



تأثير الفلورغلوسينول في توالد الاعضاء والتعبير الجيني لنخيل
التمر *Phoenix dactylifera* L. صنف البرحي النامي تحت
الشد الملحي

اطروحة مقدمة إلى

مجلس كلية الزراعة - جامعة البصرة

وهي جزء من متطلبات نيل شهادة دكتوراه فلسفة في البستنة وهندسة الحدائق
(تقانات احياوية)

تقدم بها الطالب

مفيد ظاهر طالب الأسدي

ماجستير علوم زراعية - البستنة وهندسة الحدائق

2018

أشراف

أ.د. عبد المنعم حسين علي الموسوي

أ.د. عقيل هادي عبد الواحد

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

وَفِي الْأَرْضِ قِطْعٌ مُتَجَوِّرَاتٌ وَجَنَّاتٌ مِّنْ أَعْنَابٍ
وَزَرْعٌ وَنَخِيلٌ صِنُوانٌ وَغَيْرُ صِنُوانٍ يُسْقَى
بِمَاءٍ وَحِدٍ وَنُفْضِلٌ بَعْضُهَا عَلَى بَعْضٍ فِي
الْأَكْلِ إِنَّ فِي ذَلِكَ لَآيَاتٍ لِّقَوْمٍ يَعْقِلُونَ

(سور الرعد-4)

صدق الله العلي العظيم

الأهداء



الى روح استعجلت الرحيل ولم تزل في عقدها الثانيالى سندي الذي طالتُهُ يد الأرهاب

فكسرت ما كنتُ أَلجأُ اليه من متاعب الحياة اليك أخي الشهيد حيدر

الى من جرع الكأس فارغاً ليسقيني قطرة حب..... الى القلب الكبير والدي العزيز

الى القلب الناصع بالبياض ، الصابرة المحتسبةالى أمي على سجادة صلاتها

الى من جعلتني أعانق الفرحأبنة اخي الجميلة زهراء

الى سندي في الحياة قناديل الدرب ، من تطيب الحياة بوجودهمأخوتي

الى رسل العلم والأخلاق أساتذتي الأفاضل

الى هذا الصرح العلميجامعة البصرة

شكر وتقدير

اللهم لك الحمد حمداً خالداً مع خلودك ولك الحمد حمداً لا ينتهي له دون علمك ولك الحمد حمداً لا امد له دون مشيئتك ولك الحمد حمداً لا جزاء لقائله إلا رضاك، اللهم وصل على سيد من خلقته وصفوة من اصطفيته وأفضل من اجتبته وأكرم من اعتمده محمد (صلى الله عليه واله) وعلى أهل بيته الطيبين الطاهرين وعلى أصحابه المنتجبين الى يوم الدين.

بدءاً أود إن أتقدم بوافر الشكر وجزيل العرفان الى استاذي الفاضلين الأستاذ الدكتور عقيل هادي عبد الواحد والأستاذ الدكتور عبد المنعم حسين علي لإشرافهما على تنفيذ هذا العمل و لما بذلوه من جهد وما قدموه من توجيهات وإرشادات علمية ساهمت في تذليل الصعوبات بمتابعتهم الحادة وما أنفقوه من اجل إتمام هذا العمل، فأسأل الله ان يجعل هذا العمل في ميزان حسناتهم ، فجزاهم الله عني كل خير .

ولا يفوتني أن أتوجه بالشكر والعرفان الى كل من عمادة كلية الزراعة و أساتذتي الأفاضل جميعهم من أعضاء اللجنة العلمية في قسم البستنة وهندسة الحدائق والسيد رئيس قسم البستنة وهندسة الحدائق الأستاذ المساعد الدكتور ميسون موسى كاظم الذي سخر كل إمكانيات القسم في خدمة طلبة الدراسات العليا، كما أتقدم بالشكر وعظيم العرفان الى عمادة كلية الطب البيطري وعمادة الكلية التقنية ورئاسة قسم التحليلات المرضية ورئاسة قسم علوم الحياة وكما أتقدم بوافر الامتنان والشكر الى الأستاذ الدكتور حسام سعدي و الأستاذة الدكتورة ايمان محمد عبد الزهرة والأستاذ الدكتور عدنان البدران والاستاذ المساعد وداد مزبان طاهر والأستاذ الدكتور علي السعيد والأستاذ الدكتور سحر عبد العباس والأستاذ الدكتور ماجد عبد الحميد لما قدموه لي من توجيهات وإرشادات علمية طيلة فترة البحث ، وتعجز كلمات الشكر الى من ساندني ورفع من معنوياتي الى أصدقائي المدرس الدكتورة سهاد طه والدكتور أيوب وطالب الدكتوراه الأستاذ جعفر .

كما لايسعني إلا أن أقدم شكري وأمتناني العظيمين الى السيد مسؤول مختبرات زراعة الانسجة في شركة فدك الأهلية لما قدموه من تسهيل مهام العمل وتوفير كافة مستلزمات الدراسة المختبرية فجزاهم الله عني كل خير .وعرفاناً بالجميل وحباً واحتراماً أشكر السيد الوالد ظاهر طالب ووالدتي العزيزة لما قدموه لي من دعم طيلة فترة الدراسة.

الخلاصة

أجريت الدراسة في مختبر زراعة الأنسجة التابع لشركة فدك في محافظة البصرة -أبي الخصيب للموسم 2019-2021 م لمعرفة تأثير الإجهاد الملحي المتضمن إضافة كلوريد الصوديوم إلى أوساط التضاعف والاستطالة وبالتركيز (0 ، 25 ، 50، 100، 150 ، 200) مليمول في الصفات المظهرية والبايوكيميائية ودراسة التعبير الجيني لبعض الجينات تحت ضغط الملوحة بعد ايجاد المطابقة الجينية للنباتات الناتجة لبراعم نخيل التمر صنف البرحي المكثّر خارج الجسم الحي.

كما تضمنت الدراسة معرفة تأثير مركب الفلوروجلويسينول Phloroglucinol و بخمسة تراكيز (0 و 25 و 50 و 75 و 100) مايكرومول في الصفات الخضرية والبايوكيميائية ودور هذا المركب في تقليل آثار الإجهاد الملحي للبراعم النامية على أوساط ملحية .استعملت في هذه التجربة البراعم الخضرية الناتجة من توالد الاعضاء المباشرة التي زرعت في اوساط غذائية صلبة متكونة من أملاح MS(Murashig and Skoog) المدعم بمنظمات النمو النباتية حيث بينت نتائج الدراسة الآتي:

1- وجد أن التراكيز العالية من كلوريد الصوديوم NaCl تؤثر بشكل سلبي في معظم الصفات المدروسة إذ لوحظ تسجيل أقل معدل للوزن الطري في مرحلة التضاعف عند التركيز 150 و 200 مليمول (15.5 , 18.29غم) على التوالي ، وتفاوتت المعاملة 200مليمول معنوياً في صفة قطر الأفرع (3.92ملم) قياساً بمعاملة المقارنة . وفي مرحلة الاستطالة لوحظ تفوقت المعاملة 100مليمول معنوياً في صفة عدد النباتات المتكونة والأوراق وقطر النباتات (18.50 فرعاً و 3سم و 4.16 ملم) في حين سجلت المعاملة 50 مليمول أعلى معدل طول النباتات 13.81 سم

2- سجلت المعاملة 25 مايكرومول من مركب الفلوروجلويسينول اعلى معدل للوزن الطري بلغ 20.79 و 24.30 غم بعد (8 و 12 اسبوع)، وسجلت المعاملة القياسية اعلى معدل لعدد البراعم المتكونة (29.17برعماً). كما لوحظ أن إضافة 25 مايكرومول من الفلوروجلويسينول إلى الوسط الحاوي على 200مليمول من كلوريد الصوديوم قد أثر بشكل معنوي في التقليل من الآثار الضارة للشد الملحي فقد لوحظ تسجيل زيادة في الوزن الطري وعدد البراعم وارتفاع البراعم في هذا التركيز (25.07 غم و 22برعماً و 10.67 سم) ، وفي مرحلة الاستطالة سجلت المعاملة ذاتها تفوقاً معنوياً في صفة (عدد الأفرع و وطول الأفرع) (9.17 فرعاً و 9.63 سم).

3- أشارت الدراسة البايوكيميائية الى أن إضافة كلوريد الصوديوم و الفلوروجلويسينول بالتراكيز العالية إلى وسط التضاعف قد نتج عنه ارتفاع بمحتوى البراعم من الكربوهيدرات وحامض الأبسيسك والبرولين ، في حين انخفض مؤشر الكلوروفيل الكلي بالتراكيز العالية لكلوريد الصوديوم .

4- أثبتت نتائج دراسة البروتينات باستخدام SDS-PAGE للأفرع المتشكلة لنخيل التمر صنف البرحي والمعاملة بتراكيز مختلفة من كلوريد الصوديوم حدوث بعض التغيرات الملحوظة في التعبير البروتيني إذ تشير النتائج إلى تكوين بعض الحزم البروتينية في البراعم المعرضة للشدود الملحية عالية التركيز وسجل اختفاء لعدد من الحزم المفصولة في تراكيز اخرى على هلام الترحيل SDS-PAGE إذ تكون 32 حزمة بروتينية تراوح مدى الوزن الجزيئي فيها بين 15.5-48 kDa .

أما بالنسبة لنتائج الفصل الكهربائي للبروتينات المستخلصة من البراعم الخضرية المتشكلة والنامية في أوساط نمو MS والمدعم بمركب الفلوروجلويسينول والتراكيز (0،25،50،75،100 مايكرومول) فحصل حدوث تغييرات على المستوى البروتيني للأنماط المختلفة، إذ نتج عن المعاملة بالتراكيز العالية 75 و 100 مايكرومول حزمتان كبيرتا الحجم بوزن جزيئي 68.8 kDa وأربع حزم صغيرة وقليلة الكثافة وبوزن جزيئي تراوح بين 15-22 kDa .

وبينت نتائج التحليل الجيني للبراعم المعاملة بكلوريد الصوديوم قياساً بالنباتات غير المجهدة في مرحلة الاستطالة والمعرضة لظروف الشد الملحي استخدمت 8 بادئات من بادئات الـ RAPD هذه البادئات أنتجت عدد حزم كلي بلغ 320.5 حزمة وبمتوسط عدد حزم 40.06 لكل بادئ تراوح حجمها بين (200-8000 pb) أنتج كل بادئ عدد حزم تراوح بين 5-9 حزمة بمتوسط بلغ 6.67 حزمة لكل بادئ.

5- بينت دراسة التعبير الجيني للأفرع الخضرية المزروعة في أوساط حاوية على كلوريد الصوديوم والتراكيز المختلفة وباستخدام ستة جينات هدف وهي (PdMT2A ، PIP1,2 ، PROTs ، ABA ، STKs) وجينين مرجعية هما (ERF و ACTn) حيث سجل الجين PIP2 أعلى مستوى تعبير جيني (18.14 ضعفاً قياساً بمعاملة السيطرة التي سجلت عند هذا الجين 1.54 ضعفاً ، في حين أن التراكيز المنخفضة سجلت مستويات متقاربة مع معاملة السيطرة (غير الملحية) ، إلا أن في الجين PdMT2A لوحظ ارتفاع مستوى التعبير الجيني عند المعاملة 100 ملليمول من كلوريد الصوديوم ثم أخذت هذه الزيادة بالتراجع بزيادة تركيز كلوريد الصوديوم حيث بلغ في المعاملة 150 و 200 ملليمول (2.85, 5.95).

قائمة المحتويات List of Content

| رقم الصفحة | الموضوع | الفقرة |
|------------|---|--------|
| 1 | المقدمة | 1 |
| 4 | مراجعة المصادر | 2 |
| 4 | الزراعة خارج الجسم الحي | 2:1 |
| 6 | الإجهاد الملحي salt stress | 2-2 |
| 8 | آلية تحمل الملحي في نخيل التمر | 3-2 |
| 10 | المؤشرات المظهرية Phenotypic indicators | 4-2 |
| 10 | تأثير الإجهاد الملحي على نمو الأفرع الخضرية وتطورها | 1-4-2 |
| 14 | التأثيرات المظهرية الناتجة عن الفلورغلوسينول (PG) Phloroglucinol | 2-4-2 |
| 15 | التأثيرات البيوكيميائية Biochemical effects | 5-2 |
| 15 | تأثير كلوريد الصوديوم والفلورغلوسينول في محتوى الأفرع الخضرية من الكلوروفيل الكلي | 1-5-2 |
| 17 | تأثير كلوريد الصوديوم والفلورغلوسينول في مستويات الكربوهيدرات الذائبة الكلية | 2-5-2 |
| 18 | تأثير كلوريد الصوديوم والفلورغلوسينول في مستويات من الحامض الأميني البرولين | 3-5-2 |
| 20 | تأثير كلوريد الصوديوم والفلورغلوسينول في محتوى الهرمونات النباتية | 4-5-2 |
| 23 | التلون البني Browning | 5-5-2 |
| 24 | المؤشرات الجزيئية Molecular indicators | 6-2 |
| 26 | تأثير كلوريد الصوديوم ومركب الفلورغلوسينول PG في نمط توزيع الحزم البروتين | 1-6-2 |
| 28 | تحديد التغيرات الجزيئية باستخدام تقانة Randomly Amplified Polymorphic DNA(RAPD) | 2-6-2 |
| 31 | دور التعبير الجيني في التوصيف الجزيئي لنخيل التمر المزروع نسيجيا | 3-6-2 |

| | | |
|----|--|---------|
| | | |
| 34 | Materials and Methods المواد وطرائق العمل | 3-3 |
| 34 | Media preparation تحضير الأوساط الغذائية | 1-3 |
| 36 | تحضير معاملات الدراسة | 2-3 |
| 36 | اختبار تأثير تراكيز مختلفة من الكلوريد الصوديوم في نمو الأفرع الخضرية لنخيل التمر صنف البرحي | 3-3 |
| 37 | اختبار تأثير تراكيز مختلفة من الفلورغلوسينول في نمو الأفرع الخضرية لنخيل التمر صنف البرحي | 4-3 |
| 37 | تأثير تراكيز مختلفة من الفلورغلوسينول في نمو الأفرع الخضرية لنخيل التمر صنف البرحي تحت ظروف الشد الملحي | 5-3 |
| 39 | دراسة المؤشرات المظهرية | 4-3 |
| 39 | الوزن الطري | 1-4-3 |
| 39 | حساب عدد الأفرع الخضرية المتكونة | 2-4-3 |
| 39 | حساب عدد النبيتات والأوراق المتكونة | 3-4-3 |
| 39 | حساب أقطار الأفرع الخضرية وأطوالها | 4-4-3 |
| 39 | دراسة المؤشرات البايوكيميائية للأفرع الخضرية | 5-3 |
| 39 | تقدير الكربوهيدرات Total carbohydrates (ملغم.100غم ⁻¹ وزن جاف) | 1-5-3 |
| 40 | تقدير محتوى صبغة الكلوروفيل الكلي Total chlorophyll (ملغم 100 غم ⁻¹ وزن طري) | 2-5-3 |
| 41 | تقدير الهرمونات النباتية للنبيتات في مرحلة الاستطالة | 3-5-3 |
| 42 | Determination of abscisic acid (ABA) تقدير حامض الأبسيسك (مايكروغرام غم ⁻¹ وزن طري) | 1-3-5-3 |
| 43 | تقدير المواد الشبيهة بالأوكسين IAA | 2-3-5-3 |

| | | |
|----|---|-----------|
| 43 | تقدير المواد الشبيهة بالساييتوكاينينات | 3-3-5-3 |
| 43 | Determination of the prolin تقدير الحامض الأميني البرولين | 4-3-5-3 |
| 44 | Browning (التلون البني) حساب | 4-5-3 |
| 45 | المؤشرات الجزيئية | 6-3 |
| 45 | تحضير العينات النباتية | 1-6-3 |
| 45 | الترحيل الكهربائي للبروتينات الكلية للافرع الخضريّة الناتجة من المعاملة بكلوريد الصوديوم والفلورغلوسينول وبالتراكيز المختلفة | 2-6-3 |
| 45 | Preparation of Extraction Solution تحضير محلول الاستخلاص | 1-2-6-3 |
| 45 | Preparation of sample تحضير العينة | 2-2-6-3 |
| 46 | Electrophoresis الترحيل الكهربائي | 3-2-6-3 |
| 46 | Electrophoresis solutions المحاليل المستعملة في الترحيل الكهربائي | 4-2-6-3 |
| 46 | Resolving gel buffer المحلول الدائري لهلام الفصل | 1-4-2-6-3 |
| 46 | Stacking gel buffer المحلول الدائري لهلام الرص | 2-4-2-6-3 |
| 46 | محلول 10% SDS | 3-4-2-6-3 |
| 46 | Electrode buffer محلول الدائري للاقطاب | 4-4-2-6-3 |
| 47 | Acrylamide stock solution محلول الأكريل أميد | 5-4-2-6-3 |
| 47 | Ammonium persulfate (APS) محلول برسلفات الأمونيوم | 6-4-2-6-3 |
| 47 | N,N,N-Tetra methyl ethylene diamine (TEMED) المحفز الأساسي للأكريل أميد | 7-4-2-6-3 |

| | | |
|----|---|-----------|
| 47 | Staining solution محلول التصبيغ | 8-4-2-6-3 |
| 47 | Destaining solution محلول إزالة الصبغة | 9-4-2-6-3 |
| 47 | Procedure طريقة العمل | 3-6-3 |
| 47 | Gel preparation تحضير الهلام | 1-3-6-3 |
| 47 | Separation Gel preparation تحضير هلام الفصل | 1-1-3-6-3 |
| 48 | Stocking gel preparation %10 تحضير هلام الرص | 2-1-3-6-3 |
| 48 | Samples preparation تحضير العينات | 2-3-6-3 |
| 48 | Turn on the protein separator تشغيل جهاز الفصل | 3-3-6-3 |
| 48 | DNA Extraction استخلاص الحامض النووي | 4-6-3 |
| 50 | Agarose Gell Preparation تحضير هلام الأكاروز | 1-4-6-3 |
| 51 | DNA تقانة التضاعف العشوائي المتعدد الأشكال لسلسلة الحمض النووي Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) | 2-4-6-3 |
| 52 | RAPD Data Analysis تحليل البيانات الـRAPD | 3-4-6-3 |
| 52 | Band Molecular Weight تقدير الأوزان الجزيئية للحزم المتضاعفة | 1-3-4-6-3 |
| 52 | Primer Parameters مؤشرات البادئ | 2-3-4-6-3 |
| 53 | فحص تفاعل سلسلة البلمرة في الوقت الحقيقي الكمي (الأستتساخ العكسي) Quantitative Reverse Transcription Real-Time PCR (RT-qPCR) | 5-6-3 |
| 54 | Total RNA extraction استخلاص الأحماض النووية الكلي | 1-5-6-3 |

| | | |
|----|---|---------|
| 56 | تصنيع cDNA | 2-5-6-3 |
| 57 | اختبار التفاعل الكمي (qRT - Quantitative Real – Time PCR (PCR) | 3-5-6-3 |
| 58 | تحليل بيانات التعبير الجيني Real-Time PCR data analysis | 4-5-6-3 |
| 60 | التحليل الإحصائي statistical analysis | 7-3 |
| 61 | النتائج والمناقشة RESULTS AND DISCUSSION | 4:4 |
| 61 | المؤشرات الخضرية في مرحلة التضاعف | 1-4 |
| 61 | تأثير إضافة كلوريد الصوديوم إلى أوساط الزراعة في الصفات الأفرع الخضرية | 1-1-4 |
| 65 | تأثير إضافة الفلورغلوسينول Phloroglucinol الى وسط التضاعف الأفرع الخضرية | 2-1-4 |
| 68 | تأثير اضافة تراكيز مختلفة من الفلورغلوسينول Phloroglucinol في وسط التضاعف الأفرع المعرضة للأجهاد الملحي تركيزه 200مليمول من كلوريد الصوديوم | 3-1-4 |
| 71 | المؤشرات الخضرية في مرحلة الاستطالة | 2-4 |
| 71 | تأثير إضافة كلوريد الصوديوم في مؤشر الصفات الخضرية في مرحلة الاستطالة للأفرع الخضرية لنخيل التمر صنف البرحي | 1-2-4 |
| 75 | تأثير إضافة الفلورغلوسينول Phloroglucinol إلى وسط الاستطالة في مؤشر الصفات الخضرية الأفرع الخضرية | 2-2-4 |
| 78 | تأثير اضافة تراكيز مختلفة من الفلورغلوسينول Phloroglucinol في وسط الاستطالة الأفرع المعرضة للأجهاد الملحي تركيزه 200مليمول من كلوريد الصوديوم | 2-2-4 |
| 81 | المؤشرات البيوكيميائية | 3-4 |
| 81 | تأثير إضافة كلوريد الصوديوم في محتوى النموات الخضرية من الكربوهيدرات الكلية | 1-3-4 |
| 83 | تأثير إضافة ال-PG إلى وسط التضاعف على محتوى النموات الخضرية من الكربوهيدرات الكلية | 2-3-4 |

| | | |
|-----|---|---------|
| 85 | تأثير اضافة تراكيز مختلفة من الفلورغلوسينول في وسط التضاعف للافرع المعرضة الى الاجهاد الملحي تركيزه 200مليمول من كلوريد الصوديوم في محتوى النموات من الكربوهيدرات | 3-3-4 |
| 87 | تأثير إضافة كلوريد الصوديوم الى وسط التضاعف في مؤشر محتوى النموات الخضرية من الكلوروفيل الكلي في مرحلة تضاعف. | 4-3-4 |
| 89 | تأثير إضافة الفلورغلوسينول إلى وسط التضاعف في مؤشر محتوى الافرع الخضرية من الكلوروفيل الكلي . | 5-3-4 |
| 91 | تأثير إضافة تراكيز مختلفة من الفلورغلوسينول الى النموات الخضرية المعرضة الاجهاد ملحي تركيزه 200مليمول من كلوريد الصوديوم في محتوى النموات الخضرية من الكلوروفيل الكلي | 6-3-4 |
| 93 | تأثير إضافة كلوريد الصوديوم إلى وسط الاستطالة في مؤشر محتوى الافرع الخضرية من الحامض الأميني البرولين وحامض الأبسيسك | 7-3-4 |
| 95 | تأثير إضافة الفلورغلوسينول إلى وسط الاستطاله في مؤشر محتوى الافرع الخضرية من الحامض الأميني البرولين و حامض الأبسيسك | 8-3-4 |
| 97 | تأثير إضافة تراكيز مختلفة الفلورغلوسينول مع كلوريد الصوديوم إلى وسط الاستطاله في مؤشر محتوى الافرع الخضرية من الحامض الأميني البرولين و النمو حامض الابسيسك | 9-3-4 |
| 99 | تأثير إضافة كلوريد الصوديوم إلى وسط الاستطالة في محتوى البراعم من الاوكسين اندول حامض الخليك (IAA) | 10-3-4: |
| 100 | تأثير إضافة الفلورغلوسينول إلى وسط الاستطالة في محتوى الافرع الخضرية من الاوكسين اندول حامض الخليك (IAA) | 11-3-4 |
| 102 | تأثير اضافة الفلورغلوسينول مع كلوريد الصوديوم الى وسط الاستطالة في محتوى الافرع الخضرية من الأوكسين أندول حامض الخليك (IAA) | 12-3-4 |
| 104 | تأثير إضافة كلوريد الصوديوم الى وسط الاستطالة في محتوى الافرع الخضرية من السايوتوكينينات | 13-3-4 |
| 105 | تأثير إضافة الفلورغلوسينول إلى وسط الاستطالة في محتوى الافرع الخضرية من السيتوكينينات | 14-3-4 |
| 107 | تأثير اضافة الفلورغلوسينول مع كلوريد الصوديوم الى وسط الاستطالة في محتوى الافرع الخضرية من السيتوكينات | 15-3-4 |

| | | |
|-----|---|------------|
| 108 | (التلون البني Browning) | 16-3-4 |
| 113 | المؤشرات الجزيئية | 4-4 |
| 113 | الترحيل الكهربائي للهيئة البروتينية على Electrophoresis for Proteins SDS-PAGE | 1-4-4 |
| 116 | تقدير تركيز ونقاوة الـ DNA | 2-4-4 |
| 116 | اختبار استقرار الحمض النووي باستخدام RAPD Random Amplified Polymorphic | 3-4-4 |
| 118 | الثبات الجيني للبراعم الخضرية لصنف نخيل البرحي | 1-3-4-4 |
| 122 | قياس تركيز نقاوة الحمض النووي Total RNA yield and quality | 4-4-4 |
| 123 | تقدير مستوى التعبير الجيني في فحص تفاعل سلسلة البلمرة في الوقت الحقيقي الكمي Quantitative Real-Time PCR qRT-PCR للبراعم الخضرية لتخيل التمر صنف البرحي ونامية تحت ظروف الإجهادات اللاحيوية. | 5-4-4 |
| 123 | جين STK_s | 1-5-4-4 |
| 126 | علاقة مستوى التعبير الجيني STK بالمؤشرات النمو الخضرية للبراعم المتشكلة لنخيل التمر صنف البرحي تحت ظروف الشد الملحي. | :1-1-5-4-4 |
| 127 | جين ABA | 2-5-4-4 |
| 131 | علاقة مستوى التعبير الجيني ABA بمؤشر مستويات حامض الابسيسيك (ABA) الافرع الخضرية المتشكلة لنخيل التمر صنف البرحي تحت ظروف الشد الملحي | 1-2-5-4-4 |
| 132 | جين PROLINE TRANSPORTER 2 (PROts) | 3-5-4-4 |
| 135 | علاقة مستوى التعبير الجيني PROts بمؤشر مستويات الحامض الاميني البرولين (prolien) الافرع الخضرية المتشكلة لنخيل التمر صنف البرحي تحت ظروف الشد الملحي .. | 1-3-5-4-4 |
| 137 | جين PIP1 | 4-5-4-4 |
| 140 | علاقة مستوى التعبير الجيني PIP1 بمؤشرات الفصل البروتيني وتركيز الكلوروفيل الكلي الافرع الخضرية المتشكلة لنخيل التمر صنف البرحي تحت ظروف الشد الملحي | 1-4-5-4-4 |
| 141 | جين PIP2 | 5-5-4-4 |

| | | |
|-----|---|-----------|
| 144 | علاقة مستوى التعبير الجيني PIP2 بمؤشرات الفصل البروتيني وتركيز الكلوروفيل الكلي الافرع الخضرية المتشكلة لنخيل التمر صنف البرحي تحت ظروف الشد الملحي | 4-4-5-5-1 |
| 146 | جين PdMT2A | 4-4-5-6 |
| 149 | علاقة مستوى التعبير الجيني PdMT2A ونسبة الاسوداد في الافرع الخضرية المتشكلة لنخيل التمر صنف البرحي تحت ظروف الشد الملحي | 4-4-5-6-1 |
| 151 | الاستنتاجات | 5:6 |
| 152 | التوصيات | 5:7 |
| 153 | الملاحق | 5:8 |
| 1 | المصادر | 6:6 |

قائمة الجداول

| رقم الصفحة | الموضوع | ت |
|------------|---|----|
| 35 | تراكيز المواد المضافة الى الوسط الغذائي | 1 |
| 36 | تراكيز معاملات الدراسة | 2 |
| 51 | البادئات الجزيئية المستخدمة في تضاعف تقنية RAPD | 3 |
| 51 | مكونات العينة الداخلة في تفاعل البلمرة المتسلسل RAPD-PCR | 4 |
| 52 | برنامج تفاعل البلمرة المتسلسل RAPD-PCR | 5 |
| 54 | جينات الإجهادات المستهدفة في براعم نخيل التمر صنف البرحي | 6 |
| 56 | عدة المواد المستخدمة في الاستخلاص والمجهزة من promega | 7 |
| 56 | تحضير تفاعل النسخ العكسي لتحويل RNA إلى cDNA | 8 |
| 57 | الظروف الحرارية لتصنيع cDNA | 9 |
| 58 | مكونات مزيج التفاعل qRt-PCR لجينات الهدف | 10 |
| 58 | برنامج التعبير الجيني التفاضلي لجينات الإجهاد الملحي qTR-PCR | 11 |
| 63 | تأثير التراكيز المختلفة من كلوريد الصوديوم في الصفات الافرع الخضرية النخيل النامية بعد 12 اسبوع | 13 |

| | | |
|-----|--|----|
| 66 | تأثير التراكيز المختلفة من مركب الفلورغلوسينول في الصفات الافرع الخضرية النخيل النامية على وسط التضاعف بعد 8-12 أسبوع. | 14 |
| 70 | تأثير اضافة تراكيز مختلفة من الفلورغلوسينول Phloroglucinol في وسط التضاعف الافرع المعرضة للأجهاد الملحي تركيزه 200مليمول من كلوريد الصوديوم . | 15 |
| 73 | تأثير التراكيز المختلفة من كلوريد الصوديوم في الصفات الخضرية للأفرع الخضرية في مرحلة الاستطالة | 16 |
| 76 | تأثير التراكيز المختلفة من مركب الفلورغلوسينول في الصفات الخضرية في مرحلة الاستطالة للأفرع الخضرية نخيل التمر صنف البرحي | 17 |
| 79 | تأثير الإضافة المشتركة الفلورغلوسينول Phloroglucinol مع كلوريد الصوديوم Nacl في الصفات الخضرية للأفرع الخضرية في مرحلة الأستطالة الخضرية لنخيل التمر صنف البرحي | 18 |
| 118 | بادئات RAPD المستخدمة الاكتشاف مواقع التباينات الوراثية في الافرع المتشكلة لنخيل التمر صنف البرحي تحت ظروف إجهاد ملحي | 19 |
| 120 | عدد الحزم المنتجة من استعمال بادئات RAPD ومعدل التشابه الوراثي بين الافرع الخضرية المتشكلة لنخيل التمر صنف البرحي النامية تحت ظروف إجهاد ملحي | 20 |
| 122 | نقاوة الحمض النووي RNA وتركيزه للبراعم الخضرية لنخيل التمر صنف البرحي المتشكلة في أوساط حاوية على كلوريد الصوديوم وبتراكيز مختلفة باستخدام Nanodrop spectrophotometer وعلى الأطوال الموجية (A260/A280) | 21 |
| 124 | التعبير الجيني للجين Stks باستخدام طريقة (2-ΔΔct livak method) الافرع الخضرية لنخيل التمر صنف البرحي | 22 |
| 127 | معاملات الارتباط بين كمية التعبير الجيني ومؤشرات النمو الخضرية الافرع نخيل التمر صنف البرحي | 23 |
| 129 | التعبير الجيني للجين ABA باستخدام طريقة (2-ΔΔct livak method) الافرع الخضرية لنخيل التمر صنف البرحي | 24 |
| 133 | التعبير الجيني للجين PROts باستخدام طريقة (2-ΔΔct livak method) الافرع الخضرية لنخيل التمر صنف البرحي | 25 |

| | | |
|-----|---|----|
| 138 | التعبير الجيني للجين PIP1 باستخدام طريقة (ct livak method $\Delta\Delta$ -2) الافرع الخضرية لنخيل التمر صنف البرحي | 26 |
| 142 | التعبير الجيني للجين PIP2 باستخدام طريقة (ct livak method $\Delta\Delta$ -2) الافرع الخضرية لنخيل التمر صنف البرحي | 27 |
| 147 | التعبير الجيني للجين PdMT2A باستخدام طريقة (ct livak $\Delta\Delta$ -2) الافرع الخضرية لنخيل التمر صنف البرحي (method | 28 |

قائمة الأشكال

| رقم الصفحة | اسم الموضوع | ت |
|------------|---|----|
| 14 | التركيب الكيميائي لـ Phloroglucinol (PG) | 1 |
| 40 | المنحنى القياسي للكلوكوز المستعمل في تقدير الكربوهيدرات الكلية | 2 |
| 42 | المنحنى القياسي الحامض الالبيسيك | 3 |
| 44 | المنحنى القياسي للبرولين (ملغم.لتر) | 4 |
| 82 | يوضح تأثير إضافة كلوريد الصوديوم الى أوساط النمو في مؤشر محتوى النموات الخضرية من الكربوهيدرات الكلية (ملغم.100غم-1) | 5 |
| 84 | تأثير إضافة الفلورغلوسينول Phloroglucinol(PG) إلى وسط التضاعف في مؤشر محتوى النموات الخضرية من الكربوهيدرات الكلية (ملغم.100غم-1) في مرحلة التضاعف لنخيل التمر صنف البرحي | 6 |
| 86 | تأثير اضافة تراكيز مختلفة من الفلورغلوسينول في وسط التضاعف للافرع المعرضة الى الاجهاد الملحي تركيزه 200مليمول من كلوريد الصوديوم في محتوى النموات من الكربوهيدرات. | 7 |
| 88 | تأثير إضافة كلوريد الصوديوم إلى وسط التضاعف في مؤشر محتوى النموات الخضرية من الكلوروفيل الكلي (ملغم. 100غم-1) في مرحلة التضاعف لنخيل التمر صنف البرحي | 8 |
| 90 | تأثير إضافة الفلورغلوسينول Phloroglucinol(PG) إلى وسط التضاعف في مؤشر محتوى الافرع الخضرية من الكلوروفيل الكلي (ملغم. 100غم-10) في مرحلة التضاعف لنخيل التمر صنف البرحي | 9 |
| 92 | تأثير إضافة تراكيز مختلفة من الفلورغلوسينول الى النموات الخضرية المعرضة الاجهاد ملحي تركيزه 200مليمول من كلوريد الصوديوم في محتوى | 10 |

| | | |
|-----|---|----|
| | النموات الخضرية من الكلوروفيل الكلي (ملغم.100غم-1) لنخيل التمر صنف البرحي | |
| 94 | تأثير إضافة كلوريد الصوديوم إلى وسط الاستطالة في مؤشر محتوى الأفرع الخضرية من الحامض الأميني البرولين و حامض الأبيسيك ($\mu\text{g.kg}^{-1}$) لنخيل التمر صنف البرحي | 11 |
| 96 | تأثير إضافة الفلورغلوسينول إلى وسط الاستطالة في مؤشر محتوى الأفرع الخضرية من الحامض الأميني البرولين و حامض الأبيسيك ($\mu\text{g.kg}^{-1}$) في نخيل التمر صنف البرحي | 12 |
| 98 | تأثير إضافة الفلورغلوسينول مع كلوريد الصوديوم إلى وسط الاستطالة في مؤشر محتوى الأفرع الخضرية من الحامض الأميني البرولين وهرمون النمو حامض الأبيسيك ($\mu\text{g.kg}^{-1}$) في نخيل التمر صنف البرحي | 13 |
| 100 | تأثير إضافة كلوريد الصوديوم إلى وسط الاستطالة في محتوى الأفرع الخضرية من الأوكسين أندول حامض الخليك في نخيل التمر صنف البرحي | 14 |
| 101 | تأثير إضافة الفلورغلوسينول (Phloroglucinol(PG) الى وسط الاستطالة في محتوى النموات الخضرية لنخيل التمر صنف البرحي من الأوكسين أندول حامض الخليل IAA | 15 |
| 103 | تأثير إضافة الفلورغلوسينول (Phloroglucinol(PG) مع كلوريد الصوديوم الى الاستطالة في محتوى الأفرع الخضرية من الأوكسين أندول حامض الخليل IAA | 16 |
| 105 | تأثير إضافة كلوريد الصوديوم إلى وسط الاستطالة في محتوى الأفرع الخضرية نخيل التمر صنف البرحي من السايبتوكينينات | 17 |
| 106 | تأثير إضافة الفلورغلوسينول إلى وسط الاستطالة في محتوى الأفرع الخضرية من السايبتوكينينات | 18 |
| 108 | تأثير إضافة الفلورغلوسينول مع كلوريد الصوديوم إلى وسط الاستطالة في محتوى الأفرع الخضرية نخيل التمر صنف البرحي من السايبتوكينينات | 19 |
| 110 | تأثير إضافة كلوريد الصوديوم إلى وسط النمو في مؤشر التلون البني في الأفرع الخضرية لنخيل التمر صنف البرحي | 20 |
| 110 | تأثير إضافة الفلورغلوسينول إلى أوساط النمو في مؤشر التلون البني في الأفرع الخضرية لنخيل التمر صنف البرحي | 21 |

| | | |
|-----|---|----|
| 111 | تأثير الإضافة المشتركة الفلورغلوسينول مع كلوريد الصوديوم إلى أوساط النمو في مؤشر التلون البني في الافرع الخضرية لنخيل التمر صنف البرحي | 22 |
| 115 | الفصل الكهربائي باستخدام SDS-PGAE لبروتينات لأفرع الخضرية لنخيل التمر صنف البرحي النامية في أوساط حاوية على كلوريد الصوديوم الفلورغلوسينول واستخدم Coomassie Blue التلطيخ الحزم . | 23 |
| 115 | المنحنى القياسي للبروتينات القياسية kDa على أساس الوزن الجزيئي والمسافة النسبية للبروتينات القياسية | 24 |
| 120 | نواتج تضخيم بادئات الـ RAPD المستعملة في تحديد الحمض النووي الافرع الخضرية نخيل التمر صنف البرحي النامية على أوساط حاوية كلوريد الصوديوم | 25 |
| 121 | نواتج تضخيم بادئات الـ RAPD المستعملة في تحديد الحمض النووي الافرع الخضرية نخيل التمر صنف البرحي النامية على أوساط حاوية كلوريد الصوديوم | 26 |
| 125 | منحنيات التغير التضاعفي لكمية التعبير الجيني في فحص qRT-PCR للجين STKs الافرع النامية تحت تأثير الإجهاد الملحي لنخيل التمر صنف البرحي ومعاملات | 27 |
| 125 | تأثير معاملات كلوريد الصوديوم في مستوى التعبير الجيني الافرع الخضرية النامية تحت إجهاد ملحي لنخيل التمر صنف البرحي قياساً بمعاملة السيطرة. | 28 |
| 127 | العلاقة الخطية بين مستوى التعبير الجيني للجين STK مع المؤشرات الخضرية في الافرع الخضرية نخيل التمر صنف البرحي تحت ظروف الإجهاد الملحي | 29 |
| 130 | منحنيات التغير التضاعفي لكمية التعبير الجيني في فحص qRT-PCR للجين ABA الافرع الخضرية النخيل التمر صنف البرحي النامية تحت تأثير الإجهاد الملحي | 30 |
| 130 | تأثير معاملات كلوريد الصوديوم في مستوى التعبير الجيني للجين ABA الافرع الخضرية النامية تحت إجهاد ملحي لنخيل التمر صنف البرحي قياساً بمعاملة السيطرة . | 31 |

| | | |
|-----|---|----|
| 132 | العلاقة الخطية بين مستوى التعبير الجيني للجين ABA ومستوى تركيز حامض الالبسيسك (ABA) في الافرع الخضرية نخيل التمر صنف البرحي تحت ظروف الإجهاد الملحي | 32 |
| 134 | منحنيات التغير التضاعفي لكمية التعبير الجيني في فحص qRT-PCR للجين PROts الافرع الخضرية نخيل التمر صنف البرحي النامية تحت تأثير الإجهاد الملحي | 33 |
| 134 | تأثير معاملات كلوريد الصوديوم في مستوى التعبير الجيني للجين PROts2 الافرع الخضرية النامية تحت إجهاد ملحي لنخيل التمر صنف البرحي قياساً بمعاملة السيطرة . | 34 |
| 135 | العلاقة الخطية بين مستوى التعبير الجيني للجين PRO2 ومستوى تركيز الحامض الأميني البرولين Proline في الافرع الخضرية نخيل التمر صنف البرحي تحت ظروف الإجهاد الملحي | 35 |
| 139 | منحنيات التغير التضاعفي لكمية التعبير الجيني في فحص qRT-PCR للجين PIP1 في الافرع الخضرية نخيل التمر صنف البرحي ومعاملات كلوريد الصوديوم (mM) Nacl | 36 |
| 139 | تأثير معاملات كلوريد الصوديوم في مستوى التعبير الجيني للجين PIP1 الافرع الخضرية النامية تحت إجهاد ملحي لنخيل التمر صنف البرحي قياساً بمعاملة السيطرة | 37 |
| 140 | العلاقة الخطية بين مستوى التعبير الجيني للجين PIP وعدد حزم البروتين الكلية وكفاءة التمثيل الضوئي للافرع الخضرية المتشكلة لنخيل التمر صنف البرحي | 38 |
| 143 | منحنيات التغير التضاعفي لكمية التعبير الجيني في فحص qRT-PCR للجين PIP2 الافرع الخضرية نخيل التمر صنف البرحي النامية تحت تأثير الإجهاد الملحي | 39 |
| 143 | تأثير معاملات كلوريد الصوديوم في مستوى التعبير الجيني للجين PIP2 الافرع الخضرية النامية تحت إجهاد ملحي لنخيل التمر صنف البرحي قياساً بمعاملة السيطرة . | 40 |
| 144 | العلاقة الخطية بين مستوى التعبير الجيني للجين PIP2 وعدد حزم البروتين الكلية وكفاءة التمثيل الضوئي الافرع الخضرية المتشكلة لنخيل التمر صنف البرحي | 41 |

| | | |
|-----|--|----|
| 148 | منحنيات التغير التضاعفي لكمية التعبير الجيني في فحص qRT-PCR للجين PdMT2A الافرع الخضرية نخيل التمر صنف البرحي النامية تحت تأثير الإجهاد الملحي | 42 |
| 148 | تأثير معاملات كلوريد الصوديوم في مستوى التعبير الجيني للجين PdMT2A الافرع الخضرية النامية تحت الإجهاد الملحي لنخيل التمر صنف البرحي. | 43 |
| 149 | العلاقة الخطية بين مستوى التعبير الجيني للجين PdMT2A ونسبة الاسوداد في الافرع الخضرية المتشكلة لنخيل التمر صنف البرحي تحت شد ملحي | 44 |

قائمة اللوحات

| رقم الصفحة | الموضوع | ت |
|------------|---|---|
| 38 | تمثل مرحلة نقل الافرع الخضرية لنخيل التمر صنف البرحي الى الأوساط الملحية و الفلوروجلايسينول | 1 |
| 64 | الافرع الخضرية المتشكلة في وسط التضاعف المحتوي على كلوريد الصوديوم بالتراكيز (0،25،50،100،150،200) مليمول بعد 8-12 اسبوع. | 2 |
| 67 | الافرع الخضرية المتشكلة في وسط التضاعف المحتوي على الفلورغلويسينول (0،25،50،75،100) مايكرومول بعد 8-12 اسبوع في مرحلة التضاعف | 3 |
| 70 | الافرع الخضرية المتشكلة في وسط التضاعف المحتوي على كلوريد الصوديوم 200 مليمول والفلورغلويسينول بالتراكيز (0،25،50،75،100) مايكرومول . | 4 |
| 74 | الافرع الخضرية النامية على وسط الاستطالة المحتوي على كلوريد الصوديوم وبالتراكيز (0،25،50،100،150،200) مليمول كلوريد الصوديوم بعد 32 اسبوعاً | 5 |
| 77 | الأفرع المتشكلة على وسط الاستطالة المحتوي على الفلورغلويسينول (0،25،50،75،100) مايكرومول بعد 32 اسبوعاً | 6 |
| 80 | الافرع المتشكلة على وسط الاستطالة كلوريد الصوديوم 200 مليمول والفلوروكلايسينول (0،25،50،75،100) مليمول بعد 32 اسبوعاً | 7 |
| 112 | التلون البني في الافرع الخضرية المتشكلة | 8 |

قائمة المختصرات

| | |
|---|----------|
| Quantitative Real – Time Polymerase chain Reaction | qRT-PCR |
| reactive oxygen species | ROS |
| late embryogenesis abundant proteins | LEA |
| Random Amplified Polymorphic DNA | RAPD |
| Murashige and Skoog | MS |
| Phloroglucinol (1,3,5- trihydroxy benzene) C ₆ H ₆ O ₃ | PG |
| indole-3-acetic acid | IAA |
| Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophorsis | SDS-PAGE |
| Aquaporins | AQPs |

المقدمة Introduction

تتأثر الزراعة في جميع انحاء العالم بعدد من لإجهادات الحيوية وغير الحيوية بما في ذلك الإجهادات الناتجة عن الإجهاد الملحي وسمية المواد الكيميائية، لذا تعد مشكلة الملوحة من أخطر المعوقات البيئية التي تؤثر في نمو نخيل التمر وإنتاجيته وبحلول عام 2050 من المتوقع أن يكون أكثر من 50% من الأراضي الصالحة للزراعة غير صالحة لنمو النباتات بسبب تملح الأراضي وبالتالي يعتبر إنتاج نباتات تتحمل الملوحة وفهم آليات التكيف والاستجابة مع كلوريد الصوديوم حاجة ملحة وضرورية للتقليل من مخاطر الإجهاد الملحي (Assaha et al., 2017).

تشمل التأثيرات المثبطة للملوحة الإجهاد التناضحي وقلة امتصاص الماء والمغذيات وسمية أيونات الصوديوم Na^+ والكلور Cl^- مما يؤدي الى التقليل من كفاءة التمثيل الضوئي وحدوث اضطرابات فسيولوجية أخرى يلجأ النبات للتقليل من تلك التأثيرات عن طريق تراكم المواد الذائبة والمتوافقة مثل البرولين الذي يحفز تخليق هرمون حامض الأبسيسك، علاوة على ذلك وجد أن تراكم أيونات كلوريد الصوديوم يحفز التعبير الجيني للبروتينات المقاومة للإجهاد الملحي ولذا يعتبر الإجهاد الملحي من الإجهادات غير الحيوية الرئيسة التي تؤثر في فسيولوجيا النبات وقد كان ذلك محور العديد من الدراسات التي بحثت مسارات التكيف مع الملح وفي الوقت الحالي تمثل هذه الطرق من البحوث عنصراً مكملاً رئيساً لطرق التربية التقليدية (Munns and Tester, 2008).

تعيش أشجار النخيل *Phoenix dactylifera* L. التي تنتمي الى العائلة Arecaceae في بيئات صحراوية وبخاصة في مناطق الشرق الأوسط وتبقى قابلة للحياة حتى في المناطق ذات التربة المالحة نسبياً ومع امداد محدود من مياه الري تعيش لمدة طويلة (Meddich et al., 2018)، وعلى الرغم من قدرة أشجار النخيل على تحمل الإجهادات المختلفة إلا أنها بمقاومتها التي تبديها ضد الشدود تفقد الكثير من خواصها كشجرة مثمرة، إذ تعاني من انخفاض الإنتاجية وجودة الثمار وترتفع احتياجاتها لمياه الري بصورة أكبر (Yaish and Kumar, 2015).

يتم إكثار نخيل التمر أما تكاثراً خضرياً بالفسائل أو جنسياً عن طريق زراعة البذور في التربة Al.khalifah and Shanavaskan, (2012) وتعتبر طريقة التكاثر بالفسائل offshoots propagation المفضلة والشائعة

في إكثار نخيل التمر لكون النباتات الناتجة تكون مطابقة للنبات الأم من الناحية الوراثية ، إلا أن هذه الطريقة من التكاثر تواجه العديد من الصعوبات منها قلة أعداد الفسائل المتكونة على نخلة الأم خلال فترة الحداثة، فضلاً عن أن الاكثار بالفسائل يكون بطيئاً لأن الفسائل يجب أن تبقى متصلة بالشجرة الأم لفترة تتراوح بين 2-3 سنة حتى تتمكن من تكوين نظام جذري متكامل ومتطور قبل فصلها عن الشجرة الأم ، (Sudhersan and AboEl- Nil,2004) .

إن الانخفاض الذي شهدته اعداد نخيل التمر في العراق بصورة عامة عام والبصرة بصورة خاصة يعود لعدة اسباب منها اهمال الجوانب الحيوية وهجرة الاراضي الزراعية اضافة الى عوامل بيئية متمثلة بتغيرات مناخية (ali and hama, 2016) لذا أصبح من ضمن الاجراءات الضرورية لإكثار نخيل التمر هو الاستفادة من التطبيقات العملية في مجال التقانات الحيوية وبصورة خاصة زراعة الأنسجة النباتية .

تعد تقانة زراعة الأنسجة *plant tissue culture technique* من التقانات الحديثة التي تتميز بكفاءتها العالية من حيث وفرة النباتات المنتجة وتجانسها في مدد زمنية قصيرة ، كما أن النباتات الناتجة تكون مطابقة من حيث التركيب الوراثي مع الشجرة الأم الذي أخذت منه النسيج النباتي ، كما يمكن إكثارها على مدار السنة (zaid *et al.* 2011) .

كما تمكن تقنية زراعة الأنسجة من توفير بيئة مثالية وموحدة لدراسة التكيفات والاستجابة التي تبديها ضد الشدود المختلفة، وتمكن من مراقبة المضاعفات الناشئة من التباين الوراثي والمورفولوجي الناجم عن الإجهاد الملحي (Al-Khateeb and Al-Khateeb, 2016 ; Htwe *et al.*, 2011).

هنالك مسلكان رئيسان لإكثار النخيل نسيجياً أولهما اما عن طريق تولد الأعضاء direct organogenesis اي تكون الأعضاء مباشرة من النسيج النباتي دون المرور بمرحلة الكالس لهذا تكون مطابقة لنبات الأم (Kushairi *et al.*, 2010) وثانيهما بوساطة تكوين الأجنة الجسمية Somatic embryogenesis مباشرة من النسيج النباتي أو عن طريق المرور بمرحلة الكالس والتي تتكون منه الأجنة وذلك من خلال زراعة الجزء النباتي في أوساط غذائية صناعية معقمة (Mazri *et al.*, 2017).

اهتم الباحثون باستعمال بعض المركبات الكيميائية التي لها تأثير في تحفيز تكوين الأعضاء وتحفيز التجذير ومن تلك المركبات المستخدمة مركب الفلورغلوسينول (Phloroglucinol, 1,3,5-PG, trihydroxybenzene) وعلى الرغم من أن الفلورغلوسينول يعتبر من الهرمونات غير التقليدية أو المواد المساعدة الهرمونية التي تؤثر في نمو وتطور الأعضاء و قد استخدم في زراعة الأنسجة مع بعض النباتات ومع ذلك لا تزال أدوار الفلورغلوسينول غير مفهومة (Petti, 2020).

وبناءً على ما تقدم تهدف الدراسة الحالية إلى :

1-دراسة تأثير تراكيز مختلفة من كلوريد الصوديوم ومركب الفلورغلوسينول في نمو وتطور براعم نخيل التمر صنف البرحي اعتماداً على المؤشرات الخضرية والبايوكيميائية والجزئية.

2-دراسة تأثير الإضافة المشتركة الفلورغلوسينول وكلوريد الصوديوم في نمو وتطور براعم نخيل التمر صنف البرحي اعتماداً على المؤشرات الخضرية والبايوكيميائية.

3- دراسة النمط البروتيني للبروتينات والاستقرار الوراثي للمادة الوراثية باستخدام مؤشرات RAPD لبراعم نخيل التمر صنف البرحي النامية في أوساط ملحية

4- دراسة مستويات التعبير الجيني التفاضلي بوساطة تقنية Quantitative Real - Time Polymerase chain Reaction (qRT-PCR) لبعض الجينات المشاركة في مقاومة الإجهاد الملحي الناتج عن اضافة كلوريد الصوديوم إلى الأوساط الزراعية لبراعم نخيل التمر صنف البرحي.

2: استعراض المراجع Literature's review

1:2: الزراعة خارج الجسم الحي

في العقود الماضية تم التعرف على تقنيات زراعة الانسجة كأداة فاعلة ومهمة لتكثير النباتات خارج الجسم الحي واعتبرت من أهم وسائل التكاثر غير التقليدي واستخدمت تقانة زراعة الخلايا والأنسجة النباتية بشكل مكثف في الدراسات الفسيولوجية لفهم الاستراتيجيات التي تتبعها النباتات في مقاومة تحمل الإجهادات المختلفة التي تتعرض لها النباتات، وقد تكون تقنية زراعة الأنسجة في إطار هذه الدراسات بمثابة نظام نموذجي في التحقيق ودراسة الآليات التي تعمل على النبات بأكمله إذ تتضمن استخدام زراعة الأنسجة أو زراعة الخلايا للدراسات الفسيولوجية أو الجزيئية بعض المزايا منها، تجانس الخلايا المأخوذة لدراسة نمو الأنسجة أو الخلايا في وسط محدد وفي بيئة خاضعة للمراقبة، وكذلك تمكن الباحث من اجراء التجارب على مدار العام، كما انها تمكن من دراسة استجابة الأنسجة او الخلايا المعزولة من أجزاء مختلفة من النبات والنامية تحت تأثير اجهاد ملحي واستخدامها في التمييز بين الآليات التي تعمل على المستوى الخلوي فقط وعلى تنظيم الخلايا في النبات بأكمله وتحديد تاثيرات الإجهادات (farooq et al., 2015;summart et al., 2010).

فضلاً عن ذلك أصبحت تقانة زراعة الأنسجة النباتية في السنوات الأخيرة ذات أهمية اقتصادية وصناعية كبرى في مجال تكاثر النباتات وتحسينها كونها تساعد في إنتاج مئات الآلاف منها في عملية مستمرة بفترة زمنية قصيرة نسبياً وبغض النظر عن الموسم والظروف المناخية التي تؤثر في النمو , monthony et al. (2021)، وأيضاً تعتبر زراعة الأنسجة النباتية من أكثر التقنيات كفاءة لتحسين المحاصيل من خلال إنتاج نباتات معدلة وراثياً وعزل المتغيرات المفيدة في الأنماط الجينية عالية الإنتاج والمتكيفة مع عوامل الإجهاد أو

المقاومة للأمراض وزيادة قدرتها على التحمل الملحي الذي يعد مشكلة العالم الحديث وبذلك يمكن اعتبار تقنية زراعة الأنسجة من التقنيات الواعدة لما لها من تأثير كبير على مستقبل الزراعة العالمية من خلال توفير النباتات اللازمة لتلبية الطلب العالمي المتزايد (Abul-soad and Al-khayri, 2017).

تعد عملية الإكثار عن طريق تكون البراعم العرضية Adventitious buds واحدة من أهم طرق إكثار النخيل خارج الجسم الحي (Bekheet and Saker, 1998). إن أولى المحاولات لتشجيع نشوء البراعم العرضية تعود إلى عقد الخمسينيات من القرن الماضي التي تم فيها استعمال منظمات النمو النباتية التي من خلالها تحدد مسارات التخصص في الخلايا والأنسجة المزروعة خارج الجسم الحي *in vitro* (Abahmane, 2013)، إن آلية التمايز إلى براعم عرضية تتم عبر تحول بعض الخلايا إلى خلايا مرستيمية سريعة الانقسامات مؤدية بذلك إلى تكوين أشباه المرستيمات (Meristemoids) والتي بدورها تتطور إلى مرستيمات لها القدرة على إعطاء بادئات الجذور أو السيقان التي تتطور فيما بعد إلى جذور وسيقان (Weckx et al., 2019).

توالى الابحاث العلمية المتعلقة بإكثار النخيل بتقانة زراعة الأنسجة النباتية فقد بين Abd El Bar and El Dawayati, (2014) إمكانية إكثار نخيل التمر بوساطة الزراعة النسيجية باستخدام الأجزاء النباتية (البراعم القمية والبراعم الأبضية و بادئات الأوراق) التي أخذت من فسائل بعمر 3-4 سنوات، وقد أدخلت تقانة إكثار النخيل كتقنية تساعد في دراسة العلاقة بين النباتات ومدى تأثرها بمحيطها الخارجي وكذلك ساعدت في التوصل إلى استنتاجات قيمة في حل مشكلات نمو وتطور النباتات وعلاقتها الفسيولوجية وكذلك انتاج نباتات متحملة إلى الإجهادات اللاحيوية .

2-2: الإجهاد الملحي Salt Stress

من بين أكبر التحديات التي تواجه إنتاجية المحاصيل الغذائية في جميع أنحاء العالم في الوقت الحاضر تملح الأراضي الصالحة للزراعة إذ تحولت مساحات شاسعة من الأراضي في العالم عبر السنين الى مناطق غير صالحة للزراعة بسبب تراكم الأملاح في التربة (Alturki, 2018)، وقد لوحظ تفاقم هذه التحديات في المناطق القاحلة والشبه القاحلة حيث أدت التغيرات المستمرة في المناخ والنقص الحاصل في كمية المياه إلى تقلص مساحة الأراضي الصالحة للزراعة وإنخفاض في إنتاجية العديد من المحاصيل النباتية بضمنها أشجار الفاكهة متحملة الملوحة كنخيل التمر ومع نضوب موارد المياه العذبة يتسبب الري بالمياه عالية الملوحة والجفاف والتبخر والارتفاع في درجات الحرارة في هذه المناطق إلى تراكم كبير في كمية الأملاح الذائبة في التربة الى جانب تعرض الكثير من هذه الأراضي إلى مصادر أخرى للإجهاد اللاحيائي مثل التعرض إلى المعادن الثقيلة ونقص في موارد التربة العضوية كل تلك العوامل تمثل تهديداً حقيقياً لإنتاج المحاصيل والأمن الغذائي (Munns and Tester 2008a).

إن التربة التي تزيد فيها الملوحة عن 4ديسي سيمنز/م⁻¹ يعاني نخيل التمر النامية فيها انخفاضاً ملحوظاً بنسبة 3.6% من المحصول، وكما أشارت الدراسة التي قدمها (Ramoliya and Pandey 2003) إلى أن أشجار نخيل التمر يمكن أن تتحمل الملوحة بحدود تصل إلى 12 دييسي سيمنز/م من دون أن تظهر عليها آثار الإجهاد الملحي (Maas and Grattan 1999) إلا أن هذه الزيادة الطفيفة يمكن ملاحظة تأثيراتها في كمية ونوعية المحصول الناتج، وقد أشار الباحثون (Tripler et al., 2007) إلى إن الري بصورة معتدلة بالمياه قليلة الملوحة له آثار جيدة على جودة النضج . تؤدي الملوحة إلى تثبيط نمو معظم النباتات وذلك بالازدياد تركيز الأملاح في المياه المستخدمة للري ولاسيما أملاح كلوريد الصوديوم، وبذلك تعد الملوحة إحدى

عوامل الإجهاد اللاحيوي abiotic stress المحددة لنمو النباتات وتطورها وقد وجد إن تعرض النخيل إلى الإجهاد الملحي له عدة تأثيرات على الوظائف الحيوية لنخيل التمر إذ يؤثر في العمليات الفيزيولوجية والفسيولوجية والجينية فمن الناحية الفيزيولوجية وجد إن كلوريد الصوديوم في مستويات معنية تؤثر في نمو النخيل وتطوره ومنها إن نخيل التمر الذي ينمو في بيئات ملحية تأخذ الأشجار فيه الشكل المتقرمة وقلة الإنتاج الثمري (Yaish and Kumar, 2015).

من الناحية الفسيولوجية فقد وجد إن الاملاح تؤثر على العلاقات المائية والضغط الانتفاخي وتؤثر أيضاً في أنزيمات البناء الضوئي مما يؤدي الى انخفاض كفاءة التمثيل الضوئي وإن هذه التغيرات في العمليات الحيوية التي يسببها الإجهاد الملحي ترتبط بالتأثير في مستويات التعبير الجيني لدى أشجار النخيل إذ يلجأ النبات إلى إعادة بناء بروتينات الإجهاد الملحي أو بروتينات الدفاع ، لأجل المقاومة مما يترتب عليها توقف النمو أو النمو البطيء ودخول النباتات في مرحلة الشيخوخة المبكرة (Al-Khateeb et al., 2020).

تؤدي الملوحة إلى تغييرات ضارة في التركيب الداخلي للخلايا وكذلك تؤثر في وظائف الأعضاء مما ينعكس سلباً على نمو النباتات لذلك يلجأ النبات إلى أتباع آليات مختلفة للتقليل من تلك الاضرار او التغييرات بما في ذلك الاجهاد الأزموزي والسمية الايونية إذ تمنع الملوحة امتصاص الماء وتزيد من تركيز ايونات الصوديوم Na^+ وتهديد سلامة الأغشية وتؤدي الأيونات السامة مثل Na^+ إلى تراكم أنواع الأوكسجين الفعالة reactive oxygen species (ROS) التي تسهم في أختلال التوازن في امتصاص المغذيات هذه التأثيرات لها علاقة سلبية على النبات بما في ذلك انخفاض القدرة على التمثيل الضوئي وضعف إشارة المستقبلات البروتينية وعمليات الايض والتمثيل الغذائي، وهذه التأثيرات تسهم بشكل مشترك في خفض معدلات النمو وزيادة معدلات الشيخوخة وانخفاض كمية وجودة الحاصل (Salih et al., 2020).

قدمت العديد من الدراسات السابقة التي أوضحت الأساس الميكانيكي لتحمل الإجهاد الملحي في نخيل التمر ففي دراسة حديثة وصفت شكلاً فريداً من السكون الأجنة في مراحل مبكرة من النمو إذ تبين ان الأجنة تدخل في حالة سكون مؤقتة كمعادلة للهروب من اضرار الإجهادات والأمر الذي يحمي الأعضاء والخلايا المتضررة من جفاف التربة والاجهاد الملحي وهذا يمثل تكيفاً مع ظروف الصحراء القاسية (Xiao *et al.*, 2019).

درس (Alhammadi and Edward, 2009) التباين في الأستجابة المعقدة للضغوط اللاأحيائية بين الأصناف البذرية لنخيل التمر النامية في أوساط ملحية ، كما ودرس الباحثون تاثيرات أملاح كلوريد الصوديوم في نخيل التمر المزروع نسيجياً (Al-Khateeb *et al.*, 2020) ،وقدمت دراسة (Safronov *et al.*, 2017) دراسة تكيف نخيل التمر النامي تحت تأثير اجهاد الجفاف على المستوى الجينوم باستخدام تقنيات الحمض النووي ، كما قدم (Al Kharusi, *et al.*, 2019a) دراسة في التحقيق في تغيير استراتيجيات تغير وظيفة الجينات الملحية باستخدام جينات مرجعية كجينات منظمة لعملية التعبير الجيني ، وأما الباحثون Al-Harrasi *et al.*, (2018) فقد درسوا التغيرات في عوامل النسخ في جذور نخيل التمر المعرضة إلى الملح .

2-3: آلية التحمل الملحي في نخيل التمر

يمكن للنباتات التكيف مع ملوحة التربة من خلال ثلاثة مسارات رئيسية ، وهي اولاً تنظيم الأزموزية regulate osmotic ثانياً وتراكم Na^+ أو Cl^- في الأنسجة وثالثاً إقصاءها وإفرازها خارج محيط الخلية ومسار التنظيم الجيني (Assaha *et al.*, 2015) ، وتتضمن هذه الاستراتيجيات في المقاومة الملحية آليات مختلفة بما في ذلك إنتاج المواد المذابة والمتوافقة مثل السكريات وكحولات السكر على سبيل المثال (التريالوز والمانيتول والجالاكتينول) أو تخليق الأحماض الأمينية والأمينات مثل (البرولين والجليسين والبيتين) أو تخليق

كاسحات الجذور الحرة مثل Meddich *et al.*, (2018) Superoxide dismutase، أو تعديل الجينات المشفرة للناقلات المسؤولة عن التوازن الأيوني أو تراكم البروتينات المتأخرة (LEA) late embryogenesis proteins مثل dihydriolins بالإضافة إلى ذلك قد تتخذ استراتيجية في التغيير بالمحتوى الهرموني في الأوراق والجذور ، مثلاً يزداد تركيز حمض الأبسيسيك ABA وحمض الخليك الأندول (IAA) والإيثيلين (Salih *et al.*, 2020 ;Al-bahrani and Alkhayri,2012).

على الرغم من حقيقة أن المسارات الجزيئية الكامنة وراء آليات التكيف مع الملح في بعض الأنواع النباتية التي قد تم تشريحها وتحديدها جزيئياً إلا أن هذه الآليات في نخيل التمر لا تزال غير معروفة إذ ركزت الدراسات السابقة في ضوء التكيف أشجار النخيل مع الملح على التمايز الجيني للأنواع التكيفية باستخدام تحليل علامات الحمض النووي مثل الحمض النووي المضخم العشوائي متعدد الأشكال (RAPD) و SCAR وغيرها من تقنيات التمايز الجيني (Elshibli and Korpelainen, 2008) ومع ذلك فإن هذه التقنيات أو التحليلات الجينية لم تحدد موضوع الجينات الوظيفية المرتبطة بصفات التكيف مع الملح في هذا النبات فضلاً عن ذلك قدمت حديثاً دراسة باستخدام مزارع الخلايا المعلقة للتحقيق في استجابة خلايا نخيل التمر للملوحة، إذ لاحظ (Al-bahrani and Alkhayri, 2012) أن نمو الأنسجة قد تأثر سلباً بزيادة تركيز كلوريد الصوديوم كما أن تركيز Na^+ قد زاد في البداية ثم انخفض في غضون أربعة أيام بعد استخدام معالجات التخفيف لآثار الملوحة علاوة على ذلك أشار إلى أن مستويات البرولين كانت مرتبطة ارتباطاً مباشراً بتركيز كلوريد الصوديوم في كالس نخيل التمر ، كما قدمت دراسة (Hendricks, 2006) حول تحمل نخيل التمر للشدود الملحية وبينت أن الإجهادات الملحية تؤثر في مجمل العمليات الفسيولوجية .

قدمت العديد من الدراسات التي تناولت تسلسل جينوم نخيل التمر لصنف خلاص Khalas وتم رسم خريطة وراثية الجينومات للصنف نفسه (Al-mssallem *et al.*, (2013) Al-dous *et al.*, (2011) ، كما قدمت دراسة للتعبير الجيني على أنسجة نباتية الـ34 نبات والنامية في أوساط ملحية Zhang *et al.*, (2011) وقد أوضح الباحثون أن من الصعب معرفة ما إذا كان النباتات تتحمل الموحة في مستويات متقاربة او العكس .

2-4: المؤشرات المظهرية Phenotypic indicators

2-4-1: تأثير الإجهاد الملحي على نمو الأفرع الخضرية وتطورها

إن دراسة تأثير أيونات كلوريد الصوديوم في مؤشرات النمو للبراعم الخضرية يسهم في فهم التغيرات الفسيولوجية التي تطرأ على النظام الخلوي في نخيل التمر إذ إن تراكم الأملاح في الخلية يؤدي إلى تحطم الأغشية الخلوية وبالتالي تنعكس آثاره سلباً على عمليات النمو (Al-Abdoulhadi *et al.*, (2011) فقد لاحظ الباحث (Al-bahrani and Al-khayri, (2012) إن زيادة تركيز الأملاح في الوسط الغذائي قد أدى إلى خفض مؤشرات النمو المعبر عنها بالوزن الطري والوزن الجاف لكالس نخيل التمر وذلك لأن الإجهاد الملحي يؤدي إلى الإخلال بالتركيب البروتيني للنبات مما يتطلب توقف عمليات النمو للسيطرة على الأضرار الناجمة من عملية الإجهاد الملحي .

إشارت الدراسة التي اجراها (Abbas *et al.*, (2015) إلى أن نمو النباتات تحت الإجهاد الملحي كان له الأثر الضار بعملية النمو وقد لاحظوا أيضاً اختلافاً في تركيز البروتينات المتكونة بين المستويات المختلفة، كما وبينت الدراسة أن التراكيز الملحية أدت الى زيادة تراكيز بروتينات الدفاع بعملية هدم البروتينات المسؤولة

عن النمو فيما أوضحت دراسة (Ferdosi *et al.*, 2021) أن الأوساط الحاوية على تراكيز 300 ملي مول أدت إلى توقف نمو البراعم بينما أعطت المعاملة 150 ملي مول نتائج معنوية في قطر البرعم مقارنة بمعاملة المقارنة، وتضمنت الدراسة التي أجراها (Alturki, 2018) معاملة الأوساط بالتراكيز الملحية (0, 50, 100, 150, 200, 300, 400, ملي مول /لتر⁻¹) انخفاض في طول البراعم وقطرها والوزن الطري والوزن الجاف تدريجياً في معظم المعاملات مقارنة بمعاملة السيطرة .

في حين سجلت الدراسة التي أجراها (El-Sharabasy *et al.*, 2008) انخفاضاً متدرجاً في نمو الأفرع الخضرية المزروع على وسط MS لثلاثة أصناف من نخيل التمر والمعاملة بتراكيز من كلوريد الصوديوم (0, 40, 80, 120 ppm) إذ سجلت المعاملة 80 جزء بالمليون زيادة في أعداد الأوراق المحترقة وعند التركيز 120 جزء بالمليون أدى إلى زيادة في انخفاض قوة النمو مقارنة بمعاملة المقارنة ، وايضاً أوضحت دراسة (Alkhateeb *et al.*, 2015) التي أجريت على الأفرع الخضرية لنخيل التمر إلى الانخفاض التنازلي في وزن وطول الأفرع المتكونة والمزروعة على وسط MS تدريجياً بينما شكل التركيز 200 ملي مول توقف استجابة النمو عند هذا التركيز مقارنة بمعاملة المقارنة والذي قد يكون نتيجة تراكم أيونات الصوديوم في أنسجة البراعم. بينما أشارت دراسة (Darwesh, 2013) إلى زيادة في قطر الأفرع الخضرية لنخيل التمر المتكونة والنامية على وسط MS عند التراكيز (100, 150, 200 مليمول)، وكما اشارت دراسة (Salih *et al.*, 2020) إن إضافة كلوريد الصوديوم إلى الأوساط الغذائية وبالتراكيز 200 و250 مليمول أدى إلى التأثير على مجمل مؤشرات النمو لصنفي النخيل الحلاوي والساير .

قد تمتلك الأصناف الأصلية التي تنمو في ترب مالحة نسبية عند زراعتها على وسط MS النمط الظاهري الطبيعي للجينات المسؤولة عن آلية التكيف مع الإجهادات الأحيائية من تلك الأصناف التي تنمو في ترب أقل

ملوحة ومع ذلك تبقى الصفات المظهرية مؤشراً مهماً في ملاحظة التغيرات أو الاختلافات على المستوى الخلوي للأنسجة النامية (Faiyue *et al.*, 2012 Krishnamurthy *et al.*, 2014) .

فقد أشارت دراسة (Aldhebiani *et al.*, 2018) إلى أن تراكم الأملاح يؤدي إلى التقليل من محلول التربة ويؤثر في إمكانات التناضحية مما يتسبب في إجهاد جفافي شديد بسبب عرقلة عملية الامتصاص وتراكم للأيونات السمية في الأغشية الخلوية محدثاً بذلك أضراراً كبيرة تظهر على النباتات بشكل قصر في أطوال النباتات النامية وزيادة في قطرها كوسيلة يتخذها النبات لتقليل التنافس الشديد داخل الأنسجة تحت تأثير الإجهاد الملحي ، بينما أوضح الباحثون (Hazzouri *et al.*, 2020) أن البراعم النامية في وسط MS تحتوي على كلوريد الصوديوم NaCl بتركيز 240مليمول أدت إلى الانخفاض في استطالة الورقة وتقليل من مساحة الورقة .

كما أظهرت انخفاضاً في نمو الجذر بدرجة 20% تحت الشد الملحي مقارنة بمعاملة المقارنة ، وقد أوضحت الدراسة للباحثون (Pan *et al.*, 2018) أن الإجهاد الملحي يتداخل مع العلاقات المائية مما يؤثر في الجهد التناضحي ويغير انجذاب ماء الخلية مؤدياً إلى إغلاق الأنايبب الناقلة وتقليل تمدد الأوراق لغرض التعديلات الخلوية الضرورية في حركة الماء والتي تتطلب الكنيتين والسوبرين ، وإشارت دراسة (Khair and Karim, 2015) إلى أن معاملة أشجار نخيل التمر صنف البرحي المأخوذة من زراعة الأنسجة بكلوريد الصوديوم وبتراكيز مختلفة قد أدت إلى إحداث تغيرات مظهرية منها تغيرات على مستوى الأوراق واحتراق حوافها وتأخر النمو عند التركيز 25كلغم/شجرة من كلوريد الصوديوم ووضحت دراسة (Yaish *et al.*, 2015) أن أيونات كلوريد الصوديوم تعيق حركة امتصاص الماء والعناصر الغذائية عند تراكمها في أنسجة الجذور مما يتسبب في إحداث تغيرات في مؤشرات النمو المظهرية .

يؤدي زيادة تركيز الأملاح في الوسط الغذائي إلى تعرض النبات إلى إجهاد مائي والذي يعتبر من الإجهادات متداخلة التأثير مع تأثير الإجهاد الملحي إذ يؤثر على معظم فعاليات نمو النبات وتطوره واستقلابه وتحدث فيه تغيرات مورفولوجية وتشريحية (Al Kharusi *et al.*, 2019) ، ويعتقد أن زيادة قدرة النبات على التحمل للإجهادات المائية والملحية قد يعزى إلى عمليات تكيف النبات الفيزيولوجي مع الظروف الملحية ومنها العامل الدفاعي البيولوجي للنبات ويتجلى هذا الموقف بربط الشوارد الملحية بواسطة أحماض عضوية داخل الخلية النباتية وأشارت دراسة (Morales and Urrestarazu, 2013) على نبات موز فردوسي paradisiaca المزروع نسيجياً إذ زرعت البراعم النسيجية على أوساط MS الحاوية على كلوريد الصوديوم بالتركيز (500,200,100) مليمول إلى انخفاض نسبة الافرع وعددها بزيادة تركيز كلوريد الصوديوم وسجلت المعاملة 500 مليمول انخفاضاً تنازلياً وإنتاج نبيتات ضعيفة ومشوهة مقارنة بمعاملة المقارنة في حين أن تأثير التركيز 100 مليمول أثر فقط على نسبة التجذير.

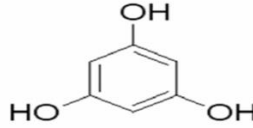
درس (Shiyab *et al.*, 2003) تأثير الإجهاد الملحي لكلوريد الصوديوم على نمو براعم البرتقال المزروعة نسيجياً وتطورها إذ نميت البراعم على أوساط MS المعاملة بالتركيز (300,200,150,100,50) مليمول. لتر⁻¹ واستنتج الباحثون من خلال هذه الدراسة إلى أن متوسطات نمو الافرع قد انخفضت انخفاضاً طفيفاً عند التركيزات القليلة 50 و100 مليمول. لتر⁻¹ في حين أدت التركيزات العالية 200 و300 مليمول. لتر⁻¹ إلى تعرض النسيج المزروع إلى الصدمة الملحية وتوقف النمو.

فيما أوضحت دراسة (Alkhateeb, and Solliman . 2015) إلى أن التركيزات العالية من كلوريد الصوديوم تؤثر بشكل كبير على مجمل مظاهر النمو في براعم نخيل التمر إلا أن هذه التأثيرات على مستوى الجذر تحصل بصورة تدريجية في زيادة تركيز الأملاح.

2-4-2: التأثيرات المظهرية الناتجة عن الفلورغلوسينول (Phloroglucinol(PG))

يعد الفلورغلوسينول (Phloroglucinol (1,3,5- trihydroxy benzene) (PG) $C_6H_3(OH)_3$) أحد نواتج تحطيم الـ Phloridzin (شكل 1)، ويعتبر الـ (PG) ذا خصائص محفزة للنمو من خلال دوره في زيادة توالد الأفرع وتكوين الأجنة الجسمية ، كما أنه محفز للتجذير في العديد من المحاصيل البستانية والحقلية عند إضافته مع الأوكسينات ، حيث إن آلية عمل PG يكون كمعزز للأوكسين ، الذي يحفز على تنشيط الفسيولوجية للمواد الشبيهة بالسايوتوكاينينات والمواد الشبيهة بالأوكسينات ، كما يعمل كمركب ذو نشاط يشابه عمل السايوتوكاينينات ، و بالتالي زيادة معدل الانقسام في النباتات الخشبية والأنواع الأخرى التي يصعب إكثارها بالطرق التقليدية (da Silva *et al.*, 2013) .

Phloroglucinol (1,3,5-Trihydroxybenzene)



شكل (1) التركيب الكيميائي لـ Phloroglucinol (PG) (Biessy and Filion, 2021)

تحدد كفاءة أنظمة الإكثار الدقيق في الزراعة خارج الجسم الحي بنسبة تكون البراعم و إنتاجها مباشرة بمنظمات النمو، منها مركب PG ،الذي له خصائص منظم نمو ونظراً إلى أن الفلوركلاليسينول هو فينول اساسي فقد افترض انه يؤدي دوراً مهماً في حماية جدار الخلية وعلى وجه الخصوص في ما يتعلق بفرط الهيدرات وظاهرة التزجيج في زراعة الانسجة النباتية إذ اشارت دراسة (Chandrika *et al.*, 2015) إلى أن استعمال الفلورغلوسينول مع منظمات النمو حفز تكوين الجذور واستطالتها وأدى إلى لتقليل من فرط الهيدرات في النبات، كما لاحظت دراسة (Petti, 2020) إن إضافة هرمون الفلورغلوسينول إلى أوساط الزراعة لنباتات

الهلوت الغامق أدى إلى زيادة استحثاث الكالس ونسبة التجذير إلا أن التراكيز العالية منه أدت إلى تشوهات في الصفات المورفولوجية للنبات وبخاصة عند التركيز 4ملغم.لتر⁻¹ .

بينما اشارت دراسة (Pérez *et al.*, 2016) إلى أن إضافة هرمون الفلورغلوسينول إلى الأوساط الغذائية بالتراكيز (158,118.5,0.79µM) والمدعم Indole-3-butyric acid و Zeolite قد أدى إلى زيادة في تجذير الأفرع لنبات البابايا وزيادة في عدد البراعم في التركيز 79 مايكروليتر، في حين لم تكن تأثيراته إيجابية على الصفات المورفولوجية للبراعم قياسا بالمعاملة القياسية وعلى الرغم من ان الادوار الوظيفية للفلوروجلاسينول في استحثاث الكالس الجنيني وتكوين الأفرع إلا ان الأدوار التي يؤديها في تطور البراعم واستطالة الافرع لاتزال غير مفهومة (Tchouga *et al.*, 2020).

2-5: التأثيرات البيوكيميائية Biochemical effects

2-5-1: تأثير كلوريد الصوديوم و الفلورغلوسينول في محتوى الافرع الخضرية من الكلوروفيل الكلي

على الرغم من أن أشجار نخيل التمر تعتبر ذات تحمل معتدل لمجموعة من الإجهادات اللاحيوية بما في ذلك الإجهادات الملحية لذا يعتمد الباحثون على دراسة أكثر الصفات التي يظهر فيها تغيرات على المستوى نفسلجي منها الكلوروفيل إذ يتاثر بشكل ملحوظ في التراكيز العالية من الملوحة من كلوريد الصوديوم أو الكالسيوم (Kharusi *et al.*, 2017). الإجهاد الملحي هو سمة متعددة العوامل وأول تأثيرها هو لشد التناضحي حيث أن وجود تراكيز عالية من كلوريد الصوديوم يمنع امتصاص الماء مما يؤدي الى إبطاء النمو و توقفه ومن ثم الموت النهائي للنباتات الحساسة (Munns, 2002).

هذا ألد التناضحى يكون تأثيره شديداً جداً لأنه يؤدي إلى إغلاق الفتحات عبر مسارات إشارات حمض الأبيسيسيك مع انخفاض متدرج في الأفرع المتكونة وبالتالي انخفاض في عملية التمثيل الضوئي-Garica (2002) *et al.*, sanchez بالإضافة إلى أن الجهد الأزموزي الناتج من أيونات Na^+ يؤثر على الكلوروفيل الذي يمثل الصبغة الأساسية في عملية التمثيل الضوئي والذي يؤدي إلى انخفاض الكتلة الحيوية وغالباً ما يؤدي تراكم أيونات الصوديوم والإجهاد الأزموزي إلى حدوث ضغوط ثانوية بما في ذلك الأكسدة ونقص المغذيات وينتج عنها الأكسجين التفاعلي الأنواع (Ros) وبشكل رئيسي O_2 - في سلاسل نقل الإلكترون لعملية التمثيل الضوئي والتنفس والتنفس الضوئي وغالباً ما تؤدي أنواع الأكسجين التفاعلية هذه إلى تحلل الدهون الغشائية من خلال الأكسدة مما يؤدي إلى إعاقة تطور الخلايا وتأثيرها على مجمل الفعاليات الحيوية فيها (Gill and Tuteja, 2010).

من خلال ذلك يمكن تقييم تحمل الإجهاد الملحي على أساس قدرة النبات في الحفاظ على سلامة الغشاء تحت ظروف الإجهاد الملحي ومن المكونات المهمة لهذه الألكتروليات المتسربة أيونات البوتاسيوم K^+ والذي يعتبر من الأيونات الضرورية لجميع مراحل تطور النبات كما أنه يتدخل في معظم العمليات الفسيولوجية بما في ذلك تنظيم الاس الهيدروجيني والحفاظ على مكونات الغشاء وامتصاص النتروجين في الأوراق وتنظيم فتح الثغور وبسبب هذه الوظائف المتعددة للـ K^+ أصبح الإجهاد الملحي محور دراسات تحمل الإجهادات اللاحيوية على وجه الخصوص (Yaish *et al.*, 2015).

بالنسبة للتأثير المركب الشبيهة بالهرمون الفلورغلوسينول فقد أشارت الدراسات السابقة إلى أن إضافة هذا المركب إلى أوساط النمو يمكن أن يعزز عملية التمثيل الضوئي إذ أشارت دراسة Gómez-Kosky *et al.*, (2021) على نباتات قصب السكر النامية على أوساط مشتملة على التراكيز (20,15,10,0) ملغم والمدعم بالـ

IAA وجود فروقات معنوية بين معاملات الدراسة إذ حققت المعاملة 20 ملغم IAA+ أعلى معدل لمحتوى النباتات من الكلوروفيل الكلي الذي بلغ 1.3 ملغم.100غم وزن طري .

2_5_1: تأثير كلوريد الصوديوم و الفلورغلوسينول في مستويات الكربوهيدرات الذائبة الكلية

تؤدي الكربوهيدرات دوراً مهماً في الحفاظ على نمو الخلايا النامية في بيئات ملحية إذ يكون دورها في تنظيم الضغط التناضحي ومنع جفاف الخلايا إذ تعمل كسلائف تمكن من تخليق البرولين الحر وكذلك تمنع من أكسدته لذا فإن وجود الكربوهيدرات بكميات كافية في النباتات النامية تحت ظروف الإجهاد الملحي يكون حاجة ملحة للنباتات في مقاومة الظروف الملحية المجهدة لها (Vysotskaya et al., 2017).

تشير الدراسات السابقة إلى أن الإجهاد الملحي يكون مرتبط مع الإجهاد المائي في التأثير على مستوى الكربوهيدرات في الأوراق النباتية إذ بينت دراسة Ozdeniz, (2019) إلى أن مستوى الكربوهيدرات في النباتات النامية تحت الإجهاد الملحي تزداد بزيادة التراكيز الملحية في بيئات النمو إذ تعمل الكربوهيدرات من تقليل الآثار الضارة لهذا الإجهاد عن طريق رفع مستويات المواد القابلة للذوبان مثل الجلوكوز والسكرور للذين لهما دور في زيادة مستوى البرولين الحر .

قد لاحظ khuder and Al-Taei , (2015) زيادة في مستويات الكربوهيدرات القابلة للذوبان في براعم القمح المزروع نسيجياً تحت بيئات ملحية مختلفة التراكيز حيث بلغ أعلى مستوى لها في التركيز الملحي 1.5% حيث بلغت 0.134 ملغم . في حين أشارت دراسة Jasim et al., (2010) إلى ارتفاع نسبة الكربوهيدرات الذائبة الكلية في الكالس الجنيني لنخيل التمر صنف "اشقر" عند زراعته على أوساط مشتملة على كلوريد الصوديوم وبالتراكيز (2,1.5,1.0.5,0.0)% وإن هذه الزيادة يمكن أن تفسر الآلية المتبعة من قبل النخيل في

مقاومة الإجهاد الملحي وأستمرار النمو في البيئات الملحية. فيما أشارت الدراسة التي اجراها الباحثون (Shoab *et al.*, 2018) أن النباتات تتعرض إلى إجهادات مختلفة وهذه الإجهادات تظهر مستوى استجابة مختلف من نبات إلى آخر وحتى داخل أفراد النوع الواحد ومن بين الاستجابات الأولية التي تظهرها النباتات إعادة البرمجة الأيضية وتوجيهها نحو مقاومة تلك الإجهادات عن طريق زيادة مضادات الإكسدة والأنزيمات والمواد القابلة للذوبان والأحماض الأمينية. وأما بالنسبة للتأثير الفلوروجلويسنول فإن دراسات حول تأثيره على المحتوى الكربوهيدراتي للنباتات قليلة .

2-5-3: تأثير كلوريد الصوديوم و الفلورغلويسنول في مستويات من الحامض الأميني البرولين

إن أحد أهم اضرار الاجهاد الملحي هو إنتاج المحفز الأنواع الأكسجينية التفاعلية ROS تسبب هذه الأنواع ضرراً كبيراً من خلال أكسدة البيروكسيدات المكونة للغشاء الخلوي في الخلية النباتية Munns and Tester, (2008) تكيف الخلايا آليات مختلفة للحفاظ على مستوى من استقرارية الأغشية تحت السيطرة في تحويل الإشارة ويتم عادة عن طريق تنظيف هذه الأنواع الأكسجينية بالأضيات المضادة للأكسدة ذات الوزن الجزيئي المنخفض مثل الجلوماتاين وحامض الأسكوربك والألغا توكوفيرول والأنزيمات المضادة للأكسدة الخلوية الكلية مثل الكتلينز والبيروكسيديز ولكن في ظل ظروف الإجهاد المستمرة والشديدة فإن توليد الجذور الحرة يتجاوز إمكانات مضادات الإكسدة الخلوية مما يؤدي إلى حصول الإجهاد التأكسدي (Hayat *et al.*, 2012a).

استجابة لهذه الشدود تجمع النباتات كميات كبيرة من المواد القابلة للذوبان التي هي عبارة عن مركبات عضوية ذات وزن جزيئي منخفض وقابلة للذوبان بدرجة كبيرة في العصير الخلوي وعادة ما تكون غير سامة بتركيز خلوية عالية توفر هذه المواد الحماية للنباتات من خلال المساهمة في تعديل التناضح الخلوي وتدخل في الحفاظ على سلامة الاغشية وإزالة سموم الـ ROS وتشمل هذه المواد الحامض الاميني البرولين والسكرورز

والجلايسين (Lee et al., 2008). و من المعروف أن تراكم البرولين تحدث في ظل عجز مائي أو شد ملحي أو عند التعرض إلى المعادن الثقيلة ويسهم هذا التراكم البروليني في الحفاظ على استقرار الأغشية وتدعيم البروتينات الواقية بالإضافة إلى ضبط الأزموزي الخلوي. وكما يعمل البرولين أيضاً كقطب مائي متوافق مع المرافقات الأنزيمية NADP⁺ والNADPH (Sharma and Dietz, 2006).

إن مسار تخليق البرولين في النباتات يتم في مسارين مسار الكلوتامين ومسار أورينيئين وأن الجين المسؤول عن تخليق البرولين في المسار الأول في معظم النباتات يتم ترميزه "P5CS" Pyrraline-5-carboxylic acid " وتتبع الدراسات مسار الجين "PDH" pyruvate dehydrogenase " وتم تحديده على المستوى الجزئي في نبات التبغ لوحظ أنه مرتبط بمسار تخليق الكلوتامين. (Ashraf and ; Hayat et al., 2012b). (Harris, 2004).

بينما أظهرت نتائج الدراسة (Jasim et al., 2010) أن زيادة تركيز كلوريد الصوديوم في الوسط الغذائي أدى إلى التأثير بمحتوى الكربوهيدرات والبروتينات الذائبة الكلية في الكالس والأجنة الجسدية إلا أنه أدى إلى زيادة في محتواها من البرولين الحر واستنتجت الدراسة أن للبرولين دوراً في مقاومة الشد الملحي وتحسين نمو الاجنة الجسدية وتطورها ، في حين أشارت دراسة (Yaish and Kuman, 2015) إلى أن مسارات تخليق الجين المسؤول عن البرولين تكون نشطة عند تراكم أيونات كلوريد الصوديوم في الخلية ومع ذلك يلاحظ أن تراكيز البرولين تأخذ بالانخفاض كلما زاد تلك التراكيز مشيراً إلى توقف آليات النمو في النخيل .

في أبحاث زراعة الأنسجة هنالك حاجة مستمرة للبحث عن مواد جديدة يمكن أن تؤدي إلى نمو أفضل أو أكثر كفاءة أو تحفيز استجابات ضد الشدود معينة في المختبر أن مركب (PG) (1,2,3), ثلاثي هيدروكسي البنزين) هو مركب ذا مدى واسع من المضادات الحيوية ويعد من المركبات الأيض الثانوي التي ينتجها النبات

له خصائص معززة للنمو وعلى الأرجح أنه يعمل كواقيات الأوكسين (de silva,2013) . وفي دراسة Tchouga et al., (2020) أقترح أن الفينول الأساسي يمكن إن يزيد من استحثاث الكالس واستطالة الجذور وقد يكون له تأثير إيجابي في مجمل عمليات النمو .

2-5-4: تأثير كلوريد الصوديوم و الفلورغلوسينول في محتوى الهرمونات النباتية

إن الدور الذي تؤديه منظمات النمو النباتية في العمليات الحياتية الداخلية هو الأساس في نمو الأعضاء النباتية وتطورها وإن هذا الدور يتأثر أو يتحدد عند تعرض النبات إلى ظروف غير طبيعية كالإجهادات البيئية الأحيائية وخاصة تراكم أيونات الصوديوم والكلور والجفاف (Mahalingam, 2015) إن منظمات النمو مثل الأوكسينات والسيتوكينيات والجبرلينات في النباتات تؤثر بشكل مباشر في نمو وتطور النبات فضلاً عن دورها في تخفيف الآثار الضارة للإجهادات للأحيائية (Hu et al., 2013) لذا كان لابد من دراسة الاستجابات الفسيولوجية والكيميائية التي تسببها أيونات الصوديوم والكلور في مستويات منظمات النمو النباتية.

فقد اتضح من الدراسات السابقة أن تراكم أيونات الصوديوم والكلور يكون عائقاً ميكانيكياً لعمل تلك المنظمات من خلال تحكم ايونات الصوديوم والكلور بالإشارات الصادرة وبالتالي تصبح تلك الأيونات ضارة على أغشية الخلايا النامية عن طريق إعاقته لإنتاج الهرمونات فقد تبين أن هرمون الأوكسين auxin indole-3-acetic (IAA) الذي له دور مهم في تعزيز عمليات النمو والتطور مثل انقسام الخلايا واستطالتها تتأثر أدواره الوظيفية عند التعرض إلى الشدود المختلفة. وهذا التأثير مرتبط ارتباطاً مباشراً بمستوياته داخل الجزء النباتي والذي يتفاعل إما سلباً أو إيجاباً مع الهرمونات الأخرى تحت ظروف الشد Wen Liu et al., (2015) .فقد لاحظ (Ouyang et al., 2011) انخفاضاً في تركيز الاوكسينات للنباتات النامية في وسط

ملحي.

ايضاً وجد الباحثون (Al-Khalifa *et al.*, 2017) إن مستوى تراكيز الهرمونات النباتية (IAA,Zeatin, GA3) قد انخفض عند التركيز العالية من NaCl في وسط الإكثار وذلك خلال دراستهما على أشجار النخيل المعرضة إلى الشد الملحي بتركيزين 1000 و2000 جزء بالمليون، إن الاستجابة لظروف الشد الملحي تتمثل بحدوث تغيرات على عدة مستويات ومنها على المستوى الفسيولوجي مؤدية تغيرات في مستوى تراكيز الهرمونات النباتية وعند ارتفاعها تسبب تقييد حاد للأوكسينات على حساب مستويات السيتوكينات مؤدية إلى دخول النبات في مرحلة الشيخوخة وتوقف النمو (Alhammadi & Kurup., 2012).

أشارت دراسة (2012) AlBahrany and Alkhayri إلى أن تعرض معلق خلايا نسيج النخيل في المختبر إلى ظروف الإجهاد الملحي (أيونات الصوديوم والكالسيوم والبوتاسيوم) أدت إلى انخفاض في كفاءة الانقسام الخلوي في التراكيز العالية. في حين أشارت دراسة الـ Petti, (2020) إلى إن استخدام الفلورغلوسينول كمكمل وحيد إلى الوسط الغذائي تسبب في تكوين الكالس بنسبة 37% مما يشير إلى الخصائص التي يتصف بها هذا المركب الشبيهة بالساييتوكين واستتجت الدراسة أن الـ PG يعمل كجزء شبيهة بالهرمون يمكن أن يؤدي إلى زيادة الكتلة الحية ولم توضح الدراسات السابقة فيما إذا كانت التراكيز العالية منه قد تتسبب في تغييرات على مستوى الهرمونات إلا أن دراسة التي اجراها (2013) da Silva *et al.* كشفت إلى أن التراكيز العالية من الفلورغلوسينول قد تسببت بزيادة نسبة الأسوداد.

كما اوضحت دراسة (Sarkar and Naik, 2000).تأثر الاجزاء النباتية في زيادة تراكيز مركب الـ PG عندما تتعرض النباتات إلى احد الإجهادات اللاحيوية فإنها تتبع سلسلة من العمليات الحياتية للتقليل أو الهروب من الأثار الضارة لذلك الإجهاد ومن بين تلك العمليات زيادة نشاط الهرمونات ومنها حامض الأبسسك والذي وصف في الستينات كمثبط للنمو عندما يتراكم في الأوراق وسمي أيضاً بهرمون الإجهاد القادر على احداث

العديد من التكيفات للتعامل مع مختلف الإجهادات البيئية المؤثرة في نمو النبات Lidiya B. Vysotskaya *et al.*, (2008).

أظهرت نتائج دراسة Al-Khalifa *et al.*, (2017) أن ارتفاع تركيز NaCl في وسط النمو إلى PPM2000 أدى إلى انخفاض في الأوكسينات والساييتوكينينات وزيادة كانت متدرجة في مستويات تركيز حامض ABA قابلها انخفاض في مستوى التمثيل الضوئي وزيادة في الصبغات الكاروتينيدات. كما توصلت نتائج دراسة الباحثون Sabir *et al.*, (2012) على نبات *Withania somnifera* المزروع نسيجياً أن تركيز حامض الأبسيسك ارتفع في الافرع النامية في أوساط حاوية على NaCl بتراكيز عالية مقارنة بمعاملة المقارنة. في حين بينت دراسة Aldhebiani *et al.*, (2018) أن نمو وتطور براعم نخيل التمر قد توقفت عند إضافة NaCl إلى الوسط بتركيز mM300 وذلك خلال دراستهم لصنفين من نخيل التمر الخلاص والبرحي. وتوصلت نتائج دراسة Al-Khateeb *et al.*, (2020) وبين إلى أن صنف البرحي أقل تحملاً للملوحة مقارنة مع صنف الخلاص وأن هرمونات الإجهاد قد أزدادت بشكل ملحوظ عند تثبيط النمو بالتراكيز العالية لـ NaCl 200مليمول مما يشير إلى استجابة البراعم للشد الملحي من خلال تنشيط تلك الهرمونات للتقليل من الضرر الحاصل للأغشية وتعديل الازموزية .

2-5-5: التلون البني Browning

تعد ظاهرة التلون البني أو اسمرار الأجزاء النباتية المزروعة خارج الجسم الحي مشكلة تواجه الإكثار النسيجي لنخيل التمر وتحد من نجاحها (Ahmad *et al.*, 2013) وتتأثر هذه الظاهرة بكثير من العوامل منها عوامل تتعلق بالنبات نفسه مثل عمر الجزء النباتي المستخدم ونوعية الجزء النباتي وموعد الزراعة وتركيبه الوسط الغذائي وعوامل أخرى تتعلق في طريقة التعقيم. إشار بعض الباحثون إلى أن اسمرار الأجزاء النباتية قد يكون نتيجة لحصول الأوكسدة للمواد الفينولية (Attia *et al.*, 2020) إذ تعمل أيونات الصوديوم من إنتاج الجذور الحرة الأوكسيجينية التفاعلية تحت ظروف الشد وكإستجابة لهذه الظروف تعمل النباتات على كس الجذور الحرة عن طريق تنشيط مضادات الأوكسدة البيروكسيدية إلا أن استمرار بقاء الأجزاء النباتية تحت ظروف الإجهاد الملحي إضافة إلى أرتفاع تركيز كلوريد الصوديوم في الوسط الغذائي يضعف من نشاط النبات وبالتالي فإن استمرار المقاومة لهذا الإجهاد يترتب عليها زيادة مستوى الأوكسدة خاصة للمواد الفينولية التي تتحول إلى كينونات "Quinones" التي تعرف بسميتها للنباتات (Hichem *et al.*, 2009).

أوضح بعض الباحثين أن كلوريد الصوديوم ينجم عنه أكسدة للمواد المعدنية الضرورية لنمو وتطور النبات مما يترتب عليه عدم ثباتيته الأغشية نتيجة النقص الحاصل في تراكيز المواد الضرورية للحفاظ على سلامة الأغشية (Guo *et al.*, 2017). وبينت الدراسات السابقة أن تراكم أيونات كلوريد الصوديوم وزيادة تراكيز المواد الشبيهة بالمنظمات في أوساط النمو له علاقة في أختزال عمليات النمو وتراكم المواد الفينولية وزيادة اسمرار الأنسجة النامية على تلك الأوساط والمعرضة للشدود المختلفة ولاسيما الملحية منها والتي تتداخل في زيادة التأثيرات (Sané *et al.*, 2005).

أوضحت دراسة (Salekjalali, 2012) أن اضافة المركب PG إلى الوسط الغذائي قد أثرت في التلون البني وذلك باستخدام عدة تراكيز من (100,50,0) ملغم. لتر⁻¹ من مركب الفلورغلوسينول حيث سجلت المعاملة بالتركيز 50 ملغم. لتر⁻¹ أعلى معدل لنسبة الاسوداد مقارنة مع المعاملة القياسية .

2-6: المؤشرات الجزيئية Molecular indicators

تعد المؤشرات الجزيئية وسيلة فعالة ومهمة في برامج التحسين الوراثي سواء اكانت في وضع البرامج الخاص بالتربية التي تشمل اختيار المواد الأولية الضرورية للتربية وكذلك تقويم نواتج عمليات التربية أو في رفع كفاءة برامج التربية من خلال الكشف المبكر عن وجود الصفات المرغوب بها في المصدر الوراثي ، فضلاً عن التحقق من الأصالة الوراثية أو التحقق من درجة الخلط ، كما يمكن استعمالها في العديد من التطبيقات الزراعية أو في إنشاء قاعدة للمعلومات الوراثية (Martins, 2016). إن التطور الحاصل في تقنيات البيولوجيا الجزيئية سبب نقلة نوعية كبيرة على المستوى الوراثي للنبات حيث إن استخدام الطرق الجزيئية في تصنيف وتربية النبات شهد تقدماً كبيراً تم استغلاله في تمييز الجنس والبصمة الوراثية ، بعد أن كان يعتمد على التوصيف المظهري وتلتها تقنيات التوصيف البيوكيميائية حيث أن الدقة في التوصيف تكون أقل مما عليه في التقنية الجزيئية ، بدأ التوصيف النباتي باستخدام المؤشرات الجزيئية عند بداية الثمانينيات من القرن الماضي حيث تمتاز هذه المؤشرات بظهور التغيرات الوراثية مباشرة على الـDNA. ويعتبر الـDNA المادة الوراثية المستقرة والتي لا تتغير بسهولة بالمؤثرات البيئية كما هو الحال بالمؤثرات البيوكيميائية والمظهرية (Nishoet *al.*, 20018) .

قد أشار (ElSayed and Rafudeen, 2012) إلى أن مؤشرات DNA تعتبر من المؤشرات الوراثية المهمة لدراسة العلاقة الوراثية بين الأفراد ومعرفة البصمة الوراثية التي تظهر الأختلاف في المعلومات الوراثية ، كما تمتاز بقدرتها على كشف الأختلافات الوراثية بين اقرب الأفراد مهما كانت طفيفة، إن تكنولوجيا الزراعة الحديثة في المختبر تشتمل على إنتاج نباتات مستقرة وراثيا أو اتباع برامج التربية المحسنة التي تهدف إلى إنتاج نباتات مقاومة للظروف البيئية المختلفة (Matthes *et al.*, 2001) لذا فان تربية النباتات في بيئات ملحية أو عند تعرضها إلى عوامل تتعدى قدرة النباتات الطبيعية فإن هذه العوامل تؤدي إلى أحداث العديد من الاستجابات البايوكيميائية والفسولوجية والمظهرية وتكمن الصعوبة في مدى ملاحظة التفاعل بين هذه الاستجابات والعوامل المعرضة لها والتي يصعب تحديدها أو تحديد تأثيرها على استقرار المادة الوراثية إذ يمكن أن يتسبب عن ظروف الإجهادات تغييرات في التعبير الجيني مما يؤدي إلى تنشيط أو تخليق بروتينات جديدة (Yamaguchi and Recently, 2000).

لذا فإن الدور المهم للمؤشرات الجزيئية أنها تمكن من تحديد التباينات في الطرز أو التركيب الجيني سواء إكان هذا التباين على مستوى جزيئات RNA أم على DNA وفي بعض الاحيان تكون هذه التباينات الجينية مهمة لأحداث طفرات جينية في النباتات وإنتاج طرز وراثية ذات صفات جديدة وقد استخدم العديد من المؤشرات الجزيئية في نخيل التمر منها ما يتم عن طريق التتابع البروتيني وقياس التعبير الجيني أو تلك المرتبطة بالحمض النووي كمؤشرات AFLIP و SSR و ISSR و RAPD و RAFLIP وغيرها من الواسمات التي اثبتت دقتها في مجال تشخيص التباينات الجينية وتحديدها على مستوى جزيئة الحمض النووي ال RNA وعلى الرغم من أن العديد من المؤشرات الجزيئية قد استخدمت في نخيل التمر إلا أن التركيب

الجيني والتغيرات التي تجري على مستوى جينوم النخيل لا تزال غير مفهومة بسبب ما يتميز به النخيل من ترابط جيني ووظيفي (sarder et al., 2015).

2-6-1: تأثير كلوريد الصوديوم ومركب الفلورغلوسينول PG في نمط توزيع حزم البروتين

على الرغم من ان أشجار النخيل لديها القدرة على النمو في ظل ظروف ملحية إلا انها أظهرت مستويات مختلفة من تحمل الملوحة فقد تمتلك الأصناف الاصلية النامية في بيئات ملحية نسبياً نمطاً ظاهرياً طبيعياً وجينات مسؤولة عن آلية تكيف ملوحة اكثر كفاءة من تلك التي تم تميمتها في أوساط خالية من كلوريد الصوديوم (Hendricks, 2006). ففي أشجار المانغروف طور النبات حواجز بروتينية محددة يمكن ان تعمل كمرشحات ضد امتصاص كلوريد الصوديوم في جذورها مما يقلل من حركة الملح في النباتات (Faiyue et al., 2012).

على العموم قد يساعد فهم آليات لتركيزات عالية من كلوريد الصوديوم في نهاية الأمر على تحسين وإنتاج نباتات لها لقدرة على النمو في بيئات ملحية. وقد أشارت الدراسات السابقة الى إن تحمل النخيل للإجهادات الملحية يرتبط عموماً بتعديلات في الصفات المورفولوجية والفسولوجية، مثل التغيرات في بنية النبات ونموه (البراعم والجذور) والتغيرات في سمك بشرة الأوراق وتنظيم غلق وفتح الثغور والانبات ومعدل التمثيل الضوئي، و ترتبط هذه التغيرات بتعديلات خلوية متنوعة بما في ذلك التغيرات في استقرار الاغشية والبروتينات وزيادة القدرة لمضادات الاكسدة وتفعيل مسارات الإشارات الهرمونية لاسيما تلك التي تعتمد على هرمون الاجهاد (حامض الابسيسيك) والحامض الاميني البرولين الذي يشارك ايضاً في تقليل الاضرار الناتجة من الاجهاد الملحي (Accari and Fisher, 2015; El-Mokhtar et al., 2020).

إن تنظيم هذه التغييرات على المستوى الخلوي هو الاستجابة الرئيسية التي تسبب تغييرات في التعبير الجيني وقد بذلت عدة محاولات للحصول على تعريف وظيفي للتعبير الجيني في النخيل النامي تحت ظروف ملحية، وبرغم من تقديم العديد من الدراسات إلا أنها لا تقدم وصفاً دقيقاً لتلك الآليات بسبب الارتباط المحدود بين مستويات عوامل النسخ mRNA والبروتينات لذا أصبح دراسة البروتينات مكملاً مهماً لدراسة بيانات التعبير الوظيفي للتعبير الجيني للبروتينات كاستجابة للإجهادات الملحية ومن الدراسات التي أجريت على التوصيف الوظيفي للبروتينات الإجهاد الملحي هي دراسة (Abbas et al., 2015) أن الإجهاد الملحي قد تسبب عنه تخليق بروتينات جديدة ذات أوزان جزيئية منخفضة تراوحت بين (35.0-54.0) كيلودالتون وذلك خلال دراستهم لتأثير كلوريد الصوديوم في نمو الكالس الجيني النخيل التمر صنف اشقر .

أيضاً أشارت دراسة (Moursy et al., 2020) إلى أن أشجار نخيل التمر صنف الخلاص عند تعرضها إلى تراكيز عالية من كلوريد الصوديوم فإن النخيل تزيد من مستويات تخليق بروتينات الكيناز kinase والتي تلعب دوراً أساسياً في حماية النظام الخلوي في النخيل كما وبينت دراسة (Al-Mayahi, 2016) تخليق بروتينات جديدة ذات أوزان جزيئية منخفضة في نخيل التمر صنف Nersy المزروع على أوساط ملحية ذات تراكيز مختلفة . يؤدي الإجهاد الملحي إلى العديد من التغييرات البروتينية المختلفة في الأنسجة النباتية المختلفة ومن شأن التحليل المقارن الاستجابة للأنسجة النباتية المختلفة للإجهاد الملحي إن يحسن فهم تركيب البروتينات الأنسجة النباتية واستجابتها التفاضلية للإجهاد الملحي وعلاوة على ذلك سيوفر المزيد من الأفكار حول الآليات البروتينية التي تتحكم في وقاية الأنسجة من أيونات كلوريد الصوديوم.

تعد طريقة الترحيل الكهربائي للهلام عديد الاكريلاميد Polyacrylamide Gel Electrophorsis بوجود Sodium Dodecyl Sulfate والتي يرمز لها اختصاراً SDS_PAGE من أكثر التقنيات المستعملة في

تحديد الاوزان الجزيئية للبروتينات شيوياً في مجال التحليل لمقارن للبروتينات الناتجة تحت اجهاد ملحي وقد توصلت الدراسات السابقة الى ان الاجهادات اللاحيوية تؤدي الى تغيير في نمط توزيع الحزم البروتينية في هلام الترحيل الكهربائي ويؤدي الى ظهور حزم بروتينية ذات وزن جزيئي منخفض جديدة مثل دراسة

(Attaha *et al.*, 2013; Munns, 2005 ;Bakker *et al.*, 2001) . واما بالنسبة للمركب PG فلم

تكن هنالك دراسات سابقة حول تاثير هذا المركب على توزيع البروتينات او قدرته على حث الاستجابة ضد الاجهادات الملحية من خلال زيادة او تقليل في تعبير البروتينات المخلقة في انسجة النبات ويعتقد أن له دوراً في منع مسببات الاجهاد من خلال تداخله في تحفيز الفعاليات الحيوية للنمو .

2-6-2: تحديد التغيرات الجزيئية باستخدام تقانة Randomly Amplified Polymorphic

DNA(RAPD)

ان التجديد المختبري لأشجار النخيل باستخدام اجزاء نباتية المختلفة ومنها القمم النامية البراعم الخضرية تم توثيقة من قبل العديد من الباحثين (El Hadrami *et al.*, 1995) وان توليد النباتات من خلال زراعة الانسجة عادة ما تخضع لاختلافات جسدية بين النباتات الجديدة التي تكون بسبب البروتوكولات المتبعة او بسبب طول مدة الزراعة وبالتالي تؤدي الى احداث تغيرات مظهرية (Matthes *et al.*, 2001) وقد تشمل هذه الاختلافات على المستوى الحمض النووي او تسبب إعادة ترتيب في الجينات وفي معظم الحالات تؤدي الى احداث طفرة نقطية (Krishna *et al.*, 2016) وفي بعض الأحيان يحدث التباين الوراثي بين الأنماط الجينية بسبب الاختلافات الجينية أو اللاجينية اثناء استزراع الجزء النبات وعلى الرغم من أن التباين بين الأنماط الجينية هو الهدف النهائي في تربية النباتات ونهج التكنولوجيا الحديثة فلا بد من اخضاع هذا التغيرات الى الاتجاه المحسن وعدم تأثيرها على صفات الصنف الاصلية وعادة يتم من خلال استخدام مختلف الواسمات منها المورفولوجية

والكيميائية والفسولوجية وفي افضل الأحوال هذه الواسمات قد لا تعطي دلائل واقعية عن تغيرات أو ثبات المادة الوراثية إما الواسمات القائمة على استخدام الحمض النووي مثل RFLIP و AFLP تقنية تضخيم المناطق المميزة SCAR وتقنيتا SSR و ISSR واللذان تعتمدان على التكرار المتسلسل البسيط Khan *et al.*, 2012).

إضافة إلى الأنماط الأيزوزيمات القائمة على استخدام أنزيمات محددة والتي توفر معلومات عن التغيرات الجينية إلا أنها تتعامل فقط مع مناطق ترميز الجينوم إضافة إلى إنتاجها تغييرات مسرطنة ، أما تقنيتي RFLIP و AFLP فعلى الرغم من دقة نتائجهم في الكشف إلا أنها تحتاج إلى تكاليف عالية الأستخدامهما إضافة إلى عدم إمكانية تحديد المناطق الضعيفة بالمادة الوراثية واحتياجها إلى معلمات اشعاعية Jones *et al.*, 2013) وتعتبر تقنية RAPD من التقنيات الجزيئية الموثوقة للكشف عن التباينات الوراثية والتغيرات الجينية حتى داخل نباتات من نفس الصنف وقد استخدمت مع زراعة الأنسجة من قبل العديد من الباحثون (Sudha *et al.*, 2019; Kumar *et al.*, 2010)

إن هذه التقنيات البيولوجيا الجزيئية والتي تستند إلى تفاعل السلسلة المتعدد Polymerase chain reaction (PCR) والتي تعتبر من الأدوات المستخدمة في التحليلات الوراثية وبناء الخرائط ، كما أن تقنية التضاعف العشوائي المتعدد الأشكال لسلسلة الدنا (RAPD) قد استخدمت للتضخيم العشوائي للحمض النووي الجيني DNA في العديد من النباتات لتحديد التباينات بين الافراد الناتجة (Liu Wan *et al.*, 2005)، وقد استخدمت مؤشرات التقنيات الحيوية في مجال ايجاد التباينات الناتجة من تحفيز استجابة النخيل لمقاومة الشد الملحي ففي دراسة (Al-Khateeb *et al.*, 2019) التي استخدمت فيها 36 بادئاً من بادئات ال RAPD لاحظ الباحثون عدم وجود تباينات أو تعدد شكلي بين البراعم المتشكلة على بيئات ملحية ومعاملة

المقارنة وذلك خلال دراسته على نخيل التمر صنف البرحي في حين أبلغت نتائج دراسة Shareef and Jasim., (2017) التي أجريت على صنفين من نخيل التمر (الساير والبرحي) والتي تم تطبيق معاملات كلوريد الصوديوم والسالسليك وبتراكيز مختلفة وباستخدام ثلاث بادئات من بادئات الـ RAPD حيث اشارت دراستهم إلى وجود تباين عالي الاختلاف وتعدد شكلي عالي أيضاً بصنف ساير وفي التركيز 100 جزء بالمليون من السالسليك وكلوريد الصوديوم في حين كان التعدد الشكلي في الصنف البرحي مرتفعاً في بادئ واحد فقط ، وأيضاً قدمت دراسة (Abass, 2016) على نخيل التمر صنف الحلاوي والتي اوضح فيها الباحث ان الكالس الجيني النامي على أوساط ملحية عالية التركيز تسببت في أحداث تغييرات بايوكيميائية وايضا تسببت في إنتاج حزم متباينة وذات تعدد شكلي في البادئات الثلاثة المستخدمة في دراسته .

قد تعزى هذه التباينات في نتائج الباحثين نتيجة اختلاف في النوع النباتي والبروتوكولات المتبعة في الاكثار ، أو عن استخدام منظمات النمو والمركبات الكيميائية الأخرى الداخلة في تحضير الأوساط الزراعية والتي تسببت في بعض الحالات إلى حدوث طفرة نقطية وبالتالي تسبب اختلافات في الأنماط الجينية والاجنة الجسدية المتكونة (Lakshmanan et al., 2007 ; Krishna et al., 2016).

2-6-3: دور التعبير الجيني في التوصيف الجزيئي لنخيل التمر المزروع نسيجياً

يتمثل الهدف الرئيسي لعلم الوراثة التطوري في توفير حساب إلى الأساس الجيني للتنوع الظاهري بين الأنواع هو تحديد التغيرات الجينية والآليات الجزيئية التي تكمن وراء هذا التنوع وكذلك لفهم التكيف مع الضغوطات البيئية التي يتطور تحتها التنوع الظاهري في حين أن المساهمة النسبية للتغيرات في تنظيم الجينات التكيف لاتزال موضع نقاش ، فقد اصبح من الواضح إن الأختلاف في أنماط التعبير الجيني غالباً ما يلعب دوراً

رئيسياً في تطور الأنماط الظاهرية المورفولوجية بالإضافة إلى تغيرات بيولوجية معقدة أخرى ، منذ أكثر من أربعة عقود افترض بريتن ودافيدسون أن المناطق الجينومية بين الجينات تلعب دوراً مهماً في تحديد التغيرات الخلوية عند تتعرض إلى ظروف نمو غير طبيعية ، لذا فان دراسة عملية التعبير الجيني قد تكون مدخلاً لتحديد الجين النشط في النظم الخلوية المختلفة (Erdmann and Barciszewski, 2013) ، وبين Laurie *et al.*, (2002) إن مصطلح Gene expression يشير إلى عملية تحويل المعلومات الوراثية المخزونة في الجين إلى بروتين فعال إذ تتم هذه العملية من خلال مرحلتين أساسيتين هما الاستنساخ والترجمة للمعلومات الوراثية الموجودة في الدنا الى جزيء mRNA ثم تترجم في الرايبوسومات هذه المعلومات الوراثية المنسوخة الإنتاج البروتين وأضاف (Greco *et al.*, 2012 ;Thomas, 1993).

بينت العديد من الدراسات أن جينات الإجهاد الملحي قد تختلف في وظيفتها من نبات إلى اخر وحتى أنها قد تختلف في التراكيز المحلية التي تحدث استجابة للتعبير الجيني لها فقد بينت دراسة (Hu *et al.*, 2012) التي أجريت على نبات *Lolium perenne* وبتراكيز محلية عالية التراكيز ومتدرجة لاحظ الباحثون أن تراكيز الملح كان لها تأثير في زيادة تعبير جينات الإجهاد الملحي حيث كانت الجينات (Cyt,POD) ذات مستويات تعبير جيني مرتفع في حين اجريت دراسة (Farooq *et al.*, 2021) على التعبير التفاضلي الجينات الإجهاد الملحي في نبات الرز وذلك بإضافة تراكيز متدرجة ومنخفضة لكلوريد الصوديوم فقد أشارت الدراسة إلى أن التركيز 50 مليمول قد لا يكون كافياً في احداث مستويات مرتفعة من التعبير الجيني لجينات الإجهاد الملحي .

الجينات المتعلقة باستجابة النباتات للشدود الملحية تكون مرتبطة بالعديد من الجوانب بما في ذلك عمليات التمثيل الغذائي الفسيولوجية ، الدفاع عن الخلية ، إنتاج الطاقة ، نقل الأيونات ، التوازن الهرموني ونمو الخلايا وانقسامها وغيرها من الوظائف الحيوية المتعلقة في استمرار النمو بالشكل الطبيعي تحت ظروف الشد الملحي هذا

الأرتباط يتم تنسيقه وفق آليات معينة دقيقة (Zhang *et al.*, 2012)، هذا وتعتمد هذه الآليات على تفعيل ثلاث مسارات رئيسية عند تعرض النبات إلى الإجهاد وهي اكتشاف المسبب "أيونات كلوريد الصوديوم" أو أي مسبب للإجهادات الأخرى .

أشارت الدراسة (Xu and Deng, 2010) إلى أن جين STK يرتبط بشكل قوي بتحفيز جينات المقاومة resistance gene (PR) الدفاعية وإن هذا الجين مسؤول عن تحفيز الإشارة أو تحويلها وتوصيلها، أن جينات العائدة إلى STK لها عدة ارتباطات في علميات النمو المختلفة في زيادة سمك جدار الخلية أو تعديل الأزموزي وتوازن الأيونات. في حين وجدت دراسة (Ge *et al.*, 2007) إلى أن لجين STK دوراً في تحفيز الاستجابة لمقاومة الشد الملحي عن طريق التحكم الوظيفي للبروتينات Kinases ، كما بينت دراسة (North *et al.*, 2007) أن جينات ABA تشفر إلى الإنزيمات الخاصة بتخليق الحيوي لحمض الأبسيسك عند تعرض النبات إلى الإجهاد الملحي وأن هذه الجينات تكون متداخلاً ومتناسقة مع العديد من الجينات الدفاعية في تكيف النباتات إلى الملوحة وأن جينات ABA يعبر عنها في ظروف الشد الملحي بأضعاف كبيرة عن تلك التي تنمو تحت ظروف طبيعية (Barrero *et al.*, 2006).

أن الأنزيم الرئيسي لبناء البرولين هو pyrroline.5-carboxylate synthetase (P5CS) Δ^1 يتم ترميز هذا الأنزيم بواسطة جينين منظمين تفاضلياً في العديد من النباتات وقد إشارة الدراسات السابقة إلى أن التعبير الجيني للجين PROts في نباتات الأرييدوسيا Arabidopsis وبنجر السكر suger beet والطماطة وأيضاً في نبات الشعير barley يشترك مع مجاميع جينية "ناقلات الأحماض الأمينية" في حماية النبات وتفعيل الاستجابة ضد الشدود المختلفة (Fujiwara *et al.*, 2010 ; Yamada *et al.*, 2009).

اظهرت دراسة (Lehmann *et al.*, 2011) أن الإجهاد الملحي يزيد من مستويات الرنا المرسال mRNA في جذور نباتات الشعير كما لوحظ زيادة في التعبير الجيني للجين Prots وتراكم في مستويات البرولين تحت ظروف الإجهاد ، وأما بالنسبة لجينات الـAquaporins(AQPS) التي وجد أنها تكون موجودة في tonoplast فجوات الخلايا وفي الاغشية membranes وفي الشبكة الاندوبلازمية Endoplasmic reticulum وهي تشكل جزءاً متداخلاً من البروتينات ذات الوزن الجزيئي المنخفض الأساسي الذي تنظم مسارات حركة الماء والمواد المذابة مثل الجليسرول والبرولين وفي الظروف المجهدة للنبات فأنها تعمل على رفع مستوى استقرارية الاغشية كما وجد عند تعرض النباتات إلى الإجهادات فان كفاءة البناء الضوئي تنخفض ويزداد مستوى الصبغات النباتية الأخرى ويتم تخفيض مستويات الطاقة المستخدمة هذا الأمر يتطلب من النباتات تفعيل مسارات تحافظ على نقل المياه وتوصيل ثنائي أوكسيد الكربون في طاقة أقل مما هو عليه في الظروف الطبيعية ومن بين هذه المسارات هو تنشيط بروتينات "PdiT2A" التي تعمل في مستوى منخفض الطاقة (Patankar *et al.*, Li *et al.*, 2016) .2018,

قد تم تأكيد وجود جينات AQPS في عدد من النباتات فقد حددت دراسة (Hachez *et al.*, 2008) نوعين من جينات AQPs هي (PIP1,PIP2) التي وجد أن مستوى mRNA يزداد في أوراق نبات الذرة المعرضة للإجهاد الجفاف وأشارت دراسة (Hachez *et al.*, 2012) إلى ارتفاع مستوى التعبير الجيني لجينات PIPs المسؤولة عن تحفيز بروتينات AQPs في النباتات الذرة المجهدة قياساً بالنباتات التي لم تتعرض إلى ظروف إجهاد ، وفي نبات الأرز وجد نوعان من جينات PIP1,PIP2 وهي تشارك في تنظيم نقل الماء في الإجهادات الملحية وتشارك مع بروتينات (NIP) Nod26-like intrinsic proteins في زيادة مقاومة الشد الملحي (C. Liu *et al.*, 2013)

في أشجار نخيل التمر فقد بينت دراسة Patankar *et al.*, (2019) وجود جينات PIP والذي يشفر إلى مجموعة من البروتينات معظمها ذات وزن جزيئي كان 30.84 KDa والتي تنتمي إلى عائلة الأكوابورين QAPS في جينات النخيل مقسمة في اربع مجاميع فرعية رئيسية وقد اشارت الدراسة إلى أن الأفرط في مستوى التعبير الجيني لجينات PIP تزداد في الأوراق وجذور وبذورها النخيل النامية تحت شد ملحي وإن الاستراتيجية التي تتبعها النباتات من تقليل البروتينات الناقلة للماء وزيادة التعبير عن البروتينات ذات الوزن الجزيئي المنخفض ، وهذه الآلية تعد من الاليات التي يتبعها النخيل للحفاظ على مستوى التمثيل الضوئي.

3: المواد وطرائق العمل

Materials and Methods

اجريت الدراسة الحالية في مختبر زراعة الأنسجة النباتية التابع لشركة فدك الزراعية الأهلية في محافظة البصرة -أبي الخصيب للفترة من تشرين الثاني 2019 ولغاية آب 2021 م، حيث استعملت بادئات الافرع الخضرية لنخيل التمر صنف البرحي الناتجة من زراعة البرعم الطرفي لفسائل البرحي الخضرية حيث زرعت على اوساط MS الحاوية على منظمات النمو المذكورة في (فقرة 3-1) ولمدة ثلاثة اشهر من بداية شهر تشرين الثاني لعام 2019م الى كانون الثاني عام 2020م وبعد الوصول الى عدد المكررات المطلوب للدراسة بدء تنفيذ التجربة بدراسة تأثير تراكيز مختلفة من كلوريد الصوديوم و الفلورغلوسينول في نمو وتطور الافرع الخضرية الخضرية لنخيل التمر صنف البرحي والتي استمرت اشباط عام 2021م.

3-1: تحضير الوسط الغذائي Media preparation

- 1- حضر الوسط الغذائي الخاص بتضاعف الافرع الخضرية والموصوف من قبل (Al-Musawi, 2017) والمكون من المواد الموضحة في (جدول 1-1)
- 2- اضيفت الهرمونات الخاصه بعملية التضاعف (Al-Musawi 2017) والمكونة من 0.1 ملغم.لتر- 1 من كل من Kinetin (KN) و Benzyl amino purine (BAP) و Dimethylallylamino purine (2iP6).
- 3- تم ضبط الأس الهيدروجيني (pH) للوسط باستخدام جهاز Digital pH-Meter باستخدام محلول هيدروكسيد الصوديوم تركيز 0.1 عياري أو حامض الهيدروكلوريك بتركيز 0.1 عياري وعلى درجة 5.8.
- 4- تم إضافة الآكار بتركيز 7.5 غم. لتر⁻¹ للوسط الصلب، ولغرض اذابته سخن الوسط حتى درجة حرارة 90 م° وباستخدام Magnetic stirrer
- 5- وزع الوسط الغذائي بواقع 50 مل لكل وعاء زراعي ، بعدها غلفت فوهات الجارات بأوراق الألمنيوم Aluminum foil ، ومن ثم سدت بمدادات معدنية أو بلاستيكية.

6- عقت الأوساط الغذائية بواسطة جهاز المعقم (Autoclave) على درجة حرارة 121 م° وتحت ضغط 1.05كغم. سم² ولمدة 20 دقيقة.

جدول (1) تراكيز المواد المضافة الى الوسط الغذائي

| الكمية ملغم . لتر ¹⁻ | المادة | ت |
|---------------------------------|----------------------------------|----|
| 4330 | املاح MS | 1 |
| 170 | Sodium hydrogen ortho phosphate | 2 |
| 80 | Adenine sulphates | 3 |
| 100 | Meso-Inositol | 4 |
| 0.5 | Thiamine-HCl ثيامين | 5 |
| 200 | L-Glutamine | 6 |
| 500 | Poly vinyl pyrrolidone 10(PVP) | 7 |
| 200 | Calcium nitrate tetrahydrate | 8 |
| 10 | D-pantothenate calium (vitB5 Ca) | 9 |
| 50 | Sucrose | 10 |

3-2 : تحضير معاملات الدراسة

أضيف إلى أوساط النمو تراكيز مختلفة من كلوريد الصوديوم و تراكيز مختلفة من الفلوروجلايسينول بشكل منفرد ثم اضيف الفلوروجلايسينول إلى الأوساط الملحية وحسب (جدول 2-)

جدول (2) تراكيز معاملات الدراسة

| التركيز | المادة | ت |
|---------|---|---|
| 25 | كلوريد الصوديوم NaCl (ملي.مول.لتر ⁻¹) | 1 |
| 50 | | 2 |
| 100 | | 3 |
| 150 | | 4 |
| 200 | | 5 |
| 25 | الفلوروجلوسينول (مايكرومول.لتر ⁻¹) | 6 |
| 50 | | 7 |
| 75 | | 8 |
| 100 | | 9 |

3-3: اختبار تأثير تراكيز مختلفة من كلوريد الصوديوم في نمو الأفرع الخضرية لنخيل التمر صنف البرحي

نقلت الافرع الخضرية لنخيل التمر صنف البرحي، حيث تم فصلها وإعادة زراعته على وسطي الزراعة MS الصلب مع المواد المذكورة في (جدول 1-). تمت إعادة الزراعة كل 4 اسابيع في المرحلة الاولى من تحضير التجربة ولمدة اربعة اشهر حتى الحصول على اربع مكررات لكل معاملة بعد ذلك جهزت الأوساط بتراكيز مختلفة من كلوريد الصوديوم وبالتراكيز (0 و 25 و 50 و 100 و 150 و 200) مليمول.لتر⁻¹ في تجربة CRD لتحديد التراكيز المناسبة حيث استخدمت 4 مكررات لكل معاملة وبوزن 3-4 غم للعينة الواحدة ، وحصنت الزروع في غرفة النمو عند درجة حرارة 27 ± 2 م° تحت شدة إضاءة 37.91 مايكرومول.متر⁻² ولفترة ضوئية يومية (16) ساعة ، وأجريت عملية إعادة الزراعة كل أربعة اسابيع الى

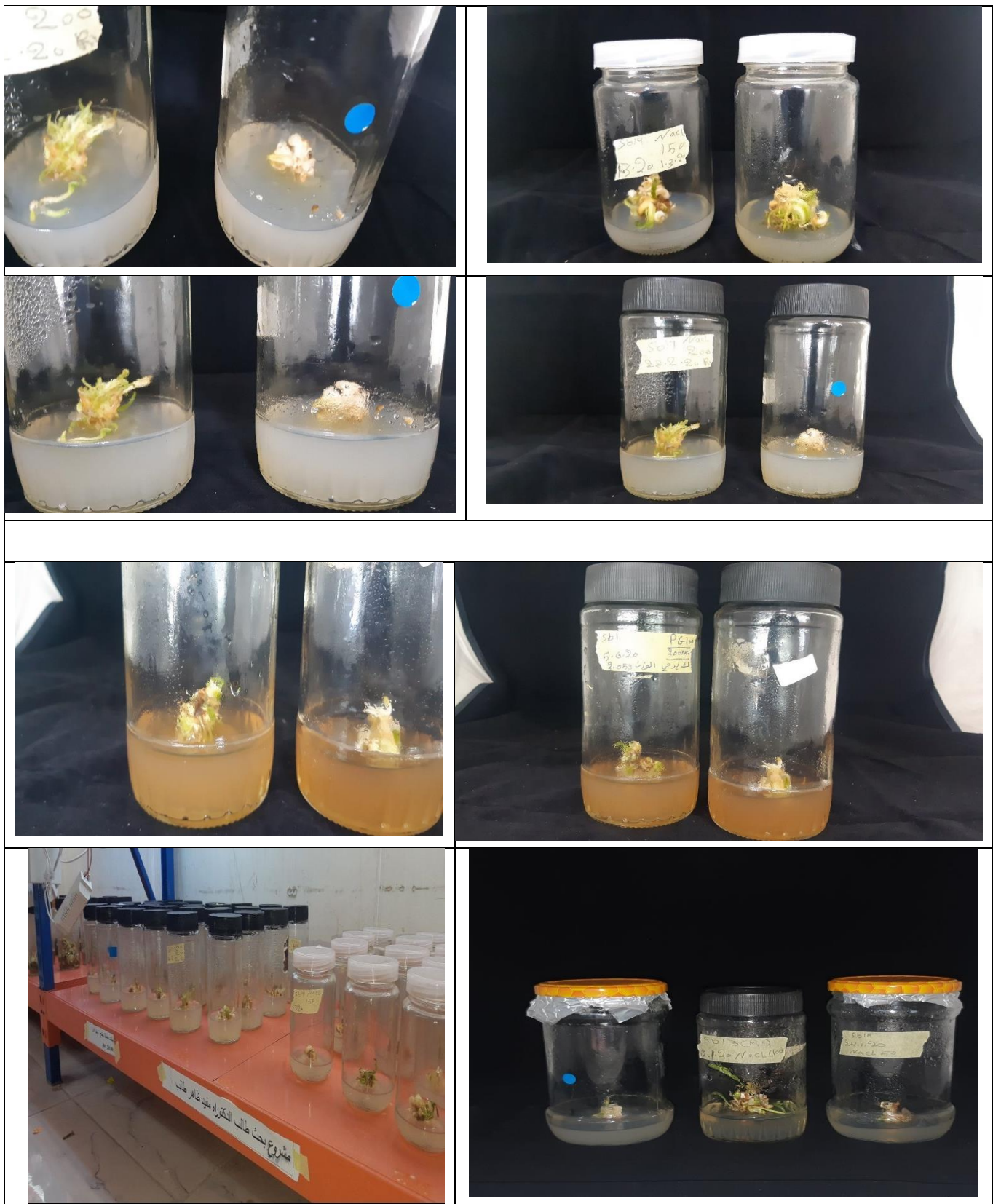
ثمانية اسابيع للأوساط الملحية وأستمرت مرحلة التضاعف لمدة ثلاثة اشهر للتركيز الملحية ثم نقلت الى اوساط الاستطالة والتي استمرت 28 اسبوعاً.

3-4: اختبار تأثير تراكيز مختلفة من الفلورغلويسينول في نمو الأفرع الخضرية لنخيل التمر صنف البرحي

نقلت الأفرع الخضرية لنخيل التمر صنف البرحي، حيث تم فصلها وإعادة زراعته على وسطي الزراعة MS الصلب مع المواد المذكورة في (جدول 2- و 1) ، جهزت الأوساط بتراكيز مختلفة من الفلوروجلايسينول وبالتراكيز (0 و 25 و 50 و 75 و 100) مايكرومول. لتر⁻¹، في تجربة CRD لتحديد التراكيز المناسبة حيث استخدمت 4 مكررات لكل معاملة، وحضنت الزروع في غرفة النمو عند درجة حرارة 27 ± 2 م° تحت شدة إضاءة 37.91 مايكرومول.متر⁻² ولفترة ضوئية يومية (16) ساعة ، وأجريت عملية إعادة الزراعة كل ثمانية أسابيع ولمدة ثلاثة اشهر ثم نقلت الى اوساط الاستطالة الحاوية ايضا على مركب الفلوروجلايسينول والتي استمرت 32 اسبوعاً.

3-5: تأثير تراكيز مختلفة من الفلورغلويسينول في نمو الافرع الخضرية لنخيل التمر صنف البرحي تحت ظروف الشد الملحي.

نقلت الأفرع لنخيل التمر صنف البرحي، حيث تم فصلها وإعادة زراعته على وسطي الزراعة MS الصلب مع المواد المذكورة في (جدول 2- و 1) ، جهزت الأوساط الحاوية على الكلوريد الصوديوم بالتركيز 200 ملليمول بتراكيز مختلفة من الفلوروكلايسينول وبالتراكيز (0 و 25 و 50 و 75 و 100) مايكرومول في تجربة CRD لتحديد التراكيز المناسبة حيث استخدمت 4 مكررات لكل معاملة وحضنت الزروع في غرفة النمو عند درجة حرارة 27 ± 2 م° تحت شدة إضاءة 37.91 مايكرومول.متر⁻² ولفترة ضوئية يومية (16) ساعة ، وأجريت عملية إعادة الزراعة كل ثمانية أسابيع ونظراً لتأخر نمو الأفرع تحت الشد الملحي استمرت الزراعة الى ستة اشهر حتى الوصول الى مرحلة النبيتات.



لوحة(1): تمثل مرحلة نقل الافرع الخضرية لنخيل التمر صنف البرحي الى الأوساط الملحية و الفلورغلوسينول

3-4: دراسة المؤشرات المظهرية

3-4-1- الوزن الطري:

تم قياس الوزن الطري في كل مرة يتم فيها إعادة الزراعة والتي تبدأ (8) أسابيع الى 12 اسبوع من الزراعة باستعمال ميزان حساس نوع Sartorius كمعدل لعشرة جارات زراعية لكل معاملة، إذ استخرجت الأجزاء النباتية من الأوعية الزراعية ووزن الجزء النباتي بشكل مباشر بعد ازالة بقايا الوسط.

3-4-2: حساب عدد الافرع الخضرية المتكونة

تم حساب عدد البراعم بعد 28 اسبوع من زراعته على وسط التضاعف.

3-4-3: حساب عدد النبيتات والاوراق المتكونة وعدد الافرع غير مكتملة النمو

تم حساب عدد النبيتات والاوراق المتكونة بعد 32 اسبوعاً بشكل مباشر والأربع مكررات في كل معاملة وفي مرحلة الاستطالة.

3-4-4: حساب أقطار الافرع الخضرية وأطوالها

حسبت أقطار واطوال الأفرع المتكونة بعد الزراعة ابتداء من المنطقة السفلية للأفرع والنبيتات باستخدام المسطرة القياس بوحدة (سم) وحسبت الأقطار باستخدام "القدمة" وبوحدة (ملم)

3-5: دراسة المؤشرات البايوكيميائية للأفرع الخضرية

3-5-1: تقدير الكربوهيدرات Total carbohydrates (ملغم.100غم⁻¹ وزن جاف)

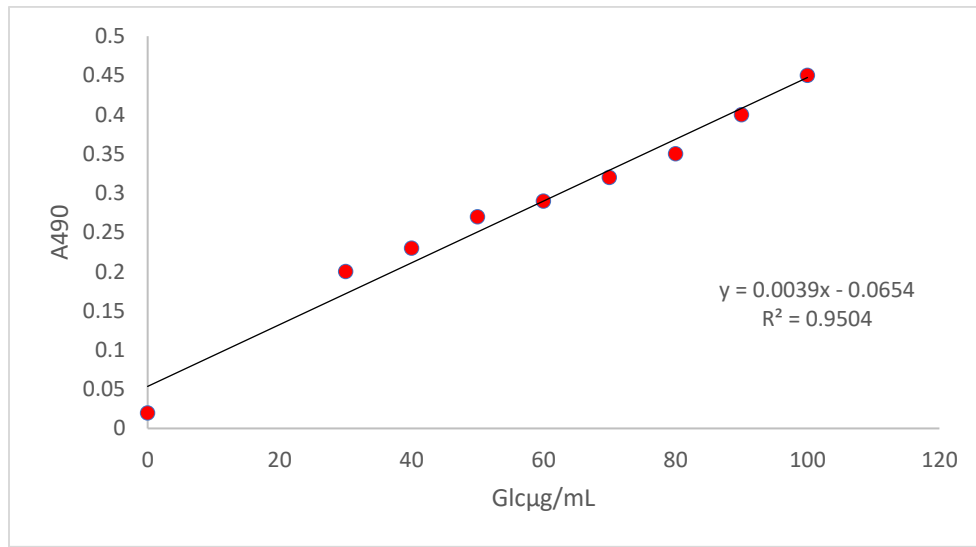
قدرت الكربوهيدرات الذائبة الكلية في مختبرات قسم البستنة وهندسة الحدائق وفقاً لطريقة فينول-حامض الكبريتيك والموصوفة من قبل (Dubois et al., 1951) حيث اخذ 0.5 غم من الجزء النباتي بعد 6 اشهر من موعد الزراعة على اوساط التضاعف وبعد تجفيفه وضع في دورق زجاجي سعة 150 مل ثم أضيف 75مل من الماء المقطر إلى العينة ووضعت في حمام مائي Water bath على درجة حرارة 70م° ولمدة 60 دقيقة ، بعد ذلك اخرجت الزجاجيات المستعملة من الحمام المائي وتركت حتى تبرد ثم رشح المستخلص

خلال ورق الترشيح Whatman1 ثم أخذ 5مل من الراشح وأضيف له 25مل من الماء المقطر، ثم أخذ 1مل منه وأضيف له 1مل من الفينول 5% و5مل من حامض الكبريتيك المركز H₂SO₄ ثم برد المستخلص بدرجة حرارة المختبر، قيست الامتصاصية على طول موجي 490 نانوميتر بجهاز المطياف spectrophotometer قدرت قراءات جهاز المطياف اعتمادا على المنحنى القياسي للكربوهيدرات الذي استعمل فيه الكلوكوز شكل(2)

حسبت الكربوهيدرات الذائبة الكلية بناء على المعادلة التالية:

الكربوهيدرات الذائبة الكلية (ملغم.100غم-1 ووزن جاف)

$$100 \times \frac{\text{كمية الكربوهيدرات في المنحنى القياسي} \times \text{حجم النهائي للمستخلص (مل)} \times \text{التخفيفات}}{\text{وزن العينة (غم)}}$$



شكل (2): المنحنى القياسي للكلوكوز المستعمل في تقدير الكربوهيدرات الكلية

3-5-2: تقدير محتوى صبغة الكلوروفيل الكلي Total chlorophyll (ملغم 100 غم⁻¹ وزن طري)

أخذت نماذج من الأجزاء النباتية الخضرية بصورة عشوائية من اربع عينات لكل معاملة، وتم غسلها لتخلص من بقايا الوسط الغذائي ثم أخذ من كل عينة 0.1 غم و أضيف لها 10 مل من الأسيتون بتركيز 80% و سحق النسيج جيداً بهاون خزفي بالأسيتون ثم فصل النسيج عن الراشح بوساطة جهاز الطرد المركزي (Horwitz et al (1970). استعمل جهاز المطياف لقياس الامتصاص الضوئي للصبغة على

الأطوال الموجية 645 و 663 نانوميتر ثم حسبت كمية صبغة الكلوروفيل (ملغم 100غم⁻¹ / نسيج ورقي طري) بتطبيق المعادلة الآتية :

$$\text{Total chlorophyll} = (20.2 \times D(645) + 8.02 \times D(663)) \times (V / (W \times 1000))$$

علماً أن D = الامتصاص الضوئي (Optical Density)

D (645) = قراءة الامتصاص الضوئي بطول موجي 645 نانوميتر

D(663) = قراءة الامتصاص الضوئي بطول موجي 663 نانوميتر

V = الحجم النهائي للمستخلص (10 مل)

W = وزن النسيج الورقي 0.5 غم

3-5-3: تقدير الهرمونات النباتية للنبيتات في مرحلة الاستطالة

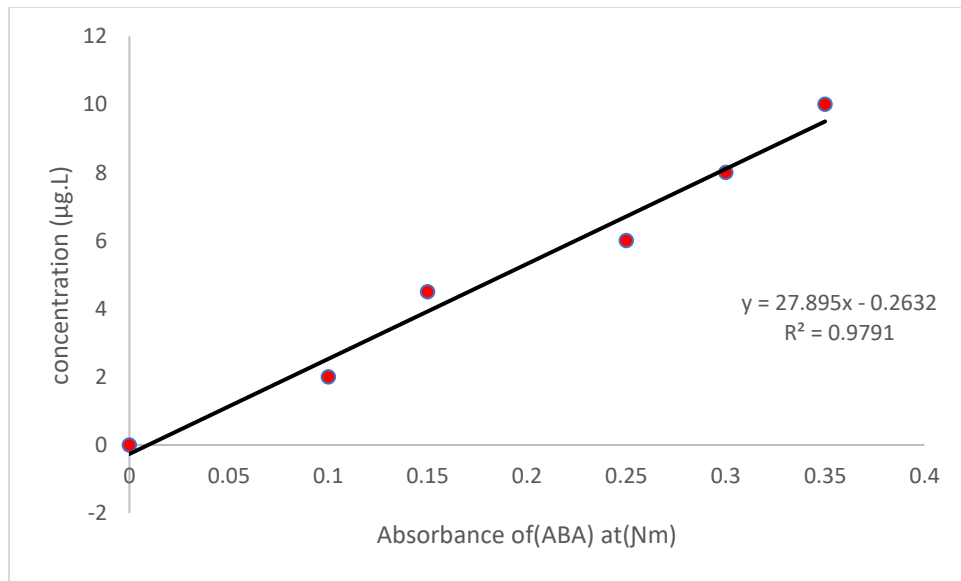
تم استخلاص الهرمونات النباتية وفقاً (Abbas and Fandi (2001) من الافرع الخضرية في مرحلة الاستطالة لنخيل التمر صنف البرحي النامية على أوساط ملحية بوساطة مذيب الميثانول 80% الذي أضيف 50 مل منه إلى العينة النباتية مقدارها 5 غم من الافرع وتركت على درجة حرارة 4 م° لمدة 24 ساعة ثم اخذ الراشح وترك الراسب لإعادة الاستخلاص بالطريقة نفسها أعلاه مرة أخرى, وجمعت المستخلصات بحيث كان حجم الراشح النهائي 100 مل في زمن 48 ساعة.

أجري على المستخلصات (الجزء العضوي) عملية التبخير على حرارة 40 م حتى الوصول إلى الجزء المائي Aqueous phase, بعد ذلك أجريت عملية الترويق Clearing بإضافة (3 مل) من خلات الرصاص القاعدية 45% وتم التخلص من الراسب باستعمال جهاز الطرد المركزي بمعدل 3000 دورة بالدقيقة لمدة 5 دقائق ومن ثم أضيفت قطرة واحدة من خلات الصوديوم للتأكد من إتمام عملية الترسيب. إذ إن ظهور العكارة في الراشح يحتم إعادة المحاولة. بعد ذلك أضيف المقدار نفسه (3 مل) من اوكزالات البوتاسيوم 22% وأجري لها عملية الطرد المركزي بالطريقة نفسها أعلاه للتخلص من الراسب. جمع الراشح وأكمل إلى 50 مل بالماء المقطر ومن ثم عدلت درجة حموضته pH إلى 5.2 بإضافة قطرات من حامض الهيدروكلوريك 1

عياري. نقلت المواد العضوية في الجزء المائي إلى الجزء العضوي باستعمال مذيب داي أثيل إيثر Diethyl ether بعملية الفصل Partitioning وذلك بوضع العينة في قمع الفصل Separating funnel مع 50 مل من مذيب الإيثر وبعد الرج لمدة 10 دقائق عزلت طبقة المذيب (الطبقة الإيثرية) وكررت العملية إلى المحلول المائي مرة أخرى وبواقع ثلاث مرات, جمعت طبقة الإيثر في دورق مخروطي سعة 150 مل, وترك المستخلص للتبخر إلى 5 مل بعدها نقل المستخلص إلى قناني صغيرة Vials وأضيف له 5 مل ميثانول لكل عينة .

1-3-5-3 : تقدير حامض الأبسيسيك (ABA) Determination of abscisic acid (MA) (مايكروغرام غم⁻¹ وزن طري)

تم تقدير حامض الأبسيسيك من العينات المستخلصة بالميثانول المطلق على أساس امتصاصها للأشعة فوق البنفسجية على طول موجي قدره 254 نانومتر وبحسب ما ورد في (Crozier et al (1980). وقد استعمل في التقدير جهاز المطياف نوع Spectrophotometer UV-Visible UVD-3200 وقد قَدِّر اعتماداً على منحنى قياسي (شكل-3) استعمل فيه حامض الأبسيسيك الطبيعي وعيّر عن النتائج بوحدة ميكروغرام غم⁻¹ وزن طري.



شكل (3): المنحنى القياسي الحامض الابسيسيك

3-5-3-2: تقدير المواد الشبيهة بالأوكسين IAA

قدرت المواد الشبيهة بالأوكسينات اعتماداً على طريقة Crozier *et al.*, (1980) بوساطة جهاز Spectrophotometer Visible Shimadzu ، تم قياس العينات على طول موجي 280 نانومتر وحسبت التراكيز اعتماداً على منحنى قياسي استخدم فيه الأوكسين الطبيعي (أندول حامض الخليك IAA) وقدرت النتائج بالمايكروغرام . غم¹⁻ وزن طازج .

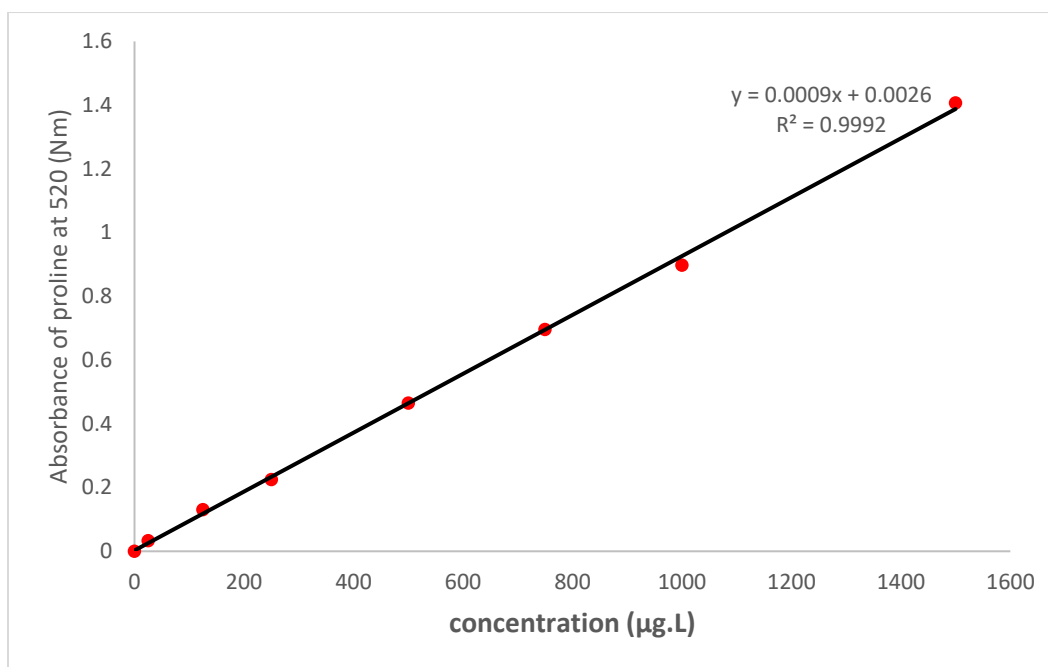
3-5-3-3: تقدير المواد الشبيهة بالساييتوكاينينات:

قدرت المواد الشبيهة بالساييتوكاينينات في العينات على اساس امتصاص الأشعة فوق البنفسجية وعلى طول موجي قدره 265 نانومتر وفقاً لطريقة Abbas and Fandi (2001) ، وقد استخدم في تقديره جهاز المطياف نوع Spectrophotometer UV-Visible Shimadzu وقدر تركيز المواد الشبيهة بالساييتوكاينينات اعتماداً على منحنى قياسي استخدم فيه البنزل ادنين (BAP) وعبرت عن النتائج بوحدة المايكروغرام . غم¹⁻ وزن طازج.

3-5-3-4: تقدير الحامض الأميني البرولين Determination of the proline

قدر الحامض الأميني البرولين في مختبرات قسم البستنة وهندسة الحدائق وقد تم اتباع الطريقة المتبعة من قبل Bates *et al.*, (1973) إذ أخذ 50 ملغم من النسيج الورقي الجاف و سحقت جيداً مع 10 مل من محلول الاستخلاص حامض السلفوساليسيك تركيز 3% (Sulphosalicylic acid) ، ثم رشحت باستخدام ورق الترشيح العادي، أخذ 2 مل من الراشح و أضيف له 2 مل من محلول الننهيدرين المحمض (المحضر بإذابة 1.25 غم ننهيدرين في 30 مل حامض الخليك الثلجي المركز و 20 مل حامض الفوسفوريك 30%) و 2 مل حامض الخليك الثلجي المركز 98% ثم رجبت الأنابيب جيداً، بعدها وضعت في حمام مائي بدرجة 100م° و تركت لمدة ساعة واحدة ثم تم إنهاء التفاعل برفع الأنابيب و وضعها في حجرة التجميد في الثلاجة و تركت لمدة 15 دقيقة ثم أخرجت و تركت لكي تصبح بدرجة حرارة المختبر بعدها تم فصل البرولين عن المزيج بإضافة 5 مل من التولوين المركز 98% (Toluene) لأنبوبة الاختبار ثم رجبت باستخدام جهاز Vortex Mixer بأقصى سرعة لمدة 30 ثانية، ثم تركت الأنابيب لمدة 5 دقائق لتستقر ثم

سحبت طبقة التولوين بوساطة الماصة و أخذت قراءة الامتصاص الضوئي لها على طول موجي 520 نانوميتر بجهاز المطياف. قورنت النتائج مع قراءات المنحنى القياسي للبرولين شكل (4) .



شكل(4): المنحنى القياسي للبرولين (ملغم.لتر)

يتم حساب تركيز البرولين من القانون الآتي :

$$\frac{(\text{حجم التولوين} \times \text{برولين ملغم}) / 115.5}{\text{وزن العينة للنباتية (غم)} / 5}$$

3-5-4: حساب (التلون البني) Browning

تم حساب النسبة المئوية للاسمرار بواسطة المعادلة

$$\text{النسبة المئوية للاسمرار} \% = \frac{\text{عدد الاجزاء المصابة بالاسمرار}}{\text{عدد الكلي للاجزاء المزروعة}} \times 100$$

3-6: المؤشرات الجزيئية

3-6-1: تحضير العينات النباتية

أخذت النباتات النامية على اوساط ملحية بعد 32 اسبوعاً من الزراعة واستخرج النسيج النباتي من عبوات الزراعة وغسل جيداً بالماء المقطر للتخلص من بقايا الوسط الغذائي ثم عقم بالكحول بتركيز 70% لتخلص من الملوثات بعد ذلك قطعت الأنسجة النباتية إلى أجزاء صغيرة ، وضعت العينات في جفنة خزفية معقمة وتم طحنها جيداً بإضافة النيتروجين السائل Liquid Nitrogen حتى تحولت العينات إلى مسحوق أبيض ، وحفظ المسحوق في حاوية حجم 10 مليلتر وعلمت بعلامات دالة خاصة لكل عينة لغرض إجراء التحليلات اللاحقة حيث اجري تقدير المؤشرات الجزيئية في مختبرات اهلية إذ تم تقدير النمط البروتيني في الشركة التقنية العراقية وقدر مؤشرات الـRAPD والتعبير الجيني في مختبرات البيان الأهلية.

3-6-2: الترحيل الكهربائي للبروتينات الكلية للافرع الخضرية الناتجة من المعاملة بكلوريد الصوديوم و الفلورغلوسينول وبالتراكيز المختلفة

3-6-2-1: تحضير محلول الاستخلاص Preparation of Extraction Solution

حضر محلول استخلاص العينات بحسب طريقة (Bavei *et al.*, 2011) حيث حضر ال Tris-HCl buffer 6.8 وذلك بأخذ 1.5 غم من مادة Tris-HCl وجرى إذابتها في حجم ماء مقطر 25مل ثم اخذ 0.0175 غم من مادة Phenyl Methane Sulfonyl Fluoride (PMSF) والتي أذيت في كمية قليلة من الماء المقطر وأضيفت إلى المحلول الأول بعد ضبط قيمة أسه الهيدروجيني pH على 6.8 باستخدام حامض الهيدروكلوريك HCL و هيدروكسيد الصوديوم NaOH.

3-6-2-2: تحضير العينة Preparation of sample

أخذ 0.3 غم من كل عينة من العينات المطحونة وسحقت في هاون خزفي مع 1مل من المحلول المحضر Tris-HCl buffer على درجة حرارة 4م° ومن ثم أجرى عملية الطرد المركزي للعينات وبسرعة 15000 دورة /دقيقة ولمدة 30 دقيقة و بدرجة تبريد 4م° ثم أخذ الراشح وترك الراسب بعدها حفظت العينات المستخلصة في التبريد reefer container لحين الترحيل.

3-2-6-3: الترحيل الكهربائي Electrophoresis

أجريت عملية الترحيل الكهربائي لفصل البروتينات لتحديد النمط البروتيني Protein patterns للبراعم الخضرية المتشكلة لنخيل التمر صنف البرحي ولجميع معاملات قيد الدراسة على هلام متعدد الأكريل أمايد "Polyacrylamide" وبحسب طريقة (Laemmli, 1970) والموصوفة والمعدلة من قبل (Sá-Pereira *et al.*, 2000)

3-2-6-4: المحاليل المستعملة في الترحيل الكهربائي Electrophoresis solutions

3-2-6-4-1: المحلول الدائري لهلام الفصل Resolving gel buffer

حضر المحلول بتركيز 1.5 مولاري باذابة 18.2 غم من مادة "Tris base" Hydroxymethyl methylamine في 80 مل من الماء المقطر وعدل الأس الهيدروجيني pH الى 8.8 باستعمال 1 مولاري من حامض الهيدروكلوريك وأكمل الحجم الى 100 مل بالماء المقطر .

3-2-6-4-2: المحلول الدائري لهلام الرص Stacking gel buffer

حضر بتركيز 0.5 مولاري باذابة 6 غم من مادة "Tris base" في 40 مل من الماء المقطر وعدل الأس الهيدروجيني إلى 6.8 باستعمال 1 مولاري من حامض الهيدروكلوريك وأكمل الحجم إلى 100 مل بالماء المقطر .

3-2-6-4-3: محلول 10% SDS

حضر باذابة 5 غم من مادة Sodium dodecyl sulphate في كمية من الماء المقطر ثم أكمل الحجم إلى 50 مل بالماء المقطر

3-2-6-4-4: محلول الدائري للاقطاب Electrode buffer

حضر باذابة 12 غم من مادة Tris base 57 غم من مادة Glycine في كمية من الماء المقطر وأكمل الحجم إلى 500 مل بالماء المقطر مع إضافة 5 مل من محلول 40% SDS .

3-6-2-4-5: محلول الأكريل أمايد Acrylamide stock solution

حضر بإذابة 29.2 غم من مادة الأكريل أمايد مع 0.8 غم من مادة Bis-acrylamide في 60 مل من الماء المقطر وأكمل الحجم إلى 100 مل بالماء المقطر ، ثم رشح المحلول خلال ورقة الترشيح watmane NO.1 ثم أضيف 4مل من محلول SDS 10% .

3-6-2-4-6: محلول برسلفات الامونيوم (APS) Ammonium persulfate

حضر التركيز 1.5 وذلك بإذابة 0.15 ملغم من مادة "APS" في 10 مل من الماء المقطر .

3-6-2-4-7: المحفز الاساسي للاكريل امايد N,N,N-Tetra methyl ethylene diamine (TEMED)

استعملت مادة "TEMED" المحفزة لبلمرة الأكريل أمايد كمادة جاهزة وبتركيز 99%

3-6-2-4-8: محلول التصبيغ Staining solution

حضر بإذابة 0.5 من صبغة Coomassie Blue(R-20) في خليط من حامض الخليك وكحول مثيلي وماء مقطر بنسبة 5:4:1 على التوالي وبحجم 250 مل .

3-6-2-4-9: محلول ازالة الصبغة Destaining solution

حضر من خليط من حامض الخليك وكحول المثيلي وماء مقطر وبنسبة 5:4:1 على التوالي

3-6-3: طريقة العمل Procedure

3-6-3-1: تحضير الهلام Gel preparation

3-6-3-1-1: تحضير هلام الفصل Separation Gel preparation

حضر هلام الفصل بتركيز 7.5 بمزج 14.55 مل من الماء المقطر و 7.5 مل من محلول أكريل أمايد و 7.5 مل من محلول الدارئ لهلام الفصل و 0.3 مل من محلول SDS و اضيف 150 مايكروليتر من محلول البيروسلفات الأمونيوم و 15 مايكروليتر من TEMED .

3-6-3-2: تحضير هلام الرص 10% Stocking gel preparation

حضر هلام الرص 10% بمزج 12.2 مل من الماء المقطر مع 5 مل من محلول الدارئ لهلام الرص و 2.6 مل من محلول الأكريل أميد و 0.2 مل من محلول SDS واضيف 50 مايكروليتر من محلول بيروسلفات الامونيوم و 10 مايكروليتر من ال TEMED .

3-6-3-2: تحضير العينات Samples preparation

حضرت العينة باخذ 40 مايكروليتر من الراشح الناتج من الخطوة (3-8-2-2) وأضيف له 0.5 مل من محلول التصبيغ وبذلك تكون العينة جاهزة للترحيل

3-6-3-3: تشغيل جهاز الفصل Turn on the protein separator

مزجت مكونات هلام الفصل جيد باستخدام magnetic sterer ثم حملت بعناية بين لوحين زجاجيين في مستودع جهاز الترحيل وترك الهلام لمدة 30 دقيقة لإكمال التصلب ثم يغسل السطح العلوي من المحلول وتسحب الطبقة الخارجية من الماء لمفصولة ثم يضاف محلول هلام الرص 10% ويوضع المشط المخصص وذلك لتكوين حفر الترحيل للبروتينات Wells of the electrophoresis استخدم جهاز الترحيل العمودي V.G.E المجهز بقدرة كهربائية مقدارها 50 فولت ولمدة ساعتين ثم اجري الفصل الكهربائي التحليلي في الألواح العمودية عن طريق تشغيل لمدة ساعة عند 150 فولت.

3-6-4: استخلاص الحامض النووي DNA Extraction

جرى استخلاص الحمض النووي DNA للأفرع المتشكلة والنامية في أوساط معاملة بكلوريد الصوديوم بعد 24 اسبوعاً من الزراعة وفقاً ل (Saghai-Marroof et al., (1984 وبالطريقة الموصوفة من قبل Doyle and Doyle, (1987) وتبعاً للخطوات الآتية:

1-أخذ 0.2 غم من الجزء النباتي للعينات المدروسة وسحقت العينات باستخدام الهاون الخزفي بوجود النتروجين السائل Liquid Nitrogen

- 2-أضيف 1.5مل من مادة الاستخلاص الاساسية (Cetyltrimethyl ammonium bromide) CTAB والمسخن الى درجة حرارة 65م° ، نقل المستخلص إلى انبوبة سعة 4مل ثم وضعت على هزاز Vortex بعد ذلك وضعت العينات في حمام مائي Water bath بدرجة حرارة 60م° ولمدة 30دقيقة.
- 3- أضيف لكل عينة 1مل من محلول Chloroform : Iso Amyl Alcohol (24:1) ومزج باستخدام المازج الكهربائي جهاز (Vortex) وحُضنت لمدة 3 دقائق في وعاء فيه جريش الثلج.
- 4-نقلت العينات إلى جهاز الطرد المركزي وبسرعة 10000 دورة/دقيقة ولمدة 5دقائق وبدرجة حرارة الجهاز المبردة .
- 5-جمع الراشح في أنابيب جديدة واطيف له 1000مايكروليتر من الايزوبروبونال Isopropanol المبرد ثم أضيف 300 مايكروليتر من NaCl (5M) مزجت المواد ثم ترك لمدة 30دقيقة في درجة حرارة المختبر لترسيب DNA ثم تم اعادة الطرد المركزي على 10000دورة /دقيقة ولمدة 15دقيقة .
- 6-استبعد الأيزوبروبانول مع مراعاة الحفاظ على DNA من الفقد.
- 7- أضيف لكل عينة 100 مايكروليتر من Ammonium Acetate (5.2 M) يتبعها إضافة 700 مايكروليتر من كحول الايثانول المطلق Absolute ethanol المبرد وتمزج ببطء بقلب الأنبوب عدة مرات لترسيب DNA ثم وضعت في التبريد عند درجة حرارة - 20 ° م لمدة 20 دقيقة.
- 8-أضيف الكحول الأثيلي مرة أخرى وبتركيز 70% وذلك لتخلص الأحماض النووية من أثار الايزوبروبونال ثم جمع الراسب بجهاز الطرد المركزي ولمدة 5دقائق وبسرعة 10000دورة/دقيقة تركت العينات بعدها لتجف لمدة 10 دقائق.
- 9- أضيف 300مايكروليتر من محلول TE إلى الأحماض النووية والمتجمعة في قعر الأبندروف ورجت العينات جيداً حتى ذوبان المادة النووية .

10- أضيف 90 مايكروليتر من خلات الصوديوم بتركيز 4 ملي مولر و PH=5.2 ، ثم أضيف 1مل من كحول الأيثانول المطلق 99.9% المبرد وتمزج ببطئ بقلب الأنبوبة عدة مرات لترسيب DNA ثم وضعت في التبريد عند درجة حرارة 20 م° لمدة 20 دقيقة.

11-أضيف 100 مايكروليتر من محلول TE buffer لكل عينة ثم تخزن عند درجة حرارة 4م° لحين الاستخدام .

3-6-4-1:تحضير هلام الاكاروز Agarose Gell Preparation

اذيب 0.3 من الاكاروز وبتركيز 1.2% في 25 مل من محلول Tris –Boric acid EDTA (TBE) بقوة 1X ،سخن المزيج مع التحريك المستمر حتى ذوبان الهلام كليا ثم ترك حتى وصول درجة حرارة الهلام ما بين (50-55) م° ، اضيف للهلام 1 مايكروليتر من صبغة السايبر كرين مع صبغة التحميل Loading dye سكب الهلام برفق وباستمرار لمنع تكون الفقاعات الهوائية في قالب التحميل المعقم بالماء المعقم المعامل بالكلور 10% وترك لمدة 30 دقيقة حتى يتصلب . وبعد تصلب الهلام وضع في حوض الترحيل وغمر بمحلول X1 TBA ثم يرفع المشط برفق للحفاظ على الحفر رحلت العينات بمقدار فولتية 80 فولت ولمدة 30 دقيقة فحصت نتائج الترحيل بتعرض للاشعة فوق البنفسجية بوضعها في جهاز UV- Transilluminator، استخدم الدليل الحجمي للحمض النووي pd100-10000 DNA ladder المجهاز من شركة bioneer وبعدد حزم 20 حزمة .

3-4-2: تقانة التضاعف العشوائي المتعدد الأشكال لسلسلة الحمض النووي Randomly DNA Amplified Polymorphic DNA (RAPD)

استعملت ثمانى بادئات عشوائية مكونة من قواعد نيوكليوتيدية عشوائية Decamer nucleotide primers والموضحة في (جدول 3-3) وبنسبة GC% كلية 66.25% وبحسب (rawashdeh and amri,2006)

جدول(3): البادئات الجزيئية المستخدمة في تضاعف تقنية RAPD

| CG% | Primer sequence (5'-3') | Gene name | No. |
|-----|-------------------------|-----------|-----|
| 60 | AGTCAGCCAC | OPA-03 | 1 |
| 70 | TGGACCGGTG | OPE-08 | 2 |
| 60 | CAGCTCACGA | OPG-12 | 3 |
| 70 | CTGCTGGGAC | OPD-10 | 4 |
| 70 | GGACCCAACC | MOH-9 | 5 |
| 70 | GTGAGGCGTC | MOH-8 | 6 |
| 60 | ACGGCGTATG | OPE-19 | 7 |
| 60 | AGGGGTCTTG | OPA-05 | 8 |

نفذ تفاعل ال PCR في حجم نهائي بلغ 25مايكروليتر إذ اشتمل التفاعل على 5مايكروليتر من قالب الدنا لكل معاملة فضلا عن المكونات الموضحة في (جدول 4-4) ثم اكمل الحجم النهائي الى 25مايكروليتر باستخدام Distilled Water

جدول(4): مكونات العينة الداخلة في تفاعل البلمرة المتسلسل RAPD-PCR

| التركيز | مواد التفاعل | ت |
|---------|--|---|
| 1 µl | RPED Primer(1.0 µM) | 1 |
| 2.5 µl | Buffer(1X) | 2 |
| 8µl | DNTPs(1.25µM) | 3 |
| 1µl | MgCL ₂ (1.5mM) | 4 |
| 1µl | DNA <i>Taq</i> Polymereases(1Unit.µl ⁻¹) | 6 |

تم مضاعفة الحمض النووي المحضر بواسطة تقنية PCR وبحسب برنامج الجهاز المتبع بوجود ثمانى من بادئات RABD وكما موضح في (جدول 5-5) حيث وضعت مواد التفاعل في انبوب

EppendorfTM-PCR وقد بلغ الحجم النهائي 25 مايكروليتر ، تم التفاعل بوجود 5 مايكروليتر من قالب الـ DNA لكل معاملة بالإضافة إلى باقي المكونات المشتركة بالتفاعل كما في (جدول -4) مزجت العينات جيدا بالهزاز Vortex لمدة 10 ثوان ، ثم نقلت العينات إلى جهاز المبلمر الحراري Cleaver Scientific (Thermocycler) لبدء التفاعل التضاعفي .

جدول (5) برنامج تفاعل البلمرة المتسلسل RAPD-PCR

| Stage | Step | Temperature | Time | cycle |
|-------|------|-----------------------|--------|-------|
| 1 | 1 | Denaturation 95C° | 5 min | 1 |
| 2 | 1 | Denaturation 95 C° | 1 min | 35 |
| | 2 | Annealing 35-37 C° | 1 min | |
| | 3 | Extension 72 C° | 2 min | |
| 3 | 1 | Final Extension 72 C° | 10 min | 1 |

3-4-6-3: تحليل البيانات الـ RAPD RAPD Data Analysis

بعد انتهاء تفاعل PCR رحلت للحزم المتضاعفة والنتيجة من البادئات الثمانية على هلام الاكاروز 1% ومن ثم قدرت المؤشرات الآتية:

3-4-4-6-3: تقدير الازان الجزيئية للحزم المتضاعفة Band Molecular Weight

قدرت الأوزان الجزيئية للحزم المتضاعفة (base pairs:bp) باستخدام برنامج image.10 اعتماداً على العينة القياسية مع الدليل الحجمي "1Kb DNA Ladder".

3-4-6-3: مؤشرات البادئ Primer Parameters

حسب العدد الكلي للحزم المتضاعفة و الناتجة من الترحيل الكهربائي لهلام الاكاروز باستخدام كل بادئ ، وحسبت الحزم المتضاعفة المتشابهة و المتباينة في البادئات المستخدمة حولت النتائج الى جداول توصيف في برنامج Past.3.v10 وذلك بوضع (1) عند وجود حزمة و (0) عندما لا تظهر حزمة . تم تقدير المعاملات التالية لكل بادئ ولمجموع تأثير البوادئ لكل تقنية ولجميع المعاملات قيد الدراسة.

1- عدد الحزم الكلية المنتجة لكل بادئ .

2- عدد الحزم المتشابهه (Monomorphic bands %)

3- عدد الحزم المتباينة (Polymorphic bands %)

4- النسبة المئوية للتباين وحسب المعادلة الآتية :

عدد الحزم المتباينة المنتجة من البادئ

$$\text{النسبة المئوية للتباين} = \frac{\text{عدد الحزم المتباينة المنتجة من البادئ}}{\text{عدد الحزم الكلي المنتجة من البادئ}} \times 100$$

عدد الحزم الكلي المنتجة من البادئ

7- حسب معامل التشابه Similarity coefficient بين المعاملات المختلفة حسب المعادلة المعتمدة من قبل وباستخدام حزمة البرمجية image.10 (Nei and Li, 1979) .

3-6-5: فحص تفاعل سلسلة البلمرة في الوقت الحقيقي الكمي (الاستنساخ العكسي) Quantitative Reverse Transcription Real-Time PCR (RT-qPCR)

تم إجراء فحص تفاعل سلسلة البلمرة في الوقت الحقيقي الكمي (الاستنساخ العكسي) وذلك لقياس المستويات الكمية للحمض النووي المرسل (mRNA transcript levels) للدلالة على مقدار التعبير الجيني Gene expression للجينات الموضحة في (جدول 6-6) وكذلك استخدمت الجينات (ACTN و REF1) كجينات منظمة قياسية لحساب التعبير الجيني (Yaish et al.,2018; Patankar et al.,2019). (Patankar et al.,2018;)

جدول (6): جينات الاجهادات المستهدفة في براعم نخيل التمر صنف البرحي

| No | Gene Name | Accession Number | Gene Description | Primer Sequence (5'-3') | |
|----|-----------------------|------------------|---|-------------------------------|-------------------------------|
| | | | | Forward | Reverse |
| 1 | STKs | XM_008811351.2 | serine/threonine protein kinasesSTY8 | TATGGCGGCTTATCTTTTGG | CTTGTTCGGAAGAGGAGGTG |
| 2 | ABA RECEPTOR | XM_008805920.2 | abscisic acid receptor PYL4-like | ACGGTGGGCAGACTCGTAAT | GATCCAGCTTGCAAAAAAAG AAG |
| 3 | PROLINE TRANSPORTER 2 | XM_008814663.2 | proline transporter 2 | CCTGGCATTGGTTGAATGTTG | TGGCAGCAGCCAATGCT |
| 4 | PIP1 | XM_008780694.2 | Aquaporin PIP1-2 | TGCGTTTTACCACCAGATAGTCA | GGCTCAAGGCTGCTCTTG |
| 5 | PIP2 | XM_008793314.1 | Aquaporin PIP2-4 | TCCCACGTCCCGGTTTT | GGACCATGAACACCGCAAA |
| 6 | PdMT2A | XM_008804521.2 | metallothionein 2A | GGATTTCATATGATGCTTGCTG TAGCGG | GGATTTCATATGATGCTT GCTGTAGCGG |
| 7 | ERF1(ref) | XM_008784898.2 | ethylene-responsive transcription factor 1-like | GGATCTCTGGAGCTTCGATGA | ACCAGGATCCCTCAGTAAAT GC |
| 8 | ACTIN(ref) | XM_008778129 | Actin | TCAATGTGCCTGCCATGTATGT | GCGGCCGCTAGCATAGAG |

3-6-5-1: استخلاص الأحماض النووية الكلي Total RNA extraction

تم استخلاص الحمض النووي الرايبوسومي الكلي Total RNA من أنسجة الأجزاء النباتية المعاملة بكلوريد الصوديوم وبالتركيز المختلفة وذلك باستخدام عدة Total RNA Isolation والمجهزة من قبل شركة Promega اتبع خطوات الأستخلاص المرفقة مع kit والموصوفة من قبل shenoi and kephart.(1998). مع إجراء بعض التحويلات البسيطة فيها وكما في الخطوات الاتية :

1-هرست الأجزاء النباتية بالهاون الخزفي مع كمية من النتروجين وحفظت في أنابيب خاصة في التبريد لحين الاستعمال

2-أخذ 30ملغم من الأجزاء النباتية المطحونة وأضيف لها 175مايكروليتر من RNA lysis وأضيف 350 مايكروليتر من RNA Dilution Buffer مزجت المواد المضافة مع العينة جيدا في المازج

الممغنط vortex ومن ثم وضعت في جهاز الطرد المركزي 5000 دورة /دقيقة ولمدة 10 دقائق نقلت بعد ذلك الطبقة العليا الى Collection Tube الحاوي على Spin feltir واهمل الراسب .

3-أضيف 200 مايكروليتر من الأيثانول 95% للراشح ومن ثم وضعت في جهاز الطرد المركزي 14000 دورة/دقيقة .

4- أضيف 600 مايكروليتر من محلول RNA Wash Solution المخفف بالأيثانول 95% ومن ثم نقلت العينات إلى جهاز الطرد المركزي مرة أخرى على 12000 دورة /دقيقة ولمدة دقيقة واحدة ثم بعد ذلك حضنت العينات في درجة حرارة 20-25 ولمدة 15 دقيقة

5-حضر محلول DNase لكل عينة وبشكل منفرد وذلك من خلال مزج المحاليل 40 مايكروليتر من Yellow core buffer و 5 مايكروليتر من 0.09M MnCl و 5 مايكروليتر من DNaseI enzyme مزجت المواد بهدوء دون استخدام الممازج الممغنط ، ثم اضيف 50 مايكروليتر لكل عينة من DNase المحضر ثم حضنت العينات في 25° مرة اخرى ولمدة 15دقيقة

6-نقلت العينات الى Collection Tube جديد ومن ثم اضيف 200 مايكروليتر من DNase stop ثم وضعت في جهاز الطرد المركزي 12000 دورة / دقيقة ولمدة دقيقة واحدة بعد ذلك حضنت بدرجة حرارة 37° ولمدة 10 دقائق ثم اضيف EDTA وحضنت ايضاً في درجة حرارة 40° ولمدة 5دقائق لتثبيت فعل الانزيم.

7- نقلت العينات الى Elution Tube 1.5ml واطيف 600 مايكروليتر من RNA Wash Solution 2 المخفف بالأيثانول 95% ومن ثم نقلت إلى جهاز الطرد المركزي 12000 دورة /دقيقة ولمدة دقيقة واحدة

8- أهمل السائل في الطبقة العليا برفق واطيف 250 مايكروليتر من RNA Wash Solution 2 وارجعت العينات مرة اخرى إلى جهاز الطرد المركزي وعلى 14000 دورة/دقيقة ولمدة دقيقتين .

9- تم إزالة Spin feltir ومن ثم أضيف 100 مايكروليتر من Nuclease-Free Water ثم نقلت إلى الطرد المركزي بقوة 12000 دورة/دقيقة ولمدة دقيقة واحدة وبعدها نقلت العينات إلى Collection Tube جديد وخرنت في تبريد -70 م°.

جدول(7): عدة المواد المستخدمة في الاستخلاص والمجهزة من promega

| concentration | ingredients | No. |
|---------------|---|-----|
| 50packs | Collection Tubes (50/pack) | 1 |
| 50packs | Elution Tubes (50/pack) | 2 |
| 50packs | Spin Columns (50/pack) | 3 |
| 250ml | RNA Lysis Buffer (RLA) | 4 |
| 96ml | RNA Dilution Buffer (RDA) (blue buffer) | 5 |
| 3 × 900μl | β-mercaptoethanol(%97.4) | 6 |
| 11ml | DNase I (lyophilized) | 7 |
| 2 × 750μl | MnCl ₂ , 0.09M | 8 |
| 11ml | Yellow Core Buffer | 9 |
| 26.5ml | DNase Stop Solution (DSA) | 10 |
| 206ml | RNA Wash Solution (RWA) | 11 |
| 25 × 2ml | Nuclease-Free Water | 12 |

3-6-5-2: تصنيع cDNA

استخدمت طريقة تصنيع الحمض النووي cDNA المكمل للـ cDNA من عينات الحمض النووي RNA لعينات الدراسة وباستخدام عدة Goscript Reverse Transcription system والمجهزة من قبل شركة Promega الحاوية على المواد الموضحة في (جدول 8-) وتم اجراء الخطوات وفقاً لخطوات العمل المرفقة مع العدة

جدول(8): تحضير تفاعل النسخ العكسي لتحويل الـ RNA الى cDNA

| concentration | ingredients | No. |
|---------------|--------------------------|-----|
| 50μl | Reverse Transcriptase | 1 |
| 300μl | 5X Reaction Buffer | 2 |
| 750μl | MgCl ₂ (25mM) | 3 |
| 200μl | PCR Nucleotide Mix | 4 |
| 50μg | Oligo(dT)15 Primer | 5 |
| 50μg | Random Primers | 6 |
| 1.25ml | Nuclease-Free Water | 7 |
| 2,500u | rRNasin | 8 |

حضر 5مايكروليتر من خلال مزج 5مايكوغرام من الحمض النووي RNA المستخلص مع 0.5 مايكوغرام من البادئ (Oligo(dT) وبالجم نفسه أضيف البادئ العشوائي Random Primers ثم حضن المزيج في حمام مائي على درجة حرارة 70م° ولمدة خمس دقائق ثم نقل الأنابيب إلى الثلج مباشرة ولمدة خمس دقائق بعدها نقلت إلى جهاز الطرد المركزي ولمدة 10 ثواني نقلت العينات بعدها إلى التبريد لبدء استكمال مزج تفاعل النسخ العكسي، حضر المزيج المكمل للتفاعل من خلال إضافة 1مايكروليتر من Nuclease-Free Water مع 4.0 مايكروليتر من Reaction Buffer و 1.2 مايكروليتر من MgCl₂ و 1.00 مايكروليتر من PCR Nucleotide Mix (dNTP) و 20 دالتون من rRNasin و 1.0 مايكروليتر من Reverse Transcriptase ومن ثم أكمل الحجم إلى 15 مايكروليتر بإضافة Nuclease-Free Water أضيف 15مايكروليتر من الخليط الثاني إلى الخليط الأول وأكمل الحجم إلى 20مايكروليتر لكل عينة ثم نقلت المكونات إلى جهاز الطرد المركزي 3000دورة/دقيقة ولمدة ثلاث دقائق ، بعد ذلك نقلت أنابيب الاختبار إلى جهاز الدوار الحراري PCR وتم تطبيق الظروف الحرارية لعملية تصنيع cDNA حسب درجات الحرارة المرفقة في عدة التضخيم وحسب (جدول -9).

جدول (9): الظروف الحرارية لتصنيع cDNA

| Time | Temperature | Step |
|------------|-------------|--------------------------|
| 1 hour | 55C° | cDNA synthesis (RT step) |
| 15 minutes | 95 C° | Heat inactivation |

3-5-6-3: اختبار التفاعل الكمي (qRT - PCR) Quantitative Real – Time PCR

تم إجراء اختبار qRT-PCR لعينات الـ cDNA لمعاملات الدراسة وكذلك للجينات المنظمة القياسية باستخدام صبغة السايبر الخضراء Green starqPCR التي تتفاعل مع الجينات المستهدفة في جهاز Real-Time PCR وقد حضر مزيج التفاعل qRT-PCR للجينات الهدف والجينات المنظمة القياسية الموضحة في (جدول -6) وشملت مكونات التفاعل كما في (جدول -11).

جدول(10): مكونات مزيج التفاعل qRt-PCR للجينات الهدف

| Volume | qPCR master mix |
|---------|-------------------------------|
| 5 µL | cDNA template |
| 1 µL | gene Forward primer |
| 1 µL | gene Reverse primer |
| 12.5 µL | 2x green star qPCR master mix |
| 5.5 µL | DEPC water |
| 25 µL | Total |

أضيفت المكونات الموضحة في (جدول -10) إلى أنابيب qTR-PCR ومن ثم نقلت إلى جهاز الطرد المركزي المازج vortex centrifuge وبسرعة 3000دورة /دقيقة ولمدة ثلاث دقائق بعدها نقلت إلى صفيحة جهاز (Real-time-PCR BioRad USA) وتم تطبيق الظروف الحرارية qPCR thermo cycler condition لكل الجينات الستة المستهدفة ووفقاً لما ورد في (جدول 11) .

جدول (11): برنامج تفاعل سلسلة البلمرة في الوقت الحقيقي الكمي (الاستنساخ العكسي) qTR-PCR

| Repeat Cycle | Time | Temperature | qRT- PCR Step |
|--------------|---------|-------------|--|
| 1 | 3 min | 95 C° | Initial Denaturation |
| 45 | 20 sec | 95 C° | Denaturation |
| | 30 sec | 45-55 C° | Annealing Extension Detection (scan) |
| 1 | 0.5 sec | 60 - 95 C° | Melting |

3-6-5-4: تحليل بيانات التعبير الجيني Real-Time PCR data analysis

حللت النتائج المتحصل عليها من تفاعل سلسلة البلمرة في الوقت الحقيقي الكمي من خلال استخدام طريقة Livak Method والموصوفة من قبل (2001). livak and schmittgen والتي تعتمد على استخراج الكمية النسبية "Relative Quantitive" من خلال عملية تصحيح ومعادلة الجينات الهدف مع الجين المحافظ الاحتمال نسبة التعبير الجيني (التغيير التضاعفي Fold change) في الجينات المستهدفة في الدراسة الحالية ، يتم تصحيح قيم عدد الدورات العتبة (CT) Threshold cycle number للجينات المستهدفة مع قيم CT للجين المحافظ عن طريق مستويات نسب التعبير الجيني الكمي "التغيير التضاعفي"

بطريقة ليفاك حيث تعد احد عينات الدراسة "غير الملحية" كعينات معيارية "calibrator" كمجموعة سيطرة "Control samples" وعليه فان كل قيمة من قيم الجينات المستهدفة المصححة يتم تقسيمها مع قيم العينة القياسية "calibrator" لاستخراج مستويات التعبير النسبي (التغيير التضاعفي) بعد ذلك استخدمت دلتا دورات العتبة Δct method مع الجين المصحح Reference Gene وكما في الخطوات الآتية :

صححت قيمة ct للجين المحافظ Reference Gene من كل من الجين المستهدف للعينة القياسية والجين المستهدف للعينة الدراسة وكما في المعادلتين

$$\Delta Ct_{(test)} = Ct_{(target, test)} - Ct_{(ref, test)}$$

$$\Delta Ct_{calibrator} = Ct_{(target, calibrator)} - Ct_{(ref, test)}$$

صححت قيمة ΔCt للجين المستهدف لعينة الدراسة من قيمة ΔCt للجين المستهدف لعينة القياس وكما يلي:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{(test)} - \Delta Ct_{(calibrator)}$$

حسبت نسبة التغيير التضاعفي لمستويات التعبير الجيني حسب المعادلة الآتية

$$\text{Fold change} = 2^{\Delta\Delta Ct}$$

7-3: التحليل الاحصائي statistical analysis

نفذت جميع تجارب الدراسة باستعمال التصميم العشوائي الكامل Complete Randomized Design (C.R.D) بالتجارب وحيدة العامل one way وجرى تحليل جميع البيانات وفقاً لبرنامج Genstat.10.v2 حددت المعنوية عن طريق تحليل (Analysis of Variance ANOVA) واعتماد اقل فرق معنوي المعدل (R.L.S.D) (Revised Least significant Difference) عند مستوى احتمالية 0.05 لتحديد المعنوية بين المعاملات الراوي وخلف الله، (1980)، وكذلك استخدمت عدة البرمجيات الجاهزة Graph Prism.8 في رسم المخططات البيانية (ملحق-4) و عدة ImageJ.10 في الدراسة تحديد الاوزان الجزئية الجزئية (ملحق-3) كما تم حساب معامل الارتباط correlation R Coefficient لمعرفة العلاقة بين جينات المستهدفة والمؤشرات المدروسة

4:4 النتائج والمناقشة RESULTS AND DISCUSSION

4-1: المؤشرات الخضرية في مرحلة التضاعف

4-1-1: تأثير إضافة كلوريد الصوديوم إلى أوساط الزراعة في الصفات الأفرع الخضرية

بينت النتائج (جدول-13) إن إضافة كلوريد الصوديوم إلى وسط التضاعف قد أثر في نمو وتطور الأفرع الخضرية حيث سجل التركيز 100 مليمول من كلوريد الصوديوم أعلى معدل للوزن الطري وفي الفترتين (8 و12 أسبوعاً) والتي بلغت (22.44 و25.94 غم) على التتابع مقارنة بمعاملة المقارنة التي سجل معدل الوزن الطري فيها (17.64 و23.01 غم) على التتابع في حين انخفضت الزيادة عكسياً بزيادة تركيز كلوريد الصوديوم إذ سجلت المعاملات 200 مليمول (13.19 , 16.39 غم) على التتابع. أما بالنسبة لعدد الأفرع فتشير النتائج إلى تفوق المعاملة المقارنة (غير المجهدة) معنوياً قياساً بمعاملات التراكيز العالية 150 و 200 مليمول مسجلة أعلى معدل لعدد الأفرع المتشكلة والذي بلغ (33.66) في حين لم تسجل فروقات معنوية بين المعاملات الأخرى ومعاملة المقارنة، وسجلت المعاملة 200 مليمول أدنى معدل لعدد الأفرع الخضرية إذ بلغت (18.16). ولوحظ من خلال تجربة معاملة الأفرع الخضرية في وسط التضاعف بكلوريد الصوديوم إن التراكيز الملحية العالية قد أثرت بشكل كبير على عدد الأفرع الخضرية المتكونة وإن هذا التأثير كان متدرجاً بالانخفاض (جدول-13).

وأما تأثير إضافة كلوريد الصوديوم في ارتفاع الأفرع واقطارها المتشكلة فقد سجلت انخفاضاً ملحوظاً في ارتفاع الأفرع عكسياً مع زيادة تركيز كلوريد الصوديوم مقارنة بمعاملة المقارنة ولكن كان التأثير أكثر حدة في المعاملة 200 مليمول إذ سجلت متوسط ارتفاع الفرع (سم) 6.53، في حين أظهرت معاملة 100 مليمول استجابة معنوية في مقاومة الشد الملحي والتي سجلت 9.63 سم مما يشير إلى أن تحفيز مقاومة الإجهاد الملحي كان أكثر نشاطاً في عند هذا التركيز مقارنة بمعامليتي 150 و 200 مليمول

كما بينت النتائج أن التراكيز الملحية قد أثرت معنوياً في قطر الأفرع إذ سجلت المعاملة 200 مليمول أعلى معدل لقطر للأفرع والذي بلغ (3.6 ملم) مقارنة بمعاملة المقارنة "غير المجهدة" التي بلغت (1.47 ملم) وسجلت المعاملة 100 مليمول معدل قطر بلغ 2.27 ملم متفوقاً معنوياً على معاملة المقارنة وعلى المعاملتين ذات التراكيز 25 و 50 مليمول من كلوريد الصوديوم (جدول -13)، وبعبارة أخرى

تسبب التراكيز العالية من كلوريد الصوديوم عند اضافتها الى الوسط الغذائي اختزالاً في أطوال الافرع وزيادة في قطره.

وبينت نتائج الدراسات السابقة (Alkhateeb *et al.*, 2015) و Hussein and Khierallah, (2016) Taibi *et al.*, (2011) حيث وجدت أن التراكيز العالية من كلوريد الصوديوم تؤثر بشكل تدريجي على مجمل مظاهر النمو في الافرع نخيل التمر.

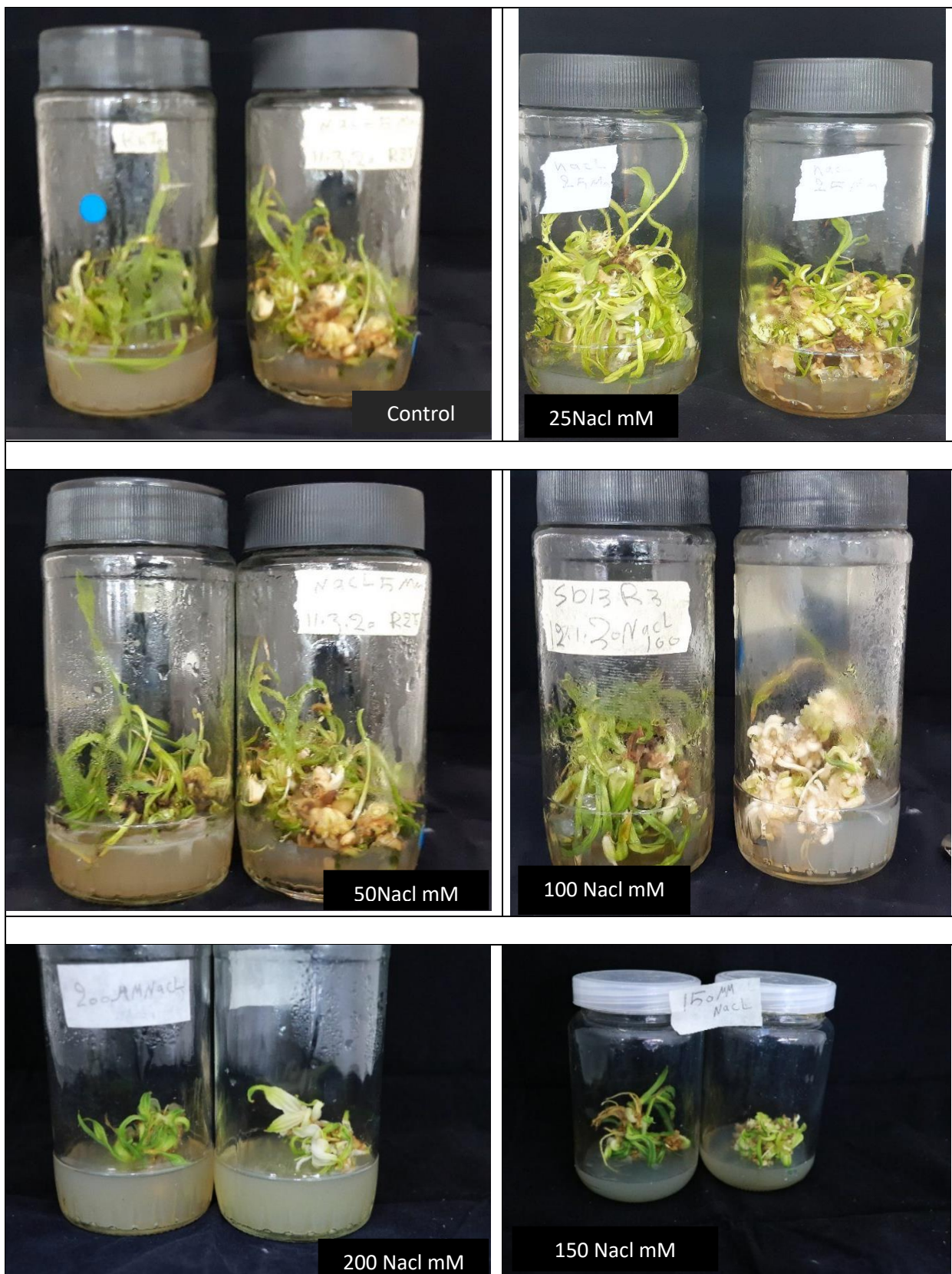
يسبب تراكم أيونات كلوريد الصوديوم في الأوساط الغذائية النامية عليها البراعم المتشكلة إلى التأثير على حالة الأمتصاص النشط للماء والمغذيات نتيجة زيادة الجهد الأزموزي إضافة إلى التأثير على استقراره الأغشية وتكوين البروتينات وتخليق منظمات النمو (Al-Abdoulhadi *et al.*, 2011) وأيضا يحدث تراكم أيونات كلوريد الصوديوم تغيرات في تركيب البروتينات إضافة إلى التأثير على الأنقسام النشط للخلايا وأستطالتها هذه الآثار السلبية يتبعها احداث تغيرات على المستويات المورفولوجية والفسولوجية والبيوكيميائية هذه الآليات المتبعة من قبل النباتات تتم وفق إشارات متقنة للحد من تلك الاثار السلبية الناتجة من الشد الملحي (Alturki, 2018)

إن الأختلاف في معدلات الوزن الطري وأطوال البراعم قد اخذت اتجاهاً منخفضاً معنوياً وزيادة في معدلات اقطار البراعم مع زيادة تركيز الأملاح في الوسط الغذائي وهذا يعكس الاستجابة الحاصلة في تحفيز مقاومة الشد الملحي من قبل البراعم إذ اثرت مستويات كلوريد الصوديوم بشكل ملحوظ في أقطار البراعم النامية خاصة في التراكيز المرتفعة التي رافقها تأخر في النمو وتشوهات للبراعم وتقزيمها إذ تعكس الزيادة في اقطار البراعم بزيادة تركيز كلوريد الصوديوم إلى الآلية المتبعة من قبل النباتات في الوقاية أو الحفاظ على حد أدنى لنمو تحت تأثير الإجهاد الملحي من خلال لتقليل من فقدان الماء بآلية تجميع عدد من المواد المذابة المتوافقة والمشملة على البروتينات والكاربوهيدرات والأحماض الأمينية ومركبات الأمونيوم الرباعية إذ يعتمد هذا التراكم على تفعيل مضادات الأكسدة الطاردة للجذور الحرة (ROS) مما يظهر عليها مورفولوجيا كتورم أو تبدو وكأنها منتفخة (Tuna *et al.*, 2007).

جدول (13): تأثير التراكيز المختلفة من كلوريد الصوديوم في الصفات الافرع الخضرية النخيل النامية بعد 12 اسبوع

| القياسات | | | | | | |
|---------------------------|-------------------|------------------------------|------------------------------|--------------------|-----------------------|---------------------|
| المعاملات | التركيز مليمول | الوزن الطري (غم) 8 اسابيع | الوزن الطري (غم) 12 اسبوع | عدد الافرع الخضرية | ارتفاع الافرع (سم) | قطر الافرع (ملم) |
| معاملة السيطرة | 0 | 17.64±1.17 | 23.01±1.34 | 33.66±0.96 | 11.80±1.44 | 1.46±0.05 |
| المعاملات الملحية Nacl | 25 | 18.72 ± 2.07 | 22.92 ± 0.14 | 32.05±0.31 | 11.53±2.13 | 1.60±0.20 |
| | 50 | 19.51±0.53 | 22.56±1.67 | 31.77±0.98 | 10.63±0.66 | 1.80±0.10 |
| | 100 | 22.44±0.65 | 25.94±0.47 | 32.40±1.96 | 9.30±0.55 | 2.76±0.15 |
| | 150 | 15.15±1.55 | 18.29±1.62 | 26.00±2.19 | 7.06±1.10 | 3.43±0.35 |
| | 200 | 13.19±2.319 | 16.39±2.47 | 18.16±1.27 | 6.53±0.70 | 3.92±0.82 |
| R.LSD | | 2.275 | 3.646 | 3.252 | 1.841 | 0.713 |

±تمثل المتوسطات معدل أربع مكررات متبوعة بقيم الانحراف المعياري عند مستوى احتمال 5%



لوحة(2): الافرع الخضرية المتشكلة في وسط التضاعف المحتوي على كلوريد الصوديوم بالتراكيز (0,25,50,100,150,200) مليمول بعد 8-12 اسبوع.

4-1-2: تأثير إضافة الفلورغلويسينول Phloroglucinol الى وسط التضاعف الافرع الخضرية

تشير نتائج (الجدول-14) إلى التأثير للمركب PG عند اضافته الى وسط الزراعة وبالتراكيز المنخفضة إذ سجلت المعاملة 25 مايكرومول أعلى معدل للوزن الطري وبدون فارق معنوي بلغ (20.79 و 24.30غم) بعد 8 و 12 أسبوعاً بالتتابع قياساً بمعاملة المقارنة التي سجلت متوسط وزن بلغ (19.73 و 23.66غم) . في حين ان الزيادة في تركيز مركب ال PG قد أثر بشكل سلبي في نمو الافرع الخضرية وتطورها عن طريق التأثير في الوزن الطري إذ لوحظ انخفاض الوزن بزيادة التراكيز حيث سجلت المعاملة 100 مايكرومول أقل معدل وزن بعد 8 و 12 أسبوعاً والذي بلغ (9.19 و 11.87 غم) على التتابع من الزراعة مع تسجيل زيادة في التلون البني بزيادة التركيز ولوحظ تكون كتل حية جديدة من كتل البراعم المتضررة من التلون البني

تشير بيانات (الجدول- 14) تأثير إضافة (PG) الى أوساط النمو في مؤشر عدد الافرع الناتجة في مرحلة التضاعف إلى الانخفاض في معدل عدد الافرع بين معاملة المقارنة ومعاملات الدراسة إذ سجلت معاملة المقارنة أعلى معدل عدد الافرع والذي بلغ (29.17) في حين سجلت معاملات مركب PG ذات التركيز 100 مايكرو مول اقل معدل لعدد الافرع والذي بلغ (7.50) ويلاحظ ان المعاملة 25 مايكرو مول قد تفوقت معنوياً مقارنة بباقي معاملات الدراسة والتي سجلت متوسط عدد الافرع بلغ (25.47) فرعاً، يتضح من نتائج الدراسة الحالية أن الفلوروجلايسينول قد اثر بشكل كبير في تطور البراعم ونموها وسبب في تأخرها إضافة الى ملاحظة اسوداد البراعم وموتها بزيادة تركيز المركب PG.

أما بالنسبة الى مؤشرات اطوال واقطار الافرع في مرحلة التضاعف فلم تسجل فروقات معنوية بين المعاملة PG 25 مايكرومول معنوياً في معدل طول الافرع ومعاملة المقارنة والتي سجلت معدل طول بلغ 12.13 في حين كانت النتائج سلبية بزيادة تركيز الفلوروجلايسينول إذ سجلت المعاملة 100 مايكرومول أقل معدل في طول الافرع بلغ 2.33 سم . لكن وجد من خلال الدراسة إلى أن معدل اقطار الافرع قد ازداد معنوياً بزيادة تركيز ال PG فقد سجلت المعاملة 50 مايكرو مول أعلى معدل قطر والذي بلغ 4.00 ملم قياساً بمعاملة المقارنة التي سجلت معدل قطر بلغ 1.80 ملم (جدول

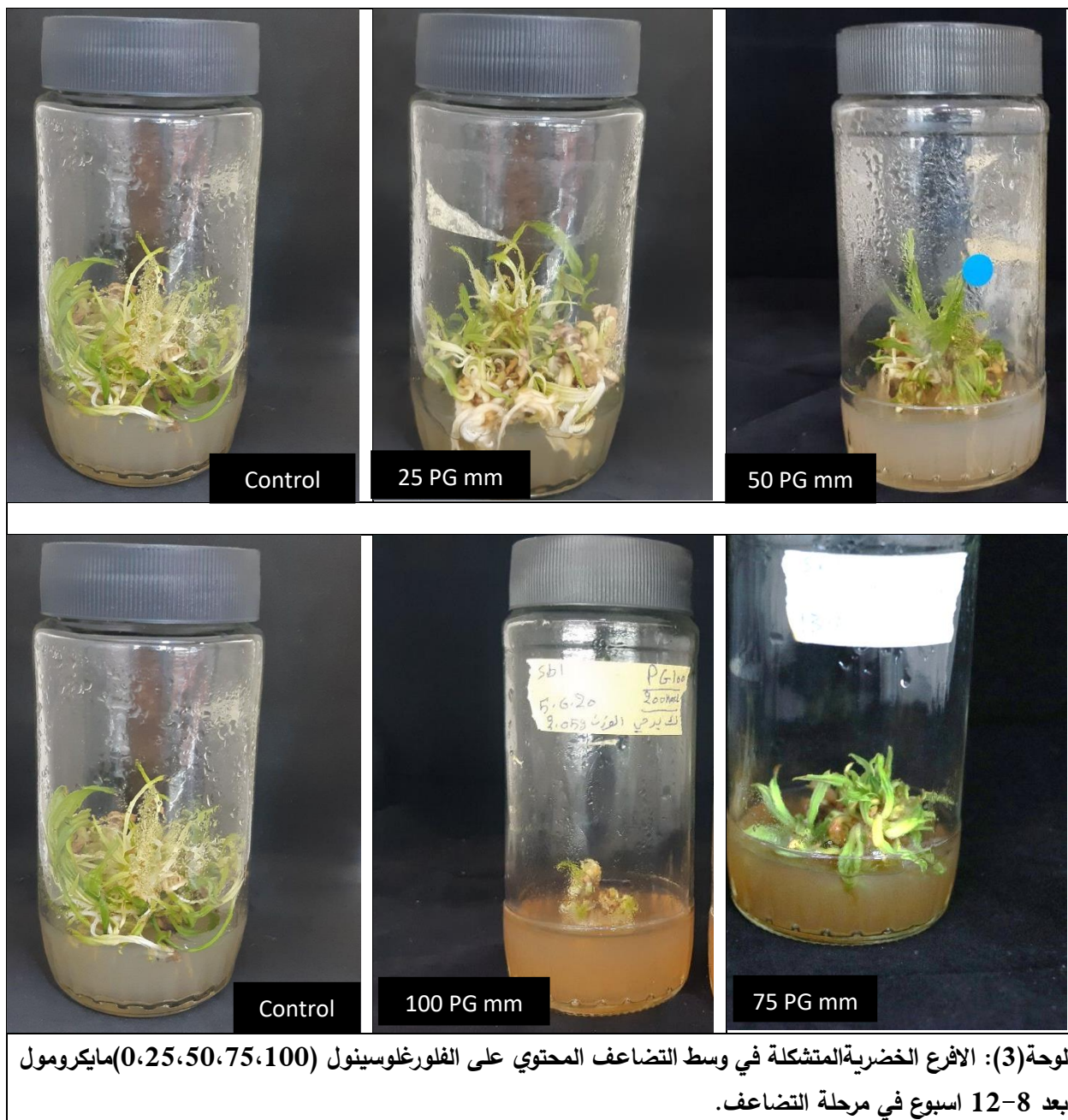
(14-

ويعزى (Sharifian *et al.*, 2009) السبب في الزيادة المعنوية لمؤشرات النمو الخضري في التراكيز القليلة الى دور الفلوروجلايسينول في العمل كمؤازر مع الأوكسين في تحفيز تطور البراعم في حين أدت الزيادة المفرطة في التراكيز الى تعريض البراعم المتشكلة الى اجهادات كيميائية اثرت سلباً في معدلات النمو إذ إن الزيادة في التركيز عن الحد الطبيعي ينتج عنها تراكم للمواد الفينولية وبالتالي تؤدي الى التأثير العكسي على نمو الافرع.

جدول (14): تأثير التراكيز المختلفة من مركب الفلوروجلوسينول في الصفات الافرع الخضرية النخيل النامية على وسط التضاعف بعد 8-12 أسبوع.

| القياسات | | | | | | المعاملات |
|-----------------|--------------------|------------|---------------------------|---------------------------|-------------------|----------------------------------|
| قطر الافرع (مم) | ارتفاع الافرع (سم) | عدد الافرع | الوزن الطري (غم) 12 اسبوع | الوزن الطري (غم) 8 اسابيع | التركيز مايكرومول | |
| 1.80±0.52 | 12.90±0.53 | 29.17±0.76 | 23.66±0.59 | 19.73±1.05 | 0 | معاملة السيطرة معاملات PG |
| 3.67±0.76 | 12.13±0.81 | 25.47±0.50 | 24.30±0.36 | 20.79±0.87 | 25 | |
| 4.00±1.00 | 11.00±1.00 | 18.00±1.73 | 19.40±0.92 | 15.78±1.75 | 50 | |
| 2.33±0.29 | 8.70±0.61 | 11.77±0.67 | 16.20±0.79 | 12.27±0.31 | 75 | |
| 1.50±0.50 | 2.33±1.15 | 7.50±0.50 | 11.87±1.63 | 9.19±1.15 | 100 | |
| 0.994 | 1.253 | 1.408 | 1.313 | 1.546 | | R.LSD |

±تمثل المتوسطات معدل أربع مكررات متبوعة بقيم الانحراف المعياري عند مستوى احتمال 5%



4-1-3: تأثير اضافة تراكيز مختلفة من الفلورغلوسينول Phloroglucinol في وسط التضاعف الافرع المعرضة للأجهاد الملحي تركيزه 200مليمول من كلوريد الصوديوم .

تشير نتائج (جدول -15) إلى تأثير الإضافة المشتركة للفلورغلوسينول مع كلوريد الصوديوم إلى أوساط الزراعة في مؤشر النمو الوزني الطري(غم) للأفرع الخضرية . فقد سجلت المعاملة (200مليمول NaCl + 25 مايكرومول PG) أعلى معدل للنمو الوزني الطري وفي المرحلتين 8 اسابيع و12 أسبوعاً والتي بلغت (21.23 و 25.07غم) وبالتتابع وبفارق معنوي قياساً بالمعاملة القياسية (ملحية) والتي سجلت (13.19 و 16.39غم) في حين سجلت المعاملة (200مليمول NaCl + 100 مايكرومول PG) أقل معدل ووزن طري في المرحلتين 8 أسابيع و12 أسبوعاً والتي بلغت (10.40 و 6.63غم) وبالتتابع . كما لوحظ إن المعاملة (200مليمول NaCl + 25 مايكرومول PG) قد أثرت في مؤشر النمو بالتركيز المنخفض في تحسين وزيادة الاستجابة المقاومة الشد الملحي الناتج من إضافة 200مايكرومول من كلوريد الصوديوم وأن إضافة مركب PG بالتراكيز المنخفضه رفع من مستوى الاستجابة وتحسين النمو في هذه المعاملة إلا أن الزيادة بتركيز PG في الأوساط الملحية قد أثر بشكل سلبي والذي قد يرجعاً إلى زيادة التلون البني مما تسبب في إعاقة النمو وتطور البراعم .

أما من حيث عدد الافرع المتكونة على أوساط التضاعف فقد سجلت الدراسة أعلى معدل معنوي لعدد البراعم والذي بلغ (22) فرعاً عند المعاملة (200مليمول NaCl + 25 مايكرومول PG) مقارنة بمعاملة المقارنة وباقي معاملات الدراسة وكما ووجد أن زيادة فترة بقاء الافرع في أوساط النمو قد سببت تراجعاً في تلك معدلات اعداد البراعم بعد 12 اسبوعاً . أما زيادة تركيز الفلورغلوسينول المضاف إلى أوساط التضاعف والمدعم بالتراكيز الملحية المختلفة قد أثر بشكل كبير في مؤشر النمو وتطور الافرع مسبباً في انتاج أفرع مشوهة ومتقزمة وارتفاع نسبة الاسوداد(التلون البني) نتيجة زيادة تركيز الفلورجلاليسينول والذي سجل اقل متوسط عدد براعم في المعاملة (200مليمول NaCl + 100 مايكرومول PG) الذي بلغ (4.33) (جدول-15)

وفي ما يخص مؤشر أطوال واقطار الافرع النامية في أوساط التضاعف والمعاملة بتراكيز مختلفه من كلوريد الصوديوم والفلوروكلايسينول فتوصلت الدراسة إلى أن الإضافة المزدوجة من فلوروجلايسينول وكلوريد الصوديوم لها تأثير واضح في مؤشر النمو فقد لوحظ تفوق المعاملة PG

25 مايكرومول+200مليمول كلوريد الصوديوم معنويا في صفة ارتفاع الافرع والذي سجل معدل ارتفاع بلغ (10.67سم) قياسا بمعاملة السيطرة (الملحية) التي سجلت معدل ارتفاع بلغ (6.53سم) وبفارق معنوي ايضا قياساً بالمعاملات الأخرى.

فيما سجلت المعاملة 100 PG مايكرومول+200مليمول كلوريد الصوديوم أقل معدل ارتفاع الافرع والذي بلغ 4.3سم وأما بالنسبة إلى صفة قطر الافرع فقد سجلت المعاملة السيطرة (الملحية) 200 مليمول كلوريد الصوديوم تفوقاً معنويا في صفة قطر البرعم والذي بلغ 3.9ملم قياسا بالمعاملات الفلوروجلايسينول+كلوريد الصوديوم التي سجلت انخفاضاً طفيفاً في معدل القطر ولم تكن هنالك فروقات معنوية بين المعاملات المزوجة الفلوروجلوسينول مع كلوريد الصوديوم إذ سجلت المعاملة PG25 مايكرومول+200مليمول كلوريد الصوديوم معدل قطر بلغ 3.00ملم وسجلت المعاملة (100مايكرومول PG+200مليمول NaCl) أقل معدل قطر والذي بلغ 1.5ملم (جدول-15).

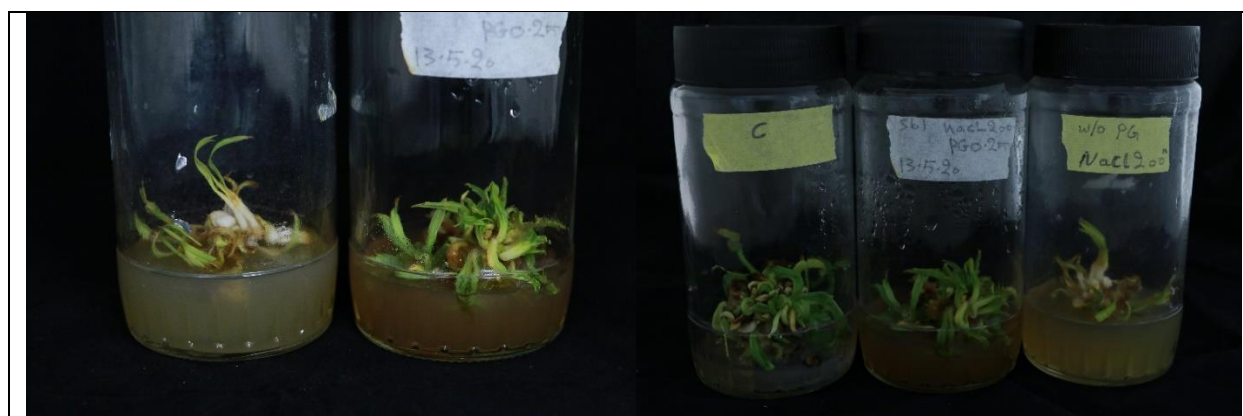
مما تقدم تبين نتائج الدراسة الحالية أن الإضافة المشتركة لكلوريد الصوديوم والتراكيز العالية من الفلوروجلايسينول قد أثرت بشكل سلبي في نمو الافرع نتج عنها زيادة مستوى التلون البني إلا أن التراكيز المنخفضة قد ساعدت في تحسين طفيف في مؤشرات النمو الخضري الذي نتج عنها ارتفاع في الوزن الطري وزيادة في عدد الافرع.

إن تعرض الافرع المتشكلة إلى تراكيز عالية من كلوريد الصوديوم يؤثر بشكل مباشر في مجمل عمليات النمو والتطور للأعضاء النامية نتيجة توقف منحنى النمو وارتفاع مستوى الأوكسدة الأنزيمية وعلى الرغم من حقيقة أن النباتات تتبع آليات في مقاومة الشد الملحي إلا أن تأثير تركيز كلوريد الصوديوم في المحتوى الهرموني له دور في ايقاف النمو النشط لذا تعد إضافة المواد الخارجية للمركبات التي تكون شبيهة بالأوكسينات لها دور في رفع مستوى الهرمونات وزيادة انقسام الخلايا وبما أن الفلوروكلايسينول يعد من المركبات التي توازر الأوكسين وتحميه من الأوكسدة فقد لاحظت دراسة (Suman Kumar, 2015) ارتفاع مؤشرات النمو في التراكيز المنخفضة من الفلوروكلايسينول وإشارة دراسة (Kang et al., 2010) أيضاً إلى دور الفلوروكلايسينول في تحسين النمو الخضري للبراعم المكثرة نسيجياً.

جدول (15): تأثير اضافة تراكيز مختلفة من الفلورغلوسينول Phloroglucinol في وسط التضاعف الافرع المعرضة للأجهاد الملحي تركيزه 200مليمول من كلوريد الصوديوم .

| القياسات | | | | | المعاملات |
|------------------|--------------------|------------|---------------------------|---------------------------|---------------|
| قطر الافرع (ملم) | ارتفاع الافرع (سم) | عدد الافرع | الوزن الطري (غم) 12 اسبوع | الوزن الطري (غم) 8 اسابيع | |
| 3.92±0.82 | 6.53±0.70 | 18.16±1.27 | 16.39±2.47 | 13.19±2.31 | 200 NaCl |
| 3.00±1.00 | 10.67±0.58 | 22.00±1.00 | 25.07±1.10 | 21.23±0.51 | 25PG+200NaCl |
| 1.83±0.29 | 7.67±1.53 | 12.00±1.00 | 17.83±1.48 | 13.80±0.75 | 50PG+200NaCl |
| 2.17±0.76 | 6.73±1.10 | 8.67±1.53 | 14.87±1.07 | 11.97±0.61 | 75PG+200NaCl |
| 1.50±0.50 | 4.33±1.15 | 7.67±2.08 | 10.40±0.53 | 6.63±0.67 | 100PG+200NaCl |
| 0.941 | 1.617 | 2.171 | 0.973 | 0.956 | R.LSD |

-تمثل المتوسطات معدل أربع مكررات متبوعة بقيم الانحراف عند مستوى احتمال 5% -



لوحة (4) الافرع الخضرية المتشكلة في وسط التضاعف المحتوي على كلوريد الصوديوم 200مليمول والفلورغلوسينول بالتراكيز (0،25،50،75،100) مايكرومول .

4-2: المؤشرات الخضرية في مرحلة الاستطالة

4-2-1: تأثير إضافة كلوريد الصوديوم في مؤشر الصفات الخضرية في مرحلة الاستطالة للأفرع الخضرية لنخيل التمر صنف البرحي

يوضح (الجدول-16) تأثير إضافة كلوريد الصوديوم إلى أوساط النمو الخالية من الهرمونات تحت ظروف المختبر المسيطر عليها إلى تفوق المعاملة NaCl100 مليمول في مؤشر النمو (عدد الأفرع والأوراق) في مرحلة الأستطالة تفوقاً معنوياً عند مستوى احتمالية 5% والذي بلغ (18.5 و3.66) برعماً و ورقة وبدون فارق معنوي مقارنة بمعاملة المقارنة والتي سجلت معدل عدد أفرع وأوراق بلغ (13.33 و2.00). في حين سجلت المعاملة NaCl200 مليمول أقل معدل لعدد الأفرع والأوراق والذي بلغ (6.7 و2.9) على التتابع. في حين لم تظهر اي فروقات معنوية بين المعاملتين (25 و 50 مليمول) في صفتي عدد الأفرع والأوراق. أما صفة ارتفاع الفرع، فقد سجلت الدراسة أعلى مؤشر ارتفاع الأفرع عند المعاملة 50 مايكرومول من كلوريد الصوديوم والذي بلغ 13.80 سم وبدون فارق معنوي قياساً بمعاملة المقارنة التي سجلت ما معدلة 13.73 سم وبفارق معنوي قياساً بمعاملات التركيز المرتفع 150 و 200 مليمول بلغت 8.63 و 8.52 على التوالي.

يوضح (الجدول -16) تأثير إضافة كلوريد الصوديوم إلى وسط النمو الخالي من الإضافات الهرمونية وفي ظروف المختبر المسيطر عليها في مؤشر النمو ارتفاع وقطر الأفرع الناتجة في مرحلة الأستطالة لنخيل التمر صنف البرحي تسجيل المعاملة 50 مليمول من كلوريد الصوديوم أعلى معدل ارتفاع الأفرع قياساً بمعاملات التركيز المرتفع 100 و200 مليمول من كلوريد الصوديوم وسجلت المعاملة 200 مليمول من كلوريد الصوديوم أقل معدل لطول الأفرع والذي بلغ 8.52 سم.

وأما بالنسبة لمؤشر قطر الأفرع فيتضح من النتائج تسجيل المعاملة 100 مليمول أعلى معدل قطر والذي بلغ 4.16 ملم وبفارق معنوي عن المعاملة المقارنة والتي سجلت أقل معدل لقطر البرعم والذي بلغ 1.73 ملم كما وسجلت معامليتي 150 و200 مليمول تفوقاً معنوياً في صفة قطر البرعم والتي بلغت لكل معاملة (3.66، 3.60 ملم) على التوالي في حين سجلت المعاملة 50 مليمول معدل قطر بلغ 2.00 ملم وبدون فارق معنوي عن معاملة 25 مليمول ومعاملة القياسية (جدول-16).

ويوضح (جدول-16) تأثير كلوريد الصوديوم في نسبة البراعم غير مكتملة النمو فقد تبين أنها تزداد بزيادة تراكيز كلوريد الصوديوم إذ سجلت المعاملة 200مليمول أعلى نسبة والتي بلغت 48.74% تلتها المعاملة 150 مليمول والتي سجلت ما معدلة 33.06% في حين سجلت المعاملة القياسية أقل نسبة والتي بلغت 15.02%.

يلاحظ أن الإضافة المتدرجة من كلوريد الصوديوم إلى أوساط النمو قد أثرت في مؤشرات النمو بزيادة التراكيز لكلوريد الصوديوم وقد حققت المعاملة 100مليمول من كلوريد الصوديوم تفوقاً معنوياً في معظم الصفات المقاسة ثم بعد ذلك أخذ مؤشر النمو بالانخفاض سلماً بزيادة التركيز مما يشير إلى أن التركيز 100مليمول يمثل المعدل القياسي للأملح التي يمكن أن تحفز الاستجابة تحت ظروف الشد إذ أن الاختلاف في معدلات مؤشر النمو (عدد الأفرع-عدد الأوراق) المدروسة قد اخذت اتجاهاً متدرجاً معنوياً مع زيادة تركيز الاملاح في الوسط الغذائي وهذا يعكس الاستجابة الحاصلة في تحفيز مقاومة الشد الملحي بحيث اثرت مستويات كلوريد الصوديوم بشكل ملحوظ في عدد الأفرع النامية لاسيما في التراكيز المرتفعة التي رافقها تأخر في النمو الأفرع وتقزمها.

وقد يعزى السبب في زيادة المعنوية الحاصلة في المعاملة 100مليمول كلوريد الصوديوم في مرحلة الأستطالة إلى الآلية المتبعة من قبل النباتات في الوقاية أو الحفاظ على نمو تحت تأثير الإجهاد الملحي والحفاظ على أنظمة النمو الحيوية بآلية تجميع عدد من المواد المذابة المتوافقة والمشملة على البروتينات والكربوهيدرات والأحماض الأمينية ومركبات الأمونيوم الرباعية إذ يعتمد هذا التراكم على تفعيل مضادات الأكسدة الطاردة للجذور الحرة (ROS) مما يظهر عليها مورفولوجيا زيادة في عدد الأفرع، ثم بزيادة التركيز تسبب تلك المواد المتراكمة توقف النمو وتقزم البراعم أو وفقدانها، وقد أشارت دراسة (Hussein and Khierallah, 2011) إلى تأثير تراكيز كلوريد الصوديوم بالتراكيز 1500 و3000 و4500 جزء بالمليون في تحفيز الاستجابة لمقاومة الشد الملحي بتغيرات حاصلة في مؤشرات النمو الكالس الجنيني لنخيل التمر صنف برحي

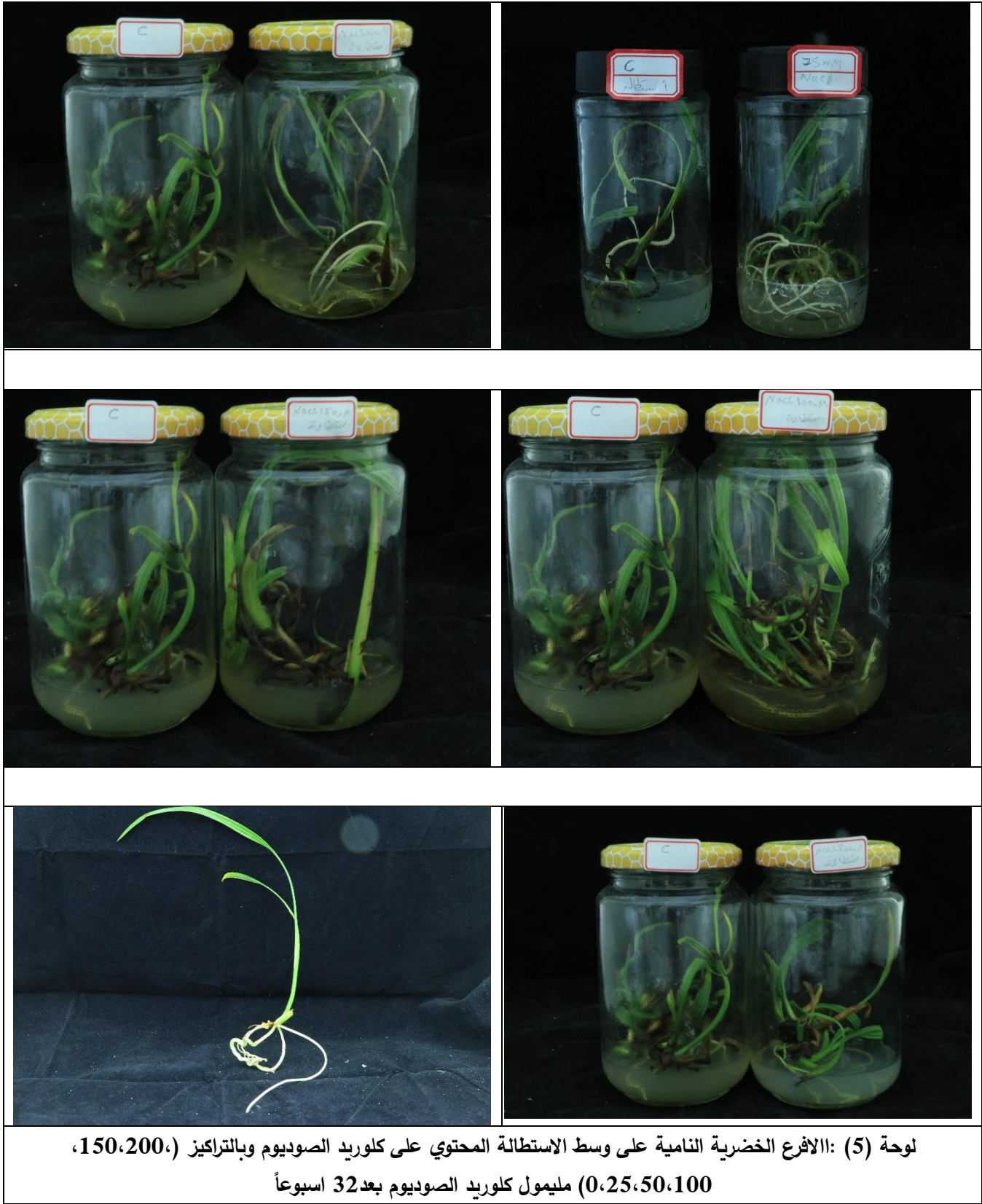
تشير نتائج مؤشرات النمو المعتمدة على طول الأفرع وقطرها إلى أن المعاملات الملحية بكلوريد الصوديوم تأخذ تأثيراً متدرجاً في تطور الأفرع إلا أن هذا التأثير يزداد بزيادة تركيز الاملاح وقد يعزى السبب في تقليل من طول الأفرع الى الدور الذي تلعبه ايونات الصوديوم في إعاقه امتصاص المواد

المغذية من الوسط وبالتالي يظهر ذلك على شكل تراجع في استطالة الأفرع وتأخر في نموها وفي التراكيز العالية من كلوريد الصوديوم التي تصل الـ 200مليمول تسبب تقزم في هذه الأفرع وشذوذ في نموها. أما الزيادة الحاصلة في قطر الأفرع فقد يعزى إلى تراكم المواد الذائبة في مناطق الامتصاص مما يتسبب بتوسع للخلايا واستطالتها.

جدول (16): تأثير التراكيز المختلفة من كلوريد الصوديوم في الصفات الخضرية للأفرع الخضرية في مرحلة الاستطالة

| القياسات | | | | | | المعاملات |
|-------------------------------|----------------|---------------|-------------|------------------|------------------|----------------------|
| نسبة البراعم غير مكتملة النمو | قطر الفرع(ملم) | طول الفرع(سم) | عدد الاوراق | عدد الافرع الكلي | التركيز (مليمول) | |
| 15.02±7.72 | 1.73±0.08 | 13.73±0.48 | 2.00±0.00 | 13.33±0.58 | 0 | المعاملة غير الملحية |
| 18.00±8.82 | 1.80±0.26 | 13.77±0.86 | 2.47±0.12 | 15.07±0.90 | 25 | |
| 15.30±3.11 | 2.00±0.50 | 13.81±0.09 | 2.50±0.00 | 16.00±0.56 | 50 | المعاملات الملحية |
| 21.79±3.59 | 4.16±0.52 | 11.07±0.01 | 3.57±0.21 | 18.50±0.87 | 100 | Nacl |
| 33.06±8.22 | 3.66±0.17 | 8.63±0.32 | 3.00±0.50 | 8.93±3.99 | 150 | |
| 48.74±9.20 | 3.60±0.53 | 8.52±0.02 | 2.92±0.05 | 6.70±2.34 | 200 | |
| 13.488 | 0.269 | 0.631 | 0.338 | 2.088 | | R.LSD |

±تمثل المتوسطات معدل أربع مكررات متبوعة بقيم الانحراف المعياري عند مستوى احتمال 5%



لوحة (5): الأفرع الخضرية النامية على وسط الاستطالة المحتوي على كلوريد الصوديوم وبالتراكيز (0، 25، 50، 100، 150، 200)، ملليمول كلوريد الصوديوم بعد 32 اسبوعاً

4-2-2: تأثير إضافة الفلورغلوسينول Phloroglucinol إلى وسط الاستطالة في مؤشر الصفات الخضرية الأفرع الخضرية

يوضح (الجدول -17) تأثير إضافة الفلورغلوسينول إلى أوساط النمو في مؤشر عدد الأفرع والأوراق في مرحلة الاستطالة لبراعم نخيل التمر النامية في ظروف المختبر . فقد سجلت المعاملة القياسية أعلى معدل لعدد الأفرع والذي بلغ 14.03 و فارق معنوي قياسا بمعاملة فلورجلوسينول ذات التركيز 25 مايكرومول والتي بلغ عندها متوسط عدد الأفرع 12 فرعاً. في حين سجلت المعاملة 100 مايكرومول من الفلورغلوسينول أقل معدل لعدد افرعاً بلغ 5.57 . وأما بالنسبة لصفة عدد الأوراق فقد سجلت المعاملة القياسية أعلى معدل لعدد الأوراق والذي بلغ 2.20 ورقة وبدون فارق معنوي قياسا بمعاملات الدراسة، سجلت المعاملة 100 مايكرومول أقل معدل لصفة عدد الأوراق بلغ 1.00

يوضح (الجدول _17) تأثير أضافة الفلورغلوسينول في صفتي الطول وقطر الأفرع في مرحلة الأستطالة. حيث سجلت المعاملة القياسية أعلى معدل للطول والذي بلغ 14.98 سم وبفارق معنوي قياساً بمعاملات الدراسة الأخرى. في حين سجلت المعاملة 25 مايكرومول معدل طول 13.11 سم وتفق معنوياً ايضاً عن معاملات الفلورغلوسينول الأخرى . بينما سجل أقل معدل للطول 3.11 سم عند المعاملة 100 مايكرومول . وفيما يخص صفة قطر الأفرع فوجدت الدراسة المعاملة 25 مايكرومول سجلت أعلى معدل لقطر البرعم والذي بلغ 1.50 ملم وبدون فارق معنوي قياساً بالمعاملة المقارنة التي سجلت مامعدلة 1.33 ملم في حين سجلت المعاملة 100 مايكرومول أقل معدل لقطر البرعم والذي بلغ 1.00 ملم كما وسجلت المعاملة ذاتها أعلى نسبة للبراعم غير مكتملة النمو والتي بلغت 58.22% في حين أن المعاملة القياسية بلغ نسبة الأفرع غير مكتملة النمو فيها مامعدلة 9.58%

أن نتائج الدراسة الحالية تبين أن التأثير المعنوي الفلورغلوسينول تكون في المستويات المنخفضة منه وقد يعزى السبب في الزيادة بمؤشر النمو إلى الدور الذي يؤديه الفلورغلوسينول كمؤازر الى الأوكسين في حث النمو عند التراكيز المنخفضة وأن زيادته تسبب في تراكم المواد الفينولية والتي تؤثر بشكل سلبي على نمو وتطور النبات . وتأتي هذه النتائج متطابقة مع نتائج (Sarkar, 2000) حيث وجد أن مؤشرات النمو (الطول والقطر للأفرع) لنبات البطاطا قد أظهرت وجود انخفاض معنوي في مستوى

النمو وقد تزايد هذا الانخفاض مع ارتفاع مستويات مركب PG ويلاحظ ان التراكيز العالية سببت في تراجعاً كبيراً لمؤشر النمو ويعتقد ان هذا التراجع في مؤشرات النمو كان بسبب زيادة المواد المؤكسدة للاوكسينات

جدول (17): تأثير التراكيز المختلفة من مركب الفلورغلوسينول في الصفات الخضرية في مرحلة الاستطالة للأفرع الخضرية نخيل التمر صنف البرحي

| القياسات | | | | | | المعاملات |
|------------------------------|----------------|---------------|-------------|------------------|------------------|-------------------------------------|
| نسبة الافرع غير مكتملة النمو | قطر الفرع(ملم) | طول الفرع(سم) | عدد الاوراق | عدد الافرع الكلي | التركيز (مليمول) | |
| 9.58±4.44 | 1.33±0.29 | 14.98±0.97 | 2.20±0.35 | 14.03±0.45 | 0 | المعاملة القياسية معاملات PG |
| 27.21±10.32 | 1.50±0.50 | 13.11±0.43 | 2.50±0.46 | 12.00±1.00 | 25 | |
| 40.46±11.37 | 1.23±0.25 | 11.40±0.56 | 1.80±0.26 | 5.80±0.20 | 50 | |
| 56.51±12.28 | 1.07±0.12 | 8.00±2.65 | 1.73±1.10 | 6.00±1.00 | 75 | |
| 58.92±7.69 | 1.00±0.00 | 3.00±1.00 | 1.00±0.50 | 5.57±1.50 | 100 | |
| 14.607 | 0.433 | 2.078 | 0.924 | 1.434 | | R.LSD |

تمثل المتوسطات معدل أربع مكررات متبوعة بقيم الانحراف المعياري عند مستوى احتمال 5%



لوحة (6): الأفرع المتشكلة على وسط الاستطالة المحتوي على الفلور غلوسينول (0،25،50،75،100) مايكرومول بعد 32 اسبوعاً

4-2-2: تأثير اضافة تراكيز مختلفة من الفلورغلوسينول Phloroglucinol في وسط الاستطالة الافرع المعرضة للأجهاد الملحي تركيزه 200مليمول من كلوريد الصوديوم

بينت النتائج في (الجدول_18) أن المعامله (25 مايكرومول PG + 200مليمول كلوريد الصوديوم) قد تفوقت معنوياً في عدد الافرع والذي بلغ 9.17 فرعاً قياساً بالمعاملة المضاف لها كلوريد الصوديوم بشكل منفرد وبتركيز 200مليمول والمعاملات الأخرى عند مستوى احتمالية 5% . في حين وسجلت المعاملة 100مايكرومول PG + 200مليمول NaCl اقل معدل لعدد الأفرع والذي بلغ 4 فرعاً . بينما سجلت المعاملة 200 NaCl (المقارنة) أعلى معدل لعدد الأوراق والذي بلغ (2.92) وسجلت المعامله 100مايكرومول PG + 200مليمول NaCl اقل معدل لعدد الأوراق بلغ (1).

أما بالنسبة لصفتي طول الأفرع وقطرها فقد تبين من نتائج (الجدول_18) أن المعاملة 25 مايكرومول PG+200مليمول NaCl قد تفوقت معنوياً في طول الأفرع حيث سجلت أعلى معدل لطول الأفرع والذي بلغ 9.63 سم في حين سجلت المعاملة 100+200NaCl mM أقل معدل لطول الأفرع الناتجة والذي بلغ 5.7 سم كما ويلاحظ أن الإضافة المشتركة لم تؤثر معنوياً في صفة قطر الأفرع فقد سجلت المعاملة القياسية الملحية أعلى معدل قطر والذي بلغ 3.60 ملم في حين سجلت المعاملة ذات التركيز 100مايكرومول PG + 200مليمول NaCl أقل معدل في صفة قطر البرعم والذي بلغ 1.43ملم

أن الإضافة المشتركة الفلورغلوسينول وبالتركيز 25مايكرومول مع كلوريد الصوديوم بالتركيز 200مليمول قد حفزت الاستجابة الطفيفة ضد الشد الملحي الذي يسببه كلوريد الصوديوم إلا أن هذا الاستجابة قد تراجعت بزيادة التركيز لمركب PG وقد يعزى السبب إلى أن الضغوط التي تسببها أيونات كلوريد الصوديوم قد تراكمت مع وجود المعزز الفينولي لمركب الPG الامر الذي انعكس سلبي على عمليات النمو بينما أن الإضافات المنخفضة قد شجعت الاستجابة مما يشير إلى تحفيز مسارات تخليق الأوكسينات كمنظمات نمو مشجعة الأستطالة الأفرع (Raghu *et al.*, 2006).

وقد أشارت دراسة (Suman Kumar, 2015) إلى أن التراكيز العالية من مركب الPG يكون لها تأثيراً سلبياً في نمو وتطور البراعم وعند اضافتها بشكل منفرد وان تحفيز التكيف الطفيف مع الملح الذي

لوحظ في التراكيز المنخفضة قد يكون إلى الدور الذي يؤديه الفلوروكلايسينول في كنس الجذور الحرة الناتجة من الإجهادات (Kang *et al.*, 2010).

جدول (18): تأثير الإضافة المشتركة الفلورغلويسينول Phloroglucinol مع كلوريد الصوديوم NaCl في الصفات الخضرية للأفرع الخضرية في مرحلة الأستطالة الخضرية لنخيل التمر صنف البرحي

| القياسات | | | | | المعاملات mM |
|------------------------------------|----------------|---------------|-------------|------------------|----------------------|
| نسبة الأفرع غير مكتملة النمو | قطر الفرع(ملم) | طول الفرع(سم) | عدد الاوراق | عدد الأفرع الكلي | |
| 48.87±9.21 | 3.60±0.53 | 8.52±0.02 | 2.92±0.05 | 6.70±1.21 | 200 NaCl |
| 39.61±6.15 | 2.40±0.85 | 9.63±1.52 | 2.00±0.00 | 9.17±0.35 | 25PG+200NaCl |
| 50.18±12.47 | 2.17±0.29 | 8.83±0.87 | 1.51±0.49 | 5.90±0.61 | 50PG+200NaCl |
| 47.17±33.16 | 1.87±0.81 | 6.77±1.26 | 1.30±0.52 | 5.50±0.50 | 75PG+200NaCl |
| 58.89±8.39 | 1.43±0.40 | 5.70±0.61 | 1.00±0.00 | 4.00±1.00 | 100PG+200NaCl |
| 25.768 | 0.935 | 1.517 | 0.484 | 1.213 | R.LSD |

±تمثل المتوسطات معدل أربع مكررات متبوعة بقيم الانحراف المعياري عند مستوى احتمال 5%



لوحة (7): الافرع المتشكلة على وسط الاستطالة كلوريد الصوديوم 200مليمول والفلورغلوسينول
(0.25.50.75.100)مليمول بعد 32 اسبوعاً

4-3: المؤشرات البيوكيميائية

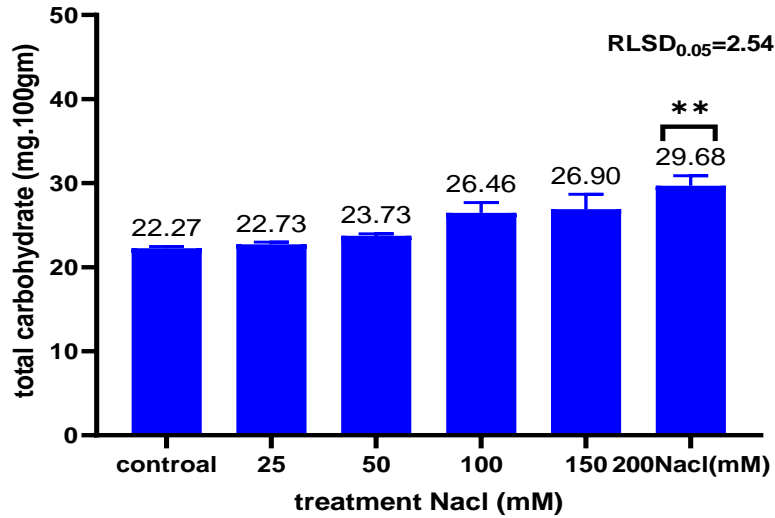
4-3-1: تأثير إضافة كلوريد الصوديوم في محتوى النوات الخضرية من الكربوهيدرات الكلية

من خلال (الشكل 5-5) يلاحظ إن معاملة البراعم الخضرية لنخيل التمر بكلوريد الصوديوم في طور التضاعف قد اثرت بشكل معنوي في محتواها من الكربوهيدرات إذ يشير الشكل إلى ارتفاع بمحتوى الكربوهيدرات بزيادة تركيز أملاح NaCl حيث سجلت المعاملتان (200 و150مليمول) أعلى ارتفاع معنوي بلغ(26.90 و29.68 ملغم.100غم⁻¹) مقارنة بمعاملة المقارنة التي بلغ محتوى الكربوهيدرات فيها (22.27 ملغم.100غم⁻¹) وسجلت المعاملة 100مليمول من كلوريد الصوديوم ارتفاعاً طفيفاً في محتوى الكربوهيدرات، بينما لم تكن هنالك فروقات معنوية بين المعاملة (25مليمول) ومعاملة المقارنة التي سجلت مامعدلة 22.73 ملغم.100غم⁻¹.

تعد الكربوهيدرات القابلة للذوبان من المركبات العضوية الضرورية التي لها علاقة في تنظيم الضغط الأزموزي في النباتات المجهدة والتي ترفع من قدرة النباتات في مقاومة الشد الملحي إذ غالباً ما يشير تراكم الكربوهيدرات في النباتات إلى الإجهاد ووجود الكربون والأوكسجين والهيدروجين في تكوينها مما له دور مهم كسلائف للعديد من المركبات الضرورية للحفاظ على طبيعة نمو النبات (Manuscript, 2010)

وقد أشار العديد من الدراسات إلى أن المحتوى المرتفع من الكربوهيدرات في انسجة النبات ذو علاقة بزيادة نشاط الأنزيمات التي تعمل على هدم جزيئات السكر لتحرير الكلوكوز والفركتوز الضرورية في استمرار العمليات الأيضية في النباتات المجهدة فقد بينت دراسة (Ozdeniz, 2019) أن نسبة مستوى الكربوهيدرات في النباتات النامية تحت الإجهاد الملحي تزداد بزيادة التراكيز الملحية في بيئات النمو إذ تعمل الكربوهيدرات من تقليل الأثار الضارة لهذا الإجهاد عن طريق رفع مستويات المواد القابلة للذوبان مثل الجلوكوز والسكرورز والتي لها دور في تحفيز الاستجابة لمقاومة هذا الإجهاد. وأشار الباحثان (Shareef and Al-Khayri, 2021) عند دراستهم على النخيل صنف البرحي المزروع نسيجياً إلى أن محتوى الأوراق من الكربوهيدرات القابلة للذوبان قد ازدادت بشكل ملحوظ عند التركيز 70غم.لتر⁻¹ من NaCl وأن هذه الزيادة يمكن أن تفسر الآلية المتبعة من قبل النخيل في مقاومة للإجهاد الملحي

واستمرار النمو في البيئات الملحية, فيما إشارة دراسة (Ferdosi *et al.*, 2021) إلى أن النباتات تتحمل الإجهاد الملحي بتركيز مختلفة إلا أن معظمها تكون مرتبطة بطريقة ما بتراكم المواد المذابة ومنها السكريات الذائبة الكلية والذي عند زيادته يؤدي الى انخفاض القدرة التناضحية.

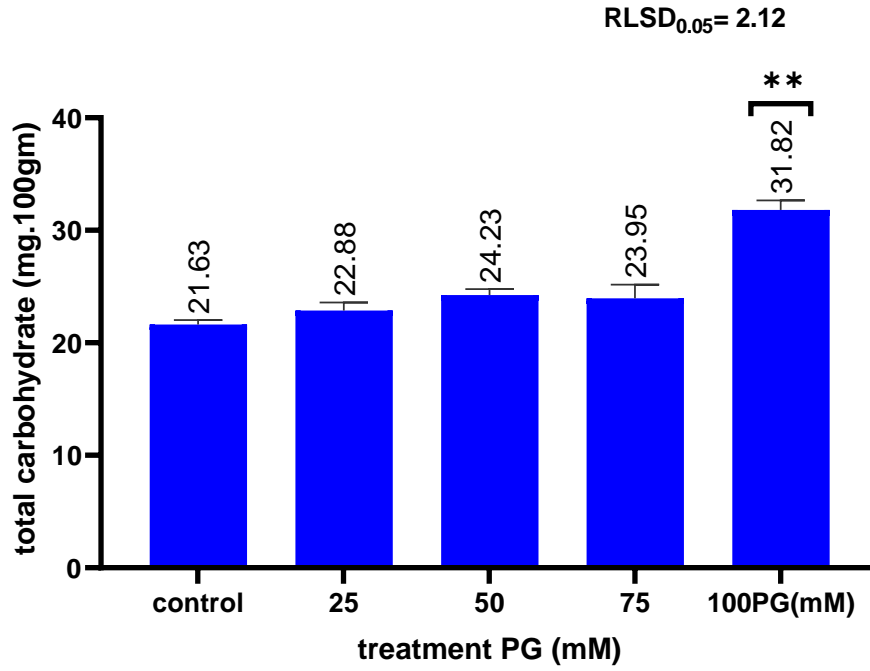


شكل (5): يوضح تأثير إضافة كلوريد الصوديوم الى أوساط النمو في مؤشر محتوى النموات الخضرية من الكربوهيدرات الكلية (ملغم.100غم⁻¹)

4-3-2: تأثير إضافة الـ PG إلى وسط التضاعف على محتوى النموات الخضرية من الكربوهيدرات الكلية

يوضح (الشكل 6-): تأثير إضافة الفلوروجلايسينول إلى وسط التضاعف في محتوى الافرع الخضرية من الكربوهيدرات الكلية. وقد بينت الدراسة الحالية أن المعاملة 100 مايكرومول قد سجلت أعلى معدل لمحتوى الكربوهيدرات بلغ (31.82 ملغم.100غم⁻¹) وبفارق معنوي عالي قياساً بالمعاملة القياسية التي بلغ معدل محتوى الكربوهيدرات عندها (21.63 ملغم.100غم⁻¹) وأيضاً بفارق معنوي قياساً بالمعاملات الأخرى. بينما سجلت المعاملة 50 مايكرومول (24.23 ملغم.100غم⁻¹) وبفارق معنوي قياساً بمعاملة المقارنة. في حين سجلت المعاملة 25 مايكرومول متوسط كربوهيدرات بلغ (22.88 ملغم.100غم⁻¹⁰) وبدون فارق معنوي مع المعاملة القياسية فضلاً عن أنه لم يكن هنالك فروقات معنوية بين المعاملتين (50 و 75 مايكرومول).

إن التأثير المعنوي للفلوروجلايسينول في التراكيز المرتفعة هو الذي تسببت في ارتفاع المحتوى الكربوهيدراتي في البراعم ، ويعتقد أن زيادة تركيز المركب الـ PG في الوسط نتج عنه تعرض إلى الإجهادات إضافة إلى زيادة مستوى الأكسدة التي تزداد بازدياد المحتوى الكربوهيدرات. وقد أشارت الدراسة (Kang *et al.*, 2010) إلى دور الفلوروجلايسينول في زيادة المحتوى الفينولي في الأوساط التي تعتبر في التراكيز المنخفضة منه مصدر حماية للأوكسين من الأكسدة فقد وجدت الدراسة أن الإضافة للفلوروجلايسينول تزيد من تراكم المواد الفينولية.



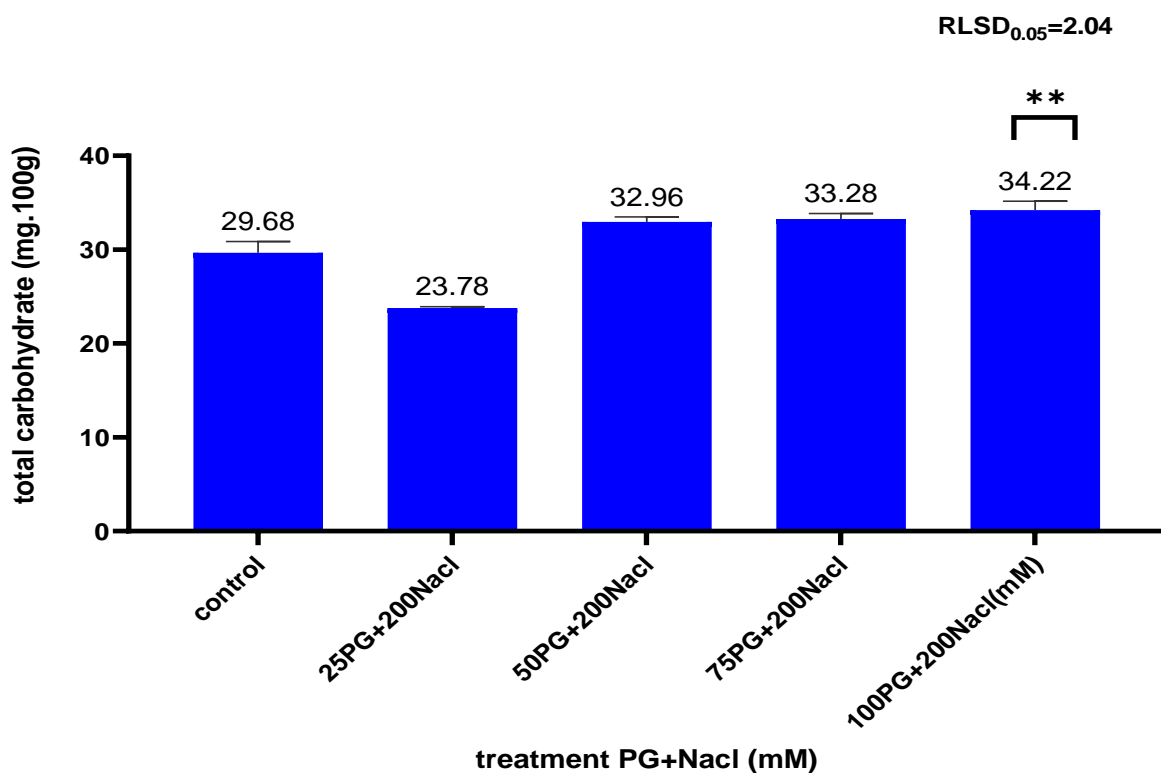
شكل (6): تأثير إضافة الفلورغلوسينول(Phloroglucinol(PG) إلى وسط التضاعف في مؤشر محتوى النموات الخضرية من الكربوهيدرات الكلية (ملغم.100غم⁻¹) في مرحلة التضاعف لنخيل التمر صنف البرحي

4-3-3: تأثير اضافة تراكيز مختلفة من الفلورغلوسينول في وسط التضاعف للافرع المعرضة الى الاجهاد الملحي تركيزه 200مليمول من كلوريد الصوديوم في محتوى النموات من الكربوهيدرات

يوضح (الشكل 7-7) تأثير الإضافة المشتركة الفلورغلوسينول مع كلوريد الصوديوم إلى وسط التضاعف في محتوى البراعم الخضرية من الكربوهيدرات الكلية إلى وجود فروقات عالية المعنوية بين معاملات الدراسة والمعاملة القياسية "الملحية". حيث وجد أن المعاملة (200 مليمول NaCl + 100 مايكرومول PG) قد سجلت أعلى معدل لمحتوى البراعم من الكربوهيدرات الكلية والذي بلغ (34.22 ملغم. 100غم⁻¹) وبفارق معنوي قياساً بمعاملة كلوريد الصوديوم والمعاملات الأخرى في حين سجلت معاملة المقارنة "الملحية" مامعدلة (23.78 ملغم. 100غم⁻¹). كما سجلت المعاملتين (200 مليمول NaCl + 50 مايكرومول PG و 200 مليمول NaCl + 75 مايكرومول PG) محتوى عالي من الكربوهيدرات والذي بلغ (و 33.27-32.69 ملغم. 100غم⁻¹) على التتابع وبدون فروقات معنوية بينهما .

إن تأثير إضافة الفلورغلوسينول إلى الأوساط الملحية قد زاد من المحتوى الكربوهيدراتي بشكل كبير بالتراكيز العالية وأن هذا التراكم الكربوهيدراتي يشير إلى تعرض النباتات إلى إجهادات ناتجة عن كلتا الإضافتين والتي انعكست سلباً على نمو البراعم وزيادة نسبة الاسوداد. إلا أن التراكيز المنخفضة من الفلوروكلايسينول تسببت في خفض محتوى الكربوهيدرات وقد يعزى السبب في هذا الانخفاض الى دور الفلورغلوسينول في التراكيز المنخفضة منه في تقليل الاثار الضارة من ايونات الصوديوم المحفزة لتراكم المواد الذائبة .

وقد أيدت دراستا (Pérez *et al.*, (2015) Suman Kumar, (2015) ذلك حيث وجد أن التراكيز العالية من الفلوروكلايسينول تتسبب في إجهاد النباتات نتيجة تراكم المواد الفينولية المؤكسدة كما يزداد نسبة اسوداد النباتات في التراكيز العالية في حين إن التراكيز المنخفضة منه تعمل كمؤازر إلى الأوكسينات وتشجع النمو



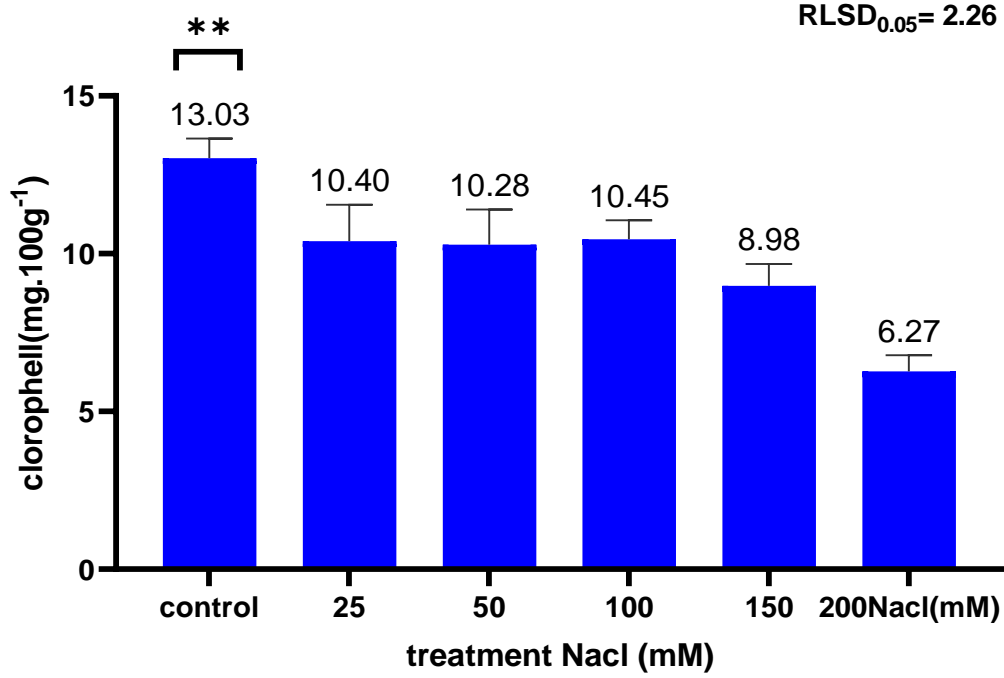
شكل (7): تأثير اضافة تراكيز مختلفة من الفلورغلوسينول في وسط التضاعف للافرع المعرضة الى الاجهاد الملحي تركيزه 200مليمول من كلوريد الصوديوم في محتوى النموات من الكربوهيدرات.

4-3-4: تأثير إضافة كلوريد الصوديوم الى وسط التضاعف في مؤشر محتوى النموات الخضرية من الكلوروفيل الكلي في مرحلة تضاعف.

يشير (الشكل -8) إلى الانخفاض المعنوي في محتوى الافرع الخضرية من الكلوروفيل الكلي مع زيادة تراكيز الأملاح مقارنة بمعاملة المقارنة عند مستوى معنوي 5%. حيث سجلت المعاملة 200مليمول من كلوريد الصوديوم أقل معدل معنوي بلغ 6.27 ملغم. 100غم⁻¹ بينما سجلت معاملة المقارنة (غير المجهدة ملحياً) أعلى معدل معنوي من المحتوى الكلوروفيل الكلي والذي بلغ 13.07 ملغم. 100غم⁻¹ في حين لم تكن هنالك فروقات معنوية بين معاملي (25 و50 مليمول) في محتواها من الكلوروفيل الكلي بلغ (10.39، 10.28 ملغم. 100غم) على التتابع.

وقد يعزى السبب في انخفاض كفاءة عملية التمثيل الضوئي بزيادة تركيز كلوريد الصوديوم إلى تأثير أيونات Na^+ و Cl^+ في عملية الامتصاص للعناصر الضرورية لبناء الصبغات والتي منها البوتاسيوم الذي له دور في تحفيز أنزيمات الكلوروفيل وبالتالي فإن وجود أيونات كلوريد الصوديوم في الوسط تحد من كفاءة التمثيل الضوئي ، إن الإجهاد الملحي هو سمة متعددة التأثيرات وأول تأثير هو لشد التناضحي إذ أن هذا الشد التناضحي يكون تأثيره شديداً جداً بزيادة تراكيز كلوريد الصوديوم لأنه يؤدي إلى إغلاق الفتحات عبر مسارات إشارات حمض الأبسيسيك (Sen and Alikamanoglu, 2011) (Steinmacher *et al.*, 2007).

كما أن وجود تراكيز عالية من كلوريد الصوديوم تعمل على تقليل من كمية الماء الجاهز للنبات امتصاص الماء مما يؤدي إلى إبطاء عمليات النمو أو توقف النمو تماماً ودخول النباتات في الشيخوخة مع انخفاض ملحوظ في الأفرع المتكونة وبالتالي تنعكس كل هذه العوامل سلباً على بناء صبغة الكلوروفيل ، حيث يؤدي الإجهاد الملحي إلى تحطم في صبغة الكلوروفيل . وقد لاحظت دراسة (Ha-tran et al., 2021) انخفاض محتوى الكلوروفيل الكلي في التراكيز التي تصل الى 200ملي. عند مستوى معنوية 50% قياساً بمعاملة المقارنة .

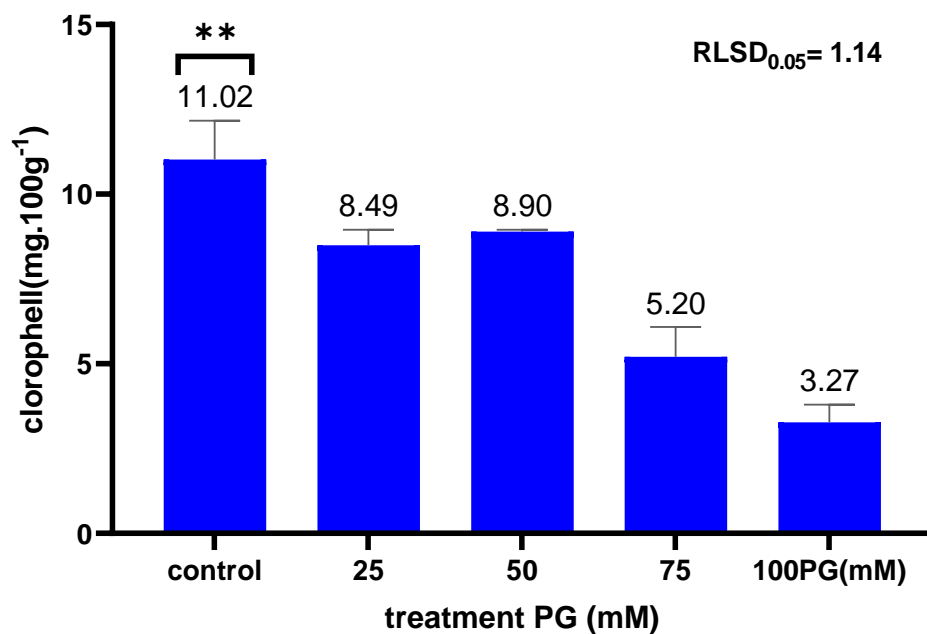


شكل (8): تأثير إضافة كلوريد الصوديوم إلى وسط التضاعف في مؤشر محتوى النموات الخضرية من الكلوروفيل الكلي (ملغم. 100غم⁻¹) في مرحلة التضاعف لنخيل التمر صنف البرحي

4-3-5: تأثير إضافة الفلورغلوسينول إلى وسط التضاعف في مؤشر محتوى الأفرع الخضرية من الكلوروفيل الكلي .

يوضح (الشكل 9) تأثير إضافة الفلورغلوسينول إلى وسط النمو في محتوى الأفرع من الكلوروفيل الكلي، حيث بينت النتائج أن التركيز العالي منه 100 مايكرومول يؤدي إلى خفض عالي المعنوية لمحتوى الأفرع من الكلوروفيل بلغ (3.27 ملغم.100غم⁻¹) في حين سجل أعلى معدل لمحتوى الكلوروفيل في المعاملة القياسية حيث بلغ (11.027 ملغم.100غم⁻¹) وبفارق معنوي قياساً بمعاملات الفلورغلوسينول (PG) ولم تسجل فروقات معنوية بين المعاملتين 50 و 25 مايكرومول بمحتواها من الكلوروفيل الكلي إذ سجلت المعاملتان مامعدلة (8.49 و 8.89 ملغم.100غم⁻¹) على التوالي إلا أن المعاملتان قد سجلت تفوقاً معنوياً قياساً بالمعاملات ذات التراكيز المرتفعة (100 و 75 مايكرومول) .

أن الدور الذي يؤديه الفلورغلوسينول في تشجيع الأوكسينات يعد كمؤشر في حماية الخلية وزيادة في كفاءة العمليات الفسيولوجية ومنها عملية التمثيل الضوئي ولكن زيادة تركيزه في الوسط قد يسبب في دخول النبات بمرحلة إجهادات (Pérez *et al.*, 2015) فضلاً عن أن التراكم الفينولي الذي يسببه الفلورغلوسينول نتيجة زيادة تركيزه في الوسط الغذائي يؤثر في الفعاليات الفسيولوجية و في مؤشرات النمو .

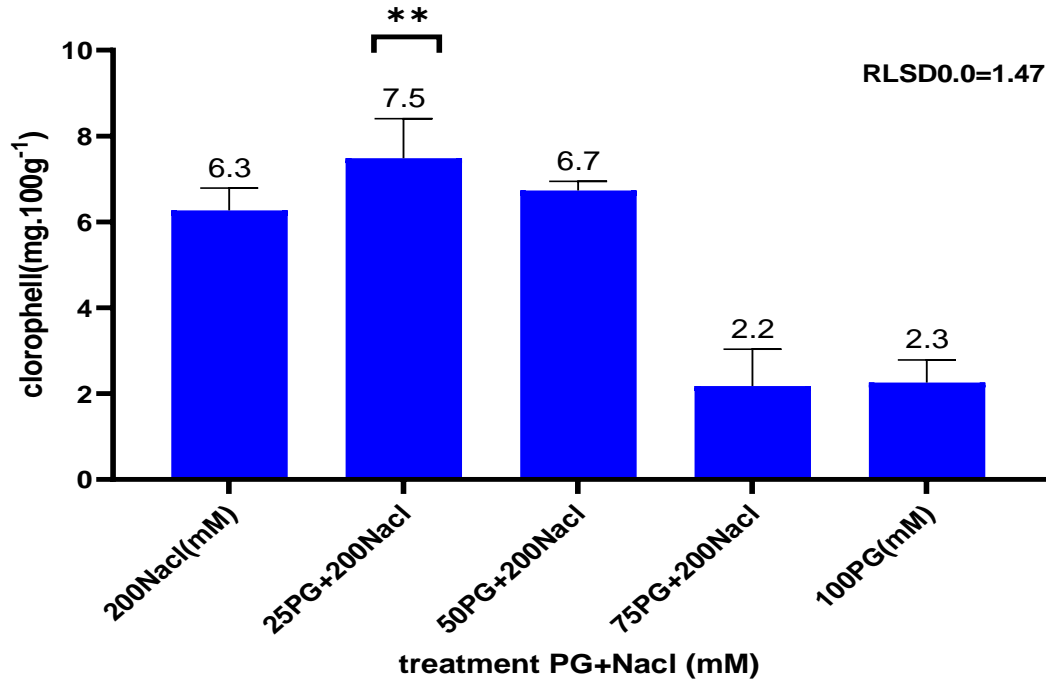


شكل (9): تأثير إضافة الفلورغلوسينول (Phloroglucinol(PG) إلى وسط التضاعف في مؤشر محتوى الأفرع الخضرية من الكلوروفيل الكلي (ملغم. 100غم⁻¹⁰) في مرحلة التضاعف لنخيل التمر صنف البرحي

4-3-6: تأثير إضافة تراكيز مختلفة من الفلورغلوسينول الى النموات الخضرية المعرضة الاجهاد ملحي تركيزه 200مليمول من كلوريد الصوديوم في محتوى النموات الخضرية من الكلوروفيل الكلي

يوضح (الشكل-10) تأثير الإضافة المشتركة الفلورغلوسينول وكلوريد الصوديوم في محتوى النموات الخضرية من الكلوروفيل الكلي. فقد سجلت المعاملة المشتركة 200 مليمول Nacl + 25 مايكرومول PG اعلى محتوى للكلوروفيل الكلي بلغ (7.48 ملغم.100غم⁻¹) وبدون فارق معنوي قياسا بمعاملة كلوريد الصوديوم ذات التركيز 200مليمول التي سجلت (6.27 ملغم.100غم⁻¹) وبفارق معنوي قياسا بالمعاملات الاخرى. في حين سجلت كلتا المعاملتين 200 مليمول Nacl + 75 مايكرومول PG و 200 مليمول Nacl + 100 مايكرومول PG اقل معدل معنوي في محتوى النموات الخضرية من الكلوروفيل الكلي والذي بلغ (2.17-2.26 ملغم.100غم⁻¹) على التتابع .

أن الدور الذي يؤديه الفلورغلوسينول في حماية الخلية والوقاية من الأكسدة أدى إلى زيادة كفاءة البناء الضوئي في التراكيز المنخفضة وقد أشارت الدراسة السابقة إلى دور الفلورغلوسينول في التراكيز المنخفضة في الوقاية من الأكسدة وتحسين العمليات الحيوية في النبات (Raghu *et al.*, (2006) . في حين أن التراكيز العالية منه تؤدي إلى حدوث إجهاد كيميائي يؤثر في عمليات التخليق الحيوي للكلوروفيلات (Suman Kumar, 2015)



شكل (10): تأثير إضافة تراكيز مختلفة من الفلورغلويسينولالى النموات الخضرية المعرضة الاجهاد ملحي تركيزه 200مليمول من كلوريد الصوديوم في محتوى النموات الخضرية من الكلوروفيل الكلي (ملغم.100غم⁻¹) لنخيل التمر صنف البرحي

4-3-7: تأثير إضافة كلوريد الصوديوم إلى وسط الاستطالة في مؤشر محتوى الأفرع الخضرية من الحامض الأميني البرولين وحامض الأبسيسك

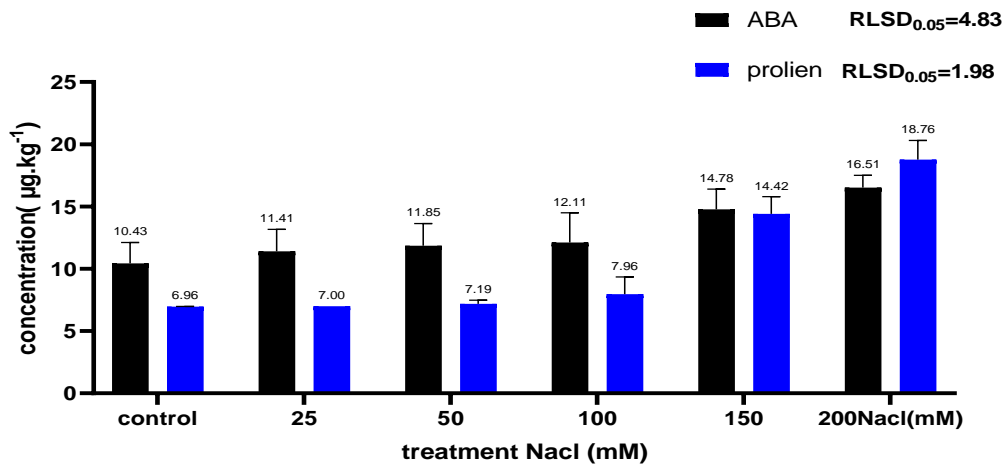
توضح نتائج (الشكل_11) الأرتفاع المعنوي في محتوى الأفرع الخضرية لصنف برحي من الحامض الأميني البرولين إذ سجل التركيزان (150-200مليمول) أعلى معدل معنوي لمحتوى البرولين والذي بلغ (14.41-18.76 مايكروغرام.كغم⁻¹) على التتابع وبفارق عالي المعنوية قياساً بمعاملة المقارنة والتي سجلت معدل بلغ (6.96 مايكروغرام.كغم⁻¹) ، في حين لم تسجل فروقات معنوية بين المعاملات ذات التراكم (25,50,100مليمول) قياساً بمعاملة المقارنة حيث بلغ محتواها من الحامض الأميني البرولين (7.96, 7.19, 6.99مايكروغرام.كغم⁻¹) على التتابع .

يلاحظ إن هذا الأرتفاع في الحامض الأميني البرولين اخذ اتجاهاً متزايداً معنوياً بزيادة تركيز كلوريد الصوديوم في الوسط الغذائي مما يشير إلى إن تراكم أيونات كلوريد الصوديوم في انسجة الأفرع قد حفزت الاستجابة السريعة لمقاومة الشد من خلال التسريع في زيادة محتواها من الحامض الأميني البرولين وقد يعد البرولين واحداً من أكثر المؤشرات حساسية لمقاومة الملوحة لنخيل التمر Cha- (Um *et al.*, 2010) إذ يتراكم البرولين نتيجة لظروف الإجهاد الملحي ، وإن زيادة محتوى الأنسجة منه يعتبر مؤشراً على زيادة مقاومة النباتات للملوحة . إن زيادة مستويات الحامض الأميني البرولين عند تعريض الخلايا والأنسجة إلى ظروف الشد الملحي قد يعود إلى زيادة سرعة بنائه وقلّة سرعة استعماله نتيجة لبطء عملية تثبيط الناتج الأخير لعملية تخليق البرولين بفعل تثبيط فعالية الأنزيمات المؤكسدة للبرولين (Gomes Silveira *et al.*, 2003) . كما وإن الزيادة في مستويات البرولين عند تعريض النباتات لظروف الشد الملحي قد يعود إلى تحفيز بنائه وهي وسيلة دفاعية مهمة للنباتات حيث أن تعريض النباتات للشد الملحي يعيق من تخليق البروتينات فيزداد تركيز الأمونيا، إلا أن استهلاكها نتيجة استخدامها في بناء البرولين يقلل من أثر الأمونيا السام في النبات (De Lacerda *et al.*, 2003).

كما توضح نتائج (الشكل-11) الأرتفاع المعنوي بمحتوى الأفرع الخضرية من حامض الأبسيسك إذ سجلت المعاملتان (150-200 مليمول من NaCl) أعلى معدل بلغ (14.77-16.15 مايكروغرام.كغم⁻¹)

(على التتابع.أما معاملة المقارنة فقد سجلت أقل معدل بلغ (10.43) مايكروغرام.كغم⁻¹ . وعلى العموم لوحظ إن ارتفاع الأبيسيك اخذ اتجاهاً متزايداً مع زيادة تركيز الملح إشارة إلى الاستجابة المتدرجة في مقاومة الشد الملحي من قبل البراعم .

يمكن تفسير الزيادة الحاصلة بمحتوى الأفرع من حامض الأبيسيك إلى الدور المهم الذي يؤديه هذا الحامض في الحفاظ على سلامة الأغشية من اضرار الشد الملحي وتقليل الآثار الضارة لكلوريد الصوديوم حيث أن مسارات إشارات حامض الأبيسيك تؤثر على بناء العديد من البروتينات التي تؤدي إلى استحثاث المقاومة في البيئات القاسية (Chojak-Koźniewska *et al.*, (2017). وتطابق النتائج الحالية مع النتائج التي حصل عليها (Al-Khalifa *et al.*, (2017) حيث زيادة تركيز الملح في وسط النمو أدى الى زيادة تركيز الأبيسيك. كما توصلت نتائج دراسة Woodward and Bennett, (2005) على نبات Eucalyptus المزروع نسيجياً إلى أن تركيز حامض الأبيسيك قد ازداد في البراعم النامية في أوساط حاوية على NaCl بالتراكيز العالية مقارنة بمعاملة المقارنة و لاحظ (Aldhebiani *et al.*, (2018) ان نمو وتطور براعم نخيل التمر لصنفي الخلاص والبرحي قد توقفت وأرتفع مستوى حامض الأبيسيك عند إضافة NaCl إلى الوسط بتركيز 300مليمول.



شكل (11): تأثير إضافة كلوريد الصوديوم إلى وسط الاستطاله في مؤشر محتوى الأفرع الخضرية من الحامض الاميني البرولين و حامض الابسيك ($\mu\text{g.kg}^{-1}$) لنخيل التمر صنف البرحي

4-3-8: تأثير إضافة الفلورغلوسينول إلى وسط الاستطاله في مؤشر محتوى الافرع الخضرية من الحامض الأميني البرولين و حامض الأبسيسك

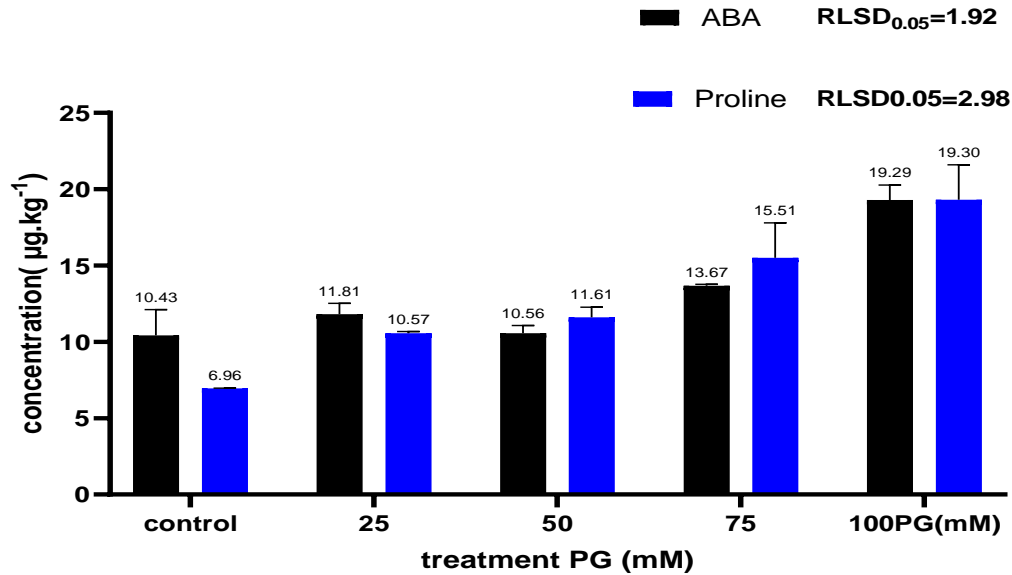
يوضح (الشكل -12) ارتفاع في مستوى الحامض الأميني البرولين في الافرع الخضرية والناميه في الوسط الزراعي المزود بالتركيز 100 مايكرومول من الفلورغلوسينول لتسجل معاملته تفوقاً معنوياً قياساً بمعاملة المقارنة حيث بلغ 19.30 مايكروغرام.كغم⁻¹ . بينما سجلت معاملة المقارنة مامعدلة 6.95 مايكروغرام.كغم⁻¹ . في حين كان تركيز الحامض الأميني البرولين في الافرع الخضرية النامية في الوسط الزراعي المزود بـ(25مايكرومول) من الفلوركلاليسينول سجل 10.57 مايكروغرام.كغم⁻¹ وبفارق معنوي قياساً بمعاملة المقارنة. ولم تسجل الدراسه فروقات معنوية بين التركيزان (25-50 مايكرومول) .

كما ويوضح (الشكل -12) الأرتفاع المعنوي لتركيز حامض الأبسيسك في الافرع الخضرية لنخيل التمر صنف البرحي النامي في الوسط الزراعي المزود بالتركيز العالية 100مايكرومول من الفلورغلوسينول والذي سجلت 19.29 مايكروغرام .كغم⁻¹ . بينما سجلت معاملة المقارنة أقل معدل معنوي من تركيز حامض الأبسيسك والذي بلغ 10.43 مايكروغرام.كغم⁻¹ ولم يكن هنالك فرقاً معنوياً بين المعاملة 25 مايكرومول والمعاملة 50 مايكرومول عند مستوى معنوي 0.05.

يقوم النبات بتخليق مضادات الأكسدة التي منها الحامض الأميني البرولين والأبسيسك من اجل المحافظة على الخلية النباتية من خلال الأسهم في الحفاظ على الجهد المائي المنخفض و أكسدة الأنواع الأكسجينية الفعالة (ROS) وحماية الجدار الخلوي والحفاظ على الأنزيمات الخلوية عند تعرضه الظروف الشدود المختلفة والنتيجة من تنبيه الإشارة عن تخليق حامض الأبسيسك (Ramakrishna and Ravishankar, 2011). ويعد كل من البرولين والأبسيسك من المؤشرات المهمة لتحفيز استجابة النباتات المقاومة للإجهادات المختلفة فقد يعود التأثير المهم للبرولين في نمو النباتات وزيادة تحملها لعوامل الشد كونه ذا وزن جزيئي صغير وأن هذا النوع من الأحماض الأمينية يعمل على احاطة البروتينات ذات الأوزان الجزيئية الكبيرة ويحافظ عليها من التأثيرات الضارة للإجهادات كما يعتقد انه يكون أوامر هيدروجينية قوية بين الماء والبروتينات لحماية تركيب

البروتينات الموجودة في الأغشية الخلوية ومن ثم يحافظ على نفاذية الاغشية ويمنع تسرب المواد الالكتروليتية وبذلك يحافظ على امتلاء الخلية وعدم تأثرها بعوامل الشد وسحبها للأيونات الضارة من الوسط المسبب للإجهادات (Ledger *et al.*, 2016)

اما عن دور حامض الابسسك في حماية الخلية حيث يبدئ هذا الهرمون بتحفيز عدد من التعديلات في mRNA عن طريق تعديل التعبير الجيني مما يؤدي إلى إيقاف تخليق بعض البروتينات الحيوية ذات الاوزان الجزيئية الكبيرة وهي آلية تستخدمها النباتات للهروب من ظروف الإجهادات تؤدي تلك الآلية إلى التأثير على بعض العمليات الحيوية وتراكم لبعض المواد الذائبة والأحماض الأمينية الضرورية (Gaspar *et al.*, 1996).



شكل (12): تأثير إضافة الفلورغلوسينول إلى وسط الاستطاله في مؤشر محتوى الافرع الخضرية من الحامض الاميني البرولين و حامض الأبيسيك ($\mu\text{g.kg}^{-1}$) في نخيل التمر صنف البرحي

4-3-9: تأثير إضافة تراكيز مختلفة الفلورغلويسينولمع كلوريد الصوديوم إلى وسط الاستطاله في مؤشر محتوى الافرع الخضرية من الحامض الأميني البرولين و النمو حامض الابسيسك

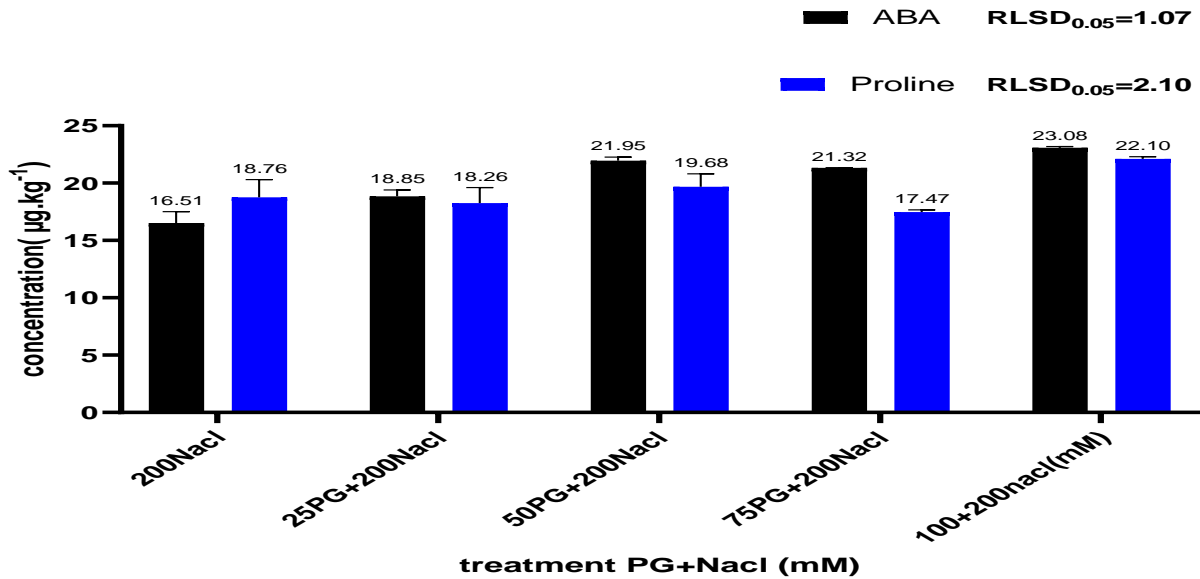
يوضح (الشكل -13) تأثير الإضافة المشتركة الفلورغلويسينول وكلوريد الصوديوم في محتوى الافرع الخضرية من الحامض الأميني البرولين و حامض الأبسيسك إذ يلاحظ أن المعاملة 200 مليمول NaCl + 100 مايكرومول PG سجلت أعلى معدل معنوي لتركيز البرولين والذي بلغ 22.10 مايكروغرام.كغم⁻¹ في حين سجلت المعاملة الملحية 200 NaCl مليمول أقل معدل منه 18.76 مايكروغرام.كغم⁻¹. ويلاحظ عدم وجود فروقات معنوية بين المعاملات المنخفضة التركيز (25,50 مايكرومول) قياساً بمعاملة المقارنة. في حين سجلت المعاملة 200 مليمول NaCl + 75 مايكرومول PG أقل معدل معنوي والذي بلغ 17.47 مايكروغرام.كغم⁻¹ الزيادة في تركيز الحامض الأميني اخذت تزداد بزيادة تركيز الإضافات.

وكما يلاحظ من (الشكل -13) أن المعاملة 200 مليمول NaCl + 100 مايكرومول PG قد سجلت تفوقاً معنوياً بمحتواها من الأبسيسك اذ بلغ 23.07 مايكروغرام.كغم⁻¹ قياساً بالمعاملة الملحية (القياسية) التي بلغ معدل محتواها من الأبسيسك 18.51 مايكروغرام.كغم⁻¹. في حين بلغ تركيز الأبسيسك في التراكيز المنخفضة 25 مايكرومول من الفلوروجلايسينول 18.84 مايكروغرام.كغم⁻¹ وبدون فرقا معنوياً قياساً بالمعاملة الملحية . كما لم تكن هنالك فروقات معنوية بين المعاملة المعاملة 200 مليمول NaCl + 50 مايكرومول PG والمعاملة القياسية وان الزيادة في تركيز الهرمون كانت متدرجة في ارتفاع التركيز منه بزيادة تركيز الفلوروجلايسينول .

تعرض النبات إلى الشدود المختلفة إلى المحفز الانواع للأكسيجينية التفاعلية (ROS) الذي يسبب أتلانف الجزيئيات الحيوية الخلوية بشكل مباشر مثل البروتينات والأحماض الأمينية ودهون الأغشية ، و تعمل النباتات على تكيف آليات مختلفة للحفاظ على انخفاض نسبة الأكسيجينية داخل خلاياها وابقاءها بمستوى منخفض. وتتخلص النباتات من الأنواع الأكسيجينية التفاعلية بواسطة مستقبلات المضادة للأكسدة مثل الأسكوربيك وفيتامين E والحامض الأميني البرولين وهرمون النمو الأبسيسك لحماية الخلية والهروب من الإجهادات اللحيوية وقد ساهم البرولين في استقرار الهياكل الخلوية (الأغشية-

البروتينات) (Rodriguez and Romero, 2019) لذا فقد ارتبط تراكم البرولين وهرمون النمو الأبيسيك تحت ظروف الشد للأحيائي بتحمل النباتات إلى الإجهادات.

يؤدي الفلورغلوسينول دوراً في الحماية الذي يوفرها للأوكسينات وكما يؤدي دورة كواقي من الأكسدة الناتجة تحت ظروف الإجهادات المختلفة. إلا أن التراكيز العالية منه قد تؤدي إلى زيادة تراكم المواد الفينولية وبالتالي زيادة معدلات الإجهادات في الوسط وقد يعزى السبب في تراكم الحامض الأميني البرولين في التراكيز العالية من الفلوركلابسينول في أوساط النمو الملحية إلى وجود شد عالي أثر على الفعاليات الفسيولوجية نتج عنها زيادة تراكم الحامض الأميني البرولين وحامض الأبيسيك كوسيلة للتقليل من الشدود ، وربما أن المسارات التي تم تفعيلها في الأوساط التي تكون فيها الضغوطات الناتجة من الشد الملحي والكيميائي في النخيل لا يزال غير معروفة إلا أن دراسة (Skriver and Mundy, 1990) أشارت إلى أن الضغوط المتراكمة في النباتات النامية تحت ظروف مختبرية تؤدي إلى تغييرات في مسلك منظمات النمو ومسار تخليق البروتينات فتؤدي إلى زيادة تراكم في مضادات الأكسدة ومثبطات النمو النباتية والتي تؤدي إلى توقف عمليات النمو.



شكل (13): تأثير إضافة الفلورغلوسينول مع كلوريد الصوديوم إلى وسط الاستطالة في مؤشر محتوى الافرع الخضرية من الحامض الأميني البرولين وهرمون النمو حامض الأبيسيك ($\mu\text{g.kg}^{-1}$) في نخيل التمر صنف البرحي

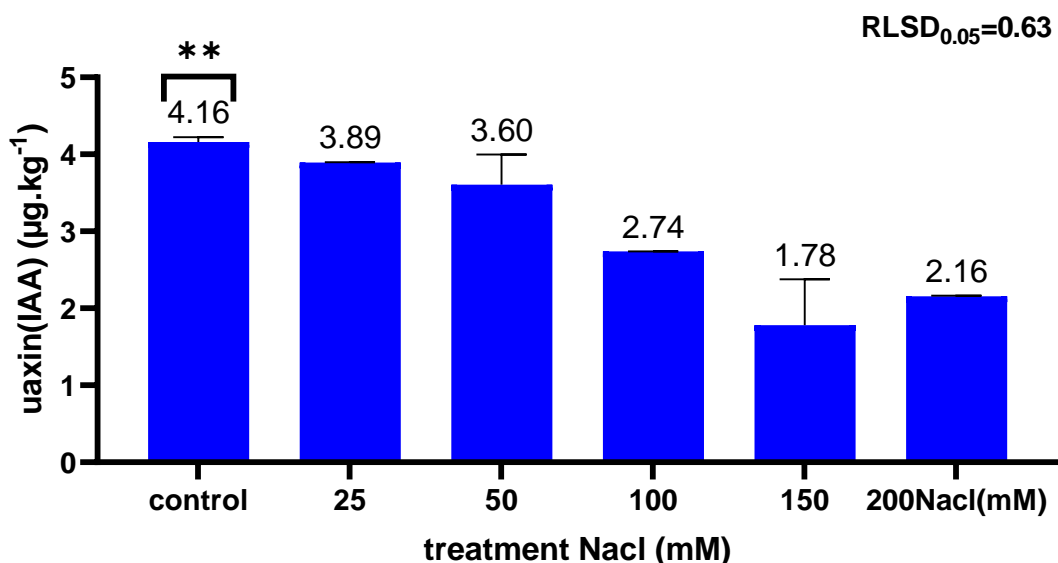
4-3-10: تأثير إضافة كلوريد الصوديوم إلى وسط الاستطالة في محتوى الافرع من اندول حامض

الخليك (IAA)

أوضحت النتائج (الشكل-14) عدم وجود فروقات معنوية بين التراكيز المنخفضة (25,50مليمول) من كلوريد الصوديوم ومعاملة المقارنة التي سجلت معدل محتوى أوكسين بلغ (3.60 و3.89 مايكروغرام.كغم⁻¹) على التتابع . في حين تفوقت المعاملة القياسية "غير الملحية" معنوياً قياساً بالمعاملات ذات التراكيز المرتفعة (100,150,200مليمول) من كلوريد الصوديوم والتي بلغ محتواها من الأوكسين مامعدلة (2.73،1.78،2.15 مايكروغرام.كغم⁻¹) وبالتتابع عند مستوى معنوية 0.05.

تشير البيانات المتحصل عليها من الدراسة الحالية إلى أن إضافة كلوريد الصوديوم بالتراكيز العالية أدى إلى التأثير بشكل سلبي على مسارات تخليق الأوكسينات المسؤولة عن زيادة انقسام الخلايا وأستطالتها وظهرت البراعم استجابة لمستوى كلوريد الصوديوم عند التراكيز 100مليمول من خلال الأرتفاع المعتدل لمؤشر هرمون أندول حامض الخليك فيما تسببت التراكيز العالية من كلوريد الصوديوم في تثبيط تخليق هذا الهرمون كنتيجة للشد الملحي.

وقد أوضحت دراسة (Prakash and Prathapasenan, 1990) إن انخفاض محتوى الأوراق من هرمون IAA بزيادة التراكيز الملحية كان بسبب تأثيرها في سير مجمل العمليات البيوكيميائية في أجزاء النبات المختلفة والتي تؤدي إلى اختلال في بناء وانحلال المواد البروتينية والأحماض الأمينية والتي تؤثر في التمثيل النيتروجيني وبالتالي منع تخليق الهرمونات وذلك كوسيلة وقائية لتقليل من اثار ايونات الصوديوم الضارة .



شكل (14): تأثير إضافة كلوريد الصوديوم إلى وسط الاستطالة في محتوى الأفرع الخضرية من الأوكسين اندول حامض الخليك في نخيل التمر صنف البرحي

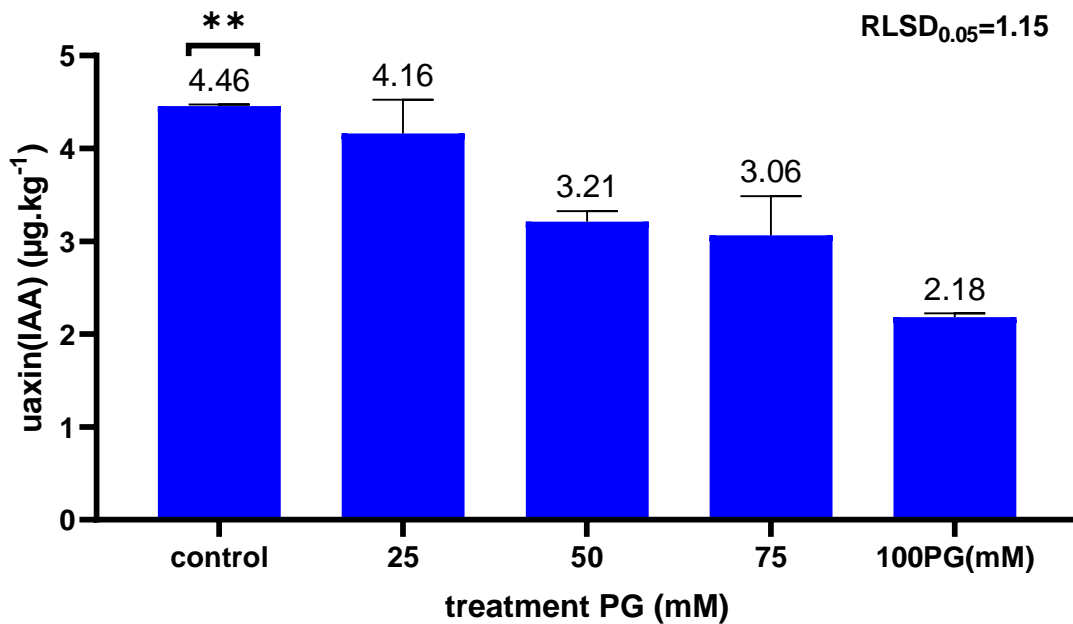
4-3-11: تأثير إضافة الفلورغلوسينول إلى وسط الاستطالة في محتوى الأفرع الخضرية من اندول حامض الخليك (IAA)

تشير نتائج (الشكل-15) إلى أن محتوى الأفرع الخضرية من هرمون أندول حامض الخليك قد انخفض بشكل معنوي إلى (2.18 مايكروغرام.كغم⁻¹) النامية على وسط الاستطالة الحاوي على تركيز عالي من الفلورغلوسينول (100 مايكرومول). في حين سجل أعلى معدل من الـ IAA في المعاملة القياسية و التراكيز المنخفضة من الفلورغلوسينول PG25 مايكرومول (4.45 و 4.16 مايكروغرام/كغم⁻¹) على التوالي وبدون فروقات معنوية. كما لم تختلف معنوية النتائج بين المعاملات ذات التراكيز (PG50 و 75 و 100 مايكرومول) والتي سجلت (3.21 و 3.06 و 2.18 مايكروغرام.كغم⁻¹) على التوالي عند مستوى معنوية 0.05 .

على الرغم من أن مركب الفلورغلوسينول هو أحد المركبات الفينولية المؤازرة للأوكسينات ويحفز المواد الشبيهة بالسايبتوكينينات عند اضافته إلى الأوساط بتراكيز منخفضة إلا أن الدراسات السابقة لم تقدم آلية الإجهادات الناتجة من تفاعلات الفلورغلوسينول. بيد أن التراكيز العالية منه تتسبب في أحداث إجهادات كيميائية تؤدي إلى تغيرات جوهرية في تخليق الهرمونات النباتية الرئيسية (الأوكسينات

،السايتوكينينات ،الجبرلين) بسبب تراكم للمواد الفينولية في أوساط النمو والتي تؤدي إلى اسوداد
الزروعات (Gaspar *et al.*, 1996) و(Pérez *et al.*, 2015).

ومن خلال ما تقدم تبين أن الفلورغلوسينول في التراكيز العالية منه تسبب في احداث إجهادات كيميائية
تؤثر في مجمل العمليات البيوكيميائية إضافة إلى أن التراكيز المنخفضة تؤدي الى زيادة في مستويات
مؤشر الهرمون IAA قياسا بمعاملة غير المحتوية عليه.

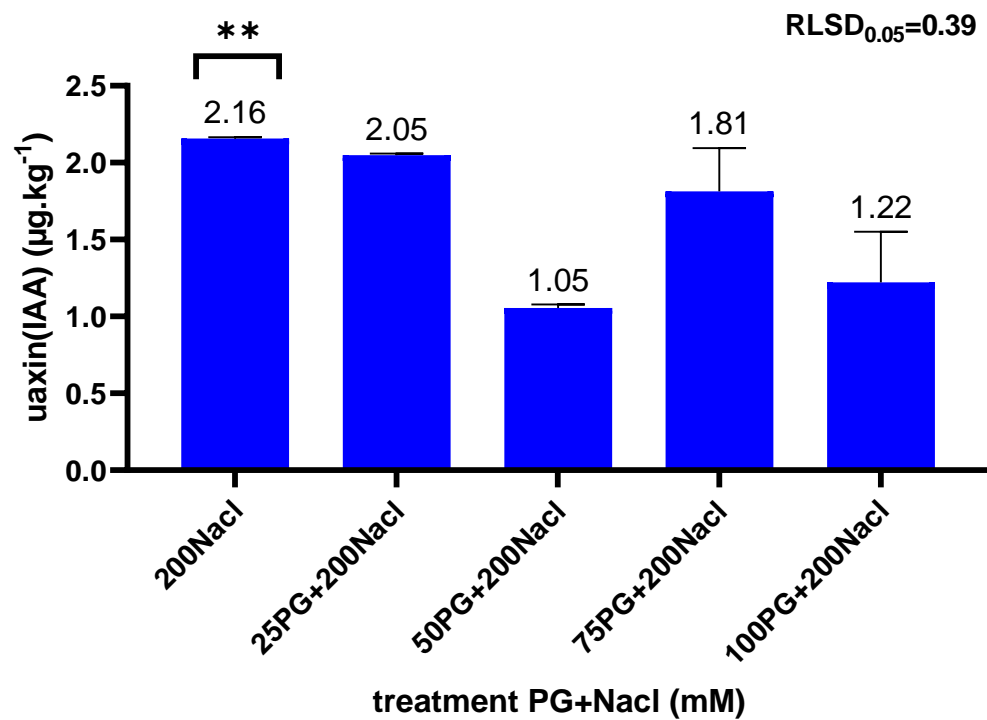


شكل (15): تأثير إضافة الفلورغلوسينول Phloroglucinol(PG) الى وسط الاستطالة في محتوى
النموات الخضرية لنخيل التمر صنف البرحي من الاوكسين أندول حامض الخليل IAA

4-3-12: تأثير اضافة الفلورغلويسينول مع كلوريد الصوديوم الى وسط الاستطالة في محتوى الافرع الخضرية من أندول حامض الخليك (IAA)

تشير بيانات (الشكل -16) إلى الأنخفاض المعنوي في محتوى النموات من هرمون أندول حامض الخليك في المعاملة (200مليمول من كلوريد الصوديوم+100مايكرومول من PG) التي سجلت (1.22مايكروغرام.كغم⁻¹). في حين سجلت المعاملة القياسية (الملحية فقط) تفوقاً معنوياً قياساً بالمعاملات المشتركة مع الفلورغلويسينول بمحتواها من هرمون IAA بمعدل بلغ (2.15مايكروغرام.كغم⁻¹) كما تفوقت المعاملة (200مليمول كلوريد الصوديوم+25مايكرومول من فلوروكلايسينول) معنوياً قياساً بباقي المعاملات والتي بلغت (2.05مايكروغرام.كغم⁻¹) ولم تكن هنالك فروق معنوية بين المعاملات عالية التركيز عند مستوى معنوية 0.05 .

أن انخفاض محتوى الهرمون في التراكيز المشتركة بين الفلورغلويسينول وكلوريد الصوديوم قد يكون نتيجة تراكم الإجهادات الناتجة من الملح ومركب الفلورغلويسينول وكاستجابة لتلك الشدود خفضت النموات من محتواها من الهرمون، أن آليه مقاومة الإجهادات اللاحيوية في نباتات تتخذ مسارات فسيولوجية تسبب في تثبيط تخليق أو عزل أو هدم لبعض المركبات الضرورية في علميات النمو وان هذا الآلية يتبعها النبات في ظروف الشدود المختلفة (Iqbal and Ashraf, 2013) و (Afroz *et al.*, 2005). وفي ضوء ما تقدم يتبين إن الإضافة المشتركة قد اثرت بشكل سلبي في مؤشر محتوى البراعم من هرمون أندول حامض الخليك في التراكيز العالية وإن التراكيز المنخفضة منه يمكن أن تؤدي إلى التقليل من الأثار الضارة الكلوريد الصوديوم في وسط الغذائي.



شكل (16): تأثير إضافة الفلورغلوسينول (PG) مع كلوريد الصوديوم الى الاستطالة في محتوى الافرع الخضرية من الأوكسين أندول حامض الخليل IAA

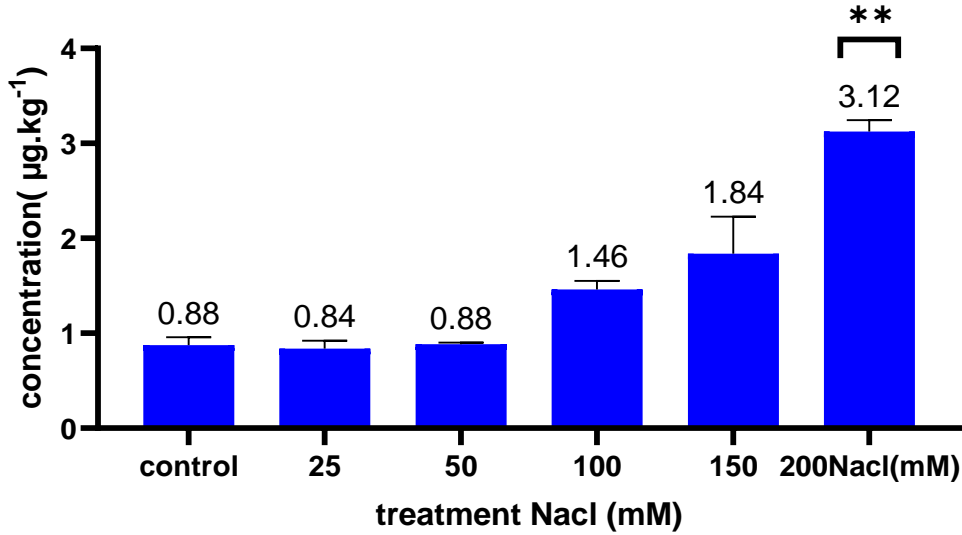
4-3-13: تأثير إضافة كلوريد الصوديوم الى وسط الاستطالة في محتوى الافرع الخضرية من الساييتوكينينات

أوضحت النتائج المبينة في (الشكل -17) أن معاملة كلوريد الصوديوم NaCl بالتركيز 150مليمول أدت الى تسجيل أعلى معدل لمحتوى النموات من الساييتوكينينات بلغت 3.12 ميكروغرام.كغم⁻¹ مختلفة بشكل عالي المعنوية قياساً بالمعاملة القياسية ومعاملات كلوريد الصوديوم الاخرى إذ سجلت المعاملة القياسية مامعدله (0.87ميكروغرام.كغم⁻¹). كما سجلت المعاملة ذات التركيز 150مليمول تفوقاً معنويًا قياساً بمعاملة المقارنة إذ بلغ محتوى الساييتوكينينات (1.83ميكروغرام.كغم⁻¹) وبدون فارق معنوي قياساً بالمعاملة ذات التركيز 100مليمول التي سجلت مامعدله (1.46ميكروغرام.كغم⁻¹) في حين أن المعاملتان (25,50مليمول) سجلتا مامعدله (0.83 و0.88ميكروغرام.كغم⁻¹) على التوالي وبدون فروقات معنوية قياساً بمعاملة المقارنة عند مستوى معنوية 0.05.

أن نمو النباتات وتطورها يتم تنظيم جوانبه المختلفة بواسطة منظمات النمو الرئيسية (الأوكسين والسايتوكينينات) تؤدي الساييتوكينينات دوراً مهماً في تشكل البلاستيدات الخضراء وتمايز الحزم الوعائية وتكوين الصبغات وتراكم المغذيات وانقسام الخلايا وزيادة حجمها (Injury, 2020)، وإذا ما تعرضت هذه النباتات إلى إجهادات للاحوية و بصفة خاصة الملحية فإن الساييتوكينينات تعمل على زيادة قدرة النباتات، في مقاومة الشد الملحي من خلال التفاعل مع الأوكسينات وحامض الأبسسك ABA في زيادة استقرار الأغشية (Batool et al., 2016).

ومما تقدم يتبين أن معاملة كلوريد الصوديوم NaCl بالتركيز العالية قد عرضت النموات إلى ظروف شد ملحي أدت إلى زيادة في محتواها من الساييتوكينينات عند المقارنة بالتركيز المنخفضة لكلوريد الصوديوم ومعامله القياسية

RLSD_{0.05}=0.72



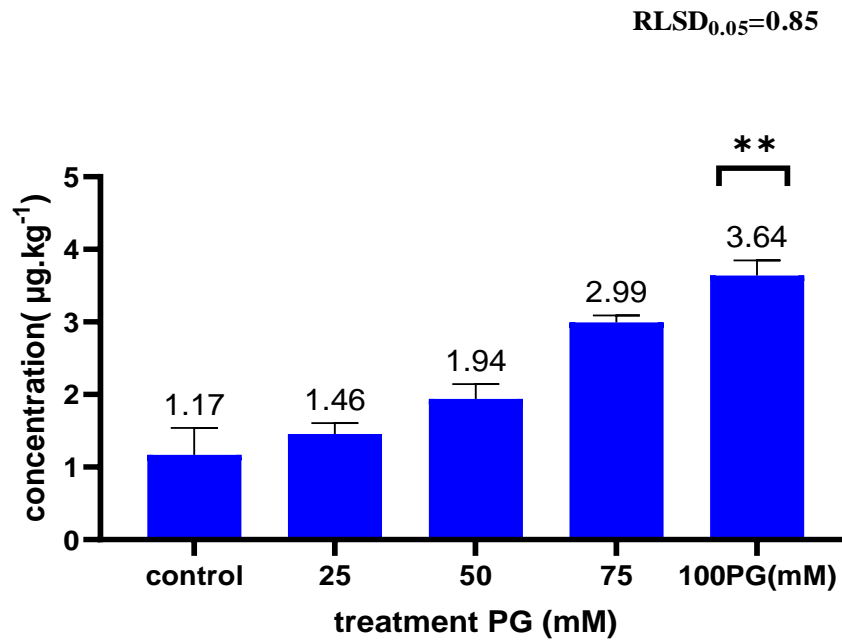
شكل (17): تأثير إضافة كلوريد الصوديوم إلى وسط الاستطالة في محتوى الافرع الخضرية نخيل التمر صنف البرحي من السايكوكينينات

4-3-14: تأثير إضافة الفلورغلويسينول إلى وسط الاستطالة في محتوى الافرع الخضرية من السايكوكينينات

توضح النتائج المبينة في (الشكل 18-18) تأثير إضافة الفلورغلويسينول إلى وسط الاستطالة في محتوى الافرع من السايكوكينينات إذ سجلت المعاملة ذات التركيز 100 مايكرومول من الفلوروكلايسينول أعلى معدل معنوي لمحتوى النموات من السايكوكينينات والذي بلغ 3.64 مايكروغرام .كغم⁻¹ في حين سجلت معاملة المقارنة أقل معدل بلغ 1.16 مايكروغرام.كغم⁻¹ كما سجلت المعاملة PG75 مايكرومول تفوقاً معنوياً قياساً بمعاملة المقارنة والمعاملات الأخرى حيث بلغ محتوى السايكوكينينات فيها 2.99 مايكروغرام.كغم⁻¹ . بينما لم تسجل فروقات معنوية بين التراكيز 25 و 50 مايكرومول قياساً بمعاملة المقارنة بلغ محتوى السايكوكينينات 1.45 و 1.93 مايكروغرام.كغم⁻¹ عند مستوى معنوية 0.05 .

لقد أشارت الدراسات السابقة إلى أن إضافة الفلورغلويسينول يمكن أن يعزز توليد خلايا جديدة من الأنسجة المزروعة كونه من المواد الشبيهة بالسايكوكينينات. فقد بينت دراسة (Petti, 2020) إلى أن التراكيز العالية من الفلوروكلايسينول 20 ملغم.لتر⁻¹ قد أدت إلى إنتاج الكالس من الأنسجة المزروعة

وخفضت من مؤشرات النمو المورفولوجية. بينما وجد (2017) Al-Khalifa *et al.* و Munene و (2017) *et al.* أن الفلوروجلايسينول من المركبات المعززة للفينول وأن زيادته تزيد من إنتاج المركبات الفينولية مما يؤدي إلى أختزال عملية النمو، والنتائج الحالية لا تتوافق مع نتائج الباحثون السابقين.

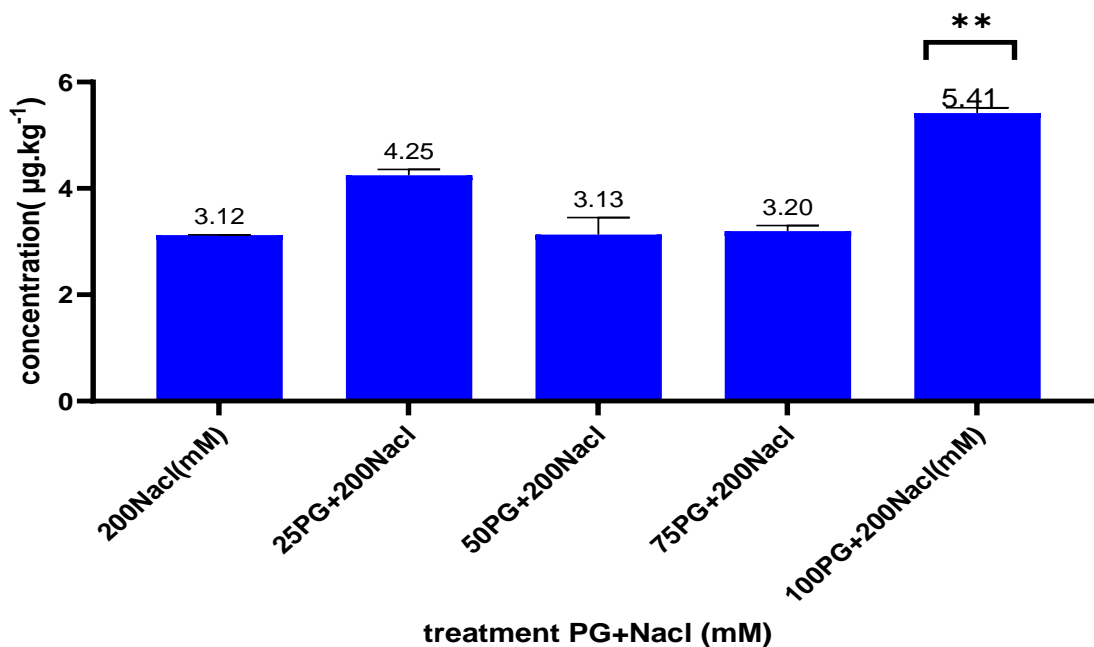


شكل (18): تأثير إضافة الفلوروجلايسينول إلى وسط الاستطالة في محتوى الافرع الخضرية من السايبتوكينينات

4-3-15: تأثير اضافة الفلورغلوسينول مع كلوريد الصوديوم الى وسط الاستطالة في محتوى الافرع الخضرية من السيتوكينات

أوضحت النتائج المبينة في (الشكل -19) أن المعاملة ذات التركيز (200مليمول كلوريد الصوديوم+100مايكرومول PG) أدت إلى تسجيل أعلى معدل عالي المعنوية لمحتوى البراعم من الساييتوكينينات في مرحلة الاستطالة بلغ 5.41مايكروغرام.كغم⁻¹ مقارنة مع معاملة المقارنة التي بلغت 3.12مايكروغرام.كغم⁻¹. كما وسجلت المعاملة (200مليمول NaCl+25مايكرومول PG) تفوقاً معنوياً قياساً بالمعاملة الملحية والتي بلغ محتوى الساييتوكينينات عندها 4.24 مايكروغرام.كغم⁻¹. لوحظ من خلال الدراسة أن محتوى الساييتوكينينات في النموات الخضرية يزداد بزيادة تركيز الفلوروكلايسينول المشترك مع كلوريد الصوديوم بالتأثير المحفز نفسه لتراكم المواد الشبيهة بالساييتوكينينات.

تؤدي الضغوطات اللاأحيائية الناتجة من مختلف مصادر الإجهادات إلى تغيرات واسعة على مستوى الإشارة وحتى الإشارات الخلوية منها لذا تعتمد النباتات إلى تطوير آليات متقنة للاستشعار والاستجابة لظروف الشد المختلفة إذ تعمل العديد من الهرمونات كمنظمات نمو في تحمل الإجهادات Nishiyama (2011), *et al.*, وقد وجد (Zwack and Rashotte, 2015) أن للساييتوكينينات دوراً في حث الاستجابة لمقاومة الإجهادات المختلفة بالإضافة إلى دوره في نمو النبات وتطورها. وعلى الرغم أنه لا يوجد فهم كامل للآلية المتبعة من قبل النخيل لتحفيز الساييتوكينين تحت ظروف الشد المختلفة وزيادة مقاومتها ولربما يكون نتيجة التفاعلات المعقدة بين الساييتوكينين وإشارات الإجهادات من جهة ، وبين هرمون الشد حامض الأبسيسك من جهة أخرى. في حين أشار عدد من الدراسات السابقة إلى أن الإجهادات من مختلف مصادرها تحفز تخليق الساييتوكينينات وأن هذا الأرتفاع قد يكون مؤقتاً متبوعاً بانخفاض مستمر (Hansen and Dörffling, 2003) (Pospíšilová *et al.*, 2005); Alvarez *et al.*, (2008).



شكل (19): تأثير إضافة الفلورغلويسينول مع كلوريد الصوديوم إلى وسط الاستطالة في محتوى الأفرع الخضرية نخيل التمر صنف البرحي من الساييتوكينينات

4-3-16: (التلون البني Browning)

توضح النتائج المبينة في (الشكل -20) ارتفاع معدل نسبة التلون البني في الوسط الزراعي المزود بكلوريد الصوديوم بالتراكيز العالية إذ سجلت المعاملتان 150,200مليمول من كلوريد الصوديوم أعلى معدل لنسبة التلون البني بلغت 25.17 , 28.14 % لكل منهما على التوالي في حين سجلت المعاملة القياسية أقل معدل لنسبة التلون البني بلغ 14.15% ولم تسجل التراكيز المنخفضة 25 و 50 و 100 مليمول فروقات ذات دلالة معنوية قياساً بمعاملة المقارنة.

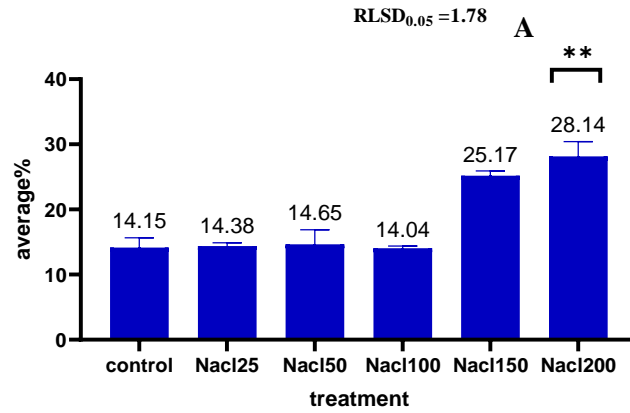
كما وتوضح نتائج (الشكل -21) تسجيل المعاملة الفلوروجلايسينول ذات التركيز PG75 مايكرومول أعلى معدل لنسبة التلون البني في البراعم حيث سجلت ماعدله 47.97%. بينما سجلت المعاملة PG100 مايكرومول ايضاً معدلاً عالياً المعنوية لنسبة التلون البني الذي بلغ 40.81% في حين

سجلت معاملة المقارنة أقل معدل لنسبة التلون البني بلغ مامعدله 12.42% لتسجل المعاملات ذات التراكيز المرتفعة (75 و100 مايكرومول) تفوقاً عالي المعنوية في نسبة التلون البني قياساً بمعاملة المقارنة والمعاملات الأخرى عند مستوى معنوية 0.05

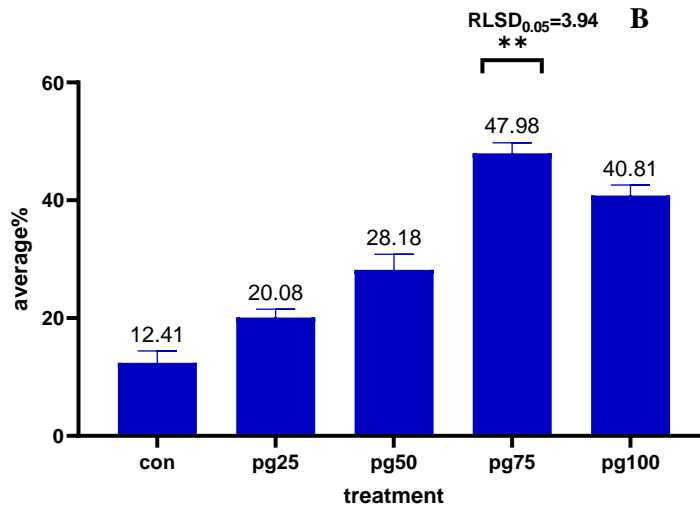
وتوضح البيانات الواردة في (الشكل -22) تأثير المعاملة المشتركة الفلورغلوسينول مع كلوريد الصوديوم في معدل نسبة التلون البني للأفرع الخضرية المزروعة عليها في ظل ظروف مختبرية مسيطر عليها إلى تسجيل المعاملة (200مليمول NaCl+100مايكرومول PG) أعلى معدل لنسبة التلون البني للنموات الخضرية لنخيل التمر صنف البرحي التي بلغت (56.07%) وأيضاً سجلت المعاملة (200مليمول NaCl+75مايكرومول PG) معدل عالي المعنوية لنسبة التلون البني بلغ (50.6%) في حين سجلت المعاملة القياسية (الملحية) أقل معدل لنسبة التلون البني بلغ (28.15%) ولم تسجل فروقات معنوية بين المعاملتان (200مليمول NaCl+25مايكرومول PG) و (200مليمول NaCl+50مايكرومول PG) التي سجل كل منهما معدل نسبة تلون بني بلغ (24.78%) و (25.48%) على التوالي عند مستوى معنوية 0.05.

أن التأثير السلبي المختلف مصادر الإجهادات الأحيائية في استمرار انسجة النخيل قد يرجع الى أكسدة المركبات متعددة الفينول Polyphenols بفعل أنزيمي الـ Peroxidase أو polyphenol oxidase وتكوين الـ quinines السامة إلى الأنسجة النباتية (Bayona-Rodriguez and Romero, 2019)، وتعمل مضادات الأكسدة هذه كمواد كانشه Scavengers للجذيرات الحرة Free Radicals الناجمة عن الإجهادات اللاحائية والتي تؤثر في التحولات الغذائية المضطربة والتي ينتج عنها ROS وبالتالي يظهر مورفولوجيا أثر تلك التفاعلات في إحداث نواتج داكنة على سطح الأنسجة المعرضة للشدود Woodward and Bennett, (2005). كما بينت الدراسات السابقة أن تراكم أيونات كلوريد الصوديوم وزيادة تراكيز المواد الشبيهة بالمنظمات له علاقة في أختزال عمليات النمو وتراكم المواد الفينولية وزيادة استمرار الأنسجة النامية على تلك الأوساط والمعرضة للشدود المختلفة Sarkar and Naik, (2007) Tuna et al., (2000)

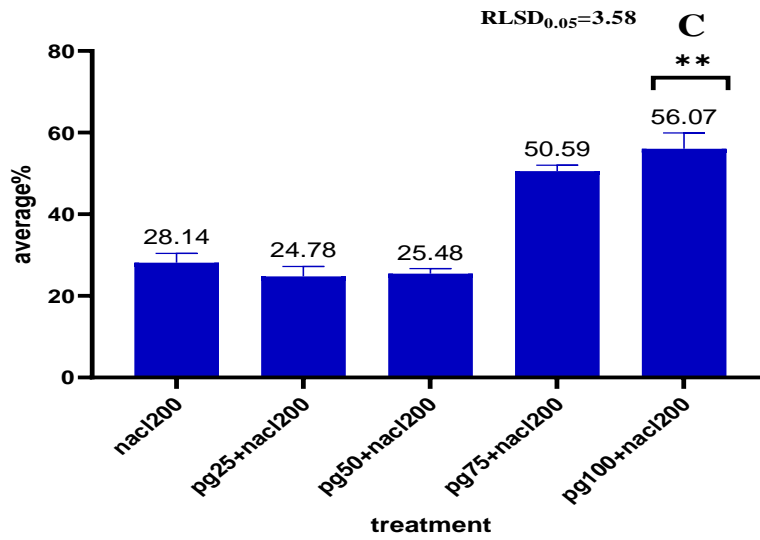
ومما سبق يتبين من نتائج الدراسة الحالية أن زيادة مستويات كلوريد الصوديوم والمركب الفلورغلوسينول في أوساط النمو تؤثر سلباً في نسبة التلون البني وإن افضل استجابة للتكيف النموات مع ظروف الشد كانت في التراكيز المنخفضة لكل من المعاملات



شكل (20): تأثير إضافة كلوريد الصوديوم إلى وسط النمو في مؤشر التلون البني في الأفرع الخضرية لنخيل التمر صنف البرحي



شكل (21): تأثير إضافة الفلورغلوسينول إلى أوساط النمو في مؤشر التلون البني في الأفرع الخضرية لنخيل التمر صنف البرحي



شكل (22): تأثير الإضافة المشتركة الفلورغلوسينول مع كلوريد الصوديوم إلى أوساط النمو في مؤشر التلون البني في الأفرع الخضرية لنخيل التمر صنف البرحي



لوحة (8): التلون البني في الافرع الخضرية المتشكلة

4-4: المؤشرات الجزيئية

1-4-4: الترحيل الكهربائي للهيئة البروتينية على SDS-PAGE Electrophoresis for Proteins

أظهرت نتائج دراسة البروتينات باستخدام SDS-PAGE للبراعم المتشكلة لنخيل التمر صنف البرحي والمعاملة بتراكيز مختلفة من كلوريد الصوديوم حدوث بعض التغيرات الملحوظة في التعبير البروتيني إذ تشير النتائج إلى تسبب الإجهاد الملحي بتكوين بعض الحزم البروتينية في البراعم المعرضة للشدود الملحية عالية التركيز وسجل اختفاء لعدد من الحزم المفصولة في تراكيز أخرى على هلام الترحيل SDS-PAGE إذ تكون 32 حزمة بروتينية تراوح مدى الوزن الجزيئي فيها بين 48-15.5 kDa وكما في (الشكل-23) توزعت بمعدل 5 حزم لكل معاملات كلوريد الصوديوم عدا معاملات التراكيز العالية (200-150 مليون) فقد نتج عنها تخليق حزم بروتينية إضافية ذات وزن جزيئي منخفض 20, 24, kDa، وقد حسبت الأوزان الجزيئية لكل حزمة اعتماداً على المنحنى القياسي للبروتينات الموضح في (الشكل-24)

كما تبين من نتائج الفصل الكهربائي للبروتينات المستخلصة من البراعم الخضرية المتشكلة والنامية في أوساط نمو MS-media والمعاملة بمركب الفلوروغلويسينول وبالتراكيز (25 و50 و75 و100 مايكرومول) وكما مبين في (الشكل-19) حدوث تغييرات على المستوى البروتيني لأنماط المختلفة إذ نتج عن المعاملة بالتراكيز العالية 75-100 مايكرومول حزمتان كبيرتا الحجم بوزن جزيئي 68.8 kDa واربعة حزم صغيرة وقليلة الكثافة وبوزن جزيئي تراوح بين 15-22 kDa في حين أن المعاملتان 25, 50 مايكرومول من الفلوروكلايسينول لم يلحظ وجود اختلافات في الأنماط الناتجة قياساً بالمعاملة المحايدة "غير المعاملة"

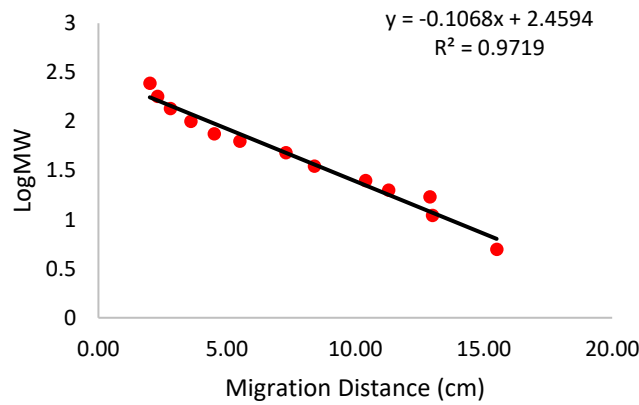
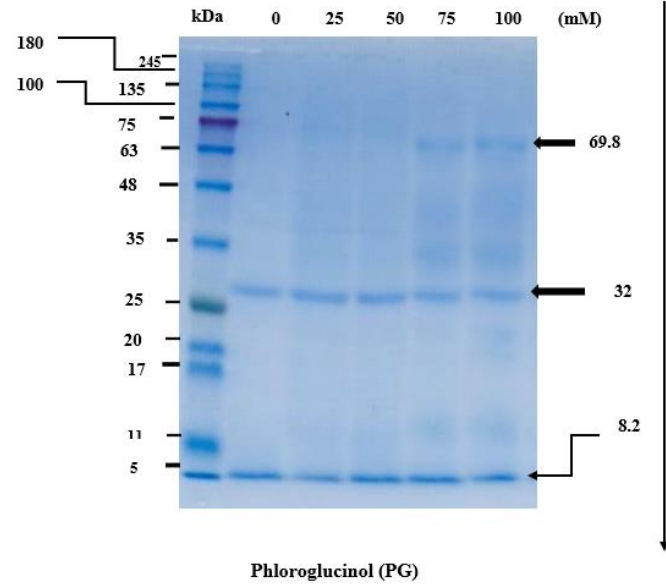
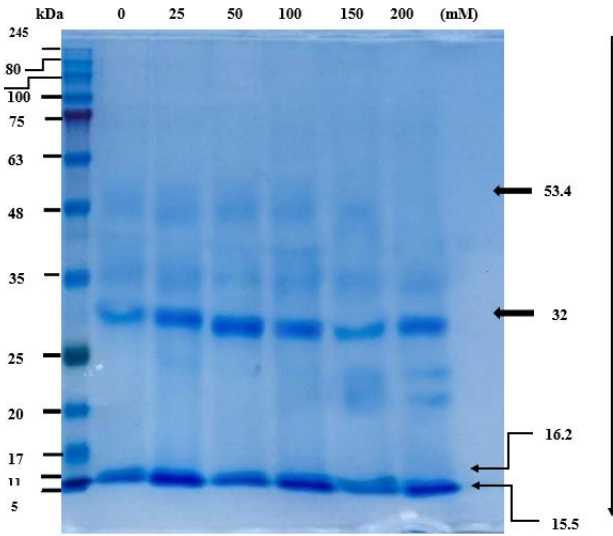
يشير تحليل الأنماط البروتينية المفصولة إلى أن البراعم التي تم تنميتها في أوساط منخفضة التراكيز 25, 50 مليون كلوريد الصوديوم لم يتم تغيير أي من التراكيب البروتينية وانماطها فيها قياساً بالمعاملة المحايدة (غير الملحية) وفي المعاملة الملحية ذات التركيز 50-100 مليون لم يسجل إضافة أنماط جديدة متشكلة إلا أنه لوحظ أن الحزم في هاتين المعاملتين كانت أكثر كثافة من باقي المعاملات مما يشير إلى زيادة في عملية التعبير البروتيني فيها. ومن هذا يتضح أن تأثير الملوحة يمكن أن يكون عن

طريق تنشيط جينات جديدة أو في زيادة التعبير عن الجينات موجودة مسبقاً لها دور فاعل في مقاومة الملوحة

وقد تكون التغييرات في تكوين البروتينات تحت ظروف الإجهاد اللاأحيائي ناتجة عن التغييرات في كفاءة الترجمة mRNA أو عملية التنظيم ونسخ الحمض النووي الرايبي RNA ونقله واستقراره . يرتبط التعبير عن بروتينات الإجهاد الملحي بالتكيف مع الشد الملحي. وأشارت الدراسات السابقة إلى أن واحدة من الآليات الدقيقة والمهمة والمعنية في حماية الخلية والمادة الوراثية من الإجهادات الملحية هو تحريض الريبوسومات Ribosomes على تخليق مجموعة من البروتينات الجديدة Bassiouny *et al.* (2008) .

ولاحظ El Rabey *et al.* (2015) إضافة بروتينات جديدة في النباتات نخيل التمر المجهدة والنامية في تراكيز عالية من كلوريد الصوديوم وأن هذه البروتينات الجديدة تمتلك وظيفة محددة جدا هي حماية الخلية والمادة الوراثية من التغيير أو التدمير الناتج من أيونات كلوريد الصوديوم التي تسبب في حال لم تستطع النباتات التكيف أو لم يزول أثر الشد إلى تدمير المادة الوراثية . كما وأشارت الدراسة (Al-Mayahi, 2016) أيضا إلى تسجيل غياب بعض الحزم البروتينية المفصولة على PAGE ولم يفهم آلية التعويض عن البروتينات المفقودة التي يتبعها النخيل تحت ظروف الإجهاد الملحي

اتفقت نتائج هذه الدراسة مع ما توصلت إليه الدراسات السابقة (Chiconato *et al.* (2021) التي أوضحت نتائجها إلى أن وجود كلوريد الصوديوم بالتراكيز العالية في أوساط النمو يتسبب في إضافة بروتينات معظمها كانت ذات اوزان جزيئية منخفضة تراوحت بين 20-35 kDa او ذات اوزان جزيئية كبيرة ما بين 45-75 kDa

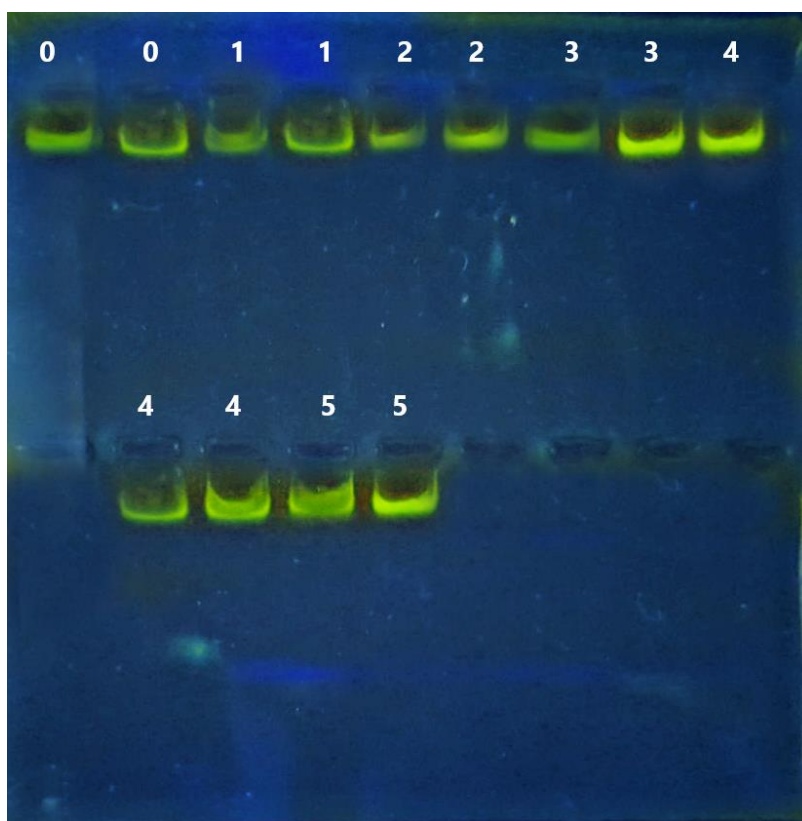


شكل (23): الفصل الكهربائي باستخدام SDS-PAGE لبروتينات لأفرع الخضرية لنخيل التمر صنف البرحي النامية في أوساط حاوية على كلوريد الصوديوم الفلورغلوسينول واستخدام Coomassie Blue التلطيخ الحزم .

شكل (24) : المنحنى القياسي للبروتينات القياسية kDa على أساس الوزن الجزيئي والمسافة النسبية للبروتينات القياسية

4-4-2 تقدير تركيز ونقاوة ال DNA :

تم تقدير تركيز ونقاوة الـ DNA بواسطة جهاز Nano - drop Spectrophotometer ، حيث تم معايرة الجهاز وذلك بوضع قطرة من TE لتصفير الجهاز ثم وضع 1 مايكروليتر من الـ DNA على عدسة الجهاز وتم تسجيل تركيز ونقاوة كل عينة على الأطوال الموجية 260 و 280 نانوميتر .



لوحة (2): الحمض النووي DNA المستخلص من البراعم الخضرية النامية في تراكيز مختلفة من كلوريد الصوديوم

4-4-3: اختبار استقرار الحمض النووي باستخدام RAPD Random Amplifid Polymorphic

أظهرت نتائج الدراسة الجينية بين البراعم المتشكلة و المعاملة بكلوريد الصوديوم قياساً بالنباتات غير المجهدة المعتمدة على الاستقرار الوراثي للمادة الوراثية للبراعم الخضرية المتشكلة لنخيل التمر صنف البرحي في مرحلة التضاعف والاستطالة والمعرضة لظروف الشد الملحي وبالتراكيز المذكورة في (جدول

2-) على أساس مكررين لتقييم الاختلافات الناتجة من تعريض البراعم للشد الملحي مقارنة بالمعاملة غير الملحية استخدمت 8 بادئات (جدول-19) هذه البادئات انتجت عدد حزم كلي بلغ 320.5 حزمة وبمتوسط عدد حزم 40.06 لكل بادئ تراوح حجمها بين (200-8000 pb) انتج كل بادئ عدد حزم تراوح بين 4-9 حزمة بمتوسط بلغ 6.67 حزمة لكل بادئ (جدول-19)، انتج تحليل RAPD أنماطاً أحادية التشكل الوراثي اثناء ترحيل الحمض النووي بين عينات الدراسة ومعاملة المقارنة ولم يلاحظ وجود تعدد شكلي في البادئات المستخدمة .

إن من التقنيات المستخدمة لتقييم التطير الجيني والاستقرار الوراثي في المختبر متعددة وربما أهمها تقنية AFLP و ISSR والمعتمدة على تحديد التباينات بين الحزم الناتجة وأيضاً تقنية RAPD والتي تعد تقنية قوية بسبب تطبيقاتها الاقتصادية كما أنها أداة موثوقة وقد استخدمت على نطاق واسع في تحليل التباينات الجينية والتغايرات في عملية التعبير الجيني في النباتات كما أنها تعطي نتائج دقيقة عن وجود أو عدم وجود تباينات في المادة الوراثية ، خلال هذه الدراسة يلاحظ عدم وجود اختلافات في الأنماط الجينية بين مختلف المعاملات كلوريد الصوديوم التي أظهرت فيها البراعم الخضرية لصنف التخليل البرحي المقاومة للشد الملحي كما أن نتائج هذه الدراسة تتفق مع ما وجده *Valladares et al., (2010)* و *Othmani et al., (2006)*.

وكما يتضح من نتائج الدراسات السابقة *Al-Khateeb et al., (2019)* عدم وجود اختلافات في الأنماط الجينية لبراعم أو الأجنة الجسدية المكثرة في المختبر والمعاملة بكلوريد الصوديوم في حين أبلغت نتائج دراسة *Lakshmanan et al., (2007)* على وجود اختلافات في الأنماط الجينية الناتجة من زراعة الأنسجة وقد يعزى التغير في النمط الجيني إلى الأختلاف في النوع النباتي والبروتوكولات المتبعة في الاكثار أو عن استخدام منظمات النمو والمركبات الكيميائية الأخرى الداخلة في تحضير الأوساط الزراعية تسبب في بعض الحالات إلى شذوذ الكروموسومات أو حدوث طفرة نقطية وبتالي تسبب اختلافات في الأنماط الجينية والأجنة الجسدية المتكونة *Krishna et al., (2016)* ولذلك خلال الاستزراع المنظم في المختبر يكون من الأهمية القصوى مراقبة النظم الجينية والتباينات الوراثية التي تنتج عن تغيير في تركيبة البروتينات.

جدول (19): بادئات RAPD المستخدمة لاكتشاف مواقع التباينات الوراثية في الأفرع المتشكلة لنخيل التمر صنف

البرحي تحت ظروف إجهاد ملحي

| الوزن الجزيئي (pb) | المعاملات | | | | | | تتابع البادئات | | اسم البادئ |
|--------------------|-----------|---------|---------|--------|--------|------|----------------|------------|------------|
| | 200nacl | 150nacl | 100nacl | 50nacl | 25nacl | cont | "3 | "5 | |
| 6000-500 | 8 | 8 | 8 | 8 | 8 | 8 | 8 | AGTCAGCCAC | OPA-03 |
| 7000-500 | 6.5 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | TGGACCGGTG | OPE-08 |
| 5000-700 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | CAGCTCACG | OPG-12 |
| 6000-200 | 5 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | CTGCTGGGAC | OPD-10 |
| 5000-250 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | GGACCCAACC | MOH-9 |
| 3000-500 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | GTGAGGCGTC | MOH-8 |
| 8000-350 | 6 | 6 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | ACGGCGTATG | OPE-19 |
| 4000-250 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | AGGGGTCTTG | OPA-05 |

4-4-3-1: الثبات الجيني للأفرع الخضرية لصنف نخيل البرحي

Genetic stability of vegetative shoots of date palm cultivar Barhi

في الدراسة الحالية استخدمت تقنية RAPD لتحقق بمدى الاستقرار الوراثي لعينات الدراسة المعاملة بكلوريد الصوديوم وبواقع 8 بادئات جزيئية وباستخدام تقانة RAPD أعطيت هذه البادئات المستخدمة في تضخيم المادة الوراثية عدد حزم كلي بلغ 320.5 حزمة وبمتوسط عدد حزم 6.67 لكل بادئ والتي تراوحت أوزانها الجزيئية بين 8000-250 pb وكما مبين في (جدول-19) و(شكل-26 و25). لوحظ أن البادئات (OPA-03 و OPA-5, MOH-8, MOH-9, OPG-12) قد سجلت أعلى نسبة للاستقرار الوراثي بلغ 100% ولم يكن هنالك تعدد شكلي في هذه الواسمات في حين اعطى البادئ (OPE-19) اقل نسبة استقرار وراثي بلغ 95% مقارنة بالبادئات الأخرى (جدول-20).

ويلاحظ أن البادئ (OPD-10) قد نتج عن تضخيمه ثلاثة مواقع رئيسة تفاضلية للارتباط والتكرار الجيني في المعاملة 200مليمول من كلوريد الصوديوم والذي يشير إلى دقة هذا البادئ في تحديد الاختلافات الناتجة بينما انتجت البادئات الأخرى مواقع تكرر أحادية ولم يلحظ وجود تعدد شكلي بين معاملات كلوريد الصوديوم ومعاملة المقارنة مما يشير إلى استقرار المادة الوراثية في التراكيز المستخدمة للملح ومن نتائج تضخيم البادئات (OPE-8, OPD-10, OPE-19) يلاحظ زيادة تركيز كلوريد الصوديوم من 150 إلى 200مليمول أدى إلى غياب حزمة جزيئية اثناء التضخيم التي كانت ظاهرة في المعاملات الأخرى مما تسببت في احداث تغيرات طفيفة في نسبة التشابه الوراثي وعلى الرغم من

ذلك بقي التباين الوراثي بين الافرع المعاملة ب200 مليون ومعاملة المقارنة منخفضة ولم تكن هنالك تباينات بين التراكيز (25 و50 و100 مليون) والمعاملة المحايدة .

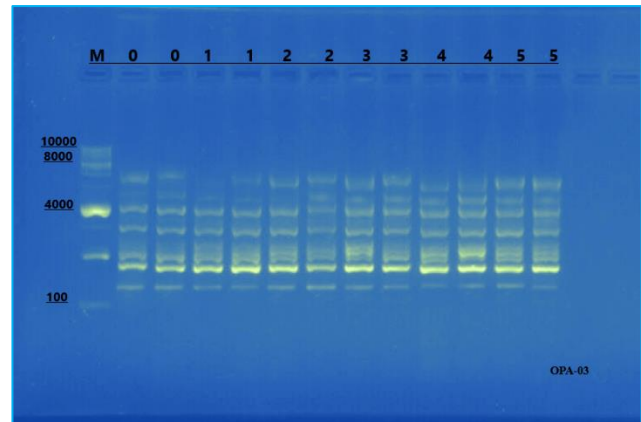
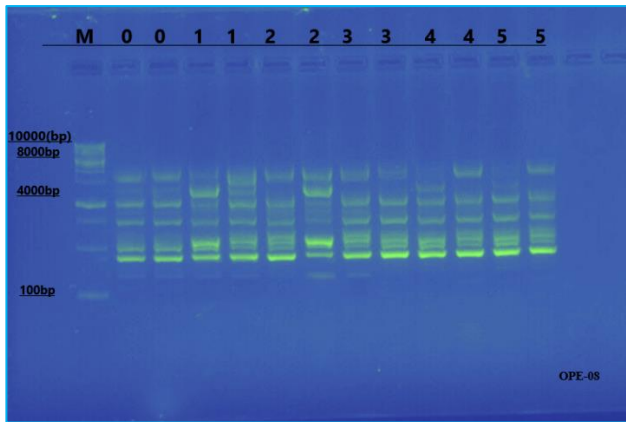
أحد الأهداف الرئيسية لتقنية زراعة الأنسجة النباتية هو تحقيق إكثار ناجح للنوع أو الصنف النباتي الحقيقي ويعتبر صنف البرحي واحد من أصناف نخيل التمر الاقتصادية المهمة في العراق والعالم لذا فإن المحافظة على صفات الصنف الوراثية من الأمور المهمة للغاية ولاسيما اثناء تربية تلك النباتات في المختبر على التكيف ومقاومة الإجهادات اللاحيوية ومنها الإجهاد الملحي .

اشارت دراسة (Steinmacher *et al.*, 2007) إلى أن اكثار مجموعة متنوعة من النباتات في المختبر يؤدي إلى احداث اختلافات قد يصعب ملاحظتها بالطرق التقليدية وقد تكون هذه الاختلافات ناتجة عن عامل وراثي أو عامل بيئي وأن هذا الاختلافات الجديدة قد توفر مصدراً اضافياً مهماً في تحسين النباتات. بينما لاحظ (Anwar *et al.*, 2010) تبايناً وراثياً مستقراً من دون حدوث شذوذ في المادة الوراثية للنباتات التي زرعت على أوساط مضاف لها تراكيز مختلفة من كلوريد الصوديوم. أن استقرار المادة الوراثية وعدم حصول تباينات كبيرة في المادة الوراثية قد يكون نتيجة ان هذا البروتوكول المتبع في اكثار البراعم الخضرية ومعاملات الدراسة ناجحة في المحافظة على استقرار المادة الوراثية وان التباينات النسبية الطفيفة الناتجة لا تؤثر في صفات الصنف وقد تكون بسبب احداث الإجهاد الملحي او عامل اخر متمثل بطفرة نقطية.

في الدراسة الحالية تم تحديد تراكيز كلوريد الصوديوم الذي يمكن استخدامه الإنتاج نباتات مستجيبة لظروف الشد الملحي وغير متباينة وراثياً وإن التباين الطفيف الذي تم تشخيصه في مواقع الارتباط6 للتركيز 200 مليون الذي قد يكون بسبب ظروف الترحيل لذا من الصعب تحديد هذه التغيرات الطفيفة الحاصلة باستخدام الواسمات الجزيئية المعروفة التي قد تحتاج إلى دراسة التسلسل الجينومي الكامل الاكتشاف مواقع الجينات المحدثة لطفرات النقطية الناتجة من الإجهادات الملحية ومدى قدرتها على احداث تغير في المادة الوراثية على المستوى البعيد وإن هذا الأمر قد يساعد أيضاً في وضع استراتيجيات افضل ضد الإجهادات الملحية لنخيل التمر.

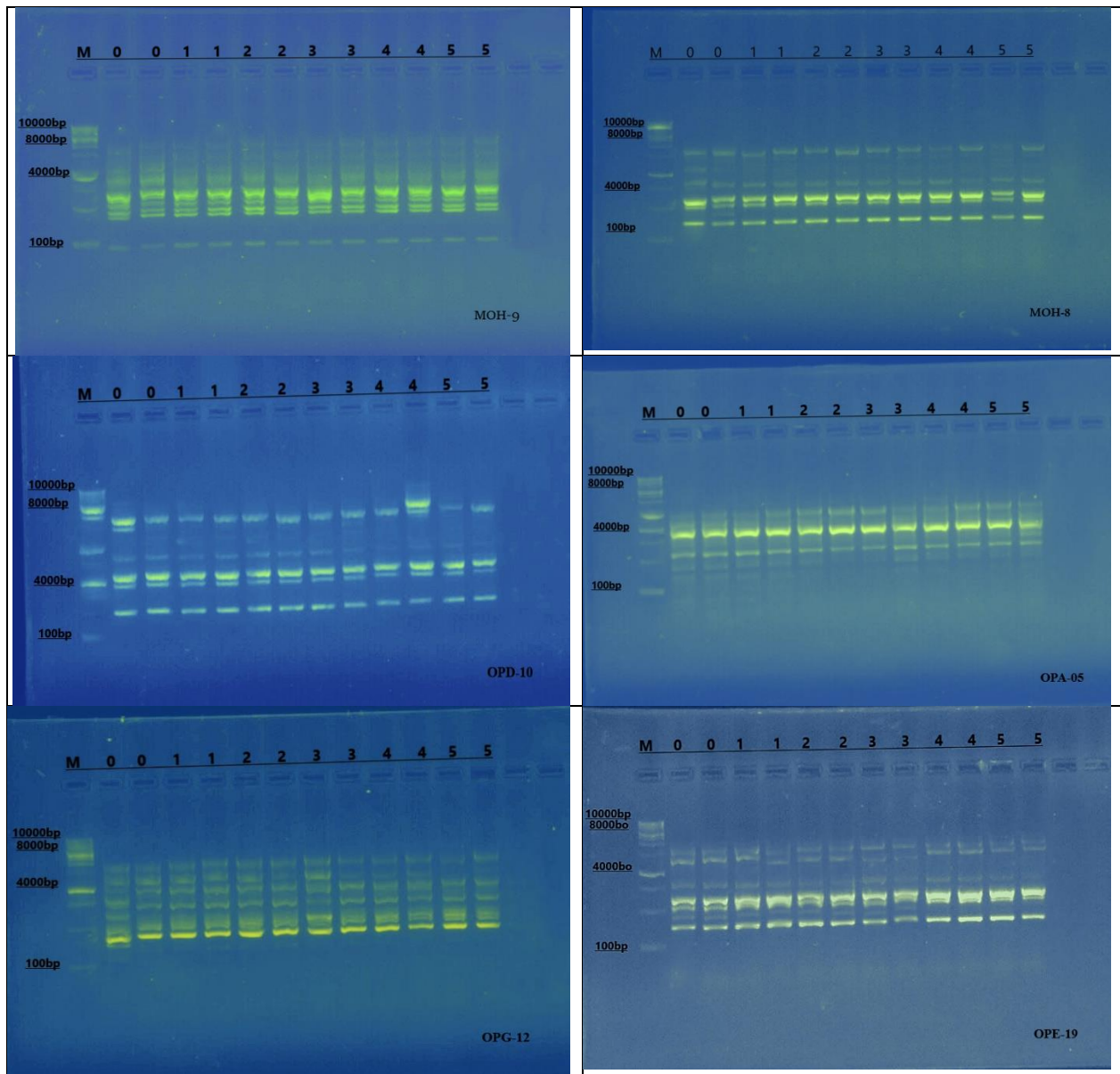
جدول (20): عدد الحزم المنتجة من استعمال بادئات RAPD ومعدل التشابه الوراثي بين الأفرع الخضرية المتشكلة لنخيل التمر صنف البرحي النامية تحت ظروف إجهاد ملحي

| اسم البادئ | عدد الحزم الكلي | عدد الحزم المتشابهة | معامل التشابه % |
|------------|-----------------|---------------------|-----------------|
| OPA-03 | 48 | 48 | 100 |
| OPE-08 | 41.5 | 40.5 | 97.59 |
| OPG-12 | 36 | 36 | 100 |
| OPD-10 | 35 | 34 | 97.14 |
| MOH-9 | 54 | 54 | 100 |
| MOH-8 | 36 | 36 | 100 |
| OPE-19 | 40 | 38 | 95 |
| OPA-05 | 30 | 30 | 100 |
| total | 320.5 | 316.5 | 98.75 |



شكل (25): نواتج تضخيم بادئات RAPD المستعملة في تحديد الحمض النووي الأفرع الخضرية نخيل التمر صنف البرحي النامية على أوساط حاوية كلوريد الصوديوم

تمثل التسلسلات (0....5) مكررات المعاملات حيث 0 معاملة المقارنة 1-25nacl-2 50 nacl-3 100nacl-4
-5 150 nacl 200 nacl (mM).



شكل (26): نواتج تضخيم بادئات الـ RAPD المستعملة في تحديد الحمض النووي الافرع الخضرية نخيل التمر صنف البرحي النامية على اوساط حاوية كلوريد الصوديوم

تمثل التسلسلات (5....0) مكررات المعاملات حيث 0 معاملة المقارنة 1-25nacl-2 50 nacl-3 100nacl-4
 -5 150 nacl 200 nacl (mM).

4-4-4: قياس تركيز نقاوة الحمض النووي Total RNA yield and quality

تم الكشف عن تركيز الحمض النووي RNA ng/μL المستخلص من عينات الدراسة وذلك باستخدام جهاز Nanodrop spectrophotometer ومن ثم قدرت النقاوة من خلال قراءة الامتصاصية على الطول الموجي للنفس الجهاز (260/280nm) واستخدم 2 مايكروليتر من (Nuclease-Free Water) لتصفير الجهاز ثم قدرت النقاوة لكل عينة من العينات المستخلصة وذلك باخذ 1 مايكروليتر ووضعها على الركيزة الجهاز وقراءة الامتصاصية حيث يعتبر ال RNA نقياً عندما تكون قراءة الجهاز (1.8nm) والعينات التي تراكيها عالية تم تخفيفها باضافة Nuclease-Free Water

جدول (8) : نقاوة الحمض النووي RNA وتركيزه الأفرع الخضرية لنخيل التمر صنف البرحي المتشكلة

في اوساط حاوية على كلوريد الصوديوم وبتراكيز مختلفة باستخدام Nanodrop

spectrophotometer وعلى الاطوال الموجية (A260/A280)

| RNA Purity (A260/A280) | Total RNA Concentration (ng/μL) | Rep | Sample |
|---------------------------|------------------------------------|-----|-------------------|
| 1.73 | 4.34 | T1 | المعاملة القياسية |
| 1.79 | 6.27 | T2 | |
| 1.75 | 4.87 | T1 | 25Nacl (mM) |
| 1.72 | 4.64 | T2 | |
| 1.69 | 4.84 | T1 | 50 Nacl (mM) |
| 0.81 | 5.1 | T2 | |
| 1.64 | 3.43 | T1 | 100Nacl (mM) |
| 1.5 | 4.98 | T2 | |
| 0.94 | 12.21 | T1 | 150 Nacl(mM) |
| 1.8 | 3.46 | T2 | |
| 2.1 | 9.93 | T1 | 200 Nacl (mM) |
| 0.89 | 13.76 | T2 | |

4-4-5: تقدير مستوى التعبير الجيني في فحص تفاعل سلسلة البلمرة في الوقت الحقيقي الكمي Quantitative Real-Time PCR qRT-PCR الأفرع الخضرية لنخيل التمر صنف البرحي ونامية تحت ظروف الإجهادات اللاحيوية.

4-4-5-1: جين STK_s

حسب التعبير الجيني Gene expression بإجراء العد النسبي وباستخدام طريقة ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) المعتمدة على عملية التصحيح Normalization باستخدام الجين المحافظ ACT_1 حسب قيم Cyclo Threshold (CT) للجين الهدف $STKs$ باستخدام CT للجين المحافظ أو المعياري ACT_1 في كل المعاملات التجريبية ومجموعة السيطرة الإتمام عملية التصحيح في التعبير الجيني.

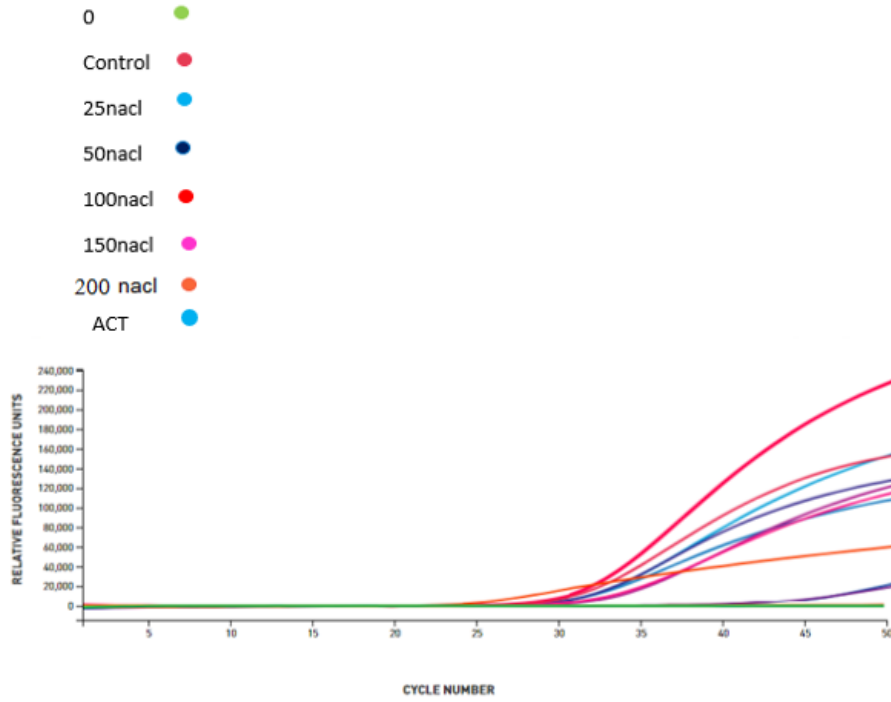
يوضح (الجدول -21) و(الشكل -27) التعبير الجيني للجين $STKs$ في الأفرع الخضرية المتشكلة تحت ظروف شد محلي لنخيل التمر صنف البرحي وجود فروقات معنوية في معاملات الدراسة للجين الهدف بزيادة تركيز كلوريد الصوديوم في أوساط النمو إذ سجلت المعاملة 200NaCl ملليمول اعلى تعبير جيني بلغ (11.81)ضعفاً عما هو في معاملة السيطرة التي سجلت قيمة التعبير الجيني فيها (1.041) كما ان المعاملة ذات التركيز 150ملليمول من كلوريد الصوديوم سجلت فرقاً معنوياً في زيادة كمية التعبير الجيني وبمقدار (5.13) ضعفاً عما في معاملة السيطرة كما أن المعاملتين (50,100)ملليمول سجلتا زيادة معنوية طفيفة في كمية التعبير الجيني في حين أن المعاملة 25ملليمول لم يتم فيها تحفيز التعبير الجيني للجين $STKs$ والتي سجلت مستوى منخفضاً بلغ 0.77 لقيمة fold change

ويوضح (الشكل -28) مستويات التعبير الجيني للجين $STKs$ لأفرع الخضرية المتشكلة والنامية تحت ظروف شد محلي لصنف النخيل التمر البرحي تسجيل معاملات التراكيز المرتفعة من كلوريد الصوديوم ارتفاعاً Upregulation معنوياً واضحاً في مستوى التعبير الجيني قياساً بمعاملة السيطرة "غير الملحية" والمعاملات ذات التراكيز المنخفضة من كلوريد الصوديوم التي سجلت مستوى منخفضاً Downregulation في قيم Fold change للتعبير الجيني .

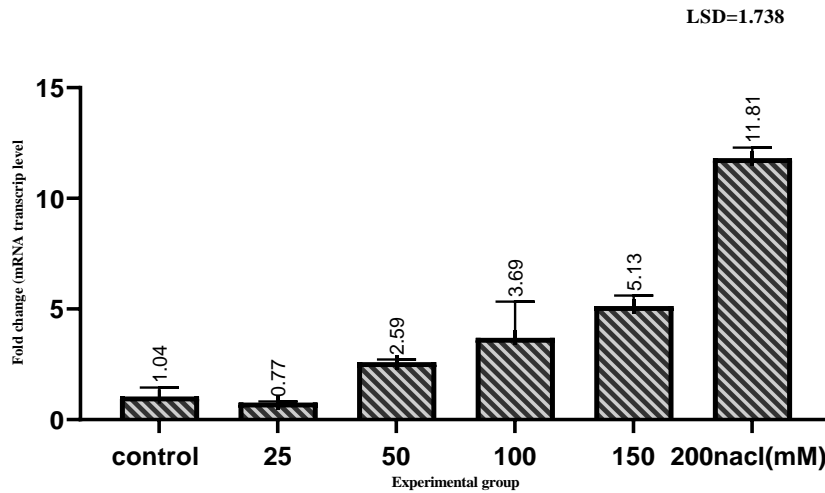
جدول (21): التعبير الجيني للجين Stks باستخدام طريقة (2^{-ΔΔct} livak method) الأفرع الخضرية لنخيل التمر صنف البرحي

| Mean±St.Error | Flood change 2 ^{-ΔΔct} | ct ^{ΔΔ} | control ^{Δct} | test ^{Δct} | ACT ^{ct} | Stks ^{ct} | معاملات كلوريد الصوديوم (mM) |
|---------------|------------------------------------|------------------|------------------------|---------------------|-------------------|--------------------|---------------------------------|
| 1.041±0. 0.45 | 0.75 | 0.41 | 2.24 | 2.65 | 30.13 | 32.78 | المعاملة القياسية (0) |
| | 1.33 | -0.41 | 2.24 | 1.83 | 30.03 | 31.86 | المعاملة القياسية (0) |
| 0.77±0. 0.16 | 0.74 | 0.44 | 2.24 | 2.68 | 30.24 | 32.92 | Nacl-25 |
| | 0.81 | 0.31 | 2.24 | 2.55 | 30.26 | 32.81 | Nacl-25 |
| 2.59±0. 0.53 | 2.50 | -1.32 | 2.24 | 0.92 | 30.12 | 31.04 | Nacl-50 |
| | 2.68 | -1.42 | 2.24 | 0.82 | 30.23 | 31.05 | Nacl-50 |
| 3.69±0.91 | 4.86 | -2.28 | 2.24 | -0.04 | 30.13 | 30.09 | Nacl-100 |
| | 2.53 | -1.34 | 2.24 | 0.9 | 30.13 | 31.03 | Nacl-100 |
| 5.13±0.49 | 4.79 | -2.26 | 2.24 | -0.02 | 30.04 | 30.02 | Nacl-150 |
| | 5.46 | -2.45 | 2.24 | -0.21 | 30.28 | 30.07 | Nacl150 |
| 11.81±1.20 | 9.78 | -3.29 | 2.24 | -1.05 | 30.15 | 29.1 | Nacl-200 |
| | 13.83 | -3.79 | 2.24 | -1.55 | 30.63 | 29.08 | Nacl-200 |

±تمثل المتوسطات معدل مكررين متبوعة بقيم الانحراف المعياري



شكل (27): منحنيات التغير التضاعفي لكمية التعبير الجيني في فحص qRT-PCR للجين STKs الافرع النامية تحت تأثير الإجهاد الملحي لنخيل التمر صنف البرحي ومعاملات



شكل (28) تأثير معاملات كلوريد الصوديوم في مستوى التعبير الجيني الافرع الخضرية النامية تحت إجهاد ملحي لنخيل التمر صنف البرحي قياساً بمعاملة السيطرة.

4-4-5-1-1: علاقة مستوى التعبير الجيني STK بالمؤشرات النمو الخضريّة الافرع الخضريّة المتشكلة لنخيل التمر صنف البرحي تحت ظروف الشد الملحي.

يتبين من نتائج التحليل الإحصائي لمعامل الارتباط للدراسة الحالية وجود علاقة معنوية سالبة بين المؤشرات (وزن البراعم ، طول البرعم ، وعدد البراعم) و الجين STK في جميع معاملات كلوريد الصوديوم (جدول 10 و الشكل 24) . في حين لوحظ وجود علاقة موجبة معنوية عالية بين قطر النبات وكمية التعبير الجيني Fold change (الجدول 22: والشكل 29) وبمعامل تأثير عالي المعنوية للجين المستهدف على نمو البراعم المتشكلة

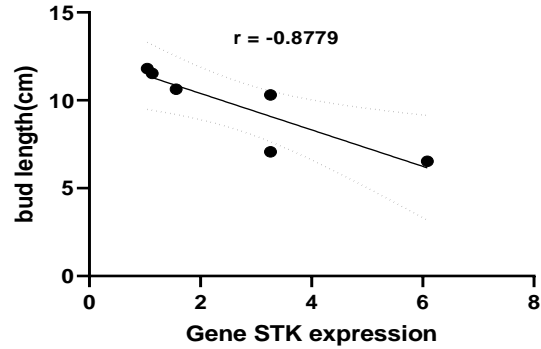
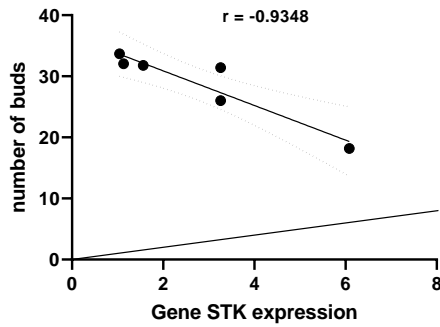
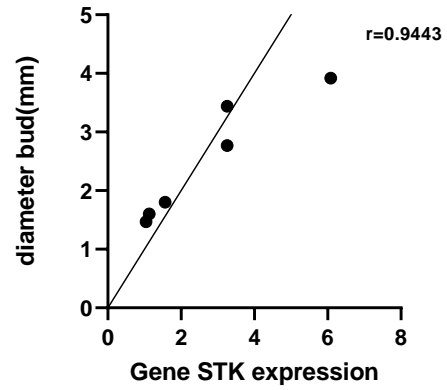
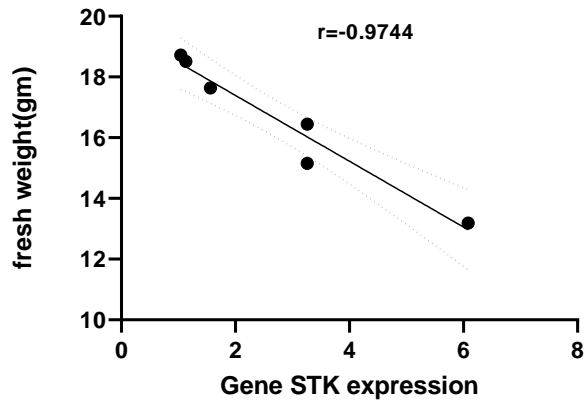
الجينات المتعلقة باستجابة النباتات للشدود الملحية تكون مرتبطة بالعديد من الجوانب بما في ذلك عمليات التمثيل الغذائي الفسيولوجية ، والدفاع عن الخلية ، وإنتاج الطاقة ، ونقل الأيونات ، والتوازن الهرموني ونمو الخلايا وانقسامها وغيرها من الوظائف الحيوية المتعلقة في استمرار النمو بالشكل الطبيعي تحت ظل ظروف الشد الملحي . هذا الارتباط يتم تنسيقه وفق آليات معينة دقيقة Zhang *et al.* (2012) ، هذه الآليات تعتمد في الحقيقة على تفعيل ثلاثة مسارات رئيسة عند تعرض النبات إلى الإجهاد وهي اكتشاف المسبب "أيونات كلوريد الصوديوم" أو أي مسبب للإجهادات الأخرى ، توصيل الإشارة وبدء الاستجابة الدفاعية "defensive response" وحتى تؤدي النباتات هذه الآليات الثلاثة يتطلب تحفيز التعبير الجيني للجينات STK المشفرة للبروتينات Kinases (Ge *et al.*, 2007)

وأشارت الدراسات السابقة إلى أن جين STK يرتبط بشكل قوي بتحفيز جينات المقاومة resistance (PR) gene الدفاعية وأن هذا الجين مسؤول عن تحفيز الإشارة أو تحويلها وتوصيلها ، أن الجينات العائدة الى STK لها ارتباطات عدة في علميات النمو المختلفة في زيادة سمك جدار الخلية أو تعديل الأسموزي وتوازن الأيونات (Xu and Deng, 2010) ، أن للجين دور STK في تحفيز الاستجابة لمقاومة الشد الملحي عن طريق التحكم الوظيفي للبروتينات Kinases (Ge *et al.*, 2007)

لقد أوضحت نتائج الدراسة الحالية أن للجين المستهدف STK علاقة ارتباط وتأثير عالي المعنوية في صفات النمو الخضريّة كما انه يتم تحفيز تعبيره الجيني بزيادة تركيز كلوريد الصوديوم.

جدول (22) معاملات الارتباط بين كمية التعبير الجيني ومؤشرات النمو الخضريّة الافرع نخيل التمر صنف البرحي

| stks Expression (ng/μl) | | المؤشرات الخضريّة للبراعم |
|------------------------------------|----------------|---------------------------|
| معامل تأثير (Eta) الجين stks الكلي | معامل الارتباط | |
| 0.857 | -0.974 | الوزن الطري (غ) |
| | 0.944 | قطر الفرع (مم) |
| | -0.878 | اطوال الفرع (سم) |
| | -0.935 | عدد الافرع |



شكل (29): العلاقة الخطية بين مستوى التعبير الجيني للجين STK مع المؤشرات الخضريّة في الافرع الخضريّة نخيل التمر صنف البرحي تحت ظروف الإجهاد الملحي

ABA جين: 2-5-4-4

يوضح (الجدول -23) و(الشكل -30) التعبير الجيني للجين ABA في الافرع الخضريّة المتشكلة تحت ظروف شد ملحي لنخيل التمر صنف البرحي وجود فروقات معنوية في معاملات الدراسة للجين

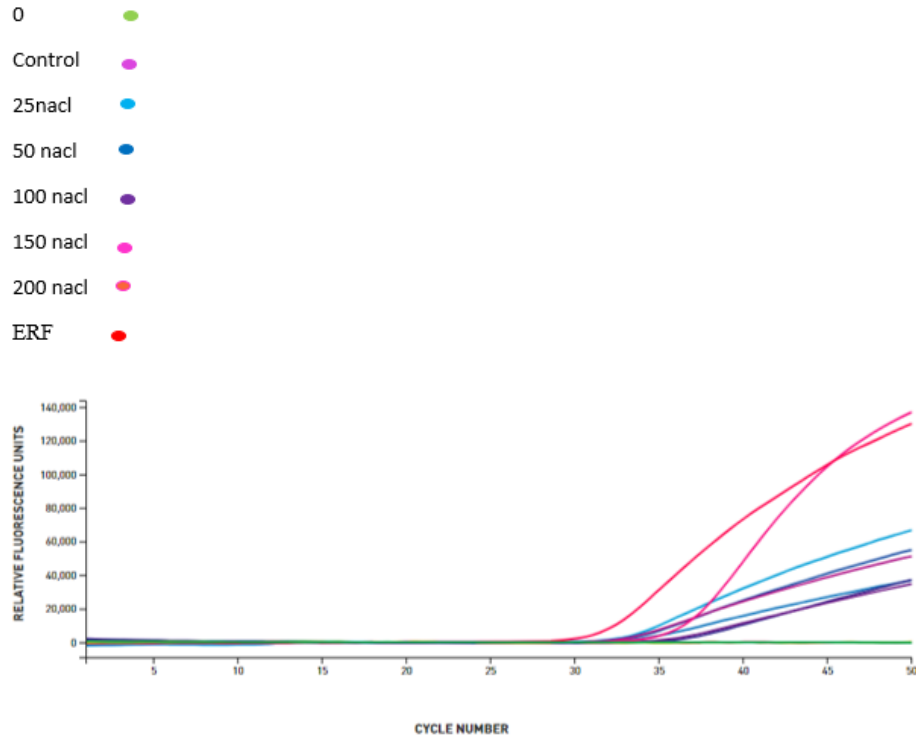
الهدف بزيادة تركيز كلوريد الصوديوم في أوساط النمو إذ سجلت المعاملة 200NaCl مليون أعلى تعبير جيني بلغ (11.76) ضعفاً عما في معاملة السيطرة التي سجلت قيمة التعبير الجيني فيها (0.99) كما أن المعاملة ذات التركيز 150 مليون من كلوريد الصوديوم سجلت فرقاً معنوياً في زيادة كمية التعبير الجيني وبمقدار (8.55) ضعفاً عما في معاملة السيطرة والمعاملات الأخرى وسجلت المعاملة 100 مليون من كلوريد الصوديوم زيادة معنوية بمقدار 3.88 وبفارق معنوي عن المعاملة القياسية "غير الملحية" وعن معاملي 25,50 مليون كلوريد الصوديوم في حين أن المعاملتان (25,50) مليون سجلتا زيادة معنوية طفيفة في كمية التعبير الجيني وبدون فارق معنوي عن معاملة السيطرة وبلغت الزيادة في كمية التعبير الجيني فيهما 1.03 و 2.69 .

ويوضح (الشكل -31) مستويات التعبير الجيني للجين ABA الافرع الخضرية المتشكلة والنامية تحت ظروف شد محلي لصنف نخيل التمر البرحي تسجيل معاملات التراكيز المرتفعة (100, 150, 200 مليون) من كلوريد الصوديوم ارتفاعاً Upreulation معنوياً واضحاً في مستوى التعبير الجيني قياساً بمعاملة السيطرة "غير الملحية" والمعاملات ذات التراكيز المنخفضة من كلوريد الصوديوم التي سجلت مستوى منخفضاً Downregulation في قيم Fold change للتعبير الجيني.

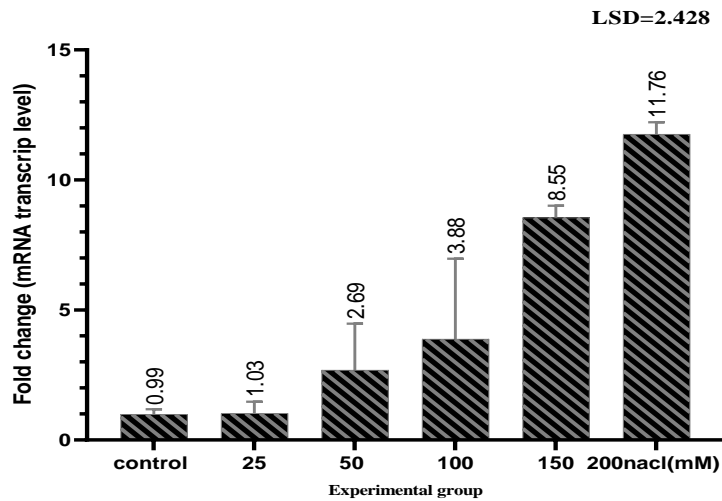
جدول(23): التعبير الجيني للجين ABA باستخدام طريقة (2^{-ΔΔct} livak method) الأفرع الخضرية لنخيل التمر صنف البرحي

| Mean±St.Error | Fllod change 2 ^{-ΔΔct} | ΔΔct | control ^{Δct} | test ^{Δct} | ERFct | ABAct | معاملات كلوريد الصوديوم (mM) |
|---------------|------------------------------------|-------|------------------------|---------------------|-------|-------|---------------------------------|
| 0.99±0.07 | 0.87 | 0.20 | 1.85 | 2.05 | 36.02 | 33.97 | المعاملة القياسية(0) |
| | 1.13 | -0.18 | 1.85 | 1.67 | 36.12 | 34.45 | المعاملة القياسية(0) |
| 1.03±0.17 | 0.77 | 0.38 | 1.85 | 2.23 | 36.03 | 33.8 | Nacl-25 |
| | 1.39 | -0.47 | 1.85 | 1.38 | 36.03 | 34.65 | Nacl-25 |
| 2.69±0.71 | 1.72 | -0.78 | 1.85 | 1.07 | 36.2 | 35.13 | Nacl-50 |
| | 4.23 | -2.08 | 1.85 | -0.23 | 36.6 | 36.83 | Nacl-50 |
| 3.88±1.23 | 2.27 | -1.18 | 1.85 | 0.67 | 36.16 | 35.49 | Nacl-100 |
| | 6.64 | -2.73 | 1.85 | -0.88 | 36.18 | 37.06 | Nacl-100 |
| 8.55±0.18 | 8.23 | -3.04 | 1.85 | -1.19 | 36.3 | 37.49 | Nacl-150 |
| | 8.88 | -3.15 | 1.85 | -1.3 | 36.3 | 37.6 | Nacl150 |
| 11.76±0.95 | 10.20 | -3.35 | 1.85 | -1.5 | 36.9 | 38.4 | Nacl-200 |
| | 13.55 | -4.26 | 1.85 | -2.41 | 36.4 | 38.81 | Nacl-200 |

±تمثل المتوسطات معدل مكررين متبوعة بقيم الانحراف المعياري مستوى الاحتمال 0.5%



شكل (30): منحنيات التغير التضاعفي لكمية التعبير الجيني في فحص qRT-PCR للجين ABA الافرع الخضرية النخيل التمر صنف البرحي النامية تحت تأثير الإجهاد الملحي



شكل (31) تأثير معاملات كلوريد الصوديوم في مستوى التعبير الجيني للجين ABA الافرع الخضرية النامية تحت إجهاد ملحي لنخيل التمر صنف البرحي قياساً بمعاملة السيطرة .

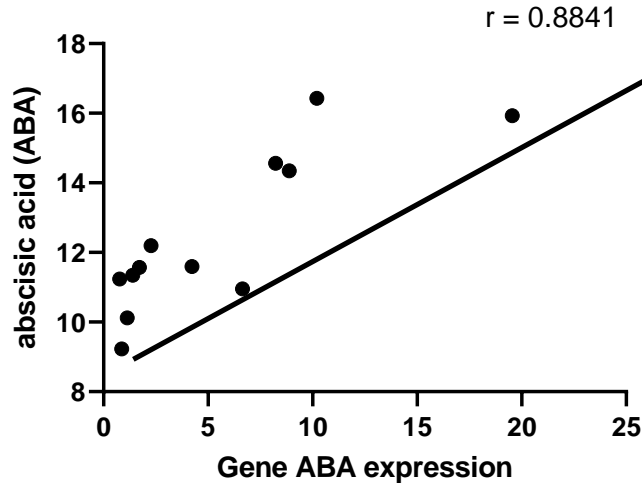
4-4-5-2-1: علاقة مستوى التعبير الجيني ABA بمؤشر مستويات حامض الأبيسيك (ABA) الأفرع الخضرية المتشكلة لنخيل التمر صنف البرحي تحت ظروف الشد الملحي .

يوضح الشكل معاملات الارتباط "بيرسون" بين التعبير الجيني للجين ABA ومستويات الحامض الأميني الأبيسيك حيث جاءت العلاقة طردية و معنوية قوية بأعلى معامل ارتباط بقيمة (0.88) وبدلالة إحصائية عند مستوى معنوي (0.01) بين مستوى زيادة التعبير الجيني Fold change للجين ABA ومستويات حامض الأبيسيك (ABA) في جميع معاملات كلوريد الصوديوم الأفرع الخضرية المتشكلة تحت ظروف الإجهاد الملحي (الشكل 32).

حامض الأبيسيك هو عبارة عن sesquiterpenoid(C15) يتم تصنيعه في النباتات عبر مسار غير مباشر باستخدام سلائف الكاروتينويد في الكاروتينات النباتية ومعظم تفاعلات البناء الحيوي له تتم في البلاستيدات وله أيضا مسار مباشر في تصنيعه عن طريق xanthophylls zeaxanthin , violaxanthin وأيضاً neoxanthin وقد اشارت الدراسات السابقة إلى دوره الاساسي في تنظيم نمو وتطور النباتات وتكيفها إزاء الضغوط البيئية المختلفة إذ لوحظ أن عملية التعبير الجيني التفاضلي تزداد مع زيادة تلك الإجهادات وكذلك يصاحبها ارتفاع في مستويات هرمون الأبيسيك (Ren et al., 2010)

بينت الدراسات السابقة أن جينات ABA تشفر إلى الأنزيمات الخاصة بتخليق الحويي لحامض الأبيسيك عند تعرض النبات إلى الإجهاد الملحي وأن هذه الجينات تكون متداخلة ومتناسقة مع العديد من الجينات الدفاعية في تكيف النباتات إلى الملوحة وأن جينات ABA يعبر عنها في ظروف الشد الملحي بأضعاف كبيرة عن تلك التي تنمو تحت ظروف طبيعية (North et al., 2007) (Barrero et al., 2006).

وبناء على ما تقدم تبين أن معاملات كلوريد الصوديوم وبالتراكيز العالية حفزت الاستجابة لمقاومة تراكيم الايونات السامة من خلال تفعيل جينات ABA التي ارتبطت بعلاقة طردية مع مستويات ABA في البراعم وأن هذه الزيادة المرتفعة في مستويات التعبير الجيني للجين الهدف يمكن ان تفسر على تكيف البراعم للنمو في ظروف الإجهاد الملحي.



شكل (32): العلاقة الخطية بين مستوى التعبير الجيني للجين ABA ومستوى تركيز حامض الابسيسيك (ABA) في الافرع الخضرية نخيل التمر صنف البرحي تحت ظروف الإجهاد الملحي

4-4-5-3: جين PROLINE TRANSPORTER 2 (PROts)

يوضح (الجدول -24) و(الشكل -33) التعبير الجيني للجين PROts في الافرع الخضرية المتشكلة تحت ظروف شد ملحي لنخيل التمر صنف البرحي وجود فروقات معنوية في معاملات الدراسة للجين الهدف بزيادة تركيز كلوريد الصوديوم في أوساط النمو إذ سجلت المعاملة NaCl200 مليون أعلى تعبير جيني بلغ (17.80) ضعفاً عما في معاملة السيطرة التي سجل قيمة التعبير الجيني فيها (1.00) كما سجلت المعاملة ذات التركيز 150 ملي.مولار تفوقاً معنوياً بحيث بلغ مستوى التعبير الجيني (10.11) ضعفاً قياساً بمعاملة المقارنة وان المعاملات ذات التركيز (25، 50، 100) مليون من كلوريد الصوديوم سجلت مستويات معنوية في زيادة كمية التعبير الجيني وبمقدار (1.45، 3.85، 2.59) ضعفاً عما في معاملة السيطرة

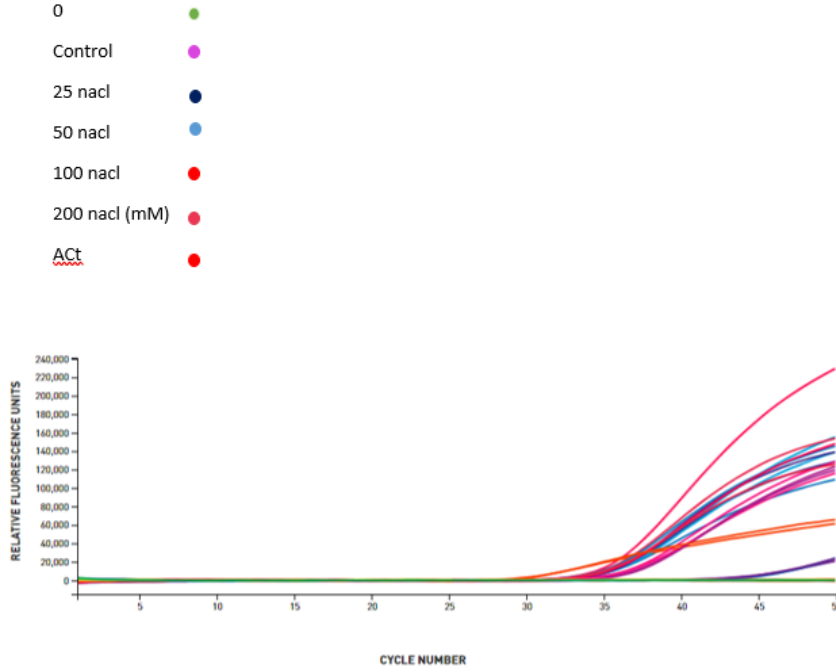
ويوضح (الشكل -34) مستويات التعبير الجيني للجين PROts للبراعم المتشكلة والنامية تحت ظروف شد ملحي لصنف النخيل التمر البرحي تسجيل معاملات التراكيز المرتفعة (200، 150، 100 مليون)

من كلوريد الصوديوم ارتفاعاً Upregulation معنوياً واضحاً في مستوى التعبير الجيني قياساً بمعاملة السيطرة "غير الملحية" والمعاملات ذات التراكيز المنخفضة من كلوريد الصوديوم التي سجلت مستوى منخفضاً Downregulation في قيم Fold change للتعبير الجيني.

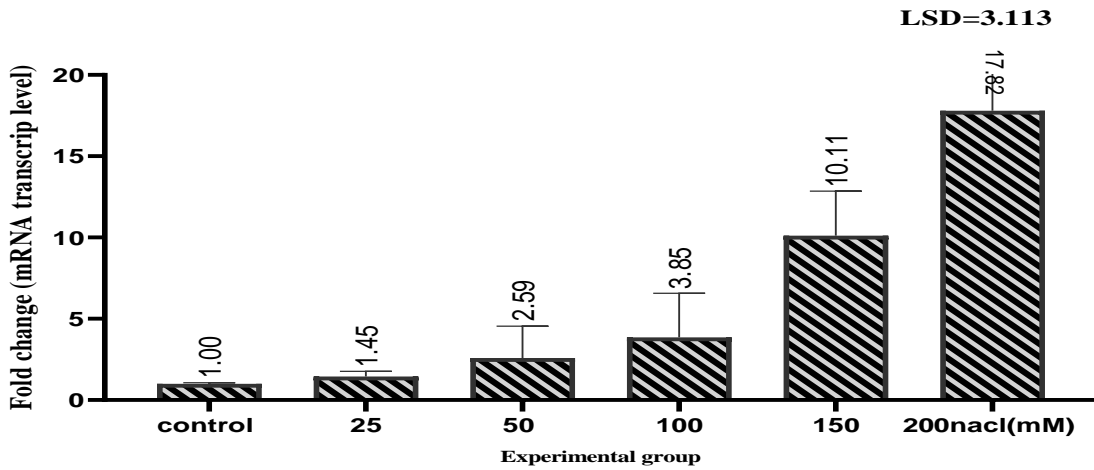
جدول(24): التعبير الجيني للجين PROts باستخدام طريقة (2^{-ΔΔct} livak method) الأفرع الخضرية لنخيل التمر صنف البرحي

| Mean±St.Error | Fllod change 2 ^{-ΔΔct} | ΔΔct | control ^{Δct} | test ^{Δct} | ACTct | PROts ct | معاملات كلوريد الصوديوم (mM) |
|---------------|------------------------------------|-------|------------------------|---------------------|-------|-------------|---------------------------------|
| 1.00±0.20 | 0.96 | 0.06 | 0.89 | 0.95 | 33.12 | 34.07 | المعاملة القياسية(0) |
| | 1.04 | -0.06 | 0.89 | 0.83 | 33.22 | 34.05 | المعاملة القياسية(0) |
| 1.45±0.13 | 1.22 | -0.29 | 0.89 | 0.6 | 33.16 | 33.76 | Nacl-25 |
| | 1.67 | -0.74 | 0.89 | 0.15 | 33.44 | 33.59 | Nacl-25 |
| 2.59±0.78 | 1.21 | -0.27 | 0.89 | 0.62 | 33.45 | 34.07 | Nacl-50 |
| | 3.97 | -1.99 | 0.89 | -1.1 | 33.31 | 32.21 | Nacl-50 |
| 3.85±1.08 | 1.93 | -0.95 | 0.89 | -0.06 | 33.3 | 33.24 | Nacl-100 |
| | 5.78 | -2.53 | 0.89 | -1.64 | 33.02 | 31.38 | Nacl-100 |
| 10.11±1.09 | 12.04 | -3.59 | 0.89 | -2.7 | 33.92 | 31.22 | Nacl-150 |
| | 8.17 | -3.03 | 0.89 | -2.14 | 33.77 | 31.63 | Nacl150 |
| 17.80±1.38 | 15.35 | -3.94 | 0.89 | -3.05 | 33.67 | 30.62 | Nacl-200 |
| | 20.25 | -4.34 | 0.89 | -3.45 | 33.05 | 29.6 | Nacl-200 |

±تمثل المتوسطات معدل مكررين متبوعة بقيم الانحراف المعياري مستوى الاحتمال 0.5%



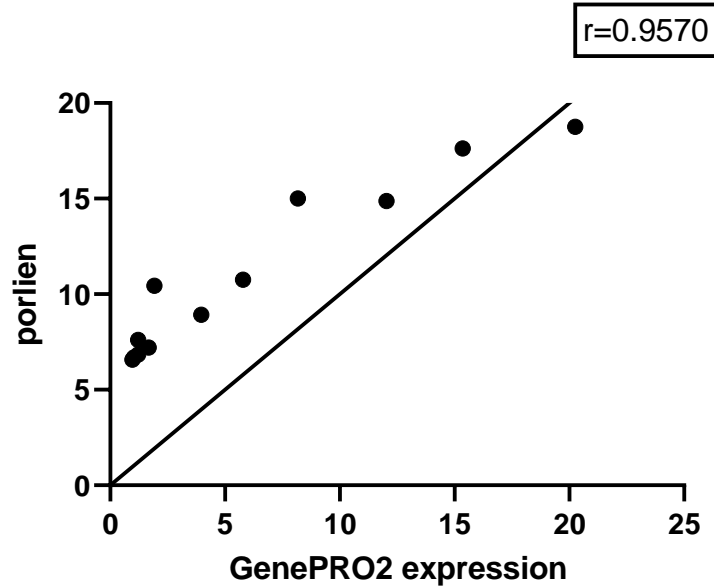
شكل (33): منحنيات التغير التضاعفي لكمية التعبير الجيني في فحص qRT-PCR للجين PROts الافرع الخضرية نخيل التمر صنف البرحي النامية تحت تأثير الإجهاد الملحي



شكل (34) تأثير معاملات كلوريد الصوديوم في مستوى التعبير الجيني للجين PROts2 الافرع الخضرية النامية تحت إجهاد ملحي لنخيل التمر صنف البرحي قياساً بمعاملة السيطرة .

4-4-5-3-1: علاقة مستوى التعبير الجيني PRots بمؤشر مستويات الحامض الأميني البرولين (prolien) الافرع الخضرية المتشكلة لنخيل التمر صنف البرحي تحت ظروف الشد الملحي

تشير النتائج المتحصل عليها إلى أن معاملات الارتباط "بيرسون" بين التعبير الجيني للجين PRots ومستويات الحامض الأميني البرولين حيث جاءت بعلاقة طردية معنوية قوية بأعلى معامل ارتباط بقيمة (0.9871) وبدلالة إحصائية عند مستوى معنوي (0.01) بين مستوى زيادة التعبير الجيني Fold change للجين Pro2 ومستويات حامض البرولين في جميع معاملات كلوريد الصوديوم للبراعم المتشكلة تحت ظروف الإجهاد الملحي (شكل:35).



شكل(35): العلاقة الخطية بين مستوى التعبير الجيني للجين PRO2 ومستوى تركيز الحامض الأميني البرولين Proline في الافرع الخضرية نخيل التمر صنف البرحي تحت ظروف الإجهاد الملحي

المواد المذابة العضوية التي تتراكم بتراكيز عالية في سيتوبلازم الخلية استجابت للإجهاد اللاأحيائي من دون التدخل في عملية التمثيل الغذائي الأولية يتم تصنيفها على أنها مواد مذابة "متوافقة" وأفضل مواد متوافقة والمعروفة في النباتات هي البرولين والجليسين وغيرها ان عملية ضبط المواد المذابة التي تؤدي

دورها الوقائي أثناء الإجهادات المختلفة يتم ضبط وظيفتها بنطاق متعدد من الآليات المتداخلة في الخلية والتي ينتج عنها التعديل التناضحي وحماية الهيكل الخلوي والتنظيم الخلوي (Yancey, 2005)

أن الأنزيم الرئيسي لبناء البرولين هو Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase (P5CS) يتم ترميز هذا الأنزيم بواسطة جينين منظمين تفاضلياً في العديد من النباتات وقد أشارت الدراسات السابقة إلى أن التعبير الجيني للجين PROts في نباتات الأريديوسيا Arabidopsis وبنجر السكر suger beet والطماطة وأيضاً في نبات الشعير barley يشترك مع مجاميع جينية "ناقلات الأحماض الأمينية" في حماية النبات وتفعيل الاستجابة ضد الشدود المختلفة (Fujiwara et al., 2010) (Yamada et al., 2009)

وأظهرت دراسة (Lehmann et al., 2011) أن الإجهاد الملحي يزيد من مستويات الرنا المرسال mRNA في جذور نباتات الشعير كما لاحظوا زيادة في التعبير الجيني للجين Prots وتراكم في مستويات البرولين تحت ظروف الإجهاد

وبناءً على ما تقدم تبين أن تحفيز الاستجابة التكيفية للبراعم النامية تحت شد ملحي قد عبر عنها بزيادة في مستويات التعبير الجيني للجين Prots والتي ارتبطت بعلاقة قوية مع التراكم البرولييني الحاصل في البراعم النامية تحت ظروف إجهاد ملحي ومما يجب الإشارة إليه ان هذه الزيادة في التعبير كانت تفاضلية ومنظمة مع جينات هرمون التوتر ABA

4-4-5-4: جين PIP1

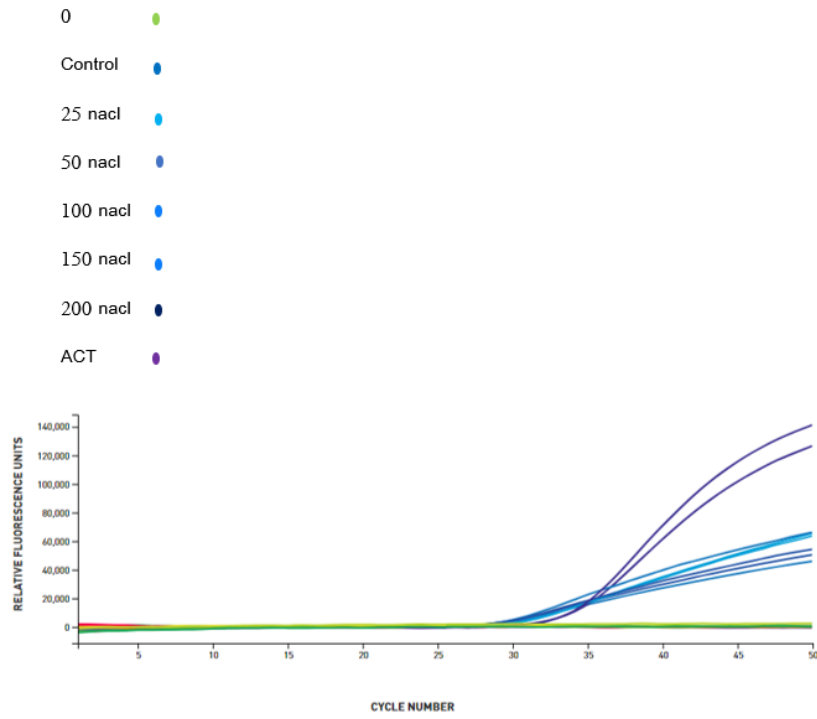
يوضح (جدول -25) و(الشكل-36) التعبير الجيني للجين PIP1 في الأفرع الخضرية المتشكلة تحت ظروف شد ملحي لنخيل التمر صنف البرحي زيادة في مستوى التعبير الجيني تحققت في المعاملة 200 مايكرومول من كلوريد الصوديوم التي سجلت 6.87 ضعفاً قياساً بالمعاملة القياسية "غير الملحية" والتي حققت مستوى تعبير بلغ 1.04 وبفارق معنوي عند مستوى ($P < 0.05$) وسجلت المعاملتان ذات التراكيز 100 و150 مايكرومول زيادة في التعبير الجيني بلغت 2.19 و2.23 ضعفاً عن المعاملة القياسية في حين أن مستوى التعبير عن الجين PIP في المعاملة ذات التركيز 25 مايكرومول كان منخفضاً 0.80 قياساً بالمعاملة القياسية مما يشير إلى تحسس النبات إلى كلوريد الصوديوم بدءاً من التركيز 50 وإلى التراكيز المرتفعة

ويوضح (الشكل -37) مستويات التعبير الجيني للجين PIP1 الأفرع الخضرية المتشكلة والنامية تحت ظروف شد محلي لصنف النخيل التمر البرحي تسجيل معاملات التراكيز (100، 150، 200) من كلوريد الصوديوم ارتفاعاً Upregulation معنوياً واضحاً في مستوى التعبير الجيني قياساً بمعاملة السيطرة "غير الملحية" والمعاملات ذات التراكيز المنخفض من كلوريد الصوديوم التي سجلت مستوى منخفضاً Downregulation في قيم Fold change للتعبير الجيني. مما يشير إلى أن استجابة التعبير الجيني للجين PIP1 قد تحققت في المستويات المنخفضة بشكل متدرج ثم زاد الإفراط بالتعبير الجيني بزيادة مستويات كلوريد الصوديوم الجين PIP1

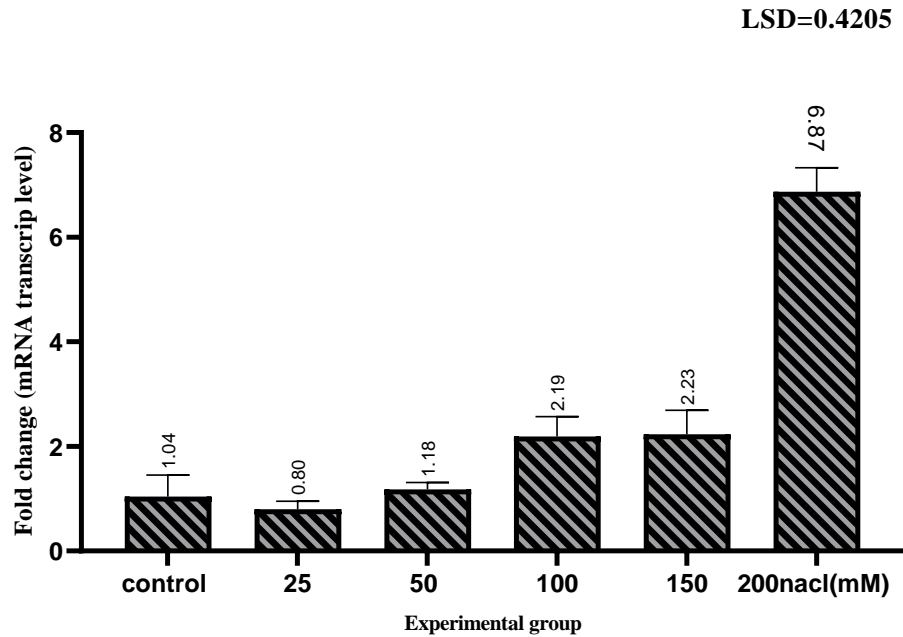
جدول(25): التعبير الجيني للجين PIP1 باستخدام طريقة (2^{-ΔΔct} livak method) الأفرع الخضرية لنخيل التمر صنف البرحي

| Mean±St.Error | Fllod change 2 ^{-ΔΔct} | ΔΔct | control ^{Δct} | test ^{Δct} | ACTct | PIP1 ct | معاملات كلوريد الصوديوم (mM) |
|---------------|------------------------------------|-------|------------------------|---------------------|-------|---------|---------------------------------|
| 1.04±0.16 | 1.33 | -0.41 | 2.48 | 2.07 | 30.1 | 32.17 | المعاملة القياسية(0) |
| | 0.75 | 0.41 | 2.48 | 2.89 | 30 | 32.89 | المعاملة القياسية(0) |
| 0.80±0.06 | 0.91 | 0.14 | 2.48 | 2.62 | 30.1 | 32.72 | Nacl-25 |
| | 0.70 | 0.51 | 2.48 | 2.99 | 30.02 | 33.01 | Nacl-25 |
| 1.18±0.05 | 1.09 | -0.12 | 2.48 | 2.36 | 30.04 | 32.4 | Nacl-50 |
| | 1.27 | -0.34 | 2.48 | 2.14 | 30.11 | 32.25 | Nacl-50 |
| 2.19±0.15 | 1.92 | -0.94 | 2.48 | 1.54 | 30.1 | 31.64 | Nacl-100 |
| | 2.46 | -1.3 | 2.48 | 1.18 | 30.1 | 31.28 | Nacl-100 |
| 2.23±0.18 | 2.55 | -1.35 | 2.48 | 1.13 | 30 | 31.13 | Nacl-150 |
| | 1.91 | -0.93 | 2.48 | 1.55 | 30.11 | 31.66 | Nacl150 |
| 6.87±0.03 | 6.92 | -2.79 | 2.48 | -0.31 | 30.21 | 29.9 | Nacl-200 |
| | 6.82 | -2.77 | 2.48 | -0.29 | 30.11 | 29.82 | Nacl-200 |

±تمثل المتوسطات معدل مكررين متبوعة بقيم الانحراف المعياري مستوى الاحتمال 0.5%



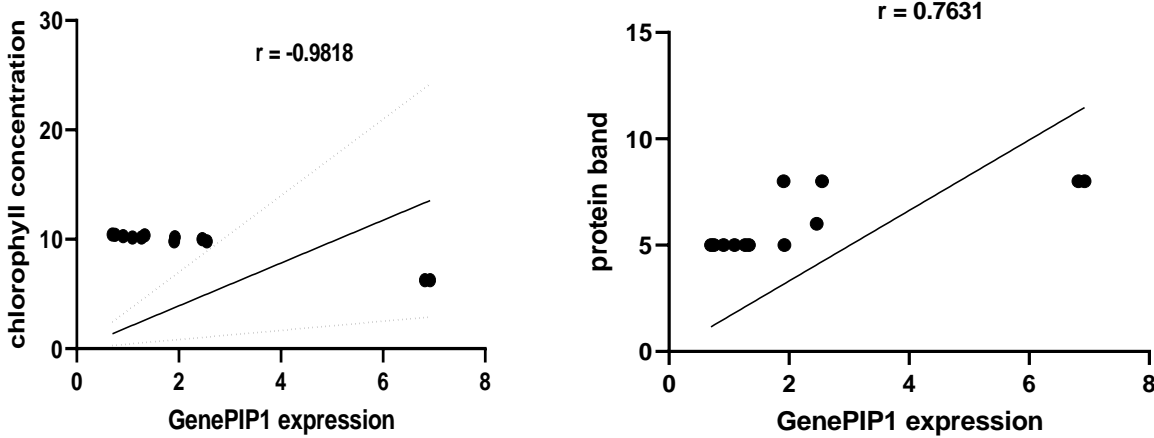
شكل(36): منحنيات التغير التضاعفي لكمية التعبير الجيني في فحص qRT-PCR للجين PIP1 في الافرع الخضرية
 نخيل التمر صنف البرحي ومعاملات كلوريد الصوديوم Nacl (mM)



شكل (37) تأثير معاملات كلوريد الصوديوم في مستوى التعبير الجيني للجين PIP1 الافرع الخضرية النامية تحت إجهاد
 ملحي لنخيل التمر صنف البرحي قياساً بمعاملة السيطرة .

4-4-5-4-1: علاقة مستوى التعبير الجيني PIP1 بمؤشرات الفصل البروتيني وتركيز الكلوروفيل الكلي الافرع الخضرية المتشكلة لنخيل التمر صنف البرحي تحت ظروف الشد الملحي

يوضح الشكل معاملات الارتباط "بيرسون" بين التعبير الجيني للجين PIP1 ومؤشر نواتج البروتينات المرحلة على هلام SDS-PAGE وكفاءة التمثيل الضوئي حيث جاءت العلاقة طردية معنوية قوية بأعلى معامل ارتباط بقيمة (0.7631) وبدلالة إحصائية عند مستوى معنوي (0.01) بين مستوى زيادة التعبير الجيني Fold change للجين PIP1 وعدد الحزم في حين أن العلاقة بين مستوى زيادة التعبير الجيني Fold change للجين PIP1 وكفاءة التمثيل الضوئي كانت عكسية سالبة وبمعامل ارتباط بلغ (-0.9818) في جميع معاملات كلوريد الصوديوم للبراعم المتشكلة تحت ظروف الإجهاد الملحي (الشكل:38) .



شكل(38): العلاقة الخطية بين مستوى التعبير الجيني للجين PIP1 وعدد حزم البروتين الكلية وكفاءة التمثيل الضوئي للافرع الخضرية المتشكلة لنخيل التمر صنف البرحي

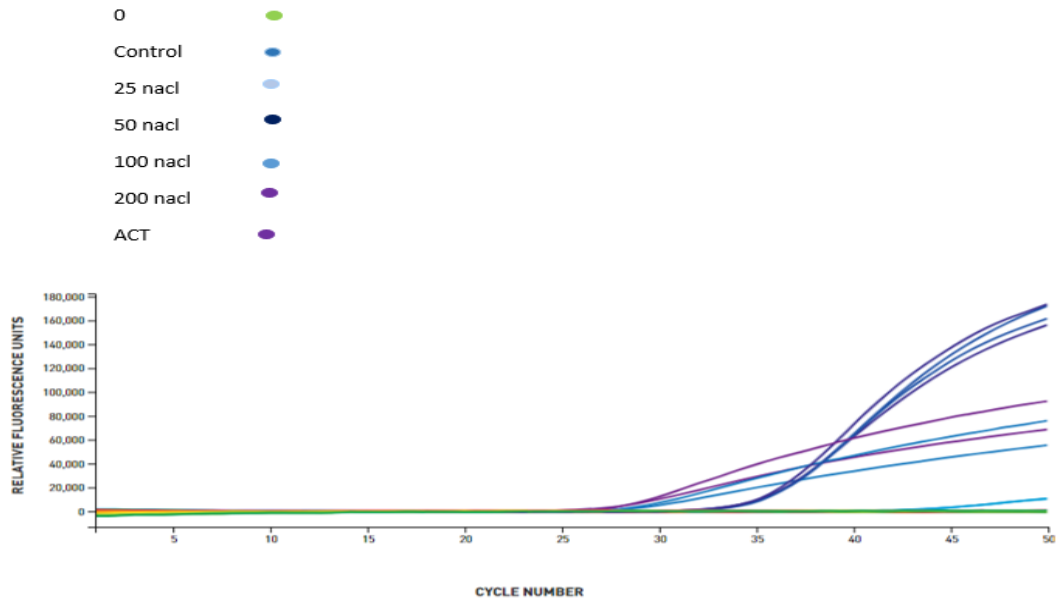
يوضح (الجدول -26) و(الشكل -39) التعبير الجيني للجين PIP2 في الافرع الخضرية المتشكلة تحت ظروف شد ملحي لنخيل التمر صنف البرحي زيادة في مستوى التعبير الجيني تحققت في المعاملة مليمول 200 من كلوريد الصوديوم التي سجلت 18.14 ضعفاً قياساً بالمعاملة القياسية "غير الملحية" والتي حققت مستوى تعبير بلغ 1.54 وبفارق معنوي عند مستوى ($P < 0.05$) وسجلت المعاملتان ذات التراكيز مليمول 100 و 150 زيادة في التعبير الجيني بلغت 3.45 و 8.81 ضعفاً عن المعاملة القياسية . في حين أن مستوى التعبير عن الجين PIP2 في المعاملة ذات التركيز مليمول 25 كان منخفضاً 0.81 قياساً بالمعاملة القياسية مما يشير إلى تحسس النبات إلى كلوريد الصوديوم بدءاً من التركيز مليمول 50 الذي حقق مستوى ارتفاع بلغ 4.14 والى التراكيز المرتفعة

ويوضح (الشكل -40) مستويات التعبير الجيني للجين PIP2 لافرع الخضرية المتشكلة والنامية تحت ظروف شد محلي لصنف النخيل التمر البرحي تسجيل معاملات التراكيز (100 و 150 و 200) مليمول من كلوريد الصوديوم ارتفاعاً Upregulation معنوياً واضحاً في مستوى التعبير الجيني قياساً بمعاملة السيطرة "غير الملحية" والمعاملات ذات التراكيز المنخفض من كلوريد الصوديوم التي سجلت مستوى منخفضاً Downregulation في قيم Fold change للتعبير الجيني. مما يشير إلى أن استجابة التعبير الجيني للجين PIP2 قد تحققت في المستويات المنخفضة بشكل متدرج ثم زاد الافراط بالتعبير الجيني بزيادة مستويات كلوريد الصوديوم الجين PIP2

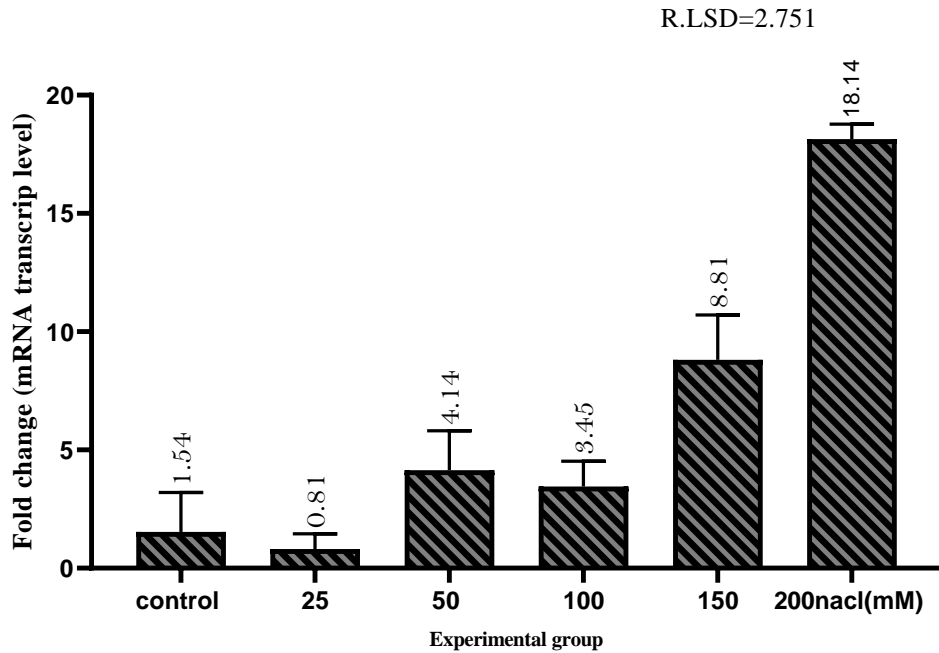
جدول(26): التعبير الجيني للجين PIP2 باستخدام طريقة (2^{-ΔΔct} livak method) الأفرع الخضرية لنخيل التمر صنف البرحي

| Mean±St.Error | Fllod change 2 ^{-ΔΔct} | ΔΔct | control ^{Δct} | test ^{Δct} | ACTct | PIP2 ct | معاملات كلوريد الصوديوم (mM) |
|---------------|------------------------------------|-------|------------------------|---------------------|-------|---------|---------------------------------|
| 1.54± 0.66 | 0.37 | 1.44 | 2.53 | 3.97 | 30.1 | 34.07 | المعاملة القياسية(0) |
| | 2.71 | -1.44 | 2.53 | 1.09 | 30 | 31.09 | المعاملة القياسية(0) |
| 0.81± 0.26 | 0.36 | 1.48 | 2.53 | 4.01 | 30.1 | 34.11 | Nacl-25 |
| | 1.27 | -0.34 | 2.53 | 2.19 | 30.02 | 32.21 | Nacl-25 |
| 4.14± 1.06 | 2.25 | -1.17 | 2.53 | 1.36 | 30.04 | 31.4 | Nacl-50 |
| | 6.02 | -2.59 | 2.53 | -0.06 | 30.11 | 30.05 | Nacl-50 |
| 3.45± 1.23 | 5.62 | -2.49 | 2.53 | 0.04 | 30.1 | 30.14 | Nacl-100 |
| | 1.27 | -0.35 | 2.53 | 2.18 | 30.1 | 32.28 | Nacl-100 |
| 8.81± 1.59 | 11.63 | -3.54 | 2.53 | -1.01 | 30 | 28.99 | Nacl-150 |
| | 5.98 | -2.58 | 2.53 | -0.05 | 30.11 | 30.06 | Nacl150 |
| 18.14± 0.43 | 18.90 | -4.24 | 2.53 | -1.71 | 30.21 | 28.5 | Nacl-200 |
| | 17.39 | -4.12 | 2.53 | -1.59 | 30.11 | 28.52 | Nacl-200 |

±تمثل المتوسطات معدل مكررين متبوعة بقيم الانحراف المعياري مستوى الاحتمال 0.5%



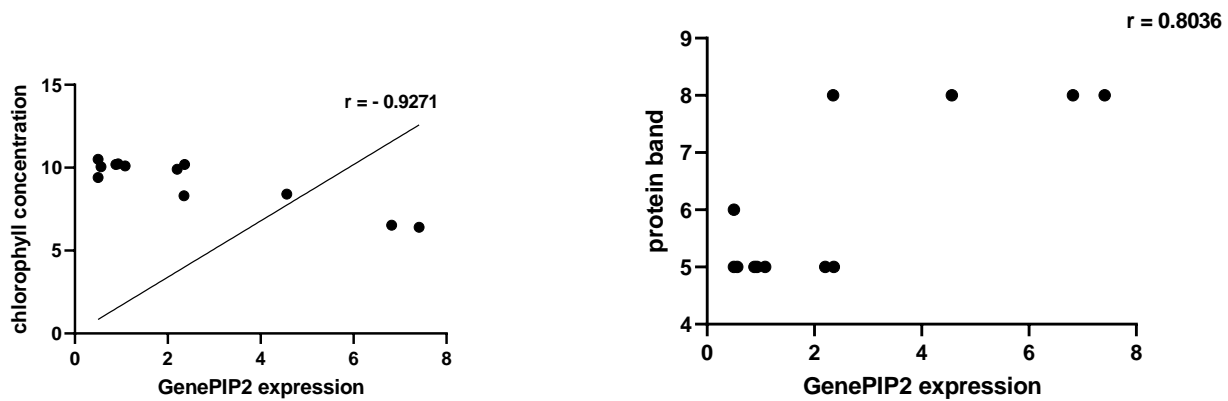
شكل(39): منحنيات التغير التضاعفي لكمية التعبير الجيني في فحص qRT-PCR للجين PIP2 الافرع الخضرية نخيل التمر صنف البرحي النامية تحت تأثير الإجهاد الملحي



شكل (40) تأثير معاملات كلوريد الصوديوم في مستوى التعبير الجيني للجين PIP2 الافرع الخضرية النامية تحت إجهاد ملحي لنخيل التمر صنف البرحي قياساً بمعاملة السيطرة .

4-4-5-5-1: علاقة مستوى التعبير الجيني PIP2 بمؤشرات الفصل البروتيني وتركيز الكلوروفيل الكلي الافرع الخضرية المتشكلة لنخيل التمر صنف البرحي تحت ظروف الشد الملحي

يوضح الشكل معاملات الارتباط "بيرسون" بين التعبير الجيني للجين PIP2 ومؤشر نواتج البروتينات المرحلة على هلام SDS-PAGE وكفاءة التمثيل الضوئي حيث جاءت العلاقة طردية معنوية قوية بأعلى معامل ارتباط بقيمة (0.8036) وبدلالة إحصائية عند مستوى معنوي (0.01) بين مستوى زيادة التعبير الجيني Fold change للجين PIP2 وعدد الحزم في حين أن العلاقة بين مستوى زيادة التعبير الجيني Fold change للجين PIP2 وكفاءة التمثيل الضوئي كانت عكسية سالبة وبمعامل ارتباط بلغ (-0.9271) في جميع معاملات كلوريد الصوديوم للبراعم المتشكلة تحت ظروف الإجهاد الملحي (الشكل:41) .



شكل(41): العلاقة الخطية بين مستوى التعبير الجيني للجين PIP2 وعدد حزم البروتين الكلية وكفاءة التمثيل الضوئي الافرع الخضرية المتشكلة لنخيل التمر صنف البرحي

تتعرض النباتات إلى إجهادات لأحيائية مختلفة ولعل من بين أكثر الإجهادات تأثيراً على النخيل هي الإجهادات الناتجة من الملوحة وعلى الرغم من حقيقة أن النخيل يستطيع العيش في بيئات ملحية إلا أن تراكم أيونات الصوديوم والأيونات السامة الأخرى تشكل تحدياً حقيقياً لاستمرار النمو بالشكل الطبيعي لذا كان لابد من معرفة الآلية التي يقاوم بها النخيل الإجهادات والتي من شأنها أن توفر معلومات قيمة في تربية وتحسينها الأصناف الاقتصادية (Al-Abdoulhadi *et al.*, 2011).

تلجأ النباتات إلى تفعيل مسارات متعددة الجوانب عند تعرضها للشدود الملحية يسيطر على آلية تفعيل هذه المسارات مجموعة كبيرة جداً من الجينات والتي من بينها جينات الـ (Aquaporins(AQPS) التي وجد أنها تكون موجودة في tonoplast الخلية وفي الأغشية membranes وفي الشبكة الاندوبلازمية Endoplasmic reticulum وهي تشكل جزءاً متداخلاً من البروتينات ذات الوزن الجزيئي المنخفض الأساسية هي تنظم مسارات حركة الماء والمواد المذابة مثل الجليسرين وفي ظل الظروف المجهد للنبات فأنها تعمل على رفع مستوى استقرارية الأغشية كما وجد عند تعرض النباتات إلى الإجهادات فان كفاءة البناء الضوئي تتخفف ويزداد مستوى الصبغات النباتية الأخرى ويتم تخفيض لمستويات الطاقة المستخدمة هذا الأمر يتطلب من النباتات تفعيل مسارات تحافظ على نقل المياه وتوصيل ثنائي أكسيد الكربون في طاقة اقل مما عليه في الظروف الطبيعية ومن بين هذه المسارات تنشيط بروتينات "AQPS" التي تعمل في مستوى منخفض من الطاقة (Patankar *et al.*, Li *et al.*, 2016) 2018,

تم تأكيد وجود جينات AQPS في عدد من النباتات فقد حددت دراسة (Hachez *et al.*, 2008) نوعين من جينات AQPS هي (PIP1,PIP2) التي وجد أن مستوى mRNA يزداد في أوراق نبات الذرة المعرضة للاجهاد الجفاف وأشارت دراسة (Hachez *et al.*, 2012) إلى ارتفاع مستوى التعبير الجيني لجينات PIPs المسؤولة عن تحفيز بروتينات AQPS في النباتات الذرة المجهد قياساً بالنباتات التي لم تتعرض الى ظروف إجهاد ، وفي نبات الأرز وجد نوعان من جينات PIP1,PIP2 تشارك في تنظيم نقل الماء في الإجهادات الملحية وتشارك مع بروتينات Nod26-like intrinsic proteins(NIP) في زيادة مقاومة الشد الملحي (Liu *et al.*, 2013)

وفي أشجار نخيل التمر فقد بينت دراسة (Patankar *et al.*, 2019) عن وجود جينات PIP الذي يشفر الى مجموعة من البروتينات معظم وزنها الجزيئي كان 30.84 KDa وهي تنتمي إلى عائلة الاكوابورين QAPS في جينوم النخيل مقسمة في اربع مجاميع فرعية رئيسية وأشارت الدراسة السابقة أن الافراط في مستوى التعبير الجيني لجينات PIP تزداد في الأوراق وجذور وبذور النخيل النامية تحت شد ملحي وأن الاستراتيجية التي تتبعها النباتات من تقليل من البروتينات الناقلة للماء وزيادة التعبير عن البروتينات ذات الوزن الجزيئي المنخفض تعد من الآليات التي يتبعها النخيل للحفاظ على مستوى التمثيل الضوئي .

وبناء على ما تقدم تبين أن أيونات كلوريد الصوديوم مجهدة للبراعم النامية وأن هذا الإجهاد سبب في تفعيل استجابة النبات إلى النمو من خلال تفعيل جينات PIP1 وPIP2 المقاومة للإجهادات كما أن العلاقة بين زيادة عدد البروتينات ذات الوزن الجزيئي المنخفض جاءت بعلاقة طردية مع زيادة التعبير الجيني لهذا الجين وعكسية سالبة مع كفاءة التمثيل الضوئي.

4-4-5-6: جين PdMT2A

توضح نتائج (الجدول -27) و(الشكل -42) التعبير الجيني للجين PdMT2A في البراعم المتشكلة تحت ظروف إجهاد ملحي إلى زيادة في التعبير الجيني تحققت عند المعاملة 100مليمول من كلوريد الصوديوم التي بلغت 5.59 ضعفاً قياساً بمعاملة المقارنة "غير الملحية" التي كان مقدار التعبير الجيني عندها 1.00 وبفارق معنوي عند مستوى احتمال ($P < 0.05$) كما سجلت المعاملة 50 مليمول تفوقاً معنوياً قياساً بمعاملة المقارنة والمعاملات الأخرى التي حققت مستوى زيادة في كمية التعبير الجيني بلغ 3.68 وسجلت المعاملة 25مليمول مستوى زيادة طفيف في التعبير عن الجين PdMT2A بلغت 1.76 في حين أن المعاملات ذات التراكيز المرتفعة من كلوريد الصوديوم (100،200) مليمول حققت مستوى زيادة في كمية التعبير الجيني بلغ (2.85, 2.95) على التوالي

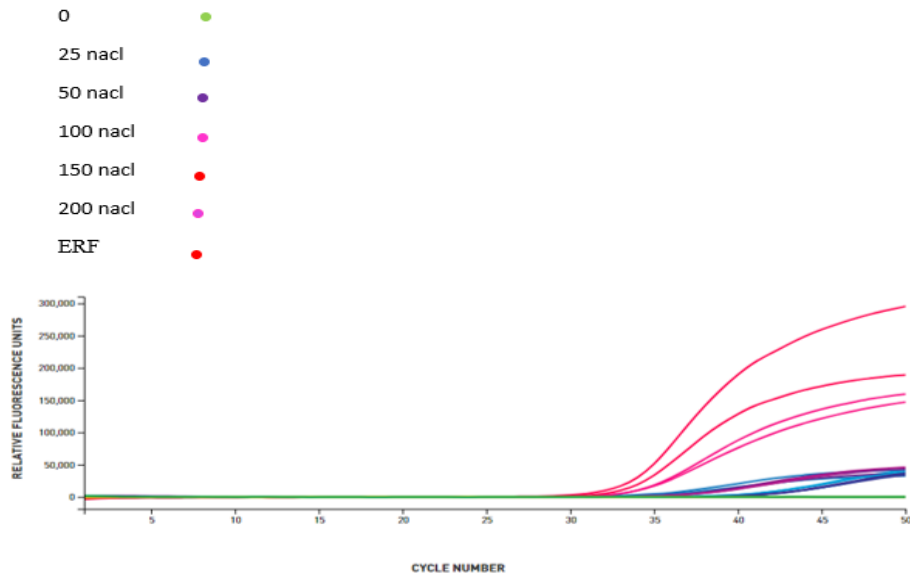
ويوضح (الشكل -43) مستويات الزيادة المتحققة في كمية التعبير الجيني للجين PdMT2A في براعم نخيل التمر صنف البرحي والمتشكلة تحت ظروف إجهاد ملحي إلى أن مستوى الزيادة كان مرتفعاً Upregulation في التراكيز (50و100) مليمول من كلوريد الصوديوم وبقيم flod change معنوية

عند مستوى مقارنة ($P>0.05$) في حين أن التراكيز (25 و150 و200) مليمول من كلوريد الصوديوم كانت قيم flod change قد سجلت مستوى منخفضاً Downregulation في كمية التعبير الجيني للجين PdMT2A المعبر عنه بمعاملات كلوريد الصوديوم وكما في (الشكل -43)

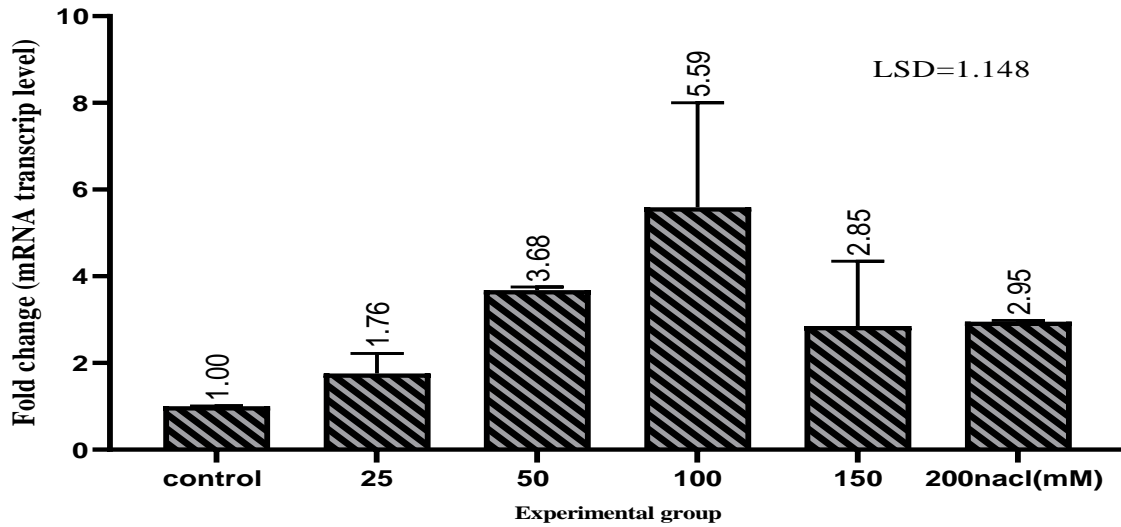
جدول (27): التعبير الجيني للجين PdMT2A باستخدام طريقة ($2^{-\Delta\Delta ct}$ livak method) الأفرع الخضرية لنخيل التمر صنف البرحي

| Mean±St.Error | Flod change $2^{-\Delta\Delta ct}$ | $\Delta\Delta ct$ | control Δct | test Δct | ACTct | PdMT2A ct | معاملات كلوريد الصوديوم (mM) المعاملة القياسية (0) المعاملة القياسية(0) |
|---------------|---------------------------------------|-------------------|---------------------|------------------|-------|--------------|---|
| 1.00±0.00 | 0.99 | 0.01 | 2.06 | 2.07 | 32.1 | 34.17 | المعاملة القياسية (0) |
| | 1.01 | -0.01 | 2.06 | 2.05 | 32.24 | 34.29 | المعاملة القياسية(0) |
| 1.76±0.18 | 1.43 | -0.52 | 2.06 | 1.54 | 32.18 | 33.72 | Nacl-25 |
| | 2.08 | -1.06 | 2.06 | 1 | 32.11 | 33.11 | Nacl-25 |
| 3.68±0.03 | 3.63 | -1.86 | 2.06 | 0.2 | 32.2 | 32.4 | Nacl-50 |
| | 3.73 | -1.9 | 2.06 | 0.16 | 32.09 | 32.25 | Nacl-50 |
| 5.59±1.36 | 3.18 | -1.67 | 2.06 | 0.39 | 32.25 | 32.64 | Nacl-100 |
| | 8.00 | -3 | 2.06 | -0.94 | 32.22 | 31.28 | Nacl-100 |
| 2.85±0.80 | 4.26 | -2.09 | 2.06 | -0.03 | 32.16 | 32.13 | Nacl-150 |
| | 1.43 | -0.52 | 2.06 | 1.54 | 32.12 | 33.66 | Nacl150 |
| 2.95±0.01 | 2.97 | -1.57 | 2.06 | 0.49 | 32.41 | 32.9 | Nacl-200 |
| | 2.93 | -1.55 | 2.06 | 0.51 | 32.31 | 32.82 | Nacl-200 |

±تمثل المتوسطات معدل مكررين متبوعة بقيم الانحراف المعياري مستوى الاحتمال 0.5%



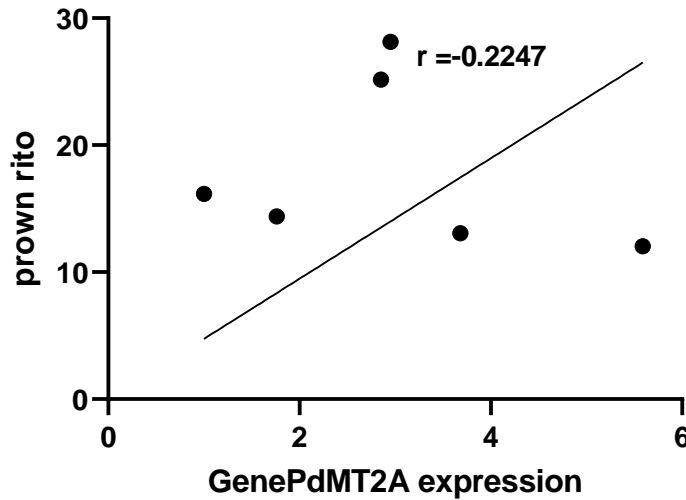
شكل (42): منحنيات التغير التضاعفي لكمية التعبير الجيني في فحص qRT-PCR للجين PdMT2A الأفرع الخضرية نخيل التمر صنف البرحي النامية تحت تأثير الإجهاد الملحي



شكل (43) تأثير معاملات كلوريد الصوديوم في مستوى التعبير الجيني للجين PdMT2A الأفرع الخضرية النامية تحت الإجهاد الملحي لنخيل التمر صنف البرحي.

4-4-5-6-1: علاقة مستوى التعبير الجيني PdMT2A ونسبة الاسوداد في الافرع الخضرية المتشكلة
لنخيل التمر صنف البرحي تحت ظروف الشد الملحي

يوضح الشكل معاملات الارتباط "بيرسون" بين التعبير الجيني للجين PdMT2A ومؤشر نسبة التلون البني الافرع الخضرية النامية تحت ظروف إجهاد ملحي إذ أن العلاقة كانت سالبة ضعيفة بلغت (-0.2247) وبدلالة إحصائية عند مستوى معنوي (0.01) بين مستوى زيادة التعبير الجيني Fold change للجين PdMT2A ونسبة التلون البني في جميع معاملات كلوريد الصوديوم للبراعم المتشكلة تحت ظل ظروف الإجهاد الملحي (الشكل:43) مما يشير إلى أن انخفاض التعبير الجيني لهذا الجيني أدى إلى زيادة نسبة الأسوداد في معاملات الدراسة.



شكل(43): العلاقة الخطية بين مستوى التعبير الجيني للجين PdMT2A ونسبة الاسوداد في الافرع الخضرية المتشكلة
لنخيل التمر صنف البرحي تحت شد ملحي

النباتات التي تعيش في ظروف ملحية تتبع آليات دقيقة للتكيف مع ظروف الشد الملحي الناتج وعلى الرغم أن الآليات في باقي النباتات قد تم توضيحها إلا أنها لا زالت غير مفهومة في نخيل التمر للكثير من الجينات التي تشارك في حث المقاومة وقد أشارت دراسة (Xiao et al., 2019) إلى أن النخيل التي تنمو تحت ظروف إجهاد ملحي وبعد مرحلة الأنبات يتوقف نمو الأعضاء وتطورها نتيجة انخفاض في كمية التعبير الجيني للجينات المرتبطة بزيادة النمو وتخفيض التعبير عن الهرمونات الاستطالة النبات وبالمقابل يزداد التعبير الجيني للجينات التي تحفز إنتاج الهرمونات والأحماض الأمينية والبروتينات ذات الوزن الجزيئي المنخفض والتي تؤدي إلى زيادة مقاومة النخيل لظروف الشد الملحي والحفاظ على أدنى مستوى من النمو

كما أشارت دراسة (Hazzouri et al., 2020) إلى إن تعرض نباتات النخيل الى مستويات ملحية أدى إلى تحفيز تخليق بروتينات المضادة الأكسدة والشبيه metallothionein والتي لها وزن جزيئي منخفض 7kDa يتم تحفيزها عن طريق رفع مستوى التعبير الجيني للجين PdMT2A وفي نباتات الذرة (Uzarowska et al., 2009) سجلت وجود نوعان من جينات PdMT2A التي تحفز إنتاج بروتينات شبيه ميتالوثيونين والتي تشارك في تقليل من الأثار الضارة للجذور الحرة (ROS)

تبين من نتائج الدراسة الحالية أن جين PdMT2A قد زادت مستويات التعبير الجيني عنه في التراكيز 100مليمول والتركيز 50مليمول كما أن التعبير لجيني له في التراكيز العالية كانت ضعفا واحد عن البراعم غير المجهد وربما يرجع السبب في انخفاض التعبير الجيني في التراكيز العالية إلى مستوى تنسيق جيني بين جينات PdMT2A وجينات مشابهه لها في الآليات وهذا يتفق مع نتائج الفصل البروتيني التي لوحظ فيها وجود بروتينات بوزن جزيئي منخفض في جميع المعاملات إلا أن التراكيز العالية سجلت تكوين حزميتين من البروتينات في التراكيز المرتفعة.

5:6: الاستنتاجات والتوصيات

1- ان استخدام التركيز (100 مليمول) من كلوريد الصوديوم له دور في تحفيز استجابة الافرع الخضرية الخضرية لنخيل التمر، تلاه المعاملة 25 فلوروكلايسينول الذي كان له تاثير معنوي في معظم الصفات الخضرية

2- لوحظ إن زيادة التركيز المستخدم من كلوريد الصوديوم والفلورغلوسينولفي وسطي التضاعف والاستطالة أدت إلى التأثير السلبي في معظم الصفات الخضرية .

3- أثبتت الدراسات البايوكيميائية للبراعم الناتجة عن المعاملة بكلوريد الصوديوم وبالتراكيز المختلفة قد أدى إلى زيادة تراكم الحامض الأميني البرولين والأبسيسك وزيادة عالية المعنوية من المركبات الكربوهيدراتية ومؤثراً بشكل سلبي في معدلات الكلوروفيل والأوكسين ، كما أن المعاملة بالمركب الفلورغلوسينول حفزت تراكم البرولين والأبسيسك في التراكيز العالية مؤدية إلى توقف النمو في التركيز 100مليمول في مرحلة الاستطالة ، ولم يكن للإضافة المشتركة الفلورغلوسينول وكلوريد الصوديوم تاثير معنوي في مستويات الكلوروفيل الكلي في حين اثرت بشكل ايجابي المعنوية عند التركيز 25مايكرومول

4- أثبتت نتائج الترحيل الهيئة البروتينة للبروتينات الكلية من البراعم لصنف النخيل التمر البرحي إن إضافة كلوريد الصوديوم بالتراكيز المنخفضة والفلورغلوسينول لم تحدث تغييراً في نمط ترحيل البروتينات والتي كانت متطابقة مع معاملة السيطرة ، في حين أن الزيادة في تركيز كلوريد الصوديوم 200مليمول والفلورغلوسينول 100مايكرومول أدت إلى ظهور حزم جديدة وسجلت اختفاءً لبعض الحزم الاخرى .

5- أشارات نتائج تحليل مؤشر الRAPD إلى وجود استقرار في المادة الوراثية وتشكل أنماط أحادية التشكل الوراثي اثناء ترحيل الحمض النووي بين عينات الدراسة ومعاملة المقارنة ولم يلحظ وجود تعدد شكلي في البادئات المستخدمة، ومن نتائج تضخيم البادئات (OPE-8,OPD-10,OPE-19) تبين زيادة تركيز كلوريد الصوديوم من 150 إلى 200مليمول أدى إلى غياب حزمة جزيئية اثناء التضخيم

التي كانت ظاهرة في المعاملات الأخرى مما تسببت في احداث تغيرات طفيفة في نسبة التشابه الوراثي وعلى الرغم من ذلك بقي التباين الوراثي بين البراعم المعاملة ب200 مليمول ومعاملة المقارنة منخفضاً ولم تكن هنالك تباينات بين التراكيز (25 و50 و100 مليمول) والمعاملة المحايدة .

6- اتفقت نتائج التعبير الجيني مع نتائج البايوكيميائية ونتائج ترحيل البروتينات على هلام SDS للبراعم النامية على أوساط ملحية ، إذ لوحظ ارتفاع مستويات التعبير الجيني للجينات (STKs و PROTs و PIP1,2) بزيادة تركيز كلوريد الصوديوم التي تحفز إلى تخليق بروتينات ذات وزن جزيئي منخفض كما لوحظ ارتفاع مستويات التعبير الجيني للجين ABA الذي بلغ أعلى مستوى له في معاملة 200 مليمول من كلوريد الصوديوم ، أما بالنسبة للجين PdMT2A فلوحظ استقرار التعبير الجيني في التراكيز المنخفضة ثم ارتفع مستوى الزيادة عند التركيز 100 مايكرومول ثم بعد ذلك أخذت مستويات التعبير الجيني لهذا الجين بالتراجع بزيادة تركيز الملح مما يشير إلى توقف عمليات النمو عند التعرض إلى الإجهاد الملحي لفترة طويلة

6:7: التوصيات

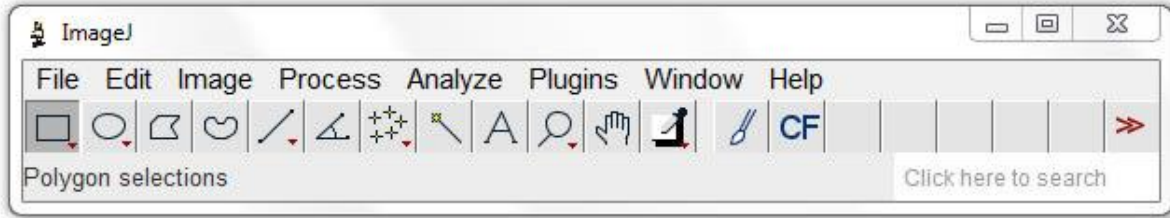
اعتماداً على النتائج التي توصلت اليها الدراسة نوصي بما يأتي:

- 1- إمكانية اعتماد التراكيز المنخفضة من كلوريد الصوديوم والفلورغلوسينول في إكثار نخيل التمر صنف البرحي في مرحلة التضاعف والاستطالة
- 2- اعتماد مؤشرات الRAPD في دراسة التطابق الوراثي والاستقرار الوراثي في زراعة الأنسجة النباتية
- 3- إمكانية استخدام الجينات (STKs و PROTs و ABA و PIP1,2 و PdM2TA) كجينات تحفز مقاومة البراعم للإجهاد الملحي
- 4- إجراء دراسة جزيئية لجينات الدراسة الحالية وتحديد البروتينات التي يتم تخليقها عند التعرض لظروف الشد الملحي

الملاحق

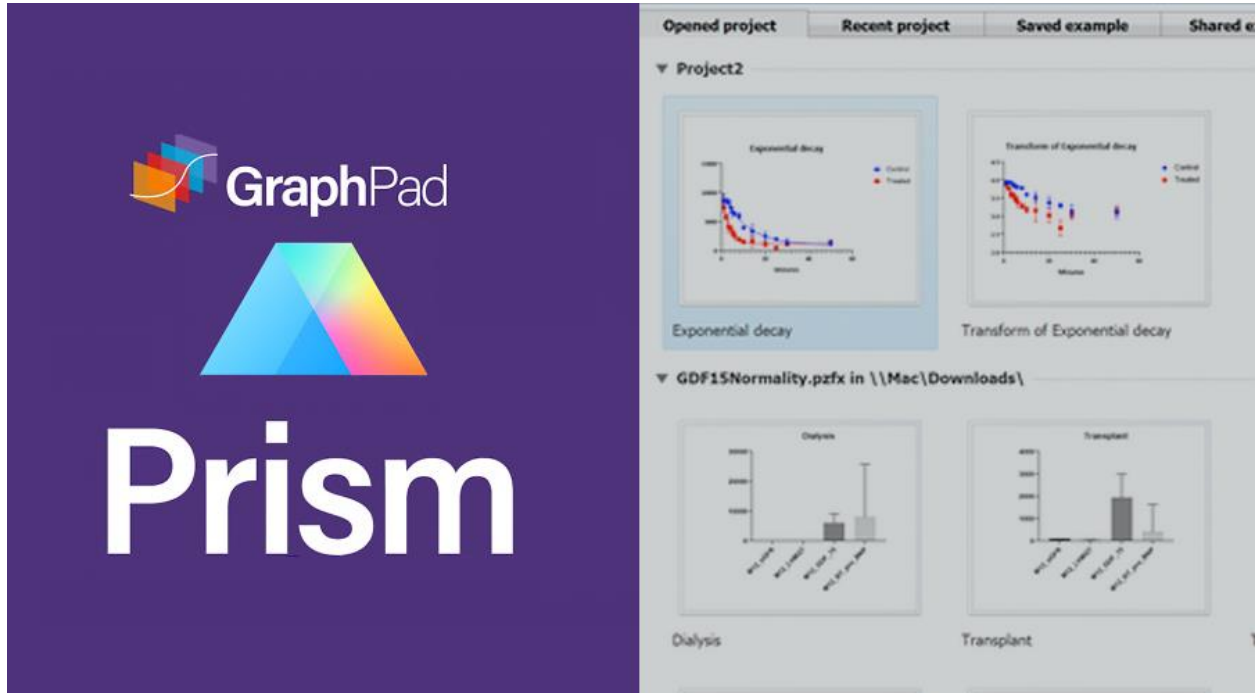
ملحق (1) تراكيز الاملاح اللاعضوية لوسط "MS"

| الكمية (ملغم. لتر ⁻¹) | الرمز الكيميائي | اسم المادة | المجموعة |
|-----------------------------------|--------------------------------------|--|------------------------|
| 1650 | NH ₄ NO ₃ | Ammonium nitrates نترات الامونيوم | النترات |
| 1900 | KNO ₃ | Potassium nitrates نترات البوتاسيوم | Nitrate |
| 0370 | MgSO ₄ .7H ₂ O | Magnesium sulphates كبريتات المغنسيوم المائية hydrated | الكبريتات Sulphates |
| 16.9 | MnSO ₂ .H ₂ O | Manganese sulphate كبريتات المنغنيز المائية hydrated | |
| 8.6 | ZnSO ₄ .7H ₂ O | Zinc sulphate hydrated كبريتات الخارصين المائية | |
| 0.025 | CuSO ₄ .5H ₂ O | Cupric sulphate hydrated كبريتات النحاس المائية | |
| 170 | KH ₂ PO ₄ | فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين Potassium di Hydrogen Phosphate | P.B.MO |
| 6 | H ₂ BO ₃ | Boric acid حامض البوريك | |
| 0.25 | NaMoO ₄ 2H ₂ O | Sodium molybdate مولبيدات الصوديوم المائية hydrated | |
| 440 | CaCl ₂ .2H ₂ O | Calcium Chloride hydrated كلوريد الكالسيوم المائي | الهاليدات Halides |
| 0.83 | KI | Potassium Iodide ايوديد البوتاسيوم | |
| 0.25 | COCl ₂ .6H ₂ O | Cobalt chloride hydrated كوريد الكوبلت المائي | |
| 27.84 | FeSO ₄ .7H ₂ O | Ferrous Sulphate hydrated كبريتات الحديدوز المائية | الحديد |
| 37.24 | Na ₂ EDTA | المادة المخلفية بشكل ملح ثنائي الصوديوم | المخلفي |



ملحق(3): برنامج ImageJ المستخدم في تحديد الاوزان الجزيئية للبروتينات والحمض النووي

<https://imagej.nih.gov/ij/download.html>



ملحق(4) برنامج Graph prism المستخدم في رسم الأشكال <https://www.graphpad.com/demos/>



ملحق (5): مرحلة إعادة زراعة الأفرع الخضرية ومرحلة استخلاص الأحماض النووية

المصادر references

الراوي ،خاشع محمود وخلف الله ،محمد عبد العزيز.(1980).تصميم وتحليل التجارب الزراعية .وزارة التعليم العالي والبحث العلمي ،مؤسسة دار الكتب للطباعة والنشر ،جامعة الموصل .ص488.

Abass, M. H. (2016). Responses of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) callus to biotic and abiotic stresses. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 28(1), 66–74. <https://doi.org/10.9755/ejfa.2015-09-799>

Abass, M. H., Al-Utbi, S. D., & Al-Samir, E. A. R. H. (2017). Genotoxicity assessment of high concentrations of 2,4-D, NAA and Dicamba on date palm callus (*Phoenix dactylifera* L.) using protein profile and RAPD markers. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 15(1), 287–295. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2016.12.003>

Abbas , M.F. and Fandi , B.S.(2001 a).Endogenous hormone levels during fruit development in jujube (*Ziziphus mauritana* Lam .) Basrah J.Agric .Sci .14(1):15-22.

Abbas, M. F., Jasim, A. M., & Al-zubaidy, B. H. (2015). Effect of NaCl stress on protein pattern changes in embryogenic callus of the date palm (*Phoenix*

dactylifera L.) cv. Ashkar. *AAB BIOFLUX Advances in Agriculture & Botanics-International Journal of the Bioflux Society*, 7(1), 7–11.

Abd El Bar, Ola H; El Dawayati, Maiada M.(2014). Histological changes on regeneration in vitro culture of date palm (*Phoenix dactylifera*) leaf explants. *Australian Journal of crop science*.8(6):898-855.

Aboul-Maaty, N. A.-F., & Oraby, H. A.-S. (2019). Extraction of high-quality genomic DNA from different plant orders applying a modified CTAB-based method. *Bulletin of the National Research Centre*, 43(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s42269-019-0066-1>

Abul-soad, A. A., & Al-khayri, J. M. (2018). Chapter 25 Date Palm Somatic Embryogenesis from In florescence Explant. IN:Hain S.Gupta.P.editors.step wise protocols from somatic embryogenesis of woody plants forestry Sciences,VoL.85.Ber lin: Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-79087-9>

Accari, S. L., & Fisher, P. R. (2015). Emerging Roles of JmjC Domain-Containing Proteins. In *International Review of Cell and Molecular Biology* (Vol. 319). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2015.07.003>

Afify, A. E. M. M. R., El-Beltagi, H. S., El-Salam, S. M., & Omran, A. A. (2012).

Protein solubility, digestibility and fractionation after germination of sorghum varieties. *PLoS ONE*, 7(2), 1–6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031154>

Afroz, S., Mohammad, F., Hayat, S., & Siddiqui, M. H. (2005). Exogenous Application of Gibberellic Acid Counteracts the Ill Effect of Sodium Chloride in Mustard. *Turkish Journal of Biology*, 29(4), 233–236.

Ait-El-Mokhtar, M., Baslam, M., Ben-Laouane, R., Anli, M., Boutasknit, A., Mitsui, T., Wahbi, S., & Meddich, A. (2020). Alleviation of Detrimental Effects of Salt Stress on Date Palm (*Phoenix dactylifera* L.) by the Application of Arbuscular Mycorrhizal Fungi and/or Compost. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 4(September), 1–19. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2020.00131>

Al-Abdoulhadi, I. A., Dinar, H. A., Ebert, G., & Büttner, C. (2011). Effect of salinity on leaf growth, leaf injury and biomass production in date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultivars. *Indian Journal of Science and Technology*, 4(11), 1542–1546. <https://doi.org/10.17485/ijst/2011/v4i11/30283>

Al-bahrani.M. Abdulaziz . & Al-Khayri,J.N.(2012). In vitro Responses of Date Palm Cell Suspensions under Osmotic Stress Induced by Sodium, Potassium and Calcium Salts at Different Exposure Durations. *American Journal of Plant Physiology* 7 (3): 120-134,DOI: 10.3923/ajpp.2012.120.134 © 2012 Academic Journals Inc.

- Aldhebiani, A. Y., Metwali, E. M. R., Soliman, H. I. A., & Howladar, S. M. (2018). Response of different date palm cultivars to salinity and osmotic stresses using tissue culture technique. *International Journal of Agriculture and Biology*, 20(7), 1581–1590. <https://doi.org/10.17957/IJAB/15.0674>
- Al-Dous, E. K., George, B., Al-Mahmoud, M. E., Al-Jaber, M. Y., Wang, H., Salameh, Y. M., Al-Azwani, E. K., Chaluvadi, S., Pontaroli, A. C., Debarry, J., Arondel, V., Ohlrogge, J., Saie, I. J., Suliman-Elmeer, K. M., Bennetzen, J. L., Kruegger, R. R., & Malek, J. A. (2011). De novo genome sequencing and comparative genomics of date palm (*Phoenix dactylifera*). *Nature Biotechnology*, 29(6), 521–527. <https://doi.org/10.1038/nbt.1860>.
- Ahmad, I., Tanveer, H., Ashraf, Muhammad, N. (2013). Lethal Effects of Secondary Metabolites on Plant Tissue Culture. *American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci.*, 13 (4): 539-547.
- Maryam, Muhammad Rafay and Muhammad Iqbal. (2010). Effect of salinity on growth of twelve cultivars of the Palm. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 40(15–16), 2372–2388.
- Alhammadi, M. S., & Edward, G. P. (2009). Effect of salinity on growth of twelve cultivars of the United Arab Emirates Date Palm. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 40(15–16), 2372–2388. <https://doi.org/10.1080/00107070903271111>

/10.1080/00103620903111293

Alhammadi., M.S, & Kurup., S. (2012). Impact of Salinity Stress on Date Palm (*Phoenix dactylifera* L) – A Review. *Crop Production Technologies*.
[https://doi. /10.5772/29527](https://doi.org/10.5772/29527)

Al-Harrasi, I., Al-Yahyai, R., & Yaish, M. W. (2018). Differential DNA methylation and transcription profiles in date palm roots exposed to salinity. *PLoS ONE*, *13*(1), 1–29. [https://doi. /10.1371/journal.pone.0191492](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191492)

Ali, A. S. A., & Hama, N. N. (2016). Integrated management for major date palm pests in Iraq. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, *28*(1), 24–33.
[https://doi. /10.9755/ejfa.2016-01-032](https://doi.org/10.9755/ejfa.2016-01-032)

Al-Khalifa, A. A., Abbas, K. F., & Al-Jabary, K. M. (2017). Phytohormones and Pigments Content in Date Palm *Phoenix dactylifera* L. under Salinity Stress. *International Journal of Scientific Research in Agricultural Sciences*, *4*(2), 36–042. [https://doi. /10.12983/ijrsras-2017-p0036-0042](https://doi.org/10.12983/ijrsras-2017-p0036-0042)

AL-Khalifah N. and Shanavaskhan A.(2012). Micro propagation of date palms and association of Agricultural Research in stitution in the near east and north Africa(AARINENA).D.5.4. Asia –Pacific consortium on agriculture Biotechnology (APCOAB)

- Al-Khateeb, A. A., & Al-Khateeb, S. A. (2016). In Vitro role of hormones at multiplication stage of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cvs Khalas and Sukary. *Research Journal of Biotechnology*, 11(1), 58–63.
- Alkhateeb, S. A., Alkhateeb, A. A., & Solliman, M. E. D. (2015). In vitro response of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) to K/Na ratio under saline conditions. *Biological Research*, 48. [https://doi. /10.1186/s40659-015-0055-2](https://doi.org/10.1186/s40659-015-0055-2)
- Al-Khateeb, S. A., Al-Khateeb, A. A., Sattar, M. N., & Mohmand, A. S. (2020). Induced in vitro adaptation for salt tolerance in date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultivar Khalas. *Biological Research*, 53(1), 1–12. [https://doi. /10.1186/s40659-020-00305-3](https://doi.org/10.1186/s40659-020-00305-3)
- Al-Khateeb, S. A., Al-Khateeb, A. A., Sattar, M. N., Mohmand, A. S., & El-Beltagi, H. S. (2019). Assessment of somaclonal variation in salt-adapted and non-adapted regenerated date palm (*Phoenix dactylifera* L.). *Fresenius Environmental Bulletin*, 28(5), 3686–3695.
- Al-Mayahi, A. M. W. (2016). Influence of salicylic acid (SA) and ascorbic acid (ASA) on in vitro propagation and salt tolerance of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cv. “Nersy.” *Australian Journal of Crop Science*, 10(7), 969–976. [https://doi. /10.21475/ajcs.2016.10.07.p7640](https://doi.org/10.21475/ajcs.2016.10.07.p7640)

Al-Mssallem, I. S., Hu, S., Zhang, X., Lin, Q., Liu, W., Tan, J., Yu, X., Liu, J., Pan, L., Zhang, T., Yin, Y., Xin, C., Wu, H., Zhang, G., Ba Abdullah, M. M., Huang, D., Fang, Y., Alnakhli, Y. O., Jia, S., ... Yu, J. (2013). Genome sequence of the date palm *Phoenix dactylifera* L. *Nature Communications*, 4, 1–7. <https://doi.org/10.1038/ncomms3274>

Almusawi, Abdulminam H.A. Abdullah J. Sayegh, Ansam M.S. Alshanaw, and John L. Griffis Jr.(2017). Platform Bioreactor for Mass Micropropagation of Date palm. *Date Palm Biotechnology protocols* V.1,251-265;Dio:10.1007/978-1-4939-7156-5-21.

Alturki, S. (2018). Effect of NaCl on growth and development of in vitro plants of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) ‘Khainazi’ cultivar. *Asian Journal of Plant Sciences*, 17(3), 120–128. <https://doi.org/10.3923/ajps.2018.120.128>

Alvarez, S., Marsh, E. L., Schroeder, S. G., & Schachtman, D. P. (2008). Metabolomic and proteomic changes in the xylem sap of maize under drought. *Plant, Cell and Environment*, 31(3), 325–340. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2007.01770.x>

AL-Zubaidi, Batoul Hanoun Faleh (2008). Effect of sodium chloride and Proline in the induction and growth of callus of palm date (*Phoenix dactylifera* L.) Al-ashqir cultivar. Ph.D. thesis - college of Agriculture - University of Basra - Iraq.

- Ashraf, M., & Harris, P. J. C. (2004). Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. *Plant Science*, *166*(1), 3–16. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2003.10.024>
- Assaha, D. V. M., Mekawy, A. M. M., Ueda, A., & Saneoka, H. (2015). Salinity-induced expression of HKT may be crucial for Na⁺ exclusion in the leaf blade of huckleberry (*Solanum scabrum* Mill.), but not of eggplant (*Solanum melongena* L.). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *460*(2), 416–421. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.03.048>
- Assaha, D. V. M., Ueda, A., Saneoka, H., Al-Yahyai, R., & Yaish, M. W. (2017). The role of Na⁺ and K⁺ transporters in salt stress adaptation in glycophytes. *Frontiers in Physiology*, *8*(JUL). <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00509>
- Attaha, A. H. M., Mhoder, T. Y., & Abd, A.-K. M. (2013). Protein Pattern of *Phoenix dactylifera* Seeded Strains Grown in Basrah Region Using Cluster and Principal Component Analysis. *Journal of Plant Studies*, *2*(2), 149–157. <https://doi.org/10.5539/jps.v2n2p149>
- Attia, H., Al-Yasi, H., Alamer, K., Esmat, F., Hassan, F., Elshazly, S., & Hessini, K. (2020). Induced anti-oxidation efficiency and others by salt stress in *Rosa damascena* Miller. *Scientia Horticulturae*, *274*(July), 109681. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109681>

Abdul-Aziz, M. A. (2020). cloning and sequencing of five LEA2 genes from date palm cv. khalas and func as and functional characterization to heat and salt stress tolerance using yeast knockout mutants. Theses, United Arab Emirates University

Bakker, H., Bardor, M., Molthoff, J. W., Gomord, V., Elbers, I., Stevens, L. H., Jordi, W., Lommen, A., Faye, L., Lerouge, P., & Bosch, D. (2001). Galactose-extended glycans of antibodies produced by transgenic plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(5), 2899–2904. <https://doi.org/10.1073/pnas.031419998>

Barrero, J. M., Rodríguez, P. L., Quesada, V., Piqueras, P., Ponce, M. R., & Micol, J. L. (2006). Both abscisic acid (ABA)-dependent and ABA-independent pathways govern the induction of NCED3, AAO3 and ABA1 in response to salt stress. *Plant, Cell and Environment*, 29(10), 2000–2008. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2006.01576.x>

Bassiouny, E., Mostafa, H. M., Khawas, H. A. El, Hassanein, S. A., & Monem, S. I. A. El. (2008). Physiological Responses of Wheat Plant to Foliar Treatments with Arginine or Putrescine. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 2(4), 1390–1403.

Bates, L.S., Waldren, R.P. & Teare, I. D. (1973). Rapid determination of free proline

for water-stress studies. *Plant Soil*, 39, 205–207.

Batool, N., Ilyas, N., & Shehzad, A. (2016). Role of Phytohormones As Salt Stress. 54(3), 353–368.

Bavei, V., Shiran, B., Khodambashi, M., & Ranjbar, A. (2011). Protein electrophoretic profiles and physicochemical indicators of salinity tolerance in sorghum (*Sorghum bicolor* L.). *African Journal of Biotechnology*, 10(14), 2683–2697. <https://doi.org/10.5897/ajb09.754>

Bayona-Rodriguez, C. J., & Romero, H. M. (2019). Physiological and agronomic behavior of commercial cultivars of oil palm (*Elaeis guineensis*) and OxG hybrids (*Elaeis oleifera* x *Elaeis guineensis*) at rainy and dry seasons. *Australian Journal of Crop Science*, 13(3), 424–432. <https://doi.org/10.21475/ajcs.19.13.03.p1354>

Bekheet, A. and Saker, M.M. (1998). In Vitro propagation of Egyptian Date Palm Direct and indirect shoot of (*Phoenix dactylifera* L.) c.v. Zaghlool proliferation from shoot-tip explants. *United Arab Emirates Journal of Science* 8-10.

Biessy, A., & Filion, M. (2021). Phloroglucinol derivatives in plant-beneficial *Pseudomonas* spp.: Biosynthesis, regulation, and functions. *Metabolites*, 11(3). <https://doi.org/10.3390/metabo11030182>

Chandrika, R., Shivakameshwari, M. N., & Saraswathi, K. J. T. (2015). Reduction of Vvitrification in in vitro shoot cultures of *Eryngium foetidum* L . - a potential aromatic and medicinal herb. *Indian Journal of Plant Sciences*, 4(2), 52–58.

Cha-Um, S., Takabe, T., & Kirdmanee, C. (2010). Ion contents, relative electrolyte leakage, proline accumulation, photosynthetic abilities and growth characters of oil palm seedlings in response to salt stress. *Pakistan Journal of Botany*, 42(3), 2191–2020.

Chiconato, D. A., De Santana Costa, M. G., Balbuena, T. S., Munns, R., & Dos Santos, D. M. M. (2021). Proteomic analysis of young sugarcane plants with contrasting salt tolerance. *Functional Plant Biology*, 48(6), 588–596. <https://doi.org/10.1071/FP20314>

Chojak-Koźniewska, J., Linkiewicz, A., Sowa, S., Radzioch, M. A., & Kuźniak, E. (2017). Interactive effects of salt stress and *Pseudomonas syringae* pv. lachrymans infection in cucumber: Involvement of antioxidant enzymes, abscisic acid and salicylic acid. *Environmental and Experimental Botany*, 136(January), 9–20. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2017.01.004>

Crozier, A. ; Loferski, K. ; Zaerr, B. and Morris, R.O.(1980). Analysis of pictogram quantities of indol-3-acetic acid by high performance liquid chromatography

fluorescence procedures .Planta , 150 : 366-370 .

da Silva, J. A. T., Dobránszki, J., & Ross, S. (2013). Phloroglucinol in plant tissue culture. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 49(1), 1–16. [https://doi. /10.1007/s11627-013-9491-2](https://doi.org/10.1007/s11627-013-9491-2)

Darwesh, R. S. S. (2013). Improving growth of date palm plantlets grown under salt stress with yeast and amino acids applications. *Annals of Agricultural Sciences*, 58(2), 247–256. [https://doi. /10.1016/j.aogas.2013.07.014](https://doi.org/10.1016/j.aogas.2013.07.014)

De Lacerda, C. F., Cambraia, J., Oliva, M. A., Ruiz, H. A., & Prisco, J. T. (2003). Solute accumulation and distribution during shoot and leaf development in two sorghum genotypes under salt stress. *Environmental and Experimental Botany*, 49(2), 107–120. [https://doi. /10.1016/S0098-8472\(02\)00064-3](https://doi.org/10.1016/S0098-8472(02)00064-3)

Doyle, J. J., & Doyle, J. L. (1987). Doyle_plantDNAextractCTAB_1987.pdf. In *Phytochemical Bulletin* (Vol. 19, Issue 1, pp. 11–15).

Dubois, M., Gilles, K., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. (1951). A colorimetric method for the determination of sugars. *Nature*, 168(4265), 167. [https://doi. /10.1038/168167a0](https://doi.org/10.1038/168167a0)

El Hadrami, I., Cheikh, R., & Baaziz, M. (1995). Somatic embryogenesis and plant regeneration from shoot-tip explants in *Phoenix dactylifera* L. *Biologia Plantarum*, 37(2), 205–211. <https://doi.org/10.1007/BF02913212>

El Rabey, H. A., Al-Malki, A. L., Abulnaja, K. O., & Rohde, W. (2015). Proteome Analysis for Understanding Abiotic Stress (Salinity and Drought) Tolerance in Date Palm (*Phoenix dactylifera* L.). *International Journal of Genomics*, 2015(i). <https://doi.org/10.1155/2015/407165>

ElSayed, A. I., & Rafudeen, M. S. (2012). Molecular marker assisted for recognition drought tolerant in some of bread wheat genotypes. *Journal of Crop Science and Biotechnology*, 15(1), 17–23. <https://doi.org/10.1007/s12892-011-0051-1>

El-Sharabasy, S. F., Wanas, W. H., & Al-Kerdany, A. Y. (2008). Effect of salinity stress on some date palm cultivars during proliferation stage in vitro. *Arab J. Biotech*, 11(2), 273–280.

El-Mokhtar , M. Baslam,M.Laouane,R.Alin,M.Meddich,A.(2020). Alleviation of Detrimental Effects of Salt Stress on Date Palm (*Phoenix dactylifera* L.) by the Application of Arbuscular Mycorrhizal Fungi and/or Compost. *JOURNAL=Frontiers in Sustainable Food Systems.V(4): ISSN=2571-581X: https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fsufs.2020.00131* .

- Elshibli, S., & Korpelainen, H. (2008). Microsatellite markers reveal high genetic diversity in date palm (*Phoenix dactylifera* L.) germplasm from Sudan. *Genetica*, 134(2), 251–260. <https://doi.org/10.1007/s10709-007-9232-8>
- Erdmann, V. A., & Barciszewski, J. (2013). DNA and RNA nanobiotechnologies in medicine: Diagnosis and treatment of diseases. *DNA and RNA Nanobiotechnologies in Medicine: Diagnosis and Treatment of Diseases*, October 2016, 1–460. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-36853-0>
- Faiyue, B., Al-Azzawi, M. J., & Flowers, T. J. (2012). A new screening technique for salinity resistance in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings using bypass flow. *Plant, Cell and Environment*, 35(6), 1099–1108. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2011.02475.x>
- Farooq, M. A., Saqib, Z. A., & Akhtar, J. (2015). Silicon-mediated oxidative stress tolerance and genetic variability in rice (*Oryza sativa* L.) grown under combined stress of salinity and boron toxicity. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 39(5), 718–729. <https://doi.org/10.3906/tar-1410-26>
- Farooq, M., Park, J. R., Jang, Y. H., Kim, E. G., & Kim, K. M. (2021). Rice Cultivars Under Salt Stress Show Differential Expression of Genes Related to the Regulation of Na⁺/K⁺ Balance. *Frontiers in Plant Science*, 12(August). <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.680131>

Ferdosi, M. F. H., Shoaib, A., Habib, S., & Khan, K. A. (2021). Modulation of salt-induced stress impact in *Gladiolus grandiflorus* L. by exogenous application of salicylic acid. *Scientific Reports*, 11(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-95243-9>

Fujiwara, T., Mitsuya, S., Miyake, H., Hattori, T., & Takabe, T. (2010). Characterization of a novel glycinebetaine/proline transporter gene expressed in the mestome sheath and lateral root cap cells in barley. *Planta*, 232(1), 133–143. <https://doi.org/10.1007/s00425-010-1155-4>

Garcı-sanchez, F;jifon,J.L; carvajal,M.and syrertsen,J.R. (2002).Gas exchange,chlorophyll and nutrient content in relation tona tand in sunburst mandarin grafted on different root plant science J.162(5)705-712.

Gaspar, T., Keveks, C., Penel, C., Greppin, H., Reid, D. M., & Thorpe, T. A. (1996). Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. In *Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 32(4), 272–289. <https://doi.org/10.1007/BF02822700>

Ge, R. C., Chen, G. P., Zhao, B. C., Shen, Y. Z., & Huang, Z. J. (2007). Cloning and functional characterization of a wheat serine/threonine kinase gene (TaSTK) related to salt-resistance. *Plant Science*, 173(1), 55–60. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2007.04.005>

Gill, S. S., & Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(12), 909–930. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.08.016>

Gomes Silveira, J. A., De Almeida Viégas, R., Almeida Da Rocha, I. M., De Oliveira Monteiro Moreira, A. C., De Azevedo Moreira, R. D., & Abreu Oliveira, J. T. (2003). Proline accumulation and glutamine synthetase activity are increased by salt-induced proteolysis in cashew leaves. *Journal of Plant Physiology*, 160(2), 115–123. <https://doi.org/10.1078/0176-1617-00890>

Gómez-Kosky, R., Armas, P. M., Calimano, M. B., Villegas, A. B., Otero, Y., Jaramillo, D. N., Ferreiro, J. Á., Daniels, D. D., & Pérez, L. P. (2021). Effect of Phloroglucinol on in Vitro Rooting of Sugarcane (*Saccharum* spp. cv C90-469). *Sugar Tech*, 23(2), 466–471. <https://doi.org/10.1007/s12355-020-00906-y>

Greco, M., Chiappetta, A., Bruno, L., & Bitonti, M. B. (2012). In *Posidonia oceanica* cadmium induces changes in DNA methylation and chromatin patterning. *Journal of Experimental Botany*, 63(2), 695–709. <https://doi.org/10.1093/jxb/err313>

Guo, K., Tu, L., Wang, P., Du, X., Ye, S., Luo, M., & Zhang, X. (2017). Ascorbate alleviates Fe deficiency-induced stress in cotton (*Gossypium hirsutum*) by

modulating ABA levels. *Frontiers in Plant Science*, 7(January), 1–16.

<https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01997>

Hachez, C., Heinen, R. B., Draye, X., & Chaumont, F. (2008). The expression pattern of plasma membrane aquaporins in maize leaf highlights their role in hydraulic regulation. *Plant Molecular Biology*, 68(4–5), 337–353. <https://doi.org/10.1007/s11103-008-9373-x>

Hachez, C., Veselov, D., Ye, Q., Reinhardt, H., Knipfer, T., Fricke, W., & Chaumont, F. (2012). Short-term control of maize cell and root water permeability through plasma membrane aquaporin isoforms. *Plant, Cell and Environment*, 35(1), 185–198. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2011.02429.x>

Khuder, H. Al-taei, Y.I.H. (2015). Effect of Salt Stress on Some Growth Indicators and Cellular Components of Wheat (<i>Triticum aestivum</i> L.) Callus. *International Journal of Applied Agricultural Sciences*, 1(4), 91-99. <https://doi.org/10.11648/j.ijaas.20150104.11>

Hansen, H., & Dörffling, K. (2003). Root-derived trans-zeatin riboside and abscisic acid in drought-stressed and rewatered sunflower plants: Interaction in the control of leaf diffusive resistance? *Functional Plant Biology*, 30(4), 365–375. <https://doi.org/10.1071/FP02223>

Hayat, S., Hayat, Q., Alyemeni, M. N., Wani, A. S., Pichtel, J., & Ahmad, A. (2012b). Role of proline under changing environments: A review. *Plant Signaling and Behavior*, 7(11). <https://doi.org/10.4161/psb.21949>

Hazzouri, K. M., Flowers, J. M., Nelson, D., Lemansour, A., Masmoudi, K., & Amiri, K. M. A. (2020). Prospects for the Study and Improvement of Abiotic Stress Tolerance in Date Palms in the Post-genomics Era. *Frontiers in Plant Science*, 11(March), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00293>

Hendricks, D. (2006). SALT TOLERANCE AND CURRENT STATUS OF THE DATE PALMS In the Graduate College PhD.Theses.

Hendricks, D. (2006). SALT TOLERANCE AND CURRENT STATUS OF THE DATE PALMS In the Graduate MS Theses College.

Hichem, H., Mounir, D., & Naceur, E. A. (2009). Differential responses of two maize (*Zea mays* L.) varieties to salt stress: Changes on polyphenols composition of foliage and oxidative damages. *Industrial Crops and Products*, 30(1), 144–151. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2009.03.003>

Horwitz, W.; Chichilo, P.; Reynolds, H. (1970). No TOfficial methods of Analysisisitle. *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists.*, 222.

- Htwe, N. N., Maziah, M., Ling, H. C., Zaman, F. Q., & Zain, A. M. (2011). Responses of some selected Malaysian rice genotypes to callus induction under in vitro salt stress. *African Journal of Biotechnology*, 10(3), 350–362. <https://doi.org/10.4314/ajb.v10i3>
- Hu, L., Li, H., Pang, H., & Fu, J. (2012). Responses of antioxidant gene, protein and enzymes to salinity stress in two genotypes of perennial ryegrass (*Lolium perenne*) differing in salt tolerance. *Journal of Plant Physiology*, 169(2), 146–156. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2011.08.020>
- Hu, Y. F., Zhou, G., Na, X. F., Yang, L., Nan, W. Bin, Liu, X., Zhang, Y. Q., Li, J. L., & Bi, Y. R. (2013). Cadmium interferes with maintenance of auxin homeostasis in *Arabidopsis* seedlings. *Journal of Plant Physiology*, 170(11), 965–975. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2013.02.008>
- Hussein, N. H., & Khierallah, H. S. M. (2011). Effect of Sodium Chloride on the Growth of Embryogenic Callus for Date Palm (Barhi Cultivar) After Cryopreservative. *Euphrates J. of Agriculture SC*. 01, 150–164.
- Injury, S. S. (2020). Crop Adaptations to Salt Stress. *J. of plant physiology*, 1211–1214.
- Iqbal, M., & Ashraf, M. (2013). Salt tolerance and regulation of gas exchange

and hormonal homeostasis by auxin-priming in wheat. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, 48(9), 1210–1219. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2013000900004>

Jasim, A. M., Abbas, M. F., & Alzubaidy, B. H. (2010). Effect of salt stress and proline on chemical content of embryogenic callus and somatic embryos of date palm (*Phoenix dactylifera* L. 'Ashkar'). *Acta Horticulturae*, 882, 219–224. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2010.882.24>

Jones, R. C., Steane, D. A., Lavery, M., Vaillancourt, R. E., & Potts, B. M. (2013). Multiple evolutionary processes drive the patterns of genetic differentiation in a forest tree species complex. *Ecology and Evolution*, 3(1), 1–17. <https://doi.org/10.1002/ece3.421>

Kang, K. A., Zhang, R., Chae, S., Lee, S. J., Kim, J., Kim, J., Jeong, J., Lee, J., Shin, T., Lee, N. H., & Hyun, J. W. (2010). Phloroglucinol (1,3,5-trihydroxybenzene) protects against ionizing radiation-induced cell damage through inhibition of oxidative stress in vitro and in vivo. *Chemico-Biological Interactions*, 185(3), 215–226. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2010.02.031>

Khair, T. S. A. B., & Karim, M. F. (2015). The use of electrolyte leakage procedure in assessing heat and salt tolerance of Ruzaiz date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultivar regenerated by tissue culture and offshoots and

treatments to alleviate the stressful injury. *Journal of Horticulture and Forestry*, 7(4), 104–111. <https://doi.org/10.5897/jhf2014.0378>

Khan, S., Al-Qurainy, F., & Nadeem, M. (2012). Biotechnological approaches for conservation and improvement of rare and endangered plants of Saudi Arabia. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 19(1), 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2011.11.001>

Kharusi, L. Al, Assaha, D. V. M., Al-Yahyai, R., & Yaish, M. W. (2017). Screening of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultivars for salinity tolerance. *Forests*, 8(4). <https://doi.org/10.3390/f8040136>

Krishna, H., Alizadeh, M., Singh, D., Singh, U., Chauhan, N., Eftekhari, M., & Sadh, R. K. (2016). Somaclonal variations and their applications in horticultural crops improvement. *3 Biotech*, 6(1), 1–18. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0389-7>

Krishna, H., Alizadeh, M., Singh, D., Singh, U., Chauhan, N., Eftekhari, M., & Sadh, R. K. (2016). Somaclonal variations and their applications in horticultural crops improvement. *3 Biotech*, 6(1), 1–18. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0389-7>

Krishnamurthy, P., Jyothi-Prakash, P. A., Qin, L., He, J., Lin, Q., Loh, C. S., & Kumar, P. P. (2014). Role of root hydrophobic barriers in salt exclusion of

- a mangrove plant *Avicennia officinalis*. *Plant, Cell and Environment*, 37(7), 1656–1671. <https://doi.org/10.1111/pce.12272>
- Kumar, M., Choi, J., An, G., & Kim, S. R. (2017). Ectopic expression of *OsSta2* enhances salt stress tolerance in rice. *Frontiers in Plant Science*, 8(March), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00316>
- Kumar, N., Modi, A. R., Singh, A. S., Gajera, B. B., Patel, A. R., Patel, M. P., & Subhash, N. (2010). Assessment of genetic fidelity of micropropagated date palm (*Phoenix dactylifera* L.) plants by RAPD and ISSR markers assay. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 16(2), 207–213. <https://doi.org/10.1007/s12298-010-0023-9>
- Kushairi, a, Tarmizi, a H., Zamzuri, I., R, S. K., Ooi, S. E., Palm, M., Board, O., Institusi, N. P., & Bangi, B. B. (2010). Production , Performance and Advances in Oil Palm Tissue Culture 1. *International Seminar on Advances in Oil Palm Tissue Culture*, (6): 1–23.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- Lakshmanan, V., Venkataramareddy, S. R., & Neelwarne, B. (2007). Molecular

analysis of genetic stability in long-term micropropagated shoots of banana using RAPD and ISSR markers. *Electronic Journal of Biotechnology*, 10(1).
<https://doi.org/10.2225/vol10-issue5-fulltext-12>

Laurie, S., Feeney, K. A., Maathuis, F. J. M., Heard, P. J., Brown, S. J., & Leigh, R. A. (2002). A role for HKT1 in sodium uptake by wheat roots. *Plant Journal*, 32(2), 139–149. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2002.01410.x>

Ledger, T., Rojas, S., Timmermann, T., Pinedo, I., Poupin, M. J., Garrido, T., Richter, P., Tamayo, J., & Donoso, R. (2016). Volatile-mediated effects predominate in Paraburkholderia phytofirmans growth promotion and salt stress tolerance of Arabidopsis thaliana. *Frontiers in Microbiology*, 7(NOV), 1–18.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01838>

Lee, G., Carrow, R. N., Duncan, R. R., Eiteman, M. A., & Rieger, M. W. (2008). Synthesis of organic osmolytes and salt tolerance mechanisms in Paspalum vaginatum. *Environmental and Experimental Botany*, 63(1–3), 19–27.
<https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2007.10.009>

Lehmann, S., Gummy, C., Blatter, E., Boeffel, S., Fricke, W., & Rentsch, D. (2011). In planta function of compatible solute transporters of the AtProT family. *Journal of Experimental Botany*, 62(2), 787–796. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq320>

Li, J., Jia, H., Han, X., Zhang, J., Sun, P., Lu, M., & Hu, J. (2016). Selection of reliable reference genes for gene expression analysis under abiotic stresses in the desert biomass willow, *Salix psammophila*. *Frontiers in Plant Science*, 7(OCTOBER2016). <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01505>

Liu, C., Fukumoto, T., Matsumoto, T., Gena, P., Frascaria, D., Kaneko, T., Katsuhara, M., Zhong, S., Sun, X., Zhu, Y., Iwasaki, I., Ding, X., Calamita, G., & Kitagawa, Y. (2013). Aquaporin OsPIP1;1 promotes rice salt resistance and seed germination. *Plant Physiology and Biochemistry*, 63(November), 151–158. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2012.11.018>

Liu, Wan, Li, P. J., Qi, X. M., Zhou, Q. X., Zheng, L., Sun, T. H., & Yang, Y. S. (2005). DNA changes in barley (*Hordeum vulgare*) seedlings induced by cadmium pollution using RAPD analysis. *Chemosphere*, 61(2), 158–167. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.02.078>

Liu, Wen, Li, R. J., Han, T. T., Cai, W., Fu, Z. W., & Lu, Y. T. (2015). Salt stress reduces root meristem size by nitric oxide-mediated modulation of auxin accumulation and signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 168(1), 343–356. <https://doi.org/10.1104/pp.15.00030>.

Livak, K. and Schmittgen. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using RealTime Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *methods*, 25(4), 402-408.

Maas, E. V., & Grattan, S. R. (1999). Crop Yields as Affected by Salinity. In: Skaggs, R.W., van Schilfgaarde, J. (Eds.). *Agricultural Drainage*, Agron Monogr, 38 ASA, CS(38), 55–108.

Mahalingam, R. (2015). Consideration of Combined stresses: a crucial paradigm for improving multiple stress tolerance in plant IN: *Combined Stresses in Plants* (ed. R mahalingam). 1-25 Cham Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-07899-1>

Manuscript, A. (2010). Plant Stress Tolerance. In *NIH Public Access* (Vol. 639, Issue March 2010). <https://doi.org/10.1007/978-1-60761-702-0>

Martins, S. C. R. (2016). Characterization of Portuguese old varieties of hazelnut (*Corylus avellana* L.) by morphological, molecular, biochemical and nutritional parameters. PhD. Theses

Matthes, M., Singh, R., Cheah, S. C., & Karp, A. (2001). Variation in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) tissue culture-derived regenerants revealed by

AFLPs with methylation-sensitive enzymes. *Theoretical and Applied Genetics*, 102(6–7), 971–979. <https://doi.org/10.1007/s001220000491>

Mazri, M. A., Belkoura, I., Meziani, R., Mokhless, B., & Nour, S. (2017). Somatic embryogenesis from bud and leaf explants of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cv. Najda. *3 Biotech*, 7(1). <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0676-y>

Meddich, A., Ait El Mokhtar, M., Bourzik, W., Mitsui, T., Baslam, M., & Hafidi, M. (2018). Optimizing Growth and Tolerance of Date Palm (*Phoenix dactylifera* L.) to Drought, Salinity, and Vascular Fusarium-Induced Wilt (*Fusarium oxysporum*) by Application of Arbuscular Mycorrhizal Fungi (AMF). *April*, 239–258. https://doi.org/10.1007/978-3-319-75910-4_9

Monthony, A. S., Page, S. R., Hesami, M., & Jones, A. M. P. (2021). The past, present and future of cannabis sativa tissue culture. *Plants*, 10(1), 1–29. <https://doi.org/10.3390/plants10010185>

Morales, I., & Urrestarazu, M. (2013). Thermography study of moderate electrical conductivity and nutrient solution distribution system effects on grafted tomato soilless culture. *HortScience*, 48(12), 1508–1512. <https://doi.org/10.21273/hortsci.48.12.1508>

Moursy, M. Saker, S. (2020). Molecular Characterization of Egyptian Date Palm..

Al-Ain, United Arab Emirates, Vol. 10. pp. 173-182.

Munene, R., Changamu, E., Korir, N., & Joseph, G.-O. (2017). Effects of different nitrogen forms on growth, phenolics, flavonoids and antioxidant activity in amaranth species. *Tropical Plant Research*, 4(1), 81–89. <https://doi.org/10.22271/tpr.2017.v4.i1.012>

Munns, R. (2002). Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, Cell and Environment*, 25(2), 239–250. <https://doi.org/10.1046/j.0016-8025.2001.00808.x>

Munns, R. (2005). Genes and salt tolerance: Bringing them together. *New Phytologist*, 167(3), 645–663. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2005.01487.x>

Munns, R., & Tester, M. (2008). Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology*, 59(February), 651–681. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092911>

Nei, M., & Li, W. H. (1979). Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(10), 5269–5273. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.10.5269>

/10.1073/pnas.76.10.5269

Nishiyama, R., Watanabe, Y., Fujita, Y., Le, D. T., Kojima, M., Werner, T., Vankova, R., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., Kakimoto, T., Sakakibara, H., Schmölling, T., & Tran, L. S. P. (2011). Analysis of cytokinin mutants and regulation of cytokinin metabolic genes reveals important regulatory roles of cytokinins in drought, salt and abscisic acid responses, and abscisic acid biosynthesis. *Plant Cell*, 23(6), 2169–2183. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.087395>

North, H. M., Almeida, A. De, Boutin, J. P., Frey, A., To, A., Botran, L., Sotta, B., & Marion-Poll, A. (2007). The *Arabidopsis* ABA-deficient mutant *aba4* demonstrates that the major route for stress-induced ABA accumulation is via neoxanthin isomers. *Plant Journal*, 50(5), 810–824. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113X.2007.03094.x>.

Osmoprotectant-Mediated Abiotic Stress Tolerance in Plants, Osmoprotectant-Mediated Abiotic Stress Tolerance in Plants (2019). <https://doi.org/10.1007/978-3-030-27423-8>

Othmani, A., Rhouma, S., Bayoudh, C., Mzid, R., Drira, N., & 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.

International Research Journal of Plant Science, 1(3), 48–55.

Ouyang, S. Q., He, S. J., Liu, P., Zhang, W. K., Zhang, J. S., & Chen, S. Y.

(2011). The role of tocopherol cyclase in salt stress tolerance of rice

(*Oryza sativa*). Science China Life Sciences, 54(2), 181–188.

<https://doi.org/10.1007/s11427-011-4138-1>

Ozdeniz, E. (2019). The role of free proline and soluble carbohydrates in water

gypsum stress on some gypsophyte and gypsovag plants. Planta Daninha, 37,

1–7. <https://doi.org/10.1590/S0100-83582019370100111>

Win, R. J., E., and Gabr, M. F. (1985). Palms Scientia Horticulturae, 25, P., Vitro,

I. N., Special, 255–262. 25, 255–262.

Pan, Y., Zhu, M., Wang, S., Ma, G., Huang, X., Qiao, C., Wang, R., Xu, X., Liang,

Y., Lu, K., Li, J., & Qu, C. (2018). Genome-wide characterization and

analysis of metallothionein family genes that function in metal stress

tolerance in brassica napus L. International Journal of Molecular Sciences,

19(8), 1–18. <https://doi.org/10.3390/ijms19082181>

Patankar, H. V., Al-Harrasi, I., Al Kharusi, L., Jana, G. A., Al-Yahyai, R., Sunkar,

R., & Yaish, M. W. (2019). Overexpression of a Metallothionein 2A Gene

from Date Palm Confers Abiotic Stress Tolerance to Yeast and Arabidopsis

thaliana. International Journal of Molecular Sciences, 20(12). <https://doi.org/10.3390/ijms20122871>

Patankar, H. V., Al-Harrasi, I., Al-Yahyai, R., & Yaish, M. W. (2018). Identification of candidate genes involved in the salt tolerance of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) Based on a yeast functional bioassay. DNA and Cell Biology, 37(6), 524–534. <https://doi.org/10.1089/dna.2018.4159>

Patankar, H. V., Al-Harrasi, I., Al-Yahyai, R., & Yaish, M. W. (2019). Functional characterization of date palm aquaporin gene pdpip1;2 confers drought and salinity tolerance to yeast and arabidopsis. Genes, 10(5). <https://doi.org/10.3390/genes10050390>

Pérez, L. P., Montesinos, Y. P., & Olmedo, J. G. (2015). Effect of phloroglucinol on rooting and in vitro acclimatization of papaya Effect of phloroglucinol on rooting and in vitro acclimatization of papaya (*Carica papaya* L . var . Maradol Roja). December. <https://doi.org/10.1007/s11627-015-9733-6>

Pérez, L. P., Montesinos, Y. P., Olmedo, J. G., Rodriguez, R. B., Sánchez, R. R., Montenegro, O. N., Escriba, R. C. R., Daniels, D., & Gómez-Kosky, R. (2016). Effect of phloroglucinol on rooting and in vitro acclimatization of papaya (*Carica papaya* L. var. Maradol Roja). In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant, 52(2), 196–203.

Petti, C. (2020). Phloroglucinol Mediated Plant Regeneration of *Ornithogalum dubium* as the Sole “Hormone-Like” Supplement in Plants Tissue Culture Long-Term Experiments: 9(929), 1–15.

Pospíšilová, J., Vágner, M., Malbeck, J., Trávníčková, A., & Bařková, P. (2005). Interactions between abscisic acid and cytokinins during water stress and subsequent rehydration. *Biologia Plantarum*, 49(4), 533–540. <https://doi.org/10.1007/s10535-005-0047-0>

Prakash, L., & Prathapasenan, G. (1990). NaCl- and gibberellic acid-induced changes in the content of auxin and the activities of cellulase and pectin lyase during leaf growth in rice (*Oryza sativa*). *Annals of Botany*, 65(3), 251–257. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aob.a087931>

Ramakrishna, A., & Ravishankar, G. A. (2011). Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signaling and Behavior*, 6(11), 1720–1731. <https://doi.org/10.4161/psb.6.11.17613>

Ramoliya, P. J., & Pandey, A. N. (2003). Soil salinity and water status effect on growth of *Phoenix dactylifera* seedlings. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 31(4), 345–353. <https://doi.org/10.1080/01140671.2003.9514270>

Ren, Z., Zheng, Z., Chinnusamy, V., Zhu, J., Cui, X., Iida, K., & Zhu, J. K. (2010).

Erratum: RAS1, a quantitative trait locus for salt tolerance and ABA sensitivity in Arabidopsis (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (2010) 107, 12 (5669-5674) DOI: 10.1073/pnas.0910798107). Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 107(22), 10330. <https://doi.org/10.1073/pnas.1005825107>.

Rawashdeh, I and Amri, A. (2006). Genetic Characterization of Date Palm Varieties Using RAPD Markers. Jordan Journal of Agricultural Sciences, Volume 2, No.3.

Sabir, F., Sangwan, R. S., Kumar, R., & Sangwan, N. S. (2012). Salt Stress-induced Responses in Growth and Metabolism in Callus Cultures and Differentiating In Vitro Shoots of Indian Ginseng (*Withania somnifera* Dunal). Journal of Plant Growth Regulation, 31(4), 537–548. <https://doi.org/10.1007/s00344-012-9264-x>

Safronov, O., Kreuzwieser, J., Haberer, G., Alyousif, M. S., Schulze, W., Al-Harbi, N., Arab, L., Ache, P., Stempffl, T., Kruse, J., Mayer, K. X., Hedrich, R., Rennenberg, H., Salojärvi, J., & Kangasjärvi, J. (2017). Detecting early

signs of heat and drought stress in *Phoenix dactylifera* (date palm). PLoS ONE, 12(6), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177883>

Saghai-Marouf, M. A., Soliman, K. M., Jorgensen, R. A., & Allard, R. W. (1984). Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 81(24), 8014–8018. <https://doi.org/10.1073/pnas.81.24.8014>

Salekjalali, M. (2012). Phloroglucinol, BAP and NAA enhance axillary shoot proliferation and other growth indicators in vitro culture of damask rose (*Rosa damascena* Mill.). *Advances in Environmental Biology*, 6(7), 1944–1949. <https://doi.org/10.5829/idosi.aejaes.2012.12.07.1799>

Salih, A. M., Ibrahim, M. A., & Abass, M. H. (2020). The response of different date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultivars to callus induction and development by in vitro culture under salt stress. *Polish polar Research*.41(11):23-41.

Sané, D., Kneyta, M. O., Diouf, D., Diouf, D., Badiane, F. A., Sagna, M., & Borgel, A. (2005). Growth and development of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) seedlings under drought and salinity stresses. *African Journal of Biotechnology*, 4(9), 968–972. <https://doi.org/10.5897/AJB2005.000-3183>

Sané, D., Kneyta, M. O., Diouf, D., Diouf, D., Badiane, F. A., Sagna, M., & Borgel, A. (2005). Growth and development of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) seedlings under drought and salinity stresses. *African Journal of Biotechnology*, 4(9), 968–972. <https://doi.org/10.5897/AJB2005.000-3183>

Sá-Pereira, P., Duarte, J., & Costa-Ferreira, M. (2000). Electroelution as a simple and fast protein purification method: Isolation of an extracellular xylanase from *Bacillus* sp. CCM1 966. *Enzyme and Microbial Technology*, 27(1–2), 95–99. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(00\)00185-X](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(00)00185-X)

Sarkar, D., & Naik, P. S. (2000). Phloroglucinol enhances growth and rate of axillary shoot proliferation in potato shoot tip cultures in vitro. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 60(2), 139–149. <https://doi.org/10.1023/A:1006419805980>

Sen, A., & Alikamanoglu, S. (2011). Effect of salt stress on growth parameters and antioxidant enzymes of different wheat (*Triticum Aestivum* L.) varieties on in vitro tissue culture. *Fresenius Environmental Bulletin*, 20(2 A), 489–495.

Shareef H. J., Jasim A. M., A. M. F. (2017). Molecular Analysis of Anti-salinity Compounds on Date Palm offshoots (*Phoenix dactylifera* L .) cultivars using RAPD. *Journal of Environmental Science*, 6(February), 061–071.

Shareef, H. J., & Al-Khayri, J. M. (2021). Salt and drought stress exhibits oxidative

stress and modulated protein patterns in roots and leaves of date palm (*Phoenix dactylifera* L.). *Acta Agriculturae Slovenica*, 117(1), 1–10. <https://doi.org/10.14720/aas.2021.117.1.1829>

Sharifian, S., Vahdati, K., Mirmasoumi, M., & Ghaem Maghami, S. A. (2009). Assessment of phloroglucinol effect on rooting of tissue cultured Persian walnut. *Acta Horticulturae*, 812(February), 189–196. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2009.812.22>

Sharma, S. S., & Dietz, K. J. (2006). The significance of amino acids and amino acid-derived molecules in plant responses and adaptation to heavy metal stress. *Journal of Experimental Botany*, 57(4), 711–726. <https://doi.org/10.1093/jxb/erj073>

Shiyab, S. M., Shibli, R. A., & Mohammad, M. M. (2003). Influence of sodium chloride salt stress on growth and nutrient acquisition of sour orange in vitro. *Journal of Plant Nutrition*, 26(5), 985–996. <https://doi.org/10.1081/PLN-120020070>

Shoaib, A., Meraj, S., Nafisa, Khan, K. A., & Javaid, M. A. (2018). Influence of salinity and *Fusarium oxysporum* as the stress factors on morpho-physiological and yield attributes in onion. *Physiology and Molecular*

Biology of Plants, 24(6), 1093–1101. <https://doi.org/10.1007/s12298-018-0570-z>

Skriver, K., & Mundy, J. (1990). Gene expression in response to abscisic acid and osmotic stress. *Plant Cell*, 2(6), 503–512. <https://doi.org/10.1105/tpc.2.6.503>

Steinmacher, D. A., Krohn, N. G., Dantas, A. C. M., Stefenon, V. M., Clement, C. R., & Guerra, M. P. (2007). Somatic embryogenesis in peach palm using the thin cell layer technique: Induction, morpho-histological aspects and AFLP analysis of somaclonal variation. *Annals of Botany*, 100(4), 699–709. <https://doi.org/10.1093/aob/mcm153>

Sudha, G. S., Ramesh, P., Sekhar, A. C., Krishna, T. S., Bramhachari, P. V., & Riazunnisa, K. (2019). Genetic diversity analysis of selected Onion (*Allium cepa* L.) germplasm using specific RAPD and ISSR polymorphism markers. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 17, 110–118. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.11.007>

Sudharsan, C. and Abo El-Nil, M.M. (2004). Axillary shoot production in micropagated date palm *Phoenix dactylifera* L. *Cur. Sci.*, 86(6).

Suman Kumar, J. N. J. (2015). Phloroglucinol Plays Role in Shoot Bud Induction and In Vitro Tuberization in *Tinospora Cordifolia*- A Medicinal Plant with

Multi- Therapeutic Application. *Advanced Techniques in Biology & Medicine*, 03(02), 2–6. <https://doi. /10.4172/2379-1764.1000125>.

Sedra,M. Lashermes,P. Trouslot,P. Marie-Christine.(2015). Identification and genetic diversity analysis of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) varieties from Morocco using RAPD markers. *r Academic Publishers*.03(9),22-45

Summart, J., Thanonkeo, P., Panichajakul, S., Prathepha, P., & McManus, M. T. (2010). Effect of salt stress on growth, inorganic ion and proline accumulation in Thai aromatic rice, Khao Dawk Mali 105, callus culture. *African Journal of Biotechnology*, 9(2), 145–152. <https://doi. /10.4314/ajb.v9i2>.

Taïbi, K., Taïbi, F., Ait Abderrahim, L., Ennajah, A., Belkhodja, M., & Mulet, J. M. (2016). Effect of salt stress on growth, chlorophyll content, lipid peroxidation and antioxidant defence systems in *Phaseolus vulgaris* L. *South African Journal of Botany*, 105, 306–312. <https://doi. /10.1016/j.sajb.2016.03.011>

Tchouga, A. O., Deblauwe, V., Mouafi Djabou, S. A., Forgione, G., Hanna, R., & Niemenak, N. (2020). Micropropagation and effect of phloroglucinol on rooting of *diospyros crassiflora* Hiern. *HortScience*, 55(4), 424–428. <https://doi. /10.21273/HORTSCI14556-19>

Thomas, T. L. (1993). Gene expression during plant embryogenesis and germination: An overview. *Plant Cell*, 5(10), 1401–1410. <https://doi.org/10.2307/3869791>

Tripler, E., Ben-Gal, A., & Shani, U. (2007). Consequence of salinity and excess boron on growth, evapotranspiration and ion uptake in date palm (*Phoenix dactylifera* L., cv. Medjool). *Plant and Soil*, 297(1–2), 147–155. <https://doi.org/10.1007/s11104-007-9328-z>.

Teixeira da Silva, J. A.; Judit Dobránszki and Silvia Ross, (2013). Phloroglucinol in plant tissue culture. *In Vitro Cell.Dev.Biol.—Plant* .49:1–16:Doi:10.1007/s11627-013-9491-2.

Tuna, A. L., Kaya, C., Ashraf, M., Altunlu, H., Yokas, I., & Yagmur, B. (2007). The effects of calcium sulphate on growth, membrane stability and nutrient uptake of tomato plants grown under salt stress. *Environmental and Experimental Botany*, 59(2), 173–178. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2005.12.007>

Użarowska, A., Dionisio, G., Sarholz, B., Piepho, H. P., Xu, M., Ingvaridsen, C. R., Wenzel, G., & Lübberstedt, T. (2009). Validation of candidate genes putatively associated with resistance to SCMV and MDMV in maize (*Zea mays* L.) by expression profiling. *BMC Plant Biology*, 9, 1–15. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-9-15>

- Valladares, S., Sánchez, C., Martínez, M. T., Ballester, A., & Vieitez, A. M. (2006). Plant regeneration through somatic embryogenesis from tissues of mature oak trees: True-to-type conformity of plantlets by RAPD analysis. *Plant Cell Reports*, 25(9), 879–886. <https://doi.org/10.1007/s00299-005-0108-z>
- Viehweger, K. (2014). How plants cope with salinity. How plant cepe with heavy metals *Botanical Studies*, 55(35), 1–12.
- Vysotskaya, Lidia B., Korobova, A. V., Veselov, S. Y., Dodd, I. C., & Kudoyarova, G. R. (2009). ABA mediation of shoot cytokinin oxidase activity: Assessing its impacts on cytokinin status and biomass allocation of nutrient-deprived durum wheat. *Functional Plant Biology*, 36(1), 66–72. <https://doi.org/10.1071/FP08187>
- Vysotskaya, Lidiya B., Korobova, A. V., & Kudoyarova, G. R. (2008). Abscisic acid accumulation in the roots of nutrient-limited plants: Its impact on the differential growth of roots and shoots. *Journal of Plant Physiology*, 165(12), 1274–1279. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2007.08.014>
- Walker, J. M. (2016). *Molecular Biology 1391 Protocols for In Vitro Cultures and Secondary Metabolite Analysis of Aromatic and Medicinal Plants IN Series Editor.*

Weckx, S., Inzé, D., & Maene, L. (2019). Tissue Culture of Oil Palm: Finding the Balance Between Mass Propagation and Somaclonal Variation. *Frontiers in plant science*, 10, 722. <https://doi./10.3389/fpls.2019.00722>

Winicov, I., & Bastola, D. R. (1997). Salt tolerance in crop plants: New approaches through tissue culture and gene regulation. *Acta Physiologiae Plantarum*, 19(4), 435–449. <https://doi./10.1007/s11738-997-0040-7>

Woodward, A. J., & Bennett, I. J. (2005). The effect of salt stress and abscisic acid on proline production, chlorophyll content and growth of in vitro propagated shoots of *Eucalyptus camaldulensis*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 82(2), 189–200. <https://doi./10.1007/s11240-005-0515-4>

Xiao, T. T., Raygoza, A. A., Pérez, J. C., Kirschner, G., Deng, Y., Atkinson, B., Sturrock, C., Lube, V., Wang, J. Y., Lubineau, G., Al-Babili, S., Ramírez, A. C., Bennett, M., & Blilou, I. (2019). Emergent protective organogenesis in date palms: A morpho-devo-dynamic adaptive strategy during early development. *Plant Cell*, 31(8), 1751–1766. <https://doi./10.1105/tpc.19.00008>

Xu, Q., & Deng, X. (2010). Cloning and phylogenetic analyses of serine/threonine kinase class defense-related genes in a wild fruit crop “chestnut rose.” *BMC Research Notes*, 3. <https://doi./10.1186/1756-0500-3-202>

- Yaish, M. W., & Kumar, P. P. (2015). Salt tolerance research in date palm tree (*Phoenix dactylifera* L.), past, present, and future perspectives. *Frontiers in Plant Science*, 6(MAY), 1–5. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00348>
- Yaish, M. W., Sunkar, R., Zheng, Y., Ji, B., Al-Yahyai, R., & Farooq, S. A. (2015b). A genome-wide identification of the miRNAome in response to salinity stress in date palm (*Phoenix dactylifera* L.). *Frontiers in Plant Science*, 6(NOVEMBER), 1–19. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00946>
- Yamada, N., Promden, W., Yamane, K., Tamagake, H., Hibino, T., Tanaka, Y., & Takabe, T. (2009). Preferential accumulation of betaine uncoupled to choline monooxygenase in young leaves of sugar beet - Importance of long-distance translocation of betaine under normal and salt-stressed conditions. *Journal of Plant Physiology*, 166(18), 2058–2070. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2009.06.016>
- Yamaguchi-Shinozaki†, K. S. and K., & Recently. (2000). Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways. *Current Opinion in Plant Biology*, 3(3), 217–223.
- Yancey, P. H. (2005). Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses. *Journal of Experimental Biology*, 208(15), 2819–2830. <https://doi.org/10.1242/jeb.01730>

Zaid A, El-Korchi B, Visser HJ (2011) Commercial date palm tissue culture procedures and facility establishment. In: Date palm biotechnology, Jain SM, Al-Khayri JM, Johnson DV (eds.) Springer, Dordrecht.

Zhang, F. J., Jin, Y. J., Xu, X. Y., Lu, R. C., & Chen, H. J. (2008). Study on the extraction, purification and quantification of Jasmonic acid, abscisic acid and indole-3-acetic acid in plants. *Phytochemical Analysis*, 19(6), 560–567. <https://doi.org/10.1002/pca.1085>

Zhang, H., Han, B., Wang, T., Chen, S., Li, H., Zhang, Y., & Dai, S. (2012). Mechanisms of plant salt response: Insights from proteomics. *Journal of Proteome Research*, 11(1), 49–67. <https://doi.org/10.1021/pr200861w>

Zhao, X., Tan, H. J., Liu, Y. B., Li, X. R., & Chen, G. X. (2009). Effect of salt stress on growth and osmotic regulation in *Thellungiella* and *Arabidopsis* callus. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 98(1), 97–103. <https://doi.org/10.1007/s11240-009-9542-x>

Zwack, P. J., & Rashotte, A. M. (2015). Interactions between cytokinin signalling and abiotic stress responses. *Journal of Experimental Botany*, 66(16), 4863–4871. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv172>

SUMMARY

The current study was conducted in the tissue culture laboratory of Fadak Company in Basra Governorate - Abi Al-Khasib for the season 2019-AD to know the effect of salt stress on phenotypic, biochemical and 2020 molecular traits and study the mechanism of molecular variations and gene expression levels of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) buds of Barhi cultivar, the study also included knowing the effect of fluoroglycinol On the vegetative, biochemical and molecular characteristics and the role of this compound in reducing the effects of salt stress on buds growing on saline media. In this experiment, live masses taken from indirect sprouts that were grown on solid food media consisting of MS salts as well as plant growth regulators auxins and cytokines were used to the nutrient medium. In addition to the study treatments that included the addition of sodium chloride in the medium of multiplication and elongation at concentrations(0, 25, 50, 100, 150 and 200) mmol, and the phloroglycinol compound was used at five concentrations (0, 25, 50, 75 and 100 micromol), once alone and again with Sodium chloride at a concentration of 200 mmol to determine the ability of phloroglycinol to reduce the harmful effects of a concentration of 200 mmol of sodium chloride and b . After the doubling and elongation stage, the buds were used for the purpose of carrying out the experiment. The results of the study showed the following:

1- When studying the effect of sodium chloride with different concentrations on the phenotypic characteristics in the doubling and elongation phases, it was found that high concentrations of it negatively affect most of the measured traits, as it was noted that the lowest rate of fresh weight was) recorded in the doubling phase at concentrations 150 and 200 mmol13.19 , g). While the concentration of 100 mmol recorded the highest average 16.39 as for the traits ,(and 25.94 g 22.44) of fresh weight after 8 and 12 weeks

(number of buds and bud height), the standard treatment was significantly superior to that of the study treatments with high concentrations (150 and 200 . mmol)33.66 and11.80 and without significant difference compared to the (and the treatment 200 mmol was significantly superior , low concentrations .to the bud diameter (3.6 mm)

In the elongation stage, it was noted that sodium chloride treatments also affected the phenotypic characteristics measured, as the treatment of 100 mmol significantly exceeded in the characteristic of the number of branches formed, leaves and branch diameter (18 , 3 and 4.16), while the treatment 50 mmol recorded the highest rate of branch length 13.81 and the high concentrations affected in a way Inversely on the measured traits, as treatment 150 and 200 mmol recorded the highest percentage of incomplete buds (33.06 and 48.74%).When studying the effect of phloroglycinol compound added individually to the medium of doubling and elongation on phenotypic traits, it was noted that the results were significant in low concentrations in most of the traits. (29.17 buds). The significance of the results was decreased by increasing the concentration of fluoroglycinol, so that the concentration reached 75 and 100 μmol as the lowest mean for the measured traits. As for the elongation stage, it was observed that the addition of phloroglycinol had a negative effect on the measured traits, and the comparison treatment recorded a significant superiority in most of the studied .traits

2- When studying the effect of adding phloroglycinol at different concentrations to the media containing sodium chloride at a concentration of mmol, it was noted that adding 25 micromol of 200 phloroglycinol to the medium containing 200 mmol had a significant effect in reducing the harmful ,effects of salt stress. At this concentration (25.07 g, 22 buds and 10.67 cm) while the buds were affected by the increase in fluoroglycinol concentrations to record lower rates than the saline treatment 200 mmol.), while the saline treatment exceeded 200 mmol in the rest of the traits

3- The biochemical study indicates that the addition of sodium chloride in high concentrations to the multiplication medium resulted in an increase in the sprouts' content of carbohydrates, abscisic acid and proline, as well as a significant increase in cytokinins, while the level of photosynthesis decreased in high concentrations of sodium chloride, and for fluoroglycinol treatments it was observed The high level of carbohydrates, abscisic acid and proline at the concentration of 75 and 100 micromol, while the addition of high concentrations led to a decrease in the levels of chlorophyll and auxin and an .increase in the percentage of browning (brown discoloration)

The addition of phloroglycinol at different concentrations to the saline medium of 200 mmol led to an effect on most of the measured chemical ,indicators, as it led to an increase in the levels of carbohydrates, abscisic acid proline and cytokines, while the significant results decreased for chlorophyll and auxin indole acetic acid by increasing the concentrations to record the treatment (200 mmol of sodium chloride +). 100 micromoles ofPG had the (lowest level for chlorophyll and auxin, while the treatment recorded 200 mmol sodium chloride + 25 micromoles of phloroglycinol and the standard .treatment significantly in the level of auxin and chlorophyll

4- The results of the study of proteins usingSDS-PAGE of the buds formed from date palm variety Barhi and treated with different concentrations of sodium chloride showed that some noticeable changes in protein expression occurred. The separated bundles in other concentrations on theSDS-PAGE migration gel are 32 protein bundles with a molecular weight range between 15.5-48kDa , and high concentration coefficients (150-200 mmol resulted (.in the synthesis of additional protein bundles It has a low molecular weight of24,20 kDa .

As for the results of electrophoresis of proteins extracted from formed and developing vegetative buds inMS growth media and treated with phloroglycinol at concentrations (25, 50, 75 and 100 μ mol), changes occurred at the protein level of the different patterns. Density and molecular weight

ranged between 15-22kDa while the two treatments were 25.50 μ mol of , fluoroglycinol. No differences were observed in the resulting patterns .compared to the neutral treatment

results of the analysis showed genetic For shoots treated with sodium chloride compared to unstressed plants in the multiplication and elongation ,stage and exposed to salt stress conditions8 primers were used. These primers produced a total number of packets of 320.5 packets, with an average number of packets of 40.06 for each primer whose size ranged between (200 8000 -pb ,each primer produced a number of packets ranging between 4-9 (.with an average of 6.67 packets for each primerRAPD analysis produced monomorphic patterns during Migration of DNA between the study samples and the comparison treatment. No morphological polymorphism was observed in the primers used , with a genetic stability rate ranging between .for the primers %95-100

5- The study gene expression of buds grown in media containing sodium) chloride at different concentrations and using six target genesSTKs ,ABA ,PROTs ,PIP1,2 andPdMT2A) and two reference genes (ACTn andERF where the ,(PIP2 gene recorded the highest level of gene expression. (18.14-fold compared to the control treatment, which was recorded at 1.54-fold for this gene, and it was noted that the other target genes had increased gene ,expression at similar levels in the environments with high salt concentrations while the low concentrations recorded similar levels with the control (non-saline) treatment, except In thepdMT2A gene , an increase in the level of gene expression was observed when treated with 100 mmol of sodium chloride, then this increase decreased with an increase in the concentration of .NaCl, reaching 150 and 200 mmol in the treatment (2.95,2.85)



Effect of phloroglucinol on organogenesis and gene expression of date palm *Phoenix dactylifera* L cv. Barhi that grow under salt stress

A Thesis

**Submitted to the College of Agriculture University of Basrah
As a partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of
Doctor of philosophy in Agriculture Sciences
Horticulture and Landscape
(Biotechnology)**

By

Mufeed Dhahir Talib Alasadi

**M.Sc Agricultural Science -Horticulture and
Landscape Gardening**

Supervised by

Prof. Dr. Abdulminam H. A. Al-Musawi

Prof. Dr. Aqeel H. Abdul Wahid