P- ISSN 1991-8941 , E-ISSN 2706-6703
2014 ,(8), (2) :31-39

مجلة جامعة الانبار للعلوم الصرفة (JUAPS)

Open Access

تحليل التنوع الوراثي لعدد من أصناف نخيل التمر في الأنبار باستخدام مؤشر RAPD-PCR

خالد جمال هاشم عبد المجيد عبد العزيز حمادي

جامعة الانبار . كلية التربية للعلوم الصرفة

معلومات البحث:

تاريخ التسليم: 2013/00/00
تاريخ القبول: 2014/5/6
تاريخ النشر: / / 2022
DOI: 10.37652/juaps.2014.123975

الكلمات المفتاحية:

التنوع الوراثي ،
أصناف نخيل التمر ،
الأنبار ،
RAPD–PCR.

الخلاصة:

تناولت الدراسة تحليل التنوع الوراثي من خلال تحديد العلاقة الوراثية والبعد الوراثي بين عشرة أصناف من نخيل التمر، مع تحديد البصمة الوراثية لبعض الأصناف باستخدام مؤشر الـRAPD.استخلص الـDNA من الأوراق الفتية لأصناف النخيل المدروسة باستخدام طريقة CTAB، بنقاوة تراوحت (1.85-1.6) وانتجت تفاعلات الـ RAPD ان هناك ثلاث بادئات من اصل 12 بادئا لم تُظهر أي موقع ارتباط وهي OPF-10 وOPN-16 وOPZ-7، أما التسع الباقية فقد أظهرت 617 حزمة، منها 200 حزمة عامة بنسبة مئوية 32.41 % و417 حزمة متباينة بنسبة مئوية 67.58%، وسجل البادئ OPW-13 أعلى عدد من مواقع الارتباط، بواقع 89 حزمة وبنسبة مئوية 14.42%، وأقل عدد مواقع ارتباط فكانت 48 حزمة بنسبة مئوية 7.77% في البادئ OPN-14، وسجل الصنف جوزي (4) أعلى عدد من مواقع الارتباط بواقع 70 حزمة بنسبة مئوية 11.34%، أما الصنف برين (10) فامتاز بامتلاكه اقل عدد من مواقع الارتباط بـ 40 حزمة وبنسبة مئوية 6.48 %. أظهرت نتائج البعد الوراثي لتفاعلات الـ RAPD أن أقل قيمة للبعد الوراثي (0.0966) كانت بين الصنفين أشرسي (8) ودكواني(9) وأعلى قيمة بعد وراثي كانت (0.3241) بين الصنفين عوينة أيوب (6) وبرين (10) وبالاستناد إلى هذه القيم تم ايجاد العلاقة الوراثية حيث قسمت الأصناف العشرة إلى ثلاث مجاميع رئيسية ضمت المجموعة الاولى الأصناف أشرسي (8)، دكواني(9) وبرين (10) أما المجموعة الثانية فضمت الصنفين أم بلاليز (2) وأصابع العروس (5) والمجموعة الثالثة فضمت مجموعتين فرعيتين شملت الأولى الصنفين جوزي(4) ومايع(7) والثانية شملت الأصناف تبرزل(1)، خيارة(3) وعوينة أيوب (6).

المقدمة:

تنتمي نخلة التمر *Phoenix dactylifera L.* إلى العائلة النخيلية Palmae (arcaceae) التي تضم حوالي 200 جنس واكثر من 4000 نوع وتعد أكثر العوائل النباتية فائدة للإنسان بعد العائلة النجيلية[1]، وإنّ أشجار النخيل من النباتات ثنائية المسكن، خلطية التلقيح لذلك فإنَّ الأشجار الناتجة من زراعة البذور تكون غير مطابقة للصنف الاصلي الذي اخذت منه البذور، وفي معظم الاحيان تكون رديئة النوعية فضلا عن إعطائها أشجارا مذكرة بنسبة عالية، لذلك تعدُّ نخلة التمر سلالة أو نسلاً غير ثابت وراثيا.[2]

مع ظهور تقانات المؤشرات الجزيئية Molecular Markers، وظفت هذه المؤشرات في توصيف المادة الوراثية للنباتات كون DNA مادة مستقرة نسبيا لا تتأثر بالعوامل البيئية، وهي ذاتها في كل أجزاء الكائن ومراحل عمره، بالإضافة إلى أن هذه المؤشرات تتوارث وفق قوانين مندل المعروفة، وبالتالي يمكن متابعتها في الأجيال اللاحقة ومنذ المراحل المبكرة من النمو[3]، وتظهر تباينات يمكن أن تفيد في رسم الخرائط الوراثية، وتمييز الأفراد عن بعضها، وتحديد درجات القرابة ودراسة التطور الوراثي لهذه النباتات [4]. ومن هذه المؤشرات هي مؤشرات التضاعف العشوائي متعدد الاشكال لسلسلة الدنا Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)، والتي تمتاز بانها لا

* Corresponding author at: ducation university of Al-anbar College
E-mail address:

تحتاج إلى معرفة مسبقة بالتركيب النيوكليوتيدي للمادة الوراثية المراد دراستها ولا يتطلب انجازها وقتا طويلا ولا تحتاج إلى وجود مواد مشعة[5].

تهدف الدراسة الى تحليل التنوع الوراثي، والتقارب والتباعد بين الأصناف المدروسة بالاضافة الى تحديد البصمة الوراثية.

المواد وطرائق العمل

استخلصت المادة الوراثية DNA من أوراق الأصناف المدروسة باستخدام طريقة Dellaporta CTAB وآخرون[6] مع بعض التعديلات حسب Benito وآخرون [7].

تقدير تركيز الـ DNA ونقاوته:

تم تقدير تركيز DNA بقياس الامتصاصية لِطيف الاشعة فوق البنفسجية UV استناداً إلى Sambrok وآخرون[8] وذلك باستخدام جهاز قياس الكثافة الضوئية UV–spectrophotometer وعند الطول الموجي 260 نانومتر، أخذ 20 مايكروليتر من عينة DNA وخففت 100 مرة باستخدام محلول TE الدارئ ذي الرقم الهيدروجيني 8 بإضافة 1980 مايكروليتر منه، وتم تقدير تركيز DNA وفقاً للمعادلة الآتية :

تركيز DNA (مايكروغرام\مل) = قراءة الامتصاصية عند الطول الموجي 260 نانومتر لـ1 مل من العينة المخففة× (100) عامل التخفيف × 50 / 1000.

اما نقاوة DNA فتم تقديرها من حاصل قسمة امتصاصية العينة المخففة عند الطول الموجي 260 نانوميتر على قراءة الامتصاصية عند الطول الموجي 280 نانوميتر.

تفاعلات RAPD :

أجريت جميع تفاعلات RAPD استناداً إلى ماذكر Williams وآخرون[9] مع إجراء تحوير بسيط كان باستخدام خليط Bioneer PreMix. وتشمل مكونات التفاعل الاتي :

1- Bioneer Pre Mix 20ul reaction مجهز من شركة Bioneer وهو عبارة عن خليط جاهز يحوي على :

* النيوكليوتيدات ثلاثية الفوسفات منقوصة الاوكسجين dNTPs
* انزيم بلمرة DNA.Taq DNA Polymerase
* PCR Reaction Buffer المحتوي على صبغة التحميل Loading Dye

2- البادئات العشوائية Primers : تم تجهيزها من قبل شركة Alfa DNA – Canada

3- قالب DNA –DNA Template. والجدول أدناه يبين الكميات المستخدمة لكل تفاعل:

جدول (1) يمثل المكونات الاساسية لتفاعل RAPD

المادة	التركيز النهائي	الحجم للعينة الواحدة
ماء مقطر	-	15 ul
Bioneer Pre Mix	1 x	2ul
البادئ Primer	10 pmole	1.5 ul
قالب DNA	50 ng	1.5 ul

بعد مزج مكونات التفاعل جيدا تم تطبيق البرنامج الاتي بواسطة جهاز Thermocycler :

جدول(2) يمثل عدد دورات جهاز Thermocycler والوقت اللازم لاتمام كل دورة

عدد الدورات	الوقت اللازم بالدقائق	الحرارة درجة مئوية
1	4	94
40	1	92
	1	36
	2	72
1	7	72

رفعت الأنابيب من جهاز المبلمر الحراري بعد انتهاء وقت التفاعل وتم سحب 6 مايكروليتر من ناتج التفاعل PCR Product. حمل الناتج في حفر هلام الاكاروز المحضر مسبقا بتركيز 1.2 % مع وجود الدليل الحجمي.DNA Ladder 1 kb و رحلت العينات بواسطة جهاز الترحيل الكهربائي Electrophoresis لمدة 60–120 دقيقة. واخذت صورة للهلام بواسطة الكامرة الرقمية.

جدول (3) بادئات مؤشر RAPD

ت	البادئ	التتابع (3 ـــــ 5)
1	OPA-5	5 – AGGGGTCTTG – 3
2	OPA – 13	5 – CAGCACCCAC – 3
3	OPD – 16	5 – AGGGCGTAAG – 3
4	OPF – 04	5 – GGGCGGTACT – 3
5	OPF – 10	5 – GGAACGTTGG – 3
6	OPI - 11	5 – ACATGCCGTG – 3
7	OPM – 01	5 – GTTGGTGGCT – 3
8	OPN – 14	5 – TCGTGCGGGT – 3
9	OPN – 16	5 – AAGCGACCTG – 3
10	OPO – 07	5 – CAGCACTGAC – 3
11	OPW-13	5 – CACAGCGACA – 3
12	OPZ – 07	5 – CCAGGAGGAC – 3

التحليل الاحصائي:

أحصيت حزم الدنا الناتجة على أساس وجود الحزمة (1) أو غياب الحزمة (0) وفقا لمعطيات البادئات العشر المستخدمة في تفاعلات الـRAPD، وتم حساب معامل الإرتباط ورسم شجرة القرابة

الوراثية باستخدام طريقة UPGMA، واجريت التحاليل الاحصائية باستخدام برنامج NTSYS-pc v1.8 المعتمد في نتائجه على معادلة Nei's [10].

النتائج والمناقشة:

تم في هذه الدراسة استخدام 12 بادئاً لتفاعلات RAPD، لم تظهر 3 بادئات نواتج تفاعل وهي OPF-4 و OPN-16 و OPZ-7 أما البادئات التسع الباقية فقد أظهرت نواتج تفاعل كانت ملائمة لتحليل التباين الوراثي من خلال ايجاد العلاقات الوراثية بين الأصناف المعتمدة على البعد الوراثي بينها وأيضا لإيجاد البصمة الوراثية للبعض منها، وتمت دراسة نتائج تفاعلات RAPD بالاعتماد على أساسين أولهما حسب البادئات المستخدمة والثاني حسب الاصناف المدروسة

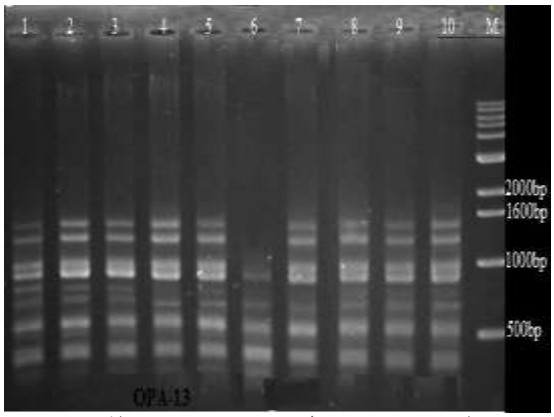
نتائج تفاعلات RAPD حسب البادئات المستخدمة

حللت نتائج البادئات على أساس أعداد مواقع الارتباط وأحجامها الجزيئية بالإضافة إلى أعداد القطع المتضاعفة للأصناف المدروسة. أعلى بادئ من حيث عدد مواقع الارتباط بحسب نتائج تفاعلات RAPD كان البادئ OPW-13 بواقع 89 حزمة أما أقل عدد من مواقع الارتباط فظهر في البادئ OPN-14 بواقع 48 حزمة، أعلى حجم جزيئي لمواقع الارتباط كان 2400 bp في البادئ OPI-11 اما أقل حجم جزيئي فكان أقل من 500 bp في جميع البادئات.

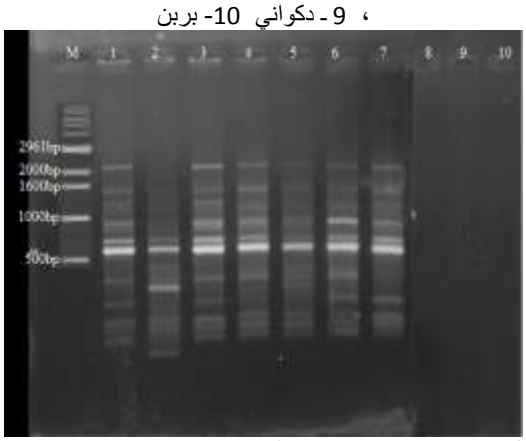
نتائج تفاعلات RAPD حسب الأصناف المدروسة:

حللت نتائج البادئات باستخدام مؤشر RAPD على أساس أعداد مواقع الارتباط ونسبتها المئوية وأعداد مواقع الارتباط لكل صنف ومدى الحجوم الجزيئية لكل صنف ووجود الحزم الفريدة والغائبة.أكبر صنف من حيث مواقع الارتباط بحسب نتائج تفاعلات RAPD هو الصنف جوزي (4) بواقع 70 حزمة وأقل صنف من حيث مواقع الارتباط كان الصنف برين (10) بواقع 40 حزمة.

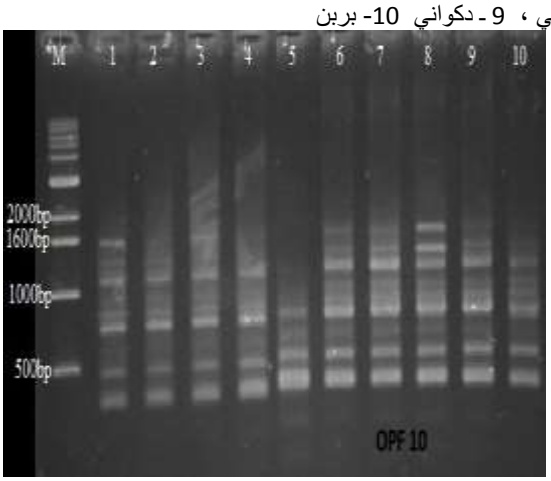
سجل الصنف أصابع العروس (5) أعلى ظهور للحزم الفريدة والغائبة بواقع 6 حزم كانت 3 غائبة و 3 فريدة وأقل ظهور للحزم الفريدة والغائبة كان حزمة واحدة في الأصناف تبرزل (1) وخيارة (3) ودكواني (9) وبرين (10). فيما لم يرتبط كل من الأصناف أشرسي (8) ودكواني (9) وبرين (10) مع البادئ OPA-5.



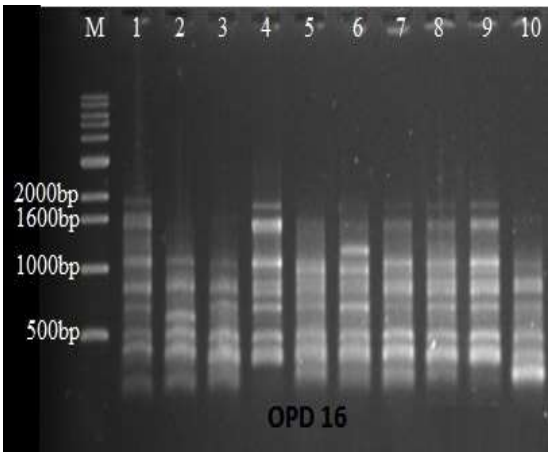
الشكل (1) يظهرحزم تضاعف البادئ OPA – 5 بواسطة مؤشر RAPD – PCR مع الاكاروز بتركيز 1 % ، M تمثل الدليل الحجمي DNA Ladder . تمثل الأرقام أسماء أصناف نخيل التمر 1- تبرزل ، 2- ام بلاليز ، 3- خيارة ، 4- جوزي 5- اصابع العروس ، 6- عوينة ايوب ، 7- مايع ، 8- اشرسي ، 9 - دكواني 10- برين



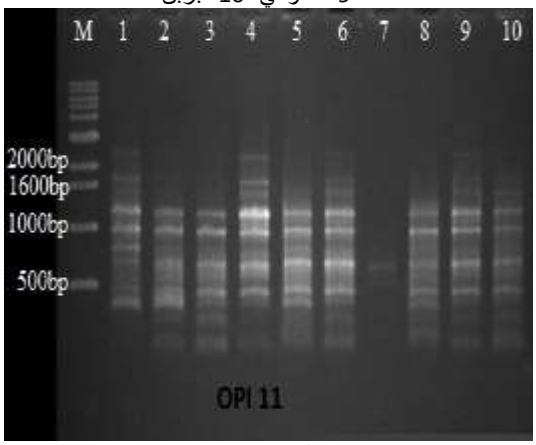
الشكل (2) يظهرحزم تضاعف البادئ OPA – 13 بواسطة مؤشر RAPD – PCR مع الاكاروز بتركيز 1 % ، M تمثل الدليل الحجمي DNA Ladder . تمثل الأرقام أسماء أصناف نخيل التمر 1- تبرزل ، 2- ام بلاليز ، 3- خيارة ، 4- جوزي 5- اصابع العروس ، 6- عوينة ايوب ، 7- مايع ، 8- اشرسي ، 9 - دكواني 10- برين



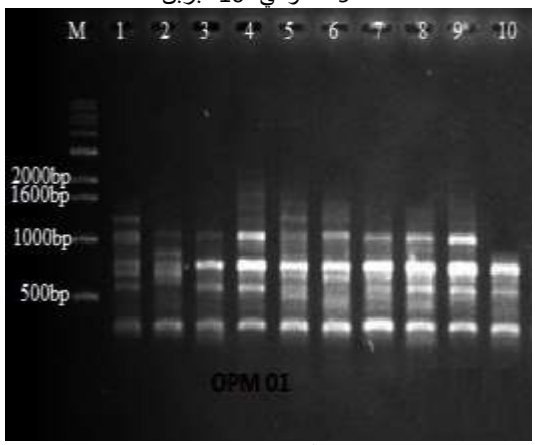
الشكل (3) يظهرحزم تضاعف البادئ OPN – 14 بواسطة مؤشر RAPD – PCR مع الاكاروز بتركيز 1 % ، M تمثل الدليل الحجمي DNA Ladder . تمثل الأرقام أسماء أصناف نخيل التمر 1- تبرزل ، 2- ام بلاليز ، 3- خيارة ، 4- جوزي 5- اصابع العروس ، 6- عوينة ايوب ، 7- مايع ، 8- اشرسي ، 9 - دكواني 10- برين



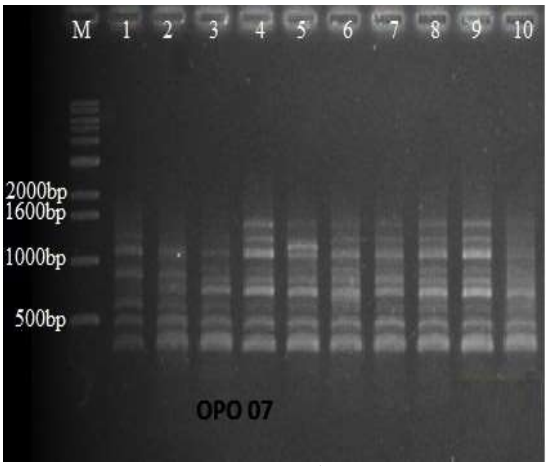
الشكل (4) يظهرحزم تضاعف البادئ OPM –1 بواسطة مؤشر RAPD – PCR مع الاكاروز بتركيز 1 % ، M تمثل الدليل الحجمي DNA Ladder . تمثل الأرقام أسماء أصناف نخيل التمر 1- تبرزل ، 2- ام بلاليز ، 3- خيارة ، 4- جوزي 5- اصابع العروس ، 6- عوينة ايوب ، 7- مايع ، 8- اشرسي ، 9 - دكواني 10- بربن



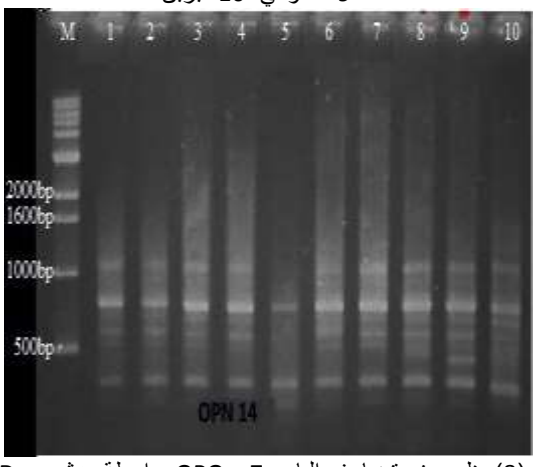
الشكل (5) يظهرحزم تضاعف البادئ OPI – 11 بواسطة مؤشر RAPD – PCR مع الاكاروز بتركيز 1 % ، M تمثل الدليل الحجمي DNA Ladder . تمثل الأرقام أسماء أصناف نخيل التمر 1- تبرزل ، 2- ام بلاليز ، 3- خيارة ، 4- جوزي 5- اصابع العروس ، 6- عوينة ايوب ، 7- مايع ، 8- اشرسي ، 9 - دكواني 10- بربن



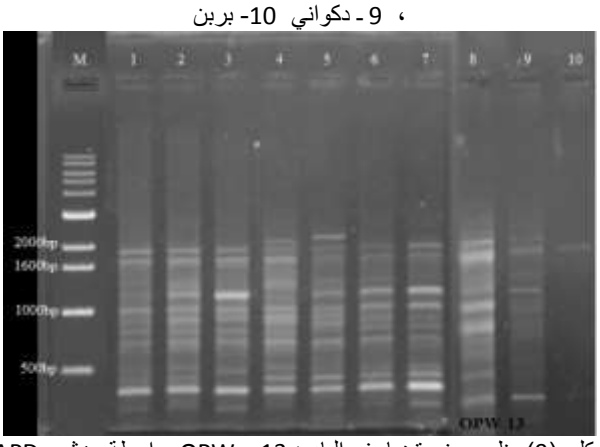
الشكل (6) يظهرحزم تضاعف البادئ OPM –1 بواسطة مؤشر RAPD – PCR مع الاكاروز بتركيز 1 % ، M تمثل الدليل الحجمي DNA Ladder . تمثل الأرقام أسماء أصناف نخيل التمر 1- تبرزل ، 2- ام بلاليز ، 3- خيارة ، 4- جوزي 5- اصابع العروس ، 6- عوينة ايوب ، 7- مايع ، 8- اشرسي ، 9 - دكواني 10- بربن



الشكل (7) يظهر حزم تضاعف البادئ OPN – 14 بواسطة مؤشر RAPD – PCR مع الاكاروز بتركيز 1 % ، M تمثل الدليل الحجمي DNA Ladder . تمثل الأرقام أسماء أصناف نخيل التمر 1- تبرزل ، 2- ام بلاليز ، 3- خيارة ، 4- جوزي 5- اصابع العروس ، 6- عوينة ايوب ، 7- مايع ، 8- اشرسي ، 9 - دكواني 10- بربن



الشكل (8) يظهرحزم تضاعف البادئ OPO – 7 بواسطة مؤشر RAPD – PCR مع الاكاروز بتركيز 1 % ، M تمثل الدليل الحجمي DNA Ladder . تمثل الأرقام أسماء أصناف نخيل التمر 1- تبرزل ، 2- ام بلاليز ، 3- خيارة ، 4- جوزي 5- اصابع العروس ، 6- عوينة ايوب ، 7- مايع ، 8- اشرسي ، 9 - دكواني 10- بربن



الشكل (9) يظهر حزم تضاعف البادئ OPW – 13 بواسطة مؤشر RAPD – PCR مع الاكاروز بتركيز 1 % ، M تمثل الدليل الحجمي DNA Ladder . تمثل الأرقام أسماء أصناف نخيل التمر 1- تبرزل ، 2- ام بلاليز ، 3- خيارة ، 4- جوزي 5- اصابع العروس ، 6- عوينة ايوب ، 7- مايع ، 8- اشرسي ، 9 - دكواني 10- بربن

P- ISSN 1991-8941 , E-ISSN 2706-6703 (*JUAPS*) مجلة جامعة الانبار للعلوم الصرفة Open Access
2014 ,(8), (2) :31-39

جدول (4) يمثل عدد الحزم الكلي والحزم المتباينة والعامة لبادئات مؤشر RAPD

اسم البادئ	عدد مواقع الارتباط الكلي	عدد المواقع المتباينة	عدد المواقع المتماثلة	المواقع المميزة (bp)	المواقع الغائبة (bp)	مدى الحجم الجزيئي bp
OPO-7	74 %11.99	74 %45.94	40 %54.05	1175 (أصابع العروس)	775(تبرزل)	أقل من 500- 1525
OPA-13	70 %11.34	30 %48.85	40 %51.14	-	1525 (عوينة أيوب) 1300-1000	أقل من 500- 1525
OPD-16	69 %11.18	29 %42.02	40 %57.97	650 (أم بلاليز) 1175(عوينة أيوب)	725 (أم بلاليز)	1950 -500 أقل من
OPI-11	75 %12.15	65 %86.66	10 %13.33	825(أم بلاليز)	500 -1000-	أقل من 500- 2400
OPN-14	48 %7.77	38 %79.16	10 %20.83	أقل من500(كوانى)	1075 (أصابع العروس)	أقل من 500- 1075
OPM-1	49 %7.94	29 %59.18	20 %40.81	900(أم بلاليز) 1650(جوزى)	1050(برين)	1650 -500 أقل من
OPF-10	71 %11.50	41 %57.74	30 %42.25	-	875 (أصابع)	أقل من 500- 1600
OPW-13	89 %14.42	79 %88.76	10 %11.23	675(خيارة)2175(جوزى) 2275(أصابع العروس)	1950 (برين)	2275 -500 أقل من
OPA-5	72 %11.66	72 %100	0 %0	(أصابع العروس) أقل من 500	-	أقل من 500- 2200

جدول (5) يمثل عدد الحزم الكلي والحزم المتباينة والعامة لأصناف نخيل التمر حسب مؤشر RAPD

اسم الصنف	عدد مواقع الارتباط الكلي	عدد المواقع المتباينة	عدد المواقع المتماثلة	المواقع المميزة (bp)	المواقع الغائبة (bp)	مدى الحجم الجزيئي bp
تبرزل (1)	68 %11.02	48 %70.58	20 %29.41	-	(OPO-7)675	أقل من 500- 2400
أم بلاليز (2)	63 %10.21	43 %68.25	20 %31.74	(OPA-5) 500 أقل من OPD-)650 (825(OPI-11(16 (900(OPM-1	725(OPD-16	أقل من 500- 2400
خيارة (3)	63 %10.21	43 %68.25	20 %31.74	OPW-) 675 (13	-	أقل من 500- 2200
جوزي (4)	70 %11.34	50 %71.42	20 %28.57	(OPM-1) 1650 (OPW-13)2175	-	أقل من 500- 2400
أصابع العروس (5)	62 %10.04	42 %67.74	20 %32.25	OPA-5 500أقل من (OPO-7)1175 (OPW-13)2275	(OPF-10)1350 -875 (OPN-14) 1075	أقل من 500- 2275
عوينة أيوب (6)	69 %11.18	49 %71.01	20 %28.98	(OPD-16)1175	1300 – 1000 (OPA-13) 1525	2400 -500 أقل من
مايع (7)	65 %10.53	45 %69.23	20 %30.76	-	500 – 500 أقل من 1225 - 1000 (OPI-11)	أقل من 500- 2200
أشرسي (8)	60 %9.72	40 %66.66	20 %33.33	-	-	أقل من 1950 -500
دكواني (9)	57 %9.23	37 %64.91	20 %35.08	أقل من 500 (OPN-14)	-	أقل من 500- 2400
برين (10)	40 %11.66	20 %50	20 %50	-	1050 (OPM-1)	أقل من 500- 1725

تقدير البعد الوراثي بالاعتماد على نتائج تفاعلات الـ RAPD

يشير البعد الوراثي إلى الاختلاف على مستوى المادة الوراثية بين الأنواع او الأفراد ضمن الأنواع، حيث ان الأبعاد الصغيرة تدل على وجود قرابة وراثية أقوى في حين أن الأبعاد الكبيرة تشير إلى وجود علاقة وراثية أكثر بعدا [11]. وعندما تكون قيمة البعد الوراثي بين صنفين مساوية للصفر فمعنى ذلك أنه لايوجد اختلاف بين الصنفين والمادة الوراثية لديهما متطابقة والتشابه الوراثي لديهما يكون بنسبة 100 %، أما إذا كان البعد الوراثي يساوي 1 فمعناه أن نسبة التشابه بين الصنفين 0 % [12]. وذلك حسب البادئات المستخدمة.

تم تقدير البعد الوراثي من نتائج تفاعلات مؤشرات RAPD بين أصناف نخيل التمر العشرة الداخلة بالدراسة باستخدام البرنامج الوراثي (NTSYS – PC. Version 2.0) المستند في تحليلاته على معادلة Nie [10] وبالاعتماد على وجود الحزم المشتركة بين كل صنفين. إذ يمكن استخدام 10 بادئات أو اكثر لإيجاد البعد الوراثي بين النماذج المدروسة [13].

يوضح الجدول (6) قيم الأبعاد الوراثية بين الأصناف العشرة لنخيل التمر وتراوحت القيم بين (0.0786 –0.3214)، كانت أقل قيمة بعد وراثي (0.0786) بين الصنفين جوزي (4) والصنف أشرسي (8) وهذا يدل على أنهما يمتلكان أكبر نسبة تشابه في المادة الوراثية بالاستناد إلى البادئات المستخدمة في تفاعلات RAPD والاختلافات على مستوى الجينوم بينهما تكون أقل مايمكن. أما عند العودة للصفات المظهرية لهذين الصنفين فنجد انهما متشابهان إلى حد كبير في حجم وشكل الجذع والأوراق وأيضا ثمارهما متشابهة إلى حد كبير جدا من ناحية الحجم واللون المائل إلى البني [14].

أما أكبر قيمة بعد وراثي فكانت قيمته (0.3214) بين الصنفين عوينة أيوب (6) والصنف برين (10) وهذا يدل على أنهما يمتلكان أقل نسبة تشابه في المادة الوراثية بالاستناد إلى البادئات المستخدمة في تفاعلات الـ RAPD.

جدول (6) قيم الأبعاد الوراثية بين أصناف نخيل التمر بالاعتماد على مؤشرات RAPD

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	0.0000									
2	0.2019	0.0000								
3	0.3161	0.1404	0.0000							
4	0.1653	0.1404	0.1625	0.0000						
5	0.2099	0.1838	0.1869	0.1484	0.0000					
6	0.2790	0.2903	0.3184	0.2314	0.1196	0.0000				
7	0.2810	0.2309	0.1947	0.1753	0.1436	0.2030	0.0000			
8	0.1569	0.1903	0.2147	0.0786	0.1213	0.1623	0.2061	0.0000		
9	0.2272	0.1987	0.1823	0.1053	0.1869	0.2107	0.1753	0.0969	0.0000	
10	0.2726	0.2605	0.2441	0.2006	0.2465	0.3214	0.2989	0.1922	0.2006	0.00

استخدمت قيم البعد الوراثي في رسم مخطط القرابة أو العلاقة الوراثية بين الأصناف المدروسة وقد أظهر المخطط توزع الأصناف على 3 مجموعات رئيسية:

المجموعة الرئيسية الأولى:

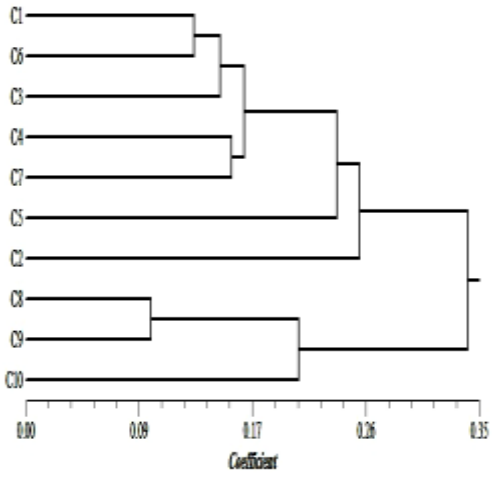
ضمت المجموعة الرئيسية الأولى الأصناف أشرسي (8)، دكواني (9) وبربن (10) وكان الصنف أشرسي (8) اقرب إلى الصنف دكواني (9) منه إلى الصنف بربن (10)، إذ اشترك هذان الصنفان بأكبر عدد من مواقع الارتباط بينهما، وكانت أقل قيمة بعد وراثي بحسب البادئات المستخدمة في تفاعلات RAPD في هذين الصنفين.

المجموعة الرئيسية الثانية:

شملت هذه المجموعة صنفين وهما أم بلاليز (2) وأصابع العروس (5) ويعزى هذا التقارب إلى اشتراك هذين الصنفين بأكبر عدد من مواقع الارتباط بينهما ولكونهما متقاربين وراثيا.

المجموعة الرئيسية الثالثة:

ضمت هذه المجموعة مجموعتين فرعيتين شملت الأولى الصنفين جوزي (4) ومايع (7) والثانية شملت الأصناف تبرزل (1)، خيارة (3) وعوينة أيوب (6) وكان الصنف تبرزل (1) أقرب إلى الصنف عوينة أيوب (6) منه إلى الصنف خيارة (3).



شكل (4) يمثل مخطط العلاقة الوراثية للأصناف نخيل التمر العشرة حسب تفاعلات RAPD

نتائج تفاعلات الـ RAPD

تم استخدام 12 بادئاً من بادئات مؤشر RAPD التي اختيرت عشوائيا ووفق دراسات سابقة وجهزت من شركة ALFA DNA، إذ أظهرت 9 بادئات فقط نواتج ارتباط مع الأصناف العشرة في حين لم تظهر 3 بادئات اي نواتج ارتباط وهذا يشير إلى عدم إيجاد تتابع البادئ لتتابع مكمل له على DNA القالب.

البادئات التي لم تظهر أي موقع ارتباط مع الأصناف المدروسة وهي OPN-16 و OPZ-7 كانت قد أظهرت نواتج ارتباط مع أصناف نخيل أخرى عند استخدامها من قبل Rawashdah و Amri [15]، أما البادئ OPF-4 الذي لم يظهر أي نتيجة ارتباط مع تلك الأصناف فقد أظهر نواتج ارتباط عند استخدامه من قبل Freeman و Maymon [16].

يتم بناء التباينات والاختلافات بين الأفراد بالاعتماد على وجود أو غياب الحزم وأعدادها وأحجامها، إن وجود الحزم يتبع لوجود تتابع مكمل لتتابع البادئ على DNA القالب وبالتالي فإن عدم وجود التتابع المكمل يوازي في أهميته وجوده; لأن هذا يعطي مؤشر على الصنف أو النوع [17]. ويمكن استثمار البادئات التي لم تظهر أي ارتباط في الكشف عن الأصناف المجهولة والخط الوراثي الذي تنتمي له هذه الأصناف المجهولة [18].

ومن الأسس التي تم الاعتماد عليها لاستخراج التباين بين الأصناف بحسب تفاعلات RAPD هو غياب الحزمة العامة أو مايسمى بالحزمة الغائبة Absent Band، وأيضا وجود الحزمة الفريدة Unique Band. اذ يعدّ ظهور الحزمة الغائبة مؤشراً لهذا الصنف بسبب انفراد هذا الصنف بغياب هذه الحزمة عن بقية الأصناف، وبلغ عدد الحزم الغائبة 14 حزمة، تميز الصنف مايع (7) بامتلاكه أكبر عدد من الحزم الغائبة بواقع 4 حزم وقعت جميعها في البادئ OPI-11، أما أقل عدد من الحزم الغائبة فكانت حزمة واحدة في كل من الصنف تبرزل (1) في البادئ OPO-7 والصنف أم بلاليز (2) في البادئ OPD-16 والصنف دكواني (9) في البادئ OPN-14 والصنف بربن (10) في البادئ OPM-1، وكذلك امتاز الصنف أصابع العروس (5) بامتلاكه 3 حزم غائبة ظهرت في البادئين OPN-14 و OPF-10 وامتاز الصنف عوينة أيوب (6) بامتلاكه 3 حزم غائبة أيضا ظهرت جميعها في البادئ OPA-13. أما الحزم الفريدة فيعتبر ظهورها من الأسس المهمة في ايجاد البصمة الوراثية، وامتاز الصنف أم بلاليز (2) بامتلاكه أكبر عدد من الحزم الفريدة اذ بلغ عددها 4 حزم ظهرت في البادئات OPM-1 و OPI-11 و OPD-16 و OPA-5، أما أقل عدد من الحزم الفريدة فكان حزمة واحدة في كل من الصنف خيارة (3) والصنف عوينة أيوب (6) والصنف دكواني (9)، كذلك امتاز الصنف جوزي (4) بامتلاكه حزمتين فريدتين في البادئين OPW-13 و OPM-1 وامتاز الصنف أصابع العروس (5) بامتلاكه 3 حزم فريدة في البادئات OPW-13 و OPO-7 و OPA-5.

لقد امتازت جميع البادئات في تفاعلات RAPD بوجود الحزمة العامة Main Band التي تمثل موقعاً (قطعة مشتركة من الـ DNA) يشترك به كل أفراد النوع أو الجنس [19]، إذ بلغ عدد الحزم العامة 200 حزمة من أصل 617 حزمة وبنسبة مئوية بلغت 32.41 % أما الحزم

الباقية البالغ عددها 417 حزمة فتسمى بالحزم المتباينة Polymorphic bands، تميزت البادئات OPO-7 و OPA-13 و OPD-16 بإظهارها أكبر عدد من الحزم العامة حيث ظهر في كل منها 40 حزمة عامة أما أقل عدد من الحزم العامة فكان 10 حزم في كل من البادئات OPI-11 و OPN-14 و OPW-13، فيما امتاز البادئ OPM-1 بـ 20 حزمة عامة والبادئ OPF-10 بـ 30 حزمة عامة في حين لم تظهر في البادئ OPA-5 اي حزمة عامة.

أما التباين المعتمد على الاختلافات في شدة تألق الحزم Intensity فلم يتم الاعتماد عليه كمقياس للتباين وذلك بالاعتماد على Vogt وآخرون[20]، إذ إن هذه الحزم تكون ناتجة عادة من ظهور بعض الحزم المتضاعفة معا في نفس الحجم الجزيئي فتظهر على شكل حزمة سميكة واحدة قد تكون ناتجة من تضاعف نفس الموقع على الاليل الآخر، وبما أنها بنفس الحجم الجزيئي فلذلك تتجمع جميع القطع المتضاعفة في نفس الموقع منتجة قطعة سميكة، وأحيانا تؤدي زيادة تركيز DNA القالب إلى تضاعف نفس الموقع اكثر من مرة بسبب تكرار عدد نسخ DNA ولذلك لايمكن استخدام الاختلاف في سمك الحزم كمقياس للتباين [21].

المصادر:

1- **مطر، عبد الامير مهدي. (1991)**. زراعة النخيل وانتاجه. مطبعة دار الحكمة. جامعة البصرة. العراق. ص 13-157.

2- **خير الله، حسام سعد الدين. (2007)**. الاكثار الدقيق لصنفين من نخيل التمر *Phoenix dactylifera L.* باستخدام النورة الزهرية ودراسة الثبات الوراثي باستخدام مؤشرات تباين اطوال قطع الدنا المتضاعفة AFLP. اطروحة دكتوراه / جامعة بغداد/ كلية الزراعة.

3 - **العاصي، عقيل حسين علي (1996)**. دراسة فسلجيه والكشف عن تباينات وراثية في دنا عدد من الاصناف / الخطوط الوراثية لنبات الشعير *H. Vulgare L.* المتحملة للملوحة رسالة ماجستير علوم حياة /هندسة وراثية،كلية التربية ابن الهيثم/ جامعة بغداد.

4- Debener, T. and Mattiesch, L..(2006). Effective pairwise combination of long primers for RAPD analyses in roses. Plant Breeding، 171: 147-151.

5- حسين ، جنان قاسم.(2012). البعد الوراثي لانواع ورد باستخدام. مجلة العلوم الزراعية العراقية- 42(2) :79-71.

6- Dellaporta, S.L., Wood, J. and Hicks, J.B.(1983). A plant DNA Minipreparation version 2. Plant Mol. Bio. Rep. 1: 19-22.

7- Benito, C; Figueiras, A.M; Zaragozal, C; Gallego, F.j. and Dela Penal, A. (1993). Rapid identification of *Trijticeae geno* types from single seed using the polymerase chain reaction. Journal Plant Molecular Biology. Vol. 21 (1):181-183.

8- Sambrook, J.; Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd end). Cold Spring Harbor. NY.

9- WILLIAMS, J.G.K.; 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*. Nucleic Acids Research 18: 6531–6535.

10- Nei، M. and Li، W. H. (1979). Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction Endonucleases. Proceeding of the National Academy of Science، USA. 74 : 5269 – 5273.

11- Cavalli-Sforza, L. L. *(2001)* *Genes, Peoples, and Languages*. Berkeley: University of California Press.

12- Paetkau, D.; Waits, L.P ; Clarkson, P.L ; Craighead, L. and Strobeck, G. (1997). An empirical evaluation of genetic distance statistics using microsatellite data from bear (Ursidae) populations. Genetics 147:1943-1957.

13- Brummer، E. C. ; Bolton، J. H. and Kochert، G. (1995). Analysis of annual medicago species using RAPD marker. Genome، 38: 362-367.

14 - ابراهيم، عبد الباسط عودة. (2011). نخلة التمر شجرة الصحراء. مقالة علمية حول (النخلة شجرة الصحراء).

15- Rawashdeh، I. and Amri، A.(2006). Genetic characterization of date palm varieties using RAPD markers.Jordan journal of agricultural sciences. 2(3) :234-242.

16- Freeman، S. and Maymon، M. (2000). Reliable Detection of the Fungal Pathogen *Fusarium oxysporum* f.sp. *albedinis*, Causal Agent of Bayoud Disease of Date Palm, Using Molecular Techniques**.** *Phytoparasitica* 28(4).

17- Mullis, Kary (1990). "The unusual origin of the polymerase chain reaction". *Scientific American* **262** (4): 56–61, 64–5.

Protocols, Application and Overview. New York. p.5.

21- **الحسني، خلود ابراهيم حسن. 2002**. استخدام المؤشرات الجزيئية المعتمدة على التفاعل التضاعفي لسلسلة الدنا في دراسة التنوع الوراثي للبطاطا *Solanium tuberosum L.* اطروحة دكتوراه قسم الهندسة الوراثية/كلية العلوم/جامعة بغداد. ع ص 196.

18- **العاصي، عقيل حسين على (2002)**. استخدام مؤشرات الدنا في تحليل التنوع الوراثي للشعير(*Hordeum vulgare* L.) المزروع في العراق. أطروحة دكتوراة. كلية التربية ابن الهيثم – جامعة بغداد.

19- **Williams, J.G.., Hanafey, M.K., Rafalski, J.A. and Tingey,s.v.(2003).** Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. *Methods in Enzymology* 218: 704-741.

20- **Vogt, T. ; Francoise.M. ; Frank.K. ; Welsh.J. and Clelland. M.(1997).** Fingerprinting of DNA and RNA using arbitrarily primed PCR. IN: G. Anolles and P. M. Gresshof (eds.). DNA Markers,

GENETIC DIVERSITY ANALYSIS FOR NUMBER OF DATE PALM VARIETIES IN AL-ANBAR USING THE RAPD-PCR TECHNIQUE

KHALID JAMAL HASHIM ABDUL MAJEED A. HUMADI

ABSTRACT

The present study deals with the application of RAPD markers to study ten varieties of date palm in order to determine the genetic relationship and genetic distance among them. also aimed to determine the DNA fingerprinting for some of them. DNA was isolated from fresh leaves of date palm trees using CTAB method. The purity of DNA is (1.6-1.85) RAPD reactions had been conducted by using 12 primers. Three of them had not been detected, i.e. link sites which include OPN-16, OPZ-7 and OPF-10. Other nine primers show 617 bands 200 of them are main bands and 417 are a variety of Polymorphic bands. The primer OPW 13 has recorded the highest number of binding sites that makes 89 bands. The lower number of binding sites noticed 48 bands of the primer OPN 14. The (Jouzi) cultivar has recorded the highest number of binding sites making 7 bands. The variety (Barban), however, is characterized with having the least number of binding sites by 40 bands.The results of genetic distance of the RAPD interactions had revealed that the minimum value of the genetic distance (0.0966) are between the two cultivar (Ashrasee 8) and (Dakwani 9), the highest value of genetic distance is (0.3214) between the two varieties (Uwainat Ayyub 6) and (Braban10). According to these values and regarding to genetic relationship، ten varieties had been classified into three main groups, the first group had included the variety (Ashrasi 8), (Dakwani 9) and (Braban 10). The second group includes the two varieties (Um Balaleez 2) and (Asabia Alaroos 5). The third group includes two single varieties that include (Assabia Alaroos 5) and (Jouzi 4) and (Maya 7). The second group includes the varieties (Tibarzal, (Khiarah 3) and(Uwaynat Ayyub 6)