



جامعة بغداد

دراسة تحديد جنس نخيل التمر في مرحلة البادرات باستخدام المؤشرات الجزيئية والتقليدية

أطروحة تقدمت بها

ثائرة خيري الراوي

الى مجلس كلية الزراعة – جامعة بغداد
وهي جزء من متطلبات درجة دكتوراه فلسفة في العلوم الزراعية/ البستنة وهندسة
الحدائق
(إنتاج فاكهة)

اشراف

أ.م.د. حسام سعد الدين محمد خير الله

أ.د. مؤيد رجب عبود

2015

1436

وَهُوَ الَّذِي أَنْزَلَ مِنَ السَّمَاءِ مَاءً فَأَخْرَجْنَا بِهِ نَبَاتَ كُلِّ شَيْءٍ فَأَخْرَجْنَا مِنْهُ خَضِرًا
نُخْرِجُ مِنْهُ حَبًّا مُتَرَاكِبًا وَمِنَ النَّخْلِ مِنَ النَّخْلِ مِنْ طَلْعِهَا قِنْوَانٌ دَانِيَةٌ وَجَنَّاتٍ مِّنْ أَعْنَابٍ وَالزَّيْتُونَ وَالرُّمَّانَ
مُشْتَبِهًا وَغَيْرَ مُتَشَابِهٍ انظُرُوا إِلَى ثَمَرِهِ إِذَا أَثْمَرَ وَيَنْعِهِ إِنَّ فِي ذَلِكُمْ لَآيَاتٍ لِّقَوْمٍ يُؤْمِنُونَ.

صدق الله العظيم

(سورة الانعام-الاية-99).

بسم الله الرحمن الرحيم

إقرار المشرفين

نقر أن إعداد هذه الأطروحة جرى تحت اشرافنا في قسم البستنة/ كلية الزراعة/جامعة بغداد وهي جزء من متطلبات درجة دكتوراه فلسفة في العلوم الزراعية-البستنة وهندسة الحدائق (انتاج الفاكهة).

المشرف

الدكتور مؤيد رجب عبود

أستاذ

كلية الزراعة-جامعة بغداد

المشرف

الدكتور حسام سعد الدين محمد خير الله

أستاذ مساعد

كلية الزراعة-جامعة بغداد

بناء على التوصيات المتوفرة أرشح هذه الأطروحة للمناقشة

رئيس قسم البستنة وهندسة الحدائق

الأستاذ الدكتورة ايمان جابر عبد الرسول

الإهداء

إلى عاشق النخيل

ومؤسس الشبكة العراقية لنخلة التمر

www.iraqi-datepalms.net

الأستاذ الدكتور إبراهيم الجبوري

الخلاصة:

في محاولة للتشخيص المبكر للجنس في نخيل التمر اجريت هذه الدراسة باستخدام بعض الطرائق التقليدية هي اتجاه انبات البذور نحو اليمين (R) ونحو اليسار (L) وشكل الأوراق المستقيمة (A) والأوراق المقوسة (T) كما اختبرت سبعة اصناف مذكرة هي غنامي احمر، غنامي اخضر، خكري كريطلي، خكري سميسي، خكري عادي، رصاصي وغلامي وسبعة أصناف مؤنثة هي برحي، تبرزل، مكتوم، أشرسى، خستاوي، أسطة عمران وخضراوي. واستخدمت تقانة تحليل DNA بوساطة تقانة تحليل انزال المجاميع (BSA) Bulk Segregent Analysis واستخدام ثلاثة مؤشرات جزيئية هي مؤشرات التضاعف العشوائي المتعدد الأشكال لسلسلة الدنا Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) وتقانة البلمرة المتشعبة (Nested PCR) ومؤشرات التتابعات المتباينة المضاعفة المنشطرة (CAPS) Cleaved Amplified Polymorphic Sequence ومؤشرات تسلسل التتابعات المتباينة القصيرة (SSR) Simple Sequences Repeats، فضلاً عن تقدير بعض المكونات الكيماوية للأوراق كالبروتين والبرولين والبيروكسيديز .

تم استخلاص الدنا والحصول على كميات مناسبة من الدنا الكلي (المجيني) إذ بلغ أعلى تركيز للأحماض النووية 299 نانوغرام /مايكرو لتر للصنف الأشرسى والذي بلغت نقاوته 1.82، وأقل تركيز للبادئات ذات اتجاه الأنبات نحو اليسار 167.5 نانوغرام/ مايكرو لتر وبلغت نقاوته 2.13%.

أظهرت بادئات مؤشرات RAPD المستعملة اختلافاً في نواتج البلمرة، إذ أظهر 50 بادئا تشابها في نمط توزيع الحزم وكانت هذه الحزم متطابقة شكلياً (Monomorphic bands) في حين أظهرت البادئات OPA12، OPB07، OPC09، OPC13، OPD10، OPD20، OPE04، OPK18، OPX04، OPN17 حزماً متباينة شكلياً (Polymorphic bands) لعينة مجموعة الأصناف المذكورة (M) عنها في عينة مجموعة الأصناف المؤنثة (F). أظهرت هذه البادئات عدد حزم كلي 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 الأقل كفاءة (3.51%) إذ لم يعط غير 22 حزمة. وعلى الرغم من ذلك يلاحظ أن البادئ OPE04 أعطى أعلى نسبة للتباين بلغت 22.72% وبقوة تشخيصية قدرها 12.19، في حين أعطى البادئ OPD20 أقل

نسبة مئوية للتباين كانت 3.29 وبقوة تشخيصية بلغت 7.3%، وأعطى البادئ OPD10 أعلى قوة تشخيصية بلغت 14.63%، وأعطى البادئ OPD07 أقل قوة تشخيصية بلغت 4.87%.

أظهرت نتائج بلمرة البادئ OPD10 118 حزمة، وكان عدد الحزم المتباينة 6 حزم وعدد من الحزم المتشابهة بلغ عددها 112 حزمة، وبلغت أعلى قيمة وزن جزيئي للحزم 816 زوج قاعدي وأقل وزن جزيئي للحزمة بلغت 143 زوج قاعدي، وكانت أعلى نسبة تضاعف هي للصف غنامي أخضر وخكري عادي ومكتوم وتبرزل وخستاوي إذ بلغت 10 حزم لكل منهما، وأقل نسبة تضاعف للصف خضراوي إذ بلغت 5 حزم. ظهرت حزمة متباينة ذات وزن جزيئي 143 زوج قاعدي في ستة 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. وبالنسبة لمؤشرات CAPS استعملت أنزيمات القطع (Restriction Enzyme) الثلاثة وهي *Bcl I* و *Hpa II* و *Rsa I* لقطع نواتج بلمرة البادئ OPD10. أشارت النتائج الى استجابة نواتج تفاعل البلمرة للقطع بالأنزيم *Bcl I* اذ قطعت الحزمة ذات الوزن الجزيئي 143 زوج قاعدي التي تحتويها ستة عينات مؤنثة، استخدم أنزيم القطع *Hpa II* لقطع نواتج تفاعل البلمرة وقطعت الحزم ذات الوزن الجزيئي 816, 734, 650, 522, 433, 320. كما استعمل أنزيم القطع *RsaI* ولم يظهر أي استجابة.

بعد إجراء تفاعل البلمرة المتسلسل المتشعب (Nested PCR) للدنا الناتج من عزل وتنقية دنا الحزم المميزة الموجودة في ستة أصناف مؤنثة لوحظ وجود الحزمة OPD10_{143bp} بوضوح في دنا ستة من العينات الأثنوية التي تمثل الأصناف برحي، تبرزل، مكتوم، أشرسى، خستاوي، خضراوي عدا الصف أسطة عمران الذي لم تظهر فيه هذه الحزمة.

أظهرت نتائج التشابه الوراثي باستخدام البرنامج الحاسوبي Paste على مقياس Jacard Similarity Index بين البادرة ذات الأوراق المقوسة ومجموعة الإناث 71.4%، كما بلغت نسبة التشابه الوراثي بين البادرة ذات الأوراق المقوسة وبين الأم (البرحي) (83.3%)، وبذلك يرجح أن تكون هذه البادرة مؤنثة. وبالنسبة لمؤشرات SSR وباستعمال ثلاث بادئات هي البادئ mPdCIR48 والبادئ mPdCIR078 والبادئ mPdCIR093، وباستعمال البادئ mPdCIR078 ظهرت الأوزان الجزيئية لمجموعة الأصناف المذكورة (M) هي 117، 134، 137، 147، 154 زوج قاعدي، والأوزان الجزيئية لمجموعة الأصناف المؤنثة (F) هي 132، 134، 137، 143، 145، 154 زوج قاعدي. وبما أن الأوزان الجزيئية للحزم (134، 137) موجودة في المجموعة المذكورة والمجموعة المؤنثة بذلك

عدت حزمياً حيادية لا يعتمد عليها في التمييز بين الأصناف المذكورة والأصناف المؤنثة وعدت الحزمة 143 مميزة للإناث اذ ظهرت بستة أصناف مؤنثة وهي (برحي وتبرزل ومكتوم وأشرسي وخستاوي وخضراوي) اي بنسبة 85.7% ولم تظهر في اي من الصناف المذكورة وبذلك يمكن اعتماد هذا البادئ لتمييز جنس نخيل التمر.

بالنسبة للتحليل الكيماوي لم تظهر فروقات في محتوى البادرات بنوعيتها ذات الأوراق المستقيمة (A) وذات الأوراق المقوسة (T) من البروتين والبرولين وأنزيم البيروكسيداز.

1- المقدمة:

نخيل التمر من النباتات المزهرة المعمرة دائمة الخضرة أحادية الجنس ثنائية المسكن وحيدة الفلقة Monocotyledon يتم إكثارها جنسياً بالبذور أو خضرياً بالفسائل أو بزراعة الأنسجة النباتية، لها القدرة على النمو في مناطق عالية الملوحة، كما تنمو تحت أي درجة حرارة إلى درجة التجميد على أن لا تقل درجة الحرارة العظمى عن 9 م° كما أن النخيل يتحمل أقصى درجات حرارة (الموسوي، 1987).

تتنتمي نخلة التمر Date Palm إلى العائلة النخيلية Arecaceae وتضم أكثر من 200 جنس وحوالي 4000 نوع وتعد أكثر العوائل النباتية فائدة للإنسان بعد العائلة النجيلية Gramineae (مطر، 1991)، وتعد الرتبة Arecae التي يعود إليها نخيل التمر من أهم الرتب النباتية المعروفة إذ تنتسب إليها أنواع كثيرة من النخيل، والاسم العلمي لنخلة التمر *Phoenix dactylifera* L. (البكر، 1972). احتل العراق موقع الصدارة في أعداد أشجار النخيل الذي وصل إلى 32 مليون نخلة عام 1952 وكان فيه أكبر غابة لأشجار النخيل بالعالم في شبه جزيرة الفاو، كما كان البلد الأول في الإنتاج والتصدير على مستوى العالم، إلا أن عدد النخيل قد انخفض إذ بلغ 14765000 نخلة وبمعدل إنتاج سنوي 655450 طن حسب إحصائية (الجهاز المركزي للإحصاء 2013).

إن الانخفاض الكبير لأعداد النخيل والإنتاجية للأشجار والأندثار الوراثي Genetic erosion لأصناف عديدة من نخيل التمر في هذه المنطقة أدى إلى حدوث الأضرار بالتنوع الأحيائي Biodiversity. 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 (العاني، 1998). ونظراً لعدم التوصل لحد الآن ورغم المحاولات العديدة إلى تثبيت أساس علمي دقيق ومعتمد لتمييز جنس النخيل في مرحلة البادرات استناداً للطرائق الوراثية والتقليدية، لذا عمد الباحثون إلى استخدام طرائق جديدة باستخدام مؤشرات أكثر دقة وكفاءة توفيراً للجهد والوقت لتمييز الجنس. 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 الأدوات المناسبة للتحليل الجزيئي للمادة الوراثية فظهرت مؤشرات الدنا DNA التي يمكن أن تساعد في تحديد جنس النخيل قام بعض الباحثين بمحاولة

تسخير مؤشرات الدنا في التمييز المبكر لجنس نخيل التمر كمؤشرات (RAPD) Randomly Amplified Polymorphic DNA أو Inter Short Sequence Repeat ISSR (Younis). كما قامت AL- Dous وآخرون (2008) و AL- Dous وآخرون (2011) بتجميع مسودة الجينوم لنخيل التمر المؤنث صنف الخلاص، وباستخدام مؤشرات تباين النيوكلويدة المفردة (SNPs) Single Nuclotide Polymorphism).

لذا هدفت هذه الدراسة إلى محاولة التشخيص المبكر لجنس بادرات النخيل الناتجة من زراعة البذور من خلال:

1 - تقانة تحليل انعزال المجاميع (BSA) Bulk Segregent Analysis باستخدام ثلاثة مؤشرات جزيئية هي مؤشرات التضاعف العشوائي المتعدد الأشكال لسلسلة الدنا Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) ومؤشرات التتابعات المتباينة المضاعفة المنشطرة (CAPS) Cleaved Amplified Polymorphic Sequence ومؤشرات التتابعات الترادفية القصيرة (SSR) Simple Sequences Repeats).

2- تقدير بعض المكونات الكيماوية للأوراق كالبروتين والبرولين والبيروكسيديز لدراسة إمكانية استخدامها كمؤشرات لتمييز جنس النخيل.

2- مراجعة المصادر:

ان صعوبة تمييز جنس نخيل التمر في المراحل الأولية للنمو من أهم العوامل الأساسية التي تحد من التوسع في زراعة النخيل ونظراً لعدم التوصل لحد الآن، ورغم المحاولات العديدة، إلى تثبيت أساس علمي دقيق ومعتمد لتمييز جنس النخيل استناداً للطرائق الوراثية التقليدية، ولذا فإن من الممكن تصنيف التقنيات والطرائق التي درست بهدف التمييز إلى ما يلي:

1-2 دراسة ومقارنة الصفات المظهرية (الطرائق التقليدية)

أوضح Al-Salih وآخرون (1985) أن البذور بعد ان تتشرب بالماء اللازم، يفتح النخيل (germ pore) ويخرج طرف الفلقة الأبيض (scutellum) ويدعى النجمة (Apicol) من النخيل يقع في الجهة البطنية للبذرة (تقابل الجهة الظهرية التي تحتوي على اخدود) وهو الجزء الذي يحتوي بداخله الجنين والذي يندفع بوساطته الجنين إلى خارج البذرة ثم ينحني إلى الأسفل باتجاه الجاذبية الأرضية. ذكر المجاهد ورسول (1987) أن البادرات الذكرية في حالة انباتها من البذور المغطاة بالحصيرة لها القدرة على شق هذه الطبقة بعكس البادرات الأنثوية النابتة من البذور المتبقية.

أجرى الهاشمي (1989) دراسته على ثلاثة أصناف من نخيل التمر هي السابر، خستاوي، زهدي أن طريقة الأنبات في انحاء النجمة (Apicol) نحو يمين رأس البذرة أو نحو يسارها قد يكون لها شأن هام في تشخيص البادرة الناتجة من حيث الجنس (إن انحراف جزء الفلقة الظاهر نحو يمين رأس البذرة Proximal end أو نحو يسارها) بنسبة تقارب النصف مما يدل على صدق توقع أن يكون الإنبات نصفه لليمين ونصفه لليساار.

وقد درس Al-Ani (1986) العلاقة بين جنس النخيل ومحتوى الكلوروفيل والفسفور الموجود في أوراق النخيل وقد بينت النتائج بأنه لا توجد علاقة بين الجنس ومحتوى الفسفور الموجود في أوراق النخيل الذكرية والأنثوية. أما Firstrom و Spaiith (1980) فقد عارضا الدراسات التي تستند إلى الصفات المظهرية لكون هذه الصفات تظهر نتيجة عدد من المورثات (Genes) والتي تتأثر بصورة كبيرة بالعوامل البيئية مالم يتم تحديد الأساس الوراثي لهذه الصفات.

2-2 المؤشرات الخلوية Cytological markers:

هناك عدة أنواع من المؤشرات الوراثية المستخدمة في التوصيف الوراثي لأنواع وأصناف النخيل وجنسه مثل المؤشرات المظهرية Phenotype markers والمؤشرات الخلوية Cytological markers والمؤشرات الأنزيمية Isozyme markers والمؤشرات البروتينية Protin markers فضلاً عن مؤشرات الدنا DNA markers وتبعاً لنوع المؤشر الوراثي المستخدم، يختلف مفهوم البصمة الوراثية Gentic fingerprint فعند استخدام البروتينات فإن البصمة تعني نمط توزيع الحزم المفصولة بالترحيل الهلامي والناجمة من ترحيل المحتوى البروتيني للأفراد المدروسة، وتعرف بصمة المتناظرات الأنزيمية (Isozyme fingerprint) لذلك الفرد أو الصنف بنمط توزيع الحزم المرحلة المفصولة بالترحيل الهلامي، أما عند استخدام مؤشرات الدنا فإن البصمة الوراثية تعني نمط توزيع الحزم المتباينة والناجمة تماماً من تقطيع الدنا المجيني للأفراد المدروسة أو من تضخيم مناطق متباينة في جينوم الأفراد بوساطة تفاعل سلسلة البوليميريز PCR وباستخدام بادئ ملئم (El-Shibli و Korelainen، 2007).

ومن المتطلبات التي يجب توافرها في كل المؤشرات الوراثية هي:

يجب أن تكون متوارثة heritable ولها القدرة على التمييز بين الأفراد المدروسة، وتعطي نتائج قابلة للمقارنة وفي نفس الوقت سهولة القياس والتطوير (Hillis و Mortiz، 1990).

دراسة عدد الكروموسومات وأحجامها وأشكالها ومقارنة الأفراد تتم من خلال الدراسات الخلوية (Reale وآخرون، 2006).

أجريت العديد من الدراسات السايولوجية لتمييز جنس نخيل التمر إذ قام Al-Salih وآخرون (1987 a) بدراسة على نخيل التمر المذكر صنف غنامي أخضر بسبب الجدل المثار حول حدوث أو عدم حدوث الإخصاب في نخلة التمر، وقد بينت الدراسة أن عدد الكروموسومات في الخلايا السبورية الذكرية المأخوذة من متوك الأزهار الذكرية يساوي 9، وأن عددها في الخلايا الجسمية المأخوذة من نهايات جذور نفس الفحل تساوي 18، ومن المحتمل أن هذه الاختلافات في عدد كروموسومات الخلايا التناسلية الذكرية عن عدد كروموسومات الخلايا التناسلية الأنثوية 14-18 قد تكون سبباً أساسياً في احتمالية عدم التوافق في حدوث الإخصاب. وفي دراسة أخرى قام بها هذا Al-Salih وآخرون (1987 b) اختبر صنفين زراعيين من إناث نخيل التمر وهما السابر والخصاب، وقد اعتمدت الاختبار بالدرجة الأولى في وقت نضوج الثمار إذ أن السابر صنفاً مبكراً والخصاب صنفاً متأخراً،

ودرس عدد الكروموسومات في كل من الصنفين المذكورين، فوجدوا اختلافات في عدد الكروموسومات، إذ كان عدد كروموسومات السائر $2x=32$ بينما عددها في الخصاب $2x=36$.

بين سلبي وآخرون (1995) عند دراستهم للطرز الكروموسومية لبعض أصناف نخيل التمر الذكورية والأنثوية أن هنالك اختلافات في أشكال وأحجام الكروموسومات للنبات الواحد، إذ تميزت أصناف النخيل الذكورية في بعض الحالات بوجود 17 زوجاً من الكروموسومات المتناظرة. بينما تميزت الاصناف الانثوية بوجود 18 زوجاً من الكروموسومات المتناظرة عادة لذا عدّ الزوج الواحد من الكروموسومات غير المتناظرة والذي ظهر في بعض الخلايا الجنسية للأصناف الذكورية هو الزوج الذي له علاقة بتحديد الجنس.

اجريت بعض الدراسات لتمييز الجنس في نخيل التمر وفي المراحل المبكرة من النمو، فقد أشار Siljak وآخرون (1996) إلى استخدام طريقة مطولة نوعاً ما تعتمد على تحليل مرستيمات نهايات جذور الأصناف الأنثوية والذكورية في الجزائر وباستخدام صبغة chromomycin A3 وعملية التهجين بالموقع (In situ-hybridization) وباستخدام المجهر المتحد البؤر (Confocal microscopy) وذلك لتمييز كروموسومات الجنس الحاملة لكنتل الكروماتين (chromocenter) المتغاير في الحجم في أنوية الطور البيني، وقد لوحظ احتواء خلايا جذور الإناث على زوج من الكروموسومات المتناظرة (Homomorphic chromosome)، أما أصناف الذكور فقد احتوت على زوج من الكروموسومات غير المتناظرة (Heteromorphic chromosome).

استنتج عبد الوهاب (1999) أن عدد الكروموسومات في الخلايا الجسمية لطرف الجذر في جميع الأصناف الأنثوية (الخشراوي والخضراوي والزهدي والاشرسي والميرحاج) وكذلك أصناف الذكور (الغنامي الأحمر والغنامي الأخضر والرصاصي والخكري والوردي) هو $(2n=36)$ والعدد ثابت لجميع الأصناف المدروسة.

قام عباس (2000) في دراسة العدد الكروموسومي لسبعة أصناف ذكورية وأنثوية من نخيل التمر، وأوضح تحليل الهيئة الكروموسومية وجود بعض الفروقات المظهرية في الكروموسومات يمكن من خلالها تمييز الذكور عن الإناث، كما لا يمكن الاعتماد على العدد الكروموسومي في تشخيص النباتات المغايرة للصنف وذلك لافتقار هذه الطريقة للدقة المطلوبة في الكشف عن التغيرات والطفرات التي تحدث على مستوى المادة الوراثية الدنا للنبات، كما أكد Al-Ani وآخرون (2010) على أن العدد الكروموسومي لنخيل التمر هو 18 زوج.

وجدت Al-Dous وآخرون (2011) أن طول جينوم نخيل التمر M658.

قام Mathew وآخرون (2014) برسم الخارطة الجينية لنخيل التمر صنف خلاص وتمييز الكرموسوم الجنسي المفترض له. تم فحص 4000 مؤشر، أما المؤشرات التي استخدمت لرسم الخارطة الجينية فكانت 1200 مؤشر امتدت بطول 1293 سنتي موركان من الجينوم، في أول الأمر تم وضع 19% مسودة التسلسل الجينومي للمجاميع المرتبطة وتم دمج النتائج للحصول على الخارطة الجينية باستخدام مؤشرات SNPs marker. وبين المجاميع المرتبطة لنخيل التمر، أظهرت معدل طويل من التشابه الجيني مع نخيل الزيت، المنطقة المقترحة لتمييز جنس نخيل التمر هي منطقة التلومير لمجموعة الارتباط LG 12، وعند إعادة ارتباط التلوميرات لتكوين الكرموسوم الكامل لم تنتشت هذه المنطقة. إن مجموعة الارتباط هذه لديها تصاحب جيني مع كرموسوم chr 10 لنخيل الزيت، بالإضافة إلى وجود مناطق تشابه قصيرة لسلسلة تتابعات لكرموسوم نخيل الزيت رقم 1، 2، 5. وثبت عدد كروموسومات نخلة التمر بـ18 زوجاً من الكروموسومات، كما وضح أن طول الجينوم الكلي هو cM1293 سنتي موركان على افتراض أن حجم الجينوم 670 Mb أي أن الطول الفيزيائي حوالي 1.93 cM/ Mb، وجاءت نتائج هذه الدراسة مؤيدة لنتائج دراسات سابقة أجريت في العراق (قام بها Al- Salih وآخرون عام 1987) بعدد الكروموسومات وتخمين طولها. ولوحظ في هذه الدراسة أن نصف القسم السفلي من مجموعة الارتباط LG 12 قد يكون الكرموسوم الجنسي لنخلة التمر، وأن هذه المنطقة المعزولة من الجين كانت بطول cM 26 وطولها الفيزيائي لربما يكون M 13 أو حوالي 2% من الجينوم الكلي.

2-3 مؤشرات المتناظرات الأنزيمية: Isozyme markers

الأنزيمات هي مواد عضوية تتكون من مجموعة البروتينات معقدة التركيب ذات وزن جزيئي عال تنتجها الخلايا، وتوجد بكميات ضئيلة فيها وتعمل الأنزيمات كعوامل مساعدة تتحكم في سرعة التفاعلات الحيوية المختلفة، وتتميز بتخصصها، إذ أن لكل أنزيم مادة معينة أو مواد متشابهة كيميائياً يمكن أن يؤثر فيها، كما أنها تؤثر في سرعة التفاعلات العكسية (الداوودي، 1991)، وتحتوي الخلية النباتية على حوالي ألف نوع من الأنزيمات (المريقي، 2005).

المتناظرات الأنزيمية:

الأنزيمات هي مواد عضوية تتكون من مجموعة البروتينات معقدة التركيب ذات وزن جزيئي عال تنتجها الخلايا، وتوجد بكميات ضئيلة فيها وتعمل الأنزيمات كعوامل مساعدة تتحكم في سرعة

التفاعلات الحيوية المختلفة، وتتميز بتخصصها، إذ أن لكل أنزيم مادة معينة أو مواد متشابهة كيميائياً يمكن أن يؤثر فيها، كما أنها تؤثر في سرعة التفاعلات العكسية (الداودي، 1991)، وتحتوي الخلية النباتية على حوالي ألف نوع من الأنزيمات (المريقي، 2005).

المتناظرات الأنزيمية:

يمكن تعريف المتناظر الأنزيمي Isozyme بأنه الشكل الآخر لأنزيم معين يشبه ذلك الأنزيم بالوظيفة لكنه يختلف عنه في تسلسل الأحماض الامينية فيه Hunter و Markert (1957)، وبذلك يمكن فصلها عن بعض باستخدام الهجرة الكهربائية، ويتم ترحيل هذه الأنزيمات المتناظرة على هلام متعدد اكرل أميد أو النشأ. أول من استخدم الأنزيمات لوصف التغيرات (Market و Moller, 1959)، وبعدها قام Tanksley و Orton (1983) بتطوير تقانة Isozymes لكشف وتحليل الاختلافات الاليلية allelic variatas إن التعبير الجيني Gene expression غالباً ما يتأثر بالظروف البيئية ونوع النسيج المستخدم لهذه التحليلات ومرحلته العمرية، كما أن عدد المتناظرات الأنزيمية يكون قليلاً أو محدوداً (Beckmann و Soller، 1990). ويتميز أفراد النوع الواحد بثبات عدد تلك الأنزيمات لذلك يمكن الكشف عن التغيرات المختلفة عن بعضها بسهولة (الحسني، 2002). تعد الأنزيمات المتناظرة والتي يتم إظهارها ومقارنة أنماط توزيع الحزم للفرد وتحديد التباينات المطلوبة بصمة لذلك الفرد أو الصنف Isozyme fingerprint (kuner و آخرون، 2002).

قام Torres و Tisserat (1980) في دراسة لهما على المتناظرات الأنزيمية Isozyme لمستخلص سعف النخيل التي تم وصفها كمؤشرات أو دوالاً وراثية للتمييز، تطابقت الشتلات الناتجة من زراعة الأنسجة التي مصدرها الكالس الذي أعقبه تكوين أجنة خضرية تطورت لاحقاً إلى بادرات صغيرة متشابهة فيما بينها، وفي دراسة قام بها Hitrotoshi و Fumio (1983) لتحديد الجنس في بادرات النخيل باستخدام مستخلصات سعف النخيل وترحيلها على هلام النشأ بالهجرة الكهربائية باعتماد النظم الأنزيمية للبيروكسيديز في كل من الإناث والذكور والبادرات الناتجة عنها كانت هنالك اختلافات واضحة في أنزيم البيروكسيديز بين الذكور والإناث إذ ظهرت حزمتان منه في الإناث، بينما لم تظهر تلك الحزمتين في الذكور، وعليه يمكن الأستنتاج بأنه يمكن تشخيص البادرات الأنثوية عن الذكورية باستخدام أنزيم البيروكسيديز، كما لاحظ Al-Jibouri وآخرون (1988) تطابق النباتات الناتجة من زراعة الأنسجة فيما بينها وكذلك مع أمهاتها ولم يلاحظ وجود تغيرات وراثية فيما عدا نبات واحد أظهر تبايناً في الأشكال المتناظرة لبعض النظم الأنزيمية فضلاً عن تأكيد هذا التباين من خلال ملاحظة حصول التضاعف الكرموسومي في تلك الحالة، وجد Salman وآخرون (1988) أن نباتات

النخيل النسيجية المنتجة من الأجنة الجسمية لأربعة أصناف كانت متطابقة وذلك عند تطبيق تحليل نتائج ترحيل أنزيماتها المتناظرة، ولكن بعد فترة من الزمن أظهرت تغيرات واضحة. كما درس AI- Jibory و Dham (1990) ستة أصناف ذكورية من نخيل التمر من ناحية محتواها من المتناظرات الأنزيمية باستخدام هلام متعدد الاكرل أمايد، وقد لوحظت بعض الفروقات بين الأصناف المدروسة، وتضمنت الاختلافات في عدد المتناظرات الأنزيمية المدروسة وقيم الحركة النسبية وشدة تألق الحزم. ولأن الأنزيمات هي نواتج التعبير الجيني، فإن البناء الوراثي لأي صنف يمكن أن يحدد اعتماداً على المتناظرات الأنزيمية الموجودة، لذا يمكن اعتماد هذا النظام بوصفه مؤشراً وراثياً. استخلص Melchinger وآخرون (1990) البروتين الخام من البذور وفصله باستخدام الترحيل الكهربائي عبر هلامنة من النشا أو من البولي اكريلاميد polyacrylamide ثم تصبغ هذه الهلامنة لتفاعل أنزيمي معين، إذ تظهر استجابة هذا التفاعل الأنزيمي Isozymes وأوضح أن التغيرات في تركيب الحامض الأميني يمكن أن يعكس اختلافات في الخاصية الحركية أثناء عملية الترحيل الكهربائي، وبهذا تظهر الاختلافات في الحزم المرئية على الهلام وخط توزيع الحزم للعينة المرحلة، وقام Booij وآخرون (1995) بتمييز أصناف نخيل التمر وذلك بواسطة الاختلافات الأنزيمية، إذ أمكن فصل المتناظرات الأنزيمية على هلام متعدد الاكرل أمايد، وظهرت اختلافات في عدد هذه المتناظرات وكذلك في قيم الحركة النسبية وشدة تألق الحزم، وقام Bendiab وآخرون (1998) باستخدام المؤشرات الخاصة بالأنزيمات المتناظرة للتمييز بين الأصناف المختلفة لنخيل التمر، وشملت هذه الأنزيمات Esterase (EST) و Transaminase Oxaloacetate Glutamate (GOT) و Endopeptidase (ENP) و Alcohol Dehydrogenase (ADH) و Peroxidase (PER) و Polyphenoloxidase و Phosphoglucose Isomerase (PGI)، واستخدم العاني (1998) بعضاً من هذه المؤشرات للتمييز المبكر للجنس لعدة أصناف ذكورية وأنثوية في العراق) وفي بحث قام به Saker وآخرون (2000) باستخدام انزيمات الـ(PPO) أوضح عدم ثبوتية نتائج هذا النوع من المؤشرات، كما لاحظ الباحث Azeqour وآخرون (2002) في دراسة التباين الوراثي باستخدام الأنزيمات المتناظرة للنباتات النسيجية التابعة لثلاث أصناف من المغرب وجود اختلافات في انماط توزيع الحزم ولوحظ كذلك وجود اختلافات مظهرية واضحة بين أشجار الصنف الواحد من جهة وبين الأصناف المختلفة من جهة أخرى.

2-4 استخدام مؤشرات الدنا الجزيئية في تمييز الجنس المبكر لنخيل التمر DNA marker

استخدمت مؤشرات الدنا الجزيئي DNA marker لتحليل الكائنات الراقية وراثياً وعلى المستوى الجزيئي ومن ضمنها النبات، وهي أكثر أنواع تقانات الهندسة الوراثية والأوسع انتشاراً (Paterson وآخرون، 1991). إن التوصيف الوراثي الجزيئي باستخدام هذا النوع من المؤشرات يمتلك العديد من المميزات أهمها عدم وجود تأثير بيئي في الصفة المستخدمة كمؤشر وراثي واستخدام أي جزء من النبات وفي أي مرحلة من النمو وليست هنالك حدود للتحليل الممكنة (DNA-based markers) وأصبحت تقنية واسعة الانتشار في السنوات الأخيرة ولها تطبيقات في مجالات عدة منها:

- رسم الخارطة الجينية.
- تحديد الجنس في بعض الأنواع النباتية.
- تحليل التنوع الوراثي.
- تحديد العلاقة الوراثية بين الأصناف المدروسة.

2-4-1- التفاعل التضاعفي لسلسلة الدنا

Polymerase Chain Reaction (PCR) Based Markers:

لقد تم وصف التفاعل التضاعفي لسلسلة الدنا أن عمل هذه التقانة هو مضاعفة قطعة معينة من الدنا المنتجة من المجين الكلي أنزيمياً وخارج الجسم الحي in vitro بوجود البادئات Primers والتي تربط بالنتابع المكمل لها على شريط الدنا القالب Template DNA وأن هذا الاكتشاف أحدث ثورة في عالم البيولوجيا الجزيئية تضاهي الثورة التي أحدثها اكتشاف التركيب المزدوج للدنا من قبل Watson وCrik (1953)، وعلى الرغم من عدم اهتمام الكثيرين به في البداية لكن اليوم يعد الـPCR التقنية الأكثر رواجاً في مختبرات الوراثة الجزيئية في جميع أنحاء العالم والذي تعتمد عليه الكثير من الدراسات على مستوى الدنا (Mullis وFallona، 1987)، وبهذا استحق عليها Mullis جائزة نوبل عام 1993 إذ جعلت إمكانية استخدام قطرة دم أو شعرة أو حتى خلية واحدة لإجراء عمليات الـPCR عليها (Higuchi وآخرون، 1988).

أما أهم متطلبات الـPCR فهي أنزيم بلمرة الدنا (Taq DNA Polymerase)، والبادئات (Primers) والنيوكليوسيدات منقوصة الأوكسجين الثلاثية الفسفور (deoxynucleosid triphosphates) والمحلول الدائري (PCR buffer) المحتوي على أيونات المغنيسيوم (Mg^{++})

وقالب الدنا (DNA Template), فضلاً عن جهاز المبلمر الحراري (Thermocycler) ومكونات أخرى سيتم التحدث عنها لاحقاً، وفيما يأتي توضيح لهذه المتطلبات:

أ- أنزيم البلمرة DNA Polymerase:

يعد أنزيم بلمرة الدنا واحداً من المكونات الأساسية و الرئيسية في تفاعلات الـ PCR, إذ تعتمد هذه التفاعلات على قابلية هذا الأنزيم على البناء وبالتالي مضاعفة تتابعات محده من الدنا القالب الكاملة لتتابعات البادئ, لذا فإن الاهتمام في تطوير نوعية وكفاءة هذا الأنزيم حظي باهتمام الكثير من الباحثين والمختصين بهذا المجال، وقد استهل العمل بهذه التقانة مع أنزيم البلمرة klenow fragment المستخلص من بكتريا القولون E.coli وهو من نوع (DNA Polymerase I) (Chien وآخرون، 1976 و Kalclin وآخرون، 1980)، إلا أن هذا الأنزيم يفقد امكانيته على البناء عند تعرضه إلى الحرارة العالية المطلوبة لمسح خيوط الدنا القالب مما يجعل عمله يتوقف إلا بإضافة كميات أخرى منه في كل دورة مما جعل الباحثين يتجهون إلى استنباط نوع جديد هو Taq Polymerase الثابت حرارياً والمعزول من البكتريا المحبة للحرارة Thermophilic Eubacterium وتدعى Thermus aquaticus (Saiki وآخرون، 1988) إذ أن له الأمكانية على الأستمرار بنشاطه وبدرجة 95 م° وبناء قطع أطول من الأنزيم السابق، إذ تتراوح أفضل درجات فعاليته في البناء بين (70-80 م°) وله نشاط خاص في البناء يتراوح بـ(35-100) نيوكليوتيدة في الثانية لكل جزيئه أنزيم إذ يضيف القواعد عند النهاية 3'-OH (Graham و Newton، 1997).

تتألف جزيئة الأنزيم Taq DNA Polymerase من سلسلة مفردة من الببتيد المتعدد وذوي وزن جزئي يقارب 95 كيلودالتون, ولذا عرفت الوحدة الأنزيمية one unit على إنها كمية الأنزيم اللازمة لسحب 10 نانومول من التركيب الكلي للنيوكليوتيدات dNTPs في خليط التفاعل وتحويلها إلى حامض الدنا القالب القابل للترسيب خلال 30 ثانية وبدرجة 75 م° وتحت ظروف التفاعل المثلى (Innis و Gelfand، 1990) وقد دفع النجاح الذي حققه هذا الأنزيم الباحثين والشركات المختصة إلى كلونة الجين المسؤول عن انتاجه ونقله إلى داخل بكتريا E.Coli لينتج على نطاق واسع ويتوفر تجارياً وأصبح يعرف بأنزيم Almitaq® DNA polymerase والذي يمتاز بالناقاوة العالية والدقة في إعادة نفس النتائج عند تكرار التجربة Reproducibility مقارنة بالأنزيم الأصل (Roch، 1999).

ب- البادئ **The Primer**:

يعرف البادئ بكونه قطعة قصيرة مفردة من الدنا أو الرنا (RNA) ترتبط بقلب شريط الدنا المفرد عند النهاية -3 المحتوية على مجموعة الهيدروكسيل OH الضرورية لبدأ عمل أنزيم بلمرة الدنا (Zaid وآخرون، 1999)، وهناك عدة أنواع من البادئات تختلف في طبيعتها باختلاف نوع المؤشرات، فقد تكون ذات تتابعات عامة Universal ويمكن استخدامها مع مجين كل الكائنات، وقد تكون تلك البادئات مصممة بشكل خاص ليتعرف على موقع متخصص متوزع بشكل عشوائي داخل المجين، وقد يصمم البادئ بوجود تسلسل معين في تركيبه كتلك المستعملة في تحليلات Amplified DNA Fragment Length Polymorphism (AFLP) و DNA Amplification fingerprint (DAF) (Nelson و Caskey، 1992).

ج- المحلول المنظم أو الدارئ **PCR buffer**:

المحلول المنظم هو المحلول الذي يحافظ على قيمة رقمه الهيدروجيني من التغيرات عند اضافة حامض أو قاعدة إليه أو عند تخفيف المحلول، ويقوم هذا المحلول بعملية تنظيم عمل أنزيم البلمرة والمحافظة على نشاطه، لذا أصبح هناك العديد منها وفقاً لنوع الأنزيم المستخدم. وتختلف هذه المحاليل المنظمة من حيث تركيز مكوناتها والرقم الهيدروجيني لها، إلا أن القياسية منها تحتوي على المكونات الرئيسية مثل كلوريد المغنيسيوم $MgCl_2$ بتركيز 50 مللي مولر وكلوريد البوتاسيوم KCl وبتركيز 1.5 مللي مولر والترس الحامضي Tri-HCl بتركيز 100 مللي مولر ذي رقم هيدروجيني قدره 8.3 فضلاً عن 0.1% حجم/وزن من الجيلاتين ليصبح المحلول بقوة X10 ويتم تخفيفه أثناء تحضير التفاعل ليصبح X 1 (Roch، 1999).

د- النيوكليوسيدات منقوصة الأوكسجين الثلاثية الفوسفات:

Deoxynucleoside triphosphate (dNTPs)

وهي عبارة عن القواعد النتروجينية الاربع مع سكر منقوص الاوكسجين وثلاث مجاميع من الفوسفات والتي تشكل مادة بناء شريط الدنا والذي يقوم أنزيم بلمرة الدنا بإضافته إلى النهاية OH بدأً من نقطة ارتباط البادئ بالقلب وبطول يختلف حسب نوع المؤشرات المستخدمة وهي:

Deoxy Adenosine Triphosphate (dATP)

Deoxy Thymosine Triphosphate (dTTP)

Deoxy Guanosine Triphosphate (dGTP)

Deoxy Cytosine Triphosphate (dCTP)

وتضاف هذه المكونات الأربعة بتركيز متساوية ومناسبة لإجراء التفاعل ويعتمد ذلك التركيز على تركيز Mg^{++} وذلك لأن زيادة تركيز dNTPs يؤدي إلى قلة الـ Mg^{++} الجاهز لفعالية أنزيم بلمرة الدنا (Innis و Gelfand, 1990)، وكذلك يتأثر تركيز الـ dNTPs بتركيز البادئات المستعملة وطول القطع المتضاعفة وعدد دورات الـ PCR ويمكن الوصول إلى التركيز المناسب تجريبياً (Graham و Newton, 1997).

هـ- قالب ألدنا DNA Template:

إن التطور في تقنيات الـ PCR وفرت طريقة سريعة وكفوءة للكشف عن وجود أو غياب تتابع معين من قواعد الدنا في نموذج ما مما جعل بالإمكان تحليل مئات النماذج مرة واحدة وخاصة عند توفير قالب الدنا الملائم الذي يمكن الحصول عليه من مصادر عديدة كالمكتبات الجينية Genomic libraries كما ويمكن الحصول على دنا الحيوانات والنباتات المختلفة وبشكل تجاري ومن مختلف الأنسجة والخلايا.

توجد عدة طرق لاستخلاص وتحضير الدنا، وهناك بعض المشاكل تبرز عند استخلاص الدنا للنباتات وهي تحلل الدنا DNA degradation لوجود السكريات المتعددة والمواد الفينولية وغيرها من المركبات الثانوية في النباتات والتي تعمل على تحطيم الدنا أو تثبيط عمل الأنزيمات القاطعة وأنزيمات بلمرة الدنا في المراحل اللاحقة كما تكون مستحضرات الدنا في هذه الحالة بلون بني بسبب أكسدة المواد الفينولية إلى مركبات الـ Quinone، إذ تعد هذه المواد عوامل مؤكسدة قوية تعمل على تحطيم الدنا والبروتين، لذلك لا يمكن الحصول في هذه الحالة على الدنا بوزن جزيئي عالٍ من النبات، لذلك يجب اختيار طريقة استخلاص مناسبة لتجنب المشاكل أعلاه واختصار خطوات العمل لتتوافق مع تقنيات الـ PCR السريعة والتي تتطلب خطوات أقل لتجنب التلوث الذي يعد من المشاكل الرئيسة التي تصاحب تلك التحليلات، وهناك عدة طرق اعتمدت للاستخلاص مستندة على المبدأ أعلاه.

وفي نخيل التمر لجأ العديد من الباحثين إلى استخلاص الدنا بطريقة Benito وآخرون (1993) والتي تعالج ومنذ الخطوة الأولى أغلب المشاكل التي تكتنف استخلاص الدنا النباتي فضلاً عن كونها طريقة فعالة لعزل الدنا من النبات والفطريات (Weigant وآخرون، 1993؛ والخطيب، 2000؛ وجبرائيل، 2001)، فيما لجأ آخرون إلى طريقة Aitchitt وآخرون (1993)، ومنهم (Trifi وآخرون، 2000؛ و Hussein وآخرون، 2002) في حين قام البعض الآخر باتباع طريقة Dellaporta وآخرون

(1983) ومنهم (Zehdi وآخرون, 2002) الذين قاموا باستخلاص الدنا لـ18 صنفاً في تونس و قام (Al-Khalifha و Askari, 2006) بعزل الدنا بهذه الطريقة لـ13 صنفاً تجارياً في السعودية.

و- جهاز المبلمر الحراري Thermocycler:

إن اكتشاف جهاز المبلمر الحراري أدى إلى تجاوز الكثير من المحددات المهمة لتقنية الـPCR عند بداية اكتشافها، إذ كانت تستعمل طريقة النقل اليدوي للنماذج بين الحمامات المائية للحصول على الدرجات الحرارية المطلوبة لكل دورة من دورات الـPCR، ويعد هذا الجهاز من أهم متطلبات تفاعل الـPCR، ولقد تم تطوير هذه الأجهزة من ناحية استيعابها لعدد أكبر من العينات تصل إلى حوالي 96 حفرة بدلاً من الأنابيب، وهذا يسرع في عملية تحضير النماذج وكذلك الكشف عن النواتج. وعلى العموم يؤثر الجهاز المستعمل في نتائج التفاعل والمدة المستغرقة في كل دورة وعدد الدورات والوقت المستغرق بين دورة وأخرى (Ramp time) والذي يفضل أن يكون أقصر ما يمكن، وذلك ليمنع استظالة البادئات المرتبطة بالمواقع الخطأ (Sambrook وآخرون, 1989).

2-4-2 مراحل التفاعل التضاعفي لسلسلة الدنا PCR stages:

لقد تم تحديد تفاعل الـ(PCR) بثلاث مراحل أو خطوات أساسية تتكرر في كل دورة من دورات التضاعف ولمدة زمنية محددة، وهذه المراحل هي:

1- المسخ Denaturation:

تعد هذه المرحلة الأولى والأساسية في تحضير دنا القالب مزدوج السلسلة Double strand للعمليات اللاحقة. ومن المعروف إن تلك العملية تحدث في الخلية In vivo أثناء الطور البيئي من الانقسام الخلوي وبواسطة أنزيمي الـDNA Helicase والـTopoisomerase وإذ أن ارتباط الشريطين يكون عن طريق الأواصر الهيدروجينية فقد وجد بان الحرارة العالية أيضاً تؤدي إلى فتح الشريطين، وقد استثمرت هذه الظاهرة في تحقيق المرحلة الأولى من الـPCR وذلك برفع درجة الحرارة لمحلول التفاعل والذي يحتوي على قالب الدنا من (92-95م) ولوقت يتراوح بين (3-5) دقائق للحصول على شريط مفرد ليعمل كقالب لبناء القطعة المكتملة لها وتعتمد عملية المسخ على عدد من العوامل كتنوع ومصدر دنا القالب ونوع الأنزيم المستخدم (Fincham, 1983؛ Cha و Thilly, 1993).

2- مرحلة ارتباط البادئ Primer annealing:

وهي المرحلة التي تأتي بعد مرحلة المسخ مباشرة، إذ يتم فيها ارتباط البادئات مع التتابعات من القواعد النتروجينية المكمل لها في الشريط المفرد من الدنا القالب وذلك ببناء الأواصر الهيدروجينية بينهما. وتعتمد درجة الحرارة وطول الفترة الزمنية اللازمة لهذه المرحلة على العديد من العوامل التي تحدد كفاءتها، ومنها تركيز وطول البادئ ونسبة احتوائه على قواعد G+C، ويتم احتساب درجة الحرارة اللازمة للارتباط من خلال تطبيق إحدى المعادلات الحسابية الملائمة لطول البادئ وذلك لاستخراج الدرجة الحرارية الحقيقية لتفكك 50% منه Melting Temperature (Tm) والتي يمكن حسابها على وفق المعادلة الآتية:

$$Tm = \text{عدد قواعد } (T + A) \times 2 + \text{عدد قواعد } (C + G) \times 4$$

إلا أن هذه المعادلة تكون ملائمة للبادئات ذات التتابعات القصيرة دون 20 نيوكليوتيدة، أما البادئات التي يتراوح طولها من 20-30 نيوكليوتيدة فإن المعادلة الآتية تكون مناسبة لها:

$$\text{درجة الحرارة المثلى للالتحام} = 22 + 1.46 [(G + C) + (T + A) \times 2]$$

وهناك معادلات أخرى لأنواع أخرى من البادئات، إلا أن نتائج أغلب البحوث أشارت إلى أن المعادلة الأولى هي الأشمل مفضلاً عن 3-12 درجة حرارية إلى الناتج لتعطي درجة الحرارة المثلى للارتباط (Newton وGraham, 1997).

3- مرحلة الاستطالة Extension stage:

وهي المرحلة الأخيرة من تفاعل الـ PCR وتتضمن عملية اضافة الـ dNTPs إلى النهاية OH للبادئ عند منطقة ارتباطه بقالب الدنا لتكوين شريط دنا مكمل لذلك القالب من قبل أنزيم البلمرة، وأن أفضل درجة حرارية تتم فيها عملية الاستطالة وهي الدرجة الملائمة لإعطاء أعلى فعالية للأنزيم وهي 72م أما المدة اللازمة لذلك فتختلف حسب نوع المؤشرات المستخدمة والمؤشرات التي تعطي نواتج تضاعف كبيرة الحجم تحتاج إلى وقت أطول من تلك التي تعطي نواتج تضاعف قصيرة وذلك لقدرة أنزيم البلمرة المستخدم Taq DNA polymerase على بناء 35-100 نيوكليوتيدة في الثانية وعلى العموم تكون المدة اللازمة للاستطالة أطول (10 دقائق) في الدورة الأخيرة لتفاعلات الـ PCR وذلك لضمان استطالة جميع نواتج التفاعل (Williams وآخرون, 1990). وتجدر الإشارة إلى أن عدد الدورات المستخدمة في تفاعلات الـ PCR وهي 40 دورة كافية للحصول على عدد نسخ ملائمة للدنا

الهدف بحيث يمكن رؤيتها عند الكشف عنها باستخدام هلام الاكاروز، كما أن فعالية الأنزيم تقل بعد ذلك العدد من الدورات (Graham و Newton, 1997).

أما الكشف عن نواتج الـ PCR فيتم بعدة طرق أكثرها شيوعاً الهجرة الكهربية باستعمال هلام الاكاروز والتصبيغ باستخدام بروميد الايثيديوم والكشف باستخدام الأشعة فوق البنفسجية أو باستخدام هلام متعدد الاكريل أمايد والتصبيغ باستخدام نترات الفضة مع الكشف المباشر بالعين المجردة وأن هاتين الطريقتين تستغرقان عدة ساعات (Samrook وآخرون, 1989).

أهمية مؤشرات التفاعل التضاعفي لسلسلة الـ PCR وأنواعها:

تكمن أهمية تفاعل الـ PCR بتفردتها بعدة مميزات كالدقة والخصوصية والحساسية العالية في الكشف عن قطعة دنا معينة ضمن الآلاف من القطع، لذلك أصبحت لا يمكن الاستغناء عنها في دراسات الوراثة الجزيئية، فضلاً عن أنها طريقة عمل سهلة نسبياً وسريعة وخاصة عند الاحتياج لتحليل عينات عديدة. لذلك فقد أصبح لهذا التفاعل تطبيقات واسعة منها دراسة التنوع الوراثي وإيجاد البصمة الوراثية وكذلك في مجال التربية والتحسين للحيوانات والنباتات الاقتصادية إذ استخدمت هذه التقنية لتسهيل نتائج التضريب والتهجين عند محاولة استنباط أصناف جديدة (Kahl و Winter, 1995؛ و Longridge وآخرون, 1996)، وكذلك استخدمت في مجال تشخيص الأمراض المختلفة كالأمراض الوراثة والوبائية وذلك بالاستناد إلى المبادئ الأساسية لهذه التفاعلات. وتجري حالياً باستخدام تقنية الـ PCR تشخيص الإصابات الفيروسية للإنسان، كفيروس التهاب الكبد والأنفلونزا والحصبة وفيروسات نقص المناعة المكتسبة الإيدز (HIV)، وفيروسات أنفلونزا الطيور مثل الفايروس (H5N1)، والأمراض السرطانية (Ou وآخرون, 1988؛ و Escaich وآخرون, 1991؛ و Trani وآخرون, 2006)، كذلك أصبحت من التقانات التي يعتمد عليها في تحديد الأبوة الشرعية ومجال التحقيق الجنائي والطب العدلي (Forensic medicine) (Johnson و Raven, 1996). مما تقدم تظهر الأهمية الكبيرة لهذه التقنية واستخداماتها الواسعة مما دعا الباحثين إلى العمل الدؤوب والمستمر لإيجاد أنواع جديدة من مؤشرات الدنا المعتمدة على هذه التقنية فضلاً عن العدد الكبير الذي تحقق منها وقد قام Karp وآخرون (1997) بتقسيم مؤشرات الدنا المعتمدة على الـ PCR إلى قسمين رئيسيين هما:

2-4-3 أنواع المؤشرات حسب موقعها على المجين:

2-4-3-1 المؤشرات التي تستهدف مواقع متعددة من المجين

Multilocus Profiling Techniques PCR- based markers

وهذه تشمل:

أ- المؤشرات التي تستخدم بادئات عشوائية تماماً كمؤشرات نسق النواتج المتضاعفة المتعددة العشوائية (MAAP Multiple Arbitrary Amplicon Profiling) تشمل بدورها مؤشرات التفاعل العشوائي متعددة الاشكال لسلسلة الدنا (Randomly Amplified Polymorphic DNA) (Caetano-Anolles وآخرون، 1991) والتفاعل العشوائي لتسلسل الدنا أو ال (Arbitrary Primed PCR)، وتمتاز بكونها تحتاج إلى بادئات مشعة بالنظائر، ويتم الكشف عن النواتج المتضاعفة باستخدام هلام متعدد الاكريلامايد واستخدمت هذه المؤشرات في دراسة العلاقة الوراثية بين الانواع النباتية وبصمة الدنا المتضاعفة (DNA Amplification Fingerprinting) وهي تختلف عن المؤشرات السابقة في ظروف التفاعل وطريقة فصل النواتج المتضاعفة والتي تتم باستخدام هلام متعدد الاكريلامايد وطريقة الكشف المعتمدة على صبغة نترات الفضة الحساسة للكشف عن تركيز الدنا الذي يصل إلى البيكوغرام.

ب- المؤشرات التي تستخدم فيها بادئات شبه عشوائية Semi-arbitrary Primers كمؤشرات تباين أطوال قطع الدنا المتضاعفة AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) (Vos وآخرون، 1995).

ج- المؤشرات التي تستخدم فيها بادئات متخصصة كمواقع محددة متوزعة داخل المجين كـ (Alu- Sinnett وآخرون، 1990)، ومؤشرات التتابعات القصيرة المتكررة Simple PCR (Weising وآخرون، 1998).

2-3-4-2 المؤشرات التي تستهدف موقع محدد معروف التسلسل

Sequence Targeted and Single Locus PCR Marker

إن تطبيق هذا النوع يحتاج إلى معرفة تسلسل موقع الدنا الهدف الذي ليس بالضرورة أن يكون في النواة، بل قد يكون في الماييتوكونديريا أو الكلوروبلاست في الخلايا النباتية والحيوانية، ومن الأمثلة على هذا النوع من المؤشرات:

Ribosomal Gene (Henry و Ko، 1996) Alpha – Amylase Gene Analysis
Analysis (Storage protein analysis).

4-4-2 مؤشر التضاعف العشوائي المتعدد الاشكال لسلسلة الدنا

Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD)

هي تقانة حديثة نسبياً بدأ العمل بها مطلع التسعينات من القرن المنصرم (Williams وآخرون، 1990). تسمح بمسح كامل الهيئة للكرموسوم الكائن عشوائياً للكشف عن أي تغيرات وراثية في مادته الوراثية.

يستعمل في هذه التقانة بادئ مؤلف من عشرة قواعد نتروجينية (ذات تتابعات عشوائية لكن غالباً ما تحتوي على GC بنسبة 50% على الأقل). لا يقتصر استخدام هذه التقانة على بادئ واحد معين إنما يُستعمل فيها عدة مئات من البوادي يرمز لكل منها بأحد الأحرف الإنكليزية الستة والعشرين وعن يمينه رقم، ومجال هذا الرقم هو من (01←20).

وبالتالي يكون عدد البادئات المستخدمة في هذه التقنية هو: (Primers 520 = 26×20) وكلها معروفة التسلسل النكليوتيدي. تبنت شركة (Operon) الأمريكية حق بيع هذه البرايمرات، لذا أصبحت هذه البرايمرات تعرف عالمياً باسم Operon Primers. يتراوح عدد القواعد النتروجينية في البادئات العشوائية المستخدمة في تقانة الـ RAPD عادة بين 9 و 12 قاعدة نتروجينية، ومحتواها من الـ G,C بين 50-80%، وهي تتابعات مصممة بشكل عشوائي، إلا أنها لا تحتوي على تتابعات متممة لبعضها.

باستخدام تفاعل الـ (PCR)، ولدى تطبيقه على تقانة RAPD. يتم استخدام بادئ واحد فقط لوسط التفاعل على أن يتم استخدام أكثر من بادئ بإعادة التجربة في كل مرة وباستخدام نفس البرنامج في جهاز PCR لكن مع نبات آخر من نفس النوع، فإذا لاحظنا أي تغيير في تواجد القطع الناتجة عن عينة النبات الأول مع القطع الناتجة عن عينة النبات الثاني فهذا يدل على وجود اختلافات وراثية بين العينتين.

مما سبق نستنتج أن كثافة القطع على هلام الأكاروز غير مهم إنما تبرز الأهمية في هذه التقنية من وجود أو غياب هذه القطعة. تتميز هذه التقنية بمميزات عدة ومنها:

ومن أهم المميزات التي وضحتها Mburu و Hanotte (2005):

1. تقانة سهلة سريعة.
2. كميات قليلة من الـ DNA 5-50 نانو غرام فقط.
3. لا حاجة لمعلومات مسبقة عن الجينوم المدروس.

- 4 تكاليفها زهيدة.
5. مفيد في دراسة المجموعات ذات الأعداد الكبيرة من الأفراد.
6. قدرة هذه المؤشرات في الكشف عن مواقع متعددة من المجين بسبب ارتباط البادئات بأكثر من موقع بالإضافة إلى توزيع تلك المواقع بانتظام على طول المجين.
7. البادئات المستخدمة فيها عامة Universal حيث يمكن استخدام البادئ الواحد مع مدى واسع من الكائنات الحية وبالتالي امكانية تطبيق هذه المؤشرات على مدى واسع من الأنواع.
8. لا يتطلب استخدامه وجود مواد مشعة.

فضلا عن مساوى عديدة ومنها

1. الحزم ذات الوزن الجزيئي الواحد قد لا تكون متماثلة.
 2. تكشف عن وجود السيادة أو عدم وجودها فقط اي انها تميز بين النمطين الوراثيين (aa و AA) وتعجز عن التميز بين النمطين (Aa و AA).
 3. نتائجها غير قابلة للتكرار
- ورغم ذلك فان لهذه التقنية تطبيقات عديدة وهي:

1. دراسة القرابة الوراثية.
2. التباينات الوراثية بين وضمن النوع والعشيرة.
3. خرائط الارتباط الوراثي.

أجرى El-Kharbotly (1998) بحثاً لرسم الخارطة الجينية لنخيل التمر باستخدام مؤشرات الدنا AFLP إذ استخلص دنا بادرات النخيل وعزل قطعة دنا متوقع أن تحدد جنس النخيل المذكور.

قامت الخطيب (2000) باستخدام مؤشرات التضاعف العشوائي المتعدد الأشكال لسلسلة الدنا RAPD في تمييز جنس وأصناف ذكور نخيل التمر في محاولة لإيجاد مؤشرات وراثية مرتبطة بتحديد الجنس في أشجار نخيل التمر، كذلك الكشف عن التباينات الوراثية لاستخدامها كمؤشرات في التمييز بين أصناف ذكور نخيل التمر الشائعة في العراق والبعد والعلاقة الوراثية بينها، إذ أجريت الدراسة على ثلاثة أصناف مؤنثة هي برحي وخضراوي ومكتوم وتسعة أصناف مذكرة هي غنامي أحمر وغنامي أخضر وغلامي وذكر عادي وخكري وسميسي ووردي وكريطلي وورصافي باستخدام

30 بادئ RAPD انتخبت 11 منها دلت نتائجها على وجود تباينات عديدة وواضحة، وتم الحصول على عدد من الحزم تراوحت 5-12 حزمة، أظهر البادئان OPC08 و OPI14 حزمتين مميزة (Polymorphic) في جميع الذكور وفقدت في أصناف الإناث أن العلاقة بين ظهور هاتين الحزمتين والتعبير الجنسي قد يعد مؤشراً وراثياً مرتبطاً بالجنس في نخيل التمر.

أشار الباحثان Al-Khalifah و Al-Askari (2006) إلى أن مؤشرات الـ RAPD تعد وسيلة فعالة في الكشف المبكر عن التغيرات الوراثية التي تحصل في النباتات المنتجة من زراعة الأنسجة النباتية وذلك في دراسة لثلاث أصناف من نخيل التمر السعودية.

أجرت Younis وآخرون (2008) بحثهم على سبعة من أصناف نخيل التمر الجافة المصرية أربعة أصناف منها مؤنثة وهي ساكوتي وبرتمودا وملكابي وداجانا وثلاثة أصناف أخرى مذكرة وهي ساكوتي وملكابي وداجانا باستخدام مؤشر التضاعف العشوائي متعدد الأشكال لسلسلة الدنا RAPD إذ قاموا باختبار 30 بادئ مستخدمة على نباتات أخرى بنجاح ثم تم اختيار سبعة بادئات وهي A10, A12, A13, D5, D7, D10, D20 تم الحصول على 109 حزمة متضاعفة لهذه الأصناف السبعة 76 حزمة كانت متباينة (70%)، وأعلى نسبة تضاعف للحزم كانت للصف المذكر ملكابي 75 حزمة، بينما أقل حزم وجدت في صنف دجانا المؤنث حيث كان عدد الحزم 66 حزمة، وأعلى عدد حزم تكونت عند استخدام برايمر D5 فقد كانت 24 حزمة، بينما أقل حزم تكونت عند استخدام البادئ D20 إذ بلغت 6 حزم. إن وجود 25 حزمة متضخمة كان كاف لاستخدامه لتحديد الجنس، إذ عدّ ظهور 13 حزمة مميزة مؤشراً إيجابياً، بينما احتسب غياب 12 حزمة كمؤشر سلبي. بالنسبة للأصناف أعلى مؤشر لتحديد الجنس احتسب لصف داجانا 7 نقاط، بينما أقل مؤشر كان للصف المذكر ساكوتي وللصف المؤنث برتمودا، إذ حصل كل منهما على نقطة واحدة. لقد أظهرت البادئات A10, A12, D10 حزماً مميزة بأوزان 490، 750، 800 زوج قاعدي على التتابع في الأصناف المؤنثة، ولم تظهر في الأصناف المذكرة، بينما البادئان A12, D10 ظهرا حزماً مميزة بأوزان 370، 675 زوج قاعدي على التتابع ظهرت في الأصناف المذكرة الثلاث دون المؤنثة.

2-4-5 تفاعل البلمرة المتسلسل المتشعب Nested Polymerase Chain Reaction:

تفاعل البلمرة المتشعب: هو سلسلة تفاعل بلمرة محور إذ يستخدم البادئ للمرة الأولى وبعد الحصول على الحزمة الهدف تقطع الحزمة من الهلام وتعزل وتنقى ويعاد عمل بلمرة لها مع البادئ نفسه، أي إجراء عملية بلمرة للبادئ لمرة ثانية.

الهدف من هذه العملية تقليل الحزم غير المتخصصة الناتجة من عملية البلمرة الأولى وتستخدم هذه الطريقة لغرض معرفة تسلسلات القواعد النتروجينية Sequencing ولغرض التحليل الجيني Genetic analysis وهذه الطريقة هي مفتاح للأبحاث الجينية المخبرية والتي تسير سوية مع أبحاث البصمة الوراثية Fingerprinting لأبحاث الدنا الشرعية DNA Forensics والأبحاث البشرية الجينية Human Geneticases (Becker و Darai، 1992).

2-4-6 مؤشرات التتابعات المتباينة المضاعفة المنشطرة

Polymorphic Sequence (CAPS) Cleaved Amplified

هذه المؤشرات هي خليط من PCR و RFLP وتسمى عادة PCR-RFLP هذه التقنية تتضمن تضخيم الدنا الهدف باستخدام جهاز PCR يتبعها هضم بواسطة أنزيمات التقيد. ومن هنا فإن مؤشرات CAPS تعتمد على الاختلاف في أنماط هضم أنزيمات التقطيع لنواتج تضاعف PCR الناتجة بفعل بلمرة القواعد النتروجينية بين العينات. الخطوة الحرجة المهمة في منهجية مؤشر CAPS هي القطع الأنزيمي لنواتج البلمرة ، وأخيرا إعداد أو توزيع المواقع المتعددة الأشكال.

لمؤشرات الـ CAPS العديد من المزايا:

1. بما أن تحضير القطع المتباينة الأطوال يعتمد في هذه المؤشرات على تضخيم القطع بتقانة PCR لذلك فهي سهلة جداً ولا تحتاج إلى وقت طويل مقارنة بتحليل أنواع أخرى من المؤشرات التي تتطلب التهجين من خلال وصمة سوزن.
2. بادئات CAPS المشتقة من مناطق واسمات تسلسلات التعبير ESTs هي أكثر فائدة كمؤشر وراثي يستخدم في دراسة رسم الخرائط المقارن comparative mapping بالمقارنة مع المؤشرات المأخوذة من تتابعات غير فعالة مثل مؤشرات التتابعات الترادفية الجينومية.
3. إن مؤشرات الـ CAPS تتوارث تبعا للسيادة المشتركة. وعلى الرغم من ذلك فإن قابلية الـ CAPS على كشف التعدد الشكلي للـ DNA ليست فعالة كما في الـ SSR والـ AFLP بسبب أن تأثير تغيير النيوكليوتيدات لمواقع الهضم الخاصة بأنزيمات التقيد تعد أساسيات لكشف تعدد أشكال الـ DNA بواسطة الـ CAPS. بمعنى آخر فإن عمل مؤشرات الـ CAPS يكون فقط في حالة الطفرات التي تحدث في المواقع التعريفية لأنزيمات التقيد المستعملة طور بعض الباحثين مؤشرات بديلة تسمى Derived CAPS (d CAPS) التي تتجاوز المعوقات والمشاكل الموجودة في الـ CAPS بواسطة

تكوين حالة عدم وجود التتابع في بادئات PCR والتي تستعمل في تخليق التعدد الشكلي المعتمد على الطفرات المطلوبة.

بعد بلمرة الدنا إذا كانت النواتج monomorphic أي لا توجد تباينات فتستخدم تقانة CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence) بعد الحصول على الدنا بعد إجراء تفاعل البلمرة يقطع الدنا بأحد أنزيمات القطع بعدها يتم الحصول على تباينات جديدة (قطع جديدة).

أوضحت Al-Mahmoud وآخرون (2012) أن تفاعل البلمرة PCR هي الطريقة الوحيدة والسريعة والحساسة لفحص منطقة الارتباط الجنسي، وأن تجربة (CAPS) التي قاموا بها لربما أصبحت متخصصة بصورة كافية لتحديد جنس نخلة التمر، وذلك أولاً باستخدام بادئات RAPD لتضخيم الدنا ثم استخدام أنزيمات القطع (هضم) *RsaI* ، *Hpa II* ، *Bcl* و رحلت النواتج ترحيلاً كهربائياً، وفي تجربة ثانية صمموا طريقة أخرى باستخدام خطوة واحدة من تفاعل PCR فقط بدون الهضم بالأنزيمات اعتماداً على صفة التباين الوراثي العالي في منطقة الارتباط الجنسي، وذلك لتقليل خطوات العمل وتسهيله، أي عدم استخدام الهضم بالأنزيم وذلك بتصميم بادئات ترتبط لتعطي حزم ذات التعدد الشكلي (مميزة).

2-4-7 تمييز جنس نخيل التمر باستخدام مؤشر التتابعات الترادفية القصيرة

Microsatellite or Simple sequence Repeats markers (SSRs):

وتسمى مؤشرات التتابعات البسيطة المكررة وهي إحدى مؤشرات الدنا الحديثة والمتمثلة بإمكانية الكشف عن التباينات لمناطق من الدنا لها تتابعات متكررة ترادفياً Sequence Repeats Simple يتراوح طولها من (1-5) زوج قاعدي، وتنتشر على معظم مناطق مجين الكائنات وتحدد مثل هذه المناطق من المكررات حافات أو جوانب Flanks ذات تتابعات فريدة Unique Sequence لكل منطقة مكررات، وكذلك تكون مميزة للنوع، لذا تصمم بادئات تفاعلات PCR بهذا النوع من المؤشرات لتكون متوافقة مع هذه الجوانب. ومن مميزات هذه الطريقة بالمقارنة مع المؤشرات AFLP هو أنها تركز على إظهار التباينات الوراثية في المناطق الجانبية لمواقع المكررات الترادفية الموجودة بصورة طبيعية في مجين الكائن، بينما في مؤشرات AFLP يقوم الباحث ببناء تلك الجوانب (Gupta وآخرون، 1996). وفي مجال نخيل التمر استخدمت مؤشرات Repeat Simple Sequence Inter في تحديد العلاقات الوراثية بين 18 صنفاً من الأصناف التونسية وذلك باستخدام بادئات مناسبة تكون مكتملة للتتابعات المتكررة، وقد تم الحصول على العديد من الحزم المتباينة تم من خلالها تقدير البعد الوراثي بين هذه الأصناف (Zehdi وآخرون، 2002). وفي تونس أيضاً قام الباحثان Salah

و Helaily (2003) في تحليل التباين الوراثي لـ 15 صنفاً من أصناف نخيل التمر مستخدمين مؤشرات الـ ISSR إذ تم اعتماد أربع بادئات في تفاعل الـ PCR وبواسطة التحليل التجمياعي، ثم تقسيم هذه الأصناف إلى مجموعتين. وأكدت الدراسة كفاءة هذا النوع من المؤشرات في التمييز أو التشخيص بين الأصناف المدروسة بسبب التكرار العالي للتتابعات المتكررة الترادفية الثنائية والثلاثية في مجين نخلة التمر.

مؤشرات SSR وهي مؤشرات تستخدم بادئات متخصصة كمواقع محددة متوزعة داخل المجين ذات تتابعات قصيرة متكررة SSR، وهي تقنية أكتشفت وطورت من قبل (Rantz و Tautz، 1984؛ و Litt و Luty، 1989). تعد التتابعات الترادفية القصيرة Microsatellite إحدى المؤشرات الجزيئية Molecular markers المستخدمة في البيولوجيا الجزيئية لدراسة التباينات الوراثية Polymorphism. إن فحص المايكروستلايت يظهر تمايز polymorphism (متعدد الأشكال) عالٍ وينتج أعداداً كبيرة من الاليلات. ولهذه التقنية عدة مصطلحات:

• (SSR) Simple Sequence Repeats

• (SSLP) Simple Sequence Length Polymorphism

• (STMS) Simple Tagged Microsatellite

تسمى أيضاً Microsatellites وهي إحدى مؤشرات الدنا الحديثة والمتمثلة بإمكانية الكشف عن التباينات لمناطق من الدنا لها تتابعات متكررة ترادفياً Simple Sequence Repeats يتراوح طولها من (1-5) زوج قاعدي وتنتشر على معظم مناطق مجين الكائنات وتحدد مثل هذه المناطق من المكررات حافات أو جوانب Flanks ذات تتابعات فريدة Unique Sequence لكل منطقة مكررات، وكذلك تكون مميزة للنوع لذا تصمم بادئات تفاعلات الـ PCR بهذا النوع من المؤشرات لتكون متوافقة مع هذه الجوانب.

وتكمن قوة هذه التقنية كمؤشر جزيئي من خلال:

1- كثرة تكرارها في الجينوم حيث وجد 4262 تسلسل microsatellite في جينوم سمك القط الذي يبلغ 11.4 مليون bp (أي microsatellatie واحد كل 2.67 Kbp).

2- توزيعها على الكروموسومات في المناطق غير مشفرة (غالباً في التيلومير والسينترومير، والانترونات، وحتى داخل المناطق المشفرة مثل تكرار CAG الذي يعطي بولي كلوتامين الذي يسبب التخلف العقلي).

3- ذات حجم موقع صغير لا يتجاوز بضع مئات يمكن الكشف عنها بسهولة بتفاعل ال-PCR.

4- ذات طبيعة مشتركة السيادة.

5- تعطي مستوى مرتفع من التعدد الشكلي.

6- سهولة التكاثر أو التناسل

يعتمد التعدد الشكلي للمicrosatellite على اختلاف الحجم الذي يسببه اختلاف عدد الوحدات التكرارية بين الأليلات في الموقع الفريد. وتصل نسبة الطفرات في مواقع الmicrosatellite إلى 2-10 (Ellegren، 2000) وهي أكبر نسبة من نسب الطفرات في المواقع غير التكرارية.

2-4-7-1 أنواع مؤشرات التتابعات الترادفية القصيرة (SSRs)

تتواجد وتتوزع مؤشرات التتابعات الترادفية القصيرة (SSRs) بكثرة وبشكل عشوائي في مجين الفرد وقد تكون في المنطقة المشفرة أو غير المشفرة في مجينات حقيقية النوى، وقسم الخولاني (2008) مؤشرات SSR إلى نوعين:

أ- EST-SSR - وهي عبارة عن مناطق SSR التي تتواجد ضمن مواقع المورثات في المناطق المشفرة (Exons) التي تنسخ إلى mRNA ثم تترجم إلى بروتينات (المناطق المشفرة من المورثة).

ب- g-SSR - عبارة عن مقاطع SSR التي تتواجد في المناطق غير المشفرة حيث تتواجد مؤشرات SSR ضمن المناطق الفاصلة بين المورثات على المجين. طرق فصل نواتج ال-PCR والتظهير:

1. الطريقة الأولى: باستخدام هلام الاكروز وذلك يحدث بشروط خاصة في فصل وتصيبغ حزم ال-SSR وهي:

a. أقل فرق بين الأليلات أكثر من 10 زوج قاعدي.

b. طول القطعة المضخمة لا يقل عن (100-500) زوج قاعدي.

2. الطريقة الثانية: استخدام هلام متعدد أكرل امايد عند الترحيل الكهربائي بدلاً من هلام الاكاروز لقدرتها العالية على التمييز، إذ ممكن أن تظهر الاختلاف في زوج قاعدي واحد.

3. الطريقة الثالثة: استخدام جهاز Sequencer (slab gel) أو نظام الأنابيب الشعرية capillaries لفصل قطع DNA، البادئات المستخدمة موسومة كيميائياً ويتوهج بعدة ألوان أخضر أو أصفر وفي هذه الحالة يمكن استخدام 3 بادئات كلٍ منها معلمة بلون مختلف.

محاسن ومميزات الـ SSR:

- 1- تحتاج إلى كمية قليلة من الـ (DNA) إذ تُعد الكمية (10←100 ng) كافية لتطبيق تفاعل الـ (PCR) في تقانة الـ (Microsatellite).
- 2- إن التسلسل الـ (Microsatellite) متوفر بشكل كبير في جينوم جميع الكائنات تقريباً.
- 3- تتوزع بشكل عشوائي على الجينوم .
- 4- غالباً ما يكون هناك تباين وراثي (Polymorphism) في مناطق الـ (Microsatellite)، لذا فبإمكاننا استخدام هذه التقانة كمؤشر جزيئي للتمييز بين الأصناف المختلفة وراثياً، فإذا استخدمنا مثلاً (Primers 100) للتمييز بين نوعين فإنه قد تصل درجة الاختلاف فيما بينها (فيما تظهره لنا هذه التقانة) لحوالي (60%).
- 5- تقانة دقيقة جداً لدرجة أن البادئ المصمم لدينا لموقع محدد قد لا يظهر هذا الموقع إلا مرة واحدة على طول الجينوم.
- 6- يمكن اعتبار هذه التقانة بأنها (Co-dominante) أي أنها قادرة على الكشف عن السيادة المشتركة (كلا الأليلين).
- 7- يُمكن تكرارها في أي وقت ومكان مع احتفاظها بنفس النتائج خلافاً لتقانة الـ (RAPD). (Barone وآخرون، 2000؛ Erhard و Weimann، 2007)

مساوئ هذه التقنية هي:

- 1- تكاليف العمل بها عالية فالعمل في هذه التقانة يُحتم علينا دراسة النوع المُستخدم في هذه التقانة دراسة كاملة.
 - 2- تحتاج هذه التقانة إلى استخدام بادئين (Two Primer) وذلك لكل موقع ترادفي وهذا الشيء متعب ومُكلف أيضاً.
- قام Zehdi وآخرون (2002) ببحث على 45 صنف من نخيل التمر التونسية باستخدام 14 موقع مايكروستلايت حصل على 7.14 الليل لكل موقع، وقام الباحثان El-Shibli و Korperlainen

(2009) بتجربة على 68 صنفاً من نخيل التمر السوداني والمغربي وباستخدام 16 موقع مايكروستلايت، فوجد الباحثان 21.4 اليبلا لكل موقع.

كما أجرى Ahmed و Al-Qaradawi (2009) بحثاً لتمييز جنس نخيل التمر باستخدام مؤشر مايكروستلايت يحتوي على التسلسلات القصيرة المتكررة باستخدام بادئات 44 mPdCIR0 و 32 mPdCIR0 و mPdCIR078 وكان الوزن الجزيئي للحزم 100-300 . أظهر البادئ mPdCIR078 مدى وزن جزيئي 118-152.

أجرى الباحثان Elmeer و (Mattat، 2012) بحثاً لتمييز جنس نخيل التمر باستخدام مؤشر التتابعات القصيرة المتكررة (SSR) Simple Sequence Repeats لتمييز جنس نخلة التمر، استخدم 14 زوج من بادئات SSR ولأصناف بلغ عددها 34 صنفاً مزروعة في قطر، حدد 254 موقع مايكروستلايت وبمعدل 8.86 اليبلا لكل موقع. حدد 22 موقعاً منها لتمييز 9 عينات مذكرة من 12 عينة مذكرة، أي بنسبة 75%، كذلك حددت الاليلات المختلطة heterozygous ذات وزن جزيئي 160-190 الناتجة من استخدام البادئ mPdCIR048 عادت للظهور 4 مرات خاصة في 12 عينة ذكور ولم تظهر ولا مرة في 117 عينة أناث لنخلة التمر.

مبادئ تحليل المكون الرئيسي (Principle Coordinate Analysis PCoA) لأثنى عشر عينة مذكرة و لسبعة عينات مؤنثة من نخيل التمر أوضحت مجموعتين مستقلتين من الذكور والإناث، وكانت قيمة 0.65 Polymorphic Information Content Analysis (PIC) وعند استخدام البادئ mPdCIR0 35 والبادئ mPdCIR0 44 نتجت حزمتين في عينتين مذكرتين وبوزن جزيئي 288-302. وظهر الاليلين بوزن جزيئي 122-140 في 12 عينة مذكرة ولم يظهر في أي من العينات المؤنثة ال117 وبلغت قيمة (PIC) 0.85 .

5-2 المؤشرات الكيميائية markers Chemical

هنالك بعض المؤشرات الكيميائية التي يمكن استخدامها في تحديد جنس نخيل التمر ومنها:

2-5-1 محتوى البروتين:

تؤلف البروتينات حوالي 50% من الوزن الجاف للخلية وهي مواد عضوية ذات أوزان جزيئية عالية تتصف بعدم نفاذها خلال الأغشية النفوذية (Permeable membrane), وتصنع خلايا النبات البروتينات وذلك من خلال أكسدة الكربوهيدرات بعملية التنفس (الفليح, 1988).

وجد العاني (1998) باستخدام الهجرة الكهربائية للبروتينات على الهلام متعدد الاكريل أمايد لأربعة أصناف أنثوية (الزهدي والخستاوي والبرحي والبريم) ومن الفسائل والبادرات النامية من البذور بأن هنالك اختلافات في التراكيب الوراثية للأبناء من خلال توزيع الأنماط البروتينية للحزم المتكونة على الهلام لجميع الأصناف المدروسة سواء كانت نباتات بالغة أو فسائل أو بادرات. وجد El-Yazal (2008) في دراسة على أشجار نخيل التمر عمرها ثماني سنوات صنف (سيوي) في محاولة لتمييز الجنس من خلال تقدير المحتوى البروتيني للأشجار المؤنثة والمذكرة أن هنالك بعض الاختلافات في محتوى البروتينات بين الفسائل الأنثوية والمذكرة حيث بلغ في أوراق الفسائل الأنثوية 10.31 ملغم/100 غم من الوزن الطري وتركيزه في أوراق الفسائل الذكرية 7.01 ملغم/100 غم من الوزن الطري ، اي ان تركيز البروتين في الاوراق الفسائل المؤنثة أعلى منه في الأوراق الفسائل المذكرة.

قامت Dkhil-Dakhlaoui وآخرون (2013) بدراسة لرسم الخارطة البروتينية وتمييز جنس نخيل التمر صنف دجلة نور اذ تم فصل وتمييز البروتينات الموجودة في عينات الأورق بالترحيل الكهربائي باستخدام هلام متعدد الاكريل امايد وجهاز المطياف الضوئي الكتلي Mass Spectrometry إذ تبين أن عدد المواقع الكلية التي ظهرت كانت 284 موقعاً وأن 158 موقعا منها شخصت، أي بمعدل نجاح 55.6% وتحديد 126 بروتين فريد كما وجد موقع واحد (spot) متخصص بالجنس، وبذلك أصبح بالإمكان تمييز جنس نخيل التمر بواسطة فحص ذلك البروتين.

2-5-2 محتوى البرولين:

البرولين هو حامض أميني يوجد في الخلية النباتية وتزداد نسبته عند تعرض النبات للإجهاد. بين Helail (2000) في دراسة لمحاولة تمييز جنس نخيل التمر على اشجار عمرها أربع سنوات صنف زغلول لتمييز جنس نخيل التمر أن محتوى البرولين في أوراق الأشجار المؤنثة بلغ 48.3 غم/100 غم من الوزن الرطب وتركيزه في المذكرة بلغ 39.95 غم/100 غم من الوزن الرطب، أي أن تركيز البرولين في أوراق الفسائل المؤنثة أعلى منه في أوراق الفسائل المذكرة، وفي دراسة قام بها El-Yazal (2008) على أشجار نخيل التمر صنف سيوي عمرها ثماني سنوات لتمييز جنس

نخيل التمر من خلال تقدير محتوى البرولين للأشجار المؤنثة والمذكرة، فوجد أن هنالك بعض الاختلافات بين الفسائل الأنثوية والذكورية، إذ بلغ محتوى البرولين في أوراق الفسائل الأنثوية 7.75 ملغم/100 غم من الوزن الطري، ومحتواه في أوراق الفسائل الذكورية بلغ 8.78 ملغم/100 غم من الوزن الطري أي أن محتوى البرولين في أوراق الفسائل المذكرة أعلى منه في أوراق الفسائل في المؤنثة.

2-5-3 محتوى البيروكسيديز:

أجرى Helail (2000) بحثاً على أشجار نخيل التمر بعمر أربع سنوات صنف زغول لتميز الجنس فيها، فوجد أن محتوى أنزيم البيروكسيديز في أوراق الأشجار المؤنثة قد بلغ 8.06 ملغم/100 غم من الوزن الطري ومحتوى أوراق الأشجار المذكرة بلغ 9.20 ملغم /100 غم الوزن الطري، أي أن محتوى البيروكسيديز في أوراق الفسائل المذكرة أعلى منه في أوراق الفسائل المؤنثة.

3- المواد وطرائق العمل:

نفذت مراحل الدراسة في مختبرات وحدة أبحاث النخيل والتمور في كلية الزراعة / جامعة بغداد للمدة من 2012/1/12 ولغاية 2014/4/1 والتي تضمنت اتباع الطرائق التقليدية للتمييز المبكر لجنس النخيل واستخلاص الدنا من العينات الورقية للأشجار واستخدام تقانة مؤشرات الدنا الجزيئية وتشمل تقانة تحليل انعزال المجاميع (BSA) Bulk Segregant Analysis واستخدام مؤشرات التضاعف العشوائي المتعدد الأشكال لسلسلة الدنا Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) فيما نفذت التجارب الأخرى في قسم التقانات الأحيائية /كلية الزراعة/ جامعة باليرمو في إيطاليا وللمدة من 2014/11/3 ولغاية 2015/3/28 والتي تضمنت استخلاص الدنا من البادرات، واستخدام مؤشرات التتابعات المتباينة المضاعفة المنشطرة Cleaved Amplified Polymorphic Sequence (CAPS) وتقانة التتابعات الترادفية القصيرة Simple Sequences Repeat (SSR) وتقانة البلمرة المتشعبة (المعشعش) (Nested PCR)، فضلاً عن إجراء التحاليل الكيميائية للعينات المأخوذة من البادرات مثل تحليل محتوى البروتين وتحليل البرولين وأنزيم البيروكسيديز.

3-1 استخدام الطرائق التقليدية للتمييز المبكر لجنس النخيل

3-1-1 اختيار الأشجار وإجراء عملية التلقيح:

لقت أشجار النخيل المؤنثة صنف البرحي باستعمال حبوب لقاح الغنامي الأخضر نظراً لوفرة حبوب لقاحه (الهيبي وآخرون، 1975) وتميزها بنسبة إنباتها العالية (Mohammed, 1978) وحيويتها العالية إذ بلغت 83% (الراجحي، 1989). أجريت عملية التلقيح في 2013/4/12 وغطيت الشماريخ الزهرية المؤنثة بأكياس عزل ورقية لمدة امتدت ثلاثة أسابيع بعد إتمام عملية التلقيح لضمان عدم حدوث الخلط بحبوب لقاح أخرى ورفعت بعد ذلك. جمعت الثمار الناضجة في 2013/10/15. رمز للصنف غنامي أخضر بالحرف G ورمز للصنف البرحي بالحرف B.

3-1-2 زراعة البذور وتهيئة البادرات:

بعد اكتمال نضج الثمار استخرجت منها البذور وغسلت بالماء المقطر، وغمرت بمحلول هيدروكسيد الصوديوم بتركيز 10 مولار لمدة دقيقتين تبعاً لما وصفه (Abdual-Wahab, 1976) ثم غسلت بماء حنفية وأصبحت جاهزة للزراعة، قسمت البذور إلى مجموعتين:

المجموعة الأولى: أخذت 500 بذرة ووضعت بأطباق زجاجية ومع قليل من الماء في الحاضنة على درجة حرارة 30 م°، بعد أسبوع بدأت البذور بالإنبات، وبعد أسبوعين بدأ الجنين النابت يتجه نحو اليمين أو نحو اليسار، عزلت هذه البذور النابتة وقسمت إلى مجموعتين هي: مجموعة بذور نابتة نحو اليمين، ومجموعة بذور نابتة نحو اليسار، وزرعت بأصص قطرها 7 سم حاوية على الزميح النهري والبتموس لاستخدامها في الدراسات اللاحقة.

المجموعة الثانية: 1- زرعت 500 بذرة مباشرة في أصص قطرها 7 سم تحتوي على خليط من الزميح النهري والبتموس، وتم تغطيتها بالجوت، ب- زرعت 500 بذرة أخرى في أصص لكن دون تغطية، بعد 4-5 أسابيع بدأت البادرات بالبروز وأظهرت البادرات الغير مغطاة تمايزاً مظهرياً حسب (شكل أوراقها) وقسمت إلى مجموعتين مجموعة بادرات شكل أوراقها مستقيم ومجموعة بادرات شكل أوراقها مقوس.

أعطيت المجاميع الأربعة للبادرات التي تم الحصول عليها رموزاً مختلفة، إذ رمز للبادرات التي اتجه إنبات بذورها نحو اليمين بالحرف R، والبادرات التي اتجه إنبات بذورها نحو اليسار بالحرف L، والبادرات التي كان شكل أوراقها مستقيماً بالحرف A والبادرات التي كان شكل أوراقها مقوساً بالحرف T.

2-3 استخدام مؤشرات الدنا في تمييز الجنس المبكر لنخيل التمر

1-2-3 جمع العينات النباتية من الأشجار البالغة :Collection of plant samples

جمعت العينات النباتية من الأشجار الذكرية والأنثوية، إذ جمعت عينات الأوراق (السعف) من أشجار الأصناف الذكرية السبعة : غنامي أحمر وغنامي أخضر وخكري كريطلي وخكري سميسمي وخكري عادي ورصاصي وغلامي. وكذلك من الأصناف الأنثوية السبعة: برحي وتبرزل ومكتوم واشرسى وخستاوي واسطة عمران وخضراوي، وذلك من محطة البستنة التابعة لدائرة البستنة والغابات/ وزارة الزراعة عدا الصنف الذكرى رصاصي الذي أخذت عيناته من أشجار مزروعة في بستان النخيل التابع لقسم البستنة وهندسة الحدائق في كلية الزراعة/ جامعة بغداد في الموقع السابق (أبو غريب) أخذت العينات من الموقع القريب من قمة رأس النخلة مع مراعاة اختيار الأوراق الحديثة الغضة والخالية مظهرياً من الإصابات المرضية والحشرية. غلفت العينات برقائيق 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.

3-2-2 استخلاص الدنا من عينات الأشجار الذكرية والأنثوية DNA Extraction

عزلت المادة الوراثية (DNA) من جميع العينات المذكورة للأصناف الذكرية والأنثوية في الفقرة السابقة ووفقاً لطريقة Benito وآخرون (1993) مع إجراء بعض التعديلات عليها وكما هو موضح في الخطوات الآتية:

3-2-2-1 المحاليل المستخدمة

أ- محلول الاستخلاص الدارئ Extraction buffer:

حضر محلول استخلاص الأحماض النووية حسب التراكيز الآتية:

جدول (أ) محلول الاستخلاص الدارئ

| المادة | الاسم لانكليزي | التركيز |
|--|--|--------------|
| كلوريد الصوديوم | Sodium chloride NaCl | 1.4 مولر |
| ترس حامضي | Tris – HCl, pH 8 | 0.1 مولر |
| المادة المخليبية | Ethylendiaminetetraacetic acid(EDTA) | 20 مللي مولر |
| مادة ستايل ثلاثي مثيل بروميد الامونيوم | Cetyltrimethyl Ammonium Bromide (CTAB) | %2 |

استخدم الماء المقطر لتحضير المحلول وعقم بالموصدة.

ب- محلول الغسل Washing buffer: حضر 500 سم³ منه وحسب التراكيز الآتية وأكمل الحجم

بالماء المقطر:

جدول (ب) محلول الغسل

| المادة | الاسم | التركيز |
|----------------|------------------|--------------|
| كحول أثيلي | Ethanol | %76 |
| خلات الأمونيوم | Ammonium acetate | 10 مللي مولر |

ج- محلول الكلوروفورم/ كحول الايزوأميل: Chloroform / Isoamyl alcohol

Solution

وحضر هذا المحلول بنسبة 24 حجم من الكلوروفورم: حجم واحد من كحول الأيزوميل وكالاتي:

جدول (ج) محلول الكلوروفورم/ كحول الايزوأميل

| المادة | الأسم | الكمية |
|------------------|-----------------|---------------------|
| الكلوروفورم | Chloroform | 480 سم ³ |
| كحول الايزوأميلي | Isoamyl alcohol | 20 سم ³ |

حفظ هذا المحلول في قنينة معتمدة ومحكمة عند درجة حرارة 4 م.

د- محلول الإذابة TE buffer:

حضر المحلول بإذابة المواد الموضحة أدناه في الماء المقطر ثم يعقم بالموصدة.

جدول (د) محلول الإذابة

| المادة | الأسم | التركيز |
|------------------|--|--------------|
| ترس قاعدي | Tris – base | 10 مللي مولر |
| المادة المخليبية | Ethylendiaminetetraacetic acid (EDTA) pH: 8 | 1 مللي مولر |

هـ- محاليل أخرى جاهزة كالنتروجين السائل liquid nitrogen وكحول الايزوبروبانول

Isopropanol

3-2-2-2 طريقة العمل: (تتم كافة الخطوات اللاحقة بارتداء القفازات)

- 1- قطعت الأوراق الغضة (1 غم من الأوراق) باستخدام مقص نظيف ومعقم إلى قطع صغيرة، ثم طحنت في هاون خزفي مبرد مسبقاً بإضافة النتروجين السائل بكمية مناسبة واستمر الطحن بإضافة كميات أخرى منه حتى أصبح النسيج النباتي على شكل مسحوق أبيض ناعم.
- 2- نقلت العينات المطحونة إلى أنابيب الطرد مركزي سعة 15 مل وأضيف إليها 5 سم³ من محلول الاستخلاص (3-2-2-2-أ) الذي تم تسخينه مسبقاً إلى 65 م° وتم تحضين الدوارق في الحمام المائي وعلى درجة الحرارة نفسها مع التحريك المستمر والهادئ لمدة 60-90 دقيقة.

- 3- رفعت الأنابيب من الحمام المائي ووضعت في الثلج لمدة قصيرة لتكتسب درجة حرارة الغرفة (25°م) ثم أضيف إلى كل أنبوبة 5 سم³ من محلول الكلوروفورم: ايزوأميل (3-1-2-2-ج) مع التحريك المستمر لمدة 15 دقيقة.
- 4- نقلت الأنابيب إلى جهاز الطرد المركزي ونبذت بسرعة 4000 دورة / دقيقة ولمدة 15 دقيقة وعلى درجة (20-25°م).
- 5- بعد نهاية عملية الطرد عزلت الطبقة المائية العليا ونقلت إلى أنابيب جديدة.
- 6- رفعت الطبقة العليا إلى أنابيب جديدة وأضيف إليها بمقدار 2 / 3 من حجمها من كحول الأيزوبربانول المبرد لكل عينة، ومزج الوسطان بالتقليب بهدوء لترسيب الدنا والذي يظهر بشكل كتلة كثيفة من الألياف بيضاء اللون تمثل خيوط الدنا، وتوضع العينات في درجة حرارة المختبر لمدة 30 دقيقة لإنهاء عملية الترسيب.
- 7- نُبذ المزيج بجهاز الطرد المركزي بسرعة 10000 دورة / الدقيقة، ولمدة 10 دقائق.
- 8- تم التخلص من الجزء الرائق (الكحول المذاب بالماء) وتم الاحتفاظ بالأحماض النووية التي ترسبت في قاع الأنبوبة.
- 9- أضيف 1.0 سم³ لكل عينة من محلول الغسل (3-2-2-2-ب) البارد إلى الراسب وتم تحريك العينة بهدوء في محلول الغسل ثم تركت فيه لعدة دقائق.
- 10- نبذت العينات مرة أخرى على 10000 دورة / الدقيقة لمدة 10 دقائق وتم التخلص من الجزء الرائق.
- 11- أضيفت الكمية نفسها من محلول الغسل مرة أخرى و نبذت العينات على السرعة السابقة نفسها للمدة الزمنية نفسها.
- 12- تم التخلص من الجزء الرائق وجرى وضع الأنابيب بصورة مقلوبة على مناديل ورقية لمدة قصيرة بغية التخلص من الإيثانول على درجة حرارة المختبر ولمدة 5 دقائق.
- 13- أضيف 1.0 سم³ محلول الإذابة (TE buffer) (3-2-2-2-د) ووضعت العينات في جهاز الهزاز لتثوب بهدوء على درجة 4°م لمدة 24 ساعة.
- 14- نبذت العينات في اليوم التالي بجهاز الطرد المركزي على سرعة 10000 دورة بالدقيقة ونقل الدنا الذائب النقي إلى أنابيب أخرى (Microfuge) وحفظت العينات على شكل نموذج الدنا

الأساس Stock Sample على درجة 4° م (للاستخدام المباشر). أو على درجة -20° م عند الرغبة بحفظ العينات لمدد طويلة.

3-2-3 استخلاص الدنا من بادرات النخيل:

استخلص الدنا من البادرات حسب طريقة (Doyle و Doyle، 1987) وعلى النحو الآتي:

- 1- وضعت العينات الورقية بوزن 0.1 غم في الأنبوبة سعة 1.5 مليلتر. ووضعت الأنبوبة في النتروجين السائل لمدة 5 دقائق.
- 2- سحقنا العينة باستخدام جهاز الطحن الكهربائي الهزاز بعد وضع كرتين صغيرتين في كل أنبوبة ولمدة 25 ثانية.
- 3- أخرجت الكرتين الصغيرتين بالمغناطيس وأضيف 750 مايكرو لتر من CTAB المحضر في الفقرة (3-2-2-2-أ) المسخن مسبقاً على درجة 65-70° م قلبت باليد حتى امتزجت جيداً.
- 4- وضعت العينات في الحمام المائي ولمدة 3 دقائق وعلى درجة حرارة 70° م وقلبت باليد مرة ثانية.
- 5- أضيف 750 مايكرو لتر من الكلوروفورم (أيزواميل الكحول) 24:1 المحضر في الفقرة (3-2-2-2-ج) وقلبت باليد ولمدة 3 دقائق.
- 6- وضعت في جهاز الطرد المركزي وعلى أقصى سرعة ولمدة 10 دقائق.
- 7- سحبت الطبقة السائلة الشفافة العليا العديمة اللون ونقلت إلى الأنابيب الجديدة، ويمكن إعادة خطوة إضافة الكلوروفورم أو ايزواميل الكحول إذا كانت الطبقة العلوية غير راتقة.
- 8- أضيف 450 مايكرو لتر (3/2 من الحجم الكلي) من ايزوبروبانول البارد ووضعت العينات في التجميد على درجة -20° م لمدة ساعة واحدة.
- 9- قلبت العينات باليد ثم وضعت بجهاز الطرد المركزي بأقصى سرعة لمدة 5 دقائق.
- 10- تم التخلص من المحلول الرائق وأضيف 500 مايكرو لتر من الإيثانول البارد تركيزه 70% (الإيثانول مخزن على درجة -20° م) وقلب بهدوء ثم وضع بجهاز الطرد المركزي وبأقصى سرعة لمدة 5 دقائق.
- 11- تم التخلص من محلول الغسل بسكبه بعناية ثم جفف الدنا بترك الأنابيب مفتوحة وعلى درجة حرارة الغرفة لليلة واحدة (over night).

12- أضيف TE المحضر في الفقرة (3-2-2-2-2-د) بمقدار 40 مايكرو لتر ووضعت العينات في الثلجة على درجة حرارة 4 م° لليلة واحدة.

13- أخرجت العينات من الثلجة وجرى تقليبها باليد لإذابة الدنا وأضيف RNAs للتركيز النهائي للدنا وحضن لمدة 30 دقيقة على درجة حرارة 37 م° للتخلص من الدنا.

4-2-3 توصيف الدنا Characterization of DNA

تضمنت عملية توصيف الدنا وقياس تركيزه وتقدير نقاوته وذلك ل18 عينة. 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.

5-2-3 تمييز الجنس في النخيل باستخدام مؤشرات RAPD وتقانة انعزال المجاميع BSA:

3-2-5-1 تحضير عينات الدنا:

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 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 و رمز لمجموعة أصناف الذكور بالحرف (M) ولمجموعة أصناف الإناث بالحرف (F).

3-2-5-2 تحضير تفاعلات RAPD:

حضرت هذه التفاعلات استناداً إلى Williams وآخرون (1990). المحاليل والمواد اللازمة لإجراء التفاعل:

1- خليط التفاعل الرئيسي Master Mix: استعمل خليط التفاعل الرئيسي المنتج من قبل شركة Bioneer والمكون من المحلول الدارئ PCR Buffer بقوة 10 X ويتألف من: 100 ملي مولر من Tris-HCl ذو الأس الهيدروجيني 8.3 و500 ملي مولر من KCl و2 ملي مولر من MgCl₂ و0.1% من الجلوتين والقواعد النتروجينية ثلاثية الفوسفات dNTPs والتي تشمل dATP، dGTP، dCTP، dTTP وبتركيز 200 ملي مولر وانزيم بلمرة الدنا Taq DNA Polymerase

وبتركيز 50 مايكروليتر/وحدة فضلاعن أحتواءه على المثبت stabilizer المكون من Xylene
Cyanol والصبغة الدالة Tracking dye .

2- البادئات العشوائية (Primers) واستعمل 60 بادئ مجهزة من شركة Bioneer وهي كما يأتي:

2-5-3 طريقة العمل:

أجري العمل بارتناء القفازات وحفظت كافة المحاليل على الثلج أثناء التحضير. والتي تشمل
الخطوات الآتية:

1. حضر خليط التفاعل النهائي بمزج المكونات خليط التفاعل الجاهز مع البادئ والماء بأنبوية من الأنابيب الصغيرة eppendorf سعة 200 مايكروليتر معقمة وبالتراكيز المبينة إزاء كل مادة
2. أضيف 2 مايكروليتر من دنا العينات للحصول على تركيز 100 نانوغرام لخليط التفاعل التضاعفي المتعدد الأشكال لسلسلة الدنا (Udupa وآخرون، 1998) ليصبح الحجم النهائي 20 مايكروليتر.
3. مزجت العينات جيداً ووضعت بالمنبذة لعدة ثواني لجمع محتويات التفاعل في قعر الأنبوية.
4. نقلت الأنابيب إلى جهاز المبلر الحراري الحلقي (Thermocycler) لبدء التفاعل التضاعفي.

جدول (و) تحضير تفاعلات RAPD

| المكونات | حجم العينة الواحدة (مايكروليتر) | التركيز النهائي |
|-----------------------------|---------------------------------|-----------------|
| ماء مقطر | 12 | |
| خليط التفاعل الرئيسي الجاهز | 5 | 1X |
| البادئ | 1 | 10 بيكومول |
| الدنا القالب للعينات | 2 | 100 نانوغرام |
| الحجم النهائي للعينة | 20 | |

جدول (هـ) البادئات العشوائية (RAPD) والقواعد النتروجينية المكونة لها

| تسلسل القواعد النتروجينية '3----->'5 | اسم البادئ | التسلسل | تسلسل القواعد النتروجينية '3----->'5 | اسم البادئ | التسلسل |
|---|------------|---------|---|------------|---------|
| CTGGGGCTGA | OP I-13 | 31. | GGGTAACGCC | OP A-10 | 1. |
| CCTAGTCGAG | OPK-18 | 32. | CAATCGCCGT | OP A-12 | 2. |
| GGCATGACCT | OP L-01 | 33. | TCGGCGATAG | OP A-13 | 3. |
| GACTGCACAC | OP L-04 | 34. | GGTGACGCAG | OP B-07 | 4. |
| TGGTGGACCA | OP L-20 | 35. | GGAGGGTGTT | OP B-15 | 5. |

| | | | | | |
|-----|---------|------------|-----|---------|------------|
| 6. | OP B-18 | CCACAGCAGT | 36. | OP M-06 | CTGGGCAACT |
| 7. | OP C-01 | TTCGAGCCAG | 37. | OP M-08 | TCTGTCCCC |
| 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 | GTGTGCCCA | 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 | CCCGATTCGG | 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 |

اختير البرنامج المناسب والذي اعتمد في جميع التفاعلات التضاعفية اللاحقة. إذ تم التفاعل وفق البرنامج التالي:

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 72 م° كدورة أخيرة للاستطالة النهائية ثم خفضت درجة الحرارة إلى 4 وحفظت العينات بالتبريد.

3-2-5-4 الكشف عن نواتج تضاعف مؤشرات RAPD

3-2-5-4-1 المحاليل المستخدمة :

أ- محلول TBE (Tris-Borat-EDTA) بقوة $10 \times$: حضر منه لتر وفق التركيز الآتي:

جدول (ز) محلول TBE

| المادة | الرقم | التركيز | الكمية |
|------------------|--|------------|--------------------|
| ترس القاعدي | Tris- base | 0.89 مولار | 108 غم |
| حامض البوريك | Boric acid | 0.89 مولار | 55 غم |
| المادة المخليبية | Ethylendiaminetetra acetic acid (EDTA) | 0.20 مولار | 40 سم ³ |

ذوبت المواد المذكورة آنفاً في 800 سم³ من الماء المقطر، وعدّل الأس الهيدروجيني إلى 7.8 ثم أكمل الحجم بالماء المقطر إلى اللتر، وعقم بالموصدة، وعند الأستعمال خفف المحلول 10 مرات بالماء المقطر.

ب- صبغة بروميد الاثيديوم (10 mg / ml) Ethidium bromide

حضر بإذابة 1 غرام من مسحوق الصبغة في 100 سم³ من الماء المقطر أي بتركيز 10 ملغم / سم³ وتحفظ في قنينة معتمة في درجة حرارة 4°م.

ج - مؤشر الوزن الجزيئي

استعمل مؤشر وزن جزيئي (DNA Ladder 100 bp) معروف الأوزان الجزيئية مكون من 13 حزمة أوزانها الجزيئية كالاتي: (100، 200، 300، 400، 500، 600، 700، 800، 900، 1000، 1200، 1600، 2000) زوج قاعدي من شركة (Bioneer Co. Korea). كما استخدم مؤشر حجم جزيئي (DNA Ladder bp50) من مكون 16 حزمة أوزانها الجزيئية كالاتي: (50، 100، 150، 200، 250، 300، 350، 400، 450، 500، 550، 600، 650، 700، 750، 1000) زوج قاعدي.

3-2-5-4-2 تحضير هلام الاكاروز Agarose gel preparation

- 1- أعد لوح التحميل باستخدام لوح بلاستيكي شفاف ذو أبعاد ملائمة لحوض الترحيل الكهربائي وتم وضع المشط الخاص لتكوين الحفر في المكان المناسب له في الحوض.
 - 2- حضر هلام الاكاروز بتركيز 1% وذلك للكشف عن نواتج تفاعل سلسلة البوليميريز polymerase, وللحصول على هذا التركيز تم إذابة 500 ملغم من الاكاروز في 50 سم³ من محلول الـ TBE بقوة 1× وسخن مع التحريك المستمر لحين اكتمال الإذابة ثم يبرد إلى درجة حرارة تقع بين 55-60 م°.
 - 3- سكب الاكاروز برفق وبشكل مستمر هادئ لتجنب تكون فقاعات هوائية وأزيل بالماصة إن وجدت, ترك الهلام في درجة حرارة المختبر إلى أن اكتسب الصلابة.
- 3-2-3 3-4-5 الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز**

Agarose Gel Electrophoresis (AGE)

- 1- بعد تصلب الهلام رفع المشط بهدوء.
- 2- وزع 10 مايكروليتر من ناتج تفاعل البلمرة للعينات على الحفر باستخدام الماصة الدقيقة Micropipette وروعي عدم خروج العينة من سطح الحفرة وكذلك يوضع مؤشر الوزن الجزيئي في الحفرة المخصصة له على جانبي الهلام.
- 3- اغلق الجهاز وتم توصيل أقطاب التيار الكهربائي و جهاز بقدرة 3 فولت / سم وتم الترحيل باتجاه القطب الموجب وبعد 2-3 ساعة وعند وصول الصبغة الزرقاء إلى ما قبل نهاية الهلام تم إيقاف الترحيل.
- 4- رفع اللوح من الحوض وغمر في حوض آخر يحتوي على محلول صبغة بروميد الاثيديوم بتركيز نهائي 0.5 مايكروغرام / سم³ وترك لربع ساعة مع التحريك المستمر والهادئ.
- 5- فحص الهلام بتعريضه للأشعة فوق البنفسجية بوضعه على الجهاز الحاوي على مصدر الأشعة تلك عند الطول الموجي (240 نانومتر) لرؤية حزم الدنا وصور الهلام باستخدام جهاز التصوير (Gel documentation system ATTO, Japan).
- 6- حسبت المعلمات الآتية لأخذها من صورة الهلام:

أ- عدد الحزم الكلية المنتجة من كل بادئ.

ب- كفاءة البادئ % Primer efficiency وحسبت من القانون

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

ج- عدد الحزم المتشابهة (المتماثلة) Monomorphic bands

د- عدد الحزم ذات التعدد الشكلي (المتباينة) Polymorphic bands

هـ- النسبة المئوية للتعدد الشكلي (للتباين) % وحسبت كالآتي:

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

و- القوة التشخيصية للبادئ Discrimination power وهذه حسبت كالآتي:

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

3-2-6 إيجاد التباينات الجزيئية بين أصناف النخيل المدروسة باستخدام مؤشرات الدنا RAPD

تنتخب البادئات التي أعطت حزماً متباينة مميزة لمجموعة دون الأخرى ويعاد تفاعل PCR ولكن باستخدام عينات الدنا الأربعة عشر (سبعة ذكور وسبعة إناث) كل على انفراد وترجل نواتج التفاعل على هلام الاكاروز بتركيز 1% لفصل الحزم الناتجة ويتم تصبيغ 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, واستخدم البرنامج الحسوبي Photo capture لحساب الأوزان الجزيئية للحزم.

3-2-7 استخدام مؤشرات التتابعات المتباينة المضاعفة المنشطرة لتمييز المبكر لجنس النخيل

Cleaved Amplified Polymorphic Sequence (CAPs)

1- استعمل البادئ OPD10 الذي أعطى أعلى نسبة للارتباط بالجنس وأجري تفاعل PCR للأصناف الأربعة عشر (سبعة مذكرة وسبعة مؤنثة) للحصول على ناتج التضاعف.

2- تؤخذ نواتج التضاعف ويضاف إليها أنزيمات قطع لكل صنف من الأصناف الأربعة عشر المذكورة والمؤنثة. وبذلك يكون لدينا 28 عينة سوف يتم ترحيلها (14 عينة قبل القطع بالأنزيم و 14 عينة بعد القطع بالأنزيم).

استخدمت ثلاث أنزيمات Restriction Enzyme وهي *Bcl I* و *Hpa II* و *Rsa I* المنتجة من قبل شركة Promega.

أنزيم القطع *Bcl I* Restriction Enzyme ومصدر هذا الأنزيم هو بكتريا *Bacillus caldolylicus* ودرجة الحرارة المثلى لعمل الأنزيم 50 م° ويظهر 20-50% من فعاليته على درجة حرارة 37 م°، وأنزيم القطع *Hpa II* Restriction Enzyme ومصدر هذا الأنزيم هو بكتريا *Haemophilus parainfluenzae* ودرجة الحرارة المثلى لعمل الأنزيم هي 37 م°، وأنزيم القطع *Rsa I* Restriction Enzyme مصدر هذا الأنزيم هو بكتريا *Rhodopseudomonas Sphaeroides* ودرجة الحرارة المثلى لعمل الأنزيم حرارة 37 م° حضرت هذه التفاعلات استناداً إلى Al-Mahmoud وآخرون (2012).

طريقة العمل:

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 الأيوني و 2 مايكرو لتر من المحلول الدائري RE 10X و 0.2 مايكرو لتر من Acetylated BAS 10 مايكروغرام /مايكرو لتر (مرفقات مع الأنزيم) وضعت عدة ثواني بجهاز الطرد المركزي ثم اضيف أنزيم القطع 1 مايكرو لتر. وضعت العينات في جهاز المبلمر الحراري لغرض تحضينها حسب درجة الحرارة المناسبة لتحضين كل مجموعة والوقت المناسب والذي يتراوح من 3 ساعات، كما وضعت لكل مجموعة على درجة حرارة 65 م° لإيقاف عمل الأنزيم وللحفاظ على العينات من التلف، رحلت نواتج العينات (28 عينة) على هلام الاكاروز 1% ثم صبغ الهلام بصبغة بروميد الاثيديوم.

3- أظهرت الحزم باستخدام الأشعة فوق البنفسجية وباستخدام جهاز Gel documentation system وصور الهلام كما ورد في (3-2-3-4-5).

4- حلت صورة الهلام بالبرنامج الحاسوبي Photo capture, soft ware لينتج عنه الأوزان الجزيئية للحزم الموجودة في الهلام.

5- أخذت البيانات لكل أنزيم قطع و تقييد وللأنزيمات الثلاث، وتم تمثيل البيانات بإعطاء رقم 1 لوجود الحزمة، و 0 لغيابها، وأدرجت في جدول قبل وبعد القطع الأنزيمي وحسب الأوزان الجزيئية للحزم الناتجة واستخدم البرنامج الحاسوبي Past, soft ware لأخذ بعض البيانات.

3-2-8 عزل وتنقية الدنا الخاص بالحزمة المميزة للجنس:

Elution and Purification of DNA

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 Trans illumination 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 (Becker و Dorai، 1992) وكالاتي:

المواد المستخدمة:

- 1- استخدم العدة المنتجة من شركة QIAGEN QIAquick Gel Extraction Kit,
- 2- الإيثانول بتركيز 96-100%
- 3- الأيزوبروبانول 100%
- 4- خلات الصوديوم pH=5
- 5- شفرة معقمة
- 6- أنبوب صغير 1.5 ملتر.
- 7- بلوك حراري.
- 8- جهاز الطرد المركزي

ملاحظات قبل البدء بالعمل:

- 1- هذا البرنامج لتنقية 10 مايكروغرام من الدنا
- 2- إضافة الإيثانول بتركيز (96-100%) للبر PE قبل استخدامه.
- 3- تحضير البلوك الحراري على درجة حرارة 50.

4- كل خطوات الطرد المركزي تجهز 17900 دورة بالدقيقة.
طريقة العمل:

- 1- قطعت شريحة (حزمة الدنا) من هلام الاكروز باستخدام شفرة (معقمة وحادة)، وضعت الشريحة في انبوب صغير شفاف وتم وزنها (تركيز الهلام المستخدم 1%).
- 2- أضيف محلول دارى QG بثلاثة أمثال وزن شريحة الهلام المقطوع.
- 3- حضنت في البلوك الحراري على درجة حرارة 50م لمدة 10 دقائق (إلى أن يتم ذوبان شريحة الهلام كاملاً) قلبت باليد كل 3 دقائق لمساعدة الهلام على الذوبان، وبعد أن تمت الإذابة بصورة تامة فحص لون المزيج والذي يجب أن يكون لونه أصفر مشابه للون المحلول الدارى QG الموجود في العلبة الأصلية (إذا كان اللون برتقالي أو أرجواني يجب إضافة 10 مايكرو لتر من خلات الصوديوم pH =5 إلى أن يصبح لون المزيج أصفر).
- 4- أضيف حجم من الايزوبروبانول بقدر حجم المزيج الأصفر بتركيز (100%)، ووضع المزيج في الأنبوب العمود (column) ثم وضع في جهاز الطرد المركزي لمدة دقيقة واحدة.
- 5- أضيف 500 مايكرو لتر من محلول دارى QG إلى الأنبوب العمود ثم وضع في جهاز الطرد المركزي لمدة دقيقة واحدة وتم التخلص من السائل المتجمع بالأسفل ثم إرجاع العمود الصغير إلى داخل الأنبوب مرة ثانية.
- 6- أضيف 750 مايكرو لتر من محلول دارى PE للغسل وترك لمدة 2-5 دقائق ثم وضع في جهاز الطرد المركزي لمدة دقيقة واحدة ثم أخرجت الأنبوب وتم التخلص من السائل المتجمع بالأسفل.
- 7- جهز أنبوب صغير جديد بحجم 1.5 مليلتر أخذ الأنبوب الداخلي الصغير العمود ووضع في هذا الأنبوب الجديد، أضيف 30 مايكرو لتر من المحلول الدارى EB لمركز الأنبوب العمود ذو الغشاء لفصل الدنا الملتصق بالغشاء بعد مرور 4 دقائق وضع في جهاز الطرد المركزي لمدة دقيقة واحدة، فحص الدنا الناتج في جهاز Nanodrop spectrophotometer لمعرفة تركيز الدنا الناتج ونقاوته.

3-2-9 تفاعل البلمرة المتسلسل المتشعب Nested Polymerase Chain Reaction:

لكون مؤشرات RAPD تمتاز بكونها عشوائية وعامة، وإمكانية الحصول على نفس النتائج عند إعادة التجربة قليلة، كان من الضروري تأكيد النتائج المستحصل عليها، لذا أُجري تفاعل البلمرة المتسلسل المتشعب لهذا الغرض.

بعد عزل وتنقية الدنا الناتج من عملية البلمرة الأولى RAPD باستخدام البادئ OPD10 أخذ الدنا الناتج وأجري له تفاعل RAPD باستخدام البادئ OPD10 للمرة الثانية وبذلك يصبح تفاعل بلمرة متسلسل متشعب، رمز لعينة الدنا المتشعب بالحرف N.

أجري التفاعل كما في الفقرة (3-2-5-3). بعد انتهاء التفاعل، أُخرجت العينات المتشعبة من جهاز Thermocycler ورحلت كهربائياً بالهلام ثم صبغت ببروميد الأثيديوم ووضعت في جهاز التصوير وأخذت الصور.

المواد المستخدمة:

جدول (ح) لمواد تفاعل البلمرة المتسلسل المتشعب

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

اعتمد تسجيل النتائج على اساس مصفوفة ثنائية العدد (Binary) أعمدها مساوية لعدد العينات المدروسة وعدد أسطرها مساوي لعدد المؤشرات ذات التباين (التعدد الشكلي). تعتبر المصفوفة ثنائية لأن جميع مربعاتها تحوي على أحد العنصرين أما 0 أو 1 اذ يرمز 0 الى عدم وجود الحزمة ويرمز 1 الى وجودها، وهذه المصفوفة هي الحجر الأساس لبناء مصفوفة التشابه الوراثي وترسم شجرة القرابة الوراثية Dandrogram للعينات باستخدام برنامج PAST بنسخته المعدلة Version.1.91 (Hammer واخرون, 2001) وبالاعتماد على مقياس Jacard Similarity index.

10-2-3 تحضير تفاعلات تسلسل التتابعات الترادفية القصيرة SSR:

لغرض تأكيد النتائج التي تم الحصول عليها من تفاعلات التضاعف العشوائي المتعدد الأشكال RAPD فقد تم استعمال مؤشر آخر هو مؤشر التتابعات القصيرة المتكررة SSR لهذا الغرض أجي التفاعل حسب Barone وآخرون (2000). أخذت العينات التسعة عشر (19) عينة وهي مجموعة الذكور ومجموعة الإناث والأصناف الأربعة عشر المذكورة والمؤنثة والعينة المتشعبة وعينة البادرات ذات الأوراق المستقيمة وذات الأوراق المقوسة وإجري لها تفاعل تفاعلات تسلسل التتابعات القصيرة المتكررة وذلك لأجل عمل مقارنة بين الطرق المختلفة لتمييز جنس النخيل.

المواد المستخدمة:

استعمل الخليط الجاهز (Master mix) المجهز من قبل شركة Life Technologies Europe (BV) Belgium والمتكون من المحلول المنظم PCR Gold Buffer بقوة 10 X المتكون من 30 ملي مولر من Tris-HCl ذو الأس الهيدروجيني 8.05 و 100 ملي مولر من KCl و 5 ملي مولر من MgCl₂ والقواعد النيتروجينية ثلاثية الفوسفات dNTPs والتي تشمل dATP، dGTP، dCTP، dTTP بتركيز 400 ملي مولر وانزيم بلمرة الدنا AmpliTaqGold 5 مللتر/وحدة

استخدم البادئ mPdCIR048 ذو درجة انصهار 51.4 م° ويتكون من 20 قاعدة نيتروجينية F و 20 قاعدة نيتروجينية R واستخدم البادئ mPdCIR078 ذو درجة انصهار 49.6 ويتكون من 17 قاعدة نيتروجينية F و 17 قاعدة نيتروجينية R كما استخدم البادئ mPdCIR093 ذو درجة انصهار 51.8 ويتكون من 22 قاعدة نيتروجينية F و 20 قاعدة نيتروجينية R كما موضح في الجدول ادناه.

جدول (ط) بادئات SSR والقواعد النيتروجينية المكونة لها

| | اسم البادئ | القواعد النيتروجينية F | القواعد النيتروجينية R |
|---|------------|------------------------|------------------------|
| 1 | mPdCIR048 | CGAGACCTACCTTCAACAAA | CCACCAACCAAATCAAACAC |
| 2 | mPdCIR078 | TGGATTTCCATTGTGAG | CCCGAAGAGACGCTATT |
| 3 | mPdCIR093 | CCATTTATCATTCCCTCTCTTG | CTTGGTAGCTGCGTTTCTTG |

يجري العمل بارتداء القفازات ويتم حفظ كافة المحاليل على الثلج أثناء التحضير، والتي تشمل الخطوات الآتية:

1. يتم تحضير خليط التفاعل النهائي بمزج المكونات وهي خليط التفاعل الجاهز مع البادئ والماء بأنبوية واحدة معقمة وبالتراكم المبيبة إزاء كل مادة وبعدها العينات المدروسة. مزجت المكونات جيداً بوساطة الخلاط الهزاز Vortex لمدة 30 ثانية وبعدها وضعت في جهاز الطرد المركزي لمدة 30 ثانية.

2. وضع 7 مايكرو لتر من الخليط لكل أنبوية من الأنابيب الصغيرة eppendrrf سعة 200 مايكرو لتر.

3. أضيف 1 مايكرو لتر من دنا كل عينة لكل أنبوية بعد إجراء التخفيف عليها للوصول إلى التركيز 50 نانوغرام/ مايكرو لتر.

4. تمزج جيداً وتوضع بالمنبذة لعدة ثواني لجمع محتويات التفاعل في قعر الأنبوية.

5. تنتقل الأنابيب إلى جهاز المبلر الحراري الحلقي (Thermocycler) لبدء التفاعل التضاعفي المتسلسل المتكرر، وبعد استخدام عدة برامج للتضاعف اختير البرنامج المناسب، إذ تم التفاعل

وفق البرنامج التالي:

دورة واحدة لمدة 3 دقيقة على درجة حرارة 94 م° للمسخ الأولي لشريط الدنا، تليها 10 دورات تضاعف تتضمن كل دورة: 30 ثانية على درجة حرارة 94 م° لمسخ القالب و 30 ثانية على درجة حرارة 60 م° لربط البادئات بالدنا القالب 1 دقيقة على درجة حرارة 72 م° لاستطالة البادئات المرتبطة تليها 25 دورة تضاعف تتضمن كل دورة 30 ثانية على درجة حرارة 94 م° لمسخ القالب 30 ثانية على درجة حرارة 50 م° لربط البادئات بالدنا القالب 1 دقيقة على درجة حرارة 72 م° لاستطالة البادئات المرتبطة مع دورة أخيرة واحدة على درجة حرارة لمدة 72 م° لمدة 7 دقائق كدورة أخيرة للاستطالة النهائية.

جدول (ي) مكونات تفاعل SSR

| المكونات | حجم العينة (مايكرو لتر) | التركيز النهائي |
|----------------------|-------------------------|-----------------|
| ماء مقطر | 2.2 | |
| خليط التفاعل الجاهز | 4 | 1X |
| البادئ (F+R) | 0.8 | 10 بيكومول |
| الدنا القالب للعينات | 1 | 50 نانوغرام |

| | | |
|--|---|---------------|
| | 8 | الحجم النهائي |
|--|---|---------------|

الكشف عن نواتج تضاعف مؤشرات SSR

أجري العمل بارتداء القفازات وحفظت كافة المحاليل على الثلج أثناء التحضير وتبعاً للخطوات الآتية:

1. حضر خليط التفاعل النهائي بمزج المكونات 8.6 مايكرو لتر من HiDi formamide و 0.4 مايكرو لتر من LIZ500 (Applied Biosystem) وضع في كل أنبوبة صغيرة مزجت المكونات جيداً بواسطة جهاز الخلاط الهزاز لمدة 30 ثانية وبعدها وضع في جهاز الطرد المركزي (المنبذة) لمدة 30 ثانية لترسيب قطرات المحلول المتعلقة على جدار الأنبوبة.
 2. وضع 9 مايكرو لتر من الخليط في كل حفرة من حفر الطبق الخاص بجهاز التحليل الجيني Genetic Analyzer.
 3. أضيف 1 مايكرو لتر من ناتج تفاعل بلمرة البادئات الثلاثة mPdCIR048 و mPdCIR078 و mPdCIR093PCR (لمؤشرات SSR) لكل حفرة ليصبح الحجم النهائي 10 مايكرو لتر في كل حفرة. غطت بغطاء مطاوي خاص.
 4. استخدمت الكمادات للوقاية من رائحة الفورماميد ووضع الطبق في جهاز المبلمر الحراري على درجة حرارة 95م° ولمدة 3 دقائق لتجري عملية مسخ للدنا denaturation.
 5. حضرت حاوية ثلج وضعت عليها طبق العينات بعد إخراجها من جهاز المبلمر الحراري مباشرة ثم وضعت بجهاز التحليل الجيني وبسرعة تجنباً لإعادة ارتباط شريطي الدنا.
 - 6- تم ترحيل العينات باستخدام جهاز التحليل الجيني ABI 3130 Genetic Analyzer وذلك للحصول على الأوزان الجزيئية للحزم الناتجة وبدقة عالية يضاف formamide والـ HiDi مع وجود LIZ500 فتتكون القمم ذات الألوان المختلفة وذلك حسب لون المعلم المستخدم تظهر النتيجة في جهاز الحاسوب وهي عبارة عن منحنيات على محورين متعامدين يمثل المحور X تمثل الوزن الجزيئي للحزم الناتجة في حين يمثل المحور Y درجة كثافة الحزمة.
- 3-3 تمييز جنس النخيل باستخدام الطرق الكيمياءوية:

أجرت التحليلات الكيماوية للبادرات :

- بادرات ذات أوراق مستقيمة A.
- بادرات ذات أوراق مقوسة T.

3-3-1 تقدير النسبة المئوية للبروتين الكلي في الاوراق:

حسبت على اساس الوزن الجاف وذلك بناءً على تقدير النسبة المئوية للنتروجين الكلي بعملية التقطير بطريقة كدال Kildal method من خلال اكسدة المادة العضوية , اذ وضع خليط من حامض البوريك تركيز 2% مع صبغتي المثل الحمراء والبروموكريسول الخضراء المذابتين بالإيثانول 20 مل في دورق مخروطي سعة 100مل ثم اضيف للخليط 10 مل من العينة المهضومة و 10 مل من هيدروكسيد الصوديوم 10 عياري بتركيز 40% وأجريت عملية التقطير وتحرير الأمونيا حتى تغير لون الخليط من الأحمر الى الأخضر بعدها اجري التسحيح مع حامض الكبريتيك 0.04 عياري لحين الوصول الى نقطة التعادل البنفسجية الخفيفة وحسب حجم الحامض المستهلك في التسحيح ثم حسبت النسبة المئوية للنتروجين الكلي وفقاً للمعادلة الآتية:

$$F \times \%N = \% \text{ البروتين}$$

$$5.75 = F$$

(1975 ,A.O.A.C)

3-3-2 تقدير محتوى الحامض الأميني البرولين:

تحضير العينات للتحليل:

تم التقدير وفق ما ذكره Ghafor وآخرون (2014) بأخذ 0.1 غم من الأوراق النباتية ووضع بالخلاط مع 50 مليلتر من خليط الإيثانول والماء المتكون من (60 إيثانول و 40 ماء) ثم أذيت العينة في 30 مليلتر من حامض الهيدروكلوريك 6 مولاري ووضع السائل في أنبوبة زجاجية مغلقة مضغوطة vaccum sealed glass على درجة حرارة 110م° ولمدة 6 ساعات (التحضيرين بحمام جاف) ثم بعد ذلك رشح السائل خلال مرشح زجاجي واستخدم المبخر الدوار لتركيز الراشح حتى وصل الراشح إلى حجم 5 مليلتر أضيف 1 مللتر من حامض الستريك كمحلول دارى ذو رقم هيدروجيني =2.2 ثم مزج

20 مايكروليتر من الانموذج في 10 مايكروليتر من كاشف PITS لمدة دقيقة واحدة ثم اضيف 50 مايكروليتر من محلول خلات الصوديوم الدارئ بتركيز 0.1 مولاري ذي الرقم الهيدروجيني 7. وضعت النماذج بجهاز الطرد المركزي لمدة 10 دقائق ثم رشح المحلول في مرشح غشائي قطر فتحاته 0.22 مايكرون. بعدها جرت عملية الفصل في عمود نوع anion exchange shim-pack XR-ODS حجم الجسيمات 5 مايكروليتر وباستعمال الطور المتحرك 5% ميثانول مذاباً في دارئ خلات الصوديوم بتركيز 0.1 عياري ذيالرقم الهيدروجيني 7 بمعدل جريان 1.4 مل/ دقيقة بدرجة حرارة 25 م حن 20 مايكروليتر من المحلول الناتج في جهاز

High Performances Liquid Chromotography (HPLC) فحصت العينة على الطول الموجي 220 نانومتر, احتسب تركيز النموذج كميأً بمقارنة مساحة القمة للنماذج القياسية مع مساحة القمة للأنموذج قيد التحليل حسب المعادلة الآتية:

$$\text{تركيز الأنموذج غم/100 مللتر} = \frac{\text{مساحة قمة الأنموذج قيد التحليل}}{\text{مساحة قمة الأنموذج القياسي}} \times \text{تركيز الأنموذج القياسي} \times \text{معامل التخفيف}$$

3-3-3 تقدير محتوى انزيم البيروكسيديز :

تحضير العينات للتحليل:

قدر انزيم البيروكسيديز وفق ماذكره (Underhill و Critchley، 1995), جمعت العينات (الأوراق النباتية) وحفظت في حاظفة تحتوي على النتروجين السائل بعد الوصول الى المختبر وضعت العينات بالتجميد أخذ 1 غم من الأوراق المجمدة أضيف لها 2.5 مليلتر من محلول كلوريد الكالسيوم 0.5 مولاري ووضعت بالخلاط مع 2.5 مليلتر من جريش الثلج, ثم وضعت في جهاز الطرد المركزي بسرعة 1000 دورة/دقيقة ولمدة 8 دقائق وبعد إخراج العينات أخذ الرائق ووضع في أنبوب نظيف جديد ووضع بالتجميد لمدة ساعتين، حضر محلولين هما المحلول A phenol-aminoantipyrène solution الذي يعمل كمذيب ومحلول B hydrogen peroxide in buffer solution إذ يعمل كدارئ وبعد إخراج العينات من التجميد أضيف 1.4 مليلتر من المحلول A كما أضيف 1.5 مليلتر من المحلول B بعدها جرت عملية الفصل في عمود نوع anion exchange shim-pack XR-ODS حجم الجسيمات 5 مايكروليتر وباستعمال الطور المتحرك ميثانول 5% مذاباً في دارئ خلات الصوديوم بتركيز 0.1 عياري ذيالرقم الهيدروجيني 7 وبمعدل جريان 1.4 مل / دقيقة م حن 10 مايكروليتر من المحلول الناتج في جهاز High Performances Liquid Chromotography (HPLC) وفحصت

العينة على الطول الموجي 510 نانومتر, احتسب تركيز النموذج كميّاً بمقارنة مساحة القمة للنماذج القياسية مع مساحة القمة للنموذج قيد التحليل حسب المعادلة الآتية:

$$\text{تركيز النموذج غم/100 مللتر} = \frac{\text{مساحة قمة النموذج قيد التحليل}}{\text{مساحة قمة النموذج القياسي}} \times \text{تركيز النموذج القياسي} \times \text{معامل التخفيف}$$

4- النتائج والمناقشة:

1-4 نتائج استخدام الطرائق التقليدية

إن الطريقة التقليدية المعتمدة على اختراق البادرات للغطاء لم تثبت قدرتها على التمييز بين البادرات أذ اخترقت جميع البادرات الغطاء.

1-1-4 نتائج إنبات البذور ونوع البادرات :

أظهرت نتائج الجدول (1) أن النسبة المئوية لأنبات البذور المزروعة بأطباق البتري قد بلغت 98.8 % وكان عدد البذور المتجهة بأنباتها نحو اليمين 229 بذرة بنسبة انبات 45.8 % و 265 عدد البذور المتجهة بأنباتها نحو اليسار وبنسبة انبات 53 %، وتتفق هذه النتيجة مع ما وجدته الهاشمي (1989) في بحثه على بذور النخيل من ناحية عدد البذور النابتة ونسبة الإنبات.

كما أظهرت نتائج الجدول (1) أن النسبة المئوية لأنبات البذور المزروعة بأصص قد بلغت 97% و كان عدد البادرات ذات الأوراق المستقيمة 244 بذرة ونسبتها 50 % وعدد البادرات ذات الأوراق المقوسة 241 ونسبتها 48.8%.

جدول (1) النسبة المئوية لأنبات البذور المزروعة ونوع البادرات الناتجة

| ت | عدد البذور الكلية النابتة | نسبة إنباتها % | نوع البادرات | عدد البذور النابتة | نسبة الإنبات % |
|------------------|---------------------------|----------------|--|--------------------|----------------|
| المجموعة الأولى | 494 | 98.8 | البادرات الناتجة من البذور المتجهة بأنباتها نحو اليمين R | 229 | 45.8 |
| | | | البذور المتجهة بأنباتها نحو اليسار L | 265 | 53 |
| المجموعة الثانية | 485 | 97 | البادرات ذات الأوراق المستقيمة A | 244 | 48.8 |
| | | | البادرات ذات الأوراق المقوسة T | 241 | 48.2 |

4-2 نتائج عزل وتوصيف الدنا المجيني من الأوراق والبادرات لنخيل التمر:

من خلال إجراء تجارب عزل الأحماض النووية الكلية من الأوراق (السعف) الفتية للأصناف 14 المذكورة والمؤنثة وباستخدام مادة CTAB (Cetyltrimethyl ammonium bromide) في محلول الاستخلاص حسب الطريقة الموصوفة من قبل Benito وآخرون (1993) فقد تم الحصول على كميات مناسبة من الدنا الكلي (المجيني) حسب نتائج كمية الدنا المستخلص والنقاوة بالاعتماد على قراءة الامتصاص لطيف الأشعة فوق البنفسجية عند الطول الموجي 260 نانوميتر و280 نانوميتر وذلك عند فحص العينات بجهاز Nanodrop spectrophotometer. إذ بلغ أعلى تركيز للأحماض النووية 299 نانوغرام /مايكرو لتر للسنف الأشرسي والذي بلغت نقاوته 1.82، وأقل تركيز للبادرات المتجهة بانباتها نحو اليسار إذ بلغ 167.5 نانوغرام /مايكرو لتر وبلغت نقاوته 2.13 كما في الجدول (2).

إن استخدام هذه الطريقة التي تعد من الطرائق الكفوءة والملائمة لعزل الدنا من النباتات سيؤدي إلى اختصار خطوات العمل إذ تعد طريقة بسيطة وسريعة مقارنة بالطرائق الأخرى المعتمدة على النبد المركزي الفائق في محلول متدرج الكثافة باستخدام ملح كلوريد السيزيوم والذي يتطلب جهداً ووقتاً إضافياً. إن استخدام مادة الـ(CTAB) في محاليل الاستخلاص لعزل الدنا المجيني يعود إلى وقت ليس بالقصير فقد استعمله Murray و Thompson (1980) ولكن بالاعتماد على محلول متدرج الكثافة مع ملح كلوريد السيزيوم.

أما طريقة Benito وآخرون (1993) فقد استعملت بكفاءة من قبل خيرالله (2007) في استخلاص الدنا من النباتات النسيجية لسنفي النخيل برحي ومكتوم إذ أن الكفاءة والسهولة تمثلت في الإجراءات والمواد الكيميائية المكونة لمحاليل العزل إذ أن كل مادة فيها تعمل على إزاحة إحدى مكونات الخلية غير المرغوبة وبنفس الوقت تحافظ على الدنا كونه الهدف من الاستخلاص معتمدة على خاصية ترسيب الدنا بالمذيبات العضوية. ولكون النباتات تمتاز بجدران سميكة تحيط بالأغشية الخلوية، لذا فإن تكسير الخلايا يتم باستخدام السحق اليدوي بوجود النتروجين السائل إذ تعمل الدرجات الحرارية المنخفضة (-196م) على إيقاف نشاط الأنزيمات النووية والتي تتحرر بمجرد تحطم جدران الخلايا، وأن وجود مادة الـCTAB في محلول الاستخلاص يعمل على تكوين معقد مع الحوامض النووية Nucleic acids CTAB Complex تمنحها المقاومة ضد التحلل وتحافظ على هيكلها الأساسي وبذلك يسهل فصلها عن البروتينات.

أما مادة الـ EDTA الداخلة في محلول الاستخلاص وهي عامل مخلبي (Chelating agent) فإنها تعمل على اقتناص الأيونات الموجبة مثل Mg^{12} الضرورية لفعالية الأنزيمات النووية التي تعمل على تحلل الأحماض النووية مما يثبط عمل تلك الأنزيمات (Maniatis وآخرون، 1982)، أما الكلوروفورم فيعمل على التخلص من CTAB في المرحلة اللاحقة ومسح بقية البروتينات، وكذلك السكريات المتعددة والمواد الأخرى مثل الكلوروفيل التي يتم فصلها فيما بعد بالطرد المركزي ويبقى الدنا بالطور المائي، إذ يتم ترسيبه بواسطة كحول الأيزوبروبانول البارد. أما محلول الغسل فيعمل على قصر الدنا بعد ترسيبه وتخليصه من جميع ما علق به من مركبات. ومن الجدير بالذكر هنا أنه تم إجراء تحويل بسيط في هذه الطريقة الموصوفة من قبل Benito وآخرون (1993) وذلك بعدم إضافة أنزيم RNase الذي يعمل على التخلص من الحامض النووي RNA وذلك لعدم تأثيره في الدقة المطلوبة في تطبيق تفاعلات PCR إذ أنه يتلف عند التعرض للدرجات الحرارية العالية، فضلاً عن أن البادئات المستخدمة في تفاعلات RAPD تتعرف على تسلسل شريط الدنا فقط (Corniquel و Mercier، 1994)، كما لم يتم إضافة مادة المركبتو إيثانول التي تعمل على تحليل أنزيم DNase ومنع أكسدة المواد الفينولية وظهور اللون البني في المستخلص (Kahl و Weising، 1997).

وعلى الرغم من احتواء أنسجة النخيل على الفينولات فأن كفاءة المواد والظروف السابقة أغنت الطريقة عند التعامل مع هذه المادة السامة. أستعملت طريقة الـ CTAB لعزل الدنا من أوراق سعف نخيل التمر في دراسات أجريت من قبل العديد من الباحثين (الخطيب، 2000؛ جبرائيل، 2001؛ Jubrael، 2005؛ Ali وآخرون، 2006).

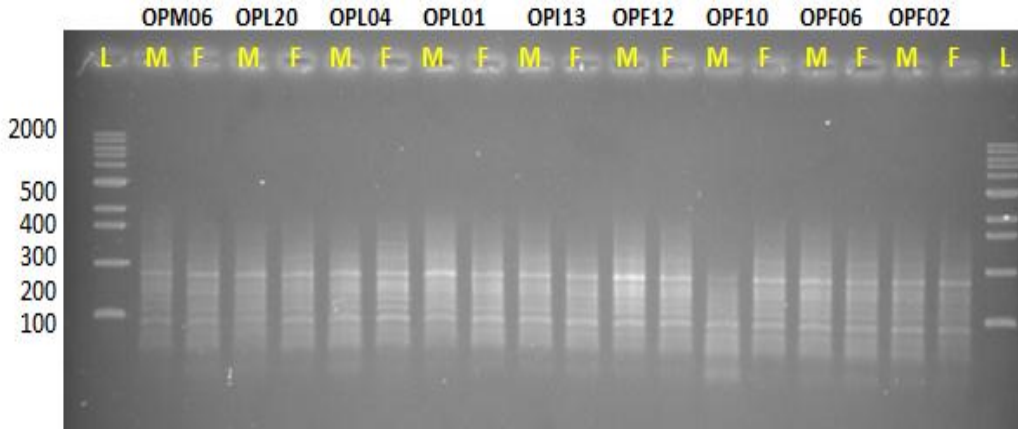
أما استخلاص الأحماض النووية من البادرات المدروسة فقد استعملت فيها طريقة Doyle و Doyle (1987) وهي طريقة سريعة للاستخلاص تشابه طريقة Benito وآخرون (1993) مع بعض التحوير الذي أدى إلى تقليل زمن الاستخلاص.

3-4 استخدام مؤشرات الدنا الجزيئية في تمييز الجنس المبكر لنخيل التمر:

1-3-4 نتائج تحليل انعزال المجاميع (BSA) Bulks segtegant analysis باستخدام مؤشرات RAPD:

سخرت مؤشرات RAPD في هذه الدراسة لتمييز جنس نخيل التمر للعينات بعد تقسيمها إلى مجموعة أصناف الذكور ومجموعة أصناف الإناث للأصناف المدروسة باستخدام 60 بادئ من البادئات الخاصة لمؤشرات التضاعف العشوائي المتعدد الأشكال للدنا.

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 OPA12، OPB07، OPC09، OPC13، OPD10، OPD20، OPE04، OPK18، OPN17، OPX04 حزمًا متباينة (Polymorphic bands) أو تسمى متعددة الأشكال لعينة مجموعة الأصناف المذكورة (M) عنها في عينة مجموعة الأصناف المؤنثة (F).

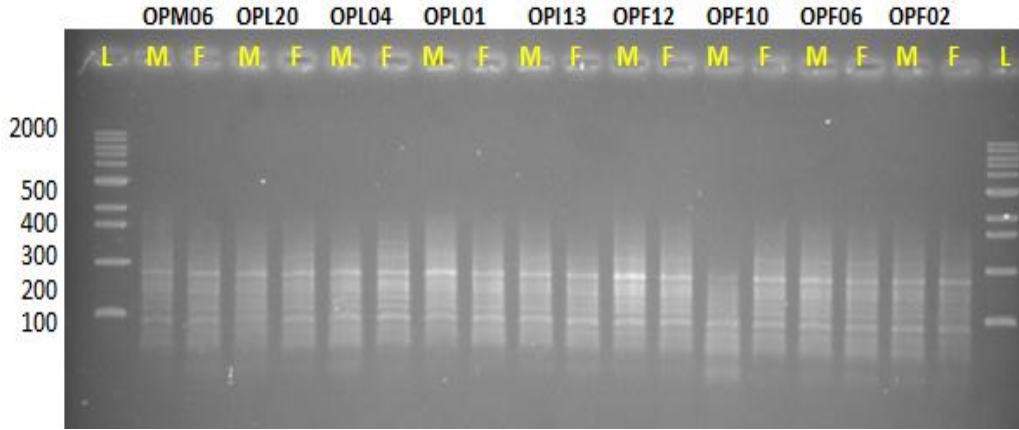


شكل (1) نواتج الترحيل الكهربائي لتفاعل البلمرة المتسلسل PCR لمجموعتي الذكور M وإناث F نخيل التمر باستخدام 9 بادئات لمؤشرات RAPD تظهر تطابقاً شكلياً،

L: دليل الأوزن القياسي (100 pb DNA Ladder)

جدول (2) تركيز ونقاوة الدنا للعينات المستخلصة من ذكور وأناث وبادرات نخيل التمر

| النقاوة قراءة الجهاز 280\260 | تركيز الدنا نانوغرام/مايكرو لتر | اسم الصنف | اسم المجموعة |
|---------------------------------|------------------------------------|-----------------------|-----------------|
| 1.89 | 255.9 | غنامي أحمر | الأصناف المذكرة |
| 1.96 | 189.0 | غنامي اخضر | |
| 2.10 | 232.6 | خكري كريطلي | |
| 2.14 | 290.7 | خكري سميسي | |
| 2.07 | 198.5 | خكري عادي | |
| 1.97 | 265.0 | رصاصي | |
| 2.06 | 187.1 | غلامي | |
| 1.77 | 178.6 | برحي | الأصناف المؤنثة |
| 1.99 | 186.7 | تبرزل | |
| 2.05 | 185.7 | مكتوم | |
| 1.82 | 299.0 | أشوسي | |
| 2.08 | 246.8 | خستاوي | |
| 1.97 | 222.9 | أسطة عمران | |
| 1.78 | 236.9 | خضراوي | |
| 2.01 | 178.3 | اتجاه إنبات يمين | البادرات |
| 2.13 | 167.5 | اتجاه إنبات يسار | |
| 1.72 | 200.4 | ذات الأوراق المستقيمة | |
| 1.56 | 253.7 | ذات الأوراق المقوسة | |



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 OPC13 و OPD20 و OPA12.

L: دليل الأوزان القياسي للدنا (DNA Ladder) 100 pb

4-3-2 نتائج تحليل مؤشرات RAPD لتمييز جنس أصناف النخيل:

استخدمت البادئات التي اظهرت نواتج تفاعلها المتسلسل حزماً 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 الشكل (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 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 OPD10 أعلى قوة تشخيصية بلغت 14.63% وأعطى البادئان OPX04 و OPB07 أقل قوة تشخيصية بلغت 4.87%.

جدول (3) أعداد الحزم الكلية والمتباينة وكفاءة البادئات والقوة التشخيصية الناتجة من تفاعل بلمرة عشرة بادئات RAPD المستخدمة للتمييز بين 14 صنفاً من الاصناف الذكورية والأنثوية لنخيل التمر

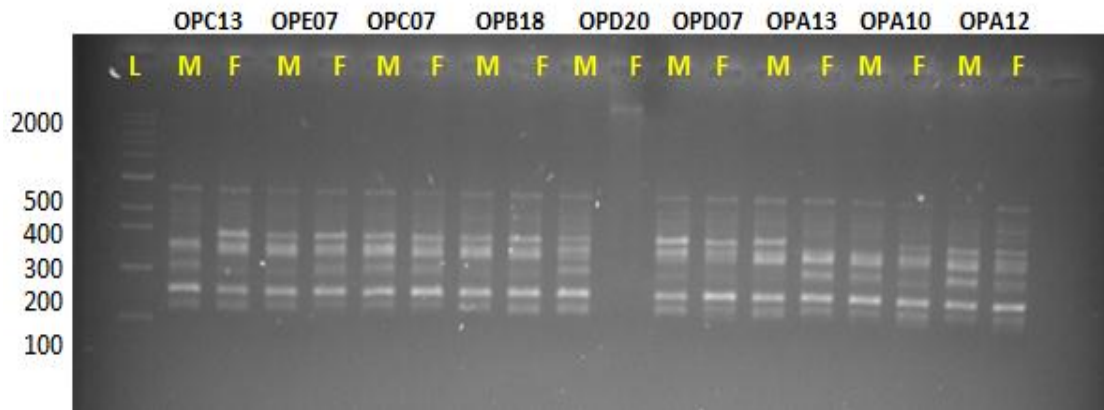
| ت | اسم البادئ | عدد الحزم الكلية | النسبة المئوية لكفاءة البادئ | عدد الحزم المتشابهة | عدد الحزم المتباينة | النسبة المئوية للتباين | النسبة المئوية للقوة التشخيصية للبادئ |
|----|------------|------------------|------------------------------|---------------------|---------------------|------------------------|---------------------------------------|
| 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 | - |

4-3-3 تمييز الجنس للأصناف الذكورية والانثوية باستخدام البادئ OPD10:

أظهرت نتائج بلمرة البادئ OPD10 الموضحة في الجدول (3) عدد من الحزم الكلية بلغت 118 حزمة، أي بمعدل 8.2 حزمة، وكان عدد الحزم المتباينة (Polymorphic bands) 6 حزم وعدد من الحزم المتشابهة (Monomorphic bands) بلغ عددها 112 حزمة، وأظهر الجدول (4) أن أعلى قيمة وزن جزيئي للحزم كانت 816 زوج قاعدي وأقل وزن جزيئي للحزمة بلغت 143 زوج قاعدي، وكانت أعلى نسبة تضاعف هي للصفة غنامي أخضر وخكري عادي ومكتوم وتبرزل وخستاي إذ بلغت 10 حزم لكل منهما، وأقل نسبة تضاعف للصفة خضراوي إذ بلغت 5 حزم، كما في الشكل (3). إن ظهور حزمة متباينة polymorphic bands ذات الوزن الجزيئي 143 زوج قاعدي 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 مميزاً لجنس أصناف نخيل التمر العراقية على مستوى مؤشرات RAPD.

وهذه النتيجة تتفق مع النتيجة التي توصلت إليها Younis وآخرون 2008 بحثهم إذ أظهر البادئ OPD10 حزمًا متباينة في الأصناف المؤنثة لم تظهر في الأصناف المذكورة.

بينت نتائج تفاعلات RAPD اختلافات في عدد الحزم المضاعفة وأحجامها الجزئية باختلاف البادئ المستخدم والناجمة من الاختلاف في عدد المواقع المكملية 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 المكملية 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 مجين الأفراد المدروسة، لذا فإن حدوث أي تغيير في تسلسل النيوكليوتيدات نتيجة الإضافة Insertion، أو الحذف Deletion، أو إعادة ترتيب Rearrangement للنوكليوتيدات في مجين الأفراد المدروسة لأي سبب كان كالتغيرات في الهيئة الكروموسومية Karyotypic change أو الطفرات النقطية Point mutation أو الارتباط أو العبور الجسمي 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 (Change in organelles DNA Brar) Jain و (1998)، إذ أن حدوث واحد أو أكثر من هذه التغيرات سوف يسبب تغييراً في مواقع الارتباط بالبادئ، وبالتالي يتغير حجم القطعة المتضاعفة مما يؤدي إلى ظهور هذه الحزم المتباينة، أو غيابها في مواقع محددة على الهلام.



الشكل (3) الترحيل الكهربائي الهلامي لنواتج تفاعل بلمرة سبعة عينات مذكرة (1-7) وسبعة عينات مؤنثة (8-14) باستعمال البادئ OPD10

L: دليل الأوزان القياسي للدنا (50 DNA Ladder) pb

3-3-4 نتائج مؤشرات التتابعات المتباينة المضاعفة المنشطرة

Cleaved Amplified Polymorphic Sequence (CAPS)

رشح البادئ OPD10 ليستعمل في تفاعل CAPS, تم عمل تفاعل البلمرة للعينات المذكورة والمؤنثة، استعملت أنزيمات القطع و التقييد (Restriction Enzyme) الثلاثة وهي *Hpa* و *Bcl* I و *Rsa* I و II لقطع نواتج التفاعل, بعد ترحيل 28 عينة (14 عينة مذكرة ومؤنثة قبل القطع بالأنزيم و 14 عينة بعد القطع بالأنزيم) أظهرت نتائج الجدول (5) الى استجابة هذه النواتج للقطع بالانزيم *Bcl* I اذ قطعت الحزمة ذات الوزن الجزيئي 143 زوج قاعدي التي تحتويها ستة عينات مؤنثة وكما في الشكل (4), وتتفق هذه النتيجة مع ما اوضحته Al-Mahmoud وآخرون (2012) عند استخدام أنزيم القطع *Bcl* I الذي قام بنفس العمل.



الشكل (4) الترحيل الكهربائي الهلامي لنواتج تفاعل البلمرة لسبعة أصناف مذكرة العينات (1-7) وسبعة أصناف مؤنثة العينات (8-14) باستخدام البادئ OPD10 قبل القطع بالأنزيم وبعد القطع بالأنزيم *Bcl* I

L: دليل الأوزان القياسي للدنا (pb50 DNA Ladder)

استخدم أنزيم التقويد *HpaII* لهضم نواتج تفاعل البلمرة باستعمال البادئ OPD10 وتشير النتائج الموضحة في الجدول (6) قطعت الحزم ذات الوزنالجزئي , 522,433,320, 650 , 734 ، 816 زوج قاعدي الموجودة في الأصناف المؤنثة والمذكرة كما في الشكل (5). وهذه النتيجة لا تتفق مع ما وضحته Al-Mahmoud وآخرون (2012) التي حصلت قطع للحزمة 180 زوج قاعدي الموجودة في الأصناف المؤنثة عند استخدام الأنزيم *HpaII*.

جدول (4) الحزم الناتجة من تضاعف دنا عينات النخيل الذكرية والأنثوية باستعمال البادئ OPD10 مع أوزانها الجزيئية

| الأوزان الجزيئية | الأصناف المذكورة | | | | | | | الأصناف المؤنثة | | | | | | |
|---------------------|------------------|---------------|----------------|---------------|--------------|-------|-------|-----------------|-------|-------|--------|--------|---------------|--------|
| | غلامي أحمر | غلامي أخضر | خكري كريطلي | خكري سميسي | خكري عادي | رصاصي | غلامي | برحي | تبرزل | مكتوم | أشرسبي | خستاوي | أسطة عمران | خضراوي |
| 816 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| 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 | 0 |
| 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 |



الشكل (5) الترحيل الكهربائي الهلامي لنواتج تفاعل البلمرة لسبعة أصناف مذكرة العينات (1-7) وسبعة أصناف مؤنثة العينات (8-14) باستخدام البادئ OPD10 قبل القطع بالأنزيم وبعد القطع بالأنزيم *HpaII*

L: دليل الأوزان القياسي للدنا (100 pb DNA Ladder)

أجري تفاعل PCR باستخدام البادئ OPD10 وعند استعمال أنزيم التقبيد *RsaI*, لم يظهر أي استجابة للعينات للقطع بهذا الأنزيم وهذا يؤيد ما وضحته Al-Mahmoud وآخرون (2012) من عدم استجابة عينات نخيل التمر التي تم بلمرتها للقطع بأنزيم القطع والتقبيد *Ras I*. كما في جدول (7).

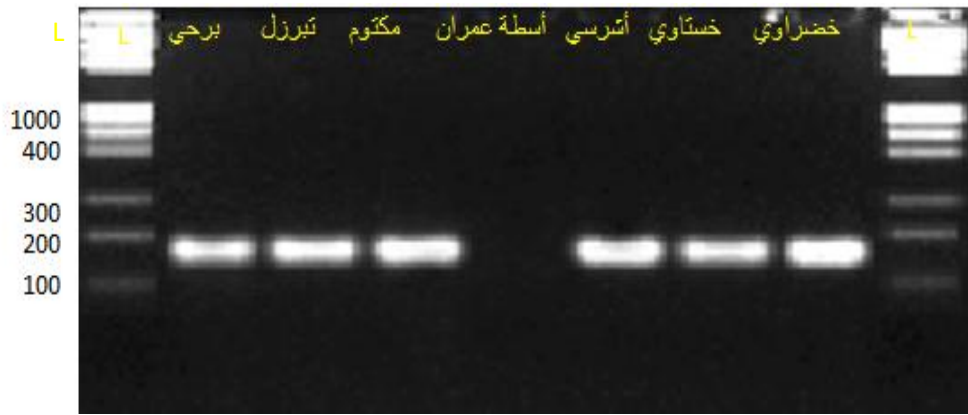
| جدول (6) الأوزان الجزئية للحزم الناتجة من تفاعل البلمرة المتسلسل باستعمال البادئ OPD10 لسبعة أصناف مذكرة وسبعة أصناف مؤنثة قبل القطع بالأنزيم وبعد القطع بالأنزيم Hpa II | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--|--------------------|------------|-------------|------------|-----------|-------|-------|------|-------|-------|-------|-------|------------|--------|--------------------|------------|-------------|------------|-----------|-------|-------|------|-------|-------|-------|-------|------------|--------|
| الوزن الجزئي | قبل القطع بالأنزيم | | | | | | | | | | | | | | بعد القطع بالأنزيم | | | | | | | | | | | | | |
| | غانمي احمر | غانمي اخضر | خكري كريبطي | خكري سميسي | خكري عادي | رصاصي | غلامي | برجي | تيززل | مكتوم | اشرسي | خستاي | اسطة عمران | خضراوي | غانمي احمر | غانمي اخضر | خكري كريبطي | خكري سميسي | خكري عادي | رصاصي | غلامي | برجي | تيززل | مكتوم | اشرسي | خستاي | اسطة عمران | خضراوي |
| 816 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 734 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 650 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 522 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 433 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 320 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 282 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 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 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 180 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 |
| 154 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 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 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 |

جدول (7) الأوزان الجزئية للحزم الناتجة من تفاعل البلمرة المتسلسل باستعمال البادئ OPD10 لسبعة أصناف مذكرة وسبعة أصناف مؤنثة قبل القطع بالأنزيم وبعد القطع بالأنزيم Ras I

| الوزن الجزئي | قبل القطع بالأنزيم | | | | | | | | | | | | | بعد القطع بالأنزيم | | | | | | | | | | | | | | | |
|--------------|--------------------|------------|-------------|------|-----------|-------|-------|------|-------|-------|-------|--------|------------|--------------------|------------|------------|-------------|------|-----------|-------|-------|------|-------|-------|-------|--------|------------|--------|---|
| | غانمي أحمر | غانمي أخضر | خكري كريبطي | خكري | خكري عادي | رصاصي | غلامي | برحي | تبرزل | مكتوم | اشرسي | خستاوي | اسطة عمران | خضراوي | غانمي أحمر | غانمي أخضر | خكري كريبطي | خكري | خكري عادي | رصاصي | غلامي | برحي | تبرزل | مكتوم | اشرسي | خستاوي | اسطة عمران | خضراوي | |
| 816 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| 765 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| 650 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| 522 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| 433 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 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 | 1 | 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 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| 253 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| 180 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 154 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 |
| 143 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 |

4-3-5 نتائج تفاعل البلمرة المتسلسل المتشعب:

أجري تفاعل البلمرة المتسلسل المتشعب للحزمة المميزة وذات التعدد الشكلي التي ظهرت في دنا ستة من العينات الأنتوية التي تمثل الأصناف برحي وتبرزل ومكتوم واشرسى وخستاوي وخضراوي عدا الصنف أسطة عمران الذي لم تظهر فيه هذه الحزمة وبعد إجراء الترحيل الكهربائي و باستخدام البرنامج الحاسوبي Photo capture ظهر أن الوزن الجزيئي للعيينة المتشعبة N هو 143 زوج قاعدي كما في الشكل (6).

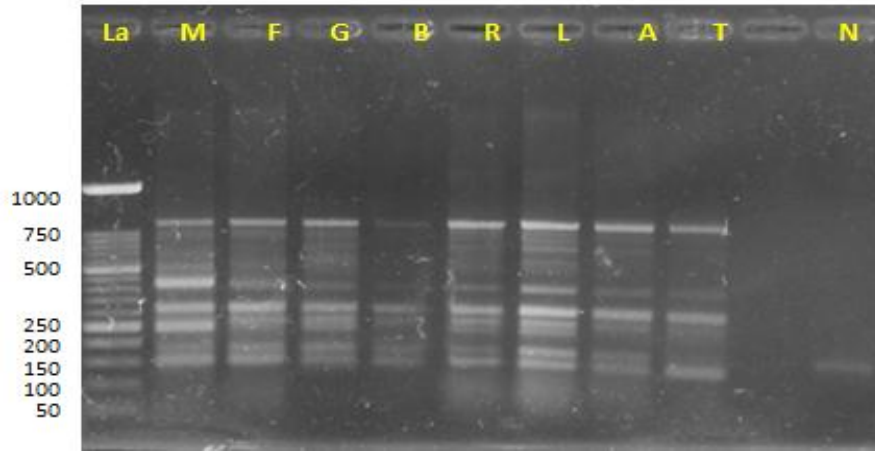


شكل (6) الترحيل الكهربائي لنواتج بلمرة المتشعبة للأصناف المؤنثة السبعة

L: يمثل دليل الأوزان القياسي للدنا (DNA Ladder) 100 pb

4-3-6 استخدام مؤشر الدنا في تمييز جنس بادرات النخيل:

يبين الجدول (8) نتائج تفاعل بلمرة RAPD للعينات {مجموعة الذكور (M) ومجموعة الإناث (F) وغنامي أخضر (G) وبرحي (B) والبادرة المتجهة بأنباتها نحو اليمين () والبادرة المتجهة بأنباتها نحو اليسار () والبادرة المستقيمة الأوراق (A) والبادرة المقوسة الأوراق (T) والعيينة المتشعبة (N)} باستخدام البادئ OPD10 لوحظ أن العينة T قد شابهت العينة B في عدم احتوائهما على الحزم ذات الأوزان 522, 600, 740 واحتوائهما على الحزمة ذات الوزن الجزيئي 143 زوج قاعدي (الحزمة المميزة للإناث) كما الشكل (7).



الشكل (7) الترحيل الكهربائي لنواتج بلمرة باستخدام البادئ OPD10 لعينات مجموعة الذكور M ومجموعة الإناث F والغنامي الأخضر G والبرحي B والبادرات المتجهة نحو اليمين R ونحو اليسار L وذات الأوراق المستقيمة A والمقوسة T والمتشعبة N
La: دليل الأوزان القياسي للدنا (50 DNA Ladder) pb

جدول (8) نواتج بلمرة العينات باستخدام البادئ OPD10 لمجموعة الذكور ومجموعة الإناث والغنامي الأخضر والبرحي والبادرات المتجهة نحو اليمين ونحو اليسار وذات الأوراق المستقيمة والمقوسة والعينة المتشعبة

| الوزن الجزيئي زوج قاعدي | مجموعة الذكور M | مجموعة الإناث F | غنامي أخضر G | برحي B | يمين R | يسار L | مستقيمة A | مقوسة T | متشعبة N |
|----------------------------|--------------------|--------------------|-----------------|-----------|-----------|-----------|--------------|------------|-------------|
| 816 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| 743 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| 650 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| 522 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| 433 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| 320 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| 280 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| 253 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| 180 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| 154 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| 143 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |

إنَّ شجرة القرابة الوراثية هي تخطيط يظهر العلاقات التطورية لمجموعة من الكائنات الحية التي نشأت من سلف مشترك. يكون السلف المشترك في جذع الشجرة، والكائنات التي تنشأ منه توجد في

نهاية فروع الشجرة. تشير المسافة بين المجموعة الواحدة والمجموعات الأخرى إلى درجة العلاقة بينهم. فالمجموعات القريبة من بعضها توضع في فروع قريبة من بعضها، وعلى الرغم من ذلك فإن هذه الطريقة تقديرية ولكنها طريقة سهلة لدراسة علاقات القرابة والتطور.

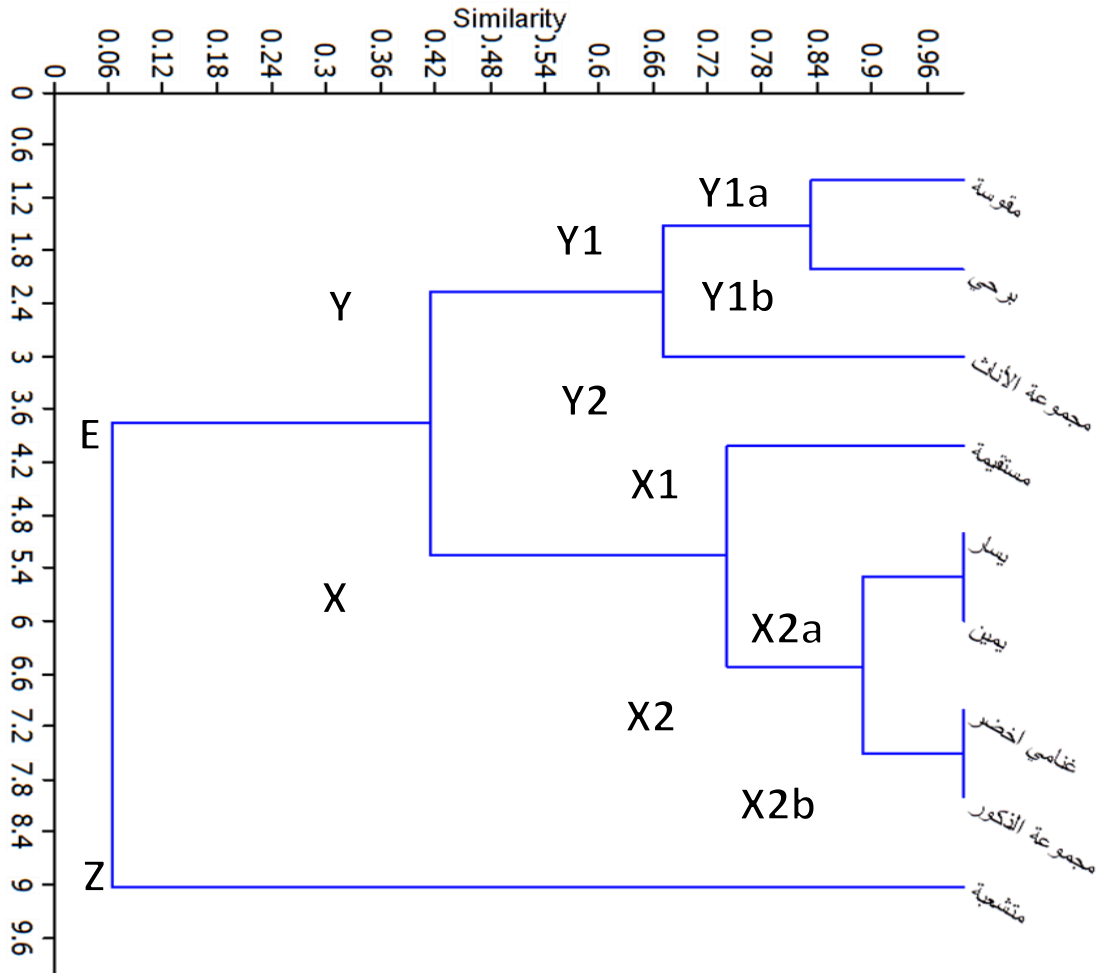
بشكل عام، فإن الكائنات التي تكون متشابهة شكلياً مع بعضها أو متشابهة وراثياً مع بعضها من المحتمل ان تكون قريبة من بعضها أكثر من الكائنات التي تكون ذات بنى أو تسلسلات مختلفة. وقد تكون الأفراد مختلفة مع بعضها مظهرياً ولكنها قريبة من بعضها جينياً وبالتالي قد تعود هذه الاختلافات الى تأثيرات بيئية فقط لاتؤخذ بعين الاعتبار في تحديد درجة القرابة بين الأفراد.

أظهر التحليل العنقودي للعينات المدروسة باستخدام مؤشرات RAPD واعتماداً على طريقة (UPGMA) Pair – Group Method using an arithmetic Average ان العينات المدروسة قسمت الى مجموعتين رئيسيتين E و Z بلغت نسبة التشابه بينهما 6% ضمت المجموعة Z العينة المتشعبة وضمت المجموعة (E) مجموعتين ثانويتين X و Y بلغت نسبة التشابه بين المجموعتين 42% شملت المجموعة Y العينات المقوسة والبرحي ومجموعة الإناث أما المجموعة X شملت العينة المستقيمة واليسار واليمين وغنامي اخضر ومجموعة الذكور كما في الشكل (8).

نتائج التشابه الوراثي على مقياس Jacard Similarity index كانت كالآتي:

أظهرت البادرة المقوسة اعلى نسبة تشابه مع مجموعة الإناث بلغت 71.40% ونسبة التشابه الوراثي بين البادرة المستقيمة ومجموعة الذكور بلغت 30% كما أظهرت البادرة المقوسة أعلى نسبة تشابه وراثي مع الأم (البرحي) 83.33%، وبلغت نسبة التشابه الوراثي بين العينة المتشعبة وبين مجموعة الإناث 14.2% ونسبة التشابه الوراثي بين العينة المتشعبة ومجموعة الذكور بلغت 0.00% ونسبة التشابه الوراثي بين العينة المتشعبة وبين الأم (البرحي) بلغت 16.6%، وبلغت نسبة التشابه الوراثي بين البادرة المستقيمة ومجموعة الإناث 36.3% ونسبة التشابه الوراثي بين البادرة المستقيمة ومجموعة الذكور بلغت 77.7% ونسبة التشابه الوراثي بين البادرة ذات اتجاه الأنثبات نحو اليسار ومجموعة الإناث 27.2%، وبلغت نسبة التشابه الوراثي بين البادرة ذات اتجاه الأنثبات نحو اليسار ومجموعة الذكور بلغت 60% ونسبة التشابه الوراثي بين البادرة ذات اتجاه الأنثبات نحو اليسار وبين الأم (البرحي) بلغت 50%، وبلغت نسبة التشابه الوراثي بين البادرة ذات اتجاه الأنثبات نحو اليمين ومجموعة الإناث 60% وبلغت نسبة التشابه الوراثي بين البادرة ذات اتجاه الأنثبات نحو اليمين ومجموعة الذكور 88.8% ونسبة

التشابه الوراثي بين البادرة ذات اتجاه الأنبات نحو اليمين وبين الأم (البرحي) بلغت 50% وكما في الجدول (9). إن نسبة التشابه الوراثي للبادرة المقوسة مع مجموعة الإناث بلغت 71.4% ونسبة التشابه الوراثي لهذه البادرة مع الأم (البرحي) بلغت 83.33% مما يعطي مؤشراً ايجابياً أن تكون هذه البادرة شجرة مؤنثة مستقبلاً.



الشكل (8) شجرة القرابة الوراثية (Dendrogram) للعينات مجموعة الذكور ومجموعة الإناث والغنامي الأخضر والبرحي والبادرة المتجهة بأنباتها نحو اليمين والبادرة المتجهة بأنباتها نحو اليسار والبادرة المستقيمة الأوراق والبادرة المقوسة الأوراق والعينة المتشعبة اعتماداً على نتائج البلمرة بالبادئ OPD10

جدول (9) التشابه الوراثي للعينات مجموعة الذكور ومجموعة الإناث والغنامي الأخضر والبرحي والبادرات المتجهة نحو اليمين و نحو اليسار والمستقيمة والمقوسة والمتشعبة اعتماداً على نتائج البلمرة ببادئ OPD10

| | متشعبة | مقوسة | مستقيمة | يسار | يمين | برحي | غنامي اخضر | مجموعة الأناث | مجموعة الذكور |
|------------------|--------|-------|---------|-------|-------|-------|---------------|------------------|------------------|
| متشعبة | 1.000 | | | | | | | | |
| مقوسة | 0.200 | 1.000 | | | | | | | |
| مستقيمة | 0.000 | 0.181 | 1.000 | | | | | | |
| يسار | 0.000 | 0.400 | 0.700 | 1.000 | | | | | |
| يمين | 0.000 | 0.400 | 0.700 | 1.000 | 1.000 | | | | |
| برحي | 0.166 | 0.833 | 0.272 | 0.500 | 0.500 | 1.000 | | | |
| غنامي أخضر | 0.000 | 0.300 | 0.777 | 0.888 | 0.888 | 0.400 | 1.000 | | |
| مجموعة الأناث | 0.142 | 0.714 | 0.363 | 0.600 | 0.600 | 0.625 | 0.500 | 1.000 | |
| مجموعة الذكور | 0.000 | 0.300 | 0.777 | 0.888 | 0.888 | 0.400 | 1.000 | 0.500 | 1.000 |

4-3-7 نتائج تفاعل التتابعات المتسلسلة القصيرة SSR

بعد إجراء تفاعل بلمرة بأستعمال ثلاث بادئات التتابعات المتكررة (SSR) وهي البادئ 48 mPdCIR0 و mPdCIR078 والبادئ mPdCIR093 جرى فصل النواتج باستخدام جهاز التحليل الجيني Genetic Analyser 3130، إذ أظهر البادئ mPdCIR048 الأوزان الجزيئية لحزم مجموعة الأصناف المذكرة (M) 195,193,182 زوج قاعدي، وأن الأوزان الجزيئية لحزم مجموعة الأصناف المؤنثة (F) 195,185,182,158 زوج قاعدي. وبما أن الأوزان الجزيئية للحزم 195,182 موجودة في المجموعة المذكرة والمجموعة المؤنثة بذلك اعتبرت حزمًا حيادية لا يعتمد عليها في التمييز بين الأصناف المذكرة والأصناف المؤنثة كما في الجدول (10).

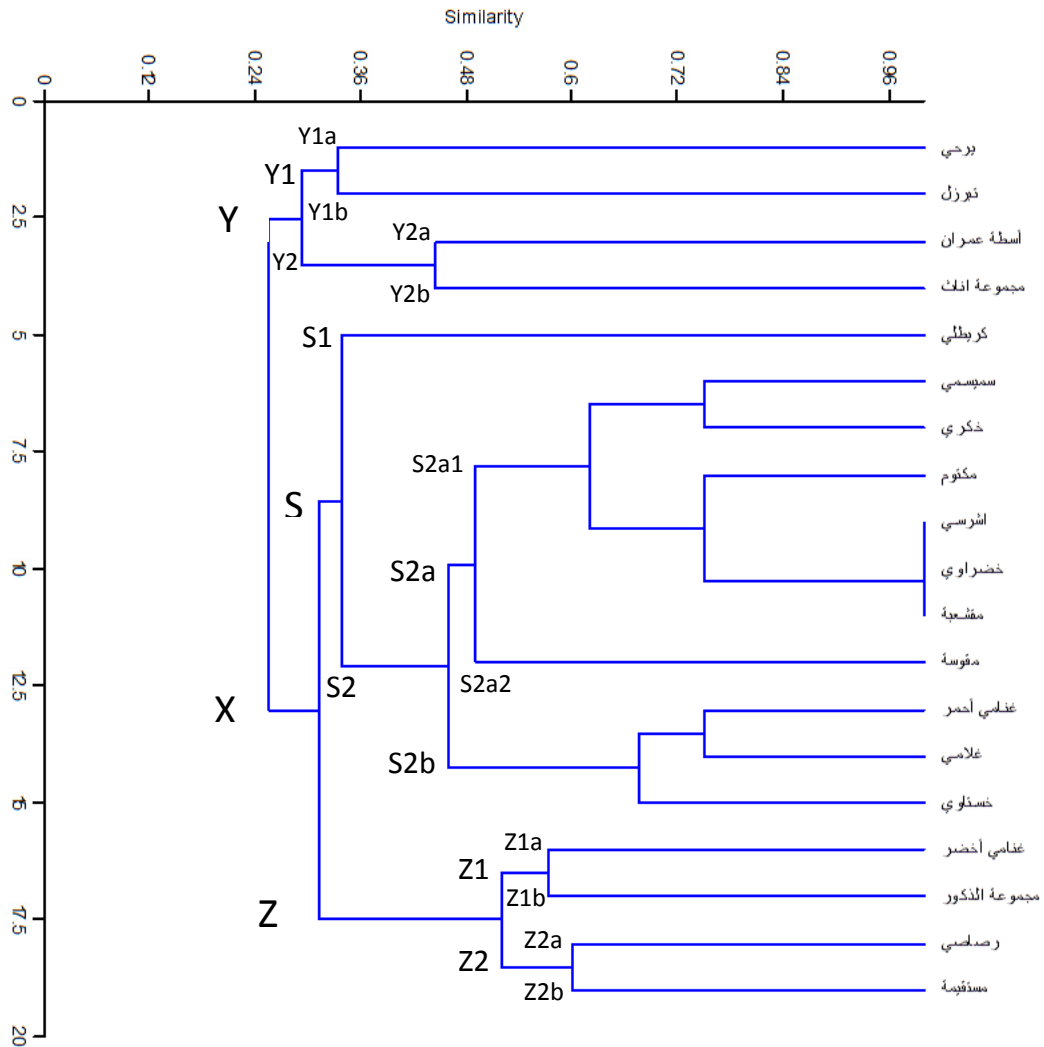
وأظهر البادئ mPdCIR078 الأوزان الجزئية لحزم عينة مجموعة الأصناف المذكورة (M) 117، 134، 137، 147، 154 زوج قاعدي، والأوزان الجزئية لحزم عينة مجموعة الأصناف المؤنثة (F) 132، 134، 137، 143، 145، 154 زوج قاعدي.

وبما أن الأوزان الجزئية للحزم (134، 137) موجودة في المجموعة المذكورة والمجموعة المؤنثة، بذلك اعتبرت حزمًا حيادية لا يعتمد عليها في التمييز بين الأصناف المذكورة والأصناف المؤنثة. عدت الحزمة 143 مميزة للإناث إذ ظهرت الحزمة المميزة للإناث بستة أصناف مؤنثة وهي برحي وتبرزل ومكتوم وأشرسي وخستاوي وخضراوي، أي بنسبة 85.7% وبذلك يمكن اعتماد هذا البادئ لتمييز جنس نخيل التمر، كما أحتوت عينة البادئة ذات الأوراق المقوسة والعينة المتشعبة على الحزمة ذات الوزن الجزئي 143 المميزة للإناث كما يبين الجدول (11).

أظهر البادئ mPdCIR093 الأوزان الجزئية لحزم عينة مجموعة الأصناف المذكورة (M) ومجموعة الأصناف المؤنثة (F) 160، 166، 170، 172، 178 زوج قاعدي أي ان البادئ لم ينجح بالأرتباط بدنا العينات واطهر نتائج غير صحيحة إذ اظهر حزم عديدة لكل عينة كما لم يظهر أي تمييز بين الأصناف المذكورة والأصناف المؤنثة كما في الجدول (12).

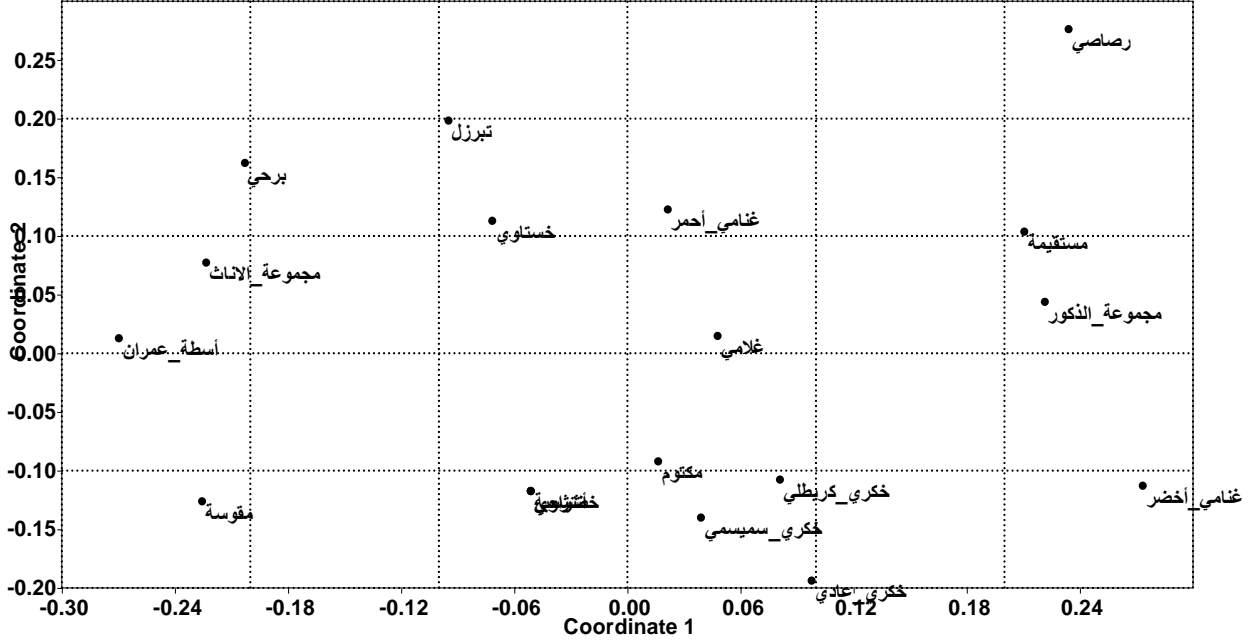
أظهر البادئ mPdCIR048 والبادئ mPdCIR093 نتيجة لا تتفق مع ما وجدته الباحثان Elmeer و Matat (2012) في حين أظهر البادئ mPdCIR078 نتيجة تتفق مع ما وجدته الباحثان في إمكانية تمييز جنس نخيل التمر.

أظهر مخطط البعد الوراثي UPGMA اعتماداً على نتائج بادئات التتابعات المتسلسل (SSR) أن العينات المدروسة توزعت الى مجموعتين Y و X كما في الشكل (9) وأن نسبة التشابه بينهما بلغت 24%، إذ ضمنت المجموعة الأولى مجموعتين ثانويتين تضمنت العينات برحي وتبرزل واسطة عمران ومجموعة الأناث و ضمت المجموعة الثانية مجموعتين ثانويتين S و Z بلغت نسبة التشابه بينهما 30% تضمنت المجموعة S العينات سميسي وخكري ومكتوم وأشرسي وخضراوي ومنتشعبة ومقوسة وغنامي احمر وغلامي وخستاوي، في حين ضمت المجموعة Z العينات غنامي اخضر ومجموعة الذكور ورمصاصي ومستقيمة.



الشكل (9) شجرة القرابة الوراثية (Dendrogram) للعينات مجموعة الذكور وسبعة اصناف مذكرة ومجموعة الإناث وسبعة أصناف مؤنثة والمستقيمة والمقوسة الأوراق والمنتشعبة لنتائج SSR

أظهرت نتائج تحليل المكون الرئيسي (PCA) المبينة في الشكل (10) تشابه نتائج شجرة القرابة الوراثية (شكل 9) في توزيع العينات المدروسة الى مجاميع.



شكل (10) توزيع العينات مجموعة الذكور وسبعة اصناف مذكرة ومجموعة الإناث وسبعة أصناف مؤنثة والمستقيمة والمقوسة الأوراق والمتشعبة على المستوى المتعامد حسب تحليل المكون الرئيسي (PCA) اعتمادا على مؤشر SSR

4-4 نتائج التحليلات الكيميائية

4-4-1 نتائج تحليل البروتين:

توضح النتائج في الجدول (13) أن محتوى بادرات النخيل بنوعها ذات الأوراق المستقيمة A وذات الأوراق المقوسة T لم تتأثر بنوعية البادرات إذ بلغ معدل النسبة المئوية للبروتين في البادرات ذات الأوراق المستقيمة 3.33% وفي المقوسة 3.06%. وجاءت هذه النتائج غير متفقة مع ما وجدته El-Yazal (2008) في بحثه على فساتل مذكرة ومؤنثة إذ وجد أن محتوى الفساتل المؤنثة من البروتين كان أكثر مما في الفساتل المذكرة بنحو 3%.

جدول (13) محتوى بادرات النخيل التمر من النسبة المئوية للبروتين الكلي/على اساس الوزن الجاف

| البروتين % | نوع البادرة | البروتين % | نوع البادرة |
|------------|-------------|------------|-------------|
| 3.02 | T1 | 3.35 | A1 |
| 3.10 | T2 | 3.30 | A2 |
| 3.05 | T3 | 3.35 | A3 |
| 3.06 | | 3.33 | المعدل |

2-4-4 محتوى بادرات النخيل من الحامض الاميني البرولين ملغم/100غم من الوزن الطري

يبين الجدول (14) محتوى بادرات النخيل بنوعيه ذات الاوراق المستقيمة A والمقوسة T من الحامض الأميني البرولين إذ يتبين أن البادرات A احتوت على كمية من البرولين أكثر من محتوى البادرات (T) بنحو 2.5% وهذا جاء متفقاً مع ما وجدته El-Yazal (2008) في بحثه على فساتل مذكرة ومؤنثة إذ وجد ان محتوى الفساتل المذكرة من البرولين أعلى منه في المؤنثة بنحو 1.03% ولم يتفق مع ما وجدته Helail (2000) إذ وجد ان محتوى الفساتل المؤنثة من البرولين اعلى من محتوى الفساتل المذكرة بنحو 8.45%.

جدول (14) محتوى البادرات من البرولين ملغم/ 100غم من الوزن الطري

| البرولين ملغم/100غم | نوع البادرة | البرولين ملغم/100غم | نوع البادرة |
|---------------------|-------------|---------------------|-------------|
| 22.00 | T1 | 25.10 | A1 |
| 22.24 | T2 | 25.43 | A2 |
| 22.00 | T3 | 25.39 | A3 |
| 22.80 | | 25.30 | المعدل |

4-4-3: محتوى بادرات النخيل من أنزيم البيروكسيديز ملغم/100غم من الوزن الرطب

تبين النتائج في الجدول (15) بأنه لا توجد فروقات في محتوى البادرات بنوعيتها ذات الأوراق المستقيمة A وذات الأوراق المقوسة T من أنزيم البيروكسيديز، وهذه النتائج جاءت غير متفقة مع ما وجدته Helail (2000) في كون الفسائل المذكورة احتوت على نسبة عالية من أنزيم البيروكسيديز قياساً بمحتوى الفسائل المؤنثة لنخيل التمر بنحو 11.65%.

جدول (15) محتوى البادرات من البيروكسيديز ملغم /100مللتر

| نوع البادرة | محتوى البادرات من أنزيم البيروكسيديز ملغم /100 غم | نوع البادرة | محتوى البادرة من أنزيم البيروكسيديز ملغم /100 غم |
|-------------|---|-------------|--|
| A1 | 6.47 | T1 | 7.12 |
| A2 | 6.40 | T2 | 6.98 |
| A3 | 6.45 | T3 | 6.45 |
| المعدل | 6.44 | | 6.85 |

5- الاستنتاجات والتوصيات:

5-1 الاستنتاجات:

أظهرت نتائج الدراسة الحالية مايلي:

1-إن الطريقة التقليدية المعتمدة على اختراق البادرات للغطاء لم تثبت قدرتها على التمييز بين لبادرات كما لم تثبت طريقة اتجاه إنبات البادرات (نحو اليمين ونحو اليسار) قدرتها على تمييز الجنس ايضاً.

2-أثبتت الدلائل الجزيئية قدرة الطريقة التقليدية المعتمدة على شكل الورقة (مستقيمة أو مقوسة) على تمييز الجنس المبكر وبنسبة عالية.

3- دلت نتائج الدراسة قدرة البادئ OPD10 الخاص بمؤشرات RAPD على تمييز الجنس المبكر بنسبة 85.7% من خلال تكوين الحزمة ذات الوزن الجزيئي 143 زوج قاعدي التي ظهرت بالإناث (6 من 7) ولم تظهر بالذكور نهائياً. وأثبتت تقانة تفاعل البلمرة المتشعب خصوصية الحزمة OPD10_(143bp) لتحديد الجنس في الأصناف قيد الدراسة.

4- أكدت دراسة مؤشرات التتابعات القصيرة البسيطة SSR على نفس نتائج تفاعلات RAPD من حيث خصوصية OPD10_(143bp) لتحديد الجنس المبكر لبادرات النخيل.

5- لا توجد علاقة بين الجنس ومحتوى البروتين والبرولين والبيروكسيديز في أوراق بادرات النخيل الذكرية والأنثوية.

2-5 التوصيات:

- 1- متابعة الشتلات المدروسة لحين الازهار للتحقق من جنسها حقلياً ومقارنة النتائج مع المؤشرات الجزيئية.
- 2- إيجاد التسلسل النيوكليوتيدي للحزمة التي تم التوصل إليها $OPD10_{(143Pb)}$ وذلك الغرض دراسة إمكانية تصميم بادئ يمتاز بدقة أعلى في تمييز جنس النخيل.
- 3- دراسة مواقع أخرى وذلك باختيار بادئات أخرى لمؤشرات SSR وتحليل النتائج باستخدام جهاز Genetic Analyzer.
- 4- إمكانية تمييز الجنس في إناث أخرى وذكور أخرى من نخيل التمر باستخدام المؤشرات الجزيئية وخاصة البادئ الذي تم التوصل إليه في هذه الدراسة.

المصادر المعتمدة:

المصادر العربية

✻ البكر, عبد الجبار . 1972. نخلة التمر - ماضيها وحاضرها والجديد في زراعتها وصناعتها وزراعتها وتجاريتها، مطبعة العاني، بغداد.

✻ الجهاز المركزي للإحصاء، الإحصائية السنوية. 2014. بغداد، جمهورية العراق.

✻ الحسني، خلود إبراهيم حسن. 2002. استخدام المؤشرات الجزيئية المعتمدة على التفاعل التضاعفي لسلسلة الدنا في دراسة التنوع الوراثي للبطاطا (*Solanum tuberosum L.*)، أطروحة دكتوراه، كلية العلوم، جامعة بغداد-العراق.

✻ الخطيب, تمارا عدنان. (2000). استخدام مؤشرات التضاعف العشوائي المتعدد الأشكال لسلسلة الدنا (RAPD) في التمييز لجنس وأصناف ذكور نخيل التمر، رسالة ماجستير، كلية العلوم، جامعة بغداد.

✻ الخولاني، محمد العزي. (2008). دراسة التباينات الوراثية لأصناف الشعير في الجمهورية اليمنية باستخدام المؤشرات الجزيئية للدنا، أطروحة دكتوراه، قسم المحاصيل الحقلية، كلية الزراعة، جامعة تشرين، سوريا.

✻ الراجحي, ستار جاسم حتروش. 1989. دراسة خلوية على فحول معينة من نخيل التمر. رسالة ماجستير. كلية العلوم/ جامعة بغداد.

✻ الداوودي، علي محمد حسين. (1991). الكيمياء الحيوية المتقدمة، دار الحكمة للطباعة والنشر، بغداد.

✻ العاني, مؤيد رجب عبود. (1998). دراسة إمكانية تمييز جنس النخيل في مرحلة البادرات باستخدام الهجرة الكهربائية للبروتينات والمواد الشبيهة بالجبرلينات، أطروحة دكتوراه، كلية الزراعة-جامعة بغداد.

✻ الفليح، خولة محمد أحمد. (1988). الكيمياء الحياتية، جامعة الموصل، ص426.

✻ المجاهد, عبدالله محمد علي و رسول، عمر يوسف. (1987). ملح الملاحه في معرفة الفلاحه، كلية الزراعة-جامعة صنعاء، دار الفكر للطباعة والنشر، الطبعة الأولى.

- المريقي، أحمد جابر موسى (2005). كيمياء نباتات البساتين. كلية الزراعة، جامعة الاسكندرية، 54-87.
- الموسوي، علي حسين عيسى. (1987). علم تصنيف النبات، وزارة التعليم العالي والبحث العلمي، جامعة بغداد.
- الهاشمي، عماد رشيد. (1989). تأثير الأملاح الشائعة في التربة العراقية على إنبات بذور نخلة التمر ونمو بادراتها، رسالة ماجستير، كلية العلوم-جامعة بغداد.
- الهيبي، عبد اللطيف رحيم وخالد نعمان وصفاء محمد. 1975. بحوث ودراسات قسم النخيل/ مديرية البستنة العامة. وزارة الزراعة والأصلاح الزراعي. مقدمة للمؤتمر الدولي الثالث للنخيل والتمر المنعقد في بغداد للفترة 11/30-1975/12/4.
- جبرائيل، جلادت محمد صالح. (2001). التوصيف الوراثي لعدد من أصناف نخيل التمر (*Phoenix dactylifera L.*) في العراق باستخدام مؤشرات RAPD، مجلة إباء للأبحاث الزراعية، المجلد 11، العدد 1، ص 138-148.
- خير الله، حسام سعد الدين محمد. (2007). الاكثار الدقيق لصنفين من نخيل التمر *Phoenix dactylifera L.* باستخدام النورة الزهرية ودراسة الثبات الوراثي باستخدام مؤشرات تباين اطوال قطع الدنا المتضاعفة (AFLP). أطروحة دكتوراه، كلية الزراعة-جامعة بغداد، بغداد.
- سليبي، محمود إسماعيل ومؤيد رجب العاني ومحمد عباس سلمان. (1995). دراسة الطرز الكروموسومية لأصناف مختلفة من نخيل التمر. مجلة العلوم الزراعية العراقية، المجلد 26، العدد الثاني، ص 119-130.
- عباس، كاظم إبراهيم. (2000). دراسة كروموسومية وتشريحية ومظهرية في بعض الأصناف الزراعية من نخيل التمر. أطروحة دكتوراه. كلية العلوم. جامعة البصرة. العراق.
- عبد الوهاب، نبيل إبراهيم. (1999). دراسة فسلجية لصفات بعض أصناف نخلة التمر الذكرية والأنثوية وتحديد طاقمها الكروموسومي، أطروحة دكتوراه، كلية الزراعة-جامعة بغداد.

✻ مطر, عبد الأمير مهدي. (1991). زراعة النخيل وإنتاجه، وزارة التعليم العالي والبحث العلمي، جامعة بغداد.

المصادر الأجنبية:

- ✻ Abdual-Wahab, A. S. 1976. The Influence of some chemicals on the germination of date palm seeds. Bul. Coll. Sci.17(1).
- ✻ Ahmed T.A, Al-Qaradawi A. (2009) Molecular phylogeny of Qatari date palm genotypes using simple sequence repeats markers. Biotechnology 8:126–131.
- ✻ Aitchitt, M.; Ainsworth, C.C.; and Thangavelu, M..1993. A rapid and efficient method for the extraction of total DNA from mature leaves of the date palm (*Phoenix dactylifera* L.). Plant. Mol.Biol.Rep.11: 317-319.
- ✻ Al-Ani, B.; Zaid, A. and Shabana, H.. 2010. On the state of chromosomes of Date Palm (*Phoenix dactylifera* L). 4th Inter, Date Palm Conf, Acta Hort.882:253.
- ✻ Al-Ani, M.R.;AL-Jibouri.,A.M.and Kgazal,M.A.1986. Sex modification and identification and apomixis studies in date palm (*Phoenix dactylifera*). Iraqi Atomic Energy Commission. Nuclear Research center. 6410\6400 p 1-16
- ✻ 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.; Saie I. Elmeer, K. ; Bennetzen J. L.; Kruegger R. R. and. Malek, J. A. 2011. De

novo genome sequencing and comparative genomics of date palm (*Phoenix dactylifera*). National Biotechnolog. 29, 6: 521-527.

- 🌴 Ali, T.A.; Jubrail, J. M and A.M. Jassim. 2006. The use of RAPDs technique for the detection of genetic stability of the regenerated plantlets (Barhi cv.) in Iraq. 3rd Inter, Date Palm, Conf, Feb, 2-19, Abu-Dhabi. UAE.
- 🌴 Al-Jibouri, A.A.M; Salman, R.M. and M.S. Omar. 1988. Transfer of in vitro regenerated date palms to the soil. Date Palm. J. 6: 390-400.
- 🌴 Al-Jibouri, A.A.M. and Dham, K.M.1990. Biochemical classification of date palm male cultivars. J. hort. sci. 65: 5: 615-619
- 🌴 Al-Khalifha, N. S. and Askari, E.. 2006. Early detection of genetic variation in date palms propagated from tissue culture and offshoots by DNA fingerprinting. Proc. 3rd Inter, Date Palm, Conf, Feb, 19-21. 2006. Abu-Dhabi. UAE.
- 🌴 Al-Kharbotly, A.; Mardi, M.; Al-Saadi, N. 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.
- 🌴 Al-Mahmoud, M. E., Al-Dous, E. K., Al-Azwani, E. K., and Malek J. A. 2012. DNA-based assays to distinguish date palm (Arecaceae) gender. Amer.J. Bot. 1: 7-10.
- 🌴 Association of official analytical chemical. 1975.Official methods of analysis A.O.A.C.10. The Republished by A.O.A.C. Washington. D.C., U.S.A.

- 🌴 Al-Salih, A.A; A.Z. Al-Jarrah; S.M. Bader and M.T. Al-Qadi (1985). A study on the functional anatomy of the first secondary root of the date palm. *Date Palm J.4* (1): 1-14.
- 🌴 Al-Salih A.A., Hussain N.and Al-Jarrah A. 1987 a. Chromosomes numbers of A date palm males cultivar Ghannami Akhdar *Date Palm J. 5*(2): 128-133.
- 🌴 Al-Salih.A.A., Al-Najjar. N.R. and Al-Mashhadani. A.N. 1987b. Study on the chromosomes numbers of two specific female date palm cultivars, *Date Palm J. 5*(2): 134-143.
- 🌴 Azeqour, M.; Majourhat, K. and M. Baaziz. 2002. Morphological variations and isoenzyme polymorphism of date palm clones from in vitro culture acclimatized and established on soil in south morocco. *Euphytica. 123.*(1). 57-66.
- 🌴 Barone, E.; Martinez, M.L.; Verneque, R.S.; and Soutinho, L.L. 2000. Percentage testing and effect of misidentification on the estimation of breeding value in gir cattle. *Genetics and Molecular Biology. 25*(4): 389-394.
- 🌴 Becker, Y. and Darai, G. 1992. Diangnosis of human viruses by polymerase chain reaction technology. *Polymerase by Rosalind frontiers of virology, 1*, print book English book. 66-87.
- 🌴 Beckman, J.S. and Soller M. 1990. Restriction fragment length polymorphism in genetic improvement methodologies mapping and costs. *Theor. Apple. Genet. 67*: 35-43.
- 🌴 Bendiab, K.; Baaziz, M. and Majourhat ,K. 1998. Preliminary date palm cultivar composition of morocca palm groves as revealed by

leaf isoenzym phenotypes. *Biochemical Systematics and Ecology* 26: 71-82.

- 🌴 Benito, C; Figueiras, A.M; Zaragoza, C; Gallego, F.j. and A. Dela Penal. 1993. Rapid Identification of Trijticeae geno types from single seed using the polymerase chain reaction. *Journal Plant Molecular Biology*. Vol. 21 (1): 181-183.
- 🌴 Booiij , I.: Monfort, S. and Ferry, M. 1995. Characterization of thirteen date palm cultivars by enzyme electrophoresis using the phast system. *J. plant physiol.* vol. 145, p. 62-66.
- 🌴 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.
- 🌴 Caetano-Anolles, G.; Bassa, B.J. and P.M. Gresshoff. 1991. DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. *Biotech.* 9: 553-557.
- 🌴 Cha, R. S. and Thilly, W. G. 1993. Specificity, Efficiency, and Fidelity of PCR.. *Methods Appl.* 3: 118-129.
- 🌴 Chien, A.; Edgar, D.B. and J.M. Trela 1976. Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermos aquaticus*. *J. Bacteriol.* 127: 1550-1557.
- 🌴 Corniquel, B. and Mercier,L.. 1994. Date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultivar identification by RFLP and RAPD. *Plant. Sci.*, 101: 163-172.
- 🌴 Dakhlaoui –Dkhil,S.; Coquet, L.cosette,P.;Elkahoui,S.;Song,P.C.Vaudry,D.

- ;Hannachi,A.S.Trifi,N.Limam,F.and Jouenne,T..2013.The Date Palm (*Phoenix dactylifera* L.) leaf proteome:identification of a gender biomarker to screen male parents. International Associe Samuel de Champlain, Rouen, france.18-23.
- 🌴 Dellaporta, S.L.; Wood, J. and J.B. Hicks 1983.A plant DNA micro-preparation. Version II. Plant. Mol.Biol.Rep.1: 19-21.
- 🌴 Doyle, J.J. and Doyle, J.L. (1987). A rapid isolation procedur for small quantites of fresh leaf tissue. Phytoche. Bull., 19:11-15
Modified by Marchese,
- 🌴 Ellegren, H.2000. Microsatellite mutation in the germline: implication for evolutionary inference. Trends Genet. 16: 551-558.
- 🌴 Elmeer, K. and Matatt,I. 2012. Marker –assisited sex differentiation in date palm using simple sequences repeats. 3, Biotech 2: 241-247.
- 🌴 El-Shibli, S. and Korpelainen, H. 2007. Microsatellite markers reveal highgenetic diversity in date palm (*Phoenix dactylifera* L.) germplasm from Sudan. Genetica. 134:251–260
- 🌴 El-Shibli ,S. and korelainen,H. 2009. Biodiversity of date palm (*Phoenix dactylifera*.L) in sudan chemical, morphology and DNA polymorphism of selected cultivars. Plant Gene Resource. 7:194-203.
- 🌴 Erhardt. E. and Weimann, C.. 2007. Use of molecular marker for evaluation of genetic diversity and in animal production. Arch. Latinoam. Prod. Anim. 15(1): 63-66.
- 🌴 El-Yazal Mohamad A.Seif.2008.Sex determination of date palm *Phoenix dactylifera* through chemical composition ofleaves. Fayoum. J. Agric Res. and Dev 22 :2 : 76-87.

- 🌴 Escaich, S. W.; Baginski, I.; Ritter, J.; Philippe, N.; Bertrand, Y.; Claris, O.; Raudrant, D.; Sepetjan, M. and C. Trepo 1991. Comparison of HIV detection by virus isolation in lymphocyte cultures and molecular of HIV DNA and RNA by PCR in offspring of seropositive mothers. *J. AIDS*. 4: 130-135.
- 🌴 Fincham, J. R. S. 1983. Cells, DNA and Chromosome. In: Wright, P. G. S. (Ed) *Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory. New York, 2-48. from Sudan. *Genetica* 134:251–260.
- 🌴 Fristorm ,J.W. and Spaith, R.T.1980.The search for genetic variation. In. *principle of genetic* pp:511-530.
- 🌴 Ghafor ,Y. ; Mohammad, n and Salh, D..2014.Extraction and dertermination of chemical ingridents from stem of.International Jornal of Engineering and Techno.16:4.
- 🌴 Gupta, P.K.; Balyan, H.S.; Sharma, P.C. and B. Ramesh. 1996. Microsatellite in plants: a new class of molecular markers. *Current Science*. 1:45-54.
- 🌴 Hammer, Z.; Harper D.A. and Ryan, P.D. 2001 PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica* 4(1):9.
- 🌴 Helaili , B.M. 2000. Sex predication of date palm through some leaf chemical constituents. *Minufiya Journal of Agriculture Research (Egypt)*. 25 (2): 539-549.
- 🌴 Higuchi, D.; Von Berlodingen, C.H. Sensabaugh, G.F. and H.A. Erlich. 1988. DNA typing from single hairs. *Nucleic Acids Res*. 332: 543-545.

- 🌴 Hillis, D. M. and Moritz, C.. 1990. *Molecular Systematics*, (1 st edition). Sinauer Associates. Inc. Sunderland. Massachusetts. USA.588.
- 🌴 Hitrotoshi, S. and Fumio, I..198. Sex identification of dioecious plant by isozyme method in date palm (*Phoenix dactylifera*) Japanese J. Tropical Agriculture. 27(2): 75-78.
- 🌴 Hunter, R.L. and Merkert, C.L. (1957). Histochemical demonstration of enzyme separated by zone electrophoresis in starch gels. *Science*. 125: 1294-1295.
- 🌴 Hussein, E.H.; Adawy S.S.; El-Khishin, D.; Moharam, H. and El-Itriby, H..2002. Genetic variability Studies and molecular fingerprinting of some Egyptian date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultivars. I. A preliminary Study using RAPD markers. *Arab J. Biotech*. 5 (2): 217-224.
- 🌴 Innis, M. A. and Gelfand, D.H..1990. Optimization of PCR Basic Methodology, Part One. In: *PCR Protocols*, Sinky, J.J and T.J. White. (Eds) Academic Press., Inc. London.
- 🌴 Jubrael, J.M.S.; Udupa, S.M and Baum, M. 2005. Assessment of AFLP-based genetic relationships among date palm (*Phoenix dactylifera* L.) varieties of Iraq. *J. Amer. Soc. Hort. Sci*. 130(3): 442-447.
- 🌴 Karp, A. Edwards, K. J.; Bruford, M.; Vosman, B.; Morgante, M.; Seberg, O.; Kremer, A.; Boursot, P.; Arctander, P.; Taus, D. And G. M. Hewitt 1997. *Molecular Technologies for biodiversity evaluation: Opportunities and Challenges*. *Nature Biotechn*. 15: 625-628.
- 🌴 Kalclin, A.S.; Slyusarenko, A.G. and Gorodetski S. I. 1980. Isolation and properties of DNA polymerase from extremely

- thermophilic bacterium *Thermus aquaticus*. *Biokhimiya*. 45: 1576-1584.
- 🌴 Ko, H.L. and Henry R. J.. 1996. Specific 5S ribosomal RNA primers for the identification of plant species. *Plant Molecular Biology Reports* 14: 33-43
 - 🌴 Kunert, K. J; Baaziz, M. and C. A. Cullis. 2002. Techniques for determination of true-to-type date palm (*Phoenix dactylifera* L.) plants: A literature Review. *Emirate Journal of Agriculture Sciences* 15(1): 1-16.
 - 🌴 Litt, M. and Luty, J.A. (1989). A hypervariable microsatellite revealed, by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle action gene. *Am. J. Hum. Genet.*
 - 🌴 Longridge, P., Lance, R. and A. Barr. 1996. Practical Application of Marker Assisted Selection, Proceeding Of The Inte, Conf. And VII Inter Barly Genetic Symp Saskatchewan, Canada, University Of Saskatchewan, Saskatoon.189-196.
 - 🌴 Maniatis, T.; Fritsch, E. F. and J. Sambrook. 1982. *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbar laboratory. New York.
 - 🌴 Market, C.; Moller , F..1959. Multiple forms of enzymes: Tissue, autogene and species specific patterns.Proceedings of the National Academy of Sciences, Washington.45:753-763..
 - 🌴 Mathew, S. L.; Spannagl, M. ; Al- Malki, A.; George, B.; Torres, F. M.; Al- Dous, K. E.; Al- Zwani , E.; Emad H. ; Mathew S.; Mayer F. K. ; Mahmoud, A. Y.; Suhre, K. and Malek,J. 2014.A first genetic map of date palm (*Phoenix dactylifra*) reveals long-range structure conservation in the date palms. *BMC Genomic*. 15: 285-299.

- ✿ Mburu, D. and Hanotte, O., 2005. A practical approach to microsatellite genotyping with special reference to livestock population genetics. ILRI Biodiversity project manual prepared for the IAEA\ILRI training course on molecular characterization of small ruminant genetic resources of Asia, October-December ILRI, and Nairobi, Kenya.
- ✿ Melchinger, A.E.; Lee, M.; Lamkey, K.R.; and Woodman, W.L. 1990. Genetic diversity for restriction fragment length polymorphisms: relation to estimate genetic effect *Zea mays* inbreds Crop Sci. 30: 1033-1040.
- ✿ Mohammed, S. 1978. Investigation on the Storage viability and germination of date palm of different male cultivars. Sci. Res. found palm and Date Res Cen.tech. Bull. 1178. Baghdad. Iraq.
- ✿ Mullis, K. B. and F. Fallona. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. Methods Enzymol. 155– 335.
- ✿ Murray, M.G. and Thompson, W.I. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucl. Acids Res., 8: 4321-432.
- ✿ Nelson, D.L. and Caskey, C.T. . 1992. Alu PCR: The use of repeat sequence primers for amplification of human DNA from complex sources. P. 113–118. In: H. A Erlich (ed). PCR Technology Principles and Applications. Stockton, New York. USA.
- ✿ Newton, C.R. and A. Graham. 1997. PCR. 2nd Edition, Springer-Verlag. New York. USA.
- ✿ Ou, C. Y.; Kwok, S.; Mitchell, S.W.; Mack, D. H.; Sinnsky, J. J.; Krebs, J. W., Feorino, P., Warfield, D. and Schochetman, G. 1988.

DNA amplification for direct detection of HIV-1 in DNA of peripheral blood mononuclear cells. *Science*, 239: 295-297.

- 🌴 Paterson, A.H; Tanskley, S.D and Sorrel M.E.1991.DNA Marker in plant improvement. *Adv. Agton*: 36: 818-820.
- 🌴 Raven, H. P. and Johnson, G. B. 1996. The forensic sciences by biotechnology a novel method. *Appl. Genet*. 47: 212-220.
- 🌴 Reale, S.; Doveri, S.; Diaz, A.; Angiolillo, A.; Lucentini, L.; Pilla, F.; Martin, A.; Donini, P.; Lee, D. 2006. SNP-based markers for discriminating olive (*Olea europaea* L.) cultivars. *Genome*. 49: 1193-1205.
- 🌴 Roch. Mlecular. Biochemicals Company. 1999. Taq DNA polymerase from *Thermus aquatcus*. BM. Germany.
- 🌴 Saiki, R. K.; Gelfand, G. H.; Stoffel, S.; Scharf, S. J.; Higuchi, R.; Horn, G. T.; Mullis, K. B. and Elich H. A.,. 1988. Primer directed enzymatic amplification of DNA polymerase. *Science*. 239: 487-791.
- 🌴 Saker, M. M.; Bekheet, S. A.; Taha, H. S.; Fahmy, A. S. and H. A. Moursy. 2000. Detection of somaclonal variations in tissue cultured-derived date palm plants using isozyme analysis and RAPD fingerprints. *Date Palm Inter Symp*. 22-25. Feb, Windhoek, Namibia.
- 🌴 Salah, M. and R. Al-Helaly. 2003. Application of inter sequence repeated (ISSR) method to analyze the polymorphisms in some Tunisian varieties of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) *Inter, Date Palm, Meeting*. April. KSA.

- 🌴 Salman R. M., Al-Jibouri A.A. M, Al-Qadhy W.K. and Omar M.S.. 1988. Isozyme and chromosomal analysis of tissue Culture derived date palms. *Date Palm Journal* 6:401-411.
- 🌴 Sambrook, J.; Fritsch, E. F. and Maniatis, T.1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd end). Cold Spring Harbor. NY.
- 🌴 Siljak-yakovlev,s; Benmalek, S.; Cerbah, M; Caba de la pena, T; Bounage, N; Brown, S.C. and Sarr, A. 1996. Chromosomal sex determination and heterochromatin structure in date palm. *sex plant reprod*, 9: 127-132.
- 🌴 Sinnett, D.; Deragon, J.M.; Simard, L. R; and Labuda, D. 1990. Alu repeats: human DNA polymorphisms detected by polymerase chain reaction using Alu specific primers. *Genomics*. 7: 331-334.
- 🌴 Tanksley, S.D. and Orton, T.J. 1983. *Isozyme in plant Genetics and Breeding*, parts A and B. Elsevier Science, Amsterdam, Netherlands.
- 🌴 Tautz, D. and Rentz, M..1984. Simple sequence are ubiquitous repetitive components of eucariotic genome. *Nature.*, 322: 652-656.
- 🌴 Torres, A.M.and Tisserat, B.1980. Leaf isozymes as a gentic markers in date palm. *Amer. J. Bot.* 67 (2): 162-167.
- 🌴 Trani, D.L.; Campitelli, L. Donatelli, I.; Bedini, B.; Buonavoglia, C.; Delogu, M.; Marco, M. and G. Vaccari. 2006. A sensitive one-step real-time PCR for detection of avian influenza viruses using a MGB probe and an internal positive control. (Abst), *BMC Infectious Diseases*, 6: 87.
- 🌴 Trifi, M.; Rhouma, A. and Marrakcki, M. 2000. Phylogenetic relationships in Tunisian date palm (*Phoenix dactylifera* L.)

germplasm collection using DNA amplification fingerprinting. *Agronomie*. 20: 665.

- 🌴 Udupa, S.M; Weig, F.; Saxena, M.C. and Kahl, G..1998. Genotyping with RAPD and micro satellite markers resolve pathotype diversity in the *Ascochyta* blight pathogen of chickpea. *theor. Appl. Genet.* 97:299-301.
- 🌴 Underhill, S.J.R. and Critchley,C..1995. Cellular Localisation of Polyphenol oxidase and peroxidase Activity in *Litchi Chinesis* Sonn. pericarp. *Australian Journal of Experimental Agriculture*.34: 115-122.
- 🌴 Vos, P.; Hogers, R.; Bleeker, M.; Van de Lee Hornes, M.; Frijters, A.; Pot, J.; Peleman, J.; Kuiper, M. and Zabeau, M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucl. Acid. Rese.* 23(1): 4407-4414.
- 🌴 Watson, J. D. and Crick, F.H.C. 1953. Molecular structure of nucleic acids: a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature.* 71: 737-738
- 🌴 Weigant, F.; Baun, M.; Udapa, S. 1993. DNA molecular marker techniques, technical manual. No. 20. International Center for Agricultural Research in the Dry Areas. Aleppo, Syria.
- 🌴 Weising, K. and Kahl,G.1997. Hybridization-based Micro satellite fingerprinting of plant and fungi. In: Caetano-Anolles, and P.M. Gresshoff: *DNA Markers: Protocols, Applications and Overview*. Wiley-VCH, New York. USA.
- 🌴 Weising, K.; Winter, P.; Huttel, B. and K. Gunter. 1998. Microsatellite markers for molecular breeding. *J. Crop. Prod.* 112: 101-113.

- 🌴 . 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.
- 🌴 Winter, P. and Kahl, G. 1995. Molecular marker technologies for plant improvement. *World J. of Micro bio. & Biotech.* 11 : 348-448.
- 🌴 Younis, R. A. ; Ismail , O. M. and Soliman, S.S.. 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.
- 🌴 Zaid, A. ; Hughes, H. G.; Porceddu, E. and Nicolas, F. W. 1999. Glossary of biotechnology and genetic engineering. FAO Research and Technology Paper 7. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome-Italy. M. 99.
- 🌴 Zehdi, S.; Trifi, M.; Salem, A.M.; Rhouma, A. and M. Marrakchi. 2002. Survey of inter simple sequence repeat polymorphisms in Tunisian date palms (*Phoenix dactylifera* L.). *J. Gene and Breed.* 56: 77-83.

Abstract:

In an attempt for early detection of date palm gender, the current study was conducted using some traditional methods {direction of seed germination to right (R) and to left (L) and the type of seedling with straight leaves (A) and arched leaves (M)} and tested 7 male varieties Ghnami Ahmer, Ghnami Akhdhar, khkry-kratly, khkry-Semesmy, khkry-Adi, Resasy, Gulami) and 7 female varieties Barhi, Tebrzal, Maktom, Ashrsi, Khastawi, Austa Omran, Khadrawi. Using DNA markers technology as Bulk Segregant Analysis (BSA) and three molecular markers including Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPDs), Cleaved Amplified Polymorphic Sequence (CAPS) and Simple Sequences Repeats (SSRs), as well as the estimation of some of the chemical components in leaves such as a protein, proline and peroxidase analysis.

Total genomic DNA was extracted and obtained , reaching the highest concentration of 299 ng/ μ L of the variety Ashrasi with purity 1.82, and less concentration of the variety (L) amounting to 167.5 ng/ μ L with purity 2.13%.

Results showed RAPD primers used indicators show a difference in the outcomes of polymerization, since starting 50 showed similarity in the pattern of distribution of packets and these packages were identical morphologically (Monomorphic bands) while prefixes showed OPA12, OPB07, OPC09, OPC11, OPD10, OPD20, OPE04, OPK18, OPN17, OPX04 assertive mixed (Polymorphic bands) or multiple forms of a sample group called varieties note (MB) in the sample group reported female items (FB). These primers showed total number of packages amounted to 626 and was the number of disparate packages including 41 package and contrast ratio stood at 6.54%. OPD10 initiator gave the highest number of packs reached 118 package and was the highest efficiency (18.85%). While the initiator OPE04 least efficient (3.51%), as did not give non-22 package. Although it notes that this initiator gave the highest proportion of the variance it reached 22.72% and strongly diagnostic of 12.19% while gave the initiator OPD20 lowest percentage of the variance was 3.29% and strongly diagnostic amounted to 7.31 % gave the initiator OPD10 highest diagnostic power amounted to 14.63% the the initiator OPD07 lowest diagnostic power amounted to 4.87%. The results of the of polymerization initiator OPD10(118) package, and the number of disparate

packages 6 packages and a number of similar packets numbered 112 package, and reached the highest value of the molecular weight of the packs 816 base pairs and less molecular weight of the package amounted to 143 base pairs, with the highest rate doubled are of the variety Ghnami Akhdhar, khkry-Adi, Maktoom ,Tebrzal, Khastawi, It amounted to 10 packs each and the lowest percentage doubled for the variety Khadrawi reaching 5 packs mixed pack, with molecular weight of 143 base pairs appeared in six female of the total 7 varieties female varieties (85.71%) did not appear in all male varieties note promised that a positive sign and thus Vote for this to be the initiator of a unique indicator of sex varieties of dates on the palm Iraqi RAPD level indicators.

Results of CAPS markers used restriction enzymes (Restriction Enzyme) a three *Bcl* I and *Hpa* II and *Rsa* I to cut the polymerase reaction products OPD10. Results indicated that in response to these products for cutting enzyme *Bcl* I. molecular weight package cut 143 base pairs contained six female samples ,used restriction enzyme *Hpa* II to cut polymerase reaction products as the molecular weight package pack 816, 734, 650, 522, 433, 320. When using the restriction enzyme *Rsa*I, it did not show any response. After a Nested polymerase chain interaction of DNA that produced from elution and purification of female varieties samples observed the polymorphic band OPD10₁₄₃ bp clearly in six of the female samples which represent items Barhi, Tebrzal, Maktom, Ashrsi, Khastawi, Khadrawi except Class Austa Omran which this package did not show, while It did not appear in any of the male samples, by rate discrimination 85.7% Results of the analysis showed that the percentage of similarity between the gesture arched female and a total of 71.4% as the genetic similarity between the gesture and arched between mother was (Barhi) (83.3%) and it is likely that this gesture be female tree. For the indicators and using three SSR primers are the initiator mPdCIR048, the initiator mPdCIR078and the initiator mPdCIR0 93, the initiator mPdCIR07 showed molecular weights to pack the range of items memo (M) 117, 134, 137, 147, 154 base pairs, and that the molecular weights of the packages range female items (F) were 132, 134, 137, 143, 145, 154 base pairs. As the weights molecule package134,137are present in the memo group, and female thus considered assertive neutral unreliable in distinguishing between varieties memorandum and articles female, distinctive package for females appeared in the six of the female samples which represent items Barhi, Tebrzal, Maktom, Ashrsi, Khastawi, Khadrawi except Class Austa Omran which this package did not show while It did not appear in any of the male samples, by rate discrimination 85.71%. this primer can be the adoption of this initiator to distinguish between male and female of date palms.

The chemical analysis showed that there were not affected by the seedling quality of date palm with straight leaves (A) and with arched leaves (M) content of protein, proline and peroxidase enzyme .



University of Baghdad

Studying Sex Determination of Date Palm in Seedlings stage Using Molecular and Conventional Markers

**A Dissertation
Submitted By**

THAERA KHAIRI AL-RAWI

**to the Council of the College of Agriculture at the
University of Baghdad in Partial Fulfillment of the
Requirements the Degree of
Doctorate of Philosophy in Agriculture sciences /
Horticulture and Landscape Gardening
Pomology**

Advisers

Prof. Dr. Moayad Rajab Abood

Assisant. prof. Dr. Hussam S.M. Khierallah

2015