تقييم الثبات الجيني لأنسجة نخيل التمر (Phoenix dactylifera L.) صنف الحلاوي المُكثرة خارج الجسم الحي باستخدام الواسمات الجزيئية RAPD

حليمة جبار عبد الرزاق العرادي[1] انسام مهدي صالح[2] زهراء حيدر عبد الكريم[3] سكينة عدنان عبد الغني[2]

[1]مركز علوم البحار [2]مركز ابحاث النخيل [3]كلية الزراعة

جامعة البصرة، العراق.

halema.hansen@gmail.com

الخلاصة

أجريت الدراسة في مختبرات مركز أبحاث النخيل للفترة من 2017–2019 لدراسة تاثير بعض منظمات النمو النباتية في استحثاث كالس نخيل التمر و أثرها في احداث التغيرات الوراثية على صعيد الكالس, أستخدم لتنفيذ هذه التجربة اربع توليفات تضمنت:1– المقارنة (الخالية من منظمات النمو) و ثلاثة معاملات أعطت استجابة لأستحثاث الكالس هي المعاملة 2 المتضمنة 2,4– D (5 ملغم .لتر$^{-1}$) +NAA (5 ملغم. لتر$^{-1}$) + 2i P (1 ملغم. لتر$^{-1}$) والمعاملة 3 المتضمنة 2,4– D (5 ملغم. لتر$^{-1}$) +NAA (1 ملغم. لتر$^{-1}$)+ BA(1 ملغم. لتر$^{-1}$) والمعاملة 4 المتضمنة 2 ,4–D (5ملغم. لتر$^{-1}$) + NAA (5 ملغم. لتر$^{-1}$)+ NOA (5 ملغم .لتر$^{-1}$) +IAA (1 ملغم .لتر$^{-1}$) + IBA(1 ملغم. لتر$^{-1}$) + 2i P (3 ملغم. لتر$^{-1}$) + BA (3 ملغم. لتر$^{-1}$) وتفاوتت نسبة الأستجابة لأستحثاث الكالس, بالغةً أقصى معدل لها في المعاملة (2) مسجلةً (66.4)% متفوقة على باقي معاملات التجربة في حين سجلت المقارنة (4.8)% كأدنى نسبة في استحثاث الكالس . كما سجلت المعاملة نفسها أعلى وزن طري وجاف بلغ (0.894 و 0.0844) غم وبتفوق معنوي على باقي المعاملات وجاءت المقارنة بالقيمة الأدنى بلغت (0.228 و 0.0127) غم للوزنين الطري والجاف, وبينت الدراسة وجود تطابق وراثي للكالس الناتج من المعاملات أعلاه والفسيلة والنبات الام ما عدا المعاملة الاولى الخالية من منظمات النمو والتي اعطت حزمة واحدة مختلفة عن الفسيلة والنبات الام والمعاملة الرابعة والحاوية على عدد من الاوكسينات والسايتوكاينينات اعطت حزمتين واضحتين مبينة ظهور تباين وراثي نتيجة الاختلال الهرموني في خلايا الجزء النباتي المزروع.

كلمات مفتاحية: منظمات النمو النباتية, الأكثار الدقيق, الثبات الوراثي, الكالس

المقدمة Introduction

اتجهت الأنظار نحو اكثار النخيل نسيجيا لتعويض التدني الهائل في أعداده, ورغم ان تقانة زراعة الانسجة توظف للإكثار السريع للنباتات الا أنها قد تعطي نتائج سلبية فيما لو أستخدمت منظمات النمو بتراكيز عالية, ان إستخدام منظمات النمو يعتمد على نوع وتركيز المنظم المراد استخدامه والذي يحدده الغرض من الزراعة وطبيعة الجزء النباتي المزروع ومكونات الوسط الغذائي وحالته الفيزيائية (Othmani *et al,* 2009) . ورغم ذلك فإن العديد من الهرمونات النباتية تحفز التباين الجسدي (somaclonal variation) أثناء الزراعة الفرعية المستأصلة لفترات طويلة على وسط عالي الأوكسين (Abul-Soad *et al* , 2002). لذلك كان مهماً التعرف على أثر هذه المركبات في الثبات الوراثي للصنف او النوع مبكراً في مرحلة الكالس قبل مرحلة التمييز العضوي Organogenesis لتلافي حدوث الطفرات الوراثية لاحقاً (Samad *et al.*, 2001). تعد تقانة RAPD من التقانات الكفوءة في التعرف على التباين الوراثي بين الأنواع النباتية والأصناف وحتى المعاملات، وتكمن بساطتها في إمكانية استخدام أكثر من بادئ للتعرف على التتابعات المختلفة والمتشابهة الموجودة في شريط الـ DNA كما أن بساطة جهاز الترحيل الكهربائي يسهل من عملية عزل قطع الـ DNA(Bands) اعتمادا على الوزن الجزيئي لها. ان قطع الـ DNA المتباينة ربما تنتج من اختلاف في ارتباط البادئات بـ DNA النبات, حذف أو إضافة قاعدة أو عدد من القواعد النتروجينية المكونة لشريط الـ DNA, والتي تعمل على احداث تغيرات في إعداد الحزم وأوزانها الجزيئية والتي تظهر بعد إجراء عملية فصل الحزم اعتمادا على الوزن الجزيئي لها في هلام الاكاروز باستخدام جهاز الترحيل الكهربائي وهذا من شانه قادر على تنشيط جينات معينة Gene on أو إسكات(تثبيط) جينات أخرى Gene off وبذلك يحدث تغير في واحد أو أكثر من الصفات الموجودة في النبات وبذلك يمكن التعرف على الاختلافات الوراثية بين الأصناف أو حتى في الصنف نفسه عند زراعته خارج الجسم الحي للتعرف على التغيرات الجسمية (Kunert *et al.*,2003 ; Muler *et al.*,1990). كما وجد Saker *et al.*(2000) تباين وراثي مقداره 4% بين 70 نبات تم إخلافها من مزارع أنسجة نخيل التمر باستخدام مؤشر RAPD. ان استخدام منظمات النمو النباتية المختلفة عند زراعة النخيل نسيجيا قد يؤدي الى الحصول على العديد من التغايرات الوراثية في مزارع نسيج الكالس, كما يحدث في غيره من أشجار الفاكهة ففي دراسة أجراها القاسمي (2008) بين فيها وجود تباين وراثي مقداره 78.6 % بين سبعة أصناف من الزيتون المزروعة نسيجيا باستخدام مؤشرات RAPD وتسعة بادئات عشوائية. و بين الجلبي (2009) أن من بين 25 بادئا عشوائيا تم استخدامها للتعرف على التباين الوراثي بين خمسة أصناف من التفاح المحلي في سوريا، فان 15 بادئ منها اظهر فعاليه في أعطاء التباين الوراثي إذ أعطت

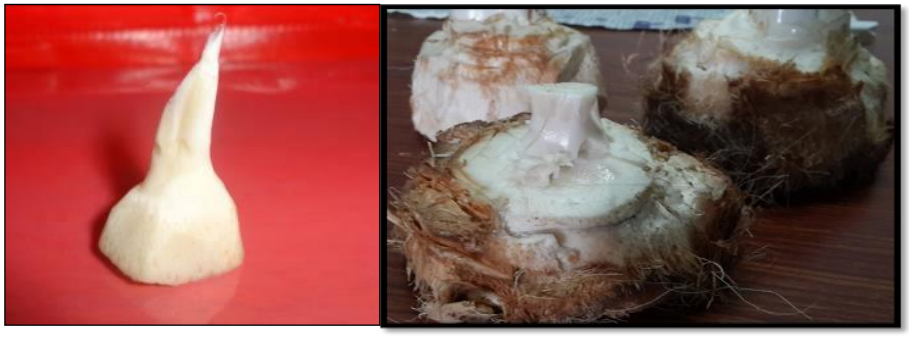
البادئات المستخدمة 152 حزمة لجميع الأصناف من بينها 39 حزمة متشابهة Monomorphic و 113 متعددة شكليا Polymorphic بنسبة تباين قدرها 74%، إذ أعطى البادئ OPE-03 أعلى عدد من الحزم، في حين أعطت البادئات P23 و P29 و P39 اقل عدد من الحزم. كما أوضح Moghaieb*et al.* (2011) وجود تشابه وراثي بين النباتات الناتجة من زراعة صنفين من نخيل التمر المزروعة نسيجيا أحدهما غير معروف والآخر هو صنف Ferhi وذلك عند استخدام مؤشر الـ RAPD وعشرة بادئات عشوائية وكل بادئ نتج عنة حزمة واحدة بحجم 200-2600 قاعدة متكاملة وأوضحت نتائجه أن هناك تباين وراثي بين الصنف غير المعروف والصنف Ferhi بلغت 36.2 و 37.8 % على التوالي عن مقارنتها مع النبات الأم. اعادة الزراعة المتكررة للكالس المتكون من الانسجة النباتية قد يؤدي الى حدوث تباين وراثي بتاثير منظمات النمو النباتية وهذه تعد مشكلة كبيرة في زراعة النخيل نسيجيا لذلك اجريت هذه الدراسة بهدف الكشف عن التباين الوراثي في وقت مبكر.

المواد وطرائق العمل Materials and Methods

نفذت التجربة في محتبر زراعة الانسجة النباتية التابع لمركز ابحاث النخيل في جامعة البصرة.

اعداد الأجزاء النباتية

اختيرت 3 فسائل صنف الحلاوي بعمر 3 سنوات من نفس الأم ,وأزيل السعف الخارجي للفسائل تدريجيا في تتابع من أسفل الى أعلى بحذر شديد كيلا تتلف البراعم الجانبية, وبعد ازالة السعف وصولا الى قلب النخلة (الجمار),(لوحة 1) تمت ازالة مبادىء الأوراق عن ا لبراعم القمية لتوضع بعدها في محلول مضاد للأكسدة, متكون من 150ملغم للتر من حامض الأسكوربك و100ملغم للتر من حامض الستريك, ثم عقمت بوضعها في محلول هايبو كلورات الصوديوم(القاصر التجاري20% مضافا اليه قطرتين من المادة الناشرة tween 20 لعشرون دقيقة, غسلت الأجزاء النباتية بعد ذلك بالماء المقطرالمعقم لأزالة آثار المادة المعقمة, داخل منضدة انسياب الهواء المعقمة, كما أخذت عينات من الأوراق الفتية للفسائل والأم. أستؤصلت الأجزاء المراد زراعتها تحت ظروف معقمة وزرعت في الوسط الغذائي الخاص بتحفيز نشوء الكالس, وحضنت في ظروف مظلمة لمدة 4-6شهرا ودرجة حرارة 25+2 مo داخل الحاضنة, وتمت أعادة الزراعة الأنسجة الى نفس البيئة المحفزة لنشوء الكالس3مرات ,مرة كل 8أسابيع. تم زراعة ارباع البراعم القمية والجانبية في وسط غذائي لتحفيز الكالس.



لوحة (1): المراحل الاخيرة من تشريح فسائل نخيل التمر صنف الحلاوي وصولا الى البرعم القمي

الوسط الغذائي

استخدم وسط غذائي مكون من مجموعة املاح MS (Murashige& Skoog , 1962) تم الحصول عليها من شركة Zist Arman Sabz(ZAS) استخدمت بواقع 4.33. ملغم لتر$^{-1}$مضافاً لها السكروز بواقع 40 غم/لتر واورثوفوسفات الصوديوم الحامضية 170ملغم / لتر وكبريتات الأدنين 40 ملغم / لتر ومجموعة الفيتامينات 10ملغم / لتر والفحم المنشط 2 غم / لتر ومنظمات النمو النباتية التي أضيفت كتوليفات للوسط الغذائي مكونةً معاملات التجربة الحالية. ضبطت قيمpH الوسط إلى5.7 –5.8 بواسطة جهاز pH–meter باستخدام (NaOH و 0.1 HCl عياري). و اضيف الاگار بمقدار6 غم/لتر واكمل الحجم بالماء المقطر وتم تسخين الوسط على (Hot plate stirrer) وعند وصول درجة الحرارة الى (90 – 91) م تم توزيع الوسط في انابيب اختبار وبمعدل 15 مل / انبوبة وسدت فوهاتها بالقطن الطبي وغلفت اعناقها بأوراق الالمنيوم . وبعدها وضعت الانابيب الزجاجية في جهاز التعقيم البخاري (المؤصدة) لمدة 20 دقيقة بدرجة حرارة 121 م وضغط قدره 1.5 بار ثم تركت لتبرد, وبعد اجراء عملية الزراعة وحضنت الأنابيب في الظلام داخل الحاضنة وعلى درجة حرارة 25±2 م .

المعاملات الخاصة بإنتاج الكالس

استخدمت خمسة عشرتوليفة لتنفيذ هذه التجربة كما مبينة في جدول (1)

وأنتخبت المعاملات التي أنتجت الكالس واستثنت المعاملات التي حدث فيها تضخم خضري فقط خلال فترة الدراسة التي امتدت لعشرة أشهر لأنتاج الكالس.

المعاملات المنتخبة (ملغم لتر$^{-1}$) :

1–المقارنة (الخالية من منظمات النمو)

2- 2,4- D 5 + NAA 5 + 2i P 1 .

3- 2,4- D 5 + NAA 1 + BA 1

4- 2 ,4-D 5 + NAA 5 + NOA 5+ IAA 1+IBA 1+ 2i P 3 + BA 3

جدول (1) التوليفات المستخدمة في التجربة لانتاج الكالس في نخيل التمر صنف الحلاوي.

التوليفة	IBA	2,4-D	NAA	NOA	IAA	BA	Kin	2iP
1	0	0	0	0	0	0	0	0
2	1	1	1	1	1	1	1	1
3	3	3	3	0	0	1	1	1
4	5	5	5	5	5	0	0	0
5	1	1	1	1	1	0	5	0
6	5	5	5	5	5	1	1	1
7	5	5	5	5	5	5	5	5
8	1	5	5	1	1	1	1	1
9	0	5	5	0	0	0	0	1
10	0	5	1	0	0	1	0	0
11	0	1	3	3	1	1	1	0
12	0	3	1	1	1	0	0	1
13	0	1	1	1	0	1	1	0
14	1	5	5	5	1	3	0	3
15	1	5	1	1	1	1	1	1

وحسبت مؤشرات النمو الآتية بعد مرور 12 اسبوع من الزراعة وظهور الكالس من البراعم القمية :

1- النسبة المئوية لأستجابة النسيج لأستحثاث الكالس: وحسبت اعتماداً على المعادلة:

النسبة المئوية لأستحثاث الكالس = عدد الأنابيب المستحثة / عدد الأنابيب الكلي ×100

2- وزن الكالس الطري(غم)

3- وزن الكالس الجاف (غم)

اختبار البصمـــة الوراثيـــــة

أجريت اختبارات البصمة الوراثية في مختبر الوراثة الجزيئية المركزي التابع لكلية الزراعة – جامعة البصرة وقبل أجراء اختبار البصمة الوراثية تم تجفيد عينات الأوراق للمعاملات المدروسة عن طريق تقنية التجفيف بواسطة التبريد(Freeze Dryer tchnique) و باستخدام جهاز التجفيد (Lyophilizre) نوع 501- Edwords \pirani وبدرجة حرارة (- 196) مº ولفترة زمنية معينة لحين التخلص من معظم الماء ثم حفظ المسحوق في عبوات محكمة الغطاء ثم وضعت في المجمدة لحين استعمالها فيما بعد، استخدمت تقنية التضاعف العشوائي المتعدد الأشكال لسلسلة الدنا Random Amplifid Polymorphic DNA (RAPD) لتحديد البصمة الوراثية ودراسة التباين الوراثي اذ تم عزل ال DNA وفقاً لطريقـة (1993) . Weigand et al. واستعملت ثلاثة بادئات عشوائية تم الحصول عليها من شركة Operon Technology تتكون من عشرة قواعد نيوكلوتيدية عشوائية (Decanucleotid Primers) و تسلسلها القاعدي كما يلي :-

OPA-01=5¯-CAGGCCCTTC-3¯

OPH-04=5¯-GGAAGTCGCC -3¯

OPH-05=5¯-AGTCGTCCCC - 3¯

ونظرا لفشل البادئ OPA-01 في اظهار اية نتائج ممكن الاعتماد عليها في هذه الدراسة استبعد من الدراسة واعتمدت نتائج البادئين OPH-04 و OPH-05. اشتمل مزيج التفاعل على المكونات المبينة في جدول (2).

جدول (2) مزيج التفاعل الخاص ب DNA

المادة	التركيز
Buffer (10x)	205 µl
Primer (30ng/µl)	1 µl
Taq DNA Polymerase	34/ µl 0.2µl
dNtps (10mM)	2µ l
MgCl2	1µl
Sterile Milliq Water	13.3 µl

جدول (3) يوضح البرنامج الذي استخدم لأجراء عملية تضخيم قطع الـ DNA المستخلص.

جدول (3) برنامج PCR لتضخيم DNA المستخلص

Stag	Step		Time	Cycle
1	1	Denaturation 94℃	1 min	1
2	1	Denaturation 94℃	1 min	40
	2	Annealing 37 ℃	1.5 min	
	3	Extension 72℃	2 min	
3	1	Extension 72℃	10 min	1

التحليل الاحصائي

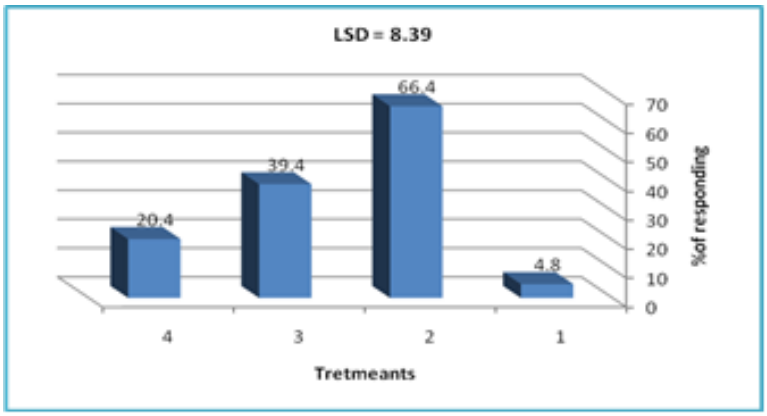
صممت التجارب على ضوء التصميم العشوائي الكامل (Completely Randomized Design (C.R.D وأستخدم برنامج Gen Stat في تحليل نتائج نسبة الأستجابة لأستحثاث الكالس وللوزنين الطري والجاف للكالس ثم أختبرت المعنوية بأستخدام أختبار أقل فرق معنوي المعدلRLSD وعلى مستوى احتمال 5%(بشير،2003).

النتائج والمناقشة **Results and Discussion**

النسبة المئوية لأستحثاث الكالس

تشير النتائج في شكل (1) واللوحة رقم (2) الى تفوق المعاملة (2) معنوياً على باقي معاملات التجربة في معدل النسبة المئوية لأستحثاث الكالس مسجلةً 66.4% وجاءت بعدها المعاملة (3) لتسجل 39.4% لتتفوق بدورها على المعاملتين (4) و المقارنة االبالغتين (20.4% و4.8 %) وبفارق معنوي فيما بينها, وكما يبدو ان المعاملات الحاوية على تراكيزمحددة من D-2,4 كانت الأعلى استجابةً لأستحثاث الكالس ان لنوع الاوكسين المستخدم وتركيزه دور في أستحثاث الكالس ألأولي وان زيادة مستويات ألأوكسينات الى حد ما يؤدي الى زيادة انتاج الكالس (Mohamed et al 2001.) يتضح من النتائج الدور المهم للأوكسينD-2,4 في استحثاث الكالس اذ ان غياب هذا الأوكسين في معاملة المقارنة أثر في استحثاث الكالس وذلك بعدم تحفيز الخلايا البرنكيمية Cell division على الإنقسام وهذا يبين أهمية الأوكسين في عملية إنقسام الخلايا إذ يعمل على تحفيز تكوين الحامض النووي الرايبوزي mRNA، واستطالتها Cell elongation عن طريق نشاطه بعملية أكسدة المواد الغذائية وتكوين الإنزيمات المتعلقة بالنمو مثل إنزيمات التنفس التي ينتج عنها طاقة عالية متمثلة بمركب ادنوسين الثلاثي الفوسفات ATP واستفادة النسيج النباتي من هذه الطاقة في عملية الإنقسام والنمو(صالح، 1991 ،المعري، 1995), وبين(2015) Mazri and, Meziani ان الاوكسين D-2,4 هو الاكثر فعالية في استحثاث الكالس, ولكن استعمال التراكيز العالية منه تؤدي الى حدوث التغايرات الجسمية (Fkiet al, 2011) . كما انالسيتوكينينات مطلوبة لاستحثاث الكالس وانقسام الخلايا (1987 ,Minocha). ان التوازن بين تطبيق auxin و cytokinin ضروري لتكوين الكالس (Rout,2004). أظهرت نتائج هذه التجربة أن استخدام تركيزات عالية من السيتوكينين في المعاملة الرابعة تسبب في الاسمرار واضمحلال في استحثاث الكالس وجد (2012) .Vescovi et al أيضا أن استخدام مستويات عالية من BA 1-9 m/l يسبب موت خلايا الكالس في المزارع النسيجية لنبات Arabidopsis thaliana. وجد(2015) Elahe et al.

أن نوع منظمات نمو النبات وظروف حضانة النباتات المستأصلة, لها تأثير معنوي على تكون الكالس والتلون البني للأجزاء النباتية المستأصلة اذ كانت الاستجابة أكثر في الظلام أدى استعمال مستويات عالية من السيتوكينين خاصة BAP إلى تقليل اللون البني، لكن تركيزاته المنخفضة أدت إلى تحسين تكون الكالس, وبين ان توليفة مكونة من الاوكسينات والسايتوكاينينات ادت الى عدم تكون الكالس متفقا بذلك مع الدراسة الحالية .



شكل (1): تأثيرالتوليفات المختلفة لمنظمات النمو النباتية في استحثاث كالس نخيل التمر صنف الحلاوي

1–المقارنة 2– 2,4– D 5 + NAA 5 + 2i P 1 –3. 2,4– D 5 + NAA 1 + BA 1

4– 2 ,4–D 5 + NAA 5+ NOA 5+ IAA 1+IBA 1+ 2i P 3 + BA 3

لوحة (2) : استحثاث كالس نخيل التمر صنف الحلاوي بتاثير المعاملة 2,4– D 5 + NAA 5 + 2i P 1

الوزن الطري والجاف للكالس

تظهر النتائج في جدول (4) التفوق المعنوي للمعاملة (2) على باقي المعاملات تليها المعاملة (3) فالمعاملة (4) ثم جاءت المقارنة الخالية من منظمات النمو مسجلةً أدنى قيمة في معدلي الوزن الطري والجاف للكالس, بلغت (0.894

و0.548 و 0.336 و0.228) غراماً على التوالي لوزن الكالس الطري و (0.0844 و0.0456 و 0.0196 و0.0127) غراماً على التوالي لوزن الكالس الجاف, وربما يعود السبب في ذلك الى توليفات منظمات النمو النباتية الأساسية في نجاح زراعة الأنسجة لأنها تنظم انقسام الخلايا وتمايز الأنسجة والأعضاء (Jennifer, *et al.* 2010). اذ ان الأوكسين (2,4–D) هو الأكثر فعالية في إستحثاث الكالس (Ahmed, *et al* 2007; Gaj, 2004) وجد (Othmani, *et al.* 2010) ان الأوكسين (2,4–D) بتركيز 1 ملغم/ لتر ادى الى استحثاث كالس نخيل التمر صنفي التونسي ودقلة نور.

جدول(4): تأثير منظمات النمو النباتية في معدل الوزن الطري والجاف للكالس.

المعاملات (ملغم لتر$^{-1}$)	الوزن الطري للكالس(غم)	الوزن الجاف للكالس(غم)	وصف الكالس
1– المقارنة (الخالية من منظمات النمو)	0.228d	0.0127d	نموات خضرية وتضخم, الكالس هش و تلون بني
2– 2,4– D 5 + NAA 5 + 2i P 1	0.894a	0.0844a	نمو جيد كالس ابيض مفصص وهش لا يوجد تلون بني
3– BA 1 + NAA 1 + 2,4– D 5	0.548b	0.0456b	نمو متوسط للكالس كالس هش نسبة منخفضة من التلون البني
4– 2 ,4–D 5 + NAA 5 + NOA 5+ BA 3 + 2i P 3+IBA 1+ IAA 1+	0.366c	0.0196c	تضخم خضري نمو كالس منخفض كالس هش تلون متوسط
LSD	0.0847	0.00758	

اختبار البصمة الوراثية:

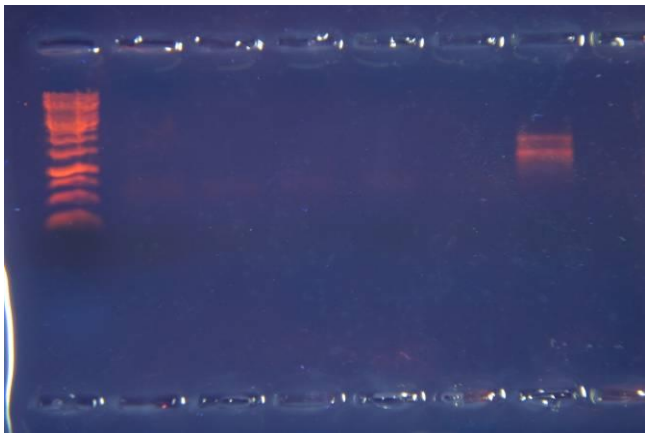
تبين النتائج الموضحة في اللوحة رقم 3 والجدول (5) حدوث اختلاف وراثي واضح من استخدام التوليفة رقم 4 وذلك بظهور حزمتين واضحتين لهما وزن جزيئي مختلف عن باقي المعاملات عند استعمال البادئ OPH–05, كما تشير النتائج الموضحة في اللوحة رقم 4 والجدول (2) الى ان استعمال البادئ OPH–04 بين ان التوليفة رقم 4 ايضا

اعطت حزمتين واضحتين ذات اوزان جزيئية مختلفة كما توضح اللوحة ايضا ان التوليفة رقم1 وهي خالية من منظمات النمو قد اعطت حزمة واحدة وقد يعود السبب الى ان افتقار الوسط الغذائي لمنظمات النمو النباتية يؤدي الى اختلال بالتوازن الهرموني مسببا تنشيط بعض الجينات الخاملة (Gene off) وظهورها من جديد وهذا يعكس الدور الاساسي والمهم لمنظمات النمو عند استعمالها بتراكيز ملائمة وهذا يدل على ان التراكيز المرتفعة من الاوكسينات و السايتوكاينينات ذات تأثير كبير على زراعة النخيل نسيجيا فضلا عن التأثير الضار لأغلبها, لقد أدت تقانة التفاعل التضاعفي لسلسلة الدنا إلى تطوير نظام للفحص الجزيئي والذي يتم فيه استخدام تقانة RAPD والتي تعتمد على استخدام تسلسل قواعد نتروجينية من بادئ DNA، فعندما يجد البادئ مناطق مشابهة له في شريط DNA يتضاعف الناتج وعند تحليل الناتج تظهر حزم مختلفة تدعى أشكالا مظهرية متعددة او تعددية شكلية (1994) .Wang *et al*. وهذا يتفق مع العديد من الباحثين الذين بينوا كفاءة تقانة الـ RAPD في التعرف على درجة التباين بين النباتات المزروعة خارج الجسم الحي والنبات الأُم الذي أخذت منه (Geisteira *et al*. 2002 ; Bennici *et al*., 2003) وقد يعود السبب بظهور حزم جديدة في نماذج الكالس المستحثة الى دور الاوكسينات في تنشيط بعض الجينات الخاملة التي تتحفز بواسطة العديد من الاشارات Signal وقد اوضح Yuxin *et al.* (2003) الميكانيكية الجزيئية لهذه الاشارات وبين ان الجين ARGOS المعروف في نبات Arabidopsis والمسؤول عن الحجم النهائي للعضو النباتي يتم حثه بواسطة الاوكسينات .

تشير نتائج الدراسة الحاليه الى ان استعمال منظمات النمو النباتيه بطريقة متوازنه ادى الى الاستقرار الوراثي للكالس الناتج متفقة بذلك مع Ahmed *et al.*(2009) الذي بين ان البراعم العرضية الناتجة من قواعد الاوراق الفتية لنخيل التمر والبالغة 180 برعما كانت متطابقة مع النبات الام عند استعمال تقانة RAPD ونتائج مشابهة تم الحصول عليها من قبل(2010) Othmani *et al.* عند دراسته على صنفين من نخيل التمر التونسي ودقلة نور.

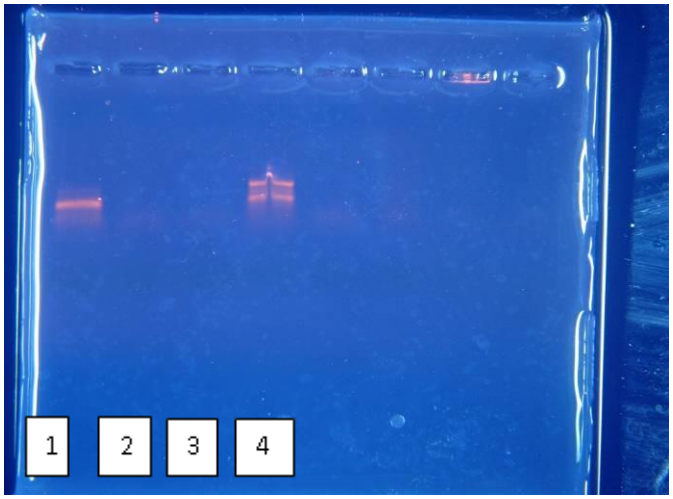
جدول (5) : الكشف عن التباين الوراثي باستعمال البادئات العشوائية وبتاثير المعاملات المختلفة

نوع البادئ	المعاملة	عدد الحزم
OPA-01	فشل البادئ في الكشف عن التباين الوراثي	لا يوجد
OPH-04	المقارنة (خالية من منظمات النمو)	1
	BA 3 + 2i P 3+IBA 1+ IAA 1+ NOA 5+ NAA 5 + 2 ,4-D 5	2
OPH-05	BA 3 + 2i P 3+IBA 1+ IAA 1+ NOA 5+ NAA 5 + 2 ,4-D 5	2



لوحة رقم (3):استخدام البادئ OPH-05 في الكشف عن الاختلاف الوراثي

M : Marker100pb,1-النبات الام ,2- الفسيل ,3 – التوليفة (1) ,4-التوليفة (2) ,5- التوليفة (3),6- التوليفة (4) .



لوحة رقم (4) :استخدام البادئ OPH-O4 في الكشف عن الاختلاف الوراثي

1- التوليفة 1 ,2- التوليفة 2 ,3- التوليفة 3 ,4- التوليفة 4

المصادر **References**

بشير، سعد زغلول (2003) . دليلك الى البرنامج الإحصائي SPSS . الإصدار العاشر .المعهد العربي للتدريب والبحوث الإحصائية : 159 – 170 ص.

الجلبي، علا توفيق وبيان محمد مزهر و خليل المعري (2009). توصيف بعض أصناف التفاح المحلية في سوريا باستخدام بعض المؤشرات الشكلية والجزيئية. المجلة الأردنية في العلوم الزراعية، المجلد ، 5(1): 73-88.

صالح، مصلح محمد سعيد (1991). فسيولوجيا منظمات النمو النباتية، وزارة التعليم العالي والبحث العلمي. جامعة صلاح الدين- جمهورية العراق، الطبعة الأولى.

القاسمي، علي زيد (2008). دراسات بيوتكنولوجية على إكثار وتحسين بعض أصناف الزيتون. جامعة القاهرة. كلية الزراعة- رسالة ماجستير- القاهرة – مصر.

المعري, خليل وجيه(1995). إكثار النخيل بواسطة تقنية زراعة الأنسجة النباتية، جامعة دمشق – كلية الزراعة – دمشق.

Abul-Soad, A., I. Ibrahim, N. El-Sherbeny and S. Baker (2002). In vitro optimization for plant regeneration of date palm (*Phoenix dactylifera* L.). Minia. J. Agric. Res. Dev. 22: 2265-2282.

Ahmed O, Chokri B, Noureddine D, Mohamed M, Mokhtar T (2009). Regeneration and molecular analysis of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) plantlets using RAPD markers. Afr. J. Biotechnol. 8(5): 813-820.

Bennici, A.,Anzidei, M.,Vendramin, G.G. (2003). Genetic stability and uniformity of *Foeniculum vulgare* Mill, regenerated plants t hrough organogenesis and somatic embryogenesis.*Plant Science*,166: 1-7.

Elahe B. P. ;Mohammadi; E. S. and Seyedeh Z. H.(2015). Effects of some plant growth regulators and light on callus induction and explants browning in date palm (*Phoenix dactylifera* L.) in vitro leaves culture , Iranian Journal of Plant Physiology, Vol (5), No(4).

Fki L, Masmoudi R, Kriaâ W, Mahjoub A, Sghaier B, et al. (2011) Date palm micropropagation via somatic embryogenesis. In: Date palm biotechnology, Jain SM, Al-Khayri JM, Johnson DV (eds) Springer, Dordrecht.

Gaj MD (2004) Factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Plant Growth Regul. 43:27-47.

Geisteira, A.S., Otoni, W.C., Barros, E.G. and Moreira, M.A. (2002). RAPD-based detection of genomic instability in soybean plants derived from somatic embryogenesis. Plant Breeding, 121: 269-271.

Jennifer KC, Reflini, Harry EI, Brian PF, Stephen PC, Peter DS (2010) Effects of Picloram in Inflorescence Culture of Oil Palm. Sumatra Biosci, Singapore, pp. 71-78.

Kunert, K. J. Baaziz, M. and Cullis, C.A. (2003). Techniques de termination of true to type date plam (*Phoenixdactylifera* L.) Plants : A literature review. Am. J. Agric. Sci. Vol. 15(1): 1-16.

Mazri MA, Meziani (2015) Micropropagation of date palm: A review. In Vitro Cell Dev Biol Plant. 4: 160.

Minocha, S. C. 1987. Plant growth regulators and morphogenesis in cell and tissue culture of forest trees, In: Cell and Tissue Culture in Forestry, General Principles and Biotechnology, JM Bonga and DJ Durzan (Ads.) Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, pp: 50-66

Moghaieb, R.E.A. ; Abde-Hadi, A.A. and Ahmed, R. A. (2011). Genetic stability among date plantlets regenerated from petiole explants. Afric. J. Biot., Vol. 10(65):14311-1431.

Mohamed, S.M.; El-Sharabasy, S.F.; Bosila,H.A.; Ibrahim,I.A. andRefay, K.A.(2001). Micropropagation studies on Zaghloul and Sewi cultivars of Date Palm (*Phoenix dactylifera* L.).1-Callus initiation and formation . Proc. 2nd Inter. Con. on date palm Al-Ain , U.A.E. March, 2001:491-499.

Muler, E.; Brown, P. T.; Hartke, S. and Lorz, H. (1990). DNA variation in tissue culture derived rice plants. Theor. Appl. Genet, 80:673-679.

Murashige , T. and Skoog ,F.(1962) .A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. PhysiologiaPlantarum 15: 473-497

Othmani A, Bayoudh C, Drira N, Trifi M (2009). In Vitro cloning of date palm *(Phoenix dactylifera* L)., Cv. Deglet Bey by using embryogenic suspension and temporary immersion bioreactor (TIB). Biotechnol Equip. 23:2, 1181-1188

Othmani, A.; Rhouma, S.; Bayoudh, C.; Mzid, R.; Drira, N. and Trifi, M. (2010). Regeneration and analysis of genetic stability of plantlets as revealed by RAPD and

AFLP markers in date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cv. Deglet Nour. *Int. Res. J. Plant Sci.,* 1: 48-55.

Saker, M.; Bekheet, S.; Taha, H.; Fahmy, A. and Moursy, H. (2000). Detection of somaclonal variations in tissue culture derived date palm plants using isoenzyme analysis and RAPD finger prints. BiologiaPlantarum, 43:347-351.

Samad, M. A., Begum, S. and Majid, M. A. (2001). Somaclonal 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.

Vescovi, M., M. Riefler, M. Gessuti, O. Nova, T. Schmulling and F. L. Schiavo. 2012. 'Programmed cell death induced by high levels of cytokinin in Arabidopsis cultured cells is mediated by the cytokinin receptor CRE1/AHK4'.Journal of Experimental Botany Advance Access, 6: 1-8

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

Weigand, F.; Baum, M. and Udupa, S. (1993). DNA molecular marker techniques. Technical manual. No. 20. International Research for Agriculture Research in The Dry Areas, Aleppo, Syria.

Yuxin H.; Xie, Q. and Nam, C. (2003). The Arabidopsis Auxin-Inducible Gene ARGOS Controls Lateral Organ Size, Plant Cell; 15 (9): 1951-1961.

Evaluation of genetic stability of *in vitro*-propagated date palm tissues *(Phoenix dactylifera* L.) cv Hillawi using RAPD molecular markers

Haleemah J. Al-Aradi[1]; Ansam M. Salih[2] ; Zahraa H. Abdulkarem[3] ; Sukainah A. Abdulqani[2]

Marine Science Centre[1]; Date Palm Research Centre[2]; Agriculture College[3]

University of Basrah, Iraq

halema.hansen@gmail.com

Abstract

The study was conducted in the laboratories of Date Palm Research Center to study some plant growth regulators in the induction of callus in the date palm and its effect on causing genetic changes at the level of callus. This experiment carried out; four treatments were used that included (1) the control (free of growth regulators) and three treatments that gave a response to callus induction; they were the treatment (2) that included 2,4-D (5 mg. l-1) + NAA (5 mg. l-1)) +2i P (1 mg. l-1) and treatment (3) including 2,4-D 5) mg. l-1)+1) NAA mg. l-1) + BA (1 mg. l-1) and treatment (4) including, 4-D) 2 5 mg. l-1) + 5) NAA mg. l-1) + NOA (5 mg. l-1) + IAA (1 mg. l-1) + IBA (1 mg. l-1) + 2i P (3 mg. l-1) + BA) 3 mg. l-1). The response rate for callus induction varied, reaching its maximum rate in treatment (2) recorded (66.4%), while control treatment (1) recorded (4.8%) as the lowest rate in callus induction. Also, treatment (2) recorded the highest fresh and dry weight of (0.894) and (0.0844) g with a significant increase compared with other treatments, while the control recorded the lowest value of (0.228 and 0.0127) g of fresh and dry weight. The results showed that there was a genetic match for the callus resulting from the treatments between the seedling and the mother plant, except for the first treatment (control) free of growth regulators, which gave one band different from the seedling and the mother plant, and the fourth treatment, which contained some auxins and cytokinins, which gave two clear bands showing the emergence of genetic variation as a result of hormonal imbalance in cells of explant.

Keywords: plant growth regulators, micropropagation, genetic stability, callus