وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة ديالى

كلية التربية للعلوم الصرفة

قسم علوم الحياة

دراسة جزيئية لبعض اصناف العنب المزروعة في محافظة ديالى بمؤشرات RAPD وSSR

رسالة مقدمة إلى

مجلس كلية التربية للعلوم الصرفة_جامعة ديالى

وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الحياة

علم النبات

من قبل

علا رباح محمود القره غولي

بكالوريوس علوم حياة 2014

باشراف

أ.د ***نجم عبدالله جمعه***

أ.م.د ***عمار احمد سلطان***

2017م ***1438 هـ***

1- المقدمة Introduction

ينتمي نبات العنب إلى العائلة Vitacea والتي تضم حوالي 60 نوعا من انواع العنب ألبري في أسيا، أمريكا ألشمالية و أوربا تحت شبه الاستوائية والبحر ألأبيض المتوسط والظروف المناخية المعتدلة القارية (Rossetto وأخرون ، 2002 ؛ Sefc وأخرون ، 2003 ؛ Crespan وأخرون، 2004). وتضم *Vitacea* عدة اجناس واهمها الجنس *Vitis* الذي ينقسم بدوره إلى قسمين رئيسين هما تحت جنس *Muscadina* وتحت جنس *Euvitis*، هذا الأخير يضم معظم أنواع vitis التي قسمت بدورها إلى ثلاث مجموعات حسب منشئها الجغرافي(Reynier، 1989) وهي مجموعة الأنواع الأمريكية وتشمل غالبية الأصول ومجموعة الأنواع الاوروآسيوية، مجموعة أنواع أوربا وغرب آسيا والتي ينتمي إليها نوع *Vitis vinifera* L. الذي يضم أشجار عنب المائدة، فضلا عن العنب الآسيوي. اهتم الإنسَان منذ أكثر من ستة الاف سنة بزراعة العنب وإنتاجه وتصنيع ثماره وعصيره (السرواني، 2008)، يحتل العراق المرتبة الخامسة على الوطن العربي من ناحية الإنتاج والمساحة إذ يشكل إنتاج العنب 16.63% من مجموع إنتاج الفاكهة في العراق فقد بلغ الانتاج سنة من2001الى 2005 ومن 2006 الى 2007 حوالي 297، 185، 184، 203 الف طن: ألف هكتار على التوالي (المنظمة العربية للتنمية الزراعية، 2009). تعد زراعة العنب قديمة جدًا في العراق منذ نشوء أولى الحضارات وذلك لملائمة الظروف البيئية، تاريخ العنب في العراق قديم يرجع الى استيطان الانسان في وادي الرافدين منذ 3700 سنة ق.م، اذ وجد الكثير من الآثار والكتابات القديمة التي تشير الى الاهتمام بزراعة العنب في العراق (حسن ومحمد، 1989). لقد تطورت زراعة العنب في العراق بشكل واسع وخاصةً في السنين الأخيرة، إذ يعد العنب ذا اهميه في إنتاج الزبيب أو العصير أو النبيذ، وينتشر العنب في المناطق المعتدلة الدافئة والمعتدلة الباردة (السعيدي، 2014). يتواجد في العراق 75 صنفا من العنب أغلبها بذرية

وعدد قليل منها عديمة البذور ولم تنتشر زراعتها بصورة تجارية (الملاك،2001). عدد الأصناف المزروعة في العراق تقدر بحوالي 75 صنفا تتركز معظمها في شمال العراق، للعنب فوائد طبية وعلاجية عديدة وذلك لكونه غذاء متكاملا لما تحتويه حباته من سكريات واحماض وبروتينات والياف غذائية (جمال الدين، 2010)، يعد العنب من بين أنواع الفاكهة المهمة وذلك لقيمته الغذائية العالية، إذ تحوي ثماره على نسبة عالية من السكريات الأحادية والاحماض العضوية والسائد فيها حامض التارتاريك والماليك، وتحتوي ثماره على نسبة قليلة من البروتين وعلى بعض الفيتامينات وأملاح معدنية كالبوتاسيوم والمغنيسوم والكالسيوم ، Hulme 1970))، ويعد من أشجار الفاكهة الأكثر تحملاً للظروف البيئية (السعيدي، 1982). في ظل التطور المتسارع في علم التقانات الحيوية تم تحديد أساليب وطرائق دقيقة لتمييز الأصناف عن بعضها البعض لتجنب الخطأ في التميز من خلال استخدام تقنيات تعتمد على دراسة مورثات بحد ذاتها، او مواقع معينه من الحمض النووي DNA مثل تقنيات SSR و RAPD وغيرها، والتي تعتمد على التفاعل التسلسلي البوليميرازي (Polymerase Chain Reaction) (Semagn واخرون، 2006). تعد طرائق توصيف الأنواع النباتية وتصنيفها اعتمادا على الصفات الشكلية والانتاجية الأكثر قدما، ولكنها تتأثر غالبا بالظروف البيئية السائدة وتعطي نتائج متقاربة ومتشابهة يصعب عليها في تمييز الاختلافات (Wjhani، 2004) وكذلك تتطلب وقتًا وجهدًا كبيرًا لذلك يجب دعم هذه الطرائق بطرائق التقانات الحيوية الحديثة (Ricciardi واخرون، 2002). وكان لتقنيات البيولوجي الجزيئي الاثر الكبير في تميز الأصناف عن بعضها البعض وخصوصا تلك التي اعتمدت على كشف التباينات التي تعتمد قطعة محددة من الدنا، وذلك مثل مؤشرات التضاعف العشوائي المتعددة الأشكال لسلسلة الدنا RAPD ، ومؤشرات التضاعف للقطع متباينة الطول AFLP (Khierallah، 2011). استخدمت تقنيات الـ SSR وRAPD في دراسة التنوع الوراثي لأصناف

الخلاصة

اجريت هذه الدراسة في مختبر الوراثة الجزيئية في كلية التربية للعلوم الصرفة /جامعة ديالى للكشف عن التغاير الوراثي وتقدير البعد الوراثي بين سبع اصناف من العنب المحلي *Vitis vinifera* L. وهي الفرنسي، الكمالي، ديس العنز، الاعجيمي، الحلواني، الزيتوني والاسود شدة. استعمل 15 بادئا" عشوائيا" للتحري عن مؤشرات الدنا بتقانة التضاعف العشوائي المتعدد الاشكال لسلسلة الدنا(Random Amplified Polymorphic (RAPD و 10 بوادئ متخصصة للتحري عن مؤشرات الدنا بتقانة المقاطع البسيطة المتكررة (SSR) Simple Sequence Repeat والمعتمدة على تفاعل البلمرة الحراري Polymerase Chain Reaction (PCR) . تضمنت خطوات العمل عزل وتنقية الدنا من الأوراق الفتية للأصناف الداخلة في الدراسة، إذ تم الحصول على تراكيز من الدنا وبنقاوة تراوحت مابين 1.8-2 . نفذت تفاعلات البلمرة المتسلسل (PCR) مع البادئات المستعملة للكشف عن التباينات بين قطع الدنا المتضاعفة لكل صنف (أعدادها و أحجامها الجزيئية) عند ترحيل نواتج التضاعف للعينات على هلام الاكاروز بعد تصبيغها ببروميد الاثيديوم . بينت نتائج التحليل الوراثي بمؤشرات الRAPD اختلافا" واضحا" في عدد حزم الدنا المتضاعفة واوزانها الجزيئية وذلك تبعا للبادئ المستعمل، إذ بلغ العدد الكلي للحزم المتباينة (polymorphic bands) 88 حزمة لكافة البوادئ، وكان اقل عدد حزم متباينة 6 حزم في البادئين 1227 و OPF-01، في حين كان اعلى عدد من الحزم المتباينة 12 في البادئ OPF-04، واظهرت عدد من البادئات المستعملة في الدراسة حزما" فريدة لبعض من النماذج المدروسة والتي تعد بمثابة بصمة وراثية لتمييز الأصناف عن بعضها، إذ اعطى الصنف اعجمي اعلى عدد من الحزم الفريدة وذلك عند استخدام البوادئ 1225 و OPF-09، إذ اعطت هذه البوادئ حزمتين مميزة ذات اوزان جزيئية متباينة ، بينما اعطى الصنف الاسود اقل عدد من الحزم

من العنب المحلي المنتشرة في محافظة ديالى، إذ إن هذه الصفات شديدة التأثر بالظروف البيئية مما يؤدي إلى وجود تشابه بين الأصناف والأصول، لذلك من الضروري استخدام طرائق دقيقة لتمييز الأصول والأصناف. قام Divecchi Staraz (2007) بإجراء دراسات باستخدام مؤشرات SSR حول تقييم التنوع الوراثي للعنب البري، إذ أظهرت هذه الدراسات تباينات واضحة بين الأنماط البرية والمزروعة في نفس المنطقة الجغرافية، وكذلك استخدم مؤشرات RAPD- من أجل توصيف وتصنيف اشجار العنب المزروعة.

ونظرا لما تقدم من أهمية العنب من الناحية الاقتصادية ولصعوبة التمييز بين الأنواع من الناحية المظهرية ولقلة وجود دراسات حول استخدام مؤشرات الدنا للكشف عن التنوع الوراثي لأصناف العنب في العراق عامة وفي محافظة ديالى خاصة واعتمادًا على التعددية الشكلية للحامض النووي DNA استخدمت في هذه الدراسة تقنية تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل العشوائي PCR – RAPD وتقنية المقاطع البسيطة المتكررة SSR أو ما تسمى بمواقع المايكرو ستلايت Microstalite Loci للكشف عن كل مما يأتي:

1. العلاقة الوراثية بين أصناف العنب المستخدمة في هذه الدراسة والمنتشرة في محافظة ديالى وتقييم درجة التباين الوراثي والتطابقات الممكنة فيما بينها.
2. إيجاد البعد الوراثي بين الأصناف المستخدمة في الدراسة وذلك لغرض معرفة الاصول الجغرافية المحتملة لهذه الأصناف المزروعة في محافظة ديالى.
3. ايجاد درجة التشابه بين الأصناف السبعة من العنب والمنتشرة في محافظة ديالى.