دراسة العلاقة والبعد الوراثي لأصناف من نخيل التمر *Phoenix dactylifera* L. النادرة باستخدام بعض الواسمات الجزيئية

عبدالكريم محمد عبد

مركز أبحاث النخيل
جامعة البصرة

Abu_zahra1966@yahoo.com

الخلاصة:

أجريت هذه الدراسة على أربعة أصناف من نخيل التمر المزروعة في محافظة البصرة جنوب العراق. وهي (الحابسي والشويثي والنبايتي والمياسي) لتحديد البصمة الوراثية لكل صنف من الأصناف قيد الدراسة ودراسة التباين الوراثي وعلاقات القرابة بين هذه الأصناف باستخدام تقنية الـRAPD-PCR التي تعتمد على تباين المادة الوراثية DNA . وقد وجد أن الصنف الشويثي والمياسي أعطوا أطول حزم باستخدام البادئ OPC-08 كما أعطى هذا البادئ حين استخدامه 15 حزمة بينما البادئ OPB-09 أعطى أكثر عدد من الحزم 23 حزمة .وسجل البادئ نفسه مع الصنف حابسي اقل طول للحزمة233pb. كما بينت الدراسة عند استخدام التحليل العنقودي للأصناف انعزال الصنف حابسي عن باقي الأصناف وكان هناك تقارب وراثي ما بين الصنف شويثي والصنف نبايتي وقد ابتعد وراثيا الصنف مياسي عنهما بعض الشيء من خلال رسم سجلات النسب الوراثية Dendrogram .

المقدمة:

إن التطورات الوراثية والمظهرية التي طرأت على نخيل التمر عبر آلاف السنين كانت تغيرات طبيعية خلال تلك العصور بحيث تطورت مجتمعات من نخيل التمر متأقلمة مع تلك التغيرات المستمرة والمتوارثة في الخصائص الفسيولوجية والمظهرية والوراثية التي أعطت مفهوم الصنف الزراعيCultivar إذ يمكن المحافظة عليها وانتقالها من جيل إلى جيل بإكثارها بطريقة الفسائل Offshoots. ولكن الاستمرار بالإكثار الخضري لمدة طويلة جداً من الزمن يؤدي إلى حصول تغيرات وراثية في الصنف المزروع وحصول طفرات وراثية Genetic Mutations ينشأ عنها بعض الأفراد المتشابهة والتابعة للصنف الأصلي والتي تسمى بالسلالة Clone وهي تعبير عن الحد الأدنى من التغايرات الوراثية والمظهرية في النخيل (الجبوري وزايد، 2006).

وأوضح El-Rayes (2009) في دراسته استخدام البصمة الوراثية بطريقة الـ RAPD على بعض أصناف نخيل التمر السعودية وقد ظهرت اختلافات سواء على مستوى الحامض النووي(DNA) أو على مستوى التركيب الكيميائي. وقام AL-Mosholeh *et al*,(2004) باختبار مدى ملائمة طريقة التكبير العشوائي لقطع الحامض النووي اليوكسي ريبوزRAPD كأدلة وراثية في نخيل التمر ، وتم تحليل البصمة الوراثية لخمسة أصناف من نخيل التمر المعروفة في المملكة العربية السعودية ، وهي البرحي ونبتة علي وروثانا وعجوة وسكري ،وتم اختبار 12 بادئ وقد أعطى 64 حزمة ، وتراوحت نسب التشابه الوراثي بين أصناف نخيل التمر من 70-85%. وكان الصنف السكري ابعد الأصناف من حيث درجة التشابه الوراثي عن بقية الأصناف.

ومن خلال دراسة قام بها(2003) Askari *et al* . استخدم طريقة الـ RAPD لإيجاد العلاقات الوراثية بين أصناف نخيل التمر،وأشارت الدراسة إلى إمكانية استخدام طريقة الـ RAPD لتحديد ولتعريف العلاقة بين أصناف نخيل التمر.

وقد صنف Ben-Abdalla *et al* .(2000) عدد من أصناف النخيل باستخدام تقنية الـRAPD ،كما تمتاز هذه المؤشرات بقدرتها على كشف أعداد كبيرة من التباينات Numerous Polymorphic مما جعلها قادرة على إيجاد أي اختلافات مهما كانت طفيفة وبين اقرب الأفراد فضلا عن قدرتها على تتبع التغيرات الوراثية عبر الأجيال. واستثمر الباحث Ali *et al* , (2006) في العراق مؤشرات الـ RAPD-PCR للتحقق من الثبات الوراثي لنباتات النخيل الناتجة بطريقة تكوين الأجنة الجسمية لصنف نخيل التمر صنف البرحي اذ تم استخدام 30 بادئ ولاحظت أن ثلاث بادئات منها فقط تم الحصول على حزم متباينه Polymorphic Bands .لذا

اتجهت الدراسة الحالية الى استخدام طريقة RAPD-PCR لتحديد ومعرفة البعد الوراثي بين الاصناف المدروسة والمزروعة في محافظة البصرة- العراق.

المواد وطرق العمل :

اجريت التجارب المعملية الخاصة باستخلاص وتحليل الـ DNA في مختبر التقانات الحياتية التابع لقسم الثروة الحيوانية -كلية الزراعة – جامعة البصرة .اذ اختيرت أربعة أصناف من نخيل التمر وهي(الحابسي والشويثي والنبايتي والمياسي).أخذت وريقات من كل صنف وتم غسلها بالماء المقطر ثم وضعت في جهاز التجفيف بالتجميد Freeze drying وتمت عملية الطحن باستخدام هاون صيني Mortar وأصبحت العينات بودرة ناعمة وتم اخذ 0.2 غم من المسحوق لاستخلاص الـDNA منها.

استخلاص الـ DNA.

تم استخلاص الـ DNA بإتباع خطوات الاستخلاص المرفقة بمحاليل استخلاص الـ(DNeasy Plant Mini Kit). لشركة QIAGEN والتي تتضمن خطوات تحليل خلايا نباتية إلى عدة خطوات وهي كتالي.

1-تم وضع 400 مايكرو ليتر من محلول AP1 التركيب الكيميائي للمحلول يحتوي على 70 ملغ من العينة الجافة.

2-تم خلط المحلول بالعينة الجافة باستخدام (Vortex).

3- تم تحضين العينة في درجة حرارة 65م لمدة 10 دقائق يتم الخلط إثناء التحضين عدة مرات أو في حاضنة مع هزاز.

4-تم وضع 130 ميكروليتر من المحلول AP2 ثم التحضين في الثلج لمدة 5 دقائق هذه الخطوة ترسب البروتينات والسكريات ومختلف المحتويات غير الـ DNA .

5- تم طرد مركزي لمدة 5 دقائق على سرعة 20 ،000xg .

6-تم اخذ الرائق المحتوي على الـ DNA ووضع في أنبوب فلتر لحجب أي عوالق في الرائق على الفلتر ووضع في الطرد المركزي على 000xg,20 لمدة 2 دقيقة خلال الطرد المركزي يمر الـ DNA من خلال الفلتر ويؤخذ المحلول . الذي مر من خلال الفلتر الذي يحتوي على الـ DNA ووضع عليه مثل حجمه مرة ونصف المحلول AP3/E وتخلط بالماصة (micropipette).

7- تم نقل المحلول إلى الفلتر الثاني ويترسب عليه الـ DNA ووضع في الجهاز الطرد المركزي على 6000xg لمدة دقيقة واحدة.

8-تم غسل الـ DNA الموجود على الفلتر بوضع محلول الغسيل AW ووضع في جهاز الطرد المركزي على 6000xg لمدة 2 دقيقة . وأعيد الغسيل بالمحلول AW مرة أخرى .

9-تم تجفيف الفلتر بالوضع في جهاز الطرد المركزي على 000xg,20 لمدة 2 دقيقة ووضع الفلتر في أنبوبة جديدة معقمة ووضع عليه المحلول (EDTA 1mM,Tris 10 mM(TE حيث يذوب الـ DNA في المحلول ويمر خلال الفلتر في أنبوب التجميع.

التأكد من وجود الـDNA.

تم التأكد من جودة الـ DNA وذلك تحميل الـ DNA الجينومي بمقدار (7x15ng/µl)+صبغة بروموفينول الزرقاء على هلام الاجاروز بتركيز 0.8% في محلول الفصل الكهربائي مقداره (1xTBE) وتركيز ايون الهيدروجين (pH8.0)مع وضع وزن جزيئي معلوم على هلام الاجاروز ، وتم صبغ الاجاروز بصبغة بروميد الايثيديوم بوضع 20 مايكروليتر من محلول بروميد الايثيديوم(0.5 mM)في 500 ملليتر ماء مقطر.

دراسة التباين الوراثي باستخدام طريقة الـRAPD.

تم استخدام 4 بادئات من بادئات الـRAPD جدول(1). أجريت التجربة بتحضير مزيج كلي Master mix لكل بادئة في أنبوبة سعة 1.5 مليليتر ، تم توزيع المزيج في أنابيب سعة 200 ميكرولتر مرقمة بأرقام عينات الـ DNA بواقع 24 ميكرولتر لكل أنبوبة ، ثم يضاف حجم 1 ميكرولتر (تركيز 15 نانوغرام /ميكرولتر)من كل عينة من DNA إلى محتويات الأنبوبة الخاصة بها ليصبح الحجم الكلي لمحتويات التفاعل 25 ميكرولتر . وضعت انابيب التفاعل في جهاز الدوران الحراري Thermal cycler من شركة MWG Biotch لإجراء برنامج تفاعل المبلمر المتسلسل المتكون من:

المراحل	درجة الحرارة (مئوي)	الزمن(دقائق)	عدد الدورات
الدنترة الاولية	**94**	**4:00**	**1**
الدنترة	**94**	**1:00**	**35**
التلدين	**36**	**2:00**	
الاستطالة	**72**	**2:00**	
الاستطالة النهائية	**72**	**7:00**	**1**

طريقة التفريد الكهربائي لنواتج الـ RAPD

وذلك باستخدام هلام الاجاروز Agarose gel بتركيز 2% في محلول 1xTBE(Sambrook *et al*.,1989).بعد إتمام عملية الفصل تم صبغ هلام الاجاروز بصبغة الايثيديوم بروميد 0.025 ميكروجرام/ملليليتر ثم تم فحص حزم الـDNA على هلام الاجاروز باستخدام جهاز (Compact Imaging System) .من شركة (IMAGQ).

التحليل التجميعي للدلالات الجزيئية:

تم التعامل مع أي نمط وراثي وأي حزمة اجري لها تكثير باستخدام RAPD على أنها صفة ، وان ناتج الـPCR تحولت إلى مصفوفات ثنائية (1) يشير إلى وجود حزمة و(0) لغيابها . وتم استخدام البرنامج الحاسوبي NTSYS-PC V2-1(Rohlf,2001) لتطوير مصفوفات متشابهة تعتمد على معامل Jaccard وهذه البيانات استخدمت لبناء مخطط تفرعي للتراكيب الوراثية لتقدير القرابة الوراثية بينها بالاعتماد على طريقة المجموعة الزوجية غير الموزونة مع المتوسط الحسابي Unweighted pair group method with arithmetic average (UPGMA)(Sokal and Michener, 1958).

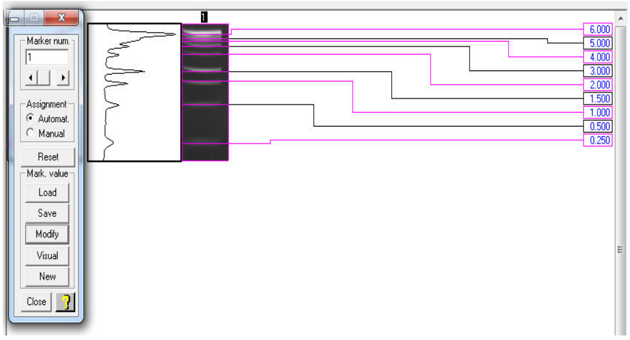
جدول(1) تتابع البيادءات المستعملة في تقنية PCR

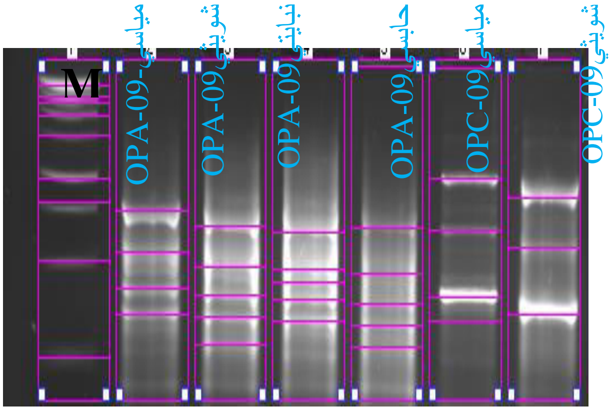
ت	Operon cod	Primer sequence	GC%
1	OPA-09	GGGTAACGCC	70%
2	OPB-09	TGGGGGACTC	70%
3	OPC-09	CTCACCGTCC	70%
4	OPC-08	TGGACCGGTG	70%

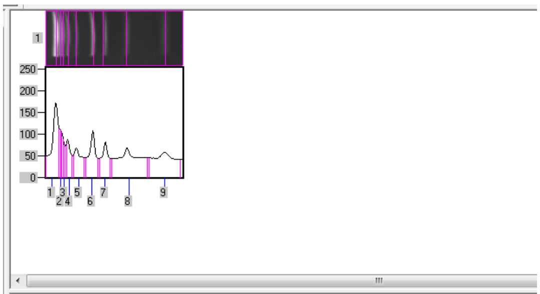
النتائج والمناقشة:

بينت نتائج تفاعلات الـ RAPD اختلافات في عدد الحزم المتضاعفة وأوزانها الجزيئية باختلاف البادئ المستخدم. وقد أعطى البادئ OPC-08 اقل عدد حزم والبالغة 10 بينما البادئ OPA-09و OPB-09 أعطت أكثر عدد حزم والبالغة 19 حزمة .كما نلاحظ وجود تشكل وراثي عالي مابين أصناف الدراسة(**polymorphic**). فعند استخدام البادىء OPA-09 شكل (1) نجد انه أنتج 20حزمة وقد تراوحت أطول الحزم من 272-693 وقد كانت أطول الحزم في الصنف شويثي بينما البادئ OPC-09 شكل(1 و2) أنتج 15 حزمة وقد سجل في الصنف مياسي أطول الحزم 1500(شكل ،2). وكانت هناك 23 حزمة للبادئ OPB-09 شكل(2) وتراوحت أطول الحزم من 223-1906 وقد حصل الصنف الشويثي على أطول الحزم وبواقع1906 (شكل،3). وقد سجل البادئ OPC-08 أكثر طول للجزم من بين البادئات

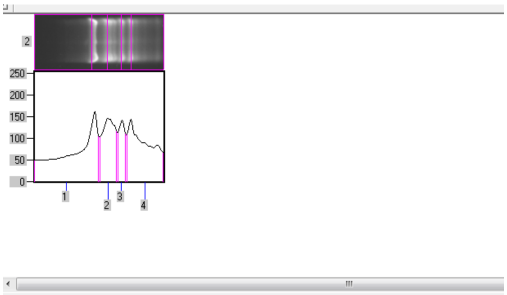
المستخدمة بالدراسة وقد تراوحت ما بين 290-2053 وقد سجل كل من الصنف الشويثي والحابس أطول الحزم 2053.(شكل،4).كما تم تقدير درجة القرابة الوراثية بين الأصناف الأربعة من نخيل التمر وكانت اكبر درجة قرابة وراثية بين صنفي نبايتي وشويثي شكل(4) ومن هذا الشكل نجد أن الصنف حابس قد انعزل عن باقي أصناف الدراسة وقد وقع في مجموعة لوحده كما تم انعزال الصنف مياسي عن أصناف المجموعة الثانية وكان بعيدا وراثيا عنهما. أن الاختلافات بين أصناف الدراسة قد يعود إلى اختلاف المواقع التي يتعرف عليها البادئ مما يدلل على أنها أصناف مستقلة بذاتها . كما يدل التعدد التشكلي لهذه الحزم على حصول اختلافات وراثية بين الأصناف المدروسة والتي تنتج أما عن تغير جيني ثابت بسبب خارجي أو عن طريق التهجين أو بسبب الطفرات ، وهذه الاحتمالات واردة ففي حالة الاختلافات الوراثية الحاصلة عن طريق التهجين فهذا يعني أن أصناف نخيل التمر أظهرت تعددا شكليا إنما نشأت في أول الأمر عن طريق بادرات بذرية تم إكثارها فيما بعد عن طريق الفسائل ، فأعطت ثمار قريبة في صفاتها الظاهرية للصنف المعروف ، فتم إكثارها وتداولها على أنها فسائل من ذلك الصنف المعروف وهذا الاستنتاج يتفق نع ما أشار إليه (Devanand and Chao,2003,).



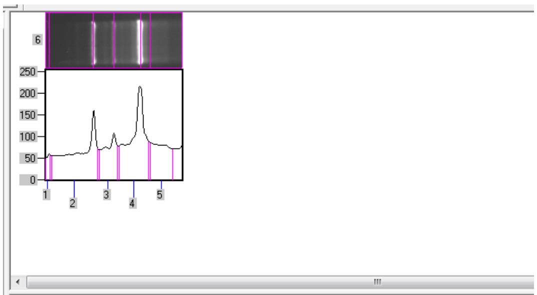




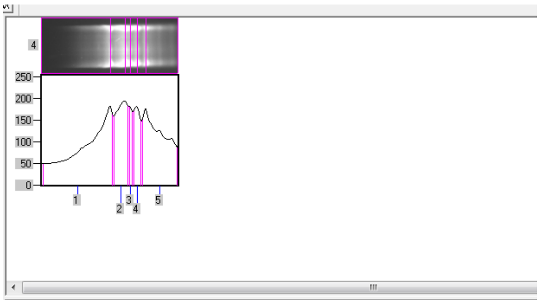
Number	Volume	Height	Area	------	M.W.	Number	Volume	Height	Area	------	M.W.
1	99286	238	1023		6.000	6	62408	154	960		1.500
2	13968	143	128		5.000	7	47407	108	832		1.000
3	15525	123	192		4.000	8	133303	84	2688		0.500
4	31735	112	448		3.000	9	114250	68	2368		0.250
5	45799	84	832		2.000						



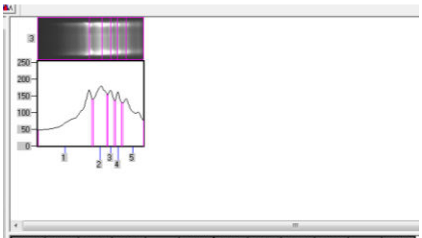
Number	Volume	Height	Area	------	M.W.	Number	Volume	Height	Area	------	M.W.
1	363663	250	5134		0.864	3	83143	215	650		0.410
2	177358	225	1365		0.533	4	280313	217	2925		0.343



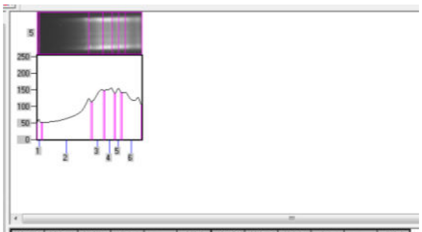
Number	Volume	Height	Area	------	M.W.	Number	Volume	Height	Area	------	M.W.
1	21761	72	389		7.600	4	257910	255	2275		0.386
2	242028	254	3510		1.500	5	141276	103	1755		0.328
3	115482	147	1430		0.657						



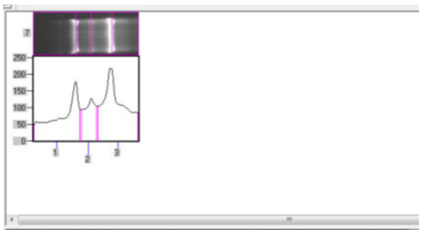
Number	Volume	Height	Area	------	M.W.	Number	Volume	Height	Area	------	M.W.
1	469198	255	5265		0.641	4	100431	255	585		0.380
2	201069	255	1105		0.470	5	336585	255	2665		0.328
3	46344	255	260		0.429						



Number	Volume	Height	Area	------	M.W.	Number	Volume	Height	Area	------	M.W.
1	417732	255	5184		0.693	4	94023	255	640		0.338
2	220463	255	1344		0.477	5	224731	226	2047		0.277
3	100151	255	640		0.392						

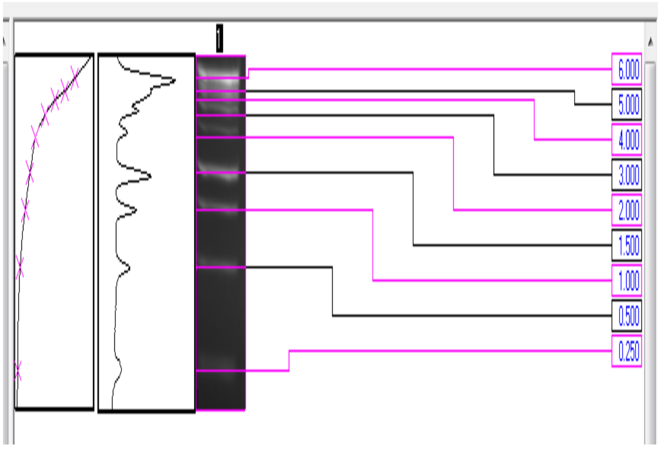


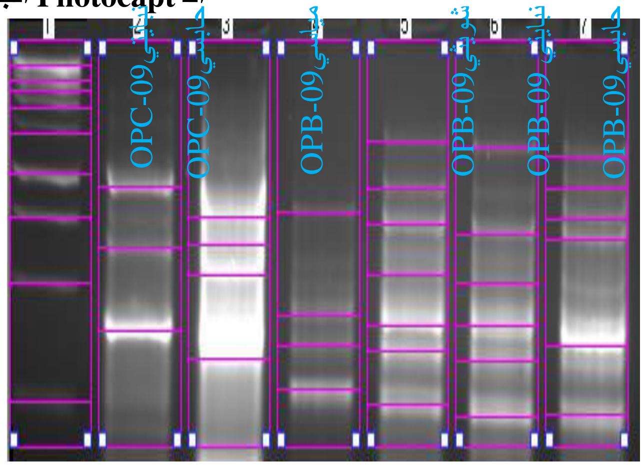
Number	Volume	Height	Area	------	M.W.	Number	Volume	Height	Area	------	M.W.
1	25185	82	447		7.800	4	145170	239	960		0.369
2	341261	194	4736		0.674	5	85671	239	576		0.318
3	157636	239	1152		0.456	6	245965	214	1920		0.272

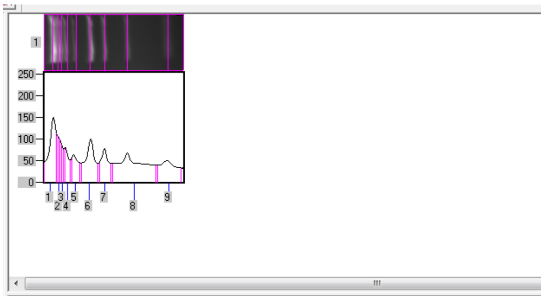


Number	Volume	Height	Area	------	M.W.	Number	Volume	Height	Area	------	M.W.
1	358500	255	4550		1.080	3	483567	255	3965		0.343
2	168070	204	1560		0.552						

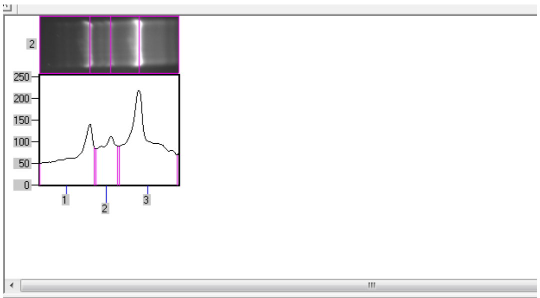
شكل(1) الترحل الكهربائي على هلام الاكاروز اذ تمثل M المؤشر الجزيئي(1Kpb) مع جانب من برنامج الـ Photocapt الجاهز في رسم العلاقة وتحديد الحزم.



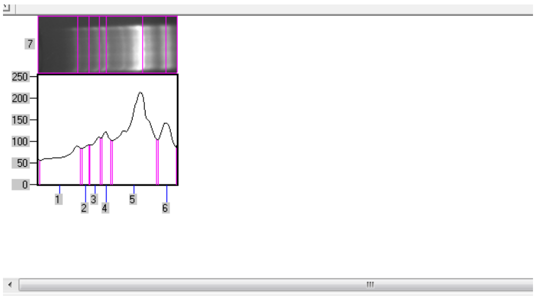




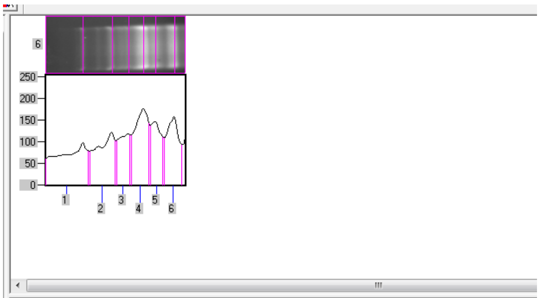
Number	Volume	Height	Area	------	M.W.	Number	Volume	Height	Area	------	M.W.
1	93982	221	989		6.000	6	82245	143	1320		1.500
2	20701	149	198		5.000	7	52563	108	924		1.000
3	16380	128	198		4.000	8	154976	87	3366		0.500
4	30455	110	462		3.000	9	75870	61	1848		0.250
5	36444	85	660		2.000						



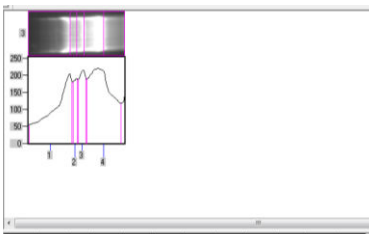
Number	Volume	Height	Area	------	M.W.	Number	Volume	Height	Area	------	M.W.
1	304660	202	4287		1.346	3	508487	255	4556		0.332
2	165477	160	1742		0.726						



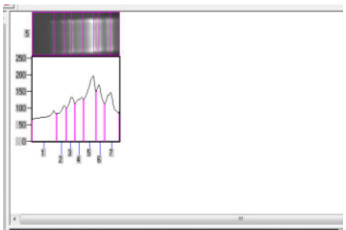
Number	Volume	Height	Area	------	M.W.	Number	Volume	Height	Area	------	M.W.
1	219119	110	3216		1.719	4	84139	161	737		0.787
2	53521	112	603		1.315	5	505093	255	3484		0.304
3	87468	137	871		0.974	6	176997	182	1474		0.223



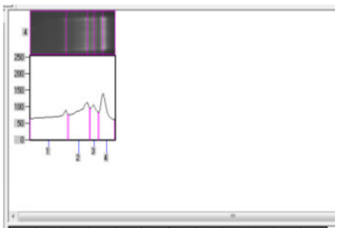
Number	Volume	Height	Area	------	M.W.	Number	Volume	Height	Area	------	M.W.
1	248713	131	3349		1.813	4	212878	244	1407		0.344
2	191868	161	2010		0.830	5	135424	197	1005		0.283
3	121397	155	1072		0.500	6	180356	213	1407		0.218



Number	Volume	Height	Area	------	M.W.	Number	Volume	Height	Area	------	M.W.
1	501509	255	4752		1.000	3	174886	255	858		0.540
2	98852	255	528		0.745	4	684189	255	3828		0.286

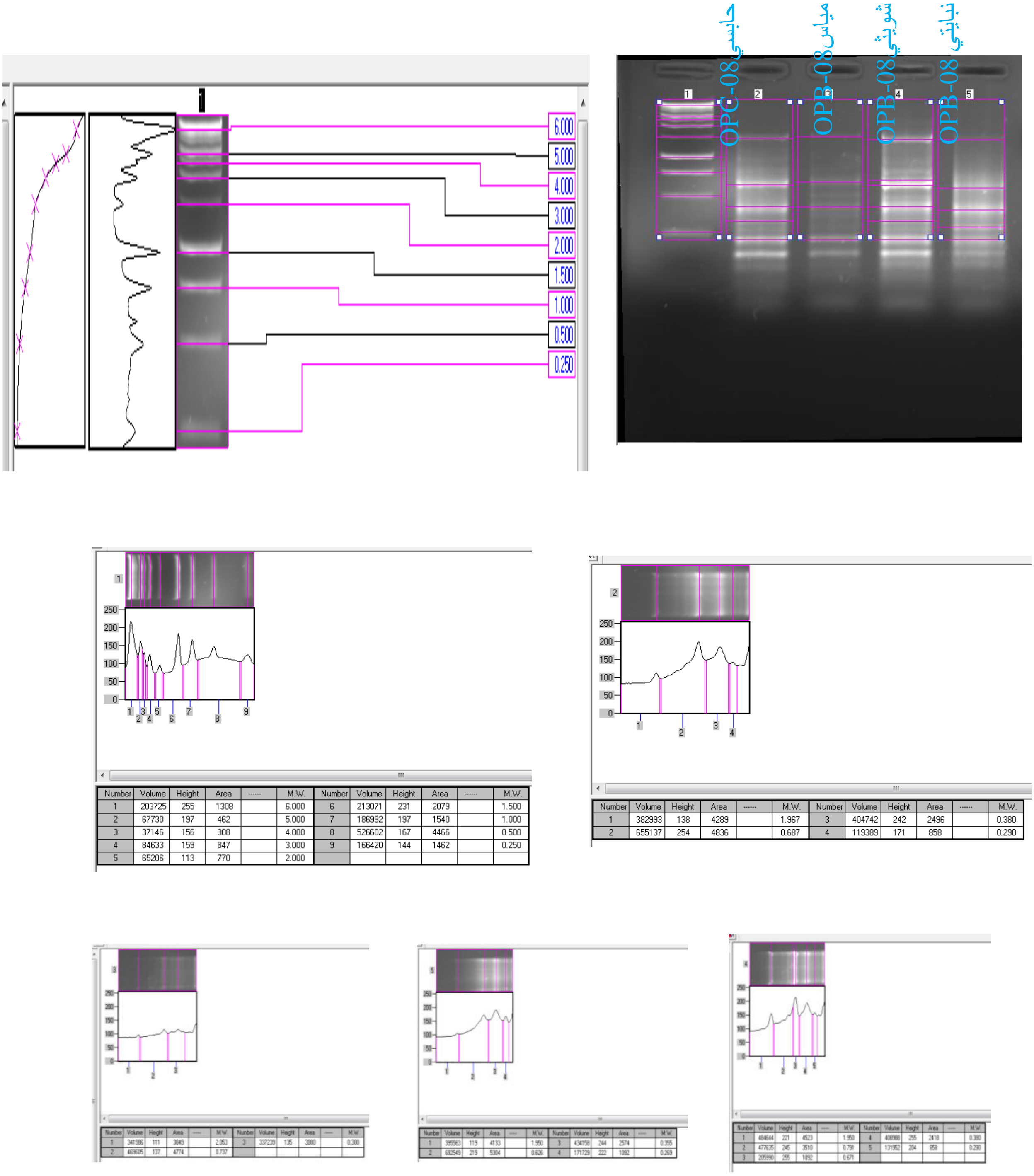


Number	Volume	Height	Area	------	M.W.	Number	Volume	Height	Area	------	M.W.
1	224719	115	2969		1.906	5	238453	255	1452		0.344
2	106285	137	1122		1.315	6	136013	230	924		0.296
3	118479	178	990		0.924	7	207794	196	1782		0.245
4	125062	171	990		0.540						



Number	Volume	Height	Area	------	M.W.	Number	Volume	Height	Area	------	M.W.
1	339964	111	4823		1.053	3	103366	131	1072		0.304
2	242971	142	2680		0.371	4	194838	183	2010		0.258

شكل(2) الترحل الكهربائي على هلام الاكاروز اذ تمثل M المؤشر الجزيئي(1Kpb) مع جانب من برنامج الـ Photocapt الجاهز في رسم العلاقة وتحديد الحزم.



Number	Volume	Height	Area	-----	M.W.	Number	Volume	Height	Area	-----	M.W.
1	203725	255	1308		6.000	6	213071	231	2079		1.500
2	67730	197	462		5.000	7	186992	197	1540		1.000
3	37146	156	308		4.000	8	526602	167	4466		0.500
4	84633	159	847		3.000	9	166420	144	1462		0.250
5	65206	113	770		2.000						

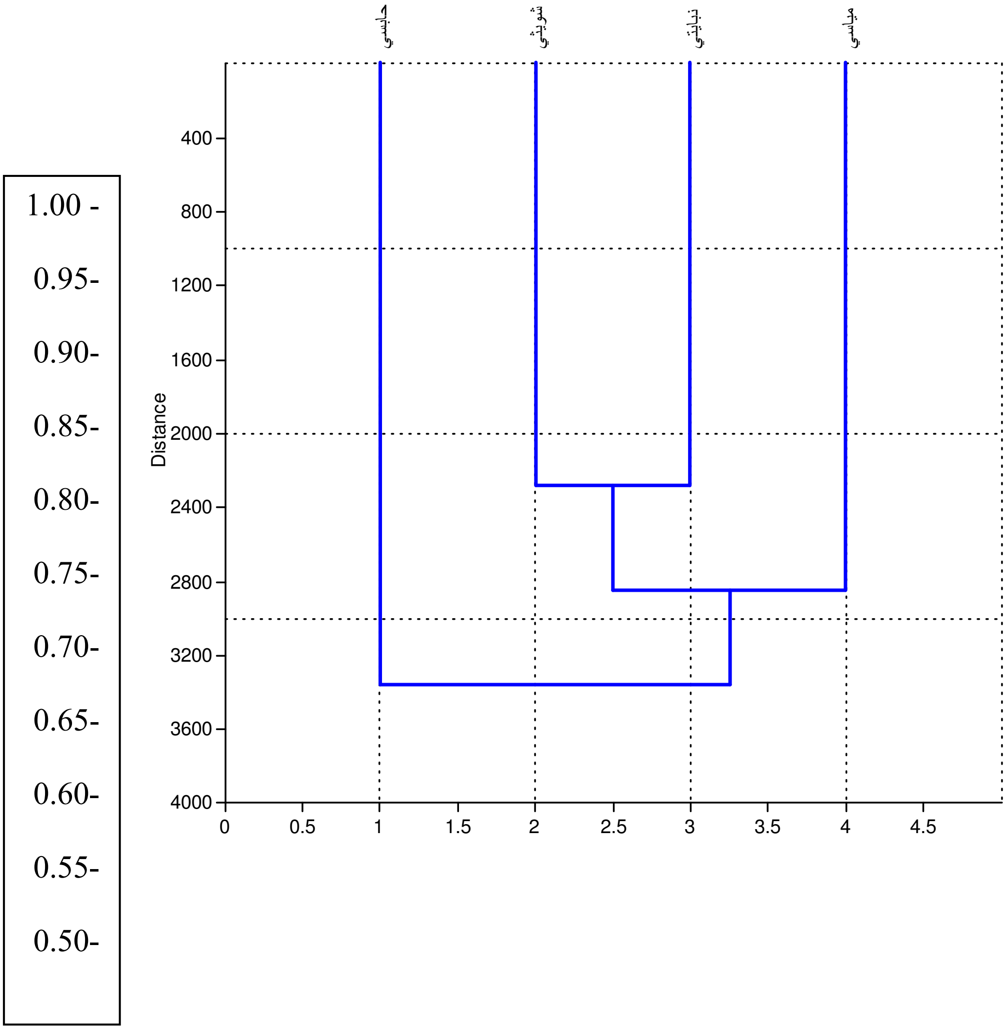
Number	Volume	Height	Area	-----	M.W.	Number	Volume	Height	Area	-----	M.W.
1	382993	138	4289		1.967	3	404742	242	2496		0.380
2	655137	254	4836		0.687	4	119389	171	858		0.290

Number	Volume	Height	Area	-----	M.W.	Number	Volume	Height	Area	-----	M.W.
1	341986	111	3849		2.053	3	337239	135	3080		0.380
2	469605	137	4774		0.737						

Number	Volume	Height	Area	-----	M.W.	Number	Volume	Height	Area	-----	M.W.
1	399563	119	4133		1.950	3	434158	244	2574		0.355
2	692549	219	5304		0.626	4	171729	222	1092		0.269

Number	Volume	Height	Area	-----	M.W.	Number	Volume	Height	Area	-----	M.W.
1	484644	221	4523		1.950	4	408988	255	2418		0.380
2	477635	245	3510		0.791	5	131952	204	858		0.290
3	205990	255	1092		0.671						

شكل(3) الترحل الكهربائي على هلام الاكاروز اذ تمثل M المؤشر الجزيئي(1Kpb) مع جانب من برنامج الـ Photocapt الجاهز في رسم العلاقة وتحديد الحزم.



شكل(4) التحليل التجميعي لأربعة أصناف من نخيل التمر باستخدام تقنية الـRAPD

المصادر:

الجبوري، حميد جاسم و عبدالوهاب زايد (2006)تكنولوجيا زراعة وإنتاج نخيل التمر. منظمة الأغذية والزراعة التابعة للأمم المتحدة (فاو)،334-346 ص .

Ali,T.A.;Jubrail ,J.M. and Jassim ,A.M.(2006). The use of RAPDstechnique for the regenerated plantlets (Barhi cv) in Iraq,3rd Inter ,Date Palm,Conf, Feb,19-21.

Al-Moshileh ,A.M.;Motawei,M.I.;Al-Wasel,A. and Abdel-Latif ,T.(2004).Identification of some date palm(*Phoenix dactylifera* L.) cultivars in Saudi Arabia using RAPD fingerprints .Agric , Marine Sci ,9(1):1-3.

Askari,E.;Al-Khalifah ,N.S,; Ohmura.T.;Al-Hafedh,Y.S.;Khan,F.A.;Al-Hindi and Okawara,R.(2003).Molecular phylogeny of seven date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultivars by DNA fingerprinting . Pak.J.B.,35:323-330.

Ben-abdalla.A.;Stiti,K.;Lepoivre ,P and Jardin ,P.D.(2000). Date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultivars identification using random amplified polymorphic DNA (RAPD)cahiers /Agricultures 9:103-107.

Devanand ,P.S. and Chao ,C.T.(2003).Identification of genetic strains Mediool and Deglet Noor date (*Phoenix dactylifera* L.) cultivars in California using Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) markers .,Acta .Hort., 623: 333-340.

El-Rayes.(2009).Charachterization of three date palm cultivars based on RAPD fingerprints and fruit chemical composition. JKAU .Met Env .&Arid .Sci., Vol.20 No.2,pp:3-20.

Rohlf,F.J.(2001).NTSYS-PC Numerical Taxonomy and Multivariate System ,version 2.1Applied Biostatistics Inc ., New York.

Sambrook ,J.; Fritsch ,E.F. and Maniatis ,T.(1989).Molecular cloning: a laboratory manual ,2nd ed .,Cold Spring Harbor Laboratory .Cold Spring Harbor ,N.Y.

Sokal,R.R.and Michener ,C.D.(1958) A statistical method for evaluating systematic relationships Univ. of Kansas Sci.,

Study of genetic relationship and distance among rare cultivars of date palm using some Molecular markers

ABDULKAREEM MOHAMMAD ABD

Date Palm Research Center

University of Basra

Abu_zahra1966@yahoo.com

Summary:

This study has been conducted on four cultivars of date palms planted at the province of Basra in the southern of Iraq ,Alhabsy , Shoithi , Alnbayty and Almayasi to determine the DNA of each examined cv., as well as the variation and relationships among these cvs. by using the technique of RAPD-PCR technique .Results showed that the primer OPB-08 amplified the longest of bands in Shoithi and Al-Mayasi cultivars ,the same primer gave 15 bands .Where as the primer OPB-09 amplified 23 bands so that length less of band in Habsy cultivar (223bp).The cultivars were distributed in tow clusters as analysed by cluster W2 program ,and Alhabsy cultivar was in segregated in a definite group .There were also a closeness of genetic relationship between Shoithi and Alnbayty. Where as, Mayasi cultivar was separated away according to dendogram map.