



جمهورية العراق
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة ديالى
كلية التربية للعلوم الصرفة
قسم علوم الحياة

تقدير البعد الوراثي لبعض اصناف نخيل التمر
***Phoenix dactylifera* L. المزروعة في العراق باستعمال**
تقانة (RAPD)

رسالة مقدمة الى

مجلس كلية التربية للعلوم الصرفة - جامعة ديالى

وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الحياة

علم النبات

من قبل

مهند رشيد حسين الزيدي

بكالوريوس علوم حياة سنة 2008

بإشراف

باحث علمي اقدم/ د. شذى عايد يوسف

أيلول / 2014 م

ذو القعدة 1435 هـ

1- المقدمة Introduction

تعد نخلة التمر *Phoenix dactylifera* L. من أقدم اشجار الفاكهة التي عرفها الإنسان وعمل على زراعتها منذ أقدم العصور، إذ كان معروفاً في بابل قبل 4000 سنة قبل الميلاد وكانت شجرة نخلة التمر مقدسة عند السومريين والبابليين والاشوريين. وقد عنيت شريعة حمورابي بحماية النخيل وأكدت على أهمية زراعته وفرضت عقوبة مالية على من يقطع النخلة (الخليلي، 1956). ولنخيل التمر مكانة كبيرة في الاديان السماوية الثلاثة وورد ذكره في الكتب المقدسة، ومنها القرآن الكريم، إذ ذكرت شجرة النخيل في 20 موضعاً، كما ورد ذكرها في كثير من الأحاديث النبوية (النعمان، 2010). تنتمي نخلة التمر الى العائلة النخيلية Arecaceae، وتمتاز بوصفها من النباتات ثنائية المسكن Dioecious و المعمرة Perennial دائمة الخضرة من ذوات الفلقة الواحدة Monocotyledonous وثنائية المجموعة الكروموسومية Diploid $(36=2n)$ (Zhao وآخرون، 2013). يتبع نخيل التمر الجنس *Phoenix* والنوع *dactylifera* (البكر، 1972)، إذ ان اسم الجنس يشير إلى الاسم القديم لمدينة فينيقيا، إذ كان الفينيقيون يملكون النخل وهم الذين نشروا زراعته في حوض البحر الأبيض، أما اسم النوع فيعني الاسم الاغريقي للشجرة حاملة الأصابع إذ تكون الثمار في العذوق كالأصابع في اليد (ابراهيم، 2011). وبمرور الزمن حدثت تغيرات في الخصائص الفسلجية والمظهرية والوراثية لنخيل التمر مما تطلب تمييزها وتصنيفها تحت مفهوم الصنف، إذ يتوافر اكثر من 1500 صنف من اصناف النخيل في العالم، اما في العراق فيصل اعداد اصناف النخيل الى اكثر من 600 صنف ويتركز القسم الاكبر منها في جنوب العراق (ابراهيم، 2011؛ Zaid و Arias-Jiménez، 2002). احيانا تظهر افراد من احد اصناف النخيل احيانا وذلك نتيجة لحصول طفرات وراثية genetic mutations تختلف عن الصنف الأصلي في بعض الصفات و مشابهة له في صفات أخرى، يطلق عليها النسيلة Clone (مطر، 1991)، ويتوافر عدد قليل من النسائل المعروفة لبعض الأصناف، ومثال على ذلك صنف الخضراوي في العراق، إذ تتوافر منه ثلاث نسائل هي خضراوي بصرة وخضراوي بغداد وخضراوي مندلي، وهذه السلالات تختلف فيما بينها في حجم الثمرة فقط. وللصنف الذكري غنامي تتوافر نسيلتان هما الغنامي الأخضر والغنامي الأحمر والاختلاف بينهما يكون في حجم ولون الطلعة التي يكون لون غلافها اخضر و أحمر على التوالي، اما الصنف الذكري الخكري فتتوافر منه أربع نسائل هي خكري كريظلي وخكري وردي وخكري عادي وخكري سميسي (ابراهيم، 2011). وصل اعداد نخيل التمر حول العالم في عام 2001 الى اكثر من 100

مليون نخلة (Arinkin وآخرون، 2014)، وتبلغ أعداد النخيل في العراق نحو 15288410 نخلة (اناث 14764596 و ذكور 523814) ويأتي الزهدي بالمرتبة الاولى من حيث اعداد اشجار النخيل يتبعه الخستاوي ثم الساير فالخضراوي فالحلاوي فالديري. وتعد محافظة بغداد الاولى من حيث اعداد النخيل تتبعها محافظة ديالى ثم بابل بالمرتبة الثالثة، كما قدر انتاج التمور للموسم 2012 ولجميع الاصناف بحدود 655.5 الف طن، اذ احتلت محافظة بابل المركز الاول تليها محافظة بغداد ثم ديالى بالمركز الثالث، وبلغت النسبة المئوية للانتاج بحدود 15.3 و 14.3 و 12.8% على التوالي من مجموع انتاج العراق فيما شكل انتاج بقية المحافظات بمقدار 57.6% (الجهاز المركزي للإحصاء، 2012).

وبالرغم من عدّ الصفات المظهرية اساسا للمفاتيح التصنيفية، الا ان هناك بحثاً قليلة في النخيل اعتمدت في تصنيف النخيل على بعض مميزات السعف (Elhoumaizi وآخرون، 2002 ؛ Hammadi وآخرون، 2009 ؛ Arinkin وآخرون، 2014) بسبب صعوبة تمييز الأصناف وخاصة الاصناف الانثوية عن طريق صفاتها المظهرية وبدون وجود الثمار كون صفات النمو الخضري تتأثر بالظروف البيئية المحيطة. ان لون الثمار في مرحلة الكمري يكون اخضر في جميع الاصناف غير ان هذا اللون يتبدل في مرحلة الخلال (البسر) الى لون اصفر او احمر او ما يقارب هذين اللونين او اختلاطهما. وتختلف الاصناف بالنسبة الى لون بسرها وهذا الاختلاف ثابت عادة ويعتمد عليه في التفريق بين الاصناف. ولتجاوز العقبات المرتبطة بالتمييز بين أصناف النخيل استنادا على الصفات المظهرية لصفات النمو الخضري استعملت طريقة الإنزيمات المتناظرة، اذ يتم ترحيل هذه الإنزيمات المتناظرة والبروتينات على هلام البولي اكريلاميد polyacrylamide أو النشأ ويعرف خط توزيع الحزم للعينة بأنها بصمة الإنزيمات المتناظرة لذلك الصنف وبتصنيف الحزم ومقارنة أنماط توزيعها للصنف ومقارنتها مع الاصناف الاخرى يتم الكشف التباينات المطلوبة (Saaidi و Baaziz، 1988 ؛ Ali وآخرون، 2001)، لكن لها بعض المثالب فهي تعطي نسبة قليلة من التباين فضلا عن تأثرها بالظروف البيئية وارتباطها بمرحلة نمو معينة وبنسج معين. ان التطور الهائل الذي حصل في مجال علم الاحياء الجزيئي Molecular Biology والنجاحات التي حققتها الهندسة الوراثية Genetic Engineering وخاصة في عقد الثمانينيات والتسعينات من القرن المنصرم ادت الى ظهور العديد من التقنيات المناسبة للتحليل الجزيئي للمادة الوراثية وتمتاز بعدم تأثرها بالبيئة وبنوع النسيج والمرحلة العمرية للكائن قيد الدراسة، اذ وفرت هذه التقنيات الحديثة طرائق كثيرة في

الكشف والتمييز المبكر بين الاصناف الزراعية بايجاد نوع من المؤشرات التي تدرس التنوع الوراثي على مستوى الدنا DNA وعدّها مؤشرات وراثية تعرف بمؤشرات الدنا DNA markers. ويمكن تعريف تلك المؤشرات بأنها عبارة عن تتابعات من الدنا يمكن الاستدلال بها على موقع معين على الكروموسوم او المجين تستعمل لدراسة العلاقات الوراثية بين الأفراد وإيجاد البصمة الوراثية (Weigand وآخرون، 1993 ؛ Gao وآخرون، 2012). وتعد مؤشرات التضاعف العشوائي المتعدد الاشكال لسلسلة الدنا Random Amplify polymorphic DNA (RAPD) والتي تعتمد على تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) الاكثر شيوعا بوصفها تتسم بسرعتها وبساطتها وعدم تطلبها لكمية كبيرة من الدنا كما ويمكن تطبيقها على مجتمعات وراثية كبيرة الحجم فضلا عن ذلك فان هذه التقنية تستخدم البادئات العشوائية التي تسمح بتغطية مناطق مختلفة من مجينات الافراد المدروسة (شومان وآخرون، 2001)، لذلك اصبح لهذه التقنية تطبيقات في دراسات التنوع الوراثي وإيجاد البصمة الوراثية لاصناف مختلفة من النخيل (Haider وآخرون، 2012؛ Al-Khalifah وآخرون، 2012).

وبالرغم من الاعداد الكبيرة لاصناف النخيل العراقية والتي يتجاوز 600 صنف الا ان هنالك عددا " قليلا" من البحوث والتي درس فيها تمييز الاصناف العراقية على المستوى الجزيئي وتحديد البصمة الوراثية لكل صنف، لذا اجريت هذه الدراسة سعيا" للوصول الى الاهداف الآتية :-

1. تحديد البصمة الوراثية لكل صنف من الاصناف المدروسة وإيجاد العلاقة الوراثية بينها باستعمال مؤشرات RAPD من خلال توزيع الاصناف الى مجاميع استنادا الى درجة البعد الوراثي بينها.
2. ايجاد قاعدة بيانات للمادة الوراثية للاصناف المدروسة ليكون بالامكان مستقبلا امكانية ايجاد مؤشرات دنا مرتبطة بصفات معينة لتلك الاصناف.

الخلاصة

اجريت هذه الدراسة في مختبر البايولوجيا الجزيئية/ قسم الهندسة الوراثية / دائرة البحوث الزراعية/وزارة العلوم والتكنولوجيا بهدف تقدير البصمة الوراثية ودراسة العلاقة الوراثية لتسعة اصناف عراقية من نخيل التمر *Phoenix dactylifera L.* وهي اصابع العروس، زهدي، سكري، سعادة، اشرسى، برين، شتوي، خستوي ونهير السلي. استعمل 20 بادئا " عشوائيا" للتحري عن مؤشرات الدنا بتقانة التضاعف العشوائي المتعدد الاشكال لسلسلة الدنا Random Amplified Polymorphic (RAPD) والمعتمدة على تفاعل البلمرة الحراري Polymerase Chain Reaction (PCR). تضمنت خطوات العمل عزل وتنقية الدنا من الاوراق الفتية للاصناف الداخلة في الدراسة، اذ تم الحصول على تراكيز من الدنا تراوحت ما بين 100 و 522.5 نانوغرام/مايكرو لتر وبنقاوة تراوحت ما بين 1.66 - 1.92. نفذت تفاعلات البلمرة المتسلسل (PCR) مع البادئات المستعملة للكشف عن التباينات بين قطع الدنا المتضاعفة لكل صنف (اعدادها واحجامها الجزيئية) عند ترحيل نواتج التضاعف للعينات على هلام الاكاروز بعد تصبيغها بيروميد الاثيديوم. بينت نتائج التحليل الوراثي بمؤشرات الـ RAPD اختلافا " واضحا" في عدد حزم الدنا المتضاعفة واوزانها الجزيئية وذلك تبعا" للبادئ المستعمل اذ بلغ العدد الكلي للحزم المتباينة (polymorphic bands) 157 حزمة لكافة البوادئ، وكان اقل عدد حزم متباينة 5 حزم في البادئين OPA-01 و OPA-20 في حين كان اعلى عدد من الحزم المتباينة 12 حزمة في البادئين OPA-08 و OPH-09، كما اظهرت العديد من البادئات المستعملة في الدراسة حزما" فريدة للنماذج المدروسة جميعها والتي تعد بمثابة بصمة وراثية لتمييز الاصناف عن بعضها ، اذ اعطى الصنف اشرسى اعلى عدد من الحزم الفريدة وذلك عند استعمال البوادئ OPA - 08 و OPC - 04 و OPF - 05 و OPF - 12 اذ اعطت هذه البوادئ ستة حزم مميزة ذات اوزان جزيئية متباينة، بينما اعطى الصنف زهدي اقل عدد من الحزم الفريدة والتي بلغت حزمة واحدة ذات وزن جزيئي 385 زوج قاعدي عند استعمال البادئ OPA - 05. ولغرض ايجاد نسبة التشابه الوراثي والعلاقة الوراثية بين الاصناف ادخلت البيانات التي تم الحصول عليها الى الحاسوب ووفق البرنامج الاحصائي SPSS، تراوحت نسبة التشابه بين الاصناف ما بين 0.291 و 0.511 وكانت اكبر نسبة تشابه بين الصنفين سعادة وشتوي. اما نتائج التحليل التجمعي dendogram فقد انفصلت الاصناف الى مجموعتين رئيسيتين، ضمت المجموعة الاولى ثلاث مجموعات فرعية، شملت الاولى على الصنفين شتوي وسعادة اما الثانية فضمت الاصناف زهدي واشرسى ونهير السلي في حين تمثلت الثالثة بالصنف اصابع العروس. كما انقسمت المجموعة الرئيسية الثانية الى مجموعتين فرعية، ضمت