# تحفيز التغاير الوراثي باستخدام مستخلص ثمار الحنظل وأشعة كاما في أصناف من الحنطة خارج الجسم الحي

محمد محمود زيدان* أبراهيم عبدالله حمزة الشمري

جامعة بغداد - كلية الزراعة - قسم المحاصيل الحقلية

الملخص

أجريت التجربة في مختبر زراعة الأنسجة النباتية - كلية الزراعة - جامعة بغداد بأستخدام زراعة الأنسجة النباتية لتحفيز التغايرات الوراثية لثلاثة أصناف من الحنطة هي إباء99 وبحوث10 و ساوة اشتملت التجربة على أستخدام مستخلص ثمار الحنظل بالتراكيز 0 و100 و200 و300 مل لتر$^{-1}$ وأشعة كاما بالجرع 100 و200 و300 Gy . أخذت قياسات الوزن الطري والجاف للكالس بعد المعاملة بمستخلص ثمار الحنظل وأشعة كاما وأجري فحص البصمة الوراثية PCR-RAPD Random amplified Poly morphic DNA . بينت النتائج وجود فروق معنوية في متوسط الوزن الطري والجاف للكالس أعطى التركيز 100 مل لتر$^{-1}$ أعلى وزن طري وجاف بلغ (260.50 و 25.00) ملغم وأعطت الجرعة 100 Gy أعلى وزن طري وجاف بلغ (171.0 و 14.93)ملغم . وكشف تحليل PCR-RAPD عن وجود أختلافات في عدد الحزم الناتجة وأوزانها الجزيئية في معاملات مستخلص ثمار الحنظل وأشعة كاما قياساً بمعاملة المقارنة . وفي ضوء النتائج يمكن الاستنتاج أن لمستخلص ثمار الحنظل وأشعة كاما القابلية على أحداث التغايرات الوراثية والتي يمكن استثمارها في تحمل الإجهاد الملحي والمائي لأصناف الحنطة ، ونوصي بعزل المادة المسؤولة عن أحداث التغايرات الوراثية في مستخلص ثمار الحنظل.

كلمات المفتاحية: زراعة الأنسجة النباتية، مستخلص ثمار الحنظل، أشعة كاما ، PCR-RAPD

# GENITIC VARIATION BY USING EXTRAT COLOYNTHIS FRUITS AND GAMMA RAYS IN DIFFERENT CULTIVARS WHEAT *IN VITRO*

M.M. Zaidan I.A. Hamza. AL-Shmarey

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

ABSTRACT

An experiment was conducted in the Plant Tissue Culture Lab at the Coll. of Agric. Univ. of Baghdad. Stimulated *invitro* genetic variation in three cultivars of wheat *Triticum aestivum* L.cv:Iba99, Bhuth10 and sawa. The variables were the extract of *Citrullus colocynths* L. fruits at concentration 0,100,200and300ml L$^{-1}$ and gamma rays doses 100,200 and300 Gy .Measurements has took fresh and dry callus weight affter using extract colocynths and gamma rays and PCR-RAPD test was done. Results reveled significant different in means fresh and dry callus weight 100ml L$^{-1}$ concentration gave callus weight of 260.50 and14.93mg and dose 100Gy gave callus weight of 171.07 and 14.93mg .PCR-RAPD test showed differences in banding and molecular weights in extract colocynths and gamma rays compered to control treatment. In light of results, it can be concluded that the extract colocynths and gamma rays may be have the ability to make genetic variation and can be used in tolerance salt and drought stress ,and recommended to isolate substance in the extract colocynths which caused these variation and diagnosis.

Key word: Plant tissue culture, Gamma rays, Extract of colocynths fruits , PCR-RAPD.

* البحث مستل من اطروحة دكتوراه للباحث الأول

المقدمة

يحتل محصول الحنطة *Triticum aestivum* L. المرتبة الأولى في العالم من حيث الأهمية والإنتاج، وإن أزمة العالم ماهي في الواقع إلا أزمة حنطة بالدرجة الأولى فجميع المؤشرات الدولية عندما تتحدث عن أزمة الغذاء إنما تبحث وتتحدث على درجة التحديد عن أزمة توافر الحنطة التي تكفي لمواجهة الطلب العالمي المتزايد عليه ، مع هذا فأنه على الرغم من إن أحد مناشئ الحنطه الهامه العالمية هو أرض الرافدين ، إلا إن هذا المحصول لاتزال إنتاجيته ضعيفة في العراق بسبب عدم اعتماد أصناف محسنة فعلاً وعدم إدارة الحقل بالصورة المطلوبة وذلك بدءاً من عمليات خدمة التربة انتهاءاُ بعمليات خدمة المحصول (11). عملت مراكز البحث العلمي في العالم على دراسة واستنباط أصناف من الحنطة متحملة للملوحة وكان من بين تلك الأعمال ماتوصل اليه الباحثون لبعض أصناف حنطة الخبز في كل من الهند وباكستان(17 ).

إن أهم نقطة في نجاح برامج التربية سواء في طرائق التربية التقليدية أو التربية خارج الجسم الحي هو ضرورة وجود أو تحفيز التغاير الوراثي ، إذ بدون التغاير الوراثي يصعب إنجاح أي برنامج تحسين للنباتات، إن أستعمال تقانة زراعة الأنسجة في مجالات الوراثة وتربية النبات بهدف أستنباط خطوط وراثية بمواصفات جيدة من حيث زيادة الأنتاج كماً ونوعاً أوتحسين تحملها للأجهادات يتيح للباحثين في هذا المجال من تحقيق أهدافهم المرجوه من خلال تحفيز التغاير الوراثي . تُعد الطفرة تغيير في تركيب مادة الـ DNA أو RNA نتيجة فعل مؤثرات خارجيه أو داخليه قد ينتج عنه تغيير في تركيب المادة الوراثية مما يسبب تغايراً عن تراكيبها الطبيعية لصفة أو لصفات معينة نتيجة تغيير التعبير الجيني الذي قد يتوارث من جيل لآخر (1). هناك طرائق عدة لتحفيز التغايرات الوراثية في الأنواع النباتية مثل المحفزات الكيماوية والفيزياوية والطبيعية من بين المركبات الكيماوية Ethyl Methane Sulphonate EMS والصوديوم آزايد Sodium Azide ($SA(NaN_3$ ) وNitrosoguanidine والكولشسين أما بخصوص المحفزات الفيزياوية فتشمل أشعة كاما وبيتا والأشعة فوق البنفسجية أضافة الى الصعق الكهربائي وتعد أشعة كاما من أشهر المحفزات التي تناولتها الأبحاث العلمية. أما من بين المركبات الطبيعية المستخدمة لتحفيز التغاير وراثي هو مستخلص ثمار الحنظل إذ أثبتت الدراسات أنه بالأمكان أستخدامه في تحفيز التغاير الوراثي وعلاقته بتحمل الأجهاد من تلك الدراسات ماوجدته بداي(7) من أمكانية تحفيز التغاير الوراثي لصنفين من قصب السكر وتحمل الأجهاد المائي ، وللهدف ذاته أستخدم مستخلص ثمار الحنظل مع صنفين لمحصول الجت لتحفيز التغاير الوراثي وتحسين التحمل للأجهاد الملحي (6) .

أستخدم AL-Bokari وآخرون 2012 (2) أشعة كاما لتحديد الحساسية الأشعاعية لبعض أصناف الحنطة وتحديد الجرع المثلى، كما أستخدم Singh وBalyan 2009(20) أشعة كاما لغرض معرفة تأثيرها في نوعية الحبوب لحنطة الخبز والشعير فيما درس تأثير أشعة كاما في الأنبات وصفات البادرات لكل من حنطة الخبز والشعير (15). ودرست اشعة كاما في معرفة التأثير في الصفات الفسلجية لبادرات الحنطة والشعير (8) هناك عدد قليل من الأبحاث المنشوره حول تأثير مستخلص ثمار الحنظل في تحفيز التغاير الوراثي في النبات وعلاقته بتحمل الأجهاد ومن بين أولى الدراسات التي أجريت في العراق ما توصلت

اليه (7) من أستخدام مستخلص ثمار الحنظل في تحفيز التغاير الوراثي لصنفين من قصب السكر لتحمل الأجهاد المائي خارج الجسم الحي وأظهرت نتائج المؤشرات الجزيئيه إن معاملة المقارنه أعطت 10 حزم تراوحت أوزانها الجزيئية بين 75 -1500 bp ، وحقق التركيز 200 مل لتر$^{-1}$ 9 حزم بوزن جزيئي بين 75 -1500 bp في حين أعطى البادئ OPB-05 3 حزم جزيئيه لمعاملة المقارنة وبوزن جزيئي بلغ 250 -800 bp وأعطى البادئ ذاته 4 حزم للتركيز 200 مل لتر$^{-1}$ وبوزن جزيئي 200 -800 bp واستنتجت الباحثة الى دور مستخلص الحنظل في تحفيز التغاير الوراثي ودوره في تحمل الإجهاد المائي . كما أشارت نتائج دراسة أخرى عن إمكانية أستخدام مستخلص ثمار الحنظل في معاملة بذور محصول الجت وعلاقة ذلك بتحمل الإجهاد الملحي (6).

تهدف الدراسة الحالية الى تحفيز التغاير الوراثي بأستخدام مستخلص ثمار الحنظل وأشعة كاما بهدف الحصول على تغايرات وراثية بين أصناف الحنطة والحصول على خلايا الكالس وأمكانية تمايزه الى نباتات يمكن اعتمادها كأصناف واعدة مستقبلاً في ظل شحة وسوء إدارة المياه فضلاً عن ملوحة التربة وماء الري.

المواد وطرائق العمل

نفذت الدراسة الحالية في مختبر زراعة الأنسجة النباتية للدراسات العليا - كلية الزراعة - جامعة بغداد . أستخدم مستخلص ثمار الحنظل وأشعة كاما في تحفيز التغاير الوراثي بين ثلاثة أصناف من الحنطة وهي إباء99 و بحوث10 و ساوة تم الحصول عليها من وزارة الزراعة دائرة البحوث الزراعية. وأتبعت طريقة (12) في تحضير مستخلص ثمار الحنظل ونقعت بذور الأصناف بالتراكيز100 و200 و300 مل لتر$^{-1}$ مدة 24 ساعة قبل التعقيم والزراعة في وسط أستحثاث الكالس في حين أستخدمت أشعة كاما بالجرع 100 و200 و300 Gy حسب طريقة (9).

بناءً على الدراسات السابقة استخدمت هايبوكلورات الصوديوم NaOCl القاصر التجاري (فاس) بتركيز 6% في تعقيم البذور وأُعتمد التركيز 4.5% ولمدة 15 دقيقة الذي يُعد الأفضل في تعقيم البذور دون التأثير على حيويتها و بلغت نسبة التلوث 0.00 % (4). أُجريت عملية تعقيم البذور في جهاز انسياب الهواء الطبقي Laminar air flow cabinet نقلت البذور بعدها الى قناني معقمه سعة 250 مل وأضيف اليها 10 مل من الماء المقطر المعقم لضمان نقع البذور بصوره جيدة واحكم غلق القناني حضنت البذور في ظلام تام لمدة 24 ساعة وبدرجة حرارة 25 $^{0}$م ± 2 لغرض تحفيز الأجنة على النمو . نقلت بعدها الى أنابيب زراعة زجاجية Test tubes (Veales) مجهزه بوسط غذائي صلب حاوي على أملاح MS (18 ) وخالي من منظمات النمو Free hormone media حضنت بذور الأصناف بدرجة حرارة 25 $^{0}$ م ± 2 لمدة 48 ساعة وبظروف16 ساعة ضوء و8 ساعة ظلام وبعدها فصلت الأجنة الناضجة المعاملة بمعاملات مستخلص ثمار الحنظل وأشعة كاما وزرعت في وسط استحثاث الكالس. أُستخدم الوسط الغذائي MS الجاهز مجهز من شركة himidia الهندية بوزن4.91 غم لتر$^{-1}$ وأُضيف إليه الفيتامينات ومنظمات النمو والسكروز والآكار بالكميات المبينه في جدول 1،

أُضيف الأوكسين 2,4-dichlorophenoxy D -4,2 actic acid بالتركيز 3 ملغم لتر$^{-1}$ مع أضافة كل من الكاينتين Kinetin .kin و NAA. acid Nphthalene actic بتركيز 0.5 ملغم لتر$^{-1}$ لغرض أستحثاث الكالس من الأجنة الناضجة لأصناف الحنطة المدروسة والمعاملة بمستخلص ثمار الحنظل وأشعة كاما، أُخذ حجم 800 مل من الماء المقطر وأُضيفت اليه المكونات السابقة الذكر بعدها عدلت الدالة الهيدروجينية Potenz Hydrogen PH للوسط الغذائي الى 5.7 وذلك بإضافة قطرات من هيدروكسيد الصوديوم Sodium NaOH أوحامض الهيدروكلوريك HCl بتركيز (1) عياري بعدها اكمل الحجم الى 1000مل ثم أضيف الآكار بمعدل 7 غم لتر$^{-1}$ نوع Agar - Agar مجهز من شركة himidia سخن الوسط الغذائي بإستخدام جهاز التسخين الخلاط المغناطيسي Magnetic Stirrer hotplate لحين التجانس ثم وزع في أنابيب الزراعة Veales وبمعدل 10 مل وعقم بجهاز التعقيم على درجة حراره 121 $^{0}$ م وضغط 104 كغم سم$^{2}$ لمدة 15 دقيقه وتركت لتبرد وتتصلب على درجة حرارة الغرفة وبزاوية ميل 45 $^{0}$ وحفظت لحين الإستخدام.

قيس الوزن الطري والجاف للكالس المعامل بمستخلص ثمار الحنظل وأشعة كاما بعد أربعة أسابيع من الزراعة في وسط MS بإستخدام ميزان حساس معقم داخل كابينة الزراعة استخرجت قطع الكالس الطري ووضعت على ورق ترشيح وأزيلت بقايا الوسط الغذائي الملتصقة بالكالس باستخدام شفره جراحيه وسجل الوزن الطري للكالس وجففت قطع الكالس الطري في فرن كهربائي (Oven ) على درجة حراره 70 $^{0}$ م لمدة 48 ساعه أو لحين ثبات الوزن . وأخذ الكالس الجاف لأصناف الحنطة المدروسة لأجراء تحليل البصمة الوراثية لمعاملات مستخلص ثمار الحنظل وأشعة كاما للتراكيز والجرع المذكورة أعلاه.

جدول1 . مكونات الوسط الغذائي الخاص باستحثاث الكالس

**Table 1.Content medium to callus induction.**

| المادة | محتويات الوسط الغذائي MS ملغم لتر$^{-1}$ |
|---|---|
| املاح MS | 4991 |
| Pyridoxine- Hcl | 0.5 |
| Glycine | 2.0 |
| Nicotine acid | 0.5 |
| Thiamine- Hcl | 0.1 |
| Myo-insitol | 100 |
| 2,4-D | 3 |
| NAAوkin | 0.5 |
| Sucrose | 30000 |
| Agar | 7000 |

أخذ الكالس الجاف لأصناف الحنطة المدروسة لأجراء تحليل البصمة الوراثية PCR لمعاملات مستخلص الحنظل وأشعة كاما المذكورة أعلاه وحسب تقانة RAPD (5). أستخدم Wizard Genomic DNA Purification Kit في إستخلاص الـ DNA والمجهز من شركة Promega الامريكية، قيس تركيز الـ DNA (نانوغرام مايكروليتر$^{-1}$) ودرجة النقاوة ( قراءة الجهاز على الطول الموجي260/ قراءة الجهاز على الطول الموجي280) بأستخدام جهاز Nano–Drop spectrophotometer . أستخدمت خمسة بوادئ تم الحصول عليها من شركة Promega الامريكية، كل بادئ يتكون من عشرة قواعد نتروجينية عشوائية وتسلسلها القاعدي كما يأتي

| Primer code | Sequence(5' to 3' ) |
|---|---|
| B–19 | ACCCCCGAAG |
| OPA– 01 | CAGGCCCTTC |
| OPB–08 | GTCCACACGG |
| OPE–01 | CCCAAGGTCC |
| OPF–13 | GGCTGCAGAA |

أُستخدم التصميم العشوائي الكامل في التجربة وبتجارب عامليه بين الأصناف وتراكيز مستخلص ثمار الحنظل وأشعة كاما.

**النتائج والمناقشة**

تأثير مستخلص ثمار الحنظل وأشعة كاما في الوزن الطري و الجاف للكالس

اختلفت أصناف الحنطة الثلاثة فيما بينها معنويا في الوزن الطري للكالس تحت تراكيز مستخلص ثمار الحنظل جدول2 فقد تفوق الصنف إباء99 معنويا على بقية الأصناف وبمتوسط وزن بلغ 218.81 ملغم مقارنة مع الصنفان بحوث10 وساوه اللذان أعطيا متوسط وزن بلغ 194.44 و 198.62 ملغم لكليهما بالتتابع . أن التحفيز بمستخلص ثمار الحنظل في الوسط الغذائي قد زاد في متوسط الوزن الطري للكالس فقد سبب التركيز 100 مل لتر $^{-1}$من تحقيق أعلى متوسط وزن طري للكالس بلغ 260.50 ملغم متفوقا على المعاملة 300 مل لتر$^{-1}$ التي سجلت أدنى متوسط بلغ 98.92 ملغم تلتها المعاملة 200 مل لتر$^{-1}$ ومعاملة المقارنة اللتان أعطتا متوسط وزن طري بلغ 234.25 و222.17 ملغم بالتتابع ، الجدول 2 يشير الى معنوية التداخل بين معاملات مستخلص ثمار الحنظل و الأصناف قيد الدراسة ويبين الى إن هناك

اختلاف في كمية الاستجابة فقد حقق الصنف اباء99 مع المعاملة 100 مل لتر$^{-1}$ من مستخلص ثمار الحنظل أعلى متوسط وزن طري للكالس بلغ 292.25 ملغم متفوقا على التركيز 300 مل لتر$^{-1}$ الذي سجل أدنى متوسط وزن للكالس بلغ 97.00 لذات الصنف، كما نلحظ معنوية التداخل بين الصنفان بحوث10 وساوه مع المعاملة 100 مل لتر$^{-1}$ اللذان أعطيا متوسط وزن طري بلغ 234.38 و 254.88 ملغم لكليهما بالتتابع .

جدول 2 .تأثير تراكيز مستخلص ثمار الحنظل في الوزن الطري للكالس (ملغم)

**Table2. Effect of colocynth plant extract Concentration in fresh weight of callus (mg)**

| الأصناف **cultivars** | تراكيز مستخلص الحنظل مل لتر$^{-1}$ **Concentration of colocynth plant extract ml L$^{-1}$** | | | | المتوسط **mean** |
|---|---|---|---|---|---|
| | **0** | **100** | **200** | **300** | |
| إباء99 | 260.25 | 292.25 | 225.75 | 97.00 | **218.81** |
| بحوث10 | 189.50 | 234.38 | 239.12 | 114.75 | **194.44** |
| ساوة | 216.75 | 254.88 | 237.88 | 85.00 | **198.62** |
| **LSD0.05** | **5.25** | | | | **2.64** |
| المتوسط **Mean** | **222.17** | **260.50** | **234.25** | **98.92** | |
| **LSD0.05** | **3.03** | | | | |

سلكت الأصناف سلوكا مختلفا فيما بينها في صفة الوزن الجاف للكالس بتأثير مستخلص ثمار الحنظل جدول3 فقد تفوق الصنف اباء99 معنويا في هذه الصفة بمتوسط وزن جاف بلغ 20.28 ملغم مقارنة مع الصنفان بحوث10 وساوه اللذان لم يختلفا معنويا بينهما في هذه الصفة . أثرت معاملات مستخلص ثمار الحنظل في متوسط الوزن الجاف إذ حقق التركيز 100 مل لتر$^{-1}$ أعلى متوسط وزن جاف بلغ 24.75 ملغم فيما تحقق أدنى متوسط للوزن الجاف لدى المعاملة 300 مل لتر$^{-1}$ بمتوسط 9.75 ملغم وسجلت معاملة المقارنة وزن جاف 20.87 ملغم . تشير النتائج في جدول3 الى معنوية التداخل بين معاملات

مستخلص ثمار الحنظل والأصناف في كمية الاستجابة، تحقق أعلى متوسط وزن جاف للكالس في الصنف اباء99 مع المعاملة 100 مل لتر$^{-1}$ بمتوسط بلغ 26.88 ملغم تلته الصنفان ساوه وبحوث10 اللذان سجلا متوسط وزن جاف بلغ 25.00 و 22.37 ملغم لكليهما بالتتابع عند نفس المعاملة بينما انخفض الوزن الجاف للكالس للأصناف الثلاثة مع المعاملة 300 مل لتر$^{-1}$ من مستخلص ثمار الحنظل.

جدول3. تأثير تراكيز مستخلص ثمار الحنظل في الوزن الجاف للكالس (ملغم)

**Table3. Effect of colocynth plant extract Concentration on dry weight of callus (mg)**

| الأصناف **Cultivars** | تراكيز مستخلص الحنظل مل لتر$^{-1}$ **Concentration of colocynth plant extract ml L$^{-1}$** | | | | المتوسط **mean** |
|---|---|---|---|---|---|
| | **0** | **100** | **200** | **300** | |
| إباء99 | 22.88 | 26.88 | 22.13 | 9.25 | **20.28** |
| بحوث10 | 19.62 | 22.37 | 23.12 | 11.12 | **19.06** |
| ساوة | 20.12 | 25.00 | 22.50 | 8.87 | **19.12** |
| **LSD0.05** | **1.13** | | | | **0.57** |
| المتوسط **Mean** | **20.87** | **24.75** | **22.58** | **9.75** | |
| **LSD0.05** | **0.65** | | | | |

أما بالنسبة لتأثير جرع أشعة كاما فقد أختلفت أصناف الحنطة فيما بينها معنويا في متوسط الوزن الطري للكالس ومن خلال الجدول4 نلاحظ تفوق الصنف إباء99 معنويا في متوسط الوزن الطري بلغ 133.18 ملغم متفوقا على الصنفان بحوث10 و ساوة اللذان أعطيا متوسط وزن بلغ 127.00 و125.70 ملغم بالتتابع. أثرت جرع التشعيع معنويا في استحثاث ووزن الكالس ، فقد تفوقت معاملة المقارنة معنويا على بقية جرع التشعيع والتي أعطت متوسط وزن طري بلغ 224.47 ملغم وبنسبة زيادة بلغت 23.78 و 67.73 و 79.27 % عن الجرع 100 و200 و300 Gy والتي أعطت متوسط وزن طري بلغ 171.07 و

72.43 و 46.53 ملغم بالتتابع. يشير الجدول 4 الى معنوية التداخل بين جرع أشعة كاما وأصناف الحنطة الثلاثة قيد الدراسة ، فقد تفوق الصنف إباء99 مع معاملة المقارنة وحقق وزن طري بلغ 259.90 ملغم في حين تفوق الصنف ساوة مع الجرعة Gy100 وحقق متوسط وزن طري بلغ 193.80 ملغم متفوقا على الصنفان إباء99 وبحوث10 اللذان حققا متوسط وزن طري بلغ 171.80 و 147.60 ملغم لكليهما بالتتابع ، في حين أنخفض الوزن الطري للكالس مع الجرعة Gy300 ولجميع الأصناف المدروسة.

جدول 4. تأثير جرع من أشعة كاما في الوزن الطري للكالس (ملغم)

**Table 4. Effect of Dose gamma rays in fresh weight callus (mg)**

| الأصناف **Cultivars** | جرع أشعة كاما **Gy** **Dose of gamma rays (Gy)** | | | | المتوسط **Mean** |
|---|---|---|---|---|---|
| | **0** | **100** | **200** | **300** | |
| إباء99 | 259.90 | 147.60 | 71.00 | 54.20 | **133.18** |
| بحوث10 | 196.50 | 171.80 | 90.60 | 49.10 | **127.00** |
| ساوة | 217.00 | 193.80 | 55.70 | 36.30 | **125.70** |
| **LSD0.05** | **5.98** | | | | **2.99** |
| المتوسط **Mean** | **224.47** | **171.07** | **72.43** | **46.53** | |
| **LSD0.05** | **3.45** | | | | |

أظهرت النتائج المتحصل عليها في جدول 5 عن عدم وجود فروق معنوية بين الأصناف في صفة متوسط الوزن الجاف قيد الدراسة الحالية بتأثير جرع أشعة كاما المختلفة ، كما ويشير الجدول نفسه الى تأثير جرع أشعة كاما في متوسط الوزن الجاف للكالس إذ تفوقت معاملة المقارنة معنويا في تحقيق أعلى وزن جاف بلغ 21.26 ملغم تلتها الجرعة Gy100 التي سجلت متوسط وزن جاف بلغ 14.93 ملغم في حين انخفض الوزن الجاف مع زيادة جرع الإشعاع الى 200 و300 Gy بالتتابع .

نلحظ أيضا من جدول 5 معنوية التداخل بين جرع الإشعاع وأصناف الحنطة المدروسة في هذه الصفة فقد تحقق أعلى متوسط وزن جاف في معاملة المقارنة مع الصنف إباء99 وبمتوسط بلغ 22.60 ملغم متفوقا على الصنفان بحوث10 و ساوة لنفس المعاملة التي انخفض فيها الوزن الجاف ، كما نلحظ تفوق الجرعة Gy100 مع الصنف ساوة بإعطاء أعلى متوسط وزن جاف للكالس بلغ 16.50 ملغم ومتفوقا على الصنفان إباء99 و بحوث 10، في حين انخفض متوسط الوزن الجاف بزيادة جرع الإشعاع وصولا الى الجرعتين 200 و 300 Gy.

جدول5. تأثير جرع من أشعة كاما في الوزن الجاف للكالس (ملغم)

**Table 5. Effect of Dose gamma rays in dry weight callus (mg)**

| الأصناف **cultivars** | جرع أشعة كاما **Gy** **Dose of gamma rays (Gy)** | | | | المتوسط **Mean** |
|---|---|---|---|---|---|
| | **0** | **100** | **200** | **300** | |
| إباء99 | 22.60 | 13.70 | 6.50 | 5.60 | **12.10** |
| بحوث10 | 20.10 | 14.60 | 9.00 | 5.10 | **12.20** |
| ساوة | 21.10 | 16.50 | 6.40 | 4.20 | **12.05** |
| **LSD0.05** | **0.96** | | | | **n.s** |
| المتوسط **Mean** | **21.26** | **14.93** | **7.30** | **4.96** | |
| **LSD0.05** | **0.55** | | | | |

أختلفت تراكيز مستخلص ثمار الحنظل في التأثير في استحثاث الكالس من خلال التأثير في الوزن الطري والجاف للكالس إذ نلحظ أن الأصناف سلكت نفس السلوك تجاه تراكيز مستخلص ثمار الحنظل المستخدمة في الدراسة وتحقق أعلى متوسط وزن طري وجاف للكالس لدى المعاملة 100 مل لتر$^{-1}$ قياساً مع معاملة المقارنة ثم انخفض الوزن الطري والجاف للكالس مع زيادة تراكيز مستخلص ثمار

الحنظل، يعزى ذلك الى إن التركيز 100مل لتر$^{-1}$ كان الأفضل في الحصول على أعلى وزن طري وجاف للكالس، فضلاً عن أحتواء المستخلص على مركبات فعالة ربما تؤدي الى تحفيز استحثاث الكالس والتي تشمل الراتنجيات Resin و السابونين والبكتين و الكولين والحنظلين و الكولوسانثين والستيرول والفينولات كل هذه المركبات قد يكون لها علاقة في تحفيز استحثاث ونمو الكالس ، فضلاً عن ذلك فقد أظهرت نتائج التحليل الوراثي للـ DNA في الدراسة الحالية عن وجود تغاير وراثي بين معاملات مستخلص ثمار الحنظل ومن خلال ملاحظة الأشكال نجد أن التركيز 100 مل لتر$^{-1}$ من مستخلص ثمار الحنظل كان أكثر المعاملات في تحفيز التغاير الوراثي وباختلاف الأصناف والبوادئ مما أنعكس على استحثاث ونمو الكالس.

جاءت نتائج هذه الدراسة مؤكدة لما توصلت الية ( 6 و7) الذين وجدوا أن التركيز 100 مل لتر$^{-1}$ والتركيز 150 مل لتر$^{-1}$ من مستخلص ثمار الحنظل كان الأفضل في تحفيز النمو الخضري لقصب السكر والأفضل في نمو واستحثاث الكالس الجت فضلاً عن تحفيز التغاير الوراثي . يعود دور مستخلص ثمار الحنظل الى تحفيز الأجزاء النباتية على النمو والانقسام وكذلك أحتواء المستخلصات النباتية ومنها مستخلص ثمار الحنظل على بعض المركبات الفعالة والتي من شأنها تحفيز النمو . أما تأثير التراكيز العالية في خفض الوزنين الطري والجاف للكالس فقد يعود الى زيادة تركيز بعض المركبات الفعالة مثل المركبات التربينية خفض النمو، من جهة أخرى نلحظ أن الجرعة الإشعاعية 100 Gy تسببت هي الأخرى في تحفيز التغاير الوراثي مقارنة مع الجرع الأخرى 200 و300 Gy أضافة الى تحقيق اعلى وزن طري وجاف مقارنة مع الجرع الاخرى وبنفس الوقت نجد أن الوزن الطري والجاف للجرعة 100 Gy كان أقل من معاملة المقارنة ، قد يعود السبب في زيادة الوزن الطري للكالس الناتج من الجرعة 100 Gy مقارنة مع الجرع 200 و300 Gy الى التأثير التحفيزي لهذه الجرعة في نمو وتطور خلايا أنسجة الكالس ، أما الجرع العالية فقد تسببت في خفض متوسط وزن الكالس نتيجة التأثيرات المباشرة الضارة على كروموسومات الخلايا وبالتالي التأثير في الأنقسام الميتوزي Mitosis والذي ينعكس على تطور النبات وأخلافه لذا فأن الجرعة المثالية هي التي يمكن أستثمارها في الحصول على خطوط متحملة للملوحة والجفاف (19). يفسر انخفاض الوزنين الطري والجاف للكالس تحت الجرع العالية الى ما يعرف بالحساسية الإشعاعيةٍ Sensitivity Radio وهي مقياس لمعرفة مدى تأثر الأجزاء المشعة بالإشعاع ، وهناك نوعين من التأثيرات البيولوجية للإشعاع هي التأثيرات المباشرة وغير المباشرة ، فالتأثيرات المباشرة للإشعاع يكون الجزء المتضرر هو نواة الخلية أي المادة الوراثية الدنا لاسيما أذا كانت الطاقة الممتصة كافية لأقتلاع الألكترونات من جزئ الدنا مما

ينتج عنها تكسير الروابط ومن ثم تكسير أحد الشريطين أوكلاهما مما يسبب تغيير في الشفرة الوراثية ( تغير على المستوى الجيني) مؤدياً موت الخلية (3). أما التأثير غير المباشر فينتج عن تأثير الإشعاع على الماء الموجود في الخلية مما ينتج عنه تحلل الماء وتكون جذور حرة ومنها ذرات الأوكسجين النشط و بيروكسيد الهيدروجين التي لها القابلية على التفاعل مع مكونات الخلية مكونة بذلك مركبات سامة تؤثر على الخلايا حيث لوحظ إن زيادة $H_2O_2$ و Lipidhydroperoxide تسبب في أكسدة وتدمير الأغشية البلازمية ، يفسر تثبيط الجرع العالية من أشعة كاما من خلال تأثير الإشعاع على وضعية الخلايا والوسط الخارجي للحساسية الإشعاعية للنبات من خلال مراحل النمو المختلفة وكذلك يعتمد تأثير الإشعاع على حجم الخلية إذ توجد علاقة بين حجم النواة ودرجة تأثير الإشعاع والتي يعبر عنها بكمية انحرافات الكروموسومات إذ أن الخلايا ذات حجم الأنوية الصغيرة تكون حساسيتها للإشعاع أقل من الخلايا ذات الأنوية الكبيرة التي يكون تأثير الإشعاع فيها أكبر ( 16).

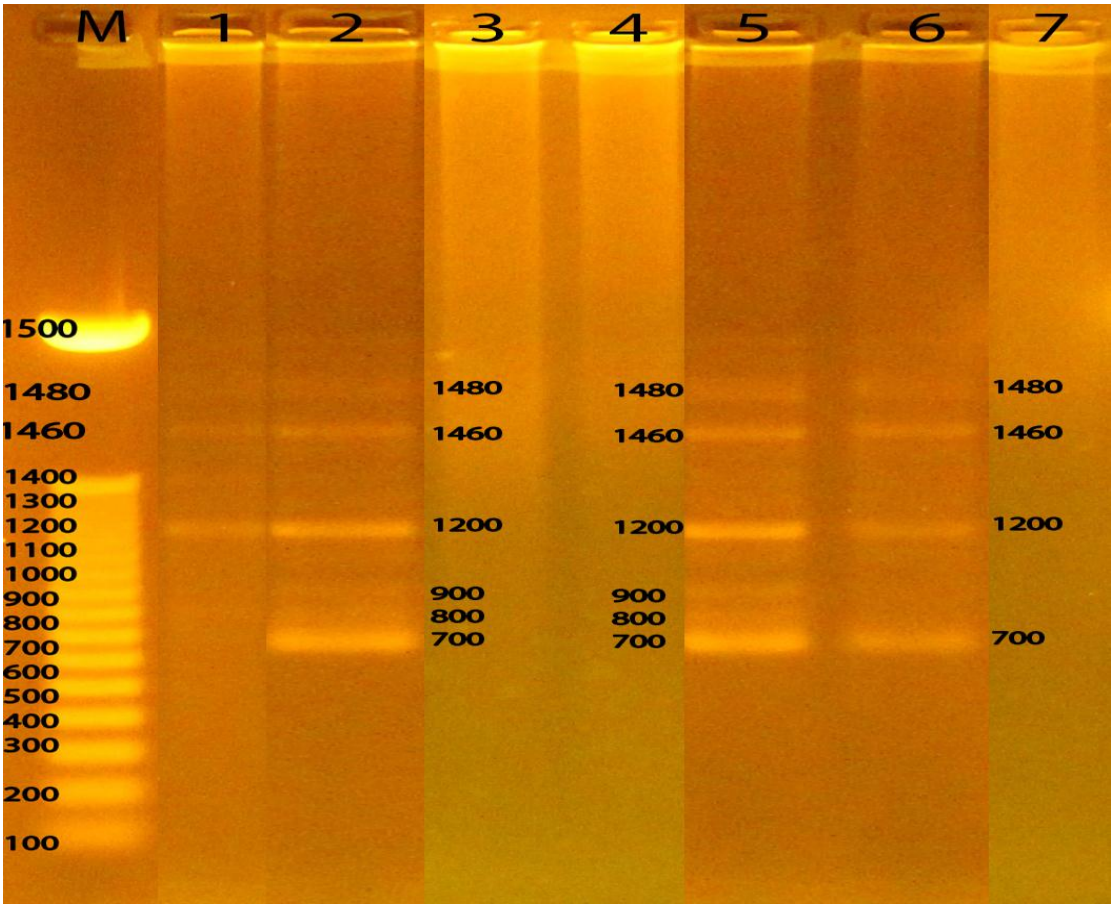
المؤشرات الجزيئية

نجح البادئ OPA-01 في الكشف عن التغاير الوراثي بين الأصناف والمعاملة بمستخلص ثمار الحنظل وأشعة كاما ويلحظ من نتائج التحليل الوراثي أن أعلى تغاير وراثي تحقق في الجرعة 100 Gy والتركيز 100 مل لتر$^{-1}$ من مستخلص ثمار الحنظل وبدرجة قليلة مع بقية المعاملات، فضلاً عن كون هاتين المعاملتين كانتا الأفضل في استحثاث الكالس مقارنة مع بقية المعاملات الأخرى وبناءً على هذا الكشف وباستخدام تقانة PCR-RAPD يمكن اختيار هذه المعاملات في برامج التربية خارج الجسم الحي، أذ كما نلحظ من الأشكال التالية أن أكثر المعاملات التي حصل بها أرتباط مع البادئ OPA-01 هي معاملة المقارنة والمعاملة 100 مل لتر$^{-1}$ من مستخلص ثمار الحنظل والجرعة 100 Gy ولجميع الأصناف ومن خلال استخدام هذه التقانة في عزل وترحيل الدنا أثبتت هذه الطريقة نجاحها في الحصول على الكمية المطلوبة وبدرجة عالية من النقاوة والكشف عن التغاير الوراثي.

البادئِ **OPA**–01 للصنف إباء99

أظهرت نتائج الكشف الوراثي بأستخدام تقانة PCR- RAPD من الشكل 1 عن أختلاف سلوك البادئ OPA-01 بأختلاف أصناف الحنطة ، فقد حقق هذا البادئ مع الصنف إباء99 سبعة مواقع ارتباط فيزياوية تراوحت أوزانها الجزيئية بين 1480- 700 bp ، وحقق التركيز 100 مل لتر$^{-1}$ من مستخلص ثمار الحنظل أعلى عدد للحزم بلغت 6 حزم وأظهرت الحزمة المتألقة بوزن جزيئي 1200 bp ، وسجلت الجرعة 100 Gy 6 حزم وظهرت الحزمة المتألقة بوزن جزيئي 700 bp في حين سجلت معاملة

المقارنة 5 حزم في حين لم تسجل بقية المعاملات لهذا الصنف أي أرتباط مع هذا البادئ.




شكل1. البادئ OPA-01 للصنف إباء99 99figuer1. Primer OPA-01 to cultivar iba

M= الدليل الحجمي DNA – Ladder . 4= 300 مل لتر$^{-1}$ مستخلص ثمار الحنظل.

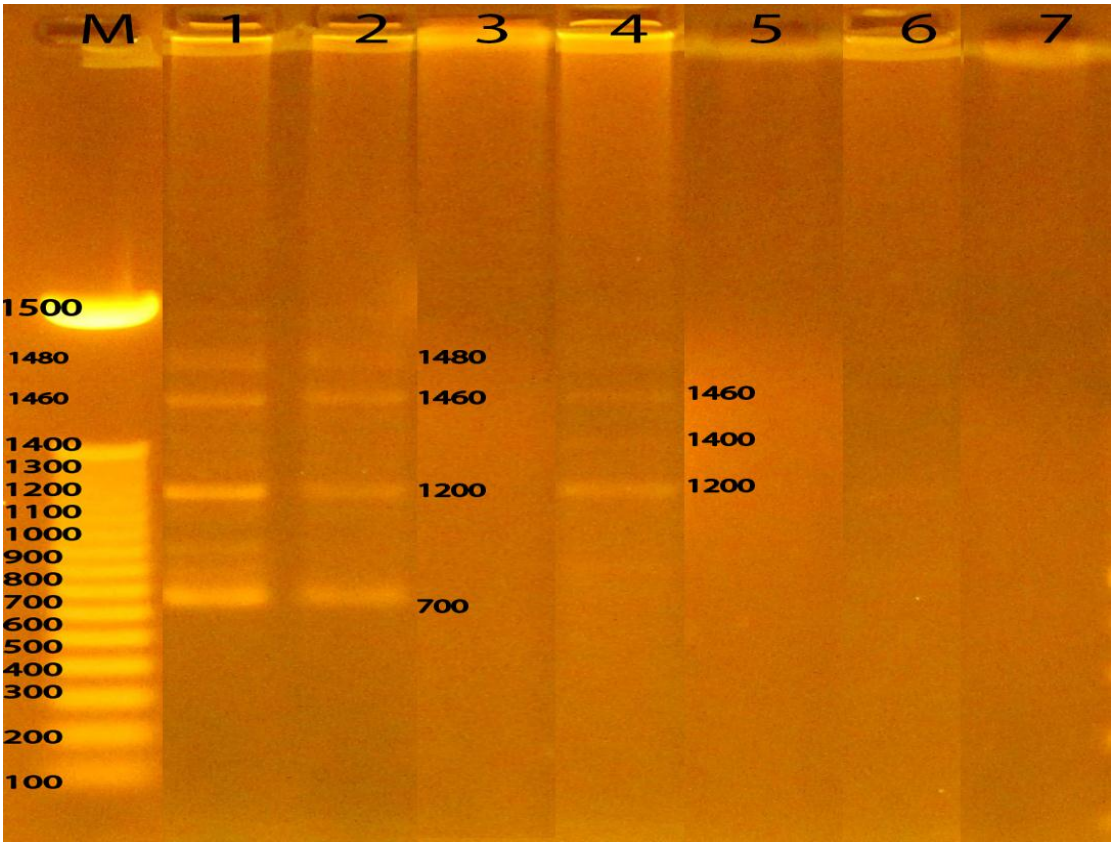
1= معاملة المقارنة . 5= 100 Gy.

2= 100 مل لتر$^{-1}$ مستخلص ثمار الحنظل . 6= 200 Gy.

3= 200 مل لتر$^{-1}$ مستخلص ثمار الحنظل . 7= 300 Gy.

البادئ **OPA**-01 للصنف بحوث10

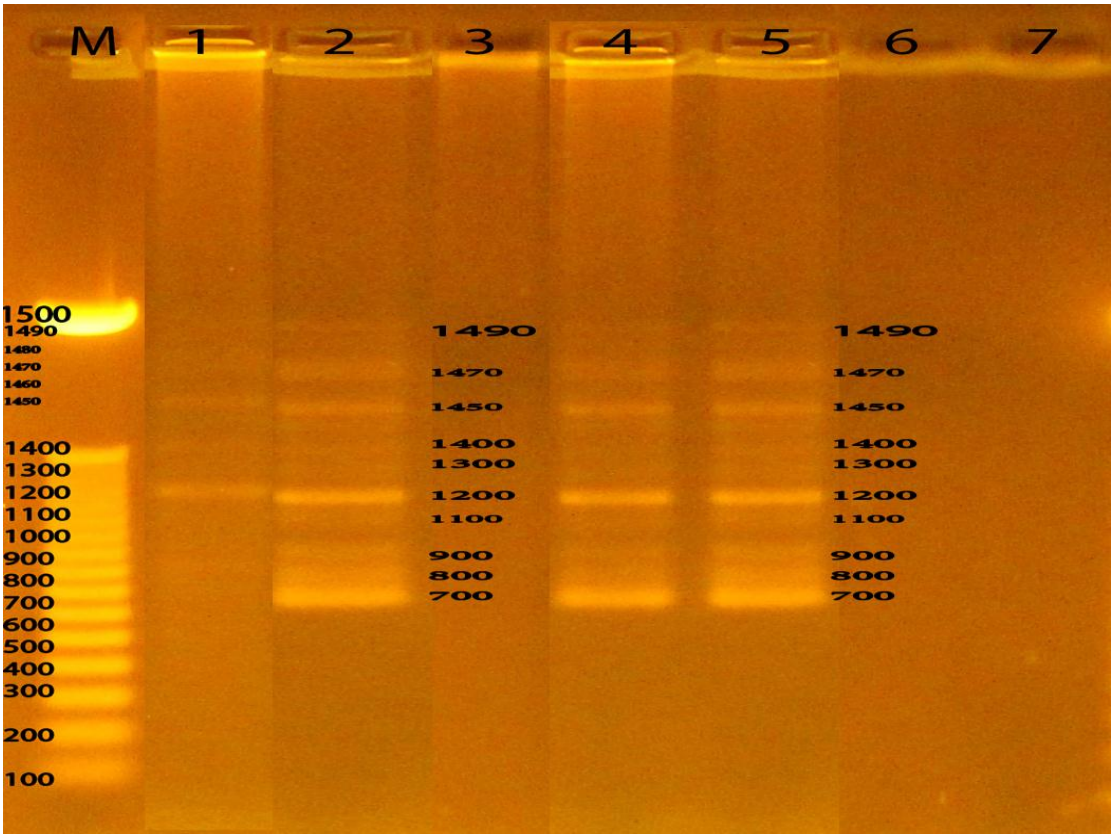
بالنسبة لهذا البادئ مع الصنف بحوث10 فيطهر من نتائج الشكل 2 عن ظهور ثمانية مواقع ارتباط فيزياوية تراوحت أوزانها الجزيئية بين 1480- 700 bp وحققت معاملة المقارنة 7 حزم في حين حقق التركيز 100 مل لتر$^{-1}$ من مستخلص ثمار الحنظل 5 حزم وكانت الحزمتين 1200 و700 bp شديدة التألق وحققت المعاملة 300 مل لتر$^{-1}$ حزمتين بوزن جزيئي 1450 و 1200 bp ، في حين لم تسجل جرع أشعة كاما أي ارتباط مع هذا البادئ .




شكل2. البادئ OPA-01 للصنف بحوث10 figure2. Primer OPA-01 to cultivar- bhuth

البادئ **OPA**-01 للصنف ساوة

حقق هذا البادئ مع الصنف ساوة عشرة مواقع فيزياوية تراوحت أوزانها الجزيئية بين 1490- 700 bp شكل3 وحققت المعاملة 100 مل لتر$^{-1}$ من مستخلص ثمار عشرة حزم وكانت الحزمتين 1200 و700 bp شديدة التألق فيما حققت معاملة المقارنة 3 حزم . في حين سجلت الجرعة 100 Gy عشرة حزم وكانت الحزمتين 1200 و700 bp شديدة التألق.




شكل3. البادئ OPA-01 للصنف ساوة figuer3. Primer OPA-01 to cultivar sawa

إن اختلاف شدة التألق للحزم قد يكون ناتجاً من ظهور بعض الحزم المتضاعفة معاً في نفس الموقع لأمتلاكها نفس الحجم الوزن الجزيئي لذلك تتجمع في الموقع نفسه ( 8). إن فقدان الحزم أو اختلاف مواقعها نتيجة تغيير المواقع المكملة للبادئ على DNA عينات معاملات الأصناف المدروسة والاختلاف في شدة التألق يدل على تأثير مستخلص ثمار الحنظل واشعة كاما في أستحداث الطفرات في خلايا الكالس، وهذا ما أكده Hanacek وآخرون 2002(13) من أن معدل حدوث الطفرات في النباتات يزداد باستخدام المطفرات، إذ بين بعض الباحثين أن بعض المطفرات تعمل على استحداث طفرات نقطية Point mutation وذلك من خلال التغيير في زوج واحد أو أكثر من القواعد النتروجينية نتيجة الحذف Deletion أو التعويض Substitution بزوج واحد من القواعد أو تضاعفه في سلسلة Polynucleotide الطويلة مؤدياً بذلك أحداث تغيير في عملية استنساخ mRNA وبالتالي البروتينات وفعاليتها في الخلايا الحية (10).

أن حجم القطعة المتضاعفة يستند على البعد بين مواقع ارتباط البادئ على شريطي الـ DNA القالب ، أي أنه يساوي النقطة المحصورة بين موقعي الارتباط وبما أن تلك المواقع منتشرة على شريطي الـ DNA بشكل عشوائي فأن حدوث أي تغير في تسلسل

النيوكلوتيدات التي قد تكون ناتجة من طفرة وراثية مثلاً بسبب تغيير في أحد مواقع الارتباط بالبادئ وبذلك يتغير حجم القطعة المتضاعفة والذي يجب أن يكون ضمن قدرة الأنزيم المستخدم في هذه التفاعلات وهو انزيم Taq DNA Polymerase وإن قدرة هذ الأنزيم المستخدم تصل الى بناء قطع متضاعفة يصل حجمها الجزيئي الى 4000 bp (14). وفي بعض الدراسات يصل الى 5000 bp وفي هذه الدراسة لم يتجاوز حجم أكبر قطعة عن 1500 bp. ومن هذه الدراسة يلحظ أن استخدام مستخلص ثمار الحنظل وأشعة كاما وتضمين الوسط الغذائي بالإجهاد الملحي ممثلاً بملح NaCl والإجهاد المائي ممثلاً بمركب PEG قد يؤثر في تحمل الأصناف لتلك الإجهادات .

**REFERNCES:**


1- **AL- Haggar,** M.2013. Evolving molecular methods for detection of mutations . J. Gene Technol. 20:1-12.

2- **AL-Bokari,** M.M.A., ALzahrani, S.M., and A.S. AL.2012.Radiosensitivityof some local cultivars of wheat *Triticum aestivum* L. to gamma irradiation . Bangladesh J.
Bot. 41:(1-5).

3- **AL-Hussani ,** Z. A.J.H. 2016. In vitro Employment of Genetic Variation in Potato Solanum tuberosum L. to Improve Salt Tolerance. PhD. Thesis. Coll. of Agric. Univ. of Kufa.in Arabic. pp181.

4- **AL-Samarey,** I.A. H.2007. Induction and Assessment of Variation for Drought Tolerant in Some Wheat *T. aestivum* L. Cultivars invitro . PhD. Thesis, Coll. of Agric. Univ. of Baghdad. in Arabic. Pp172.

5- **AL-khafaji,** H.M.K.; Ibrahei, M.A and Massan, N. Abd AL-Hussan.2016.Aplication of Assessing RAPD Markers for Genetic Distance Sunflower *Helianthus annuss* L. Euphrates J. Agric. Sci. 8(1):1-10.

6- **AL-Tememi,** R.J.A.2016. Infuence of Colocynth Extract, Growth Regulators and NaCl on Callus Initiation Embryos Alfalfa Seeds invitro . Msc. Thesis . Coll. of .Agric. Univ. of . Baghdad. in Arabic.pp118.

7- **Baday,** S.J.S.2014. Role of Some Plant Growth Regulators and Colocynth Fruits Extract in Vegetative Multiplication and Drought Tolerance of Sugar Can in vitro . MSc. Thesis . Coll. of .Agric.Univ. of Baghdad. in Arabic. Pp120.

8- **Baron,** A.; A. Sebastino, and D.Carputo.1999. Chromosome pairing in Solanum commersonii , S. tuberosum sexual hybrids detected by commersonii-specific RAPDs and cytological analysis. Genome, 42:218-224.

9- **Borzouei,** A., M.Kafi, H.Khazaei, B.

Naseriyan and A.M.Abadi. 2010. Effects of gamma radiation on germination and physiological aspects of wheat *T. aestivum* L. seedlings. Pak.J. Bot. 42(4):2281-229.

**10- Britt**, A.B. 1999. Molecular genetics of DNA repair in higher plants . Trends Plant Sci. 4(1):20-25.

**11- EL-sahookie,** M.M.2013. Breeding Crops for Abiotic Stress –A Molecular and Epigenetic Approach , Coll. of Agric. Univ . of Baghdad . in Arabic. pp244.

**12- Fleming,** T.2000. PDR for Herbal Medicine , Medical economics company Inc. Montvale, USA.,p395-396.

**13-Hanacek**, P.; L. Havel, and M. Truksa .2002. Characterization and determination of getic stability of early somatic embryo culture clones of Norway spruce using RAPD markers. Biol., 57:517-522.

**14-He,** G.; C.S. Parkash, and R.L. Jarret.1994. Analysis of genetic diversity in a sweet potato Ipomoea batata gerplasm collection using DNA amplification fingerprinting. Genome38:938-945.

**15-Kara,** Y., E. Zeynep and E.V.Havser .2015. The effect of different gamma radiation applied on Tokak 157/37 Barley Hordum vulgar L. and Karahan-99 wheat *T. aestivum* L. on M1 generation . Inter. J. of Second. Metabolite.2(1):8-12.

**16-Kovacs,** E. and Keresztes, A.2002. Effect of gamma and UV-B/C radiation on plant cells. Micron, 33:199-210.

**17-Munns,** R., R. James , and A. Lauchli . 2006 . Approaches to increasing the salt tolerance of wheat and other cereals . J. Exp. Agric. 57:1025-1043.

**18-Murashige,**T. and F. Skoog.1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture . Physiol. Plant. 15:473-797.

**19-Predieri ,** S. and Divirgilio, N. 2007. In vitro mutagenesis and mutant multiplication, In:Jain, SM.: Haggman , H.eds. Springer ,323-333.

**20-Singh,** N.K., H.S. Balyan.2009. Induced mutations in bread wheat T. aestivum L. cv. Kharchin65 for reduced plant height and improve grain quality traits. Adv. In Biol. Res.3(5-6):215-221.