

تشخيص جنس بادرات نخيل التمر باستخدام بعض مؤشرات الدنا الجزيئية

* حسام سعد الدين محمد خيرالله * مؤيد رجب العاني * ثائرة خيري عثمان الراوي

استاذ مساعد استاذ باحثة

*وحدة أبحاث النخيل والتمور - كلية الزراعة - جامعة بغداد * قسم البستنة وهندسة الحدائق - كلية الزراعة - جامعة بغداد

khierallah70@yahoo.com

المستخلص

اجريت الدراسة الحالية للتشخيص المبكر للجنس في نخيل التمر باستخدام بعض تقانات تحليل DNA بواسطة تقانة تحليل انعزال المجاميع Bulk Segregant Analysis واستخدام مؤشرات التضاعف العشوائي المتعدد الأشكال لسلسلة الدنا (RAPD) Randomly Amplified Polymorphic DNA ومؤشرات التتابعات المتباينة المضاعفة المنشطة Cleaved Amplified Polymorphic Sequence (CAPS)، وتفاعل البلمرة المتسلسل المتشعب Nested PCR. أظهرت بادرات مؤشرات RAPD المستعملة اختلافاً في إظهار نواتج البلمرة، إذ أظهر 50 بادراً تطبيقاً شكلياً في نمط توزيع الحزم في حين أظهرت عشرة بادرات حزماً متباينة شكلياً لعينة مجموعة الأصناف المذكورة (M) عنها في عينة مجموعة الأصناف المؤنثة (F). بلغ عدد الحزم الكلي 626 حزمة كان عدد الحزم المتباينة منها 41 وبنسبة تباين 6.54%. أعطى البادئ OPD10 أعلى عدد حزم بلغ 118 حزمة وكان الأعلى كفاءة (18.85%)، في حين كان البادئ OPE04 الأقل كفاءة (3.51%) إذ لم يعط الا 22 حزمة. ظهرت حزمة متباينة ذات وزن جزيئي 143 زوجاً قاعدياً في ست أصناف مؤنثة من مجموع الأصناف السبعة المؤنثة (أي بنسبة 85.71%) ولم تظهر في جميع الأصناف المذكورة، وعد ذلك مؤشراً إيجابياً، وبذلك رشح هذا البادئ ليكون مؤشراً مميزاً لجنس أصناف نخيل التمر العراقية على مستوى مؤشرات RAPD. أما مؤشرات CAPS استعملت أنزيمات القطع الثلاثة *Bcl I* و *Hpa II* و *Rsa I* لقطع نواتج بلمرة البادئ OPD.10. أشارت النتائج الى استجابة نواتج تفاعل البلمرة للقطع بالانزيم *Bcl I* إذ قطعت الحزمة ذات الوزن الجزيئي 143 زوج قاعدي التي تحتويها ستة عينات مؤنثة، استخدم أنزيم القطع *HpaII* لقطع نواتج تفاعل البلمرة وقطعت الحزمة ذات الوزن الجزيئي 180 زوج قاعدي الموجودة في 5 أصناف مذكورة و 6 أصناف مؤنثة، وكذلك تم قطع الحزمة ذات الوزن الجزيئي 433 زوج قاعدي الموجودة في جميع الأصناف المؤنثة والمذكورة. تعد النتائج أعلاه واعده في مجال تمييز الجنس في نخيل التمر على المستوى الجزيئي.

الكلمات المفتاحية: تمييز الجنس، RAPD، CAPS، تفاعل البلمرة المتشعب، *Phoenix dactylifera*.
البحث مستل من أطروحة دكتوراه للباحث الثالث.

The Iraqi Journal of Agricultural Sciences –1197-1205: (5) 48/ 2017

Khierallah & et al.

SEX IDENTIFICATION OF DATE PALM BY USING DNA MOLECULAR MARKERS

H. S. M. Khierallah
Assist. Prof.M. R. Abood
Prof.T. K. Al-Rawi
ResearcherDate Palm Research Unit Horticulture Dep. Date Palm Research Unit College of Agriculture/
University of Baghdad
khierallah70@yahoo.com

ABSTRACT:

This study was conducted to investigate the early detection of date palm gender, the current study was conducted using some DNA markers technology using Bulk Segregant Analysis (BSA) and three molecular markers including Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPDs), and Cleaved Amplified Polymorphic Sequence (CAPS) and Nested PCR. Results showed that RAPD primers used cleared different banding pattern. Fifty primers showed monomorphic bands while ten showed polymorphic bands for the two balks Males (MB) and females (FM). These primers showed 626 total bands in which 41 of them was polymorphic (6.54% polymorphism). OPD.10 primer gave the highest number of bands reached 118 bands and was the highest efficiency (18.85%). While the primer OPE04 was least efficient (3.51%), giving only 22 bands. A band with molecular weight of 143 bp appeared in six females of the total seven female varieties (85.71%) and did not appear in all males suggesting a positive marker which could be consider a candidate region for gender in date palm. Results of CAPS markers using three restriction enzymes: *Bcl I*, *Hpa II* and *RsaI* to digest the PCR products of OPD.10 primer. Results indicated that not all enzymes were useful for cutting DNA of samples. *Bcl I* enzyme cut the band of 143 bp which appeared in six female samples, while *Hpa II* enzyme cut the band of 180 bp in five males and six females. The former enzyme had also cut and the band of 433 bp in all female varieties. No response was noted when DNA was restricted with enzyme *RsaI*. The above results consider to be promising for gender detection in date palm.

Key wards: *Phoenix dactylifera* L., sex detection, RAPD, CAPS, nested PCR.

Part of Ph.D. Dissertation of the third author.

*Received:8/9/2016, Accepted:21/2/2017

المقدمة

نخيل التمر *Phoenix dactylifera* L. من النباتات المزهرة المعمرة دائمة الخضرة أحادية الجنس ثنائية المسكن وحيدة الفلقة *Monocotyledon* يتم إكثارها جنسياً بالبذور أو خضرياً بالفسائل أو بزراعة الأنسجة النباتية (3). إن الانخفاض الكبير لأعداد النخيل والإنتاجية للأشجار فضلاً عن الأضرار بالتنوع الأحيائي *Biodiversity* في العراق الأمر الذي أدى إلى حدوث تدهور وراثي *Genetic erosion* لعدة اصناف من نخيل التمر. ولتحقيق قفزة نوعية في مجال التوسع في زراعة النخيل، ينبغي إيجاد مؤشرات وراثية ثابتة ودقيقة ومعتمدة يمكن استخدامها لغرض تحديد جنس البادرات الناتجة من البذور (4). وتشير المصادر الى قيام عدد من الباحثين بمحاولات لتحديد جنس البادرات في مرحلة مبكرة منها ما كان معتمداً على الطرائق التقليدية (5 و6) والخلوية كما (7 و8 و9 و10) وقام بعضهم باستخدام المؤشرات الكيموحيوية (4 و11). إن التطور السريع الذي حصل في مجال علم الحياة الجزيئية *Molecular Biology* والنجاحات المستمرة التي حققتها الهندسة الوراثية *Genetic Engineering* بدءاً من عقد الثمانينيات وما تطور منه بسرعة في عقد التسعينيات وما بعده قد وفرت الطرائق المناسبة للتحليل الجزيئي للمادة الوراثية فظهرت مؤشرات الدنا *DNA* التي يمكن أن تساعد في تحديد جنس النخيل لذا عمد الباحثون إلى استخدام طرائق جديدة باستخدام مؤشرات أكثر دقة وكفاءة توفيراً للجهد والوقت لتمييز الجنس (9 و12 و13 و14). تهدف هذه الدراسة إلى محاولة التشخيص المبكر لجنس البادرات الناتجة من زراعة البذور عن طريق استخدام تقانة تحليل انعزال المجاميع *Bulk Segregant Analysis (BSA)* باستخدام ثلاثة مؤشرات جزيئية هي مؤشرات التضاعف العشوائي المتعدد الأشكال لسلسلة الدنا *(RAPD) Randomly Amplified Polymorphic DNA* ومؤشرات التتابعات المتباينة المضاعفة المنشطة *(Cleaved Amplified Polymorphic Sequence) (CAPS)*.

المواد وطرائق العمل:

نفذ قسم من التجارب في مختبرات وحدة أبحاث النخيل والتمور في كلية الزراعة- جامعة بغداد فيما نفذ القسم الآخر

في قسم التقنيات الأحيائية- كلية الزراعة- جامعة باليرمو في إيطاليا.

جمع العينات النباتية من الأشجار البالغة :

جمعت العينات النباتية من الأشجار الذكرية والأنثوية، إذ جمعت عينات من السعف ومن أشجار الأصناف الذكرية: غنامي أحمر وغنامي أخضر وخكري كريطلي وخكري سميسي وخكري عادي ورصاصي وغلامي. وكذلك من الأصناف الأنثوية: برحي وتبرزل ومكثوم واشرسى وخستاوي واسطة عمران وخضراوي، وذلك من محطة البستنة التابعة لدائرة البستنة والغابات - وزارة الزراعة عدا الصنف الذكري رصاصي الذي أخذت عيناته من أشجار مزروعة في بستان النخيل التابع لقسم البستنة وهندسة الحدائق في كلية الزراعة- جامعة بغداد أخذت العينات من الموقع القريب من قمة رأس النخلة مع مراعاة اختيار الأوراق الحديثة الغضة والخالية مظهرياً من الإصابات المرضية والحشرية. لفت العينات برفائق الألمنيوم *Aluminum foil*، ووضعت في أكياس بلاستيكية وحفظت في الثلج، إذ نقلت بهذه الطريقة إلى المختبر. غسلت الأوراق بالماء المقطر لتنظيفها من الأتربة ثم مسحت بقطن مغمس بالكحول لغرض تعقيمها.

استخلاص الدنا وتوصيفه من عينات الأشجار الذكرية والأنثوية

عزلت المادة الوراثية (*DNA*) من جميع العينات المذكورة للأصناف الذكرية والأنثوية في الفقرة السابقة على طريقة *Benito* وآخرون (15). تضمنت عملية توصيف الدنا قياس تركيزه وتقدير نقاوته. استعمل جهاز قياس تركيز الدنا *Nanodrop-spectrophotometer* وعلى الطول الموجي 260 نانومتر. في حين تم تقدير نقاوة الدنا بحساب النسبة بين قراءتي الجهاز على الطولين الموجيين 260 و280 نانوميتر.

تمييز الجنس في النخيل بوساطة تقانة تحليل انعزال المجاميع *BSA*

استخدام مؤشرات التضاعف العشوائي المتعدد الأشكال : خفف محلول مستخلص الدنا من الفقرة السابقة بالماء المقطر المعقم وحسب التراكيز المحسوبة للحصول على تركيز قدره 50 نانوغرام للمايكرو لتر. حضرت عينات الدنا بعمل مجموعتين رئيسيتين من دنا العينات هما مجموعة الأصناف

$$\text{كفاءة البادئ} = \frac{\text{عدد الحزم الكلية التي أنتجها البادئ}}{\text{عدد الحزم الكلية لكل البادئات}} \times 100$$

ج- عدد الحزم المتشابهة (المتماثلة)

هـ- عدد الحزم ذات التعدد الشكلي (المتباينة)

د- النسبة المئوية للتعدد الشكلي وحسبت كالآتي:

$$\text{النسبة المئوية للتباين} = \frac{\text{عدد الحزم ذات التعدد الشكلي المنتجة من البادئ}}{\text{عدد الحزم المنتجة الكلية من البادئ}} \times 100$$

القوة التشخيصية للبادئ وهذه حسبت كالآتي:

$$\text{القوة التشخيصية للبادئ} = \frac{\text{عدد الحزم ذات التعدد الشكلي المنتجة من البادئ}}{\text{عدد الحزم ذات التعدد الشكلي المنتجة من كل البادئات}} \times 100$$

إيجاد التباينات الجزيئية بين أصناف النخيل قيد الدراسة

بأستخدام مؤشرات الدنا RAPD

أنتخبنا البادئات التي أعطت حزماً متباينة مميزة لمجموعة دون الأخرى ويعاد تفاعل PCR ولكن باستخدام عينات الدنا لسبع ذكور وسبع إناث كل على انفراد وترجل نواتج التفاعل على هلام الاكاروز بتركيز 1% لفصل الحزم الناتجة ويتم تصبغ الهلام بصبغة بروميد الاثيديوم ويتم إظهار الحزم باستخدام الأشعة فوق البنفسجية باستخدام جهاز Gel documentation system وتصوير الهلام يتم بعدها عمل مصفوفة ويرمز لوجود الحزمة بالعدد 1 و 0 لغياب الحزمة لبيان الحزم المتباينة للأصناف، وأستخدم البرنامج الحسوبي Photo capture لحساب الأوزان الجزيئية للحزم.

استخدام مؤشرات التتابعات المتباينة المضاعفة المنشطرة

لتمييز المبكر لجنس النخيل (CAPs)

أستعمل البادئ OPD10 الذي أعطى أعلى نسبة للارتباط بالجنس وأجري تفاعل PCR للأصناف الأربعة عشر المذكورة والمؤنثة للحصول على ناتج التضاعف. أخذت نواتج التضاعف وأضيف إليها أنزيمات قطع لكل صنف من الأصناف الأربعة عشر المذكورة والمؤنثة. استخدمت ثلاثة أنزيمات Restriction Enzyme وهي *Hpa II* و *Bcl I* و *Rsa I* المنتجة من شركة Promega. أنزيم القطع Restriction Enzyme *Bcl I* ومصدر هذا الأنزيم هو بكتريا *Bacillus caldolylicus* ودرجة الحرارة المثلى لعمل الأنزيم 50 م° ويظهر 20-50% من فعاليته على درجة حرارة 37م°، وأنزيم القطع *HpaII* ومصدر هذا الأنزيم هو بكتريا *Haemophilus parainfluenzae* ودرجة الحرارة المثلى لعمل الأنزيم هي 37م°، وأنزيم القطع *Rsa I* مصدر هذا

المذكورة ومجموعة الأصناف المؤنثة وذلك بخلط 20 مايكرو لتر من محلول الدنا المستخلص لكل صنف مذكر وللأصناف السبعة وكذلك للأصناف المؤنثة السبعة لتكوين محلولين فقط ورمز لمجموعة أصناف الذكور بالحرف (M) ولمجموعة أصناف الإناث بالحرف (F). حضرت هذه التفاعلات استناداً إلى Williams وآخرون (16). إذ استعمل خليط التفاعل الرئيس (Master Mix) المنتج من شركة Bioneer. استعمل 60 بادئ عشوائي مجهزة من الشركة نفسها والجدول 2 يبين البادئات العشوائية والقواعد النتروجينية المكونة لها. حضر خليط التفاعل النهائي بمزج المكونات أدناه كما في جدول 1. اختير البرنامج المناسب والذي اعتمد في جميع التفاعلات التضاعفية اللاحقة. إذ تم التفاعل وفق البرنامج: دورة واحدة لمدة 2 دقيقة على درجة حرارة 94 م° للمسخ الأولي لشريط الدنا، تليها 40 دورة تضاعف تتضمن كل دورة دقيقة واحدة على درجة حرارة 92 م° لمسخ القالب ودقيقة واحدة على درجة حرارة 36 م° لربط البادئات بالدنا القالب و2 دقيقة على درجة حرارة 72 م° لاستطالة البادئات المرتبطة مع دورة أخيرة واحدة للاستطالة لمدة 7 دقائق وعلى درجة حرارة لمدة 72م° كدورة أخيرة للاستطالة النهائية ثم خفضت درجة الحرارة إلى 4 وحفظت العينات بالتبريد. أستخدم الترحيل الكهربائي الهلامي لفصل نواتج نواتج تفاعل سلسلة البوليميريز. حضر هلام الاكاروز بتركيز 1% ورحل باتجاه القطب الموجب بقدرة 3 فولت/ سم وبعد 2-3 ساعة فحص الهلام بوضعه في جهاز ذو مصدر للأشعة فوق البنفسجية عند الطول الموجي (240 نانومتر) لرؤية حزم الدنا وصور الهلام باستخدام جهاز التصوير (Gel documentation system ATTO, Japan).

جدول 1 . مكونات عينات تفاعل RAPD

المكونات	حجم العينة الواحدة (مايكرو لتر)	التركيز النهائي
ماء مقطر	12	
خليط التفاعل الرئيس	5	1X
البادئ	1	10 بيكومول
الدنا القالب للعينات	2	100 نانوغرام
الحجم النهائي للعينة	20	

حسبت المعلمات الآتية بأخذها من صورة الهلام:

أ- عدد الحزم الكلية المنتجة من كل بادئ

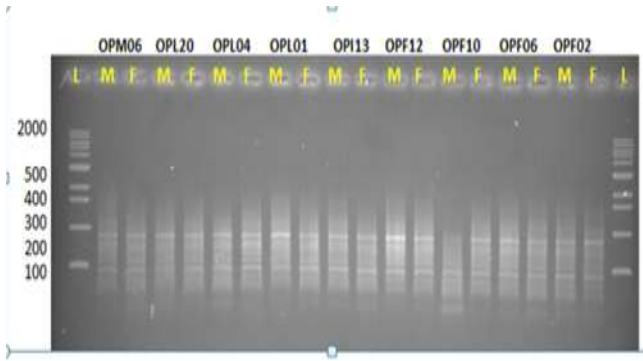
ب- كفاءة البادئ % Primer efficiency وحسبت من القانون:

م لإيقاف عمل الأنزيم وللحفاظ على العينات من التلف، رحلت النواتج على هلام الاكاروز 1% ثم صبغ الهلام بصبغة بروميد الاثيديوم. أظهرت الحزم باستخدام الأشعة فوق البنفسجية وباستخدام جهاز Gel documentation system وصور الهلام كما ورد سابقاً. حلت صورة الهلام بالبرنامج الحاسوبي Photo Capture,soft ware لينتج عنه الأوزان الجزيئية للحزم الموجودة في الهلام. أخذت البيانات لكل أنزيم قطع و تقييد ولأنزيمات الثلاث، ومثلت البيانات بإعطاء رقم 1 لوجود الحزمة، و 0 لغيابها، وأدرجت في جدول قبل وبعد القطع الأنزيمي وحسب الأوزان الجزيئية للحزم الناتجة أستخدم البرنامج الحاسوبي PAST software .

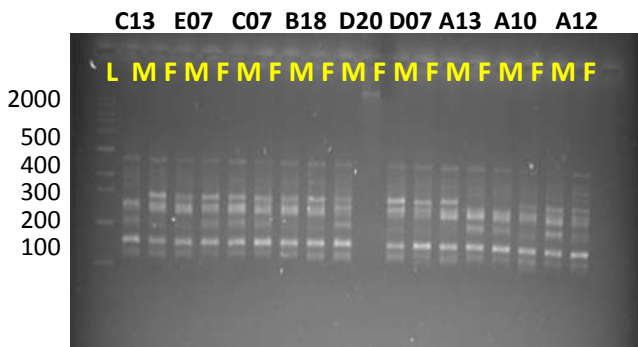
الأنزيم هو بكتريا *Rhodopseudomonas Haeroides* ودرجة الحرارة المثلى لعمل الأنزيم حرارة 37م. أخذ 1 مايكرو لتر من الدنا الذي تم تضخيمه بجهاز PCR الذي يمثل نواتج تفاعل مؤشرات RAPD وأضيف له 16.3 مايكرو لتر من الماء المعقم اللايوني و 2 مايكرو لتر من المحلول الدائري RE 10X و 0.2 مايكرو لتر من المحلول الدائري BAS مايكروغرام/مايكرو لتر (مرفقات مع الأنزيم) وضعت عدة ثواني بجهاز الطرد المركزي ثم اضيف 1 مايكرو لتر من أنزيم القطع. وضعت العينات في جهاز المبلمر الحراري لغرض تحضينها حسب درجة الحرارة المناسبة لتحضين كل مجموعة والوقت المناسب وهو 3 ساعات، كما وضعت كل مجموعة على درجة حرارة 65

جدول 2 . البادئات العشوائية (RAPD) والقواعد النتروجينية المكونة لها

جدول 2 البادئات العشوائية (RAPD) والقواعد النتروجينية المكونة لها.					
التسلسل	اسم البادئ	تسلسل القواعد النتروجينية '3----->'5	التسلسل	اسم البادئ	تسلسل القواعد النتروجينية<'3----->'5
1.	OP A-10	GGGTAACGCC	31.	OP I-13	CTGGGGCTGA
2.	OP A-12	CAATCGCCGT	32.	OPK-18	CCTAGTCGAG
3.	OP A-13	TCGGCGATAG	33.	OP L-01	GGCATGACCT
4.	OP B-07	GGTGACGCAG	34.	OP L-04	GACTGCACAC
5.	OP B-15	GGAGGGTGT	35.	OP L-20	TGGTGGACCA
6.	OP B-18	CCACAGCAGT	36.	OP M-06	CTGGGCAACT
7.	OP C-01	TTCGAGCCAG	37.	OP M-08	TCTGTTCCCC
8.	OP C-07	GTCCCGACGA	38.	OP M-16	GTAACCAGCC
9.	OP C-09	CTCACCGTCC	39.	OP M-19	CCTTCAGGCA
10.	OP C-13	AAGCCTCGTC	40.	OP N-05	ACTGAACGCC
11.	OP C-15	GACGGATCAG	41.	OP N-11	TCGCCGCAA
12.	OP D-05	TGAGCGGACA	42.	OP N-17	CATTGGGGAG
13.	OP D-07	TTGGCACGGG	43.	OP P-08	ACATCGCCCA
14.	OP D-08	GTGTGCCCCA	44.	OP P-09	GTGGTCCGCA
15.	OP D-10	GGTCTACACC	45.	OP P-12	AAGGGCGAGT
16.	OP D-20	ACCCGGTCAC	46.	OP P-14	CCAGCCGAAC
17.	OP E-04	GTGACATGCC	47.	OP P-18	GGCTTGGCCT
18.	OP E-07	AGATGCAGCC	48.	OP P-20	GACCCTAGTC
19.	OPE-10	CACCAGGTGA	49.	OP R-13	GGACGACAAG
20.	OP E-13	CCCGATTCCGG	50.	OP R-18	GGCTTTGCCA
21.	OP F-02	GAGGATCCCT	51.	OP T-08	AACGGCGACA
22.	OP F-06	GAGGATCCCT	52.	OP T-16	GGTGAACGCT
23.	OP F-10	GGAAGCTTGG	53.	OP W-03	GTCCGGAGTG
24.	OP F-12	ACGGTACCAG	54.	OP W-09	GTGACCGAGT
25.	OP F-14	TGCTGCAGGT	55.	OP W-10	TCGCATCCCT
26.	OP G-06	GTGCCTAACC	56.	OP W-11	CTGATGCGTG
27.	OP G-07	GAACCTGCGG	57.	OP W-13	CACAGCGACA
28.	OP G-08	TCACGTCCAC	58.	OP X-04	CCGCTACCGA
29.	OP I-06	AAGGCGGCAG	59.	OP X-11	GGAGCCTCAG
30.	OP I-11	ACATGCCGTG	60.	OP X-17	GACACGGACC



شكل 1. نواتج الترحيل الكهربائي لتفاعل البلمرة المتسلسل PCR لمجموعتي الذكور MB وأناث FB نخيل التمر باستعمال 9 بادئات لمؤشرات RAPD تظهر تطابقاً شكلياً L: دليل الأوزن القياسي (100bp DNA Ladder).



شكل 2 نواتج الترحيل الكهربائي لتفاعل البلمرة المتسلسل PCR لمجموعتي ذكور M وإناث F نخيل التمر باستعمال 9 بادئات لمؤشرات RAPD تظهر تعدداً شكلياً للبادئين OPC.13 و OPD.20: دليل الأوزان القياسي لل DNA (100 pb Ladder).

نتائج تحليل مؤشرات RAPD لتمييز جنس أصناف النخيل استخدمت البادئات التي اظهرت نواتج تفاعلها المتسلسل حتماً متباينة من التجربة السابقة في دراسة إمكانية التمييز بين الأصناف الذكرية والانثوية لنخيل التمر وكل صنف على حدة. يبين الجدول 3 بعض المعلومات الخاصة بنتائج تفاعل البلمرة المتسلسل الخاص بالبادئات العشرة التي أظهرت تبايناً شكلياً في التمييز بين مجموعتين عينات الذكور عن الإناث كما في الشكلين 1 والشكل 2. يلاحظ من نتائج الجدول أن عدد الحزم الكلية بلغ 626 وكانت عدد الحزم المتباينة منها 41 حزمة وبنسبة تباين بلغت 6.54%. أعطى البادئ OPD10 أعلى عدد حزم بلغ 118 حزمة وكان الأعلى (كفاءة 18.85%). في حين كان البادئ OPE04 الأقل كفاءة (3.51%) إذ لم يعط غير 22 حزمة. وبالرغم من ذلك يلاحظ أن هذا البادئ أعطى أعلى نسبة للتباين

عزل وتنقية الدنا

أجري تفاعل RAPD في جهاز المبلر الحراري PCR وباستخدام البادئ OPD10 للعينات الأربعة عشر المذكورة والمؤنثة حسب ما ورد ذكره سابقاً، وبعد ترحيل الدنا الناتج في جهاز الترحيل الكهربائي للهلام وجدت حزمة مميزة (Specific band) في الأصناف المؤنثة، وضع الهلام على جهاز مصدر الأشعة فوق البنفسجية المفتوح من الأعلى وقطعت قطعة الهلام التي تحتوي على الحزمة المميزة باستخدام شفرة معقمة وضعت هذه القطعة في أنبوب صغير بعد ذلك تم عزل وتنقية للدنا التي تحتويه تلك القطعة من الهلام.

تفاعل البلمرة المتسلسل المتشعب المتشعب Nested Polymerase Chain Reaction

لتأكيد النتائج المستحصل عليها، أُجري تفاعل البلمرة المتسلسل المتشعب. بعد عزل وتنقية الدنا الناتج من عملية البلمرة الأولى RAPD باستخدام البادئ OPD10 أخذ الدنا الناتج وأجري له تفاعل RAPD باستخدام البادئ OPD.10 للمرة الثانية وبذلك يصبح تفاعل بلمرة متسلسل متشعب، رمز لعينة الدنا المتشعب بالحرف N. أُجري التفاعل كما مر سابقاً. بعد انتهاء التفاعل، أُخرجت العينات المتشعبة من جهاز Thermocycler ورحلت كهربائياً بالهلام ثم صبغت ببروميد الأثيديوم ووضعت في جهاز التصوير وأخذت الصور.

النتائج والمناقشة

نتائج تحليل انعزال المجاميع (BSA) Bulks

segregant analysis باستخدام مؤشرات RAPD

أظهرت البادئات المستعملة اختلافاً في إظهار نواتج البلمرة، إذ أظهر 50 بادئاً تشابهاً في نمط توزيع الحزم وكانت هذه الحزم متطابقة شكلياً (Monomorphic bands) في حين أظهرت البادئات OPA.12، OPB.07، OPC.09، OPC.13، OPD.10، OPD.20، OPE.04، OPK.18، OPN.17، OPX.04 حزمياً متباينة (Polymorphic bands) أو تسمى متعددة الأشكال لعينة مجموعة الأصناف المذكورة (MB) عنها في عينة مجموعة الأصناف المؤنثة (FB).

بلغت 22.72% وبقوة تشخيصية قدرها 12.19% في حين أعطى البادئ OPD20 أقل نسبة مئوية للتباين كانت 3.29% وبقوة تشخيصية بلغت 7.31% وأعطى البادئ

جدول 3. الحزم الناتجة من تضاعف دنا عينات النخيل الذكرية والأنثوية باستعمال البادئ OPD.10 مع أوزانها الجزيئية

الوزن الجزيئي	الأصناف المذكورة							الأصناف المؤنثة						
	غنامي أخضر	غنامي	كركدي عادي	كركدي خكري	عادي عادي	رصاصي	غنامي	عادي	عمران	أسطة	خستاي	متم	عمران	عادي
816	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
734	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0
650	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0
522	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0
433	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
320	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
282	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0
253	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1
180	0	1	0	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1
154	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0
143	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1

المواقع المكملة لذلك البادئ في جينوم النبات وبادئات أخرى لم تعط نتائج كاملة عند استخدامها، إذ يلاحظ فقدان الحزم في بعض العينات قيد الدراسة عند تطبيق مؤشرات RAPD وذلك بسبب غياب المواقع المكملة لتسلسلات تلك البادئات في جينوم نخلة التمر. وأن ظهور هذه الحزم المتباينة أو غيابها المستخدمة في مواقع محددة يعود إلى اختلاف في ترتيب القواعد، إذ أن مواقع ارتباط البادئات المستخدمة منتشرة بشكل عشوائي على جينوم الأفراد المدروسة، لذا فإن حدوث أي تغيير في تسلسل النيوكليوتيدات نتيجة الإضافة Insertion، أو الحذف Deletion، أو إعادة ترتيب Rearrangement للنيوكليوتيدات في جينوم الأفراد المدروسة لأي سبب كان كالتغيرات في الهيئة الكروموسومية Karyotyping change أو الطفرات النقطية Point mutation أو الارتباط أو العبور الجسيمي Somatic crossing over، أو بلمرة الدنا DNA Amplification، أو مثيلة DNA Methylation أو وجود ما يعرف بالجينات القافزة Transposable elements أو التغيير في دنا العضيات (17) Change in organelles DNA، إذ أن حدوث واحد أو أكثر من هذه التغيرات سوف يسبب تغييراً في مواقع الارتباط بالبادئ، ومن ثم يتغير حجم القطعة المتضاعفة مما يؤدي إلى ظهور هذه الحزم المتباينة، أو غيابها في مواقع محددة على الهلام.

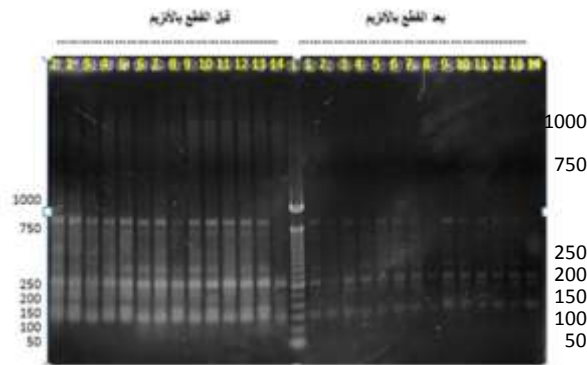
تمييز الجنس للأصناف الذكرية والأنثوية باستخدام البادئ

OPD10

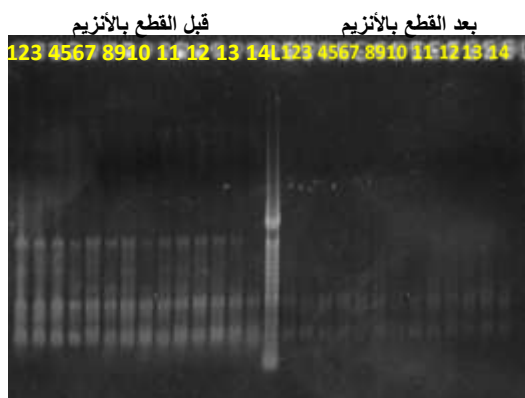
أظهرت نتائج بلمرة البادئ OPD10 الموضحة في الجدول 3 عدداً من الحزم الكلية بلغت 118 حزمة، أي بمعدل 8.44 حزمة، وكان عدد الحزم المتباينة 6 حزم وعدد من الحزم المتشابهة بلغ عددها 112 حزمة، وأظهر الجدول (4) أن أعلى قيمة وزن جزيئي للحزم كانت 816 زوج قاعدي وأقل وزن جزيئي للحزمة بلغت 143 زوجاً قاعدياً، وكانت أعلى نسبة تضاعف هي للصنف غنامي أخضر وخكري عادي ومكتوم وتبرزل وخستاي وأسطة عمران، إذ بلغت 10 حزم لكل منهما، وأقل نسبة تضاعف للصنف خضراوي إذ بلغت 5 حزم، كما في الشكل (3). إن ظهور حزمة متباينة polymorphic bands ذات الوزن الجزيئي 143 زوجاً قاعدياً في ستة أصناف مؤنثة من مجموع الأصناف السبعة المؤنثة (أي بنسبة 85.71%) وغيابها في جميع الأصناف المذكورة عد مؤشراً إيجابياً وبذلك رشح هذا البادئ ليكون مؤشراً مميّزاً لجنس أصناف نخيل التمر العراقية على مستوى مؤشرات RAPD. وهذه النتيجة تتفق مع النتيجة التي توصلت إليها Younis وآخرون (14) بحثهم إذ أظهر البادئ OPD.10 حزمًا متباينة في الأصناف المؤنثة لم تظهر في الأصناف المذكورة. بينت نتائج تفاعلات RAPD اختلافات في عدد الحزم المضاعفة وأحجامها الجزيئية باختلاف البادئ المستخدم والناتجة من الاختلاف في عدد

جدول 4 أعداد الحزم الكلية والمتباينة وكفاءة البادئات والقوة التشخيصية الناتجة من تفاعل بلمرة عشرة بادئات RAPD المستخدمة للتمييز بين 14 صنفاً من الإصناف الذكرية والأنثوية لنخيل التمر

ت	اسم البادئ	عدد الحزم الكلية	النسبة المئوية المنوية لكفاءة البادئ	عدد الحزم المتشابهة	عدد الحزم المتباينة	النسبة المئوية المنوية للتباين	لقوة التشخيصية للبادئ
1	OPA12	72	11.50	68	4	5.56	9.75
2	OPB07	60	9.58	58	2	3.33	4.87
3	OPC09	44	7.03	39	5	11.36	12.19
4	OPC13	87	13.90	83	4	4.59	9.75
5	OPD10	118	18.85	112	6	5.08	14.63
6	OPD20	91	14.54	88	3	3.29	7.31
7	OPE04	22	3.51	17	5	22.72	12.19
8	OPK18	34	5.43	29	5	14.70	12.19
9	OPN17	66	10.54	61	5	7.57	2.19
10	OPX04	32	5.11	30	2	6.25	4.87
	المجموع	626	-	585	41	-	-
	المعدل	62.6	-	4.1	6.54	-	-

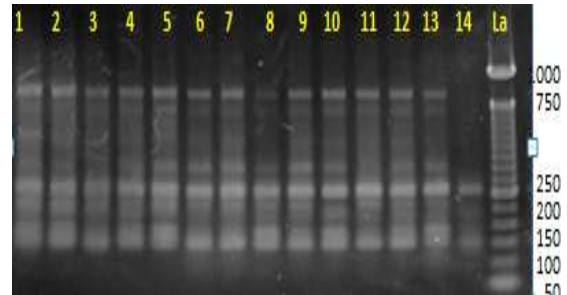


المؤنثة والمذكورة، وهذه النتيجة تتفق مع ما وضحته AI-Mahmoud وآخرون (18) التي حصلت قطع للحزمة 180 زوجاً قاعدياً الموجودة في الأصناف المؤنثة عند استخدام الأنزيم *HpaII*. أجري تفاعل PCR باستخدام البادئ OPD10 وعند استعمال أنزيم التقييد *RsaI*، لم يظهر أي استجابة للعينات للقطع بهذا الأنزيم وهذا يؤكد ما أوضحته AI-Mahmoud وآخرون (18) من عدم استجابة عينات نخيل التمر التي تم بلمرتها للقطع بأنزيم القطع والتقييد *Ras*



الشكل 5. الترحيل الكهربائي الهلامي لنواتج تفاعل البلمرة لسبعة أصناف مذكرة العينات (1-7) وسبعة أصناف مؤنثة العينات (8-14) باستخدام البادئ OPD.10 قبل القطع بالانزيم وبعد القطع بالانزيم *HpaII*: دليل الأوزان القياسي للدنا (100 bp DNA Ladder).

نتائج مؤشرات التتابعات المتباينة المضاعفة المنشطرة (CAPS): رشح البادئ OPD10 ليستعمل في تفاعل CAPS، تم عمل تفاعل البلمرة للعينات المذكرة والمؤنثة، استعملت أنزيمات القطع والتقييد (*Restriction Enzyme*) الثلاثة وهي *Bcl I* و *Hpa II* و *Rsa I* لقطع نواتج التفاعل، تشير النتائج الموضحة في الشكل 4 الى أستجابة هذه النواتج للقطع بالانزيم *Bcl I* اذ قطعت الحزمة ذات الوزن الجزيئي 143 زوجاً قاعدياً التي تحتويها ستة عينات مؤنثة، وتتفق هذه النتيجة مع ما أوضحته AI-Mahmoud وآخرون (18) باستخدام أنزيم القطع *Bcl I* الذي قام بالعمل نفسه.



الشكل 3 الترحيل الكهربائي الهلامي لنواتج تفاعل بلمرة سبعة عينات مذكرة (1-7) وسبعة عينات مؤنثة (8-14) باستخدام البادئ OPD10، L: دليل الأوزان القياسي للدنا (100 pb DNA Ladder)

استخدم أنزيم التقييد *HpaII* لهضم نواتج تفاعل البلمرة باستخدام البادئ OPD10 وتشير النتائج الموضحة في الشكل 5 إلى أن الحزمة ذات الوزن الجزيئي زوج قاعدي الموجودة في 4 أصناف مذكرة و6 أصناف مؤنثة قد قطعت كما تم قطعت الحزم ذات الوزن الجزيئي 816 ، 734 ، 282،433،320،522،650 زوجاً قاعدياً الموجودة في الأصناف

Date Palm Seeds. MSc. Thesis. College of Sciences, Baghdad University.

6. Al-Khateeb, T. A. 2000. Using Random Amplified Polymorphic DNA Markers (RAPD) in Identification of Male and Some Date Palm. MSc. Thesis, College of Science, University of Baghdad.

7. Al-Mahmoud, M. E., Al-Dous, E. K., Al-Azwani, E. K., and Malek, J. 2012. DNA-based assays to distinguish date palm (Arecaceae) gender. Amer. J. Bot. 1: 7-10.

8. Al-Mojahed, A. M. A. 1987. Mulh-Al Melaha in Farming Knowledge. Agriculture college. University of Sanaa. Knowledge press. pp. 386.

9. Al-Mosawi, A. H. E., 1987. Plant Taxonomy Science. University of Baghdad, Ministry of High Education and Scientific Research. pp. 452.

10. Brar, D. S. and Jain, S. M. 1998. Somaclonal Variation: Mechanism And Applications In Crop Improvement. In: Jain, S. M.; Barar, D. S. And B. S. Ahloowalia (Eds.) Somaclonal Variation and Induced Mutation In Crop Improvement. Kluwer Academic Publishers London. UK, p 15-37.

11. Benito, C., Figueiras, A. M., Zaragoza, C., Gallego, F. J. K. and Dela, P. 1993. Rapid Identification of Trijcticeae genotypes from single seed using the polymerase chain reaction. Journal Plant Molecular Biology. 21 (1): 181-183.

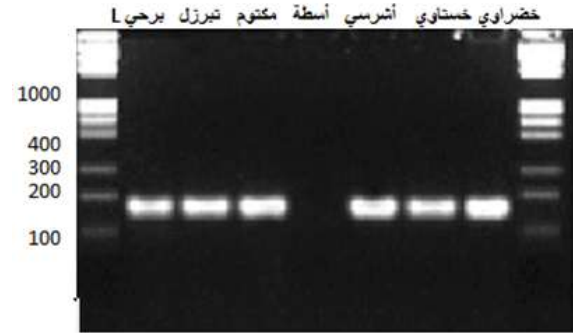
12. El-Kharbotly, A., M. Mardi , N. Al-Saadi, and Y. Al-Mahruki, 1998. Towards the construction of the genetic map of date palm using the amplified fragment length polymorphism technique (AFLP). In: Proc. The First Inter. Conf. on Date Palms. Al-Ain. UAE, p. 18-25.

13. Hitrotoshi, S. and I. Fumio, 1983. Sex identification of dioecious plant by isozyme method in date palm (*Phoenix dactylifera*). Japanese J. Tropical Agriculture. 27(2): 75-78.

14. Mathew, S. L., Spannagl M., Al-Malki, B. George ; F. M. Torres ; K. E. 15.- Al- Dous ; E. Al- Zwani ; H. Emad; S .Mathew ; F. K. Mayer; A. Y. Mahmoud ; K. Suhre and J. Malek . 2014.A first genetic map of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) reveals long-range structure conservation in the date palms. BMC Genomic. 15: 285-299.

نتائج تفاعل البلمرة المتسلسل المتشعب

أجري تفاعل البلمرة المتسلسل المتشعب للحزمة المميزة وذات التعدد الشكلي التي ظهرت في دنا ست من العينات الأنثوية التي تمثل الأصناف برحي وتبرزل ومكتوم واشرسى وخستاوي وخضراوي عدا الصنف أسطة عمران الذي لم تظهر فيه هذه الحزمة وبعد إجراء الترحيل الكهربائي وبأستخدام البرنامج الحاسوبي Photo capture ظهر أن الوزن الجزيئي للعينة المتشعبة N هو 143 زوجاً قاعدياً كما في الشكل 6.



شكل 6. الترحيل الكهربائي لنواتج بلمرة المتشعبة لأصناف

المؤنثة السبعة L: يمثل دليل الأوزان القياسي للدنا 100

bpDNA Ladder

REFERENCES

1. Abbas, K. I. 2000. Studying of Chromosome, Anatomy and Morphology of Some Date Palm Cultivars. PhD. Dissertation, College of Science, Basrah University.
2. Al-Ani, M. R., 1998. Studying the Possibility of Identified Date Palm Sex in Seedling Stage by Using Electrophoreses of Protein and Gibberellin Like Substances, Ph.D. Dissertation, Agriculture College, University of Baghdad.
3. Al-Baker, A. J. 1972. The Date Palm: A Review of its Past and Present Status, and the Recent Advances in its Culture, Industry and Trade. Al-Ani Press, Iraq pp. 642.
4. Al-Dous, E. K., George B., Al-Mahmoud, M. E., Al-Jaber, M. Y., Wang, H., Al-Salameh, Y. M., Al-Azwani, E. K., Chaluvadi S., Pontaroli, A. C., DeBarry J., Arondel, V., Ohlrogge, J., Saie, I., Elmeer, K., Bennetzen, J., Kruegger, R. and Malek, J. 2011. De novo genome sequencing and comparative genomics of date palm (*Phoenix dactylifera* L.). Nature Biotechnology 29, 6: 521-527.
5. Al-Hashemi, E. R. 1989. Effect of common salt in Iraqi Soil on Germinate and Grow of

15. Mutar, A.M. 1991. Date Palm Cultivation and Production, Basrah University. Ministry of High Education and Scientific Research. pp.420.
16. Salbi, M. E., Al-Ani, M. R. and A. S. Mohamed 1995. Studying Chromosomes karyotype of different cultivars of date palm. Iraqi Agri. Sci. J., 26(2):119-130.
17. Williams, K. J., Kubelik, A., Livak, K., Rafalski, J. and Tingey, S. 1990. DNA

polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic acids Research, 18: 6531-6535.

18. Younis, R. A., O. M. Ismail, and S. S. Soliman, 2008. Identification of sex-specific DNA markers for date palm (*Phoenix dactylifera* L.) using RAPD and ISSR techniques. Research Journal of Agriculture and Biological Sciences 4: 278.