تطبيقات مؤشرات ISSR في نخيل التمر (مقال مراجعة)

احمد يوسف لفتة هزاع[1*] مرتضى شنان عودة[1] حسن عبد الامام فيصل[2]

[1]قسم البستنة وهندسة الحدائق- كلية الزراعة-جامعة البصرة

[2]مركز ابحاث النخيل-جامعة البصرة- العراق.

* Email: ahmed.lafta@uobasrah.edu.iq

الخلاصة

يعتبر نخيل التمر من أقدم أشجار الفاكهة المزروعة في العراق والمهمة اقتصاديًا. ونظرا لتطور التقنيات القائمة على الحمض النووي DNA ، اجريت هذه المراجعة لبيان اهمية تطبيق تقنية التتابعات الترادفية البسيطة الداخلية Inter Simple Sequence Repeats (ISSR) والتي تعتبر من التقنيات الجزيئية المفيدة في تقييم العلاقات الوراثية والتنوع الوراثي بين الأصناف المختلفة في نخيل التمر ولها القدرة القوية على التمييز بين الأصناف، وتعطي مستويات عالية من التعددية الشكلية للحمض الريبي النووي منقوص الاوكسجين DNA ، إذ تعد من التقانات السريعة وذات المصداقية العالية، واعطت نتائج متميزة في دراسة التنوع الوراثي وتقدير القرب والبعد الوراثي بين أصناف النخيل، وتحديد هوية الأصناف الجديدة والسلالات البذرية. كما تم توظيف ISSR بشكل فعال من اجل التمييز بين الحامض النووي الخاص بالجنس واعطت نتائج يمكن اعتمادها لتحديد جنس نخيل التمر، وبينت النتائج التي تم الحصول عليها أنها أداة فعالة للكشف عن تعدد الأشكال الجزيئي في النخيل مما يدل على القوة التمييزية لتقنية ISSR .

كلمات مفتاحية: نخيل التمر، تقانات، جنس النخيل، DNA، ISSR.

المقدمة Introduction

تعرف التقانات الاحيائية بأنها مجمل التقانات التي تستعمل الانظمة الحيوية في الكائنات الحية او مكوناتها في انتاج او تحوير او تطوير منتجات او عمليات من اجل استخدامات معينة تكون ذات قيمة ومردود للإنسان ، إذ تستعمل بشكل فعال في برامج التحسين الوراثي سواء في وضع برامج التربية والتي تشمل اختيار المادة الاولية وتقويم نواتج عمليات التربية او في رفع كفاية برامج التربية من طريق الكشف المبكر عن وجود الصفة المرغوبة في المصدر الوراثي الى جانب ذلك التحقق من درجة الخلط او الاصالة الوراثية Ashter (2009) . تعتمد تقنية ISSR تكرارت التسلسلات البسيطة الداخلية على التوابع الدقيقة Microsatellite وتعطي مستويات عالية من التعددية الشكلية للحمض الريبي النووي منقوص الاوكسجين DNA ، إذ تعد من التقانات البسيطة والسريعة وذات المصداقية العالية وتستعمل هذه التقانة في مجالات واسعة لتحديد الاصناف ورسم الخرائط الوراثية والتنوع الوراثي. Rahayu *et al.*(2007) ; Kijas, *et al* (1995) ; Khanam *et al.* (2012).

وتعتبر طريقة لتقييم العلاقة الوراثية والتنوع الجيني بين الأصناف المختلفة ولها القدرة القوية على التمييز بين الأصناف،كما تمتاز هذه التقنية بغزارتها فانها تعطي عدداً كبيراً من الحزم ومستوى التعددية الشكلية عالي والتكاليف منخفضة كما ان جهد تنفيذها منخفض، Vandernest *et al*.(2000) .

تطبيق مؤشرات الـ ISSR في تقدير التنوع والوراثي ودراسة العلاقات الوراثية لنخيل التمر

Application of ISSR Markers in the Assessment of Genetic Diversity and Study of Date Palm Genetic Relationships

تعتبر تقانة ISSR من التقنيات الجزيئية المفيدة في تقييم العلاقات الوراثية والتنوع الوراثي بين الأصناف المختلفة ولها القدرة القوية على التمييز بين الأصناف، وتعطي مستويات عالية من التعددية الشكلية للحمض الريبي النووي منقوص الاوكسجين DNA ، إذ تعد من التقانات السريعة وذات المصداقية العالية (Khatak et al., 2016).

طبق Ibrahim *et al*.(2011) تقنية ISSR لتحديد التباين الوراثي بين 18 صنفاً من أصناف نخيل التمر المصرية، اذ استخدمت ثمانية بادئات لتقنية ISSR، نجحت خمسة بادئات من انتاج 255 حزمة مضخمة منها 242 حزمة متعددة الاشكال. وبلغت اعلى نسبة لتعدد الاشكال 98% . وبينت نتائج دراسة قارنت بين 45 سلالة من أصناف نخيل التمر الهندية (15 ذكرية و 30 انثوية) لتقييم التنوع الوراثي بينها باستخدام مؤشرات ISSR، حيث

استخدم 53 بادئاً لتقنية ISSR أنتجت حزم مضخمة بلغت 608 حزمة ومستوى منخفض نسبياً من تعدد الاشكال بنسبة 90.9%، وكان متوسط عدد الحزم ومتوسط نسبة التضاعف الفعالة EMR لكل بادئ من بادئات ISSR (11.5 و 10.4) على التوالي، كما بلغت قيمة متوسط محتوى المعلومات ذات التعدد الشكلي PIC (0.62) . كما بينت النتائج ان متوسط التشابه الوراثي بين السلالات الذكرية والسلالات الانثوية كان 76.0% و 74.0% على التوالي، ومتوسط معامل التشابه الملاحظ بين التراكيب الوراثية للذكور والاناث كان 72.0%. (Mitra *et al*,.2011) . واجريت دراسة لتحديد العلاقة الوراثية بين 18 صنفاً انثوياً و 5 أصناف ذكرية من أصناف نخيل التمر المأخوذة من عدة دول (سوريا، تونس، المغرب، المملكة العربية السعودية، الامارات العربية، ايران، مصر، العراق) من قبل Haider *et al.* (2012) في مختبرات وزارة الزراعة السورية 15 بادئاً بتقنية ISSR وكان مجموع الحزم المضخمة 1369 حزمة اعطتها بوادئ ISSR وبلغ حجمها (200–2000) زوج قاعدي (bp) ، حيث كان اعلى عدد للحزم المضخمة 130 حزمة للبادئ A40 واقل عدد 41 حزمة للبادئ B16 ، واعطت البوادئ معدل تضخيم 91.3 حزمة لكل بادئ، كما بينت النتائج ان عدد الحزم ذات التعدد الشكلي كانت 725 حزمة ومعدل نسبة التعدد الشكلي 50.60% حيث اعطى البادئان (A10 , B18) اعلى نسبة بلغت 100% بينما البادئان (A44 , C29) لم يعطيا أي نسبة للتعدد الشكلي.

أجريت دراسة من قبل Ahmed and Al–Qaradawi,(2013) لتقييم التنوع الوراثي لخمسة عشر صنفاً من نخيل التمر القطرية باستخدام تقنيات ISSR وكان عدد بادئات ISSR ثمانية عشر بادئاً منها ثلاثة بادئات فقط أعطت حزم مضخمة بلغت 84 حزمة كما أعطت 8 حزم ذات تعدد شكلي كان حجمها (500–2500bp) . وكان متوسط معدل معامل التشابه (0.000–0.750) وهذا يدل على ان الأصناف المدروسة متباينة للغاية فيما بينها. تم كذلك دراسة التنوع الوراثي من قبل كل من Marsafari and Mehrabi (2013) لخمسة عشر صنفاً من أصناف نخيل التمر في جنوب وغرب ايران لتحديد مدى ارتباطها الوراثي والتنوع الجيني باستخدام 14 بادئاً لتقنية ISSR، وبينت النتائج ان عدد الحزم المضخمة بلغت 162 حزمة لتقنية ISSR منها 155 حزمة ذات تعدد شكلي وكانت النسبة المئوية للتعدد الشكلي 95.67% ، كما بلغ حجم الحزم المضخمة (100 – 2250 bp) وكان عدد الحزم المضخمة لكل بادئ يتراوح من 4 الى 18 ، وبلغ متوسط مجموع الحزم المضخمة ومتوسط الحزم ذات التعدد الشكلي 11.57 و 11.07 على التوالي، وتراوحت قيمة محتوى معلومات التعدد الشكلي من 0.222 الى 0.309 مع معدل بلغت قيمته 0.274 ، كما تراوحت قيمة قوة البادئ بين 0.864 و 6.992 . كما أوضحت النتائج ان قيم التنوع الوراثي تراوحت

بين 0.059 الى 0.188 و كفاءة البوادئ تراوحت من 1.085 الى 1.304 ، اما التشابه الوراثي بين الأصناف باستخدام بوادئ ISSR تراوحت قيمته من 0.941 الى 0.994 ، ومن خلال النتائج أعلاه اشارت الدراسة الى وجود تنوع وراثي كبير بين الأصناف المدروسة.

قام Marsafari *et al.* (2014) بدراسة العلاقة الوراثية لخمسة عشر صنفاً من أصناف نخيل التمر الإيرانية باستخدام 14 بادئ لتقنية ISSR ، وبلغ مجموع الحزم الناتجة من تضخيم البوادئ 162 حزمة مضخمة . اما Sabir *et al*. (2014) فقد استعمل تقنيات ISSR لتوصيف عشرة أصناف من نخيل التمر في المملكة العربية السعودية حيث استخدم 13 بادئاً لتقنية ISSR والتي أعطت 135 حزمة مضخمة منها114 حزمة ذات تعدد شكلي، وبلغ معدل حجم الحزم المضخمة من 203bp (للبادئ HB10) الى 4596bp (للبادئ HB15) وكان معدل مستوى نسبة التعدد الشكلي للبوادئ من 20% (للبادئ HB8) الى 100% (للبادئين HB15 , 814) وبمعدل تعدد شكلي بلغ 80% . طبق Karim *et al*. (2015) تقانة ISSR في تقدير التنوع الوراثي بين مجموعة من افحل نخيل التمر في منطقة جريد بتونس، باستخدام 6 بوادئ لتقنية ISSR والتي أعطت 41 حزمة مضخمة وكان هناك 37 حزمة ذات تعدد شكلي بنسبة 90% ومعدل عدد الحزم 6.8 لكل بادئ وتراوح حجم الحزم من 250bp الى 3000bp ، واظهر التحليل الإحصائي وجود تنوع وراثي مع وجود مسافات وراثية تتراوح بين 0.512 و 0.975 وبمعدل 0.743 ، كما أظهرت نتائج تحليل مصفوفة التشابه نسبة تشابه 70%. وبينت النتائج التي تم الحصول عليها أن ISSR هو أداة فعالة للكشف عن تعدد الأشكال الجزيئي في النخيل مما يدل على القوة التمييزية لتقنية ISSR . وفي دراسة استخدمت فيها عشرة بادئات من ISSR لتقدير التنوع الوراثي لخمسة وستون صنفاً من أصناف النخيل العراقية من قبل Kareem *et al*.(2016) ، اظهرت النتائج ان البادئات أعطت 993 حزمة مضخمة وكان مجموع عدد الحزم ذات التعدد الشكلي 72 حزمة، وأعطى البادئ UBC–824 اعلى عدد للحزم المضخمة بلغ 138 حزمة منها 9 حزم ذات تعدد شكلي بينما اعطى البادئ UBC–841 اقل عدد للحزم بلغ 49 حزمة منها 4 حزم ذات تعدد شكلي، وبلغت نسبة التقارب الوراثي 100% – 67% بين الأصناف التي تنتمي لنفس المجموعة، وكانت النسبة المئوية للتعدد الشكلي للبادئات 98.9% ونسبة كفاءة البادئات 0.13% ونسبة قيمة التمايز 0.09% . كذلك استخدم ازهر،(2016) بعض المؤشرات المظهرية ومؤشرات مكررات التتابعات البسيطة الداخلية ISSR لدراسة التنوع الوراثي للطرز البيئية لـ 44 صنفاً من اهم اصناف النخيل المسجلة في خمس مناطق بيئية في العراق ومزروعة في محطات دائرة البستنة في وزارة الزراعة، اشتملت الدراسة 14 مؤشر مظهري و18 مؤشر جزيئي من مؤشرات (ISSR). اذ لوحظ ان عدد الحزم الكلية بلغ 7343

وعدد الحزم المتباينة منها بلغ 219 حزمة وبنسبة تباين 86.866% , واعطت جميع البادئات اعلى نسبة تباين بلغت (100%) ، وتشير نتائج تحليل البعد الوراثي بين الاصناف المدروسة واعتمادا على المؤشرات الجزيئية الى ان اعلى بعد وراثي بلغ 0.609 في حين بلغ أقل بعد وراثي 0.137 كما يلاحظ من نتائج التحليل العنقودي Cluster (analysis) بالاعتماد على طريقة UPGMA الى انقسام الاصناف المختارة من المناطق البيئية الخمس الى مجموعتين رئيسيتين. وفي دراسة أجريت من قبل Guettouchi *et al.* (2017) لتقدير التنوع الوراثي بين 20 صنفاً من أصناف نخيل التمر الجزائرية استخدم 21 بادئاً لتقنية ISSR ، بينت النتائج ان بوادئ ISSR انتجت حزماً مضخمة بلغ مجموعها 151 حزمة وكانت نسبة التعدد الشكلي 76% .

قام Purayil *et al.* (2018) بالكشف عن التنوع الوراثي لتسعة أصناف من نخيل التمر في دولة الإمارات العربية المتحدة، باستخدام خمسة بوادئ لتقنية ISSR ،وأوضحت النتائج ان تقنية ISSR أعطت 37 حزمة مضخمة وبمعدل 7.4 حزمة منها 30 حزمة ذات تعدد شكلي وسبعة منها أحادية التشكل وبلغ معدل نسبة التعدد الشكلي 80.14% .

قدر Hazaa (2019) التنوع الوراثي بين عشرين من اصناف نخيل التمر والمزروعة في وسط وجنوب العراق باستخدام سبعة بادئات من ISSR اذ انتجت البوادئ ما مجموعه 956 حزمة مضخمة وبمتوسط بلغ 136.57 حزمة لكل بادئ، كما بلغ عدد الحزم ذات التعدد الشكلي الناتجة من فعل البوادئ 193 حزمة وبمتوسط بلغ 27.57 حزمة ، وبلغت النسبة المئوية للتعددية الشكلية الكلية 98.50% جدول (1) وبلغت قيم الابعاد الوراثية للأصناف الانثوية العشرين الناتجة من فعل بوادئ ISSR ، بين (0.107 – 0.650)، اذ سجلت اعلى قيمة تشابه وراثي بين الصنفين (Ashrasy و Azraq–Azraq)، اما اقل قيمة للتشابه الوراثي فقد سجلت بين الصنفين (Brtgala، Ashrasy)، وتراوحت قيم التشابه الوراثي لبقية الاصناف بين اعلى واقل قيمة جدول (2) .

كما اجرى Takele *et al.*(2021) تقييم للتنوع الوراثي بين ثمانية طرز وراثية لنخيل التمر المزروعة في منطقة عفار بإثيوبيا باستخدام 15 بادئ من (ISSR)، وأشارت النتائج إلى ارتفاع مستوى تعدد الأشكال (69.91٪). وسجلت البادئات (ISSR ID–438229 و ID–438238 و ID–438239 و ID–438243) أعلى مستوى من تعدد الأشكال (85.7–100٪) وبلغت قيمة PIC (0.3–0.37) ومؤشر شانون (0.41–0.54) ، وكشفت النتائج عن تنوع كبير في السلالات المحلية لنخيل التمر الاثيوبية.

جدول (1) نواتج سبعة بوادئ ISSR من الحزم ونسب كفاءتها وقدرتها التمييزية في الاصناف المدروسة.

primers	no total bands	no of bands	Mono morphism bands	Poly morphism bands	Unique bands	Poly morphism %	Primer Efficiency %	Primer Discrimination power %
814	104	27	0	27	7	100	10.88	13.99
844	122	19	2	17	1	89.47	12.76	8.81
HB9	145	23	0	23	2	100	15.17	11.92
HB10	92	28	0	28	8	100	9.62	14.51
Hb12	157	37	0	37	8	100	16.42	19.17
ISA02	148	27	0	27	5	100	15.48	13.99
ISA71	188	34	0	34	3	100	19.66	17.62
total	956	195	2	193	34			
Mean	136.57	27.86	0.28	27.57	4.86	98.5	14.28	14.29

جدول (2) قيم التشابه الوراثي بين الاصناف الانثوية بفعل بوادئ ISSR

	Imrani	Jamal al-Din	Shteiwi	Um Al - Bilaliz	Sultani	Azraq-Azraq	Ashrasy	Barben	Angasa	Emamt-Algaty	Filfila	Brtgala	Najdi	Hamrawi	Swadani	Sakri	Abd-alhadi	Habsi	Nbaiti	Ashger
Imrani	1.000																			
Jamal al-Din	0.431	1.000																		
Shteiwi	0.316	0.453	1.000																	
Um Al - Bilaliz	0.357	0.405	0.464	1.000																
Sultani	0.329	0.277	0.355	0.400	1.000															
Azraq-Azraq	0.307	0.289	0.238	0.320	0.464	1.000														
Ashrasy	0.284	0.300	0.232	0.333	0.463	0.650	1.000													
Barben	0.171	0.207	0.259	0.213	0.165	0.124	0.128	1.000												
Angasa	0.133	0.157	0.205	0.188	0.155	0.153	0.131	0.455	1.000											
Emamt-Algaty	0.218	0.209	0.202	0.231	0.153	0.179	0.143	0.386	0.462	1.000										
Filfila	0.230	0.205	0.198	0.227	0.190	0.173	0.150	0.310	0.319	0.438	1.000									
Brtgala	0.136	0.148	0.181	0.163	0.145	0.116	0.107	0.343	0.438	0.368	0.413	1.000								
Najdi	0.195	0.161	0.114	0.163	0.159	0.171	0.163	0.343	0.438	0.292	0.459	0.385	1.000							
Hamrawi	0.203	0.153	0.118	0.154	0.165	0.177	0.139	0.319	0.391	0.343	0.410	0.403	0.582	1.000						
Swadani	0.218	0.238	0.217	0.247	0.153	0.193	0.200	0.228	0.250	0.297	0.278	0.274	0.224	0.233	1.000					
Sakri	0.244	0.218	0.157	0.273	0.190	0.232	0.181	0.179	0.213	0.273	0.270	0.188	0.218	0.211	0.400	1.000				
Abd-alhadi	0.253	0.227	0.117	0.190	0.186	0.272	0.250	0.232	0.222	0.266	0.231	0.155	0.260	0.237	0.250	0.378	1.000			
Habsi	0.165	0.217	0.167	0.163	0.159	0.200	0.148	0.324	0.296	0.224	0.219	0.233	0.250	0.279	0.240	0.267	0.347	1.000		
Nbaiti	0.203	0.181	0.188	0.216	0.227	0.257	0.200	0.282	0.236	0.250	0.229	0.225	0.243	0.292	0.184	0.211	0.306	0.318	1.000	
Ashger	0.257	0.244	0.193	0.253	0.231	0.183	0.160	0.284	0.163	0.190	0.200	0.138	0.197	0.239	0.175	0.157	0.210	0.300	0.257	1.000

تطبيقات الـ ISSR في تحديد هوية اصناف نخيل التمر :

Applications ISSR In determining the identity of date palm cultivars:

اثبتت هذه التقنية فعاليتها العالية في تحديد الصنف بنجاح اذا اجريت داراسات عديدة في هذه المجال، استخدم Younis *et al*,.(2008) تقنيتي ISSR لتحديد هوية بعض أصناف نخيل التمر المصرية، حيث اُختير أربعة أصناف انثوية وثلاث أصناف ذكرية. استخدمت سبعة بادئات حيث أعطت ما مجموعه 89 حزمة مضخمة منها 77 حزمة ذات تعدد شكلي، وكانت نسبة تعدد الاشكال بين الأصناف 87% .واجرى Karim *et al*,(2010) دراسة لتحديد هوية 10 أصناف من نخيل التمر التونسية باستخدام اثنا عشر بادئاً بتقنية ISSR، حيث بينت النتائج ان سبعة بادئات فقط أعطت تعدد شكلي بينما البادئات الأخرى لم تعطي أي منتج تضخيم لعينات DAN واعطت البادئات السبعة معدل حزم 11.71 حزمة لكل بادئ وكان معدل حجم الحزم 2500 bp – 200 واعطت مجموع حزم بلغ 82 حزمة وكانت المسافة الوراثية بين الأصناف من 0.3008 الى 0.7885 وبمعدل 0.505 واستنتج أن الأصناف تتميز بدرجة عالية من التنوع الوراثي على مستوى الحمض النووي.

كما قام Mansour *et al*,.2011 باستخدام ثمانية بادئات لتقنية ISSR لتحديد البصمة الوراثية لعشرة أصناف من نخيل التمر في المركز الوطني للبحوث والإرشاد الزراعي الأردني، حيث اعطى احد البادئات نسبة تعدد شكلي بلغت 100% بين المورثات كما يمكن استخدام البيانات التي تم الحصول عليها لإنشاء قاعدة بيانات وراثية لتراكيب نخيل التمر التي نمت في تلك المنطقة.

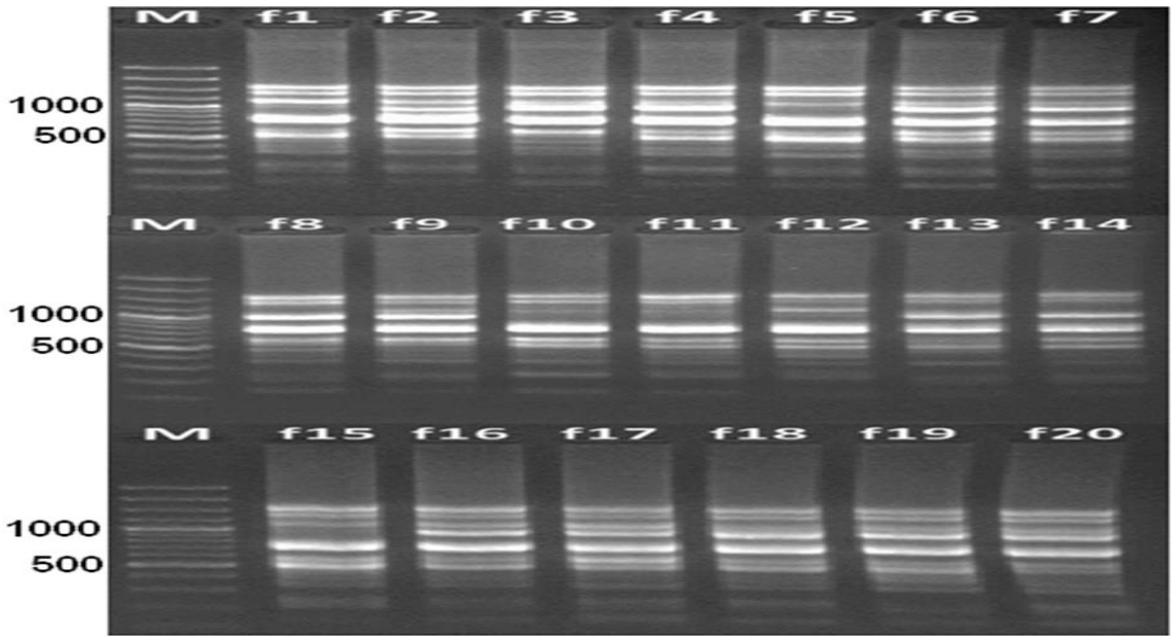
اما Sabir *et al*,.(2014) فقد استعمل ISSR لتوصيف عشرة أصناف من نخيل التمر في المملكة العربية السعودية حيث استخدم 13 بادئ والتي أعطت 135 حزمة مضخمة منها114 حزمة ذات تعدد شكلي، وكان معدل مستوى نسبة التعدد الشكلي للبادئات 85% .

كذلك قام(2016) Khalifa *et al.* بتحديد هوية ثمانية أصناف تجارية عالية الجودة في ليبيا باستخدام 11 بادئاً لتقنية ISSR بلغ مجموع الحزم المضخمة 111 حزمة ومعدل حجمها (861–2544) bp، وكان عدد الحزم ذات التعدد الشكلي 87 حزمة مع نسبة مئوية للتعدد الشكلي تراوحت من 36.36% الى 100% وتراوحت قيم المسافة الوراثية بين الأصناف من 0.178 الى 0.567 .

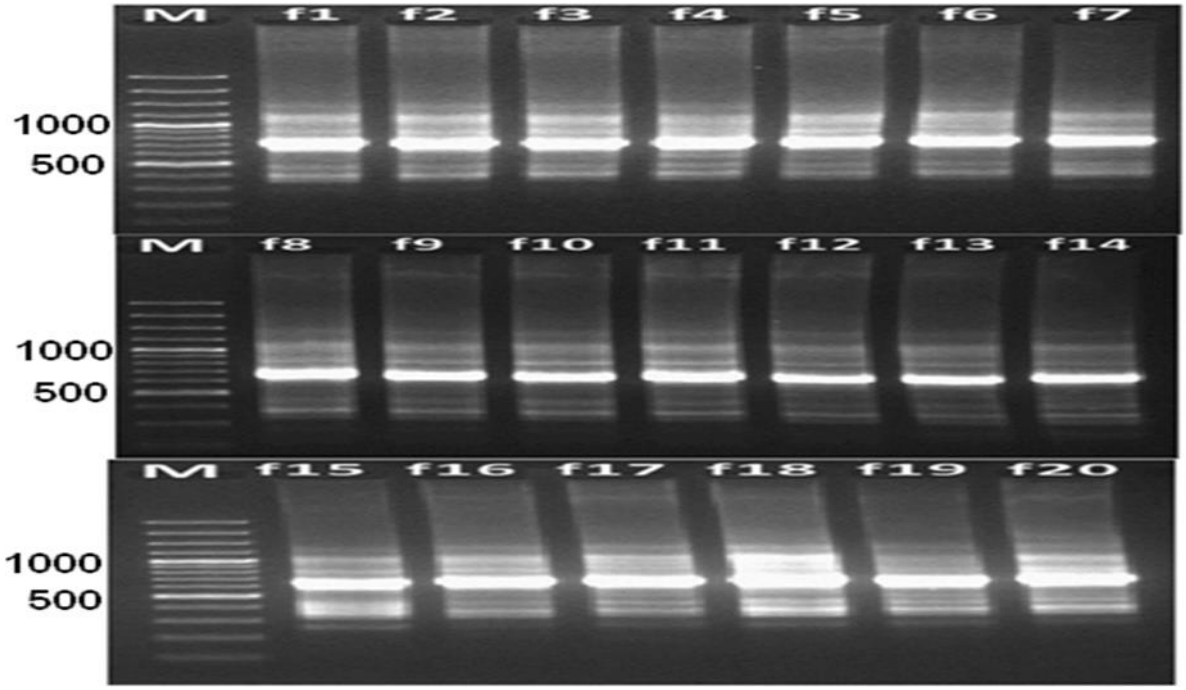
وفي الباكستان قام (2016) Mirbahar *et al.* بإيجاد البصمة الوراثية لخمسة وعشرون صنفاً من أصناف نخيل التمر التجارية في اربع مقاطعات باستخدام سبعة بوادئ من ISSR وأظهرت أصناف نخيل التمر الخمسة والعشرين

تبايناً وراثيا في مستوى الحمض النووي كما أظهرت البوادئ تعدداً شكلياً بنسبة 84% في أصناف نخيل التمر المدروسة. كذلك درس Elmeer *et al.* (2017) كفاءة ISSR في تشخيص الهوية الوراثية لـ 18 سلالة من سلالات صنف Khalas المنتشرة في مناطق مختلفة من دولة قطر، واستخدم 29 بادئاً وبينت النتائج ان البوادئ أعطت 132 حزمة مضخمة وبمعدل 4.6 حزمة لكل بادئ وكان عدد الحزم ذات التعدد الشكلي 72 حزمة، وبلغ معدل نسبتها 54.5% ،كما وبينت نتائج تحليل الشجرة الوراثية ان اعلى نسبة لمعامل التشابه الوراثي لتقنية ISSR كانت 99.97% وادنى نسبة كانت 64% وكان معدل المسافة الوراثية 0.14 . واستنتجت الدراسة ان تقنية ISSR استطاعت التمييز بين أصناف نخيل التمر واعتبرت هذه النتائج معنوية في بحث وتحديد البصمة الوراثية .

كما اجرى Hazaa (2019) دراسة لتحديد البصمة الوراثية لعشرين صنفاً من اصناف نخيل التمر باستخدام سبعة بادئات من ISSR واثبتت الدراسة فعالية عدد من البوادئ في تحديد هوية بعض الاصناف المدروسة، اذ ظهرت في نتائج تضخيم البوادئ حزم فريدة (unique) بلغ عددها 34 حزمة وبمتوسط 4.86 حزمة لكل بادئ جدول (1)، وأعطى كل من البادئين (HB10، Hb12) ثمانية حزم مميزة للأصناف ، لوحة (1) و لوحة (2).



لوحة (1) الترحيل الكهربائي لناتج تفاعل البلمرة المتسلسل ISSR–PCR بفعل البادئ HB12 للأصناف الانثوية على هلام الاجاروز بتركيز 2% اذ يمثل M الدليل الحجمي DNA M=100bp و f1 – f20 تمثل الأصناف الانثوية (Jamal al–Din ،Imrani، Emamt–Algaty ،Angasa،Barben ،Ashrasy ،Azraq–Azraq ،Sultani ،Um Al – Bilaliz ،Shteiwi، Ashger ،Nbaiti ،Habsi ،Abd–alhadi ،Sakri ،Swadani ،Hamrawi ،Najdi ،Brtgala ،Filfila)



لوحة (2) الترحيل الكهربائي لناتج تفاعل البلمرة المتسلسل ISSR–PCR بفعل البادئ HB10 للأصناف الانثوية على هلام الاجاروز بتركيز 2% اذ يمثل M الدليل الحجمي DNA M=100bp و f20 – f1 تمثل الأصناف الانثوية (Imrani، Jamal al– Emamt– ،Angasa،Barben ،Ashrasy ،Azraq–Azraq ،Sultani ،Um Al – Bilaliz ،Shteiwi ،Din Ashger، Nbaiti ،Habsi ،Abd–alhadi ،Sakri ،Swadani ،Hamrawi ،Najdi ،Brtgala ،Filfila ،Algaty).

تطبيقات الـ ISSR في تحديد الجنس في نخيل التمر :

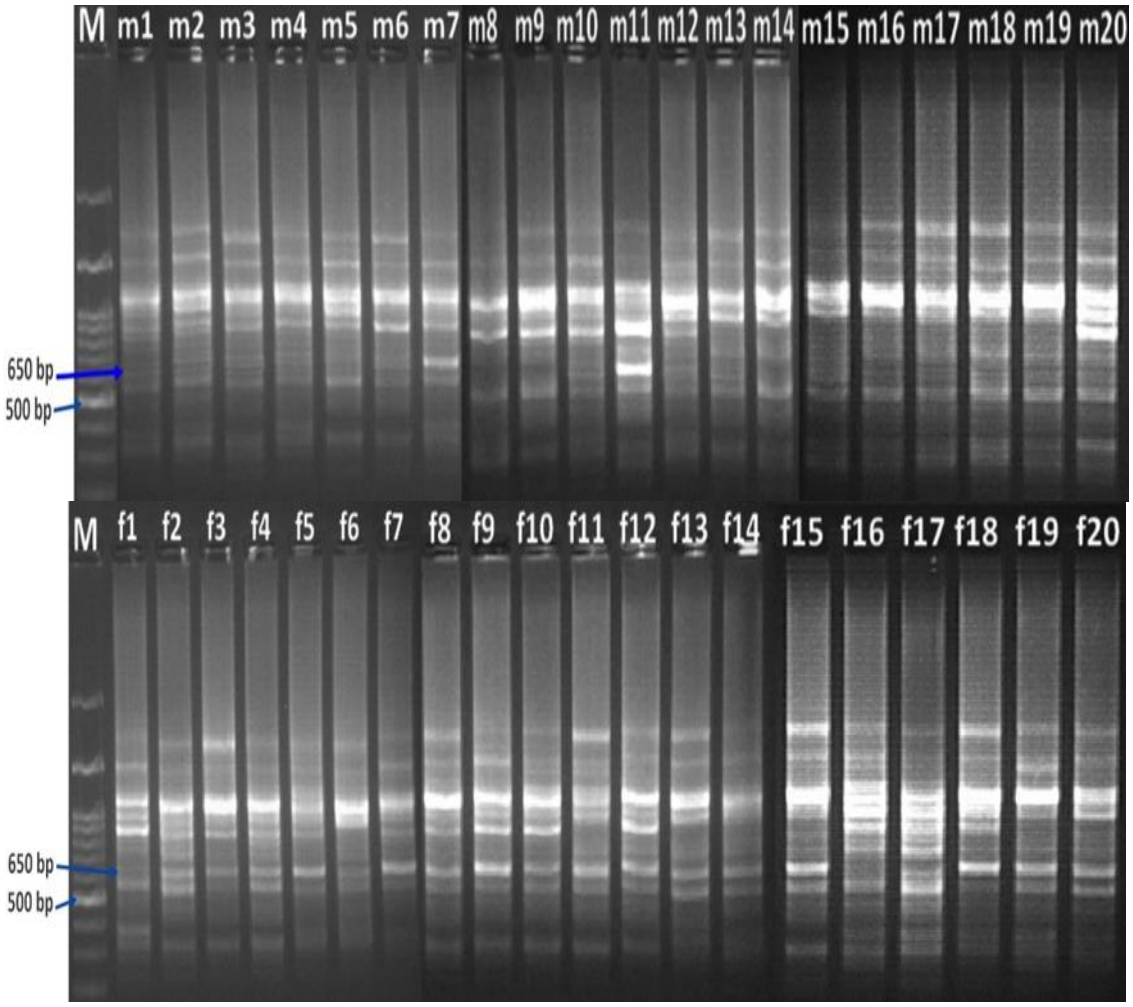
Sex Determination in Date Palm use of ISSR

لكون تقنية ISSR من التقنيات الحديثة في المؤشرات الجزيئية للحامض النووي منقوص الاوكسجين وتعد من الاجيال المتقدمة، فقد اجريت العديد من الدراسات التي تناولت هذه التقنيات لتحديد الجنس في نخيل التمر . ففي دراسة على سبعة أصناف من نخيل التمر المصرية (ثلاثة أصناف ذكرية وأربعة أصناف انثوية) لتحديد الجنس وهوية الأصناف باستخدام تقنيتي ISSR بينت النتائج وجود خمسة حزم مميزة ومحددة للذكور في تحليل تقنية ISSR والتي ظهرت في نتائج خمس من البوادئ (844، 814، HB12، HB10، HB9) عند الاوزان الجزيئية (920 bp، 590 bp، 375 bp، 1010 bp، 340 bp) على التوالي (Younis *et al.*, 2008).

وفي المملكة العربية السعودية قام Al–Ameri *et al.* (2016) بفحص 200 بادئاً لتقنية ISSR لتحديد مؤشرات خاصة بالجنس لعشرة أصناف ذكرية وعشرة أصناف انثوية من نخيل التمر، نجح بادئان فقط (IS A02 و IS A71)

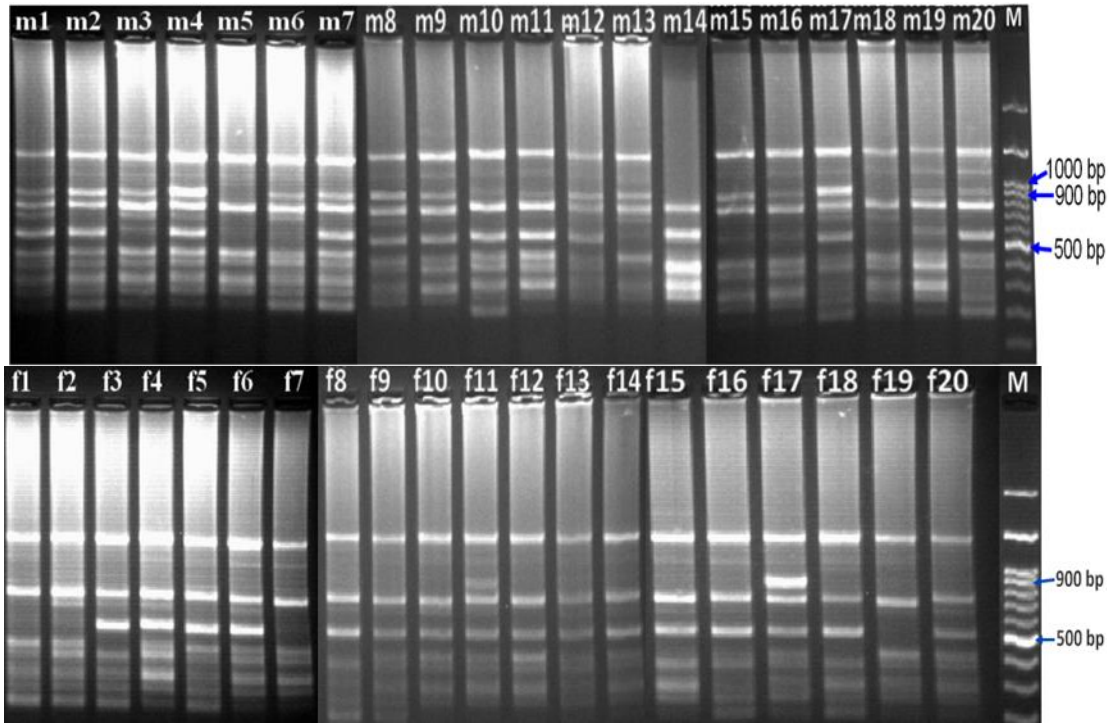
في انتاج حزم فريدة مميزة للجنس، حيث انتج البادئ IS A02 حزمة ذات وزن جزيئي 390 bp وجدت في الأصناف الانثوية فقط، بينما اعطى البادئ IS A71 حزمة ذات وزن جزيئي 380 bp في الأصناف الذكرية فقط .

استخدم Hazaa (2019) سبعة بادئات لتقنية ISSR لتحديد الجنس في 40 صنف من نخيل التمر العراقية (20 صنفاً انثوياً و 20 صنفاً ذكرياً)، وظهرت في نتائج البادئ ISA02 وجود حزمة قد تكون مميزة للجنس ظهرت في 18 صنفاً من الأصناف الانثوية وعند الحجم الجزيئي 650 زوج قاعدي وبلغت نسبتها % 90 ، في حين لم تظهر هذه الحزمة الا في صنفين من الأصناف الذكرية لوحة (3)، اما الحزم المميزة للجنس الذكري فيلاحظ ان افضل البوادئ هو 844، اذ بينت نتائجه ظهور حزمة قد تكون مميزة للجنس ظهرت في 17 صنف ذكري وبلغ حجمها الجزيئي 900 زوجاً قاعدياً وبنسبة بلغت 90%، اما في الأصناف الانثوية فقد ظهرت هذه الحزمة في صنف واحد فقط لوحة (4) .



لوحة (3) الترحيل الكهربائي لناتج تفاعل البلمرة المتسلسل ISSR–PCR للبادئ ISA02 لعينات الأصناف الذكرية والانثوية على هلام الاجاروز بتركيز 2% اذ يمثل M الدليل الحجمي M=100bp DNA

و f1 – f20 تمثل الأصناف الانثوية و m1–m20 تمثل الاصناف الذكرية.



لوحة (4) الترحيل الكهربائي لناتج تفاعل البلمرة المتسلسل ISSR–PCR للبادئ 844 لعينات الأصناف الذكرية والانثوية على هلام الاجاروز بتركيز 2% اذ يمثل M الدليل الحجمي M=100bp DNA

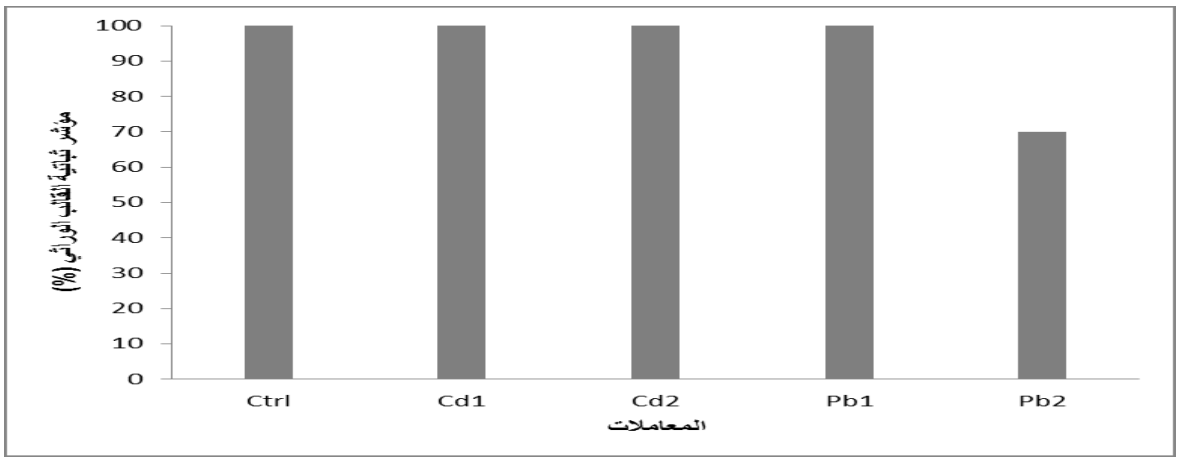
و m1–m20 تمثل الاصناف الذكرية و f1 – f20 تمثل الأصناف الانثوية

تطبيقات الـ ISSR في الكشف عن تأثير التلوث بالمعادن الثقيلة في الثبات الوراثي لأصناف نخيل التمر :

Applications of the ISSR in detecting the effect of heavy metal pollution on the genetic stability of date palm cultivars.

بينت العديد من الدراسات أن تقنية ISSR هي أداة جيدة لتقييم تأثيرات اجهادات العناصر الثقيلة على النباتات تحت هذه الظروف , ويعد استخدام مؤشرات ISSR كعلامة تشخيصية إذ يرتبط وجود وغياب وشدة الحزم بتلف الحمض النووي , والطفرات التي تسببها العناصر الثقيلة وسميتها. وبينت دراسة أجراها El Sherbeny *et al.* (2017) وجود تباين وراثي بين النباتات تحت ظروف إجهاد العناصر الثقيلة. كذلك أشار Theriault *et al* (2014) الى امكانية استخدا م هذه التقنية لرصد التغيرات في الحمض النووي التي تسببها العناصر الثقيلة. اجريت دراسة من قبل الجابري (2017) لبيان تاثير التلوث بالمعادن الثقيلة (الكادميوم والرصاص والكروم والكوبلت) في الثبات الوراثي لأصناف نخيل التمر والمزروعة في ستة مناطق في محافظة البصرة باستخدام خمسة بادئات لتقنية ISSR، وبينت النتائج ان المعاملة بمعدن الرصاص اثرت في الصفات الوراثية ، اذ بلغت قيمة مؤشر التشابه الوراثي 75% مقارنتا بباقي المعاملات،

كذلك أدت الى خفض قيمة مؤشر ثباتيه القالب الوراثي الى 70% (شكل 1) مما يدل على كفاءة هذه التقنية في دراسة تحديد التباين الوراثي تحت ظروف اجهاد المعادن الثقيلة .



شكل (1) تاثير المعاملة بتراكيز مختلفة من الكادميوم والرصاص في مؤشر ثباتية القالب الوراثي GTS لنخيل التمر صنف البرحي(%).

استخدم الموالي (2021) تقنية ISSR لتقييم تاثير التلوث ببعض المعادن الثقيلة والهيدروكاربونات النفطية لأشجار النخيل صنف الحلاوي في خمسة بساتين من مناطق مختلفة في البصرة، اعتمادا على قرب بساتين النخيل من مصادر التلوث، واظهرت النتائج انخفاض في قيمة مؤشر التشابة الوراثي الى 72% فضلا عن خفض قيمة مؤشر ثباتيه القالب الوراثي بنسبة بلغت 65.5%. مما يدل على ان المواقع القريبة من مصادر التلوث تؤدي الى حدوث تغيرات وراثية اثبتتها مؤشرات تقنية ISSR.

المصادر **References**

ازهر، هديل ظافر (2016). دراسة التنوع الوراثي للطرز البيئية لأصناف نخيل التمر في العراق باستخدام بعض المؤشرات المظهرية ومؤشرات مابين المكررات البسيطة المتكررة ISSR . رسالة ماجستير. كلية الزراعة . جامعة بغداد.

الجابري، خير الله موسى (2017). التباين الموسمي للتلوث بالمعادن الثقيلة وتأثير معاملة الكادميوم والرصاص في بعض الصفات الكيموحيوية والتشريحية والوراثية لنخيل التمر. *Phoenix dactylifera* L. صنف البرحي. اطروحة دكتوراه. كلية العلوم . جامعة البصرة .

الموالي، حسنين محمد غباش (2021). تأثير التلوث ببعض العناصر الثقيلة والهيدروكاربونات النفطية في بعض صفات ثمار وأوراق نخيل التمر. *Phoenix dactylifera* L. صنف الحلاوي. اطروحة دكتوراه. كلية الزراعة . جامعة البصرة .

Ahmed, T. A., Al-Hadidi, S. H., Al-Qaradawi, A. Y. & Radwan, O. (2013). Determination of inter-and intra-specific genetic variations among Qatari date palm cultivars using inter simple sequence repeat (ISSR) markers. African Journal of Biotechnology 12(19): 2540-2546.

Al-Ameri, A. A., Al-Qurainy, F., Gaafar, A., Khan, S. & Nadeem, M. (2016). Male specific gene expression in dioecious Phoenix dactylifera (Date palm) tree at flowering stage. *Pakistan Journal of Botany* 48(1): 131-135.

Ashter, S. (2009).Evaluation of some genotyps of the Syrian wheat (hexagonal and quaternary) using biochemical and molecular markers are different. Ph. D. Diss. Agronomy Department. Faculty of Agriculture. University of Syrian.

Elmeer, K., Alghanem, M., Al-Latifi ,L. & Alhemairi, H. (2017). Efficiency of RAPD and ISSR Markers for the Detection of Polymorphisms and Genetic Relationships in Date Palm. *Biotechnology* 16(1): 19-26.

El Sherbeny, E.A., Morsy,A.A. and Hassan ,A.H.(2017) . Impact of heavy metals pollution on molecular genetics of some medicinal plants. Journal of Agriculture and Veterinary Science , 10, Issue 1 Ver. I : 66 -71.

Guettouchi, A., Elshibli, S., Haider, N., Nabulsi, I. & Ykhlef, N. (2017). Molecular diversity in Date Palm (*Phoenix Dactylifera* L.) cultivars from Algeria indicated by RAPD and ISSR polymorphisms. *Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology* 18(2): 76-89

Haider, N., Nabulsi, I. & MirAli, N. (2012). Phylogenetic relationships among date palm (Phoenix dactylifera L.) cultivars in Syria using RAPD and ISSR markers. *Journal of Plant Biology Research* 1(2): 12-24.

Hazaa, A.Y.L. (2019). Employment of Molecular Markers to Study Genetic Diversity and Gender Determination of many Date Palm Phoenix dactylifera L. cultivars. PhD thesis, College of Agriculture - University of Basra.217 pp.

Ibrahim, A. I., Hemeida, A. A., Abdelkader, H. S., Girgis, A. A., & Abou-El-Einin, H. (2011). Genetic variance between some Egyptian Date Palm cultivars using PCR-based markers with emphasis on the prevalence of Al wijam disease. Archives of Phytopathology and Plant Protection, 44(8), 732-742.

Karim, K., Chokri, B., Amel, S., Wafa, H., Richid, H., & Nouredine, D. (2010). Genetic diversity of Tunisian date palm germplasm using ISSR markers. International Journal of Botany, 6(2), 182-186.

Karim, K., Ines, R., Souhayla, M. & Khayria, H. (2015). Morphological and molecular evaluation of the genetic diversity of Tunisian local date palm pollinators. *Academia Journal of Biotechnology* 3(2): 26-34.

Khalifa, N. S., Shehata, M. M., Abodoma, A. F. & Alkumbezy, A. F. (2016). Molecular analysis of commercial date palm cultivars in Lybia using ISSR and SRAP PCR-based markers. *Genetika* 48(1): 307-322.

Khanam, S., Sham, A., Bennetzen, J. L. & Aly, M. A. (2012). Analysis of molecular marker-based characterization and genetic variation in date palm ('Phoenix dactylifera'L.). *Australian Journal of Crop Science* 6(8): 1236-1244.

Khatak ,S., Ghai, M. & Dahiya, S. (2016). ISSR Marker based Inter and Intra-Specific Diversity Analysis in Different Genotypes of Cannabis sativa. *International Journal of Engineering Technology Science and Research* 3(4): 6-16.

Kareem, M. A. H., Naji, H. F., & Al-Saadi, A. H. (2016). Determination of genetic diversity of Iraqi date palm (Phoenix dactylifera L.) by using ISSR technique. Euphrates Journal of Agriculture Science, 8(3).

Kijas, J., Fowler, J. & Thomas, M .(1995) .An evaluation of sequence tagged microsatellite site markers for genetic analysis within Citrus and related species. *Genome* 38(2): 349-355.

Mansour, M. T., Hassawi, D. S., Migdadi, H. M., & Brake, M. (2011). Fingerprinting date palm genotypes (Phoenix dactylifera L.) using Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) markers. J Genet Breed, 63, 17-22.

Marsafari, M., Mehrabi, A. & Tahmasebi, Z. (2014). The identification of RAPD and ISSR informative markers with some quality traits of fruit in some of Iranian date palm. *International Journal of Plant, Animal and Environmental Sciences* 4(2): 714-722.

Marsafari, M. & Mehrabi, A. A. (2013). Molecular identification and genetic diversity of iranian date palm ('Phoenix dactylifera'L.) Cultivars using ISSR and RAPD markers. *Australian journal of crop science* 7(8): 1160-1166.

Mirbahar, A. A., Khan, S., Markhand, G. S., Kauser, N. & Saeed, R. (2016). DNA fingerprinting of some pakistani date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultivars using ISSR markers. *Pakistan Journal of Botany* 48(5): 2005-2010.

Mitra, C., Kharb, P., Uppal, S., & Jain, S. (2011). Genetic diversity analysis in date palm (Phoenix dactylifera L.): a comparative assessment using ISSR and RAPD marker assays. The Journal of Horticultural Science and Biotechnology, 86(4), 398-402.

Purayil, F. T., Robert, G. A., Gothandam, K. M., Kurup, S. S., Subramaniam, S. & Cheruth, A. J. (2018). Genetic variability in selected date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultivars of United Arab Emirates using ISSR and DAMD markers. *3 Biotech* 8(2): 109.

Rahayu, S. E., Hartana, A., Chikmawati, T., & Kartawinata, K. (2007). Genetic Diversity of Pandanus and Freycinetia from Java based on ISSR Marker. *Floribunda*, *3*(3-4).

Sabir, J. S., Abo-Aba, S., Bafeel, S., Zari, T. A., Edris, S., Shokry, A. M., Atef, A., Gadalla, N. O., Ramadan, A. M. & Al-Kordy, M. A. (2014). Characterization of ten date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultivars from Saudi Arabia using AFLP and ISSR markers. *Comptes rendus biologies* 337(1): 6-18.

Takele, D., Tsegaw, M., & Indracanti, M. (2021). Genetic diversity assessment in some landraces and varieties of date palm (Phoenix dactylifera L.) from Afar Region, Ethiopia, using ISSR markers. Ecological Genetics and Genomics, 19, 100085.

Theriault, G., Nkongolo, K. and Michel P. (2014). Genetic and metal analyses of fragmented populations of Betula papyrifera (Marsh) in a mining reclaimed region: identification of population diagnostic molecular marker. Eco. Evol. 4(17): 3435-3443 .

Younis, R. A., Ismail, O. M. & Soliman, 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(4): 278-284.

Van der Nest, M. A., Steenkamp, E. T., Wingfield, B. D., & Wingfield, M. J. (2000). Development of simple sequence repeat (SSR) markers in Eucalyptus from amplified inter-simple sequence repeats (ISSR). Plant breeding, 119(5), 433-436.

Application of ISSR Markers in Date Palm (review article)

Ahmed Yousef Lafta Hzaa[1*] Murtadha Shanan Auda[1]

Hassan Abdulimam Faisal[2]

[1]Department of Horticulture, College of Agriculture

[2]Date Palm Research Centre

University of Basrah, Iraq

* Email: ahmed.lafta@uobasrah.edu.iq

Abstract

The date palm is one of the oldest and economically important cultivated fruit trees in Iraq. In view of the development of DNA-based techniques, this review was conducted to demonstrate the importance of applying the Inter Simple Sequence Repeats (ISSR), which is considered one of the useful molecular techniques in evaluating genetic relationships and genetic diversity between different in date palm cultivars and has a strong ability to distinguish Among the cultivars, it gives high levels of DNA polymorphism, as it is one of the fast and highly credible technologies, and it gave distinguished results in the study of genetic diversity, estimation of genetic proximity and distance between date palm cultivars, and identification of new cultivars and seed strains. ISSR was also effectively employed in order to distinguish between the DNA of the sex and gave reliable results to determine the sex of the date palm, and the results obtained showed that it is an effective tool for detecting molecular polymorphisms in palm, which indicates the discriminatory power of ISSR technique.

Keywords: Date palm, DNA, palm sex, ISSR, Technology