تمييز جنس نخيل التمر بأستخدام مؤشر الدنا العشوائي (RAPD) وبعض الطرائق التقليدية والكيميائية

مؤيد رجب عبود حسام سعد الدين محمد خير الله ثائرة خيري الراوي

كلية الزراعة / جامعة بغداد

الملخص

في محاولة للتشخيص المبكر للجنس في نخيل التمر اجريت الدراسة الحالية باستخدام بعض الطرائق التقليدية هي أتجاه انبات البذور وشكل الأوراق وتقانات تحليل DNA بوساطة تقانة مؤشرات جزيئية هي مؤشرات التضاعف العشوائي المتعدد الأشكال لسلسلة الدنا(Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD ، أستخدمت البادئات OPB07، OPC09، OPC13، OPD10، OPD20، OPE04، OPK18، OPN17 وOPX04 للتمييز بين سبعة أصناف مذكرة وسبعة اصناف مؤنثة أظهرت نتائج بلمرة البادئ OPD10 118حزمة، وكان عدد الحزم المتباينة (متعددة الأشكال Polymorphic bands) 6 حزم وعدد من الحزم المتشابهة (Monomorphic bands) بلغت 112 حزمة، 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 المذكرة، وعد ذلك مؤشراً إيجابياً، وبذلك رشح هذا البادئ ليكون مؤشراً مميزاً لجنس أصناف نخيل التمر العراقية على مستوى مؤشرات RAPD. أظهرت نتائج التحليل أن نسبة التشابه بين البادرة ذات الأوراق المقوسة ومجموعة الإناث 71.4%، كما بلغت نسبة التشابه الوراثي بين البادرة ذات الأوراق المقوسة وبين الأم (البرحي) 3. 83%.أظهر التحليل الكيمياوي عدم وجود فروقات في محتوى البادرات بنوعيها ذات الأوراق المستقيمة وذات الأوراق المقوسة من البروتين والبرولين و انزيم البيروكسيديز.

Recognize the Sex of date palm Using Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) and some Traditional and Chemical Methods

Moayad Rajab Abood Hussam S.M. Khierallah Thaera Khairil- Al-Rawi

Abstract:

In an attempt for early detection of date palm gender, the current study was

conducted using some traditional methods (direction of seed germination

and the shape of the leaves) and DNA marker by using Randomly Amplified Polymorphic (RAPD),The ، initiator that used were (OPB07, OPC09, OPC13, OPD10, OPD20, OPE04, OPK18, OPN17 and OPX04) .The results of initiator OPD10 polymerization showed that the number of total package reached 118 package, and the number of disparate packages 6 packages and a number of similar packets numbered 112 package, molecular weight of 143 base pairs appeared in six female out of the total seven female (85.71 %) did not appear in all varieties and that was a positive indicator thus the initiator was filtered to make a unique indicator of sex varieties of dates on the palm Iraqi RAPD level indicators. Percentage of similarity between the arched leave seedling and female group was 71.4% and the genetic similarity between the arched leave seedling and mother (Berhi) was (83.3%) and it is likely that this gesture be female tree. The chemical analysis showed that no differences were found in the seedling quality of date palm with straight leave seedling and with arched leave seedling content of protein , proline and peroxidase enzyme.

البحث مستل من اطروحة الدكتوراه للباحث الثالث

المقدمة:

تنتمي نخلة التمر Date Palm إلى العائلة النخيلية Arecaceae وتضم أكثر من 200 جنس وحوالي 4000 نوع ، والأسم العلمي لنخلة التمر *Phoenix dactylifera* L. (البكر، 1972).لقد كان العراق يحتل 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 الى 14765000 نخلة وبمعدل إنتاج سنوي 655450 طن حسب إحصائية (الجهاز المركزي للإحصاء 2013).

إن الانخفاض الكبير لأعداد النخيل والإنتاجية للأشجار فضلاً عن الأضرار بالتنوع الأحيائي Biodiversity في هذه المنطقة الأمر الذي أدى إلى حدوث اندثار وراثي Genetic erosion لأصناف عديدة من تخيل التمر. ولتحقيق قفزة نوعية في مجال التوسع في زراعة النخيل، ينبغي إيجاد مؤشرات وراثية ثابتة ودقيقة ومعتمدة يمكن استخدامها لغرض تحديد جنس البادرات الناتجة من البذور (العاني، 1998). 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. وفي دراسة أجراها الهاشمي (1989) على ثلاثة أصناف من نخيل التمر هي الساير، خستاوي، زهدي وجد أن طريقة الأنبات في انحناء النجمة (Apicol) نحو يمين رأس البذرة أو نحو يسارها قد يكون لها شأن هام في تشخيص البادرة الناتجة من حيث الجنس . إن التوصيف الوراثي الجزيئي باستخدام المؤشرات الجزيئية يمتلك العديد من المميزات أهمها عدم وجود تاثير بيئي في الصفة المستخدمة كمؤشر وراثي واستخدام أي جزء من النبات وفي أي مرحلة من النمو وليست هنالك حدود للتحاليل الممكنة، قامت الخطيب (2000) باستخدام مؤشرات التضاعف العشوائي المتعدد الأشكال لسلسلة الدنا RAPD لتمييز جنس وأصناف ذكور نخيل التمر كما أجرى Younis وآخرون (2008) بحثهم على سبعة من أصناف من نخيل التمر المصرية الجافة بأستخدام المؤشرRAPD لتمييز الجنس ، وقام El-Yazal (2008) بدراسة على أشجار نخيل التمر عمرها ثماني سنوات صنف (سيوي) في محاولة لتمييز الجنس من خلال تقدير المحتوى البروتيني في اوراق الأشجار المذكرة والمؤنثة فوجد أن تركيز البروتين في أوراق الفسائل المؤنثة أعلى منه في أوراق الفسائل المذكرة ، كما قام Helaili (2000) في دراسة على اشجار عمرها أربع سنوات صنف زغلول لتمييز جنس نخيل التمر اعتماداً على محتوى البرولين والبيروكسيديز فوجد أن تركيز البرولين في أوراق الفسائل المؤنثة أعلى منه في أوراق الفسائل المذكرة ومحتوى البيروكسيديز في أوراق الفسائل المذكرة أعلى منه في أوراق الفسائل المؤنثة. لذا هدفت هذه الدراسة إلى محاولة التشخيص المبكر لجنس البادرات الناتجة من زراعة البذور من خلال استخدام تقنيات DNA وبوساطة مؤشرات التضاعف العشوائي المتعدد الأشكال لسلسلة الدنا Randomly Amplified Polymorphic DNA(RAPD) وتقدير بعض المكونات الكيمياوية للأوراق كالبروتين والبرولين والبيروكسيديز.

المواد وطرائق العمل:

نفذ البحث في وحدة أبحاث النخيل والتمور/ كلية الزراعة / جامعة بغداد للمدة من 2012/1/12 ولغاية 2014/4/1 . لقحت أشجار النخيل المؤنثة صنف البرحي باستعمال حبوب لقاح الغنامي الأخضر بتاريخ 2013/4/12 جمعت الثمار الناضجة في 2013/10/15. رمز للصنف البرحي بالحرف B و رمز للصنف غنامي أخضر بالحرف G.

بعد اكتمال نضج الثمار استخرجت منها البذور وقسمت إلى مجموعتين :

1- **المجموعة الأولى**: أخذت 500 بذرة ووضعت بأطباق زجاجية ، وبعد أسبوعين عزلت هذه البذور النابتة وقسمت إلى مجموعتين هي: مجموعة بذور نابتة نحو اليمين ورمز للبادرات الناتجة منها بعد الزراعة بالحرف R، ومجموعة بذور نابتة نحو اليسار ورمز للبادرات الناتجة منها بعد الزراعة بالحرف L .
2- **المجموعة الثانية**: زرعت 500 بذرة أخرى في أصص أظهرت البادرات الناتجة تميزاً مظهرياً حسب شكل أوراقها وقسمت إلى مجموعتين مجموعة بادرات شكل أوراقها مستقيم ورمز لها بالحرف A و لثلاث مكررات بالرموز (A1 ، A 2 ، A 3) ومجموعة بادرات شكل أوراقها مقوس و رمز لها بالحرف T و ثلاث مكررات بالرموز (T1 ، T 2 ، T 3).

أستخلص الدنا من البادرات المجاميع الأربع كما أستخلص من الاصناف المذكرة وهي(غنامي احمر ،غنامي اخضر ،كريطلي خكري، سميسمي خكري، خكري عادي و رصاصي) و الأصناف المؤنثة وهي (برحي ،مكتوم ، تبرزل، أشرسي ،خستاوي ،أسطة عمران و خضراوي).

تم خلط دنا الاصناف المذكرة ليمثل عينة مجموعة الذكور ورمز لها بالحرف M ورمز لعينة مجموعة الأناث بالحرف F .

حضرت تفاعلات RAPD استناداً إلى Williams وآخرون (1990)، استعمل خليط التفاعل الرئيسي Master Mix المنتج من قبل شركة Bioneer،واستخدمت البادئات OPA12، OPB07، OPC09، OPC13، OPD10، OPD20، OPE04، OPK18، OPN17، OPX04،حضر خليط التفاعل النهائي من 12مايكروليتر من الماء المقطر اللأيوني DDW و5 مايكروليتر من Master Mix (1X) و1مايكروليتر من البادئ بتركيز(10بيكامول) و2 مايكروليتر من الدنا بتركيز(100 نانوغرام). وضعت العينات في جهاز المبلمر الحراري PCR وفق البرنامج الاتي:

Initial denaturation	Temp.: 94°C	Time: 5 min
No. of cycles = 40 cycles		
Denaturation	Temp.: 94°C	Time: 1 min
Annealing	Temp.: 36°C	Time: 1 min
Extension	Temp.: 72°C	Time: 2 min
	Temp.: 72°C	Time: 10 min

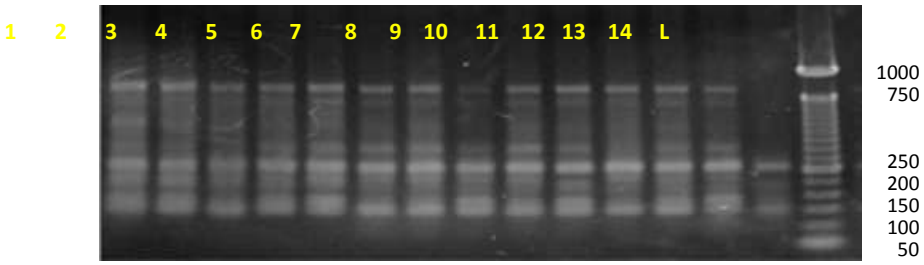
تم الترحيل الكهربائي للأصناف المذكرة والمؤنثة كلاً على حدة بأستخدام بادئات مؤشر التضاعف العشوائي المتعدد لسلسلة الدناRAPD ،واستخدمت صبغة بروميد الأثيديوم لتصبيغ العينات وصور الهلام بجهازGel documentation system وحللت النتائج باستخدم البرنامج الحاسوبي Past .

قدر محتوى الأوراق من البروتين طبقاً لما ورد في(A.O.A.C ، 1975) ومحتوى الأوراق من البرولين حسب ماذكره(Ghafor واخرون ، 2014) والبيروكسيديز وفقاً لما ذكره (Underhill وCritchley، 1995) .

النتائج والمناقشة:

لوحظ في الشكل (1) ان البادئ OPD10 قد اظهر حزمة متباينة (Polymorphic bands) ذات وزن جزيئي 143 bpوجدت في ستة من الأصناف المؤنثة السبعة المدروسة اي بنسبة 85.7% ولم تظهر بالذكور نهائياً . وعلى هذا الأساس رشح البادئ اعلاه لأستخدامه في تمييز جنس نخيل التمر في مرحلة البادرات .

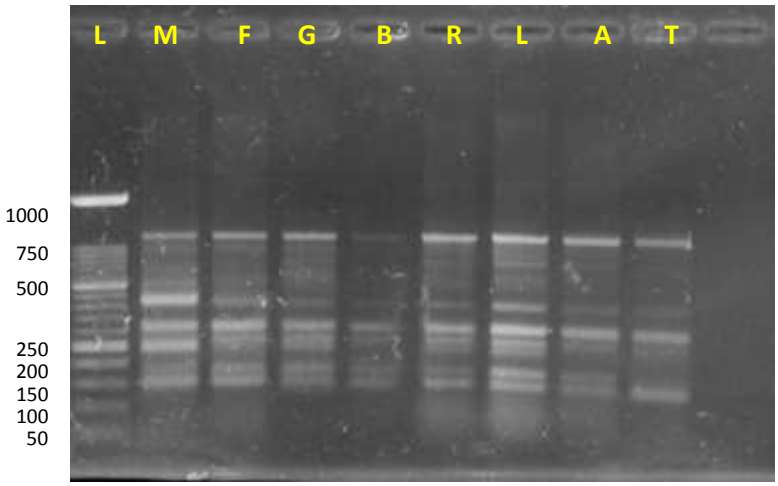
وبين الجدول (1) والشكل (2) نتائج تفاعل RAPD للعينات المدروسة باستخدام البادئ OPD10 والتي اظهرت أن العينتين(T و B) قد تشابهتا في عدم احتوائهما على الحزم ذات الأوزان 522، 600، 740 زوج قاعدي وأحتوائهما على الحزمة المميزة للأناث ذات الوزن الجزيئي البالغ 143 زوج قاعدي.



الشكل (1) الترحيل الكهربائي الهلامي لنواتج تفاعل بلمرة (1-7)عينات مذكرة و(8-14)عينات مؤنثة باستعمال البادئ OPD10، L:دليل الأوزان القياسي للدنا(DNA Ladder 50 bp)

جدول (1) نواتج بلمرة العينات باستخدام البادئ OPD10

مقوسة T	مستقيمة A	يسار L	يمين R	برحي B	غنامي أخضر G	مجموعة الإناث F	مجموعة الذكور M	الوزن الجزيئي زوج قاعدي
1	1	1	1	1	1	1	1	816
0	1	1	1	0	1	1	1	765
0	1	1	1	0	1	0	1	600
0	1	1	1	0	1	0	1	522
1	1	1	1	1	1	1	1	433
1	0	1	1	1	0	1	0	350
1	0	1	1	1	1	1	1	250
0	1	1	1	1	1	0	1	182
0	1	1	1	0	1	1	1	154
0	1	0	0	0	0	0	0	147
1	0	0	0	1	0	1	0	143



الشكل (2) الترحيل الكهربائي لنواتج بلمرة باستخدام البادئ OPD10

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

تبين من الجدول (2) وجود تشابه وراثي على مقياس Jacard Similarty index بين البادرة المقوسة ومجموعة الإناث قد بلغت 71.40% ونسبة التشابه الوراثي بين البادرة المقوسة وبين الأم (البرحي)83.3%.

توضح النتائج في الجدول (3) أن محتوى بادرات النخيل بنوعيها 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 وجده El-Yazal (2008) في بحثه على فسائل مذكرة ومؤنثة إذ وجد أن محتوى الفسائل المؤنثة من البروتين كان أكثر مما في الفسائل المذكرة بنحو 3%.

يبين الجدول (4) محتوى بادرات النخيل بنوعيها 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 وجده El-Yazal (2008) في بحثه على فسائل مذكرة ومؤنثة اذ وجد ان محتوى الفسائل المذكرة من البرولين أعلى منه في المؤنثة بنحو 1.03% ولم يتفق مع ما وجده Helail (2000) اذ وجد ان محتوى الفسائل المؤنثة من البرولين اعلى من محتوى الفسائل المذكرة بنحو8.45%.

جدول (2) التشابه الوراثي للعينات المدروسة اعتماداًعلى نتائج البلمرة بالبادئ OPD10

	بادرات مقوسة T	بادرات مستقيمة A	بادرات متجهة يساراً L	بادرات متجهة يميناً R	برحي B	غنامي اخضر G	مجموعة الأناث F	مجموعة الذكور M
مقوسة	1.000							
مستقيمة	0.181	1.000						
يسار	0.400	0.700	1.000					
يمين	0.400	0.700	1.000	1.000				
برحي	0.833	0.272	0.500	0.500	1.000			
غنامي أخضر	0.300	0.777	0.888	0.888	0.400	1.000		
مجموعة الأناث	0.714	0.363	0.600	0.600	0.625	0.500	1.000	
مجموعة الذكور	0.300	0.777	0.888	0.888	0.400	1.000	0.500	1.000

جدول (3) محتوى بادرات النخيل التمر من البروتين الكلي

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

جدول (4) محتوى البادرات من البرولين ملغم/ 100مللتر

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

تبين النتائج في الجدول (5) وجود فروقات بسيطة في محتوى البادرات بنوعيها ذات الأوراق المستقيمة A وذات الأوراق المقوسة T من أنزيم البيروكسيديز، وهذه النتائج جاءت غير متفقة مع ما وجده Helail (2000) في كون الفسائل المذكرة احتوت على نسبة عالية من أنزيم البيروكسيديز قياسا بمحتوى الفسائل المؤنثة لنخيل التمر بنحو 11.65%.

أن الفروقات البسيطة للمتوسط الحسابي بين محتوى البادرة A والبادرة T من البروتين والبرولين والبيروكسيديز يدل على عدم امكانية استخدام هذه التحاليل للتمييز بين البادرة البادرة A والبادرة T اما المؤشرات الجزيئية أظهرت نسبة تمييز مهمة يمكن استخدامها للتفريق بين البادرتين.

جدول (5) محتوى البادرات من البيروكسيديز ملغم /100مللتر

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

المصادر:

البكر، عبد الجبار. 1972. نخلة التمر- ماضيها وحاضرها والجديد في زراعتها وصناعتها وتجارتها، مطبعة العاني، بغداد.

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

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.

المجاهد، عبدالله محمد علي و رسول، عمر يوسف. (1987). ملح الملاحة في معرفة الفلاحة، كلية الزراعة–جامعة صنعاء، دار الفكر للطباعة والنشر، الطبعة الأولى.

الهاشمي، عماد رشيد. (1989). تأثير الأملاح الشائعة في التربة العراقية على إنبات بذور نخلة التمر ونمو بادراتها، رسالة ماجستير، كلية العلوم-جامعة بغداد.

El-Yazal M. A.Seif.2008.Sex determination of date palm *Phoenix dactylifera* through chemical composition ofleaves. Fayoum. J. Agric Res. and Dev 22 :2 : 76-87.

Association of official analytical chemical A.O.A.C.10.. 1975.Official methods of analysis The Republished by A.O.A.C. Washington. D.C., U.S.A.

Helaili , B.M. 2000. Sex predication of date palm through some leaf chemical constituents. Minufiya Journal of Agriculture Research (Egypt). 25 (2): 539-549.

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.

Underhill, S.J.R. and Critchley,C..1995.Celluar Localisation of Polyphenol oxidase and peroxidase Activity in *Litchi Chinesis* Sonn. pericarp. Australian Journal of Experimental Agriculture.34: 115-12.

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.

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.