



## البنية العلمية وسبلنا للحياة المتعلمة



### التباين الوراثي والتشخيص المبكر لأصناف النخيل (*Phoenix dactylifera L.*) اعتمادا على الدنا

#### الميتوكوندريا mtDNA

رسول إبراهيم حميد الخفاجي ، عقيل حسين علي العاصي

قسم علوم الحياة ، كلية العلوم ، جامعة تكريت ، تكريت ، العراق

[ggaug4092@gmail.com](mailto:ggaug4092@gmail.com) , [akalassie09@yahoo.com](mailto:akalassie09@yahoo.com)

#### المخلص

أجريت هذه الدراسة على خمسة أصناف نخيل التمر العراقية المستزرعة في ثلاث محافظات من الموصل (برحي، خستاي، زهدي، بريم، خضراوي) ومن بغداد والبصرة نفس الأصناف لغرض تحليل التباين الوراثي بين نفس الأصناف مع اختلاف المحافظة والتباين بين كل صنف مع الأصناف الأخرى على مستوى دنا الميتوكوندريا Mitochondrial DNA ، باستخدام أربعة أزواج بادئات متخصصة لتحديد جينات *matR* gene و *cox3* gene و *rps3* gene وكذلك *nad5* gene الموجودة على دنا الميتوكوندريا ، حيث بعد اجراء تفاعلات PCR أنتجت جميع العينات حزمة عامة ذات حجم جزيئي 497 زوج قاعدي للجين *matR* و 451 زوج قاعدي للجين *cox3* و 339 زوج قاعدي للجين *rps3* و 488 زوج قاعدي للجين *nad5* . لغرض بلوغ الهدف المنشود اختبرت ثلاث جينات وهي *matR* و *cox3* و *nad5* لثلاث أصناف وهي برحي و خستاي وخضراوي للمحافظات الثلاثة وتم تحديد التسلسل النيوكليوتيدي لهذه الجينات ، بينت نتائج التسلسل النيوكليوتيدي للجينات *matR* و *cox3* و *nad5* وجود تشابه كبير جدا في تتابعات هذه الجينات بين أصناف نخيل التمر المدروسة وصل إلى 1 أي إن تسلسل قواعد هذه الجينات في المناطق المدروسة متشابه بنسبة 100% ، عدا صنف خستاي الموصل لجين *cox3* وجود بعض طفرات الاستبدال ، قورنت نتائج التسلسل النيوكليوتيدي للجينات الثلاثة في الأصناف المدروسة مع التسلسل القياسي Refseq للجين نفسه وكانت نسبة التطابق 100% بين هذه الأصناف والتسلسل القياسي ، عدا صنف خستاي الموصل لجين *cox3* فكانت هناك 10 طفرات من نوع الاستبدال .

#### 1- المقدمة

النواة ولها وظائف بايولوجية معينة ، ومن الأمثلة على تلك المادة الوراثية هي احتواء الميتوكوندريا على الدنا الخاص بها والذي يسمى Mitochondrial DNA (mtDNA) ، الذي يحمل الجينات التي تشفر لإنتاج المواد الضرورية لعملية التمثيل الغذائي والتنفس (Siqueira et al ., 2018). وان تصنيف أو تشخيص نخيل التمر يتم على أساس شكل الشجرة والثمار ، إلا أن الصفات المظهرية عادة لا يعتمد عليها وربما لا تكون مرتبطة بشكل تام مع الطرز الوراثية لنخيل التمر حيث إن هذه الصفات عادة تكون متأثرة بالظروف البيئية أو أنها تختلف باختلاف المرحلة العمرية لنخيل التمر ( IPGRI, 2005). استخدمت المؤشرات الجزيئية في مجال تصنيف النخيل ودراسة تنوعها الوراثي، وان المؤشرات المعتمدة على الدنا DNA markers هي أكثر دقة من المؤشرات الأخرى ويمكن أن تحدد بدقة الأصناف وتحدد التنوع الوراثي والعلاقات فيما بينها، ولهذا فقد

يعود نخيل التمر (*Phoenix dactylifera L.*) Date Palm إلى رتبة النخيليات Palmae ، العائلة النخيلية Palmaceae التي تضم أنواع النخيل المختلفة والتي أهمها نخيل التمر، وهي شجرة فواكه خشبية معمرة (Sghaier-Hammami et al., 2009) ، يعد العراق من أقدم مواطن زراعة النخيل في العالم إذ يزرع فيه أكثر من 600 صنف (إبراهيم وخليف، 1998) ، تعود الأهمية الاقتصادية لنخيل التمر إلى حد كبير إلى ثمارها ذات القيمة الغذائية (Al-Shahib and Marshall, 2003) . يتكون جينوم النخيل من 18 زوج من الكروموسومات  $2n=2x=36$  (Al-Khayri et al., 2015) ، ويقدر حجمه الجزيئي بين 550 Mb (Malek , 2010) ، و 658 Mb (Alfaifi et al., 2015) ، ولكن عدد كروموسومات النخيل لم يحدد بالضبط (Shabana ,et al ., 2010) . ومن الجدير بالذكر فان الخلايا الحية تحتوي على مادة وراثية إضافية غير تلك الموجودة في

البلاستيدات الخضراء ومناطق أخرى غير مشفرة ) ، ويحتوي على ما لا يقل عن 38 جين يشفر للبروتين وخمسة جينات ذات الهيكل المفتوح الكاملة (ORFs) Open Reading Frames، معظم هذه الجينات لها ادوار مهمة إما في حركة البروتون عبر الغشاء الداخلي للميتوكوندريا أو تفاعلات نقل الإلكترون في سلسلة الجهاز التنفسي (Fang et al., 2012). يكون جينوم الميتوكوندريا خيارا جيدا ومهما في دراسات العلاقات الوراثية والتصنيفية لعدة أسباب من أهمها هو وجوده بعدة نسخ في كل خلية وبالتالي يمكن الحصول عليه بسهولة عند استخلاص الجينوم الكلي من النبات، بالإضافة إلى ذلك فهو صغير الحجم ويظهر تباين قليل في محتوى الجينات وفي بعض الحالات في ترتيبها (Wang et al., 2012). على هذا الأساس استند هذا البحث على تحليل التباين الوراثي لنخيل التمر العراقي على مستوى mtDNA باستخدام بادئات خاصة وكذلك تحديد التسلسل التابعي لمنطقة معينة من مناطق mtDNA لتحليل التباين بين الأصناف.

## 2- المواد وطرق العمل

### جمع العينات Samples collection

جمعت العينات وهي عبارة عن أوراق فتية من أشجار النخيل العراقية من ثلاثة محافظات وهي (الموصل، بغداد، البصرة) معروفة الأصناف مسبقا من قبل المختصين والخبراء المالكين لبساتين النخيل، حيث إن تلك الأشجار كانت عبارة عن فئيل لأصناف معروفة تم جلبها سابقا من مناطق زراعة الصنف في العراق، كما موضح في الجدول (1) وتم تشخيص الأصناف بالاعتماد على شكل الثمار بالدرجة الأولى وعلى الشكل العام للشجرة.

جدول (1) أصناف نخيل التمر الداخلة في الدراسة

ت	الاسم الشائع	منطقة الجمع	الانتشار الجغرافي
1	برحي	الموصل _ بغداد _ البصرة	جميع مناطق زراعة النخيل في العراق
2	خستايوي	الموصل _ بغداد _ البصرة	المنطقة الوسطى من العراق
3	زهدي	الموصل _ بغداد _ البصرة	جميع مناطق زراعة النخيل في العراق
4	بريم	الموصل _ بغداد _ البصرة	منطقة شط العرب بشكل أساسي و في مناطق أخرى من العراق
5	خضراوي	الموصل _ بغداد _ البصرة	منطقة شط العرب بشكل أساسي و في مناطق أخرى من العراق

الحامض النووي لميتوكوندريا نخيل التمر ، باستخدام برنامج Primer3Plus من قِبَل (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi/>)، حيث تم تصميمها من قبل ا.م.د. احمد عبد الجبار سليمان / كلية العلوم / جامعة الانبار. حيث تم تحضير خليط التفاعل الرئيسي Master reaction وذلك بمزج مكونات PCR Premix المجهز من شركة Bioneer ويحجم نهائي 20 µl وباستعمال أربع أزواج من البادئات المتخصصة nad5 (1U Taq Polymerase, 250µM), matR, cox3, rps3 dNTPs, 10mM Tris-Hcl, 30 mM KCL, 1.5 mM

استخدمت هذه المؤشرات على نطاق واسع لدراسة التباين الوراثي لأصناف النخيل (Jaradat, 2014)، إذ ظهرت خلال العقد الماضي محاولات عديدة لاستخدام المؤشرات الجزيئية لتمييز أو دراسة التنوع الحياتي لأشجار النخيل مثل AFLP و SSR و ISSR و RAPD (Sabir et al., 2014)، لا يقتصر عمل مؤشرات الدنا على دنا النواة nuclear DNA حيث وكما ذكر (Batley, 2015)، فإنه يمكن تطبيقها على جينوم العضيات الأخرى مثل دنا الميتوكوندريا (mtDNA) mitochondrial DNA، لذلك استخدم دنا الميتوكوندريا (mtDNA) لتحديد العلاقات الوراثية بين أصناف النخيل (Fang et al., 2012)، لكونه يحتوي على تسلسلات تشفير محفوظة للغاية (عادة 24 جينا أساسيا مع 17 جينا متغيرا) (Kozik et al., 2019). عرف منذ فترة طويلة أن جينومات الميتوكوندريا النباتية أكبر بكثير وأكثر تعقيدا في التركيب من تلك الموجودة بالحيوانات وتتضمن كميات كبيرة من الحمض النووي غير المشفر (Wynn and Christensen, 2019). إن جينوم الميتوكوندريا يكون بشكل عام ذو هيكل دائرية مفردة أو متعددة (Briebe, 2019). أهم ما يميز جينومات الميتوكوندريا النباتية هي إنها تكون ذات معدلات طفرة منخفضة جدا، يعود السبب لاحتوائها على مسارات إصلاح فعالة، على وجه الخصوص نظام إعادة التركيب المتماثل (Chevigny et al., 2020). يتميز دنا ميتوكوندريا نخيل التمر بأنه حلقي circular ثنائي السلسلة وذو حجم جزيئي يقدر بـ 715,001 زوج قاعدي، وبمتوسط محتوى GC يكون بنسبة 45.1 %، يكون تسلسل تشفير البروتين الخاص بجينوم ميتوكوندريا نخيل التمر هو بنسبة 6.5 % فقط من الجينوم، والباقي وهو الأغلبية بنسبة (93.5%) من الجينوم، يتكون من غير تشفير (تعتبر المناطق المشتقة من جينوم

### 1- استخلاص الدنا المجيني DNA Extraction

تم استخلاص الـ DNA بأخذ 1.5 غرام من الأوراق الطرية لنخيل التمر Phoenix dactylifera باستخدام مادة الـ CTAB (Huang et al., 2013). 1.4 M NaCl, 100 mM Tris-Hcl, 20 mM Na2EDTA, 2% CTAB. في هذه الطريقة تم الحصول على الجينوم الكلي لنخيل التمر المتضمن جينوم النواة nDNA وجينوم الميتوكوندريا mtDNA وجينوم البلاستيدات الخضراء cpDNA.

2- تفاعلات الـ PCR: استخدمت في هذه الدراسة أربعة أزواج من البوادئ المصممة خصيصا لهذه الدراسة لمضاعفة أربعة مناطق من

ويرمج الجهاز حسب كل بادئ متخصص كما في الجدول (2).

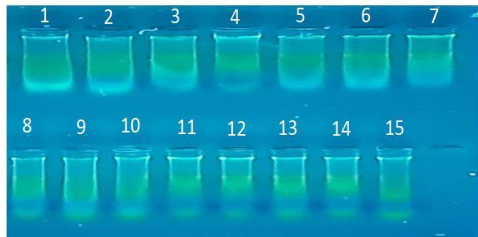
MgCl<sub>2</sub> , 10 pmol Each primer (F,R), 50ng DNA  
Thermocycler جهاز المبلر الحراري ( Template ) ، وباستخدام

جدول (2) البادئات المستخدمة في الدراسة

البادئ Primer	Sequences (5' 3') →	برنامج التفاعل	حجم الحزمة (bp)
matR F	GGACGTTCAACAGGCAGTCT	94°C 2min 1cycle , 35 cycle 94°C 30sec 59°C 60sec 72°C 60sec , and 72°C 5 min 1 cycle	497
matR R	GCTTCCCAAGCTCTATGCTG		
cox3 F	TTCTTCTTTGGCACCTACGG	94°C 2min 1cycle , 35 cycle 94°C 30sec 55°C 60sec 72°C 60sec , and 72°C 5 min 1 cycle	451
cox3 R	AAATGGGAATAACCGAACCA		
nad5 F	TTCAACCATTTTTGCTCGTG	94°C 2min 1cycle , 35 cycle 94°C 30sec 57°C 60sec 72°C 60sec , and 72°C 5 min 1 cycle	488
nad5 R	GAATCACCGAACCTGCACTC		
rps3 F	CCTAAATCGACCCCTTCTT	94°C 2min 1cycle , 35 cycle 94°C 30sec 57°C 60sec 72°C 60sec , and 72°C 5 min 1 cycle	339
rps3 R	CGGAGGGGTCAGTACTCAAG		

بعد انتهاء المضاعفة على جهاز المبلر الحراري رحلت العينات على هلام الاكاروز بتركيز 1.5 % .

كميات جيدة من الـ DNA الكلي وبمعدل يتراوح بين 100-1000 نانوغرام لكل 1 مايكروليتر وبنقاوة تتراوح ما بين 1.6-1.9 وقد تم تقدير كمية الـ DNA المستخلص والنقاوة بالاعتماد على قراءة جهاز النانو دروب Nano drop spectrophotometer . الشكل رقم (1) يوضح عينات الـ DNA لأصناف نخيل التمر الداخلة في الدراسة.



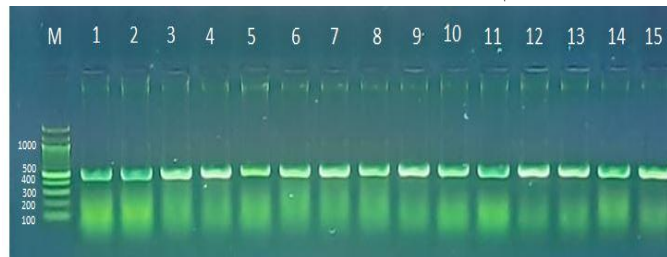
الشكل (1) نتائج عزل الـ DNA المجيني لأصناف نخيل التمر المرحلة على هلام الأكاروز بتركيز 1%.

عينات الموصل (1) برحي (2) خستاوي (3) زهدي (4) بريم (5) خضراوي ، عينات بغداد (6) برحي (7) خستاوي (8) زهدي (9) بريم (10) خضراوي ، عينات البصرة (11) برحي (12) خستاوي (13) زهدي (14) بريم (15) خضراوي.

### 3-1 نتائج تفاعلات mtDNA Specific primers

#### 1- زوج بادئات الجين matR

اظهرت نتائج الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز بتركيز 1.5 % وجود حزم الجين matR في جميع العينات المختبرة على مستوى واحد من عينات الدليل الحجمي 100 bp DNA ladder (الشكل 2).



الشكل (2) نتائج ترحيل تفاعل زوج البادئات لجين matR على هلام الأكاروز بتركيز 1.5%.

عينات الموصل (1) برحي (2) خستاوي (3) زهدي (4) بريم (5) خضراوي ، عينات بغداد (6) برحي (7) خستاوي (8) زهدي (9) بريم (10) خضراوي ، عينات البصرة (11) برحي (12) خستاوي (13) زهدي (14) بريم (15) خضراوي .DNA ladder (M).

### 3- التسلسل التتابعي للحمض النووي DNA Sequencing:

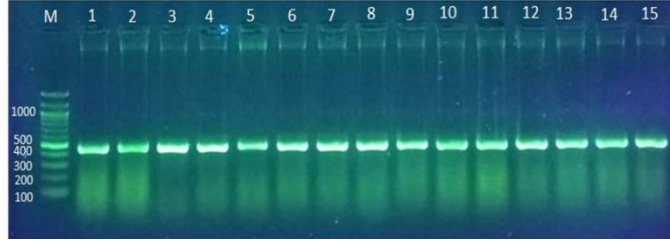
تم عمل تتابع الحمض النووي DNA Sequencing لجين matR و جين cox3 وكذلك جين nad5 الداخلة في الدراسة من خلال اخذ ناتج PCR لأصناف النخيل الداخلة في الدراسة بحجم 25 مايكروليتر مع زوج البودائ (Forward + Reverse) بتركيز 17 بيكامول \ مايكروليتر لكل جين بعد أن وضعت في 0.2 ml eppendorf pcr tube نظيفة ومعقمة وغلفت جيدا وإرسالها إلى شركة Macrogen للتقانات الحيوية في كوريا الجنوبية، بعد إن وصلت النتائج من الشركة تمت قراءة التتابعات حسب برنامج Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) على الموقع العالمي National Center for Biotechnology Information (NCBI) لتحديد التسلسل التتابعي للجينات المدروسة حيث فورنت النتائج فيما بينها.

عمل هذا البحث في مختبرات البيولوجي الجزيئي لكلية العلوم / جامعة تكريت للفترة من 18-11-2019 إلى 28-4-2020.

### 3- النتائج والمناقشة

تم عزل الـ DNA المجيني من الأوراق الفتية لأشجار نخيل التمر بحسب الطريقة التي ذكرها (Huang et al ., 2013) والتي استخدم فيها مادة CTAB إذ إن الـ DNA المستخلص بهذه الطريقة مناسب لتفاعلات الـ PCR من حيث الكمية والنقاوة ، فتم الحصول على

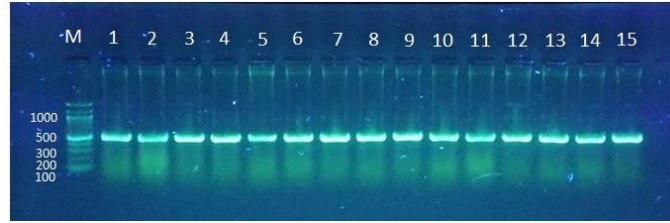
2- زوج بادئات الجين *cox3* : اظهرت نتائج الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز بتركيز 1.5 % وجود حزم الجين *cox3* في جميع العينات المختبرة على مستوى واحد من عينات الدليل الحجمي 100 bp DNA ladder (الشكل 3).



الشكل (3) نتائج تفاعل زوج البادئات لجين *cox3* على هلام الأكاروز بتركيز 1.5%.

عينات الموصل (1) برحي (2) خستاوي (3) زهدي (4) بريم (5) خضراوي ، عينات بغداد (6) برحي (7) خستاوي (8) زهدي (9) بريم (10) خضراوي ، عينات البصرة (11) برحي (12) خستاوي (13) زهدي (14) بريم (15) خضراوي (M) DNA ladder.

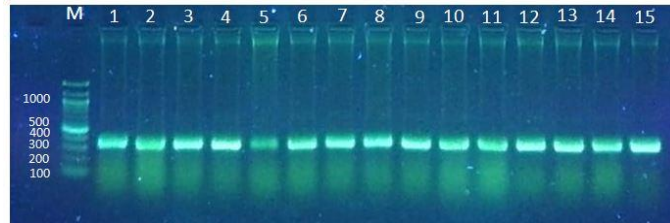
3- زوج بادئات الجين *nad5* : اظهرت نتائج الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز بتركيز 1.5 % وجود حزم الجين *nad5* في جميع العينات المختبرة على مستوى واحد من عينات الدليل الحجمي 100 bp DNA ladder (الشكل 4).



الشكل (4) نتائج تفاعل زوج البادئات لجين *nad5* على هلام الأكاروز بتركيز 1.5%.

عينات الموصل (1) برحي (2) خستاوي (3) زهدي (4) بريم (5) خضراوي ، عينات بغداد (6) برحي (7) خستاوي (8) زهدي (9) بريم (10) خضراوي ، عينات البصرة (11) برحي (12) خستاوي (13) زهدي (14) بريم (15) خضراوي (M) DNA ladder.

4- زوج بادئات الجين *rps3* : أظهرت نتائج الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز بتركيز 1.5 % وجود حزم الجين *rps3* في جميع العينات المختبرة على مستوى واحد من عينات الدليل الحجمي 100 bp DNA ladder (الشكل 5).



الشكل (5) نتائج تفاعل زوج البادئات لجين *rps3* على هلام الأكاروز بتركيز 1.5%.

عينات الموصل (1) برحي (2) خستاوي (3) زهدي (4) بريم (5) خضراوي ، عينات بغداد (6) برحي (7) خستاوي (8) زهدي (9) بريم (10) خضراوي ، عينات البصرة (11) برحي (12) خستاوي (13) زهدي (14) بريم (15) خضراوي (M) DNA ladder.

رجوعها لأصل وراثي واحد حيث إنها تعطي صورة واضحة عن قوة الترابط بين أنواع الجنس المختلفة ذات الأصل الواحد ( Kuhn , 1993).

3-2- نتائج تحليل وتحديد التتابع النيوكليوتيدي للجينات التي تم اختيارها: من خلال ملاحظة نتائج تفاعلات البادئات المتخصصة فان هذه النتائج لم تتمكن من التمييز بين أصناف النخيل الداخلة في الدراسة لذلك تم اللجوء إلى الكشف عن التسلسل التتابعي للحامض النووي DNA sequencing من ثم مقارنته ومطابقته مع التسلسل القياسي Reference Sequence للجين نفسه والمسجل في الموقع العالمي NCBI للوقوف على مدى ثبوت الجين، وتحليل النتائج لغرض الكشف عن التباين إلى حد مستوى قاعدة نتروجينية واحدة،

واستخدمت هذه الجينات الأربعة في هذه الدراسة لغرض تحليل التباين الوراثي في مجموعة من أصناف النخيل العراقية حيث ظهرت الحزمة العامة main band في كل العينات المدروسة وبجسم جزئي 497 bp لجين *matR* و 451 bp لجين *cox3* و 488 bp لجين *nad5* و 339 bp لجين *rps3*. سبب ظهور الحزمة العامة عند ترحيل ناتج تفاعل PCR وبجسم جزئي واحد هو عثور البادئ على الموقع المكمل له على شريط الدنا لجميع العينات المدروسة ( Devos and Gale 1992). من خلال نتائج تفاعلات specific primer ولأزواج البادئات الأربعة لم يظهر أي اختلاف أو تباين أشكال polymorphism لأي منطقة منها وإنما كانت بحجم واحد ولكل بادئ وفي جميع الأصناف، إن التشابه في الأحجام الجزئية يدل على

## المؤتمر الدولي الثاني والعلمي الرابع لكلية العلوم – جامعة تكريت / 1ج

والمميزة فقط تجنباً لحدوث أي أخطاء حتى ولو كان في قاعدة نتروجينية واحدة (مهدي، 2016).

### 1- نتائج تحليل وتحديد التتابع النيوكليوتيدي لجين matR

A3\_AF  
Sequence ID: Query\_45191 Length: 403 Number of Matches: 1  
Range 1: 1 to 403

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Frame
745 bits(403)	0.0()	403/403(100%)	0/403(0%)	Plus/Plus	
CDS:maturase (mitoch Query Sbjct	491 560165	S L Y T P A G R K A A G E G G G H W A G TCATTGTATACTCCCGCGGTCCGGAAGCGCGGGGGAAGAGGGGACACTGGCGGGGA			560224 60
CDS:maturase (mitoch Query Sbjct	511 560225	S F S S E E F P I Q I E A P I K K I L R R TCFTTTCAGCAGCGAATCCCCATACAGATAGAGGCGCCTATCAAAAAGATACTCCGAAAG			560284 120
CDS:maturase (mitoch Query Sbjct	531 560285	L R D R G L I S R R R P R P I H V A S L CTTCGGATCGAGGTCTATTAGCCGAAGAAGACCAGCCCAATCCACGTGGCTCTTTG			560344 180
CDS:maturase (mitoch Query Sbjct	551 560345	T N V S D G D I V N R S A G I A I S P L ACGAAGTCAGCGACGAGACATAGTAAATCGTCCGCGGGCATCGCAATAAGCTCTCTG			560404 240
CDS:maturase (mitoch Query Sbjct	571 560405	S Y V R C R D N L Y Q V R T I V D H Q I TCCTACTACAGGTGCGCGCAACCTTTACCAAGTCCGAACATTGTCGACCACCAAGATC			560464 300
CDS:maturase (mitoch Query Sbjct	591 560465	R W S A I F T P A H K H K S S A R N I I CGCTGGTCCGCTATATTACCCCAAGCCACAGCACAAATCTTCGGCGGGAATAAATC			560524 360
CDS:maturase (mitoch Query Sbjct	611 560525	Q K V P K D S N I V N Q E G CAAAAAGTACCCCAAGACTCAAAATAGTCAATCAAGAAGGTG			560567 403

الشكل (6) اصطفاف alignment تتابع القواعد النتروجينية من جين matR Forward في صف خضراوي الموصل (3) وتتابع الجين القياسي YP\_005090392.1 .

جدول (3) مطابقة نتائج التسلسل التتابعي للجين matR للأصناف

الداخلة في الدراسة مع التسلسل القياسي لهذا الجين

المدى مطابقتها للجين القياسي	البداى	الصف	ت
مطابق 100%	Forward Reverse	برحي الموصل	1
مطابق 100%	Forward Reverse	خستاي الموصل	2
مطابق 100%	Forward Reverse	خضراوي الموصل	3
مطابق 100%	Forward Reverse	برحي بغداد	4
مطابق 100%	Forward Reverse	خستاي بغداد	5
مطابق 100%	Forward Reverse	خضراوي بغداد	6
مطابق 100%	Forward Reverse	برحي البصرة	7
مطابق 100%	Forward Reverse	خستاي البصرة	8
مطابق 100%	Forward Reverse	خضراوي البصرة	9

### 2- نتائج تحليل وتحديد التتابع النيوكليوتيدي لجين cox3

B2\_BF  
Sequence ID: Query\_50510 Length: 328 Number of Matches: 1  
Range 1: 1 to 328

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Frame
551 bits(298)	4e-100()	318/328(97%)	0/328(0%)	Plus/Plus	
CDS:cytochrome c ox1 Query Sbjct	103 309	P R E I P F L N T P I L P S S G A A V T CCTCGGGAAATCCCTTTTCTTAATACCCCTATTCCCTTCATCCGGAGCTGCCGTAAC			368 60
CDS:cytochrome c ox1 Query Sbjct	123 369	W A H H A I L A G K E K R A V Y A L V A TGGGCTCATCATGCTATACTCGCGGGGAAGGAAAAACRAGCAGTTTACGCTTTAGTAGCT			428 120
CDS:cytochrome c ox1 Query Sbjct	143 429	T V S L A L V S T G F Q G M E V Y Q A P ACCGTTTCACTGGCTCTAGTATCCACTGGCTTTCAAGGAAATGGAATATTACCAAGCACCC			488 180
CDS:cytochrome c ox1 Query Sbjct	163 489	S T I S D S I V G S T F F S A T G F H G TCCACTATTTAGATAGTATTTATGGTTCTACCTTTTCTCAGCAACTGGCTTTTATGGT			548 240
CDS:cytochrome c ox1 Query Sbjct	183 549	F H V I I G T L F L I I C G I R Q Y L G TTTCATGTGATTATAGGTACTCTTTTCTGATCATAGTGGTATTCGCCAATATCTTGGT			608 300
CDS:cytochrome c ox1 Query Sbjct	203 609	H L T K E H H V G CATCTGACCAAGGAGCATCACGTTGGCT			636 328

الشكل (7) اصطفاف alignment تتابع القواعد النتروجينية من جين cox3 Forward في صف خستاي الموصل (2) وتتابع الجين القياسي YP\_005090382.1 .

صنف خستاي الموصل، وعند مقارنة نتائج التسلسل التتابعي للجين cox3 للأصناف الداخلة في الدراسة مع التسلسل التتابعي القياسي

اختيرت نتائج تضاعف مناطق لثلاث جينات matR و cox3 و nad5 من ثلاثة أصناف نخيل التمر لثلاث محافظات عراقية وهي الموصل وبغداد والبصرة. إن بداية ونهاية التسلسل التتابعي لأي قطعة مدروسة بواسطة جهاز التحليل الوراثي تكون غير واضحة ومشوشة المعالم لذلك يستغنى عن بعض التسلسلات وتقرأ التسلسلات الواضحة

عند دراسة نتائج تحليل تتابعات القواعد النتروجينية وتحليلها باستخدام موقع المركز الوطني لمعلومات التقانة الإحيائية الأمريكي NCBI لوحظ انه وجود تشابه كبير جدا في تتابعات الجين matR بين أصناف نخيل التمر المدروسة وصل إلى I أي إن تسلسل قواعد هذا الجين في المناطق المدروسة متشابه بنسبة 100% ، وعند مقارنة نتائج التسلسل التتابعي للجين matR للأصناف الداخلة في الدراسة مع التسلسل التتابعي القياسي لهذا الجين المنشور في موقع NCBI نو رقم المدخل YP\_005090392.1 ، وكانت نسبة التماثل 100% في جميع الأصناف المدروسة كما موضح في الجدول (3) .

عند دراسة نتائج تحليل تتابعات القواعد النتروجينية لوحظ إن تسلسل قواعد هذا الجين في المناطق المدروسة متشابه بنسبة 100% عدا

احتوى هذا الجين على 10 طفرات من نوع الاستبدال (Transition أو Transversion) في صنف خستاوي الموصل، الأولى في الموقع 406 حيث استبدلت القاعدة الكوانين G بالقاعدة الأدينين A، والثانية في الموقع 412 حيث استبدلت القاعدة الثايمين T بالقاعدة الكوانين G، والثالثة في الموقع 448 حيث استبدلت القاعدة الثايمين T بالقاعدة الكوانين G، والرابعة في الموقع 564 حيث استبدلت القاعدة الكوانين G بالقاعدة الأدينين A، والخامسة في الموقع 587 حيث استبدلت القاعدة الثايمين T بالقاعدة الكوانين G، السادسة في الموقع 598 حيث استبدلت القاعدة الأدينين A بالقاعدة الكوانين G، السابعة في الموقع 613 حيث استبدلت القاعدة الثايمين T بالقاعدة الأدينين A، الثامنة في الموقع 618 حيث استبدلت القاعدة الأدينين A بالقاعدة السايروسين C، التاسعة في الموقع 619 حيث استبدلت القاعدة الأدينين A بالقاعدة السايروسين C، العاشرة في الموقع 624 حيث استبدلت القاعدة السايروسين C بالقاعدة الأدينين A، كما موضح في الجدول (5).

لهذا الجين المنشور في موقع NCBI ذو رقم المدخل YP\_005090382.1، وكانت نسبة التطابق 100% في جميع الأصناف المدروسة عدا صنف خستاوي الموصل للجين cox3 F كما موضح في الجدول (4).

الجدول (4) مطابقة نتائج التسلسل المتتابع للجين cox3 للأصناف الداخلة في

الدراسة مع التسلسل القياسي لهذا الجين

ت	الصنف	الباي	مدى مطابقته للجين القياسي
1	برحي الموصل	Forward Reverse	مطابق 100%
2	خستاوي الموصل	Forward Reverse	غير مطابق
3	خضراوي الموصل	Forward Reverse	مطابق 100%
4	برحي بغداد	Forward Reverse	مطابق 100%
5	خستاوي بغداد	Forward Reverse	مطابق 100%
6	خضراوي بغداد	Forward Reverse	مطابق 100%
7	برحي البصرة	Forward Reverse	مطابق 100%
8	خستاوي البصرة	Forward Reverse	مطابق 100%
9	خضراوي البصرة	Forward Reverse	مطابق 100%

جدول (5) الطفرات الحاصلة في صنف خستاوي الموصل لجين cox3 (Forward)

الموقع	التغير إلى	الأحماض الامينية	الموقع	النوع	التغير إلى	القواعد	ت
135	Q (glutamine)	R (arginine)	406	Transition	A	G	1
137	G (glycine)	V (valine)	412	Transversion	G	T	2
149	G (glycine)	V (valine)	448	Transversion	G	T	3
188	S (serine)	G (glycine)	564	Transition	A	G	4
195	W(tryptophan)	C (systeine)	587	Transversion	G	T	5
199	R (arginine)	Q(glutamine)	598	Transition	G	A	6
204	Q (glutamine)	L (leucine)	613	Transversion	A	T	7
206	P (proline)	K (lysine)	618	Transversion	C	A	8
206	P (proline)	K (lysine)	619	Transversion	C	A	9
208	N (asparagine)	H (histidine)	624	Transversion	A	C	10

تحتوي مركبات الجهاز التنفسي على مجموعات تعويضية وهي ضرورية لتفاعلات نقل الإلكترون، حيث إن المركب الرابع COX هو يحفز احد المركبات التنفسية يقوم في نقل الإلكترون من السيوكروم إلى المستقبل النهائي للإلكترونات، O<sub>2</sub>، في عملية تقترن بانتقال H<sup>+</sup> لإنتاج ATP (Jett and Leary, 2017)، بالإضافة إلى ذلك يجب ربط نشاط الجهاز التنفسي بالميتوكوندريا بمتطلبات الطاقة للخلايا وتلك التي تفرضها البيئة (Mansilla et al., 2018)، حيث تنخفض مستويات نسخ الجينات المشفرة لـ COX في النباتات بشدة تحت نقص الاكسجة ويتم استعادتها إلى المستويات الأولية عندما يتم إرجاع النباتات إلى الظروف الهوائية العادية، وهذا يشير أن التكون الحيوي لـ COX قد يكون أيضا تحت سيطرة توفر الأوكسجين في النباتات (Tsuji et al., 2000). قد يكون السبب هو إن هذا الصنف في تلك المنطقة قد تعرض إلى النقص في الاكسجة مما أدى إلى حدوث هذه الطفرات لكي يتكيف للعيش في تلك الظروف.

تحتوي مركبات الجهاز التنفسي على مجموعات تعويضية وهي ضرورية لتفاعلات نقل الإلكترون، حيث إن المركب الرابع COX هو يحفز احد المركبات التنفسية يقوم في نقل الإلكترون من السيوكروم إلى المستقبل النهائي للإلكترونات، O<sub>2</sub>، في عملية تقترن بانتقال H<sup>+</sup> لإنتاج ATP (Jett and Leary, 2017)، بالإضافة إلى ذلك يجب ربط نشاط الجهاز التنفسي بالميتوكوندريا بمتطلبات الطاقة للخلايا وتلك التي تفرضها البيئة (Mansilla et al., 2018)، حيث تنخفض مستويات نسخ الجينات المشفرة لـ COX في النباتات بشدة تحت نقص الاكسجة ويتم استعادتها إلى المستويات الأولية عندما يتم إرجاع النباتات إلى الظروف الهوائية العادية، وهذا يشير أن التكون الحيوي لـ COX قد يكون أيضا تحت سيطرة توفر الأوكسجين في النباتات (Tsuji et al., 2000). قد يكون السبب هو إن هذا الصنف في تلك المنطقة قد تعرض إلى النقص في الاكسجة مما أدى إلى حدوث هذه الطفرات لكي يتكيف للعيش في تلك الظروف.

قد يكون السبب عند زراعة هذا الصنف تم اخذ فسيلة من الأم الأصلية من منطقة زراعتها وزراعتها في منطقة أخرى من ثم اخذ فسيلة من الفسيلة التي أصبحت هي الأم وزراعتها في منطقة أخرى وبعدها اخذ فسيلة من الفسيلة الأخيرة التي أصبحت أم وهكذا أي لم تؤخذ الفسائل من الأم الأصلية الموجودة في منطقة زراعتها مما يعتقد في مرور الوقت حدثت طفرة لكي تتكيف للمعيشة في المنطقة المنقولة إليها.

3- نتائج تحليل وتحديد التتابع النيوكليوتيدي لجين nad5

C6\_CF  
Sequence ID: Query\_8738 Length: 382 Number of Matches: 1  
Range 1: 1 to 382

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Frame
706 bits(382)	0.0()	382/382(100%)	0/382(0%)	Plus/Plus	
CDS:NADH dehydrogena Query Sbjct	114 340 1	R L N A I T L I C I L L F I G A V G K S AGATTGAATGCCATAACTCTGATTGTATTTTACTTTTATTGGTCTGTTGGGAAATCT .....			399 60
CDS:NADH dehydrogena Query Sbjct	134 400 61	A Q I G S H T R S P D A M E G P T P V S GCACAGATAGGATCGCATACTCGGTCAACCGATGCAATGGAGGGTCCCACTCCAGTATCT .....			459 120
CDS:NADH dehydrogena Query Sbjct	154 460 121	A S I H A A T M V T A G V F M I A R C S GCTTCGATTCATGCAGCTACTATGGTCACAGCTGGCGTTTTCATGATAGCAAGGTGCTCC .....			519 180
CDS:NADH dehydrogena Query Sbjct	174 520 181	P L F E Y P P T A L I V I T S A G A M T CCTTTATTGAATACCCACCTACGGCTTGTATTACTTCTGCAGGAGCTATGACG .....			579 240
CDS:NADH dehydrogena Query Sbjct	194 580 241	S F L A A T T G I L Q N D L K R V I A Y TCATTCTTGGCGCAACCACTGGAATATTACAGAAGCATCAAAGAGGGTCAATAGCTTAT .....			639 300
CDS:NADH dehydrogena Query Sbjct	214 640 301	S T C S Q L G Y M I F A C G I S N Y S V TCAACTTCAGTCAATTAGGCTATATGATCTTTGCTTGGCGCATCTCTAACTATTGGTT .....			699 360
CDS:NADH dehydrogena Query Sbjct	234 700 361	S V F H L M N AGCGTCTTCACTTAATGAATC .....	721 382		

الشكل (8) اصطفاف alignment تتابع القواعد النروجينية من جين nad5 Forward في صنف خضراوي بغداد (6) وتتابع الجين القياسي . YP\_005090389.1

الميتوكوندريا النباتية ذات معدلات طفرة منخفضة جدا كما ذكر أنفا، ويعود السبب لاحتوائها على مسارات إصلاح فعالة على وجه الخصوص نظام إعادة التركيب المتماثل. الجدول (6) مطابقة نتائج التسلسل التتابعي للجين nad5 للأصناف الداخلة في

الدراسة مع التسلسل القياسي لهذا الجين

ت	المنصف	البداية	مدى مطابقته للجين القياسي
1	برحي الموصل	Forward Reverse	مطابق 100%
2	خستاي الموصل	Forward Reverse	مطابق 100%
3	خضراوي الموصل	Forward Reverse	مطابق 100%
4	برحي بغداد	Forward Reverse	مطابق 100%
5	خستاي بغداد	Forward Reverse	مطابق 100%
6	خضراوي بغداد	Forward Reverse	مطابق 100%
7	برحي البصرة	Forward Reverse	مطابق 100%
8	خستاي البصرة	Forward Reverse	مطابق 100%
9	خضراوي البصرة	Forward Reverse	مطابق 100%

عند دراسة نتائج تحليل تتابعات القواعد النروجينية وتحليلها لوحظ إن تسلسل قواعد هذا الجين في المناطق المدروسة متشابه بنسبة 100% ، عند مقارنة نتائج التسلسل التتابعي للجين nad5 للأصناف الداخلة في الدراسة مع التسلسل التتابعي القياسي لهذا الجين المنشور في موقع NCBI ذو رقم المدخل YP\_005090389.1 ، وكانت نسبة التوافق 100% في جميع الأصناف المدروسة كما موضح في الجدول (6) .

من خلال نتائج التتابعات النيوكليوتيدية للجينات الداخلة في الدراسة لم يظهر أي اختلاف أو تباين أشكال polymorphism لأي منطقة من مناطق الجينات الثلاثة في جميع الأصناف الداخلة في الدراسة عدا صنف خستاي الموصل لجين COX3 ، وان هذا التشابه يدل على رجوعها لأصل وراثي واحد ، وان منطقة الهدف كانت متوارثة بشكل دقيق دون تعرضها لأي نوع من أنواع الطفرات وبالتالي هذا يعني أنها ذات الخزين الوراثي ذو ثباتية عالية لا يتأثر بالظروف البيئية من تقلبات مناخية ومواقع جغرافية. هذه النتائج تؤكد بان جينومات

#### المصادر

- Al-Khayri, J.M., Jain, S.M., and Johnson, D.V. (2015). Date palm genetic resources and utilization : Volume 2 : Asia and Europe (Vol.2). Doi .org/ 10.1007/978-94-017-9707-8.
- Al-Shahib, W., and Marshall, R. J. (2003) . The fruit of the date palm: Its possible use as the best food for the future? International Journal of Food Sciences and Nutrition. 54(4), 247–259.
- Batley, J.(2015). Plant Genotyping Methods And Protocols. Springer New York Heidelberg Dordrecht London. DOI 10.1007/978-1-4939-1966-6.
- Briebe, L.G. (2019). Structure-function analysis reveals the singularity of plant mitochondrial DNA replication components: A mosaic and redundant system. Plants, 8(12). Doi.org/10.3390/plants8120533.

- إبراهيم، عاطف محمد ومحمد نظيف حجاج خليف (1998). نخلة النمر زراعتها ، رعايتها وإنتاجها في الوطن العربي . منشأة المعارف بالإسكندرية ، جمهورية مصر العربية.
- مهدي ، شيماء صباح.(2016). دراسة التنوع الوراثي لضروب مختلفة من الفلفل الحلو *Capsicum annum L.* الأسواق المحلية باستعمال بعض التقانات الوراثية الجزيئية . أطروحة دكتوراه. كلية التربية للعلوم الصرفة - ابن الهيثم ا جامعة بغداد.
- Alfaifi, S. A., Khan, M.A., Migdadi, H. M. Jakse, J., Ammar, M. H., El-Harty, E. H., Althamrah, M. I., Afzal, M., Javed, M. M., and Alghamdi, S. S.(2015). Analysis of ESTs from the date palm (*Phoenix dactylifera L.*) cv. Sukary, an elite variety. Plant OMICS, 8(5), 441–448.

of Molecular Sciences, 19(3). Doi.org /10.3390/ ijms 19030662.

▪ **Pfalz, J., and Pfannschmidt, T. (2013).** Essential nucleoid proteins in early chloroplast development. Trends in plant science, 18(4), 186-194.

▪ **Sabir JSM, Arasappan D, Bahieldin A, Abo-Aba S, and Bafeel S. (2014).** Whole Mitochondrial and Plastid Genome SNP Analysis of Nine Date Palm Cultivars Reveals Plastid Heteroplasmy and Close Phylogenetic Relationships among Cultivars. PLoS ONE 9(4): e94158. Doi :10.1371/journal.pone.0094158.

▪ **Sghaier-Hammami, B., Valledor, L., Drira, N., and Jorrin-Novo, J. V. (2009).** Proteomic analysis of the development and germination of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) zygotic embryos. Proteomics, 9(9), 2543–2554.

▪ **Shabana, H., Al-Ani, B., and Zaid, A. (2010).** On the status of chromosomes of the date palm (*Phoenix dactylifera* L.). In IV International Date Palm Conference 882 (pp. 253-268).

▪ **Siqueira, J. A., Hardoim, P., Ferreira, P. C. G., Nunes-Nesi, A., and Hemerly, A. S. (2018).** Unraveling Interfaces between Energy Metabolism and Cell Cycle in Plants. Trends in Plant Science, 23(8), 731–747.

▪ **Tsuji, H.; Nakazono, M.; Saisho, D.; Tsutsumi, N.; Hirai, A. (2000).** Transcript levels of the nuclear-encoded respiratory genes in rice decrease by oxygen deprivation: Evidence for involvement of calcium in expression of the alternative oxidase 1a gene. FEBS Lett. 471, 201–204.

▪ **Wang, W., Wu, Y., and Messing, J. (2012).** The Mitochondrial Genome of an Aquatic Plant, *Spirodela polyrhiza*. PLoS ONE, 7(10), 1–9. Doi.org / 10.1371 / journal .pone .0046747.

▪ **Wynn, E. L., and Christensen, A. C. (2019).** Repeats of unusual size in plant mitochondrial genomes: Identification, incidence and evolution. G3: Genes, Genomes, Genetics, 9(2), 549–559.

▪ **Zervas, A., Petersen, G., and Seberg , O. (2019).** Mitochondrial genome evolution in parasitic plants. BMC Evolutionary Biology, 19(1), 1–14. Doi .org/10.1186/s12862-019-1401-8.

▪ **Chevigny, N., Schatz-Daas, D., Lotfi, F., and Gualberto, J. M. (2020).** DNA repair and the stability of the plant mitochondrial genome. International Journal of Molecular Sciences, 21(1). Doi.org/ 10 .3390/ijms21010328.

▪ **Devos, K.M. and M.D. Gale.(1992).** The use of random amplified polymorphic DNA marers in wheat. Theo. and Appl.Genet.84:567-572.

▪ **Fang, Y., Wu, H., Zhang, T., Yang, M., Yin, Y., Pan, L., Yu, X., Zhang, X., Hu, S., Al-Mssallem, I. S., and Yu, J. (2012).** A complete sequence and transcriptomic analyses of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) mitochondrial genome. PLoS ONE. 7(5): e37164.

▪ **Huang, Q.X. ;Wang, X.C. ;Kong, H. ;Guo, Y.L. and Guo, A.P. (2013).** An efficient DNA isolation method for tropical plants. Afr. J. Bio. 12(19): 2727-2732.

▪ **International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI). (2005).** Descripteurs du Palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.). Institut International des Ressources Phytogenetiques, Rome, Italia.

▪ **Jaradat, A. A. (2014).** Synthesis and assessment of date palm genetic diversity studies. Emirates Journal of Food and Agriculture, 26(11), 934–952.

▪ **Jett, K.A.; Leary, S.C.( 2017).** Building the CuA site of cytochrome c oxidase : A complicated, redox -dependent process driven by a surprisingly large complement of accessory proteins. J. Biol. Chem.

▪ **Kozik, A., Rowan, B. A., Lavelle, D., Berke, L., Eric Schranz, M., Michelmore, R. W., and Christensen, A. C. (2019).** The alternative reality of plant mitochondrial DNA: One ring does not rule them all. PLoS Genetics, 15(8), 1–30.

▪ **Kuhn,V. (1993).**Chenopodiaceae . In kubitzi , k.,Rohwer,J.G.,Bittrich .V.,(Eds): The Families and genera of Vascular plants . 2,pp 253-281-Berlin , Heidelberg : Springer .

▪ **Malek JA. (2010).** Next generation DNA sequencing applied to the date palm tree (*Phoenix dactylifera*). Acta Hort. 882: 249–252.

▪ **Mansilla, N., Racca, S., Gras, D. E., Gonzalez, D. H., and Welchen, E. (2018).** The complexity of mitochondrial complex iv: An update of cytochrome c oxidase biogenesis in plants. International Journal

## Genetic variation and early diagnosis of palm varieties (*Phoenix dactylifera* L.) based on mtDNA

### Abstract

This study was conducted on five varieties of Iraqi date palm cultivated in three governorates of Mosul (Barahi, Khostawi, Zuhdi, Brim, Khadrawi) and from Baghdad and Basrah the same varieties for the purpose of analyzing the genetic variation between the same varieties with different governorate and the variation between each variety with other varieties at the level of Mitochondrial DNA, using four specialized primer pairs to identify the matR gene, cox3 gene, and rps3 gene, as well as the nad5 gene on mitochondrial DNA, where after PCR interactions all samples produced a general molecular size package of 497 matR base pairs and 451 base pairs for the cox3 gene. And 339 base pairs for the rps3 gene and 488 base pairs for the nad5 gene. For the purpose of achieving the desired goal, three genes were selected, namely matR, cox3 and nad5, for three varieties, which are Barhi, Khestawi and Khadrawi for the three governorates, and the nucleotide sequence of these genes was determined. The study reached 1, meaning that the sequence of bases of these genes in the studied areas is similar by 100%, except for the cox3 class, the presence of some substitution mutations, the results of the nucleotide sequence of the three genes in the studied varieties were compared with the standard sequence Refseq of the same gene and the match rate was 100% Between these classes and the standard sequence, except for the cox3 class, there were 10 substitution mutations .