أيجاد الاختلافات الوراثية لعدد من أصناف نخيل التمر باستخدام تقنية الترحيل الهلامي الكهربائي

عقيل هادي عبد الواحد منتهى عبد الزهرة عاتي
1- قسم البستنة وهندسة الحدائق - كلية الزراعة – جامعة البصرة- العراق

2- مركز بحوث النخيل – جامعة البصرة- العراق

الخلاصة

أجريت الدراسة الحالية في مختبرات مركز بحوث النخيل ، جامعة البصرة لبحث الاختلافات الوراثية لعدد من أصناف نخيل التمر هي (بوكي وبرحي وبريم وجوزي وحساوي وساير وام الدهن) بتقنية الترحيل الهلامي الكهربائي على هلام متعدد الاكرمايد للحزم البروتينية لسعف النخيل لهذه الأصناف. أظهرت النتائج وجود اختلاف في عدد ومواقع الحزم البروتينية، وأن الصنفين الحساوي والساير يقعان بنفس المجموعة، اذ ان كليهما يملكان حزمتين بروتينيتين على هلام البولي اكرمايد ويمتلكان نفس الوزن الجزيئي، كما أن الجوزي والبريم متقاربين من حيث المسافة الوراثية، في حين أظهرت النتائج تباعد أم الدهن والبوكي في المسافة الوراثية فيما بينهما، كما تم دراسة محتوى ثمار الأصناف قيد الدراسة في محتواها من البروتين الذائب والأحماض الامينية الحرة.

Finding the genetic difference for many Date palm cultivar by using gel electrophoreses technique

This study was carried out in date palm center laboratory, University of basrah, in order to find out the genetic distance for many date palm cultivar (Boki, Barhi, Breame, Jowzi, Hasawi, Saeer and Am-aldehan) by gel electrophoreses technique on gel for protein patron of date palm leave. The result showed , that the polyacrylamide process of gene expression had occurred gel electrophoreses in the appearance of protein bands , which differed in number, location on the gel, and molecular weight for various cultivar. The Hasawi and Saeer cv. had localed in same group. They had two and had the same protein molecular weight. The protein bands on polyacrylamide genetic distance between the Jowzi and Bream was close genetic distance, but genetic distance was very faraway in Am-aldehan and Boki cv. The content protien and free amino acid of the fruits in the studied date palm cultivars were measured.

المقدمة

تعد نخلة التمر .*Phoenix dactylifera* L من اشهر الأشجار التي عرفها الإنسان منذ أقدم العهود. ولا يعرف على وجه الدقة الموطن الأصلي لنخلة التمر، ولكن يعتقد أن اصل النخيل قد جاء من شمال أفريقيا أو شبة القارة الهندية أو شبة جزيرة العرب (1).

أن استخدام المؤشرات المظهرية هي الطريقة الأسهل والأقل تعقيدا للتمييز بين الأصناف وتعد أول وأقدم طريقة لدراسة التنوع الوراثي وقد استخدمت منذ فترة طويلة ومازالت تستخدم للتميز بين الأصناف، وهي تعتمد على أيجاد الاختلافات المظهرية كلون الأزهار والمسقط الزهري لها وشكل الأوراق وتوزيعها وطبيعة النمو الخضري (14)، وفي مجال نخيل التمر فان بعض الباحثين أشاروا الى صعوبة تمييز الأصناف عن طريق صفاتها المظهرية وبدون وجود الثمار كون صفات النمو الخضري تتأثر بالظروف البيئية المحيطة وعمليات الخدمة (17)، ففي العراق قام (2) بدراسة الصفات المظهرية لثلاث أصناف زراعية أنثوية في البصرة وكذلك دراسة صفات الطلع والصفات الخضرية الأخرى في ستة أصناف ذكرية ولاحظ وجود اختلافات معنوية في معظم الصفات المدروسة. وتطورت طرق التمميز الى استخدام بعض المركبات الكيميائية ومنها البروتينات والمشابهات الإنزيمية إذ يمكن تعريف الـIsozyme بأنه الشكل الآخر لإنزيم معين يشبه ذلك الإنزيم بالوظيفة لكنه يختلف عنه في تسلسل الأحماض الامينية فيه، وبذلك يمكن فصلها عن بعض باستخدام الهجرة الكهربائية، ويتميز الصنف الواحد بثبات عدد تلك الإنزيمات، فباستخدام التحليلات أعلاه يمكن تمييزها عن بعضها البعض(3)، كما ان نمط البروتينات تعد احد هذة الطرق اذ تصنف هذه الطرق ضمن المؤشرات الجزيئية Molecular Markers لان البروتين ناتج عن عملية تعبير الجين Gene expression ، ويتم ترحيل هذه الإنزيمات المتناظرة والبروتينات على هلام الـ Polyacrylamide أو النشا ويعرف خط توزيع الحزم للعينة المُرحلة بأنها بصمة الإنزيمات المتناظرة لذلك الصنف Isozyme fingerprint ويتم إظهار هذه الحزم بتصنيفها ومقارنه أنماط توزيع الحزم الصنف وإيجاد التباينات المطلوبة (3).

ففي العراق بين (4) بدراسته تحليل بعض النظم الإنزيمية لخمسة أصناف من حبوب لقاح أفحل النخيل هي الغنامي الأخضر والغنامي الأحمر وسميسمي وخكري وردي وعادي على هلام البولي اكرمايد وباستخدام تقنية الهجرة الكهربائية، واكد وجود اختلافات واضحة بين أصناف أفحل نخيل التمر في مواقع وشدة تلك النظم الإنزيمية على هلام الاكرمايد. كما بين (18) في التحليل النظم الإنزيمية لأربعة من أصناف النخيل المستحدثة من الزراعة النسيجية، على هلام الاكرمايد بان هناك تشابها كبيرا بين نباتات الصنف الواحد، ولكنها اختلفت بين الأصناف مما يشير الى تجانس وراثي عالي للنباتات الناتجة من الزراعة النسيجية للصنف الواحد، وعلى هذا الأساس بين أنة بالإمكان استخدام تحليل النظم الإنزيمية لتحديد التطابق الوراثي بين الأصناف قيد الدراسة.

وقد قام العديد من الباحثين باستخدام المؤشرات الخاصة بالإنزيمات أو البروتينات المتناظرة في التمييز بين الأصناف المختلفة لنخيل التمر (9 و10 و11 و12 و13) في حين استخدم (8) الترحيل الكهربائي للبروتينات كأساس للتمييز بين جنس نخيل التمر في العراق. وقد اعتمد (6 و7) هذا النوع من التصنيف للتمييز بين بعض أصناف النخيل المنتشرة في المملكة العربية السعودية.

المواد وطرائق العمل

أجريت هذه الدراسة في مركز بحوث النخيل- جامعة البصرة وذلك بأخذ عينات ثمريه ونماذج من سعف النخيل البالغ (السعف من المحيط الرابع من القمة) وذلك في مرحلة الخلال للثمار. انتخبت سبعة أصناف من نخيل التمر المهمة في محافظة البصرة هي (بوكي وبرحي وبريم وجوزي وحساوي وساير وام الدهن) غسلت وجففت هوائيا وذلك للتخلص من الغبار مستبعد بذلك النماذج غير الملائمة، عمد الى تجفيد العينات بتقنية التجفيف بوساطة التبريد Freeze-dryer (Lyophilization) technique حيث وضعت العينات المراد تجفيدها في عبوات بلاستيكية ثم وضعت في جهاز التجفيد (Lyophilizer) نوع (Edwards) وموديل (Prianiso) وبدرجة حرارة (26-) م ولفترة زمنية معينة إلى أن يتم التخلص من معظم الماء، حفظ المسحوق بعد ذلك في أنابيب محكمة الغطاء ثم وضعت في المجمدة لحين استعماله فيما بعد، تم استعمال المسحوق في عملية الترحيل الكهربائي للبروتينات على هلام Polyacrylamide باستعمال SDS وبطريقة SDS-PAGE وفقاً لما ذكره (8) قدرت الاوزان الجزيئية للبروتينات ورسمت عبر برنامج حاسوبي خاص PhotoCaptMw. قدرت البروتينات الذائبة الكلية والأحماض الامينية الحرة في ثمار نخيل التمر للأصناف قيد الدراسة في العينات الجافة، إذ قدرت البروتينات حسب طريقة (15)، إذ استخدم البومين المصل البقري كعينة قياسية لتقدير البروتينات على طول موجي 600 نانومتر، في حين قدرت الأحماض الامينية الحرة حسب طريقة (16) ، إذ قدرت باستخدام الحامض الاميني الاسبارجين على طول موجي 570. نفذت التجارب حسب تصميم القطاعات العشوائية الكاملة Complete Randomized Block Design (الراوي وخلف الله،1980) ، وتم تحليل النتائج باستخدام تحليل التباين ، وبالاعتماد على البرنامج الحاسوبي المتقدم في التحليل الإحصائي الجاهز SPSS ver-19 ، وقورنت المتوسطات باستخدام اقل فرق معنوي معدل Revised-LSD على مستوى احتمال 5 % .

النتائج والمناقشة

دلت نتائج المستحصل عليها من لوحة (1) الخاصة بنتائج التحليل البروتيني للأصناف قيد الدراسة وجود اختلافات في النمط البروتيني على هلام البولي اكرمايد، إذ اختلفت هذه الأصناف من حيث عدد وموقع الحزم البروتينية. أن الصنفين الحساوي والساير يقعان بنفس المجموعة، اذ ان كليهما يملكان حزمتين بروتينيتين على هلام البولي اكرمايد، وزنهما الجزيئي 62.94 و33.07 كيلودالتن، كما يتبين من شجرة التقارب Dandogramوجدول التشابة جدول(1). كما أن صنفي الجوزي والبريم متقاربين إذ إنهما امتلكا ثلاث حزم بروتينية على هلام البولي اكرمايد، كانت أوزانهما الجزيئية (67.93 و43.00 و34.83)كيلودالتن لصنف الجوزي و (63.30 و40.78 34.00) كيلودالتن لصنف نخيل البريم على التوالي. كما وانهما يقعان في نفس المجموعة مع البرحي الذي أعطى حزم بروتينية بلغت (64.78 و46.65 و32.58)كيلودالتن على التوالي، في حين أظهرت النتائج تباعد أم الدهن والبوكي في لوحة(2) التي تبين توزيع الحزم البروتينية على هلام البولي اكرمايد.

كما ويتضح من جدولين (1،2) الخاصة بمصفوفة الاختلاف ومصفوفة التشابه إن المسافة الوراثية بين الأصناف كانت متقاربة جدا بين صنفي الحساوي والساير ، في حين كانت بين صنفي البوكي و ام الدهن ابعد مسافة وراثية وان مصفوفة التشابه قد قسمت الأصناف قيد الدراسة الى ثلاث مجاميع متقاربة هي الساير والحساوي في مجموعة والبوكي في مجموعة ثانية وبقية الأصناف قيد الدراسة تمثل المجموعة الثالثة.

ويتضح من شكلين(1 و2) محتوى ثمار أصناف نخيل التمر قيد الدراسة من الأحماض الامينية الحرة والبروتينات الذائبة ، ويتبين من الشكلين ان أفضل صنف في محتواة من الأحماض الامينية هو الجوزي والذي لم يختلف بدورة معنويا عن الصنف ام الدهن في حين سجل فرقا معنويا مع البوكي الذي سجل اقل محتوى للاحماض الامينية، كما إن أفضل صنف في محتواة من البروتينات الذائبة هو الصنف حساوي تلاه الصنف البوكي وام الدهن واللذان لم يختلفا فيما بينهما معنويا في محتوى الثمار من البروتين الذائب، في حين سجل الصنف الساير اقل محتوى من البروتين.

ان الاختلافات سواء كانت من حيث النمط البروتيني على هلام الاكرمايد او محتوى الثمار من البروتينات الذائبة والأحماض الامينية تعود بمجملها الى طبيعة الصنف الوراثية وان هذا الأمر قد واضحة العديد من الباحثين (6 و7 و8).

تستنتج من هذه الدراسة أنة بالإمكان الاعتماد على عملية الترحيل الهلامي الكهربائي للبروتينات على هلام الاكرمايد كونها طريقة كيميائية دقيقة وسهلة في إيجاد التباينات الوراثية بين أصناف نخيل التمر.

لوحة(1)شجرة التقارب الوراثي بين عدد من أصناف النخيل (1: الساير 2: البرحي 3:الحساوي 4: البريم 5: ام الدهن 6: الجوزي 7: البوكي.)

جدول(1) المسافات الوراثية لاصناف نخيل التمر قيد الدراسة على اساس الوزن الجزيئي للحزم البروتينية

جدول (2) مصفوفه التقارب لتقسيم اصناف النخيل قيد الدراسة الى ثلاث مجاميع على اساس الوزن الجزيئي للحزم البروتينية

الوزن الجزيئي لاصناف نخيل التمر من خلال برنامج فحص البروتين	لوحة هلام البولي اكرمايد

لوحة(2) الاختلافات الوراثية لعدد من أصناف نخيل التمر باستخدام تقنية الترحيل الهلامي الكهربائي(1: الساير 2: البرحي 3:الحساوي 4: البريم 5: ام الدهن 6: الجوزي 7: البوكي 8:البروتينات القساسية.)

تحديد الوزن الجزيئي لاحد عينات التجربة	تحديد حزم العينة القياسية

لوحة(3) جانب من برنامج فحص البروتين

المصادر

البكر، عبد الجبار (1972). نخلة التمر ماضيها وحاضرها والجديد في زراعتها وصناعتها وتجارتها. مطبعة العاني، بغداد،1085 صفحة .

عباس ، كاظم إبراهيم(2000). دراسة كروموسومية وتشريحية ومظهرية في بعض الأصناف الزراعية من نخيل التمر . أطروحة دكتوراه، كلية العلوم -جامعة البصرة – العراق،160 صفحة .

الحسني، خلود إبراهيم حسن(2002). استخدام المؤشرات الجزيئية المتعددة على التفاعل التضاعفي لسلسلة الدنا في دراسة التنوع الوراثي للبطاطا (*Solanum tuberosum* L.) .أطروحة دكتوراه ، كلية العلوم - جامعة بغداد- العراق،200 صفحة.

الجبوري، عبد الجاسم محيسن جاسم الجبوري(1988). التحليل الإنزيمي لحبوب لقاح أفحل نخيل التمر *Phoenix dactylifera* L. مجلة نخلة التمر،12(4):341-357.

عبد الواحد، عقيل هادي(2011).دراسة البصمة الوراثية لصنفين من أفحل نخيل التمر Phoenix dactylifera L. وتأثير لقاحهما في الصفات الفيزيائية والكيميائية لثمار صنف الحلاوي. أطروحة دكتوراه- كلية الزراعة- جامعة البصرة- العراق-233 صفحة.

العيسي ، عادل محمد (2006). مقارنة فسيولوجية بيئية بين ثلاثة أصناف من نخيل التمر في الإحساء والقطيف بالمملكة العربية السعودية. أطروحة دكتوراه، كلية العلوم –جامعة الملك سعود- المملكة العربية السعودية.

العيسي، عادل محمد و علي عبد المحسن الهلال وفيصل عبد الله السعد(2008). التحليل بالتفريد الكهربائي للنظم الإنزيمية في ثمار ثلاثة أصناف من نخيل التمر *Phoenix dactylifera* L. النامية في الاحساء والقطيف بالمملكة العربية السعودية . مجلة جامعة الملك عبد العزيز، مجلد(19):63-84ص.

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

Al-Helal , A. A.(1988). Amylase isoenzymes and protein of date palm (Phoenix dactylifera L.) fruit. Bot. Bull. Academia Sinica., 29: 239-244.

Al-Helal,A. A.(1992).Electrophoresis analysis of three selected isoenzymes of date palm pollen grain. Bot. Bull. Academia Sinica.,33:241-246.

Al-Jiboury, A.A.M.(1990). Biochemical classification of mail date palm cultivars. J. Hort. Sci., 65:725-729.

Baaziz, M. and Saaidi, M. (1988). Preliminary identification of date palm cultivars by esterase isoenzymes and peroxidase activities. Can. J. Bot., 66:89-93.

Bendiab, K.; Baaziz, M. and Majourhat, K. (1998). Preliminary date palm cultivar composition of Morocco palm groves as revealed by leaf isoenzym phenotypes. Biochemical Systematic and Ecology, 26:71-82.

Jin, Y. ; Statler , G. D. ; Franckowiak , J. D. and Steffenson, B. J. (1993). Linkage between leaf rust resistance gene and morphological markers in barley. Phytopathology, 83:230-233.

Lowry, O. H. ; Rosebrough, N. J. ; Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193: 265-275.

16-Moore, S. and W.H. Stein, 1954. In: Colowick, S. P. and N. O. Kaplan (ed.), Methods in Enzymology, Vol. III. Academic Press Inc. New

York.
Salman, R. M. ; Al-Juboury, A. A.M. ; Al-Quadhy, W.K. and Omar, M.S.(1988). Isozyme and chromosomal analyses of tissue culture derived date palm. Date Palm Journal(2):401-410.
Sedra, M. H. ; lashermes , P.; Trouslot ,P.; Combes, M. C. and Homan, S. (1998). Identification and genetic diversity analysis of date palm (Phoenix dactylifera L.) varieties from Morocco using RAPD makers. Euphytica., 103: 75 – 82.