تحفيز التغايرات الوراثية باستخدام مستخلص ثمار الحنظل واستحثاث الكالس لأجنة بذور تركيبين وراثيين من الجت

إبراهيم عبد الله حمزة رنين جواد علي*
أستاذ مساعد باحث
قسم المحاصيل الحقلية – كلية الزراعة – جامعة بغداد
qweenrose98@gmail.com

المستخلص

نفذت تجربة في المختبر المركزي لزراعة الانسجة النباتية – الدراسات العليا – كلية الزراعة – جامعة بغداد للمدة من تموز 2015 إلى تموز 2016 بهدف دراسة تأثير مستخلص ثمار الحنظل *Citrullus colocynthis* في تحفيز التغايرات الوراثية واستحثاث الكالس من أجنة تركيبين وراثيين (PAC-78001 والمحلي) من الجت باستعمال تقانة زراعة الأنسجة بتصميم التجارب العاملية على وفق ترتيب الألواح المنشقة. نقعت البذور بتراكيز مختلفة من مستخلص ثمار الحنظل (0 و75 و150 و225 و300) مل لتر$^{-1}$ لمدة 24 ساعة، ومن ثم عقمت البذور بتركيز 4.5% من محلول هايبوكلورات الصوديوم NaOCl لمدة 15 دقيقة. اظهرت النتائج وجود اختلاف معنوي بين التركيبين الوراثيين للجت في استجابتهما لمستويات مختلفة من مستخلص ثمار الحنظل، إذ اعطى التركيز 150 مل لتر$^{-1}$ أعلى معدل للوزنين الطري والجاف للكالس بلغا 205.90 و20.60 ملغم لتر$^{-1}$ بالتتابع. كما اظهرت نتائج PCR باستخدام مؤشر RAPD والترحيل على هلام الأكروز لعينات DNA المعزولة من كالس التركيبين الوراثيين للجت والمعرضين لتراكيز مختلفة من مستخلص ثمار الحنظل وجود اختلاف في أعداد الحزم المتضاعفة وأحجامها الجزيئية وشدة تألقها باستخدام البوادئ Y07– وY06– وOE-12 وC-08 وD-10 وY10–وA-16، ولم يظهر أي اختلاف في عدد الحزم ولتراكيز مستخلص ثمار الحنظل جميعها في التركيب الوراثي المحلي للبادئ A-16.

الكلمات المفتاحية: الجت، زراعة الأنسجة النباتية، استحثاث الكالس، مؤشر RAPD.

*البحث مستل من رسالة ماجستير للباحث الثاني.

The Iraqi Journal of Agricultural Sciences –749-764: (3) 48/ 2017 Hamza & Ali

PRIMING OF GENETIC VARIATIONS BY COLOCYNTH FRUIT EXTRACT AND CALLUS INITIATION IN EMBRYOS OF TWO CULTIVARS OF ALFALFA SEEDS

I. A. Hamza R. J. Ali*
Assist. Prof. Researcher
Dept. of Field Crops – Coll. of Agric. Univ. of Baghdad
qweenrose98@gmail.com

ABSTRACT

An experiment was conducted at Central lab of Graduate studies, College of Agriculture, University of Baghdad during 2015-2016. The aim was to study the effect of colocynth fruit extract on inducing callus from embryos of two alfalfa cultivars were PAC-78001 and local variety by tissue culture technique using factorial experiment within CRD. Seeds was soaked with colocynth fruit extract at 0, 75, 150, 225, and 300 ml Li^{-1} for 24 hours, then, sterilized by NaOCl at 4.5% for 15 minutes. The results showed significant differences between two cultivars responding to colocynth fruit extract levels. Concentration at 150 ml Li^{-1} gave the highest both fresh and dry weight of callus (205.90 and 20.60) respectively. Also, PCR results depending on RAPD and electrophoresis for DNA samples which isolated from callus of two cultivars and subjected to various concentrations of colocynth fruit extract 0, 75, 150, 225 and 300 ml Li^{-1} showed differences in amplified observed bands, molecular weights and brightness intensity by using primers primer -Y07, -Y06, OE-12, C-08, D-10, -Y10 and A-16, and There was no difference in bands number at all concentrations of colocynth fruit extract for local variety by primer A-16.

Key words: Alfalfa, plant tissue culture, callus induced, RAPD.

***Part of M.Sc. thesis of the second author.**

المقدمة

يعد محصول الجت من محاصيل العائلة البقولية المهمة والذي يحتل المرتبة الأولى من بين المحاصيل العلفية، ويتميز بقيمته الغذائية العالية للحيوان ولاسيما الأبقار والأغنام والدواجن والأسماك، كما يتميز بإنتاجية عالية من المادة الخضراء وتحمله لعوامل الشد الحيوي وغير الحيوي، وهو نبات معمر يبقى في الأرض من 3–4 سنوات حسب طبيعة التربة وعوامل الخدمة (5) وتصل نسبة البروتين فيه 22.9% والكربوهيدرات 36.1% والدهون 2.5% عند وصول النبات إلى بداية التزهير، وهذه النسب محسوبة على أساس النسبة المئوية للوزن الجاف للجت (10)، ويتميز محصول الجت بإنتاجيته العالية ومحافظته على التربة وتثبيت النتروجين الجوي من ثم التقليل من استعمال المركبات الكيميائية التي تعمل على تلوث التربة والمياه الجوفية (25). يعد الاجهاد الملحي من العوامل اللاحيائية الأكثر أهمية والتي تسبب تأثيرات ضارة في تطور وإنتاج المحاصيل من خلال التغايرات الفسيولوجية والكيميائية والجزيئية (15 و24)، وللتقليل من هذه المشكلة استعملت أساليب جديدة للتعايش مع الملوحة من خلال تطوير تراكيب وراثية من المحاصيل تكون ذات تحمل للملوحة عن طريق التربية التقليدية والانتخاب أو باستخدام التقانات الحديثة، إذ تتيح زراعة الأنسجة التعامل مع أعداد هائلة من الخلايا النباتية واجراء عملية الغربلة والانتخاب على هذه الخلايا في الأوساط الملحية لتحديد الخلايا الأفضل والتي اظهرت تحملاً للتراكيز الملحية والعمل على تمايزها إلى نباتات وتجذيرها وأقلمتها ومن ثم اختبارها حقليا لتحمل الملوحة (17 و19). إن استحثاث الطفرات وتوظيف تقانة زراعة الانسجة للتعامل مع الخلايا المطفرة ساعد في الحصول على سلالات نقية ذات صفات مرغوبة وقد أثبتت نجاحآ كبيرآ في تحسين صفات المحاصيل المختلفة، والذي انعكس على زيادة الإنتاج والحصول على نباتات متحملة للاجهادات الحيوية واللاحيوية من خلال استحثاث الكالس وتطفيره وتعريضه إلى اجهادات الملوحة والجفاف والبرودة وغيرها (22)، إذ إن استخدام الصفات المظهرية في تحديد صفات النباتات الناتجة من زراعة الانسجة هو محدود وغير مفيد بالمقارنة مع الصفات الوراثية، وأن التقدم الحديث في علم الوراثة والبيولوجي الجزيئي اظهر الوصف الأساسي لجزيئة DNA الذي يستعمل لمعرفة التشابه والاختلاف بين أفراد متعددة تضم أصناف وأنواع نباتية مختلفة (14)، وبالامكان تشخيص الطفرات وتقدير التباين الوراثي من خلال دراسة التنوع البايوكيميائي الذي يشمل التنوع في البروتينات والأنزيمات المتناظرات الأنزيمية والتنوع في نواتج الأيض الثانوي والمسارات الأيضية فضلا عن التنوع في تسلسلات نيوكلوتيدات DNA باستعمال مؤشرات التضاعف العشوائي لقطع من DNA ومنها تقانة PCR لغرض معرفة البصمة الوراثية وأكثرها شيوعا هو مؤشر RAPD وتحتاج هذه التقانة بشكل أساسي إلى بادئات ذات تسلسل عشوائي تحتوي على أكثر من 50% من قواعد Cytosine وGuanine وأن بساطة جهاز الترحيل الكهربائي جعلت من هذه التقانة سهلة وسريعة (26)، وهناك بعض الدراسات التي استخدمت مؤشرات RAPD للتعرف على التباين الوراثي بين الأصناف والأنواع واستخدمت طريقة RAPD كثيرا لجنس *Medicago* لتقدير التغايرات الوراثية للجت لتحديد الخرائط الجينية (9). اشارت Baday (3) إلى وجود اختلاف في أعداد الحزم وأوزانها الجزيئية باستخدام مؤشر RAPD في تقدير التباين الوراثي لصنفين من قصب السكر المعرضة لتراكيز مختلفة من مستخلص الحنظل 0 و50 و100 و150 و200 مل لتر$^{-1}$ باستخدام 5 بوادئ عشوائية، وهذا يعود إلى تأثير مستخلص الحنظل وتراكيزه في الأنسجة النباتية. لذا يهدف البحث إلى تحفيز التغايرات الوراثية عن طريق استحثاث الكالس من أجنة بذور تركيبين وراثيين من الجت لإنتاج خطوط خلايا متحملة للملوحة من خلال زراعة الكالس على تراكيز مختلفة من مستخلص ثمار الحنظل.

المواد وطرائق العمل

نفذت تجربة في مختبر زراعة الانسجة النباتية – الدراسات العليا – كلية الزراعة – جامعة بغداد للمدة من بداية شهر تموز 2015 حتى شهر تموز 2016 بهدف استحثاث التغايرات الوراثية خارج الجسم الحي باستخدام مستخلص ثمار الحنظل لتركيبين وراثيين من الجت. غسلت بذور التركيبين الوراثيين للجت (المحلي وPAC-78001) بماء الحنفية الجاري لمدة 5 دقائق قبل البدء بالزراعة لغرض التخلص من الشوائب والأتربة العالقة بها، بعدها نقعت بذور

التركيبين الوراثيين للجت بتراكيز مختلفة من مستخلص ثمار الحنظل (0 و75 و150 و225 و300) مل لتر$^{-1}$ لمدة 24 ساعة التي تم تحضيرها بحسب طريقة Fleming (12)، ومن ثم نقلت البذور المعاملة بالمستخلص إلى منضدة الزراعة (Limener ari flow cabeant منضدة أنسياب الهواء الطبقي) لاجراء عملية التعقيم السطحي للبذور باستعمال محلول القاصر التجاري هايبوكلورات الصوديوم NaOCl بالتركيز 4.5% واضافة قطرتين من المادة الناشرة Tween 20 مع الرج المستمر لمدة 15 دقيقة (13)، وبعدها غسلت البذور المعُقمة بالماء المقطر المُعقم ثلاث مرات لازالة المتبقي من المادة المعقمة، وسُجلت نسبة التلوث بعد أسبوع من الزراعة، بعد ذلك زرعت البذور في وسط MS الخالي من منظمات النمو (16) الجاهز من شركة High media بوزن 4.33 غم لتر$^{-1}$ في مراحل الزراعة جميعها والمُجهز بـ 30 غم لتر$^{-1}$ سكروز، واكمل الحجم إلى 800 مل وعُدل الاس الهيدروجيني pH إلى 5.70 باستعمال هيدروكسيد الصوديوم NaOH (Sodium hydroxide) أو حامض الهيدروكلوريك HCl (Hydrochloric acid) واحد عياري واكمل الحجم إلى 1000 مل واضيف 7 غم لتر$^{-1}$ من Agar، وعُقم الوسط في جهاز التعقيم البخاري (المؤصدة) (Autoclave) بدرجة 121 مْ وضغط 1.04 كغم سم$^{-2}$ ولمدة 15 دقيقة لغرض تحفيز نمو الأجنة. استئصلت الأجنة النامية لبذور الجت بمجرد ملاحظة ظهور الجذير بعد 48 ساعة بأجراء عملية الضغط الخفيف على البذرة من جهة الجنين باستعمال شفرات جراحية، وزرع الجنين بشكل مقلوب على وسط MS الحاوي على 2,4-D بالتركيز 2 ملغم لتر$^{-1}$ والكاينتين بالتركيز 0.5 ملغم لتر$^{-1}$ لغرض استحثاث الكالس، ومن ثم حضنت الأجنة في ظلام تام وعلى درجة حرارة 25 مْ ± 2 بعد أربعة أسابيع وسجل الوزن الطري والجاف للكالس بمعدل عشرة تكرارات لكل معاملة وتركيب وراثي من الجت (الجدول 1).

قياس الوزنين الطري والجاف

استعمل الميزان الألكتروني الحساس في تحديد الوزن الطري، إذ استخرج الكالس من القناني المزروعة فيها ووضعت على ورق الترشيح وازيلت بقايا الوسط الغذائي باستعمال شفرة جراحية وحسب الوزن الطري للكالس، وجففت النموات في الفرن الكهربائي على درجة حرارة 70 مْ لمدة 48 ساعة ولحين ثبات الوزن لتحديد الوزن الجاف (1).

جدول 1. مكونات الوسط الغذائي MS لاستحثاث الكالس من أجنة بذور الجت

المادة	التركيز ملغم لتر$^{-1}$
MS	4330
Myo-inositol	100
2,4-D	2
Kin.	0.50
Citrullus colocynthis (0 و75 و150 و225 و300) مل لتر$^{-1}$	
Thiamine-HCl	0.4
Glycine	2
Nicotinc acid	2
Pyrodoxine – HCl	0.5
Sucrose	30000
Agar	7000

استخلاص DNA

عزلت المادة الوراثية DNA من معاملات مستخلص ثمار الحنظل (0 و75 و150 و225 و300) مل لتر$^{-1}$ على وفق طريقة Dellaprota وآخرون (8).

محلول الاستخلاص

استعمل Wizard Genomic DNA Purification Kit في استخلاص DNA والمجهز من شركة Promega الأمريكية المنشأ بالكميات الآتية:

المادة	الحجم لعينة واحدة (µl)
Nucleilysis solution	600
RNase solution	3.00
Protein precipitation solution	200
DNA rehydration solution	100

حفظت المحاليل في درجة حرارة 15–30 مْ.

تفاعل البلمرة المتسلسل Polymerase Chain-PCR Reaction

استعمل إثنا عشر بادئاً عشوائياً تم الحصول عليها من شركة Promega الأمريكية المنشأ، كل بادئ يتكون من عشر نيوكليوتيدات عشوائية وتسلسلها القاعدي كما يأتي:

Primer	Sequence (5′ – 3′)
A-16	AGCCAGCGAA
C-08	TGGACCGGTG
D-10	GGTCTACACC
OE-12	TTATCGCCCC
-Y06	AAGGCTCACC
-Y07	AGAGCCGTCA
-Y10	CAAACGTGGG

أما البرنامج الذي استعمل لاجراء عملية تضخيم قطع DNA المستخلص فكما يأتي:

Stage	Step		Time	Cycle
1	1	Denaturation 94ċ	3min	1
	1	Denaturation 94ċ	1min	
2	2	Annaling 37 ċ	1min	40
	3	Extension 72 ċ	2min	
3	1	Extension 72 ċ	7min	1

تحضير هلام الأكروز

اعد لوح التحميل باستعمال لوح بلاستيكي شفاف ذي أبعاد ملائمة لحوض الترحيل الكهربائي وثبت المشط الخاص لتكوين الحفر Wells عند أحد أطراف الهلام. حضر هلام الاكروز بتركيز 2% وذلك للكشف عن عينات DNA المعزول وذلك باذابة 2 غم من الاكروز في 10 مل من محلول TBE–Buffer بقوة (×1) ويكمل الحجم إلى 100 مل بإضافة 90 مل من الماء المقطر وسخن مع التحريك المستمر لحين إكتمال الاذابة في جهاز Microwaves، ثم برد إلى درجة حرارة 50–55 مْ وأضيف إليه 5 مايكروليتر من صبغة بروميد الاثيديوم. سكب الاكروز في حوض الترحيل بشكل مستمر وهادئ لتجنب تكوين فقاعات هوائية ترك الهلام في درجة حرارة المختبر ليبرد ويكتسب الصلابة.

الترحيل الكهربائي على هلام الأكروز

بعد تصلب الهلام رفع المشط بهدوء ووضع في حوض الترحيل وغمر بمحلول TBE–Buffer بقوة (×1) وحضرت العينات للترحيل.

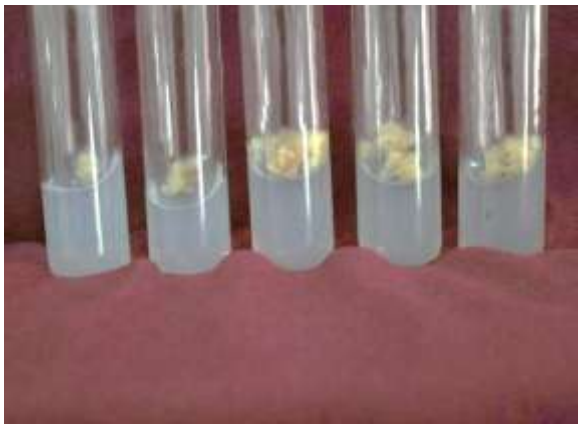
وزعت العينات على الحفر باستخدام الماصة الدقيقة Micropipette وروعي عدم خروج العينة من سطح الحفرة، ورحل مع العينات الدليل الحجمي Marker بحجم 100– 1500 bp، وأغلق جهاز الترحيل وتم توصيل أقطاب التيار الكهربائي وجهز بفولتية مقدارها 90 فولت وتم الترحيل باتجاه القطب الموجب وبعد مضي ساعتين وعند وصول الصبغة الزرقاء إلى ما قبل نهاية الهلام أوقف الترحيل، فحص الهلام بتعريضه للاشعة فوق البنفسجية بوضعه في جهاز DNA/RNA UV-Cleaner عند طول موجي 260–280 نانوميتر لرؤية حزم DNA وتصويرها لكل تركيب ومعاملة. قدرت الأحجام الجزيئية للقطع المتضاعفة لـ DNA بالاعتماد على مواقع الحزم ذات الأحجام الجزيئية المعروفة والناتجة من قطع DNA الدليل الحجمي القياسي (27)، رسم المنحنى القياسي بين قيم الاحجام الجزيئية للدليل الحجمي الممثلة على المحور الصادي وقيم المسافات التي تبعد هذه الحزم عن حفر تحميلها داخل الهلام الممثلة على المحور السيني، قيست المسافة التي قطعتها كل حزمة (القطعة المضاعفة) من حزم العينات المدروسة وباسقاط عمود من تلك المسافة على المنحنى القياسي ومن نقطة التقاطع هذه تم اسقاط عمود آخر على المحور الصادي ليمثل حجم القطعة المضاعفة (20)، وبمقارنة الحزم المتضاعفة للعينات المدروسة والناتجة من تفاعل RAPD مع حزم DNA القياسي وتقدير أحجامها الجزيئية حصلنا على نواتج تفاعلات RAPD لـ DNA معاملات الاصناف المدروسة وحسب نوع البادئ المستخدم. نفذت التجارب باستعمال التجارب العاملية في التصميم العشوائي الكامل (CRD)، وحللت النتائج باستخدام البرنامج الاحصائي Genestate، وقورنت المتوسطات بحسب إختبار أقل فرق معنوي (LSD) وعلى مستوى احتمال 5% (11).

النتائج والمناقشة

تأثير تراكيز مستخلص ثمار الحنظل والتراكيب الوراثية في وزن الكالس الطري في وسط MS المضاف إليه 2 ملغم لتر$^{-1}$ من 2,4-D و0.5 ملغم لتر$^{-1}$ من .Kin بعد خمسة أسابيع من الزراعة

يوضح الجدول 2 وجود اختلافا معنويا بين التراكيب الوراثية للجت في معدل الوزن الطري للكالس، فقد اعطى التركيب الوراثي PAC-78001 أعلى معدل لوزن الكالس الطري بلغ 211.86 ملغم واختلف معنوياً عن التركيب الوراثي المحلي الذي اعطى 129.70 ملغم. كما يظهر من نتائج الجدول 2 أن لتراكيز مستخلص ثمار الحنظل المضاف إلى الوسط الغذائي تأثيراً معنوياً في معدل الوزن الطري للكالس، إذ يلاحظ أن الوسط الغذائي MS المجهز بتركيز 150 مل لتر$^{-1}$ من مستخلص ثمار الحنظل اعطى أعلى معدل لوزن الكالس الطري بلغ 205.90 ملغم واختلف معنوياً عن بقية المعاملات التي كان أقلها في الوسط الغذائي MS المجهز بتركيز 300 مل لتر$^{-1}$ من مستخلص ثمار الحنظل بلغ 135.60 ملغم واختلف عن المعاملات الاخرى جميعها. أما عن التداخل بين العاملين فيبين الجدول 2 وجود تداخل معنوي بين تراكيز مستخلص ثمار الحنظل والتراكيب الوراثية للجت في معدل الوزن الطري للكالس، إذ تفوقت أجنة التركيب الوراثي PAC-78001 المزروعة في وسط MS

المجهز بتركيز 150 مل لتر$^{-1}$من مستخلص ثمار الحنظل باعلى معدل للوزن الطري للكالس بلغ 254.20 ملغم واختلفت معنوياً عن التداخلات الأخرى جميعها التي كان أقلها في أجنة التركيب الوراثي المحلي المزروعة في الوسط الغذائي MS المجهز بتركيز 300 مل لتر$^{-1}$ من مستخلص ثمار الحنظل بلغ 103.70 ملغم واختلف معنوياً عن التداخلات الأخرى، ويبين الشكل 3 تأثير تراكيز مستخلص ثمار الحنظل (0 و75 و150 و225 و300) مل لتر$^{-1}$ من اليمين إلى اليسار بالتتابع في وزن الكالس الطري للتركيب الوراثي PAC-78001 بعد خمسة أسابيع من الزراعة في وسط MS. قد يعزى سبب زيادة وزن الكالس المستحث من أجنة بذور التركيبين الوراثيين للجت بزيادة تراكيز مستخلص ثمار الحنظل وصولا للتركيز 150 مل لتر$^{-1}$ قياسا بمعاملة المقارنة إلى أن هذا التركيز كان الأفضل في تشجيع وتحفيز انقسام خلايا الكالس، فضلا عن احتواء مستخلص ثمار الحنظل على مركبات فعالة قد تؤدي اضافتها للوسط الغذائي إلى تحفيز نمو وانقسام الخلايا (23).



شكل 1. تأثير تراكيز مستخلص ثمار الحنظل من اليمين إلى اليسار (0 و75 و150 و225 و300) مل لتر$^{-1}$ في وزن الكالس الطري للتركيب الوراثي PAC-78001 بعد 5 أسابيع من الزراعة

جاءت هذه النتيجة متوافقة مع ما توصل إليه باحثون آخرون (3 و7) عند دراستهم على مستخلص ثمار الحنظل. أما سبب انخفاض الوزن الطري للكالس في التراكيز العالية من مستخلص ثمار الحنظل فيعود إلى وجود مركبات ذات طبيعة هرمونية إذ تحفز التراكيز القليلة منها نمو الكالس، فيما يكون للتراكيز العالية تأثير تثبيطي في نمو الكالس كما في دور المركبات التربينية (2 و3).

جدول 2. تأثير تراكيز مختلفة من مستخلص ثمار الحنظل في معدل وزن الكالس الطري (ملغم) المستحث من زراعة الأجنة المستأصلة من بذور التركيبين الوراثيين للجت في وسط MS المضاف إليه 2 ملغم لتر$^{-1}$ من 2,4-D و0.5 ملغم لتر$^{-1}$ من .Kin بعد خمسة أسابيع من الزراعة

تراكيز مستخلص ثمار الحنظل (مل لتر$^{-1}$)	التراكيب الوراثية		المعدل
	PAC-78001	المحلي	
0	215.60	134.80	175.20
75	219.40	132.80	176.10
150	254.20	157.60	205.90
225	202.60	119.60	161.10
300	167.50	103.70	135.60
$LSD_{0.05}$	6.37		4.51
المعدل	211.86	129.70	
$LSD_{0.05}$	2.85		

تأثير تراكيز مستخلص ثمار الحنظل والتراكيب الوراثية في وزن الكالس الجاف في وسط MS المضاف إليه 2 ملغم لتر$^{-1}$ من 2,4-D و0.5 ملغم لتر$^{-1}$ من .Kin بعد خمسة أسابيع من الزراعة

يبين الجدول 3 وجود فروقا معنوية بين التراكيب الوراثية للجت في معدل الوزن الجاف للكالس، إذ تفوق التركيب الوراثي PAC-78001 بأعلى معدل للصفة (21.12 ملغم) بينما حقق التركيب الوراثي المحلي أقل معدل للوزن الجاف للكالس (13.44 ملغم). كما توضح النتائج أن لتراكيز مستخلص ثمار الحنظل المضاف إلى الوسط الغذائي تأثيراً معنوياً في معدل الوزن الجاف للكالس، فقد حقق التركيز 150 مل لتر$^{-1}$ من مستخلص ثمار الحنظل أعلى معدل للصفة بلغ 20.60 ملغم واختلف معنوياً عن التراكيز الاخرى ولاسيما التركيز 300 مل لتر$^{-1}$ الذي حقق أقل معدل للوزن الجاف للكالس (14.65 ملغم)، وقد يعزى تأثير مستخلص ثمار الحنظل في زيادة معدلات نمو الكالس إلى احتواء المستخلص على أنواع من المركبات الفينولية التي تسبب تغايرات وراثية تزيد من نمو الكالس عند استخدامه بالتركيز المناسب (3). كما يظهر من نتائج الجدول 3 وجود تداخل معنوي بين تراكيز مستخلص ثمار الحنظل والتراكيب الوراثية للجت في معدل الوزن الجاف للكالس، إذ اعطى التركيب

الوراثي PAC-78001 المزروع في وسط MS المجهز بالتركيز 150 مل لتر$^{-1}$ من مستخلص ثمار الحنظل أعلى معدل للوزن الجاف للكالس بلغ 24.80 ملغم واختلف معنوياً عن بقية التداخلات التي حقق فيها التركيب الوراثي المحلي المزروع في وسط MS المجهز بالتركيز 300 مل لتر$^{-1}$ من مستخلص ثمار الحنظل أقل معدل للوزن الجاف للكالس بلغ 11.60 ملغم واختلف معنوياً عن التداخلات الأخرى جميعها.

جدول 3. تأثير تراكيز مختلفة من مستخلص ثمار الحنظل في معدل وزن الكالس الجاف (ملغم) المستحث من زراعة الأجنة المستأصلة من بذور التركيبين الوراثيين للجت في وسط MS المضاف إليه 2 ملغم لتر$^{-1}$ من 2,4-D و0.5 ملغم لتر$^{-1}$ من Kin. بعد خمسة أسابيع من الزراعة

تراكيز مستخلص ثمار الحنظل (مل لتر$^{-1}$)	التراكيب الوراثية		المعدل
	PAC-78001	المحلي	
0	20.60	13.40	17.00
75	21.20	12.90	17.05
150	24.80	16.40	20.60
225	21.30	12.90	17.10
300	17.70	11.60	14.65
$LSD_{0.05}$	0.91		0.65
المعدل	21.12	13.44	
$LSD_{0.05}$	0.41		

المؤشرات الوراثية

البادئ Y07–

انتج البادئ Y07– تسعة مواقع فيزياوية تراوحت أحجامها الجزيئية بين 320–1300 زوج قاعدي و290 و1200 زوج قاعدي لكالس التركيبين الوراثيين للجت PAC-78001 والمحلي بالتتابع. يبين الشكل 2 أنه في التركيب الوراثي PAC-78001 اختفت الحزم جميعها عند التركيز 300 مل لتر$^{-1}$ من مستخلص ثمار الحنظل، في حين اظهر التركيز 225 مل لتر$^{-1}$ من مستخلص ثمار الحنظل الحزم المتألقة 390 و1300 زوج قاعدي قياسا بمعاملة المقارنة، واظهر التركيز 150 مل لتر$^{-1}$ من مستخلص ثمار الحنظل الحزمة المتألقة 390 زوجاً قاعدياً. يوضح الشكل 2 أن أقل الحزم بلغ 7 حزم في كالس التركيب الوراثي المحلي للجت عند استخدام البادئ Y07– في معاملتي 75 و300 مل لتر$^{-1}$ من مستخلص ثمار الحنظل، وعند التركيب الوراثي المحلي اظهر التركيز 150 مل لتر$^{-1}$ من مستخلص ثمار الحنظل حزمتين متألقتين حجمها 400 و550 زوجاً قاعدياً، وأن الحزمة 600 زوجاً قاعدياً اختفت عند التركيز 75 مل لتر$^{-1}$ من مستخلص ثمار الحنظل وظهرت في التراكيز الأخرى.

البادئ Y06–

انتج البادئ Y06– ستة مواقع فيزياوية تراوحت أحجامها الجزيئية بين 100–1200 زوج قاعدي في كالس التركيب الوراثي للجت PAC-78001 وسبعة مواقع فيزياوية للتركيب الوراثي المحلي تراوحت أحجامها الجزيئية بين 150–1200 زوج قاعدي. كانت أقل الحزم في التركيب الوراثي PAC-78001 عند التركيز 300 مل لتر$^{-1}$ من مستخلص ثمار الحنظل بلغت حزمة واحدة بحجم جزيئي 100 زوج قاعدي، واظهرت في التركيب الوراثي نفسه الحزمة 180 زوجاً قاعدياً شدة تألق عند التراكيز 75 و225 مل لتر$^{-1}$ من مستخلص ثمار الحنظل. يوضح الشكل 3 أن البادئ Y06– في التركيب الوراثي المحلي اعطى أقل عدد حزم بلغ 5 حزم في التركيزين 150 و225 مل لتر$^{-1}$ من مستخلص ثمار الحنظل، ولم يعطِ كالس التركيب الوراثي المحلي أي حزم تذكر في تراكيز مستخلص ثمار الحنظل جميعها عند الحزمة 250 زوجاً قاعدياً في حين تحقق ظهور تام للحزم 180 و450 و1200 زوج قاعدي في تراكيز مستخلص ثمار الحنظل جميعها ومعاملة المقارنة.

البادئ OE-12

اعطى البادئ OE-12 خمسة مواقع فيزياوية تراوحت أحجامها الجزيئية بين 300–1200 زوج قاعدي في كالس التركيب الوراثي للجت PAC-78001، أما كالس التركيب الوراثي المحلي فقد اعطى ستة مواقع فيزياوية تراوحت أحجامها الجزيئية بين 320–1200 زوج قاعدي. يبين الشكل 4 أن التركيب الوراثي PAC-78001 المعامل بالتركيز 300 مل لتر$^{-1}$ من مستخلص ثمار الحنظل اعطى حزمة واحدة فقط بحجم جزيئي 300 زوج قاعدي والتي ظهرت بشدة تألق عند التركيز 225 مل لتر$^{-1}$ من مستخلص ثمار الحنظل، ويوضح الشكل 4 اختفاء الحزمة 400 زوج قاعدي في التركيب الوراثي المحلي المعامل بتراكيز مستخلص ثمار الحنظل (75 و150 و225 و300) مل لتر$^{-1}$ جميعا وظهورها في معاملة المقارنة.

البادئ C-08

اظهر البادئ C-08 تسعة مواقع فيزياوية تراوحت أحجامها بين 90 و1200 زوج قاعدي لكالس التركيب الوراثي PAC-78001 المعامل بتراكيز مستخلص ثمار الحنظل المختلفة، وسبعة مواقع فيزياوية لكالس التركيب الوراثي المحلي تراوحت أحجامها بين 120 و1300 زوج قاعدي. كان أقل عدد للحزم في التركيب الوراثي PAC-78001 المعامل بالتركيز 300 مل لتر$^{-1}$ من مستخلص ثمار الحنظل بلغ حزمتين تراوحت أحجامها بين 390 و450 زوجاً قاعدياً، كما يلاحظ من الشكل 5 اختفاء الحزمة ذات الوزن الجزيئي 210 زوج قاعدي في كالس التركيب الوراثي PAC-78001 المعامل بالتراكيز 150 و225 و300 مل لتر$^{-1}$ من مستخلص ثمار الحنظل. يوضح الشكل 5 أن الحزمة ذات الوزن الجزيئي 320 زوجاً قاعدياً اختفت في كالس التركيب الوراثي المحلي العامل بتراكيز مستخلص ثمار الحنظل جميعها ولم تظهر إلا في معاملة المقارنة.

البادئ D-10

اظهر البادئ D-10 تسعة مواقع فيزياوية تراوحت أحجامها الجزيئية بين 180–1300 زوج قاعدي لكالس التركيبين الوراثيين للجت PAC-78001 والمحلي بالتتابع. كان أقل عدد للحزم في كالس التركيب الوراثي PAC-78001 المعامل بالتركيز 300 مل لتر$^{-1}$ من مستخلص ثمار الحنظل بلغ حزمتين تراوحت أحجامها الجزيئية بين 180–290 زوجاً قاعدياً، أما الحجم الجزيئي 600 زوج قاعدي فلم يظهر إلا في التركيز 150 مل لتر$^{-1}$ من مستخلص ثمار الحنظل، واظهر الحجم الجزيئي 650 زوجاً قاعدياً شدة تألق في التراكيز 75 و150 و225 مل لتر$^{-1}$ من مستخلص ثمار الحنظل، كما يلاحظ أن الحزمة 490 زوجاً قاعدياً ظهرت فقط في التركيزين 150 و225 مل لتر$^{-1}$ (الشكل 6). يوضح الشكل 6 أن كالس التركيب الوراثي المحلي للجت اظهر 7 حزم عند التراكيز 150 و225 و300 مل لتر$^{-1}$، ويلاحظ أنه عند التركيز 300 مل لتر$^{-1}$ من مستخلص ثمار الحنظل اختفاء الحزم 850 و950 زوج قاعدي، وكذلك في التركيز 225 مل لتر$^{-1}$ اختفت الحزم 350 و1300 زوج قاعدي، أما في التركيز 150 مل لتر$^{-1}$ من مستخلص ثمار الحنظل فقد اختفت الحزم 950 و1300 زوج قاعدي، وظهرت حزمة وحيدة متألقة بوزن جزيئي 850 زوجاً قاعدياً عند التركيز 225 مل لتر$^{-1}$ من مستخلص ثمار الحنظل.

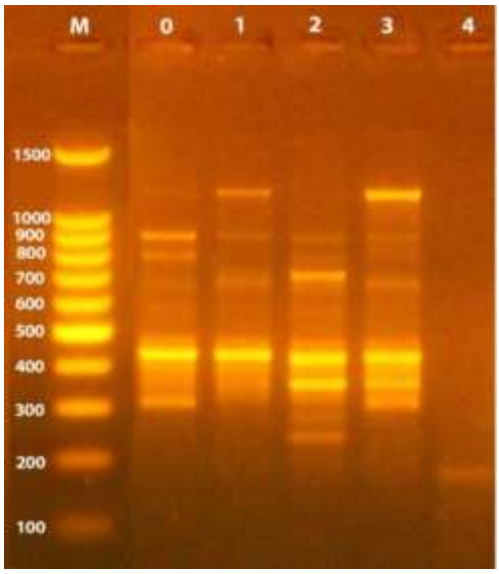
البادئ Y10–

انتج البادئ Y10– تسعة مواقع فيزياوية تراوحت أحجامها بين 100–1200 زوج قاعدي لكالس التركيب الوراثي PAC-78001 المعامل بتراكيز مختلفة من مستخلص ثمار الحنظل، وثمانية مواقع فيزياوية للتركيب الوراثي المحلي تراوحت أحجامها بين 380 –1300 زوج قاعدي. كان أقل عدد للحزم في كالس الجت المستحث من التركيب الوراثي للجت PAC-78001 المعامل بالتركيز 300 مل لتر$^{-1}$ من مستخلص ثمار الحنظل بلغ حزمتين وتميز هذا التركيب بظهور الحزمة الوحيدة ذات الوزن الجزيئي 100 زوج قاعدي، وظهر في التركيز 225 مل لتر$^{-1}$ من مستخلص ثمار الحنظل حزمة واحدة متألقة بوزن جزيئي 470 زوجاً قاعدياً، ويلاحظ من الشكل 7 أنه في التركيب الوراثي PAC-78001 اختفاء الحزمة 750 زوج قاعدي في التركيزين 75 و150 مل لتر$^{-1}$ من مستخلص ثمار الحنظل، وكذلك اختفاء الحزمة 700 زوج قاعدي عند التركيزين 75 و225 مل لتر$^{-1}$ من مستخلص ثمار الحنظل، كما يبين الشكل 20 أن الحزمة ذات الوزن الجزيئي 520 زوجاً قاعدياً ظهرت في تراكيز مستخلص ثمار الحنظل جميعها. أما التركيب الوراثي المحلي فيلاحظ من الشكل 7 أن الحزمة ذات الوزن الجزيئي 460 زوجاً قاعدياً قد اختفت في التركيز 300 مل لتر$^{-1}$ من مستخلص ثمار الحنظل، وأن الحزمة 800 زوج قاعدي اختفت عند التراكيز 75 و150 و225 مل لتر$^{-1}$ من مستخلص ثمار الحنظل، كما اختفت الحزمة 500 زوج قاعدي عند التركيز 150 مل لتر$^{-1}$ من مستخلص ثمار الحنظل.

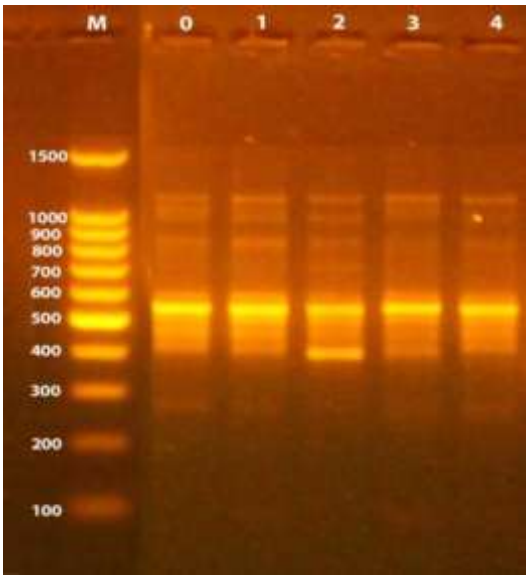
البادئ A-16

ارتبط البادئ A-16 بالتتابعات المكملة له في قالب DNA إذ بلغ عدد الحزم خمسة مواقع فيزياوية تراوحت أحجامها بين 220 و950 زوج قاعدي للكالس المستحث من أجنة التركيب الوراثي PAC-78001 وثمانية مواقع فيزياوية تراوحت أحجامها بين 120 و1200 زوج قاعدي للكالس المستحث من أجنة التركيب الوراثي المحلي. اظهر الكالس المستحث من التركيب الوراثي PAC-78001 والمعامل

بالتركيز 300 مل لتر$^{-1}$ من مستخلص ثمار الحنظل أقل معدل للحزم بلغ 2 حزمة، وتميز هذا التركيب بظهور الحزمة ذات الوزن الجزيئي 350 زوجاً قاعدياً وكذلك الحزمة ذات الوزن الجزيئي 220 زوجاً قاعدياً والتي تميزت بشدة تألقها، كذلك يلاحظ من الشكل 8 أن الحزمة ذات الوزن الجزيئي 950 زوجاً قاعدياً والتي ظهرت في تراكيز مستخلص ثمار الحنظل جميعها باستثناء التركيز 300 مل لتر$^{-1}$ اعطت حزما متألقة واختلفت عن بقية الحزم الأخرى. أما التركيب الوراثي المحلي فكانت للحزمة ذات الوزن الجزيئي 1200 زوج قاعدي شدة تألق في تراكيز مستخلص ثمار الحنظل جميعها قيد الدراسة واختلفت عن بقية الحزم الأخرى، وظهرت شدة التألق في معاملة المقارنة عند الوزن الجزيئي نفسه (الشكل 8).



PAC-78001



المحلي

الشكل 2. البادئ Y07−

M= الدليل الحجمي القياسي المتمثل بـ DNA ladder

0= معاملة المقارنة

1= التركيز 75 مل لتر$^{-1}$ من مستخلص ثمار الحنظل

2= التركيز 150 مل لتر$^{-1}$ من مستخلص ثمار الحنظل

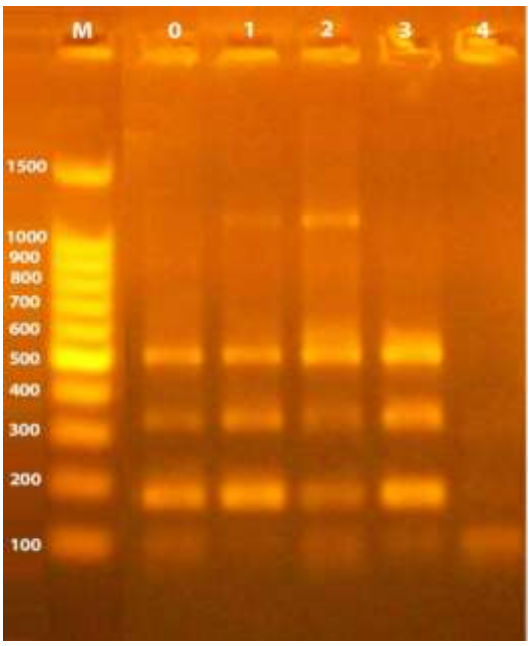
3= التركيز 225 مل لتر$^{-1}$ من مستخلص ثمار الحنظل

4= التركيز 300 مل لتر$^{-1}$ من مستخلص ثمار الحنظل

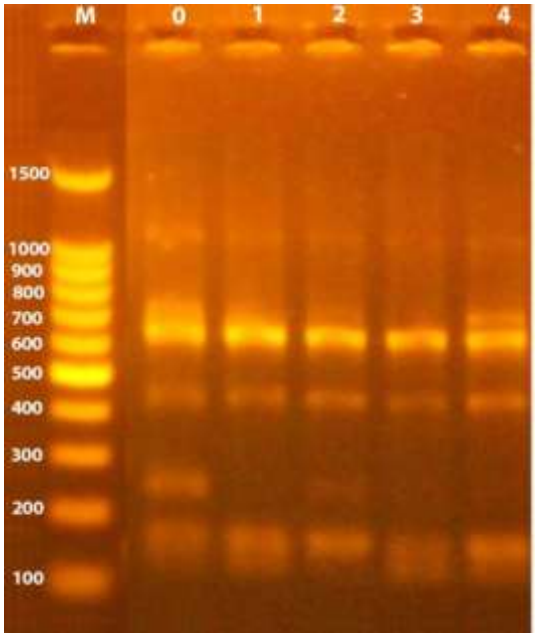
جدول 4. البادئ Y07−

التراكيب الوراثية للجت											
PAC-78001					الوزن الجزيئي	المحلي					الوزن الجزيئي
تراكيز مستخلص ثمار الحنظل (ملغم لتر$^{-1}$)						تراكيز مستخلص ثمار الحنظل (ملغم لتر$^{-1}$)					
0	75	150	225	300		0	75	150	225	300	
0	1	0	*1	0	1300	1	1	1	1	1	1200
1	1	1	1	0	900	1	1	1	1	0	1000
1	1	1	1	0	700	1	1	1	1	1	890
1	1	1	1	0	490	1	0	1	1	1	600
*1	*1	*1	*1	0	450	*1	*1	*1	*1	*1	550
1	1	1	1	0	410	1	1	1	1	1	500
1	1	*1	*1	0	390	1	1	1	1	1	450
1	1	1	1	0	350	1	1	*1	1	1	400
1	1	1	1	0	320	1	0	0	0	0	290

0= الحزمة الغائبة Absend of band 1= الحزم الموجودة Presence of band *= الحزم المتألقة



PAC-78001



المحلي

الشكل 3. البادئ Y06-

M= الدليل الحجمي القياسي المتمثل بـ DNA ladder

0= معاملة المقارنة

1= التركيز 75 مل لتر$^{-1}$ من مستخلص ثمار الحنظل

2= التركيز 150 مل لتر$^{-1}$ من مستخلص ثمار الحنظل

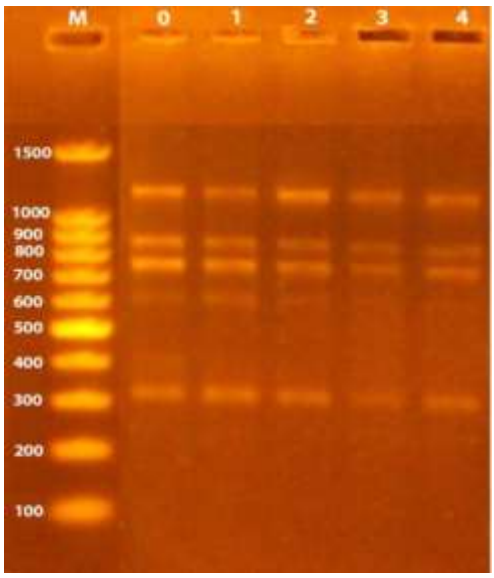
3= التركيز 225 مل لتر$^{-1}$ من مستخلص ثمار الحنظل

4= التركيز 300 مل لتر$^{-1}$ من مستخلص ثمار الحنظل

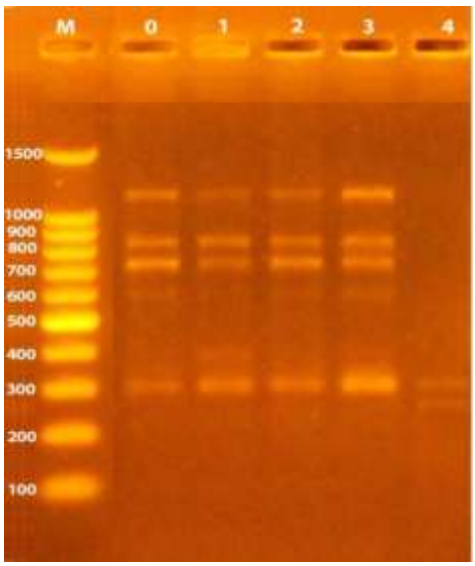
جدول 5. البادئ Y06-

التراكيب الوراثية للجت											
المحلي					الوزن الجزيئي	PAC-78001					الوزن الجزيئي
تراكيز مستخلص ثمار الحنظل (ملغم لتر$^{-1}$)						تراكيز مستخلص ثمار الحنظل (ملغم لتر$^{-1}$)					
300	225	150	75	0		300	225	150	75	0	
1	1	1	1	1	1200	0	0	1	1	0	1200
1	0	1	1	1	700	0	0	1	0	0	600
*1	*1	*1	*1	*1	650	0	*1	*1	*1	*1	500
1	1	1	1	1	450	0	1	1	1	1	350
0	0	0	0	1	250	0	*1	*1	*1	1	180
1	1	1	1	1	180	1	1	1	1	1	100
1	1	0	1	1	150						

0= الحزمة الغائبة Absend of band 1= الحزم الموجودة Presence of band *= الحزم المتألقة



لمحلي



PAC-78001

الشكل 4. البادئ OE-12

M= الدليل الحجمي القياسي المتمثل بـ DNA ladder

0= معاملة المقارنة

1= التركيز 75 مل لتر$^{-1}$ من مستخلص ثمار الحنظل

2= التركيز 150 مل لتر$^{-1}$ من مستخلص ثمار الحنظل

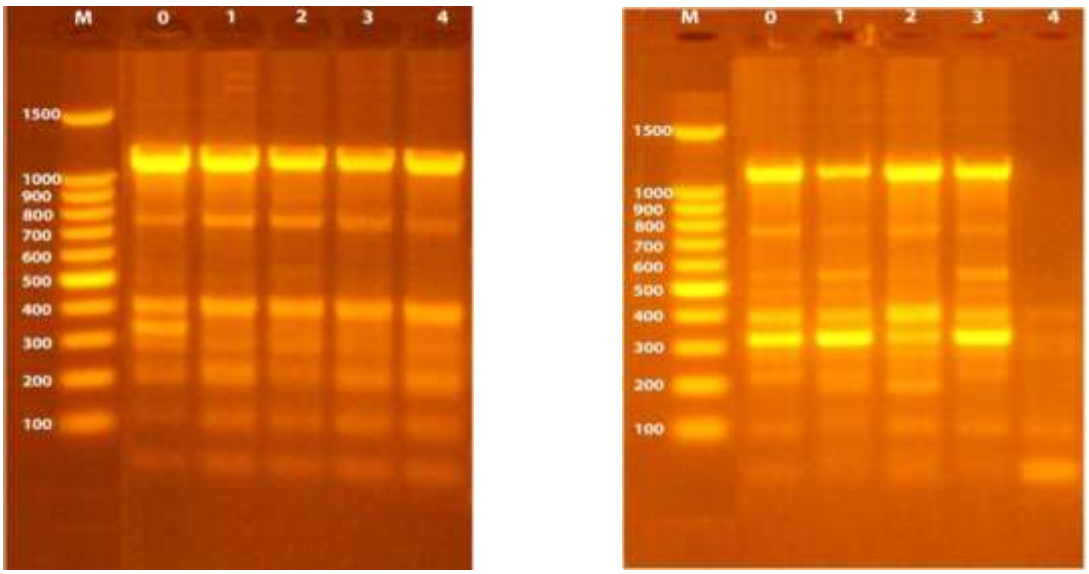
3= التركيز 225 مل لتر$^{-1}$ من مستخلص ثمار الحنظل

4= التركيز 300 مل لتر$^{-1}$ من مستخلص ثمار الحنظل

جدول 6. البادئ OE-12

التراكيب الوراثية للجت											
الوزن الجزيئي	PAC-78001 تراكيز مستخلص ثمار الحنظل (ملغم لتر$^{-1}$)					الوزن الجزيئي	المحلي تراكيز مستخلص ثمار الحنظل (ملغم لتر$^{-1}$)				
	0	75	150	225	300		0	75	150	225	300
1200	1	1	1	1	0	1200	1	1	1	1	1
850	1	1	1	1	0	900	1	1	1	1	1
750	1	1	1	1	0	750	1	1	1	1	1
600	1	1	1	1	0	620	1	1	1	1	1
300	1	1	1	*1	1	400	0	0	0	0	0
						320	1	1	1	1	1

0= الحزمة الغائبة Absend of band 1= الحزم الموجودة Presence of band *= الحزم المتألقة



المحلي PAC-78001

الشكل 5. البادئ C-08

M= الدليل الحجمي القياسي المتمثل بـ DNA ladder

0= معاملة المقارنة

1= التركيز 75 مل لتر$^{-1}$ من مستخلص ثمار الحنظل

2= التركيز 150 مل لتر$^{-1}$ من مستخلص ثمار الحنظل

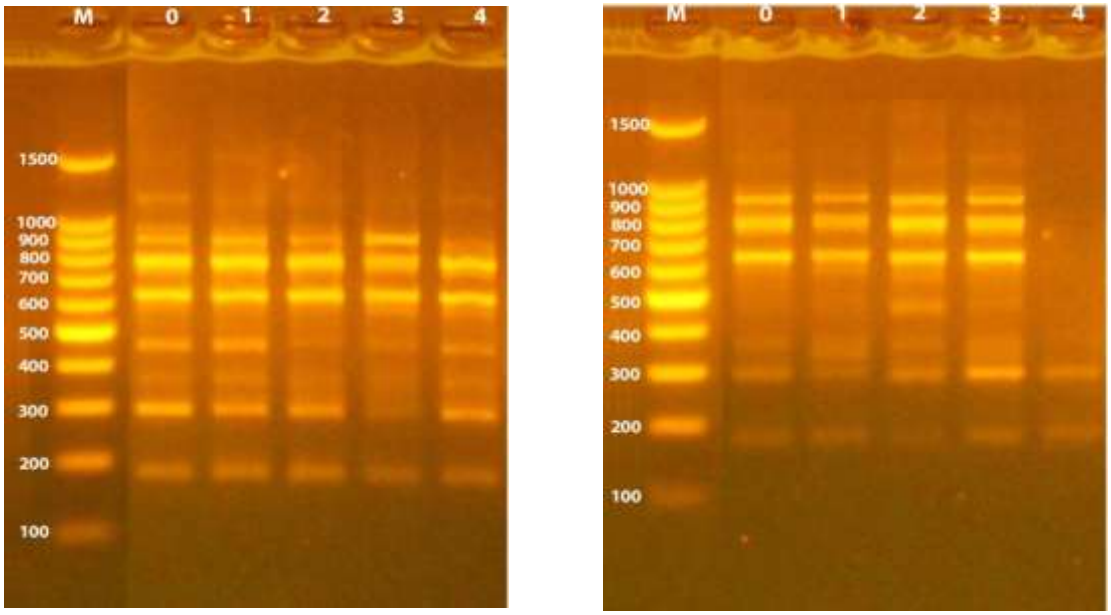
3= التركيز 225 مل لتر$^{-1}$ من مستخلص ثمار الحنظل

4= التركيز 300 مل لتر$^{-1}$ من مستخلص ثمار الحنظل

جدول 7. البادئ C-08

التراكيب الوراثية للجت											
المحلي					الوزن الجزيئي	PAC-78001					الوزن الجزيئي
تراكيز مستخلص ثمار الحنظل (ملغم لتر$^{-1}$)						تراكيز مستخلص ثمار الحنظل (ملغم لتر$^{-1}$)					
300	225	150	75	0		300	225	150	75	0	
*1	*1	*1	*1	*1	1300	0	*1	*1	*1	*1	1200
1	1	1	1	1	750	0	1	1	1	1	750
1	1	1	1	1	400	0	1	1	1	1	550
0	0	0	0	1	320	0	1	1	1	1	450
1	1	1	1	1	280	1	1	*1	1	1	390
1	1	1	1	1	200	1	*1	1	*1	*1	320
1	1	1	1	1	120	0	1	1	1	1	290
						0	0	0	1	1	210
						0	1	1	1	1	90

0= الحزمة الغائبة Absend of band 1= الحزم الموجودة Presence of band *= الحزم المتألقة



المحلي PAC-78001

الشكل 6. البادئ D-10

M= الدليل الحجمي القياسي المتمثل بـ DNA ladder

0= معاملة المقارنة

1= التركيز 75 مل لتر$^{-1}$ من مستخلص ثمار الحنظل

2= التركيز 150 مل لتر$^{-1}$ من مستخلص ثمار الحنظل

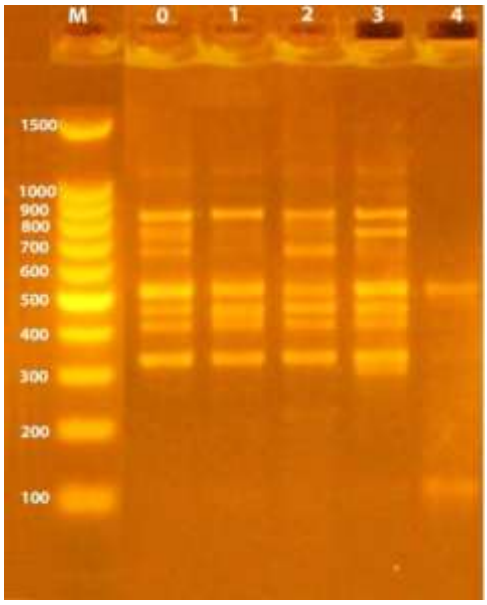
3= التركيز 225 مل لتر$^{-1}$ من مستخلص ثمار الحنظل

4= التركيز 300 مل لتر$^{-1}$ من مستخلص ثمار الحنظل

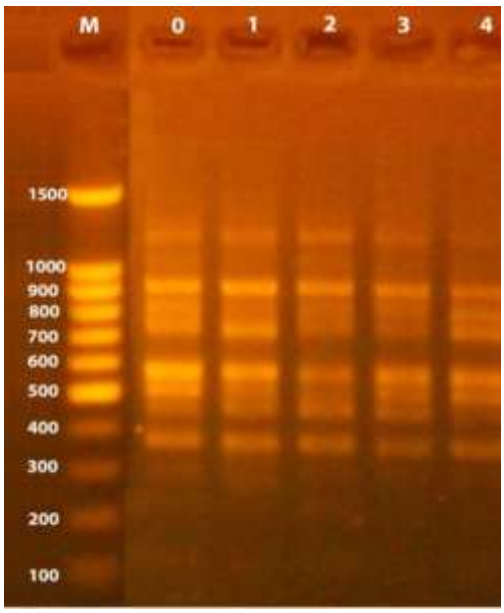
جدول 8. البادئ D-10

التراكيب الوراثية للجت											
المحلي					الوزن الجزيئي	PAC-78001					الوزن الجزيئي
تراكيز مستخلص ثمار الحنظل (ملغم لتر$^{-1}$)						تراكيز مستخلص ثمار الحنظل (ملغم لتر$^{-1}$)					
300	225	150	75	0		300	225	150	75	0	
1	0	0	1	1	1300	0	1	1	0	1	1300
0	1	0	0	1	950	0	1	1	1	1	950
0	*1	1	1	1	850	0	*1	*1	1	*1	800
*1	*1	*1	*1	*1	800	0	*1	*1	*1	*1	650
*1	*1	*1	*1	*1	650	0	0	1	0	0	600
1	1	1	1	1	450	0	1	1	0	0	490
1	0	1	1	1	350	0	1	1	1	1	350
1	1	1	1	1	300	1	1	1	1	1	290
1	1	1	1	1	180	1	1	1	1	1	180

0= الحزمة الغائبة Absend of band 1= الحزم الموجودة Presence of band *= الحزم المتألقة



PAC-78001



المحلي

الشكل 7. البادئ Y10-

M= الدليل الحجمي القياسي المتمثل بـ DNA ladder

0= معاملة المقارنة

1= التركيز 75 مل لتر$^{-1}$ من مستخلص ثمار الحنظل

2= التركيز 150 مل لتر$^{-1}$ من مستخلص ثمار الحنظل

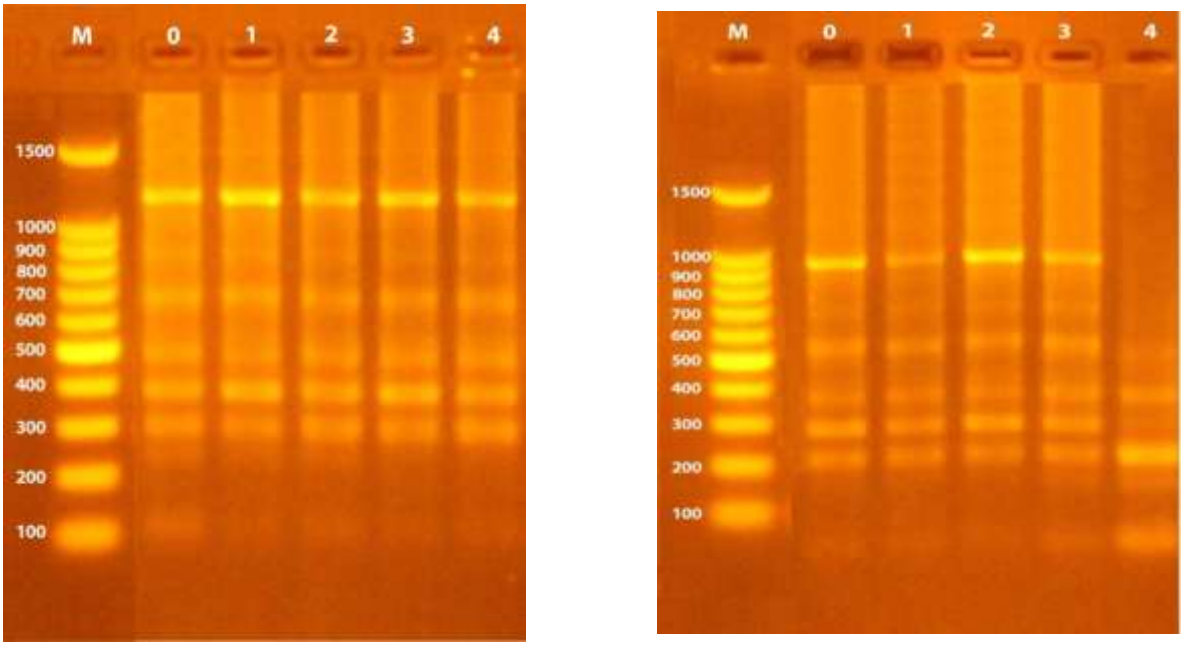
3= التركيز 225 مل لتر$^{-1}$ من مستخلص ثمار الحنظل

4= التركيز 300 مل لتر$^{-1}$ من مستخلص ثمار الحنظل

جدول 9. البادئ Y10-

التراكيب الوراثية للجت											
الوزن الجزيئي	PAC-78001 تراكيز مستخلص ثمار الحنظل (ملغم لتر$^{-1}$)					الوزن الجزيئي	المحلي تراكيز مستخلص ثمار الحنظل (ملغم لتر$^{-1}$)				
	0	75	150	225	300		0	75	150	225	300
1200	1	1	1	1	0	1300	1	1	1	1	1
800	1	1	1	1	0	900	1	1	1	1	1
750	1	0	0	1	0	800	1	0	0	0	1
700	1	0	1	0	0	710	1	1	1	1	1
520	*1	1	1	1	1	580	1	1	1	1	1
470	1	1	1	*1	0	500	1	1	0	1	1
410	1	1	1	1	0	460	1	1	1	1	0
320	1	1	1	1	0	380	1	1	1	1	1
100	0	0	0	0	1						

0= الحزمة الغائبة Absend of band 1= الحزم الموجودة Presence of band *= الحزم المتألقة



المحلي PAC-78001

الشكل 8. البادئ A-16

M= الدليل الحجمي القياسي المتمثل بـ DNA ladder

0= معاملة المقارنة

1= التركيز 75 مل لتر$^{-1}$ من مستخلص ثمار الحنظل

2= التركيز 150 مل لتر$^{-1}$ من مستخلص ثمار الحنظل

3= التركيز 225 مل لتر$^{-1}$ من مستخلص ثمار الحنظل

4= التركيز 300 مل لتر$^{-1}$ من مستخلص ثمار الحنظل

جدول 10. البادئ A-16

التراكيب الوراثية للجت											
المحلي تراكيز مستخلص ثمار الحنظل (ملغم لتر$^{-1}$)					الوزن الجزيئي	PAC-78001 تراكيز مستخلص ثمار الحنظل (ملغم لتر$^{-1}$)					الوزن الجزيئي
300	225	150	75	0		300	225	150	75	0	
*1	*1	*1	*1	*1	1200	0	*1	*1	*1	*1	950
1	1	1	1	1	850	0	1	1	1	1	550
1	1	1	1	1	700	1	1	1	1	1	350
1	1	1	1	1	490	0	1	1	1	1	290
1	1	1	1	1	390	*1	1	1	1	1	220
1	1	1	1	1	300						
1	1	1	1	1	250						
1	1	1	1	1	120						

0= الحزمة الغائبة Absend of band 1= الحزم الموجودة Presence of band *= الحزم المتألقة

نتائج تفاعل البوادئ

اظهرت نتائج RAPD-PCR للبوادئ المختبرية اختلافات واضحة بين تراكيز مستخلص ثمار الحنظل للكالس المستحث من أجنة التركيبين الوراثيين للجت (PAC-78001 والمحلي) قيد الدراسة من خلال عدد الحزم الناتجة ومواقعها الفيزياوية وشدة تألقها مع وجود اختلافات بين البوادئ ذاتها فضلا عن ظهور حزم جديدة في تراكيز مستخلص الحنظل للكالس المستحث من التركيبين الوراثيين للجت والتي لم تظهر في معاملة المقارنة للكالس المستحث من كلا التركيبين الوراثيين للجت. اوضحت النتائج أن نواتج التفاعل لعدد من الحزم كانت قادرة على تمييز الاختلافات الوراثية لكالس الجت المعرض للتركيز 300 مل لتر$^{-1}$ من مستخلص ثمار الحنظل

والتي قد تعزى إلى تأثير هذا التركيز إلى احتمال احداث بعض التغايرات الوراثية أو إلى حدوث تغايرات جسمية مما سبب حدوث تغير في تسلسل النيوكليوتيدات نتيجة الاضافة أو الحذف أو اعادة الترتيب للنيوكليوتيدات في DNA خلال معاملة التركيبين الوراثيين للجت بتراكيز مختلفة من ملح NaCl (6)، إذ شخصت البوادئ Y07− وY06− و-OE 12 وC-08 وD-10 وY10− وA-16 تأكيدا إلى احتمال حدوث تغايرات وراثية في أنسجة الكالس المستحث من أجنة بذور الجت المزروع في وسط MS المجهز بالتركيز 300 مل لتر$^{-1}$ من مستخلص ثمار الحنظل. يتبين من الجداول 4 و5 و6 و 7 و8 و9 و10 والأشكال 2 و 3 و4 و5 و6 و7 و8 أن مؤشر RAPD هو من المؤشرات الكفوءة في التعرف على التباين الوراثي بين الأنواع والأصناف النباتية والمعاملات المختلفة، ويمكن استخدام أكثر من بادئ للتعرف على التتابعات المختلفة والمتشابهة الموجودة في شريط DNA فضلا عن سهولة عملية عزل قطع DNA (Bands) اعتمادا على الوزن الجزيئي، وهذه جاءت مؤكدة لكثير من نتائج الباحثين (4 و18 و21) الذين بينوا كفاءة تقانة RAPD-PCR في التعرف على التغايرات الوراثية.

REFERENCES

1. Al-Sahaf, F. H. 1989. Plant Nutrition Application. Dar Al-Kutob Publ., Mosul Univ. Ministry of Higher Edu., and Scientific Res, Iraq.
2. Al-Zubaidi, K. M. R. 2002. Effect of some Plant Extracts on Behavior Stored of Potatoes Var. Dazari. M.Sc. Thesis, Coll. of Agric., Univ. of Baghdad.
3. Baday, S. J. S. 2014. Role of some Phytohormones and Colocynth Fruits Extract in Vegetative Multiplication and Drought Tolerance of Sugarcane invitro. M.Sc. Thesis, Coll. of Agric., Univ. of Baghdad. pp. 113.
4. Balkrishna, R. A. and S. S. Shankarrao. 2013. In vitro screening and molecular genetic markers associated with salt tolerance in maize. Afric. J. Biol. 12(27): 4251-4255.
5. Barnes, D. and C. Sheaffer. 1995. Alfalfa. In R. Baarnes, D. Miller and C. Nelson (edrs.) . An Introduction to Grassland Agriculture . Iowa state Univ. Press. p. 205-216.
6. Brar, D. S. and S. M. Jian. 1998. Somaclonal variation: Mechanism and applications in crop improvement. In: S. M. Jain; D. S. Brar and S. Ahloowalia (Edrs.). Somaclonal Variation and Induced Mutation in Crop Improvement. Kluwer Academic Publ., London. UK. p. 15-37.
7. Delazar, A.; S. Gibbons; A. R. Kosari; H. Nazemiyeh; M. Modarresi; L. Nahar and S. D. Sarker. 2006. Flavone C-glycosides and cucurbitacin glycosides from Citrullus colocynthis. DARU. 14: 109-114.
8. Dellaporta, S. L.; J. Wood and J. B. Hicks. 1983. A plant DNA micro preparation. Plant Mol. Rep.1: 19-21.
9. Echt, C. S.; L. A. Erdahl and T. J. McCoy. 1992. Genetic segregation of random amplified polymorphie DNA in diploid cultivated alfalfa Gemome. 22: 84-78.
10. Elsahookie, M. M. 2013. Breeding Crops for Abiotic Stress: A molecular Approach and Epigenetic. Coll. of Agric., Univ. of Baghdad. pp. 244.
11. Elsahookie, M. M. and K. M. Wuhaib. 1990. Experiment Design and Analysis Application. Coll. of Agric., Univ. of Baghdad, Ministry of Higher Edu. and Scientific Res.
12. Fleming, T. 2000. PDR for Herbal Medicine. Medical Economics Co. Inc. Montvale, USA. p. 395-396.
13. Harten, A. M.; C. J. J. M. Raemakers; E. Jacobsen and G. Y. P. Kiu. 2004. Direct organogenesis and somatic embryogenesis in mature cotyledon explant of winged bean (*Psophocarpus* tetagonoiobus L.) DCI using cytokinine-based media. Plant Genetic Resources. News Letter Issue. 131: 63-69.
14. Iqbal, M. J., N. Aziz; N. A. Saeed; Y. Zafar and K. A. Malik. 1997. Genetic diversity evaluation of some elite cotton varieties by RAPD analysis. Theor. Appl. Genet. 94: 139-144.
15. Khan, N. A.; R. Nazar and N. A. Anjum. 2009. Growth. Photosynthesis and antioxidant metabolism in mustard (*Brassica juncean* L.) cultivars differing in ATP-Sulfurylase activity under Salinity stress. Sci. Hort. 122: 455-460.
16. Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. Physiol. Planta. 15: 473-497.
17. Mustafa, N. R.; W. Winter; F. Iren and R. Verpoorte. 2011. Initiation, growth and

cryopreservation of plant cell suspension cultures. Nat Prot. 6: 715-742.

18. Nevena, N.; T. Ksenija; B. Goran; B. Aleksandar; S. Ivana; D. Milic and S. Katic. 2011. Estimation of genetic diversity in tetraploid alfalfa populations based on RAPD markers for breeding purposes. Int. J. Mol. Sci. 12: 5449-5460.

19. Perez-Tornero, O.; C. L. Tallon; I. Porras and J. M. Navarro. 2009. Physiological and growth changes in micro-propagated *Citrus macrophylla* explants due to salinity. J. Plant Physiol. 166(17): 1923-1933.

20. Sambrook, J.; E. F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. Molecular Cloning Alaboratory Manual. 2nd Edn. Cold Spring Harbor, NewYork.

21. Sarid Ullah, S. M.; M. A. Hossain; M. M.Hossain; S. Barman; M. M. H. Sohag and S. H. Prodhan. 2013. Genetic diversity analysis of chewing sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) varieties by using RAPD markers. J. Bio. Sci. Biotech. 2(2): 145-150.

22. Serrat, X.; R. Esteban; N. Guibourt; L. Moysset; S. Nogués and E. Lalanne. 2014. EMS Mutagenesis in Mature Seed-Derived Rice Calli as a New Method for Rapidly Obtaining TILLING Mutant Populations. Plant Methods. p. 3-13.

23. Shukri, W. M. and R. M. Al-Meaqel. 2013. Plant Cell and Tissue Culture. Al-Mutanabi Lab., Al-Damam, KSA.

24. Syeed, S.; N. A. Anjum; R. Nazar; N. Iqbal; A. Masood and N. A. Khan. 2010. Salicylic acid-mediated Changes in photosynthesis, nutrients content and antioxidant metabolism in two mustard (*Brassica juncean* L.) cultivars differing in Salt tolerance. Acta. Plant Physiol: 10: 11-17.

25. Touil, L.; F. Guesimi; K. Fares; C. Zagrouba and A. Ferchichi. 2008. Genetic diversity of some Mediterranean populations of the cultivated alfalfa (*Medicago sativa* L.). J. Sci. 11(15): 1923-1928.

26. Williams, K. J.; A. Kubelik; K. Livak; J. Rafalski and S. Tingey. 1990. DNA polymorphic amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res. 18: 6531-6535.

27. Zaid, A.; H. G. Hughes; E. Porceddu and F. W. Nicolas. 1999. Glossary of Biotechnology and Genetic Engineering. FAO Res. Tech. Food and Agric. Org. of the United Nations. Rome, Italy.