	6
ACC CGG TCAC	Op-D20	7

جدول رقم (3) نواتج البادانات العشوائية المستعملة في هذه الدراسة , الحزم المتعددة الاشكال والنسبة المئوية للتعدد الشكلي

ت	البادئ	عدد الحزم الرئيسية	عدد الحزم المتعددة الاشكال	النسبة المئوية للتعدد الشكلي %
1	UBC76	17	16	94.11
2	UBC16	13	12	92.30
3	UBC1	17	17	100
4	M13	14	10	71.42
5	Op-D20	14	14	100
6	Op-B11	16	16	100
7	Op-B01	11	10	90.90
المجموع				
المعدل				
		102	95	92.67
		14.5	13.5	

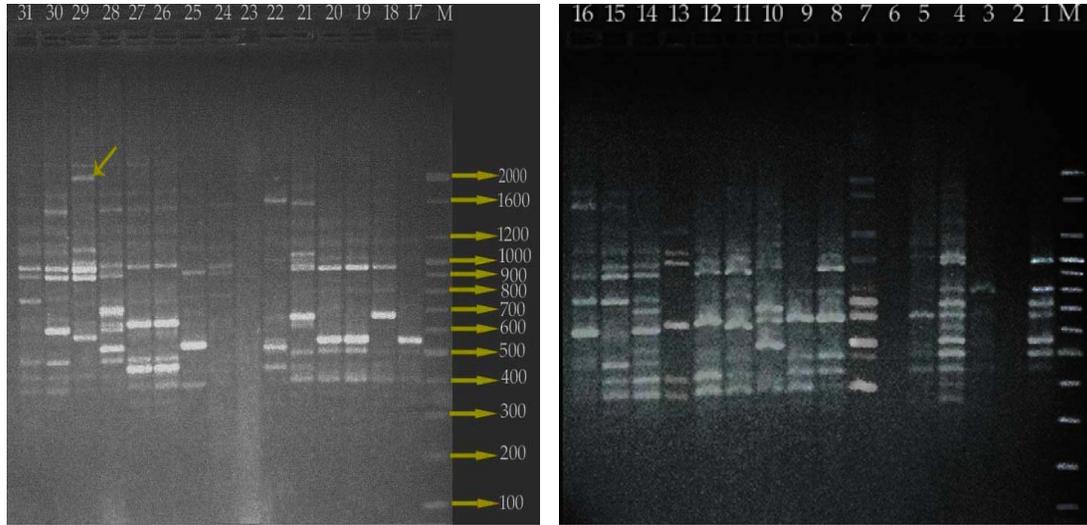
جدول رقم (4) العينات والبادانات التي أظهرت حزمًا مميزة لهذه العينات مع الوزن الجزيئي لهذه الحزم

ت	اسم العينة	اسم البادئ	الوزن الجزيئي للحزم المميزة / bp
1	أبو عجل 1	M13	1450
2	الوادية 1	M13	450
3	كرماشية 3	Op-D20	1600
4	مسحب وصلال 1	M13	1200
		UBC16	770
5	دجلة 1	M13	1700
6	أبو غريب 1	M13	850
7	أبو غريب 2	UBC1	2000
		Op-D20	550
8	أبو غريب 3	Op-D20	2000

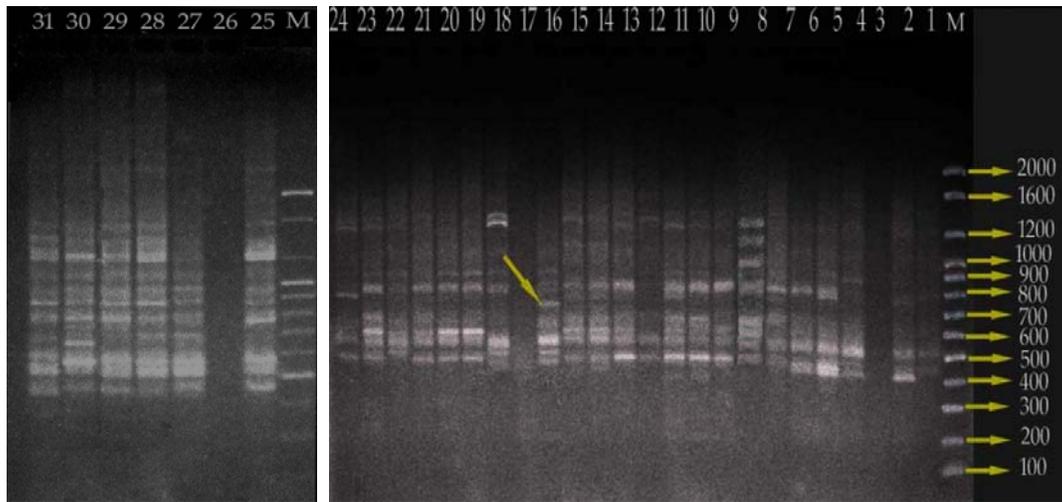


شكل رقم (1) شجرة القرابة الوراثية Dendrogram اعتماداً على نتائج تقانة الـ RAPD لعينات القصب المدروسة بحسب معامل جاكارد للتشابه الوراثي

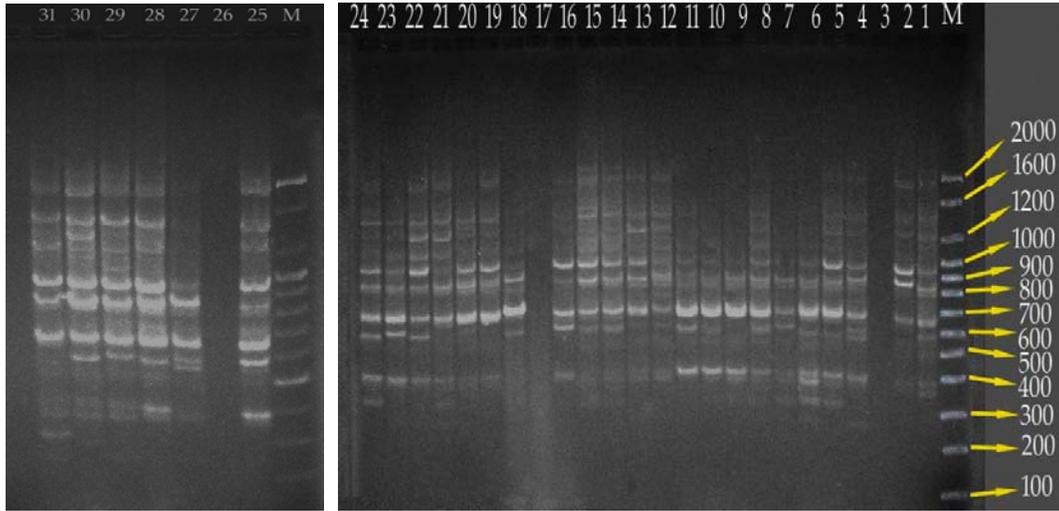




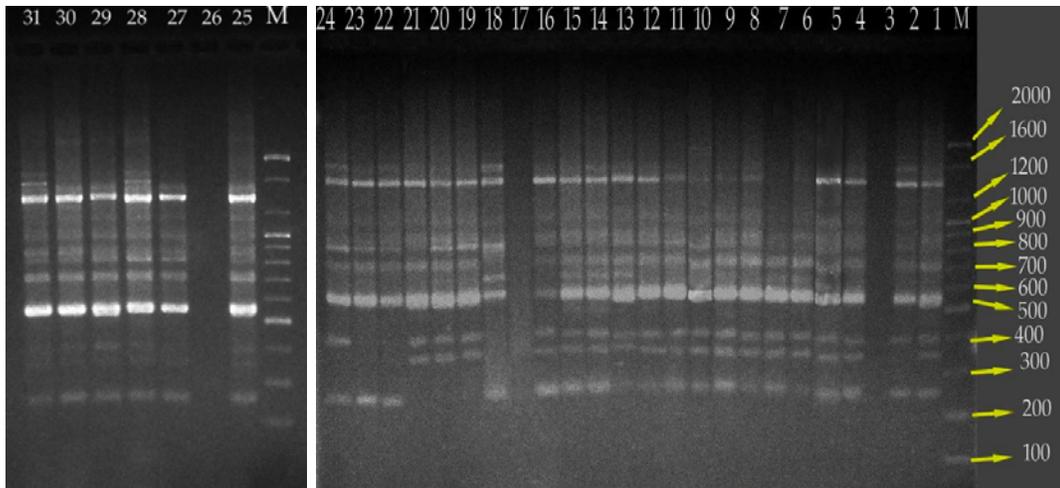
شكل رقم (2) نواتج تضاعف البادئ UBC1 المرحلة على هلام الأكاروز 1.5% مع الدليل الحجمي Ladder  
 1 marker = M - الدوب 1, 2- الدوب 2, 3- الدوب 3, 4- الحسيجي 1, 5- الحسيجي 2, 6- الحسيجي 3, 7- أبو  
 عجل 1, 8- أبو عجل 2, 9- أبو عجل 3, 10- مؤخر بريدة 1, 11- مؤخر بريدة 2, 12- مؤخر بريدة 3, 13- الوادية 1,  
 14- الوادية 2, 15- الوادية 3, 16- دجلة 1, 17- دجلة 2, 18- دجلة 3, 19- المصب العام 1, 20- المصب العام 2,  
 21- المصب العام 3, 22- مسح وصلال 1, 23- مسح وصلال 2, 24- مسح وصلال 3, 25- كرماشية 1, 26-  
 كرماشية 2, 27- كرماشية 3, 28- أبو غريب 1, 29- أبو غريب 2, 30- أبو غريب 3, 31- أبو غريب 4.



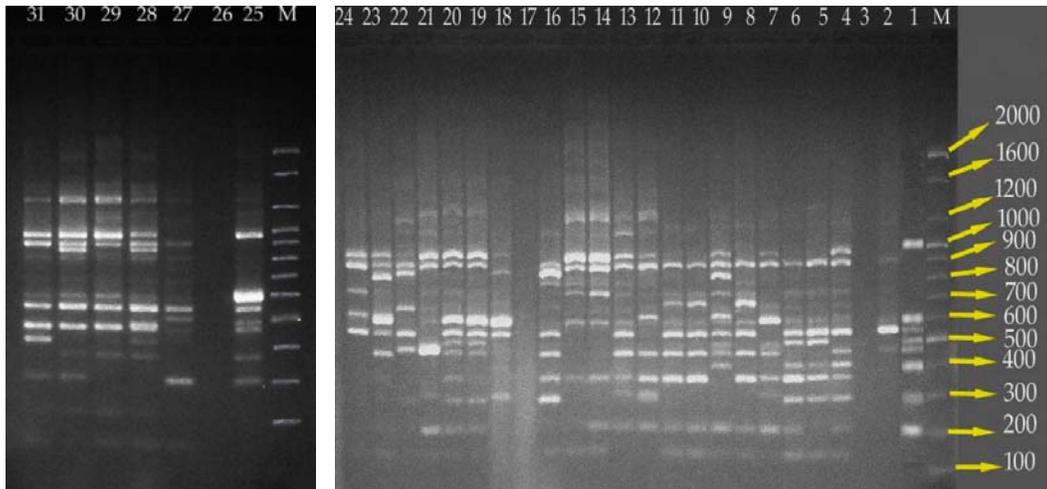
شكل رقم (3) نواتج تضاعف البادئ UBC16 المرحلة على هلام الأكاروز 1.5% مع الدليل الحجمي Ladder1  
 marker = M  
 - الحسيجي 1, 2- الحسيجي 2, 3- الحسيجي 3, 4- أبو عجل 1, 5- أبو عجل 2, 6- أبو عجل 3, 7- مؤخر بريدة 1,  
 8- مؤخر بريدة 2, 9- مؤخر بريدة 3, 10- الوادية 1, 11- الوادية 2, 12- الوادية 3, 13- كرماشية 1, 14-  
 كرماشية 2, 15- كرماشية 3, 16- مسح وصلال 1, 17- مسح وصلال 2, 18- مسح وصلال 3, 19- المصب  
 العام 1, 20- المصب العام 2, 21- المصب العام 3, 22- دجلة 1, 23- دجلة 2, 24- دجلة 3, 25- الدوب 1, 26-  
 الدوب 2, 27- الدوب 3, 28- أبو غريب 1, 29- أبو غريب 2, 30- أبو غريب 3, 31- أبو غريب 4



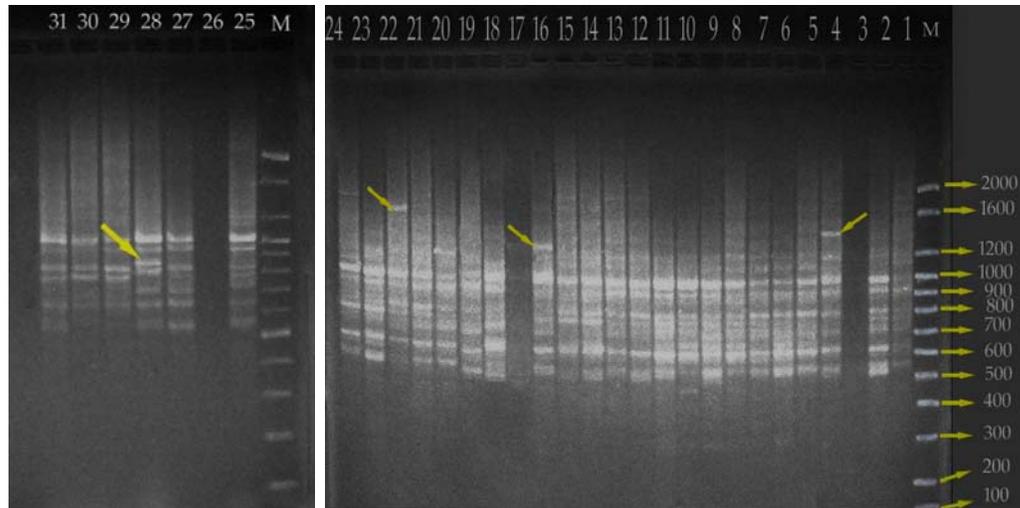
شكل رقم (4) يمثل نواتج تضاعف البادئ UBC76 المرحلة على هلام الأكاروز 1.5% مع الدليل الحجمي Ladder  
 -1 marker =M الحسيجي 1, -2 الحسيجي 2, -3 الحسيجي 3, -4 أبو عجل 1, -5 أبو عجل 2, -6 أبو عجل 3,  
 -7 مؤخر بريدة 1, -8 مؤخر بريدة 2, -9 مؤخر بريدة 3, -10 الوادية 1, -11 الوادية 2, -12 الوادية 3, -13 كرماشية  
 1, -14 كرماشية 2, -15 كرماشية 3, -16 مسح وصلال 1, -17 مسح وصلال 2, -18 مسح وصلال 3, -19  
 المصب العام 1, -20 المصب العام 2, -21 المصب العام 3, -22 دجلة 1, -23 دجلة 2, -24 دجلة 3, -25 الدوب 1,  
 -26 الدوب 2, -27 الدوب 3, -28 أبو غريب 1, -29 أبو غريب 2, -30 أبو غريب 3, -31 أبو غريب 4



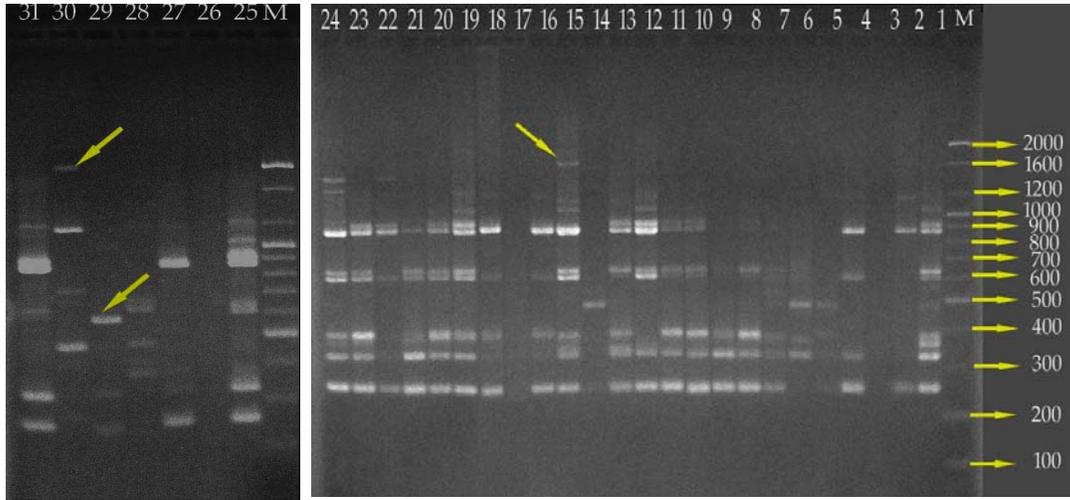
شكل رقم (5) يمثل نواتج تضاعف البادئ Op-B01 المرحلة على هلام الأكاروز 1.5% مع الدليل الحجمي Ladder  
 -1 marker =M الحسيجي 1, -2 الحسيجي 2, -3 الحسيجي 3, -4 أبو عجل 1, -5 أبو عجل 2, -6 أبو عجل 3,  
 -7 مؤخر بريدة 1, -8 مؤخر بريدة 2, -9 مؤخر بريدة 3, -10 الوادية 1, -11 الوادية 2, -12 الوادية 3, -13  
 كرماشية 1, -14 كرماشية 2, -15 كرماشية 3, -16 مسح وصلال 1, -17 مسح وصلال 2, -18 مسح وصلال 3,  
 -19 المصب العام 1, -20 المصب العام 2, -21 المصب العام 3, -22 دجلة 1, -23 دجلة 2, -24 دجلة 3,  
 -25 الدوب 1, -26 الدوب 2, -27 الدوب 3, -28 أبو غريب 1, -29 أبو غريب 2, -30 أبو غريب 3, -31 أبو غريب 4



شكل رقم (6) يمثل نواتج تضاعف البادئ Op-B11 المرحلة على هلام الأكاروز 1.5% مع الدليل الحجمي Ladder marker =M -1 الحسيجي 1, -2 الحسيجي 2, -3 الحسيجي 3, -4 أبو عجل 1, -5 أبو عجل 2, -6 أبو عجل 3, -7 مؤخر بريدة 1, -8 مؤخر بريدة 2, -9 مؤخر بريدة 3, -10 الوادية 1, -11 الوادية 2, -12 الوادية 3, -13 كرماشية 1, -14 كرماشية 2, -15 كرماشية 3, -16 مسح وصلال 1, -17 مسح وصلال 2, -18 مسح وصلال 3, -19 المصب العام 1, -20 المصب العام 2, -21 المصب العام 3, -22 دجلة 1, -23 دجلة 2, -24 دجلة 3, -25 الدوب 1, -26 الدوب 2, -27 الدوب 3, -28 أبو غريب 1, -29 أبو غريب 2, -30 أبو غريب 3, -31 أبو غريب 4



شكل رقم (7) يمثل نواتج تضاعف البادئ M13 المرحلة على هلام الأكاروز 1.5% مع الدليل الحجمي Ladder marker =M -1 الحسيجي 1, -2 الحسيجي 2, -3 الحسيجي 3, -4 أبو عجل 1, -5 أبو عجل 2, -6 أبو عجل 3, -7 مؤخر بريدة 1, -8 مؤخر بريدة 2, -9 مؤخر بريدة 3, -10 الوادية 1, -11 الوادية 2, -12 الوادية 3, -13 كرماشية 1, -14 كرماشية 2, -15 كرماشية 3, -16 مسح وصلال 1, -17 مسح وصلال 2, -18 مسح وصلال 3, -19 المصب العام 1, -20 المصب العام 2, -21 المصب العام 3, -22 دجلة 1, -23 دجلة 2, -24 دجلة 3, -25 الدوب 1, -26 الدوب 2, -27 الدوب 3, -28 أبو غريب 1, -29 أبو غريب 2, -30 أبو غريب 3, -31 أبو غريب 4



شكل رقم (8) يمثل نواتج تضاعف البادئ Op-D20 المرحلة على هلام الأكاروز 1.5% مع الدليل الحجمي

Ladder

marker =M  
 1- الحسيجي, 2- الحسيجي, 3- الحسيجي, 4- أبو عجل, 5- أبو عجل, 6- أبو عجل, 3-  
 7- مؤخر بريدة, 8- مؤخر بريدة, 9- مؤخر بريدة, 10- الوادية, 11- الوادية, 12- الوادية, 13-  
 14- كرماشية, 15- كرماشية, 3- 16- مسح وصلال, 17- مسح وصلال, 18- مسح  
 وصلال, 19- المصب العام, 20- المصب العام, 21- المصب العام, 22- دجلة, 23- دجلة, 24- دجلة, 3-  
 25- الدوب, 26- الدوب, 27- الدوب, 28- أبو غريب, 29- أبو غريب, 30- أبو غريب, 31- أبو  
 غريب 4

## Genetic Diversity of Iraqi of Common Reed *Phragmites australis* by Using RAPD Technique

**Nidhal N. Hussain**

**Taghreed A. Abdul.Karim**

Dept. of Biology/ College of Education for Pure Science (Ibn Al-haitham) /  
University of Baghdad

**Harb A. Abed mohammad**

Directorate of Plant Protection/ Ministry of Agriculture

**Received in:23/Septemper/2014, Accepted in :24/November/2014**

### Abstract

Genetic diversity was studied in 31 Iraqi common reed samples , which were collected from Iraqi marshes in Basrah , Messan and Thi-Qar provinces and also from different areas in Baghdad province . Random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique was used for evaluation of genetic diversity between collected samples . Seven primers were used for polymorphism detecting between common reed samples . The results revealed 102 bands for the all samples when RAPD-PCR was used . The percentage rate for the monomorphic bands is 6.86% , while the percentage rate for the polymorphic bands is 93.13% , and the numbers of these bands are ranging between 10 to 17 for each used primer . The UBC1 primer gave the highest number of polymorphic bands with 17 bands , while the M13 and Op-B01 primers gave the lowest number of polymorphic bands with 10 bands . The mean value of polymorphic bands is 13.5 for each used primer , while the percentage mean ratio for polymorphism is 92.67% , ranging between 71.42% for M13 primer and 100 % for UBC1 and Op-B11 primers . The results of dendrogram analysis for the RAPD data by using unweighted pair-group method with arithmetic average (UPGMA) were showed that almost common reed samples were distributed in six main groups with 60% in similarity . These six groups showed coincidence with their geographic area . The samples which collected from one location or from same province were clustered in one group , while the Meshab and Sallal (Basrah) isolated samples were segregated from the other samples . The genetic variations between isolated common reeds have advantage in weeds control by using chemical or other methods .

**Keywords :** Common reed *Phragmites australis* , Iraq marshes , RAPD , Genetic diversity