



الجمهورية العربية السورية
جامعة دمشق
كلية الهندسة الزراعية
قسم علوم البستنة

عزل و زرع البروتوبلاست في بعض أصناف البطاطا

Protoplast Isolation and Culture of Some Potato Cultivars

رسالة أعدت لنيل درجة الماجستير في الهندسة الزراعية

(قسم علوم البستنة)

إعداد

م. نور محمد رشاد القباني

(الهيئة العامة للتقانة الحيوية)

إشراف

المشرف المشارك

د. فهد البيسكي

(الهيئة العامة للتقانة الحيوية)

المشرف العلمي

أ.د. خليل المعري

(كلية الزراعة - جامعة دمشق)

نوقشت وأجيزت في 10 / 7 / 2012

قُدِّمَت هذه الرسالة استكمالاً لمتطلبات نيل درجة الماجستير في علوم

البستنة من كلية الزراعة في جامعة دمشق

This thesis has been submitted as a partial fulfillment of the
requirement for the degree of master in Horticulture at the
Faculty of Agriculture, Damascus University

تصريح

أُصرِّح بأنّ هذا البحث " عزل وزرع البروتوبلاست في بعض أصناف البطاطا" لم يسبق أن قُبل للحصول على شهادة، ولا هو مُقدّم حاليّاً للحصول على شهادة أخرى.

اسم المُرشّحة

نور محمد رشاد القباني

تاريخ : 2012 / 7 / 10

DECLARATION

This is to declare that, this work "**Protoplast Isolation and Culture of Some Potato Cultivars**" has not been being submitted concurrently for any other degree.

Candidate name

Nour Al Qabbani

Date: 10 / 7 / 2012

شهادة

نشهد بأن العمل المقدم في هذه الرسالة هو نتيجة بحث علمي قامت به المرشحة نور محمد رشاد القباني بإشراف الأستاذ الدكتور خليل المعري (المشرف الرئيسي) الأستاذ في قسم علوم البستنة/ كلية الزراعة/ جامعة دمشق، و الدكتور فهد البيسكي (المشرف المشارك) (الهيئة العامة للتقانة الحيوية، دمشق، سوريا)، وإن أية مراجع أخرى ذكرت في هذا العمل موثقة في نص هذه الرسالة.

المشرف الرئيسي

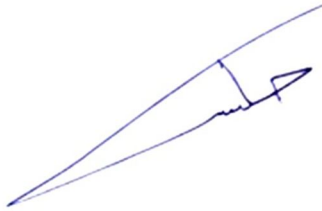
المشرف المشارك

المرشحة

أ. د. خليل المعري

د. فهد البيسكي

نور محمد رشاد القباني



تاريخ ٢٨/٧/٢٠١٥

CERTIFICATION

We witness that the described work in this thesis is the result of scientific research conducted by the candidate **Nour Mohammed Rshad Al Qabbani**, under supervision of Prof. Dr. Khalil Al Maarri (Main Supervisor) at the department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Damascus University, and Dr. Fahed AL-Biski (Co-Supervisor) at the National Commission of Biotechnology, Damascus, Syria. and any reference of other researchers work has been duly acknowledged in the text.

Candidate

Nour Al Qabbani



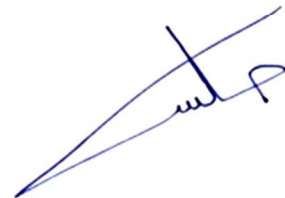
Co-supervisor

Dr. Fahed Al Biski



Advisor

Prof. Dr. Khalil Al Maari



Date: ٢٨/٧/٢٠١٥

تنويه

قدمت هذه الرسالة استكمالاً لمتطلبات نيل درجة الماجستير في الهندسة الزراعية / اختصاص علوم البستنة من كلية الزراعة . جامعة دمشق .

This thesis has been submitted as partial fulfillment of the requirement for the degree of Master in Horticulture at the faculty of Agriculture, Damascus University.

نوقشت وأجيزت في 2012 / 7/10

أمام لجنة الحكم



أ.د. خليل المعري

الأستاذ في قسم علوم البستنة / كلية الزراعة - جامعة دمشق



أ.د. بسام الصفدي

رئيس دائرة التقانة الحيوية النباتية في هيئة الطاقة الذرية السورية



د. عدنان قنبر

مدرس في قسم المحاصيل الحقلية / كلية الزراعة - جامعة دمشق

كلمة شكر

ACKNOWLEDGMENT

الحمد لله الذي أنار عقولنا ، ويسر طريقنا ، وشغل أوقاتنا بما ينفعنا ، نحمده تعالى ونشكره ونصلي على نبيه محمد صلى الله عليه وسلم.

أحياناً تعجز الكلمات عما يجول في خاطر المرء من شكر وتقدير، وخاصةً لمن قدموا عسارة قلوبهم، ونتاج جهدهم الطويل، و تجربتهم المريرة، فكل الشكر والتقدير لأساتذتنا الأفاضل.....

وأتوجه بجزيل الشكر والامتنان إلى كل الذين أناروا لي الطريق وأفادوني بعلمهم وخلاصة تجاربهم في إنجاز هذا البحث وأخص بالشكر أساتذتي المشرفين الأستاذ الدكتور خليل المعري و الدكتور فهد البيسكي، كما أتقدم بجزيل الشكر والامتنان لأعضاء لجنة الحكم لما بذلوه من جهد وعناء في تدقيق هذه الأطروحة وإعطاء التوجيهات والتوصيات اللازمة لجعلها في أكمل صورة .

وأتوجه بخالص الشكر والامتنان للمهندس منار مخول والمهندس سومر العلي لما قدماء من مساعدة أثناء إنجاز هذا البحث.

كما أنني أشكر إدارة الهيئة العامة للتقانة الحيوية لما قدمته من دعم وتسهيلات لإنجاز هذا العمل .

ولايسعني في النهاية إلا أن أتقدم بخالص الشكر إلى عائلتيأبي العزيز وأمي الحنونة وأخوتي الذين كانوا لي الدعم والسند في كافة مراحل الدراسة .

الإهداءات

إلى سيد الأنبياء والمرسلين

إلى السراج المنير، سيد الأولين والآخرين

إلى من قال إنما أرسلت معلماً

إلى من نرجو أن ننهل من يده الشريفة شربة لا نظماً بعدها أبداً

النبي الكريم محمد صلى الله عليه وسلم

إلى مثلي الأعلى الذي خط دروب حياتي

إلى من زرع في قلبي حب العلم والاجتهاد ، ومنحني الثقة بالنفس

وكل أمني أن أنال رضاه ، وأرد له جزءاً مما أعطاه

إلى القلب الطيب ، والنفس الأبية... إلى الرجل العظيم الحكيم

أبي.....

إلى منبع الود والعطاء

إلى القلب الذي ينبض بالحب والحنان

إلى العين التي ترقبني في كل مكان

إلى الكنز الذي يغدق علينا درراً ولآلئ حسان

أمي.....

إلى نبع الصفاء والحنان

إلى من يألّفها قلبي وتودّها روعي

إلى من وهبت عائلتنا أخاً حقيقياً

وأزهاراً كانت مبعث الفرح في حياتنا

أختي نهى وزوجها ابراهيم الحلبي وأولادها

إلى الشموع التي أضاءت دربي

إلى الدم الذي يجري في عروقي

إلى من قضيت معهم حلو الحياة ومرها

إلى مصدر فخري واعتزازي

إخوتي : محمد ، عبد الحميد ، طارق

إلى من قضيت معهم ربيع حياتي وأجمل ذكرياتي

إلى من كانوا بسمتي وفرحي

إلى من يتجدد الأمل بجمعتهم و تفرح النفوس لحديثهم

صديقاتي

فهرس المحتويات

المحتويات	رقم الصفحة
الملخص	
1-المقدمة	1
1-1 مقدمة عامة	2
1-2 مواعيد وطريقة الزراعة	3
1-3 طرائق إكثار البطاطا	3
1-4 واقع زراعة البطاطا في سوريا	4
1-5 مبررات البحث	5
1-6 أهداف البحث	6
2- الدراسة المرجعية	7
3- مواد البحث وطرائقه	24
1-3 المادة النباتية	25
2-3 طرائق البحث	26
1-2-3 زراعة النهايات الوردية بالأصص	26
2-2-3 زرع الأنسجة للخزعات النباتية	27
1-2-2-3 الزرع الأولي للعقل الساقية	27
2-2-2-3 مرحلة إكثار الخزعات النباتية	28
3-2-3 مرحلة عزل البروتوبلاست	29
4-2-3 تحديد كثافة البروتوبلاست المعزولة	31
5-2-3 تحديد حيوية البروتوبلاست المعزولة	32
6-2-3 العوامل المؤثرة في عزل البروتوبلاست	33
1-6-2-3 تأثير المعاملة بنيتوسلفات الفضة أثناء طور الإكثار	33
2-6-2-3 تأثير نوع و تركيز منظم الضغط الأسموزي	34
3-6-2-3 تأثير عمر الأوراق النباتية داخل الأنابيب أثناء طور الإكثار	34
7-2-3 مرحلة زرع البروتوبلاست	34
8-2-3 مرحلة استحداث الكالوس	35
9-2-3 مرحلة تشكل النموات من الكالوس	36
10-2-3 مرحلة إكثار النموات المتجددة	37
11-2-3 مرحلة التقسية	38
12-2-3 التوصيف الجزيئي على مستوى DNA	41

41	3-2-12-1 استخلاص DNA
43	3-2-12-2 تقدير كمية DNA و نوعيته
44	3-2-12-3 التفاعل التسلسلي البوليميرازي
46	3-2-12-4 الرحلان الكهربائي والتلوين والتصوير لنواتج PCR
46	3-2-13 التحليل الإحصائي
47	4- النتائج والمناقشة
48	4-1 مرحلة الزرع الأولي للعقل الساقية
49	4-2 مرحلة إكثار الخزعات النباتية
49	4-3 العوامل المؤثرة في عزل البروتوبلاست
49	4-3-1 تأثير المعاملة بثيوسلفات الفضة أثناء طور الإكثار
55	4-3-2 تأثير نوع و تركيز منظم الضغط الأسموزي
59	4-3-3 تأثير عمر الأوراق النباتية داخل الأنابيب أثناء طور الإكثار
62	4-4 مرحلة زرع البروتوبلاست
66	4-5 مرحلة استحداث الكالوس
67	4-6 مرحلة تشكل النموات من الكالوس
70	4-7 مرحلة إكثار النموات المتجددة
71	4-8 مرحلة التقسية
75	4-9 التوصيف الجزيئي على مستوى DNA باستخدام تقنية ISSR
78	5-1 الاستنتاجات
81	5-2 المقترحات والتوصيات
82	6-المراجع

فهرس الجداول

رقم الصفحة	محتوى الجدول	رقم الجدول
5	تطور المساحة المزروعة وإنتاج البطاطا في سورية.	1
30	المحاصيل المستخدمة في عزل البروتوبلاست في البطاطا.	2
39	تركيب الأوساط المغذية لموراشيچ وسكوج (MS) وشينك وهيلدبراند (SH) المستخدمة في البحث.	3
40	الأوساط المغذية المستخدمة في تجارب البحث .	4
44	التتالي النكليوتيدي لبادئات ISSR المستخدمة.	5
51	تأثير تراكيز STS في بعض الصفات المورفولوجية في الصنفين المدروسين .	6
53	تأثير تراكيز STS في كثافة وحيوية البروتوبلاست المعزولة في الصنفين المدروسين.	7
56	تأثير تراكيز مختلفة من المانيتول في كثافة وحيوية البروتوبلاست المعزولة في الصنفين المدروسين .	8
57	تأثير تراكيز مختلفة من السكروز في كثافة وحيوية البروتوبلاست المعزولة في الصنفين المدروسين.	9
60	تأثير عمر الأوراق النباتية في كثافة وحيوية البروتوبلاست المعزولة في الصنفين المدروسين.	10
62	تأثير تراكيز مختلفة من Z في تشكل الجدار الخلوي و بدء الإقسام في الصنفين المدروسين.	11
64	تأثير تراكيز مختلفة من Z في نسبة تشكل المستعمرات الخلوية في الصنفين المدروسين.	12
66	تأثير تراكيز مختلفة من NAA في نسبة تشكل الكالوس في الصنفين المدروسين.	13
69	تأثير تراكيز مختلفة من Z و BAP في نسبة تشكل البراعم الخضرية و عدد النموات في الصنف بنيلا.	14
73	مراحل عزل وزرع وتجديد البروتوبلاست في الصنف بنيلا.	15
76	عدد الحزم الكلي و النسبة المئوية للتباين الشكلي الناتج عن البادئات المستخدمة في ISSR للصنف بنيلا و 5 سلالات متجددة منه .	16

فهرس المخططات والأشكال

رقم الشكل	الموضوع	رقم الصفحة
1	درنات أصناف البطاطا المدروسة.	26
2	زراعة النهايات الوردية لدرنات الصنفين المدروسين.	27
3	المخطط العام لعملية عزل البروتوبلاست.	31
4	جهاز الماسح الضوئي.	33
5	جهاز عد المستعمرات الخلوية .	35
6	المخطط العام لعملية زرع البروتوبلاست وتجديدها.	37
7	زرع الخزعات النباتية في مرحلة الإكثار.	49
8	تأثير تراكيز STS في بعض الصفات المورفولوجية في الصنفين المدروسين.	52
9	تأثير التركيز 0.00 ميكرومول من STS في كثافة وحيوية البروتوبلاست في الصنف بنيلا .	54
10	تأثير التركيز 0.50 ميكرومول من STS في كثافة وحيوية البروتوبلاست في الصنف بنيلا .	54
11	تأثير التركيز 0.25 مول من المانيتول في كثافة وحيوية البروتوبلاست في الصنف بنيلا .	58
12	تأثير التركيز 0.75 مول من المانيتول في كثافة وحيوية البروتوبلاست في الصنف بنيلا .	58
13	كثافة وحيوية البروتوبلاست في الصنف بورين عند استخدام أوراق نباتية بعمر 4 أسابيع.	61
14	كثافة وحيوية البروتوبلاست في الصنف بورين عند استخدام أوراق نباتية بعمر 7 أسابيع.	61
15	تشكل الجدار الخلوي بعد يومين من زرع البروتوبلاست .	64
16	البروتوبلاست بعد 4 أيام من زرعها في وسط خالي من Z.	65
17	المستعمرات الخلوية بعد 4 أسابيع من زرع البروتوبلاست في وسط يحوي 1.5 مغ/ل Z في الصنفين المدروسين.	65
18	كالوس ناتج من المستعمرات الخلوية في الصنفين المدروسين.	67
19	النموات المتجددة بدءاً من كالوس الصنف بنيلا.	70
20	نبات متجدد بعد 2 أسبوع من زرعها في وسط MS .	70
21	مراحل عملية التقسية في الصنف بنيلا.	72
22	مراحل تجديد الصنف بنيلا بدءاً من البروتوبلاست المعزولة.	74
23	هلامة الأغاروز لملاحظة التعددية الشكلية الناتجة عن استخدام البادئات في 5 عينات (2-6) من السلالات الخضرية بالمقارنة مع النبات الأم من الصنف بنيلا (1) بوجود معلم ذو وزن جزيئي 1 kp .	77

المختصرات العلمية الواردة في الأطروحة

Abbreviations

المختصر العلمي	الاسم الانكليزي	الاسم العربي
MS	Murashige and Skoog (1962)	المحلول المعدني موراشيج وسكوج
SH	Schenk and Heldebrand(1972)	المحلول المعدني تشينك وهيلدبراند
Cellulase	Cellulase TC (From Trichoderma Reesi)	أنزيم سيلولاز
Pectinase	Pectinase Rohament P5(From Aspergillus niger)	أنزيم بكتيناز
STS	Silver Thiosulphate $Ag[(S_2O_3)_2]^{-3}$	ثيو سلفات الفضة
MES	2-N-morpholino-ethanesulfonic acid	حمض مورفولينو إيثان سلفونيك
B1	Thiamine	ثيامين
B3	Nicotinic acid	حمض نيكوتينيك
C	Ascorbic acid	حمض أسكوربيك
B6	Pyridoxine	بيرودوكسين
Z	Zeatin	زياتين
NAA	Naphthalene acetic acid	نفتالين أستيك أسيد
IAA	Indole acetic acid	أندول أستيك أسيد
GA3	Gebberellic acid	حمض الجبريللين
6-BAP	6- benzyl aminopurine	6- بنزيل أمينو بيورين

الملخص

تم في هذا البحث وضع تقنية لعزل وتجديد البروتوبلاست من أوراق صنفى البطاطا بنيلا وبورين، ودُرست بعض العوامل المؤثرة في كثافة وحيوية البروتوبلاست المعزولة، وحددت أفضل الشروط المدروسة في زرع البروتوبلاست واستحداث الكالوس و تجديده، ومن ثم تحديد مدى التشابه الوراثي بين النباتات المتجددة من كالوس الصنف بنيلا مع النباتات الأم بطريقة ISSR.

أدت إضافة ثيوسلفات الفضة (STS) بتركيز 50 ميكرومول إلى وسط الزرع، إلى زيادة المسطح الورقي، وتقصير السلاميات، وزيادة كثافة و حيوية البروتوبلاست المعزولة في كل من الصنفين بنيلا و بورين، حيث بلغت الكثافة (1.70 ± 0.06 مليون بروتوبلاست/مل و 1.63 ± 0.06 مليون بروتوبلاست/مل) على التوالي، والحيوية (82.91 ± 2.33 % و 73.82 ± 2.39 %) على التوالي .

وبيّنت النتائج وجود فروق معنوية بين الصنفين المدروسين ($P < 0.01$) بتأثير تراكيز المانيتول كمنظم للضغط الأسموزي، حيث أعطى التركيز 0.75 مول أعلى كثافة من البروتوبلاست في الصنف بنيلا (1.67 ± 0.08 مليون بروتوبلاست/مل)، وكانت الحيوية (87.82 ± 2.77 %)، بينما كانت أعلى كثافة في الصنف بورين عند استخدام التركيز 0.50 مول (1.85 ± 0.06 مليون بروتوبلاست/مل) و الحيوية (86.05 ± 2.76 %)، كما بيّنت النتائج أن استخدام أوراق نباتات مزروعة مخبرياً بعمر 4 أسابيع، أدى إلى الحصول على أعلى كثافة من البروتوبلاست المعزولة وبفروق معنوية بين الصنفين بنيلا وبورين (1.93 ± 0.04 مليون بروتوبلاست/مل و 1.44 ± 1.22 مليون بروتوبلاست/مل) على

التوالي، وحيث كانت الحيوية ($84.91 \pm 2.21\%$ و $82.59 \pm 4.0\%$) على التوالي، وذلك

بعد التحضين مدة 14-16 ساعة ضمن المحلول الأنزيمي المؤلف من :

Cellulase TC %1.75 + Pectinase %0.4 + 0.005 مول كلوريد الكالسيوم المائي

+ (0.5-0.75) مول مانيتول + 0.01 مول حمض مورفولينو إيثان سلفونيك (MES)، و

درجة حموضة الوسط (pH) 5.6.

وقد لوحظ بدء الانقسام الخلوي للبروتوبلاست بعد 3-4 أيام في الصنف بنيلا، و بعد 4-5

أيام في الصنف بورين عند استخدام الزيياتين (Z) بتركيز 1 و 1.5 مغ/ل، وسجلت أعلى

نسبة لتشكل المستعمرات الخلوية عند استخدام الزيياتين بتركيز 1 مغ/ل، وذلك بفروق معنوية

بين الصنفين بنيلا و بورين ($1.58 \pm 0.1\%$ و $1.27 \pm 0.09\%$) على التوالي، وتم الحصول

على أعلى نسبة لتشكل الكالوس عند استخدام الأوكسين نفتالين أسيتك أسيد (NAA) بتركيز

0.1 مغ/ل وبفروق معنوية بين الصنفين بنيلا و بورين ($51.12 \pm 8.77\%$)

و ($18.96 \pm 2.81\%$) على التوالي، و بلغ أعلى متوسط لعدد النموات الخضرية المتشكلة بدءاً

من كالوس الصنف بنيلا (1.06 ± 0.33)، عند استخدام Z بتركيز 1.5 مغ/ل، في حين لم يتم

الحصول على أي نمو من كالوس الصنف بورين.

بلغت نسبة نجاح عملية التقسية 92% بعد شهرين من نقل النباتات إلى البيت البلاستيكي،

و بلغ متوسط طول النباتات 26.6 سم، وتم الحصول على درينات متوسط قطر 30 درينة

13.17 مم ومتوسط وزنها 2.06 غ.

بيّنت تقنية ISSR أن النباتات المتجددة من كالوس الصنف بنيلا كانت مماثلة تماماً للنبات

الأم بنسبة 100%.

الفصل الأول: المقدمة
INTRODUCTION

1- المقدمة Intruduction :

1-1 مقدمة عامة:

تعد البطاطا (*Solanum tuberosum* L.) من أهم محاصيل الخضار في العالم، وتنتمي البطاطا إلى الجنس *Solanum* الذي يعد من أهم وأكبر أجناس العائلة الباذنجانية *Solanaceae*.

تكوّن أنواع البطاطا سلسلة متصلة من التراكيب الصبغية المتضاعفة، فهناك الأنواع الثنائية $2n=2x=24$ والثلاثية $2n=3x=36$ والرابعة $2n=4x=48$ والخماسية $2n=5x=60$ والسداسية $2n=6x=72$ (مسعود، 1981؛ بوراس، 1989).

الموطن الأصلي للبطاطا هو أمريكا الوسطى والجنوبية (تشيلي، البيرو والمكسيك)، حيث تنتشر الأنواع البرية التي تتميز بدرناتها الصغيرة وطعمها المر، ومن هناك انتقلت إلى أوروبا عقب الغزو الإسباني للبيرو في منتصف القرن السادس عشر، حيث جاء الفاتحون باحثين عن الذهب غير أن الكنز الحقيقي الذي عادوا به إلى أوروبا هو البطاطا (بوراس و زملاؤه، 2006).

يستأثر محصول البطاطا باهتمام عالمي كبير لكونه أحد أكثر المحاصيل الغذائية غنى بالطاقة، فكما هو الرز بالنسبة لدول شرق آسيا والقمح لدول شرق البحر المتوسط، يعد محصول البطاطا غذاءً أساسياً بالنسبة لدول أوروبا الشمالية والأمريكيتين، إذ يحتوي كل 100 غ من درنات البطاطا المقشرة على حوالي 79.8 غ ماء و 17.1 غ كربوهيدرات و 2 غ بروتين و 0.1 غ دهون و 0.5 غ ألياف و 0.9 غ كالسيوم و 53 مغ فوسفور و 0.6 مغ حديد و 3 مغ صوديوم و 4.7 مغ مغنيزيوم و 0.1 مغ ثيامين و 0.4 مغ ريبوفلافين و 1.5 مغ نياسين و 20 مغ حمض الأسكوربيك (الموصللي، 2000).

وتعدّ البطاطا أحد أهم المحاصيل الزراعية في العالم، وغذاءً أساسياً في البلدان النامية، وذلك لوفرة غلتها، وسهولة إنتاجها، وتنوع الظروف البيئية التي تنمو فيها. وإضافة لكونها غذاءً للإنسان.

فإنها تُقدم أيضاً كعلف للحيوانات، ولها استعمالات عديدة في مجال الصناعة، حيث يستخرج منها النشاء، وتُستعمل في صناعة الورق والمنسوجات، وصناعة المواد اللاصقة، و في صناعة التخمير واستخراج الكحول مثل الإيثانول والبيوتانول وبعض الأحماض مثل الستريك و اللاكتيك (بوراس، 1989).

1-2 مواعيد وطريقة الزراعة:

تزرع البطاطا في سورية في عروات ثلاث:

عروة ربيعية : ابتداءً من منتصف كانون الثاني حتى منتصف شباط، حيث تزرع البطاطا في المنطقة الساحلية في كانون الثاني، أما في المناطق الداخلية فتزرع في أواسط شباط.

عروة صيفية: تزرع ابتداءً من منتصف آذار حتى منتصف نيسان، وهذا يلائم المناطق الباردة.

عروة خريفية: تزرع ابتداءً من منتصف تموز حتى منتصف آب، وهذا يلائم المناطق الداخلية

(بوراس و زملاؤه، 2006).

طريقة الزراعة الأكثر شيوعاً في سورية هي طريقة الزراعة النصف آلية، وهناك الزراعة اليدوية و بشكل

قليل الزراعة الآلية، وأهم أصناف البطاطا المزروعة في سورية هي: ليزيتا - بنيلا - دراجا - مارفونا -

بورين - سبونتا - أغريا - أطلس - أرنوبا - سولاني - أريندا (FAO, 1991) .

1-3 طرائق إكثار البطاطا:

الإكثار الجنسي (Sexual reproduction):

يستخدم للأغراض البحثية و أغراض التربية لإنتاج أصناف جديدة، أما تسويقياً فالدرينات الناتجة صغيرة

الحجم، غير قابلة للتسويق، وبالتالي إكثارها لهذا الغرض غير اقتصادي (Wiersema, 1982).

الإكثار اللاجنسي (Asexual):

1-بالدرنات : وهي الطريقة الرئيسية المتبعة للإكثار وذلك بزراعة الدرنات الكاملة أو قطع منها، والتي هي عبارة عن سوق متحورة لإختزان الغذاء، ومن مميزات هذه الطريقة أنها تحافظ على نقاوة الصفات الوراثية للصنف، ولكن من مساوئها أنها تسبب تدهور فيزيولوجي لبذار البطاطا نتيجة زراعتها عدة مواسم متتالية، إضافة لانتقال الأمراض الفيروسية إلى الأجيال التالية مما يؤدي إلى انخفاض الإنتاج بنسبة قد تصل إلى 30-50% (De bokx et al., 1987).

2-الإكثار بطرائق زرع الأنسجة النباتية:

على مر السنوات الخمسين الماضية كان استخدام تقانات زرع الأنسجة والخلايا النباتية الأكثر بروزاً في البطاطا (*Solanum tuberosum*) أكثر من أنواع المحاصيل الأخرى، ويتم إكثار البطاطا بالنسج بطريقتين :

- إنتاج شتول بأعداد كبيرة بالنسج بعد تقسيئها في البيوت الزجاجية (Albiski et al., 2001).
- إنتاج درينات دقيقة في المخبر باستخدام أوساط مغذية خاصة (المعري وزملاؤه، 2008).

1-4 واقع زراعة البطاطا في سورية:

بدأ الاهتمام والتخطيط لزراعة محصول البطاطا في سورية منذ بداية السبعينات، وكانت الأصناف المزروعة قليلة العدد، ثم بدأت الأبحاث الزراعية تهتم بمتطلبات البطاطا من حيث المعاملات الزراعية اللازمة ، والظروف المناخية والاحتياجات الغذائية، ومع بداية الثمانينات بدأ إدخال أصناف جديدة، بما يتلائم مع اختلاف البيئات في القطر، كما بدأت المساحات الزراعية تتسع وتزداد حتى أصبحت البطاطا من المحاصيل الغذائية الهامة (NAPC,2008) ، ويبين الجدول 1 مساحة وإنتاج محصول البطاطا في سورية من عام 2005 حتى عام 2010 (المجموعة الإحصائية، 2010).

جدول 1: تطور المساحة المزروعة وإنتاج البطاطا في سورية.

الأعوام						البطاطا في سورية
2010	2009	2008	2007	2006	2005	
35	35	36	31	28	30	المساحة المزروعة/ألف هكتار
675	706	721	570	603	608	الإنتاج /ألف طن
20	20.2	19.9	18.3	21.7	20.6	الغلة طن/هكتار

(المجموعة الإحصائية، 2010).

1-5 مبررات البحث:

ساعدت برامج التربية والتحسين الوراثي للبطاطا في تطوير بعض الأصناف الجديدة، التي تلبي متطلبات السوق من حيث مقاومتها للإجهادات الحيوية واللا حيوية ، وتحسين الجودة والإنتاجية.

تعد تربية البطاطا أقل نجاحاً بالمقارنة مع المحاصيل الأخرى، بسبب التعقيد الوراثي للنبات، ويحتاج التحسين الوراثي بالطرائق التقليدية في البطاطا إلى وقت وجهد كبير وتكاليف باهظة .

وإن استخدام التقنيات الحيوية النباتية الحديثة ، مثل زرع ودمج البروتوبلاست ، يمكن أن يوفر الوقت والجهد، بهدف التغلب على مشاكل عدم التوافق الجنسي، وبالتالي التمكن من تحقيق الهدف النهائي وهو نقل الصفات الاقتصادية المرغوبة في البطاطا ، حيث يستعمل دمج البروتوبلاست بنجاح في نقل بعض الصفات من الأصناف البرية إلى الأصناف المزروعة، مثل نقل صفة المقاومة للفيروسات (Valkonen and Rokka,1998) والمقاومة للصقيع (Preisner et al.,1991)، وهذا التهجين الجسمي وسيلة لزيادة التغيرات الوراثية في عديد من المحاصيل، ليس فقط عن طريق التغلب على عدم التوافق الجنسي، وإنما يمكن أن يؤدي أيضاً إلى

اندماج النوى و السيتوبلاسم، وهذا صعب أو مستحيل الحصول عليه بالتهجين الجنسي التقليدي. ولا بد قبل البدء ببرنامج لدمج البروتوبلاست من إجراء تأسيس لهذه التقنية وتحديد الشروط الأنسب لعزل البروتوبلاست من أجزاء نباتية مختلفة كمرحلة أولى، والتمكن من عملية تجديد البروتوبلاست للحصول على نباتات كاملة كمرحلة ثانية، و ثم ليصار إلى استخدام التقنية الأوسع انتشاراً وهي دمج البروتوبلاست، بهدف التحسين الوراثي واستنباط أصناف جديدة متحملة للإجهادات البيئية المحلية، مثل الجفاف والملوحة ومقاومة بعض الأمراض والحشرات .

1-6 أهداف البحث:

- 1- عزل البروتوبلاست من ميزوفيل الأوراق في البطاطا من الصنفين المدروسين : بنيلا- بورين .
- 2- أمثلة تقنية عزل البروتوبلاست وتجديدها ضمن الظروف المحلية، من خلال دراسة بعض العوامل المتعلقة بالأوساط المغذية .
- 3- الحكم على مدى التشابه الوراثي بين النباتات الناتجة مع النباتات الأم المكاثرية بالأنسجة، باستخدام إحدى تقنيات البصمة الوراثية (Inter Simple Sequence Repeat) ISSR.

الفصل الثاني

الدراسة المرجعية

LITERATURE REVIEW

2- الدراسة المرجعية Literature Review :

البروتوبلاست هي خلية نباتية خالية من الجدار الخلوي البكتوسللوzy، يتم عزلها وزرعها بهدف الحصول على نباتات كاملة (Shepard and Totten, 1977).

تعد تقنية عزل وزرع البروتوبلاست من التقنيات الحيوية الهامة في مجال التحسين الوراثي للنباتات، واستنباط سلالات و أصناف جديدة مفيدة و متحملة للإجهادات الحيوية واللاحيوية، وتعد حالياً إحدى التقنيات الحيوية الأساسية (Zhu *et al.*, 2005; Sheahan *et al.*, 2007)، و قد استخدمت في دراسة العمليات والنشاطات الخلوية، مثل هضم الجدار الخلوي و الإنقسام الخلوي في مختلف النباتات

(Pongchawee *et al.*, 2006; Yoo *et al.*, 2007).

وتستخدم تقنية عزل وزرع البروتوبلاست بشكل كبير في مجال التحسين الوراثي للنباتات، وذلك لأن سطح الغشاء الخلوي للبروتوبلاست المعزولة يكون مكشوفاً بشكل كامل، وبالتالي يشكل هذا نقطة بداية لعدد من التقنيات التي تهدف إلى التغير الوراثي في الخلايا النباتية وفي كامل النبات، ثم يتم نقل المعلومات الوراثية الجديدة من نوع إلى آخر عن طريق دمج البروتوبلاست المعزولة من الأجزاء الجسمية لتلك الأنواع النباتية، وتستخدم أيضاً في عزل الطفرات (Ling *et al.*, 2009).

يوجد طريقتان للتخلص من الجدار الخلوي و عزل البروتوبلاست : العزل الميكانيكي و العزل الأنزيمي، **العزل الميكانيكي** صعب ويحتاج إلى وقت طويل، وينتج عنه القليل من البروتوبلاست فقط إضافة إلى أنه لا يستخدم إلا مع الأنواع النباتية ذات الخلايا الكبيرة، مثل الفوناريا والطحالب وفي بعض الحالات النادرة فقط، تطورت هذه الخلايا إلى نبات كامل (Binder *et al.*, 2003).

اكتُشف **العزل الأنزيمي** من قبل Cocking (1960)، الذي عزل البروتوبلاست من القمم الجذرية لبادرات البندورة، عن طريق التحلل الأنزيمي للجدر الخلوية باستخدام أنزيم السيلولاز المعزول من فطر

Myrothecium Verrucaria. وحصل Power and Cocking (1970) على البروتوبلاست باستخدام محلول يحوي أنزيمي السيلولاز والبكتيناز، حيث يحدث تقريق للتجمعات الخلوية أولاً، ثم تتحلل الجدر الخلوية ثانياً وتتحرر البروتوبلاست مباشرة. وقد أحدث العزل الإنزيمي للبروتوبلاست ثورة في علم النبات خصوصاً في علم تربية النبات، ومنذ ذلك الحين تم عزل البروتوبلاست في كثير من الأنواع النباتية ومن الطحالب والفطور.

وعلى الرغم من أن إعادة تجديد النبات عن طريق عزل البروتوبلاست لم يكن معروفاً، ولكن هناك تطوراً مستمراً لطرائق عزل البروتوبلاست وزرعها (Umate et al., 2005)، ولقد نجح زرع البروتوبلاست في عديد من أصناف البطاطا الشائبة والرباعية وفي أكثر من 30 نوع عالمي (Ferreira and Zelcer, 1989)، وأمكن الحصول على نباتات رباعية الصيغة الصبغية ($2n=4x=48$)، وثنائية الصيغة الصبغية ($2n=2x=24$) من البطاطا (*S. tuberosum*)، ومن الأنواع الأخرى في الجنس *Solanum* مثل *S. Chacoense* (Shanin, 1984).

تمتلك العديد من أصناف البطاطا البرية صفة المقاومة للأمراض، ولكنها غير متوافقة جنسياً مع أصناف البطاطا التجارية، ولقد أمكن عن طريق دمج البروتوبلاست نقل العديد من صفات المقاومة من الأصناف البرية إلى الأصناف التجارية، مثل صفة مقاومة الفيروسات عند التهجين بين *S. tuberosum* و *S. brevidens* (Pehu et al., 1990)، والمقاومة للفيتوفثورا عند التهجين بين *S. tuberosum* و *S. circaeifolium* (Mattheij et al., 1992)، والمقاومة لخنفساء كولارادو عند التهجين بين *S. tuberosum* و *S. chacoense* (Cheng et al., 1995)، واستخدم دمج البروتوبلاست في نقل صفة المقاومة للصقيع من النوع البري *S. brevidens* والمقاومة للبكتيريا من النوع البري *S. commersonii* إلى الأصناف التجارية التي لا تمتلك صفات المقاومة هذه (Preisner et al., 1991). وقد احتوت الهجن

الجسمية الناتجة عن دمج بروتوبلاست كل من *S.tuberosum* و *S.brevidens* ، على مستقلبات ثانوية غير موجودة في أي من النوعين السابقين (Laurial et al.,1996)، وكذلك عندما تم تحليل محتوى الهجن الجسمية الناتجة عن دمج البروتوبلاست بين النوعين *S.tuberosum* و *S.bulbocastanum* من القلويدات الموجودة في نباتات العائلة الباذنجانية (Savarese et al.,2009).

وتم في مجال تربية النبات دمج بروتوبلاست الخيار مع بروتوبلاست السلالة البرية منه المقاومة لنيماتودا تعقد الجذور، أما هجين البندورة مع البطاطا الناجم عن دمج البروتوبلاست، فقد ظهرت به بعض صفات الأبوين رغم أنه كان دائماً أقرب إلى أحدهما، وقد تكونت لبعض نباتات الهجن درنات صغيرة بيضاء اللون، وأزهار وثمار صفراء اللون لها نكهة البندورة (الرفاعي و الشوبكي، 2002).

يعتمد عزل و زرع البروتوبلاست من ميزوفيل الأوراق في البطاطا، على العديد من العوامل أهمها مدى توفر النسيج النباتي الملائم في الوقت المناسب، من دون التأثير بالتغيرات الموسمية وبذلك فإن استخدام النباتات النامية مخبرياً لعزل البروتوبلاست أمر مرغوب، نظراً لنوعية وثبات وارتفاع حيوية البروتوبلاست الناتج عنها (Davey et al.,2005) ، إضافة إلى غياب مشاكل التلوث فالنباتات النامية داخل الأنابيب لا تحتاج إلى تعقيم (Greplova et al.,2007). و تم عزل البروتوبلاست و تجديدها في البطاطا باستخدام مصادر مختلفة من الأنسجة (ورقة - قمم نامية - ساق - جذر - درنة) ، وباستخدام طرز وراثية ومستويات صبغية مختلفة (Jones et al.,1989).

وقد عزلت البروتوبلاست في البطاطا بدءاً من ميزوفيل الورقة (Cardi et al.,1990)، ومن معلق خلوي (Tavazza et al.,1988)، ومن الدرنات (Jones et al.,1989).

وتعد الأوراق من أهم المصادر الأساسية للحصول على البروتوبلاست، فهي تتيح فرصة الحصول على خلايا جيدة ومتماثلة في نفس الوقت من أنسجتها (Sheen,2001). تكون البروتوبلاست المعزولة من خلايا

الورقة كروية الشكل، خضراء اللون وغنية بالكلوروبلاست، أما البروتوبلاست المعزولة من خلايا الجذر فتكون غير منتظمة الشكل وشفافة (Ling *et al.*, 2009). وهناك مصادر أخرى للبروتوبلاست منها مزارع الكالوس حديثة العمر، والتي تستخدم في الحصول على كميات كبيرة من البروتوبلاست ذات الحيوية العالية، ويؤدي عزل البروتوبلاست منها إلى الحصول على سلالات خضرية، تستخدم في التحسين الوراثي للمحاصيل الزراعية كافة (Avetisov *et al.*, 1987)، ويعد المعلق الخلوي من المصادر الجيدة لعزل البروتوبلاست في الرز (Tang *et al.*, 2001) وفي الموز (Ryema *et al.*, 2003).

وقد تم عزل البروتوبلاست وزرعها في العديد من الأنواع مثل الرز (Yamada *et al.*, 1986) والذرة (Sheen, 1993) والقمح (Harris *et al.*, 1988) والبصل (Karim and Adachi, 1997) و الفصّة (Jin *et al.*, 2003) ونخيل البلح (Chabne *et al.*, 2007) والملفوف الأحمر (Chen *et al.*, 2004) بعد الإيثيلين من المثبطات المعروفة لنمو البطاطا المزروعة مخبرياً، وقد أمكن تثبيط تأثير الإيثيلين باستخدام بعض المركبات، مثل أيون الفضة (ثيوسلفات أو نترات الفضة) أو acetylsalicylic acid وهذا يؤدي إلى تحسين كثافة البروتوبلاست وكفاءة تشكل المستعمرات الخلوية وتحسين القدرة على التجديد في البطاطا (Perl *et al.*, 1988)، وفي البندورة (Rethmeier *et al.*, 1991). وأدت إضافة ثيوسلفات الفضة بتركيز 50-100 ميكرومول/ل إلى وسط الزرع في البطاطا، إلى زيادة المسطح الورقي، وانخفاض طول السلاميات، وزيادة الوزن الجاف و الكلوروفيل ا، وزيادة كثافة البروتوبلاست المعزولة من الأوراق (Songstad *et al.*, 1988).

يؤدي تعريض ووضع النسيج النباتي ضمن محلول بلزمة قبل المعاملة الأنزيمية، إلى زيادة كثافة وحيوية البروتوبلاست المعزولة (Davey *et al.*, 2000a, 2004; Power *et al.*, 2004)، حيث تسبب هذه المعاملة

بلزمة للخلايا، وبالتالي تسهل عملية هضم الجدار الخلوي، إضافة إلى أنها تقلل من كمية الأنزيمات المتسربة إلى داخل الخلية أثناء عزل البروتوبلاست (Zhao and Wu,2006). وقد أدت هذه المعاملة إلى زيادة كثافة وحيوية البروتوبلاست المعزولة في كل من الشوندر السكري (Krens *et al.*,1990) والتفاح (Wallin and Johansson,1989).

يؤدي تعريض النباتات للظلام قبل عزل البروتوبلاست منها إلى الحصول على كثافة عالية من البروتوبلاست ذات الحيوية العالية في البطاطا (Chang and Loescher,1991)، ويعود السبب في ذلك إلى وجود حبيبات النشاء في أوراق البطاطا، والتي تقوم بتمزيق خلايا البروتوبلاست الهشة أثناء القيام بعملية التثقيب، بينما يؤدي التحضين في الظلام لمدة 24 ساعة أو أكثر إلى انخفاض محتوى الأوراق من النشاء، إضافة إلى أنه في ظروف الإضاءة المنخفضة، تصبح الجدر الخلوية أقل سماكة و ذات محتوى أقل من البكتات، وهذا يؤدي بدوره إلى زيادة كثافة وحيوية البروتوبلاست المعزولة، وقد لوحظت نتائج مماثلة عند عزل البروتوبلاست من أوراق التبغ (Watts *et al.*,1974) و البازلاء (Constabel *et al.*,1973) والبنندورة (Niedz and Sink,1988).

ويزداد ثبات واستقرار البروتوبلاست مع انخفاض درجة الحرارة إلى 4-10 م° لمدة 6-24 ساعة (Fehr *et al.*,1989).

يعتبر السيلولاز والبكتيناز من الأنزيمات التي تستخدم بشكل واسع في عزل البروتوبلاست، حيث يقوم البكتيناز بتفريق التجمعات الخلوية، عن طريق التحليل المائي لرابطة 1-4-D glacturonide في البكتين والحمض البكتيني (Grezes *et al.*,1994). ويستخدم السيلولاز في فك الروابط السيللوزية في الجدار الخلوي، والتي تنتهي بتحرير البروتوبلاست (Sondahl *et al.*,1980).

تعتمد كفاءة برنامج عزل البروتوبلاست، على نوع وتركيز المحلول الأنزيمي المستخدم في عملية العزل (Chabane *et al.*, 2007)، ففي بعض الحالات يسبب العزل الأنزيمي للبروتوبلاست فقدان القدرة على استعادة الجدار الخلوي والإنقسام والتمايز، فاستخدام التراكيز المنخفضة من الأنزيمات غير كافٍ لتحرير البروتوبلاست، واستخدام تركيز مرتفع من البكتيناز قد يكون ذو أثر سام على الخلايا، حيث يؤدي إلى زيادة نفاذية الغشاء الخلوي، و تسرب محتويات الخلية ثم موتها، أما التركيز المرتفع من السيلولاز، فإنه يؤثر على سلامة الغشاء الخلوي حيث يضعف نشاطه الطبيعي، ويسبب تحللاً مفرطاً لأنسجة الورقة (Zhu *et al.*, 2005; Raiker *et al.*, 2008). لذلك فإنه يجب تحديد التركيز المناسب من الأنزيمات للحصول على بروتوبلاست ذات كثافة وحيوية مرتفعة (Ishii, 1988).

وقد استخدم المزيج الأنزيمي المؤلف من Cellulase R-10 و Macerozyme R-10، لعزل بروتوبلاست البطاطا والبندورة والتبغ (Ehsanpour and Jones, 2001).

وتم عزل البروتوبلاست في صنف البطاطا Desiree باستخدام وسط إستخلاص يحوي مزيجاً من الأنزيمات Cellulase R-10 %1 و Macerozyme R-10 %0.25، بينما استخدم المحلول الأنزيمي المحتوي على Cellulase R-10 %0.25 و Macerozyme R-10 % 0.3 لعزل بروتوبلاست الأصناف ثنائية الصيغة الصبغية في البطاطا (Sidorova *et al.*, 1987)، في حين استخدم Tican (1996) لعزل بروتوبلاست الصنف Delaware المزيج الأنزيمي المحتوي على Cellulase R-10 %0.7 و Macerozyme %0.15 R-10 ، و أن استخدام التركيز الأعلى من الأنزيمات يسبب إنتاج أعلى من البروتوبلاست، ولكن البروتوبلاست الناتجة تكون أقل حيوية وأكثر تحطماً.

وقد وجد Tavazza and Ancora (1986)، في صنف البطاطا Desiree أن المحلول الأنزيمي المحتوي على مزيج من الأنزيمات Cellulase R-10 %0.1 و Macerozyme R-10 %0.25 يعطي كثافة من

البروتوبلاست حوالي $10^6 \times 1.56$ بروتوبلاست/غرام أوراق نباتية، وفي الصنف Kenebe $10^6 \times 1.21$ بروتوبلاست /غرام أوراق نباتية.

تؤثر مدة تحضين الأنسجة النباتية ضمن المحلول الأنزيمي بشكل كبير في كثافة وحيوية البروتوبلاست المعزولة، وتؤثر كذلك في طبيعة الغشاء السيتوبلازمي ، وبالتالي في تشكّل الجدار الخلوي وفي الإنقسام الخلوي، ففترة التحضين غير الكافية تؤدي إلى انخفاض كثافة البروتوبلاست المعزولة، أما التحضين الطويل فيؤدي إلى انخفاض الحيوية (Kaur et al.,2006).

يعمل الجدار الخلوي على الحفاظ على شكل الخلية، وعلى التوازن الحولي بين داخل الخلية وخارجها، ولكن عندما يتم التخلص من الجدار الخلوي، فإن توازن الضغط الأسموزي سوف يختل. لذلك يجب أن يكون الضغط الأسموزي للمزيج الأنزيمي ولمحلول الغسيل ولوسط الزرع مماثلاً للضغط الأسموزي داخل الخلية، وإن استخدام التركيز المناسب من منظم الضغط الأسموزي يحمي الخلية عديمة الجدار الخلوي من الإنكماش أو الانفجار، بينما يؤدي عدم إضافة منظم للضغط الأسموزي إلى وسط الإستخلاص والزرع، إلى تسرب الماء إلى داخل الخلية وبالتالي انفجارها (Karp,2005)، ومن أكثر المواد التي استخدمت لضبط الضغط الأسموزي السوربيتول والمانيتول والغلوكوز و السكروز (Navratiova,2004)، ويعد المانيتول المركب الأفضل تأثيراً فهو خامل نسبياً في عملية الاستقلاب الخلوي و يتسرب ببطء إلى داخل البروتوبلاست، و تم عزل البروتوبلاست من مختلف الأنواع النباتية ومن مختلف الأنسجة النباتية باستخدام تراكيز مختلفة من المانيتول، ولكن زيادة تركيزه في وسط العزل يسبب بلزمة للخلايا

(Sinha et al.,2003;Duquenne et al.,2007) بينما استخدم السوربيتول في عزل البروتوبلاست من أوراق المشمش (Ortinparraga and Burgos,2003).

وقد بيّن Grun and Chu (1978) أن الضغط الأسموزي الأمثل لمحلول عزل البروتوبلاست وزرعه، يختلف حسب النوع والطرز الوراثي في البطاطا، ويؤدي الزرع في ضغط أسموزي مرتفع إلى حدوث الإسمرار وتثبيط نمو الكالوس (Klimaszewske, 1989)، وتكون الخلايا كروية الشكل و الكلوروبلاست في وسط الخلية عندما يكون تركيز منظم الضغط الأسموزي مثالياً في محلول العزل والزرع

(Tee et al., 2010). وقد ذكر Zhang وزملاؤه (2011) أنه من الأفضل جعل الضغط الأسموزي للمزيج الأنزيمي ومحلول الغسيل ولوسط الزرع أعلى قليلاً من الضغط الأسموزي داخل الخلية، مما يؤدي إلى تحسين الحالة الفيزيولوجية للخلية و زيادة قوة وكثافة الغشاء السيتوبلازمي، وبذلك يقل احتمال ضرر الخلية عند تطبيق المعاملة الأنزيمية .

يعد تقييم الحيوية من المتطلبات الأساسية لتأسيس نظام زرع البروتوبلاست، وذلك لتقييم كفاءة برنامج عزل البروتوبلاست. حيث يعتمد نمو الخلايا بشكل أساسي على حيويتها، التي يمكن تقييمها باستخدام المجهر الضوئي من خلال ملاحظة الشكل المظهري للبروتوبلاست، ولكن هذه الطريقة تعطي فكرة أولية على سلامة البروتوبلاست (الرفاعي والشوبكي، 2002). ويتم عادة تقييم حيوية البروتوبلاست باستخدام الأصبغة، التي تصنف في مجموعتين:

المجموعة الأولى : تضم الأصبغة المفلورة والتي تحتاج إلى مجهر وميض مزود بأشعة UV، ومن هذه الأصبغة: (Fluorescein diacetate (FDA) التي ترتبط مع مراكز أنزيم الإستراز داخل الخلايا، وينطلق الفلورسين الذي يتجمع داخل سيتوبلازم الخلايا الحية ولايستطيع النفاذ من الأغشية الخلوية الحية، فتظهر الخلايا الحية باللون الأخضر بوجود أشعة UV، بينما تبقى الخلايا الميتة عاتمة (Larkin, 1976) واستخدمت صبغة FDA في تقييم حيوية البروتوبلاست في صنفى البطاطا May queen و Delaware

(Kikuta *et al.*,1984; Ehsanpour and Jones,2001)، وفي تقييم حيوية حبوب اللقاح في الرز (Khatun and Flowers,1995).

المجموعة الثانية : تضم الأصبغة غير المفلورة، ومن أكثر هذه الأصبغة استخداماً أزرق إيفان، أزرق المثلين و فينوسفرانين، وقد استخدم أزرق إيفان في تقييم حيوية البروتوبلاست من قبل العديد من الباحثين (Gurr,1971;Hooly and Mccarthy,1980)، حيث لامتص الخلايا الحية أزرق إيفان بينما تمتص الخلايا الميتة وحطام الخلايا هذه الصبغة فتظهر باللون أزرق. وهذا اختبار لوظائف الغشاء السيتوبلاسمي المسؤول عن امتصاص الأيونات من قبل الخلية (Epstein,1972) . وقد استخدمت صبغة أزرق إيفان في تقييم حيوية خلايا العديد من الأنواع النباتية مثل البصل والفاصولياء (Taylor and West,1980) والقهوة العربية (Da Silva and Yuffa,2006).

يتم من خلال هذه الطريقة تقييم الحيوية بشكل سهل وسريع لعدد كبير من الخلايا، و استخدمت صبغة فينوسفرانين في تقييم حيوية المعلق الخلوي في فول الصويا، حيث تظهر الخلايا الحية باللون الأحمر (Da Silva and Yuffa,2006).

إن المتطلبات الأساسية في وسط زرع البروتوبلاست مشابهة لمتطلبات زرع الأنسجة النباتية و الكالوس سواء في أوساط الزرع الصلبة أو السائلة، ويعتمد الكثير منها على مكونات وسط موراشيغ وسكوج (MS) لكن مع إجراء بعض التعديلات، والتي غالباً ما تكون في مصادر الكربون والنيتروجين والفيتامينات، والتي يكون لها تأثيرات مفيدة في حيوية البروتوبلاست وفي تشكل المستعمرات الخلوية.

فعلى سبيل المثال يلعب النتروجين العضوي دوراً هاماً بالنسبة لنمو البروتوبلاست، و يجب ألا يزيد تركيزه في الأوساط الغذائية عن 20 ميلي مول وخاصة أيون النترات. ويعتبر أيون الأمونيوم NH_4^+ ساماً بالنسبة لبروتوبلاست البطاطا (Shepard and Totten,1977) وبروتوبلاست الأشجار المثمرة وبعض

أنواع العائلة المركبة (sauvad *et al.*,1990). وتعتبر تراكيز بعض العناصر الغذائية مثل الزنك و الحديد المستخدمة في أوساط زرع الكالوس والأنسجة النباتية مرتفعة بالنسبة لزراع البروتوبلاست. وبالمقابل فإنه يجب زيادة كمية أيون الكالسيوم في الوسط بمقدار 3-4 أضعاف، مع احتواء الوسط الغذائي على 3-5% سكروز (Okumura *et al.*,1984).

وقد استخدمت الأوساط الغنية بالعناصر الغذائية مثل وسط KM8P لزراع البروتوبلاست بكثافة قليلة (Kao and Michayluk,1975)، فهي تزود بعوامل نمو كافية، ولكن المركبات العضوية في مثل هذه الأوساط قد يكون لها أثر ضار في بعض الأنواع النباتية (Hunt and Helgeson,1989).

إن تشكل الحمض النووي RNA في البروتوبلاست المعزولة حديثاً، لايعتمد على التزويد الخارجي بالهرمونات خلال أول 18 ساعة من زرع البروتوبلاست في الوسط، بينما يحتاج تشكل الحمض النووي DNA والذي يبدأ بعد 72-96 ساعة من زرع البروتوبلاست، إلى تزويد خارجي بالأوكسينات والسيتوكينينات (Bergounioux *et al.*,1988)، وبالتالي يجب أن يحتوي وسط زرع البروتوبلاست على واحد أو أكثر من الأوكسينات مثل (نفتالين أسيتك أسيد أو أندول أسيتك أسيد)، مع واحد أو أكثر من السيتوكينينات (زياتين أو بنزيل أمينو بيورين أو كينتين) لتحفيز انقسام البروتوبلاست ونموها

(Veilleux *et al.*,2005). فعلى سبيل المثال إن البروتوبلاست المعزولة من الخلايا الفتية والنشطة تحتاج إلى نسبة عالية من الأوكسينات، بعكس البروتوبلاست المعزولة من خلايا متكشفة فتحتاج إلى نسبة عالية من السيتوكينينات ليحدث لها إعادة تكشف (Vasil and Vasil, 1980)، ويمكن أن تزرع بروتوبلاست بعض الأنواع النباتية من دون إضافة هرمونات مثل البرتقال (Sim *et al.*,1988)

والبيتونيا (Phillips and Darrel,1988).

وقد ذكر Kikuta وزملاؤه (1984) أن المزيج الهرموني المؤلف من زياتين و نفتالين أسيتك أسيد، هو المزيج الهرموني المثالي الذي يؤثر في بدء الإنقسام الخلوي في بروتوبلاست البطاطا، وأن البروتوبلاست التي تزرع في وسط لا يحوي هذين الهرمونين تموت خلال أربعة أيام، وذلك عند بدء الإنقسام الخلوي، بينما تفيد التوازنات الهرمونية الأخرى مثل (نفتالين أسيتك أسيد و بنزيل أدنين) أو (أيزوبنتيل أدنين و نفتالين أسيتك أسيد) في المحافظة على حيوية البروتوبلاست، أما الكينتين فلا يؤثر نهائياً في حدوث الإنقسام الخلوي .

إن نوع منظم النمو النباتي المستخدم والتوازن بين الأوكسينات والسيتوكينينات، عوامل هامة في التخلق الشكلي بدءاً من الكالوس الناتج من البروتوبلاست (Jomori et al.,1995).

إن الكثافة التي تزرع فيها البروتوبلاست ضمن وسط الزرع، عامل هام في تشكيل الجدار الخلوي و بدء الإنقسام، و تتراوح كثافة الزرع المثلى بين 5×10^2 و 1×10^6 بروتوبلاست/مل، وهذا يعتمد على النوع النباتي والصنف، حيث تقوم الخلايا المنقسمة بتحفيز إنقسام الخلايا المجاورة، وذلك عن طريق تحرير عوامل نمو خصوصاً الأحماض الأمينية في وسط الزرع (Horita et al.,2003).

يعد Binding (1966) أول من حصل على نبات كامل في النباتات الدنيا من الأشنيات، وفي عام 1971 تم الحصول على نبات كامل بدءاً من بروتوبلاست ميزوفيل أوراق التبغ، وبذلك تم إثبات القدرة الكامنة والشاملة (Totipotency) في خلايا النباتات الراقية (Takebe et al.,1971)، وقد تم وصف العديد من البرامج لعزل البروتوبلاست من البطاطا وزرعها وتجديدها ، بدءاً من بروتوبلاست ميزوفيل الأوراق (Haberlach et al.,1985). وقد ذكر Shepard and Totten (1977) أول تجديد ناجح من بروتوبلاست صنف البطاطا Russet Burbank ، وتم الحصول على نباتات بطاطا متجددة بنجاح في عدد كبير من الأصناف الرباعية (Bokelman and Roest,1983)، ومن الأصناف الثنائية مثل Majestic و Maris Piper و Desiree و King Edward و Spunta

(Creissen and Karp,1985;Haberlach *et al.*,1985)، ومن أنواع أخرى في الجنس *Solanum* مثل

: *S. phureja* (Creissen,1984) و *S. chacoense* (Butenko *et al.*,1977).

بينما فشلت بعض الأنواع في القدرة على التجديد بدءاً من البروتوبلاست مثل *S. pinnatisectum* و *S. acaule* (Menke *et al.*,1996;Yamada *et al.*,1997).

ولقد تبين أن استجابة نبات البطاطا لزرع البروتوبلاست المعزولة وللتجديد، يعتمد على الطراز الوراثي وعلى وسط الزرع (Karp,1991;Fish *et al.*,1988)، حيث وجد Thomas (1981) أن كالوس الصنف Maris piper لم ينتج أية نموات خضرية في وسط التجديد. ووجد Tican (1996) أن صنف البطاطا Delaware أظهر إستجابات منخفضة في زرع الأنسجة وإعادة تجديد النبات، بينما بين Foulger and Jones (1986) أن أكثر من 70% من بروتوبلاست الصنف Desiree و الصنف King Edward أعطى نباتات .

تعد المؤشرات الجزيئية Molecular markers ذات أهمية قصوى على صعيد تربية النبات، بفعل عدة عوامل منها: إمكانية تحديد موقع وراثي مطلوب لطراز وراثي معين مباشرة، وعدم وجود أي علاقة بين الأطوار الفينولوجية للنبات والمؤشرات الجزيئية. وبالتالي يمكن استخلاص الحمض النووي منقوص الأوكسجين DNA من النبات منذ المراحل الأولى للنمو، وعدم تأثر هذه المؤشرات بالشكل الظاهري للنبات وبالمؤثرات البيئية كما هو الحال في المؤشرات المورفولوجية، والحصول على عدد كبير من المؤشرات بزمن قصير نسبياً، إضافة إلى أنها تعد مؤشرات مساعدة في إسرار عمليات الانتخاب والتربية، وهي بذلك تختصر الزمن الذي تستغرقه عمليات التربية، إضافة إلى خفضها للتكاليف المادية (سيد، 2001). كما أن استخدام تقنيات المؤشرات الجزيئية في برامج التربية، يقلل من تعقيدات إدخال عدد من الصفات المرغوبة في النمط الوراثي (Qi *et al.*,1996). وقد استخدمت تقنيات المؤشرات الجزيئية بنجاح في

تقدير درجة التباين الوراثي بين وضمن عدد كبير من الأنواع والأصناف النباتية مثل الرز (Joshi *et al.*, 2000)، القمح (Kanbar and Kondo, 2011) والبطاطا (Huang and Sun, 2000).

تعتمد معظم تقنيات المؤشرات الجزيئية على التفاعل التسلسلي البوليميرازي Polymerase Chain Reaction (PCR)، حيث يتم تضخيم قطعة محددة من DNA باستخدام مرئسات محددة

(Weising *et al.*, 1995)، ويتم تفاعل PCR بوجود مركبات أساسية هي كلوريد المغنيزيوم $MgCl_2$ ،

النكليوتيدات ثلاثية الفوسفات (dNTPs) Deoxynucleotide Triphosphates وأنزيم Taq-

Polymerase. ويتم تضخيم DNA عبر عدد من الدورات يصل عددها إلى 40 دورة

(Newton and Graham, 1994) في جهاز المدور الحراري (Thermo cycler)، وقد طُور التفاعل

التسلسلي البوليميرازي (Polymerase Chain Reaction- PCR) من قبل الباحث Saiki وزملاؤه

(1985)، و كان لهذا التفاعل أثر مهم على صعيد الدراسات الوراثية الجزيئية، ويقوم هذا التفاعل بمضاعفة

Amplification قطع محددة من DNA باستخدام مرئسات عشوائية أو متخصصة مصممة لهذا الهدف،

مما يسمح بالحصول على ملايين النسخ المضاعفة من قطعة واحدة من DNA التي تتضاعف أسياً، وذلك

باستخدام دورات حرارية متعددة (Ayad *et al.*, 1997)، ويمر التفاعل التسلسلي البوليميرازي PCR

في ثلاث خطوات رئيسية يتم خلالها تصنيع سلاسل جديدة من DNA ابتداءً من قطعة أولية:

مرحلة التسخن الحراري (Denaturation)، مرحلة الالتحام (Annealing) ومرحلة الاستطالة

(Extention) (Mullis *et al.*, 1986).

ولقد أدى تطور التقنيات الحيوية الجزيئية إلى ظهور عدد كبير من المؤشرات الجزيئية الهامة التي تسمح

بتوصيف الكائنات الحية، والتمييز حتى بين الوحدات التصنيفية الصغيرة، ومن أكثر التقنيات المستخدمة

حالياً في دراسة التباين الوراثي في النبات:

- تقنية التضخيم العشوائي للتعدد الشكلي للـ DNA Randomly Amplified Polymorphic (RAPD) (Williams *et al.*, 1990)
- تقنية تباين أطوال قطع الدنا المضخمة (AFLP) Amplified Fragment Length Polymorphism (Zabeau and Vos, 1993).
- تقنية التكرارات المتتابعة البسيطة (SSR) Simple Sequence Repeat or Microsatellites (Tautz, 1989).
- تقنية التكرارات المتتابعة البسيطة البينية (ISSR) Inter Simple Sequence Repeats (Zietkiewicz *et al.*, 1994).
- تمتاز تقنية **RAPD** بإمكانية أتمنتها و سهولة معرفة التسلسل النيوكليوتيدي للمرئسات، وتنسم بالبساطة والسرعة وعدم الحاجة لكميات كبيرة من المادة الوراثية DNA، في حين يؤخذ عليها عدم ثباتية النتائج عند تكرارها لتأثرها بعوامل عديدة (Virk *et al.*, 2000).
- وتمتاز تقنية **AFLP** بأنها تسمح بإظهار عدد كبير من التعددات الشكلية، حيث تستخدم في تحديد البصمة الوراثية دون معرفة مسبقة بالتسلسل النيوكليوتيدي للمرئسات المنتخبة مخبرياً لأي من المورثات سواء كان بسيطاً أو معقداً (Vos *et al.*, 1995)، لكن يؤخذ عليها أنها تتطلب خبرة عملية دقيقة وتحتاج إلى زمن طويل لإجرائها، كما أن تكلفتها مرتفعة (Karp *et al.*, 1997).
- وتعد تقنية **SSR** مثالية وهامة بسبب ارتفاع معدل تطورها، ما يعكس نسب عالية من التعددية الشكلية polymorphism، كما أن نتائجها ثابتة عند تكرارها، وهي تتطلب كمية قليلة من DNA ويمكن أتمنتها، إلا أنه يعاب عليها حاجتها إلى مرئسات ذات تسلسل نيوكليوتيدي محدد يحدد مكان التابع البسيط الترادفي SSR في الجينوم (Karp *et al.*, 1997; Sweigart *et al.*, 1999). وجدت منذ عام 1994 تقنية جديدة للمؤشرات الجزيئية تدعى تقنية **ISSR** (Inter Simple sequence repeats).

تعتمد على تكرارات التسلسلات البسيطة الداخلية ، وتعطي مستويات عالية من التعددية الشكلية للـ DNA. و تستخدم هذه التقنية كمؤشر جزيئي في دراسات البنية الوراثية والتنوع الوراثي (Fu- Rong *et al.*, 2007). تعتمد تقنية ISSR على تضخيم المواقع بين التتابع الدقيقة المتقاربة والمتوضعة بشكل متعكس (Zietkiewicz *et al.*, 1994)، وذلك باستخدام مرئسات وحيدة طولها (16-18 bp)، مؤلفة من نكليوتيدات متكررة (Bornet *et al.*, 2002; Nagaraju *et al.*, 2002).

إن الفائدة الرئيسية لهذه التقنية هي أنها لا تتطلب وقتاً طويلاً لبناء المكتبة الوراثية، وهي مؤشرات ذات طبيعة عشوائية، فهي مناسبة بشكل خاص لدراسات علم الوراثة العرقي وتقييم التنوع الوراثي وتحديد الأصناف (Raina *et al.*, 2001; Korbin *et al.*, 2002)، وإن بساطة مؤشرات ISSR تزيد من إمكانية استخدامها في الوسم الجينومي (Ammiraju *et al.*, 2001). ولكون مؤشرات ISSR غزيرة فإنها تعطي عدداً كبيراً من الحزم، ومستوى من التعددية الشكلية مرتفع أو متوسط، كما أن الجهد والتكلفة اللازمتان لتنفيذها منخفضة نسبياً (Sheppard and Smith, 2000; Gui *et al.*, 2008).

وقد بين Taylor وزملاؤه (2001) أن البصمة الوراثية للـ DNA أداة مفيدة في تحديد الاختلافات الوراثية في البطاطا. ولقد استخدمت مؤشرات ISSR في الدراسات الوراثية للبطاطا لأنها فعالة في كشف المستويات المنخفضة جداً من التباينات الوراثية (Klliker *et al.*, 2003)، و طبقت بنجاح في دراسات التنوع الوراثي في عدد كبير من النباتات منها البطاطا، وهي تكشف وبشكل سريع البصمات عن تعددات شكلية كثيرة، وبذلك فهي تحدد الاختلافات الوراثية بين أصناف البطاطا (Bornet *et al.*, 2002).

وقد استخدمت هذه التقنية كوسيلة جيدة للتوصيف الوراثي في البطاطا وفي برامج إدارة المادة الوراثية (Powell *et al.*, 1996). واستخدمت تقنية ISSR في تقييم الهجن الجسمية الناتجة عن دمج بروتوبلاست

الأصناف التجارية : Cardinal و Nicola و Aminca (Ellouza *et al.*, 2006)

وقد درس Kanbar and Kondo (2011) التباين الوراثي بين 20 صنف مزروع من الشعير جمعت من سوريا واليابان مستخدمين 23 مرئسة من ISSR و 6 مرئسات من RAPD في تحليل التباين الوراثي. ودرس Medraoui وزملاؤه (2007) التنوع الوراثي بين عدد من السلالات المحلية من الذرة البيضاء Sorghum جمعت من 4 مواقع متباينة جغرافياً في المغرب وذلك باستخدام تقنيتي RAPD و ISSR.

الفصل الثالث

مواد البحث وطرائقه

MATERIALS AND METHODS

3- مواد البحث وطرائقه:

نفذ هذا البحث في مخبر التقانات النباتية في الهيئة العامة للتقانة الحيوية بدمشق، وفي كلية الزراعة - جامعة دمشق، خلال الفترة 2011-2012.

3-1 المادة النباتية Plant material:

استخدم في تنفيذ هذا البحث صنفان من البطاطا هما بنيلا وبورين، حيث تم الحصول على 100 درنة من كل صنف من مرتبة إليت (مرحلة من المراحل العليا لإنتاج بذار البطاطا)، وذلك من المؤسسة العامة لإكثار البذار.

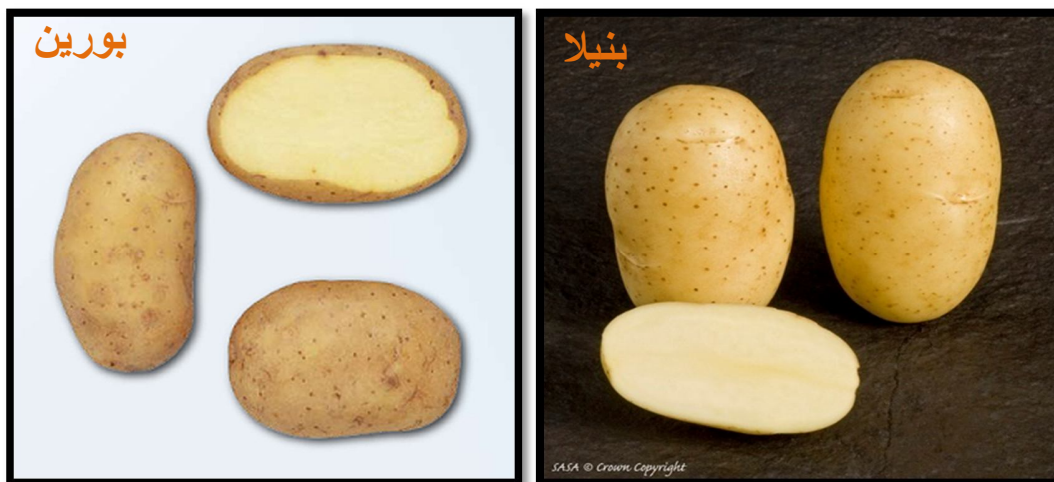
1-الصنف بنيلا (Binella):

تتصف نباتات هذا الصنف بكونها قصيرة إلى متوسطة الطول، نصف قائمة إلى زاحفة، مبكرة، الدرنات بيضوية و الإنتاجية جيدة إلى عالية و متحملة للإصابة بفيروسات البطاطا X و Y (International Potato Center, 1993) (شكل 1).

2-الصنف بورين (Burren):

تتصف نباتات هذا الصنف بكونها متوسطة الإرتفاع إلى طويلة، مبكرة إلى متوسطة التبكير. الدرنات بيضوية متطاولة و الإنتاجية عالية و متوسطة الحساسية للإصابة بفيروسات البطاطا PVY و PLRV و جيدة التحمل للجفاف (International Potato Center, 1993) (الشكل 1).

ويعتبر هذان الصنفان من أهم الأصناف التجارية رباعية الصيغة الصبغية المعتمدة في سورية والمرغوبة لدى المزارعين، والتي تدخل في برنامج إنتاج بذار البطاطا.



شكل 1: درنات أصناف البطاطا المدروسة.

3-2 طرائق البحث Research Methods:

3-2-1 زراعة النهايات الوردية بالأصص :

فحصت الدرنات المختارة من الصنفين المدروسين، بحيث تكون سليمة ظاهرياً من الأمراض البكتيرية والفطرية، وخالية من العيوب والتشوهات، وتم إنباتها بإتباع الخطوات التالية:

- فركت الدرنات بالماء الجاري، لإزالة كل الشوائب إن وجدت، ثم عُوملت بحمض الجبرلين (4 ppm) لمدة ربع ساعة لكسر طور السكون (Dormancy period).

- استئصلت النهايات الوردية من قمة الدرنه، وهي الجهة المقابلة لمكان اتصال الدرنه بالساق المدادة (الستولون) وتتركز فيها عدة عيون، وزرعت في أصص مملوءة بمادة البيتموس (التورب الزراعي) المعقم (شكل 2).



شكل 2 : زراعة النهايات الوردية لدرنات الصنفين المدروسين.

3-2-2-2 زرع الأنسجة للخزعات النباتية:

3-2-2-3-1 الزرع الأولي للعقل الساقية :

جمعت النموات المأخوذة من النهايات الوردية (بعد 45 يوم من الزراعة)، تحت جهاز العزل الجرثومي حيث تم قص النموات إلى عقل مفردة بطول 2-3 سم يحوي كل منها برعم جانبي واحد، وغسلت بالماء الجاري لإزالة الغبار والأتربة العالقة عليها. غمرت بالكحول الإيثيلي تركيز 70% لمدة 1 دقيقة، مع التحريك ثم نقعت بهيبوكلوريت الصوديوم (NaOCl) تركيز 0.5 % (المحلول التجاري 5.25%) لمدة 10 دقائق ، ثم غسلت الخزعات النباتية 3 مرات متتالية بالماء المقطر المعقم، وذلك بمعدل 5 دقائق في كل مرة بهدف إزالة كل أثر المادة المستخدمة بالتعقيم.

زرعت العقل بعد تعقيمها في وسط MS (Murashig and Skooge, 1962) (جدول 3)، المضاف له 30 غ/ل سكروز و 7 غ/ل آجار وبدرجة حموضة (pH) 5.8، وذلك ضمن أنابيب اختبار بحجم 2.5 × 20 سم

تحتوي 12 مل من الوسط المغذي، وذلك بعد تعقيم الأنابيب في جهاز التعقيم الرطب Autoclave على حرارة 121°م و ضغط 1.04 كغ/سم² لمدة 20 دقيقة.

حضنت الأنابيب المزروعة بغرفة النمو (Growth Room) على درجة حرارة حرارة 22±2°م و إضاءة 16 ساعة/ 8 ظلام و شدة ضوئية 3000 لوكس، علماً أن عدد الأنابيب المزروعة بلغ 50 أنبوباً من كل صنف، وسجلت في هذه المرحلة النسب المئوية للعينات السليمة والنسب المئوية للعينات النامية من العينات السليمة وذلك وفق مايلي:

$$\% \text{العينات السليمة} = (\text{عدد العينات السليمة} / \text{العدد الكلي للعينات المزروعة}) \times 100 .$$

$$\% \text{العينات النامية} = (\text{عدد العينات النامية} / \text{العدد الكلي للعينات المزروعة}) \times 100 .$$

3-2-2-2 مرحلة إكثار الخزعات النباتية :

تهدف مرحلة الإكثار إلى الحصول على أكبر كمية ممكنة من النموات الخضرية جيدة النمو، قسمت العينات النباتية الناتجة من مرحلة الزرع الأولي إلى عقل صغيرة بطول 1-1.5 سم تحتوي برعم جانبي مع ورقة، وزرعت في نفس وسط الزرع الأولي بهدف الإكثار. كررت عملية الإكثار خمس مرات متتالية للحصول على الكمية الكافية من المادة النباتية اللازمة لتنفيذ التجارب الخاصة بعزل وزرع البروتوبلاست.

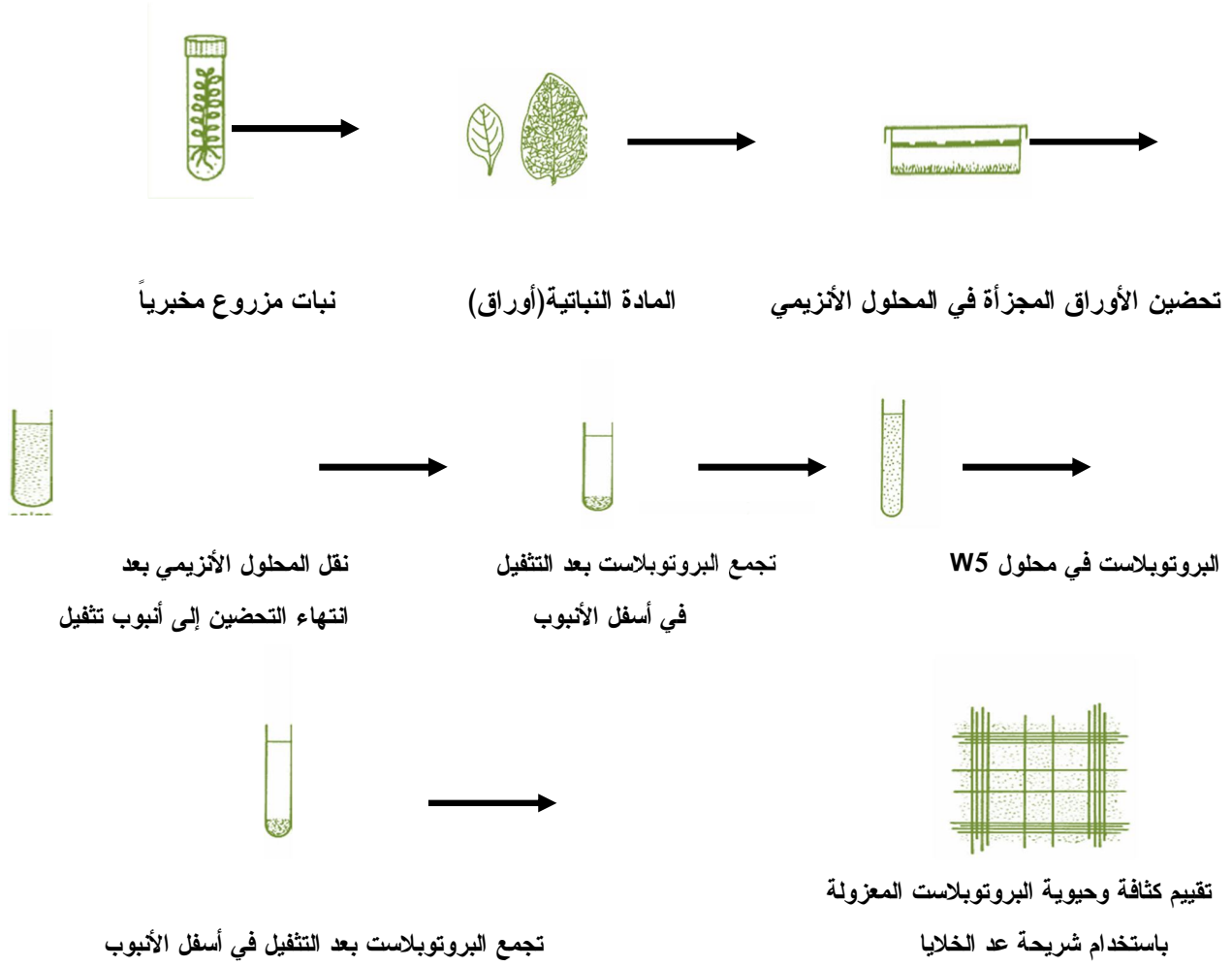
3-2-3 مرحلة عزل البروتوبلاست Protoplast Isolation Stage :

- قبل البدء بتجارب عزل البروتوبلاست ، زرعت الأجزاء النباتية (عقل بطول 1.5 سم تحتوي برعم جانبي واحد) المستخدمة في عزل البروتوبلاست في وسط SH (Schenk and Hildebrand, 1972) الخالي من الهرمونات (جدول 3) ، والمزود بثيوسلفات الفضة بتركيز 50 ميكرومول.
- إن العملية الكاملة لعزل البروتوبلاست وزرعها تمت في ظروف معقمة، وتم اتباع طريقة العزل الأنزيمية.
- أخذ 10-20 نباتاً أي ما يعادل 1 غ مادة نباتية تقريباً، وعرضت لدرجة حرارة 10 م° في الظلام لمدة 24 ساعة (ظروف إجهاد) ، مما ينعكس إيجابياً على حيوية البروتوبلاست وقدرتها على النمو لاحقاً .
- أخذت الأوراق الكبيرة والمتوسعة بشكل كامل بدون أعناقها، وقطعت إلى أجزاء صغيرة (1-2) مم بواسطة شفرة معقمة وذلك ضمن أطباق بتري قطر 9 سم .
- أضيف إلى الأوراق المجزأة 10 مل من محلول البلزما (Albiski, 1995) (جدول 2)، وبعد 30 دقيقة استبعد محلول البلزما وأضيف بدلاً منه 10 مل من المحلول الأنزيمي المعقم بالفلتر (0.22 µm) (جدول 2).
- حضنت الأطباق مدة 14-16 ساعة في الظلام ودرجة حرارة 25 م°، وتلى ذلك فترة ناتج التحلل الأنزيمي من خلال 8 قطع من الشاش المعقم والموضوعة على أنابيب فالكون 15 مل .
- غسّلت هذه الأنسجة بمحلول الغسيل W5 (Gerplova et al., 2007) (جدول 2).
- ثقلت الأنابيب في جهاز طرد مركزي (Germany, Eppendorf) على سرعة 700 دورة / د لمدة 5 دقائق، واستبعد السائل الطافي وأضيف للراسب 10 مل من محلول الغسيل W5، ثم ثقلت 500 دورة / د لمدة 6 دقائق، واستبعد السائل الطافي وكررت عملية الغسيل مرة ثانية.

- أضيف للراسب الذي يمثل البروتوبلاست المعزولة 1 مل من وسط الزرع السائل من أجل تحديد الكثافة و تقييم الحيوية و يبين الشكل 3 المخطط العام لعملية عزل البروتوبلاست.

جدول 2: المحاليل المستخدمة في عزل البروتوبلاست في البطاطا

العناصر	محلول البلزمة	المحلول الأنزيمي	محلول الغسيل (W5)
Cellulase TC		%1.75	
Pectinase		%0.4	
NaCl			0.15(M/L)
KCl			0.01(M/L)
CaCl₂.2H₂O	0.001(M/L)	0.005(M)	0.125(M/L)
غلايسين			0.01(μM/L)
مانيتول	0.5(M/L)	0.50-0.75(M)	-
غلوكوز			0.005(μM/L)
MES	3(M/L)	0.01(M)	-
pH	5.6	5.6	5.8



شكل 3 : المخطط العام لعملية عزل البروتوبلاست

3-2-4 تحديد كثافة البروتوبلاست المعزولة :

حددت كثافة البروتوبلاست المعزولة قبل إجراء عملية الزرع باستخدام شريحة عد الخلايا (NEUBAUER IMPROVED)، وذلك في المربع المركزي المؤلف من 25 مربع صغير، وحيث كل مربع يتألف بدوره من 16 مربع. نظفت شريحة العد بالكحول الإيثيلي، ثم غُسلت بالماء المقطر و تُبَتَّت الساترة على شريحة

العد، و سحب 25 ميكرو لتر من معلق البروتوبلاست بواسطة ماصة دقيقة ووضع في الحجرة المخصصة

للعد، وتمت عملية عد الخلايا باستخدام المجهر الضوئي المقلوب (Inverted Microscope)

بتكبير 20X وتم حساب عدد الخلايا في 1 مل من معلق البروتوبلاست باستخدام العلاقة التالية :

$$\text{عدد الخلايا/مل} = \text{عدد الخلايا} \times 10^4 \text{ (Invitrogen, 2002)}.$$

3-2-5 تحديد حيوية البروتوبلاست المعزولة:

حددت حيوية البروتوبلاست باستخدام صبغة أزرق إيفان (Sigma) Evans blue ، التي تلون الخلايا الميتة

فقط باللون الأزرق، أما الخلايا الحية فتبقى خضراء لامعة، وذلك بأخذ 25 ميكرو لتر من معلق

البروتوبلاست وإضافته إلى 25 ميكرو لتر من صبغة أزرق إيفان في أنبوب معقم سعة 1.5 مل أي بنسبة

1:1، ثم تم حساب عدد الخلايا الحية غير المصبوغة باللون الأزرق باستخدام شريحة عد الخلايا في المجهر

الضوئي المقلوب وبتكبير 20X، وتم حساب النسبة المئوية للخلايا الحية باستخدام المعادلة التالية :

$$\% \text{ البروتوبلاست الحية} = (\text{عدد البروتوبلاست الحية} / \text{العدد الكلي للبروتوبلاست}) \times 100.$$

علماً أنه تم تحضير صبغة أزرق إيفان بتركيز 0.4 % (W/ V)، وتم تقييم الحيوية مباشرة بعد إضافة

الصبغة إلى معلق البروتوبلاست (Ling et al., 2010).

3-2-6 العوامل المؤثرة في عزل البروتوبلاست:

جرت دراسة عدد من العوامل المؤثرة في كثافة وحيوية البروتوبلاست المعزولة .

3-2-6-1 تأثير المعاملة بثيوسلفات الفضة أثناء طور الإكثار:

يعد مركب ثيوسلفات الفضة (STS) من مثبطات الإثيلين المعروفة، وقد زرعت النباتات التي ستستخدم في عزل البروتوبلاست في وسط SH الخالي من الهرمونات و المزود بتركيز مختلفة من STS (0-25-50-75-100) ميكرومول، وبمعدل 16 أنبوب من كل معاملة وبذلك كان عدد الأنابيب المزروعة في هذه المرحلة : 5 معاملات × 2 صنف × 32 مكرر = 320 أنبوباً، وأعيدت التجربة مرتين. تم قياس طول النبات ومتوسط طول ثلاث مسافات عقدية من وسط النبات ومساحة المسطح الورقي، باستخدام جهاز الماسح الضوئي (Area Meter AM300) (شكل 4)، وذلك بعد شهر من الزراعة. أخذت الأوراق الناتجة من كل معاملة، وتم عزل البروتوبلاست منها بالطريقة أنفة الذكر، وبعد العزل تم حساب كثافة البروتوبلاست وحيويتها لكل معاملة على حدة.



شكل 4: جهاز الماسح الضوئي.

3-2-6-2 تأثير نوع و تركيز منظم الضغط الأسموزي:

درس تأثير نوعين من منظمات الضغط الأسموزي : المانيتول و السكروز وذلك بتركيز مختلفة: (0 - 0.25 - 0.5 - 0.75 - 1) مول لكل منهما.

و تم تحديد التركيز الأمثل من حيث كثافة وحيوية البروتوبلاست المعزولة. نفذت التجربة بثلاثة مكررات، وبمعدل 3 غ (للمكرر الواحد) من الأوراق المتكونة أثناء طور الإكثار، بوجود STS بتركيز 50 ميكرومول، وأعيدت التجربة مرتين .

3-2-6-3 تأثير عمر الأوراق النباتية داخل الأنابيب أثناء طور الإكثار:

تمت دراسة تأثير أعمار النبات (4-5-6-7) أسابيع في كثافة وحيوية البروتوبلاست المعزولة. نفذت التجربة بثلاثة مكررات، وبمعدل 3 غ (للمكرر الواحد) من الأوراق المتكونة أثناء طور الإكثار، بوجود STS بتركيز 50 ميكرومول، وأعيدت التجربة مرتين.

3-2-7 مرحلة زرع البروتوبلاست : Protoplast Culture Stage

عدلت كثافة البروتوبلاست المعزولة بحيث تصبح 20,000 خلية/مل من وسط الزرع (Kikuta et al., 1984) (جدول 4)، وتم الزرع ضمن أطباق بتري بلاستيكية قطر 6 سم، بحيث يحتوي كل طبق 2 مل من معلق البروتوبلاست، وتمت عملية الزرع باستخدام ماصة دقيقة، وقد استخدم وسط زرع يحتوي تراكيز مختلفة من هرمون Z (0-0.5-1-1.5) مغ/ل، وتم تحديد موعد تشكل الجدار الخلوي وموعد بدء الإنقسام الخلوي، من خلال فحص الأطباق باستخدام المجهر الضوئي المقلوب، وبعد أسبوعين من الزرع أضيف وسط زرع جديد إلى القديم بنسبة 2:1 على التوالي، مع تخفيف الضغط الأسموزي من 0.4 مول إلى 0.3 مول من المانيتول. بعد شهر من زرع البروتوبلاست وعندما أصبحت المستعمرات الخلوية مرئية، تم تحديد النسبة المئوية للبروتوبلاست التي شكلت مستعمرات خلوية باستخدام جهاز عد

المستعمرات الخلوية Colony Counter (شكل 5)، حيث تم العد عن طريق وضع الطبق ضمن ساحة العد المقسمة إلى مربعات والمزودة بمكبرة وإضاءة. علماً أنه زرع 12 طبق من كل معاملة وأعيدت التجربة مرتين، وبذلك كان عدد الأطباق المزروعة في هذه المرحلة : 4 معاملات $\times$ 2 صنف $\times$ 24 طبق = 192 طبق .



شكل 5: جهاز عد المستعمرات الخلوية.

3-2-8 مرحلة استحداث الكالوس Callus Initiation Stage:

استبدل وسط زرع البروتوبلاست بعد تشكل المستعمرات الخلوية، بوسط استحداث الكالوس السائل (Ehsanpour and Jones, 2001)(جدول 4) وذلك باستخدام ماصة دقيقة. و درس تأثير استخدام تراكيز مختلفة من هرمون NAA (0.5-0.25-0.1-0) مغ/ل، وبعد أربعة أسابيع تم تحديد النسبة المئوية لتشكيل الكالوس باستخدام جهاز عد المستعمرات الخلوية، ثم تم نقل الكالوس إلى وسط صلب يحوي 7 غ/ل أجاروز.

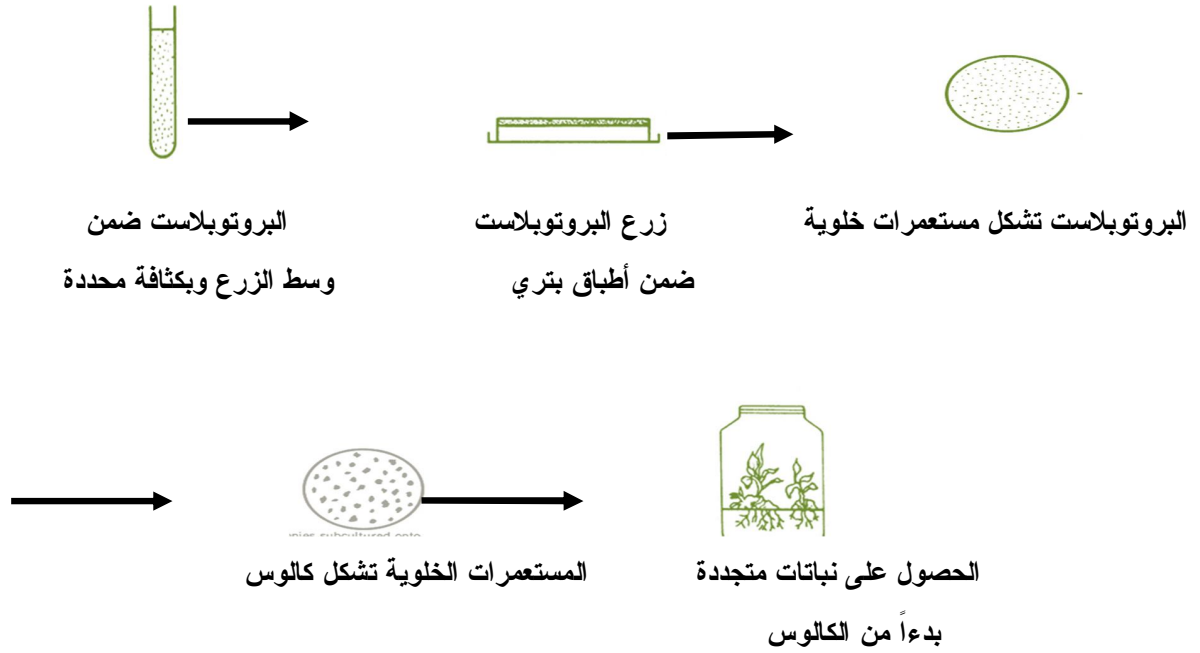
علماً أنه تم زراعة 12 طبق من كل معاملة وأعيدت التجربة مرتين، وبذلك كان عدد الأطباق المزروعة في هذه المرحلة : 4 معاملات $\times$ 2 صنف $\times$ 24 طبق = 192 طبق .

3-2-9 مرحلة تشكل النموات من الكالوس :Regeneration Stage

نقل الكالوس بعد أربعة أسابيع من نقله إلى وسط الاستحداث المهلم بالأغاروز، إلى وسط التجديد (Ehsanpour and Jones,2001) (جدول 4)، حيث تم اختبار تأثير نوعين من منظمات النمو Z(0-0.5-1-1.5-2) مغ/ل و بنزيل أمينو بيورين (BAP) (0-0.5-1-1.5) مغ/ل، وتم حساب نسبة الكالوس الذي شكل براعم خضرية بعد 4 أسابيع من الزرع، وعدد النموات المتشكلة من كل كالوس بعد 10 أسابيع من الزرع، علماً أنه تم زرع 4 أطباق من كل معاملة بحيث يحتوي كل طبق على 4 قطع من الكالوس، كررت التجربة مرتين و كان عدد الأطباق المزروعة في هذه المرحلة:

8 معاملات $\times$ 2 صنف $\times$ 8 أطباق = 128 طبق.

ويبين الشكل 6 المخطط العام لعملية زرع البروتوبلاست وتجديدها.



شكل 6 : المخطط العام لعملية زرع البروتوبلاست وتجديدها.

3-2-10 مرحلة إكثار النموات المتجددة من الكالوس:

تهدف مرحلة الإكثار هنا إلى الحصول على عدد كافٍ من النموات الخضرية جيدة النمو، لذا تم نقل النبيتات إلى وسط الإكثار MS، ثم حضنت الخزعات النباتية المزروعة في غرفة النمو على درجة حرارة $22 \pm 2^\circ \text{C}$ وفترة إضاءة 16 ساعة/ 8 ظلام وشدة ضوئية 3000 لوكس، و تمت إعادة الزرع (Subculturing) مرة كل شهر تقريباً حيث تم إكثارها ثلاث مرات للحصول على العدد الكافي من النباتات اللازمة لعملية التقسية و لتنفيذ تقنية ISSR.

3-2-11 مرحلة التقسية Acclimatization Stage:

تمت عملية التقسية بنقل النباتات تدريجياً من الأنابيب إلى الشروط الطبيعية، حيث تم غسل الوسط العالق بالجذور بالماء المقطر والمعقم، ثم عوملت بمبيد فطري جهازى (دومينو) 0.5 مل/ل لمدة 5 دقائق، ونقلت إلى أصص بلاستيكية قطر 8 سم تحوي تورب رطب تم تعقيمه في الأوتوكلاف على حرارة 121 م° لمدة 15 دقيقة. غطيت الأصص بأكياس بلاستيكية وتركنت في ظروف غرفة النمو (حرارة 22±2 م° و إضاءة 16 ساعة) لمدة 10 أيام، ثم تم تنقيب الأكياس وتركنت لمدة أسبوع آخر بهدف تقليل الرطوبة تدريجياً حول النباتات. وتمت سقاية النباتات مرة أسبوعياً بوسط ¼ MS مع معاملتها بالمبيد الفطري بمعدل مرة كل أسبوعين. بعد ذلك رفعت الأكياس عن النباتات ونقلت إلى أصص أكبر بعد شهر من وضعها في غرفة النمو، ثم نقلت إلى ظروف البيت البلاستيكي، حيث تم نقل 25 نبات، وحسبت نسبة نجاح عملية التقسية بعد شهرين من بدء عملية التقسية وفق مايلي:

$$\% \text{ نجاح عملية التقسية} = (\text{عدد النباتات الناجحة بعملية التقسية} / \text{عدد النباتات المنقولة لمرحلة التقسية}) \times 100.$$

تم حساب متوسط طول النباتات، ومتوسط قطر ووزن 30 درينة من الدرينات المشكلة .

جدول 3: تركيب الأوساط المغذية لموراشيج وسكوج (MS) وشينك وهيلدبراند (SH) المستخدمة في البحث .

المركب	التركيب الكيميائي	وسط MS (مغ/ل)	وسط SH (مغ/ل)
نترات الأمونيوم	NH_4NO_3	1650	
نترات البوتاسيوم	KNO_3	1900	1900
كلوريد الكالسيوم المائي	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440	328
سلفات المغنيزيوم المائية	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370	360
فوسفات البوتاسيوم	KH_2PO_4	170	170
كلوريد الأمونيوم	NH_4Cl	-	267.5
سلفات الحديد المائية	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27.85	27.8
شلات الصوديوم	Na_2EDTA	37.25	37.3
سلفات المنغنيز المائية	$\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	22.3	22.3
سلفات الزنك	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8.6	8.6
حمض البوريك	H_3BO_3	6.2	6.2
يود البوتاسيوم	KI	6.6	0.83
مولبيدات الأمونيوم المائية	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.83	0.25
سلفات النحاس المائية	$\text{CuSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.025	0.025
كلور الكوبالت المائي	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025	0.025
ثيامين	B1	1	0.5
بيرووكسين	B6	-	0.5
بيوتين	H	-	0.05
حمض النيكوتين	PP	-	5
حمض الفوليك	B2	-	0.5
ميواينوزيتول		100	100
سكروز		30 غ/ل	30 غ/ل
أغار		7 غ/ل	7 غ/ل
pH		5.8	5.8

(Murashig and Skooge,1962;Schenk and Hildebrand,1972).

جدول 4: الأوساط المغذية المستخدمة في تجارب البحث.

المركب	التركيب الكيميائي	مرحلة زرع البروتوبلاست (مغ/ل)	مرحلة استحداث الكالوس (مغ/ل)	مرحلة التجديد (مغ/ل)
نترات الأمونيوم	NH ₄ NO ₃	-	1650	1650
نترات البوتاسيوم	KNO ₃	950	1900	1900
كلوريد الكالسيوم	CaCl ₂ .2H ₂ O	880	440	440
كبريتات المغنيزيوم	MgSO ₄ .7H ₂ O	185	370	370
فوسفات البوتاسيوم	KH ₂ PO ₄	85	170	170
سلفات الحديد	FeSO ₄ .7H ₂ O	25	27.85	27.85
شلات الصوديوم	Na ₂ EDTA	35	37.25	37.25
سلفات المنغنيز	MnSO ₄ .7H ₂ O	10	22.3	22.3
سلفات الزنك	ZnSO ₄ .7H ₂ O	4.6	8.6	8.6
حمض البوريك	H ₃ BO ₃	3.1	6.2	6.2
يود البوتاسيوم	KI	0.4	6.6	6.6
مولبيدات الأمونيوم	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.1	0.83	0.83
سلفات النحاس	CuSO ₄ .5H ₂ O		0.025	0.025
كلور الكوبالت	CoCl ₂ .6H ₂ O	0.1	0.025	0.025
ثيامين	B1	0.25	-	-
بيرودوكسين	B6	0.25	0.5	0.5
حمض النيكوتين	PP	2.5	0.5	0.5
حمض الفوليك	B2	0.25	0.5	0.5
بيوتين	H	0.01	0.05	0.05
غلايسين		1	2	2
هيدروليزات الكازئين		250	400	1000
ميواينوزيتول		50	100	100
غلوتامين			100	146
سكروز		0.5 غ	2.5 غ/ل	2.5 غ/ل
مانيتول		72800 ثم 54600	40000	30000
سلفات الأدنين		-	40	80

976	976	500	MES	مورفولينو إيثان سلفونيك
-	0-0.1-0.25-0.5	0.5	NAA	نفتالين أسيتك أسيد
0.1	-	-	IAA	أندول أسيتك أسيد
0-0.5-1-1.5	0.5	-	BAP	بنزيل أمينو بيورين
0-0.5-1-1.5-2	-	0-0.5-1-1.5	Z	زياتين
-	-	0.1	GA3	جبرلين حمض الخل
7 غ/ل	7 غ/ل	-		أغار
5.6	5.6	5.8		pH

(Kikuta *et al.*,1984;Ehsanpour and Jones,2001).

3-2-12 التوصيف الجزيئي على مستوى DNA

3-2-12-1 استخلاص DNA DNA Extraction

- عزل DNA (Genomic DNA) من أوراق مأخوذة من نباتات بعمر 3 أسابيع بطريقة CTAB المعدلة (Murray and Thompson,1980)، حيث وزن 0.2 غ من الأوراق النباتية لكل عينة وذلك لخمس سلالات متجددة من كالوس البروتوبلاست في الصنف بنيلا، وطحنت في هاون بوجود الآزوت السائل N₂ liquid طحناً ناعماً حتى أصبحت على شكل مسحوق.

- نقل المسحوق النباتي إلى أنابيب معقمة سعة 2 ml ، ثم أضيف لكل عينة 750 µl من محلول الاستخلاص CTAB المحتوي على المكونات التالية:

3% (w/v) CTAB , 100 mM Tris-HCl (pH 8), 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA (pH8) , 0.2 % 2-mercaptoethanol (v/v))

- حضنت العينات في الحمام المائي على درجة حرارة 65 م° مع التحريك المستمر لمدة 60 دقيقة.

- وضعت العينات في الثلج لمدة 5 دقائق، ثم أضيف للعينات كمية من مادة chloroform/ isoamyl alchohol (1: 24) مماثلة لكمية محلول الاستخلاص، ومُزجت برفق لمدة عشر دقائق.
- وضعت الأنابيب في جهاز الطرد المركزي نوع Heraeus على سرعة 10000 دورة/ د لمدة 10 دقائق على درجة حرارة 4 م°، حيث تم في هذه المرحلة فصل المزيج إلى طورين.
- نقل بعدها الطور الطافي (المحتوي على DNA) إلى أنابيب جديدة سعة 1.5 مل، وأعيدت تنقيته مرة أخرى بكمية مماثلة من مادة chloroform/ isoamyl alchohol (1: 24).
- أضيف 500 ميكروليتر من isopropanol المبرد على حرارة - 20 م° مع التحريك بلطف، وتركت العينات بعدها على درجة حرارة - 20 م° طوال الليل من أجل ترسيب DNA.
- في اليوم التالي أعيد التنقيط بسرعة 10000 دورة / د لمدة 10 دقائق، ثم تم التخلص من الرشاحة وغسل الراسب (DNA) بإضافة 200 µl من محلول إيتانول 70%.
- ثقلت الأنابيب بعد ذلك على سرعة 10000 دورة/ د لمدة 10 دقائق، واستبعد الطافي وجفف راسب DNA على حرارة 37 م° لمدة 20 دقيقة.
- أذيب DNA في (50 µl) من محلول TE المكون من: (10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA).
- تم التخلص من RNA بإضافة 2µl من أنزيم RNase (10mg /ml) والتحصين على درجة 37 م° لمدة نصف ساعة.
- حفظت العينات بدرجة حرارة 4 م° لمدة 24 ساعة، ثم خزنت على درجة حرارة - 20 م° لحين الاستخدام.

3-2-12-2 تقدير كمية DNA و نوعيته :

استخدم لتقدير كمية DNA في العينات جهاز المطياف الضوئي (UV spectrophotometer) نوع HITASHE ، والذي يعتمد في عمله على قياس كمية DNA الموجودة عن طريق امتصاصه للأشعة فوق البنفسجية Ultra Violet بموجات طولها 260 و 280 نانومتر، حيث تسمح قراءة الإمتصاص على طول الموجة 260 نانومتر بحساب تركيز DNA في العينة ، بحيث أن كل واحد من الكثافة الضوئية (OD) optical density تقابل حوالي 50 ميكرو غرام/ مل لسلاسل DNA المضاعفة.

وإن النسبة بين قراءة الموجة 260 نانومتر/ إلى قراءة 280 نانومتر تساعد في تقدير نقاوة DNA ، ويجب أن تتراوح هذه النسبة بين 1.8 - 2.0 .

ويمكن حساب كمية DNA من المعادلة التالية (Maniatis, 1982):

$$\text{DNA Concentration (} \mu\text{g /}\mu\text{l)} = \text{OD}_{260} \times 50 \times (\text{عامل التمديد}) / 1000$$

حيث أن OD 260 تمثل الكثافة الضوئية لامتصاص DNA (ميكرو غرام) عند الموجة 260 نانومتر.

حُمِلت كمية قليلة من DNA (6 ميكرو لتر)، في هلامة من الأغاروز تركيزها 1% لتحديد نوعية DNA المستخلصة للتأكد من عدم تقطعها، حيث يجب أن يظهر DNA على شكل عصابات bands عالية الوزن الجزيئي في هلامة الأغاروز.

ثم مُدِدَت عينات DNA للحصول على تركيز 25 نانوغرام /ميكرو لتر لتستخدم في التفاعل التسلسلي البوليميرازي.

3-12-2-3 التفاعل التسلسلي البوليميرازي (PCR) Polymerase Chain Reaction

تم تضخيم DNA باستخدام 18 مرئسة من مرئسات التسلسلات المتكررة البسيطة البينية (ISSR) (جدول 5) والتي تم الحصول عليها من شركة VBC الأوربية.

جدول 5: التتالي النكليوتيدي لمرئسات ISSR المستخدمة.

رقم المرئسة	التتالي النكليوتيدي
ISSR1	(CT)8TG
ISSR2	(CT)8AC
ISSR3	(CT)8GC
ISSR4	(CA)6AC
ISSR5	(CA)6GT
ISSR6	(CA)6AG
ISSR7	(CA)6GG
ISSR8	(GA)6GG
ISSR9	(CAC)3GC
ISSR10	(GAG)3GC
ISSR11	(CTC)3GC
ISSR12	(GTG)3GC
ISSR13	GAG(CAA)5
ISSR14	CTG(AG)8
ISSR15	(AG)8TG
ISSR16	(ATG)5
ISSR17	(AG)8
ISSR18	(CCA)5

أجري التفاعل التسلسلي البوليميرازي في حجم نهائي قدره 25 ميكروليتر، حيث استخدم 50 نانوغرام من الحمض النووي و12.5 ميكروليتر من 2 X PCR Master Mix، الذي تم الحصول عليه من شركة Promega الحاوي على المكونات التالية : Taq-Polymerase ، dNTPs ، $MgCl_2$ ، و20 بيكومول من المرئسة، أجريت عملية التضخيم Amplification في جهاز المدور الحراري من شركة APOLLO,USA موديل ATC401 وفق البرنامج الحراري التالي:

- تثبيت درجة الحرارة على 94 م° لمدة 5 دقائق ثم :

I- فصل Denaturation وهي مرحلة انفصال شريطي DNA عن بعضهما ، وذلك بتعريضه لحرارة 94 م° مدة 30 ثانية، تؤدي إلى وقف التفاعلات الأنزيمية وفصل سلسلتي DNA عن بعضهما لتصبحا سلسلتين مفردتين.

II-التحام Annealing وهي مرحلة التحام المرئسة على القطعة الأصلية من DNA عن طريق تخفيض درجة الحرارة إلى 35-65 م° مدة 45 ثانية، وذلك تبعاً لطول المرئسة وتركيبها من الأسس الآزوتية، حيث تلتصق المرئسة على DNA في المكان المناسب، ويقوم أنزيم البوليميراز في إكمال السلسلة المتممة ومضاعفة سلسلة DNA.

III- استطالة Extension وهي مرحلة تركيب السلسلة الجديدة المكملّة للقطعة الأصلية من DNA، باستخدام نيكليوتيدات مفردة ثلاثية الفوسفات ATP ، CTP ، GTP ، TTP وبمساعدة أنزيم البوليميراز، من خلال رفع درجة الحرارة إلى 75 م°، لمدة دقيقة ونصف.

-إعادة الخطوات (I-II-III) 35 مرة. ثم تركت العينات مدة 7 دقائق على حرارة 72 م° لاتمام التفاعل. بعد انتهاء هذا التفاعل تم الحصول على عدد كبير من سلاسل DNA.

حفظت العينات في درجة حرارة -20 م° لتفصل الحزم بعدها بالرحلان الكهربائي على هلامه أغاروز.

3-2-12-4 الرحلان الكهربائي والتلوين والتصوير لنواتج PCR :

تم فصل نواتج عمليات التضخيم في جهاز الرحلان الكهربائي على هلام من الأغاروز ذات تركيز 2% في محلول 1X TBE (Sambrook *et al.*, 1989) بوجود مؤشر ذو وزن جزيئي 1kp. استمر الترحيل لمدة ثلاث ساعات على 90 فولت، وصبغت الهلامة في محلول الإيثيديوم برومايد Ethidium bromide، وصورت الهلامة بوجود الأشعة فوق البنفسجية وذلك للكشف عن التعددية الشكلية polymorphism

3-2-13 التحليل الإحصائي Statistical analysis:

استخدم التصميم العشوائي الكامل (Completely Randomized Design) لتصميم التجربة، واستخدم برنامج التحليل الإحصائي SPSS. 17 لمقارنة المتوسطات وحساب أقل فرق معنوي (LSD) على مستوى معنوية 0.01.

الفصل الرابع
النتائج والمناقشة
RESULTS AND DISCUSSION

4- النتائج والمناقشة:

4-1 مرحلة الزرع الأولي للعقل الساقية:

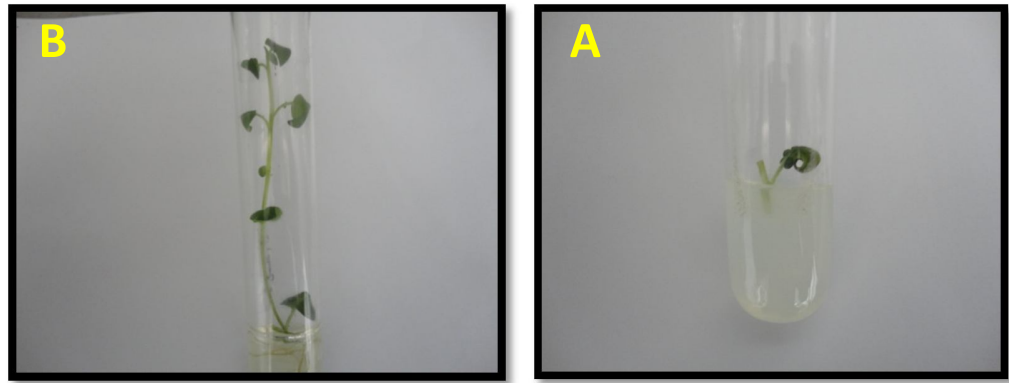
تم الحصول على نتائج جيدة عند استخدام هيبوكلوريت الصوديوم (NaOCl) بتركيز 0.5% لمدة 10 دقائق في التطهير السطحي لدرنات كل من الصنفين بنبلا وبورين، حيث بلغت نسبة العينات السليمة (83% و 80%) على التوالي، و بلغت نسبة العينات التي أبدت استجابة للنمو من العينات السليمة في كل من الصنفين بنبلا وبورين (100% و 100%) على التوالي. وهذه النتيجة تتوافق مع كثير من الأبحاث التي أشارت إلى أهمية هيبوكلوريت الصوديوم في تعقيم الأجزاء النباتية المختلفة لنبات البطاطا

(Love , 1987 ; Al Maarri et al.,2012). تم استخدام مادة هيبوكلوريت الصوديوم NaOCl نظراً لفعاليتها في عمليات التطهير السطحي في العديد من النباتات المزروعة مخبرياً، حيث تتميز هذه المادة بفعالية عالية في تطهير الخزعات النباتية قليلة التلوث السطحي، خاصة إذا استخدمت بالتركيز المناسبة مقارنة مع مواد أخرى مثل هيبوكلوريت الكالسيوم، والذي يعزى انخفاض تأثيره إلى انخفاض معدل نفاذيته عبر الأغشية الخلوية (Pevalek and Jelaska, 1987، المعري، 1995).

أما بالنسبة لمعدلات التلوث في الزراعات الثانوية فقد كانت منخفضة جداً، وتعود نسب التلوث هذه إما لعدم كفاية تعقيم الأدوات المستخدمة بالحرارة أثناء الزراعة، أو لخطأ في العمل أو لتلوث عرضي أثناء إجراء عمليات الزرع، علماً أن الزراعات الملوثة كانت تستبعد ولم تدخل مطلقاً في القراءات والإحصاءات.

4-2 مرحلة إكثار الخزعات النباتية :

تم إكثار النباتات الناتجة من مرحلة الزرع الأولي مرة كل أربعة أسابيع (الشكل 7) ، وذلك بمعدل خمس مرات بحيث تم الحصول على العدد الكافي من المادة النباتية لتنفيذ تجارب البحث.



شكل 7 : زرع الخزعات النباتية في مرحلة الإكثار.

A : عند الزراعة ، B : بعد 4 أسابيع من الزرع.

4-3 العوامل المؤثرة في عزل البروتوبلاست :

4-3-1 تأثير المعاملة بثيوسلفات الفضة أثناء طور الإكثار:

بينت النتائج في الجدول (6) أن استخدام STS يؤثر وبشكل معنوي في طول النبات وفي متوسط طول المسافات العقدية ومساحة المسطح الورقي، وقد وجدت فروق معنوية بين الأصناف وبين التراكيز ($p \leq 0.01$) ، حيث تأثر الصنف بورين بإضافة STS أكثر من الصنف بنيلا، فقد سجل أقل طول للنبات في الصنفين بنيلا و بورين (8.40 ± 0.96 سم و 3.93 ± 0.43 سم) على التوالي، عند استخدام التركيز 75 ميكرومول، وأقل متوسط طول للمسافات العقدية في الصنف بنيلا (1.36 ± 0.14 سم) عند التركيز 50 ميكرومول، وعند التركيزين 75 و 100 ميكرو مول (0.47 ± 0.08 سم و 0.47 ± 0.05 سم) على التوالي

في الصنف بورين، ولم تسجل فروق معنوية في متوسط طول المسافات العقدية بين التراكيز 50 و 75 و 100 ميكرومول في الصنف بنيلا، وهذا يتوافق مع ما

حصل عليه Ehsanpour and Jones (2001)، حيث وجد أن زيادة تركيز ثيوسلفات الفضة في وسط الزرع من 50 إلى 100 ميكرومول لم يؤدِ إلى انخفاض معنوي في طول المسافات العقدية في صنف البطاطا Delaware، وقد تم الحصول على أكبر زيادة في المسطح الورقي في الصنف بنيلا عند التركيز 75 ميكرومول (569.1 ± 70.60 مم²) ودون وجود فروق معنوية عند التراكيز 50 و 100 ميكرومول، أما بالنسبة للصنف بورين فقد تم الحصول على أكبر مسطح الورقي عند استخدام التراكيز 25 و 50 ميكرومول (1399.54 ± 204.40 مم² و 1477.75 ± 245.59 مم²) على التوالي، وهذا يوافق ما حصل عليه Ehsanpour and Jones (2001)، حيث وجد أن استخدام STS بتراكيز 50-100 ميكرومول يؤدي إنتاج مسطح ورقي أكبر كمصدر للمادة النباتية لعزل البروتوبلاست. ويقع التركيز الأمثل من STS لنمو عقل البطاطا بشكل طبيعي في صنف البطاطا Delaware ضمن المدى 50-100 ميكرومول، وهذا يوافق ما ذكره Mollers وزملاؤه (1992) حيث تؤدي إضافة STS بتراكيز منخفضة إلى وسط الزرع في البطاطا المزروعة مخبرياً إلى زيادة في المسطح الورقي، وقد تراوحت هذه الزيادة بين 1.5 و 2.3 ضعف وذلك بالنسبة لـ 20 سلالة ثنائية الصيغة الصبغية من البطاطا *S. tuberosum*، وذلك بالمقارنة مع الشاهد المزروع في وسط خالٍ من STS.

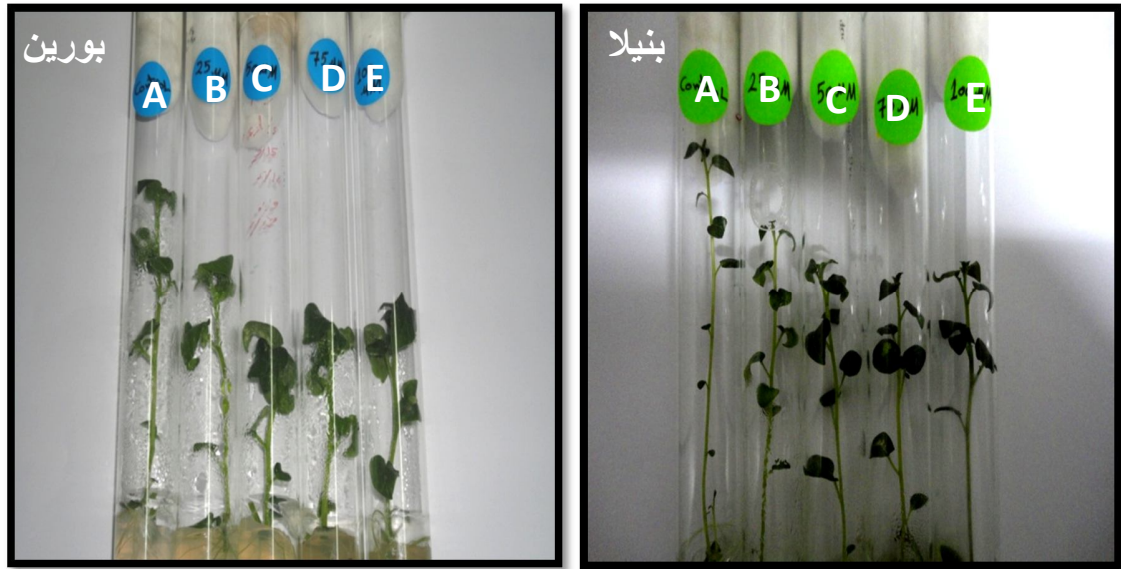
إن الهرمون النباتي الإثيلين هو المسؤول عن نقص مساحة الأوراق لسلاسل البطاطا المكاثرة مخبرياً ضمن أوعية محكمة الإغلاق. بالتالي فإن تثبيط تأثير الإثيلين باستخدام بعض المركبات مثل STS يؤدي إلى إعادة عقل البطاطا إلى نموها الطبيعي، و الحصول على مسطح ورقي أكبر وزيادة كثافة وحيوية البروتوبلاست المعزولة منها، ويقلل كذلك من استطالة السلاسلات (Gary et al., 1985).

وقد بيّن Hussey and Stacy (1981) أنه عند أخذ 1 مل من غاز أوعية النمو المغلقة فإن النموات الضعيفة في النمو تراكفت مع زيادة قدرها 3 أضعاف في تركيز غاز الإثيلين، وبيّن الشكل (8) تأثير التراكيز المختلفة من STS في بعض الصفات المورفولوجية في الصنفين المدروسين.

جدول 6: تأثير تراكيز STS في بعض الصفات المورفولوجية في الصنفين المدروسين.

LSD 1%	متوسط مساحة المسطح الورقي (م ²)		LSD 1%	متوسط طول المسافات العقدية (سم)		LSD 1%	متوسط طول النبات (سم)		تركيز STS (µm)
	بورين	بنيل		بورين	بنيل		بورين	بنيل	
73.197	869.0±73.79 ^c	298.9±33.16 ^e	0.087	1.94±0.17 ^f	2.25±0.16 ^g	0.524	9.66±0.88 ^d	13.85±0.79 ^e	0
	1399.54±204.40 ^a	462.8±32.19 ^d		1.06±0.09 ^c	1.55±0.14 ^e		5.76±0.52 ^b	9.45±1.19 ^d	25
	1477.75±245.59^a	550.4±100.3 ^c		0.67±0.14 ^b	1.36±0.14^d		6.19±1.18 ^b	9.21±0.961 ^{cd}	50
	1142.05±52.34 ^b	569.1±70.60^c		0.47±0.08^a	1.43±0.16 ^d		3.93±0.43^a	8.40±0.96^c	75
	806.35±147.81 ^c	564.4±94.64 ^c		0.47±0.05^a	1.38±0.22 ^d		4.60±0.44^a	9.40±1.00 ^d	100

- الأرقام المتشاركة بحرف أو أكثر لا يوجد بينها فروق معنوية (تحليل ANOVA باستخدام برنامج SPSS على مستوى معنوية 0.01).



شكل 8: تأثير تراكيز STS في بعض الصفات المورفولوجية في الصنفين المدروسين.
A: الشاهد، B: التركيز $25\mu\text{m}$ ، C: التركيز $50\mu\text{m}$ ، D: التركيز $75\mu\text{m}$ ، E: التركيز $100\mu\text{m}$.

يبين الجدول (7) أن إضافة STS إلى وسط الزرع يؤدي إلى زيادة كثافة وحيوية البروتوبلاست المعزولة بالمقارنة مع الشاهد، وقد بلغت أعلى كثافة من البروتوبلاست المعزولة في الصنفين بنيل و بورين (1.70 ± 0.06 مليون بروتوبلاست/مل و 1.63 ± 0.06 مليون بروتوبلاست/مل) على التوالي، عند استخدام التركيز 50 ميكرومول وبفروق غير معنوية بين الصنفين، وعند هذا التركيز تم الحصول على أعلى حيوية من البروتوبلاست المعزولة وبفروق معنوية بين الصنفين بنيل و بورين ($82.91 \pm 2.33\%$ و $73.82 \pm 2.39\%$) على التوالي. وهذا يوافق ما ذكره Avihai وزملاؤه (1988) أن كثافة البروتوبلاست المعزولة من أنسجة نباتية مزروعة في وسط مضاف له STS، أعلى من تلك المعزولة من أنسجة مزروعة في وسط خالٍ من STS، وبين Tican وزملاؤه (2011) أن إضافة STS إلى وسط الزرع في صنف البطاطا *S.chacoens*، أدى إلى زيادة كثافة البروتوبلاست المعزولة. كما تؤكد ما ذكره Veen (1987) أن معاملة عقل البطاطا بـ STS يوفر مادة نباتية مناسبة لعزل البروتوبلاست. وقد ذكر Mussell وزملاؤه

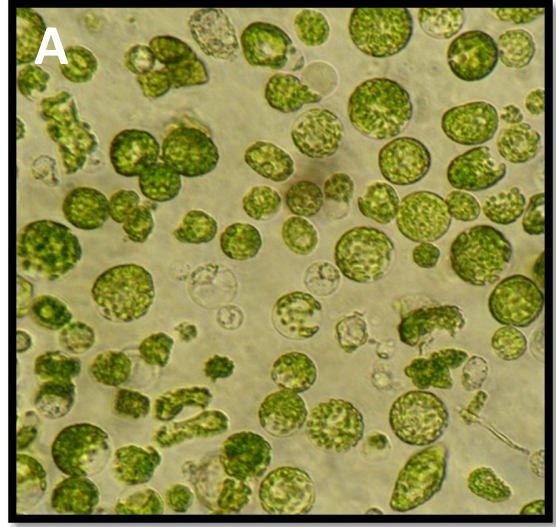
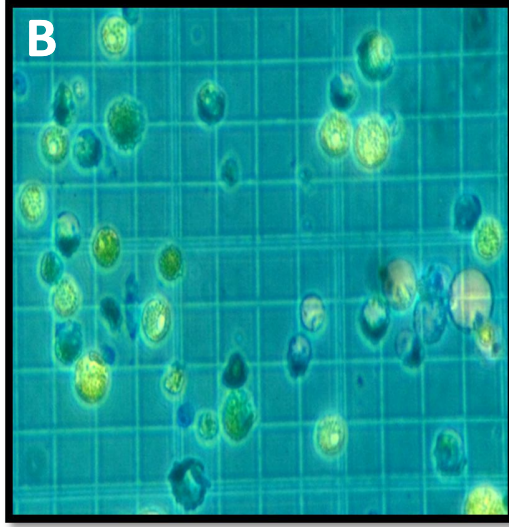
(1986) أن تشكل الإثيلين ينخفض أثناء العزل الأنزيمي للبروتوبلاست من أنسجة البطاطا النامية بوجود STS. وذكر Perla وزملاؤه (1988) أن إضافة STS يزيد وبشكل كبير من كثافة البروتوبلاست المعزولة من النباتات المزروعة مخبرياً في صنف البطاطا Berolina وذلك عن طريق زيادة مساحة المسطح الورقي. هناك فرضيتان لتأثير STS في كثافة وحيوية البروتوبلاست : **الفرضية الأولى** هي زيادة نسبة نصل الورقة إلى أنسجة الساق بوجود STS، وبالتالي تزداد كثافة البروتوبلاست المعزولة من ميزوفيل الورقة. **الفرضية الثانية** هي أن أنسجة الورقة المأخوذة من نموات مزروعة في وسط يحوي STS تكون أكثر مقاومة للإجهاد الناتج عن التحضين ضمن المحلول الأنزيمي (Tican et al., 2011).

ويبين الشكلان 9 و 10 كثافة وحيوية البروتوبلاست عند استخدام وسط خالٍ من STS ووسط يحوي STS بتركيز 0.50 ميكرومول.

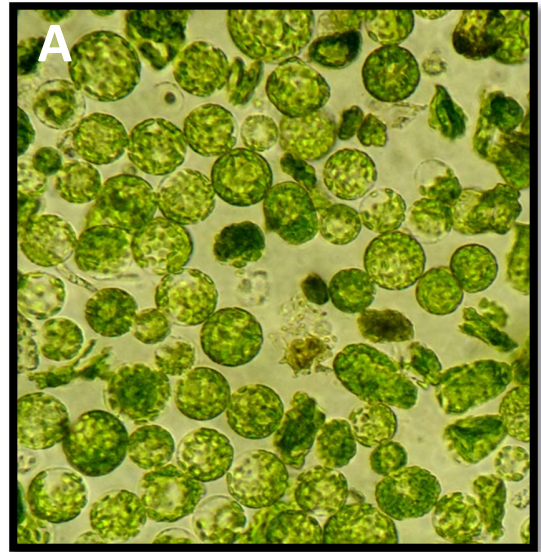
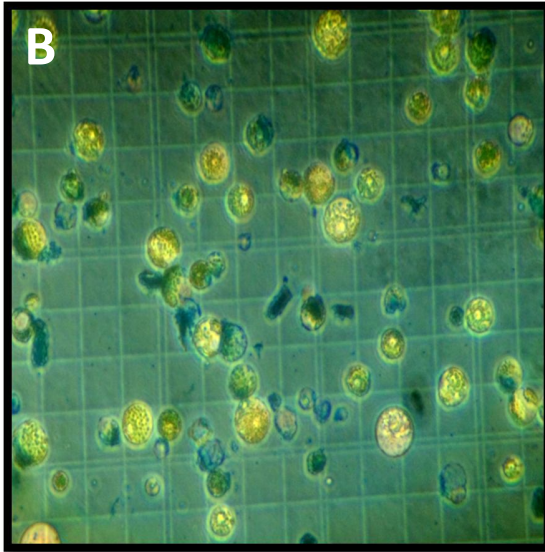
جدول 7: تأثير تراكيز STS في كثافة وحيوية البروتوبلاست المعزولة في الصنفين المدروسين.

LSD 1%	متوسط حيوية البروتوبلاست (%)		LSD 1%	متوسط كثافة البروتوبلاست $\times 10^6$ (بروتوبلاست/مل)		تركيز STS (μM)
	بورين	بنبلا		بورين	بنبلا	
2.29	62.65 $\pm$ 5.64 ^c	71.0 $\pm$ 5.53 ^{bc}	0.36	0.65 $\pm$ 0.07 ^b	0.79 $\pm$ 0.60 ^b	0
	74.22 $\pm$ 3.31 ^b	75.23 $\pm$ 4.03 ^b		0.80 $\pm$ 0.03 ^b	0.79 $\pm$ 0.05 ^b	25
	73.82$\pm$2.39^b	82.91$\pm$2.33^a		1.63$\pm$0.06^a	1.70$\pm$0.06^a	50
	73.0 $\pm$ 3.25 ^b	84.38 $\pm$ 2.85 ^a		0.80 $\pm$ 0.04 ^b	1.44 $\pm$ 0.08 ^a	75
	65.34 $\pm$ 3.21 ^d	67.31 $\pm$ 2.97 ^d		0.78 $\pm$ 0.03 ^b	0.68 $\pm$ 0.03 ^b	100

1- لأرقام المشاركة بحرف أو أكثر لا يوجد بينها فروق معنوية (تحليل ANOVA باستخدام برنامج SPSS على مستوى معنوية 0.01).



شكل 9: تأثير التركيز 0.00 ميكرومول من STS في كثافة وحيوية البروتوبلاست في الصنف بنيل. A: ضمن محلول العزل ، B: على شريحة عد الخلايا.



شكل 10: تأثير التركيز 50 ميكرومول من STS في كثافة وحيوية البروتوبلاست في الصنف بنيل. A: ضمن محلول العزل ، B: على شريحة عد الخلايا.

4-3-2 تأثير نوع و تركيز منظم الضغط الأسموزي :

يؤثر الضغط الأسموزي لمحلول عزل البروتوبلاست بشكل كبير في كمية ونوعية البروتوبلاست المعزولة، حيث يبين الجدول (8) وجود فروق معنوية بين الصنفين المدروسين وبتأثير تراكيز المانيتول المختلفة المستخدمة في وسط العزل ($p < 0.01$). وقد بلغت أكبر كثافة من البروتوبلاست المعزولة في الصنف بنيلا عند استخدام التركيز 0.75 مول (1.67 ± 0.08 مليون بروتوبلاست/مل)، وعند هذا التركيز تم الحصول على أعلى نسبة حيوية ($87.82 \pm 2.77\%$)، بينما كانت أعلى كثافة في الصنف بورين عند التركيز 0.5 مول (1.85 ± 0.06 مليون بروتوبلاست/مل) وكانت أعلى حيوية ($86.05 \pm 2.76\%$). وسجلت أقل كثافة و حيوية للبروتوبلاست المعزولة عند استخدام التركيز 0.25 مول وذلك في كل من الصنفين بنيلا و بورين. ويبين الشكلان 11 و 12 تأثير استخدام المانيتول بتركيز 0.25 و 0.75 مول في كثافة وحيوية البروتوبلاست في الصنف بنيلا . الضغط الأسموزي الأمثل لمحلول عزل البروتوبلاست يختلف حسب النوع والصنف، فهو

0.3 مول مانيتول في النوع *S. chacoence* و 0.4 مول في النوع *S. tuberosum*

(Grun and chu ,1978) .

وفي هذا البحث وجدنا أن التركيز الأمثل من المانيتول في الصنف بنيلا 0.75 مول وفي الصنف بورين 0.5 مول وهذا يخالف ما حصل عليه Ehsanpour and Jones (2001) بأن التركيز المثالي من المانيتول في صنف البطاطا Delaware هو 0.4 مول. ووجد Kikuta وزملاؤه (1984) أن التركيز المثالي من المانيتول بالنسبة لصنف البطاطا May Queen هو 0.6 مول. يعزى الاختلاف في النتائج إلى اختلاف التركيب الوراثي بين الأصناف وهذا واضح من خلال مقارنة النتائج التي تم الحصول عليها مع نتائج الآخرين.

جدول 8: تأثير تراكيز مختلفة من المانيتول في كثافة وحيوية البروتوبلاست المعزولة في الصنفين المدروسين.

LSD 1%	متوسط حيوية البروتوبلاست (%)		LSD 1%	متوسط كثافة البروتوبلاست $\times 10^6$ (بروتوبلاست/مل)		تركيز المانيتول (M)
	بورين	بنيلا		بورين	بنيلا	
1.724	0 ^h	0 ^h	0.076	0 ^h	0 ^h	0
	27.66±4.59 ^f	2.86±1.17 ^g		0.18±0.03 ^g	0.3±0.08 ^f	0.25
	86.05±2.76^b	81.82±3.02 ^c		1.85±0.06^a	1.16±0.35 ^c	0.50
	76.87±2.69 ^d	87.82±2.77^a		0.85±0.03 ^d	1.67±0.08^b	0.75
	67.65±3.31 ^e	69.03±3.69 ^e		0.76±0.03 ^e	0.86±0.07 ^d	1.00

-الأرقام المتشاركة بحرف أو أكثر لا يوجد بينها فروق معنوية (تحليل ANOVA باستخدام برنامج SPSS على مستوى معنوية 0.01).

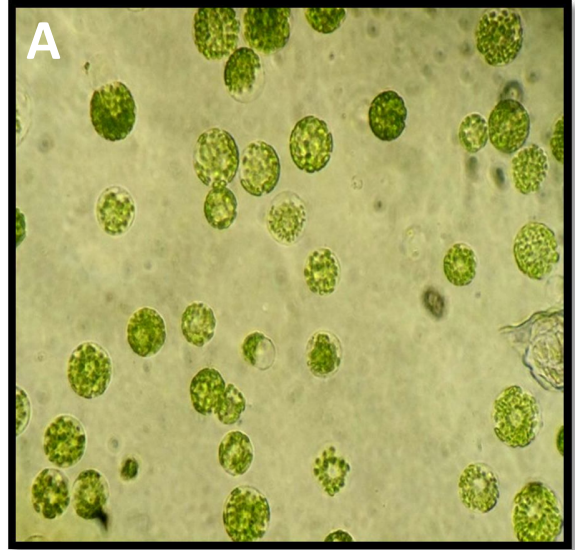
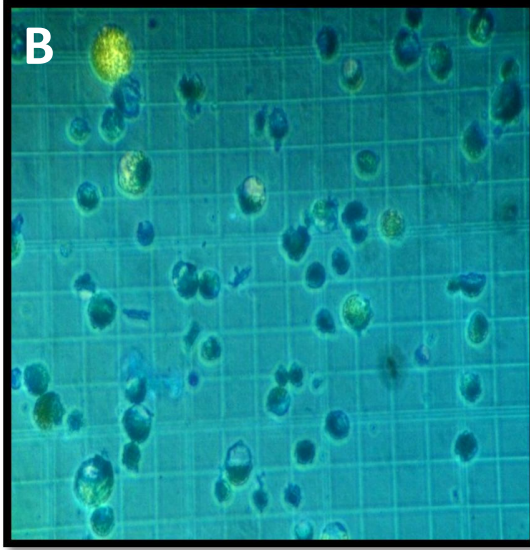
وبيّن الجدول (9) أنه عند استخدام السكرز كمنظم للضغط الأسموزي بدلاً من المانيتول، فإن أعلى كثافة من البروتوبلاست المعزولة تم الحصول عليها عند استخدام التركيز 0.5 مول من السكرز في كل من الصنفين بنيلا و بورين، ولكن مع وجود فروق معنوية ($p < 0.01$) بين الصنفين عند هذا التركيز (1.07 ± 0.08 مليون بروتوبلاست/مل و 0.94 ± 0.03 مليون بروتوبلاست/مل) على التوالي. و كانت أعلى حيوية عند استخدام هذا التركيز وبفروق غير معنوية بين الصنفين ($76.89 \pm 4.67\%$ و $75.39 \pm 3.34\%$) على التوالي .

جدول 9: تأثير تراكيز مختلفة من السكر في كثافة وحيوية البروتوبلاست المعزولة في الصنفين المدروسين.

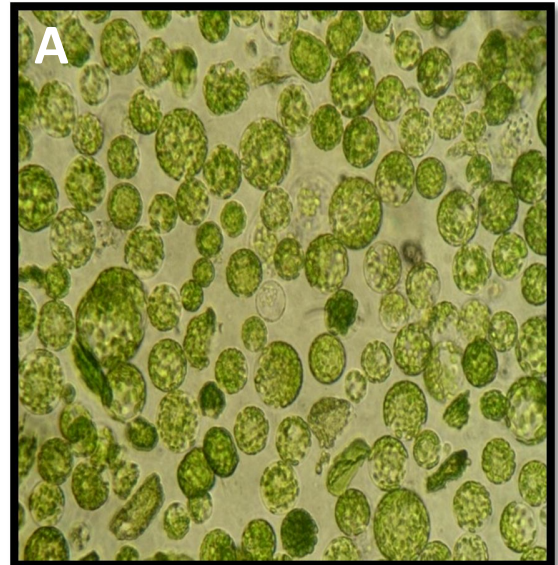
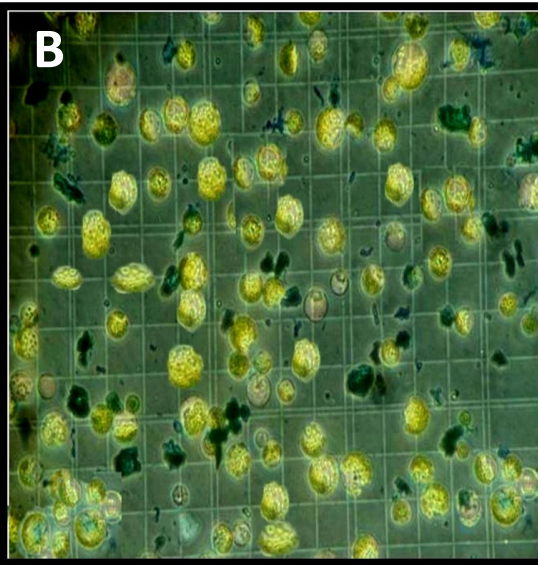
LSD 1%	متوسط حيوية البروتوبلاست (%)		LSD 1%	متوسط كثافة البروتوبلاست $\times 10^6$ (بروتوبلاست/مل)		تركيز السكر (M)
	بورين	بنيل		بورين	بنيل	
1.740	0 ^d	0 ^d	0.028	0 ^f	0 ^f	0
	15.82±2.17 ^c	15.65±2.34 ^c		0.27±0.04 ^e	0.27±0.04 ^e	0.25
	75.39±3.34^a	76.89±4.67^a		0.94±0.03^b	1.07±0.08^a	0.50
	29.31±4.54 ^b	28.8±4.04 ^b		0.44±0.56 ^c	0.37±0.07 ^d	0.75
	0 ^d	0 ^d		0 ^f	0 ^f	1.00

-الأرقام المتشاركة بحرف أو أكثر لا يوجد بينها فروق معنوية (تحليل ANOVA باستخدام برنامج SPSS على مستوى معنوية 0.01).

يفسر ارتفاع كثافة وحيوية البروتوبلاست المعزولة في كل من الصنفين المدروسين، عند استخدام المانيتول كمنظم للضغط الأسموزي في محلول العزل مقارنة مع السكر، وذلك لأن المانيتول لا يدخل في الاستقلاب الغذائي للنبات، فهو يعمل كمنظم أسموزي خامل حيث يتسرب ببطء إلى داخل الخلية (Kikuta *et al.*, 1984).



شكل 11: تأثير التركيز 0.25 مول من المانيتول في كثافة وحيوية البروتوبلاست في الصنف بنيل. A: ضمن محلول العزل ، B: على شريحة عد الخلايا.



شكل 12: تأثير التركيز 0.75 مول من المانيتول في كثافة وحيوية البروتوبلاست في الصنف بنيل. A: ضمن محلول العزل ، B: على شريحة عد الخلايا.

4-3-3 تأثير عمر الأوراق النباتية داخل الأنابيب أثناء طور الإكثار:

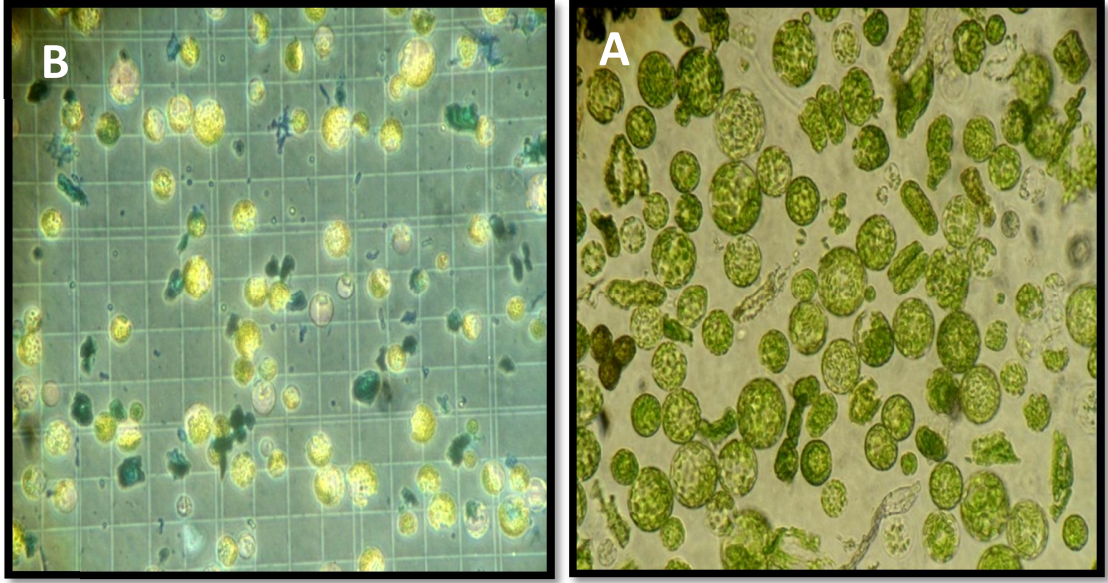
يؤثر عمر الأوراق في كثافة وحيوية البروتوبلاست المعزولة، حيث يلاحظ من الجدول (10) أن أعلى كثافة من البروتوبلاست المعزولة تم الحصول عليها عند استخدام أوراق نباتية بعمر 4 أسابيع في كل من الصنفين بنيل و بورين، وبفروق معنوية (1.93 ± 0.04 مليون بروتوبلاست/مل و 1.44 ± 1.22 مليون بروتوبلاست/مل) على التوالي، وقد بلغت أعلى حيوية عند استخدام أوراق بعمر 4 أسابيع في الصنف بنيل ($84.91 \pm 2.21\%$)، وبفروق غير معنوية عن استخدام أوراق بعمر 4 و 5 أسابيع في الصنف بورين ($82.59 \pm 4.0\%$ و $84.48 \pm 2.69\%$) على التوالي، وهذا يتوافق مع ما حصل عليه Qin chen وزملاؤه (2007) حيث تم الحصول على أعلى كثافة من البروتوبلاست المعزولة عند استخدام أوراق بعمر 30 يوم وذلك في صنف البطاطا *S.pinnatisectum*.

وقد أظهرت تجارب مماثلة أن عمر الأوراق يؤثر في كثافة البروتوبلاست في كل من البصل (Buiteveld and Creem-Molenoar, 1994) والفصّة (Levee et al., 2005). تعطي الأوراق الحديثة بروتوبلاست ذات كثافة وحيوية أعلى، وذلك لأنها تحوي كميات كبيرة من خلايا الميزوفيل ذات الجدر الخلوية منخفضة الثخانة، بسبب ارتفاع معدل الانقسام الخلوي فيها، إضافة إلى انخفاض نسبة تراكم المواد الليغنينية فيها (Babaoglu, 2000). ويبين الشكلان 13 و 14 كثافة وحيوية البروتوبلاست في الصنف بورين عند استخدام أوراق بعمر 4 و 7 أسابيع.

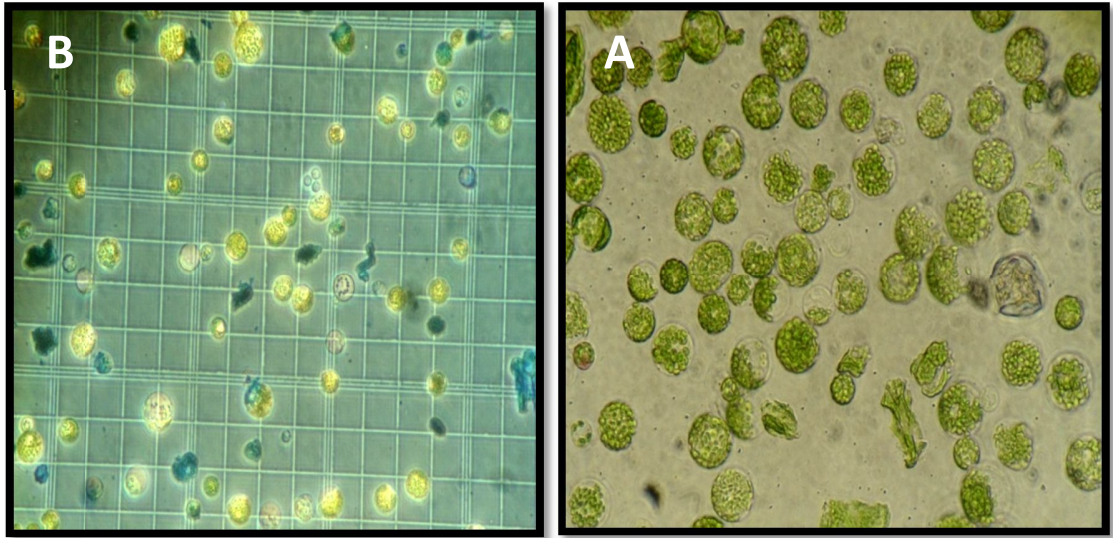
جدول 10: تأثير عمر الأوراق النباتية في كثافة وحيوية البروتوبلاست المعزولة في الصنفين المدروسين.

LSD 1%	متوسط حيوية البروتوبلاست (%)		LSD 1%	متوسط كثافة البروتوبلاست $\times 10^6$ (بروتوبلاست/مل)		عمر الأوراق (أسبوع)
	بورين	بنيلا		بورين	بنيلا	
1.976	82.59±4.0 ^{ab}	84.91±2.21 ^a	0.0415	1.44±1.22 ^b	1.93±0.04 ^a	4
	84.48±2.69 ^a	80.21±2.89 ^c		0.84±0.04 ^d	1.31±0.10 ^c	5
	73.37±2.20 ^e	75.72±2.88 ^d		0.74±0.06 ^{ef}	0.79±0.03 ^e	6
	73.12±2.24 ^e	67.33±5.25 ^f		0.75±0.03 ^e	0.70±0.03 ^{ef}	7

١- لأرقام المتشاركة بحرف أو أكثر لا يوجد بينها فروق معنوية (تحليل ANOVA باستخدام برنامج SPSS على مستوى معنوية 0.01).



شكل 13: كثافة وحيوية البروتوبلاست في الصنف بورين عند استخدام أوراق نباتية بعمر 4 أسابيع .
A: ضمن محلول العزل ، B: على شريحة عد الخلايا.



شكل 14: كثافة وحيوية البروتوبلاست في الصنف بورين عند استخدام أوراق نباتية بعمر 7 أسابيع .
A: ضمن محلول العزل ، B: على شريحة عد الخلايا.

4-4 مرحلة زرع البروتوبلاست Protoplast Culture Stage:

تعتمد قدرة البروتوبلاست في تشكيل الجدار الخلوي والانقسام ومتابعة النمو بشكل كبير على الوسط المستخدم في زرعها، وبشكل خاص على طبيعة وتركيز منظمات النمو النباتية (Anjum,1998). ويلاحظ من الجدول (11) أن البروتوبلاست استعادت القدرة على تشكيل الجدار الخلوي بعد يومين في كل من الصنفين بنيلا وبورين عند استخدام الزيوتين بتركيز (1-1.5) مغ/ل (شكل 15)، وهذا يتوافق مع ما حصل عليه Kikuta وزملاؤه (1984) وذلك عند استخدام الزيوتين بتركيز 1 مغ/ل في صنف البطاطا May Queen .

جدول 11: تأثير تراكيز مختلفة من Z في تشكيل الجدار الخلوي و بدء الإنقسام في الصنفين المدروسين .

بدء الإنقسام الخلوي (يوم)		تشكل الجدار الخلوي (يوم)		تركيز Z (مغ/ل)
بورين	بنيلا	بورين	بنيلا	
-	-	-	-	0
8-6	7-5	3	2	0.5
5-4	4-3	2	2	1
5-4	4-3	2	2	1.5

ويبين الجدول (11) أن البروتوبلاست بدأت بالإنقسام الخلوي الأول بعد 3-4 أيام بالنسبة للصنف بنيلا، وبعد 4-5 أيام بالنسبة للصنف بورين، عند استخدام وسط زرع يحوي Z بتركيز (1-1.5) مغ/ل، وهذا يخالف Thomas (1981) الذي ذكر أن بدء الإنقسام الخلوي في صنف البطاطا Maris Bard و Maris

Piper كان بعد 3-4 أيام من الزرع في وسط يحوي Z بتركيز 0.5 مغ/ل، بينما الخلايا التي زرعت في وسط خالٍ من Z لم يطرأ عليها أي انقسام وتحولت إلى اللون البني وماتت بعد أربعة أيام من زرعها، وذلك في صنف البطاطا بنيلا وبورين (شكل 16). ويلاحظ من الجدول (12) وجود فروق معنوية بين الأصناف وبين التراكيز ($p < 0.01$) في نسبة تشكل المستعمرات الخلوية، و تم تسجيل أعلى نسبة لتشكيل المستعمرات الخلوية عند استخدام الزيوتين بتركيز 1 مغ/ل في صنف البطاطا بنيلا وبورين (1.58 ± 0.1 % و 1.27 ± 0.09 %) على التوالي، وبفروق معنوية بين الصنفين وهذا يوافق ما حصل عليه Kikuta وزملاؤه (1984) حيث بلغت نسبة تشكل المستعمرات الخلوية في الصنف May Queen 5 % عند استخدام Z بتركيز 1 مغ/ل، و يخالف ما حصل عليه Tican (1996) حيث بلغت أعلى نسبة لتشكيل المستعمرات الخلوية في الصنف Desiree 18.3 % عند استخدام Z بتركيز 0.5 مغ/ل، وقد بلغت هذه النسبة 0.48 % عند التركيز 1 مغ/ل. وهذا يخالف أيضاً ما حصل عليه Anjum (1998) في الصنف Maris Piper حيث بلغت النسبة المئوية للبروتوبلاست التي شكلت مستعمرات خلوية 15 % وذلك عند استخدام Z بتركيز 0.5 مغ/ل.

إن نسبة تشكل المستعمرات الخلوية في صنف البطاطا بنيلا أعلى مقارنة مع الصنف بورين. وهذا يعود إلى أن الطرز الوراثية المختلفة، تتطلب هرمونات وعناصر مغذية محددة لبدء وتحفيز إنقسام البروتوبلاست فيها (Anjum, 1998)، ويبيّن الشكل 17 نسبة تشكل المستعمرات الخلوية بعد 4 أسابيع من زرع البروتوبلاست في الصنف بنيلا.

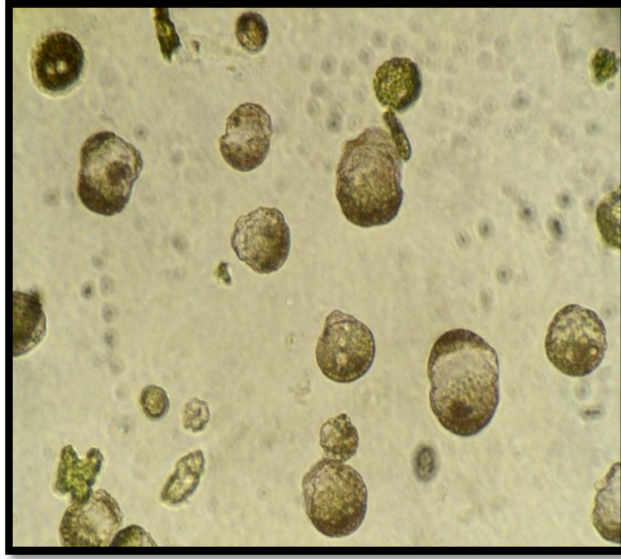
جدول 12 : تأثير تراكيز مختلفة من Z في نسبة تشكل المستعمرات الخلوية في الصنفين المدروسين.

تركيز Z (مغ/ل)	نسبة تشكل المستعمرات الخلوية (%)		LSD 1%
	بنيل	بورين	
0	0 ^f	0 ^f	0.035
0.5	0.80±0.02 ^d	0.69±0.02 ^c	
1	1.58±0.10 ^a	1.27±0.09 ^b	
1.5	1.58±0.10 ^a	1.19±0.05 ^c	

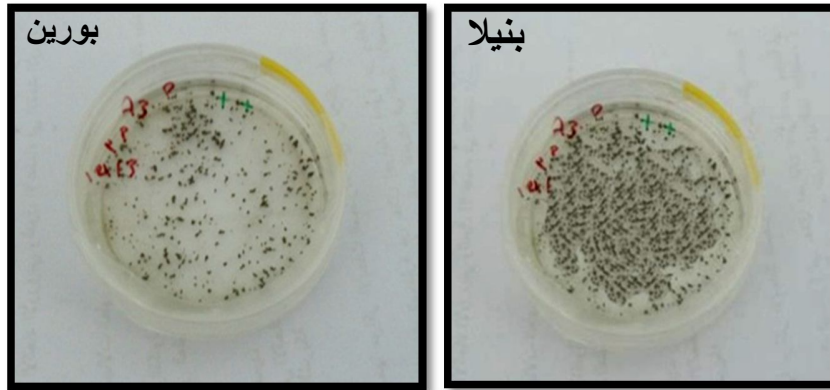
١- لأرقام المتشاركة بحرف أو أكثر لا يوجد بينها فروق معنوية (تحليل ANOVA باستخدام برنامج SPSS على مستوى معنوية 0.01).



شكل 15 : تشكل الجدار الخلوي بعد يومين من زرع البروتوبلاست.



شكل 16: البروتوبلاست بعد أربعة أيام من زرعها في وسط خالٍ من Z.



شكل 17: المستعمرات الخلوية بعد 4 أسابيع من زرع البروتوبلاست في وسط يحوي 1.5 مغ/ل Z في الصنفين المدروسين.

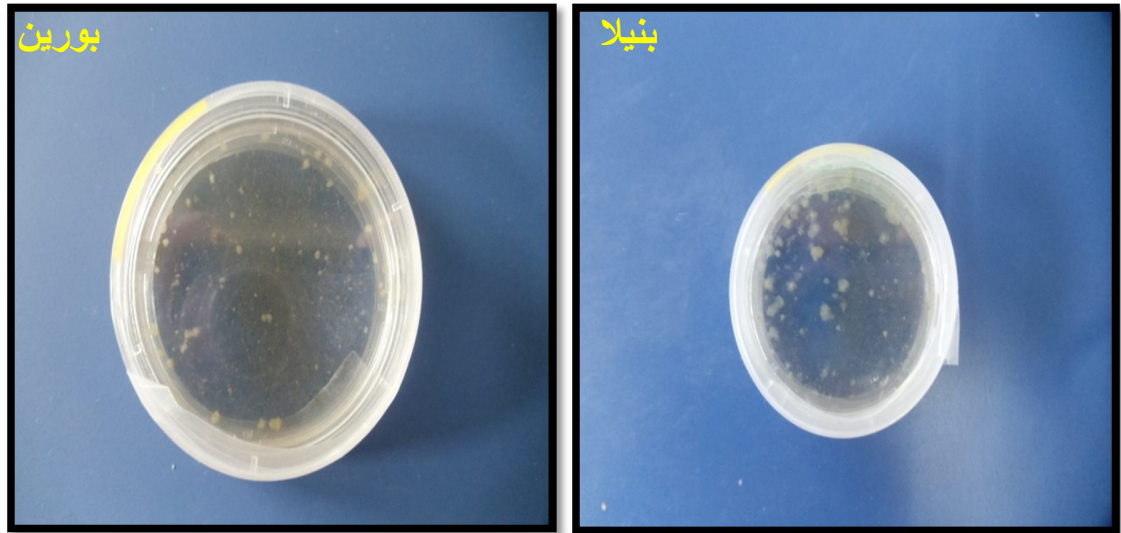
4-5 مرحلة استحداث الكالوس Callus Initiation Stage :

يبين الجدول (13) أن أعلى نسبة لتشكيل الكالوس بدءاً من المستعمرات الخلوية، كانت عند استخدام NAA بتركيز 0.1 مغ/ل في الصنفين بنيلا وبورين ($51.12 \pm 8.77\%$ و $18.96 \pm 2.81\%$) على التوالي، وبفروق معنوية بين الصنفين، مع وجود فرق غير معنوي عن التركيز 0.25 مغ/ل في الصنف بورين، و لم يتم الحصول على كالوس عند استخدام وسط خالٍ من NAA. وهذا يتوافق مع ما حصل عليه Tican (1996) حيث بلغت نسبة تشكل الكالوس في صنف البطاطا Desiree 20.8% عند استخدام NAA بتركيز 0.1 مغ/ل، بينما في الطراز الثنائي 687061/1 كانت النسبة 43% ، و هذا يوافق أيضاً ما حصل عليه Ehsanpour and Jones (2001) حيث بلغت نسبة تشكل الكالوس بدءاً من البروتوبلاست في صنف البطاطا Delaware 0.1-0.5% ، و يبين الشكل 18 الكالوس الناتج من المستعمرات الخلوية في الصنفين بنيلا وبورين.

جدول 13: تأثير تراكيز مختلفة من NAA في نسبة تشكل الكالوس في الصنفين المدروسين.

LSD 1%	نسبة تشكل الكالوس (%)		تركيز NAA (مغ/ل)
	بورين	بنيلا	
2.382	0 ^f	0 ^f	0
	18.96 ± 2.81^d	51.12 ± 8.77^a	0.1
	16.68 ± 2.33^d	41.31 ± 3.99^b	0.25
	12.22 ± 2.98^c	31.22 ± 2.11^c	0.5

- الأرقام المتشاركة بحرف أو أكثر لا يوجد بينها فروق معنوية (تحليل ANOVA باستخدام برنامج SPSS على مستوى معنوية 0.01).



شكل 18 : كالوس ناتج من المستعمرات الخلوية في الصنفين المدروسين.

4-6 مرحلة تشكل النموات من الكالوس Regeneration Phase :

يبين الجدول (14) أن استخدام Z بتركيز 1.5 مغ/ل أعطى أعلى نسبة لتشكيل البراعم الخضرية في الصنف بنيل ($81.25 \pm 6.25\%$)، وذلك بفرق معنوي عن التركيز 1.5 مغ/ل من BAP حيث بلغت نسبة تشكل البراعم الخضرية عند هذا التركيز ($43.75 \pm 6.25\%$)، وهذا يخالف ما حصل عليه Thomas (1981) في الصنف Maris Bard حيث بلغت نسبة تشكل البراعم الخضرية 50% عند استخدام Z بتركيز 0.5 مغ/ل. وسجل أعلى متوسط لعدد النموات المتشكلة من الكالوس في الصنف بنيل (1.06 ± 0.33) عند استخدام Z بتركيز 1.5 مغ/ل، بينما لم يتم الحصول على أي نموات عند استخدام 6-BAP بتركيزات مختلفة، وهذا يخالف ما حصل عليه Gary وزملاؤه (1985) في صنف البطاطا Majestic حيث بلغت نسبة تشكل النموات 71% عند استخدام Z بتركيز 0.5 مغ/ل .

وبين Ehsanpour and Jones (2001) في صنف البطاطا Delaware أن نسبة تشكل النموات 20-30 % عند استخدام Z بتركيز 1 مغ/ل، وهذا مشابه لما ذكره Shepard and Totten (1977) في صنف

البطاطا Russet Burbank. بينما كانت نسبة تشكل النموات 78% في صنف البطاطا Desiree و 66% في صنف البطاطا Maris Piper، عند استخدام Z بتركيز 1 مغ/ل (Anjum,1998). وقد استخدم Z بتركيز 1 مغ/ل في التجديد في كل من الأنواع *S. toxicarium*، *S. sisymbriifolium* و *S. integrifolium* (Oda et al.,2006) وبيّن الشكل 19 النموات المتجددة بدءاً من كالوس الصنف بنيل. و لم يتم الحصول على نموات متجددة من كالوس الصنف بورين عند استخدام كل من Z و BAP-6 وهذا يوافق نتائج Thomas (1981)، حيث أن الكالوس الناتج من بروتوبلاست صنف البطاطا Maris Piper لم يعط أية نموات في وسط التجديد، وكذلك وجد Haberlach وزملاؤه (1985) أن De jons 77-1 أحد الطرز الوراثية في صنف البطاطا *S. tuberosum*، لم يتجدد رغم أنه أعطى أعداد كبيرة من الكالوس الجيد. يستنتج من ذلك أن تجدد النموات من الكالوس الناتج من البروتوبلاست يعتمد على الطراز الوراثي (Vamling and Glimelius,1990).

وقد وجد أن Z أكثر فعالية من BAP-6 في تجديد النموات بدءاً من كالوس البروتوبلاست في الصنف بنيل وفي الأنواع الأخرى في الجنس *Solanum*، وربما يعود السبب في ذلك إلى كون Z هو سيتوكينين منتج طبيعياً ، وهذا مايجعل امتصاصه أسهل من قبل الخلايا النباتية ، بينما BAP-6 سيتوكينين صناعي (Sadohara ,1993) .

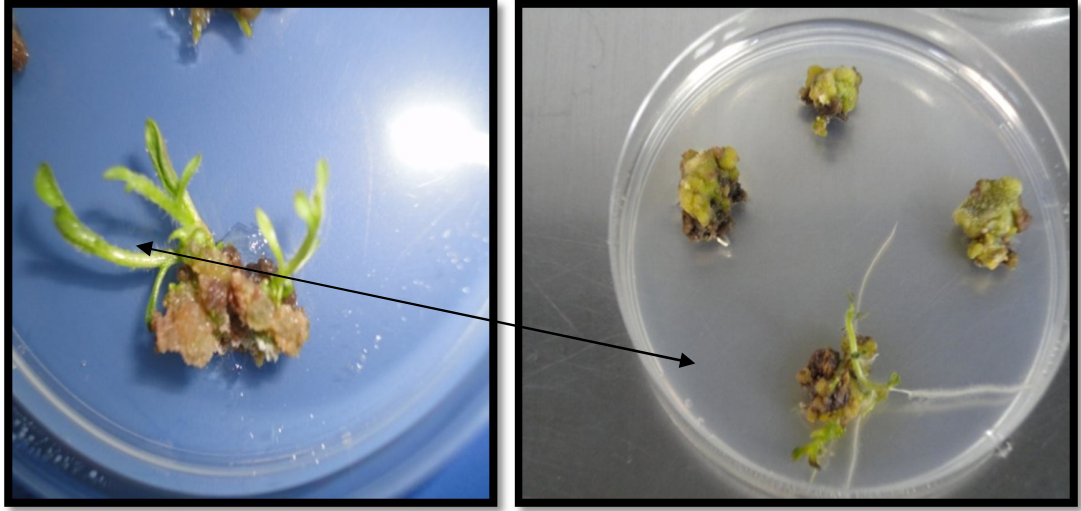
جدول 14: تأثير تراكيز مختلفة من Z و BAP في نسبة تشكل البراعم الخضرية وعدد النموات في الصنف بنيلا.

LSD 1%	متوسط عدد النموات المتكونة /كالوس		LSD 1%	نسبة تشكل البراعم الخضرية (%)		تركيز Z(مغ/ل)
	بورين	بنيلا		بورين	بنيلا	
0.38	0	0 ^c	20.10	0	0 ^d	0
	0	0.13±0.08 ^b		0	25±0.00 ^c	0.5
	0	0.25±0.14 ^b		0	58.33±8.33 ^b	1
	0	1.06±0.33 ^a		0	81.25±6.25 ^a	1.5
	0	0.31±0.15 ^b		0	73.75±6.25 ^{bc}	2
	0	0 ^c		0	25±0.00 ^c	0.5
	0	0 ^c		0	33.33±8.33 ^c	1
	0	0 ^c		0	43.75±6.25 ^{bc}	1.5

١- لأرقام المتشاركة بحرف أو أكثر لا يوجد بينها فروق معنوية (تحليل ANOVA باستخدام برنامج SPSS على مستوى معنوية 0.01).

ويبين الجدول (15) مراحل عزل وزرع وتجديد البروتوبلاست في الصنف بنيلا، ويبين الشكل 22 مراحل

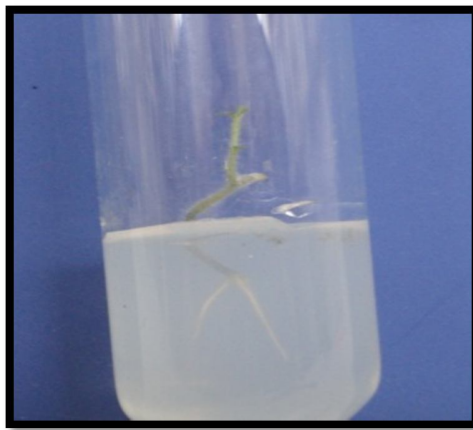
تجديد الصنف بنيلا بدءاً من البروتوبلاست المعزولة.



شكل 19: النموات المتجددة بدءاً من كالوس الصنف بنيلا.

4-7 مرحلة إكثار النموات المتجددة من الكالوس:

نقلت النموات الناتجة من مرحلة التجديد إلى وسط الإكثار الذي احتوى المحلول المعدني لـ MS، وبعد أسبوعين لوحظ تشكل الجذور في قاعدة النموات الخضرية المنقولة (شكل 20)، وبعد أربعة أسابيع تم الحصول على نباتات كاملة النمو، تم إكثارها ثلاث مرات بهدف تأمين المادة النباتية الكافية لإجراء عملية التقسية وتطبيق تقنية ISSR .



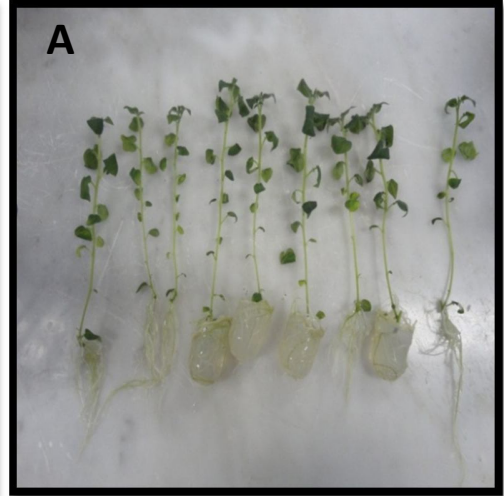
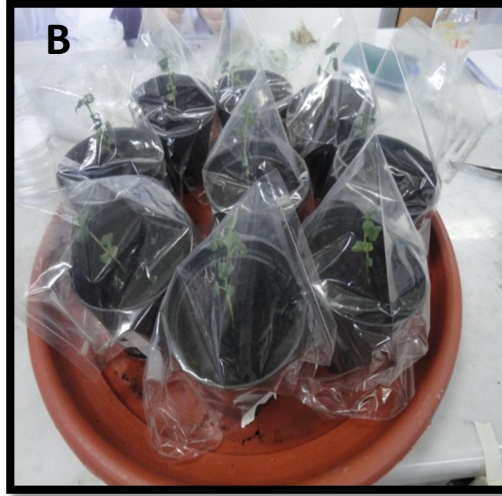
شكل 20 : نبات متجدد بعد 2 أسبوع من زرعها في وسط MS .

4-8 مرحلة التقسية Acclimatization Stage:

إن مسامات النباتات المكاثرة بالأنسجة لا تستجيب للظروف الخارجية بالإنغلاق مما يؤدي لفقد محتواها من الماء بسرعة وذبول الأوراق (Brainerd and Fuchigami, 1982).

وأشار Broome and Zimmerman (1985) إلى ضرورة التدرج خلال عملية التقسية، حيث أقيت النباتات ضمن غرفة النمو لمدة شهر ثم تم نقلها إلى ظروف البيت البلاستيكي.

بعد شهرين من التقسية بلغت نسبة النجاح 92%، وبلغ متوسط طول النباتات 26.6 سم، و بعد 3 أشهر من التقسية تم الحصول على درينات بلغ متوسط قطر 30 درينة منها 13.17 مم ومتوسط وزنها 2.06 غ، ويبين الشكل 21 مراحل عملية التقسية في الصنف بنيلا.

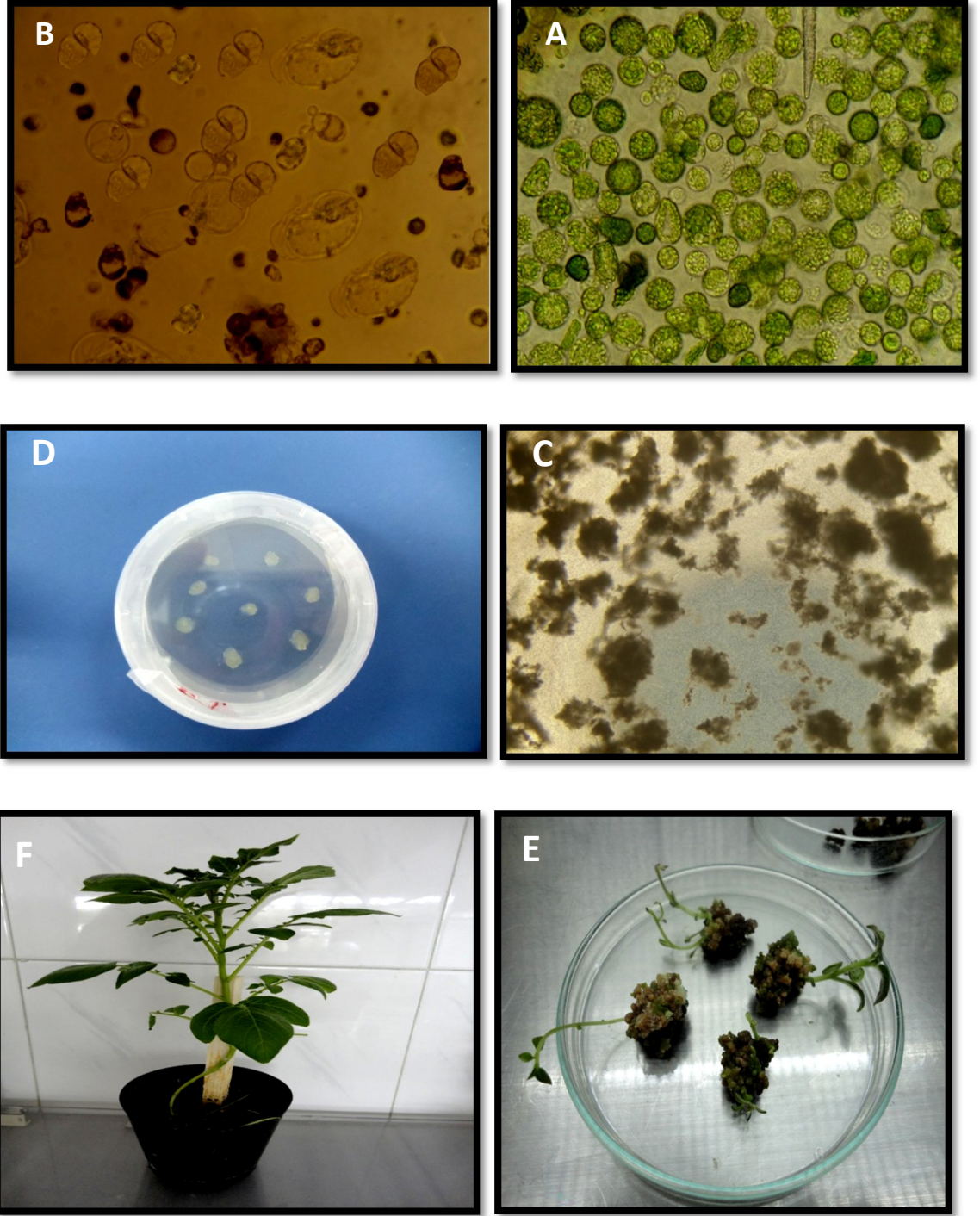


شكل 21 : مراحل عملية التفسية في الصنف بنيل.

A: النباتات المنقولة لمرحلة التفسية، B: تغطية النباتات بالأكياس الشفافة ، C: بعد 30 يوم من التفسية، D: بعد 60 يوم من عملية التفسية، E: تشكل الدريبات بعد 90 يوم من عملية التفسية.

جدول 15 : مراحل عزل وزرع وتجديد البروتوبلاست في الصنف بنيلا.

مرحلة الزرع	متطلبات الوسط المغذي	الفترة الزمنية
تحضير المادة النباتية لعزل البروتوبلاست	وسط SH + ثيوسلفات الفضة	4 أسابيع
عزل البروتوبلاست	محلول بلزمة +محلول أنزيمي + منظم للضغط الأسموزي++ + محلول غسيل	14- 16 ساعة
زرع البروتوبلاست	وسط مغذي سائل + منظم للضغط الأسموزي+ هرمونات (GA3 + NAA+ Z)	4 أسابيع
استحداث الكالوس	وسط مغذي سائل ثم صلب + منظم للضغط الأسموزي+ هرمونات (BAP+ NAA)	8 أسابيع
تجديد الكالوس	وسط مغذي صلب + منظم للضغط الأسموزي +هرمونات (IAA + Z)	(12-16) أسابيع
مرحلة إكثار النموات المتجددة	وسط MS	(24-28) أسابيع
مرحلة التقسية	عناصر مغذية ¼ MS +مبيد فطري+تورب معقم +ظروف خاصة	(28-36) أسابيع



شكل 22: مراحل تجديد الصنف بنيلاً بدءاً من البروتوبلاست المعزولة.

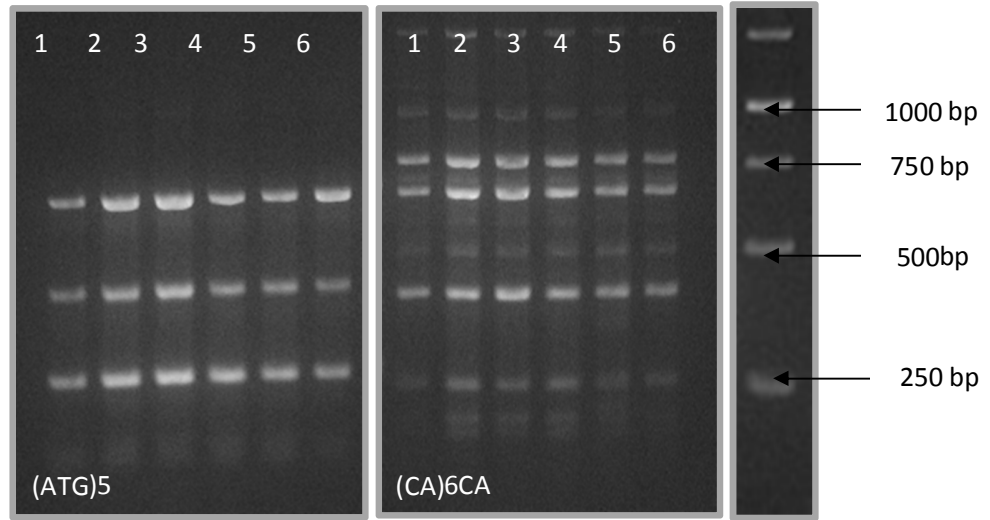
A: البروتوبلاست ضمن محلول العزل، B: الخلايا بعد انتهاء الإقسام الأول، C: المستعمرات الخلوية بعد 30 يوم من الزرع في وسط النمو، D: الكالوس بعد 60 يوم من الزرع في وسط استحداث الكالوس، E: الحصول على نموات بدءاً من كالوس البروتوبلاست، F: نبات بعد شهر من عملية التنقية.

4-9 التوصيف الجزيئي على مستوى DNA باستخدام تقنية ISSR :

استخدمت تقنية ISSR للحكم على مدى التباين الوراثي بين النبات الأم في الصنف بنيلا وبين 5 سلالات تم الحصول عليها من كالوس البروتوبلاست في الصنف بنيلا، حيث يبين الجدول 16 أن جميع السلالات الناتجة تماثل النبات الأم بنسبة 100% (شكل 23)، وقد تراوح عدد الحزم لكل مرئسة بين 3 حزم كحد أدنى عند استخدام المرئستين رقم 3 و16، و8 حزم كحد أعلى عند استخدام المرئستين رقم 4 و 18، وبينت النتائج أن النباتات غير متباينة على مستوى قطع DNA ، وقد توافقت نتائجنا مع ما حصل عليه Ehsanpour and Jones (2001) حيث كانت النباتات الناتجة من زرع البروتوبلاست في صنف البطاطا Delaware مشابهة للنبات الأم بشكل أساسي، وبين Gary وزملاؤه (1985) أن 57% من النباتات المتجددة من بروتوبلاست صنف البطاطا Majestic كانت تملك نفس العدد الصبغي للنبات الأم $(n=4x=48)$ ،

جدول 16: عدد الحزم الكلي و النسبة المئوية للتباين الشكلي الناتج عن المرئسات المستخدمة في ISSR للصنف بنيل و 5 سلالات متجددة منه.

المرئسات	عدد الحزم	نسبة التباين %
ISSR1	5	0
ISSR2	7	0
ISSR3	3	0
ISSR4	8	0
ISSR5	5	0
ISSR6	4	0
ISSR7	7	0
ISSR8	4	0
ISSR9	7	0
ISSR10	4	0
ISSR11	6	0
ISSR12	7	0
ISSR13	7	0
ISSR14	7	0
ISSR15	7	0
ISSR16	3	0
ISSR17	5	0
ISSR18	8	0



شكل 23 : هلامة الأغاروز لملاحظة التعددية الشكلية الناتجة عن استخدام المرئسات في 5 عينات (2-6) من السلالات الخضرية بالمقارنة مع النبات الأم من الصنف بنيلا (1) بوجود معلم ذو وزن جزيئي 1 kp.

الفصل الخامس

الاستنتاجات والتوصيات

CONCLUSION AND RECOMENDATION

1-5 الاستنتاجات

1- تم في هذا البحث وضع تقنية لعزل البروتوبلاست من أوراق صنف البطاطا بنيلا وبورين، لأول مرة في سوريا، وتمت دراسة تأثير بعض العوامل في كثافة وحيوية البروتوبلاست المعزولة.

2- بيّنت النتائج أنه تم الحصول على أعلى كثافة وحيوية من البروتوبلاست المعزولة، عند استخدام أوراق نباتية مأخوذة من نباتات مزروعة في وسط يحوي ثيوسلفات الفضة بتركيز 50 ميكرومول .

3- تم الحصول على أعلى كثافة وحيوية من البروتوبلاست المعزولة، عند استخدام المانيتول كمنظم للضغط الأسموزي بالمقارنة مع السكروز وذلك بتركيز 0.75 مول بالنسبة للصنف بنيلا و 0.50 مول للصنف بورين.

4- إن استخدام أوراق نباتية بعمر أربعة أسابيع أعطى أعلى كثافة وحيوية من البروتوبلاست المعزولة وذلك في كل من الصنفين بنيلا وبورين.

5- سجّلت أعلى نسبة لتشكل المستعمرات الخلوية بدءاً من البروتوبلاست، عند استخدام هرمون الزياتين بتركيز 1 مغ /ل في كل من الصنفين بنيلا وبورين.

6- سجّلت أعلى نسبة لتشكل الكالوس بدءاً من المستعمرات الخلوية، عند استخدام هرمون نفتالين أسيتك أسيد بتركيز 0.1 مغ /ل في كل من الصنفين بنيلا وبورين.

7- تم الحصول على أعلى نسبة لتشكل البراعم الخضرية ولمتوسط عدد النموات المتشكلة عند استخدام هرمون الزياتين بتركيز 1.5 مغ/ل في الصنف بنيلا، بينما لم يتم الحصول على نموات بدءاً من كالوس البروتوبلاست في الصنف بورين.

8- كانت النباتات الناتجة في الصنف بنيلا مشابهة للنبات الأم ، ولم تظهر أي تباين وراثي على مستوى DNA .

9- تم الحصول على نباتات كاملة بدءاً من البروتوبلاست المعزولة في الصنف بنيلا، ونمت النباتات بشكل طبيعي في ظروف البيت البلاستيكي ، حتى مرحلة تشكل الدريعات .

2-5 المقترحات والتوصيات

1- متابعة أمثلة و تحسين ظروف عزل وزرع و تجديد البروتوبلاست في كل من الصنفين المدروسين بنيلا

وبورين.

2- أمثلة تقنية عزل وزرع وتجديد البروتوبلاست في أنواع وأصناف البطاطا الأخرى المهمة اقتصادياً

ومحلياً.

3- إجراء تجارب حول استخدام الأجزاء النباتية الأخرى مثل الدرنة و الجذر في عزل البروتوبلاست.

4- تطبيق تقنية دمج البروتوبلاست بهدف التحسين الوراثي للبطاطا وللأنواع النباتية الأخرى.

5- أمثلة تقنية عزل وزرع وتجديد البروتوبلاست في الأنواع النباتية الأخرى المهمة اقتصادياً.

6- استخدام تقنية عزل البروتوبلاست في الدراسات الخلوية و الوراثة.

الفصل السادس: المراجع

REFERENCES

المراجع العربية

- 1- الرفاعي ، توفيق و الشوبكي ، سمير .2002. تقنيات القرن 21 لتحسين النبات باستخدام زراعة الأنسجة، الطبعة الأولى ، دار الفكر العربي، القاهرة، ص: 271-290.
- 2- المجموعة الإحصائية الزراعية السنوية لعام 2010. الجمهورية العربية السورية، وزارة الزراعة، مديرية الاقتصاد الزراعي ، قسم الإحصاء.
- 3- المعري ، خليل . 1995. إكثار النخيل بزراعة الأنسجة النباتية ، جامعة الملك فيصل، السعودية، ص: 77-96.
- 4-المعري ، خليل ؛ خيتي ، مأمون؛ الطويل ،خالد وعبد القادر أحمد . 2008 . تكوين درينات دقيقة في بعض أصناف البطاطا بواسطة زراعة الأنسجة ،ندوة البطاطا- جامعة دمشق.
- 5- الموصلي ، حسين علي . 2000. البطاطا (البطاطس)- زراعتها وأفاتها- تخزينها وتصنيع منتجاتها، الطبعة الأولى ، ص : 14.
- 6- بوراس، متيادي .1989. إنتاج الخضار. منشورات جامعة دمشق، كلية الزراعة، ص 438 – 460.
- 7- بوراس ، متيادي و أبو ترابي ، بسام و البسيط ، إبراهيم . 2006. إنتاج محاصيل الخضار- الجزء النظري- جامعة دمشق، ص: 396.
- 8- سيد، محمود هيثم . 2001. استخدام مؤشرات من الدنا في انتخاب مورثات المقاومة للأمراض في الشعير، جامعة دمشق، كلية الزراعة، أطروحة دكتوراه.
- 9-مسعود، كاسر . 1981. أساسيات تربية النبات، منشورات جامعة حلب، كلية الزراعة، ص: 350.
- 10-منظمة الأغذية والزراعة للأمم المتحدة ومكتب الكومنولث الزراعي (FAO). 1991. المرشد الوجيز في أمراض النبات. إصدار الجمعية العربية لوقاية النبات، ص: 600.

References

- 1-Albiski, F. 1995. Methods of biotechnology and immunological chemistry to obtain disease resistant tomatoes. PhD thesis. University of Boshken. Federal Russia, pp: 278.
- 2-Albiski, F., Ismail, I. and Helali, O. 2001. Seed potato production through tissue culture. National technical report. FAO, Syria.
- 3-ALMaarri, K., Massa, R. and Albiski, F. 2012. Evaluation of some therapies and meristem culture to eliminate Potato Y potyvirus from infected potato plants. (accepted for publication).
- 4-Ammiraju, J.S.S., Dholakia, B.B., Santra, D.K., Singh, H., Lagu, M.D., Tamhankar, S.A., Dhaliwal, H.S., Rao, V.S., Gupta, V.S. and Ranjekar, P.K. 2001. Identification of inter simple sequece repeat (ISSR) markers associated with seed size in wheat. Theor. Appl. Genet, 102:726-732.
- 5-Anjum, M.A. 1998. Effect of protoplast source and media on growth and regenerability of protoplast-derived calluses of *Solanum tuberosum* L. Acta. Physiol. Planta., 20(2):129-133
- 6- Avetisov, V.A., Krivoshchapova, G.I., Melik-Sarkisoy, O.S. 1987. Some characteristics of potato callus protoplast culture. Soviet Plant Physiol., 34: 484-490.
- 7-Avihai, P., Aviv, D. and Galun, E. 1988. Ethylene and *in vitro* culture of potato: suppression of ethylene generation vastly improves protoplast yield, plating efficiency and transient expression of an alien gene. Plant Cell Rep., 7:403-406.
- 8-Ayad, W.G., Hodgkin, T., Jaradat, A. and Rao, V.R. 1997. Molecular genetic techniques for plant genetic resources. Report for an IPGRI workshop, IPGRI, Rome, Italy, 11-12.
- 9-Babaoglu, M. 2000. Protoplast isolation in Lupin (*Lupinus mutabilis*: sweet) Determination of optimum explant sources and isolation conditions. Turkish Journal of Botanical, 24: 177-185.
- 10-Bergounioux, C., Perennes, C., Brown, S.C. and Gadai, P. 1988. Cytometric analysis of growth-regulator-dependent transcription and cell-cycle progression in *Petunia* protoplast cultures. Planta, 175:500-505.
- 11- Binder, K.A., Wegner, L.H., Heidecker, M. and Zimmermann, U. 2003. Gating of Cl⁻ currents in protoplasts from the marine alga *Valonia utricularis* depends on the transmembrane Cl⁻ gradient and is affected by enzymatic cell wall degradation. J. Membr. Biol., 191:165-178
- 12-Binding, H. 1966. Regeneration und Verschmelzung nachter Laubmoos protoplasten. Z Pflanzenphysiol. 55: 305-321.

- 13- Bokelmann, G.S. and Roest, S. 1983. Plant regeneration from protoplasts of potato (*Solanum tuberosum* cv. Bintje). *Z. Pflanzenphysiol.*, 109: 259-265.
- 14-Bornet, B., Goraguer, F., Joy, G. and Branchard, M. 2002. Genetic diversity in European and Argentinian cultivated potatoes (*Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum*) detected by inter-simple sequence repeats (ISSRs). *Genome* 45:481-484.
- 15- Brainerd, K.E. and Fuchigami, L.H. 1982. Acclimatization of aseptically cultured apple plants to low relative humidity. *J. Hort.Sci.*, 106:515-518.
- 16-Broome, O.C. and Zimmerman, R.H. 1985. Culture of shoot meristems fruit plant cell culture and somatic cell. *Genetics of plants*, 1: 111-122.
- 17-Buiteveld, J. and Greemers-Molenaar, J. 1994. Plant regeneration from protoplast isolated from suspension culture of Leek (*Allium ampeloprasum* L.). *Plant Sci.*, 100:203-210.
- 18-Butenko, R.G., Kuchko, A.A., Vitenko, V.A. and Avetisov, V.A. 1977. Production and cultivation of isolated protoplasts from mesophyll of leaves of *Solanum tuberosum* L. and *Solanum chacoense* Bitt. *Soviet plant physiology*, 24:541-546.
- 19-Cardi, T., Puite, K.J., Sree Ramulu, K. 1990. Plant regeneration from mesophyll protoplasts of *Solanum cornmersonii* Dun. *Plant Sci.*, 70:215-221.
- 20-Chabane, D., Assani, A., Bouguedoura, N., Haicour, R. and Ducreux, G. 2007. Induction of callus formation from date palm protoplasts by means of nurse culture. *Comptes Rendus Biol.*, 330: 392-401.
- 21-Chang, M.M. and Loescher, W.H. 1991. Effects of preconditioning and isolation conditions on potato (*Solanum tuberosum* L. cv. Russet Burbank) protoplast yield for shoot regeneration and electroporation. *Plant Sci.*, 73:103-109.
- 22-Chen, L.P., Zhang, M.F., Xiao, Q.B., Wu, J.G. and Hirata, Y. 2004. Plant regeneration from hypocotyl protoplasts of red cabbage (*Brassica oleracea*) by using nurse cultures. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 77: 133-138.
- 23-Cheng, J., Saunders, J.A. and Sinden, L.S. 1995. Colorado potato beetle resistant somatic hybrid potato plants produced via protoplast electrofusion. *In vitro Cell Dev. Biol.*, 31: 90-95.
- 24- Cocking, E.C. 1960. A method for isolation of plant protoplasts and vacuoles. *Nature*, 187: 962-963.
- 25- Constabel, F., Kirkpatrick, J.W. and Gamborg, O.L. 1973. Callus formation from mesophyll protoplasts of *Pisum sativum*. *Can. J. Bot.*, 51 :2105--2106.

- 26-Creissen, G.P.1984. Protoplast regeneration and selection for toxin resistance in *Solanum*.PhD thesis.University of london.
- 27- Creissen, G.P.and Karp, A.1985. Karyotypic changes in potato plants regenerated from protoplasts.plant cell.Tissue and organ culture, 4:171-182.
- 28-Da Silva, R.F. and Yuffá, A.M. 2006.Viability in protoplasts and cell suspensions of *Coffea arabica* cv. Catimor. 9 (5).
- 29-Davey, M.R., Power, J.B.and Lowe, K.C.2000a. Plant protoplasts. In: Spier RE, editor. Encyclopaedia of cell technology. New York, USA7 John Wiley and Sons,p: 1034– 1042.
- 30-Davey, M.R., Anthony, P, Power, J.B.and Lowe, K.C. 2004. Protoplast applications in biotechnology. In: Goodman RM, editor. Encyclopaedia of plant and crop science.New York, USA7 Marcel Dekker, 1061–1064.
- 31-Davey, M.R., Anthony, P., Power, B.J. and Lowe, K.C. 2005. Plant protoplasts: Status and biotechnological perspectives. Biotechnological Advances, 23, 131-171.
- 32-De Bokx, J.A. and Van der Want , J.P.H.,eds. 1987. Viruses of potatoesand seed-potato production.Pudoc, wageningen, Netherlands.
- 33-Duquenne, B. Eeckhaut, T., Werbrouck, S. and Huylenbroeck, J.V. 2007. Effect of enzyme concentrations on protoplast isolation and protoplast culture of *Spathiphyllum* and *Anthurium*. Plant Cell Tiss., Organ Cult., 91: 165-173.
- 34-Ehsanpour, A.A .and Jones, M.G.K. 2001. plant regeneration from mesophyll protoplast of potato (*Solanumtuberosum* L.) cultivar Delaware using silver thiosulfate(sts),12:2.
- 35-Ellouza, O.N., Bouzidb, R.J., Sihachakrc, D., Trikid, M.A., Ducreux, G., Driraf, N. and Lakhouag, L. 2006. Production of potato intraspecific somatic hybrids with improved tolerance to PVY and *Pythium aphanidermatum*. Journal of Plant Physiology, 163 : 1321-1332.
- 36-Epsten, E. 1972. Mineral nutrition of plants: principles and perspectives.Wiley and Sons, New York.
- 37-Feher, A., Preiszner, J. and Dudits, D.1989. Differentiation of potato(*Solanum tuberosum* L.) plants from cultured leaf protoplasts. Acta Biologica Hungarica, 40:369-380.
- 38-Ferreira, D.I. and Zelcer, A. 1989. Advances in protoplast research on*Solanum*,Int. Rev.Cytology,115:1-65.
- 39-Fish, N., Karp, A. and Jones, M.G.K.1988. Production of somatic hybrids by electro- fusio in *solanum* .Thero.Appl.Genet,76:260-66.

- 40-Foulger, D. and Jones, M.G.K. 1986. Improved efficiency of genotype – dependent regeneration from protoplast of important potato cultivars . plant cell rep.,5:72-76.
- 41-Fu- Rong, G., Jian- Ying, G. and Fang- Hao, W. 2007. Application of ISSR Molecular marker in invasive plant species study. State key laboratory for Biology of plant diseases and insect pests institute of plant protection, Yunnan Agricultural university, Kunming Chin. J. Appl. Ecol., 18(4): 919-927.
- 42-Gary, P., Cresse, N. and Angela, K.1985. Karyotypic changes in potato plants regenerated from protoplasts.Plant Cell Tissue Organ Culture,4 : 171-182.
- 43-Greplova, M., Polzerova, H.and Domkarova, J . 2007. Procedure of protoplast electrofusion(in *Solanum* genus). Scientific studies 15 – Potato Research Institute Havlickuv Brod, 71-83.
- 44-Grezes, J., Thomas, D. and Thomasset, B. 1994. Factors influencing protoplast isolation from *Cofea Arabica* cells. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 36: 9 1-97.
- 45-Grun, P. and Chu, L. J.1978. Development of plants from protoplasts of *Solanum* (*Solanaceae*). Am. J. Bot., 65: 538-43.
- 46-Gui, F.R., Wan, F.H. and Guo, J.Y. 2008. Population genetics of *Ageratina denophora* using intersimple sequence repeat (ISSR) molecular markers in China. Plant Biosystems, 142 (2):255-263.
- 47-Gurr, E.1971. Synthetic dyes in biology, medicine, and chemistry. Academic Press, New York.
- 48-Haberlach, G.T., Cohen, B.A., Reichert, N.A., Baer, M.A., Towili, L.E. and Helgeson, J.1985. Isolation,culture and regeneration of protoplasts from potato and several related *Solanum* species.plant science, 39,67-74.
- 49-Harris, R., Wright, M., Byrne, M., Varnum, J., Brightwell, B. and Schubert, K.1988. Callus formation and plantlet regeneration from protoplast derived from suspension cultures of Wheat (*Triticum aestivum* L). plant cell reports, 7,337-340.
- 50-Hooley, R. and Mccarthy, D . 1980. Extracts from virus infected hypersensitive tobacco leaves are detrimental to protoplast survival. Physiol Plant Pathol .,16:25-38.
- 51-Horita, M., Moorhashi, H.and Komai, F. 2003. Produc tion of fertile somatic hybrid plants between Oriental hybridlily and *Lilium x formolongi*. Planta, 217: 597-601.

- 52- Huang, J. and Sun, S.M. 2000. Genetic diversity and relationships of sweet potato and its wild relatives in *Ipomoea* series *Batatas* (Convolvulaceae) as revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) and restriction analysis of chloroplast DNA. *Theor Appl Genet*, 100: 1050–1060.
- 53-Hunt, G.J. and Helgeson, J.p.1989. A medium and simplified procedure for growing single cells from *solanum* species. *Plant sci.*,60:251-257.
- 54-Hussey, G. and Stacey, N. J. 1981. *In vitro* propagation of potato (*Solanum tuberosum* L.) . *Ann. of Bot.*, 48: 787-96.
- 55-International Potato Center (CIP).1993. Basic techniques in plant. Lima, Peru.
- 56-Invitrogen. 2002. Growth and maintenance of insect cell lines. *Invitrogen life Technologies*. version k, www.invitrogen.com.tech-service@invitrogen.com
- 57-Ishii, S. 1988. Factors influencing protoplast viability of suspension-cultured rice cells during isolation process. *Plant Physiology*, 88: 26-29.
- 58- Jin, H., Jia, J.F. and Hao, J.G. 2003. Protoplasts from *Agrobacterium rhizogenes*-transformed cell line of *Medicago sativa* L. regenerated to hairy roots. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, 39: 208-211.
- 59-Jomori, H., Tanaka, Y. and Kaizuma, N.1995. Plant regeneration from leaf-derived calli of gentians and their protoplasts culture. *Acta Hortic.*,392:81-86.
- 60-Jones, H., Karp, A., Jones, M.G.K. 1989. Isolation, culture and regeneration of plants from potato protoplasts. *Plant Cell Rep.*, 8: 307-311.
- 61-Joshi, S.P., Gupta, V.S., Aggarwal, R.K., Ranjekar, P.K. and Brar, D.S. 2000. Genetic diversity and phylogenetic relationship as revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) polymorphism in the genus *Oryza*. *Theor Appl Genet*, 100: 1311–1320.
- 62-Kanbar, A. and Kondo, K. 2011. Efficiency of ISSR and RAPD Dominant Markers in Assessing Genetic Diversity among Japanese and Syrian Cultivars of Barley (*H. Vulgare* L.). *Res. J. Agric. and Biol. Sci.*, 7(1): 4-10.
- 63-Kao, V.N. and Michayluk, M.R. 1975. Nutritional requirements for growth of *Vicia hajstana* cells and protoplasts at a very low population density in liquid media. *Planta*. 126:105-110.
- 64-Karim, M.A. and Adachi, T .1997. Cell suspension, isolation and culture of protoplasts of *Allium cepa*. *Plant Cell Tissue, Organ Cult.*, 51: 43-47.
- 65-Karp, A.1991. Cytological techniques. In; Lindsey, K. (Ed.), *plant tissue culture manual*, 41-13.
- 66-Karp, G .2005. *Cell and Molecular Biology*. United States of America: John Wiley and Sons.

- 67-Karp, A., Kresovich, S., Bhat, K.V., Ayada, W.G. and Hodgkin, T. 1997. Molecular tools in plant genetic resources conservation: a guide to the technologies. IPGRI technical bulletin, vol.2. International Plant Genetic Resources Institute, Rome , Italy.
- 68-Kaur, N.D., Vyvadilova, M. , Klima, M. and Bechyne, M. 2006. A simple procedure for mesophyll protoplast culture and plant regeneration in *Brassica oleracea* L. and *Brassica napus* L. Plant Breed, 42(3): 103-110.
- 69-Kikuta, Y., Saito, W. and Okazawa, Y.1984. Protoplast cultures of potato: Changes in viability and initiation of cell division, Plant Tissue Culture Lett.,1: 18-21.
- 70-Khatun, S. and Flowers, T.J. 1995. The estimation of pollen viability in rice. Journal of Experimental Botany, 46(1):151-154.
- 71-Klimaszewska, K.1989. Recovery of somatic embryos and plantlets from protoplasts cultures of *larix x eurolepis*. plant cell Rep.,8:440-444.
- 72-Klliker, R., Herrmann, D. Boller, B. and Widmer, F. 2003. Swiss Mattenkee landraces, a distinct and diverse genetic resource of red clover (*Trifolium pratense* L.). Theor. Appl. Genet, 107:306-315.
- 73-Krenz, F.A., Jamar, D., Rouwendal, G.J.A. and Hall, R.D. 1990. Transfer of cytoplasm from new *Beta* CMS sources to sugar beet by asymmetric fusion. Thero. Appl. Genet,79: 390-396.
- 74-Korbin, M., Kuras, A. and Żurawicz, E. 2002. Fruit plant germplasm characterisation using molecular markers generated in RAPD and ISSR-PCR. Cell. Mol. Biol. Lett., 785-794.
- 75-Larkin, P.J.1976. Purification and viability of plant protoplasts.Planta ,128:213-216.
- 76-Laurila, J., Laakso, I., Valkonen, J.P.T., Hiltunen, R. and Pehu, E. 1996. Formation of parental-type and novel glycoalkaloids in somatic hybrids between *Solanum brevidens* and *S. tuberosum*. Plant Sci., 118: 145-155.
- 77-Levee, V., Bartand, M., Duval, M., Bilodeau, P., Aquin, S. and Vezina, L.P. 2005. An efficient system for protoplast culture alfafa (*Medicago sativa*) suitable for plant transformation and regeneration <http://www.medicago.com>, July 16.
- 78- Ling, A.P.K., Ong, C.P.L., Tee, C.S. and Hussein, S. 2009. Establishment of Protoplast Isolation Protocols of *Orthosiphon Stamineus*. American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture, 3(3): 587-596.

- 79-Ling, A.P.K., Phua, G.A.T., Tee, C.S. and Hussein, S. 2010. Optimization of Protoplast Isolation Protocols from callus of *Eurycoma longifolia*. Journal of Medicinal Plants Research, 4(17): 1778-1785.
- 80- Love, S.L., Rhodes, B.B. and Moyer, J.W. 1987. Meristem-tip culture and virus indexing of sweet potato. International Board Genetic Recourse. (IBPGR). Rome. 46 P.
- 81- Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J. 1982. Molecular cloning: Laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor/ NY.
- 82- Mattheij, W.M., Eijlander, R., Dekoning, J.R.A. and Louwes, K.M. 1992. Intraspecific hybridization between the cultivated potato *Solanum tuberosum* subspecies *tuberosum* L. and the wild species *S. circaeifolium* subsp. *circaeifolium* Bitter exhibiting resistance to *Phytophthora infestans* (Mond.) de Bary and *Globodera pallida* (Stone) Behrens. 1. Somatic hybrids. Theor. Appl. Genet., 83: 459-466.
- ., Ater, M., Benlhabib, O., Msikine, D. and Filali-Maltouf, A. 2007. Evaluation of genetic variability of sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) in north western Morocco by ISSR and RAPD markers. C R Biol. 2007 Nov; 330(11): 789-797.
- 84- Menke, U., Schilde-Rentschler, L., Ruoss, B., Zanke, C., Hemleben, V. and Ninnemann, H. 1996. Somatic hybrids between the cultivated potato *Solanum tuberosum* L. and the 1EBN wild species *Solanum pinnatisectum* Dun.: morphological and molecular characterization. Theor. Appl. Genet, 92: 617-626.
- 85- Mollers, C., Zhang, S. and Wenzel, G. 1992. The Influence of Silver thiosulfate on Potato Protoplast Cultures. Plant Breeding, 108, 12—18 .
- 86- Mullis, K., Faloona, S., Scharf, R., Saiki, O., Horn, O. and Erlich, H. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: The polymerase chain reaction. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 51, 263-273.
- 87- Mussell, H. E., Earle, L., Campbell, L.A. and Batt, S. 1986. Ethylene synthesis during protoplast formation from leaves of *Avena sativa*, Plant Sci., 47, 207-214 .
- 88- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A Revised Medium For Rapid Growth and Bioassays With Tobacco Tissue Cultures. Plant Physi., 15(1): 473-479.
- 89- Murray, M.G. and Thompson, W. F. 1980. Rapid isolation of high molecular weight DNA. Nucleic Acids Res., 8: 4321- 4325.

- 90-Nagaraju, J., Kathirvel, M., Kumar, R.R., Siddiq, E.A. and Hasnain, S.E. 2002. Genetic analysis of traditional and evolved Basmati and non-Basmati rice varieties by using fluorescence-based ISSR-PCR and SSR markers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 99: 5836-5841.
- 91-NAPC. 2008. The Syrian Agricultural Trade. GCP/SYR/006/ITA, Damascus
- 92-Navratilova, B. 2004. Protoplast cultures and protoplast fusion focused on *Brassicaceae*. *Hort. Sci. (Prague)*, 31: 140-157.
- 93-Niedz, R.P. and Sink, K.C. 1988. Multifactor analysis of environmental preconditioning of tomato seedlings on protoplasts culture and development. *J. Plant Physiol.*, 133:385-391.
- 94-Newton, C. R. and Graham, A. 1994. PCR, ^{1st} edition, Bios Scientific Publisher Ltd., UK.
- 95-Oda, N., Isshiki, S., Sadohara, T., Ozaki, Y. and Okubo, H. 2006. Establishment of protoplast culture of *Solanum sisymbriifolium*. *J. Fac. Agr., Kyushu Univ.*, 51(1):63-66.
- 96- Okamura, M., Hayashi, T. and Miazaki, S. 1984. Inhibiting effect of ammonium ion in protoplast culture of some *asteraceae* plants. *plant cell physiol.*, 25:281-286.
- 97-Ortin-Parraga, F. and Burgos, L. 2003. Isolation and culture of mesophyll protoplasts from apricot. *J. Hortic. Sci. Biotechnol.*, 78:624– 628.
- 98-Pehu, E., Gibson, R.W., Jones, M.G.K. and Karp, A. 1990. Studies on the genetic basis of resistance to potato leaf roll virus, potato virus Y and potato virus X in *Solanum brevidens* using somatic hybrids of *Solanum brevidens* and *Solanum tuberosum*. *Plant Sci.*, 69: 95-101
- 99-Perl, A., Aviv, D. and Galun, E. 1988. Ethylene and *in vitro* culture of potato : suppression of ethylene generation vastly improves protoplast yield, plating efficiency and transiency expression of an ahen gene. *plant Cell Rep.*, 7:403-406.
- 100- Pevalek, K.B. and Jelaska, S. 1987. Microclonal propagation of *Prunus avium*. *Acta Hort.*, 212:599-601.
- 101-Phillips, R. and Darrell, N.j. 1988. A simple technique for single-cell cloning of crown gall tumor tissue: *Petunia* protoplast regeneration without exogenous hormones. *Plant physiol.*, 133:447-451.
- 102- Pongchawee, K., Na-Nakorn, U., Lamseejan, S., Poompuang, S. and Phansiri, S. 2006. Factors affecting protoplast isolation and culture of Anubias Nana Engler. *International journal of botany* 2(2):193-200.

- 103-Powell, W., Morgante, M., Doyle, J.J., Mcnical, J., Tingey, S.V. and Rafalsk, I. 1996. Genepool Variation in Genus Glycine Subgenus Soja Revealed by polymorphic Nuclear and chloroplast microsatellite. *Genetics* 144: 793.
- 104-Kanbar, A. and Kondo, K. 2011. Efficiency of ISSR and RAPD Dominant Markers in Assessing Genetic Diversity among Japanese and Syrian Cultivars of Barley (*H. Vulgare* L.). *Res. J. Agric. & Biol. Sci.*, 7(1): 4-10.– 803.
- 105-Power, J.B. and Cocking, E.C. 1970. Isolation of leaf protoplasts: macromolecular uptake and growth substance response. *Journal of Experimental Botany*, 21: 64-70.
- 106-Power, J.B., Davey, M.R., Anthony, P. and Lowe, K.C. 2004. Protoplast culture and regeneration. In: Goodman RM, editor. *Encyclopaedia of plant and crop science*. New York, USA7 Marcel Dekker: 1065–1068.
- 107- Preiszner, J., Feher, A., Veisz, O., Sutka, J. and Dudits, D. 1991. Characterization of morphological variation and cold resistance in interspecific somatic hybrids between potato (*Solanum tuberosum* L.) and *S. brevidens* Phil. *Euphytica* 57:37–49.
- 108- Qi, X., Stam, P. and Lindhout, P. 1996. Comparaison and integration of four barley genetic maps. *Genome* 39: 379-394.
- 109-Qin Chen, H. Y. Li., Shi, Y.Z., Beasley, D., Bizimungu, B. and Goettel, M.S. 2007. Development of an effective protoplast fusion system for production of new potatoes with disease and insect resistance using Mexican wild potato species as gene pools. *Agr.*, 611-619.
- 110-Raikar, S.V., Braun, R.H., Bryant, C., Conner, A.J. and Christey, M.C. 2008. Efficient isolation, culture and regeneration of *Lotus corniculatus* protoplasts. *Plant Biotechnol. Reports*, 2 (3) :171-177.
- 111-Raina, S.N., Rani, V., Kojima, T. Ogihara, Y., Singh, K.P. and Devarumath, R.M. 2001. RAPD and ISSR fingerprints as useful genetic markers for analysis of genetic diversity, varietal identification, and phylogenetic relationships in peanut (*Arachis hypogaea*) cultivars and wild species. *Genome* 44:763-772.
- 112-Rethmeier, N.O.M., Janes, C.E., Snel, E.A.M., Nijkamp, H.J.J. and Hille, J. 1991. Improvement or regeneration of *Lycopersicon pennellii* protoplasts by decreasing ethylene production. *Plant Cell Rep.*, 9:539-543.

- 113-RyeMa, R., Guo, Y.D. and Pulli, S. 2003. Somatic embryogenesis and fertile green plant regeneration from suspension cell-derived protoplasts of rye (*Secale cereale* L). Plant Cell Rep., 2003;22:320–327.
- 114-Sadohara, T. 1993. Studing on the breeding of *Solanum* species by protoplast fusion. Thesis of the Master Degree, Kyushu Univ.,Fukuoka,Japan(In Japanese).
- 115-Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F.,Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A., Arnheim, N. 1985. Enzymatic amplification of b-globulin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anaemia. Science 230: 1350-1354.
- 116-Sambrook, J., Fritch, E.F. and Maniatus, T. 1989. Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- 117-Savarese, S., Andolfi, A., Cimmino, A., Carputo, D., Frusciante, L. and Evidente, A. 2009. Glycoalkaloids as Biomarkers for Recognition of Cultivated, Wild, and Somatic Hybrids of Potato. Chem. Biodiv. , 6: 437-446.
- 118-Sauvad, M.A. Brochard, P. and Boccon-Gibod, J.1990. Aprotoplast-to-plant system in chrysanthemum:differential responses among several commercial clones. Plant Cell Rep.,8:692-695.
- 119- Schenk, R.U. and Hildebrandt, A.C.1972. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. Can. J. Bot., 50: 199-204.
- 120-Sidrova,V.A., Zubko, M.K., Kuchko, A.A., Komarnitsky, L.K. and Gleba, Yu.Yu. 1987. Somatic hybridization in potato : use of gamma irradiated protoplast of *Solanum pinnatisectum* in genrtic reconstruction .Theor Appl.Genet,74:364-368.
- 121-Sim, G.E., Loh, C.S.and Goh, C.J. 1988. Direct somatic embryogenesis from protoplasts of *Citrus mitis* Blanco. Plant Cell Rep.,7:418-420.
- 122- Sinha, A., Wetten, A.C. and Caligari, P.D.S. 2003. Effect of biotic factors on the isolation of *Lupinus albus* protoplasts.Australian Journal of Botany, 51,103-109.
- 123-Shanin, E.A.1984. Isolated and culture of protoplasts : tomato In:I.K. cell culture vasil(Ed.), and somatic cell Genetics of plants ,vol.1:Laboratory , procedures and their applications.Academic press,Inc.,Orlando:381-390.
- 124-Sheahan, M.B., Rose, R.J. and McCurdy, D.W . 2007. Actin-filament-dependent remodeling of the vacuole in cultured mesophyll protoplasts. Protoplasma. 230: 141-152.

- 125-Sheen, J.1993. Protein phosphates activity is required for light-inducible gene expression in maize .EMBO journal, 12,3497-3505.
- 126-Sheen, J . 2001. Signal transduction in maize and Arabidopsis mesophyll protoplasts. Plant.Physiol. ,127: 1466-1475
- 127-Shepard, J.F. and Totten, R.E.1977. Mesophyll cell protoplasts of potato.plantsci.lett., 26:127-132.
- 128-Sheppard, W. S. and Smith D. R. 2000. Identification of African-derived bees in the Americas: A survey of methods. Ann. Entomol. Soc. Am., 93:159-176.
- 129-Songstad, D.D., Duncan, D.R.and Widholm, J.M.1988. Effect of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid,silver nitrate and norbornadiene on plant regeneration from maize callus cultures .plant cell Reports,7:262-65.
- 130- Sondhal, M.R., Chapman, M.S. and Sharp, W.R. 1980. Protoplast liberation, cell wall reconstitution and callus proliferation in *Cofea Arabica* L. callus tissue. Turrialba, 30: 161-165.
- 131-Sweigart, A., karoly, K., Jones, A. and Willis, H.J. 1999. The distribution of individual inbreeding coefficients and pairwise relatedness in population of *Mimulus guttatus*. Heredity 83:625-632.
- 132-Takebe, I., Lalib, G. and Melchers, G .1971. Regeneration of whole plants from isolated mesophyll protoplasts of tobacco. Naturwissenschaften 58: 138-320.
- 133- Tang, K., Sun, X., An, D., Power, J.B., Cocking, E.C. and Davey, M.R. 2001. A simple and rapid procedure to establish embryogenic cell suspensions as a source of protoplasts for efficient plant regeneration from two Chinese commercial rice cultivars. Plant Cell, Tissue Organ Cult., 66:149– 53.
- 134-Tautz, D. 1989. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. Nucleic Acids Res.,17:6463-6471.
- 135- Taylor, W.J. and West, D.W. 1980. The Use of Evan's Blue Stain to Test the Survival of Plant Cells after Exposure to High Salt and High Osmotic Pressure.Journal of Experimental Botany, 31(121): 571-576.
- 136-Taylor, W.J., Rebecca, F. and Peter, F. 2001. DNA fingerprinting and genetic relations of potato cultivars(*Solanum tuberosum* L.) commercially grown in Australia.Issn.52:911-918.
- 137-Tavazza, R. and Ancora, G.1986. plant regeneration from mesophyll protoplast in commercial potato cultivars(*Primura,Kennebec,Spunta,Desiree*).plant cell Rep.,5:243-246.

- 138-Tavazza, R., Ordas, R.J.and Ancora, G. 1988. Procedure for the regeneration of plants from cell suspension protoplasts of tetraploid potato (*Solanum tuberosum* L.) cv. Desiree. Plant Sci., 58: 223-230.
- 139-Tee, C.S., Lee, P. S., Kiong, A.L.P . and Mahmood, M. M. 2010. Optimisation of protoplast isolation protocols using *in vitro* leaves of *Dendrobium crumenatum* (pigeon orchid) African Journal of Agricultural Research , 5(19): 2685-2693.
- 140- Tican, R.1996. plant regeneration from mesophyll protoplasts of dihaploid and tetraploid lines (*Solanum tuberosum* L.) .Romanian agricultural research,5(6):29-32.
- 141- Tican, R.,Auroric, M. and Aurori, A. 2011.The effects of cefotaxime and silver thiosulfate on *in vitro* culture of *Solanum chacoense*.Romanian Biotechnological Letters.16(4):6369-6377.
- 142-Thomas, E.1981.plant regeneration from shoot culture derived protoplasts of tetraploid potato (*Solanum tuberosum* cv.Maris Bard).plant science let.,23:81-88.
- 143-Umate, P., Rao, K.V., Kiranmayee, K., Sree, T.J. and Sadanandam, A .2005. Plant regeneration of mulberry (*Morus indica*) from mesophyll-derived protoplasts. Plant Cell Tissue Organ Cult., 82 (3) : 289-293.
- 144-Valkonen, J.P.T. and Rokka, V.M. 1998.Combination and expression of two virus resistance mechanisms in interspecific somatic hybrids of potato. Plant Sci.,131: 85–94.
- 145-Vamling, K. and Glimelius, K. 1990. Regeneration of plants from protoplasts of oilseed *Brassica* crops. In: BAJAJ Y.P.S. (ed.): Biotechnology in Agriculture and Forestry. Vol. 10. Legumes and Oilseed Crops I. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg..
- 146-Vasil, I.K. and Vasil, V . 1980. Isolation and culture of protoplasts. In: Vasil IK (ed) Perspectives in plant cell and tissue cultures, Academic Press, New York.
- 147- Veen, H.1987. Use of inhibitors of ethylene action. Acta Hort., 201: 213-22.
- 148-Veilleux, R.E., Compton, M.E. and Saunders, J.A.2005. Use of Protoplasts for Plant Improvement:In Plant Development and Biotechnology.Trigiano,R.N.and D.J.Gray(Eds.). CRC press,Florida,213-224.
- 149-Virk, P.S.Zhu, J., Newbury, H.J., Bryan, G.J., Jackson, M.T. and Ford-Lloyd, B.V. 2000. Effectiveness of different classes of molecular markers for classifying and revealing variations in rice (*Oryza sativa*) germplasm.Euphytica 112, 275-284.

- 150-Vos, P., Hogers, R., Bleeker, R.M., Reijans, M., Van der Lee, T., Hornes, M.N., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M. and Zabeau, M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res* 23, 4407-4414.
- 151-Wallin, A. and Johansson, L. 1989. Plant regeneration from leaf mesophyll protoplasts of *in vitro* cultured shoots of a columnar apple. *J. Plant Physiol.*, 135:565-570.
- 152- Watts, J.W., Motoyoshi, F. and King, J.M. 1974. Problems associated with the production of stable protoplasts of cells of tobacco mesophyll, *Ann. Bot.*, 38 667--671.
- 153-Weising, K., Nybom, H., Wolff, K. and Meyer, W. 1995. DNA fingerprinting in plants and fungi, CRC Press, Inc., London.
- 154-Wiersema, S.G. 1982. Evaluation of technology for production of seed tubers from true potato seed. International Potato Center (CIP) . Technology Evaluation Series NO.1:14 P.
- 155-Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. and Tingey, S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers *Nucleic. Acids Research*, 18(22): 6531- 6535.
- 156-Yamada, Y., Yang, Z.Q. and Tang, D.T. 1986. Plant regeneration from protoplast derived callus of rice (*Oryza Sativa L.*). *plant cell reports*, 5(2), 85-88.
- 157- Yamada, T., Misoo, S., Ishii, T., Ito, Y., Takaoka, K., Kamijima, O. 1997. Characterization of somatic hybrids between tetraploid *Solanum tuberosum L.* and dihaploid *S. acaule*. *Breeding Sci.*, 47: 229-236.
- 158- Yoo, S.D., Cho, Y.H. and Sheen, J. 2007. Arabidopsis mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis. *Nat Protoc* 2: 1565-1572.
- 159-Zabeau, M. and Vos, P. 1993. Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprinting. European Patent Application number: 92402629.7, publication number 0 534 858 A1.
- 160-Zietkiewicz, E., Rafalski, A. and Labuda, D. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, 20: 176–183.
- 161-Zhang, J., Wentao, S., Yan, P., Li, X. and Zhou, P. 2011. Factors that influence the yield and viability of protoplasts from *Carica papaya L.* *African Journal of Biotechnology*, 10(26) : 5137-5142.
- 162-Zhao, L.G. and Wu, J.W. 2006. Development and application of medicinal plant tissue cultures for production of drugs and herbal medicinals in China. *Natl. Prod. Report*, 23:789-810.
- 163-Zhu, L., Wang, B.C., Zhou, J., Chen, L.X., Dai, C.Y. and Duan, C.R.. 2005. Protoplast isolation of callus in *Echinacea augustifolia*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 44: 1-5.

Abstract

In this research, a technique for protoplast isolation and regeneration, from the leaves of potato(*Solanum tuberosum*) cultivars Binella and Burren was developed. Some factors affecting the density and viability of the isolated protoplast, have been studied. Also, the was study determined the optimal conditions for protoplast culture , callus initiation and regeneration.

Genetic resemblance by ISSR technique between regenerated and mother plants, were investigated.

The addition of 50 μ M silver thiosulfate (STS), to the culture medium led to increase the leaf area , decreased the length of internodes, and increased the density and viability of isolated protoplasts in each of the cultivars Binella and Burren, where the obtained density was (1.70 ± 0.06 million protoplast / ml , 1.63 ± 0.06 million protoplast / ml) respectively, and the viability ($82.91 \pm 2.33\%$, $73.82 \pm 2.39\%$) respectively.

The results also showed significant differences ($P \leq 0.01$) between both studied cultivars under different concentrations of mannitol as a regulator of the osmosis pressure. 0.75 M mannitol led to a higher density of isolated protoplasts in cv. Binella (1.67 ± 0.08 million protoplast / ml). and viability of ($87.82 \pm 2.77\%$), while, the highest density in cultivar Burren resulted at the mannitol concentration of 0.50 M (1.85 ± 0.06 million protoplast / ml) and the viability was ($86.05 \pm 2.76\%$). Results also show that the use of *in vitro* grown plant leaves aged 4 weeks, lead to higher density of isolated protoplast with significant differences between cultivars Binella and Burren (1.93 ± 0.04 million protoplast / ml , 1.44 ± 1.22 million protoplast / ml) respectively. The viability was ($84.91 \pm 2.21\%$ and $82.59 \pm 4.0\%$) respectively, after an incubation period of 14-16 hours in a medium containing:

1.75% Cellulase TC + 0.4% Pectinase + 0.005M $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ + 0.5-0.75 M mannitol +0.01M morpholino-ethanesulfonic acid(MES), and pH of 5.6.

Protoplast division started after 3-4 days in the cultivar Binella, and after 4-5 days in the cultivar Burren, when using Zeatin(Z) concentration of 1 or 1.5mg /l. The highest rate of cell colonies formed was recorded - when using Z at the concentration of 1 mg / l and with significant differences between cultivars Binella and Burren ($1.58 \pm 0.1\%$, $1.27 \pm 0.09\%$) respectively.

The highest percentage of callus formation was obtained on medium containing 0.1 mg / l naphthalene acetic acid (NAA), with significant differences between cultivars Binella and Burren ($51.12 \pm 8.77\%$, $18.96 \pm 2.81\%$) respectively.

The highest mean of shoots from Binella callus was obtained (1.06 ± 0.33), when using 1.5 mg / l Z, while not getting any shoots of Burren.

Around 92% of plantlets were successfully acclimatized, after two month in the green house. Average plant length reached 26.6 cm. Also, tubers were produced (30 tubers) with an average deameter of 13.17 mm and weight 2.06 g.

ISSR technique showed that plants regenerated from Binell callus, were similar to the mother plants by 100%.

Damascus University
Faculty of Agriculture
Department of Horticulture



Protoplast Isolation and Culture of Some Potato Cultivars

**Thesis Submitted in partial fulfillment of requirement for
Master of agriculture (Horticulture Dep.)**

**Presented by
Nour Mohamad Rashad Al Qabbani**

(National Commission of Biotechnology)

**Supervisor
Prof.Dr.Khalil Al Maarri**

Faculty of Agriculture,Damascus.Syria

**Co- Supervisor
Dr.Fahed Al Biski**

National Commission of Biotechnology