جمهورية العراق
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعـــة ديالى - كلية الزراعـــة

الاكثار الدقيق لنبات الداوّدي من العقد المفردة وتحفيز التغاير لتحمل الاجهاد الملحي في المزارع النسيجية

رسالة مقدمة من قبل

محمد ظاهر عبدالهادي الكرخي

إلى
مجلس كلية الزراعة – جامعة ديالى
وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في العلوم الزراعية
(البستنة وهندسة الحدائق)

بإشراف

أ. د أياد عاصي عبيد
أ.د. كاظم محمد إبراهيم

1440 هـ
2018 م

بِسۡمِ ٱللَّهِ ٱلرَّحۡمَٰنِ ٱلرَّحِيمِ

﴿ وَعَلَّمَكَ مَا لَمۡ تَكُن تَعۡلَمُۚ وَكَانَ فَضۡلُ ٱللَّهِ عَلَيۡكَ عَظِيمٗا ١١٣ ﴾

صدق الله العظيم
سورة النساء
الآية (١١٣)

إقرار المشرفين:

نشهد أن إعداد هذه الرسالة (**الاكثار الدقيق لنبات الداوّدي من العقد المفردة وتحفيز التغاير لتحمل الاجهاد الملحي في المزارع النسيجية**) قد جرى تحت إشرافنا في جامعة ديالى- كلية الزراعة– قسم البستنة وهندسة الحدائق، وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في العلوم الزراعية- البستنة وهندسة الحدائق.

التوقيع:

الاسم: **د. اياد عاصي عبيد**

اللقب العلمي: أستاذ

التاريخ: / /2018 م

التوقيع:

الاسم: **د. كاظم محمد ابراهيم**

اللقب العلمي : أستاذ

التاريخ: / /2018 م

إقرار لجنة الاستلال:

نشهد نحن لجنة الاستلال المشكلة بموجب الأمر الاداري 1970 في 2018/9/4 بأنّه تم مراجعة الرسالة لكشف وجود الاستلال باستخدام البرامج الإلكترونية المتخصصة بكشف الاستلال وتبين أن نسبة الاستلال ضمن الحدود المسموح بها وفق التعميمات.

عضواً

ا.م.د. عبدالكريم عبدالجبار محمد

عضواً

م.د. عدنان غازي سلمان

رئيس اللجنة

أ.د. عزيز مهدي عبد

إقرار المقوم اللغـــوي:

أشهد بأنّ هذه الرسالة تم مراجعتها من الناحية اللغوية وتصحيح ما ورد فيها من أخطاء لغوية وتعبيرية وبذلك أصبحت الرسالة مؤهلة للمناقشة.

التوقيع:

الاسم: **د. لؤي صيهود التميمي**

اللقب العلمي: استاذ مساعد

التاريخ / /2018 م

إقرار رئيس لجنة الدراسات العليا:

بناء على التوصيات المقدمة من قبل المشرف العلمي ولجان المراجعة (الاستلال والتقويم اللغوي) وتقرير المقوم العلمي أرشح هذه الرسالة للمناقشة.

التوقيع:

الاسم: **د. اياد عاصي عبيد**

اللقب العلمي: أستاذ

التاريخ: / /2018 م

إقرار رئيس قسم البستنة وهندسة الحدائق:

بناء على اكتمال التوصيات المطلوبة أرشح هذه الرسالة للمناقشة.

التوقيع:

الاسم: **د. اياد عاصي عبيد**

اللقب العلمي: أستاذ

التاريخ: / /2018 م

اقرار لجنة المناقشة

نشهد نحن أعضاء لجنة المناقشة، أطلعنا على الرسالة الموسومة بـ(**الاكثار الدقيق لنبات الداوّدي من العقد المفردة وتحفيز التغاير لتحمل الاجهاد الملحي في المزارع النسيجية**)، وقد ناقشنا الطالب في محتواها وفيما يتعلق بها بتاريخ 2018/11/15، وقررنا أنها جديرة بالقبول لنيل شهادة الماجستير في العلوم الزراعية – البستنة و هندسة الحدائق.

الاستاذ المتمرس الدكتور

عباس جاسم حسين

كلية التربية أبن الهيثم - جامعة بغداد

رئيس لجنة المناقشة

الاستاذ المساعد الدكتور

مثنى محمد إبراهيم

كلية التربية للعلوم الصرفة - جامعة ديالى

عضواً

الاستاذ المساعد الدكتور

عبدالكريم عبدالجبار محمد سعيد

كلية الزراعة - جامعة ديالى

عضواً

الاستاذ الدكتور

اياد عاصي عبيد

كلية الزراعة - جامعة ديالى

عضواً ومشرفاً

الاستاذ الدكتور

كاظم محمد إبراهيم

كلية التقانات الاحيائية - جامعة النهرين

عضواً ومشرفاً

الاستاذ الدكتور

نادر فليح علي المبارك

عميد كلية الزراعة - جامعة ديالى

/ / 2018

الاهـداء

الــى قـرة عينــي ، وشمـس عمـري، وسنـدي وذخـري والدايّ
فلكما طاعـتي وحبــي، حفظكما الله لي.

وأهديها الى النجـوم التــي تزيـن لي حياتي
أخوتي سلمان، مصطفى وحيدر

والى القمر، التي تنير لي دربي
زوجي الحبيبة

والى شمعتا عمري ابنـائي
افنـان واسامة
أتطلع اليهم لأرى فيهم مستقبلي وآمالي
وفقهم الله، وحفظهم لي

والى الايادي التي زودتني العلم وحملتني أمانتهم، استاذتي الافاضل

والى كل من سبقني فضله وفاتني ذكره.

شكر وتقدير

الحمد لله رب العالمين الذي هدانا الى درب المعرفة والصلاة والسلام على سيد المرسلين محمد وآله الطيبين الطاهرين وصحبه اجمعين. بعد شكر الله وحمده لابد من شكر عبده، أتقدم بالشكر الجزيل وفائق التقدير للأستاذين المشرفين الفاضلين **الدكتور أياد عاصي عبيد** و**الدكتور كاظم محمد ابراهيم الصميدعي**، لاقتراحهم مشروع البحث الذي قد لقي من علمهما رعاية لم تعرف التهاون منذ تشكله وحتى استوائه على ما استقر عليه هنا.

اسمى كلمات العرفان والتقدير الى رئيس واعضاء لجنة المناقشة **الدكتور عباس جاسم حسين** و**الدكتور مثنى محمد ابراهيم** و**الدكتور عبدالكريم عبدالجبار محمد سعيد** لتفضلهم بقبول مناقشة هذه الرسالة ولما ابدياه من ملاحظات وتوجيهات علمية قيمة.

شكري وخالص تقديري وامتناني لصاحب الفضل الكبير **الدكتور عباس فاضل الدليمي** رئيس جامعة ديالى، وشكري موصول لعميد كلية الزراعة **الدكتور نادر فليح** ولكادر مكتبه ولمعاون العميد **الدكتور نزار سليمان** ولكادر الدراسات العليا **الدكتور محمد علي** و**الاستاذان الاحمدان** لما قدماه من مساعده.

اشكر زملائي طلبة الدراسات العليا لما قدماه من عون طيلة مدة الدراسة والبحث، ويطيب لي في هذا المقام أن أقدم شكري وامتناني للأساتذة الأفاضل واخص بالذكر **الدكتور علي هاني** و**الدكتورة نجوى شهاب وكادر شركة وهج الدنا** و**الدكتور حاتم كريم** و**الدكتورة رشا السعدي** و**الدكتور ياسين عمران** لما ابدوه لي من مساعدة وعون فجزاهم الله عن ذلك افضل الجزاء.

واذا نسى قلمي تقديم الشكر والثناء لاحد فأن قلبي وعقلي يشكر جميع من قدم يعد العون والمساعدة .. ومن الله التوفيق.

الملخص

نفذت التجارب الحالية في مختبر زراعة الانسجة والخلايا النباتية، كلية الزراعة، جامعة ديالى للفترة من أيار 2017- تموز2018. شملت الدراسة عدة تجارب اولها تجارب الاكثار الدقيق بهدف تضاعف العقد المفردة للداوّدي *Chrysanthemum morifolium* var. Kiev المأخوذة من الحقل. عقمت العقل بمحلول هايبوكلورات الصوديوم بالتركيز 0، 10، 20، 30 أو 40% (v/v) لمدة 6 دقائق، ودراسة تأثير البنزايل ادنين (BA) المضاف لوسط موراشيج وسكوج (MS) بتراكيز 0.0، 0.25، 0.5، 0.75، 1.0 أو 2.0 ملغم.لتر$^{-1}$، وكذلك تأثير توليفات من نفثالين حامض الخليك (NAA) تركيز 0.1 أو 0.2 ملغم.لتر$^{-1}$ مع ثلاث تراكيز من BA 1.0، 2.0 أو 5.0 ملغم.لتر$^{-1}$ في نشوء وتضاعف الافرع، فضلاً عن تجربة تجذير الافرع بثلاث تراكيز من اندول حامض البيوتريك (IBA) 0.0، 0.5 أو 1.0 ملغم.لتر$^{-1}$، ثم أقلمة النبيتات الناتجة وصولا الى الحقل. تشير نتائج التجارب الاولى، الحصول على افضل تركيز 40% (2.4% مادة فعالة) من هايبوكلورات الصوديوم لتعقيم العقد المفردة، وتركيز 1 ملغم.لتر$^{-1}$ من BA كأفضل تركيز للتضاعف، وحسنت اضافة NAA من ارتفاع الافرع على حساب عددها، وكان لتركيز 0.5 ملغم.لتر$^{-1}$ من IBA افضل النتائج في تجذير الافرع، كما ونجحت جميع النبيتات بعد الأقلمة بالنجاة بنسبة مئوية بلغت 100% عند زراعتها في مزيج رمل : بيتموس (1:1) وتغطيتها بالغطاء البلاستيكي الشفاف. اجريت تجربة ثانية بهدف الحصول على الجرعة الملائمة للتطفير باستعمال المطفر الكيميائي أثيل ميثان سلفونيت (EMS) بتراكيز 0.0، 0.5، 1.0، 1.5، 2.0، 2.5 أو 3.0% وبطريقتين، اضافة المادة المطفرة للماء المقطر أو اضافة المادة المطفرة للمحلول المنظم، إذ نقعت العقد المفردة النسيجية لمدة 90 دقيقة مع الرج المستمر بكل التراكيز والمعاملات عدا معاملة السيطرة، واظهرت النتائج حصول انخفاض معنوي في نسبة النجاة بانخفاض الاس الهيدروجيني (pH) لمحلول المادة المطفرة، وتم الحصول على الجرعتين الملائمتين اللتان سببتا انخفاض النسبة المئوية للهلاك بمقدار 50%، إذ بلغا بعد التخفيف 1% من EMS المضاف للماء المقطر و1.25% من EMS المضاف للمحلول المنظم. فيما يخص التجربة الثالثة تأثير معاملات التطفير والاجهاد الملحي والتداخل بينهما لاختبار دور التطفير في تحسين تحمل نبات الداوّدي للملوحة والذي يعد من النباتات متوسط التحمل للملوحة. زرعت العقد المطفرة بطريقتين من التطفير مع معاملة المقارنة على وسط MS كامل قوة الاملاح مضاف له 0، 100، 150، 200 أو 300 مليمول من ملح كلوريد الصوديوم (NaCl) كعامل اجهاد وتم الكشف عن تأثيره في النمو والتجذير

والوزنين الطري والجاف. بينت النتائج حصول انخفاض معنوي في متوسطات الصفات المدروسة مع زيادة تركيز NaCl، كما وحسنت معاملات التطفير معنوياً في بعض صفات الدراسة (ارتفاع الافرع، عدد الاوراق، النسبة المئوية لاستجابة نشوء الجذور، طول الجذور). تضمنت الدراسة الوراثية أيجاد البعد الوراثي لعدد من عينات الداوّدي المطفر عن النبات الام باستعمال مؤشرات الدنا (DNA markers) بتقانة RAPD-PCR، إذ كانت مراحل العمل عزل وتنقية الدنا ثم الكشف عن التباينات بين القطع المتضاعفة لكل عينة بعد الترحيل الكهربائي. اكدت النتائج كفاءة تقنية RAPD في الكشف عن التغايرات الوراثية الناتجة من التطفير بالمطفر الكيميائي EMS كما واثبتت الدراسة الحالية ان اضافة المادة المطفرة EMS للمحلول المنظم افضل في استحثاث التغايرات الوراثية للعقد المفردة للداوّدي من اضافته للماء المقطر.

قائمة المحتويات

قائمة المحتويات	الصفحات
المقدمة	1
مراجعة المصادر	3
2-1 نبات الداوّدي	3
2-2 التصنيف النباتي	3
2-3 زراعة الخلايا والانسجة والاعضاء النباتية	3
2-4 الاكثار الدقيق	4
2-4-1 التعقيم السطحي للأجزاء النباتية	4
2-4-2 تأثير السايتوكاينينات في نشوء وتضاعف افرع نبات الداوّدي	6
2-4-3 تأثير اضافة الاوكسينات مع السايتوكاينينات في نشوء وتضاعف افرع نبات الداوّدي	7
2-4-4 تأثير الاوكسينات في تجذير أفرع نبات الداوّدي	8
2-4-5 الأقلمة	10
2-5 تأثير أثيل ميثان سلفونيت (EMS) في استحثاث الطفرات	11
2-6 تأثير الاجهاد الملحي في نمو النباتات	14
2-7 دور المطفر الكيميائي EMS في تحسين تحمل النباتات للملوحة خارج الجسم الحي	16
2-8 الكشف عن التباينات الوراثية	17
2-8-1 التفاعل التضاعفي لسلسلة الدنا Polymerase Chain Reaction (PCR)	18
2-8-2 تقانة التضاعف العشوائي متعدد الأشكال لسلسلة الدنا RAPD-PCR	18
3- المواد وطرائق العمل	21
3-1 المواد	21
3-1-1 الاجهزة والادوات المستعملة في التجربة	21
3-1-2 المواد الكيميائية المستعملة في التجربة	22
3-2 طرائق العمل	22
3-2-1 مصدر الاجزاء النباتية	23
3-2-2 تحضير الوسط الغذائي وتعقيمه	23
3-2-3 تجارب الاكثار الدقيق	25
3-2-3-1 تهيئة الاجزاء النباتية وتعقيمها	25
3-2-3-2 تجربتي التضاعف	25
3-2-3-3 تجربة التجذير	26
3-2-3-4 الأقلمة	27
3-2-4 اكثار نبات الداوّدي من نبات واحد لإنتاج سلالة للتطفير	27
3-2-5 تجارب التطفير والاجهاد الملحي	27
3-2-5-1 اختبار تأثير أثيل ميثان سلفونيت (EMS) في استحثاث التغايرات الوراثية	27
3-2-5-1-1 تحضير المطفر الكيميائي EMS	27
3-2-5-1-2 اختبار تأثير تراكيز EMS ومعاملات التطفير والتداخل بينهما في النسبة المئوية لنجاة العقد المطفرة والحصول على الجرعة نصف القاتلة (LD_{50})	28

3-2-5-2 تحضير الاوساط الغذائية لاختبار تحمل اجهاد كلوريد الصوديوم	29
3-2-5-3 تأثير التطفير واجهاد كلوريد الصوديوم والتداخل بينهما في تكشف عقد الداوّدي	29
3-2-6 التصميم التجريبي والتحليل الاحصائي	30
3-2-7 التجارب الوراثية الجزيئية	30
3-2-7-1 دراسة الطفرات بمؤشرات الدنا بتقنية RAPD-PCR	30
3-2-7-1-1 استخلاص الدنا	31
3-2-7-1-2 قياس نقاوة وتركيز الدنا	32
3-2-7-1-3 تخفيف البوادئ وتحضير خليط التفاعل لأجراء التفاعل التضاعفي لسلسلة الدنا	32
3-2-7-1-4 تحضير هلام الاكاروز	33
3-2-7-1-5 الترحيل الكهربائي	34
3-2-7-2 تحليل نتائج RAPD	34
3-2-7-2-1 حساب الحجم الجزيئي	35
3-2-7-2-2 تقدير قيمة البعد الوراثي	35
4- النتائج والمناقشة	37
4-1 تجارب الاكثار الدقيق	37
4-1-1 تأثير هايبوكلورات الصوديوم في تعقيم الاجزاء النباتية	37
4-1-2 تأثير تراكيز BA في نشوء الافرع من العقد المفردة وتضاعفها وتجذيرها	37
4-1-2-1 استجابة نشوء الافرع	37
4-1-2-2 متوسط عدد الافرع	38
4-1-2-3 متوسط ارتفاع الفرع	38
4-1-2-4 متوسط عدد الاوراق	38
4-1-2-5 نشوء الجذور	40
4-1-2-6 متوسط عدد الجذور	40
4-1-2-7 متوسط طول الجذور	40
4-1-3 تأثير اضافة NAA مع BA في نشوء الافرع من العقد المفردة وتضاعفها وتجذيرها	41
4-1-3-1 استجابة لنشوء الافرع	41
4-1-3-2 متوسط عدد الافرع	41
4-1-3-3 متوسط ارتفاع الافرع	43
4-1-3-4 متوسط عدد الاوراق	43
4-1-3-5 استجابة نشوء الجذور ومتوسط عددها وطولها	43
4-1-4 تأثير تراكيز IBA في تجذير الافرع	44
4-1-4-1 نشوء الجذور	44
4-1-4-2 متوسط عدد الجذور	44
4-1-4-3 متوسط طول الجذور	44
4-1-4-4 متوسط عدد الأيام اللازمة لتجذير كامل الافرع	44
4-1-5 الأقلمة	46
4-2 تجارب التطفير والاجهاد الملحي	47
4-2-1 تأثير تركيز EMS ومعاملات التطفير والتداخل بينهما في النسبة المئوية	47

لنجاة العقد المطفرة والحصول على الجرعة نصف القاتلة (LD_{50})	
4-2-2 تأثير التطفير واجهاد كلوريد الصوديوم والتداخل بينهما في نبات الداوّدي	49
4-2-2-1 تأثير التطفير واجهاد كلوريد الصوديوم والتداخل بينهما في بعض صفات النمو الخضري	49
4-2-2-1-1 تأثير التطفير واجهاد كلوريد الصوديوم والتداخل بينهما في الاستجابة لنشوء الافرع	49
4-2-2-1-2 تأثير التطفير واجهاد كلوريد الصوديوم والتداخل بينهما في متوسط ارتفاع الافرع	50
4-2-2-1-3 تأثير التطفير واجهاد كلوريد الصوديوم والتداخل بينهما في متوسط عدد الاوراق	50
4-2-2-2 تأثير التطفير واجهاد كلوريد الصوديوم والتداخل بينهما في النمو الجذري	52
4-2-2-2-1 تأثير التطفير واجهاد كلوريد الصوديوم والتداخل بينهما في النسبة المئوية لاستجابة نشوء الجذور	52
4-2-2-2-2 تأثير التطفير واجهاد كلوريد الصوديوم والتداخل بينهما في متوسط عدد الجذور	53
4-2-2-2-3 تأثير التطفير واجهاد كلوريد الصوديوم والتداخل بينهما في متوسط طول الجذور	54
4-2-2-3 تأثير التطفير واجهاد كلوريد الصوديوم والتداخل بينهما في الوزنين الطري والجاف	55
4-2-2-3-1 تأثير التطفير واجهاد كلوريد الصوديوم والتداخل بينهما في متوسط الوزن الطري	55
4-2-2-3-2 تأثير التطفير واجهاد كلوريد الصوديوم والتداخل بينهما في متوسط الوزن الجاف	55
4-3 التجارب الوراثية الجزيئية	56
4-3-1 دراسة التغايرات الوراثية باستعمال مؤشرات الدنا بتقنية RAPD-PCR	56
4-3-1-1 استخلاص الدنا وتقدير الكمية والنقاوة	56
4-3-1-2 التفاعل التضاعفي لسلة الدنا بتقنية RAPD	57
4-3-1-3 تحديد البعد الوراثي بين العينات المدروسة	60
5- الاستنتاجات والتوصيات	63
5-1 الاستنتاجات	63
5-2 التوصيات	64
6- المصادر	65
6-1 المصادر العربية	65
6-2 المصادر الاجنبية	66
7- الملاحق	76

قائمة الجداول

الجداول	الصفحات
الجدول 1. الاجهزة والادوات التي استعملت في التجربة مع البلد المصنع.	21
الجدول 2. المواد الكيميائية التي استعملت في التجربة مع الشركة والبلد المصنع.	22
الجدول 3. المكونات الكيميائية للوسط الغذائي MS المحور من Hi-media.	24
الجدول 4. تراكيز محاليل المادة المطفرة EMS والاس الهايدروجيني.	28
الجدول 5. تتابع البادئات وتسلسلها النيوكليوتيدي المستعملة في تقنية RAPD-PCR (Kameswari وGirwani، 2017).	32
الجدول 6. مكونات خليط التفاعل الرئيسي.	33
الجدول 7. حجم المواد المستعملة في تقنية RAPD-PCR (مايكرولتر).	33
الجدول 8. برنامج تفاعل PCR المستخدم للكشف عن التغايرات الوراثية بعد التطفير لنبات الداوّدي (Kameswari وGirwani، 2017).	33
الجدول 9. تأثير تراكيز هايبوكلورات الصوديوم التجاري في النسبة المئوية لتلوث العقد المفردة لنبات الداوّدي المزروعة خارج الجسم الحي بعد غمرها لمدة 6 دقائق وبعد اسبوعين من الزراعة على وسط MS خالٍ من منظمات النمو.	37
الجدول 10. تأثير تراكيز BA في نشوء الافرع من العقد المفردة لنبات الداوّدي وتضاعفها وتجذيرها بعد مرور أربعة أسابيع من الزراعة على وسط MS.	38
الجدول 11. تأثير اضافة NAA مع BA في نشوء الفروع من العقد المفردة لنبات الداوّدي وتضاعفها وتجذيرها بعد مرور أربعة أسابيع من الزراعة على وسط MS.	41
الجدول 12. تأثير تراكيز IBA في تجذير الافرع لنبات الداوّدي بعد مرور أربعة أسابيع من الزراعة على وسط MS.	45
الجدول 13. تأثير تراكيز EMS ومعاملات التطفير والتداخل بينهما في النسبة المئوية لنجاة العقد النسيجية لنبات الداوّدي المزروعة على وسط MS خالٍ من منظمات النمو بعد مرور اسبوعين من الزراعة.	47
الجدول 14. تأثير التطفير وكلوريد الصوديوم والتداخل بينهما في النسبة المئوية (%) لاستجابة نشوء الافرع لنبات الداوّدي المزروعة على وسط MS خالٍ من منظمات النمو بعد مرور خمسة أسابيع من الزراعة.	49
الجدول 15. تأثير التطفير وكلوريد الصوديوم والتداخل بينهما في ارتفاع افرع (سم) نبات الداوّدي المزروعة على وسط MS خالٍ من منظمات النمو بعد مرور خمسة أسابيع من الزراعة.	50
الجدول 16. تأثير التطفير وكلوريد الصوديوم والتداخل بينهما في عدد الاوراق (ورقة. جزء نباتي$^{-1}$) لنبات الداوّدي المزروعة على وسط MS خالٍ من منظمات النمو بعد مرور خمسة أسابيع من الزراعة.	51
الجدول 17. تأثير التطفير وكلوريد الصوديوم والتداخل بينهما في النسبة المئوية (%) لاستجابة نشوء الجذور لنبات الداوّدي المزروعة على وسط MS خالٍ من منظمات النمو بعد مرور خمسة أسابيع من الزراعة.	53
الجدول 18. تأثير التطفير وكلوريد الصوديوم والتداخل بينهما في عدد الجذور (جذر. جزء نباتي$^{-1}$) لنبات الداوّدي المزروعة على وسط MS خالٍ من منظمات النمو بعد مرور خمسة أسابيع من الزراعة.	53
الجدول 19. تأثير التطفير وكلوريد الصوديوم والتداخل بينهما في طول الجذور (سم) لنبات الداوّدي المزروعة على وسط MS خالٍ من منظمات النمو بعد مرور خمسة أسابيع من الزراعة.	54

الجدول 20. تأثير التطفير وكلوريد الصوديوم والتداخل بينهما في الوزن الطري (ملغم) لنبات الداوّدي المزروعة على وسط MS خالٍ من منظمات النمو بعد مرور خمسة أسابيع من الزراعة.	55
الجدول 21. تأثير التطفير وكلوريد الصوديوم والتداخل بينهما في الوزن الجاف (ملغم) لنبات الداوّدي المزروعة على وسط MS خالٍ من منظمات النمو بعد مرور خمسة أسابيع من الزراعة.	56
الجدول 22. نقاوة وتراكيز الدنا المستخلص من العينات السبع المدروسة.	56
الجدول 23. عدد الحزم الكلية للبوادئ الثمانية مع أحجامها الجزيئية للداوّدي (النبات الام ونواتج التطفير).	58
الجدول 24. البعد الوراثي بين العينات السبع المدروسة.	60

قائمة الاشكال

الاشكال	الصفحات
الشكل 1. الية عمل *Ethyl methanesulfonate* (EMS) في احداث التغايرات الوراثية. (A) التركيب الكيميائي للنيوكليوتيدات في DNA، (B) الحالة الطبيعية للازدواج القاعدي في DNA، (C) الية عمل المطفر حسب مصطفى (2018)، (D) الية عمل المطفر حسب Pierce (2016).	12
الشكل 2. نبات الداوّدي المستورد والمستعمل كمصدر للأجزاء النباتية.	23
الشكل 3. العقد المفردة المقطعة بعد التعقيم السطحي.	25
الشكل 4. مؤشرات الحجم الجزيئي المكونة من 13 حزمة اوزانها 100-10000 زوج قاعدي.	34
الشكل 5. افرع نبات الداوّدي الناتجة من التضاعف بعد مرور أربعة أسابيع من زراعة العقد المفردة على وسط MS حاوٍ تراكيز مختلفة من BA.	39
الشكل 6. افرع نبات الداوّدي الناتجة من مرحلة التضاعف بعد أربعة أسابيع من العقد المفردة المزروعة على وسط MS حاوٍ توليفات مختلفة من NAA مع BA.	42
الشكل 7. تأثير تراكيز IBA في نشوء الجذور العرضية على الافرع لنبات الداودي بعد مرور أربعة أسابيع من الزراعة على وسط MS.	45
الشكل 8. نباتات الداوّدي المؤقلمة، (A) النباتات اثناء التغطية باكياس النايلون (البولي اثلين الابيض)، (B) النباتات بعد ازالة الغطاء ونموها طبيعيا تحت ظروف المختبر بعد مرور أربع أسابيع من بدء الأقلمة.	46
الشكل 9. منحنى نجاة العقد المفردة لنبات الداوّدي المطفرة بتراكيز مختلفة من المطفر الكيميائي EMS المضاف للماء المقطر بعد مرور اسبوعين من الزراعة على وسط MS بكامل القوة وخالٍ من منظمات النمو.	48
الشكل 10. منحنى نجاة العقد المفردة لنبات الداوّدي المطفرة بتراكيز مختلفة من المطفر الكيميائي EMS المضاف للمحلول المنظم بعد مرور اسبوعين من الزراعة على وسط MS بكامل القوة وخالٍ من منظمات النمو.	48
الشكل 11. عقد نبات الداوّدي المفردة الخاضعة لمعاملات التطفير والنامية بظروف اجهاد كلوريد الصوديوم خارج الجسم الحي بعد مرور خمسة أسابيع من الزراعة على وسط MS كامل القوة وخالٍ من منظمات النمو.	51
الشكل 12. مخطط التحليل العنقودي (شجرة القرابة) للعينات قيد الدراسة اعتمادا على مؤشرات RAPD-PCR، اذ تمثل العينة 1 النبيتة الام (بدون تطفير)، العينات 2-4 تمثل النبيتات المطفرة بالمطفر EMS تركيز 1% المضاف للماء المقطر والعينات 5-7 تمثل النبيتات المطفرة بالمطفر EMS تركيز 1.25%المضاف للمحلول المنظم.	61

قائمة الملاحق

الملاحق	الصفحات
الملحق 1. نتائج تحليل جينوم العينات السبع العشوائية من نبات الداوّدي (بدون تطفير ومع التطفير) بثمان بوادئ في تفاعل RAPD-PCR، تمثل العينة 1 دنا النبيتة الام، العينات 2-4 تمثل دنا النبيتات المطفرة بمعاملة T2، العينات 5-7 تمثل دنا النبيتات المطفرة بمعاملةT3، M تمثل مؤشر الحجم الجزيئي ladder DNA.	76

المختصـــرات

bp	Base pair	زوج قاعدي
BA	Benzyl Adenine	البنزايل ادنين
Ch.	Chrysanthemum	الداوّدي
DNA	Deoxy Ribonucleic Acid	الدنا
EMS	Ethyl methane sulphonate	أثيل ميثان سلفونيت
IAA	Indol Acetic Acid	اندول حامض الخليك
IBA	Indol Butyric Acid	اندول حامض البيوتريك
Kin	Kinetin	الكاينتين
LD_{50}	Lethal Dose 50	الجرعة نصف القاتلة
$HgCl_2$	Mercuric chloride	كلوريد الزئبق
SSR	Microsatellites	تقنية المواقع البسيطة المتكررة
MS	Murashige and Skoog medium	وسط موراشيج و سكوج
NAA	Naphthalene Acetic Acid	نفثالين حامض الخليك
%	Percent	النسبة المئوية
PCR	Polymerase chain reaction	التفاعل التضاعفي لسلسلة الدنا
pH	Potential of Hydrogen	الاس الهيدروجيني
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA	التضاعف العشوائي المتعدد الاشكال لسلسة الدنا
RNA	Ribonucleic Acid	الحمض النووي الرايبوزي
NaCl	Sodium Chloride	كلوريد الصوديوم
NaOCl	Sodium Hypochlorite	هايبوكلورات الصوديوم
TBE	Tris/Borate/EDTA	المحلول المنظم القياسي
UV	Ultra Violet	الاشعة فوق البنفسجية
v/v	volume / volume	حجم / حجم
w/v	Weight / volume	وزن / حجم
T1	معاملة المقارنة بدون تطفير	
T2	معاملة التطفير باضافة المطفر EMS تركيز 1% للماء المقطر	
T3	معاملة التطفير باضافة المطفر EMS تركيز 1.25% للمحلول المنظم	

1- المقدمة

نبات الداوّدي من نباتات الزينة المهمة في العالم، وتعد هولندا التي وفرت عام 2015 حوالي 1.2 مليار زهرة داوّدي مقطوفة للسوق المحلية والعالمية ثم اليابان وايطاليا اكبر المنتجين له كأزهار قطف، والمملكة المتحدة والمانيا وفرنسا اكبر المستوردين في اوربا. الداودّي من اكثر ازهار القطف مبيعا بعد الورد وتعد Royal Flora Holland السوق الرئيس لبيعه، وواردات الداوّدي بارتفاع متزايد اذ بلغت في عام 2014 حوالي 256 مليون يورو وبلغت في 2016 حوالي 284 مليون يورو (CBI، 2017)، على الرغم من وجود وفرة من اصناف الداوّدي، فان الطلب المتزايد عليه يشجع مربي النبات على انتاج اصناف جديدة بتربية الطفرات، اذ بلغ عدد الاصناف الجديدة التجارية المعلنة 236 منذ عام 1960-2000 (Schum، 2003).

الداوّدي من نباتات التربية الخاصة يكُثر بالطرق التقليدية بالخلفات كما وتستعمل زراعة الانسجة والاعضاء النباتية ايضاً (الجلبي والخياط، 2013)، لإنتاج اعداد كبيرة من النباتات على مدار السنة ولاختصار الوقت والجهد (Smith، 2013)، ولتلافي عدم التوافق الجنسي الذاتي الذي يعيق عملية التربية الداخلية للداوّدي (بعض الاصناف) وعدم انتاج نباتات مماثلة لإبائها (Wang وآخرون، 2014). تعد التغايرات الوراثية القاعدة الاساس لإنتاج تراكيب وراثية جديدة غير موجودة، وتحصل هذه التغايرات بالطفرات الطبيعية او المستحثة، ولانخفاض وتيرة حصول الطفرات الطبيعية (Jankowicz-Cieslak وآخرون، 2017)، تم اللجوء الى التربية بالطفرات لاستحثاث التغايرات للحصول على خطوط متحملة للإجهادات أو الحصول على اصناف جديدة. يعد المطفر الكيميائي EMS من اهم المطفرات التي تسبب طفرات نقطية تؤدي الى احداث تغايرات وراثية (Shu وآخرون، 2011).

تشكل الاجهادات بنوعيها الأحيائية واللاأحيائية، الخطر الرئيس الذي يهدد النشاط الزراعي، وان تبخر مياه الري في الاراضي المروية يسبب تراكم تدريجي للأملاح في منطقة الجذر وسطح التربة (جندية، 2003)، وتشير التقديرات إلى أن ما يقرب من نصف المساحة الإجمالية للأراضي المروية بالعالم يمكن أن تتأثر سلباً بالملوحة (Munns وTester، 2008)، ويعد الداوّدي من النباتات متوسطة الحساسية للملوحة (Grieve وآخرون، 2012). توفر التقانات الاحيائية النباتية فرصة انتخاب نباتات متحملة للملوحة خارج الجسم الحي بتضمين وسط الزراعة عامل انتخاب (NaCl) (الصميدعي، 2017)، اذ استعملت التقانات الاحيائية لمحاولة استنباط تراكيب وراثية متحملة للملوحة أو نباتات متغايرة مظهريا بالتطفير، وتعد مؤشرات الدنا من ادق ادوات الكشف عن التغايرات الوراثية، والتي تتضمن العديد من التقنيات،

ان تقنية التضاعف العشوائي متعدد الاشكال لسلسلة الدنا RAPD-PCR من التقنيات ذات الدقة التشخيصية العالية (Kumar وGurusubramanian،2011)، وفيها يتم مضاعفة مواقع على شريط الدنا باستعمال بادئات عشوائية تبحث عن مواقع مكملة لها على شريط الدنا من اجل الارتباط به ومضاعفته، اذ يكون ناتج هذا التضاعف قطع من الدنا مختلفة الاطوال والاعداد اعتماداً على عدد مواقع الارتباط والبعد بين موقع واخر (Bardakci، 2001).

بالنظر للحاجة الماسة في العراق الى اصناف داوّدي متحملة للاجهاد الملحي ويمكن اكثارها نسيجيا لسد حاجة السوق المحلية لذا هدفت الدراسة الحالية الى:

1. الوصول الى بروتوكول للإكثار الدقيق لنباتات الداوّدي (صنف مستورد) بالزراعة النسيجية.
2. الحصول على الجرعة نصف القاتلة (LD_{50}) بمعاملتين من المطفر EMS.
3. معرفة مدى إمكانية استعمال التربية بالتطفير في تحسين أو تقليل الآثار الضارة للإجهاد الملحي في نمو نبات الداوّدي.
4. توظيف تقانة RAPD لفحص التغاير الوراثي الحاصل نتيجة الطفرة النقطية والمقارنة بين طريقتي التطفير 1% من EMS المضاف للماء المقطر و1.25% من EMS المضاف للمحلول المنظم في افضلية استحثاث التغايرات.