دور مستخلص ثمار الحنظل و الكلايكول متعدد الاثيلين في إستحثاث التغايرات الوراثية وتحمل الجفاف لقصب السكر خارج الجسم الحي

إبراهيم عبد الله حمزة الشمري
مدرس
dr.ibraheem16@yahoo.com

سجى جواد شنيشل بداي*
باحث
sajajawad3@gmail.com

قسم المحاصيل الحقلية – كلية الزراعة – جامعة بغداد

المستخلص

أجريت تجربة في مختبر زراعة الانسجة النباتية في كلية الزراعة – جامعة بغداد خلال العامين 2013– 2014 باستعمال زراعة الانسجة النباتية، لاستحثاث التغايرات الوراثية وتحمل الجفاف خارج الجسم الحي لصنفين من قصب السكر هما VN413 وROC1. إشتملت التجربة على إستعمال مستخلص ثمار الحنظل بالتراكيز 0.0 و50 و100 و150 و200 مل.لتر$^{-1}$، والاثيلين متعدد الكلايكول بالتراكيز 0.0 و7.5 و15.0 و22.5 و30.0غم. لتر$^{-1}$.أخذت القياسات عن معدل عدد الافرع الخضرية قبل المعاملة وبعدها بمستخلص ثمار الحنظل ، وأجري فحصRandom amplified polymorphic DNA (PCR-RAPD). بينت النتائج وجود فروق معنوية في معدل عدد الافرع الخضرية قبل المعاملة وبعدها بمستخلص ثمار الحنظل بالتركيزين 150 مل. لتر$^{-1}$ و 30.0 غم.لتر$^{-1}$ من PEG، إذ بلغ عددها قبل المعاملة بالمستخلص 2.9 فرع.نبات$^{-1}$، وبلغ عددها بعد المعاملة بالمستخلص 8.2 فرع. نبات$^{-1}$ وكشف فحص RAPD عن وجود إختلافات في عدد الحزم الناتجة وأوزانها الجزيئية في معاملات مستخلص ثمار الحنظل ومعاملة المقارنة، في ضوء النتائج يمكن الإستنتاج إن لمستخلص ثمار الحنظل القابلية على إحداث التغايرات الوراثية وزيادة تحمل النموات الخضرية لاجهاد الجفاف الناجم عن المعاملة بمركب PEG في قصب السكر ، ونوصي بعزل المادة المسؤولة عن إحداث هذه التغايرات وتشخيصها.

الكلمات المفتاحية: زراعة الانسجة النباتية، مستخلص ثمار الحنظل، PEG، PCR-RAPD.

* البحث مستل من رسالة ماجستير للباحث الثاني.

The Iraqi Journal of Agricultural Sciences – 46(4): 529-538, 2015 Al-shemary & Baday

ROLE OF *CITRULLUS COLOCYNTHIS* FRUITS EXTRACT AND POLY ETHYLENE GLYCOL IN THE INDUCTION OF GENETIC VARIATIONS AND DROUGHT TOLERANCE OF SUGARCANE IN VITRO

I. A. H. Al-shemary
Instructor
dr.ibraheem16@yahoo.com

S. J. S. Baday*
Research
sajajawad3@gmail.com

Dept. of Field Crops - Coll. of Agric - Univ. of Baghdad

ABSTRACT

An experiment was conducted plant tissue culture Labs at the College of Agriculture University of Baghdad, during 2013 – 2014 to stimulate in vitro genetic variations and drought tolerance in two cultivars of Sugarcane (VN413,ROC1).The variables were the extract of *Citrullus colocynthis* fruits at concentrations: 0,50,100,150,200 ml.L^{-1} and Poly Ethylene Glycol at concentrations :0.0,7.5,15.0, 22.5,30.0 g.L^{-1}. Measurements has taken on average of the number of the vegetative branches before and after use the extract of *Citrullus colocynthis* fruits treatment and PCR-RAPD test was done results revealed significant differences in average of the number of the vegetative branches after use with the extract of *Citrullus colocynthis* fruits at 150 ml.L^{-1} and 30.0 g.L^{-1} of PEG, is gave before extract treatment 2.9 branch.plant^{-1},and after treatment 8.2 branch.plant^{-1}. PCR-RAPD test showed differences in banding Pattern and molecular weights in the extract of *Citrullus colocynthis* fruits treatment and control treatment,in light of the results can be concluded that the extract of *Citrullus colocynthis* fruits may be have the ability to make a genetic variations and increase bearing shoots to drought stress caused by treatment with PEG in sugar cane, and recommends isolating the substance responsible for causing these variations and diagnosis.

Keywords: Plant tissue culture, Extract of (*Citrullus colocynthis*) fruits, PEG, PCR-RAPD.
***Part of M.Sc. thesis of the second author.**

المقدمة

يعد قصب السكر من المحاصيل الصناعية النقدية المهمة بوصفه مصدراً أساسياً للسكروز والايثانول في العالم ، وتعد البرازيل من أكبر الدول المنتجة لقصب السكر لعام 2011، إذ تنتج مايقارب 27.500 مليون لتر من الايثانول و31 مليون طن من السكر (14) . يعد الجفاف أكثر الاجهادات اللاحيوية التي تحدد إنتاجية المحاصيل في جميع أنحاء العالم (32). توفر تقانة زراعة الانسجة النباتية الوقت والجهد لانتاج شتلات من قصب السكر بدلاً من العقل من خلال الاكثار الخضري للنباتات وتجذيرها وأقلمتها ، كما يمكن من خلالها إحداث التغايرات الوراثية في النباتات الناتجة من خلال التطفير خارج الجسم الحي ، ثم إعادة إخلاف النباتات من خلايا الكالس أو من الاجزاء الخضرية المطفرة للحصول على نباتات متحملة للشدود البيئية كالجفاف والملوحة والحرارة المرتفعة خلال مدة زمنية قصيرة باستعمال التطفير والانتخاب خارج الجسم الحي (28)، ونظراً لإعتماد طرائق تربية النبات على الطفرات الوراثية والتهجين والانتخاب ولكون الجينات هي العوامل المسؤولة عن ظهور الصفات الوراثية فإن المطفرات قد تغير من التركيب الوراثي للكائن الحي أو جزء منه مما ينتج عنه صفة جديدة لم تكن موجودة سابقاً وإن حدوث الطفرات بصورة تلقائية في الطبيعة قليل جداً ويمكن إحداثها صناعياً بإستعمال المطفرات الفيزيائية كالاشعاع مثل أشعة كاما أوالمواد الكيمياوية مثل Ethyl methan sulphonate (EMS) و Sodium azide (SA) (26). إن المستخلصات الطبيعية تشمل مجموعة من مستخلصات النبات أو جزءاً منها . أكتسب مستخلص ثمارالحنظل أهمية خاصة وذلك من خلال البحوث والدراسات التي أجريت عليه في مجال التقانات الاحيائية لما له من أهمية طبية . أجريت كثير من الدراسات حول قابلية المركبات الفينولية على التطفير ، فقد أشار Nash وآخرون (1994) إلى إن لبعض الفلافينويدات قابلية تطفيرية على البكتريا (23)، وقد عزى قابلية الفلافينويدات على التطفير إلى وجود مركبات هيدروكاربونية حلقية Polycyclic aromatic hydrocarbons في تركيبها (31)، وجد Delazar وآخرون (2006) في دراسته عن المركبات الفينولية في نبات الحنظل إن الفحص الكيميائي الاولي بين وجود كميات كبيرة من الفينولات والفلافينويدات منتشرة في جميع أجزاء النبات (10). وفرت تقانة زراعة الانسجة النباتية عدة طرائق لاستحثاث الاجهاد الجفافي بالمواد الكيمياوية (12). يمتازمركب PEG بكونه مركباً ذا وزن جزيئي عالٍ وخامل لايخترق الخلايا النباتية و يعمل على ترك الخلايا النباتية تحت وطاة العجز المائي بطريقة مماثلة للجفاف في الظروف الطبيعية من دون أن يحدث تأثيرات سامة (27). تعد تقانة تفاعل البلمرة المتسلسل المتعاقب (PCR) من التقانات الجزيئية التي لها أهمية كبيرة في مجال البايولوجيا الجزيئية، وهناك عدد من المؤشرات التي تستخدم في تقانة PCR لغرض معرفة البصمة الوراثية منها (RAPD) وتحتاج هذه التقانة بشكل أساسي إلى بوادئ ذات تسلسل عشوائي تحتوي على أكثر من 50% من القواعد السايتوسين Cytosine والكوانين Guanine (33). أشار Chaiyabut وآخرون (2014) إلى إستعمال مؤشر RAPD في تحليل التنوع والعلاقات الوراثية في 56 صنفاً من قصب السكر إذ إستعمل 96 بادئاً عشوائياً وإن 15 منها فقط أظهرت إستجابة في تضخيم DNA ولاحظ وجود أعلى تشابه وراثي تراوح بين 0.102 – 0.998 في صنف TP07–395 وصنف AsaToa وصنف Asawa وصنف Solo–06 وأقل تشابه وراثي بلغ 0.102 في صنف SP80 (9) ، إستعمل Sarid Ullah وآخرون (2013) مؤشر RAPD والتضخيم بإستعمال تقانة PCR وعشرة بوادئ عشوائية إذ نتج عنها حزم ذات وزن جزيئي تراوح بين 190 – 1200bp وبتباين وراثي قدره 73.5% عند تحليل التنوع الوراثي لخمسة أصناف من قصب السكر (29)، بين Patade وآخرون (2006) إمكانية تحسين التحمل الجفافي والملحي لقصب السكرخارج الجسم الحي بإستعمال عدة تراكيز ملحية متداخلة مع مركب PEG وأشعة كاما (25)، تهدف هذه الدراسة إلى تقييم إستجابة صنفين من قصب السكر لتحمل الجفاف من خلال تحديد تركيز من مستخلص ثمار الحنظل الذي قد يحفز التغايرات الوراثية، وزيادة تحمل النموات الخضرية لقصب السكر لاجهاد الجفاف.

المواد والطرائق

إستعمل في هذه الدراسة صنفان من قصب السكر VN413 و ROC1 تم الحصول عليهما من الشركة العامة

للمحاصيل الصناعية / محطة بحوث الاسحاقي في الدجيل. الصنف VN413 من الاصناف الفيتنامية والصنف ROC1 مـن الاصـناف الصـينية . إسـتعملت العقـل السـاقية القميـة (الكالوح) بطول 25 – 30 سم وفصلت القمم النامية بطول 1 سم وعقمت بتركيز 4.5 % من هايبوكلورات الصوديوم، وغسلت الاجزاء المعقمة بالماء المقطر المعقم ثلاث مرات لإزالة أثار المادة المعقمة في منضدة إنسياب الهواء الطبقي. إستعمل في هذه الدراسة وسط MS الجاهز بوزن 4.6 غم. لتر$^{-1}$ في جميع مراحل الزراعة .عدل الاس الهيدروجيني PH للوسـط الغـذائي إلـى 5.7، وعقـم بجهـاز المعقـام البخـاري (Autoclave) لمدة 20 دقيقة وبدرجة حرارة 121 مْ وضغط 1.04 كغم.سم$^{-2}$، وحضنت الزروعات بدرجة حرارة 25 ±2 مْ وشدة إضاءة 1000 لـوكس لمدة 16 ساعة إضاءة و8 ساعة ظلام.

جدول 1. مكونات الوسط الغذائي المستخدم في مرحلة النشوء

المادة	الكمية (ملغم . لتر$^{-1}$)
أملاح MS	(قوة كاملة) 4600
Indol acetic acid (IAA)	1
مايوانسيتول	100
سكروز	30000
الفحم المنشط	3000
الاجار	7000

استعمل في مرحلة التضاعف وسط غذائي سائل وأضيف Benzil adnine (BA) بالتركيز 1.0 ملغـــم . لتر$^{-1}$. أتبعت طريقة (15) في تحضير مستخلص ثمار الحنظل، إذ طحنت ثمار الحنظل الجافة في جفنة خزفية، ووزن 100غم من مسحوق الحنظل وأضيف 250 مل من الماء المقطر وترك منقوعاً لمدة يوم واحد ، وفي اليوم التالي رشح الخليط بورق الترشيح بعدها أخذ الراشح ووزع في أنابيب جهاز النبذ المركزي بالتساوي (Centrifuge) وترك لينبذ مركزياً بسرعة 3000 دورة. دقيقة $^{-1}$لمدة 10 دقيقة، وإستعملت التراكيز 0 و50 و100 و150 و200 مل. لتر$^{-1}$ وأضيفت إلى الوسط الغذائي MS المجهز بتركيز 1.0 ملغم. لتر$^{-1}$ من BA وذلك لدراسة تأثير مستخلص ثمار الحنظل في صفات النمو الخضري وإجراء فحص PCR لتحديد تأثير مستخلص ثمار الحنظل في تحفيز التغايرات الوراثية. إستعملت خمسة تراكيز من مركب PEG، أضيفت إلى الوسط الغذائي في أثناء التحضير بالكميات الآتية: 0.0 و7.5 و15.0 و22.5 و30.0 غم . لتر$^{-1}$. زرعت النموات غير المعاملة والمعاملة بمستخلص ثمار الحنظل في وسط التضاعف وبواقع 8 مكررات لكل صنف وتركيز .عزلت المادة الوراثية DNA من النموات الخضرية الطرية لمعاملات مستخلص ثمار الحنظل المستعملة مل. لتر$^{-1}$ على وفق الطريقة (11). أستخدم Wizard Genomic DNA Purification Kit في إستخلاص DNA ولعينة واحدة لكل صنف وتركيز. استعمل إثنا عشر بادئاً عشوائياً تم الحصول عليها من شركة Promega الامريكية المنشأ، كل بادئ يتكون من عشر قواعد نيوكليوتيدية عشوائية وتسلسلها القاعدي كما يأتي:

جدول 2. البوادئ العشوائية وتسلسلها القاعدي

Primer code	Sequence(5´- 3´)
OPA-01	CAGGCCCTTC
OPA-03	AGTCAGCCAC
OPA-06	GGTCCCTGAC
OPA-08	GTGACGTAGG
OPA-12	TCGGCGATAG
OPB-05	TGCGCCCTTC
OPB-09	TGGGGGACTC
OPB-11	GTAGACCCGT
OPB-15	GGAGGGTGTT
OPH-04	GGAAGTCGCC
OPH-05	AGTCGTCCCC
OPH-19	CTGACCAGCC

إشتمل مزيج تفاعل DNA (PCRPreMix) لعينة واحدة على مايأتي:

جدول 3. مكونات تفاعل البلمرة المتسلسل المتعاقب

Tris-HCl	10 Mm
KCl	30 Mm
dNtps(Datp,Dctp,dGTP,dTTP)	250 µM
MgCl2	1.5 mM
Taq DNA Polymerase	1 U

المجهز من شركة BioNeer الكندية، أضيف اليه 2 مايكروليتر من البادئ و2 مايكروليتر من DNA العينة و11 مايكروليتر من الماء المقطر المعقم، تم فصل الحزم باستعمال هلام الاكروز بالتركيز 2% وبفولطية 90 فولت لمدة ساعتين، وبمقارنة الحزم المتضاعفة للعينات المدروسة والناتجة من تفاعل RAPD مع حزم DNA القياسي وتقدير أحجامها الجزيئية تم الحصول على نواتج تفاعلات RAPD لـDNA معاملات الاصناف المدروسة وحسب نوع البادئ المستخدم. نفذت جميع التجارب بإستعمال التصميم العشوائي الكامل CRD، وبتجارب عاملية وحللت النتائج بإستعمال

البرنامج الاحصائي Genestate، وقورنت المتوسطات بحسب إختبار أقل فرق معنوي (LSD) وعلى مستوى إحتمال 5% (13).

النتائج والمناقشة

تـأثير تراكيـز PEG فـي معدل عدد الافرع الخضـرية قبـل المعاملة بمستخلص ثمار الحنظل لصنفين من قصب السكر

يوضـح الجـدول (2) تفـوق الصـنف VN413 معنويـاً علـى الصـنف ROC1 فـي معـدل عـدد الافـرع الخضـرية، إذ بلـغ معدل عدد الافرع الخضرية 11.0 فرع .نبات$^{-1}$ في الصنف VN413 ، فيما بلـغ معدل عدد الافرع الخضرية 9.1 فرع .نبات$^{-1}$ في الصنفROC1 ، قد يعود السبب في كون معدل عدد الافرع الخضرية للصنف VN413 أعلى من الصنف ROC1 المعاملة بتراكيز مختلفة من مركب PFG إلى تأثير العوامل الوراثية في قابلية تحمل الجفاف ، إذ إن الاصناف المختلفة تعطي إستجابات مختلفة عند تعرضها لعوامل الشد المختلفة وهذا ماأكده (4)، فضلاً عن إنخفاض معدل عمليات الامتصاص والنقل والتمثيل الضوئي الذي يؤدي إلى إنخفاض معدل الانقسام والنمو وبذلك تبقى النباتات على قيد الحياة دون زيادة في نموها الخضري كجزء من التحمل والتكيف لظروف الاجهاد الناجمة عن المعاملة بمركب PE ، إن هذه النتائج تتفق مع ماتوصل اليه (7) . يبين الجدول (2) وجود فروق معنوية بين تراكيز PEG ، إذ تفوقت معاملة المقارنة في معدل عدد الافرع الخضرية معطية 17.3 فرع . نبات$^{-1}$ ، قد يعزى ذلك إلى عدم وجود شد عالٍ على الخلايا ومن ثم سـهولة إمتصـاص العناصـر الغذائيـة والهرمونـات اللازمـة لعمليـة البنـاء الضـوئي ، ثـم بـدأ يتنـاقص معـدل عـدد الافـرع الخضرية بزيادة تراكيز PEG ليصل معدلها إلى (14.1 ، 11.6 ، 4.4 ، 2.9) فرع . نبات$^{-1}$ عند زيادة تركيز PEG إلى (7.5 ، 15.0 ، 22.5 ، 30.0) غم . لتر$^{-1}$ بالتتابع ، إن ذلـك قـد يعـزى إلـى إنخفـاض كفـاءة التمثيـل الضـوئي كاستجابة لظروف نقص الماء التي يسببها مركب PEG إذ تفقد الاغشية الخلوية ثباتها وينخفض محتوى الاوراق من الماء كما ينخفض تركيز CO2 الداخلي وتتدهور الصبغات الضوئية ومن ثم إنخفاض معدل صافي التمثيل الضوئي التي تعد العملية الاساسية لنمو النبات (30) ، كذلك قد يعزى لتأثير الشد المائي على خفض النمو الخضري من خلال تـأثيره فـي تكـوين الاحمـاض النوويـة وكـذلك عرقلـة تمثيـل النتـروجين إذ يخفـض فعاليـة إنـزيم Ribonuclease و Nitrate reductase وإنخفاض مستوى الاحماض النووية ومن ثم يؤثر سلباً في نمو النبات من خلال تأثيره في إنقسام وإستطالة الخلايا (22)، إن هذه النتائج تتفق مع ماتوصل اليـه (3 و6 و18 و34). أمـا بخصـوص التـداخل بـين الاصـناف وتراكيـز PEG فـيلاحظ مـن الجـدول (2) تفـوق الصنف VN413 معنوياً في معدل عدد الافرع الخضرية إذ بلـغ 18.1 فرع . نبات$^{-1}$ في معاملة المقارنـة، فيما إنخفض معدل عدد الافرع الخضرية في الصنف ROC1 ليصل إلى 2.5 فرع . نبات$^{-1}$ عند التركيز 30.0 غم.لتر$^{-1}$ من PEG ، قد يعزى ذلك إلى دور مركب PEG في خفض جهد الماء بعـد إضـافته بتركيـز معـين إلـى الوسـط الغـذائي ومـن ثـم يضـعف قـدرة النمـوات علـى إمتصـاص المـاء علـى المسـتوى الذي يشبه ما يحدث في الطبيعة تحت ظروف الجفاف (2).

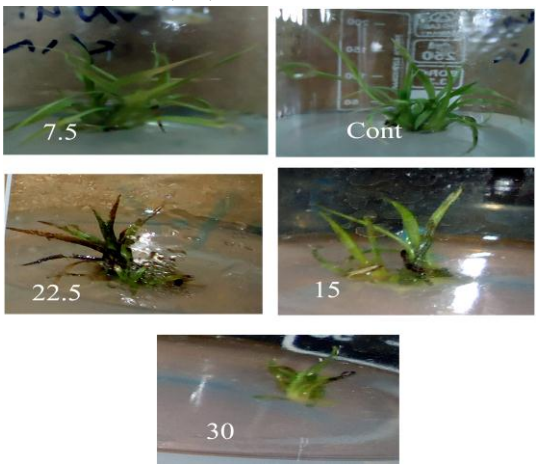
جدول 4. تأثير تراكيز مختلفة من PEG في معدل عدد الافرع الخضرية (فرع . نبات$^{-1}$) لصنفين من قصب السكر بعد أربعة أسابيع من الزراعة في وسط MS المجهز بتركيز 1.0 ملغم. لتر$^{-1}$ من BA قبل المعاملة بمستخلص ثمار الحنظل

الاصناف	تركيز PEG غم .لتر$^{-1}$					المعدل
	0.0	7.5	15.0	22.5	30.0	
VN413	18.1	15.3	13.4	5.0	3.3	11.0
ROC1	16.4	13.0	9.9	3.9	2.5	9.1
أ.ف.م 0.05	0.9					0.4
المعدل	17.3	14.1	11.6	4.4	2.9	
أ.ف.م 0.05	0.6					

تـأثير تراكيـز PEG فـي معدل عـدد الافـرع الخضـرية بعـد المعاملة بمستخلص ثمار الحنظل لصنفين من قصب السكر

يشير جدول (3) إلى وجود فروق معنوية بين صنفي قصب السكر المدروسين بعد المعاملة بمستخلص ثمار الحنظل بتركيز 150 مل.لتر$^{-1}$ في معدل عدد الافرع الخضرية قياساً باعدادها قبل المعاملة بمستخلص ثمار الحنظل كما مبين في جدول 2 ، إذ أعطى الصنف VN413 أعلى معدل لعدد الافرع الخضرية بلغ 13.7 فرع .نبات$^{-1}$ ، فيما حقق الصنف ROC1 أقل معدل لعدد الافرع الخضرية بلـغ 12.7 فرع .نبات$^{-1}$. يبين الجدول وجود فروق معنوية بين تراكيز PEG ، إذ تفوقت معاملة المقارنة في معدل عدد الافرع الخضرية وأعطـت 16.9 فـرع .نبـات$^{-1}$ وإختلفـت معنويـاً عـن بقيـة المعاملات الاخرى، فيما بلغ أقل معدل لعدد الافرع الخضرية

8.2 فرع .نبات$^{-1}$ في الوسط المجهز بتركيز 30.0 غـــم. لتر$^{-1}$ من مركب PEG. يوضح الجدول (3) إن التداخل بين الاصـناف وتراكيـز مركـب PEG كـان معنويـاً إذ أعطـى الصـنف VN413 أعلـى معدل لعـدد الافرع الخضـرية بلـغ 17.7 فرع .نبات$^{-1}$ في معاملـة المقارنـة ، وإنخفض معدل عدد الافرع الخضرية للصنف نفسه ليصل إلى 8 فرع .نبات$^{-1}$ عند التركيز 30.0 غم .لتر$^{-1}$ من مركب PEG والذي لم يختلف معنوياً عند التركيز نفسه للصنف ROC1. إن هذه الزيـادة فـي معـدل عـدد الافـرع الخضـرية بعـد المعاملـة بمستخلص ثمار الحنظل قد تعود إلى إحتواء مستخلص ثمار الحنظل على بعض المركبات كالفينولات والفلافينويدات التي تعمل على إحداث بعض التغايرات الوراثية أدت إلى زيادة معدل عدد الافرع الخضرية رغم التأثيرات السلبية لمركب PEG، وهذا ما أكده (1) حول إحتواء المستخلص الكحولي لبذور الحنظل على المركبات الفينولية التي لها القابلية على إحداث الطفرات الوراثية ، وعزى Nash وآخرون (1994) قابلية المركبات الفينولية على التطفير لاحتوائها على مركبات هيدروكاربونية حلقية (23)، أو قد يعزى السبب في زيادة معدل عدد الافرع الخضرية بعد المعاملة بمستخلص ثمار الحنظل إلى إحتواء المستخلص على الفينولات التي تعمل كمضادات للاكسدة والجذور الحرة ROS التي تنتج عند تعرض النبات للاجهاد وإزالة أضرارها وذلك ينعكس إيجابياً على نمو النبات ، وهذا ما أكده (20).



شكل 1. النبيتات الناتجة من الزراعة في وسط غذائي يحتوي على تراكيز مختلفة من مركب PEG (غم . لتر$^{-1}$) بعد أربعة أسابيع من الزراعة في وسط MS المجهز بتركيز 1.0 ملغم . لتر$^{-1}$ من BA للصنف VN413 قبل المعاملة بمستخلص ثمار الحنظل

جدول 5. تأثير تراكيز مختلفة من PEG في معدل عدد الافرع الخضرية (فرع .نبات$^{-1}$) لصنفين من قصب السكر المعاملة 150 مل .لتر$^{-1}$ من مستخلص ثمار الحنظل بعد أربعة أسابيع من الزراعة في وسط MS المجهز بتركيز 1.0 ملغم.لتر$^{-1}$ من BA

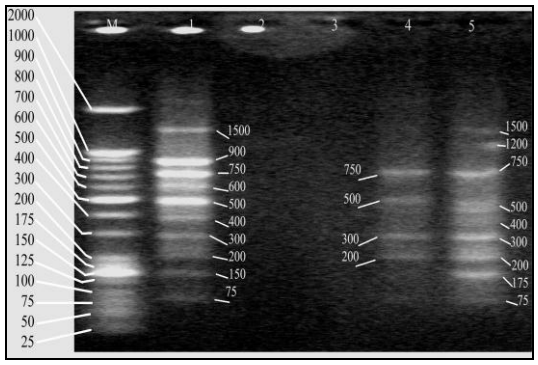
الاصناف	تركيز PEG غم .لتر$^{-1}$					المعدل
	0.0	7.5	15.0	22.5	30.0	
VN413	17.7	16.1	15.6	11.0	8.0	13.7
ROC1	16.0	15.7	12.4	11.1	8.4	12.7
أ.ف.م 0.05	0.8					0.3
المعدل	16.9	15.9	14.0	11.1	8.2	
أ.ف.م0.05	0.5					

عـدد الحـزم الناتجـة والـوزن الجزيئـي المقـدر بإسـتعمال البادئـات العشـوائية لانسـجة الصـنف VN413 المعاملـة بتراكيز مختلفة من مستخلص ثمار الحنظل

تبين الاشكال من 2–6 عدد الحزم الناتجة وأوزانها الجزيئية المقدرة لعينات DNA المعزولة من النبيتات المزروعة في أوساط زراعية حاوية على مستخلص ثمار الحنظل بالتراكيز 50 و100 و150 و200 مـل .لتـر$^{-1}$ فضـلاً عـن معاملـة المقارنة بإستعمال البـوادئ العشوائية (OPA–01، OPA–08، OPB–05 وOPH–04 وOPH–05).

البادئ OPA–01

يشير الشكل 2 إلى عدد الحزم الناتجة وأوزانها الجزيئية المقدرة لعينات DNA المعزولة ، إذ نتج عن إستعمال البادئ OPA–01 في التركيز 200 مل.لتر$^{-1}$ من مستخلص ثمار الحنظل المجهز للوسط الغذائي المزروع فيه نبيتات الصنف VN413من قصب السكر 9 حزم تراوحت أوزانها الجزيئية بين (75– 1500 bp ، أما التركيز 150 مل.لتر$^{-1}$ فقد أعطى 4 حزم باوزان جزيئية تراوحت بين 200– bp750 ، وأعطت معاملة المقارنة للبادئ نفسه 10 حزم باوزان جزيئية تراوحت بين 75– 1500 bp .



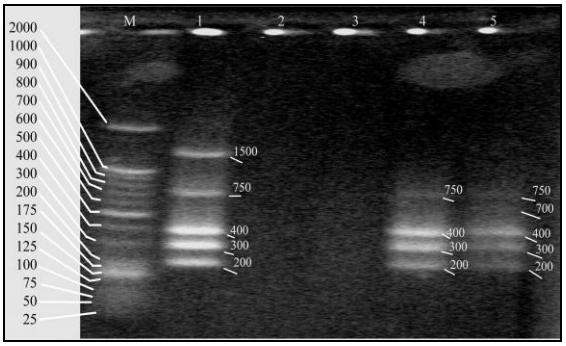
شكل 2. نواتج تفاعل PCR لمؤشرات RAPD بإستعمال البادئ OPA–01 للصنفVN413 من قصب السكر

M : (DNA Ladder).

1. معاملة المقارنة.
2. 50 مل.لتر$^{-1}$ مستخلص ثمار الحنظل.
3. 100مل.لتر$^{-1}$ مستخلص ثمار الحنظل.
4. 150 مل.لتر$^{-1}$ مستخلص ثمار الحنظل.
5. 200 مل.لتر$^{-1}$ مستخلص ثمار الحنظل.

البادئ OPA– 08

أعطى البادئ OPA–08 في التركيز 200 مل . لتر$^{-1}$ من مستخلص ثمار الحنظل 5 حزم باوزان جزيئية تراوحت بين 200 – 750 bp ، وحقق التركيز 150 مل.لتر$^{-1}$ من مستخلص ثمار الحنظل 4 حزم باوزان جزيئية تراوحت بين 200–750 bp، وأعطت معاملة المقارنة 5 حزم باوزان جزيئية تراوحت بين 200 – 1500 bp ، فيما لم تحقق معاملتا 50 و100 مل. لتر$^{-1}$ من مستخلص ثمار الحنظل أي حزم تذكر ، وكما مبين في الشكل 3 .



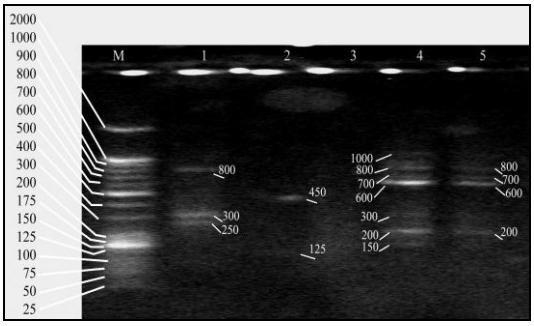
شكل 3. نواتج تفاعل PCR لمؤشرات RAPD باستعمال البادئ 08 – OPA للصنف VN413 من قصب السكر

M : (DNA Ladder).

1. معاملة المقارنة.
2. 50 مل.لتر$^{-1}$ مستخلص ثمار الحنظل.
3. 100مل.لتر$^{-1}$ مستخلص ثمار الحنظل.
4. 150 مل.لتر$^{-1}$ مستخلص ثمار الحنظل.
5. 200 مل.لتر$^{-1}$ مستخلص ثمار الحنظل.

البادئ OPB – 05

يبين الشكل 4 إن البادئ OPB–05 قد كشف في التركيز 200 مل.لتر$^{-1}$ من مستخلص ثمار الحنظل عن 4 حزم إختلفت أوزانها الجزيئية المقدرة للحزم المتضاعفة وتراوحت بين 200– 800 bp ، فيما أعطت معاملة 150 مل.لتر$^{-1}$ من مستخلص ثمار الحنظل 7 حزم باوزان جزيئية تراوحت بين 150 –1000 bp ، وحقق التركيز 50 مل.لتر$^{-1}$ من مستخلص ثمار الحنظل حزمتين بوزن جزيئي 125 و 450 bp ، فيما أعطت معاملة المقارنة 3 حزم بوزن جزيئي تراوح بين 250 – 800 bp ، ولم تحقق معاملة 100مل. لتر$^{-1}$ أي حزم تذكر.



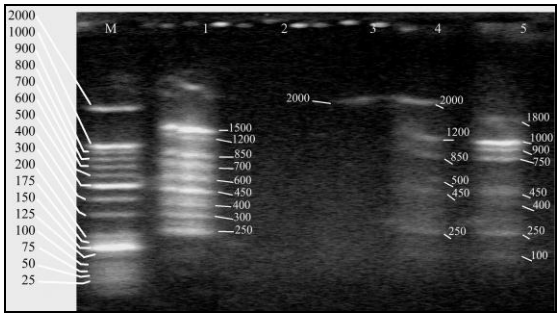
شكل 4. نواتج تفاعل PCR لمؤشرات RAPD بإستعمال البادئ05 – OPB للصنف VN413 من قصب السكر

M : (DNA Ladder).

1. معاملة المقارنة.
2. 50 مل.لتر$^{-1}$ مستخلص ثمار الحنظل.
3. 100 مل.لتر$^{-1}$ مستخلص ثمار الحنظل.
4. 150 مل.لتر$^{-1}$ مستخلص ثمار الحنظل.
5. 200 مل.لتر$^{-1}$ مستخلص ثمار الحنظل.

البادئ OPH–04

يلاحظ من الشكل (5) إن إستعمال البادئ OPH–04 قد حقق 8 حزم في معاملة 200 مل. لتر$^{-1}$ من مستخلص ثمار الحنظل للصنف VN413 تراوحت أوزانها الجزيئية بين 100– 1800 bp ، فيما أعطت معاملة 150 مل.لتر$^{-1}$ من مستخلص ثمار الحنظل 6 حزم تراوحت أوزانها الجزيئية بين 250bp–2000، وأعطت معاملة 100 مل.لتر$^{-1}$ من مستخلص ثمار الحنظل حزمة واحدة بوزن جزيئي 2000bp ، فيما أعطت معاملة المقارنة 9 حزم تراوحت أوزانها الجزيئية بين 250 – 1500 bp ، ولم تعطِ معاملة 50 مل.لتر$^{-1}$ من مستخلص ثمار الحنظل أي حزم تذكر.

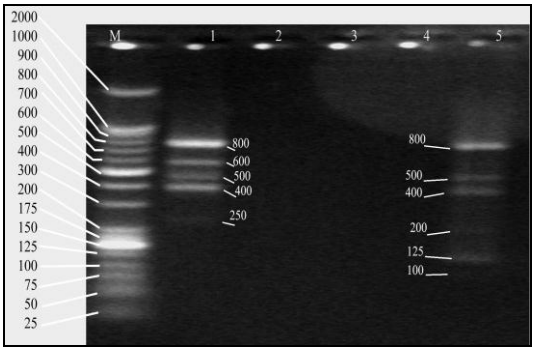


شكل 5. نواتج تفاعل PCR لمؤشرات RAPD بإستعمال البادئ OPH–04 للصنفVN413 من قصب السكر

M : (DNA Ladder) .
1. معاملة المقارنة.
2. 50 مل.لتر$^{-1}$ مستخلص ثمار الحنظل.
3. 100 مل.لتر$^{-1}$ مستخلص ثمار الحنظل.
4. 150 مل.لتر$^{-1}$ مستخلص ثمار الحنظل.
5. 200 مل.لتر$^{-1}$ مستخلص ثمار الحنظل.

البادئ OPH – 05

حقق البادئ OPH – 05 في معاملة 200 مل.لتر$^{-1}$ من مستخلص ثمار الحنظل 6 حزم تراوحت أوزانها الجزيئية بين 100– bp800 ، قياساً بمعاملة المقارنة التي أعطت 5 حزم تراوحت أوزانها الجزيئية بين 250– 800 bp، ولم تظهر أي حزم في معاملات 50 و100 و150 مل . لتر$^{-1}$ من مستخلص ثمار الحنظل، وكما موضح في الشكل 6.



شكل 6. نواتج تفاعل PCR لمؤشرات RAPD بإستعمال البادئ OPH– 05 للصنفVN413 من قصب السكر

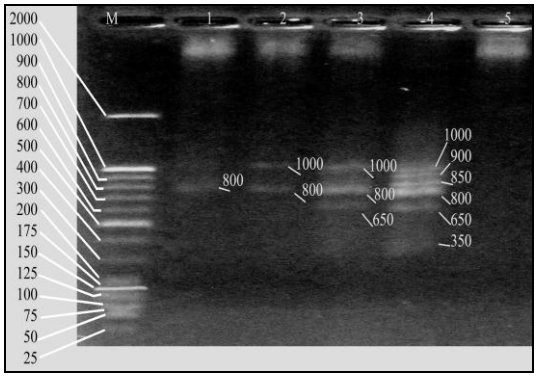
M : (DNA Ladder) .
1. معاملة المقارنة.
2. 50 مل.لتر$^{-1}$ مستخلص ثمار الحنظل.
3. 100 مل.لتر$^{-1}$ مستخلص ثمار الحنظل.
4. 150 مل.لتر$^{-1}$ مستخلص ثمار الحنظل.
5. 200 مل.لتر$^{-1}$ مستخلص ثمار الحنظل.

إن عدم ظهور الحزم في بعض المعاملات يعود إلى عدم وجود مواقع مكملة للبوادئ على DNA العينات ، وهذا يتفق مع خصوصية تفاعلات RAPD ، إذ إن عدم وجود نواتج تضاعف يدل على عدم وجود مواقع مكملة للبوادئ على DNA لمعاملات قصب السكر المدروسة (5).

إن فقدان الحزم أو إختلاف مواقعها نتيجة تغير المواقع المكملة للبادئ على DNA عينات المعاملات المدروسة قد يدل على تأثير مستخلص ثمار الحنظل في إستحداث الطفرات ، وهذا ما أكده (16) ، وإن قطع DNA المتباينة قد تنتج من اختلافات في مواقع ارتباط البوادئ بـ DNA النبات نتيجة حذف أو إضافة قاعدة أو عدد من القواعد النيتروجينية المكونة لشريطDNA هذه العمليات تعمل على حدوث تغيرات في أعداد الحزم وأوزانها الجزيئية التي تظهر بعد إجراء عملية فصل الحزم إعتماداً على الوزن الجزيئي لها في هلام الاكروز بإستعمال جهاز الترحيل الكهربائي ، وهذا من شأنه أن يكون قادراً على تنشيط جينات معينة أو إسكات جينات أخرى وبذلك يحدث تغير في واحد أو أكثر من الصفات الموجودة في النبات ، وبذلك يمكن التعرف على الاختلافات الوراثية بين الاصناف والمعاملات (3 و21).

عدد الحزم الناتجة والوزن الجزيئي المقدر بإستعمال البادئ العشوائي OPB – 05 لانسجة الصنف ROC1 المعاملة بتراكيز مختلفة من مستخلص ثمار الحنظل

يشير الشكل 7 إلى عدد الحزم الناتجة وأوزانها الجزيئية لعينات DNA لمعاملات مستخلص ثمار الحنظل المستخدمة بالتراكيز 50 و100 و 150و200 مل .لتر$^{-1}$ المجهز لوسط MS المزروع فيه الاجزاء النباتية لصنف ROC1 فضلاً عن معاملة المقارنة بإستعمال البادئ05 –OPB. أعطى التركيز 150 مل.لتر$^{-1}$ من مستخلص ثمار الحنظل 6 حزم تراوحت أوزانها الجزيئية بين bp350 – 1000، فيما حقق التركيز 100 مل.لتر$^{-1}$ من مستخلص ثمار الحنظل 3 حزم تراوحت أوزانها الجزيئية بين 650 – 1000 bp، وحقق التركيز 50 مل.لتر$^{-1}$ من مستخلص ثمار الحنظل حزمتين تراوحت أوزانهما الجزيئية بين 800 – 1000 bp، فيما أعطت معاملة المقارنة حزمة واحدة بلغ وزنها الجزيئي 800 bp ، ولم ينتج عن التركيز 200 مل.لتر$^{-1}$ من مستخلص ثمار الحنظل أي حزم تذكر.



شكل 7. نواتج تفاعل PCR لمؤشرات RAPD بإستعمال البادئ OPB – 05 للصنفROC1 من قصب السكر

(DNA Ladder) : M.

1. معاملة المقارنة.
2. 50 مل.لتر$^{-1}$ مستخلص ثمار الحنظل .
3. 100 مل.لتر$^{-1}$ مستخلص ثمار الحنظل .
4. 150 مل.لتر$^{-1}$ مستخلص ثمار الحنظل .
5. 200 مل.لتر$^{-1}$ مستخلص ثمار الحنظل .

إن الاختلافات الوراثية التي ظهرت في معاملات مستخلص ثمار الحنظل لصنفي قصب السكر، قد تعود إلى حدوث تغير في تسلسل النيوكليوتيدات نتيجة الاضافة أو الحذف أو إعادة الترتيب للنيوكليوتيدات ف DNA خلايا المعاملات للاصناف المدروسة كالتغيرات في الهيئة الكروموسومية أو الطفرات النقطية أوالارتباط والعبور أو وجود مايعرف بالجينات القافزة أو التغيير في DNA العضيات (8)، وإن هذه التغيرات الوراثية في DNA خلايا النبات قد تعد آلية ملائمة للتأقلم لظروف الشد Stress التي تتعرض لها الانسجة عند الزراعة خارج الجسم الحي و إستغلال المرونة Plasticity التي يتمتع بها DNA النبات لتكوين تركيب وراثي أكثرتكيفاً مع ظروف البيئة الجديدة (24) يتبين من الاشكال (2 و7) إن مؤشر RAPD هو من المؤشرات الكفوءة في التعرف على التباين الوراثي بين الانواع والاصناف النباتية وحتى المعاملات ، وتكمن بساطتها في إمكانية إستعمال أكثر من بادئ للتعرف على التتابعات المختلفة والمتشابهة الموجودة في شريط DNA كما إن بساطة جهاز الترحيل الكهربائي تسهل عملية عزل قطع DNA (Bands) إعتماداً على الوزن الجزيئي، وهذا يتفق مع ماوجده كثير من الباحثين (17 و25 و19 و29 و9) الذين بينوا كفاءة تقانة RAPD – PCR في التعرف على التغايرات الوراثية.

REFERENCES

1. Abbas, A. H., H. H.Obaid, L. H. Sagban, I.Abdul Ameer and R.H. Kubba. 2012. Mutagenic and anti-mutagenic effect of alcoholicextract of *(Citrullius colocynthis)* seeds using bacterial system (G-system). J. of Kerbala Univ. Sci., 10(4):229–236.

2. Al-Amery, L. K. J. 2007. Effect of Different Abiotic Stresses on Growth and Production of Microtubers of Potato (*Solanum tuberosum* L.) in Vitro. PhD. Thesis, Coll. of Agric., Univ. of Baghdad. Pp:369.

3. Al–Arradi, H. J. 2013. The Use Tissue Cultere Technique, Chemiicalsand Radiation to Produce Salt Tolerance Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) and Its Genetic Stability. PhD.Thesis, Coll. Of Agric., Univ. of Basrah. Pp:306.

4. Al–Shamary, I. A. 2007. Induction and Assessment of Variation for Drought Tolerance in some Wheat (*Triticum eastivum* L.) Cultivars in vitro. PhD. Thesis, Coll. of Agric., Univ. of Baghdad. Pp:172.

5. Bastianel, M., A. L. C. Dornelles, M. Antonio, M.E.Wickert, S.F. Maraschin, H. D. C. Filho, and G. Schafer. 2006. Characterization of citrus genotype (Citrus spp) using RAPD markers.Univ. Fed. San. Ma.,77:501– 511.

6. Begum, M. K., M. O .Islam, M. A. S. Miah, M. A. Hossain and N. Islam. 2011. Production of somaclone in vitro for drought stress tolerant plantlet selection in sugarcane (*Saccharum officinarum L.*). The Agric., Sci. J. of Krishi Foundation, 9 (1&2):18–28 .

7. Bouiamrine, E.H. and M.Diouri. 2012. Response of durum wheat (*Triticum -durum* Desf.) callus culture to osmosis induced drought stress caused by polyethylene glycol (PEG). Annals of Biol. Res., 3(9):4555–4563.

8. Brar, D. S., and S. M. Jain.1998. Somaclonal variation: Mechanism and Applic-ations in Crop Improvement. In: Jain, Brar, D. S. and B. S.Ahloowalia (eds). Somaclonal Variation and Induced Muta-tion in Crop Improvement. Kluwer Acad-emic Publishers, London. UK, pp:15–37.

9. Chaiyabut, A., S. Poeaim, A.Poeaim and K. Distabanjong. 2014. Genetic diversityanalysis of sugarcane (*Saccharum* sp.) in Thailandusing RAPD technique. J. of Agric. Tech., 10 (1): 159–165 .

10. Delazar, A., S. Gibbons, A. R. Kosari, H. Nazemiyeh, M. Modarresi, L. Nahar andS. D. Sarker. 2006. Flavone C-glycosides and cucurbitacin glycosides from *Citrulluscolocynthis*. DARU., 14:109–114.

11. Dellaporta, S. L., J. Wood and J. B. Hicks. 1983. Aplant DNA micro preparation. VersionII. Plant. Mol. Rep.,1:19– 21.

12. El–Aref, H. M. 2002. Employment of maize immature embryo culture for improve-ment of drought to lerance Proceeding of the 3rd Scientific Conference of Agric. Sci., Fac. of Agric., Assiut Univ. Assiut. E., 22: 463 -477

13. Elsahookie, M. M. and K. M. Wuhaib. 1990. Application Design and Analysis of Experiments. Univ. of Baghdad, pp:488.
14. FAO. 2014. FAOSTAT: production–crops, 2011 data international data relating to food and agriculture, available online at http:// faostat. fao.org/site/339/default.aspx.
15. Fleming, T. 2000. PDR for Herbal Medicine, Medical economics company Inc. montvale, USA., p.395–396.
16. Hanacek, P., L. Havel and M. Truksa. 2002. Characterization and determination of genetic stability of early somatic embryo culture clones of Norway spruce using RAPD markers Biol., 57:517–522.
17. Harvey, M., D. Carson, S. Grorne waid, V.Huckett, N.Msomi and F. Botha .1996. Application of the PCR–RAPD methodology to sugarcane breeding at the south African sugar association experim-ent station . CSIRO Division of Tropical Crops and Pastures Brisbane. P:67–69.
18. Islam, M. W., M. A. S. Miah, M. H. R. Pramanik, M. A. Hossain, M. K. Begum and M. S. Islam. 2009. In vitro selection of somaclones of sugarcane under drought stress condition and their evaluation in field condition. Pakistan Sugar J. XXIV,(4):13–25.
19. Lal, M., R. K.Singh, S. Srivastava, N. Singh, S. P. Singh, M. L. Sharma. 2008. RAPD marker based analysis of micro propagated plantlets of sugarcane for early evaluation of genetic fidelity. Sugar Tech.,10(1): 99–103.
20. Mehn, A. M. and F. Shahdadi. 2014. Phenolic compounds and antiradical properties of methanolic extracts of *Citrullus colocynthis* and Plantago major in Iran. Intel. J. of Bio. Sci., (IJB), 4(3): 224–228.
21. Muler, E., P. T.Brown, S. Hartke and H. Lorz. 1990. DNA variation in tissue culture derived rice plants. Theor. Appl. Genet., 80:673–679.
22. Munjal, N., S. K. Sawhney and V. sawhney .1997. Activation of nitrate reductase in extracts of water stressed. wheat phyto chemistry, 45(4): 659–665.
23. Nash, D., S. Hu, N. J. Leonard, S. Y. Tiong and D. Fillips. 1994. Theraspberry locus of Drosophila melanogaster includes and inosine mono phosphate dehydrogenes like coding sequence. J. Genome, 37:333–341.
24. Parfitt, D. E. and S. Arulseker. 1987. Measurement and origin of genetic variation in tissue culture system. In Bonga,J.M. and D.G.Durzan(eds).Cell and Tissue Culture in Forestry Volume 1. General Principles and Biol., Martinus Nijhoff Publishers . Boston. USA. Pp:286– 297.
25. Patade, V. Y., P.Suprasanna, V. A. Bapat and U.G.Kulkarni. 2006. Selection for abiotic (Salinity and Drought) stress tolerance and molecular characterization of tolerant lines in sugarcane. BARC News letter, 273:244–256.
26. Patade, V. Y. and P. Suprasanna. 2009. An in vitro radiation induced mutagenesis selection system for salinity toleranceinsugarcane.SugerTech., 11(3):246–251.
27. Rakoczy–Trojanowska, M. 2002. Alternative methods of plant transformation–ashort review. Cellular and Molecular Biology Letters, 7:849–858.
28. Samad, M. A., S. Begum and M. A. 2001. Soma clonal variation and irradiation in sugarcane callus for selection against red root water logged condition and delayed or non flowering characters. IAEA–Tecdoc., 1227:45 – 50.
29. Sarid Ullah, S. M., M. A.Hossain, M. M. Hossain, S. Barman, M. M. H.Sohag and S. H. Prodhan. 2013. Genetic diversity analysis of chewing sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) varieties by using RAPD markers. J. Bio. Sci. Biot.,2(2):145–150.
30. Shao, H. B., L. Y.Chu, C. A.Jaleel and C. X. Zhao. 2008. Water deficit stress induced anatomical changes in higher plants. Comp. Ren. Biol., 331 : 215–225.
31. Tomas-Barberan, F. A. and R. J. Robins. 1997. Photochemistry of fruit and vegetables. Calareodon Press. Oxford. Pp:375.
32.Watanabe, K. N. 2002. Challenges in biotechnology for abiotic stress tolerance on roots and tubers. Genetic engineering of crop plants for abiotic stress. Proceeding of an APECJIRCAS joint symposium and workshop, Bangkok, Thailand, JIRCAS Working Report.,23: 75–83.
33.Williams, K. J., A. Kubelik, K. Livak, J. Rafalski and S.Tingey. 1990. DNA polymorphic amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic acids Res.,18:6531–6535.

34. Zaidan, M. M. 2014. Effect of Growth Regulators, Sucrose and Moisture Stress on Microtubers Growth and Production of Three Potato *Solanum tuberosum* L.Cultivars in vitro. M.Sc. Thesis, Coll. Of Agric., Univ. of Baghdad. Pp:137.