جمهورية العراق
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة ديالى
كلية التربية للعلوم الصرفة
قسم علوم الحياة

تقدير البعد الوراثي لبعض اصناف نخيل التمر *Phoenix dactylifera* L. المزروعة في العراق باستعمال تقانة(RAPD)

رسالة مقدمة الى

مجلس كلية التربية للعلوم الصرفة – جامعة ديالى

وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الحياة

علم النبات

من قبل

مهند رشيد حسين الزيدي

بكالوريوس علوم حياة سنة ٢٠٠٨

بإشراف

باحث علمي اقدم/ د. شذى عايد يوسف

ذو القعدة ١٤٣٥هـ أيلول /٢٠١٤ م

بسم الله الرحمن الرحيم

﴿ وَفِي الْأَرْضِ قِطَعٌ مُتَجَاوِرَاتٌ وَجَنَّاتٌ مِنْ أَعْنَابٍ وَزَرْعٌ
وَنَخِيلٌ صِنْوَانٌ وَغَيْرُ صِنْوَانٍ يُسْقَىٰ بِمَاءٍ وَاحِدٍ وَنُفَضِّلُ
بَعْضَهَا عَلَىٰ بَعْضٍ فِي الْأُكُلِ ۚ إِنَّ فِي ذَٰلِكَ لَآيَاتٍ
لِّقَوْمٍ يَعْقِلُونَ ﴾

صدق الله العظيم

الآية (٤) من سورة الرعد

الإهداء

إلى من أرسله الله قدوة ومعلماً ورحمة للعالمين ... سيدنا محمد (ص)

الى ينبوع الحب والحنان التي أعطت ولم تأخذ ولهجت بالدعاء ولم تفتر . . والدتي

الى من أحمل إسمه بكل فخر و تحمل من أجلي الصعاب وبذل الغالي والنفيس . . والدي رحمه الله

الى مَن اشدُّ بهم ازري وخفقت قلوبهم من اجلي . . اخوتي واخواتي

أهدي ثمرة جهدي . . .

الباحث

الشكر والتقدير

الحمد لله رب العالمين الذي يسّر لي أمري, والذي أنار لي عقلي ودربي أحمده حمداً كثيراً بسعة عرشه وعدد خلقه، والصلاة والسلام على سيد الخلق أجمعين محمد الأمين وعلى آله وصحبه أجمعين.

أتقدم بالشكر والتقدير الى عمادة كلية التربية للعلوم الصرفة ، ورئاسة قسم علوم الحياة لإتاحة الفرصة لي لإكمال دراستي العليا ، كما وأخص بالشكر الجزيل للمشرفة الباحث العلمي اقدم الدكتورة شذى عايد يوسف والتي كانت مرجعي الأول والأخير طيلة فترة البحث وكانت خير عون في ترصين هذه الرسالة، وبكل فخر واعتزاز أتقدم بعميق الشكر وعظيم التقدير الى الدكتور عمار احمد سلطان القرةغولي على مده يد العون لي.

ويسعدني أن أشكر كل منتسبي مختبر البايولوجيا الجزيئية/ دائرة البحوث الزراعية / وزارة العلوم والتكنولوجيا على تقديمهم المساعدة لي في اجراء التحليلات المختبرية ، واتقدم بالتقدير والاحترام الوافرين لرئيس لجنة المناقشة وأعضائها المحترمين ، لتفضلهم بالموافقة على قبول مناقشة الرسالة وابدائهم التوجيهات العلمية القيمة .

الباحث

إقرار المشرف

أشهد أن إعداد هذه الرسالة الموسومة بـ **(تقدير البعد الوراثي لبعض اصناف نخيل التمر *Phoenix dactylifera* L. المزروعة في العراق باستعمال تقانة(RAPD))** التي قدمها طالب الماجستير **(مهند رشيد حسين الزيدي)** قد جرى تحت إشرافنا في قسم علوم الحياة / كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة ديالى وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الحياة / علم النبات .

التوقيع :

المشرف : د. شذى عايد يوسف

المرتبة العلمية : باحث علمي اقدم

دائرة البحوث الزراعية/ وزارة العلوم والتكنولوجيا

التاريخ : / / ٢٠١٤

توصية رئيس قسم علوم الحياة

بناءً على التوصيات المتوافرة نرشح هذه الرسالة للمناقشة

التوقيع :

الأسم : أ.م. د. نجم عبدالله جمعة الزبيدي

رئيس قسم علوم الحياة

التاريخ : / / ٢٠١٤

إقرار الخبير اللغوي

أشهد أن اعداد هذه الرسالة الموسومة بـ(**تقدير البعد الوراثي لبعض اصناف نخيل التمر *Phoenix dactylifera* L. المزروعة في العراق باستعمال تقانة (RAPD)**) التي قدمها طالب الماجستير (**مهند رشيد حسين الزيدي**) قد تمت مراجعتها من الناحية اللغوية, وصُحّحَ ما ورد فيها من أخطاء لغوية وتعبيرية , وبذلك أصبحت الرسالة مؤهلة للمناقشة بقدر تعلق الأمر بسلامة الأسلوب وصحة التعبير.

التوقيع

الاسم

المرتبة العلمية

/ / ٢٠١٤

إقرار المقوم العلمي

أشُهد أن اعداد هذه الرسالة الموسومة بـ (**تقدير البعد الوراثي لبعض اصناف نخيل التمر المزروعة في العراق باستعمال تقانة (RAPD)** ***Phoenix dactylifera*** **L.**) التي قدمها طالب الماجستير (**مهند رشيد حسين الزيدي**) قد تمت مراجعتها من الناحية العلمية وبذلك أصبحت الرسالة مؤهلة للمناقشة .

التوقيع

الاسم

المرتبة العلمية

/ / ٢٠١٤

إقرار لجنة المناقشة

نشهد نحن رئيس وأعضاء لجنة المناقشة أننا اطلعنا على هذه الرسالة الموسومة بـ (**تقدير البعد الوراثي لبعض اصناف نخيل التمر *Phoenix dactylifera* L. المزروعة في العراق باستعمال تقانة (RAPD)**) وقد ناقشنا الطالب (**مهند رشيد حسين الزيدي**) في محتوياتها وفيما له علاقة بها بتاريخ ١٢/ ١١/ ٢٠١٤ ، ونؤيد بأنها جديرة بالقبول لنيل درجة الماجستير في علوم الحياة / علم النبات بدرجة (امتياز).

رئيس اللجنة
التوقيع :
الاسم : د. كاظم محمد ابراهيم
المرتبة العلمية : استاذ
العنوان : جامعة النهرين
كلية التقنيات الحيوية
التاريخ : / / ٢٠١٤

عضو اللجنة
التوقيع :
الاسم : د. عماد خلف عزيز
المرتبة العلمية : استاذ مساعد
العنوان : جامعة ديالى
كلية الزراعة
التاريخ : / / ٢٠١٤

عضو اللجنة
التوقيع :
الاسم : د. عمار احمد سلطان
المرتبة العلمية : استاذ مساعد
العنوان : جامعة ديالى
كلية التربية للعلوم الصرفة
التاريخ : / / ٢٠١٤

عضو اللجنة المشرف
التوقيع :
الاسم : د. شذى عايد يوسف
المرتبة العلمية : باحث علمي اقدم
العنوان : دائرة البحوث الزراعية
وزارة العلوم والتكنلوجيا
التاريخ : / / ٢٠١٤

مصادقة مجلس الكلية

صدقت الرسالة من قبل مجلس كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة ديالى

الاستاذ الدكتور
عباس عبود فرحان
عميد كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة ديالى
التاريخ : / / ٢٠١٤

قائمة المحتويات

التسلسل	المحتويات	الصفحة
	الخلاصة	أ– ب
	قائمة المحتويات	ج– د
	قائمة الجداول	هـ– و
	قائمة الصور	و– ز
	قائمة الاشكال	ز
الفصل الأول – المقدمة		
١	المقدمة	١
الفصل الثاني – استعراض المراجع		
٢	مراجعة المصادر	٤
٢–١	تصنيف نخيل التمر	٤
٢–٢	الموطن الاصلي لنخيل التمر	٤
٢–٣	اهمية نخيل التمر	٥
٢–٤	الصفات العامة لنخيل التمر	٥
٢–٥	الصفات الخضرية والثمرية لاصناف نخيل التمر الداخلة في الدراسة	٦
٢–٦	التنوع المظهري	٨
٢–٧	التنوع الوراثي	٩
٢–٨	مؤشرات التضاعف العشوائي المتعدد الأشكال لسلسلة الدنا	١٢
٢–٩	مقارنة الوصف المظهري بالموشرات الجزيئية	١٤
الفصل الثالث – المواد ، وطرائق العمل		
٣	المواد وطرائق العمل	١٦
٣–١	الاجهزة المستعملة في هذه الدراسة	١٦
٣–٢	المحاليل والمواد الكيمائية المستعملة في هذه الدراسة	١٧

٣-٣	محاليل الاصل	١٨
٣-٤	طرائق العمل لاستخلاص المادة الوراثية	١٩
٣- ٤ - ١	جمع عينات النبات	١٩
٣- ٤ -٢	استخلاص المادة الوراثية	١٩
٣-٤-٣	توصيف الدنا	٢١
٣-٥	مؤشرات التفاعل التضاعفي العشوائي لسلسلة الدنا	٢٢
٣-٦	الترحيل الكهربائي لخليط تفاعل البلمرة الحراري	٢٢
٣-٧	تحليل النتائج	٢٤
٤- الفصل الرابع النتائج والمناقشة		
٤	النتائج والمناقشة	٢٥
٤-١	نتائج عزل الدنا	٢٥
٤-٢	نتائج تفاعلات RAPD	٢٧
٤-٣	التعددية الشكلية وكفاءة البوادئ وقدرتها التمييزية	٥٦
٤-٤	مناقشة نتائج تفاعلات RAPD	٥٨
٤-٥	تقدير البعد الوراثي بين الاصناف المدروسة	٦١
٥- الفصل الخامس الاستناجات والتوصيات		
٥-١	الاستنتاجات	٦٤
٥-٢	التوصيات	٦٤
المصادر العربية		٦٥-٦٧
المصادر الانكليزية		٦٨ -٧٥
الملاحق		٧٦
الملخص باللغة الانكليزية		A

قائمة الجداول

التسلسل	الجدول	الصفحة
1	الأجهزة المستخدمة والشركات المصنعة والمنشأ	١٦
٢	المحاليل والمواد الكيمائية والمنشأ	١٧
٣	البادئات العشوائية مع التتابعات الخاصة بها	٢٣
٤	برنامج تفاعل مؤشرات التفاعل التضاعفي العشوائي لسلسلة الدنا RAPD – PCR	٢٣
٥	تراكيز الدنا ونقاوته لاصناف النخيل الداخلة في الدراسة	٢٥
٦	الحزم المتباينة للبادئ OPA-01 مع اوزانها الجزيئية	٢٨
٧	الحزم المتباينة للبادئ OPA-05 مع اوزانها الجزيئية	٣٠
٨	الحزم المتباينة للبادئ OPA-08 مع اوزانها الجزيئية	٣١
٩	الحزم المتباينة للبادئ OPA-10 مع اوزانها الجزيئية	٣٣
١٠	الحزم المتباينة للبادئ OPA-11 مع اوزانها الجزيئية	٣٤
١١	الحزم المتباينة للبادئ OPA-17 مع اوزانها الجزيئية	٣٦
١٢	الحزم المتباينة للبادئ OPA - 20 مع اوزانها الجزيئية	٣٧
١٣	الحزم المتباينة للبادئ OPB - 05 مع اوزانها الجزيئية	٣٨
١٤	الحزم المتباينة للبادئ OPC - 04 مع اوزانها الجزيئية	٣٩
١٥	الحزم المتباينة للبادئ OPC-08 مع اوزانها الجزيئية	٤١
١٦	الحزم المتباينة للبادئ OPC-15 مع اوزانها الجزيئية	٤٢
١٧	الحزم المتباينة للبادئ OPE - 12 مع اوزانها الجزيئية	٤٤
١٨	الحزم المتباينة للبادئ OPF - 02 مع اوزانها الجزيئية	٤٥
١٩	الحزم المتباينة للبادئ OPF - 05 مع اوزانها الجزيئية	٤٧
٢٠	الحزم المتباينة للبادئ OPF - 12 مع اوزانها الجزيئية	48

٢١	الحزم المتباينة للبادئ OPH - 07 مع اوزانها الجزيئية	٤٩
٢٢	الحزم المتباينة للبادئ OPH - 09 مع اوزانها الجزيئية	٥١
٢٣	الحزم المتباينة للبادئ OPH - 16 مع اوزانها الجزيئية	٥٣
٢٤	الحزم المتباينة للبادئ OPQ - 17 مع اوزانها الجزيئية	٥٤
٢٥	الحزم المتباينة للبادئ OPR - 07 مع اوزانها الجزيئية	٥٦
٢٦	نواتج البادئات من الحزم مع نسب كفائتها وقدرتها التمييزية	٥٧
٢٧	البادئات التي ميزت الاصناف المدروسة والوزن الجزيئي لكل حزمة مميزة	٦٠
٢٨	نسبة التشابه بين اصناف نخيل التمر المدروسة	٦٢

قائمة الصور

التسلسل	عنوان الصورة	الصفحة
١	نواتج الدنا لاصناف نخيل التمر المرحلة على هلام الاكاروز	٢٦
٢	نواتج تفاعل RAPD-PCR للبادئ OPA-01	٢٨
٣	نواتج تفاعل RAPD-PCR للبادئ OPA-05	٢٩
٤	نواتج تفاعل RAPD-PCR للبادئ OPA-08	٣١
٥	نواتج تفاعل RAPD-PCR للبادئ OPA-10	٣٢
٦	نواتج تفاعل RAPD-PCR للبادئ OPA-11	٣٤
٧	نواتج تفاعل RAPD-PCR للبادئ OPA-17	٣٥
٨	نواتج تفاعل RAPD-PCR للبادئ OPC- 04	٣٩
٩	نواتج تفاعل RAPD-PCR للبادئ OPC - 08	٤٠
١٠	نواتج تفاعل RAPD-PCR للبادئ OPC - 15	٤٢
١١	نواتج تفاعل RAPD-PCR للبادئ OPE - 12	٤٣

١٢	نواتج تفاعل RAPD-PCR للبادئ OPF - 02	٤٥
١٣	يمثل نواتج تفاعل RAPD-PCR للبادئ OPF - 05	٤٦
١٤	نواتج تفاعل RAPD-PCR للبادئ OPH - 07	٥٠
١٥	نواتج تفاعل RAPD-PCR للبادئ OPH - 09	٥١
١٦	نواتج تفاعل RAPD-PCR للبادئ OPH - 16	٥٢
١٧	نواتج تفاعل RAPD-PCR للبادئ OPQ - 17	٥٤
١٨	نواتج تفاعل RAPD-PCR للبادئ OPR - 07	٥٥

قائمة الاشكال

١	مخطـط التحليـل التجمعـي Dendogram للعلاقـة الوراثيـة Genetic Relationship فيما بين اصناف نخيل التمر المدروسة	٦٣

٢- استعراض المراجع Literature Review

٢ -١- تصنيف نخيل التمر Classification of Date Palm

تنتمي شجرة نخيل التمر Date Palm الى جنس *Phoenix* والنوع *dactylifera* بحسب تصنيف العالم السويدي لينيس Lenneus ويمكن توضيح تصنيف نخيل التمر كما يأتي:

Kingdom : Plant

Phylum : Anthophyta

Class : Angiospermae

Subclass : Monocotylendoneae

Order : Palmae

Family : Arecaceae (Palmaceae)

Genus : Phoenix

Species : dactylifera

ذكر ابراهيم (٢٠١١) ان اسم الجنس فينيكس *Phoenix* يشير الى الاسم القديم لمدينة فينيقية التي انتشرت فيها زراعة نخيل التمر، اما اسم النوع داكتيليفرا *dactylifera* فيعني الاسم الاغريقي للشجرة حاملة الاصابع Fingers bearing tree.

٢ – ٢- الموطن الاصلي لنخيل التمر Original Habitat of The Date Palm

ان اراء المؤرخين والكتاب كثيرة ومختلفة حول اصل نخيل التمر ونشأته لكن على الاغلب ان الموطن الاصلي لنخلة التمر هو بلاد مابين النهرين (Jassim و Limoges، ٢٠١٤) او في غرب الهند (El-Shafie، ٢٠١٢)، كما عرفت النخلة في الحضارات التي قامت على الارض العربية اذ اشار مطر (١٩٩١) الى ان نخلة التمر كانت معروفة في بابل بحوالي ٤٠٠٠ سنة قبل الميلاد في مدينة اور في جنوب العراق حيث عثر على الكثير من النقوش السومرية التي تدل على مدى قدمها، كما ان امتداد زراعة النخيل حول منطقة الخليج العربي منذ تلك العصور دليل اخر على ان نخلة التمر تأصلت في تلك المنطقة. اما عن اصل زراعة النخيل في مصر فان الحفريات الموجودة على تماثيل مصر تبين ان اول من زرع نخيل التمر في مصر هم الاقوام الآتية من ليبيا والذين استقروا في وسط مصر وأعاليه ، اما بالنسبة لاصل النخيل في البقاع الاخرى من العالم فقد اظهرت اكثر المتحجرات القديمة ان النخيل يعود الى العصر الجوارسي إذ وجدت بعض المخطوطات عن النخيل في مناجم الفحم في بعض دول اوربا مثل فرنسا ، وانكلترا ، والمانيا ، وبلجيكا ، وبعض الاماكن من امريكا الشمالية (العكيدي، ٢٠١٠).

٢ – ٣ – أهمية نخيل التمر Importance of Date Plam

للنخيل قيمة اقتصادية عالية نظرا" لاستعمالها في العديد من الصناعات ذات القيمة الاقتصادية كصناعة الدبس والخل بالاضافة الى استعمال السيقان والاوراق في كثير من الاعمال الانشائية والصناعات اليدوية، كما تتميز التمور بقيمتها الغذائية العالية لكونها غنية بالكاربوهيدات والتي تصل نسبتها الى ٨٠٪ (El-Sharnouby وآخرون، ٢٠١٢) والبروتينات والالياف

والفيتامينات والمعادن (Dada وآخرون، ٢٠١٢ ؛ Shakya وآخرون، ٢٠١٠)، اذ تتضمن البوتاسيوم والكالسيوم والحديد والمغنسيوم والصوديوم والفسفور (حسن، ٢٠٠٧). وفي دراسة اجراها Al-Shoaibi وآخرون (٢٠١٢) اظهرت ان عصير التمر المركز (الدبس) يمتلك فعالية مضادة للاكسدة ويعدّ وقائيا" للكبد وقد يرجع ذلك الى محتواه من الفينولات التي اكتشف انها تمتلك فعالية مضادة للاكسدة. كما وجد Abuelgassim (٢٠١٠) ان مستخلص اوراق النخيل يمتلك فعالية وقائية ضد مرض السكر وكذلك فرط الدهون.

٢- ٤- الصفات العامة لنخيل التمر General Characteristics of Date Palm

رغم تعدد اصناف النخيل الا انها تشترك في الكثير من الصفات ومنها صفات الجذور التي تمتاز بوصفها متعددة ولا تتغلظ مع عمر النبات كما انها تتجدد باستمرار طوال فترة حياة النخلة حيث تنتشر في التربة بصورة افقية وعمودية مما يساعد النخلة على جعلها منتصبة ومقاومة لحركة الرياح. يتراوح طول نخلة التمر ١٥-٢٥ متراً، ويتألف جذع النخلة Trunk من ألياف سليلوزية قوية Strong Cellulose Fibers والتي ممكن أن تستعمل في صنع الرقائق الخشبية (Amer، ١٩٩٤). كما تمتاز النخلة بسيادة قمية واضحة الا في حالات نادرة وعوامل عديدة كالعامل الوراثي المرتبط بصنف معين كصنف التبرزل. تمتاز ورقة النخيل الكاملة (السعفة) بوصفها مركبة ريشية يصل عمرها الى ٦ سنوات بعد ذلك يتوقف نشاطها وتفقد صبغة الكلوروفيل ومن ثم تجف ولكنها تبقى متصلة بالجذع وبذلك تحتاج الى تدخل الانسان لازالتها كما ان نظام توزيع الاوراق في رأس النخلة لا تتطابق ورقة فوق اخرى الا بعد ١٣ ورقة تقريبا" وهذا يقلل من تظليل الاوراق لبعضها. تختلف ثمار نخيل التمر من حيث الشكل واللون والحجم ونسبة المواد المعدنية والسكريات والكاربوهيدرات من صنف لاخر وتترتب الثمار على سنيبلات Spikelets وتحمل كل سنيبلة ٢٠-٦٠ ثمرة مفردة ، وتلتصق هذه السنيبلات على حامل مركزي Central Stalk لتُشكل العذق Bunch، اذ تحمل كل نخلة ما يقارب ٥-٣٠ عذقاً (Ahmed وآخرون ،١٩٩٥). ويقسم تطور ثمرة النخيل الى مراحل عدة وهي (١) مرحلة الحبابوك- مرحلة الثمار العاقدة الصغيرة وتكون ذات لون كريمي بخطوط افقية خضراء تمتد من ٤- ٥ اسابيع بعد التلقيح، (٢) مرحلة الجمري- وهي المرحلة الثانية لنمو الثمرة ويكون لونها اخضرا" وعفصة المذاق، (٣) مرحلة البسر (الخلال) - مرحلة تلون الثمرة باللون الاحمر او

الاخضر او الاشقر، (٤) مرحلة الرطب – وهي مرحلة نضج الثمرة وتحولها من البسر الى الارطاب الذي يظهر على شكل نقط طرية في طرف الثمرة، (٥) مرحلة التمر– وهي مرحلة النضج النهائي اذ تتخذ الثمرة اللون المميز للصنف (ابراهيم، ٢٠٠٩).

٢ –٥– الصفات الخضرية والثمرية لاصناف نخيل التمر الداخلة في الدراسة

Characteristics Vegetative and Fruiting of Date Palm Varieties in this Study

١– الخستاوي

يتميز هذا الصنف بكون الجذع متوسط الضخامة، والسعف اخضر اللون وقليل الانحناء ويكون شكل الثمرة بيضويا" مستطيلا" ولون الثمرة في مرحلة الخلال (البسر) اصفر الى مشمشي، اما في مرحلة التمر فيكون لون الثمرة احمر. قشرة الثمرة متوسطة السمك اذ تكون الثمرة طرية وتتراوح انتاجية نخلة الخستاوي بين ١٠٠– ١٤٠ كغم، كما ان لهذا الصنف القدرة على تحمل الملوحة، والرطوبة، والصقيع (العكيدي، ٢٠١٣).

٢– الاشرسي

يكون الجذع ضخما" ولون السعف اخضر كثير الاشواك اما شكل الثمرة فيكون بيضويا". لون الثمار في مرحلة الخلال (البسر) يكون اصفر وفي مرحلة التمر يكون برتقاليا" ويتراوح وزن الثمرة بين ٨ – ١١ غم (غالب، ٢٠٠٨)، كما ان لها القدرة على تحمل الملوحة العالية، والجفاف، والصقيع.

٣– بربن

يكون الجذع ضخما" والسعف يكون طويلا" وسميكا"، ويظهر شكل الثمرة بيضويا" مقلوبا" والثمرة في مرحلة التمر تكون ذات لون بني غامق الى اسود اما وزنها فيتراوح بين ١٢ –١٥ غم. صنف البربن له القدرة على تحمل الملوحة والجفاف وغير حساس للرطوبة (العكيدي، ٢٠١٣).

٤– سكري

الجذع ضعيف والرأس هرمي طويل، اما السعف فيكون متباعدا" و منحنيا" من الوسط وضعيفا". تكون الثمار في مرحلة الخلال صفراء اهليجية منتفخة الوسط قليلا" وفي مرحلة الرطب تكون ذات لون عسلي غامق وذات قوام لين جدا" (حسين، ٢٠٠٩).

٥- سعادة

نخلة سعادة ذات رأس متناظر والسعف اخضر اللون، اما الجذع فيكون متوسط الضخامة. شكل الثمرة اهليجي متطاول وذو لون احمر في مرحلة الخلال ومرحلة الرطب واحمر مسمر في مرحلة التمر. الصنف مقاوم للجفاف ومتوسط التحمل للملوحة (العكيدي، ٢٠١٣).

٦- اصابع العروس

يكون الجذع ضخما" الى حد ما وشكل الثمرة محدبا" مستطيلا" ويتراوح طول الثمرة ٤ – ٤.٤٩ سم اما قطرها فيتراوح ما بين ٢ و ٢.٢٤ سم. يكون لون العذق الثمري مائلا" الى اللون البرتقالي (غالب، ٢٠٠٨) .

٧ – شتوي

جذع النخلة ضخم والسعف اخضر اللون قليل الانحناء. شكل الثمرة مستطيل محدب ويتراوح طولها بين ٣.٥ – ٤.٥ سم، والعذق الثمري ذو لون اصفر مائل الى البرتقالي وتتميز ثمار هذا الصنف بتأخرها في مرحلة النضج.

٨ – زهدي

لون السعف اخضر منتظم مستقيم، شكل الثمرة بيضوي والثمرة تكون نصف جافة، اما لونها فيكون في مرحلة الخلال اصفر وفي مرحلة التمر اصفر – بني، ويكون لون العذق الثمري مائلا" الى الاصفر. يتراوح وزن الثمرة بين ٧.٨ – ٨.٥ غم، اما انتاجية نخلة صنف الزهدي فتكون بين٩٠ – ١٤٠ كغم، ويعدّ صنف الزهدي من اكثر الاصناف المتحملة للصقيع (غالب، ٢٠٠٨).

٩ – نهير السلي

الجذع متوسط الضخامة، والسعف قائم متباعد، لون الثمرة في مرحلة الخلال (البسر) اصفر مائل الى البرتقالي وفي مرحلة التمر بني غامق. يتراوح وزن الثمرة مابين ٤ – ٧ غم. الصنف مقاوم للجفاف ومتوسط التحمل للملوحة.

٢ – ٦– التنوع المظهري Phenotypic Diversity

إن مظهر أي صفة هو المحصلة النهائية للتركيب الوراثي والتأثير البيئي والتداخل بينهما وهو ما يطلق عليه الشكل المظهري وان الاختلافات في الإشكال المظهرية للنباتات تسمى بـ(التنوع المظهري) **Diversity** Phenotypic. يعد استعمال المؤشرات المظهرية الطريقة الأقل تعقيدا للتمييز بين اصناف النخيل وبالاعتماد على التنوعات المظهرية في لون الأزهار، والثمار، وارتفاع الساق، وشكل الأوراق، وتوزيعها، وطبيعة النمو الخضري (عبد الواحد وعاتي، ٢٠١٢). وبالرغم ان لبعض المزارعين خبرة طويلة في مجال تشخيص الأصناف بالاعتماد على الصفات المظهرية للنمو الخضري الا ان العديد من الباحثين اشاروا الى صعوبة تمييز الاصناف عن طريق صفاتها المظهرية وبدون وجود الثمار، كون ان صفات النمو الخضري تتأثر بالظروف البيئية المحيطة وعمليات الخدمة (Sedra وآخرون, ١٩٩٨)، إذ يختلف المظهر الخارجي للنبات نفسه باختلاف ظروف النمو الخارجية.

٢ – ٧ – التنوع الوراثي Genetic Diversity

التنوع الوراثي هو اختلاف صفات النباتات الناتجة من اختلافها في التركيب الوراثي عند زراعتها في البيئة نفسها (عبد الغفور وآخرون، ٢٠١١). ان تقييم التنوع الوراثي بين المجتمعات يتم بشكل روتيني وذلك باستعمال مختلف التقنيات الجزيئية والتي تستعمل في المختبر مثل تحليل الحامض النووي الدنا (DNA). وجد Barrow (١٩٩٨) من خلال دراسته على عدد من اصناف نخيل التمر ان هنالك عددا" من الاصناف لا تظهر تباينات مظهرية واضحة فيما بينها، الا ان هنالك تباينات وراثية كبيرة ظهرت بين تلك الاصناف. ويعد المؤشر الوراثي Genetic Marker ومنها مؤشرات الدنا DNA Markers صفة مميزة يمكن استعمالها في التوصيف الوراثي وتمييز الاصناف فيما بينها كما هو الحال في حالة استعمال المؤشرات المظهرية،

والمؤشرات الانزيمية، والمؤشرات البروتينية والخلوية، وكما هو معروف فان الدنا هو المادة الوراثية المستقرة التي لا تتأثر بالبيئة لذا امتازت هذه المؤشرات بالاستقرارية Stability بعكس المؤشرات الاخرى التي تتأثر بشكل كبير بالظروف البيئية (Weigand وآخرون،١٩٩٣). فضلا عن ذلك فان لمؤشرات الدنا امكانية الكشف عن التنوعات الوراثية على مستوى الدنا والتي يمكن من خلالها ايجاد البصمة الوراثية لكونها تعكس التنوعات مباشرة على مستوى القواعد المكونة له. ونظرا لان مجين الكائنات الحية الراقية يحتوي على الملايين من هذه القواعد لذلك فان اعداد هذه المؤشرات كبير جداً وبالتالي فان لها القدرة على الكشف عن مئات المواقع Ioci وآليلات عدة للموقع الواحد. هناك عدد من مؤشرات الدنا وهي مؤشرات الدنا المعتمدة على التهجين الجزيئي Molecular Hybridization-Based DNA Markers والتي تتضمن مؤشرات تباين أطوال قطع التقييد(RFLP) Restriction Fragments Length Polymorphism (Hauschild وStepanovic، 2008؛ Nybom وآخرون ، ٢٠١٤)، اذ يتم في هذه التقنية استعمال إنزيمات التقييد Restriction enzymes وبوجود المجس prob المعلم اما بمواد مشعة او مواد كيميائية للكشف عن التغايرات وتحتاج الى الكثير من الوقت والجهد والكلفة (Soller و Beckmann ،١٩٨٣). اما النوع الثاني من المؤشرات فهي المؤشرات المعتمدة على تفاعل سلسلة الدنا DNA Polymerase Chain Reaction (PCR) Based Markers وتعتمد هذه التقنية على أساس مضاعفة قطعة معينة من الدنا إنزيمياً وخارج الجسم الحي *in vitro* باستعمال تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل(PCR) وبتوافر البادئات primers والتي ترتبط بالتتابع المكمل لها على شريط الدنا القالب template DNA فضلا" عن وجود انزيم البلمرة polymerase الذي يتميز بتحمله لدرجات الحرارة العالية (Tong وآخرون،٢٠١٢) ووجود النيوكليوتيدات المفسفرة منقوصة الأوكسجين dNTPs– Deoxyribonucleoside triphosphate (الادنين – deoxyadenosine triphosphate dATP والسايتوسين deoxycytidine triphosphate - dCTP والكوانين deoxyguanosine triphosphate-dGTP والثايمين deoxythymidine dTTP–triphosphate). تتلخص فكرة هذا التفاعل بالتركيب والتصنيع المتكرر لقطعة محددة من شريط الدنا لينتج في النهاية كمية كبيرة من قطع الدنا وبساعات قليلة، اذ تتم عملية البلمرة في ثلاث مراحل وهي:

١-المسخ Denaturation

وذلك بتعريض الحلزون المزدوج الى درجة حرارة تصل الى ٩٥ مْ بوقت يتراوح بين ٢- ٥ دقائق، اذ تؤدي درجات الحرارة العالية الى كسر الروابط الهيدروجينية والتي تربط بين القواعد النتروجينية بين شريطي الدنا (قاسم، ٢٠١١) وبالتالي الحصول على شريط دنا مفرد السلسلة single strand DNA ليسهل انجاز الخطوة اللاحقة من التفاعل.

٢- الارتباط Annealing

وهي المرحلة الثانية من مراحل تفاعل البلمرة، اذ يتم ذلك بخفض درجات الحرارة لخليط التفاعل للسماح بارتباط البادئ بالموقع المكمل له على شريط الدنا المفرد (ssDNA). تعتمد درجة الحرارة المناسبة لارتباط البادیء على طول البادئ المستعمل ونسبة احتوائها من القواعد النتروجينية السايتوسين والكوانين (G +C) (Innis وGelfand ، ١٩٩٠).

٣-الاستطالة Extension

وهي المرحلة الاخيرة من مراحل تفاعل البلمرة، اذ يتم فيها بناء شريط الدنا وذلك باضافة النيوكليوتيدات عن طريق انزيم البلمرة وان درجة الحرارة الملائمة للاستطالة هي ٧٢ مْ وهي الحرارة المناسبة لعمل انزيم البلمرة في اضافة النيوكلوتيدات لشريط الدنا المتكون (Wilson وWalker، ٢٠٠٥). وتعتمد عملية الاستطالة على العديد من العوامل منها تركيز انزيم البلمرة والنيوكليوتيدات والبوادئ المستخدمة وعدد مواقع ارتباط هذه البوادئ بشريط الدنا القالب.

تشمل مؤشرات الدنا المعتمدة على تفاعل سلسلة الدنا على العديد من التقنيات ومنها

١. التفاعل العشوائي متعدد الاشكال لسلسلة الدنا RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) وسيتم ايضاحها لاحقاً.

٢. تباين اطوال القطع المتضاعفة AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism): يتم هضم الدنا بانزيمي تقييد ومن ثم تخضع قطع الدنا المهضومة جميعها الى معاملتها بالملائمات Adaptors ليتم ربطها بالنهايات للقطع الناتجة عن الهضم الإنزيمي ومن ثم تستعمل بادئات متخصصة لمضاعفة الدنا بجهاز التدوير الحراري Thermal cycler . يرحل ناتج التفاعل على هلام الاكريلامايد (Boyang و Chao، ٢٠٠٢ ؛ Caballero وآخرون ، ٢٠١٣).

٣.المايكروستلايت Microsatellites : استثمر ظهور تتابعات قصيرة متكررة في مجين الكائنات الراقية تختلف في اعدادها بين الاصناف في ايجاد هذا النوع من المؤشرات لغرض تمييزها وتشمل تقانة التكرارات البسيطة المتعددة Simple Sequence Repeat –SSR و مابين تكرارات التسلسلات البسيطة Inter Simple Sequence Repeats-ISSR (Fernández وآخرون، ٢٠٠٢؛ McGregor وآخرون، ٢٠٠٠؛ Liu وآخرون، ٢٠١٣) والتي تكشف عن عدد قليل من المواقع إن لم يكن موقعا" واحدا".

٢ – ٨– مؤشرات التضاعف العشوائي متعدد الأشكال لسلسلة الدنا

Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD)

هي احدى المؤشرات التي تستعمل فيها بادئات عشوائية يمكن تطبيقها على دنا اي كائن حي، اذ ترتبط بالمواقع المكملة لها على القالب الدنا ويتم الكشف عن النواتج المتضاعفة بترحيلها على هلام الاكاروز (الحسني و جبرائيل، ٢٠٠٨). يمتاز هذا النوع من المؤشرات بعدم احتياجها الى النظائر المشعة ولا تتطلب كمية كبيرة من الدنا المجيني فضلا عن عدم الحاجة الى معرفة مسبقة عن التسلسل النيوكليوتيدي للدنا كما انها لا تتطلب نقاوة عالية من الدنا الهدف، كما يمكن تطبيقها بشكل واسع في برامج تربية وتحسين النبات وفي دراسة التنوع الوراثي Genetic Variation وتحديد العلاقات الوراثية Genetic Relationship وبناء الخرائط الوراثية

Linkage Maps للعديد من الكائنات الحية (Arif وآخرون، ٢٠١٠) وايجاد البصمة الوراثية للعديد من الاحياء (Welsh وMcClelland، ١٩٩٠).

اجرى جبرائيل (٢٠٠١) دراسة استعمل فيها ٢٠ بادئ للكشف عن الاختلافات الوراثية لتسعة اصناف من نخيل التمر وتحديد العلاقة الوراثية بين تلك الاصناف. كما استعملت الخطيب (٢٠٠١) مؤشرات RAPD بهدف ايجاد مؤشرات وراثية مرتبطة بتحديد الجنس لعدد من اشجار نخيل التمر العراقية باستعمال ١١ بادئا" انتخبت من اصل ٣١ بادئ دلت النتائج الى ظهور تباينات عديدة وواضحة اعتمدت على الاختلافات في عدد الحزم المتضاعفة وعلى اوزانها الجزيئية اذ أظهر البادئان OPC -08 و OPI- 14 حزمتان ذات اوزان جزيئية ٤٢٢٥ و ٢٤٠٠ زوج قاعدي في جميع اصناف الذكور وفقدت في اصناف الاناث. كما اكدت دراسة الفقي وآخرون (٢٠٠٢) ان استعمال هذا النوع من المؤشرات هي وسيلة كفوءة للتمييز وتحديد البصمة الوراثية لخمسة اصناف من الفاصوليا. وفي دراسة اجريت من قبل Al-Moshileh وآخرون (٢٠٠٤) في امكانية استعمال تقانة RAPD للكشف عن التباينات الوراثية لعدد من اصناف نخيل التمر في المملكة العربية السعودية. كما ساعد هذا النوع من المؤشرات في تقييم التنوع الوراثي لـ ٢٨ صنفا" من الخوخ وذلك باستخدم ١٢ بادئ، اذ بلغ عدد الحزم المتباينة ٨١ حزمة وتراوحت درجة الاختلاف الوراثي للاصناف المدروسة بين ٥ – ٥٥ % (Raddova وآخرون، ٢٠٠٣). اشار الباحثان Al-Khalifah و Askari (٢٠٠٦) الى ان مؤشرات RAPD تعد وسيلة فعالة في الكشف المبكر عن التغايرات الوراثية التي تحصل من النباتات المنتجة من زراعة الانسجة النباتية لثلاثة اصناف من نخيل التمر وهي برحي وخلاص وسكري. كما استعملت مؤشرات RAPD لتحديد التنوع الوراثي لخمسة اصناف من نخيل التمر وهي تبرزل وزغلول وبرحي ونبتة سيف و Mekfazy باستعمال ٣٠ بادئ وبينت النتائج ان سبعة بوادئ اظهرت اختلافا" وراثيا ملحوظا" بين الاصناف المدروسة (Rawashdeh و Amri، ٢٠٠٦). وبالاشارة الى كفاءة تقانة RAPD في الكشف عن التغايرات الوراثية استخدمت هذه المؤشرات في مقارنة محصول الرز بسمتي ٣٧٠ مع اثنين من الطوافر القصيرة الارتفاع المشتقة منه بينما فشلت المؤشرات الانزيمية isozyem في تشخيصها نتيجة انخفاض مستوى الاختلافات الوراثية بينهما (الساهوكي، ٢٠٠٦). واثبتت هذه التقانة كفاءتها لدراسة التنوع الوراثي

لبعض طرز الرمان التي بلغ عددها ١١ طرزا وراثيا" مزروعة في مناطق مختلفة من اليمن باستعمال ٣٠ بادئا" وقد أوضحت النتائج ان درجة القرابة بين الطرز كانت ٥٩- ٩٦ % وبمتوسط قدره ٧٩٪ (الشاوش وآخرون، ٢٠٠٧). اجريت دراسة قام بها Bader وآخرون (٢٠٠٧) للتأكد من الثبات الوراثي لصنفين من نخيل التمر (برحي ومكتوم) المنتجة من زراعة الانسجة باستعمال مؤشرات RAPD. وفي دراسة اجريت من قبل Ali وآخرون (٢٠٠٦) حول مدى الثبات الوراثي لنخيل التمر صنف البرحي والناتجة من الزراعة النسيجية باستعمال ٣٠ بادئ، لوحظ وجود تنوع وراثي من خلال مقارنة نتائج التحليل مع البصمة الوراثية للصنف الاصل الذي اخذت منه. استعمل الباحث Rashed وآخرون (٢٠٠٨) مؤشرات RAPD في الكشف عن التنوع الوراثي لـ ٣٠ تركيبا" وراثيا" من الحنطة وقد اشار الباحثون ان هذا النوع من المؤشرات كان اكثر دقة في تحديد التنوع الوراثي بين التراكيب الوراثية مقارنة بالطرائق الاخرى. كما استخدمت مؤشرات RAPD لتشخيص ٢١ صنفا من البطاطا الناتجة من الاكثار الدقيق للنباتات خارج الجسم الحي بوجود ٣٤ بادئا" اختير من اصل ٧٢ بادئ، اذ اظهرت النتائج ان هنالك بوادئ متخصصة لصنف معين والتي عدت بمثابة البصمة الوراثية لذلك الصنف (الحسني و جبرائيل، ٢٠٠٨) . استعمل El-Rayes (٢٠٠٩) ٤٠ بادئ في تحديد البصمة الوراثية والتشابه الوراثي لثلاثة اصناف من نخيل التمر (السكري الاصفر، والسكري الاحمر، ونبتة السكري) بالاعتماد على ١١٥ حزمة ناتجة من التفاعل واشارت النتائج الى وجود ٨١-٨٧٪ من درجة التشابه للاصناف الثلاثة وكان الصنف نبتة السكري ابعد الاصناف من حيث درجتي التشابه والقرابة. وفي الهند اجريت دراسة حول مدى الثبات الوراثي باستعمال مؤشرات RAPD ومؤشرات التكرارات البسيطة المتسلسلة للمقارنة بين النباتات الناتجة من زراعة الانسجة لـ ٤٢ صنف من نخيل التمر مع فسائل للصنف الاصلي واظهرت النتائج مطابقة تلك النباتات مع الاصل (Kumar وآخرون، ٢٠١٠). وفي دراسة اخرى اجريت من قبل عبد الواحد (٢٠١١) لتحديد التنوع الوراثي بين صنفين من افحل نخيل التمر وهما الخكري العادي، والغنامي الاخضر استعمل فيها موشرات RAPD بوجود البادئين OPA- 4 و OPA -10، بينت النتائج ان كلا من البادئين اعطى حزما" متباينة في العدد والموقع على هلام الاكاروز، اذ اعطى البادئ OPA- 4 ثلاث حزم مقارنة بحزمة واحدة لصنفي الخكري العادي والغنامي الاخضر على التوالي، اما البادئ OPA -10 فقد اعطى أربع حزم لصنف الخكري العادي مع حزمتين للصنف

الغنامي الاخضر. ولقد طبقت تقانة RAPD لايجاد البصمة الوراثية والنسبة المئوية للبعد الوراثي لستة اصناف من الورد باستعمال ١٠ بوادئ اذ بينت النتائج اختلافا واضحا" في عدد حزم الدنا المتضاعفة واوزانها الجزيئية وذلك تبعا" للبادئ المستعمل، اذ بلغ العدد الكلي للحزم المتباينة ٦٨ حزمة لكافة البادئات المستعملة (حسين،٢٠١١). كما استعمل هذا النوع من المؤشرات من قبل Haider وآخرون (٢٠١٢) لدراسة التنوع الوراثي وتحديد البصمة الوراثية لـ ٢٣ صنفا" من نخيل التمر المزروعة في سوريا تمثل ١٨ صنف من الاناث و ٥ اصناف من الذكور بوجود ٣٥ من البادئات العشوائية. وفي دراسة اجراها El kichaoui وآخرون (٢٠١٣) لخمسة اصناف من نخيل التمر المزروعة في فلسطين وهي الحياني، وزهدي، واميري، وحلاوي، وبرحي، وبنت عيشه استعمل فيها ستة بوادئ عشوائية لتحديد البصمة الوراثية لتلك الاصناف.

٢-٩ مقارنة الوصف المظهري بالمؤشرات الجزيئية

ان اغلب المؤشرات المستعملة في تحديد التنوع الوراثي بين الاصناف الزراعية سواء كانت المؤشرات المظهرية او الجزيئية لها بعض المحددات ، من اهم هذه المحددات هي تأثرها بالبيئة الواحدة والعمر الزمني ونوع العضو النباتي المعتمد في تحديد التنوع بين الاصناف. وللمقارنة بين الصفات المظهرية والمؤشرات الجزيئية اجرى الباحث Maric وآخرون (٢٠٠٤) دراسة لتقدير التنوع الوراثي بين ١٤ صنفا" من القمح بالاعتماد على الصفات المظهرية وعلى احد مؤشرات الدنا وهي مؤشرات RAPD، وقد استخدم الباحث ١٢ صفة مظهرية للتفرقة بين التراكيب الوراثية ، بينت النتائج ان مؤشرات RAPD اظهرت درجة عالية من التنوع الوراثي بين الاصناف مقارنة بالوصف المظهري كما لم يكن هنالك تشابه بين شجرة العلاقات للمدخلات الناتجة من الصفات المظهرية وبين تلك الناتجة من مؤشرات RAPD. وفي دراسة اخرى اجريت على ٩٤. تركيبا" وراثيا" من الذرة البيضاء باستعمال صفات الحبوب ومؤشرات RAPD بوجود ١٧ بادئ، بينت الدراسة ان هنالك تلازما" بين النتائج التي تم الحصول عليها من كلا الطريقتين (Dahlberg وآخرون، ٢٠٠٢). كذلك قارن الباحث Askari وآخرون (٢٠٠٣) العلاقة الوراثية بين اصناف مختلفة من نخيل التمر بالاعتماد على الخصائص المظهرية للثمار كالشكل واللون ونوعية الثمار ومؤشرات RAPD واشار الباحث الى ان لتلك المؤشرات دقة عالية لايجاد

التنوع الوراثي بين الاصناف مقارنة بالصفات المظهرية. إن افضلية مؤشرات الدنا تعود لانه المادة الوراثية التي لا تتأثر بالمحددات التي تعاني منها الطرق الاخرى، اذ تمتاز مؤشرات الدنا بالاستقرارية بعكس المؤشرات المظهرية التي تتاثر بشكل كبير بالظروف البيئية (Elmeer وآخرون ،٢٠١١ ؛ Singh وSingh ، ٢٠٠٦) كما تمتاز هذه المؤشرات بكونها تعتمد على مادة الدنا الموجودة في جميع خلايا الكائن الحي وبشكل متساوٍ لاي مرحلة عمرية من مراحل النمو.

٣- المواد وطرائق العمل Materials and Methods

٣-١ الاجهزة المستعملة في هذه الدراسة

جدول (٣ – ١). الأجهزة المستعملة والشركات المصنعة والمنشأ.

ت	اسم الجهاز	الشركة المصنعة او المنشأ
1	خلاط كهربائي	Alaraby -Egypt
2	جهاز البلمرة الحراري PCR Thermal Block	Bioneer - Korea
3	حمام مائي Water bath	Memmert - Germany
4	جهاز الكشف والتصوير (تصوير الهلام) Gel documentation	E.Graph- Japan
5	جهاز الترحيل الكهربائي للهلام Gel Electrophoresis	Bioneer - Korea
6	جهاز طرد مركزي دقيق Micro Centrifuge	Bioneer - Korea
7	مازج دوار Vortex	Labtech - Korea

8	فرن الموجات الدقيقة Microwave oven	LG - Korea
9	ميزان كهربائي حساس Sensitive Electronic Balance	Sartorius - Germany
10	جهاز قياس تركيز ونقاوة الدنا Nanodrop	USA
١١	ماصة دقيقة Micropipette	Eppendrof - Germany

٣ – ٢ المحاليل والمواد الكيمائية المستعملة في هذه الدراسة

جدول ٣–٢. المحاليل والمواد الكيمائية والمنشأ.

ت	المحاليل والمواد الكيميائية	المنشأ
١	اكاروز Agarose	Promega – USA
٢	كحول اثيلي مطلق Absolute ethanol alcohol	BDH – England
٣	حامض البوريك Boric acid	Fluka – Switzerland
٤	كلوروفورم Chloroform	BDH – England
٥	بروميد الاثيديوم Ethidium bromide تركيز ١٠ ملغم/مل	Promega – USA
٦	EDTA (Ethylene Diamin Tetra Acetate)	BDH – England
٧	ماركر الدنا Ladder DNA 100 bp (100 – 2000 bp)	Bioneer – Korea
٨	صبغة التحميل Loading dye	Bioneer – Korea
٩	عدة خليط تفاعل البلمرة الحراري AccuPower® PCR PreMix kit	Bioneer – Korea
١٠	ترس قاعدي Tris base	BDH – England

١١	كلوريد الصوديوم Sodium chloride	Himedia - India
١٢	هيدروكسيد الصوديوم Sodium hydroxide	Himedia - India
١٣	Cetyl trimethyl ammonium) CTAB (bromide	BDH – England
١٤	مركبتوايثانول Marcapto ethanol	Himedia - India
١٥	كحول الايزواميلي Isoamyle alcohol	Himedia - India
١٦	كحول الايزوبروبانول Isopropanol	Himedia - India
١٧	خلات الصوديوم Sodium Acetate	Himedia - India

٣ – ٣ محاليل الاصل :

١- محلول EDTA (تركيز ٠.٥ مولار، الرقم الهيدروجيني ٨)

اذيبَ ٢.٦٨غم من الـ EDTA في الماء المقطر ثم يعدل الرقم الهيدروجيني pH الى ٨ باستعمال محلول هيدروكسيد الصوديوم بتركيز ١٠عياري (حُضِر باذابة ٤ غرامات من هيدروكسيد الصوديوم في ٨ مل من الماء المقطر). واكمل الحجم بالماء المقطر الى ٥٠ مل وعُقِمَ بالمؤصدة .

٢- محلول دارئ ترس حامض الهيدروكلوريد (تركيز ١ مولار، الرقم الهيدروجيني ٨)

اذيب ٣.٠٢٥ غرام من الترس القاعدي في الماء المقطر ثم عُدل الرقم الهيدروجيني الى ٨ باستخدام حامض الهيدروكلوريد المركز واكمل الحجم بالماء المقطر الى ٢٥ مل ثم عُقِمَ بالمؤصدة .

٣- محلول كلوريد الصوديوم (٥ مولار)

اذيب ٧.٣٠٥غرام من كلوريد الصوديوم واكملَ الحجم الى ٢٥ مل بالماء المقطر ثم عُقِمَ بالمؤصدة .

استعملت محاليل الاصل اعلاه لتحضير

أ- محلول الاستخلاص Extraction buffer والمعتمد على مادة CTAB (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide) بتركيز ٢٪: وزن ٠.٥ غم من مادة الـ CTAB وأُضيفَ اليها ٧ مل من محلول كلوريد الصوديوم و٢.٥ مل من محلول دارئ ترس حامض الهايدروكلوريك و ١ مل من محلول EDTA واكمل الحجم بالماء المقطر الى ٢٥ مل ثم عُقِمَ بالمؤصدة.

ب- محلول الاذابة (TE buffer): حُضِرَ ٥٠٠ مل بمزج ٥ مل من محلول دارئ ترس- حامض الهيدروكلوريك مع ١ مل من محلول EDTA ثم أُكمِلَ الحجم بالماء المقطر الى ٥٠٠ مل وعُقِمَ بالمؤصدة.

ت – المحلول الداريء TBE buffer بقوة ١٠X: إذابة ١٠٨ غرام من مادة الترس القاعدي (Tris-base) و ٥٥ غراما" من حامض البوريك و ٤٠ مل من محلول الـ EDTA في ٨٠٠ مل من الماء المقطر، عُدِلَ الاس الهيدروجيني الى ٨ ثم أُكملَ الحجم بالماء المقطر الى اللتر، وعُقِمَ بالمؤصدة ، و خُففَ عند الاستعمال ١٠ مرات بالماء المقطر (اي عمل محلول بقوة ١X).

٣ – ٤ طرائق العمل لإستخلاص المادة الوراثية

٣ – ٤ – ١ جمع عينات النبات Collection of Plant Samples

تم جمع عينات النبات من الاوراق (السعف) القريبة من القمة لتسعة اصناف من اناث نخيل التمر المزروعة في محافظة ديالى – بعقوبة وهي : اصابع العروس، وزهدي ، وسكري، وسعادة، واشرسي، وبربن، وشتوي، وخستاوي ونهير السلي ، ثم غسلت جيدا" بالماء المقطر ثم نشفت ووضعت داخل اكياس ورقية مثقبة وتركت العينات حتى جفت تماما (حد التكسر)، ثم نقلت الى مختبر البايولوجيا الجزيئية – قسم الهندسة الوراثية في دائرة البحوث الزراعية/وزارة العلوم والتكنولوجيا.

٣- ٤ -٢ - استخلاص المادة الوراثية

تم إستخلاص الدنا المجيني من اوراق تسعة اصناف مختلفة من نخيل التمر بالطريقة الموصوفة من قبل Borges وآخرون (٢٠٠٩) مع بعض التحوير.

طريقة العمل

١- أخذت قطعتان من الاوراق الجافة و قطعت الى قطع اصغر ليتم طحنها على شكل مسحوق باستعمال الطاحونة الكهربائية. وزن من المسحوق ٥٠ ملغم ونقل الى انابيب ابندروف.

٢- اضيف الى المسحوق ٦٠٠ مايكرولتر من محلول الإستخلاص و ١٢.٥ مايكروليتر من المركبتوايثانول Marcapto ethanol و مزجت بواسطة المازج الكهربائي (فورتكس).

٣- وضعت الأنابيب في حمام مائي على درجة حرارة ٦٥ مْ ولمدة ٦٠ دقيقة.

٤- نقل المحلول الى انبوب ابندروف جديد.

٥- اضيف بعد ذلك ٢٠٠ مايكرولتر من محلول الكلوروفورم:الكحول الايزواميلي بنسبة ١:٢٤ (حجم:حجم) ثم نبذت العينات في جهاز الطرد المركزي Centrifuge بسرعة ١٤٠٠٠ دورة / دقيقة ولمدة ١٥ دقيقة، بعد ذلك سحبت الطبقة العليا ثم نقلت الى انبوب ابندروف جديد.

٦- اضيف الى تلك الطبقة ٦٠٠ مايكروليتر من كحول الايزوبروبانول Isopropanol مع ٥٠ مايكرولتر من خلات الصوديوم (تركيز ٣ مولار، ذو الاس الهيروجيني ٥.٢)، ومزجت جيداً بالتقليب بهدوء لترسيب الدنا ثم حُفظت العينات في درجة حرارة -٢٠ مْ ولمدة ٢٤ ساعة.

٧- نبذت العينات بجهاز الطرد المركزي وبسرعة ١٢٠٠٠ دورة/دقيقة ولمدة ١٠ دقيقة، وتم التخلص من البروبانول.

٨- اضيف بعد ذلك الكحول الاثيلي (٧٠٪) وبمقدار ٦٠٠ مايكرولتر الى الراسب (الذي يمثل الدنا) ثم وضعت العينات في جهاز الطرد المركزي وبسرعة ١٤٠٠٠ دورة/دقيقة لمدة ٥ دقائق.

٩- بعد التخلص من الكحول تم اضافة ٥٠ مايكرولتر من محلول الإذابة (TE buffer) .

١٠- وضعت العينات في درجة حرارة الغرفة لغاية اليوم التالي. حفظت العينات على شكل نموذج الدنا الاساس Stock sample في درجة -٢٠مْ لحين الإستعمال.

٣-٤-٣- توصيف الدنا Characterization of DNA

ان عملية توصيف الدنا تضمنت:

أ- قياس تركيز الدنا وتقدير نقاوته

تم قياس تراكيز الدنا وتقدير نقاوته بوساطة جهاز Nanodrop إذ تم وضع ٣ مايكروليتر من العينة على عدسة الجهاز الذي يقيس الإمتصاصية عند الطول الموجي 260 نانوميتر والطول الموجي280 نانوميتر.

ب_ الترحيل الكهربائي لعينات الدنا باستعمال هلام الاكاروز Gel Electrophoresis

١- حُضِّرَ الهلام بتركيز ١٪ بإضافة ١ غم من الاكاروز الى 100 مل من المحلول الداريء TBE (قوة x ١) ثم سخن بفرن الموجات الدقيقة microwave oven إلى حين اكتمال الإذابة وترك ليبرد إلى درجة حرارة 50-55 ˚م.

٢- أُضيف ٣ مايكروبتر من صبغة بروميد الايثيديوم Ethidium bromide .

٣- حُضِّرَ اللوح الزجاجي المعد لصب الهلام وثبت عليه المشط الخاص لتكوين الحفر عند احد اطراف الحوض.

٣- تم سكب الهلام السائل برفق وبشكل مستمر داخل الحوض لمنع حدوث الفقاعات ثم ترك ليتصلب.

٤- بعد تصلب الهلام وضع في حوض الترحيل وغمر بالمحلول الداريء TBE بقوة x ١ ومن ثم رفع المشط.

٥- تم مزج ٨ مايكروليتر لكل عينة من عينات الدنا المراد تحميلها مع ٣ مايكروليتر من محلول صبغة التحميل (loading dye). وزعت العينات داخل الحفر الموجودة في الهلام.

٦- تم توصيل اقطاب التيار الكهربائي وجهز بقدرة ٩٠ فولت لمدة 60 دقيقة.

٧- تم فحص الهلام بتعريضه للأشعة فوق البنفسجية بوضعه في جهاز الكشف والتصوير Gel Documentation لرؤية حزم الدنا.

٣-٥- مؤشرات التفاعل التضاعفي العشوائي لسلسلة الدنا

١-تم اجراء التفاعل باستعمال عدة خليط تفاعل البلمرة الحراري AccuPower® PCR PreMix kit، اذ تحوي العدة على ٩٦ انبوب ابندورف صغير سعة ٠.٢ مايكروليتر تحوي على المكونات الآتية :

أ- انزيم البلمرة Top DNA polymerase 2.5 U/ml

ب- القواعد النيتروجينية ثلاثية الفوسفاتdNTPs تركيز 250 µM

ت- المحلول المنظم PCR Buffer والذي يتكون من Tris – HCL 10 mM و KCl 30 mM و $MgCl_2$ 1.5 mM

٢- استعمل ٢٠ بادئ عشوائي كما مبينة بالجدول (٣-٣) علما ان البادئات مصنعة في شركة Bioneer وبحسب التتابعات الخاصة بشركة Operon.

طريقة العمل

١- حُضرَ خليط التفاعل وذلك باضافة ١٢ مايكروليتر ماء و ١٠٠ نانوغرام من البادييء مع ٢٠٠ نانوغرام من عينة الدنا لكل انبوب ابندروف صغير من عدة خليط تفاعل البلمرة الحراري.

٢- تم تخفيف عينات دنا الاصناف للحصول على تركيز ١٠٠نانوغرام/مايكروليتر وهو التركيز االذي استخدم في تفاعلات البلمرة المتسلسل.

٣- وضعت العينات في جهاز البلمرة الحراري Thermocycler ونفذ البرنامج الموضح في جدول (٣- ٥).

٣-٦-الترحيل الكهربائي Gel Electrophoresis لخليط تفاعل البلمرة الحراري PCR

تم اجراء الترحيل الكهربائي وحسب ما مذكور في الفقرة ب- الترحيل الكهربائي لعينات الدنا باستخدام هلام الاكاروز Gel Electrophoresis

جدول (٣- ٣) البادئات العشوائية مع التتابعات الخاصة بها.

ت	اسم البادئ	تسلسل البادئ ٣ ⟵ ٥
١	OPA-01	CAGGCCCTTC
٢	OPA-05	AGGGGTCTTG
٣	OPA-08	GTGACGTAGG
٤	OPA-10	GTGATCGCAG
٥	OPA-11	CAATCGCCGT
٦	OPA-17	GACCGCTTGT
٧	OPA-20	GTTGCGATCC
٨	OPB-05	GGAGGGTGTT
٩	OPC-04	CCGCATCTAC
١٠	OPC-08	TGGACCGGTG
١١	OPC-15	GACGGATCAG
١٢	OPE-12	TTATCGCCCC
١٣	OPF-02	GAGGATCCCT
١٤	OPF-05	CCGAATTCCC
١٥	OPF-12	ACGGTACCAG

١٦	OPH-07	CTGCATCGTG
١٧	OPH-09	TGTAGCTGGG
١٨	OPH-16	TCTCAGCTGG
١٩	OPQ-17	GAAGCCCTTG
٢٠	OPR-07	ACTGGCCTGA

جدول (٣- ٥) برنامج تفاعل مؤشرات التفاعل التضاعفي العشوائي لسلسلة الدنا PCR - RAPD .

ت	الحرارة (مْ)	الخطوات	الوقت
١	٩٤	المسخ الاولي لشريط الدنا Initial Denaturation	٤ دقيقة
٢	٩٤	مسخ القالب Denaturation	١ دقيقة
٣	٣٦	ارتباط البادئ Primer Annealing	١ دقيقة
٤	٧٢	استطالة البادئات Primer Extension	١ دقيقة
٥		الخطوات ٢-٤ تكرر ٣٥ مرة	
٦	٧٢	الإستطالة النهائية Final Extension	١٠ دقائق

نقلاً عن Khierallah وآخرون (٢٠١٤) مع اجراء بعض التحوير.

٣-٧- تحليل النتائج Data Analysis

١- حساب الوزن الجزيئي

تمت الافادة من برنامج Photo capt الاصدار ١٠ لحساب الوزن الجزيئي (Cerasela وآخرون، ٢٠١١) وهو احد برامج الحاسوب الذي يمتاز بدقته في الكشف عن الحزم الناتجة من تفاعلات البلمرة الحراري PCR ومقارنته بحجم المؤشرDNA Ladder والذي تراوحت اوزانه الجزيئية ١٠٠- ٢٠٠٠ زوج قاعدي.

٢- تقدير النسبة المئوية للتشابه Smilarity

تم استعمال البرنامج الإحصائي الجاهز SPSS الاصدار ٢٠ لحساب البعد النسبة المئوية للتشابه ورسم مخطط التحليل التجمعي . و تم حساب النسبة المئوية للتعددية الشكلية للبادئ المستخدم من خلال المعادلة الآتية :

Polymorphsim = (عدد الحزم المتباينة في البادئ / العدد الكلي لحزم البادئ)× ١٠٠

كما تم حساب النسبة المئوية لكفاءة كل بادئ من خلال المعادلة الآتية :

(العدد الكلي لحزم البادئ / العدد الكلي لحزم كل البادئات) x ١٠٠ .

اما حساب النسبة المئوية للمقدرة التمييزية لكل بادئ فتم من خلال المعادلة :

(عدد الحزم المتباينة للبادئ / عدد الحزم المتبايبة لكل البادئات) x ١٠٠

(Grudman وآخرون ، ١٩٩٥)

٥- الاستنتاجات والتوصيات

٥-١- الاستنتاجات

١- نجاح طريقة CTAB في استخلاص DNA من الأوراق الفتية لِأصناف نخيل التمر المدروسة وبنقاوة ملائمة لتفاعلات PCR .

٢- امكانية استعمال مؤشرات التضاعف العشوائي المتعدد الأشكال لسلسلة الدنا RAPD في الكشف عن التنوع الوراثي بين اصناف نخيل التمر، كما تميزت هذه المؤشرات بسرعتها وسهولة تطبيقها.

٣- قدرة مؤشرات RAPD في اعطاء بصمة وراثية للاصناف المدروسة جميعها من خلال البادئات التي اعطت حزما" مميزة.

٤- ان اعداد البادئات المستخدمة كانت كافية لتقدير البعد الوراثي والعلاقة الوراثية التي تربط الاصناف المدروسة.

٥-٢- التوصيات

١- زيادة عدد البادئات المستخدمة ضمن مؤشرات RAPD وتوسيع منهج البحث ليشمل اصناف اخرى من نخيل التمر.

٢- التركيز على البادئات التي اعطت حزما" فريدة للاصناف المدروسة وتطبيقها على اصناف اخرى من نخيل التمر للتحقق من مدى خصوصية تلك الحزم.

٣ - تزويد المؤسسات والمراكز العلمية المهتمة في اكثار وتربية النخيل بالمعلومات حول البعد الوراثي والعلاقة الوراثية بين اصناف النخيل المختلفة لغرض الإفادة منها.

الخلاصة

اجريت هذه الدراسة في مختبر البايولوجيا الجزيئية/ قسم الهندسة الوراثية / دائرة البحوث الزراعية/وزارة العلوم والتكنولوجيا بهدف تقدير البصمة الوراثية ودراسة العلاقة الوراثية لتسعة اصناف عراقية من نخيل التمر *Phoenix dactylifera* L. وهي اصابع العروس، زهدي، سكري، سعادة، اشرسي، بربن، شتوي، خستاوي ونهير السلي. استعمل ٢٠ بادئا" عشوائيا" للتحري عن مؤشرات الدنا بتقانة التضاعف العشوائي المتعدد الاشكال لسلسلة الدنا Random Amplified Polymorphic (RAPD) والمعتمدة على تفاعل البلمرة الحراري Polymerase Chain Reaction (PCR). تضمنت خطوات العمل عزل وتنقية الدنا من الاوراق الفتية للاصناف الداخلة في الدراسة، اذ تم الحصول على تراكيز من الدنا تراوحت ما بين ١٠٠ و ٥٢٢.٥ نانوغرام/مايكرولتر وبنقاوة تراوحت ما بين ١.٦٦- ١.٩٢. نفذت تفاعلات البلمرة المتسلسل (PCR) مع البادئات المستعملة للكشف عن التباينات بين قطع الدنا المتضاعفة لكل صنف (اعدادها واحجامها الجزيئية) عند ترحيل نواتج التضاعف للعينات على هلام الاكاروز بعد تصبيغها ببروميد الاثيديوم. بينت نتائج التحليل الوراثي بمؤشرات الـ RAPD اختلافا" واضحا" في عدد حزم الدنا المتضاعفة واوزانها الجزيئية وذلك تبعا" للبادئ المستعمل اذ بلغ العدد الكلي للحزم المتباينة (polymorphic bands) ١٥٧ حزمة لكافة البوادئ، وكان اقل عدد حزم متباينة ٥ حزم في البادئين OPA-01 و OPA-20 في حين كان اعلى عدد من الحزم

المتباينة ١٢ حزمة في البادئين OPA-08 و OPH-09، كما اظهرت العديد من البادئات المستعملة في الدراسة حزما" فريدة للنماذج المدروسة جميعها والتي تعد بمثابة بصمة وراثية لتمييز الاصناف عن بعضها ، اذ اعطى الصنف اشرسي اعلى عدد من الحزم الفريدة وذلك عند استعمال البوادئ OPA - 08 و OPC - 04 و OPF - 05 و OPF – 12 اذ اعطت هذه البوادئ ستة حزم مميزة ذات اوزان جزيئية متباينة، بينما اعطى الصنف زهدي اقل عدد من الحزم الفريدة والتي بلغت حزمة واحدة ذات وزن جزيئي ٣٨٥ زوج قاعدي عند استعمال البادئ OPB – 05. ولغرض ايجاد نسبة التشابه الوراثي والعلاقة الوراثية بين الاصناف ادخلت البيانات التي تم الحصول عليها الى الحاسوب ووفق البرنامج الاحصائي SPSS، تراوحت نسبة التشابه بين الاصناف ما بين ٠.٢٩١ و ٠.٥١١ وكانت اكبر نسبة تشابه بين الصنفين سعادة وشتوي. اما نتائج التحليل التجمعي dendogram فقد انفصلت الاصناف الى مجموعتين رئيستين، ضمت المجموعة الاولى ثلاث مجموعات فرعية، شملت الاولى على الصنفين شتوي وسعادة اما الثانية فضمت الاصناف زهدي واشرسي ونهير السلي في حين تمثلت الثالثة بالصنف اصابع العروس. كما انقسمت المجموعة الرئيسية الثانية الى مجموعتين فرعية، ضمت المجموعة الاولى الصنفين بربن وخستاوي في حين ضمت المجموعة الفرعية الثانية الصنف سكري.

ذذ

Abstract

This study was conducted at Molecular Biology lab, Genetic Engineering Department, Agricultural Research Directorate, Ministry of Science & Technology to estimate fingerprint and genetic relationship among 9 Iraqi varieties of date palm *Phoenix dactylifera* L. namely Asabee AL-aroose, Zahdi, Sukari, Saada, Ashrasy, Barben, Shetwi, Khistawi and Nhair Al Saly. 20 primers were used to PCR amplify characteristic Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) marker fragments. Total genomic DNA was isolated from varieties fresh leaves, the average yields of DNA were in the range of 100 – 522.5 ng/ul with purity ranged between 1.66 to 1.92. Polymerase Chain Reaction (PCR) experiments were performed to detect DNA polymorphisms amplified fragments in each cultivar (their numbers and molecular weight sizes) on agarose gel electrophoresis stained by ethidium bromide. Results of RAPD experiments revealed differences in band numbers and molecular weight sizes, all tested primers yielded 157 polymorphic bands and the lowest polymorphic band numbers (5 bands) were with primers OPA-01 and OPA-20 while the largest number of polymorphic (12 bands) were with primers OPA-08 and OPH-09. RAPD analysis showed that many primers gave unique band in all samples made possible fingerprint identification of each cultivar, Ashrasy variety gave highest 6 unique polymorphic bands with primers OPA – 08, OPC – 04, OPF – 05 and OPF – 12, while Zahdy variety gave 1 unique polymorphic band (385 pb) with primer OPB – 05. Data was analyzed by using statistical program SPSS to find similarity and genetic relationship among cultivars, similarity index ranged between 0.291 and 0.511 and the biggest percentage of similarity was between Saada and Shetwi. Dendogram analysis has separated varieties into two main groups, the first main group consists of three sub-cluster or sub-group, the first sub-cluster contained Saada and Shetwi varieties while the second sub-cluster included Zahdi, Ashrasy and Nhair Al Saly and the third sub-cluster consisted Asabee Aroose cultivar. The second main group was divided into two sub-group, the first sub- group consisted of Berben and Khistawi while the second sub-group included Sukary.

أولاً . المصادر العربية :

- ابراهيم، عبد الباسط عودة (٢٠٠٩). تاريخ سيدة الشجر. ندوة النخلة حياة وحضارة، البحرين، ٢٣- ٢٤ نوفمبر.
- ابراهيم، عبد الباسط عودة (٢٠١١). زراعة النخيل وانتاج التمور في العراق. ورقة علمية، الشبكة العراقية لنخلة التمر http://www.iraqi-datepalms.net.
- البكر، عبد الجبار (١٩٧٢). نخلة التمر، ماضيها وحاضرها والجديد في زراعتها وصناعتها وتجارتها. مطبعة العاني، بغداد، العراق.
- الجهاز المركزي للاحصاء، وزارة التخطيط، مديرية الاحصاء الزراعي (٢٠١٢). بغداد، جمهورية العراق.
- الحسني، خلود ابراهيم حسن و جبرائيل، جلادت محمد صالح (٢٠٠٨). استخدام المؤشرات الجزيئية المعتمدة على التفاعل التضاعفي لسلسة الدنا في تشخيص اصناف البطاطا المكثرة خارج الجسم الحي. مجلة جامعة دهوك، المجلد ١١ (١): ٥٢ – ٥٩.
- الخطيب، تمارا عدنان (٢٠٠٠). استخدام مؤشرات التضاعف العشوائي المتعدد الأشكال السلسة الدنا (RAPD) في التمييز لجنس وأصناف ذكور نخيل التمر *Phoenix dactylifera* L. في العراق. رسالة ماجستير، كلية العلوم، جامعة بغداد، العراق.
- الخليلي، جعفر.(١٩٥٦). التمور قديماً وحديثاً. مطبعة المعارف. بغداد، العراق.
- الساهوكي، مدحت مجيد . (2006). تربية النبات بمساعدة المعلمات الجزيئية. مجلة العلوم الزراعية، المجلد 37(4):67-72.
- الشاوش، فتحي و حامد، فيصل و العيسى، عماد. (٢٠٠٧). دراسة التنوع الوراثي لبعض طرز الرمان في اليمن باستخدام تحاليل الـ RAPD . مجلة جامعة دمشق للعلوم الزراعية، المجلد ٢٣ (٢): ٢١٩- ٢٣١.
- العكيدي، حسن خالد (٢٠١٠). نخلة التمر سيدة الشجر ودرة الثمر . مطبعة دار آمنة للنشر والتوزيع ، عمان، المملكة الاردنية الهاشمية .
- العكيدي، حسن خالد (٢٠١٣). وصف لبعض الاصناف العراقية. الشبكة العراقية لنخلة التمر http://www.iraqi-datepalms.net

- الفقي، زكي أحمد و حسين، منى هاشم و محمد، ايهاب مصطفى و حسين، هاشم أحمد. (٢٠٠٢). تحديد البصمات الوراثية لبعض اصناف الفاصوليا المزروعة في مصر باستخدام البروتينات ومشابهات الانزيمات للدنا. المجلة العربية للبيوتكنولوجي، المجلد ٥ (٢): ٢٤٩- ٢٦٢.
- النعماني، خلفان بن سليمان بن شامس. (٢٠١٠). النخل انواعه وقيمته الغذائية والعلاجية. مطبعة الاسكندرية – مصر.
- جبرائيل، جلادت محمد صالح .(٢٠٠١). التوصيف الوراثي لعدد من أصناف نخيل التمر (*Phoenix dactylifera* L.) في العراق باستخدام مؤشرات RAPD . مجلة اباء للأبحاث الزراعية، المجلد ١١(١) : ١٣٨-١٤٨.
- حسن، احمد عبد المنعم (2007). التكنولوجية الحيوية و تربية النبات .الدار العربية. مصر.
- حسين، جنان قاسم (٢٠١١).البعد الوراثي لانواع ورد باستخدام RAPD. مجلة العلوم الزراعية، المجلد ٤٢ (٢): ٧١- ٧٩.
- حسين، فرعون احمد (٢٠٠٩). وصف لبعض اصناف نخيل التمر العراقية. ورقة علمية، الشبكة العراقية لنخلة التمر http://www.iraqi-datepalms.net.
- شومان، وفاء و غزال، حسن و اشتر، سها و بوم، مايكل (٢٠٠١). التنوع الوراثي في الشعيرالسوري باستخدام مؤشرات .RAPD. مركز بحوث كلية الزراعة، جامعة الملك سعود. المملكة العربية السعودية.
- عبد الغفور، عادل هايس وصبري، نوفل عدنان ومرعي، احمد عبد الواحد. (٢٠١١) . تقدير التباينات والارتباطات المظهرية والوراثية ونسبة التوريث بالمعنى الواسع في الذرة الصفراء .*Zea mays* L .مجلة ديالى للعلوم الزراعية، مجلد ٣ (١): ٢٠٦ – ٢١٧.
- عبد الواحد، عقيل هادي و عاتي، منتهى عبد الزهرة (٢٠١٢). ايجاد الاختلافات الوراثية لعدد من أصناف نخيل التمر باستخدام تقنية الترحيل الهلامي الكهربائي. مجلة الكوفة للعلوم الزراعية، المجلد ٤(١): ٨٦ – ٩٢.

❖عبد الواحد، عقيل هادي. (٢٠١١). 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.

❖غالب، حسام علي (٢٠٠٨). الصفات والخصائص الثمرية Fruit Characteristics. اطلس اصناف نخيل التمر في دولة الامارات العربية المتحدة، الجزء(١)، المجلد (١).

❖قاسم، عصام (٢٠١١). علم الوراثة الجزيئي والهندسة الوراثية. منشورات جامعة دمشق، كلية العلوم، سوريا.

❖مطر، عبد الامير مهدي. (١٩٩١). زراعة النخيل وانتاجه. مطبعة دار الحكمة، جامعة البصرة، العراق.

❖ياسين، معن حسن صالح .(٢٠١١) . تحديد التباين الوراثي لعدد من أصناف نخيل التمر في العراق باستخدام مؤشرات RAPD و ISSR. رسالة ماجستير، كلية العلوم، جامعة تكريت، العراق.

ثانياً . المصادر الأجنبية:

Abuelgassim O. (2010). Effect of flax seeds and date palm leaves extract on serum concentration of glucose and lipid in alloxan diabetic rats. Pak. J. of bio. Sci., 13(23):1141-1145.

Ahmed, I.A.; Ahmed, A. and Robinson, R. (1995). Chemical composition of date varieties as influenced by the stage of ripening. Food Chemistry, 54:305-309.

Ali, O., Mokhtar, T.; Salwa, Z.; Abdelmejid, R. and Mohamed, M. (2001). Biochemical characterization of date palm cultivars using isozyme markers. Proceedings of the Second International Conference on Date palm, ALAin-United Arab Emirates: 613-621.

Ali, T.A.; Jubrail, J. M. and Jassim, A. M. (2006). The use of RAPDs technique for the detection of genetic stability of the regenerated plantles (Barhi cv.) in Iraq. 3rd Inter, Date Palm, Conf. Feb 19-21. Abu-Dhabi. United Arab Emirates: 86-98.

Al-Khalifah, N.; Askari, E. and Khan, A. (2012). Molecular and morphological identification of some elite varieties of date palms grown in Saudi Arabia. Emir. J. Food Agric., 24: 456-461.

Al-Khalifah, N.S. and Askari, E. (2006). Early detection of genetic variation in date palm propagated from tissue culture and offshoots by DNA fingerprinting. Acta Hort. (ISHS), 736:105-112.

Al-Moshileh, A.; Motawei, M. l.; Al-Wasel, A. and Abdel- Latif, T. (2004). Identification of some date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultivars in Saudi Arabia using RAPD fingerprint. Agric. Marine Sci. 9:1-3

Al-Shoaibi, Z.; Al-Mamary, M.; AL- Habori, M. and Al-Zubairi, A. (2012). In vivo antioxidative and hepatoprotective effect of date palm fruits (*Phoenix dactylifira* L.). Int. J. of pharmacology, 8:185-191.

Amer, W.M. (1994). History of Botany Part 1: The Date Palm in Ancient History. Botany Deptartment, Faculty of Science, Cairo University, Egypt. Available in: http://www.levity.Com/alchemy/islam08.html.

Arif, I.; Bakir, M.; Khan, H.; Al Farhan, A.; Al Homaidan, A.; Bahkali, A.; Al Sadoon, M. and Shobrak, M. (2010). A brief review of

molecular techniques to assess plant diversity. Int. J. Mol. Sci., 11(5): 2079–2096.

Arinkin, V.; Digel, I.; Porst, D.; Artmann, A .T. and Artmann, G. (2014). Phenotyping date palm varieties via leaflet cross-sectional imaging and artificial neural network application. BMC Bioinformatics, 15: 55- 63.

Askari, E.; Al-khalifa, N.; Ohmuka, T.; Al-Hafedh, Y.; Khan, F.; Al-Hindi, A. and Okawara, R. (2003). Molecular phylogeny of seven date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultivars by DNA fingerprinting. Pak. J. Bot., 35(3): 323-330.

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

Bader,S.; Baum, M.; Khierallah, H. and Choumane, W. (2007). The use of RAPDs technique for the detection of genetic stability of date palm plantlets derived from *in vitro* culture of inflorescence. The First Conference on Biology. Mosul, Iraq 4-5 September. pp.149-159.

Barone, A.; Sebastiano, A. and Carputo, D. (1999). Chromosome pairing in *Solanum commersonii- S. tuberosum* sexual hybrids detected by commersonii–specific RAPDs and cytological analysis. Genome, 42: 218 –224.

Barrow, S. (1998). A monograph of *Phoenix* L. (Palmae: Coryphoideae). Kew Bulletin 53 (3): 513-575.

Betancor, L.; Schelotto, F.; Martinez, A.; Pereira, M.; Algorta, G.; Rodríguez, M.; Vignoli, R. and Chabalgoity, J. (2004). Random amplified polymorphic DNA and phenotyping analysis of *Salmonella enterica* serovar enteritidis isolates collected from humans and poultry in Uruguay from 1995 to 2002. J. Cli. Microbiol., 42(3), 1155–1162.

Borges, A.; Rosa, M.; Recchia, G.; de Queiroz- Silva, J.; Bressan, E. and Veasey, E. (2009). CTAB methods for DNA exraction of sweetpototo for microsatellite analysis. Sci. Agric. (Piracicaba, Braz.), 66: 529–534.

Boyang, C. and Chao, C. (2002). Identification of date cultivars in California using AFLP markers. HortSci., 37(6): 966-968.

Brown, T. (2010). Gene Cloning and DNA Analysis. An *Introduction.* Sixth ediation. Wiley-Blackwell , A John Wiley & Sons, Ltd., Publication.

Caballero, A.; García-Pereira, M., and Quesada, H. (2013). Genomic distribution of AFLP markers relative to gene locations for different eukaryotic species. BMC Genomics, 14: 528-539.

Cerasela, P.; A., Lazar; Irina, P.; Maria, Ioja-Boldura; Giancarla, V.; C., Banu. (2011). Somaclonal variation at the nucleotide sequence level revealed by RAPD and ISSR markers. J. of Horticulture, Forestry and Biotechnolog, 15(4), 119- 123.

Dada, M.; Nwawe, C.; Okere, R. and Uwubanmwen, I. (2012). Potentials of date palm tree to the Nigerian economy. World J. of Agri. Sci., 8(3), 309–315.

Dahlberg, J.; Zhang, X.; Hart, G. and Mullet, J. (2002). Comparative assessment of variation among sorghm germplasm accessions using seed morphology and RAPD measurements. Crop Sci., 42: 291–296.

Dalmasso, A.; Fontanella, E.; Piatti, P.; Civera, T.; Rosati, S. and Bottero, M. (2004). multiplex PCR assay for identification of animal species in feedstuffs. Mole Cell Probes., 18 :81-87.

Deshmukh, V.; Thakare, P.; Chaudhari, U. and Gawande, P. (2007). A simple method for isolation of genomic DNA from fresh and dry leaves of Terminalia arjuna (Roxb.) wight and argot. Electronic J. Biotech., 10 (3): 468-472.

Eissa, E.; Abd El-Razek, A.; El-Sharabasy, S. and Rizk, R. (2009). Morphological and molecular genetic characterization of soft date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultivars in Egypt. Egypt. J. Genet. Cytol., 38: 269-284.

El Kichaoui, A.; Abu Zayed, M., and Ayesh, B. (2013). Genotyping and identification of six date palm (*Phoenix dactylifera* L .) cultivars of the Gaza Strip by random amplification of polymorphic DNA. Emir. J. Food Agric., 25(11), 916–925.

Elhoumaizi, M.; Saaidi, M.; Oihabi, A. and Cilas, C. (2002). Phenotypic diversity of date- palm cultivars (*Phoenix dacylifera* L.) from Morocco. Genet. Resour. Crop Evolution, 49:483-490.

Elmeer, K.; Sarwath, H.; Malek, J.; Baum, M. and Hamwieh, A. (2011). New microsatellite markers for assessment of genetic diversity in date palm (*Phoenix dactylifera* L .). 3 Biotech.,1: 91–97.

El-Rayes, D. (2009). Characterization of three date palm cultivars based on RAPD fingerprints and fruit chemical composition. JKAU: Met., Env. & Arid Land Agric. Sci., 20(2):3-20.

El-Shafie, H.(2012). Review: List of arthropod pests and their natural enemies identified worldwide on date palm, *Phoenix dactylifera* L. Agri. Biol. J. N. Am., 3(12): 516-524.

El-Sharnouby, G. A.; Aleid, S. M., and Al-Otaibi, M. M. (2012). Nutritional quality of biscuit supplemented with wheat bran and date palm fruits (*Phoenix dactylifera L* .). Food and Nutrition Sciences, 3: 322–328.

Ferdous , J.; Hanafi, M.; Rafii, M. and Muhammad, K. (2012). A quick DNA extraction protocol: without liquid nitrogen in ambient temperature. Afr. J. Biotech., 11(27): 6956-6964.

Fernández, M. E.; Figueiras, A. M. and Benito, C. (2002). The use of ISSR and RAPD markers for detecting DNA polymorphism, genotype identification and genetic diversity among barley cultivars with known origin. Theor. Appl. Genet., 104:845–851.

Gao, P.; Ma, H.; Luan, F. and Song, H.(2012). DNA fingerprinting of Chinnese melon provides evidentiary support of seed quality Appraisal . PLoS ONE, 7(12): 1-10.

Grudman , H.; Schneider , C.; Hartung, D.; Daschner, F. D. and Pith, T. L. (1995). Discriminatory power of three DNA typing techniques for P. aeruginosn . J .clin . microbial. 3:528-532.

Haider, N.; Nabulsi, I. and Mir Ali, N.(2012). Phylogenetic relationships among date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultivars in Syria using RAPD and ISSR markers. J. Plant Bio. Res., 1(2): 12-24.

Hammadi, H.; Mokhtar, R.; Mokhtar, E. and Ali, F. (2009). New approach for the morphological identification of date palm *(Phoenix dactylifera* L.*)* cultivars from Tunisia. Pak . J. Bot., 41(6): 2671-2681

Hancock, R. E., and Wong, P. G. (1984). Compounds which increase the permeability of the *Pseudomonas aeruginosa* Outer Membrane. Antimicrob. Agents Chemother., 26(1): 48–52.

Hauschild, T., and Stepanovic, S. (2008). Identification of Staphylococcus spp. by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of dnaJ gene. J. Clin. Microbiol., 46(12): 3875–3879.

Innis. M.A., and Gelfand, D.H. (1990). Optimization of PCR,. Basic methodology. Part one. In : PCR Protocols, Innis, M.A. ; Gelfand , D.H., Sninsky, J.J. and White, T.J. (eds.) Academic Press, Inc. London.

Jassim, S. and Limoges, R. (2014). Date palm tree's defense mechanisms from viral infection and solar ultraviolet radiation. Advances in Microbiology, 4(1): 1–5.

Jubrael, J. M. S.; Udupa, S. M. and Baum, M. (2005). Assessment of AFLP-based genetic relationships among data palm (*Phoenix dactylifera* L.) varieties of Iraq. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 130(3): 442-447.

Khierallah, H. S. M.; Al-Sammarraie, S. K. I., and Mohammed, H. I. (2014). Molecular characterization of some Iraqi date palm cultivars using RAPD and ISSR markers. J. of Asian Sci. Research, 4(9), 490–503.

Khierallah, H. S. M.; Bader, S. M.; Baum, M.; Hamwieh, A. (2011). Genetic diversity of Iraqi date palms revealed by microsatellite polymorphism. J. Amer. Soc. Hort. Sci., 136(4): 282–287.

Khosravinia, H. and Ramesha, K. (2007). Influence of EDTA and magnesium on DNA extraction from blood samples and specificity of polymerase chain reaction. Afr. J. Biotech., 6 (3): 184-187.

Ko, H.; Cowan,D.; Henry,R.; Graham,G.; Blakeney, A. and Lewin,L. (1994). Random amplified polymorphic DNA analysis of Australian rice (*Oryza sativa* L.) varieties. Euphytica, 80: 179-189.

Kumar, N.; Modi, A. R.; Singh, A. S.; Gajera, B. B.; Patel, A. R. and Subhash, N. (2010). Assessment of genetic fidelity of micropropagated date palm (*Phoenix dactylifera* L .) plants by RAPD and ISSR markers assay. Physiol. Mol. Biol. Plants, 16(2), 207–213.

Liu, J.; Shi, S.; Chang, E.; Yang, W. and Jiang, Z. (2013). Genetic diversity of the critically endangered *Thuja sutchuenensis* revealed by ISSR markers and the implications for conservation. Int. J. Mol. Sci., 14(7): 14860-14871.

Maric, S. J.; Bolaric, S.; Martincic, J.; Pejic, I. and Kozumplik, V. (2004). Genetic diversity of hexaploid wheat cultivars estimated by RAPD markers, morphological traits and coefficients of parentage. Plant Breeding, 123: 366 -369.

McGregor, C. E.; Lambert, C. A.; Greyling, M. M.; Louw, J. H. and Warich, L.(2000). A comparative assessment of DNA fingerprinting techniques (RAPD, ISSR, AFLP and SSR) in tetraploid potato (*Solanum tuberosum* L.) germplasm. Euphytica. 113: 135-144.

Milbourne, D.; Meyer, R.; Bradshaw, J.; Baird, E.; Bonar, N.; Provan,J.; Powell,W. and Waugh, R. (1997). Comparision of PCR-based marker systems for the analysis of genetic relationship in cultivated potato. Molecular Breeding, 3:127-136.

Nybom, H.; Weising, K. and Rotter, B. (2014). DNA fingerprinting in botany: past, present, future. Investigative Genetics, 5: 1-35.

Raddova, J.; Baranek, M.; Oukropec, I.; Vachun, M. and Pidra, M. (2003). RAPD analysis of peaches within Czech national collection. Czech J. Genet. Plant Breed., 39 (4): 113 –119.

Rashed, M.A.; Abou-Deif, M. H.; Sallam, M. A. and Ramadan, W. A. (2008). Estimation of genetic diversity among thirty bread wheat varieties by RAPD analysis. J. Applied Sci. Res., 4(12): 1898-1905.

Rawashdeh, I. and Amri, A. (2006). Genetic characterization of date palm varieties using RAPD markers. Jordan J. Agric. Sci., 2(3): 234–242.

Sedra, M. H.; Lashermes, P.; Trouslot, P. , Combes, M. and Hamon, S. (1998). Identification and genetic diversity analysis of date palm

(*Phoenix dacylifera* L.) varieties from Morocco using RAPD markers. Euphytica, 103:75-82.

Shakya, P.; Madhav, N. and Shakya, A. (2010). Evaluation of date palm polysaccharide (DPP) as a biomucoadhesent and its comparison with various mucoadhesive polymers pragati. Int. J. Pharmaceutical Sci. Res., 1(10): 164–168.

Sharma, P. and Purohit, S. D. (2012). An improved method of DNA isolation from polysaccharide rich leaves of *Boswellia serrata* Roxb. Indian J. Biotech., 11: 67–71.

Singh, J. D. and Singh, I. P. (2006). Genetic variability, heritability, expected genetic advance and character association in field pea (*Pisum sativum* L.). Legume Research, 29 (1): 65-67.

Soller, M. and Beckmann J. S. (1983). Genetic polymorphism in varietal identification and genetic improvement. Theor. Appl. Genet., 67: 25-33.

Tong, W.; Cao, X.; Wen, S.; Guo, R.; Shen, M.; Wang, J. and Shi, X. (2012). Enhancing the specificity and efficiency of polymerase chain reaction using polyethyleneimine-based derivatives and hybrid nanocomposites. Int. J. Nanomedicine, 7:1069–1078.

Wang,G.; Castiglione, S.; Zhang, J.; Fu, R.; Ma. J.; Li, W.; Sun, Y. and Sala, F. (1994). Hybrid rice (*Oryza sativa* L.): identification and parentage determination RAPD fingerprinting. Plant Cell Rep., 14: 112-115.

Weigand, F.; Baum, M. and Udupa, S. (1993). DNA molecular marker techniques. Technical manual. Internatioal Center for Agricultural Research in the Dry Areas, Aleppo, Syria.

Welsh, J. and McClelland, M. (1990). Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucleic Acids Res., 18(24): 7213-7218.

Williams, J. G. K.; Hanafey, M. K.; Rafalski, J.A. and Tingey, S.V. (1993). Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. Methods in Enzymology, 218: 704-740.

Wilson, K. and Walker, J.(2005). Principles and Techniques of Practical Biochemistry .Cambridge University Press.

Xie,J.; Zapata,A.; Shen,M. and Afza, R. (1998). Salinity tolerant performance and genetic diversity of four rice varieties. Plant Breeding Unit FAO/ IAEA Programme Agriculture and Biotechnology Laboratory.

Zaid, A. and Arias-Jiménez, E. (2002) . Date Palm Cultivation. FAO plant production and protection paper- 156 Rev.1. Food and Agriculture Organization of the United Nation. Rome, Italy. Available in: http://www.fao.org/docrep/006/y4360e/y4360e00.HTM

Zhao, Y.; Williams, R.; Prakash, C. S. and He, G. (201٣). Identification and characterization of gene - based SSR markers in data palm (*Phoenix dactylifera* L.) . BMC Plant Biology, 12(1): 1- 8.

ملحق (1)

دليل مكونات خليط التفاعل الرئيسي للـ PCR

BIONEER
Innovation · Value · Discovery

AccuPower® PCR PreMix

Bioneer Corporation
8-11, Munpyeongseo-ro, Daedeok-gu, Daejeon 306-220, South Korea
Tel: (Korea) 1588-1788, International: +82-42-930-8777
Fax: +82-42-930-8600
E-mail: sales@bioneer.com

Bioneer, Inc.
1000 Atlantic Avenue, Alameda, CA 94501 USA
Toll free: +1-877-264-4300
Fax: +1-510-865-0350
E-mail: orderusa@bioneer.com

Bioneer TradeShanghai Co., Ltd
903 Room, Building 88, no 887, Zuchongzhi Road, Zhangjiang High Tech Park, PuDong New District, Shanghai 201203 China
Tel: +86-21-5080-0969
Fax: +86-21-5080-1620
E-mail: sales@bioneer.com

Seoul Office
2nd fl. Sanso B/D, 966, Gangnam-daero, 33-gil, Seocho-gu, Seoul 137-130, South Korea
Tel: +82-2-598-1094
Fax: +82-2-598-1096

Order
Domestic only: 1588-1788
E-mail: order@bioneer.com
URL: www.bioneer.com

AccuPower® **PCR PreMix is a new, powerful, and ready-to-use PCR reagent optimized for more accurate PCR amplifications.**

Advantages

Speed Substantial reduction in PCR setup time.

Stability AccuPower® PCR PreMix is the powerful technology for convenient and easy to perform DNA amplification. It contains DNA polymerase, dNTPs, a tracking dye and reaction buffer in a premixed format, freeze-dried into a pellet. The patented chemical stabilizer of this product enables to maintain the activity of pre mixture for over a month even when stored at room temperature (25°C), over 2 years in the freezer.

Reproducibility and Yield
Batch manufacturing under strict ISO 9001 quality control conditions guarantees reproducibility. Minimal handling during reaction set up provides improved accuracy.

Simplicity Each product line contains an application specific enzyme in an easy to re-suspended, lyophilized premix of dNTPs, reaction buffer, a tracking dye, and a stabilizer. The premix is ready to use, thus offering virtually no reaction set up time.

Contents

Component \ Reaction size	20 µl reaction	50 µl reaction
Top DNA polymerase	1 U	2.5 U
Each: dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	250 µM	250 µM
Tris-HCl (pH 9.0)	10 mM	10 mM
KCl	30 mM	30 mM
$MgCl_2$	1.5 mM	1.5 mM
Stabilizer and tracking dye		

Experimental Protocol

- Add template DNA and primers to *AccuPower®* PCR tube.

Concentration of template DNA and primer

	20 µl reaction	50 µl reaction
Template DNA	5 – 50 ng	10 - 100 ng
Primer	5 - 10 pmole	10 - 20 pmole

- Add distilled water to *AccuPower®* PCR tubes to a total volume of 20 µl or 50 µl.
- Dissolve the lyophilized blue pellet by vortexing, and briefly spin down.
- Add mineral oil. (This step is unnecessary when using a thermal cycler with top heating.)
- Perform PCR of samples.
- Load samples on agarose gel without adding a loading-dye mixture, and perform electrophoresis.

Notice to Purchaser

This enzyme is specifically optimized for increasing base incorporation rate by inactivating 5'->3' exonuclease activity. Therefore, this is not recommended to use for Real Time PCR using Taqman® probe.

Trademark

AccuPower is a trademark of Bioneer Corporation.

Ordering Information

Tube type	Reaction	Cat.No.	Description
0.2ml Tube	20 ul	K-2012	0.2 ml thin-wall 8-strip tubes with attached cap / 96 tubes
		K-2016	0.2 ml thin-wall 8-strip tubes with attached cap / 480 tubes
	50 ul	K-2013	0.2 ml thin-wall 8-strip tubes with attached cap / 96 tubes
		K-2017	0.2 ml thin-wall 8-strip tubes with attached cap / 480 tubes
0.5ml Tube	50 ul	K-2011	0.5 ml thin-wall tubes with attached cap / 100 tubes
96-well	10 ul	K-2260-1	thin-wall 96-well flat plate
		K-2260-2	thin-wall 96-well full-skirted plate
		K-2260-3	thin-wall 96-well semi-skirted plate
	20 ul	K-2262-4	thin-wall 96-well flat plate
		K-2260-5	thin-wall 96-well full-skirted plate
		K-2260-6	thin-wall 96-well semi-skirted plate
384-well	5 ul	K-2080-1	thin-wall 384-well full-skirted plate
	10 ul	K-2080-2	thin-wall 384-well full-skirted plate
	20 ul	K-2080-3	thin-wall 384-well full-skirted plate
Master Mix	-	K-2010	1 ml of 2 X Master mix solution
		K-2019-1	10 ml of 2 X Master mix solution

A complete product list appears on our web site at *www.bioneer.com*.

Blazing the Biotechnology Trail