وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة ديالى

كلية الزراعة

قسم البستنة وهندسة الحدائق

تقييم قابلية نباتات الشليك المنتجة بزراعة الانسجة والمعرضة للمطفرات الفيزيائية والكيميائية لتحمل الاجهاد الملحي وتوصيفها جزيئياً

أطروحة تقدّمت بها الطالبة رغد عبد الحمزة جوامير

إلى مجلس كلية الزراعة / جامعة ديالى وهي جزء من متطلبات نيل شهادة الدكتوراة

فلسفة في العلوم الزراعية/البستنة وهندسة الحدائق / الفاكهة والخضر

بإشراف

د. اياد عاصي عبيد

استاذ

د.شذى عايد يوسف

رئيس باحثين علميين

1444 هـ

2022م

﴿يَرْفَعِ اللَّهُ الَّذِينَ آمَنُوا مِنْكُمْ وَالَّذِينَ أُوتُوا الْعِلْمَ دَرَجَاتٍ ۚ وَاللَّهُ بِمَا تَعْمَلُونَ خَبِيرٌ﴾

صدق الله العظيم

سورة المجادلة

اية: 11

الخلاصة:

تعد الملوحة احد العوامل المحددة لانتاج نبات الشليك كونه يصنف من النباتات الحساسة جداً للملوحة ومن الضرورة الاتجاه الى استعمال تقنيات تهدف الى نباتات شليك تتحمل الملوحة قدر الامكان لذا اجريت هذه الدراسة بهدف تطوير وتحسين صفات نبات الشليك اذ وظفت التقانات الاحيائية وطرق التربية الحديثة في مجال استحداث التغايرات الوراثية باستعمال التطفير الفيزيائي والكيميائي والزراعة خارج الجسم الحي لنبات للشليك .*Fragaria x ananassa* Duch صنف Albion لتحمل الاجهاد الملحي.

طبقت التجارب باستخدام التصميم العشوائي الكامل CRD وبموجب اختبار دنكن متعدد الحدود وعلى مستوى احتمال 5% باستخدام البرنامج الاحصائي Genstat وبتجارب عاملية فيما عدا تجارب التعقيم وانتاج المواد الفينولية من الافرع المطفرة والتي تضمنت تجارب بسيطة وكانت النتائج كالاتي:

شملت التجربة اكثار الشليك بأستعمال قمم المدادات كجزء نباتي للأكثار بمادة كلوريد الزئبق $HgCl_2$ تركيز (0.1%) ولمدد مختلفة (0 ، 5، 7 دقائق) بهدف اختيار المدة المناسبة لتعقيم الاجزاء النباتية وكذلك اختيار التوليفة المناسبة لنشوء البراعم وكذلك اختيار التركيز المناسب من BA متداخلاً مع NAA لتضاعف الافرع فضلاً عن الاقلمة.

عرضت الافرع المتضاعفة والمتجانسة والناتجة من مرحلة التضاعف الى عاملين الاول هو التطفير ويشمل الفيزيائي باستعمال اشعة كاما بالجرع 20، 50، 100 فضلاً عن معاملة المقارنة والكيميائي باستعمال ازايد الصوديوم (NaN3) بتركيزين 0.25، 0.5 ملي مول فضلاً عن معاملة عدم الاضافة، والعامل الثاني فقد كان تعريض الافرع الى المستويات الملحية 0، 2.5، 5، 10 غم لتر$^{-1}$ NaCl

بالتداخل مع عامل التطفير. اظهرت النتائج ان تعقيم قمم المدادات قد تحقق باستعمال $HgCl_2$ لمدة 7 دقائق، اذ اعطت اعلى نسبة بقاء وبلغ 100% ولم تعط اي نسبة تلوث ، وان افضل توليفة من منظمات النمو كانت 0.5 ملغم لتر$^{-1}$ BA و 1.5 ملغم لتر$^{-1}$ Kin اذ اعطت اعلى نسبة استجابة وبلغت 100% وان انسب تداخل لمرحلة التضاعف كان 0.5 ملغم لتر$^{-1}$ BA و 0.2 ملغم لتر$^{-1}$ NAA .

اظهرت نتائج تداخل معاملة التطفير الفيزيائي مع المستويات الملحية، حصول زيادة في عدد الافرع عند الجرعة 20 كري متداخلة مع المستوى الملحي 2.5 غم لتر$^{-1}$ في حين بينت النتائج التأثير المعنوي لمعاملة (20 كري + 0 NaCl) على جميع التداخلات الاخرى في اعطاء اعلى معدل للوزن الطري و الوزن الجاف .اما فيما يخص الصفات الفسلجية فقد اظهرت النتائج اعلى محتوى للحامض الاميني ال Proline عند المعاملة (50 كري عند المستوى 10 غم لتر$^{-1}$ NaCl) ، وسجل اعلى تراكم للكاربوهيدرات واعلى محتوى للكلوروفيل عند المعاملة (20 كري + 0 NaCl) ، كما بلغ اعلى تركيز لايون الصوديوم والمغنيسيوم عند المعاملة (100 كري بالتداخل مع 10 غم لتر$^{-1}$ NaCl) ومن جانب اخر فقد حدثت زيادة في تركيز ايون الكالسيوم عند المعاملة (100 كري + 0 غم لتر$^{-1}$ NaCl) كما سببت المعاملة (50كري و 5 غم لتر$^{-1}$ NaCl) اعلى تركيز لايون البوتاسيوم.فضلاً عن ذلك اثر التداخل (100 كري متداخلة مع المستوى 10 غم لتر$^{-1}$ NaCl) معنوياً في زيادة فعالية انزيم ال Peroxidase في حين سجلت المعاملة (20 كري + 0 NaCl) اعلى فعالية لانزيم ال Catalase واعلى تركيز للبروتين.

وبينت نتائج تداخل معاملة التطفير الكيميائي مع المستويات الملحية، تفوق المعاملة (NaN_3 0 + NaCl 0) في اعطاء اعلى معدل لعدد الافرع وطول الافرع والوزن الطري والجاف ، وفي ما يتعلق بالصفات الفسلجية فقد اظهرت النتائج اعلى تراكم للحامض الاميني ال Proline عند المعاملة (0 NaN_3 + 10 غم لتر$^{-1}$ NaCl) ، كما سجل اعلى تراكم للكاربوهيدرات عند المعاملة (0.5 ملي مول NaN_3 متداخلاً مع المستوى 5 غم لتر$^{-1}$ NaCl وبلغ اعلى محتوى للكلوروفيل عند معاملة المقارنة فضلاً عن ذلك اثر التداخل بين 0.5 ملي مول NaN_3 و المستوى 10 غم لتر$^{-1}$ في اعطاء اعلى تركيز لايون الصوديوم في حين بلغ اعلى تركيز لايونات الكالسيوم و البوتاسيوم والمغنيسيوم عند معاملة (0.25 ملي مول NaN_3 و 0 NaCl) كما تفوقت المعاملة (0 NaN_3 + 10 غم لتر$^{-1}$) في اعطاء اعلى فعالية لانزيم ال Peroxidase في حين اعطت المعاملة (0.25 ملي مول NaN_3 متداخلاً مع المستوى الملحي 2.5غم لتر$^{-1}$ اعلى فعالية لانزيم ال Catalase كما سجلت المعاملة (0 NaN_3 + 5 غم لتر$^{-1}$ NaCl) اعلى تركيز للبروتين.

وتفوقت الجرعة 20 كري معنوياً على باقي معاملات التطفير اذ اعطت اعلى تراكم للمركبات Catechine ، Ferulic acid ، Ellagic acid ، Qurcetine و Kaempferol.

استعمل مؤشر التضاعف العشوائي المتعدد الاشكال لسلسلة DNA (RAPD – PCR) للكشف عن التغايرات الوراثية للنباتات الناتجة من زراعة الافرع المتضاعفة والمطفرة باشعة كاما و NaN_3 اذ اثبتت جميع البوادىء فعاليتها في اعطاء حزم متباينة بين المواقع المقاسة باستثناء البادىء C8 . ميز البادىء H9 جميع النباتات المستحدثة من الفروع المعاملة بالتطفير الكيميائي NaN3 او الفيزيائي (اشعة كاما) وكانت اكثر التباينات في المعاملة 50 كري واقل التباينات في المعاملة 100

كري مقارنة بالنباتات غير الطافرة ، اذ اظهرت نتائج الترحيل على هلام الاكاروز وجود تغايرات واختلافات وراثية بين معاملات التطفير قيد الدراسة وفي ضوء المعطيات السابقة يتضح لنا امكانية الاستفادة من تقنية التطفير خارج الجسم الحي لتحسين صفات نبات الشليك لتحمل الاجهاد الملحي.

قائمة المحتويات

التسلسل	الموضوع	رقم الصفحة
1	المقدمة	1
2	مراجعة المصادر	4
1-2	الوصف النباتي	4
2-2	مراحل الاكثار	5
1-2-2	التعقيم وانشاء الزروعات النسيجية	5
2-2-2	مرحلة النشوء	7
3-2-2	مرحلة التضاعف	9
4-2-2	مرحلة الاقلمة	13
3-2	تأثير المطفرات في استحثاث الطفرات	15
1-3-2	تأثير التطفير في تحسين نمو نباتات الشليك	18
2-3-2	تأثير التطفير في المحتويات الخلوية	20
4-2	الملوحة وتأثيراتها في نمو وانتاجية النبات	21
1-4-2	تأثير الملوحة في نمو نباتات الشليك	22
2-4-2	تأثير الملوحة في المحتويات الخلوية	24
1-2-4-2	محتوى الخلايا من البرولين	24
2-2-4-2	تأثير الملوحة في تراكم الكاربوهيدرات	27
3-2-4-2	تاثير الملوحة في محتوى الخلايا من الايونات	29
4-2-4-2	تأثير الملوحة في فعالية انزيم البيروكسيديز والكاتليز	30
5-2	تأثير التطفير في تحمل الاجهادات الملحية	31
6-2	تأثير التطفير والملوحة في المحتويات الخلوية	33
التسلسل	الموضوع	رقم الصفحة

التسلسل	الموضوع	رقم الصفحة
2-1-5-3	الوزن الطري والجاف (غم)	51
1-1-5-3	معدل عدد الافرع وطول الافرع (سم)	51
1-5-3	مؤشرات الدراسة	51
5-3	تأثير الملوحة والتطفير في نمو الفروع	50
1-2-4-3	تحضير المطفر صوديوم ازايد	50
2-4-3	التطفير الكيميائي بالمطفر صوديوم ازايد	49
1-4-3	التطفير الفيزيائي باشعة كاما	49
4-3	تجارب التطفير	49
3-3-3	اختبار تأثير تداخل السايتوكاينين مع الاوكسين في مرحلة التضاعف	48
2-3-3	اختبار تأثير تداخل السايتوكاينين مع الاوكسين في مرحلة النشوء	47
1-3-3	التعقيم السطحي وزراعة الاجزاء النباتية	47
3-3	مراحل الاكثار والمعاملات	47
2-3	تحضير الوسط الغذائي المستخدم وتعقيمه	45
1-3	تعقيم ادوات الزراعة	44
3	**المواد وطرائق العمل**	**44**
9-2	المؤشرات الجزيئية	42
8-2	تأثير التطفير على انتاج المركبات الفينولية	40
5-7-2	مركب Kaempferol	39
4-7-2	مركب Qurcetine	38
3-7-2	مركب Ellagic acid	37
2-7-2	مركب Ferulic acid	36
1-7-2	مركب Catechine	36
7-2	المركبات الفينولية	35

3-1-5-3	تقدير الكربوهيدرات (مايكروغرام غم$^{-1}$ وزن جاف)	51
4-1-5-3	تقدير الحامض الاميني البرولين (مايكرومول غم$^{-1}$ وزن طري)	53
5-1-5-3	تقدير الكلوروفيل (ملغم غم$^{-1}$ وزن طري)	54
6-1-5-3	تقدير تراكيز الايونات في الافرع الناتجة من مرحلة التضاعف (ملغم غم$^{-1}$ وزن جاف)	55
7-1-5-3	تقدير فعالية انزيمات البيروكسيديز والكاتليز والبروتين	55
1-7-1-5-3	تقدير فعالية انزيم البيروكسيديز (وحدة مل$^{-1}$)	56
2-7-1-5-3	تقدير فعالية انزيم الكاتليز (وحدة مل$^{-1}$)	56
3-7-1-5-3	قياس البروتين (ملغم مل$^{-1}$)	57
6-3	مرحلة الاقلمة	57
1-6-3	اختبار تأثير الاوساط الزراعية في النسبة المئوية للبقاء	57
7-3	تقدير المركبات الفينولية	59
1-7-3	الاستخلاص والتقدير الكمي والنوعي للمركبات الفينولية من تجارب التضاعف	59
2-7-3	عملية الاستخلاص	59
3-7-3	ظروف الفصل	59
8-3	دراسة المؤشرات الجزيئية	64
1-8-3	استخلاصDNA	64
2-8-3	تفاعل البلمرة المتسلسل Polymerase chain reaction– PCR	65
3-8-3	تحليل النتائج Data Analysis	67
9-3	التصميم والتحليل الاحصائي	68
التسلسل	**الموضوع**	**رقم الصفحة**
4	النتائج والمناقشة	69

1-4	مرحلة النشوء	69
1-1-4	تعقيم الاجزاء النباتية	69
2-1-4	تأثير اضافة توليفات من السايتوكاينينات والاوكسينات الى الوسط الغذائي في استجابة الاجزاء النباتية للنمو	70
2-4	مرحلة التضاعف	73
1-2-4	تأثير اضافة معاملات من البنزل ادنين (BA) متداخلاً مع نفثالين حامض الخليك (NAA) في معدل عدد الافرع	73
2-2-4	تأثير اضافة معاملات من BA متداخلاً مع NAA في معدل طول الافرع	76
3-4	تأثير التطفير باشعة كاما في تحمل نبيتات الشليك للاجهادات الملحية	81
1-3-4	تأثير التشعيع والمستويات الملحية في الصفات الخضرية لنبيتات الشليك	81
1-1-3-4	عدد الافرع	81
2-1-3-4	متوسط طول الافرع	83
3-1-3-4	الوزن الطري لنيتات الشليك (غم)	85
4-1-3-4	الوزن الجاف لنيتات الشليك (غم)	87
2-3-4	تأثير التشعيع والمستويات الملحية في الصفات الفسلجية لنبيتات الشليك	92
1-2-3-4	محتوى الاوراق من البرولين (مايكرومول غم$^{-1}$ وزم طري)	92
2-2-3-4	محتوى الاورق من الكاربوهيدرات (مايكروغرام غم$^{-1}$ وزن جاف)	95
3-2-3-4	الكلوروفيل (ملغم غم$^{-1}$ وزن طري)	98
4-2-3-4	تركيز ايون الصوديوم (ملغم غم$^{-1}$ وزن جاف)	100
التسلسل	**الموضوع**	**رقم الصفحة**
5-2-3-4	تركيز ايون الكالسيوم (ملغم غم$^{-1}$ وزن جاف)	102

4-4-3-4	تركيز ايون البوتاسيوم (ملغم غم$^{-1}$ وزن جاف)	104
7-2-3-4	تركيز ايون المغنيسيوم (ملغم غم$^{-1}$ وزن جاف)	106
8-2-3-4	فعالية انزيم POD (وحدة مل$^{-1}$)	109
9-2-3-4	فعالية انزيم CAT (وحدة مل$^{-1}$)	110
10-2-3-4	محتوى الاوراق من البروتين (ملغم مل$^{-1}$)	110
4-4	تأثير الملوحة والتطفير الكيميائي بمادة صوديوم ازايد (NaN3) في تحمل النبيتات للاجهادات الملحية	116
1-4-4	تأثير المستويات الملحية والتطفير بمادة صوديوم ازايد في الصفات الخضرية لنبيتات الشليك	116
1-1-4-4	عدد الافرع	116
2-1-4-4	طول الافرع (سم)	118
3-1-4-4	الوزن الطري لنبيتات (غم)	120
4-1-4-4	الوزن جاف لنبتات (غم)	122
2-4-4	تأثير المستويات الملحية و المطفر صوديوم ازايد في الصفات الفسلجية لنبيتات الشليك	126
1-2-4-4	محتوى الاوراق من البرولين (مايكرومول غم$^{-1}$ وزن طري)	126
2-2-4-4	محتوى الاوراق من الكاربوهيدرات (مايكروغرام غم$^{-1}$ وزن جاف)	128
3-2-4-4	الكلوروفيل (ملغم غم$^{-1}$ وزن طري)	130
4-2-4-4	تركيز ايون الصوديوم (ملغم غم$^{-1}$ وزن جاف)	132
التسلسل	**الموضوع**	**رقم الصفحة**
5-2-4-4	تركيز ايون الكالسيوم (ملغم غم$^{-1}$ وزن جاف)	134

6-2-4-4	تركيز ايون البوتاسيوم (ملغم غم$^{-1}$ وزن جاف)	136
7-2-4-4	تركيز ايون المغنيسيوم (ملغم غم$^{-1}$ وزن جاف)	138
8-2-4-4	فعالية انزيم البيروكسديز POD (وحدة مل$^{-1}$)	140
9-2-4-4	فعالية انزيم الكاتليز CAT (وحدة مل$^{-1}$)	140
10-2-4-4	تركيز البروتين (ملغم مل$^{-1}$)	141
5-4	اقلمة النبيتات الناتجة عن مرحلة التضاعف	147
1-5-4	تأثير نوع الوسط الزرعي في النسبة المئوية للبقاء	147
6-4	تأثير المطفر الفيزيائي (اشعة كاما) والمطفر الكيميائي (صوديوم ازايد) في انتاج بعض المركبات الفينولية	148
1-6-4	Catechine	148
2-6-4	Ferulic acid	148
3-6-4	Ellagic acid	148
4-6-4	Qurcetine	149
5-6-4	Kaempferol	149
7-4	المؤشرات الجزيئية	158
1-7-4	تفاعلات الـ RAPD-PCR	158
5	الاستنتاجات والتوصيات	180
1-5	الاستنتاجات	180
2-5	التوصيات	181
6	المصادر	182

1-6	المصادر العربية	182
2-6	المصادر الاجنبية	185
	الملاحق	221
	Summery	A-C

قائمة الجداول

رقم الجدول	العنوان	رقم الصفحة
1	مكونات وسط MS (Murashige و Skoog، 1962) من شركة Hi-media المستعمل في الدراسة	46
2	التوليفات الهرمونية المستخدمة لاستجابة النشوء لقمم المدادات لشليك صنف Albion	48
3	ظروف هضم العينات اثناء عملية الاستخلاص	60
4	المساحة وزمن الاحتجاز وتركيز المحلول القياسي للمركبات الفينولية المفصولة لافرع نبات الشليك	61
5	البادئات العشوائية مع التتابعات الخاصة بها	66
6	تأثير مدة التعقيم بكلوريد الزئبق على نسبة التلوث ونسبة البقاء للأجزاء النباتية للشليك صنف Albion بعد مرور 14 يوم من الزراعة على وسط خالي من الهرمون	70
7	تأثير التوليفات هورمونية المختلفة في استجابة نباتات الشليك صنف Albion للنشوء بعد مرور 4 اسابيع من زراعته على وسط MS الصلب	71

8	تأثير تراكيز مختلفة من BA و NAA والتداخل بينهما في عدد الافرع المتكونة لنبيتات الشليك بعد مرور 4 اسابيع من زراعته على وسط MS	74
9	تأثير تراكيز مختلفة من BA و NAA والتداخل بينهما في عدد الافرع بعد مرور 8 اسابيع من الزراعة على وسط MS	75
10	تأثير تراكيز مختلفة من BA و NAA والتداخل بينهما في معدل طول الافرع بعد مرور 4 اسابيع من الزراعة على وسط MS	77
11	تأثير تراكيز مختلفة من BA و NAA والتداخل بينهما في معدل طول الافرع بعد مرور 8 اسابيع ين من الزراعة على وسط MS	78
رقم الجدول	**العنوان**	**رقم الصفحة**
12	تأثير التشعيع والملوحة على معدل عدد الفروع للشليك خارج الجسم الحي بعد مرور 8 اسابيع من الزراعة على وسط مجهز ب 0.5 ملغم لتر$^{-1}$ BA و 0.2 ملغم لتر$^{-1}$ NAA	82
13	تأثير التشعيع والملوحة على معدل طول الفروع (سم) للشليك خارج الجسم الحي بعد مرور 8 اسابيع من الزراعة على وسط مجهز ب 0.5 ملغم لتر$^{-1}$ BA و 0.2 ملغم لتر$^{-1}$ NAA	84
14	تأثير التشعيع و الملوحة في الوزن الطري (غم) للشليك خارج الجسم الحي بعد مرور 8 اسابيع من الزراعة على وسط مجهز ب 0.5 ملغم لتر$^{-1}$ BA و 0.2 ملغم لتر$^{-1}$ NAA	86
15	تأثير التشعيع و الملوحة في الوزن الجاف(غم) للشليك خارج الجسم الحي بعد مرور 8 اسابيع من الزراعة على وسط مجهز ب 0.5 ملغم لتر$^{-1}$ BA و 0.2 ملغم لتر$^{-1}$ NAA	88
16	تأثير التشعيع والملوحة في محتوى الاوراق من البرولين (مايكرومول برولين غم$^{-1}$ وزن طري) للشليك خارج الجسم الحي بعد مرور 8 اسابيع	93

	من الزراعة على وسط مجهز ب 0.5 ملغم لتر$^{-1}$ BA و 0.2 ملغم لتر$^{-1}$ NAA	
17	تأثير التشعيع و الملوحة في تركيز الكاربوهيدرات (مايكروغرام كلوكوز غم$^{-1}$ وزن جاف افرع) للشليك خارج الجسم الحي بعد مرور 8 اسابيع من زراعته على وسط مجهز ب 0.5 ملغم لتر$^{-1}$ BA و 0.2 ملغم لتر$^{-1}$ NAA	97
18	تأثير التشعيع و المستويات الملحية على محتوى الاوراق من الكلوروفيل للشليك خارج الجسم الحي بعد مرور 8 اسابيع من زراعته على وسط مجهز ب 0.5 ملغم لتر$^{-1}$ BA و 0.2 ملغم لتر$^{-1}$ NAA	99
رقم الجدول	**العنوان**	**رقم الصفحة**
19	تأثير التشعيع و المستويات الملحية في تركيز ايون الصوديوم(ملغم غم$^{-1}$ وزن جاف افرع) للشليك خارج الجسم الحي بعد مرور 8 اسابيع من زراعته على وسط مجهز ب 0.5 ملغم لتر$^{-1}$ BA و 0.2 ملغم لتر$^{-1}$ NAA	101
20	تأثير التشعيع المستويات الملحية في تركيز ايون الكالسيوم(ملغم غم$^{-1}$ وزن جاف افرع) للشليك خارج الجسم الحي بعد مرور 8 اسابيع من زراعته على وسط مجهز ب 0.5 ملغم لتر$^{-1}$ BA و 0.2 ملغم لتر$^{-1}$ NAA	103
21	تأثير المستويات الملحية والتشعيع في تركيز ايون البوتاسيوم (ملغم غم$^{-1}$ وزن جاف افرع) للشليك خارج الجسم الحي بعد مرور 8 اسابيع من الزراعة على وسط مجهز ب 0.5 ملغم لتر$^{-1}$ BA و 0.2 ملغم لتر$^{-1}$ NAA	105
22	تأثير التشعيع و المستويات الملحية في تركيز ايون المغنيسيوم (ملغم غم$^{-1}$ وزن جاف افرع) للشليك خارج الجسم الحي بعد مرور 8 اسابيع من الزراعة على وسط مجهز ب 0.5 ملغم لتر$^{-1}$ BA و 0.2 ملغم لتر$^{-1}$ NAA	107

23	تأثير التشعيع و المستويات الملحية في متوسط فعالية انزيم POD(وحدة مل$^{-1}$) للشليك خارج الجسم الحي بعد مرور 8 اسابيع من الزراعة على وسط مجهز ب 0.5 ملغم لتر$^{-1}$ BA و 0.2 ملغم لتر$^{-1}$ NAA	111
24	تأثير التشعيع و المستويات الملحية في متوسط فعالية انزيم CAT(وحدة مل$^{-1}$) للشليك خارج الجسم الحي بعد مرور 8 اسابيع من الزراعة على وسط مجهز ب 0.5 ملغم لتر$^{-1}$ BA و 0.2 ملغم لتر$^{-1}$ NAA	112
رقم الجدول	**العنوان**	**رقم الصفحة**
25	تأثير التشعيع و المستويات الملحية في متوسط تركيز البروتين (ملغم مل$^{-1}$) للشليك خارج الجسم الحي بعد مرور 8 اسابيع من الزراعة على وسط مجهز ب 0.5 ملغم لتر$^{-1}$ BA و 0.2 ملغم لتر$^{-1}$ NAA	113
26	تأثير المستويات الملحية و NaN3 على معدل عدد الفروع للشليك خارج الجسم الحي بعد مرور 4 اسابيع من زراعته على وسط مجهز ب 0.5 ملغم لتر$^{-1}$ BA و 0.2 ملغم لتر$^{-1}$ NAA	117
27	تأثير المستويات الملحية و NaN3 على معدل طول الفروع (سم) للشليك خارج الجسم الحي بعد مرور 4 اسابيع من الزراعة على وسط مجهز ب 0.5 ملغم لتر$^{-1}$ BA و 0.2 ملغم لتر$^{-1}$ NAA	119
28	تأثير المستويات الملحية و NaN3 في الوزن الطري (غم) لافرع الشليك خارج الجسم الحي بعد مرور 4 اسابيع من. زراعته على وسط مجهز ب 0.5 ملغم لتر$^{-1}$ BA و 0.2 ملغم لتر$^{-1}$ NAA	121
29	تأثير المستويات الملحية و NaN3 في الوزن الجاف للشليك خارج الجسم الحي بعد مرور 4 اسابيع من الزراعة على وسط مجهز ب 0.5 ملغم لتر$^{-1}$ BA و 0.2 ملغم لتر$^{-1}$ NAA	123

30	تأثير الملوحة والتطفير الكيميائي بالمطفر صوديوم ازايد على محتوى الاوراق من البرولين في الشليك خارج الجسم الحي على وسط مجهز ب 0.5 ملغم لتر$^{-1}$ BA و 0.2 ملغم لتر$^{-1}$ NAA	127
31	تأثير ملح كلوريد الصوديوم و NaN_3 على محتوى الاوراق من الكاربوهيدرات للشليك خارج الجسم الحي على وسط مجهز ب 0.5 ملغم لتر$^{-1}$ BA و 0.2 ملغم لتر$^{-1}$ NAA	129
32	تأثير الملوحة و المطفر الكيميائي صوديوم ازايد في محتوى الاوراق من الكلوروفيل للشليك خارج الجسم الحي على وسط مجهز ب 0.5 ملغم لتر$^{-1}$ BA و 0.2 ملغم لتر$^{-1}$ NAA	131
33	تأثير ملح كلوريد الصوديوم و NaN3 في تركيز ايون الصوديوم (ملغم غم$^{-1}$ وزن جاف) للشليك صنف Albion خارج الجسم الحي على وسط مجهز ب 0.5 ملغم لتر$^{-1}$ BA و 0.2 ملغم لتر$^{-1}$ NAA	133
34	تأثير ملح كلوريد الصوديوم و NaN3 في تركيز ايون الكالسيوم (ملغم غم$^{-1}$ وزن جاف) للشليك صنف Albion خارج الجسم الحي على وسط مجهز ب 0.5 ملغم لتر$^{-1}$ BA و 0.2 ملغم لتر$^{-1}$ NAA	135
35	تأثير ملح كلوريد الصوديوم و NaN3 في تركيز ايون البوتاسيوم (ملغم غم$^{-1}$ وزن جاف) للشليك صنف Albion خارج الجسم الحي على وسط مجهز ب 0.5 ملغم لتر$^{-1}$ BA و 0.2 ملغم لتر$^{-1}$ NAA	137
36	تأثير ملح كلوريد الصوديوم و NaN3 في تركيز ايون المغنيسيوم (ملغم غم$^{-1}$ وزن جاف) للشليك صنف Albion خارج الجسم الحي على وسط مجهز ب 0.5 ملغم لتر$^{-1}$ BA و 0.2 ملغم لتر$^{-1}$ NAA	139
37	تأثير ملح كلوريد الصوديوم و NaN3 في متوسط فعالية انزيم POD (وحدة مل$^{-1}$) للشليك صنف Albion خارج الجسم الحي على وسط مجهز ب 0.5 ملغم لتر$^{-1}$ BA و 0.2 ملغم لتر$^{-1}$ NAA	142

رقم الجدول	العنوان	رقم الصفحة

33	تأثير ملح كلوريد الصوديوم و NaN3 في تركيز ايون الصوديوم (ملغم غم$^{-1}$ وزن جاف) للشليك صنف Albion خارج الجسم الحي على وسط مجهز ب 0.5 ملغم لتر$^{-1}$ BA و 0.2 ملغم لتر$^{-1}$ NAA	133
34	تأثير ملح كلوريد الصوديوم و NaN3 في تركيز ايون الكالسيوم (ملغم غم$^{-1}$ وزن جاف) للشليك صنف Albion خارج الجسم الحي على وسط مجهز ب 0.5 ملغم لتر$^{-1}$ BA و 0.2 ملغم لتر$^{-1}$ NAA	135
35	تأثير ملح كلوريد الصوديوم و NaN3 في تركيز ايون البوتاسيوم (ملغم غم$^{-1}$ وزن جاف) للشليك صنف Albion خارج الجسم الحي على وسط مجهز ب 0.5 ملغم لتر$^{-1}$ BA و 0.2 ملغم لتر$^{-1}$ NAA	137
36	تأثير ملح كلوريد الصوديوم و NaN3 في تركيز ايون المغنيسيوم (ملغم غم$^{-1}$ وزن جاف) للشليك صنف Albion خارج الجسم الحي على وسط مجهز ب 0.5 ملغم لتر$^{-1}$ BA و 0.2 ملغم لتر$^{-1}$ NAA	139
37	تأثير ملح كلوريد الصوديوم و NaN3 في متوسط فعالية انزيم POD (وحدة مل$^{-1}$) للشليك صنف Albion خارج الجسم الحي على وسط مجهز ب 0.5 ملغم لتر$^{-1}$ BA و 0.2 ملغم لتر$^{-1}$ NAA	142

38	تأثير ملح كلوريد الصوديوم و NaN3 في متوسط فعالية انزيم CAT (وحدة مل$^{-1}$) للشليك صنف Albion خارج الجسم الحي على وسط مجهز ب 0.5 ملغم لتر$^{-1}$ BA و 0.2 ملغم لتر$^{-1}$ NAA	143
39	تأثير ملح كلوريد الصوديوم و NaN3 في تركيز البروتين (ملغم مل$^{-1}$) صنف Albion خارج الجسم الحي على وسط مجهز ب 0.5 ملغم لتر$^{-1}$ BA و 0.2 ملغم لتر$^{-1}$ NAA	144
40	تأثير نوع الوسط الزرعي في النسبة المئوية للبقاء لنبيتات الشليك صنف البيون الناتجة عن مرحلة التضاعف	147
41	تأثير المطفر الفيزيائي (اشعة كاما) والمطفر الكيميائي (صوديوم ازايد) في انتاج بعض المركبات الفينولية في افرع نبات الشليك صنف Albion	150
رقم الجدول	**العنوان**	**رقم الصفحة**
42	المساحة وزمن الاحتجاز للعينات المفصولة في جهاز HPLC من الافرع المطفرة باشعة كاما وصوديوم ازايد للشليك صنف Albion	151
43	المساحة وزمن الاحتجاز للعينات المفصولة في جهاز HPLC للافرع المعرضة لاشعة كاما بالجرعة 20 كري	152
44	المساحة وزمن الاحتجاز للعينات المفصولة في جهاز HPLC للافرع المعرضة لاشعة كاما بالجرعة 50 كري	153
45	المساحة وزمن الاحتجاز للعينات المفصولة في جهاز HPLC للافرع المعرضة لاشعة كاما بالجرعة 100 كري	154
46	المساحة وزمن الاحتجاز للعينات المفصولة في جهاز HPLC للافرع المطفرة بالمطفر صوديوم ازايد بالتركيز 0.25 ملي مول	155
47	المساحة وزمن الاحتجاز للعينات المفصولة في جهاز HPLC للافرع المطفرة بالمطفر صوديوم ازايد بالتركيز 0.5 ملي مول	156
48	النسبة المئوية للتعددية الشكلية و النسبة المئوية للمقدرة التمييزية و النسبة المئوية لكفاءة كل بادئ للبوادئ المستعملة في الشليك	176

قائمة الاشكال

الرقم	العنوان	رقم الصفحة
شكل (1)	يوضح مراحل عملية الاقلمة	58
شكل (2)	منحنى المحلول القياسي للمركب الفينولي Catechine المفصولة بجهاز الكروماتوكرافيا لنبات الشليك صنف البيون	61
شكل (3)	منحنى المحلول القياسي للمركب الفينولي Ellagic acid المفصولة بجهاز الكروماتوكرافيا لنبات الشليك صنف البيون	62
شكل (4)	منحنى المحلول القياسي للمركب الفينولي Ferulic acid المفصولة بجهاز الكروماتوكرافيا لنبات الشليك صنف البيون	62
شكل (5)	منحنى المحلول القياسي للمركب الفينولي Kaempferol المفصولة بجهاز الكروماتوكرافيا لنبات الشليك صنف البيون	63
شكل (6)	منحنى المحلول القياسي للمركب الفينولي Qurcetine المفصولة بجهاز الكروماتوكرافيا لنبات الشليك صنف البيون	63
شكل (7)	افرع خضرية مزروعة على وسط التضاعف MS للشليك صنف Albino بعد مرور 4 اسابيع ين من الزراعة	79
شكل (8)	تأثير التطفير باشعة كاما والاجهاد الملحي على تضاعف فروع الشليك بعد مرور 8 اسابيع من الزراعة	89
شكل (9)	تأثير المطفر صوديوم ازايد على تضاعف الافرع	124
شكل (10)	المركبات الفينولية للعينات المفصولة بجهاز الكروماتوكرافيا من الافرع الغير مطفرة	151
شكل (11)	المركبات الفينولية للعينات المفصولة بجهاز الكروماتوكرافيا من الافرع المطفرة اشعة كاما بالجرعة 20 كري	152
شكل (12)	المركبات الفينولية للعينات المفصولة بجهاز الكروماتوكرافيا من الافرع المطفرة باشعة كاما بالجرعة 50	153
شكل (13)	المركبات الفينولية للعينات المفصولة بجهاز الكروماتوكرافيا من الافرع كري100المطفرة باشعة كاما بالجرعة	154

الرقم	العنوان	رقم الصفحة
شكل (14)	المركبات الفينولية للعينات المفصولة بجهاز الكروماتوكرافيا من الافرع المطفرة بالمطفر صوديوم ازايد بالتركيز 0.25 ملي مول	155
شكل (15)	المركبات الفينولية للعينات المفصولة بجهاز الكروماتوكرافيا من الافرع المطفرة بالمطفر صوديوم ازايد بالتركيز 0.5 ملي مول	156
شكل (16)	نواتج تفاعل البادئ A8 مع أوزانها الجزيئية لعينات نباتات الشليك والمرحلة على هلام الاكروز بتركيز 1%	159
شكل (17)	نواتج تفاعل البادئ A15 مع أوزانها الجزيئية لعينات نباتات الشليك والمرحلة على هلام الاكروز بتركيز 1%	161
شكل (18)	نواتج تفاعل البادئ C8 مع أوزانها الجزيئية لعينات نباتات الشليك والمرحلة على هلام الاكروز بتركيز 1%	162
شكل (19)	نواتج تفاعل البادئ C15 مع أوزانها الجزيئية لعينات نباتات الشليك والمرحلة على هلام الاكروز بتركيز 1%	164
شكل (20)	نواتج تفاعل البادئ D2 مع أوزانها الجزيئية لعينات نباتات الشليك والمرحلة على هلام الاكروز بتركيز 1%	165
شكل (21)	نواتج تفاعل البادئ F8 مع أوزانها الجزيئية لعينات نباتات الفراولة والمرحلة على هلام الاكروز بتركيز 1%	166
شكل (22)	نواتج تفاعل البادئ F12 مع أوزانها الجزيئية لعينات نباتات الشليك والمرحلة على هلام الاكروز بتركيز 1%	168
شكل (23)	نواتج تفاعل البادئ H9 مع أوزانها الجزيئية لعينات نباتات الشليك والمرحلة على هلام الاكروز بتركيز 1%	170
شكل (24)	نواتج تفاعل البادئ H16 مع أوزانها الجزيئية لعينات نباتات الشليك والمرحلة على هلام الاكروز بتركيز 1%	171
شكل (25)	نواتج تفاعل البادئ Q16 مع أوزانها الجزيئية لعينات نباتات الشليك والمرحلة على هلام الاكروز بتركيز 1%	173
شكل (26)	نواتج تفاعل البادئ S12 مع أوزانها الجزيئية لعينات نباتات الشليك والمرحلة على هلام الاكروز بتركيز 1%	174
شكل (27)	شجرة القرابة الوراثية Dendrogram لسلالات الشليك	179

قائمة المختصرات

MS	Murashige and Skoog medium	وسط موراشيج و سكوج
NaCl	Sodium Chloride	كلوريد الصوديوم
NaN_3	Sodium azide	ازايد الصوديوم
pH	Potential of Hydrogen	الاس الهيدروجيني
$HgCl_2$	Mercury chloride	كلوريد الزئبق
BA BAP	6-Benzyl Adenine 6-Benzyl Amino purine	البنزل ادنين
NAA	Naphthaleneacetic acid	نفثالين حامض الخليك
Kin.	6-Furfurylamino purine	الكاينتين
IBA	Indole-3-butyric acid	اندول حامض البيوتريك
HPLC	High-Performance Liquid Chromotography	كروما توغرافيا السائل ذات الاداء العالي
RAPD	Random Polymorphic DNA	التضاعف العشوائي المتعدد لسلسلة ال DNA
PCR	Polymerase chain reaction	تفاعل البلمرة المتسلسل
DNA	Deoxy Ribonucleic Acid	الدنا
POD	peroxidase	بيروكسيديز
CAT	catalase	كاتليز

الفصل الاول

المقدمة

الشليك (*Fragaria x ananassa* Duch.) نبات عشبي معمر له مدادات ينتمي للعائلة الوردية (Rosaceae) وهو احد انواع الفاكهة النامية في نصف الكرة الجنوبي في المناطق المعتدلة و شبه المعتدلة (Biswas وآخرون،2008) يبلغ الانتاج العالمي للشليك حوالي 8.9 مليون طن سنوياً ويشكل انتاج الصين 40% من الانتاج العالمي الكلي، كما تعد الولايات المتحدة والمكسيك كمنتجين مهمين(FAOSTAT،2021). تنمو نباتات الشليك في ظروف مناخية متنوعة حول العالم، وهي فاكهة تشبه التوت يستهلكها الجميع بسبب خواصها العطرية وطعمها اللذيذ ومظهرها الجميل وهناك انواع مختلفة من الشليك تنمو بشكل خاص في المناطق ذات المناخ المعتدل حول العالم (Hancock وآخرون، 2020). يمكن اكثار نباتات الشليك خضرياً بواسطة المدادات ومن ميزات هذه الطريقة انها تنتج نباتات تحتفظ بجميع صفات نباتات الام التي اخذت منها ولكن قد تنقل ايضاً الامراض الفايرسية خاصة عند اصابة نبات الام بالاضافة الى ان هذه الطريقة من التكاثر غير كافية لتلبية الطلب التجاري، لذا فمن المرغوب فيه تطوير طرائق سريعة وفعالة لتكاثر النباتات على نطاق واسع (Vandana وآخرون ،2012). تعد تقنية زراعة الانسجة النباتية وسيلة مهمة لاكثار العديد من النباتات اذ تتميز النباتات المكثرة بهذه الطريقة بانها متجانسة وتنتج مدادات باعداد اكثر ولها القدرة للبقاء على قيد الحياة في الحقل كما ان الانتاج زاد بمعدل 24% مقارنة بطرائق الاكثار التقليدية (Kikas وآخرون ،2006 ; Anuradha وآخرون ،2016).

تعد الملوحة احد اهم الاجهادات اللاحيائية واكثرها ضرراً اذ تؤثر بشكل عام في نمو النبات والحاصل وان زيادة المستويات الملحية في وسط الجذور تسبب اتلاف النباتات اثناء مراحل النمو الخضري والتكاثري، وبالتالي تقل الكتلة الحيوية والانتاج (Wani و Gosal، 2011) و بناءاً على دراسات مختلفة ، فأن الملوحة تحفز النبات على انتاج انواع الاوكسجين التفاعلية (الجذور الحرة) ROS (Reactive Oxygen Species) (Yaghobi وآخرون ،2016) وان الزيادة في انتاج الجذور الحرة في النباتات يشجع عمليات الهدم و يطور من العمليات التي تسبب تنخر و تلف النبات (Tanou وآخرون ،2009).

تعد تقنية التطفير خارج الجسم الحي احد البدائل المستخدمة لتحفيز التغاير الوراثي (Li وآخرون،2019) وتسمح باكثار هذه الاختلافات خلال فترة قصيرة من الوقت وبتكلفة منخفضة فضلاً عن توفير ظروف مناسبة للجزء النباتي في اماكن مسيطر عليها وتحت ظروف معقمة (Waugh وآخرون، 2006) وان اشعة كاما ^{60}CO لها امكانية اختراق عالية ولا تشكل اي خطر على البيئة ويمكن استخدامها لتشعيع الخلايا والانسجة والاعضاء والنباتات الكاملة (Oladosu وآخرون ،2016). كما يستخدم ازايد الصوديوم (NaN3) على نطاق واسع لتحفيز الطفرات في انظمة النبات خارج الجسم الحي (*In vitro*) بالرغم من ان هذه الطفرات غير مباشرة ويعد ازايد الصوديوم امن نسبياً للتعامل مع الطفرات الكيميائية وغير مكلف ولا يسبب السرطان كما يؤثر الرقم الهيدروجيني للمحلول على كفاءة التطفير ، وقد ثبت أن أزايد الصوديوم هو الأكثر فعالية في إحداث الطفرات عند درجة الحموضة 3 (Salvi وآخرون ،2014).يعمل المطفر ازايد الصوديوم بشكل عام على تخفيز الطفرات

النقطية (Point Mutation) في المادة الوراثية (Genome) وعرقلة النشاط الايضي والنمو والتطور وتثبيط صنع البروتين وتضاعف DNA (Ragunathan و Panneerselvam ،2007).

هدفت الدراسة الى:

1–دراسة تأثير اشعة كاما و ازايد الصوديوم في نمو الفروع والحصول على تغايرات وراثية وزراعتها على وسط ملحي لانتاج نباتات شليك صنف Albion متحملة للاجهاد الملحي وانتاج المركات الفينولية في الافرع.

2–تحديد التغايرات الوراثية التي تحصل في الصنف باستخدام بعض المؤشرات الجزيئية.

3–اقلمة النبتات الناتجة في ظروف البيت البلاستيكي لانتاج نباتات شليك متحملة للاجهاد الملحي.