تحفيز التغاير الوراثي في نبات النارنج
(*Citrus aurantium* L.)

باستخدام تقانة المزارع النسيجية

أطروحة مقدمة من

سهام عبد الرزاق سالم الجبوري

الى مجلس كلية العلوم – جامعة بابل وهي جزء من متطلبات نيل درجة دكتوراه فلسفة في علوم الحياة / نبات

بإشراف

أ.د. عبد الله إبراهيم شهيد أ.د. كاظم محمد إبراهيم

١٤٢٨ ٢٠٠٧

In Vitro Induction of Genetic Variation in Sour Orange *(Citrus aurantium* L.*)* Using Tissue Culture Technique

A Thesis

Submitted By

Syham Abd Al- Razzaq Salim Al-Juboury

To the Council of the College of Science,

University of Babylon

In Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Doctor of Philosophy

in Biology / Botany

Supervised by

Prof. Dr. Abdullah Ibrahim Shaheed ***Prof. Dr. Kadhim Mohammad Ibrahim***

١٤٢٨ ٢٠٠٧

بِسْمِ ٱللَّهِ ٱلرَّحْمَٰنِ ٱلرَّحِيمِ

اقْرَأْ وَرَبُّكَ الأَكْرَمُ (٣) الَّذِي عَلَّمَ بِالْقَلَمِ (٤) عَلَّمَ الإِنسَانَ مَا لَمْ يَعْلَمْ(٥)

بِسْمِ ٱللَّهِ ٱلرَّحْمَٰنِ ٱلرَّحِيمِ

توصية المشرفين

نشهد ان اعداد هذه الاطروحة قد جرى بإشرافنا في قسم علوم الحياة/ كلية العلوم/ جامعة بابل وهي جزء من متطلبات نيل درجة الدكتوراه فلسفة في علوم الحياة/ نبات/ زراعة انسجة.

التوقيع

اسم المشرف: د. عبد الله ابراهيم شهيد

المرتبة العلمية: استاذ

العنوان: كلية العلوم/ جامعة بابل

التاريخ: / /٢٠٠٧

التوقيع

اسم المشرف: د. كاظم محمد ابراهيم

المرتبة العلمية: استاذ

العنوان: كلية العلوم/ جامعة النهرين

التاريخ : / /٢٠٠٧

توصية رئيس قسم علوم الحياة

استنادا الى توصية الاستاذين المشرفين في اعلاه ارشح هذه الاطروحة الى لجنة المناقشة لدراستها وبيان الراي فيها.

التوقيع:

الاسم: د. كريم حميد رشيد

المرتبة العلمية: أستاذ

العنوان: كلية العلوم/ جامعة بابل

التاريخ: / /٢٠٠٧

قرار لجنة المناقشة

نشهد نحن اعضاء لجنة المناقشة باطلاعنا على هذه الاطروحة الموسومة (**تحفيز التغاير الوراثي في نبات النارنج (*Citrus aurantium* L.) باستخدام تقانة المزارع النسيجية**) وقد ناقشنا الطالبة في محتوياتها وفيما له علاقة بها وذلك بتاريخ / /٢٠٠٧ ووجدنا أنها جديرة بالقبول بدرجة ( ) لنيل درجة دكتوراه فلسفة في علوم الحياة/ نبات / زراعة انسجة.

التوقيع:
رئيس اللجنة: د. مؤيد أحمد يونس
المرتبة العلمية: أستاذ
العنوان: جامعة بغداد/كلية الزراعة
التاريخ: / /٢٠٠٧

التوقيع:
العضو: د. عبد عون هاشم
المرتبة العلمية: أستاذ
العنوان: جامعة كربلاء/ كلية التربية
التاريخ: / /٢٠٠٧

التوقيع:
العضو: د. محمد شهاب أحمد
المرتبة العلمية: أستاذ مساعد
العنوان: جامعة بغداد / كلية الزراعة
التاريخ: / /٢٠٠٧

التوقيع:
العضو: د. عبد الجاسم محيسن جاسم
المرتبة العلمية: أستاذ مساعد
العنوان: جامعة النهرين / مركز بحوث التقانة الإحيائية
التاريخ: / /٢٠٠٧

التوقيع:
العضو: د. محسن جلاب عباس
المرتبة العلمية: أستاذ مساعد
العنوان: جامعة الكوفة / كلية العلوم
التاريخ: / /٢٠٠٧

التوقيع:
العضو (المشرف): د. كاظم محمد ابراهيم
المرتبة العلمية: أستاذ
العنوان: جامعة النهرين / كلية العلوم
التاريخ: / /٢٠٠٧

التوقيع:
العضو (المشرف): د. عبد الله ابراهيم شهيد
المرتبة العلمية: أستاذ مساعد
العنوان: جامعة بابل / كلية العلوم
التاريخ: / /٢٠٠٧

مصادقة عميد كلية العلوم

أصادق على ما جاء في قرار اللجنة اعلاه

التوقيع :

الاسم : د. عودة مزعل ياسر

المرتبة العلمية : أستاذ

العنوان : كلية العلوم _ العميد

التاريخ : / /٢٠٠٧

شكر وتقدير

الحمد لله رب العالمين والصلاة والسلام على نبينا الكريم محمد واله الطيبين الطاهرين.

يسعدني ان اتقدم بوافر الشكر والامتنان والتقدير الى استاذي الفاضلين الدكتور كاظم محمد ابراهيم والدكتور عبد الله ابراهيم شهيد لاشرافهما على اطروحتي و على متابعتهما لي وتوجيهاتهما القيمة والسديدة من أجل الخروج بهذه الاطروحة على احسن حال.

شكري وتقديري الى رئيس وأعضاء الهيئة التدريسية في قسم علوم الحياة وعمادة كلية العلوم في جامعة بابل لاتاحتهم الفرصة امامي لاكمال دراستي. كما اتقدم بجزيل شكري الى قسم التقنيات الحياتية النباتية في الكلية التقنية - المسيب- وقسم التقانة الاحيائية- كلية العلوم- جامعة النهرين ومنتسبيهما لتسهيل مهمتي في انجاز البحث في مختبرات زراعة الانسجة لديهما.

واقدم شكري الى السيدين احمد فاضل وبلال كامل في مركز بحوث التقانة الاحيائية- جامعة النهرين لمساعدتهما لي في تقدير عينات البروتين و DNA. كما اقدم شكري للدكتور هادي مزعل- كلية العلوم للبنات- جامعة بابل لمساعدته في اجراء التحليلات الاحصائية لنتائج البحث.شكري واعتزازي لزميلاتي وزملائي من طلبة الماجستير والدكتوراة الذين لم يقصروا في مساعدتي لانجاز هذا البحث.

وأقدم شكري الى كادر مكتب الرتاج لمساعدته في طباعة وترتيب الاطروحة لاظهارها بأحسن صورة .

ويطيب لي ان اقدم شكري وحبي وتقديري الى اسرتي العزيزة واخص بالذكر والدتي الحبيبة وسندي اخي العزيز وخالي الغالي علي حمود الذين صبروا وتحملوا معي المشاق والصعاب طيلة مدة انجاز البحث.

واتوجه بشكري لكل من مد يد العون او دعا لي بالتوفيق.

والله ولي التوفيق

سهام عبد الرزاق سالم

Summary

The aim of the current study was to induce variation in sour orange (*Citrus aurantium* L.) *in vitro* using the chemical mutagens , (sodium azide and colchicines) .Two approaches were used . The first was to induce lateral shoots on nodes excised from growing seedlings , then rooting and acclimatization . The second was to initiate callus from different seedlings explants , then induction of embryogenesis . Different combinations of auxins , cytokinins and gibberillines were examined .

Explants were surface sterilized with NaOCl at ١.٥ % for ١٥ min . after immersion for ٣٠ sec . with absolute ethanol . Explants were rinsed with sterilized distilled water , then cultured on MT nutrient medium .

Results showed that BA at ١.٥ mg /L induced lateral shoot formation . Including of $GA_٣$ at ١.٥ mg / L induced shoot elongation , while NAA had no effect on both shoot formation and elongation . Rooting was promoted on half strength MS medium supplemented with ١ mg/L NAA .

Explants with single nodes were either treated with ٠.٠٥ , ٠.١ , ٠.٥ or ١.٠ mM of sodium azide or with ٠.٠٥ , ٠.١ , ٠.٥ or ١.٠ % of colchicine for ٣٠,٦٠ or ٩٠ min .

There was a significant reduction in bud proliferation (%) , rooting , number and length of shoots . Similar pattern was recorded in number of initiated roots and length with increasing concentration of the mutagen compared with control . Phenotypic variation in leaf colour and shape was observed . Regenerated shoots were rooted for subsequent studies , after plantlets acclimatization .

Epicotyls showed a superiority over other explant sources in their response to callus induction reaching ٩٩.٢٥٪ . Both BA and NAA at ١.٥ mg/L significantly increased callus induction , fresh and dry weight compared with other combinations . Callus deteriorated after the fourth subculture on the same medium .

Calli treated with the two chemical mutagens for the above indicated time periods showed a significant decrease in callus survival (%) , mean fresh and dry weight particularly that grown on high concentrations (١.٠ mM sodium azide or ١.٠% colchicine) for the three studied periods .

Results showed that embryogenesis occurred in MT medium supplemented with BA at ١.٥ mg /L + NAA at ٠.١ mg/L + ME at ٥٠٠ mg/L . Embryogenesis decreased with increasing the levels of both mutagens and the period of exposure .

Callus induced from albino seedlings was mixed with that initiated from green seedlings . However, rapid deterioration occurred in the first type while the second continued in its growth .

Results of total protein analysis using electrophoresis for callus samples treated with both mutagens and leaves originated on lateral shoots (treated and non – treated) , showed differences in number of protein bands , location and their intensity on acrylamide gel.

Differences in molecular weights were also recorded compared with controls .

Results of PCR reactions using RAPD method for DNA samples taken from treated and untreated callus and leaves , revealed that differences in number of duplicated bands , location , intensity and their estimated molecular sizes were recorded .

الخلاصة

بهدف الحصول على التغايرات الوراثية في النارنج (*Citrus aurantium* L.) خارج الجسم الحي باستخدام المطفرين الكيمياويين ازايد الصوديوم والكولجيسين ، استعملت طريقتان رئيسيتان، شملت اولاهما تحفيز نشوء الافرع من البراعم الجانبية في العقد المستأصلة من البادرات النامية في التربة ومن ثم تجذيرها لتكوين نبيتات ملائمة للاقلمة. اما الطريقة الثانية فقد اعتمدت على استحثاث نشوء الكالس من أجزاء البادرات المختلفة ومن ثم تحفيز تكوين البراعم العرضية منه. وفي كلا الطريقتين تم اختبار توليفات مختلفة من السايتوكاينينات والاوكسينات والجبرلينات.

عقمت الاجزاء النباتية بمادة هايبوكلورات الصوديوم بتركيز ١.٥% لمدة ١٥ دقيقة بعد غمرها لمدة ٣٠ ثانية في الكحول الاثيلي المطلق (والذي كان مؤثرا في التخلص من مسببات التلوث) قبل زراعة الجزء النباتي على الوسط الغذائي MT.

اظهرت نتائج الطريقة الاولى تفوقا معنويا للتركيز ١.٥ ملغم/لتر من BA في تحفيز نشوء الافرع الجانبية. وان تجهيز GA_3 بتركيز ١.٥ ملغم/لتر معه في الوسط الغذائي MT كان محفزا لاستطالة الافرع النامية , وان اضافة NAA معهما الى الوسط لم يكن مؤثرا في تحفيز نشوء او استطالة الافرع.

ووجد ان افضل تجذير للافرع الناشئة حصل في الوسط الغذائي MS بنصف القوة والمجهز بـ ١ ملغم/لتر من NAA.

وعند معاملة العقد بازايد الصوديوم بالتراكيز (٠.٠٥ ، ٠.١ ، ٠.٥ أو ١.٠) ملي مولر والكولجيسين بالتراكيز (٠.٠٥ ، ٠.١ ، ٠.٥ أو ١.٠)% لمدة (٣٠ ، ٦٠ أو ٩٠) دقيقة ومقارنتها، لوحظ حصول انخفاض معنوي في النسب المئوية لتفتح البراعم وتجذير الافرع ومعدلات عدد وطول كل من الافرع والجذور الناتجة مع زيادة التركيز ومدة الغمر مقارنة بمعاملة السيطرة. وسجلت تغايرات في لون وشكل اوراق الافرع الناتجة. كما اجريت عملية الاقلمة للنبيتات التي تم تجذيرها لاجراء الدراسات المستقبلية عليها.

اظهرت نتائج الطريقة الثانية تفوقا معنويا للسويقة الجنينية العليا على بقية الاجزاء النباتية في استجابتها لتكوين الكالس (٩٩.٢٥%). كما تفوق التركيز ١.٥ ملغم/لتر من كل من BA و NAA معنويا في معدلات استحثاث الكالس والوزن الطري والجاف له مقارنة ببقية التوليفات لمنظمات النمو. ولوحظ تغير لون الكالس وتدهوره بعد اعادة زراعته للمرة الرابعة وعلى التوليفة المذكورة اعلاه نفسها .

غُمر الكالس المستحث بمحاليل التراكيز انفة الذكر من ازايد الصوديوم والكولجيسين وللمدد الزمنية نفسها واعادة زراعته على نفس الوسط الغذائي لاستحثاث وادامة الكالس ومقارنته مع ما ذكر اعلاه. لوحظ حصول انخفاض معنوي في النسب المئوية لبقاء الكالس حيا ومعدلات الوزن الطري والجاف له لاسيما في التراكيز العالية من المطفرين (١.٠ ملي مولر من ازايد الصوديوم و ١.٠% من الكولجيسين) ولجميع المدد الزمنية.

وبينت النتائج ان افضل وسط غذائي لتحفيز تكوين البراعم العرضية من الكالس هو MT المجهز بـ(ملغم/لتر) BA (١.٥) + NAA (٠.١) + مستخلص الشعير (ME) (٥٠٠). وقد انخفضت معدلات تكوين الاجنة من الكالس المعامل بالمطفرين الكيمياويين ولجميع التراكيز ومدد الغمر المذكورة انفا مقارنة بالسيطرة.

كما اظهرت نتائج عملية خلط الكالس الناتج من البادرات البيضاء مع المنتج من البادرات الخضراء تدهور الاول بصورة اسرع من الثاني مع استمرار نمو الاخير.

بينت نتائج تحليل البروتين الكلي باستخدام تقنية الهجرة الكهربائية على الهلام المتعدد الاكريل امايد (Polyacrylamide) لعينات الكالس واوراق الافرع المحفزة من البراعم الجانبية (المعاملة وغير المعاملة بازايد الصوديوم والكولجيسين) وجود اختلافات في عدد الحزم او مواقعها او شدة ظهورها على الهلام فضلا عن اختلاف الاوزان الجزيئية المقدرة للحزم البروتينية الظاهرة على الهلام بين تراكيز المواد المدروسة مقارنة بالسيطرة .

كما اظهرت نتائج تفاعل PCR باستخدام مؤشرات RAPD والترحيل على هلام الاكاروز لعينات DNA المعزولة من الكالس والاوراق اعلاه وباستعمال التراكيز للمواد المدروسة نفسها وجود اختلافات في عدد الحزم المتضاعفة او مواقعها او شدة تألقها او احجامها الجزيئية المقدرة.

قائمة المختصرات

A	Adenine
ABA	Abscisic Acid
ACO	Aconitase
AP-PCR	Arbitrary Primed Polymerase Chain Reaction
ATP	Adenosine Tri-Phosphate
BA	Benzyl Adenine
BAP	٦-Benzyl Amino Purine
Bp	Base Pair
B_6	Pyredoxine-HCl
C	Cytosine
$CaOCl_2$	Calcium Hypochlorite
CH	Casein Hydrolysate
CRD	Completely Randomized Design
CTAB	Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide
٢,٤-D	٢,٤-Dichlorophenoxy Acetic Acid

DAF	DNA Amplification Fingerprint
dATP	Deoxy Adenosine Tri-Phosphate
dCTP	Deoxy Cytidine Tri-Phosphate
dGTP	Deoxy Guanosine Tri-Phosphate
DNA	Deoxyribo Nucleic Acid
dTTP	Deoxy Thimidine Tri-Phosphate
EDTA	Ethylene Diamine Tetra Acetic acid
G	Guanine
GA_3	Gibberellic Acid
GOT	Glutamate Oxaloacetate Transaminase
IAA	Indole Acetic Acid
IBA	Indole Butyric Acid
IDH	Isocitrate DeHydrogenase
٢-ip	N^6-(٢-Isopentenyl Adenine)
KD	Kilo Dalton
Kin	N^6-Furfuryl Amino Purine
LAP	Lucine Amino Peptidase
LSD	Least Significant Differences
mRNA	Messenger RiboNucleic Acid
MDH	Malic Acid DeHydrogenase
ME	Malt Extract
٢-ME	٢- Mercapto Ethanol
MS	Murashige and Skoog Medium
MT	Murashige and Tucker Medium
NAA	α- Naphthalene Acetic Acid
NaOCl	Sodium Hypochlorite
PCR	Polymerase Chain Reaction
٦PG	٦-Phospho Gluconate Dehydrogenase
PG١	Phospho Glucose Isomerase
PGM	Phospho Glucose Mutase
RAPD	Randomly Amplified Polymorphic DNA
Rf	Rate of Flow
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RNA	Ribo Nucleic Acid
SDS	Sodium Dodecyl Sulphate
SOD	Super Oxide Dismutase
T	Thimine
TEMED	N,N,N,N-Tetra Methyl Ethylene Diamine
UV	Ultra Violet
Zeatin	٦-(٤-Hydroxy-٣-Methyl-٢-Butenyl)

قائمة المحتويات

الموضوع	رقم الصفحة
الخلاصة العربية	III-I
قائمة المختصرات	V-IV
قائمة المحتويات	VI
قائمة الجداول	X
قائمة الاشكال	XVI
قائمة الصور	XV
الفصل الاول- المقدمة واستعراض المراجع	**١-٣٠**
المقدمة	١-٣
استعراض المراجع	٤
زراعة الأنسجة	٤
مصدر الأجزاء النباتية	٤
تعقيم الأجزاء النباتية	٦
تأثير الاوكسينات	٨
تاثير السايتوكاينينات	٩
تاثير التداخل بين الاوكسينات والسايتوكاينينات	١١
تاثير حامض الجبرليك	١٢
استحثاث الكالس	١٣
الاجزاء النباتية المستخدمة في استحثاث الكالس	١٤
تاثير الاوكسينات والسايتوكاينينات في استحثاث الكالس	١٥
تاثير الوسط الزرعي	١٦
نشوء الاعضاء	١٦
مرحلة التجذير	١٩
مرحلة الاقلمة	٢٠
تحفيز التغاير الوراثي خارج الجسم الحي	٢١
تقنية الهجرة الكهربائية	٢٥
مؤشرات الدنا	٢٧
مؤشرات الدنا المعتمدة على التهجين	٢٧
المؤشرات المعتمدة على التفاعل التضاعفي لسلسلة الدنا	٢٨
التفاعل العشوائي لتسلسل الدنا	٢٨
بصمة الدنا المتضاعفة	٢٨
التفاعل العشوائي متعدد الاشكال لسلسلة الدنا	٢٨
الفصل الثاني- المواد وطرائق العمل	**٣١-٥٤**
مكونات الوسط الغذائي	٣١
التعقيم	٣٣
تعقيم الادوات	٣٣
تعقيم الاجزاء النباتية	٣٣

الموضوع	رقم الصفحة
انبات البذور	٣٣
تحفيز التفرعات الجانبية	٣٤
تحضير الاجزاء النباتية	٣٤
زراعة الاجزاء النباتية	٣٥
اختبار تاثير تراكيز مختلفة من الـ BA	٣٥
اختبار تاثير توليفة من الـ BA و NAA وGA_3 في تكوين التفرعات الجانبية	٣٥
مرحلة التجذير	٣٦
استحثاث الكالس	٣٦
اختيار الجزء النباتي وزراعته	٣٦
دراسة تاثير السايتوكاينين BA والاوكسين NAA في استحثاث الكالس	٣٦
ادامة الكالس	٣٧
استحثاث الكالس الابيض	٣٧
خلط الكالس	٣٨
تكوين الاعضاء من الكالس	٣٨
المحاليل الكيميائية	٣٩
ازايد الصوديوم	٣٩
الكولجيسين	٣٩
الأقلمة	٣٩
تقدير البروتينات الكلية	٤٠
استخلاص البروتينات من نسيج الأوراق والكالس	٤٢
الترحيل الكهربائي	٤٣
التصبيغ وإزالة الصبغة	٤٤
حساب قيم Rf للحزم البروتينية	٤٤
حساب الاوزان الجزيئية للبروتينات المرحلة	٤٤
تقدير الدنا	٤٥
عزل الدنا	٤٥
المحاليل المستخدمة	٤٥
توصيف الدنا	٤٨
قياس تركيز الدنا	٤٨
تقدير نقاوة الدنا	٤٩
تقدير الاحجام الجزيئية للدنا	٤٩
المحاليل المستخدمة	٤٩
طريقة تحضير هلام الاكاروز	٥٠
تحضير تفاعلات الـ RAPD	٥١
المحاليل والمواد المستخدمة	٥١
التحليل الاحصائي	٥٤
الفصل الثالث- النتائج والمناقشة	**٥٥-١٥٧**
التعقيم بمادة هايبوكلورات الصوديوم	٥٥
تحفيز التفرعات الجانبية	٥٧
تاثير الـ BA	٥٧
تاثير توليفة BA و NAA و GA_3 في النسبة المئوية لتفتح البراعم الجانبية ومعدل عدد الافرع واطوالها	٦١
تاثير NAA في النسبة المئوية لتجذير الافرع ومعدل عدد الجذور واطوالها	٦٥
تاثير ازايد الصوديوم	٦٨
تاثير الكولجيسين	٨٠
اقلمة النباتات	٩١
استحثاث الكالس من اجزاء البادرات	٩١
تاثير الجزء النباتي في استحثاث الكالس	٩١
تاثيرتوليفة BA و NAA في استحثاث وادامة الكالس	٩٥
استحثاث نشوء البراعم العرضية من الكالس	١٠٣
تاثير ازايد الصوديوم	١٠٧
تاثير الكولجيسين	١١٥

الموضوع	رقم الصفحة
خلط نسيجي الكالس	١٢٤
تحليل البروتين الكلي للاوراق والكالس	١٢٦
تحليل DNA الاوراق والكالس	١٤٢
الاستنتاجات	**١٥٨**
التوصيات	**١٦٠**
المصادر العربية	**١٦١**
المصادر الاجنبية	**١٦٣**
الخلاصة الانكليزية	**A-B**

قائمة الجداول

رقم الجدول	العنوان	رقم الصفحة
١.	مكونات الاوساط الغذائية وكمياتها المستعملة في الدراسة	٣٢
٢.	مكونات محلول استخلاص البروتينات	٤٢
٣.	تاثير تراكيز مختلفة من BA في النسبة المئوية لتفتح البراعم الجانبية ومعدل عدد وطول الافرع النامية بعد ثمانية اسابيع من زراعة العقد على الوسط الغذائي MT	٥٨
٤.	تاثير توليفة BA وNAA و GA_3 في النسبة المئوية لتفتح البراعم الجانبية ومعدل عدد وطول الافرع النامية بعد ثمانية اسابيع يوماً من زراعة العقد على الوسط الغذائي MT	٦٢
٥.	تاثير تراكيز مختلفة من NAA في النسبة المئوية لتجذير الافرع ومعدل عدد وطول الجذور بعد ثمانية أسابيع من زراعة الافرع على الوسط الغذائي MS بنصف القوة	٦٦
٦.	تاثير تراكيز ازايد الصوديوم ومدة الغمر في معدل عدد الافرع النامية بعد ثمانية أسابيع من زراعة العقد المعاملة بها على الوسط الغذائي MT المجهز بـ ١.٥ ملغم/لتر BA + ١.٥ ملغم/لتر GA_3	٧٠

٧.	تاثير تراكيز ازايد الصوديوم ومدة الغمر في معدل طول الافرع النامية (ملم) بعد ثمانية أسابيع من زراعة العقد المعاملة بها على الوسط الغذائي MT المجهز بـ ١.٥ ملغم/لتر BA + ١.٥ ملغم/لتر GA_3	٧٢
٨.	تـــاثير تراكيـــز ازايـــد الصـــوديوم ومـــدة الغمـــر فـــي معـــدل عـــدد الجـــذور بعـــد ثمانيـــة أســـابيع مـــن نقـــل الافـــرع الـــى الوســـط الغـــذائي MS بنصـــف القـــوة المجهز بـ ١.٠ ملغم/لتر NAA	٧٧
٩.	تـــاثير تراكيـــز ازايـــد الصـــوديوم ومـــدة الغمـــر فـــي معـــدل طـــول الجـــذور (ملـــم) بعـــد ثمانيـــة أســـابيع مـــن نقـــل الافـــرع الـــى الوســـط الغـــذائي MS بنصـــف القـــوة والمجهز بـ ١.٠ ملغم/لتر NAA	٧٩
١٠.	تاثير تراكيز الكولجيسين ومدة الغمر في معدل عدد الافرع بعد ثمانية أسابيع من زراعة العقد المعاملة بها على الوسط الغذائي MT المجهز بـ ١.٥ ملغم/لتر BA+ ١.٥ ملغم/لتر GA_3	٨٣
١١.	تاثير تراكيز الكولجيسين ومدة الغمر في معدل طول الافرع (ملم) بعد ثمانية أسابيع من زراعة العقد المعاملة بها على الوسط الغذائي MT المجهز بـ ١.٥ ملغم/لتر BA + ١.٥ ملغم/لترGA_3	٨٤
١٢.	تاثير تراكيز الكولجيسين ومدة الغمر في معدل عدد الجذور بعد ثمانية أسابيع من نقل الافرع الى الوسط الغذائي MS بنصف القوة والمجهز بـ ١.٠ملغم/لتر NAA	٨٨
١٣.	تاثير تراكيز الكولجيسين ومدة الغمر في معدل طول الجذور (ملم) بعد ثمانية أسابيع من نقل الافرع الى الوسط الغذائي MS بنصف القوة والمجهز بـ ١.٠ ملغم/لتر NAA	٨٩
١٤.	تأثير تراكيز مختلفة من BA وNAA (ملغم/لتر) والتداخل بينهما في معدل استحثاث الكالس من السويقة الجنينية العليا بعد ستة اسابيع من الزراعة على الوسط الغذائي MT	٩٦
١٥.	تأثير تراكيز مختلفة من BA وNAA والتداخل بينهما في معدل الوزن الطري (ملغم) للكالس المستحث من السويقة الجنينية العليا لبادرات النارنج بعد ستة اسابيع من الزراعة على الوسط الغذائي MT	٩٨
١٦.	تأثير تراكيز مختلفة من BA وNAA والتداخل بينهما في معدل الوزن الجاف (ملغم) للكالس المستحث من السويقة الجنينية العليا لبادرات النارنج بعد ستة اسابيع من الزراعة على الوسط الغذائي MT	١٠٠
١٧.	تأثير تراكيز مختلفة من BA وNAA والتداخل بينهما في معدل عدد البراعم العرضية من الكالس بعد نقله الى الوسط الغذائي MT المجهز بـ ٥٠٠ ملغم/لتر ME	١٠٤
١٨.	تأثير تراكيز أزايد الصوديوم ومدة الغمر والتداخل بينهما في معدل الوزن الطري (ملغم) للكالس بعد ستة أسابيع من الزراعةعلى الوسط الغذائي MT المجهز بـ ١.٥ ملغم/لتر BA+١.٥ ملغم/لتر NAA (الوزن الابتدائي للكالس ١٥٠ ملغم)	١٠٩
١٩.	تأثير تراكيز أزايد الصوديوم ومدة الغمر والتداخل بينهما في معدل الوزن الجاف (ملغم) للكالس بعد ستة اسابيع من الزراعة على الوسط الغذائي MT المجهز بـ ١.٥ ملغم/لتر BA+١.٥ ملغم/لتر NAA	١١٢
٢٠.	تأثير تراكيز أزايد الصوديوم ومدة الغمر والتداخل بينهما في معدل عدد البراعم العرضية المتكونة من الكالس المنقول إلى الوسط الغذائي MT المجهز بـ ١.٥ ملغم/لتر BA + ٠.١ ملغم/لتر NAA+٥٠٠ ملغم/لتر ME	١١٣

٢١.	تأثير تراكيز الكولجيسين ومدة الغمر والتداخل بينهما في معدل الوزن الطري (ملغم) للكالس بعد ستة اسابيع من الزراعة على الوسط الغذائي MT المجهز بـ ١.٥ ملغم/لتر BA+١.٥ ملغم/لتر NAA (الوزن الابتدائي للكالس ١٥٠ ملغم)	١١٨
٢٢.	تأثير تراكيز الكولجيسين ومدة الغمر والتداخل بينهما في معدل الوزن الجاف (ملغم) للكالس بعد ستة اسابيع من الزراعة على الوسط الغذائي MT المجهز بـ ١.٥ ملغم/لتر BA+١.٥ ملغم/لتر NAA	١٢١
٢٣.	تأثير تراكيز الكولجيسين ومدة الغمر والتداخل بينهما في معدل عدد البراعم العرضية المتكونة من الكالس المنقول الى الوسط الغذائي MT المجهز بـ ١.٥ ملغم/لتر BA+٠.١ ملغم/لتر NAA+٥٠٠ ملغم/لتر ME	١٢٢
٢٤.	قيم Rf وعدد الحزم ومواقع البروتين الكلي لعينات من أوراق النارنج المكثرة نسيجياً على الوسط الغذائي MT المجهز بـ ١.٥ ملغم/لتر BA + ١.٥ ملغم/لتر GA_3 والمعاملة بتراكيز مختلفة من ازايد الصوديوم ولمدة ٦٠ او ٩٠ دقيقة	١٢٧
٢٥.	قيم Rf وعدد الحزم ومواقع البروتين الكلي لعينات من أوراق النارنج المكثرة نسيجياً على الوسط الغذائي MT المجهز بـ ١.٥ ملغم/لتر BA + ١.٥ ملغم/لتر GA_3 والمعاملة بتراكيز مختلفة من الكولجيسين ولمدد غمر مختلفة	١٢٩
٢٦.	قيم Rf وعدد الحزم ومواقع البروتين الكلي لمعاملات السيطرة والتراكيز المختلفة من أزايد الصوديوم والكولجيسين لكالس النارنج النامي على الوسط الغذائي MT المجهز بـ ١.٥ ملغم/لتر BA + ١.٥ ملغم/لتر NAA	١٣٣
٢٧.	عدد الحزم والمسافة المقطوعة والوزن الجزيئي وقيم Rf للبروتينات القياسية الأربعة المرحّلة	١٣٥
٢٨.	عدد الحزم والمسافة المقطوعة والوزن الجزيئي المقدّر وقيم Rf لمعاملات السيطرة وتراكيز أزايد الصوديوم المختلفة لأوراق الافرع الناتجة من الزراعة النسيجية والمنماة على الوسط الغذائي MT المجهز بـ ١.٥ ملغم/لتر BA + ١.٥ ملغم/لتر GA_3	١٣٦
٢٩.	عدد الحزم والمسافة المقطوعة والوزن الجزيئي المقدّر وقيم Rf لمعاملات السيطرة وتراكيز الكولجيسين المختلفة لأوراق الافرع الناتجة من الزراعة النسيجية والمنماة على الوسط الغذائي MT المجهز بـ ١.٥ ملغم/لتر BA + ١.٥ ملغم/لتر GA_3	١٣٨
٣٠.	عدد الحزم والمسافة المقطوعة والوزن الجزيئي المقدّر وقيم Rf لمعاملات السيطرة وتراكيز أزايد الصوديوم والكولجيسين المختلفة للكالس النامي على الوسط الغذائي MT المجهز بـ ١.٥ ملغم/لتر BA + ١.٥ ملغم/لتر NAA	١٤٠
٣١.	تركيز الـ DNA المعزول ودرجة نقاوته لمعاملات السيطرة وتراكيز ازايد الصوديوم والكولجيسين المختلفة لأوراق الأفرع الناتجة من الزراعة النسيجية والمنماة على الوسط الغذائي MT المجهز بـ ١.٥ ملغم/لتر BA+١.٥ ملغم/لتر GA_3	١٤٣
٣٢.	تركيز الـ DNA المعزول ودرجة نقاوته لمعاملات السيطرة وتراكيز ازايد الصوديوم والكولجيسين المختلفة للكالس النامي على الوسط الغذائي MT المجهز بـ ١.٥ ملغم/لتر BA+١.٥ ملغم/لتر NAA	١٤٤
٣٣.	عدد الحزم والمسافة المقطوعة والحجم الجزيئي لدليل DNA الحجمي القياسي المرّحل (DNA ladder)	١٤٩
٣٤.	عدد الحزم الناتجة وشدة تألقها والمسافة المقطوعة والحجم الجزيئي المقدّر باستخدام البادئ OPH.٠٤ مع عينات السيطرة وتراكيز أزايد الصوديوم والكولجيسين المختلفة لاوراق الافرع الناتجة من الزراعة النسيجية والمنماة على الوسط الغذائي MT المجهز بـ ١.٥ ملغم/لتر BA + ١.٥ ملغم/لتر GA_3	١٥١

٣٥.	عدد الحزم الناتجة وشدة تألقها والمسافة المقطوعة والحجم الجزيئي المقدّر باستخدام البادئ ٠٤ . OPH مع عينات السيطرة وتراكيز أزايد الصوديوم والكولجيسين المختلفة للكالس النامي على الوسط الغذائي MT المجهز بـ ١.٥ ملغم/لتر BA + ١.٥ ملغم/لتر NAA	١٥٣

قائمة الإشكال

رقم الشكل	العنوان	رقم الصفحة
١.	المنحنى القياسي للبروتينات القياسية المرحلة	٤٥
٢.	تأثير تراكيز مختلفة من هايبوكلورات الصوديوم (%) بعد غمرها بالكحول الاثيلي المطلق لمدة ٣٠ ثانية في النسبة المئوية للتلوث لبذور وأجزاء بادرات النارنج بعد اسبوع من الزراعة	٥٦
٣.	تأثير تراكيز مختلفة من أزايد الصوديوم (ملي مولر) ومدة الغمر (دقيقة) في النسبة المئوية لتفتح البراعم الجانبية بعد ثمانية أسابيع من الزراعة على الوسط الغذائي MT المجهز بـ ١.٥ ملغم/لتر BA+١.٥ ملغم/لتر GA_3	٦٩
٤.	تأثير تراكيز مختلفة من أزايد الصوديوم (ملي مولر) ومدة الغمر (دقيقة) في النسبة المئوية لتجذير الأفرع بعد ثمانية أسابيع من الزراعة على الوسط الغذائي MS بنصف القوة المجهز بـ ١.٠ ملغم/لتر NAA	٧٦
٥.	تأثير تراكيز مختلفة من الكولجيسين (%) ومدة الغمر (دقيقة) في النسبة المئوية لتفتح البراعم الجانبية على التفتح بعد ثمانية أسابيع من الزراعة على الوسط الغذائي MT المجهز بـ ١.٥ ملغم/لتر BA + ١.٥ ملغم/لتر GA_3	٨١
٦.	تأثير تراكيز الكولجيسين (%) ومدة الغمر (دقيقة) في النسبة المئوية لتجذير الأفرع بعد ثمانية أسابيع من الزراعة على الوسط الغذائي MS بنصف القوة المجهز بـ ١.٠ ملغم/لتر NAA	٨٧
٧.	النسبة المئوية لاستجابة الأجزاء النباتية المختلفة من بادرات النارنج على تكوين الكالس بعد ستة أسابيع من زراعتها على الوسط الغذائي MT المجهز بتراكيز مختلفة من BA و NAA (ملغم/لتر)	٩٢
٨.	النسبة المئوية لبقاء الكالس بعد ستة اسابيع من كل إعادة زراعة على الوسط الغذائي MT المجهز بـ ١.٥ ملغم/لتر BA+١.٥ ملغم/لتر NAA	١٠١
٩.	تأثير تراكيز مختلفة من أزايد الصوديوم (ملي مولر) ومدة الغمر (دقيقة) والتداخل بينهما في النسبة المئوية لبقاء الكالس المزروع على الوسط الغذائي MT المجهز بـ ١.٥ ملغم/لتر BA + ١.٥ ملغم/لتر NAA	١٠٨
١٠.	تأثير تراكيز الكولجيسين (%) ومدة الغمر (دقيقة) والتداخل بينهما في النسبة المئوية لبقاء الكالس المزروع على الوسط الغذائي MT المجهز بـ ١.٥ ملغم/لتر BA + ١.٥ ملغم/لتر NAA	١١٧

قائمة الصور

رقم الصورة	العنوان	رقم الصفحة
١.	تاثير BA في تفتح البراعم الجانبية من العقد المستاصلة من بادرات النارنج بعمر ٤-٦ اشهر	٦٠
٢.	ظهور نموات مشوهة مع كالس في مناطق القطع من العقد وظهور افرع قصيرة من نفس الكالس بعد ثمانية أسابيع من الزراعة على الوسط الغذائي MT المجهز بالتوليفة ١.٥ ملغم/لتر BA +٠.٥ ملغم/لتر NAA + ١.٥ ملغم/لتر GA٣	٦٣
٣.	استطالة اكثر من فرع واحد من منطقة البرعم الواحد في العقد المستاصلة من بادرات النارنج بعمر ٤-٦ اشهر بعد ثمانية أسابيع من الزراعة على الوسط الغذائي MT المجهز بـ ١.٥ ملغم/لتر BA + ١.٥ ملغم/لتر GA٣	٦٤
٤.	تجذير الافرع بعد ثمانية أسابيع من الزراعة على الوسط الغذائي MS بنصف القوة المجهز بتراكيز مختلفة من NAA	٦٧
٥.	تكوين الافرع الجانبية من العقد المعاملة بالتركيز ٠.٠٥ ملي مولر من ازايد الصوديوم بعد ثمانية أسابيع من الزراعة على الوسط الغذائي MT المجهز بـ١.٥ ملغم/لتر BA + ١.٥ ملغم/لتر GA٣	٧٣

٦.	حدوث طفرات كلوروفيلية في اوراق الافرع المحفزة من العقد المعاملة بالتركيز ٠.٥ ملي مولر من ازايد الصوديوم بعد ثمانية أسابيع من الزراعة على الوسط الغذائي MT المجهز بـ ١.٥ ملغم/لتر BA + ١.٥ ملغم/لتر GA٣	٧٤
٧.	نمو براعم بيضاء اللون مع اخرى خضراء من العقد المعاملة بالتركيز ١.٠ملي مولر من ازايد الصوديوم لمدة ٦٠ دقيقة والنامية على الوسط الغذائي MT المجهز بـ ١.٥ ملغم/لتر BA + ١.٥ ملغم/لتر GA٣	٧٤
٨.	تجذير الافرع المحفزة من العقد المعاملة بالتركيز ١.٠ ملي مولر لمدة ٩٠ دقيقة من ازايد الصوديوم بعد ثمانية أسابيع من الزراعة على الوسط الغذائي MS بنصف القوة المجهز بـ ١.٠ ملغم/لتر NAA	٧٨
٩.	حدوث طفرات كلوروفيلية في اوراق الافرع المحفزة من العقد المعاملة بالكولجيسين بتركيز ٠.٠٥% لمدة ٩٠ دقيقة بعد ثمانية أسابيع من الزراعة على الوسط الغذائي MT المجهز بـ ١.٥ ملغم/لتر BA + ١.٥ ملغم/لتر GA_3	٨٥
١٠.	عدم تفتح البراعم الجانبية بعد ثمانية أسابيع من الزراعة على الوسط الغذائي MT المجهز بـ ١.٥ ملغم/لتر BA + ١.٥ ملغم/لتر GA٣	٨٥
١١.	ظهور الكالس على الاجزاء المختلفة لبادرات النارنج بعد ستة أسابيع من زراعتها على الوسط الغذائي MT المجهز بتراكيز مختلفة من BA و NAA	٩٤
١٢.	المقياس النظري لتكوين الكالس من السويقة الجنينية العليا بعد ستة اسابيع من الزراعة على الوسط الغذائي MT المجهز بتراكيز مختلفة من BA و NAA	٩٧
١٣.	نشوء البراعم العرضية من الكالس مع ظهور الجذور بعد ثمانية أسابيع من الزراعة على الوسط الغذائي MT المجهز بـ ٠.٥ ملغم/لتر BA + ١.٠ ملغم/لتر NAA + ٥٠٠ ملغم/ لتر ME	١٠٥
١٤.	نشوء البراعم العرضية من الكالس المزروع على الوسط الغذائي MT المجهز بتراكيز مختلفة من BA و NAA و ME	١٠٥
١٥.	نمو البراعم الى أفرع بعد ثمانية أسابيع من نقل الكالس الى الوسط الغذائي MT المجهز بـ ١.٥ ملغم/لتر BA + ٠.١ ملغم/لتر NAA +١.٥ ملغم/لتر GA_3 + ٥٠٠ ملغم/لتر ME	١٠٦
١٦.	تأثير المعاملة بأزايد الصوديوم في بقاء الكالس بعد ستة اسابيع من الزراعة على الوسط الغذائي MT المجهز بـ ١.٥ ملغم/لتر BA + ١.٥ ملغم/لتر NAA	١١٠
١٧.	ضعف تكون البراعم العرضية من الكالس المعامل بازايد الصوديوم بتركيز ٠.٠٥ ملي مولر لمدة ٩٠ دقيقة بعد اربعة أشهر من النقل الى وسط تكوين البراعم العرضية MT المجهز بـ ١.٥ ملغم/لتر BA + ٠.١ ملغم/لتر NAA + ١.٥ ملغم/لتر GA_3 +٥٠٠ ملغم/لتر ME	١١٤
١٨.	كالس معامل بالكولجيسين بتركيز ١.٠% لمدة ٦٠ دقيقة بعد ستة اسابيع من الزراعة على الوسط الغذائي MT المجهز بـ ١.٥ ملغم/لتر BA + ١.٥ ملغم/لتر NAA	١١٩
١٩.	نشوء اوراق فاقدة للسويق من غير افرع بعد اربعة اشهر من نقل الكالس المعامل بالكولجيسين بتركيز ٠.٠٥% لمدة ٦٠ دقيقة الى وسط تكوين البراعم العرضية MT المجهز بـ ١.٥ ملغم/لتر BA + ٠.١ ملغم/لتر NAA + ١.٥ ملغم/لتر GA_3 + ٥٠٠ ملغم/لتر ME	١٢٣

٢٠.	محاولة الخلط بين الكالس الاخضر (الاعلى) مع الكالس الابيض (الاسفل) بعد ستة اسابيع من نقلهما الى وسط تكوين البراعم العرضية MT المجهز بـ ١.٥ ملغم/لتر BA + ٠.١ ملغم/لتر NAA + ١.٥ ملغم/لتر GA_3 + ٥٠٠ ملغم/لتر ME	١٢٥
٢١.	البروتينات المرحلة لمعاملات ازايد الصوديوم المختلفة لاوراق الافرع المكثرة نسيجياً	١٣٠
٢٢.	البروتينات المرحلة لمعاملات الكولجيسين المختلفة لاوراق الافرع المكثرة نسيجياً	١٣١
٢٣.	البروتينات المرحلة لمعاملات مختلفة من ازايد الصوديوم والكولجيسين للكالس	١٣٤
٢٤.	النواتج المتضاعفة من الـ DNA الكلي لعينات اوراق الافرع المحفزة من العقد المعاملة وغير المعاملة بالتراكيز المختلفة من أزايد الصوديوم والكولجيسين باستخدام تفاعلات الـ RAPD والمرحلة على هلام الاكاروز بتركيز ١.٢% باستخدام البادئ OPH.٠٤	١٥٤
٢٥.	النواتج المتضاعفة من الـ DNA الكلي لعينات الكالس المعامل وغير المعامل بالتراكيز المختلفة من أزايد الصوديوم والكولجيسين باستخدام تفاعلات الـ RAPD والمرحلة على هلام الاكاروز بتركيز ١.٢% باستخدام البادئ OPH.٠٤	١٥٥

الفصل الأول Chapter One

المقدمة واستعراض المراجع

Introduction and Literature Review

١-١: المقدمــة:- Introduction

تنتمي الحمضيات الى العائلة السذبية Rutaceae والتي تضم عدداً من الاجناس اهمها إقتصادياً هو الجنس *Citrus* الذي يعد مصدراً مهماً من مصادر غذاء الانسان (Chang, ١٩٩٢; Germana, ١٩٩٧).

يعد النارنج Sour orange (*Citrus aurantium* L.) واحداً من اهم الانواع المنتمية الى هذا الجنس لمواصفاته الجيدة كتحمله للملوحة وسهولة تكاثره بالبذور ونشاط نموه ومقاومته للبرد ولمجموعته الجذرية المتعمقة وتوافقه مع معظم أنواع الحمضيات كاصل لها واحتواء أوراقه وثماره على بعض المركبات التي لها خصائص طبية (Del-Rio *et al*., ١٩٩٨; Drewnowski and Gomez-Carneros, ٢٠٠٠)، فضلاً عن مقاومته لبعض الامراض التي تصيب الانواع الاخرى كالبرتقال مثل مرض تصمغ الساق (Gottwald *et al*., ٢٠٠٢)، لذلك فقد اهتم بزراعته للاسباب اعلاه ولاهميته الغذائية العالية ولمنظره الاخضر الزاهي الذي لا تكاد تخلو حديقة منزلية منه وذلك باستخدام وسائل التكاثر الجنسي واللاجنسي.

تعُدّ تقنية زراعة الانسجة النباتية وسيلة مهمة لاكثار العديد من النباتات بكميات كبيرة ومدد زمنية قصيرة اذ ان خلايا الجزء النباتي بإمكانها التضاعف الى الاف النباتات في اقل من سنة (Devi, ٢٠٠٣). وقد اصبحت من التقنيات الحياتية المستخدمة في المجالات الزراعية والصناعية والطبية وفي بحوث الوراثة والفسلجة(Haq, ٢٠٠٧). واصبحت لها تطبيقات مهمة منها الاكثار السلالي السريع (Micropropagation) للاصناف الجيدة والنادرة (Messmer and Berger, ٢٠٠٤;Sarwar,

(١٩٩٠. ولزراعة الانسجة اهمية في حفظ المصادر الوراثية عن طريق حفظها مجمدة بالنيتروجين السائل ولمدة زمنية طويلة مما عزز بنوك المصادر الوراثية (Kobayashi *et al.*, ١٩٩١) .

وعدت الزراعة النسيجية طريقة مثالية لاكثار انواع الحمضيات بصورة عامة وذلك لكون التكاثر الجنسي والتهجين يكون معرقلاً بتكوين الاجنة النيوسيلية (Nucellar embryos) و عدم التوافق الذاتي و العقم (Vardi *et al.*, ١٩٨٢;Vardi and Spiegel-Roy, ١٩٧٨).

جرى اكثار النارنج عن طريق الاكثار السلالي السريع بتحفيز نمو البراعم الجانبية خارج الجسم الحي وبأعداد كبيرة دون التقيد بكمية البذور وموعد توفرها (Moore, ١٩٨٦). كذلك امكانية الحصول على نباتات نارنج احادية المجموعة الكروموسومية (Haploids) عن طريق زراعة المتك (Germana *et al.*, ١٩٩٠) فضلاً عن زراعة مدقات واقلام الازهار (Carimi *et al.*, ١٩٩٤) او إنتاج نباتات نارنج خالية من الأمراض الفيروسية عن طريق زراعة المرستيم القمي (Pena *et al.*, ٢٠٠٠;Ghorbel *et al.*, ٢٠٠٢).

تحدث التغايرات الوراثية بين الانواع النباتية طبيعيا عن طريق الطفرات التلقائية (Spontaneous mutations). ويمكن استحثاث الطفرات عن طريق معاملة النباتات ببعض انواع المطفرات منها الكيمياوية و الفيزياوية. ولأجل زيادة التغاير الوراثي وانتخاب الطفرات المفيدة منها، لذلك لجأ الباحثون الى استثمار الزراعة النسيجية في محاولات التطفير خارج الجسم الحي (*in vitro* mutagenesis) لإنتاج نباتات ذات تراكيب وراثية ومظهرية تختلف عن النباتات الاصل لها القدرة على مقاومة او تحمل الظروف البيئية او المسببات المرضية (Nicotra, ٢٠٠٦).

خضعت بعض انواع الجنس *Citrus* لبرامج تحسين معينة عن طريق تربية الطفرات بهدف الحصول على تراكيب وراثية جديدة وهذه شملت البرتقال الحلو *C.sinensis* والبرتقال ثلاثي الاوراق *Poncirus trifoliata* والكاريزوسترينج (*C.sinensis X P. trifoliata*) والليمون الحامض *C. limon* والليمون المكسيكي *C. aurantifolia* والكريب فروت *C. paradisi* و *C. reshni* (Moore *et al.*, ١٩٩٢ ; Pena *et al.*, ١٩٩٥, ٢٠٠٣).

تهدف الدراسة الحالية الى:-

١. تحفيز التفرعات الجانبية من عقد بادرات النارنج.
٢. استحثاث الكالس من الاجزاء المختلفة لبادرات النارنج.
٣. خلط الكالس الاخضر (المستحث من البادرات الخضراء) مع الابيض (المستحث من البادرات البيضاء Albino) في محاولة لانتاج طفرات كايميرية.

٤. استخدام ازايد الصوديوم (NaN_3) والكولجيسين كمطفرين كيمياويين لزيادة استحثاث التغايرات الوراثية في العقد والكالس بعد تحفيز التفرعات الجانبية وتكوين البراعم العرضية لملاحظة التغايرات المظهرية التي يمكن ان تحصل.
٥. ترحيل عينات البروتين عن طريق استعمال تقنية الهجرة الكهربائية (Electrophoresis) لملاحظة الاختلافات التي قد تحصل في حزم البروتين الكلي (Protein bands) في خلايا اوراق الافرع الناتجة من العقد والكالس المعاملين بازايد الصوديوم والكولجيسين.
٦. دراسة الاختلاف الوراثي وعلى مستوى الـ DNA باستخدام تقنية التفاعل التضاعفي لسلسلة الدنا PCR عن طريق استعمال مؤشرات التضاعف العشوائي المتعدد الاشكال لسلسلة DNA (RAPD)

١-٢: استعراض المراجع Literature Review

١-٢-١: زراعة الأنسجة

يقصد بالمزارع النسيجية النباتية Plant tissue cultures او ما يعرف بالزراعة خارج الجسم الحي *in vitro* عزل خلية او نسيج او عضو في أوساط غذائية معقمة وتحت ظروف معقمة ومن ثم تطور الجزء المزروع تحت ظروف مسيطر عليها من حيث الحرارة والضوء (Smith , ٢٠٠٠).

ازدادت اهمية هذه التقنية على مدى العقدين الماضيين بوصفها احدى اهم الوسائل المستخدمة في اكثار النباتات وتحسينها نوعاً وكماً (Aurelia *et al.*, ٢٠٠٧). وقد جرى اكثار العديد من اصول الجنس *Citrus* (Amin and Akhtar, ١٩٩٣; Barauh *et al.*, ١٩٩٥; El-Morsy and Millet, ١٩٩٦) وخاصة تلك التي يكون انتاجها من البذور قليلاً فضلاً عن كون النباتات المنتجة بهذه التقنية متجانسة (Uniform) (Pogany and Lineberger , ٢٠٠١; Begum *et al.*, ٢٠٠٣; Sahijram and Rajasekharan, ٢٠٠٦)

١-٢-٢: مصدر الأجزاء النباتية Source of explants

تستعمل اجزاء نباتية مختلفة في إكثار النباتات خارج الجسم الحي فالجزء النباتي (Explant) يمكن ان يؤخذ من اطراف الافرع او الاوراق او البراعم الجانبية او انسجة الساق او الجذر او حبوب اللقاح او غيرها.

وتختلف استجابة الاجزاء النباتية للزراعة النسيجية باختلاف الانواع النباتية واعمارها، اذ استخدم Altman و Goren (١٩٧٤) البراعم الجانبية المأخوذة من اشجار برتقال صنف شاموتي بعمر ٤٠ سنة في تقنية الإكثار الدقيق. وقام Barlass و Skene (١٩٨٢) بزراعة قمم الفروع والعقد والسلاميات المأخوذة من بادرات بعمر خمسة اسابيع ومن اشجار بالغة للبرتقال الثلاثي الاوراق واللالنكي كليوباترا *Citrus reticulata* وليمون الرانجبور *C. limonia* والبرتقال الحلو . وأوضحا ان العقد المفردة المأخوذة من الأشجار البالغة هي افضل جزء نباتي تلتها السلاميات المأخوذة من بادرات الانواع المذكورة في استجابتها للاكثار خارج الجسم الحي.

ولاحظ Moore (١٩٨٦) ان استجابة السلاميات المستأصلة من بادرات النارنج واللالنكي كليوباترا كانت ضعيفة عند زراعتها خارج الجسم الحي مقارنة بالاصل كاريزو ستارينج والتي اعطت عدداً جيداً من البراعم والافرع عند زراعتها في وسط Murashige و Tucker (MT) الحاوي على ٥ ملغم/لتر Benzyladenine (BA) باضافة او بدون اضافة ١ ملغم/لتر α-Naphthalene acetic acid (NAA). واستعمل Starrantino و Caruso (١٩٨٧) القمم النامية في اكثار اصول الحمضيات (الترويـر و الكاريزوستارينج وطفرة متقزمة من الستارينج (Dwarf mutant citrange) والبرتقال ثلاثي الاوراق صنف Flying dragon. ونجحت هاني(١٩٨٨) في دراستها على اصل النارنج من زراعة البراعم الطرفية والجانبية على وسط Murashige وSkoog (MS) المزود بـ ٣% سكروز مع ٢ ملغم/لتر BA و ٠.٢ ملغم/لتر Gibberellic acid (GA_3). وأوضح Bonian و جماعته (١٩٩٢) عند اكثارهم البرتقال بان البراعم الجانبية المستأصلة من الاشجار البالغة قد استجابت افضل من باقي الاجزاء النباتية. اما Singh وجماعته (١٩٩٤) فقد استخدموا قمماً نامية مستأصلة من اشجار بعمر ٥-٦ سنوات لاكثار اشجار اللالنكي كليوباترا والليمون الحامض.

كما امكن انتاج افرع خضرية وجذور بصورة مباشرة من اجزاء الساق دون المرور بمرحلة الكالس من بادرات بعمر ٤٠ يوماً ولخمسة انواع من الحمضيات هي النارنج والبرتقال و *C.reshin* و *C.macrophylla* و الهجين كاريزوستارينج عند اضافة BA بتركيز ١.٠ ملغم/لتر و NAA بتركيز ٠.١٢ ملغم/لتر الى وسط MT (Bordon *et al.*, ٢٠٠٠). واشار العبيدي وجماعته(٢٠٠١) الى امكانية اكثار اشجار الاصلين الترويـر والكاريزوستارينج عن طريق زراعة العقد الحاوية على البراعم الجانبية الموجودة في اباط الاوراق بطول ١ سم على وسط MS حاوٍ على BA بتركيز ١.٥ ملغم/لتر اذ اعطى افضل معدل لعدد التفرعات بلغ ٩.٧ فرع وبمعدل طول ١.٥سم بعد ثمانية اسابيع من الزراعة. واشار الحافظ (٢٠٠٢) الى اختلاف الانواع في استجابتها لطرائق الاكثار، اذ بين

تفوق السوينكل ستروميلو (*C. paradisi* x *P. trifoliata*) على البرتقال المحلي والنارنج في استجابته لتكوين التفرعات من البراعم الجانبية وتضاعفها بينما لم يظهر النارنج استجابة لتكوين التفرعات الجانبية.

وبينت طه (٢٠٠٢) ان لموعد اخذ الجزء النباتي تاثيراً في النسبة المئوية لاستجابة الاجزاء النباتية المختلفة للنمو خارج الجسم الحي عند دراستها على اصلي الليمون المخرفش *C. jambhiri* والفولكاماريانا *C. volkameriana* ، اذ تحققت اعلى نسبة استجابة من اطراف الفروع والعقد بلغتا ٨٠ و ٧٧% على التوالي في الليمون المخرفش وذلك عندما استأصلت العقد في الموعد الصيفي (تموز)، اما في الفولكاماريانا فكانت اعلى نسبة استجابة لاطراف الفروع ١٠٠% وفي الموعد ذاته بينما تحققت اعلى نسبة استجابة من العقد في الموعد الربيعي (نيسان) بلغت ٨٦%.

وقام الحوشبي(٢٠٠٤) بإكثار أربعة انواع من الحمضيات عن طريق زراعة العقد المفردة للبرتقال المحلي واللالنكي والكريب فروت والسندي *C. maxima* من نباتات مزروعة في الحقل واخرى مزروعة في البيت الزجاجي وتركيبها (Grafting) على بادرات اصل الترويير سترينج خارج الجسم الحي.

١-٢-٣: تعقيم الأجزاء النباتية Sterilization of explants

تعد عملية تعقيم الأجزاء النباتية المستعملة في الزراعة خارج الجسم الحي احدى العوامل المهمة في انجاح هذه العملية وتتضمن إزالة كافة الملوثات الخارجية من بكتريا وفطريات وكائنات أخرى من الجزء النباتي قبل زراعته في الوسط الغذائي كون وجودها يلوث الوسط الغذائي والجزء النباتي معاً وبالتالي موت الاخير اما بتنافسها معه على المادة الغذائية او لافرازها مواداً سامة. وهنالك العديد من المواد الكيمياوية المستعملة في مجال تعقيم الاجزاء النباتية، اذ يعتمد اختيار نوع المادة المعقمة على كفاءتها في التعقيم وسهولة ازالتها من الجزء النباتي فضلاً عن عدم سميتها له (محمد وعمر، ١٩٩٠).

تختلف الخطوات المعتمدة في تعقيم الاجزاء النباتية باختلاف مصدر النسيج المستخدم ونوعه اذ قام Barlass و Skene (١٩٨٢) باستئصال القمم النامية والعقد بطول ٢-٣سم من بادرات بعمر خمسة اسابيع لكل من الكاريزو سترينج والبرتقال الثلاثي الاوراق واللالنكي كليوباترا والليمون رانجبور والبرتقال الحلو ثم غمرها بمحلول هايبوكلورات الكالسيوم $CaOCl_2$ بتركيز ٧% مضافاً له ٠.٠١% من المادة الناشرة (Tween-٢٠) لمدة ٢٠ دقيقة ثم غسلها بالماء المقطر المعقم. اما Al-Jibouri (١٩٨٦)فقد استعمل محلول هايبوكلورات الصوديوم NaOCl بتركيز ١.٥% لمدة ١٥ دقيقة في تعقيم ثمار البرتقال ثم تقطيعها تحت ظروف معقمة بهدف استخراج بذورها خالية من التلوث. وقام Moore (١٩٨٦) بتعقيم الاجزاء الساقية لكل من النارنج والكاريزو سترينج واللالنكي كليوباترا بغمرها في محلول حامض الهيدروكلوريك HCl بتركيز ١ عياري لمدة ٣٠ ثانية ثم غمرها بالكحول الاثيلي بتركيز ٧٠% لمدة ٢.٥ دقيقة تلاها الغمر في محلول هايبوكلورات الصوديوم بتركيز ١.٥% مضافاً له ٠.١% من المادة الناشرة لمدة خمس دقائق بعدها غسلت بالماء المقطر المعقم ثلاث مرات.

وقام Al-Khayri وAl-Bahrany (٢٠٠١) بغمر عقد الليمون المكسيكي لمدة ٣٠ ثانية في الكحول بتركيز ٧٠% تبعها الغمر لمدة ١٥ دقيقة مع التحريك في محلول هايبوكلورات الصوديوم بتركيز ١% مضافاً له ثلاث قطرات من المادة الناشرة تلاها الغسل ثلاث مرات بالماء المقطر المعقم. واستخدم العبيدي وجماعته(٢٠٠١) محلول كلوريد الزئبق $HgCl_2$ بتركيز ٠.١% لمدة ثلاث دقائق مع التحريك المستمر لتعقيم القمم النامية والعقد الحاوية على البراعم الجانبية لاصلي الترويز والكاريزوسترينج ثم غسلها بالماء المقطر المعقم ثلاث مرات للتخلص من اثار المادة المعقمة. وتمكن الحافظ (٢٠٠٢) من تقليل نسبة التلوث في زروعاته باستعمال الكحول الاثيلي بتركيز ٩٥% لمدة عشر دقائق في تعقيم البذور البالغة والثمار الصغيرة لاصناف الحمضيات المكثرة خارج الجسم الحي مقارنة بهايبوكلورات الصوديوم بتركيز ١.٥% مضافاً له ٠.١% من المادة الناشرة وللمدة نفسها ثم غسلها ثلاث مرات بالماء المقطر المعقم. اظهرت نتائج الدراسة التي قام بها الحوشبي (٢٠٠٤) عند اكثاره لاصناف من الحمضيات خارج الجسم الحي ان تعقيم الاجزاء النباتية بهايبوكلورات الصوديوم بتركيز ٠.٤٥% مضافاً اليه قطرتين من المادة الناشرة لمدة عشر دقائق ثم الغسل بالماء المقطر المعقم ثلاث مرات ولمدة خمس دقائق في كل مرة اعطى نسبة جيدة لنجاة الاجزاء النباتية المأخوذة من الحقل في حين كان التركيزان ٠.٣٠ و ٠.٤٥% ملائمين لتعقيم ونجاة الاجزاء النباتية المأخوذة من شتلات مزروعة في البيت الزجاجي.

١-٢-٤: تأثير الاوكسينات Effect of auxins

الاوكسينات وهي عبارة عن حوامض عضوية يخلق بعضها طبيعياً داخل النبات ولها القابلية في التاثير في الكثير من العمليات الحيوية داخل النسيج النباتي وبتراكيز قليلة. وهي اولى الهرمونات النباتية التي تم اكتشافها ومنها الاوكسين Indole acetic acid (IAA)، وبعضها الاخر عبارة عن مركبات تصنع مختبريا وتعمل عمل الاوكسين منها Indole butyric acid (IBA) و ٢,٤-Dichlorophenoxy acetic acid (٢,٤-D) و NAA (Hopkins, ١٩٩٩). ودورها في زراعة الأنسجة هو تحفيز استحثاث الكالس او تشجيع تكوين الجذور على الافرع المكثرة نسيجياً (Subhashini and Reddy, ١٩٩٠). فقد وجد Barlass و Skene (١٩٨٢) ان اضافة ١ ملغم/لتر من NAA الى الوسط الغذائي قد حقق نسبة تجذير عالية للافرع الخضرية للكليوباترا. وتمكن Moore (١٩٨٦) من تجذير الافرع التي حصل عليها باكثار القطع الساقية للنارنج والكليوباترا والكاريزوسترينج على وسط MT بنصف القوة حاو على NAA بتركيز ١ ملغم/لتر.

واستطاع Starrantino و Caruso (١٩٨٧) تجذير الافرع الخضرية النامية خارج الجسم الحي لقمم الفروع لاربعة اصول من الحمضيات على وسط MS المزود بـ ١ ملغم/لتر من NAA. كما وصلت نسبة التجذير التي حصل عليها Al-Khayri وAl-Bahrany (٢٠٠١) الى ٥٦% عند زراعتهما للافرع الخضرية بطول ١.٠-١.٥ سم الناشئة خارج الجسم الحي من عقد الليمون على وسط MS المجهز بـ ١.٠ ملغم/لتر من IAA. كما استخدم Begum وجماعته (٢٠٠٣) أملاح الوسط الغذائي MS بنصف القوة مجهزاً بتراكيز مختلفة من الاوكسينات

NAA و IBA و IAA تراوحت بين ١.٠-١ ملغم/لتر في زراعة الافرع الخضرية المتمايزة من كالس فلق ثلاثة انواع من البوميلو Pummelo (*C. grandis*) اذ ظهرت الجذور بعد ١٥-١٨ يوماً من زراعتها على وسط التجذير وحصلت افضل استجابة في الوسط الحاوي على NAA بالتركيز ٠.١ ملغم/لتر تلاه IBA وبالتركيز نفسه.

١-٢-٥: تأثير السايتوكاينينات Effect of cytokinins

تعد السايتوكاينينات احدى اهم المركبات العضوية التي ينتجها النبات او تحضر صناعياً لتؤدي العديد من العمليات التنظيمية داخل النسيج النباتي. فهي تلعب دوراً كبيراً في تحفيز الخلايا على الانقسام وكسر السيادة القمية للافرع مما يساعد على تكوين الافرع من البراعم العرضية وتشجيع تكوين الافرع من انسجة الكالس والاوراق والجذور والفلق والقطع الساقية (Wickson and Thiman, ١٩٥٨ ; Hopkins, ١٩٩٩) . ومن اشهر هذه المركبات المستعملة في الزراعة النسيجية هي BA و purine amino N-Furfuryl (Kin) و(٢ip) N-(٢-isopentenyl adenine) و(٤-hydroxy-٣-methyl-٢-butenyl)-٦ (Zeatin).

عَدّ Barlass و Skene (١٩٨٦) أن اضافة BA متطلب ضروري لتكوين الأفرع الخضرية في الحمضيات، ولكن التركيز المثالي من هذا السايتوكاينين اختلف باختلاف النوع النباتي والجزء المزروع. ففي دراسة اجراها Moore (١٩٨٦) على اصول النارنج والكليوباترا والكاريزوسترينج مستعملاً اربعة تراكيز من BA هي ٠.٢٤ و ٠.٤٩ و ٤.٩٥ و٩.٩ ملغم/لتر، تبين ان النارنج يكشف القليل من البراعم والافرع في التركيزين ٠.٤٩ و٤.٩٥ ملغم/لتر، اما الكليوباترا فقد كون كالسا وبراعم وافرع خضرية في التراكيز ٠.٢٤ و٤.٩٥ و ٩.٩ ملغم/لتر. وتغلب عليهما الكاريزوسترينج في تكوينه للكالس والبراعم والافرع الخضرية في جميع تراكيز الـ BA المدروسة. وعُدّ التركيز ٤.٩٥ ملغم/لتر مناسباً للاصناف الثلاثة رغم اختلافها في عدد البراعم والافرع الناشئة واطوالها. ولوحظ ان التراكيز العالية من السايتوكاينينات لها تأثيرات سلبية في التضاعف اذ تنتج عنها فروع قصيرة او نموات مشوهة (Maggon and Singh, ١٩٩٥).

وأوضح Bordon وجماعته (٢٠٠٠) ان للـ BA القابلية على التغلب على ظاهرة عدم تكوين الافرع في الظلام في صنف الترويرسترينج وبصورة جزئية في النارنج من خلال الدراسة التي اجريت على خمسة اصناف من الحمضيات. وحصل Al-Khayri و Al-Bahrany (٢٠٠١) على تضاعف جيد للافرع بعد زراعة عقد الليمون على وسط MS المجهز

بنوعين من السايتوكاينينات هما ٦-Benzyl amino purine (BAP) بتركيز ١.٠ ملغم/لتر و Kin بتركيز ٠.٥ ملغم/لتر. اما الوسط المناسب لتكوين الافرع الخضرية للكاريزوسترينج فقد تكون من املاح الوسط الغذائي MS المحور مضافاً له ٣ ملغم/لتر من BAP (Pena *et al.*, ٢٠٠٤). كما تمكن Nhan و Chau (٢٠٠٥) من الحصول على تضاعف جيد لافرع الفولكاماريانا في وسط MT المزود بـ ٠.٩٩ ملغم/لتر BAP مع ٤٠ ملغم/لتر كبريتات الأدنين و ٤% سكروز.

١-٢-٦: تأثير التداخل بين الاوكسينات والسايتوكاينينات

Effect of interaction between auxins and cytokinins

بات واضحاً ان التوازن الدقيق (Delecate balance) بين تراكيز الاوكسينات والسايتوكاينينات في الوسط الغذائي امر ضروري اذ ان الزيادة الحاصلة في تركيز السايتوكاينين نسبة الى الاوكسين تحفز تكوين الافرع الخضرية في حين ان النسب العالية من الاوكسين الى السايتوكاينين تشجع تكوين الجذور العرضية بينما المستويات المتوازنة تؤدي الى تكوين نسيج الكالس (Skoog and Miller , ١٩٥٧ ; Hopkins , ١٩٩٩) .

استطاع Hidaka وجماعته (١٩٨١) من تحفيز تكوين الاجنة عن طريق زراعة متك النارنج نسيجياً على وسط مجهز بـ ٠.٠٢ ملغم/لتر Kin مع ٠.٠٢ او ٢ ملغم/لتر IAA. وتمكن Edriss و Burger (١٩٨٤) من تحفيز تكوين البراعم العرضية على سلاميات الاصل ترويرسترينج في وسط MS المحور الحاوي على ٥% سكروز و ٥٠٠ ملغم/لتر من مستخلص الشعير Malt extract (ME) مع ٠.٥ ملغم/لتر BA و ٠.١ ملغم/لتر NAA. وحصل Bonian وجماعته (١٩٩٢) على اعلى نسبة توالد لفروع البرتقال عند زراعة البراعم الجانبية على وسط MS المجهز بالتوليفة المكونة من ٠.١ ملغم/لتر BA + ٠.٠٥ ملغم/لتر NAA + ٠.١ ملغم /لتر GA_3 مع اضافة ٠.٣ غم من الفحم المنشط (Activated charcoal). وفي السنة نفسها استطاع Omura و Hidaka (١٩٩٢) الحصول على اعلى استجابة لاصل الليمون رانجبور عند زراعة قممه النامية في وسط MS حاوٍ على ٠.٢ ملغم/لتر BA و ٠.٠١ ملغم/لتر NAA مع ١.٠ ملغم/لتر GA_3. كما حصل Bordon وجماعته (٢٠٠٠) على نموات خضرية عند زراعتهم سلاميات النارنج والبرتقال واللالنكي كليوباترا والترويرسترينج على وسط MS مضافاً له ٣% سكروز والمجهز بـ٠.٩٩ ملغم/لتر BA و ٠.١٢ ملغم/لتر NAA. ونجح Daming وجماعته (٢٠٠٠) في إنتاج الأفرع الخضرية مباشرة دون المرور بمرحلة الكالس (Direct regeneration) عند زراعتهم قطع ساقية وفلق بادرات البرتقال بعمر شهر واحد على وسط حاوٍ على أملاحMS وفيتامين B_6 مع ٥% سكروز مضافاً له ٧.٥ ملغم/لتر BA و ١ ملغم/لتر NAA. كما حصلت افضل استجابة عند حضن الزروعات في الظلام لمدة ١٥ يوماً على

درجة حرارة ٢٦ °م بعدها عرضت الى فترة اضاءة (١٠٠٠ لوكس) لمدة ١٦ ساعة/اليوم لمدة ٤٥ يوماً. اذ اعطت الفلق نسبة استجابة ٩٥% والقطع الساقية ٩٦%. كما اوضح Nhan و Chau (٢٠٠٥) ان تجهيز الاوكسين NAA بتراكيز منخفضة (٠.١٤ – ٠.٢٦ ملغم/لتر) بوجود التركيز المناسب للسايتوكاينين (٠.٩٩ ملغم/لتر) قد لعبت دوراً مهماً في استطالة الافرع الخضرية للفولكامريانا. ولاحظا ان اضافة الـ NAA الى وسط تضاعف الافرع لم يكن له تأثير معنوي في زيادة عدد الافرع.

١-٢-٧: تأثير حامض الجبرليك Effect of gibberellic acid

الجبرلينات من منظمات النمو التي تضاف الى الاوساط الغذائية الا ان استخدامها اقل شيوعاً من الاوكسينات والسايتوكاينينات وهي تساهم في نشوء الاعضاء واحياناً في تحفيز نشوء الكالس ويعد حامض الجبرليك GA_3 من اكثرها شيوعاً واستعمالا (Hopkins, ١٩٩٩).

اشارت المصادر الى ان استخدامه في المزارع النسيجية قد ينتج عنه تاثيرات متناقضة فقد تكون له احيانا تأثيرات تثبيطية وتحفيزية في احيان اخرى. فقد لاحظ Navarro وجماعته (١٩٧٥) تثبيط نمو البراعم المستأصلة من الاشجار البالغة ولانواع مختلفة من الحمضيات بوجود الجبرلين في الاوساط الغذائية كذلك لم يسجل Fry و Street (١٩٨٠) أي تأثير ايجابي للجبرلين في النمو لمختلف مراحل الاكثار بل ان اضافته في بعض الاحيان قد ادت الى منع تكوين الافرع والجذور. بينما اكد بعضهم على ضرورة اضافته، اذ توصل Pontikis وSapoutzaki (١٩٨٤) الى ان البراعم الطرفية لاصل التروير سترينج تتضاعف بوجود كلٍ من GA_3 و BA و IBA وبتركيز ٠.١ ملغم/لتر لكلٍ منهم.

واشار Omura و Hidaka (١٩٩٢) الى ان GA_3 يعد عاملاً مهماً في استطالة افرع الحمضيات المزروعة خارج الجسم الحي عند اضافته الى وسط تضاعف الافرع المكون من املاح MS والمجهزة بـ ٠.٢ ملغم/لتر BA و ٠.٣ ملغم/لتر GA_3 و ٠.٠٢ ملغم/لتر IBA. ووجد Salman وجماعته (١٩٩٤) ان افضل نمو للبراعم الطرفية في النارنج كان على وسط MS الحاوي على ٠.٢ ملغم/لتر BA و ٠.٣ ملغم/لتر GA_3 و ٨٠ ملغم/لتر كبريتات الادنين. في حين وجدت العامري (٢٠٠٠) ان اضافة ٠.٢ ملغم/لترGA_3 الى وسط MT حاو على ١.٠ ملغم/لترBA ادى الى تكوين اكبر عدد من الافرع في البرتقال عنه في الليمون الحامض وان اعلى معدل اطوال للافرع كان عند التركيزين ٠.٢ و ٠.٣ ملغم/لترGA_3 في الليمون الحامض وفي البرتقال كان عند التركيزين ٠.٣ و ٠.٤ ملغم/لتر.

١-٢-٨: استحثاث الكالس Callus initiation

يعرف الكالس على انه خلايا برنكيمية غير متمايزة تنشأ على مناطق القطع او الجروح في الاجزاء النباتية اما طبيعياً او في مزارع الانسجة النباتية (Hopkins,١٩٩٩).

تعد عملية استحثاث الكالس على الجزء النباتي المزروع في الوسط الغذائي المناسب من العمليات المهمة في هذا المجال. يتم استحثاث الكالس على ثلاث مراحل هي مرحلة التحفيز (Induction) والانقسام (Division) والتمايز (Differentiation). اذ تمر خلايا الجزء النباتي خلال استحثاث ونمو الكالس بتغيرات في الحجم والعدد مع زيادة في العمليات البنائية المهمة مثل بناء البروتين والأحماض النووية. ففي مرحلة التحفيز تحدث تغيرات مهمة في الخلايا مثل بناء البروتين وتضاعف الـ DNA لتكون مهيئة لعملية الانقسام. يلي ذلك مرحلة انقسام الخلايا تنتهي بتكوين كتلة من خلايا نسيج الكالس تغطي الجزء النباتي. وبعد هذه المرحلة تبدأ مرحلة التمايز من خلال توسع و تمايز خلايا مرستيمية معينة تؤدي في النهاية الى تكوين النبات الكامل بشرط توفر عوامل النمو المناسبة (محمد وعمر، ١٩٩٠).

١-٢-٨-١: الاجزاء النباتية المستعملة في استحثاث الكالس

يستحث الكالس على الاجزاء النباتية الخالية من الملوثات والمأخوذة من النبيتات النامية خارج الجسم الحي. او من استئصال الاجزاء النباتية من النباتات المزروعة في التربة بعد تعقيمها سطحيا. يمكن استحثاث الكالس من اجزاء مختلفة من النبات كالسويقة الجنينية العليا (Epicotyl) والسويقة الجنينية السفلى (Hypocotyl) والفلق (Cotyledons) وقطع الساق (Stem segments) والاوراق (Leaves) والاجزاء التكاثرية(Reproductive parts) وغيرها. فقد تمكن Drira و Benbadis (١٩٧٥) من استحثاث الكالس عند زراعتهما متك الليمون والطرنج *C.medica*. واستطاعت هاني (١٩٨٨) الحصول على الكالس من سلاميات النارنج.

وحصل Hidaka و Omura (١٩٨٩) على كالس هش (Friable) بعد ثلاثة اشهر من زراعة بذور غير ناضجة لسبعة انواع من الحمضيات (بعد ٣-٤ اشهر من حصول التلقيح)، وتبين ان كمية الكالس اعتمدت على نوع الجنين ان كان جنسيا ام خضريا وعلى حجمه، كما امكن استحثاث الكالس من زراعة السويداء(Endosperm) (Gmitter *et al.*, ١٩٩٠). وفي السنة نفسها حصل Starrantino وCaponnetto (١٩٩٠) على نسبة جيدة من الكالس عند زراعة بويضات غير متطورة مأخوذة من ثمار اصناف مختلفة من الحمضيات.

ولاحظ Grewal وجماعته (١٩٩٤) ان اعلى استجابة من الكالس تكونت عند زراعة قطع سيقان واوراق الـ *C.depressa* والليمون المخرفش بينما في *C.reshin* كانت الفلق هي الافضل. كما تمكن Xiao-Ling وجماعته (٢٠٠٠) من استحثاث الكالس من سويداء البوميلو. واستطاع Begum وجماعته (٢٠٠٣) من استحثاث الكالس من الفلق المستأصلة من بادرات بعمر ٥-٦ اسابيع لثلاثة انواع من البوميلو.

١-٢-٨-٢: تأثير الاوكسينات والسايتوكاينينات في استحثاث الكالس

اختلفت توليفات الاوكسينات والسايتوكاينينات المناسبة لاستحثاث الكالس باختلاف الانواع النباتية ومصادر الاجزاء النباتية المستعملة في الزراعة النسيجية من جهة وعلى المحتوى الداخلي لمنظمات

النمو فيها من جهة اخرى. ان بعض الاجزاء النباتية يمكنها ان تكون كالساً دون اضافة منظمات نمو في حين ان البعض الاخر منها لا يستجيب لاستحثاث الكالس مالم يجهز الوسط الغذائي بمنظمات نمو. فقد حصل Drira و Benbadis (١٩٧٥) على كالس في الوسط الحاوي على ١.٠ ملغم/لتر من كل من 2,4-D و NAA مع ٠.١ ملغم/لترBA بعد زراعة متك الليمون و الطرنج.

ولاحظ Moore (١٩٨٦) ان النارنج قليل الاستجابة نسبياً لجميع توليفات BA/NAA المدروسة وحصل على قليل من الكالس في الوسط الحاوي على ١ ملغم/لتر NAA مع ٠.٢٤ ملغم/لترBA. وتمكن Geraci و Starrantino (١٩٩٠) من الحصول على نسبة استجابة لتكوين الكالس بلغت ٢٥% لكل من اللالنكي و *C. deliciosa* والكريب فروت والهجين (*C. deliciosa* x *C. paradisi*) عند تنميتها في وسط حاو على ١.٠ ملغم/لتر BA و ٠.٥ ملغم/لتر 2,4-D بينما كانت النسبة اعلى (٤٤.٢%) في البرتقال والليمون المنماة على وسط حاو على ١.٠ ملغم/لتر لكل من BA وNAA.

واستطاعت Germana وجماعتها (١٩٩١) الحصول على كالس عند زراعتهم متك الليمون في وسط حاو على توليفة مكونة من ٢.٠ ملغم/لترKin و ١.٠ ملغم/لترZeatin و ٠.١ ملغم/لتر NAA. وتمكن Yong وجماعته (٢٠٠٠) من استحثاث الكالس من البويضات المخصبة بعمر٦-٧ اسابيع في البرتقال واللالنكي والكريب فروت بعد عشرين يوماً من زراعتها على وسط MT المزود بـ BA فقط وبتركيز ١٠ ملغم/لتر. ولم يتكون كالس في بعض انواع الحمضيات الا بعد اضافة اوكسين بتراكيز عالية مقارنة بالسايتوكاينين اذ حصلBegum وجماعته (٢٠٠٣) على افضل كمية من الكالس عند زراعتهم فلق البوميلو على وسط MS حاو على ١.٠ ملغم/لتر BAP مع ٠.٥ ملغم/لتر NAA.

١-٢-٨-٣: تأثير الوسط الزرعي Effect of culture medium

يجب تجهيز الجزء النباتي بالمواد الأساسية والضرورية لنموه. وتختلف احتياجات الجزء النباتي اعتماداً على نوع النبات والجزء النباتي المأخوذ منه. ولايوجد لحد الان وسط قياسي لاستحثاث الكالس من جميع النباتات. وعموماً فان جميع الاجزاء النباتية تحتاج الى مكونات متشابهة في استحثاث الكالس وهذه المكونات هي املاح العناصر الغذائية الكبرى والصغرى والفيتامينات والحوامض الامينية ومصادر الكاربون ومنظمات النمو والماء فضلاً عن مادة شبه صلبة لدعم نمو الكالس (محمد و عمر، ١٩٩٠).

ان اهم الاوساط الزرعية المستخدمة في زراعة الحمضيات هي وسط MS (Murashige and Skoog, ١٩٦٢) و MT (Murashige and Tucker, ١٩٦٩) ووسط MS المحور (Chaturvedi and Mitra,١٩٧٤;Chaturvedi and Sharma,١٩٨٥;Germana *et al.*, ١٩٩٤) والتي تختلف فيما بينها في كميات وتراكيز المواد المذكورة اعلاه.

١-٢-٩: نشوء الاعضاءOrganogenesis

لاجل اخلاف النباتات من الكالس يتم نقل الأخير الى اوساط غذائية جديدة مناسبة لتحفيز نشوء الاعضاء المختلفة منه. فقد قام Chaturvedi و Mitra (١٩٧٤) بنقل الكالس المتكون من اجزاء الورقة وقطع سيقان البرتقال والسندي على وسط MS المحور (٤.٥% سكروز) الى نفس الوسط المحور مع اضافة ٠.٢٥ ملغم/لترBA و ٠.١ ملغم/لترNAA و ٥٠٠ ملغم/لترME. فقد لاحظا نشوء افرع وبراعم من هذا الكالس.

وحصل Barlass و Skene (١٩٨٢) على افرع خضرية مباشرة من الكالس المتكون على قطع سلاميات مأخوذة من بادرات بعمر خمسة اسابيع ولخمسة اصناف من الحمضيات بعد ٥-٦ اسابيع من الزراعة على وسط MS الحاوي على ٢.٢ ملغم/لترBA بينما لم تحصل استجابة في السلاميات المأخوذة من اشجار بالغة. اما Vardi وجماعتها (١٩٨٧) فقد استطاعوا الحصول على اجنة جسمانية من ثلاثة هجن من الحمضيات عند نقل الكالس الى وسط غذائي حاو على ٢% كليسيرول (Glycerol) بدلاً من السكروز بعدها تم نقل الاجنة الى اطباق بتري حاوية على الوسط الغذائي مع ٤% سكروز و ١٥٠٠ ملغم/لترME. واستطاع Ben-Hayyim و Goffer (١٩٨٩) الحصول على اجنة جسمانية عند نقل كالس البرتقال صنف شاموتي الى وسط MT المجهز بـ ٠.٢ ملغم/لتر من BA او Kin او Zeatin او ٠.١ ملغم/لتر من ABA وتكشفت هذه الاجنة الى نبيتات عند نقلها الى وسط MT حاو على ٢% سكروز و١٥٠٠ ملغم/لتر ME مع ١.٠ ملغم/لتر GA_3.

إن هناك تفاوت في الاستجابة بين الاصناف والاجزاء النباتية في عملية الاخلاف، ففي دراسة اجراها Beloualy (١٩٩١) على كالس ناتج من زراعة اجنة بالغة بعد ازالة الفلق منها ولثلاثة اصناف من الحمضيات. اذ لاحظ تكون الاجنة عند نقل الكالس الى وسط MT بوجود ١٠٠٠-١٥٠٠ ملغم/لترME كذلك تكونت افرع بوجود ٥ ملغم/لتر BA و ١ ملغم/لترNAA في البرتقال ثلاثي الاوراق والكاريزوسترينج وبوجود ١٠ ملغم/لترBA و ١ ملغم/لترNAA في النارنج. ولوحظ ان قطع الفلق و Epicotyl لنبات اللالنكي كانت الافضل في تكوين الكالس الذي عند نقله الى وسط MS المجهز بـ ٣.٠ ملغم/لتر BA و ٠.٥ ملغم/لتر NAA و ٥٠٠ ملغم/لترME اعطى اجنة جسمانية من الكالس (Gill *et al.*, ١٩٩٤).

وبين Grewal وجماعته (١٩٩٤) ان كالس الاوراق لاصناف الحمضيات المدروسة اظهر اعلى نسبة للاخلاف عند نقله الى وسط MS بنصف القوة و ٥ ملغم/لترBA. اما في الترويرسترينج فكان افضل جزء انتج كالساً ثم كون اعضاءاً هو السويقة الجنينية العليا (Garcia-Luis *et al.*, ١٩٩٩). وكان افضل وسط لظهور البراعم العرضية من كالس مستحث من بويضات بعمر ٦-٧ أسابيع لكل من البرتقال واللالنكي والكريب فروت هو الوسط الغذائي

MT المزود بـ ١ ملغم/لتر BA و ٥٠٠ ملغم/لتر (CH) Casein hydrolysate (Yong *et al.*, ٢٠٠٠). وفي السنة نفسها حصل Xiao-Ling وجماعته (٢٠٠٠) على اجنة وجذور عند نقل الكالس المستحث من سويداء البوميلو الى وسط MS المجهز بـ ١٠ ملغم/لتر GA_3. وقد اثبت العديد من الباحثين ان للنوع المدروس وظروف الزراعة والاوساط الزرعية المستخدمة فضلاً عن منظمات النمو المضافة قد اثرت في تحديد مسار نشوء الاعضاء من كالس الحمضيات (Moreira-Dias *et al.*, ٢٠٠٠).

وفي دراسة أجريت على الكالس الجنيني المستحث من جويزاء (Nucellus) بعض انواع الحمضيات النامي على وسط خال من الهرمونات، ونقله الى وسط غذائي حاوٍ على الكليسيرول او السكروز كمصدر للكاربوهيدرات تبين ان الأول يشجع وبصورة كبيرة نمو وتكشف الاجنة الجسمانية بينما تستمر الاجنة بالنمو لكنها لاتكون اعضاءا ظاهرة في حالة وجود السكروز مما يبين ان للكليسيرول دوراً مهماً كبديل للسكروز في عملية الاخلاف من خلال تشجيعة تكوين الاعضاء من الكالس (Jimenez *et al.*, ٢٠٠١). وتمكن الحافظ (٢٠٠٢) من الحصول على اجنة جسمانية من زراعة الكالس على وسط MT مجهز بـ ٠.٢٥ ملغم/لتر BA و ٠.١ ملغم/لتر NAA مع اضافة ME بمقدار ٥٠٠ ملغم/لتر.

واشار Pena وجماعته (٢٠٠٤) الى ان تحفيز نشوء الاعضاء من كالس الكاريزوسترينج كان افضل على وسط MS مع أضافة او عدم اضافة BAP بتركيز ١ ملغم/لتر يليه النقل الى نفس الوسط لكن بأضافة ٣ ملغم/لتر من الـBAP والذي حفز وبصورة اسرع النمو ثم التمايز الى افرع.

١-٢-١٠: مرحلة التجذير Rooting stage

اظهرت البحوث امكانية تجذير الافرع على وسط MS او MT بقوة كاملة او نصف قوة مع إضافة اوكسينات بتراكيز مختلفة وفقاً لأصناف الحمضيات المدروسة. اذ وجد Kitto وYoung (١٩٨١) ان افضل تجذير لافرع الكاريزو سترينج كان في وسط MT المجهز بـ ١ ملغم/لتر NAA. ولاحظ Barlass و Skene (١٩٨٢) ان افضل تجذير خارج الجسم الحي لافرع الحمضيات قيد الدراسة كان في وسط MS الحاوي على ١ ملغم/لتر NAA.

وفي دراسة قام بها Moore (١٩٨٦) على ثلاثة اصول من الحمضيات تمكن فيها من تجذير الافرع الناشئة على وسط MT بنصف القوة مجهزاً بـ ١ ملغم/لتر NAA. واستطاع

و Starrantino و Caruso (١٩٨٧) تجـــذير افـــرع اصـــلي البرتقـــال الثلاثـــي الاوراق والترويرســـــترينج فـــــي وســـــط MS مجهـــــز بـــــ ١ ملغم/لتـــــر NAA. اما Omura و Hidaka (١٩٩٢) فتمكنا من تجذير الافرع في وسط مجهز بـ ٠.٠٢ ملغم/لتر NAA او ٢.٠ ملغم/لتر IBA. واستخدم Grewal وجماعته(١٩٩٤) نصف تركيز أملاح MS مع IBA بتركيز ٢ ملغم/لتر لتشجيع تجذير ثلاثة اصول من الحمضيات. اما Ghorbel وجماعته (١٩٩٨) فقد وجدوا ان افضل تجذير لافرع الكريب فروت كان عند تركيز ٣٠ ملغم/لتر من NAA ولافرع الـ Alemow عند تركيز ٣ ملغم/لتر، ولم تجذر أفرع النارنج عند التراكيز ٠-٣ ملغم/لتر من NAA.

اظهرت نتائج تجارب التجذير التي قام بها العبيدي وجماعته (٢٠٠١) ان اضافة IAA الى الوسط الغذائي MS المحور اثر معنوياً في نسبة وسرعة التجذير وعدد الجذور واطوالها ، فقد اعطى التركيزان ١٢و١٥ ملغم/لتر نسبة تجذير ١٠٠% لنباتات اصل ترويرسترينج بعد سبعة ايام من الزراعة على الوسط اعلاه . اما الاصل كاريزوسترينج فكانت نسبة تجذير افرعه ١٠٠% بعد ستة اسابيع من الزراعة في الوسط المجهز بـ ٩ او١٢ ملغم/لتر IAA.

١-٢-١١:مرحلة الأقلمة Acclimatization stage

تعد واحدة من اهم المراحل في برنامج اكثار النباتات خضرياً عن طريق زراعة الانسجة وفيها يتم اخراج النبيتات (Plantlets) من انابيب الزراعة وغسلها جيداً في الماء الجاري و زراعتها في اوساط معقمة حاوية على اوساط زراعية. ويشترط في ضمان نجاح هذه المرحلة، توفر نسبة عالية من الرطوبة تحيط بالنبيتات المنقولة حديثاً تصل ٩٠-١٠٠% من خلال تغطيتها بأغطية زجاجية او بلاستيكية شفافة (محمد وعمر، ١٩٩٠).

ففي دراسة قام بها Barlass و Skene (١٩٨٢) استخرجا فيها النبيتات من الوسط الغذائي بعد ان وصلت اطوالها الى ٢سم او اكثر واطوال الجذور الى ٣ سم او اكثر ونقلت الى سنادين حاوية على البيتموس فقط في ظروف رطوبة مناسبة لمدة ثلاثة اسابيع قبل نقلها الى البيت الزجاجي. ونجح Al-Jibouri (١٩٨٦) في اقلمة نبيتات البرتقال واللالنكي بزراعتها في خليط معقم من التربة والبيتموس بنسبة ١:١ وحضنت بنفس ظروف الزراعة في غرفة النمو لمدة اسبوع واحد قبل نقلها الى البيت الزجاجي. اما Maximos وجماعته (١٩٩٣) فقاموا بغسل جذور النبيتات جيداً قبل زراعتها في اوعية حاوية على التربة النهرية والبيتموس بنسبة ١:١ مع تغطية النبيتات بأكياس بلاستيكية بعدها نقلت الى منصات تروى رشاً بالماء لمدة اسبوعين ثم نقلت الى البيت الزجاجي.

وتمكن Ghorbel وجماعته (١٩٩٨) من اقلمة النبيتات ونقلها الى اوعية حاوية على التربة النهرية والبيتموس بنسبة ١:١ مع تغطيتها بخيمة من البولي اثيلين للحفاظ على الرطوبة. وقامت طه (٢٠٠٢) بنقل الافرع المجذرة الى اصص حاوية على خليط معقم من البيتموس والتربة بنسبة ١:١ بعد غسل الجذور جيداً ومعاملتها بمبيد فطري وتحضينها في غرفة النمو لمدة اسبوعين وغطيت النبيتات بأغطية زجاجية شفافة للحد من الفقد الرطوبي، بعد ذلك نقلت الى البيت البلاستيكي.

١-٢-١٢: تحفيز التغاير الوراثي خارج الجسم الحي

***In vitro* induction of variation**

تركز العديد من البحوث الجارية حالياً في العالم في مجالات الوراثة وتربية النبات باستخدام تقنية زراعة الانسجة النباتية بهدف استنباط اصناف جديدة بمواصفات جيدة من حيث زيادة الانتاج نوعاً وكماً او تحمل الملوحة والجفاف (Ben-Hayyim and Goffer, ١٩٨٩) او مقاومة الامراض (Scott *et al.*, ٢٠٠٢) او الانجماد (Klima *et al.*, ٢٠٠٤) او غيرها من خلال استحثاث التغاير عن طريق احداث الطفرات (Mutations) التي تعتبر من المصادر المهمة للتغايرات الوراثية. تحدث الطفرات في الخلايا الجنسية التي تنتقل الى الاجيال اللاحقة او تحدث في الخلايا الجسمانية (Somatic cells) والتي يمكن إكثارها خضرياً.

وبما ان معدل حدوث الطفرات الوراثية قليل جداً في الطبيعة لذلك اصبح من الضروري استخدام التقنيات المختلفة لاستحثاثها خارج الجسم الحي، اذ يتم فيها تعريض ملايين الخلايا الى مطفر معين سواء كان فيزياوياً كالاشعاع او كيمياوياً باستعمال بعض المواد المطفرة ومن ثم انتخاب الخلايا الطافرة واعادة إخلاف النباتات منها (Mott *et al.*, ١٩٧٧; Sarwar, ١٩٨٧; Cistue *et al.*, ٢٠٠٥).

ولقد تمت دراسة تاثير المطفرات الفيزياوية والكيمياوية في اهم الصفات المظهرية والفسلجية للنباتات. فقد لوحظ ان الاشعاع يسبب تغيرات مظهرية وتركيبية للخلايا وان النواة هي الجزء المتضرر الرئيسي من الاشعاع وبالتالي موت الخلايا (Saif *et al.*, ١٩٩٤; Al-Mashhadani and Salman, ١٩٩٦)، او احداث تشوهات مظهرية مثل قصر النبات او تشوه الاوراق والسيقان وتقزمها وانتفاخها فضلا عن انخفاض نسبة الخصوبة (Dwivedi *et al.*, ٢٠٠٠).

وتسبب المطفرات الكيمياوية ضررا للكائنات الحية على المستوى الخلوي او الانسجة او الاعضاء. فهي تؤدي الى احداث تاثيرات مشابهه لتاثيرات الاشعة الايونية في الخلايا، الا انها تسبب تغييرات جينية اكثر من التغييرات الكروموسومية، فهي قد تسبب طفرات يمكن ان تتوارث عبر الاجيال وذلك عند استخدامها بتراكيز مناسبة ولمدة محددة (Heslot, ١٩٧٧).

ويعد ازايد الصوديوم والكولجيسين من اهم هذه المطفرات، اذ يعمل الاول على تغيير وعرقلة سير العمليات الفسلجية عن طريق تثبيط ايض الكاربوهيدرات وتفكيك عمليات الفسفرة التاكسدية المجهزة لطاقة الانقسام الخلوي وبالتالي هدم ATP الداخلة للانقسام ومن ثم تثبيط عملية الانقسام الخلوي. كما يسبب زيادة حجم النواة ثم تفككها وتحللها خاصة عند التراكيز العالية منه (Bohmova and Gajdosova, ١٩٩٣ . كما يؤدي الى احداث طفرات جينية (Gene mutations) عن طريق

التغييرات في زوج واحد من القواعد النيتروجينية نتيجة الحذف او الاضافة (Hajduch *et al.*, ١٩٩٩). كما يتسبب في احداث الطفرات المظهرية والكلوروفيلية (سعيد، ٢٠٠٥).

ويسبب الكولجيسين اضطرابات جينية عند وجوده في الخلية فيؤدي الى مضاعفة العدد الكروموسومي للخلايا (Ahloowalia, ١٩٦٦)، او تثبيط عمليات تصنيع البروتين المتسبب عن التحوير الحاصل في تركيب DNA مؤديا بذلك الى عرقلة تصنيع الانزيمات المهمة في العمليات الايضية والبنائية (Handro, ١٩٨١). كما يؤدي الى ظهور تشوهات في اوراق وسيقان النباتات المعاملة به فضلا عن احداث الطفرات الكلوروفيلية (Eigsti, ٢٠٠٣; Reuther, ٢٠٠٥).

وظفت المطفرات الفيزياوية في المزارع النسيجية اكثر من الكيمياوية. فقد استعملت فكرة الاشعاع في استحثاث الطفرات في المزارع الخلوية او النسيجية عندما قام Melchers و Bergman (١٩٥٨) بدراسة تاثير الاشعة السينية في مزارع الخلايا المعلقة لنبات حلق السبع *Antirrhinum majus* بعد تعريضها لعدة جرعات من هذه الاشعة بهدف الحصول على سلالات خلوية متحملة للحرارة المنخفضة. وقام Schieder (١٩٧٥) بتشعيع بروتوبلاست خلايا نبات الداتورة *Datura innoxia* بهدف عزل خطوط طافرة من الكالس ونجح في ذلك، في حين لم يحصل على اية طفرة عند زراعة البروتوبلاست غير المشعع. وشعع Al-Jibouri (١٩٨٦) البراعم الجانبية للبرتقال واللالنكي بأشعة كاما وزرعها خارج الجسم الحي لاستعمالها كطعوم مطفرة. لاحظ ان البرتقال اكثر حساسية للاشعاع من اللالنكي اذ لم تستجب معظم براعم الاول للنمو.

واستطاع Dotson (١٩٨٦) الحصول على نباتات متقزمة عند معاملة المتك وحبوب لقاح نبات الذرة بأزايد الصوديوم وزراعتها خارج الجسم الحي. وباستخدام تقنية خلط البروتوبلاست مع التشعيع باشعة كاما تمكنت Vardi وجماعتها (١٩٨٧) من الحصول على نسبة لا بأس بها من الهجن الجسمانية بين النارنج والليمون والبرتقال الثلاثي الاوراق اظهرت هذه الهجن اختلافات مظهرية في اشكال واحجام الاوراق مقارنة بالنباتات الام. في حين حصل Pierik (١٩٨٧) على نسبة جيدة من النباتات الطافرة عند اضافته للكولجيسين الى المعلق الخلوي (Cell suspension) في نباتي *Dendrobium* و *Cymbidium*.

وقد لاحظت Saif وجماعتها (١٩٩٤) ان تشعيع الكالس المستحث من اجنة غير ناضجة للحنطة بالجرع ٠ أو ١ أو ٣ أو ٥ كيلوراد من اشعة كاما ادى الى انخفاض معنوي في وزن الكالس الطري ومحتوى البروتين والاحماض النووية (DNA و RNA) مع زيادة جرع الاشعاع بينما لوحظت زيادة معنوية في محتوى الكاربوهيدرات الذائبة. ونجح Al-Mashhadani و Salman (١٩٩٦) في انتاج نباتات حنطة متحملة للملوحة عند تعريض الكالس المزروع الى ١ كيلوراد من اشعة كاما.

حصل Mooney وجماعته (١٩٩٧) على نباتات لالنكي سداسية المجموعة الكروموسومية Hexaploid (٦n) بعد معاملة بذور غير ناضجة لنباتات ثلاثية المجموعة الكروموسومية (٣n) Triploid بالكولجيسين وزراعتها خارج الجسم الحي. ولاحظ Svensson (١٩٩٩) عند إكثاره نبات *Aristolochia manchuriensis* خارج الجسم الحي ان زيادة جرع الاشعاع ادت الى تقليل تضاعف الافرع وقلة استجابتها للتجذير. وعامل Dabkeviciene (٢٠٠٠) مزارع نسيجية لاجنة ناتجة من تضريبات ثنائية المجموعة الكروموسومية Diploid (٢n) تابعة للجنس *Trifolium* بمادة الكولجيسين فاستطاع الحصول على نباتات رباعية المجموعة الكروموسومية Tetraploid(٤n)، وان الاكثار الدقيق لهذه النباتات ادى الى انتاج نباتات رباعية المجموعة الكروموسومية ولم تظهر نباتات كايميرا (Chimaeric plants).

وعرّض Dwivedi وجماعته (٢٠٠٠) عقل مجذرة لانواع مختلفة من نبات *Dendranthema spp.* لجرع مختلفة من اشعة كاما فلاحظوا ظهور تشوهات مظهرية في الاوراق والازهار. بعدها أُخذت اجزاء نباتية من هذه العقل وزرعت على وسط MS لاجل اخلاف نباتات جديدة فأعطت النباتات الناتجة ازهاراً مشابهة لازهار النبات الام المعامل بالاشعة. ونجح Viloria وجماعته (٢٠٠٢) في تشعيع كالس الليمون ومن ثم اخلاف النباتات منه مما ادى الى حصول تغايرات وراثية مقارنة بتلك الناتجة من الكالس غير المشعع. ووجدوا ان نباتاً واحداً من مجموع ٧٢ نباتاً حاوياً على خلايا ثنائية المجموعة الكروموسومية واخرى رباعية المجموعة الكروموسومية.

ولوحظ بان تشعيع براعم نبات الداليا *Dahlia pinnata* بالاشعة الايونية وزراعتها خارج الجسم الحي ادى الى حصول تغايرات في لون الازهار وزيادة في قطرها (Abe *et al.*, ٢٠٠٢). واوضح Kalinowski وجماعته (٢٠٠٦) ان الكولجيسين يسبب اضطرابات جينية مؤدياً الى اظهار صفات جديدة.

واشار Nicotra (٢٠٠٦) الى ان استخدام البراعم الجانبية لنبات اللالنكي المعرضة لاشعة كاما والنامية خارج الجسم الحي كطعوم مطفرة ادى الى انتاج ثمار قليلة البذور او خالية منها.

١-٢-١٣: تقنية الهجرة الكهربائية Electrophoresis technique

اثارت دراسة البروتينات بتقنية الهجرة الكهربائية (Electrophoresis) اهتمام الكثير من الباحثين في الدراسات الوراثية بسبب كون البروتينات النواتج الاولية لتركيب او فعل الجينات. فالتغايرات الحاصلة في تتابع سلسلة القواعد المشفرة وتحت اية ظروف ينتج عنها تغايرات مماثلة في التركيب الاولي للبروتينات المُشَفَرة عنها (Scandalios, ١٩٦٩). فالتبديل او الاستعاضة الحاصلة في وحدات الاحماض الامينية المكونة للبروتينات يمكن ملاحظتها عن طريق هجرة البروتينات في حقل الهجرة الكهربائية. اذ يتم فيها فصل البروتينات او الانزيمات على اساس تسليط جهد كهربائي على وسط خامل

مثل هلام متعدد الاكريل امايد (Polyacrylamide) او النشا او الاكاروز فيتحرك بذلك كل نوع من الانزيمات او البروتينات الى قطب كهربائي موجب او سالب اعتماداً على نوع الشحنة التي يحملها وعلى وزنه الجزيئي. ويمكن مشاهدة الانزيمات او البروتينات عن طريق التصبيغ بصبغات ذات فعالية خاصة.

ان التغايرات في انماط الحزم الناتجة بين الانواع او النوع الواحد نتيجة التعريض الى جهد معين او استعمال بعض المطفرات هو تعبير عن التغاير الحاصل في مواقع الجينات المشفرة عنها البروتينات او الانزيمات المرحلة (Simpson and Withers, ١٩٨٦; Anand, ٢٠٠٦). وعلى اساس ذلك استعملت هذه التقنية لتحديد الاختلافات الوراثية بين الانواع النباتية المختلفة ولتحديد العلاقات الوراثية بينها ايضاً. فقد قام Kochba وجماعته (١٩٧٧) بتحديد الاختلافات في فعالية انزيم Peroxidase مع مرور الوقت في خطوط الكالس المشتقة من بويضات البرتقال صنف شاموتي. وتمكن Torres وجماعته (١٩٧٨) من تحديد الاختلافات الوراثية والتشابه بين انواع واصناف الجنس *Citrus* باستعمال هذه التقنية وبالاعتماد على ثلاثة نظم انزيمية هي:

- **(GOT) Glutamate oxaloacetate transaminase**
- **(PGI) Phosphoglucose isomerase**
- **(PGM) Phosphoglucose mutase.**

وبين Khilbas (١٩٩٥) وجود اختلافات متميزة عند تحليل الانزيمات للنباتات الناتجة من زراعة الانسجة مقارنة بالنباتات الام باعتماد هذه التقنية وباستعمال انزيمين هما Esterase و Peroxidase. وقام Asins وجماعته (١٩٩٥) باستعمال هذه التقنية في دراسة التحليل الانزيمي ووجدوا اختلافات في عدد الحزم ومواقعها عند دراسة خمسة انواع من الحمضيات. ولتحديد التغايرات والعلاقات الوراثية ضمن النوع الواحد والجنس الواحد ضمن نباتات الجنس *Citrus* والانواع القريبة منها فقد استعمل Herrero وجماعته (١٩٩٦) تقنية الترحيل الكهربائي وبالاعتماد على عشرة انظمة انزيمية هي PGI و PGM و GOT و ٦-Phosphogluconate dehydrogenase (٦PG) و Aconitase (ACO) و Malic acid dehyrogenase (MDH) و Superoxide dismutase (SOD) و Peroxidase و Isocitrate dehydrogenase (IDH) و Lucine aminopeptidase (LAP).

وحصل Reuther (٢٠٠٥) على تغايرات واضحة في الحزم البروتينية عند معاملة اجزاء نبات *Asparagus* بالكولجيسين وتبين من محتوى البروتين ان الحزم الناتجة للنباتات رباعية المجموعة الكروموسومية كانت غامقة جداً وكبيرة مقارنة بثنائية المجموعة الكروموسومية.

وقام العبيدي (٢٠٠٦) بدراسة تحليل البروتين الكلي لكالس تركيبين وراثيين من فول الصويا *Glycine max* المعرض الى معاملات مختلفة من الملوحة وازايد الصوديوم مستخدماً تقنية الترحيل

الكهربائي. واظهرت نتائجه وجود اختلافات بين التركيبين الوراثيين في عدد الحزم ومواقعها وشدة ظهورها على الهلام فضلاً عن اختلاف الاوزان الجزيئية المقدرة للحزم البروتينية الظاهرة على الهلام.

١-٢-١٤: مؤشرات الدنا DNA markers

تعرف مؤشرات الدنا بانها تتابعات من الدنا يمكن الاستدلال منها على مواقع (Loci) معينة على الكروموسومات، وهي تستخدم لدراسة العلاقة الوراثية بين الافراد كونها تعكس الاختلافات بينهم في المعلومات الوراثية المخزونة (Paterson *et al.*, ١٩٩١). هذه الاختلافات تكون ناتجة اما من الحذف (Deletion) او الاضافة (Insertion) او اعادة الترتيب (Rearrangement) للنيوكليوتيدات في كروموسومات الافراد المدروسة لاي سببٍ كان كالطفرات مثلاً، لذلك اعتمدت في دراسة التصنيف الجزيئي (Molecular taxonomy) والدراسات التطورية (Evolutionary studies) وفي بناء الخرائط الوراثية (Genetic maps) (Williams and Clair, ١٩٩٣).

تعكس هذه المؤشرات الاختلافات مباشرة على مستوى الدنا لذلك فاعدادها كبيرة اذ انها قادرة على الكشف عن مئات المواقع وبعدة اليلات للموقع الواحد. وتتميز عن المؤشرات المظهرية والبروتينية بعدم تأثرها بالبيئة ونوع النسيج او المرحلة التطورية للنسيج لذلك فقد تعددت مجالات تطبيقاتها على النبات لتشمل استعمالها في دراسة العلاقة الوراثية بين الانواع النباتية ولملاحظة حدوث التغايرات الوراثية الحاصلة في النباتات الناتجة من الزراعة النسيجية (Munthali *et al.*, ١٩٩٦; Del-Rio *et al.*, ١٩٩٧; Zaid *et al.*, ١٩٩٩). وعلى العموم تقسم مؤشرات الدنا حسب طريقة الكشف عن النواتج الى:

١-٢-١٤-١: مؤشرات الدنا المعتمدة على التهجين

Hybridization-based-techniques

وتشمل تباين اطوال مقاطع التقييد Restriction fragment length polymorphism (RFLP) والتي تعتمد اساساً على عملية التهجين الجزيئي للدنا المهضوم والمثبت على اغشية خاصة مع مجس مناسب. واستعملت في مجال تحسين النباتات الا ان كلفتها عالية جداً وتحتاج الى كميات كبيرة من DNA وبنقاوة عالية جداً (Williams *et al.*, ١٩٩٣) لذلك لازال استعمالها محدوداً (Anand, ٢٠٠٦).

١-٢-١٤-٢: المؤشرات المعتمدة على التفاعل التضاعفي لسلسلة الدنا

Polymerase chain reaction (PCR)

وتعد الاكثر شيوعاً في مختبرات الوراثة الجزيئية في جميع انحاء العالم. وتعرّف بانها الطريقة التي يتضاعف بها تتابع DNA معين انزيمياً ملايين المرات خارج الجسم الحي وهي محاكاة لما يحدث

في الطبيعة في جميع الكائنات الحية والتي تتضاعف مادتها الوراثية اثناء الانقسام (Tragoonring *et al.*, ١٩٩٢). ومن اهم المؤشرات التي يعتمد عليها الـ PCR هي:-

١. التفاعل العشوائي لتسلسل الدنا Arbitrary primed PCR (AP-PCR)

وتمتاز بكونها تحتاج الى بادئات مشعة بالنظائر ويتم الكشف عن النواتج المتضاعفة باستعمال هلام الاكريل امايد (Polyacrylamide gel) (Welsh and McClleland, ١٩٩٠).

٢. بصمة الدنا المتضاعفة DNA amplification fingerprint (DAF)

وهي التضاعف الانزيمي لقطع منتخبة من الكروموسوم باستعمال بادئات عشوائية مفردة قصيرة (٨-١٠ نيوكليوتيدات) ويتم الكشف عن النواتج المتضاعفة باستعمال هلام متعدد الاكريل امايد (Caetano-Anolles *et al.*, ١٩٩١).

٣. التفاعل العشوائي متعدد الاشكال لسلسلة الدنا

Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD)

تم توصيف هذه المؤشرات لاول مرة من قبل Williams وجماعته (١٩٩٠) واساس عملها يعتمد على استعمال بادئات قصيرة مصنعة من ١٠ نيوكليوتيدات واحياناً تتكون من ١٧-٣٠ نيوكليوتيدة (Castaqnone-Sereno *et al.*, ١٩٩٤).

ولهذه البادئات القدرة على الارتباط بعدة مواقع على جانبي شريط الدنا وتضاعفها وبذلك يتم الحصول على عدة قطع متضاعفة يمكن فصلها على هلام الاكاروز بعد تصبيغها ببروميد الاثيديوم والكشف عنها بالاشعة فوق البنفسجية، وان عدد الحزم الناتجة من التفاعل يعتمد على تسلسل البادئ ونوع الدنا (Williams *et al.*, ١٩٩٣).

ان استخدام البادئات العشوائية في تفاعلات الـ RAPD وعدم الحاجة الى المعرفة المسبقة بتسلسل الـ DNA قيد الدراسة فضلاً عن اختصار الوقت والجهد جعلت امكانية تطبيق هذه المؤشرات على مدى واسع من الكائنات الحية المختلفة ومن ضمنها النباتات (Russel *et al.*, ١٩٩٣). وقد اصبح للـ RAPD تطبيقات واسعة في هذا المجال اذ استخدمت في ايجاد البصمة الوراثية لـ ١٤ صنف من البروكولي و١٢ صنف من القرنابيط باستخدام ٤ بادئات عشوائية (Hu and Quiros, ١٩٩١). كما استخدمت لايجاد البصمة الوراثية لبعض اصناف الكاكاو (Wilde *et al.*, ١٩٩٢) والفلفل (Prince *et al.*, ١٩٩٥) والاجاص (Ortize *et al.*, ١٩٩٧) وبعض اصناف الحنطة (Cao *et al.*, ١٩٩٩).

وشاع استخدام الـ RAPD في تحديد العلاقة الوراثية بين الانواع وخاصة النباتات لما لذلك من اهمية في برامج التربية والتحسين لتلك الانواع اذ استخدمت في تحديد العلاقة الوراثية بين بعض اصناف البقوليات (Chalmers *et al.*, ١٩٩٢) والموز

(Howel *et al.*, ١٩٩٤) والنخيل (Sedra *et al.*, ١٩٩٨; Mokhtar *et al.*, ٢٠٠٠). كما استخدمت لتحديد الخارطة الوراثية لنبات *Passiflora edulis* (Vieira *et al.*, ٢٠٠٢) وكذلك تحديد العلاقة الوراثية بين انواع الجنس *Mangifera* (Anand, ٢٠٠٦).

ومن استخدامات الـ RAPD الاخرى هو الكشف عن التغايرات الوراثية في النباتات الناتجة من الزراعة النسيجية (Corniqual and Marcier , ١٩٩٤) اذ يتم مقارنة البصمة الوراثية للنباتات المكثرة نسيجياً مع البصمة الوراثية للنبات الأصل لاجل ابقاء او ابعاد النباتات الحاوية على تغاير وراثي مرغوب او غير مرغوب فيه (Munthali *et al.*, ١٩٩٦). اذ اشار Damusco وجماعته (١٩٩٦) و Vidal وجماعته (٢٠٠٠) الى انه تم ابعاد النباتات المتقزمة غير الممثلة لصنف الموز الاصلي بالاعتماد على تفاعلات RAPD.

كما استخدمت للكشف عن التغايرات الناتجة من زراعة البروتوبلاست لنبات قصب السكر (Jazdzewska *et al.*, ٢٠٠٠). وبين Hanacek وجماعته (٢٠٠٢) من خلال استخدام الـ RAPD انه بالإمكان زيادة التغايرات الوراثية في النباتات المكثرة نسيجياً باستخدام المطفرات. كما استخدمت هذه المؤشرات لملاحظة التغاير الوراثي لنباتات الليمون المكثرة نسيجياً (Viloria *et al.*, ٢٠٠٢) واستخدمت ايضاً في توصيف انواع الحمضيات المكثرة نسيجيا وتحديد العلاقة الوراثية بينها (Bastianel *et al.*, ٢٠٠٦).

الفصل الثاني Chapter Two

المواد وطرائق العمل Materials and Methods

نفذت تجارب البحث في مختبر زراعة الانسجة النباتية التابع للكلية التقنية-المسيب- ومختبر زراعة الانسجة النباتية التابع لقسم التقانة الاحيائية-كلية العلوم-جامعة النهرين للمدة بين ٢٠٠٤-٢٠٠٦.

٢-١: مكونات الوسط الغذائي:

استعمل الوسط الغذائي الاساس لموراشيج وسكوج MS (Murashige and Skoog,١٩٦٢) لانبات البذور وعمليات التجذير، وذلك بسحب الكمية المطلوبة بعد تحضير محاليل الاساس (جدول ١). اضيف ٣٠ غم/لتر سكروز ثم اكمل الوسط الى الحجم المطلوب بالماء المقطر وعدل الأس الهيدروجيني (pH) الى ٥.٧ باستخدام ٠.١ عياري من محلول HCl او NaOH. اضيف الاكار Agar بمقدار ٨ غم/لتر ووضع على جهاز الخلاط المغناطيسي الحراري Magnetic stirrer hotplate الى درجة الغليان لاذابة الاكار وتجانس الوسط الغذائي ثم صب في انابيب اختبار (٢٥×١٥٠ملم) بمقدار

١٠ مل/انبوب. غطيت فوهات الانابيب بالقطن ورقائق الالمنيوم (Aluminum foil) وعقمت في جهاز المعقام (Autoclave) على درجة حرارة ١٢١°م وضغط ١.٠٤ كغم/سم^{٢} لمدة ١٥ دقيقة. بعدها اخرجت الانابيب وتركت لتبرد في درجة حرارة الغرفة وتصلب الوسط فيها واصبحت جاهزة للزراعة.

اما تجارب تحفيز التفرعات الجانبية واستحثاث الكالس وتكوين الاعضاء فقد استعمل لها الوسط الغذائي الاساس لموراشيج وتوكر (Murashige and Tucker, ١٩٦٩) MT المكون من املاح العناصر الكبرى والصغرى والفيتامينات مضافاً اليه السكروز بمقدار ٥٠ غم/لتر (جدول ١). وتم تحضيره حسب ما ورد في اعلاه.

جدول (١): مكونات الاوساط الغذائية وكمياتها المستعملة في الدراسة

المكونات	وسط MS (ملغم/لتر)	وسط MT (ملغم/لتر)
أ- الأملاح المعدنية		
NH_4NO_3	١٦٥٠.٠٠٠	١٦٥٠.٠٠٠
KNO_3	١٩٠٠.٠٠٠	١٩٠٠.٠٠٠
$MgSO_4.7H_2O$	٣٧٠.٠٠٠	٣٧٠.٠٠٠
KH_2PO_4	١٧٠.٠٠٠	١٧٠.٠٠٠
$CaCl_2.2H_2O$	٤٤٠.٠٠٠	٤٤٠.٠٠٠
$Na_2MoO_4.2H_2O$	٠.٢٥٠	٠.٢٥٠
$CoCl_2.6H_2O$	٠.٠٢٥	٠.٠٢٥
KI	٠.٨٣٠	٠.٨٣٠
H_2BO_3	٦.٢٠٠	٦.٢٠٠
$MnSO_4.4H_2O$	٢٢.٣٠٠	٢٢.٣٠٠
$ZnSO_4.7H_2O$	٨.٦٠٠	٨.٦٠٠
$CuSO_4.5H_2O$	٠.٠٢٥	٠.٠٢٥
Na_2EDTA	٣٧.٢٥٠	٣٧.٢٥٠
$FeSO_4.7H_2O$	٢٧.٨٥٠	٢٧.٨٥٠
ب- المكونات العضوية		
Myo-inositol	١٠٠.٠٠٠	١٠٠.٠٠٠

Glycine	٢.٠٠٠	٢.٠٠٠
Thiamine – HCl	٠.١٠٠	١٠.٠٠٠
Nicotinic Acid	٠.٥٠٠	٥.٠٠٠
Pyridoxine – HCl	٠.٥٠٠	١٠.٠٠٠

Sucrose	٣٠٠٠٠.٠	٥٠٠٠٠.٠

٢-٢: التعقيم

٢-٢-١: تعقيم الادوات

عقمت الادوات المستعملة كافة من ملاقط ومشارط وشفرات واطباق زجاجية واوراق الترشيح بعد تغليفها برقائق الألمنيوم فضلاً عن الدوارق والأسطوانات المدرجة والقناني الزجاجية بوضعها بجهاز المعقام على درجة حرارة ١٢١° م وضغط ١.٠٤ كغم/سم^{٢} لمدة ١٥ دقيقة. ووضعت بعد التعقيم في فرن كهربائي على درجة ١٢٠°م لمدة ساعة قبل الاستعمال.

٢-٢-٢: تعقيم الاجزاء النباتية

اختبر تأثير عدة تراكيز من محلول هايبوكلورات الصوديوم (نوع Clorox تركيزه ٥.٢٥%) هي ٠.٠ و ٠.٥ و ١.٠ و ١.٥ و ٢.٠% بعد تخفيفها بالماء المقطر المعقم وصبت في دوارق زجاجية معقمة سعة ٢٥٠ مل واضيف اليها قطرتان من المادة الناشرة Tween-٢٠. نقلت الاجزاء النباتية بعد غمرها بالكحول الاثيلي المطلق لمدة ٣٠ ثانية الى الدوارق الحاوية على محلول التعقيم وعقمت لمدة ١٥ دقيقة مع التحريك المستمر وغسلت ثلاث مرات بالماء المقطر المعقم لمدة دقيقتين في كل مرة للتخلص من اثار المادة المعقمة واصبحت جاهزة للزراعة. سجلت النسبة المئوية للتلوث بعد سبعة أيام من الزراعة وجرى تحديد التركيز المناسب للتعقيم.

٢-٣: إنبات البـذور:

جمعت ثمار النارنج *Citrus aurantium* L. من اشجار بالغة بعمر حوالي ٢٠ سنة نامية في احد بساتين محافظة بابل. استخرجت البذور بقطع الثمار الناضجة بسكين وتدويرها باتجاهين متعاكسين الى ان فصلت الى نصفين وجمعت البذور وغسلت جيداً بماء الحنفية بعد فركها عدة مرات برملٍ نظيف للتخلص من المادة اللزجة المحيطة بالغلاف الخارجي للبذرة. قسمت البذور الى قسمين: الاول زرع في سنادين حاوية على خليط متجانس من الرمل والبيتموس بنسبة ١:٢. والقسم الثاني من البذور ازيلت اغلفته الخارجية الخشنة باليد ونقلت الى كابينة انسياب الهواء الطبقي (Laminar air flow cabinet) بعد وضعها في دوارق زجاجية معقمة سعة كل منها ٢٥٠ مل حاوية على تراكيز مختلفة من محلول هايبوكلورات الصوديوم المشار لها سابقا مضافاً اليها قطرتان من المادة الناشرة مع التحريك المستمر

لمدة ١٥ دقيقة. غسلت بالماء المقطر المعقم ثلاث مرات للتخلص من اثار المادة المعقمة ووضعت في اطباق بتري معقمة وازيلت اغلفتها الداخلية بمسكها بملقط معقم وشق الغلاف بالشفرة وسحبه بالملقط. زرعت بذرة واحدة منزوعة الغلاف في كل انبوب حاوٍ على الوسط الغذائي، وحضنت في غرفة النمو على درجة حرارة ٢٥ ±١ °م وشدة إضاءة ١٠٠٠ لوكس ومدة إضاءة ١٦ ساعة/يوم. اجريت هذه التجربة بهدف الحصول على بادرات معقمة تكون مصدرا للاجزاء النباتية في تجارب استحثاث الكالس فضلاً عن البادرات النامية من زراعة القسم الاول من البذور.

٢-٤: تحفيز التفرعات الجانبية

٢-٤-١: تحضير الاجزاء النباتية

استأصلت قطع ساقية حاوية على براعم ابطية بطول ٤ سم من بادرات نارنج بعمر ٤-٦ اشهر والتي سبق وان تم انباتها في خليط الرمل والبيتموس حسب ما ورد في الفقرة (٢-٣). ازيلت عنها الاوراق وغسلت جيدا بالماء الجاري مع استعمال الفرشاة لازالة ما علق بها من شوائب ووضعت تحت ماء الحنفية الجاري لمدة ساعة ثم نقلت الى كابينة انسياب الهواء الطبقي اذ جرى تعقيمها بمحلول هايبوكلورات الصوديوم بتركيز ١.٥% مضافاً له قطرتان من المادة الناشرة لمدة ١٥ دقيقة وغسلت بالماء المقطر المعقم ثلاث مرات واصبحت جاهزة للزراعة.

٢-٤-٢: زراعة الاجزاء النباتية

بعد تعقيم قطع الساق في كابينة انسياب الهواء الطبقي تم اخراجها من الدورق بصورة مفردة ووضعت في طبق بتري معقم وازيلت نهاياتها المتأثرة بمادة التعقيم وجرى تقطيعها الى قطع صغيرة (عقد) كل منها حاوية على برعم واحد وبطول ١.٥سم. زرعت كل عقدة مفردة في انبوبة اختبار وعدت مكرراً وبواقع ١٠مكررات لكل تركيز. حضنت الزروعات في غرفة النمو وعلى درجة حرارة ٢٥±١ °م وشدة إضاءة ١٠٠٠ لوكس لمدة ١٦ ساعة/يوم. سجلت البيانات بعد مرور ثمانية اسابيع من تاريخ الزراعة والتي شملت النسبة المئوية لتفتح البراعم الجانبية وعدد الافرع النامية واطوالها.

٢-٤-٣: اختبار تأثير تراكيز مختلفة من الـ BA

اختبرت التراكيز ٠.٠ و ٠.٥ و ١.٠ و ١.٥ و ٢.٠ و ٢.٥ و ٣.٠ أو ٣.٥ ملغم/لتر من الـ BA والمضافة للوسط الغذائي MT لتحديد التركيز الامثل في تحفيز التفرعات من البراعم الجانبية المستأصلة من البادرات المشار اليها في الفقرة (٢-٣). زرعت ١٠ مكررات لكل تركيز وسجلت النتائج بعد ثمانية أسابيع من الزراعة.

٢-٤-٤: اختبار تأثير توليفة من الـ BA و NAA و GA_3 في تكوين التفرعات الجانبية

بعد اختيار التركيز الامثل من BA في تحفيز التفرعات الجانبية في الفقرة السابقة (٢-٤-٣)، تم تثبيت التركيز اعلاه (١.٥ملغم/لتر) واختبر تأثير اضافة تراكيز مختلفة من NAA مع تركيز واحد (١.٥ ملغم/لتر) من GA_3 والذي كان مناسباً في استطالة الافرع في تجربة سابقة (طه، ٢٠٠٢) والمضافة للوسط MT في زيادة عدد التفرعات الجانبية وحسب التوليفة ادناه:

BA (ملغم/لتر)	NAA(ملغم/لتر)	GA_3(ملغم/لتر)
١.٥	٠.٠	١.٥
١.٥	٠.١	١.٥
١.٥	٠.٥	١.٥
١.٥	١.٠	١.٥

زرعت ١٠ مكررات من كل تركيز وسجلت النسبة المئوية لتفتح البراعم وعدد الافرع النامية واطوالها بعد ثمانية أسابيع من الزراعة.

٢-٥: مرحلة التجذير Rooting stage

اختبر تاثير التراكيز ٠ و١ و٢ و٣ أو٤ ملغم/لترمن الـ NAA مضافة الى الوسط MS بنصف القوة في تجذير الافرع ذات الطول ١ سم فما فوق. اذ تمت زراعة فرع واحد في كل انبوب حاوٍ على ١٠ مل من الوسط وبواقع ١٠ مكررات لكل تركيز. حضنت الزروعات على درجة حرارة ٢٥±١°م وشدة إضاءة ١٠٠٠ لوكس لمدة ١٦ ساعة/يوم. سجلت النتائج بعد مرور ثمانية أسابيع من الزراعة والتي شملت النسبة المئوية للتجذير وعدد واطوال الجذور.

٢-٦: استحثاث الكالس Callus induction

٢-٦-١: اختيار الجزء النباتي وزراعته

بعد انبات البذور ونمو البادرات، استأصلت منها السويقة الجنينية العليا (Epicotyl) والسويقة الجنينية السفلى (Hypocotyl) والسلاميات (Internodes) والاوراق والفلق وجرى تعقيمها في كابينة انسياب الهواء الطبقي وحسب ما ورد في (٢-٢-٢). اما البادرات المعقمة النامية على الوسط الغذائي فقد استعملت اجزاؤها مباشرة للزراعة.

وضعت الاجزاء النباتية بصورة مفردة في طبق بتري معقم وقطعت بشفرات معقمة الى قطعٍ طول كل منها ١سم وزرعت بتماس مع الوسط الغذائي في انابيب الاختبار الحاوية على ١٠ مل من الوسط الغذائي. حضنت الزروعات في غرفة النمو تحت الظروف المشار اليها سابقاً. زرعت ١٠ مكررات لكل تركيز ولكل جزء نباتي. وحسبت النسبة المئوية لتكوين الكالس بعد ستة اسابيع من تاريخ الزراعة.

٢-٦-٢: دراسة تأثير السايتوكاينين BA والاوكسين NAA في استحثاث الكالس

درس تأثير تراكيز مختلفة لتوليفة مكونة من السايتوكاينين BA مع الاوكسين NAA المضافة الى الوسط MT بهدف الحصول على افضل توليفة من التراكيز في استحثاث الكالس من الاجزاء النباتية. اضيف الـ BA بالتراكيز ٠.٠ و١.٠ و١.٥ و٢.٠ و٢.٥ و٣.٠ أو٣.٥ ملغم/لتر بالتداخل مع التراكيز ٠.٠ و٠.٥ و١.٠ و١.٥ و٢.٠ أو٢.٥ ملغم/لتر من الـ NAA. جرى تقويم الزروعات من حيث استجابتها لتكوين الكالس بعد ستة اسابيع من تاريخ الزراعة وفق التخمين بالمعاينة Visual assessment وحسب Ibrahim (١٩٩٠) وكالآتي:-

١: عدم تكوين كالس.

٢: نشوء الكالس على نهايتي الجزء النباتي.

٣: نشوء الكالس على نهايتي الجزء النباتي وفوقه.

٤: احاطة الكالس بالجزء النباتي مع امكانية مشاهدة الجزء النباتي.

٥: تحول الجزء النباتي بأكمله الى كالس.

٢-٦-٣: ادامة الكالس Maintenance of callus

اعيدت زراعة الكالس المستحث من التجربة السابقة بعد ازالة ما تبقى من الجزء النباتي على توليفة التراكيز نفسها من BA و NAA في التجربة السابقة وبعدد المكررات وظروف الزراعة والتحضين نفسها. حسب الوزن الطري والجاف (ملغم) للكالس النامي بعد ستة اسابيع من الزراعة لتحديد التركيز الملائم من منظمي النمو في ادامة انسجة الكالس وزيادة كمياتها. اعيدت زراعة الكالس المتكون اعلاه على الوسط نفسه ولعدة مرات وحسبت النسبة المئوية لبقاء الكالس بعد كل اعادة زراعة Subculture.

٢-٦-٤: استحثاث الكالس الابيض Albino callus initiation

تم استحثاث الكالس الابيض من بادرات النارنج البيضاء (Albino seedlings) النامية في السنادين بنفس طريقة استحثاث الكالس من البادرات الخضراء وحسب ما ورد سابقاً (الفقرة ٢-٦-١).

٢-٦-٥: خلط الكالس Fusion of callus tissues

اخذ ١غم من كل من الكالس الابيض والاخضر ووضعا في دورق سعة ٢٥٠ مل حاوٍ على ١٠٠ مل من الوسط الغذائي MT المعد لادامة الكالس ولكن بدون اكار وترك في الحاضنة الهزازة بسرعة ١٥٠ دورة/دقيقة وبدرجة حرارة ٢٥°م لمدة عشرة ايام لحين تفتت الكالس والحصول على معلق خلوي. تم تحضير وسط غذائي جديد من وسط ادامة الكالس وصب ١٠ مل منه في اطباق بتري معقمة داخل كابينة انسياب الهواء الطبقي وتركت لتتصلب

(Torres, ١٩٨٨). اخذ ٢ مل من المعلق الخلوي وصب على الوسط الغذائي واغلقت الاطباق بشريط البارافين. زرعت خمسة اطباق وحضنت في غرفة النمو تحت الظروف المشار اليها سابقاً.

اما الطريقة الاخرى لخلط الكالس فهي بزراعة الجزء النباتي الاخضر جنباً الى جنب مع الجزء النباتي الابيض وعلى نفس الوسط الغذائي لاستحثاث وادامة الكالس وبواقع ٣٠ مكرراً وحضنت الزروعات تحت ظروف الزراعة المشار اليها سابقاً. سجلت النتائج بعد ستة اسابيع من الزراعة.

٢-٦-٦: تكوين الاعضاء من الكالس Organogenesis

استعمل الوسط الغذائي MT بوجود ٥٠٠ ملغم/لتر من ME ومضافاً اليه التراكيز ٠.٠ و٠.٥ و١.٠ و١.٥ أو٢.٠ ملغم/لتر BA مع ٠.٠ و ٠.١ و ٠.٥ أو ١.٠ ملغم/لتر NAA لاختيار التركيز الامثل من منظمي النمو في نشوء الاعضاء من الكالس. زرعت ١٠ مكررات لكل معاملة. حضنت الزروعات تحت الظروف المشار اليها سابقاً. سجلت النتائج بعد اربعة اشهر من الزراعة مع النقل كل أربعة اسابيع على الوسط نفسه.

٢-٧: المحاليل الكيميائية

٢-٧-١: ازايد الصوديوم Sodium azide

حضر محلول اساس من ازايد الصوديوم NaN_3 وذلك بأذابة ٦٤.٩٩ ملغم من مسحوق المادة في الماء المقطر واكمل الحجم النهائي الى لتر واحد، واعتبر كمحلول اساس بتركيز ١.٠ ملي مولر وحضرت منه التخافيف الاتية ٠.٠٥ و ٠.١ و٠.٥ ملي مولر. عقمت بجهاز المعقام على درجة حرارة ١٢١°م وضغط ١.٠٤ كغم/سم^2 لمدة ١٥ دقيقة. عوملت العقد والكالس بتنقيعها بهذه المحاليل المطفرة لمدة ٣٠ او ٦٠ او ٩٠ دقيقة ثم غسلت بالماء المقطر المعقم مرتين لمدة ٣٠ دقيقة في كل مرة. زرعت على وسط تحفيز البراعم الجانبية او وسط ادامة الكالس. حسبت النسبة المئوية لتفتح البراعم والتجذير وعدد واطوال الافرع النامية والجذور ونسبة بقاء الكالس.

٢-٧-٢: الكولجيسين Colchicine

اذيب ١ غم من الكولجيسين في الماء المقطر واكمل الحجم النهائي الى ١٠٠ مل للحصول على محلول اساس تركيزه ١% (وزن/حجم)، وحضرت منه التخافيف: ٠.٠٥ و ٠.١ و٠.٥ %. عقمت بجهاز المعقام على درجة حرارة ١٢١°م وضغط ١.٠٤ كغم/سم^2 لمدة ١٥ دقيقة. عوملت الاجزاء النباتية به وسجلت النتائج كما في ازايد الصوديوم (٢-٧-١).

٢-٨: الاقلمة Acclimatization

استخرجت النبيتات الناتجة من زراعة الانسجة من الوسط الغذائي بعد ان اصبحت متجانسة قدر الامكان في مجموعها الخضري والجذري وغسلت جيداً بالماء المقطر المعقم لازالة ما علق بها من الوسط ثم غسلت بالمبيد الفطري البنليت (Benlate) بتركيز ١ غم/لتر ماء مع مراعاة اضافته الى ماء السقي وحسب الحاجة لمنع الاصابة بالامراض الفطرية. نقلت الى اصص بلاستيكية بأبعاد (١٠×١٠سم) حاوية على خليط معقم من التربة النهرية والبيتموس بنسبة ١:١ (حجم:حجم) وغطيت بأكياس بلاستيكية شفافة مع المحافظة على ظروف رطوبة مناسبة لمدة اسبوعين في غرفة النمو تحت الظروف المشار اليها سابقا ثم اخرجت من غرفة النمو لمدة اسبوعين اخرين. وبعد ذلك عُملت فتحات صغيرة في الاكياس وزيد عددها بالتدريج لحين ازالة الاكياس والتاكد من نجاح النباتات (Al-Khayri and Al-Bahrany, ٢٠٠١; Begum *et al.*, ٢٠٠٣). وضعت الاصص في الحديقة لحين نمو النباتات بصورة جيدة واصبحت جاهزة للنقل الى التربة. حسبت النسبة المئوية للنباتات المتأقلمة.

٢-٩: تقدير البروتينات الكلية

استخدمت طريقة Laemmli (١٩٧٠) لاعداد وتحضير الهلام والترحيل الكهربائي للبروتينات الكلية. حضرت المحاليل الاساس المستخدمة في التجربة بتراكيز وتوليفات معينة وكالاتي:-

المحلول الاول

محلول الاكريل امايد بس اكريل امايد Acrylamide-biss acrylamide

اذيب ١٤.٦غم من الاكريل امايد و ٠.٤ غم من بس اكريل امايد في ماء مقطر واكمل الحجم الى ٥٠مل بالماء المقطر وحفظ بالثلاجة لحين الاستعمال.

<u>المحلول الثاني</u>

المحلول الدارئ ترس حامض الهيدروكلوريك (٨.٨ pH) Tris-HCl-buffer

اذيب ١.٥٧غم من ترس حامض الهيدروكلوريك في ماء مقطر واكمل الحجم الى ٥٠مل باضافة الماء المقطر وعدّل الاس الهيدروجيني الى ٨.٨ باستخدام HCl او NaOH بتركيز ١ عياري وحفظ في الثلاجة لحين الاستعمال.

<u>المحلول الثالث</u>

المحلول الدارئ ترس حامض الهيدروكلوريك (٦.٨ pH) Tris-HCl-buffer

اذيب ١.٥غم من ترس حامض الهيدروكلوريك في ماء مقطر واكمل الحجم الى ٢٥مل باضافة الماء المقطر وعدّل الاس الهيدروجيني الى ٦.٨ باستخدام HCl او NaOH بتركيز ١ عياري وحفظ في الثلاجة لحين الاستعمال.

المحلول الرابع

محلول كبريتات دودسيل الصوديوم ١٠% Sodium dodecylsulphate (SDS)

حضر باذابة ٥ غم من كبريتات دودسيل الصوديوم في الماء المقطر واكمل الحجم النهائي الى ٥٠ مل.

المحلول الخامس

محلول بيرسلفات الامونيوم ١٠٪ Ammonium persulphate

اذيب ٠.٥ غم من بيرسلفات الامونيوم في ٥ مل ماء مقطر وتم استعماله بعد التحضير مباشرةً.

المحلول السادس

المحلول الدارئ للاقطاب Tank buffer

حضر باذابة ١٢ غم من ترس حامض الهيدروكلوريك و ٥٧ غم من الكلايسين واضيف اليه ٤٠ مل من محلول كبريتات دودسيل الصوديوم تركيز ١٠% (المحلول الرابع) واكمل الحجم الى لتر باضافة الماء المقطر.

المحلول السابع

المحلول الاساس للتصبيغ Staining stock

اذيب ١غم من صبغة كوماسي الزرقاء R-٢٥٠ (Coomassie blue) في ماء مقطر واكمل الحجم النهائي الى ١٠٠ مل باضافة الماء المقطر.

المحلول الثامن

محلول التصبيغ Staining solution

حضر بخلط ٣١.٢٥ مل من محلول الصبغة الاساس (المحلول السابع) مع ١٢٥ مل ميثانول و ٢٠ مل حامض الخليك ثم اكمل الحجم الى ٢٥٠ مل بالماء المقطر.

المحلول التاسع

محلول ازالة الصبغة ١٠% حامض الخليك-٥٠% ميثانول Destaining solution I

حضر بخلط ١٢٥ مل ميثانول مع ٢٥ مل حامض الخليك ثم اكمل الحجم الى ٢٥٠ مل باضافة الماء المقطر.

المحلول العاشر

محلول ازالة الصبغة ٧% حامض الخليك-٥٠% ميثانول Destaining solution II

حضر بخلط ٣٥ مل حامض الخليك مع ٢٥٠ مل ميثانول ثم اكمل الحجم الى ٥٠٠ مل باضافة الماء المقطر.

٢-٩-١: استخلاص البروتينات من نسيج الاوراق والكالس

استخدمت طريقة Al-Jibouri و Dham (١٩٨٩) في استخلاص البروتينات من نسيج الاوراق والكالس، اذ اخذ وزن ١٠٠ ملغم من النسيج النباتي لكل عينة واضيف له ١ مل من محلول الاستخلاص المبينة مكوناته في جدول (٢). سحقت العينات بصورة تامة في جفنة خزفية ثم نبذ المحلول بجهاز الطرد المركزي بسرعة ١٨٠٠٠ دورة/دقيقة لمدة ١٥ دقيقة. جمع الرائق Supernatant ووضع في أنابيب سعة ٥ مل وحفظت على درجة –٢٠°م.

جدول (٢): مكونات محلول استخلاص البروتينات

المـــــادة	الكميــة
ترس حامض الهيدروكلوريك Tris - HCl	٠.٩٨٥ غم
كبريتات دودسيل الصوديوم Sodium dodecylsulphate (SDS)	٢ غم
الجليسرول Glycerol	١٠ مل
الفا - ميركابتو إيثانول α - Mercapto ethanol	١٠ مل
ويكمل الحجم الى ١٠٠مل باضافة ماء مقطر	

٢-٩-٢: الترحيل الكهربائي Electrophoresis

٢-٩-٢-١: طريقة العمل

١. هلام الفصل ١٠٪ Separating gel

حضـــر ٦٠ مـــل مـــن هـــذا الهـــلام باخـــذ ٢٠ مـــل مـــن المحلـــول الاول و ١٥ مـــل مـــن المحلـــول الثـــاني و ٠.٦ مـــل مـــن المحلـــول الرابـــع و ٢٤.١ مـــل مـــاء مقطـــر. مزجـــت هـــذه المكونـــات جيـــداً بجهـــاز الخـــلاط المغناطيســـي وبعـــد رفعهـــا مـــن الجهـــاز اضـــيف اليهـــا ٣٠٠ مـــايكروليتر مـــن المحلـــول الخـــامس و٢٠ مـــايكروليتر مـــن مـــادة N,N,N,N – tetra methyl ethylene diamine (TEMED) ثم وضع المزيج في انابيب الترحيل وترك لمدة ٣٠ دقيقة ليتصلب، بعدها غسل السطح العلوي للهلام بالماء المقطر وسحبت طبقة الماء.

٢. هلام الرصّ ٤٪ Stacking gel

حضر ٢٠ مل من هذا الهلام باضافة ٢.٦٦ مل من المحلول الاول و ٥ مل من المحلول الثالث و ٠.٢ مل من المحلول الرابع و ١٢.٢ مل ماء مقطر. خلطت المحاليل بجهاز الخلاط المغناطيسي وبعد رفعها اضيف اليها ١٠٠ مايكروليتر من المحلول الخامس و ١٠ مايكروليتر من TEMED ثم اضيف هذا المزيج فوق الهلام الاول في انابيب الترحيل.

٣. التحميل والتشغيل Loading and operating

وضعت انابيب الترحيل في منظومة الفصل المغمورة بالمحلول الدارئ للاقطاب (المحلول السادس). جهزت نماذج عينات البروتين بمزج ٥٠ مايكروليتر من عينات البروتين مع قطرة من صبغة البروموفينول الزرقاء ٠.١% كصبغة دليل، ثم اخذ ٥٠ مايكروليتر من مزيج البروتين والصبغة ووضع داخل كل انبوب ثم ربط الجهاز بمجهز الفولتية Power supply وشغلت المنظومة مع تنظيم الفولتية على ١٠٠ فولت وربط الجهاز بمنظومة التبريد عند درجة حرارة ٢°م واستغرقت عملية الترحيل اربع ساعات.

٢-٩-٣: التصبيغ وازالة الصبغة Staining and destaining

بعد انتهاء عملية الترحيل اخرجت اعمدة الهلام بواسطة المحقنة وغمرت بمحلول الصبغة (المحلول الثامن) لمدة ساعة ثم ازيلت الصبغة الزائدة غير المتفاعلة مع البروتين بغمر اعمدة الهلام في محلول ازالة الصبغة الاول (المحلول التاسع) لمدة ثلاث ساعات ثم بمحلول ازالة الصبغة الثاني (المحلول العاشر) واستبدل المحلول الاخير كل ساعة لحين الحصول على حزم زرقاء واضحة.

٢-٩-٤: حساب قيم Rf للحزم البروتينية

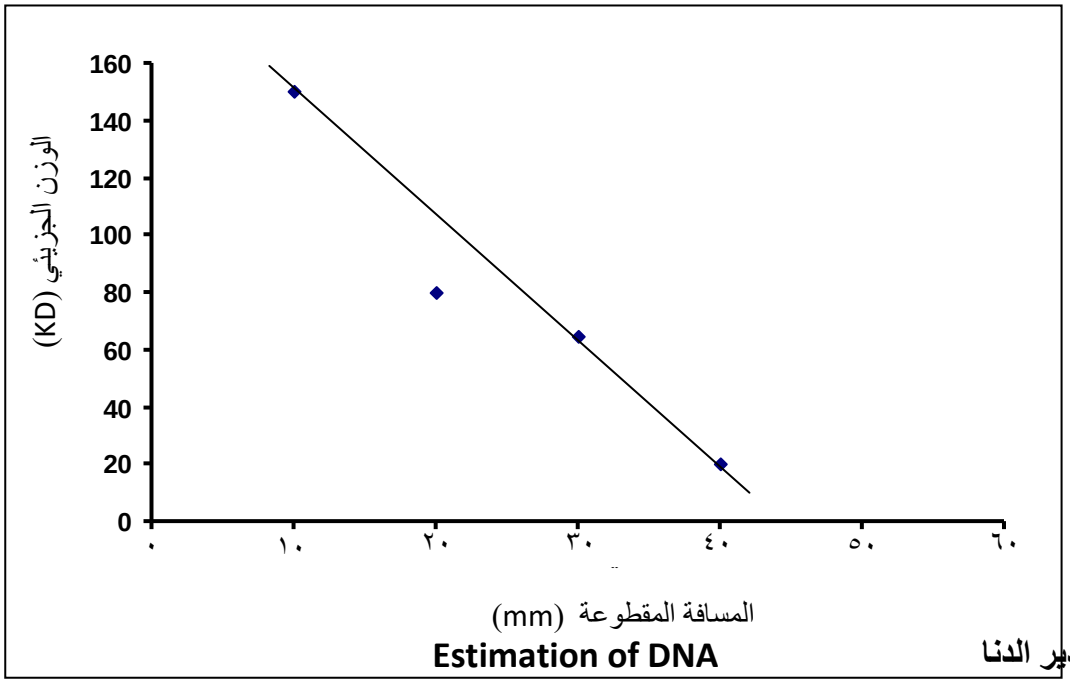
استخدمت طريقة Harborne (١٩٧٦) لتحديد قيم Rf من خلال المعادلة الاتية:-

$$\text{قيمة Rf} = \frac{\text{المسافة التي قطعتها الحزمة من نقطة بداية الترحيل}}{\text{المسافة الكلية للترحيل}}$$

٢-٩-٥: حساب الاوزان الجزيئية للبروتينات المرحلة

لغرض تحديد قيم الاوزان الجزيئية للبروتينات المرحلة فقد رُحّلَ مع العينات عينة تحتوي على اربعة بروتينات قياسية معلومة الاوزان الجزيئية ثم رسم المنحنى القياسي للبروتينات بتحديد المحور العمودي (قيم الاوزان الجزيئية للبروتينات القياسية) والمحور الافقي (المسافة التي قطعتها كل حزمة للبروتينات

القياسية) (شكل ١) ثم قدرت الاوزان الجزيئية للبروتينات الاخرى المرحلة استناداً الى هذا المنحنى (Laemmli, ١٩٧٠).



٢-١٠: تقدير الدنا **Estimation of DNA**

٢-١٠-١: عزل الدنا **Isolation of DNA**

تمت عمليات عزل الدنا وفقاً لطريقة Draper وجماعته (١٩٨٨).

٢-١٠-١-١: المحاليل المستخدمة:-

١- محلول الاستخلاص CTAB extraction buffer (pH٨) بقوة X ١

(CTAB(١%) ، Tris-HCl (٥٠ ملي مولر) ، NaCl (٠.٧ مولر) ،EDTA (١٠ ملي مولر)، ٢-ME (٢٠ ملي مولر)).

حُضر ٢٠ مل من هذا المحلول باذابة ٠.٢ غم من مادة CTAB(Cetyl trimethyl ammonium bromide) و ٠.١٢ غم من مادة ترس حامض الهيدروكلوريك (Tris-HCl) و ٠.٨١٩ غم من كلوريد الصوديوم (NaCl) و ٠.٠٧ غم من EDTA(Ethylene diamine tetra acetic acid) . عُدّل الاس الهيدروجيني (pH) الى ٨ باستخدام ٠.١ عياري من محلولHCl او NaOH. أكمل الحجم بالماء المقطر وعُقم بجهاز المعقام تحت الظروف نفسها المشار اليها سابقا وحفظ بدرجة حرارة الغرفة ثم اضيف له ٣٠ مايكروليتر من مادة ٢-ميركابتوايثانول ٢-Mercaptoethanol(٢-ME) مباشرة قبل الاستعمال.

٢- محلول الترسيب precipitation buffer (pH٨) CTAB بقوة X ١
(CTAB (١%)، EDTA (١٠ملي مولر)، Tris-HCl (٥٠ ملي مولر))

حُضـــر ١٠ مـــل منـــه باذابـــة ٠.٠١ غـــم مـــن CTAB و ٠.٠٤ غـــم مـــن EDTA و ٠.٠٦ غم من Tris-HCl ثم عُدل الاس الهيدروجيني الى ٨. أكمل الحجم بالماء المقطر وعُقم بالمعقام وحُفظ بدرجة حرارة الغرفة.

٣- محلول CTAB (١٠%)

(CTAB (١٠%)، NaCl (٠.٧ مولر)).

حُضر باذابة ٢ غم من CTAB و ٠.٨ غم من NaCl وأكمل الحجم بالماء المقطرالى٢٠ مل ثم عقم بجهاز المعقام وحفظ لحين الاستعمال.

٤- محلول كلوريد الصوديوم بتركيز ١ مولر

حُضر باذابة ٠.٥٨٥ غم وأكمل الحجم بالماء المقطر الى ١٠ مل ثم عُقم وحفظ لحين الاستعمال.

٥-محلول الكلوروفورم/كحول الاوكتانول Chloroform \ octanol solution

حُضر هذا المحلول بنسبة ١:٢٤ بمزج ٢٤ مل من الكلوروفورم مع ١ مل من كحول الاوكتانول وحفظ في قنينة زجاجية معتمة بدرجة حرارة ٤ °م لحين الاستعمال.

٦- كحول الايثانول Ethanol

حُضر محلولان بتركيز ٦٥ و٨٥% من الايثانول وحفظا لحين الاستعمال.

٧- ماء مقطر معقم

٢-١٠-١-٢: طريقة العمل

١- وزِنَ ٠.١ غم من مسحوق الكالس او ٠.٠٧ غم من مسحوق الاوراق المجفف بالتجميد وسحق جيدا مع ٠.٣ غم من هيدروكسيد الالمنيوم ($Al(OH)_3$) في جفنة خزفية معقمة الى ان تحول الى مسحوق ناعم جداً ابيض اللون.

٢- وضع مسحوق النسيج النباتي في انبوبة صغيرة معقمة (Eppendorf tube) واضيف له ٦٠٠ مايكروليتر من محلول الاستخلاص (١X CTAB) ومزج برفق باستعمال عصا بلاستيكية معقمة. حُضن المزيج في حمام مائي على درجة حرارة ٥٦°م لمدة ٢٠ دقيقة. رج الخليط بين الحين والاخر لضمان المزج الجيد.

٣- اضيف ٦٠٠ مايكروليتر من الكلوروفورم/كحول الاوكتانول ومزج جيداً حتى تحول الى مستحلب وتم نبذه في جهاز الطرد المركزي الفائق (Ulteracentrifuge) بسرعة ٨٠٠٠ دورة/دقيقة لمدة دقيقتان. رفعت الطبقة المائية وجمعت في انبوبة جديدة معقمة.

٤- غسل الطور البروتيني في الانبوبة الاصلية بـ ١٠٠ مايكروليتر من محلول الاستخلاص CTAB واعيد نبذه تحت الظروف نفسها في اعلاه. ورفعت الطبقة المائية وجمعت مع الطبقة السابقة.

٥- اضيف ٧٠ مايكروليتر من محلول CTAB بتركيز ١٠% الى الطبقة المائية التي تم جمعها ومزجت جيداً ثم اعيد الاستخلاص بالكلوروفورم/كحول الاوكتانول وبنفس الظروف اعلاه.

٦- اهمل الراسب ونُقل الجزء الرائق الى انبوب بولي اثيلين معقم واضيف له ٦٠٠ مايكروليتر من محلول الترسيب (١x CTAB). مزج جيدا وترك على درجة حرارة الغرفة لمدة ٢٠ دقيقة.

٧- نبذ المزيج بجهاز الطرد المركزي بسرعة ٢٠٠٠ دورة/دقيقة ولمدة ١٥ دقيقة لجمع الراسب. تم التخلص من الجزء الرائق وجفف الراسب.

٨- أعيدت اذابة الراسب (DNA و CTAB) في ٤٠٠ مايكروليتر من NaCl (١ ملي مولر) وسخن الى درجة حرارة ٥٥٦° م ثم نقل المحلول الى انبوبة صغيرة معقمة.

٩- اضيف ٨٠٠ مايكروليتر من الايثانول المطلق الى المحلول اعلاه ومزج جيداً وحفظ بدرجة حرارة -٢٠° م الى اليوم التالي.

١٠- نبذ المزيج السابق بسرعة ٢٠٠٠ دورة/دقيقة لمدة دقيقتان. تم التخلص من الجزء الرائق وغسل الراسب بملٍ واحد من كحول الايثانول بتركيز ٦٥% لمدة دقيقة واحدة ونبذ تحت الظروف اعلاه نفسها. تم التخلص من الكحول وكرر الغسل مرتين. اعيدت عملية الغسل بنفس الطريقة باستعمال الايثانول تركيز ٨٥%.

١١- جفف الراسب (الذي يمثل DNA فقط) واعيدت اذابته في ٨٥ مايكروليتر ماء مقطر معقم وحفظ على درجة -٢٠° م لحين الاستعمال.

٢-١٠-٢: توصيف الدنا Characterization of DNA

تضمنت عملية توصيف الدنا قياس تركيزه وتقدير نقاوته استناداً الى Sambrook وجماعته (١٩٨٩).

٢-١٠-٢-١: قياس تركيز الدنا Measurement of DNA concentration

اخذ ٥ مايكروليتر من عينة الدنا وخففت بـ ٤٩٥ مايكروليتر باستعمال محلول الاذابة نفسه في الطريقة السابقة (الماء المقطر المعقم) وتم قياس امتصاصية العينة المخففة بالاشعة فوق البنفسجية (UV-light) باستخدام جهاز قياس الكثافة الضوئية لطيف الاشعة فوق البنفسجية (Spectrophotometer) وعند الطول الموجي ٢٦٠ و ٢٨٠ نانوميتر. تم تقدير تركيز الدنا في العينة الاصلية وذلك بتطبيق المعادلة الاتية:

تركيز الدنا/مل = قراءة الامتصاصية عند الطول الموجي ٢٦٠ × معكوس التخفيف × ٥٠

على اعتبار ان القراءة عند الطول الموجي ٢٦٠ نانوميتر والتي تساوي ١ تعادل تركيزاً من الدنا مزدوج الشريط مقداره ٥٠ مايكروغرام/مل.

٢-١٠-٢-٢: تقدير نقاوة الدنا Estimation of DNA purity

تم قياس نقاوة الدنا بقسمة قراءة امتصاصية العينة المخففة عند الطول الموجي ٢٦٠ نانوميتر على قراءة الامتصاصية عند الطول الموجي ٢٨٠ نانوميتر.

٢-١٠-٣: تقدير الاحجام الجزيئية للدنا

قدرت الاحجام الجزيئية للدنا من خلال عملية الترحيل الكهربائي لعينات الدنا باستخدام هلام الاكاروز مع دليل حجمي متكون من دنا قياسي معروف الحجم الجزيئي (Zaid *et al.*, ١٩٩٩).

٢-١٠-٣-١: المحاليل المستخدمة:-

١- محلول TBE بقوة X ١٠

تم تحضير لتر منه باذابة ١٠٨ غم من مادة الترس القاعدي (Tris-base) و ٥٥ غم من حامض البوريك و ٤٠ مل من محلول EDTA (٠.٥ مولر ذو اس هيدروجيني ٨) في ٨٠٠ مل من الماء المقطر. عدل الاس الهيدروجيني الى ٧.٨ باستعمال HCl بتركيز ١٠ عياري ثم اكمل الحجم بالماء المقطر الى اللتر وعقم بالمعقام، وعند الاستعمال خفف المحلول ١٠ مرات بالماء المقطر.

٢- محلول التحميل Loading buffer (LB) بقوة X ٦

تم تحضير ١٠٠ مل منه باذابة ٠.٢٥ غم من صبغة البروموفينول الزرقاء (Bromophenol blue) في ٥٠ مل من الماء المقطر واضيف له ٣٠ مل من الجليسيرول، وعدل الاس الهيدروجيني الى ٨ باستعمال هيدروكسيد الصوديوم بتركيز ١ عياري (والذي تم تحضيره باذابة ٤ غم من هيدروكسيد الصوديوم في ١٠٠ مل من الماء المقطر) ثم اكمل الحجم الى ١٠٠ مل باضافة الماء المقطر.

٣- صبغة بروميد الاثيديوم (Ethidium bromide)

تم تحضيرها بتركيز ١٠ ملغم/مل وذلك باذابة ١٠٠ ملغم من مسحوق الصبغة في ١٠ مل من الماء المقطر وحفظت في قنينة معتمة في درجة حرارة ٤ °م لحين الاستعمال.

٤- الدليل الحجمي المتمثل بدنا قياسي معروف الحجم الجزيئي (DNA ladder) المجهز من شركة Fermentas وبتركيز ٠.١ مايكروغرام/مايكروليتر.

٢-١٠-٣-٢: طريقة تحضير هلام الاكاروز

١. تم اعداد لوح التحميل باستعمال لوح زجاجي ذو ابعاد ملائمة لحوض الترحيل الكهربائي اذ أحيطت حافات اللوح بشريط لاصق قوي وثبت عليه المشط الخاص لتكوين الحفر (Wells) عند احد اطراف الهلام.
٢. حضر هلام الاكاروز بتركيز ١.٢% وذلك للكشف عن عينات الدنا المتضاعف الذي تم تحضيره وتقدير حجمه الجزيئي باستعمال تفاعلات الـ RAPD (والتي سيرد ذكرها لاحقاً). وللحصول

على التركيز اعلاه تم اذابة ١.٢غم من الاكاروز في ١٠٠ مل من محلول TBE وسخن مع التحريك المستمر لحين اكتمال الاذابة ثم بّرد الى درجة حرارة ٥٠-٥٥°م.

٣. سُكب المستحضر برفق وبشكلٍ مستمر وهادئ لتجنب تكون الفقاعات الهوائية وازيلت بالماصة عند وجودها وترك الهلام الى ان اكتسب الصلابة.

٤. بعد تصلب الهلام رفع اللاصق ووضع في حوض الترحيل وغمر بمحلول TBE ثم رفع المشط بهدوء.

٥. تم مزج كل عينة من عينات الدنا المراد تحميلها مع ٣ مايكروليتر من محلول التحميل (LB).

٦. وزعت العينات على الحفر وروعي عدم خروج العينة من سطح الحفرة مع وضع الدليل الحجمي القياسي في الحفرة المخصصة له على احد جانبي الهلام.

٧. تم توصيل اقطاب التيار الكهربائي وجهز بقدرة ٣ فولت/سم. جرى الترحيل باتجاه القطب الموجب ، وبعد ٤-٥ ساعات وعند وصول الصبغة الزرقاء الى ما قبل نهاية الهلام تم ايقاف الترحيل.

٨. رفع اللوح من الحوض وغمر في حوض اخر حاوٍ على محلول صبغة بروميد الاثيديوم بتركيز نهائي مقداره ٥ مايكروغرام/مل وترك لنصف ساعة مع التحريك المستمر والهادئ.

٩. فُحص الهلام بتعريضه للاشعة فوق البنفسجية عند الطول الموجي ٣٦٦ و ٢٤٠ نانوميتر لرؤية حزم الدنا وتصويرها.

تحضير تفاعلات الـ RAPD

حضرت هذه التفاعلات بالاستناد الى Williams وجماعته (١٩٩٠).

١: المحاليل والمواد المستخدمة

١. المحلول المنظم PCR buffer بقوة ١٠X مجهز من شركة Roche Molecular Biochemical المكون من: ١٠٠ ملي مولر من Tris-HCl ذي الاس الهيدروجيني ٨.٣ و ٥٠٠ ملي مولر من كلوريد البوتاسيوم (KCl) و ٠.٠٠١% من الجيلاتين.

٢. القواعد النيتروجينية ثلاثية الفوسفات منقوصة الاوكسجين Deoxynucleoside triphosphates (dNTPs) والتي تشمل: ادينوسين ثلاثي الفوسفات منقوص الاوكسجين Deoxyadenosine triphosphate (dATP) والثايميدين ثلاثي الفوسفات منقوص الاوكسجين Deoxythymidine triphosphate (dTTP) والسايتدين ثلاثي الفوسفات منقوص الاوكسجين Deoxycytidine triphosphate (dCTP) والكوانوسين ثلاثي الفوسفات منقوص الاوكسجين(Deoxyguanosine triphosphate (dGTP وبتركيز ٢ ملي مولر

للمحلـــــــــول الخـــــــــزين والمجهـــــــــزة مـــــــــن شـــــــــركة Boehringer Mannheim. Gmb. H. Germany.

٣. البادئ العشوائي (Random primer) المتكون من عشر قواعد نيتروجينية والمجهز من شركة Operon Technolgies-USA رقمه OPH.٠٤ وتتابعه هو:GGAAGTCGCC

٤. كلوريد المغنيسيوم ($Mg Cl_2$) بتركيز ٢ ملي مولر.

٥. انزيم بلمرة الدنا Taq DNA polymerase.

٦. زيت معدني (Mineral oil) من شركة Sigma.

٧. اكاروز من شركة Sigma.

٢: طريقة العمل

جرى العمل بعد ارتداء القفازات وتحت كابينة انسياب الهواء الطبقي وتم حفظ كافة المحاليل على الثلج في اثناء التحضير والذي شمل الخطوات الاتية:-

١. حضر خليط التفاعل الرئيسي (Master mixture) وذلك بمزج المكونات الاتية في أنبوبة واحدة معقمة وبالتراكيز المبينة ازاء كل مادة:

المكونـــات	الحجم لعينة واحدة (مايكروليتر)
ماء مقطر معقم	١٥.٤
محلول منظم PCR buffer بقوة ١٠X	٢.٥
كلوريد المغنيسيوم	١.٢٥
dNTPs	٠.٦
البـــادئ	٢.٠
انزيم البلمرة Taq	٠.٢٥

مزجت المكونات جيداً لمدة ٣٠ ثانية ثم وضعت في جهاز الطرد المركزي الفائق لمدة ٣٠ ثانية لترسيب قطرات المحلول المتعلقة على جدار الانبوبة.

٢. وزعت المحتويات (٢٢ مايكروليتر) لكل انبوبة من الانابيب الصغيرة سعة ٠.٥ مل ومعلمة بأرقام العينات المراد ترحيلها.

٣. اضيف ٣ مايكروليتر من دنا كل عينة وذلك بعد اجراء التخافيف للنماذج المركزة باستعمال الماء المقطر المعقم للوصول الى التركيز النهائي المطلوب لبدء التفاعل التضاعفي المتعدد الاشكال لسلسلة الدنا والذي يتراوح بين ١٠-١٥٠ نانوغرام لكل مايكروليتر من عينة الدنا (Udupa *et al.*, ١٩٩٨) ليصبح الحجم النهائي ٢٥ مايكروليتر. وحضرت عينة سالبة (Negative sample) حاوية على جميع المكونات اعلاه باستثناء دنا العينة.

٤. مزجت المكونات اعلاه جيداً ونبذت لعدة ثواني لجمع محتويات التفاعل في قعر الانبوبة ثم اضيف لكل انبوبة من ٢٠-٢٥ مايكروليتر من الزيت المعدني لمنع التبخر اثناء عملية التضاعف والتي تصل فيه درجة الحرارة الى ٩٤°م (Weigand *et al.*, ١٩٩٣).

٥. نقلت الأنابيب الى جهاز المبلمر الحراري الحلقي (Thermocycler) لبدء التفاعل التضاعفي والذي تم وفق البرنامج الاتي:-

دورة واحدة لمدة خمس دقائق على درجة حرارة ٩٤°م للمسخ الاولي لشريط الدنا، تلتها ٤٠ دورة تضاعف تضمنت كل دورة دقيقة واحدة على درجة حرارة ٩٢°م لمسخ القالب ودقيقة واحدة على درجة حرارة ٣٦°م لربط البادئ بالدنا القالب ودقيقتان على درجة حرارة ٧٢°م لاستطالة البادئ المرتبط، مع دورة اخيرة واحدة للاستطالة النهائية لمدة ١٠ دقائق وعلى درجة حرارة ٧٢°م.

٦. رفعت الانابيب من المبلمر الحراري وسحبت العينات من تحت الزيت بحجم ٢٣-٢٤ مايكروليتر ومزجت مع ٣ مايكروليتر من محلول التحميل.

٧. حُضر هلام الاكاروز بتركيز ١.٢% وحملت العينات في الحفر مع الدليل الحجمي (وحسب ما ذكر في الفقرة ٢-١٠-٣-٢) ولمدة ٤-٥ ساعات.

٨. فحص الهلام بصبغة بروميد الاثيديوم تحت الاشعة فوق البنفسجية وصور الهلام باستخدام جهاز التصوير بالاشعة فوق البنفسجية UV-Camera وافلام من نوع Polaroid Black, White film Type ٦٦٧.

٩. تم تقدير الاحجام الجزيئية للقطع المتضاعفة بالاعتماد على مواقع الحزم ذات الاحجام الجزيئية المعروفة والناتجة من قطع دنا الدليل الحجمي القياسي. رسم المنحنى القياسي بين قيم الاحجام الجزيئية للدليل الحجمي الممثلة على المحور الصادي وقيم المسافات التي تبعد هذه الحزم عن حفر تحميلها داخل الهلام الممثلة على المحور السيني. قيست المسافة التي قطعتها كل حزمة (القطعة المتضاعفة) من حزم العينات المدروسة. وباسقاط عمود من تلك المسافة على المنحنى القياسي، ومن نقطة التقاطع هذه تم اسقاط عمود اخر على المحور الصادي ليمثل حجم القطعة المتضاعفة (Sambrook *et al.*,١٩٨٩).

٢-١١: التحليل الإحصائي Statistical analysis

صممت التجارب وفقاً الى التصميم العشوائي الكامل Completely randomized design (CRD) وحسبت قيمة اقل فرق معنوي Least significant differences (LSD) وعلى مستوى احتمالية ٠.٠٥ بعد مقارنة المتوسطات (الراوي وخلف الله، ١٩٨٠).